

Extrazelluläre Elektronenübertragung in einer
syntrophen Kokultur aus *Geobacter sulfurreducens*
und *Wolinella succinogenes*

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften des Fachbereichs
für Biologie
an der Universität Konstanz

vorgelegt von

Jan Kaden

aus Eisenhüttenstadt

Konstanz 2003

Tag der mündlichen Prüfung: 11. November 2003

Referent: Prof. Dr. B. Schink

Referent: Prof. Dr. A. M. Cook

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE	IV
1 EINLEITUNG	1
1.1 MIKROBIELLER ABBAU KOMPLEXER ORGANISCHER VERBINDUNGEN.....	1
1.2 SYNTROPHIE	2
1.2.1 <i>Interspecies Hydrogen transfer</i>	2
1.2.2 <i>Andere Carriersubstanzen</i>	3
1.3 DIE SYNTROPHE OXIDATION VON ACETAT.....	4
1.4 ELEKTRONENÜBERTRAGUNG BEI DER ACETATOXIDATION DURCH <i>GEOBACTER</i> <i>SULFURREDUCENS</i>	5
1.5 ZIELSETZUNG:.....	8
2 MATERIAL UND METHODEN	10
2.1 MIKROBIOLOGISCHE METHODEN	10
2.1.1 <i>Bakterienstämme</i>	10
2.1.2 <i>Medien</i>	10
2.1.3 <i>Kultivierungstechniken</i>	11
2.2 WACHSTUMSVERSUCHE.....	11
2.3 BIOCHEMISCHE METHODEN	12
2.3.1 <i>Zellsuspensionsexperimente</i>	12
2.3.2 <i>Herstellung von zellfreien Extrakten</i>	13
2.3.3 <i>Fraktionierung des Zellextrakts</i>	14
2.3.4 <i>Bestimmung von Enzymaktivitäten</i>	15
2.3.5 <i>Cytochromreinigung</i>	17
2.3.6 <i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese</i>	19
2.3.7 <i>Färbung von SDS-PAGE-Gelen</i>	19
2.4 IMMUNOLOGISCHE METHODEN	20
2.4.1 <i>Präparation des Antigens</i>	20
2.4.2 <i>Immunisierung eines Kaninchens</i>	21
2.4.3 <i>Antikörperiterbestimmung mit ELISA (enzyme linked immunoabsorbent assay)</i> .	21
2.4.4 <i>Western-Blot-Analyse</i>	22
2.5 PRÄPARATIVE METHODEN.....	23
2.5.1 <i>Konzentration von Kulturüberständen</i>	23

2.5.2	<i>Chinonextraktion</i>	24
2.5.3	<i>Präparation von Ferrihydrit</i>	25
2.5.4	<i>Herstellung von TitaniumCitrat-Lösung</i>	26
2.5.5	<i>Herstellung von Cystin-Lösung</i>	26
2.6	ANALYTISCHE METHODEN	26
2.6.1	<i>Mikroskopische Methoden</i>	26
2.6.2	<i>HPLC-Analysen</i>	26
2.6.3	<i>Spektrophotometrische Untersuchungen</i>	28
2.6.4	<i>Massenspektrometrie</i>	30
2.6.5	<i>Messung von apparenten Redoxpotentialen</i>	30
2.7	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	31
2.7.1	<i>DNA-Extraktion</i>	31
2.7.2	<i>PVPP-Reinigung der DNA</i>	31
2.7.3	<i>DNA-Konzentrationsbestimmung</i>	32
2.7.4	<i>Polymerase-Ketten-Reaktion</i>	32
2.7.5	<i>Sequenzierung</i>	33
2.7.6	<i>Analyse der N-terminalen Aminosäuresequenz</i>	33
2.8	CHEMIKALIEN UND GASE	34
3	ERGEBNISSE	35
3.1	DIE SYNTROPHE KOKULTUR <i>G. SULFURREDUCENS</i> / <i>WOLINELLA SUCCINOGENES</i>	35
3.1.1	<i>Wachstumsversuche zur syntrophen Kopplung von G. sulfurreducens mit W. succinogenes</i>	35
3.1.2	<i>Kokulturen mit verwandten Stämmen</i>	36
3.2	REINIGUNG UND CHARAKTERISIERUNG DES PERIPLASMATISCHEN 10 kDA CYTOCHROMS	36
3.2.1	<i>Reinigung</i>	36
3.2.2	<i>Charakterisierung des Cytochromes</i>	38
3.2.3	<i>Antikörperproduktion</i>	40
3.3	LOKALISATION VON CYTOCHROMEN IN VERSCHIEDENEN ZELLKOMPARTIMENTEN VON <i>GEOBACTER SULFURREDUCENS</i>	41
3.4	EXPERIMENTE ZUR CYTOCHROMAUSSCHÜTTUNG INS MEDIUM	42
3.4.1	<i>Konzentration des Kulturüberstandes</i>	42
3.4.2	<i>Untersuchung der im Kulturüberstand gefundenen Cytochrome</i>	43
3.4.3	<i>Physiologie</i>	45

3.5	UNTERSUCHUNGEN ZUR IDENTIFIZIERUNG DES MÖGLICHEN ELEKTRONENÜBERTRÄGERS.....	48
3.5.1	<i>Chinone als alternative Elektronenüberträger.....</i>	48
3.5.2	<i>Physiologische Untersuchungen.....</i>	54
3.5.3	<i>Biochemische Untersuchungen zum Elektronenüberträger.....</i>	61
3.5.4	<i>Messung des apparenten Redoxpotentials in syntroph Acetat oxidierenden Kulturen.....</i>	65
3.5.5	<i>Induzierbarkeit des Systems.....</i>	66
3.5.6	<i>Biochemie der Cystinreduktion.....</i>	67
3.5.7	<i>Das Sulfid /Schwefel Paar als alternativer Elektronenüberträger.....</i>	71
3.5.8	<i>Bildung von Sulfid aus Cystein.....</i>	73
4	DISKUSSION.....	75
4.1	SYNTROPHE ACETATOXIDATION DURCH KOKULTUREN VON <i>G. SULFURREDUCENS</i> UND <i>W. SUCCINOGENES</i>	75
4.2	ZELLULÄRE, EXPORTIERTE ELEKTRONENÜBERTRÄGER.....	75
4.2.1	<i>Cytochrome als extrazelluläre Elektronenüberträger.....</i>	75
4.2.2	<i>Einfluß von AQDS als Modellsubstanz für Huminsäuren.....</i>	79
4.2.3	<i>Chinone als extrazelluläre Elektronenüberträger.....</i>	81
4.3	CYSTEIN/CYSTIN-PAAR ALS ELEKTRONENÜBERTRÄGER.....	83
4.3.1	<i>Energetische Betrachtungen.....</i>	85
4.3.2	<i>Kinetische Betrachtungen.....</i>	86
4.3.3	<i>Biochemische Aspekte.....</i>	86
4.4	ANDERE THIOLE.....	88
4.5	DAS SULFID/SCHWEFEL-PAAR ALS ELEKTRONENÜBERTRÄGER.....	89
4.6	ÖKOLOGISCHE ASPEKTE.....	91
4.7	ANREGUNGEN FÜR WEITERFÜHRENDE UNTERSUCHUNGEN.....	92
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	93
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	95

Abkürzungen und Symbole

Abb.	Abbildung
ADMA	4-Amino-N,N-dimethylanilin-sulfat
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
ATCC	American Type Culture Collection
AQDS	2,6-Antrachinondisulfonat (oxidierte Form)
AHQDS	2,6-Antrachinondisulfonat (reduzierte Form)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Rinderserumalbumin
BV	Benzylviologen
CHAPS	3((3-(Cycloaminopropyl)-dimethylamonio)-1-propansulfonat
CSPD	Disodium3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxethane-3,2'-(5'-Chloro)Tricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}] Decan}-4-yl)Phenylphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DHNA	Dihydroxynaphtoesäure
DSM / DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	1,4-Dithiothreitol
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-nitrobezooesäure), Ellmanns Reagenz
ε	Extinktionskoeffizient
$E^{0'}$	Redoxpotential unter Standardbedingungen bei pH 7
E_h	Apparentes Redoxpotential
EDTA	Ethylendinitrilotriessigsäure
ELISA	Enzyme linked Immunoabsorbent Assay
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
g	Erdbeschleunigung $9,81 \text{ m} \times \text{s}^{-2}$
$\Delta G^{0'}$	Änderung der freien Enthalpie unter Standardbedingungen bei pH 7
HIC	Hydrophobe Interaktion
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie
KPP	Kaliumphosphatpuffer
Mk-x	Menachinon mit Seitenkette der Länge x
M_r	Relative Molekularmasse

MP	Milchpulver
NAD(P)	Nicotinsäureamid-adenin-dinukleotid-(phosphat) reduzierte Form
NAD(P)H	Nicotinsäureamid-adenin-dinukleotid-(phosphat) oxidierte Form
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OD _λ	“Optische Dichte” bei der Wellenlänge λ
p.a.	<i>pro analysi</i>
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMS	Phenazinmethosulfat
PVDF	Polyvinyliden-difluorid
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-Buffered Saline
TCA	Trichloressigsäure
Tricine	N-(Tris-hydroxymethyl-methyl)-glycin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (μmol Substrat × min ⁻¹)
rpm	Umdrehungen pro Minute
UV/Vis	Ultraviolett / Visible
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent

1 Einleitung

1.1 Mikrobieller Abbau komplexer organischer Verbindungen

Organische Substanz wird in biologischen Systemen über verschiedene, oft komplexe, metabolische Netzwerke abgebaut. An anoxischen Süßwasserstandorten sind die Endprodukte dieses Abbaus in der Regel CO_2 und Methan. Die polymere organische Substanz wird in einem ersten Schritt durch extrazelluläre hydrolytische Enzyme in Oligo- und Monomere zerlegt. Diese Enzyme werden von der klassischen primären Gärern ausgeschieden, die die entstehenden Monomere weitervergären. Einige der Gärprodukte, die C_1 -Verbindungen (z.B. CO_2 oder Formiat) und Wasserstoff können von methanogenen Archebakterien direkt zu Methan umgesetzt werden. Acetat kann ebenfalls von acetiklastischen Methanogenen direkt genutzt, jedoch auch zu Kohlendioxid weiteroxidiert werden. Homoacetogene Bakterien können auf der anderen Seite aus C_1 Verbindungen Acetat bilden, so dass die beiden Substratpools der Methanogenese miteinander verbunden sind. Bei vielen primären Gärungen entstehen jedoch Produkte wie Alkohole, längerkettige und verzweigt-kettige Fettsäuren und aromatische Verbindungen, die von Methanogenen nicht verstoffwechselt werden können. Diese werden von den „sekundären“ Gärern zu Acetat, CO_2 , Wasserstoff und möglicherweise Formiat disproportioniert. Diese Produkte können dann wiederum als Substrate in der Methanogenese genutzt werden (Abb.1-1) (Schink 1997; Schink und Stams 2002).

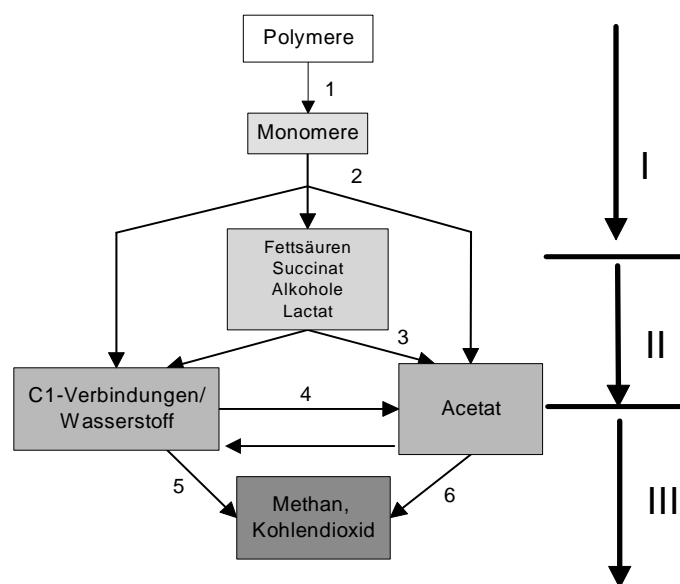


Abbildung 1-1: Kohlenstoff- und Elektronenfluss durch die verschiedenen metabolischen Gruppen, die am Abbau komplexer, organischer Substrate zu Kohlendioxid und Methan beteiligt sind. 1) und 2) primäre Gärer; 3) sekundäre Gärer; 4) homoacetogene Bakterien; 5) Wasserstoff-oxidierende Methanogene; 6) Acetatverwertende Methanogene; I, II, III sind die verschiedenen metabolischen Stufen (modifiziert nach Schink, 1997)

Der methanogene Abbau ist der, im Vergleich zum aeroben Abbau, am wenigsten exergone Prozess. Daher werden, soweit möglich, entsprechend spezialisierte Bakterien andere respiratorische Wege bevorzugen (Nitratreduktion, Sulfatreduktion, Eisenreduktion usw.). Dem ist jedoch unter anoxischen Bedingungen häufig eine Grenze durch die Verfügbarkeit der benötigten Elektronenakzeptoren gesetzt. Damit werden die verfügbaren Elektronenakzeptoren zum entscheidenden Faktor dafür, welche Abbauprozesse möglich sind. In marinen Sedimenten stellt sich die Situation anders dar, da hier Sulfat als Elektronenakzeptor in ausreichender Konzentration zur Verfügung steht und die Gruppe der sulfatreduzierenden Bakterien metabolisch so vielseitig ist, dass alle primären Gärprodukte unter Bildung von Sulfid zu CO₂ oxidiert werden können (Widdel 1988). Des Weiteren haben sulfatreduzierende Bakterien eine höhere Affinität zum Substrat Wasserstoff als methanogene (Kristjansson et al. 1982).

1.2 Syntrophie

Eine besondere Situation ergibt sich, wenn an einem Standort zwar ein oxidierbares Substrat, aber kein vom Bakterium nutzbarer Elektronenakzeptor verfügbar ist. In diesem Fall ist ein Abbau der organischen Substanz nur realisierbar, wenn die anfallenden Elektronen auf anderem Wege abgegeben werden können. Das ist möglich, wenn ein zweites Bakterium zwar das organische Substrat nicht oxidieren, aber den vorhandenen Elektronenakzeptor nutzen kann. Kommt es in so einem Fall zu einer Elektronenübertragung zwischen den beiden Bakterienarten, können beide gemeinsam den Abbauprozess durchführen. Den Energiegewinn der Gesamtreaktion müssen sich dabei die beiden Partner teilen. Eine solche Assoziation nennt man syntroph, wenn keiner der beiden Partner das Substrat allein abbauen und keiner der Partner durch Kosubstrate oder Vitamine ersetzt werden kann (Schink 1997; Schink und Stams 2002).

1.2.1 *Interspecies Hydrogen transfer*

Die Elektronen können z.B. in Form von Wasserstoff übertragen werden. Dabei ist der Wasserstoffpartialdruck in der Kultur von besonderer Bedeutung. Klassisches Beispiel einer syntrophen Kultur ist die Ethanol-oxidierende Kultur *Methanobacillus omelianskii* (Barker 1940). Bryant et al. (1967) entdeckten, dass diese Kultur eigentlich aus einem Ethanol-oxidierenden S-Organismus und einem methanogenen Bakterium M. o. H. besteht. Die bei der Ethanoloxidation freiwerdenden Elektronen werden dabei über einen „interspecies hydrogen transfer“ übertragen. Die Oxidation von Ethanol zu Acetat und Wasserstoff ist jedoch unter Standardbedingungen ein endergoner Prozess und somit als dissimilatorischer Stoffwechselweg unmöglich. Sinkt der Wasserstoffpartialdruck jedoch unter einen Wert von 10⁻³ bar, wird das

chemische Gleichgewicht soweit verschoben, dass die Reaktion exergon wird. In der syntrophen *M. omelianskii*-Kultur verbraucht der methanogene Partner den Wasserstoff und sorgt damit für die entsprechende Erniedrigung des Partialdrucks. Dabei ist die Gesamtreaktion jedoch nur in einem beschränkten Konzentrationsbereich möglich, denn wenn die Wasserstoffkonzentration zu weit absinkt, wird die Methanogenese endergon. Damit sind die beiden Partner in der *M. omelianskii*-Kultur strikt aufeinander angewiesen. Nur wenn der Wasserstoff ständig verbraucht wird, kann die Oxidation des organischen Substrats ablaufen, und nur wenn ständig Wasserstoff gebildet wird, ist Methanogenese möglich. Die syntrophe Oxidation wurde für eine ganze Reihe von Substraten der sekundären Gärer beschrieben, so z.B. für primäre Alkohole wie z.B. Ethanol (Schink 1885; Bryant et al. 1967); Fettsäuren wie Butyrat (McInerney et al. 1979; McInerney et al. 1981) oder Propionat (Boone und Bryant 1980), die Oxidation von Isovalerat (Stieb und Schink 1986) oder von aromatischen Verbindungen z.B. Benzoesäure (Mountfort und Bryant 1982; Wallrabenstein et al. 1995). Eine umfassende Aufstellung der bislang bekannten syntrophen Abbauprozesse ist in Schink und Stams (2002) enthalten.

1.2.2 Andere Carriersubstanzen

Viele dieser syntrophen Kulturen verwenden den „interspecies hydrogen transfer“, es sind jedoch auch andere Elektronenüberträger bekannt. So wurde der Begriff „syntrophe Kultur“ erstmals für die Beschreibung der Kooperation zwischen dem schwefelreduzierenden Bakterium *Desulfuromonas acetoxidans* und phototrophen grünen Schwefelbakterien der Gattung *Chlorobium* verwendet (Pfennig und Biebl 1976). In dieser Kultur wird der während der Acetatoxidation gebildete Schwefelwasserstoff von den Phototrophen zu Schwefel reoxidiert und damit die Acetatoxidation über ein Sulfid/Schwefel-Paar syntroph an die Photosynthese gekoppelt. Formiat wurde seit den ersten Arbeiten (Bryant et al. 1967; McInerney und Wofford 1992) als alternativer Elektronencarrier zum Wasserstoff angesehen, da die syntrophen Partner neben Wasserstoff auch Formiat oxidieren können. Das Standard Redox-Potential des CO_2 /Formiat-Paares (- 420 mV) ist bei pH 7 praktisch identisch mit dem des Proton/Wasserstoff-Paares (- 414 mV) (Schink und Stams 2002). Formiat ist aufgrund von günstigeren kinetischen Eigenschaften unter Umständen sogar ein besserer Elektronenüberträger (Boone et al. 1989). Daher wird angenommen, dass Formiat der bevorzugte Carrier in wässrigen Systemen mit großen Diffusionsstrecken ist, wogegen Wasserstoff in dichten Bakterienaggregaten dominieren könnte (Schink und Stams 2002). Wahrscheinlich sind Wasserstoff und Formiat oft gegeneinander als Carrier austauschbar (Wu et al. 1993); (Bleicher und Winter 1994) und werden in vielen Fällen wahrscheinlich sogar gleichzeitig benutzt (Schink 1991). Auch bei der syntrophen Acetatoxida-

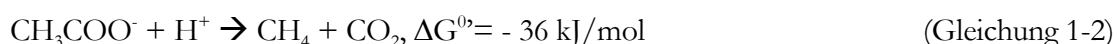
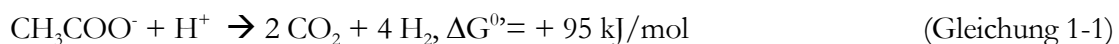
tion unter thermophilen Bedingungen wird Formiat neben Wasserstoff als Carrier verwendet (Hattori et al. 2001).

Acetat ist neben Wasserstoff und Formiat Produkt der sekundären Gärungen. Es ist damit ebenso eine syntrophe Assoziation denkbar, in der die Verschiebung des chemischen Gleichgewicht der Disproportionierungsreaktion nicht ausschließlich durch eine Erniedrigung des Wasserstoffkonzentration erreicht wird, sondern gleichfalls durch einen Verbrauch von Acetat durch z.B. acetatverwertende Methanogene. Hinweise auf einen solchen Zusammenhang zeigen Experimente, in denen der syntrophe Abbau von Fettsäuren (Fukuzaki et al. 1990) oder Benzoat (Schocke und Schink 1997) durch die Akkumulation bzw. den Zusatz von Acetat gehemmt wurde.

An natürlichen Standorten findet man häufig exogene redoxaktive Substanzen, die für eine elektronenübertragende Funktion zu anorganischen Elektronenakzeptoren in Frage kommen. Zu diesen Substanzen gehören vor allem Huminstoffe (Lovley et al. 1996a). Es wurde auch ein Einfluss von chinoiden Substanzen, die von den Bakterien selbst ins umgebende Medium abgegeben werden, auf die Elektronenübertragung zu anorganischen Akzeptoren vermutet (Newman und Kolter 2000).

1.3 Die syntrophe Oxidation von Acetat

Wie bereits ausgeführt, gibt es Methanogenese sowohl mit CO₂ und Wasserstoff, als auch mit Acetat. Daher ist die Oxidation von Acetat zu CO₂ und Wasserstoff eigentlich für die Mineralisation der organischen Substanz nicht notwendig. Besonders wenn man betrachtet, dass die Acetatoxidation (Gleichung 1-1) unter Standardbedingungen endergon ist und die Gesamtreaktion zum Methan (Gleichung 1-2) mit nur 18 kJ/mol pro Teilreaktion nur einen äußerst geringen Energieertrag liefert.



Somit haben aceticlastische Methanogene (z.B. *Methanosarcina barkeri* und *Methanosaeta soehngenii*) gegenüber einer syntrophen Kokultur den Vorteil, dass sie den gesamten Betrag innerhalb eines Organismus nutzen können und ihn nicht auf zwei syntrophe Partner verteilen müssen (Schink und Stams 2002). Es ist jedoch charakteristisch für dissimilatorische Netzwerke, dass es bei vielen Schritten Verzweigungspunkte gibt und Abbau somit über verschiedene

Wege möglich wird, die in Abhängigkeit der gegebenen Bedingungen mehr oder weniger stark genutzt werden. So wurde gefunden, dass für die Methanogenese aus Acetat bei moderat erhöhter Temperatur (58 °C), im Gegensatz zur direkten Methanogenese durch acetiklastische Archaeobakterien, das Zusammenwirken von zwei verschiedenen Bakterien notwendig war. Dieser Stoffwechselweg wurde erstmals von (Zinder und Koch 1984) für das moderat thermophile Bakterium AOR beschrieben. Dieser syntrophe Acetatoxidierer konnte in Reinkultur mit CO₂ und H₂ mit einem homoacetogenen Stoffwechsel wachsen (Lee und Zinder 1988c; Lee und Zinder 1988b). Das Bakterium benutzt den für Homoacetogene typischen CO-Dehydrogenase-Weg (Lee und Zinder 1988a). Für das thermophile Bakterium *Thermoacetogenium phaeum* wurde der gleiche Stoffwechsel beschrieben (Hattori et al. 2000). Interessanterweise können diese Bakterien den gleichen Stoffwechselweg zur Acetatbildung und zur Acetatoxidation benutzen, was darauf zurückzuführen ist, dass die Reaktionen so nahe am thermodynamischen Gleichgewicht ablaufen, dass je nach Konzentrationsverhältnis der Substrate entweder die Hin- oder die Rückreaktion genügend Energie für ein Wachstum liefert (Schink und Stams 2002). Durch die erhöhte Temperatur ist der Gesamtenergieertrag der Acetatoxidation zu Methan und CO₂ mit 42 kJ/mol (bei 58°C) etwas größer und die Reaktion damit vorteilhafter, so dass sich die Konkurrenzsituation im Vergleich zu Methanogenen günstiger darstellt. Es findet jedoch auch unter diesen Bedingungen direkte Methanogenese statt (*Methanosarcina thermophila*) (Zinder und Mah 1979). Auf der anderen Seite ist mit *Clostridium ultunense* (Schnürer et al. 1997) eine mesophile Kultur bekannt, die bei geringerer Temperatur (bei 35°C) wächst und syntroph Acetat oxidiert (Schnürer et al. 1994; Schnürer et al. 1996). Das zeigt, dass syntrophe Acetatoxidation auch in diesem Temperaturbereich möglich ist und der Energiebetrag von 38 kJ offensichtlich für ein syntrophes Wachstum zweier Partner gerade noch ausreicht. Die Kultur wurde jedoch im Medium mit erhöhter Ammoniumkonzentration isoliert. Daher scheint die syntrophe Acetatoxidation zu Methan nur unter zusätzlichen Stressbedingungen aufzutreten, die die acetiklastische Methanogenese hemmen (Schnürer et al. 1994).

1.4 Elektronenübertragung bei der Acetatoxidation durch *Geobacter sulfurreducens*

Geobacter sulfurreducens kann Acetat zu CO₂ oxidieren. Die bei dieser Reaktion frei werdenden Elektronen werden normalerweise auf Elektronenakzeptoren wie Fumarat oder Eisen(III) übertragen. Dabei werden Succinat respektive Eisen(II)ionen gebildet. Auch elementarer Schwefel oder Malat können reduziert werden. Nitrat, Sulfat oder Thiosulfat werden dagegen nicht reduziert (Caccavo et al. 1994). Da die Gattung Geobacteraceae als die bedeutendste

Gattung eisenreduzierender Bakterien angesehen wird (Rooney-Varga et al. 1999; Snoeyenbos-West et al. 2000), wurde die Elektronenübertragung auf Eisen als terminalen Elektronenakzeptor intensiv untersucht. Bis heute konnte der Mechanismus der Eisenreduktion in *G. sulfurreducens* jedoch nicht befriedigend geklärt werden. Eine Eisenreduktaseaktivität mit NADH oder reduziertem Pferdeherz-Cytochrom *c* als Elektronendonator in *G. sulfurreducens* wurde von (Gaspard et al. 1998) beschrieben. Die in der äußeren Membran lokalisierte Eisenreduktion wurde jedoch nur mit komplexiertem Fe(III)NTA, Fe(III)EDTA oder Fe(III)Citrat beobachtet. Eine von (Magnuson et al. 2000) aus *G. sulfurreducens* gereinigte Eisenreduktase mit einer molekularen Masse von 300 kDa war ebenfalls membranständig und reduzierte Eisen(III) ebenfalls mit NADH, jedoch mit sehr geringer Aktivität und wiederum nur mit komplexiertem Eisen. Einzig ein 89 kDa großes Cytochrom *c* erfüllt die geforderten Bedingungen einer terminalen Eisenreduktase. Dieses Protein ist in der äußeren Membran lokalisiert, und reduziert amorphes Ferrihydrit mit einer Rate, die mit der anderer Eisenreduktasen (z.B. aus *Desulfovibrio* spp.) vergleichbar ist (Magnuson et al. 2001). Die Elektronen werden also über eine terminale Eisenreduktase in der äußeren Membran von *G. sulfurreducens* direkt auf Eisen(III) übertragen. Dabei ergibt sich jedoch das Problem, dass Eisen(III) bei neutralem pH-Wert praktisch unlöslich ist. Eine direkte Interaktion der membranständigen Eisenreduktase mit dem Eisen(III) ist somit schwierig, da ein ständiger direkter Kontakt zwischen Zelloberfläche und der Oberfläche des Eisen(III)-Minerals spätestens dann nicht mehr gegeben sein kann, wenn die Oberfläche zu Eisen(II) reduziert ist. Alternativ dazu könnten die Elektronen jedoch, ähnlich der Elektronenübertragung in einer syntrophen Kultur, mit Hilfe eines Carriersystems auf das ungelöste Eisen(III) übertragen werden. Dabei werden vor allem die an vielen Standorten vorhandenen Huminstoffe diskutiert (Lovley et al. 1996a). Huminstoffe sind hochmolekulare Assoziationen, die beim Abbau organischer Substanz entstehen und sich hauptsächlich aus den schwer abbaubaren Anteilen der Biomasse zusammensetzen. Sie sind strukturell sehr heterogen und enthalten viele redoxaktive Gruppen. Vor allem über die enthaltenen chinoiden Anteile könnte der Elektronentransfer zum Eisen stattfinden. In der Tat wurde gezeigt, dass die Eisenreduktion in Anwesenheit von Antrachinon-2,6-disulfonat (AQDS), einer Modellsubstanz für Huminsäuren, stark zunimmt (Lovley et al. 1996a). Durch andere Autoren wird der Einfluss von Substanzen diskutiert, die von den Bakterien ausgeschieden werden. Das wird zum einen für Chinone angenommen (Newman und Kolter 2000), zum anderen sind auch kleine redoxaktive Proteine, wie z.B. Cytochrome denkbar (Seeliger et al. 1998). Auch Schwefelverbindungen könnten einen Einfluss auf die Elektronenübertragung haben. So wurde gefunden, dass der Zusatz von Cystein die Eisenreduktion verstärken kann (Doong und Schink 2002).

