

CYKLUS Na^+ IÓNOV U BAKTÉRIÍ A METHANOARCHAEA

ZUZANA NOVÁKOVÁ a PETER ŠMIGÁŇ

Ústav biochémie a genetiky živočíchov, Slovenská akadémia vied, Moyzesova 61, 900 28 Ivanka pri Dunaji, Slovenská republika
 Zuzana.Novakova@savba.sk

Došlo 20.6.07, prijaté 29.10.07.

Kľúčové slová: Methanoarchaea, Na^+ translokujúce systémy, Na^+ závislá ATP syntáza, generátory a konzumenti $\Delta\mu_{\text{Na}^+}$

Obsah

1. Úvod
2. Generátory elektrochemického potenciálu sodných iónov u methanoarchaea
 - 2.1. Enzýmy metanogenézy ako primárne sodné pumpy
 - 2.1.1. Na^+ translokujúci metyltransferázový komplex
 - 2.1.2. Formylmetanofurán dehydrogenáza
3. Konzumenti elektrochemického potenciálu sodných iónov u methanoarchaea
 - 3.1. Na^+ translokujúca V_1V_0 ATPáza
 - 3.2. Na^+ závislá A_1A_0 ATP syntáza
4. Generátory elektrochemického potenciálu sodných iónov u baktérií
 - 4.1. Dekarboxylázy
 - 4.2. Oxidoreduktázy
5. Konzumenti elektrochemického potenciálu sodných iónov u baktérií
 - 5.1. Na^+ spriahnutý symport
 - 5.2. Na^+/H^+ antiporter
 - 5.3. Flagelárne motory poháňané gradientom sodných iónov
 - 5.4. F_1F_0 ATP syntáza využívajúca sodné ióny ako spriahajúce
 - 5.5. Cyklus sodných iónov u bakteriálnych patogénov
6. Záver

1. Úvod

Sodík je šiesty najčastejšie sa vyskytujúci prvok v zemskej kôre a najčastejšie sa vyskytujúci alkalický kov. Sodné ióny spolu s iónmi Cl^- sú najviac zastúpené ióny v morskej vode. Odhaduje sa, že v moriach a oceánoch je až $1,5 \cdot 10^{16}$ ton Na^+ . Sodík je vitálne dôležitý pre bunkovú biológiu a jeho pôsobenie na organizmy je dvojaké. Na jednej strane, život bez neho by nebol možný, na strane

druhej, vo vyšších koncentráciách dokáže byť pre organizmy toxický. Vzhľadom k predpokladu, že život vznikol v oceánoch a moriach, kde ako je uvedené vyššie dominuje sodík ako hlavný kation, zohrávajú Na^+ ióny významnú úlohu v živote všetkých organizmov, počnúc od Archaea cez Prokaryoty, až po Eukaryoty, človeka vrátane. Morské, prípadne alkalitolerantné organizmy vyžadujú vysoké koncentrácie sodíka priamo vo svojom okolí, ale ani pre ostatné organizmy nie je jeho prítomnosť zanedbateľná. Je pochopiteľné, že na to, aby mohli organizmy udržiavať Na^+ homeostázu majú viaceré sofistikované Na^+ závislé systémy, ktoré sa na tom podieľajú.

Funkcia Na^+ iónov u živých organizmov je veľmi rôznorodá. Ióny Na^+ sa podieľajú na udržiavaní osmotického tlaku, pH všetkých živých organizmov, a aj viaceré bioenergetické systémy sú závislé na Na^+ iónoch. Prikladom takéhoto procesu je u methanoarchaea tvorba metánu – metanogenéza. Pre úplnosť je potrebné dodať, že aj u vyšších organizmov, vrátane človeka, sú Na^+ ióny dôležité, pre vedenie nervového vzruchu, reguláciu objemu a tlaku krvi, udržanie svalovej dráždivosti, acidobázickej rovnováhy, ale aj v mnohých iných fyziologických dejoch.

Nadbytok Na^+ iónov na druhej strane vedie k rozmanitým patologickým stavom. V prímorských oblastiach a v súčasnosti aj v našich podmienkach salinita pôd stúpa a poľnohospodárska produkcia je negatívne ovplyvňovaná vysokou koncentráciou solí v pôde. Všetky tieto zistenia poukazujú na dôležitosť spoznávania funkcií Na^+ iónov v bunkovej biológii.

Preto, aby Na^+ ióny mohli v organizmoch plniť uvedené funkcie, musí mať bunka neporušenú membránu, ktorá prostredníctvom rôznych pump a transportérov reguluje ich intracelulárnu koncentráciu. Je známe, že u živočíchov sa elektrochemický gradient Na^+ iónov ($\Delta\mu_{\text{Na}^+}$) využíva pre poháňanie transportu rôznych metabolitov do bunky. $\Delta\mu_{\text{Na}^+}$ je generovaný primárnou sodnou pumpou, Na^+/K^+ ATPázou. Tento typ ATPázy nebol u prokaryotov nájdený. Napriek tomu sa v posledných dvoch dekádach ukázalo, že Na^+ ióny môžu zohrávať významnú funkciu aj v bioenergetike prokaryotov a archaea. Dovtedy bola všeobecne akceptovaná predstava, že jediným spriahajúcim iónom je H^+ . V krátkosti je na porovnanie potrebné pripomenúť základný princíp membránovo viazanej konverzie energie v mitochondriách, mnohých baktériách a chloroplastoch ako to navrhol profesor P. Mitchell vo svojej chemiosmotickej teórii¹. V membráne týchto organel je transfer elektrónov spriahnutý s translokáciou H^+ cez membránu a vzniknutý elektrochemický gradient H^+ ($\Delta\mu_{\text{H}^+}$) je využitý na poháňanie mnohých bunkových endergonických procesov. Protón je tzv. spriahajúci ión. Veľkosť elektrochemického gradientu protónov je určená uvedenou rovnicou:

$$\Delta\mu_{\text{H}^+} = F \Delta\Psi - 2,303 RT \Delta\text{pH}$$

($\Delta\Psi$ je elektrický potenciálový rozdiel cez membránu, R je plynová konštanta, T je teplota v K, F je Faradajova konštanta, $\Delta\text{pH} = \text{pH}_{\text{in}} - \text{pH}_{\text{out}}$).

