

Abb. 3. Oxidation von Cycloocten mit 30proz.  $\text{H}_2\text{O}_2$ , katalysiert durch geträgertes  $\text{Q}_3\text{PO}_4[\text{W}(\text{O})(\text{O}_2)]_4$ . Reaktionsbedingungen: 1 mmol Cycloocten, 2 mmol 30proz.  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 0.005 mmol  $\text{Q}_3\text{PO}_4[\text{W}(\text{O})(\text{O}_2)]_4$  (100 mg  $\text{Q}_3\text{PO}_4[\text{W}(\text{O})(\text{O}_2)]_4$ -20% PEO/PPO-SiO<sub>2</sub>) bei 23 °C. Cyclooctenoxid war das einzige Produkt C = Umsatz.

ergab die dagegen optimale Katalysatorspezies. Das Gleichgewicht zwischen Hydrophilie und Hydrophobie der Katalysatorspezies muß also so eingestellt werden, daß sowohl die Löslichkeit von Cycloocten als auch von Wasserstoffperoxid in der Phase mit gebundenem Polyether optimal ist. Der Katalysator und 20% PPO-SiO<sub>2</sub> waren nahezu gleich effektiv, aber eine weitere Erhöhung des Anteils an PPO reduzierte die Aktivität. Die Katalysatorpartikel wurden fünfmal ohne Verlust der katalytischen Aktivität recycelt. Im Filtrat des Reaktionsgemisches wurden keine katalytisch aktiven Spezies nachgewiesen; es war katalytisch nicht aktiv.

Wir haben das Konzept der Lösungsmittel-angebondenen SLP-Katalyse entwickelt und anhand von Polyoxometallat-katalysierten Oxidationen vorgestellt. Diese neuen Katalysatorsysteme sind aktiver und selektiver als analoge nicht-geträgerte Systeme. Nach dem Recycling bleibt die katalytische Aktivität erhalten. Die Lösungsmittel-angebondene SLP-Katalyse wird auch in weiteren Reaktionen und mit anderen Katalysatoren Anwendung finden.

### Experimentelles

Die Monomere **1** wurden durch Reaktion von 25 mmol  $(\text{CH}_3\text{O})_3\text{SiPhCH}_2\text{Cl}$  mit 25 mmol  $\text{CH}_3(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2\text{OH}$  (MG = 350) oder  $\text{CH}_3(\text{OCH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2)_2\text{OH}$  (MG = 200) in 100 mL Aceton in Gegenwart von 125 mmol festem  $\text{K}_2\text{CO}_3$  unter Rückfluß über 18 h hergestellt. Die festen Salze wurden durch Zentrifugieren abfiltriert und das Lösungsmittel entfernt. An dieser Stelle wurde nicht weiter gereinigt. Die funktionalisierten Xerogele wurden durch Lösen der entsprechenden Menge von **1** und  $\text{Si}(\text{OEt})_4$  (insgesamt 5 mmol) in 20 mL Aceton dargestellt. Zehn Äquivalente Wasser und 0.01 Äquivalente Dibutylzinn-dilaurat wurden zugegeben, um die Polymerisation zu initiieren. Das Reaktionsgemisch wurde drei Stunden bei 60 °C gehalten und zum langsamen Verdampfen des Lösungsmittels zwei Tage bei Raumtemperatur stehengelassen. Die funktionalisierten Silicatpartikel wurden zweimal mit Wasser und Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet. Die Katalysatoren wurden durch Imprägnieren der Silicate mit Polyoxometallaten wie folgt erhalten: Für die Reaktion in Gleichung (a) wurden 400 mg  $\text{H}_3\text{PV}_2\text{Mo}_{10}\text{O}_{40} \cdot x\text{H}_2\text{O}$  (0.2 mmol) in 10 mL Aceton gelöst und zu 1.5 g 20% PEO-SiO<sub>2</sub> zugegeben, und das Lösungsmittel wurde entfernt. Das Silicat wurde dann ca. 12 h bei Raumtemperatur im Vakuum getrocknet. Für die Reaktion in Gleichung (b) war die Vorgehensweise dieselbe mit der Ausnahme, daß 164 mg  $\text{H}_3\text{PV}_2\text{Mo}_{10}\text{O}_{40} \cdot x\text{H}_2\text{O}$  (0.075 mmol) eingesetzt wurden. Für die Reaktion in Gleichung (c) wurden 1.04 g (0.5 mmol)  $[(\text{C}_6\text{H}_{13})_4\text{N}]_3\text{PO}_4[\text{W}(\text{O})(\text{O}_2)]_4$  in 20 mL  $\text{CHCl}_3$  gelöst und zu 20% PEO/PPO-SiO<sub>2</sub> zugegeben. Das Gemisch wurde dann wie zuvor behandelt.

Typische Oxidationen wurden in magnetisch gerührten 5 mL-Probengläschen durchgeführt. Die Materialmengen und Reaktionsbedingungen werden im Text angegeben. Die Reaktionsgemische wurden mit GLC (HP 5890) analysiert unter Verwendung einer 30 m, 0.32 mm ID, 0.25 µm Methylsilicon-beschichteten (RTX-1) Säule. Katalysatorrecycling durch Filtration des Katalysators, gefolgt von Waschen, um Reaktionsrückstände zu entfernen, und Trocknen.

Eingegangen am 16. Dezember 1996,  
veränderte Fassung am 12. März 1997 [Z 9892]

