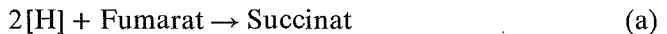


# Der Mechanismus der Energieübertragung bei der Elektronentransport-Phosphorylierung mit Fumarat in *Vibrio succinogenes*

VON ACHIM KRÖGER

Sehr viele obligat anaerobe und fakultativ aerobe Bakterien besitzen ein membrangebundenes Enzymsystem, das die Reduktion von Fumarat durch eine Reihe von Donorsubstraten katalysiert [1–4]:

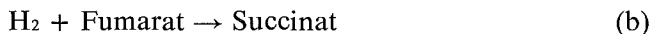


Die Redoxpotentialdifferenzen zwischen dem Redoxpaar Fumarat/Succinat einerseits und den Donorsubstraten ( $\text{H}_2$ , Formiat, NADH, Glycerol-1-Phosphat, Laktat) andererseits gestatten die Synthese von 1 ATP/2e durch Elektronentransport-Phosphorylierung. In einigen Fällen wurde gezeigt, dass die Reduktion von Fumarat tatsächlich mit ATP-Synthese gekoppelt ist [5–12].

In diesem Artikel soll das System der Fumaratreduktion von *Vibrio succinogenes* [5] dargestellt werden. Dabei soll erstens das System des Elektronentransports zum Fumarat und zweitens der Mechanismus der Energieübertragung vom Elektronentransport auf die ATP-Synthese besprochen werden.

## Das Elektronentransportsystem

*V. succinogenes* bestreitet das für die Zellvermehrung erforderliche ATP aus der Fumaratreduktion durch  $\text{H}_2$  (Reaktion b) oder Formiat (Reaktion c):



Beide Reaktionen werden von zellfreien Membranpräparationen der Bakterien katalysiert, die auf Formiat und Fumarat gezogen wurden. Die Reaktionen (b) und (c) werden von einem Elektronentransportsystem (Abb. 1) katalysiert, das Formiatdehydrogenase, Hydrogenase und Fumaratreduktase enthält. MK ist eine Komponente des Elektronentransports von beiden Donoren zum Fumarat. Durch Extraktion des MK aus der Membran wird der Elektronentransport gehemmt und durch Einbau des Chinons in die Membran reakti-

viert [13]. Das MK des Bakteriums wird durch H<sub>2</sub> oder Formiat reduziert und durch Fumarat reoxidiert [13]. Unabhängig von MK vermag die Membran die Oxidation von H<sub>2</sub> und Formiat durch künstliche Akzeptoren und die Reduktion von Fumarat durch künstliche Donoren zu katalysieren.

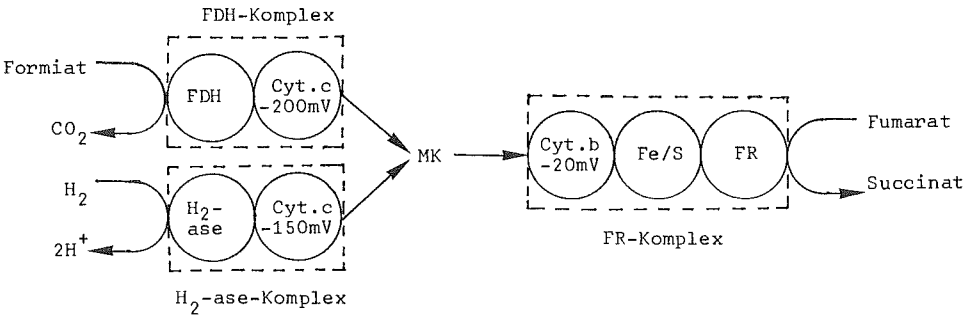
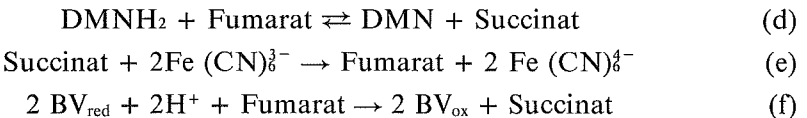


Abb. 1 Das Elektronentransportsystem von *Vibrio succinogenes*.  
 FDH = Formiatdehydrogenase, H<sub>2</sub>-ase = Hydrogenase.  
 FR = Fumaratreduktase, Fe/S = Eisen-Schwefel.  
 Die Cytochrome sind durch ihr Mittelpotential charakterisiert.  
 MK = Menachinon