In Abwesenheit eines anorganischen Elektronenakzeptors können die Elektronen jedoch auch in einer syntrophen Interaktion auf das anaerobe Partnerbakterium *Wolinella succinogenes* übertragen werden (Cord-Ruwisch et al. 1998). Die Kokultur kann Acetat zu CO_2 oxidieren und mit den dabei freigesetzten Elektronen wird Nitrat zu Ammonium reduziert. Reinkulturen von *G. sulfurreducens* oder *W. succinogenes* bauen Acetat mit Nitrat als Elektronenakzeptor nicht ab. Dabei wird im Gegensatz zu den eben beschriebenen Bakterien nicht der CO-Dehydrogenase-Weg benutzt. Vielmehr wird Acetat über die Reaktionen des Citratzyklus abgebaut (Galushko und Schink 2000). Wächst *G. sulfurreducens* in Reinkultur mit Acetat plus Fumarat, werden die Reaktionen des Citratzyklus in einer offenen Schleife zur Fumarat-Reduktion genutzt. Bei Wachstum in Kokultur wird dagegen der komplette Tricarbonsäure-Zyklus durchlaufen. Die Aktivierung des Acetat erfolgt in beiden Fällen über eine Succinyl-CoA : Acetyl-CoA-Transferase Reaktion, in der Reinkultur jedoch zusätzlich, unter Investition eines ATP, über Acetatkinase und Phosphotransacetylase (Galushko und Schink 2000).

Im Gegensatz zu dem bereits erwähnten Konzept, dass die Elektronen über den „Interspecies hydrogen Transfer“ vom Donor- zum Akzeptorbakterium übertragen werden (Schink 1997), gibt es für die *G. sulfurreducens* / *W. succinogenes* Kokultur mehrere Hinweise dafür, dass ein alternativer Elektronencarrier benutzt wird. Die pro mol oxidiertem Acetat gebildete Zellmasse war ca. 18 g und bis zu 80 % dieser Trockenmasse war *G. sulfurreducens* (Zellzahlverhältnis *G. sulfurreducens* zu *W. succinogenes* 2,1:1 bis 4,1:1). Wenn die Elektronen über Wasserstoff übertragen würden, müsste *W. succinogenes* 14 - 18 g Trockenmasse pro mol Acetat bilden, da *W. succinogenes* Reinkulturen 3,5 – 4,5 g Trockenmasse pro mol Wasserstoff oder Formiat bilden können und pro mol Acetat 4 mol Wasserstoff gebildet werden müssten. In der Kokultur ist der Wachstumsertrag für *W. succinogenes* mit 3 - 4 g Trockenmasse jedoch wesentlich geringer. Auf der anderen Seite sollte *G. sulfurreducens* mit dem vorhandenen Wasserstoffpartialdruck von 0,02 - 0,04 Pa eine Energie von -53 kJ/mol oxidiertem Acetat zur Verfügung stehen, genug um 2/3 mol ATP zu bilden. Auch unter Annahme optimaler Bedingungen könnten mit dieser Energiemenge maximal 6,6 g Trockenmasse gebildet werden. Offensichtlich muss *G. sulfurreducens* die Elektronen an einen Elektronenübertäger abgeben, dessen Redoxpotential positiver als das des Proton/Wasserstoff Redoxpaar ist (Cord-Ruwisch et al. 1998). Gegen Wasserstoff als Elektronenübertäger spricht auch, dass in *G. sulfurreducens* Reinkulturen eine hohe Hydrogenaseaktivität gemessen wurde, diese jedoch in *G. sulfurreducens* / *W. succinogenes* Kokulturen nicht detektierbar war (Galushko und Schink 2000). Ein kleines periplasmatisches Cytochrom mit einem Redoxpotential von -167 mV, das von *G. sulfurreducens* während des Wachstums ins Medium abgegeben wird, wurde als ein alternativer Elektronencar-

rier in der Kokultur und bei der Reduktion von Ferrihydrit diskutiert (Seeliger et al. 1998). Das gereinigte Cytochrom kann Eisen(III) reduzieren, es wird von *G. sulfurreducens* reduziert und von *W. succinogenes* mit Nitrat als Elektronenakzeptor reoxidiert. Die Abgabe des Cytochroms schon während des Wachstums, parallel zur metabolischen Aktivität der Zellen deutete auf einen gerichteten Prozess. Gegen eine zufällige Freisetzung des Cytochroms durch Lyse eines Teils der Bakterien sprach auch, dass weder messbare Proteinkonzentrationen noch Malat-Dehydrogenase-Aktivität im Kulturüberstand gefunden wurden. Die Herkunft des Cytochroms aus dem Periplasma wurde mit einem identischen Elutionsverhalten in der Kationenaustauschchromatographie (Mono S, Pharmacia) und mit identischen Absorptionsmaxima im UV/Vis Spektrum des Überstandscytochroms und des gereinigten periplasmatischen Cytochroms begründet (Seeliger 1998; Seeliger et al. 1998). In der Zwischenzeit sind Zweifel daran aufgetaucht, ob dieses Cytochrom für den extrazellulären Elektronentransport relevant ist. Die Ausschüttung von Cytochrom ins Medium erfolgt auch in Reinkulturen von *G. sulfurreducens* auf Acetat plus Fumarat, in denen kein extrazellulärer Elektronenüberträger benötigt wird. Höhere Konzentrationen von Cytochromen konnten im Kulturüberstand erst am Ende der logarithmischen Wachstumsphase beobachtet werden. Eine artifizielle Cytochromausschüttung kann auch durch eine Erhöhung der Ionenstärke des Mediums oder durch die Zugabe von Sulfat oder Nitrat stimuliert werden. Beide Elektronenakzeptoren können durch *G. sulfurreducens* nicht reduziert werden (Straub und Schink 2003). Im Kulturüberstand sind mindestens zwei weitere Cytochrome vorhanden, die mit SDS-PAGE und Häm-spezifischer Färbung der konzentrierten Kulturüberstände nachgewiesen werden können (Lloyd et al. 1999); Kaden unveröffentlicht). Bisher konnte ein elektronenübertragender Effekt des Cytochroms zu unlöslichem Eisen(III) ausgeschlossen werden (Lloyd et al. 1999; Straub und Schink 2003).

1.5 Zielsetzung:

Die vorliegende Arbeit hatte die Identifikation des Elektronenüberträgers bei der syntrophen Acetatoxidation in *G. sulfurreducens* / *W. succinogenes*-Kokulturen zum Ziel. Aufgrund uneindeutiger Befunde im Hinblick auf eine elektronenübertragende Funktion durch das 9,6 kDa Cytochrom war es das erste Anliegen der Arbeit, eine solche Elektronenübertragung über das Cytochrom in der Kokultur zu überprüfen. Voraussetzung dafür war, die bei Seeliger (Seeliger 1998; Seeliger et al. 1998). begonnene Cytochromcharakterisierung abzuschließen. Dazu war es notwendig, die Identität des kleinen periplasmatischen Cytochroms mit dem im Überstand gefundenen zu überprüfen. Insbesondere war zu klären, welchen Anteil das kleine Cytochrom an den im Überstand befindlichen Proteinen hatte. Auch sollte geprüft werden, ob das Cytoch-

rom über aktive Exportprozesse, also gezielt, in das Medium abgegeben wurde oder ob die Cytochrome durch unspezifische Prozesse (wie z.B. Lyse einiger Bakterien) ins Medium gelangten. In einem weiteren Schritt war zu überprüfen, ob das im Überstand vorhandene Cytochrom für die Elektronenübertragung in der Acetatoxidation und somit für das syntrophe Wachstum notwendig war. Wenn sich die Hypothese der Elektronenübertragung über das Cytochrom nicht bestätigte, war von einem anderen möglichen Elektronenüberträger im Medium auszugehen. Dafür gab es zwei Ansatzpunkte.

Zum einen konnten andere, von den Bakterien exportierte, Überträgersubstanzen vorliegen. Hierbei wurde insbesondere nach der Anwesenheit von Chinonen gesucht, da bekannt war, dass *G. sulfurreducens* intrazellulär Menachinone als Überträger benutzt (Galushko und Schink 2000). In diesem Zusammenhang war die Frage zu klären, ob in der syntrophen Kokultur spezifisch andere Chinone auftraten als in den Reinkulturen, denn ein Chinon als extrazellulärer Elektronenüberträger sollte besondere Eigenschaften (z.B. Wasserlöslichkeit) aufweisen und sich wesentlich von den membrangebundenen Chinonen unterscheiden. Diese Chinone müssten gegebenenfalls auch in das umgebende Medium abgegeben werden, daher war die Anwesenheit von Chinonen im Medium zu prüfen.

Zum anderen mussten dem Medium von außen zugesetzte redoxaktive Substanzen auf eine mögliche Überträgerwirkung untersucht werden. Insbesondere das als Reduktionsmittel in hohen Konzentrationen zugegebene Cystein war ein aussichtsreicher Kandidat, da die reaktive Schwefelgruppe analog zum Sulfid / Schwefel-Kreislauf bei *D. acetoxidans* und *Chlorobium spp.* (Biebl und Pfennig 1978) reagieren konnte. Natürlich war auch das Sulfid / Schwefel Paar auf seine Funktion als möglicher Elektronenüberträger zu prüfen.

2 Material und Methoden

2.1 Mikrobiologische Methoden

2.1.1 Bakterienstämme

Aufgrund vorangegangener Arbeiten wurden die untersuchten Bakterienkulturen schon in unserem Labor kultiviert. *Geobacter sulfurreducens* Stamm PCA (DSM 12127, ATCC 51573) stammte ursprünglich von R. Cord-Ruwisch (Perth, Australien), und *Wolinella succinognes* (DSM 1740) wurde von A. Kröger (Frankfurt) überlassen. *Geobacter bremensis* (DSM 12179), *Geobacter pelophilus* (DSM 12255) und *Pseudomonas stutzeri* (DSM 5190, ATCC 17588) wurden freundlicherweise von K.L. Straub (Konstanz) überlassen. *G. metallireducens* (DSM 7210, ATCC 53774) wurde von B. Morasch (Konstanz) überlassen. *Methanospirillum hungatei* SK1 (DSM 864, ATCC 27890) und *Acetobacterium woodii* (DSM 1030) entstammten der Stammsammlung des Lehrstuhls für Mikrobielle Ökologie der Universität Konstanz.

2.1.2 Medien

Alle verwendeten Bakterienstämme wurden in definiertem Süßwasser-Mineralsalzmedium kultiviert (Widdel 1980). Dieses enthielt folgende Salze (Angaben pro Liter): 1 g NaCl, 0,4 g $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, 0,2 g KH_2PO_4 , 0,5 g KCl, 0,15 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, war mit 30 mM Natriumbicarbonat gepuffert und mit Cystein (1 mM) reduziert. In einem speziell dafür konstruierten Kolben (Widdel-Kolben, Widdel (1980)) wurde das mit Mineralsalzen versetzte Medium autoklaviert und unter einer N_2/CO_2 -Atmosphäre (Mischungsverhältnis 80:20 % (v/v)) abgekühlt. Die Bicarbonat-Stammlösung wurde separat autoklaviert. Die Cystein-Stammlösung wurde unter anoxischen Bedingungen angesetzt und sterilfiltriert. Bicarbonat und Cystein wurden nach dem Abkühlen zugesetzt, Cystein wurde gelegentlich erst bei der Komplettierung des anoxischen Mediums mit den Substraten zugesetzt. Das Medium wurde durch Zugabe von Selenit-Wolframat-Lösung und Spurenelementlösung SL10 (Widdel et al. 1983), sowie in einigen Fällen 7-Vitamine-Lösung (Widdel und Pfennig 1981), aus sterilen Stammlösungen vervollständigt. Soweit notwendig wurde dem Medium 0,25 g/l NH_4Cl als Stickstoff- bzw. 3,0 g/l Na_2SO_4 als Schwefelquelle zugesetzt. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von steriler 1 M Salzsäure bzw. steriler 1 M Na_2CO_3 -Lösung auf einen Wert zwischen 7,2 und 7,4 eingestellt.

2.1.3 Kultivierungstechniken

Stammkulturen, Kulturen für mikroskopische Untersuchungen sowie Vorkulturen für größere Ansätze wurden in 50 ml - Schraubdeckelfläschchen (mit Aluminiumdeckel) ohne Gasraum oder in 118 ml - Serumfläschchen (mit Butyl-Gummistopfen) mit 50 ml Medium und N₂/CO₂-Atmosphäre (N₂/CO₂ – 80:20 % (v/v)) kultiviert. Bei Probenentnahme aus den Schraubdeckelflaschen wurde das entnommene Volumen durch autoklavierte Glaskugeln ersetzt. Vorkulturen für Wachstumsexperimente wuchsen in 125 ml - (100ml Medium) Infusionsflaschen (Müller&Krempel, Bülach, Schweiz), da diese zentrifugierbar waren. War eine größere Menge an Zellmaterial, z.B. für Suspensionsexperimente nötig, wurden Kulturen in 1200 ml - (1000 ml Medium) Infusionsflaschen (Müller&Krempel, Bülach, Schweiz) ebenfalls mit N₂/CO₂ im Gasraum angezogen. Die Kultivierungstemperatur betrug 30 °C. Die Reinheit der Kulturen wurde regelmäßig mikroskopisch kontrolliert. Alle 4 - 8 Wochen wurden neue Vorkulturen aus den parallel kultivierten Stammkulturen angesetzt. Das Medium für *Geobacter sulfurreducens* enthielt keine Vitamine, das Medium für *Wolinella succinogenes* war ohne Ammonium angesetzt und das Kokulturmedium war sowohl Vitamin- als auch Ammonium- frei. Die Reinkulturen von *Geobacter sulfurreducens*, *Geobacter bremensis* und *Geobacter pelophilus* wuchsen mit 20 mM Acetat plus 40 mM Fumarat und *Geobacter metallireducens* wuchs mit 20 mM Acetat plus 40 mM Ferrihydrit. Reinkulturen von *Wolinella succinogenes* wurden mit 30 mM Formiat plus 10 mM Nitrat plus 10 mM Acetat kultiviert. *Methanospirillum hungatei* wurde in Reinkultur mit einer H₂/CO₂ (80:20 % (v/v)) Atmosphäre und 2 mM Acetat für den Baustoffwechsel kultiviert. *Acetobacterium woodii* wuchs mit 10 mM Ethylenglykol und *Pseudomonas stutzeri* mit 10 mM Acetat plus 10 mM Nitrat.

Die Kokulturen wurden durch Mischung von jeweils zwei Reinkulturen in Cystein-reduziertem Medium mit 20 mM Acetat plus 10 mM Nitrat etabliert. Dabei wurde mit Vorkultur aus den Reinkulturen im Verhältnis 1:1 beimpft. Versuche zur Kokultivierung mit *M. hungatei* oder *A. woodii* wurden mit 10 mM Acetat als Substrat durchgeführt und enthielten Ammonium als Stickstoffquelle. Auch war das Medium in diesen Kulturen mit 7-Vitamine-Lösung komplettiert.

2.2 Wachstumsversuche

Vorkulturen für Wachstumsexperimente wurden in 100 ml Medium (125 ml Infusionsflaschen) bis zur späten exponentiellen Wachstumsphase gezogen. Um eine Cystein-Kontamination im Experiment zu vermeiden, wurde die komplette Flasche bei 1500 × g für 20 min in einem Sor-

vall GSA Rotor mit speziellen Gummieinsätzen zentrifugiert. Der Überstand wurde unter sterilen, anoxischen Bedingungen durch das gleiche Volumen an frischem, anoxischem, jedoch unreduziertem Medium ersetzt und das Bakterienpellet resuspendiert. Wurde dieser Schritt versäumt, so waren alle Wachstumsansätze positiv, unabhängig von anderen Zusätzen. Die Experimente wurden in 15 ml Röhren mit 10 ml Medium (Bicarbonatpuffer, Gasraum N_2 / CO_2 80:20 % (v/v)) durchgeführt, das 10 mM Acetat und 10 mM Nitrat als Substrat enthielt. Die optische Dichte wurde bei einer Wellenlänge von 660 nm direkt in den Röhren mit einem speziellen Photometer (Spectronic 70, Baush&Lomb) gemessen. Die Experimente wurden als Doppelansatz mit zwei identischen Röhren durchgeführt, wobei eines der Röhren mit Resazurin versetzt war, um den Redoxzustand des Mediums zu kontrollieren. Ergebnisse wurden nur gewertet, wenn beide Röhren den gleichen Wachstumsverlauf zeigten.

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 Zellsuspensionsexperimente

Das Zellmaterial für Zellsuspensionsexperimente wurde in 1 l Medium (1,2 l-Infusionsflaschen) angezogen. Die Zellen wurden in der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase unter anoxischen Bedingungen geerntet. Die Zellkultur wurde in eine Anaerobenkammer (Coy, Ann Arbor, Mich., USA) mit N_2/H_2 -Atmosphäre (95:5 % (v/v)) in 500 ml-Zentrifugenbecher aus Polypropylen überführt. Diese wurden mindestens 24 h in der Anaerobenkammer vorinkubiert, um den im Kunststoff gelösten Sauerstoff zu entfernen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation in einem GS3-Rotor in einer Sorvall RC5-B-Zentrifuge (DuPont de Nemours, Bad Homburg) bei $2000 \times g$ und $4-10^\circ C$ für 20 min geerntet. Der Kulturüberstand wurde dekantiert und das Zellpellet in der Anaerobenkammer in einem geringeren Volumen in Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,0) möglichst schonend resuspendiert und ein- bis zweimal durch erneute Zentrifugation in 30 ml-Zentrifugenröhren im Sorvall SS-34 Rotor in der oben genannten Zentrifuge bei $2000 \times g$ gewaschen. Auch diese Zentrifugenröhren waren im Anaerobenzelt vorinkubiert. Nach dem Waschschrift wurden die Zellen in wenigen Millilitern Puffer aufgenommen und in Serumflaschen (8 ml) gefüllt. Der Gasraum wurde mit Stickstoff gespült, um den Wasserstoffanteil der Zeltatmosphäre zu entfernen. Die so erhaltenen Zellsuspensionen wurden bei $4^\circ C$ gekühlt, die optische Dichte bei 660 nm wurde bestimmt und das Zellsuspensionsexperiment innerhalb einer Stunde gestartet.

Vorversuche in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0, zeigten nur eine sehr geringe Acetatoxidation. Um das von den Bakterien bevorzugte Puffersystem zur Verfügung zu stellen, wurden

alle weiteren Zellsuspensions-Experimente in 10 ml Natriumbicarbonat-gepuffertem Medium (ohne Vitamine und Ammonium) in 15 ml Röhren unter N_2/CO_2 -Atmosphäre durchgeführt. Zusätze erfolgten mit 1 ml Spritzen aus sterilen, anoxischen Stammlösungen. Das Experiment wurde durch Zugabe der Zellen gestartet; die OD_{660} wurde auf 1,5 eingestellt und während des Verlaufs des Experiments mehrfach kontrolliert. Die Röhren bei 30 °C wurden im Dunkeln inkubiert. Die Probenahme erfolgte mit Spritzen. Die Proben wurden für 10 min bei $20000 \times g$ in einer auf 4 °C gekühlten Eppendorf Zentrifuge (5417C, Eppendorf Hamburg) zentrifugiert und der Überstand entweder unmittelbar analysiert (Thiolgruppenbestimmung) oder bei -20 °C gelagert (Acetatbestimmung). Auch Zellsuspensionsexperimente wurden als Doppelansatz durchgeführt. Ansätze mit pasteurisierter Zellsuspension dienten als Negativkontrolle.

2.3.2 Herstellung von zellfreien Extrakten

2.3.2.1 Nicht-selektiver Zellaufschluss

Zellfreie Extrakte wurden unter anoxischen Bedingungen durch Aufschluss der dichten Zellsuspension in einer French-Press (Amicon Silver Springs, Maryland, USA) bei 136 MPa hergestellt. Der Aufschluss erfolgte durch drei- bis viermalige Passage und wurde mikroskopisch kontrolliert. Nicht aufgeschlossene Zellen, Zelltrümmer sowie Ausfällungen wurden anschließend durch Zentrifugation in 35 ml-Zentrifugenröhren im Sorvall SS-34 Rotor bei $2000 \times g$ oder durch Zentrifugation in der Eppendorfszentrifuge (5415 C, Eppendorf Hamburg) bei $4000 \times g$ direkt im Anaerobenzelt abgetrennt. Der Überstand wurde mit einer automatischen 1 ml -Pipette (Gilson, Frankreich) entnommen, in ein Serumfläschchen überführt und im Eisbad aufbewahrt. Alle Schritte wurden unter anoxischen Bedingungen in geschlossenen Gefäßen oder im Anaerobenzelt durchgeführt.

2.3.2.2 Zellaufschluss mittels Lysozym und EDTA

Zur Präparation der Periplasmafraktion von *G. sulfurreducens* wurden die Zellen nicht in Kaliumphosphat sondern in 100 mM Tris/HCl-Puffer, pH 8,5, plus 20 % (w/v) Saccarose aufgenommen. Der so entstandenen Zellsuspension wurde 2 mM EDTA und 1 mg/ml Lysozym ($9500 \text{ Units} \times \text{mg}^{-1}$) zugesetzt. Der Ansatz wurde für 60 min bei 30 °C unter langsamem Schütteln inkubiert. Die Sphäroplastenbildung wurde in Abständen mikroskopisch kontrolliert. Die Sphäroplasten und übrig gebliebene ganze Zellen wurden 20 min bei $4000 \times g$ abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit $40000 \times g$ ein weiteres Mal zentrifugiert. Dadurch wurde ein klarer Überstand erhalten. Dieser wurde als periplasmatische Fraktion weiterverwendet. Für Experi-

mente, in denen ein störender Einfluss der in der Fraktion vorhandenen 20 % Saccharose nicht auszuschließen war, wurde über Gelfiltration (Material: Sephadex G25; Fertigsäule zum Pufferaustausch PD10, Pharmacia Freiburg) ein Pufferaustausch vorgenommen. Die so erhaltene, leicht verdünnte Fraktion wurde, soweit notwendig mittels 4 kDa Ultrafiltration (Rührzelle, Amicon, Beverly USA und Fugisept-Mikrokonzentration, Intersept Witten) wieder konzentriert. Größerer Mengen von Periplasma-Fraktion als Ausgangsmaterial zur Cytochromreinigung wurden unter oxidischen Bedingungen präpariert, da das Cytochrom auch unter Sauerstoff stabil war.

Der Aufschluss der Sphäroplasten erfolgte mittels osmotischem Schock. Dazu wurde das Sphäroplasten-Pellet in 10 mM Tris/HCl, pH 8,5, resuspendiert. Der Puffer enthielt 1 mg/ml DNAse 1 sowie 10 mM MgCl₂. Es wurde darauf geachtet, keine RNase freie DNase zu verwenden, so dass auch RNA im Ansatz abgebaut wurde. Nicht aufgeschlossenen Zellen wurden bei 20000 × g für 20 min abzentrifugiert (Optima TL-Ultrazentrifuge, Beckman Instruments). Gegenüber der Zentrifugation im SS-34-Rotor hatte diese Methode den Vorteil der besseren Handhabbarkeit und der besseren Abtrennung.

2.3.3 Fraktionierung des Zellextrakts

Der durch den Zellaufschluss gewonnene Rohextrakt wurde im Anaerobenzelt in spezielle 3 ml-Zentrifugenröhrchen gefüllt. Diese wurden in einem gasdicht verschließbaren Rotor in einer Optima TL-Ultrazentrifuge (Beckman Instruments) bei 100000 × g und 4 °C 60 Minuten zentrifugiert. Im Anaerobenzelt wurde der Überstand, der die cytoplasmatische Fraktion (im Falle des Lysozym EDTA Aufschlusses) bzw. die lösliche Fraktion (Periplasma plus Cytoplasma, im Falle des Aufschlusses mit der French Press Methode) darstellte, abgenommen. Das aus Membranbruchstücken bestehende Pellet wurde in 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0 bzw. 50 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7,0, resuspendiert. Die so erhaltenen Fraktionen wurden in mit Butylgummi-Septen verschlossenen 3 ml-Reaktionsröhrchen aufbewahrt und entweder sofort in Experimenten eingesetzt oder bei - 21 °C aufbewahrt. Alle für die Zellfraktionierung verwendeten Puffer enthielten einen Protease-Inhibitor-Mix (Complete, Roche, Mannheim) um Proteinabbauende Prozesse zu unterbinden. Alle Proben wurden bei 4 °C aufbewahrt und direkt im Experiment eingesetzt bzw. bei - 20 °C gelagert.

2.3.4 Bestimmung von Enzymaktivitäten

Enzymaktivitäten wurden entweder photometrisch in kontinuierlichen Tests oder diskontinuierlich durch Quantifizierung von Substrat oder Produkt mittels HPLC-Analyse bzw. einer entsprechenden photometrischen Methode gemessen. Alle Aktivitäten wurden bei 30 °C mit mehreren, unabhängig voneinander hergestellten zellfreien Extrakten bzw. Extraktfraktionen bestimmt. Durch Kontrollen mit hitzedenaturiertem Extrakt wurde sichergestellt, dass die gemessenen Umsätze tatsächlich durch Protein katalysiert waren.

2.3.4.1 Kontinuierliche Enzymtests

Um in spektrophotometrischen Tests Enzymaktivitäten anoxisch zu messen, wurden Halbmikro-Quarzküvetten (1 cm Lichtweg) mit Normschliff verwendet, die mit Gummisepten verschlossen und anschließend mit N₂ begast wurden. Die anoxisch hergestellten Puffer und alle anderen Zusätze wurden mit gasdichten Mikroliter-Spritzen (Unimetrics, Macherey-Nagel, Düren; Hamilton, Bonaduz Schweiz) zugegeben. Der Reaktionsverlauf wurde über die Absorptionsänderung der enthaltenen Substrate mit einem Spektrophotometer (Hitachi 100-40, Tokyo, Japan) verfolgt und mit einem SE-120 Metrawatt-Schreiber (BBC-Goertz, Wien, Österreich) aufgezeichnet. Die Reaktion wurde in Parallelansätzen entweder durch Zugabe der verschiedenen Substrate oder durch Zugabe des Zellextrakts bzw. der Proteinfraction gestartet.

2.3.4.1.1 Hydrogenase-Test

Die Hydrogenase aus *G. sulfurreducens* wurde als Hilfsenzym bei Experimenten zur Cystinreduktion sowohl in Zellsuspensionen als auch im Rohextrakt sowie den einzelnen Fraktionen von *G. sulfurreducens* eingesetzt. Daher musste die Hydrogenaseaktivität vor einem solchen Experiment überprüft werden. Es wurde die wasserstoffabhängige Reduktion von Benzylviologen ($\epsilon = 8,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) über die Zunahme der Extinktion bei 578 nm gemessen. Der Versuchsansatz enthielt 2 mM Benzylviologen in wasserstoffgesättigtem 50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0, in einer mit Wasserstoff begasten Küvette. Die Reaktion wurde durch Zugabe der Enzymfraktion (Rohextrakt, Cytoplasmafraktion ect.) oder durch Benzylviologen-Zugabe gestartet (Diekert und Thauer 1978). Ein Anreduzieren des Ansatzes mit Natriumdithionit war in keinem Fall notwendig.

2.3.4.1.2 DTNB-Reduktionstest

Für DTNB-Reduktion wurde ein kontinuierliches Testsystem verwendet, welches auf dem diskontinuierlichen Test zur Bestimmung der Thiolgruppenkonzentration basierte (Lange und

Vejdelek 1987). Der Ansatz enthielt 1 mM DTNB ($\epsilon = 13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), 5 mM MgCl_2 in Kaliumphosphatpuffer pH 8,0. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Protein bzw. durch Zugabe von Wasserstoff in den Gasraum und mehrmaliges Umschwenken der Küvette gestartet. Die Zunahme der Extinktion bei 412 nm wurde verfolgt.

