



Frank Falinski (Autor)

Überproduktion von Subkomplexen der F₄₂₀H₂-Dehydrogenase aus *Archaeoglobus fulgidus* und abschließende Untersuchungen zur Verbreitung von Methanophenazin in methanogenen Archaea

Frank Falinski

Überproduktion von Subkomplexen der
F₄₂₀H₂-Dehydrogenase aus *Archaeoglobus fulgidus*
und abschließende Untersuchungen zur Verbreitung
von Methanophenazin in methanogenen Archaea



Cuvillier Verlag Göttingen

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/3308>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

1. Einleitung

Die Archaea sind aufgrund von 16 S rRNA-Analysen im phylogenetischen Stammbaum von den Eukarya und den Bacteria getrennt. Sie sind eingeteilt in die Crenarchaeota (extrem thermophile und thermoacidophile Archaea), die Euryarchaeota (insbesondere extrem halophile und methanogene Archaea) (WOESE et al., 1990; BARNS et al., 1996) und die aufgrund von sequenzierten rRNA-Genen neugebildete Gruppe der Korarchaeota (BROWN und DOOLITTLE, 1997). Die Vertreter der letzten Gruppe ließen sich bisher nicht im Labor anziehen. Als vierte Gruppe zählen seit neuestem die Nanoarchaeota dazu, von denen bisher nur *Nanoarchaeum equitans*, ein als Symbiont lebendes Archaeon mit einem nur 0,5 Mb kleinen Genom, isoliert wurde (HUBER et al., 2002).

Die Abtrennung der Archaea von den beiden anderen Organismenreichen wird durch besondere morphologische und biochemische Eigenschaften bestätigt (WOLFE, 1985; KATES et al., 1993; KEELING et al., 1994; KLENK und DOOLITTLE, 1994). Archaeelle Organismen besitzen eine Zellwand, die nicht wie die der Eubakterien aus einem Peptidoglykangerüst (β -1,4-glykosidische Mureinsäureverknüpfung) besteht, sondern aus Pseudomurein (N-Acetyl-Glucosamin β -1,3-glykosidisch mit Talosaminmuronsäure verknüpft), Polysacchariden oder Proteinen (KANDLER und HIPPE, 1977; KANDLER und KÖNIG, 1978). Die Zellwände der Archaea sind deshalb gegen Lysozym und Penicillin resistent. Die Cytoplasmamembran enthält Glycerinether mit C₂₀ (Phytanyl)- und C₄₀ (Biphytanyl)-Isoprenoidalkylen anstatt Fettsäureglycerinestern (TORNABENE und LANGWORTHY, 1978; JONES et al., 1987; DE ROSA und GAMBACORTA, 1988; KATES, 1993). Der Translationsapparat der Archaea ist unempfindlich gegenüber Chloramphenicol, wird aber durch Diphtherietoxin gehemmt, was Rückschlüsse auf den Proteinbiosyntheseapparat zuläßt. Wie bei den Bacteria ist für die Proteinbiosynthese nur eine DNA-abhängige RNA-Polymerase vorhanden, deren Untereinheitenstruktur aber den korrespondierenden Enzymen aus Eukaryoten homolog ist (ZILLIG et al., 1982). Die Größe der archaeellen Ribosomen liegt zwischen derjenigen von Bacteria und Eukarya (SCHMIDT und BÖCK, 1984). Während der Translation wird Methionin statt Formyl-Methionin als Startaminosäure benutzt (JONES et al., 1987), und in der tRNA konnte kein Ribothymidin nachgewiesen werden (FOX et al., 1980). Aus *Saccharomyces cerevisiae* oder *Homo*

sapiens isolierte TATA-Bindeproteine können archaeelle Transkriptionsfaktoren in zellfreien Transkriptionssystemen aus *Methanococcus voltae* ersetzen (WETTACH et al., 1995), und Sequenzen von archaeellen Histonen ähneln denen aus Eukarya (SANDMAN et al., 1990). Außerdem wurden von DI RUGGIERO et al. (1997) DNA-Reparaturproteine identifiziert, die homolog zu den korrespondierenden Enzymen der Eukarya sind und in den Bakterien nicht vorkommen.

