

# Energiekonservierung in anaeroben Bakterien

Peter Dimroth, ETH Zürich

Die ersten Lebewesen auf dieser Erde waren Anaerobier, denn eine O<sub>2</sub>-haltige Atmosphäre bildete sich erst nach der Entstehung der Photosynthese. Auch auf der heutigen Erde gibt es noch ausgedehnte O<sub>2</sub>-freie Bereiche, die von anaeroben Mikroorganismen besiedelt werden. Diese Organismen sind dazu in der Lage, ein breites Spektrum von organischen Verbindungen abzubauen, wobei die Mechanismen der biologischen Energiekonservierung jedoch begrenzt sind. Zum Teil sind diese Mechanismen identisch oder ähnlich wie die ihrer aeroben Artgenossen. Eine grosse Zahl anaerober Bakterien synthetisiert ihr gesamtes ATP durch Substratkettenphosphorylierung. Andere benutzen einen chemiosmotischen Mechanismus für die ATP-Synthese. Der als Triebkraft für die ATPase dienende elektrochemische Protonengradient wird dabei von einer anaeroben Atmungskette erzeugt, in der statt Sauerstoff ein weniger starkes Oxidationsmittel, z. B. Sulfat oder Schwefel, als terminaler Elektronenacceptor fungiert. In *Propionigenium modestum* wird durch Decarboxylierung von Methylmalonyl-CoA ein elektrochemischer Na<sup>+</sup>-Gradient über die Membran aufgebaut, der von einer speziellen Na<sup>+</sup>-translozierenden ATPase zur ATP-Synthese genutzt wird. *Oxalobacter formigenes* erzeugt in einem 1:1-Gegentausch von Oxalat gegen Formiat einen elektrochemischen Protonengradienten, der für die ATP-Synthese verwendet wird. Getrieben wird der Austausch von der Decarboxylierung des Oxalats, denn hierdurch bildet sich für Oxalat ein von aussen nach innen und für Formiat ein von innen nach aussen gerichteter Konzentrationsgradient über die Membran hinweg.

## Energy Conservation in Anaerobic Bacteria

The first forms of life on the earth were anaerobes, because an O<sub>2</sub>-containing atmosphere formed only after the development of photosynthesis. Extended O<sub>2</sub>-free areas exist even on earth today, which are occupied by anaerobic microorganisms. These organisms can degrade a broad spectrum of organic compounds, but use only a few mechanisms for the conservation of biological energy. These mechanisms are in part identical or similar to those of their aerobic counterparts. A huge number of anaerobic bacteria synthesize ATP entirely by substrate-level phosphorylation. Others use a chemiosmotic mechanism for ATP synthesis. The electrochemical gradient of protons required as driving force for the ATPase is created by an anaerobic respiratory chain, in which oxygen as terminal electron acceptor is replaced by a less strong oxidant, e.g. sulfate or sulfur. In *Propionigenium modestum*, an electrochemical Na<sup>+</sup> ion gradient is created over the membrane by decarboxylation of methylmalonyl-CoA, which is used for ATP synthesis by a particular Na<sup>+</sup>-translocating ATPase. *Oxalobacter formigenes* in a 1:1 exchange of oxalate for formate forms an electrochemical proton gradient which is used for ATP synthesis. The exchange is driven by the decarboxylation of oxalate, developing a concentration gradient over the membrane which for oxalate is directed from the outside to the inside and for formate from the inside to the outside.

## 1 Einleitung.

Seit alters her haben sich die Menschen die Stoffwechsellleistungen anaerober Mikroorganismen zunutze gemacht, so etwa die der alkoholischen Gärung zur Herstellung alkoholischer Getränke wie Wein und Bier oder der Milchsäuregärung zur Konservierung von Lebensmitteln und zur Herstellung verschiedener Milchprodukte.

Durch die immer dichter werdende Besiedlung dieser Erde wird die Reinhaltung des Wassers zu einer immer grösseren Herausforderung. Es hat sich gezeigt, dass anaerobe Bakterien vorteilhaft zur Klärung von mit organischen Stoffen belasteten Abwässern eingesetzt werden können. Mit dieser Art der Abwasserklärung lassen sich gegenüber den aeroben Kläranlagen mit ihren intensiven Rühr- und Belüftungssystemen gewaltige Energiemengen einsparen, und darüber hinaus kann das im Anaeroben gebildete Methan als Energiequelle genutzt werden. Aufwendige Kontroll- und Regeleinrichtungen, die zur Gewährleistung einer gleichmässigen Sauerstoffversorgung in aeroben Klärbekken erforderlich sind, entfallen bei anaerober Prozessführung. Wegen des langsameren Wachstums der anaeroben Organismen ist allerdings eine längere Verweilzeit der Abwässer und damit der Bau grösserer Behälter erforderlich.

Die steigenden Ölpreise, die wir gerade jetzt wieder erleben, führen uns vor Augen, dass die fossilen Lagerstätten an Öl, Gas und Kohle kostbare Rohstoffe darstellen, mit deren Verbrauch wir bedeutend behutsamer umgehen sollten, als dies in den letzten Jahrzehnten geschehen ist. Es ist deshalb von immenser Bedeutung, nach Wegen Ausschau zu halten, wie Rohstoffe und Energiequellen sich aus nachwachsenden Materialien gewinnen lassen. Hierzu können anaerobe Bakterien einen wichtigen Beitrag leisten. So lassen sich durch den anaeroben Abbau organischer Abfallprodukte eine Reihe von Substanzen gewinnen, die als Chemierohstoffe oder als Energiequelle genutzt werden können. Dazu zählen z. B. Methan, Ethanol, andere Lösungsmittel wie Aceton oder Butanol und organische Säuren. Ausserdem lässt sich das beeindruckend vielfältige katalytische Potential der Anaerobier nutzen, um bestimmte chemische Reaktionen hochspezifisch und bei nur etwa 30 °C ablaufen zu lassen, und es können aus solchen Bakterien Enzyme für synthetische und diagnostische Zwecke gewonnen werden. Es ist deshalb nicht verwunderlich, dass das Interesse an der Erforschung anaerober Bakterien in den letzten 15 Jahren stark zugenommen hat. In diese Zeit fiel auch eine wesentliche Verbesserung der Techniken zur Isolierung und Handhabung strikter Anaerobier, die heute zur Routine eines jeden guten mikrobiologischen Laboratoriums gehören.

