



# Detektion von Fe-CN- und Fe-CO-Schwingungen im aktiven Zentrum der [NiFe]-Hydrogenase durch inelastische kernresonante Streuung\*\*

Saeed Kamali, Hongxin Wang, Devrani Mitra, Hideaki Ogata, Wolfgang Lubitz,\*

Brian C. Manor, Thomas B. Rauchfuss, Deborah Byrne, Violaine Bonnefoy, Francis E. Jenney Jr., Michael W. W. Adams, Yoshitaka Yoda, Ercan Alp, Jiyong Zhao und Stephen P. Cramer\*

Hydrogenasen ( $H_2$ asen) sind wichtige Enzyme, die Produktion und Umsetzung von molekularem Wasserstoff katalysieren.<sup>[1]</sup> Sie sind von großem Interesse für mögliche Anwendungen in einer zukünftigen „Wasserstoffwirtschaft“, einerseits als Enzym an sich und andererseits als Blaupause für die Synthese biomimetischer Katalysatoren.<sup>[2]</sup> In [NiFe]- $H_2$ asen läuft die Katalyse am dimetallischen Ni-Fe-Zentrum ab.<sup>[3]</sup> Fe ist im aktiven Zentrum mit Ni durch zwei Cystein-thiolat-Liganden verbunden. In Abhängigkeit vom Redoxzustand oder dem Grad der aeroben Deaktivierung existiert zwischen Fe und Ni zusätzlich ein weiterer Brückenligand (Hydrid, Oxo/Hydroxo oder möglicherweise Hydroperoxyo).<sup>[4]</sup> Das außergewöhnliche Fe-Zentrum trägt ferner einen CO- und zwei CN<sup>-</sup>-Liganden; es ist das erste Zentrum dieser Art, das in der Natur entdeckt wurde.<sup>[5]</sup> Diese [NiFe]- $H_2$ asen haben ausnahmslos zusätzliche Fe-S-Cluster, mit denen Elektronen zum und vom Reaktionszentrum transportiert werden (siehe Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen).

[NiFe]- $H_2$ asen sind durch Röntgenkristallographie intensiv untersucht worden,<sup>[3,4a]</sup> und mithilfe von Infrarotspektroskopie konnten mehr als zehn verschiedene Intermediate entschlüsselt werden,<sup>[3,6]</sup> die bei der Katalyse, der Aktivierung und der Inhibierung des Enzyms eine Rolle spielen. Dennoch

sind viele Fragen zur Identität und Struktur dieser Zustände noch offen. Neben dem Fe(CN)<sub>2</sub>CO-Motiv (Abbildung 3, links) werden z.B. Strukturen angenommen, die Fe(CN)<sub>3</sub>CO<sup>[7]</sup> und Fe(SO)<sub>x</sub> enthalten.<sup>[8]</sup> Das Verständnis der Strukturtransformationen, die die verschiedenen Zustände ineinander überführen, ist entscheidend für die Aufklärung des Wirkmechanismus der  $H_2$ asen. Hier beschreiben wir die Anwendung einer neuen Technik basierend auf inelastischer kernresonanter Streuung, nämlich NRVS (nuclear resonance vibrational spectroscopy), auch NIS (nuclear inelastic scattering) oder NRIXS (nuclear resonant inelastic X-ray scattering) genannt, die Aufschluss über Struktur und Dynamik der Redoxkette und des aktiven Zentrums der [NiFe]- $H_2$ ase gibt.

NRVS hat sich als eine leistungsfähige Technik zur Erforschung der Dynamik von Eisenzentren in Metalloproteinen etabliert.<sup>[9]</sup> Bei der Messung wird ein hoch monochromatischer (meV) Röntgenstrahl durch eine Kernresonanz gefahren. Im Unterschied zur Mößbauer-Spektroskopie, die rückstroßfreie Kernübergänge detektiert, werden bei NRVS inelastische Streuvorgänge unter Vernichtung und Erzeugung von Phononen gemessen, was die Beobachtung von vibronischer Feinstruktur ermöglicht. Die sich ergebenden Spektren sind mit den üblichen IR- oder Raman-Spektren vergleich-

[\*] Dr. S. Kamali,<sup>[4]</sup> Dr. H. Wang,<sup>[4]</sup> Dr. D. Mitra, Prof. S. P. Cramer  
Department of Chemistry, University of California  
Davis, CA 95616 (USA)

E-Mail: spjcramer@ucdavis.edu

Dr. H. Wang,<sup>[4]</sup> Prof. S. P. Cramer  
Physical Biosciences Division, Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, CA 94720 (USA)

Dr. H. Ogata, Prof. W. Lubitz  
Max-Planck-Institut für Chemische Energiekonversion  
45470 Mülheim an der Ruhr (Deutschland)

E-Mail: Wolfgang.Lubitz@cec.mpg.de

B. C. Manor, Prof. T. B. Rauchfuss  
Department of Chemistry, University of Illinois  
Champaign-Urbana, IL 61801 (USA)

Dr. D. Byrne  
Institut de Microbiologie de la Méditerranée, Aix-Marseille-Université, Marseille 13009 (Frankreich)