**Stichworte:** Heterogene Katalyse • Homogene Katalyse • Oxidation • Polyoxometallate

- [1] F. R. Hartley, *Supported Metal Complexes*, Reidel, Dordrecht, **1985**; R. A. Sheldon, *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **1996**, *1*, 101–106.
- [2] A. Corma, A. Feurte, M. Iglesias, F. Sanchez, *J. Mol. Catal.* **1996**, *107*, 225–234; F. Minutolo, D. Oini, P. Salvadori, *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 3375–3378; A. J. Butterworth, J. A. Clark, P. H. Walton, S. J. Barlow, *Chem. Commun.* **1996**, 1859–1860; P. Battioni, E. Cardin, M. Louloudi, B. Schöllhorn, G. A. Spyroulias, D. Mansuy, T. G. Traylor, *ibid.* **1996**, 2037–2038; R. Neumann, H. Miller, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1995**, 2277–2278.
- [3] P. P. Knops-Gerrits, D. E. Vos, F. Thibault-Starzyk, P. A. Jacobs, *Nature* **1994**, *369*, 543–546; R. F. Parton, I. F. J. Vankelecom, M. J. A. Casselman, C. P. Bezoukhanova, J. B. Uytterhoeven, P. A. Jacobs, *Nature* **1994**, *370*, 541–544.
- [4] I. F. J. Vankelecom, D. Tas, R. F. Parton, V. Van de Vyver, P. A. Jacobs, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 1445–1447; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 1346–1348.
- [5] E. Wiebus, B. Cornils, *Chem. Ing. Technol.* **1994**, *66*, 916–923; B. Cornils, E. Wiebus, *Chemtech* **1995**, 33–38; R. V. Chaudhari, B. M. Bhanage, R. M. Deshpande, H. Delmas, *Nature* **1995**, *373*, 501–503; R. V. Chaudhari, A. Bhattacharya, B. M. Bhanage, *Catal. Today* **1995**, *24*, 123–133.
- [6] I. T. Horvath, J. Rabai, *Science* **1994**, *266*, 72–75.
- [7] P. E. Rony, *J. Mol. Catal.* **1975**, *1*, 13–25; M. E. Davis, *Chemtech* **1992**, 498–502.
- [8] J. P. Arhancet, M. E. Davis, B. E. Hanson, *J. Catal.* **1990**, *121*, 327–339; J. P. Arhancet, M. E. Davis, B. E. Hanson, *ibid.* **1990**, *129*, 94–99 und 100–105; M. J. Naughton, R. S. Drago, *ibid.* **1995**, *155*, 383–389.
- [9] J. P. Arhancet, M. E. Davis, B. E. Hanson, *Catal. Lett.* **1991**, *11*, 129–136.
- [10] K. T. Wan, M. E. Davis, *Nature* **1994**, *370*, 449–450.
- [11] R. Neumann, M. Lissel, *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 4607–4610.
- [12] R. D. Gall, M. Faraj, C. L. Hill, *Inorg. Chem.* **1994**, *33*, 5448–5455.
- [13] M. Hamamoto, K. Nakayama, Y. Nishiyama, Y. Ishii, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 6421–6425.
- [14] G. A. Tsigdinos, C. J. Hallada, *Inorg. Chem.* **1968**, *7*, 437–441.
- [15] C. Venturello, R. D'Aloisio, J. C. J. Bart, M. Ricci, *J. Mol. Catal.* **1985**, *32*, 107–110.

## NADH-induzierte Einflüsse auf die Koordination des Nickels im aktiven Zentrum der löslichen Hydrogenase aus *Alcaligenes eutrophus*: XAFS-Untersuchungen an drei ESR-spektroskopisch unterscheidbaren Zuständen\*\*

Arnd Müller, Andreas Erkens, Klaus Schneider, Achim Müller, Hans-Friedrich Nolting, Vicente Armando Solé und Gerald Henkel\*

Professor Günter Schmid zum 60. Geburtstag gewidmet

Hydrogenasen sind Enzyme, die in vielen aeroben und anaeroben Mikroorganismen die reversible Aktivierung von molekularem Wasserstoff katalysieren.<sup>[1]</sup> Diese Fähigkeit macht sie zu interessanten Untersuchungsobjekten, insbesondere wegen möglicher Anwendungen des zugrundeliegenden katalytischen Prinzips in industriellen Prozessen oder als Quelle für „biologischen Wasserstoff“.<sup>[2]</sup>

[\*] Prof. Dr. G. Henkel, Dipl.-Chem. A. Müller  
Fachgebiet Anorganische Chemie der Universität  
Lotharstraße 1, D-47048 Duisburg  
Telefax: Int. +203/3792110  
E-mail: biohenkel@uni-duisburg.de

Dr. A. Erkens, Dr. K. Schneider, Prof. Dr. A. Müller  
Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld

Dr. H.-F. Nolting, Dr. V. A. Solé  
European Molecular Biology Laboratory, Outstation Hamburg

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG), vom Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie (BMBF) sowie vom Fonds der Chemischen Industrie gefördert.

Die meisten der heute bekannten Hydrogenasen sind Metalloenzyme, die als essentielle Bestandteile Nickel und Eisen enthalten (NiFe-Hydrogenasen) und sich damit von den weniger verbreiteten „Iron-only“-Hydrogenasen unterscheiden.<sup>[1]</sup> Die Nickel-Bindungsstelle dieser Enzyme ist durch spezifische ESR-Signale charakterisiert, deren Abfolge während des katalytischen Cyclus auf eine ungewöhnliche Redoxchemie hinweist. Sie wird unter anderem auch deshalb als Ort der Wasserstoffaktivierung angesehen. Besondere Aufmerksamkeit erregte im letzten Jahr die NiFe-Hydrogenase aus *Desulfovibrio gigas*, die nach den Ergebnissen einer Röntgenstrukturanalyse ein gemischtes zweikerniges Ni/Fe-Zentrum mit Cystein-Brücken enthält.<sup>[3]</sup> Die lösliche NAD<sup>+</sup>-reduzierende NiFe-Hydrogenase aus dem aeroben, H<sub>2</sub>-oxidierenden Bakterium *Alcaligenes eutrophus* H16 (E.C. 1.12.1.2) hat als heterotetrameres Enzym, zusammengesetzt aus je zwei heterodimeren Proteinen unterschiedlicher Funktion ( $\beta\delta$  und  $\alpha\gamma$ ), eine höhere Komplexität als die „typischen“ heterodimeren Hydrogenasen.<sup>[4]</sup> Das O<sub>2</sub>-unempfindliche Holoenzym enthält neben dem Nickelzentrum unterschiedliche Eisen-Schwefel-Cluster (2Fe-2S, 3Fe-4S, 4Fe-4S) sowie ein Flavin (FMN) als redoxaktive prosthetische Gruppen.