Da Sauerstoff in der Uratmosphäre nicht vorhanden war, müssen die ältesten Organismen auf der Erde Anaerobier gewesen sein. Eine O<sub>2</sub>-haltige Atmosphäre bildete sich vor ca. 2,5 Milliarden Jahren mit der Entwicklung von Organismen, die zur Photosynthese und damit zur Bildung von O<sub>2</sub> in der Lage waren. Bis vor 0,6 Milliarden Jahren hatte sich der Sauerstoffgehalt der Atmosphäre wahrscheinlich nur auf 2 % erhöht. Erst nachdem die grünen Pflanzen das Land erobert und mit einer dichten Pflanzendecke überzogen hatten, nahm die Sauerstoffkonzentration rasch zu und erreichte mit 21 % O<sub>2</sub> ihren heutigen Wert. Sauerstoff, der für die meisten eukaryontischen Lebewesen essentiell ist, ist somit klar eine Folge von Leben auf dieser Erde und nicht dessen Voraussetzung.

Auf der heutigen Erde werden durch die photosynthetischen Leistungen der grünen Pflanzen, der Algen und der Cyanobakterien jährlich etwa 130 Milliar-

den Tonnen als CO<sub>2</sub>-gebundener Kohlenstoff zu organischen Verbindungen reduziert. Diesen Photosyntheseleistungen stehen abbauende Prozesse gegenüber, bei denen die organischen Verbindungen wieder zu CO<sub>2</sub> oxidiert werden, wobei die bei diesen Oxidationen gewonnene Energie das Wachstum der betreffenden Organismen ermöglicht.

An der endgültigen Mineralisierung des organischen Materials, d. h. an dessen Überführung in CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>S und NH<sub>3</sub> als den prinzipiellen Endprodukten, haben Bakterien einen wesentlichen Anteil. Der weitaus grösste Teil dieser Abbauprozesse findet aerob, d. h. unter Beteiligung von O<sub>2</sub>, statt. Die anaeroben Abbauprozesse sind auf einzelne Nischen beschränkt, etwa auf anaerobe Sedimente und anaerobe Bereiche von Seen und Meeren, oder auf die Verdauungsorgane von Tieren und Menschen. Dennoch sind anaerobe Abbauvorgänge von grundlegendem Interesse für das Verständnis des Kohlenstoffkreislaufs in der Natur sowie für die verschiedenen daran beteiligten Reaktionen und Organismen.

## 2 Zentrale Stellung von ATP im zellulären Energiestoffwechsel.

Eine unmittelbare Voraussetzung für jegliches Leben ist die permanente Zufuhr von Energie. Die Bioenergetik befasst sich mit den Vorgängen, mit denen sich die Zelle die äusseren Energiequellen erschliesst und für ihre eigenen energie-

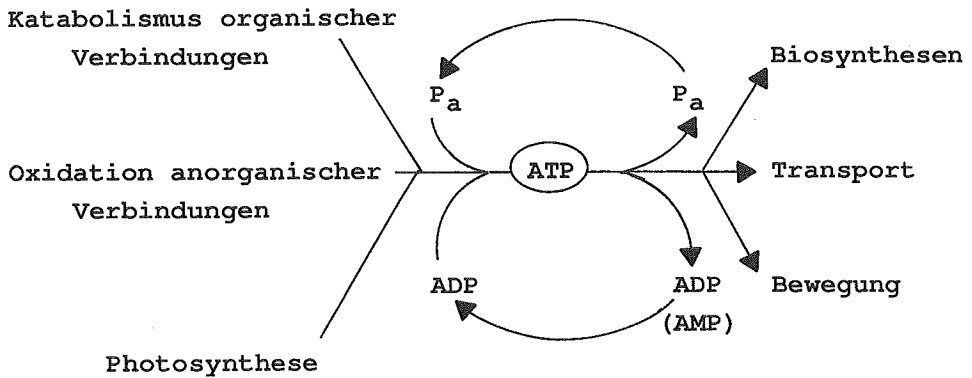


Bild 1 ATP als zentrales Zwischenprodukt im zellulären Energiestoffwechsel

Fig. 1 ATP as the central intermediate in cellular energy metabolism

abhängigen Leistungen nutzbar macht. Von zentraler Bedeutung bei den energie-transformierenden Vorgängen ist das Adenosintriphosphat (abgekürzt ATP). Dieses stellt sozusagen die Währung dar, mit der die bioenergetischen Leistungen einer Zelle beglichen werden. Auf dem in Bild 1 dargestellten Schema wird dies deutlich. Alle lebenden Zellen besitzen irgendeinen Mecha-



FAD<sup>+</sup>) vollständig zu CO<sub>2</sub> oxidiert. Daran schliesst sich die von den Enzymen der Atmungskette katalysierte Elektronenübertragung von dem gebildeten NADH und FADH<sub>2</sub> auf den Sauerstoff an, wobei die oxidierten Cofaktoren regeneriert werden. Die energetische Betrachtung dieser beiden an der Oxidation des Zuckers beteiligten Vorgänge zeigt, dass bei der ersten ohne Beteiligung von O<sub>2</sub> ablaufenden Stufe lediglich 4 ATP-Moleküle gebildet werden, während es bei der Elektronenübertragung von den reduzierten Cofaktoren auf den Sauerstoff zur Synthese von 34 ATP-Molekülen kommt. Aus diesen Überlegungen ergibt sich zwangsläufig, dass anaerobe Bakterien, die die Elektronenübertragung auf den Sauerstoff naturgemäss nicht durchführen können, nur einen Bruchteil der ATP-Menge pro Mol abgebautem Substrat synthetisieren können wie ihre aeroben Artgenossen.

