

Halobakterien – Leben ohne Sauerstoff

Lichtenergieumwandlung und Farbunterscheidung durch Retinalpigmente

Von Gottfried Wagner

Das halophile Archaeobakterium *Halobacterium halobium* gehört zu einer Gruppe hochspezialisierter Mikroorganismen. Archaeobakterien existierten bereits im Erdaltertum, noch bevor sich die Reiche der Pro- und Eukaryoten voneinander getrennt hatten. Sie überlebten bis heute an Extremstandorten, wo sie dem Konkurrenzdruck anderer Organismen weitgehend entzogen sind. Aufgrund dieser Umweltbedingungen waren sie zur Entwicklung spezifischer Anpassungsstrategien gezwungen. Halobakterien zeigen außergewöhnliche Stoffwechselleistungen in Anpassung an die besiedelten Standorte. (Siehe auch Spiegel der Forschung Nr. 2; S. 40–42.) Ihre natürlichen Lebensräume sind z. B. austrocknende Küstenstreifen tropischer und subtropischer Meere oder Salinen. Diese Biotope zeichnen sich neben dem hohen Salzgehalt durch intensive Sonnenbestrahlung aus.

Die starke Sonneneinstrahlung bedingt niedrige Sauerstoffkonzentration in den auf etwa 40 °C erwärmten Salzlösungen. Eine Regulation des zellulären Ionenhaushalts ist für Halobakterien wegen der extremen Salzkonzentrationen in ihren Lebensräumen besonders wichtig. Vermutlich waren es Sauerstoffmangelbedingungen, die die Halobakterien zur Entwicklung lichtgetriebener Ionenpumpen zwangen. Sie reichern selektiv bestimmte Ionen im Zellinneren an und pumpen andere Ionen nach außen. Dadurch schaffen die Ionenpumpen die lebensnotwendigen Konzentrationsunterschiede über der Bakterienmembran.

Diese Ionengradienten zwischen innen und außen dienen als Triebkraft zur Aufnahme von Aminosäuren, zur Regulation des Ionenhaushalts und zur Synthese von Energieäquivalenten (ATP). Die Wirksamkeit der Lichtenergieumwandlung halobakterieller Ionenpumpen liegt im gleichen Größenordnungsbereich wie die der Photosynthese grüner Pflanzen und erstreckt sich über einen weiten Intensitätsbereich der Sonneneinstrahlung von diffusem Tageslicht bis zu extremer Sonnenbelastung.

Die Bedeutung dieser Lichtenergieumwandlung wird auch dadurch unterstrichen, daß die Bakterien zur aktiven Akkumulation im bioenergetisch nutzbaren Licht befähigt sind. Gelb-Orange-Licht wirkt auf die schwimmenden Bakterien als Lockreiz und Blau-UV-Licht wirkt als Fluchtreiz. Angetrieben werden sie bei ihren Schwimmbewegungen durch schraubig gewundene Geißeln.

Retinalproteine als Photorezeptoren

Sowohl lichtgetriebener Ionentransport als auch Photosensorik sind Funktionen von Retinalpigmenten (Rhodopsinen), die als integrale Proteine in die Zellmembran eingebaut sind. Die Rezeptoren der halobakteriellen Lichtenergieumwandlung und Lichtwahrnehmung gehören also zur gleichen Stoffklasse wie der Sehpurpur des menschlichen Auges.

Bisher sind drei Retinalproteine in der Membran der Halobakterien identifiziert worden. Bacteriorhodopsin (BR) und Halorhodopsin (HR) fungieren als lichtgetriebene Ionenpumpen, Sensorhodopsin (SR) vermittelt die lichtgesteuerten Schwimmreaktionen.

Die drei Retinalpigmente BR, HR und SR durchlaufen nach Lichtabsorption jeweils einen Photozyklus, der ohne weitere Energiezufuhr zum Grundzustand zurückführt. Im Verlauf dieser zyklischen Molekülumlagerungen wird vom BR ein Proton vom Zellinneren ins Außenmedium gepumpt und vom HR-Molekül ein Chlorid-Ion von außen ins Zellinnere aufgenommen. Das SR zeigt keine meßbare Ionentransportfunktion.

