

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Jan Bazger

Elektronová bifurkace – nový fenomén v bioenergetice
Electron bifurcation – a new phenomenon in bioenergetics

Bakalářská práce

Školitel:
doc. RNDr. Ivan Hrdý, Ph.D

Praha, 2021

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne, 13. 8. 2021

Podpis

Abstrakt:

Elektronová bifurkace je mechanismus enzymové katalýzy, při níž dochází k redukci kofaktoru o nižším redoxním potenciálu elektronovým donorem o vyšším redoxním potenciálu. Od roku 2008, kdy se pozorování tohoto děje, dříve známého pouze z Q-cyklu v komplexu III, rozšířilo o objev elektronové bifurkace založené na flavinech bylo celkově popsáno 12 flavoproteinů, které tento děj katalyzují. Využití této katalýzy je zatím pozorováno zejména u anaerobních organismů, jako jsou metanogeny nebo acetogeny, které žijí v prostředí s nízkoenergetickými substráty. Pro tyto organismy je možnost redukce vysokoenergetických molekul, v podobě ferredoxinu či flavodoxinu, schopné redukce molekul, jejichž redukci by museli katalyzovat na úkor chemiosmotického gradientu nebo hydrolyzy ATP významnou výhodou. Fylogenetických analýz, které by dávali ucelený přehled o možnostech celkového rozšíření elektronové bifurkace založené na flavinech mezi organismy je zatím v literatuře nedostatek. Podobná situace se týká molekulárních mechanismů, pro většinu enzymových komplexů jsou tyto data zatím nedostupná.

Klíčová slova: elektronová bifurkace, flavin, flavoprotein, ubiquinon, konzervace energie, ferredoxin, flavodoxin, Rnf komplex, Ech hydrogenáza

Abstract:

Electron bifurcation is a mechanism of enzyme catalysis in which a cofactor of lower redox potential is reduced by an electron donor of higher redox potential. Since 2008, when the observation of this event, previously known only from the Q-cycle in complex III, was extended by the discovery of flavin-based electron bifurcation, a total of 12 flavoproteins have been described that catalyze this event. The use of this catalysis has so far been observed mainly in anaerobic organisms, such as methanogens or acetogens, which live in environments with low-energy substrates. For these organisms, the ability to reduce high-energy molecules, in the form of ferredoxin or flavodoxin, capable of reducing molecules whose reduction they would have to catalyze at the expense of a chemiosmotic gradient or ATP hydrolysis is a significant advantage. Phylogenetic analyses that give a comprehensive overview of the possibilities for the overall spread of flavin-based electron bifurcation among organisms are still scarce in the literature. A similar situation applies to molecular mechanisms, for most enzyme complexes, such data are not yet available.

Key words: electron bifurcation, flavin, flavoprotein, ubiquinone, energy conservation, ferredoxin, flavodoxin, Rnf complex, Ech hydrogenase

Obsah

1 Úvod	1
2 Principy elektronové bifurkace.....	2
3 Fyziologický význam ferredoxinů a flavodoxinů	5
4 Molekulární mechanismy elektronové bifurkace v enzymových komplexech	7
4.1 Komplex III	7
4.2 NADH-dependentní ferredoxin:NADP ⁺ oxidoreduktáza	8
4.3 Elektron-transferující flavoprotein-menachinon oxidoreduktáza	10
5 Růst mikroorganismů na nízkoenergetických substrátech	11
5.1 Acetogeneze	12
5.2 Fixace dusíku	15
5.3 Metanogeneze.....	16
6 Objev FBEB	19
7 Fylogenetické rozšíření FBEB mezi organismy	22
8 Elektronová bifurkace a vznik života	23
9 Závěr.....	25
10 Použitá literatura	26

Seznam zkratk

EB	elektronová bifurkace
FBEB	elektronová bifurkace založená na flavinech
QBEB	elektronová bifurkace založené na chinonech
FBEC	elektronová konfurkace založená na flavinech
Rnf komplex	rhodobacter nitrogen fixační komplex
Ech	E. Coli hydrogenáza
NfnAB	NADH-dependentní ferredoxin:NADP ⁺ oxidoreduktáza
FixABCX	elektron-transferující flavoprotein-menachinon oxidoreduktáza
HydABC	ferredoxin- a NAD-dependentní [FeFe]-hydrogenáza
NAD	nikotinamidadenindinukleotid
FAD	flavinadenindinukleotid
Fd	ferredoxin
Fld	flavodoxin
UQ	ubichinol
Q	ubichinon
SQ	semichinon
WLP	Wood-Ljungdahl dráha

1 Úvod

Elektronová bifurkace na bázi flavinu je nedávno objeveným mechanismus sprážením endergonických a exergonických redoxních reakcí. Má zásadní význam pro biochemii mikroorganismů, zejména těch, které žijí na termodynamických limitech života, typicky organismů využívající metanogeneze nebo acetogeneze. Klíčovou vlastností, společnou všem bifurkačním enzymům, je schopnost využívat volnou energii uvolněnou sprážením exergonických a endergonických redoxních reakcí k redukci dvou rozdílných akceptorů o různých redoxních potenciálech.

Samotný termín „elektronová bifurkace“ je původně používán k popisu jevů spojených s Q-cyklem respiračního komplexu III (cytochrom bc_1) mitochondriálního elektronového transportního řetězce (ETC), který v 70. letech 20. století objevil a popsal Peter Dennis Mitchell (Mitchell, 1975). Výsledkem tohoto cyklu je translokace protonů z matrix mitochondrie do mezimembránového prostoru spojená s oxidací ubichinolu (QH_2) v místě Q_o a redukcí ubichinonu (Q) v místě Q_i . Tento transmembránový přenos protonů udržuje protonmotivní sílu nutnou k udržení chemiosmotického gradientu potřebného k syntéze ATP.

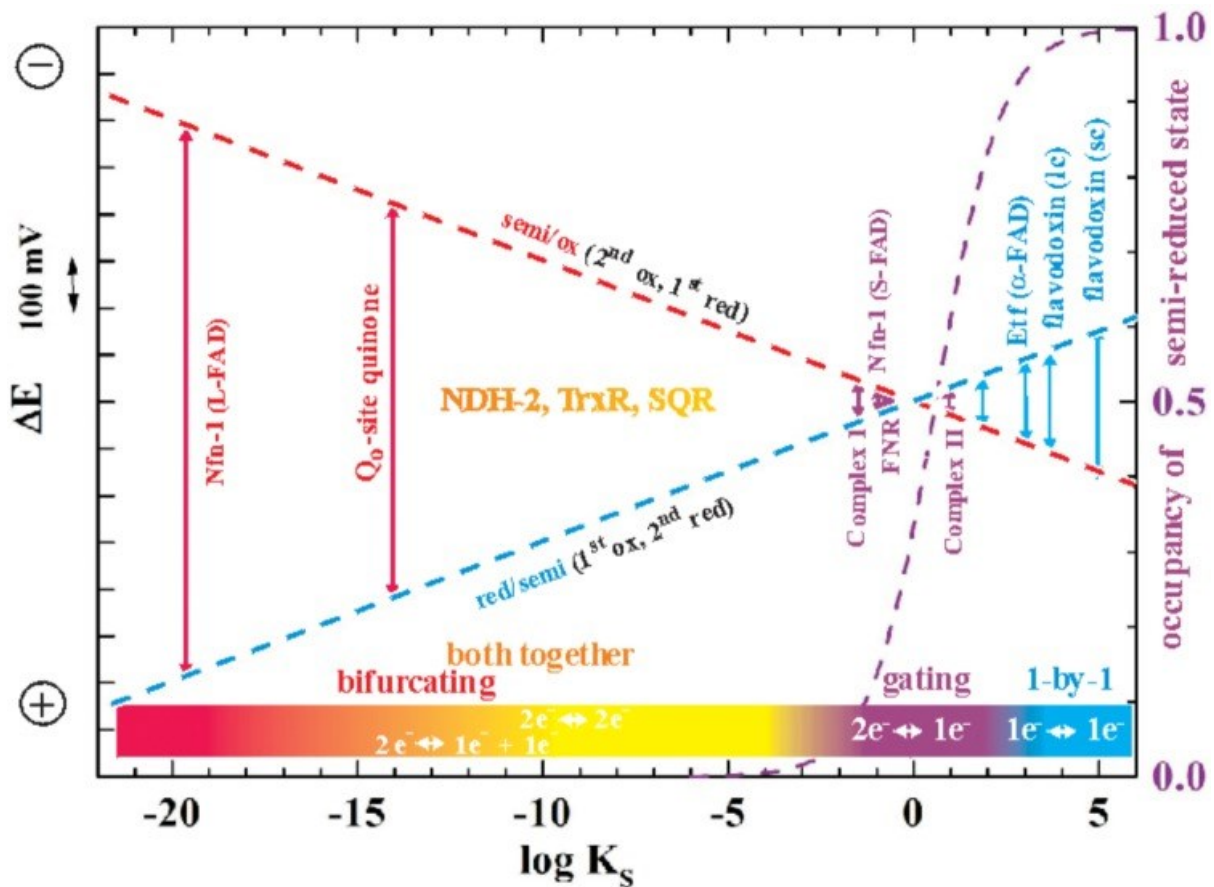
Mnoho let se mělo za to, že elektronová bifurkace je unikátní jen pro komplex III. V roce 2008 (Herrmann *et al.*, 2008) byl ale stejný jev objeven v enzymovém komplexu využívajícím flavin jako bifurkační kofaktor. Dnes je bifurkace elektronů na bázi flavinu (FBEB) popsána v řadě anaerobních, ale i několika aerobních organismů.

Celkově se mechanismy elektronové bifurkace v enzymech využívajících flaviny i chinony zdají analogické. Flaviny a chinony mají podobné redoxní vlastnosti, jsou účinné při zprostředkování jednoelektronového i dvouelektronového přenosu a mohou fungovat využitím invertovaných redukčních potenciálů.

2 Principy elektronové bifurkace

Enzymová katalýza využívající elektronové bifurkace (EB) je charakterizována přesunem dvou elektronů z jednoho dvouelektronového donoru na dva prostorově oddělené akceptory o rozdílných redoxních potenciálech. V rámci této katalýzy lze rozlišovat dvě dráhy přesunu elektronů. První dráha je celkově endergonická, elektron se v jejím rámci přesouvá na finální elektropozitivnější (vysokopotenciálový) akceptor. Z dostupných modelů katalýzy EB platí, že první elektronový akceptor v této dráze je ale elektronegativnější než donor elektronů, platí tedy, že tento krok je rychlost limitujícím faktorem celé katalýzy (Crofts *et al.*, 2013). Přenos druhého elektronu v druhé dráze, tzv. nízkopotenciálové, je umožněn díky metastabilní povaze donoru elektronů, který po přenosu prvního elektronu získává větší redukční potenciál (nižší elektrochemický potenciál) a může tak redukovat akceptory s nízkým potenciálem. Z celkového pohledu je druhá dráha elektronové bifurkace endergonická (Lubner *et al.*, 2017), akceptorem je molekula, na jejíž redukci by se jinak musela vynaložit dodatečná volná energie ze systému.

Zmíněnými donory elektronů jsou molekuly chinonového typu: ubichinon, menachinon, plastochinon (Bergdoll *et al.*, 2016), nebo flavinového typu, kde donorem je flavin ve formě flavinadenindinukleotidu (FAD), či flavinmononukleotidu (FMN) (Lubner *et al.*, 2017). Klíčovou vlastností těchto kofaktorů jsou jejich redoxní vlastnosti při dvouelektronových přenosech. Přenos se může rozlišovat podle toho, jestli je přenos elektronů uskutečněn po jednom elektronu, nebo oběma elektrony najednou. V případě přenosu z donoru na akceptor po jednom elektronu se takový děj označuje za negativní kooperaci. Pokud jsou oba elektrony přenášeny společně, je děj označován jako pozitivní kooperace. V případě negativní kooperace, první redukce (chinonu/flavinu) vede ke snížení elektrochemického potenciálu pro druhou redukci kofaktoru. Následná redukce tedy bude energeticky náročnější. Jak ale Michaelis ve své práci z roku 1932 (Michaelis, 1932) popsal, vlastnosti kofaktoru se mohou lišit v závislosti na jeho prostředí a negativní kooperace spolu s pozitivní kooperací tvoří kontinuum charakterizované postupnou změnou rozdílu elektrochemického potenciálu mezi středy redoxních potenciálů jednotlivých přechodů. Pro silnou pozitivní kooperaci, jejíž součástí je elektronová bifurkace, platí, že v rovnovážných redoxních titracích za standardních fyziologických podmínek je semiredukovaný stav kofaktoru velmi nestabilní. Kontinuum redoxních vlastností kofaktorů, charakterizované rovnovážnou konstantou K_s a změnou elektrochemického potenciálu, je dobře ilustrováno obrázkem 1, takzvanou „redoxní houpačkou“.