#### 4 Energiekonservierung durch Substratkettenphosphorylierung.

Grundsätzlich erfolgt auch im anaeroben Bereich der Energiegewinn aus der Oxidation der organischen Kohlenstoffverbindungen. Zu berücksichtigen ist hierbei allerdings, dass zum Ausgleich der Elektronenbilanz entweder ein externer, von O<sub>2</sub> verschiedener Elektronenacceptor benötigt wird, oder aber die Elektronen innerhalb der Kohlenstoffverbindungen so verschoben werden, dass ein Teil der Kohlenstoffatome der Produkte stärker oxidiert und ein Teil stärker reduziert vorliegt als in der Ausgangsverbindung.

Ein gut untersuchtes Beispiel für den 2. Typ ist die in Bild 3 dargestellte alkoholische Gärung. In deren Verlauf wird ein Teil der Kohlenstoffatome der Glucose zu CO<sub>2</sub> oxidiert, ein anderer zur Methylgruppe von Ethanol reduziert. Im Zuge des Glucoseabbaus werden die Elektronen bei der Oxidation von 3-Phosphoglycerinaldehyd zu 3-Phosphoglycerinsäure auf NAD<sup>+</sup> übertragen und das so gebildete NADH zur Reduktion von Acetaldehyd zu Aethanol verwendet. Wie in diesem Beispiel gezeigt, muss bei derartigen Gärungen die Bilanz von NADH liefernden und NADH verbrauchenden Reaktionen aufgehen, weil der Cofaktor nur in katalytischen Mengen in den Zellen zur Verfügung steht.

Aus dem in Bild 3 dargestellten Stoffwechsel der alkoholischen Gärung wird bereits eine Möglichkeit ersichtlich, wie unter anaeroben Bedingungen ATP synthetisiert werden kann. Der Mechanismus der an die Oxidation von Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu 3-Phosphoglycerat gekoppelten ATP-Synthese ist im Detail in Bild 4 gezeigt. Die Oxidation des Glycerinaldehyd-3-Phosphats führt zur Bildung des Carbonsäure-Phosphorsäure Anhydrids des 1,3-Diphosphoglycerats, in dem die freie Energie der Oxidationsreaktion quasi als Bindungsenergie konserviert ist. Es ist daher möglich, den Phosphatrest in der nachfolgenden von 3-Phosphoglyceratkinase katalysierten Reaktion auf ADP zu übertragen und damit ATP zu synthetisieren. Dieses ist ein klassisches Beispiel der sog. Substratphosphorylierung, dessen Chemie bereits in den 30er Jahren von Otto

Warburg aufgeklärt wurde. Andere Beispiele für Substratphosphorylierung sind die Übertragung des Phosphatrestes von Phosphoenolpyruvat oder Acetylphosphat auf ADP unter ATP-Bildung (Bild 5). Enolphosphate und Acylphosphate sind sog. energiereiche Verbindungen, bei denen die freie Energie der Hydrolyse der Bindung zur Phosphorsäure in der gleichen Größenordnung liegt wie im ATP. Charakteristisch für die unter dem Begriff Substratphosphorylierung zusammengefassten Reaktionen ist die Speicherung der Energie einer exergonen Reaktion in Form einer energiereichen Phosphatverbindung, von der aus der Phosphatrest in einer nachgeschalteten Reaktion auf ADP übertragen

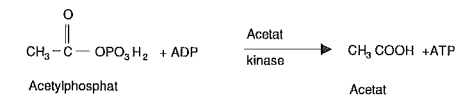
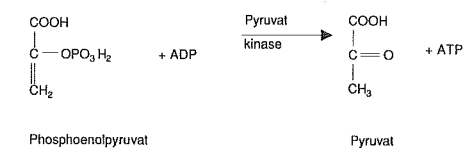
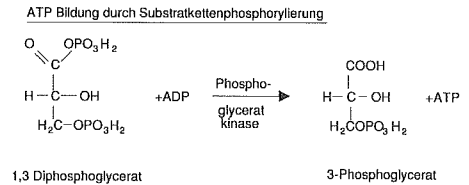
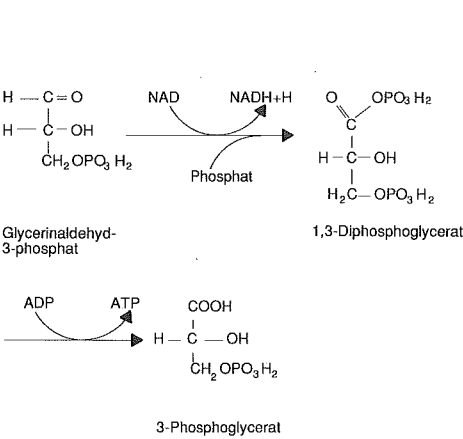


Bild 4 ATP-Synthese bei der Oxidation von Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu 3-Phosphoglycerat

Fig. 4 ATP synthesis during the oxidation of glyceraldehyde-3-phosphate to 3-phosphoglycerate

Bild 5 Reaktionen, die zur Substratkettenphosphorylierung führen

Fig. 5 Reactions leading to substrate-level-phosphorylations

werden kann. Substratkettenphosphorylierungen finden unter der Katalyse löslicher Enzyme im Cytoplasma statt.

## 5 Energiekonservierung durch anaerobe Atmung.

Alle anderen zur Biosynthese von ATP führenden Reaktionen laufen in den Membranen ab und sind strikt von einer in sich geschlossenen Membran abhängig. Im Zuge der Elektronentransport-Phosphorylierung wird die freie Energie einer Oxidationsreaktion von Komponenten der Atmungskette genützt, um einen elektrochemischen Protonengradienten über die Membran aufzubauen. Dieser Protonengradient dient der ebenfalls in der Membran verankerten

ATPase als Triebkraft für die Synthese von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat. Dieser in Bild 6 dargestellte Vorgang folgt einer Theorie von Peter Mitchell, die lange Zeit heftig umstritten war, heute aber allgemein akzeptiert und durch viele experimentelle Befunde belegt ist.

