

Zur Bildung des FeMo-Cofaktors der Nitrogenase in der Natur und im Reagensglas – ein Zusammenspiel von Genetik und Chemie

Achim Müller* und Eugen Krahn

Es ist eine der herausragenden Anforderungen an die Chemie, gezielt Verbindungen mit maßgeschneiderten Strukturen und Eigenschaften zu erzeugen. Eine Art Vorbildcharakter haben hierbei Produkte der Natur, wobei sich das Spektrum von Biokatalysatoren mit optimaler Selektivität und Aktivität bis zu „anorganischen Materialien“ mit außergewöhnlichen Eigenschaften erstreckt, deren Genese sich mit dem Begriff Biomineralisation beschreiben läßt. Von fun-

damentaler Bedeutung ist es, die Abläufe an den Schnittlinien zwischen Genexpression und nachfolgenden nicht gesteuerten Prozessen zu verstehen. Die Chemie hat schon viel erreicht, doch bei der gezielten Synthese von maßgeschneiderten, hochkomplexen Metallclustern mangelt es noch an grundlegenden Theorien und ordnenden Prinzipien. Dies gilt speziell auch für den faszinierenden Metall-Schwefel-Cluster der Nitrogenase, der das aktive Zentrum für die N_2 -Re-

duktion ist und sich einer Synthese im Labor bislang entzogen hat. Für das Verständnis der biologischen Clustersynthese, die stufenweise erfolgt, sind Informationen aus der Genetik und Chemie erforderlich.

Stichworte: Bioanorganische Chemie · Biosynthese · Eisen-Molybdän-Cofaktor · Eisen-Schwefel-Cluster · Nitrogenase · Stickstoff-Fixierung

Die Fixierung des Stickstoffes aus der Luft wird eine der großen Entdeckungen sein, die auf den Einfallsreichtum der Chemiker warten.

Sir William Crookes, 1898^[**]

1. Einleitung

Trotz unzähliger Versuche ist es nicht gelungen, den für die bakterielle Stickstoff-Fixierung durch das Nitrogenase-Enzymsystem entscheidenden Metall-Schwefel-Cluster zu synthetisieren. Diese Synthese wäre ein bahnbrechender Beitrag zur Erreichung des Ziels, den „Haber-Bosch-Prozeß der Natur“, die biologische Stickstoff-Fixierung – neben der Photosynthese für unsere Ernährung der wichtigste Prozeß –, nachzuempfinden. Der Drang, ein tiefergehendes Verständnis dieses elementaren Stoffwechselvorgangs zu erreichen, resultiert aus dem Traum, den erwähnten, extrem energieaufwendigen industriellen Prozeß zu verbessern. Die Synthese einiger chemisch ähnlicher Cluster, besonders solcher mit einem $[Fe_4S_4]^{2+}$ -Zentrum, ist dagegen in Gegenwart der Basisbestandteile kaum zu verhindern. Was mag der Grund für diesen anscheinenden Widerspruch sein? Durch

aufregende Erkenntnisse aus der Genetik, denen in Chemikerkreisen nicht so viel Aufmerksamkeit zuteil wurde wie denen aus röntgenstrukturanalytischen Untersuchungen, beginnt sich allmählich ein Bild abzuzeichnen, wie die Natur hier – und vielleicht auch grundsätzlich – bei der Clustersynthese vorgeht. Aber gerade die Analyse der Ergebnisse aus der Genetik könnte von entscheidender Bedeutung für die erfolgreiche Synthese „im Reagensglas“ sein, da sich hierdurch Hinweise auf spezielle Bedingungen der stufenweise erfolgenden Synthese ergeben: Die In-vivo-Synthese des Eisen-Molybdän-Cofaktors (FeMoco) des Nitrogenase-Enzymsystems ist bisher die einzige Biosynthese einer anorganischen Clusterstruktur, von der bekannt ist, daß sie über Zwischenstufen verläuft. Die vielen Versuche zur chemischen Synthese des FeMo-Cofaktors waren natürlich lange Zeit dadurch erschwert, daß nur die ungefähre Zusammensetzung, nicht aber die genaue Struktur dieses Clusters bekannt war^[1]. Hier zeigten sich die Grenzen unseres chemischen Verständnisses, da die Aufklärung der Struktur eines aus Sicht des Chemikers noch relativ kleinen Clusters trotz des Aufgebots aller möglichen spektroskopischen Methoden nicht gelang.

Dann kam eine Nachricht, die sich wie ein Lauffeuer unter Naturwissenschaftlern – selbst durch Tageszeitungen – verbreitete: Basierend auf Röntgenstrukturanalysen gelang es, die räumliche Struktur beider Komponenten der Nitrogenase einschließlich ihrer fast schon sagenumwobenen Clusterzentren zu modellieren. Durch die Strukturanalyse ist jetzt auch die genaue Lage und die Proteinumgebung der Clusterzentren im MoFe-Protein bekannt^[2] (Abb. 1). Das „Kim-Modell“ des FeMo-Cofaktors entlarvte zur Enttäuschung der Chemiker alle früher po-

[*] Prof. Dr. A. Müller, E. Krahn
Lehrstuhl für Anorganische Chemie I
Fakultät für Chemie der Universität
Postfach 100131, D-33501 Bielefeld
Telefax: Int. + 521 106-6003

[**] Eine Äußerung von Sir William Crookes im Hinblick auf das Problem am Ende des 19. Jahrhunderts: „England und alle zivilisierten Nationen stehen vor der tödlichen Gefahr, nicht genug zu Essen zu haben.“