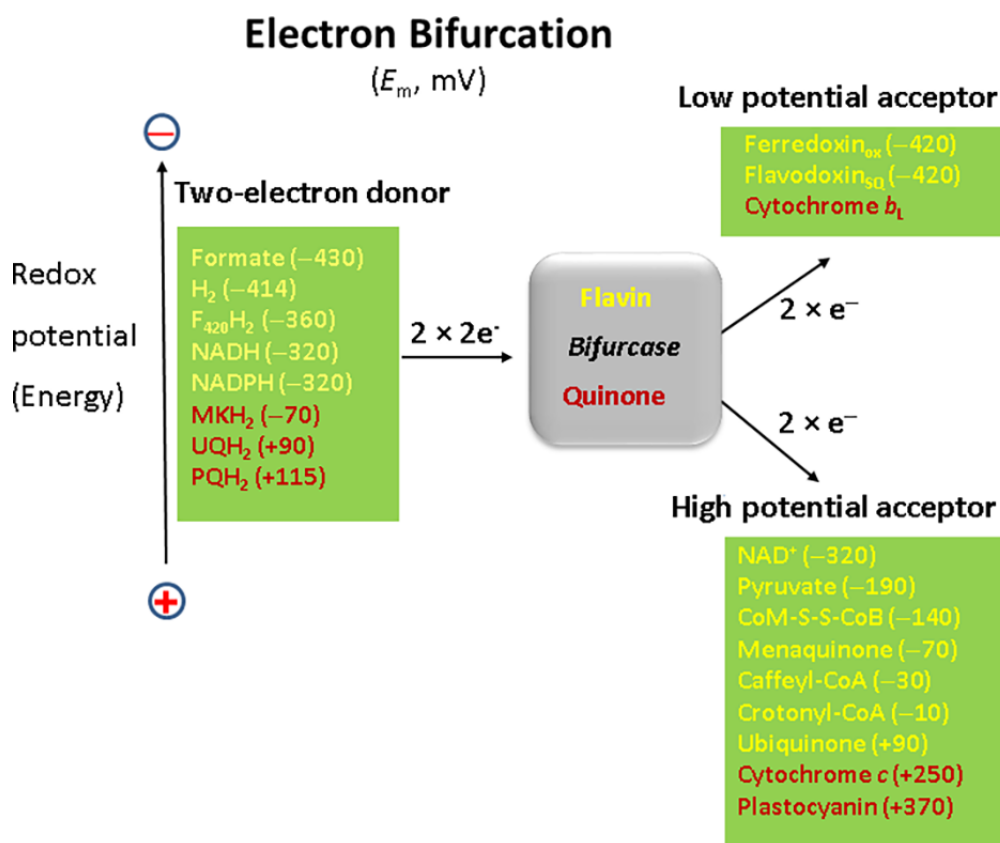


Obr. 1: Vztah mezi funkcí přenosu elektronů a redoxní kooperativou flavinových kofaktorů (převzato z Baymann *et al.*, 2018)

Jak je z obrázku 1 patrné, flavinové kofaktory mohou mít různé redoxní vlastnosti a vykazovat tak oba typy kooperace. Díky tomu mohou být v organismech využívány k mnoha různým účelům. Striktní jednoelektronový přenos, vykazující charakteristiky negativní kooperace, lze pozorovat u sinicích žijících v prostředí s limitovaným množstvím dostupného železa. Flavinový kofaktor nahrazuje funkci [2Fe-2S] ferredoxinů a ve formě semiredukovaného/redukovaného páru tam přenáší elektrony z fotosystému I (Sétif, 2001). Oba typy kooperace, v závislosti na prostředí, může vykazovat enzym ferredoxin NAD(P)⁺ reduktáza (FNR), který katalyzuje jednoelektronový přenos v interakci s ferredoxiny, nebo dvouelektronový přenos v interakci s NAD. Striktně dvouelektronové přenosy katalyzuje thioredoxin reduktáza (TrxR) redukující thioredoxin při oxidaci NADPH (Wang *et al.*, 1998). Děj elektronové bifurkace patří svou charakteristikou ke dvouelektronovým přenosům se silně pozitivní kooperací. Redoxní profily těchto kofaktorů se pak v anglické literatuře označují jako „inverted“ nebo nověji jako „crossed“ (Yuly *et al.*, 2019). Právě tyto profily, kde semiredukovaný / oxidovaný pár kofaktoru má zásadně nižší střed redoxního potenciálu, jsou zásadní vlastností kofaktorů pro katalýzu elektronové bifurkace. Přenos elektronu na akceptor v druhé dráze by z termodynamického hlediska nebyl dostupný. Nízkopotenciálový akceptor by byl příliš

elektronegativní na to, aby katalýza z kinetického hlediska probíhala pro organismus smysluplně využitelnou rychlostí bez zapojení dalšího zdroje energie, například v podobě ATP.

V principu jsou mechanismy elektronové bifurkace na bázi flavinů i chinonů podobné. Hlavní odlišnosti spočívají v buněčné lokalizaci těchto enzymových komplexů. Zatímco enzymy katalyzující elektronovou bifurkaci na bázi chinonu (QBEB) jsou membránově vázány, elektronová bifurkace na bázi flavinu (FBEB) jsou až na jednu výjimku (FixABCX) cytoplazmatické. Dalším rozdílem je jejich využití. QBEB využívají zejména aerobní organismy v respiračním cyklu k regeneraci chinonu a translokaci protonů přes membránu, FBEB je až na výjimky využívána anaerobní organismy a produktem jsou primárně nízkopotenciální redukční ekvivalenty (Fd/Fld), které mohou být využity přímo jako substrát pro další redoxní reakce nebo jako zdroj energie pro enzymy generující membránový potenciál (Hedderich, 2004; Westphal *et al.*, 2018).



Obr. 2: Přehled substrátů a produktů rozlišených podle popsaných flavinových a chinonových systémů. Čísla v závorkách odpovídají středním redoxním potenciálům za standardních fyziologických podmínek (převzato z Buckel and Thauer, 2018a).

3 Fyziologický význam ferredoxinů a flavodoxinů

V biologii a biochemii se o konzervaci energie mluví ve spojitosti s přeměnou chemické nebo světelné energie do formy ATP. Mechanismy takové konzervace zahrnují fosforylaci na substrátové úrovni, fosforylaci s přenosem elektronů nebo fotofosforylaci s „energeticky bohatými“ meziprodukty, které jsou regulovány v rovnováze se systémem ATP. Těmito energeticky bohatými meziprodukty jsou chápány molekuly typu 1,3-bisfosfoglycerátu nebo fosfoenolpyruvátu, v případě substrátové fosforylace acetylfosfátu, v případě fosforylace spojené s přenosem elektronů přes membránu pak elektrochemický iontový (H^+/Na^+) gradient. U aerobních organismů s dýchacím řetězcem lze z tohoto pohledu považovat za energeticky bohaté meziprodukty také NADH. U anaerobních organismů pak můžeme redukované formy ferredoxinů a flavodoxinů považovat za zdroj vysokoenergetických elektronů vhodných k redukčním reakcím. V případě spojení s translokačními enzymy vytvářející chemiosmotický gradient je pak ale také můžeme považovat za energeticky bohaté meziprodukty, díky jejich rovnováze se systémem generujícím ATP prostřednictvím membránového gradientu. Striktně vzato z tohoto pohledu nelze považovat elektronovou bifurkaci na bázi flavinu za nový způsob konzervace energie, jak je občas označována, ale spíše za nový mechanismus pro generování energeticky bohatých molekul, který prostřednictvím redukce NAD^+ nebo H^+ jako elektronových akceptorů mohou poskytovat energii pro fosforylaci ADP. Toho využívají zejména bakterie a archea rostoucí v anaerobních podmínkách.

Dnes jsou známy dva typy enzymových komplexů podílejících se na tvorbě membránového gradientu využívajících Fd nebo Fld jako zdroj energie. Ech hydrogenáza, spadající pod [NiFe] membránové hydrogenázy (Hedderich, 2004), a Rnf komplex, membránová Fd: NAD^+ oxidoreduktáza (Kuhns *et al.*, 2020). Ve své nejjednodušší formě má šest podjednotek. EchA a EchB jsou integrované do membrány a spojují přenos elektronů z Fd_{red} na protony, čímž produkuje H_2 . Elektrony jsou přenášeny přes klastry FeS a flaviny. Rozdílného chemického potenciálu mezi Fd_{red} a H^+ se využívá pro endergonický export H^+ nebo Na^+ k vytvoření membránového gradientu. Je třeba dodat, že konečné potvrzení tohoto procesu čeká na potvrzení přímým důkazem, purifikací a rekonstitucí enzymového komplexu do liposomu. Fd-dependentní aktivita u Ech hydrogenázy je zatím uvažována na základě nepřímých důkazů (Islam *et al.*, 2015).. Hydrogenázy tohoto typu jsou přítomné u archeí, například v *Pyrococcus furiosus* (Sant'Anna *et al.*, 2015) nebo bakterií *Moorella thermoacetica* (Islam *et al.*, 2015).

Druhým Fd-dependentním respiračním komplexem, který se vyskytuje u archeí a anaerobů i aerobních bakterií, je komplex Rnf. V roce 2007 byla u bakterie *Acetobacterium woodii* prokázána jeho membránově vázaná aktivita Fd: NAD^+ oxidoreduktázy (Imkamp *et al.*, 2007). O tři roky později bylo prokázáno, že tato aktivita je spojena s transportem Na^+ skrz cytoplazmatickou membránu (Biegel and Müller, 2010). Tento nový typ respiračního enzymu byl osekvenován a ukázalo se, že je kódován geny rnf (Rhodobacter nitrogen fixation) (Biegel, Schmidt and Müller, 2009). Homology

těchto genů byly nalezeny u purpurové nesírné bakterie *Rhodobacter capsulatus* a na základě mutační analýzy se ukázalo, že se podílejí na fixaci dusíku (Schmehl *et al.*, 1993). Geny rnf jsou u bakterií široce rozšířené a vyskytují se také u některých archeí (Biegel *et al.*, 2011). Membránově vázaný komplex Rnf obsahuje ve své nejjednodušší formě šest podjednotek a využívá FeS klastry s flaviny jako nosiče elektronů. Na rozdíl od Ech hydrogenáz zde není akceptorem elektronů proton, ale NAD⁺. Rozdíl v oxidačním potenciálu akceptoru je tedy ve srovnání s Ech hydrogenázou větší. Předpokládá se proto, že zatímco komplexy Ech translokovat 1 proton na 2 elektrony, Rnf komplex může translokovat 1 proton na 1 elektron (Westphal *et al.*, 2018; Muras *et al.*, 2019).

4 Molekulární mechanismy elektronové bifurkace v enzymových komplexech

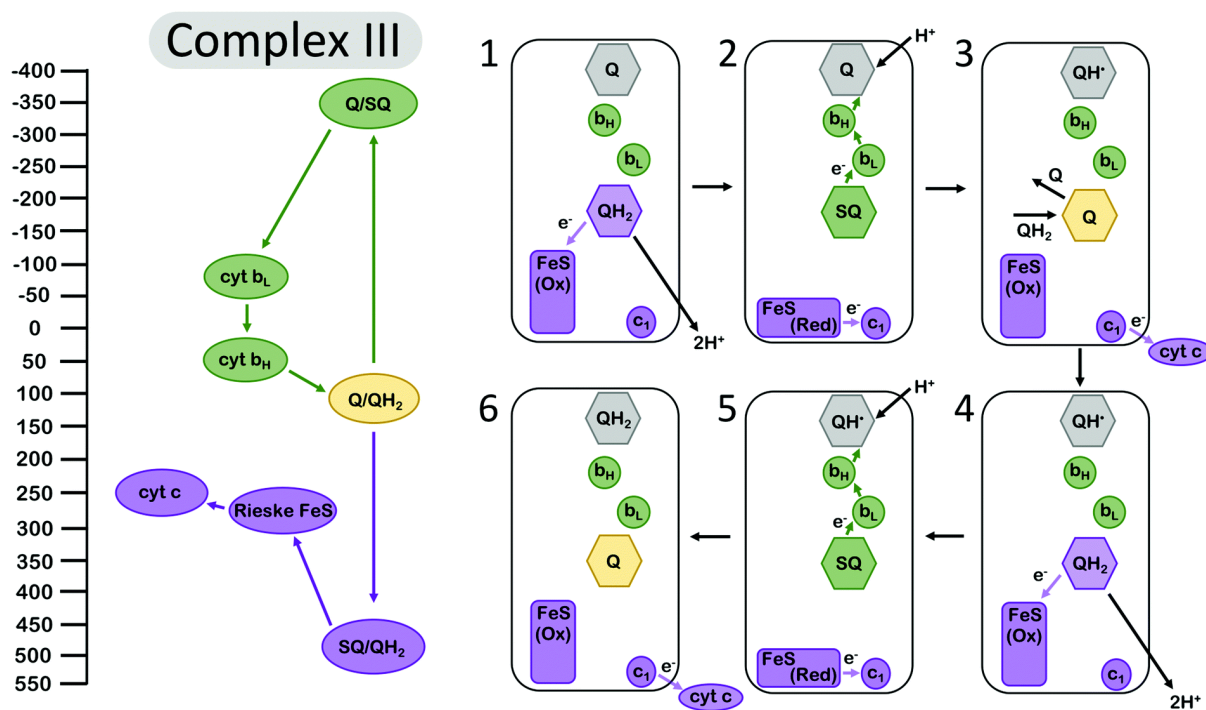
4.1 Komplex III

Elektronová bifurkace založená na chinonech (QBEB) se uplatňuje v komplexu III, v rámci Q-cyklu. V rámci tohoto cyklu je jev elektronové bifurkace využíván při spojování dvou dějů: v první elektronové dráze k redukci cytochromu c (cyt c) a v druhé elektronové dráze k redukci ubichinolu (Q) v místě Q_i . Prvním krokem reakce je redukce vysokopotenciálového FeS klastru pomocí oxidace ubichinolu (QH_2) na semichinon (SQ) v místě Q_o . Tento semichinon je pak schopný redukce nížpotenciálového hemu b_L (cyt b_L). Redukce tohoto nížpotenciálového hemu je díky nízkému redukčnímu potenciálu semichinonu exergonická a generuje „hnací sílu“ k další redukci ubichinolu (Q) v místě Q_i . Oxidace QH_2 a redukce Q je přitom spřažená s translokací protonů a zodpovědná za tvoření protonového gradientu na membráně. Tento jinak endergonický proces je spojen s redukcí vysokopotenciálového cytochromu c_1 (cyt c), který umožní Q-cyklu díky svému termodynamickému profilu proběhnout spontánně. Výsledkem Q-cyklu tedy je odklon poloviny elektronů v elektronovém transportním řetězci, které generují další protonmotivní sílu.

