

# Química de coordinación de dinitrógeno y las nuevas nitrogenasas

G.J. Leigh\*

## Resumen

En la actualidad, se reconocen tres tipos de nitrogenasa, que contienen los metales de transición molibdeno y hierro, vanadio y hierro, y hierro solo, respectivamente. Es atractivo suponer que los sitios activos para la reducción de dinitrógeno se encuentran en el molibdeno, vanadio y hierro, correspondientes a los metales presentes.

La estructura aproximada de la proteína MoFe de la nitrogenasa de *Azotobacter vinelandii* no presenta un sitio activo obvio. En general, la química del molibdeno y dinitrógeno tiene que ver con las especies de estados de oxidación muy bajos y dinitrógeno terminal, y especies con estados de oxidación más altos y puentes de dinitrógeno. La química de vanadio y dinitrógeno es superficialmente parecida, aunque en detalle es muy diferente. La química de hierro y dinitrógeno, hasta ahora casi totalmente ignorada en este contexto, está revelando semejanzas provocativas con la función nitrogenasa. Se sugiere que el hierro podría encontrarse en el sitio activo de todas las nitrogenasas, a pesar de los dogmas actuales.

## Introducción

En 1930, Bortels demostró que el molibdeno o vanadio eran especies metálicas necesarias para la función de fijación de nitrógeno.<sup>1</sup> Pero no fue hasta 1960,<sup>2</sup> cuando al prepararse extractos sin células que contenían nitrogenasa, se pudo proceder con los estudios detallados de la estructura y función de la misma. A principios de 1960, Vol'pin volvió a despertar<sup>3</sup> el interés químico en el estudio de la fijación de nitrógeno al demostrar la forma en que los compuestos de metales de transición y un agente reductor fuerte en un ambiente no acuoso podían reaccionar con N<sub>2</sub> para dar materiales que producen amoníaco al ser hidrolizados.

Después de 1960, el trabajo biológico se concentró sobre las enzimas de molibdeno, olvidándose de las posibles variantes de vanadio. Las investigaciones químicas cubrieron toda la serie de transición, pero se prestó atención especial<sup>4</sup> a los complejos con fosfinas de molibdeno y tungsteno que podían unirse al N<sub>2</sub> y activarlo mediante una protonación sencilla, produciendo amoníaco bajo circunstancias favorables. Al mismo tiempo, Shilov y sus colaboradores desarrollaron<sup>5</sup> varios sistemas fijadores de ni-

trógeno que contenían, entre otros elementos, molibdeno y vanadio. Estos interesantes sistemas funcionan en ambientes acuosos (o, al menos, próticos). Sólo en el caso de los sistemas de tungsteno (y quizá, molibdeno) con fosfina se propuso un mecanismo bastante detallado.<sup>6</sup> En otros sistemas, los mecanismos propuestos eran bastante más especulativos.

Por esto, hacia finales de las década de los años ochenta, se aceptaba en general que el molibdeno estaba ubicado en el sitio activo de las nitrogenasas y que la química de reducción de dinitrógeno sería posiblemente parecida a la de la protonación de dinitrógeno en los complejos de molibdeno con fosfinas, con un grupo reducido de opiniones que se inclinaban hacia un mecanismo de puentes de dinitrógeno en dimolibdeno del tipo favorecido por Shilov.<sup>5</sup>

## Estudios recientes sobre las nitrogenasas

Las investigaciones con la enzima por sí misma han destruido esta autosatisfacción. Primero, se descubrió una segunda nitrogenasa sin molibdeno, aceptada inicialmente de mala gana hasta que se demostró genéticamente sin lugar a dudas.<sup>7</sup> Esta nitrogenasa contiene vanadio en lugar de molibdeno, pero desde otros aspectos físicos y estructurales se parece bastante a las nitrogenasas que contienen molibdeno. Su química, en detalle, es ciertamente diferente. En la actualidad, se sabe<sup>7</sup> que existe una tercera nitrogenasa genéticamente diferente que podría estar basada en un sitio activo con hierro. Esto ha dado lugar a cierto cuestionamiento entre los químicos. ¿Existe una química del dinitrógeno de los tres elementos lo suficientemente parecida para que podamos imaginarnos procesos de reducción de dinitrógeno parecidos con los tres elementos en el tipo de ambiente imaginado en las nitrogenasas?