Dr. V. Bonnefoy  
CNRS, IMM, Laboratoire de Chimie Bactérienne  
Marseille Cedex 20 (Frankreich)

Prof. F. E. Jenney Jr.  
Georgia Campus, Philadelphia College of Osteopathic Medicine  
Suwanee, GA 30024 (USA)

Prof. M. W. W. Adams  
Department of Biochemistry & Molecular Biology, University of Georgia, Athens, GA 30602 (USA)

Dr. Y. Yoda  
JASRI, SPring-8  
1-1-1 Kouto, Sayo-cho, Sayo-gun, Hyogo 679-5198 (Japan)

Dr. E. Alp, Dr. J. Zhao  
Advanced Photon Source, Argonne National Laboratory  
Argonne, IL 60439 (USA)

[†] Diese Autoren trugen zu gleichen Teilen zu dieser Arbeit bei.

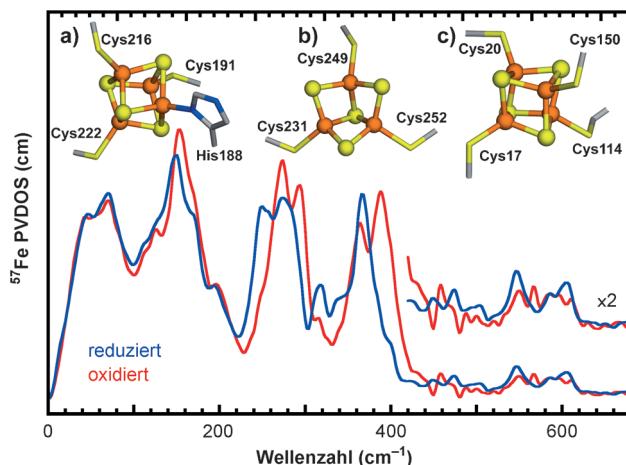
[\*\*] Diese Arbeit wurde durch die National Institutes of Health (GM-65440 (S.P.C.) und GM-061153 (T.B.R.)), das DOE Office of Biological and Environmental Research (S.P.C.), das BMBF (03SF0355C), das EU/Energy Network Project SOLAR-H2 (FP7 Contract 212508), die Max-Planck-Gesellschaft (W.L. und H.O.) und das DOE Office of Basic Energy Sciences (A.P.S.) unterstützt. Antragsnummer bei SPring-8: 2010B0032-2012A0032.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201204616> zu finden.

bar,<sup>[10]</sup> haben jedoch andere Auswahlregeln und spektrale Intensitäten. Genauer gesagt hängt die NRVS-Intensität einer bestimmten Normalschwingung von der Bewegung des resonanten Kerns (in diesem Fall  $^{57}\text{Fe}$ ) entlang der Richtung des einfallenden Röntgenstrahls ab.<sup>[9d,11]</sup> Die Gültigkeit dieser NRVS-Interpretation wurde durch Vergleich mit IR- und Raman-Spektren von Fe-S-Modellverbindungen,<sup>[12]</sup> kleinen Eisen-Proteinen,<sup>[13]</sup> und Modellverbindungen oder Proteinen mit CO- und CN-Liganden bestätigt.<sup>[14]</sup>

Im Unterschied zur IR- und Raman-Spektroskopie wird NRVS nicht durch Wasser- oder Protein-Moden beeinträchtigt und erlaubt die Untersuchung aller Oxidationszustände; eine etwaige Fluoreszenz der Probe ist nicht störend. Mit ihrer besonderen Spezifität bezüglich bestimmter Elemente und Isotope stellt NRVS eine wertvolle Ergänzung zu den konventionellen Spektroskopietechniken dar. In komplexen Metalloenzymen wie den H<sub>2</sub>asen stellt sich die Frage, ob eine Detektion der Schwingungen von speziellen Liganden, die sich am Eisen des aktiven Zentrums in den verschiedenen Zuständen des katalytischen Zyklus befinden, in Anwesenheit vieler anderer Fe-S-Cluster des Proteins möglich ist. Die Antwort hierauf gibt diese Studie, in der die ersten NRVS-Resultate an der katalytischen [NiFe]-H<sub>2</sub>ase aus dem Bakterium *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F (DvMF) präsentiert werden. Trotz der großen Beiträge von drei unterschiedlichen Fe-S-Clustern in der Elektronentransportkette wurden Banden bei hohen Frequenzen detektiert, die den Fe-CO- und Fe-CN-Beuge- und -Streckschwingungen der Liganden am aktiven [NiFe]-Zentrum zugeschrieben werden können. Diese Banden wurden durch Vergleiche mit Modellverbindungen und kleineren Fe-S-Proteinen zugeordnet.