Wir waren nun daran interessiert, zu erfahren, ob und wie sich die Koordination des Nickels bei reduktiver Aktivierung des Enzyms verändert und wollten gleichzeitig der Frage nachgehen, ob es eine strukturelle Verwandtschaft zwischen den Nickelzentren der Hydrogenasen von *Alcaligenes eutrophus* und von *Desulfovibrio gigas* gibt. Als maßgeschneiderte Untersuchungsmethode bietet sich hier die hochauflösende Röntgenabsorptionsspektroskopie (XAFS) an. Dabei handelt es sich um eine Technik zur Strukturbestimmung im Nahordnungsbereich angeregter Atome, die im Gegensatz zur Röntgenstrukturanalyse auch zur Charakterisierung nichtkristalliner Systeme herangezogen werden kann. Zu diesem Zweck haben wir die lösliche Hydrogenase aus *Alcaligenes eutrophus* in drei ESR-spektroskopisch unterscheidbaren Zuständen mit der XAFS-Analyse charakterisiert.<sup>[5]</sup> Im folgenden berichten wir über die Auswertung der XANES- und EXAFS-Regionen (XANES = kantennahe, EXAFS = kantenferne Röntgenabsorptions-Feinstruktur) der Nickel-K-Kante und zeigen erstmals, daß sich die einzelnen Zustände insbesondere bezüglich der Zahl der am Nickel gebundenen Schwefelatome und damit auch chemisch voneinander unterscheiden.

Ausgangspunkt der Untersuchungen ist das aerob isolierte Enzym (Form 1), das kein ESR-Signal des Nickel-Zentrums aufweist. Die Behandlung mit NADH führt zu einer reduzierten Form (Form 2), die das für das aktive Enzym charakteristische ESR-Signal zeigt („Ni-C“). Im Gegensatz dazu entsteht durch Reduktion des Enzyms mit Natriumdithionit ein Zustand (Form 3), der zwar ESR-Signale von reduzierten Fe-S-Clustern, jedoch wie die oxidierte Form kein Ni-Signal aufweist.<sup>[4]</sup> Die normierten Röntgenabsorptionsspektren im Bereich der Ni-K-Kante sind in Abbildung 1 dargestellt, und in Tabelle 1 sind die Ergebnisse der XANES-Analyse zusammengefaßt. Abbildung 2 gibt die experimentell bestimmten EXAFS-Funktionen wieder.

Tabelle 1. Parameter der normierten Röntgenabsorptionsspektren im Bereich der Ni-K-Kante (XANES).

Enzymform [a]	$E_{1/2}$ [eV] [b]	$I_{max}$ [c]	$A$ [eV] [d]
Luft-oxidiert	8340.7	1.30	0.029
NADH-reduziert	8339.6	1.07	0.035
Dithionit-reduziert	8341.1	1.38	0.025

[a] Siehe Text. [b] Energie der Kante bei einer normierten Höhe von 0.5. [c] Maximale Kantenintensität. [d] Fläche des Vorkantenpeaks.

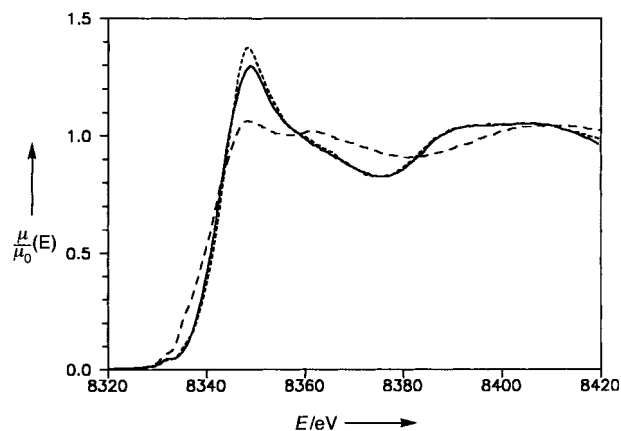


Abb. 1. Normierte Röntgenabsorptionsspektren im Bereich der Ni-K-Kante (durchgezogen: Luft-oxidiert; gestrichelt: NADH-reduziert; gepunktet: Dithionit-reduziert)

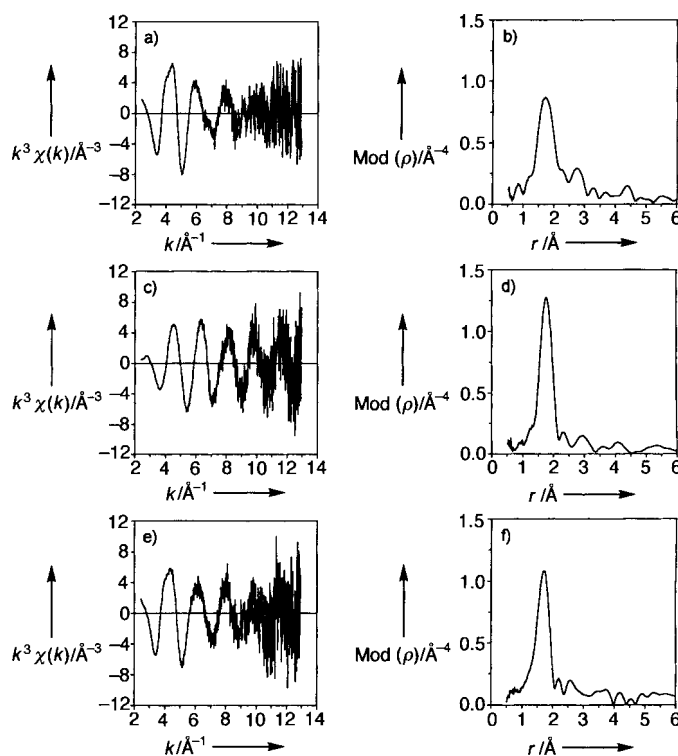


Abb. 2. Experimentelles Nickel-EXAFS ( $k^3$ -Wichtung, links) und zugehörige Fourier-Transformierte (rechts); oben: Luft-oxidiert; Mitte: NADH-reduziert; unten: Dithionit-reduziert.

In allen drei untersuchten Formen des Enzyms treten Vorkantenpeaks auf, deren Flächen erste Hinweise auf verzerrt oktaedrisch koordiniertes Nickel geben.<sup>[6]</sup> Die Kantenstrukturen aller drei Hydrogenasespektren deuten ebenfalls auf eine oktaedrische Koordination des Nickels hin. Weiterhin läßt sich aus ihnen schließen, daß Nickel nach der Reduktion mit NADH (Form 2) überwiegend von Schwefelliganden umgeben ist, während die erste Koordinationssphäre des Nickels in den übrigen Zuständen (Form 1 und Form 3) überwiegend von leichteren Atomen wie Stickstoff oder Sauerstoff gebildet wird.

