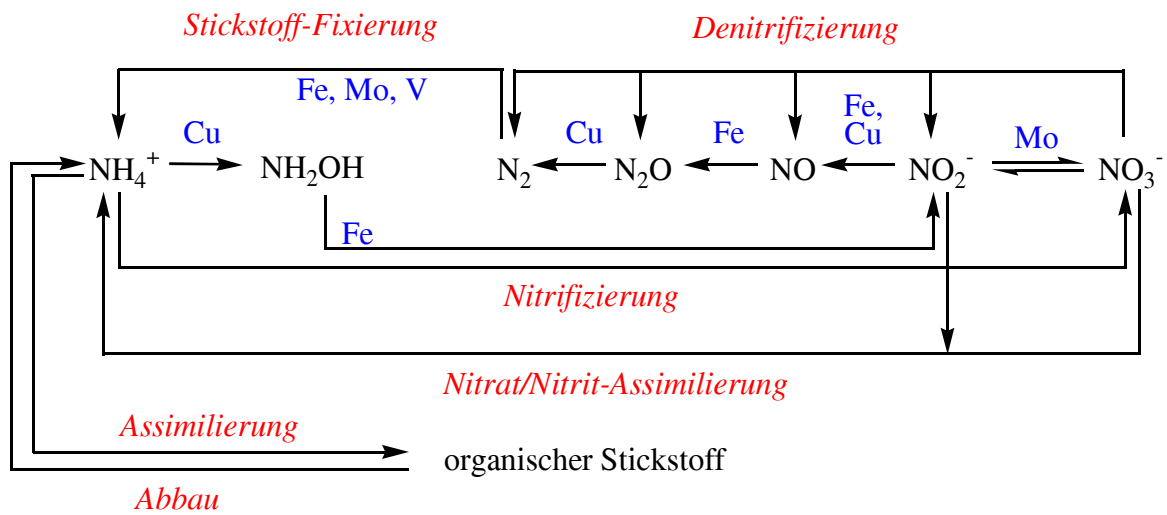
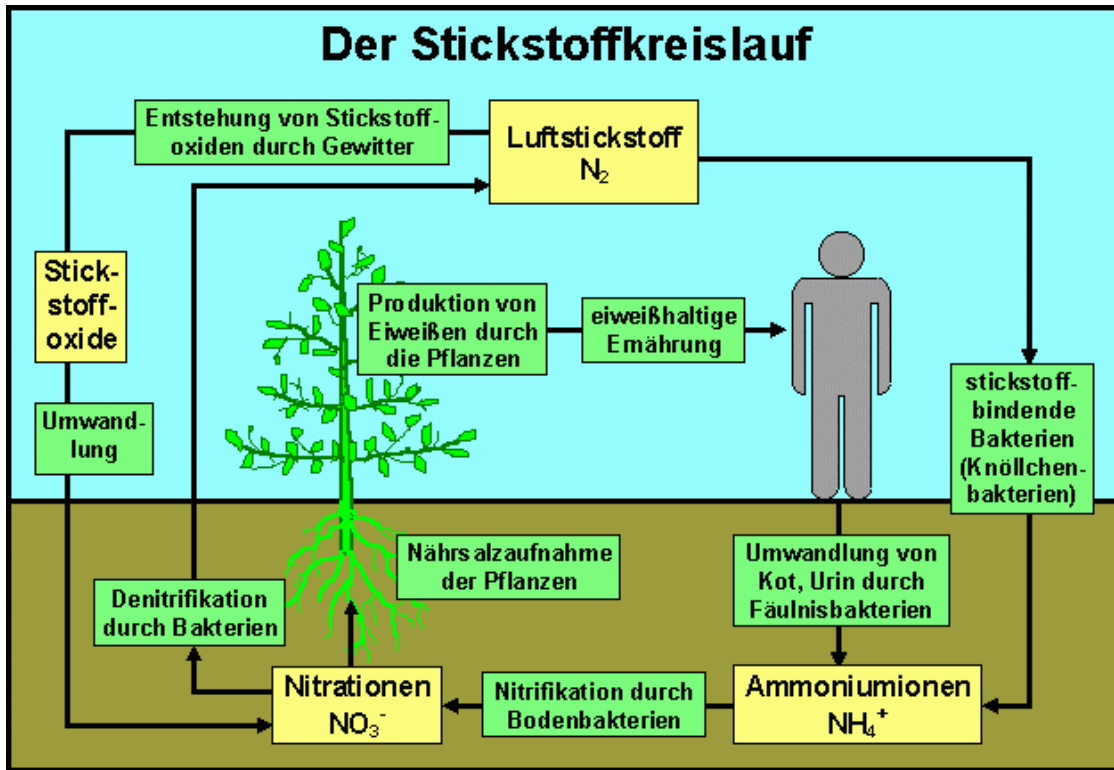
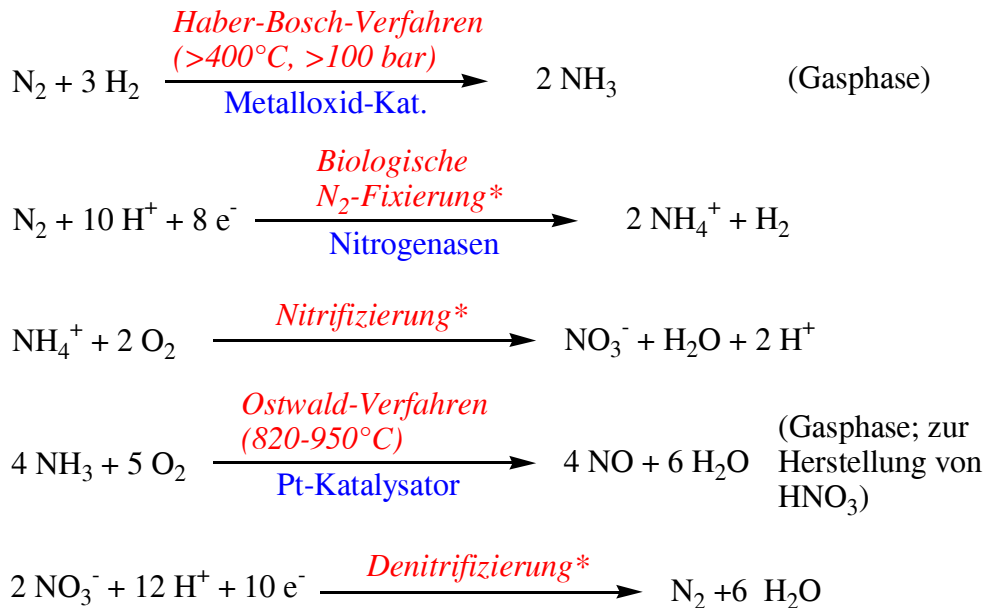