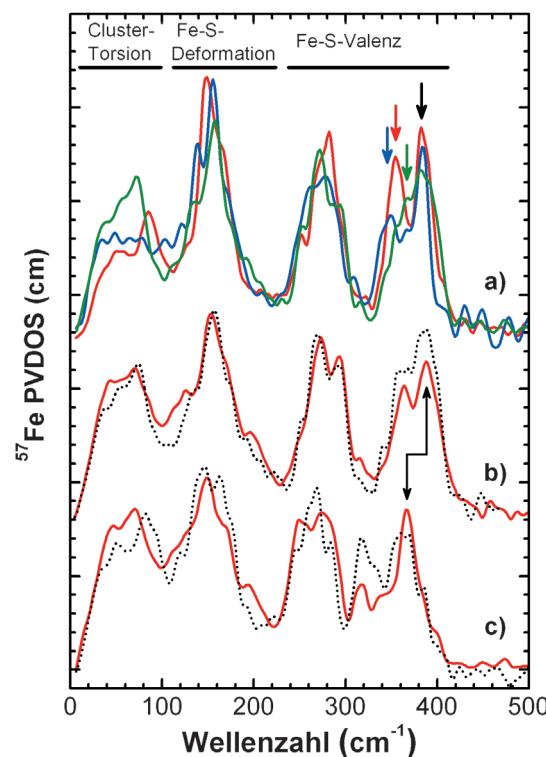
Die aus NRVS erhaltene partielle vibronische Zustandsdichte PVDOS (partial vibrational density of states) des „oxidierten“ und „reduzierten“ Zustands der [NiFe]-H<sub>2</sub>ase in DvMF ist in Abbildung 1 dargestellt. Da 11 der 12 Eisenatome dieses Enzyms sich im [3Fe-4S]-Zentrum oder den beiden [4Fe-4S]-Zentren befinden (Abbildung 1, oben), wird



**Abbildung 1.**  $^{57}\text{Fe}$ -PVDOS aus NRVS-Messungen für oxidierte (rot) und reduzierte H<sub>2</sub>ase (blau) aus DvMF. Experimentelle Einzelheiten siehe Hintergrundinformationen. Oben: a) distaler [4Fe-4S]-Cluster mit Cys<sub>3</sub>-His-Ligation; b) medialer [3Fe-4S]-Cluster und c) proximaler [4Fe-4S]-Cluster der [NiFe]-H<sub>2</sub>ase aus DvMF.

das Spektrum durch die Beiträge dieser Clusters dominiert.<sup>[12b,13b]</sup> Die starken Banden reichen von Protein- und Cluster-Torsionsmoden unterhalb von 100 cm<sup>-1</sup> über Biege- und Gerüstmoden nahe 150 cm<sup>-1</sup> bis hin zu Fe-S-Valenzschwingungen zwischen 250 und ca. 400 cm<sup>-1</sup>. Die Banden bei höchster Frequenz mit signifikanter Intensität stammen von der oxidierten H<sub>2</sub>ase mit den Fe-S-Streckschwingungen bei 390 cm<sup>-1</sup>, an denen Cys-Liganden beteiligt sind, sowie bei 380 cm<sup>-1</sup> für Fe-S-Streckschwingungen der Sulfidbrücken.<sup>[13b]</sup> Schwache Moden einer S-C-C-Beugung mit einem kleinen Beitrag von Fe-S-Dehnungen können ferner zwischen 430 und 450 cm<sup>-1</sup> auftreten.<sup>[12b,13a]</sup>

Bei Reduktion des Proteins verschieben sich die Fe-S-Valenzbanden zu einer niedrigeren Frequenz (3 oder 6 %, je nachdem ob Schwerpunkt- oder Spitzen-Positionen eingesetzt werden). Eine ähnliche partielle Änderung ist im Bereich um 150 cm<sup>-1</sup> zu beobachten, der mit den Fe-S-Beugungsschwingungen zusammenhängt; der kleinere absolute Effekt ist jedoch schwieriger zu beobachten. Vergleichbare redoxbedingte Verschiebungen wurden für Ferredoxin (Fd) aus der Mutante D14C von *Pyrococcus furiosus* (*Pf*) beschrieben. Diese Verschiebungen sind im Einklang mit der Reduktion der Cluster von [4Fe-4S]<sup>2+</sup> zum [4Fe-4S]<sup>+</sup>-Redoxzustand in der reduzierten Probe.



**Abbildung 2.** PVDOS von  $^{57}\text{Fe}$ -NRVS für a) Fd aus D14C Pf (rot), reduziertes HiPIP aus Af (grün) und oxidiertes N<sub>2</sub>ase-Fe-Protein aus Av (blau); b) oxidierte H<sub>2</sub>ase (rot) im Vergleich zum gewichteten Betrag von reduziertem HiPIP plus oxidiertem Fd-[3Fe-4S] aus D14C-Pf (durchgehend gestrichelt); c) reduzierte H<sub>2</sub>ase (rot) im Vergleich zum gewichteten Betrag von reduziertem Fe-Protein plus reduziertem Fd aus D14C-Pf plus reduziertem Fd-[3Fe-4S] aus D14C-Pf (durchgehend gestrichelt). Probenpräparation und Einzelheiten zur spektralen Gewichtung sind in den Hintergrundinformationen beschrieben.

