

Lebenskünstler unter glühender Sonne

Halobakterien: Ein Kapitel molekularer Ökologie / Von Gottfried Wagner

Wie herrlich ist dein Aufgang am Rande des Himmels,
o lebender Aton, Ursprung des Lebens!
Wenn du am östlichen Himmel aufsteigst, füllst du
das ganze Land mit deiner Schönheit.
Die Menschen und alles Getier und Pflanzen leben durch
dich; wenn du untergehst, sterben sie, denn du bist die
Lebenszeit selber und man lebt durch dich.

(Aus dem Sonnensang König Echnaton's).

Das Licht der Sonne als Urquell des Lebens war bereits den alten Kulturen bewußt. In literarischer Form umreißt der Sonnensang König Echnaton's einen dominierenden Umweltfaktor, dem sich alle Lebensäußerungen auf der Erde unterordnen durch Anpassungs- und Optimierungsstrategien. Die Energie für Lebensprozesse stammt grundsätzlich von der Sonnenstrahlung, die von photosynthetisierenden Pflanzen und Mikroorganismen aufgenommen und als Teil ihrer Nahrung in zelleigene Energie umgewandelt wird. Aber die Sonne versorgt das Leben auf der Erde nicht nur mit Energie. Sie spielt auch eine entscheidende Rolle für die Orientierung der Organismen in Zeit und Raum. Die Arbeitsgruppe Membran- und Bewegungsphysiologie im Fachbereich Biologie konzentriert sich auf die molekulare Analyse von Mechanismen der Lichtenergie- und der Lichtsignal-Wandlung an biologischen Membranen.

Untersucht werden zwei ausgewählte Mikroorganismen, die bereits in Frühzeiten der Erdgeschichte entstanden sind und aufgrund ihrer Optimierungsstrategien bis in die Gegenwart überleben konnten. Sowohl das Salzwasser-liebende Archaeobakterium *Halobacterium halobium*, auf das hier besonders eingegangen werden soll, als auch die Süßwasseralge *Mougeotia* sind weltweit zu wichtigen Modellorganismen in der Zellbiologie geworden.

Halobakterien haben als biologische Spezialisten extreme Salzstandorte wie das Tote Meer oder Küstenstreifen Kaliforniens, Südafrikas oder Südaustraliens, ja sogar gepökelten Fisch, als Lebensraum erobert. Die Besiedlung dieser Extremstandorte mit Anpassung an hohe Bestrahlungsstärken der Sonne hat das Überleben der Halobakterien seit Urzeiten der Erdgeschichte gesichert, seit Zeiten, in denen die zellzerstörende ultraviolette Sonnen-Strahlung ohne Abschirmung durch eine Ozonschicht auf die Erde traf. Anhand einer spektralen Abtastung des Lichtes nach zellschädigenden bzw. zellnützlichen Komponenten entscheiden Halobakterien mit großer Präzision über ihre Lage im Raum. Wenigstens drei Photorezeptoren arbeiten hier zusammen, die in ihrem chemischen Aufbau dem Sehpurpur der Tiere bis zum Menschen verblüffend ähnlich