Pero, aun este tipo de reajuste ha resultado inadecuado a causa del anuncio preliminar de las estructuras de la proteína más grande de la nitrogenasa de *Azotobacter vinelandii*,<sup>8</sup> descrita como una "dinitrogenasa". Es la proteína que contiene molibdeno y el supuesto sitio activo. La estructura no se ha resuelto lo suficientemente bien para permitir sacar conclusiones definitivas sobre los dos clusters de hierro, molibdeno y azufre (FeMoco), que aparentemente se encuentran en el centro de esta proteína, pero los datos cristalográficos y estructurales permiten sacar las siguientes conclusiones más o menos firmes.

(i) La mejor representación del centro de hierro-molibdeno es la de dos clusters unidos de composición 4Fe:3S y

\* AFRC Institute of Plant Science Research Nitrogen Fixation Laboratory, Universidad de Sussex, Brighton BN1 9RQ, R.U.

1Mo:3Fe:3S, con tres átomos de hierro de cada cluster unidos aparentemente por ligantes  $S^{2-}$ . Los dos átomos de molibdeno de los cofactores están a unos 70 Å de distancia.

(ii) Cada uno de los clusters es efectivamente un "cubano" aplanado  $M_4S_4$  con un azufre menos en un vértice, produciendo una cara de tres átomos de hierro unidos al otro cluster como se describe arriba en (i).

(iii) Los puentes de átomos de hierro en los diferentes clusters se encuentran a una distancia aproximada de 2.7 Å.

(iv) En el ápice de los clusters más alejados de los grupos enlazados de tres átomos de hierro se encuentra el cuarto átomo metálico, un hierro en un caso y un molibdeno en el otro. El ligante adicional en este hierro es un azufre proveniente de un residuo cisteinil.

(v) El molibdeno tiene efectivamente un número de coordinación de seis, puesto que está unido a tres ligantes  $S^{2-}$  dentro del cluster, un homocitrato bidentado, y un residuo histidinil de la proteína. En la figura 1 se muestra esta estructura. Ésta no revela un punto obvio de unión del sustrato (aunque debe recordarse que estamos observando un cristal de enzima y no una enzima durante su reciclamiento), y aparentemente el molibdeno está coordinadamente saturado. Los átomos de hierro en las caras opuestas de los dos clusters parecen muy instaurados. Por supuesto, no existe evidencia cristalográfica de los ligantes hidruros, aunque generalmente se considera que se encuentran en el sitio activo de la nitrogenasa.

Si el molibdeno está en el sitio activo, esta estructura no nos ayuda a definir su función.<sup>9</sup> Si el vanadio reemplaza al molibdeno en las variaciones de vanadio de la nitrogenasa, suponemos que posee la misma coordinación. El cofactor de hierro-vanadio FeVaco no es muy diferente de FeMoco, y su función es igualmente desconocida. Si el hierro funciona en el sitio activo en la tercera variación de nitrogenasa, es de suponer que el cofactor FeMoco se convierte en un cofactor de hierro, con una función parecida a la de FeMoco y FeVaco. Parece que la única deducción clara que se puede sacar es que aparentemente la estructura cristalina excluye un mecanismo con las estructuras Mo- $N_2$ -Mo o V- $N_2$ -V en alguna etapa, puesto que los átomos de molibdeno (o vanadio) están muy separados. Sin embargo, Fe- $N_2$ -Mo y