Individuální elektronové přenosy první (zobrazené na obrázku 2), celkově exergonické dráhy, probíhají proti elektrochemickému gradientu a jsou tedy endergonické. Jednoelektronová oxidace páru QH_2/SQ v místě Q_o , probíhá při elektrochemickém potenciálu téměř +500 mV, akceptorem je FeS klustr, který je redukován při potenciálu +275 mV, je tedy elektropozitivnější, následně redukován cytochrom c_1 je pak redukován přibližně při +250 mV (Bergdoll *et al.*, 2016), také proti elektrochemickému potenciálovému gradientu. Vzhledem k tomu, že celkový redoxní potenciál páru QH_2/Q je přibližně +100 mV a představuje průměr hodnot redukčních potenciálů párů QH_2/SQ a SQ/Q , je redukční potenciál páru SQ/Q je přibližně -350 mV (Zhang *et al.*, 2007), což je dostatečně nízký potenciál k tomu, aby redukce Q v místě Q_i zprostředkována hemy b_L a b_H , prováděla postupně po krocích a zároveň probíhala translokace protonů přes membránu.

Pokud by relativní vzdálenosti FeS klastru a cyt b_L (prvních akceptorů v první a druhé elektronové dráze) vůči Q_o místu zůstaly beze změny, probíhala by redukce FeS klastru, za předpokladu, že elektron přešel na následující elektronový akceptor cytochrom c_1 , jako termodynamicky nejvýhodnější a nastávala by s vyšší rychlostí oproti redukci cyt b_L . Aby se této druhé redukci FeS klastru předešlo, komplex cytochromu bc_1 v oblasti FeS klastru projde konformačním změnou a vzdálenost mezi oxidačním místem Q_o a FeS klastrem je zvětšena. Výsledkem této alosterické regulace je pak kineticky příznivější redukce cytochromu b i přes jeho významně nižší redoxní potenciál.

Touto konformační změnou jsou v cytochromu bc_1 řízeny energetické hladiny dvou poloreakcí, celkově exergonické redukce cytochromu c_1 oxidací QH_2 v matrix mitochondrie a celkově endergonická reakce redukce Q ve vnitřní membráně mitochondrie. Jako u pravděpodobně u všech elektron bifurkujících reakcí je zejména první elektronový přenos limitem rychlosti reakce, následný přenos elektronů ze semichinonu na $cyt\ b_L$ a $cyt\ b_H$ probíhá rychle (Bergdoll *et al.*, 2016) a limituje tak časově výskyt semichinonu v Q_0 místě.



Obr. 2: Navrhované schéma elektronových přenosů v komplexu III s energetickým rozhraním kofaktorů (převzato z Yuly *et al.*, 2019).

4.2 NADH-dependentní ferredoxin:NADP⁺ oxidoreduktáza

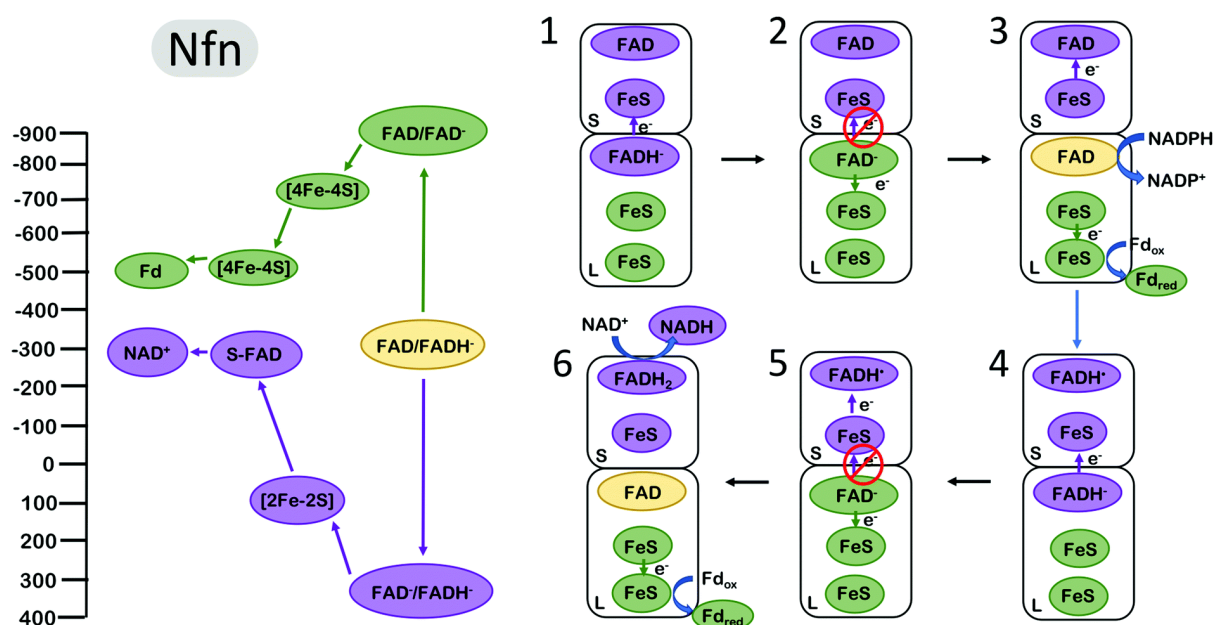
NADH-dependentní ferredoxin:NADP⁺ oxidoreduktáza (NfnAB) je dimerní enzym, který spřahuje oxidaci NADPH s exergonickou redukcí NAD⁺ a endergonickou redukcí ferredoxinu (Fd). Mezi dosud charakterizovanými enzymy katalyzující elektronovou bifurkaci pomocí flavinového kofaktoru má nejjednodušší strukturu (Buckel and Thauer, 2018b) a je proto často voleným modelem pro objasnění mechanismů elektronové bifurkace.

Enzymový komplex je rozdělen na dvě podjednotky. Ve velké podjednotce, kde se uskutečňuje elektronová bifurkace, jsou také umístěny dva železo-sírné klastry [4Fe-4S] a místo pro redukci Fd. Malá podjednotka obsahuje železo-sírný klastř [2Fe-2S] a flavinadenin dinukleotid (FAD)

lokalizovaného blízko místa, kde dochází k redukcí NAD^+ (Demmer *et al.*, 2015). Energetické rozhraní elektronové bifurkace enzymu Nfn, oproti energetickým rozhraním jiných flavoproteinů i cytochromu bc_1 , zahrnuje rozsáhlejší změny oxidoredukčních potenciálů.

Během bifurkace je první elektron v první dráze (fialová dráha na obrázku 3) určený k redukcí NAD^+ přenesen na [2Fe-2S] klastr v malé podjednotce. Podobně jako u katalýzy v cytochromu bc_1 je tento první přenos endergonický a děje se při relativně vysokém redukčním potenciálu. Další společnou charakteristikou v rámci této dráhy je postupný přenos elektronu na elektronegativnější akceptory. Odhad redoxního potenciálu páru $\text{FAD}^{\cdot-}/\text{FADH}^-$ v první dráze je +350 mV, odhad finálního elektronového akceptoru v první dráze NAD^+/NADH je pak přibližně -320 mV (Liang, Huang and Wang, 2019). Redoxní potenciály druhé elektronové dráhy jsou pak odhadovány pro pár $\text{FAD}/\text{FAD}^{\cdot-}$ na více než -910 mV a pro $\text{Fd}_{\text{ox/red}}$ jako finální akceptor elektronu -500 mV. Celkově jsou tak změny elektrochemického potenciálu kofaktorů více než 1,3 V.

Zajímavostí Nfn enzymu je také jeho předpokládaný mechanismus kontroly řízení toku elektronů. V tomto případě, na rozdíl od všech ostatních dosud modelově popsanych EB enzymů, se nepředpokládají významné konformační změny ovlivňující relativní vzdálenosti elektronových akceptorů vůči flavinovému donoru (Demmer *et al.*, 2016). Klastr [4Fe-4S] se nachází ve vzdálenosti 8 Å od elektronového donoru FADH^- , [2Fe-2S] klastr je pak od FADH^- vzdálen přibližně je 15 Å (Lubner *et al.*, 2017). Přenos na [4Fe-4S] klastr navzdory menší vzdálenosti je během prvního elektronového přenosu nepravděpodobný díky silné elektronegativitě tohoto kofaktoru. Avšak po prvním elektronovém přenosu má pár $\text{FAD}^{\cdot-}/\text{FAD}$ dostatečně nízký potenciál k jeho redukcí a jeho redukce pak probíhá řádově rychleji než redukce [2Fe-2S] klastru (Zhang *et al.*, 2017).



Obr. 3: Navrhované schéma elektronových přenosů v enzymu Nfn s energetickým rozhraním kofaktorů (převzato z Yuly *et al.*, 2019).

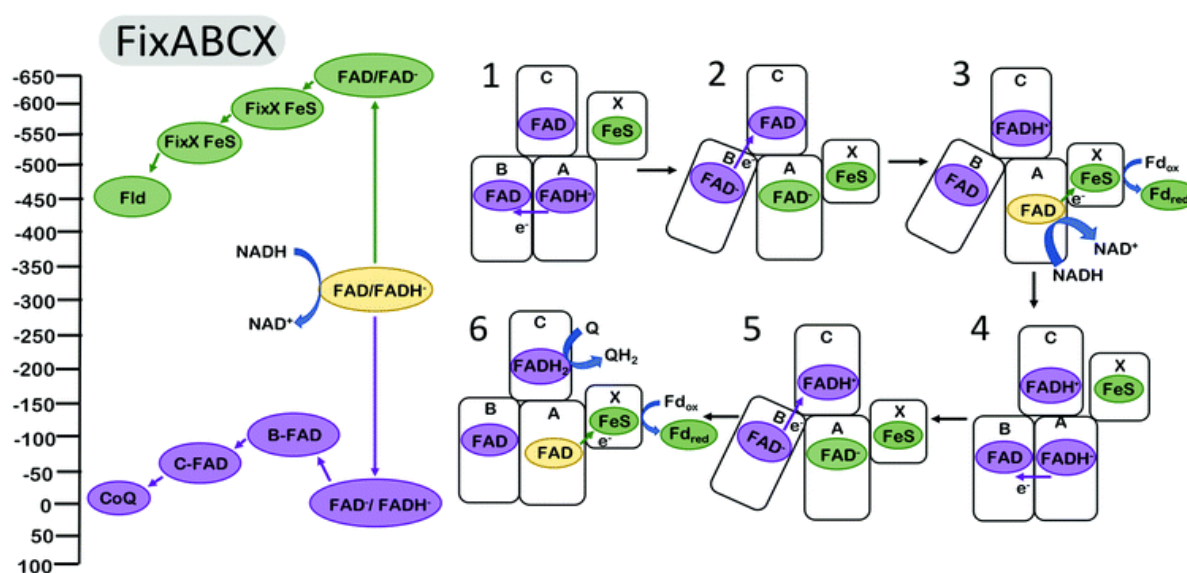
4.3 Elektron-transferující flavoprotein-menachinon oxidoreduktáza

Elektron-transferující flavoprotein-menachinon oxidoreduktáza (FixABCX) je často využíván pro produkci redukčních ekvivalentů využívaných pro fixaci dusíku. Spřahuje oxidaci NADH s redukcí vysokopotenciálového ubichinonu a redukcí nízkopotenciálového flavodoxinu, případně ferredoxinu (Buckel and Thauer, 2018a).

Rozsah energetického rozhraní je dle dostupných studií je srovnatelný s elektronovou bifurkací v cytochrom bc_1 komplexu (Ledbetter *et al.*, 2017). První přenos elektronu, podobně jako v předešlých příkladech, je endergonický. Celkově je první dráha (fialová dráha na obrázku 4) přenášeného elektronu silně exergonická, ale na rozdíl od přenosů v rámci první dráhy elektronové bifurkace v Nfn či cytochromu bc_1 jsou následné přenosy exergonické. Přenos druhého elektronu po nízkopotenciálové dráze je pak z celkového pohledu endergonickou reakcí, ale jednotlivé přenosy jsou tentokrát podobně jako u Nfn a cytochromu bc_1 exergonické.

Oxidace $FADH^-$ probíhá při redukčním potenciálu 0 mV, redukovaný flavin b-FAD je redukován při potenciálu přibližně -100 mV. Metastabilní meziprodukt FAD^- má pak dostatečně nízký potenciál k redukcí Fd nebo Fld, jejichž redukční potenciály jsou za fyziologických podmínek přibližně -500 mV.

Pro enzym FixABCX se předpokládá využívání konformačních změn analogických ke konformačním změnám v cytochromu bc_1 . Strukturální a biochemické výsledky enzymů butyryl-CoA reduktázy (Demmer *et al.*, 2017) kofeyl-CoA dehydrogenázy (Demmer *et al.*, 2018) odpovídají modelu, kde zvětšení vzdálenosti mezi původně proximálním příjemcem elektronu na vysokopotenciálové dráze po přenosu prvního elektronu vede ke snížení dalšího přenosu elektronu po této dráze a zvýhodňuje přenos druhého elektronu nízkopotenciálovou dráhou vedoucí k redukcí Fd.



Obr. 4: Navrhované schéma elektronových přenosů v enzymu FixABCX s energetickým rozhraním kofaktorů (převzato z Yuly *et al.*, 2019).

