

Jern-svovl-proteiners strukturelle og funktionelle diversitet

Jern-svovl-proteiners funktionelle diversitet er stor. Det samme metalcenter kan afhængigt af proteinomgivelserne deltage i vidt forskellige funktioner, som f.eks. elektrontransport, genregulering og sensorfunktioner. Også den strukturelle diversitet er stor, idet naturen har udviklet sofistikerede varianter af jern-svovl-klyngen

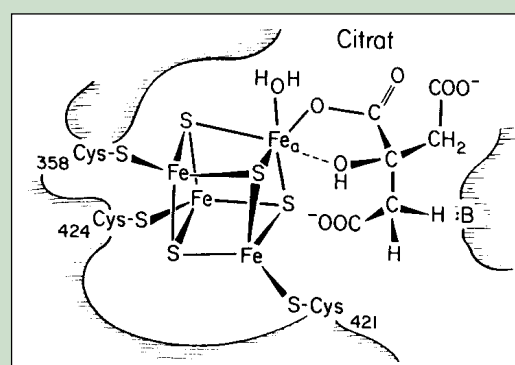
Af Signe Christophersen, Pernille Efferbach Jensen, Bee-Lean Ooi og Hans E.M. Christensen, Biouorganisk Gruppe, Kemisk Institut, DTU

Jern-svovl-proteiner findes i alle levende organismer og har sandsynligvis været blandt de første metalionholdige katalysatorer, som naturen har udviklet. Bl.a. derfor udgør deres metalcenter, FeS-klyngerne, en meget vigtig klasse af metalcentre i biologiske systemer [1].

FeS-proteiner indeholder to eller flere jern-ioner, i oxidationstrin +2 eller +3, der er tetraederisk koordineret til thiolatgrupper fra cystein samt uorganisk, syrelabil sulfid (figur 1) [2].

Indtil for nylig kendte man kun de »klassiske« FeS-proteiner, der indeholder [2Fe-2S]-, [3Fe-4S]- og/eller [4Fe-4S]-klynger (figur 1). Alle disse proteiner fungerer som elektrontransportører, og det var længe den eneste kendte funktion for jern-svovl-proteiner.

Det har siden vist sig, at FeS-proteinerne har betydelig strukturel og funktionel diversitet. Jern-svovl-klynger findes i mere end 100 forskellige klasser af enzymer og proteiner involveret i C-, O-, H-, S- og N-metabolismen. Proteinerne er sandsynligvis den form for metalloproteiner, hvor den samme funktionelle enhed giver flest variationer i funktion. Klyngen



Figur 2. Når aconitase er på sin aktive form er substratet, citrat, bundet til det labile jern i klyngen, der herved bliver hexakoordineret. Gengivet fra [6] med tilladelse.

kan f.eks. have en strukturel, sensorisk eller regulatorisk funktion, eller den kan være involveret i katalyse.

Ud over de »almindelige« jern-svovl-klynger er der karakteriseret sofistikerede varianter såsom hybridklyngen og sirohæmbundne klynger. Her beskrives et lille udsnit af de jern-svovl-proteiner, der kendes på nuværende tidspunkt.

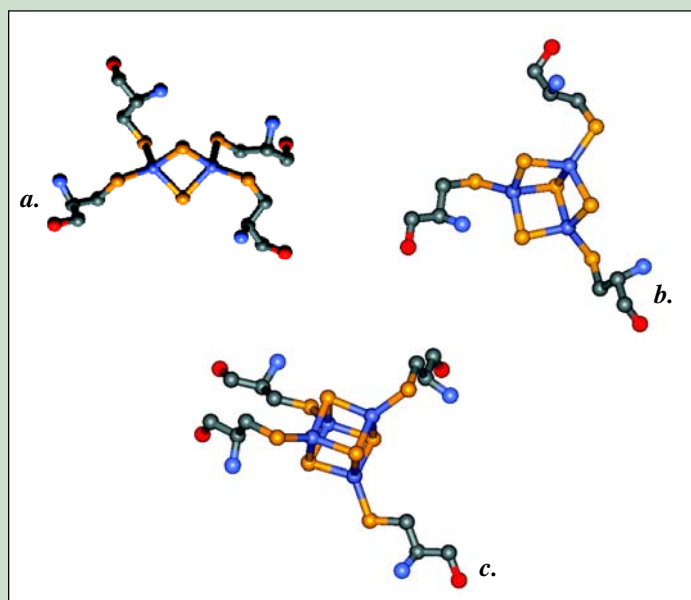
Nye sammenligninger

Hidtidige sammenligninger af jern-svovl-proteiner har hovedsageligt omhandlet de forskelle, der er mellem [4Fe-4S]-ferredoxiner og HiPIP, som indeholder den samme type jern-svovl-klynge. Men der findes også proteiner, der indeholder jern-svovl-klynger med andre funktioner end elektrontransport. Det er aconitase et eksempel på.