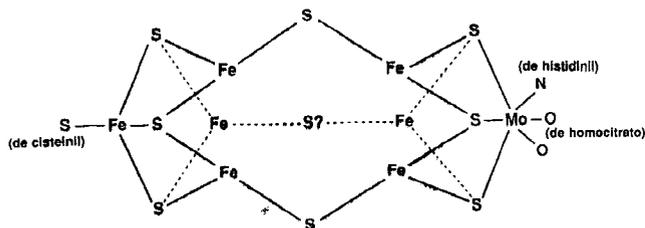


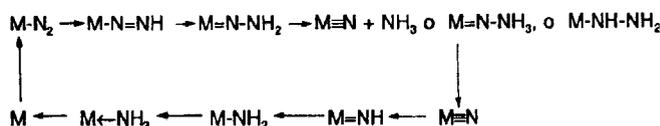
Figura 1. Estructura del núcleo local de clusters de molibdeno-hierro en la proteína superior de la nitrogenasa de *Azotobacter vinelandii*.<sup>8</sup>

Fe- $N_2$ -V siguen siendo posibles, además de la unión en un solo átomo de Mo, V, o Fe.

La química de los complejos de  $N_2$  no sugiere una solución definitiva de este problema. La química de dinitrógeno y molibdeno no ha revelado hasta la fecha compuestos caracterizados con una entidad Mo- $N_2$ -Fe en donde se puede lograr fácilmente la protonación para dar amoniaco. Igualmente, no se conocen compuestos con V- $N_2$ -Fe. Ignoraremos el gran número de complejos de tungsteno y molibdeno con puentes de  $N_2$ <sup>10</sup> puesto que suponemos que no son pertinentes para la función nitrogenasa.

### Complejos mononucleares de dinitrógeno con molibdeno y tungsteno

Aquellos que contienen dinitrógeno tan activado que lleve a la protonación son principalmente complejos de fosfinas que contienen dos ligantes de dinitrógeno, aunque se conocen ejemplos con uno o con tres dinitrógenos. Las protonaciones de estos complejos se han estudiado mediante métodos sintéticos y cinéticos, y se ha postulado una serie de intermediarios probables.<sup>6,11</sup> Es claro que no existe un mecanismo único de protonación, y que la ruta seguida en un cierto caso dependerá de la fosfina, disolvente, y ácido, así como del metal. A continuación se presenta un esquema simplificado. Se le recomienda al lector leer las publicaciones originales si desea mayores detalles.



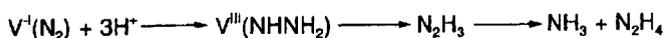
Los seis electrones para convertir un  $N_2$  a  $2NH_3$  provienen de un solo átomo de metal, inicialmente en el estado de oxidación 0 y finalmente en el estado de oxidación VI. Estas observaciones llevan al modelo aceptado con mayor frecuencia para la función de la nitrogenasa; esto es, el desplazamiento de  $H_2$  por  $N_2$  en el metal hidrídico (molibdeno), seguido de la protonación paso a paso del  $N_2$ , generando  $NH_3$ , y un flujo constante de electrones que llegan al  $N_2$  desde otro punto en la enzima a través del átomo metálico. Esto se combina en el modelo de Lowe-Thorneley para la función nitrogenasa, el mejor y más completo que se ha propuesto hasta la fecha.<sup>12</sup>

### Complejos mononucleares de dinitrógeno con vanadio

Sorprendentemente, y a pesar de los sistemas fijadores de nitrógeno con vanadio de Shilov,<sup>5</sup> los primeros compuestos estables de dinitrógeno con vanadio fueron reportados por Gambarotta *et al.*<sup>13</sup> hace tan solo cuatro años. Éstos contienen puentes de dinitrógeno, y aunque la protonación de estos complejos puede producir amoniaco,<sup>14</sup> no continuaremos analizando estos com-

plejos en el presente artículo por la misma razón que hemos excluido los complejos con puentes de molibdeno.

Los análogos de vanadio y fosfina de los complejos de bis(dinitrógeno) de molibdeno(0) y tungsteno(0) son más recientes todavía.<sup>15</sup> Éstos son isoelectrónicos con las especies del metal(0) y contienen vanadio(-I). El tratamiento con ácido produce amoníaco e hidrazina, pero no vanadio(V).<sup>15</sup> Existen menos de seis electrones por vanadio disponible, y por consiguiente se pueden producir menos de dos NH<sub>3</sub> por cada vanadio. Provisionalmente se ha propuesto un mecanismo de conversión de N<sub>2</sub> a NH<sub>3</sub>, aunque no está respaldado cinéticamente. Se da a continuación.



