

GDCh

GÖCh

Nachrichten

aus der Chemie



02 | 2017

Zeitschrift der
Gesellschaft
Deutscher
Chemiker

65. Jahrgang
Februar 2017
S. 109 - 216

01 | 2017

Mitteilungsblatt
der Gesellschaft
Österreichischer
Chemiker

Verlagspostamt 1010 Wien
P.b.b. / 05Z036512 M

Wasserstoff

Hydrogenasen in Algen | s. 123

Spurensuche



Hofmann in London | s. 157

Quiz in der Vorlesung | s. 164

Wasserstoffkatalyse in Mikroalgen

Moritz Senger, Sven Stripp

Hydrogenasen in Grünalgen katalysieren die Abgabe von Wasserstoff. Wie läuft das auf molekularer Ebene ab? Isotopenmarkierung und Infrarotspektroskopie helfen, diese Frage zu beantworten.

◆ Die Industrie stellt H₂ aus Erdöl und Erdgas her. Eine Alternative ist die biologische Wasserstoffproduktion, etwa durch Bakterien¹⁾ oder photosynthetische Mikroalgen.²⁾

Dass Grünalgen Wasserstoff produzieren, beschrieb erstmals Hans Gaffron in den frühen 1940er Jahren.³⁾ Zusammen mit Tim Stuart wies Gaffron 30 Jahre später nach, dass Photosynthese und Wasserstoffmetabolismus direkt gekoppelt sind.³⁾ Ihre Arbeit prägte den Begriff photobiologische Wasserstoffproduktion. In den 1990er Jahren erschloss das Team von Tasios Melis das volle Potenzial der Grünalgen wie *Chlamydomonas reinhardtii* für die Wasserstoffproduktion, indem sie die Anzuchtbedingungen veränderten.³⁾

Auf molekularer Ebene sind die für den Wasserstoffmetabolismus verantwortlichen Enzyme, die Hydrogenasen, seit den 1930er Jahren bekannt,³⁾ die ersten Kristallstrukturen veröffentlichten Inokuchi und Kollegen jedoch erst Ende der 1980er Jahre.⁴⁾ Abhängig von der Metallzusammensetzung des aktiven Zentrums werden [NiFe]- und [FeFe]-Hydrogenasen unterschieden. In Grünalgen fanden Wissenschaftler bisher ausschließlich [FeFe]-Hydrogenasen.³⁾

[FeFe]-Hydrogenasen

◆ Typischerweise bildet nur eine einzige Aminosäurekette die waserlöslichen [FeFe]-Hydrogenasen. Das Enzym kann in zwei funktio-

