

## Bioanorganische Chemie

# Maximale Reduktionskraft voraus: mehr als die biologische Variante

OLIVER EINSLE  
INSTITUT FÜR BIOCHEMIE, UNIVERSITÄT FREIBURG

**The enzyme nitrogenase is described to catalyze the “biological version” of the Haber-Bosch reaction, the reductive fixation of atmospheric  $N_2$  gas into a bioavailable form. While formally correct, our current understanding of the mechanism of this remarkable enzyme reveals the astounding degree of finetuning that is required to carry out the most challenging reductive catalysis found in nature under mild conditions and in an aqueous environment.**

DOI: 10.1007/s12268-024-2190-1  
© Der Autor 2024

■ „Die Reaktion des Enzyms Nitrogenase ist die einzig bekannte biologische Variante des großtechnischen Haber-Bosch-Verfahrens zur Fixierung von Stickstoff.“ Diese Aussage ist fast ein Allgemeinplatz, aber sie war schon deshalb immer etwas unscharf, weil die exakte Arbeitsweise des Enzyms bis heute nicht vollständig verstanden ist. Dabei ist die Bedeutung der Stickstofffixierung unumstritten: Als der prominente britische Chemiker Sir William Crookes 1898 das „Weizenproblem“ vorhersagte, eine bevorstehende, globale Nahrungsmittelkrise, die daher rührte, dass das Bevölkerungswachstum die Nahrungsmittelproduktion überstieg, war seine Rede ein Weckruf für den deutschen Chemiker Fritz Haber und den Ingenieur Carl Bosch. Sie erdachten und realisierten die chemische Synthese von Ammoniak,  $NH_3$ , aus atmosphärischem  $N_2$ . Dieses Haber-Bosch-Verfahren aus dem Jahr 1913 wird bis heute nahezu unverändert angewandt, liefert so viel bioverfügbaren Stickstoff wie alle natürlichen Quellen zusammen und verbraucht dabei 2–3 % der weltweiten Energieproduktion [1]. Heute hängt die Ernährung von über 50 % der mehr als 8 Milliarden Menschen vom Einsatz von Dünger aus der  $N_2$ -Fixierung ab. Obwohl das Haber-Bosch-Verfahren damit eine der größten Erfolgsgeschichten der Chemie ist, führt die schiere Menge von 200 Megatonnen Stickstoff, die jedes Jahr fixiert werden, unweigerlich zu erheblichen ökologischen Problemen.

Erschwungliche und leicht verfügbare Düngemittel werden im Überschuss eingesetzt, um die Ernteerträge maximieren. Allerdings erreicht weniger als die Hälfte der ausgebrachten Stickstoffsalze die Pflanzen, während ein großer Teil durch konkurrierende mikrobielle Denitrifizierer oder Anammox-Bakterien wieder zu gasförmigem  $N_2$  reduziert wird, oder in Gewässer und Aquifere ausgewaschen wird. Die negativen Folgen sind u. a. Eutrophierung sowie die Freisetzung kritischer Treibhausgase wie  $N_2O$ . Unsere Gesellschaft ist auf das Haber-Bosch-Verfahren angewiesen, und doch nötigt uns gerade das Bevölkerungswachstum, das dadurch ermöglicht wurde, Alternativen für eine wirtschaftlich und ökologisch nachhaltige Nahrungsmittelproduktion zu finden [2].

### Stickstofffixierung im Haber-Bosch-Verfahren und im Enzym

Mechanistisch besticht der chemische Prozess nicht unbedingt durch seine Eleganz: Bei einem Druck von 100–180 bar und einer Temperatur von 400–500 °C adsorbieren  $N_2$  und  $H_2$  aus einem Synthesegasgemisch in einem Reaktor an eine Eisenoberfläche und dissoziieren in einzelne Atome. Aus  $H_2$  entstehen so Oberflächen-assoziierte Hydride, die unter diesen Bedingungen äußerst mobil sind und sich mit den Stickstoffatomen zu Ammoniak vereinen. Dies entspricht einer Reduktion von  $N_2$ , bei der  $H_2$  sowohl als Reduktionsmittel als auch als Protonenquel-

le dient. Das eigentliche Problem besteht in der außerordentlichen Stabilität der  $N_2$ -Dreifachbindung, und das Haber-Bosch-Verfahren nutzt hier konsequent LeChateliers Prinzip des kleinsten Zwangs aus: Durch die massive Erhöhung von Druck und Temperatur wird das Gleichgewicht der Reaktion auf die Produktseite verschoben [3]. Was aber bedeutet dies für die „biologische Variante“, die Reaktion der Nitrogenase?

