

**Energiestoffwechsel von Cytochrom-freien methanogenen Archaea bei  
Wachstum auf H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub>**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

Anne-Kristin Kaster  
aus Bendorf am Rhein

**Marburg/Lahn, Dezember 2010**

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden in der Zeit von Oktober 2007 bis Oktober 2010 am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg/Lahn unter der Leitung von Professor Dr. Rudolf K. Thauer durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität in Marburg als Dissertation angenommen am:

Erstgutachter: Professor Dr. Rudolf K. Thauer

Zweitgutachter: Professor Dr. Wolfgang Buckel

Tag der mündlichen Prüfung: 27.01.2011

Die Ergebnisse der Doktorarbeit sind in drei Originalarbeiten veröffentlicht und in zwei Übersichtsartikel integriert.

1. Kaster AK, Moll J, Parey K and Thauer RK. (2010) Coupling of ferredoxin- and heterodisulfide reduction via electron bifurcation in hydrogenotrophic methanogenic archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*; in revision.pp. 80-92
2. Kaster AK, Goenrich M, Seedorf H, Liesegang H, Wollher A, Gottschalk G, and Thauer RK. (2010) More than 200 genes required for methane formation from H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> and energy conservation in *Methanothermobacter marburgensis* and *M. thermautotrophicus*. *Archaea*, in revision.....pp. 93-141
3. Liesegang H, Kaster AK, Wiezer A, Goenrich M, Wollher A, Seedorf H, Gottschalk G, and Thauer RK. (2010) Complete genome sequence of *Methanothermobacter marburgensis*, a methanoarchaeon model organism. *Journal of Bacteriology*, **192**(21):5850-5851.....pp.142-143
4. Thauer RK, Kaster AK, Goenrich M, Schick M, Hiromoto T, Shima S. (2010) Hydrogenases from methanogenic Archaea, Nickel, a novel cofactor, and H<sub>2</sub> storage. *Annual Reviews of Biochemistry*, **79**:507-536.....pp. 144-173
5. Thauer RK, Kaster AK, Seedorf H, Buckel W, Hedderich R. (2008) Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. *Nature Reviews of Microbiology* **6**(8):579-591.....pp. 174-186

*Für meine Familie*

## Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>2</b>
<b>Einleitung</b> .....	<b>4</b>
<b>Material &amp; Methoden</b> .....	<b>14</b>
1. Kultivierung von methanogenen Archaea .....	15
1.1 <i>Methanothermobacter marburgensis</i> .....	15
1.2 <i>Methanobrevibacter arboriphilus</i> .....	15
1.3 <i>Methanosarcina barkeri</i> .....	16
2. Bestimmung der Methanbildungsraten und H <sub>2</sub> -Schwellenkonzentrationen .....	18
3. Bestimmung von Wachstumserträgen .....	20
4. Synthese, Charakterisierung und Nachweis von Coenzymen.....	21
4.1 Darstellung CoB-S-S-CoB und CoB-SH .....	23
4.2 Darstellung von CoM-S-S-CoM .....	26
4.3 Darstellung von CoM-S-S-CoB .....	26
5. Reinigung von Ferredoxin und [FeFe]-Hydrogenase aus <i>C. pasteurianum</i> .....	27
6. Reinigung des MvhADG/HdrABC Komplexes aus <i>M. marburgensis</i> .....	27
7. Bestimmung der katalytischen Eigenschaften des MvhADG/HdrABC Komplexes ..	29
7.1 Ferredoxin-Reduktions-Assay.....	30
7.2 Metronidazol-Reduktions-Assay .....	30
<b>Ergebnisse</b> .....	<b>32</b>
1. H <sub>2</sub> -Schwellenkonzentrationen und Wachstumserträge .....	32
2. Kopplung von Ferredoxin-Reduktion mit H <sub>2</sub> und CoM-S-S-CoB-Reduktion mit H <sub>2</sub> über den MvhADG/HdrABC Komplex .....	35
2.1 CoM-S-S-CoB-abhängige Ferredoxin-Reduktion mit H <sub>2</sub> in Zellextrakten.....	36
2.2 Reinigung des MvhADG/HdrABC Komplexes, der die CoM-S-S-CoB- abhängige Ferredoxin-Reduktion katalysiert .....	39
2.3 Kinetische Eigenschaften des MvhADG/HdrABC Komplexes.....	41
2.4 Stöchiometrie der Kopplung von Ferredoxin-Reduktion mit H <sub>2</sub> und CoM-S-S-CoB-Reduktion mit H <sub>2</sub> .....	44
2.5 Energetische Kopplung .....	47
3. Nicht interpretierbare und nicht auswertbare Ergebnisse.....	49
<b>Diskussion</b> .....	<b>54</b>
<b>Literatur</b> .....	<b>71</b>
<b>Aus der Doktorarbeit hervorgegangene 5 Publikationen</b> .....	<b>80</b>
<b>Danksagung</b>	
<b>Curriculum vitae</b>	
<b>Erklärung</b>	

**Abkürzungsverzeichnis**

BV	Benzylviologen
CH $\equiv$ H <sub>4</sub> MPT <sup>+</sup>	Methenyl-Tetrahydromethanopterin
CH <sub>2</sub> = H <sub>4</sub> MPT	Methylen-Tetrahydromethanopterin
CH <sub>3</sub> - H <sub>4</sub> MPT	Methyl-Tetrahydromethanopterin
CHO	Formyl
CoB-SH	Coenzym B, N-7-Mercaptoheptanoyl-O-Phospho-L-Threonin
CoB-S-S-CoB	Homodisulfid aus CoB-SH
CoM-SH	Coenzym M, 2-Mercaptoethansulfonat,
CoM-S-S-CoB	Heterodisulfid aus CoM-SH und CoB-SH
CoM-S-S-CoM	Homodisulfid aus CoM-SH
DTT	Dithiothreitol
EchA-F	Energie-konvertierende Hydrogenase Ech
EhaA-T	Energie-konvertierende Hydrogenase Eha
EhbA-Q	Energie-konvertierende Hydrogenase Ehb
F <sub>420</sub>	Coenzym F <sub>420</sub> , ein 8-Hydroxy-7,8-didemethyl-5-deazariboflavin
Fd	Ferredoxin
Frh	F <sub>420</sub> -reduzierende [NiFe]-Hydrogenase
FwdA-DFGH	Wolfram-abhängige Formylmethanofuran Dehydrogenase
FwdA/FmdBCE	Molybdän-abhängige Formylmethanofuran Dehydrogenase
H <sub>4</sub> MPT	Tetrahydromethanopterin
HdrABC	Ferredoxin-abhängige Heterodisulfid-Reduktase
HdrDE	Methanophenazin-abhängige Heterodisulfid-Reduktase
Mbh	Membran-gebundenen Hydrogenase
MFR	Methanofuran
MtrA-H	Methyl-H <sub>4</sub> MPT: Coenzym M Methyltransferase
MTZ	Metronidazol
MV	Methylviologen
MvhADG	Methylviologen-reduzierende [NiFe]-Hydrogenase
Upm	Umdrehungen pro Minute
SDS-PAGE	Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese
TFA	Trifluoressigsäure
OD	Optische Dichte
VhoACG	Methanophenazin-reduzierende [NiFe]-Hydrogenase

## Zusammenfassung

Methanogene Archaea sind Organismen, die Methan als Endprodukt ihres anaeroben Energiestoffwechsels bilden. Es gibt zwei stoffwechselphysiologisch unterschiedliche Gruppen: Zum einen die Cytochrom-freien Methanogenen, welche nur  $H_2$  und  $CO_2$  und/oder Formiat zu Methan umsetzen und zum anderen die Cytochrom-haltigen Methanogenen, die auf Acetat, Methanol und/oder Methylamin spezialisiert sind und von denen nur einige wenige auf  $H_2$  und  $CO_2$  wachsen können. Da lediglich der Energiestoffwechsel Cytochrom-haltiger Methanogener bei Wachstum auf  $H_2$  und  $CO_2$  weitgehend verstanden ist, war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, den Energiestoffwechsel Cytochrom-freier Methanogener aufzuklären. Dazu wurden zunächst die Wachstumserträge und  $H_2$ -Schwellenkonzentrationen von zwei Cytochrom-freien Methanogenen bestimmt und mit denen eines Cytochrom-haltigen verglichen. Anschließend wurde die Kopplung des ersten und letzten Schrittes der Methanbildung aus  $H_2$  und  $CO_2$  auf Enzymebene untersucht.

Für die Cytochrom-freien Organismen *Methanothermobacter marburgensis* und *Methanobrevibacter arboriphilus* wurde ein Wachstumsertrag auf  $H_2$  und  $CO_2$  von ca. 2 g Zellen/mol Methan und eine  $H_2$ -Schwellenkonzentration von ca. 8 Pa bestimmt. Für den Cytochrom-haltigen Organismus *Methanosarcina barkeri* wurde hingegen ein Wachstumsertrag von ca. 7 g Zellen/mol Methan und eine  $H_2$ -Schwellenkonzentration von ca. 150 Pa gefunden. Unter Einbeziehung aller Literaturwerte (Wachstumserträge bis zu 3,5 g Zellen/mol Methan und  $H_2$ -Schwellenkonzentration immer unter 10 Pa bei Cytochrom-freien Methanogenen) sprechen die Ergebnisse dafür, dass in Cytochrom-freien Methanbildnern ca. 0,5 mol ATP/mol Methan aus  $H_2$  und  $CO_2$  gebildet wird und in Cytochrom-haltigen ca. 1 mol ATP/mol Methan. Methanbildung aus  $H_2$  und  $CO_2$  und ATP-Synthese müssen in den beiden Gruppen daher unterschiedlich gekoppelt sein.

Ein wesentlicher Kopplungsschritt bei der Methanbildung ist die Kopplung der endergonen Reduktion von Ferredoxin mit  $H_2$  mit der exergonen Reduktion des Heterodisulfids CoM-S-S-CoB mit  $H_2$ . In methanogenen Archaea mit Cytochromen sind beide Reaktionen chemiosmotisch miteinander unter Beteiligung der Membran-

assoziierten Enzymkomplexe EchA-F (Energie-konvertierende [NiFe]-Hydrogenase) sowie VhoACG (Methanophenazin-reduzierende [NiFe]-Hydrogenase) und HdrDE (Methanophenazin-abhängige Heterodisulfid-Reduktase) gekoppelt. In Methanogenen ohne Cytochrome kann eine chemiosmotische Kopplung der beiden Reaktionen nicht erfolgen, da in diesen Organismen die Reduktion von CoM-S-S-CoB mit H<sub>2</sub> von einem zytoplasmatischen FAD-haltigen MvhADG/HdrABC Komplex katalysiert wird. In der vorliegenden Arbeit wurde gefunden, dass der MvhADG/HdrABC Komplex aus *M. marburgensis* Ferredoxin-abhängig ist. Der gereinigte Komplex katalysierte die CoM-S-S-CoB-abhängige Reduktion von Ferredoxin mit H<sub>2</sub> und die Ferredoxin-abhängige Reduktion von CoM-S-S-CoB mit H<sub>2</sub>. Pro mol CoM-S-S-CoB wurde 1 mol Ferredoxin reduziert:



Ferredoxin ( $E_o' = -400 \text{ mV}$ ) wurde mit H<sub>2</sub> (1 bar, pH 7) ( $E_o' = -414 \text{ mV}$ ) in Gegenwart von CoM-S-S-CoB ( $E_o' = -140 \text{ mV}$ ) zu fast 100% reduziert, woraus geschlossen werden kann, dass die Reduktionen von Ferredoxin und CoM-S-S-CoB mit 2 H<sub>2</sub> auch energetisch miteinander gekoppelt sind. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass die Kopplung über den erst vor kurzem entdeckten Mechanismus der Flavin-basierten Elektronenbifurkation erfolgt.

Auf der Basis aller Ergebnisse wurde für *M. marburgensis* ein Stoffwechselschema vorgeschlagen, das die im Vergleich zu Cytochrom-haltigen Methanbildnern niedrigeren Wachstumserträge und H<sub>2</sub>-Schwellenkonzentrationen bei Wachstum auf H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> erklären kann. Das Schema stützt sich auch auf Genomdaten, die während dieser Arbeit für *M. marburgensis* in Zusammenarbeit mit dem Göttingen Genomics Laboratory ermittelt und über Sequenzvergleiche interpretiert wurden. Die Ergebnisse der Genomanalysen sind in zwei Publikationen als Bestandteil der Doktorarbeit am Ende abgedruckt.

## Einleitung

Methanogene Archaea gehören zu der phylogenetisch diversen Gruppe der strikt anaeroben Euryarchaeota aus der Domäne der Archaea (Woese et al. 1990). Ihr Energiemetabolismus ist auf die Methanbildung aus H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub>, Formiat, Methanol, Methylamin und/oder Acetat beschränkt (Boone et al. 1993; Thauer 1998; Garcia et al. 2000; Grahame and Gencic 2000; Ferry and Kestead 2007). Außerdem benötigen sie ein Redoxpotential von unter -300 mV für ihr Wachstum (Zinder 1993). Trotz dieser Einschränkungen spielen diese Mikroorganismen eine quantitativ wichtige Rolle im globalen Kohlenstoffzyklus. Schätzungsweise 1 Milliarde Tonnen Methan werden jährlich durch methanogene Archaea in anoxischen Habitaten wie Frischwassersedimenten, Mooren, Reisfeldern oder dem Darmtrakt von Wiederkäuern und Termiten produziert. Dies bedeutet, dass von den 70 Gt Kohlenstoff, die jährlich aus CO<sub>2</sub> über Photosynthese zu Biomasse fixiert werden, ca. 2% zu Methan umgewandelt werden (Thauer et al. 2008; Thauer et al. 2010).

### Methanogene mit und ohne Cytochrome

Es gibt sechs Ordnungen von methanogenen Archaea, die bisher identifiziert werden konnten: Die *Methanopyrales*, die *Methanococcales*, die *Methanobacteriales*, die *Methanomicrobiales*, die *Methanosarcinales* (Boone et al. 1993; Whitman et al. 2001; Brochier et al. 2004), sowie die mit den *Methanosarcinales* nahe verwandten *Methanocellales* ord. nov. (Sakai et al. 2008). Die Ordnung mit dem ältesten Ursprung innerhalb der Euryarchaeota ist die der *Methanopyrales*, die evolutionsgeschichtlich jüngsten Ordnungen die der *Methanocellales* und *Methanosarcinales* (Boone et al. 1993; Sakai et al. 2008). Alle Organismen, die den *Methanosarcinales* zugeordnet werden, enthalten Cytochrome (Proteine, die Häm als prosthetische Gruppe enthalten und die Reduktionsäquivalente übertragen können) (Kühn et al. 1979; Kühn et al. 1983; Kühn and Gottschalk 1983; Jussofie and Gottschalk 1986) und Methanophenazin (ein funktionelles Menaquinon Analog) (Abken et al. 1998; Beifuss et al. 2000; Tietze et al. 2003).

Die *Methanopyrales*, *Methanococcales*, *Methanobacteriales* und *Methanomicrobiales* enthalten keine Cytochrome und/oder Methanophenazin und sind auf die Reduktion von CO<sub>2</sub> zu Methan mit H<sub>2</sub> beschränkt. Man nennt sie daher auch hydrogenotroph. Manche Hydrogenotrophe können allerdings auch Formiat als Elektronendonator verwenden (Bonin and Boone 2006). Nur ein Methanogener ohne Cytochrome, *Methanosphaera stadtmanae*, kann CO<sub>2</sub> nicht zu Methan reduzieren. Dieses menschliche Darmarchaeon ist von Methanol und H<sub>2</sub> als Energiequelle abhängig (Fricke et al. 2006).

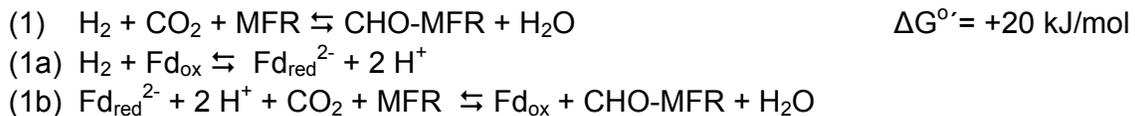
Die *Methanosarcinales* sind dagegen auf Acetat, Methanol und/oder Methylamin spezialisiert (Kendall and Boone 2006). Nur wenige Organismen dieser Ordnung können auf H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> wachsen wie z. B. *Methanosarcina barkeri*. Der bisher einzige charakterisierte Organismus aus der Ordnung *Methanocellales* - *Methanocella paludicola* ord. nov. (ein Isolat aus Rice Cluster I) - kann hingegen nur auf H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> sowie auf Formiat als Energiequelle wachsen (Conrad et al. 2006; Sakai et al. 2008).

Methanogene mit und ohne Cytochrome, die auf H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> wachsen können, scheinen sich nicht nur durch ihre Elektronentransportkomponenten, sondern auch in der Art ihrer Kopplung von Methanbildung und ATP-Synthese zu unterscheiden. In der Literatur zu findende Wachstumserträge für *Methanosarcina* Spezies liegen stets höher als die für Cytochrom-freie Methanogene (Robertson and Wolfe 1970; Zehnder and Wuhrmann 1977; Smith and Mah 1978; Weimer and Zeikus 1978; Schauer and Ferry 1980; Schönheit et al. 1980; Morii et al. 1987; Karadagli and Rittmann 2005), bedingungsgleiche Untersuchungen liegen allerdings nicht dazu vor. H<sub>2</sub>-Schwellenkonzentrationen wurden bisher nur für Cytochrom-freie Methanogene publiziert (Lovley 1985; Cord-Ruwisch et al. 1988). Es wird aber generell angenommen, dass die zum Wachstum benötigten H<sub>2</sub>-Konzentrationen bei Cytochrom-haltigen Archaea etwa 10 Mal höher liegen als bei Cytochrom-freien Methanogenen (Boone et al. 1993; Garcia et al. 2000). Dem widerspricht, dass für den Cytochrom-haltigen Rice Cluster I aus der Ordnung der *Methanocellales* eine niedrige H<sub>2</sub>-Schwellenkonzentration ermittelt wurde (Conrad et al. 2006). Diese Unterschiede müssen ihre Ursache im Energiestoffwechsel der Organismen haben (Thauer et al. 2008).

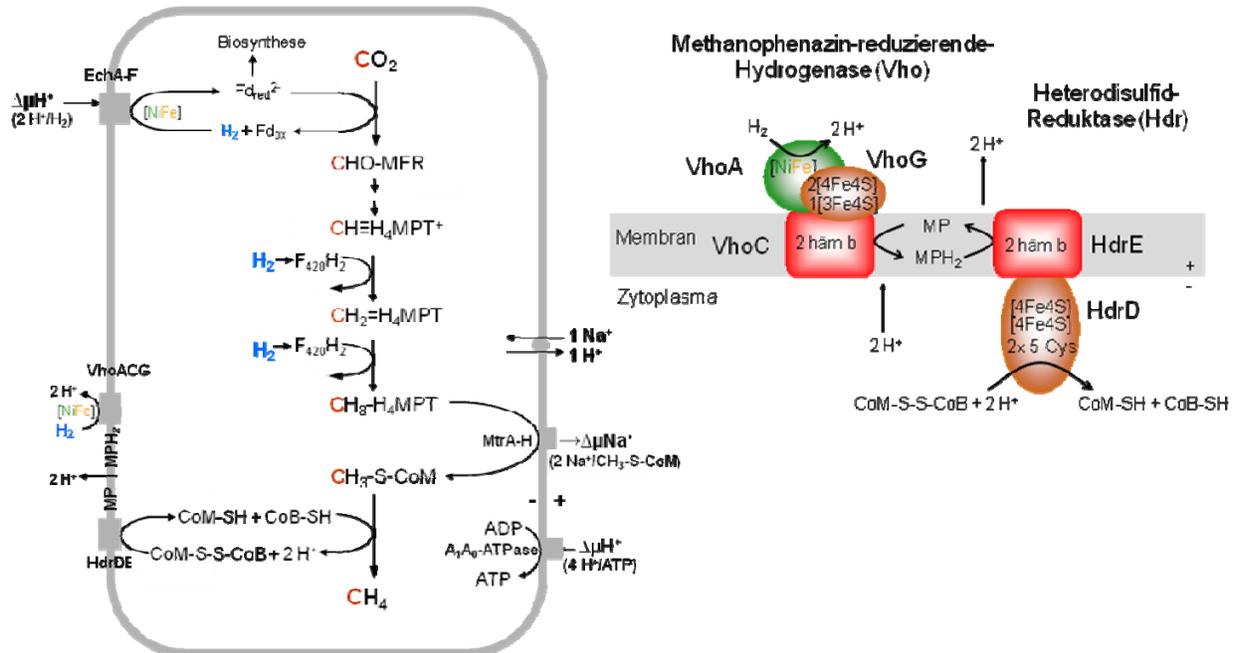
## Energiekonservierung in methanogenen Archaea mit Cytochromen

Der Energiestoffwechsel von Cytochrom-haltigen Methanogenen bei Wachstum auf  $H_2$  und  $CO_2$  ist weitgehend verstanden. Die Energiekonservierung in diesen Organismen, die mit der Reduktion von  $CO_2$  mit  $H_2$  zu Methan verbunden ist, wird über sechs membrangebundene Enzyme gewährleistet (Abbildung 1). Das Schema berücksichtigt bereits, den in der vorliegenden Arbeit gemachten Befund, dass aus thermodynamischen Gründen nur ca. 1 mol ATP pro mol Methan erzeugt werden kann. Dies geht aus einer  $H_2$ -Schwellenkonzentration von 150 Pa hervor. Bei dieser  $H_2$ -Konzentration ist die Änderung der freien Enthalpie der Methanbildung aus 4  $H_2$  und  $CO_2$  lediglich noch ca. -65 kJ/mol und nicht mehr, wie unter Standardbedingungen, -131 kJ/mol.

Der erste Schritt der Methanbildung aus  $H_2$  und  $CO_2$  ist die endergone Reduktion von  $CO_2$  plus Methanofuran (MFR) mit  $H_2$  zu Formylmethanofuran (CHO-MFR) (Reaktion 1), die aus den Teilreaktionen 1a und 1b besteht.



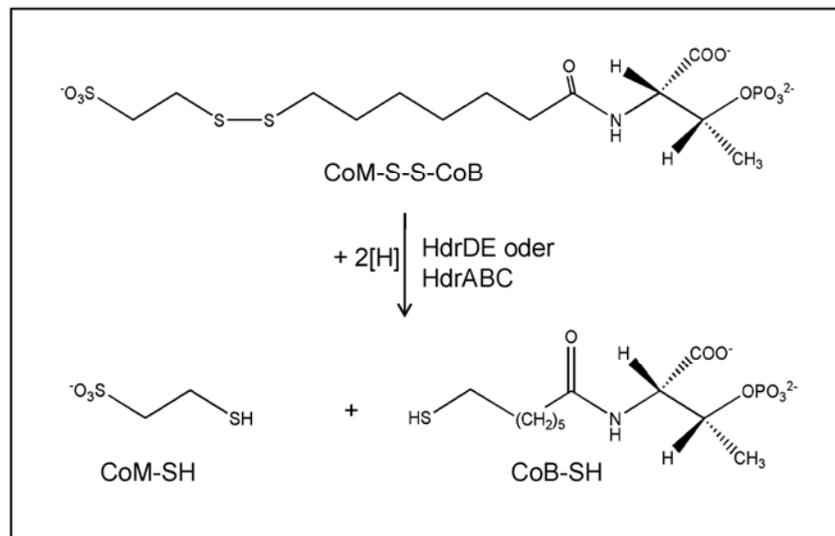
Bei physiologischen Substrat- und Produktkonzentrationen ist die Änderung der freien Enthalpie  $\Delta G$  in Reaktion 1 stärker positiv (de Poorter et al. 2003). So ist der  $H_2$ -Partialdruck in methanogenen Habitaten meist nicht  $10^5$  Pa wie unter Standardbedingungen, sondern liegt weit darunter. Dies hat zur Folge, dass das Redoxpotential des  $2 H^+/H_2$  Paares nicht -414 mV, sondern um etwa 100 mV positiver ist. Dagegen dürfte das Redoxpotential der  $Fd_{ox}/Fd_{red}^{2-}$  Paares in der Zelle eher bei -500 mV als bei -400 mV unter Standardbedingungen liegen (Thauer et al. 2008). Die endergone Reduktion von Ferredoxin mit  $H_2$  (Reaktion 1a) wird in *Methanosarcina* Spezies, die auf  $H_2$  und  $CO_2$  wachsen können, durch den Membran-gebundenen Energie-konvertierenden [NiFe]-Hydrogenase Komplex EchA-F katalysiert. Die Reduktion von  $CO_2$  mit reduziertem Ferredoxin zu CHO-MFR (Reaktion 1b) wird durch eine zytoplasmatische CHO-MFR Dehydrogenase katalysiert und sollte unter physiologischen Bedingungen nahe am Gleichgewicht operieren, da sowohl  $E'$  von Ferredoxin und  $E_o'$  des  $CO_2 + MFR/CHO-MFR$  Paares bei -500 mV liegen (Bertram and Thauer 1994; Bartoschek et al. 2000).



**Abbildung 1: Reaktionen, Enzyme und Coenzyme, die an der Methanbildung aus  $H_2$  und  $CO_2$  in Cytochrom-haltigen *Methanosarcina* Spezies beteiligt sind.** Es sind sechs Membrankomplexe an der Energiekonservierung beteiligt, von denen die zwei Cytochrom-haltigen Komplexe VhoACG (Methanophenazin-reduzierende [NiFe]-Hydrogenase) und HdrDE (Methanophenazin-abhängige Heterodisulfid Reduktase) nochmal im Detail dargestellt sind. Die anderen vier Membran-gebundenen Komplexe sind:  $A_1A_0$ -ATPase; EchA-F, Energie-konvertierende [NiFe]-Hydrogenase; MtrA-H, Methyltransferase und ein  $Na^+/H^+$ -Antiporter. MP, Methanophenazin;  $H_4MPT$ , Tetrahydromethanopterin;  $CH=H_4MPT^+$ , Methenyl- $H_4MPT^+$ ;  $CH_2=H_4MPT$ , Methylen- $H_4MPT$ ;  $CH_3-H_4MPT$  Methyl- $H_4MPT$ ; CHO-MFR, Formylmethanofuran. (Rechte Abbildung aus der Dissertation von N. Hamann (Hamann 2007)).

Der letzte Schritt der Methanogenese, die exergone Reduktion des Heterodisulfids  $CoM-S-S-CoB$  mit  $H_2$  ( $\Delta G^{\circ} = -53 \text{ kJ/mol}$ ), wird von der Membran-assoziierten Heterodisulfid-Reduktase HdrDE katalysiert (Abbildung 1 und 2). HdrDE ist mit der Methanophenazin-reduzierenden [NiFe]-Hydrogenase (VhoACG) über Methanophenazin elektrochemisch verbunden. In der zytoplasmatischen Membran ist der VhoACG Komplex so orientiert, dass seine aktive Seite zum Periplasma zeigt (Deppenmeier et al. 1995). Die Reduktion des  $CoM-S-S-CoB$  mit  $H_2$  in die Thiole  $CoM-SH$  und  $CoB-SH$  ist mit dem Aufbau eines elektrochemischen Protonenpotentials gekoppelt. Es ist gezeigt worden, dass ein Protonen- zu

Elektronen-Verhältnis von 2:1 vorliegt (Ide et al. 1999; Murakami et al. 2001). So wird die bei der Reduktion von CoM-S-S-CoB mit  $H_2$  freiwerdende Energie in einem elektrochemischen Protonenpotential konserviert, das einerseits zur Reduktion von Ferredoxin mit  $H_2$  über den EchA-F Komplex (Welte et al. 2010a; Welte et al. 2010b) und andererseits zur Synthese von ATP über einen  $H^+$ -translozierenden  $A_1A_0$ -ATP Synthase Komplex (Ruppert et al. 1998) genutzt wird (Abbildung 1). Da nachgewiesen worden ist, dass der Methyltransferase-Komplex (MtrA-H) die elektrogene Translokation von  $2 Na^+$  über die Zytoplasmamembran pro transferierter Methylgruppe katalysiert (Gottschalk and Thauer 2001), wird ein  $Na^+/H^+$ -Antiporter benötigt, für den aus energetischen Gründen ein  $Na^+/H^+$  Verhältnis von 1 angenommen wird, was aber noch zu zeigen ist.



**Abbildung 2: Die von der Heterodisulfid-Reduktase (Hdr) katalysierte Reduktion.** HdrDE, Membran-assoziierte Heterodisulfidreduktase in Cytochrom-haltigen Methanogenen; HdrABC, zytoplasmatische Heterodisulfidreduktase in Cytochrom-freien Methanogenen; CoM-S-S-CoB, Heterodisulfid aus Coenzym M (CoM-SH) und Coenzym B (CoB-SH).  $E^{\circ}$  (CoM-S-S-CoB/CoM-SH + CoB-SH) = -140 mV (Tietze et al. 2003).

### **Energiekonservierung in methanogenen Archaea ohne Cytochrome**

Im Gegensatz zu den Cytochrom-haltigen Methanogenen wird der Energiestoffwechsel in Cytochrom-freien Methanogenen weit weniger verstanden. Die Energiekonservierung in diesen Organismen, die mit der Reduktion von CO<sub>2</sub> mit H<sub>2</sub> zu Methan verbunden ist, wird offensichtlich über nur zwei membrangebundene Enzyme gewährleistet, nämlich den MtrA-H Komplex, der die Na<sup>+</sup>-abhängige Bildung von Methyl-Coenzym M und Tetrahydromethanopterin (H<sub>4</sub>MPT) aus Methyl-H<sub>4</sub>MPT und Coenzym M (CoM-SH) ( $\Delta G^{\circ} = -30$  kJ/mol) katalysiert (Lienard et al. 1996; Gottschalk and Thauer 2001) und der Na<sup>+</sup>-abhängigen A<sub>1</sub>A<sub>0</sub>-ATP Synthase. Alle anderen methanogenen Enzyme werden in der zytoplasmatischen Zellfraktion gefunden. Die Reduktion von CO<sub>2</sub> mit reduziertem Ferredoxin zu CHO-MFR (Reaktion 1b) wird wie in Cytochrom-haltigen Methanogenen von einer zytoplasmatischen CHO-MFR Dehydrogenase katalysiert. Das Enzymsystem, das Reaktion 1a katalysiert, konnte bisher allerdings noch nicht identifiziert werden. Cytochrom-freie Methanogene enthalten zwar mindestens eine Membran-gebundene Energie-konvertierende Hydrogenase (EhaA-T/EhbA-Q), welche die von H<sup>+</sup> oder Na<sup>+</sup> angetriebene Reduktion von Ferredoxin mit H<sub>2</sub> katalysiert. Diese Hydrogenasen scheinen aber eine hauptsächlich anabole Funktion zu besitzen (Tersteegen and Hedderich 1999; Hedderich 2004; Porat et al. 2006; Thauer et al. 2010).

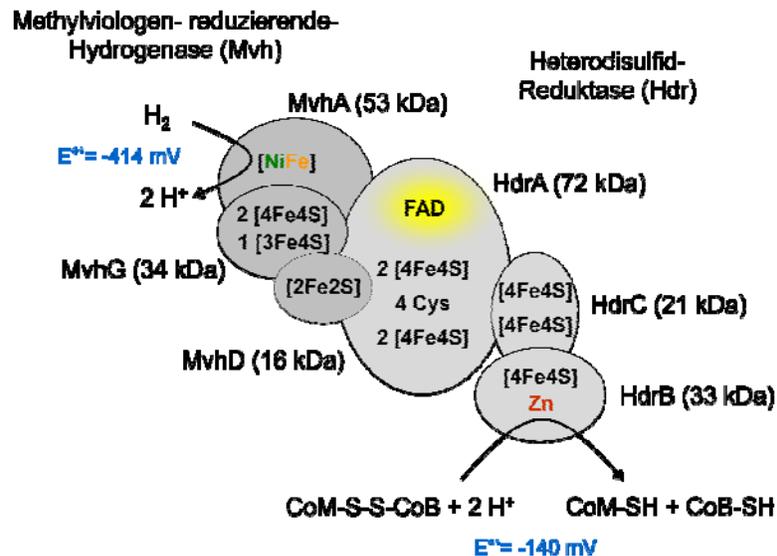
Cytochrom-freie Methanogene enthalten keine Membran-assoziierte Heterodisulfidreduktase und, wie schon angesprochen, kein Methanophenazin. Eine chemiosmotische Kopplung der exergonen Reduktion von CoM-S-S-CoB mit H<sub>2</sub> mit der unter physiologischen Bedingungen endergonen Reduktion von Ferredoxin mit H<sub>2</sub> (Reaktion 1a) ist daher nicht möglich. Wie also kann die endergone Reduktion von Ferredoxin mit H<sub>2</sub> im ersten Schritt der Methanogenese mit der exergonen Reduktion von CoM-S-S-CoB mit H<sub>2</sub> zu CoM-SH und CoB-SH (Abbildung 2) gekoppelt werden, um Energie zu konservieren (Thauer et al. 2008)?