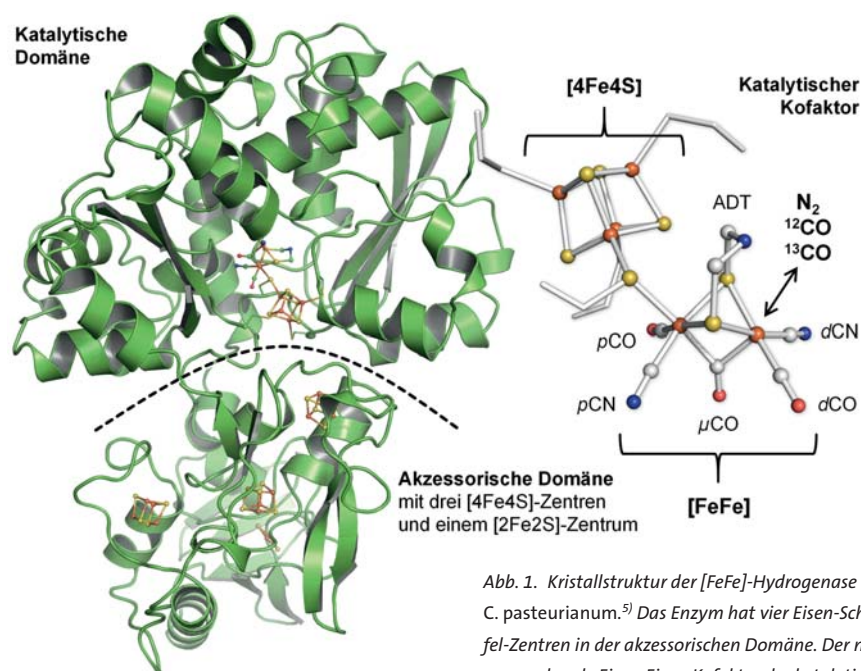


Abb. 1. Kristallstruktur der [FeFe]-Hydrogenase aus *C. pasteurianum*.⁵⁾ Das Enzym hat vier Eisen-Schwefel-Zentren in der akzessorischen Domäne. Der namensgebende Eisen-Eisen-Kofaktor der katalytischen Domäne bindet drei CO- und zwei CN-Liganden, deren Schwingungsfrequenzen sich per Infrarotspektroskopie untersuchen lassen.

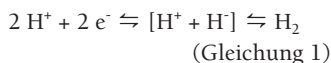
nale Domänen gegliedert werden: einen akzessorischen Teil, der bis zu vier Eisen-Schwefel-Zentren bindet, und die Kopfdomäne mit dem katalytischen Kofaktor (Abbildung 1).⁵⁾ Über die akzessorische Domäne tauschen Kofaktor und Redoxpartner Elektronen aus; in vivo ist der Redoxpartner meistens das photosynthetische Ferredoxin.⁶⁾

Die [FeFe]-Hydrogenase aus *C. reinhardtii* gilt als Minimaleinheit zur Wasserstoffproduktion, da dem Enzym die akzessorische Domäne fehlt und Elektronen direkt in den katalytischen Kofaktor injiziert werden.³⁾ Über eine Serie konservierter Aminosäurereste reagieren zwei Protonen aus dem umgeben-

QUERGELESEN

- » Wasserstoff erzeugende Enzyme werden in [Fe]-, [NiFe]- und [FeFe]-Hydrogenasen eingeteilt. In Grünalgen gibt es ausschließlich [FeFe]-Hydrogenasen.
- » Im [FeFe]-Zentrum haben beide Eisenionen einen CO- und einen CN-Liganden, ein weiteres CO verbrückt die Metallionen. Die Masse der Atome beeinflusst Frequenz und Kopplung, weshalb FT-IR-Spektroskopie sich zur Untersuchung eignet.
- » Damit der Wasserstoff schnell entsteht, braucht es das verbrückende CO, und ein Hydrid darf ausschließlich terminal binden.

den Wasser über Hydrolyse mit zwei Elektronen zu molekularem Wasserstoff:



Für [FeFe]-Hydrogenasen hängt die Richtung der Reaktion vom Verhältnis aus Produkt- und Edukt-Konzentration ab, während [NiFe]- und [Fe]-Hydrogenase unter ähnlichen Bedingungen eher die Oxidation von H₂ katalysieren.⁷⁾ Ob sich ein hydridischer Übergangszustand bildet, untersuchen wir momentan in Zusammenarbeit mit der Universität Bochum und dem Max-Planck-Institut für chemische Energiekonversion in Mülheim.⁴⁾

Das katalytische Zentrum der [FeFe]-Hydrogenasen, der H-Cluster, besteht aus einem [4Fe4S]-Zentrum, koordiniert von vier Cystein-Seitengruppen. Das Schwefelatom eines der Cysteine bindet zusätzlich an das eigentliche [FeFe]-Zentrum (Abbildung 1). Beide

Eisenionen tragen einen Kohlenmonoxid- und einen Cyanid-Liganden (CO/CN⁻), und ein dritter CO-Ligand verbrückt die beiden Eisenionen (μCO). Eine Aminodithiolat-Gruppe (ADT) verbindet die oktaedrisch koordinierten Eisenionen auf der Oberseite, sodass das näher am [4Fe4S]-Zentrum gelegene (proximale) Eisenion abgesättigt ist, das weiter entfernte (distale) Eisenion aber eine freie Bindestelle behält.

