

# Nitrogenase – eine Geschichte von Kohlenstoffatomen

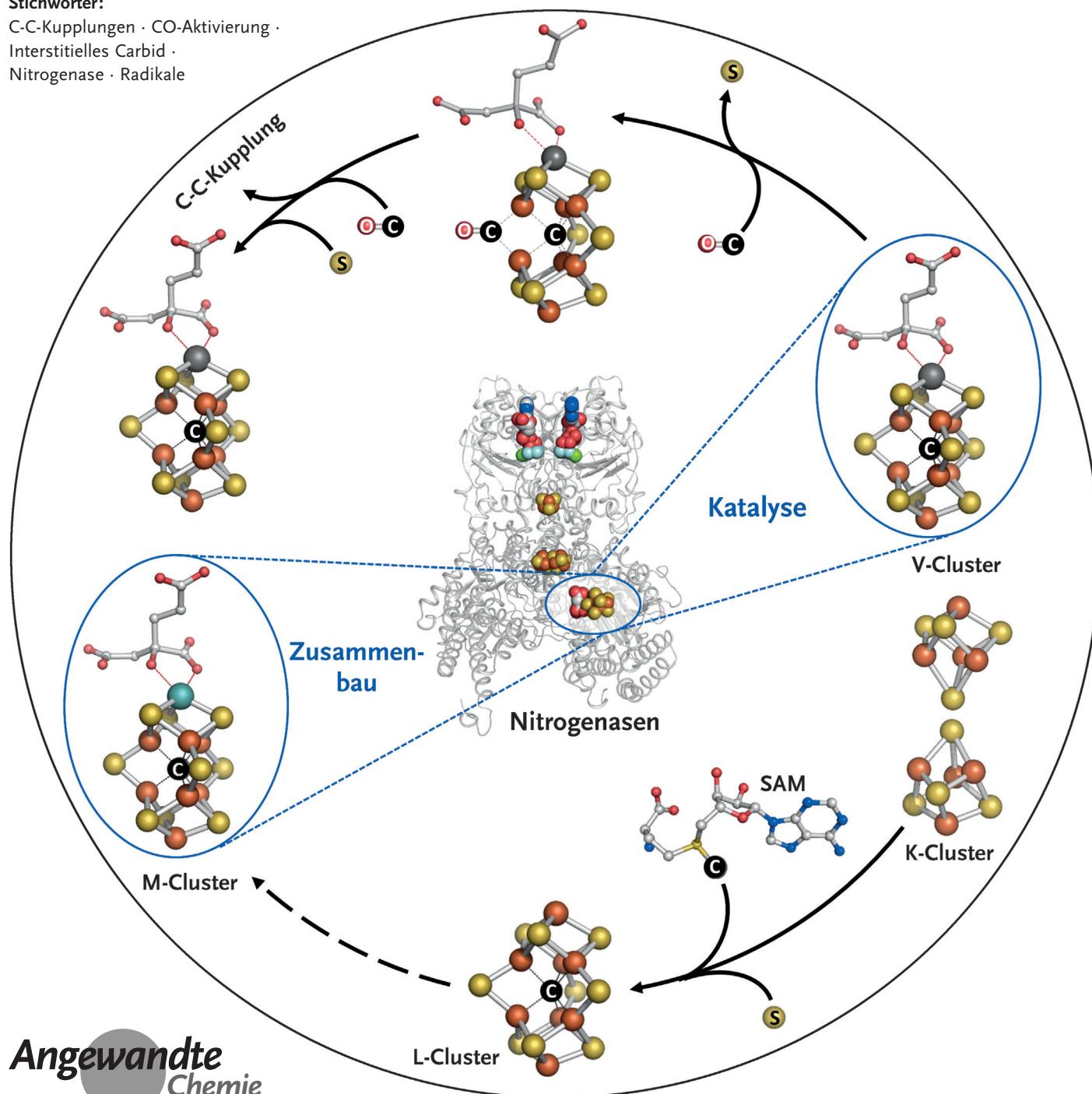
Yilin Hu\* und Markus W. Ribbe\*

**Stichwörter:**

C-C-Kupplungen · CO-Aktivierung ·

Interstitielles Carbid ·

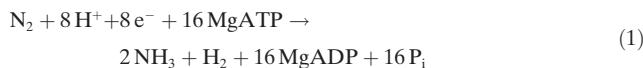
Nitrogenase · Radikale



Die Nitrogenase, benannt nach der Fähigkeit, Stickstoff in Ammoniak umzuwandeln, hat eine überraschende Verbindung zu Kohlenstoff – einerseits durch das interstitielle Carbid im zentralen Hohlraum des Cofaktors, andererseits durch ihre Fähigkeit zur reduktiven Kohlenstoff-Kohlenstoff-Kupplung kleiner Kohlenstoffverbindungen zu Kohlenwasserstoffen. Neueste Studien enthüllen einen SAM-abhängigen Radikalmechanismus für das Einbringen des Carbids in den Cofaktor. Dieser Mechanismus entspricht sowohl einem neuartigen Biosyntheseweg zu komplexen Metalclustern als auch einer neuartigen Weise der Schwefelverdrängung für die Aktivierung von Kohlenmonoxid durch die Nitrogenase. Hierbei ist das interstitielle Carbid essenziell; es verleiht dem Cofaktor eine gewisse Flexibilität bei gleichzeitiger Erhaltung der strukturellen Einheit.

## 1. Einleitung

Die Nitrogenase ist ein komplexes Metalloenzym, das eine Schlüsselfunktion im globalen Stickstoffkreislauf einnimmt und die Reduktion des inerten Stickstoffs ( $N_2$ ) zu biologisch verfügbarem Ammoniak ( $NH_3$ ) katalysiert. Die Reaktion wird üblicherweise gemäß Gleichung (1) dargestellt



(ADP = Adenosindiphosphat ATP = Adenosintriphosphat,  $P_i$  = anorganisches Phosphat).<sup>[1–3]</sup> Unlängst wurde gezeigt, dass die Nitrogenase auch kleine kohlenstoffhaltige Moleküle wie Kohlenmonoxid (CO) und Kohlendioxid ( $CO_2$ )<sup>[4]</sup> zu Kohlenwasserstoffen reduzieren kann, was die Nitrogenase zu einer vielseitigen Reduktase macht – sowohl für Stickstoff- als auch für Kohlenstoff-haltige Verbindungen.<sup>[5–8]</sup> Die Nitrogenase-katalysierten Reduktionsreaktionen von Stickstoff- und Kohlenstoffverbindungen gleichen sich durch die Verwendung von Protonen( $H^+$ )/Elektronen( $e^-$ )-Paaren als Reduktionsmittel und die Umsetzung dieser Verbindungen unter Umgebungsbedingungen. Des Weiteren haben beide Nitrogenasereaktionen ihre industriellen Entsprechungen im Haber-Bosch- und im Fischer-Tropsch-Prozess. Der erste Prozess verbindet  $N_2$  und Wasserstoff ( $H_2$ ) zu  $NH_3$ ,<sup>[9]</sup> während der zweite typischerweise CO, gelegentlich auch  $CO_2$ , mit  $H_2$  zu Kohlenwasserstoff-basierten Kraftstoffen umwandelt – beide Prozesse finden unter hohen Temperaturen und Drücken statt.<sup>[10]</sup> Die Tatsache, dass Nitrogenase  $N_2$ , CO und  $CO_2$  unter Umgebungstemperatur und -druck aktiviert, offenbart das Potenzial dieses Enzyms als geeignete Vorlage für zukünftige Prozesse zur Umwandlung dieser kleinen Moleküle in landwirtschaftlich und ökonomisch wertvolle Produkte.

Genauso interessant ist, dass die Nitrogenasereaktivität gegenüber Stickstoff- und Kohlenstoffverbindungen auf eine Rolle des Enzyms als evolutionäres Bindeglied zwischen dem Stickstoff- und dem Kohlenstoffkreislauf schließen lässt. In einer  $CO_2$ -reichen Atmosphäre könnte die Nitrogenase die Funktion einer  $CO_2$ /CO-Reduktase erfüllt haben, die sich mit dem Aufkommen der Photosynthese in eine  $N_2$ -Reduktase

## Aus dem Inhalt

<b>1. Einleitung</b>	8357
<b>2. Nitrogenase und Kohlenstoff: das interstitielle Carbid des Nitrogenasecofaktors</b>	8358
<b>3. Nitrogenase und Kohlenstoff: reduktive C-C-Kupplung durch Nitrogenase</b>	8361
<b>4. Zentrales Carbid und Kohlenstoffkupplung: Besteht eine mechanistische Relevanz zwischen beiden?</b>	8364
<b>5. Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>8365</b>

entwickelte, aber eine gewisse  $CO_2$ /CO-Reduktaseaktivität behielt.

Die Nitrogenaseaktivität gegenüber Kohlenstoffverbindungen hat seit ihrer Entdeckung viel Aufmerksamkeit erhalten, da sie einen Ansatz für die begehrte Wiederaufbereitung des Kohlenstoffabfallprodukts CO und des Treibhausgases  $CO_2$  zu nützlichen chemischen Produkten und Kraftstoffen bieten könnte. Die grundlegende Bedeutung dieser Aktivität hat zu der Frage geführt, ob es einen intrinsischen Zusammenhang zwischen Nitrogenase und Kohlenstoff gibt und, falls dem so ist, wie dieser mit der Fähigkeit der Nitrogenase zur Umsetzung Kohlenstoff-haltiger Verbindungen verknüpft ist. Dieser Idee folgend, wurde ein Carbidion identifiziert, das als Strukturelement des Cofaktors (genannt M-Cluster) der Molybdän(Mo)-Nitrogenase fungiert. Die oft als „konventionelle“ Nitrogenase bezeichnete Mo-Nitrogenase von *Azotobacter vinelandii* besteht aus einer Reduktasekomponente und einer katalytischen Komponente.<sup>[1]</sup> Die Reduktasekomponente wird Fe-Protein (NifH) genannt und bildet ein  $\gamma_2$ -Dimer, das einen Untereinheiten überbrückenden  $[Fe_4S_4]$ -Cluster und eine MgATP-Bindestelle pro Untereinheit enthält; die katalytische Komponente, MoFe-Protein (NifDK) genannt, ist ein  $\alpha_2\beta_2$ -Tetramer, das pro  $\alpha\beta$ -Dimer zwei komplexe Metallcluster enthält: einen P-Cluster ( $[Fe_8S_7]$ ) in der  $\alpha/\beta$ -Untereinheitengrenzfläche und einen M-Cluster ( $[MoFe_7S_9C\text{-Homocitrat}]$ ) innerhalb der  $\alpha$ -Untereinheit.<sup>[11–14]</sup> Die Katalyse durch die Mo-Nitrogenase umfasst die Bildung eines funktionellen Komplexes zwischen NifH und NifDK<sup>[15,16]</sup> und den ATP-abhängigen Elektronentransport zwischen dem  $[Fe_4S_4]$ -Cluster von NifH über den P-Cluster bis zum M-Cluster von NifDK, an dem, nach der