Vor über 20 Jahren stellten Bobik und Wolfe fest, dass Zellextrakte von *Methanothermobacter thermautotrophicus* (ein Cytochrom-freies methanogenes Archaeon) die Reduktion von CO<sub>2</sub> zu CHO-MFR mit H<sub>2</sub> (Bobik and Wolfe 1988) und

die Reduktion von Metronidazol (MTZ) mit  $H_2$  (Bobik and Wolfe 1989) nur in Anwesenheit von CoM-S-S-CoB katalysieren. Es ist inzwischen bekannt, dass beide Reaktionen, die  $CO_2$ -Reduktion zu CHO-MFR (Hochheimer et al. 1996; Stojanowic and Hedderich 2004) und die MTZ-Reduktion (Lockerby et al. 1984; Crossnoe et al. 2002), Ferredoxin-abhängige Reaktionen sind. Könnte es also sein, dass sowohl die Reduktion von Ferredoxin mit  $H_2$  als auch die Reduktion von CoM-S-S-CoB mit  $H_2$  von einem gemeinsamen Enzym katalysiert werden?

### **Der MvhADG/HdrABC Komplex in methanogenen Archaea ohne Cytochrome**

Es war bekannt, dass die die Reduktion von CoM-S-S-CoB mit  $H_2$  durch den zytoplasmatischen MvhADG/HdrABC Komplex (auch  $H_2$ : Heterodisulfid-Oxidoreduktase Komplex genannt) katalysiert wird, der aus der Methylviologen-reduzierenden [NiFe]-Hydrogenase MvhADG (auch  $F_{420}$ -nicht-reduzierende Hydrogenase genannt, um sie von der Frh, der  $F_{420}$ -reduzierenden Hydrogenase zu unterscheiden) und der Heterodisulfid-Reduktase HdrABC besteht. Die beiden Enzyme sind elektrisch über das Protein MvhD verbunden (Stojanowic et al. 2003; Thauer et al. 2010). In Abbildung 3 ist der MvhADG/HdrABC Komplex aus Cytochrom-freien Methanogenen dargestellt. MvhA beherbergt das [NiFe]-Zentrum der großen Hydrogenase-Untereinheit, MvhG ist die kleine Untereinheit der Hydrogenase mit einem [3Fe4S] und zwei [4Fe4S] Clustern und MvhD eine Untereinheit mit einem [2Fe2S]-Cluster. HdrA enthält mindestens ein FAD und vier [4Fe4S]-Cluster, HdrB das aktive Zentrum mit Zink und einen ungewöhnlichen [4Fe4S] Cluster und HdrC ist eine Untereinheit mit wiederum zwei [4Fe4S]-Clustern (Hedderich et al. 1994; Setzke et al. 1994; Madadi-Kahkesh et al. 2001; Duin et al. 2002; Stojanowic et al. 2003; Hamann et al. 2007). Die Gene, die diese Proteine codieren, sind in drei Transkriptionseinheiten *mvhDGAB*, *hdrA* und *hdrBC* (Reeve et al. 1989; Hedderich et al. 1994; Liesegang et al. 2010) organisiert. *mvhB* kodiert für ein Polyferredoxin mit zwölf [4Fe4S]-Clustern, das teilweise zusammen mit dem MvhADG/HdrABC aufgereinigt wird und auch schon charakterisiert wurde (Smith et al. 1991; Hedderich et al. 1992). Die sechs Untereinheiten besitzen eine 1:1:1:1:1:1 Stöchiometrie (Setzke et al. 1994) mit molekularen Massen von 72 kDa (HdrA), 53 kDa (MvhA), 34 kDa (MvhG), 33 kDa (HdrB), 21 kDa (HdrC) und 16 kDa (MvhD) (Abbildung 3).



**Abbildung 3: Schema des MvhADG/HdrABC Komplexes aus methanogenen Archaea.** Der Komplex aus Methylviologen-reduzierender [NiFe]-Hydrogenase MvhADG und Heterodisulfid-Reduktase HdrABC katalysiert die Reduktion des Heterodisulfides CoM-S-S-CoB mit H<sub>2</sub>, allerdings nur mit sehr niedrigen spezifischen Aktivitäten. Der MvhADG/HdrABC Komplex wird in den meisten methanogenen Archaea gefunden. Einige Ausnahmen bilden Organismen der *Methanomicrobiales* (Anderson et al. 2009) (siehe Diskussion). Die Massen der Untereinheiten wurden aus der Primärstruktur der Enzymuntereinheiten aus *M. marburgensis* berechnet.

Das Problem war immer, dass der gereinigte Komplex aus *Methanothermobacter marburgensis* - einem Cytochrom-freien Methanogenen, der mit *M. thermotrophicus* nah verwandt ist – die CoM-S-S-CoB-Reduktion mit H<sub>2</sub> nur in Gegenwart von Viologen-Farbstoffen, wie z. B. Methylviologen (MV) (-420 mV), mit physiologisch relevanten Raten katalysierte. Die halbmaximale Stimulation wurde bei einer MV-Konzentration von 7 µM beobachtet. Bei diesen niedrigen Konzentrationen sind die Raten der Reduktion von MV mit H<sub>2</sub> (katalysiert durch den MvhADG/HdrABC Komplex) und der Oxidation von reduziertem MV mit CoM-S-S-CoB (katalysiert durch die MvhADG/HdrABC sub-Komplexe) niedriger als 1% der Rate der CoM-S-S-CoB-Reduktion mit H<sub>2</sub>. Dies zeigt, dass eine Elektronenübertragung von H<sub>2</sub> zu CoM-S-S-CoB in Gegenwart niedriger MV-Konzentrationen eher über Komplex-gebundenes als über freies MV abläuft (Setzke et al. 1994).

### Der Elektronenbifurkations-Mechanismus

Vergleichbare Eigenschaften wurden bei dem zytoplasmatischen Bcd/EtfAB Komplex von Clostridien gefunden. Clostridien sind Gram-positive, obligat anaerobe, Sporen bildende Bakterien. Hauptgärungsprodukte von saccharolytischen Clostridien sind Buttersäure, Essigsäure,  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2$ . Es wurde lange angenommen, dass der Bcd/EtfAB Komplex die Reduktion von Crotonyl-CoA mit NADH zu Butyryl-CoA und NAD katalysiert. Jedoch wurde diese Reaktion ebenfalls nur in signifikanten Raten katalysiert, wenn Viologen-Farbstoffe zugegen waren. Es wurde nun kürzlich festgestellt, dass der Bcd/EtfAB Komplex die simultane Reduktion von Crotonyl-CoA und Ferredoxin mit zwei NADH katalysiert. Offenbar koppelt der Komplex die endergone Reduktion von Ferredoxin ( $E_o' = -400 \text{ mV}$ ) mit NADH ( $E_o' = -320 \text{ mV}$ ) mit der exergonen Crotonyl-CoA-Reduktion ( $E_o' = -10 \text{ mV}$ ) mit NADH ( $E_o' = -320 \text{ mV}$ ) (Li et al. 2008). Da FAD die einzige prosthetische Gruppe ist, die im Bcd/EtfAB Komplex gefunden wird, wurde ein Flavin-basierter Elektronenbifurkations-Mechanismus der Kopplung für diese Reaktionen vorgeschlagen (Herrmann et al. 2008). Flavoproteine (FP) können drei unterschiedliche Redoxpotentiale besitzen, nämlich ein  $E_o'$  für das FP/ $\text{FPH}_2$  Paar ( $n = 2$ ), ein  $E_o'$  für das FP/ $\text{FPH}$  Paar ( $n = 1$ ) und ein  $E_o'$  für das  $\text{FPH}/\text{FPH}_2$  Paar ( $n = 1$ ).  $E_o'$  (FP/ $\text{FPH}$ ) ist in der Regel positiver und  $E_o'$  ( $\text{FPH}/\text{FPH}_2$ ) negativer als  $E_o'$  (FP/ $\text{FPH}_2$ ). Die Oxidation von  $\text{FPH}_2$  durch zwei Ein-Elektronen-Akzeptoren mit unterschiedlichen Redoxpotentialen führt somit zu einer Bifurkation der beiden Elektronen in  $\text{FPH}_2$  (Wang et al. 2010).

Mit diesem Wissen und den Feststellungen von Bobik und Wolfe (Bobik and Wolfe 1988; Bobik and Wolfe 1989) könnten die bisherigen Resultate nun so interpretiert werden, dass in Zellextrakten von *M. thermotrophicus* die Reduktion von Fd mit  $\text{H}_2$  mit der Reduktion von CoM-S-S-CoB mit  $\text{H}_2$  ebenfalls über Elektronenbifurkation gekoppelt ist (Idee von Professor Wolfgang Buckel). Es wurde daher die Hypothese aufgestellt, dass der MvhADG/HdrABC Komplex aus Cytochrom-freien Methanogenen die endergone Reduktion von Ferredoxin mit  $\text{H}_2$  an die exergonen Reduktion von CoM-S-S-CoB mit  $\text{H}_2$  koppelt, ohne dabei eine chemiosmotische Kopplung zu involvieren (Thauer et al. 2008).

## Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Energiestoffwechsel von Cytochrom-freien Methanogenen aufzuklären und die Hypothese des Elektronenbifurkations-Mechanismus zu überprüfen, um die unterschiedliche Art der Kopplung von Methanbildung und ATP-Synthese zu Cytochrom-haltigen Methanogenen erklären zu können. Dazu wurden zunächst die Wachstumserträge und die H<sub>2</sub>-Schwellenkonzentrationen von zwei Cytochrom-freien Methanogenen (*Methanothermobacter marburgensis* und *Methanobrevibacter arboriphilus*) bestimmt und mit denen eines Cytochrom-haltigen (*Methanosarcina barkeri*) verglichen, um die angesprochenen phänotypischen Unterschiede mit bedingungsgleichen Experimenten abzusichern. Anschließend wurden sowohl die Stöchiometrie der Kopplung der CoM-S-S-CoB-Reduktion mit H<sub>2</sub> und der Ferredoxin-Reduktion mit H<sub>2</sub> sowie die energetische Kopplung mit dem MvhADG/HdrABC Komplex aus *M. marburgensis* auf Enzymebene untersucht.

Während der Doktorarbeit wurde einer ganzen Reihe von Fragen nachgegangen und es wurden Methoden ausprobiert, die zu keinen verwertbaren Ergebnissen führten. Diese sind im Ergebnisteil in einem getrennten Kapitel zusammengefasst.

## Material & Methoden

Metronidazol (MTZ), Benzylviologen (BV), Methylviologen (MV), Rinderserumalbumin (BSA), Dithiotreithiol (DTT) und FAD wurden von Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Alle anderen verwendeten Chemikalien stammten von Carl Roth (Karlsruhe) oder Merck (Darmstadt). Alle Chemikalien besaßen den Reinheitsgrad „zur Analyse“ oder „für biochemische Zwecke“. Lösungsmittel hatten den HPLC-Reinheitsgrad.

Die Gase  $N_2$  (99,996%),  $H_2$  (99,995%),  $H_2/N_2$  (10%/90%),  $H_2S$  (>99%),  $H_2/CO_2$  (80%/20%),  $N_2/CO_2$  (80%/20%), Formiergas (5%  $H_2$ /95%  $N_2$ ) (Reinheit  $N_2$  und  $H_2$ : 99,996%, Reinheit  $CO_2$  99,995%), sowie  $H_2$ -freie synthetische Luft, Methan und  $H_2$ -Mischungen mit jeweils 50 ppmv oder 1000 ppmv  $H_2$  (letztere als zertifizierte Kalibrierungsgase), wurden von Messer Industriegase (Düsseldorf) bezogen.

Arbeiten unter Sauerstoffausschluss wurden in Anaerobenzelten (Coy, Ann Arbor, Michigan, USA, Toepffer Lab Systems, Göppingen) durchgeführt. Diese enthielten eine Atmosphäre aus Formiergas. Sauerstoff wurde aus der Zeltatmosphäre kontinuierlich durch Reduktion mit  $H_2$  an einem Palladium-Katalysator (R-020/13, BASF, Ludwigshafen) entfernt. Dadurch entstehendes Wasser wurde mittels Silica Gel Orange (Roth, Karlsruhe) entzogen.

Für Puffer und Lösungen wurde immer vollentsalztes Wasser verwendet, das mittels einer Entsalzungsanlage (Elgastat Maxima UF, Elga, Ransbach-Baumbach) hergestellt wurde. Die Leitfähigkeit betrug 18 m $\Omega$ . Zur Anaerobisierung wurden die Lösungen und Puffer aufgekocht, unter  $N_2$ -Begasung in Glasflaschen (Schott, Mainz) abgefüllt und an einer Vakuumpumpe anaerobisiert. Zur vollständigen Anaerobisierung wurden die abgefüllten Flüssigkeiten im Anaerobenzelt gerührt. Die Aufbewahrung erfolgte unter 0,2 bar Überdruck mit 100%  $N_2$ . Puffer, die für die Reinigung verwendet wurden, wurden vor dem Aufkochen zusätzlich per Unterdruck durch einen Membranfilter (0,45  $\mu$ m; Millipore, Eschborn) gezogen.

## 1. Kultivierung von methanogenen Archaea

*Methanothermobacter marburgensis* (DSM 2133), *Methanobrevibacter arboriphilus* (DSM 744) und *Methanosarcina barkeri* (DSM 804) wurden von der *Deutschen Sammlung von Mikroorganismen DSMZ* (Braunschweig) bezogen. Die Archaea wurden anaerob auf 80% H<sub>2</sub>/20% CO<sub>2</sub>/0,1% H<sub>2</sub>S (Gasfluss: ca. 500 mL/min) in einem 2 L Fermenter gezogen, der 1,5 L Medium enthielt und mit 10% Vorkultur angeimpft wurde. Die optische Dichte ( $\Delta$ OD) der verschiedenen Zellkulturen wurde bei 578 nm an einem Ultrospec<sup>®</sup> 3100 *pro* Photometer der Firma Amersham Biosciences (Piscataway, New Jersey, USA) gemessen. Die Zellen wurden mit Hilfe einer Zentrifuge (Sorvall RC 5B Plus, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold) bei 11000 x g abgeerntet. Für die Kultivierung und Ernte von *M. arboriphilus* und *M. barkeri* war steriles Arbeiten nötig, da die Kulturen sonst kontaminieren.

### 1.1 *Methanothermobacter marburgensis*

*M. marburgensis* ist ein strikt anaerober, autotropher Organismus, der bei einem Temperaturoptimum von 65°C auf H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> wächst. *M. marburgensis* Medium wurde nach Schönheit et al. 1980. hergestellt und kann zahlreichen Arbeiten der AG Thauer entnommen werden (z. B. aus der Dissertation von N. Haman, 2007). Eine Stammhaltung des Organismus ist nicht nötig, da auch Vorkulturen nach 2 Monaten Lagerung (bei 4°C) problemlos anwachsen. Unter den angegebenen Bedingungen wuchs *M. marburgensis* mit einer Verdopplungszeit von ca. 2 Stunden bis zu einer  $\Delta$ OD von ca. 8.

### 1.2 *Methanobrevibacter arboriphilus*

*M. arboriphilus* wurde zur Stammhaltung in 500 mL Schraubflaschen mit 250 mL Medium (Tabelle 1) und einer Gasphase von 80% H<sub>2</sub>/20% CO<sub>2</sub> bei 1,5 bar Überdruck gezogen. Nach Überimpfen mit 100 mL einer angewachsenen Vorkultur wurden die Flaschen bei 37°C und 150 Upm auf einem Schüttler inkubiert. Die Gasphase wurde täglich bis zu 6 Mal ausgetauscht, um eine H<sub>2</sub>-Limitierung zu vermeiden. Die Großzucht erfolgte in einem 2 L Fermenter unter ständigem Rühren (500 Upm) und Begasung (s. o.). Unter den angegebenen Bedingungen wuchs *M. arboriphilus* mit einer Verdopplungszeit von ca. 5 Stunden bis zu einer  $\Delta$ OD von ca. 4.

**Tabelle 1:** Zusammensetzung des Mediums für die Kultivierung von *M. arboriphilus*.

Komponente	Menge
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,75 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,75 g
NH <sub>4</sub> Cl	1 g
NaHCO <sub>3</sub>	4,8 g
Hefeextrakt	1g
Cystein-HCl	0,5 g
Resazurin (0,2%)	500 µL
Vitaminlösung <sup>a)</sup>	10 mL
Spurenelementlösung <sup>b)</sup>	10 mL
Auf 985 mL deionisiertes H <sub>2</sub> O auffüllen	
Zugabe nach dem Autoklavieren:	
MgCl <sub>2</sub> -Lösung (636 g MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O/L)	5 mL
Na <sub>2</sub> S-Lösung (28 g Na <sub>2</sub> S x 9 H <sub>2</sub> O/L)	10 mL
Penicillin-Lösung (1 mg/10 mL)	1 mL

<sup>a)</sup> Vitaminlösung: 2 mg Biotin, 2 mg Folsäure, 10 mg Pyridoxin-HCl, 5 mg Thiamin-HCl, 5 mg Riboflavin, 5 mg Nicotinsäure, 0,1 mg Vitamin B<sub>12</sub>, 5 mg *p*-Aminobenzoesäure und 5 mg DL- $\alpha$ -Liponsäure, mit H<sub>2</sub>O auf 1 L auffüllen.

<sup>b)</sup> Spurenelementlösung: 9 g Titriplex I (auf pH 6.7 mit NaOH einstellen), 8 g MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O, 1 g FeCl<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O, 20 mg CoCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O, 20 mg Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, 0,12 g NiCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O und 0,11 g CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, mit H<sub>2</sub>O auf 1 L auffüllen.

### 1.3 *Methanosarcina barkeri*

*M. barkeri* musste zuerst von einem Methanol-haltigen Medium auf H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> adaptiert werden. Der Organismus wurde daher zur Stammhaltung in 100 mL Schraubflaschen mit 50 mL Medium (Tabelle 2) gezogen. Nach Überimpfen mit 10 mL einer angewachsenen Vorkultur wurden die Flaschen bei 37°C ohne Schütteln inkubiert. Das entstandene Methan wurde regelmäßig mit Hilfe einer Kanüle aus der Flasche abgelassen. Danach wurden die auf Methanol gewachsenen Zellen in 500 mL Schraubflaschen mit 250 mL Medium ohne Methanol, dafür aber mit Hefeextrakt sowie Trypton/Pepton und einer Gasphase von 80% H<sub>2</sub>/20% CO<sub>2</sub> bei 1,5 bar Überdruck überimpft. Dann wurden die Flaschen bei 37°C und 150 Upm auf einem

Schüttler inkubiert. Die Gasphase wurde täglich bis zu 6 Mal ausgetauscht, um eine H<sub>2</sub>-Limitierung zu vermeiden. Die Großzucht erfolgte in einem 2 L Fermenter unter ständigem Rühren (50 Upm) und Begasung (s. o.). Unter den angegebenen Bedingungen wuchs *M. barkeri* mit einer Verdopplungszeit von ca. 18 Stunden bis zu einer  $\Delta OD$  von ca. 1.

**Tabelle 2:** Zusammensetzung des Mediums für die Kultivierung von *M. barkeri* für Wachstum auf Methanol. Für das Wachstum auf H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> wurde der pH Wert der Salzlösung B auf 7,5 eingestellt und anstelle von Methanol wurde dem Medium 2 g/L Hefeextrakt sowie 1 g/L Trypton/Pepton zugesetzt.

Komponente	Menge
Methanol	10 mL
Salzlösung A <sup>a)</sup>	500 mL
Wird langsam zugegeben zu	
Salzlösung B <sup>b)</sup>	450 mL
Resazurin (0,2%)	500 $\mu$ L
Vitaminlösung <sup>c)</sup>	10 mL
Spurenelementlösung <sup>d)</sup>	10 mL
Auf 990 mL deionisiertes H <sub>2</sub> O auffüllen	
Zugabe nach dem Autoklavieren:	
Na <sub>2</sub> S-Lösung (28 g Na <sub>2</sub> S x 9 H <sub>2</sub> O/L)	10 mL
Penicillin-Lösung (1 mg/10 mL)	1 mL

<sup>a)</sup> Salzlösung A: 1,24 g CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, 2 g MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O, 2 g KCl, 10 g NaCl, 2,5 g NH<sub>4</sub>Cl, 25 mg FeCl<sub>3</sub> x 6 H<sub>2</sub>O, mit H<sub>2</sub>O auf 500 mL auffüllen.

<sup>b)</sup> Salzlösung B: 0,39 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, 0,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, 0,14 g Cysteine-HCl und 13,6 g Imidazol (auf pH 6.4 mit HCl eingestellt), mit H<sub>2</sub>O auf 450 mL auffüllen.

<sup>c)</sup> Vitaminlösung: 2 mg Biotin, 2 mg Folsäure, 10 mg Pyridoxin-HCl, 5 mg Thiamin-HCl, 5 mg Riboflavin, 5 mg Nicotinsäure, 0,1 mg Vitamin B<sub>12</sub>, 5 mg *p*-Aminobenzoesäure und 5 mg DL- $\alpha$ -Liponsäure, mit H<sub>2</sub>O auf 1 L auffüllen.

<sup>d)</sup> Spurenelementlösung: 1,5 g Titriplex I (pH 6,5 mit KOH einstellen), 0,1 g FeSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 0,1 g ZnSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 0,1 g CoCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O; 10 mg Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, 30 mg NiCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O, 10 mg CuSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O, 10 mg AlCl<sub>3</sub> x 6 H<sub>2</sub>O und 15 mg NaHSeO<sub>3</sub>, mit H<sub>2</sub>O auf 1 L auffüllen.

## 2. Bestimmung der Methanbildungsraten und H<sub>2</sub>-Schwellenkonzentrationen

Die Zellen wurden in ihrer logarithmischen Wachstumsphase abgeerntet.  $\Delta OD$  wurde bei 578 nm gemessen, die zwischen 0 und 0,3 proportional zur Zellkonzentration war. Wenn nötig wurden die Proben entsprechend verdünnt. Eine  $\Delta OD_{587}$  von 1 entspricht 0,4 mg Trockenzellmasse pro mL Kultur in *M. marburgensis* (Schönheit et al. 1980). Der gleiche Wert wurde für *M. arboriphilus* bestimmt (Wennerhold 2004). Die Bestimmung der Trockenzellmasse für *M. barkeri* ist auf Grund der Präzipitation von Komponenten des Mediums schwieriger. Hier wurde ein Wert von 0,32 mg Trockenzellmasse pro mL Kultur zu Grunde gelegt. Wichtig für die Bestimmung der Raten und der H<sub>2</sub>-Schwellenkonzentrationen war, die Zellen beim Abernten nicht auf 4°C zu kühlen, sondern bei Raumtemperatur zu zentrifugieren.

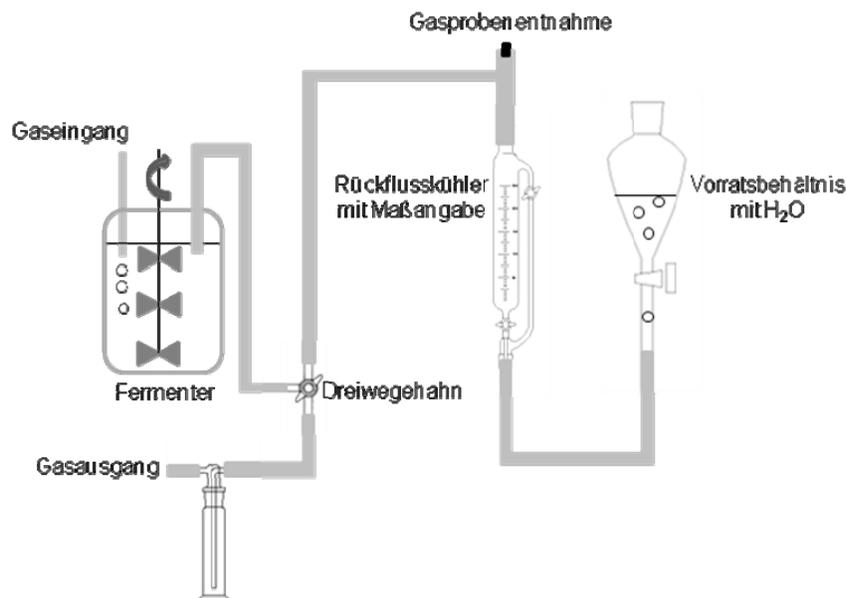
**Methanbildungsraten.** Für die Bestimmung der Methanbildungsraten wurden Zellen von *M. marburgensis*, *M. arboriphilus* und *M. barkeri* mit 50 mM Kaliumphosphat pH 7 mit 25 mM NaCl, 2 mM DTT und 2 mM MgCl<sub>2</sub> resuspendiert oder im Medium des jeweiligen Organismus resuspendiert und in verschiedenen Verdünnungen in 150 mL Müller-Krempel Flaschen gefüllt, die mit Butylgummi-Stopfen verschlossen und mit 80% H<sub>2</sub>/20% CO<sub>2</sub> gefüllt waren. Die Flaschen wurden dann bei 60°C (*M. marburgensis*) oder 37°C (*M. arboriphilus* und *M. barkeri*) mit 200 Upm geschüttelt. Die Gasproben wurden mit einer gasdichten Spritze von Hamilton (Bonaduz, Schweiz) entnommen und für die Methananalyse in einen SRI 8610C Gas Chromatograph von SRI Instruments, Inc. (Las Vegas, USA) eingespritzt, der mit einem Flammenionisation Detektor (CE Instruments, GC 8000, Mailand, Italien) und einer Edelstahlsäule (0,5 nm Molsieb; Gitter 80/100; Größe: 130 cm x 2 cm) ausgestattet war. Die Messungen wurden bei 120°C mit N<sub>2</sub> als Trägergas (Flussrate = 30 mL/min) durchgeführt. Die Peakhöhen bzw. der integrierte Bereich unter den Peaks waren jeweils proportional zu der Methan-Konzentration. Kalibriert wurde mit verschiedenen Mengen 100%igem Methan.

Um den Einfluss von Viologen-Farbstoffen zu messen, wurden außerdem verschiedenen Konzentrationen BV (0,5-50 µM) und MV (0,5 µM-5 mM) zu den Zellsuspensionen gegeben.

**H<sub>2</sub>-Schwellenkonzentrationen.** Die H<sub>2</sub>-Schwellenkonzentrationen von *M. marburgensis*, *M. arboriphilus* und *M. barkeri* wurden wie folgt bestimmt: Ca. 1 g Feuchtzellen (siehe Methanbildungsraten) wurde in 50 mM Kaliumphosphat pH 7 mit 25 mM NaCl, 2 mM DTT und 2 mM MgCl<sub>2</sub> oder im Medium des jeweiligen Organismus resuspendiert. 2 mL H<sub>2</sub>-freie Zellsuspensionen wurden dann in 150 mL H<sub>2</sub>-freie Müller-Krempel Flaschen (Bülach, Schweiz) gefüllt, die mit Perbunan Stopfen der Firma Deutsch & Naumann (Berlin) verschlossen waren (Perbunan ist weniger H<sub>2</sub> durchlässig als Butylgummi). Als Gasphase diente 80% N<sub>2</sub>/20% CO<sub>2</sub>. Verschiedene Mengen H<sub>2</sub> (bei *M. marburgensis* und *M. arboriphilus* bis zu 50 Pa; bei *M. barkeri* bis zu 600 Pa) wurden zu den Zellsuspensionen gegeben. Die Flaschen wurden dann bei 60°C (*M. marburgensis*) oder 37°C (*M. arboriphilus* und *M. barkeri*) mit 200 Upm geschüttelt. Gasproben wurden mit einer gasdichten Spritze von Hamilton (Bonaduz, Schweiz) zunächst alle 30 Minuten und später alle 1-3 Stunden entnommen. Nachdem die H<sub>2</sub>-Schwellenkonzentration des jeweiligen Organismus erreicht war, wurde wieder H<sub>2</sub> zu den Flaschen gegeben, um zu überprüfen, ob die gleiche H<sub>2</sub>-Schwellenkonzentration ein zweites Mal erreicht wurde. Die Gasproben wurden in einem Gaschromatographen mit einer Edelstahlsäule (0,5 nm Molsieb; Gewebe: 80/100; Größe 2 m x 4 mm) analysiert (Säule: 65°C; Detektor: 280°C). Proben, die H<sub>2</sub> von 200 bis 5000 ppmv enthielten, wurden mit einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor (GC-8A, Shimadzu, Kyoto) analysiert. Als Trägergas diente N<sub>2</sub> mit einem Gasfluss von 40 mL/min. Proben mit geringerem H<sub>2</sub> Gehalt (0,01 bis 200 ppmv) wurden mit einem HgO Konversionsdetektor (Trace Analytical Techmation, Düsseldorf) analysiert. Als Trägergas diente hier H<sub>2</sub>-freie synthetische Luft mit einem Gasfluss von 40 mL/min (Schuler and Conrad 1990). Die Höhe bzw. der integrierte Bereich unter den Peaks waren jeweils proportional zu der H<sub>2</sub>-Konzentration. Kalibriert wurde mit 1000 ppmv oder 50 ppmv H<sub>2</sub>-haltigen Gasgemischen (zertifiziert).

### 3. Bestimmung von Wachstumserträgen

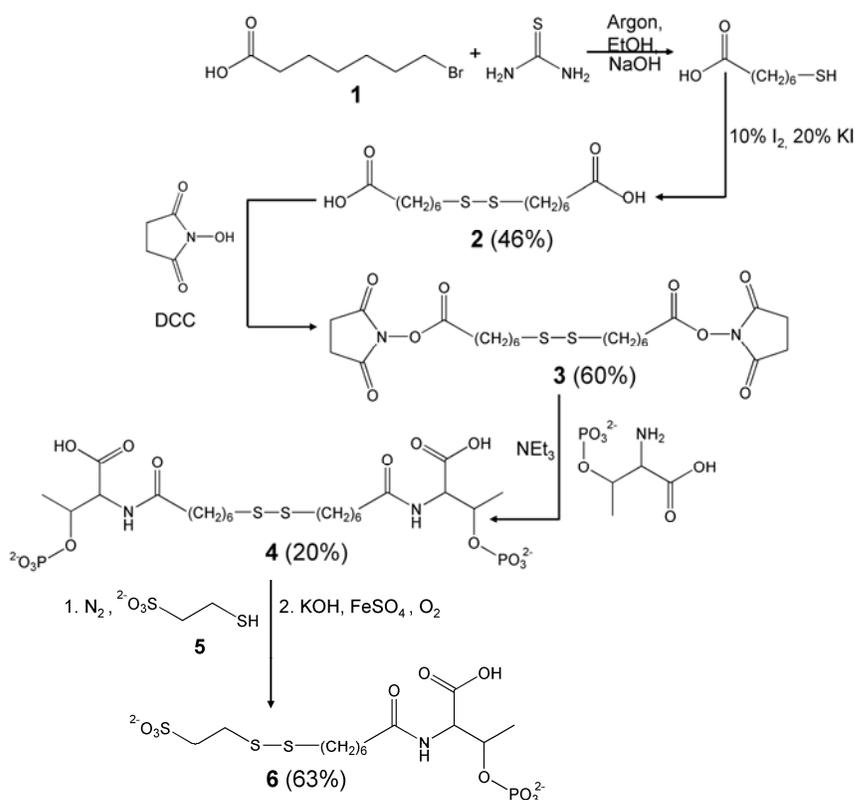
Wachsenden Kulturen von *M. marburgensis*, *M. arboriphilus* und *M. barkeri* wurden Gasproben für die Methanbestimmung und Zellproben für die Zellmassen-Bestimmung über die  $\Delta OD$  entnommen. Die Gasprobenentnahme erfolgte mit einer gasdichten Spritze von Hamilton (Bonaduz, Schweiz). Zur Ermittlung der gebildeten Methanmenge musste noch die Gasflussrate bekannt sein, die über die in Abbildung 4 gezeigte, selbst gebaute Apparatur bestimmt wurde. Die Proben wurden alle paar Stunden, abhängig von der jeweiligen Verdopplungszeit des Organismus, entnommen. Die Methananalyse wurde wie unter „2. Methanbildungsraten“ beschrieben durchgeführt.



