

Untersuchung des Katalyseprozesses der membrangebundenen Hydrogenase aus *Ralstonia eutropha* H16 mittels oberflächenverstärkter IR-Absorptionsspektroskopie**

Nattawadee Wisitruangsakul, Oliver Lenz, Marcus Ludwig, Bärbel Friedrich, Friedhelm Lendzian, Peter Hildebrandt und Ingo Zebger*

[NiFe]-Hydrogenasen bilden eine Klasse von Enzymen, die die heterolytische Spaltung von molekularem Wasserstoff (H_2) katalysieren, wie auch die entsprechende Umkehrreaktion, die Reduktion von Protonen zu H_2 .^[1] Das katalytisch aktive Zentrum ist ein verbrückter Ni/Fe-Komplex mit vier konservierten Cysteinliganden. Zudem sind ein CO und zwei CN^- als sehr ungewöhnliche, exogene Liganden an das Fe gebunden. Während die meisten dieser Enzyme nur unter strikt anaeroben Bedingungen katalytisch aktiv sind, weisen die [NiFe]-Hydrogenasen aus *Ralstonia* eine bemerkenswerte Sauerstofftoleranz auf, deren Ursprung bisher noch nicht vollständig aufgeklärt ist.^[2-4] Die Forschungsaktivitäten in diesem Bereich gelten dem katalytischen Mechanismus dieser Enzyme und ihrer potenziellen Anwendung in der biotechnologischen Energiespeicherung und -wandlung. Solche Anwendungen setzen eine Immobilisierung der Enzyme auf einem elektrisch leitenden Substrat unter Beibehaltung ihrer nativen Struktur und Funktion voraus.^[5] In der Tat zeigen erste Experimente, dass membrangebundene Hydrogenase aus *Ralstonia* auf pyrolytischen Graphitelektroden immobilisiert und so zum Aufbau einer einfachen Brennstoffzelle genutzt werden kann, die unter aeroben Bedingungen mit H_2 -Konzentrationen von unter 3% operiert.^[2,3]

Zur Untersuchung der immobilisierten Enzyme ist ein experimenteller Ansatz wünschenswert, mit dem sich die molekulare Struktur des aktiven Zentrums und insbesondere die strukturellen Änderungen während des katalytischen Prozesses *in situ* verfolgen lassen. Die IR-Spektroskopie ist eine der am häufigsten eingesetzten Techniken und ermöglicht es, die verschiedenen Zustände innerhalb des Katalyzyklus anhand der Strettschwingungen der CO- und CN^- -Liganden des aktiven Ni/Fe-Zentrums zu identifizieren. Die Schwingungsfrequenzen reagieren äußerst empfindlich auf Änderungen der Elektronendichte innerhalb des katalytisch

aktiven Zentrums, die durch Änderungen des Oxidationszustands des Nickels, der Ligandenumgebung und der Cofaktor-Protein-Wechselwirkungen hervorgerufen werden. Die IR-Spektroskopie hat in Verbindung mit der EPR-Spektroskopie wichtige Einblicke in die enzymatische Wirkungsweise von Hydrogenasen in Lösung geliefert.^[6-8]

Die größte Beschränkung der konventionellen IR-Spektroskopie ist ihre relativ geringe Empfindlichkeit, die nicht ausreicht, um immobilisierte Enzyme zu studieren. Oberflächenverstärkte IR-Absorptionsspektroskopie (surface-enhanced infrared absorption (SEIRA) spectroscopy) kann diesen Nachteil umgehen, da die IR-Absorption von Proteinen, die auf Au-Oberflächen immobilisiert sind, um bis zu zwei Größenordnungen verstärkt wird.^[9,10] SEIRA-Spektroskopie wurde schon erfolgreich eingesetzt, um die Immobilisierung von Proteinen auf Au-Elektroden und redoxinduzierte Strukturänderungen von Proteinen unter stationären Bedingungen und auch zeitaufgelöst zu verfolgen.^[11-14] Hier beschreiben wir die erstmalige Verwendung dieser Technik zur Untersuchung einer Hydrogenase – der membrangebundenen Hydrogenase aus *Ralstonia eutropha* H16 (*R.e.* MBH) –, die an eine Au-Oberfläche gebunden ist. Anders als in früheren Studien an Cofaktor-Protein-Komplexen ist die SEIRA-Analyse von Hydrogenasen nicht auf die Identifizierung von Änderungen der Proteinstruktur beschränkt. Vielmehr ermöglicht die SEIRA-Technik die direkte Beobachtung von charakteristischen Banden des katalytischen Zentrums in einem spektralen Fenster ohne störende IR-Absorptionsbanden des Proteins.