Die Gruppe der Archaea steht also bezüglich der Transkription, der Translation und der Replikation den Eukarya näher als den Bacteria, denen sie aber wiederum im Zellstoffwechsel und in der Energiegewinnung ähneln. Diese Befunde finden Bestätigung in Sequenzvergleichen mit Genomen der Eukarya und Bacteria, die durch die archaeellen Genomprojekte der letzten Jahre ermöglicht wurden (BULT et al., 1996; KLENK et al., 1997; SMITH et al., 1997; DEPPENMEIER et al., 2002).

Die in dieser Arbeit untersuchten methanogenen Organismen *Methanobolus* (*Ml.*) *tindarius*, *Methanosarcina* (*Ms.*) *thermophila*, *Methanothermobacter* (*Mt.*) *marburgensis* und *Methanococcus* (*Mc.*) *maripaludis* werden in stoffwechselphysiologischer Hinsicht in zwei Gruppen unterteilt. Die obligat hydrogenotrophen Organismen der Familien *Methanobacteriaceae* (*Mt. marburgensis*), *Methanococcaceae* (*Mc. maripaludis*) und *Methanomicrobiaceae* beschränken sich im Substratspektrum auf H_2/CO_2 und Formiat. Demgegenüber sind methylotrophe Organismen der Familie *Methanosarcinaceae* (*Ml. tindarius*, *Ms. thermophila*) befähigt, einfache C_1 -Verbindungen wie Methanol und Methylamine zu verwerten. Einige Vertreter dieser Gruppe können darüber hinaus auch Acetat bzw. H_2/CO_2 als Energie- und C-Quelle nutzen (JARREL und KALMOKOFF, 1988; WHITMAN et al., 1991; BOONE et al., 1993; DEPPENMEIER et al., 2002a). Durch die Umsetzung der genannten Substrate zu Methan tragen die methanogenen Archaea als letztes Glied der anaeroben Nahrungskette zur Aufrechterhaltung des Kohlenstoffkreislaufes bei (KLASS et al., 1984; GARCIA et al., 2000). Als natürliche Standorte sind Reisfelder, Sümpfe und Feuchtgebiete, Faulschlamm (auch in Faultürmen), Sedimente von Seen, Flüssen und anderen Gewässern sowie der Pansen von Wiederkäuern und der Verdauungstrakt von Termiten zu nennen. Besonders durch verstärkte Rinderzucht und intensiv betriebenen Reisanbau in den letzten Jahrzehnten wurde die Methanogenese stark erhöht, so daß methanogene

Archaea jährlich etwa 10^9 t Methan produzieren (FRIEDMANN et al., 1990; WEISS und THAUER, 1993). Methanotrophe Bakterien reoxidieren gut die Hälfte davon, während die andere Hälfte in die Atmosphäre gelangt und zum Treibhauseffekt beiträgt. So lassen sich inzwischen etwa 70 % des Methangehaltes der Atmosphäre, der laut CAMMACK (1997) bei 1,8 ppm liegt, auf biologische Methanogenesevorgänge zurückführen.

Das ebenfalls untersuchte Archaeon *Archaeoglobus (A.) fulgidus* gehört in die Ordnung der Archaeoglobales, die einzige bekannte archaeelle Ordnung, deren Vertreter zur Sulfatreduktion befähigt sind (STETTER et al., 1987). Es ist ein hyperthermophiler Organismus, der in einem Temperaturbereich zwischen 62 °C und 92 °C und bei einem Temperaturoptimum von 83 °C anaerob wächst. *A. fulgidus* ist hauptsächlich in submariner Umgebung an hydrothermalen Arealen zu finden.