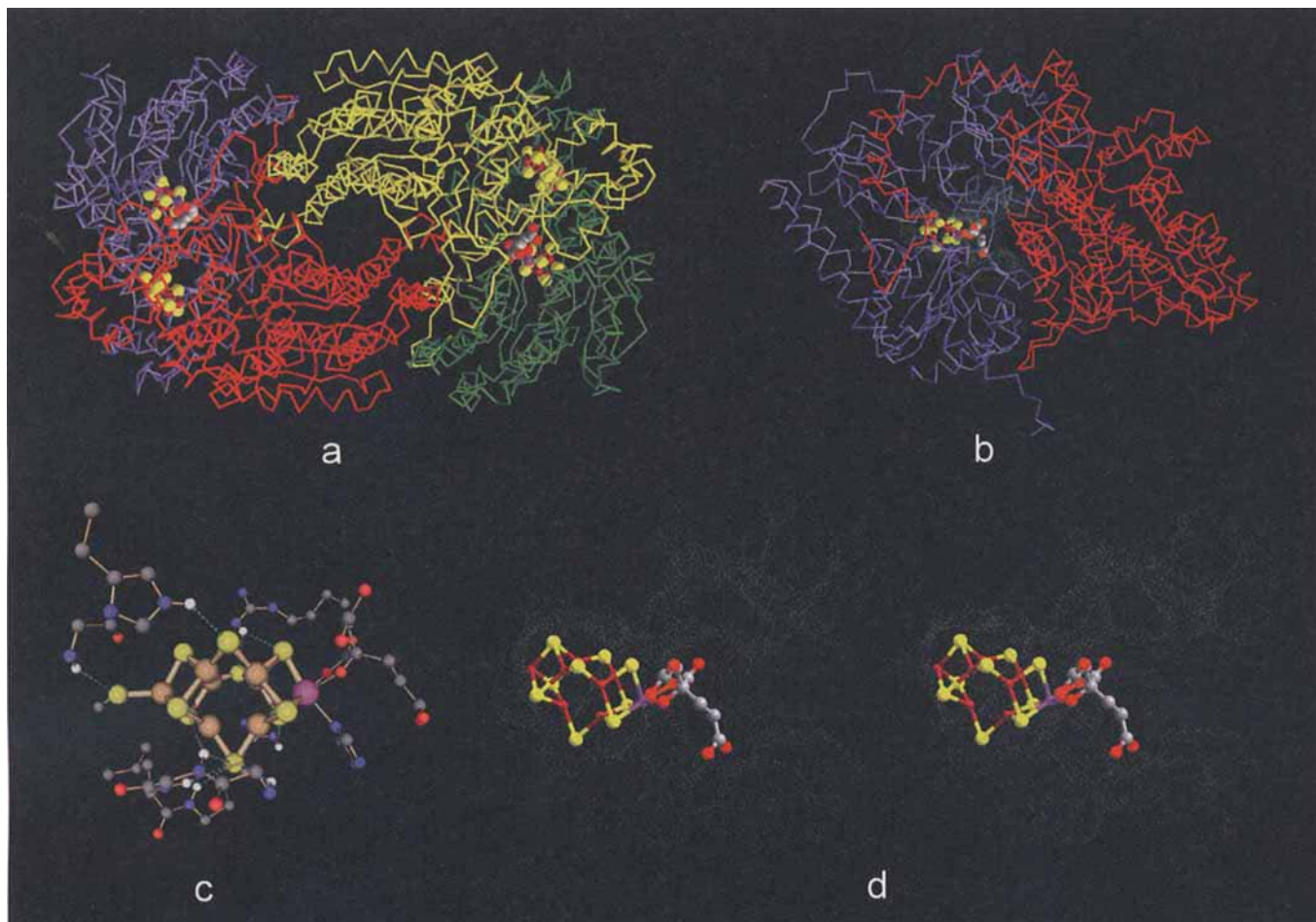


Abb. 1. a) Proteinketten (nur α -Kohlenstoffatome) und Clusterzentren des MoFe-Proteins (α -Untereinheiten: blau und grün, β -Untereinheiten: gelb und rot). b) Proteinketten (nur α -Kohlenstoffatome) einer α - und β -Untereinheit einschließlich des FeMo-Cofaktors und seiner Proteinumgebung (repräsentiert als Ausschnitt aus der „wasserzugänglichen Oberfläche“ (siehe Text) der α -Untereinheit) innerhalb der α -Untereinheit. c) Struktur des FeMo-Cofaktors einschließlich der koordinativ bindenden und wasserstoffbrückenbildenden Aminosäurereste aus seiner Proteinumgebung (Wasserstoffbrücken grün, gestrichelt, Fe braun, S gelb, Mo violett, C grau, O rot und N blau). d) Stereodarstellung des FeMo-Cofaktors und der wasserzugänglichen Oberfläche seiner Proteinumgebung.

stulierten Modelle als wirklichkeitsfremd. Die Struktur des Cofaktors (Abb. 1c, d) besteht danach – formal betrachtet – aus einem Fe_4S_3 - und einem MoFe_3S_3 -Cuban-Fragment, die über drei (anorganische) Sulfidliganden verbrückt sind. Die Zusammensetzung $\text{MoFe}_7\text{S}_9/\text{Homocitrat}$ und seine – vor allem auf-

grund der sechs nahezu trigonal umgebenen und damit koordinativ nicht abgesättigten Fe-Zentren – ungewöhnliche Struktur machen den FeMo-Cofaktor zum größten und komplexesten in Enzymen vorkommenden Metallcluster der Biosphäre.



Achim Müller, geboren 1938 in Detmold, promovierte an der Universität Göttingen 1965 bei O. Glemser und habilitierte sich dort 1967. Seit 1977 hat er einen Lehrstuhl für Anorganische Chemie an der Universität Bielefeld inne. Er ist Mitglied wissenschaftlicher Akademien, darunter der Deutschen Akademie der Naturforscher Leopoldina sowie der Polnischen Akademie der Wissenschaften. Seine Arbeitsgebiete umfassen unter anderem die Molekülphysik (Theorie des Masseneinflusses auf Molekülkonstanten), die Schwingungsspektroskopie (Matrixisolations-spektroskopie, Bandenkonturanalyse, Resonanz-Raman-Effekt, Metallisotopeneffekte), die Bioanorganische Chemie (Modellverbindungen und biologische Stickstoff-Fixierung von freilebenden Mikroorganismen) und die Chemie der molekularen Metallchalkogenid-Komplexe und -Cluster (Synthese, geochemische Relevanz, Molekül- und Elektronenstruktur, supramolekulare und topologische Aspekte sowie ihre Verwendung in der heterogenen Katalyse). Zahlreiche Originalarbeiten und mehr als 30 Übersichtsartikel aus diesen Bereichen wurden von ihm publiziert.

Trotz der jetzt vorliegenden detaillierten Strukturinformationen ist das Nitrogenase-Enzymsystem in wesentlichen Punkten noch nicht verstanden^[8]. Über den Mechanismus der Katalyse ist nach wie vor sehr wenig bekannt. So ist selbst die Frage nach den Bindungsstellen der Substrate N_2 und H_2 sowie nach der Struktur von Intermediaten unbeantwortet. Neben dem Mechanismus interessiert des weiteren:

- Wie erfolgt die Biosynthese des Clusters, d.h. an welcher Stelle treten die konstituierenden Elemente Fe^{n+} , Mo^{n+} und S^{2-} sowie das Homocitrat in den Biosyntheseweg ein? Sind vorher zusammengefügte, größere Einheiten beteiligt, und welche Intermediate treten auf?
- Wie geht die Natur vor, um die Struktur des FeMo-Cofaktors – insbesondere der sechs koordinativ ungesättigten Fe-Zentren – und möglicher Intermediate während des Biosyntheseweges zu stabilisieren? Ist die Synthese in vitro grundsätzlich nicht möglich, oder ist sie bislang nur noch nicht gelungen? Welcher neuen Konzepte bedarf es, um die Natur hier zu imitieren?

Antworten auf diese Fragen sind auch von allgemeiner Bedeutung, da sie sicherlich einen Beitrag zum Verständnis des In-vivo-Zusammenbaus weiterer in aktiven Zentren von Enzymen vorkommender Metallcluster liefern könnten. Auch über die Biosynthesen der „reinen“ FeS-Cluster der Zusammensetzung $\{Fe_2S_2\}$, $\{Fe_3S_4\}$ und $\{Fe_4S_4\}$ ^[9] sowie $\{Fe_6S_6\}$ ^[10, 11] liegen kaum Detailkenntnisse vor. Entsprechendes gilt übrigens auch für den Mn_xO_y -Cluster des Photosystems II^[12].

2. Gründe für die Schwierigkeiten der Clustersynthese im Reagensglas

Die gezielte Synthese von MoFeS-Clustern, und besonders solchen mit nur einem Mo-Atom, ist für Chemiker kein triviales Problem. Schwierigkeiten bereiten unter anderem

- die Aufrechterhaltung spezifischer Oxidationsstufen – vor allem der Molybdänzentren – in Gegenwart von redoxaktiven Liganden wie S^{2-} ^[13],
- die Konfigurationskontrolle etwa über die Bildung einer *fac*-Umgebung des Mo-Zentrums,
- das Verhindern der Bildung polynuclearer Mo-Verbindungen, hervorgerufen durch die Brückenbildungstendenz von S^{2-} - und O^{2-} -Liganden, sowie die Tendenz der Molybdänatome in niedrigen Oxidationsstufen Metall-Metall-Bindungen zu bilden und
- die Erzeugung definierter Koordinationsgeometrien (bei niedrigen Koordinationszahlen) an den Metall- und Schwefelzentren.

Die stabilsten FeS-Cluster sind diejenigen vom Fe_4S_4 -Typ. Aber auch verbrückte Cubansysteme sind relativ leicht zu synthetisieren (vgl. etwa die Synthese von $[(Fe_4S_4Cl)_2S]^{4-}$ ^[14]). Die meisten der bislang synthetisierten MoFeS-Modellverbindungen für das aktive Zentrum des MoFe-Proteins wurden durch „strikte Selbstorganisation“ (darunter versteht man ein ungesteuertes „Zusammenfinden“ der Einzelkomponenten) erhalten und sind oft Heteroanaloga oder -derivate der einfacher zugänglichen binären FeS-Cluster. Es handelt sich dabei z.B. um

Verbindungen vom sogenannten Doppelcuban-Typ $[MoFe_3S_4]_2(SR)_3$ ^[15]. Von der Synthese des ersten Doppelcubans bis zu der des entsprechenden Monocubans, einem $MoFe_3S_4$ -Cluster, durch lösungsmittelinduzierte Spaltung eines Doppelcubans^[16] waren aufgrund der erwähnten Schwierigkeiten – insbesondere wegen der ausgeprägten Tendenz der Mo-Zentren zur Metall-Metall-Wechselwirkung – mehrere Jahre intensiver Laborarbeit nötig. Neben dem Fe_4S_4 -Zentrum finden sich in Metalloproteinen, wie bereits erwähnt, die aus der Eisen-Schwefel-Chemie bekannten Fe_2S_2 -, Fe_3S_4 - und (wahrscheinlich auch) Fe_6S_6 -Zentren. Wegen der vergleichsweise geringen Bildungstendenz dieser Cluster ist die Einhaltung spezieller Bedingungen zu ihrer Synthese nötig^[17]. Ein für Überlegungen zum Verlauf der Biosynthese des FeMo-Cofaktors wichtiger Reaktionstyp wird bei der „Umwandlung“ der Clustertypen Fe_4S_4 , Fe_3S_4 und MFe_3S_4 (Abb. 2a)