2.3.4.1.3 Menadionreduktion

Um die Reduktion von Chinonen in den verschiedenen Fraktionen von *G. sulfurreducens* zu untersuchen, wurde die Oxidation von NAD(P)H in Gegenwart von Menadion (Vitamin K3) gemessen. Der Testansatz enthielt entweder 0,2 mM NADH oder 0,2 mM NADPH als Elektronendonator in Tricine/KOH-Puffer, pH 8,0, plus 5 mM MgCl_2 . Gestartet wurde entweder durch Zugabe von 0,5 mM Menadion oder durch die Proteinzugabe. Die Abnahme der NAD(P)H-Extinktion ($\epsilon_{\text{NADH } 365} = 3,4$; $\epsilon_{\text{NADPH } 365} = 3,5 \text{ (mM}^{-1} \text{ cm}^{-1})$ (Bergmeyer 1975)) wurde bei 365 nm gemessen (Testansatz nach Galushko, pers. Mitteilung). Da Menadion in methanolischer Lösung eingesetzt wurde, wurde ein Kontrollansatz mit reinem Methanol durchgeführt.

2.3.4.1.4 Malat-Dehydrogenase-Test

Malat-Dehydrogenase Aktivität wurde als cytoplasmatisches Markerenzym benutzt. Damit ließ sich bei Experimenten mit Kulturüberstand überprüfen, ob und in welchem Maß in der Kultur Zellen lysiert waren und ob im Überstand gefundene Proteine somit auf Degradationseffekte zurückzuführen sind. Beim Zellaufschluss mit Lysozym und EDTA ließ sich über die Malatdehydrogenaseaktivität der Anteil cytoplasmatischer Proteine in der periplasmatischen Fraktion abschätzen. Malat-Dehydrogenase wurde mit NAD(P)H als Elektronendonator in Richtung der Malat Bildung verfolgt. Dabei wurde die Abnahme der NAD(P)H Extinktion bei 365 nm gemessen. Der Ansatz in 50 mM Tris/HCl (pH 7.2) enthielt neben dem Zellextrakt 0.2 mM NAD(P)H und 3 mM Oxaloacetat (Stams et al. 1984).

2.3.4.2 Diskontinuierliche Enzymtests

Diskontinuierliche Enzymtests wurden in 8 ml-Serumfläschchen durchgeführt, die mit N_2 oder H_2 begast und mit Butylgummisepten verschlossen waren. Auch hier erfolgte die Zugabe der verschiedenen Zusätze mit gasdichten Mikroliter-Spritzen (Unimetrics oder Hamilton). Auf diese Art wurden die Experimente zur Cystinreduktase-Aktivität in verschiedenen Fraktionen von *G. sulfurreducens* durchgeführt. Dabei musste der Proteingehalt im Ansatz $> 1 \text{ mg/ml}$ sein, um Aktivitäten bestimmen zu können. Die Probenentnahme erfolgte mit gasdichten 100 μl -Mikroliter Spritzen, die Probe wurde unmittelbar in die vorgelegte DTNB-Lösung gegeben um

Reoxidation freier Thiolgruppen zu vermeiden. Der Test wurden in 10 und 50 mM KPP, pH 7,0, 10 und 50 mM Tris/HCl, pH 7,0, und in Medium mit und ohne Zusatz von Spurenelementlösung, Selenit Wolframat-Lösung (jeweils in den auch für die Kultivierung verwendeten Konzentrationen) oder 5 mM MgCl₂ durchgeführt. Als Substrat wurde entweder Acetat oder Wasserstoff eingesetzt. Der Test wurde durch Proteinzugabe gestartet.

2.3.5 *Cytochromreinigung*

Als Ausgangsmaterial für die Reinigung des 9,6 kDa Cytochroms diente die mit Lysozym und EDTA präparierte periplasmatische Fraktion von *Geobacter sulfurreducens*. Es wurde eine FPLC-Anlage der Firma Pharmacia (Freiburg) verwendet. Die Reinigung wurde unter Luft durchgeführt, da das Cytochrom auch unter Sauerstoffeinfluss stabil war (Seeliger 1998). Unmittelbar vor dem Probenauftrag wurde die Probe in der Eppendorfzentrifuge bei 20000 × g 5 min partikelfrei zentrifugiert. Der Trennungsgang wurde anhand der Proteinabsorption bei 260 nm verfolgt, die über einen Photomultiplier kontinuierlich gemessen und mit einem SE-120 Metrawatt-Schreiber aufgezeichnet wurde.

2.3.5.1 *Hydrophobe Interaktion*

Die Proteinreinigung über hydrophobe Interaktion beruht auf der Wechselwirkung von hydrophoben Proteinanteilen mit dem Säulenmaterial. Dabei wird die Proteinprobe in einem Puffer mit hoher Ionenstärke aufgetragen, so dass auch Proteine mit einer geringeren Zahl hydrophober Aminosäuren an die Säule binden. Bei Verringerung der Ionenstärke des Eluenten werden die gebundenen Proteine dann sukzessive eluiert und somit getrennt. Die cytochromhaltige Fraktion wurde mit NH₄Acetat (pH 6,3) bis zu einer Endkonzentration des Puffers von 1,7 M versetzt. Diese Probe wurde auf eine hydrophobe Interaktionssäule (HIC-Sepharose, Pharmacia Freiburg) aufgetragen. Das Cytochrom eluierte bei der Ausgangspufferkonzentration. Andere gebundene Proteine wurden in einem linearen Gradienten von 1,7 M NH₄Acetat zu 0,1 M NH₄Acetat eluiert.

2.3.5.2 *Gelfiltrationschromatographie*

Bei der Gelfiltration werden die Moleküle aufgrund ihrer Größe und damit in erster Näherung nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Die Trennung beruht darauf, dass kleinere Moleküle in die Poren des Säulenmaterials diffundieren können, während dies für große Moleküle unmöglich ist. Damit steht den großen Molekülen ein wesentlich geringeres Säulenvolumen zur Ver-

fügung als den kleinen, sie laufen daher schneller durch die Säule. Es wurde eine Superose 12 - Säule (25 ml Säulenvolumen, Pharmacia Freiburg) verwendet. Die Flussgeschwindigkeit betrug 0,5 ml/min und das Auftragsvolumen lag bei 300 µl Cytochrom-Fraktion (0,3 mg/ml).

Für einen schnellen, schonenden Pufferwechsel wurde ebenfalls die Gelfiltration angewandt. Dafür wurde eine fertige Mini-Säule (PD 10, Pharmacia Freiburg) verwendet, welche als Säulenmaterial Sephadex G25 enthält. Die Probe wurde in einem Volumen von 2 ml aufgetragen und mit 3 ml neuem Puffer eluiert. Damit wurde die Probe eineinhalbfach verdünnt. Durch die nachfolgende Ionenaustauschchromatographie wurde dieser Effekt jedoch wieder ausgeglichen.

2.3.5.3 Kationenaustauschchromatographie

Ein der effektivsten Methoden, Proteine zu trennen ist die Ionenaustauschchromatographie. Dabei interagieren die geladenen Aminosäuren mit geladenen Gruppen des Säulenmaterials und es kommt dadurch zu einer Bindung der Proteine an die Säule. Für die Cytochromreinigung wurde eine Kationenaustauschersäule (MonoS, 0,6 x 5 cm Glassäule) der Firma Pharmacia (Freiburg) verwendet. Die Reinigung erfolgte in 25 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6,3. Im linearen Natriumchlorid-Gradienten von 0 bis 1 M eluierte das Cytochrom bei 150 mM NaCl. Die Flussgeschwindigkeit betrug 1 ml/min. Das Fraktionsvolumen betrug 2 ml. Die Aufzeichnung des Trennungsgangs erfolgte wie oben beschrieben.

2.3.5.4 Chromatographie an Hydroxylapatit

Chromatographie an Hydroxylapatit nutzt Interaktionen über Wasserstoffbrückenbindung zur Proteintrennung. Es wurde als Material BioGel HT (Biorad) verwendet. Hydroxylapatit ist eine Form von Calciumphosphat ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$). Das Material eignet sich zur Reinigung von Proteinen, Nucleinsäuren und anderen Macromolekülen; das Druckmaximum liegt bei 60 bar, die dynamischen Bindekapazität ist mit 25 mg/g Lysozym angegeben; das Material lässt sich in einem pH-Bereich von 5,5 – 14,0 verwenden. Der Probenauftrag erfolgte in 25 mM Na_2PO_4 -Puffer, pH 7,0. Die Proteine wurden in einem linearen Gradienten von 25 mM zu 0,5 M Na_2PO_4 mit einer Flussrate von 1 ml/min getrennt. Das gesuchte Cytochrom eluierte bei einer Konzentration von 390 mM Na_2PO_4 .

Zur Reinigung des 9,6 kDa Cytochroms wurden zwei Reinigungsmethoden alternativ verwendet. Zum einen wurde die Reinigungsmethodik nach Seeliger (1998) nachvollzogen. Für die Reinigung größerer Mengen Cytochrom wurde eine alternative Methode über Hydroxylapatit, MonoS-Kationenaustauschchromatographie und Gelfiltration entwickelt.

2.3.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Aufgrund des geringen Molekulargewichtes des Cytochroms wurde SDS-PAGE nach der Methode von (Schägger und von Jagow 1987) durchgeführt, mit der Proteine mit niedrigem Molekulargewicht wesentlich besser aufgetrennt werden als mit der klassischen Methode nach (Lämmli 1970). Die Methode basiert auf unterschiedlichen Puffern für Anode und Kathode. Der Kathodenpuffer enthält zusätzlich 1 M Tricin (N-Tris(hydroxymethyl)methylglycin) welches bei der Elektrophorese als Schlepperion dient. Es wurde ein Trenngel mit 12 % Polyacrylamid und ein 4 % Sammelgel verwendet. Die Trennung erfolgte bei $I = 30 - 40$ mA und $U < 200$ mV in einer Mini-Protean II Dual Slab Cell (BioRad). Als Marker wurde der Low-molecular-weight-marker Kit (Amersham, Freiburg) eingesetzt. Dieser enthielt die Markerproteine: Phosphorylase b (94 kDa), Albumin (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Kohlendioxid-Anhydrase (30 kDa), Trypsininhibitor (21 kDa) und α -Lactalbumin (14 kDa). Als Häm-spezifisch färbbares Markerprotein wurde Cytochrom *c* aus dem Pferdeherzmuskel verwendet (14 kDa). Die Gele wurden unmittelbar nach dem Elektrophoreselauf gefärbt und nach der Färbung fotografiert und für die Aufbewahrung getrocknet (in wasserdurchlässiger Folie, entweder in einem Spannrahmen bei 30 °C luftgetrocknet oder in einem Gelrockner (Biorad) bei 70 °C unter Vakuum).

2.3.7 Färbung von SDS-PAGE-Gelelen

Zur Anfärbung mit Coomassie-Brilliantblau wurde die Methode der kolloidalen Coomassiefärbung (Neuhoff et al. 1988) angewendet. Bei dieser Methode ist der Farbstoff in der Färbelösung nicht vollständig gelöst, sondern liegt überwiegend in Form von kolloidalen Partikeln vor. Bei der Färbung diffundiert der geringe Anteil gelösten Farbstoffs in das Gel und bindet an die Proteine. Im gleichen Maß löst sich neuer Farbstoff aus den Kolloiden. Aufgrund der geringen Menge gelösten Farbstoffs verlängert sich die Färbezeit wesentlich, es kommt jedoch nur zu einer sehr geringen Anfärbung des Geles und daher kann der sonst nötige Entfärbeschritt entfallen. Die Detektionsgrenze verschiebt sich mit dieser Methode von 1 μ g Protein/Bande bei der konventionellen Coomassie-Färbung auf 30 ng Protein/Bande. Vor der Färbung wurden die Proteine zunächst eine Stunde in 12 % TCA im Gel fixiert. Färbestammlösung (0,1 % Coomassie-Brilliantblau G-250 in 2 % H_3PO_4 und 10 % $(NH_4)_2SO_4$ wurde mit 20 % Methanol versetzt. In dieser Färbelösung wurde das Gel für 24 – 48 h gefärbt. Danach wurde das Gel in 20 % Methanol für 1 min gewaschen und fotografiert.

Die spezifische Färbung von *c*-Typ-Cytochromen wurde nach der Methode von (Thomas et al. 1976) mit den Modifikationen von (Goodhew et al. 1986) durchgeführt. Das Gel wurde 30 min

mit 1,25 mM Tetramethylbenzidin in 0,25 M Natriumacetat, pH 5, und 30 % Methanol unter leichtem Schütteln inkubiert. Durch Zugabe von 26 mM Wasserstoffperoxyd wurde das Gel für weitere 15 Minuten im Dunkeln entwickelt; die Bandenbildung wurde dabei in Abständen kontrolliert. Nach Abschluss der Färbereaktion wurde das Gel zweimal mit 0,25 M Natriumacetat (pH 5,0) und 30 % Propanol gewaschen. Da die Färbung nicht stabil ist, wurde das Gel so schnell wie möglich (immer innerhalb einer Stunde nach Färbung) fotografiert. Besonders wichtig war, dass bei der Probenvorbereitung kein Mercaptoethanol verwendet wurde, da dieses die kovalente Bindung der Häm-Gruppe an das Cytochrom aufhebt. Sollten „Protein-gefärbte“ Gele mit „Häm-gefärbten“ Gelen verglichen werden, wurde auch im Probenpuffer der Protein-gefärbten Gele kein Mercaptoethanol verwendet, um gleiche Laufbedingungen für die Proteine zu gewährleisten.

Silberfärbung wurde wie bei Seeliger (1998) beschrieben durchgeführt. Die Gele wurden zuerst in Methanol/Essigsäure/Wasser (50:12:38 % v/v) mit $0,5 \text{ ml} \times \text{l}^{-1}$ 37 % Formaldehyd eine Stunde inkubiert. Danach wurde das Gel dreimal für 20 min in Ethanol/Wasser (50 % v/v) gewaschen. Danach wurde das Gel genau eine Minute in $0,2 \text{ g} \times \text{l}^{-1}$ Thiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$) vorbehandelt und dreimal je 20 Sekunden mit Wasser gewaschen. Anschließend wurde es genau 20 min in $2 \text{ g} \times \text{l}^{-1}$ Silbernitratlösung mit $0,75 \text{ ml} \times \text{l}^{-1}$ 37% Formaldehyd entwickelt. Sofort beim Auftreten der ersten Banden wurde die Entwicklerlösung abgesaugt und der Entwicklungsprozess damit abgebrochen. Das Gel wurde daraufhin weitere zwei Mal mit Wasser (jeweils 2 Minuten), weitere 10 Minuten in Methanol/Essigsäure/Wasser (50:12:38 % v/v) und 20 Minuten in Methanol/Wasser (50 % v/v) gewaschen. Danach wurde es fotografiert und getrocknet.

2.4 Immunologische Methoden

2.4.1 Präparation des Antigens

Polyklonale Antikörper gegen das gereinigte 9,6 kDa-Cytochrom aus *G. sulfurreducens* wurden in einem Kaninchen in der Tierforschungsanlage der Universität Konstanz hergestellt. Das Cytochrom wurde wie beschrieben gereinigt und in sterilem 20 mM Tris-Puffer, pH 7,5, aufgenommen. Mit Tris-Puffer wurde die Probe auf ein Gesamtvolumen von 0,5 ml gebracht. Der Cytochromgehalt in der Immunisierungsprobe lag bei 117 µg. Einen Tag vor der Injektion in das Tier wurde die Probe auf ihre Sterilität hin untersucht.

2.4.2 Immunisierung eines Kaninchens

Bei der Immunisierung des Kaninchens wurde die Probe mit dem gleichen Volumen (0,5 ml) Adjuvans (MPL+TDM + CWS Adjuvant System, Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) vermischt. MPL+TDM + CWS Adjuvant System wird in der Tierforschungsanlage als Alternative zu Freundschem Adjuvans angewandt. Es enthält MPL (hoch raffiniertes ungiftiges Monophosphoryl A, aus Mutanten von *S. minnesota* isoliert), synthetisches Trehalose Dicorynomycolat (TDM, S-TDCM, ein Analoges von Trehalose Dimycolat des *Mycobacterium tuberculosis*) und Zellwandskelett (CWS, deprotonierte und lipidfreie Zellwand-Präparate von *Mycobacterium*) in einer stabilen Öl-Wasser Emulsion mit 20% Tween-80. Vor der Immunisierung mit dem Antigen wurde dem Kaninchen 2 ml Blut aus einer Ohrvene entnommen. Das Serum, das nach dem Abzentrifugieren der Blutzellen erhalten wurde, wird im Folgenden als Präimmunserum bezeichnet. Die Injektion der Probe erfolgte subkutan in den Nacken des Tieres. 4 Wochen später wurde das Kaninchen noch einmal mit etwa 100 µg Antigen immunisiert. 7 Tage nach dieser ersten Auffrischungsimmunisierung wurde dem Tier aus der Ohrvene 2 ml Blut entnommen. Nach dem Abzentrifugieren der Blutzellen wurde das Serum auf eine Kreuzreaktion mit dem Cytochrom hin getestet. Dabei konnte eine positive Reaktion nachgewiesen werden. 4 Wochen nach der ersten Auffrischungsimmunisierung wurde eine zweite Auffrischungsimmunisierung mit etwa 100 µg Protein durchgeführt. 10 Tage später wurde 2 ml Blut entnommen und der Antikörpertiter mit ELISA bestimmt. Etwa 8 Wochen nach der ersten Auffrischungsimmunisierung wurde eine dritte Auffrischungsimmunisierung mit etwa 50 µg Protein durchgeführt. 7 Tage später wurde dem Tier 2 ml Blut entnommen und mit dem Serum eine Western-Blot Analyse und eine Antikörpertiterbestimmung mit ELISA vorgenommen. 14 Tage nach der dritten Auffrischungsimmunisierung wurde das Kaninchen ausgeblutet. Das Serum wurde bis zur weiteren Verwendung für immunologische Untersuchungen portioniert bei –20 °C aufbewahrt.

2.4.3 Antikörpertiterbestimmung mit ELISA (enzyme linked immunoadsorbent assay)

Die Konzentration der Antikörper im Serum gegen das gereinigte Cytochrom wurde mit einem enzymgekoppelten Immunoabsorptionstest bestimmt (Rosner 1994). Das Antigen wird dabei an eine Oberfläche gebunden, mit Antiserum verschiedener Verdünnungsstufen inkubiert und mit Anti-Antikörpern, an die ein Enzym gebunden ist, über eine Farbreaktion nachgewiesen. Eine Mikrotiterplatte wurde mit absolutem Ethanol gewaschen. In jede der 96 Vertiefungen wurde 50 µl Antigenlösung (gereinigtes Cytochrom, 25 ng Protein) in Kopplungspuffer (100 mM

Na₂CO₃/NaHCO₃, pH 9,6) gefüllt. Die Platte wurde für drei Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend fünfmal mit 100 µl 0,05 % (v/v) Tween-20 in PBS pro Vertiefung gespült. Überschüssige Proteinbindestellen wurden mit 5 % (w/v) Milchpulver in Kopplungspuffer (250 µl / Vertiefung) blockiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Platte siebenmal mit Tween 20 in PBS gewaschen. Präimmunsereum und Serum, das nach den Aufrischungsimmunisierungen des Tieres entnommen worden war, wurde 1:50 mit 1% Milchpulver in PBS verdünnt. Davon wurden 150 µl in die Vertiefungen der ersten Spalte auf der Mikrotiterplatte gegeben. Von Spalte zu Spalte wurde das Serum 1:5 mit 1 % Milchpulver in PBS weiterverdünnt. Nach Inkubation der Platte für drei Stunden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler wurde sie siebenmal mit Tween 20 in PBS gewaschen. Die sekundären Antikörper (Ziegen-Antikaninchen-Antikörper konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase) wurden 1 : 500 mit 1 % Milchpulver in PBS verdünnt. Jeweils 100 µl wurden in die Vertiefungen pipettiert. Die Inkubation der Platte erfolgte über Nacht bei +4 °C. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte siebenmal mit Tween-20 in PBS und einmal mit 100 mM Citratpuffer, pH 5, gewaschen, der auf 37 °C vorgewärmt worden war. Die Farbreaktion erfolgte nach Zugabe von 200 µl Substratlösung (3,1 mM 1,2-Phenylendiamin, 30 µl 30 % H₂O₂ in 100 ml 100 mM Citratpuffer, pH 5,1), die zuvor auf 37 °C erwärmt worden war. Die Platte wurde für 12 Minuten bei 37 °C inkubiert. Bereits nach einer Minute konnte der Beginn der Farbreaktion beobachtet werden. Durch Zugabe von 50 µl 2,4 M Schwefelsäure pro Vertiefung wurde die Farbreaktion abgestoppt. Die Absorptionsmessung erfolgte in einem ELISA-Lesegerät EAR 340 (SLT Instruments) bei 492 nm, wobei die Hintergrundabsorption bei 690 nm abgezogen wurde. Als Antikörpertiter wurde die Verdünnungsstufe bezeichnet, bei der die Absorption nach Zugabe von Serum deutlich über der Kontrolle mit Präimmunsereum lag.

2.4.4 *Western-Blot-Analyse*

Western-Blot-Analysen zur Immunodetektion des Cytochroms wurden nach (Harlow und Lane 1988) durchgeführt. Nach einer SDS-PAA-gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine auf einem 12 %igen PAA-Gel wurden die Proteine mittels eines Fastblot-Systems (Semiphor, Hoefer) mit Carbonplatten im Semitrockenmodus auf eine Nitrozellulose-Membran (BioBlot-NC, CoStar, Cambridge USA), übertragen. Als Transferpuffer wurde 10 mM CHAPS, pH 11,0, mit 12 % (v/v) Methanol verwendet. Bei einer konstanten Stromstärke von 250 mA wurden die Proteine innerhalb von 25 Minuten transferiert. Der Transfererfolg wurde durch Anfärben des Gels mit Coomassie Brilliant Blau sowie durch Anfärbung der Nitrozellulosemembran mit Ponceau S (Färbedauer 10 min) kontrolliert. Die Ponceau S Färbung ist reversibel und der Blot

wurde mit TBS komplett entfärbt. Um die unspezifische Proteinbindekapazität der Membran zu blockieren, wurde die Membran eine Stunde in 5 % (w/v) Magermilchpulver (MP) in TBS (Tris buffered Saline: 10 mM Tris/HCl, pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,5 % NP 40 (v/v; Nonident P40)) geschwenkt. Anschließend wurde die Membran mit Antiserum (1:400 oder 1:500 verdünnt in 1% (w/v) Magermilchpulver in TBS) für mindestens 1 - 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Dazu wurde die Membran in einem kleinen Plastikröhrchen, mit dem in 1% MP/TBS verdünnten Antiserum (Volumen 10 ml) langsam rotierend bewegt. Die Membran wurde anschließend dreimal für 3 Minuten mit TBS gewaschen und mit Ziegen-Antikaninchen-Antikörper-alkalische-Phosphatase-Konjugat (1:800 oder 1:1000 verdünnt in TBS plus 3% BSA, Boehringer (Roche) Mannheim) für 3 Stunden bei Raumtemperatur wie oben beschrieben inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal für 3 Minuten mit TBS plus 5 % MP, weitere zweimal nur mit TBS und zweimal mit CSPD- Puffer (100 mM Tris/HCl pH 9,5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂) gewaschen. Die Detektion des Antikörperkonjugats erfolgte über Chemilumineszenz. Durch die alkalische Phosphatase des sekundären Antikörpers wird CSPD dephosphoryliert. Das führt zur Bildung eines metastabilen Dioxethan Phenolat-Anions, welches zerfällt und in gepufferter Lösung Licht bei 477 nm emittiert. Diese Lumineszenz wird mittels Röntgenfilm detektiert (Bronstein 1991). Die Detektionsreaktion wurde durch Inkubation der Membran in einer frisch angesetzten Färbelösung mit 100µl CSPD-Stammlösung (Roche, Mannheim) in 10 ml CSPD-Puffer für 10 min initiiert. Danach wurde die Membran in Haushaltsfolie eingeschweißt und 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Membran für unterschiedlich lange Zeit (15, 30, 60, 120 Minuten) mit einem Röntgenfilm inkubiert. Durch die Lumineszenzreaktion der gebundenen Antikörper wurden die Banden auf dem Röntgenfilm abgebildet.

2.5 Präparative Methoden

2.5.1 *Konzentration von Kulturüberständen*

Um eine genauere Charakterisierung der im Kulturüberstand vorhandenen Proteine zu ermöglichen, mussten diese zuerst konzentriert werden. Das bereitete Schwierigkeiten, da die im Labor etablierten Methoden nicht dafür geeignet waren, große Volumina mit sehr geringen Proteinkonzentrationen zu konzentrieren, vor allem, da das gesuchte Cytochrom mit nur 9,6 kDa ein relativ geringes Molekulargewicht hatte. Um Proteine aus Kulturüberständen zu konzentrieren, wurde der Kulturüberstand nach der Zellernte in einem ersten Schritt durch einen 2 µm-Filter filtriert. Damit wurden nicht abzentrifugierte Bakterien entfernt. Der nun zellfreie Kulturüber-

stand wurde mit einer Flussrate von 2 ml/min über eine Hydroxylapatitsäule (BioGel HT, Bio-rad) geleitet. Das Cytochrom und andere Proteine wurden an das Säulenmaterial gebunden. Die Säule wurde danach mit 25 mM Na₂PO₄-Puffer, pH 7,0, gewaschen und die gebundenen Proteinen mit 0,5 M Na₂PO₄-Puffer, pH 6,5, von der Säule eluiert. Die so erhaltene Proteinfraction wurde mit Ultrafiltration in einer Amicon-Rührzelle bei einem angelegten N₂-Druck von 3 bar (P_{\max} 3,6 bar) mit einer 4 kDa-Polyethersulfon-Membran (PES 4, Intersept Witten) weiter konzentriert. Dabei konnte gleichzeitig ein Austausch des Puffers erfolgen. Die Ultrafiltrationsmembran wurde vor Benutzung in Wasser gewaschen um enthaltenes Glycerin zu entfernen. Soweit erforderlich wurde das erhaltene Retentat über Fugisept-Microfiltrationseinheiten (Intersept Witten) weiter eingengt.

Um größere Volumina zu konzentrieren, kam eine 250 ml-Tangentialfiltrationseinheit (Viacell 250, Sartorius Göttingen) zum Einsatz. Im Gegensatz zu herkömmlichen Ultrafiltrationseinheiten wurde die Lösung konstruktionsbedingt nicht von oben durch die Membran gedrückt und die Lösung dabei mit einem Magnetrührer bewegt. Vielmehr steht die Membran in dieser Filtrationseinheit senkrecht. Damit wird eine wesentlich größere Membranoberfläche möglich. Um eine gleichmäßige Filtration zu erreichen, wurde die gesamte Apparatur auf einem Orbital-schüttler mit 60 rpm geschüttelt. Die Filtration wurde unter 3,5 bar N₂-Überdruck durchgeführt, die Ausschlußgröße der Membran lag bei 4,5 kDa. Auf diese Art wurde 1 l Kulturüberstand auf 1 ml Retentatvolumen innerhalb von 2 Stunden eingengt. Die Membran wurde vor der eigentlichen Filtration von enthaltenem Glycerin gereinigt, indem 250 ml Wasser filtriert wurden. Mit dieser Methode war es möglich, in kurzer Zeit ein großes Volumen Kulturüberstand zu konzentrieren.

2.5.2 *Chinonextraktion*

Chinoide Verbindungen wurden sowohl aus Zellen, als auch aus dem Kulturüberstand in Anlehnung an des Protokoll von (Shestopalov et al. 1997) extrahiert.

2.5.2.1 *aus Kulturüberständen*

Nach dem Wachstum wurden die Bakterienkulturen durch Zentrifugation wie beschrieben geerntet. Der, durch einen 2 µM-Filter sterilfiltrierte, Kulturüberstand (Volumen in der Regel 50 – 100 ml) wurde im Scheidetrichter jeweils das gleichen Volumen Methanol und Hexan gegeben. Das Gemisch wurde geschüttelt und es wurde ein ebenfalls gleich großes Volumen Aceton zugegeben. Die Mischung enthielt somit z.B. 50 ml Kulturüberstand + 50 ml Methanol + 50 ml

Hexan + 50 ml Aceton. Nach der Phasentrennung wurde die Hexanphase separiert und zum restlichen Extraktionsansatz das 1,5-fache Volumen (z.B. 75 ml) Hexan zugesetzt. Der Extraktionsvorgang wurde wiederholt. Die Hexanphasen wurden vereinigt und im Rotationsverdampfer (Rotavapor RE, Büchi) getrocknet. Extrahierte Substanzen wurden in 3 ml Hexan gelöst. Diese wurden unter einem N₂-Strom in einem kleinen Reagenzröhrchen getrocknet. Dieser Extrakt wurde unter Lichtausschluss bei + 4 oder – 20 °C aufbewahrt und zur spektroskopischen oder zur HPLC-Analyse in einem entsprechenden Lösungsmittel bzw. dem HPLC-Eluenten gelöst.