In vielen anaeroben Bakterien wird ATP nach einem ähnlichen Mechanismus synthetisiert. Der wesentliche Unterschied zu den aeroben Artgenossen besteht darin, dass der Sauerstoff bei den Anaerobiern durch andere terminale Elektronenacceptoren ersetzt ist. So benutzen beispielsweise die Sulfat reduzierenden Bakterien Sulfat und die methanogenen Bakterien  $\text{CO}_2$  als terminalen Elektronenacceptor. Andere Elektronenacceptoren anaerober Bakterien sind z. B. Fumarat, Schwefel, Dimethylsulfoxid und Trimethylamin N-oxid. In diesen anaeroben Atmungsketten wird ganz analog zur Atmung mit  $\text{O}_2$  ein elektrochemischer Protonengradient über die Membran aufgebaut, der von der ATPase als Triebkraft für die endergone ATP-Synthese benutzt wird. Auf Bild 7 sind die Redoxpotentiale einiger für die anaerobe Atmung wichtiger Elektronenacceptoren wiedergegeben. Man erkennt daraus, dass es sich bei den anaeroben Elektronenacceptoren Nitrat, Fumarat,  $\text{CO}_2$  und Schwefel im Vergleich zum Sauerstoff um sehr viel schwächere Oxidationsmittel handelt. Deshalb liefert die Oxidation eines Elektronendonors wie NADH oder  $\text{H}_2$  mit den anaeroben

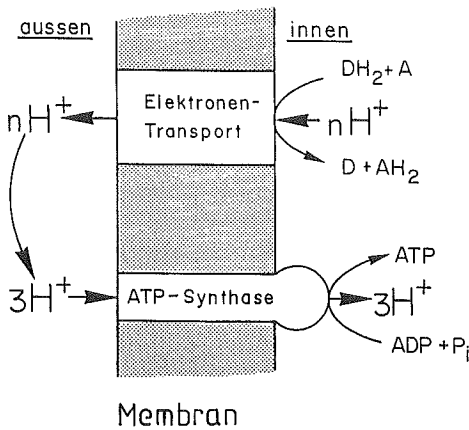


Bild 6 Schema der Elektronentransport-Phosphorylierung. Von der Atmungskette wird ein elektrochemischer Protonengradient über die Membran aufgebaut, der von der ATPase (ATP-Synthase) als Triebkraft für die ATP-Synthese verwendet wird

Fig. 6 Scheme of the electron transport phosphorylation. An electrochemical proton gradient across the membrane is generated by the respiratory chain, which is used by the ATPase (ATP synthase) as driving force for ATP synthesis

Halbreaktion	$E^{\circ}$ mV
$H^+/H_2$	-410
NAD/NADH	-320
$S/HS^-$	-270
$CO_2/CH_4$	-244
Fumarat/Succinat	+ 33
$NO_3^-/NO_2^-$	+433
$O_2/H_2O$	+818

Bild 7 Redoxpotentiale einiger biologisch wichtiger Redoxreaktionen

Fig. 7 Redoxpotentials of some biologically important redox reactions

Elektronenacceptoren sehr viel geringere Energiebeträge als mit  $O_2$ , und deshalb ist auch die durch anaerobe Atmung gebildete Menge ATP sehr viel kleiner.

An dem Bakterium *Wolinella succinogenes* ist der Mechanismus der Bildung eines elektrochemischen Protonengradienten durch anaerobe Atmung und dessen Verwendung zur ATP-Synthese gut untersucht worden (A. Kröger, 1987). Wenn das Bakterium mit Formiat als Elektronendonator und Fumarat als Elektronenacceptor wächst, dann enthält es auf der Aussenseite der Membran eine Formiat Dehydrogenase und auf der Innenseite eine Fumarat Reduktase. In Bild 8 ist gezeigt, dass die Elektronen der Formiat Oxidation von der Formiat Dehydrogenase über Menachinon quer über die Membran zur Fumarat Reduktase gelangen, von wo sie dann unter Bildung von Succinat auf Fumarat übertragen werden. Durch diese Elektronenverschiebung über die Membran hinweg wird ein aussen positives und innen negatives Membranpotential aufgebaut. Man sieht ausserdem, dass bei der Formiat Oxidation an der Aussenseite der Membran Protonen freigesetzt werden, während Protonen an der Innenseite der Membran zur Fumarat Reduktion verbraucht werden. Insgesamt entsteht also ein elektrochemischer Protonengradient ( $H^+_{\text{ausseen}} > H^+_{\text{innen}}$ ). Dieser Protonengradient dient der ebenfalls in der Membran verankerten ATPase als Triebkraft für die ATP-Synthese.

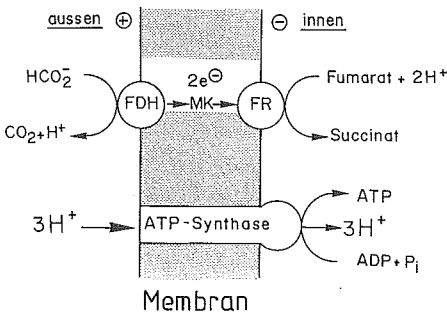


Bild 8 Mechanismus der Bildung eines elektrochemischen Protonengradienten mit einer Atmungskette aus Formiat Dehydrogenase und Fumarat Reduktase

Fig. 8 Mechanism of the formation of an electrochemical proton gradient with a respiratory chain composed of formate dehydrogenase and fumarate reductase