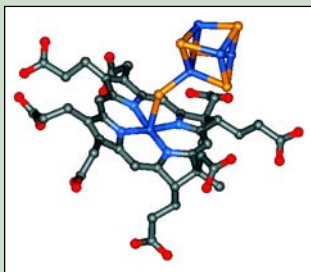
Aconitase/IRP-1

Bindingssekvensen for klyngerne i [3Fe-4S]-ferredoxiner og [4Fe-4S]-ferredoxiner er ens (tabel 1, side 40). Det betyder, at klyngen i et givent protein kan veksle mellem at indeholde tre eller fire jern [3c]. Det sker også i aconitase. Proteinet, som fungerer i Krebs cyklus, indeholder i sin aktive form en [4Fe-4S]-klynge, hvorfra der kan elimineres en jern-ion ved tilstedeværelse af superoxid. Det inaktiverer proteinet, som så virker som sensor for superoxid [2,6]. Når cellen udsættes for oxidativt stress, nedbrydes klyngen i aconitase til [3Fe-4S], så Krebs cyklus inhiberes.

Aconitase katalyseres ved klyngen. Det skyldes, at citrat (substratet) er bundet til det labile jern, når proteinet omdanner citrat til isocitrat (figur 2) [6]. Jern-svovl-klyngen kan også elimineres fuldstændigt fra proteinet. Det medfører strukturelle ændringer, der betyder, at apo-proteinet nu kan bindes til mRNA og deltage i genregulering. Proteinets på denne form kaldes IRP-1 (Iron Regulatory Protein-1) [7,8,9].

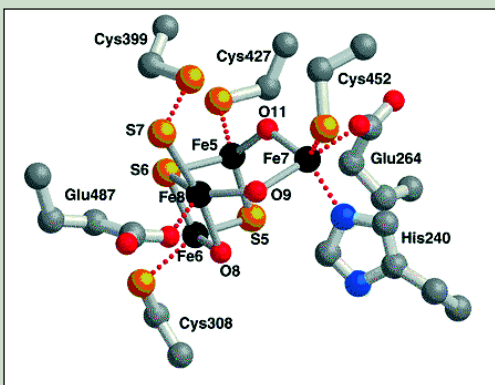


Figur 1. De tre almindelige klyngetyper: [2Fe-2S], [3Fe-4S] og [4Fe-4S]. Jern-svovl-klyngerne er bundet til proteindelen via cysteinligander (kun disse er vist), således at jern er koordinativt mættet. Strukturerne er fremstillet i programmet WebLabViewerPro. Atomerne er farvet efter følgende kode: jern er lilla, svovl gul, karbon mørkegrå, oxygen rød og nitrogen blå.



Figur 3. Det aktive site i sirohæmproteinerne. [4Fe-4S]-klyngen er bundet til sirohæm via en fælles cysteinligand. PDB: 2GEP.

Figur 4. Hybridklyngen består af både jern (sort), svovl og oxygen og er koordineret til syv proteinligander (nummerering fra *Desulfovibrio desulfuricans*). Gengivet fra [12] med tilladelse fra Society of Biological Inorganic Chemistry.



Aconitase/IRP-1 fungerer som sensor for jern, idet der, når jern er til stede i cellen, findes en intakt [4Fe-4S]-klynge i aconitase. Ved jernmangel nedbrydes klyngen, så IRP-1 kan opregulere cellens jernoptag [2,7,8,9].

Katalyse ved klyngen

Også i jern-svovl-proteiner med sirohæmbundne klynger sker der katalyse ved klyngen. Disse proteiner, som er sulfid- og nitritreduktaser, katalyserer reduktionen af hhv. sulfid til sulfid eller nitrit til ammoniak [2,10].

Ved reaktionen er substratet, sulfid eller nitrit, bundet til den distale side (modsat FeS-klyngen) af jern-ionen i sirohæm, som samtidig er bundet til en [4Fe-4S]-klynge via en fælles cysteinligand (figur 3). Jern-svovl-klyngens funktion er at transportere elektroner til det aktive site. Den fælles cysteinligand gør



Figur 5. I hybridcenterproteinet fra *Desulfovibrio vulgaris* sidder hybridklyngen kun 11,6 Å fra den almindelige klynge, alligevel sker der ikke intramolekylær elektrontransport. Proteinets sekundære strukturelementer er angivet med rødt (α -helixer) hhv. blå (β -sheets). PDB: 1E2U.

sirohæmproteinerne specielle, idet der kun kendes meget få jern-svovl-proteiner, hvor klyngen er kovalent bundet til et andet metalcenter [2,10,11].