Zum Vergleich mit unserer [NiFe]-H<sub>2</sub>ase sind in Abbildung 2a die Spektren der [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Cluster von drei Referenzproteinen dargestellt: des Fe-Proteins der Nitrogenase aus *Azotobacter vinelandii* (*Av*), des Ferredoxins der *Pf*-Mutante D14C sowie des reduzierten high-potential Fe-Proteins (HiPIP) aus *Acidithiobacillus ferrooxidans* (*Af*). Diese Proteine enthalten alle den gleichen [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Cluster wie die oxidierte H<sub>2</sub>ase aus DvMF. Obwohl diese [4Fe-4S]-Cluster ähnliche NRVS-Bandenschwerpunkte aufweisen, bestehen Unterschiede in den relativen Peakintensitäten innerhalb der Banden zwischen den verschiedenen Proteinen. Einige dieser Unterschiede können Variationen in den Fe-S-C-C-Diederwinkeln zugeschrieben werden.<sup>[13b]</sup>

Ein Beispiel für diese Variation der relativen Bandenintensitäten und Positionen ist, dass im Bereich 330–400 cm<sup>-1</sup> diese drei Proteine zwar alle ein Maximum bei 383 cm<sup>-1</sup> haben. Allerdings hat Fd aus D14C-*Pf* im niedrigen Energiebereich eine starke Bande bei 355 cm<sup>-1</sup>, H<sub>2</sub>ase aus *Av* dagegen eine kleinere bei 350 cm<sup>-1</sup>, und HiPIP aus *Af* hat nur schwache Schultern (Abbildung 2a, durch farbige Pfeile gekennzeichnet). Die detaillierte Struktur des Spektrums hängt demnach empfindlich von der Konformation und Umgebung des jeweiligen Clusters ab. Bemerkenswert ist, dass das reduzierte HiPIP und der proximale und distale [4Fe-4S]-Cluster in der [NiFe]-H<sub>2</sub>ase eine oder mehrere Fe-S-Cys-Verknüpfungen mit Diederwinkeln nahe 0° oder 180° aufweisen, bei denen die kinematische Kopplung zwischen der Fe-S-Bewegung und der SCC-Seitenkettenbewegung am größten ist.<sup>[15]</sup>

Die Interpretation der NRVS-PV DOS wird durch die Anwesenheit eines „medialen“ [3Fe-4S]-Clusters (Abbildung 1b, S1) in der Elektronentransportkette von der H<sub>2</sub>ase erschwert. Zum Vergleich haben wir das Spektrum eines ähnlichen Clusters in einer modifizierten Form des Fd-Proteins aus *Pf* gemessen. In einer rein empirischen Analyse wurde die beste Übereinstimmung mit dem Spektrum der oxidierten H<sub>2</sub>ase durch eine Kombination des Spektrums des reduzierten HiPIP mit dem passenden Beitrag des [3Fe-4S]-Ferredoxins erzielt (Abbildung 2b). In ähnlicher Weise wurde das Spektrum der reduzierten H<sub>2</sub>ase-Probe simuliert, und zwar durch Kombination gleicher Wichtungen der Spektren des reduzierten Fd aus *Pf*D14C, des reduzierten Fe-Proteins und des reduzierten [3Fe-4S]-Ferredoxins (Abbildung 2c). Die Qualität dieser empirischen Simulation erlaubt die Schlussfolgerung, dass fast alle Banden unterhalb von 400 cm<sup>-1</sup> den 11 Fe-Zentren zuzuschreiben sind, die Teil der Fe-S-Cluster der Elektronentransportkette sind.

