



Resonanz-Raman-Spektroskopie als Methode zur Untersuchung des aktiven Zentrums von Hydrogenasen**

Elisabeth Siebert, Marius Horch,* Yvonne Rippers, Johannes Fritsch, Stefan Frielingsdorf, Oliver Lenz, Francisco Velazquez Escobar, Friedrich Siebert, Lars Paasche, Uwe Kuhlmann, Friedhelm Lendzian, Maria-Andrea Mroginski, Ingo Zebger* und Peter Hildebrandt*

In memoriam Gernot Renger

In vielen Mikroorganismen stellen [NiFe]-Hydrogenasen Schlüsselenzyme des Wasserstoff-Metabolismus dar, da sie molekularen Wasserstoff reversibel mithilfe ihres Heterodimetallzentrums oxidieren können. Die freiwerdenden Elektronen werden in der Regel über drei Eisen-Schwefel-Cluster zum physiologischen Redoxpartner übertragen.^[1,2] Das aktive Zentrum beherbergt zwei Metallionen, Nickel und Eisen, welche über zwei Cysteinyl-Thiolate verbrückt sind. Zwei weitere Cysteinate sind ausschließlich am Nickel gebunden, wohingegen das Eisenion von einem CO- und zwei CN⁻-Liganden koordiniert wird.^[3] Verschiedene Redoxzustände des Dimetallzentrums unterscheiden sich primär im Oxidationszustand des Nickels sowie in der Art des Liganden in der dritten verbrückenden Position zwischen Nickel und Eisen, welche als Spaltungsstelle für das Wasserstoff-Molekül dient.^[4,5]

Die Aufklärung grundlegender Prozesse der mikrobiellen Energieumwandlung ist entscheidend, um biotechnologische Anwendungen zur Nutzung von Wasserstoff als sauberer Energieträger voranzutreiben.^[6] In diesem Zusammenhang ist ein umfassendes Verständnis des katalytischen Zyklus der Hydrogenasen und damit eine strukturelle Charakterisierung des aktiven Zentrums sowie der beteiligten Intermediate notwendig. Elektronenspinresonanz(EPR)- und Infrarot(IR)-Spektroskopie sind etablierte Techniken zur Untersuchung der Redoxzustände des katalytischen Zyklus.^[4,5] Jedoch weisen beide Methoden intrinsische Einschränkungen auf: Die EPR-Spektroskopie ist auf die Untersuchung paramagnetischer Ni-Zustände beschränkt, sodass Informationen

über das Eisenion im aktiven Zentrums (Fe^{II} , $S = 0$) weitgehend unzugänglich sind. Mit IR-Spektroskopie sind die Strettschwingungen der zweiatomigen Liganden am Eisen und somit alle Zustände des aktiven Zentrum detektierbar. Somit können Änderungen der ElektronendichteVerteilung des Dimetallkomplexes verfolgt werden, die jedoch keine direkten Einblicke in die Struktur des [NiFe]-Zentrums geben. Unter diesen Gesichtspunkten könnte die Resonanz-Raman(RR)-Spektroskopie als komplementäre Methode dienen, da sie über Metall-assoziierte Schwingungsmoden direkt und selektiv Informationen zu strukturellen und elektronischen Eigenschaften des [NiFe]-Zentrums liefert.^[7]

Im Rahmen eines kombinierten experimentellen und theoretischen Ansatzes demonstrieren wir hier erstmals die Eignung der RR-Spektroskopie zur Analyse der Struktur des aktiven Zentrums einer [NiFe]-Hydrogenase. Angesichts der Verfügbarkeit einer Kristallstruktur sowie früherer IR- und EPR-Untersuchungen wurde die sauerstofftolerante membrangebundene Hydrogenase (MBH) aus *Ralstonia eutrophpha* H16 (*Re*) als Modellsystem gewählt.^[8,9]