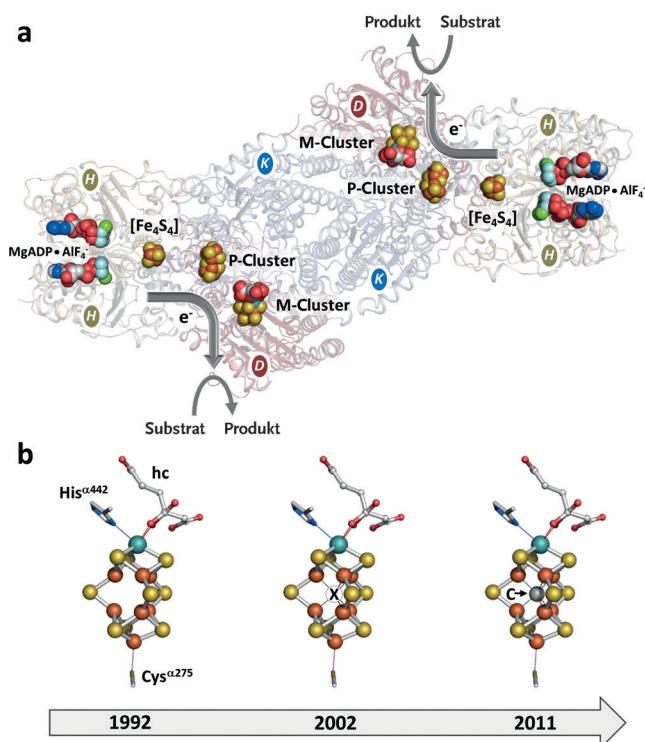
[\*] Prof. Dr. Y. Hu, Prof. Dr. M. W. Ribbe  
Department of Molecular Biology and Biochemistry;  
Department of Chemistry, University of California, Irvine  
Irvine, CA 92697-3900 (USA)  
E-Mail: yilinh@uci.edu  
mribbe@uci.edu

Anreicherung einer ausreichenden Zahl von Elektronen, die Substratreduktion stattfindet (Abbildung 1 a).

Der komplexeste bekannte biologische Metallcofaktor, der M-Cluster, wird nur von zwei Liganden innerhalb der  $\alpha$ -Untereinheit gebunden, Cys<sup>a275</sup> und His<sup>a442</sup>. Der Cluster besteht aus einem [MoFe<sub>7</sub>S<sub>9</sub>]-Kern, der aus einem [Fe<sub>4</sub>S<sub>3</sub>]- und einem [MoFe<sub>3</sub>S<sub>3</sub>]-Kubus besteht, die durch drei  $\mu_2$ -Sulfide miteinander verbunden sind. Des Weiteren wird der M-Cluster durch die 2-Hydroxy- und die 2-Carboxygruppe des organischen Homocitratrestes am Mo-Ende koordiniert (Abbildung 1 b).<sup>[11–13]</sup> Der zentrale Hohlraum des M-Clusters wurde lange Zeit als ein großer „Leerraum“<sup>[13]</sup> angesehen, bis 2002 eine hochauflöste Kristallstruktur von NifDK (1.16 Å) Elektronendichte enthüllte, die von einem N-, O- oder C-Atom stammen könnte.<sup>[11]</sup> Dieses interstitielle Atom – zur Zeit der Entdeckung als „X“ bezeichnet, um seine unbekannte Identität zu betonen – wurde später durch spektroskopische und strukturelle Untersuchungen als  $\mu_6$ -koordiniertes Carbidion ( $C^{4-}$ ) identifiziert (Abbildung 1 b).<sup>[12,14]</sup> Die Gegenwart eines interstitiellen Carbiids im Kern des M-Clusters unterstreicht die Komplexität dieses Metallcofaktors und legt die Basis für die funktionelle Vielfalt der Nitrogenase. Darüber hinaus lösten die strategische Lage und die unerwartete Identität des interstitiellen Atoms Begeisterung aus und weckten Interesse an der Relevanz dieses Atoms für den biosynthetischen und katalytischen Mechanismus der Nitrogenase. Fragen über den Ursprung und den Einbau dieses Carbiids in den M-Cluster sowie über seine Auswirkung auf die Reaktivität für Kohlenstoffverbindungen wurden aufgeworfen.

## 2. Nitrogenase und Kohlenstoff: das interstitielle Carbid des Nitrogenasecofaktors

Seit der Entdeckung des interstitiellen Carbiids finden sowohl der Ursprung als auch der Mechanismus der Carbid-einbringung stetiges Interesse vonseiten der Nitrogenase-Forscher wie auch allgemein von Bioanorganikern. Die größten Kenntnisse wurden aus Studien zur Biosynthese des M-Clusters,<sup>[17–20]</sup> des aktiven Cofaktors der Mo-Nitrogenase, erlangt.



**Abbildung 1.** Die Mo-Nitrogenasestruktur und die dazugehörigen Metallcluster. a) Bändermodell (transparent) des MgADP-AlF<sub>4</sub><sup>-</sup>-stabilisierten NifH/NifDK-Komplexes. Am Elektronentransport beteiligte Schlüsselbestandteile, einschließlich MgADP-AlF<sub>4</sub><sup>-</sup>, [Fe<sub>4</sub>S<sub>3</sub>]-Cluster, P-Cluster und M-Cluster, sind in Kalottenform dargestellt. Die beiden NifH-Untereinheiten sind mit H gekennzeichnet und in Grau und Gold eingefärbt, die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten von NifDK sind mit D bzw. K gekennzeichnet und jeweils in Rot und Hellblau eingefärbt. b) Die Strukturen des M-Clusters basieren auf den kristallographischen Daten von 1992, 2002 und 2011. His<sup>a442</sup> und Cys<sup>a275</sup>, die beiden Proteinliganden des M-Clusters, werden gezeigt. Die Atome aller Cluster sind wie folgt gefärbt: Fe orange, S gelb, Mo türkis, O rot, C grau, N blau, Mg grün, Al beige, F hellblau. hc = Homocitrat. Für die Erstellung der Abbildung wurde PYMOL verwendet (PDB-Einträge: 1N2C, 1M1N, 3U7Q).

### 2.1. Die Biosynthese des M-Clusters

Die Biosynthese des M-Clusters ist ein komplizierter Prozess, der einer Vielzahl *nif*-codierter (Nif)-Proteine involviert.<sup>[20]</sup> Biochemische und genetische Untersuchungen haben die Zahl der Hauptakteure dieses Prozesses zu einem



Markus W. Ribbe erhielt ein Diplom in Biologie und promovierte bei Prof. Ortwin Meyer in Mikrobiologie an der Universität Bayreuth. Er forschte als Postdoktorand in der Gruppe von Prof. Barbara K. Burgess an der University of California, Irvine, wo er momentan als Chancellor's Professor tätig ist. Die letzten 20 Jahre widmete er sich der Erforschung des Zusammensetzes und der Katalyse von Nitrogenase mithilfe einer Kombination aus biochemischen, spektroskopischen und strukturellen Methoden. Der vorliegende Aufsatz basiert auf dem Vortrag zum 50-jährigen Jubiläum der Bürgenstock-Konferenz 2015.

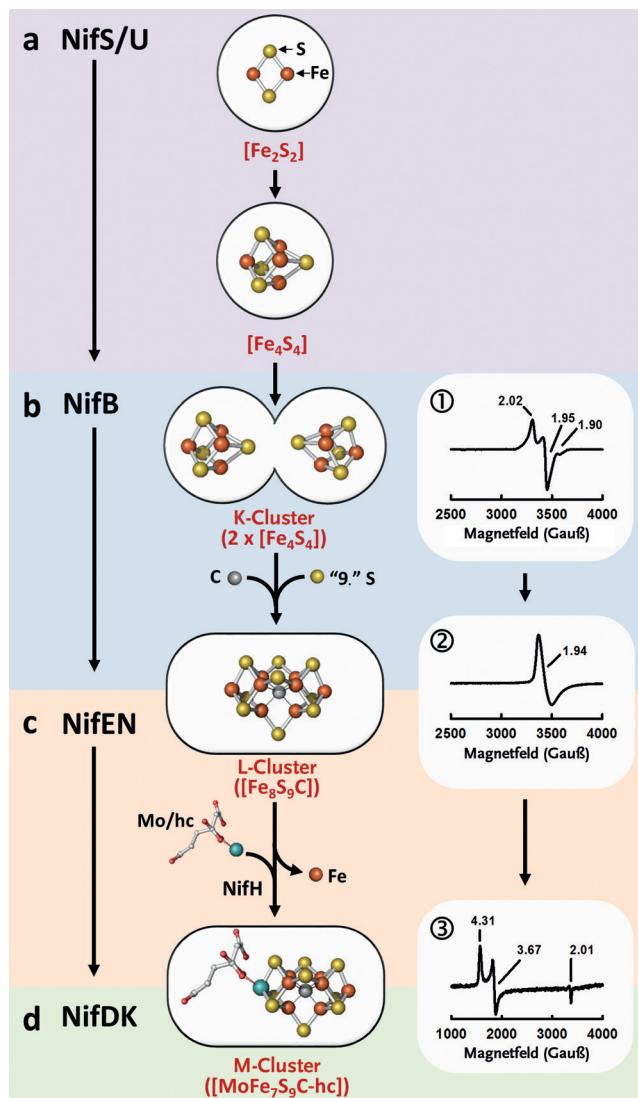


Yilin Hu erhielt ein B.S.-Diplom in Genetik von der Fudan University (China) und promovierte in Biochemie bei Prof. Charles W. Slattery an der Loma Linda University (USA). Sie war Postdoktorandin bei Prof. Barbara K. Burgess an der University of California, Irvine, und ist gegenwärtig dort Assistant Professor. Die letzten zwölf Jahre widmete sie sich der Erforschung des Zusammensetzes und der Katalyse von Nitrogenase mit besonderem Schwerpunkt auf der genetischen Manipulation des Nitrogenasesystems.

