

Protonengekoppelte Reduktion des katalytischen [4Fe-4S]-Zentrums in [FeFe]-Hydrogenasen

Moritz Senger^[a], Konstantin Laun^[a], Florian Wittkamp^[b], Jifu Duan^[c], Michael Haumann^[d], Thomas Happe^[c], Martin Winkler^[c], Ulf-Peter Apfel^{[b]*}, Sven T. Stripp^{[a]**}

[a] Fakultät für Physik, Freie Universität Berlin, Arnimallee 14, 1495 Berlin

[b] Fakultät für Chemie und Biochemie, Ruhr-Universität Bochum, Universitätsstrasse 150, 44801 Bochum

[c] Fakultät für Biologie und Biotechnologie, Ruhr-Universität Bochum, Universitätsstrasse 150, 44801 Bochum

[d] Fakultät für Physik, Freie Universität Berlin, Arnimallee 14, 1495 Berlin

Korrespondenzautoren

** sven.stripp@fu-berlin.de Tel.: +49 30 838 55069

* ulf.apfel@rub.de Tel.: +49 234 3224187

Zusammenfassung: In der Natur katalysieren [FeFe]-Hydrogenasen die Abgabe und Aufnahme von molekularem Wasserstoff (H₂) an einem einzigartigen Eisen-Schwefel-Kofaktor. Das geringe elektrochemische Überpotential in der Wasserstoffabgabe-Reaktion macht die [FeFe]-Hydrogenasen zu einem hervorragenden Beispiel für effiziente Biokatalyse. Gegenwärtig sind die molekularen Details des Wasserstoffumsatzes jedoch noch nicht vollständig verstanden. Daher adressieren wir in dieser Untersuchung die initiale Reduktion des katalytischen Zentrums der [FeFe]-Hydrogenasen mittels Infrarotspektroskopie und Elektrochemie und zeigen, dass der reduzierte Zustand Hred´ durch protonengekoppelten Elektronentransport gebildet wird. Ladungskompensation bindet das überschüssige Elektron am [4Fe-4S]-Zentrum und führt zu einer Stabilisierung der konservativen Konfiguration des [FeFe]-Kofaktors. Die Rolle von Hred´ beim Wasserstoffumsatz und mögliche Auswirkungen auf den katalytischen Mechanismus werden diskutiert. Es liegt nahe, dass die Regulation elektronischer Eigenschaften in der Umgebung von metallischen Kofaktoren die Grundlage für Multielektronen-Prozesse bildet.

Hydrogenasen sind Redoxenzyme, die Nickel- und Eisenionen für den Umsatz von molekularem Wasserstoff (H_2) nutzen.^[1] Die anorganischen Kofaktoren der Hydrogenasen stellt einen natürlichen Bauplan für das Design artifizierlicher Katalysatoren dar, die in Zukunft für eine nachhaltige Wasserstoffproduktion eingesetzt werden können.^[2–6] In [FeFe]-Hydrogenasen zum Beispiel wurde ein [6Fe-6S]-Komplex als katalytisches Zentrum identifiziert.^[7,8] Dieser sogenannte „H-Cluster“ besteht aus einem [4Fe-4S]-Zentrum, welches kovalent an einen [FeFe]-Kofaktor gebunden ist (Abb. 1). Der Wasserstoffumsatz findet an dem distal zum [4Fe-4S]-Zentrum lokalisierten Eisenion des bimetallicen Kofaktors statt (Fe_d).^[9–11] Eine Aminodithiolatgruppe (adt) am [FeFe]-Kofaktor fungiert als Protonrelais in der heterolytischen Oxidation von H_2 .^[12,13] Zusätzlich trägt der [FeFe]-Kofaktor zwei CN- und bis zu vier CO-Liganden.

In der Literatur werden verschiedene Redoxzustände des H-Clusters beschrieben (Tab. S1 und S2). Dazu gehört unter anderem der katalytisch-aktive, oxidierte Zustand **Hox**, der sich durch einen ESR-aktiven [FeFe]-Kofaktor und ein oxidiertes [4Fe-4S]-Zentrum auszeichnet.^[14] **Hred** und **Hred'** sind zwei unterschiedliche, einfachreduzierte Zustände. Während der H-cluster in **Hred** das Elektron am [FeFe]-Kofaktor trägt, liegt in **Hred'** ein reduziertes [4Fe-4S]-Zentrum vor.^[15–18] Weder **Hred** noch **Hred'** sind ESR-aktiv.^[18,19] Redoxzustände mit zwei zusätzlichen Elektronen sind **Hsred** und **Hhyd**. Der sogenannte „superreduzierte“ Zustand **Hsred** ähnelt **Hred**, trägt aber ein weiteres Elektron am [4Fe-4S]-Zentrum.^[19] Auch der hydridische Zustand **Hhyd** zeigt ein reduziertes [4Fe-4S]-Zentrum. Trotzdem erlaubt der „superoxidierte“ [FeFe]-Kofaktor mit einem terminalen Hydrid am Fe_d eine eindeutige Charakterisierung von **Hhyd**.^[9–11] Im Gegensatz dazu konnte per Dichtefunktionaltheorie (DFT) gezeigt werden, dass **Hred** und **Hsred** ein verbrückendes Hydrid am [FeFe]-Kofaktor tragen.^[20,21] Eine Diskussion der hier verwendeten Nomenklatur findet sich im Anhang.

Abbildung 1. Aktives Zentrum der oxidierten [FeFe]-Hydrogenase HYDA1.