Kapitel 7 Der Stickstoffkreislauf

7.1 Allgemeines



Schematischer Stickstoff-Zyklus, die blau markierten Elemente repräsentieren die beteiligten Enzyme, mit Stickstoff-Fixierung ist die biologische (durch Bakterien) gemeint.



**durch Bakterien*

7.2 Die Stickstoff-Fixierung

Obschon Pflanzen und Bakterien Stickstoff durch assimilative Nitratreduktion und NH_3 Assimilation aus der Umwelt in die Biosphäre zurückholen, entweicht immer noch eine große Menge Stickstoff:

- In Form von Gasen als Folge der bakteriellen Denitrifizierung (Schema oben)
- Durch Sedimentation von totem organischem Material auf den Meeresgrund (Chitin ist aus N-Acetylglukosamin aufgebaut und enthält die größte Masse organisch gebundenen Stickstoffs, mehr als alle Proteine!!) (in Schema 1.5 nicht gezeigt).

Der durch die mikrobielle Denitrifizierung und Sedimentation verlorene Stickstoff wird durch bakterielle und industrielle Stickstofffixierung wieder in organische Verbindungen eingebaut. Nur die sog. diazotrophen Bakterien können N_2 fixieren: **Freilebende chemoheterotrophe** (z.B. Azotobacter, Klebsiella, ein naher Verwandter von *E. coli*), **photoautotrophe** (z.B. gewisse Cyanobakterien) und **Bakterien, die mit Pflanzen Symbiose eingehen** (z.B. Rhizobium, Wurzelknöllchen). Symbiotische Bakterien nehmen von Pflanzen Dicarbonsäuren auf. Der Abbau der Dicarbonsäuren im bakteriellen Zitronensäurezyklus, liefert Reduktionsäquivalente und ATP für die N_2 -Reduktion. Bakterien geben NH_3 an Pflanzen ab.

Pro Jahr werden 2×10^{11} kg N_2 fixiert.