Die RR-Spektren der H₂-reduzierten MBH, die mit einer Anregungswellenlänge von 458 nm und bei einer Temperatur von 79 K gemessen wurden, weisen deutliche Schwingungsbanden zwischen 400 und 650 cm⁻¹ auf (Abbildung 1 A, schwarze Linie). Vergleichbare Signale werden im Spektrum des oxidierten, unbehandelten Enzyms nicht beobachtet. Die besagten Banden im Spektrum des reduzierten Enzyms liegen in einem für Fe-CO/CN-Streck- und Biegeschwingungen typischen Bereich,^[10] wie es auch für Hydrogenase-Modellkomplexe beobachtet wurde.^[11–13] Anteile von Eisen-Schwefel-Cluster-Moden können hierbei ausgeschlossen werden, da diese einerseits bei niedrigeren Frequenzen zu finden sind und andererseits, entsprechend der Resonanzverstärkung über die S→Fe-Charge-Transfer-Übergänge, vornehmlich in der oxidierten Form des Enzyms detektiert werden.^[14] Unter Nutzung einer mit theoretischen Methoden verfeinerten Kristallstruktur^[2,15] können diese Schlussfolgerungen ebenfalls durch Raman-Spektren gestützt werden, die für das aktive Zentrum der MBH mithilfe eines kombinierten quantenmechanischen/molekülmechanischen (QM/MM) Modells berechnet wurden (Details zu den Rechnungen, siehe SI5). Um den unterschiedlichen Grad der Resonanzverstärkung durch einen Metall-Ligand-Charge-Transfer-Übergang im berechneten Spektrum wiederzugeben, wurden die Intensitäten der einzelnen Moden entsprechend des Beitrags der Fe-CO-Koordinaten zur potentiellen Energie (po-

[*] E. Siebert, [+] M. Horch, [+] Y. Rippers, [+] F. Velazquez Escobar, Prof. Dr. F. Siebert, L. Paasche, Dr. U. Kuhlmann, Dr. F. Lendzian, Prof. Dr. M. A. Mroginski, Dr. I. Zebger, Prof. Dr. P. Hildebrandt Technische Universität Berlin, Institut für Chemie, Sekr. PC14 Straße des 17. Juni 135, 10623 Berlin (Deutschland)
E-Mail: marius.horch@gmx.de
ingo.zebger@tu-berlin.de
hildebrandt@chem.tu-berlin.de

Dr. J. Fritsch, Dr. S. Frielingsdorf, Prof. Dr. O. Lenz
Institut für Biologie/Mikrobiologie, Humboldt-Universität zu Berlin
Chausseestraße 117, 10115 Berlin (Deutschland)

[†] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.

[**] Finanzielle Unterstützung durch die DFG (Exzellenzcluster „UniCat“) und den Senat Berlin („Nachhaltige Chemie“).

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201209732> zu finden.