2.5.2.2 *aus Zellmaterial*

Die Extraktion von Zellmaterial erfolgte analog, mit geringen Modifikationen. Die Zellen wurden geerntet und in 50 mM Ammoniumacetat-Puffer, pH 6,5, resuspendiert und mit einigen Kristallen Ferricyanid versetzt, um enthaltene Chinone zu oxidieren. 70 mg Zellprotein wurden mit 10 ml Methanol und 10 ml Hexan versetzt und mit einem Magnetrührer gerührt. Dem Ansatz wurde unter ständigem Rühren 10 ml Aceton zugesetzt. Durch Zentrifugation der Probe bei 3000 × g in gläsernen Zentrifugenbechern im Schwenkrotor (Labofuge 6000, Heraeus Frankfurt) für 10 Minuten wurde eine optimale Phasentrennung erreicht. Die obere chinonhaltige Hexanfraktion wurde abgenommen und 3 ml Hexan wurden zur verbleibenden Extraktionsansatz gegeben. Der Ansatz wurde erneut gemischt und ein weiteres Mal zentrifugiert. Die Hexanfraktion wurde abgenommen, mit der schon vorhandenen vereinigt und unter einem N₂-Strom getrocknet. Die erhaltenen Chinonextrakte wurden unter Lichtausschluss bei – 20 °C aufbewahrt und zur spektroskopischen oder zur HPLC-Analyse in einem entsprechenden Lösungsmittel bzw. dem HPLC-Eluenten gelöst.

2.5.3 *Präparation von Ferrihydrit*

Zur Herstellung einer synthetischen Eisen(III)Lösung wurde eine 0,4 M FeCl₃-Lösung mit NaOH langsam auf pH 7 titriert; der Ansatz wurde gerührt, um lokale pH-Maxima über 7,0 zu vermeiden. Die so erhaltene Ferrihydrit-Suspension wurde fünfmal durch Zentrifugation (je 10 min bei 11000 × g im Sorvall GS3 Rotor) und Resuspendieren des Pellets in Wasser gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Ferrihydrit in einem möglichst geringen Volumen Wasser resuspendiert und auf 50 ml Serumfläschchen verteilt. Die Konzentration wurde mit Ferrozin bestimmt und die Suspensionen durch Autoklavieren sterilisiert.

2.5.4 Herstellung von TitaniumCitrat-Lösung

Titan(III)citrat wurde nach (Zehnder und Wuhrmann 1976) im Anaerobenzelt hergestellt. 75 ml Natriumcitrat-Lösung wurde mit 7,5 ml Titan(III)Chlorid (Ampulle 15% Ti(III)Cl in 10% HCl) gemischt und mit 10 ml gesättigter Na₂CO₃-Lösung neutralisiert. Vor und nach Zugabe von Karbonat wurde der pH Wert bestimmt. Dazu wurde im Zelt pH-Papier verwendet. Der pH-Wert wurde für die fertige Lösung mit der pH-Elektrode überprüft. Die Lösung wurde im Zelt auf zwei 50 ml Serumflaschen verteilt. Bei einem erhaltenen Endvolumen von 92,5 ml lag eine Titan(III)Konzentration von 94 mM vor.

2.5.5 Herstellung von Cystin-Lösung

Bis auf einige Ausnahmen wurde auch Cystin in den Versuchen in Lösung eingesetzt. Cystin wurde unter schwach alkalischen Bedingungen (pH 9 – 10) gelöst. Nachdem Cystin komplett in Lösung war, wurde der pH-Wert mit 0,1 M HCl auf 8,0 eingestellt. Diese Stammlösung wurde auf eine Konzentration von 10 mM eingestellt, soweit notwendig sterilfiltriert und anaerobisiert. So hergestellte Lösungen waren ca. 12 Stunden lang nutzbar, bis sich deutliche Cystinausfällungen zeigten. Sie wurden vor jedem Experiment frisch angesetzt.

2.6 Analytische Methoden

2.6.1 Mikroskopische Methoden

Die mikroskopische Untersuchung der Bakterienkulturen wurde mit einem Phasenkontrastmikroskop (Zeiss, Oberkochen) bei einer 400-fachen Vergrößerung durchgeführt. Das Mikroskop war mit einer zusätzlichen Vergrößerungsoptik ausgestattet, die die Vergrößerung um einen variablen Faktor zwischen 0 und 2 erweiterte, so dass maximal 800-fache Vergrößerungen erreicht werden konnten. Beim Versuch der Kokultivierung mit *M. hungatei* wurde die Fluoreszenz der methanogenen Bakterien mit einem Axiophot der Firma Zeiss (Oberkochen) beobachtet. Dieses war mit einem Fluoreszenzfilter ausgestattet, der die folgenden Spezifikationen besaß: Bandpaßfilter (BP) 395-400, Farbteiler (FT) 460, Langpaßfilter (LP) 470.

2.6.2 HPLC-Analysen

Die Acetatkonzentration wurde mit einem High-Performance-Liquid-Chromatography-System (HPLC) bestimmt. Die Messung erfolgte mit einem Brechungsindexdetektor ERC-7512 (Erma, Sykam GmbH, Gilching), einem universellen Detektor für nicht absorbierende Substanzen. Das

Detektionsprinzip beruht auf der Änderung der Ablenkung einer Lichtquelle durch gelöste Substanzen in der Probenzelle im Vergleich zur Referenzzelle, welche nur vom Eluenten durchflossen wird. Die Trennung der Proben erfolgte über eine Aminex HPX 87-H-Ionenausschlußsäule 300×7,8mm (Biorad, München). Das Trennprinzip der Säule war Ionenmoderated partition HPLC (IMP). Die grundlegenden Trennmechanismen der IMP sind Größenausschluss, Ionenaustausch, Normal- und Umkehrphasenverteilung und Ligandenaustausch. Bei der verwendeten Säule lagen Sulfonsäurereste in protonierter Form vor, darum musste diese mit verdünnter Säure als Laufmittel gefahren werden. Für die Trennsäule galten die folgenden Spezifikationen: max. Rückdruck: 1,5 kPsi bzw. 10 MPa; max. Temperatur: 65°C. Der Trennsäule war eine Vorsäule Sugar 3 20×4,6mm (GROM, Herrenberg-Kayh) sowie ein kombinierter Metall-Glas-Vorfilter vorgeschaltet. Der Fluss wurde mit einer Sykam-Pumpe S 1000 (Sykam GmbH, Gilching) erzeugt. Die Flussrate betrug 1 ml/min bei einem Druck zwischen 5 und 9 MPa. Für die Trennung wurde die Säule in einem Säulenofen (Timberline Instruments Inc.) auf 40 °C temperiert. Die Probenapplikation erfolgte über einen Autosampler (Autoinjector 234, Gilson). Die Proben wurden dem Reaktionsansatz in Abständen entnommen und mit Schwefelsäure (Endkonzentration 10 mM) versetzt. Damit wurden zum einen ein Abstoppen der Reaktion und zum anderen eine Ansäuerung erreicht, die für die Applikation in der HPLC notwendig war. Das Elutionsmittel war 5 mM Schwefelsäure. Um zu verhindern, dass es zur Ausgasung von eventuell gelösten Gasen (Sauerstoff, Kohlendioxid) kommt, wurde der Eluent 15 min entgast und das angelegte Vakuum anschließend durch Helium aufgehoben. Der Eluent wurde unter Helium-Atmosphäre an die HPLC angeschlossen. Die Berechnung des Acetatgehalts erfolgte über Integration mit der HPLC-Steuersoftware Shimazu Class VP (Shimazu Instruments) und durch Kalibrierung mit Standardkonzentrationen.

Organisch aus Kulturüberstand, sowie aus Bakterien extrahierte Proben wurden mit einem Beckman-HPLC-System (Beckman Instruments) untersucht. Die Auftrennung erfolgte über eine Reversed-phase-Chromatographiesäule (Ultrasphere – ODS 250 × 4,6mm). Die Elution der Substanzen erfolgte mit $1 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$ (Pumpe 126, Beckman Instruments) und Acetonitril / Isopropanol 60% / 40 % (v/v) als Eluent. Die Substanzen wurden mit einem Photodiodenarray-Detector (128, Beckmann Instruments) detektiert. Dazu wurde kontinuierlich ein UV –Spektrum im Wellenlängenbereich von 194 nm bis 450 nm aufgenommen. Die Identifikation der Substanzen und die Auswertung erfolgte mit der Integrations- und Steuersoftware des Systems (System Gold, Beckman Instruments), als Standards wurden Menadion (2 Methyl-1,4-naphthochinon), DHNA (Dihydroxynaphthoesäure) und Vitamin K₂ (Menachinon) verwendet.

2.6.3 Spektrophotometrische Untersuchungen

Die Messung der Optischen Dichte von Bakterienkulturen wurde in Glasküvetten mit 1 cm Lichtweg bei einer Wellenlänge von 578 nm mit einem Einstrahl-Spektrophotometer Hitachi 100-40 (Hitachi, Tokyo, Japan) durchgeführt. Mit dem gleichen Gerät wurden auch Enzymtests durchgeführt, wie oben beschrieben. Die Bestimmung des Proteingehalts von Extrakten wurde in einem Spektralphotometer Hitachi U-1100 (Hitachi, Tokyo, Japan) durchgeführt. UV/VIS-Absorptionsspektren wurden in Zweistrahl-Spektralphotometern Uvikon 930 und Uvikon 830 (Kontron, Zürich, Schweiz) aufgenommen. Die Messung erfolgte dabei in Quarzküvetten gegen Luft bzw. gegen den entsprechenden Puffer. Der Messbereich umfasste ein Wellenlängenspektrum von 200 - 900 nm.

2.6.3.1 Cytochrom-Konzentrationsbestimmung Extinktionsbestimmung

Die Konzentration von Cytochromen wurde über die Extinktionsmaxima in UV/Vis-Spektrum bestimmt. Dabei wurde, soweit möglich die α -Bande im Redoxdifferenzspektrum mit einem Extinktionskoeffizienten von $31,4 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ verwendet. In Kulturüberstandsmessungen war die Konzentration jedoch häufig so gering, dass eine Konzentrationsbestimmung über die α -Bande nicht möglich war. In diesem Fall wurde die γ -Bande im oxidierten Spektrum mit einem Extinktionskoeffizienten von $137 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ benutzt. Die Extinktionswerte sind aus (Förster 1998) entnommen.

2.6.3.2 Thiolgruppenbestimmung

Die Bildung von Cystein wurde über die Messung seiner freien Thiolgruppe verfolgt. Dazu wurde ein photometrisches Testsystem benutzt, welches auf Ellmann's Reagenz basiert (Lange und Vejdelek 1987). Eine 10 mM DTNB-Stammlösung (in 50 mM KPP pH 8,0) wurde 1 : 10 mit dem gleichen Puffer verdünnt. Zu einem Milliliter dieser Arbeitslösung wurde 50 - 200 μl Probe gegeben. Die Endkonzentration an Cystein in der Küvette lag zwischen 100 und 10 μM . Die Reaktion von DTNB mit Thiolen führt zur Bildung einer lichtabsorbierenden Verbindung ($\epsilon = 13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), deren Absorption in 1 ml Küvetten bei 412 nm in einem Hitachi U-1100-Photometer (Hitachi, Tokyo, Japan) gemessen wurde. Die Konzentration wurde anhand einer Standardkurve (0 – 1 mM Ausgangskonzentration) berechnet. Die Standards wurden über Verdünnung einer anoxischen L-Cystein-Stammlösung hergestellt. Standards waren unter Luft-sauerstoff für mindestens 1 h stabil, daher wurden die Messungen unter oxischen Bedingungen,

jedoch möglichst schnell durchgeführt. Es wurde darauf geachtet, dass alle Proben innerhalb derselben Zeitspanne bearbeitet wurden.

2.6.3.3 Bestimmung von Sulfid

Die Sulfid-Konzentration wurde mit der Methode nach (Cline 1969) bestimmt. Diese beruht darauf, dass Sulfid in saurer Lösung in Gegenwart von Eisen(III)ionen als Oxidationsmittel mit dem Reagenz 4-Amino-N,N-Dimethylanilin den Farbstoff Methylenblau bildet, der sein Absorptionsmaximum bei 664 nm hat. Als Eichsubstanz wurde $\text{Na}_2\text{S} \times 9 \text{H}_2\text{O}$ verwendet. Für die Eichkurve wurden Lösungen mit Konzentrationen von 1 bis 15 mM hergestellt. In den Reaktionsansatz dürfen maximal 1.3 bis 1.5 $\mu\text{mol S}^{2-}$ eingebracht werden. In der vorliegenden Arbeit wurde eine auf geringere Volumina modifizierte Mikromethode eingesetzt. Dazu wurde 1ml Zinkacetat in 10 ml Reagenzgläsern vorgelegt. Die Probe (10 - 100 μl) wurde unmittelbar nach Probenahme in die Zinkacetatlösung gegeben und geschüttelt. Dabei fiel ZnS aus, wodurch ein Verlust durch Oxidation des Sulfids mit Luftsauerstoff verhindert wurde. Die Ansätze wurden mit 0,4 ml ADMA versetzt und mit Wasser auf 3 ml aufgefüllt und erneut geschüttelt. Danach wurde 1 ml Fe(III) Lösung (2 mg $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ /ml) zugegeben. Nach 20 min bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 670 nm bestimmt. In Zellsuspensionsversuchen wurden die Proben vor der Messung in der Eppendorffzentrifuge partikelfrei zentrifugiert. Die Messung war linear bis zu einer Absorption von 0,5, was einer Konzentration von 3,5 mM Sulfid im Ausgangsmaterial entsprach.

2.6.3.4 Bestimmung von Eisen(II)Ionen mit Ferrozin

Die Bestimmung von Eisen beruht auf der Reaktion von Eisen(II) mit Ferrozin (Na_2 -3-(2-pyridyl)-5,6-bis(4-phenylsulfonsäure)-1,2,3-Triazin). Die Konzentration des gebildeten Komplexes wird über die Extinktion bei 562 nm gemessen. Auch die Gesamteisenkonzentration kann mit dieser Methode bestimmt werden; dafür muss das in der Probe vorhandene Eisen vollständig zum Fe^{2+} reduziert werden. Dazu wurden 0,1 ml Probe mit 0,9 ml 10 % (w/v) Hydroxylaminhydrochlorid in 1 M HCl versetzt und zwei Stunden inkubiert. Sollte nur die Fe^{2+} Konzentration bestimmt werden, wurde die Probe lediglich mit 1M HCl versetzt; dadurch werden die Fe^{2+} Ionen stabilisiert. Die so vorbehandelten Proben wurden mit 1 ml 50 % (w/v) Ammoniumacetat 0,1 % (w/v) Ferrozine in Aq. dest. versetzt. Nach 10 Minuten wurde die Extinktion bei 562 nm gemessen. Die maximal messbare Konzentration in der Probe betrug 4 mM Fe^{2+} ; eine Eichkurve wurde von 0 – 4 mM Fe^{2+} aufgenommen (modifiziert nach (Stookey 1970)).

2.6.3.5 Bestimmung des Proteingehalts

Zur Bestimmung des Proteingehaltes wurde die Methode nach (Bradford 1976) benutzt. Diese beruht auf der Adsorption von Coomassie-Blue an Proteine. Eine dadurch hervorgerufene Absorptionsänderung wurde im Einstrahl-Spektrophotometer Hitachi U1100 (Tokio, Japan) bei 595 nm gemessen. Es wurden Einweg-Plastikküvetten (Brand) mit 1cm Lichtweg verwendet. Als Reagenz wurde das BioRad-Fertigreagens (BioRad, München) benutzt. Dieses wurde 1:5 verdünnt und musste vor der Verwendung durch einen Faltenfilter filtriert werden, da sich nach längerer Aufbewahrungszeit Ausfällungen bilden, die die Messung beeinflussen. Der Proteingehalt wurde durch Vergleich mit Rinderserumalbumin zwischen 1 mg/ml und 0,0625 mg/ml bestimmt (nur in diesem Bereich ist die Messung linear, Proben höheren Proteingehaltes wurden entsprechend verdünnt). Es wurden grundsätzlich Doppelbestimmungen durchgeführt. Für Proben mit hohem Cytochromgehalt wurde zusätzlich eine zweite Standardreihe mit Pferdeherzcytochrom verwendet und die erhaltenen Proteinwerte mit den Albumin-Werten abgeglichen.

2.6.4 Massenspektrometrie

Für die Analyse von Chinonmustern in den beiden Reinkulturen *Geobacter sulfurreducens* und *Wolinella succinogenes* sowie der *G. sulfurreducens* / *W. succinogenes* Kokultur wurden jeweils 1 Liter Kulturen angezogen und wie beschrieben geerntet. Die Bakterienpellets wurden in 50 mM Ammoniumacetat-Puffer, pH 6,5, resuspendiert und zweimal gewaschen. Danach wurden die Kulturen lyophilisiert unter in 2 ml Glasröhrchen gefüllt. Diese wurden bis zur Analyse unter Lichtausschluss gelagert. Die Extraktion der Proben wie auch die massenspektroskopischen Untersuchungen wurden von Dr. R. Geyer am Center for Biomarker Analysis der Universität von Tennessee (Knoxville, Tennessee, USA) durchgeführt.

2.6.5 Messung von apparenten Redoxpotentialen

Redoxpotentiale während des Wachstums der Kokultur wurden in einem anoxischen 3-Elektroden-System gemessen (Emde et al. 1989). Es wurde eine Silber/Silberchlorid Referenzelektrode und ein Platin-Netz als Arbeitselektrode verwendet. Die Referenzelektrode wurde durch Elektrolyse eines Silberdrahtes (Durchmesser 0,5 mm) in 1 M HCl hergestellt. Das Platin-Netz wurde vor dem Versuch durch Ausglühen aktiviert. Alle Elektroden sowie das Kulturgefäß wurden durch Autoklavieren sterilisiert. Die Lugin-Kapillare, die die Kulturkammer mit der Arbeitselektrode und die Referenzelektrode miteinander verband, wurde mit sterilem 3 %

Agar in 1 M KCl ausgegossen. Das entstandene Referenzelektrodenkompartiment wurde mit 100 mM KCl gefüllt. Der Aufbau war mit einem Potentiostat (Typ LB 81 M, Bank Elektronik) verbunden, welcher als Potentiometer diente. Die Berechnungen waren auf ein Redox-Potential für die Silber/Silberchlorid-Elektrode, bezogen auf die Standard-Wasserstoff-Elektrode, von + 203,5 mV (30 °C) (Kölling 2000) bezogen. Die Referenzelektrode wurde mit einer 3 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ / 3 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ Mischung in 100 mM KCl kalibriert, welche ein bekanntes Redox-Potential von + 213,5 mV (30 °C, Ag/AgCl) hat. Dieses Redoxpotential entsprach einem Redox-Potential von + 412 mV bezogen auf die Standard Wasserstoffelektrode bei pH 7,0 (Kölling 2000).

2.7 Molekularbiologische Methoden

2.7.1 DNA-Extraktion

Die Extraktion von DNA aus *Geobacter sulfurreducens* wurde mechanisch durch Zerschlagen der Zellen in einem Bead beater durchgeführt (More et al. 1994). Ein Milliliter einer *G. sulfurreducens* – Suspension zu 1,88 g Zirconia Beads (Durchmesser 0,1 mm, bei 180 °C sterilisiert) in ein 2 ml Schraubdeckel-Reaktionsgefäß gegeben. Dazu wurden 800 µl 120 mM Natriumphosphat Puffer, pH 8,0, und 260 µl SDS-Lösung (10% SDS, 0,5 M Tris/HCl, pH 8,0; 0,1 M NaCl). Beide Lösungen wurden vorher autoklaviert. Die Zellen wurden in einem Bead beater (Modell Savant BIO 101) für 45 s mit einer Schlaggeschwindigkeit von 6,5 m/s aufgeschlossen. Danach wurden Zelltrümmer, Zirconia Beads und nicht aufgeschlossene Zellen in einer Mikrozentrifuge (Eppendorf Zentrifuge 5417 R) 4 min bei $15300 \times g$ und Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand (600 – 800 µl) wurde vorsichtig und ohne das Pellet zu berühren in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet wurde mit 120 mM Natriumphosphat Puffer, pH 8,0, auf ein Volumen von 1200 µl aufgefüllt und erneut bei 6,5 m/s 45 s aufgeschlossen. Nach erneuter Zentrifugation wurden beide Überstände vereinigt.

2.7.2 PVPP-Reinigung der DNA

Um Verunreinigungen durch Proteine, vor allem Cytochrome, zu beseitigen, musste die DNA-Präparation gereinigt werden. Dazu wurde eine Methode mit PVPP (Polyvinylpolypyrrolidon, Firma Sigma (Nr.: P6755)) verwendet (Holben 1988; Berthelet et al. 1996). Zur Vorbereitung wurde 15 g PVPP in einem Becherglas mit 3 M HCl auf 200 ml aufgefüllt. Diese Suspension wurde 12 – 16 Stunden auf einem Magnetrührer gerührt. Der Magnetrührer wurde gestoppt. Nach Sedimentation des PVPP wurde der HCl-Überstand abgenommen und das PVPP wurde

mit 10 mM Tris/EDTA, pH 8,0, äquiliert. Mit einer Vakuum-Pumpe wurde der Überstand abgenommen und durch 10 mM TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0) ersetzt. Dieser Schritt wurde wiederholt. Dann wurde der pH-Wert der PVPP/TE - Suspension mit NaOH auf pH 8,0 eingestellt. PVPP wurde abgedeckt bei 4°C gelagert. Die eigentliche Reinigung wurde in Mikro Bio-Spin Chromatographie Säulen (Nr.: 7326204, Bio-Rad, München) durchgeführt. Dazu wurde der Verschluss der Zentrifugationssäule entfernt und diese in ein 2 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) gesteckt, auch der Deckel des Reaktionsgefäßes wurde entfernt, da er bei der Zentrifugation störte. Mit einer automatischen Pipette (Eppendorf) und mit Sterilfilter versehenen Pipettenspitzen wurde PVPP Suspension in die Zentrifugationssäule pipettiert. Diese wurde nach jeder Zugabe von PVPP für 1 min bei $375 \times g$ bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach jeder Zentrifugation wurde die abfiltrierte Flüssigkeit entfernt. Diese Schritte wurden solange wiederholt, bis die Säule vollständig mit PVPP gefüllt war. Unmittelbar vor der Benutzung wurde die Säule für 2 min bei $375 \times g$ trocken zentrifugiert. Die Säule wurde in ein neues, steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die 200µl DNA-Präparation wurden in das Zentrum der Säule pipettiert. Es wurde 2 min bei $375 \times g$ zentrifugiert. Die gereinigte DNA befand sich im Filtrat; Verunreinigungen wurden an das Säulenmaterial gebunden.

2.7.3 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der DNA – Lösungen wurde fluoressenzphotometrisch mit einem Höfer DynaQuant 200 Fluorimeter bestimmt. Dazu wurde 10 µl DNA-Lösung mit 90 µl doppelt destilliertem Wasser verdünnt. Zu 2 ml Messlösung (18 ml H₂O, 2 ml 10 × TNE (100 mM Tris, pH 7,4, 10 mM EDTA, 2 M NaCl) und 2 µl Fluoreszenzfarbstoff (Hoechst HT 33258) wurde 2 µl DNA direkt in eine Fluoreszenzküvette (Hellma) pipettiert und gemessen. Aus diesem Ausgangsmaterial wurde mit PCR das Gen des 9,6 kDa Cytochroms amplifiziert. Dazu wurden aus der Proteinsequenz degenerierte Primer abgeleitet. Dazu wurde die Software DNA-Star eingesetzt und der genetische Standardcode für *Escherichia coli* verwendet. Die Primer wurden von der Firma MBI Fermentas (Ebersberg) hergestellt.

2.7.4 Polymerase-Ketten-Reaktion

Mit den degenerierten Primern und der aus *G. sulfurreducens* extrahierten DNA wurde über PCR das Gen für das 9,6 kDa Cytochrom amplifiziert. Der verwendete PCR-Mastermix setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen: 34,8 µl H₂O, 5 µl PCR-Puffer, 5 µl dNTP (Nukleotide), 3 µl MgCl₂, 0,5 µl Vorwärts-Primer (50 pmol), 0,5 µl Rückwärts-Primer (50 pmol); 0,2 µl Taq-Polymerase (3 U im Ansatz). Die PCR Reaktion wurde in einem Thermocy-

ler (Mastercycler, Eppendorf) durchgeführt. Dabei wurde die DNA bei 95 °C für 1 min deanturiert, die Hybridisierung mit dem Primern erfolgte bei 65 °C für 2 min und die DNA Synthese fand 2 min bei 72 °C statt. Der Erfolg der PCR - Reaktion wurde im Agarosegel (1% Agarose in 0,5 TBE (100 mM Tris, pH 8,0, 2 mM EDTA, 100 mM Borsäure) überprüft. 5 µl DNA-Probe wurde mit 2 µl Auftragspuffer (100 mM EDTA, 0,2 g/ml Ficoll 200, 1 mg/ml Bromphenolblau, 1 mg/ml Xylencyanal) gemischt und in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Die Trennung erfolgte bei konstanter Spannung von 120 V in einer Zeit von 1,5 h. Das Gel wurde mit Ethidiumbromid gefärbt und mit einer Geldokumentationsanlage (Intas) im UV-Licht fotografiert.

2.7.5 Sequenzierung

Das amplifizierte PCR Produkt wurde bei der Firma GATC (Konstanz) mit einem ABI-Sequencer sequenziert. Dabei wurden die gleichen Primer verwendet, die auch bei der PCR zum Einsatz kamen. Die Auswertung erfolgte mit dem DNA-Star Softwarepaket.

2.7.6 Analyse der N-terminalen Aminosäuresequenz

Zur Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz des Überstandscytochroms wurde konzentrierter Kulturüberstand (400 pmol Protein) in einem 12 %igen SDS-PAAGel aufgetrennt und mit einem Fastblot-System (Semiphor, Hoefer) auf eine PVDF-Membran (Immobilon P, Millipore) übertragen, die zuvor nach Angaben des Herstellers behandelt worden war. Als Transferpuffer wurde 10 mM CHAPS, 10 % (v/v) Methanol, pH 11, verwendet. Der Transfer erfolgte bei 250 mA in 20 Minuten. Das Gel wurde nach dem Elektrobloiting angefärbt, um den Transfererfolg zu beurteilen. Die Membran wurde in Wasser, dann in Methanol gewaschen und anschließend für eine Minute mit Coomassie-Brilliantblau angefärbt. Danach wurde die Membran dreimal für jeweils 10 Minuten in Entfärbelösung (40 % (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure) geschwenkt, mit Wasser gespült und bei Raumtemperatur getrocknet. Die gefärbte Proteinbande wurde aus der Membran ausgeschnitten, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei +4 °C aufbewahrt. Die Sequenzierung wurde von Leonardo Cobianchi (AG Wendel, Konstanz) mit automatisiertem Edman-Abbau in einem Applied Biosystems 477A-Protein Sequenzer durchgeführt. Die Detektion der Aminosäuren erfolgte über eine angeschlossene Reversed-Phase HPLC. Die einzelnen Aminosäuren wurden über ihre Retentionszeit identifiziert. Als Standard wurde ein definiertes Aminosäuregemisch verwendet.

Die N-terminale Aminosäuresequenz des Cytochroms wurde mit der veröffentlichten Sequenz von *G. sulfurreducens* sowie mit den Sequenzen niedermolekularer Cytochrome verwandter Bakterienarten verglichen. Ein Sequenzvergleich mit anderen Protein- bzw. DNA-Sequenzen erfolgte über die NCBI-Datenbank (National Center for Biotechnology Information) via Internet mittel Blast-(Basic Local Alignment Search Tool)-search. Direkte Vergleiche wurden mit der Sequenzanalyse-Software DNA-Star durchgeführt.

2.8 Chemikalien und Gase

Es wurden Chemikalien in der Qualität p.a. bzw. in der höchsten verfügbaren Reinheit der Firmen Fluka (Neu-Ulm), Sigma (Daisenhofen), Roth (Karlsruhe), Serva (Darmstadt), BioRad (München), Biomol (Ilvesheim), Roche (Mannheim), Riedel-de Haen (Seelze), Aldrich (Steinheim) verwendet.