Beitrag zur N_2-Fixierung	
Diazotrophe Bakterien	60%
industrielle N_2-Fixierung (Haber-Bosch)	25%
UV-Licht und Blitze (Gewitter)	15%

Die Reaktion: $N_2 + 3 H_2 \rightleftharpoons 2 NH_3$ ($\Delta H = -92 \text{ kJ/mol}$; $\Delta S = -0.199 \text{ kJ/}^\circ\text{K}$)

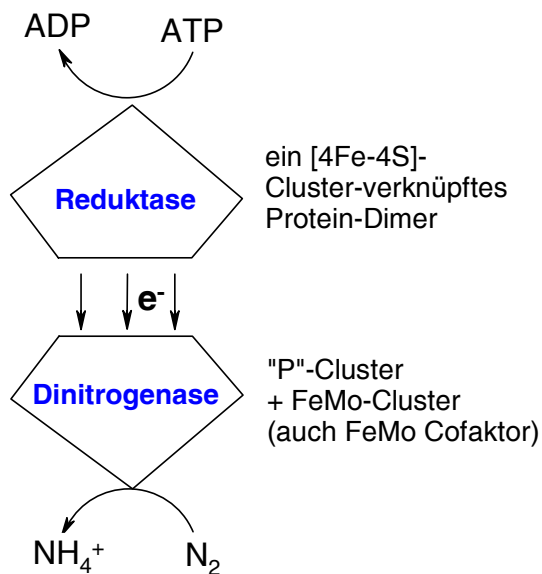
	Chem. Bindungsdissoziationsenergie (kJ/mol)	ΔS° (kJ/°K)
1 Mol $N \equiv N$	944	0.192
1 Mol H-H,	434	0.131
1 Mol H_2N-H	430	0.192
Hydrolyse 1 Mol ATP	22 kJ/mol	

Chemie der N_2 -Fixierung:

An der bakteriellen N_2 -Fixierung sind zwei Enzyme (Dinitrogenasen) beteiligt. Zusammen bilden Sie eine $(\alpha_2\beta_2)(\gamma_2)$ 2-Protein funktionelle Einheit.

- ❖ Dinitrogenase-Reduktase (γ_2), wird auch als Dinitrogenase-Fe-Protein bezeichnet (dimer, ca. 60 kDa). Zwischen den beiden γ -Untereinheiten befindet sich ein einzelner [4Fe4S]-Cluster.
- ❖ Dinitrogenase ($\alpha_2\beta_2$), wird auch als Dinitrogenase-FeMo-Protein bezeichnet (tetramer, ca. 220 kDa)

Netto-Reaktion: $N_2 + 8 H^+ + 8 e^- + 16 ATP \rightleftharpoons 2 NH_3 + H_2 + 16 ADP + 16 P$

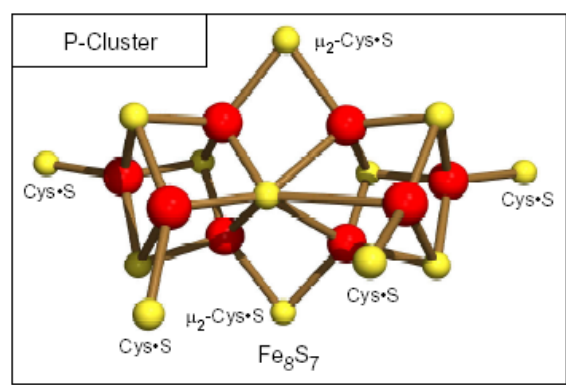
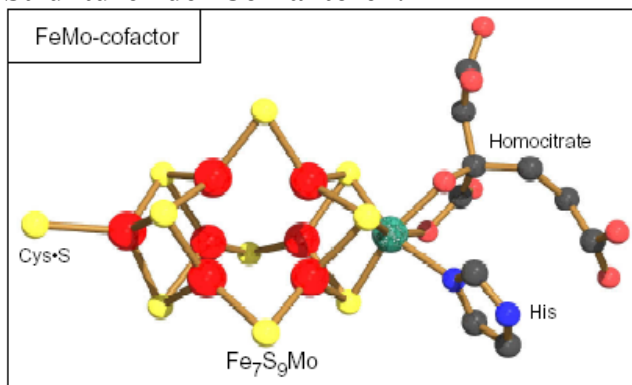


Man beachte, dass für jedes übertragene Elektron 2 ATP hydrolysiert werden, und dass als obligatorisches Nebenprodukt H_2 -Gas entsteht.

Das ATP wird von je zwei Mg^{2+}/ATP -Rezeptoren geliefert.