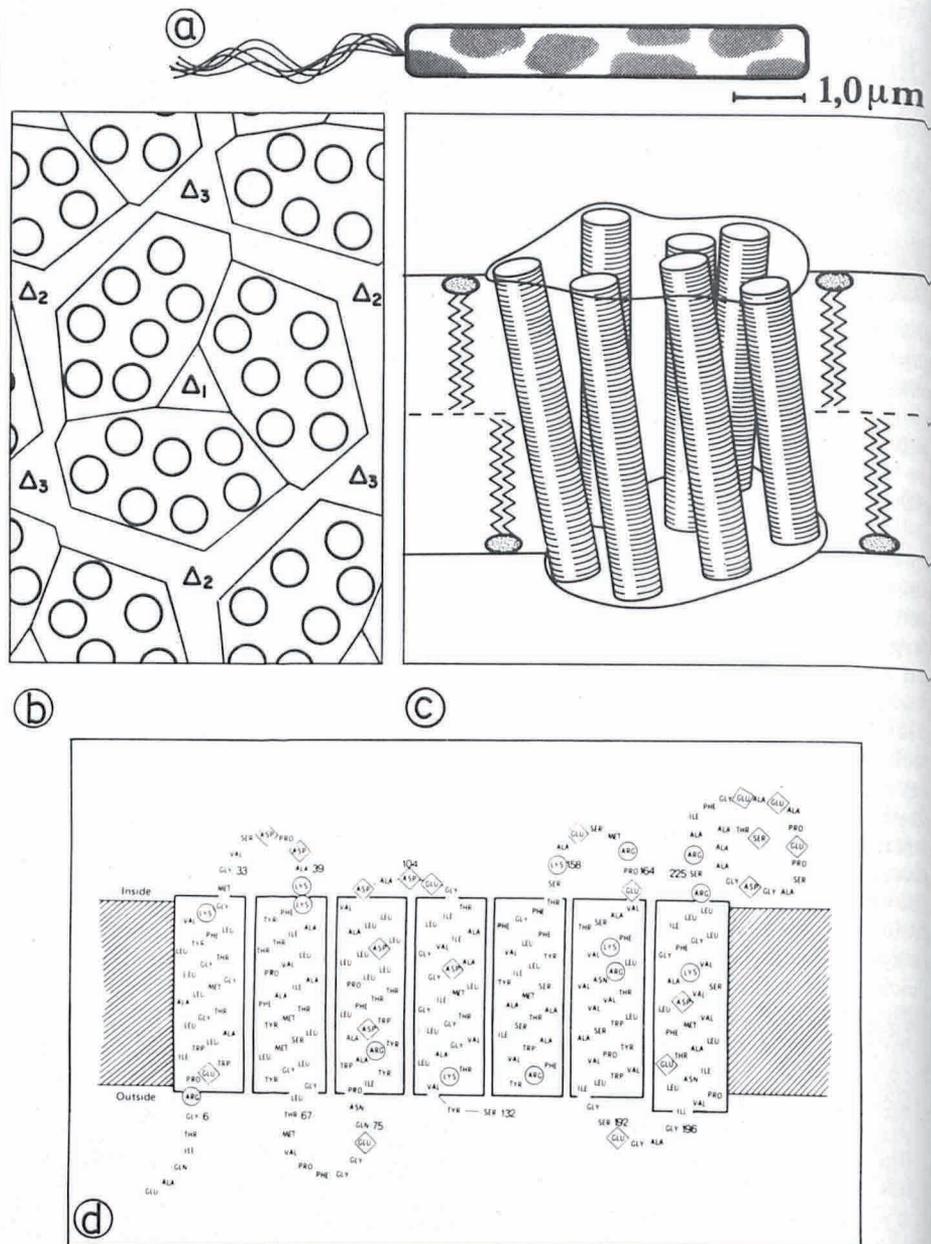


Bild 1a: Schematische Darstellung einer Halobakterien-Zelle mit inselartigen Purpurbereich-Bereichen und monopolarer Begeißelung.

Bild 1b: Die Anordnung von Bakteriorhodopsin in der Purpurbereich-Membran, in Aufsicht leicht schematisiert gezeigt. Jeweils drei Bakteriorhodopsin-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-Trimeren.

Bild 1c: Modell eines Bakteriorhodopsin-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 (Bild 1d).

Bild 1d: Aminosäure-Sequenz des Bakteriorhodopsin. Die Anknüpfung der chromophoren Gruppe (Vitamin A-Aldehyd) an einen Lysin-Rest erfolgt in Aminosäure-Position 216.

sind. Hier wie dort bildet ein Vitamin A-Aldehyd die lichtabsorbierende Gruppe, die kovalent an ein spezifisches Protein in der Zellmembran gebunden ist. Bei Wechselwirkung des Lichtes mit den Photorezeptoren, d. h. bei Absorption von Lichtquanten, werden die Pigmentmoleküle in einen energetisch angeregten Zustand gehoben. Von diesem aktivierten Zustand aus durchlaufen die Retinal-Proteine vorbestimmte photo- und thermochemische Reaktionsschritte in geschlossenen Kreisläufen. An diese Kreisläufe sind koordinierte Reaktionsfolgen in der Zellmembran gekoppelt, die im Fall von Bakteriorhodopsin zum elektrogenen Export von Wasserstoff-Ionen führen, im Fall von Halorhodopsin zum elektrogenen Import von Chlorid-Ionen, und im Fall des sensorischen halobakteriellen Rhodopsins zur zellulären Erregung, Ausgangspunkt der bakteriellen Orientierung im Biotop (Bilder 1-4).

Lichtenergie-Wandlung

Bakteriorhodopsin, entdeckt von D. Oesterheld und W. Stoeckening, bildet in der intakten Zelle klar umrissene Membran-Areale, die bis zu 50% der Membranoberfläche bedecken können. Aufgrund ihrer Farbe wurde diesen Membranbereichen die Bezeichnung „Purpur-Membran“ gegeben. Das Herausbrechen und die Isolierung der Purpurmembran-Inseln aus der umgebenden Zellmembran gelingt durch osmotischen Schock und anschließende Dichtegradienten-Zentrifugation. Dadurch werden chemische und physikalische Untersuchungen an der isolierten und chemisch homogenen Membranfraktion möglich. Bakteriorhodopsin in der Purpurmembran ist in einem zweidimensional-kristallinen, hexagonalen Gitter angeordnet und durchspannt senkrecht zur Membranoberfläche die gesamte 5 nm dicke Zellmembran (Bild 1, 3).