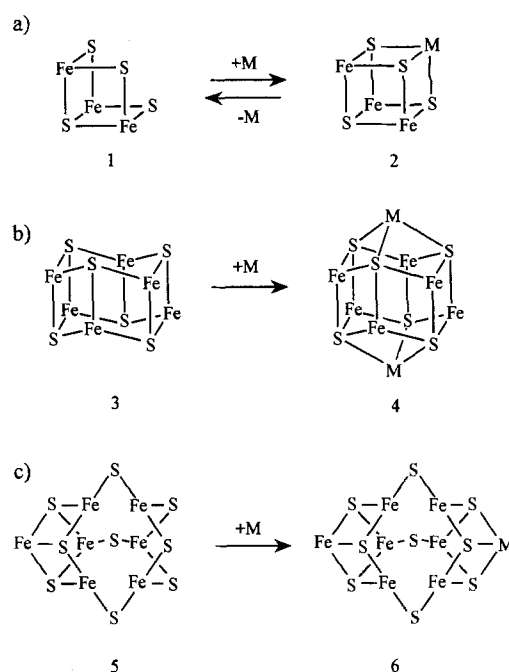
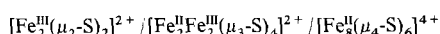


Abb. 2. Schematische Darstellung der Umwandlung von Clusterzentren durch Komplexierung/Dekomplexierung von Metall-Ionen durch schwefelhaltige Clusterfragmente. a) Eine Fe_3S_4 -Einheit 1 bindet über die drei μ_2 -Schwefelzentren ein Metall-Kation M unter Bildung eines MFe_3S_4 -Clusterkerns 2. b) Capping des Fe_6S_6 -Clusters 3. c) Möglicher terminaler Reaktionsschritt innerhalb des nifEN-Proteins bei der Biosynthese des FeMo-Cofaktors: Capping des Fe_7S_9 -Fragments 5 analog zu a) erzeugt die FeMo-Cofaktor-Clusterkernstruktur MFe_7S_9 6 ($M = Mo$). Auch die Erzeugung von 5 aus 6 ($M = Fe$) ist denkbar, da in der Cofaktortasche des MoFe-Proteins – und daher wahrscheinlich auch im nifEN-Protein – nur eine der beiden „Clusterenden“ ungeschützt ist (siehe Abb. 1b, d).

ineinander besonders deutlich; sie ist in vitro sowohl in Enzymen als auch mit Modellverbindungen gelungen^[18]. Durch „Capping“-Reaktionen werden von passend angeordneten Metall-Schwefel-Fragmenten weitere Metallzentren über μ_2 -S-Atome „komplexiert“, wobei das $Fe_3(\mu_3-S)(\mu_2-S)_3$ -Fragment 1 (Abb. 2a) hierbei formal als dreizähliger η^3 -Ligand auftritt^[19]. So bilden auch Verbindungen vom Prisman-Typ, d.h. mit der zentralen Einheit Fe_6S_6 3 (Abb. 2b, vgl. auch das Clusteranion vom Heteroprismen-Typ $[MoFe_3S_6L_6]^{n-}$ ^[14]), vermutlich eine Zwischenstufe bei der Reaktion, die zu Verbindungen mit der Einheit $[Fe_8S_6]^{4+}$ 4 (Abb. 2b; $M = Fe$)^[20] führt.

Hierbei erfolgt ein Capping der Fe_3S_3 -Flächen, die wie das Fe_3S_4 -Fragment als „ η^3 -Ligand“ – jedoch mit einer $(\mu_3\text{-S})_3$ -Anordnung – fungieren. Capping einer $\text{L}_6\text{Fe}_6\text{S}_6$ -Struktur mit einem $\text{MoL}_3(\text{Solv})_3$ -Fragment ergibt Cluster des Typs $[(\text{MoL}_3)_m\text{Fe}_6\text{S}_6\text{L}_6]^{m-}$ mit $m = 1, 2$ (4, Abb. 2b; $M = \text{Mo}$)^[14].

Die Triebkraft der Capping-Reaktionen ist die Tendenz zur Erhöhung der Koordinationszahl der Sulfidliganden, entsprechend dem Übergang von μ_2 nach μ_3 bzw. μ_3 nach μ_4 . Die Tendenz steigt signifikant mit dem „Grad der Reduziertheit“ des Clusters, ausgedrückt z.B. durch das Verhältnis der Zahl der Fe^{II} - zu der der Fe^{III} -Zentren. Dies ist erkennbar in der Reihe der bekannten zentralen Clustereinheiten^[11]:



Daraus folgt, daß die μ_2 -Schwefelzentren des FeMo-Cofaktors in einem relativ stark oxidierten Clusterintermediat leichter generiert werden können.

Durch mehrstufige Synthesen lassen sich mittlerweile auch Verbindungen isolieren, die verbrückte cubanartige MoFe_3S_4 -Einheiten ohne starke Mo-Mo-Wechselwirkungen enthalten. Als Beispiel sei hier das Cluster-Anion $\{[(\text{MoFe}_3\text{S}_4\text{Cl}_2)(\text{C}_2\text{O}_4)]_2(\mu_2\text{-S})(\mu_2\text{-CN})\}^{5-}$ genannt (Abb. 3 oben). Die Synthese von analogen Substanzen mit einem MoFe_3S_4 - und einem Fe_4S_4 -Fragment ist dagegen bisher nicht gelungen.

Eine kürzlich beschriebene Verbindung, der durch strikte Selbstorganisation in einem apolaren Lösungsmittel erhaltene Cluster $[\text{MoFe}_4\text{S}_6(\text{PET}_3)_4\text{Cl}]$ (Abb. 3 unten)^[22], soll hier noch erwähnt werden, da es sich bei dem $\text{Fe}_4(\mu_3\text{-S})_3(\mu_2\text{-S})_3$ -Fragment

dieses Moleküls um die bislang größte erhaltene Partialstruktur des „Kim-Modells“ handelt. Der zum Fe_3S_4 -inverse Fe_4S_3 -Kern war bisher nur im Anion des schwarzen Roussinschen Salzes und einigen Derivaten^[23] sicher nachgewiesen. Die $(\mu_2\text{-S})_3$ -Anordnung im MoFe_4S_6 -Clustertyp wird jedoch wahrscheinlich durch das $(\text{PET}_3)\text{MoS}_3$ -Fragment determiniert und stabilisiert, da sich als Nebenprodukt ein Cluster vom Fe_6S_6 -Prisman-Typ, nicht aber eine Verbindung mit einem $(\text{Fe}_4\text{S}_3)(\mu_2\text{-S})_3(\text{Fe}_4\text{S}_3)$ -Kern (6, Abb. 2c; $M = \text{Fe}$) bildet. Im Gegensatz zu den dreifach koordinierten Fe-Zentren im FeMo-Cofaktor sind die vier Fe-Atome dieser Verbindung allerdings durch PET_3 -Gruppen als viertem Liganden koordinativ abgesättigt. Mit diesen Überlegungen sind die bislang geltenden Grenzen in der Annäherung an die Natur durch die bioanorganischen Modellsysteme umrissen.

Bei der FeMo-Cofaktor-Biosynthese müssen nach oben Geschildertem präorganisierte Fragmente verknüpft werden, da sich der Cofaktor offensichtlich nicht unmittelbar durch strikte Selbstorganisation bildet. Bei der chemischen Synthese kann entsprechend ein Prinzip der Natur ausgenutzt werden, kleine Bausteine zu erzeugen, die die Information zur (späteren) Bildung der komplexen Struktur enthalten (vgl. Lit.^[24]).

So determiniert etwa eine $[\text{OMoS}_3]^{2-}$ -Einheit – als Fragment eines verzerrten Würfels – in Gegenwart weicher Metallzentren die Bildung von Cubanstrukturen wie etwa der von $[(\text{CuCl})_3(\text{OMoS}_3)]^{2-}$ (Abb. 4)^[25]: Das Anion $[\text{OMoS}_3]^{2-}$ ist schon ein halber Cubus, wobei der Sauerstoffligand eine geringere Affinität zu Cu^+ hat als die Schwefelliganden. Die im $[\text{OMoS}_3]^{2-}$ -Fragment enthaltene Information zur Generierung der Zielstruktur wird durch den „Koordinationsalgorithmus“ der Kupferatome „abgelesen“ (vgl. auch Lit.^[24]). Ein Beispiel für die Steuerung einer weitergehenden Verknüpfung solcher cubanartiger Fragmente zeigt sich bei der Bildung der prismanförmigen Verbindung $[(\text{OMoS}_3)_2(\text{CuPPh}_3)_4]$ aus zwei Hälften, den $\text{OMoS}_3(\text{CuPPh}_3)(\text{Cu}(\text{PPh}_3)_2)$ -Einheiten (Abb. 5). Nach der in Lösung erfolgenden Abspaltung einer PPh_3 -Schutzgruppe, Archetyp für Schutzgruppen für Clusterfragmente, findet die „Dimerisierung“ zur Zielverbindung^[25] statt.