5 Růst mikroorganismů na nízkoenergetických substrátech

Termodynamický výsledek elektronové bifurkace se zásadně liší od výsledků klasické enzymové katalýzy. Klasické enzymové katalýzy mají za následek snížení volné energie systému, okolní prostředí musí být regulováno tak, aby katalýza byla exergonická. V případě FBEB je katalýza také celkově exergonický děj, ale na rozdíl od klasické enzymové katalýzy je zde jeden z generovaných produktů dále od termodynamické rovnováhy, než byl na jejím začátku. Například NADH tak může exergonicky redukovat FAD v rámci dvouelektronové redukční reakce, ale konečný produkt, redukovaný ferredoxin nebo flavodoxin, jako výsledek této katalýzy, má podstatně větší redukční potenciál než původní reduktant, NADH (Demmer *et al.*, 2015). Podíváme-li se na tuto úvahu z pohledu termodynamiky života v redoxním kontextu, tedy jako na zdroj volné energie prostředí, pak organismus, který z prostředí jako donor elektronů využívá například molekulární vodík, zvyšuje prostřednictvím elektronové bifurkace redukční výkon dostupný k pohonu metabolických reakcí vysoko nad redukční možnosti přímo poskytované molekulárním vodíkem. Protože první termodynamický zákon musí zůstat zachován, druhý přenášený elektron má vyšší redukční potenciál, což nakonec vede k nižším redoxním rozdílům mezi těmito přenášenými elektrony a jejich finálními akceptory. Na elektronovou bifurkaci se lze proto dívat jako na konvertor volné energie, který zvyšuje uspořádanost živého systému oproti prostředí. V praxi to pro organismy využívající například molekulární vodík jako zdroj elektronů znamená podstatné zvýšení dostupné koncentrace molekul s redukčním potenciálem větším, než je přímo dostupný z jejich okolí bez potřeby dodatečné investice energie získané na úkor například elektrochemického membránového gradientu (Muras *et al.*, 2019).

Pro porovnání efektivity katalýzy oxidoredukčních reakcí můžeme uvažovat endergonickou redukci Fd ($E^{0'} = -500 \text{ mV}$) elektrony z H_2 ($E^{0'} = -414 \text{ mV}$). Rozdíl redoxního potenciálu $0,086 \text{ mV}$ výpočtem $\Delta G^{0'} = -n \cdot F \cdot E$ odpovídá $8,3 \text{ kJ/mol}$ volné energie, kterou je do katalýzy tohoto děje potřeba investovat. Pokud by reakce byla spřažena s hydrolyzou ATP, musel by být investován jeden ekvivalent ATP, což při standardních fyziologických podmínkách znamená $G^{0'} = -60 \text{ kJ/mol}$. V případě, že by redukce byla spřažena s reverzním elektronovým transportem zprostředkovanou nejdříve hydrogenázou, kde H_2 by redukoval NAD^+ ($E^{0'} = -320 \text{ mV}$) a následně například v enzymu Rnf by byl Fd endergonicky redukován na úkor elektrochemického gradientu Na^+/H^+ , energie potřebná k zajištění transportu dvou elektronů na Fd přes rozdíl 180 mV by byla 35 kJ/mol , což je ekvivalent $0,58 \text{ mol}$ ATP. Pokud by redukce byla katalyzována pomocí enzymu využívajícího FBEB a redukce by probíhala z H_2 na Fd a NAD^+ , bylo by nutné překonat rozdíl pouze 80 mV , což odpovídá jen $0,23 \text{ molu}$ ATP. FBEB tedy vychází jako energeticky nejúspornějším způsobem elektronového transportu. Pro organismy žijící v energeticky chudém prostředí s nízkoenergetickými substráty jako je vodík nebo kyselina mravenčí metabolizované v metanogenezi nebo acetogenezi jsou tyto rozdíly fyziologicky důležité.

Je třeba ještě podotknout, že jeden organismus využívající FBEB přitom není limitován jen na jeden enzym katalyzující elektronovou bifurkaci. U zástupců organismů z kmene Firmicutes, Thermotogae a Euryarchaeota bylo nalezeno až sedm různých homologů v jednom genomu. V genomu zástupců kmene Firmicutes byly často detekovány kombinace homologů Hyd, Bf-Ldh, Car, Bf-Bcd a Nfn. V genomech zástupců kmene Thermotogae byla běžná detekovat kombinace homologů Hyd, Nfn a Bfn a Fix. Genomy zástupců Euryarchaeot, zejména organismů provádějící metanogenezi, často obsahovali kombinaci genů pro expresi Nfn, Mvh, Hdr2, a Fdh homologů (Poudel *et al.*, 2018).

5.1 Acetogeneze

Acetogeneze je proces, při kterém vzniká acetát buď redukcí CO₂ nebo organických kyselin. Jak již bylo napsáno v kapitole 3, *sensu stricto* se elektronová bifurkace nepovažuje za děj ukládající energii. V případě acetogenů, kteří redukcí CO₂ nebo organických kyselin produkují acetát, má ale elektronová bifurkace obzvlášť významné postavení v jejich primárním metabolismu.

Acetogeneze se celkově se vyskytuje u 23 různých bakteriálních rodů. Většina patří do kmene Firmicutes, kde jsou studovány hlavně druhy bakterií jako *Acetobacterium woodii* a *Clostridium ljungdahlii* jako zástupci nesporulujících a sporulujících grampozitivních bakterií a *Moorella thermoacetica* jako zástupce gram negativních bakterií. Společným znakem acetogenů, stejně jako je redukce CO₂ pomocí Wood-Ljungdahlovy dráhy. Navzdory významu této dráhy, která mohla být využívána už v LUCA (Weiss *et al.*, 2016), otázka, jak je WLP spojena se syntézou ATP u acetogenů byla dlouhou dobu ne zcela objasněna.

WLP dráha se dělí na dvě větve, metylovou a karbonylovou. Zatímco v metylové větvi je redukce CO₂ na acetyl-CoA vícekroková a různé acetogeny využívají různých kofaktorů k redukčním reakcím, v karbonylové větvi, při redukcí CO₂ na CO, je třeba překonat významnou energetickou bariéru. Redoxní potenciál páru CO₂/CO v acetogenech není přesně znám, za standardních podmínek fyziologických podmínek je -520 mV, v acetogenech se však očekávají pozitivnější hodnoty (Bar-Even, 2013). Z provedených pokusů vychází jako jediný vhodný reduktant ferredoxin, jehož redoxní potenciál může být za vhodných podmínek -500 mV (Hess, Schuchmann and Müller, 2013). Právě při redukcí ferredoxinu pro redukcí CO₂ uplatňují zatím všechny modelové acetogeny elektronovou bifurkaci. Konkrétně v případě *A. woodii*, která je v tomto ohledu dobře popsána, se jedná o tetramerní flavoprotein [FeFe]-hydrogenázový komplex (HydABC).

V případě *A. woodii* se ale využití redukovaného ferredoxinu neomezuje jen na výše zmíněnou CO₂ redukcí ve WLP dráze, ale uplatňuje se i při tvorbě Na⁺ chemiosmotického gradientu katalyzovaného Rnf komplexem. Tento gradient je pak využíván ATP syntázou, jejíž mechanismus syntézy ATP byl nedávno popsán (Hess, Schuchmann and Müller, 2013; Schuchmann and Müller, 2014), k syntéze ATP. Samotný Rnf komplex katalyzuje translokaci Na⁺ kationtů pomocí energie

uvolněné při redukci NAD^+ oxidací ferredoxinu. Redukovaný ferredoxin je tedy vysokoenergetickým meziproduktem, jehož koncentrace reguluje množství ATP, které může *A. woodii* syntetizovat.

Množství redukovaného ferredoxinu je přitom závislé na dostupných substrátech.

Při autotrofní acetogenezi podle rovnice:



se metabolismus *A. woodii* nachází na blízko termodynamické hranici života. Vezmou-li se do úvahy parciální tlaky H_2 , je změna volné energie této reakce přibližně -20 kJ/mol (Greening *et al.*, 2015). U *A. woodii* byl nedávno stanoven fosforylační potenciál, v závislosti na substrátu, na hodnotu kolem 30 kJ/mol (Spahn, Brandt and Müller, 2015). Takto nízký fosforylační potenciál pomáhá k získání energie potřebné udržení metabolismu organismu za těchto podmínek, ale i tak znamená, že lze z této reakce generovat pouze $0,6 \text{ ATP}$. Aby *A. Woodii* maximalizovala získanou energii, využívá katalýzy Rnf komplexu a ATP syntázy. Rnf komplex využívá uvolněné energie při oxidaci ferredoxinu a redukci NAD^+ k translokaci Na^+ . NADH se pak reoxiduje redukcí CO_2 na acetát v metylové větvi WLP dráhy. Samotný ferredoxin je pak redukován oxidací H_2 . Tato redukce je katalyzována HydABC komplexem, který generuje NADH a Fd_{red} ve stejném množství. Autotrofní redukční dráha CO_2 v *A. Woodii*, využívající WLP dráhu, vyžaduje čtyři redukční ekvivalenty. Dva ve formě 2 NADH , jeden ve formě Fd_{red} a jeden ve formě H_2 , pro první krok fixace CO_2 H_2 -dependentní CO_2 reduktázou (Schuchmann and Müller, 2013). HydABC komplex oxiduje 3 moly H_2 za vzniku $1,5 \text{ mol NADH}$ a $1,5 \text{ molu Fd}_{\text{red}}$. Jeden mol Fd_{red} je využit CO dehydrogenázou. Pro Rnf komplex tedy zůstává $0,5 \text{ mol Fd}_{\text{red}}$, což umožňuje translokaci 1 mol Na^+ . ATP syntáza syntetizuje ATP se stechiometrií $3,66 \text{ Na}^+/\text{ATP}$ (Fritz and Müller, 2007), nakonec může být tedy vyrobeno $0,27 \text{ ATP}$ podle rovnice 1.

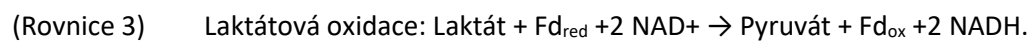
Kafeátová respirace, další typ anaerobní respirace popsany v roce 1988 u *A. Woodii*, (Hansen *et al.*, 1988) umožňuje acetogenům růst na sloučeninách rostlinného původu. Z polymerů ligninu umožňuje získávat O-metylové skupiny, využít je jako zdroj energie a uhlíku. Dvojně vazby v kafeátech pak využít jako akceptory elektronů. Kafeátová respirace probíhá zjednodušeně podle rovnice:



Bioenergetika a sekvence této dráhy byla objasněna nedávno (Bertsch *et al.*, 2013). Kafeát je aktivován koenzymem A transferázou. Kafeyl-CoA je pak redukován elektron bifurkačním enzymem, kafeyl-CoA reduktázou (CarCDE). Uvolněná energie spojená s oxidací ferredoxinu a redukcí NAD^+ v Rnf komplexu je využita k translokaci 2 kationtů Na^+ . Další zdroj NADH v této respiraci může pocházet z redukce H_2 v HydABC komplexu. Kafeátová respirace je příkladem

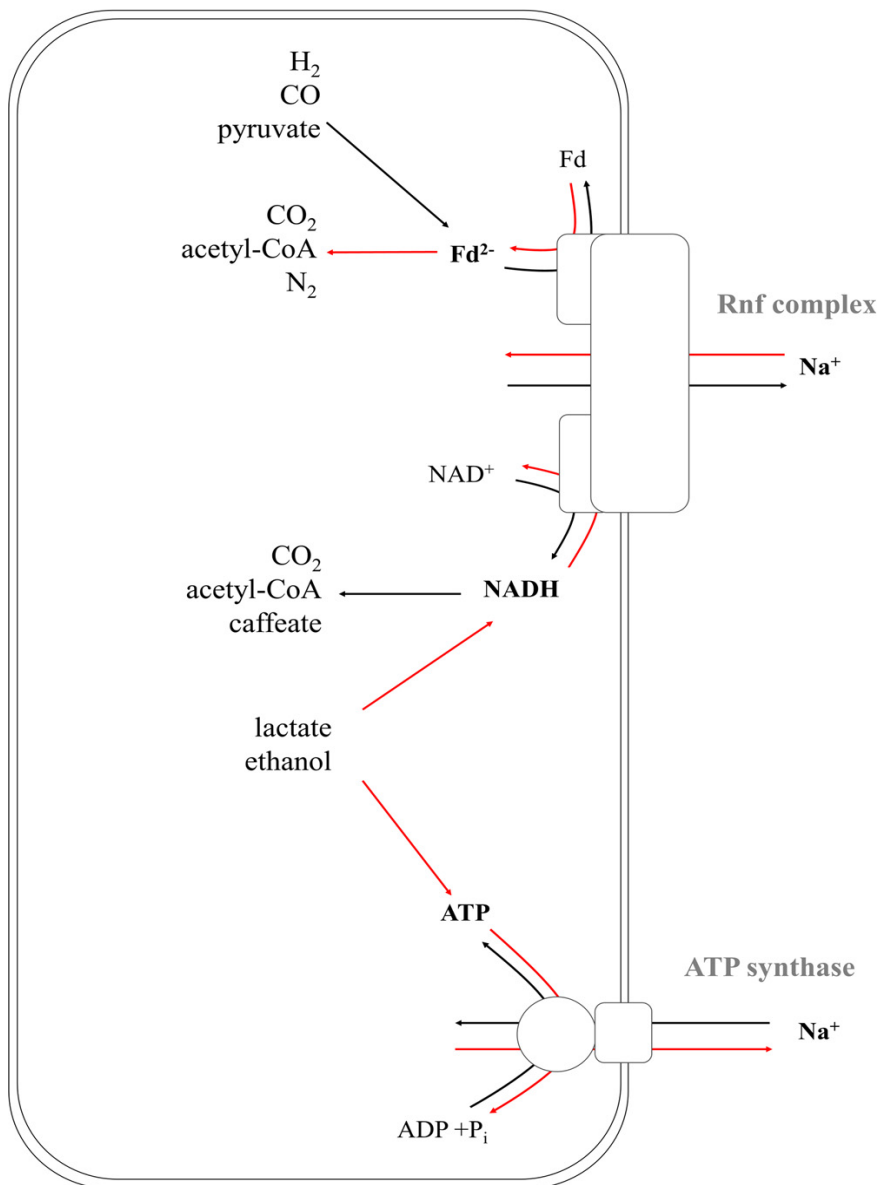
metabolického scénáře, v němž je bifurkace elektronů nezbytná pro konzervaci energie, jakožto jediného mechanismu, kterým se uvolňuje energie pohánějící reakce v respirační dráze.