Hybridcenterproteiner

Hybridcenterproteinerne indeholder en meget anderledes type klynge. Den består af jern, svovl og oxygen, og er i modsætning til andre typer af klynger bundet til syv ligander fra proteinet, tre cystein, en persulfidocystein, to glutamat samt en histidin (figur 4). Histidin som ligand kendes også fra Rieske jern-svovl-proteiner og hæm-proteiner. En anden speciel egenskab ved hybridklyngen er, at den kan stabiliseres i hele fire oxidationstrin (+3, +4, +5 eller +6, reduktionspotentialområdet er givet i tabel 1) [2,3g,12], hvorimod FeS-proteiner med almindelige klynger kun stabiliserer to oxidationstrin.

Hybridklyngens funktion er sandsynligvis elektrontransport, som foregår uafhængigt af den anden, almindelige jern-svovl-klynge, der også findes i disse proteiner (figur 5) [2,3g,12]. Det er dog tankevækkende, at den raffinerede klynge udfører elektrontransport (en funktion der normalt varetages af ferredoxiner og HiPIP).

Sensoriske proteiner

Ud over aconitase fungerer flere FeS-proteiner som sensorer. Et af dem er proteinet SoxR, der er sensor for superoxid og nitrogenoxid. SoxR er en homodimer med en [2Fe-2S]-klynge i hver monomer. Cysteinbindingssekvensen for klyngerne samt reduktionspotentialen er gengivet i tabel 1.

Når SoxR aktiveres, bindes det til DNA, hvorved gentranskriptionen stimuleres. Herved dannes proteiner, der er involveret i cellens forsvar mod skadelige oxidationsmidler. Klyngens oxidationstrin bestemmer proteinets aktivitet, idet både apo- og holo-SoxR bindes med lige stor affinitet til DNA. Dvs. FeS-klyngen har ikke noget med selve bindingen at gøre. Ved normal vækst befinder klyngen sig på reduceret form, $[\text{Fe}_2\text{S}_2]^{1+}$, og proteinet er inaktivt, selv om det bindes til DNA. Ved tilstedeværelse af superoxid (eller nitrogenoxid) oxideres klyngen til $[\text{Fe}_2\text{S}_2]^{2+}$, hvorved proteinet aktiveres [2,9].

DNA-reparationsenzymet endonuklease III

Et eksempel på et FeS-protein, hvor klyngens funktion udelukkende er strukturel, er endonuklease III (figur 6), der kan bindes til DNA. Her er proteinets funktion at genkende skadede pyrimidiner og fjerne dem. Bindingen til DNA skyldes placeringen af nogle basiske aminosyrer, der fastholdes af [4Fe-4S]-klyngen i endonuklease III. Klyngens bindingsmotiv og reduktionspotential er gengivet i tabel 1. FeS-klyngen vekselvirker ikke med DNA og bidrager heller ikke til enzymets katalytiske aktivitet. Klyngens rolle er derimod strukturel [2,13].

Reduktionspotentialer

Selv om jern-svovl-proteiners funktioner spænder over et bredt område, er størstedelen af de FeS-proteiner, man kender involveret i respiratorisk og fotosyntetisk elektrontransport. Som det fremgår af tabel 1 dækker reduktionspotentialerne fra -660 til +550 mV versus standard hydrogenelektroden, dvs. næsten hele det fysiologiske relevante område. Hypotetisk kan der dannes elektrontransportkæder for hele området, der udelukkende består af jern-svovl-proteiner.

Da jern-svovl-proteinernes funktioner spænder lige fra elektrontransport over strukturelle, sensoriske og regulatoriske funktioner til katalyse ved klyngen samt genregulering, kunne man forestille sig, at en hel cellefunktion kunne baseres på jern-svovl-proteiner.

Struktur-funktionsrelationer

Til trods for de mange funktioner, der kendes for jern-svovl-proteiner, er det endnu ikke lykkedes at klarlægge, hvilke faktorer, der er bestemmende for jern-svovl-klyngens funktion i et givent protein. I tabel 1 ses det, at bortset fra ferredoxiner, der indeholder hhv. tre og fire jern, er bindingssekvenserne for FeS-klyngerne vidt forskellige proteinerne imellem. Da alle typer ferredoxiner samt HiPIP er involveret i elektrontransport, kan cysteinbindingssekvensen ikke siges at være bestemmende for funktionen af klyngen.