**Abbildung 4: Apparatur zur Bestimmung der Wachstumserträge in exponentiell wachsenden Kulturen von methanogenen Archaea.** Der Fermenter war über einen Dreivegehahn sowohl mit der Waschflasche des Gasausgangs als auch mit einem Rückflusskühler mit Maßangabe verbunden, der wiederum mit einem mit Wasser gefüllten Vorratsbehälter (in diesem Fall ein Scheidetrichter) verbunden war. Sollte die Menge der Methanbildung bestimmt werden, konnte das Gas aus dem Fermenter über den Dreivegehahn in den Rückflusskühler geleitet werden. Am oberen Ende befand sich dann ein mit einem Butylgummistopfen verschlossener Gasausgang, aus dem mit einer gasdichten Spritze Gasproben entnommen werden konnten. Das ausströmende Gas verdrängt das im Rückflusskühler befindliche Wasser in das Vorratsbehälter. So konnte der Gasfluss (mL/Minute) mit Hilfe einer Stoppuhr ermittelt werden.

#### 4. Synthese, Charakterisierung und Nachweis von Coenzymen

CoB-S-S-CoB, CoB-SH, CoM-S-S-CoM und CoM-S-S-CoB wurden mit einer modifizierten Synthese nach (Noll et al. 1987; Ellermann et al. 1988) und (Hedderich 1990) hergestellt. Die Synthese von CoB-S-S-CoB und von CoM-S-S-CoB ist schematisch in Abbildung 5 dargestellt. CoM-SH, Phospho-L-Threonin, N-Hydroxysuccinimid, Dicyclohexylcarbodiimid und 7-Bromheptansäure wurden von Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Letztere ist mittlerweile nicht mehr käuflich erhältlich, was auch für das zur Reinigung der Disulfide benötigte Säulenmaterial XAD-2-Polystyren Adsorbent (0,1-0,2 mm) der Firma Serva (Heidelberg) gilt. Von der 7-Bromheptansäure gab es in der AG Thauer noch genügend Vorrat, sodass die Verbindung nicht synthetisiert werden musste. Anstelle von XAD-2-Polystyren Adsorbent wurde SERDOLIT® PAD II Säulenmaterial (0,1-0,2 mm) von Serva verwendet.



**Abbildung 5: Synthese des Heterodisulfids CoM-S-S-CoB.** In einer 3-stufigen Synthese wurde ausgehend von 7-Bromheptansäure (**1**) über 7,7'-Dithiodiheptansäure (**2**) und 7,7'-Dithio-Bis(Succinimidooxyheptanoat) (**3**) zunächst das Homodisulfid CoB-S-S-CoB (**4**) hergestellt, welches dann in einem letzten Schritt mit einem Überschuss CoM-SH (**5**) versetzt und zum CoM-S-S-CoB (**6**) umgesetzt wurde. Für Details siehe Text.

In einer 3-stufigen Synthese wurde ausgehend von 7-Bromheptansäure (**1**) zunächst das Homodisulfid CoB-S-S-CoB (**4**) hergestellt. Dieses wurde zum einen durch Reduktion mit NaBH<sub>4</sub> zu CoB-SH umgesetzt, zum anderen für die Synthese des CoM-S-S-CoB verwendet, indem es anaerob mit einem Überschuss CoM-SH (**5**) versetzt und dann zum Heterodisulfid (**6**) aufoxidiert wurde. Dabei fiel CoM-S-S-CoM als Nebenprodukt an. Um größere Mengen CoM-S-S-CoM herzustellen, wurde CoM-SH mit Sauerstoff aufoxidiert. Die Synthesen sind auf den folgenden Seiten nochmals im Detail beschrieben.

Die synthetisierten Verbindungen wurden auf Reinheit mittels High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Säulen (Luna 5u C8, 100A; 4,6 mm x 250 mm) der Firma Phenomenex (Torrance, California, USA) untersucht. Das HPLC System war von der Firma Sykam (Eresing) (Gasdruckregulierung: S7121; Pumpe: S1122; Mixer für die Lösungen: S8111; UV/VIS Detektor: S3240, Vakuumentgaser: S7505). Die Retentionszeiten der Substanzen auf der analytischen HPLC wurden bei 211 nm detektiert. Die HPLC Läufe dauerten jeweils 60 Minuten mit einer Flussrate von 1 mL/min. Dabei wurde folgender Gradient verwendet:

0-5 Minuten 100% H<sub>2</sub>O/TFA (0,05%) pH 2/0% Acetonitril

5-45 Minuten 0% H<sub>2</sub>O/TFA (0,05%) pH 2/90% Acetonitril

45-50 Minuten 0% H<sub>2</sub>O/TFA (0,05%) pH 2/90% Acetonitril

50-60 Minuten 100% H<sub>2</sub>O/TFA (0,05%) pH 2/0% Acetonitril

Die Reinheit der Substanzen wurde außerdem mit <sup>1</sup>H Nuclear Magnetic Resonance Spektrometrie (NMR) überprüft, des Weiteren wurde für CoB-S-S-CoB und CoM-S-S-CoB eine Elektrospray-Ionisation Massen-Spektrometrie (ESI-MS) Analyse durchgeführt. <sup>1</sup>H NMR Spektren wurden routinemäßig mit einem 200 MHz NMR-Gerät der Fa. Bruker (Rheinstetten) aufgenommen. Um das Verhältnis von CoB-S-S-CoM, CoM-S-S-CoM sowie CoB-S-S-CoB in den CoM-S-S-CoB-Stammlösungen zu ermitteln (siehe Ergebnisteil), wurden <sup>1</sup>H NMR Spektren mit 600 MHz aufgenommen. Letztere Messungen wurden von Herrn Silvan Scheller aus der Arbeitsgruppe von Professor Jaun an der ETH Zürich durchgeführt.

#### 4.1 Darstellung CoB-S-S-CoB und CoB-SH

**7,7'-Dithiodiheptansäure (2).** Für die Herstellung von 7,7'-Dithioheptansäure wurden 9,6 g (46,6 mmol) 7-Bromheptansäure (**1**) in 110 mL Ethanol gelöst und mit 17,4 g (228 mmol) Thioharnstoff versetzt. Die Lösung wurde 17 Stunden unter Argonatmosphäre bei 90°C im Rückfluss gekocht, auf Raumtemperatur abgekühlt, mit 25 mL 60%iger wässriger Natriumhydroxid-Lösung versetzt und weitere 2 Stunden unter Argonatmosphäre im Rückfluss gekocht. Die gelblich-weiße Suspension wurde eingeengt, der Rückstand mit 100 mL wässriger 1 M Salzsäure und dann mit 20 mL konzentrierter Salzsäure versetzt. Es wurde dreimal mit je 100 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden dann dreimal mit je 150 mL 1 M Natriumbicarbonat-Lösung extrahiert. Die vereinigten wässrigen Extrakte wurden mit konzentrierter Salzsäure auf pH 1-2 angesäuert und wieder dreimal mit je 200 mL Dichlormethan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden durch Watte filtriert und dann auf ca. 70 mL eingeengt. Zur Oxidation des Thiols zum Homodisulfid wurde die organische Phase solange mit 10%iger Jod- (m/v)/20%iger (m/v) Kaliumjodidlösung 1:1 versetzt, bis die braune Farbe erhalten blieb. Die wässrige Phase wurde abgetrennt. Zur Entfernung von überschüssigem Jod wurde die organische Phase dreimal mit wässriger 1 M Natriumthiosulfatlösung und dann zweimal mit je 40 mL Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde durch Watte filtriert und am Rotationsverdampfer bei Raumtemperatur eingeengt. Der weiße Rückstand wurde aus Benzol umkristallisiert und 2 Tage am Hochvakuum getrocknet. Man erhielt 3,3 g (46%) weiße 7,7'-Dithiodiheptansäure (**2**). Die Vorstufe 7,7'-Dithioheptansäure wurde freundlicherweise von Herrn Jürgen Koch, der früher Technischer Assistent in der Arbeitsgruppe von Professor Thauer war, zur Verfügung gestellt.

**7,7'-Dithio-Bis(Succinimidooxyheptanoat) (3).** 5 g (15,5 mmol) 7,7'-Dithiodiheptansäure wurden in 65 mL Dioxan gelöst und mit 3,7 mg (32,2 mmol) käuflich zu erwerbendem N-Hydroxysuccinimid versetzt. Zu dieser Lösung wurde bei Raumtemperatur 6,5 g (31 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid in 40 mL Dioxan getropft. Die Lösung wurde 16 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Der entstandene N,N'-Dicyclohexylharnstoff wurde mit einer Glasfritte abgetrennt und zweimal mit 20 mL Dioxan gewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden am Rotationsverdampfer bei Raumtemperatur eingeeengt. Dreimalige Kristallisation des Rückstandes aus heißem Isopropanol ergaben nach dem Trocknen am Hochvakuum (2 Tage) 4,5 g (60%) 7,7'-Dithio-Bis(Succinimidooxyheptanoat) (**3**) als weißes Pulver.

**N,N'-(7,7'-Dithio-Diheptanoyl)Bis(O-Phospho-L-Threonin) (CoB-S-S-CoB) (4).** 4 g (2 mol) käuflich zu erwerbendes O-Phospho-L-Threonin wurden unter Rühren mit 40 mL Wasser versetzt und dann mit 5,6 mL (40 mmol) Triethylamin freigesetzt. Diese Lösung tropfte man bei 15°C zu einer Lösung aus 3,62 g (7 mmol) 7,7'-Dithio-Bis(Succinimidooxyheptanoat) in 180 mL Tetrahydrofuran und 40 mL Acetonitril. Die Lösung wurde 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bei Raumtemperatur abgezogen, der weiße Rückstand in 250 mL wässriger 1 M Salzsäure aufgenommen und 5 Mal mit je 80 mL Dichlormethan ausgeschüttelt. Das Dichlormethan in der wässrigen Phase wurde am Rotationsverdampfer bei Raumtemperatur entfernt, es blieb eine gelbliche Flüssigkeit zurück. Die Substanz wurde dann auf eine SERDOLIT<sup>®</sup> PAD II Säule (2 x 15 cm, mit 1 M wässriger Salzsäure equilibriert) aufgetragen, mit 100 mL 1 M wässriger Salzsäure und 150 mL Wasser gewaschen und dann mit dem folgenden Methanol Stufengradienten eluiert: 200 mL Wasser, 100 mL 30% Methanol, 200 mL 50% Methanol und 200 mL 100% Methanol. CoB-S-S-CoB begann bei 50% Methanol zu eluieren. Die vereinigten Produktfraktionen wurden am Rotationsverdampfer bei 50°C eingeeengt und die eingeeengte Säure durch Zugabe von 2 mL 2 M Ammoniaklösung in das Ammoniumsalz überführt. Nach dem Lyophilisieren wurden 1 g (20%) CoB-S-S-CoB (**4**) als weißer Feststoff mit folgenden Daten erhalten. Das SERDOLIT<sup>®</sup> PAD II Material wurde nach jeder Reinigung durch Kochen unter Reflux mit Ethylacetat regeneriert.

$C_{22}H_{42}N_2O_{14}P_2S_2$  Mr 684,6 (Säure)

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 200 MHz)  $\delta/\text{ppm}$  = 1,3 (d, 6 H,  $\text{CH}_3$  (2x)), 1,3-1,5 (m, 8 H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2$  (2x)), 1,6-1,75 (m, 8 H,  $\text{S-CH}_2\text{-CH}_2$  (2x),  $\text{CO-CH}_2\text{-CH}_2$  (2x)), 2,3-2,4 (m, 4 H,  $\text{COCH}_2$  (2x)), 2,8 (t, 4 H,  $\text{SCH}_2$  (2x)), 4,2 (d, 2 H,  $\text{CH-COO}$  (2x)), 4,5-4,6 (m, 1 H,  $\text{CH-OP}$  (2x)).

HPLC Retentionszeit: 23 min

**N-7-Mercaptoheptanoyl-O-Phospho-L-Threonin (CoB-SH).** 25 mg (32  $\mu\text{mol}$ ) CoB-S-S-CoB (Ammoniumsalz) wurden unter Stickstoffatmosphäre in 0,5 mL anaerobem 50 mM Kaliumphosphat pH 7 gelöst. Zu dem Reaktionsansatz wurden sukzessive 2 mL anaerobe  $\text{NaBH}_4$ -Lösung (10% in 50 mM Kaliumphosphat pH 7) gegeben. Die Lösung wurde 16 Stunden bei Raumtemperatur unter Stickstoffatmosphäre gerührt. Zur Aufarbeitung wurde überschüssiges  $\text{NaBH}_4$  durch Zugabe von 0,5 mL 25% Salzsäure zerstört, die Lösung stark angesäuert (pH 0) und auf eine XAD-2-Säule (1 cm x 10 cm, mit anaerober 1 M Salzsäure equilibriert) aufgetragen. Die Säule wurde mit anaerobem Wasser gespült und CoB-SH mit anaerobem Wasser/Methanol (70:30; v/v) eluiert. Die vereinigten Produktfraktionen wurden lyophilisiert, das Lyophilisat in anaerobem 50 mM Tris/HCL pH 7,6 aufgenommen und der pH der Lösung mit 2 M NaOH auf pH 7 eingestellt. Die CoB-SH-Konzentration der Lösung wurde über eine Bestimmung der Thiolgruppen mit Ellmans-Reagenz ermittelt. Es wurde eine Gesamtausbeute an CoB-SH von 50  $\mu\text{mol}$  (78%) berechnet. CoB-SH wurde freundlicherweise von Herrn Jürgen Koch zu Verfügung gestellt.

**Quantitative Bestimmung von CoB-SH.** Der Thiolnachweis mit dem Ellmans-Reagenz (Zahler and Cleland 1968) wurde folgendermaßen durchgeführt. Zu 0,1 mL 1 M Tris/HCl pH 8,1 wurden 20  $\mu\text{L}$  der zu untersuchenden Probe und anschließend 0,1 mL einer 1 mM Ellmans Reagenz (5,5'-Dithiobis-2-Nitrobenzoesäure = DTNB) in 50 mM Natriumacetat pH 5 (immer frisch hergestellt) gegeben. Die Lösung wurde mit Wasser auf 1 mL aufgefüllt und nach 10 Sekunden Inkubation bei Raumtemperatur bei 412 nm gemessen. Als Standard dienten 2-Mercaptoethansulfonsäure-Lösungen bekannter Konzentrationen.

HPLC Retentionszeit: 20 min

## 4.2 Darstellung von CoM-S-S-CoM

164 mg (1 mmol) käuflich zu erwerbendes 2-Mercaptoethansulfonat (Natriumsalz) (CoM-SH) wurden in 10 mL 0,1 M wässriger Ammoniaklösung gelöst und 12 Stunden mit Sauerstoff durchgast. Die vollständige Umsetzung von CoM-SH wurde mit Ellmans-Reagenz (siehe Quantitative Bestimmung von CoB-SH) überprüft. Nach dem Lyophilisieren wurden 160 mg (98%) CoM-S-S-CoM (Natriumsalz) mit folgenden Daten erhalten:

$^1\text{H-NMR}$  (200 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ),  $\delta/\text{ppm} = 3\text{-}3,1$  (m, 4 H, S- $\text{CH}_2$  (2x)),  $3,3\text{-}3,35$  (m, 4 H,  $\text{CH}_2\text{-SO}_3$ ).

HPLC Retentionszeit: 7 min

## 4.3 Darstellung von CoM-S-S-CoB (6)

100 mg (0,13 mmol) CoB-S-S-CoB (**4**) und ein Überschuss von 400 mg (2,4 mmol) CoM-SH (**5**) wurden in 3 mL anaerobem 100 mM Kaliumphosphat pH 8,0 gelöst und die Lösung wurde im Anaerobenzelt 3 Stunden bei 40°C gerührt. Der Reaktionsansatz wurde mit 100 mM Kaliumphosphat pH 8,0 auf 10 mL verdünnt, es wurde ca. 0,5 mg  $\text{FeSO}_4$  zugesetzt (hier färbte sich der Ansatz schon leicht rötlich) und dann 4 Stunden mit Sauerstoff durchgast. Die Flüssigkeit wurde anfangs dunkelrot und färbte sich schließlich gelb. CoM-SH und CoB-SH waren dann vollständig zu CoM-S-S-CoB sowie CoM-S-S-CoM oxidiert. Zur Aufarbeitung wurde die Lösung mit 25%iger wässriger Salzsäure auf pH 0 eingestellt und auf eine PAD-II-Säule (2,5 x 15 cm, mit 1 M wässriger Salzsäure equilibriert) aufgetragen. Die Säule wurde mit 50 mL 1 M wässriger Salzsäure und mit 150 mL Wasser gewaschen. CoM-S-S-CoB wurde mit Wasser/Methanol (80:20; v/v) eluiert. Die vereinigten Produktfraktionen wurden am Rotationsverdampfer bei 50°C eingengt. Die eingengte Säure wurde mit 1 mL 2 M wässriger Ammoniaklösung versetzt und die Lösung erneut eingengt. Da SERDOLIT<sup>®</sup> PAD II Säulenmaterial wesentlich schlechter als das XAD-2 Material auftrennte und das CoM-S-S-CoB noch Dephosphoverbindungen enthielt, wurde nach der PAD II Säule noch eine weitere Trennung über die präparative HPLC Säule mit einem  $\text{H}_2\text{O/TFA}$  (0,05%) pH 2/Acetonitril Gradienten (Flussrate: 20 mL/min) (siehe oben) durchgeführt. Nach

Lyophilisieren wurden dann 90 mg (63%) CoM-S-S-CoB (**6**) als weißer Feststoff mit folgenden Daten erhalten.

$C_{13}H_{26}NO_{10}PS_3$  Mr 483 (Säure)

$^1H$ -NMR (200 MHz,  $D_2O$ )  $\delta/ppm$  = 1,3 (d, 3 H,  $CH_3$ ), 1,3-1,5 (m, 4 H,  $CH_2-CH_2$ ), 1,6-1,75 (m, 4 H, S- $CH_2-CH_2$ , CO- $CH_2-CH_2$ ), 2,3-2,4 (m, 2 H,  $CH_2-CO$ ), 2,8 (t, 2 H,  $CH_2-S$ ), 3 (m, 2 H,  $CH_2-S$ ), 3,2-3,3 (m, 2 H,  $CH_2-SO_3$ ), 4,1 (d, 1 H, CH-COO), 4,5-4,6 (m, 1 H, CH-OP).

HPLC Retentionszeit: 18 min

### **5. Reinigung von Ferredoxin und [FeFe]-Hydrogenase aus *Clostridium pasteurianum***

Ferredoxin (Fd) aus *Clostridium pasteurianum* wurde nach (Schönheit et al. 1978) von Frau Johanna Moll hergestellt. Die Reinheit des Fd wurde über den Quotienten der beiden Absorptionsmaxima bei 390 nm und 280 nm bestimmt. Es wurde immer Fd verwendet, bei dem  $A_{390/280}$  mindestens 0,74 oder größer war.

Hydrogenase aus *C. pasteurianum* wurde gemäß (Li et al. 2008) präpariert. Die Hydrogenase wurde allerdings nicht komplett aufgereinigt, sondern nach dem Reinigungsschritt der Q-Sepharose verwendet.

### **6. Reinigung des MvhADG/HdrABC Komplexes aus *M. marburgensis***

Die Aufreinigung wurde unter strikt anaeroben Bedingungen bei 4°C, außer bei den chromatographischen Schritten, die bei 18°C im Anaerobenzelt stattfanden, durchgeführt. Alle Puffer enthielten 2 mM DTT, 2 mM CoM-SH und 20  $\mu$ M FAD. Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) Fertigsäulen (DEAE-Sepharose, Q-Sepharose und Superdex Gelfiltration) waren von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) bzw. GE Healthcare (München). Die Amicon-Mikrokonzentratoren (10 kDa) stammten von Millipore (Eschborn), das FPLC System von der Firma Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden).

Zellextrakte wurden routinemäßig aus ca. 15 g Feuchtzellen von *M. marburgensis* hergestellt, die zuvor in der logarithmischen Wachstumsphase frisch unter anoxischen Bedingungen abgeerntet worden waren. Die Zellen wurden in ca. 30 mL 50 mM Tris/HCl pH 7,6 (Puffer A) resuspendiert und drei Mal mit einer French Press bei 150 MPa aufgeschlossen. Zelltrümmer und Membranen wurden durch Zentrifugation bei 160.000 x g für 30 Minuten entfernt. Der Überstand (ca. 35 mL), hier Zellextrakt genannt, enthielt ca. 800 mg Protein, und wurde auf eine DEAE-Sepharose fast flow Säule (2,6 cm x 16 cm), die mit Puffer A equilibriert war, aufgetragen. Protein wurde durch einen NaCl Gradienten in Puffer A eluiert: 100 mL 0 M NaCl, 100 mL 0,2 M NaCl, 100 mL 0,3 M NaCl, 100 mL 0,32 M NaCl und 100 mL 0,4 M NaCl (Flussrate: 5 mL/min). Der MvhADG/HdrABC Komplex eluierte im letzten Peak. Die Fraktionen mit der höchsten Aktivität (ca. 40 mL) wurden auf eine Hi-Load Q-Sepharose Säule (2,6 cm x 16 cm), die mit Puffer A equilibriert war, aufgetragen. Protein wurde durch einen NaCl Gradienten in Puffer A eluiert: 20 mL 0 M NaCl, 100 mL 0,3 M NaCl, 100 mL 0,4 M NaCl, 100 mL 0,45 M NaCl, 100 mL 0,54 M NaCl (Flussrate: 5 mL/min). Der MvhADG/HdrABC Komplex eluierte wieder im letzten Peak. Die Fraktionen mit der höchsten Aktivität (ca. 15 mL) wurden gesammelt und mittels Ultrafiltration in 10 kDa Amicon-Mikrokonzentratoren auf 2-3 mL ankonzentriert. Diese wurden dann auf eine Superdex 200-Gelfiltrationssäule (2,6 cm x 60 cm), equilibriert mit Puffer B (Puffer A + 150 mM NaCl), aufgetragen. Der Komplex wurde eluiert (Flussrate: 1 mL/min), indem die Säule ca. 3,5 Stunden mit Puffer B gewaschen wurde. Der MvhADG/HdrABC Komplex eluierte im mittleren von 3 Peaks mit einer Proteinkonzentration von ca. 1 mg/mL. Die Enzym-Lösung wurde unter H<sub>2</sub> im Anaerobenzelt oder im Kühlschrank (4°C) gelagert.

Die Reinheit des Komplexes und die Zusammensetzung der Untereinheiten wurde mittels SDS-PAGE kontrolliert (Laemmli 1970). Die Elektrophorese wurde in einer Elektrophoreseapparatur (Biorad, München) mit 12%igen Tris-HCl Gelen (BioRad, München) in 25 mM Tris mit 192 mM Glyzin und 0,1% (w/v) SDS-Elektrodenpuffer durchgeführt. Als Massenstandard wurde der LMW-SDS Marker von GE Healthcare (München) verwendet. Für die SDS-PAGE wurden bis zu 100 µg Protein mit SDS-Probenpuffer (63 mM Tris/HCl, pH 6,8, 2% (w/v) SDS, 10% (v/v) Glycerin, 16 mM DTT und 0,01% (w/v) Bromphenolblau) 1:1 verdünnt und 5 min bei 95°C denaturiert. Sobald die Lauffront das Sammelgel erreicht hatte, wurde die Spannung von 80 V

auf 160 V erhöht. Nach Anfärben der Banden mit Coomassielösung (0,05% (w/v) Serva Blue R (Coomassie R-250), 0,05% (w/v) Crocein Scarlet 7B, 0,5% (w/v) CuSO<sub>4</sub>, 25% (v/v) Isopropanol und 10% (v/v) Eisessig) durch Inkubation für 1-4 h unter leichtem Schütteln, wurden die Gele bei Raumtemperatur in Entfärbelösung (0,5% (w/v) CuSO<sub>4</sub>, 12% (v/v) Isopropanol und 7% (v/v) Eisessig) geschüttelt, bis der nicht vom Protein gebundene Farbstoff entfernt war. Zusätzlich wurden die sechs Untereinheiten noch mit Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time Of Flight (MALDI-TOF) Analyse identifiziert.

### **7. Bestimmung der katalytischen Eigenschaften des MvhADG/HdrABC Komplexes**

Enzym-Assays wurden an einem Ultrospec<sup>®</sup> 1100 *pro* Photometer (Amersham Biosciences, New Jersey, USA) durchgeführt, das an einen Schreiber und ein Wasserbad angeschlossen war, mit dem die Temperatur, bei der die spezifische Aktivität gemessen wurde, eingestellt werden konnte. Zur Messung der Enzymaktivitäten wurden Quarzküvetten der Fa. Hellma (Mühlheim) mit einer Schichtdicke von 1 cm und einem Volumen von 1,5 mL verwendet, die mit gekochten und autoklavierten Butylgummi- oder Perbunanstopfen der Firma Deutsch & Naumann (Berlin) verschlossen wurden. Die Gasphase wurde durch mehrmaliges Vakuumziehen und Begasen mit H<sub>2</sub> anaerobisiert. Die Zugabe der anaeroben Testkomponenten erfolgte mit Hilfe von Mikroliterspritzen (Hamilton, Bonaduz, Schweiz). Das Volumen der Testansätze betrug immer ca. 0,75 mL.

Die Proteinkonzentrationsbestimmung wurde an einem Ultrospec<sup>®</sup> 3100 *pro* Photometer (Amersham Biosciences, New Jersey, USA) mit dem BioRad-Proteintest (BioRad, München) nach der Bradford-Methode durchgeführt (Bradford 1976). Das Testprinzip beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie Brillantblau R-250 in saurer Lösung von 465 nm zu 595 nm durch die Bindung des Farbstoffes an das Protein. Die Proteinproben und BSA als Standard wurden mit 0,2 mL Farbstofflösung versetzt und mit H<sub>2</sub>O auf 1 mL aufgefüllt. Die Absorption wurde nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur bei 595 nm gemessen.

Alle Enzymassays, außer wenn anders vermerkt, wurden bei 60°C mit 100% H<sub>2</sub> Atmosphäre (1,2 bar entspricht ca. 0,6 mM H<sub>2</sub> bei 60°C (Thauer et al. 2010)) in 1,6 M Kaliumphosphat bei pH 7 durchgeführt. Der Standardassay enthielt 1 mM CoM-S-S-CoB und die Reaktion wurde durch Zugabe von Protein gestartet.

### 7.1 Ferredoxin-Reduktions-Assay

Für die Assays wurde Ferredoxin (Fd) mit zwei [4Fe4S]-Clustern und einem Absorptionsmaximum bei 390 nm ( $\epsilon = 30.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Hong and Rabinowitz 1970; Schönheit et al. 1978) aus *C. pasteurianum* ( $E_o' = -400 \text{ mV}$ ,  $n = 2$ ) (Smith et al. 1991) verwendet, da Fd aus *M. marburgensis* in Substratmengen wesentlich schwerer zu isolieren ist. Hierbei wurde auf die Erfahrung vertraut, dass auch sehr entfernt verwandte Organismen funktionell austauschbare Fd besitzen (Tagawa and Arnon 1968). Die Reduktion des Fd wurde durch Messung der Abnahme der Absorption bei 390 nm verfolgt ( $\Delta\epsilon = 11.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Uyeda and Rabinowitz 1971). 1 U entspricht 1  $\mu\text{mol}$  mit 2 Elektronen reduziertes Fd pro Minute.

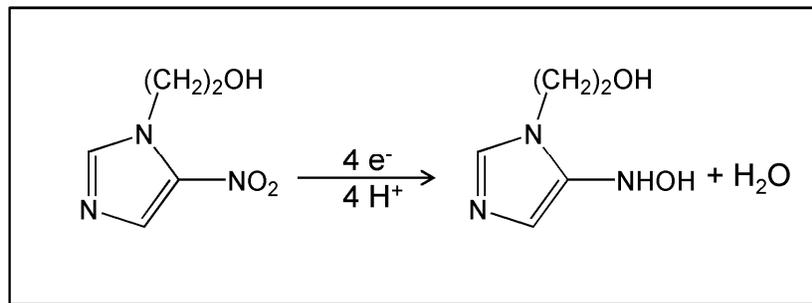
Der Testansatz enthielt in der Regel ca. 30  $\mu\text{M}$  Clostridium-Fd und 1 mM CoM-S-S-CoB und die Reaktion wurde durch Zugabe von MvhADG/HdrABC Komplex oder Zellextrakt gestartet. Stopfen, Küvetten und Spritzen mussten Viologen-frei sein, um Entkopplung zu vermeiden (siehe Ergebnisteil).

Komplette Absorbtionsspektren von Fd (siehe Ergebnisteil, Abbildung 19) wurden mit einem Specord S10 Diodenarray Photometer der Firma Zeiss (Meile et al.) aufgenommen oder mit einem Ultrospec<sup>®</sup> 1100 *pro* Photometer (Amersham Biosciences, New Jersey, USA).

### 7.2 Metronidazol-Reduktions-Assay

Des Weiteren wurde Metronidazol (MTZ) als künstlicher Elektronenakzeptor verwendet. Die Reduktion des MTZ wurde durch Messung der Abnahme der Absorption bei 320 nm verfolgt ( $\epsilon = \Delta\epsilon = 9.300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Chen and Blanchard 1979; Bobik and Wolfe 1989). MTZ wird schnell durch reduziertes Fd und Fd-ähnliche Proteine in einer spontanen irreversiblen Vier-Elektronen Reaktion reduziert ( $n = 4$ ) (Lindmark and Müller 1976; Church and Laishley 1995) (Abbildung 6). 1 U entspricht

1  $\mu\text{mol}$  mit 4 Elektronen reduziertes MTZ pro Minute. Der Testansatz enthielt in der Regel 0,15 mM Metronidazol und 0,5 mM CoM-S-S-CoB und die Reaktion wurde durch Zugabe von MvhADG/HdrABC Komplex oder Zellextrakt gestartet. Durch die Zugabe von Ferredoxin konnte die Enzymaktivität gesteigert werden. Stopfen, Küvetten und Spritzen mussten Viologen-frei sein, um Entkopplung zu vermeiden.



**Abbildung 6: Die Nitro-Gruppe des Metronidazols wird in einer irreversiblen 4 Elektronen Reduktion zum Hydroxylamin reduziert.** Die Abnahme der Extinktion des Metronidazols kann bei 320 nm verfolgt werden.

## Ergebnisse

Der Ergebnisteil ist in drei Teile untergliedert. Im ersten Teil wurden  $H_2$ -Schwellenkonzentrationen und Wachstumserträge für zwei Cytochrom-freie (*M. marburgensis* und *M. arboriphilus*) und einen Cytochrom-haltigen Methanbildner (*M. barkeri*) in bedingungsgleichen Experimenten ermittelt, um die ATP-Ausbeute bei der Methanbildung aus  $H_2$  und  $CO_2$  abschätzen zu können. Im zweiten Teil wurde die Kopplung zwischen der endergonen Ferredoxin-Reduktion und der exergonen CoM-S-S-CoB-Reduktion, katalysiert durch den gereinigten MvhADG/HdrABC Komplex aus *M. marburgensis*, untersucht. Der dritte Teil der Ergebnisse befasst sich mit Methanbildungsraten in Zellsuspensionen mit und ohne Viologen-Farbstoffe, sowie verschiedenen Methoden der quantitativen Bestimmung von Coenzym M und Coenzym B bei sehr niedrigen Konzentrationen. Letzteren Versuchen wurde während der Doktorarbeit viel Zeit gewidmet, sie führten aber zu keinen verwertbaren Ergebnissen, weshalb sie gesondert aufgeführt werden.