Bei dieser Gelegenheit möchte ich noch auf einige Besonderheiten des anaeroben Stoffwechsels hinweisen. Wir haben gesehen, dass die Fumaratreduktion mit Formiat freiwillig abläuft und dabei auch noch Energie liefert. Andererseits ist die Oxidation von Succinat zu Fumarat ein ganz normaler Schritt des Citronensäurecyclus. Diese Reaktion läuft jedoch nur mit  $O_2$  als Oxidationsmittel freiwillig ab. Mit Schwefel als Elektronenacceptor ist die Succinatoxidation dagegen endergon. Trotzdem kann *Desulfuromonas acetoxidans* Acetat über den Citronensäurecyclus mit Schwefel als Elektronenacceptor oxidieren. Der kritische Schritt dabei ist die endergone Oxidation von Succinat mit Schwefel. Zur Überwindung der Energiebarriere wird der elektrochemische Protonengradient herangezogen, der unter ATP Hydrolyse aufgebaut wird; bei der Succinatoxidation werden, wie in Bild 9 gezeigt, Protonen in



Richtung ihres Gradienten in die Zelle aufgenommen. Man spricht hier von einem umgekehrten Elektronentransport, weil die Elektronen hier entgegen ihrer Vorzugsrichtung unter Energiezufuhr von dem Substratpaar mit positiverem zu dem mit negativerem Redoxpotential fließen (R. K. Thauer, 1988).

Das Zusammenleben mehrerer anaerober Bakterien mit aufeinander abgestimmten Stoffwechselleistungen ist eine andere geniale Lösung energetischer Probleme. So ist die freie Energie der Ethanoloxidation zu Acetat und  $H_2$  unter Standardbedingungen mit  $\Delta G^{O'} = +9.6 \text{ kJ/Mol}$  endergon, wird aber bei Verringerung der  $H_2$ -Konzentration auf sehr kleine Werte exergon. Deshalb können die Ethanol oxidierenden Bakterien nur in enger Symbiose mit Methanbakterien leben, die den Wasserstoff verbrauchen, um Methan zu bilden, und ihn dabei auf sehr niedriger Konzentration halten. Das Leben dieser Bakterien ist daher wie in Bild 10 gezeigt auf den  $H_2$ -Transfer zwischen den beiden Spezies angewiesen (M. J. Wolin und T. L. Miller, 1982).

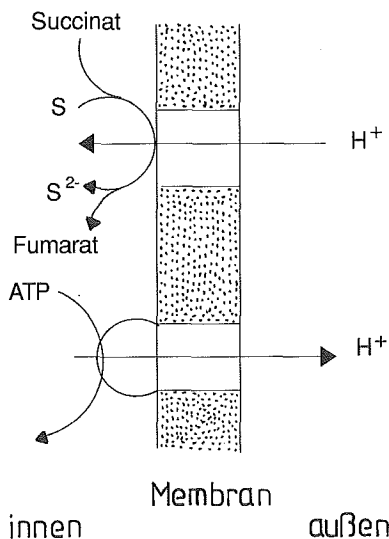
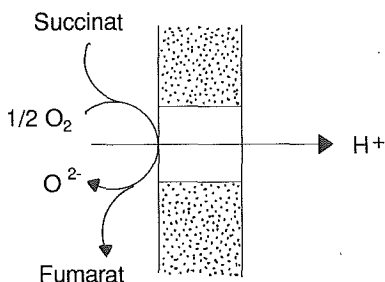


Bild 9 Schematische Darstellung der Succinat-Oxidation mit  $O_2$ , die zum Aufbau eines elektrochemischen Protonengradienten führt, und der Succinat-Oxidation mit S, die von einem unter ATP Hydrolyse gebildeten Protonen-Gradienten angetrieben wird

Fig. 9 Schematic drawing of succinate oxidation with  $O_2$ , leading to the generation of an electrochemical gradient of protons and of succinate oxidation with S which is driven by a proton gradient generated by ATP hydrolysis

## 6 Energiekonservierung mit Membran-gebundenen Decarboxylasen.

Vor etwa 10 Jahren habe ich einen weiteren Energiekonservierungsmechanismus in anaeroben Bakterien entdeckt (P. Dimroth, 1987). Bei diesem wird nicht die Energie von Oxidationsreaktionen, sondern die der Decarboxylierung bestimmter aktivierter Carbonsäuren konserviert. Als Beispiel ist in Bild 11 der Mechanismus der Energiekonservierung durch Oxalacetat Decarboxylase in *Klebsiella pneumoniae* wiedergegeben. Dieses ist das zweite Enzym des anaeroben Citratabbaus; es ist in der Cytoplasmamembran des Bakteriums lokalisiert. Die freie Energie der Decarboxylierung von Oxalacetat zu Pyruvat ( $\Delta G^{\circ} = -28 \text{ kJ/Mol}$ ) wird verwendet, um  $\text{Na}^+$ -Ionen aus dem Cytoplasma nach aussen zu pumpen. Der so gebildete elektrochemische  $\text{Na}^+$ -Gradient dient den Bakterien als Triebkraft für die Aufnahme des Wachstumssubstrats Citrat in die Zelle. In unserem Labor beschäftigen wir uns eingehend mit der Struktur und der Funktion der Oxalacetat Decarboxylase und anderer verwandter  $\text{Na}^+$ -translozierender Decarboxylasen. Wir haben einige dieser Decarboxylasen vollständig gereinigt und bezüglich ihrer strukturellen und funktionellen Eigenschaften

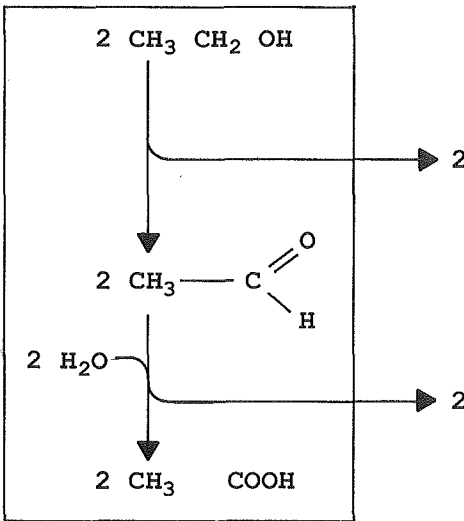


Bild 10 Wasserstoffübertragung zwischen verschiedenen Spezies. Der Verbrauch des  $\text{H}_2$  von dem methanogenen Bakterium ermöglicht die Oxidation von Ethanol durch den S-Organismus

