

Bakterielle Kohlenstoffreduktion

Strukturelle und mechanistische Grundlagen der Acetogenese

JAN MICHAEL SCHULLER

SYNMIKRO FORSCHUNGSZENTRUM UND FACHBEREICH CHEMIE,
UNIVERSITÄT MARBURG

Acetogenic bacteria are a specialized group of strictly anaerobic bacteria producing acetate from hydrogen and carbon dioxide in the ancient Wood-Ljungdahl pathway (WLP). We have shown that enzymatic decorated nanowires accompanied by redox-induced conformational changes as occurring in a novel bifurcation mechanism are key adaptations for this kind of extreme lifestyle. Explored by the development of redox-controlled cryoEM, this new understanding may lead to new approaches in biotechnology and synthetic biology able to combat current challenges such as human induced climate change.

VAAM-Forschungspreis 2023

DOI: 10.1007/s12268-023-1985-9
© Der Autor 2023

Die Verringerung des aktuell hohen atmosphärischen CO_2 -Gehalts auf ein vorindustrielles Niveau ist eine der dringendsten Herausforderungen für die Menschheit. Angesichts des Ausmaßes der Auswirkungen des hohen CO_2 -Gehalts auf globale Ökosysteme und damit verbundenen sozioökonomischen Folgen sind innovative Lösungen sowohl auf chemischer als auch auf biologischer Ebene dringend erforderlich. Eine vielversprechende biologische Lösung ist der Einsatz des Kohlenstoffrecyclings mittels acetogener Bakterien. Diese Mikroorganismen können CO_2 in großen Industrieanlagen fixieren, produzieren Biokraftstoffe und recycelte Kohlenstoffverbindungen und entfernen so CO_2 aus der Atmosphäre. Der Stoffwechsel mitsamt seinen enzymatischen

Reaktionen ist jedoch noch immer ein großes Rätsel und steht daher im Zentrum unserer Forschung.

Wood-Ljungdahl: vermutlich ältester Stoffwechselweg des Lebens

Acetogene Bakterien sind eine Gruppe strikt anaerober Bakterien, die phylogenetisch nicht miteinander verwandt sind. Sie zeichnen sich durch einen speziellen Stoffwechselweg aus, den Wood-Ljungdahl-Weg (WLP). In diesem Prozess werden zwei Moleküle Kohlendioxid (CO_2) reduziert und zu einem Molekül Acetyl-CoA kondensiert. Dieses Produkt ist die metabolische Drehscheibe des grundsätzlichen Anabolismus in der Zelle, da es die Vorstufe aller zellulären Komponenten in Acetogenen ist. Umgekehrt ist Acetyl-CoA auch das wichtigste Zwischenprodukt im Katabolismus, wo es über Acetylphosphat zu Acetat umgewandelt wird, was die einzige ATP-erzeugende Reaktion der CO_2 -Reduktion darstellt. Aufgrund der Aktivierung von Formiat als Zwischenprodukt im WLP wird ATP verbraucht, was einen Netto-ATP-Gewinn von Null bedeutet [1].

Der Zweck dieses Prozesses kann daher nur darin bestehen, die CO_2 -Fixierung als Elektronensenke für die Zellatmung der Bakterien zu nutzen (Abb. 1). Die Atmung dieser Bakterien ist konzeptionell einfach und beruht lediglich auf der Verwendung von molekularem Wasserstoff als Reduktionsmittel. Eine Elektron-bifurkierende Hydrogenase oxidiert diesen und bildet gleichzeitig ein reduziertes Pyridinnukleotid (NADH/NADPH) und ein niedrigpotenzielles Ferredoxin. Der Schlüssel für die Energieerhaltung in Acetogenen, die mit $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ wachsen, ist der Überschuss an reduziertem Ferredoxin aus der H_2 -Oxidation, das wie-

oxid (CO_2) reduziert und zu einem Molekül Acetyl-CoA kondensiert. Dieses Produkt ist die metabolische Drehscheibe des grundsätzlichen Anabolismus in der Zelle, da es die Vorstufe aller zellulären Komponenten in Acetogenen ist. Umgekehrt ist Acetyl-CoA auch das wichtigste Zwischenprodukt im Katabolismus, wo es über Acetylphosphat zu Acetat umgewandelt wird, was die einzige ATP-erzeugende Reaktion der CO_2 -Reduktion darstellt. Aufgrund der Aktivierung von Formiat als Zwischenprodukt im WLP wird ATP verbraucht, was einen Netto-ATP-Gewinn von Null bedeutet [1].