Die SEIRA-Experimente erfolgten in der Kretschmann-ATR-Konfiguration mit einem Halbzylinderkristall aus Silicium, auf dessen flacher Seite nasschemisch ein Au-Film abgeschieden wurde.^[15] Die Au-Oberfläche wurde anschließend mit einer selbstorganisierten Monolage aus Nickelnitroloessigsäure (Ni-NTA)^[11,16] beschichtet, an die die *R.e.* MBH, die mit einem Hexahistidin-Peptid am C-Terminus der für den Elektronentransfer zuständigen Untereinheit des dimeren Enzyms modifiziert wurde, mit hoher Affinität binden kann (weitere experimentelle Angaben sind in den Hintergrundinformationen zu finden). Diese Strategie ermöglicht eine einheitliche Orientierung des immobilisierten Proteins. Das SEIRA-Spektrum, das in Ar-Atmosphäre aufgenommen wurde, dokumentiert die effiziente Immobilisierung (Abbildung 1). Die intensiven Amid-I- und Amid-II-Banden weisen auf einen hohen Bedeckungsgrad hin. Eine genauere Beobachtung des spektralen Bereichs zwischen 1850–2150 cm^{-1} zeigt die schwachen, jedoch deutlich erkennbaren Streck-

[*] N. Wisitruangsakul, Dr. F. Lendzian, Prof. P. Hildebrandt, Dr. I. Zebger
Institut für Chemie, Sekr. PC14, Technische Universität Berlin
Straße des 17. Juni 135, 10623 Berlin (Deutschland)
Fax: (+49) 30-31421122
E-Mail: ingo.zebger@tu-berlin.de

Dr. O. Lenz, Dr. M. Ludwig, Prof. B. Friedrich
Institut für Biologie/Mikrobiologie, Humboldt-Universität zu Berlin
Chausseestraße 117, 10115 Berlin (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde von der DFG (Sfb 498, Exzellenz-Cluster „Unicat“) gefördert

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200802633> zu finden.

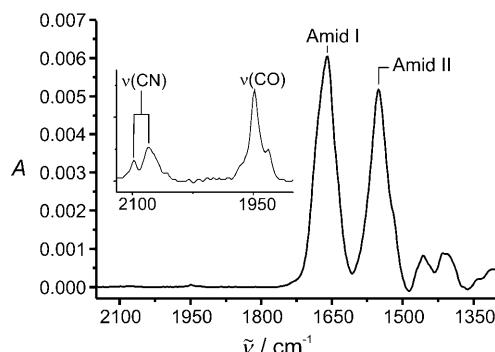


Abbildung 1. SEIRA-Spektrum der *R.e.* MBH, die mit einem Hexahistidin-Peptid an die mit Ni-NTA modifizierte Au-Oberfläche gebunden wurde. Der vergrößerte Ausschnitt zeigt den spektralen Bereich zwischen 1850 und 2150 cm⁻¹ mit den Stretschwängungen der CO- und CN⁻-Liganden.

schwingungsbanden der zweiatomigen Liganden des Fe im aktiven Zentrum auf. Die intensivere CO-Stretschwung befindet sich bei 1948 cm⁻¹, und die CN-Stretschwängungen treten bei 2098 und 2081 cm⁻¹ auf. Dieses Bandenmuster ist charakteristisch für den „bereiten“ Ni_r-B-Zustand (Abbildung 2, Tabelle 1).^[7,17] Während der Immobilisierung steigen