V roku 1980 bola prvýkrát popísaná existencia primárnej pumpy generujúcej elektrochemický gradient Na^+ iónov u anaeróbnej baktérie *Klebsiella aerogenes*². Zo začiatku boli tieto zistenia prijímané bioenergetickou komunitou s určitou nedôverou a boli považované za kuriozitu v zmysle, že u prokaryotov je všetko možné. Postupne sa však ukázalo, že viaceré mikroorganizmy môžu ióny Na^+ využívať vo svojich bioenergetických systémoch ako ióny spriahajúce (coupling). Aj nedávne sekvenovanie mnohých bakteriálnych genómov preukázalo existenciu rôznych Na^+ závislých bioenergetických systémov.

Myšlienka, že Na^+ ión môže slúžiť ako spriahajúci ión, bola založená na mnohých pozorovaniach. Zistilo sa, že Na^+ môže byť transportované z bunky pomocou primárnych púmp (generátorov Na^+ gradientu), a že tok Na^+ po gradiente do bunky sa využíva na prácu rovnako ako H^+ gradient (obr. 1, cit.³). Prítomnosť primárnych Na^+ púmp v bunke je výhodná pri nízkom elektrochemickom H^+ gradiente, alebo pri vysokej koncentrácii Na^+ iónov, čo nie sú vhodné podmienky pre funkciu Na^+/H^+ antiportera, ktorý sa taktiež zúčastňuje na transporte iónov Na^+ z bunky.

Objavy enzýmov využívajúcich Na^+ ióny viedli v roku 1985 Skulacheva⁴ k formulovaniu revolučného konceptu cyklu sodného kationu v membránovej energetike, ktorý je v súčasnosti akceptovaný rovnako ako protónový cyklus Mitchella. Odhalenie, že Na^+ kation dokáže fungovať rovnako ako spriahajúci ión, ktorý dopĺňa prípadne nahrádza protón v bioenergetických funkciách, preformovalo dovtedajší náhľad na bioenergetiku. Existujú organizmy využívajúce výlučne energiu H^+ gradientu, ďalej organizmy, u ktorých je známa koexistencia oboch gradientov H^+ ako aj Na^+ , a taktiež ako napr. *Propionigenium modestum*, ktoré využíva len gradient Na^+ iónov pri

transformácii energie⁵. V nasledovných častiach poskytneme stručný prehľad o substitúcii H^+ iónov Na^+ iónmi v bioenergetických cykloch, vo svete, kde $\Delta\mu_{\text{Na}^+}$ namiesto $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ poháňa membránové endergonické reakcie (transport aminokyselín, cukrov a iných metabolitov, syntézu ATP a pohyb bakteriálnych bičiek). Cyklus Na^+ iónov bol v poslednej dobe objavený u celého radu morských mikroorganizmov, mnohých ľudských a živočíšnych patogénov, ale aj u archaea. Môžeme konštatovať, že svet Na^+ -závislej bioenergetiky má dôležité miesto v biosfére našej planéty.

2. Generátory elektrochemického potenciálu sodných iónov u methanoarchaea

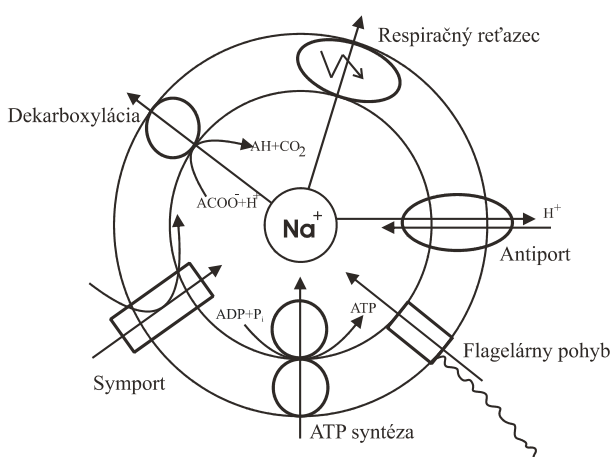
2.1. Enzýmy metanogenézy ako primárne sodné pumpy

Methanoarchaea patria medzi fylogeneticky najstaršie organizmy a sú zaradené do tretej vývojovej línie organizmov, do ríše Archaea. Záujem o túto skupinu mikroorganizmov nie je neočakávaný. Na jednej strane v čase, keď sa stále viac zaujímate o alternatívne zdroje energie, je tvorba metánu methanoarchaea mimoriadne zaujímavá. Na druhej strane metán predstavuje jeden z aktívnych skleníkových plynov. Aj keď CO_2 je najdôležitejším skleníkovým plynom, molekuly metánu zachytávajú teplo až s 20 násobnou účinnosťou ako molekuly CO_2 . Antropogénna činnosť výrazne prispieva k zvyšovaniu koncentrácie metánu v atmosfére (ryžové polia, produkcia a distribúcia zemného plynu a nafty, dolovanie uhlia, poľnohospodárstvo, ale aj prírodné zdroje, oceány, tundry a vlhké zeme...). Je preto potrebné chápať všetky parametre, ktoré bezprostredne ovplyvňujú tvorbu metánu. Metanogenéza je pre methanoarchaea jediná metabolická dráha, v ktorej získavajú energiu. Pre tvorbu metánu využívajú len niekoľko jednoduchých substrátov ($\text{H}_2 + \text{CO}_2$, metanol, formiát a metylamíny). Najuniverzálnejším substrátom je vodík a oxid uhličitý. Postupnou redukciou oxidu uhličitého vodíkom vzniká metán a redoxné reakcie, ktoré sa tohto procesu zúčastňujú, generujú elektrochemické gradienty Na^+ iónov a H^+ súbežne. Oba tieto gradienty môžu byť priamo využívané na poháňanie syntézy ATP.

Problém bioenergetiky methanoarchaea, súčasného využitia dvoch iónových gradientov a ich kooperácia nebola doposiaľ detailne objasnená. Napriek viacročným snahám viacerých laboratórií, problém transformácie energie u methanoarchaea zostáva otvorený. Doposiaľ sa nepodarilo jednoznačne vysvetliť molekulárny mechanizmus využitia oboch iónových gradientov H^+ a Na^+ v syntéze bunkového ATP. Na rozdiel od toho, enzýmy, ktoré tieto gradienty generujú, sú známe a priamo súvisia s procesom metanogenézy.

