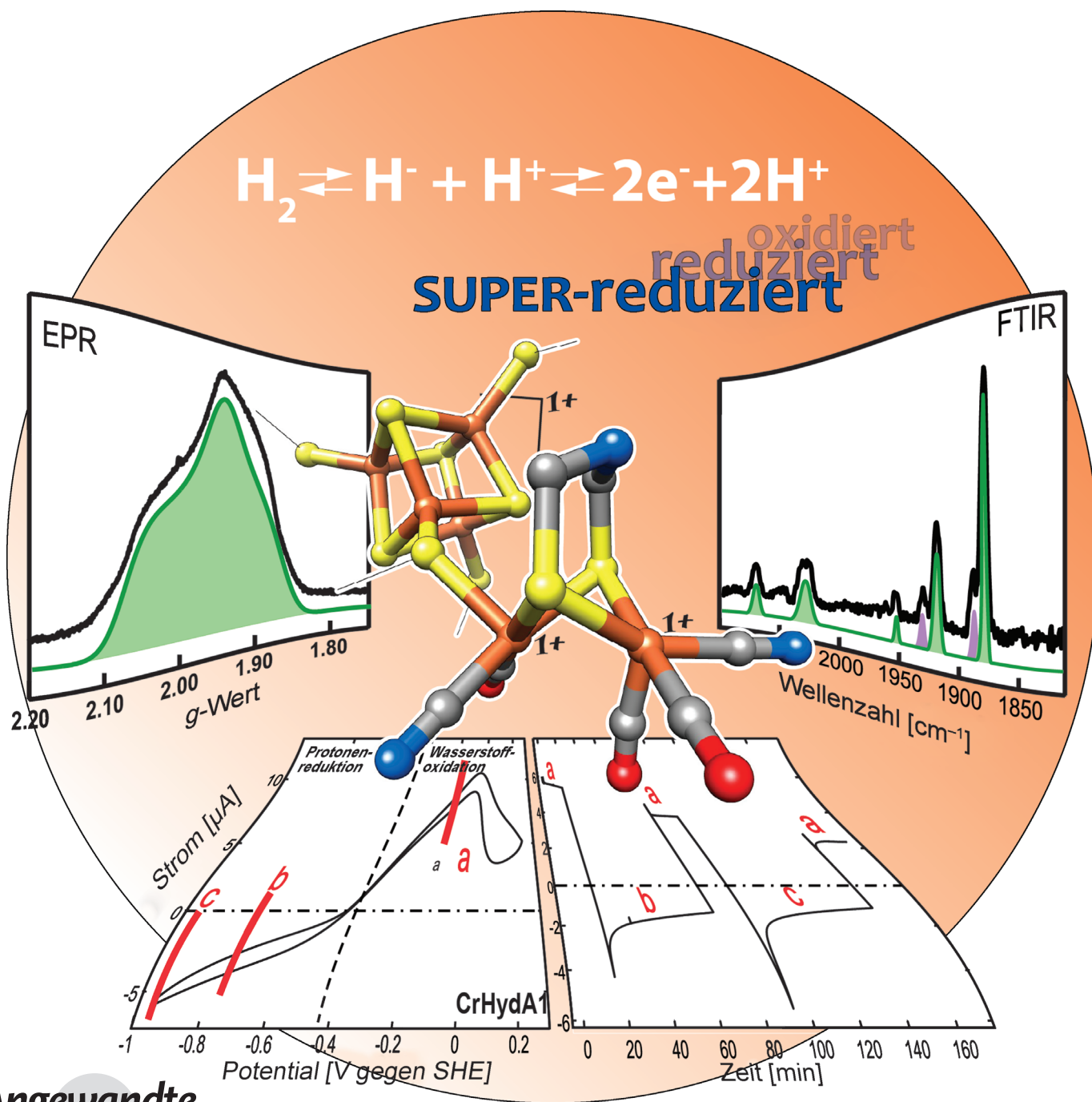


Identifizierung und Charakterisierung des „super-reduzierten“ Zustands des H-Clusters von [FeFe]-Hydrogenasen: ein neuer Baustein im katalytischen Zyklus?*

Agnieszka Adamska, Alexey Silakov,* Camilla Lambertz, Olaf Rüdiger, Thomas Happe, Edward Reijerse* und Wolfgang Lubitz*



Hydrogenasen katalysieren in einer einfachen, reversiblen Reaktion die Bildung von molekularem Wasserstoff aus Protonen und Elektronen. Basierend auf dem Metallgehalt des aktiven Zentrums werden die Hydrogenasen in drei Gruppen eingeteilt: [NiFe]-, [FeFe]- und [Fe]-Hydrogenasen.^[1,2] Hinsichtlich der Herstellung und Verwertung von H₂ als erneuerbarer Energieträger sind Hydrogenasen von großem biotechnologischem Interesse.^[1,3] Vor allem die [FeFe]-Hydrogenase weist eine sehr effiziente Wasserstoffproduktion auf, weshalb die genaue Analyse des katalytischen Mechanismus dieser Hydrogenase von besonderem Interesse für die Entwicklung künstlicher Systeme zur Wasserstoffproduktion ist.^[4,5]