Die aktuellen Fortschritte in der posttranslationalen Proteinmodifikation erlauben es, [FeFe]-Hydrogenasen mit artifiziellem Kofaktoren zu erzeugen und die Redoxdynamik im ansonsten unveränderten Enzym zu untersuchen.^[22–24] Im Vergleich zum adt-Kofaktor des nativen Enzyms HYDA1^{adt} ist die Hydrophobizität der Dithiolatbrücke in

H-cluster-Variante HYDA1^{pd} durch eine Methylenkopfgruppe signifikant erhöht (Abb. 1).^[22] Mit Hilfe spektroelektrochemischer Studien wurde in HYDA1^{pd} das Vorkommen von **Hox** und **Hred'** gezeigt; **Hred** und **Hsred** hingegen sind nicht beobachtet worden.^[18,23] Das verfestigt die Annahme, dass die Bildung von **Hred** mit einer Protonierung am [FeFe]-Kofaktor assoziiert ist.^[15] In HYDA1^{adt} und HYDA1^{pd} konnten wir jüngst durch den Einsatz von pH- und Redox titrationen die Existenz der *explizit* protonierten Spezies **HoxH** und **Hred'H** demonstrieren. Die Korrelation experimenteller und berechneter Frequenzen unterstützt die Annahme einer Protonierung am [4Fe-4S]-Zentrum; interessanterweise nicht nur für **HoxH**, sondern auch für den reduzierten Zustand, **Hred'**.^[16] Bislang fehlte jedoch ein eindeutiger, experimenteller Beweis für eine *implizite* Protonierung in der Bildung von **Hred'**. In dieser Studie verwenden wir Proteinfilm elektrochemie und Fourier-transformierte Infrarotspektroskopie in verminderter Totalreflektion (Abb. S1), um den Einfluss des pH-Werts auf das Übergangspotential von **Hox** zu **Hred'** zu untersuchen.

Die Struktur des H-clusters lässt sich an Hand der charakteristischen Infrarotabsorption der CO- und CN-Liganden untersuchen.^[25–28] Abbildung 2 zeigt das Vibrationsprofil der eingestellten Spezies in Kofaktorvariante HYDA1^{pd} bei verschiedenen pH-Werten und ansteigend reduzierenden Potentialen. Bei -350 mV vs. SHE befindet sich das Enzym hauptsächlich im oxidierten Zustand, **Hox**. Der reduzierte Zustand **Hred'** dominiert unter leicht alkalischen Bedingungen ab ca. -650 mV (pH 7.5). In einem sauren Milieu wurde die protonierte, oxidierte Spezies **HoxH** bei -150 mV angereichert und **Hred'H** erscheint bereits ab -450 mV (pH 5.5). Da der verwendete Messaufbau einen direkten Elektronentransfer ermöglicht, kann der registrierte Strom als Maß für die katalytische Aktivität ausgewertet werden (Abb. S1). Unsere Messungen mit HYDA1^{pd} suggerieren kein Einsetzen von Wasserstoffumsatz.

Abbildung 2. FTIR Spektroelektrochemie an Kofaktor-Variante HYDA1^{pd}.

In einer aktuellen Arbeit konnten Sommer *et al.* zeigen, dass die Bildung von **Hred** in nativem Enzym mit einer Protonierung des [FeFe]-Kofaktors einhergeht.^[15] Protonengekoppelter Elektronentransfer (PCET) am [4Fe-4S]-Zentrum wurde durch unsere DFT-Berechnungen auch für die Bildung von **Hred'** favorisiert.^[16] Um die

berechneten Spektren experimentell zu bekräftigen, haben wir die Redoxübergänge **Hox** → **Hred'** und **HoxH** → **Hred'H** bei verschiedenen pH-Werten bestimmt. Die Abwesenheit des sekundären Amids in der Dithiolatgruppe von HYDA1^{pdt} verhindert die Protonierung des [FeFe]-Kofaktors und eine Anreicherung von **Hred** und **Hsred**. Das erlaubt eine direkte Analyse der Redoxchemie des [4Fe-4S]-Zentrums. Um die Übergangspotentiale zu identifizieren, wurde in Abbildung 3 die Änderung der angereicherten Redoxspezies gegen das elektrochemische Potential aufgetragen (Details in Abb. S2). Die elektrochemischen Kurven wurden gemäß der Nernst-Gleichung für ein Elektron ($n = 1 \pm 0.5$) simuliert.^[15,16,18] Dieser Ansatz erlaubte es, alle elektronischen Übergänge in einem Proteinfilm nachzuvollziehen. Während das **HoxH/ Hred'H** Redoxpaar bei pH 5.5 deutlich dominierte, ist bei pH 7.5 die protonierte Spezies nur noch zu einem kleinen Anteil vertreten. Mittlere pH-Werte (6.5) ergaben eine Koexistenz von **Hox/ Hred'** und den explizit protonierten Spezies.

Abbildung 3. Anreicherung der Redoxzustände.

Abbildung 4. Pourbaix Diagramm.

Das Pourbaix-Diagramm in Abbildung 4 zeigt die Auswertung der Übergangspotentiale für **Hox** → **Hred'** und **HoxH** → **Hred'H** von pH 5.5 bis 7.5 und -300 bis -450 mV (kompletter Datensatz in Abb. S3). Allgemein gesprochen korreliert der Wechsel von alkalischen zu sauren pH-Werten mit einem Redoxübergang bei weniger stark negativen Potentialen. Eine lineare pH-Abhängigkeit der Potentialdaten mit 50 ± 3 mV/pH (**Hox/ Hred**) und 55 ± 3 mV/pH (**HoxH/ Hred'H**) wurde festgestellt ($R^2 = 0.98$ und 0.96). Der Anstieg für **HoxH** → **Hred'H** zeigt eine signifikante Verschiebung von ca. +50 mV gegenüber **Hox** → **Hred'**. Augenscheinlich hat die Protonierung am [4Fe-4S]-Zentrum einen direkten Einfluss auf das Übergangspotential der Hox Reduktion. Die blaue Gerade in Abb. 4 liegt deutlich oberhalb des H⁺/H₂ Referenzpotentials (gestrichelte Linie, rot), was die spontane Reduktion von HYDA1^{pdt} in Anwesenheit von H₂ erklären kann^[16], obwohl die pdt-Variante katalytisch kaum aktiv ist.^[23] Der Übergang **Hred'H** → **Hred'** unter stark reduzierenden Bedingungen ($E < -600$ mV) ist pH-unabhängig (Abb. S4).