Der Zweck dieses Prozesses kann daher nur darin bestehen, die CO_2 -Fixierung als Elektronensenke für die Zellatmung der Bakterien zu nutzen (Abb. 1). Die Atmung dieser Bakterien ist konzeptionell einfach und beruht lediglich auf der Verwendung von molekularem Wasserstoff als Reduktionsmittel. Eine Elektron-bifurkierende Hydrogenase oxidiert diesen und bildet gleichzeitig ein reduziertes Pyridinnukleotid (NADH/NADPH) und ein niedrigpotenzielles Ferredoxin. Der Schlüssel für die Energieerhaltung in Acetogenen, die mit $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ wachsen, ist der Überschuss an reduziertem Ferredoxin aus der H_2 -Oxidation, das wie-

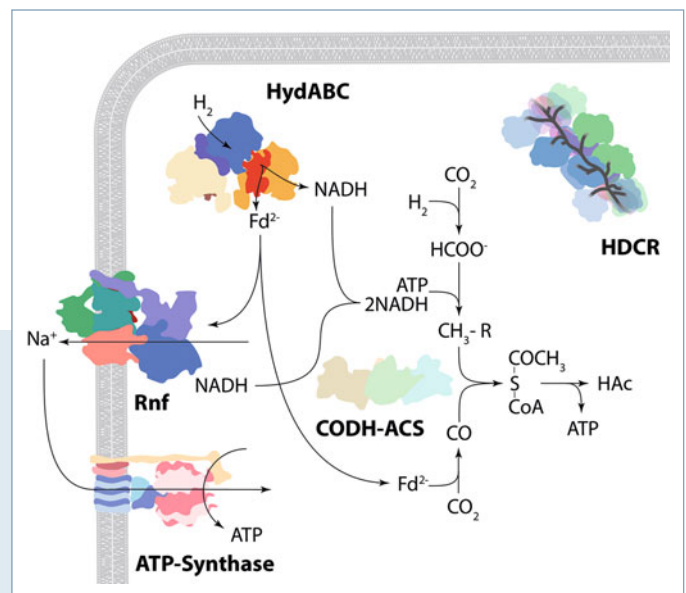
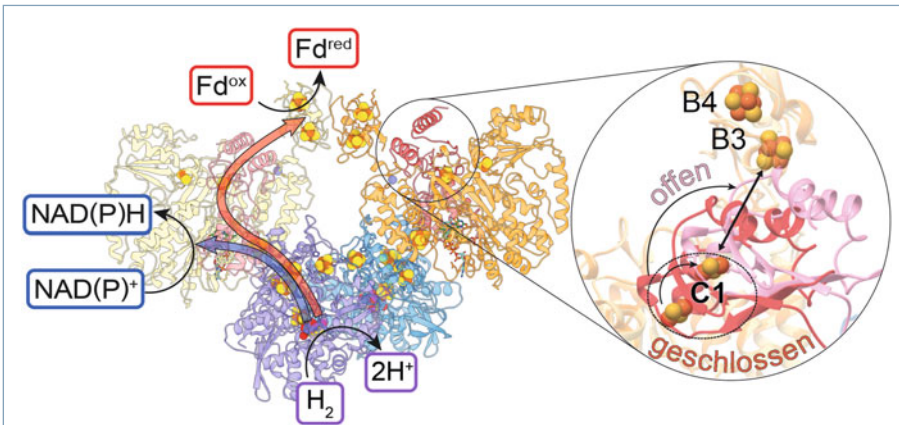


