

ENZIMAS DE MADURACIÓN DE LA HIDROGENASA

HIDROGENASE MATURATION ENZYMES

CARLOTTA PANZONE

Politécnico de Torino

carlotta.panzone@cea.fr

Resumen:

Este trabajo forma parte de una investigación exhaustiva sobre las hidrogenasas, cuyo objetivo es comprender sus mecanismos de reacción, la estructura de los sitios activos y el impacto del oxígeno en su inactivación. Las hidrogenasas, enzimas que facilitan la reacción reversible de producción de hidrógeno mediante la reducción de protones, desempeñan un papel crucial en las transformaciones energéticas que implican reacciones redox. Este estudio explora la sensibilidad de las hidrogenasas al oxígeno, dilucidando el impacto de la concentración de oxígeno sobre su potencial redox y la subsiguiente inactivación debida a estrés oxidativo. Comprender la influencia del entorno en la actividad de la enzima es fundamental para desarrollar sistemas versátiles.

La investigación profundiza en la reacción del oxígeno con el clúster H, un componente esencial de las hidrogenasas, aunque el mecanismo específico sigue siendo desconocido y objeto de debate. Este estudio pretende desvelar los entresijos de esta reacción e identificar los sitios dentro del clúster H susceptibles de degradación. El objetivo global es aprovechar estos conocimientos para diversas aplicaciones biotecnológicas, en particular en el desarrollo de bioelectrodos eficientes para la producción de hidrógeno.

Las hidrogenasas surgen como catalizadores prometedores para la producción de hidrógeno debido a su alta y bajo sobrepotencial. Los experimentos de inmovilización en diferentes materiales, como electrodos de grafito pirolítico, con el objetivo de crear dispositivos para la producción biológica de hidrógeno. El estudio también explora aplicaciones en la fotoelectroquímica del hidrógeno proporcionando una alternativa sostenible a los catalizadores basados en el platino. La inmovilización de hidrogenasas en diversos electrodos y su acoplamiento con nanopartículas sensibilizadas ha resultado prometedora, con la ambición última de imitar los procesos naturales para producir hidrógeno y oxígeno a partir del agua en una célula de división del agua impulsada por la luz.

Palabras clave: hidrogenasas, sensibilidad al oxígeno, potencial redox, degradación del cluster H, inmovilización enzimática, Bioelectrodos.



Abstract:

This work is a part of a comprehensive investigation into hydrogenases, aiming to comprehend their reaction mechanisms, the structure of active sites, and the impact of oxygen on their inactivation. Hydrogenases, enzymes facilitating the reversible reaction of hydrogen production through proton reduction, play a crucial role in energy transformations involving redox reactions. This study explores the sensitivity of hydrogenases to oxygen, elucidating the impact of oxygen concentration on their redox potential and subsequent inactivation due to oxidative stress. Understanding the influence of the environment on the enzyme's activity is pivotal for developing versatile systems.

The research delves into the reaction of oxygen with the H-cluster, an essential component of hydrogenases, yet the specific mechanism remains unknown and subject to debate. This study seeks to uncover the intricacies of this reaction and identify the sites within the H-cluster susceptible to degradation. The overarching goal is to leverage this knowledge for various biotechnological applications, particularly in the development of efficient bioelectrodes for hydrogen production.

Hydrogenases emerge as promising catalysts for hydrogen production due to their high activity and low overpotential. Immobilization experiments on different materials, such as pyrolytic graphite electrodes, are underway, aiming to create devices for biological hydrogen production. The study also explores applications in hydrogen photoelectrochemical production, providing a sustainable alternative to platinum-based catalysts. Immobilizing hydrogenases on various electrodes and coupling them with sensitized nanoparticles has shown promise, with the ultimate ambition of mimicking natural processes to produce hydrogen and oxygen from water in a light-driven water splitting cell.

Key Words: hydrogenases, oxygen sensitivity, redox potential, H-cluster Degradation, enzyme immobilization, Bioelectrodes.

RECIBIDO: 09-03-2023 / ACEPTADO: 11-05-2023 / PUBLICADO: 15-12-2023

Cómo citar: Panzone C., (2023). Enzimas de maduración de la hidrogenasa. *Anales*, 39, 1-32. <https://doi.org/10.58479/acbf.2023.82>

CONTENIDO

Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	5
1.1 Hidrógeno	7
1.2 Metaloproteínas	8
1.3 Cúmulos de hierro y azufre	10
1.4 Hidrogenasas	12
1.5 Maduración de las [Fe-Fe]-hidrogenasas	13
1.5.1 La maquinaria de las proteínas Hyd	14
1.6 Maduración química	17
1.7 Hidrogenasas artificiales	19
1.8 Objetivos del proyecto	20
1.8.1 HydF de <i>Thermosipho melanesiensis</i>	20
1.8.2 HydA de <i>Megasphaera elsdenii</i>	23
2. Métodos y materiales	24
2.1 Expresiones heterólogas de proteínas	24
2.1.1 Transformación	25
Referencias	27

1. Introducción

Este trabajo forma parte de un proyecto mayor, que implica una investigación básica sobre las hidrogenasas para comprender el mecanismo de reacción, la estructura del sitio activo y cómo actúa el oxígeno en su inactivación.

Las hidrogenasas son enzimas capaces de catalizar la reacción reversible de producción de hidrógeno, mediante la reducción de protones. Toda reacción implica transformaciones energéticas y las hidrogenasas utilizan energía química. En particular, el uso de energía química implica reacciones redox con transferencia de electrones y átomos enteros de hidrógeno. Así, la reacción de reducción de protones que da hidrógeno tiene que acoplarse con una semirreacción de oxidación, que proporciona electrones. La pareja $2\text{H} / \text{H}_2$ tiene un potencial de reducción de $-0,42\text{ V}$ y se acopla con la oxidación de un donante de electrones, que tiene un potencial redox más negativo (en el caso de este estudio se utilizó metil viologeno como donante de electrones, que tiene un potencial redox de $-0,9\text{ V}$).¹

Las hidrogenasas son muy sensibles al oxígeno, de hecho sólo son activas en condiciones anaeróbicas. Para catalizar la reacción, las hidrogenasas necesitan electrones a un potencial redox específico. El aumento de la concentración de oxígeno conduce al aumento del potencial redox y, en estas condiciones, las hidrogenasas no son activas porque el oxígeno tiene un potencial redox más positivo y es un mejor aceptor de electrones y porque tiene una acción oxidativa muy elevada que implica la degradación del sitio activo de la hidrogenasa. De hecho, en presencia de ambientes muy oxidativos, el oxígeno es capaz de formar especies muy altamente activas (ROS) que atacan el sitio activo de la hidrogenasa, conduciendo a su degradación. En la hidrogenasa, el potencial redox de los clústeres está influido por la estructura de la proteína y puede ser regulado por el entorno. Así pues, es importante comprender cómo el entorno puede influir en la actividad de la enzima, con el fin de crear nuevos sistemas capaces de funcionar en condiciones diferentes. Además, se sabe que el oxígeno reacciona con el cluster H, pero el mecanismo es aún desconocido y muy debatido. Así pues, es necesario saber cómo reacciona y qué sitio del clúster H interviene en la degradación.

El objetivo de estos estudios es conseguir utilizar estas enzimas en diferentes aplicaciones biotecnológicas. Estamos interesados en estudiar y utilizar las hidrogenasas porque son los mejores catalizadores para la producción de hidrógeno, con la mayor actividad y un bajo sobrepotencial. Además, son fáciles de inmovilizar, por lo que pueden tener muchas aplicaciones en bioelectrodos. Se están llevando a cabo experimentos de inmovilización de hidrogenasas mediante adsorción en diferentes materiales. Por ejemplo, se ha observado el reto de crear dispositivos para la producción biológica de hidrógeno y la evolución de hidrógeno con hidrogenasa absorbida en un electrodo de grafito pirolítico.² La principal aplicación es

como catalizadores de producción fotoelectroquímica de hidrógeno. De hecho, hasta ahora la mayor parte del hidrógeno se produce mediante el reformado al vapor del gas natural, pero se necesitan nuevas fuentes renovables. La división del agua ya se utiliza para producir hidrógeno a partir de fuentes naturales, pero este proceso utiliza platino como catalizador, un elemento muy caro y poco abundante. Ya se han descrito algunos ejemplos de hidrogenasas utilizadas como dispositivos de división del agua. La principal ventaja de este sistema es el uso de un catalizador metálico menos caro y ampliamente disponible en la naturaleza, como el hierro, inspirándose en los procesos naturales. Por ejemplo, se inmovilizó la hidrogenasa en un electrodo de fieltro de carbono y se utilizó como fotoánodo una nanopartícula de TiO_2 sensibilizada con porfirina. Se obtuvo una tasa de producción comparable a la de un electrodo de platino. El objetivo final es producir hidrógeno y oxígeno a partir de agua en una célula de división de agua impulsada por luz, imitando la reacción que se produce en algas y cianobacterias, acoplando un electrodo para la evolución de O_2 que contenga el PSII aislado con un electrodo para la evolución de H_2 que contenga hidrogenasa y el PSI aislado. Un gran inconveniente de este sistema es la gran sensibilidad al oxígeno de esta enzima.³

Las hidrogenasas también pueden utilizarse para prevenir la biocorrosión. De hecho, estas enzimas pueden inducir la biocorrosión inducida por microbios anaerobios porque pueden actuar como cromato reductasas, reduciendo el cromato VI. Así pues, también pueden aplicarse en la descontaminación de entornos contaminados.⁴

Las hidrogenasas también pueden utilizarse como biosensores de H_2 , como el electrodo de arcilla-PBV-hidrogenasa descrito en el trabajo de Quian et al.⁵. Este biosensor se desarrolló con la hidrogenasa inmovilizada intercalada entre dos capas de una mezcla de arcilla montmorillonita y poli(butilviologeno) (PBV) sobre un electrodo de carbono vítreo. Dicho sistema era capaz de transferir electrones por metilviologeno al electrodo y catalizar la oxidación del hidrógeno a protones.