Durch Extraktion der Membran mit Detergenzien und anschliessende Reinigung konnte der Fumaratreduktase-Komplex isoliert werden. Er besteht aus einem Satz von 3 verschiedenen Untereinheiten. Das grösste Peptid (Mr 79 000) enthält 1 Molekül kovalent gebundenes FAD [15], eine essentielle Sulfhydrylgruppe und etwa 4 Eisen-Schwefel-Gruppen. Das nächstgrösste Peptid (Mr 31 000) enthält nur Eisen-Schwefel-Gruppen, und das kleinste Peptid (Mr 25 000) ist ein b-Cytochrom mit dem Mittelpotential -20 mV. Der Fumaratreduktase-Komplex katalysiert die Reduktion von Fumarat durch DMNH<sub>2</sub> (d) Benzylviologen-Radikal (f) und die Oxidation von Succinat durch DMN (d) oder Fe (CN)<sub>6</sub><sup>3-</sup> (e).



Die K<sub>m</sub> für Fumarat ist 0.35 mM und die für Succinat 20 mM in Reaktion (d).

Durch Abspaltung des Cytochrom b aus dem Fumaratreduktase-Komplex wird ein Enzym erhalten, das aus einem Molekül des grossen und einem Molekül des Mr 31 000 Peptids besteht [14]. Dieses Enzym katalysiert nur die Reaktionen (e) und (f), aber nicht Reaktion (d). Das zeigt, dass DMNH<sub>2</sub> und

DMN nur mit dem Cytochrom b (-20 mV) reagieren können. Wegen der strukturellen Ähnlichkeit von DMN und MK ist anzunehmen, dass Cytochrom b (-20 mV) der direkte Akzeptor der Elektronen des bakteriellen MKH<sub>2</sub> ist. Durch Abspaltung des Mr 31 000 Peptids wird aus dem cytochrom-freien Enzym die Fumaratreduktase erhalten, die nur aus dem grossen Peptid besteht und nur noch Reaktion (f) katalysiert. Dadurch wird gezeigt, dass das Substratzentrum des Enzyms auf dem grossen Peptid lokalisiert ist. Es ist anzunehmen, dass die Eisen-Schwefel-Gruppen der Mr 31 000 Untereinheit den Elektronentransport vom Cytochrom b zur Fumaratreduktase katalysieren.

Formiatdehydrogenase wurde nach Extraktion aus der Membran rein dargestellt und besteht aus 2 gleichen Untereinheiten (Mr 110 000), die jeweils 1 Atom Molybdän und etwa 20 Eisen-Schwefel-Gruppen tragen [16]. Der Elektronentransport von der Formiatdehydrogenase zum MK wird durch ein Cytochrom b mit dem Mittelpotential -200 mV katalysiert [16,17], das zusammen mit dem Enzym isoliert werden kann (Formiatdehydrogenase-Komplex).

Die Hydrogenase von *V. succinogenes* konnte bisher noch nicht rein erhalten werden. Dieses Enzym ist wahrscheinlich ein Eisen-Schwefel-Protein, und es ist möglich, dass ein Cytochrom c mit dem Mittelpotential -150 mV [17] den Elektronentransport von der Hydrogenase zum MK katalysiert.

Die Komplexe der Fumaratreduktase, der Formiatdehydrogenase und der Hydrogenase sowie MK bilden wahrscheinlich nur eine funktionelle, aber keine topologische Einheit. Es ist anzunehmen, dass die Komplexe unabhängig voneinander jeweils statistisch in der Membran verteilt sind. Der Elektronentransport zwischen den Komplexen wird durch Diffusion des MK in der Lipidphase der Membran gewährleistet [18].

### Energieübertragung

Wenn *V. succinogenes* durch eine French-Pressenbehandlung erhalten wird, wird eine zellfreie Membranpräparation erhalten, die die Phosphorylierung von externem ADP katalysiert, wenn Fumarat durch H<sub>2</sub> reduziert wird [12]. Ein Teil des Präparats besteht aus invertierten Vesikeln, bei denen das aktive Zentrum der ATPase nach der Aussenseite der Membran gerichtet ist. Der Rest sind wahrscheinlich offene Membranfragmente, die zwar zur Fumaratreduktion durch H<sub>2</sub>, aber nicht zur Phosphorylierung befähigt sind. Die gemessenen P/Fumarat-Quotienten sind etwa 0.5 (Tabelle 1). Da nur etwa die Hälfte der Partikel phosphorylieren, ist die ATP-Ausbeute der Reaktion etwa 1 Mol/Mol Fumarat. Die ATP-Synthese ist vom Elektronentransport abhängig, wie durch seine Hemmung mit NQNO gezeigt wird. Durch Entkoppler (FCCP) und den Hemmstoff der ATPase, DCCD, wird die Phosphorylierung, nicht aber der Elektronentransport völlig gehemmt. Dadurch wird gezeigt, dass die ATP-Synthese durch Elektronentransport-Phosphorylierung bewerkstelligt wird.