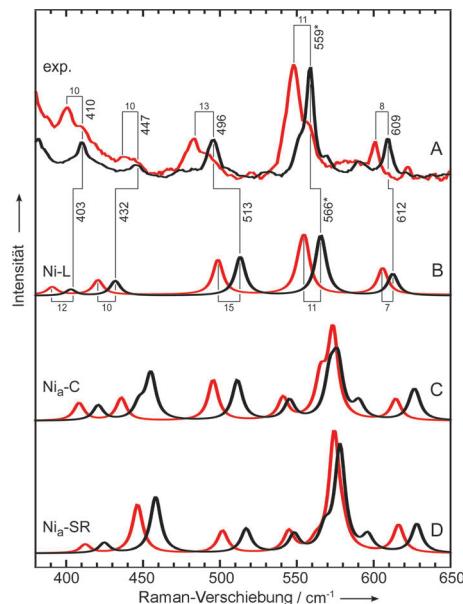


Abbildung 1. Linke Seite: A) Experimentelle RR-Spektren der H_2 -reduzierten MBH, aufgenommen mit einer Anregungswellenlänge von 458 nm. Berechnete Raman-Spektren des [NiFe]-Zentrums für B) Ni-L, C) Ni_a -C und D) Ni_a -SR. Schwarze und rote Linien entsprechen jeweils den Spektren der nichtmarkierten bzw. ^{13}C -markierten Spezies. Die mit einem Stern versehenen Banden enthalten Anteile zweier dicht beieinander liegender Normalmoden (Tabelle 1). Die entsprechenden Isotopenverschiebungen beziehen sich auf die Maxima der resultierenden Banden. Rechte Seite: Strukturmodelle des aktiven Zentrums im Ni-L- (B), Ni_a -C- (C) und Ni_a -SR-Zustand (D).

tential energy distribution, PED) angenähert. Die so berechneten Spektren verschiedener Redoxzustände des aktiven Zentrums zeigen alle deutliche Banden zwischen 400 und 650 cm^{-1} , also im Bereich der experimentell beobachteten RR-Signale (siehe Abbildung 1). Die ausgeprägten ^{13}C -Isotopenverschiebungen aller Hauptbanden im RR-Spektrum

(Abbildung 1 A, rote Linie) werden ebenfalls durch die QM/MM-Rechnungen wiedergegeben (Abbildung 1 B-D, rote Linien). Damit wird sowohl die Bandenzuordnung als auch die Annahme bestätigt, dass ein Fe \rightarrow CO-Charge-Transfer die Grundlage der Resonanzverstärkung ist. Des Weiteren werden experimentell beobachtete ^{15}N -Isotopenverschiebungen um 1 cm^{-1} ebenfalls durch die Rechnungen wiedergegeben (Tabelle 1). Basierend auf diesen Ergebnissen können die Banden im RR-Spektrum eindeutig Streck- und Biegeschwingungen der $[\text{Fe}(\text{CO})(\text{CN}^-)_2]$ -Einheit zugewiesen werden. Dies bestätigt die vorläufige Zuordnung einer kürzlich veröffentlichten Studie basierend auf der Kernresonanz-Schwingungsspektroskopie (nuclear resonance vibrational spectroscopy, NRVS).^[16]

Wie für viele andere Hydrogenasen kann auch für die H_2 -reduzierte MBH eine Mischung aus verschiedenen katalytisch aktiven Redoxzuständen IRspektroskopisch nachgewiesen werden.^[17] Der paramagnetische Ni_a -C-Zustand (Ni^{III} , $S=1/2$) trägt ein Hydrid in der dritten verbrückenden Position

zwischen den beiden Metallionen^[18] und gilt somit als Schlüsselintermediat des katalytischen Zyklus der [NiFe]-Hydrogenasen. Dieses Hydrid verbleibt vermutlich auch im vollständig reduzierten Ni_a -SR-Zustand,^[4] der jedoch nicht EPR-aktiv ist (Ni^{II} , $S=0$). Für dieses Intermediat werden bis zu drei Subspezies beobachtet, die sich mutmaßlich im Pro-

Tabelle 1: Experimentelle Frequenzen und Isotopenverschiebungen der Normalmoden des aktiven Zentrums der H_2 -reduzierten MBH sowie berechnete Werte für Ni-L, Ni_a -C und Ni_a -SR (in cm^{-1}).^[a]