Al menos dos factores quedan claros. Primero, el molibdeno y el vanadio no poseen una química idéntica del N<sub>2</sub>. Las diferencias podrían considerarse en los modelos de la función nitrogenasa apropiada, pero todavía no se sabe cómo. Segundo, los intermediarios nitruro, imida, e hidrazida(2-) que se obtienen tan fácilmente en la química de molibdeno, poseen equivalentes en la de vanadio, pero no son tan fáciles de obtener.<sup>16</sup> En nuestras amplias investigaciones sobre este tipo de derivados de vanadio, hemos demostrado que éste no produce fácilmente enlaces múltiples vanadio-nitrógeno. Estos complejos no se pueden obtener mediante los métodos empleados con éxito en la química de molibdeno, y frecuentemente, una vez sintetizados, presentan estructuras (existe la tendencia a polimerizarse) y reactividades diferentes.<sup>16</sup>

Por esto, aún cuando el vanadio en las nitrogenasas de este metal ocupa una posición estructural análoga a la del molibdeno en sus nitrogenasas, no se puede considerar que las dos químicas sigan rutas paralelas muy estrechas. Esto no apoya la idea de que esos metales ocupan el sitio activo, aún cuando tampoco la contradice.

### Complejos mononucleares de dinitrógeno con hierro

En la primera publicación de Vol'pin<sup>3</sup> no se demostró que el

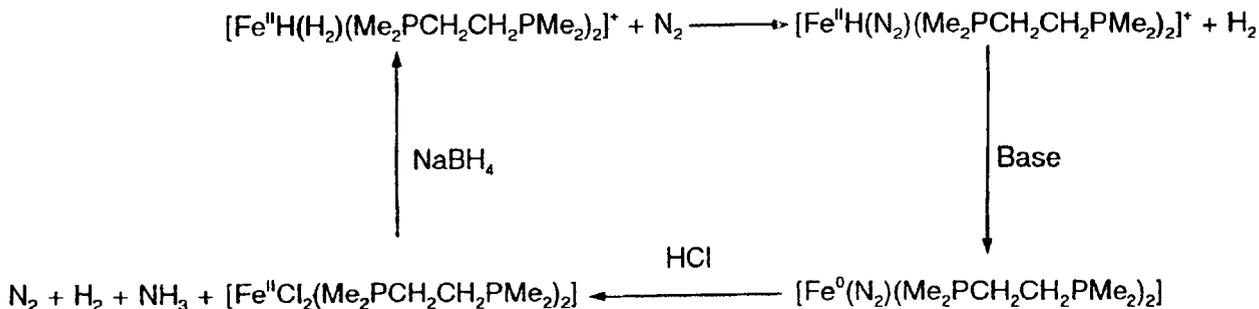
hierro puede fijar nitrógeno en sistemas muy reducidos, aunque el hierro metálico es el componente principal de los catalizadores de Haber.<sup>17</sup> Hace poco<sup>18</sup> se descubrieron sistemas reducidos no acuosos que fijan nitrógeno y contienen hierro. Sin embargo, a pesar de algunos avances recientes, el mecanismo de conversión de dinitrógeno a amoníaco sobre el catalizador de Haber no queda completamente claro. Los complejos de dinitrógeno de hierro(II) y hierro(0) se conocen desde los primeros días de los complejos de dinitrógeno,<sup>19</sup> aunque algunos no han sido caracterizados completamente, pero sólo recientemente se ha demostrado la conversión de dinitrógeno coordinado a hierro siguiendo un ciclo definido.<sup>20</sup> Éste se presenta en el esquemal pie de la página.