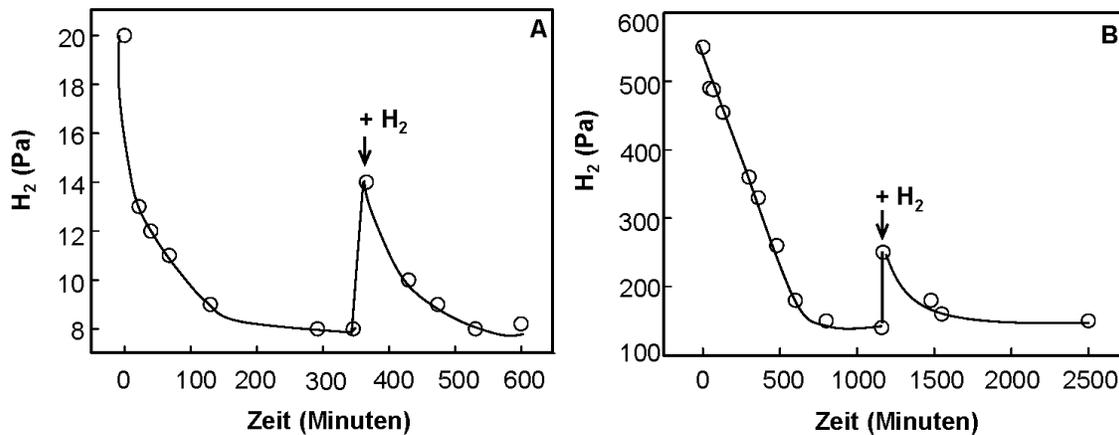
### 1. $H_2$ -Schwellenkonzentrationen und Wachstumserträge

Bei der Reduktion von  $CO_2$  mit  $H_2$  zu Methan ist das Gleichgewicht ( $\Delta G = 0$  kJ/mol) theoretisch bei einem  $H_2$ -Partialdruck ( $p_{H_2}$ ) von ca. 0,2 Pa erreicht (wenn der  $CO_2$  Partialdruck gleich dem Methan Partialdruck ist) (Thauer et al. 2008). Wenn allerdings die Methanogenese mit der Phosphorylierung von ADP zu ATP ( $\Delta G' = +50$  kJ/mol) gekoppelt ist, ist die  $H_2$ -Gleichgewichtskonzentration ( $H_2$ -Schwellenkonzentration) höher. So berechnet sich ein  $p_{H_2} = 2$  Pa, wenn die ATP Ausbeute (mol ATP/mol Methan) 0,5 ist, ein  $p_{H_2} = 30$  Pa, wenn die ATP Ausbeute 1 ist und ein  $p_{H_2} = 4500$  Pa, wenn die ATP Ausbeute 2 ist. Die  $H_2$ -Schwellenkonzentration ist also ein Indikator für die Stöchiometrie der Kopplung zwischen der exergonen Reduktion von  $CO_2$  mit  $H_2$  zu Methan und der endergonen ATP Synthese.

Eine weitere Methode, die ATP Ausbeute bei der Bildung von  $CH_4$  aus  $H_2$  und  $CO_2$  abzuschätzen, ist die Bestimmung des Wachstumsertrages ( $Y_{CH_4}$ ) (g Trockenzellmasse/mol Methan), der proportional zur ATP Ausbeute ist. Der Wachstumsertrag hängt neben der ATP Ausbeute auch noch von den Substraten ab, aus denen die Biomasse aufgebaut werden muss, und von der

Wachstumsgeschwindigkeit. Der Wachstumsertrag pro mol ATP ( $Y_{ATP}$ ) liegt bei Wachstum auf  $CO_2$  als Kohlenstoff- und  $NH_3$  als N-Quelle bei etwa 6 g/mol (Stouthamer 1979). Der Einfluss der Wachstumsgeschwindigkeit über die Erhaltungsenergie auf den Wachstumsertrag wurde hier vernachlässigt.

**$H_2$ -Schwellenkonzentrationen** wurden in Zellsuspensionen, die die Reduktion von  $CO_2$  zu Methan katalysieren, für drei Methanogene bestimmt. Im Falle von *M. marburgensis* (Abbildung 7A) und *M. arboriphilus* wurde eine  $H_2$ -Schwellenkonzentration von ca. 8 Pa ermittelt und im Fall von *M. barkeri* (Abbildung 7B) von ca. 150 Pa (Tabelle 3). Aus einer  $H_2$ -Schwellenkonzentration von 8 Pa errechnet sich ein  $\Delta G'$  von -38 kJ/mol und damit eine ATP Ausbeute von 0,75. Für die Schwellenkonzentration von 150 Pa ergibt sich ein  $\Delta G'$  von -65 kJ/mol und damit eine ATP Ausbeute von etwa 1,3.



**Abbildung 7: Abnahme der  $H_2$ -Konzentration bei der Methanbildung aus  $H_2$  und  $CO_2$  durch Zellsuspensionen von (A) *M. marburgensis* und (B) *M. barkeri*.**

Die 150 ml Müller-Krempel Flaschen enthielten 2 mL Zellsuspension (ca. 200 mg Zellen) und 80%  $N_2$ /20%  $CO_2$  als Gasphase,  $H_2$  wurde in den angegebenen Konzentrationen mit einer gasdichten Spritze hinzugegeben. Die Flaschen wurden bei 65°C (A) oder 37°C (B) mit 200 Upm geschüttelt. Nachdem die  $H_2$ -Schwellenkonzentrationen erreicht waren, wurde erneut  $H_2$  in die Flaschen gegeben, um sicherzustellen, dass die Organismen weiterhin  $H_2$  verbrauchten.

**Wachstumserträge** wurden in Batch Kulturen in der exponentiellen Wachstumsphase bestimmt. Es wurde zum einen die Zunahme der OD bei 578 nm verfolgt und zum anderen die Methanbildungsrate bestimmt. Aus den Werten wurde für *M. marburgensis* und *M. arboriphilus* ein Wachstumsertrag von jeweils ca. 2 g/mol errechnet. Der Wert für *M. barkeri* lag bei ca. 7 g/mol. Unter Zugrundelegung eines  $Y_{\text{ATP}}$  von 6,5 (Stouthamer 1979) für  $\text{CO}_2$  als C-Quelle ergibt sich aus den Wachstumserträgen eine ATP Ausbeute von 0,3 für *M. marburgensis* und *M. arboriphilus* und eine ATP Ausbeute von etwa 1 für *M. barkeri*. Die ATP-Ausbeute für die beiden Cytochrom-freien Methanbildner dürfte bei maximaler Kopplung höher liegen, was aus höheren Wachstumserträgen von bis zu 3,5 g unter  $\text{H}_2$ -limitierenden Wachstumsbedingungen geschlossen wird (Tabelle 3).

**Table 3:  $\text{H}_2$ -Schwellenkonzentrationen und Wachstumserträge von *M. marburgensis* im Vergleich zu anderen Cytochrom-freien und Cytochrom-haltigen Methanogenen.** Die  $\text{H}_2$ -Schwellenkonzentrationen von *M. marburgensis*, *M. arboriphilus* und *M. barkeri* wurden mit Zellsuspensionen gemessen, die Wachstumserträge mit exponentiell wachsenden Kulturen bestimmt. n.b., nicht bestimmt.

	<b><math>\text{H}_2</math>-Schwellenkonzentration (Pa)</b>	<b><math>Y_{(\text{CH}_4)}</math> (g/mol)</b>
<b>Cytochrom-freie Methanogene:</b>		
<i>Methanothermobacter marburgensis</i>	8 <sup>a</sup>	bis zu 3 <sup>a, b, c</sup>
<i>Methanobrevibacter arboriphilus</i>	8 <sup>a, d</sup>	bis zu 2,7 <sup>a, e, f</sup>
<i>Methanobacterium bryantii</i>	7 <sup>g</sup>	bis zu 2,5 <sup>h, i</sup>
<i>Methanobacterium formicicum</i>	7 <sup>d, g</sup>	3,5 <sup>j</sup>
<i>Methanobrevibacter smithii</i>	10 <sup>d</sup>	n. b.
<i>Methanococcus vannielii</i>	7,5 <sup>d</sup>	n. b.
<i>Methanospirillum hungatei</i>	9 <sup>d, g</sup>	n. b.
<b>Cytochrom-haltige Methanogene:</b>		
<i>Methanosarcina barkeri</i>	150 <sup>a</sup>	bis zu 7,3 <sup>a, b, k</sup>
<i>Methanosarcina</i> sp. Strain 227	n.b.	8,7 <sup>l</sup>

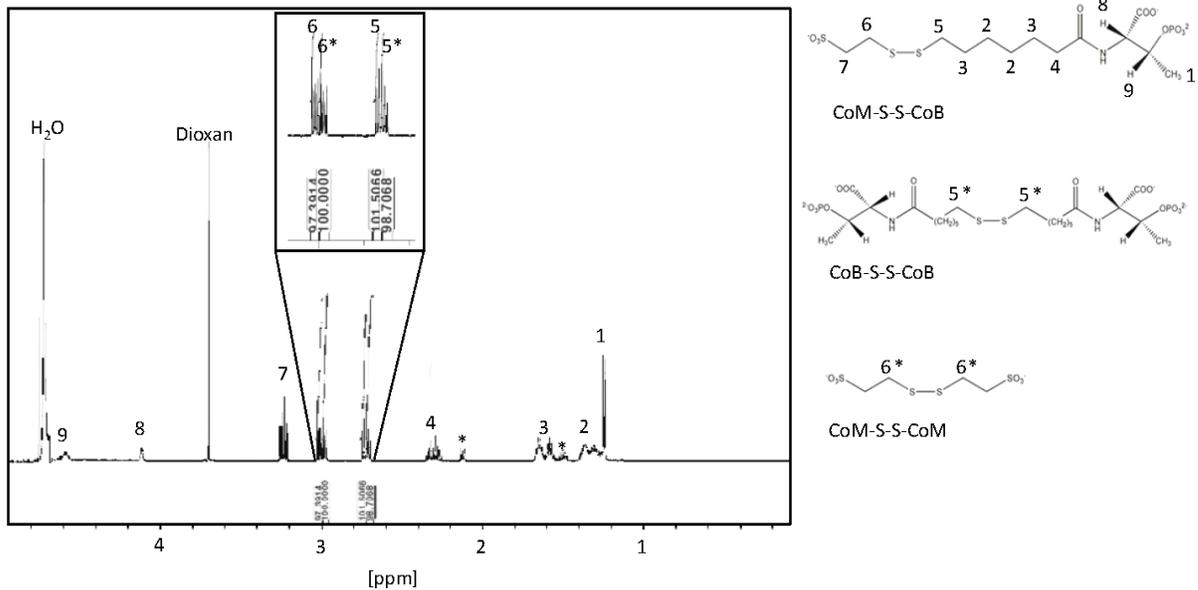
<sup>a</sup> **diese Arbeit**; <sup>b</sup> (Wennerhold 2004); <sup>c</sup> (Schönheit et al. 1980); <sup>d</sup> (Cord-Ruwisch et al. 1988); <sup>e</sup> (Morii et al. 1987); <sup>f</sup> (Zehnder and Wuhrmann 1977); <sup>g</sup> (Lovley 1985); <sup>h</sup> (Robertson and Wolfe 1970); <sup>i</sup> (Karadagli and Rittmann 2005); <sup>j</sup> (Schauer and Ferry 1980); <sup>k</sup> (Weimer and Zeikus 1978); <sup>l</sup> (Smith and Mah 1978).

## 2. Kopplung von Ferredoxin-Reduktion mit H<sub>2</sub> und CoM-S-S-CoB-Reduktion mit H<sub>2</sub> über den MvhADG/HdrABC Komplex

Das Heterodisulfid, das in den Assays verwendet wurde, war ein 2:1:1 Gemisch aus CoM-S-S-CoB, CoM-S-S-CoM und CoB-S-S-CoB (Abbildung 8). Die Mischung und nicht das reine CoM-S-S-CoB wurde verwendet, da das Heterodisulfid die Eigenschaft besitzt, spontan in CoM-S-S-CoM und CoB-S-S-CoB zu disproportionieren, bis sich aus statistischen Gründen ein Gleichgewicht von 2:1:1 aus allen 3 Disulfiden eingestellt hat. Dies geschieht auch unter sauren Bedingungen während des Einfrierens (Konzentration) bei der Lyophilisation. Bei den CoM-S-S-CoB-Konzentrationen der Stammlösungen (35 mM) ist die Geschwindigkeit der Disproportionierung sehr hoch, bei den Konzentrationen in den Assays (1 mM oder weniger) ist sie allerdings viel geringer. Unter den Testbedingungen diente das Homodisulfid CoM-S-S-CoM oder CoB-S-S-CoB nicht als Substrat für den MvhADG/HdrABC Komplex und das Heterodisulfid wurde von den beiden Homodisulfiden auf Grund ihrer Synproportionierung nur in vernachlässigbaren Raten nachgebildet (<2 nmol/min im 0,75 mL Assay bei Homodisulfid-Konzentrationen <1 mM). Offenbar kann die Disproportionierung von CoM-S-S-CoB auch *in vivo* erfolgen, da *Methanothermobacter* Arten eine NADP<sup>+</sup>-abhängige CoM-S-S-CoM-Reduktase besitzen (Smith and Rouviere 1990). In den Versuchen wurde ebenfalls sichergestellt, dass CoM-SH und CoB-SH (alleine oder zusammen) CoM-S-S-CoB als Substrat nicht ersetzen konnten.

Die Tatsache, dass CoM-S-S-CoB in einem 2:1:1 Gemisch mit den beiden Homodisulfiden vorliegt, wurde erst gegen Ende der Arbeit herausgefunden. In den <sup>1</sup>H NMR Spektren, die routinemäßig mit 200 MHz aufgenommen wurden, ist die Aufspaltung der Multiplets von Heterodisulfid und Homodisulfiden nämlich nicht wie mit 600 MHz zu erkennen (Abbildung 8). Erst bei der Bestimmung der Stöchiometrie (siehe 2.4) wurde festgestellt, dass sich nur die Hälfte des angenommenen CoM-S-S-CoB in der Stammlösung befand. Dies ist auch der Grund, warum in den Metronidazol-Reduktions-Assays nur 0,5 mM CoM-S-S-CoB statt 1 mM wie bei den Ferredoxin-Reduktions-Assays eingesetzt wurden, da die Experimente anfangs alle mit Metronidazol durchgeführt wurden, und davon ausgegangen wurde, dass CoM-S-S-CoB in Reinform vorliegt.

Die  $H_2$ : CoM-S-S-CoB Oxidoreduktase Aktivität des gereinigten MvhADG/HdrABC Komplexes war bei 60°C am höchsten in 1,6 M Kaliumphosphat pH 7 (Setzke et al. 1994). Daher, außer wenn anders angegeben, wurden die Reduktionsassays unter diesen Bedingungen durchgeführt.

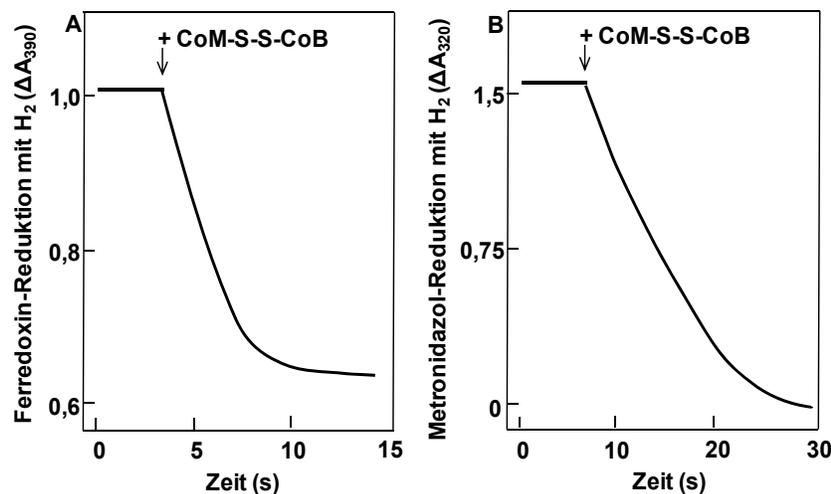


**Abbildung 8:**  $^1H$  NMR Spektrum (600 MHz) des CoM-S-S-CoB (in  $D_2O$ ), welches in den Experimenten verwendet wurde. CoM-S-S-CoB und die beiden Homodisulfide CoM-S-S-CoM und CoB-S-S-CoB liegen in einem Verhältnis von 2:1:1 vor. Die Nummern über den Peaks können den Protonen der Strukturen auf der rechten Seite zugeordnet werden. \* Verunreinigungen.

## 2.1 CoM-S-S-CoB-abhängige Ferredoxin-Reduktion mit $H_2$ in Zellextrakten

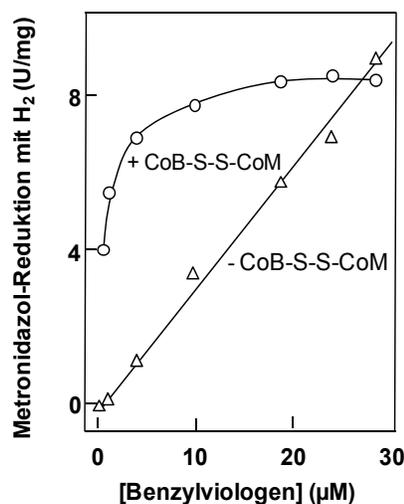
Zellsuspensionen von *M. marburgensis* katalysieren die Reduktion von  $CO_2$  mit  $H_2$  zu Methan bei 60°C mit einer spezifischen Aktivität von ca. 6  $\mu\text{mol}$  pro Minute (U) und mg Protein (Schwörer and Thauer 1991) bzw. ca. 3 U pro mg Zellen. Dies ist daher die zu erwartende spezifische Aktivität für Enzyme in Zellextrakten von *M. marburgensis*, die an der Methanbildung aus  $H_2$  und  $CO_2$  - wie der MvhADG/HdrABC Komplex - beteiligt sind. Die Tatsache, dass die Zellextrakte die Reduktion von CoM-S-S-CoB mit  $H_2$  nur mit einer spezifischen Aktivität von maximal 0,2 U/mg (Setzke et al. 1994) katalysierten, konnte somit als ein Indiz dafür gewertet werden, dass eine wichtige Komponente fehlte. Diese Komponente, so stellte sich jetzt heraus, ist Ferredoxin (Fd), welches von  $H_2$  in einer CoM-S-S-CoB-abhängigen Reaktion reduziert wird.

Zellextrakte von *M. marburgensis* katalysierten die Reduktion von Fd aus *C. pasteurianum* mit  $H_2$  in signifikanten Raten nur in Gegenwart von CoM-S-S-CoB (Abbildung 9A). Die Rate stieg linear mit der Proteinkonzentration. Direkt nach der Herstellung der Zellextrakte betrug die spezifische Aktivität 2 U/mg Protein, erhöhte sich aber auf 5 U/mg nach 5 Stunden Inkubation des Zellextrakts bei 4°C mit 100%  $H_2$ . Dieser Wert liegt nahe an der spezifischen Aktivität der Methan-Bildung aus  $H_2$  und  $CO_2$  durch Zellsuspensionen von *M. marburgensis* (siehe oben). Die Zellextrakte katalysierten ebenfalls die CoM-S-S-CoB-abhängige Reduktion von Metronidazol (MTZ) mit  $H_2$  (Abbildung 9B). Die spezifische Aktivität betrug hier 2 U/mg vor und 4 U/mg nach Inkubation des Zellextrakts bei 4°C mit 100%  $H_2$ . Die spezifische Aktivität stieg nach Zugabe von Fd um 20-50% an. Der höchste Anstieg konnte vor Inkubation des Zellextraktes mit 100%  $H_2$  beobachtet werden.



**Abbildung 9: CoM-S-S-CoB-abhängige Reduktion von (A) Ferredoxin (Fd) und (B) Metronidazol (MTZ) mit  $H_2$ , katalysiert durch Zellextrakte von *M. marburgensis*.** Die Assays wurden bei 60°C in 1,5 mL anaeroben Küvetten durchgeführt, die 0,75 mL Flüssigkeit und 100%  $H_2$  in der Gasphase enthielten. Der Assay enthielt: 1,6 M Kaliumphosphat pH 7; 1 mM CoM-S-S-CoB; ~30  $\mu g$  (A) oder ~140  $\mu g$  (B) Zellextrakt; und entweder 35  $\mu M$  Fd (A) oder 150  $\mu M$  MTZ (B). Die Reduktion wurde durch Zugabe von CoM-S-S-CoB gestartet und photometrisch bei 390 nm (A) oder 320 nm (B) verfolgt. Nach etwa 30 Sekunden waren sowohl das Fd als auch das MTZ vollständig reduziert.

Wenn bei den Reduktionsassays Küvetten und Stopfen verwendet wurden, die zuvor in Kontakt mit Methylviologen (MV) oder Benzylviologen (BV) gekommen waren, konnten die Zellextrakte die Reduktion von Fd oder MTZ mit  $H_2$  bereits in Abwesenheit von CoM-S-S-CoB katalysieren. Bei BV-Konzentrationen von etwa 25  $\mu M$  wurde die MTZ-Reduktion unabhängig von der CoM-S-S-CoB-Zugabe (Abbildung 10). Der MvhADG/HdrABC Komplex kann die Reduktion von Viologenen mit  $H_2$  in Abwesenheit von CoM-S-S-CoB katalysieren (Setzke et al. 1994) und der reduzierte Viologen-Farbstoff transferiert dann die Elektronen zum Ferredoxin oder Metronidazol in einer spontanen Reaktion. Dies stellte insbesondere zu Beginn des Projektes ein nicht unerhebliches Problem dar, da die Küvetten für die Fd- und MTZ-Reduktions-Assay zunächst schon für Assays mit BV als Elektronenakzeptor verwendet worden waren. BV ist extrem hydrophob und seine 2 positiven Ladungen können zusätzlich noch gut mit den negativen Silica-Gruppen der Glaswände der Küvetten wechselwirken. Es stellte sich heraus, dass BV nur durch Chromschwefelsäure zuverlässig zu entfernen war. Daher wurde in den Versuchen immer darauf geachtet, dass Küvetten, Stopfen und Spritzen, die für die Fd- oder MTZ-Assays verwendet wurden, nicht in Kontakt mit Viologen-Farbstoffen kamen.



**Abbildung 10: Rate der Reduktion von Metronidazol (MTZ) mit  $H_2$ , katalysiert durch Zellextrakte von *M. marburgensis* in Abwesenheit ( $\Delta$ ) und Gegenwart ( $\circ$ ) von CoM-S-S-CoB, aufgetragen gegen die Benzylviologen (BV)-Konzentration.** Die Assays wurden bei 60°C in 1,5 mL anaeroben Küvetten durchgeführt, die 0,75 mL Flüssigkeit und 100%  $H_2$  in der Gasphase enthielten. Der Assay enthielt: 1,6 M Kaliumphosphat pH 7; 0,5 mM CoM-S-S-CoB; 150  $\mu M$  MTZ, 50-100  $\mu g$  Zellextrakt und BV wie angegeben. Die Reduktion wurde durch Zugabe von Zellextrakt gestartet und photometrisch bei 320 nm verfolgt.

## 2.2 Reinigung des MvhADG/HdrABC Komplexes, der die CoM-S-S-CoB-abhängige Ferredoxin-Reduktion katalysiert

Das Enzymsystem, das die CoM-S-S-CoB-abhängige Reduktion von Fd mit H<sub>2</sub> katalysierte, konnte 26-fach mit 14%iger Ausbeute angereichert werden (Tabelle 4). Die Reinigung erfolgte in Anwesenheit von FAD, das für hohe Aktivitäten absolut notwendig war. In Abwesenheit von FAD verlor der Komplex schnell seine Fähigkeit, die CoM-S-S-CoB-abhängige Reduktion von Fd (oder MTZ) mit H<sub>2</sub> zu katalysieren. Kontakt mit O<sub>2</sub> führte zum sofortigen Verlust der Aktivität, diese ließ sich durch erneutes Anaerobisieren auch nicht wieder herstellen.

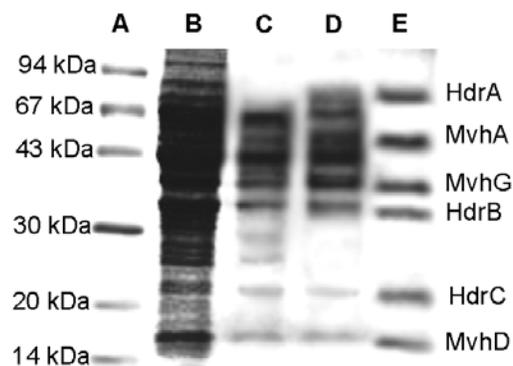
Nach einer Inkubationszeit von 10 Stunden bei 4°C mit 100% H<sub>2</sub> katalysierte der gereinigte Komplex die Reduktion von Fd (33 µM) mit einer spezifischen Aktivität von 110 U/mg, vor der Inkubation mit nur 40 U/mg. Die spezifische Aktivität mit MTZ als Elektronenakzeptor (0,15 mM) betrug 60 U/mg nach und 26 U/mg vor der Inkubation. Nach 24 Stunden sank die Aktivität des Komplexes wieder auf die Werte vor Inkubation mit H<sub>2</sub> und wurde dann im Laufe der Zeit immer weniger. Der Komplex zeigte eine längere Haltbarkeit (ca. 4 Wochen bei ca. 20 U/mg im Fd-Assay), wenn er im Anaerobenzelt statt im Kühlschrank gelagert wurde.

**Tabelle 4: Aufreinigung des MvhADG/HdrABC Komplexes aus *M. marburgensis*.** Die Aktivität wurde über die CoM-S-S-CoB-abhängige Reduktion von Ferredoxin (Fd) sowie Metronidazol (MTZ) (Nummern in Klammern) mit H<sub>2</sub> bestimmt. Vor der Aktivitätsmessung wurden die jeweiligen Fraktionen mit 100% H<sub>2</sub> bei 4°C inkubiert. Die Assays wurden bei 60°C in 1,5 mL anaeroben Küvetten durchgeführt, die 0,75 mL Flüssigkeit und 100% H<sub>2</sub> in der Gasphase enthielten. Die Assays enthielten: 1,6 M Kaliumphosphat pH 7; 1 mM CoM-S-S-CoB; 1-150 µg Zellextrakt; und entweder 35 µM Fd oder 150 µM MTZ. Die Reduktion wurde durch Zugabe von CoM-S-S-CoB gestartet und photometrisch bei 390 nm im Falle der Fd-Reduktion oder 320 nm im Falle der MTZ-Reduktion verfolgt.

	U	Protein (mg)	U/mg	Anreicherung	Ausbeute (%)
<b>Zellextrakt</b>	4025 (3200)	800	5 (4)	1	100
<b>DEAE-Sepharose</b>	1800 (1200)	200	9 (6)	1,8 (1,5)	45 (38)
<b>Q-Sepharose</b>	880 (540)	60	15 (9)	3 (2,3)	22 (17)
<b>Superdex 200</b>	550 (250)	5	110 (60)	26 (15)	14 (8)

Die Beobachtung, dass Zellextrakte die Reduktion von Ferredoxin (Fd) und Metronidazol (MTZ) mit fast der gleichen spezifischen Aktivität katalysierten, während der gereinigte Komplex eine zweifach höhere spezifische Aktivität mit Fd als mit MTZ als Elektronenakzeptor aufweist (Tabelle 3), kann durch die Tatsache erklärt werden, dass die Zellextrakte Ferredoxine enthalten, welche die MTZ-Reduktion stimulieren, diese aber während der Reinigungsprozedur (siehe Material und Methoden) ganz oder teilweise entfernt werden. Die höheren spezifischen Aktivitäten nach Inkubation mit 100% H<sub>2</sub> sind vermutlich auf die Aktivierung der [NiFe]-Hydrogenase MvhADG zurückzuführen. [NiFe]-Hydrogenasen sind meistens sehr sauer-stoffempfindlich und können leicht inaktiviert werden. Durch Inkubation mit H<sub>2</sub> gelangt das Enzym aber wieder in seinen aktiven Zustand (Pandelia et al. 2009; Horch et al. 2010).

Die SDS-PAGE zeigte nach der Gelfiltration 6 Untereinheiten mit apparenten molekularen Massen, die denen des MvhADG/HdrABC Komplexes entsprachen (Abbildung 11, für aus der Sequenz errechnete Massen siehe auch Abbildung 3). Sie wurden außerdem noch durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie identifiziert, die auch zeigen konnte, dass in einigen Präparationen noch das Polyferredoxin MvhB (48 kDa) – wahrscheinlich nur in Spuren - zugegen war (Hedderich et al. 1992).



**Abbildung 11: Aufreinigung des MvhADG/HdrABC Komplexes aus *M. marburgensis* visualisiert mit SDS-PAGE.** Linie A: Molekularer Massen Standard; Linie B: ~20 µg Zellextrakt; Linie C: ~20 µg Protein nach der DEAE-Sepharose; Linie D: ~20 µg Protein nach der Q-Sepharose und Linie E: ~100 µg Protein nach der Superdex 200 Gelfiltration (siehe auch Tabelle 4).

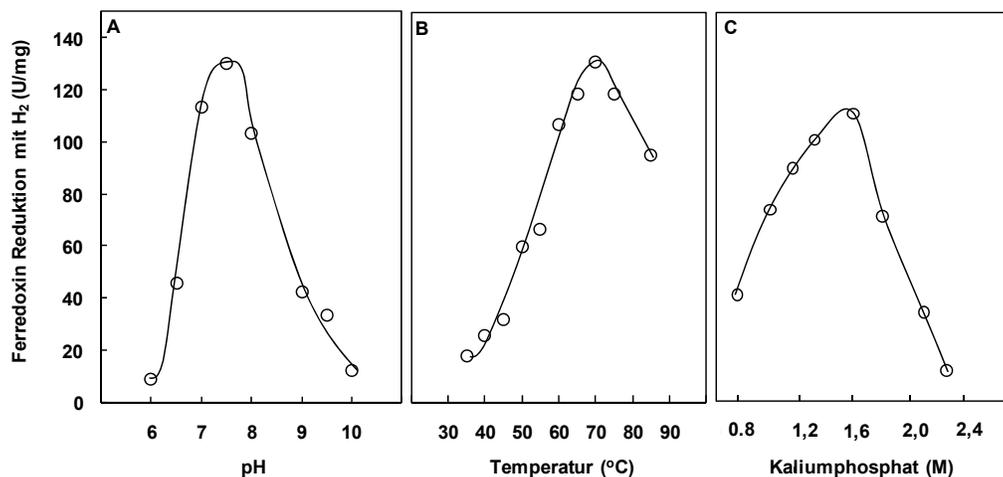
### 2.3 Kinetische Eigenschaften des MvhADG/HdrABC Komplexes

Der gereinigte MvhADG/HdrABC Komplex katalysierte die CoM-S-S-CoB-abhängige Reduktion von Fd mit H<sub>2</sub> am besten bei einer Kaliumphosphat-Konzentration von 1,6 M, einem pH von 7,5 und einer Temperatur von 70°C (Abbildung 12). Die Optima stimmen mit zuvor gemessenen Daten von (Setzke et al. 1994) überein. Für hohe Aktivitäten war eine hohe Kaliumphosphat-Konzentration unabdingbar. In Tris/HCl Puffern katalysierte der Komplex die Reaktionen mit nicht einmal einem Zehntel der Raten, die bei entsprechend hohen Kaliumphosphat-Konzentrationen gemessen wurden. Andere Salze wie KCl, NaCl, oder (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> hatten allerdings keinen stimulierenden Effekt (nicht gezeigt). Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass in thermophilen bzw. hyperthermophilen *Methanobacteriales* und *Methanopyrales* Spezies extrem hohe Konzentrationen an Kaliumionen (~1 M) (Jarrell et al. 1984; Schönheit et al. 1984) und an zyklischem 2,3-Diphosphoglycerat (cDPG) gefunden werden (bei *M. thermautotrophicus* ca. 65 mM (Hensel and König 1988), bei *Methanopyrus kandleri* ca. 1 M (Shima et al. 1998). Es wird ein Zusammenhang von hohen Kaliumphosphat-Konzentrationen mit der Thermostabilität von Enzymen dieser Organismen vermutet.