Nach Absorption eines Lichtquants (Photon) durchläuft Bakteriorhodopsin unter Absorptionsänderung photochemische und thermochemische Zwischenstufen, und kehrt ohne weitere Energiezufuhr in seinen Ausgangszustand zurück (Bild 2). Hier zeigt sich ein wichtiger Unterschied zum Sehpurpur Rhodopsin, das unter Aufwendung von Stoffwechselenergie (Wirbeltier-Auge) bzw. Absorption eines weiteren Lichtquants (Insekten-Auge) in seinen Ausgangszustand zurückgeführt werden muß. Dieser Unterschied ist wohl auch biologisch sinnvoll, da Bakteriorhodopsin und ebenfalls das kürzlich entdeckte Halorhodopsin vor allem als kontinuierliche Lichtenergie-Wandler in der Zelle fungieren, während Rhodopsin am Startpunkt einer komplexen Erregungsleitungs- und Erregungs-Verstärkungskette steht. Aufgrund des elektrogenen Membrantransportes durch Bakteriorhodopsin

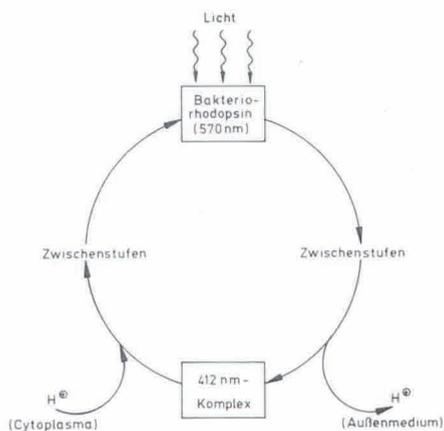


Bild 2: Photozyklus von Bakteriorhodopsin. Angeregt durch Absorption eines Photons verläßt Bakteriorhodopsin seinen protonierten Ausgangszustand mit Absorptionsmaximum bei 570 nm (Grün-Licht) und durchläuft Zwischenstufen. Protonenabspaltung mit nachfolgender Protonenfreigabe in den extrazellulären Raum (Außenmedium) führt zum deprotonierten 412 nm Komplex (Absorption im Blau-Licht), der über weitere Zwischenstufen und Reprotonierung aus dem Cytoplasma in den Ausgangszustand zurückfindet. Bei Zimmertemperatur und Lichtsättigung wird der Photozyklus etwa zweihundertmal pro Sekunde durchlaufen.

und Halorhodopsin wird die elektromagnetische Energie des Lichtes in chemisch nutzbare Energie umgewandelt, denn aus dem Protonentransport durch Bakteriorhodopsin resultiert ein Konzentrationsgradient für Protonen über der Membran und infolge des gerichteten Ladungstransportes beider elektrogenen Membranproteine auch ein Anstieg in der Membranspannung. Diese gewonnene elektrochemische Energie wird schließlich in biologisch nutzbare Energie in Form der „energiereichen“ Bindung des Adenosintriphosphates (ATP) umgesetzt.



Bild 3: Detailansicht eines Purpurmembran-Areals, umgeben von heterogener Zellmembran.

Wir finden also auch bei Halobakterien eine Art Photophosphorylierung, die vergleichbar ist der Photophosphorylierung photosynthetisierender Pflanzen.

Membran-Transport

Lebende, d. h. in aller Regel wachsende Zellen sind auf einen ständigen Stoffaustausch mit der Zellumgebung angewiesen. Zellulär gewünschte Stoffe wie metabolisierbare Aminosäuren und Zucker oder Spurenelemente und osmoregulatorisch wirksame Ionen sollen in die Zelle gelangen; andererseits sollen katabolisch anfallende Schadstoffe oder physiologisch unerwünschte Ionen aus der Zelle hinausbefördert werden. Die Transportfunktion der Zellmembran ist bei Halobakterien, die ja in einem salzreichen und gleichzeitig aminosäurereichen Biotop leben, besonders ausgeprägt; der Aminosäurereichtum ist eine Folge des Absterbens nicht-halotoleranter Organismen bei Anstieg der Salinität im Biotop.