Schlussfolgerungen

In der Vergangenheit konnten wir in nativem Hydrogenase-Enzym zwischen pH 10 und pH 7 eine beschleunigte Anreicherung von **Hred'** beobachten.^[16] Für pH-Werte kleiner 7 wurde die Analyse jedoch durch die bevorzugte Bildung von **Hred** limitiert.^[15] Dieser Zusammenhang ließ eine kompetitive Protonierung in der Bildung von **Hred'** und **Hred** vermuten. Der Anstieg von 55 mV/pH in Abb. 4 belegt nun eindeutig, dass die Reduktion des [4Fe-4S]-Zentrums in Abhängigkeit von einer Protonierungsreaktion erfolgt. Während der **Hox/ Hred** Übergang mit der Bindung eines Protons am [FeFe]-Kofaktor assoziiert ist^[15,20], so korreliert die Anreicherung von **Hred'** mit einer Protonierung am [4Fe-4S]-Zentrum.^[16] Diese Schlussfolgerung wird entscheidend unterstützt durch DFT-Berechnungen, der Unabhängigkeit der **Hred'** Anreicherung vom Protonentransfer über die adt-Gruppe, und die an dieser Stelle erstmals präsentierten experimentellen Daten. Sowohl für **Hred** als auch **Hred'** ist PCET der entscheidende Prozess, ob überschüssige Ladung am [4Fe-4S]-Zentrum (**Hred'**) oder am [FeFe]-Kofaktor (**Hred**) stabilisiert wird. Die PCET-Reaktivität eines konventionellen Eisen-Schwefel-Zentrums wurde schon früher vermutet^[29,30], konnte hier jedoch das erste Mal für ein biologisches System belegt werden.

Der verbrückende CO-Ligand (μCO) des oxidierten [FeFe]-Kofaktors ist in den reduzierten Zuständen **Hred** und **Hsred** durch ein verbrückendes Hydrid (μH) ersetzt (Abb. S5).^[20] Diese Geometrie ist aufgrund der Stabilität von μH Metallkomplexen^[4] schwerlich mit der hohen Wasserstoffumsatzrate der [FeFe]-Hydrogenasen vereinbar, wenn man **Hox** als Grundzustand annimmt.^[31–36] Erst kürzlich haben wir daher **HoxH** und **Hred'** als geschwindigkeitsbestimmendes Redoxpaar im katalytischen Kreislauf vorgeschlagen.^[16,37] Beide Spezies weisen eine konservative Struktur auf. Diesbezüglich merkten Singleton *et al.* bereits 2008 an, dass die Stabilisierung der μCO -Geometrie („*rotated structure*“) von zentraler Bedeutung für den katalytischen Mechanismus ist.^[38] Um die μCO -Geometrie zu bewahren und einen effizienten Wasserstoffumsatz zu begünstigen, dürfte die Protonierung des [4Fe-4S]-Zentrums zur Unterdrückung einer frühzeitigen Reduktion des [FeFe]-Kofaktors essentiell erforderlich sein.

Auch **Hhyd** ist durch einen μCO -Liganden charakterisiert.^[9–11] Es ist eine reizvolle Aufgabe, nun die Infrarot-Signatur von **Hhyd** per DFT-Berechnungen auszuwerten. In diesem Fall wird eine „Superoxidation“ des [FeFe]-Kofaktors nur dann erzielt, wenn das terminale Hydrid von einem Proton am reduzierten [4Fe-4S]-Zentrum begleitet wird.^[37] Es zeigt sich, dass die Protonierung des [4Fe-4S]-Zentrums nicht nur essentiell für die Beschreibung von **Hred** ist, sondern auch in **Hhyd** nicht unterschlagen werden darf.

Abbildung 5. *Katalytischer Zyklus der Wasserstoffabgabe-Reaktion.*

Wir denken, dass **Hred** und **Hsred** einen *ineffizienten* Wasserstoffumsatz bedingen, da der Wechsel von der verbrückenden in die terminale Position am [FeFe]-Kofaktor mit nur geringer Wahrscheinlichkeit stattfindet.^[34–36] Im Gegensatz dazu konstituieren **Hred** und **Hhyd** den voraussichtlich schnellen Wasserstoffumsatz (Abb. 5 und Abb. S5), für den [FeFe]-Hydrogenasen bekannt sind.^[37] Diese Spezies stabilisieren die μCO -Geometrie des [FeFe]-Kofaktors durch PCET zum [4Fe-4S]-Zentrum. Auf dieser Grundlage schlagen wir vor, dass artifizielle H-Clustermodelle neben dem katalytischen Zentrum protonierbare, redox-aktive Liganden ausnutzen sollten.^[39] Camara und Rauchfuss haben Vergleichbares bereits publiziert.^[40] Protonierbare Redox-Liganden können genutzt werden, um die Lokalisation von Ladungen zu kontrollieren, die μCO -Geometrie des katalytischen Zentrums zu stabilisieren und so den Wasserstoffumsatz zu erleichtern. Zusammenfassend suggerieren unsere Beobachtungen, dass die Regulation der elektronischen Eigenschaften in der Umgebung von metallischen Kofaktoren der Schlüssel ist, multiple Redoxprozesse bei gleichbleibend moderaten Übergangspotential möglich zu machen.

Danksagung: MS und STS danken der *IMPRS on Multiscale Biosystems* und *NanoScale* für Finanzierung. FW und UPA werden finanziell unterstützt vom *Fonds der Chemischen Industrie* (Liebig Grant), dem *Emmy Noether Programm* der DFG (AP242/2-1) und der *Studienstiftung des deutschen Volkes*. JD, MW und TH danken der *Volkswagen Stiftung* (LigH2t), der DFG (EXC 1069) und dem *China Scholarship Council* für finanzielle Mittel. MH dankt dem *Bundesministerium für Bildung und Forschung* (Grant 05K14KE1).

Schlagwörter: Infrarot Spektroskopie • Elektrochemie • Protonengekoppelter Elektronentransport • Wasserstoffumsatz • Katalyse

Beschriftung der Abbildungen

Abbildung 1. Aktives Zentrum der oxidierten [FeFe]-Hydrogenase HYDA1. Das [4Fe-4S]-Zentrum und der [FeFe]-Kofaktor bilden den sog. H-cluster (pdb Koordinaten 4XDC). Die offene Bindestelle am distalen Eisenion (Fe_d , schwarzer Kreis) und die Aminodithiolate-Gruppe sind essentiell für den Wasserstoffumsatz. In der Kofaktor-Variante pdt ist die NH-Kopfgruppe ist durch CH_2 ersetzt. Reduktion des [FeFe]-Kofaktors destabilisiert den verbrückenden CO-Liganden (μCO). Die Protonierung des [4Fe-4S]-Zentrums erfolgt aller Wahrscheinlichkeit nach an C417. Cystein 169 stellt das primäre Protonenrelais zwischen Kofaktor und Protein dar.