Minimalsatz an Nif-Proteinen verringert und führen zum Entwurf eines M-Cluster-Biosyntheseweges (Abbildung 2).<sup>[20]</sup> Dieser Prozess wird initiiert durch NifS und NifU, die komplementäre Funktionen bei der Mobilisierung von Fe und S für die Bildung von kleinen FeS-Fragmenten haben. Es wird angenommen, dass NifS als Pyridoxal-abhängige Cysteindesulfurase ein Protein-gebundenes Cysteinpersulfid bildet, das anschließend an NifU weitergegeben wird, um schrittweise  $[\text{Fe}_2\text{S}_2]$ - und  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster zu bilden (Abbildung 2a).<sup>[21–26]</sup> Daraufhin wird ein  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Clusterpaar (ge-

nannt K-Cluster) von NifU zu NifB transferiert, wo dieses zu einem  $[\text{Fe}_8\text{S}_9\text{C}]$ -Cluster (genannt L-Cluster) umgewandelt wird. Der L-Cluster gleicht dem Fe-S-Kern des M-Clusters, außer dass das „Mo-Homocitrat-Konjugat“ am einen Ende des Clusters durch ein Fe-Atom ersetzt ist (Abbildung 2b,c).<sup>[27–31]</sup> Anschließend wird der L-Cluster von NifB zu NifEN transferiert und dort durch eine ATP-abhängige Mo- und Homocitrat-Insertion durch NifH zum M-Cluster gereift. Der „ausgereifte“ M-Cluster wird danach zu seinem Zielprotein NifDK geliefert (Abbildung 2c,d).<sup>[32–35]</sup>

Dieser Biosyntheseweg wurde mithilfe strategischer *nif*-Deletionen,<sup>[20,36]</sup> die die Identifikation von biosynthetischen Intermediaten des M-Clusters ermöglichen, entschlüsselt. Weiterführende EPR-spektroskopische und biochemische Untersuchungen enthüllten die schrittweise Umwandlung des K → L → M-Clusters (Abbildung 2, ①–③), die sowohl durch eine Änderung der EPR-Merkmale vom K-Cluster-spezifischen  $S = 1/2$ -Signal ( $g = 2.02, 1.95$  und  $1.90$ ) über das L-Cluster-spezifische Merkmal ( $g = 1.94$ ) zum M-Cluster-spezifischen  $S = 3/2$ -Signal ( $g = 4.31, 3.67$  und  $2.01$ ) als auch durch die damit einhergehenden Änderungen im Metallgehalt und den Rekonstitutionsaktivitäten dieser Cluster verfolgt werden kann.<sup>[19,26,31,33,34]</sup> XAS/EXAFS und kristallographische Untersuchungen ermöglichen weitere Einblicke in die Strukturen dieser Intermediate des M-Clusters und bestätigen die Bildung eines kompletten 8Fe-Kerns des M-Clusters (den L-Cluster), bevor eines der terminalen Fe-Atome durch Mo und Homocitrat ersetzt wird (Abbildung 2c,d).<sup>[28–31]</sup> Dies etablierte NifH – besser bekannt als die Reduktasekomponente der Mo-Nitrogenase – als ATP-abhängige Mo/Homocitratinsertase, die für die Umwandlung des L-Clusters in den „ausgereiften“ M-Cluster verantwortlich ist (Abbildung 2).<sup>[33]</sup> All diese Beobachtungen definierten die Strategie der M-Clusterbiosynthese als eine schrittweise Fusion von FeS-Modulen zu 2Fe-, 4Fe- und 8Fe-Plattformen, bei der einhergehend mit der Bildung des 8Fe-Kerns das zusätzliche C und S eingebaut werden (Abbildung 2b,c) und anschließend ein Fe durch Mo/Homocitrat ersetzt wird (Abbildung 2c,d). Das Ereignis der Carbidinsertion ist von besonderem Interesse, da es einen zentralen Schritt im komplexen Syntheseweg der Kernstruktur des M-Clusters bildet.



**Abbildung 2.** Die Biosynthese des M-Clusters der Mo-Nitrogenase. Funktionen einiger montageassozierter Nif-Proteine führen a) zur Bildung des  $[\text{Fe}_2\text{S}_2]$ - und  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Clusters in NifS/U; b) zur Bildung des L-Clusters ( $[\text{Fe}_8\text{S}_9\text{C}]$ ) in NifB; c) zur Insertion des Mo und des Homocitrats (hc) durch NifH in den L-Cluster, was einen „gereiften“ M-Cluster ( $[\text{MoFe}_8\text{S}_9\text{C}-\text{hc}]$ ) in NifEN hervorbringt; d) zum Einbau des M-Clusters in das Zielprotein NifDK. NifB katalysiert die Umwandlung von K- zu L-Cluster, was einhergeht mit der SAM-Radikal-abhängigen Carbideinbringung, der Insertion des neunten Schwefelatoms und der Neuordnung/Kupplung der 4Fe-Einheiten des K-Clusters in den 8Fe-L-Cluster. Die charakteristischen EPR-Signale des ① K-, ② L- und ③ M-Clusters sind neben den zugehörigen Strukturmodellen gezeigt.

## 2.2. Die Inkorporierung des interstitiellen Carbids

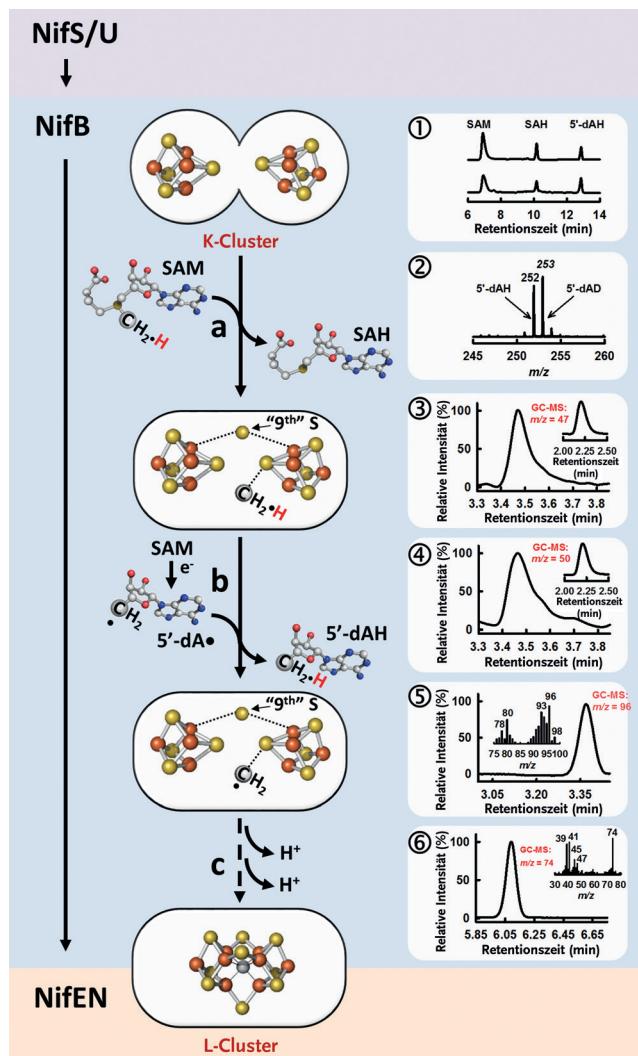
Die Inkorporierung des interstitiellen Carbids als strukturelles M-Cluster-Element wird von NifB, einem unverzichtbaren Bestandteil der Cofaktorsynthese, katalysiert. Der erste Hinweis auf die essenzielle Rolle von NifB in diesem Prozess kam von der Beobachtung, dass die Deletion des *nifB*-Gens zur Bildung eines M-Cluster-losen NifDK (genannt Apo-NifDK) führte.<sup>[37,38]</sup> Eine Sequenzanalyse von NifB offenbarte das Vorhandensein eines CxxxCxxC-Motivs, das für die Koordinierung des S-Adenosylmethionin (SAM) bindenden  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Clusters (genannt SAM-Cluster) verantwortlich ist. Außerdem wurden genügend Liganden für die Bindung der beiden  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Module des K-Clusters identifiziert. Dies führte zur Hypothese, dass NifB mithilfe eines SAM-Radikals die Kupplung der beiden 4Fe-Einheiten des

K-Clusters zu einem 8Fe-L-Cluster katalysieren könnte.<sup>[20,29]</sup> Diese Hypothese wurde von EPR-Studien gestützt, die zeigten, dass das K-Cluster-spezifische  $S = 1/2$ -Signal mit dem Auftreten des L-Cluster-spezifischen  $g = 1.94$ -Signals (Abbildung 2) nach der Inkubation von NifB mit SAM verschwand.<sup>[27]</sup> Diese Experimente lieferten auch den ersten Hinweis zur SAM-abhängigen Umwandlung eines K-Clusters ( $2 \times 4\text{Fe}$ ) in einen L-Cluster (8Fe).

Die Funktion von SAM in diesem Prozess wurde mittels HPLC-Analyse der von NifB erzeugten SAM-Spaltprodukte untersucht. Nach Inkubation von SAM mit NifB wurden zwei Produkte detektiert: das erste, S-Adenosylhomocystein (SAH), wurde durch die Abspaltung der Methylgruppe von SAM erzeugt; das zweite, 5'-Desoxyadenosin (5'-dAH), entstand durch die Wasserstoffabstraktion durch das 5'-Desoxyadenosylradikal (5'-dA $\cdot$ ; Abbildung 3, ①).<sup>[19,20]</sup> Diese Beobachtung legt die Beteiligung von zwei SAM-Molekülen an der NifB-katalysierten K $\rightarrow$ L-Clusterumwandlung nahe: Eines fungiert als Methylgruppendonator, der letztlich das interstitielle Carbid bildet, wohingegen das andere für die Generierung des 5'-dA $\cdot$ -Radikals genutzt wird, das die Wasserstoffatome von der Methylgruppe abstrahiert, um den radikalabhängigen Prozess der Carbidinsertion zu initiieren.

Isotopenmarkierungsexperimente lieferten weitere Belege für diese Behauptung und bestätigten sowohl den Einbau des  $^{14}\text{C}$ -Atoms von [ $^{14}\text{C}$ ]Methyl-SAM in den L-Cluster, einhergehend mit der Umwandlung von K- zu L-Cluster in NifB,<sup>[19,20]</sup> als auch die Bildung des deuterierten 5'-Desoxyadenosins (5'-dAD) für den Fall, dass [ $\text{D}_3$ ]Methyl-SAM als Methylgruppendonator in diesem Prozess verwendet wurde (Abbildung 3, ②).<sup>[19,20]</sup> Zusammengenommen liefern diese Experimente einen überzeugenden Beweis dafür, dass die Methylgruppe von SAM der Ursprung des interstitiellen Carbids ist (Abbildung 3a), wobei eine erste Wasserstoffabstraktion durch ein 5'-dA $\cdot$ -Radikal (Abbildung 3b) stattfindet, bevor das entstehende Kohlenstoffintermediat durch weitere Deprotonierungs-/Dehydrierungsschritte in das interstitielle Carbid umgewandelt wird (Abbildung 3c).<sup>[20]</sup>

Die ersten Schritte der Carbidinsertion wurden eingehender untersucht, um den Ort der Methylbindung und die Ereignissequenz zwischen Methyltransfer und Wasserstoffabstraktion zu bestimmen. Interessanterweise wurden Methanethiol ( $\text{CH}_3\text{SH}$ ) und [ $\text{D}_3$ ]Methanethiol ( $\text{CD}_3\text{SH}$ ) als die jeweiligen Produkte der Inkubation von NifB mit regulärem SAM (Abbildung 3, ③) und [ $\text{D}_3$ ]Methyl-SAM (Abbildung 3, ④) nach Stoppen der Reaktion mit Säure detektiert. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass die von SAM erhaltene Methylgruppe zum säurelabilen Schwefelatom des NifB-gebundenen K-Clusters transferiert wird.<sup>[17]</sup> Die Substitution von Schwefelatomen des K-Clusters durch Selen (Se) führt zur Bildung von Methanselenol ( $\text{CH}_3\text{SeH}$ ) – der Se-substituierten Form des Methanethiols – in derselben Reaktion, was ein weiterer Hinweis auf die Bindung der Methylgruppe an ein S-Atom des K-Clusters ist (Abbildung 3, ⑤).<sup>[17]</sup> Außerdem generiert die Inkubation von NifB mit Allyl-SAM, einem SAM-Analogon mit Allylgruppe ( $-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ ) anstelle der Methylgruppe ( $-\text{CH}_3$ ), SAH als einziges Produkt der SAM-Spaltung. Auch wenn von der Allylgruppe kein Wasserstoffatom durch ein 5'-dA $\cdot$ -Radikal ab-



**Abbildung 3.** Die Bildung des L-Clusters in NifB. Die Carbidinsertion beginnt vermutlich mit dem Methyltransfer von einem SAM-Molekül zu einem Sulfidion des K-Clusters (a), gefolgt von einer Wasserstoffabstraktion durch ein 5'-dA $\cdot$ -Radikal, das durch die homolytische Spaltung eines zweiten SAM-Moleküls erhalten wird (b). Das erhaltene, Cluster-gebundene Kohlenstoffintermediat (z.B. ein Methylradikal) initiiert anschließend die Radikal-basierte chemische Umwandlung/Kupplung der beiden [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Module des K-Clusters zu einem [Fe<sub>8</sub>S<sub>9</sub>C]-L-Cluster, einhergehend mit der Einfügung des neunten Schwefelatoms und der weiteren Dehydrierung/Deprotonierung des Kohlenstoffintermediates, bis ein Carbidion im Zentrum des L-Clusters entsteht (c). ① HPLC-Spektren des Standards (oben) und der SAM-Spaltprodukte von NifB (darunter); ② LC-MS-Studien der 5'-dA-Moleküle, erzeugt durch die Inkubation von NifB mit [D<sub>3</sub>]Methyl-SAM; ③–⑥ GC-MS-Untersuchungen der Produkte von säuregestoppten Reaktionen ③ mit NifB und SAM, ④ mit NifB und [D<sub>3</sub>]Methyl-SAM, ⑤ mit Fe/Se-rekonstituiertem NifB und SAM und ⑥ mit NifB und Allyl-SAM.