Abb. 1: Kopplung von Atmung und Acetatbildung aus Wasserstoff und Kohlendioxid in *Acetobacterium woodii*. Die Reduktionsäquivalente für die CO_2 -Fixierung im Wood-Ljungdahl-Stoffwechselweg werden von einer H_2 -oxidierenden, elektronenbifurkierenden Hydrogenase (HydABC) bereitgestellt, die Ferredoxin und NAD^+ reduziert. Überschüssiges reduziertes Ferredoxin wird durch den Rnf-Komplex oxidiert, NAD^+ reduziert und zeitgleich ein Na^+ -Gradient aufgebaut. Dieser Gradient treibt die ATP-Synthase über eine Na^+ -abhängige ATP-Synthase an. Insgesamt können pro produziertem Acetat 0,3 ATP aus $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ gebildet werden.



▲ **Abb. 2:** Elektronenfluss in der elektronenbifurkierenden Hydrogenase. Durch Modulation der NAD(P)⁺-Bindungsaffinität durch die Reduktion eines nahe gelegenen Eisen-Schwefel-Clusters schaltet HydABC zwischen exergonischer NAD(P)⁺-Reduktion und endergonischer Fd-Reduktion um. Die Ablösung des reduzierten NAD(P)H-Nukleotids löst eine Konformationsänderung aus, die anschließend den Elektronenweg mit niedrigem Potenzial ermöglicht.

derum durch membrangebundene Enzymkomplexe, den Rnf-Komplex oder Ech-Hydrogenasen reoxidiert wird. Diese Enzyme konservieren Energie durch Natriumionen- oder Protonen-Translokation, was einen chemiosmotischen Gradienten aufbaut, der typischerweise eine rotierende ATP-Synthase antreibt und so das einzige gewonnene und verwertbare ATP im Acetogeneseprozess erzeugt. Dabei werden zusätzliche pyridine Nukleotide oder H₂-Moleküle gebildet, die anschließend im Wood-Ljungdahl-Weg auf Acetat übertragen werden (**Abb. 1**).

Die Zellen scheiden Acetat in großen Mengen aus. Die Acetatbildung dient lediglich als terminaler Elektronenakzeptor und stellt die Alternative zum Sauerstoff dar, der in aeroben Organismen die Elektronen empfängt. Diese direkte Verknüpfung von CO₂-Fixierung und Atmung ist einzigartig unter den sieben bekannten CO₂-fixierenden Stoffwechselwegen. Aus diesem Grund gilt der WLP als vielleicht der älteste biochemische Stoffwechselweg auf der Erde, denn er steht am Anfang der Synthese von organischen Verbindungen: von „lebender Materie“ also, die aus CO₂ und H₂ oder aus Kohlenmonoxid, gasförmigen Verbindungen, die bereits auf der frühen Erde vorhanden waren, hervorgeht. Die strukturelle und mechanistische Basis einer Vielzahl der beteiligten Enzyme war jedoch zum großen Teil unbekannt. Dieses Rätsel haben wir begonnen, zusammen mit einem Experten für Acetogene, Volker Müller von der Universität Frankfurt, zu lösen.

Neuartiger Mechanismus für mikrobielle Elektronenbifurkation

Eine elektronenbifurkierende Hydrogenase ist das zentrale Enzym der Atmung bei Acetogenen. Dieses bemerkenswerte Enzym kann aus molekularem Wasserstoff (–300 mV) ein Ferredoxin mit niedrigem Potenzial (–500 mV) erzeugen, eine endergone Reaktion, die thermodynamisch eigentlich gar nicht „erlaubt“ wäre. Doch das Enzym wendet einen Trick an: Es erzeugt parallel zur endergonen Ferredoxin-Reduktion ein NAD(P)H mit höherem Potenzial, was eine exergone Reaktion ist. Durch diese simultane Kopplung kann das Enzym die thermodynamische Barriere der Ferredoxin-Reaktion überwinden. Dies ist besonders wichtig für einen Stoffwechsel, der aufgrund seines geringen Energiegehalts darauf angewiesen ist, Ressourcen effizient zu nutzen und dadurch ATP einzusparen.