Im ersten Schritt der Kurvenanpassungsanalysen auf der Basis Fourier-gilterter EXAFS-Funktionen (Abb. 3,  $r' = 0.9 - 3.1$  Å) wurden die Ligandensphären durch Kombinationen aus Sauerstoff- und Schwefel-Donorfunktionen unter Berücksichtigung integraler Besetzungszahlen mit Koordinationszahl-

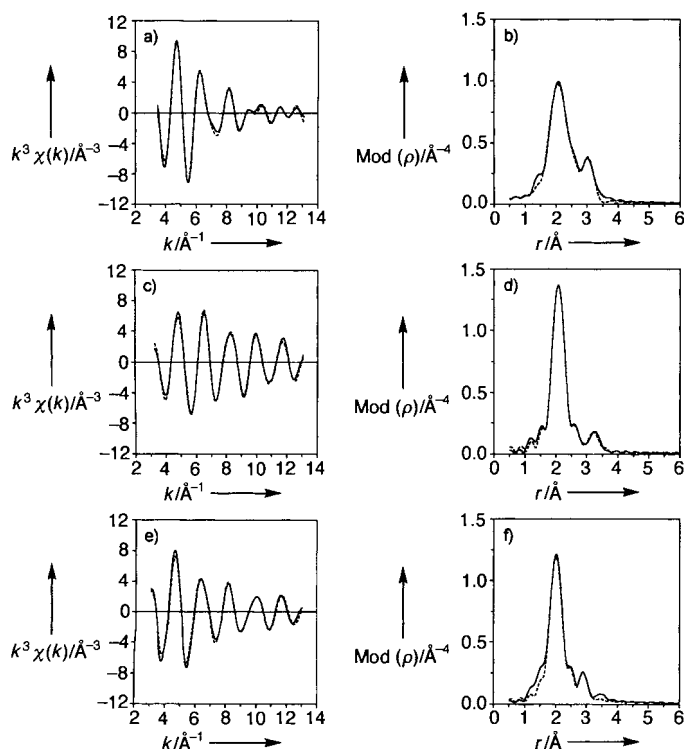


Abb. 3. Links: Fourier-gefiltertes Nickel-EXAFS (durchgezogen) mit theoretisch angepaßter Kurve (gestrichelt); rechts: zugehörige Fourier-Transformierte (durchgezogen: Experiment; gestrichelt: Modell); oben: Luft-oxidiert; Mitte: NADH-reduziert; unten: Dithionit-reduziert.

len von vier bis sechs modelliert. Dabei wurden die aus den XANES-Spektren abgeleiteten charakteristischen Unterschiede in der Koordination des Nickels sehr gut bestätigt: während in den Formen 1 und 3 neben vier Sauerstoffatomen nur zwei Schwefelatome an der Bindung des Nickels beteiligt sind, ergibt sich für Form 2 eine Koordinationssphäre aus vier Schwefel- und zwei Sauerstoff-Donorfunktionen.

Im weiteren Verlauf der Strukturbestimmung haben wir zusätzliche Koordinationsschalen in die Kurvenanpassungsanalysen einbezogen. Bei der NADH-behandelten Hydrogenase (Form 2, Abb. 3c,d) läßt sich eine signifikante Verbesserung der Anpassung erreichen, wenn die direkt gebundenen Schwefelatome auf zwei Schalen mit Abständen von 2.20 und 2.38 Å im Verhältnis 3:1 verteilt werden (Fit-Index 0.45; die Anpassung ausschließlich mit Schwefelatomen führt zu einem Fit-Index von 0.64). Das Modell läßt sich durch Einführung eines Streuers aus der Reihe der elektronenreichen 3d-Metalle, vermutlich Eisen (siehe unten) im Abstand von 3.07 Å weiter verbessern (Fit-Index 0.29). Die Ergebnisse der Strukturverfeinerung sind in Tabelle 2 aufgeführt.<sup>[7]</sup>

Die EXAFS-Funktion der aerob isolierten Hydrogenase (Form 1, Abb. 3a) weist dagegen erheblich komplexere Merkmale auf. Die starke Dämpfung deutet auf mehrere Schalen unterschiedlicher Rückstreuatom hin, die im relativ großen Peak der Fourier-Transformierten bei ca. 3 Å zusammengefaßt sind (Abb. 3b). Die beste Anpassung dieser Beiträge erhalten wir mit zwei weiteren Schwefelatomen im Abstand von 3.02 Å sowie einem zusätzlichen Metallatom bei 2.71 Å (Fit-Index 0.41).<sup>[8]</sup> Die qualitative Verbesserung des Strukturmodells geht hier eindeutig aus der Entwicklung des Fit-Indexes hervor, der vor der Erweiterung des Strukturmodells 2.04 und nach Einführung der weiteren Schwefelatome 0.86 beträgt. Die Ergebnisse der endgültigen Kurvenanpassungsanalyse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.<sup>[7]</sup>

Tabelle 2. Ergebnisse der Kurvenanpassungsanalysen auf der Basis Fourier-gefilterter EXAFS-Funktionen ( $r' = 0.9 - 3.1$  Å).

Enzymform [a]	N [b]	Schale	Abstand [Å] [c]	$2\sigma^2$ [Å <sup>2</sup> ] [d]	Fit-Index
Luft-oxidiert	4	Ni-O	2.03	0.014	0.41
	2	Ni-S	2.33	0.016	
	1	Ni-Fe	2.71	0.013	
	2	Ni-S	3.02	0.008	
NADH-reduziert	2	Ni-O	2.06	0.007	0.29
	3	Ni-S	2.20	0.013	
	1	Ni-S	2.38	0.010	
	1	Ni-Fe	3.07	0.021	
Dithionit-reduziert	4	Ni-O	2.05	0.011	0.51
	2	Ni-S	2.39	0.029	
	1	Ni-Fe	2.88	0.020	

[a] Siehe Text. [b] Koordinationszahl. [c] Geschätzter Fehler 0.03 Å. [d] Debye-Waller-Parameter.