Natriumionen, die den kationischen Hauptanteil in austrocknenden Küstenstreifen und im Toten Meer 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. Es wird also ein Teil der protonentreibenden Kraft von der ATP-Synthese abgezweigt; dieser Energieanteil geht aber nicht verloren sondern findet sich wieder in einem Export von Natriumionen, die ihrerseits beim aktiven Rückstrom in die Zelle besonders die Akkumulation der Glutaminsäure treiben.

Zur Osmoregulation und Ladungsneutralisation beim Na⁺-Export zeigen Halobakterien einen selektiven Einstrom von Kalium-Ionen, die zellulär bis hin zu einer Konzentration von mindestens 3 Mol pro Liter akkumuliert werden. Als Aufnahme-Mechanismus ist ein Transport durch Kalium-spezifische Kanäle gut charakterisiert, getrieben durch das Membran-Potential. Wir finden also, daß Kalium neben seiner Funktion als Protein-Stabilisator auch eine wichtige Rolle als osmoregulierendes Gegen-Ion spielt. Eine weitere Funktion zellulär akkumulierten Kaliums wird bei Ausschaltung von oxidativer und Photophosphorylierung sichtbar. Aufgrund der vorherrschenden Membranselektivität für Kalium gegenüber Natrium bildet ein hoher Kalium-Konzentrationsgradient über der Zellmembran ein nutzbares Ionendiffusionspotential, das als Triebkraft für den Protoneneinstrom wirkt und so über die Protonen-treibende Kraft ATP-Synthese treibt. Die Kapazität dieses „Notaggregates“ zur ATP-Synthese reicht immerhin für mehrere Stunden. Das Netzwerk der geschilderten Transportvorgänge, die im Licht letztendlich alle energetisch an

die Lichtenergiewandler Bakteriorhodopsin und Halorhodopsin gekoppelt sind, ist in Bild 4 gezeigt.

Orientierung im Biotop

Die optimale Nutzung der Sonnenenergie könnte nicht gelingen ohne lichtgesteuerte Orientierung der Halobakterien im Biotop. Dies erfolgt durch ein Erkennen der farblichen Zusammensetzung des Sonnenspektrums, also durch eine Art von Farbsehen. Austrocknende Meeresarme oder gar das Tote Meer mit großen Anteilen an tierischen und pflanzlichen Zersetzungsprodukten lassen Licht einige Meter tief eindringen. Es herrscht dort langwelliges Licht vor mit hohen Rotanteilen, die dem Wasser oft eine braunrote Farbe verleihen. Energiereiche, ultraviolette Strahlung gelangt dagegen aufgrund von Absorption, Lichtstreuung und Lichtbrechung an diesen Standorten nur in die obersten Wasserschichten. Die ökologische Nische zwischen diesen Lichtmilieugrenzen nutzen die Halobakterien durch Einhalten einer bestimmten Tauchtiefe, die einerseits bereits Vermeidung der UV-Strahlung erlaubt, andererseits aber ausreichende Lichtenergie im grün-orangen Wellenlängenbereich einzufangen gestattet (Bild 5). Wie Mini-U-Boote, angetrieben durch schraubig gewundene Geißeln, durchziehen die Halobakterien ihren Lebensraum und registrieren die Lichtverhältnisse in der Tauchtiefe durch ein Selpurpur-ähnliches Pigment, das unter Beteiligung unserer Arbeitsgruppe an Halobakterien-Mutanten erst kürzlich entdeckt und gegenwärtig schwerpunktmäßig mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft und des Bundesministers für Forschung und Technik untersucht wird. Im nationalen und internationalen Austausch von Methoden und Erkenntnissen werden unter Selektionsbedingungen gewonnene Mutantenstämme mit molekularbiologischen Verfahren definiert und zelluläre Auswirkungen gelöschter bzw. erworbener genetischer Information auf Lichtabsorption und Übertragungsschritte zellulärer Erregung analysiert.

Halobakterien haben aufgrund ihrer ungewöhnlich vorteilhaft organisierten Photorezeptoren zum Verständnis der Lichtenergiewandlung an biologischen Membranen wesentlich beigetragen, mit Auswirkungen auf umweltfreundliche biotechnologische Verfahren der Sonnenenergie-Nutzung. Nun stehen wir an der Schwelle eines vertieften Einblicks in zelluläre Funktionsketten, die Unterscheidung von Farben und zelluläre Erregung einschließen. Die molekulare Biologie von Retinal-Proteinen war Schwerpunktthema eines Workshops der European Molecular Biology Organization (EMBO-Workshop) im Herbst dieses Jahres mit einem Hauptvortrag der Gießener Gruppe.