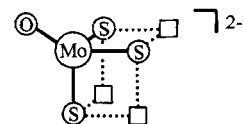


Abb. 4. Schematische Darstellung des cubanartigen Cluster-Anions $[(\text{CuCl})_3(\text{OMoS}_3)]^{2-}$. Die Quadrate stellen jeweils eine CuCl -Einheit dar.

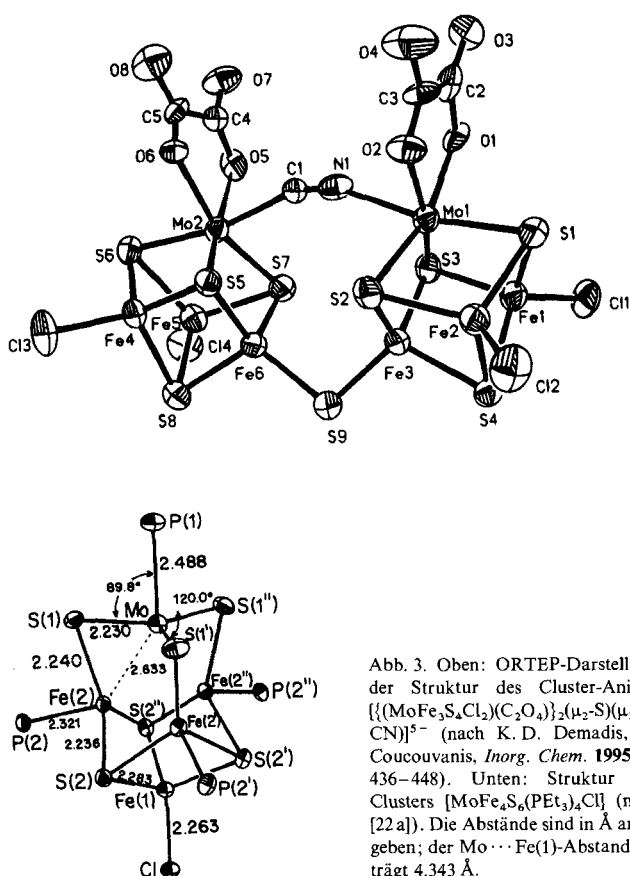


Abb. 3. Oben: ORTEP-Darstellung der Struktur des Cluster-Anions $\{[(\text{MoFe}_3\text{S}_4\text{Cl}_2)(\text{C}_2\text{O}_4)]_2(\mu_2\text{-S})(\mu_2\text{-CN})\}^{5-}$ (nach K. D. Demadis, D. Coucouvanis, *Inorg. Chem.* 1995, 34, 436–448). Unten: Struktur des Clusters $[\text{MoFe}_4\text{S}_6(\text{PET}_3)_4\text{Cl}]$ (nach [22a]). Die Abstände sind in Å angegeben; der $\text{Mo} \cdots \text{Fe}(1)$ -Abstand beträgt 4.343 Å.

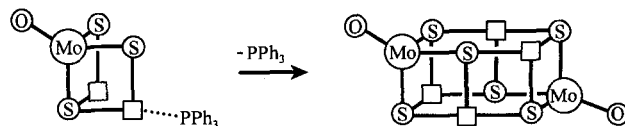


Abb. 5. Schematische Darstellung der Bildung der prismanförmigen Verbindung $[(\text{OMoS}_3)_2(\text{CuPPh}_3)_4]$ durch „Dimerisierung“ von zwei $[\text{OMoS}_3(\text{CuPPh}_3)]$ -Einheiten. Die Quadrate repräsentieren je eine CuPPh_3 -Einheit.

Zum Beitrag der Anorganischen Chemie ist folgendes zusammenfassend zu sagen: Obwohl die Jagd nach dem FeMo-Cofaktor bislang vergebens war, hat die Jagdgesellschaft eine faszinierende Vielfalt von Verbindungen hervorgebracht (vgl. hierzu vor allem Lit.^[14, 18]).

3. Wie steuert die Natur die Biosynthese des FeMo-Cofaktors?

*Die Natur ist als ein System von Stufen zu betrachten,
deren eine aus der anderen notwendig hervorgeht*

G. W. F. Hegel

3.1. Die Funktionen der beteiligten Genprodukte

Von Chemikern fast unbemerkt wurde von Genetikern viel Material über die molekularen Werkzeuge, die in N_2 -fixierenden Mikroorganismen den Zusammenbau des FeMo-Cofaktors bewirken, erarbeitet. Die Bakterien benötigten für den Prozeß der N_2 -Fixierung mehr als zwanzig Gene. Durch biochemische Charakterisierung von Mutanten, bei denen selektiv einzelne dieser sogenannten *nif*-Gene^[26] inaktiviert wurden, konnten nun Hinweise auf die Beteiligung von mindestens sechs Genprodukten (Produkten der *nif*-Gene E, N, Q, V, B und H) an der Biosynthese des FeMo-Cofaktors erhalten werden^[27, 28]. Dies bedeutet, daß die Synthese der anorganischen Cofaktoren wesentlich genetisch gesteuert ist. Die zentrale Frage ist: Wie ebenen Genprodukte, d. h. Proteine, den Weg, den die konstituierenden Elemente Fe, S und Mo in der Zelle durchlaufen?

Zwei Gene, *nifE* und *nifN*, zeigen eine deutliche Homologie (Ähnlichkeiten in den Sequenzen) in *nifD* und *nifK*, den Strukturgenen, die die Proteinketten des MoFe-Proteins codieren. Die Genprodukte von *nifE* und *nifN* bilden zusammen ebenfalls ein tetrameres Protein^[29]. Darüber hinaus findet sich in Bakterienstämmen, bei denen diese Gene inaktiviert sind, ein cofaktorloses Apo-MoFe-Protein, das sich durch Zugabe des isolierten FeMo-Cofaktors im sogenannten Rekonstitutionstest aktivieren läßt^[30]. Aus den geschilderten Fakten wurde gefolgert, daß das *nifEN*-Protein als Schablone dient, in der sich ein wesentlicher Schritt der FeMo-Cofaktor-Biosynthese vollzieht. (Darüber hinaus wird vermutet, daß das Fe-Protein auch an das *nifEN*-Tetramer bindet und hier Elektronen für Reduktionsschritte liefert^[29].)

Ein entscheidender Hinweis auf eine Funktion des *nifB*-Proteins innerhalb der Eisen-„Verarbeitung“ (des „Fe-Processings“) ergab sich aus der Beobachtung, daß das *nifB*-Gen auch für die beiden alternativen Nitrogenasesysteme^[31] essentiell ist^[32] – im Gegensatz zu anderen Genen, die in allen drei Systemen eigenständig sind. Ein weiterer Durchbruch gelang jüngst der Arbeitsgruppe von P. Ludden mit der Isolierung des Cofaktors des *nifB*-Proteins („*nifB*-Cofaktor“), des bislang einzigen bekannten Intermediats der FeMo-Cofaktor-Biosynthese^[33]. In diesem Arbeitskreis an der University of Wisconsin in Madison wird schon seit längerer Zeit an einem In-vitro-System für die Cofaktor-Biosynthese gearbeitet^[34]. Als Grundlage dienten zunächst zellfreie Extrakte eines *nifB*- und eines *nifEN*-defizienten Bakterienstammes. Während beide Stämme nur cofaktorloses Apo-MoFe-Protein bilden, liegt nach Vereinigung der Extrakte die komplette Cofaktorsynthesemaschinerie vor. Mit diesem System gelang es schon vor etwa sechs Jahren, modifizierte Formen des Cofaktors in das MoFe-Protein zu integrieren, bei denen das Homocitrat^[2] durch ähnliche organische Verbindungen ersetzt wurde. Dieses System wurde dann als „Aktivitätstest“ bei der Anreicherung und Reinigung des *nifB*- und des *nifEN*-Proteins eingesetzt. Von entscheidender Bedeu-

tung ist, daß der „*nifB*-Cofaktor“, bei dem es sich den bisherigen Erkenntnissen zufolge um einen FeS-Cluster handelt, das *nifB*-Protein im In-vitro-System ersetzen kann^[33].