Für Enzyme ist Kinetik Verhandlungssache, aber für die Thermodynamik gilt dies nicht: Die Bindungsenthalpie der Dreifachbindung von  $N_2$  beträgt  $-946 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ , was bedeutet, dass die Elektronen, mit denen eine derartige Bindung reduziert werden kann, ein Redoxpotenzial von  $-1,6 \text{ V}$  mitbringen müssen. Im Unterschied zur Gasphasenchemie des Haber-Bosch-Verfahrens findet die Enzymreaktion jedoch im wässrigen Milieu des Zytoplasmas und unter Normaldruck und -temperatur statt, wo bereits ein halb so hohes Potenzial genügt, um Wasser in  $H_2$  und  $O_2$  zu zerlegen. Die Spaltung von  $N_2$  sollte hier schlicht unmöglich sein [4]. Mit der Nitrogenase schafft es die Natur aber dennoch, diese Reaktion ablaufen zu lassen und muss dabei wesentlich mehr leisten, als nur Haber-Bosch-Chemie in ein Enzym einzubauen. Wie Nitrogenase dies bewerkstelligt und welche Tricks hierfür benötigt werden, war und ist seit Jahrzehnten Gegenstand intensiver Arbeiten und Debatten. Die folgende Darstellung beschreibt eine Arbeitshypothese, die unsere eigenen Arbeiten zu einer Synthese kinetischer, biochemischer, spektroskopischer, theoretischer und struktureller Daten integriert, die von vielen Arbeitsgruppen über einen langen Zeitraum gesammelt wurde. In jüngster Zeit beginnt hieraus ein Modell zu kondensieren, das die zentralen mechanistischen Fragestellungen in adäquater Weise adressieren kann und einem weitreichenden – aber nicht ausschließlichen – Konsens entspricht. Die technischen Herausforderungen zwischen dem industriechemischen und dem enzymatischen Prozess unterscheiden sich dabei deutlich, und doch finden sich viele überraschende Übereinstimmungen. Folgen

wir also zunächst einem Elektron auf seinem Weg.