Mit Kohlenmonoxid hemmen

◆ Die freie Position am distalen Eisenion interpretieren viele Autoren als Bindestelle für eine hydridi-

sche Spezies bei der Wasserstoffkatalyse.⁴⁾ Passend dazu bindet in Gegenwart gasförmigen Kohlenmonoxids ein zusätzlicher CO-Ligand am distalen Eisenion (d₂CO) und inhibiert so die katalytische Aktivität.⁸⁾ Diese Kohlenmonoxidvergiftung ist nahezu vollständig reversibel.⁹⁾

Die Sensibilität der [FeFe]-Hydrogenase gegenüber Kohlenmonoxid lässt sich nutzen, um isotopenmarkiertes ¹³CO über das distale Eisenion einzuführen. Gleichzeitig erlauben die Absorptionseigenschaften des H-Clusters im sichtbaren Spektralbereich, durch Einstrahlen von Licht unterschiedlicher Wellenlängen selektiv alle Ei-

Hox-CO	pCO	μCO	d ₁ CO	d ₂ CO	Behandlung
1	12	12	12	12	¹² CO
2	12	12	12	13	¹³ CO
3	12	12	13	13	¹³ CO + rot
3*	12	12	13	12	¹² CO
4	12	13	13	13	¹³ CO + blau
5	12	13	13	12	¹² CO
6	12	13	12	12	¹² CO + rot
6*	12	13	12	13	¹³ CO
7	13	13	13	13	¹³ CO
8	13	13	13	12	¹² CO
9	13	13	12	12	¹² CO + rot
9*	13	13	12	13	¹³ CO
10	13	12	12	12	¹² CO + blau
11	13	12	12	13	¹³ CO
12	13	12	13	13	¹³ CO + rot
12*	13	12	13	12	¹² CO

Tab. 1. Alle Isotopomere, die im CO-inhibierten Zustand, Hox-CO, vorliegen können.

Hox	pCO	μCO	d ₁ CO	d ₂ CO	Hox-CO
1	12	12	12		1, 2
2	12	12	13		3, 3*
3	12	13	13		4, 5
4	12	13	12		6, 6*
5	13	13	13		7, 8
6	13	13	12		9, 9*
7	13	12	12		10, 11
8	13	12	13		12, 12*

Tab. 2. Alle Isotopomere, die den aktiven Zustand, Hox, einnehmen können.

