1. Einleitung

Die bioanorganische Chemie, die zwischen den klassischen Fächern Chemie, Biologie und Physik angesiedelt ist, beschäftigt sich u.a. mit den aktiven Zentren von Metalloproteinen. Viele dieser Proteine enthalten ein, zwei oder mehrere Übergangsmetalle; oft sind sie an Elektronentransfer- und Redoxprozessen beteiligt.
Eine besondere Rolle hierbei spielen die weit verbreiteten Eisen-Schwefel-Proteine, die u.a. am Elektronentransfer der bakteriellen und pflanzlichen Photosynthese, der Atmungskette, der Stickstoff-Fixierung in Nitrogenasen und an der Wasserstoffbildung in Hydrogenasen beteiligt sind. Die Eisen-Schwefel-Proteine enthalten bis zu acht Eisenatome in den Oxidationsstufen +II und +III. Häufig beobachtete Strukturtypen sind die in Abb. 1.1 dargestellten 1-Fe-, 2-Fe-, 3-Fe- und 4-Fe-Zentren, die terminal über die Thiolatgruppe von Cystein mit der Peptidkette verbunden sind. Eine Ausnahme bilden die $[Fe_2S_2]$-Rieske-Zentren, bei denen eines der beiden Eisenatome terminal von zwei Histidinen koordiniert ist. Bei mehrkernigen Zentren sind die Eisenatome über Sulfidionen verbrückt. Die tetraedrische bzw. verzerrt tetraedrische Koordination bewirkt nur eine vergleichsweise geringe Ligandenfeldaufspaltung der 3d-Orbitale, so daß sich die Eisenatome in beiden Oxidationsstufen grundsätzlich im high-spin-Zustand befinden.

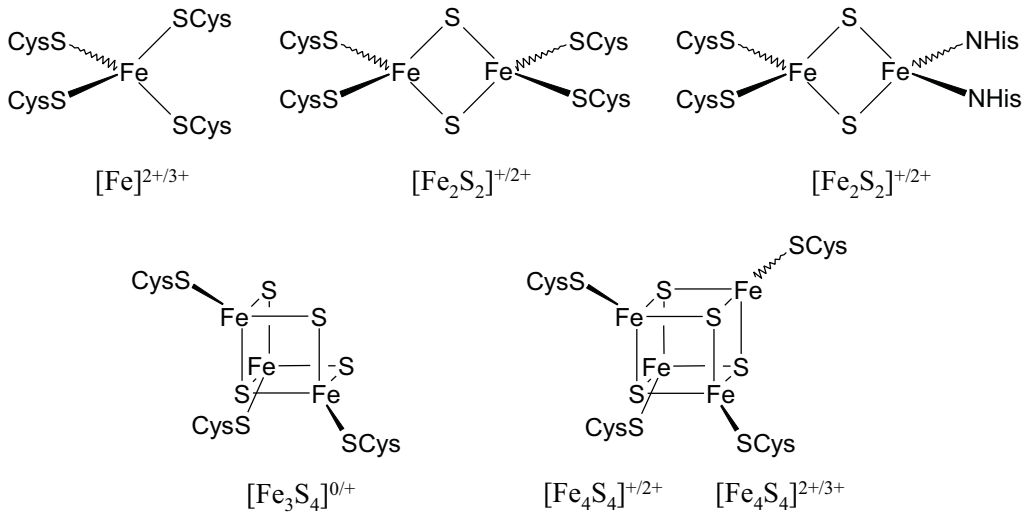

Abb. 1.1:

Höherkondensierte Cluster liegen im MoFe-Protein der Nitrogenase vor:
Im Eisen-Molybdän-Cofaktor (FeMoCo), einem $MoFe_7S_9$-Cluster und im P-Cluster (Fe_8S_7) sind kuboidale Fe_4S_3- und $MoFe_3S_3$-Einheiten über Sulfidbrücken miteinander verknüpft[CHA93][PET97]. Weitere Fe-S-Komplexe wurden in der Sulfitreduktase[CHR84][CRA95] und in der Mono-Dehydrogenase[RAG96][HU96] gefunden, wobei jeweils ein Fe_4S_4-Cluster an eine Häm-Gruppe bzw. an einen Ni-Komplex gebunden ist.