Die EXAFS-Funktion der Dithionit-reduzierten Hydrogenase (Form 3, Abb. 3e) hat Ähnlichkeiten mit der des aerob isolierten Enzyms (Form 1, Abb. 3a). Das ursprüngliche Zwei-Schalen-Modell (Fit-Index 0.89) läßt sich auch hier mit einem Metallatom im Abstand von 2.88 Å (Fit-Index 0.51) sinnvoll erweitern. Allerdings führt die Berücksichtigung einer weiteren Schwefelschale, wie sie in Form 1 beobachtet wurde, zu physikalisch nicht sinnvollen Resultaten. Die Ergebnisse der abschließenden Strukturverfeinerung gehen aus Tabelle 2 hervor.<sup>[7]</sup>

Aus den Ergebnissen der Kurvenanpassungsanalysen lassen sich bestimmte Grundaussagen zur Koordination des Nickelatoms der Hydrogenase in allen drei untersuchten Enzymformen herleiten, die schematisch in Abbildung 4 dargestellt sind.

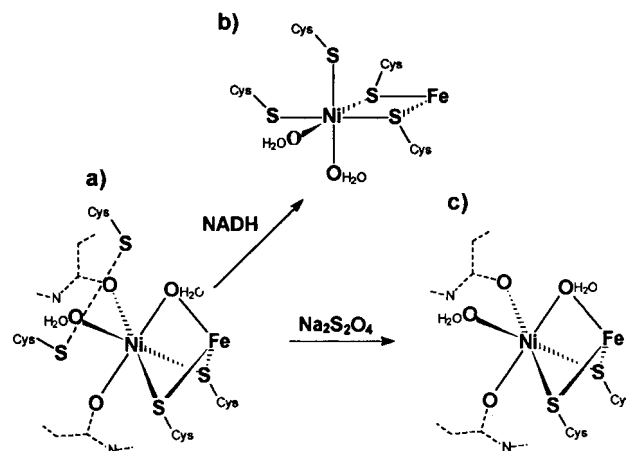


Abb. 4. Modelle für das Nickel-Zentrum der Hydrogenase aus *Alcaligenes eutrophus* in schematischer Darstellung: (a) Luft-oxidiert; (b) NADH-reduziert; (c) Dithionit-reduziert; die hier gezeigten Zuordnungen der O-Donorfunktionen sind willkürlich gewählt (siehe Text).

In allen drei Enzymformen liegen mit großer Wahrscheinlichkeit sechs Ligandatom in verzerrt oktaedrischer Anordnung um das Nickelatom vor.

Wir beginnen die Interpretation unserer Ergebnisse mit dem Strukturmodell für das NADH-behandelte Enzym (Form 2, Abb. 4b). Das Nickelatom ist hier von vier Schwefelatomen umgeben, von denen drei etwas kürzere Bindungen zum Nickel bilden als das vierte. Es handelt sich bei ihnen um die Thiolat-funktionen der vier konservierten Cysteinreste der  $\beta$ -Untereinheit des Enzyms.<sup>[9]</sup> Die restlichen Positionen des Koordinations-oktaeders sind mit leichteren Atomen besetzt, bei denen es sich um Sauerstoffatome gebundener Wassermoleküle handeln

könnte. Das benachbarte Metallatom sollte wegen des Abstandes von 3.07 Å über zwei verbrückende Thiolatfunktionen mit dem Nickel verknüpft sein. Es handelt sich dabei vermutlich um Eisen, denn die Hydrogenase aus *Alcaligenes eutrophus* enthält nach den Ergebnissen von Metallgehaltsanalysen außer Nickel und Eisen keine anderen 3d-Metalle.<sup>[4]</sup> Unser Strukturvorschlag (Abb. 4b) zeigt in bezug auf die Anzahl verbrückender und terminal gebundener Schwefelatome gute Übereinstimmung mit der Koordination des Nickels in der kristallisierten Hydrogenase aus *Desulfovibrio gigas*. Dieser Befund überrascht deshalb, weil es sich bei der kristallographisch untersuchten Hydrogenase um ein aerob isoliertes, enzymatisch inaktives Enzym handelt,<sup>[3]</sup> das gegenüber der mit NADH reduktiv aktivierten *Alcaligenes eutrophus*-Hydrogenase stark abweichende elektromechanische und spektroskopische Eigenschaften zeigt.<sup>[1, 4]</sup>

In der aerob isolierten Hydrogenase (Form 1, Abb. 4a) sind ebenso wie in der mit Natriumdithionit behandelten Präparation (Form 3, Abb. 4c) nur zwei Schwefelatome an der Bindung des Nickels beteiligt. Die übrigen Liganden sind vermutlich Stickstoff- oder Sauerstoffatome. Hier kommen neben Wassermolekülen und/oder funktionellen Aminosäureresten auch die Amidgruppen der Proteinketten in Frage.<sup>[8]</sup> In beiden Zuständen ist das Eisen 2.71 (Form 1, Abb. 4a) bzw. 2.88 Å (Form 3, Abb. 4c) vom Nickel entfernt. Die hier im Vergleich zu Form 2 (Abb. 4b) gefundene deutliche Verkürzung des Nickel-Eisen-Abstandes spricht stark für eine zusätzliche dritte Brücke im Heterodimetall-Zentrum des Enzyms.

Bei allen drei Enzymformen ist die Beteiligung eines Wasserstoffatoms an der Koordination des Nickels möglich, da entsprechende Strukturmodelle, bei denen der Wasserstoff durch eine nicht besetzte Koordinationsstelle modelliert wird, physikalisch noch sinnvoll sind. Eine solche Beteiligung erfüllt die Anpassungskriterien jedoch schlechter als die von uns vorgeschlagenen Bindungssituationen. Gleiches gilt auch für eine tatsächlich unbesetzte Koordinationsstelle.