Třetím příkladem metabolické dráhy využívající katalytické aktivity flavoenzymů u *A. woodii* je oxidace laktátu. Redoxní potenciál páru laktát/pyruvát ($E^0 = -190$ mV) je příliš vysoký pro přímou redukci NAD^+ (Schink, 2015). Fakultativní anaerobové, jako je například *E. coli*, tento problém řeší pomocí membránově vázané laktát dehydrogenázy (Ldh), která přenáší elektrony na ubichinon. Otázka, jak striktní anaerobové bez cytochromů oxidují laktát, byla nedávno vyřešena (Weghoff, Bertsch and Müller, 2015). Energetická bariéra je překonána katalýzou elektronové bifurkace v laktát dehydrogenázém/ elektron-transferujícím flavoprotein komplexu (Ldh/Etf), který katalyzuje redukci laktátu podle rovnice:



Vzniklý pyruvát je pak za redukce Fd dekarboxylován na acetyl-CoA a CO_2 . Fd je pak využit k redukci CO_2 . V této metabolické dráze je však třeba dodatečného zdroje redukovaného Fd pro redukci H_2 metylové dráze. K této redukci dochází pomocí reverzního elektronového transportu katalyzovaného Rnf komplexem na úkor chemiosmotického gradientu, který je v tomto případě udržován hydrolýzou ATP. Na enzymovém komplexu HydABC, katalyzujícím redukci H_2 oxidací Fd a NADH, tedy v tomto případě nedochází k elektronové bifurkaci (FBEB), ale k elektronové konfurkaci (FBEC).

Možné substrátové propojení metabolických drah a využití Rnf komplexu a ATP syntázy je ukázáno na obrázku 5.

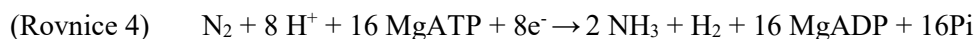


Obr. 5: Zjednodušené schéma metabolických drah využívaných v *A. Woodii* v závislosti na dostupném substrátu (převzato z Westphal *et al.*, 2018).

5.2 Fixace dusíku

Biologická fixace vzdušného dusíku, redukce (N_2) na amoniak (NH_3), je díky jeho trojně vazbě mimořádně energeticky náročný chemický proces. Atomární dusík (N) je nezbytnou složkou pro život, jeho zabudování z N_2 do biologicky dostupné formy, v procesu zvaném biologická fixace dusíku, je klíčovým bodem globálního cyklu dusíku. Štěpení N_2 a jeho přeměnu na biologicky dostupný NH_3 provádějí výhradně diazotrofní bakterie a archea, které exprimují enzym nitrogenázu. (Vitousek *et al.*, 2013)

V nejrozšířenější formě nitrogenázy, molybden nitrogenáze, probíhá fixace ve zjednodušené formě podle rovnice:



Fixaci provádí široké spektrum bakterií i archeí rostoucí jak v aerobním, tak i anaerobním prostředí. Jak lze z rovnice 4 vidět, samotná biologická redukce dusíku na amoniak nitrogenázou je velmi energeticky náročný děj, který vyžaduje velké množství ATP i elektronů. Vzhledem k energetickému profilu reakce musí být jako redukční ekvivalenty využity ferredoxiny nebo flavodoxiny. Zatímco diazotrofní mikroorganismy obývající anoxické prostředí, například archea z rodu *Methanosarcina* (Santiago-Martínez *et al.*, 2016) nebo bakterie z rodu *Desulfotomaculum* (Junier *et al.*, 2010), mohou v tomto případě k potřebné redukci Fd/Fld využít enzymu pyruvát:flavodoxin oxidoreduktázy (PFOR). Organismy aerobní a fakultativně anaerobní ale v metabolismu pyruvátu využívají pyruvát dehydrogenázy (PDH) (Hutcherson *et al.*, 2017), kde není produktem Fd_{red} ale NADH, které nemá dostatečný redukční potenciál pro redukci N₂. Aby tyto organismy byly schopné redukce Fd/Fld, začaly využívat enzymového komplexu FixABCX, který tuto redukci může katalyzovat za vzniku menachinolu, který dále pohání respirační cyklus za spotřeby NADH (Ledbetter *et al.*, 2017; Feng *et al.*, 2021).

FixABCX enzymový komplex je v tomto případě unikátní ze dvou důvodů. Enzymy katalyzující elektronovou bifurkaci jsou standardně využívány anaerobními organismy v cytoplazmě. V tomto případě je FixABCX enzym využíván organismy aerobními, například *Rhizobium meliloti* (Dai *et al.*, 2014), tak fakultativně anaerobními *Rhodospirillum rubrum* (Edgren and Nordlund, 2004). Navíc FixABCX není cytoplazmatický, ale membránově vázaný. V rámci využití FixABCX komplexu má mezi ostatními diazotrofy unikátní postavení bakterie *Azobacter vinelandii*. Je jedním z mála diazotrofů, který exprimuje jak geny pro FixABCX, tak pro Rnf komplex. Zároveň byla prokázána funkce obou těchto komplexů při fixaci dusíku (Ledbetter *et al.*, 2017). Předpokládá se, že vzhledem k jejímu růstu v prostředí s proměnlivou koncentrací plynného kyslíku, čelí *A. vinelandii* zvýšeným nárokům na regulaci metabolismu. Kombinované využití obou enzymových komplexů by v tomto prostředí mohlo pomoci s regulací, podobně jako je tomu v případě *A. woodii*, kde využití obou komplexů umožňuje katalyzovat širokou škálu metabolických drah a regulovat katalýzy oběma směry v závislosti na okolních podmínkách.

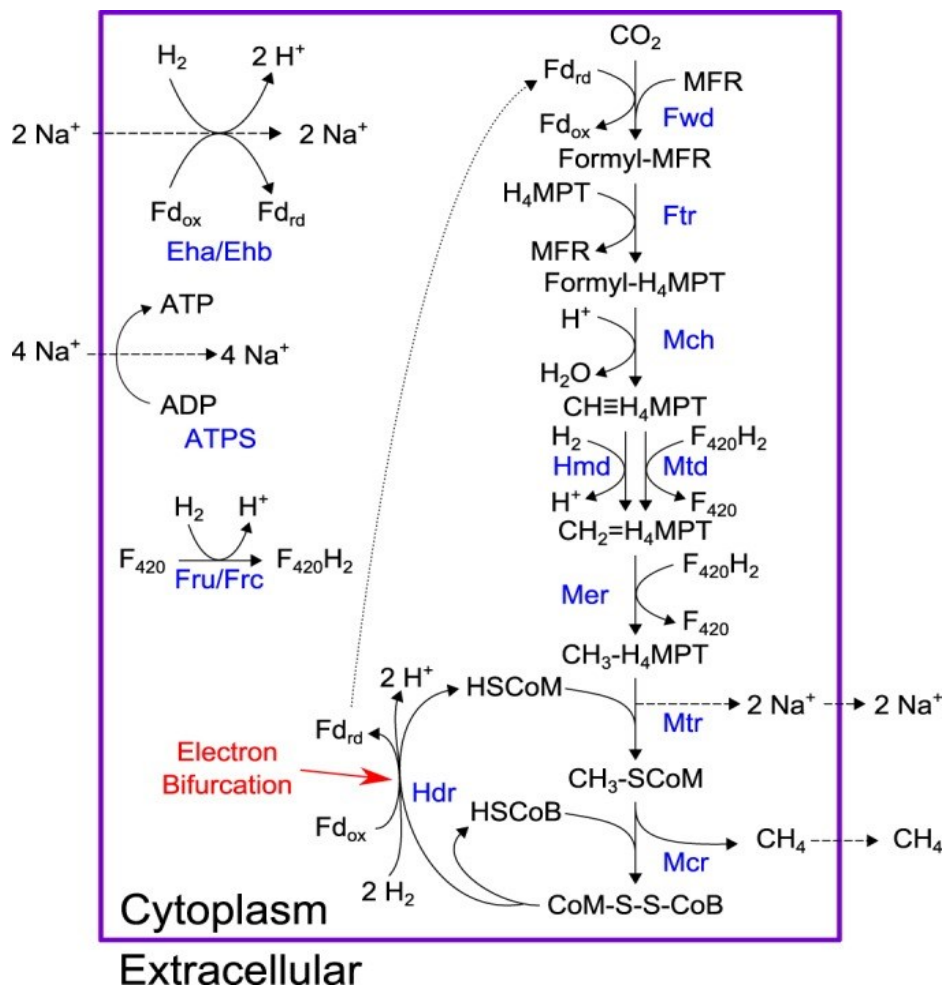
5.3 Metanogeneze

Metanogeny, stejně jako všechny živé organismy, využívají energii získanou z metabolických procesů k růstu a údržbě buněk. Nejsou však schopny syntetizovat ATP prostřednictvím substrátové fosforylace, využívají místo toho jen ATP syntázy závislé na membránovém gradientu (Blaut and Gottschalk, 1984), což je jejich hlavní mechanismus pro zachování energie (Deppenmeier and Müller,

2008). Vzhledem k omezenému množství energie dostupné z metanogenních substrátů, je jen velmi málo kroků ve čtyřech metabolických metanogenních drahách dostatečně exergonických, aby se mohly využít k translokaci iontů přes buněčnou membránu (Thauer *et al.*, 2008). Mezi metanogeny přitom existují významné rozdíly mezi systémy využívané k zachování energie, konkrétně rozdíly mezi organismy obsahující cytochromy a těmi bez cytochromů. První skupina, obsahující cytochromy, dominuje zejména v prostředí s nízkými teplotami (4 °C), druhá skupina metanogenů, bez cytochromů, dominuje v termofilním a hypertermofilním prostředí, kde ΔG° při tvorbě metanu z H_2 a CO_2 klesá ze -131 kJ/mol (při teplotě 25 °C) na 100 kJ/mol (při teplotě 100 °C). Při takto vysokých teplotách a nízkých parciálních tlacích H_2 děj není dostatečně exergonický, aby umožnil růst metanogenů se ziskem jednoho ekvivalentu ATP nebo více na vygenerovaný ekvivalent metanu.

Obecně se ale předpokládá, že redukce CO_2 na CH_4 pomocí redukce H_2 a metody konzervace takto získané energie probíhají shodně jak v metanogenech s cytochromy i bez nich. Jeden z hlavních rozdílů spočívá v redukcí heterodisulfidu CoM-S-S-CoB oxidací H_2 , která je bez možnosti využití cytochromů a metanofenazinu odlišná. Původní teorie o mechanismu tohoto enzymu, který tuto redukcí CoM-S-S-CoB katalyzuje, zahrnovala membránovou translokaci protonů, tedy podobnou funkci jako má VhoACG-HdrDE komplex u metanogenů s cytochromech. Místo enzymových komplexů VhoACG a HdrDE využívaných v metanogenech s cytochromy, měli metanogeny bez cytochromů využívat cytoplazmatické komplexy enzymů [NiFe] hydrogenázy MvhADG a heterodisulfid reduktázy HdrABC. Podjednotka HdrB obsahuje hydrofobní úsek, který by mohl tvořit transmembránový helix, avšak všechny pokusy o získání biochemických důkazů o vazbě mezi tímto komplexem a cytoplazmatickou membránou selhaly. Bioinformatické analýzy dále neukázaly na možnou přítomnost podjednotek na periplazmatické straně membrány a je tedy nepravděpodobné, že funkce enzymového komplexu MvhADG-HdrABC by byly spřažené s protonovou translokací skrz membránu (Thauer *et al.*, 2010). Zdá se tedy, že metanogeny postrádající cytochromy postrádají jedno ze dvou energií ukládajících míst a bez něho by pro ně růst měl být obtížný.

Aktuálně nejpravděpodobnější vysvětlení tohoto dilematu dává jev, který poprvé pozoroval Robert P. Gunsalus (RPG efekt) (Gunsalus and Wolfe, 1977) při práci s extrakty z *Methanothermobacter thermautotrophicus*. Výtěžek redukce CO_2 oxidací H_2 významně vzrostl po přidání CoM-S-S-CoB heterodisulfidu. R.P. Gunsalus navrhol propojení úvodní endergonické redukce CO_2 pomocí oxidace H_2 s poslední reakcí metanogeneze, exergonické redukce CoM-S-S-CoB. V roce 2011, po více než 30 letech, byla tato teze prokázána na izolovaném komplexu hydrogenázy, složeného z komplexů MvhAGD a HDRABC, který katalyzoval redukcí Fd oxidací H_2 ve spojení se stechiometrickou redukcí CoM-S-S-CoB a oxidací H_2 (Kaster *et al.*, 2011). FAD navázaný na podjednotku HdrA byl navržen jako místo spojení, kde se elektrony rozdělují na endergonickou dráhu směrem k Fd a na exergonickou dráhu směrem k CoM-S-S-CoB. Právě identifikace elektronové bifurkace MvhAGD-HdrABC vysvětlila RPG-efekt a uzavřela mezeru v chápání energetiky při tvorbě CH_4 z H_2 a CO_2 .