Seit den 70er Jahren dienen synthetische Fe-S-Cluster als Modellkomplexe der aktiven Zentren von Ferredoxinen bzw. „High Potential Iron Proteins“ (HiPIP's). Die große Anzahl der Fe_4S_4-Cluster, die sogenannten Fe-S-Cubane, spiegelt dabei ihre weite Verbreitung in biologischen Systemen wider.

Nach der Strukturaufklärung der beiden Nitrogenaseproteine (Fe- und MoFe-Protein) 1992 und 1993 hat sich auch die Modellchemie der im MoFe-Protein vorkommenden Cluster (FeMoCo und P-Cluster) außerordentlich dynamisch entwickelt[DEM95][DEM96][MAL95] [OST99][LAU95]. Von besonderem Interesse ist dabei der FeMoCo, denn hier findet die Reduktion von Distickstoff zu Ammoniak statt. Dieser einzigartige Mo-Fe-S-Cluster kann zwar in inaktiver Form aus dem Protein extrahiert werden, es ist bislang jedoch nicht gelungen, ihn im Labor zu synthetisieren.

Die Charakterisierung der genannten Modellverbindungen fördert das Verständnis der unterschiedlichen Eigenschaften natürlicher Fe-S- bzw. Mo-Fe-S-Cluster. Unter den vielfältigen Methoden, die hierbei benutzt werden, sind die spektroskopischen (z.B. NMR, EPR, ENDOR, Mößbauer, UV/VIS, IR und Raman) und die elektrochemischen (z.B. Cyclovoltammetrie) besonders hervorzuheben[HOL96][STE96] [SPI82] [SPI88][MOU98].

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Synthese von Mo/Fe/S/Se-Clustern und ihre schwingungsspektroskopische Analyse. Hierfür eignet sich neben der IR- besonders die Resonanz-Raman-Spektroskopie, da durch S/Se $\rightarrow$ Fe-Charge-Transfer (CT)-Übergänge im Sichtbaren besonders die Clusterschwingungen verstärkt werden. Der Resonanzeffekt ermöglicht es, diese Schwingungen auch im Protein zu beobachten. Ein Vergleich mit den Spektren strukturell charakterisierter Modellkomplexe erlaubt dann Aussagen über die Clustergeometrie im Protein.

Die Bestimmung der Kraftfelder verschiedener $Fe_4(S/Se)_4$-Cluster durch Normalkoordinatenanalyse trägt zu einem besseren Verständnis der elektronischen Struktur dieser Moleküle bei. Sie bildet einen weiteren Schwerpunkt dieser Arbeit. Die Übertragung der dabei gewonnenen Erkenntnisse auf molybdänhaltige Heterocubane ist wichtig für das langfristige Ziel, Ramanspektren des FeMoCo der Nitrogenase in isolierter und proteingebundener Form aufzunehmen und zu interpretieren.

Im folgenden werden die in obigem Schema abgebildeten Fe-S-Zentren im einzelnen besprochen und anschließend das Stickstoff-fixierende System Nitrogenase vorgestellt.

2. Grundlagen

2.1 Eisen-Schwefel-Proteine

2.1.1 Rubredoxine $[Fe]^{2+/3+}$

Rubredoxine sind Elektronentransferproteine mit einem einkernigen Eisenzentrum, das von vier Cysteinresten tetraedrisch koordiniert ist. Ihre Masse beträgt zwischen 6 und 7 kDa. Das Eisenatom liegt in den Oxidationsstufen +II und +III vor. Charakteristische UV/Vis-Banden der oxidierten Form - allesamt S $\rightarrow$ Fe^{3+}-CT-Übergänge - liegen bei 350, 380, 490, 570 und 750 nm[LOV65][EAT73]. Die reduzierte Form ist farblos und zeigt Banden bei 315 und 331 nm[LOV65]. Die Resonanz-Raman-Spektren werden von der total-symmetrischen Bande ("breathing mode") bei ~ 320 cm^{-1} dominiert und weisen darüber hinaus auf Symmetrieerniedrigung hin[CZE94]. Die Fe-S-Bindungslängen variieren im Protein zwischen 2,23 und 2,29 Å, die Redoxpotentiale liegen zwischen –100 und +50 mV[KÜM97] [MEY01].