Die Zwischenzustände der Moleküle beim Photozyklus sind teilweise ebenfalls photoaktiv. Sie absorbieren Licht in einem anderen Spektralbereich als der Grundzustand des Rhodopsins und modulieren so die spezifische Aktivität des Pigments (Photochromie). Die Retinalproteine zeigen im Grundzustand Absorptionsmaxima für Gelb-Orange-Licht, während photoaktive Zwischenzustände Blau-UV-Licht absorbieren.

Blau-UV-Licht führt zu folgender spezifischer Modulation der jeweiligen Pigmentaktivität im Orange-Licht:

- HR – Förderung der spezifischen Pumpaktivität
- BR – Senkung der spezifischen Pumpaktivität
- SR – Umkehr der Geißelrotationsrichtung

Die Modulation der Pigmentaktivität über die Blau-Licht-Absorption photoaktiver Zwischenzustände ermöglicht den halobakteriellen Rhodopsinen die Unterscheidung verschiedener Farben mit einem Pigment.

Lichtenergieumwandlung und sekundäre Ionenflüsse

Ein Modell der halobakteriellen Zellmembran ist in Bild 1 dargestellt. Die Membrankomponenten der Bakterien spiegeln die besonderen Anforderungen ihrer Umwelt wi-

der. Die ATP-Synthese der Zellen wird durch einen Protonengradienten angetrieben (pmf = proton motive force). Dieser Gradient wird beispielsweise von der Atmungskette erzeugt, die unter Sauerstoffverbrauch Protonen nach außen pumpt. Unter Sauerstoffmangel wird vermehrt Bacteriorhodopsin synthetisiert, das als lichtgetriebene elektrogene Protonenpumpe ebenfalls pmf aufbaut. Die Energie des Protonengradienten wird durch eine ATPase für die Zelle nutzbar gemacht. Dieser bisher einzige bekannte Mechanismus zur biologischen Energiegewinnung aus Licht ohne Chlorophyll wurde 1971 von Oesterhelt und Stoeckenius entdeckt. ATP-Synthese und pH-Änderungen bieten geeignete Parameter, mit deren Hilfe wir unter anaeroben Bedingungen die direkte Energiegewinnung aus Licht in den Zellen untersuchen können.

Natrium-Ionen, die den Hauptanteil der Kationen in austrocknenden Küstenstreifen stellen, sind selbst für die salzadaptierten Halobakterien intrazellulär unerwünscht. Deshalb verfügen die Halobakterien über ein wirkungsvolles Na⁺-Exportsystem, das über einen Einstrom von Protonen angetrieben wird (Na⁺/H⁺-Antiport). Ein erheblicher Teil der protonentreibenden Kraft wird zu diesem Zweck von der ATP-Synthese abgezweigt. Die Na⁺-Konzentration in den Zellen bestimmen wir mit Hilfe von Atomabsorptionsspektroskopie. Der unter Energieaufwand aufrecht erhaltene Natriumgradient wird seinerseits wieder energetisch genutzt. Der Rückstrom von Na⁺ in die Zelle ist mit dem Transport von Aminosäuren gekoppelt (Na⁺/Aminosäure-Symport). Aminosäuren stellen die wichtigste Nährstoffquelle der Halobakterien dar. Sie sind wegen des Absterbens nicht-halotoleranter Organismen bei Anstieg der Salinität im Biotop reichlich vorhanden.

Zur Osmoregulation und zum Ladungsausgleich beim Na⁺-Export zeigen Halobakterien einen selektiven Einstrom von Kalium-Ionen, die bis zu einer Konzentration von 3 Mol pro Liter angereichert werden. Die

K^+ -Aufnahme wird durch spezifische Kanäle vermittelt und vom Membranpotential angetrieben. Eine weitere Funktion des akkumulierten Kaliums wird sichtbar, wenn sowohl die oxidative als auch die Photophosphorylierung ausgeschaltet werden. Da die Zellmembran für Kalium nur schwer zu durchdringen ist, stellt der K^+ -Konzentrationsgradient zwischen Innenraum und Außenmedium ein nutzbares Ionendiffusionspotential dar. Der langsame K^+ -Ausstrom treibt noch mehrere Stunden über die pmf die ATP-Synthase. K^+ -Ströme können durch selektive Elektroden gemessen werden.