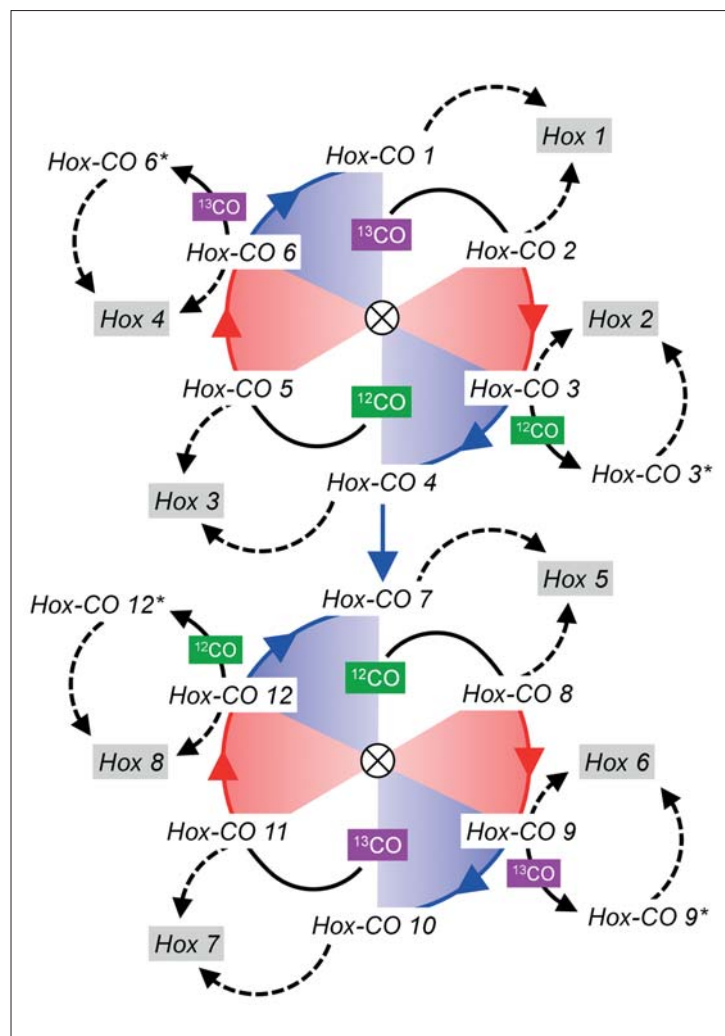


Abb. 2. In Gegenwart von ¹²CO- oder ¹³CO-Gas lassen sich mit rotem oder blauem Licht die CO-Liganden des katalytischen Kofaktors selektiv austauschen. Wird die Atmosphäre über dem Proteinfilm mit N₂ gespült (gestrichelte Pfeile), so kommt es zu einer Reaktivierung der Enzyme, und der oxidierte Zustand Hox reichert sich an.

sencarbonylbindungen zu schwächen. Aus der Literatur ist dieser Prozess als Kannibalismus bekannt: Unter dem Einfluss weißen Lichts setzt der H-Cluster Kohlenmonoxid frei und zerfällt dabei. Dieses Kohlenmonoxid reagiert mit einer Teilfraktion der Probe und bildet den CO-inhibierten Zustand.¹⁰⁾

Findet die Reaktion in einer ¹³CO-Atmosphäre statt, ersetzt ¹³CO schrittweise die natürlichen Carbonylliganden.¹¹⁾ So ergeben sich alle theoretisch möglichen ¹²CO-¹³CO-Kombinationen ($2^4 = 16$) (Tabelle 1). Werden die isoto­penmarkierten Proben unter N₂ reaktiviert, reichert sich der aktive Zustand an, der in acht ¹²CO-¹³CO-Kombinationen ($2^3 = 8$) vorliegen kann (Tabelle 2). Abbildung 2 zeigt in zwei zyklischen Diagrammen, wie die unterschiedlichen Isotomere ineinander überführt werden können. Dabei spielt neben der Beleuchtung mit rotem (640 nm) oder blauem Licht (460 nm) auch die Hydratisierung der Probe eine Rolle.¹¹⁾