Alle Gase und Gasgemische stammten von Messer-Griesheim (Darmstadt, Germany) und vom Sauerstoffwerk Friedrichshafen und hatten einen Reinheitswert von 5.0.

3 Ergebnisse

3.1 Die syntrophe Kokultur *G. sulfurreducens* / *Wolinella succinogenes*

3.1.1 Wachstumsversuche zur syntrophen Kopplung von *G. sulfurreducens* mit *W. succinogenes*

Geobacter sulfurreducens Stamm PCA wuchs in Reinkultur mit 20 mM Acetat plus 40 mM Fumarat mit einer Verdopplungszeit von 7,7 h. Eine Kultivierung mit 20mM Acetat plus 40 mM Eisen(III)citrat oder Ferrihydrit war ebenso möglich. Es konnten verschiedene Reduktionsmittel wie Ascorbat, DTT oder Cystein eingesetzt werden. *Wolinella succinogenes* wuchs in Reinkultur mit 30 mM Formiat plus 10 mM Nitrat mit einer Verdopplungszeit von 10 h, als Substrat für den Baustoffwechsel wurde 5 mM Acetat zugesetzt. Als Reduktionsmittel wurde Cystein oder Ascorbat verwendet. Diese Wachstumsdaten stimmten mit denen früherer Beobachtungen (Cord-Ruwisch et al. 1998) überein.

Die Kokultur wuchs mit 20 mM Acetat plus 10 mM Nitrat mit einer Verdopplungszeit von 6,5 h. Die Kultur wurde, wie bei (Cord-Ruwisch et al. 1998) beschrieben, mit Cystein als Reduktionsmittel etabliert. Das zahlenmäßige Verhältnis *G. sulfurreducens* zu *W. succinogenes* lag, wie ebenfalls schon bei Cord-Ruwisch et al. (1998) beschrieben, zwischen 2 und 4,5 zu 1.

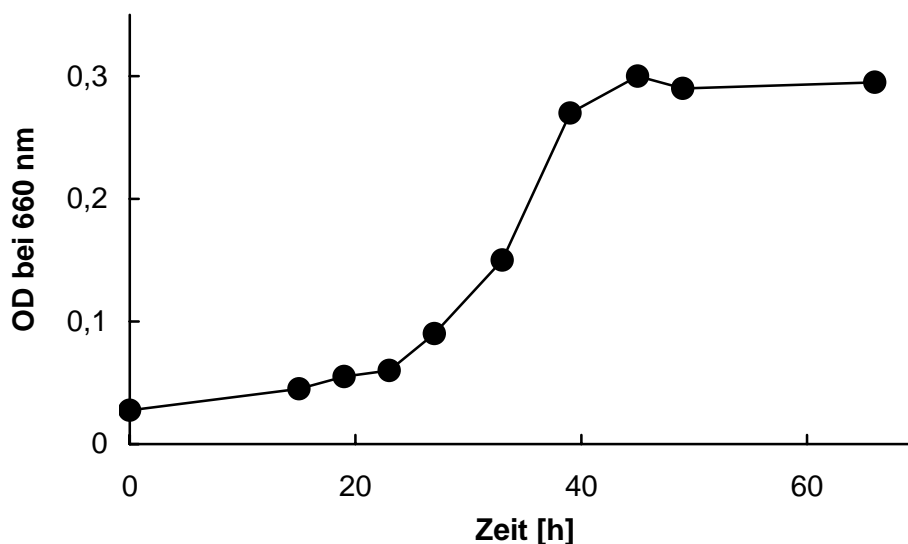


Abbildung 3-1:Wachstum einer *Geobacter sulfurreducens* / *Wolinella succinogenes* Kokultur mit 20 mM Acetat plus 10 mM Nitrat; gemessen wurde die optische Dichte bei 660 nm, der Ansatz wurde mit 2 % Inokulum beimpft.

3.1.2 Kokulturen mit verwandten Stämmen

Es wurden weitere syntrophe Kulturen etabliert. Neben der schon erwähnten Kokultur *Geobacter sulfurreducens* / *Wolinella succinogenes* wuchsen auch die beiden nahe verwandten Arten *Geobacter bremerensis* (DFR1) und *Geobacter pelophilus* (DFR2) mit *W. succinogenes* als Partnerorganismus. Die *G. bremerensis* Kokultur zeigte dabei das gleiche Wachstumsverhalten wie die *G. sulfurreducens* Kokultur. Die *G. pelophilus* Kokultur wuchs etwas langsamer, erreichte aber die gleiche optische Dichte. Kein Wachstum konnte in Kulturen von *G. sulfurreducens* mit *Methanospirillum hungatei* SK1 oder *Acetobacterium woodii* beobachtet werden. Auch eine Kokultur von *Geobacter metallireducens* mit *W. succinogenes* zeigte kein Wachstum.

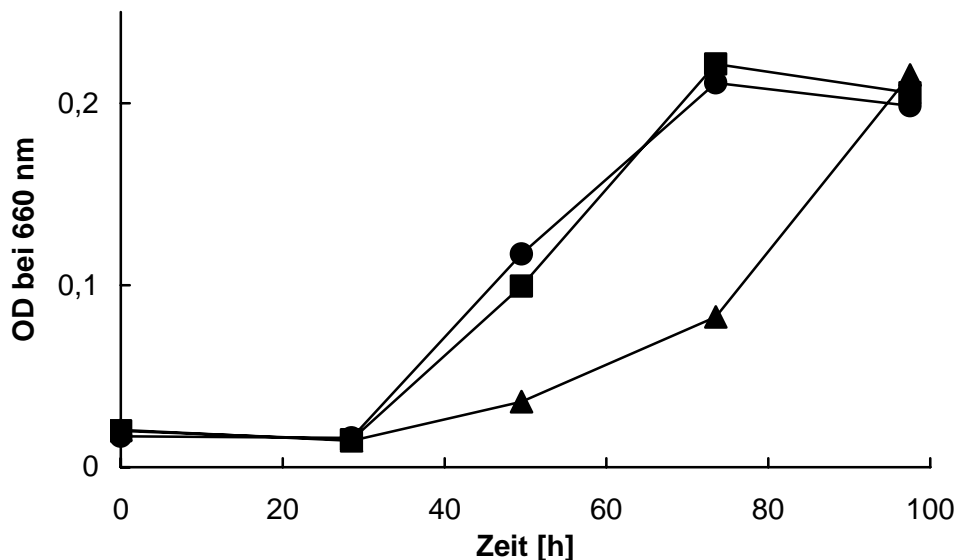


Abbildung 3-2: Vergleich des Wachstums von Kokulturen von *Geobacter sulfurreducens* (■), *G. bremerensis* (●), *G. pelophilus* (▲) mit *W. succinogenes* als syntrophem Partner; alle Ansätze mit 20 mM Acetat plus 10 mM Nitrat in Cystein-reduziertem Medium mit 2 % Inokulum, gemessen wurde die optische Dichte bei 660 nm.

3.2 Reinigung und Charakterisierung des periplasmatischen 10 kDa Cytochroms

3.2.1 Reinigung

Da bei (Seeliger et al. 1998) vermutet wurde, dass ein kleines (10 kDa) periplasmatisches *c*-Typ Cytochrom als externer Elektronencarrier in der Kokultur fungieren könnte, wurde geplant, eine größere Menge dieses Cytochroms zu reinigen. Dieses sollte für die Herstellung polyklonaler Antikörper, für den Einsatz in physiologischen Experimenten und für eine weiterführende biochemische Charakterisierung z.B. durch Kristallisationsexperimente eingesetzt werden. Die

von (Seeliger et al. 1998) beschriebene Reinigungsprozedur enthielt jedoch Reinigungsschritte, in denen das Cytochrom nicht an das Säulenmaterial gebunden wurde, sondern im Durchlauf auftrat. Das war sowohl in Hinblick auf Selektivität als auch auf Effizienz ungünstig. Aus diesem Grund wurde die Reinigungsmethodik modifiziert. Nach einem optimierten Reinigungsschema über Hydroxylapatit, Anionenaustauschchromatographie und Gelfiltration konnte eine Anreicherung der 9,6 kDa Cytochrombande bis zur Reinheit im SDS-Gel erreicht werden (Abbildung 3-3a). Der Vergleich von Präparaten die mit der originalen Reinigungsprozedur vorge-reinigt wurden (allerdings in modifizierter Abfolge: hydrophobe Interaktion, Gelfiltration (Sephadex G50), Anionenaustauschchromatographie (Mono S)) mit Präparaten, die nach dem neuen Reinigungsschema erhalten (Hydroxylapatitchromatographie, Anionenaustauschchromatographie (Mono S) wurden, zeigte nach Auftrennung in der SDS-PAGE, dass der Reinigungserfolg nach dem neuen, vereinfachten Schema nur geringfügig geringer war als nach dem Originalschema (Abbildung 3-3b).

Tabelle 3-1: Vergleich des originalen mit dem optimierten Reinigungsschema für das 9,6 kDa Cytochrom

Reinigungsschema nach (Seeliger et al. 1998):	optimiertes Reinigungsschema:
• Präparation der Periplasma-Fraktion	• Präparation der Periplasma-Fraktion
• Mono S; Puffer: 25 mM NaPO ₄ (pH 6,3)	• Hydroxylapatit Säule (BioGel HT, BioRad; 30 mM NaPO ₄ Puffer)
• Gelfiltration Superose 12; Puffer 0,15 M Ammoniumacetat	• Umpuffern durch Gelfiltration (Pharmacia PD10) auf 25 mM NaPO ₄
• Lyophilisieren	• Pharmacia Mono S Kationenaustausch-Chromatographie (25 mM NaPO ₄ Puffer)
• mit Ammoniumacetat auf 1,7 M einstellen	• Pharmacia Superose 12 Gelfiltration (Tris/HCl 10 mM pH 7.0)
• HIC Phenylsuperose 8	• Gereinigtes Protein
• Cytochrom im Durchlauf	• Konzentration durch Ultrafiltration über 4 kDa-Membran möglich

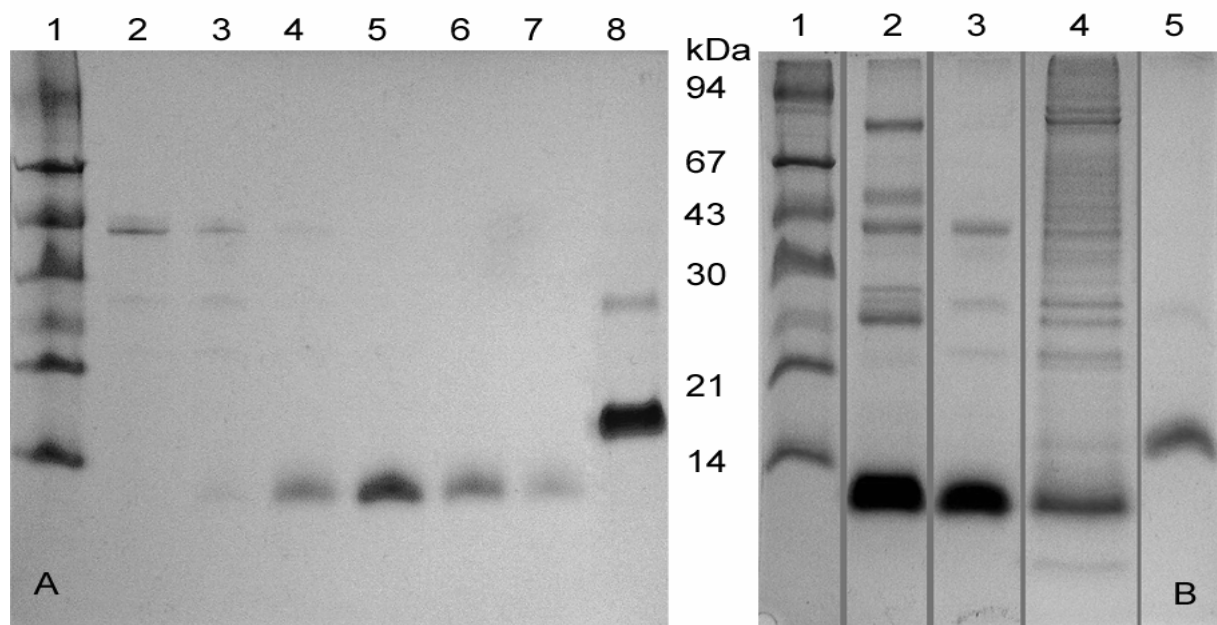


Abbildung 3-3: SDS-Page von Präparaten verschiedener Stufen der Reinigung des periplasmatischen Cytochrom *c*. **A**: aufeinander folgende Fraktionen des letzten Reinigungsschrittes (Superose 12 Gelfiltration) Spur 2-7, Spur 5 zeigt das gereinigte Cytochrom, Proteingehalt: 0,2 mg/ml, Eluent: 10 mM Tris/HCl pH 7,0, Größe: ca. 9 kDa in der Gelfiltration, durch Vergleich mit Standardproteinen bestimmt (hier nicht gezeigt), Spur 1: Molekulargewichtsmarker, Spur 8: Pferdeherz Cytochrom *c*; **B**: Vergleich von Präparaten der alternativen Reinigungsschemata nach der Anionenaustauschchromatographie, Spur 1: Molekulargewichtsmarker, Spur 2: mit Hydroxylapatit-Chromatographie vorgereinigt; Spur 3: mit HIC und Gelfiltration Sephadex G50 vorgereinigt; Spur 4: Ausgangsmaterial; Spur 5: Pferdeherz Cytochrom *c* (in B: wurden zwischenliegende Spuren mit anderen, für die Fragestellung unwesentlichen Proben entfernt)

Die über diese optimierte Reinigungsmethode begonnene Präparation einer größeren Menge des *c*-Typ-Cytochromes wurde allerdings aufgegeben, weil in verschiedenen Experimenten die Funktion dieses Cytochromes als Carriermolekül nicht bestätigt wurde (z.B. Straub und Schink 2003).

3.2.2 Charakterisierung des Cytochromes

Die biochemische Charakterisierung des Cytochromes wurde schon von (Seeliger et al. 1998) durchgeführt und ist in ihren Arbeiten dokumentiert.

3.2.2.1 Proteinsequenzinformationen

Die N-terminale Sequenz des Cytochroms wurde bestimmt (Seeliger 1998). Das gereinigte Cytochrom wurde am MPI für Biochemie in Martinsried vollständig sequenziert, die Ergebnisse wurden freundlicherweise von O. Einsle (MPI Martinsried) zur Verfügung gestellt. Es zeigte

Die so bestimmte Gensequenz des Cytochrom 1 lautet:

1-TTGCGGACGA TATCGTACTG AAGGCCAAGA ACGGTGATGT GAAGTTCCCG - 50
51- CCAAGGCCCA CCAGAAGGCT GTTCCCGACT GTAAGAAGTG CCAGAAGGC - 99
100 - CCGGGCAAGA TCGAGGGCTT CGGCAAAGAG ATGGCTCATM AKGGCW - 145
146 - RSRRSKGGTG CCRSTGMMMS ARAACAAATG AAGAASGSGC CGACGAA - 192
194 - GTGCGGCGAA TGCCACAAGA AGATANGCTT - 222

3.2.3 Antikörperproduktion

In der Tierforschungsanlage der Universität Konstanz wurden polyklonale Kaninchen-Antikörper gegen das gereinigte 9,6 kDa Cytochrom hergestellt. Der Antikörpertiter erreichte nach 14 Wochen einen Wert von $3,9 \times 10^6$ /ml. Die Antikörper wurden in ersten Tests auf ihre selektive Reaktivität gegen das Cytochrom geprüft. Im Western-Blot wurden keine Kreuzreaktionen mit *Wolinella succinogenes* Proteinen, Pferdeherz-Cytochrom oder den Proteinen des Markerstandards beobachtet. Jedoch waren in den verschiedenen *Geobacter sulfurreducens*-Fraktionen mehrere Banden nachzuweisen. Daher war die Antikörperpräparation zwar für *G. sulfurreducens*, jedoch nicht für das gesuchte Cytochrom spezifisch (Abb. 3-4). Diese Kreuzreaktivität könnte jedoch auch auf die Verwendung eines generellen Western-Blot Protokolls zurückzuführen sein. Von Versuchen zur weiteren Optimierung der Testbedingungen wurde abgesehen, weil die Funktion des Cytochroms als Elektronenüberträger durch andere Experimente in Frage gestellt war.

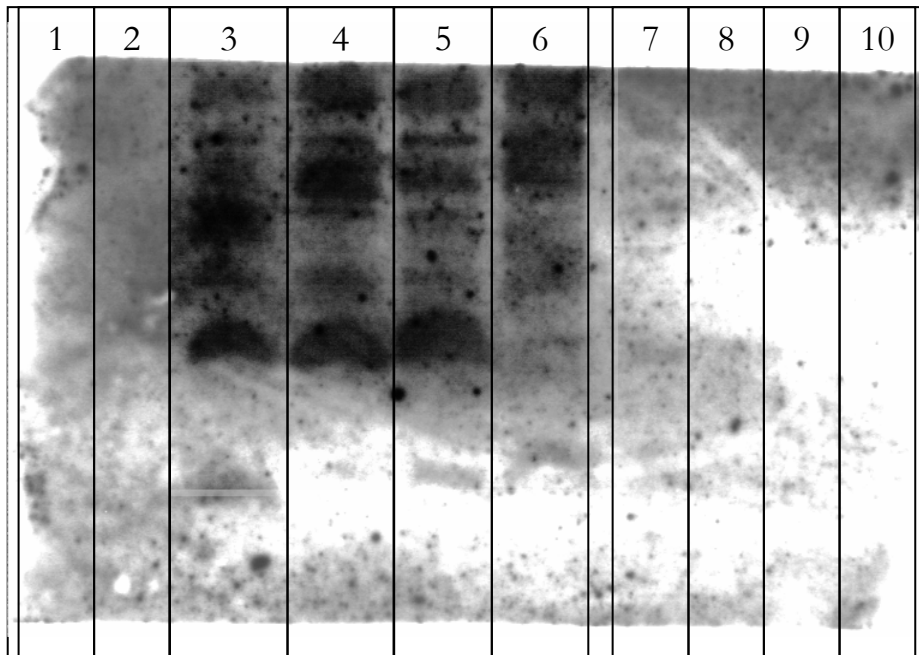


Abbildung 3-4: Western-Blot zur Untersuchung der Spezifität der, gegen das gereinigte Cytochrom hergestellten, Antikörper; aufgetragen wurden: 1: Pferdeherzcytochrom; 2: *W. succinogenes* Rohextrakt; 3: *G. sulfurreducens* lösliche Fraktion; 4: *G. sulfurreducens* Membranfraktion; 5: Kokultur Rohextrakt; 6: *G. sulfurreducens* Kulturüberstand; 7: *W. succinogenes* Kulturüberstand; 8: *G. bremensis* Kulturüberstand; 9: *G. pelophilus* Kulturüberstand; 10: Molekulargewichtsmarker

3.3 Lokalisation von Cytochromen in verschiedenen Zellkompartimenten von *Geobacter sulfurreducens*

Die Konzentration von Cytochromen in verschiedenen Kompartimenten einer wachsenden *Geobacter sulfurreducens* Kultur wurde bestimmt (Tabelle 3-2). Es zeigte sich, dass die Konzentration im Kulturüberstand deutlich geringer war als in früher beschriebenen Ergebnissen (Seeliger et al. 1998). Ebenfalls aufgeführt ist die Cytochrom-Konzentration im Überstand der Suspension nach dem ersten Waschschrift in Kaliumphosphatpuffer während der Zellernte (Waschüberstand). Diese kann als Maß für eine präparationsbedingte Cytochromabgabe angesehen werden.

Tabelle 3-2: Verteilung der Cytochrome in den verschiedenen Fraktionen von *G. sulfurreducens*. Parallel sind der Proteingehalt sowie die Malatdehydrogenaseaktivität als Maß für den Anteil cytoplasmatischer Proteinen in anderen Fraktionen aufgeführt.

Kompartiment	Malatdehydrogenase- aktivität [$\mu\text{mol/ml}\cdot\text{min}$]	Cytochromgehalt [μM]	Proteingehalt [mg/ml]
Kulturüberstand	nicht nachweisbar	0,019	0
Waschüberstand	0,06	0,208	0
Periplasma	0,14	10,6	0,355
Membranfraktion	0,78	7,8	0,1
Cytoplasma	2,6	1,98	0,544

3.4 Experimente zur Cytochromausschüttung ins Medium

3.4.1 Konzentration des Kulturüberstandes

Da die Proteinkonzentration in den Kulturüberständen zu gering für weitere Untersuchungen war, wurde nach einer Methode zur Konzentration von Cytochromen aus dem Kulturüberstand gesucht.

Mit einer Tangentialfiltrationseinheit (Ultrafiltration mit 4kDa Ausschlussgröße) war es möglich, größere Mengen von Überstandsproteinen von *Geobacter sulfurreducens* zu konzentrieren. Dabei wurde ein Konzentrieren um einen Faktor 1000 erreicht, so dass der Überstand in einer SDS-PAGE Analyse untersucht werden konnte. Probleme bereitete dabei das teilweise Anhaften der Proteine an der Filtrationsmembran, das auch schon von (Seeliger et al. 1998) beschrieben wurde.

Eine selektive Konzentration von Überstandsproteinen konnte auch durch Hydroxylapatit-Chromatographie erreicht werden, jedoch mit erheblich größerem Zeitaufwand. Es war auch hier eine nachfolgende Ultrafiltration (4 kDa Ausschlußgröße) zur weiteren Volumenreduktion notwendig (Tab. 3-3). Ein großer Nachteil gegenüber der Tangentialfiltration lag in der Selektivität der Bindung von bestimmten Proteinen an das Hydroxylapatit. Infolgedessen enthielt das Konzentrat nicht alle der im Überstand enthaltenen Proteine.

Tabelle 3-3: Konzentration eines *G. sulfurreducens* Kulturüberstandes über eine Kombination aus Hydroxylapatit-Chromatographie und Ultrafiltration, das Cytochrom wurde in diesem Fall um einen Faktor 825 konzentriert.

	Cytochromgehalt [μM]	Volumen [ml]	Ausbeute [%]
Kulturüberstand	0.182	400	100
Hydroxylapatit	1.5	5	10
Ultrafiltration 4 kDa	150	0.1	20

3.4.2 Untersuchung der im Kulturüberstand gefundenen Cytochrome

Die konzentrierten Kulturüberstände wurden über SDS-PAGE analysiert und miteinander verglichen. Sollte das kleine Cytochrom als Elektronencarrier benutzt werden, konnte eine gerichtete Ausscheidung angenommen werden. Daher wurde erwartet, dass das 10 kDa Cytochrom in relativ hoher Konzentration im Überstand zu finden wäre, andere Proteine dagegen, wenn überhaupt, nur in geringer Konzentration. Es zeigte sich aber, dass zwar das gesuchte Cytochrom im Überstand vorhanden war, es fanden sich jedoch auch noch weitere, höhermolekulare Cytochrome (40 kDa, in einigen Präparationen auch bei 20 und 80 kDa) und eine Anzahl anderer Proteine (Abb. 3-5 und 3-6). Eines von diesen Proteinen (Größe ca. 15 - 16 kDa) war in wesentlich höherer Konzentration vorhanden (Abb. 3-5). Trotz der relativ hohen Konzentration dieses Proteins zeigte sich im weiteren Verlauf der Experimente, dass es als Elektronenüberträger wahrscheinlich nicht in Frage kommt.

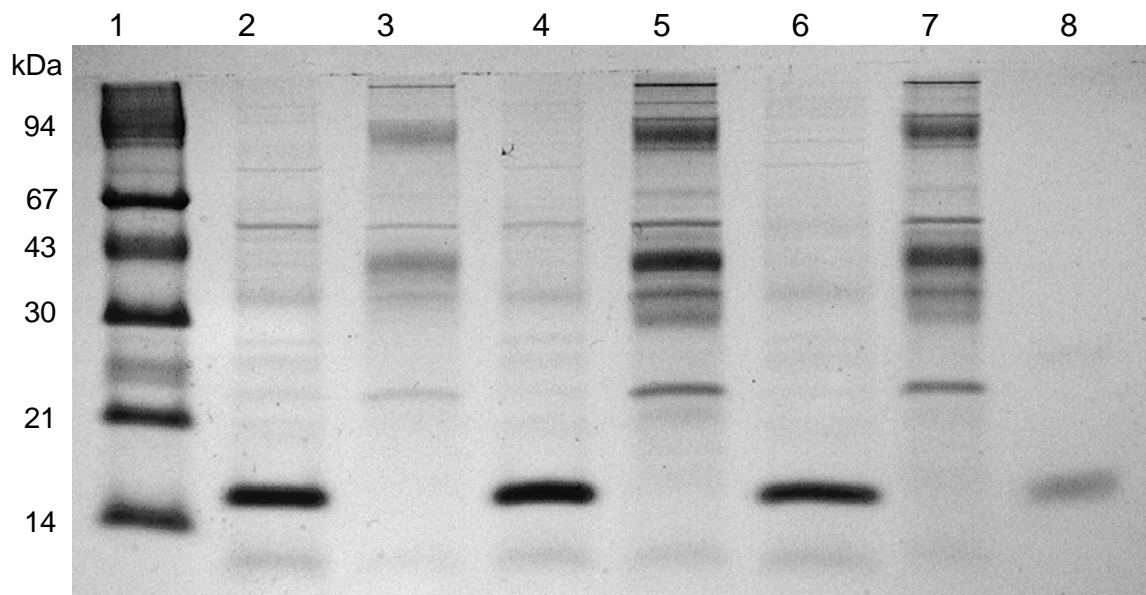


Abbildung 3-5: SDS-PAGE verschiedener Periplasmafraktionen von *G. sulfurreducens*-Reinkulturen verglichen mit dem jeweiligen Überstandskonzentrat (Gel nach Schagger und Jagow, kolloidale Coomassie Färbung) Spur 1 Molekulargewichtsmarker Spur 2, 4, 6 über Tangentialfiltration (cut-off 4 kDa) konzentrierte Kulturüberstände; Spur 3, 5, 7 die jeweils zugehörigen Periplasmafraktionen; Spur 8 Pferdeherz-Cytochrom *c* (M_r 13 kDa).

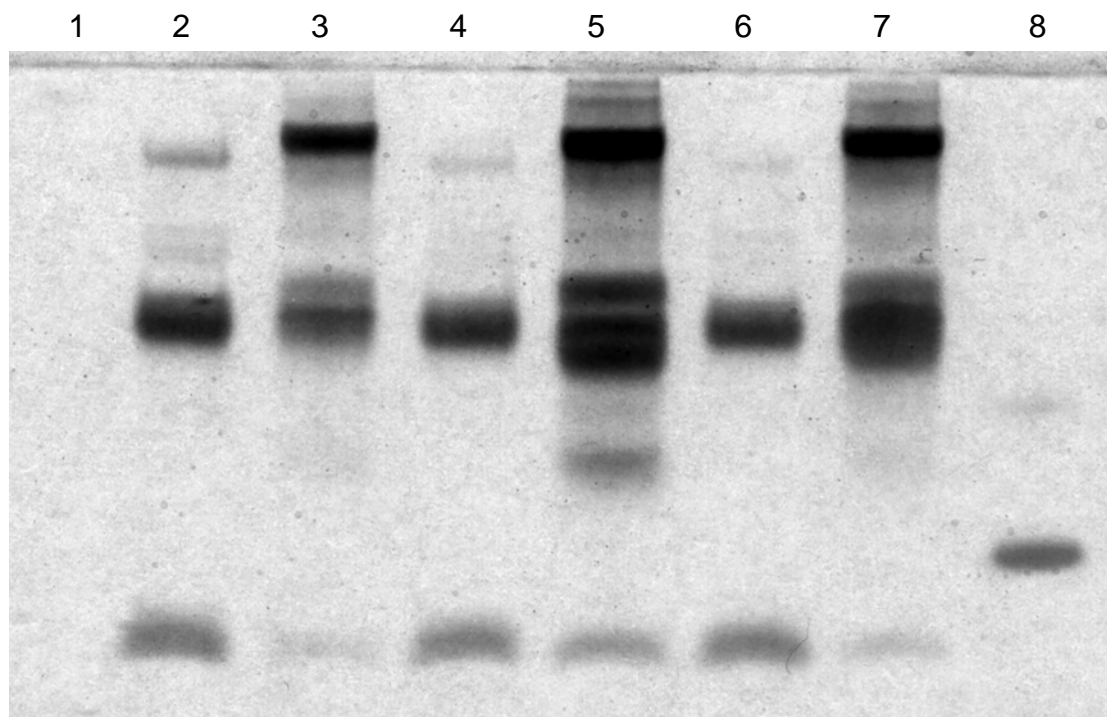


Abbildung 3-6: Parallel durchgeführte SDS-PAGE mit gleicher Auftragung wie in Abbildung 6, jedoch mit Hämgruppen-spezifischer Färbung (Cytochromfärbung); Spur 1 Molekulargewichtsmarker; Spur 2, 4, 6 konzentrierte Kulturüberstände; Spur 3, 5, 7 die jeweils zugehörigen Periplasmafraktionen; Spur 8 Pferdeherz Cytochrom *c* (M_r 13 kDa). Im Überstand sind deutlich mindestens 2 Cytochrombanden (10 und 40 kDa) zu erkennen, zum Teil sind auch noch schwache Signale im Bereich von 80-90 kDa zu erkennen.