Fig. 10 Hydrogen transfer between different species. The consumption of  $\text{H}_2$  by the methanogenic bacterium allows the oxidation of ethanol by the S-organism

### S-Organismus

untersucht. Ein Funktionsmodell der Oxalacetat Decarboxylase ist auf Bild 12 gezeigt (P. Dimroth, 1990). Die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten des Enzyms sind fest in der Membran verankert und über Protein-Protein-Wechselwirkung mit der ins Cytoplasma hereinragenden  $\alpha$ -Untereinheit verbunden. Der Katalysemechanismus beginnt mit der Übertragung der Carboxylgruppe des Oxalacetats auf die prosthetische Gruppe Biotin, die an die  $\alpha$ -Untereinheit gebunden ist. Dabei entsteht das Produkt Pyruvat. Hieran schliesst sich die von der  $\beta$ - oder ( $\beta+\gamma$ )-

Untereinheit katalysierte Decarboxylierung des Carboxybiotinenzyms an. Dieser Schritt ist vermutlich über eine Konformationsänderung des Enzyms an den Transport von  $\text{Na}^+$ -Ionen aus dem Cytoplasma ins Periplasma gekoppelt. Zukünftige Untersuchungen an diesem System verfolgen das Ziel, an diesem relativ einfachen Modell den molekularen Mechanismus der Kopplung zwischen der vektorialen Kationentranslokation durch die Membran und der chemischen Decarboxylierungsreaktion aufzuklären.

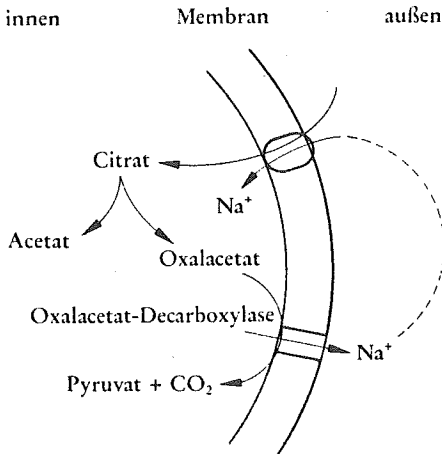


Bild 11  $\text{Na}^+$ -Cyclus in *Klebsiella pneumoniae*. Von Oxalacetat Decarboxylase nach aussen gepumpte  $\text{Na}^+$ -Ionen werden benutzt, um Citrat aktiv in die Zellen aufzunehmen

Fig. 11  $\text{Na}^+$  cycle in *Klebsiella pneumoniae*. Sodium ions pumped outwards by oxaloacetate decarboxylase are used for the active transport of citrate into the cells

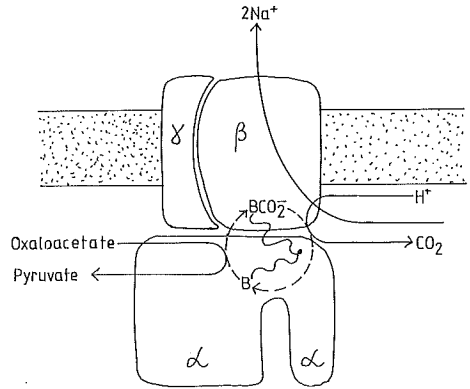


Bild 12 Struktur-Funktions-Modell von Oxalacetat Decarboxylase. Die  $\alpha$ -Untereinheit katalysiert die  $\text{CO}_2$ -Übertragung von Oxalacetat auf die prosthetische Gruppe Biotin. Der  $\text{Na}^+$ -Transport ist an die Decarboxylierung des Carboxybiotins durch die  $\beta$ - (oder  $\beta+\gamma$ )-Untereinheiten gekoppelt

Fig. 12 Structural-functional model of oxaloacetate decarboxylase. The  $\alpha$ -subunit catalyzes the  $\text{CO}_2$ -transfer from oxaloacetate to the prosthetic group biotin. The transport of  $\text{Na}^+$  is coupled to the decarboxylation of the carboxybiotin by the  $\beta$ - (or  $\beta+\gamma$ )-subunits

In *Propionigenium modestum* stellt der von der verwandten Methylmalonyl-CoA Decarboxylase gebildete  $\text{Na}^+$ -Gradient die einzige Energiequelle dar, die diesem Bakterium zur ATP-Synthese zur Verfügung steht (W. Hilpert et al., 1984). Ein Schema des Energiestoffwechsels dieses strikt anaeroben Bakteriums ist auf Bild 13 zu sehen (P. Dimroth, 1990). Succinat wird von der Zelle aufgenommen und nach Aktivierung zum Thioester zu Methylmalonyl-CoA umgelagert. Dessen Decarboxylierung zu Propionyl-CoA mittels einer Membran-gebundenen Decarboxylase führt zum Aufbau eines elektrochemischen  $\text{Na}^+$ -Gradienten, der von einer ATPase direkt als Energiequelle für die ATP-Synthese genutzt wird. Dies ist das erste Beispiel für eine chemiosmotische

ATP-Synthese durch einen  $\text{Na}^+$ -Cyclus anstelle des üblichen Protonenkreislaufs. Besonders interessant ist die enge strukturelle und funktionelle Verwandtschaft der *P. modestum* ATPase zu den Protonen-translozierenden ATPasen anderer Bakterien sowie aus Mitochondrien und Chloroplasten. Die Untersuchungen führen zu dem Schluss, dass das  $\text{Na}^+$  im Katalysemechanismus der *P. modestum* ATPase genau die gleiche Funktion ausübt wie die Protonen bei den  $\text{H}^+$ -translozierenden ATPasen. Durch diese Erweiterung der Kationenspezifität werden alle ATP-Synthese-Mechanismen widerlegt, die eine spezifisch von Protonen auszuübende Funktion erfordern (W. Laubinger and P. Dimroth, 1987, 1988, 1989).