### „Energiereiche Elektronen“ – aber wie?

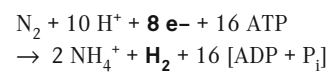
Ausgangspunkt ist für alle Diazotrophen der Zentralstoffwechsel, in dem Nährstoffe oxidiert und Elektronen letztlich auf NADH übertragen werden (**Abb. 1**). Hier beginnen bereits die Probleme, da das Redoxpotenzial von NADH ( $E^{0'} = -315 \text{ mV}$ ) nicht ausreicht, um die erste der beiden Proteinkomponenten der Nitrogenase, das Fe-Protein (oder Dinitrogenase-Reduktase) zu reduzieren. Mindestens drei verschiedene Strategien können zum Einsatz kommen, um dieses Hindernis zu überwinden: Das Enzym Pyruvat: Ferredoxin-Oxidoreduktase (PFOR) etwa kann durch eine oxidative Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetat stark reduzierende Elektronen auf Ferredoxin ( $E^{0'} = -415 \text{ mV}$ ) übertragen. Alternativ kann der Elektronen-bifurkierende, membranassoziierte FIX-Komplex unter Nutzung eines Chinons als Hochpotenzial-Akzeptor ein Flavodoxin reduzieren ( $E^{0'} = -430 \text{ mV}$ ). Als dritte Option kommt schließlich der membranintegrale RNF-Komplex in Frage, der in der  $\text{N}_2$ -Fixierung, anders als in Acetogenen, NADH *oxidiert* und unter Ausnutzung des Protonengradienten ebenfalls Ferredoxin reduziert. Ferredoxin und Flavodoxin sind nun ihrerseits in der Lage, ein Elektron auf das Fe-Protein der Nitrogenase zu übertragen (**Abb. 1**). Diese dimere P-Loop-NTPase besitzt einen [4Fe:4S]-Cluster, der beide Protomere verbrückt und bindet nach Reduktion 2 Moleküle ATP. So beladen kann das Fe-Protein nun einen Komplex mit der zweiten Komponente der Nitrogenase bilden. Dieses MFe-Protein (das in drei Varianten vorkommt, mit  $M = \text{Mo}, \text{V}$ , oder Fe) ist die katalytische Untereinheit und besitzt zwei ungewöhnliche Eisen-Schwefel-Zentren [5–8]. Sein P-Cluster ist ein flexibler [8Fe:7S]-Elektronenüberträger, während der FeM-Ko-Faktor das hoch spezialisierte Aktivzentrum darstellt (**Abb. 2A**). In dem eben gebildeten Komplex aus Fe- und MFe-Protein besteht die scheinbar einfache Aufgabe nun darin, das stark reduzierende Elektron des Fe-Proteins auf den FeM-Ko-Faktor zu übertragen. Was tatsächlich passiert, ist jedoch wohl deutlich ausgefeilter, da einem direkten Elektronentransfer zwei Probleme entgegenstehen: Zum einen ist der P-Cluster im Normalzustand bereits vollständig reduziert (d. h. alle acht Fe-Ionen liegen formal als  $\text{Fe}^{2+}$  vor) und kann daher kein weiteres Elektron aufnehmen,

zum anderen ist das Redoxpotenzial des Fe-Proteins noch immer nicht ausreichend negativ, um eine Übertragung auf den FeM-Ko-Faktor zu ermöglichen. Hier kommt nun zum Tragen, dass das Fe-Protein nicht nur als Elektronenüberträger fungiert, sondern – ebenso wie die verwandten G-Proteine – auch die Hydrolyse des gebundenen Nukleosidtriphosphats ATP an eine Konformationsänderung koppelt, einen *power stroke*, der mechanisch auf die Oberfläche des MFe-Proteins einwirkt und dazu führt, dass ein Elektron zunächst vom P-Cluster auf den FeM-Ko-Faktor übertragen wird, sodass in einem zweiten Schritt das Fe-Protein seinerseits lediglich den P-Cluster wieder in seinen voll reduzierten Ausgangszustand zurückversetzen muss. Somit ist nun ein erstes Elektron aus dem Zentralstoffwechsel auf den FeM-Ko-Faktor der Dinitrogenase übertragen. In zwei Schritten wurde sein Redoxpotenzial gegenüber dem von NADH deutlich abgesenkt, und mit der finalen Hydrolyse von 2 ATP pro Elektron hat das System seine

Möglichkeiten voll ausgenutzt und den bereits zuvor sehr elektronenreichen Ko-Faktor ein weiteres Mal reduziert [9].