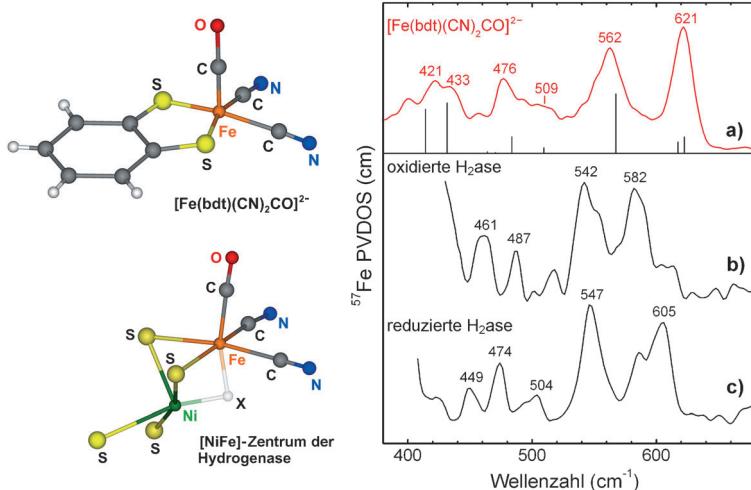
Aus chemischer Sicht stammt der interessanteste NRVS-Beitrag von dem speziellen Eisenatom (Low-Spin-Fe<sup>2+</sup>-Zustand)<sup>[4b]</sup> im aktiven Zentrum der [NiFe]-H<sub>2</sub>ase. Da es sich nur um ein einziges Fe handelt, sollte die Intensität der Signale seiner Fe-CO- und Fe-CN-Banden sehr klein sein im Vergleich zu den Banden der 11 Fe-Atome der Fe-S-Cluster. Raman-Daten<sup>[16]</sup> und auch NRVS des Myoglobin-CO (Mb-CO),<sup>[17]</sup> des LFe-CO-Modells<sup>[14b]</sup> und der [Fe]-H<sub>2</sub>ase<sup>[14a]</sup> zeigen, dass die Fe-CO- und Fe-CN-Banden im Bereich 400–650 cm<sup>-1</sup> auftreten, wo die Fe-S-Cluster vernachlässigbare NRVS-Intensitäten haben.

Eine Vergrößerung des Bereichs 400–650 cm<sup>-1</sup> (Abbildung 1 und 3) lässt Banden erkennen, deren Intensitäten und Frequenzen mit den Dehnungs- und Beugeschwingungen von Fe-CN und Fe-CO übereinstimmen. Das oxidierte Protein hat Banden mit Maxima bei 542 und 582 cm<sup>-1</sup>, die sich in der reduzierten Probe nach 547 und 605 cm<sup>-1</sup> verschieben. Frühere Arbeiten an Modellverbindungen und der [Fe]-H<sub>2</sub>ase<sup>[14a]</sup> sowie auch an Häm-CO-Derivaten<sup>[18]</sup> weisen diese Banden der Fe-CO-Dehnungsmodus bzw. der Fe-C-O-Beugungsmodus zu. Wie bereits häufig festgestellt,<sup>[14c]</sup> verschieben starke Fe-CO-Rückbindungen die Fe-CO-Beugeschwingungen (in diesem Fall bei 578 cm<sup>-1</sup>) zu höheren Frequenzen als die Fe-CO-Streckschwingungen<sup>[18]</sup> (in diesem Fall bei 512 cm<sup>-1</sup>). DFT-Rechnungen haben ferner gezeigt, dass die Beugeschwingung mit einer Kippschwingung mischt.<sup>[19]</sup>

Die kleinen Verschiebungen von  $\nu_{\text{FeCO}}$  zu höheren Frequenzen mit der Reduktion des Enzyms sind im Einklang mit der bekannten „inversen Korrelation“ zwischen  $\nu_{\text{FeC}}$  und  $\nu_{\text{CO}}$  in FeCO-Komplexen.<sup>[10,18,20]</sup> Spiro und Mitarbeiter fanden z.B. in Myoglobin-CO einen Anstieg des  $\nu_{\text{FeCO}}$  ca. um den Faktor 0.75 der Abnahme des  $\nu_{\text{CO}}$ .<sup>[18]</sup> Obwohl Mb-CO sicher kein gutes Strukturmodell für H<sub>2</sub>ase ist, nehmen wir eine ähnliche Änderung für die inverse Korrelation an. Wenn der größte Teil unserer „oxidierten“ Probe in der Ni-A-Form (mit  $\nu_{\text{CO}}$  bei 1956 cm<sup>-1</sup>) und die „reduzierte“ Probe überwiegend in der Ni-R1-Form (mit  $\nu_{\text{CO}}$  bei 1948 cm<sup>-1</sup>) vorliegt, dann wird mit dem im NRVS beobachteten Anstieg von  $\nu_{\text{FeCO}}$  um 5 cm<sup>-1</sup> die erwartete Größe und Richtung, verglichen mit der Abnahme von 8 cm<sup>-1</sup> in  $\nu_{\text{CO}}$ , erhalten. Im Augenblick sind unsere Möglichkeiten, diese Verschiebung weiter zu analysieren, durch mehrere Faktoren begrenzt, z.B. durch die experimentelle spektrale Auflösung der NRVS von ca. 8 cm<sup>-1</sup>, die Anwesenheit einiger Bandenaufspaltungen und die Heterogenität der Proben bezüglich der erzeugten Zustände.