2.1.1. Na^+ translokujúci metyltransferázový komplex

U metanogénnych archaea je tvorba metánu spojená s paralelnou tvorbou $\Delta\mu_{\text{Na}^+}$ a $\Delta\mu_{\text{H}^+}$, ktoré sa využívajú na



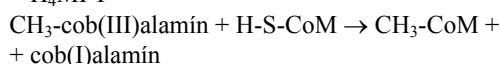
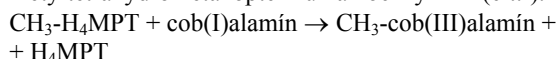
Obr. 1. Prehľad bakteriálnych systémov podieľajúcich sa na energetickom spriahnutí prostredníctvom cirkulácie iónov Na^+

poháňanie endergonických reakcií. Funkciu primárnej H^+ pumpy plní H_2 -heterodisulfid reduktáza (EC 1.8.98.1) a funkciu primárnej Na^+ pumpy N^5 -metyltetrahydrometanopterín: koenzým M metyltransferáza (EC 2.1.1.86).

V prípade tvorby metánu z acetátu, H_2 a CO_2 sa metanogenéza ukázala ako Na^+ závislý proces. Na rozdiel od toho, redukcia metanolu z H_2 na metán nevyžaduje prítomnosť Na^+ kationov. Tieto poznatky viedli k hypotéze, že metanogenéza v mieste prenosu metylovej skupiny z N^5 -metyltetrahydrometanopterínu na koenzým M je proces závislý na Na^+ katióne⁶. Reakcia je katalyzovaná membránovo viazaným enzýmom N^5 -metyltetrahydrometanopterín: koenzým M metyltransferázou translokujúcou Na^+ .

Enzým bol prvýkrát purifikovaný z *Methanobacterium thermoautotrophicum* (kmeň Marburg)⁷. Uvedená metyltransferáza je zložená z ôsmich podjednotiek pričom na 23 kDa polypeptid je naviazaná corrinoidová prostetická skupina obsahujúca kobalt. Vzhľadom na molekulovú hmotnosť celého komplexu a jednotlivých podjednotiek sa dá očakávať, že purifikovaný komplex tvorí tetramér.

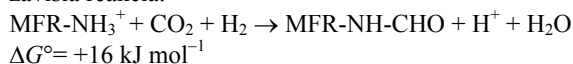
Metyltransferáza katalyzuje dve reakcie. Najprv metyláciu prostetickej skupiny a následne jej demetyláciu, pričom výsledne sa prenáša metylová skupina z N^5 -metyltetrahydrometanopterínu na koenzým M (cit.⁸).



Redukovaná forma enzýmu sa správa ako nukleofil voči metylovej skupine N^5 -metyltetrahydrometanopterínu (CH_3-H_4MPT) a vytvorí s ňou intermediát, ktorý potom odovzdá metylovú skupinu koenzýmu M a vytvorí sa metylkoenzým M. Demetylácia metyltransferázy je stimulovaná Na^+ iónmi, čo nasvedčuje tomu, že práve druhá časť reakcie súvisí s vektorovým transportom týchto iónov. Predpokladá sa, že translokáciu Na^+ iónov poháňajú konformačné zmeny prenášajúce sa cez navzájom susediace podjednotky.

2.1.2. Formylmetanofurán dehydrogenáza

Tento enzým (EC 1.2.99.5) katalyzuje prvý krok metanogenézy, pri ktorom sa CO_2 viaže na metanofurán ($MFR-NH_3^+$) a následne je redukovaný za vzniku formylmetanofuránu ($MFR-NH-CHO$) pomocou elektrónov z vodíka (obr. 2, cit.⁹). Na tejto reakcii sa podieľajú ešte ďalšie dva enzymatické komplexy, hydrogenáza citlivá na kyslík a oxidoreduktáza. Syntéza formylmetanofuránu je v energetickom metabolizme metanogénov dôležitá H_2 závislá reakcia.



Reakcia je endergonická a poháňaná Na^+ gradientom. Bolo zistené, že tvorba metánu z CO_2 a H_2 , ale nie z formaldehydu a H_2 , je inhibovaná Na^+ iónofórmami, čiže redukcia CO_2 po tvorbu formaldehydu musí byť poháňaná $\Delta\mu_{Na^+}$.

Formylmetanofurán dehydrogenáza bola purifikovaná a charakterizovaná u *Methanosarcina barkeri*¹⁰, *Methano-*

*bacterium thermoautotrophicum*¹¹, *Methanobacterium wolfei*¹² a u *Archaeoglobus fulgidus*¹³. Je to multipodjednotkový solubilný proteín obsahujúci molybdén (volfrám), nehemové železo, síru a molybdopterín dinukleotid, ktorého aktivita na vzduchu rapídne klesá.

Enzým u *Methanobacterium thermoautotrophicum* je zložený z dvoch podjednotiek s približnou hmotnosťou 60 kDa a 45 kDa.

3. Konzumenti elektrochemického potenciálu sodných iónov u methanoarchaea

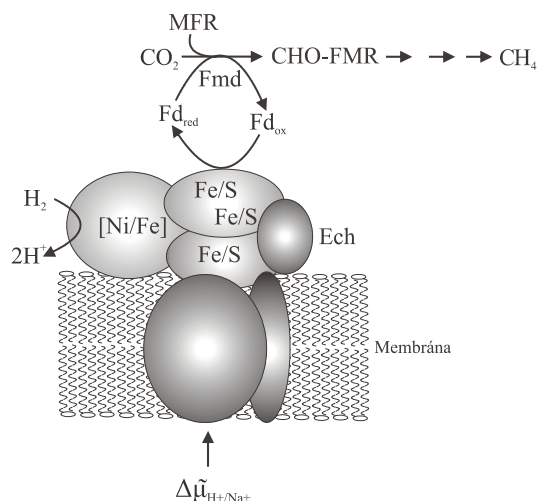
3.1. Na^+ translokujúca V_1V_0 ATPáza

V_1V_0 ATPázy (EC 3.6.3.15) sa nachádzajú u baktérií a taktiež vo vakuolách eukaryotických buniek. U eukaryotov pracujú ako H^+ pumpy, ktoré okysľujú vnútorné prostredie rôznych organel (lyzozómy, endozómy, cisterny Golgiho aparátu). V tomto prípade ich primárna funkcia nespočíva v tvorbe ATP.