Las hidrogenasas también pueden tener aplicación en las pilas de biocombustible, aprovechando su capacidad para catalizar la oxidación del hidrógeno. Las pilas de combustible proporcionan energía eléctrica a partir de una reacción química que sólo produce agua como subproducto. Utilizan únicamente H_2 y O_2 y tienen mayor eficiencia que los motores de combustión. Las pilas de biocombustible utilizan enzimas como electrocatalizadores, en particular hidrogenasas en el ánodo para la oxidación del hidrógeno. La ventaja es que la enzima es muy específica para el sustrato y que no es necesario separar cátodo y ánodo con una membrana.³

Conocer cómo actúan estas enzimas y su mecanismo puede conducir al diseño racional de imitadores sintéticos que puedan tener aplicaciones a gran escala. Por ejemplo, algunos análogos sintéticos del sitio activo de la [Fe-Fe] hidrogenasa han demostrado ser catalizadores eficientes para la reducción del oxígeno en medio acuoso.⁶ El principal problema sigue siendo la baja tolerancia al oxígeno. El desarrollo de catalizadores que puedan funcionar en presencia de oxígeno es la dirección investigada por muchos investigadores. Recientemente, se ha demostrado que evitar los efectos inhibidores del oxígeno con catalizadores tolerantes al oxígeno puede ser más manejable que crear un catalizador resistente al oxígeno. Estos catalizadores son capaces de reducir el oxígeno y las ERO sin sufrir daños y, de este modo, la reducción de protones compite con la reducción de O_2 , por lo que el hidrógeno se produce

a menor velocidad y rendimiento. Este problema puede afrontarse diseñando un catalizador con una cinética mayor para la reducción de protones que para la reducción de oxígeno. La idea es insertar un fotosistema de sacrificio, que sea capaz de reducir el oxígeno y evitar la formación de ROS, manteniendo una alta actividad en la producción de H_2 . Se ha informado de algunos sistemas como posibles aplicaciones para la evolución de H_2 , utilizando polímeros activos redox que contienen moléculas de viologeno que pueden inmovilizar la hidrogenasa o electrodos de carbono poroso 3D con la enzima.⁷

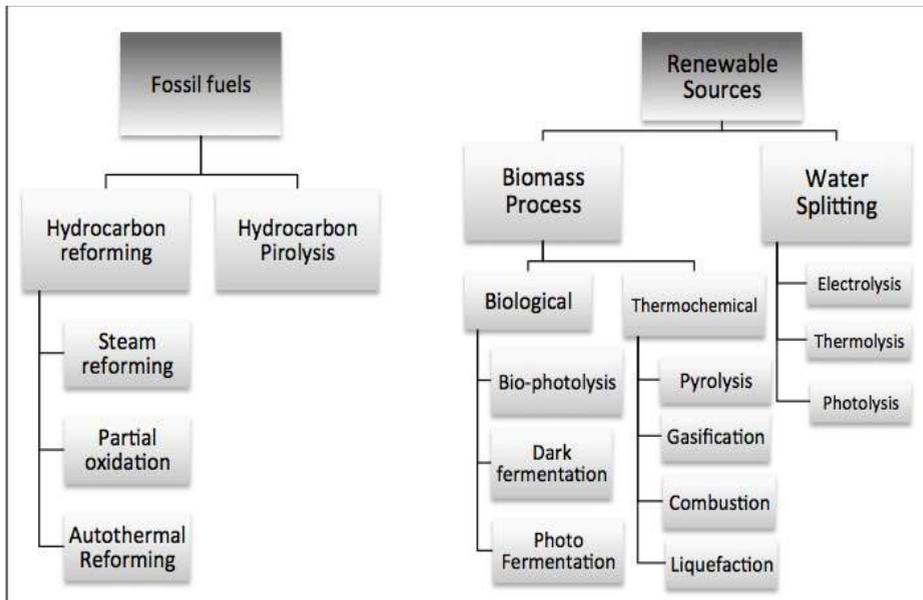
1.1 Hidrógeno

El uso masivo de combustibles fósiles empieza a plantear graves problemas al medio ambiente mundial y al cambio climático, lo que exige el desarrollo de nuevas tecnologías para el uso y almacenamiento de la energía. El uso de fuentes de energía renovables está en expansión, pero el principal problema es el desarrollo de sistemas de almacenamiento que puedan guardar y suministrar eficientemente la energía cuando se necesite.⁸

Existen diversas fuentes renovables que podrían utilizarse para producir energía. Una alternativa prometedora a los combustibles fósiles es el hidrógeno. De hecho, el hidrógeno es una de las moléculas con mayor contenido energético (valores caloríficos superior e inferior del hidrógeno: 141,9 y 119,9 kJ/g)⁹ y no contiene carbono. Además, su combustión produce energía y agua según la reacción: $2H_2 + O_2 \rightarrow 2H_2O$. También se puede transportar y almacenar de forma segura de muchas maneras como gas comprimido, líquido criogénico e hidruro sólido. Sin embargo, el uso del hidrógeno también tiene sus inconvenientes, que hay que afrontar y mejorar. Entre ellos, el hidrógeno molecular no está muy disponible en la naturaleza, aunque sea muy abundante, sino que se almacena en el agua o en los hidrocarburos y es necesario extraerlo eficazmente de estos compuestos.¹⁰ Además, hoy en día el hidrógeno se produce mediante métodos muy caros y contaminantes.

Los métodos utilizados para la producción de hidrógeno son en su mayoría métodos convencionales, como el reformado de hidrocarburos y la pirólisis, o procesos renovables, que utilizan biomasa o agua como fuentes (Figura 1.1). Entre los métodos de reformado de hidrocarburos, el reformado con vapor, la oxidación parcial y el reformado autotérmico son procesos de alta eficiencia, ampliamente utilizados para la producción de hidrógeno, pero se basan en biocombustibles y producen el gas de efecto invernadero CO_2 como subproducto de la combustión. Actualmente, la atención se centra en el desarrollo de procesos basados en fuentes renovables. Ya se produce una pequeña cantidad del hidrógeno total con la electrólisis del agua, que es capaz de producir hidrógeno muy puro, sin subproductos contaminantes, pero requiere un gran consumo de electricidad. Un resultado muy satisfactorio sería utilizar la fotocatalisis para producir hidrógeno a partir de la división del agua. Otra forma de producir hidrógeno a partir de fuentes renovables son los procesos de biomasa. Existen diversos procesos y son inocuos para el medio ambiente, pero los rendimientos finales son menores y dependen de la materia prima utilizada.⁸

Figura 1.1 Métodos de producción de hidrógeno



Cada vez se desarrollan más tecnologías que utilizan el hidrógeno como fuente de energía, por ejemplo las pilas de combustible. Éstas tienen aplicaciones potenciales muy prometedoras porque son capaces de producir electricidad y calor a partir de H₂ y O₂, produciendo únicamente agua como producto final. El principal problema en la aplicación de esta tecnología es la falta de hidrógeno molecular en la naturaleza.

Así pues, la necesidad de nuevos métodos innovadores para producir hidrógeno molecular con gran eficacia y menor coste provocó un aumento considerable de la investigación en la producción biológica de hidrógeno. Estos procesos utilizan principalmente agua o biomasa como fuente para la producción de hidrógeno por bacterias o algas.⁸ ¡Estos microorganismos utilizan sus enzimas hidrogenasa y nitrogenasa para catalizar la reacción reversible de reducción de protones: $2H^+ + 2e^- \leftrightarrow H_2$.¹¹ Así pues, nuestro interés por las hidrogenasas procede de todas estas razones.

1.2 Metaloproteínas

Metaloproteína es un término genérico para designar una proteína que contiene un cofactor de iones metálicos. Se calcula que casi el 30% de las proteínas existentes en la naturaleza son metaloproteínas. El cofactor de iones metálicos suele estar coordinado por átomos de nitrógeno, oxígeno o azufre pertenecientes a aminoácidos de la cadena polipeptídica, generalmente en sus cadenas laterales, o por un ligando macrocíclico incorporado a la proteína (por ejemplo, porfirina, corrina y cloro). La presencia del ion metálico permite a la proteína desempeñar sus

funciones, que no podrían realizarse fácilmente sin él. Así pues, el ion metálico forma parte del sitio activo y desempeña un papel crucial.

Se han realizado muchos esfuerzos para comprender la estructura y la función de estas proteínas. Tienen muchas funciones diferentes en las células, como el transporte (transferrina para el hierro), el almacenamiento (ferritina para el hierro) o la transducción de señales. También intervienen en la catálisis de procesos biológicos, como la fotosíntesis, la respiración, la oxidación del agua, la reducción del oxígeno molecular y la fijación del nitrógeno. Algunos de ellos son enzimas y se denominan metaloenzimas.¹²

Las metaloenzimas están presentes en todas las familias de enzimas y catalizan una gran variedad de reacciones, por lo que no pueden asociarse a un grupo concreto de enzimas, pero se ha demostrado que cada metal tiene una función específica en la enzima.¹³ Los iones metálicos que suelen encontrarse en las metaloenzimas son el hierro, el zinc y el cobre, pero algunas proteínas también contienen níquel, manganeso, molibdeno, cobalto, vanadio y calcio. En la tabla 1.1 se indican las funciones de los cofactores metálicos más comunes en las enzimas. Algunos ejemplos son las hemoproteínas que contienen una porfirina de hierro como grupo prostético y las hidrogenasas que pueden contener grupos de hierro-azufre o níquel-hierro.

Las propiedades de las metaloproteínas dependen claramente de la naturaleza del metal, pero pueden estar estrictamente influidas por muchos otros factores, como el tipo de ligandos y el número de coordinación, la segunda esfera de coordinación en el sitio activo, la accesibilidad del sustrato al centro metálico y la estructura tridimensional de la proteína.

Tabla 1.1 Funciones importantes de algunos metales en algas y bacterias.¹³

<u>Metal</u>	<u>Roles específicos en las enzimas</u>
<u>K</u>	<u>Estabilización de proteínas</u>
<u>Ca</u>	<u>Estabilización de proteínas</u>
<u>Mg</u>	<u>Estabilización de proteínas</u>
<u>Fe</u>	<u>Transporte, almacenamiento y activación del oxígeno, transporte de electrones, descomposición</u>
<u>Mn</u>	<u>Evolución de oxígeno, descomposición de peróxido y superóxido del superóxido</u>
<u>Zn</u>	<u>Estabilización de proteínas, escisión hidrolítica</u>
<u>Cu</u>	<u>Transporte, almacenamiento y activación del oxígeno, transporte de electrones, descomposición del</u>
<u>Mo</u>	<u>Transferencia de oxígeno, activación de nitrógeno</u>
<u>Co</u>	<u>Reacciones de radicales libres, nucleófilos</u>

Por ello, conocer las estructuras tridimensionales y la configuración del sitio activo es muy importante para la comprensión de estas proteínas. Existen técnicas para investigar las propiedades químicas y estructurales. Las más relevantes son las herramientas espectroscópicas, como la resonancia paramagnética de electrones (EPR), la doble resonancia electronuclear (ENDOR), la resonancia de espín electrónico (ESR), la resonancia Raman o la

espectroscopia Mössbauer. Otra potente técnica es la cristalografía de proteínas por rayos X, que permite resolver la disposición espacial de los átomos de las proteínas.¹⁴

1.3 Cúmulos de hierro y azufre

Entre los grupos de metales que suelen encontrarse en las proteínas, algunos de los más comunes son los de hierro y azufre. El hierro es uno de los átomos más abundantes en la Tierra y suele actuar como cofactor enzimático o grupo prostético. El hierro puede unirse a las cadenas aminoacídicas directamente o a través de otros átomos, como el azufre en el [Fe-S]-cluster.¹⁵

Los cúmulos de [Fe-S] suelen desempeñar un papel importante en las proteínas y se ha descubierto que son muy comunes en los componentes más antiguos de la materia viva, como las arqueas, las bacterias, las plantas y los animales. Se cree que han contribuido al éxito de la vida en la Tierra.¹⁶ Los estudios sobre este grupo comenzaron en la década de 1960, cuando se descubrió que participaban en reacciones oxidorreductoras en muchas plantas y microorganismos. Más tarde, en los años 70, se demostró que los complejos hierro-azufre podían sintetizarse artificialmente como complejos análogos del sitio activo de las proteínas.¹⁷

Las proteínas con clústeres [Fe-S] pueden participar en muchas reacciones, pero sobre todo en las de oxidación-reducción y en la transferencia de electrones. De hecho, el hierro es capaz de cambiar muy fácilmente entre la forma oxidada del Fe³⁺ y la reducida del Fe²⁺, comportándose como donante o aceptor de electrones en muchas reacciones biológicas.¹⁸ Por ejemplo, el hierro participa en la respiración celular en bacterias y mitocondrias.⁵ Otra función importante de este cluster es que, al ser capaces de unir reversiblemente Fe y S, actúan como almacén de Fe y S para la activación de enzimas o sustratos, como en la enzima aconitasa, que tiene la función de catalizar la transformación reversible de citrato a isocitrato en el ciclo del ácido cítrico.¹⁹ Además, se ha demostrado que intervienen en la replicación y reparación del ADN. Por ejemplo, la ADN polimerasa-ε requiere la presencia de un clúster [Fe-S] para replicar las cadenas de ADN y reparar las dañadas.²⁰