Das aktive Zentrum der [FeFe]-Hydrogenase wird als H-Cluster bezeichnet (Abbildung 1) und besteht aus einem Zwei-Eisen-Cluster [2Fe], der kovalent über eine Cystein-

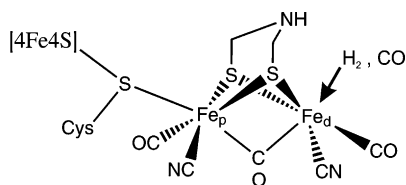


Abbildung 1. Struktur des aktiven Zentrums (H-Cluster) der [FeFe]-Hydrogenasen. Der Pfeil zeigt die freie Koordinationsstelle am distalen Eisenatom (Fe_d) an.

brücke an einen kubischen [4Fe₄S]-Cluster gebunden ist.^[1,6–8] Im [2Fe]-Subcluster werden beide Eisenatome durch CO- und CN-Liganden koordiniert, welche die Eisenatome auf niedriger Oxidationsstufe und im Low-Spin-Zustand halten.^[8–11] Die beiden Eisenatome des [2Fe]-Subclusters sind über eine Azadithiolatbrücke (adt, (SCH₂)₂NH) miteinander verbunden.^[8,12] Mit hoher Wahrscheinlichkeit stellt die freie Koordinationsstelle am distalen Eisenatom (Fe_d) (relativ zum [4Fe₄S]-Cluster) die Bindestelle des H₂ dar (Abbildung 1).^[1,13] Außerdem wird angenommen, dass die adt-Amingruppe, die perfekt zur freien Koordinationsstelle hin ausgerichtet ist, am Protonentransfer zwischen der Enzymoberfläche und dem aktivem Zentrum beteiligt ist.^[8,12]

Bisher sind zwei Redoxzustände identifiziert worden, von denen eine direkte Beteiligung am katalytischen Zyklus angenommen wird: der aktive „oxidierte“ Zustand H_{ox}, der paramagnetisch ist und durch einen gemischtvalenten Zustand im [2Fe]-Cluster (Fe^IFe^{II}) charakterisiert ist, und der aktive „reduzierte“ Zustand H_{red}, der eine (Fe^IFe^I)-Konfiguration annimmt.^[1]

Beide aktiven Formen können durch Kohlenmonoxid (CO) gehemmt werden, was zu dem oxidierten Zustand H_{ox}-CO führt.^[1,6,9] In diesem Zustand liegt der [4Fe₄S]-Subcluster in oxidiert Form (+2) vor und ist formal diamagnetisch (S_{4Fe4S}=0).^[14,15] Der Redoxübergang von H_{ox} zu H_{red} erfolgt bei einem Redoxpotential von –400 mV (pH 8.0) was am Beispiel der [FeFe]-Hydrogenase von *Desulfovibrio desulfuricans* (DdH) mittels FTIR-Spektroelektrochemie gezeigt werden konnte.^[11] In derselben Studie wurde ein nachfolgender irreversibler Reduktionsschritt bei E_m = –540 mV zum sogenannten „super-reduzierten Zustand“ H_{sred} nachgewiesen. Eine analoge Studie an der [FeFe]-Hydrogenase aus *Chlamydomonas reinhardtii* (CrHydA1) bestätigt dieselben Redoxübergänge,^[16] mit dem Unterschied, dass der H_{sred}-Zustand für CrHydA1 bei einem deutlich positiveren Potential E_m = –460 mV (pH 8.0) eingenommen wird und dieser Übergang von H_{red} zu H_{sred} reversibel ist.^[16] Die Redoxpotentiale von H_{red} und H_{sred} in CrHydA1 liegen nahe an dem des (isolierten) nativen Redoxpartners PetF (–400 mV bei pH 7.0).^[17] Außerdem wurde gezeigt, dass das Redoxpotential von PetF durch Interaktion mit seinen Redoxpartnern wie z. B. der Ferredoxin-NADP⁺-Reduktase (FNR) deutlich gesenkt wird.^[18] Folglich könnte CrHydA1 H_{sred} einen stabilen Zwischenzustand repräsentieren, in dem das Enzym verweilen kann, ähnlich wie es für H_{ox} und H_{red} der Fall ist. Es gibt zwei Möglichkeiten für die Verteilung der Elektronen im H-Cluster im H_{sred}-Zustand: Entweder ist der [2Fe]-Subcluster zu [Fe⁰Fe^I] reduziert oder der [4Fe₄S]-Subcluster zu [4Fe₄S]⁺. Ähnlich wie für H_{ox} wird für H_{sred} ein paramagnetischer Zustand (S = 1/2) angenommen.

In dieser Arbeit wird der H_{sred}-Zustand von CrHydA1 spektroskopisch mittels EPR- und FTIR-Techniken identifiziert und im Detail charakterisiert. Um die mögliche katalytische Rolle des H_{sred}-Zustandes zu verifizieren, wurden neben CrHydA1 auch die [FeFe]-Hydrogenasen DdH aus *Desulfovibrio desulfuricans* und CaHydA aus *Clostridium acetobutylicum* mittels Proteinfilmelektrochemie (PFE) untersucht.

