

SEIRA-spektroskopische Untersuchung der elektrochemischen Aktivierung einer immobilisierten [NiFe]-Hydrogenase unter Turnover- und Non-Turnover-Bedingungen**

Diego Millo, Peter Hildebrandt, Maria-Eirini Pandelia, Wolfgang Lubitz und Ingo Zebger*

[NiFe]-Hydrogenasen bilden eine Familie von Metalloenzymen, die die reversible Spaltung von molekularem Wasserstoff in Protonen und Elektronen katalysieren. Diese Enzyme beherbergen eine aus FeS-Clustern bestehende Elektronentransferkette, die externe Redoxpartner mit dem katalytischen [NiFe]-Zentrum verbindet. Dieser Dimetallkomplex enthält zwei an das Ni-Atom gebundene terminale Cysteinreste, drei zweiatomige, am Fe-Atom koordinierte anorganische Liganden (ein CO und zwei CN⁻) und zwei verbrückende Cysteine zwischen dem Ni- und Fe-Atom.^[1,2] Das [NiFe]-Zentrum kann in verschiedenen Zuständen vorliegen, die sich hinsichtlich des Oxidationszustands des Ni-Atoms und der Art des exogenen, verbrückenden Liganden zwischen dem Ni- und Fe-Atom unterscheiden. EPR- und IR-Untersuchungen haben eine Vielzahl von Informationen bezüglich der Struktur des aktiven Zentrums in diesen Zuständen geliefert und damit zu einem besseren Verständnis der katalytischen Prozesse im Wasserstoffmetabolismus aerober und anaerober Mikroorganismen beigetragen.

Angesichts der vielversprechenden Anwendungsmöglichkeiten von Hydrogenasen als Katalysatoren in biotechnologischen Verfahren ist das Interesse an solchen enzymatischen Prozessen in den letzten Jahren erheblich gestiegen.^[3] Um das volle Potenzial dieser Enzyme zu nutzen, müssen diese so auf Elektroden immobilisiert werden, dass ihre native Struktur und Funktion erhalten bleiben und eine effiziente elektronische Verbindung zwischen dem katalytischen Zentrum und den leitenden Trägermaterialien gewährleistet ist. In den letzten Jahren wurden vielversprechende Ergebnisse erzielt, die die katalytische Aktivität immobilisierter Hydrogenasen auf Graphit-Elektroden demonstrieren und

damit die Realisierbarkeit einer Hydrogenase/Laccase-Bio-brennstoffzelle zeigen konnten.^[4]

Da EPR- und konventionelle IR-Spektroskopie nicht auf Enzyme angewendet werden können, die an Elektroden gebunden sind, wird die Funktion und katalytische Leistungsfähigkeit derartiger Systeme üblicherweise mit elektrochemischen Methoden wie der Proteinfilmvoltammetrie (PFV) verfolgt. Diese Techniken liefern Informationen über die elektrische Wechselwirkung zwischen Elektrode und Enzym, erlauben jedoch keine Einblicke in mechanistische Details des katalytischen Prozesses oder die Art der beteiligten Spezies. Solche Informationen wären jedoch essenziell für die Optimierung von bioelektronischen Funktionseinheiten auf Hydrogenasebasis. Eine vielversprechende, alternative Methode ist die SEIRA-Spektroskopie (SEIRA = oberflächenverstärkte Infrarotsorption), die eine selektive Verstärkung der IR-Banden von immobilisierten Proteinen auf biokompatibel beschichteten Au-Elektroden ermöglicht. Es wurde insbesondere gezeigt, dass SEIRA-Spektroskopie die Detektion der CO- und CN-Streckschwingungen des katalytischen Zentrums für unterschiedliche Redoxzustände ermöglicht und somit die Voraussetzungen schafft, um katalytische Prozesse *in situ* zu verfolgen.^[5,6]