Die N-terminale Sequenz des 10 kDa Cytochroms aus konzentriertem Kulturüberstand (aus *G. sulfurreducens* Reinkultur) stimmte mit der des periplasmatischen 9,6 kDa Cytochroms bis auf eine Aminosäure überein, wobei 3 Aminosäuren des Überstands-Cytochroms nicht sicher bestimmt werden konnten (Tabelle 3-4). Die anderen Cytochrome im Überstand ließen sich nicht ansequenzieren.

Tabelle 3-4: Vergleich der N-Terminale Sequenz des 10 kDa-Cytochroms aus dem konzentrierten Kulturüberstand von *G. sulfurreducens* mit dem N-Terminus des 9,6 kDa Cytochroms aus dem Periplasma des gleichen Bakteriums

a) Kulturüberstands-Cytochrom:

Ala-Asp-Asp-Ile(Ser)-Val(Gly)-Leu-Lys(Val)-Ala-Val-Asn-Asn-Asp;

b) periplasmatisches Cytochrom (Seeliger Dissertation, 1998):

Ala-Asp-Asp(Cys)-Ile-Val-Leu-Lys-Ala-Lys-Asn

3.4.3 Physiologie

In Wachstumsexperimenten wurde untersucht, wieviel Cytochrom unter welchen Bedingungen abgegeben wird. Dazu wurde die Cytochromkonzentration im Kulturüberstand während des Wachstums sowohl in der Rein- als auch in der Kokultur bestimmt. Wie bereits ausgeführt, können Cytochrome in beträchtlichen Konzentrationen auch durch den Präparationsvorgang freigesetzt werden (Straub und Schink 2003). Bei besonders schonender Zentrifugation der Überstandsproben wurden in Wachstumsexperimenten sowohl in Rein- als auch in Kokulturen erst gegen Ende der Wachstumsphase Cytochromkonzentrationen von ca. 20-30 nM messbar (Abbildung 3-7). Die Cytochrom-Konzentration im Überstand der Kokultur war gegenüber der Reinkultur nicht erhöht. Proteine konnten im nicht konzentrierten Kulturüberstand während des gesamten Wachstums mit der Bradford-Bestimmungsmethode nicht nachgewiesen werden.

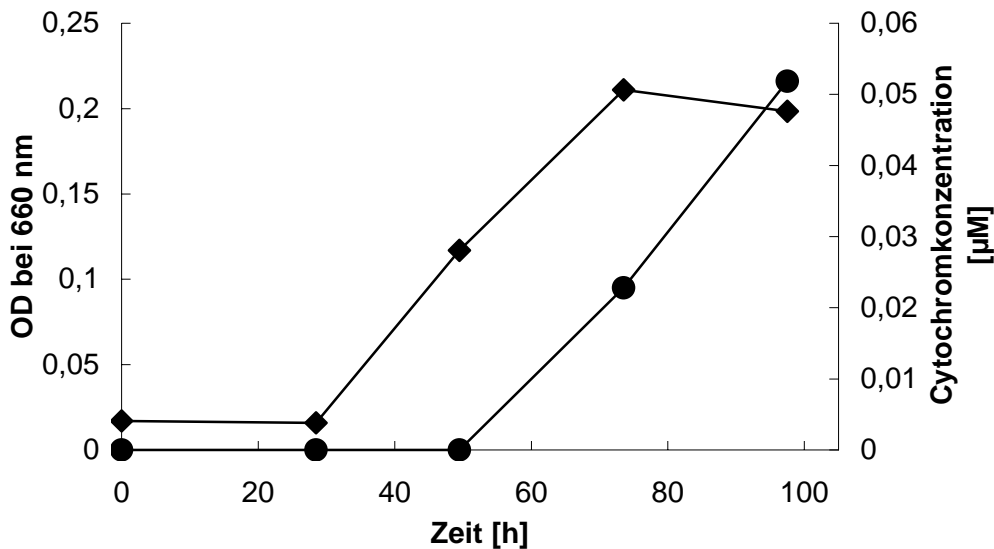


Abbildung 3-7: Vergleich des Wachstums einer *G. sulfurreducens* / *W. succinogenes* Kokultur (optische Dichte bei 660 nm) (◆) mit dem Cytochromgehalt im Kulturüberstand (●). Die Kultur wuchs mit 20mM Acetat plus 10mM Nitrat in Cystein-reduziertem Bicarbonat-gepuffertem Medium, der Ansatz war mit 2% Inokulum beimpft.

Um zu überprüfen, ob ein kleines Protein, wie das während des Wachstums ins Medium abgegebene Cytochrom, Elektronen zwischen den beiden Partnern transportieren kann (Seeliger et al. 1998), wurde das Wachstum einer Kokultur unter normalen Bedingungen mit dem Wachstum unter Zugabe von Cytochrom (Kulturüberstand Konzentrat 4 kDa, wie vorangehend beschrieben) untersucht. Wie in Abbildung 3-8 gezeigt, wurde keine Wachstumsstimulation beobachtet.

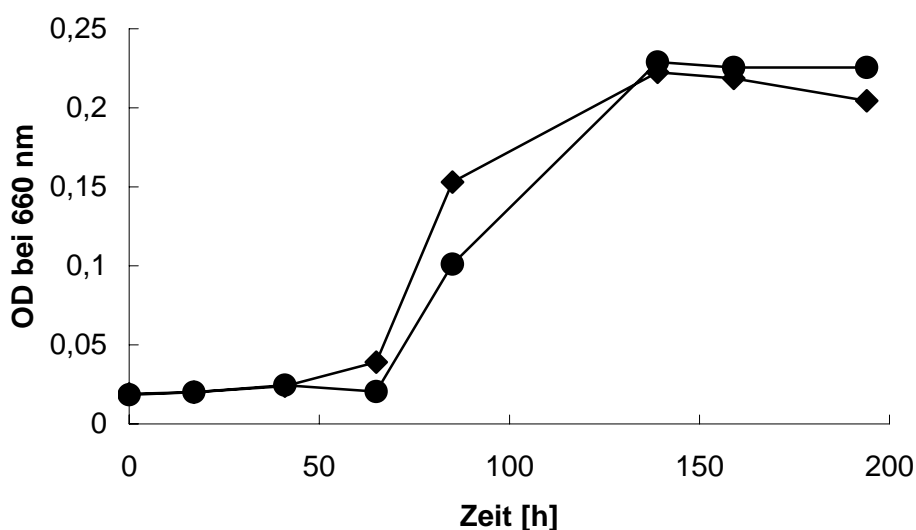


Abbildung 3-8: Vergleich des Wachstums mit (●) und ohne (◆) Zusatz von konzentriertem Kulturüberstand (0,1 µM Cytochrom im Ansatz). Die Kultur wuchs mit 20 mM Acetat plus 10 mM Nitrat in Cystein-reduziertem, Bicarbonat-gepuffertem Medium, der Ansatz war mit 2% Inokulum beimpft.

Um den Einfluss des Cytochroms (ebenfalls Kulturüberstandkonzentrat) auf die Acetatoxidation zu prüfen, wurde das Kulturüberstandkonzentrat im Zellsuspensionsversuch mit gewaschenen Kokultursuspensionen in einer Endkonzentration von 100 nM Cytochrom zugesetzt (Abb. 3-9). Diese zugesetzte Konzentration entsprach der, die auch in den Überständen wachsender Kulturen gefunden wurde. Acetat wurde mit einer Rate von 66 $\mu\text{M}/\text{min}$ sowohl mit als auch ohne Cytochromzugabe oxidiert. Eine Stimulation durch zugesetztes Cytochrom wurde nicht beobachtet. Auch AQDS in ähnlicher Konzentration bewirkte keinen gesteigerten Acetatumsatz. Das war interessant, da AQDS als Elektronencarrier bei der Reduktion von Fe(III) beschrieben ist.

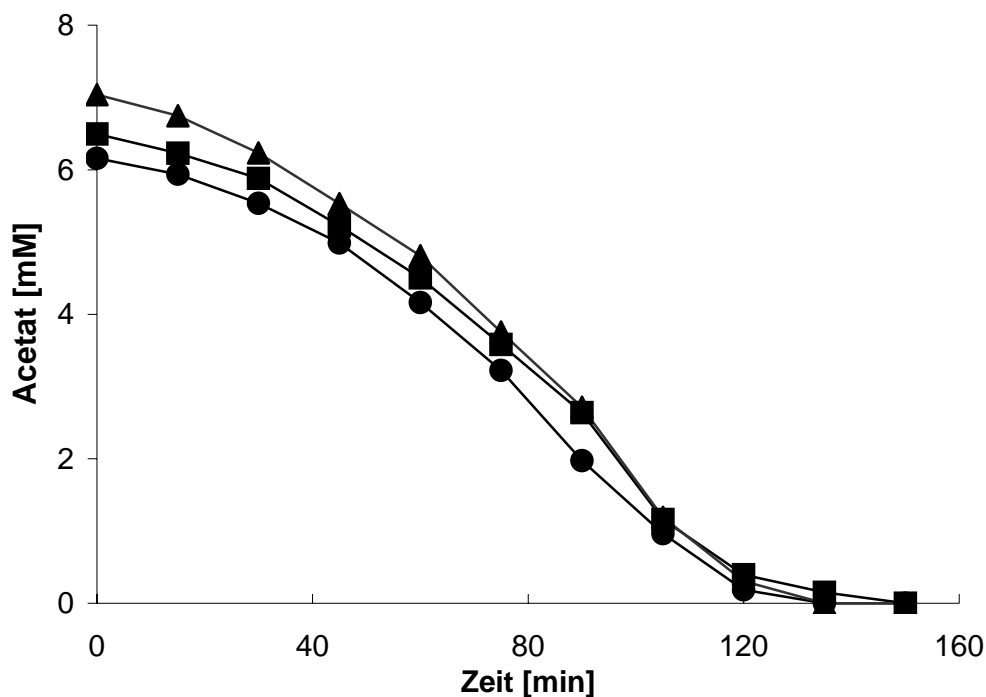


Abbildung 3-9: Vergleich der Acetatoxidation in dichten Suspensionen ($\text{OD}_{660} = 1,5$) der *G. sulfurreducens* / *W. succinogenes*-Kokultur in Gegenwart von (●) 0,2 μM AQDS; (▲) 0,1 μM Cytochrom; (■) Kontrolle-Ansatz ohne Zusatz. Alle Ansätze enthielten 10 mM Acetat als Elektronendonator und 10 mM Nitrat als Elektronenakzeptor in Cystein-reduziertem Bicarbonat-gepuffertem Medium.

Im entsprechenden Kontrollexperiment mit Ferrihydrit als Elektronenakzeptor war ebenfalls weder mit Cytochrom noch mit AQDS (in äquivalenter Konzentration) eine Steigerung der Eisenreduktionsrate zu beobachten (Abb. 3-10); in Experimenten mit AQDS bei höher Konzentration (K. Straub, Konstanz, pers. Mitteilung.) wurde eine solche AQDS-bedingte Steigerung der Eisenreduktionsrate jedoch beobachtet.

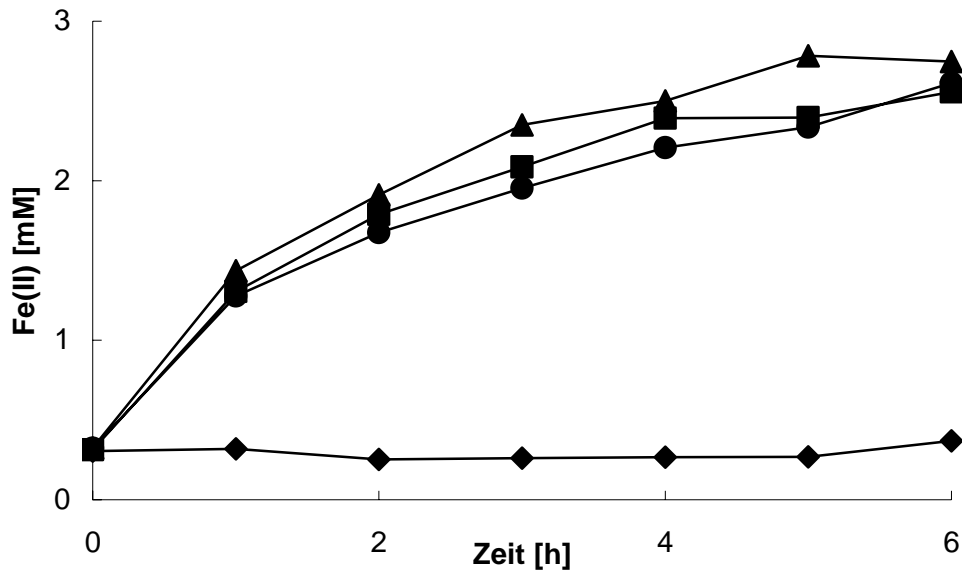


Abbildung 3-10: Reduktion von Eisen in dichten Suspensionen ($OD_{660} = 1,5$) von *G. sulfurreducens* in Gegenwart von (●) 0,1 μM AQDS und (▲) 0,1 μM Cytochrom bzw. (■) in Abwesenheit von AQDS und Cytochrom; (◆) pasteurisierte Kontrolle. Alle Ansätze enthielten 10 mM Acetat als Elektronendonator und 10 mM Ferrihydrit als Elektronenakzeptor in Bicarbonat-gepuffertem Medium.

Eine elektronenübertragende Funktion von AQDS in der Kokultur wurde in späteren Experimenten endgültig ausgeschlossen (siehe Kap. 1.5.3.6).

3.5 Untersuchungen zur Identifizierung des möglichen Elektronenüberträgers

3.5.1 Chinone als alternative Elektronenüberträger

3.5.1.1 Chinone in *Geobacter sulfurreducens*, *Wolinella succinogenes* und der Kokultur

Chinone sind neben Cytochromen häufig wichtige Elektronenüberträger in bakteriellen Redoxsystemen. Es wird vermutet (Galushko und Schink 2000), dass in *Geobacter sulfurreducens* Menachinone Elektronen von reduzierten Pyridin-Nucleotiden ($\text{NADH} + \text{H}^+$ oder $\text{NADPH} + \text{H}^+$) übernehmen und auf andere Enzyme in der Elektronentransportkette (z.B. Cytochrome) übertragen. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde die NADH bzw. NADPH-abhängige Menachinonreduktion in verschiedenen Fraktionen von *G. sulfurreducens* untersucht. Als Elektronenakzeptor wurde das wasserlösliche Menadion (Vitamin K_3 , 2-Methyl-1,4-naphtochinon) eingesetzt. Im Rohextrakt von *G. sulfurreducens* konnte eine NADPH abhängige Menadionreduktion mit einer Rate von $0,9 \mu\text{mol} \times (\text{mg Protein})^{-1} \times \text{min}^{-1}$ beobachtet werden, die Rate der NADH abhängigen Reduktion war fünfmal geringer. Es zeigte sich auch, dass die

Menadionreduktion mit NADPH in der Membranfraktion ($0,99 \mu\text{mol} \times (\text{mg Protein})^{-1} \times \text{min}^{-1}$) höher war als in der löslichen Fraktion ($0,77 \mu\text{mol} \times (\text{mg Protein})^{-1} \times \text{min}^{-1}$). Demgegenüber war die NADH abhängige Reaktion in beiden Fraktionen gleich ($0,16$ zu $0,18 \mu\text{mol} \times (\text{mg Protein})^{-1} \times \text{min}^{-1}$) (Tabelle 3-5).

Tabelle 3-5: Vergleich der Raten der NADH- und der NADPH abhängigen Reduktion von Menadion (Vitamine K3) / 2-Methyl-1,4-naphthochinon in verschiedenen Fraktionen von *G. sulfurreducens*; alle Werte in $\mu\text{mol} \times (\text{mg Protein})^{-1} \times \text{min}^{-1}$. Der Test wurde in Tricine/KOH Puffer $0,1 \text{ M}$ pH $8,0$, mit $0,2 \text{ mM}$ NAD(P)H und $0,2 \text{ mM}$ Menadion durchgeführt.

NADPH \rightarrow K3		NADH \rightarrow K3	
Rohextrakt	$0,93 \pm 0,4$	Rohextrakt	$0,18 \pm 0,11$
Membran Fraction	$0,99 \pm 0,2$	Membran Fraction	$0,16 \pm 0,13$
Lösliche Fraktion	$0,77 \pm 0,2$	Lösliche Fraktion	$0,186 \pm 0,08$

Es gab Hinweise darauf, dass in der Kokultur ein anderes Chinonmuster ausgeprägt wurde als in den Reinkulturen (A. Galushko, pers. Mitteilung). Da ein solcher Befund auch im Hinblick auf einen eventuellen externen Elektronenakzeptor interessant wäre, wurde die Ausstattung der Rein- und der Kokulturen mit Chinonen untersucht. Dazu wurde von der Kokultur und von den beiden Reinkulturen Zellmaterial präpariert und jeweils 50 mg Trockenmasse extrahiert. Diese Extrakte wurden mit Massenspektroskopie auf ihren Gehalt an chinoiden Substanzen hin analysiert. *G. sulfurreducens*-Reinkulturen enthielten hauptsächlich MK-8 (m/z 718) und geringe Mengen an MK-9 (m/z 786); *Wolinella succinogenes*-Reinkulturen waren durch MK-6 (m/z 581) charakterisiert und enthielten auch MK-4 in geringer Menge. Die MK-6 Menge, welche aus 50 mg lyophilisiertem Zellmaterial von *W. succinogenes* extrahiert wurde, war geringer als die Menge an MK-8 aus der gleichen Menge *G. sulfurreducens*, jedoch in derselben Größenordnung. Die Kokultur *G. sulfurreducens* / *W. succinogenes* war vom MK-8 von *G. sulfurreducens* dominiert. Eine signifikante Veränderung des Chinonmusters der Kokultur im Vergleich zu den Reinkulturen konnte nicht beobachtet werden.

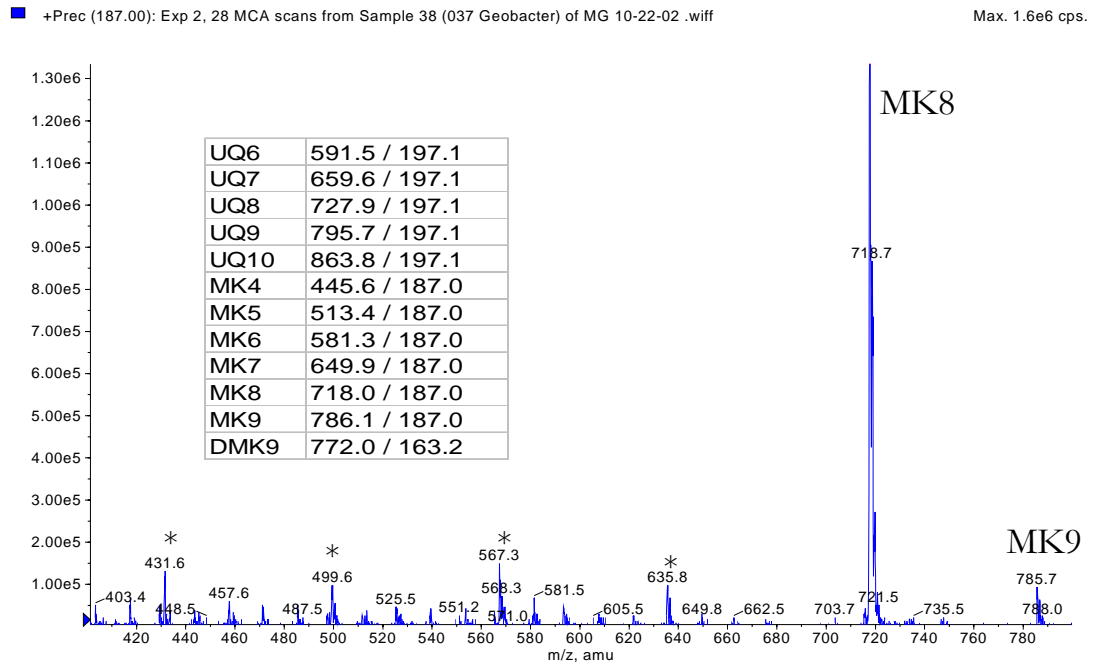


Abbildung 3-11: Massenspektrogramm des Chinonextraktes einer *Geobacter sulfurreducens* Reinkultur. Die x-Achse zeigt die Massenzahlen von m/z 400 – 800; es dominieren Menachinon 8 und 9 (MK 8 und MK 9); * diese Massen können keiner Masse der Menachinon Standard Serie zugeordnet werden, Modifikationen in den Isoprenoid Seitenketten sind für andere Organismen beschrieben (Collins und Jones 1981)

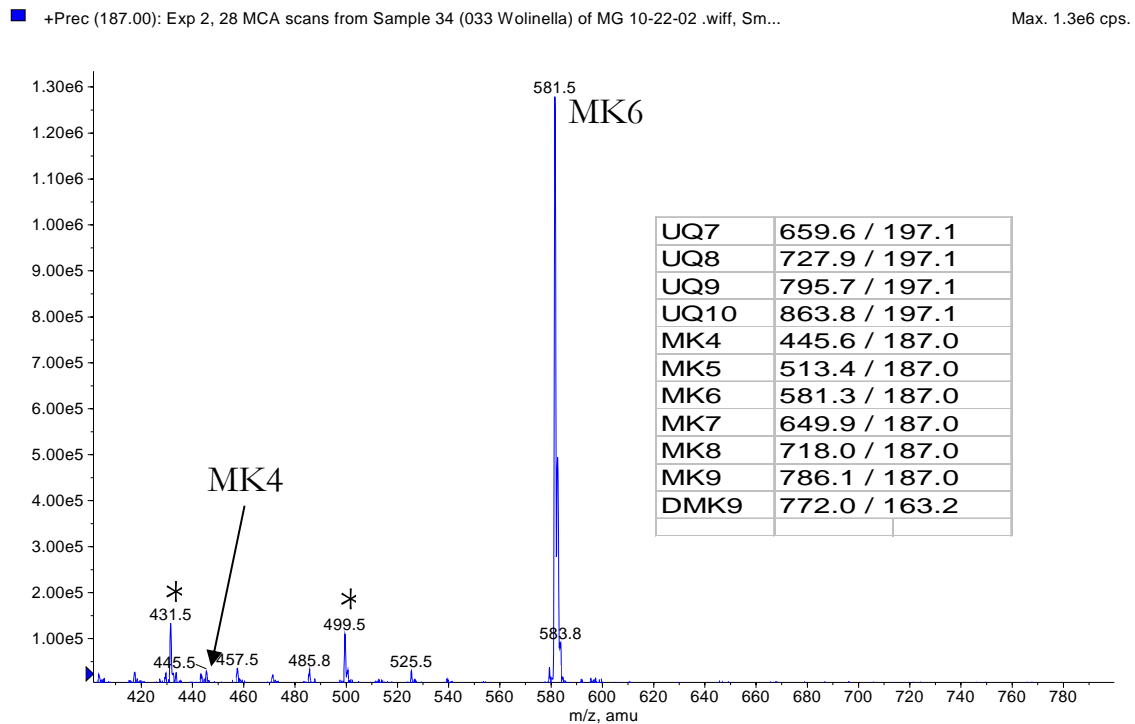


Abbildung 3-12: Massenspektrogramm des Chinonextraktes einer *Wolinella succinogenes* Reinkultur. Die x-Achse zeigt die Massenzahlen von m/z 400 – 800; es dominieren Menachinon 4 und 6 (MK 4 und MK 6); * diese Massen können keiner Masse der Menachinon Standard Serie zugeordnet werden

+Prec (187.00): Exp 2, 28 MCA scans from Sample 36 (035 Geo/Wolinella) of MG 10-22-02 .wif...

Max. 9.6e5 cps.

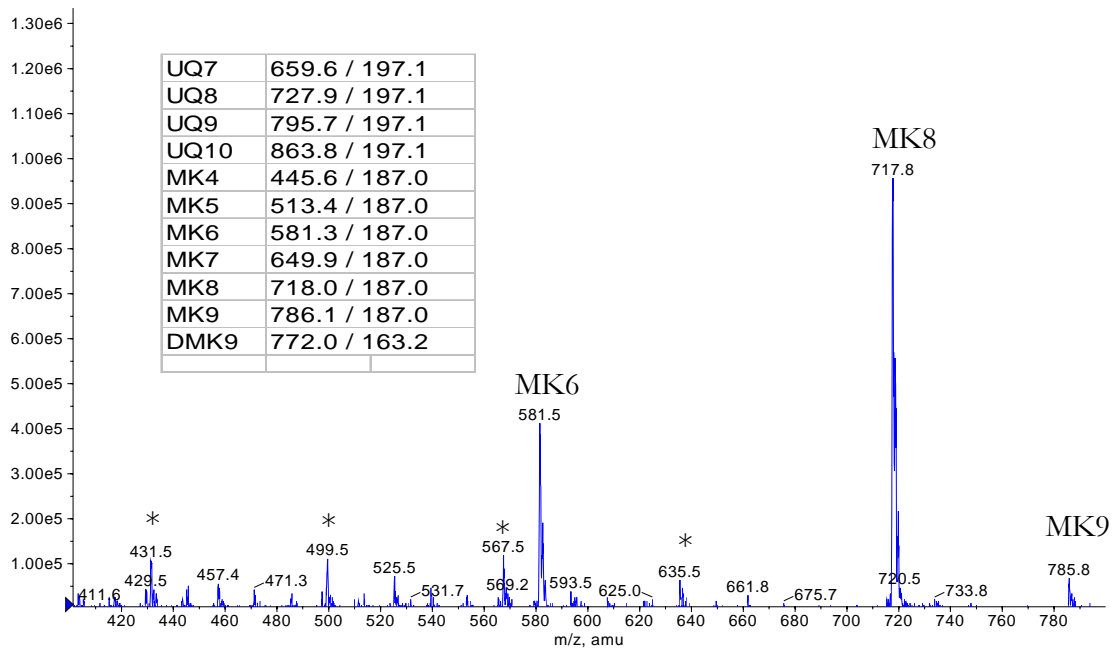


Abbildung 3-13: Massenspektrogramm des Chinonextraktes einer *Geobacter sulfurreducens* / *Wolinella succinogenes* Kokultur. Die x-Achse zeigt die Massenzahlen von m/z 400 – 800; es dominieren Menachinon 6, 8 und 9 (MK 6; MK 8 und MK 9); * diese Massen können keiner Masse der Menachinon Standard Serie zugeordnet werden

3.5.1.2 Chinone als mögliche extrazelluläre Elektronencarrier

Da offensichtlich in beiden Partnern der Kokultur Chinone wichtige Elektronenüberträger im Stoffwechsel darstellten, lag die Hypothese nahe, dass diese Substanzen eventuell auch als externe Carrier fungieren könnten. Daher wurde nach solchen Substanzen im Kulturüberstand von *Geobacter sulfurreducens* / *Wolinella succinogenes* Kokulturen gesucht. Kulturüberstand der Kokultur wurde organisch (Hexan:Methanol/1:1) extrahiert um damit evtl. vorhandene, chinoiden Substanzen zu konzentrieren. Der so gewonnene Extrakt zeigte ein ungewöhnliches UV-Spektrum, dieses hatte jedoch keine Ähnlichkeit mit dem als Referenz eingesetzten Vitamin K2 (Abb. 3-14).