2.1.2 Rieske-Zentren $[Fe_2S_2]^{+/2+}$

Rieske-Zentren spielen eine Rolle als Elektronenakzeptoren in Eisen-Schwefel-Proteinen, die in die Oxidation von Hydrochinonen zu Semichinonen in Cytochrom-bc-Komplexen involviert sind[LIN99]. Im Unterschied zu $[Fe_2S_2]$-Ferredoxinen (s. 2.1.3) ist eines der beiden Eisenatome des Rieske-Zentrums mit der Peptidkette über die Ring-Stickstoffatome zweier Histidine statt über Cysteinthiolat verbunden. In der oxidierten Form besitzen beide Eisenatome die formale Oxidationsstufe +III. Das bei der Reduktion zusätzlich aufgenommene Elektron ist lokalisiert, wie die Mößbauer-Spektren des Rieske-Proteins von *Thermus thermophilus* zeigen[FEE84]. Die Größe der Isomerieverschiebung im Mößbauer-Spektrum deutet darauf hin, daß in der reduzierten Form das Fe^{II} durch die beiden Histidine koordiniert ist. Durch antiferromagnetische Kopplung von Fe^{II} (S = 2) und Fe^{III} (S = 5/2) ergibt sich ein Gesamtspin von S = 1/2, was im EPR-Spektrum zu einem g-Wert von 1,90 – 1,91 führt. Während das Fe^{III} nahezu ideal tetraedrisch von vier Schwefelatomen umgeben ist, liegt beim Fe^{II} mit einem N^{His}-Fe-N^{His}-Winkel von 91° eine starke Verzerrung vor[IWA96][CAR97]. Die Redoxpotentiale sind stark abhängig vom pH-Wert. Sie liegen bei pH 7 zwischen +265 und +320 mV.

2.1.3 Ferredoxine $[Fe_2S_2]^{+/2+}$

$[Fe_2S_2]$-Ferredoxine sind kleine Eisen-Schwefel-Proteine, die bei niedrigem Reduktionspotential am Einelektronentransport beteiligt sind. Sie enthalten einen Fe_2S_2-Cluster (meistens planar), der über jeweils zwei terminal koordinierte Cysteinthiolate im Protein verankert ist. Die Eisen-Schwefel-Abstände betragen im Clusterkern 2,17-2,28 Å und variieren bei den terminalen Fe-S-Bindungen zwischen 2,20 und 2,32 Å. Hinsichtlich der biologischen Funktion lassen sich drei Arten unterscheiden[ZAN01]:

1.) In Pflanzen, Algen und Cyanobakterien nehmen Ferredoxine bei niedrigem Potential Elektronen des Photosystems I auf. Andere pflanzliche Ferredoxine sind am Elektronentransport bei der Stickstoff-Fixierung und der Assimilation von Wasserstoff, Stickstoff oder Schwefel beteiligt.
2.) Ferredoxine vom Adrenodoxin-Typ sind Elektronendonoren der Cytochrom P450-Monooxygenase oder in bakteriellen Hydroxylierungssystemen.
3.) Eine kleine Gruppe von $[Fe_2S_2]$-Ferredoxinen ist an der Stickstoff-Fixierung von *Clostridium pasteurianum* und *Azotobacter vinelandii* beteiligt[MEY86][GOL98][CHA99].

Wie bei den Rieske-Zentren liegt im oxidierten Zustand ein antiferromagnetisch gekoppeltes Fe^{III}-Paar vor. Im reduzierten Zustand ist das zusätzliche Elektron lokalisiert und die beiden Eisenatome sind ebenfalls antiferromagnetisch gekoppelt: Es resultiert ein Gesamtspin von S = 1/2[BEI97]. Die oxidierten Formen sind in Lösung braun und gekennzeichnet durch Absorptionsbanden zwischen 300 und 500 nm. Die Redoxpotentiale liegen bei pH 7 zwischen – 400 und –100 mV.