CrHydA1, das in *C. acetobutylicum* heterolog überexprimiert wurde, wurde unterschiedlichen Reduktions- und Oxidationsmitteln ausgesetzt. Abbildung 2 zeigt eine Auswahl entsprechender FTIR- und FID-detektierter (Q-Band) EPR-Spektren für jede Probe ausgehend von oxidativen bis zu reduzierenden Bedingungen. Die charakteristischen IR-Banden und g-Faktoren für die verschiedenen Zustände des H-Clusters sind oberhalb der Spektren angegeben. Die FTIR-Frequenzen wurden der Literatur entnommen^[16] und sind in Abbildung S1 der Hintergrundinformationen ausführlich dargestellt. Man kann eindeutig sehen, dass die mit Natriumthionit (NaDT) im Elutionspuffer isolierte Proteinprobe aus einer Mischung der Zustände H_{ox}, H_{red} und H_{sred} besteht. Wird eine solche Probe mit H₂ begast oder mit zusätzlichem

[*] A. Adamska, Dr. A. Silakov, Dr. O. Rüdiger, Dr. E. Reijerse, Prof. W. Lubitz
Max-Planck-Institut für Chemische Energiekonversion
Stiftstraße 34–36, 45470 Mülheim an der Ruhr (Deutschland)
E-Mail: aus40@psu.edu
edward.reijerse@cec.mpg.de
wolfgang.lubitz@cec.mpg.de

Dr. C. Lambert, Prof. T. Happe
Lehrstuhl Biochemie der Pflanzen, AG Photobiotechnologie
Ruhr Universität Bochum
Universitätsstraße 150, 44801 Bochum (Deutschland)

[**] Herzlichen Dank an Gudrun Klihm und Leslie Currell für die Unterstützung bei den EPR- und FTIR-Experimenten. Für die finanzielle Unterstützung danken wird der Max-Planck-Gesellschaft und der EU (FP7 Energy 212508 „SOLAR H2“)

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201204800> zu finden.