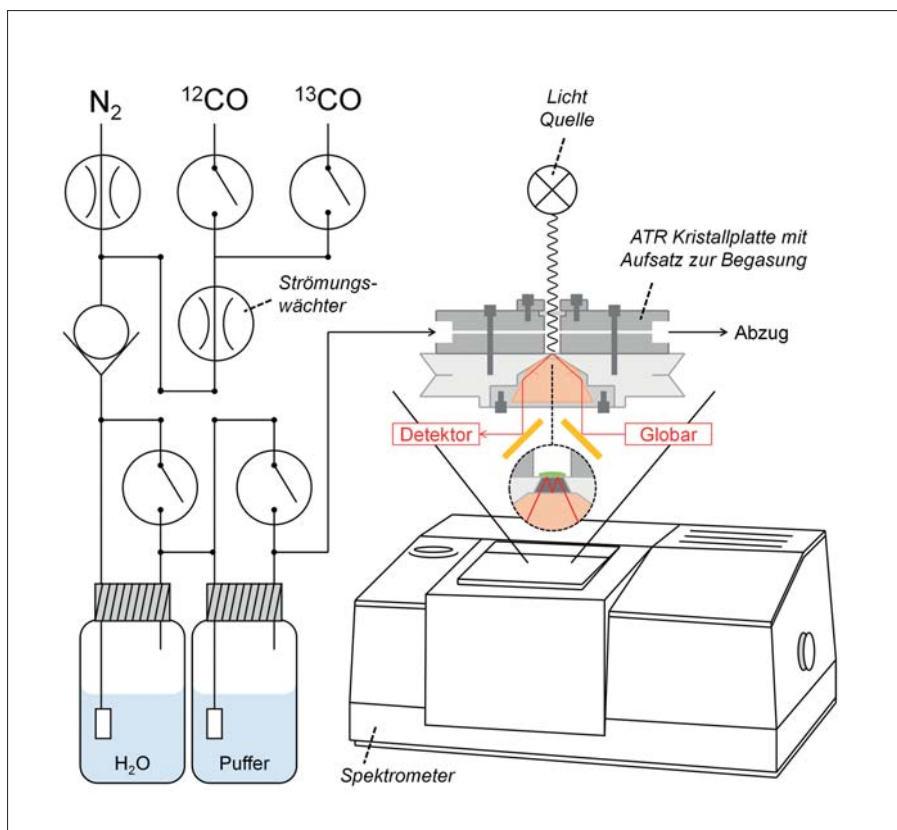


Abb. 3. Experimenteller Aufbau. Der Proteinfilm auf der Oberfläche des ATR-Kristalls wird mit angefeuchteten Gasen behandelt und selektiv beleuchtet. Die ATR-Optik befindet sich dabei in einem handelsüblichen FT-IR-Spektrometer. Digitale Strömungswächter erlauben es, die Aerosol-Titrations quantitativ auszuwerten.

Proben analysieren mit ATR/FT-IR-Spektroskopie

◆ Fourier-transformierte Infrarot-Spektroskopie (FT-IR) ist eine Schlüsseltechnik, um Hydrogasen zu analysieren. Die natürlichen CO- und CN-Liganden absorbieren in einem Bereich des mittleren Infrarot, den weder Protein- noch Wasserbanden überlagern. Die Streck­schwingungsfrequenz der CO- und CN-Liganden reagiert sensibel auf Änderungen in der Elektronendichteverteilung des

H-Clusters, und im Gegensatz zur Elektronenspinresonanz-Spektroskopie sind alle Redoxzustände infrarotaktiv.

Die FT-IR-Spektroskopie liefert direkte Informationen über die Energie und Charakteristik einer Molekülschwingung, wobei sich die Kopplungsmuster komplexer Schwingungssysteme mit Dichtefunktionaltheorie (DFT) berechnen lassen.¹¹⁾ Alle Berechnungen führen wir in Kooperation mit Stefan Mebs und Michael Hauman

(FU Berlin) durch. Ändert sich die Masse eines Atoms im Molekülverband, beeinflusst das stark Frequenz und Kopplung. Die Erhöhung der Kohlenstoffmasse von ¹²C auf ¹³C in den CO-Liganden verringert sich die Frequenz rein rechnerisch um 44 cm⁻¹.

Um diese Änderungen im Experiment zu beobachten, sollte die Hydrogenaseprobe nur wenig Wasser enthalten, also hoch konzentriert vorliegen. Der Dampfdruck über der Probe muss austauschbar

expression CMS

Das erste Massenspektrometer speziell für Chemiker



Direkte Massenanalyse von festen und flüssigen Proben



Direkte Massenanalyse von DC-Platten

Reaktionsmonitoring & Identifizierung neuer Komponenten in 30 Sekunden

Advion

Nähere Informationen:
central-europe@advion.com | www.expressioncms.com

sein, ohne dass dabei das Protein eintrocknet. Daher müssen die Gase angefeuchtet werden (Abbildung 3). Wird ein bestimmter Feuchtigkeitsgehalt unterschritten, reagiert die Probe nicht mehr auf angebotene Gase (caking), Kohlenmonoxidvergiftung und Reaktivierung durch N_2 finden nur noch sehr langsam statt. Letztlich sollte das Experiment so aufgebaut sein, dass sich die Probe mit Kaltlichtlampen, LED oder Laser beleuchten lässt. Die Proteinprobe wird hier mit abgeschwächter Totalreflexion (ATR, siehe Einschub in Abbildung 3) vermessen. Da das Aerosol im mittleren Infrarot absorbiert, erlaubt es die Messmethode, die Gasphase oberhalb des Probenfilms auszutauschen, ohne dass sie mit dem IR-Messlicht interagiert.