Der zentrale Schritt der Biokatalyse in „Standard“-[NiFe]-Hydrogenasen (d.h. Sauerstoff-sensitiven Hydrogenasen) ist die Aktivierung des isolierten Enzyms, das in einer Mischung zweier oxidierter, inaktiver Zustände vorliegt, in denen vermutlich ein Hydroperoxid (Ni_u-A) bzw. ein Hydroxid (Ni_r-B) die verbrückende Position zwischen Ni und Fe einnimmt.^[7,8] Die Reduktion von Ni_u-A und Ni_r-B führt auf unterschiedlichen Wegen zur Bildung des gleichen aktiven Zustands (Ni_a-S). Hier beschreiben wir die Anwendung der SEIRA-Spektroskopie, um die Aktivierung einer solchen „Standard“-[NiFe]-Hydrogenase aus *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F (*DvMF*) auf einer Au-Oberfläche zu untersuchen. Entgegen unseren bisherigen Arbeiten, in denen nur die H₂-induzierte Aktivierung des immobilisierten Enzyms verfolgt werden konnte,^[5,6] stellten wir hier zum ersten Mal eine SEIRA-spektroskopische Untersuchung der elektrochemischen Aktivierung unter Turnover- und Non-Turnover-Bedingungen (d.h. in der An- bzw. Abwesenheit von H₂ als Substrat).

Die SEIRA-Spektren wurden mit einem Siliciumprisma, das mit einer nanostrukturierten Au-Schicht modifiziert war, in abgeschwächter Totalreflexion (ATR) aufgenommen. Die Goldoberfläche wurde mit einer selbstorganisierten Monolage (self-assembled monolayer; SAM) aus 6-Amino-1-hexanthiol funktionalisiert, um eine elektrostatische Bindung

[*] Dr. D. Millo, Prof. Dr. P. Hildebrandt, Dr. I. Zebger
Institut für Chemie, Sekr. PC14, Technische Universität Berlin
Straße des 17. Juni 135, 10623 Berlin (Deutschland)
Fax: (+49) 30-3142-1122
E-Mail: ingo.zebger@tu-berlin.de

Dr. M.-E. Pandelia, Prof. Dr. W. Lubitz
Max-Planck-Institut für Bioanorganische Chemie
Stiftstraße 34–36, 45470 Mülheim an der Ruhr (Deutschland)

[**] Finanzielle Unterstützung wurde von folgenden Institutionen gewährt: DFG (P.H., I.Z.: Exzellenzcluster „UniCat“), EU/„Energy Network Project“ SOLAR-H2 (FP 7, Contract 212508, W.L., M.E.P.), Alexander-von-Humboldt-Stiftung (D.M.) und Max-Planck-Gesellschaft (W.L., M.E.P.). SEIRA = Oberflächenverstärkte Infrarotsorption.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201006646> zu finden.

des Enzyms über dessen kleine, die FeS-Cluster beherbende Untereinheit zu ermöglichen. Au dient hierbei als Verstärker der spektroskopischen Signale und auch als Arbeitselektrode. Der experimentelle Aufbau wurde durch Platzieren des Spektrometers in einem anaeroben Zelt entscheidend verbessert (siehe SI 1 in den Hintergrundinformationen), da selbst Spuren von Sauerstoff das katalytische Zentrum beim Anlegen eines Potentials zersetzen können.^[6]

Die zahlreichen Redoxzustände von Hydrogenasen können über die IR-Signaturen der am katalytischen Zentrum koordinierten CO- und CN⁻-Liganden identifiziert werden, wobei die CO-Streckschwingung die stärkste Intensität aufweist. SEIRA-Spektren im CO- und CN-Valenzschwingungsbereich, die während der Redoxtitration des immobilisierten Enzyms in einer Argon-Atmosphäre aufgenommen wurden, sind in Abbildung 1 gezeigt. Eine zuver-