Existen diferentes tipos de [Fe-S]-cluster y generalmente están coordinados a cisteínas. Las conformaciones más comunes son la disposición rómbica [2Fe-2S], que contiene 2 átomos de hierro conectados a cuatro cisteínas a través de dos iones sulfuro puente, y la forma cubana [4Fe-4S], que consta de cuatro átomos de hierro y cuatro átomos de azufre coordinados a cuatro cadenas laterales sulfhidrúlicas de cisteínas (Figura 1.2). Se han observado otras agrupaciones, como la [1Fe-0S], que contiene un solo átomo de hierro coordinado a cuatro cisteínas (como en la rubredoxina) y la [3Fe-3S] o formas más complejas como la [7Fe-8S], la [8Fe-7S] o la [8Fe-8S] (observadas en proteínas de molibdeno-hierro).¹²

Los estudios sobre el proceso de ensamblaje de los clústeres [Fe-S] demostraron que este proceso se produce *in vivo* con tres maquinarias diferentes el sistema NIF, observado por primera vez en *Azotobacter vinelandii*, para la maduración específica de la nitrogenasa en bacterias azotófitas; el ensamblaje ISC, observado en mitocondrias de levaduras y otros eucariotas, para la generación de proteínas [Fe-S] en condiciones normales; y el sistema SUF,

observado en *Erwinia chrysanthemi* y *Escherichia coli* para la generación de proteínas [Fe-S] en condiciones de estrés oxidativo. Durante la evolución, estos dos últimos mecanismos se transfirieron de las bacterias a los eucariotas, que demostraron contener grupos [Fe-S] en las mitocondrias, el citosol y el núcleo. En particular, las mitocondrias contienen la maquinaria de ensamblaje ISC, mientras que los plástidos albergan proteínas de la maquinaria SUF. Se demostró que todo el proceso estaba muy conservado desde la levadura hasta el ser humano. Siempre requiere 1) un donante de azufre (normalmente una cisteína) que puede liberar azufre a través de una cisteína desulfurasa, creando un persulfuro como intermediario; 2) un donante de hierro específico; 3) una transferencia de electrones (normalmente realizada por componentes bacterianos y mitocondriales), para reducir el S; 4) una proteína andamio, como plataforma para la biosíntesis del clúster [Fe-S]. De hecho, pueden unirse a los clústeres [Fe-S]- con enlaces lábiles, permitiendo una transferencia fácil y estable del clúster a la proteína diana; 5) una proteína de transferencia del clúster, necesaria para la correcta transferencia del clúster a las apoproteínas (Figura 1.3).²¹

Figura 1.2 Agrupaciones de hierro y azufre que suelen encontrarse en las proteínas.

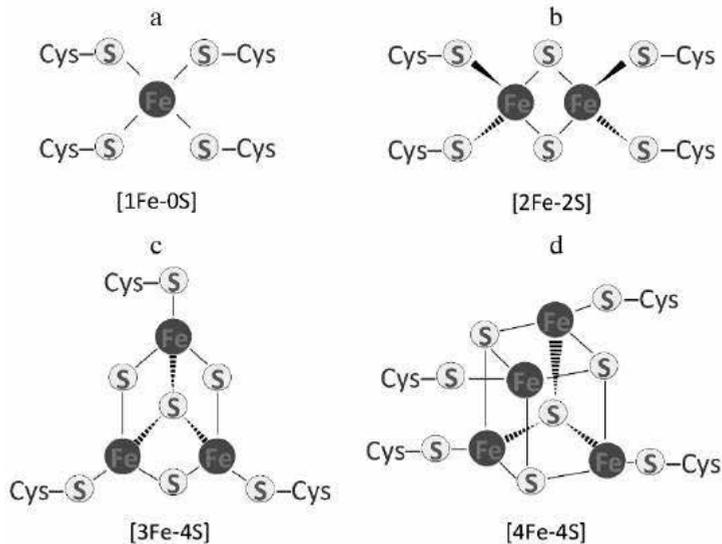
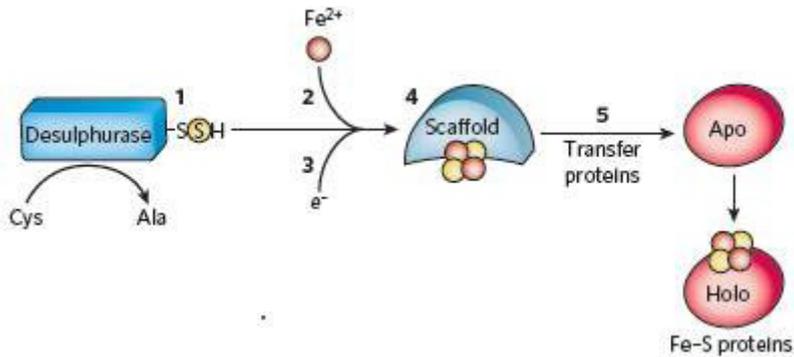


Figura 1.3 Principios biosintéticos de la biogénesis de las proteínas [Fe-S].



La cisteína desulfurasa libera azufre de una Cys, convirtiéndola en una Ala. El azufre obtenido se combina con Fe^{2+} y electrones para ensamblar el clúster [Fe-S] en una proteína andamio. A continuación, el clúster ensamblado se transfiere a la apo-proteína, convirtiéndola en una holo-proteína activa.²¹

1.4 Hidrogenasas

Entre las proteínas hierro-azufre, las hidrogenasas son una clase de proteína de especial interés. La investigación sobre esta clase está creciendo significativamente, desde el año 2000, debido a su aplicabilidad inherente en el desarrollo de tecnologías de energías renovables, basadas en el hidrógeno. Se necesitan nuevos métodos para producir hidrógeno a partir de fuentes renovables y procesos de bajo coste.

Las hidrogenasas son metaloenzimas que pueden catalizar la reacción reversible de conversión de dihidrógeno en protones y electrones a velocidades catalíticas muy elevadas ($\sim 10\ 000\text{s}^{-1}$)¹²²:



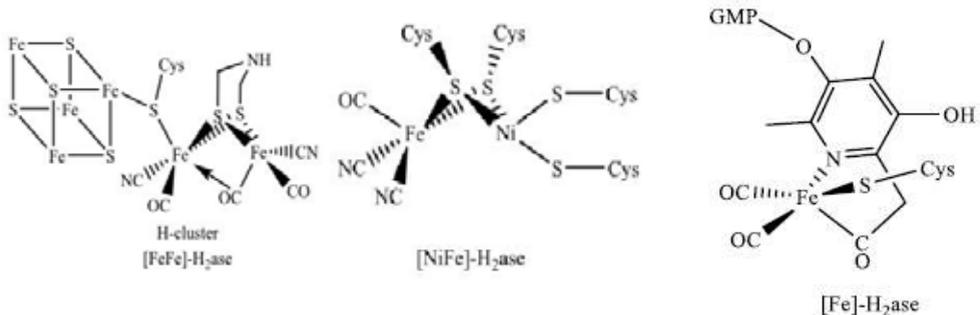
Esta reacción tiene lugar en presencia de un sitio activo que contiene un metal, lo que permite que el pH del H_2 disminuya drásticamente, dando lugar al desdoblamiento heterolítico de la molécula.

Las hidrogenasas pueden clasificarse en tres clases: [Ni-Fe]-hidrogenasas, [Fe-Fe]-hidrogenasas e hidrogenasas sin metal. Esta última clase contiene un único átomo de hierro y sólo puede activar el hidrógeno en presencia de otro sustrato y sólo se encuentra en metanógenos. Las clases más interesantes son las [Ni-Fe]- y las [Fe-Fe]-hidrogenasas.³

Las [Ni-Fe]-hidrogenasas se han aislado como heterodímeros, en los que la subunidad grande contiene el centro bimetálico [Ni-Fe] del sitio activo, profundamente enterrado en la proteína, y la subunidad pequeña contiene algunos clústeres [Fe-S], importantes para la transferencia de electrones y esenciales para la activación del H₂. Así pues, el sitio activo está formado por dos átomos, uno de hierro y otro de níquel, conectados a través de dos cisteínas (Figura 1.4).²³ Las [Ni-Fe]-hidrogenasas participan en el consumo de hidrógeno, mientras que las [Fe-Fe]-hidrogenasas participan normalmente en la producción de hidrógeno.

Las [Fe-Fe]-hidrogenasas, normalmente conocidas como HydA, tienen un sitio activo formado por un [4Fe-4S]-cluster conectado a un [2Fe]-subcluster a través de un tiolato de una cisteína. Este complejo se denomina cluster H. La cisteína es el único enlace entre el [4Fe-4S]-cluster y el [2Fe]-subcluster. Los dos átomos de hierro del subcluster di-hierro están conectados a través de un puente azapropaneditiolato. La esfera de coordinación está rellena por un grupo CO y un grupo CN (Figura 2.4). HydAs difiere enormemente en tamaño y número de clusters accesorios, de hecho, dependiendo del microorganismo, HydA puede tener un único [4Fe-4S]-cluster (el contenido en el cluster H) o clusters [4Fe-4S]-clusters adicionales que están implicados en la transferencia de electrones, desde la superficie al sitio activo de la proteína.²⁴

Figura 1.4 Sitios activos de las diferentes clases de hidrogenasas: Cluster H de [Fe-Fe]-hidrogenasa (a la izquierda), [Ni-Fe]-hidrogenasa (en el centro) y [Fe]-sólo hidrogenasa (a la derecha).



1.5 Maduración de las [Fe-Fe]-hidrogenasas

Para volverse activo, el polipéptido [Fe-Fe]-hidrogenasa codificado por el gen *hydA* tiene que incorporar el (los) clúster(es) [Fe-S] y el subclúster di-hierro. Esto se denomina proceso de maduración, que es un proceso postraduccional muy complejo e implica reacciones difíciles. De hecho, implica la síntesis del CO y el CN, el ligando ditiolato, el ensamblaje del subcúmulo de dihierro y su incorporación a la proteína [4Fe-4S] y el ensamblaje y transferencia de los [Fe-S]-cúmulos adicionales. Todo el proceso tiene que estar estrechamente controlado porque pueden producirse CN⁻ y CO a nivel tóxico, así como ditiolato hidrolíticamente sensible.

La vía que se sigue en la naturaleza para la maduración de las hidrogenasas se está desvelando por diversos métodos y aún se desconoce en parte.

Una de las primeras pistas del proceso de maduración fue la identificación en el genoma de *Chlamydomonas reinhardtii* de genes que codifican las tres proteínas accesorias, HydE, HydF e HydG, necesarias para la maduración de una hidrogenasa activa. También se demostró que muchos organismos que contienen [Fe-Fe]-hidrogenasas tienen en su genoma genes que codifican estas tres madurasas.²⁵ Además, el primer ejemplo de expresión heteróloga²⁵ y la primera activación *in vitro*²⁶ de una [Fe-Fe]-hidrogenasa activa revelaron que las tres proteínas son necesarias para la activación de la hidrogenasa. Esta activación no requiere la adición de precursores de cluster, lo que significa que la maquinaria de maduración es capaz de sintetizarlos y transferirlos a HydA.²⁶ Sin embargo, se demostró que la adición de hierro, sulfuro, SAM (S-adenosil-L-metionina), cisteína y tirosina potenciaba la actividad de la hidrogenasa, lo que sugiere que el hierro y el sulfuro reconstituyen el cluster hierro-azufre y que la SAM añadida es probablemente esencial para las proteínas HydE e HydG.²⁷ Además, se ha demostrado que el proceso de maduración necesita que el componente [4Fe-4S] del clúster H esté ensamblado antes de la inserción del subclúster [2Fe] en la proteína. Así pues, la maduración requiere las tres madurasas HydE, HydF e HydG para la síntesis del subcluster [2Fe]-y su transferencia e incorporación a la apohidrogenasa.²⁸

1.5.1 La maquinaria de las proteínas Hyd

La producción de una [Fe-Fe]-hidrogenasa activa requiere la acción simultánea de HydA con HydF, HydE e HydG que juntas componen la denominada maquinaria HYD.