Abbildung 2. FTIR Spektroelektrochemie an Kofaktor-Variante $\text{HYDA1}^{\text{pdt}}$. Der Frequenzbereich der CO-Liganden von -150 bis -650 mV vs. SHE ist gezeigt (die CN-Frequenzen sind Abb. S2 zu entnehmen). Der Elektrolytpuffer wurde mit 10 mM Dithionit versetzt und auf pH 7.5 und pH 5.5 eingestellt. Unter oxidierenden Bedingungen konnte Hox und HoxH angereichert werden, reduzierende Potentiale führten zu einer Anreicherung von Hred' und $\text{Hred}'\text{H}$.

Abbildung 3. Anreicherung der Redoxzustände. Gezeigt sind die relativen Änderungen der angereicherten Spezies (%) als Funktion von Zellpotential E (mV) und pH-Wert. Die beobachteten Redoxzustände sind Hox (schwarz), HoxH (blau), Hred' (rot) und $\text{Hred}'\text{H}$ (orange). Abbildung S3 zeigt das gesamte Set der untersuchten pH-Werte.

Abbildung 4. Pourbaix Diagramm. Gezeigt sind die Übergangspotential für $\text{Hox} \rightarrow \text{Hred}'$ (schwarz) und $\text{HoxH} \rightarrow \text{Hred}'\text{H}$ (blau) als Funktion des pH-Wertes. Die Werte erlauben eine lineare Regression mit Steigungen von 55 ± 5 mV/pH (schwarz) und 50 ± 3 mV/pH (blau). Der Abstand von ungefähr 50 mV hebt das $\text{HoxH} \rightarrow \text{Hred}'\text{H}$ Übergang über das H^+/H_2 Referenzpotential (rote Linie, 59 mV/pH). Die Fehlerbalken repräsentieren die Qualität der Kurvensimulation (nach Nernst mit $n = 1 \pm 0.5$).

Abbildung 5. Katalytischer Zyklus der Wasserstoffabgabe-Reaktion. Die adt-Gruppe ist nicht gezeigt, da wir davon ausgehen, dass es hier zu keinen Protonierungsänderungen kommt. Von oben links: Hox wird durch einen PCET-Prozess in Hred[•] überführt. Das „regulatorische“ Proton (blau) bindet an eines der Cysteine, die das [4Fe-4S]-Zentrum koordinieren, z.B. C417 (vgl. Abb. 1). Protonierung und Reduktion des [FeFe]-Kofaktors führt zu einer Anreicherung an Hhyd; das „katalytische“ Proton (grün) besetzt die apikale Position an Fe_d. Nach Aufnahme eines weiteren, katalytischen Protons wird H₂ abgegeben und der oxidierte Grundzustand wieder hergestellt, hier HoxH (oben rechts). Die Abgabe des regulatorischen Protons regeneriert Hox. Es sei angemerkt, dass die Reduktion von HoxH nach Hred[•] durch einfachen Elektronentransport energetisch sinnvoll erscheint; experimentell bewiesen ist dieser Übergang jedoch nicht und die Beteiligung von Hox und/oder HoxH am katalytischen Zyklus bleibt Gegenstand der Interpretation. Im unteren Drittel der Abbildung deuten gestrichelte Linien Übergänge an, die mit einer Änderung der Kofaktor-Geometrie einhergehen. Die Redoxzustände Hred und Hsred sind durch den reduzierten [FeFe]-Kofaktor (rot) und ein verbrückendes Hydrid (μH) gekennzeichnet.

Referenzen

- [1] W. Lubitz, H. Ogata, O. Ru, E. Reijerse, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4081–4148.
- [2] G. J. Kubas, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4152–205.
- [3] C. Tard, C. J. Pickett, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2245–2274.
- [4] D. Schilter, J. M. Camara, M. T. Huynh, S. Hammes-Schiffer, T. B. Rauchfuss, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 8693–8749.
- [5] B. Konkona, K. junge Puring, I. Sinev, S. Piontek, O. Khavryuchenko, J. P. Dürholt, R. Schmid, H. Tüysüz, M. Muhler, W. Schuhmann, et al., *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 12269.
- [6] F. Möller, S. Piontek, R. G. Miller, U.-P. Apfel, *Chem. - A Eur. J.* **2017**, DOI 10.1002/chem.201703451.
- [7] Y. Nicolet, C. Piras, P. Legrand, C. E. Hatchikian, J. C. Fontecilla-Camps, *Structure* **1999**, *7*, 13–23.
- [8] J. W. Peters, W. N. Lanzilotta, B. J. Lemon, L. C. Seefeldt, *Science* **1998**, *282*, 1853–1858.