Mit der Charakterisierung des *nifS*-Proteins^[35] scheint jetzt darüber hinaus auch das Syntheseäquivalent der Zelle für die anorganischen Sulfidliganden, die intrazellulär aufgrund ihrer Toxizität nicht in ungebundener Form vorkommen dürfen, gefunden zu sein. Durch dieses Enzym wird „der Schwefel“ aus Cystein unter Bildung einer proteingebundenen Persulfid-Gruppierung für die Biosynthese aktiviert. Der vorgeschlagene Mechanismus ist von genereller Relevanz für die Biosynthese von FeS-Clustern^[35].

Das Element Molybdän wird von den Zellen in Form von $[MoO_4]^{2-}$ - oder $[MoO_3(OH)]^-$ -Ionen aufgenommen. Demnach muß beim „Mo-Processing“ folgendes passieren: 1) Eine Änderung der Ligandensphäre (hin zu „weichen“ S-Liganden und Homocitrat), 2) eine Erhöhung der Koordinationszahl von 4 auf 6 und 3) eine Reduktion des Mo-Zentrums (im FeMo-Cofaktor liegt offensichtlich die Oxidationsstufe IV vor^[36]). Wichtige Hinweise auf die Beteiligung des *nifQ*-Proteins am Mo-Processing ergeben sich aus folgenden Befunden: Die Ausschaltung dieses Gens hat keinen Einfluß auf die Aktivität der alternativen (Mo-unabhängigen) Nitrogenasesysteme^[31] und manifestiert sich nicht mehr phänotypisch in Gegenwart hoher Konzentrationen an $[MoO_4]^{2-}$ -Ionen oder Cystein in der Umgebung der Organismen. Des weiteren zeigen Versuche mit $[^{99}MoO_4]^{2-}$ und tritiummarkiertem Homocitrat, daß Molybdänatome und Homocitrat relativ früh gemeinsam in den FeMo-Cofaktor-Syntheseweg eintreten^[27].

Durch In-vivo ^{99}Mo -TDPAC-Spektroskopie (TDPAC = *time differential perturbed angular correlation*) lassen sich Informationen über das Processing des Molybdäns gewinnen. Die Methode basiert auf der Bestimmung der Wechselwirkung des Kernquadrupolmomentes mit dem elektrischen Feldgradienten der Elektronenhülle, d. h. die erhaltenen Frequenzdaten sind vergleichbar mit denen der Kernquadrupolresonanz-Spektroskopie. Die Ergebnisse ermöglichen Aussagen über die Art der intermediär auftretenden Mo-Spezies^[37]. Messungen erfolgten an Mutanten, bei denen der FeMo-Cofaktor-Biosyntheseweg durch Ausschaltung eines oder mehrerer der involvierten Gene an verschiedenen Stellen unterbrochen ist. Bisher konnten das fertige MoFe-Protein und ein Mo-Speicherprotein von uns detektiert werden^[37].

3.2. Die Verknüpfung der Bausteine

Die Ergebnisse der genetischen Studien zeigen eindeutig, daß es sich bei der FeMo-Cofaktor-Biosynthese um einen mehrstufigen Prozeß handelt. Diese Information ist natürlich aus dem Strukturmodell des Clusters nicht unmittelbar ableitbar. Offensichtlich kommt es im *nifEN*-Protein zur Aufnahme eines „FeS“-Fragments („*nifB*-Cofaktor“) und anschließend zur Fusion mit einem Mo-haltigen Fragment (Abb. 6), so daß hier der endgültige Zusammenbau der Fragmente zum fertigen FeMo-Cofaktor erfolgt. Einige weitere Rückschlüsse auf die Funktion des *nifEN*-Proteins werden jetzt durch einen Vergleich der Aminosäuresequenzen des MoFe- und des *nifEN*-Proteins bezüglich einzelner Aminosäurereste, deren Funktionen sich aus ihrer

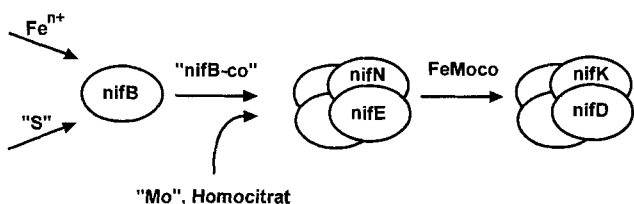


Abb. 6. Vereinfachte, schematische Darstellung des Eintritts der „Ingredienzien“ Fe^{2+} , „S“, „Mo“ und Homocitrat in den Biosyntheseweg des FeMo-Cofaktors. NifX steht jeweils für das Genprodukt (Protein oder Protein-Untereinheit) des Gens *nifX*, co für Cofaktor.

räumlichen Anordnung innerhalb des MoFe-Proteins ableiten lassen, ermöglicht^[38].

Legt man die Ergebnisse der bislang angestellten Betrachtungen zugrunde, ergeben sich zwei mögliche Szenarien für einen Verlauf der FeMo-Cofaktor-Biosynthese:

1) Innerhalb des nifEN-Proteins kommt es zur Verknüpfung eines „ Fe_4 “- mit einem „ MoFe_3 “-Clusterfragment. Die Bildung eines solchen MoFe_n -Fragments könnte unter Beteiligung eines MoS-Vorläufers vonstatten gehen, der – wie das OMoS_3 -Fragment – die Struktur einer Clusterecke determiniert^[39].

2) Der „nifB-Cofaktor“ ist der gesamte Eisen-Schwefel-Teil des FeMo-Cofaktors (5, Abb. 2), und das Capping der η^3 -S-Anordnung (analog zur $\text{Fe}_3\text{S}_4 \rightarrow \text{MFe}_3\text{S}_4$ -Konversion: 1 \rightarrow 2, Abb. 2) mit einem Mo-Homocitrat-Fragment innerhalb des nifEN-Proteins erfolgt als terminaler Schritt der FeMo-Cofaktor-Synthese (5 \rightarrow 6, Abb. 2). Die molekulare Erkennung des Molybdats verläuft dabei in der Zelle durch Homocitrat unter Bildung eines Komplexes des Typs $\text{MoO}_n/\text{Homocitrat}$; dieser wird durch das nifEN-Protein eingefangen und positioniert^[41]. Die dann stattfindende Reduktion des Molybdäns(VI) im Protein erhöht die Basizität des Mo-Komplexfragments, was eine Protonierung terminaler Sauerstoffliganden erleichtert und damit eine Labilisierung der Ligandensphäre bewirkt. Darüber hinaus erhöht eine Reduktion des Molybdänzentrums dessen Affinität zu den „weichen“ Schwefelliganden, wodurch ein Capping des Fe_7S_9 -Fragmentes erleichtert wird. Um ein solches Fragment innerhalb des nifB-Proteins zu generieren, sollte dort zur Erzeugung der μ_2 -Schwefelzentren ein Clusterfragment in einem relativ oxidierten Zustand stabilisiert werden. (Die für das Capping notwendigen Reduktionsschritte können dann im nifEN-Protein unter Beteiligung des Fe-Proteins erfolgen.)

3.3. Der Weg des FeMo-Cofaktors in das MoFe-Protein

Auf welchem Weg gelangt der Cofaktor nach seiner Synthese im nifEN-Genprodukt in das Apo-MoFe-Protein und wie wird die höhere Affinität des Zielproteins für die Syntheschablone erreicht? Daß der FeMo-Cofaktor zwischenzeitlich mehr oder weniger frei, d. h. nicht proteingebunden, im Cytosol der Zelle vorliegt, darauf weist die Rekonstituierbarkeit des Apo-MoFe-Proteins mit dem isoliertem FeMo-Cofaktor in Gegenwart des Fe-Proteins hin (vgl. Lit.^[36]). Darüber hinaus konnte von uns gezeigt werden, daß der frisch synthetisierte Cofaktor in vivo in das Apo-„MoFe“-Protein eines vorher exprimierten alternativen Nitrogenasesystems^[31] aufgenommen wird^[42]. Dies setzt zumindest eine gewisse kinetische Stabilität des Clusters außerhalb

der Proteinumgebung voraus, wobei aufgrund des etwas veränderten ESR-Spektrums^[36] deutlich wird, daß der FeMo-Cofaktor außerhalb des Proteins in leicht veränderter Form vorliegt.