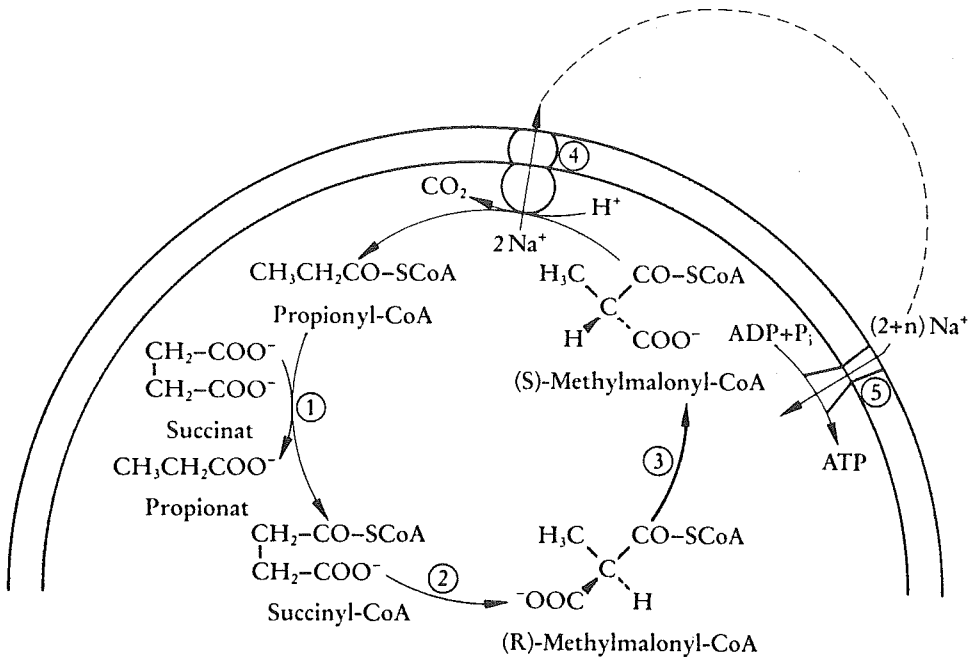


Bild 13 Energie-Metabolismus von *Propionigenium modestum* mit einem  $\text{Na}^+$ -Cyclus als Bindeglied zwischen der exergonen Decarboxylierung von Methylmalonyl-CoA und der endergonen ATP-Synthese. Die am Stoffwechsel beteiligten Enzyme sind: 1 = Propionyl-CoA-Succinat-CoA-Transferase; 2 = Methylmalonyl-CoA-Mutase; 3 = Methylmalonyl-CoA-Racemase; 4 = Methylmalonyl-CoA-Decarboxylase; 5 = ATP-Synthase (ATPase)

Fig. 13 Energy metabolism of *Propionigenium modestum* with a  $\text{Na}^+$  cycle connecting the exergonic decarboxylation of methylmalonyl-CoA to endergonic ATP synthesis. The enzymes involved in the metabolism are: 1 = propionyl-CoA-succinate-CoA-transferase; 2 = methylmalonyl-CoA-mutase; 3 = methylmalonyl-CoA-racemase; 4 = methylmalonyl-CoA-decarboxylase; 5 = ATP-synthase (ATPase)

Es gibt noch einen anderen interessanten Aspekt des Mechanismus der ATP-Synthese in *P.modestum*. Aus bioenergetischer Sicht stösst die durch Decarboxylierung von Methylmalonyl-CoA getriebene Bildung von ATP auf Schwierigkeiten, wenn man eine 1:1-Stöchiometrie zugrunde legt. Die freie Energie der Decarboxylierung ist nämlich mit etwa  $-30$  kJ/Mol mindestens um ein Drittel zu niedrig, um unter physiologischen Bedingungen den Energiebedarf für die Knüpfung der Anhydridbindung im ATP decken zu können. Aus diesem Grund ist bei derartig niedrigen Energiespannen eine Substratketten-Phosphorylierung mit einer 1:1-Stöchiometrie ausgeschlossen. Bei einem chemiosmotischen Mechanismus kann dagegen die Energie der Decarboxylierung von mehr als einem Mol Methylmalonyl-CoA gespeichert und zur ATP-Synthese genutzt werden, wenn den beiden Energie-transformierenden Systemen eine unterschiedliche Stöchiometrie bezüglich des Kopplungs-Ions zugrunde liegt. Nehmen wir z. B. an, dass bei der Decarboxylierung von einem Mol Methylmalonyl-CoA zwei Mol  $\text{Na}^+$ -Ionen durch die Membran gepumpt werden und in dem gebildeten Gradienten die freie Energie von  $30$  kJ gespeichert wird. Bei Durchtritt von vier statt zwei Mol  $\text{Na}^+$ -Ionen durch die Membran würden unter Beibehaltung des elektrochemischen Potentials  $60$  statt  $30$  kJ freigesetzt, womit die Synthese von ATP energetisch möglich würde. Mit dem vektoriellen Kopplungsmechanismus kann daher die für die Synthese von einem Mol ATP erforderliche Energie aus dem Umsatz von mehr als einem Mol des Energie-liefernden Substrats bezogen werden. Anaerobe Bakterien können deshalb sogar dann wachsen, wenn aus dem Umsatz von einem Mol Substrat nicht genug Energie herauskommt, um damit ein ganzes Mol ATP zu bilden. Das kleinste Quantum biologisch nutzbarer Energie wird deshalb auch nicht von der ATP-Hydrolyse bestimmt, sondern von einem einzelnen Ion, das einen Gradienten über eine Membran bildet (P. Dimroth, 1987).