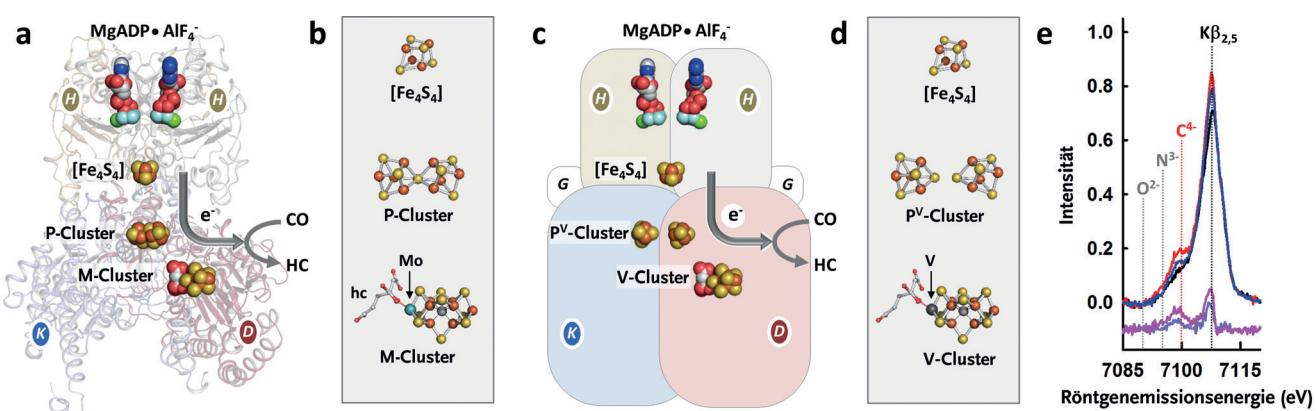
strahiert wird, bildet sich dennoch ein Allylthiol ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_2\text{SH}$ ) – die allylsubstituierte Form des Methanethiols – nach Säurequenchen (Abbildung 3, ⑥).<sup>[17]</sup> Diese Beobachtung deutet an, dass der Allylgruppentransfer vom Allyl-SAM unabhängig von der Wasserstoffabstraktion ist. Auf Grundlage von Analogieüberlegungen folgt der Transfer der Methylgruppe von SAM einem S<sub>N</sub>2-Mechanismus; bei diesem

wird die komplette Methylgruppe auf ein Schwefelatom des K-Clusters transferiert und anschließend durch Abstraktion eines Wasserstoffatoms durch das 5'-dA<sup>+</sup>-Radikal weiter zu einem Kohlenstoffintermediat – wahrscheinlich zu einem Methylradikal – prozessiert (Abbildung 3a,b).

Während die Schritte der Carbidinsertion vor der Wasserstoffabstraktion durch diese Studien präzisiert werden konnten, sind die nachfolgenden Ereignisse derzeit nur vage beschrieben. Es ist nicht klar, wie das von der Methylgruppe abgeleitete Kohlenstoffintermediat weiter in ein Carbidion prozessiert wird, woher das neunte Schwefelatom stammt und wie das Cluster-überbrückende Sulfid eingebaut wird, um die Stöchiometrie des L-Clusters zu vervollständigen. Die vielleicht wichtigste Frage ist, wie die Radikalchemie – initiiert durch die Bildung eines Cluster-gebundenen, radikalischen Kohlenstoffintermediates – die Kupplung und Restrukturierung der beiden 4Fe-Module des K-Clusters zu einem 8Fe-L-Cluster mit dem gleichzeitigen Einbau des interstitiellen Carbids und des neunten Schwefelatoms ermöglicht. Vermutlich erfolgt ein einfacher Liganden austausch der tetraedrischen Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup>-Atome mithilfe eines Additions-/Eliminierungsmechanismus für den benötigten strukturellen Umbau, der zur Bildung des L-Clusters führt;<sup>[40,41]</sup> die genauen Details dieses Radikalprozesses müssen aber noch erforscht werden. Unabhängig davon etabliert die einzigartige Chemie dieses Prozesses NifB als ein neuartiges Mitglied der radikalgetriebenen SAM-Methyltransferasen, mit einer Spezialisierung im Metallcofaktorzusammenbau;<sup>[39]</sup> und außerdem platziert sie die Carbidinsertion auf einem strategisch wichtigen Punkt in einem vorher unbekannten Radikal- und SAM-abhängigen Metalcluster-Biosyntheseweg.

### 3. Nitrogenase und Kohlenstoff: reduktive C-C-Kupplung durch Nitrogenase

Die Beziehung zwischen Nitrogenase und Kohlenstoff geht weit über das zentrale Carbid im Kern des Cofaktors dieses Metalloenzyms hinaus. Die Untersuchungen der letzten Jahre haben die Nitrogenase als „reduktive C-C-Kupplase“ etabliert, die in der Lage ist, kleine Kohlenstoffverbindungen (CO und CO<sub>2</sub>) zu Kohlenwasserstoffen [Alkenen (C<sub>n</sub>H<sub>2n</sub>) und Alkanen (C<sub>n</sub>H<sub>2n+2</sub>)] unter Umgebungsbedingungen zu reduzieren.<sup>[5–8,42–46]</sup> Dies rief ein erhebliches Interesse an der Erforschung des Enzyms und dessen Relevanz für die Umwelt und die Energieproduktion hervor. Während die N<sub>2</sub>-reduzierende Aktivität zunächst für die „konventionelle“ Mo-Nitrogenase etabliert wurde, wurde die CO-reduzierende Aktivität zuerst für die „alternative“ (V)-Nitrogenase von *A. vinelandii* entdeckt.<sup>[7]</sup> Die V-Nitrogenase ist eine natürliche Variante der Mo-Nitrogenase, zu der sie – in Bezug auf die Aminosäuresequenz der Untereinheiten wie auch auf die strukturelle Zusammensetzung der Metallzentren – hochgradig homolog ist.<sup>[47,48]</sup> Wie das Mo-Gegenstück (Abbildung 4a) besteht auch die V-Nitrogenase aus einer Reduktasekomponente [genannt Fe-Potein (VnfH)] und einer Katalysekomponente [genannt VFe-Protein (VnfDGK)] (Abbildung 4c). Der Substratumsatz durch die V-Nitrogenase (Abbildung 4c) involviert, wie auch bei der Mo-Nitrogenase, die Bildung eines funktionellen Komplexes der beiden Nitrogenasekomponenten,<sup>[1–3,47,48]</sup> gefolgt von einem ATP-abhängigen Elektronentransfer von der Reduktase- zur Katalysekomponente, in der die Substratreduktion stattfindet.



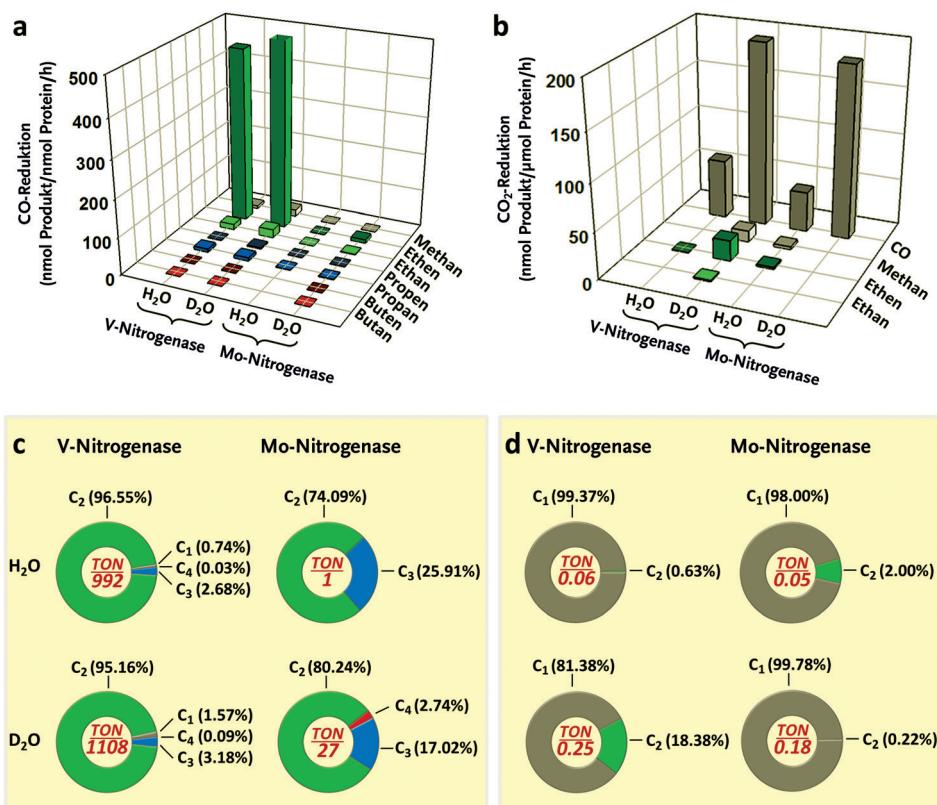
**Abbildung 4.** Ein Vergleich der Strukturen von Mo- und V-Nitrogenase und deren Metalcluster. a) Bändermodell (transparent) des  $\frac{1}{2}$  MgADP-AlF<sub>4</sub><sup>-</sup>-stabilisierten NifH/NifDK-Komplexes. Schlüsselkomponenten des Elektronentransfers, einschließlich MgADP-AlF<sub>4</sub><sup>-</sup> und [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]<sup>-</sup>, P- sowie M-Cluster, sind als Kalottenmodell gezeigt; b) Strukturen des [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]<sup>-</sup>, P- und M-Clusters als Stäbchenmodell. c) Schematische Darstellung des  $\frac{1}{2}$  MgADP-AlF<sub>4</sub><sup>-</sup>-stabilisierten VnfH/VnfDGK-Komplexes. Schlüsselkomponenten des Elektronentransfers, einschließlich MgADP-AlF<sub>4</sub><sup>-</sup> und [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]<sup>-</sup>, P<sup>V</sup>- sowie V-Cluster, sind als Kalottenmodell gezeigt. d) Struktur des [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]<sup>-</sup>, P<sup>V</sup>- und V-Clusters als Stäbchenmodell. Die Struktur der Mo-Nitrogenase wurde auf Grundlage kristallographischer Daten (PDB-Eintrag: 1N2C) erstellt, wohingegen die hypothetische Struktur der V-Nitrogenase auf Basis verfügbarer biochemischer und spektroskopischer Daten erstellt wurde. Die Untereinheiten und Atome beider Nitrogenasen sind wie in Abbildung 1 beschrieben eingefärbt. Zusätzlich ist die δ-Untereinheit von VnfDGK mit G gekennzeichnet und in Weiß gezeigt; V ist dunkelgrau. Die Clusterstrukturen in (a) und (b) beruhen auf kristallographischen Daten<sup>[11–13,15,16]</sup> und diejenigen in (c) und (d) auf XAS/EXAFS-Daten.<sup>[48–51]</sup> PYMOL wurde für die Erstellung der Strukturen dieser Abbildung verwendet (PDB-Einträge: 1N2C, 1M1N, 3U7Q). HC: Kohlenwasserstoffe. e) K-Valenz-XES-Spektrum von V-Cluster (rot), Holo-VnfDGK (blau) und Apo-VnfDGK (schwarz) sowie Differenzspektren (zur Klarheit versetzt) von V-Cluster/Apo-VnfDGK (magenta) und Holo-/Apo-VnfDGK (graublau). Die gestrichelten Linien kennzeichnen die berechneten Energien für den M-Cluster mit den interstitiellen Atomen C<sup>4-</sup>, N<sup>3-</sup> und O<sup>2-</sup> relativ zur K $\beta_{2,5}$ -Linie.<sup>[52]</sup> Die Rolle von Mo oder V in der Nitrogenasekatalyse ist unklar, allerdings wird angenommen, dass das Heterometall eine Rolle bei der Modulierung der Redoxeigenschaften des Cofaktors spielt.