In einer umfassenden interdisziplinären Studie untersuchten wir diesen zentralen metabolischen Komplex der Acetogenen und fanden einen neuartigen Bifurkationsmechanismus [1]. Demnach ermöglicht es die spezielle FeS(Eisen-Schwefel)-Umgebung des Ko-Faktors FMN (Flavinmononukleotid), redoxzustandsabhängig die Affinität für NAD⁺ zu steuern. Bedingt durch den Hydridtransfer und die anschließende Dissoziation von NADH, einem exergonen Prozess, kommt es zu einer signifikanten Konformationsänderung innerhalb einer Thioredoxin-ähnlichen Domäne des Enzyms mit einem [2Fe-2S]-Cluster. Durch die detaillierte Analyse der Struktur bei verschiedenen Zuständen

entlang ihres funktionellen Zyklus stellten wir fest, dass diese Domäne eine ähnliche Funktion wie ein Kran hat, indem sie Elektronen zwischen der Bindungsstelle des Ferredoxins und dem FMN-Ko-Faktor transportiert und so den Elektronentransfer kinetisch steuert (**Abb. 2**). Erst dadurch wird der Pfad für den Elektronentransfer mit niedrigem Potenzial möglich.

Dieser Mechanismus der Elektronenbifurkation unterscheidet sich grundlegend von den klassischen flavinbasierten Enzymen, wie sie gewöhnlich in Mikroorganismen vorkommen. Er ähnelt eher dem Cytochrom-bc₁-Komplex (Komplex III) in den bakteriellen und mitochondrialen Atmungsketten, der den Q-Zyklus, auch eine Art der Elektronenbifurkation, durch die mobile Rieske-Domäne katalysiert. Obwohl ursprünglich als einzigartig für diesen Komplex beschrieben, wurden inzwischen eine Reihe weiterer Schlüsselenzyme des anaeroben Metabolismus beschrieben, die die neuartige Form der Bifurkation modular einsetzen [2, 3].

Interessanterweise sind sogar die Untereinheiten NuoE und NuoF des respiratorischen Komplexes I sehr eng mit diesen Proteinen verwandt und stellen wahrscheinlich deren evolutionäre Nachkommen dar. Die Erforschung des WLP-Stoffwechselwegs bietet somit also eine einzigartige Möglichkeit, die Historie dieser molekularen Maschinen, die auch in eukaryotischen Zellen eine Rolle spielen, besser zu verstehen. Auch beim Menschen führen Fehlfunktionen in der mitochondrialen Atmungskette nicht selten zu schweren Erkrankungen.

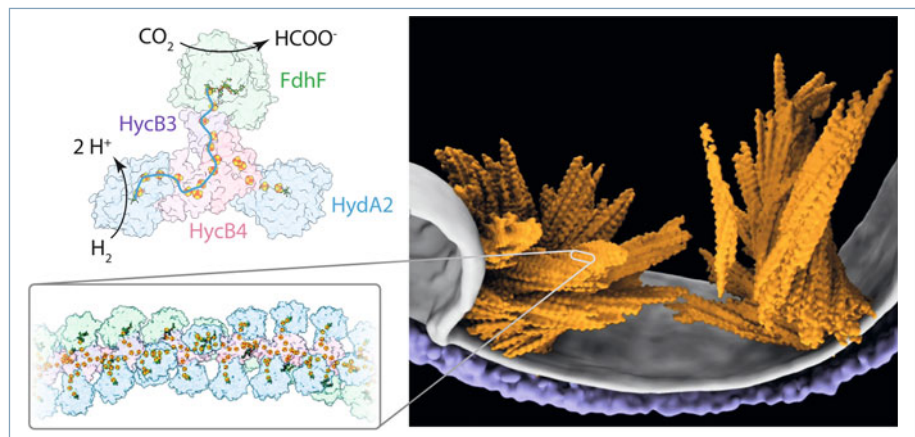
Enzymatisch dekorierte Elektronen-Nanodraht für rasche CO₂-Fixierung

Das erste Enzym im „Methyl-Branch“ vieler Acetogenen ist die Wasserstoff-abhängige CO₂-Reduktase (HDCR). Dieses Enzym ist das einzige Enzym, das Wasserstoff direkt zur Reduktion von CO₂ nutzen kann [4]. Dabei ist es 10.000-mal effizienter als jeder chemische Katalysator, und seine Reaktion ist unter Standardbedingungen vollständig umkehrbar. Diese absolut unerreichbaren katalytischen Bedingungen machen es zu einem Spitzenkandidaten für die biotechnologische Forschung.