- [9] D. W. Mulder, Y. Guo, M. W. Ratzloff, P. W. King, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *139*, 83–86.
- [10] E. J. Reijerse, C. C. Pham, V. Pelmeshnikov, R. Gilbert-wilson, A. Adamska-venkatesh, J. F. Siebel, L. B. Gee, Y. Yoda, K. Tamasaku, W. Lubitz, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 4306–4309.
- [11] M. Winkler, M. Senger, J. Duan, J. Esselborn, F. Wittkamp, E. Hofmann, U.-P. Apfel, S. T. Stripp, T. Happe, *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 16115.
- [12] A. Silakov, B. Wenk, E. Reijerse, W. Lubitz, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 6553–6554.
- [13] G. Berggren, A. Adamska-Venkatesh, C. Lambertz, T. R. Simmons, J. Esselborn, M. Atta, S. Gambarelli, J.-M. Mouesca, E. J. Reijerse, W. Lubitz, et al., *Nature* **2013**, *499*, 66–69.
- [14] A. Silakov, E. J. Reijerse, S. P. J. Albracht, E. C. Hatchikian, W. Lubitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11447–11458.
- [15] C. Sommer, A. Adamska-venkatesh, K. Pawlak, J. A. Birrell, O. Rüdiger, E. J. Reijerse, W. Lubitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 1440–1443.
- [16] M. Senger, S. Mebs, J. Duan, O. Shulenina, K. Laun, L. Kertess, F. Wittkamp, U.-P. Apfel, T. Happe, M. Winkler, et al., *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2018**, [dx.doi.org/10.1039/C7CP04757F](https://doi.org/10.1039/C7CP04757F).
- [17] S. Katz, J. Noth, M. Horch, H. S. Shafaat, T. Happe, P. Hildebrandt, I. Zebger, *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 6746–6752.
- [18] A. Adamska-Venkatesh, D. Krawietz, J. F. Siebel, K. Weber, T. Happe, E. Reijerse, W. Lubitz, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 11339–11346.
- [19] A. Adamska-Venkatesh, A. Silakov, C. Lambertz, O. Rüdiger, T. Happe, E. Reijerse, W. Lubitz, *Angew. Chemie* **2012**, *51*, 11458–11462.
- [20] S. Mebs, K. Laun, M. Senger, J. Duan, F. Wittkamp, U.-P. Apfel, T. Happe, M. Winkler, S. T. Stripp, M. Haumann, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 12157–12160.
- [21] P. Chernev, C. Lambertz, A. Brünje, N. Leidel, K. G. V. Sigfridsson, R. Kositzki, S. Y. Chung-Hung Hsieh, M. D. Rafael Schiwon, C. Limberg, T. Happe, et al., *Inorg. Chem.* **2014**, *53*, 12164–12177.
- [22] J. Esselborn, N. Muraki, K. Klein, V. Engelbrecht, N. Metzler-Nolte, U.-P. Apfel, E. Hofmann, G. Kurisu, T. Happe, *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 959–968.
- [23] J. F. Siebel, A. Adamska-venkatesh, K. Weber, S. Rumpel, E. Reijerse, W.

- Lubitz, *Biochemistry* **2015**, *54*, 1474–1483.
- [24] J. Noth, J. Esselborn, J. Güldenhaupt, A. Brünje, A. Sawyer, U.-P. Apfel, K. Gerwert, E. Hofmann, M. Winkler, T. Happe, *Angew. Chemie* **2016**, *55*, 8396–8400.
- [25] A. L. De Lacey, C. Stadler, C. Cavazza, E. C. Hatchikian, V. M. Fernandez, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 11232–11233.
- [26] W. Roseboom, A. L. De Lacey, V. M. Fernandez, E. C. Hatchikian, S. P. J. Albracht, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2006**, *11*, 102–118.
- [27] D. W. Mulder, M. W. Ratzloff, E. M. Shepard, A. S. Byer, S. M. Noone, J. W. Peters, J. B. Broderick, P. W. King, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 6921–6929.
- [28] M. Senger, S. Mebs, J. Duan, F. Wittkamp, U. Apfel, J. Heberle, M. Haumann, S. T. Stripp, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, *113*, 8454–8459.
- [29] C. T. Saouma, W. D. Morris, J. W. Darcy, J. M. Mayer, *Chemistry*. **2015**, *21*, 9256–9260.
- [30] R. A. Henderson, *Coord. Chem. Rev.* **2005**, *249*, 1841–1856.
- [31] V. Fourmond, C. Greco, K. Sybirna, C. Baffert, P.-H. Wang, P. Ezanno, M. Montefiori, M. Bruschi, I. Meynial-Salles, P. Soucaille, et al., *Nat. Chem.* **2014**, *6*, 336–342.
- [32] C. Greco, M. Bruschi, L. De Gioia, U. Ryde, *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 15–16.
- [33] A. R. Finkelmann, M. T. Stiebritz, M. Reiher, *Chem. Sci.* **2014**, *5*, 215–221.
- [34] A. Jablonskytė, L. R. Webster, T. R. Simmons, J. A. Wright, C. J. Pickett, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 13038–13044.
- [35] G. Zampella, P. Fantucci, L. De Gioia, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 10909–10917.
- [36] G. Filippi, F. Arrigoni, L. Bertini, L. De Gioia, G. Zampella, *Inorg. Chem.* **2015**, *54*, 9529–9542.
- [37] S. Mebs, R. Kositzki, J. Duan, Leonie Kertess, M. Senger, F. Wittkamp, U.-P. Apfel, T. Happe, S. T. Stripp, M. Winkler, M. Haumann, *BBA - Bioenerg.* **2018**, *1859*, 28–41.
- [38] M. L. Singleton, N. Bhuvanesh, J. H. Reibenspies, M. Y. Darensbourg, *Angew. Chemie* **2008**, *47*, 9492–9495.
- [39] C. Greco, L. De Gioia, *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 6987–6995.
- [40] J. M. Camara, T. B. Rauchfuss, *Nat. Chem.* **2011**, *4*, 26–30.