### Von „reduziert“ zu „superreduziert“ – mit Hydriden

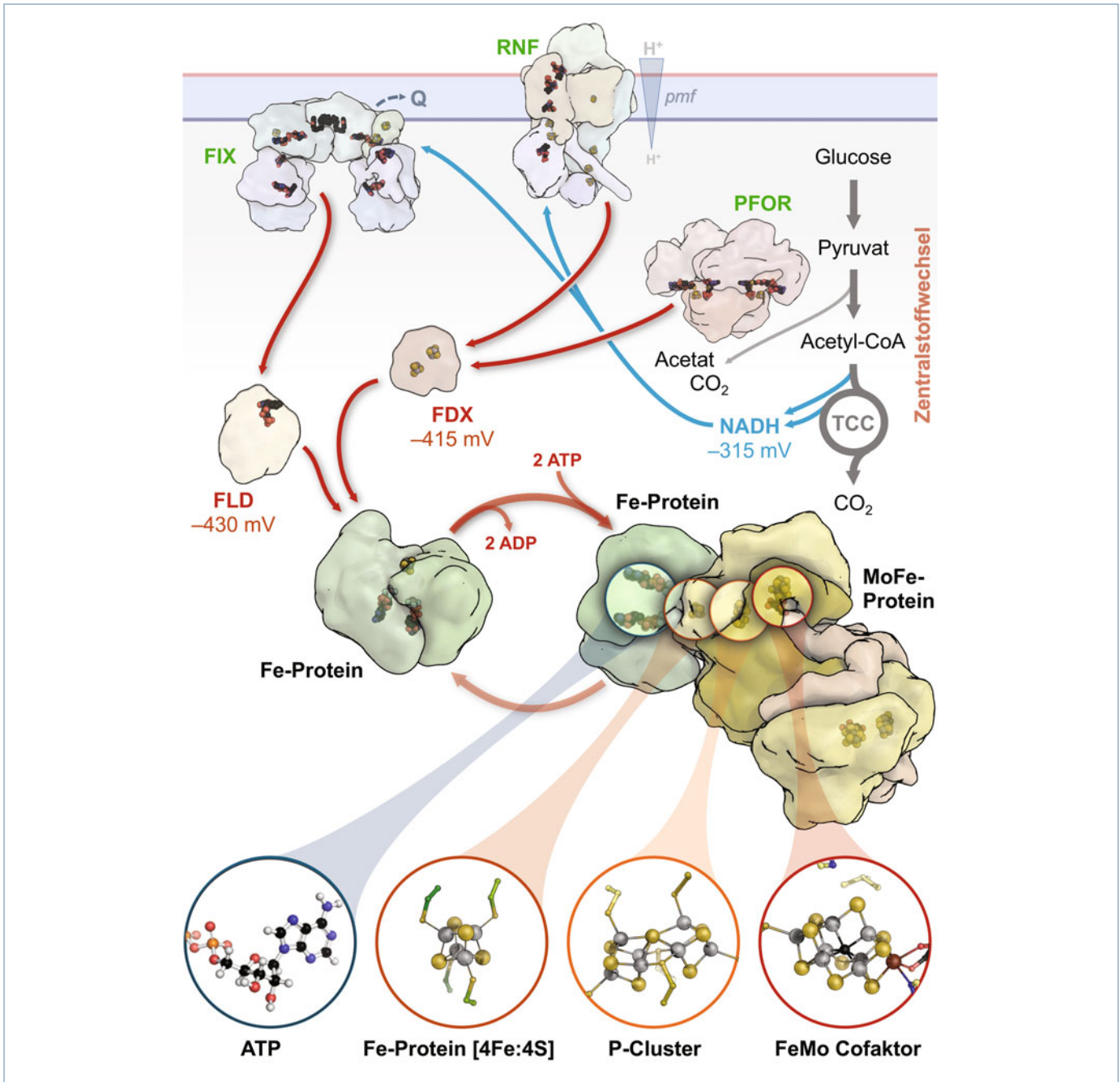
Leider funktioniert dies aber nur einmal, denn auch diese mehrstufige Reduktionskaskade ist nicht stark genug, um einen FeM-Ko-Faktor ein zweites Mal zu reduzieren. Die Reaktion der Nitrogenase erfordert jedoch nicht weniger als acht Reduktionsschritte, da neben der vollständigen Reduktion von  $\text{N}_2$  auch zusätzlich noch ein Molekül  $\text{H}_2$  als stöchiometrisches Nebenprodukt gebildet wird:



Das Problem wird zudem dadurch verstärkt, dass bereits die Bindung des Substrats  $\text{N}_2$  ein Enzym erfordert, das um nicht weniger als *vier* Elektronen reduziert vorliegt. Glücklicherweise ist der Einfallreichtum der Nitrogenase an dieser Stelle noch nicht