| Normalmoden- beschreibung ^[b] (Ni-L) | experimentell | | | | berechnet | | | |
|--|-----------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------------|-------------------------------|-----------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| | ^{12}C , ^{14}N | $\Delta^{13}\text{C}$ | $\Delta^{15}\text{N}$ | ^{12}C , ^{14}N | Ni-L $\Delta^{13}\text{C}$ | $\Delta^{15}\text{N}$ | ^{12}C , ^{14}N | Ni_a -C $\Delta^{13}\text{C}$ |
| $\delta(\text{Fe-C-O/N})$ | 410 | -10 | -1 | 403 | -12 | -2 | 421 | -12 |
| $\delta(\text{Fe-C-N}_{\text{Arg}})$ $\nu(\text{Fe-CN}_{\text{Arg}})$ | 447 | -10 | -1 | 432 | -11 | -3 | 447 455 | -12 - |
| $\delta(\text{Fe-C-N}_{\text{Thr}})$ $\nu(\text{Fe-CO})$ | 496 | -13 | -1 | 513 | -14 | -1 | 511 | -16 |
| | 552 | -10 | n.z. ^[c] | - | - | - | 545 | -4 |
| $\delta(\text{Fe-C-O})$ $\nu(\text{Fe-CO})$ | 559 | -11 | -1 | 565 567 | -10 -15 | -1 | 572 577 | -6 -3 |
| | 568 | n.z. ^[c] | 0 | - | - | - | 590 | -16 |
| $\nu(\text{Fe-CO})$ | 609 | -8 | 0 | 612 | -7 | -1 | 625 628 | - |
| | | | | | | | -13 | -1 |
| | | | | | | | -12 | 0 |

[a] Die Zusammensetzung der Normalmoden gemäß PED bezieht sich auf Ni-L (siehe SI9). [a] δ : Biegeschwingung, ν : Stretschwingerung. [c] n.z.: nicht zugeordnet.

tonierungsgrad, dem Spinzustand oder bezüglich der Wechselwirkung mit der Proteinumgebung unterscheiden.^[4,5]

Im Prinzip könnten sowohl Ni_a-C als auch Ni_a-SR zum RR-Spektrum beitragen. Allerdings kann es bei tiefen Temperaturen durch Bestrahlung des Ni_a-C-Zustands mit sichtbarem Licht, etwa dem Raman-Messstrahl bei 458 nm, zu einer Dissoziation des verbrückenden Hydrids kommen.^[18] Dabei würde der Ni-L-Zustand (Ni^I, S = 1/2), ein weiteres potenziell katalytisches Intermediat mit bis zu drei Unterzuständen, gebildet.^[17] Um dies zu überprüfen, wurden IR- und EPR-Spektren bei tiefen Temperaturen (80 K) sowohl im Dunkeln als auch, unter Nachahmung der experimentellen Bedingungen der RR-Messungen, unter konstanter Bestrahlung bei 460 bzw. 455 nm aufgenommen. Die Signale der „Belichtet-minus-dunkel“-Differenzspektren (Abbildung 2)

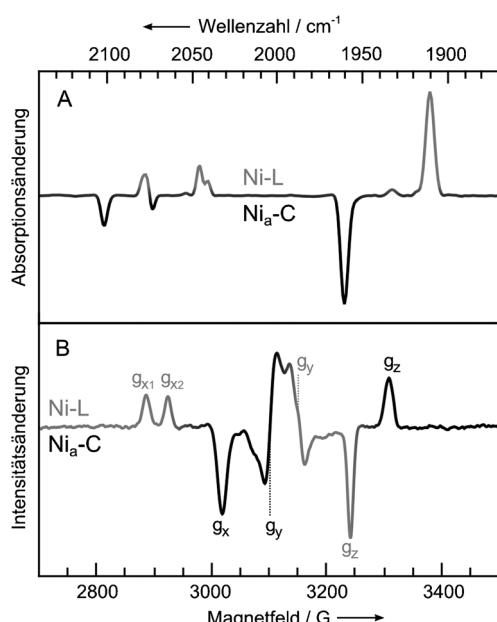


Abbildung 2. Lichtinduzierte „Belichtet-minus-dunkel“-Differenzspektren der H₂-reduzierten MBH, aufgenommen mit A) IR- und B) EPR-Spektroskopie bei tiefer Temperatur. Schwarze und hellgraue Bereiche entsprechen jeweils dem Ni_a-C- bzw. dem Ni-L-Zustand.