Obr. 6: Schéma hydrogenotrofní metanogeneze ve které je enzymem HdrABC redukováný Fd využíván k redukci CO₂ (převzato z Richards *et al.*, 2016)

6 Objev elektronové bifurkace založené na flavinech

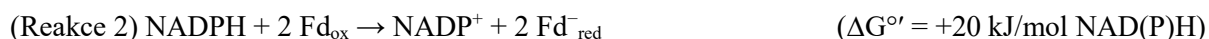
Už v roce 1932 Leonor Michaelis ve své práci (Michaelis, 1932) popsal teorii o vlastnostech některých heteronukleárních aromatických molekul, které vykazovaly velmi všestranné redoxní vlastnosti při dvouelektronových přenosech. V závislosti na okolních podmínkách tyto molekuly mohly procházet dvěma po sobě jdoucími elektronovými přechody mezi oxidovanou a jednoelektronovou semiredukovanou formou a poté mezi jednoelektronovou a dvouelektronovou, plně redukovanou formou. V jeho práci odpovídaly pozorované redoxní potenciály přechodů očekávaným hodnotám, přechod do plně redukovaného stavu byl pomalejší, probíhal za nižšího elektrochemického potenciálu než přechod do semiredukovaného stavu. Vlastnosti takových redoxních molekul mohou být ale ovlivněny okolím a v protických rozpouštědlech může být první přechod k částečně redukovanému stavu díky vodíkovým můstkům (Lim *et al.*, 2013) méně termodynamicky příznivý než druhý. Přenosy obou elektronů pak mohou proběhnout prakticky najednou a pozorované přechody budou vykazovat tzv. pozitivní kooperaci.

Anaerobní mikroorganismy, které rostou v anoxickém prostředí chudém na vhodné akceptory elektronů, využívají fermentace, při níž se oxiduje organický substrát nejprve na meziprodukt, který je následně redukován na konečný produkt a vyloučen. Nejjednodušším příkladem fermentace je laktátová fermentace. Při oxidaci glukózy pyruvát dochází k redukci dvou ekvivalentů NAD^+ a zisku dvou ekvivalentů ATP substrátovou fosforylací. Pyruvát se pak oxidací dvou ekvivalentů NADH redukuje na laktát. Tím se dojde k reoxidaci NAD^+ , které může být znovu využito v glykolýze. Buňka tak nakonec získává 2 moly ATP vzniklé substrátovou fosforylací. Teoreticky by výtěžek ATP mohl být dvojnásobný, pokud by se pyruvát oxidoval na CO_2 a acetyl-CoA a ten se následně metabolizoval na acetát. Tím by se energetická bilance v buňce při fermentaci glukózy zvýšila o 100 %. Pro buňku by však vznikl problém spojený s nedostatkem NAD^+ potřebného při glykolýze. Nejjednodušším řešením, jak reoxidovat NADH zpět na NAD^+ , může být produkce H_2 . Zde ale metabolismus buňky čelí energetickému problému, redoxní potenciál páru NADH/NAD je příliš elektropozitivní ($E^0 = -320$ mV) pro redukci protonů ($E^0 = -415$ mV). Produkce H_2 je možná, ale jen z nízkopotenciálových nosičů elektronů, jako je například ferredoxin ($E^0 =$ od -410 mV až -500 mV).

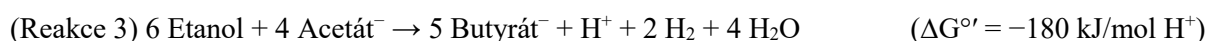
Mikroorganismy při anaerobním metabolismu přesto H_2 produkují. Otázka, jak probíhá redukce Fd s NADH jako reduktantem, zůstávala desítky let nevyřešena. Už v roce 1969 v laboratoři Karla Deckera na Freiburské univerzitě v Německu probíhal výzkum metabolismu *Clostridium kluveri*. (THAUER *et al.*, 1968; Jungermann *et al.*, 1969). Kultura *C. kluveri* při růstu na etanolu a acetátu produkovala H_2 . Při experimentech s buněčnými extrakty *C. kluveri* bylo pozorováno, že v reakci závislé na acetyl-CoA docházelo k redukci Fd_{ox} oxidací NADH (reakce 1) a v reakci závislé na NAD^+ k redukci Fd_{ox} oxidací NADPH (reakce 2). Koncentrace NADPH byla závislá na ferredoxinu a regulována redoxním systémem NAD^+/NADH , kde NAD^+ byl aktivátorem a NADH inhibítorem. Systém NADH byl závislý na ferredoxinu a acetyl-CoA. Z pohledu termodynamiky se

tedy obě tyto reakce zdály být indukované oxidanty s nižším redukčním potenciálem a probíhali tak proti termodynamickému potenciálu.

Reakce probíhající redoxních reakcí vypadaly takto:



Metabolismus *C. kluveri* ve zjednodušené formě stechiometricky produkoval H_2 společně s vodou a butyrátem při růstu na etanolu a acetátu (reakce 3) (THAUER *et al.*, 1968),



Enzymy katalyzující reakce 1 a 2 byly neznámé a byly tedy předmětem dalšího výzkumu. Bylo prokázáno, že při tomto kvašení se etanol oxiduje na acetyl-CoA prostřednictvím NAD-dependentní etanol dehydrogenázy a NAD(P)-dependentní acetaldehyd dehydrogenázy (Burton and Stadtman, 1953). Z těchto poznatků tedy vycházelo zjištění, že pro tvorbu H_2 je k dispozici pouze NAD(P)H. Bylo známo, že H_2 vzniká v klostridiích redukcí protonů s redukovaným ferredoxinem (reakce 4), která je katalyzována cytoplazmatickou hydrogenázou (Fredericks and Stadtman, 1965).



Termodynamická proveditelnost těchto reakcí byla poté předmětem dalšího výzkumu. Redoxní potenciál ferredoxinu za standardních fyziologických podmínek je $E^{\circ'} = -420 \text{ mV}$, NADPH pak $E^{\circ'} = -3200 \text{ mV}$. Předpokládalo se, že rozdíl 100 mV za standardních podmínek není v *in vivo* systémech nepřekonatelný. V testech na buněčných extraktech byl tento termodynamický problém překonán zahájením reakce v nepřítomnosti H_2 a udržováním správně vysokého poměru NAD(P)H/NAD(P)⁺ pomocí regeneračního systému. V *in vivo* systémech byly ale pozorované podmínky reakce méně termodynamicky příznivé. H_2 v plynné formě unikal z rostoucí kultury *C. kluveri*, což indikovalo, že redoxní potenciál páru $2 \text{H}^+/\text{H}_2$ je za fyziologických podmínek blízko hodnotě -400 mV . Aby protony mohly být redukovány, poměr NAD(P)H/NAD(P)⁺ v buňce by musel pak být přibližně 1000:1. Následná měření prováděná v buňce pro pár NADH/NAD⁺ přitom ukazovala poměr 1:4 a pro pár NADPH/NADP⁺ byl poměr přibližně 1,5:1 (Decker and Pfitzer, 1972).

Na vysvětlení této nesrovnalosti bylo vysloveno několik hypotéz. Jedna z prvních hypotéz pracovala s předpokladem, že *C. kluveri* obsahuje druhou acetaldehyd dehydrogenázu, která oxiduje acetaldehyd na acetát ($E^{\circ'} = -580 \text{ mV}$), který pak přímo redukuje ferredoxin (Schoberth and

Gottschalk, 1969). Jiná hypotéza byla založena na předpokladu, že enzym katalyzující redukci ferredoxinu s NAD(P)H v *C. kluyveri* je lokalizován v mikrokompartmentu s acetaldehyd dehydrogenázou, která regeneruje NAD(P)H a poměr NAD(P)H/NAD(P)⁺ by mohl dosahovat 1000:1 (Hillmer and Gottschalk, 1972). Další hypotézy uvažovaly katalýzu pomocí alosterické regulace, kde redukce ferredoxinu oxidací NADH by byla regulována párem acetyl-CoA/CoA (Jungermann *et al.*, 1971), případně redukce ferredoxinu pomocí oxidace NADPH regulována redoxním nábojem páru NAD⁺/NADH (Thauer, 2012). Teprve však v roce 2008 se podařilo purifikovat enzymy katalyzující reakci 1 a 2 a objasnit, že mechanismus závislosti na acetyl-CoA a NAD⁺ je dán mechanismem elektronové bifurkace (Herrmann *et al.*, 2008), nikoliv alosterickou regulací.

Butyryl-CoA dehydrogenáza/elektrony přenašejícího flavoprotein (Bcd/EtfAB), katalyzující reakci 1, byl prvním popsáným flavoproteinem (Li *et al.*, 2008), u kterého byl děj elektronové bifurkace na bázi flavinu v enzymech popsán. Velmi brzy po tomto objevu byla elektronové bifurkace popsána i v enzymovém komplexu [FeFe] hydrogenázy (HydABC) u bakterie *Thermatoga maritima* (Schut and Adams, 2009). NADH-dependentní ferredoxin:NADP⁺ oxidoreduktáza (NfnAB), další z enzymových komplexů *C. kluyveri* byl pak třetím popsáným EB flavoproteinem (Wang *et al.*, 2010). Dnes je známo už dvanáct FBEB enzymů, dělících se do 4 kategorií.

7 Fylogenetické rozšíření elektronové bifurkace mezi organismy

Od roku 2008, kdy byl poprvé popsán jev elektronové bifurkace v enzymovém multikomplexu Bcd/ETF (Li *et al.*, 2008), byla elektronová bifurkační aktivita popsána celkově u 11 dalších enzymů (Buckel and Thauer, 2018b). V dostupné literatuře se rychle zvyšuje počet publikací zabývajících se strukturou těchto enzymů, navrhovanými molekulárními mechanismy založených na biofyzikálních i kinetických měřeních. O odhadovaném taxonomickém rozšíření FBEB enzymů je zatím k dispozici jen omezené množství informací.

Částečně toto téma osvětluje práce „Origin and Evolution of Flavin-Based Electron Bifurcating Enzymes“, kde na základě kritérií nastavených pro eliminaci falešně pozitivních výsledků (podrobněji popsáných v jejich práci), analyzovali 4588 genomů (4343 genomů bakterií, 230 archeí a 15 genomů eukaryot) dostupných v databázi NCBI a 3136 metagenomů dostupných v databázi DOE-IMG pro 12 dosud známých genů kódujících FBEB enzymy.

Na základě jimi filtrovaných výsledků v analyzovaných datech z databáze NCBI bylo nalezeno z 4588 genomů 681 (14,8% četnost) kódujících alespoň jeden homolog enzymového komplexu teoreticky schopného FBEB. 512 genomů patřilo bakteriím, 169 archeím, v genomech eukaryot se nepodařilo nalézt žádný homolog FBEB komplexu. Z hlediska rozšíření FBEB mezi analyzovanými kmeny: ze 41 kmenů 28 kódovalo alespoň jeden homolog teoreticky schopný elektronové bifurkace. Z bakteriálních kmenů bylo zastoupeny zejména Firmicutes (184), Proteobacteria (147), Bacteroidetes (44), Thermotogae (25) a Spirochaetes (22). Z genomů archea pak Euryarchaeota (126), Crenarchaeota (42), Korarchaeota (1). Při srovnání metabolismů podle jejich požadavků na metabolismus kyslíku 16 % aerobních organismů (110 genomů), 9 % (59 genomů) bylo fakultativně aerobní a 74 % (503 genomů) obligátně anaerobní. Dá se tedy říci, že výsledek tohoto srovnání potvrzuje teze ukazující na důležitost elektronové bifurkace pro organismy žijící blízko limitu termodynamických podmínek života.

Výsledky metagenomové analýzy z databáze DOE-IMG ukázaly 893 genomů, z celkových 3136, (28,5% četnost) kódujících alespoň jeden homolog elektron bifurkačního enzymu. 275 těchto metagenomů bylo klasifikováno jako rostoucích v prostředí pod povrchem, 618 poté jako žijících v povrchových prostředí, zejména v půdě a povrchových vodách. Podpovrchové mikroorganismy, jejichž genomy obsahovaly geny kódující homolog FBEB enzymu, vykazovaly oproti povrchovým organismům znatelně častější výskyt těchto enzymů. Tedy podobně jako u výsledků genomové analýzy z databáze NCBI, výsledky odpovídají teoriím o důležitosti FBEB pro organismy žijící v anaerobním prostředí s nedostatkem oxidantů a nízkým obsahem živin (Colman *et al.*, 2017).

Jednou ze zajímavých oblastí této analýzy byla možnost zjistit četnost vícenásobného výskytu jednotlivých FBEB komplexů v genomu jednoho organismu. Výsledky analýzy ukázaly zejména na pozitivní korelaci společného výskyt Bf-Ldh, Car, Bf-Bcd, Hyd, a Nfn enzymových komplexů v genomech. Tyto kombinace mohou pravděpodobně umožňovat organismu reagovat na změny

v dostupnosti substrátu, podobně jako je to například u *Methanococcus maripaludis* (Costa *et al.*, 2013).

8 Elektronová bifurkace a vznik života

Klíčovou vlastností definující život je jeho schopnost přeměnit nerovnováhu prostředí na nerovnováhu vnitrobuněčnou. Klasickými příklady biologických procesů plnících tuto funkci jsou ATP syntázy a redoxně řízené iontové pumpy bioenergetických systémů. Obecným principem působení v těchto systémech je, že endergonické a exergonické dílčí reakce jsou spřaženy, takže celková reakce, ačkoli je exergonická, je podmíněna aktuálním průběhem endergonické dílčí reakce (Branscomb *et al.*, 2017). Vzhledem k významu elektronové bifurkace u anaerobních organismů, kteří rostou blízko termodynamických limitů života, je často diskutována možnost, jestli organismy nemohly tento způsob katalýzy využívat již od svých počátků. Tuto diskuzi podporuje skutečnost, že elektronová bifurkace v principu nezávisí ani tak na specifickém působení specializovaných enzymů jako spíše na redoxních vlastnostech specifických kofaktorů.