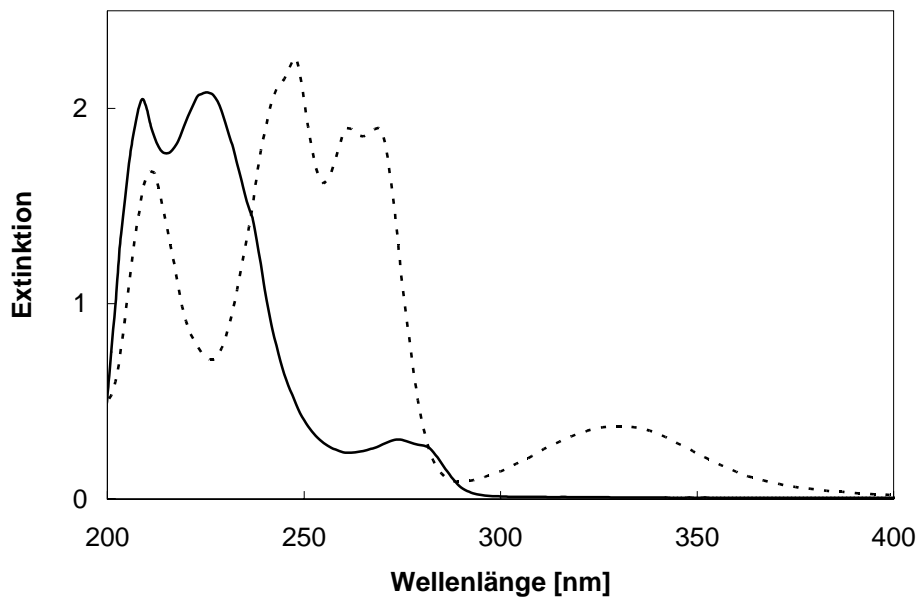


Abbildung 3-14: UV-Absorptions-Spektrum des organisch extrahierten Kulturüberstandes einer *G. sulfurreducens* / *W. succinogenes* Kokultur (—) im Vergleich zu Vitamin K2 (- - -); Aufnahme der Spektren in ethanolischer Lösung

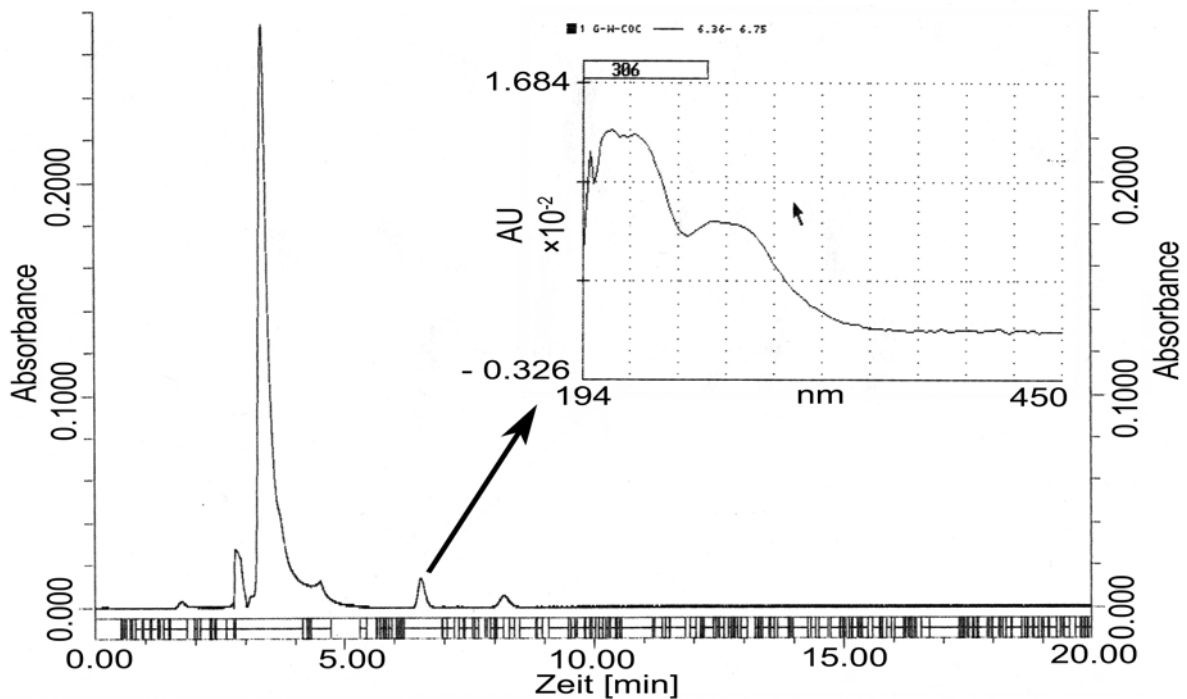


Abbildung 3-15: Chromatogramm der HPLC-Auftrennung eines Überstandsextraktes der Kokultur, die x-Achse stellt den Zeitverlauf in Minuten (0 – 20 min) dar, die y-Achse die Absorption bei 280 nm (0 – 0,3); eingebettet ist das UV-Spektrum von 195 – 400 nm der auch in den Zellen gefundenen ungewöhnlichen Substanz.

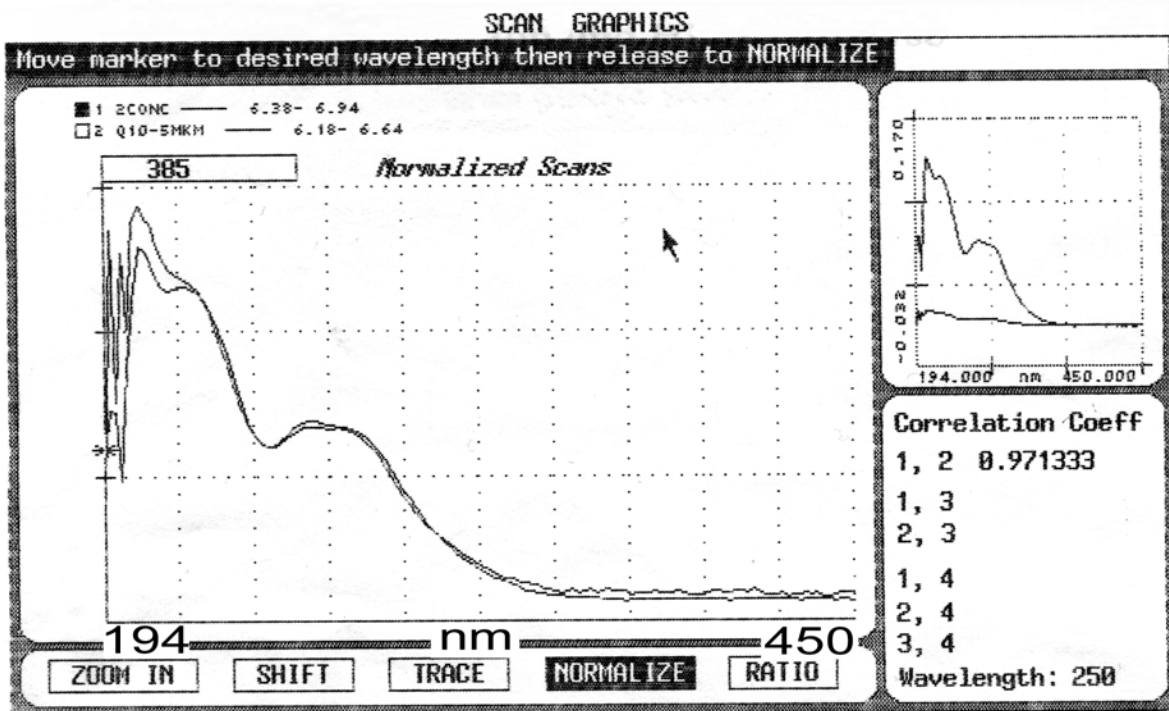


Abbildung 3-16: Vergleich der UV-Spektren (194 – 420 nm) der unbekanntes Substanz aus dem Kulturüberstand und aus Zellen von *G. sulfurreducens*, die Spektren wurden gegeneinander normalisiert, ein Korrelationsfaktor von 0,97 weist auf eine große Ähnlichkeit hin.

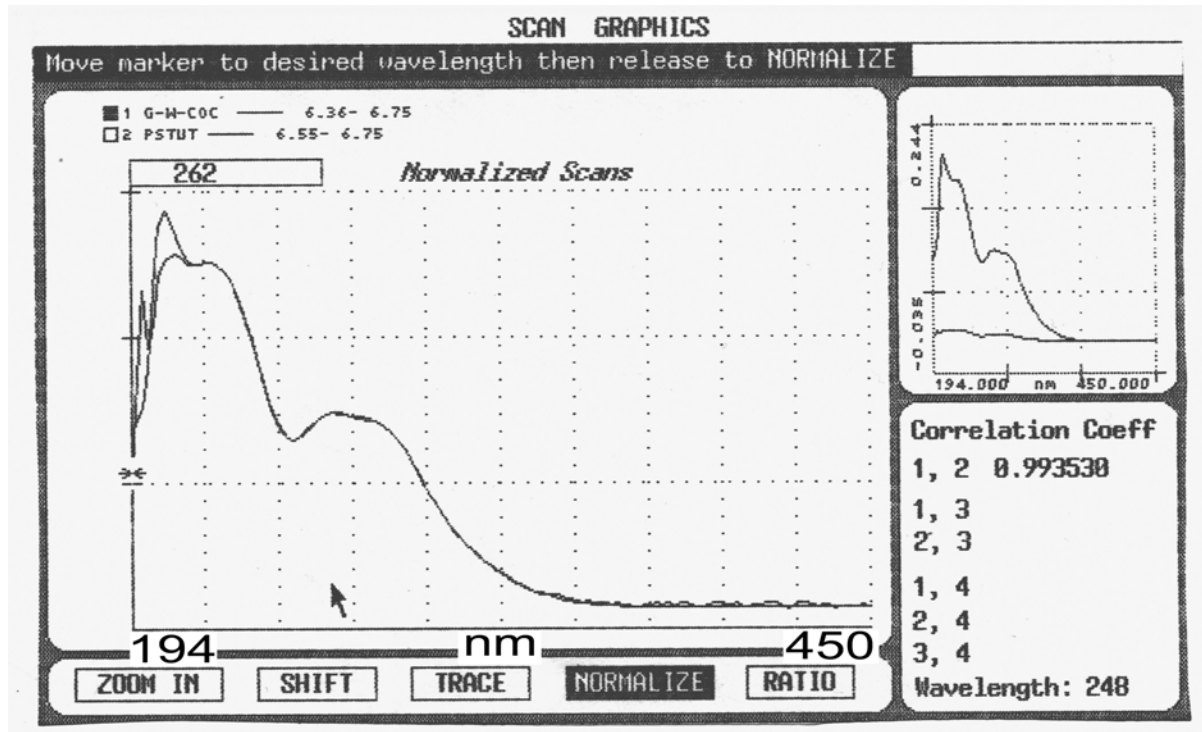


Abbildung 3-17 Vergleich der UV-Spektren (194 – 420 nm) der unbekanntes Substanz aus dem Kulturüberstand einer *G. sulfurreducens* / *W. succinogenes* Kokultur und aus Kulturüberstand von *P. stutzeri*, die Spektren wurden gegeneinander normalisiert, ein Korrelationsfaktor von 0,99 weist auf eine sehr große Ähnlichkeit hin.

Organisch extrahierte Überstandsfraktionen von Ko- und Reinkultur wurden über HPLC aufgetrennt. UV-Spektren wurden mit einem Photodiodenarraydetektor aufgezeichnet. Es wurde ein Substanz isoliert, deren UV-Spektrum stark dem Spektrum einer Substanz ähnelte, die in Chinonextraktionen aus Zellen (A. Galuschko, pers. Mitteilung) zu finden war (Abb. 3-15 und 3-16). Das UV-Absorptionsspektrum entsprach keinem der Spektren von Chinonen (Menachinon, 1,4-Dihydroxy-2-naphthoesäure), die als Standardsubstanzen eingesetzt wurden (nicht gezeigt).

Es fand sich jedoch im Extrakt aus *Pseudomonas stutzeri* Kulturüberstand eine Substanz mit einem sehr ähnlichen Absorptionsspektrum (Abb. 3-17). Da die *P. stutzeri*-Kultur keinen extrazellulären Elektronentransport benötigt, macht dieser Befund eine spezifische Relevanz der gefundenen Substanz für den Elektronentransport unwahrscheinlich. Aufgrund der Uneindeutigkeit dieser Befunde wurde von weiterführenden Experimenten zur Funktion von Chinonen als Elektronencarrier im Kulturüberstand abgesehen, obwohl eine redoxaktive chinoide Substanz nicht vollständig auszuschließen war. Erfolgversprechender schien die Suche nach im Medium vorhandenen potenziellen Elektronenüberträgersubstanzen, die von außen ins Medium zugegeben waren.

3.5.2 Physiologische Untersuchungen

Um zu prüfen, ob eine im Medium vorhandene Substanz als Elektronenüberträger fungiert, wurden Wachstumsversuche unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt. Als methodisch unabdingbar erwies sich dabei, dass die Vorkultur vor dem Animpfen mit frischem Medium ohne Zusätze gewaschen wurde, wie in Material und Methoden beschrieben. Experimente mit nicht gewaschenem Impfmateriale waren in allen Fällen positiv.

3.5.2.1 Cystein als Elektronencarrier

Es zeigte sich, dass kein Wachstum erfolgte, wenn das Reduktionsmittel Cystein fehlte (Abb. 3-18.). Die Kokultur wuchs mit 100 μM Cystein gut. Durch größere Zugaben (z.B. 500 μM) konnte das Wachstum nicht weiter gesteigert werden. Mit 10 μM Cystein hingegen wurde das Wachstum nach einiger Zeit eingestellt und es wurde nur eine geringe OD_{660} von 0,1 erreicht.

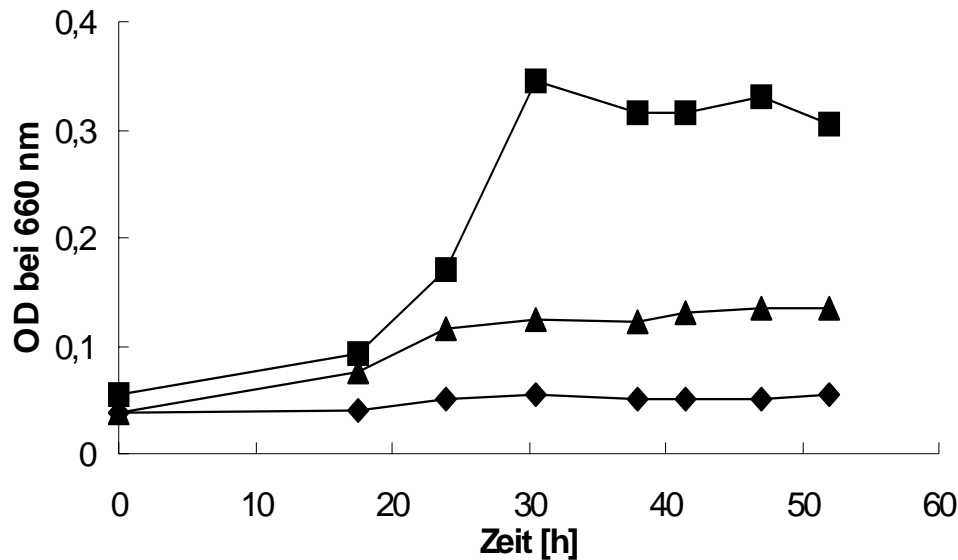


Abbildung 3-18: Vergleich des Wachstums einer Kokultur aus *G. sulfurreducens* und *W. succinogenes* mit Zusatz von 100 µM Cystein (■); 10 µM Cystein (▲) und einer Kontrolle ohne Cystein (◆). Die Ansätze wurden mit 5% gewaschener Vorkultur beimpft. Die Kulturen wuchsen mit 10 mM Acetat plus 10 mM Nitrat in anoxischem, nicht-reduziertem, Bicarbonat-gepuffertem Medium.

3.5.2.2 Alternative Reduktionsmittel

Um auszuschließen, dass die Kultur aufgrund eines ungünstigen Redoxzustandes nicht wachsen konnte, wurde der Einfluss anderer Reduktionsmittel (DTT, Ascorbat) getestet (Abb. 3-19).

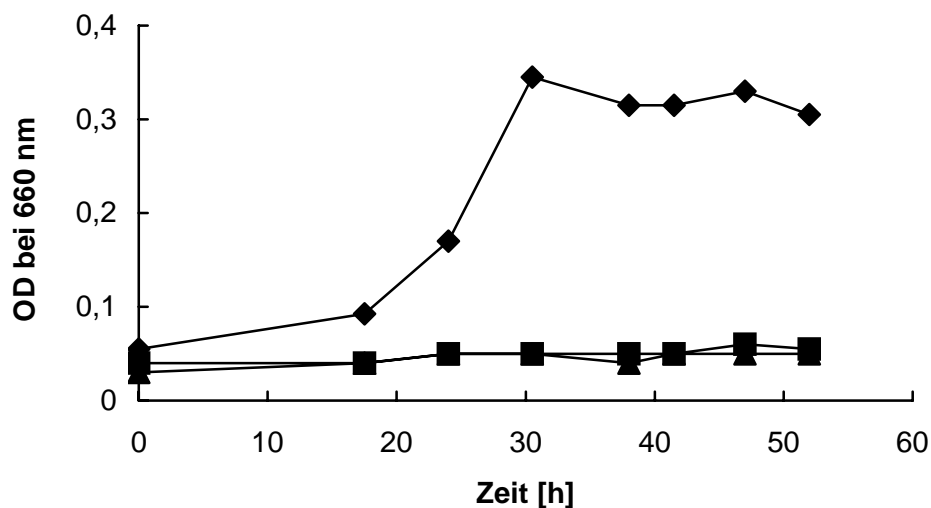


Abbildung 3-19: Wachstum der Kokultur aus *G. sulfurreducens* und *W. succinogenes* mit Zusatz von 100 µM Cystein (◆), 500 µM DTT (▲) oder 500 µM Ascorbat (■). Der Redoxzustand des Mediums wurde durch zugesetztes Resazurin kontrolliert.

Mit beiden alternativen Reduktionsmitteln (jeweils in Konzentrationen von 500 μM eingesetzt) konnte kein Wachstum innerhalb des Testzeitraumes von 50 h beobachtet werden. Das gleiche gilt auch für Eisen-(II)-Chlorid (ohne Abb.; der pH Wert wurde auf 7,0 eingestellt und während des Experiments kontrolliert). Es wurde jedoch zum Teil ein sehr langsames Wachstum nach einer mehrere Tage langen Lag-Phase auch in unreduzierten Kokulturen beobachtet (A. Galushko, pers. Mitteilung). Der Redoxzustand des Mediums wurde parallel durch Resazurinzusatz kontrolliert. Das Medium war während des gesamten Versuchs reduziert. Im Kontrollansatz mit Cystein verfärbte sich das Resazurin am Ende des Wachstums rosa und zeigte damit einen, durch eine Acetatlimitierung bedingten, Anstieg des Redoxpotentials an. Dieses war zwar in der gleichen Konzentration wie Nitrat eingesetzt, jedoch muss ein Anteil für die Assimilation berücksichtigt werden. Es sollte darauf hingewiesen werden, dass beide Reinkulturen auch mit alternativen Reduktionsmitteln wie Ascorbat kultivierbar waren.

Um einen negativen Einfluss des eingesetzten Reduktionsmittels auf das Wachstum zu prüfen, wurde das Wachstum der Kokultur unter Zusatz von 0,1 mM Cystein nochmals mit dem durch 0,5 mM Ascorbat reduziertes Medium verglichen. Zusätzlich wurden in einem weiteren Ansatz beide Substanzen gemeinsam eingesetzt. Das Wachstum war in Anwesenheit von Cystein gleich, ohne Cystein wurde kein Wachstum beobachtet (Abb. 3-20).

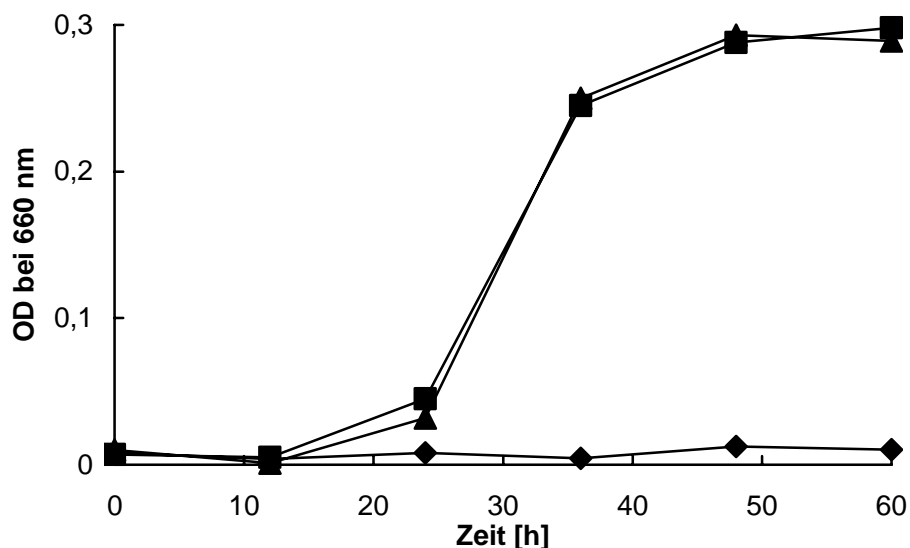


Abbildung 3-20: Vergleich des Wachstum der Kokultur aus *G. sulfurreducens* und *W. succinogenes* mit Zusatz von 100 μM Cystein (▲), 500 μM Ascorbat (◆) oder 100 μM Cystein plus 500 μM Ascorbat (■).

3.5.2.3 Der Einfluss von Cystin, der oxidierten Form des Cysteins

Um als Elektronenüberträger zu dienen, müsste Cystin, die oxidierte Form des Cysteins, durch *G. sulfurreducens* reduziert werden. Deshalb sollte L-Cystin den gleichen Einfluss wie Cystein auf das Wachstum haben. Wie in Abb. 3-21 gezeigt, war das Wachstum mit 100 μM L-Cystin gleich dem Wachstum mit 100 μM Cystein (vergl. Abb. 3-18 und 3-21). Mit 10 μM Cystin wuchs die Kultur bis zur gleichen optischen Dichte wie mit höheren Konzentrationen von Cystein oder Cystin, jedoch verzögert.

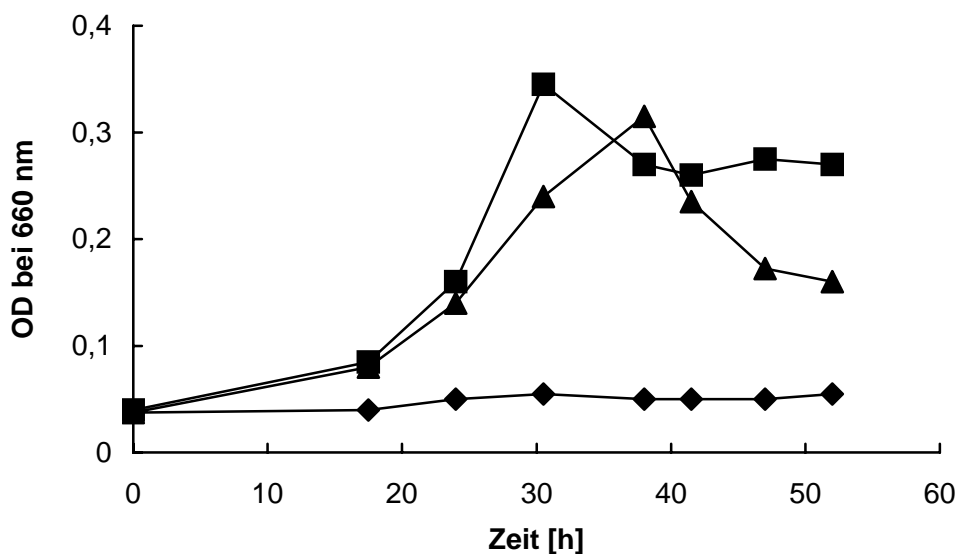


Abbildung 3-21: Einfluss von Cystin auf das Wachstum der Kokultur aus *G. sulfurreducens* und *W. succinogenes*: Zusatz von 100 μM Cystin (■), 10 μM Cystin (▲), Kontrollansatz ohne Cystinzusatz (◆). Der Abfall in der optischen Dichte in der stationären Phase ist auf Aggregation, Sedimentation und Anheftung zurückzuführen

3.5.2.4 Wachstum mit D-Cystein und DL-Homocystein im Vergleich zu L-Cystein

Viele Enzyme bevorzugen bei einem Substrat, das in 2 stereoisomeren Formen vorkommt, die L-Form. Auch Cystein kann sowohl in der L- als auch in der D-Form vorliegen. Es war zu prüfen, ob D- und L-Cystein das Wachstum der Kokultur unterschiedlich stimulieren. In der Tat wuchs die Kokultur nur bei Zusatz von L-Cystein. Mit D-Cystein war auch nach sehr langen Inkubationszeiten kein Wachstum sichtbar. Auch der Zusatz von Homocystein, einer Zwischenstufe der Methioninbiosynthese, die sich von Cystein nur durch eine zusätzliche CH_2 -Gruppe unterscheidet, führte zu keinem erkennbaren Wachstum (Abb. 3-22).

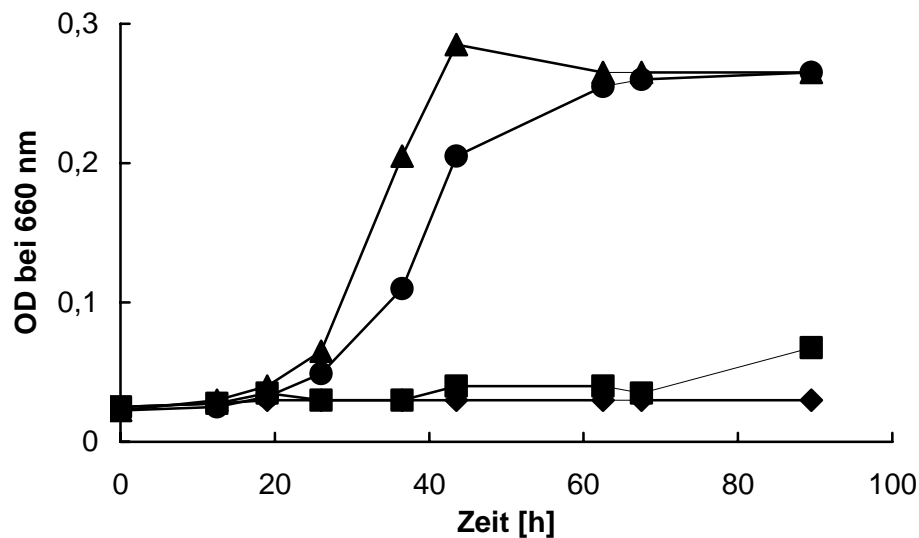


Abbildung 3-22: Vergleich des Wachstums der Kokultur (*G. sulfurreducens* und *W. succinogenes*) unter Einfluss von 100 µM D-Cystein (◆) oder 100 µM DL-Homocystein (■) zum Wachstum unter Zusatz von 100µM L-Cystein (▲) oder 100µM L-Cystin (●).

3.5.2.5 Cysteinoxidation / Cystinreduktion während des syntrophen Wachstums

Eine wichtige Frage war die nach dem Konzentrationsverhältnis von oxidiert zu reduzierter Form des zugegebenen Cysteins bzw. Cystins während des Wachstums. Dazu wurde in wachsenden Kulturen (10 mM Acetat plus 10 mM Nitrat) die Konzentration von freien Thiolgruppen bei unterschiedlich großen Zugaben von Cystin bzw. Cystein (100 - 400 µM Cystein, 50 - 200 µM Cystin) bestimmt. In Abb. 15 sind die Ergebnisse der jeweils korrespondierenden Cystin- / Cystein-Zugaben einander gegenübergestellt. Zugegebenes Cystein wurde mit Raten von $4 \mu\text{M} \times \text{h}^{-1}$ (100 µM Cystein) bis $9.1 \mu\text{M} \times \text{h}^{-1}$ (400 µM Cystein) auf ein bestimmtes, scheinbar von der zugegeben Menge abhängiges Konzentrationsniveau oxidiert. Die Konzentration freier Thiolgruppen bleibt bis zum Ende des Wachstums auf diesem Niveau und fällt beim Übergang zur stationären Phase auf Werte nahe der Detektionsgrenze ($< 10 \mu\text{M}$). Cystin wird während des Wachstums bis auf ein ähnliches Konzentrationsniveau zwischen 25 - 65 µM, proportional zur eingesetzten Cystinmenge, reduziert. Diese Konzentration bleibt ebenfalls bis zum Ende des Wachstums erhalten. Auch in diesen Ansätzen wird das gebildete Cystein bei Übergang zur stationären Phase bis zur Detektionsgrenze reoxidiert. Während des Wachstums sind also sowohl Oxidation als auch Reduktion des zugegebenen Cysteins bzw. Cystins zu beobachten; dabei wird ein bestimmtes niedriges Konzentrationsniveau gehalten. Cystein liegt während des Wachstums überwiegend in oxidiert Form vor (Abbildung 3-23).