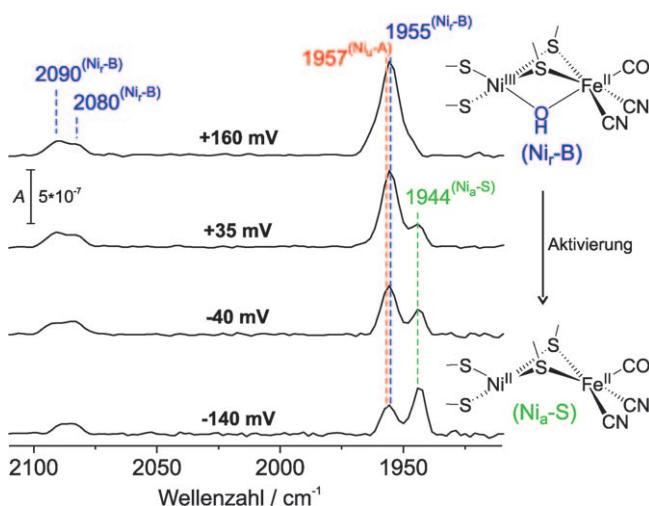


Abbildung 1. Potentialabhängige SEIRA-Spektren der [NiFe]-Hydrogenase von *DvMF*, die auf einer mit einer SAM aus 6-Amino-1-hexan-thiol funktionalisierten Au-Elektrode immobilisiert wurde. Die Experimente wurden in 50 mM Acetatpuffer bei pH 5.5 und 25 °C in einer Argon-Atmosphäre durchgeführt. Die Potentiale beziehen sich auf die Standardwasserstoffelektrode (SHE). Die elektronischen und strukturellen Änderungen am aktiven [NiFe]-Zentrum, die durch die elektrochemische Aktivierung induziert werden, sind rechts schematisch dargestellt.

lässige Untersuchung der CN-Streckschwingungen (2050–2110 cm⁻¹) ist wegen der wesentlich geringeren Intensitäten sowie der Überlappung der Banden nicht möglich. Bei +160 mV (gegen SHE) zeigt das SEIRA-Spektrum eine Bande bei 1956 cm⁻¹, die aus der Überlagerung der CO-Moden der Ni_u-A- und Ni_r-B-Zustände resultiert. Eine schrittweise Erniedrigung des angelegten Potentials führt zu einer Intensitätsminderung dieser Bande und der gleichzeitigen Zunahme einer Bande bei 1944 cm⁻¹, die dem Ni_u-S-Zustand zuzuordnen ist. Bei -140 mV erreicht die Bandenintensität bei 1944 cm⁻¹ ein Plateau und steigt bei weiterer Erniedrigung des Potentials auf -190 mV nicht weiter an (Daten nicht gezeigt). Die beobachteten potentialabhängigen Veränderungen können auf die elektrochemische Umwandlung von Ni_r-B zu Ni_u-S zurückgeführt werden, die mit der

Reduktion von Ni³⁺ zu Ni²⁺, einer Protonierung des verbrückenden OH⁻ und der anschließenden Freisetzung des gebildeten H₂O-Moleküls einhergeht (Abbildung 1).^[9] Des Weiteren ist die selbst bei -190 mV verbleibende Bandenintensität bei 1957 cm⁻¹ auf restliche Anteile des Ni_u-A-Zustands zurückzuführen, der bei diesem Potential nicht vollständig in Ni_u-S überführt werden kann.^[6] Wird das Potential wieder auf +160 mV erhöht, findet eine Umkehr der Intensitätsänderungen statt, wobei die ursprüngliche Intensität allerdings auch nach 120 min nicht wiederhergestellt werden konnte. Eine fast vollständige Reoxidation von Ni_u-S zu Ni_r-B wurde jedoch nach 18 h bei einem konstanten Potential von +160 mV erreicht, sodass eine kinetische Hinderung des zugrundeliegenden Prozesses anzunehmen ist.

Eine quantitative Untersuchung der Redoxübergänge kann anhand der potentialabhängigen Intensitätsänderung bei 1956 cm⁻¹ oder, wie in Abbildung 2 gezeigt, auf Grund-

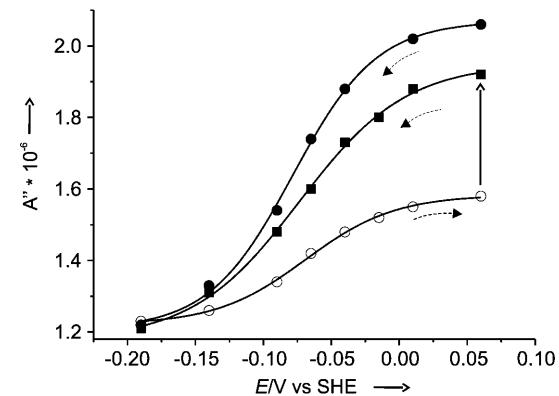


Abbildung 2. Anpassung der Nernst-Gleichung an die Signalintensitäten der 2. Ableitung der SEIRA-Banden (aus Abbildung 1). Volle Kreise (●) repräsentieren die Redoxtitration von positiven zu negativen Potentialen, offene Kreise (○) die Redoxmessungen in umgekehrter Richtung. Der vertikale Pfeil deutet eine Wiederherstellung der ursprünglichen Intensität nach 18 h bei +160 mV an. Schwarze Quadrate (■) repräsentieren die nachfolgende zweite Redoxtitration (von positiven zu negativen Potentialen).