Die Mo- und V-Nitrogenase haben einen Satz homologer Metalcluster.<sup>[48]</sup> Die entsprechenden Reduktasekomponenten der beiden Nitrogenasen (NifH und VnfH) enthalten kaum zu unterscheidende  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster (Abbildung 4b,d, oben);<sup>[16,48,49]</sup> ähnlich verhält es sich mit den jeweiligen Katalysekomponenten dieser Nitrogenasen (NifDK und VnfDGK); sie enthalten homologe P-Cluster (P- und  $\text{P}^{\text{V}}$ -Cluster) und Cofaktoren (M- und V-Cluster): der P- und der  $\text{P}^{\text{V}}$ -Cluster sind 8Fe-Cluster mit ähnlicher Topologie (Abbildung 4b,d, Mitte).<sup>[5,16,48,50]</sup> M- und V-Cluster gleichen sich nicht nur in der Zusammensetzung und Kernstruktur (Abbildung 4b,d, unten),<sup>[12–14,47,48,51]</sup> sondern enthalten beide auch das gleiche interstitielle Carbidion (Abbildung 4e).<sup>[52]</sup> Dies untermauert die strukturelle Homologie dieser beiden Cofaktoren. Dennoch gibt es auch deutliche Unterschiede zwischen diesen beiden homologen Nitrogenasen, besonders zwischen den Clustern der Katalysekomponenten.

Gegenüber der  $[\text{Fe}_8\text{S}_7]$ -Struktur des P-Clusters der Mo-Nitrogenase (Abbildung 4b, Mitte) besteht der  $\text{P}^{\text{V}}$ -Cluster der V-Nitrogenase aus einem Cluster, der mehr einem Paar von zwei  $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Clustern gleicht (Abbildung 4d, Mitte), und auch die Konformation des  $\text{P}^{\text{V}}$ -Clusters in der  $\alpha/\beta$ -Grenzfläche von VnfDGK ist wesentlich offener (Abbildung 4c). Ungeachtet der Ähnlichkeit mit dem M-Cluster der Mo-Nitrogenase (Abbildung 4b, unten) enthält der V-Cluster der V-Nitrogenase ein V anstelle von Mo und hat eine etwas andere Elektronenstruktur (Abbildung 4d, unten).<sup>[51]</sup> Die Ähnlichkeiten und Unterschiede zwischen den beiden Nitrogenasen stehen für ähnliche, aber trotzdem unterschiedliche katalytische Fähigkeiten; am offensichtlichsten sind die erheblich höhere Aktivität der V-Nitrogenase bei der Umwandlung von CO zu Kohlenwasserstoffen und die geringere Aktivität bei der Reduktion von  $\text{N}_2$  zu  $\text{NH}_3$  gegenüber dem Mo-Pendant.

### 3.1. Die ATP-abhängige Reduktion von CO und $\text{CO}_2$

Die V-Nitrogenase ist als ein Enzymsystem aus zwei Komponenten in der Lage, die Reduktion von CO zu Methan ( $\text{CH}_4$ ), Ethen ( $\text{C}_2\text{H}_4$ ), Ethan ( $\text{C}_2\text{H}_6$ ), Propen ( $\text{C}_3\text{H}_6$ ), Propan ( $\text{C}_3\text{H}_8$ ), Buten ( $\text{C}_4\text{H}_8$ ) und Butan ( $\text{C}_4\text{H}_{10}$ ) ATP-abhängig in  $\text{H}_2\text{O}$  oder  $\text{D}_2\text{O}$  zu katalysieren (Abbildung 5a).<sup>[6,7]</sup> Die Um-



**Abbildung 5.** ATP-abhängige CO- und  $\text{CO}_2$ -Reduktion durch V- und Mo-Nitrogenase. Gezeigt sind die Aktivitäten für die Produktbildung (a, b) sowie die Produktpfade (c, d) von CO- (a, c) und  $\text{CO}_2$ -Reaktionen (b, d) in Gegenwart von  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{D}_2\text{O}$ . Die Produktpfade (c, d) zeigen den Prozentanteil von  $\text{C}_1$ -,  $\text{C}_2$ -,  $\text{C}_3$ - und  $\text{C}_4$ -Produkten. Die Berechnung der TONs erfolgte basierend auf den nmol an reduziertem Kohlenstoff, der in den Kohlenwasserstoffprodukten auftauchte, pro nmol NifDK (Mo-Nitrogenase) oder VnfDGK (V-Nitrogenase).

satzzahl (TON) der V-Nitrogenase für CO beträgt in  $\text{H}_2\text{O}$   $992 \text{ h}^{-1}$  und in  $\text{D}_2\text{O}$   $1108 \text{ h}^{-1}$ , und die Hauptprodukte sind sowohl für  $\text{H}_2\text{O}$  als auch für  $\text{D}_2\text{O}$   $\text{C}_2$ -Kohlenwasserstoffe (Abbildung 5c).<sup>[6]</sup> Die Mo-Nitrogenase ist dagegen nur in der Lage,  $\text{CH}_4$ ,  $\text{C}_2\text{H}_4$ ,  $\text{C}_2\text{H}_6$ ,  $\text{C}_3\text{H}_6$  und  $\text{C}_3\text{H}_8$  in der CO-Reduktion zu generieren (Abbildung 5a), wobei die TON  $1 \text{ h}^{-1}$  (Abbildung 5c) in Gegenwart von  $\text{H}_2\text{O}$  beträgt.<sup>[6]</sup> Die Substitution von  $\text{H}_2\text{O}$  durch  $\text{D}_2\text{O}$  fügt dem Produktprofil der Mo-Nitrogenase  $\text{C}_4\text{H}_8$  und  $\text{C}_4\text{H}_{10}$  hinzu (Abbildung 5a). Diese Expansion des Produktprofils geht einher mit einem signifikanten Anstieg der TON auf  $27 \text{ h}^{-1}$  (Abbildung 5c).<sup>[6]</sup> Auch wenn das Produktprofil beider Nitrogenasen ähnlich ist, fällt die Aktivität der Mo-Nitrogenase mit 0.1% in  $\text{H}_2\text{O}$  und 2% in  $\text{D}_2\text{O}$  wesentlich geringer aus als die der V-Nitrogenase bei der ATP-abhängigen Umwandlung von CO in Kohlenwasserstoffe (Abbildung 5c).

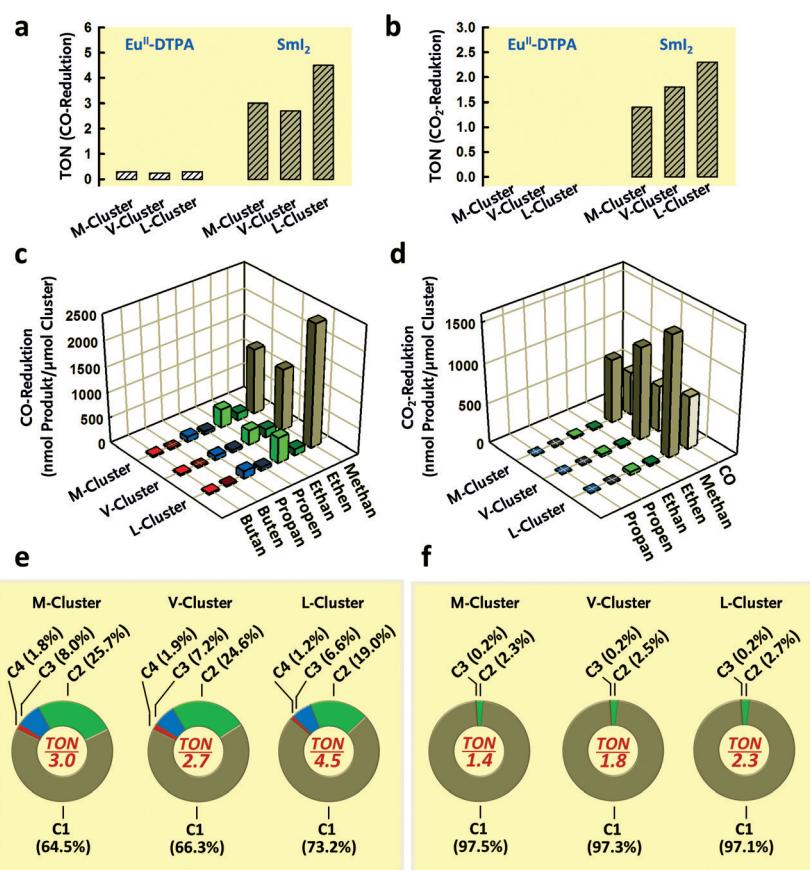
$\text{CO}_2$  ist gegenüber CO ein wirklich schlechtes Substrat sowohl für die V- als auch für die Mo-Nitrogenase. Beide Nitrogenasen ermöglichen die ATP-abhängige Reduktion von  $\text{CO}_2$  zu CO und Kohlenwasserstoffen<sup>[43]</sup> mit vergleichbarer Effizienz in  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{D}_2\text{O}$ . Das breiteste Produktprofil (CO,  $\text{CH}_4$ ,  $\text{C}_2\text{H}_4$  und  $\text{C}_2\text{H}_6$ ) und die höchste TON ( $0.25 \text{ h}^{-1}$ ) erreicht die V-Nitrogenase in  $\text{D}_2\text{O}$  (Abbildung 5b,d).<sup>[43]</sup> Im Unterschied zur CO-Reduktion generiert die  $\text{CO}_2$ -Reduktion hauptsächlich die  $\text{C}_1$ -Produkte CO und  $\text{CH}_4$ , und die Substitution von  $\text{H}_2\text{O}$  durch  $\text{D}_2\text{O}$  erhöht vor

allem die CO-Produktion durch die beiden Nitrogenasen (Abbildung 5 b,d).<sup>[43]</sup> Interessanterweise stammt zumindest ein Teil des CH<sub>4</sub> nicht von CO<sub>2</sub>, was zu der Spekulation führt, dass das interstitielle Carbid die Kohlenstoffquelle für Teile des CH<sub>4</sub> bei diesen CO<sub>2</sub>-Reaktionen ist.<sup>[43]</sup> Wenn dies der Fall ist, könnte man argumentieren, dass die Entfernung des zentralen Carbids – möglicherweise aufgrund einer Veränderung des pH-Wertes infolge des gelösten CO<sub>2</sub> in wässriger Lösung – zu einer Instabilität des Clusters führt und damit zur schlechten Nitrogenasereaktivität für CO<sub>2</sub> in H<sub>2</sub>O beiträgt. Dieses Argument wird auch durch den signifikanten Anstieg der CO<sub>2</sub>-Reduktion im Fall eines isolierten Nitrogenasecofaktors in einem Reaktionssystem auf Basis eines organischen Lösungsmittels gestützt (siehe Abschnitt 3.2).