## 7 Transport-gekoppelte Konservierung von Decarboxylierungsenergie.

Anaerobe Bakterien können von der Decarboxylierungsenergie auch noch auf andere Weise profitieren. In dem Oxalat-vergärenden Bakterium *Oxalobacter formigenes* erfolgt die Aufnahme von Oxalat in die Zelle durch einen strikten Gegentausch gegen das Endprodukt Formiat (Bild 14) (V. Anantharam et al., 1989). Da dabei 2 negative Ladungen nach innen aber nur eine nach aussen transloziert werden, führt dies zum Aufbau eines innen negativen Membranpotentials, das den Bakterien als Triebkraft für die ATP-Synthese dient. Die exergone Decarboxylierung von Oxalat zu Formiat bewirkt, dass die intrazelluläre Konzentration an Oxalat relativ gering und die an Formiat relativ gross ist. Da auf der Aussenseite umgekehrte Konzentrationsverhältnisse herrschen, kann *Oxalobacter* mit Hilfe des Oxalat/Formiat-Austauschers ein Membranpotential aufbauen und somit Energie für die ATP-Synthese bereitstellen.

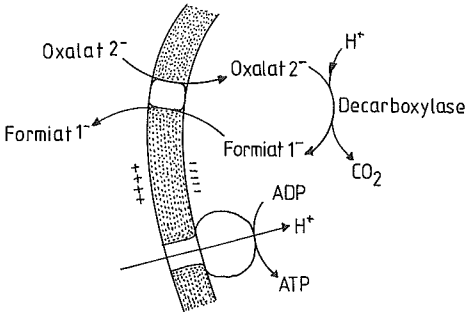


Bild 14 Energie-Metabolismus von *Oxalobacter formigenes*. Durch den elektrogenen Oxalat $^{2-}$ :Formiat $^{1-}$ -Austausch wird ein Membranpotential aufgebaut, das die Basis bildet für die ATP-Synthese mit einer Membran-gebundenen ATPase.

Fig. 14 Energy metabolism of *Oxalobacter formigenes*. The electrogenic exchange of oxalate $^{2-}$  for formate $^{1-}$  builds up a membrane potential, which is the basis for ATP synthesis with a membrane-bound ATPase

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass trotz der ungeheuer vielfältigen Stoffwechselleistungen der Bakterien sich nur wenige Mechanismen entwickelt haben, nach denen die Stoffwechselenergie konserviert und zur ATP-Synthese verwendet werden kann. Viele anaerobe Bakterien erzeugen ihr ATP ausschliesslich durch Substratkettenphosphorylierung. Andere benutzen statt dessen oder ausserdem eine Elektronentransportkette, durch die ein elektrochemischer Protonengradient aufgebaut wird, der der Membran-gebundenen ATPase als Triebkraft dient. Als drittes können anaerobe Bakterien sich der Decarboxylierungsenergie bedienen und diese entweder mit einer Membran-gebundenen Decarboxylase direkt in einen  $Na^+$ -Gradienten umwandeln, der dann für die ATP-Synthese benutzt wird; oder die Decarboxylierungsenergie kann dazu dienen, einen Konzentrationsgradienten von zweifach negativ geladenem Substrat und nur einfach negativ geladenem Produkt über die Membran aufzubauen. Durch Gegentauch dieser unterschiedlich geladenen Anionen entsteht daher ein Membranpotential, das von einer ATPase als Energiequelle für die Synthese von ATP verwendet wird.

Ich habe hier den Versuch unternommen, einen kleinen Einblick zu geben in das faszinierende Potential, das den anaeroben Bakterien zur Energiekonservierung zur Verfügung steht und das ihnen ein Wachstum unter Ausnutzung sehr geringer Energiespannen möglich macht. Ich bin davon überzeugt, dass die Beschäftigung mit der Energiekonservierung in anaeroben Bakterien nicht nur für kuriose Entdeckungen gut ist, sondern zu Erkenntnissen führt, die von generellem biologischen Interesse sind.

## 8 Literatur

- Anantharam, V., Allison, M. J. and Maloney, P. C. (1989): Oxalate: formate exchange. *J. Biol. Chem.* *264*, 7244–7250.
- Dimroth, P. (1987): Sodium ion transport decarboxylases and other aspects of sodium ion cycling in bacteria. *Microbiol. Rev.* *51*, 320–340.
- Dimroth, P. (1990): Mechanisms of sodium transport in bacteria. *Phil. Trans. R. Soc. Lond B* *326*, 465–477.
- Hilpert, W., Schink, B. and Dimroth, P. (1984): Life by a new decarboxylation-dependent energy conservation mechanism with  $\text{Na}^+$  as coupling ion. *EMBO J.* *3*, 1665–1670.
- Kröger, A. (1987): ATP-Synthese bei anaeroben Bakterien mit energiearmen Substraten. *Forum Mikrobiologie* *10*, 487–493.
- Laubinger, W. and Dimroth, P. (1987): Characterization of the  $\text{Na}^+$ -stimulated ATPase of *Propionigenium modestum* as an enzyme of the  $\text{F}_1\text{F}_0$ -type. *Eur. J. Biochem.* *168*, 475–480.
- Laubinger, W. and Dimroth, P. (1988): Sodium ion translocating ATP synthase of *Propionigenium modestum*. *Biochemistry* *27* 7531–7537.
- Laubinger, W. and Dimroth, P. (1989): Proton pumping by the  $\text{Na}^+$ -ATPase of *Propionigenium modestum*. *Biochemistry* *28*, 7194–7198.
- Thauer, R. K. (1988): Citric-acid cycle, 50 years on. *Eur. J. Biochem.* *176*, 497–508.
- Wolin, M. J. and Miller, T. L. (1982): Interspecies hydrogen transfer: 15 years later. *ASM News* *48*, 561–565.