Aus phylogenetischer Sicht sind Vertreter der Ordnungen Archaeoglobales und Methanosarcinales nahe verwandt (ACHENBACH-RICHTER et al., 1987), und sie zeigen auch einige biochemische Übereinstimmungen (THAUER, 1998). *A. fulgidus* kann organoheterotroph mit verschiedenen Kohlenstoff- und Energiequellen (z.B. Laktat, Pyruvat, 2,3-Butandiol) wachsen, aber auch lithoautotroph mit H_2 , Thiosulfat und CO_2 angezogen werden (STETTER, 1988; VORHOLT et al., 1995). Ebenfalls stoffwechselphysiologisch sind zwischen *A. fulgidus* und den methanogenen Archaea einige Parallelen zu entdecken, wobei aber nur die letzte Gruppe zur Methanogenese fähig ist, da den Archaeoglobales die Coenzyme M und F_{430} sowie die Methyl-Coenzym M-Reduktase fehlen. In allen erwähnten Organismen sind die speziellen Cofaktoren Methanofuran und Tetrahydromethanopterin enthalten, die als C_1 -Gruppenüberträger fungieren (VAN BEELEN et al., 1984; LEIGH et al., 1985; MÖLLER-ZINKHAN et al., 1989). Der zentrale Elektronenüberträger in diesen Archaea ist das 5-Deazaflavin-Derivat F_{420} , das in chemischer Hinsicht dem monozyklischen Nikotinamid der Eukarya und Bacteria gleicht. Die Regeneration des reduzierten F_{420} erfolgt bei den methylotrophen Methanarchaea und bei *A. fulgidus* über eine $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase. Dieser Enzymkomplex wurde sowohl aus Vertretern der Methanosarcinales wie auch aus *A. fulgidus* isoliert (HAASE et al., 1992; KUNOW et al., 1994; ABKEN und DEPPENMEIER, 1997). Beim Wachstum auf Methanol konnte in dem methylotrophen methanogenen Organismus

Ms. mazei Gö1 gezeigt werden, daß die $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase Teil eines energiekonservierenden Elektronentransportsystems, der $F_{420}H_2$:Heterodisulfid-Oxidoreduktase, ist. Es verbindet die Oxidation des reduzierten F_{420} mit der Reduktion eines Heterodisulfids, zusammengesetzt aus den beiden Coenzymen M (2-Mercaptoethansulfonat) und B (7-Mercaptoheptanoylthreoninphosphat; DEPPENMEIER et al., 1990a, b, 1996). Die Elektronen des $F_{420}H_2$ werden durch die $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase auf den neu entdeckten membranintegralen Elektronenüberträger Methanophenazin übertragen, wobei ein zur ATP-Synthese nutzbarer Protonengradient aufgebaut wird (ABKEN, 1997; ABKEN et al., 1998; BÄUMER et al., 1998; IDE et al., 1999; BÄUMER et al., 2000). In den obligat hydrogenotrophen methanogenen Organismen *Mc. voltae* und *Mt. marburgensis* konnten ebenfalls H_2 - bzw. $F_{420}H_2$ -abhängige Heterodisulfid-Reduktionssysteme nachgewiesen werden (SETZKE et al., 1994; BRODERSEN, 1995), die sich jedoch in ihrer Zusammensetzung von e^- -Transportern aus *Methanosarcina*-Arten unterscheiden. Eine Beteiligung dieser beiden Systeme an der Energiekonservierung wird zwar postuliert, konnte aber bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang wird auch vermutet, daß nicht Methanophenazin als membranintegraler Elektronenüberträger dient (FALINSKI, 1998), da in obligat hydrogenotrophen Archaea keine Cytochrome vorkommen (KÜHN et al., 1983; JUSSOFIE und GOTTSCHALK, 1986). In *A. fulgidus* wird beim Wachstum auf Laktat und Sulfat ebenfalls die Beteiligung der $F_{420}H_2$:Chinon-Oxidoreduktase am energiekonservierenden System vermutet, welches die Oxidation des Laktats mit der Reduktion des Sulfats verbindet (KUNOW et al., 1994). Hier werden die Elektronen des reduzierten F_{420} durch die $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase auf ein membranintegrales Menachinon-Derivat übertragen, wobei vermutlich ebenfalls Protonen über die Membran transloziert werden (TINDALL et al., 1989).

In letzter Zeit wurden Homologien zwischen der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase und der pro- und eukaryotischen NADH:Ubichinon Oxidoreduktase (Komplex I) auffällig (WEIDNER et al., 1993). Der Komplex I ist eine Komponente der Atmungskette, die den Elektronentransfer von NADH auf Ubichinon oder bei fakultativ anaeroben Bakterien auf Menachinon katalysiert. Aufgebaut ist er aus drei Modulen, einem NADH- bzw. $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase-Modul, einem Hydrogenase-Modul und einem Transporter-Modul (FRIEDRICH und WEISS, 1997).