### 3.2. Die ATP-unabhängige Reduktion von CO und CO<sub>2</sub>

Die Fähigkeit der Nitrogenase zur Reduktion von CO und CO<sub>2</sub> lieferte den Anlass für die Untersuchung des autarken Nitrogenasecofaktors in der Umsetzung von CO und CO<sub>2</sub> zu Kohlenwasserstoffen unter Umgebungsbedingungen. Die Isolierung des aktiven Cofaktors der Mo- und V-Nitrogenase gelang durch etablierte Methoden;<sup>[53]</sup> diese ermöglichen die Extraktion des M- und V-Clusters als intakte Einheiten mit dem organischen Lösungsmittel N-Methylformamid (NMF).<sup>[51]</sup> Zusätzlich wurde auch der L-Cluster (Abbildung 2) – der sowohl ein biosynthetischer Vorläufer als auch ein rein eisenhaltiges Strukturhomologes des „ausgereiften“ Cofaktors ist – in NMF isoliert,<sup>[29]</sup> was der Untersuchung der Substratumsetzung eine weitere interessante Cofaktorspezies hinzufügt. Alle drei Cofaktoren sind relativ stabil im isolierten Zustand, was wahrscheinlich auf das interstitielle Carbid – und seine μ<sub>6</sub>-Koordination an sechs Fe-Atome, was grob der Carbidkoordination in Stahl gleicht – im zentralen Hohlraum der drei Cluster zurückzuführen ist.

Die Strukturintegrität der isolierten Cofaktoren bildet die Basis für deren Funktion als Katalysator in der ATP-unabhängigen CO- und CO<sub>2</sub>-Reduktion. In der Gegenwart von Europium(II)-diethylentriaminpentaessigsäure (Eu<sup>II</sup>-DTPA; E<sup>0</sup> = -1.14 bei pH 8.0) sind alle drei Cluster in der Lage, CO in einem wässrigen Puffersystem zu Kohlenwasserstoffen zu reduzieren. Allerdings treten alle drei Reaktionen mit einem nicht katalytischen Niveau (TON < 1) auf (Abbildung 6 a).<sup>[44,46]</sup> Wenn Samarium(II)-iodid [SmI<sub>2</sub>; E<sup>0</sup> = -1.55 in Tetrahydrofuran (THF)] als Reduktionsmittel und 2,6-Lutidintriflat (Lut-H) als Protonenquelle im Lösungsmittelsystem eingesetzt werden, können alle drei Cluster CO zu



**Abbildung 6.** Die ATP-unabhängige Reduktion von CO und CO<sub>2</sub> durch die Nitrogenasecofaktoren. Gezeigt sind die TONs der Reaktionen mit Eu<sup>II</sup>-DTPA und SmI<sub>2</sub> (a, b), die Erträge der Produktbildung mit dem Reduktionsmittel SmI<sub>2</sub> (c, d) und das zugehörige Produktprofil (e, f) der Reduktion von CO (a, c, e) und CO<sub>2</sub> (b, d, f) durch die Nitrogenasecofaktoren. Die Produktprofile (e, f) zeigen den Prozentsatz der C<sub>1</sub>-, C<sub>2</sub>-, C<sub>3</sub>- und C<sub>4</sub>-Produkte. Die Berechnung der TONs erfolgte basierend auf den nmol an reduziertem Kohlenstoff, der in den Kohlenwasserstoffprodukten auftauchte, pro nmol Cofaktor.

C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>, C<sub>4</sub>H<sub>8</sub> und C<sub>4</sub>H<sub>10</sub> (Abbildung 6c) bei wesentlich höheren Raten umsetzen (Abbildung 6a). Es werden katalytische TONs von 3.0, 2.7 und 4.5 für M-, V- bzw. L-Cluster erreicht (Abbildung 6e).<sup>[45]</sup> Eine ähnliche Erhöhung der Aktivitäten kann für die Reduktion von CO<sub>2</sub> durch die drei Cluster mittels der Substitution von Eu<sup>II</sup>-DTPA (im wässrigen Puffersystem) durch SmI<sub>2</sub> (in einem organischen Lösungsmittel) erreicht werden; die Reduktion von CO<sub>2</sub> in Reaktionen mit Eu<sup>II</sup>-DTPA ist kaum detektierbar (Abbildung 6b).<sup>[44,46]</sup> Darüber hinaus ist das Produktprofil aller drei Cluster auch mit dem starken Reduktionsmittel SmI<sub>2</sub> relativ schmal (CH<sub>4</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>, C<sub>3</sub>H<sub>6</sub> und C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>; Abbildung 6d), und auch die TONs (1.4, 1.8 und 2.3 für M, V bzw. L-Cluster) sind für die CO<sub>2</sub>-niedriger als für die CO-Reduktion (Abbildung 6f).<sup>[45]</sup> Dies bestätigt, dass CO<sub>2</sub> ein schlechteres Substrat für die Nitrogenasecofaktoren ist.

Im Unterschied zum Protein-gebundenen Gegenstück zeigen die isolierten M- und V-Cluster sowohl vergleichbare CO-Reduktionsaktivitäten als auch eine Neigung zur Bildung von CH<sub>4</sub> als Hauptprodukt der CO<sub>2</sub>-Reduktion (Abbildung 6c). Andererseits bleiben die CO<sub>2</sub>-Reduktionsaktivitäten der isolierten und proteingebundenen Cluster vergleich-

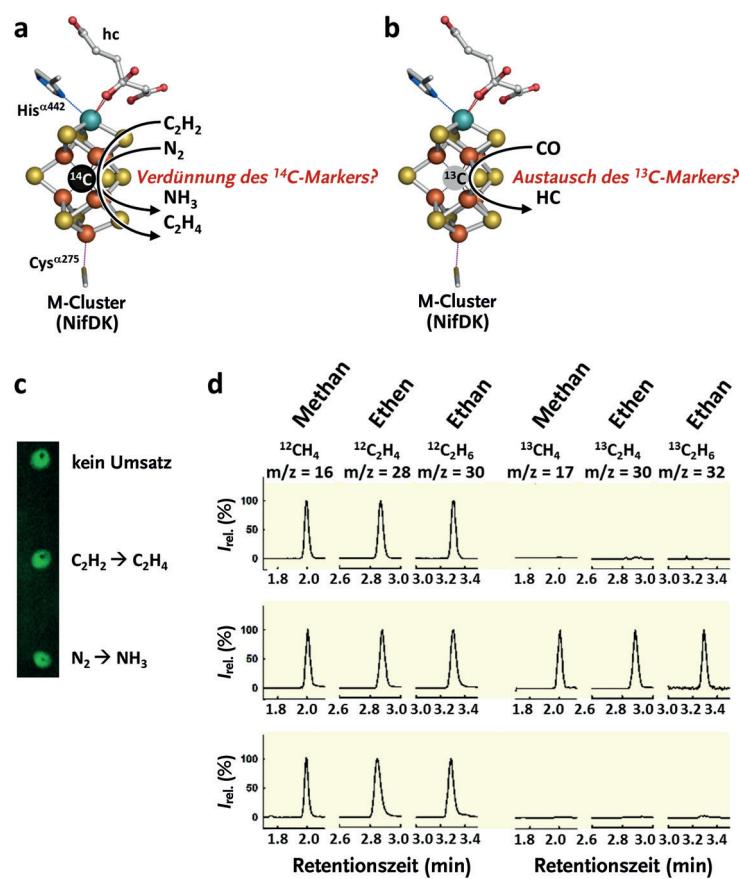
bar; allerdings sind beide Cluster wesentlich aktiver nach der Isolierung und verbessern wesentlich das CH<sub>4</sub>/CO-Verhältnis in ihrem Produktprofil (Abbildung 6d). Diese Beobachtungen demonstrieren einen Einfluss der Proteinumgebung auf die Reaktivität der Cofaktoren. Während die TONs der Cofaktor-basierten Reaktionen unter den aktuellen Bedingungen moderat sind, bestätigt die Tatsache des katalytischen Umsatzes von CO und CO<sub>2</sub> die Cluster nachdrücklich als eigenständige Katalysatoren. Dies liefert den ersten Machbarkeitsnachweis für die Entwicklung eines Cofaktor-basierten, biomimetischen Katalysators, der CO und CO<sub>2</sub> unter Atmosphärenbedingungen in Kohlenwasserstoffe umwandeln kann.

#### 4. Zentrales Carbid und Kohlenstoffkuppelung: Besteht eine mechanistische Relevanz zwischen beiden?

Die Entdeckung des interstitiellen Carbids im Zentrum des Nitrogenasecofaktors<sup>[12,14]</sup> führte zu den mechanistischen Fragen, ob das Carbid am Substratumsatz beteiligt ist und, falls dem so ist, ob das Carbid in die Kohlenwasserstoffprodukte aus der reduktiven C-C-Kupplung eingebaut wird.<sup>[18]</sup> Die Identifikation der SAM-Methylgruppe als die Quelle des interstitiellen Carbids<sup>[19]</sup> lieferte die Möglichkeit, das Carbid spezifisch mit <sup>14</sup>C- oder <sup>13</sup>C-Isotopen zu markieren, um das Schicksal der Kohlenstoffisotope beim Substratumsatz zu verfolgen.<sup>[18]</sup>

##### 4.1. Das Schicksal des zentralen Carbids beim Substratumsatz

Eine Kombination von <sup>14</sup>C- und <sup>13</sup>C-Isotopen wurde genutzt, um das Schicksal des interstitiellen Carbids des M-Clusters beim Substratumsatz zu verfolgen.<sup>[18]</sup> [<sup>14</sup>C]Methyl-SAM wurde eingesetzt, um das interstitielle Carbid zu markieren. Die <sup>14</sup>C-markierte Probe wurde einem schnellen Substratumsatz (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> und N<sub>2</sub>) ausgesetzt, und anschließend wurde die Menge des noch vorhandenen <sup>14</sup>C-markierten M-Clusters untersucht (Abbildung 7a). Wenn [<sup>13</sup>C]Methyl-SAM genutzt wurde, um das interstitielle Carbid zu markieren, wurde die <sup>13</sup>C-markierte Probe einem langsamem Substratumsatz (CO) ausgesetzt, und die Produkte wurden in Bezug auf <sup>13</sup>C untersucht (Abbildung 7b). Im Falle der <sup>14</sup>C-markierten Probe war die Intensität nach 3 h Umsatz von C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> oder N<sub>2</sub> dieselbe, obwohl die hohe Umsatzrate eine schnelle Verdünnung der <sup>14</sup>C-Markierung im Cofaktor fördern sollte (Abbildung 7c). Im Falle der <sup>13</sup>C-markierten Probe wurde kein <sup>13</sup>C-markiertes Produkt detektiert, auch nicht unter extrem langsamem CO-Umsatz mit einer CO-Konzentration im submolaren Verhältnis zum interstitiellen Carbid, um eine Verdünnung der möglichen <sup>13</sup>C-markierten Produkte zu verhindern (Abbildung 7d, untere Spuren).