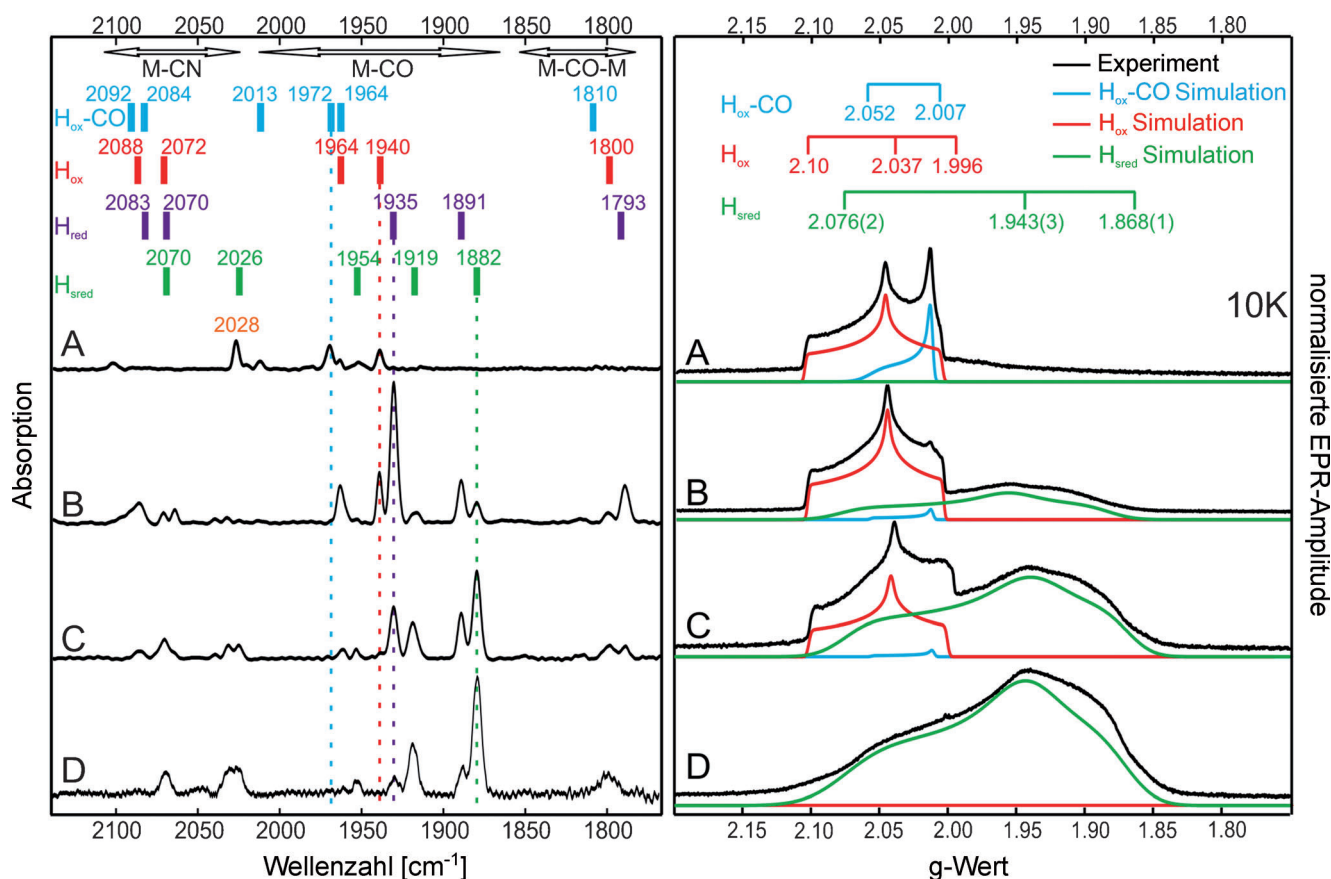


Abbildung 2. Links: FTIR-Spektren, normalisiert auf eine Enzymkonzentration von 500 μM , aufgenommen bei 100 K. Rechts: Normalisierte FID-detektierte (Q-Band) EPR-Spektren, gemessen bei 10 K. Proben: A) 700 μM CrHydA1 und 1.5 mM Thionin; B) 700 μM CrHydA1; C) 700 μM CrHydA1 und 12 mM Natriumdithionit (NaDT); D) 280 μM CrHydA1 mit 1 bar H_2 begast. Alle Proben enthielten ursprünglich 2 mM NaDT, um einer Schädigung des Proteins durch Sauerstoff vorzubeugen. Oberhalb der Spektren sind die Wellenzahlen bzw. g-Faktoren der FTIR- und EPR-Signale sämtlicher untersuchter Redoxzustände angegeben. Weitere Details zur Probenvorbereitung sind in den Hintergrundinformationen zu finden.

NaDT versetzt, so kommt es zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes in Richtung der reduzierten Spezies, während die Zugabe von Thionin die Bildung von oxidierten Spezies zur Folge hat.^[19]

Das EPR-Spektrum in Abbildung 2 zeigt eine deutliche Zunahme im Bereich der niedrigeren g-Faktoren (2.076 ± 0.002 , 1.943 ± 0.003 , 1.868 ± 0.001) in den reduzierten Proben. Die spektralen Parameter dieser Form ähneln den Signalen von typischen reduzierten $[\text{4Fe4S}]$ -Clustern.^[20] Der Anteil von H_{ox} und $\text{H}_{\text{ox-CO}}$ in jedem EPR-Spektrum wurde ebenfalls mithilfe von Simulationen der Spektren ermittelt und ist in Abbildung 2 gezeigt. Wie man deutlich anhand des Vergleichs der EPR- und FTIR-Daten sehen kann, deckt sich der Anstieg der $[\text{4Fe4S}]$ -ähnlichen EPR-Signale mit dem Erscheinen der H_{sred} -Signale in den FTIR-Messungen. Daher ordnen wir die EPR-Signale dem H_{sred} -Zustand zu, dem somit eher eine $[\text{Fe}^{\text{I}}\text{Fe}^{\text{I}}][\text{4Fe4S}]^+$ -Konfiguration als eine $[\text{Fe}^{\text{I}}\text{Fe}^{\text{0}}][\text{4Fe4S}]^{2+}$ -Konfiguration zugewiesen werden kann. Gemäß der FTIR- und EPR-Spektren enthalten die meisten Präparationen eine Mischung aus allen drei Zuständen, H_{ox} , H_{red} und auch H_{sred} . Unsere Experimente zeigen, dass sogar Proben, die überwiegend im H_{sred} -Zustand vorliegen, mit Thionin vollständig oxidiert werden können. Alle Redoxzu-

stände scheinen somit miteinander im Gleichgewicht zu stehen. Wichtig ist zudem, dass alle Proben, auch jene mit einem hohen Anteil an H_{sred} , eine hohe Hydrogenaseaktivität (ca. 560 nmol H_2 pro Minute und μg Protein) zeigen, was den Schluss zulässt, dass es sich bei H_{sred} um einen aktiven Zustand handelt.

Um die katalytische Aktivität des Enzyms in einem Potentialbereich zu bestätigen, der niedrig genug ist, um eine quantitative Bildung des H_{sred} -Zustandes zu induzieren, wurden proteinfilmelektrochemische (PFE-)Untersuchungen durchgeführt. Hierbei wurde CrHydA1 auf einer rotierenden Kohlenstoffelektrode adsorbiert.^[21] Zum Vergleich wurden parallel entsprechende elektrochemische Untersuchungen mit den Hydrogenasen DdH und CaHydA durchgeführt, die jedoch im Gegensatz zu CrHyA1 kovalent an die (rotierende) Elektrode gebunden wurden (Details im Methodenteil und in den Hintergrundinformationen). Die Zyklovoltammogramme der drei untersuchten Enzyme (Abbildung 3, oben) zeigen, dass die Aktivität der H^+ -Reduktion bei negativem Potential ansteigt und dass zudem auch im sehr niedrigen Potentialbereich keine Inaktivierung zu beobachten ist. Die Dauer und Stabilität des katalytischen Stroms wurde mit Chronoamperometrie verifiziert (Abbildung 3, unten). Bei