Um die Interpretation unserer Daten zu stützen, haben wir NRVS-Spektren einer Modellverbindung aufgenommen, die eine Fe- Koordinationssphäre aufweist, die dem aktiven Zentrum der H<sub>2</sub>ase sehr ähnlich ist: (NEt<sub>4</sub>)<sub>2</sub>[<sup>57</sup>Fe-(bdt)(CN)<sub>2</sub>(CO)] (**1**)<sup>[21]</sup> (Abbildung 3, links oben); auch das Toluoldithiolat-Derivat von **1** wurde untersucht (siehe Hintergrundinformationen). Die Fe-CO-Streck- und die Fe-CO-Beugeschwingungen dieses Komplexes liegen bei 562 bzw. 621 cm<sup>-1</sup> (Abbildung 3, rechts, rotes Spektrum). Die Stärke der Fe-CO-Bindung spiegelt sich in den relativ hohen Fe-CO-Dehnungs- und Beugungsfrequenzen wider. Als Folge der Rückbindung in das CO-π\*-Orbital resultiert eine relativ niedrige  $\nu_{\text{CO}}$ -Dehnungsfrequenz von 1897 cm<sup>-1</sup>.<sup>[21]</sup> Zum Vergleich zeigt Mb-CO niedrigere Fe-CO-Frequenzen für Dehnung und Beugung bei 512 bzw. 578 cm<sup>-1</sup><sup>[19,22]</sup> und eine höhere Fe-CO-Streckschwingung bei 1945 cm<sup>-1</sup>.<sup>[23]</sup>

Für die Fe-CN-Schwingungsmoden in **1** könnte man vier Fe-CN-Moden erwarten (für in-phase und out-of-phase Fe-CN-Dehnungen und -Beugungen). In Abbildung 3a sind vier Banden bei 421, 433, 476 und 509 cm<sup>-1</sup> gekennzeichnet; aber es gibt auch andere mögliche Banden im Bereich von 400–530 cm<sup>-1</sup>. Die zusätzliche Komplexität könnte von der Kopplung mit dem Benzoldithiolat-Ring stammen, der ebenfalls Schwingungsmoden in diesem Bereich hat.<sup>[12b]</sup> Die Fe-CN-Moden sind deutlich komplizierter als die Fe-CO-



**Abbildung 3.** Links: Struktur des Modellkomplexes 1 und des aktiven Zentrums der  $[\text{NiFe}]\text{-H}_2\text{ase}$  aus DvMF. bdt = Benzoldithiolat. Rechts: Hochfrequenzbereich der  $^{57}\text{Fe}$ -PV DOS für a)  $(\text{NEt}_4)_2[^{57}\text{Fe}(\text{bdt})(\text{CN})_2(\text{CO})]$  (rot), b) oxidierte  $[\text{NiFe}]\text{-H}_2\text{ase}$  und c) reduzierte  $[\text{NiFe}]\text{-H}_2\text{ase}$  aus DvMF. Die  $\text{H}_2\text{ase}$ -Spektren unterscheiden sich leicht von denen in Abbildung 1, da die hier gezeigten Daten von Experimenten stammen, die für die Datensammlung im Hochfrequenzbereich stark gewichtet wurden.

Beugungs- und Dehnungsmoden. Der Literatur über Häm-CN ist zu entnehmen, dass die schwächere Rückkopplung im Fall von Fe-CN zu komplexeren Mustern der Modenanordnung und Modenmischung für Dehnungs- und Beugungsbewegungen von Fe-CN führt. Für lineare Fe-CN-Gruppen ist die Fe-CN-Beugungsfrequenz höher als die Fe-CN-Streckung, während für nichtlineare Fe-CN-Gruppen das Gegenteil gilt.<sup>[16b]</sup>

In der NRVS von DvMF-H<sub>2</sub>ase wurden einige Banden im Bereich 400–500 cm<sup>-1</sup> detektiert, wo Fe-CN-Moden erwartet werden. Für die oxidierte Probe konnten reproduzierbare charakteristische Signale bei 461 und 487 cm<sup>-1</sup>, im Spektrum der reduzierten Probe dagegen bei 449, 474 und 504 cm<sup>-1</sup> erhalten werden. Trotzdem sind möglicherweise zusätzliche Fe-CN-Moden an beiden Enden dieses Frequenzbereichs nicht aufgelöst. Am unteren Ende könnten mit Cystein-Seitenketten vermischt Fe-S-Moden ein schwaches NRVS-Signal erzeugen, während auf der Hochfrequenzseite Fe-CN-Moden verdeckt oder mit einer stärkeren Fe-CO-Schwingung gekoppelt sein könnten. Eine vollständige Zuordnung wird zukünftig von der Kombination aus besserer Auflösung, Isotopenmarkierung und DFT-Rechnungen erwartet.

Zusammenfassend haben wir die ersten NRVS-Messungen an  $[\text{NiFe}]\text{-H}_2\text{asen}$  beschrieben. Das Spektrum im Bereich 0–400 cm<sup>-1</sup> wird von den Beiträgen der 11 (von insgesamt 12) Fe-Zentren dominiert, die in den Fe-S-Clustern der Elektronentransportkette vorhanden sind. Dieser „Fe-S“-Cluster-Bereich der  $\text{H}_2\text{ase}$  ist vergleichbar mit dem Spektrum des reduzierten HiPIP-Modells. Der Vergleich mit dem Spektrum einer  $\text{H}_2\text{ase}$ -Modellverbindung zeigte, dass die Fe-CN- und Fe-CO-Moden des aktiven Zentrums der  $[\text{NiFe}]\text{-H}_2\text{ase}$  bei Frequenzen im Bereich 420–620 cm<sup>-1</sup> liegen sollten, also außerhalb des Bereichs der Fe-S-Cluster. Folglich haben wir die stärkeren  $\text{H}_2\text{ase}$ -Banden im Bereich 540–605 cm<sup>-1</sup> den Fe-CO-Dehnungs- und Fe-CO-Beugungsmoden und die schwä-

cheren Banden zwischen 450 und 505 cm<sup>-1</sup> den Fe-CN-Dehnungs- und -Beugungsmoden zugeordnet.