Dos de las proteínas adicionales, HydE e HydG, pertenecen a la familia de los radicales SAM. Esta familia de enzimas cataliza generalmente reacciones químicas difíciles como la formación de enlaces CH a C-S y la formación de radicales glicil.^{29,30}

HydG contiene dos [4Fe-4S]-clusters: uno está quelado por el típico motivo de proteínas radicales SAM CysX CysX₃₂ Cys en el dominio N-terminal y el segundo está quelado por el motivo CysX CysX₂₂₂ Cys en el dominio C-terminal. Cada clúster tiene su propia función: el clúster N-terminal es necesario para la escisión reductora de SAM y la escisión de tirosina para producir p-cresol, mientras que el clúster C-terminal es necesario para la producción de los grupos diatómicos CO y CN[•]. Se ha demostrado que ambos grupos son esenciales para la actividad.³² Algunos experimentos demostraron que HydG utiliza tirosina como sustrato para sintetizar CO y CN[•]. De hecho, Pilet et al. demostraron en 2009 que HydG era capaz de escindir tirosina en p-cresol en una reacción dependiente de SAM³³ y, a continuación, se demostró que HydG produce CN[•] y CO utilizando tirosina como sustrato.^{34,35} Posteriormente, Kuchernreuther et al. demostraron que en un sistema libre de células ambos grupos diatómicos derivan de la tirosina.³⁶ Además, estudios espectroscópicos demostraron que HydG proporciona tanto los ligandos diatómicos (CO y CN[•]) como el hierro para el cluster [2Fe]-, necesario para la formación del cluster H.³⁷ De hecho, los estudios FTIR de flujo detenido aportaron pruebas de la formación sobre HydG de un complejo unido al hierro, que contiene CO⁻ y CN[•], el sinteón [Fe(CO₂⁻)CN[•]], que se considera el precursor efectivo del cluster H. Suess et al. demostraron

que la Cys se une al cluster auxiliar de hierro-azufre de HydG y sugirieron que la Cys sirve como plataforma ligando donde se construye este sinthon.³⁸

HydE, al igual que HydG, une clusters de hierro y azufre y cataliza la escisión reductora de SAM. El análisis del hierro y la espectroscopia UV-Vis y EPR mostraron que contiene dos clústeres [4Fe-4S]: uno está unido al motivo SAM radical CysX CysX₃₂ Cys en el dominio N-terminal y está muy conservado en HydE; el segundo parece ser muy lábil y se supone que no está implicado en la biosíntesis del clúster H.³⁹ La estructura de rayos X de HydE de *Thermotoga maritima* mostró que el segundo cluster está localizado en la superficie molecular y que probablemente contiene cantidades variables de hierro y sulfuro.⁴⁰ Pilet y al.³³ informaron de que HydE contiene tres sitios de unión a aniones en una gran cavidad y uno de ellos puede unir SCN⁻ con gran afinidad. Aún se desconoce el sustrato utilizado por HydE, pero pueden formularse algunas hipótesis basadas en los primeros estudios. Kuchernreuther et al.⁴¹ informaron de que la incubación de HydA de *C. reinhardtii* con SAM, cisteína, tirosina, hierro, sulfuro y maturasas multiplicaba por 5 la actividad de la hidrogenasa. Dada la demostración de que la tirosina es el sustrato de HydG³³⁻³⁶ y de que la SAM es necesaria para la actividad radical de la SAM, la cisteína parece razonablemente un posible sustrato de HydE, pero no se ha demostrado hasta ahora. Además, Betz et al.⁴⁰ sugirieron que el sustrato HydE contiene un grupo funcional tiol. Se supone que HydE proporciona el puente de ditiometilamina del clúster H, ya que se ha demostrado que HydG proporciona los componentes de hierro, CO y CN⁻ de dicho clúster.

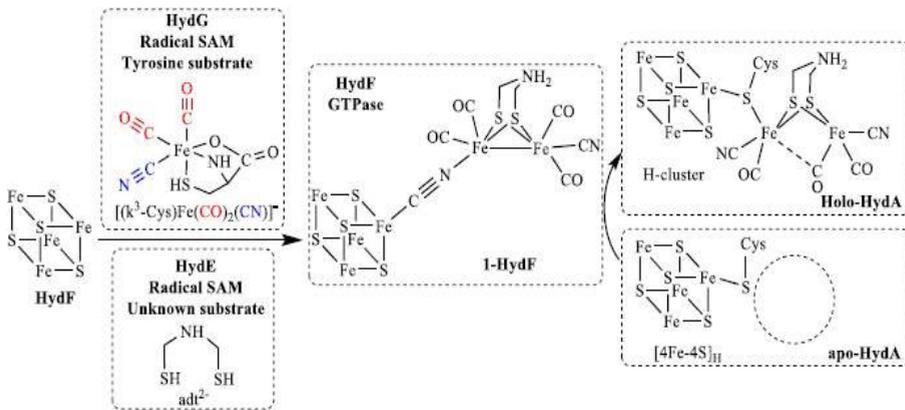
Mientras que las dos proteínas, HydE e HydG, forman parte de la familia SAM radical, la tercera proteína necesaria para la activación de la hidrogenasa, HydF, es una proteína GTP-asa. Los estudios espectroscópicos mostraron que esta proteína es capaz de unir un guanosintrifosfato y contiene un cluster [4Fe-4S] ligado por tres cisteínas y por un ligando no cisteínico, que ha sido objeto de controversia y parece variar en función de los residuos locales.⁴² También se observó la presencia de un subcúmulo [2Fe] adicional, ligado por CO y CN⁻.⁴³ A partir de la cromatografía de exclusión por tamaño, los datos de dispersión de luz estática y las estructuras cristalinas^{44,45}, se demostró que la proteína es estable como un dímero en el que cada monómero contiene tres dominios, el dominio de unión a GTP, el dominio de dimerización y el dominio de unión al cluster metálico. En la sección 2.8.1 se ofrece más información sobre la estructura de HydF.

En cuanto a la función de HydF en la maquinaria HYD, en 2008 McGlynn y col.⁴⁶ postularon que el dominio GTP-asa probablemente no interviene en la transferencia de clústeres y que HydF actúa como andamio o proteína portadora en el ensamblaje del clúster H. La hipótesis de que HydF tiene un papel clave en el ensamblaje del clúster H fue fomentada por Czech et al.⁴³ y, posteriormente, se propuso que una forma dimérica de HydF interacciona con HydE e HydG en una forma unida a GTP y luego el GTP se disocia, para permitir interacciones con HydA.⁴⁴ HydF tiene un papel clave, ya que puede actuar como proteína transportadora y andamiaje. De hecho, esto indica que es capaz de interactuar (i) con HydE e HydG, para ensamblar el subcluster binuclear y (ii) con la apo-hidrogenasa, cuando el subcluster [2Fe]-se transfiere a esta última. Las interacciones entre HydF y las otras dos madurasas han sido estudiadas por Vallese et al.⁴⁷ quienes demostraron que (i) HydF puede interactuar tanto con HydE como con HydG, independientemente de sus propiedades de GTPasa y (ii) HydE e HydG participan por

separado en la creación de modificaciones estructurales en HydF, permitiendo su interacción con la apo-hidrogenasa.

El mecanismo más probable es que toda la maquinaria HYD sintetice e inserte un subcluster [2Fe]- y sus ligandos en el apo-HydA que ya contiene el [4Fe-4S]-cluster. Las tres madurasas son esenciales: HydG lleva a cabo la síntesis del sintrón $[\text{Fe}(\text{CO}_2)\text{CN}]^-$ a partir de tirosina, se supone que HydE proporciona el ligando azaditiolato a partir de un sustrato desconocido e HydF interactúa con las dos madurasas para ensamblar todos los componentes y formar un complejo de dihierro que luego se transfiere a la apo-hidrogenasa, dando lugar a la activación de la proteína (Figura 1.5).

Figura 1.5 Representación esquemática de la maduración de apo-HydA.



HydF interactúa con HydG y con HydE. HydG proporciona el sintrón $[\text{Fe}(\text{CO}_2)\text{CN}]^-$, utilizando tirosina como sustrato, e HydE probablemente proporciona el ligando azaditiolato, a partir de un sustrato desconocido. Las tres madurasas interactúan, HydF ensambla todos los componentes creando un complejo, 1-HydF, que contiene el subcúmulo de dihierro. Este complejo se transfiere a la apo-[Fe-Fe]-hidrogenasa que se transforma en una proteína activa.⁴⁸

Aunque se está estudiando en profundidad el mecanismo de maduración de las hidrogenasas, es necesario seguir investigando. De hecho, aún quedan muchos aspectos por definir, como el papel del dominio GTP-asa, el sustrato HydE y, sobre todo, el orden de actuación de las madurasas. Broderick et al.²⁸ propusieron dos posibles vías para el ensamblaje del subcluster [2Fe]-, que difieren especialmente en el orden de actuación: en la primera HydE e HydG interactúan por separado con HydF, que a su vez transfiere el complejo de dihierro a HydA; en la vía alternativa HydG entrega cianuro y CO ligados al hierro a HydF como unidades ciano-carbonil-Fe, donde la adición de azaditiolato conecta las dos especies mononucleares de Fe.

Otra observación interesante es que en *C. reinhardtii* se ha observado que HydE e HydF forman un único péptido, denominado HydEF, lo que sugiere que es probable que estas dos madurasas formen un complejo durante el proceso de maduración.⁴⁹

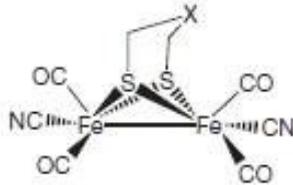
1.6 Maduración química

Como se ha explicado en la sección anterior, en la naturaleza las hidrogenasas se activan mediante un mecanismo muy complejo, en el que intervienen tres madurasas y cuyo objetivo es el ensamblaje del clúster H. Se están realizando estudios sobre la posibilidad de activar químicamente las hidrogenasas. Recientemente, se ha demostrado que las hidrogenasas pueden activarse químicamente con un proceso que no implica la coexpresión de las madurasas. De hecho, los complejos de dihierro sintetizados químicamente pueden transferirse, a través de la madurasa HydF, a la [Fe-Fe]-hidrogenasa, que ya contiene el [4Fe-4S]-cluster. Aunque estos complejos de dihierro por sí solos no son activos, cuando se insertan en la hidrogenasa muestran una elevada actividad, lo que demuestra la importancia del entorno proteico.⁵⁰

Basándose en la demostración de que la HydA purificada anaeróbicamente de *C. reinhardtii* (*CrHydA1*) podía activarse por incubación con HydF de *Clostridium acetobutylicum*⁴³, en 2003 se informó del primer ejemplo de un sistema de madurasa artificial. Se demostró que HydF de *T. maritima*, que contenía el clúster [4Fe-4S]- y se expresaba en *E. coli*, podía incorporar complejos sintéticos de dihierro 1, 2 y 3 (Figura 1.6), dando lugar a nuevas proteínas híbridas x-HydF, tras una reacción química en condiciones anaeróbicas. La caracterización espectroscópica, como FTIR, EPR e HYSCORE, proporcionó pruebas de esta incorporación. A continuación, se demostró que sólo la proteína híbrida 2-HydF era capaz de activar HydA de *C. reinhardtii* conteniendo únicamente el cluster [4Fe-4S]-. Así pues, este trabajo demostró que el complejo 2 puede transferirse eficientemente de HydF a HydA y es capaz de activar la apo-hidrogenasa, demostrando que es probable que el precursor natural sea muy similar a este complejo.⁵¹ Se dio otro paso adelante cuando se demostró que los complejos di-hierro sintéticos podían ser incorporados directamente por HydAs.⁵² Este procedimiento permite obtener una hidrogenasa activa con una actividad comparable a la medida para el tipo salvaje. Esselborn et al.⁵⁰ demostraron que las estructuras cristalinas de la HydA activa de tipo salvaje de *Clostridium pasteurianum* (Cpl) y de la Cpl semisintética madurada con el complejo 2 (Cpl^{ADT}) tienen estructuras idénticas.