Vo svete baktérií napr. Gram-pozitívna baktéria *Enterococcus hirae* má Na^+ translokujúcu V_1V_0 ATPázu, ktorá transportuje Na^+ ióny z cytoplazmy a tým vytvára $\Delta\mu_{Na^+}$ (cit.¹⁴). ATP slúži ako zdroj energie pre tento systém. Predpokladá sa, že táto Na^+ pumpa je dôležitá pre udržiavanie sodnej homeostázy baktérií žijúcich v alkalickom prostredí.

V_0 membránová časť je zložená z podjednotiek G, I a K. V_1 časť tejto ATPázy pozostáva z podjednotiek A, B, C, D, E a F.

ATPázová aktivita purifikovaného enzýmu je citlivá na inhibitory vakuolárnych ATPáz ako nitrát, *N*-etylmaleimid a destruxin B, nereaguje na konkanamycín A., ale je inhibovaná aj DCCD.



Obr. 2. Schématický model redukcie CO_2 na formylmetanofurán u *Methanosarcina barkeri*; Fmd – formylmetanofurán dehydrogenáza, MFR – metanofurán, CHO-MFR – formylmetanofurán, fd – ferredoxín, Ech – energiu konvertujúca hydrogenáza

C podjednotka V_1V_0 ATPázy obsahuje štyri (dvakrát viac ako F_1F_0 ATPáza) transmembránové helixy, ktoré zrejme vznikli génovou duplikáciou a fúziou z génu pre c podjednotku F_1F_0 ATPázy. Rotor tejto ATPázy obsahuje len polovičný počet väzbových miest pre spriahajúce ióny ako ATPázy typu F. Tvorí ho hexamér, pričom každý monomér obsahuje jedno Na^+ -väzbové miesto.

Mechанизmus, akým ATPáza pracuje, je nejasný. Predpokladá sa, že hexamerický rotor rotáciou postupne transportuje Na^+ ióny podobne ako F_1F_0 ATPáza.

3.2. Na^+ závislá A_1A_0 ATP syntáza

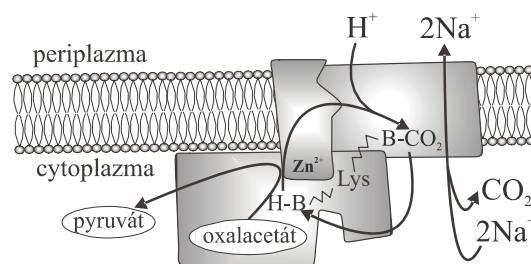
Po analýze membránovo asociovaných ATPáz niektorých archaea sa našli ATPázy, ktoré boli odlišné od ATPáz typu V a F ATPáz a boli klasifikované ako ATPázy typu A (archaeálne). Katalytické časti týchto ATPáz sú vysoko homologické s ATPázami typu V a membránová časť je funkčným homológom F_0 časti¹⁵. Niektoré metanogény (*Methanococcus jannaschii*¹⁶, *Methanobacterium thermoautotrophicum*¹⁷) majú v genóme sekvenciu len pre A_1A_0 ATPázu (EC 3.6.3.14). Jedinou cestou pre tieto organizmy ako syntetizovať ATP je ATP syntéza poháňaná iónovým gradientom. Preto sa predpokladá, že funkciou tejto ATPázy je syntéza ATP. Nevyriešenou zostáva otázka, ktorý spriahajúci ión táto ATPáza využíva. Ako už bolo spomenuté, metanogény produkujú súčasne gradienty H^+ a Na^+ iónov a predpokladá sa, že by mohli priamo využívať aj gradient Na^+ iónov na syntézu ATP¹⁸. Dospeláľ nebola na purifikovanom enzýme určená iónová špecificita, ale nedá sa vylúčiť, že A_1A_0 ATPáza translokuje H^+ aj Na^+ ióny súčasne, ako naznačujú niektoré experimenty¹⁹. Iónová preferencia môže byť určená energiou jednotlivých gradientov.

4. Generátory elektrochemického potenciálu sodných iónov u baktérií

4.1. Dekarboxylázy

Niektoré mikroorganizmy disponujú membránovo viazanými enzýmami, ktoré katalyzujú dekarboxylačné reakcie rastových substrátov a súčasne využívajú voľnú energiu dekarboxylácie na pumpovanie Na^+ iónov von z bunky, čím vytvárajú $\Delta\mu_{\text{Na}^+}$.

Spomedzi dekarboxyláz transportujúcich Na^+ ióny bola objavená ako prvá oxalacetát dekarboxyláza (EC 4.1.1.3) u *Klebsielly aerogenes* a neskôr aj u *Klebsielly pneumoniae*²⁰. Tento enzým zohráva dôležitú úlohu pri anaeróbnom metabolizme citrátu, počas ktorého sa vytvára $\Delta\mu_{\text{Na}^+}$ a 1 mol ATP na 1 mol citrátu. Oxalacetát dekarboxyláza (obr. 3, cit.²¹) je zložená z troch subjednotiek²¹. Subjednotka α obsahuje väzbové miesto pre biotín. Hydrofóbna β subjednotka je lokalizovaná v membráne. Subjednotka γ je svojím N-terminálnym koncom ukotvená v membráne a jej hydrofilná C-terminálna doména je