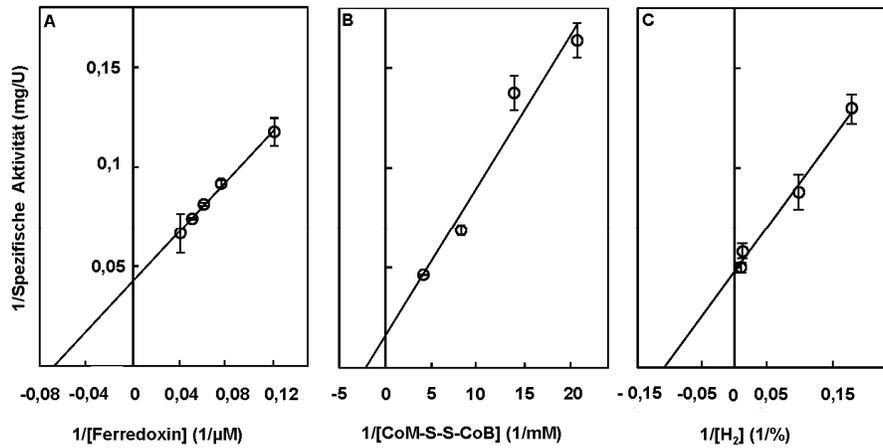
Die Rate der Fd Reduktion mit 100% H<sub>2</sub> in der Gasphase erhöhte sich hyperbolisch mit den Fd und CoM-S-S-CoB-Konzentrationen, wobei die Hälfte der maximalen Rate bei einer Konzentration zwischen 10 und 20 µM Fd (bei 1 mM CoM-S-S-CoB und 100% H<sub>2</sub>) und zwischen 0,3 und 0,6 mM CoM-S-S-CoB (bei 33 µM Fd und 100% H<sub>2</sub>) beobachtet werden konnte (Abbildung 13A und B). Der apparente K<sub>m</sub> für die H<sub>2</sub>-Konzentration betrug etwa 5-10% in der Gasphase bei einer Konzentration von 33 µM Fd und 1 mM CoM-S-S-CoB (Abbildung 13C). Trotz der Verwendung von Perbunanstopfen ließ sich kein exakterer K<sub>m</sub> Wert für H<sub>2</sub> ermitteln.

Die CoM-S-S-CoB-abhängige MTZ-Reduktion folgte ebenfalls einer Michaelis-Menten Kinetik und zeigte apparente K<sub>m</sub>-Werte von ca. 100 µM für MTZ (bei 0,5 mM CoM-S-S-CoB und 100% H<sub>2</sub>), <0,1 mM für CoM-S-S-CoB (bei 0,15 mM MTZ und 100% H<sub>2</sub>) und <5% für H<sub>2</sub> in der Gasphase bei einer Konzentration von 0,15 µM MTZ und 0,5 mM CoM-S-S-CoB (Abbildung 14A-C).

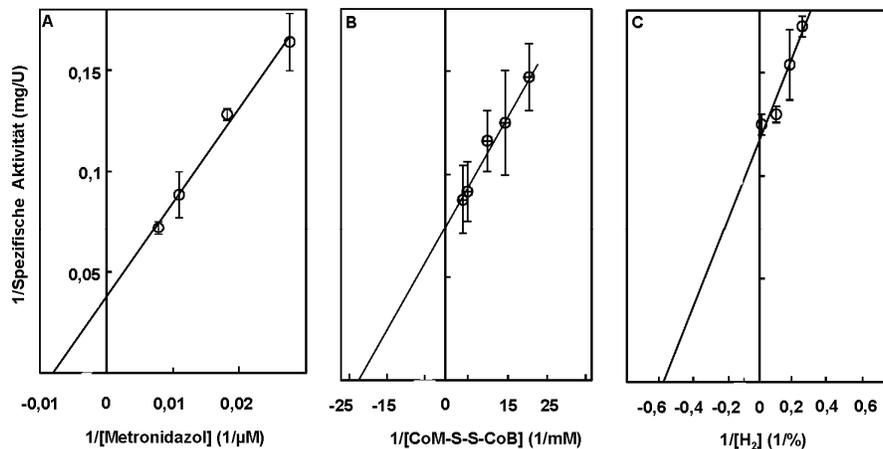
Der Unterschied bei den apparenten  $K_m$ -Werten für CoM-S-S-CoB-Konzentration mit Fd oder MTZ als Elektronenakzeptor, könnte dadurch erklärt werden, dass der Komplex die Reduktionen von Fd und CoM-S-S-CoB mit  $H_2$  wahrscheinlich über einen kinetischen Pingpong-Mechanismus katalysiert. Bei diesem Mechanismus ist der apparente  $K_m$  besonders stark von den Konzentrationen der anderen Substrate abhängig. Ein weiterer Grund für den unterschiedlichen apparenten  $K_m$  könnte sein, dass die Reduktion von MTZ mit  $H_2$  stark exergon, während die von Fd mit  $H_2$  endergon ist.



**Abbildung 12: (A) pH-, (B) Temperatur- und (C) Kaliumphosphat Konzentrations-Optima des gereinigten MvhADG/HdrABC Komplexes bei der CoM-S-S-CoB-abhängigen Katalyse der Reduktion von Ferredoxin (Fd) mit  $H_2$ .** Die Assays wurden bei 60°C in 1,5 mL anaeroben Küvetten durchgeführt, die 0,75 mL Flüssigkeit und 100%  $H_2$  in der Gasphase enthielten. Die Assays enthielten: 1 mM CoM-S-S-CoB; 33  $\mu$ M Fd und 1-10  $\mu$ g gereinigten MvhADG/HdrABC Komplex. Die Reduktion wurde durch Zugabe von Protein gestartet und photometrisch bei 390 nm verfolgt. Die Kaliumphosphat-Konzentration war 1,6 M, der pH 7 und die Temperatur 60°C oder wie angegeben.



**Abbildung 13: Lineweaver-Burk Auftragung der Raten der CoM-S-S-CoB-abhängigen Reduktion von Ferredoxin (Fd) mit H<sub>2</sub> gegen die Konzentration von Fd (A), CoM-S-S-CoB (B) und H<sub>2</sub> (C).** Die Assays wurden bei 60°C in 1,5 mL anaeroben Küvetten durchgeführt, die 0,75 mL Flüssigkeit und 100% H<sub>2</sub> in der Gasphase enthielten. Die Assays enthielten: 1,6 M Kaliumphosphat pH 7 und ~1-10 μg MvhADG/HdrABC Komplex. Die Reduktion wurde durch Zugabe von Komplex gestartet und photometrisch bei 390 nm verfolgt. Die Fd-Konzentration war 33 μM, die von CoM-S-S-CoB 1 mM und die von H<sub>2</sub> 100% in der Gasphase oder wie angegeben.



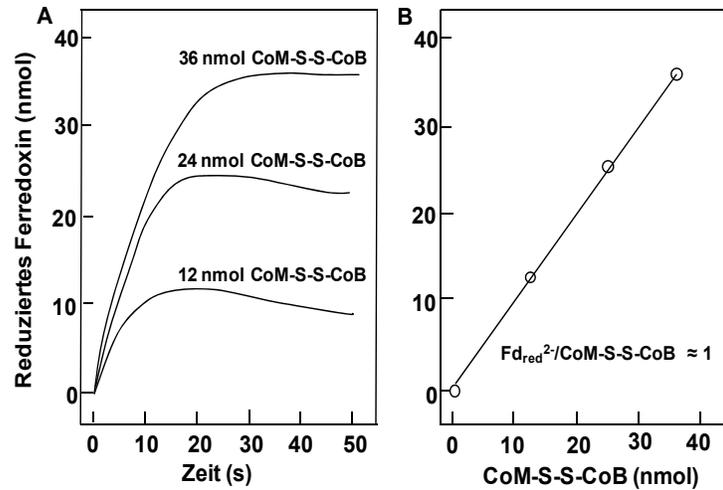
**Abbildung 14: Lineweaver-Burk Auftragung der Raten der CoM-S-S-CoB-abhängigen Reduktion von Metronidazol (MTZ) mit H<sub>2</sub> gegen die Konzentration von MTZ (A), CoM-S-S-CoB (B) und H<sub>2</sub> (C).** Die Assays wurden bei 60°C in 1,5 mL anaeroben Küvetten durchgeführt, die 0,75 mL Flüssigkeit und 100% H<sub>2</sub> in der Gasphase enthielten. Die Assays enthielten: 1,6 M Kaliumphosphat pH 7 und ~1-10 μg MvhADG/HdrABC Komplex. Die Reduktion wurde durch Zugabe von Komplex gestartet und photometrisch bei 320 nm verfolgt. Die MTZ-Konzentration war 150 μM, die von CoM-S-S-CoB 0,5 mM und die von H<sub>2</sub> 100% in der Gasphase oder wie angegeben.

## 2.4 Stöchiometrie der Kopplung von Ferredoxin-Reduktion mit H<sub>2</sub> und CoM-S-S-CoB-Reduktion mit H<sub>2</sub>

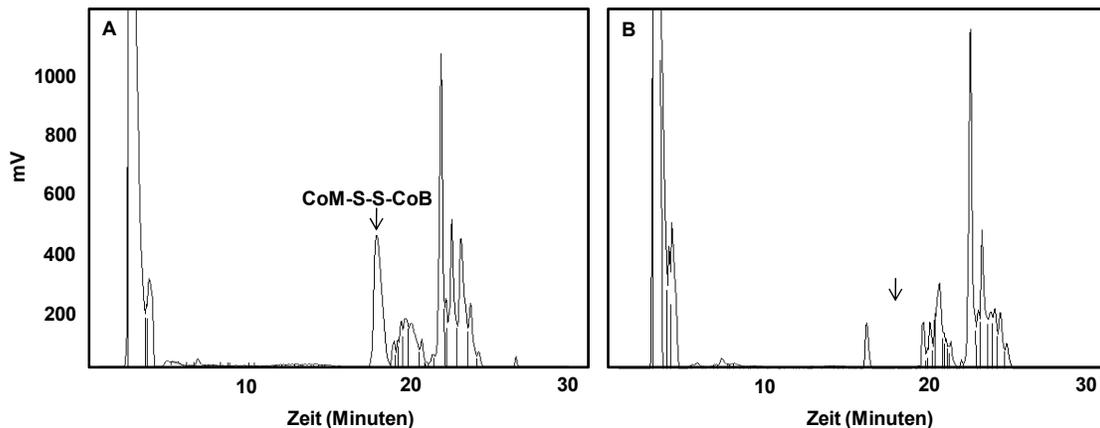
Die Abhängigkeit der Fd-Reduktion mit H<sub>2</sub> von CoM-S-S-CoB war der erste Hinweis darauf, dass der MvhADG/HdrABC Komplex die endergone Reduktion von Fd mit H<sub>2</sub> mit der exergonen Reduktion von CoM-S-S-CoB mit H<sub>2</sub> koppeln könnte. Daher stellte sich nun die Frage nach der Stöchiometrie der Kopplung. Dazu wurden die Mol-Mengen von reduziertem Fd oder MTZ mit H<sub>2</sub> pro Mol CoM-S-S-CoB ermittelt, in dem limitierte Mengen von CoM-S-S-CoB zu den Assays gegeben wurden (Abbildung 15 und Abbildung 17). Die beiden Tests unterscheiden sich insoweit, als dass die Reduktion von Fd mit H<sub>2</sub> unter Standardbedingungen endergon ist, die von MTZ jedoch exergon.

Der zeitliche Verlauf der Fd-Reduktion mit H<sub>2</sub> (100% in der Gasphase) in Gegenwart von drei limitierten CoM-S-S-CoB-Konzentrationen (12 nmol, 24 nmol und 36 nmol) ist in Abbildung 15A gezeigt. Die Fd-Reduktion verflacht nach wenigen Sekunden, gefolgt von einer langsameren Phase der Re-Oxidation (bei 12 und 24 nmol) (siehe Diskussion). Unter der Annahme einer 2-Elektronen-Reduktion von Fd und einer 2-Elektronen-Reduktion von CoM-S-S-CoB zeigt dieses Experiment, dass pro Mol reduziertem CoM-S-S-CoB zwei Mol H<sub>2</sub> oxidiert wurden, also eine 1:1 Stöchiometrie von Fd und CoM-S-S-CoB vorliegt.

Um zu überprüfen, ob das CoM-S-S-CoB vollständig reduziert wurde, wurden Proben des Assays vor und nach Zugabe des MvhADG/HdrABC Komplexes auf eine HPLC-Säule aufgetragen. Die HPLC-Analysen auf einer analytischen C8-Säule (siehe Material und Methoden, Synthese, Charakterisierung und Nachweis von Coenzymen) ergab, dass am Ende der Fd-Reduktion das eingesetzte CoM-S-S-CoB komplett verbraucht worden war (Abbildung 16). Eine Quantifizierung der Thiole war mit dieser Methode auf Grund von überlagernden Signalen allerdings nicht möglich.

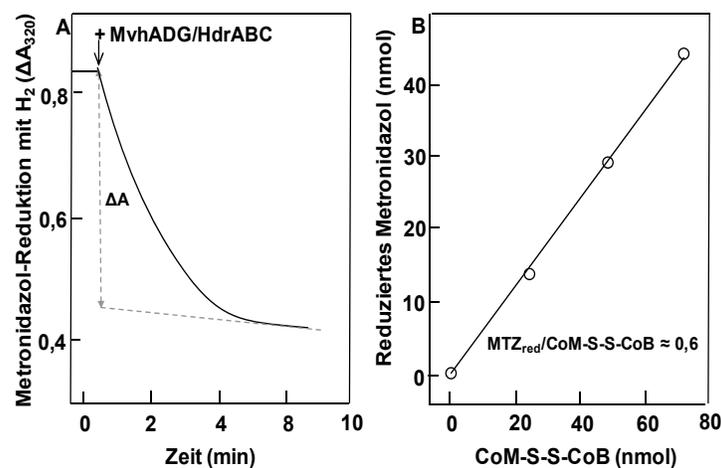


**Abbildung 15: MvhADG/HdrABC Komplex katalysierte Reduktion von Ferredoxin (Fd) mit 100% H<sub>2</sub> in Gegenwart von limitierenden CoM-S-S-CoB-Konzentrationen.** (A) Zeitlicher Verlauf der Fd-Reduktion mit 12 nmol CoM-S-S-CoB (33 nmol Fd), 24 nmol CoM-S-S-CoB (33 nmol Fd) und 36 nmol CoM-S-S-CoB (50 nmol Fd). (B) Menge des reduzierten Ferredoxins aufgetragen gegen die CoM-S-S-CoB-Konzentration. Die Assays wurden bei 40°C in 1,5 mL anaeroben Küvetten gemessen die 0,7 mL 1,6 M Kaliumphosphat pH 7, MvhADG/HdrABC Komplex (~0.1 Unit) aus *M. marburgensis*, Fd aus *C. pasteurianum* und CoM-S-S-CoB in den angegebenen Konzentrationen enthielten. Die Reduktion wurde mit MvhADG/HdrABC Komplex gestartet und photometrisch bei 390 nm verfolgt.

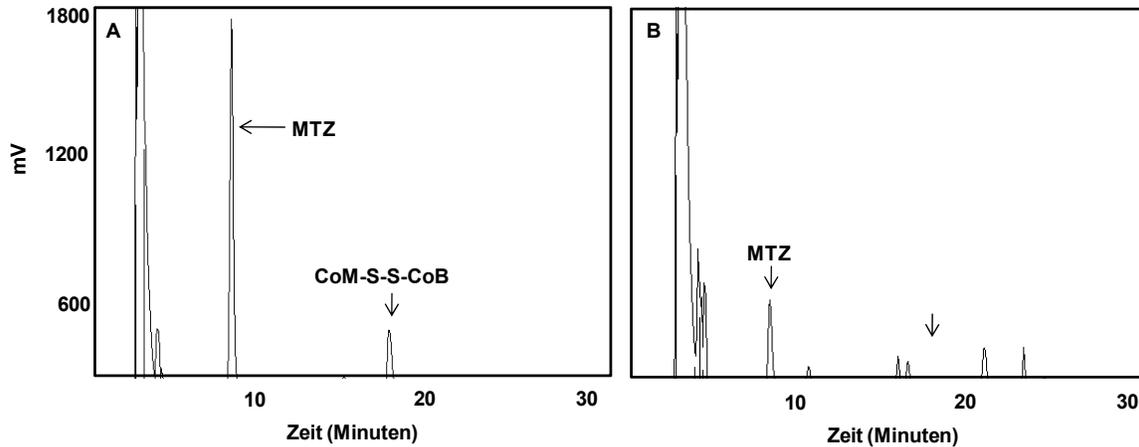


**Abbildung 16: HPLC Chromatogramme des Ferredoxin (Fd) Reduktionsansatzes vor (A) und nach (B) Zugabe des MvhADG/HdrABC Komplexes aus *M. marburgensis*.** Die Assays wurden bei 60°C in 1,5 mL anaeroben Küvetten durchgeführt, die 0,75 mL Flüssigkeit und 100% H<sub>2</sub> in der Gasphase enthielten. Der Assay enthielt: 1,6 M Kaliumphosphat pH 7, 33 µM Fd und 0,24 nmol CoM-S-S-CoB. Es wurde eine Probe entnommen und auf die HPLC Säule gegeben (A). Danach wurde die Reduktion mit 1 µg MvhADG/HdrABC Komplex gestartet. Nach 2 Minuten wurde wiederum eine Probe entnommen und auf die HPLC Säule gegeben (B).

Die MTZ-Reduktion mit  $H_2$  (100% in der Gasphase) in Gegenwart von limitierenden CoM-S-S-CoB-Konzentrationen war recht schwierig auszuwerten, da die Reduktion des MTZ langsam weiterlief, nachdem die erwarteten 0,5 Mol MTZ pro Mol CoM-S-S-CoB reduziert worden waren (Abbildung 17A). Die weitere Reduktion des MTZ ist wahrscheinlich auf die bei der Reaktion gebildeten Thiole CoM-SH und CoB-SH zurückzuführen, die langsam durch MTZ nicht-enzymatisch zu CoM-S-S-CoB reoxidiert werden und dadurch das so gebildete CoM-S-S-CoB erneut in die enzymatische Reaktion eingehen kann. Es wurde daher versucht, die Weiterreduktion durch Extrapolation zu korrigieren. Mit dieser Korrektur wurde eine Stöchiometrie von etwa 0,6 Mol reduziertem MTZ pro Mol CoM-S-S-CoB ermittelt (Abbildung 17B). Bei CoM-S-S-CoB-Konzentrationen unter 25  $\mu M$  nähert sich die Stöchiometrie allerdings 0,5 und bei einer Konzentration über 75  $\mu M$  0,7 an. Unter der Annahme einer 4-Elektronen-Reduktion von MTZ und einer 2-Elektronen-Reduktion von CoM-S-S-CoB zeigt dieses Experiment, dass pro Mol reduziertem CoM-S-S-CoB zwischen 2 und 2,4 Mol  $H_2$  oxidiert wurden. Auch hier ergab die HPLC-Analyse auf einer analytischen C8-Säule, dass am Ende der MTZ-Reduktion das eingesetzte CoM-S-S-CoB komplett verbraucht worden war (Abbildung 18).



**Abbildung 17: MvhADG/HdrABC Komplex katalysierte Reduktion von Metronidazol (MTZ) mit 100%  $H_2$  in Gegenwart von limitierenden CoM-S-S-CoB-Konzentrationen.** (A) Zeitlicher Verlauf der MTZ-Reduktion mit 90 nmol MTZ und 72 nmol CoM-S-S-CoB. (B) Menge des reduzierten MTZ aufgetragen gegen die CoM-S-S-CoB-Konzentration. Die Assays wurden bei 60°C in 1,5 mL anaeroben Küvetten gemessen die 0,7 mL 1,6 M Kaliumphosphat pH 7, MvhADG/HdrABC Komplex ( $\sim$ 0,1 Unit) aus *M. marburgensis*, MTZ (90 nmol) und CoM-S-S-CoB in den angegebenen Konzentrationen enthielten. Die Reduktion wurde mit MvhADG/HdrABC Komplex gestartet und photometrisch bei 320 nm verfolgt.



**Abbildung 18: HPLC Chromatogramme des Metronidazol (MTZ) Reduktionsansatzes vor (A) und nach (B) Zugabe des MvhADG/HdrABC Komplexes aus *M. marburgensis*.** Die Assays wurden bei 60°C in 1,5 mL anaeroben Küvetten durchgeführt, die 0,75 mL Flüssigkeit und 100% H<sub>2</sub> in der Gasphase enthielten. Der Assay enthielt: 1,6 M Kaliumphosphat pH 7, 0,15 mM MTZ und 0,24 nmol CoM-S-S-CoB. Es wurde eine Probe entnommen und auf die HPLC Säule gegeben (A). Danach wurde die Reduktion mit 1 µg MvhADG/HdrABC Komplex gestartet. Nach 2 Minuten wurde wiederum eine Probe entnommen und auf die HPLC Säule gegeben (B).

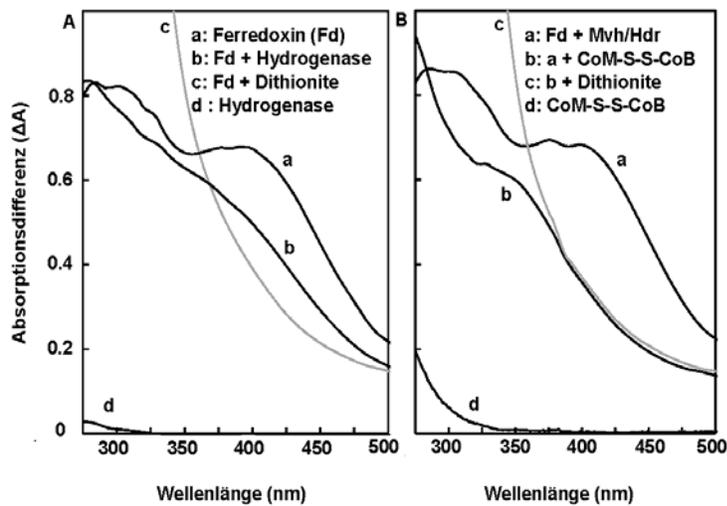
## 2.5 Energetische Kopplung

Ein endgültiger Beweis dafür, dass der MvhADG/HdrABC Komplex die endergone Reduktion von Fd mit H<sub>2</sub> mit der exergonen Reduktion von CoM-S-S-CoB mit H<sub>2</sub> koppelt, konnte mit dem in Abbildung 19 dargestellten Experiment erbracht werden. Es zeigt, dass die Reduktion von Fd mit H<sub>2</sub> über die erwartete Gleichgewichtskonzentration einer nicht-gekoppelten Reaktion hinaus geht und damit auch energetisch gekoppelt ist.

In Abbildung 19A ist die Reduktion von Fd mit 100% H<sub>2</sub> bei pH 7 und 1,2 bar ( $E_o' = -414$  mV) zu sehen, welche durch die [FeFe]-Hydrogenase aus *C. pasteurianum* (nicht-gekoppelte Reaktion) katalysiert wurde. In Abbildung 19B ist die Reduktion von Fd durch den MvhADG/HdrABC Komplex in Gegenwart von CoM-S-S-CoB (gekoppelte Reaktion) dargestellt. In der nicht-gekoppelten Reaktion wurde das Fd ( $E_o' = -400$  mV) (Smith et al. 1991) auf etwa 55% reduziert ( $E' = -410$  mV), in der gekoppelten Reaktion hingegen auf fast 100% ( $E' \approx -500$  mV), wobei die Reduktion

von Fd mit Natriumdithionit ( $E_o' = -660$  mV) (Mayhew 1978) ( $\Delta\epsilon = 11.000$  M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) (Uyeda and Rabinowitz 1971) als Vergleich diente.

Eine 100%ige Reduktion mit H<sub>2</sub> (100% bei 1 bar) ist thermodynamisch nur dann möglich, wenn die endergone Reduktion von Fd mit H<sub>2</sub> mit der exergonen Reduktion von CoM-S-S-CoB ( $E_o' = -140$  mV) mit H<sub>2</sub> gekoppelt ist ( $E_o' = -414$  mV). Das im Experiment verwendete Fd hatte einen  $\Delta A_{390/280}$  von 0,8, was zeigt, dass es sauber und nicht schon teilweise denaturiert war (Schönheit et al. 1978).



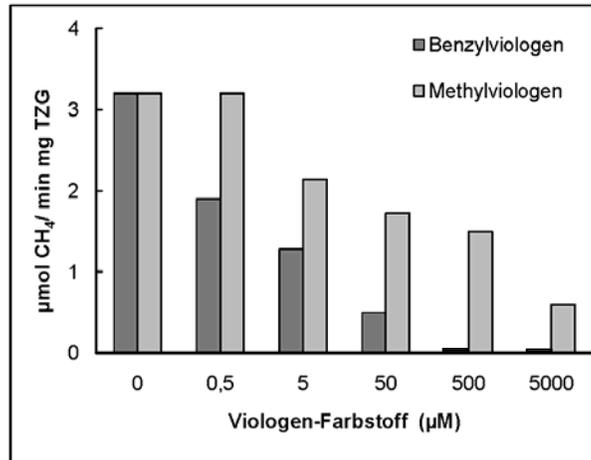
**Abbildung 19: Reduktion von Clostridium-Ferredoxin mit 100% H<sub>2</sub>, katalysiert durch (A) die [FeFe]-Hydrogenase aus *Clostridium pasteurianum* und durch (B) den MvhADG/HdrABC Komplex aus *M. marburgensis* in Gegenwart von CoM-S-S-CoB.** Die 1,5 mL anaeroben Küvetten enthielten 0,7 mL 1,6 M Kaliumphosphat pH 7 und dort wo angegeben Ferredoxin (20  $\mu$ M), [FeFe]-Hydrogenase (~1 Unit), MvhADG/HdrABC Komplex (~0,5 Units), CoM-S-S-CoB (0,5 mM) und/oder Natriumdithionit (0,5 mM). Die Gasphase bestand aus 100% H<sub>2</sub> (1,2 bar) und die Reduktionen wurden bei 40°C gemessen.

### 3. Nicht interpretierbare oder nicht auswertbare Ergebnisse

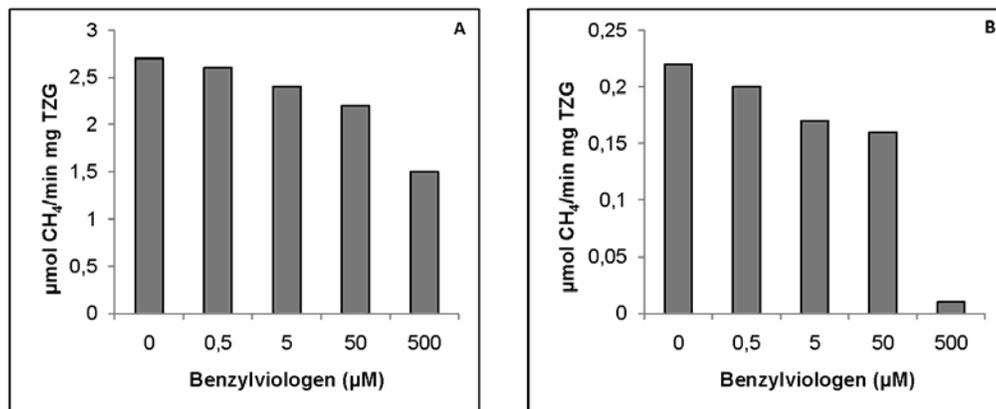
Dieser Teil befasst sich mit Versuchen, die entweder zu nicht interpretierbaren Ergebnissen geführt haben oder zu Ergebnissen, die nicht aussagekräftig waren. Ersteres war der Fall bei den Versuchen, eine entkoppelnde Wirkung von Viologen-Farbstoffen auf die Methanbildung aus  $H_2$  und  $CO_2$  in Zellsuspensionen nachzuweisen und letzteres bei den Versuchen, die Reduktion von CoM-S-S-CoB über die Bildung von CoM-SH und CoB-SH zu verfolgen.

**Methanbildungsraten mit und ohne Viologene.** Aus Abbildung 10 geht hervor, dass Viologene bei sehr niedrigen Konzentrationen die Kopplung der Reduktion von Ferredoxin (Metronidazol) und CoM-S-S-CoB mit  $H_2$  über den MvhADG/HdrABC Komplex aufheben. Daraus ergab sich die Frage, ob Viologene vielleicht spezifisch die Methanbildner hemmen, die den ersten und letzten Schritt der Methanogenese aus  $CO_2$  und  $H_2$  über den MvhADG/HdrABC Komplex koppeln. Es wurde daher getestet, inwieweit Viologen-Farbstoffe die Methanogenese in Cytochrom-freien und Cytochrom-haltigen Methanogenen beeinflussen. Dazu wurden die Methanbildungsraten für Zellsuspensionen von *M. marburgensis*, *M. arboriphilus* sowie *M. barkeri* mit und ohne Viologen-Farbstoffe bestimmt. In Abbildung 20 sind die Ergebnisse für Zellsuspensionen von *M. marburgensis* dargestellt, denen entweder Benzylviologen (BV) oder Methylviologen (MV) zugesetzt wurde. Die Methanbildungsrate ohne den Zusatz von Viologenen stimmte mit zuvor publizierten Daten überein (Perski et al. 1982). Bei der Messung der Methanbildungsraten mit Viologen-Farbstoffen hatte BV, wahrscheinlich auf Grund seiner größeren Hydrophobizität, einen stärkeren Effekt als MV. Bei Zusatz von 5  $\mu M$  BV war die Methanbildung bereits zu etwa 50% gehemmt und bei einer Konzentration von 500  $\mu M$  BV war keine Methanbildung mehr nachweisbar. Im Zellextrakt von *M. marburgensis* reichten ca. 25  $\mu M$  BV aus, um die MvhADG/HdrABC katalysierten Reduktionen zu 100% zu entkoppeln.

Da BV einen stärkeren Effekt als MV auf die Methanbildungsrate hatte, wurde bei *M. arboriphilus* und *M. barkeri* Zellsuspensionen nur noch die Zugabe von BV getestet. In Abbildung 21A sind die Ergebnisse für Zellsuspensionen von *M. arboriphilus* und in Abbildung 21B für *M. barkeri* dargestellt.



**Abbildung 20: Methanbildungsraten von Zellsuspensionen von *M. marburgensis* in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen Benzyl- oder Methylviologen.** Die Methanbildung wurde in 150 mL Müller-Krempel-Flaschen mit 80%iger H<sub>2</sub>/20%iger CO<sub>2</sub> Gasphase bei 60°C und 200 Upm mit Zellsuspensionen unterschiedlicher Konzentrationen in 50 mM Kaliumphosphat pH 7 mit 25 mM NaCl, 2 mM DTT und 2 mM MgCl<sub>2</sub> gemessen. Die Raten errechneten sich aus der Anfangsteigung. TZG = Trockenzellgewicht.



**Abbildung 21: Methanbildungsraten von Zellsuspensionen von (A) *M. arboriphilus* und (B) *M. barkeri* in Gegenwart von verschiedenen Konzentration Benzylviologen.** Die Methanbildung wurde in 150 mL Müller-Krempel-Flaschen mit 80%iger H<sub>2</sub>/20%iger CO<sub>2</sub> Gasphase bei 37°C und 200 Upm mit Zellsuspensionen unterschiedlicher Konzentrationen in 50 mM Kaliumphosphat pH 7 mit 25 mM NaCl, 2 mM DTT und 2 mM MgCl<sub>2</sub> gemessen. Die Raten errechneten sich aus der Anfangsteigung. TZG = Trockenzellgewicht.