Reaktionsschema zur N -Fixierung durch Dinitrogenasen

Strukturen der Co-Faktoren:



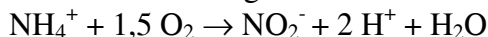
Strukturen des FeMo-Cofaktors (links) und des sog. P-Clusters (rechts)

7.3 Die Stickstoff-Eliminierung

Stickstoffelimination kann unter aeroben oder unter anaeroben Bedingungen ablaufen:

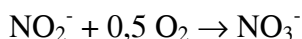
aerob:

Nitrifikation/Nitrifizierung durch **Ammonium-Oxidierer**:



Organismen: (Präfix: *Nitroso-*) *Nitrosomas*, *Nitrosococcus*, ...

und **Nitrit-Oxidierer**:



Organismen: (Präfix: *Nitro-*) *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, ...

anaerob:

Denitrifikation durch **Nitrat und Nitrit-Reduzierer**:

- assimilatorisch durch Einbau in Biomasse als NH_4^+

- dissimilatorisch zur Energiegewinnung. Abgabe als NH_3 oder N_2 , NO oder N_2O in Atmosphäre (das meiste als N_2)

Organismen: weit verbreitet; *Paracoccus denitrificans*, *Pseudomonaden*, *Bacillus*-Arten

7.3.1 Die Nitrifizierung

Reaktion: $\text{NH}_4^+ + 2 \text{ O}_2 \rightarrow \text{NO}_3^- + \text{H}_2\text{O} + 2 \text{ H}^+$

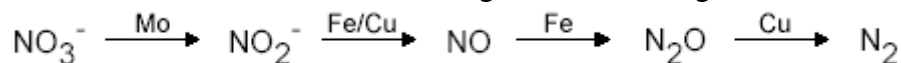
Meist in zwei Teilschritten: $\text{NH}_4^+ + 1,5 \text{ O}_2 \rightarrow \text{NO}_2^- + 2 \text{ H}^+ + \text{H}_2\text{O}$ (1)

$\text{NO}_2^- + 0,5 \text{ O}_2 \rightarrow \text{NO}_3^-$ (2)

Das Nitrat ist die Form von Stickstoff, die von den meisten höheren Pflanzen aufgenommen (assimiliert) werden kann. Die Nitrifizierung findet in *Nitrosomas* Bakterien statt. Dazu sind aerobe Bedingungen und ausreichende Pufferkapazität (Aufnahme der Protonen) im Boden notwendig.

7.3.2 Die Denitrifizierung

Die dissimilatorische Denitrifizierung wird von Bakterien zur Energiegewinnung durchgeführt und wird von Pflanzen zum Abbau von überschüssigem Nitrat genutzt. Der Mensch nutzt diese Reaktion in biologischen Kläranlagen.

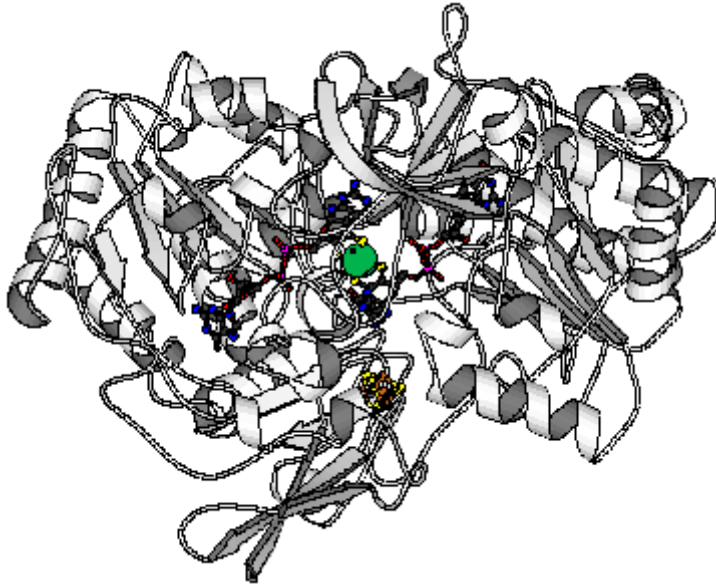


Die assimilatorische Denitrifizierung kostet Energie, Sinn ist die Entfernung von Nitrat aus dem System durch Einbau in Biomasse als NH_4^+

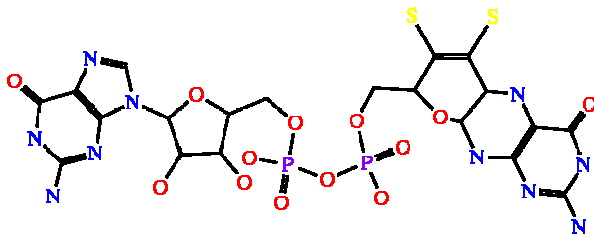
Daran beteiligten Metallo-Enzyme:

7.3.2.1 Molybdän-haltige Nitrat(+V)-Reduktase:

Die Reaktion: $\text{NO}_3^- + 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^- \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$

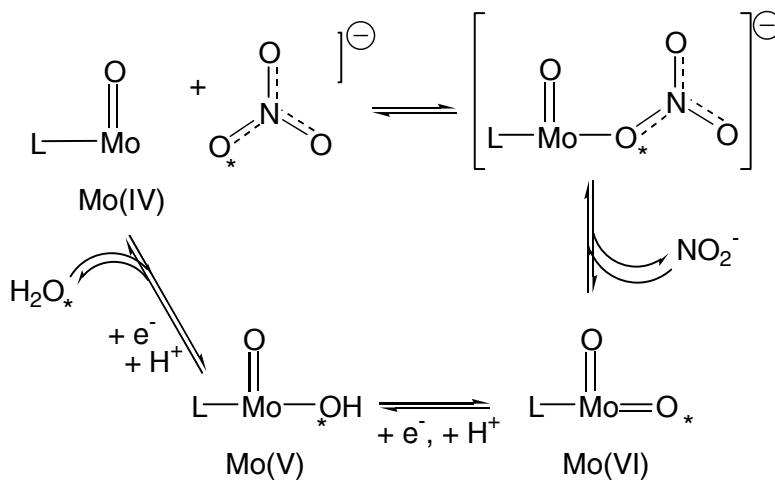


Bänder-Plot der Struktur der periplasmatischen Nitratreduktase, NapA, aus D. desulfuricans ATCC 27774 (Dias et al., 1999). Das Molybdän-Atom (grün) ist von zwei Molybdopterin Guanidin Dinukleotid Cofaktoren (MGD) komplexiert (siehe darunter). Das Molybdän-Ion ist das Reaktionszentrum für die Nitratreduktion, der darunter liegende Fe4S4 Cluster dient dem Elektrontransfer.



*Struktur der Liganden:
2-AMINO-5,6-DIMERCAPTO-7-METHYL-3,7,8A,9-TETRAHYDRO-8-OXA-1,3,9,10-TETRAAZA-ANTHRACEN-4-ON
= GUANOSINE DINUCLEOTID*

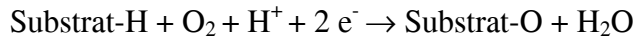
Mechanismus:



Die Umkehrungsreaktion der Nitratreduktase kann als Funktionsmodell für die Oxotransferase $\text{LMo}^{\text{VI}}\text{O}_2 + \text{X} \rightarrow \text{LMo}^{\text{IV}}\text{O} + \text{XO}$ betrachtet werden.

Exkurs Oxotransferproteine mit Mo, W und V

Diese Enzyme katalysieren die folgenden allgemeinen Reaktionen:

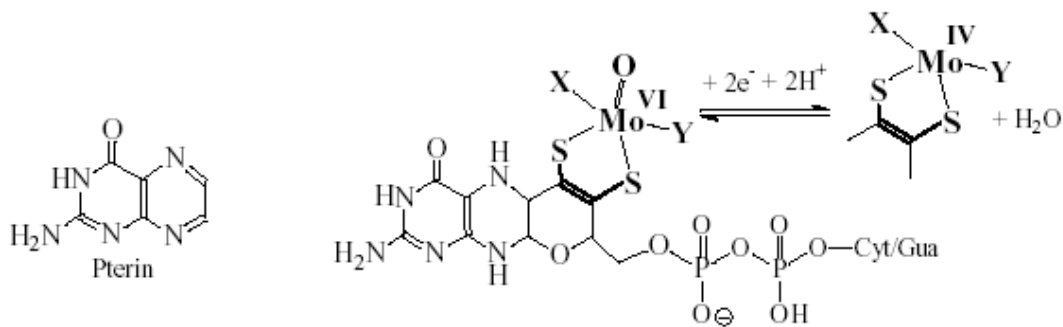


Im Sinne der Gleichung sind die Enzyme also Oxigenasen oder Dehydrogenasen. Oxidationsmittel kann hierbei auch H₂O₂ sein. Auch die umgekehrte Reaktion wird katalysiert, d.h. die Enzyme wirken häufig auch (oder ausschließlich) als Reduktasen. Die Elemente Vanadium und Molybdän sind im Meerwasser in Form ihrer löslichen Oxoanionen gut verfügbar; sie sind die häufigsten Übergangsmetalle im Meerwasser: HVO₄²⁻ (30 nM), MoO₄²⁻ (100 nM); vgl. Eisen: 0.02 ~ 1nM.