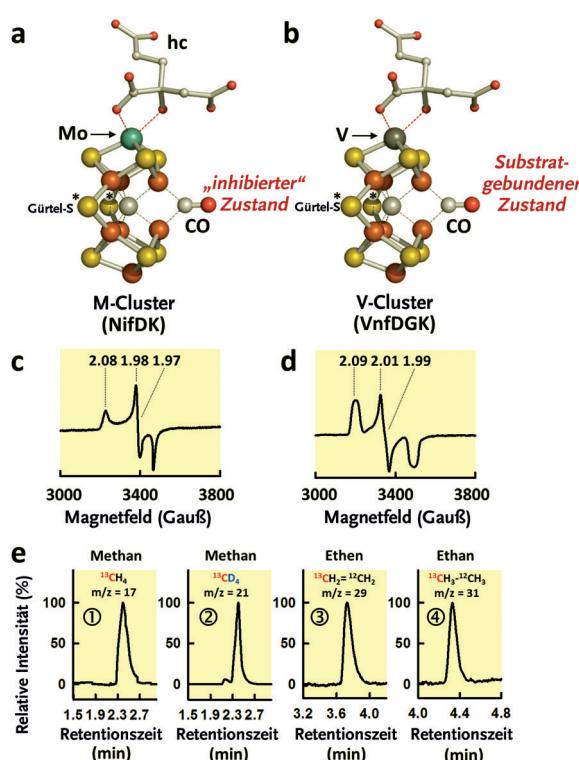
**Abbildung 7.** Die Verfolgung des interstitiellen Carbids des Nitrogenasecofaktors beim Substratumsatz. Das interstitielle Carbid des NifDK-gebundenen M-Clusters wurde markiert mit a) <sup>14</sup>C, um zu untersuchen, ob die <sup>14</sup>C-Konzentration nach N<sub>2</sub>- und C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>-Umsatz abnimmt; oder b) <sup>13</sup>C, um zu untersuchen, ob <sup>13</sup>C bei der Umsetzung von CO in die Kohlenwasserstoff(HC)-Produkte eingebaut wird. Der M-Cluster wird gezeigt, wie in Abbildung 1 b beschrieben. c) Die Intensitäten der <sup>14</sup>C-Markierung in NifDK vor und nach dem Umsatz von C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> und N<sub>2</sub>. Gezeigt ist die durch Autoradiographie detektierte Strahlung der <sup>14</sup>C-Markierung des NifDK-gebundenen M-Clusters. Die Intensitäten des <sup>14</sup>C-markierten M-Clusters haben sich durch den Umsatz von C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> und N<sub>2</sub> nicht verändert, was darauf hinweist, dass sich das interstitielle Carbid nach wie vor im Zentrum des Clusters befindet. d) GC-MS-Analyse der Kohlenwasserstoffprodukte, die durch den Umsatz von <sup>12</sup>CO mit einem unmarkierten M-Cluster (obere Spuren), von <sup>13</sup>CO mit einem unmarkierten M-Cluster (mittlere Spuren) und von <sup>12</sup>CO mit einem <sup>13</sup>C-markierten M-Cluster (untere Spuren) erhalten wurden. Es wurden keine <sup>13</sup>C-Produkte beim Umsatz von <sup>12</sup>CO mit <sup>13</sup>C-markiertem M-Cluster detektiert (unten rechts); dies legt nahe, dass das interstitielle Carbid nicht in der CO-Reduktion umgesetzt wurde.

Diese Befunde lassen darauf schließen, dass das interstitielle Carbid weder durch Substratumsatz ausgetauscht noch als Substrat in die Produkte eingebaut wird. Auf der Grundlage dieser Beobachtungen kann angenommen werden, dass eine Rolle des interstitiellen Carbids darin besteht, die Strukturintegrität während des Substratumsatzes zu bewahren.

##### 4.2. Eine zentrale Rolle des interstitiellen Carbids in der C-C-Kupplung

Die Rolle des interstitiellen Carbids für die Erhaltung der Strukturintegrität beim Substratumsatz wird von neuen CO-

Bindungsstudien mit den Cofaktoren der Mo- und V-Nitrogenase gestützt.<sup>[52,54]</sup> Bisherige spektroskopische Untersuchungen offenbarten ein einzigartiges EPR-Signal bei der Inkubation der Mo-Nitrogenase mit CO unter Umsatzbedingungen. Es wurde angenommen, dass das CO an zwei Fe-Atomen des „S-Gürtels“ des M-Clusters bindet und diesen überbrückt.<sup>[55–58]</sup> Neue kristallographische Studien des CO-gebundenen M-Clusters zeigen, dass ein CO den Platz eines Gürtel-S-Atoms und eine  $\mu_2$ -Koordination zwischen einem darüber und einem darunter liegenden Fe-Atom einnehmen kann (Abbildung 8a) – eine überraschende Beobachtung, die zu der Hypothese führte, dass eine reaktive Fe-Spezies durch



**Abbildung 8.** Die homologen Konformationen des CO-gebundenen M- und V-Clusters. a) Die Kristallstruktur des CO-gebundenen M-Clusters (ein „inhibierter“ Zustand) und b) die homologe Struktur des CO-gebundenen V-Clusters (ein Substrat-gebundener Zustand). PDB-Eintrag 4TKV.<sup>[54]</sup> XAS/EXAFS<sup>[51]</sup> und XES-Daten<sup>[52]</sup> wurden genutzt, um diese Modelle zu erstellen. Die Atome sind gefärbt wie in Abbildung 1b beschrieben. Die Gürtel-S-Atome sind mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Eines der drei Gürtel-S-Atome wurde in der CO-gebundenen Konformation des M- und V-Clusters durch eine CO-Gruppe ersetzt. c, d) EPR-Signale des c) CO-gebundenen M-Clusters und d) CO-gebundenen V-Clusters. Die Konformation des CO-gebundenen M-Clusters wurde durch die Inkubation der aktiven Mo-Nitrogenase (NifH mit NifDK) mit CO in Gegenwart von Dithionit und ATP erzeugt, wohingegen der CO-gebundene V-Cluster durch die Inkubation der ruhenden V-Nitrogenase (VnfDGK alleine) mit CO in Gegenwart des starken Reduktionsmittels Eu<sup>II</sup>-DTPA ( $E^\circ = -1.14$  V bei pH 8.0) generiert wurde. Gezeigt sind Subtraktionsspektren von Proben, die in An- und Abwesenheit von CO hergestellt wurden. Die g-Werte sind gekennzeichnet. e) Die Katalysefähigkeit des CO-gebundenen V-Clusters. GC-MS-Analyse der gebildeten Produkte nach Substratumsatz des <sup>13</sup>CO-gebundenen V-Clusters in ① <sup>1</sup>H<sub>2</sub>O und ② <sup>2</sup>D<sub>2</sub>O ohne Zugabe von zusätzlichem CO (①, ②) oder in einer Reaktion mit <sup>1</sup>H<sub>2</sub>O und der Zugabe von 1% <sup>12</sup>CO (③, ④).

die Verdrängung des S-Atoms erzeugt wurde, um die Bindung von CO zu ermöglichen.<sup>[54]</sup> Interessanterweise konnte eine homologe Konformation für den V-Cluster durch die Inkubation der „ruhenden“ V-Nitrogenase (die bloße Katalysekomponente VnfDGK) mit CO und Eu<sup>II</sup>-DTPA erhalten werden. Das niedrige Potential des V-Clusters unter diesen stark reduzierenden Bedingungen ermöglicht die Bindung von CO ohne enzymatischen Umsatz. Die EPR-Signale des CO-gebundenen M- und V-Clusters sind verblüffend ähnlich (Abbildung 8c,d)<sup>[52]</sup> und lassen auf eine ähnliche CO-gebundene Konformation schließen (Abbildung 8a,b).<sup>[52]</sup> Im Unterschied zum „inhibierten“ CO-gebundenen M-Cluster, der CO kaum umsetzen kann, war der CO-gebundene V-Cluster katalytisch kompetent und ist deshalb ein Substrat-gebundener Nitrogenasezustand. Die GC-MS-Analysen legen nahe, dass der V-Cluster mit <sup>13</sup>CO beladen werden kann und dieses anschließend in Kohlenwasserstoffe umgesetzt. In der Abwesenheit von weiterem CO resultiert die Umsetzung des V-Cluster-gebundenen <sup>13</sup>CO in der Bildung von <sup>13</sup>CH<sub>4</sub> (Abbildung 8e, ①) in H<sub>2</sub>O und in der von <sup>13</sup>CD<sub>4</sub> (Abbildung 8e, ②) in D<sub>2</sub>O.<sup>[52]</sup> Durch die Zugabe von 1% zusätzlichem <sup>12</sup>CO konnte der V-Cluster das gebundene <sup>13</sup>CO durch reduktive C-C-Kupplung in <sup>13</sup>CH<sub>2</sub>=<sup>12</sup>CH<sub>2</sub> (Abbildung 8e, ③) und <sup>13</sup>CH<sub>3</sub>-<sup>12</sup>CH<sub>3</sub> (Abbildung 8e, ④) in H<sub>2</sub>O-basierten Reaktionen umsetzen.<sup>[52]</sup>

Die Verdrängung des Gürtel-S-Atoms durch CO – eine Bindungsart, die wahrscheinlich auch in der katalytisch kompetenten Konformation des CO-gebundenen V-Clusters eingenommen wird – lässt auf einen Nitrogenase-basierten Mechanismus der CO-Aktivierung schließen, der auf einer erheblichen Umordnung der Gürtel-S-Atome beruht, um die beiden Fe-Bindungsstellen für die anfängliche CO-Bindung und möglicherweise auch die Bindung weiterer CO-Gruppen für die C-C-Kupplung freizulegen und zu aktivieren. Die Flexibilität des S-Gürtels in diesem Prozess lässt eine entscheidende Rolle des interstitiellen Carbids als stabiler Anker für die reaktiven Fe-Bindungsstellen während des Ligandenauftausches vermuten, der die Erhaltung der Integrität des Cofaktors gewährleistet und zugleich die für die Katalyse nötige Umstrukturierung des S-Gürtels ermöglicht. Aus diesem Grund übersteigt die Funktion des interstitiellen Carbids jene eines reinen Strukturelements, auch wenn es nicht direkt an der Substratreduktion teilnimmt. Dieses Atom hat in Bezug sowohl auf die Position also auch auf die Funktion eine zentrale Rolle bei der Cofaktorumstrukturierung, die die einzigartige CO-Reaktivität der Nitrogenase ermöglicht.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Eine enge Beziehung zwischen Nitrogenase und Kohlenstoff wurde mit der Identifizierung des interstitiellen Carbids im zentralen Hohlraum des Nitrogenasecofaktors sowie mit der Entdeckung der Nitrogenase-katalysierten reduktiven C-C-Kupplung kleiner Kohlenstoffverbindungen enthüllt. Untersuchungen des Carbidinsertionsweges zeigen eine neuartige, SAM-abhängige Radikalroute zu komplexen, überbrückten Metallclustern, wobei neueste Studien zur CO-Ak-

tivierung eine essenzielle, wenngleich indirekte Rolle des interstitiellen Carbids an der Aufrechterhaltung der Strukturintegrität bei gleichzeitiger Begünstigung des Cofaktorumbaus während des Substratumsatzes aufdecken.