Die Frage nach der Herkunft der beiden zusätzlichen Cysteinschwefelatome, die im ESR-aktiven Zustand (Form 2, Abb. 4b) an der direkten Bindung des Nickels beteiligt sind, ist natürlich von besonderem Interesse. Im Fall der aerob isolierten Hydrogenase (Form 1, Abb. 4a) finden wir zwei Schwefelatome, die 3.02 Å vom Nickel entfernt sind. Sie könnten zu einem Cystinrest gehören. Als mögliche Ursache für den Wechsel in der Koordination des Nickels nach der Behandlung des Enzyms mit NADH käme dann eine Generierung von zwei weiteren Cysteinfunktionen durch reduktive Spaltung dieses Cystinrestes in Frage (Form 2, Abb. 4b; siehe dazu auch [4d]).

Nach unseren Ergebnissen findet die durch NADH induzierte Reorganisation des Nickelzentrums bei der Behandlung mit Dithionit nicht statt. Dies könnte auf die fehlenden Substrateigenschaften des Dithionits zurückzuführen sein, das nicht mit der NAD<sup>+</sup>/NADH-spezifischen Bindungsstelle des Enzyms aus *Alcaligenes eutrophus* kompatibel ist.

Wir konnten den Nachweis erbringen, daß das aktive Zentrum der NAD-reduzierenden Hydrogenase – ebenso wie das der Hydrogenase aus *Desulfovibrio gigas* – ein heterodinuklearer Komplex ist. Darüber hinaus ist es erstmals gelungen, eine substantielle Änderung der Koordination des Nickels nach reduktiver Aktivierung einer NiFe-Hydrogenase nachzuweisen. Ob dieses für *Alcaligenes eutrophus* charakteristische Merkmal auch bei Hydrogenasen anderer Herkunft zu beobachten ist, müssen weiterführende Untersuchungen zeigen. In vorangegangenen Arbeiten wurde für die *Alcaligenes-eutrophus*-Hydrogenase ein Mechanismus zur spezifisch durch NADH ausgelösten reduktiven Aktivierung vorgeschlagen, der sich von dem anderer Hydrogenasen signifikant unterscheidet.<sup>[4, 16]</sup>

## Experimentelles

Zellen von *Alcaligenes eutrophus* H 16 (ATCC 17699; DSM 428) wurden heterotroph kultiviert und die lösliche Hydrogenase (Form 1) wie beschrieben isoliert [4]. Die Proteinkonzentration wurde nach der von Lowry beschriebenen Methode bestimmt und der Metallgehalt durch ICP-MS analysiert. Zur Überführung in Form 2 wurden zwei unabhängig präparierte Proben der aerob isolierten Hydrogenase unter Argon mit NADH versetzt (Endkonzentration 15 und 30 mM) und nach 10 Minuten schockgefroren. Form 3 wurde durch analoge Behandlung mit Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (5 mM) erhalten. Diese Enzymproben wurden vor den XAFS-Messungen durch ihre unterscheidbaren ESR-Spektren voneinander differenziert (experimentelle Einzelheiten siehe Lit. [4b]).

Die für die Röntgenabsorptionsspektroskopie verwendeten Enzymlösungen wurden durch Ultrafiltration in Amicon-Diaflo-Zellen (YM 100-Membran) auf eine Konzentration von ca. 1 mM gebracht. Eine Überprüfung der spezifischen Aktivität (Ausgangsaktivität: 80 µmol reduziertes NAD pro Minute und mg Enzym; dies entspricht dem 20fachen Wert der In-vivo-Aktivität) nach dem Aufkonzentrieren zeigte, daß das Enzym dabei keinen Aktivitätsverlust erlitten hat. Die Proben wurden schockgefroren [10] und während der Messungen mit einem Helium-Kryostat auf 20 K gekühlt. Die Röntgenabsorptionsspektren im Bereich der Nickel-K-Kante wurden gemäß Lit. [10] mit dem EXAFS-Spektrometer [11, 12] des EMBL (HASYLAB am DESY, Hamburg; Speicherring DORIS II, 4.5 GeV, mittlerer Strahlstrom 80 mA, Si(111)-Doppelkristall-Monochromator, fokussierender Toroidspiegel, absolute Kalibrierung der Energieachse mit simultan gemessenen Bragg-Reflexen eines Siliciumkristalls) aufgenommen.

Die Spektren wurden durch Messung der Fluoreszenzstrahlung mit einem 13-Element-Festkörperdetektor (Canberra) in einem Bereich von 8210 bis 9100 eV mit einer Meßzeit von 1–2 s/Punkt bei ca. 1400 Meßpunkten aufgenommen. Es wurde über 41 (Form 1), 27 (Form 2) bzw. 28 (Form 3) Einzelscans nach individueller Energiekalibrierung gemittelt. Da sich die einzelnen Spektren während der jeweiligen Meßreihen nicht veränderten, können wir ausschließen, daß die Ergebnisse durch Strahlenschäden beeinflusst wurden. Die EXAFS-Funktionen wurden aus den gemittelten Spektren nach bekannten Verfahren isoliert, wobei der Untergrund mit einer Spline-Funktion bestimmt wurde.<sup>[13]</sup> Zur Auswertung der Daten wurden die Programmpakete EXPROG (Energiekalibrierung und Datenreduktion) [14] und EXCURV88 (Kurveanpassungsanalysen unter Verwendung theoretischer Amplituden- und Phasenfunktionen) [15] verwendet.

Eingegangen am 19. November 1996 [Z 9782]