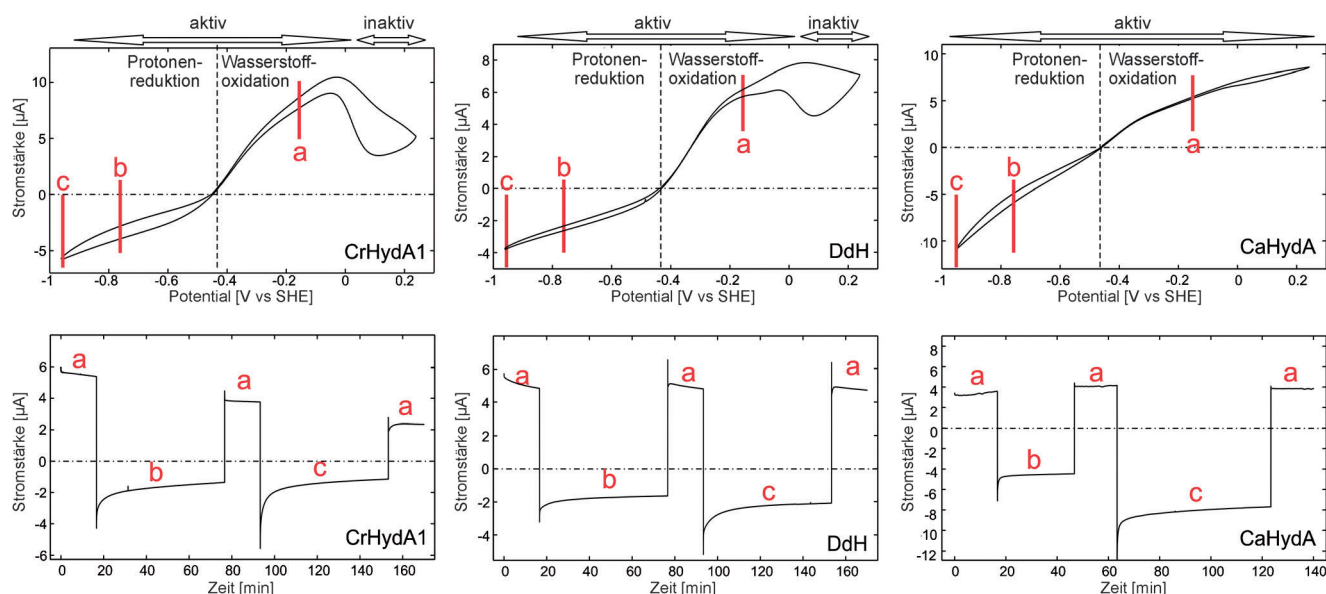


Abbildung 3. Von links nach rechts: Zyklovoltammogramm (oben) und chronoamperometrische Experimente (unten) von an eine pyrolytische Graphitelektrode (PGE) adsorbierter CrHydA1 und kovalent gebundener DdH und CaHydA. Die senkrechten Markierungen und Buchstaben in den Zyklovoltammogrammen geben die in den chronoamperometrischen Messungen verwendeten Potentiale an (a = –209 mV, b = –759 mV, c = –959 mV). Die Experimente wurden bei pH 7.0 und 10 °C bei 1 bar H_2 und einer Elektrodenrotationsgeschwindigkeit von 2500 rpm durchgeführt.

diesen Experimenten wird das Potential zunächst bei einem Referenzwert von –209 mV konstant gehalten, bei dem die anaerobe Oxidation nicht dominiert und ein stabiler H_2 -Oxidationsstrom messbar ist. Anschließend wurden nacheinander für jeweils eine Stunde zwei negative Potentiale (–960 und –760 mV) angelegt. Während für DdH und CaHydA ein anhaltender negativer katalytischer Strom an beiden Potentialen gezeigt werden konnte, nimmt der Strom für CrHydA1 ab, was auf eine Ablösung des Proteinfilms zurückgeführt wird, die vermutlich auf der vergleichsweise schwächeren nicht-kovalenten Enzymimmobilisierung beruht. Wie oben gezeigt werden konnte, wird durch den Einsatz von Reduktionsmitteln die Bildung von H_{sred} begünstigt. Wäre dieser Zustand eine Sackgasse, so müsste es zu einer H_{sred} -Akkumulation kommen, was zu einer merklichen Abnahme des katalytischen Stroms beim Anlegen von niedrigen Potentialen führen müsste. Da dies eindeutig nicht der Fall ist, sollte H_{sred} Teil des katalytischen Zyklus sein.