Bei der „Übersiedelung“ des FeMo-Cofaktors spielen nun weitere Proteine eine Rolle. So kommt dem Fe-Protein eine bislang unbekannte Funktion bei der Insertion des Cofaktors in das Apo-MoFe-Protein zu. Ferner ist das Apo-MoFe-Protein mit einem Hilfsprotein (nifY) assoziiert, das wahrscheinlich eine Konformation stabilisiert, die für die Aufnahme des Cofaktors günstig ist^[28]. Für die Aufnahme muß ein Insertionskanal freigelegt werden, da sich in der von Rees et al. bestimmten Struktur des MoFe-Proteins erstaunlicherweise keine permanent vorhandenen Öffnungen für eine Cofaktorinsertion erkennen lassen^[5].

Um diesem Problem nachzugehen, berechneten wir mit einem Molecular-Modelling-Programm^[45], basierend auf den von D. C. Rees et al. ermittelten Strukturdaten des MoFe-Proteins, die „wasserzugängliche Oberfläche“^[46] der α -Untereinheit (Abb. 1 b, d). Man erkennt deutlich einen Hohlraum, der den Cofaktor beherbergt. Dieser Hohlraum zeigt eine Öffnung, die im MoFe-Protein vollständig von der β -Untereinheit wie von einem Deckel verschlossen ist (Abb. 1 b). Eine Insertion des Cofaktors über diesen Kanal würde also eine – zumindest partielle – Abdissoziation der β -Untereinheit voraussetzen^[38]. Von physiologischer Bedeutung ist natürlich die Struktur des Proteins in Lösung, die von der kristallographisch ermittelten abweichen kann. Wir untersuchen in diesem Zusammenhang Lösungen des MoFe-Proteins mittels dynamischer Lichtstreuung. Vorläufige Ergebnisse lassen darauf schließen, daß das hydrodynamische Volumen des MoFe-Proteins etwas größer ist, als es der Struktur im Kristall entspricht. (Der gemessene Translationsdiffusionskoeffizient ist um etwa 10–15% größer als der auf Basis der kristallographischen Daten durch hydrodynamische Rechnungen erhaltene.) Durch den Sequenzvergleich ergeben sich nun neue Hinweise darauf, daß das Ausmaß der Wechselwirkungen zwischen α - und β -Untereinheit im nifEN-Protein geringer ist als im MoFe-Protein und daher eine Freilegung des Insertionskanals leichter erfolgen kann^[47]. In diesem Zusammenhang ist weiterhin wichtig, daß sich im nifEN-Protein anstelle des im MoFe-Protein am Molybdän koordinierenden Histidinrestes ein Asparaginrest befindet^[29], was sicherlich zur Folge hat, daß der Cofaktor im nifEN-Protein schwächer gebunden wird als im MoFe-Protein. Ein Säureamid-Stickstoffatom ist schwächer basisch als ein Imidazol-Stickstoffatom und damit ein deutlich schwächerer Ligand. All diese Befunde liefern Hinweise auf den Weg, auf dem der fertige Cofaktor aus seiner nifEN-Syntheseschablone „entkommen“ kann, und auf die Ursachen, warum er, einmal in das MoFe-Protein integriert, am finalen Ort gut festgehalten wird.

4. Ausblick oder was kann der Chemiker von der Natur lernen?

Die vollendete Struktur war nirgendwo als solche präformiert. Aber der Strukturplan war schon in seinen Bestandteilen vorhanden.

J. Monod

Während sich bei der Bildung größerer Cluster-Aggregate, z.B. dem FeO-Kern des Ferritins, nach einem Nucleationsvorgang in einer dominanten Wachstumsphase Selbstorganisationsprozesse

erkennen lassen^[48], wird die *stufenweise* Synthese des FeMo-Cofaktors offensichtlich entscheidend durch Proteinschablonen dirigiert. Hier bietet sich der Vergleich mit bestimmten templatgesteuerten Synthesen einer anorganischen Wirt-Gast-Chemie an^[49]. Die aktiven Zentren der Proteinschablonen bergen das hier diskutierte Geheimnis: *Die Synthesevorschrift für die FeMo-Cofaktor ist in der Sprache der Proteine geschrieben*. Diese können viele der Probleme lösen, mit denen der Chemiker zu kämpfen hat. Die Steuerung der Redoxprozesse geschieht im betrachteten Fall unter anderem durch die enzymatische Kontrolle über die Sulfidliganden, d. h. durch das NiS -Protein. Durch Bereitstellen definierter Hohlräume und spezifische Wechselwirkungen, z. B. H-Brücken, sowie durch Ladungskompensation wird die im Reagensglas eindeutig bevorzugte Bildung von polynuclearen Mo-Verbindungen des Doppelcuban- oder auch Prisman-Typs inhibiert, die Art der Verknüpfung von Fragmenten gesteuert und eine Abschirmung vor „destruktiven“ Molekülen (z. B. Nucleophilen) erreicht. Die FeMo-Cofaktorstruktur wird in den speziellen Hohlräumen der Proteine stabilisiert. Hierbei spielen Wasserstoffbrückenbindungen, besonders zu den „wenig stabilen“ μ_2 -Schweifelliganden (Abb. 1c), eine entscheidende Rolle.

Es ist in diesem Zusammenhang verständlich, daß man bislang keine Proteinschablonen für die Synthese der in der belebten Natur praktisch ubiquitären Fe_4S_4 -Proteinzentren gefunden hat. Diese entstehen wegen ihrer hohen Bildungstendenz durch strikte Selbstorganisation direkt in der Enzymtasche, die einen präformierten Ligandensatz enthält^[50]. Dies gilt auch für die thermodynamisch etwas weniger günstigen Fe_2S_2 -Zentren^[51]. $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ -Cluster, die man entsprechend ihrem relativ hohen Fe^{2+} -Anteil in den phylogenetisch ältesten Organismen, z. B. den N_2 -fixierenden Chlostridien, bevorzugt findet, konnten sich selbst schon auf der reduzierend wirkenden Ureide leicht aus Fe^{2+} - und S^{2-} -Ionen in Gegenwart eines Elektronenacceptors, etwa Spuren (!) O_2 – vielleicht durch Radiolyse von H_2O erzeugt –, bilden^[52].

Wie müßte nun ein maßgeschneiderter synthetischer Wirt als Schablone für eine In-vitro-Synthese des FeMo-Cofaktors aussehen? Sicherlich sollte ein derartiger Wirt die dreizählige Symmetrieachse des Cofaktors widerspiegeln und einen in bezug auf Form, Größe und Hydrophobie passenden Hohlraum präformiert bereitstellen können. Darüber hinaus sollte der Wirt – im Sinne eines biomimetischen Ansatzes – eine Thiolatgruppe als Liganden für das *exo*-ständige Eisenatom bereitstellen und wasserstoffbrückenbildende Zentren zur Stabilisierung der $\mu_2\text{-S}^{2-}$ -Liganden sowie basische Gruppen zur Kompensation der negativen Ladung seines potentiellen Gastes enthalten. Ein derartiger synthetischer Wirt ließe sich natürlich auch zur Komplexbildung des isolierten FeMo-Cofaktors einsetzen. Es könnte sich aber auch ein „molekularer Rezeptor“ programmieren lassen^[24, 49], der sich durch Selbstorganisation nach einem vorgegebenen Algorithmus aus mehreren Bausteinen unter dem dirigierenden Einfluß des FeMo-Cofaktors bildet. Daß darüber hinaus sogar eine Clustersynthese und die gleichzeitige Bildung einer aus Fragmenten aufgebauten Hülle als interdependenter und synergistisch erfolgreicher Gesamtprozeß möglich ist, zeigt die Synthese des Polyoxoanions $[\text{V}_{34}\text{O}_{82}]^{10-}$. Dieses Anion enthält im Zentrum einen cubanartigen $[\text{V}_4\text{O}_4]$ -Cluster, der als Templat die Bildung seines Wirtes dirigiert, aber auch nicht unabhängig von der Bildung der „äußeren Schale“ entsteht^[53].

Fernziel ist natürlich, in einem Wirt-Gast-Komplex – ein komplett präformiertes Wirt- und/oder Gastsystem ist nicht unbedingt nötig^[49], wie auch das Beispiel der $[\text{V}_{34}\text{O}_{82}]^{10-}$ -Synthese zeigt – die In-vitro-Synthese des FeMo-Cofaktors zu ermöglichen und die N_2 -Reduktion im Reagensglas zu erreichen. Hiermit hätte die Chemie – nach der Entwicklung des Haber-Bosch-Verfahrens am Anfang dieses Jahrhunderts – erneut im Sinne von Sir William Crookes gehandelt, diesmal aber in Zusammenarbeit mit anderen naturwissenschaftlichen Disziplinen, insbesondere der Genetik.