**Stichworte:** Eisen • Enzyme • EXAFS-Spektroskopie • Hydrogenasen • Nickel

- [1] a) *The Bioinorganic Chemistry of Nickel* (Hrsg.: J. R. Lancaster, Jr.), VCH, Weinheim, 1988; b) R. Cammack, *Adv. Inorg. Chem.* **1988**, 32, 297; c) R. P. Hausinger, *Biochemistry of Nickel*, Plenum, New York, 1993; d) S. P. J. Albracht, *Biochim. Biophys. Acta* **1994**, 1188, 167, zit. Lit.
- [2] R. Cammack, *Nature* **1995**, 373, 556.
- [3] A. Volbeda, M.-H. Charon, C. Piras, E. C. Hatchikian, M. Frey, J. C. Fontecilla-Camps, *Nature* **1995**, 373, 580.
- [4] a) K. Schneider, A. Erkens, A. Müller, *Naturwissenschaften* **1996**, 83, 78; b) A. Erkens, K. Schneider, A. Müller, *J. Biol. Inorg. Chem.* **1996**, 1, 99; c) K. Schneider, R. Cammack, H. G. Schlegel, *Eur. J. Biochem.* **1984**, 142, 75; d) K. Schneider, H. G. Schlegel, *Biochim. Biophys. Acta* **1976**, 452, 66.
- [5] a) G. Henkel, J. Kreutzberg, A. Müller, K. Schneider, C. Hermes, H.-F. Nolting, Jahresbericht HASYLAB, Hamburg **1993**, 679; b) A. Müller, A. Erkens, K. Schneider, A. Müller, H.-F. Nolting, G. Henkel, *J. Inorg. Biochem.* **1995**, 59, 643; c) A. Müller, A. Erkens, K. Schneider, A. Müller, H.-F. Nolting, V. A. Solé, G. Henkel, Jahresbericht HASYLAB, Hamburg **1995**, II-917.
- [6] a) G. J. Colpas, M. J. Maroney, C. Bagyinka, M. Kumar, W. S. Willis, S. L. Suib, N. Baidya, P. K. Mascharak, *Inorg. Chem.* **1991**, 30, 920; b) M. Köckerling, Dissertation, Duisburg, 1992.
- [7] In den abschließenden Cycles der Strukturverfeinerung wurden bei konstant gehaltenen Besetzungszahlen ein gemeinsamer Wert für  $E_0$ , die Abstände der einzelnen Schalen vom Zentralatom und die Debye-Waller-Parameter angepaßt.
- [8] Auf der Basis von FT-IR-Untersuchungen wurde kürzlich eine Beteiligung von Liganden mit Dreifachbindungssystemen an der Metallkoordination in der Hydrogenase aus *Alcaligenes eutrophus* postuliert (T. M. van der Spek, A. F. Arends, R. P. Happe, S. Yun, K. A. Bagley, D. J. Stufkens, W. R. Hagen, S. P. J. Albracht, *Eur. J. Biochem.* **1996**, 237, 629). Ein daher versuchsweise in das Strukturmodell eingeführtes zweiatomiges Molekül in linearer Anordnung (z. B. CN<sup>-</sup> oder CO) führte bei der Anpassung jedoch zu keinem physikalisch sinnvollen Ergebnis.
- [9] A. Tran-Betcke, U. Warnecke, C. Böcker, C. Zaborosch, B. Friedrich, *J. Bacteriol.* **1990**, 172, 2920.
- [10] G. Henkel, A. Müller, S. Weißgräber, G. Buse, T. Soulimane, G. C. M. Stefens, H.-F. Nolting, *Angew. Chem.* **1995**, 107, 1615; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 1488.
- [11] C. Hermes, E. Gilberg, M. H. J. Koch, *Nucl. Instr. Meth.* **1984**, 222, 207.
- [12] R. F. Pettifer, C. Hermes, *J. Appl. Crystallogr.* **1985**, 18, 404.

- [13] B. K. Teo, *EXAFS: Basic Principles and Data Analysis*, Springer, Berlin, 1986.  
 [14] H.-F. Nolting, C. Hermes, *EXPPROG: EMBL EXAFS Data Analysis and Evaluation Program Package*, Heidelberg, 1992.  
 [15] N. Binsted, S. J. Gurman, J. W. Campbell, *SERC Daresbury Laboratory EXCURV88 Program*, Daresbury, 1988.  
 [16] Anmerkung bei der Korrektur (14. Juli 1997): Eine zwischenzeitlich durchgeführte XAFS-Untersuchung zeigt, daß sich die lösliche Hydrogenase aus *Alcaligenes eutrophus* hinsichtlich des hier beschriebenen Verhaltens von anderen NiFe-Hydrogenasen unterscheidet (Z. Gu, J. Dong, C. B. Allan, S. B. Choudhury, R. Franco, J. J. G. Moura, I. Moura, J. LeGall, A. E. Przybyla, W. Roseboom, S. P. J. Albracht, M. J. Axley, R. A. Scott, M. J. Maroney, *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 11155).

## Die Unterscheidung von Enantiomeren chiraler Moleküle in der Gasphase: Nachweis der chiralen Erkennung bei der Bildung von 1-Phenyl-1-propanol/2-Butanol-Clustern mit resonant erhöhter Multiphotonen-Ionisierungsspektroskopie\*\*

Susanna Piccirillo, Cesare Bosman, Daniela Toja, Anna Giardini-Guidoni, Marco Pierini, Anna Troiani und Maurizio Speranza\*

Die enantioselektive Komplexierung ist eine Standardmethode in der molekularen Erkennung. In kondensierter Phase können chirale Moleküle (M) mit chiralen Partnern (C) diastereomere Komplexe (MC) bilden, die auf elektrostatischen Wechselwirkungen kurzer Reichweite oder Orbital- oder auch sterischen Effekten basieren und die in ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften differieren. Diastereomere MC-Kristalle lassen sich durch Messungen des Schmelzpunktes, der Löslichkeit und des Dampfdruckes als auch durch Röntgenstrukturanalyse unterscheiden.<sup>[1]</sup> In Lösung können zur Unterscheidung der MC kalorimetrische, kolorimetrische,<sup>[2]</sup> spektroskopische und Transportgeschwindigkeitsmessungen durchgeführt werden, auch wenn die Bestimmung durch die Gegenwart des Lösungsmittels erschwert und gelegentlich sogar unmöglich sein kann.<sup>[2, 3]</sup>

Ein Weg, um diese unerwünschten Lösungsmittelleffekte zu umgehen und die intrinsischen Wechselwirkungen in diastereomeren MCs zu untersuchen, ist die keinesfalls einfache Untersuchung in der Gasphase. Die Massenspektrometrie wurde bereits zur Enantiomerenentrennung chiraler Ionen durch Komplexierung mit chiralen Wirten eingesetzt.<sup>[4]</sup> Die inhärente Einschränkung der Massenspektrometrie, Diastereomere oder Enantiomere nur anhand des Massenunterschiedes unterscheiden zu können, erfordert häufig den Einsatz von Isotopenmarkern, die mitunter die relative Stabilität der diastereomeren Ionen-Neutralteilchen-Komplexe verändern können.