Así, el hierro, al igual que el tungsteno y el molibdeno, puede dar lugar a sistemas cíclicos que pueden ser modelos para la función nitrogenasa. La característica novedosa del sistema de hierro es que el ciclo da la vuelta al variar el pH, o cualquiera sea su equivalente en el sistema de disolventes empleado (metanol). Lo mismo podría suceder con una enzima. Por lo tanto, nos podemos imaginar un sitio activo en una nitrogenasa que sea básicamente un átomo de hierro expuesto al dinitrógeno y después un ciclo de cambio de pH, al mismo tiempo que se recibe un flujo constante de electrones. Éste es un modelo atractivo para ponerse al lado del modelo del molibdeno en circulación.

### Conclusiones (algunas veces provisionales) a partir de los datos químicos

(i) El molibdeno, vanadio y hierro presentan ejemplos de complejos mononucleares de dinitrógeno que pueden producir amoníaco cuando se tratan con ácido. Estos tres metales pueden también mediar la conversión de dinitrógeno a amoníaco en la presencia de disolventes próticos. Algunas de estas reacciones pueden ser catalíticas.

(ii) El mecanismo de reducción de dinitrógeno puede entenderse mejor en el caso de molibdeno, y menos en el caso de vanadio. El molibdeno y el hierro dan lugar a sistemas cíclicos en donde se retiene la estructura básica del sistema de coordinación/reducción. Aquí, se distinguen los sistemas cíclicos de los sistemas catalíticos en que un sistema cíclico tiene que impulsar-



se, mientras que el catalítico, una vez que se ha establecido, continuará el ciclo espontáneamente.

(iii) Los ligantes difosfina empleados para preparar los complejos de dinitrógeno están muy alejados de los donadores de azufre, nitrógeno y oxígeno empleados aparentemente por las nitrogenasas. Siempre se tendrán dudas de si la química de los complejos de fosfinas puede extrapolarse al tipo de ambiente imaginado para las nitrogenasas.

(iv) Los estados de oxidación empleados en los sistemas del modelo de fosfinas parecen ser  $\text{Mo}^0$  a  $\text{Mo}^{\text{VI}}$  o  $\text{Mo}^{\text{IV}}$ ,  $\text{V}^{-1}$  a  $\text{V}^{\text{III}}$  y  $\text{Fe}^0$  a  $\text{Fe}^{\text{II}}$ . Parece poco probable la obtención de molibdeno(0) y vanadio(-I) en ambientes biológicos. Esto también sugiere que los análogos de los complejos de fosfina no pueden formarse en las nitrogenasas. Por supuesto, los sistemas hidroxílicos que contienen molibdeno y tungsteno se unen a dinitrógeno en estados de oxidación superiores a cero, pero puesto que se piensa que implican puentes de dinitrógeno entre dos átomos de molibdeno o vanadio, parecería que también se podrían eliminar estos mecanismos.

(v) Sólo el hierro, con estados de oxidación 0 y II en los sistemas con fosfinas, sigue el ciclo de tal manera que podría ser accesible a una enzima. Esto se debe a que la reducción de II a 0 ocurre debido a la desprotonación que libera dos electrones que se encuentran formalmente en un enlace hierro-hidrógeno en los compuestos de hierro(II). Todavía no se ha demostrado si el hierro(0) y el hierro(II) pueden apoyar un ciclo de fijación de nitrógeno en un ambiente de azufre.

(vi) El hierro es el único metal que aparece en todas las nitrogenasas. Podría ser que el hierro se encuentre en el sitio activo de los tres tipos de nitrogenasa. Si este fuese el caso, tendríamos que explicar las razones por las que el molibdeno y el vanadio modulan la reactividad de las enzimas en comparación con la reactividad del sistema que sólo contiene hierro, y todavía no podemos hacerlo.

(vii) La sugerencia de un sitio con hierro podría haberse propuesto al considerar las propiedades de los tres tipos de nitrogenasa, y especialmente la estructura. De hecho, la sugerencia de un sitio con hierro se hizo hace muchos años, basándose en la intuición química<sup>21</sup> y, seguramente en retrospectiva, sin fundamento. La sugerencia, basada sobre evidencia química más firme, se reformuló en 1991,<sup>20</sup> y precede la información pública de la estructura cristalina. Todavía se desconoce la naturaleza del sitio activo en las nitrogenasas.