können auf Basis früherer Studien^[17,19] zugeordnet werden: CO/CN-Streckschwingungen und g-Tensor-Komponenten in grau stellen den Anteil des Enzyms im Ni-L-Zustand dar, der auf Kosten von Ni_a-C (schwarz) gebildet wird, wie auch am umgekehrten Vorzeichen der spektroskopischen Signatur des letztgenannten Zustands zu erkennen ist. Diese Beobachtungen beweisen eine vollständige Ni_a-C→Ni-L-Umwandlung, sodass ein Beitrag des Ni_a-C-Zustands zum RR-Spektrum in Abbildung 1A ausgeschlossen werden kann.

Die spektroskopischen Untersuchungen der MBH wurden auf verschiedene Reduktionsbedingungen erweitert (Abbildung SI6). Wird der H₂-Anteil im Gasgemisch von 100 auf 5 % reduziert, so steigt der Anteil an Ni_a-C auf Kosten von Ni_a-SR entsprechend dem höheren Reduktionspotential von Ni_a-C.^[17] Dagegen sind die entsprechenden RR-Spektren bezüglich der Frequenzen und Intensitäten der Banden

nahezu identisch (Abbildung SI6), was darauf schließen lässt, dass hier unter beiden Reduktionsbedingungen gleiche Anteile desselben Redoxzustands detektiert werden. Dies wiederum legt nahe, dass das Gleichgewicht zwischen allen reduzierten Zuständen im RR-Experiment zugunsten derselben Spezies verschoben wird, was am besten mit einer lichtinduzierten Bildung von Ni-L durch den Messstrahl erklärt werden kann. In Übereinstimmung mit dem allgemein beobachteten thermischen Zerfall von Ni-L^[4] verschwinden die RR-Signale, wenn die Temperatur auf über 200 K erhöht wird. Daher schlussfolgern wir, dass die RR-Spektren der H₂-reduzierten MBH den Ni-L-Zustand widerspiegeln, wohingegen die Resonanzverstärkung der Ni_a-C- und Ni_a-SR-Zustände bei 458 nm zu schwach ist, um detektierbare Signale zu liefern.

Diese Vermutung wird durch den Vergleich mit berechneten Raman-Spektren verschiedener Redox-, Spin- und Protonierungszustände des aktiven Zentrums bestärkt. Die berechneten Spektren weichen für die meisten dieser Zustände deutlich vom experimentellen Spektrum ab. Deshalb wird die detaillierte Betrachtung im Folgenden auf die berechneten Spektren der Ni_a-C-, Ni-L- und Ni_a-SR-Zustände beschränkt, wobei für die beiden letzteren eine Protonierung des Schwefelatoms von Cys597 angenommen wird (Abbildung 1B-D). Gemäß der berechneten Spektren aller drei Redoxzustände (siehe SI9) spiegelt die stärkste Bande des experimentellen Spektrums bei 559 cm⁻¹ zwei dicht beieinander liegende Moden mit überwiegendem Fe-CO-Biege- und Streckschwingungscharakter wider. Allerdings werden die experimentelle Frequenz und die ¹³C-Isotopenverschiebung ($\Delta\nu$) nur in den Rechnungen zu Ni-L reproduziert, wohingegen für Ni_a-C und Ni_a-SR zu hohe Frequenzen und zu geringe Isotopenverschiebungen vorhergesagt werden. Weiterhin lässt sich die experimentell beobachtete Bande bei 609 cm⁻¹ ($\Delta\nu = -8 \text{ cm}^{-1}$) gut einer Fe-CO-Streckschwingung des Ni-L-Zustands zuordnen (612 cm⁻¹, $\Delta\nu = -7 \text{ cm}^{-1}$) während für Ni_a-C und Ni_a-SR deutliche höhere Frequenzen und Isotopenverschiebungen vorhergesagt werden. Außerdem liefern die berechneten Ni-L-Spektren die beste Übereinstimmung zwischen Fe-CN-Biegeschwingungen (und -Streckschwingungen) und den Banden im RR-Spektrum unterhalb von 550 cm⁻¹. Der Vergleich mit den berechneten Spektren bestätigt demnach, dass mit RR-Spektroskopie unter den vorliegenden experimentellen Bedingungen der Ni-L-Zustand detektiert wird. Allerdings ist die gute Übereinstimmung nur für das berechnete Spektrum eines Ni-L-Zustands mit S-protoniertem Cys597 (siehe SI8) zu finden. Dies ist ein erster experimenteller Hinweis auf die bereits vorgeschlagene Protonierung des terminalen Cystein-Liganden im aktiven Zentrum der [NiFe]-Hydrogenasen.^[20]