# Hier steht eine Anzeige.

 Springer



▲ **Abb. 1:** Erzeugung von Reduktionskraft bei der Nitrogenase. Elektronen stammen ursprünglich aus dem Zentralmetabolismus und werden durch Übertragung auf ein Ferredoxin (FDX) oder Flavodoxin (FLD) auf ein niedrigeres Potenzial gebracht. Dies geschieht entweder durch oxidative Decarboxylierung von Pyruvat (PFOR) oder, ausgehend von NADH, unter Zuhilfenahme eines Protonengradienten am RNF-Komplex oder durch Bifurkation zwischen Flavin und Chinon am FIX-Komplex. FDX oder FLD können das Fe-Protein der Nitrogenase reduzieren, das daraufhin 2 ATP bindet und einen Komplex mit dem MFe-Protein bildet (hier: M = Mo). Die Komplexbildung induziert ATP-Hydrolyse, wodurch ein Elektron mit niedrigem Potenzial vom P-Cluster auf den FeM-Ko-Faktor übertragen wird. Anschließend wird der P-Cluster seinerseits vom reduzierten [4Fe:4S]-Cluster des Fe-Proteins reduziert, und Fe-Protein und MFe-Protein dissoziieren. Zur Reduktion eines einzigen Moleküls N<sub>2</sub> muss dieser Prozess mindestens achtmal durchlaufen werden.

erschöpft, denn die einzigartige Architektur des Ko-Faktors erlaubt es, mit einem zweiten Elektron und einem bereitgestellten Proton ein Hydrid, H<sup>-</sup>, auf der Oberfläche dieses Metallclusters zu platzieren (**Abb. 2B**). Der Cluster selbst ist damit nicht mehr reduziert und kann erneut ein Elektron aufnehmen,

und das Oberflächen-Hydrid stellt eine bemerkenswerte Parallele zum Haber-Bosch-Mechanismus dar [10]. Hier führt dies aber auch zu einer neuen Komplikation, denn durch eine einfache Protonierung der energiereichen Hydride kann H<sub>2</sub> entweichen, wodurch dem Enzym wieder zwei Elektronen

verlorengehen. Eine naheliegende Protonenquelle wäre wiederum das umgebende Wasser, und die Nitrogenase kann ihre Aufgabe nur dann erfüllen, wenn die gebildeten Hydride komplett von diesem Solvens abgeschirmt werden. Gleichzeitig benötigt die Reaktion selbst aber eine große Zahl von Pro-

tonen, und dies führt zur vielleicht wichtigsten Randbedingung für Stickstofffixierung unter Normalbedingungen: der vollständigen Kontrolle über den Zugang und Verbleib von Protonen und Elektronen. Die Choreografie dieses Prozesses ist komplex und das Enzym ist auch keineswegs perfekt darin. Ein nicht geringer Anteil der Elektronen geht tatsächlich unproduktiv als  $H_2$  verloren, insbesondere bei niedrigen Substratkonzentrationen. Nitrogenase zahlt diesen Preis bei dem Versuch, insgesamt vier Elektronen zu akkumulieren und damit zwei Oberflächen-Hydride zu bilden.