Jak již bylo popsáno v kapitole 7, vznik života za přítomnosti dnešních FBEB enzymových komplexů nelze s jistotou vyloučit, ale na základě výsledků fylogenetické analýzy se zdá nepravděpodobný (Poudel *et al.*, 2018). Flaviny s chinony ale nejsou jedinými kofaktory schopných dvouelektronových přenosů v silném kooperativním módu. K podobným katalýzám mohou být využívány enzymy s kofaktory přechodných kovů. Ty se relativně hojně vyskytují v geosféře a mohou mít podobné redoxní vlastnosti a možnosti vazby ligandů jako flaviny a chinony.

Jedním z vhodných zástupců přechodných kovů je molybden. Enzymy obsahující molybden jako kofaktor, zejména molybdopteriny, mohou provádět redoxní katalýzu s dvouelektronovými přenosy na velkém množství environmentálních substrátů (Grimaldi *et al.*, 2013), přičemž některé z nich jsou pravděpodobně přinejmenším stejně staré jako LUCA (Schoepp-Cothenet *et al.*, 2012). Molybdopterinový kofaktor ve specifických enzymech z této nadrodiny může zaujímat silně pozitivní kooperativní redoxní chování, tj. vyznačovat se značně inverzními potenciály pro své jednotlivé jednoelektronové přechody (Duval *et al.*, 2016) a má tak tedy teoreticky vlastnosti potřebné k elektronové bifurkaci. Samotná elektronová bifurkační katalýza na bázi molybdopterinu dosud ale popsána nebyla.

Průzkum páskované železné rudy (BIF) z období eoarchaiku (stáří 3,7 - 3,8 mld. let) v zelenokamenném pásmu Isua v oblasti jihozápadního Grónska prokázal místa obohacená na molybden tvořících takzvaný „green rust“ (Russell, 2018). V podmínkách alkalických hydrotermálních pramenů, jednom z uvažovaných míst vzniku života, jsou sloučeniny molybdenu ve formě $[\text{MoO}_4]^{2-}$, $[\text{MoS}_4]^{2-}$, $[\text{FeO}(\text{OH})\text{MoS}_4]^{3-}$ a $[(\text{Fe}_2\text{S}_2)(\text{MoS}_4)_2]^{4-}$ rozpustné a při setkání se s kyselými vodami časného oceánu by precipitovaly. Spolu s hydroxidy železa

($\sim\text{Fe}^{\text{II}}_4\text{Fe}^{\text{III}}_2[\text{OH}]_{12}\text{CO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) by tak v pásmech BIF vytvářely dvojitou vrstvu hydroxidů zvanou „green rust“ (GR) (Tosca, Guggenheim and Pufahl, 2016). V těchto podmínkách mohly být uhličitany nahrazeny molybdenovými ionty vázané na okolní protony mezi vrstvami nano a mikrokrystalů hydroxidů železa (Duval *et al.*, 2016), kde mohly katalyzovat dvouelektronové přenosy, podobně jako enzymy s molybdenovými kofaktory dnes. Po vzniku prvních jednoduchých organických molekul, pteridinů nebo jejich deriváty pterinů, mohly sloužit jako ligandy pro molybden, zvyšovat tím rozpustnost dalších přechodných kovů z GR a nakonec dát vznik enzymu využívajícího molybdopterinového kofaktoru současných enzymů.

Jedním z evolučních impulzů k přechodu od enzymů s molybdenovými kofaktory k enzymům využívajících flavin mohlo být širší vystavení prvních mikroorganismů vodám Hadeanu nebo Archaeanu, kde nižší pH snižovalo rozpustnost molybdenu. Během tohoto přechodu, organismy syntetizující pterinům chemicky příbuzné flaviny (Basu and Burgmayer, 2011), které mají podobné elektrochemické vlastnosti jako molybdopteriny díky jejich aromatickému kruhovému systému, by byly zvýhodněny. Podobnost flavinů a pterinů lze najít především v jejich pteridinové části, z níž jsou pteriny i flaviny odvozeny, zatímco třetí kruh obou molekul se liší v nasycení vazeb. U flavinů je tato část plně konjugovaná a koplanární s pteridinovou částí. Jak pteriny, tak flaviny podléhají dvouelektronovým oxidoredukčním reakcím. Zajímavou skutečností je, že i u existujících molybdoenzymů jsou jejich redoxní vlastnosti silně ovlivněny interakcemi vodíkových vazeb v části obklopující pteriny (Wu, Rothery and Weiner, 2015), podobně jako je tomu v případě flavoproteinů. Zatímco tedy molybdopteriny mohly být zachovány pro redoxní potenciály, které nejsou přístupné flavinovým systémům, flavoproteiny mohly nahradit chybějící molybdenový aniont v jeho původních rolích, zejména možná v redoxní bifurkaci elektronů.

9 Závěr

Elektronová bifurkace založená na flavinech je z hlediska bioenergetiky významným mechanismem nacházejícím uplatnění zejména v anaerobních mikroorganismech, ale také v některých organismech fakultativně anaerobních nebo aerobních. Efekt tohoto mechanismu se dá zejména dobře pozorovat u organismů, žijících na termodynamických hranicích života, kde flavoproteiny katalyzují reakce, které by jinak pro organismus nebyla termodynamicky dostupné. U některých mikroorganismů bylo popsáno propojení produktů generovaných elektronovou bifurkací s translokačními enzymy generujícími chemiosmotický membránový gradient. V takových případech jsou produkty elektronové bifurkace „energeticky bohaté“ molekuly, které mohou při své oxidaci uvolňovat energii využitelnou pro tvorbu elektrochemického iontového gradientu na membráně a poté syntézu ATP.

Modely molekulárního mechanismu katalýzy elektronové bifurkace zatím nejsou pro většinu popsaných flavoproteinů dostupné. Mezi nejlépe popsané enzymy patří enzymový komplex NfnAB a komplexy ze skupiny ETF/BCD a FixABCX. Zajímavostí do budoucna mohou být výsledky z studií enzymového komplexu HydABC, kde je elektron bifurkační aktivita prokázána, ale na přítomných flavinových kofaktorech se jí nepodařilo prokázat (Chongdar *et al.*, 2020).

10 Použitá literatura

- Bar-Even, A. (2013) 'Does acetogenesis really require especially low reduction potential?', *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1827(3), pp. 395–400. doi: 10.1016/j.bbabi.2012.10.007.
- Basu, P. and Burgmayer, S. J. N. (2011) 'Pterin chemistry and its relationship to the molybdenum cofactor', *Coordination Chemistry Reviews*, 255(9–10), pp. 1016–1038. doi: 10.1016/j.ccr.2011.02.010.
- Baymann, F. *et al.* (2018) 'On the natural history of flavin-based electron bifurcation', *Frontiers in Microbiology*, 9(JUL). doi: 10.3389/fmicb.2018.01357.
- Bergdoll, L. *et al.* (2016) 'From low- to high-potential bioenergetic chains: Thermodynamic constraints of Q-cycle function', *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1857(9), pp. 1569–1579. doi: 10.1016/j.bbabi.2016.06.006.
- Bertsch, J. *et al.* (2013) 'An electron-bifurcating caffeoyl-CoA reductase', *Journal of Biological Chemistry*, 288(16), pp. 11304–11311. doi: 10.1074/jbc.M112.444919.
- Biegel, E. *et al.* (2011) 'Biochemistry, evolution and physiological function of the Rnf complex, a novel ion-motive electron transport complex in prokaryotes', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(4), pp. 613–634. doi: 10.1007/s00018-010-0555-8.
- Biegel, E. and Müller, V. (2010) 'Bacterial Na⁺-translocating ferredoxin: NAD⁺ oxidoreductase', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(42), pp. 18138–18142. doi: 10.1073/pnas.1010318107.
- Biegel, E., Schmidt, S. and Müller, V. (2009) 'Genetic, immunological and biochemical evidence for a Rnf complex in the acetogen *Acetobacterium woodii*', *Environmental Microbiology*, 11(6), pp. 1438–1443. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.01871.x.
- Blaut, M. and Gottschalk, G. (1984) 'Coupling of ATP synthesis and methane formation from methanol and molecular hydrogen in *Methanosarcina barkeri*', *European Journal of Biochemistry*, 141(1), pp. 217–222. doi: 10.1111/j.1432-1033.1984.tb08178.x.
- Branscomb, E. *et al.* (2017) 'Escapement mechanisms and the conversion of disequilibria; the engines of creation', *Physics Reports*, 677, pp. 1–60. doi: 10.1016/j.physrep.2017.02.001.
- Buckel, W. and Thauer, R. K. (2018a) 'Flavin-Based Electron Bifurcation, A New Mechanism of Biological Energy Coupling', *Chemical Reviews*, 118(7), pp. 3862–3886. doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00707.
- Buckel, W. and Thauer, R. K. (2018b) 'Flavin-based electron bifurcation, ferredoxin, flavodoxin, and anaerobic respiration with protons (Ech) or NAD⁺ (Rnf) as electron acceptors: A historical review', *Frontiers in Microbiology*, 9(MAR). doi: 10.3389/fmicb.2018.00401.
- Burton, R. M. and Stadtman, E. R. (1953) 'The oxidation of acetaldehyde to acetyl coenzyme A.', *The Journal of biological chemistry*, 202(2), pp. 873–890. doi: 10.1016/s0021-9258(18)66200-3.

- Chongdar, N. *et al.* (2020) ‘Spectroscopic and biochemical insight into an electron-bifurcating [FeFe] hydrogenase’, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 25(1), pp. 135–149. doi: 10.1007/s00775-019-01747-1.
- Colman, D. R. *et al.* (2017) ‘The deep, hot biosphere: Twenty-five years of retrospection’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(27), pp. 6895–6903. doi: 10.1073/pnas.1701266114.
- Costa, K. C. *et al.* (2013) ‘VhuD facilitates electron flow from H₂ or formate to heterodisulfide reductase in *Methanococcus maripaludis*’, *Journal of Bacteriology*, 195(22), pp. 5160–5165. doi: 10.1128/JB.00895-13.
- Crofts, A. R. *et al.* (2013) ‘The mechanism of ubihydroquinone oxidation at the Qo-site of the cytochrome bc₁ complex’, *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1827(11–12), pp. 1362–1377. doi: 10.1016/j.bbabi.2013.01.009.
- Dai, Z. *et al.* (2014) ‘Identification of nitrogen-fixing genes and gene clusters from metagenomic library of acid mine drainage’, *PLoS ONE*, 9(2). doi: 10.1371/journal.pone.0087976.
- Decker, K. and Pfitzer, S. (1972) ‘Determination of steady-state concentrations of adenine nucleotides in growing *C. kluveri* cells by biosynthetic labeling’, *Analytical Biochemistry*, 50(2), pp. 529–539. doi: 10.1016/0003-2697(72)90063-2.
- Demmer, J. K. *et al.* (2015) ‘Insights into flavin-based electron bifurcation via the nadh-dependent reduced ferredoxin:nadp oxidoreductase structure’, *Journal of Biological Chemistry*, 290(36), pp. 21985–21995. doi: 10.1074/jbc.M115.656520.
- Demmer, J. K. *et al.* (2016) ‘Ligand binding and conformational dynamics in a flavin-based electron-bifurcating enzyme complex revealed by Hydrogen–Deuterium Exchange Mass Spectrometry’, *FEBS Letters*, 590(24), pp. 4472–4479. doi: 10.1002/1873-3468.12489.
- Demmer, J. K. *et al.* (2017) ‘The semiquinone swing in the bifurcating electron transferring flavoprotein/butyryl-CoA dehydrogenase complex from *Clostridium difficile*’, *Nature Communications*, 8(1). doi: 10.1038/s41467-017-01746-3.
- Demmer, J. K. *et al.* (2018) ‘Molecular basis of the flavin-based electron-bifurcating caffeyl-CoA reductase reaction’, *FEBS Letters*, 592(3), pp. 332–342. doi: 10.1002/1873-3468.12971.
- Deppenmeier, U. and Müller, V. (2008) ‘Life close to the thermodynamic limit: How methanogenic archaea conserve energy’, *Results and Problems in Cell Differentiation*, 45, pp. 123–152. doi: 10.1007/400_2006_026.
- Duval, S. *et al.* (2016) ‘The H-bond network surrounding the pyranopterins modulates redox cooperativity in the molybdenum-bisPGD cofactor in arsenite oxidase’, *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1857(9), pp. 1353–1362. doi: 10.1016/j.bbabi.2016.05.003.
- Edgren, T. and Nordlund, S. (2004) ‘The fixABCX Genes in *Rhodospirillum rubrum* Encode a Putative Membrane Complex Participating in Electron Transfer to Nitrogenase’, *Journal of Bacteriology*, 186(7), pp. 2052–2060. doi: 10.1128/JB.186.7.2052-2060.2004.