Molybdopterin-Enzyme

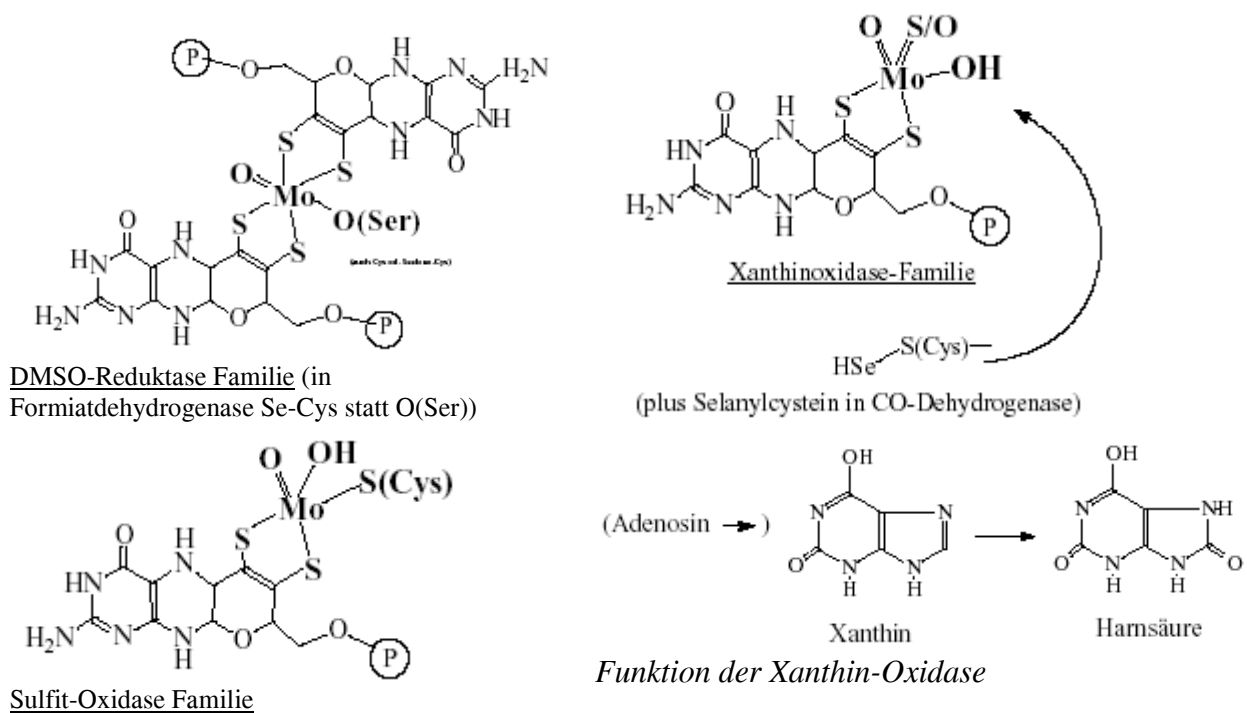
Unter den drei Elementen spielt Molybdän die wichtigste Rolle. Außer in der oben abgehandelten Nitrogenase ist Mo das zentrale Metall in den „Molybdopterin“-Cofaktoren. Die Molybdopterine sind Abkömmlinge des Pterins. Der Pterinring ist partiell hydriert und enthält ein anneliertes Pyran, das über ein Diphosphat mit Cytidin oder Guanosin verknüpft ist. Molybdän ist über eine Dithioleneinheit mit diesem System verknüpft.

Pterin und Molybdopterin:



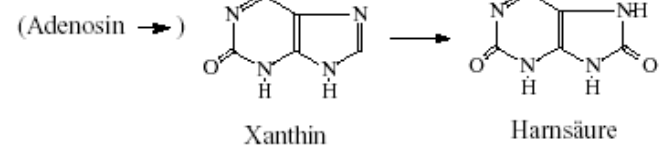
Pterin und Molybdopterin (oxidierte und reduzierte Form).