Estos resultados demostraron que el complejo sintético sufre algunas transformaciones para convertirse en el sustrato activo natural. Entre estas transformaciones, es necesaria una isomerización del ligando CN⁻, así como una sustitución de un CO por un ligando de cisteína del [4Fe-4S]-cluster de HydA.

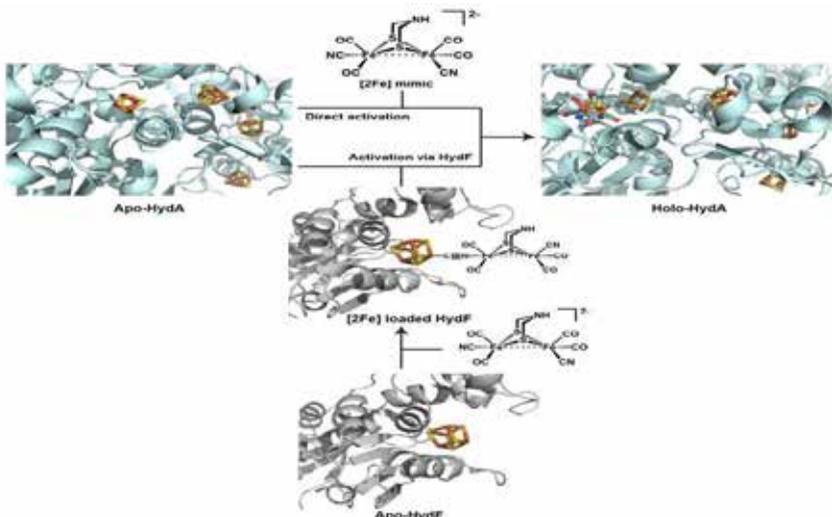
Figura 1.6 Estructuras de los imitadores sintéticos que se probaron. X=CH₂ en el complejo 1; X=NH en el complejo 2; X=O en el complejo 3.⁵¹



Así, pueden seguirse dos posibles patrones para la maduración química de la hidrogenasa (Figura 1.7): la activación de la apo-HydA puede llevarse a cabo directamente con el imitador del dihierro o a través de HydF. Tanto los mecanismos demostraron que sólo el complejo que contenía el puente de azaditiolato era capaz de obtener HydA con actividades enzimáticas elevadas, lo que subraya el papel central de este puente que contiene nitrógeno en la actividad enzimática.

Recientemente, se ha demostrado la posibilidad de evitar no sólo el uso de la maquinaria HYD, sino también la derivación del procedimiento de purificación anaeróbica estrictamente completo. De hecho, se demostró que era suficiente expresar heterológicamente HydA de *Megasphaera elsdenii* en *E. coli*, purificar aeróbicamente la apoproteína y activarla químicamente *in vitro*, para obtener una hidrogenasa activa. La activación química requiere la reconstitución anaeróbica de los [4Fe-4S]-clusters por tratamiento con hierro y azufre y la incorporación anaeróbica del [2Fe]-subcluster por reacción con el complejo [Fe₂(adt)(CO)₄(CN)]₂²⁻. La incorporación efectiva del complejo en el interior de la MeHydA se comprobó mediante espectroscopia FTIR y ensayos de actividad.⁵³

Figura 1.7 Posibles patrones de activación de la apo-HydA.



Esta metodología de maduración sintética fue un descubrimiento muy importante y ayudó significativamente a la identificación de la naturaleza del átomo central en el puente de ditiolato del [2Fe]-subcluster. Sin embargo, siguen existiendo algunos graves inconvenientes que impiden el uso de las [Fe-Fe]-hidrogenasas en aplicaciones biotecnológicas. Entre ellos, la necesidad de manipular estas proteínas en condiciones estrictamente anaeróbicas para evitar la inactivación mediada por el oxígeno es el mayor obstáculo para sus aplicaciones a gran escala.

El primero consiste en la activación de la apo-HydA mediante la incubación con HydF. Este último se incuba primero con un complejo de dihierro, que se incorpora a la maturasasa. A continuación, [2Fe]-HydF se incuba con apo-HydA y el subcúmulo de dihierro se transfiere eficientemente a la hidrogenasa, dando lugar a una proteína activa. El segundo proceso consiste en la activación directa de la apo-HydA con el complejo de dihierro.⁶²

1.7 Hidrogenasas artificiales

Como ya se ha comentado anteriormente, las hidrogenasas han sido ampliamente estudiadas por sus posibles aplicaciones tecnológicas, ya que dependen de metales no nobles, baratos y abundantes. Sin embargo, su uso en aplicaciones a gran escala sigue estando limitado por tres factores: (i) son difíciles de producir en grandes cantidades, (ii) son extremadamente sensibles al oxígeno, por lo que deben manipularse en condiciones estrictamente anaeróbicas y (iii) es muy difícil producirlos en forma activa. Esto último se ha afrontado en parte con la maduración química.

En los últimos años se han sintetizado diversos complejos metálicos biomiméticos y bioinspirados que permiten reproducir las estructuras y funciones de los sitios metálicos naturales mediante compuestos organometálicos sintéticos sencillos y de bajo peso molecular. Por ejemplo, se han sintetizado muchos complejos como modelos del sitio activo de [NiFe]-hidrogenasas. Entre ellos, se demostró que los complejos heteronucleares Ni/Fe^{54,55}, Ni/Ru⁵⁶ y Ni/Mn⁵⁷ mostraban actividad catalítica para la reducción de protones.

Sin embargo, ninguno de estos compuestos mostró una actividad comparable a la de las hidrogenasas, probablemente debido a la falta de interacciones con las cadenas polipeptídicas. Así pues, se consideró la idea de mejorar las prestaciones de los imitadores, incorporándolos a la proteína y diseñando una hidrogenasa artificial.⁵⁸

El concepto de enzimas artificiales tiene su origen en los trabajos de Wilson y Whitesides⁵⁹ y se basa en la idea de combinar un andamiaje biomolecular (una proteína o un oligonucleótido) y un complejo sintético como sitio activo. Hasta la fecha, se han descrito diversos sistemas biohíbridos que ofrecen la posibilidad de mejorar las prestaciones catalíticas.

El caso de las hidrogenasas es muy interesante, en particular por la posibilidad de optimizar la transferencia de electrones y protones. El concepto de hidrogenasas artificiales implica la combinación de una proteína huésped bien elegida y de fácil acceso con un complejo sintético con actividad catalítica de reducción de protones u oxidación de hidrógeno. El objetivo es crear un sistema híbrido barato, estable, hidrosoluble y activo. La proteína proporcionaría un entorno

de grupos funcionales alrededor del complejo sintético ayudando a las transferencias de protones y electrones. Por ejemplo, Roy et al.⁶⁰ consiguieron sintetizar un imitador bioinspirado que unía un clúster de hexacarbonilo de dihierro a un péptido rico en alanina a través de un aminoácido ditiol artificial. El sistema biohíbrido resultante fue capaz de catalizar la producción fotoinducida de hidrógeno en agua en condiciones ácidas y en presencia de rutenio como fotosensibilizador y ascorbato como donante sacrificial de electrones. Posteriormente, Sano et al.⁶¹ demostraron que el sistema híbrido obtenido tratando el apocitocromo c con un complejo de dihierro funcionaba como catalizador de la evolución de hidrógeno en presencia de rutenio como fotosensibilizador y ascorbato como reactivo de sacrificio en medio acuoso.

El hecho de que en las [Fe-Fe]-hidrogenasas el clúster de dihierro esté unido a la proteína sólo por una única cisteína permitió considerar la maduración directa de una hidrogenasa que contuviera todos los clústeres [4Fe-4S]- pero careciera del subclúster [2Fe]- (definido en lo sucesivo como apo-hidrogenasa). En particular, se ha considerado que HydF es la proteína más adecuada para un complejo sintético bioinspirado, debido a su capacidad para unir y transferir un clúster de dihierro. A este respecto, se demostró que la incubación de HydF de *Thermotoga maritima* con azaditiol (adt-complejo), propaneditiol (pdt-complejo) y oxapropanditiol (odt-complejo) daba lugar a proteínas híbridas similares a la metaloenzima diana. Este resultado proporcionó el primer ejemplo de diseño estructural racional de una hidrogenasa artificial. Además, se observó que sólo la pdt-hidrogenasa mostraba una pequeña actividad en un ensayo químico estándar, utilizando ditionito sódico y metil viologeno como fuente de electrones, así como en un ensayo fotoquímico, utilizando un fotosensibilizador metalorgánico y un donante de electrones sacrificado bajo irradiación de luz visible. Aunque esta actividad era muy baja, se trata de un punto de partida para el desarrollo de hidrogenasas artificiales más eficientes.⁵⁸

Los imitadores del dihierro también se han evaluado en entornos no proteicos, por ejemplo micelas, dendrímeros, polímeros, oligo y polisacáridos y estructuras metalorgánicas.⁶²

Desgraciadamente, hasta la fecha estos sistemas son considerablemente menos activos que las enzimas naturales, pero subsiste la esperanza de poder generar una nueva metaloenzima muy activa y estable, con potencial para su aplicación en dispositivos tecnológicos. De hecho, este campo aún está en pañales y la obtención de una

La hidrogenasa artificial es muy compleja, ya que las reacciones implican transferencias de electrones y protones y transferencia de gases. Sin embargo, se han realizado y se siguen realizando numerosos estudios que demuestran la posibilidad de crear una hidrogenasa artificial activa incrustando un catalizador ineficiente y aumentando su eficacia gracias al entorno proteico.

1.8 Objetivos del proyecto

1.8.1 HydF de *Thermosiphon melanesiensis*

Se han realizado muchos estudios sobre la estructura de HydF. La primera caracterización de HydF se realizó en la proteína de *Thermotoga maritima*⁴², mostrando que contiene un

cluster [4Fe-4S] que une GTP y cataliza su hidrólisis a GDP. Posteriormente, los estudios FTIR aportaron pruebas de la presencia de ligandos CO y CN⁻ del precursor [2Fe] y los estudios de filtración en gel de HydEFG mostraron que las proteínas tienden a ensamblarse en una conformación dimerica.⁶³ Czech et al. demostraron que HydF de *Clostridium acetobutylicum* contiene un clúster de hierro con características estructurales similares a las del clúster H de HydA activa de *Chlamydomonas reinhardtii* (CrHydA1).⁶⁴ La primera estructura cristalina se obtuvo a partir de HydF de *Thermotoga neapolitana* (TnHydF)⁴⁴ y mostró que la proteína está organizada en tres dominios: (I) el dominio I corresponde al dominio de unión a GTP, muy similar al de otras GTP-asas; (II) el dominio II está conectado al dominio I por un largo tramo de aminoácidos y es responsable de la dimerización de HydF; (III) el dominio III es el dominio de unión al cluster [4Fe-4S] y está conectado a este cluster por tres residuos de cisteína altamente conservados (Figura 1.8 a). El cristal contenía una molécula por unidad asimétrica y los dímeros se obtuvieron por reconstrucción de la celda unitaria del cristal. Sin embargo, la proteína se cristalizó como un dímero en la muestra puesta a cristalizar y se formó un tetrámero en el transcurso de la cristalización.