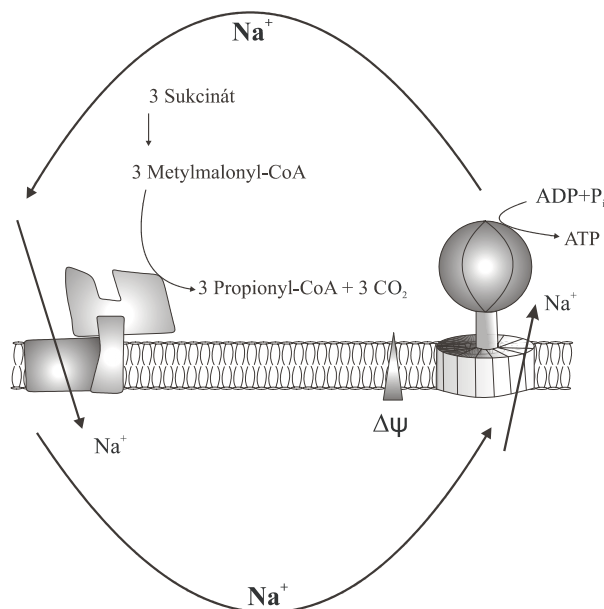
Obr. 3. Obrázok znázorňujúci geometriu oxalacetát dekarboxylázy u *Klebsielly pneumoniae* a mechanizmus dekarboxylácie; BH – biotín

miestom, kde sa k enzýmu viaže Zn^{2+} , ktorý sa priamo zúčastňuje na transfere karboxylu z oxalacetátu. Táto podjednotka sa nachádza medzi α a β podjednotkami a spája ich.

U *Veillonelly alcalescens* bola objavená Na^+ -translokujúca metylmalonyl-CoA dekarboxyláza (EC 4.1.1.41) zúčastňujúca sa pri degradácii sukcinátu na propionát a CO_2 (cit.²²).

Anaeróbná baktéria *Propionigenium modestum* získava všetku energiu tak, že spriaha exergonickú dekarboxyláciu metylmalonyl-CoA s transportom Na^+ cez membránu a vytvorený gradient využíva na syntézu ATP (obr. 4, cit.³).

Ďalšie dekarboxylázy tvoriace $\Delta\mu_{\text{Na}^+}$ sú známe u *Acidaminococcus fermentans* a *Malonomonas rubra*. *Acida-*



Obr. 4. Konzervácia energie počas fermentácie sukcinátu u *P. modestum*; cyklus Na^+ iónov spája exergonickú dekarboxyláciu metylmalonyl-CoA a endergonickú ATP syntézu

minococcus fermentans obsahuje glutaconyl-CoA dekarboxylázu (EC 4.1.1.70), ktorú využíva v metabolizme glutamátu pri dekarboxylácii glutakonyl-CoA na krotonyl-CoA (cit.²³).

Malonomonas rubra obsahuje malonát dekarboxylázu (EC 4.1.1.9), ktorá sa podieľa na reakcii premeny malonátu na acetát a CO₂ (cit.²⁴). Je viac komplikovaná ako predošlé enzýmy, pretože obsahuje aj aktivačný modul potrebný pre túto reakciu.

4.2. Oxidoreduktázy

Morské a halofilné baktérie potrebujú pre svoj rast Na⁺ ióny. Energiu $\Delta\mu_{\text{Na}^+}$ využívajú na poháňanie transportu rôznych látok proti koncentračnému gradientu. Oh a spol.²⁵ skúmali u morských baktérií obsahujúcich Na⁺-translokujúcu NADH:ubichinón oxidoreduktázu (EC 1.6.5.3) závislosť na Na⁺ iónoch. Zistili, že všetky baktérie, ktoré prestali rásť v neprítomnosti NaCl, obsahovali túto primárnu Na⁺ pumpu. Naopak, baktérie bez tejto pumpy dokázali rásť aj v neprítomnosti NaCl. Tieto zistenia ukázali, prečo niektoré morské baktérie vyžadujú pre svoj rast Na⁺ ióny.

NADH:ubichinón oxidoreduktázy (NDH-I) v respiračnom reťazci mitochondrií a baktérií katalyzujú prenos dvoch elektrónov z NADH na ubichinón. Oxidácia jedného NADH je spojená s translokáciou štyroch protónov. Okrem tejto oxidoreduktázy, veľa baktérií a húb obsahuje menšiu a jednoduchšiu (NDH-II).

NADH:ubichinón oxidoreduktáza translokujúca Na⁺ (Na⁺-NQR) bola prvýkrát nájdená u *Vibria alginolyticus*²⁶. Je to enzým spájajúci transfer elektrónov s translokáciou Na⁺ z bunky. Baktérie obsahujúce primárnu Na⁺ pumpu dokážu rásť v alkalickom prostredí aj v prítomnosti protónofórov. Táto alternatíva umožňuje baktériám udržiavať si neutrálne vnútorné pH v alkalickom prostredí.

NADH:ubichinón oxidoreduktáza bola nájdená taktiež u *Klebsielly pneumoniae*²⁷ rastúcej anaeróbne na citráte (obr. 5, cit.²⁸).

Štúdium podjednotiek NADH:ubichinón oxidoreduktázy z *Vibria alginolyticus* ukázalo, že enzým obsahuje šesť podjednotiek, ktoré v dvoch krokoch redukujú ubichi-

nón na ubichinol cez medziprodukt ubisemichinón. NqrF podjednotka obsahuje ako kofaktor nekovalentne naviazaný flavín FAD a na NqrB a NqrC podjednotku sa kovalentne viaže zrejme FMN. Na začiatku NqrB podjednotka reaguje s NADH a redukuje ubichinón na ubisemichinón. Táto reakcia je silno inhibovaná Ag⁺. Potom NqrA podjednotka v prítomnosti NqrC podjednotky redukuje ubisemichinón na ubichinol. V tomto bode dochádza k translokácii Na⁺, pričom sa potvrdilo, že špecifický inhibitor Na⁺ púmp 2-*n*-heptyl-4-hydroxychinolín *N*-oxid (HQNO) výrazne inhibuje túto časť reakcie. NqrF taktiež obsahuje [2Fe-2S] klaster, ktorý sa s vyššie spomenutými kofaktormi podieľa na redoxnej reakcii katalyzovanej NADH:ubichinón oxidoreduktázou²⁹.