Es gibt noch weitere Enzyme in der Familie der Molybdopterine:



DMSO-Reduktase Familie (in Formiatdehydrogenase Se-Cys statt O(Ser))

(plus Selenylcystein in CO-Dehydrogenase)



Funktion der Xanthin-Oxidase

Sulfite-Oxidase Familie

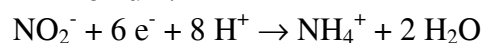
Enzym:	Funktion	weitere Co-Faktoren
Nitrat-Reduktase	$\text{NO}_3^- + 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^- = \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$	2 Cyt <i>b</i> 2 FAD ^a
DMSO-Reduktase	$(\text{CH}_3)_2\text{S}=\text{O} + 2 \text{e}^- + 2 \text{H}^+ \rightarrow (\text{CH}_3)_2\text{S} + \text{H}_2\text{O}$	keine
Xanthinoxidase:	(Abbau von Adenosin über) Xanthin zur Harnsäure (s.o.)	4 [2Fe2S] 2 FAD
Sulfit-Oxidase	$\text{SO}_3^{2-} + \text{H}_2\text{O} = \text{SO}_4^{2-} + 2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^-$	2 Cyt <i>b</i>

a Flavin-Adenin-Dinukleotid (siehe Kap 3)

7.4.2 Kupfer bzw. Häm-Eisen enthaltende Nitrit(+III) Reduktase

Cytochrom *c* Nitritreduktasen

Cytochrom *c* Nitritreduktasen katalysieren die (assimilatorische) Umwandlung von Nitrit zu Ammonium:



Gefunden wurden *c* Nitritreduktasen in:

Escherichia coli, *Vibrio fischeri*, *Desulfovibrio desulfuricans*, *Wolinella succinogenes*, *Sulfurospirillum deleyianum* und *Haemophilus influenzae*.

Bei den Cytochrom *c* Nitritreduktasen handelt es sich um eine Gruppe von Multihämzymen, wobei die Anzahl der Hämzentren pro Molekül umstritten ist. In *c*-Typ Cytochromen sind die Häm-Gruppen normalerweise kovalent über Thioetherbrücken an zwei Cysteinreste gebunden (Abbildung).

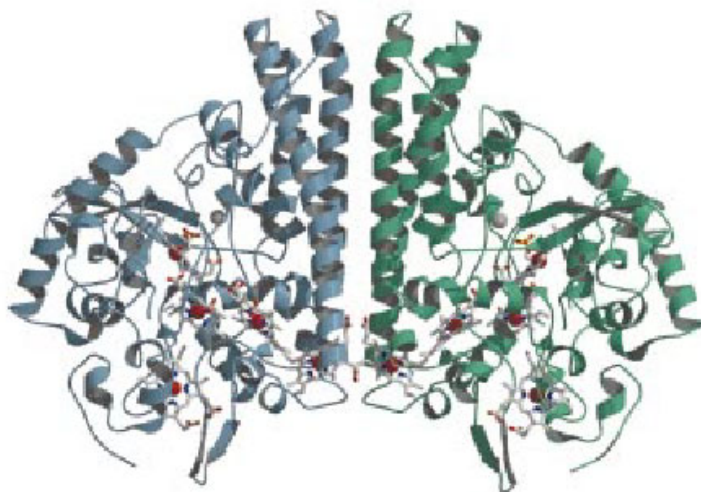


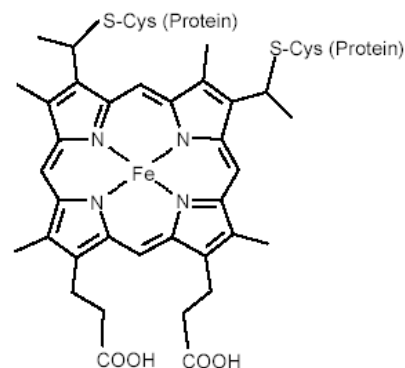
Abb.1: Strukturmodell der Cytochrom *c*-Nitritreduktase. Das dimere Enzym besitzt zehn kovalent mit der Peptidkette verknüpfte Hämgruppen, von denen zwei eine freie Koordinationsstelle aufweisen, an der die Reduktion von Nitrit zu Ammoniak stattfindet.

Die Nitritreduktase liegt funktional offensichtlich als Dimer vor, mit fünf kovalent an die Proteinkette gebundenen Hämgruppen pro Monomer. Bereits aus der Aminosäuresequenz wurde deutlich, dass eine der fünf Hämgruppen ein von dem klassischen Cys-X-X-Cys-His abweichendes Bindemotiv (für Multihämenzyme) aufweist, in dem das abschließende Histidin durch ein Lysin ersetzt ist.

Wie aus der Röntgenstruktur ersichtlich, ist gerade diese Hämgruppe das aktive Zentrum der NiR: Ein fünffach koordiniertes *high spin*-Hämeisenzentrum mit einem (vorher nie beobachteten) Lysinrest als proximalem Liganden und einer freien Koordinationsstelle an der distalen axialen Position.