### Ein letzter Kick

Bleibt zu klären, in welcher Weise uns dies der Lösung des Problems näherbringt. Über das Fe-Protein lässt sich der Ko-Faktor um ein Elektron reduzieren, was aber zur Aktivierung von  $N_2$  noch nicht ausreicht. Die Bildung eines Hydrids stellte für das Enzym zunächst einen Ausweg dar, da das Fe-Protein trotz ATP-Hydrolyse nicht in der Lage ist, den FeM-Ko-Faktor ein zweites Mal zu reduzieren. Selbst mit zwei Hydriden ist der Ko-Faktor selbst jedoch formal wieder oxidiert und erst recht nicht imstande, sein Substrat  $N_2$  auch nur zu binden. Ein letzter Trick wird daher benötigt, um einen noch weiter reduzierten Ko-Faktor zu ermöglichen, und der besteht darin, eine Rekombination der beiden Hydride zuzulassen, die nach vier Elektronentransferschritten am FeM-Ko-Faktor entstanden sind (**Abb. 2B**). Durch eine *reduktive Eliminierung* wird dann aus zwei Elektronen und zwei Protonen ein  $H_2$ -Molekül freigesetzt, wodurch die beiden anderen Elektronen notgedrungen am Ko-Faktor verbleiben. So entsteht lokal und transient eine höchst reaktive, zweifach reduzierte Form des Ko-Faktors. Erst diese ist nun tatsächlich in der Lage, ein  $N_2$ -Molekül zu binden und dessen stabile Dreifachbindung unmittelbar zu brechen. Mit dem stöchiometrisch freigesetzten  $H_2$  verliert die Nitrogenase gleich zwei der vier mühsam akkumulierten Elektronen, generiert aber dadurch eine Reduktionskraft, wie sie in einem biologischen, wässrigen System gar nicht erreichbar sein sollte. Die verbleibenden Schritte der Reaktion sind weit weniger fordernd, und am Ende steht die Freisetzung von bioverfügbaren Ammonium-Kationen.