Tabelle 1 Phosphorylierung mit zellfreien Partikeln von *V. succinogenes*, die mit der French-Press erhalten wurden.

| Zusatz | ( $\mu$ Mol/<br>g Prot.) | H <sub>2</sub> →<br>Fumarat<br>(U/g Prot.) | $\frac{P}{\text{Fumarat}}$ |
|--------|--------------------------|--|----------------------------|
| -      | -                        | 275  | 0.48                       |
| FCCP   | 5                        | 255  | <0.01                      |
| DCCD   | 10                       | 273  | <0.01                      |
| NQNO   | 5                        | 10   | 0.1                        |

Nach der Theorie von P. MITCHELL wird die freie Energie des Elektronentransports mit Hilfe eines elektrochemischen Protonenpotentials für die ATP-Synthese nutzbar gemacht [19]. Das Protonenpotential über der Membran wird durch den Elektronentransport erzeugt und seine Energie durch Protonentransport durch die ATPase in Richtung des Feldes zur Phosphorylierung verwendet. Der Mechanismus der Entstehung des Protonenpotentials ist wahrscheinlich von Fall zu Fall verschieden, während seine Nutzung zur ATP-Synthese vermutlich in allen bekannten Fällen nach dem gleichen Prinzip funktioniert. Der Elektronentransport zum Fumarat ist in *Vibrio succinogenes* mit der Ausbildung eines Protonenpotentials gekoppelt [3,20]. In Gegenwart von K<sup>+</sup> werden von Zellen etwa 2H<sup>+</sup>/Fumarat während des Elektronentransports freigesetzt, und das Cytoplasma wird alkalischer.

Die Entstehung des Potentials ist wahrscheinlich durch die gegensätzliche Orientierung der aktiven Zentren der Dehydrogenasen einerseits und der Fumaratreduktase andererseits bedingt (Abb. 2). Das Substratzentrum der Formiatdehydrogenase ist nach der Aussenseite der Membran von Zellen gerichtet, während das der Fumaratreduktase nur vom Cytoplasma her zugänglich ist. Bei den invertierten Vesikeln ist die Situation umgekehrt. Dieses Ergebnis wurde aus den folgenden Befunden erhalten:

1. Die Membran des Bakteriums ist undurchlässig für Formiat, während Fumarat von den Zellen aufgenommen wird [21]. Die Aufnahme geschieht wahrscheinlich im Gegentausch mit Succinat (Abb. 2).

2. p-CMS hemmt die Fumaratreduktase durch Reaktion mit der Sulfhydrylgruppe des aktiven Zentrums [22]. Der impermeable Hemmstoff hemmt das Enzym von invertierten Vesikeln und Membranfragmenten, nicht aber das von Zellen oder Sphäroplasten [21].

Das Substratzentrum der Hydrogenase ist wahrscheinlich, wie das der Formiatdehydrogenase, nach der Aussenseite der Membran von Zellen gerichtet.

Da die prosthetischen Gruppen der beiden Dehydrogenasen keinen Wasserstoff übertragen können, ist anzunehmen, dass nur die Elektronen von H<sub>2</sub> und Formiat aufgenommen werden, während die zugehörigen Protonen an