Der H_{sred} -Zustand scheint in [FeFe]-Hydrogenasen der Grünalge stabiler zu sein als für DdH. Dies könnte mit dem Fehlen der akzessorischen [4Fe4S]-Cluster (der sogenannten „F-Cluster“) in den Grünalgenhydrogenasen zusammenhängen. Es ist möglich, dass sich das Redoxpotential des H_{sred}/H_{red} -Übergangs in Abhängigkeit von weiteren F-Clustern ändert, was durch den sogenannten Redox-Kooperativitätseffekt zu begründen wäre, der üblicherweise in Systemen mit mehreren Redoxzentren beobachtet wird.^[22] In prokaryotischen [FeFe]-Hydrogenasen tritt H_{sred} anscheinend nur als transiente Spezies auf, da der kubische Teil während des Reaktionszyklus direkt durch die FeS-Cluster reoxidiert wird, was zum H_{red} -Zustand führt. In diesen Enzymen stellt daher der H_{red} -Zustand bei geringen Potentialen einen stabilen Zwischenzustand dar, während in den kompakten Enzymen

der Grünalgen (die keine F-Cluster besitzen) H_{sred} als Verweilzustand akkumuliert.

Im Weiteren soll auf die mögliche Rolle des H_{sred} -Zustandes im katalytischen Ablauf eingegangen werden. Am H-Cluster von CrHydA1 wird der Umsatz von zwei Protonen und zwei Elektronen ohne akzessorische [4Fe4S]-Cluster katalysiert. Der Zyklus der H_2 -Oxidation, der vermutlich von H_{ox} (als „Substrataufnahmestadium“) ausgeht, führt nach Produktabgabe zu einem Zustand, in dem zwei Elektronen (Reduktionsäquivalente) auf dem H-Cluster zurückbleiben. Da eine stabile Fe^0Fe^I -Konfiguration noch nie beobachtet werden konnte, stellt der H_{sred} -Zustand den wahrscheinlichsten Kandidaten für so einen Austrittszustand dar. Es ist somit nicht überraschend, dass besonders große Mengen an H_{sred} unter H_2 -Atmosphäre in CrHydA1 gebildet werden, wenn keine Redoxpartner (Elektronenakzeptoren) im Puffer vorhanden sind. H_{sred} wird aber auch unter reduktiven Bedingungen ohne H_2 gebildet. In vitro können dabei hohe Turn-over-Aktivitäten (H_2 -Produktion) gemessen werden. Die hier aufgeführten PFE-Experimente zeigen ebenfalls eine hohe katalytische Aktivität bei negativen Potentialen, bei denen H_{sred} nachgewiesen werden konnte. Es scheint daher sehr wahrscheinlich, dass der H_{sred} -Zustand am katalytischen Ablauf teilnimmt. Da die Struktur des H-Clusters in allen [FeFe]-Hydrogenasen stark konserviert ist und das gleiche Verhalten bei negativen Potentialen für CrHydA1, DdH und CaHydA in den PFE-Experimenten gezeigt werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass der katalytische Mechanismus ebenso konserviert ist. Daher schlagen wir den H_{sred} -Zustand als Ausgangsform für die Protonenreduktion im Reaktionszyklus aller [FeFe]-Hydrogenasen vor.

In Abbildung 4 ist der Reaktionszyklus unter Berücksichtigung des H_{sred} -Zustandes dargestellt. Wenn auch einige

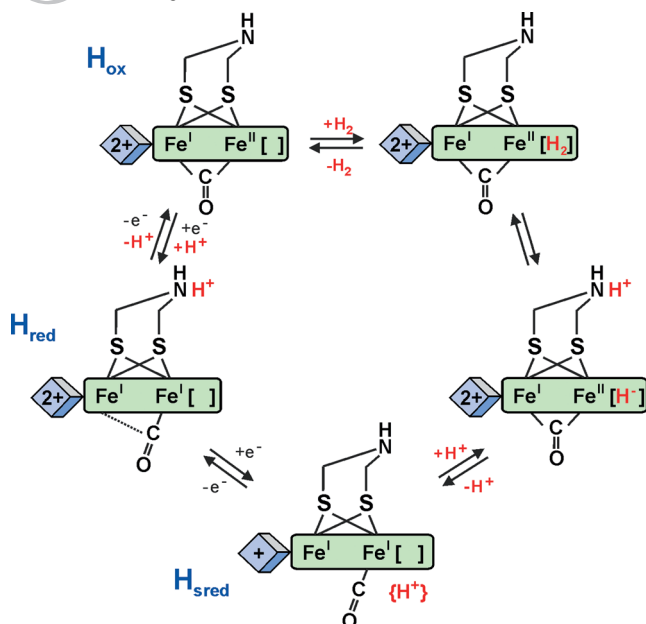


Abbildung 4. Postulierter katalytischer Zyklus der [FeFe]-Hydrogenasen unter Einbeziehung des H_{sred} -Zustandes. Das Proton $\{H^+\}$ bei H_{sred} ist vermutlich mit dem H-Cluster assoziiert und an einem nahegelegenen Aminosäurerest gebunden.