- Feng, X. *et al.* (2021) ‘Cryoelectron microscopy structure and mechanism of the membrane-associated electron-bifurcating flavoprotein Fix/EtfABCX’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(2). doi: 10.1073/pnas.2016978118.
- Fredericks, W. W. and Stadtman, E. R. (1965) ‘The nature of the cofactor requirements of the hydrogenase system from *Clostridium kluyveri*.’, *Journal of Biological Chemistry*, 240(12), pp. 4809–4815. doi: 10.1016/s0021-9258(18)97027-4.
- Fritz, M. and Müller, V. (2007) ‘An intermediate step in the evolution of ATPases - The F1F0-ATPase from *Acetobacterium woodii* contains F-type and V-type rotor subunits and is capable of ATP synthesis’, *FEBS Journal*, 274(13), pp. 3421–3428. doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.05874.x.
- Greening, C. *et al.* (2015) ‘Atmospheric hydrogen scavenging: From enzymes to ecosystems’, *Applied and Environmental Microbiology*, 81(4), pp. 1190–1199. doi: 10.1128/AEM.03364-14.
- Grimaldi, S. *et al.* (2013) ‘The prokaryotic Mo/W-bisPGD enzymes family: A catalytic workhorse in bioenergetic’, *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1827(8–9), pp. 1048–1085. doi: 10.1016/j.bbabi.2013.01.011.
- Gunsalus, R. P. and Wolfe, R. S. (1977) ‘Stimulation of CO₂ reduction to methane by methyl-coenzyme M in extracts of *Methanobacterium*’, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 76(3), pp. 790–795. doi: 10.1016/0006-291X(77)91570-4.
- Hansen, B. *et al.* (1988) ‘ATP formation coupled to caffeate reduction by H₂ in *Acetobacterium woodii* NZva16’, *Archives of Microbiology*, 150(5), pp. 447–451. doi: 10.1007/BF00422285.
- Hedderich, R. (2004) ‘Energy-Converting [NiFe] Hydrogenases from Archaea and Extremophiles: Ancestors of Complex I’, *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 36(1), pp. 65–75. doi: 10.1023/B:JOB.0000019599.43969.33.
- Herrmann, G. *et al.* (2008) ‘Energy conservation via electron-transferring flavoprotein in anaerobic bacteria’, *Journal of Bacteriology*, 190(3), pp. 784–791. doi: 10.1128/JB.01422-07.
- Hess, V., Schuchmann, K. and Müller, V. (2013) ‘The ferredoxin: NAD⁺ Oxidoreductase (Rnf) from the acetogen *acetobacterium woodii* requires Na⁺ and is reversibly coupled to the membrane potential’, *Journal of Biological Chemistry*, 288(44), pp. 31496–31502. doi: 10.1074/jbc.M113.510255.
- Hillmer, P. and Gottschalk, G. (1972) ‘Particulate nature of enzymes involved in the fermentation of ethanol and acetate by *Clostridium kluyveri*’, *FEBS Letters*, 21(3), pp. 351–354. doi: 10.1016/0014-5793(72)80200-X.
- Hutcherson, J. A. *et al.* (2017) ‘Amixicile, a novel strategy for targeting oral anaerobic pathogens’, *Scientific Reports*, 7(1). doi: 10.1038/s41598-017-09616-0.
- Imkamp, F. *et al.* (2007) ‘Dissection of the caffeate respiratory chain in the acetogen *Acetobacterium woodii*: Identification of an Rnf-type NADH dehydrogenase as a potential coupling site’, *Journal of Bacteriology*, 189(22), pp. 8145–8153. doi: 10.1128/JB.01017-07.
- Islam, M. A. *et al.* (2015) ‘Investigating *Moorella thermoacetica* metabolism with a genome-scale

constraint-based metabolic model', *Integrative Biology (United Kingdom)*, 7(8), pp. 869–882. doi: 10.1039/c5ib00095e.

Jungermann, K. *et al.* (1969) 'Ferredoxin mediated hydrogen formation from NADPH in a cell-free system of *Clostridium kluuyveri*', *FEBS Letters*, 3(2), pp. 144–146. doi: 10.1016/0014-5793(69)80119-5.

Jungermann, K. *et al.* (1971) 'Regulation of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide-ferredoxin reductase system in *Clostridium kluuyveri*.' , *Journal of Biological Chemistry*, 246(4), pp. 960–963. doi: 10.1016/s0021-9258(18)62417-2.

Junier, P. *et al.* (2010) 'The genome of the Gram-positive metal- and sulfate-reducing bacterium *Desulfotomaculum reducens* strain MI-1', *Environmental Microbiology*, 12(10), pp. 2738–2754. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02242.x.

Kaster, A. K. *et al.* (2011) 'Coupling of ferredoxin and heterodisulfide reduction via electron bifurcation in hydrogenotrophic methanogenic archaea', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(7), pp. 2981–2986. doi: 10.1073/pnas.1016761108.

Kuhns, M. *et al.* (2020) 'The Rnf complex is a Na⁺ coupled respiratory enzyme in a fermenting bacterium, *Thermotoga maritima*', *Communications Biology*, 3(1). doi: 10.1038/s42003-020-01158-y.

Ledbetter, R. N. *et al.* (2017) 'The Electron Bifurcating FixABCX Protein Complex from *Azotobacter vinelandii*: Generation of Low-Potential Reducing Equivalents for Nitrogenase Catalysis', *Biochemistry*, 56(32), pp. 4177–4190. doi: 10.1021/acs.biochem.7b00389.

Li, F. *et al.* (2008) 'Coupled ferredoxin and crotonyl coenzyme A (CoA) reduction with NADH catalyzed by the butyryl-CoA dehydrogenase/Etf complex from *Clostridium kluuyveri*', *Journal of Bacteriology*, 190(3), pp. 843–850. doi: 10.1128/JB.01417-07.

Liang, J., Huang, H. and Wang, S. (2019) 'Distribution, evolution, catalytic mechanism, and physiological functions of the flavin-based electron-bifurcating NADH-dependent reduced ferredoxin: NADP⁺ oxidoreductase', *Frontiers in Microbiology*, 10(MAR). doi: 10.3389/fmicb.2019.00373.

Lim, Z. H. *et al.* (2013) 'The hydrogen-bonded dianion of vitamin K1 produced in aqueous-organic solutions exists in equilibrium with its hydrogen-bonded semiquinone anion radical', *Journal of Physical Chemistry B*, 117(8), pp. 2396–2402. doi: 10.1021/jp4003966.

Lubner, C. E. *et al.* (2017) 'Mechanistic insights into energy conservation by flavin-based electron bifurcation', *Nature Chemical Biology*, 13(6), pp. 655–659. doi: 10.1038/nchembio.2348.

Michaelis, L. (1932) 'Theory of the Reversible Two-Step Oxidation', *Journal of Biological Chemistry*, 96(3), pp. 703–715. doi: 10.1016/s0021-9258(18)76258-3.

Mitchell, P. (1975) 'The protonmotive Q cycle: A general formulation', *FEBS Letters*, 59(2), pp. 137–139. doi: 10.1016/0014-5793(75)80359-0.

Muras, V. *et al.* (2019) 'Respiratory Membrane Protein Complexes Convert Chemical Energy', *Subcellular Biochemistry*, 92, pp. 301–335. doi: 10.1007/978-3-030-18768-2_10.

Poudel, S. *et al.* (2018) 'Origin and evolution of flavin-based electron bifurcating enzymes', *Frontiers*

- in Microbiology*, 9(AUG). doi: 10.3389/fmicb.2018.01762.
- Richards, M. A. *et al.* (2016) 'Exploring hydrogenotrophic methanogenesis: A genome scale metabolic reconstruction of *Methanococcus maripaludis*', *Journal of Bacteriology*, 198(24), pp. 3379–3390. doi: 10.1128/JB.00571-16.
- Russell, M. J. (2018) 'Green rust: The simple organizing "seed" of all life?', *Life*, 8(3). doi: 10.3390/life8030035.
- Sant'Anna, F. H. *et al.* (2015) 'Analysis of three genomes within the thermophilic bacterial species *Caldanaerobacter subterraneus* with a focus on carbon monoxide dehydrogenase evolution and hydrolase diversity', *BMC Genomics*, 16(1). doi: 10.1186/s12864-015-1955-9.
- Santiago-Martínez, M. G. *et al.* (2016) 'The nutritional status of *Methanosarcina acetivorans* regulates glycogen metabolism and gluconeogenesis and glycolysis fluxes', *FEBS Journal*, 283(10), pp. 1979–1999. doi: 10.1111/febs.13717.
- Schink, B. (2015) 'Electron confurcation in anaerobic lactate oxidation', *Environmental Microbiology*, 17(3), p. 543. doi: 10.1111/1462-2920.12568.
- Schmehl, M. *et al.* (1993) 'Identification of a new class of nitrogen fixation genes in *Rhodobacter capsulatus*: a putative membrane complex involved in electron transport to nitrogenase', *MGG Molecular & General Genetics*, 241(5–6), pp. 602–615. doi: 10.1007/BF00279903.
- Schoberth, S. and Gottschalk, G. (1969) 'Considerations on the energy metabolism of *Clostridium kluyveri*', *Archiv für Mikrobiologie*, 65(4), pp. 318–328. doi: 10.1007/BF00412211.
- Schoepp-Cothenet, B. *et al.* (2012) 'The ineluctable requirement for the trans-iron elements molybdenum and/or tungsten in the origin of life', *Scientific Reports*, 2. doi: 10.1038/srep00263.
- Schuchmann, K. and Müller, V. (2013) 'Direct and reversible hydrogenation of CO₂ to formate by a bacterial carbon dioxide reductase', *Science*, 342(6164), pp. 1382–1385. doi: 10.1126/science.1244758.
- Schuchmann, K. and Müller, V. (2014) 'Autotrophy at the thermodynamic limit of life: A model for energy conservation in acetogenic bacteria', *Nature Reviews Microbiology*, 12(12), pp. 809–821. doi: 10.1038/nrmicro3365.
- Schut, G. J. and Adams, M. W. W. (2009) 'The iron-hydrogenase of *Thermotoga maritima* utilizes ferredoxin and NADH synergistically: A new perspective on anaerobic hydrogen production', *Journal of Bacteriology*, 191(13), pp. 4451–4457. doi: 10.1128/JB.01582-08.
- Sétif, P. (2001) 'Ferredoxin and flavodoxin reduction by photosystem I', *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1507(1–3), pp. 161–179. doi: 10.1016/S0005-2728(01)00205-5.
- Spahn, S., Brandt, K. and Müller, V. (2015) 'A low phosphorylation potential in the acetogen *Acetobacterium woodii* reflects its lifestyle at the thermodynamic edge of life', *Archives of Microbiology*, 197(6), pp. 745–751. doi: 10.1007/s00203-015-1107-2.
- Thauer, R. K. *et al.* (2008) 'Methanogenic archaea: Ecologically relevant differences in energy conservation', *Nature Reviews Microbiology*, 6(8), pp. 579–591. doi: 10.1038/nrmicro1931.

- Thauer, R. K. *et al.* (2010) 'Hydrogenases from methanogenic archaea, nickel, a novel cofactor, and H₂ storage', *Annual Review of Biochemistry*, 79, pp. 507–536. doi: 10.1146/annurev.biochem.030508.152103.
- Thauer, R. K. (2012) 'The Wolfe cycle comes full circle', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(38), pp. 15084–15085. doi: 10.1073/pnas.1213193109.
- THAUER, R. K. *et al.* (1968) 'The Energy Metabolism of *Clostridium kluyveri*', *European Journal of Biochemistry*, 4(2), pp. 173–180. doi: 10.1111/j.1432-1033.1968.tb00189.x.
- Tosca, N. J., Guggenheim, S. and Pufahl, P. K. (2016) 'An authigenic origin for Precambrian greenalite: Implications for iron formation and the chemistry of ancient seawater', *Bulletin of the Geological Society of America*, 128(3–4), pp. 511–530. doi: 10.1130/B31339.1.
- Vitousek, P. M. *et al.* (2013) 'Biological nitrogen fixation: Rates, patterns and ecological controls in terrestrial ecosystems', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368(1621). doi: 10.1098/rstb.2013.0119.
- Wang, P. F. *et al.* (1998) 'Thioredoxin reductase - Thioredoxin fusion enzyme from *Mycobacterium leprae*: Comparison with the separately expressed thioredoxin reductase', *Biochemistry*, 37(46), pp. 16378–16389. doi: 10.1021/bi980754e.
- Wang, S. *et al.* (2010) 'NADP⁺ reduction with reduced ferredoxin and NADP⁺ reduction with NADH are coupled via an electron-bifurcating enzyme complex in *Clostridium kluyveri*', *Journal of Bacteriology*, 192(19), pp. 5115–5123. doi: 10.1128/JB.00612-10.
- Weghoff, M. C., Bertsch, J. and Müller, V. (2015) 'A novel mode of lactate metabolism in strictly anaerobic bacteria', *Environmental Microbiology*, 17(3), pp. 670–677. doi: 10.1111/1462-2920.12493.
- Weiss, M. C. *et al.* (2016) 'The physiology and habitat of the last universal common ancestor', *Nature Microbiology*, 1(9). doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.116.
- Westphal, L. *et al.* (2018) 'The Rnf complex is an energy-coupled transhydrogenase essential to reversibly link cellular NADH and ferredoxin pools in the acetogen *acetobacterium woodii*', *Journal of Bacteriology*, 200(21). doi: 10.1128/JB.00357-18.
- Wu, S. Y., Rothery, R. A. and Weiner, J. H. (2015) 'Pyranopterin coordination controls molybdenum electrochemistry in *Escherichia coli* nitrate reductase', *Journal of Biological Chemistry*, 290(41), pp. 25164–25173. doi: 10.1074/jbc.M115.665422.
- Yuly, J. L. *et al.* (2019) 'Electron bifurcation: Progress and grand challenges', *Chemical Communications*, 55(79), pp. 11823–11832. doi: 10.1039/c9cc05611d.
- Zhang, H. *et al.* (2007) 'Exposing the Complex III Qo semiquinone radical', *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1767(7), pp. 883–887. doi: 10.1016/j.bbabi.2007.04.004.
- Zhang, P. *et al.* (2017) 'Electron Bifurcation: Thermodynamics and Kinetics of Two-Electron Brokering in Biological Redox Chemistry', *Accounts of Chemical Research*, 50(9), pp. 2410–2417. doi: 10.1021/acs.accounts.7b00327.