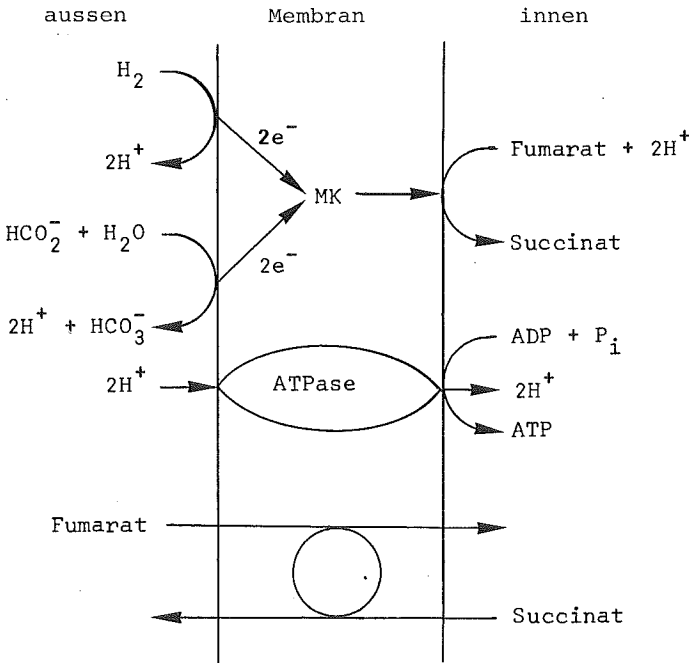


Abb. 2 Mechanismus der Entstehung des elektrochemischen Protonenpotentials bei der Fumaratreduktion in *V. succinogenes*.

den Substratzentren freigesetzt werden. Da ein Cytochrom und Eisen-Schwefel-Gruppen den Elektronentransport von MK zur Fumaratreduktase katalysieren (Abb. 1), gelangen nur Elektronen über die Kette zum Fumarat. Die zur Hydrierung der Doppelbindung des Akzeptors erforderlichen Protonen werden vermutlich aus dem Cytoplasma aufgenommen. Das Protonenpotential entsteht also durch Elektronen- und nicht Protonentransport über die Membran.

Die Elektronentransportkette stellt nur die elektrische Verbindung zwischen den Dehydrogenasen und der Fumaratreduktase dar und ist nicht direkt an der Entstehung des Protonenpotentials beteiligt. Daher sollte auch ein Protonenpotential entstehen, wenn der Elektronentransport gehemmt und durch einen geeigneten künstlichen Redoxmediator ersetzt wird. Auf diese Weise kann der vorgeschlagene Mechanismus geprüft werden. Der Redoxmediator muss die folgenden Eigenschaften besitzen:

1. Sein Redoxpotential muss zwischen dem des Donorsubstrats und dem von Fumarat liegen.
2. Er muss im oxidierten Zustand mit der Dehydrogenase, im reduzierten mit Fumaratreduktase reagieren.

3. Er muss in beiden Zuständen die Membran durchdringen.
4. Er muss ein Elektronen- und kein Wasserstoffüberträger sein.

Die Bedingungen 1 bis 3 werden sowohl von Häm als auch von DMN erfüllt. Beide Mediatoren sollten daher die Reduktion von Fumarat durch  $H_2$  nach Hemmung reaktivieren. Wie in Abb. 3 gezeigt, sollte aber nur die durch Häm reaktivierte Aktivität mit dem Aufbau eines Protonenpotentials gekoppelt sein.

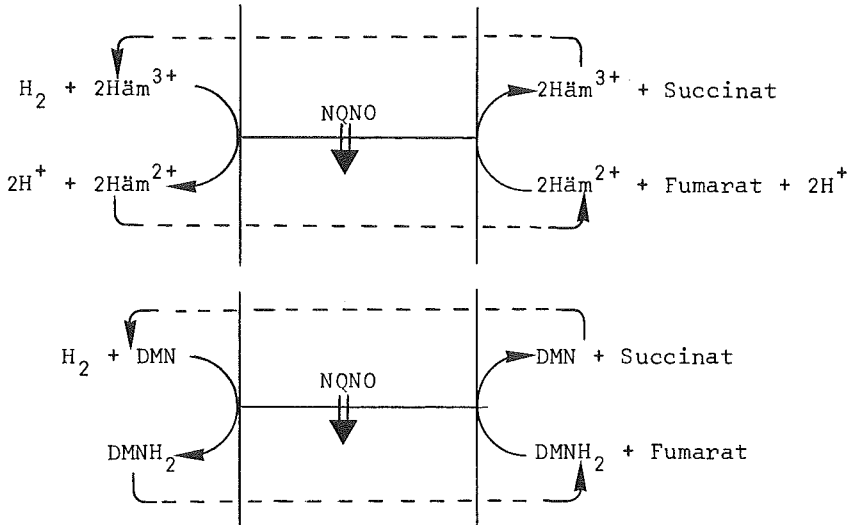


Abb. 3 Anzunehmender Mechanismus der Reaktivierung der  $H_2$ -Fumarat-Reduktion durch Häm und DMN nach NQNO-Hemmung.