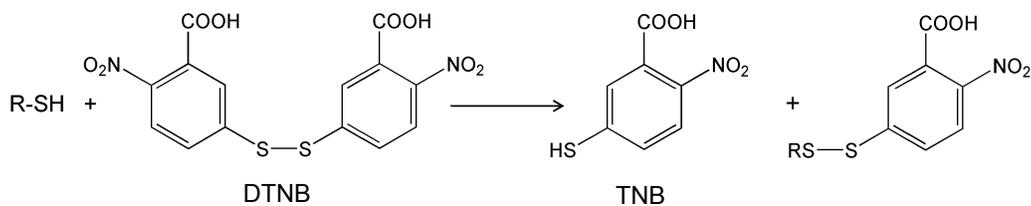
Bei dem Vergleich zwischen Cytochrom-freien und Cytochrom-haltigen Organismen fällt auf, dass zwar *M. marburgensis* im Vergleich zu *M. barkeri* stärker in der Methanbildung aus  $H_2$  und  $CO_2$  durch BV gehemmt wird, dass das aber nicht für *M. arboriphilus* zutrifft. Tatsächlich wurde *M. arboriphilus* von BV auch bei höheren Konzentrationen so gut wie gar nicht in seiner Methanbildungsaktivität beeinflusst. Die Ergebnisse lassen sich leider nicht schlüssig interpretieren.

### **Quantifizierung geringer Konzentrationen CoM-SH und CoB-SH bei der CoM-S-S-CoB-Reduktion**

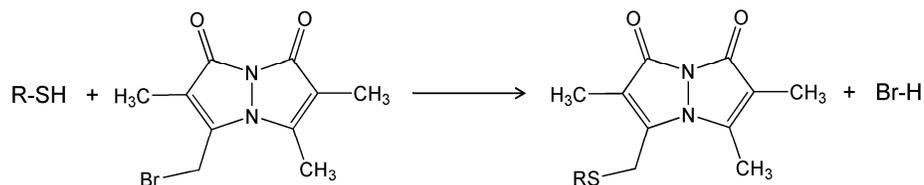
Zu Beginn der Arbeit wurde versucht, die vom MvhADG/HdrABC Komplex katalysierte Reduktion von CoM-S-S-CoB über die Thiolbildung von CoM-SH und CoB-SH mit dem Ellmans Reagenz (5,5'-Dithiobis-2-Nitrobenzoesäure = DTNB) zu bestimmen (Setzke et al. 1994) (Abbildung 22) (siehe Material und Methoden). Der Ellmans Assay ist eine der am meisten verbreiteten Methoden der Thiol-quantifizierung. Es bildet sich ein gelber Farbstoff (2-Nitro-5-Thiobenzoessäureanion = TNB), der bei 412 nm einen Extinktionskoeffizienten von  $14 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  hat (Riddles et al. 1983). Die Nachweisgrenze für diesen Assay liegt bei ca.  $3 \mu\text{M}$ , was etwa 3 nmol in einem typischen 1 mL Ansatz entspricht (Hansen et al. 2007). Sie ist aber wesentlich höher, wenn Hintergrundkonzentrationen von Thiolen vorhanden sind, und wenn Absorptionsänderungen im gelben Spektralbereich stattfinden, die nicht auf die Bildung des TNB basieren. Beides war in den Versuchen, die MvhADG/HdrABC Aktivität über den Ellmans Assay zu verfolgen, der Fall. Für die Reinigung von aktivem Enzymkomplex musste den Elutionspuffern DTT (2 mM) zugesetzt werden, was zu hohen Hintergrundkonzentrationen führte. Um hohe Aktivität zu erhalten, musste den Tests Fd zugesetzt werden, welches im gelben Spektralbereich stark absorbiert und bei der Reduktion gebleicht wird (Abbildung 19). Hohe Aktivitäten wurden auch durch Zugabe von Metronidazol erzielt, das nicht im gelben Spektralbereich absorbiert, dafür aber spontan mit Thiolen unter Reduktion reagiert, was an der Abnahme der Absorption bei 320 nm verfolgt werden konnte (Abbildung 17A). Mit dem Ellmans Assay war es für diese Problemstellung daher nicht möglich, verwertbare Ergebnisse zu erzielen.

Thiole lassen sich auch sehr empfindlich mit Monobrombiman (Abbildung 23) nachweisen (Fahey et al. 1981; Newton et al. 1981; Fahey and Newton 1982). Die Bimanderivate fluoreszieren nach Anregung mit 420 nm und sind bei 520 nm quantifizierbar. Obwohl Fd diesen Assay nicht stört, war er auf Grund der hohen Thiol Hintergrundkonzentrationen ebenfalls nicht geeignet. Außerdem reagiert Brombiman auch mit Alkoholen und Aminofunktionen (Kosower et al. 1980), was vor der photometrischen Bestimmung eine Trennung der Bimanderivate notwendig macht.

Ein weiteres Problem bei den beiden zuvor beschriebenen Assays ist ihre relativ lange Reaktionszeit, ein kontinuierliches Verfolgen der CoM-SH- und CoB-SH-Bildung wie in einem kinetischen Assay war mit DTNB und Monobrombiman nicht möglich: Beide Assays sind indirekt, das heißt es müssen Proben aus dem Reaktionsgefäß in verschiedenen Zeitabständen entnommen werden, die dann erst auf Thiole hin analysiert werden.

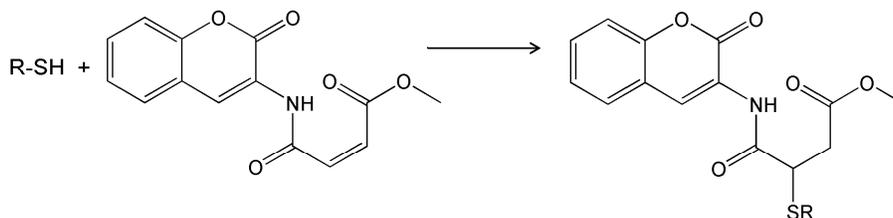


**Abbildung 22: Thiolnachweis mit dem Ellmans Reagenz (DTNB = 5,5'-Dithiobis-2-Nitrobenzoesäure.** Das 2-Nitro-5-Thiobenzoatesäureanion (TNB<sup>-</sup>) kann bei 412 nm spektroskopisch detektiert werden.



**Abbildung 23: Thiolnachweis mit Monobrombiman.** Das entstandene Produkt kann im Fluoreszenzspektrometer bei 520 nm nachgewiesen werden (Anregung bei 420 nm).

In dem Journal „Angewandte Chemie“ wurde 2009 ein Fluoreszenzfarbstoff publiziert, der eine schnelle (10 ms), hochselektive und hochempfindliche (0,1 pmol) Thiol-Quantifizierung versprach (Yi et al. 2009) (Abbildung 24). Eine kinetische Echtzeitdetektion bei 480 nm mit einem hohen Signal-Rausch-Verhältnis schien mit diesem Assay möglich. Die Ergebnisse der Publikation ließen sich allerdings nicht reproduzieren. Zum einen ließ sich die beschriebene Synthese der Verbindung nicht reproduzieren, obwohl viel Zeit darauf verwendet wurde. Zum anderen wurden mit der Verbindung, die dann letztlich von der Firma Synthron (Wolfen) gekauft wurde, Reaktionszeiten und Signal-Rausch-Verhältnisse mit Glutathion erhalten, die kaum besser waren als die, die mit dem Ellmans Reagenz gemessen worden waren.



**Abbildung 23: Thiolnachweis nach Yi et al. 2010.** Das entstandene Produkt soll im Fluoreszenzspektrometer bei 480 nm nachgewiesen werden (Anregung bei 400 nm).

## Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass der gereinigte MvhADG/HdrABC Komplex aus dem Cytochrom-freien Organismus *M. marburgensis* die CoM-S-S-CoB-abhängige Reduktion von Ferredoxin mit  $H_2$  und die Ferredoxin-abhängige Reduktion von CoM-S-S-CoB mit  $H_2$  mit einer 1:1 Stöchiometrie katalysiert und damit die beiden Reduktionen über einen Elektronenbifurkations-Mechanismus miteinander gekoppelt sind. Durch die Experimente kann nun die unterschiedliche Art der Kopplung von Methanbildung und ATP-Synthese zu Cytochrom-haltigen Methanogenen erklärt werden, die sich in den unterschiedlichen Wachstumserträgen und  $H_2$ -Schwellenkonzentrationen der beiden Organismen-Gruppen widerspiegelt.

### $H_2$ -Schwellenkonzentrationen und Wachstumserträge

Die ermittelten Wachstumserträge ( $Y_{(CH_4)}$ ) von ca. 2 g/mol für *M. marburgensis* und *M. arboriphilus* und von ca. 7 g/mol für *M. barkeri* stimmen mit den Literaturwerten (Tabelle 3) überein. Für die Cytochrom-freien Methanogenen würde sich aus diesem Wert eine ATP Ausbeute von 0,3 berechnen. Vergleicht man diesen Wert mit den 0,75 ATP, der sich aus der  $H_2$ -Schwellenkonzentration von ca. 8 Pa berechnet, so ergibt sich allerdings eine große Diskrepanz. Zu bedenken ist aber, dass Cytochrom-freie Methanogene auf  $H_2$  und  $CO_2$  in einer Batch-Kultur bei hohen Begasungsraten, das heißt hohen  $H_2$ -Konzentrationen, erstaunlicherweise einen geringeren Wachstumsertrag (ca. 1,5 g/mol) haben, als wenn sie bei niedrigen  $H_2$ -Konzentrationen wachsen (ca. 3,5 g/mol) und dies, obwohl die Organismen bei hohen Begasungsraten schneller wachsen als bei niedrigen (Schönheit et al. 1980; Morgan et al. 1997; de Poorter et al. 2007). Bei einem Wachstumsertrag von 3,5 g/mol (Tabelle 3) würde sich eine ATP Ausbeute von etwa 0,5 ATP ergeben. Die geringeren Wachstumserträge, die auch in den Experimenten dieser Arbeit gemessen wurden, könnten teilweise dadurch erklärt werden, dass aus den Kulturen CO gewaschen wird (Conrad and Thauer 1983), und CO ein Zwischenprodukt bei der autotrophen  $CO_2$ -Fixierung ist, das aus  $CO_2$  in einer endergonen Reaktion gebildet wird (Eikmanns et al. 1985). Die geringen Wachstumserträge könnten auch das Ergebnis einer Entkopplung der Ferredoxin Reduktion mit  $H_2$  und der CoM-S-S-CoB-Reduktion mit  $H_2$  bei hoher  $H_2$ -Konzentration sein. Ökologisch würde dies sogar Sinn machen, bedenkt man, dass die  $H_2$ -Konzentration in der natürlichen Umgebung

der Methanogenen in der Regel sehr niedrig ist ( $<10$  Pa). Sie muss durch die Methanogenen auch niedrig gehalten werden, damit sich Carbonsäuren als Zwischenprodukte bei der syntrophen Umsetzung von Biomasse (z. B. bei der Glukosevergärung) nicht ansammeln können (Thauer et al. 2008). Durch eine Versäuerung der Lebensräume würde die Mineralisation der Organismen gehemmt werden. Interessanterweise ist auch der Wachstumsertrag von *M. barkeri* auf  $H_2$  und  $CO_2$  ähnlich abhängig von der  $H_2$ -Konzentration (Weimer and Zeikus 1978), was darauf hinweist, dass dieses Phänomen unabhängig vom Kopplungs-Mechanismus der Methanbildung und ATP-Synthese ist.

Die höhere  $H_2$ -Schwellenkonzentration bei Cytochrom-haltigen Methanogenen, die in dieser Arbeit zum ersten Mal bestimmt wurde, kann erklären, warum die Mitglieder der *Methanosarcinales* in der Regel nicht an Methanbildung aus  $H_2$  und  $CO_2$  in den meisten methanogenen Lebensräumen beteiligt sind. In einigen Mitgliedern, e. g. in *Methanosarcina acetivorans*, ist die Transkription der Gene für die Hydrogenasen sogar dauerhaft ausgeschaltet (Guss et al. 2009). Im Ausgleich dafür besitzen sie aber ein breiteres Substratspektrum als Cytochrom-freie Methanogene.

### **Der MvhADG/HdrABC Komplex in Cytochrom-freien Methanogenen**

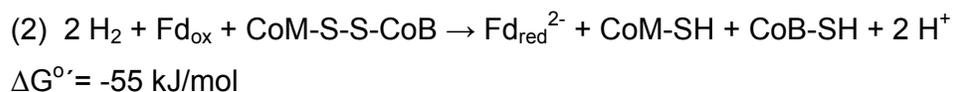
Der MvhADG/HdrABC Komplex, der in *M. marburgensis* die Reduktion von CoM-S-S-CoB mit  $H_2$  mit der Reduktion von Ferredoxin mit  $H_2$  koppelt, wird in den meisten methanogenen Archaea gefunden. Einige Ausnahmen bilden allerdings Organismen der Cytochrom-freien *Methanomicrobiales* (Anderson et al. 2009). In ihren Genomen - eine Ausnahme ist *Methanoculleus marisnigri* - fehlen die Gene für MvhA und MvhG. Sie enthalten aber die Gene für MvhD und HdrABC, die nebeneinander liegen. Es wurde daher vorgeschlagen, dass in diesen Methanogenen ein MvhD/HdrABC Komplex mit einer der Energie-konvertierenden Hydrogenasen (Eha, Ehb, Ech oder Mbh) assoziiert ist (Anderson et al. 2009). Die Folge dieser Interpretation aber wäre, dass in den meisten *Methanomicrobiales* die CoM-S-S-CoB-Reduktion mit  $H_2$  Energie verbrauchen würde, da verschiedenen Energie-konvertierenden Hydrogenasen haben alle die gleiche Topologie und daher auch die gleiche Funktion haben, nämlich die Energie-verbrauchende Reduktion von Ferredoxin mit  $H_2$  zu katalysieren. Nicht im Einklang mit dieser Interpretation ist,

dass *Methanospirillum hungatei* (einer der *Methanomicrobiales* ohne *mvhA* und *mvhG*) wie *M. marburgensis* eine H<sub>2</sub>-Schwellenkonzentration in der Nähe von 8 Pa zeigt. (Scholten and Conrad 2000; Plugge et al. 2009) (Tabelle 3).

Eine alternative Hypothese wäre, dass in den Cytochrom-freien Methanogenen denen die Gene für MvhA und MvhG fehlen, die beiden Untereinheiten durch die FrhA (große Untereinheit) und FrhG (kleine Untereinheit) der F<sub>420</sub>-reduzierenden Hydrogenase (FrhABG) ersetzt werden. Alle Methanogenen ohne Cytochrome enthalten Gene für dieses Enzym. FrhA und G wären somit sowohl in einem vermeintlichen FrhAG/MvhD/HdrABC Komplex als auch im FrhABG Komplex präsent. Es gibt Präzedenzfälle für ein solches Teilen von Untereinheiten: So teilen sich z. B. die Molybdän-haltige Formylmethanofuran Dehydrogenase FwdA/FmdBCE und die Wolfram-haltige Formylmethanofuran Dehydrogenasen FwdA-DFGH von *M. marburgensis* die Untereinheit FwdA und der Pyruvatdehydrogenase Komplex und der 2-Oxoglutarat Dehydrogenase Komplex aus *E. coli* teilen sich die Lipoamid Dehydrogenase-Untereinheit (Hochheimer et al. 1996). Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass sich im Genom von *Methanoregula boonei*, einem weiteren Organismus der Ordnung der *Methanomicrobiales*, zusätzlich zu der *frhADGB* Transkriptionseinheit putative Gene für eine große Untereinheit (NCBI Mboo\_2023) und eine kleine Untereinheit (NCBI Mboo\_1398) der F<sub>420</sub>-reduzierenden [NiFe]-Hydrogenase finden (Thauer et al. 2010).

### **Stöchiometrie der Kopplung von Ferredoxin-Reduktion mit H<sub>2</sub> und CoM-S-S-CoB-Reduktion mit H<sub>2</sub>**

Das Experiment in Abbildung 15 und viele andere dieser Art lassen erkennen, dass pro Mol CoM-S-S-CoB (2 Elektronen-Akzeptor) ein Mol Fd (2 Elektronen-Akzeptor) mit 2 H<sub>2</sub> reduziert wird (Reaktion 2).



Im Hinblick auf die exakte Stöchiometrie bleibt allerdings eine gewisse Unsicherheit. Wegen des hohen Extinktionskoeffizienten von oxidiertem und reduziertem Fd

(Abbildung 19) musste die Stöchiometrie bei relativ niedrigen Konzentrationen von Fd und somit auch bei niedrigen CoM-S-S-CoB-Konzentrationen bestimmt werden. Bei diesen niedrigen Konzentrationen lassen sich die Konzentrationen von CoM-SH und CoB-SH über HPLC oder Thiolquantifizierungs-Methoden, wie bereits im Ergebnisteil ausgeführt (siehe Seite 52), kaum zuverlässig ermitteln. Die Reduktion von Fd wird zwar häufig über die H<sub>2</sub>-Bildung in Gegenwart von Clostridium-Hydrogenase verfolgt, welches dem Fd ermöglicht, sich viele Male umzusetzen (Li et al. 2008; Wang et al. 2010), diese Methode kann aber natürlich nicht angewendet werden, wenn Fd wie hier mit H<sub>2</sub> reduziert wird.

Warum das reduzierte Fd in den vorliegenden Experimenten bei geringen CoM-S-S-CoB-Konzentrationen langsam wieder reoxidierte, ist momentan nicht ganz verstanden. Es könnte auf Verunreinigungen des MvhADG/HdrABC Komplexes mit winzigen Mengen Fd-abhängiger Hydrogenasen aus *M. marburgensis* (EhaA-T/EhbA-Q) zurückzuführen sein (Tersteegen and Hedderich 1999) oder aber auf Verunreinigungen des Fd aus *C. pasteurianum* mit winzigen Mengen von Clostridium-Hydrogenase. Letzteres scheint trotz der vielen Aufreinigungsschritte bei der Fd-Präparation wahrscheinlich. Mit dem Gaschromatograph ließ sich H<sub>2</sub>-Bildung nachweisen, wenn Fd mit einem  $\Delta A_{390/280}$  Verhältnis <0,78 mit Ti(III)citrat reduziert wurde. Die H<sub>2</sub>-Bildung nahm nach einer Reinigung des Fd mit einer Q-Sepharose (Li et al. 2008) und dem damit verbundenen Abtrennen eines Teils der Hydrogenase deutlich ab, gleichzeitig verbesserte sich auch das  $A_{390nm/280nm}$  Verhältnis.

Die Reduktion des MTZ (4 Elektronen-Akzeptor) bei limitierten CoM-S-S-CoB-Konzentrationen ergab eine Stöchiometrie zwischen 0,5 und 0,7 zu 1. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass der künstliche Elektronenakzeptor MTZ ein weitaus positiveres Redoxpotential als Fd ( $E_o' = -400$  mV) hat und deshalb MTZ auch Elektronen von Thiolen und von dem reduzierten MvhADG/HdrABC Komplex akzeptieren kann bei Redox-Potentialen, die für die Fd-Reduktion schon zu positiv sind. Die langsame Weiterreduktion des MTZ über die Stöchiometrie von 0,5:1 hinaus ist wahrscheinlich auf die bei der Reaktion gebildeten Thiole CoM-SH und CoB-SH zurückzuführen. Diese reoxidieren wieder – diesmal nicht-enzymatisch – langsam zu CoM-S-S-CoB, das seinerseits die Reduktion von MTZ mit H<sub>2</sub>, katalysiert durch den MvhADG/HdrABC Komplex, weiter stimuliert. Auch CoM-SH,

DTT und FAD in der Enzym-Stammlösung könnten zu einer CoM-S-S-CoB-unabhängigen MTZ-Reduktion beitragen. Die Nachbildung von CoM-S-S-CoB aus den beiden Homodisulfiden CoM-S-S-CoM und CoB-S-S-CoB spielte bei dieser Reaktion kaum eine Rolle, da die Raten der Nachbildung bei den vorliegenden starken Verdünnungen vernachlässigbar waren (siehe Seite 35).

### **Energetische Kopplung der CoM-S-S-CoB- und Ferredoxin-Reduktion mit H<sub>2</sub>**

Bei  $Fd_{red}^{2-}/Fd_{ox}$  Verhältnissen von über 100 nähert sich das Redoxpotential ( $E'$ ) des Fd von *C. pasteurianum* ( $E_o' = -400$  mV) den  $-500$  mV an. Das Redoxpotential ( $E_o'$ ) von  $2 H^+/H_2$  beträgt aber  $-414$  mV. Daher kann Fd nur fast vollständig mit H<sub>2</sub> (100% bei 1 bar) bei pH 7 reduziert werden, wenn die Reduktion energiegetrieben ist. Das Ergebnis aus Abbildung 19B zeigt, dass der MvhADG/HdrABC Komplex die vollständige CoM-S-S-CoB-abhängige Reduktion des Fd mit H<sub>2</sub> katalysiert (100%, bei 1 bar). Das Experiment beweist eindeutig, dass über den Komplex die endergone Reduktion von Fd mit H<sub>2</sub> (Reaktion 1a) mit der exergonen Reduktion von CoM-S-S-CoB mit H<sub>2</sub> (Reaktion in Abbildung 2) gekoppelt ist.

Es wäre interessant gewesen zu testen, ob die energetische Kopplung der beiden Reduktionen auch mit weniger H<sub>2</sub> funktioniert. Aus thermodynamischen Gesichtspunkten macht es aber nur Sinn, die H<sub>2</sub>-Konzentration um mindestens eine Zehnerpotenz zu erniedrigen. Über den Bunsenkoeffizient kann man die H<sub>2</sub>-Menge berechnen, die sich bei einer bestimmten Temperatur in der flüssigen Phase löst. Bei 1 bar (100%) und 40°C lösen sich ca. 700 nmol H<sub>2</sub> (Thauer et al. 2010), genug, um die ca. 30 nmol Fd in Gegenwart von CoM-S-S-CoB über den MvhADG/HdrABC Komplex zu reduzieren. Bei nur noch 10% H<sub>2</sub> in der Gasphase war für eine vollständige Reduktion des Fd zwar gerade noch genügend H<sub>2</sub> in der Flüssigkeit gelöst (es werden ja 2 H<sub>2</sub> benötigt!), aber gegen Ende der Reduktion war die H<sub>2</sub>-Konzentration zu niedrig und die Reduktion wurde zu langsam, als dass der Endpunkt erreicht werden konnte. So wurde das Fd nur zu ca. 65% reduziert.

Aus der Änderung der freien Enthalpie  $\Delta G^0 = -55$  kJ/mol und der spezifischen Aktivität, mit der der gereinigte MvhADG/HdrABC Komplex Reaktion 3 katalysiert ( $\sim 100$  U/mg), kann über die Haldane Gleichung ( $K_{eq}$  = katalytische Effizienz der

Hinreaktion/katalytische Effizienz der Rückreaktion) abgeschätzt werden, dass die Geschwindigkeit der Rückreaktion im besten Fall 1 pmol pro min und mg Protein ist (Mahler and Cordes 1971). Daher schlugen auch alle Versuche fehl, die H<sub>2</sub>-Bildung aus CoM-SH, CoB-SH und reduziertem Fd (reduziert mit Titan(III)citrat) durch den MvhADG/HdrABC Komplex zu zeigen (nicht dargestellt).

### **Unspezifische Stimulierung der Aktivität des MvhADG/HdrABC Komplexes**

Der MvhADG/HdrABC Komplex benötigt hohe Kaliumphosphat-Konzentrationen, um die Reduktion von Ferredoxin oder Metronidazol und CoM-S-S-CoB mit H<sub>2</sub> optimal katalysieren zu können. Dies lässt darauf schließen, dass der Komplex eine bestimmte Konformation für eine gute Aktivität braucht. Die Beobachtung, dass Salze die Aktivitäten beeinflussten, wurde schon 1994 von Setzke et al. gemacht. Lyotrope Salze wie Kaliumphosphat erhöhten die Aktivität, chaotrope Salze hemmten sie hingegen. Da die Aktivität sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von 1,6 M Kaliumphosphat (als lyotropes Salz) linear mit der eingesetzten Proteinmenge zunahm, beruht die Steigerung der Aktivität durch Kaliumphosphat demnach nicht auf der Aggregation von Subkomplexen zu einem aktiven Komplex. Es ist möglich, dass hydrophobe Wechselwirkungen die Anordnung der Redoxzentren optimieren und damit einen gesteigerten Elektronentransport ermöglichen. Ein solcher Effekt wurde bereits für eine NADPH: Cytochrom *P*-450 Reduktase beschrieben (Nisimoto and Edmondson 1992). Hohen Kaliumchlorid-Konzentrationen verstärkten die Wechselwirkungen zwischen einer hydrophoben Region der FMN-bindenden Proteindomäne der Reduktase und einer hydrophoben Region des Cytochroms.

In den Arbeiten von Setzke et al., 1994 wurden außerdem eine periphere Membrankomponente von 5-7 kDa beschrieben, die die Reduktion von CoM-S-S-CoB mit H<sub>2</sub>, katalysiert durch den gereinigten MvhADG/HdrABC Komplex, von ca. 1 U/mg auf 6 U/mg stimulierte. Diese stimulierende Wirkung ging nach Trypsinverdau verloren. Bei dem Protein handelte es sich nicht um ein Ferredoxin, da es ein reines Proteinspektrum zeigte. Auch wäre die Aktivitätssteigerung für ein Ferredoxin viel zu gering gewesen, da Ferredoxin - wie aus der vorliegenden Arbeit hervorgeht - zu einer über 100fachen Aktivitätssteigerung führt. Eine Erklärungsmöglichkeit könnte

sein, dass das hydrophobe Membranprotein an den MvhADG/HdrABC Komplex anlagert und dadurch eine aktivitätssteigernde Konformationsänderung bewirkt.

Noch schwieriger ist die aktivitätssteigernde Wirkung (2-3 fach) von Coenzym F<sub>430</sub> ( $[A]_{0.5V} = 0,2 \text{ mM}$ ), FAD (0,3 mM), FMN (0,3 mM), Coenzyme F<sub>420</sub> (0,3 mM), UDP-Glucose (2 mM), Uracil (3 mM), UDP-Glucuronate (5 mM), UDP-N-Acetyl-Glucosamine (6 mM), UDP (7 mM), UMP (12 mM) und UTP (>20 mM) zu erklären. Die meisten dieser Verbindungen weisen keine strukturellen oder funktionellen Gemeinsamkeiten auf. Ganz unspezifisch war die stimulierende Wirkung allerdings auch nicht, denn folgende Verbindungen waren ohne Effekt auf die Aktivität: Methanofuran, Formylmethanofuran, Tetrahydromethanopterin, NAD, NADP, AMP, ADP, ATP, GTP, CMP, CTP, Thymin, Cytosin, Glucose, Galactose, Glucosamin und Glucuronat.

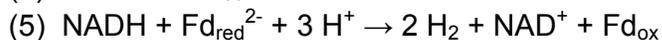
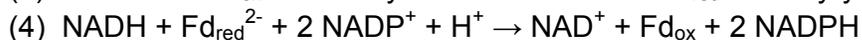
Im Falle von FMN, FAD und Coenzym F<sub>420</sub> wurde beobachtet, dass die Verbindungen in den Ansätzen durch H<sub>2</sub> - katalysiert durch den MvhADG/HdrABC Komplex - langsam reduziert wurden. Es besteht daher die Möglichkeit, dass diese drei Verbindungen ihre aktivierende Wirkung durch Senkung des Redoxpotentials im Ansatz entfaltet haben, was eine Steigerung der Hydrogenase-Aktivität zur Folge hat (Pandelia et al. 2009).

In seiner Doktorarbeit testete E. Setzke ebenfalls, ob das Polyferredoxin MvhB zu einer Aktivitätssteigerung bei der CoM-S-S-CoB-Reduktion führte. Die Aktivität nahm mit Polyferredoxin im Testansatz allerdings ab. Eine Beteiligung des Polyferredoxins am Elektronentransfer zwischen H<sub>2</sub> und CoM-S-S-CoB wurde daher als unwahrscheinlich interpretiert. Da die Aktivität damals aber mit dem Ellmans-Assay bestimmt wurde und dieser vom Ferredoxin gestört wird (siehe oben), lässt sich aus dem Ergebnis keine Schlussfolgerung ziehen.

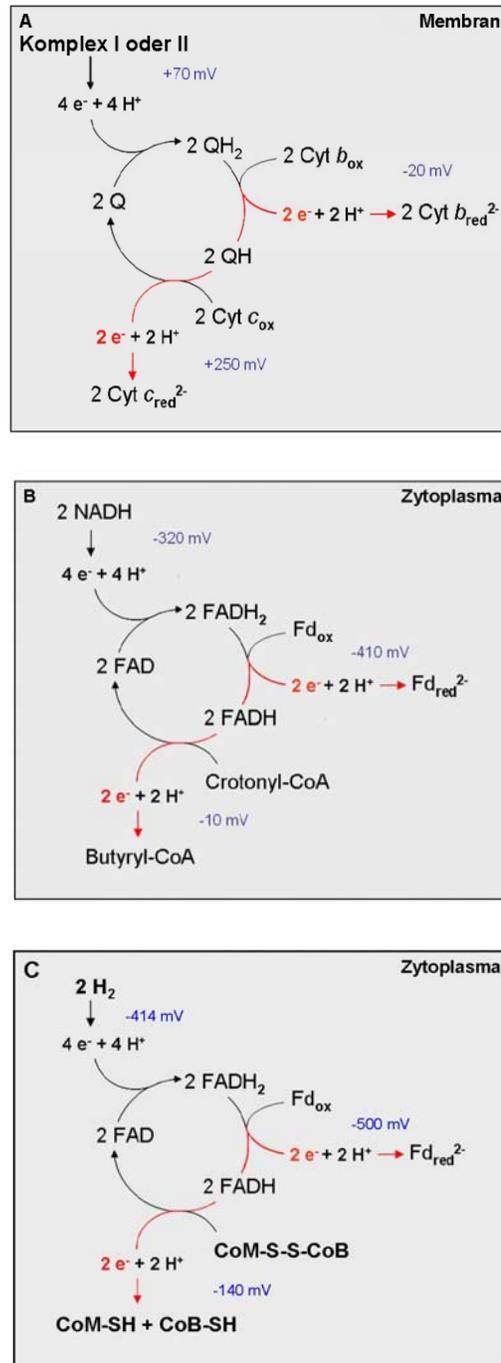
## Elektronenbifurkation

Ein gut untersuchtes System, bei dem Elektronenbifurkation stattfindet, ist der Cytochrom *bc1* Komplex der mitochondrialen und vieler bakterieller Atmungsketten, sowie der Cytochrom *b<sub>6</sub>f* Komplex, welcher das Photosystem I und II verbindet. Es handelt sich hierbei allerdings um membrangebundene Komplexe. Im sogenannten Q-Zyklus können je eins von zwei Elektronen vom reduzierten Ubichinon zum Cytochrom *b* und Cytochrom *c* transferiert werden, wobei ein Semiquinone als Zwischenprodukt entsteht. Durch Elektronenbifurkation kann 1 Elektron in einer Reaktion zu einem negativeren Elektronakzeptor transferiert werden, wohingegen das andere Elektron einen positiveren Elektronakzeptor reduziert. Dadurch kann die endergone Cytochrome *b*-Reduktion mit der exergonen Cytochrom *c*-Reduktion gekoppelt werden (Abbildung 24A) (Brandt 1996a; Brandt 1996b).

Drei zytoplasmatische Enzymkomplexe, die die Elektronbifurkation vermitteln, wurden bis jetzt charakterisiert: der Bcd/EtfAB Komplex aus *Clostridium kluyveri* (Li et al. 2008) (Abbildung 24B, siehe Einleitung), der NfnAB Komplex aus *C. kluyveri* (Wang et al. 2010) und die heterotrimere [FeFe]-Hydrogenase aus *Thermotoga maritima* (Schut and Adams 2009) katalysieren jeweils die Reaktionen 3, 4 und 5.