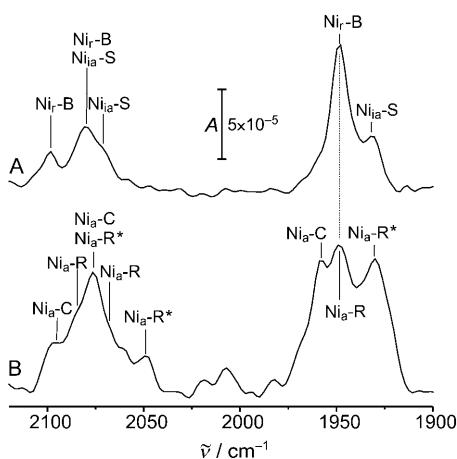


Abbildung 2. SEIRA-Spektren der über ein Hexahistidin-Peptid an eine mit Ni-NTA modifizierte Au-Oberfläche gebundenen *R.e.* MBH A) vor und B) nach Inkubation mit H₂ (in einer Pufferlösung bei pH 5.5). „Ni_a-R^{**}“ entspricht den Subzuständen Ni_a-R' und Ni_a-R'', deren CO- und CN-Stretschwängungen nahe beieinander liegen.

die Intensitäten der Amid- und der CO-Stretschwängungsbanden mit der gleichen Zeitkonstante an, was auf eine einheitliche Orientierung sowie die Strukturerhaltung des katalytischen Zentrums der adsorbierten Enzyme hinweist (siehe Hintergrundinformationen).

Die schwache Schulter bei 1930 cm⁻¹ ist der CO-Stretschwängungsmodus des inaktiven Ni_{ia}-S-Zustands zuzuordnen, dessen zugehörige CN-Stretschwängungsbanden bei 2076 und 2060 cm⁻¹ zu finden sind und daher teilweise mit denen des Ni_r-B-Zustands überlappen. Aus den integrierten Intensitäten der CO-Stretschwängungen wurden die relativen Anteile von Ni_r-B und Ni_{ia}-S auf 70% bzw. 30% abgeschätzt.

Tabelle 1: Frequenzen der CO- und CN-Stretschwängen (in cm⁻¹) der *R.e.* MBH.^{[17][a]}

Redoxzustand	$\tilde{\nu}$ (CO)	$\tilde{\nu}$ (CN)
Ni _r -B	1948	2081
Ni _{ia} -S	1930	2060
Ni _a -S	1936	2076
Ni _a -C	1957	2075
Ni _a -RS	1948	2068
Ni _a -RS'	1926	2049
Ni _a -RS''	1919	2046

[a] Die Bandenpositionen wurden für *R.e.* MBH in Lösung bei einem pH-Wert von 5.5 bestimmt. Die oxidierten Zustände (Ni_r-B, Ni_a-S, Ni_{ia}-S) treten in der isolierten Form des Enzyms unter aeroben Bedingungen auf, während die reduzierten Zustände durch Inkubation mit H₂ bei einem Druck von 1 bar induziert wurden. Ni_a-C ist ein reduzierter Zwischenzustand; Ni_a-RS, Ni_a-RS' und Ni_a-RS'' sind Mischungen der vollständig reduzierten Zustände. Bedeutung der Kürzel: ia = inaktiv, r = bereit (ready), a = aktiviert, B, C = Standardnomenklatur^[7,8] für einen oxidierten und einen intermediären, jeweils EPR-aktiven Redox-Zustand des Ni, R = vollständig reduzierte Zustände, S = EPR-„silent“.

Die Injektion von H₂ in die SEIRA-Zelle führte zu einer Abnahme der dem Ni_r-B-Zustand zugeordneten Banden und zu einem Anstieg derjenigen Banden, die charakteristisch für die aktivierte, reduzierte Zustände sind. Letztere sind am Katalysezyklus beteiligt.^[18–20] Bei 1 bar H₂ und pH 5.5 wurde ein H₂-Redoxpotential von –320 mV gegen die Standardwasserstoffelektrode (SHE) berechnet, das hinreichend negativ war, um das oxidierte Enzym nahezu vollständig in seine reduzierten Zustände zu überführen. Anhand vergleichender Transmissionsmessungen wurden diese Zustände der H₂-reduzierten, an die innere Membran gebundenen *R.e.* MBH zugeordnet. Für letztere liegt eine detaillierte Bandenzuordnung vor (basierend auf kürzlich durchgeföhrten IR- und EPR-Studien).^[17] Der Vergleich zwischen den IR- und SEIRA-Spektren zeigt weitreichende Ähnlichkeiten und insbesondere eine gute Übereinstimmung zwischen den IR- und SEIRA-Differenzspektren („oxidiert“ minus „H₂-reduziert“) auf.