Halobakterien erhalten im Zellinneren eine Chloridkonzentration von etwa 4 Mol pro Liter aufrecht, die für Wachstum und Funktion der Zelle notwendig ist. Chloridtransport ist nur unter Energieaufwand möglich, da Cl^- gegen einen hohen elektrischen Gradienten nach innen gepumpt werden muß. Diese Aufgabe übernimmt die lichtgetriebene Chloridpumpe Halorhodopsin, deren Funktion 1982 von Schobert und Lanyi aufgeklärt wurde. Da HR ebenso wie BR ein elektrogenes Transportsystem ist, leistet es auch einen Beitrag zum Aufbau des Membranpotentials. Chloridtransport wird mit Hilfe von radioaktiv markiertem $^{36}Cl^-$ bestimmt.

Die Fortbewegung der Bakterien wird durch den Protonengradienten energetisiert. Die Geißel wird durch einen H^+ -Einstrom angetrieben.

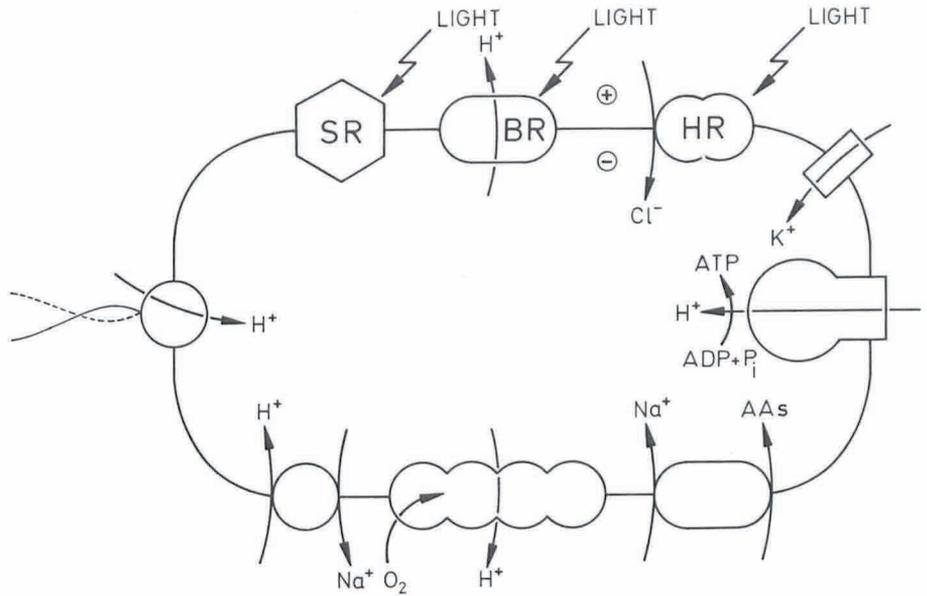


Bild 1: Membranfunktionen zur Bioenergetik und Verhaltensphysiologie von *Halobacterium halobium*. Die eingezeichneten Membrankomponenten umfassen die lichtgetriebene, elektrogene Protonenpumpe Bakteriorhodopsin (BR), die lichtgetriebene, elektrogene Chloridpumpe Halorhodopsin (HR), den Membrankanal für Kalium-Ionen, die Protonen-getriebene reversible ATP-Synthetase, den Natrium-getriebenen Aminosäure-Symport, die Atmungskette und den Protonen-getriebenen Natrium-Antiport; das Vorzeichen elektrischer Membranspannung ist ebenfalls angegeben. Die lichtabhängige Steuerung des Schwimmverhaltens erfolgt über eine noch unbekannte Signalkette zwischen sensorischem Rhodopsin (SR) und dem Protonen-getriebenen Geißelmotor.