Wir danken Priv.-Doz. Dr. Werner Klipp, Bielefeld, für die fruchtbare Zusammenarbeit im Rahmen des von der Deutschen Forschungsgemeinschaft finanzierten Projektes Biologische Stickstoff-Fixierung (Forschergruppe: Metalloenzyme), Prof. Dr. D. C. Rees, Los Angeles, für kristallographische Daten sowie dem Fonds der Chemischen Industrie und der Deutschen Forschungsgemeinschaft für finanzielle Unterstützung.

Eingegangen am 26. Oktober 1994 [A 100]

- [1] *Nitrogen Fixation* (Hrsg.: A. Müller, W. E. Newton), Plenum, New York, 1983.
- [2] Das Nitrogenase-Enzymsystem besteht aus zwei Komponenten: Das Fe-Protein, ein γ_2 -Dimer mit einer Molekülmasse von etwa 60 000 Da, überträgt in einer ATP-abhängigen Reaktion Elektronen auf das MoFe-Protein, an dem sich die Reduktion des Stickstoffs vollzieht. Das MoFe-Protein ist $\alpha_2\beta_2$ -Tetramer und hat eine Molekülmasse von etwa 240 000 Da. Der FeMo-Cofaktor ist in der α -Untereinheit lokalisiert und über zwei Aminosäureseitenketten (von Cystein und Histidin) kovalent mit dem Protein verknüpft. Zusätzlich bestehen mehrere H-Brücken zwischen dem Protein und Schwefelliganden des Cofaktors. An das Molybdänatom ist ein Homocitrat-Anion als zweizähliger Ligand über eine Hydroxy- und eine Carboxylatgruppe koordiniert (Abb. 1c, d). Das MoFe-Protein enthält neben dem FeMo-Cofaktor noch einen weiteren Typ von Metall-Schwefel-Aggregat (P-Cluster) (Abb. 1a), für den zwei Strukturmodelle diskutiert werden: zwei über je ein S-Atom verbrückte Fe_4S_4 -Cubane [3–5] oder zwei Fe_2S_2 -Fragmente, die über ein sechsfach koordiniertes Schwefelzentrum verbunden sind [6, 7]. Die beiden P-Cluster verbrücken jeweils die α - und β -Untereinheit und sind durch je drei Cysteinreste mit den Untereinheiten verknüpft. Eines der drei Cystein-Schwefelatome verbrückt jeweils die beiden Clusterhälften, die beiden anderen fungieren als terminale Liganden für die „äußeren“ Fe-Atome des Clusters [3–7].
- [3] J. Kim, D. C. Rees, *Science* 1992, 257, 1677–1682; *Nature (London)* 1992, 360, 553–560.
- [4] M. K. Chan, J. Kim, D. C. Rees, *Science* 1993, 260, 792–794.
- [5] D. C. Rees, M. K. Chan, J. Kim, *Adv. Inorg. Chem.* 1993, 40, 89–119.
- [6] J. Chen, J. Christiansen, N. Campobasso, J. T. Bolin, R. C. Tittsworth, B. J. Hales, J. J. Rehr, S. P. Cramer, *Angew. Chem.* 1993, 105, 1661–1663; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1993, 32, 1592–1594.
- [7] J. T. Bolin, A. E. Ronco, T. V. Morgan, L. E. Mortenson, N.-H. Xuong, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993, 90, 1078–1082; J. Chen, J. Christiansen, S. J. George, J. van Elp, R. Tittsworth, B. J. Hales, S. Al-Ahmad, D. Coucouvanis, N. Campobasso, J. T. Bolin, S. P. Cramer in Lit. [8], S. 231–241.
- [8] *Molybdenum Enzymes, Cofactors and Model Systems* (Hrsg.: E. I. Stiefel, D. Coucouvanis, W. E. Newton), American Chemical Society, Washington D.C., 1993.
- [9] H. Beinert, *FASEB J.* 1990, 4, 2483–2491.
- [10] I. Moura, P. Tavares, J. J. G. Moura, N. Ravi, B. H. Huynh, M.-Y. Liu, J. LeGall, *J. Biol. Chem.* 1992, 267, 4489–4496.
- [11] A. J. Pierik, R. G. B. Wolbert, P. H. A. Mutsaers, W. R. Hagen, C. Veeger, *Eur. J. Biochem.* 1992, 206, 697–704; A. J. Pierik, W. R. Hagen, W. R. Dunham, R. H. Sands, *ibid.* 1992, 206, 705–719.
- [12] K. Wieghardt, *Angew. Chem.* 1994, 106, 765–768; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1994, 33, 725–728.
- [13] A. Müller, *Polyhedron* 1986, 5, 323–340.
- [14] D. Coucouvanis in Lit. [8], S. 304–331, zit. Lit.
- [15] T. E. Wolff, J. M. Berg, C. Warrick, K. O. Hodgson, R. H. Holm, R. B. Frankel, *J. Am. Chem. Soc.* 1978, 100, 4630–4632; G. Christou, C. D. Garner, F. E. Mabbs, T. J. King, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1978, 740–741.
- [16] T. E. Wolff, J. M. Berg, R. H. Holm, *Inorg. Chem.* 1981, 20, 174–180.
- [17] A. Müller, K. Knüttel, E. Krickemeyer, A. Hildebrand, H. Bögge, K. Schneider, A. Armatage, *Naturwissenschaften* 1991, 78, 460–462.
- [18] R. H. Holm, *Adv. Inorg. Chem.* 1992, 38, 1–71.
- [19] A. Müller, V. P. Fedin, E. Diemann, H. Bögge, E. Krickemeyer, D. Sölter, A. M. Giuliani, R. Barbieri, P. Adler, *Inorg. Chem.* 1994, 33, 2243–2247.
- [20] S. Pohl, U. Opitz, *Angew. Chem.* 1993, 105, 950–952; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1993, 32, 863–864.