Um die molekulare Grundlage dieses Enzyms zu verstehen, haben wir es gereinigt und mithilfe der Kryo-Elektronenmikroskopie untersucht [5]. Die Struktur enthüllt, dass das Enzym ein Filament bildet, in dem die enzymatischen Untereinheiten in einer

dreieckigen Architektur angeordnet sind und sich vom Kern des Filaments weg erstrecken (**Abb. 3**). Der Kern des Filaments wiederum besteht aus Polyferredoxin-Proteinen, die vier [4Fe4S]-Cluster enthalten. Das Enzym ist also ein enzymatisch dekoriertes Elektronendraht, was dessen herausragende katalytischen Eigenschaften erklärt. Je länger das Filament ist, desto höher ist seine Aktivität, da es die Fähigkeit besitzt, selbst geringste Mengen an Wasserstoff umzuwandeln. Tatsächlich zeigen Untersuchungen der Aktivität von isolierten Filamenten mit nachfolgenden gezielten Mutagenese-Experimenten, dass lange Filamente die katalytische Aktivität des Enzyms maximieren.

Um das tatsächliche Ausmaß der Filamente in Acetogenen zu verstehen, betrachteten wir sie direkt mit der Kryo-Elektronentomographie, um Einblicke in das ungestörte Innere der Zellen zu bekommen. Tatsächlich konnten wir an der Spitze der Zellen riesige ringförmige zelluläre Strukturen beobachten, die aus verflochtenen Filamenten und riesengroßen ringförmigen Filament-Superstrukturen bestehen (**Abb. 3**). Wir vermuten, dass diese Organisation eine Anpassung an extreme Umweltbedingungen ist, um eine große Oberfläche mit sehr vielen untereinander verknüpften Reaktionszentren für die Oxidation von Wasserstoff zu gewährleisten. Dies stellt sicher, dass stets ausreichend Elektronen vorhanden sind, um das in die Zelle diffundierende CO_2 in Form von Formiat einzufangen und zu konzentrieren. Die HDCR ermöglicht also



▲ **Abb. 3:** Visualisierung von HDCR-Filamenten durch die Verwendung von Kryo-Elektronenmikroskopie. Mithilfe der Kryo-Elektronentomographie (Kryo-ET) in *Thermoanaerobacter kivui* konnten wir Bündel von HDCR-Filamenten (orange) beobachten, die an die Zellmembran (grau) gebunden sind. Einzelpartikel-Kryo-Elektronenmikroskopie (Kryo-EM) der gereinigten HDCR-Filamente löst die Struktur auf 3,4 Å auf. Durch Kombination der Strukturdaten von Kryo-EM und Kryo-ET können wir ein anatomisches Modell für die HDCR-Filamente ableiten, das zeigt, dass ein „Nanodraht“, bestehend aus Eisen-Schwefel-Clustern, die katalytischen Zentren der wasserstoffspaltenden (HydA2) und kohlenstofffixierenden (FdhF) Enzyme verbindet.

einen acetogenen Kohlenstoff-Konzentrationsmechanismus, der nötig ist, um am „thermodynamischen Limit“ zu überleben.

Redox-kontrollierte Kryo-EM: Einblick in anaeroben Metabolismus

Unsere großen Fortschritte bei der Erforschung des Acetogenese-Metabolismus sind eng mit der Entwicklung der redoxkontrollierten Kryo-EM-Probenpräparation in unserem Labor verbunden. Wir haben ein Vitrifizierungssystem in einem Schutzgaszelt auf-

gebaut, das anaerobe Bedingungen gewährleistet. Dadurch können wir nicht nur die Strukturen von sauerstoffsensitiven Proteinen bestimmen, sondern auch das Redoxpotenzial bis zum Zeitpunkt des Einfrierens kontrollieren. Dies eröffnet uns die Möglichkeit, den funktionellen Mechanismus von Metalloproteinkomplexen genauer zu untersuchen und zu verstehen. So konnten wir zeigen, inwiefern Metalloproteine und ihre Dynamiken die entscheidenden Elemente des acetogenen Metabolismus sind.