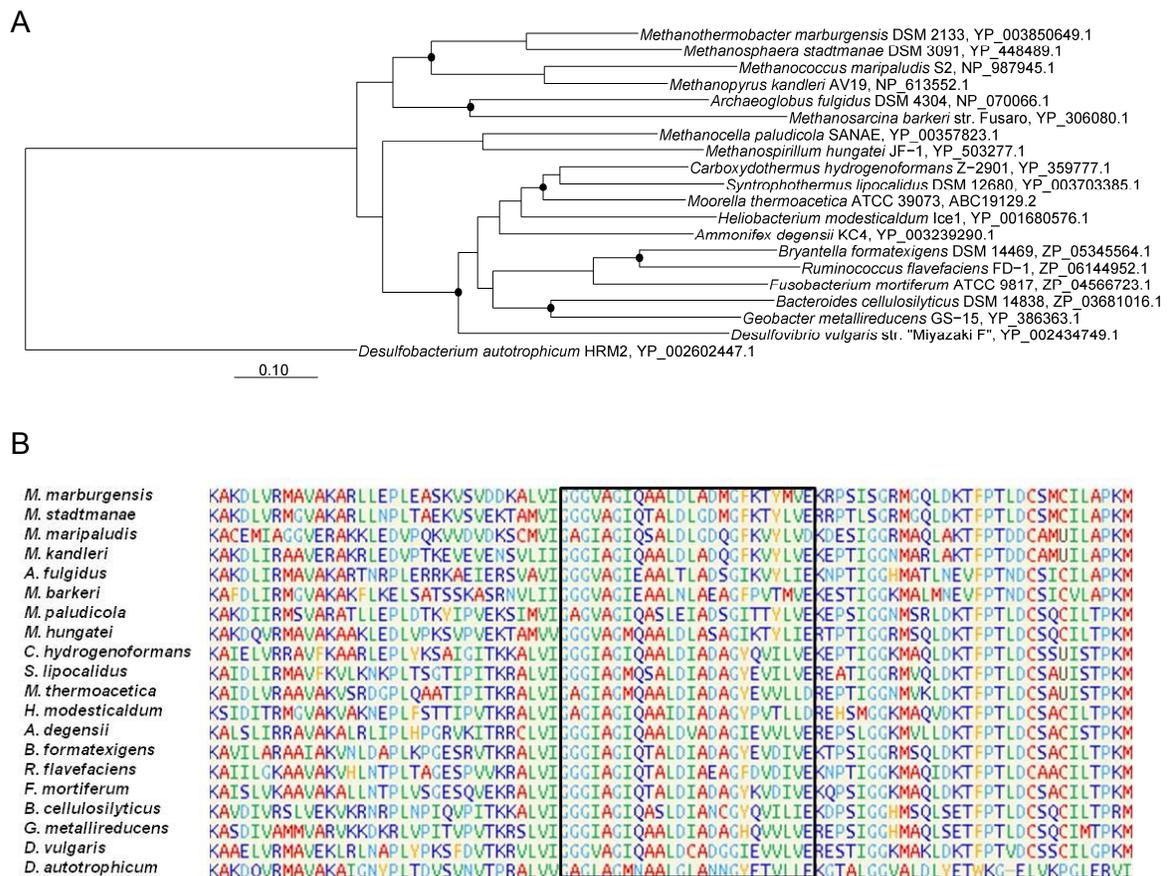


Der MvhADG/HdrABC Komplex und die drei anderen Komplexe haben gemeinsam, dass sie eine Fd-abhängige Reaktion katalysieren und dass sie alle FAD (FMN im Fall der [FeFe]-Hydrogenase aus *T. maritima*) enthalten, welches in der reduzierten Form nur lose an den Komplex gebunden ist. Dies hat einen allmählichen Verlust der Aktivität in Abwesenheit von FAD bzw. FMN zur Folge, weshalb dem Reinigungspuffer auch immer ein Überschuss an FAD zugesetzt wurde. Es ist daher naheliegend anzunehmen, dass es sich bei der Elektronenbifurkation um einen Flavin-basierten Mechanismus handelt (Abbildung 24B und C).



**Abbildung 24: Elektronenbifurkation im (A) Cytochrom *bc1* Komplex bzw. Cytochrom *b<sub>6</sub>f* Komplex und in Analogie dazu im (B) Bcd/EtfAB Komplex von *Clostridium kluveri* und im (C) MvhADG/HdrABC Komplex Cytochrom-freier methanogener Archaea. Die Elektronen werden zu einem negativeren und einem positiveren Elektronakzeptor „bifurkiert“, so können endergone mit exergonen Reaktionen gekoppelt werden. Als Zweielektronen/Einelektronen Überträger können Quinone oder Flavine dienen (Brandt 1996a; Herrmann et al. 2008, Li et al. 2008).**

Da die HdrA Untereinheit das Flavin-Bindungsmotiv besitzt (Abbildung 25B), wird angenommen, dass diese Untereinheit der Ort der Elektronenbifurkation im MvhADG/HdrABC Komplex ist. Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass die HdrA Untereinheit eines der höchstkonservierten Proteine in Methanogenen ist. HdrA ähnliche Sequenzen finden sich aber auch in vielen nicht-methanogenen Organismen, was die Vermutung nahe legt, dass Elektronbifurkationen über dieses oder ähnliche Enzyme auch in einem anderen Kontext stattfinden könnten (Strittmatter et al. 2009).



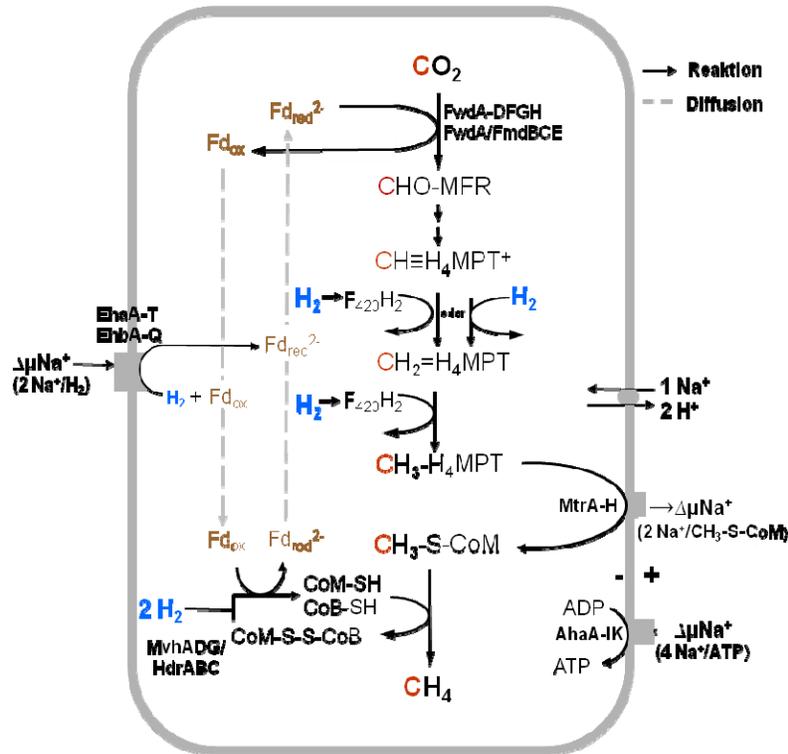
**Abbildung 25: (A) Phylogenetische Zugehörigkeit putativer HdrA-Aminosäure-Sequenzen verschiedener Organismen.** Der phylogenetische Baum wurde aus Sequenzdaten der NCBI Datenbank abgeleitet und mit Hilfe des „ARB software package“ erstellt (Ludwig et al. 2004). Die Topologie wurde durch sogenannte „neighbor-joining“ Algorithmen und eine Kimura-Korrektur mit 500 „Bootstraps“ überprüft. Knotenpunkte mit einem Prozentsatz über 85% sind durch schwarze Kreise dargestellt. Die Größe des Referenzbalkens entspricht einer Divergenz der Aminosäure-Sequenzen von 10%. **(B) Abgleich eines Ausschnittes der konservierten HdrA-Sequenz an der putativen Flavin-Bindestelle (schwarzer Kasten) in verschiedenen Organismen.** Das Alignment wurde ebenfalls mit Hilfe des „ARB software package“ erstellt.

### Die Energiekonservierung in Cytochrom-freien methanogenen Archaea

In Abbildung 26 ist das metabolische Schema der Methanogenese von Cytochrom-freien Methanogenen dargestellt, das die Ergebnisse dieser Arbeit bezüglich Wachstumserträgen,  $H_2$ -Schwellenkonzentrationen und der MvhADG/HdrABC Komplex katalysierten Kopplung der Reduktion von CoM-S-S-CoB mit  $H_2$  mit der Reduktion von Ferredoxin mit  $H_2$  integriert. Die Abbildung wurde so gezeichnet, dass pro Mol Methan 0,5 Mol ATP gebildet wird und es wurde davon ausgegangen, dass die durch den MvhADG/HdrABC Komplex katalysierte Reaktion voll gekoppelt ist (ein Mol Fd pro Mol reduziertes CoM-S-S-CoB). Es wurde außerdem berücksichtigt, dass der Methylgruppentransfer vom Methyltetrahydromethanopterin ( $CH_3-H_4MPT$ ) auf Coenzym M mit einer elektrogenen Translokation von  $2 Na^+$  abläuft und dass die ATP-Synthese über die  $A_1A_0$ -ATP-Synthase 4 elektrogene  $Na^+$  verbraucht (Becher et al. 1992; Gottschalk and Thauer 2001). Das Schema berücksichtigt graphisch allerdings nicht eine vor kurzem erschienene Publikation, in der gezeigt wurde, dass in *Methanococcus marisaludis* der MvhADG/HdrABC Komplex einen Super-Komplex mit dem Formylmethanofuran Dehydrogenase-Komplex bildet und dass daher der erste und der letzte Schritt der Methanogenese aus  $H_2$  und  $CO_2$  räumlich in enger Nachbarschaft ablaufen sollten (Costa et al. 2010). Dies wurde schon bereits vor 20 Jahren in einem Review von Rouvier und Wolfe (Rouviere and Wolfe 1989) vorgeschlagen.

Man könnte allerdings auch annehmen, dass die  $A_1A_0$ -ATP-Synthase eine  $Na^+/ATP$  Stöchiometrie von 3 zu 1 katalysiert und nicht von 4 zu 1 wie in Abbildung 26 angenommen. Dann würde der ATP Ertrag bei 0,75 ATP pro Mol Methan liegen. Dieser Wert würde den ermittelten  $H_2$ -Schwellenkonzentrationen von ca. 8 Pa sogar noch etwas besser entsprechen. Oder aber, wenn die Fd-Reduktion über den MvhADG/HdrABC Komplex nur teilweise gekoppelt wäre, dann würde Fd mit  $H_2$  zusätzlich über die Energie-konvertierenden Hydrogenasen EhaA-T und/oder EhbA-Q reduziert werden, damit weiter  $CO_2$  zu Methan reduziert werden kann. In diesem Fall würde die Energie, die für den umgekehrten Elektronentransport von  $H_2$  zu Fd benötigt wird, nicht mehr für die ATP-Synthese zur Verfügung stehen, mit dem Ergebnis, dass der ATP- und damit der Wachstums-Ertrag sinken. EhaA-T und EhbA-Q haben eine hauptsächlich anabole Funktion, indem sie reduziertes Fd

generieren, welches für die Reduktion von  $\text{CO}_2$  zu  $\text{CO}$  und von  $\text{Acetyl-CoA} + \text{CO}_2$  zu Pyruvat benötigt wird, welches wiederum für die Biosynthese vieler Komponenten in der Zelle zur Verfügung gestellt wird (Porat et al. 2006; Berg et al. 2010).



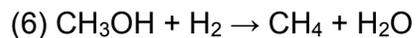
**Abbildung 26: Reaktionen, Coenzyme und Enzyme in Cytochrom-freien Archaea, die an der  $\text{CO}_2$ -Reduktion mit  $4 \text{H}_2$  zu  $\text{CH}_4$  beteiligt sind.** Reduziertes Ferredoxin (Fd), welches für die  $\text{CO}_2$ -Reduktion zu Formylmethanofuran (CHO-MFR) benötigt wird, wird in der MvhADG/HdrABC katalysierten Reaktion regeneriert.  $\text{H}_4\text{MPT}$ , Tetrahydromethanopterin;  $\text{CH}\equiv\text{H}_4\text{MPT}^+$ , Methenyl- $\text{H}_4\text{MPT}^+$ ;  $\text{CH}_2=\text{H}_4\text{MPT}$ , Methylen- $\text{H}_4\text{MPT}$ ;  $\text{CH}_3-\text{H}_4\text{MPT}$ , Methyl- $\text{H}_4\text{MPT}$ ; CHO-MFR, Formylmethanofuran; AhaA-IK,  $\text{A}_1\text{A}_0$ -ATPase; EhaA-T/EhbA-Q, Energie-konvertierende Hydrogenasen; FwdA-DFGH/FwdAFmdBCE, CHO-MFR Dehydrogenase; MtrA-H, Methyltransferase.

Interessanterweise wurden, wie in der Einleitung angesprochen, für den Cytochrom-haltigen Rice Cluster I (RC-I), ebenfalls niedrige  $\text{H}_2$ -Schwellenkonzentrationen ( $<10 \text{ Pa}$ ) ermittelt (Conrad et al. 2006). Dies deutet wie bei den Cytochrom-freien Methanogenen auf eine niedrige ATP Ausbeute hin. RC-I, der nur  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  oder Formiat als Energiequelle nutzen kann, verhält sich daher wie ein Methanogener

ohne Cytochrome. Eine Erklärung liefert die Analyse der Genomsequenz (Erkel et al. 2006): In dem Genom finden sich zum einen zwei Enzymkomplexe - MvhADG/HdrABC und  $F_{420}$ -abhängige Formiat-Dehydrogenase - die sonst nur in Cytochrom-freien Methanogenen gefunden werden. Zum anderen finden sich nicht alle Gene, die für die Synthese von VhoACG und HdrDE benötigt werden. Für den MvhADG/HdrABC Komplex liegen hingegen alle codierenden Sequenzen vor. RC-I scheint also vom MvhADG/HdrABC Komplex für die Methanogenese abhängig zu sein. Wie in der Einleitung bereits erwähnt, sind Methanogene mit Cytochromen phylogenetisch jünger als jene ohne Cytochrome. Das Vorliegen charakteristischer Gene aus Cytochrom-freien in Cytochrom-haltigen Methanogenen ist daher nicht verwunderlich. Die Ergebnisse aus RC-I unterstützen daher das Konzept, dass die Energiekonservierung über den zytoplasmatischen MvhADG/HdrABC Komplex in Cytochrom-freien Methanogenen verläuft.

### **Der Fall *Methanosphaera stadtmanae***

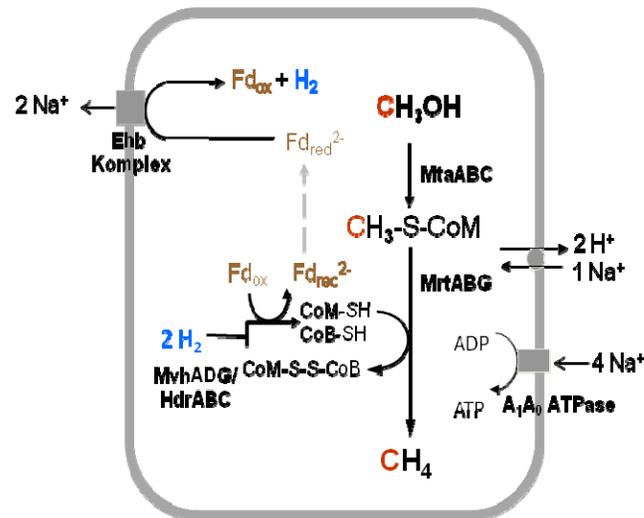
*Methanosphaera stadtmanae* gehört zwar zur Ordnung der *Methanobacteriales*, kann aber nicht auf  $H_2$  und  $CO_2$ , sondern nur auf  $H_2$  und Methanol wachsen.



$$\Delta G^\circ = -112,5 \text{ kJ/mol}$$

Genomanalysen zeigen, dass *M. stadtmanae* im Gegensatz zu den anderen Cytochrom-freien Methanogenen keine funktionsfähige Formylmethanofuran Dehydrogenase besitzt (Fricke et al. 2006). Wie also kann in diesem Organismus die Energie konserviert werden? In der 2008 erschienen Arbeit von Thauer et al. wurde für *M. stadtmanae* folgendes Schema vorgeschlagen (Abbildung 27): Der erste Schritt im Methanol-Stoffwechsel ist die Bildung von Methyl-Coenzym M aus Methanol und Coenzym M, die durch den zytoplasmatischen Enzymkomplex MtaABC katalysiert wird. Methyl-Coenzym M wird anschließend dann durch die zytoplasmatische Enzymkomplexe Methyl-Coenzym M-Reduktase (MrtABG) und MvhADG/HdrABC zu Methan reduziert. Die Hypothese ist nun, dass das durch den MvhADG/HdrABC Komplex reduzierte Ferredoxin mit Protonen reoxidiert wird und  $H_2$  entsteht. Diese Reaktion wird durch die Energie-konvertierende Hydrogenase

Ehb katalysiert und ist mit dem Aufbau eines  $\text{Na}^+$ -Potential verbunden, welches wiederum die Synthese von ATP antreibt. In dem Energiestoffwechsel würde  $\text{H}_2$  also sowohl verbraucht als auch gebildet. Ein biochemischer Beweis für diese Hypothese steht allerdings noch aus. Aber es gibt eine biochemische Analogie. Im protonenmotorischen Q-Zyklus, der durch den *bc1* Komplex der Atmungskette katalysiert wird, wird Ubichinon sowohl oxidiert als auch reduziert (siehe Abbildung 24 A) (Brandt 1996a; Brandt 1996b). Des Weiteren gibt einen noch indirekten Hinweis: Gene für den Ehb Komplex (die Untereinheiten A, H und I) gehören wie viele der Gene für die anderen in Abbildung 27 beteiligten Enzyme zu den hoch exprimierten Genen. Dies wurde aus dem Codongebrauch vorhergesagt (Fricke et al. 2006).



**Abbildung 27: Vorgeschlagene Energiekonservierung durch den Ehb Komplex in *Methanosphaera stadtmanae* bei Wachstum auf Methanol und  $\text{H}_2$ .** Die Reduktionen von CoM-S-S-CoB mit  $\text{H}_2$  und von Ferredoxin (Fd) mit  $\text{H}_2$  werden wie in Abbildung 26 über eine Flavin-basierte Elektronbifurkation gekoppelt. MtaABC; Methanol: Coenzyme M Methyltransferase; MrtABG, Methyl-Coenzym M-Reduktase; Ehb, Energie-konvertierende Hydrogenase (Thauer et al. 2008).

## Ferredoxine

Wie bereits erwähnt enthalten hydrogenotrophe Methanogene keine Cytochrome und kein Membran-assoziiertes Methanophenazin, die als Elektronenüberträger von  $H_2$  auf Elektronenakzeptoren fungieren könnten. Die einzigen identifizierten Elektronüberträger sind Ferredoxine. In Genomen von *M. marburgensis* und anderen Cytochrom-freien Methanogenen finden sich mehrere CDS (Protein codierende Sequenzen) für diese Eisen-Schwefel Redoxproteine: Für das bereits zuvor erwähnte 12 [4Fe4S] Polyferredoxin der Mvh (*mvhB*) (Hedderich et al. 1992), für ein 6 [4Fe4S] Polyferredoxin (*ehaP*), ein 10 [4Fe4S] Polyferredoxin (*ehaQ*) und ein 14 [4Fe4S] Polyferredoxin (*ehbK*) in den Transkriptionseinheiten der Energie-konvertierenden Hydrogenasen Eha und Ehb sowie für ein 8 [4Fe4S] Polyferredoxin (*fwdF*) in der Transkriptionseinheit der Wolfram-abhängigen Formylmethanofuran Dehydrogenase. Es finden sich zusätzlich noch monocistronische CDS für ein 8 [4Fe4S] Polyferredoxin, für ein 6 [4Fe4S] Polyferredoxin und für vier 2 [4Fe4S] Ferredoxine. Man könnte annehmen, dass alle diese Ferredoxine einen Pool bilden, auf den je nach Bedarf Elektronen übertragen oder aus dem Elektronen abgezogen werden könnten (Kaster et al. 2010; Thauer et al. 2010). Die [4Fe4S] Cluster innerhalb der Ferredoxine stehen miteinander in elektronischer Wechselwirkung und die unterschiedlichen Ferredoxine können Elektronen von einem Cluster zum anderen in spontanen Redox-Reaktionen übertragen. Elektronen aus  $H_2$  enden somit wahrscheinlich alle in Ferredoxinen, von wo aus sie wiederum für die Reduktion von  $CO_2$  zu Formylmethanofuran über die Formylmethanofuran Dehydrogenase (Abbildung 26) und für verschiedene anabole Reduktionsreaktionen verwendet werden (Kaster et al. 2010; Thauer et al. 2010). Anabole Ferredoxin-abhängige Reaktionen sind die Reduktion von  $CO_2$  über die CO-Dehydrogenase; die Pyruvat-Synthese aus Acetyl-CoA und  $CO_2$  über zwei Pyruvat-Synthasen; die 2-Oxoglutarat Synthese aus Succinyl-CoA und  $CO_2$  über 2-Oxoglutarat-Synthase; die Synthese von 2-Oxoisovalerate aus Isobutyryl-CoA und  $CO_2$  über 2-Oxoisovalerate Synthase; die Synthese von Indolylpyruvate aus Indolylacetyl-CoA und  $CO_2$  über Indolylpyruvate Synthase; sowie die  $N_2$ -Reduktion zu  $NH_3$  über Nitrogenase (Tersteegen et al. 1997).

Wenn *M. marburgensis* unter Eisen-limitierenden Bedingungen wächst, wird ein FMN-haltiges Flavoprotein (FprA), welches eine Flavodoxin Signatur enthält, induziert. Die intrazelluläre Konzentration des 12 [4Fe4S] Polyferredoxins MvhB geht unter diesen Bedingungen hingegen stark zurück. Es wurde angenommen, dass FprA anstelle von Polyferredoxin als Elektronenüberträger bei Eisen-Mangel fungiert, da die Reduktion von FprA mit Dithionit oder Ti(III)citrat reversibel ist (Wasserfallen et al. 1995). Interessant in diesem Zusammenhang ist ebenfalls eine Arbeit von (Woo et al. 1993), in der die Reinigung von zwei MvhADG Komplexen aus *M. thermotrophicus* beschrieben wird. Der eine Komplex enthielt neben den Untereinheiten MvhADG außerdem das Polyferredoxin MvhB als vierte Untereinheit, der andere Komplex hingegen ein Flavoprotein, das sich später als FprA herausstellte (Woo et al. 1993; Nölling et al. 1995). FprA ist allerdings als ein F<sub>420</sub>-abhängiges Enzym identifiziert worden, das an der Detoxifikation von Sauerstoff in den Zellen beteiligt ist (Seedorf et al. 2004). Ob es daher tatsächlich das Polyferredoxin bei Eisen-Mangel als Elektronenüberträger bei der Kopplung des ersten und letzten Schrittes der Methanogenese ersetzt, bleibt fraglich. Im Genom von *M. marburgensis* und anderen Cytochrom-freien Methanogenen werden außer mehreren Kopien für FprA aber noch andere putative Flavodoxine gefunden, die die Aufgabe des Elektronentransports bei Eisen-Mangel übernehmen könnten (Liesegang et al. 2010).

### **Der RPG-Effekt**

Der Befund, dass der MvhADG/HdrABC Komplex aus Cytochrom-freien Methanogenen die Reduktion von Fd mit H<sub>2</sub> mit der Reduktion von CoM-S-S-CoB mit H<sub>2</sub> koppelt, kann auch den sogenannten RPG-Effekt, der nur bei Cytochrom-freien, nicht aber bei Cytochrom-haltigen Methanogenen auftritt und erstmals 1977 von Robert P. Gunsalus beschrieben wurde (Gunsalus and Wolfe 1977), erklären. Hier wurde beobachtet, dass Zellextrakte von *M. thermotrophicus* die Reduktion von CO<sub>2</sub> mit H<sub>2</sub> zu Methan erst nach Zugabe von katalytischen Mengen Methyl-Coenzym M, Fumarat oder Serin katalysieren (Gunsalus and Wolfe 1977; Bobik and Wolfe 1988). Alle drei Zusätze haben gemeinsam, dass sie CoM-S-S-CoB generieren. Methyl-Coenzym-M generiert das CoM-S-S-CoB über die Methyl-Coenzym M Reduktase, Fumarat über die CoM- und CoB-abhängige

Fumaratreduktase (Heim et al. 1998) und Serin über die Serinhydroxy-Methyltransferase (Lin and Sparling 1998), Methylentetrahydromethanopterin Dehydrogenase, Methylentetrahydromethanopterin Reduktase, Methyltetrahydro-methanopterin: Coenzym M Methyltransferase und Methyl-Coenzym M Reduktase. Das so erzeugte CoM-S-S-CoB löst die Reduktion von Fd mit  $H_2$  als Elektronendonator aus, welches im ersten Schritt der Methanogenese für die Reduktion von  $CO_2$  erforderlich ist.

### **Ausblick**

Abschließend lässt sich festhalten, dass die Energiekonservierung in Cytochrom-freien methanogenen Archaea nun um einiges besser verstanden ist. Die phänotypischen Unterschiede bezüglich  $H_2$ -Schwellenkonzentrationen und Wachstumserträgen zu Cytochrom-haltigen Organismen, sowie der RPG-Effekt lassen sich jetzt erklären und die Hypothese der Elektronenbifurkation konnte untermauert werden. Ob letztere tatsächlich Flavin-basiert ist, muss allerdings experimentell noch bewiesen werden.

## Literatur

- Abken, H. J., M. Tietze, J. Brodersen, S. Bäumer, U. Beifuss and U. Deppenmeier (1998). "Isolation and characterization of methanophenazine and function of phenazines in membrane-bound electron transport of *Methanosarcina mazei* Gö1." *J. Bacteriol.* **180**(8): 2027-2032.
- Anderson, I., L. E. Ulrich, B. Lupa, D. Susanti, I. Porat, S. D. Hooper, A. Lykidis, M. Sieprawska-Lupa, L. Dharmarajan, E. Goltsman, A. Lapidus, E. Saunders, C. Han, M. Land, S. Lucas, B. Mukhopadhyay, W. B. Whitman, C. Woese, J. Bristow and N. Kyrpides (2009). "Genomic characterization of Methanomicrobiales reveals three classes of methanogens." *PLoS One* **4**(6): e5797.
- Bartoschek, S., J. A. Vorholt, R. K. Thauer, B. H. Geierstanger and C. Griesinger (2000). "N-carboxymethanofuran (carbamate) formation from methanofuran and CO<sub>2</sub> in methanogenic archaea - Thermodynamics and kinetics of the spontaneous reaction." *Eur. J. Biochem.* **267**(11): 3130-3138.
- Becher, B., V. Müller and G. Gottschalk (1992). "N<sup>5</sup>-methyl-tetrahydromethanopterin:coenzyme M methyltransferase of *Methanosarcina* strain Gö1 is an Na<sup>+</sup>-translocating membrane protein." *J. Bacteriol.* **174**(23): 7656-7660.
- Beifuss, U., M. Tietze, S. Bäumer and U. Deppenmeier (2000). "Methanophenazine: Structure, total synthesis, and function of a new cofactor from methanogenic archaea." *Angew. Chem. Int. Ed.* **39**(14): 2470-2472.
- Berg, I. A., D. Kockelkorn, W. H. Ramos-Vera, R. F. Say, J. Zarzycki, M. Hugler, B. E. Alber and G. Fuchs (2010). "Autotrophic carbon fixation in archaea." *Nat. Rev. Microbiol.* **8**(6): 447-460.
- Bertram, P. A. and R. K. Thauer (1994). "Thermodynamics of the formylmethanofuran dehydrogenase reaction in *Methanobacterium thermoautotrophicum*." *Eur. J. Biochem.* **226**: 811-818.
- Bobik, T. A. and R. S. Wolfe (1988). "Physiological importance of the heterodisulfide of coenzyme M and 7-mercaptoheptanoylthreonine phosphate in the reduction of carbon dioxide to methane in *Methanobacterium*." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**(1): 60-63.
- Bobik, T. A. and R. S. Wolfe (1989). "An unusual thiol-driven fumarate reductase in *Methanobacterium* with the production of the heterodisulfide of coenzyme M and N-(7-mercaptoheptanoyl)threonine-O-3-phosphate." *J. Biol. Chem.* **264**(31): 18714-18718.
- Bonin, A. S. and D. R. Boone (2006). "The order Methanobacteriales". The Prokaryotes. M. Dworkin, Falkow S., E. Rosenberg, S. K. H. and E. Stackebrandt. New York, Springer. **3**: 231-243.
- Boone, D. R., W. B. Whitman and P. Rouvière (1993). "Diversity and taxonomy of methanogens". Methanogenesis. J. G. Ferry. New York & London, Chapman & Hall: 35-80.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Brandt, U. (1996a). "Energy conservation by bifurcated electron-transfer in the cytochrome-bc1 complex." *Biochim. Biophys. Acta* **1275**(1-2): 41-46.
- Brandt, U. (1996b). "Bifurcated ubihydroquinone oxidation in the cytochrome bc1 complex by proton-gated charge transfer." *FEBS Lett.* **387**(1): 1-6.

- Brochier, C., P. Forterre and S. Gribaldo (2004). "Archaeal phylogeny based on proteins of the transcription and translation machineries: tackling the *Methanopyrus kandleri* paradox." *Genome Biol.* **5**(3): 17.
- Chen, J. S. and D. K. Blanchard (1979). "A simple hydrogenase-linked assay for ferredoxin and flavodoxin." *Anal. Biochem.* **93**(1): 216-222.
- Church, D. L. and E. J. Laishley (1995). "Reduction of metronidazole by hydrogenase from Clostridia." *Anaerobe* **1**(2): 81-92.
- Conrad, R., C. Erkel and W. Liesack (2006). "Rice Cluster I methanogens, an important group of Archaea producing greenhouse gas in soil." *Curr. Opin. Biotech.* **17**(3): 262-267.
- Conrad, R. and R. K. Thauer (1983). "Carbon monoxide production by *Methanobacterium thermoautotrophicum*." *FEMS Microbiol. Lett.* **20**(2): 229-232.
- Cord-Ruwisch, R., H. J. Seitz and R. Conrad (1988). "The capacity of hydrogenotrophic anaerobic bacteria to compete for traces of hydrogen depends on the redox potential of the terminal electron acceptor." *Arch. Microbiol.* **149**(4): 350-357.
- Costa, K. C., P. M. Wong, T. Wang, T. J. Lie, J. A. Dodsworth, I. Swanson, J. A. Burn, M. Hackett and J. A. Leigh (2010). "Protein complexing in a methanogen suggests electron bifurcation and electron delivery from formate to heterodisulfide reductase." *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **107**(24): 11050-11055.
- Crossnoe, C. R., J. P. Germanas, P. LeMagueres, G. Mustata and K. L. Krause (2002). "The crystal structure of *Trichomonas vaginalis* ferredoxin provides insight into metronidazole activation." *J. Mol. Biol.* **318**(2): 503-518.
- de Poorter, L. M., W. G. Geerts, A. P. Theuvenet and J. T. Keltjens (2003). "Bioenergetics of the formyl-methanofuran dehydrogenase and heterodisulfide reductase reactions in *Methanothermobacter thermoautotrophicus*." *Eur. J. Biochem.* **270**(1): 66-75.
- de Poorter, L. M., W. J. Geerts and J. T. Keltjens (2007). "Coupling of *Methanothermobacter thermoautotrophicus* methane formation and growth in fed-batch and continuous cultures under different H<sub>2</sub> gassing regimens." *Appl. Environ. Microbiol.* **73**(3): 740-749.
- Deppenmeier, U., M. Blaut, S. Lenters, C. Herzberg and G. Gottschalk (1995). "Analysis of the *vhoGAC* and *vhtGAC* operons from *Methanosarcina mazei* strain Gö1, both encoding a membrane-bound hydrogenase and a cytochrome *b*." *Eur. J. Biochem.* **227**(1-2): 261-269.
- Duin, E. C., S. Madadi-Kahkesh, R. Hedderich, M. D. Clay and M. K. Johnson (2002). "Heterodisulfide reductase from *Methanothermobacter marburgensis* contains an active-site [4Fe-4S] cluster that is directly involved in mediating heterodisulfide reduction." *FEBS Lett.* **512**(1-3): 263-268.
- Eikmanns, B., G. Fuchs and R. K. Thauer (1985). "Formation of CO from CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> by *Methanobacterium thermoautotrophicum*." *Eur. J. Biochem.* **146**(1): 149-154.
- Ellermann, J., R. Hedderich, R. Bocher and R. K. Thauer (1988). "The final step in methane formation. Investigations with highly purified methyl-CoM reductase (component C) from *Methanobacterium thermoautotrophicum* (strain Marburg)." *Eur. J. Biochem.* **172**(3): 669-677.