Es gibt allerdings auch noch zahlreiche offene Fragen zu dieser Kohlenstoffspezies hinsichtlich des Nitrogenasezusammenbaus und des katalytischen Mechanismus. In Bezug auf die Carbidinsertion müssen sowohl die Ereignisse zur weiteren Prozessierung des Kohlenstoffintermediats in das Carbidion als auch die damit verbundene Frage zum Ursprung des neunten Schwefelatoms sowie die Radikal-basierte Clusterumstrukturierung erforscht werden, um den Zusammenbau des Nitrogenasecofaktors zu erklären. In Bezug auf die C-C-Kupplung sind weitere Untersuchungen des Aktivierungsmechanismus der Kohlenstoffverbindungen wie auch die Verbesserung der Reaktionsbedingungen für die C-C-Kupplung notwendig, um die Reaktivität der Nitrogenase zu verstehen und Strategien für die zukünftige biotechnologische Anwendung dieser Reaktionen zur Umwandlung von Kohlenstoffabfall in nützliche Kohlenwasserstoffprodukte zu entwickeln. Die Erforschung der Beziehung zwischen Nitrogenase und Kohlenstoff verspricht, unser Verständnis des Nitrogenasemechanismus zu fördern und neuartige chemische Reaktionen zu enthüllen, die von diesem Enzymsystem katalysiert werden.

## Danksagung

Diese Arbeit wurde vom NIH grant GM-67626 (M.W.R.), DOE (BES) Award DE-SC0014470 (M.W.R. und Y.H.) und der Hellman Foundation (Y.H.) unterstützt.

**Zitierweise:** *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 8216–8226  
*Angew. Chem.* **2016**, *128*, 8356–8367

- [1] B. K. Burgess, D. J. Lowe, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2983–3012.
- [2] J. B. Howard, D. C. Rees, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2965–2982.
- [3] B. M. Hoffman, D. Lukyanov, Z. Y. Yang, D. R. Dean, L. C. Seefeldt, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4041–4062.
- [4] Während die ATP-abhängige Reduktion von CO<sub>2</sub> subkatalytisch ist, haben erste Studien mit isolierten Nitrogenasecofaktoren in organischen Lösungsmittelsystemen mit passenden Reduktionsmitteln die katalytische Umsetzung von CO<sub>2</sub> bestätigt.
- [5] Y. Hu, C. C. Lee, M. W. Ribbe, *Dalton Trans.* **2012**, *41*, 1118–1127.
- [6] Y. Hu, C. C. Lee, M. W. Ribbe, *Science* **2011**, *333*, 753–755.
- [7] C. C. Lee, Y. Hu, M. W. Ribbe, *Science* **2010**, *329*, 642.
- [8] Z. Y. Yang, D. R. Dean, L. C. Seefeldt, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 19417–19421.
- [9] R. Schlögl, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 2004–2008; *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 2050–2055.
- [10] C. K. Rofer-DePoorter, *Chem. Rev.* **1981**, *81*, 447–474.
- [11] O. Einsle, F. A. Tezcan, S. L. Andrade, B. Schmid, M. Yoshida, J. B. Howard, D. C. Rees, *Science* **2002**, *297*, 1696–1700.
- [12] T. Spatzl, M. Aksoyoglu, L. Zhang, S. L. Andrade, E. Schleicher, S. Weber, D. C. Rees, O. Einsle, *Science* **2011**, *334*, 940.
- [13] J. Kim, D. C. Rees, *Nature* **1992**, *360*, 553–560.
- [14] K. M. Lancaster, M. Roemelt, P. Ettenhuber, Y. Hu, M. W. Ribbe, F. Neese, B. Bergmann, S. DeBeer, *Science* **2011**, *334*, 974–977.
- [15] F. A. Tezcan, J. T. Kaiser, D. Mustafi, M. Y. Walton, J. B. Howard, D. C. Rees, *Science* **2005**, *309*, 1377–1380.
- [16] H. Schindelin, C. Kisker, J. L. Schlessman, J. B. Howard, D. C. Rees, *Nature* **1997**, *387*, 370–376.
- [17] J. A. Wiig, Y. Hu, M. W. Ribbe, *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 8034.
- [18] J. A. Wiig, C. C. Lee, Y. Hu, M. W. Ribbe, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 4982–4983.
- [19] J. A. Wiig, Y. Hu, C. C. Lee, M. W. Ribbe, *Science* **2012**, *337*, 1672–1675.
- [20] M. W. Ribbe, Y. Hu, K. O. Hodgson, B. Hedman, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4063–4080.
- [21] L. Zheng, R. H. White, V. L. Cash, D. R. Dean, *Biochemistry* **1994**, *33*, 4714–4720.
- [22] L. Zheng, R. H. White, V. L. Cash, R. F. Jack, D. R. Dean, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 2754–2758.
- [23] P. C. Dos Santos, D. C. Johnson, B. E. Ragle, M. C. Unciuleac, D. R. Dean, *J. Bacteriol.* **2007**, *189*, 2854–2862.
- [24] A. D. Smith, G. N. L. Jameson, P. C. Dos Santos, J. N. Agar, S. Naik, C. Krebs, J. Frazzon, D. R. Dean, B. H. Huynh, M. K. Johnson, *Biochemistry* **2005**, *44*, 12955–12969.
- [25] P. Yuvaniyama, J. N. Agar, V. L. Cash, M. K. Johnson, D. R. Dean, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 599–604.
- [26] L. M. Zheng, D. R. Dean, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 18723–18726.
- [27] J. A. Wiig, Y. Hu, M. W. Ribbe, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 8623–8627.
- [28] J. T. Kaiser, Y. Hu, J. A. Wiig, D. C. Rees, M. W. Ribbe, *Science* **2011**, *331*, 91–94.
- [29] A. W. Fay, M. A. Blank, C. C. Lee, Y. Hu, K. O. Hodgson, B. Hedman, M. W. Ribbe, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 7787–7790; *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 7933–7936.
- [30] M. C. Corbett, Y. Hu, A. W. Fay, M. W. Ribbe, B. Hedman, K. O. Hodgson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 1238–1243.
- [31] K. M. Lancaster, Y. Hu, U. Bergmann, M. W. Ribbe, S. Debeer, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 610–612.
- [32] Y. Hu, A. W. Fay, M. W. Ribbe, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 3236–3241.
- [33] Y. Hu, M. C. Corbett, A. W. Fay, J. A. Webber, K. O. Hodgson, B. Hedman, M. W. Ribbe, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 17125–17130.
- [34] Y. Hu, M. C. Corbett, A. W. Fay, J. A. Webber, K. O. Hodgson, B. Hedman, M. W. Ribbe, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 17119–17124.
- [35] J. M. Yoshizawa, B. A. Blank, A. W. Fay, C. C. Lee, J. A. Wiig, Y. Hu, K. O. Hodgson, B. Hedman, M. W. Ribbe, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 9321–9325.
- [36] Y. Hu, M. W. Ribbe, *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 13173–13177.
- [37] J. Christiansen, P. J. Goodwin, W. N. Lanzilotta, L. C. Seefeldt, D. R. Dean, *Biochemistry* **1998**, *37*, 12611–12623.
- [38] B. Schmid, M. W. Ribbe, O. Einsle, M. Yoshida, L. M. Thomas, D. R. Dean, D. C. Rees, B. K. Burgess, *Science* **2002**, *296*, 352–356.
- [39] A. W. Fay, J. A. Wiig, C. C. Lee, Y. Hu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 14829–14833.
- [40] G. R. Dukes, R. H. Holm, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 528–533.
- [41] R. C. Job, T. C. Bruice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1975**, *72*, 2478–2482.
- [42] J. G. Rebelein, Y. Hu, M. W. Ribbe, *ChemBioChem* **2015**, *16*, 1993–1996.
- [43] J. G. Rebelein, Y. Hu, M. W. Ribbe, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 11543–11546; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 11727–11730.
- [44] C. C. Lee, Y. Hu, M. W. Ribbe, *mBio* **2015**, *6*, e00307-15.
- [45] C. C. Lee, Y. Hu, M. W. Ribbe, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 1219–1222; *Angew. Chem.* **2015**, *127*, 1235–1238.
- [46] C. C. Lee, Y. Hu, M. W. Ribbe, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 1947–1949; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 1983–1985.
- [47] R. R. Eady, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 3013–3030.

- [48] Y. Hu, M. W. Ribbe, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2015**, *20*, 435–445.
- [49] M. A. Blank, C. C. Lee, Y. Hu, K. O. Hodgson, B. Hedman, M. W. Ribbe, *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 7123–7128.
- [50] Y. Hu, M. C. Corbett, A. W. Fay, J. A. Webber, B. Hedman, K. O. Hodgson, M. W. Ribbe, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 13825–13830.
- [51] A. W. Fay, M. A. Blank, C. C. Lee, Y. Hu, K. O. Hodgson, B. Hedman, M. W. Ribbe, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12612–12618.
- [52] C. C. Lee, A. W. Fay, T. C. Weng, C. M. Krest, B. Hedman, K. O. Hodgson, Y. Hu, M. W. Ribbe, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 13845–13849.
- [53] V. K. Shah, W. J. Brill, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, *74*, 3249–3253.
- [54] T. Spatzal, K. A. Perez, O. Einsle, J. B. Howard, D. C. Rees, *Science* **2014**, *345*, 1620–1623.
- [55] L. M. Cameron, B. J. Hales, *Biochemistry* **1998**, *37*, 9449–9456.
- [56] Z. Maskos, B. J. Hales, *J. Inorg. Biochem.* **2003**, *93*, 11–17.
- [57] H. I. Lee, L. M. Cameron, B. J. Hales, B. M. Hoffman, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 10121–10126.
- [58] H. I. Lee, M. Sørlie, J. Christiansen, T. C. Yang, J. Shao, D. R. Dean, B. J. Hales, B. M. Hoffman, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 15880–15890.

Eingegangen am 1. Januar 2016  
Online veröffentlicht am 20. Mai 2016

---