Punkte immer noch spekulativ sind, wurden die meisten Intermediate dieses Schemas bereits in früheren Arbeiten postuliert; vor allem die Hydrid-Form von H_{sred} wurde schon in der Literatur^[10] diskutiert. Einige Fragen bleiben dennoch offen: In unserem Reaktionsschema wird postuliert, dass H_{sred} als aktive Form mit dem gebundenen Proton reagiert und ein (terminales) Hydrid bildet, das wiederum mit dem Proton am adt-Amin reagiert und umgehend molekularen Wasserstoff bildet. Es ist unklar, zu welchem Zeitpunkt das Proton, das zum Hydrid umgesetzt wird, am H-Cluster bindet. Interessanterweise sind alle protonierten oder nicht protonierten Varianten der H_{sred} -Form, die sich aus DFT-Rechnungen ergeben, durch einen reduzierten $[4Fe_4S]$ -Cluster charakterisiert.^[23] Laut dieser DFT-Ergebnisse löst erst die zweite Protonierung (innerhalb der adt-Brücke) den Elektronentransfer vom $[4Fe_4S]_{II}$ -Cluster zum $[2Fe]$ -Subcluster aus und somit die Bildung des Hydrids am $[2Fe]$ -Subcluster mit gemischtem Valenzzustand.^[24,25] Wie jedoch das erste Proton am H-Cluster im reduzierten Zustand (H_{red} und/oder H_{sred}) stabilisiert wird, ist immer noch unklar. Experimentelle Beweise für die Existenz von Hydriden in H_{sred} und/oder H_{red} sowie detaillierte QM-Rechnungen zum Reaktionsmechanismus inklusive der Rolle des kubischen Subclusters könnten zur Klärung dieser Fragen beisteuern.

Zusammenfassend konnte hier durch die Kombination von elektrochemischen, FTIR- und EPR-Messungen an CrHydA1 der super-reduzierte Zustand H_{sred} als paramagnetisch und katalytisch aktiv identifiziert werden. Daher schlagen wir vor, dass H_{sred} als Intermediat in der Katalyse von allen [FeFe]-Hydrogenasen auftritt, der aber nur in den Algenenzymen als stabiler Verweilzustand („resting state“) existiert. In den bakteriellen Enzymen wird H_{sred} umgehend zu H_{red} reoxidiert, was auf die zusätzlichen FeS-Cluster in diesen Proteinen zurückzuführen sein könnte. Der Reakti-

onszyklus der prokaryotischen und eukaryotischen Enzyme wäre somit identisch, aber aufgrund der An- oder Abwesenheit weiterer F-Cluster sind verschiedene Verweilzustände bei niedrigen Potentialen stabil.

H_{sred} als Baustein des katalytischen Zyklus zu postulieren, ist naheliegend, da es die heterolytische Spaltung von an H_{ox} gebundenem H_2 ohne die Hilfe eines weiteren Elektronentransfers ermöglicht.^[10] Außerdem würde dies erklären, warum der kubische Subcluster einen essentiellen Teil des aktiven Zentrums von [FeFe]-Hydrogenasen darstellt, während so ein redoxaktiver „Ligand“ in [NiFe]-Hydrogenasen nicht notwendig ist.

Experimentelles

CrHydA1 wurde, wie bereits beschrieben, aus *Clostridium acetobutylicum* überexprimiert und aufgereinigt.^[26,27] Alle Schritte der Probenherstellung inklusive der Behandlung mit Thionin und die Begasung mit H_2 wurden unter strikt anaeroben Bedingungen in einem Anaerobzelt (Stickstoffatmosphäre mit 1.5–2% H_2) durchgeführt. Die FTIR-Messungen wurden an einem BRUKER IFS 66 v/s FTIR-Spektrometer mit einem Bruker-MCT-Detektor durchgeführt. Für die Aufnahme der Q-Band-EPR-Spektren wurde die FID-detektierte EPR mit einem 1 μ s Mikrowellenpuls verwendet. Alle Pulsexperimente wurden an einem Bruker ELEXSYS E580 Q-band-Spektrometer mit einer SuperQ-FT-Mikrowellenbrücke und einem selbstgebauten Resonator durchgeführt.^[28] Die Ergebnisse der Proteinfilm elektrochemie (PFE) wurden ebenfalls in einem Anaerobzelt (MBraun) unter Verwendung eines gasdichten, rotierenden Aufbaus mit drei Elektroden erzielt. Die Experimente wurden von einem VersaStat-4-Potentiostat (Princeton Applied Research) angesteuert. Detailliertere experimentelle Vorgehensweisen sind in den Hintergrundinformationen zu finden.