[\*] Prof. M. Speranza, Dr. M. Pierini, Dr. A. Troiani  
 Facoltà di Farmacia  
 Dipartimento di Studi di Chimica e Tecnologia  
 delle Sostanze Biologicamente Attive  
 Università di Roma „La Sapienza“  
 P.le A. Moro 5, I-00185 Rom (Italien)  
 Telefax: Int. + 6/49913602  
 E-mail: speranza@axrma.uniroma1.it  
 D. Toja, Prof. A. Giardini  
 Dipartimento di Chimica  
 Università di Roma „La Sapienza“  
 Dr. S. Piccirillo, Dr. C. Bosman  
 Istituto Materiali Speciali, Tito Scalo (Italien)

[\*\*] Diese Arbeit wurde gefördert vom Ministero della Università della Ricerca Scientifica e Tecnologica (MURST) und vom Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR). Professor F. Cacace, Professor F. Gasparri und Dr. M. Aschi danken wir für ihre Hilfe.

Enantiomere neutraler chiraler Moleküle in der Gasphase können durch hochauflösende Molekülspektroskopie ihrer MC-Komplexe mit chiralen Partnern unterschieden werden. Bisher gibt es jedoch nur eine einzige Arbeit über das laserinduzierte Fluoreszenz(LIF)-Anregungsspektrum eines einzelnen, strahlgeköhlten van-der-Waals-MC-Diastereomerenpaares.<sup>[5]</sup> Wir berichten hier über die erste Anwendung der resonant erhöhten Multiphotonen-Ionisierungsspektroskopie (REMPI) in Kombination mit der Flugzeitmassenspektrometrie (TOF),<sup>[6, 7]</sup> zur Unterscheidung von diastereomeren van-der-Waals-MC-Komplexen aus einer Überschallexpansion. Damit liegt die erste Untersuchung der fundamentalen Eigenschaften derartiger Komplexe auf mikroskopischem Niveau vor. Die Komplexe wurden durch Kombination eines geeigneten Chromophors, in diesem Fall (R)-(+)-1-Phenyl-1-propanol ( $P_R$ ), mit den Enantiomeren von 2-Butanol ( $B_R$  oder  $B_S$ ) hergestellt. Ihre MC-Komplexe ( $P_R B_R$  und  $P_R B_S$ ) zeigen erwartungsgemäß eine unterschiedliche spektrale Struktur, ausgeprägt im elektronischen Bandenursprung, ihrem Erscheinungspotential und jenen vibronischen Banden, die intermolekulare Schwingungen von  $P_R$  mit dem jeweiligen Partner ( $B_R$  oder  $B_S$ ) zugeordnet werden können.<sup>[8]</sup>

Die  $P_R B_R$ - und  $P_R B_S$ -Cluster wurden mit resonant erhöhten Multiphotonen-Ionisierung-Einfarbenexperimenten (1cREMPI) unterschieden, in denen der Komplex durch Absorption eines Photons der Frequenz  $\nu_1$  in einen diskreten angeregten Zustand  $S_1$  und nachfolgend durch die Absorption mehrerer anderer Photonen derselben Frequenz  $\nu_1$  in das Kontinuum angeregt wird. Die 1cREMPI-Spektren wurden erhalten, indem die TOF-Massenspektren von  $P_R B_R$  (oder  $P_R B_S$ ) als Funktion der überstrichenen Frequenz  $\nu$ , gemessen wurden. Das Erscheinungspotential von reinem  $P_R$  wurde in einem resonant erhöhten Zweiphotonen-Ionisierung-Zweifarbexperiment (2cR2PI) gemessen. Darin wurde das Molekül mit einem Photon der konstanten Wellenlänge  $\nu_1$  in einen diskreten Zustand  $S_1$  angeregt und anschließend von einem zweiten Photon variabler Frequenz  $\nu_2$  ionisiert. Es wurde für die reine Substanz  $P_R$  ein Wert von  $9.01 \pm 0.01$  eV erhalten, der mit dem bei Raumtemperatur gemessenen Ionisierungspotential von Benzylalkohol (8.9 eV) übereinstimmt.<sup>[9]</sup>

Das 1cREMPI-Anregungsspektrum von reinem  $P_R$  wird durch das Bandenzentrum des elektronischen  $S_1 \leftarrow S_0$ -Übergangs des Moleküls bei  $37\,577\text{ cm}^{-1}$  und zwei intensive, um 41 und  $47\text{ cm}^{-1}$  verschobene Peaks charakterisiert. Weitere intensive vibronische Übergänge wurden bei Verschiebungen um 530, 575, 581, 629, 772 und  $976\text{ cm}^{-1}$  relativ zum Ursprung beobachtet. Die Moden tiefer Frequenz wurden den Torsionsschwingungen des Ringsubstituenten zugeordnet. Die anderen intensiven Banden erscheinen bei Frequenzen, die typisch sind für Schwingungen des aromatischen Ringgerüsts und der Ethyl- und OH-Gruppen; sie konnten noch nicht vollständig zugeordnet werden.<sup>[10]</sup>

Abbildung 1 zeigt die 1cREMPI-Anregungsspektren der diastereomeren Paare  $P_R B_R$  und  $P_R B_S$  um ihre elektronischen Bandenzentren. Beide Cluster zeigen ein komplexes vibronisches Spektrum, das von zahlreichen Kopplungen der van-der-Waals-Schwingungen mit den tieffrequenten Moden der Partner herührt.<sup>[11, 12]</sup> Die Spektren sind relativ zum  $S_1 \leftarrow S_0$ -Zentrum des isolierten Moleküls  $P_R$  rotverschoben, was eine Erhöhung der Bindungsenergie des Clusters im  $S_1$ -Zustand relativ zu der im  $S_0$ -Zustand anzeigt. Der Unterschied in der Verschiebung der intensivsten, den elektronischen Bandenzentren der entsprechenden Clustern zugeordneten Banden beträgt  $13\text{ cm}^{-1}$ , wobei die Bandenverschiebung von  $P_R B_R - 79\text{ cm}^{-1}$  und die von  $P_R B_S - 92\text{ cm}^{-1}$  beträgt. Dieser Unterschied spiegelt eine für  $P_R B_S$  kleinere  $S_1 \leftarrow S_0$ -Energilücke als für  $P_R B_R$  wider. Das