5. Konzumenti elektrochemického potenciálu sodných iónov u baktérií

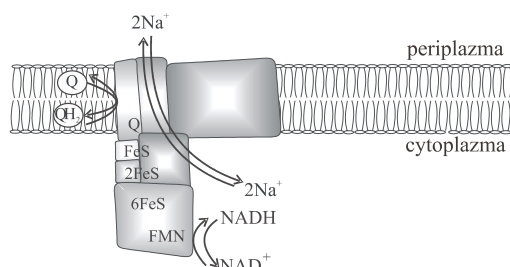
5.1. Na⁺ spriahnutý symport

Symportéry sú membránové transportné proteíny zodpovedné väčšinou za akumuláciu živín, ale aj za osmoadaptáciu buniek. Energiu na poháňanie transportu týchto látok získavajú z H⁺ alebo Na⁺ elektrochemického potenciálu. Symportéry využívajúce gradient Na⁺ iónov u baktérií tvoria viacero skupín a sú bežnou cestou pre príjem substrátov. Obyčajne ide o transport aminokyselín, sacharidov a citrátov. Ióny Na⁺ vstupujú do bunky v smere elektrochemického gradientu, čím poskytujú energiu pre vstup substrátov³⁰.

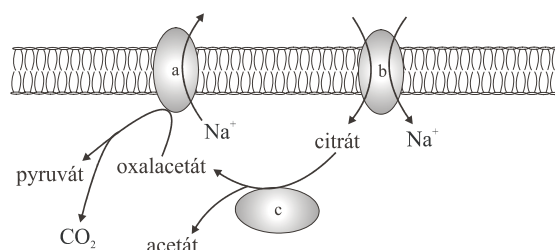
Príkladom Na⁺ závislého transportu sacharidu do bunky je melibiózový prenášač u *Salmonelly typhimurium* alebo *E. coli*. Zaujímavosťou je, že tento prenášač dokáže na kotransport okrem Na⁺ katiónu využívať aj H⁺ a Li⁺ ióny.

Kotransport Na⁺ so sacharidmi bol pozorovaný taktiež u morských baktérií (*Vibrio fisherii*, *Alteromonas haloplanktis*, *Vibrio alginolyticus*).

K. pneumoniae má za anaeróbnych podmienok indukateľný Na⁺-závislý transportný systém pre citrát ako zdroj uhlíka³¹. Citrát vstupuje do bunky v symporte s Na⁺



Obr. 5. Schématický model NADH:ubichinón oxidoreduktázy u *Klebsielly pneumoniae*; Q – ubichinón



Obr. 6. Časť metabolizmu citrátu u *K. pneumoniae*; a – oxalacetát dekarboxyláza, b – citrátový prenášač, c – citrát lyáza

a vo vnútri bunky sa štiepi citrát lyázou (EC 4.1.3.6) na acetát a oxalacetát. Oxalacetát sa následne dekarboxyluje na pyruvát pomocou membránovo viazaného enzýmu oxalacetát dekarboxylázy, ktorá pumpuje von z bunky Na^+ ióny, čím vytvára $\Delta\mu_{\text{Na}^+}$ (obr. 6, cit.³²).

Kotransportér rozvetvených aminokyselín (leucín, izoleucín, valín) závislý na Na^+ katiónoch bol študovaný u *Pseudomonas aeruginosa* a gény pre podobné prenášače boli identifikované aj u *S. typhimurium*.

5.2. Na^+/H^+ antiporter

Jeden z dôležitých transportných systémov u baktérií je aj Na^+/H^+ antiporter, ktorý spája obeh H^+ a Na^+ iónov cez membránu. Je to integrálny membránový proteín, ktorý katalyzuje výmenu H^+ z jednej strany membrány za Na^+ ióny na opačnej strane, čím reguluje vnútrobunkové pH, obsah Na^+ iónov v bunke a bunkový objem³³. Antiporter využíva protónmotívnu silu a premieňa ju na elektrochemický Na^+ gradient alebo naopak. Mnohé Na^+/H^+ antiportery sú veľmi citlivé na zmeny pH, čo potvrdzuje ich úlohu v pH homeostáze a sú rozšírené vo všetkých bunkách od archaea cez baktérie až po eukaryoty. Extrémofily patriace medzi archaea nie sú výnimka. Obsahujú antiportery, ktoré majú významné funkcie v ich metabolizme a bioenergetike. Alkalofilné baktérie sú schopné prežívať v prostredí s extrémne nízkou koncentráciou H^+ , v rozmedzí pH 9 až 11. Za túto schopnosť vďaka elektrogrénym Na^+/H^+ antiporterom, ktoré vytvárajú pH gradient s rozdielom okolo dvoch pH jednotiek³⁴. Pri respirácii a ATP syntéze využívajú protónový cyklus. Sekundárny transport spriahnutý s Na^+ gradientom využívajú na symport živín a pohyb bičika.

U extrémnych halofilov, ktoré žijú v prostredí s vysokými koncentraciami solí, udržiava antiporter nižšiu vnútrobunkovú koncentráciu Na^+ oproti okoliu. U týchto organizmov existuje primárny Na^+ cyklus rovnako ako H^+ cyklus. Syntézu ATP u nich v niektorých prípadoch poháňa aj Na^+ gradient. Sekundárny transport je v tomto prípade poháňaný Na^+ gradientom.

Metanogény majú cyklus iónov na membráne najviac podobný morským baktériám. Obsahujú Na^+/H^+ antiporter, ktorý slúži ako centrálny spojovací a prepínací článok medzi energetickými procesmi závislými na H^+ a systémami závislými na Na^+ iónoch. Pred genómovou analýzou bol Na^+/H^+ antiporter detegovaný u týchto organizmov prostredníctvom inhibítorov ako amilorid, harmalín a EIPA [5-(N-etyl-N-izopropyl)-amilorid], špecifických pre tento antiporter. Metanogénou vytvorený Na^+ gradient sa môže pomocou antiportera premieňať na H^+ gradient, ale samozrejme tento proces funguje aj opačným smerom. U *Ms. barkeri* sa antiporter v alkalických podmienkach zúčastňuje pH regulácie, kedy recykluje H^+ do cytoplazmy výmenou za Na^+ ióny.

Podrobnosti o Na^+/H^+ antiporteroch boli analyzované v prácach Šurína³⁵ a Majerníka³⁶.

5.3. Flagelárne motory poháňané gradientom sodných iónov

Flagely sú organely zodpovedajúce za pohyb mnohých baktérií a archaea. Bakteriálny flagelárny motor využíva energiu iónového gradientu a dokáže sa otáčať rýchlosťou až 100 000 otáčok za minútu. Niektoré baktérie využívajú H^+ elektrochemický gradient, iné gradient Na^+ iónov.