Ein vergleichbar komplexer, mehrstufiger Energiewandlungsprozess zur Erzeugung maximaler Reduktionskraft ist von keinem anderen Enzym bekannt, auch wenn ähnli-

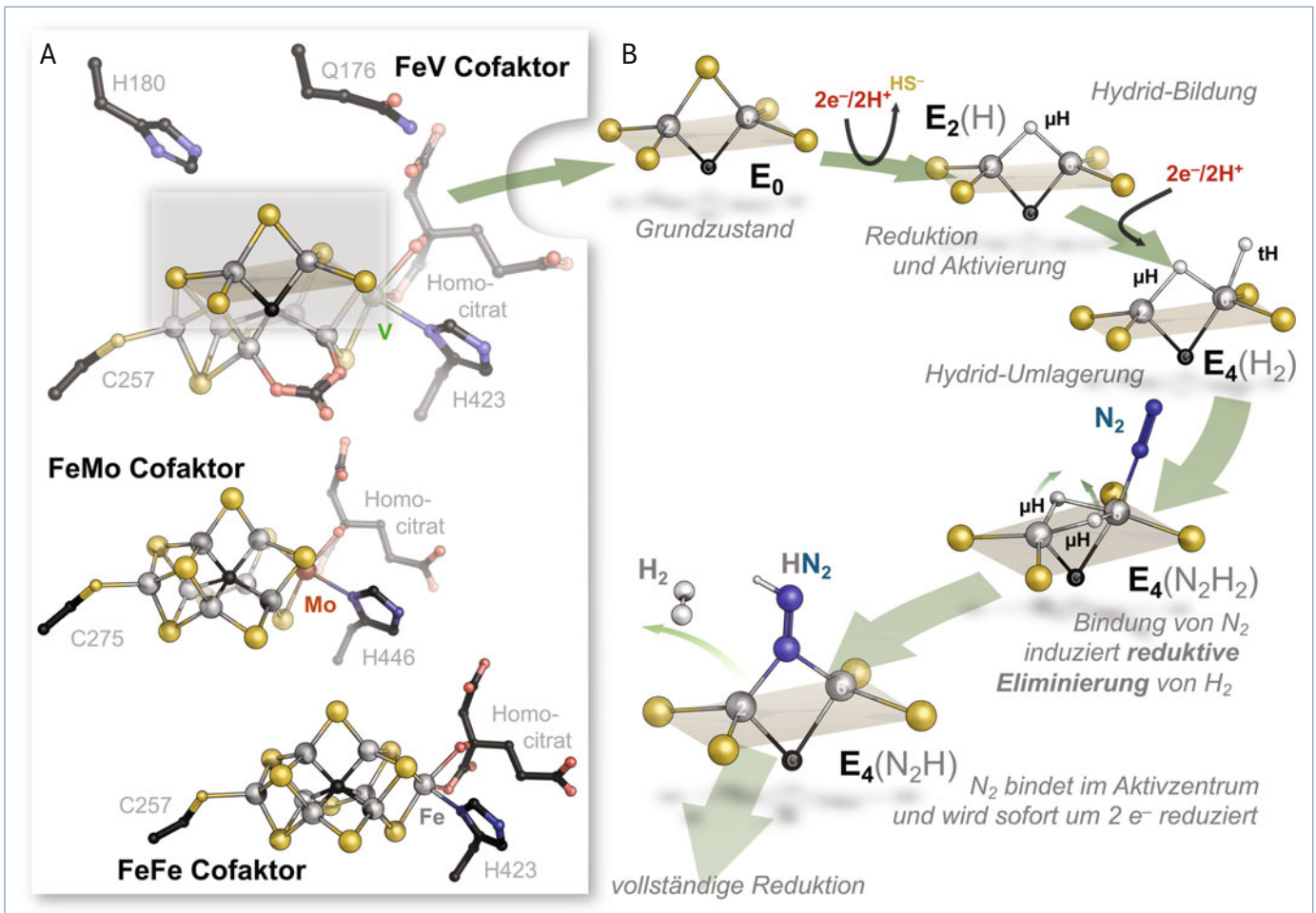
che Anforderungen beispielweise bei der anaeroben Dearomatisierung benötigt werden, dort aber durch Elektronen-Bifurkation realisiert werden können [11]. Für die Nitrogenase ist die reduktive Eliminierung von  $H_2$  vermutlich das Meisterstück, das allein ihr die Reduktion von  $N_2$  ermöglicht. Was folgt sind weitere Einzelelektronen-Schritte, und hier sind im Detail noch viele Fragen offen: Werden auch nach der initialen Aktivierung von  $N_2$  noch Hydride gebildet, oder können Reaktionsintermediate direkt reduziert werden? Wird zunächst ein N-Atom komplett reduziert, oder werden Elektronen abwechselnd übertragen? Ist die Bindung von  $N_2$  der Auslöser für die Eliminierung von  $H_2$  oder umgekehrt? Zudem beherrscht die Nitrogenase – als wohl stärkste Reduktase in der Natur – noch einige weitere Kunststücke, die ebenfalls von großer Bedeutung sind. So kann das Enzym bereits nach Aufnahme von zwei Elektronen, also nach der Bildung *eines* Hydrids, durch Kohlenstoffmonoxid, CO, inhibiert werden. Eine Variante der Nitroge-