Eingegangen am 19. Juni 2012,
veränderte Fassung am 6. August 2012
Online veröffentlicht am 26. Oktober 2012

Stichwörter: Biowasserstoff · Elektronenspinresonanz · FTIR-Spektroskopie · Hydrogenase · Proteinfilm elektrochemie

- [1] W. Lubitz, E. Reijerse, M. van Gastel, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4331–4365.
- [2] P. M. Vignais, B. Billoud, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4206–4272.
- [3] R. Cammack, *Hydrogen as a fuel: learning from nature* (Hrsg.: R. Cammack, M. Frey, R. Robson), Taylor & Francis, London, **2001**.
- [4] S. T. Stripp, T. Happe, *Dalton Trans.* **2009**, 9960–9969.
- [5] E. C. Hatchikian, N. Forget, V. M. Fernandez, R. Williams, R. Cammack, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *209*, 357–365.
- [6] B. J. Lemon, J. W. Peters, *Biochemistry* **1999**, *38*, 12969–12973.
- [7] A. S. Pandey, T. V. Harris, L. J. Giles, J. W. Peters, R. K. Szilagy, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 4533–4540.
- [8] Y. Nicolet, A. L. De Lacey, X. Vernede, V. M. Fernandez, E. C. Hatchikian, J. C. Fontecilla-Camps, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 1596–1601.
- [9] A. J. Pierik, M. Hulstein, W. R. Hagen, S. P. Albracht, *Eur. J. Biochem.* **1998**, *258*, 572–578.
- [10] J. C. Fontecilla-Camps, A. Volbeda, C. Cavazza, Y. Nicolet, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4273–4303.
- [11] W. Roseboom, A. L. De Lacey, V. M. Fernandez, E. C. Hatchikian, S. P. Albracht, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2006**, *11*, 102–118.

- [12] A. Silakov, B. Wenk, E. Reijerse, W. Lubitz, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 6592–6599.
- [13] P. E. Siegbahn, J. W. Tye, M. B. Hall, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4414–4435.
- [14] A. S. Pereira, P. Tavares, I. Moura, J. J. Moura, B. H. Huynh, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2771–2782.
- [15] C. V. Popescu, E. Münck, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 7877–7884.
- [16] A. Silakov, C. Kamp, E. Reijerse, T. Happe, W. Lubitz, *Biochemistry* **2009**, *48*, 7780–7786.
- [17] A. M. Terauchi, S. F. Lu, M. Zaffagnini, S. Tappa, M. Hirasawa, J. N. Tripathy, D. B. Knaff, P. J. Farmer, S. D. Lemaire, T. Hase, S. S. Merchant, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 25867–25878.
- [18] C. J. Batie, H. Kamin, *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 7756–7763.
- [19] In den FTIR-Messungen der oxidierten Proben taucht bei 2028 cm⁻¹ ein zusätzliches Signal auf, das keinem bekannten Zustand des H-Clusters zugeordnet werden kann. Geht man davon aus, dass dieses Signal einer CO-Schwingung entspricht, so würde die Verschiebung zu höheren Frequenzen vermuten lassen, dass der entsprechende Ligand mit einer stark oxidierten Eisenspezies assoziiert ist. Es könnte sich um ein Abbauprodukt des H-Clusters oder, alternativ, um eine inaktive Form des H-Clusters handeln, wie es bei den proteinfilm-elektrochemischen Analysen bei sehr hohen Potentialen zu sehen war.^[17] Außerdem sollte erwähnt werden, dass aufgrund des inneren Saphirfensters des Heliumkryostaten Messungen unterhalb von 1850 cm⁻¹ stark abgeschwächt und durch instrumentelle Artefakte beeinflusst sind. Die Position und Intensität der verbrückenden CO-Signale (bei ca. 1800 cm⁻¹) sind daher weniger zuverlässig als die anderen FTIR-Signale. Vor allem das Auftreten des Signals des verbrückenden CO in stark reduzierten Proben und das Fehlen dieses Signals in stark oxidierten Proben sind auf diese instrumentellen Probleme zurückzuführen.
- [20] B. Guigliarelli, P. Bertrand, *Adv. Inorg. Chem.* **1999**, *47*, 421–497.
- [21] Die kovalente Anbindung von CrHydA1 führte *nicht* zu einem elektrischen Kontakt zwischen der Elektrode und dem H-Cluster.
- [22] I. A. C. Pereira, A. V. Xavier in *Encyclopedia of Inorganic Chemistry*, Vol. 5, 2nd ed. (Hrsg.: R. B. King), Wiley, New York, **2005**, S. 3360–3376.
- [23] L. Yu, C. Greco, M. Bruschi, U. Ryde, L. De Gioia, M. Reiher, *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 3888–3900.
- [24] M. Bruschi, C. Greco, M. Kaukonen, P. Fantucci, U. Ryde, L. De Gioia, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 3555–3558; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 3503–3506.
- [25] C. Greco, L. De Gioia, *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 6987–6995.
- [26] S. Stripp, O. Sanganas, T. Happe, M. Haumann, *Biochemistry* **2009**, *48*, 5042–5049.
- [27] G. von Abendroth, S. Stripp, A. Silakov, C. Croux, P. Soucaille, L. Girbal, T. Happe, *Int. J. Hydrogen Energy* **2008**, *33*, 6076–6081.
- [28] E. Reijerse, F. Lendzian, R. Isaacson, W. Lubitz, *J. Magn. Reson.* **2012**, *214*, 237–243.