Eine der interessantesten zukünftigen Anwendungen von NRVS an Hydrogenasen könnte die Beobachtung von Fe-H/D-Normalschwingungen sein, deren Detektion und Analyse zur Charakterisierung der Brückengeometrie und der Art der Wasserstoffaktivierung beitragen könnte. Das Haupthindernis für solche chemisch hochinformativen Experimente ist der begrenzte Photonenfluss und die Auflösung bestehender Spektrometer. Allerdings sind Anlagen mit 5-fach<sup>[24]</sup> oder sogar 10-fach<sup>[25]</sup> höheren Flüssen bereits vorhanden, und in nicht so ferner Zukunft werden vier weitere Größenordnungen durch die Entwicklung von Freie-Elektronen-Lasern zur Verfügung stehen.<sup>[26]</sup> Diese Entwicklungen sollten es ermöglichen, bislang schwierige biologische NRVS-Experimente routinemäßig durchzuführen.

## Experimentelles

Die oxidierte  $^{57}\text{Fe}$ -markierte  $\text{H}_2\text{ase}$  enthielt gemäß FTIR- und EPR-Spektren überwiegend Ni-A, die  $\text{H}_2$ -reduzierte Probe eine Mischung aus Ni-C und Ni-R1 sowie etwas Ni-SIA. Die NRVS-Messungen wurden entweder am SPring-8 BL09XU oder an der Advanced Photon Source (APS), Beamline 3-ID, bei  $T=10\text{ K}$  (im Kryostaten) mit Monochromatoren mit ca. 1 meV Auflösung und einem  $1\text{ cm}^2$  APD-Detektor durchgeführt. Eine detaillierte Beschreibung der Protein- und Probenpräparation, der  $^{57}\text{Fe}$ -Markierung und Präparation des HiPIP aus *Acidithiobacillus ferrooxidans*, des Ferredoxin aus *Pyrococcus furiosus* (D14C-Mutante) und der Synthese der  $^{57}\text{Fe}$ -Modellverbindungen sowie Einzelheiten der Messungen und die weitere Analyse der Rohdaten finden sich in den Hintergrundinformationen.

Eingegangen am 13. Juni 2012,  
veränderte Fassung am 9. August 2012  
Online veröffentlicht am 8. November 2012

**Stichwörter:** FeS-Cluster · Hydrogenasen · NiFe-Zentrum · Schwingungsspektroskopie · Spektroskopische Methoden

- [1] a) M. W. W. Adams, E. I. Stiefel, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, 4, 214–220; b) P. M. Vignais, B. Billoud, J. Meyer, *FEMS Microbiol. Rev.* **2001**, 25, 455–501; c) F. A. Armstrong, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, 8, 133–140.
- [2] a) C. Tard, C. J. Pickett, *Chem. Rev.* **2009**, 109, 2245–2274; b) J. Y. Yang, M. Bullock, M. Rakowski DuBois, D. L. DuBois, *MRS Bull.* **2011**, 36, 39–47.
- [3] H. Ogata, W. Lubitz, Y. Higuchi, *Dalton Trans.* **2009**, 7577–7587.
- [4] a) J. C. Fontecilla-Camps, A. Volbeda, C. Cavazza, Y. Nicolet, *Chem. Rev.* **2007**, 107, 4273–4303; b) W. Lubitz, E. Reijerse, M. van Gastel, *Chem. Rev.* **2007**, 107, 4331–4365.
- [5] R. P. Happe, W. Roseboom, A. J. Pierik, S. P. J. Albracht, K. A. Bagley, *Nature* **1997**, 385, 126.
- [6] M.-E. Pandelia, H. Ogata, L. J. Currell, M. Flores, W. Lubitz, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2010**, 1797, 304–313.
- [7] T. Burgdorf, S. Löscher, P. Liebisch, E. Van der Linden, M. Galander, F. Lendzian, W. Meyer-Klaucke, S. P. J. Albracht, B. Friedrich, H. Dau, M. Haumann, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 576–592.