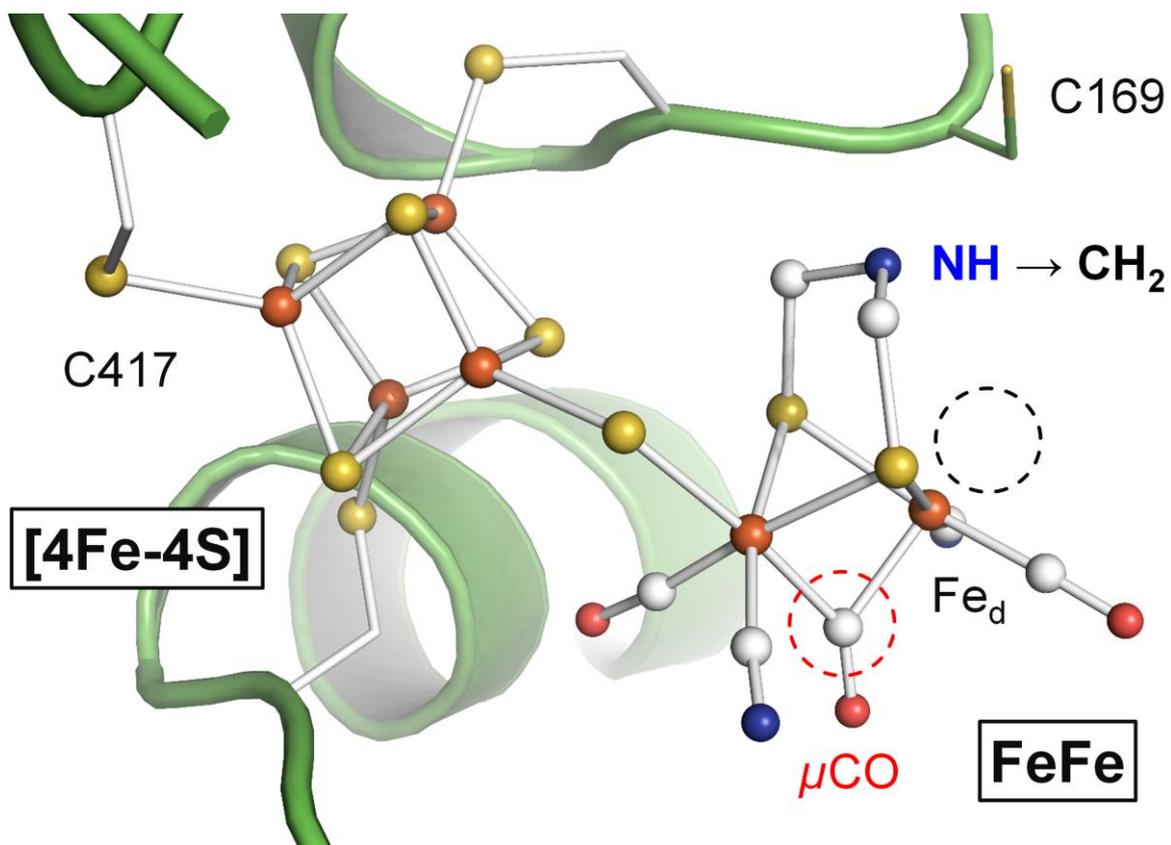


Abbildung 1

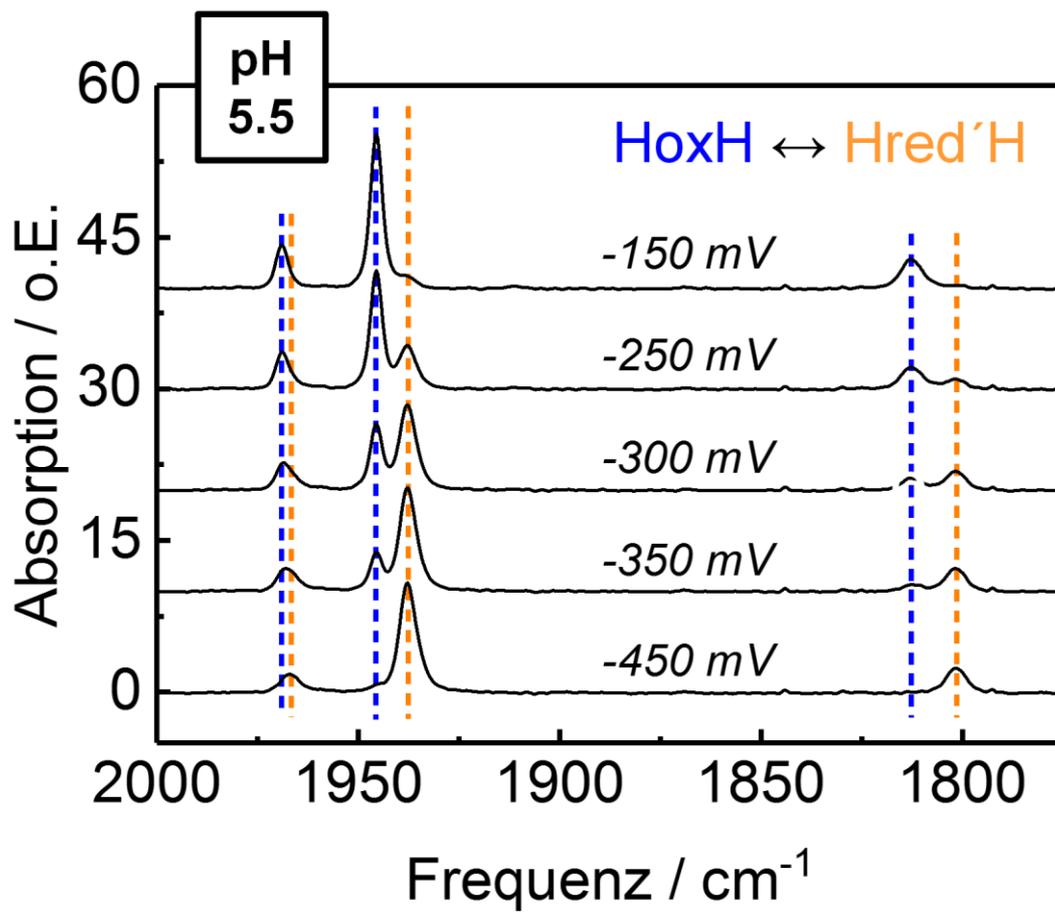
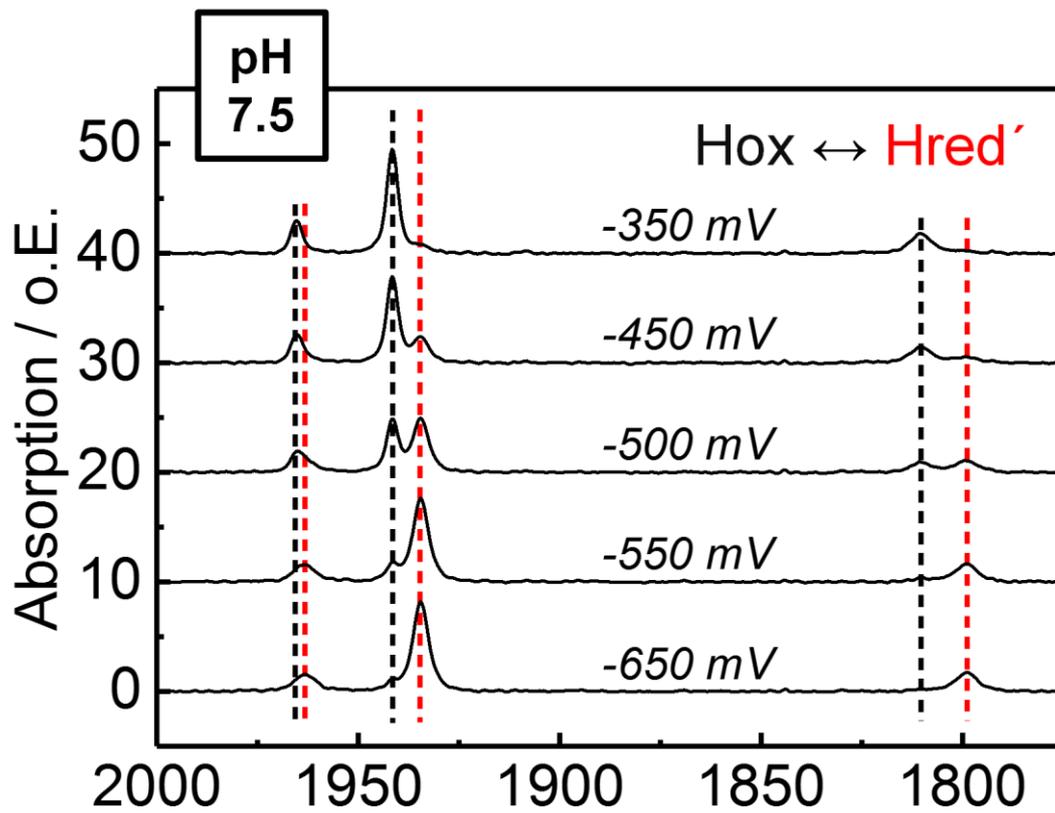