Hier steht eine Anzeige.

 Springer

Allerdings hält der anaerobe Lebensstil mit seinen Metalloproteinen auch abseits der Acetogenese noch viele Geheimnisse bereit, die im Zentrum unserer weiteren Forschung stehen. So versuchten wir, im Zusammenspiel aus grundlagenwissenschaftlichen und synthetisch biologischen Ansätzen auch zur Lösung von gesellschaftlichen Problemen wie dem menschgemachten Klimawandel beizutragen.

Danksagung

Ich bedanke mich bei Volker Müller für die großartige Zusammenarbeit als Kooperationspartner und Lehrmeister des acetogenen Metabolismus. Gert Bange danke ich als wichtigem Unterstützer und Mentor, der mich ermutigt hat, die großen Fragen zu stellen und der mich mit Hingabe durch den Emmy Noether- und ERC-Prozess geleitet hat. Mein weiterer Dank geht an Tobias Erb und besonders an Roland Lill für deren finanzielle und materielle Unterstützung beim Aufbau der anaeroben Zelt-Infrastrukturen. Ich bedanke mich auch bei allen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe und den Kolleginnen und Kollegen am SYNMIKRO-Institut für das großartige Willkommen und das besondere Arbeitsumfeld, das spannende Forschung und Teamarbeit fördert. Darüber hinaus

bedanke ich mich bei meiner Familie für ihre Unterstützung und insbesondere danke ich meiner Frau Sandra, die meine Forschung nicht nur in großartigen Visualisierungen verdeutlicht.

Literatur

- [1] Katsyv A, Müller V (2020) Overcoming Energetic Barriers in Acetogenic C1 Conversion. *Front Bioeng Biotechnol* 8: 1420
- [2] Katsyv A, Kumar A, Saura P et al. (2023) Molecular Basis of the Electron Bifurcation Mechanism in the [FeFe]-Hydrogenase Complex HydABC. *J Am Chem Soc* 145: 5696–5709
- [3] Winiarska A, Ramírez-Amador F, Hege D et al. (2023) A bacterial tungsten-containing aldehyde oxidoreductase forms an enzymatic decorated protein nanowire. *Science Adv* 9, DOI: 10.1126/sciadv.adg668
- [4] Schut GJ, Haja DK, Feng X et al. (2022) An Abundant and Diverse New Family of Electron Bifurcating Enzymes With a Non-canonical Catalytic Mechanism. *Front Microbiol* 13: 946711
- [5] Schuchmann K, Müller V (2013) Direct and Reversible Hydrogenation of CO₂ to Formate by a Bacterial Carbon Dioxide Reductase. *Science* 342: 1382–1385

[6] Dietrich HM, Righetto RD, Kumar A et al. (2022) Membrane-anchored HDCR nanowires drive hydrogen-powered CO₂ fixation. *Nature* 607: 823–830

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Dr. Jan Michael Schuller
 SYNMIKRO Forschungszentrum und Department für Chemie – KryoEM Molekularer Maschinen
 Philipps-Universität Marburg
 Karl-von-Frisch-Straße 14
 D-35043 Marburg
jan.schuller@synmikro.uni-marburg.de
www.schullerlab.org

AUTOR



Jan Michael Schuller

2006–2012 Biochemiestudium, Universität Tübingen. 2012–2016 Promotion, TU München bei Prof. Dr. W. Baumeister. 2016–2020 Postdoc bei Prof. Dr. E. Conti, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried. Seit 2020 Emmy-Noether Nachwuchsgruppenleiter am SYNMIKRO-Forschungszentrum und dem Fachbereich Chemie, Universität Marburg. 2021 Heinz Maier-Leibnitz-Preis der DFG. 2022 ERC Starting Grant Two-CO₂-One. 2023 VAAM-Forschungspreis.