nase, das Vanadium-abhängige Isoenzym, kann CO jedoch auch zu Kohlenwasserstoffen reduzieren [12, 13]. Dies wäre analog zum chemischen Fischer-Tropsch-Verfahren und kann eine wichtige Rolle bei der notwendigen Decarbonisierung spielen. Nitrogenasen reduzieren auch Nitrit, Sulfit, Lachgas, Cyanid, vermutlich  $CO_2$ , und auch Protonen (zu  $H_2$ ) ohne auf die reduktive Eliminierung zurückgreifen zu müssen. Das Enzym ist damit ein vielseitiger und hoch interessanter Kandidat für eine Vielzahl biotechnologischer Anwendungen, bis hin zu einer rekombinanten Produktion in Nahrungspflanzen, deren Wachstum dann ohne Einsatz von Düngemitteln und den damit verbundenen Umweltproblemen möglich wäre. Noch sind die vielfältigen Bemühungen in dieser Richtung in einem frühen Stadium, aber mit unserem wachsenden Verständnis der Eigenschaften und Eigenheiten der Nitrogenasen beginnt dieses zentrale Ziel einer nachhaltigen, grünen Biotechnologie langsam, ins Blickfeld zu rücken. ■

# Hier steht eine Anzeige.

 Springer





**▲ Abb. 2:** Die Reaktion der Nitrogenase. **A**, Die drei Isoformen des Enzyms nutzen leicht unterschiedliche Ko-Faktoren am Aktivzentrum. Sie unterscheiden sich durch das apikale Metall: Mo, V, oder Fe sowie durch einen ungewöhnlichen Carbonatliganden im FeV-Ko-Faktor. **B**, Die Reduktionsreaktionen finden in allen Ko-Faktoren an den beiden Eisenionen 2 und 6 statt. Der Ko-Faktor kann selbst lediglich ein Elektron aufnehmen, jedes zweite Elektron bildet daher ein Hydrid an der Clusteroberfläche, das durch separate Protonenwege  $\mu$ -verbrückend ( $\mu\text{H}$ ) oder terminal (tH) an  $\text{Fe}_6$  entsteht. Vermutlich löst die Bindung von Substraten an  $\text{Fe}_6$  eine Umlagerung des Hydrids aus der tH-Position in die  $\mu\text{H}$ -Position aus. Dies ermöglicht eine Rekombination, in der  $\text{H}_2$  eliminiert wird, und die beiden verbleibenden Elektronen einen superreduzierten Zustand erzeugen, der  $\text{N}_2$  verbrückend binden und unmittelbar reduzieren kann.

## Literatur

- [1] Smil V (2004) Enriching the Earth: Fritz Haber, Carl Bosch, and the Transformation of World Food Production. MIT Press, Cambridge, MA
- [2] Lehnert N, Musselman BW, Seefeldt LC (2021) Grand challenges in the nitrogen cycle. Chem Soc Rev 50: 3640–3646
- [3] Ertl G (2012) The Arduous Way to the Haber-Bosch Process. Z Anorg Allg Chem 638: 487–489
- [4] Einsle O (2023) Catalysis and structure of nitrogenase. Curr Opin Struct Biol 83: 102719
- [5] Einsle O, Tezcan FA, Andrade SLA et al. (2002) Nitrogenase MoFe-protein at 1.16 Å resolution: A central ligand in the FeMo-cofactor. Science 297: 1696–1700
- [6] Sippel D, Rohde M, Netzer J et al. (2018) A bound reaction intermediate sheds light on the mechanism of nitrogenase. Science 359: 1484–1489
- [7] Spatzal T, Aksoyoğlu M, Zhang LM et al. (2011) Evidence for Interstitial Carbon in Nitrogenase FeMo Cofactor. Science 334: 940
- [8] Trncik C, Detemple F, Einsle O (2023) Iron-only Fe-Nitrogenase underscores common catalytic principles in Biological Nitrogen Fixation. Nat Catal 6: 415–424
- [9] Einsle O, Rees DC (2020) Structural Enzymology of Nitrogenase Enzymes. Chem Rev 120: 4969–5004
- [10] Seefeldt LC, Hoffman BM, Dean DR (2009) Mechanism of Mo-Dependent Nitrogenase. Annu Rev Biochem 78: 701–722
- [11] Boll M, Albracht SSP, Fuchs G (1997) Benzoyl-CoA reductase (dearomatizing), a key enzyme of anaerobic aro-

matic metabolism – A study of adenosinetriphosphatase activity, ATP stoichiometry of the reaction and EPR properties of the enzyme. Eur J Biochem 244: 840–851

[12] Lee CC, Hu YL, Ribbe MW (2010) Vanadium Nitrogenase Reduces CO. Science 329: 642–642

[13] Rohde M, Laun K, Zebger I et al. (2021) Two ligand-binding sites in CO-reducing V nitrogenase reveal a general mechanistic principle. Sci Adv 7: eabg4474

**Funding note:** Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.  
**Open Access:** Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der

genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

## Korrespondenzadresse

Prof. Dr. Oliver Einsle  
 Institut für Biochemie  
 Albert-Ludwigs-Universität Freiburg  
 Albertstraße 21  
 D-79 104 Freiburg im Breisgau  
 einsle@biochemie.uni-freiburg.de

## AUTOR



### Oliver Einsle

Jahrgang 1970. 1991–1996 Biologiestudium, Universität Konstanz. 2000 Promotion in Biochemie und Biophysik, anschließend PostDoc, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried. 2001–2002 PostDoc, California Institute of Technology, Pasadena, USA. 2003–2008 Juniorprofessur für Proteinkristallographie, Universität Göttingen. Seit 2008 Professor für Biochemie, Universität Freiburg.