Diese Ergebnisse belegen, dass bei Inkubation mit H₂ das oxidierte, an die Goldschicht gebundene Enzym die gleichen Reaktionen eingeht wie das membrangebundene Protein in Lösung. Auch die Verteilung der reduzierten Spezies ist sehr ähnlich (Abbildung 3 A, B). Zu diesen gehört auch der EPR-detektierbare Ni_a-C-Zwischenzustand, der anhand seiner IR-Banden bei 1957 (CO), 2075 und 2097 cm⁻¹ (jeweils CN⁻) identifiziert werden kann. Die Frequenz der CO-Stretschwängung des EPR-inaktiven Ni_a-R-Zustands fällt mit der des Ni_r-B-Zustands bei 1948 cm⁻¹ zusammen, sodass die IR-Intensität bei dieser Frequenz trotz vollständiger Reduktion des Ni_r-B-Zustands unverändert bleibt (Abbildung 2). Die CN-Stretschwängungen von Ni_a-R erwartet man bei 2068 und 2087 cm⁻¹, und in der Tat können sie als Schulter der CN-Stretschwängung des Ni_r-B bei 2081 cm⁻¹ beobachtet werden. Die eng benachbarten CO-Banden der Ni_a-R'- und Ni_a-R''-Zustände sind lediglich im IR-Differenzspektrum in Lösung unterscheidbar, das im Vergleich zu den entsprechenden SEIRA-Spektren mit einer spektralen Auflösung von 2 cm⁻¹ anstatt von 4 cm⁻¹ aufgenommen wurde (Abbil-

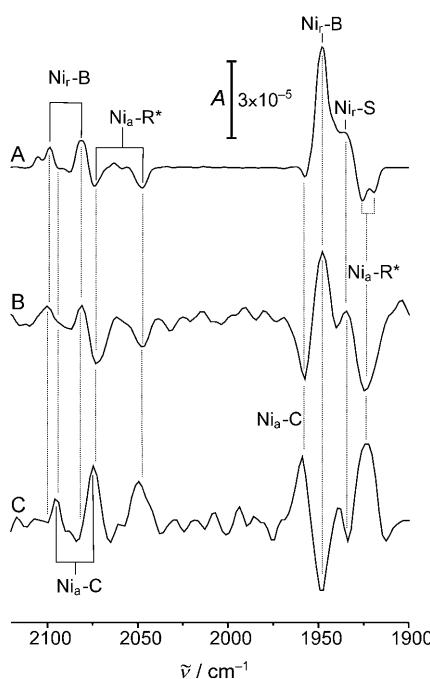


Abbildung 3. IR- und SEIRA-Differenzspektren der *R.e.* MBH. A) IR-Transmissionsdifferenzspektrum der an die cytoplasmatische Membran gebundenen MBH in Lösung („oxidiert“ minus „H₂-reduziert“); B,C) SEIRA-Differenzspektren der über ein Hexahistidin-Peptid an eine mit Ni-NTA modifizierte Au-Oberfläche gebundenen *R.e.* MBH: B) „oxidiert“ minus „H₂-reduziert“; C) „H₂-reduziert“ minus „Ar-reoxidiert“. „Ni_a-R*“ bezeichnet die Subzustände Ni_a-R' und Ni_a-R'', die durch eng benachbarte CO- und CN-Streckschwingungen charakterisiert sind. Die Intensität des Spektrums A ist um den Faktor 20 verkleinert dargestellt.

dung 3A, B). Die zugehörigen CN-Streckschwingungen liegen bei 2049 und 2075 cm⁻¹ für Ni_a-R' sowie bei 2046 und 2071 cm⁻¹ für Ni_a-R'' und überlagern teilweise die CN-Schwingung des Ni_a-C bei 2075 cm⁻¹.

Die spektralen Änderungen, die durch die Reduktion mit H₂ im immobilisierten Enzym induziert werden, sind reversibel, wie durch die anschließende Inkubation mit Ar belegt wurde. Das SEIRA-Differenzspektrum „H₂-reduziert“ minus „Ar-reoxidiert“ (Abbildung 3C) ist nahezu spiegelbildlich zum Differenzspektrum „oxidiert“ minus „H₂-reduziert“ (Abbildung 3B). Ferner belegen die Differenzspektren eindeutig die Existenz einer weiteren oxidierten Spezies, nämlich des „bereiten“, EPR-„silent“ Ni_a-S-Zustands, dessen CO-Streckschwingung bei 1936 cm⁻¹ zu finden ist.