- Erkel, C., M. Kube, R. Reinhardt and W. Liesack (2006). "Genome of Rice Cluster I archaea - the key methane producers in the rice rhizosphere." *Science* **313**(5785): 370-372.
- Fahey, R. C. and G. L. Newton (1982). "Occurrence of low molecular weight thiols in representative bacteria, fungi, plants, and animals." *Fed. Proc.* **41**(4): 1284-1284.
- Fahey, R. C., G. L. Newton, R. Dorian and E. M. Kosower (1981). "Analysis of biological thiols: quantitative determination of thiols at the picomole level based upon derivatization with monobromobimanes and separation by cation-exchange chromatography." *Anal. Biochem.* **111**(2): 357-365.
- Ferry, J. G. and K. A. Kstead (2007). "Methanogenesis". *Archaea: Molecular and cellular Biology*. R. Cavicchioli. Washington, D. C., USA, ASM Press: 288-314.
- Fricke, W. F., H. Seedorf, A. Henne, M. Kruer, H. Liesegang, R. Hedderich, G. Gottschalk and R. K. Thauer (2006). "The genome sequence of *Methanosphaera stadtmanae* reveals why this human intestinal archaeon is restricted to methanol and H<sub>2</sub> for methane formation and ATP synthesis." *J. Bacteriol.* **188**(2): 642-658.
- Garcia, J. L., B. K. C. Patel and B. Ollivier (2000). "Taxonomic, phylogenetic and ecological diversity of methanogenic archaea." *Anaerobe* **6**(4): 205-226.
- Gottschalk, G. and R. K. Thauer (2001). "The Na<sup>+</sup>-translocating methyltransferase complex from methanogenic archaea." *Biochim. Biophys. Acta* **1505**(1): 28-36.
- Grahame, D. A. and S. Gencic (2000). "Methane Biochemistry". *Encyclopedia of Microbiology* J. Lederberg. New York, USA, Academic Press. **3**: 188-198
- Gunsalus, R. P. and R. S. Wolfe (1977). "Stimulation of CO<sub>2</sub> reduction to methane by methyl-coenzyme M in extracts of *Methanobacterium*." *Biochem. Biophys. Res. Co.* **76**(3): 790-795.
- Guss, A. M., G. Kulkarni and W. W. Metcalf (2009). "Differences in hydrogenase gene expression between *Methanosarcina acetivorans* and *Methanosarcina barkeri*." *J Bacteriol* **191**(8): 2826-2833.
- Hamann, N. (2007). Identifizierung und Charakterisierung der katalytischen Unteruntereinheit von Heterodisulfid-Reduktase aus methanogenen Archaea. Dissertation. Marburg, Philipps Universität.
- Hamann, N., G. J. Mander, J. E. Shokes, R. A. Scott, M. Bennati and R. Hedderich (2007). "A cysteine-rich CCG domain contains a novel [4Fe-4S] cluster binding motif as deduced from studies with subunit B of heterodisulfide reductase from *Methanothermobacter marburgensis*." *Biochemistry* **46**(44): 12875-12885.
- Hansen, R. E., H. Ostergaard, P. Norgaard and J. R. Winther (2007). "Quantification of protein thiols and dithiols in the picomolar range using sodium borohydride and 4,4'-dithiodipyridine." *Anal. Biochem.* **363**(1): 77-82.
- Hedderich, R. (1990). Reinigung und Charakterisierung von Heterodisulfid-Reduktase aus *Methanobacterium thermotrophicum*. Dissertation. Marburg, Philipps- Universität.
- Hedderich, R. (2004). "Energy-converting [NiFe]-hydrogenases from archaea and extremophiles: Ancestors of complex I." *J. Bioenerg. Biomembr.* **36**(1): 65-75.
- Hedderich, R., S. P. Albracht, D. Linder, J. Koch and R. K. Thauer (1992). "Isolation and characterization of polyferredoxin from *Methanobacterium*

- thermoautotrophicum*. The *mvhB* gene product of the methylviologen-reducing hydrogenase operon." *FEBS Lett.* **298**(1): 65-68.
- Hedderich, R., J. Koch, D. Linder and R. K. Thauer (1994). "The heterodisulfide reductase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* contains sequence motifs characteristic of pyridine-nucleotide-dependent thioredoxin reductases." *Eur. J. Biochem.* **225**(1): 253-261.
- Heim, S., A. Künkel, R. K. Thauer and R. Hedderich (1998). "Thiol:fumarate reductase (Tfr) from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Identification of the catalytic sites for fumarate reduction and thiol oxidation." *Eur. J. Biochem.* **253**: 292-299.
- Hensel, R. and H. König (1988). "Thermoadaptation of methanogenic bacteria by intracellular iron concentration." *FEMS Microbiol. Lett.* **49**(1): 75-79.
- Herrmann, G., E. Jayamani, G. Mai and W. Buckel (2008). "Energy conservation via electron-transferring flavoprotein in anaerobic bacteria." *J. Bacteriol.* **190**(3): 784-791.
- Hochheimer, A., D. Linder, R. K. Thauer and R. Hedderich (1996). "The molybdenum formylmethanofuran dehydrogenase operon and the tungsten formylmethanofuran dehydrogenase operon from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Structures and transcriptional regulation." *Eur. J. Biochem.* **242**(1): 156-162.
- Hong, J. S. and J. C. Rabinowitz (1970). "Molar extinction coefficient and iron and sulfide content of clostridial ferredoxin." *J. Biol. Chem.* **245**(19): 4982-4987.
- Horch, M., L. Lauterbach, M. Saggi, P. Hildebrandt, F. Lenzian, R. Bittl, O. Lenz and I. Zebger (2010). "Probing the active site of an O<sub>2</sub>-tolerant NAD<sup>+</sup>-reducing [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 by in situ EPR and FTIR spectroscopy." *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **49**(43): 8026-8029.
- Ide, T., S. Bäumer and U. Deppenmeier (1999). "Energy conservation by the H<sub>2</sub>:heterodisulfide oxidoreductase from *Methanosarcina mazei* Gö1: Identification of two proton-translocating segments." *J. Bacteriol.* **181**(13): 4076-4080.
- Jarrell, K. F., G. D. Sprott and A. T. Matheson (1984). "Intracellular potassium concentration and relative acidity of the ribosomal proteins of methanogenic bacteria." *Can. J. Microbiol.* **30**(5): 663-668.
- Jussofie, A. and G. Gottschalk (1986). "Further studies on the distribution of cytochromes in methanogenic bacteria." *FEMS Microbiol. Lett.* **37**(1): 15-18.
- Karadagli, F. and B. E. Rittmann (2005). "Kinetic characterization of *Methanobacterium bryantii* M.o.H." *Environ. Sci. Technol.* **39**(13): 4900-4905.
- Kaster, A. K., M. Goenrich, H. Seedorf, H. Liesegang, A. Wolherr, G. Gottschalk and R. K. Thauer (2010). "More than 200 genes required for methane formation from H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> and energy conservation in *Methanothermobacter marburgensis* and *M. thermoautotrophicus*" *Archaea. in revision*.
- Kendall, M. M. and D. R. Boone (2006). "The order Methanosarcinales". The Prokaryotes. M. Dworkin, Falkow S., E. Rosenberg, S. K. H. and E. Stackebrandt. New York, Springer. **3**: 244-256.
- Kosower, N. S., G. L. Newton, E. M. Kosower and H. M. Ranney (1980). "Bimane fluorescent labels. Characterization of the bimane labeling of human hemoglobin." *Biochim. Biophys. Acta* **622**(2): 201-209.
- Kühn, W., K. Fiebig, H. Hippe, R. A. Mah, B. A. Huser and G. Gottschalk (1983). "Distribution of cytochromes in methanogenic bacteria." *FEMS Microbiol. Lett.* **20**(3): 407-410.

- Kühn, W., K. Fiebig, R. Walther and G. Gottschalk (1979). "Presence of a cytochrome *b559* in *Methanosarcina barkeri*." *FEBS Letters* **105**(2): 271-274.
- Kühn, W. and G. Gottschalk (1983). "Characterization of the cytochromes occurring in *Methanosarcina* species." *Eur. J. Biochem.* **135**(1): 89-94.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(259): 680-685.
- Li, F., J. Hinderberger, H. Seedorf, J. Zhang, W. Buckel and R. K. Thauer (2008). "Coupled ferredoxin and crotonyl coenzyme A (CoA) reduction with NADH catalyzed by the butyryl-CoA dehydrogenase/Etf complex from *Clostridium kluyveri*." *J. Bacteriol.* **190**(3): 843-850.
- Lienard, T., B. Becher, M. Marschall, S. Bowien and G. Gottschalk (1996). "Sodium ion translocation by *N*<sup>5</sup>-methyltetrahydromethanopterin: coenzyme M methyltransferase from *Methanosarcina mazei* Gö1 reconstituted in ether lipid liposomes." *Eur. J. Biochem.* **239**(3): 857-864.
- Liesegang, H., A. K. Kaster, A. Wiezer, M. Goenrich, A. Wollherr, H. Seedorf, G. Gottschalk and R. K. Thauer (2010). "Complete genome sequence of *Methanothermobacter marburgensis*, a methanoarchaeon model organism." *J. Bacteriol.* **192**(21): 5850-5851.
- Lin, Z. and R. Sparling (1998). "Investigation of serine hydroxymethyltransferase in methanogens." *Can. J. Microbiol.* **44**(7): 652-656.
- Lindmark, D. G. and M. Müller (1976). "Antitrichomonad action, mutagenicity, and reduction of metronidazole and other nitroimidazoles." *Antimicrob. Agents Chemother.* **10**(3): 476-482.
- Lockerby, D. L., H. R. Rabin, L. E. Bryan and E. J. Laishley (1984). "Ferredoxin-linked reduction of metronidazole in *Clostridium pasteurianum*." *Antimicrob. Agents Chemother.* **26**(5): 665-669.
- Lovley, D. R. (1985). "Minimum threshold for hydrogen metabolism in methanogenic bacteria." *Appl. Environ. Microbiol.* **49**(6): 1530-1531.
- Ludwig, W., O. Strunk, R. Westram, L. Richter, H. Meier, Yadhukumar, A. Buchner, T. Lai, S. Steppi, G. Jobb, W. Forster, I. Brettske, S. Gerber, A. W. Ginhart, O. Gross, S. Grumann, S. Hermann, R. Jost, A. König, T. Liss, R. Lussmann, M. May, B. Nonhoff, B. Reichel, R. Strehlow, A. Stamatakis, N. Stuckmann, A. Vilbig, M. Lenke, T. Ludwig, A. Bode and K. H. Schleifer (2004). "ARB: a software environment for sequence data." *Nucleic Acids Res.* **32**(4): 1363-1371.
- Madadi-Kahkesh, S., E. C. Duin, S. Heim, S. P. J. Albracht, M. K. Johnson and R. Hedderich (2001). "A paramagnetic species with unique EPR characteristics in the active site of heterodisulfide reductase from methanogenic archaea." *Eur. J. Biochem.* **268**(9): 2566-2577.
- Mahler, H. R. and E. H. Cordes (1971). "Biological Chemistry". New York, Harper & Row.
- Mayhew, S. G. (1978). "The redox potential of dithionite and SO<sub>2</sub> from equilibrium reactions with flavodoxins, methyl viologen and hydrogen plus hydrogenase." *Eur. J. Biochem.* **85**(2): 535-547.
- Meile, L., U. Jenal, D. Studer, M. Jordan and T. Leisinger (1989). "Characterization of psiM1, a virulent phage of *Methanobacterium thermoautotrophicum* Marburg." *Arch. Microbiol.* **152**(2): 105-110.
- Morgan, R. M., T. D. Pihl, J. Nolling and J. N. Reeve (1997). "Hydrogen regulation of growth, growth yields, and methane gene transcription in *Methanobacterium thermoautotrophicum* Delta H." *J. Bacteriol.* **179**(3): 889-898.

- Morii, H., Y. Koga and S. Nagai (1987). "Energetic analysis of the growth of *Methanobrevibacter arboriphilus* A2 in hydrogen-limited continuous cultures." *Biotechnol. Bioeng.* **29**(3): 310-315.
- Murakami, E., U. Deppenmeier and S. W. Ragsdale (2001). "Characterization of the intramolecular electron transfer pathway from 2-hydroxyphenazine to the heterodisulfide reductase from *Methanosarcina thermophila*." *J. Biol. Chem.* **276**(4): 2432-2439.
- Newton, G. L., R. Dorian and R. C. Fahey (1981). "Analysis of biological thiols: derivatization with monobromobimane and separation by reverse-phase high-performance liquid chromatography." *Anal. Biochem.* **114**(2): 383-387.
- Nisimoto, Y. and D. E. Edmondson (1992). "Effect of KCl on the interactions between NADPH:cytochrome P-450 reductase and either cytochrome c, cytochrome b5 or cytochrome P-450 in octyl glucoside micelles." *Eur. J. Biochem.* **204**(3): 1075-1082.
- Noll, K. M., M. I. Donnelly and R. S. Wolfe (1987). "Synthesis of 7-mercaptoheptanoylthreonine phosphate and its activity in the methylcoenzyme M methylreductase system." *J. Biol. Chem.* **262**(2): 513-515.
- Nölling, J., T. D. Pihl, A. Vriesema and J. N. Reeve (1995). "Organization and growth phase-dependent transcription of methane genes in two regions of the *Methanobacterium thermoautotrophicum* genome." *J. Bacteriol.* **177**(9): 2460-2468.
- Pandelia, M. E., H. Ogata, L. J. Currell, M. Flores and W. Lubitz (2009). "Probing intermediates in the activation cycle of [NiFe]-hydrogenase by infrared spectroscopy: the Ni-SIr state and its light sensitivity." *J. Biol. Inorg. Chem.* **14**(8): 1227-1241.
- Perski, H. J., P. Schönheit and R. K. Thauer (1982). "Sodium dependence of methane formation in methanogenic bacteria." *FEBS Lett.* **143**: 323-326.
- Plugge, C. M., B. Jiang, F. A. de Bok, C. Tsai and A. J. Stams (2009). "Effect of tungsten and molybdenum on growth of a syntrophic coculture of *Syntrophobacter fumaroxidans* and *Methanospirillum hungatei*." *Arch. Microbiol.* **191**(1): 55-61.
- Porat, I., W. Kim, E. L. Hendrickson, Q. W. Xia, Y. Zhang, T. S. Wang, F. Taub, B. C. Moore, I. J. Anderson, M. Hackett, J. A. Leigh and W. B. Whitman (2006). "Disruption of the operon encoding Ehb hydrogenase limits anabolic CO<sub>2</sub> assimilation in the archaeon *Methanococcus maripaludis*." *J. Bacteriol.* **188**(4): 1373-1380.
- Reeve, J. N., G. S. Beckler, D. S. Cram, P. T. Hamilton, J. W. Brown, J. A. Krzycki, A. F. Kolodziej, L. Alex, W. H. Orme-Johnson and C. T. Walsh (1989). "A hydrogenase-linked gene in *Methanobacterium thermoautotrophicum* strain delta H encodes a polyferredoxin." *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **86**(9): 3031-3035.
- Riddles, P. W., R. L. Blakeley and B. Zerner (1983). "Reassessment of Ellman's reagent." *Methods Enzymol.* **91**: 49-60.
- Robertson, A. M. and R. S. Wolfe (1970). "Adenosine triphosphate pools in *Methanobacterium*." *J. Bacteriol.* **102**(1): 43-51.
- Rouviere, P. E. and R. S. Wolfe (1989). "Component A3 of the methylcoenzyme M methylreductase system of *Methanobacterium thermoautotrophicum* delta H: resolution into two components." *J. Bacteriol.* **171**(9): 4556-4562.
- Ruppert, C., S. Wimmers, T. Lemker and V. Müller (1998). "The A<sub>1</sub>A<sub>0</sub> ATPase from *Methanosarcina mazei*: cloning of the 5' end of the aha operon encoding the

- membrane domain and expression of the proteolipid in a membrane-bound form in *Escherichia coli*." *J. Bacteriol.* **180**(13): 3448-3452.
- Sakai, S., H. Imachi, S. Hanada, A. Ohashi, H. Harada and Y. Kamagata (2008). "*Methanocella paludicola* gen. nov., sp. nov., a methane-producing archaeon, the first isolate of the lineage 'Rice Cluster I', and proposal of the new archaeal order Methanocellales ord. nov." *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**(4): 929-936.
- Schauer, N. L. and J. G. Ferry (1980). "Metabolism of formate in *Methanobacterium formicicum*." *J. Bacteriol.* **142**(3): 800-807.
- Scholten, J. C. and R. Conrad (2000). "Energetics of syntrophic propionate oxidation in defined batch and chemostat cocultures." *Appl. Environ. Microbiol.* **66**(7): 2934-2942.
- Schönheit, P., D. B. Beimborn and H. J. Perski (1984). "Potassium accumulation in growing *Methanobacterium thermoautotrophicum* and its relation to the electrochemical proton gradient." *Arch. Microbiol.* **140**(2-3): 247-251.
- Schönheit, P., J. Moll and R. K. Thauer (1980). "Growth parameters ( $K_S$ ,  $\mu_{max}$ ,  $Y_S$ ) of *Methanobacterium thermoautotrophicum*." *Arch. Microbiol.* **127**: 59-65.
- Schönheit, P., C. Wascher and R. K. Thauer (1978). "A rapid procedure for the purification of ferredoxin from Clostridia using polyethyleneimine." *FEBS Lett.* **89**(2): 219-222.
- Schuler, S. and R. Conrad (1990). "Soils contain 2 different activities for oxidation of hydrogen." *FEMS Microbiol. Ecol.* **73**(1): 77-83.
- Schut, G. J. and M. W. Adams (2009). "The iron-hydrogenase of *Thermotoga maritima* utilizes ferredoxin and NADH synergistically: a new perspective on anaerobic hydrogen production." *J. Bacteriol.* **191**(13): 4451-4457.
- Schwörer, B. and R. K. Thauer (1991). "Activities of formylmethanofuran dehydrogenase, methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase, methylenetetrahydromethanopterin reductase, and heterodisulfide reductase in methanogenic bacteria." *Arch. Microbiol.* **155**(5): 459-465.
- Seedorf, H., A. Dreisbach, R. Hedderich, S. Shima and R. K. Thauer (2004). " $F_{420}H_2$  oxidase (FprA) from *Methanobrevibacter arboriphilus*, a coenzyme  $F_{420}$ -dependent enzyme involved in  $O_2$  detoxification." *Arch. Microbiol.* **182**(2-3): 126-137.
- Setzke, E., R. Hedderich, S. Heiden and R. K. Thauer (1994). " $H_2$ :heterodisulfide oxidoreductase complex from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Composition and properties." *Eur. J. Biochem.* **220**(1): 139-148.
- Shima, S., C. Tziatzios, D. Schubert, H. Fukada, K. Takahashi, U. Ermler and R. K. Thauer (1998). "Lyotropic-salt-induced changes in monomer/dimer/tetramer association equilibrium of formyltransferase from the hyperthermophilic *Methanopyrus kandleri* in relation to the activity and thermostability of the enzyme." *Eur. J. Biochem.* **258**(1): 85-92.
- Smith, E. T., D. W. Bennett and B. A. Feinberg (1991). "Redox properties of 2[4Fe4S] ferredoxins." *Anal. Chim. Acta* **251**(1-2): 27-33.
- Smith, E. T., J. M. Tomich, T. Iwamoto, J. H. Richards, Y. Mao and B. A. Feinberg (1991). "A totally synthetic histidine-2 ferredoxin: thermal stability and redox properties." *Biochemistry* **30**(50): 11669-11676.
- Smith, M. R. and R. A. Mah (1978). "Growth and methanogenesis by *Methanosarcina* strain 227 on acetate and methanol." *Appl. Environ. Microbiol.* **36**(6): 870-879.

- Smith, S. G. and P. E. Rouviere (1990). "Purification and characterization of the reduced-nicotinamide-dependent 2,2'-dithiodiethanesulfonate reductase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* delta H." *J. Bacteriol.* **172**(11): 6435-6441.
- Stojanowic, A. and R. Hedderich (2004). "CO<sub>2</sub> reduction to the level of formylmethanofuran in *Methanosarcina barkeri* is non-energy driven when CO is the electron donor." *FEMS Microbiol. Lett.* **235**(1): 163-167.
- Stojanowic, A., G. J. Mander, E. C. Duin and R. Hedderich (2003). "Physiological role of the F420-non-reducing hydrogenase (Mvh) from *Methanothermobacter marburgensis*." *Arch. Microbiol.* **180**(3): 194-203.
- Stouthamer, A. H. (1979). "The search for correlation between theoretical and experimental growth yields". International Review of Biochemistry. J. R. Quayle. Baltimore, University Park Press. **21**.
- Strittmatter, A. W., H. Liesegang, R. Rabus, I. Decker, J. Amann, S. Andres, A. Henne, W. F. Fricke, R. Martinez-Arias, D. Bartels, A. Goesmann, L. Krause, A. Puhler, H. P. Klenk, M. Richter, M. Schuler, F. O. Glockner, A. Meyerdierks, G. Gottschalk and R. Amann (2009). "Genome sequence of *Desulfobacterium autotrophicum* HRM2, a marine sulfate reducer oxidizing organic carbon completely to carbon dioxide." *Environ. Microbiol.* **11**(5): 1038-1055.
- Tagawa, K. and D. I. Arnon (1968). "Oxidation-reduction potentials and stoichiometry of electron transfer in ferredoxins." *Biochim. Biophys. Acta* **153**(3): 602-613.
- Tersteegen, A. and R. Hedderich (1999). "*Methanobacterium thermoautotrophicum* encodes two multi-subunit membrane-bound [NiFe]-hydrogenases. Transcription of the operons and sequence analysis of the deduced proteins." *Eur. J. Biochem.* **264**: 930-943.
- Tersteegen, A., D. Linder, R. K. Thauer and R. Hedderich (1997). "Structures and functions of four anabolic 2-oxoacid oxidoreductases in *Methanobacterium thermoautotrophicum*." *Eur. J. Biochem.* **244**(3): 862-868.
- Thauer, R. K. (1998). "Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson." *Microbiology* **144**: 2377-2406.
- Thauer, R. K., A. K. Kaster, M. Goenrich, M. Schick, T. Hiromoto and S. Shima (2010). "Hydrogenases from methanogenic archaea, nickel, a novel cofactor, and H<sub>2</sub> storage." *Annu. Rev. Biochem.* **79**: 507-536.
- Thauer, R. K., A. K. Kaster, H. Seedorf, W. Buckel and R. Hedderich (2008). "Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation." *Nat. Rev. Microbiol.* **6**(8): 579-591.
- Tietze, M., A. Beuchle, I. Lamla, N. Orth, M. Dehler, G. Greiner and U. Beifuss (2003). "Redox potentials of methanophenazine and CoB-S-S-CoM, factors involved in electron transport in methanogenic archaea." *Chem. Bio. Chem.* **4**(4): 333-335.
- Uyeda, K. and J. C. Rabinowitz (1971). "Pyruvate-ferredoxin oxidoreductase. 3. Purification and properties of the enzyme." *J. Biol. Chem.* **246**(10): 3111-3119.
- Wang, S. N., H. Y. Huang, J. Moll and R. K. Thauer (2010). "NADP<sup>+</sup> reduction with reduced ferredoxin and NADP<sup>+</sup> reduction with NADH are coupled via an electron-bifurcating enzyme complex in *Clostridium kluyveri*." *J. Bacteriol.* **192**(19): 5115-5123.
- Wasserfallen, A., K. Huber and T. Leisinger (1995). "Purification and structural characterization of a flavoprotein induced by iron limitation in

- Methanobacterium thermoautotrophicum* Marburg." *J. Bacteriol.* **177**(9): 2436-2441.
- Weimer, P. J. and J. G. Zeikus (1978). "One carbon metabolism in methanogenic bacteria. Cellular characterization and growth of *Methanosarcina barkeri*." *Arch. Microbiol.* **119**(1): 49-57.
- Welte, C., V. Kallnik, M. Grapp, G. Bender, S. Ragsdale and U. Deppenmeier (2010a). "Function of Ech hydrogenase in ferredoxin-dependent, membrane-bound electron transport in *Methanosarcina mazei*." *J. Bacteriol.* **192**(3): 674-678.
- Welte, C., C. Kratzer and U. Deppenmeier (2010b). "Involvement of Ech hydrogenase in energy conservation of *Methanosarcina mazei*." *FEBS J.* **277**(16): 3396-3403.
- Wennerhold, J. (2004). Heterodisulfid-Reduktasen des *Methanothermobacter* Typs in *Methanosarcina barkeri* und Untersuchungen zur Rolle des H<sub>2</sub>:Heterodisulfid-Oxidoreduktase-Komplex bei der Energiekonservierung in *Methanothermobacter marburgensis*. Diploma thesis. Marburg, Philipps Universität.
- Whitman, W. B., D. R. Boone, Y. Koga and J. Keswani (2001). "Taxonomy of methanogenic Archaea". *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. D. R. Boone, R. W. Castenholz and G. M. Garrity. New York, Springer: 211-218.
- Woese, C. R., O. Kandler and M. L. Wheelis (1990). "Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya." *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **87**(12): 4576-4579.
- Woo, G. J., A. Wasserfallen and R. S. Wolfe (1993). "Methyl viologen hydrogenase II, a new member of the hydrogenase family from *Methanobacterium thermoautotrophicum* delta H." *J. Bacteriol.* **175**(18): 5970-5977.
- Yi, L., H. Y. Li, L. Sun, L. L. Liu, C. H. Zhang and Z. Xi (2009). "A highly sensitive fluorescence probe for fast thiol-quantification assay of glutathione reductase." *Angew. Chem. Int. Ed.* **48**(22): 4034-4037.
- Zahler, W. L. and W. W. Cleland (1968). "A specific and sensitive assay for disulfides." *J. Biol. Chem.* **243**(4): 716-719.
- Zehnder, A. J. B. and K. Wuhrmann (1977). "Physiology of a Methanobacterium Strain Az." *Arch. Microbiol.* **111**(3): 199-205.
- Zinder, S. H. (1993). "Physiological ecology of methanogens". *Methanogenesis*. J. G. Ferry. New York & London, Chapman & Hall: 128-206.

## **Aus der Doktorarbeit hervorgegangene fünf Publikationen**

## Curriculum vitae

Name: Anne-Kristin Kaster  
Adresse: Kastellsiedlung 9a  
56170 Bendorf/Rhein  
Deutschland  
Kontakt: Arbeit +49 06421-178110  
Privat +49 06427-931718

[kastera@mpi-marburg.mpg.de](mailto:kastera@mpi-marburg.mpg.de)

Geburtsdatum: 06.11.1982 in Neuwied (Germany)

## Ausbildung

Oktober 2007-Oktober 2010: Doktorarbeit am Max Planck Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg

September 2007 Diplom in Chemie, Philipps-Universität Marburg

Januar 2007-September 2007: Diplomarbeit am Max Planck Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg Title: "Hochregulation der [Fe]-Hydrogenase-Synthese in *Methanococcus maripaludis* und *Methanocaldococcus jannaschii* bei Wachstum unter Nickel-Mangelbedingungen."

August 2005-Mai 2006: Forschungsaufenthalt an der University of California, Berkeley in der Gruppe von Professor Dr. Dirk Trauner mit Schwerpunkt Naturstoff-synthese

April 2004: Vordiplom in Chemie an der Philipps-Universität Marburg

September 2003: Vordiplom in Physik an der Philipps-Universität Marburg

März 2003: Praktikum am Max Planck Institute für Biogeochemie in Mainz, Deutschland, mit Schwerpunkt auf Luftpartikel-analysen mit Atomkraftmikroskopie

April 2002-September 2007: Studium der Chemie an der Philipps-Universität Marburg

März 2002: Abitur, Wilhelm-Remy-Gymnasium Bendorf

### Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Professor Dr. Rudolf K. Thauer für die Chance, diese Doktorarbeit unter seiner Anleitung anzufertigen, für das interessante und abwechslungsreiche Thema, für das Wissen, dass der Teufel ein Eichhörnchen sein kann, für sein Vertrauen und für seine Geduld! Herr Thauer, ich bin sehr froh damals in Berkeley zu Ihrem Vortrag gegangen zu sein!

Mein besonderer Dank gilt auch Professor Dr. Wolfgang Buckel. Zum einen für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit und die netten Gespräche, und zum anderen für seine Idee zum Elektronenbifurkations-Mechanismen, auf der letztendlich unsere Arbeitshypothese beruhte.

Dr. Seigo Shima möchte ich an dieser Stelle noch einmal für die Betreuung während meiner Diplomarbeit und sein offenes Ohr während meiner gesamten Zeit hier am MPI danken.

Dr. Ulrich Ermiler vom MPI für Biophysik in Frankfurt danke ich für die gute Kooperation, die netten Gespräche und sein Interesse an meiner Arbeit.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Thauer und Shima möchte ich mich für die nette Atmosphäre und die gute Zusammenarbeit bedanken. Ein ganz besonderer Dank geht dabei an Dr. Meike Brefort für das Korrekturlesen der Arbeit, die lustigen, nie langweiligen Mittagspausen und ihre Freundschaft.

Johanna Moll möchte ich für das unermüdliche Präparieren des Ferredoxins danken, und dafür, dass ich ihre Bench immer okkupieren durfte und sie eine so nette und verständnisvolle Laborbanknachbarin war.

Reinhard Böcher danke ich für seine Unterstützung bei den technischen Widrigkeiten des Laboralltags, und dass er alle Computerprobleme beheben konnte.

Ich danke Kristian Parey für seine Hilfe bei der Aufreinigung des Enzymkomplexes in der Anfangsphase meines Projektes und seine stets gute Laune.

Herrn Professor Ralf Conrad möchte ich für die großzügige Mitbenutzung seiner Gaschromatographen danken.

Many thanks also to Dr. Philippe Constant for his help with the GC and his friendship.

Jörg Kahnt danke ich für die Durchführungen der MALDI-TOF Messungen, sein Interesse an meiner Arbeit und seine Hilfe bei den Unwägbarkeiten des HPLC-Programms.

Jürgen Koch danke ich für das Überlassen der Coenzyme und seine Tipps zu den Coenzym-Synthesen.

Silvan Scheller von der ETH Zürich aus der AG von Professor Jaun möchte ich für die 600 MHz  $^1\text{H}$  NMR Messungen danken.

Dr. Henning Seedorf danke ich für die Einführung in die große Welt der Bioinformatik.

Jenny Pratscher möchte ich für das konstant halten meines Glukosespiegels im oberen Bereich und für ihre Freundschaft danken.

Ich danke meinen Eltern und Christoph für ihre Unterstützung und Liebe. Ohne euch wäre es nicht möglich gewesen!.

**Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel

**„Energistoffwechsel von Cytochrom-freien methanogenen Archaea bei  
Wachstum auf H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub>“**

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Ort, Datum

Anne-Kristin Kaster