Se obtuvo otra estructura cristalina de HydF a partir de la proteína [4Fe-4S]-reconstituida de *Thermosipho melanesiensis*.⁴⁵ La estructura contenía los tres dominios diferentes ya descritos para TnHydF (Figura 1.8 b). También se demostró que el grupo hierro-azufre está coordinado por tres cisteínas muy conservadas y por el grupo carboxilato de un glutamato. Estos residuos están situados en una cavidad cargada positivamente, lo que encaja perfectamente con la necesidad de interactuar con moléculas cargadas negativamente como [4Fe-4S]^{1-/2-} y el subcúmulo [2Fe]-. Se hicieron muchos intentos para tratar de obtener cristales con el subcúmulo de dihierro, como la cocrystalización y el remojo, pero hasta ahora no ha sido posible obtenerlos. Curiosamente, la inmersión de cristales de [4Fe-4S]-TmeHydF en un cóctel de cristalización suplementado con los ligandos [2Fe] condujo a la observación de una rotura progresiva de los cristales por difusión del ligando. Se pueden formular diferentes hipótesis para explicar el fenómeno observado. En primer lugar, es posible que el complejo de dihierro no pueda acceder fácilmente al cluster debido a la presencia del residuo Glu. En segundo lugar, se ha demostrado que, en el empaquetamiento cristalino del [4Fe-4S]-TmeHydF, el contacto entre dímeros se produce en la zona donde se unen el cluster de hierro-azufre y el subcluster de dihierro, lo que conduce a la disrupción de los cristales, quizá debido a la introducción de una carga negativa del subcluster [2Fe]-. Además, se ha observado que los dominios GTP tienen factores B significativamente más altos con respecto a los otros dos dominios (Figura 1.9). Como los factores B están relacionados con el desplazamiento isotrópico cuadrático medio de los átomos, esto implica que el dominio GTP no está bien ordenado y es, por tanto, una fuente de desorden en el cristal, lo que da lugar a cristales de baja resolución.⁴⁵

Figura 1.8 a) Representación de la estructura de una subunidad del dímero apo-TnH₂F.

Los tres dominios, denominados I, II y III, aparecen en diferentes tonos de verde y el bucle que conecta los dominios I y II aparece en marrón. Las cadenas laterales de las tres cisteínas implicadas en la unión al subcluster se muestran en rojo.⁴⁴ b) Representación del dímero [4Fe-4S]-H₂F de *Thermosiphon melanesiensis*. Los dominios GTP están en verde y naranja, los dominios de dimerización en magenta y rosa claro y el dominio de unión al cluster en amarillo y azul.⁴⁵

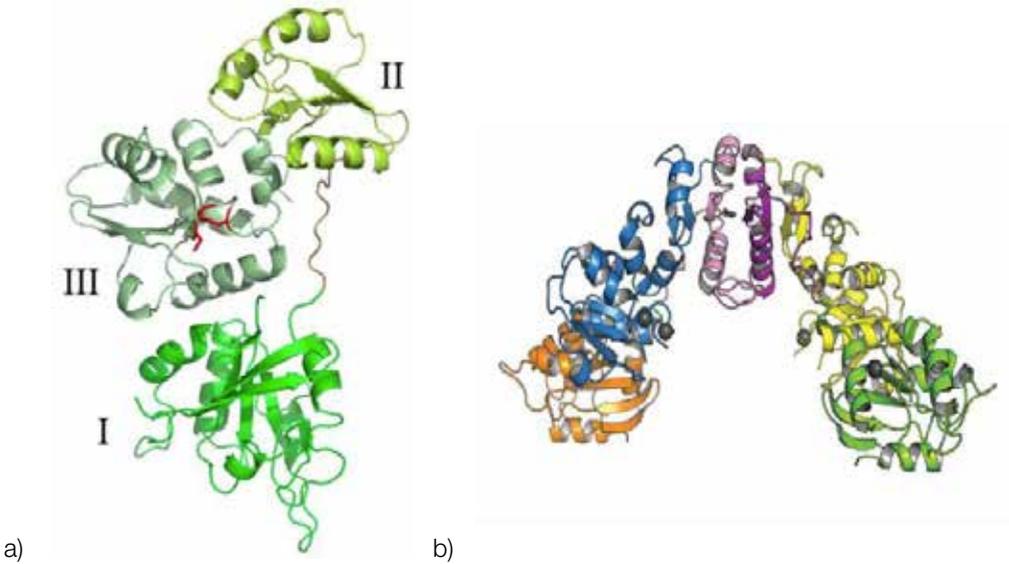
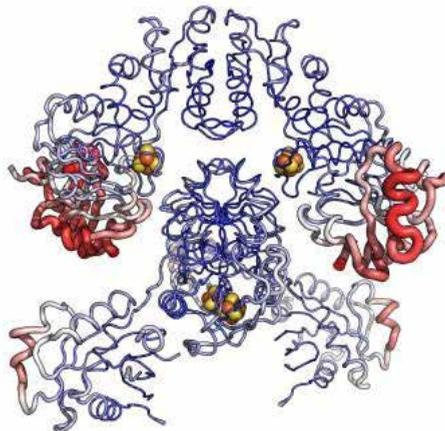


Figura 1.9 Factores B de [4Fe-4S]-TmeH₂F.



Los factores B están coloreados de azul a rojo para el intervalo [40:170] Å.⁴⁵

Así pues, el primer objetivo de mi proyecto era obtener una estructura cristalina de HydF que contuviera tanto el clúster [4Fe-4S] como el subclúster [2Fe]. Para ello, fue necesario diseñar una forma truncada de HydF de *Thermosipho melanesiensis*, cortando el dominio GTP-asa de la forma de tipo salvaje. La idea se basaba en el hecho de que se ha observado que los dominios GTP no siempre están bien orientados y a menudo son zonas desordenadas, lo que provoca una difracción de baja resolución de los cristales obtenidos y es causa de problemas para la unión del subcúmulo de dihierro.

1.8.2 HydA de *Megasphaera elsdenii*

Ya se dispone de las estructuras de HydA de tres microorganismos diferentes.

La primera estructura se obtuvo a partir de *Clostridium pasteurianum* (Cpl) y estaba compuesta por cuatro dominios distintos. El mayor de ellos se designa como dominio del sitio activo y contiene el clúster del sitio activo, conocido como clúster H. Está compuesto por seis átomos de Fe dispuestos en forma de clúster [4Fe-4S]. Está compuesto por seis átomos de Fe dispuestos como un clúster [4Fe-4S] unido a un subclúster [2Fe] por una sola cisteína. El clúster [4Fe-4S] está unido a la proteína por cuatro cisteínas, mientras que el subcúmulo de dihierro está compuesto por dos átomos de Fe ligados octaédricamente que contienen cinco ligandos CO/CN, tres ligandos S y un ligando H₂O. Los otros tres dominios contienen los cuatro clústeres accesorios de hierro-azufre: tres [4Fe-4S]-clusters y un [2Fe-2S]-cluster, dispuestos en tres dominios.⁶⁵

En segundo lugar, se publicó la estructura de la hidrogenasa de *Desulfovibrio desulfuricans* (DdHydA), que presenta una secuencia de aminoácidos idéntica a la de la hidrogenasa de *Desulfovibrio vulgaris*. Revela una conformación para el clúster H similar a la resuelta para Cpl: de hecho, se compone de un clúster [4Fe-4S] de tipo ferredoxina, profundamente enterrado en la proteína, y un subclúster [2Fe], puentado por una cisteína. Cada átomo de hierro del clúster binuclear está coordinado con un CO, un CN⁻, una especie monoatómica de oxígeno y dos tiolatos puente. La proteína también contiene tres clústeres accesorios de hierro y azufre, uno de los cuales es un clúster [2Fe-2S], como el que se encuentra en la Cpl.⁶⁶

Por último, se obtuvo otra estructura a partir de una forma truncada de HydA de *Chlamydomonas reinhardtii* (CrHydA1), expresada en ausencia de las madurasas HydE, HydF e HydG y, por tanto, purificada en su forma no saturada carente del subcúmulo [2Fe]. La estructura presenta muchas similitudes con las estructuras de las otras dos proteínas caracterizadas. CrHydA1 carece de cualquier cluster accesorio y por lo tanto ha sido apreciada por su simplicidad que puede ser explotada para investigar la maduración del cluster H.⁶⁷

Las tres estructuras se muestran en la figura 1.10.

Figura 1.10 a) Estructura de Cpl.



Es posible distinguir el primer dominio que contiene el clúster H, compuesto por un clúster [4Fe-4S] y un subclúster [2Fe], y los tres dominios que contienen los cuatro clústeres de hierro-azufre accesorios. b) Estructura de DdHydA. Es posible distinguir el cluster H, compuesto por un cluster [4Fe-4S] y un subcluster [2Fe], y los tres dominios que contienen los dos clusters [4Fe-4S] accesorios. c) Estructura de CrHydA. Sólo contiene un cluster [4Fe-4S] y carece del subcluster [2Fe] y de los clusters accesorios. En cada figura, los átomos de hierro están representados en amarillo y los átomos de azufre en naranja.

Aunque estas estructuras ya están disponibles y han proporcionado información importante sobre el comportamiento de las [Fe-Fe]-hidrogenasas, se está estudiando otro tipo de HydA. Se trata de la hidrogenasa aislada de *Megasphaera elsdenii*, que mostró comportamientos muy intrigantes y difíciles de explicar en términos de sensibilidad al oxígeno. De hecho, el laboratorio ha demostrado recientemente que presenta una mayor resistencia al oxígeno, en comparación con las demás HydA. Por esta razón, estamos interesados en estudiar la estructura de esta proteína para comprender la causa de su mayor resistencia al oxígeno.

Así pues, para el segundo objetivo de mi proyecto, me centré en la cristalización de HydA de *M. elsdenii*. En concreto, trabajé en una forma truncada, denominada MeH HydA, en la que se han eliminado todos los grupos accesorios, con el fin de obtener una proteína más simple, por analogía con CrHydA1.