Photosensorische Bewegungssteuerung

Die Rotationsrichtung der Geißel wird auch ohne äußere Reizung periodisch umgeschaltet (Spontanreversion), sie arbeitet dabei je nach Drehrichtung als Schub- oder Zuggeißel. Dieses Schwimmverhalten führt ohne äußere Einflüsse zu einer Zufallsverteilung der Bakterien in ihrem Lebensraum. Die Reaktion auf Umweltreize ermöglicht den Halobakterien die Konzentration an für sie besonders günstigen Orten ihres Biotops und die Vermeidung ungünstiger Bereiche. Die Reaktion der Bakterien auf optische und chemische Reize wird seit längerer Zeit an der KFA Jülich von Hildebrand, Dencher und Schimz untersucht.

Lockreize wie Gelb-Orange-Licht werden mit einer Verlängerung der Rotationszeit beantwortet, während Blau-UV-Licht ein Fluchtreiz ist, der zu einer raschen Drehrichtungsänderung der Geißel und somit zur Umkehr des schwimmenden Bakteriums führt.

An der Lichtreaktion ist Sensorrhodopsin (SR) beteiligt, das zuerst von Bogomolni und Spudich beschrieben wurde. SR unterscheidet sich von den beiden Ionenpumpen BR und HR auch durch die lange Dauer des

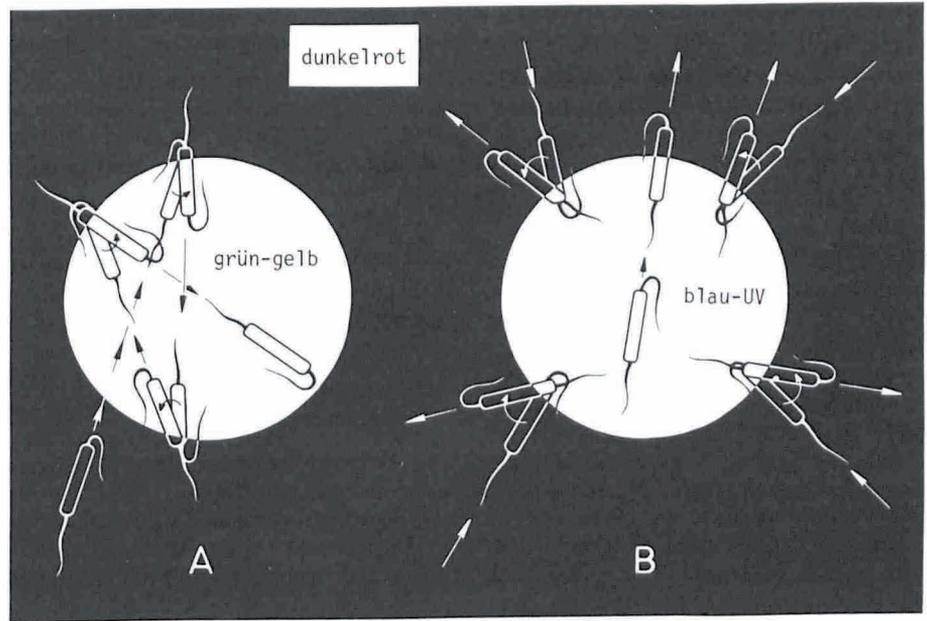


Bild 2: Photosensorisches Verhalten von *Halobacterium halobium*. A) Der Übertritt aus einem Lichtbezirk von photoenergetisch wirksamem grün-gelbem Licht in angrenzendes dunkelrotes Licht wird durch eine schreckartige Umkehr der Geißelrotationsrichtung vermieden; hieraus resultiert ein Rückwärtsschwimmen bis zum erneuten Anstoßen an die Lichtbezirksgrenze. B) Zellschädigende blau-ultraviolette Strahlung wird stärker als dunkelrotes Licht (siehe Bild 4 A) durch schreckartige Umkehr in der Geißelrotationsrichtung und Rückwärtsschwimmen vermieden. Unter natürlichen Biotop-Bedingungen wirken beide Erkennungsmechanismen in einer Form von Farbunterscheidung zusammen, um Halobakterien bei der optimalen Lichtenergie-Nutzung durch Bakteriorhodopsin und Halorhodopsin vor zu hohen UV-Bestrahlungsstärken zu schützen.