Miljøet omkring selve klyngen kan til gengæld have indflydelse på dennes funktion. Det indbefatter klyngens placering i proteinet samt de omgivende aminosyrers egenskaber og dermed klyngens påvirkning fra både første og anden koordinationsfære. Netop denne problemstilling er et aktivt forskningsområde i Biouorganisk Gruppe, DTU.

De klassiske jern-svovl-proteiner

Gruppen af de tidligst kendte jern-svovl-proteiner består af ferredoxinerne samt HiPIP (High Potential Iron Sulfur Proteins), som alle er involveret i elektrontransport. Oftest indeholder ferredoxinerne en enkelt FeS-klynge bestående af $[2\text{Fe}-2\text{S}]$, $[3\text{Fe}-4\text{S}]$ eller $[4\text{Fe}-4\text{S}]$. Strukturerne af klyngerne er vist på figur 1. Desuden findes ferredoxiner, der indeholder både $[3\text{Fe}-4\text{S}]$ - og $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ -klynger samt proteiner med to $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ -klynger. FeS-klyngerne er koordineret til cysteiner fra proteinkæden. Fordelingen af liganderne i aminosyresekvensen samt reduktionspotentialer er angivet i tabel 1. Ferredoxinerne indeholdende henholdsvis tre og fire jernioner har samme cysteinbindingssekvens, men proteinerne indeholdende $[3\text{Fe}-4\text{S}]$ -klyngen bindes kun til den første, tredje og fjerde cystein i sekvensen $[3a-e]$.

$[4\text{Fe}-4\text{S}]$ -klyngen kan forekomme i tre oxidationstrin $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{1+}$, $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ og $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{3+}$, men når klyngen befinder sig i et protein, kan den under normale, fysiologiske forhold kun eksistere i to ud af de tre oxidationstrin. Det er denne forskellighed i oxidationstrin, der har medført, at man skelner mellem HiPIP ($[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ og $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{3+}$) og ferredoxiner ($[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{1+}$ og $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$) [3f]. HiPIP og $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ -ferredoxinerne har således oxidationstrinnet $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ til fælles. Klyngen i de to typer proteiner har stort set samme bindingslængder og geometri, hvorimod både cysteinbindingssekvensen samt reduktionspotentialet afviger meget, som det ses i tabel 1 [3f, 4, 5].



Figur 6. Funktionen af $[4\text{Fe}-4\text{S}]$ -klyngen i endonuclease III er udelukkende strukturel. Den fastholder nogle basiske aminosyrer, således at proteinet kan vekselvirke med DNA. PDB: 2ABK.

Teknisk oversættelse – kemi og kemiteknik
Forskrifter – Datablade – Vejledninger – Afhandlinger

Engelsk – Fransk – Italiensk – Norsk

Tetralix

Postboks 323 • 2830 Virum
Tlf.: 4583 5438 • Fax: 4583 5448 • e-mail: mail@tetralix.dk



Specialister i

- Automatiseret Fastfaseoprensning Gilson ASPEC XL, ASPEC XLi, ASPEC XL4.
- Automatisering af væskehåndtering.
- HPLC, IC, SFC kromatografi.
- ERWEKA Dissolution systemer.
- Avancerede systemer til tabletkontrol.
- Salg og kalibrering af Gilson pipetter.



Biolab A/S · Sindalsvej 29 · DK-8240 Risskov
Telefon 8621 2866 · Telefax 8621 2301
E-mail: biolab@biolab.dk

E-mail-adresse:

Hans E.M. Christensen: hemic@kemi.dtu.dk

Referencer

1. W. Kaim og B. Schwederski, *Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life*, Wiley, Stuttgart (1994).
2. D. Bentrop, F. Capozzi og C. Luchinat, *Iron-Sulfur Proteins i Handbook on Metalloproteins*, I. Bertini, A. Sigel og H. Sigel, Dekker, NY (2001).
3. a. G. Zanetti, C. Binda og A. Aliverti, *The [2Fe-2S]-ferredoxins*, b. K. Fukuyama, *Ferredoxins containing one [4Fe-4S] center*, c. J.J.G. Moura, A.L. Macedo, B.J. Goodfellow og I. Moura, *Ferredoxins containin one [3Fe-4S] cluster. Desulfovibrio gigas ferredoxin II – solution structure*, d. C.D. Stout, *Ferredoxins containing two different Fe/S centers of the forms [4Fe-4S] and [3Fe-4S]*, e. L.C. Sieker og E.T. Adman, *The 2[4Fe-4S] ferredoxins*, f. C.W. Carter Jr., *High potential iron sulfur proteins*, g. S. Bailey, S.J. Cooper, W.F. Hagen, A.F. Arendsen og P.F. Lindley, *Hybrid cluster protein i Handbook of Metalloproteins*, A. Messerschmidt, R. Huber, T. Poulos og K. Wieghardt, Wiley, NY (2001).
4. H. Sticht og P. Rösch, *Prog. Biophys. Mol. Bio.*, 70 (1998) 95-136.
5. J.A. Cowan og S.M. Lui, *Adv. Inorg. Chem.*, 45, (1998) 313-350.
6. H. Beinert og M.C. Kennedy, *Eur. J. Biochem.*, 186 (1989) 5-15.
7. M.C. Kennedy, *Role of Iron-Sulfur Proteins in Gene Regulation i Metalins in biological systems*, A. Sigel og H. Sigel, Dekker, NY (1996).
8. E. Paraskeva og M.W. Hentze, *FEBS Lett.*, 389 (1996) 40-43.
9. S. Bian og J.A. Cowan, *Coordin. Chem. Rev.*, 190-192 (1999) 1049-1066.
10. B.R. Crane og E.D. Getzoff, *Curr. Opin. Struc. Biol.*, 6 (1996) 744-756.
11. M. Nakayama, T. Akashi og T. Hase, *J. Inorg. Biochem.*, 82 (2000) 27-32.
12. S. Macedo, E.P. Mitchell, C.V. Romão, S.J. Copper, R. Coelho, M.Y. Liu, A.V. Xavier, J. LeGall, S. Bailey, C.D. Garner, W.R. Hagen, M. Teixeira, M.A. Carrondo og P. Lindley, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 7 (2002) 514-525.
13. R.C. Prince og M.J. Grossmann, *TIBS*, 18 (1993) 153-154.

Diversiteten af kendte jern-svovl-proteiners funktioner

- elektronoverførsel
- katalyse
- katalyse koblet med elektronoverførsel
- strukturel
- sensor for oxidationsmidler
- sensor for jern
- genregulering

Bioorganisk kemi

Et af de nye områder inden for kemi er bioorganisk kemi, der fokuserer på metallers rolle i biologiske systemer. Bioorganisk kemi er et tværfagligt felt, der benytter discipliner fra mange naturvidenskabelige fagområder som f.eks. biokemi, uorganisk kemi, fysik, mikrobiologi, bioteknologi og fysiologi.

Mange af de proteiner, man kender til i dag, indeholder et metalcenter, hvorfor de går under betegnelsen metalloproteiner. Jern-svovl-proteiner, der først blev opdaget i 1960'erne, tilhører denne gruppe af proteiner.

Bioorganisk Gruppe: big.kemi.dtu.dk

Cysteinbindingssekvenser og reduktionspotentialer for udvalgte FeS-proteiner

[2Fe-2S]-ferredoxin	Cys-x ₄ -Cys-x ₂ -Cys-x _n -Cys	-400 til -100mV vs. SHE
[3Fe-4S]-ferredoxin	Cys-x ₂ -Cys-x ₂ -Cys-x _n -Cys	-145 til -100mV vs. SHE
[4Fe-4S]-ferredoxin	Cys-x ₂ -Cys-x ₂ -Cys-x _n -Cys	-650 til -250mV vs. SHE
HiPIP	Cys-x ₂ -Cys-x ₈₋₁₆ -Cys-x ₁₀₋₁₄ -Cys	+50 til +500mV vs. SHE
Hybridcenter		-200 til +300mV vs. SHE
Sirohæmproteiner	Cys-x ₅ -Cys-x _n -Cys-x ₃ -Cys	-405mV vs. SHE
Aconitase / IRP-1	Cys-x _n -Cys-x ₂ -Cys	
SoxR	Cys-x ₂ -Cys-x-Cys-x ₅ -Cys	-285mV vs. SHE
Endonuklease III	Cys-x ₆ -Cys-x ₂ -Cys-x ₅ -Cys	-600mV vs. SHE

Tabel 1. For udvalgte jern-svovl-proteiner er angivet sekvensen af de cysteiner, der koordinerer til FeS-klyngen, samt klyngens reduktionspotential (versus standard hydrogen elektroden), hvor dette er kendt. Der er ikke angivet en bindingssekvens for hybridklyngen, idet den er bundet til syv proteinligander, hvorfor bindingssekvensen ikke kan sammenlignes med de øvrige.

x_n angiver antallet af aminosyrer imellem de bindende cysteiner, hvor x er en vilkårlig aminosyre og n er antallet. Cys: Denne cystein indgår i bindingssekvensen, men er dog ikke bundet til klyngen.