- [8] Y. Higuchi, F. Toujou, K. Tsukamoto, T. Yagi, *J. Inorg. Biochem.* **2000**, *80*, 205–211.
- [9] a) W. R. Scheidt, S. M. Durbin, J. T. Sage, *J. Inorg. Biochem.* **2005**, *99*, 60–71; b) T. Petrenko, W. Sturhahn, F. Neese, *Hyperfine Interact.* **2007**, *175*, 165–174; c) E. Alp, W. Sturhahn, T. S. Toellner, J. Zhao, M. Hu, D. E. Brown, *Hyperfine Interact.* **2002**, *144/145*, 3–20; d) W. Sturhahn, *J. Phys. Condens. Matter* **2004**, *16*, S497–S530.
- [10] K. Nakamoto, *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, 5th ed., Wiley-Interscience, New York, **1997**.
- [11] B. M. Leu, M. Z. Zgierski, G. R. A. Wyllie, W. R. Scheidt, W. Sturhahn, E. E. Alp, S. M. Durbin, J. T. Sage, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 4211–4227.
- [12] a) M. C. Smith, Y. Xiao, H. Wang, S. J. George, D. Coucovanic, M. Koutmos, W. Sturhahn, E. E. Alp, J. Zhao, S. P. Cramer, *Inorg. Chem.* **2005**, *44*, 5562–5570; b) Y. Xiao, M. Koutmos, D. A. Case, D. Coucovanic, H. Wang, S. P. Cramer, *Dalton Trans.* **2006**, 2192–2201.
- [13] a) Y. Xiao, H. Wang, S. J. George, M. C. Smith, M. W. W. Adams, J. Francis, E. Jenney, W. Sturhahn, E. E. Alp, J. Zhao, Y. Yoda, A. Dey, E. I. Solomon, S. P. Cramer, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 14596–14606; b) D. Mitra, V. Pelmenschikov, Y. Guo, D. A. Case, H. Wang, W. Dong, M.-L. Tan, T. Ichijo, J. Francis, E. Jenney, M. W. W. Adams, Y. Yoda, J. Zhao, S. P. Cramer, *Biochemistry* **2011**, *50*, 5220–5235.
- [14] a) Y. Guo, H. Wang, Y. Xiao, S. Vogt, R. K. Thauer, S. Shima, P. I. Volkers, T. B. Rauchfuss, V. Pelmenschikov, D. A. Case, E. Alp, W. Sturhahn, Y. Yoda, S. P. Cramer, *Inorg. Chem.* **2008**, *47*, 3969–3977; b) V. Pelmenschikov, Y. Guo, H. Wang, S. P. Cramer, D. A. Case, *Faraday Discuss.* **2011**, *148*, 409–420; c) B. M. Leu,
- N. J. Silvernail, M. Z. Zgierski, G. R. A. Wyllie, M. K. Ellison, W. R. Scheidt, J. Zhao, W. Sturhahn, E. E. Alp, J. T. Sage, *Bioophys. J.* **2007**, *92*, 3764–3783.
- [15] R. S. Czernuszewicz, L. K. Kilpatrick, S. A. Koch, T. G. Spiro, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 1134–1141.
- [16] a) A. Boffi, E. Chiancone, S. Takahashi, D. L. Rousseau, *Biochemistry* **1997**, *36*, 4505–4509; b) Y. Kim, G. T. Babcock, K. K. Sureris, J. A. Fee, R. B. Dyer, W. H. Woodruff, W. A. Oertling, *Biospectroscopy* **1998**, *4*, 1–15.
- [17] J. T. Sage, S. M. Durbin, W. Sturhahn, D. C. Wharton, P. M. Champion, P. Hession, J. Sutter, E. E. Alp, *Phys. Rev. Lett.* **2001**, *86*, 4966–4969.
- [18] T. G. Spiro, I. H. Wasbotten, *J. Inorg. Biochem.* **2005**, *99*, 34–44.
- [19] A. Ghosh, D. F. Bocian, *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 6363–6367.
- [20] a) X. Y. Li, T. G. Spiro, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 6024–6033; b) J. D. Müller, B. H. McMahon, E. Y. T. Chien, S. G. Sligar, G. U. Nienhaus, *Biophys. J.* **1999**, *77*, 1036–1051; c) M. G. I. Galinato, C. M. Whaley, N. Lehnert, *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 3201–3215.
- [21] T. B. Rauchfuss, S. M. Contakes, S. C. N. Hsu, M. A. Reynolds, S. R. Wilson, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6933–6934.
- [22] S. Hu, K. M. Vogel, T. G. Spiro, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 11187–11188.
- [23] T. S. Li, M. L. Quillin, G. N. Phillips, J. S. Olson, *Biochemistry* **1994**, *33*, 1433–1446.
- [24] T. Hara, M. Yabashi, T. Tanaka, T. Bizen, S. Goto, X. M. Maréchal, T. Seike, K. Tamasaku, T. Ishikawa, H. Kitamura, *Rev. Sci. Instrum.* **2002**, *73*, 1125–1128.
- [25] A. Q. R. Baron, *SPring-8 Info. News.* **2010**, *15*, 14–19.
- [26] G. Geloni, V. Kocharyan, E. Saldin, DESY, 10-108, **2010**.