2.1.4 Ferredoxine $[Fe_3S_4]^{0/+}$

Strukturell charakterisiert ist das Ferredoxin II von *Desulfovibrio gigas*, einem sulfatreduzierenden Organismus. Das Ferredoxin enthält einen $[Fe_3S_4]$-Cluster und ist maßgeblich am Elektronentransfer zwischen Cytochrom c und dem Sulfitreduktasesystem beteiligt[MOU78]. Das UV/Vis-Spektrum ist durch S $\rightarrow$ Fe-CT-Übergänge bei 305 und 415 nm gekennzeichnet. Stabile Oxidationsstufen sind 0 und +I. Im oxidierten Zustand liegen drei high-spin Fe^{III} vor, die magnetisch zu einem Gesamtspin von S = 1/2 koppeln (EPR-Signal mit g = 2,02). Das Mößbauer-Spektrum bei 40 K zeigt ein Quadrupol-Dublett bei δ = 0,27 mm/s mit ΔE_Q = 0,54 mm/s [PAP87]. Die Einelektronenreduktion bei –170 mV führt zu einem Gesamtspin von S = 2. Dieser resultiert aus der antiferromagnetischen Kopplung eines Fe^{III} (S = 5/2) mit einem ferromagnetisch gekoppelten, gemischtvalenten und delokalisierten $Fe^{II/III}$-Paar (S = 9/2)[BEI97]. Bei 4,2 K sind im Mößbauer-Spektrum zwei

Dubletts bei $\delta_{(1)}$ = 0,46 mm/s (2 x $Fe^{+2,5}$) und $\delta_{(2)}$ = 0,32 mm/s (Fe^{III}) im Verhältnis 2:1 mit $\Delta E_{Q(1)}$ = 1,47 mm/s und $\Delta E_{Q(2)}$ = 0,52 mm/s zu sehen.
Eine Besonderheit der $[Fe_3S_4]$-Clustereinheit ist die Möglichkeit, das Cubangerüst durch den Einbau eines weiteren Metallatoms zu vervollständigen[JOH99].

$$[Fe_3S_4]^{+} + M^{+/2+} + ne^{-} \rightarrow [MFe_3S_4]^{+/2+} \qquad M = Fe, Co, Cr, Mn, Ni, Cu, Zn, Cd, Tl$$

Eine biologische Relevanz dieser Reaktion ist allerdings nicht bekannt. Die Synthese zu den in Proteinen vorkommenden analogen $[Fe_3S_4]^{+}$-Clustern gelang Holm Mitte der 90er Jahre[ZHO96].

2.1.5 Ferredoxine $[Fe_4S_4]^{+/2+}$

$[Fe_4S_4]$-Ferredoxine sind Elektronentransferproteine, die einen cubanartigen Cluster enthalten und sehr niedrige Redoxpotentiale zwischen –300 und –700 mV besitzen[HOL96] [BER82]. Die Clustereinheit ist über vier Cysteinreste mit der Peptidkette verbunden. Als Beispiel für die Einbindung eines solchen Clusters in die Proteinmatrix ist in Abb. 2.1 das Ferredoxin von *Bacillus thermoproteolyticus* schematisch dargestellt. Im oxidierten Zustand beträgt die durchschnittliche Oxidationsstufe der Eisenatome +2,5. Zwei Paare ferromagnetisch gekoppelter Fe^{II}- und Fe^{III}-Atome mit S = 9/2 koppeln im Grundzustand antiferromagnetisch zu einem Gesamtspin von S = 0. Ein energetisch tiefliegender Triplettzustand gibt Anlaß zu paramagnetisch verschobenen ^{1}H-NMR-Signalen der Methylenprotonen, die dem terminalen Schwefel des Cysteins benachbart sind. Der Grundzustand der reduzierten Form ist paramagnetisch und besitzt einen Spin von S = 1/2 oder S = 3/2. Die Redoxpotentiale zahlreicher synthetischer $[Fe_4S_4]^{2+}$-Cluster liegen um ca. 0,5 V niedriger als bei proteingebundenen Clustern. Der reduzierte Zustand wird durch die Proteinmatrix zusätzlich stabilisiert. Die UV/Vis-Spektren des oxidierten Zustandes sind durch eine Absorptionsbande bei ~ 400 nm gekennzeichnet. Bei analogen Clustern, die ebenfalls durch aliphatische Thiolatliganden koordiniert sind, ist diese Absorptionsbande um ~ 20 nm rotverschoben.