Napr. motilita *Vibria alginolyticus* je závislá na Na^+ gradiente a Na^+ ióny pre pohyb flagely využívajú taktiež aj niektoré alkalofilné *Bacilly*, pretože vzhľadom na pH prostredia je ich protónmotívna sila nízka³⁷. Funkčné vlastnosti motoru sa zdajú byť objasnené, ale molekulárny mechanizmus je zatiaľ neznámy, čo vyplýva z neobvyčajnej zložitosti týchto motorov.

5.4. F_1F_0 ATP syntáza využívajúca spriahajúce sodné ióny

F_1F_0 ATPázy sa nachádzajú u baktérií rovnako ako aj v mitochondriách a chloroplastoch eukaryotov. Obyčajne využívajú energiu H^+ gradientu na syntézu ATP. U *P. modestum* bolo zistené, že vlastní špeciálnu F_1F_0 ATPázu (EC 3.6.3.15), ktorá využíva ako spriahajúce ióny Na^+ (cit.³⁸). ATPázy s podobnými vlastnosťami boli nájdené aj u iných mikroorganizmov napr. *Acetobacterium woodii*³⁹ a *Ilyobacteria tartaricus*⁴⁰. Na^+ translokujúca F_1F_0 ATPáza má typické podjednotkové zloženie ako eubakteriálna ATPáza.

F_1 časť je zložená z piatich rôznych podjednotiek α_3 , β_3 , γ , δ , ϵ a F_0 časť sa skladá z troch odlišných podjednotiek a , b_2 , c_{9-12} . Porovnanie veľkosti a identity podjednotiek z *P. modestum* a *E. coli* naznačuje, že obe ATPázy sú fylogeneticky príbuzné, pričom α a β podjednotky sú vysoko konzervované.

Počas syntézy ATP dochádza k transportu Na^+ iónov z periplazmy cez kanál statoru (podjednotka a) na Na^+ väzbové miesta na rotore (podjednotka c). Po rotácii rotora sa Na^+ ión uvoľní do cytoplazmy.

Elektrochemický gradient $\Delta\mu_{\text{Na}^+}$, ktorý poháňa syntézu ATP, pozostáva z dvoch zložiek, z koncentračného gradientu Na^+ iónov Δp_{Na^+} a membránového potenciálu $\Delta\psi$. Uvedené zložky boli dlho považované za termodynamické a kinetické ekvivalenty, ale zistilo sa, že ATP syntéza je za fyziologických podmienok závislá na $\Delta\psi$. Ukázalo sa totiž, že len $\Delta\psi$ dokáže indukovať krútiaci moment, ktorý poháňa protismernú rotáciu a a c podjednotky F_0 motora *Propionigenium modestum* ATP syntázy⁴¹.

5.5. Cyklus sodných iónov u bakteriálnych patogénov

Genómová analýza ukázala, že genómy mnohých ľudských a živočíšnych patogénov kodujú primárne membránové Na^+ pumpy, Na^+ transportujúce dekarboxylázy,

Na^+ translokujúce NADH:ubichinón oxidoreduktázy a viaceré Na^+ dependentných permeáz⁴². Tieto zistenia naznačili, že patogény podobne ako aj iné baktérie môžu využívať Na^+ ióny namiesto H^+ vo svojej energetike ako spriahajúce ióny. Využívanie Na^+ cyklu môže byť významným faktorom virulencie u tak nebezpečných patogénov ako *Vibrio cholerae*, *Neisseria meningitidis*, *Salmonella enterica* serovar Typhi a *Yersinia pestis*. U *Treponema pallidum*, *Chlamydia trachomatis* a *Chlamydia pneumoniae* môže Na^+ gradient slúžiť ako jediný zdroj energie pre poháňanie sekundárnych transportérov. Aj keď mnohé patogény využívajú Na^+ vo svojich fyziologických funkciách, úloha Na^+ bioenergetiky v bakteriálnej virulencii je stále nerozriešená. Z uvedených dôvodov, porozumenie Na^+ závislej bioenergetiky vo svete baktérií a archaea predstavuje veľmi zaujímavú výzvu pre bioenergetickú vedeckú obec. Naše poznanie v tomto smere je len vo svojich počiatkoch, ale hojné rozšírenie Na^+ cyklu vo svete patogénov naznačuje, že výskyt Na^+ závislej bioenergetiky môže výrazne zvyšovať verzabilitu membránovej bioenergetiky aj u týchto mikroorganizmov. V tejto súvislosti je potrebné spomenúť, že dnes poznáme niektoré látky (napr. korormicin) fungujúce ako inhibitory Na^+ cyklu v energetickom metabolizme niektorých ľudských patogénov, čo naznačuje, že Na^+ pumpy by mohli byť sľubným potenciálnym terčom účinkovania špecifických liečiv.

6. Záver

Donedávna bolo všeobecne akceptované, že H^+ slúžia ako spriahajúce ióny, ktoré spájajú endergonické a exergonické bunkové procesy prebiehajúce na bunkových membránach. Postupne sa získali experimentálne údaje, ktoré ukázali, že Na^+ ióny môžu za špecifických rastových podmienok nahradiť H^+ ako spriahajúce ióny. U mnohých baktérií boli popísané viaceré primárne Na^+ pumpy – generátory $\Delta\mu_{\text{Na}^+}$, ako aj konzumenti $\Delta\mu_{\text{Na}^+}$. Cyklus Na^+ zložený z takýchto generátorov a konzumentov $\Delta\mu_{\text{Na}^+}$, bol v súčasnej dobe popísaný u mnohých aeróbných a anaeróbných baktérií, ale aj u archaea vrátane methanoarchaea. Nie je potom prekvapujúce, že existencia Na^+ cyklu bola popísaná aj u mnohých závažných humánných a živočíšnych patogénov. Tieto zistenia ukazujú, že Na^+ cyklus paralelne s H^+ cyklom zohráva významnú funkciu v adaptácii baktérií na prostredie, v ktorom žijú, a že jeho rozšírenie v biosfere má nezastupiteľnú funkciu.