- [21] A. Müller, N. Schladerbeck, *Chimia* **1985**, 39, 23–24.
- [22] a) E. Nordlander, S. C. Lee, W. Cen, Z. Y. Wu, C. R. Natoli, A. Di Cicco, A. Filippini, B. Hedman, K. O. Hodgson, R. H. Holm, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 5549–5558; b) W. Cen, F. M. MacDonnell, M. J. Scott, R. H. Holm, *Inorg. Chem.* **1994**, 33, 5809–5818.
- [23] M. J. Scott, R. H. Holm, *Angew. Chem.* **1993**, 105, 621–623; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, 32, 564–566.
- [24] P. Baxter, J.-M. Lehn, A. De Cian, J. Fischer, *Angew. Chem.* **1993**, 105, 92–95; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, 32, 69–72; R. Krämer, J.-M. Lehn, A. De Cian, J. Fischer, *ibid.* **1993**, 105, 764–767 bzw. **1993**, 32, 703–706, zit. Lit.
- [25] A. Müller, U. Schimanski, J. Schimanski, *Inorg. Chim. Acta* **1983**, 76, L245–L246.
- [26] Viele dieser *nif*-Gene (*nif*: nitrogen fixation) sind sequenziert worden, wodurch sich die Aminosäuresequenzen der entsprechenden Genprodukte ableiten lassen. Die Strukturgene für die α - und β -Proteinketten des MoFe-Proteins werden als *nifD* und *nifK* bezeichnet, die γ -Untereinheit des Fe-Proteins wird von *nifH* codiert (W. H. Orme-Johnson, *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **1985**, 14, 419–459; vgl. auch J. Erfkamp, A. Müller, *Chem. Unserer Zeit* **1990**, 6, 267–279, zit. Lit.). Das Produkt des *nifV*-Gens katalysiert die Synthese des Homocitrat-Liganden (Übersicht in Lit. [27]). Grundsätzlich lassen sich mit Hilfe der Genetik zahlreiche Aspekte der biologischen N_2 -Fixierung verstehen. Hierzu gehören neben der Cluster-Biosynthese auch die Regulation der Expression der *nif*-Gene durch Ammonium-Ionen und andere Stickstoffverbindungen sowie durch Molybdat-Ionen. Von großem Interesse ist natürlich die Übertragung von *nif*-Genen auf Pflanzen.
- [27] P. W. Ludden, V. K. Shah, G. P. Roberts, M. Homer, R. Allen, T. Paustian, J. Roll, R. Chatterjee, M. Madden, J. Allen in Lit. [8], S. 196–215.
- [28] D. R. Dean, J. T. Bolin, L. Zheng, *J. Bacteriol.* **1993**, 175, 6737–6744.
- [29] K. E. Brigle, M. C. Weiss, W. E. Newton, D. R. Dean, *J. Bacteriol.* **1987**, 169, 1547–1553.
- [30] V. K. Shah, W. J. Brill, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, 74, 3249–3253.
- [31] Neben den konventionellen, Mo-abhängigen Nitrogenase existieren zwei weitere, „alternative“ Nitrogenasesysteme, die durch ein eigenes genetisches System codiert werden und deren Cofaktoren anstelle der Molybdänatome Vanadium (im FeV-Cofaktor) oder Eisenzentren (im FeFe-Cofaktor) enthalten. R. N. Pau in *Biology and Biochemistry of Nitrogen Fixation* (Hrsg.: M. J. Dilworth, A. R. Glenn), Elsevier, Amsterdam, **1991**, S. 37–57.
- [32] K. Schüddekopf, S. Hennecke, U. Liese, M. Kutsche, W. Klipp, *Mol. Microbiol.* **1993**, 8, 673–684, zit. Lit.
- [33] V. K. Shah, J. R. Allen, N. J. Spangler, P. W. Ludden, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 1154–1158.
- [34] V. K. Shah, J. Imperial, R. A. Ugalde, P. W. Ludden, W. J. Brill, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**, 83, 1636–1640.
- [35] L. Zheng, R. H. White, V. L. Cash, D. R. Dean, *Biochemistry* **1994**, 33, 4714–4720.
- [36] B. K. Burgess, *Chem. Rev.* **1990**, 90, 1377–1406.
- [37] P. Mottner, T. Butz, A. Lerf, J. Erfkamp, K. Schneider, A. Müller, *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, 1164, 311–318; A. Lerf, T. Butz, *Angew. Chem.* **1987**, 99, 113–130; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1987**, 26, 110–126.
- [38] A. Müller, E. Krahn, U. Gollan, W. Suer, K. Schneider, unveröffentlicht.
- [39] Im Zusammenhang mit der Synthese eines $MoFe_3S_4$ -Clusters zeigt sich bei dem Vergleich der Aminosäuresequenzen der bislang bekannten *nifEN*- und MoFe-Proteine (verschiedener N_2 -fixierender Organismen) eine weitere Besonderheit: Alle *nifEN*-Proteine zeigen einheitliche Veränderungen in der P-Cluster-Bindungsstelle im MoFe-Protein entsprechender Region. Von den vergleichbaren Cysteinresten, die im MoFe-Protein den P-Cluster binden [2] fehlen jeweils die beiden terminalen Cysteinreste der β -Untereinheit. Die übrigen bilden einen kompletten Ligandensatz für einen Fe_3S_4 -Cluster, und durch die 3:1-Differenzierung der Eisenzentren [18, 40] (3 α -Cys, 1 β -Cys) erscheint zudem eine Konversion $Fe_4S_4 \rightarrow Fe_3S_4 \rightarrow MoFe_3S_4$ in dieser speziellen Umgebung möglich [38].
- [40] G. P. F. Van Strijdonck, J. A. E. H. van Haare, J. G. M. van der Linden, J. J. Steggerda, R. J. M. Nolte, *Inorg. Chem.* **1994**, 33, 999–1000.
- [41] Im MoFe-Protein wechselwirkt ein Glutaminrest mit einer der *exo*-ständigen Carboxylatgruppen des Homocitratliganden [3]. An der entsprechenden Stelle befindet sich im *nifEN*-Protein ein unter physiologischen Bedingungen positiv geladener Lysinrest [29]. Hierdurch findet eine zusätzliche elektrostatische Wechselwirkung statt, die im MoFe-Protein nicht vorhanden ist und an der Aufnahme und Ausrichtung des unter physiologischen Bedingungen negativ geladenen Homocitrats (oder eines Mo-Homocitrat-Intermediates) beteiligt sein könnte [38].
- [42] Wir konnten zeigen, daß sich bei Zusatz von Molybdat-Ionen zu einer wachsenden Bakterienkultur, die schon die alternative „FeFe“-Nitrogenase exprimiert hat, ein „Hybridenzym“ bildet. Dieses besteht aus dem alternativen Apo-Protein, das den konventionellen FeMo-Cofaktor anstelle des FeFe-Cofaktors inkorporiert hat. Dies wurde anhand der spektroskopischen und katalytischen Eigenschaften des Enzyms evident. Durch den Zusatz von $[MoO_4]^{2-}$ wurde zum einen die Biosynthese des FeMo-Cofaktors stimuliert, zum anderen induzieren Molybdat-Ionen aber auch die Expression der Proteinkomponenten des konventionellen Nitrogenasesystems. Um eine Bildung des MoFe-Proteins zu verhindern, wurden Mutanten verwendet, bei denen die für die Strukturproteine codierenden Gene zuvor inaktiviert worden waren [43]. Diese Befunde (vgl. auch Lit. [44]) deuten darauf hin, daß die alternativen Cofaktoren [31], über die weit weniger Strukturinformationen vorliegen als für den FeMo-Cofaktor, diesem strukturell sehr ähneln.
- [43] U. Gollan, K. Schneider, A. Müller, K. Schüddekopf, W. Klipp, *Eur. J. Biochem.* **1993**, 215, 25–35.
- [44] R. N. Pau, M. E. Eldridge, D. J. Lowe, L. A. Mitchenall, R. R. Eady, *Biochem. J.* **1993**, 293, 101–107.
- [45] CERIU 3.2 Molecular Modelling Package, Molecular Simulations, Cambridge, Burlington, **1993**.
- [46] M. L. Connolly, *Science* **1983**, 221, 709–713.
- [47] Die α - β -Anordnung des MoFe-Proteins wird durch sieben Salzbrücken (entsprechen ionischen Wechselwirkungen zwischen geladenen Aminosäureresten) stabilisiert. Des weiteren ist das N-terminale Ende der β -Untereinheit, auf dem sich drei Salzbrückenbildende Aminosäurereste befinden, um die α -Untereinheit „herumgewickelt“ (Abb. 1b) [3]. Ein Sequenzvergleich von *nifDK* und *nifEN* (aus *Azotobacter vinelandii*) zeigt, daß die ersten 52 Aminosäurereste in der *nifN*-codierten β -Untereinheit fehlen [29]. Der obengenannte „ β -Arm“ ist folglich im *nifEN*-Protein nicht vorhanden. Zwei weitere der sieben Salzbrücken scheinen im *nifEN*-Protein nicht mehr vorzuliegen [38]. Auch die Veränderungen der der P-Cluster-Bindungsstelle im MoFe-Protein entsprechenden Region [39] kann zur Destabilisierung des α - β -Komplexes im *nifEN*-Protein beitragen.
- [48] K. L. Taft, G. C. Papaefthymiou, S. J. Lippard, *Inorg. Chem.* **1994**, 33, 1510–1520, zit. Lit.
- [49] Übersicht: A. Müller, H. Reuter, S. Dillinger, *Angew. Chem.*, im Druck.
- [50] F. Bonomi, S. Pagani, B. M. Kurtz Jr., *Eur. J. Biochem.* **1985**, 148, 67–73.
- [51] S. Pagani, F. Bonomi, P. Cerletti, *Eur. J. Biochem.* **1984**, 142, 361–366.
- [52] A. Müller, N. H. Schladerbeck, *Naturwissenschaften* **1986**, 73, 669–670. Für die hohe Bildungstendenz spricht auch die Tatsache, daß sich Cluster wie $[Fe_4S_4(SH)_4]^{2+}$ – das einfachste Modellsystem für Fe_4S_4 -Proteine – isolieren lassen (A. Müller, N. H. Schladerbeck, H. Bögge, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1987**, 35–36; A. Müller, N. H. Schladerbeck, E. Krickemeyer, H. Bögge, K. Schmitz, E. Bill, A. X. Trautwein, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1989**, 570, 7) und daß sich aus dem MoFe-Protein durch Behandeln mit *N*-Methylformamid unter Zusatz verschiedener Kationen und Thiophenol Kristalle erhalten lassen, die das Anion $[Fe_4S_4(SPh)_4]^{2-}$ enthalten (A. Müller, K. Knüttel, E. Krickemeyer, A. Hildebrand, H. Bögge, K. Schneider, A. Armatage, *Naturwissenschaften* **1991**, 78, 460–462).
- [53] A. Müller, R. Rohlfing, J. Döring, M. Penk, *Angew. Chem.* **1991**, 103, 575–577; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, 30, 588–590.