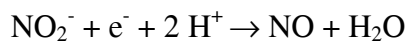
Lit. Einsle, O., Messerschmidt, A., Stach, P., Bourenkov, G. P., Bartunik, H. D., Huber, R. und Kroneck, P. M. H. (1999) Structure of cytochrome *c* nitrite reductase, *Nature*. 400, 476-480.

Elektronenanregungsspektren von Multihäm Nitritreduktasen im reduzierten Zustand weisen die typischen Banden von reduzierten *c*-Typ Cytochromen auf. Das EPR-Spektrum der Cytochrom *c* Nitritreduktasen im oxidierten Zustand zeigt für **low-spin Häm-Fe(III)** typische Signale. Neben den low-spin Häm-Fe(III) Zentren liegt z.B. bei *W. succinogenes* und *D. desulfuricans* je ein **high-spin Häm-Fe(III)** Zentrum vor, das vermutlich das reaktive Zentrum der Nitritreduktasen darstellt.



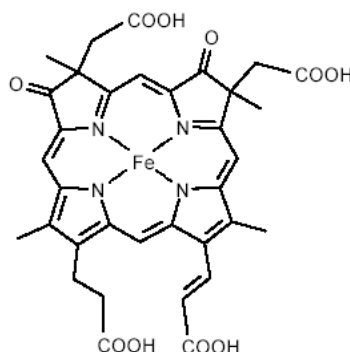
Cytochrom *cd*₁-Nitritreduktasen

Im Laufe der Denitrifikation katalysieren *cd*₁-Nitritreduktasen die Ein-Elektronen-Reduktion von Nitrit zu Stickstoffmonoxid:



*Kristallstruktur von Cytochrom *cd*₁.*
Cytochrom *cd*₁ ist ein Dimer aus zwei unterschiedlichen zwei-Domänen Monomeren.

Eine α -helikale Cytochrome *c* Domäne (rot) befindet sich über einer β -Propeller Domäne (blau) die das aktive *d*₁-Häm Zentrum enthält.



*Struktur des *d*₁-Häms*

- Der fünfte Ligand des Eisenatoms im *d*₁-Häm ist der Ringstickstoff des His₁₈₂
- Als sechster Ligand wird das Substrat gebunden (NO_2^- über das N-Atom) nach dem Reduktionsschritt verdrängt ein Hydroxylion das gebildete NO von dem Häm-Eisen

Kupfer-abhängige Nitritreduktasen

Wie die *cd*₁-Nitritreduktasen katalysieren auch diese Kupferabhängigen Enzyme (z.B. aus *Achromobacter cycloclastes* die Reduktion von Nitrit zu Stickstoff-monoxid:



Diese NiR besitzt die Struktur eines Homotrimeren mit je einem Typ I-Kupfer und einem Typ II-Kupfer pro Untereinheit. Die Typ II-Kupferzentren werden als Aktivzentrum angesehen, wohingegen das Typ I-Kupfer als Elektronenüberträger wirkt.



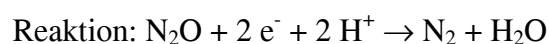
Struktur der Kupfer-enthaltenden Nitritreduktase

Überblick:

Enzyme Class	Architecture	Mass [Da]	Cofactors	Type	Reaction
Cu-containing	trimer	36 000	2 × Cu	dissim.	$\text{NO}_2^- \longrightarrow \text{NO}$
cytochrome <i>cd</i> ₁	dimer	65 000	1 heme <i>c</i> , 1 heme <i>d</i> ₁	dissim.	$\text{NO}_2^- \longrightarrow \text{NO}$
siroheme / Fe_4S_4	monomer	56 000	1 siroheme, 1 Fe_4S_4 cluster	assim.	$\text{NO}_2^- \longrightarrow \text{NH}_4^+$
cytochrome <i>c</i>	dimer	58 000	5 hemes <i>c</i> , 1 Ca^{2+}	dissim.	$\text{NO}_2^- \longrightarrow \text{NH}_4^+$

Table 1: The four different classes of nitrite reductases, their architecture and cofactor composition. For each class, a representative molecular mass is given, not taking into account minor variations between different species. The architecture given is that of the reductase alone. Complex formation with possible electron donors is still a matter of discussion in all four cases.

7.4.3 Kupfer enthaltende Distickstoffmonoxid(N+1)-Reduktase



Struktur nicht genau bekannt: Protein: 2 x 71 kDa; 8 Cu; Koordination Cys und His