LITERATÚRA

- Mitchell P.: Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc. 41, 445 (1966).
- Dimroth P.: FEBS Lett. 122, 234 (1980).
- Dimroth P.: Microbiol. Rev. 51, 320 (1987).
- Skulachev V. P.: Biokhimiia 50, 179 (1985).
- Dimroth P., Ballmoos Ch., Meier T.: EMBO 7, 3 (2006).
- Becher B., Müller V., Gottschalk G.: J. Bacteriol. 174, 7656 (1992).
- Gärtner P., Ecker A., Fischer R., Linder D., Fuchs G., Thauer R. K.: Eur. J. Biochem. 213, 537 (1992).
- Weiss D. S., Gärtner P., Thauer R. K.: Eur. J. Biochem. 226, 799 (1994).
- Hedderich R.: J. Bioenerg. Biomembr. 36, 1 (2004).
- Karrasch M., Borner G., Enssle M., Thauer R. K.: FEBS Lett. 253, 226 (1989).
- Borner G., Karrasch M., Thauer R. K.: FEBS Lett. 290, 31 (1991).
- Schmitz R. A., Richter M., Linder D., Thauer R. K.: Eur. J. Biochem. 207, 559 (1992).
- Schmitz R. A., Linder D., Stetter K. O., Thauer R. K.: Arch. Microbiol. 156, 427 (1991).
- Murata T., Yamato I., Kakinuma Y.: J. Bioenerg. Biomembr. 37, 411 (2005).
- Mukohata Y. a Ihara K., v knihe: Bioenergetics: (Kim C. H., Ozawa T., ed.). Plenum Press, New York 1990.
- Bult C. J., White O., Olsen G. J., Zhou L., Fleischmann R. D., Sutton G. G., Blake J. A., FitzGerald L. M., Clayton R. A., Gocayne J. D., Kerlavage A. R., Dougherty B. A., Tomb J. F., Adams M. D., Reich C. I., Overbeek R., Kirkness E. F., Weinstock K. G., Merrick J. M., Glodek A., Scott J. L., Geoghagen N. S., Venter J. C.: Science 273, 1058 (1996).
- Smith D. R., Doucette-Stamm L. A., Deloughery C., Lee H., Dubois J., Aldredge T., Bashirzadeh R., Blakely D., Cook R., Gilbert K., Harrison D., Hoang L., Keagle P., Lumm W., Pothier B., Qiu D., Spadafora R., Vicaire R., Wang Y., Wierzbowski J., Gibson R., Jiwani N., Caruso A., Bush D., Safer H., Patwell D., Prabhakar S., McDougall S., Shimer G., Goyal A., Pietrokowski S., Curchen G. M., Daniels C. J., Mao J. I., Rice P., Nolling J., Reeve J. N.: J. Bacteriol. 179, 7135 (1997).
- Šmigán P., Majerník A., Greksák M.: FEBS Lett. 349, 424. Erratum in: FEBS Lett. 353, 230 (1994).
- Pisa K. Y., Huber H., Thomm M., Muller V.: FEBS J. 274, 3928 (2007).
- Schwarz E., Oesterhelt D., Reinke H., Beyreuther K., Dimroth P.: J. Biol. Chem. 263, 9640 (1988).
- Dimroth P., Jockel P., Schmid M.: Biochim. Biophys. Acta. 1505, 1 (2001).
- Galivan J. H., Allen S. H.: Arch. Biochem. Biophys. 126, 838 (1968).
- Buckel W., Semmler R.: FEBS Lett. 148, 35 (1982).
- Hilbi H., Dehning I., Schink B., Dimroth P.: Eur. J. Biochem. 207, 117 (1992).
- Oh S., Kogure K., Ohwada K., Simidu U.: Appl. Environ. Microbiol. 57, 1844 (1991).
- Tokuda H., Unemoto T.: J. Biol. Chem. 259, 7785 (1984).
- Dimroth P., Thomer A.: Arch. Microbiol. 151, 439 (1989).
- Gemperli A. C., Dimroth P., Steuber J.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100, 839 (2003).
- Türk K., Puhar A., Neese F., Bill E., Fritz G., Steuber J.: J. Biol. Chem. 279, 21349 (2004).

30. Wilson T. H., Ding P. Z.: *Biochim. Biophys. Acta* 1505, 121 (2001).
31. Dimroth P., Thomer A.: *J. Biol. Chem.* 265, 7721 (1990).
32. Dimroth P.: *Biochim. Biophys. Acta* 1318, 11 (1997).
33. Hunte C., Screpanti E., Venturi M., Rimon A., Padan E., Michel H.: *Nature* 435, 1197 (2005).
34. Krulwich T. A.: *Mol. Microbiol.* 15, 403 (1995).
35. Šurín S.: *Chem. Listy* 99, 633 (2005).
36. Majerník A.: *Chem. Listy* 91, 114 (1997).
37. Imae Y., Atsumi T.: *J. Bioenerg. Biomembr.* 21, 705 (1989).
38. Laubinger W., Dimroth P.: *Eur. J. Biochem.* 168, 475 (1987).
39. Reidlinger J., Müller V.: *Eur. J. Biochem.* 223, 275. Erratum in: *Eur. J. Biochem.* 226, 1079 (1994).
40. Neumann S., Matthey U., Kaim G., Dimroth P.: *J. Bacteriol.* 180, 3312 (1998).
41. Dimroth P., Kaim G., Matthey U.: *J. Exp. Biol.* 203, 51 (2000).
42. Hase C. C., Fedorova N. D., Galperin M. Y., Dibrov P. A.: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65, 353 (2001).

Z. Nováková and P. Šmigáň (*Institute of Animal Biochemistry and Genetics, Slovak Academy of Sciences, Ivanka pri Dunaji, Slovak Republic*): **Cycle of Sodium Ions in Bacteria and Methanoarchaea**

This review discusses the progress of bioenergetic studies on the role of Na^+ in bacteria and Archaea. Na^+ ions have at least four functions in bacterial and Archaeal cells, namely in the Na^+ -ion X cotransport system, Na^+ -coupled energy transformation, pH homeostasis mechanisms, and activation of special enzymes. Thus, in a number of bacteria and Archaea, endergonic and the exergonic membrane-associated processes are linked by the cycling of Na^+ ions which shows that Na^+ , under certain conditions, can substitute H^+ as the coupling ions. This review also discusses some problems related to the Na^+ cycle in human pathogens.