Gemäß den obigen Beobachtungen ist der Anteil an Ni-L im RR-Spektrum unabhängig vom anfänglichen Verhältnis Ni_a-C/Ni_a-SR. Da Ni_a-C mit Ni_a-SR im Gleichgewicht steht, könnte eine lichtinduzierte Umwandlung von Ni_a-C eine Entvölkerung des Ni_a-SR-Zustands nach sich ziehen, sofern bei 79 K ein thermischer Ni_a-SR→Ni_a-C-Redoxübergang stattfindet. Dies kann jedoch ausgeschlossen werden, da das „Belichtet-minus-dunkel“-IR-Differenzspektrum in Abbildung 2 keine negativen Signale zeigt, die Ni_a-SR zugeordnet

werden können. Weiterhin würde diese Reaktion eine Zunahme der paramagnetischen Spezies unter Bestrahlung bewirken, was ebenfalls über das EPR-Differenzspektrum ausgeschlossen werden kann (Abbildung 2). Somit folgern wir, dass es eine bisher unbekannte direkte photochemische $\text{Ni}_a\text{-SR} \rightarrow \text{Ni-L}$ -Reaktion gibt, welche lediglich unter hohen Photonendichten, z. B. in RR-Experimenten, zu einer effizienten Umwandlung führt.

Zusammenfassend haben wir die erste RR-spektroskopische Charakterisierung des aktiven Zentrums einer [NiFe]-Hydrogenase präsentiert und damit eine wertvolle neue Methode etabliert, die auch zur Untersuchung von [Fe]- und [FeFe]-Hydrogenasen genutzt werden kann. So kann diese Technik zur Aufklärung von strukturellen und mechanistischen Aspekten beitragen, da sie eine direkte Untersuchung der Fe-CO/CN-Moden ermöglicht. Diese Moden spiegeln Bindungsverhältnisse am aktiven Zentrum wider, die als essenzielle Parameter im Wasserstoffzyklus von Hydrogenasen gelten.^[21] Zwar können Fe-Ligand-Moden auch mit NRVS untersucht werden,^[16] doch bietet diese experimentell aufwendige Technik eine wesentlich geringere spektrale Auflösung, die eine Identifizierung einzelner Redoxzustände des aktiven Zentrums praktisch unmöglich macht. Dagegen können diese in der RR-Spektroskopie eindeutig zugeordnet und somit charakterisiert werden. In Kombination mit anderen spektroskopischen sowie mit theoretischen Methoden liefert die RR-Spektroskopie darüber hinaus wertvolle Informationen zu wichtigen Details des aktiven Zentrums. Dies beinhaltet erste experimentelle Hinweise auf die Gegenwart eines protonierten terminalen Cysteins am aktiven Zentrum im Ni-L-Zustand sowie eine mögliche direkte $\text{Ni}_a\text{-SR} \rightarrow \text{Ni-L}$ -Photoumwandlung. Folglich ist der hier vorgestellte integrale Ansatz geeignet, strukturelle und elektronische Details aufzuklären, die mithilfe kristallographischer Studien nicht zugänglich sind.^[15]