Die Reduktion von Fumarat durch  $H_2$  lässt sich in Partikeln, die mit der French-Press erhalten wurden, durch NQNO zu mehr als 95% hemmen (Tabelle 2). Katalytische Konzentrationen von Häm oder DMN bewirken die Reaktivierung der Fumaratreduktion, aber nur mit Häm wird Phosphorylierung beobachtet, die durch Entkoppler unterbunden wird. In Abwesenheit von NQNO wird Phosphorylierung mit DMN gefunden. Dadurch wird gezeigt, dass DMN nicht als Entkoppler wirkt. Die Phosphorylierungsausbeute mit Häm in Gegenwart von NQNO ist 30% der Kontrolle ohne und 50% mit Häm.

Dieses Ergebnis bestätigt den vorgeschlagenen Mechanismus und schliesst aus, dass Protonen durch MK über die Membran transportiert werden (Abb. 4A). Der Aufbau eines Protonenpotentials durch die Redoxreaktion von MK würde bedingen, dass MK durch die Dehydrogenasekomplexe auf der Innenseite der Membran unter Aufnahme von Protonen aus dem Cytoplasma reduziert wird. Die Oxidation des reduzierten MK durch den Fumaratreduktase-Komplex sollte dagegen auf der Aussenseite der Membran von Zellen gesche-

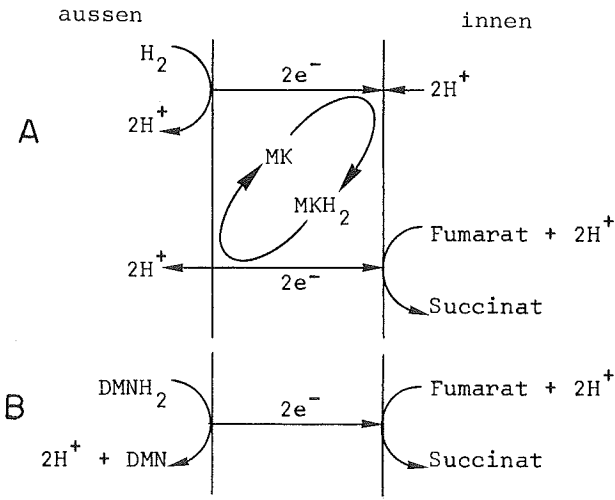


Abb. 4 Auszuschliessender Mechanismus für den Aufbau eines Protonenpotentials in *V. succinogenes*.

(A) durch Protonentranslokation, (B) durch  $DMNH_2$  - Fumaratreduktion.

hen. Das ist aber offenbar nicht der Fall. Reduziertes DMN wird wie reduziertes MK spezifisch durch Cytochrom b (-20 mV) oxidiert. Die Oxidation des reduzierten DMN auf der Innenseite der Membran sollte daher zur Ausbildung eines Protonenpotentials und damit zur Phosphorylierung in Gegenwart von NQNO (Abb. 4B) führen. Da das im Gegensatz zum experimentellen Ergebnis (Tab. 2) steht, ist der Mechanismus von Abb. 4A auszuschliessen.

Tabelle 2 Reaktivierung von  $H_2$ -Fumaratreduktion und Phosphorylierung von zellfreien Partikeln von *V. succinogenes* nach Hemmung des Elektronentransports mit NQNO.

| Zusatz                         |                               | $H_2 \rightarrow$<br>Fumarat<br>(U/g Prot.) | $\frac{P}{\text{Fumarat}}$ |
|--------------------------------|-------------------------------|---|----------------------------|
| -                              |                               | 28  | 0.07                       |
| 0.2 mM Hämin                   |                               | 208   | 0.11                       |
| + NQNO<br>(5µMol/g<br>Protein) | 0.2 mM Hämin                  | 220   | <0.01                      |
|                                | + FCCP (20µMol/<br>g Protein) | 228   | <0.01                      |
| 0.2 mM DMN                     |                               | 228   | <0.01                      |
| -                              |                               | 312   | 0.37                       |
| 0.2 mM Hämin                   |                               | 270   | 0.22                       |
| 0.2 mM DMN                     |                               | 2012  | 0.22                       |

Vorbehältlich weiterer Prüfung glauben wir, damit den Mechanismus der Entstehung des Protonenpotentials in diesem System aufgeklärt zu haben. Die Ergebnisse deuten ausserdem an, dass das Protonenpotential die Voraussetzung für die Phosphorylierung darstellt – in Übereinstimmung mit der Theorie P. MITCHELLS.