Abbildung 2

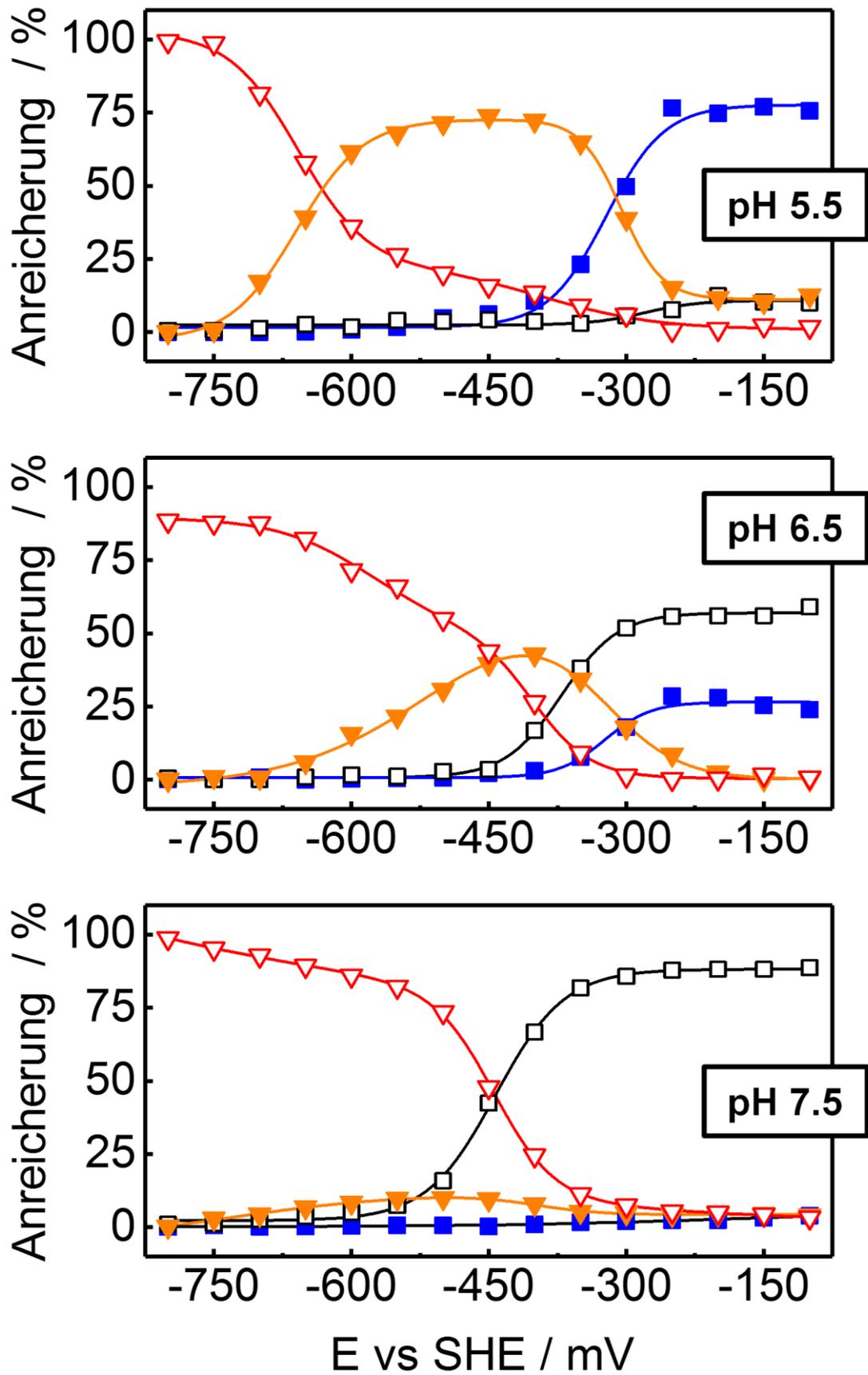


Abbildung 3

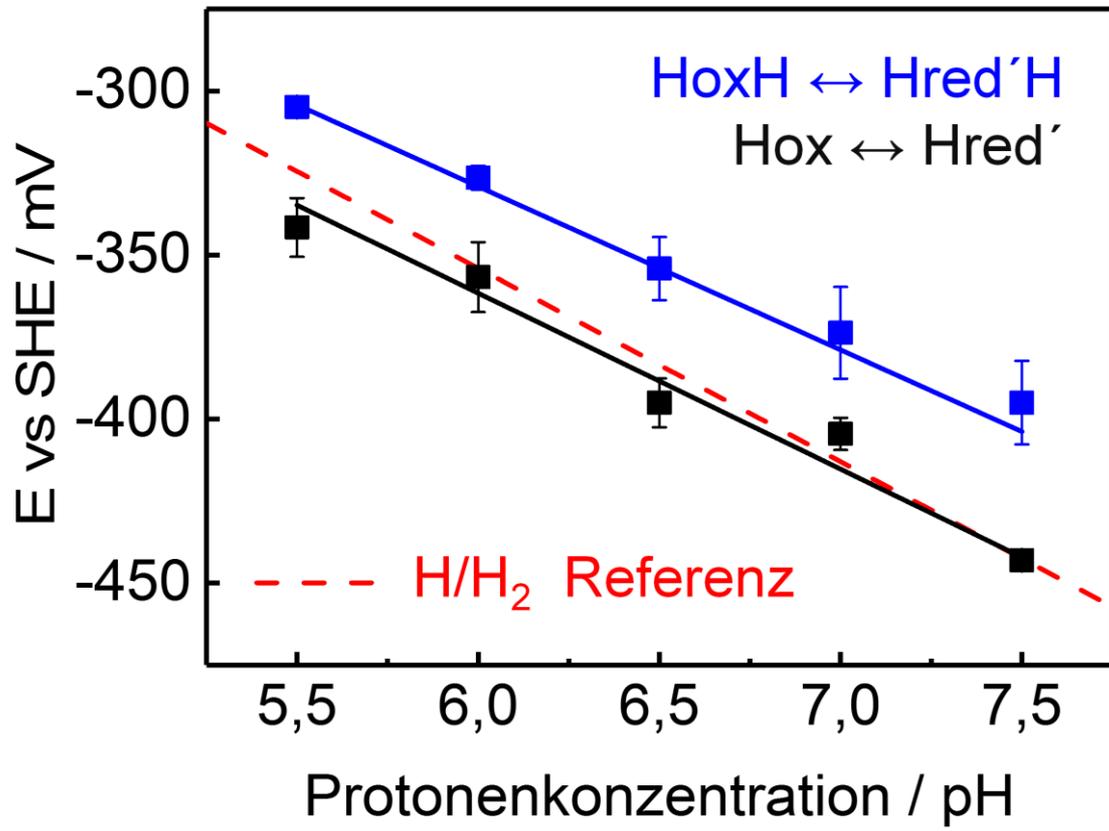