Dichtefunktionaltheorie erklärt die Frequenzmuster

◆ Abbildung 4 zeigt das Beispiel des aktiven, oxidierten Zustands H_{ox} . Das Spektrum der unbehandelten Probe (a) weist auf drei CO-Liganden hin, die sich direkt der proximalen (magenta), distalen (blau) beziehungsweise der verbrück-

enden Position (grün) zuordnen lassen (siehe auch Abbildung 1).

Aufgrund der niedrigeren Schwingungsfrequenz des verbrückenden Liganden beeinflusst die Isotopenmarkierung von μCO nicht die terminalen Liganden. Ersetzt ^{13}CO den distalen CO-Liganden (Spektrum b), verringert sich die entsprechende Schwingungsfrequenz um 35 cm^{-1} . Da der distale CO-Ligand geringfügig mit dem proximalen koppelt, verschiebt sich dieser um 9 cm^{-1} . Bei zusätzlicher Isotopenmarkierung des proximalen CO-Liganden (Spektrum c) verschiebt sich die Frequenz stark für den proximalen Liganden und schwach für den distalen. Im Vergleich zu Spektrum (a) sind nun beide terminalen Liganden um 44 cm^{-1} verschoben.

In Spektrum (d) ist ausschließlich der proximale CO-Ligand markiert. Theoretisch sollten nun beide Liganden, proximaler und distaler, mit derselben Frequenz schwingen (etwa 1930 cm^{-1}). Tatsächlich beobachtet man aber eine Aufspaltung in zwei Banden.

Obwohl die Frequenzen den Signalen in Spektrum (b) gleichen, zeigen die Banden in Spektrum (d)

unterschiedliche Amplitudenverhältnisse. DFT-Simulationen des H-Clusters sagen für diesen Fall eine starke Kopplung der terminalen CO-Liganden voraus,¹¹⁾ sodass sich die Frequenzbänder nicht mehr einer konkreten Position im H-Cluster zuordnen lassen, sondern die symmetrische und asymmetrische CO-Streckschwingung des Gesamtsystems repräsentieren. Wie in allen gezeigten Spektren ist die Frequenz des verbrückenden μCO davon weitgehend unbeeinflusst.

Ausblick

◆ Wie die Liganden im aktiven, oxidierten Zustand koppeln, ist relativ übersichtlich. Bindet ein weiterer CO-Ligand an den Kofaktor, wird es schwieriger, die Kopplungsmuster zu analysieren. Jedoch lässt sich dadurch auch die Struktur des H-Clusters charakterisieren. CO- und CN-Liganden sind durch Proteinröntgenkristallographie kaum unterscheidbar, die Berechnung der Frequenzen per Dichtefunktionaltheorie erlaubt es aber, unterschiedliche Struktur- und Isotopomere durchzuspielen.¹¹⁾ Der Vergleich experimenteller und simulierter Spektren dient dann als Qualitätskriterium: je geringer die Abweichung, desto realistischer das Modell (Abbildung 5). So zeigten wir, dass die Liganden am distalen Eisenion eine Teilrotation vornehmen, wenn externes CO gebunden wird. Der distale CN-Ligand nimmt dann die apikale Position ein.