lage der zweiten Ableitung der Absolutspektren durchgeführt werden. Die Anpassung der Nernst-Gleichung an die Daten weist ein nahezu ideales Verhalten für einen Ein-Elektronen-Prozess ($n=0.8$) und ein Mittelpunktpotential ($E_{1/2}$) von -64 mV (Tabelle 1) auf, welches dem Wert sehr ähnlich ist, der unter vergleichbaren experimentellen Bedingungen für den Ni_r-B/Ni_u-S-Übergang in Lösung ermittelt wurde (-58 mV bei pH 5.5).^[6] Dieses Ergebnis, wie auch die Übereinstimmung der Bandenpositionen in den SEIRA- und IR-Spektren, impliziert, dass das katalytische Zentrum sowie die unmittelbare Proteinumgebung im immobilisierten Enzym nicht gestört sind. Die vorliegenden Ergebnisse demonstrieren weiterhin eine gute elektronische Kopplung zwischen Enzym und Elektrode, die eine reversible Umwandlung der konjugierten Redoxzustände erlaubt. Es konnte somit erstmals ein experimentell ermitteltes Mittelpunktpotential einer immobilisierten Hydrogenase auf Grundlage der charakteristischen schwingungsspektroskopischen Signatur

Tabelle 1: Vergleich der Werte für $E_{1/2}$ und E_{switch} .^[a]

$E_{1/2}$	n	$E_{\text{switch}}^{\text{SEIRA}}$	$E_{\text{switch}}^{\text{CA}}$	$\Delta_1^{\text{[b]}}$	$\Delta_2^{\text{[c]}}$
-64(±12)	0.8(±0.2)	-16(±14)	-7(±15)	48(±2)	9(±1)

[a] $E_{1/2}$ und $E_{\text{switch}}^{\text{SEIRA}}$ wurden durch eine Anpassung der Nernst-Gleichung an die Intensitäten der zweiten Ableitung der SEIRA-Banden ermittelt. $E_{\text{switch}}^{\text{CA}}$ wurde erhalten durch Anpassung an die I - E -Kurven bei unterschiedlichen Potentialen aus einer Serie von CA-Experimenten, die simultan zu den SEIRA-Messungen durchgeführt wurden. Dabei wurde das Potential für 10 min auf den gewünschten Wert gesetzt und das SEIRA-Spektrum aufgenommen, sobald der Strom konstant war (hier für die I - E -Auftragung zur Bestimmung von $E_{\text{switch}}^{\text{CA}}$ genutzt). Potentiale sind in mV (gegen SHE) angegeben. Die Werte in Klammern bezeichnen den entsprechenden Fehler. [b] $\Delta_1 = E_{\text{switch}}^{\text{SEIRA}} - E_{1/2}$. [c] $\Delta_2 = E_{\text{switch}}^{\text{CA}} - E_{\text{switch}}^{\text{SEIRA}}$.

einem spezifischen Redoxpaar ($\text{Ni}_r\text{B}/\text{Ni}_a\text{S}$) zugeordnet werden. Mittelpunktpotentiale von immobilisierten Enzymen unter Non-Turnover-Bedingungen können auch mittels PFV ermittelt werden,^[10,11] für [NiFe]-Hydrogenasen (*Allo-chromatium vinosum* und *Desulfomicrombium baculatum*) wurden bisher allerdings nur Redoxübergänge der FeS-Cluster – nicht jedoch des aktiven Zentrums – identifiziert.^[12,13] Für alle anderen [NiFe]-Hydrogenasen, inklusive der von *DvMF*, konnte selbst in Gegenwart von Inhibitoren wie CO kein Non-Turnover-Signal beobachtet werden.^[14]