2. Métodos y materiales

2.1 Expresiones heterólogas de proteínas

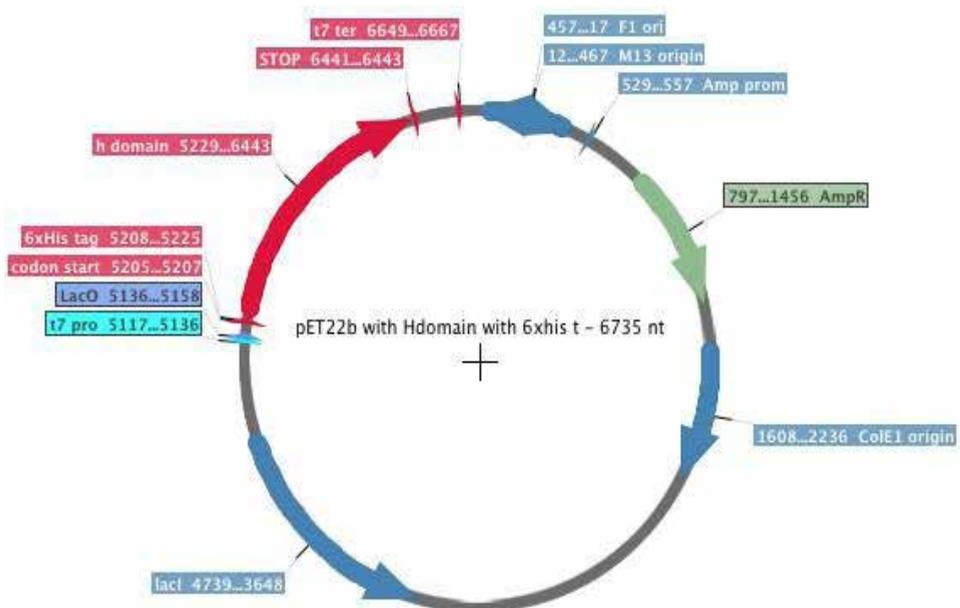
La expresión heteróloga es la expresión de un gen en un organismo huésped que no lo produce de forma natural. El gen debe insertarse en su sistema de expresión mediante la tecnología del ADN recombinante. El sistema de expresión puede ser una bacteria, una levadura o una célula vegetal, pero tiene que tener una propiedad, conocida como competencia. En biología molecular, la competencia es la habilidad de una célula para captar ADN extracelular

de su entorno. Las células pueden adquirir esta propiedad mediante un proceso artificial. El laboratorio ya disponía de células competentes de *E. coli* preparadas con un método químico y estas células se utilizaron para todas las transformaciones.

2.1.1 Transformación

La transformación es la operación que permite a la célula competente captar la molécula de ADN del entorno, a través de su membrana plasmática. La secuencia de ADN que hay que amplificar está contenida en plásmidos, pequeñas moléculas circulares de ADN capaces de replicarse de forma independiente. La representación esquemática de la Figura 2.1 muestra un ejemplo de plásmido, en concreto el pET22b, subrayando sus principales componentes: contiene una secuencia donde se inicia la replicación, denominada origen de replicación (en azul), un gen que codifica para una enzima que confiere la resistencia a los antibióticos con el fin de seleccionar las células que contienen el plásmido (resistencia a la ampicilina, en verde), el gen de interés (en rojo) precedido de un promotor t7 (en cian), necesario para la unión de la ARN polimerasa T7 y la posterior traducción de la proteína.

Figura 2.1 Representación esquemática del plásmido pET22b para MeH HydA con etiqueta de 6 histidinas.



MeHydA, MeH HydA y Δ TmeHydF sin chaperonas

Se utilizó el mismo protocolo para MeHydA, MeH HydA y Δ TmeHydF sin chaperonas. Se transformaron células competentes con el plásmido deseado (respectivamente, células Tuner DE3pLysS transformadas con pT7-7-6HMeHydA, células Tuner BL21 DE3 transformadas con pET22b y células BL21DE3 transformadas con el plásmido pET22b): Se añadió 1 μ l de ADN plasmídico (correspondiente a 50-100 ng) a 100 μ l de células y se dejó 30 minutos en hielo. Las células se sometieron a un choque térmico a 42°C durante 45 segundos y se incubaron 2 minutos en hielo. Tras añadir 400 μ L de caldo de lisogenia (LB) caliente a 37°C, las células se incubaron a 37°C durante 50 minutos. El LB se preparó en el laboratorio y es un medio complejo que contiene triptona como fuente de péptidos, extractos de levadura (que contienen vitaminas) y cloruro sódico como iones de sodio para el transporte y el equilibrio osmótico. A continuación, se centrifugaron las células a 2000 g durante 5 minutos y se desechó parte del sobrenadante, con el fin de concentrar las células. Tras la resuspensión, el 20% y el 80% del producto de transformación se cargaron en dos placas de agar que contenían Ampicilina 100 μ g/mL y se incubaron durante la noche a 37°C. En estas condiciones, sólo las células que contienen el plásmido puede crecer gracias a la resistencia a los antibióticos proporcionada por la beta-lactamasa.

Δ TmeHydF con chaperonas

Para la expresión de Δ TmeHydF con chaperonas, se utilizaron células BL21DE3 como células competentes. Se añadieron 50 ng de plásmido pGRO7 y 50 ng de plásmido Δ TmeHydF a 100 μ l de células. Entonces, el protocolo fue el mismo que antes. Las placas de agar contenían ampicilina y cloranfenicol a 50 y 34 μ g/ml respectivamente.

3. Referencias

- ¹ Ruggeri B., Tommasi T., Sanfilippo S., 2015, BioH₂ & BioCH₄ Through Anaerobic Digestion. *Green Energy and Technology, Springer-Verlag London*.
- ² Lojou E., Bianco P., 2004, Electrocatalytic Reactions at Hydrogenase-Modified Electrodes and Their Applications to Biosensors: From the Isolated Enzymes to the Whole Cells. *Electroanalysis 16 (13-14)*.
- ³ Lubitz W., Ogata H., Rüdiger O., Reijerse E., 2014, Hydrogenasas. *Chemical reviews 114 (8)*, 4081-4148.
- ⁴ Mertens R. y Liese A., 2004, Biotechnological applications of hydrogenases. *Current opinion in Biotechnology 15 (4)*, 343-348.
- ⁵ Quian D. J., Nakamura C., Wenk S. O., Ishikawa H., Zorin N., Miyake J., 2002, A hydrogen biosensor made of clay, polybutylviologen and hydrogenase sandwiched on a glass carbon electrode. *Biosensors and Bioelectronics 17 (9)*, 789-796.
- ⁶ Dey S., Rana A., Crouthers D., Mondal B., Kumar Das P., Darensbourg M. Y., Dey A., 2014, Electrocatalytic O₂ Reduction by Fe-Fe hydrogenase active site models. *Revista de la Sociedad Química Americana 136 (25)*, 8847-8850.
- ⁷ Wakerley D. W. y Reisner E., 2015, Oxygen-tolerant proton reduction catalysis: much O₂ about nothing? *Ciencia medioambiental de la energía 8*, 2283-2295.
- ⁸ Nikolaidis P., Poullikkas A., 2017, A comparative overview of hydrogen production processes. *Renewable and Sustainable Energy Review 67*, 597-611.
- ⁹ Dincer I., Acar C., 2015, Review and Evaluation of hydrogen productions methods for better sustainability. *Revista Internacional de la Energía del Hidrógeno 40*, 11094-11111.
- ¹⁰ Centro de datos sobre combustibles alternativos. Disponible en: https://www.afdc.energy.gov/fuels/hydrogen_basics.html.
- ¹¹ Hallenbeck P.C., Benemann J.R., 2002, Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *Revista Internacional de la Energía del Hidrógeno 27*, 1185-1193.
- ¹² Fontecille-Campus J. C. y Nicolet Y., 2014, *Metalloproteins: methods and protocols*, Methods in molecular biology, vol. 1122, Springer Science and Business Media New York.
- ¹³ Barton L. L., Goulhen F., Bruschi M., Woodards N. A., Plunkett R. M., Rietmeijer F. J. M., 2007, The bacterial metallome: composition and stability with specific reference to the anaerobic bacterium *Desulfovibrio desulfuricans*. *BioMetals, 20*, 291-302.
- ¹⁴ Hoppert M., 2011, Metalloenzymes, en *Encyclopedia of Geobiology* (Reitner J., Thiel V.), parte de la *Serie Enciclopedia de Ciencias de la Tierra*, 558-563.

- ¹⁵ Stiban J., Minyoung S., Kaguni L., 2016, Iron-sulfur clusters in mitochondrial metabolism: Funciones multifacéticas de un cofactor simple. *Bioquímica* (Moscú), 81(10), 1066-1080.
- ¹⁶ Rouault T. A., 2012, Biogenesis of iron-sulfur clusters in mammalian cells: new insights and relevance to human disease. *Modelos y mecanismos de enfermedad* 5(2), 155-164.
- ¹⁷ Beinert H., Holm R.H., Münck E., 1997, Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. *Science* (Nueva York, N. Y.) 277(5326), 653-659.
- ¹⁸ Bridwell-Rabb J., Fox N. G., Tsai C. L., Winn E., Barondeau D. P., 2014, Human frataxin activates Fe-S cluster biosynthesis by facilitating sulfur transfer chemistry. *Bioquímica* 53, 4904-4913.
- ¹⁹ Kiley P. J., Beinert H., 2003, The role of Fe-S proteins in sensing and regulation in bacteria. *Current opinion in Microbiology* 6(2), 181-185.
- ²⁰ Jain R., Vanamee E. S., Dzikovski B. G., Buku A., Johnson R. E., Prakash L., Prakash S., Aggarwal A. K., 2014, An iron-sulfur cluster in the polymerase domain of yeast DNA Polymerase ϵ . *Journal of Molecular Biology* 426(2), 301-308.
- ²¹ Lill R., 2009, Función y biogénesis de las proteínas hierro-azufre, *Nature* 460 (7257), 831-838.
- ²² Madden C., Vaughn M. D., Diez-Pérez I., Brown K. A., King P. W., Gust D., Moore A. L., Moore T. A., 2012, Catalytic Turnover of [Fe-Fe]-hydrogenase Based on Single-Molecule Imaging. *Journal of American Chemical Society* 134(3), 1577-1582.
- ²³ Vignais P. M., Billoud B., Meyer J., 2001, Classification and phylogeny of hydrogenases. *FEMS Microbiology Reviews* 25, 455-501.
- ²⁴ Vignais P. M., Billoud B., 2007, Occurrence, Classification and Biological Function of Hydrogenases: An Overview. *Chemical Reviews* 107, 4206-4272.
- ²⁵ Posewitz M. C., King P. W., Smolinski S. L., Zhang L., Seibert M., Ghirardi M., 2004, Discovery of Two Novel Radical S-Adenosylmethionine Proteins Required for the Assembly of an Active [Fe] Hydrogenase. *Journal of Biological Chemistry* 279(24), 25711-25720.
- ²⁶ McGlynn S. E., Ruebush S. S., Naumov A., Nagy, L. E., Dubini A., King P. W., Broderick J. B.; Posewitz M. C., Peters J. W., 2007, In vitro activation of [Fe-Fe] hydrogenase: new insights into hydrogenase maturation. *Journal of Biological Chemistry* 12(4), 443-447.
- ²⁷ Kuchenreuther J. M., Stapleton J. A., Swartz J. R., Delprato A. M., 2009, Tyrosine, Cysteine and S-Adenosyl Methionine Stimulate In Vitro [FeFe] Hydrogenase Activation ([FeFe] Hydrogenase Maturation). *PLoS ONE* 4(10), e7565.
- ²⁸ Broderick J. B., Byer A. S., Duschene K. S., Duffus B. R., Betz J. N., Shepard E. M., Peters J. W., 2014, H- cluster assembly during maturation of the [Fe-Fe]-hydrogenase. *Química Inorgánica Biológica* 19 (6), 747-757.