Mit dieser Herangehensweise lassen sich auch die reduzierten Zustände des H-Clusters beschreiben. Für die Wasserstoffproduktion kann der Kofaktor mit bis zu zwei Elektronen beladen werden (Gleichung 1). Dabei driften die Eisenionen des [Fe-Fe]-Zentrums auseinander,¹²⁾ und der verbrückende CO-Ligand wird nur noch durch das distale Eisenion koordiniert. Ohne μCO könnte ein Hydrid die beiden Eisenionen verbrücken.¹³⁾ Simulationen sagen für diesen Fall nur geringe katalytische Umsatzraten voraus.¹⁴⁾ Die schnelle Wasserstoffkatalyse – mit Geschwin-

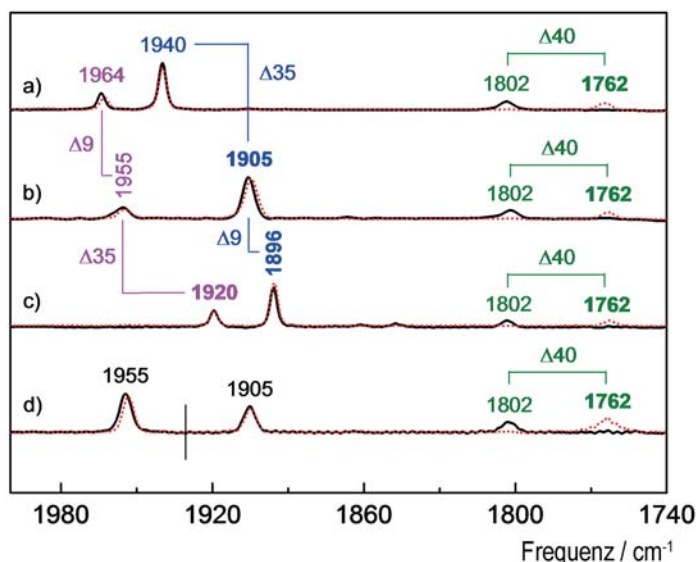


Abb. 4. FT-IR-Spektren des Carbonylbereichs der [FeFe]-Hydrogenase aus *C. reinhardtii* (magenta: pCO ; grün: $\square CO$; blau: dCO). Isotopenmuster in der Reihenfolge $p/\square/d$: 12/12/12 in (a), 12/12/13 in (b), 13/12/13 in (c) und 13/12/12 in (d). Gepunktete Spektren zeigen den jeweiligen Austausch von ^{12}CO nach ^{13}CO .

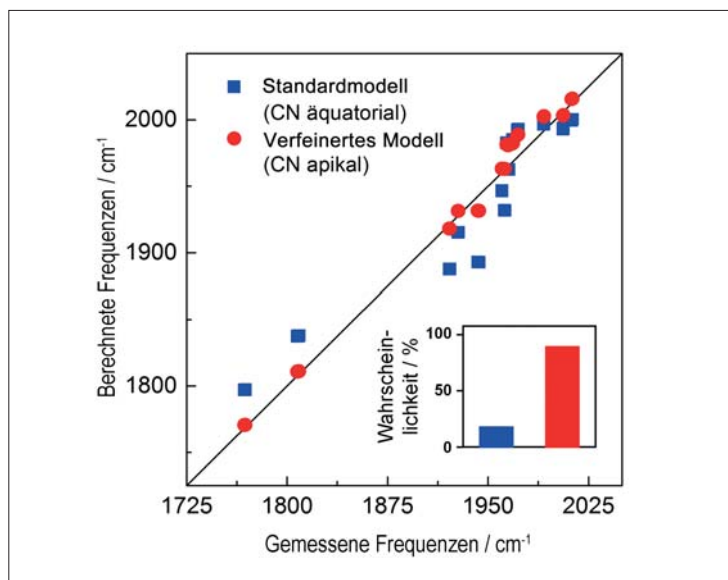


Abb. 5. Vergleich der gemessenen mit den gerechneten Frequenzen. Die Diagonale zeigt eine hypothetische Übereinstimmung von 100%. DFT-Modelle, die mit einem apikalen CN-Liganden am distalen Eisenion gerechnet worden sind, stimmen besser mit den experimentellen Frequenzen überein als die mit einem äquatorialen CN-Liganden.

digkeiten bis zu 10000 H₂ pro Sekunde – erfordert also einen Mechanismus, der das verbrückende CO unangetastet lässt und eine hydridische Spezies ausschliesslich in terminaler Position zulässt.