Im Folgenden betrachten wir Redoxübergänge unter Turnover-Bedingungen, die in Anwesenheit von H_2 gemessen wurden. Eine charakteristische elektrochemische Größe, die üblicherweise durch PFV für Hydrogenasen während des Katalyzyklus bestimmt wird, ist das Switch-Potential (E_{switch}). Dieses ist als das Potential des maximalen Anstiegs in Richtung der reduktiven Aktivierung definiert und wird über die Ableitung des Cyclovoltammograms (CV) bestimmt (siehe SI 2).^[15] Die Interpretation dieses Parameters ist nach wie vor Gegenstand von Diskussionen: E_{switch} und $E_{1/2}$ werden demselben Redoxübergang zugeordnet,^[15,16] die zugrundeliegenden Prozesse sind jedoch unterschiedlich. Unter Argon-Atmosphäre (Non-Turnover-Bedingungen) wird der Ni_rB -Zustand des immobilisierten Enzyms ausschließlich durch Elektronen reduziert ($\text{Ni}^{3+}/\text{Ni}^{2+}$), die von der Elektrode über die FeS-Cluster zur Verfügung gestellt werden (siehe SI 3A).^[9] Für Messungen unter H_2 -Atmosphäre (Turnover-Bedingungen) hingegen wurde von Armstrong et al. die Möglichkeit der Reduktion durch H_2 vorgeschlagen (siehe SI 3B).^[17] Unterschiedliche Intermediate, die eine Unterscheidung zwischen beiden Reaktionsmechanismen (elektrochemisch oder unter Substratbeteiligung) erlauben würden, konnten bisher nicht beobachtet werden, und das einzige mittels IR-Spektroskopie detektierte Intermediat (Ni_rS) ist in beiden Reaktionsschemata involviert.

In einer kürzlichen Untersuchung der [NiFe]-Hydrogenase aus *Aquifex aeolicus* konnten Fourmond et al. eine lineare Abhängigkeit zwischen E_{switch} und dem Logarithmus der Scan-Geschwindigkeit v aufzeigen.^[16] Dieses Verhalten, das unseren aktuellen Beobachtungen für die *DvMF*-Hydrogenase entspricht (siehe SI 4), impliziert, dass $E_{1/2}$ und E_{switch} für Messungen auf gleicher Zeitskala verglichen werden können.^[16] Aus diesem Grund haben wir potentialkontrollierte Experimente unter 1 bar H_2 -Atmosphäre

durchgeführt, bei denen die immobilisierte *DvMF*-[NiFe]-Hydrogenase gleichzeitig mit SEIRA-Spektroskopie und Chronoamperometrie (CA) untersucht wurde. Die potentialabhängigen Änderungen in den SEIRA-Spektren sind quantitativ vergleichbar mit denen, die unter Non-Turnover-Bedingungen aufgenommen wurden, sodass der Beitrag von Ni_aS bei Erniedrigung des Potentials wiederum auf Kosten von Ni_rB ansteigt (siehe SI 5). Dieses Ergebnis bietet den ersten experimentellen Beweis für die Beteiligung von Ni_rB und Ni_aS an der reduktiven Aktivierung einer immobilisierten Hydrogenase. Der Wendepunkt der sigmoidalen Kurve aus der quantitativen Spektrenanalyse (siehe SI 6) entspricht einem Wert von E_{switch} , der identisch mit dem aus den CA-Messungen bestimmten Wert ist.

Die sehr gute Übereinstimmung zwischen den elektrochemischen und spektroskopischen Messungen (Tabelle 1) belegt die hervorragende elektrochemische Kontrolle, die mit unserem experimentellen Aufbau erreicht wird. Des Weiteren wurde in Übereinstimmung mit der Abschätzung von Fourmond et al.^[16] für E_{switch} ein um ca. 50 mV höherer Wert als für $E_{1/2}$ ermittelt (Tabelle 1). Dieser Unterschied, der an derselben Elektrode und Proteinprobe unter vergleichbaren experimentellen Bedingungen (pH, Temperatur) beobachtet wurde, ist möglicherweise auf die Wirkung von Wasserstoff als zusätzliches Reduktionsmittel sowie auf Abweichungen vom thermodynamischen Gleichgewicht – verursacht durch Anwesenheit des Substrats – zurückzuführen. Fourmond et al. haben vorhergesagt,^[16] dass E_{switch} für niedrige Scan-Geschwindigkeiten größer ist als $E_{1/2}$, wobei $E_{1/2}$ für das immobilisierte Enzym allerdings nicht direkt bestimmt werden konnte.