Eingegangen am 5. Dezember 2012,
veränderte Fassung am 22. Januar 2013

Stichwörter: [NiFe]-Hydrogenase · Biokatalyse ·
EPR-Spektroskopie · IR-Spektroskopie ·
Resonanz-Raman-Spektroskopie

-
- [1] A. Volbeda, M. H. Charon, C. Piras, E. C. Hatchikian, M. Frey, J. C. Fontecilla-Camps, *Nature* **1995**, *373*, 580–587.
 - [2] J. Fritsch, P. Scheerer, S. Frielingsdorf, S. Kroschinsky, B. Friedrich, O. Lenz, C. M. T. Spahn, *Nature* **2011**, *479*, 249–252.
 - [3] R. P. Happe, W. Roseboom, A. J. Pierik, S. P. Albracht, K. A. Bagley, *Nature* **1997**, *385*, 126.
 - [4] W. Lubitz, E. Reijerse, G. M. van Gastel, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4331–4365.
 - [5] A. L. de Lacey, V. M. Fernandez, M. Rousset, R. Cammack, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4304–4330.
 - [6] R. Mertens, A. Liese, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2004**, *15*, 343–348.
 - [7] T. G. Spiro, R. S. Czernuszewicz, *Methods Enzymol.* **1995**, *246*, 416–460.
 - [8] T. Goris, A. F. Wait, M. Saggù, J. Fritsch, N. Heidary, M. Stein, I. Zebger, F. Lendzian, F. A. Armstrong, B. Friedrich, O. Lenz, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 310–318.
 - [9] K. A. Vincent, J. A. Cracknell, O. Lenz, I. Zebger, B. Friedrich, F. A. Armstrong, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 16951–16954.
 - [10] K. Nakamoto, *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds—Applications in Coordination, Organometallic, and Bioinorganic Chemistry*, 6. Aufl., Wiley, Hoboken, **2009**.
 - [11] H. S. Shafaat, K. Weber, T. Petrenko, F. Neese, W. Lubitz, *Inorg. Chem.* **2012**, *51*, 11787–11797.
 - [12] M. G. Galinato, C. M. Whaley, N. Lehnert, *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 3201–3215.
 - [13] C. J. Stromberg, C. L. Kohnhorst, G. A. Van Meter, E. A. Rakowski, B. C. Caplins, T. A. Gutowski, J. L. Mehalko, E. J. Heilweil, *Vib. Spectrosc.* **2011**, *56*, 219–227.
 - [14] T. G. Spiro, R. S. Czernuszewicz, S. Han in *Biological Applications of Raman Spectroscopy*, Band 3, (Hrsg.: T. G. Spiro), Wiley, New York, **1988**, S. 523–553.
 - [15] Y. Rippers, M. Horch, P. Hildebrandt, I. Zebger, M. A. Mroginski, *ChemPhysChem* **2012**, *13*, 3852–3856.
 - [16] S. Kamali, H. Wang, D. Mitra, H. Ogata, W. Lubitz, B. C. Manor, T. B. Rauchfuss, D. Byrne, V. Bonnefoy, F. E. Jenney, M. W. W. Adams, Y. Yoda, E. Alp, J. Zhao, S. P. Cramer, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 752–756; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 724–728.
 - [17] M. Saggù, I. Zebger, M. Ludwig, O. Lenz, B. Friedrich, P. Hildebrandt, F. Lendzian, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 16264–16276.
 - [18] M. Brecht, G. M. van, T. Bührke, B. Friedrich, W. Lubitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 13075–13083.
 - [19] M. E. Pandelia, P. Infossi, M. Stein, M. T. Giudici-Orticoni, W. Lubitz, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 823–825.
 - [20] C. Fichtner, M. van Gastel, W. Lubitz, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2003**, *5*, 5507–5513.
 - [21] G. J. Kubas, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4152–4205.