Bisher gibt es nur wenig experimentelle Hinweise, die eindeutige Interpretationen der Struktur zulassen. Die Isotopenmarkierung der reduzierten Zustände kann helfen, das aufzuklären, und damit zum Verständnis des molekularen Mechanismus der Wasserstoffproduktion beitragen.

Literatur

- 1) P. C. Hallenbeck, *Int. J. Hydrogen Energy* 2009, 34, 7379–7389.
- 2) T. Happe, A. Hemschemeier, M. Winkler, A. Kaminski, *Trends Plant Sci.* 2002, 7, 246–250.
- 3) S. T. Stripp, T. Happe, *Dalton Trans.* 2009, 45, 9960–9969.
- 4) Y. Higuchi, N. Yasuoka, M. Kakudo et al., *J. Biol. Chem.* 1987, 262, 2823–2825.
- 5) J. Esselborn, N. Muraki, K. Klein et al., *Chem. Sci.* 2016, 7, 959–968.
- 6) M. Winkler, A. Hemschemeier, J. Jacobs, S. T. Stripp, T. Happe, *Eur. J. Cell. Biol.* 2010, 89, 998–1004.
- 7) S. V. Hexter, F. Grey, T. Happe, V. Climent, F. A. Armstrong, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2012, 109, 11516–11521.

- 8) B. Bennett, B. J. Lemon, J. W. Peters, *Biochemistry* 2000, 39, 7455–7460.
- 9) S. T. Stripp, G. Goldet, C. Brandmayr et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2009, 106, 17331–17336.
- 10) W. Roseboom, A. L. De Lacey, V. M. Fernandez, E. C. Hatchikian, S. P. J. Albracht, *J. Biol. Inorg. Chem.* 2006, 11, 102–118.
- 11) M. Senger, S. Mebs, J. Duan et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2016, 113, 8454–8459.
- 12) S. T. Stripp, O. Sanganas, T. Happe, M. Haumann, *Biochemistry* 2009, 48, 5042–5049.
- 13) P. Chernev, C. Lambert, A. Brünje, *Inorg. Chem.* 2014, 53, 12164–12177.
- 14) G. Filippi, F. Arrigoni, L. Bertini, L. De Gioia, G. Zampella, *Inorg. Chem.* 2015, 54, 9529–9542.

Moritz Senger hat an der FU Berlin Physik studiert. In seiner Diplomarbeit beschäftigte er sich mit photosynthetischer Wasserstoffproduktion durch Kopplung von Photosystem I mit Hydrogenasen an Proteinmonolagen. Seit 2013 ist er Max-Planck-Fellow und promoviert im Arbeitskreis von Joachim Heberle zu Protonen- und Elektronentransport in [FeFe]-Hydrogenasen.



Sven Stripp hat während seiner Promotion bei Thomas Happe an der biologischen Fakultät der Universität Bochum den Einfluss von Sauerstoff auf Hydrogenasen untersucht. Anschließend wechselte er als wissenschaftlicher Mitarbeiter in den Arbeitskreis von Joachim Heberle (FU Berlin). Seit 2010 entwickelt er spektroskopische und elektrochemische Methoden zur Untersuchung von Metalloenzymen. Dabei steht die Aufklärung katalytischer Prinzipien im Vordergrund.



Einkaufen per Klick

Reichelt Chemietechnik

www.rct-online.de

- **Schneller Zugriff auf 80.000 Artikel**
- **Produktgruppe THOMAFLUID®**
Schläuche, Fittings, Hähne, Magnetventile, Pumpen
- **Produktgruppe THOMAPLAST®**
Laborplastik, Halbzeuge, Schrauben, Muttern, Distanzhülsen und O-Ringe
- **Produktgruppe THOMADRIVE®**
Antriebstechnik mit Rollenketten, Kettenrädern, Zahnriemen

**Reichelt
Chemietechnik
GmbH + Co.**

Englerstraße 18
D-69126 Heidelberg
Tel. 0 62 21 31 25-0
Fax 0 62 21 31 25-10
rct@rct-online.de