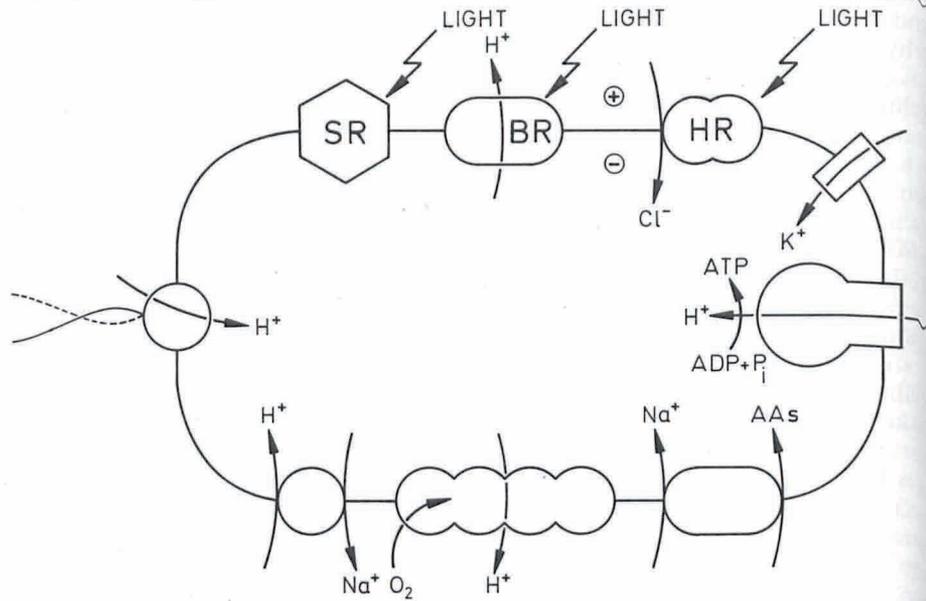


Bild 4: Membranfunktionen zur Bioenergetik und Verhaltensphysiologie von *Halobacterium halobium*. Die eingezeichneten Membrankomponenten umfassen die lichtgetriebene, elektrogene Protonenpumpe Bakteriorhodopsin (BR), die lichtgetriebene, elektrogene Chloridpumpe Halorhodopsin (HR), den Membrankanal 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.

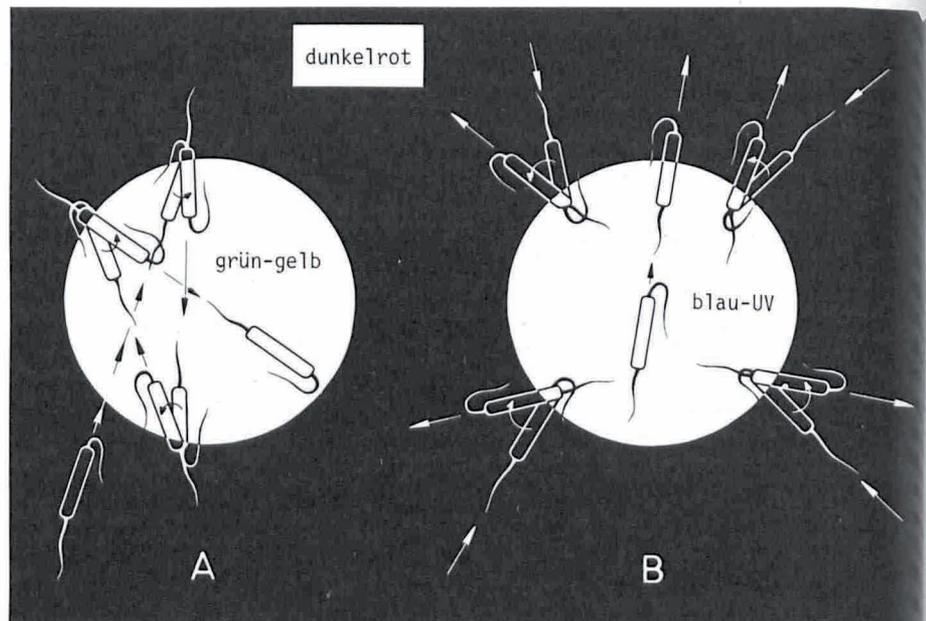


Bild 5: Photosensorisches Verhalten von *Halobacterium halobium*. A) Der Übertritt aus einem Lichtbezirk von photoenergetisch wirksamem grün-gelbem Licht in angrenzendes dunkelrotes Licht wird durch eine schreckartige Umkehr der Geißelrotationsrichtung vermieden; hieraus resultiert ein Rückwärtsschwimmen 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.