### Reconocimientos

Le agradezco a mis colegas en NFL los muchos años de asistencia, apoyo y críticas constructivas. ■

### Bibliografía

<sup>1</sup> Bortels, H., *Arch. Mikrobiol.*, 1930, 1, 333.

<sup>2</sup> Carnahan, J.E., Mortenson, L.E., Mower, H.F., Castle, J.E.,

*Biochim. Biophys. Acta*, 1960, 44, 520.

<sup>3</sup> Vol'pin, M.E., Shur, V.B., *Doklady Akad. Nauk S.S.S.R.*, 1964, 156, 1102.

<sup>4</sup> Para una revisión reciente, vea Leigh, G.J., *Acc. Chem. Res.*, 1992, 25, 177.

<sup>5</sup> Shilov, A.E., *J. Mol. Catal.*, 1987, 41, 221.

<sup>6</sup> Henderson, R.A., *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1982, 917; *idem*, *J. Organometal Chem.*, 1981, 208, C54; Hussain, W., Leigh, G.J., Pickett, C.J., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1982, 747.

<sup>7</sup> Eady, R.R., en: *Perspectives in Bioinorganic Chemistry*, Vol. 1, Eds. Hay, R.W., Dilworth, J.R., Nolan, K.B., JAI Press Ltd., London, 1991, p. 255; *idem*, *Adv. Inorg. Chem. Radiochem.*, 1991, 36, 77.

<sup>8</sup> Georgiadis, M.N., Komiya, H., Chakrabarti, P., Woo, D., Kornuc, J.J., Rees, D. C., *Science*, 1992, 257, 1677; Kim, J., Rees, D.C., *Nature*, 1992, 360, 553; Bolin, J.T., Ronco, A.E., Morgan, T.V., Mortenson, L.E., Xuong, N.-H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90, 1078.

<sup>9</sup> Sellmann, D., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1993, 32, 64.

<sup>10</sup> Veal, por ejemplo, Schrock, R.R., Kolodziej, R.M., Liu, A.H., Davis, W.M., Vale, M.G., *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, 112, 4338.

<sup>11</sup> Barclay, J.E., Hill, A., Hughes, D.L., Leigh, G.J., Macdonald, C.J., Abu Bakar, M., Mohd.-Ali, H., *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1990, 2503; Pickett, C.J., Ryder, K.S., Talarmin, J., *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1986, 1453.

<sup>12</sup> Thorneley, R.N.F., Lowe, D.J., *Biochem. J.*, 1984, 224, 877.

<sup>13</sup> Edema, J.H.H., Meetsma, A., Gambarotta, S., *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, 111, 6878.

<sup>14</sup> Leigh, G.J., Prieto-Alcón, R., Sanders, J.R., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1991, 920.

<sup>15</sup> Rehder, D., Woitha, C., Priebisch, W., Gailus, H., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1992, 364; Woitha, C., Rehder, D., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1990, 29, 1438.

<sup>16</sup> Hills, A., Hughes, D.L., Leigh, G.J., Prieto-Alcón, R., *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, enviado para su publicación; Prieto-Alcón, R., D. Phil. tesis, Universidad de Sussex, 1991.

<sup>17</sup> Veal Jennings, K.R. ed., *Catalytic Ammonia Synthesis*, Plenum Press, Nueva York y Londres, 1991.

<sup>18</sup> Veal Henderson, R.A., Leigh, G.J., Pickett, C.J., *Adv. Inorg. Chem. Radiochem.*, 1983, 27, 197.

<sup>19</sup> Shilov, A.E., *New J. Chem.*, 1992, 16, 213.

<sup>20</sup> Jimenez-Tenorio, M., Leigh, G.J., *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, 113, 5662.

<sup>21</sup> Winfield, M.E., *Rev. Pure Appl. Chem. (Australia)*, 1964, 156, 1102.

Ésta es la versión en español de un artículo en inglés que aparecerá en *New Journal of Chemistry*, 1994.