Abbildung 4

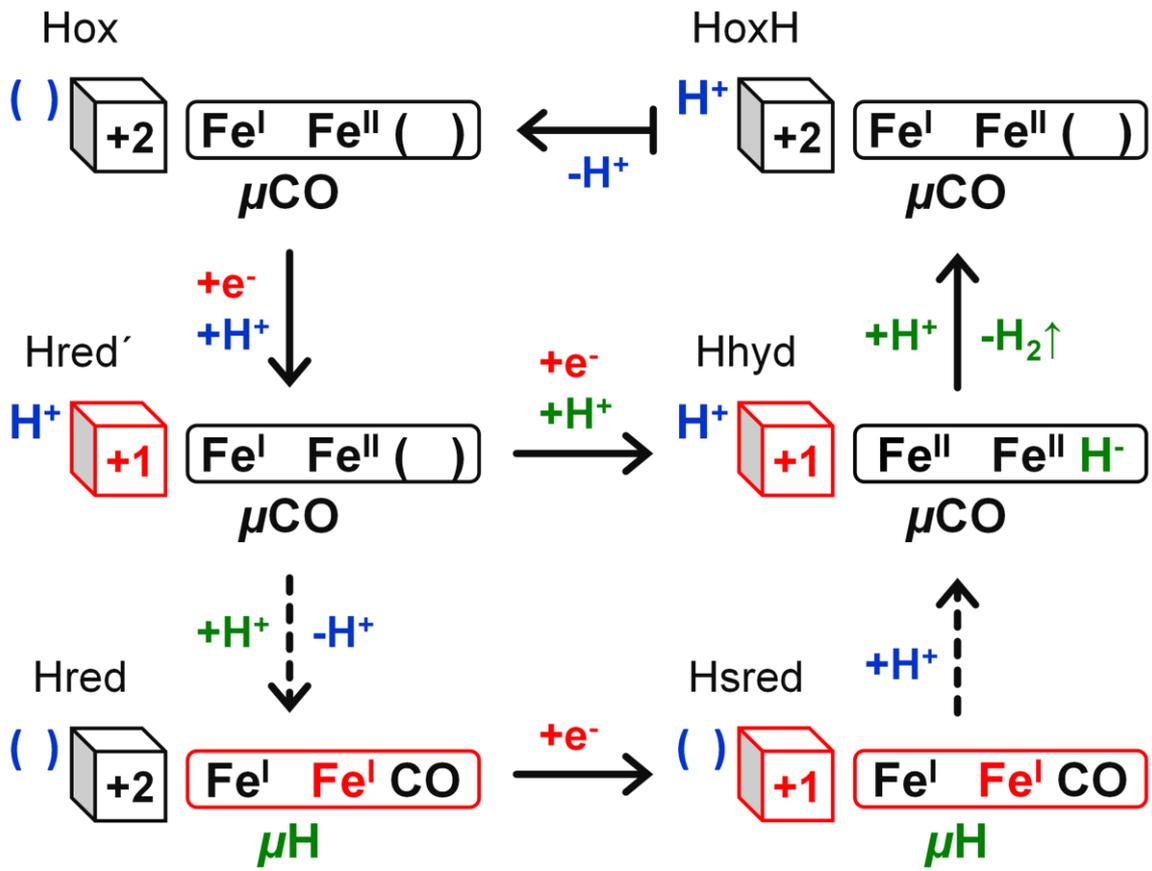


Abbildung 5