Wir haben hier die erste spektroelektrochemische SEIRA-Studie an einer immobilisierten [NiFe]-Hydrogenase unter Turnover- und Non-Turnover-Bedingungen vorgestellt. Es wurde gezeigt, dass der Redoxübergang $\text{Ni}_r\text{B}/\text{Ni}_a\text{S}$ des immobilisierten Enzyms in Abwesenheit von Wasserstoff den gleichen $E_{1/2}$ -Wert wie bei den in Lösung durchgeföhrten Experimenten aufweist, was wiederum die Integrität des aktiven Zentrums sowie einen guten elektrischen Kontakt mit der SAM-beschichteten Au-Elektrode belegt. In Übereinstimmung mit theoretischen Studien^[16] konnte mittels simultaner SEIRA- und CA-Messungen gezeigt werden, dass E_{switch} für die $\text{Ni}_r\text{B}/\text{Ni}_a\text{S}$ -Aktivierung unter H_2 -Atmosphäre höher liegt als $E_{1/2}$. Weiter zeigt die vorliegende Studie, dass SEIRA-Spektroelektrochemie geeignet ist, Redoxübergänge einzelner Spezies anhand ihrer charakteristischen schwingungsspektroskopischen Signatur zuzuordnen. Somit kann diese Methode grundlegend zur Aufklärung biokatalytischer Mechanismen immobilisierter Enzyme beitragen.

Eingegangen am 22. Oktober 2010
Online veröffentlicht am 10. Februar 2011

Stichwörter: Biokatalyse · Elektrochemie · [NiFe]-Hydrogenase · Redoxtitration · SEIRA-Spektroskopie

[1] C. Fichtner, C. Laurich, E. Bothe, W. Lubitz, *Biochemistry* **2006**, 45, 9706–9716.

- [2] M. E. Pandelia, H. Ogata, W. Lubitz, *ChemPhysChem* **2010**, *11*, 1127–1140.
- [3] J. A. Cracknell, K. A. Vincent, F. A. Armstrong, *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 2439–2461.
- [4] K. A. Vincent, J. A. Cracknell, J. R. Clark, M. Ludwig, O. Lenz, B. Friedrich, F. A. Armstrong, *Chem. Commun.* **2006**, 5033–5035.
- [5] N. Wisitruangsakul, O. Lenz, M. Ludwig, B. Friedrich, F. Lendzian, P. Hildebrandt, I. Zebger, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 621–623; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 611–613.
- [6] D. Millo, M. E. Pandelia, T. Utesch, N. Wisitruangsakul, M. A. Mroginski, W. Lubitz, P. Hildebrandt, I. Zebger, *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 15344–15351.
- [7] M. van Gastel, M. Stein, M. Brecht, O. Schroeder, F. Lendzian, R. Bittl, H. Ogata, Y. Higuchi, W. Lubitz, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2006**, *11*, 41–51.
- [8] A. Volbeda, L. Martin, C. Cavazza, M. Matho, B. W. Faber, W. Roseboom, S. P. J. Albracht, E. Garcin, M. Rousset, J. C. Fontecilla-Camps, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2005**, *10*, 239–249.
- [9] S. Kurkin, S. J. George, R. N. F. Thorneley, S. P. J. Albracht, *Biochemistry* **2004**, *43*, 6820–6831.
- [10] C. Léger, S. J. Elliott, K. R. Hoke, L. J. C. Jeuken, A. K. Jones, F. A. Armstrong, *Biochemistry* **2003**, *42*, 8653–8662.
- [11] V. V. Shumyantseva, Y. D. Ivanov, N. Bistolas, F. W. Scheller, A. I. Archakov, U. Wollenberger, *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 6046–6052.
- [12] H. R. Pershad, J. L. C. Duff, H. A. Heering, E. C. Duin, S. P. J. Albracht, F. A. Armstrong, *Biochemistry* **1999**, *38*, 8992–8999.
- [13] A. Parkin, G. Goldet, C. Cavazza, J. C. Fontecilla-Camps, F. A. Armstrong, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13410–13416.
- [14] O. Rüdiger, C. Gutierrez-Sánchez, D. Olea, I. A. C. Pereira, M. Velez, V. M. Fernandez, A. L. De Lacey, *Electroanalysis* **2010**, *22*, 776–783.
- [15] K. A. Vincent, A. Parkin, F. A. Armstrong, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4366–4413.
- [16] V. Fourmond, P. Infossi, M. T. Giudici-Orticoni, P. Bertrand, C. Léger, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4848–4857.
- [17] F. A. Armstrong, P. J. Albracht, *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. A* **2005**, *363*, 937–954.