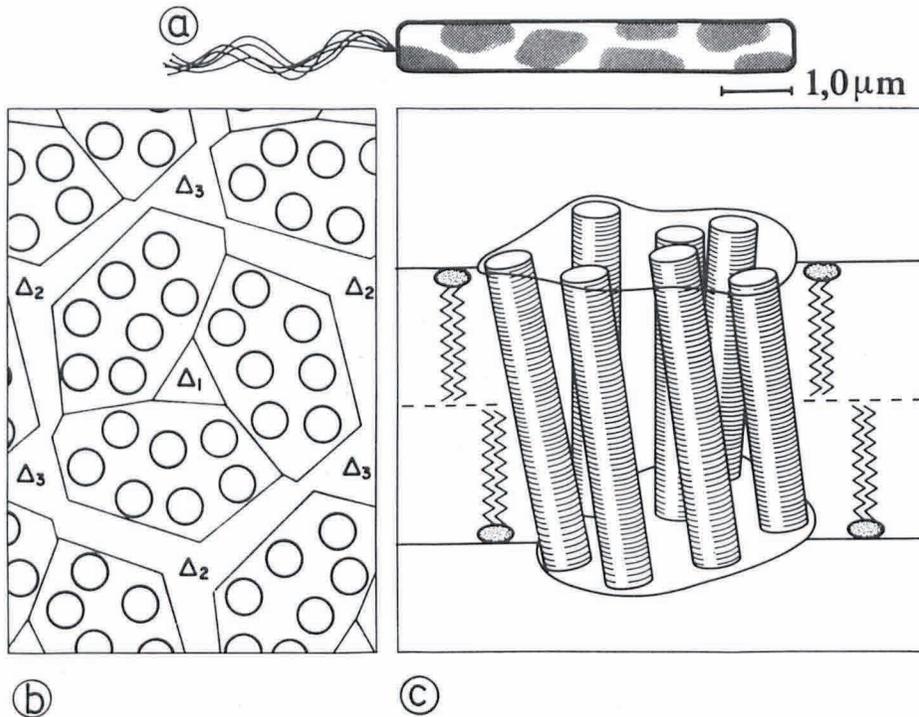


Bild 3a: Schematische Darstellung einer Halobakterien-Zelle mit inselartigen Purpurmembbran-Bereichen und monopolarer Geißelung.

Bild 3b: Die Anordnung von Bacteriorhodopsin in der Purpurmembbran, in Aufsicht leicht schematisiert gezeigt. Jeweils drei Bacteriorhodopsin-Moleküle liegen geordnet nebeneinander und bilden ein Trimer. Jedes Einzelmolekül im Trimer ist aus sieben alpha-helikal gewundenen Kettenabschnitten aufgebaut, die in Aufsicht kreisförmig erscheinen. Die bezifferten Dreiecke kennzeichnen Symmetriezentren im zweidimensional-kristallinen Gitter und liegen maßstabgetreu etwa 6 nm auseinander. Membranlipide füllen die Lücken zwischen den Protein-Trimern.

Bild 3c: Modell eines Bacteriorhodopsin-Moleküls, im senkrechten Schnitt zur Membranebene gezeigt. Membranlipide füllen die Lücken zwischen den alpha-helikal gewundenen, also in Seitenansicht stabförmig erscheinenden, Kettenabschnitten. Gel-Elektrophorese und Aminosäure-Sequenzierung weisen darauf hin, daß die alpha-helices durch Peptidspangen an ihren Enden schleifenartig untereinander verbunden sind.

Photozyklus. Beim SR, das deshalb auch als Slow-Cycling Rhodopsin bezeichnet wird, liegt sie im Sekundenbereich, während BR und HR ihre Photozyklen im Millisekundenbereich durchlaufen. Daß Sensorhodopsin eine wichtige Rolle bei der Photosensorik spielt, gilt als sicher. Dagegen ist noch umstritten, ob es als einziges Pigment die Lichtsteuerung der Schwimmbewegung vermittelt.