Die hier beschriebenen SEIRA-Analysen dokumentieren, dass die über eine His-Markierung vermittelte Immobilisierung auf einer Au-Oberfläche die natürliche Proteinstruktur und die Reaktivität der Hydrogenase gegenüber Wasserstoff nicht beeinflusst. Weiterführende Studien, in denen die Metallooberfläche als Elektrode verwendet wird, zielen auf eine Optimierung des elektronischen Kontakts der

metallischen Oberfläche mit dem katalytischen Zentrum des immobilisierten Enzyms ab. Dies ist die Voraussetzung, um die Funktionsweise von bioelektronischen Bauelementen auf Hydrogenase-Basis optimieren zu können. Hierbei zeigt sich die stationäre und zeitaufgelöste SEIRA-Spektroskopie als eine unverzichtbare Methode, um Strukturänderungen in den Enzymen während der katalytischen Prozesse *in situ* zu untersuchen, wobei komplementäre Informationen zur Untersuchung von Proteinfilmen durch Voltammetrie und verwandte Methoden erzielt werden.^[4,21]

Eingegangen am 4. Juni 2008
Online veröffentlicht am 9. Dezember 2008

Stichwörter: Biokatalyse · Biotreibstoffe · Hydrogenasen · SEIRA-Spektroskopie · Wasserstoffspaltung

- [1] R. Cammack, M. Frey, R. Robson, *Hydrogen as a Fuel* (Hrsg.: R. Cammack, M. Frey, R. Robson), Taylor and Francis, London, 2001.
- [2] K. A. Vincent, J. A. Cracknell, O. Lenz, I. Zebger, B. Friedrich, F. A. Armstrong, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 16951.
- [3] K. A. Vincent, J. A. Cracknell, J. R. Clark, M. Ludwig, O. Lenz, B. Friedrich, F. A. Armstrong, *Chem. Commun.* **2006**, 5033.
- [4] K. A. Vincent, A. Parkin, F. A. Armstrong, *Chem. Rev.* **2007**, 107, 4366.
- [5] I. Willner, E. Katz, *Bioelectronics. From Theory to Applications* (Hrsg.: I. Willner, E. Katz), Wiley-VCH, Weinheim, 2005.
- [6] S. P. Best, *Coord. Chem. Rev.* **2005**, 249, 1536.
- [7] A. L. De Lacey, V. M. Fernandez, M. Rousset, R. Cammack, *Chem. Rev.* **2007**, 107, 4304.
- [8] W. Lubitz, E. Reijerse, M. van Gastel, *Chem. Rev.* **2007**, 107, 4331.
- [9] M. Osawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1997**, 70, 2861.
- [10] M. Osawa, *Near-Field Opt. Surf. Plasmon Polaritons* **2001**, 81, 163.
- [11] K. Ataka, B. Richter, J. Heberle, *J. Phys. Chem. B* **2006**, 110, 9339.
- [12] K. Ataka, J. Heberle, *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, 388, 47.
- [13] A. Badura, B. Esper, K. Ataka, C. Grunwald, C. Woll, J. Kuhlmann, J. Heberle, M. Rogner, *Photochem. Photobiol.* **2006**, 82, 1385.
- [14] N. Wisitruangsakul, I. Zebger, H. K. Ly, D. H. Murgida, S. Ekgasit, P. Hildebrandt, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2008**, 10, 5276.
- [15] H. Miyake, S. Ye, M. Osawa, *Electrochim. Commun.* **2002**, 4, 973.
- [16] J. Hrabakova, K. Ataka, J. Heberle, P. Hildebrandt, D. H. Murgida, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, 8, 759.
- [17] M. Saggu, I. Zebger, M. Ludwig, O. Lenz, B. Friedrich, P. Hildebrandt, F. Lendzian, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [18] F. A. Armstrong, P. J. Albracht, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. A* **2005**, 363, 937.
- [19] J. C. Fontecilla-Camps, A. Volbeda, C. Cavazza, Y. Nicolet, *Chem. Rev.* **2007**, 107, 4273.
- [20] A. Volbeda, J. C. Fontecilla-Camps, *Coord. Chem. Rev.* **2005**, 249, 1609.
- [21] O. Rüdiger, J. M. Abad, E. C. Hatchikian, V. M. Fernandez, A. L. De Lacey, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 16008.