- ²⁹ Fontecave M., Ollagnier-de-Choudens S., Mulliez E., 2003, Biological radical sulfur insertion reactions. *Chemical Reviews* 103, 2149-2166.
- ³⁰ Frey P.A., Hegeman A.D., Ruzicka, F.J., 2008, The radical SAM superfamily. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 43, 63-88.
- ³¹ Driesener R.C., Duffus B.R., Shepard E. M., Bruzas I. R., Duschene K. S., Coleman N. J. R., Marrison, A. P. G., Salvadori E., Kay C. W. M., Peters J. W., Broderick J. B., Roach P. L., 2013, Biochemical and kinetic characterization of radical S -Adenosyl- L -Methionine enzyme HydG. *Bioquímica*, 52(48), 8696-8707.
- ³² King P. W., Posewitz M. C., Ghirardi M. L., Seibert M., 2006, Functional studies of [Fe-Fe] Hydrogenase Maturation in an *Escherichia coli* Biosynthetic System. *Journal of Bacteriology* 188(6), 2163-2172.
- ³³ Pilet E., Nicolet Y., Mathevon C., Douki T., Fontecilla-Camps J. C., Fontecave M., 2009, The role of the maturase HydG in [FeFe]-hydrogenase active site synthesis and assembly. *FEBS Letters* 583, 506-511.
- ³⁴ Driesener R. C., Challand M. R., McGlynn S. E., Shepard E. M., Boyd E. S., Broderick J. B., Peters J. W., Roach P. L., 2010, [FeFe]-Hydrogenase Cyanide Ligands Derived From S-Adenosylmethionine-Dependent Cleavage of Tyrosine. *Angewandte Chemie International Edition* 49, 1687-1690.
- ³⁵ Shepard E. M., Duffus B. R., McGlynn S. E., Challand M. R., Swanson K. D., Roach P. L., Peters J.W., Broderick J.B., 2010, [FeFe]-Hydrogenase Maturation: HydG-Catalyzed Synthesis of Carbon Monoxide, *Journal of the American Chemical Society* 132, 9247-9249.
- ³⁶ Kuchenreuther J. M., George S. J., Grady-Smith C. S., Cramer S. P., Swartz J. R., 2011, Cell-free H-cluster Synthesis and [FeFe] Hydrogenase Activation: All Five CO and CN₂ Ligands Derive from Tyrosine. *PLoS ONE* 6(5).
- ³⁷ Kuchenreuther J. M., Myers W. K., Suess D. L. M., Stich T. A., Pelmenschikov V., Shiigi S. A., Cramer S. P., Swartz J. R., Britt R. D., George S. J., 2014, The HydG Enzyme Generates an Fe(CO)₂ (CN) Synthone in Assembly of the FeFe Hydrogenase H-Cluster. *Science* 343, 424-427.
- ³⁸ Suess D. L. M., Bürstel I., De La Paz L., Kuchenreuther J. M., Pham C.C., Cramer S. P., Swartz J. R., Britt R. D., 2015, Cysteine as a ligand platform in the biosynthesis of the FeFe hydrogenase H cluster. *Actas de la Academia Nacional de Ciencias* 112, 11455-11460.
- ³⁹ Betz J. N., Boswell N. W., Fugate C. J., Holliday G. L., Akiva E., Scott A. G., Babbitt P. C., Peters J. W., Shepard E. M., Broderick J. B., 2015, [FeFe]-Hydrogenase Maturation: Insights into the Role HydE Plays in Dithiomethylamine Biosynthesis. *Bioquímica* 54, 1807-1818.
- ⁴⁰ Nicolet Y., Rubach J.K., Posewitz M.C., Amara P., Mathevon C., Atta M., Fontecave M., Fontecilla-Camps J.C., 2008, X-ray structure of the [FeFe]-hydrogenase maturase HydE from *Thermotoga maritima*. *Journal of Biological Chemistry* 283, 18861-18872.

- ⁴¹ Kuchenreuther J. M., Stapleton J. A., Swartz J. R., 2009, Tyrosine, Cysteine, and S-Adenosyl Methionine Stimulate In Vitro [FeFe] Hydrogenase Activation. *PLoS ONE* 4(10).
- ⁴² Brazzolotto X., Rubach J. K., Gaillard J., Gambarelli S., Atta M., Fontecave M., 2006, The [Fe-Fe]- Hydrogenase Maturation Protein HydF from *Thermotoga maritima* Is a GTPase with an Iron-Sulfur Cluster. *Journal of Biological Chemistry* 281(2), 769-774.
- ⁴³ Czech I., Silakov A., Lubitz W., Happe T., 2010, The [FeFe]-hydrogenase maturase HydF from *Clostridium acetobutylicum* contains a CO and CN⁻ ligated iron cofactor. *FEBS Letters* 584, 638-642.
- ⁴⁴ Cendron L., Berto P., D'Adamo S., Vallese F., Govoni G., Posewitz M. C., Giacometti G. M., Costantini P., Zanotti G., 2011, Crystal Structure of HydF Scaffold Protein Provides Insights into [FeFe]-Hydrogenase Maturation. *The Journal of Biological Chemistry* 286(51), 43944-43950.
- ⁴⁵ Caserta G., Pecqueur L., Adamska-Venkatesh A., Papini C., Roy S., Artero V., Atta M., Reijerse E., Lubitz W., Fontecave M., 2017, Structural and Functional Characterization of the hydrogenase-maturation HydF protein, *Nature Chemical Biology* 13(7), 779-784.
- ⁴⁶ McGlynn S. E., Shepard E. M., Winslow M. A., Naumov A. V., Duschene K. S., Posewitz M. C., Broderick W. E., Broderick J. B., Peters, J. W., 2008, HydF as a scaffold protein in [FeFe] hydrogenase H-cluster biosynthesis. *FEBS Letters* 582, 2183-2187.
- ⁴⁷ Vallese F., Berto P., Ruzzene M., Cendron L., Sarno S., De Rosa E., Giacometti G. M., Costantini P., 2012, Biochemical Analysis of the Interactions between the Proteins Involved in the [FeFe]-Hydrogenase Maturation Process. *The Journal of Biological Chemistry* 287(43), 36544-36555.
- ⁴⁸ Johnson M. K. and Scott R. A., 2017, *Metalloprotein Active Site Assembly*, John Wiley & Sons
- ⁴⁹ King P. W., Posewitz M. C., Ghirardi M. L., Seibert M., 2006, Functional studies of [Fe-Fe] Hydrogenase Maturation in an *Escherichia coli* Biosynthetic System. *Journal of Bacteriology* 188(6), 2163-2172.
- ⁵⁰ Esselborn J., Muraki N., Klein K., Engelbrecht V., Metzler-Nolte N., Apfel U. P., Hofmann E., Kurisu G., Happe T., 2016, A Structural view of synthetic cofactor integration into [FeFe]-hydrogenases. *Chemical Science* 7, 959-968.
- ⁵¹ Berggren G., Adamska A., Lambert C., Simmons T. R., Esselborn J., Atta M., Gambarelli S., Mouesca J. M., Reijerse E., Lubitz W., Happe T., Artero V., Fontecave M., 2013, Biomimetic assembly and activation of [Fe-Fe]-hydrogenases. *Nature* 499, 66-70.
- ⁵² Esselborn J., Lambert C., Adamska-Venkates A., Simmons T., Berggren G., Noth J., Siebel J., Hemschemeier A., Artero V., Reijerse E., Fontecave M., Lubitz W., Happe T., 2013, Spontaneous activation of [FeFe]-hydrogenases by an inorganic [2Fe] active site mimic. *Natural Chemical Biology* 9(10), 607-609.

- ⁵³ Caserta G., Adamska-Venkatesh A., Pecqueur L., Atta M., Artero V., Roy S., Reijerse E., Lubitz W., Fontecave M., 2016, Chemical assembly of multiple metal cofactors: The heterologously expressed multidomain [FeFe]-hydrogenase from *Megasphaera elsdenii*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1857(11), 1734-1740.
- ⁵⁴ Canaguier S., Field M., Oudart Y., Pecaut J., Fontecave M., Artero V., 2010, A structural and functional mimic of the active site of NiFe hydrogenases. *Chemical Communications* 46, 5876–5878.
- ⁵⁵ Barton B. E., Whaley C. M., Rauchfuss T. B., Gray D. L., 2009, Nickel-Iron Dithiolato Hydrides Relevant to the [NiFe]-Hydrogenase Active Site. *Journal of the American Chemical Society* 131, 6942–6943.
- ⁵⁶ Canaguier S., Fourmond V., Perotto C. U., Fize J., Pecaut J., Fontecave M., Field M. J., Artero V., 2013, Catalytic hydrogen production by a Ni-Ru mimic of NiFe hydrogenases involves a proton- coupled electron transfer step. *Chemical Communications* 49, 5004–5006.
- ⁵⁷ Fourmond V., Canaguier S., Golly B., Field M. J., Fontecave M., Artero V., 2011, A nickel-manganese catalyst as a biomimic of the active site of NiFe hydrogenases: a combined electrocatalytical and DFT mechanistic study. *Energy and Environmental Science* 4, 2417–2427.
- ⁵⁸ Artero V., Berggren G., Atta M., Caserta G., Roy S., Pecqueur L., Fontecave M., 2015, From Enzyme Maturation to Synthetic Chemistry: The Case of Hydrogenases. *ACS Publications* 48, 2380-2387.
- ⁵⁹ Wilson M. E., Whitesides G. M., 1978, Conversion of a protein to a homogeneous asymmetric hydrogenation catalyst by site-specific modification with a diphosphinerhodium(I) moiety. *Journal of the American Chemical Society* 100(1), 306-307.
- ⁶⁰ Roy A., Madden C., Ghirlanda, G., 2012, Photo-induced hydrogen production in a helical peptide incorporating a [FeFe] hydrogenase active site mimic. *Chemical Communications* 48, 9816–9818.
- ⁶¹ Sano Y., Onoda A., Hayashi T., 2011, A hydrogenase model system based on the sequence of cytochrome c: photochemical hydrogen evolution in aqueous media. *Chemical Communications* 47, 8229–8231.
- ⁶² Caserta G., Roy S., Atta M., Artero V., Fontecave M., 2015, Artificial hydrogenases: biohybrid and supramolecular systems for catalytic hydrogen production or uptake. *Current Opinion in Chemical Biology* 25, 36-47.
- ⁶³ Shepard E. M., McGlynn S. E., Bueling A. L., Grady-Smith C. S., George S. J., Winslow M. A., Cramer S. P., Peters J. W., Broderick J. B., 2010, Synthesis of the 2Fe subcluster of the [FeFe]-hydrogenase H cluster on the HydF scaffold. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(23), 10448-10453.
- ⁶⁴ Czech I., Stripp S., Sanganas O., Leidel N., Happe T., Haumann M., 2011, The [FeFe]-hydrogenase maturation protein HydF contains a H-cluster like[4Fe4S]–2Fe site. *FEBS Letters* 585(1), 225-230.

- ⁶⁵ Peters J. W., Lanzilotta W. N., Lemon B. J., Seefeldt L. C., 1998, X-ray Crystal Structure of the Fe-Only Hydrogenase (Cpl) from *Clostridium pasteurianum* to 1.8 Angstrom Resolution. *Science* 282(5395), 1853- 1858.
- ⁶⁶ Nicolet Y., Piras C., Legrand P., Hatchikian C. E., Fontecilla-Camps J. C., 1999, *Desulfovibrio desulfuricans* iron hydrogenase: the structure shows unusual coordination to an active site Fe binuclear center. *Structure* 7(1), 13-23.
- ⁶⁷ Mulder D. W., Boyd E. S., Sarma R., Lange R. K., Endrizzi J. A., Broderick J. B., Peters J. W., 2010, Stepwise [FeFe]-hydrogenase H-cluster assembly revealed in the structure of HydADEFEG. *Nature* 465(7295), 248-251.