In unserem Labor wurde eine Methode entwickelt, die Bakteriengeißeln mechanisch zu kürzen und die Zellen dann mit ihren Geißelstümpfen an präparierte Oberflächen anzuheften. Die Bakterien rotieren an einem Ort, statt frei zu schwimmen. Dies ermöglicht die Beobachtung einzelner Zellen über Stunden hinweg. Über Videoaufzeichnungen können Drehrichtung, Rotationszeit und Rotationsgeschwindigkeit sehr genau erfaßt werden. Über das Verhältnis dieser Größen SPONTAN zu den Größen GEZEIT stehen empfindliche Meßparameter zur Verfügung. Durch aktionsspektrome-

trische Untersuchungen lassen sich spektrale und kinetische Charakteristika der beteiligten Photorezeptoren untersuchen.

Molekülstruktur und Funktion des Bacteriorhodopsins

Das Bacteriorhodopsin setzt sich zusammen aus dem Proteinanteil (dem Opsin) und dem daran kovalent gebundenen Chromophor Retinal. Neben der Aminosäuresequenz des Opsins und der Bindungsstelle des Retinals ist aufgrund von Röntgendiffraktionsexperimenten bekannt, daß sich das Molekül aus sieben alpha-helikalischen Abschnitten aufbaut. Diese sind vollständig in die Membran eingelagert und werden durch nicht-helikale Teile der Proteinkette miteinander verbunden, die in den extra- bzw. intrazellulären Raum hineinragen. In der Membran lagern sich BR-Moleküle zu Trimern zusammen, die sich wiederum zu einem zweidimensional hexagonalen Gitter mit parakristallinen Eigenschaften

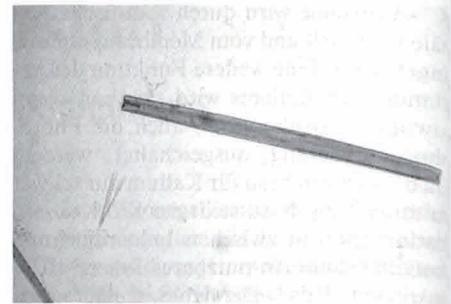


Bild 4: Bacteriorhodopsin-Kristall von 0,35 mm Länge im lichtmikroskopischen Bild. Die Kristallisation erfolgte unter restriktiven Bedingungen aus einer Proteinlösung, die durch Ammoniumsulfat mittels Dampfdiffusion-Technik konzentriert wurde.

anordnen. Diese sogenannte Purpurmembbran kann bis zu 50% der Membranoberfläche in Form von gleichmäßig verteilten, inselartigen Bereichen einnehmen.

Um den Mechanismus der Funktion als Protonenpumpe zu verstehen, ist eine genaue Kenntnis der Tertiärstruktur des BR-Moleküls notwendig. Durch Kristallisation des Proteins ist es möglich, mit Hilfe von Röntgenstrukturanalysen der Kristalle die räumliche Anordnung der Polypeptidkette und damit die Lage der einzelnen Aminosäuren im Molekül zu erkennen. Die hohe Auflösung der Tertiärstruktur erlaubt es, Vorstellungen über den möglichen Weg des Protons durch das Molekül zu entwickeln, die dann (z. B. über site-spezifische Mutationen) experimentell überprüfbar werden. Zur Gewinnung von Bacteriorhodopsin für die Kristallisation wird die Purpurmembbran nach Aufbrechen der Bakterienzellen im Saccharose-Dichtegradienten isoliert. Das Protein wird durch Zusatz von Detergentien aus seiner Lipidumgebung herausgelöst. Aus der übersättigten Proteinlösung aggregieren die Moleküle zu einer geordneten, repetitiven Struktur, dem Kristall. Die Parameter der Wachstumsbedingungen (pH, Temperatur, Ionenstärke, Fällungsmittel usw.) müssen so gewählt werden, daß eine zufällige Aggregation zu amorphen Präzipitaten verhindert wird.

BR-Kristalle, zum ersten Mal von Michel und Oesterhelt gezüchtet, sind hexagonale Säulen mit einer P1-Symmetrie und sieben Moleküle pro kristallographischer Einheitszelle. Ordnungsgrad und Größe der Kristalle (<0,2 mm) reichten bisher jedoch nicht für eine hinreichend hohe Auflösung der Molekülstruktur aus. Nahezu ideale Voraussetzungen für das langsame Wachstum weniger, aber großer und hochgeordneter Kristalle sind – wegen fehlender Konvektion – unter den Mikrogravitationsbedingungen im Weltraum gegeben.