Es ist anzunehmen, dass ähnliche Mechanismen auch in anderen Systemen mit Elektronentransport-Phosphorylierung vorkommen [2, 21, 23]. Dagegen sind andere Mechanismen für solche Systeme anzunehmen, in denen die Substratzentren der Dehydrogenase einerseits und der Fumarat- oder anderer Reduktasen andererseits nach der gleichen Seite der Membran gerichtet sind. Protonentransport über die Membran ist auch in solchen Fällen zu fordern, in denen mehr als 2 Protonen je 2 Elektronen durch den Elektronentransport freigesetzt werden.

### Abkürzungen

MK = Menachinon

MKH<sub>2</sub> = reduziertes Menachinon

NQNO = 2-(n-Nonyl)-4-Hydrochinolin-N-oxid

BV = Benzylviologen

DMN = 2,3-Dimethyl-1,4-Naphthochinon

DMNH<sub>2</sub> = 2,3-Dimethyl-1,4-Naphthohydrochinon

FCCP = Carbonylcyanid-4-trifluormethoxyhydrizon

DCCD = Dicyclohexylcarbodiimid

### Literaturverzeichnis

- [1] KRÖGER, A. (1977) in *Microbial Energetics* (HADDOCK, B.A. and HAMILTON, W.A., eds.) pp. 61–93, Cambridge University Press
- [2] THAUER, R.K., JUNGERMANN, K. und DECKER, K. (1977) *Bacteriol. Rev.* *41*, 100–180
- [3] KRÖGER, A. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* *505*, 129–145
- [4] KRÖGER, A. (1980) in *Diversity of Bacterial Respiratory Systems* (KNOWLES, C.J., ed.) CRC Press Inc., Cleveland/Ohio, im Druck
- [5] WOLIN, M.J., WOLIN, E.A. und JACOBS, N.J. (1961) *J. Bacteriol.* *81*, 911–917
- [6] BARTON, L.L., LE GALL, J. und PECK, H.D. (1970) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* *41*, 1036–1042
- [7] DE VRIES, W., VAN WYCK-KAPTEYN, W.M. und STOUTHAMER, A.H. (1973) *J. Gen. Microbiol.* *76*, 31–41
- [8] KRÖGER, A. (1974) *Biochim. Biophys. Acta* *347*, 273–289
- [9] MIKI, K. und LIN, E.C. (1975) *J. Bacteriol.* *124*, 1282–1287
- [10] MACY, J., KULLA, H. und GOTTSCHALK, G. (1976) *J. Bakteriol.* *125*, 423–428
- [11] BADZJONG, W., THAUER, R.K. und ZEIKUS, J.G. (1978) *Arch. Microbiol.* *116*, 41–49
- [12] REDDY, C.A. und PECK, H.D. (1978) *J. Bacteriol.* *134*, 982–991.
- [13] KRÖGER, A. und INNERHOFER, A. (1976) *Eur. J. Biochem.* *69*, 497–495
- [14] UNDEN, G., HACKENBERG, H. und KRÖGER, A., (1980) *Biochem. Biophys. Acta*, im Druck.
- [15] KENNEY, W.C. und KRÖGER, A. (1977) *FEBS Letters* *73*, 239–243



- [16] KRÖGER, A., WINKLER, E., INNERHOFER, A., HACKENBERG, H. und SCHÄGGER, H. (1979) Eur. J. Biochem. 94, 465–475
- [17] KRÖGER, A. und INNERHOFER, A. (1976) Eur. J. Biochem. 69, 497–506
- [18] KRÖGER, A. und KLINGENBERG, M. (1970) Vitamins and Hormones 28, 533–574
- [19] MITCHELL, P. (1961) Nature 191, 144–148
- [20] KRÖGER, A. (1975) in Electron Transfer Chains and Oxidative Phosphorylation (E. Quagliariello et al., eds.) pp. 265–270, North-Holland Publ. Co., Amsterdam
- [21] KRÖGER, A., DORRER, E. und WINKLER, E. (1980) Biochim. Biophys. Acta 589, 118–136
- [22] UNDEN, G. und KRÖGER, A. unveröffentlicht
- [23] v. JAGOW, G. (1979) Naturwiss. 66, 539–546

*Adresse des Autors:*

Dr. ACHIM KRÖGER, Institut für Mikrobiologie, Fachbereich Biologie, Universität Marburg.