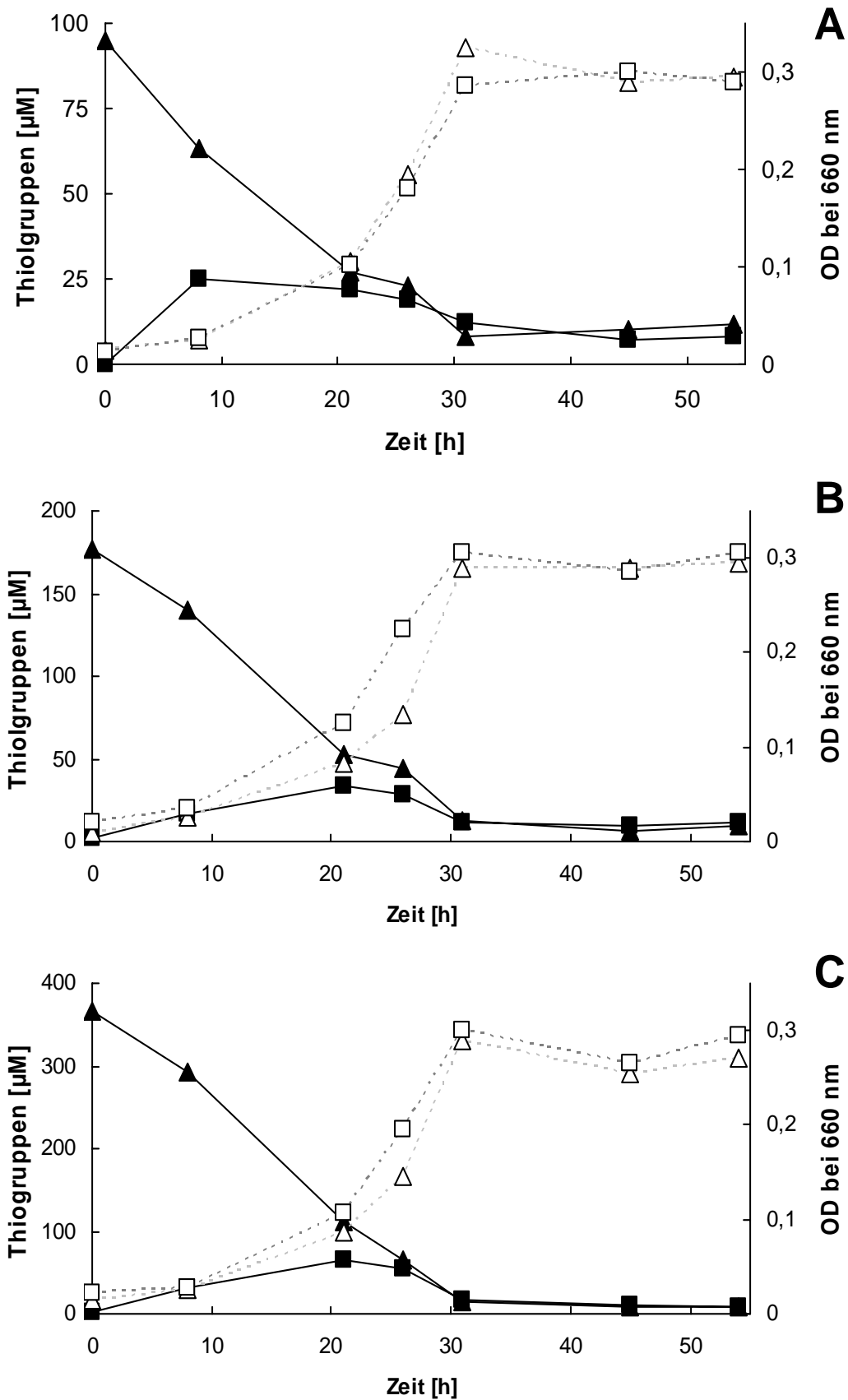


Abbildung 3-23: Konzentrationen von Cystin (■) /Cystein (▲) während des Wachstums der Kokultur (□, △ Wachstumskurven) in Abhängigkeit von dem Anfangskonzentrationen. Vergleich der jeweils korrespondierenden Cystin- / Cystein- Zugaben: **A**) 50 μM Cystin und 100 μM Cystein, **B**) 100 μM Cystin und 200 μM Cystein und **C**) 200 μM Cystin und 400 μM Cystein.

3.5.2.6 Alternative Carriersysteme

Cystein war in unseren Ansätzen als Reduktionsmittel in relativ hohen Konzentrationen enthalten. An natürlichen Standorten ist eine so hohe Konzentration einer Aminosäure unwahrscheinlich. Daher wurde nach Substanzen gesucht, die die Funktion des Cysteins an natürlichen Standorten erfüllen könnten. Eine der ersten untersuchten Verbindungen war AQDS. Eine Substanz, die als Elektronenüberträger bei der Eisenreduktion genutzt wird (Lovley et al. 1999), könnte auch bei der Elektronenübertragung in der Kokultur eine Rolle spielen. Experimentell konnte jedoch kein Wachstum der Kokultur in Gegenwart von AQDS beobachtet werden (Abb. 3-24).

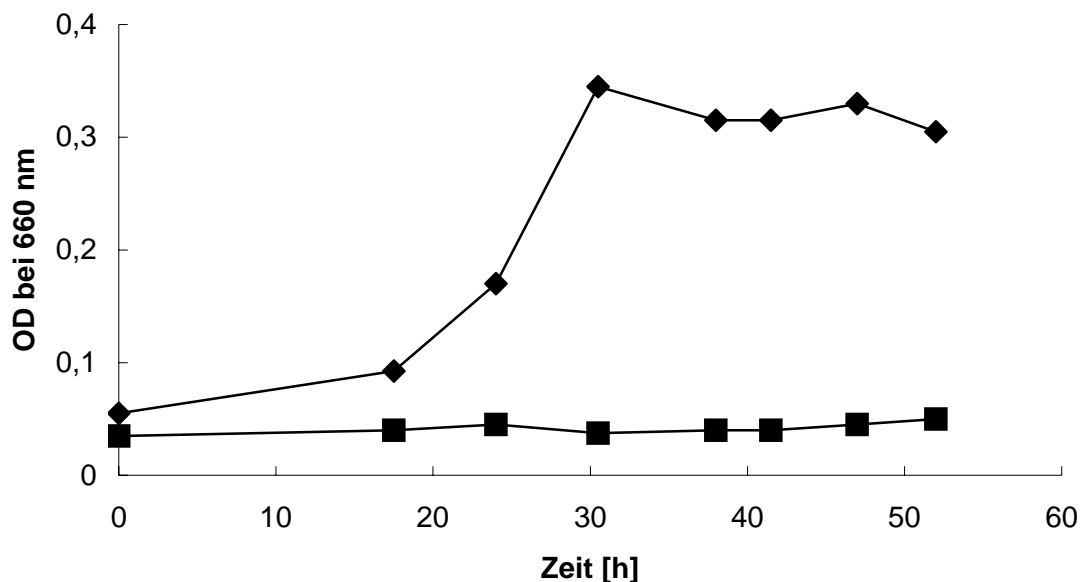


Abbildung 3-24: Wachstum einer Kokultur aus *G. sulfurreducens* und *W. succinogenes* unter Einfluss von 100 μ M Cystein (\blacklozenge) im Vergleich zum Wachstum mit Zusatz von 100 μ M AQDS (\blacksquare).

Des Weiteren wurden eine Reihe von Verbindungen auf ihre Wirkung auf das Wachstum getestet, die Thiolgruppen enthalten. Untersucht wurde die Wirkung von Cysteamin; Thioglycolat; Glutathion; Coenzym M; Mercaptopropionat; Ethanthiol; Propanthiol; Ethandithiol; Mercaptoethanol. Mit allen diesen Substanzen konnte kein Wachstum beobachtet werden.

Eventuelle toxische Effekte dieser Substanzen wurden in Wachstumsexperimenten mit 1 mM Cystein und 100 μ M der jeweiligen Substanz untersucht. Nur der Kontrollansatz mit Cystein zeigte normales Wachstum, wohingegen Kulturen mit Ethanthiol, Propanthiol, Ethandithiol, Mercaptoethanol oder Dithiothreitol stark gehemmt waren. Das Wachstum begann erst nach einer langen lag-Phase von 2 Wochen.

3.5.3 Biochemische Untersuchungen zum Elektronenüberträger

3.5.3.1 Einfluss von Cystein auf die syntrophe Acetatoxidation durch die *G. sulfurreducens* / *W. succinogenes* Kokultur

Bisher wurde der Einfluss von Cystein / Cystin auf das Wachstum der Kokultur untersucht. Mit diesen Experimenten wurde jedoch nur gezeigt, dass beide vermutlich essentiell für das Wachstum der Kokultur waren. Sowohl bei Zugabe der oxidierten als auch der reduzierten Substanz wuchs die Kokultur. Ein konkreter Einfluss auf die Acetatoxidation war damit aber noch nicht nachgewiesen. Um das zu untersuchen, wurde die Acetatkonzentration in dichten gewaschenen Zellsuspensionen ($OD_{660} = 1,5$) unter Einfluss unterschiedlicher Cysteinkonzentrationen bestimmt (Abb. 3-25). Wird Cystein in Konzentrationen von $100 \mu\text{M}$ oder mehr zugesetzt, findet eine Acetatoxidation mit einer Rate von $0,27 - 0,29 \mu\text{mol} \times \text{mg (Protein)}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ statt, mit $10 \mu\text{M}$ Cystein ist die Rate mit $0,23 \mu\text{mol} \times \text{mg (Protein)}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ nur unwesentlich geringer, die Acetatoxidation hört jedoch bei ca. 5 mM auf. Im Kontrollansatz ohne Zusatz von Cystein war keine Acetatabnahme zu beobachten.

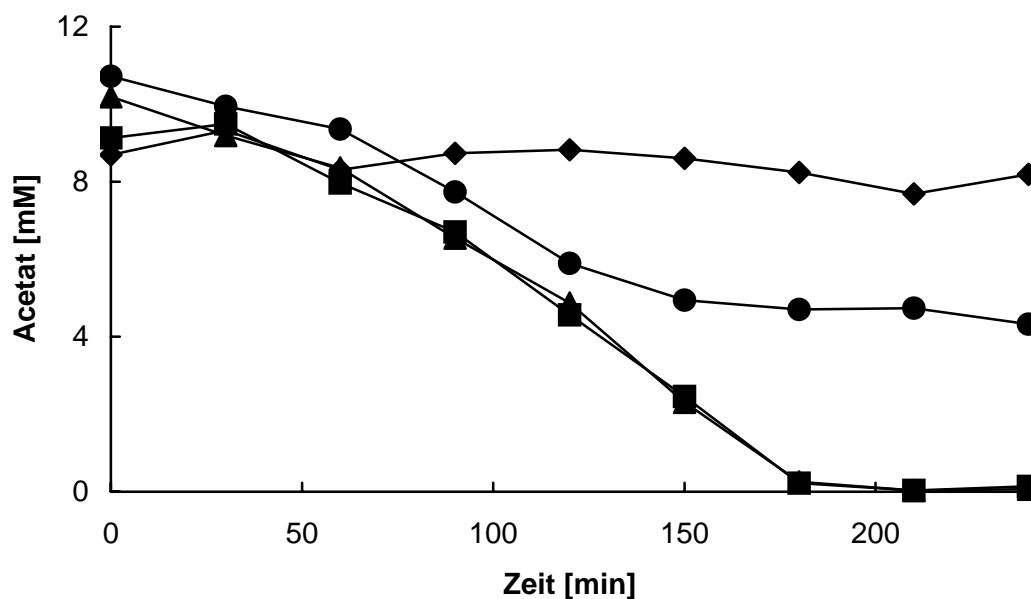


Abbildung 3-25: Abbau von Acetat in dichten Zellsuspensionen der Kokultur aus *G. sulfurreducens* und *W. succinogenes* ($OD_{660} = 1,5$). (◆) Kontrolle ohne Cystein, (■) mit $500 \mu\text{M}$ Cystein, (▲) mit $100 \mu\text{M}$ Cystein, (●) mit $10 \mu\text{M}$ Cystein.

3.5.3.2 Vergleich von Cystin und Cystin als Elektronencarrier

Auch für die Acetatoxidation in gewaschenen Kokultursuspensionen konnte, wie schon im Wachstumsexperiment, der gleiche Stimulationseffekt durch Zusatz von Cystin oder Cystein in gleicher Konzentration beobachtet werden. Im direkten Vergleich der Acetatabnahme (Abb. 3-26) wurden wiederum fast identische Raten von $0,25 \mu\text{mol} \times (\text{mg Protein})^{-1} \times \text{min}^{-1}$ mit Cystein-Zusatz und $0,21 \mu\text{mol} \times \text{mg (Protein)}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ mit Cystin-Zusatz gemessen.

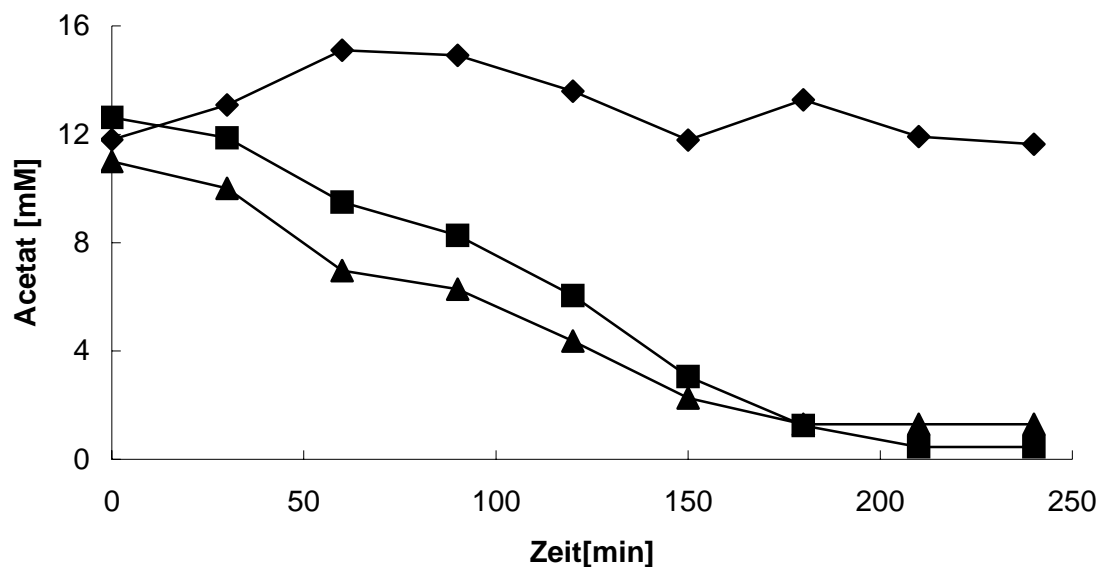


Abbildung 3-26: Vergleich von Cystin- und Cystein-abhängiger Acetat-Oxidation in Kokultur-Zellsuspensionen: Kontrollansatz ohne Zusatz (◆), mit 500 μM Cystein (■), mit 500 μM Cystin (▲).

3.5.3.3 Oxidation und Reduktion von Thiolverbindungen in Abhängigkeit von den Elektronendonator – Akzeptorkonzentrationen

Zur Beantwortung der Frage, ob das Cystin / Cystein-Paar wirklich als Elektronenüberträger fungiert, wurden Zellsuspensionen der Reinkulturen von *Geobacter sulfurreducens* und *Wolfinella succinogenes*, ebenso wie Kokultur-Suspensionen auf ihre Fähigkeit getestet, Cystin zu reduzieren oder Cystein zu oxidieren. Dazu wurden Änderungen in der Konzentration von freien Thiolgruppen gemessen. *G. sulfurreducens* reduzierte Cystin in Reinkulturen mit Raten von $6.0 - 22 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{mg Protein})^{-1}$. Mit Zellen, die in der exponentiellen Phase geerntet und unmittelbar getestet wurden, konnte kein Unterschied in den Thiol-Bildungsraten in Gegenwart oder Abwesenheit von Acetat beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Wenn hingegen *G. sulfurreducens*-Zellen aus der stationären Phase von Reinkulturen benutzt wurden, wurde ein deutlicher Unterschied in der Cystin-Reduktionsrate mit Acetat ($12.5 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times$

(mg Protein^{-1}) gegenüber Ansätzen ohne Acetat ($3.4 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{mg Protein})^{-1}$) gefunden (Abb. 3-27 a). *W. succinogenes* oxidierte Cystein mit Nitrat in Reinkultur mit einer Rate von $2.6 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{mg Protein})^{-1}$ (Abb. 3-27 b).

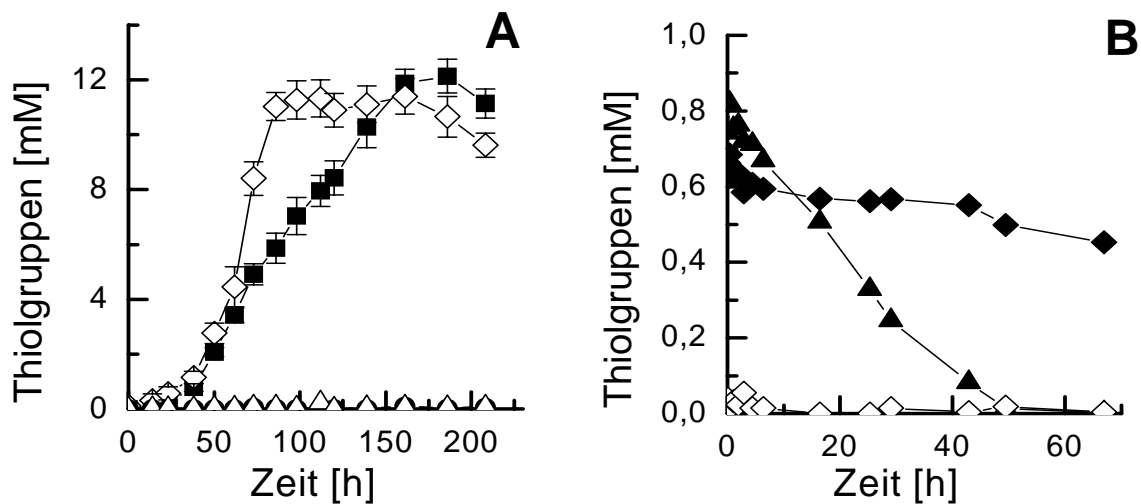


Abbildung 3-27: Cystin Reduktion und Cystein Oxidation durch dichte Zellsuspensionen von *G. sulfurreducens* und *W. succinogenes* Reinkulturen **A**) Bildung von Thiol-Gruppen aus L-Cystin in Zellsuspensionen von *Geobacter sulfurreducens*, Zellen mit Acetat und Cystin (◆), Acetate + Cystin (△), Zellen + Cystin (■); **B**) Oxidation von Cystein in Zellsuspensionen von *Wolinella succinogenes*, Zellen mit Nitrat und Cystein (▲), Zellen und Cystein (◆), Zellen mit Nitrat (◇)

Kokultursuspensionen reduzierten Cystin mit einer Rate von $1.3 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{mg Protein})^{-1}$ und oxidierten Cystein mit Nitrat mit einer Rate von $3.5 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times (\text{mg Protein})^{-1}$ (Abb. 3-28). Die Zugabe von Nitrat zu einer Suspension, die zuvor Acetat mit Cystin oxidiert hatte und dabei freie Thiolgruppen produzierte, hatte eine sofortige Abnahme der Konzentration freier Thiolgruppen zur Folge. Die Zugabe von Acetat zu einer Kokultursuspension, die vorher Cystein mit Nitrat oxidiert hatte, führte zu einer erneuten Thiol-Gruppenbildung.

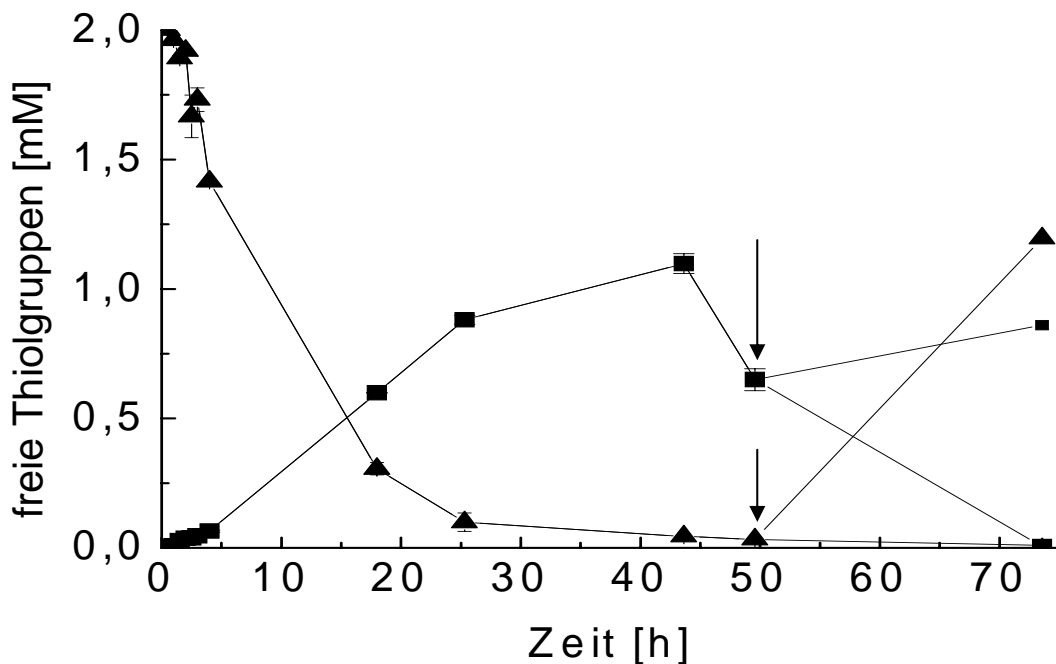


Abbildung 3-28: Cystein-Oxidation bzw. Cystin-Reduktion in dichten Zellsuspensionen der Kokultur aus *G. sulfurreducens* und *W. succinogenes* ($OD_{600}=1,5$), gemessen über die Konzentration an freien Thiolgruppen; bei Zugabe von 1 mM Acetat als Elektronendonator und 1 mM Cystin als Elektronenakzeptor (■), oder bei Zugabe von 2 mM Cystein als Elektronendonator und 1 mM Nitrat als Elektronenakzeptor (▲); die Pfeile zeigen den Zeitpunkt der Zugabe 2 mM Acetat (▲), bzw. 2 mM Nitrat (■) zu einer der beiden Parallelen an.

3.5.3.4 Versuche mit alternativen Reduktionsmitteln oder anderen potentiellen

Überträgersubstanzen

Bereits im Wachstumsversuch hatte sich gezeigt, dass bei Einsatz alternativer Reduktionsmittel ohne Zugabe von Cystein kein Wachstum erfolgte. Daraus war abzuleiten, dass nicht ungünstige Redoxbedingungen das Wachstum verhinderten, sondern die Abwesenheit von Cystein. Daran anknüpfend wurde in Kokulturzellsuspensionen überprüft, ob eine Acetatoxidation ohne Cystein unter Einsatz alternativer Reduktionsmittel (Ascorbat, DTT) möglich war. Es kam in keinem Fall ohne Cystein-Zusatz zu einer Abnahme der Acetatoxidation (Abb. 3-29).

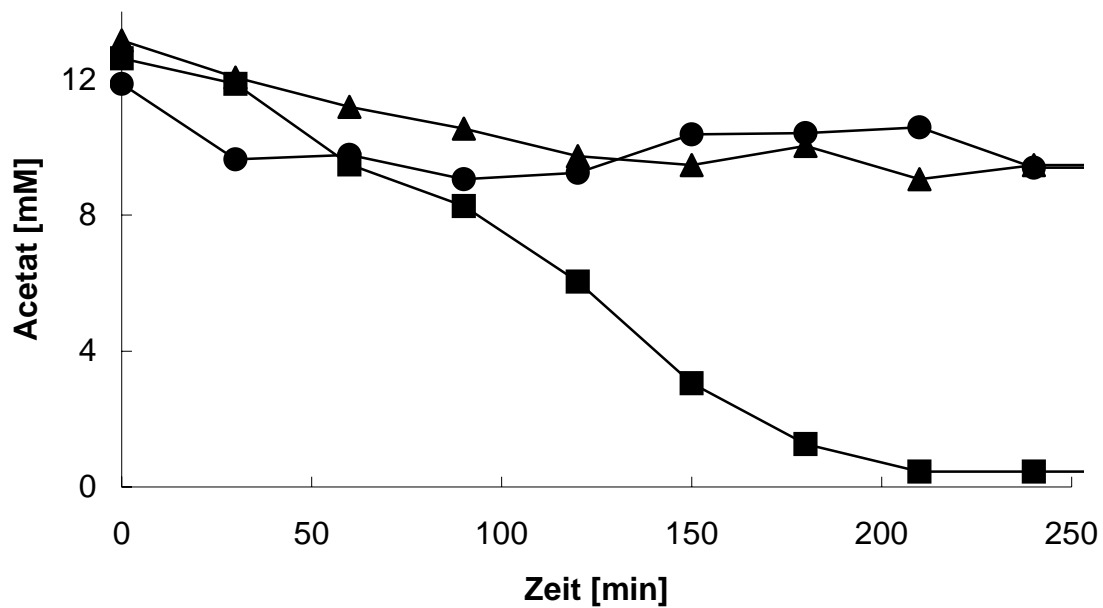


Abbildung 3-29: Acetatoxidation in dichten Zellsuspensionen der Kokultur ($OD_{660} = 1,8$) mit Zusatz von 500 μM Cystein (■), 500 μM Ascorbat (▲), 500 μM DTT (●).

Was für den Vergleich alternativer Reduktionsmittel galt, bestätigte sich auch für die getesteten alternativen Elektronenüberträgersubstanzen. Es konnte mit keiner alternativen Substanz (Dimethylsulfoxid, Trimethylamin-N-oxid, Ethanethiol, Propanethiol, Ethanedithiol, D-Cystein, Homocystein, Cysteamin, 3-Mercaptopropionat, Thioglycolat, Glutathion oder Coenzyme M; Konzentration jeweils 100 μM im Ansatz) eine signifikante Abnahme der Acetatkonzentration beobachtet werden. Lediglich mit 100 μM Mercaptoethanol wurde manchmal eine leichte Abnahme der Acetat Konzentration in Zellsuspensionen beobachtet. Wie schon gezeigt, konnte die Kokultur jedoch mit Mercaptoethanol nicht wachsen. Es besonderes Phänomen konnte beim Einsatz von AQDS beobachtet werden. Ein schneller Farbwechsel von gelb nach dunkelbraun wies darauf hin, dass AQDS von *G. sulfurreducens* zu AHQDS reduziert wird, es konnte jedoch keine Acetatabnahme beobachtet werden. Auch konnte während des gesamten Versuchszeitraums (24 h) keine Rückoxidation des AHQDS beobachtet werden.

3.5.4 Messung des apparenten Redoxpotentials in syntroph Acetat oxidierenden Kulturen

Das in einer Kultur herrschenden Redoxpotential hat starken Einfluss darauf, ob Elektronenübertragungen energetisch günstig ablaufen können oder nicht. Für die syntrophe Acetatoxidation wurde ein Elektronenüberträger mit einem Redoxpotential von ca. - 200 mV postuliert. Um zu prüfen, ob die Bedingungen in der wachsenden Kultur einer Elektronenübertragung auf

diesem Niveau entsprechen, wurde das Redoxpotential während der Acetatoxidation mit einer Redoxelektrode gemessen. Das Redoxpotential erreichte während des exponentiellen Wachstums einen Gleichgewichtszustand zwischen -169 mV und -235 mV (Abb. 3-30). Bei Nitratlimitierung verschob sich dieser Wert zu -315 mV am Ende des Wachstums (Abb. 3-30 b), bei Acetatlimitierung verschob er sich auf -130 mV am Ende des Wachstums (Abb. 3-30 a).

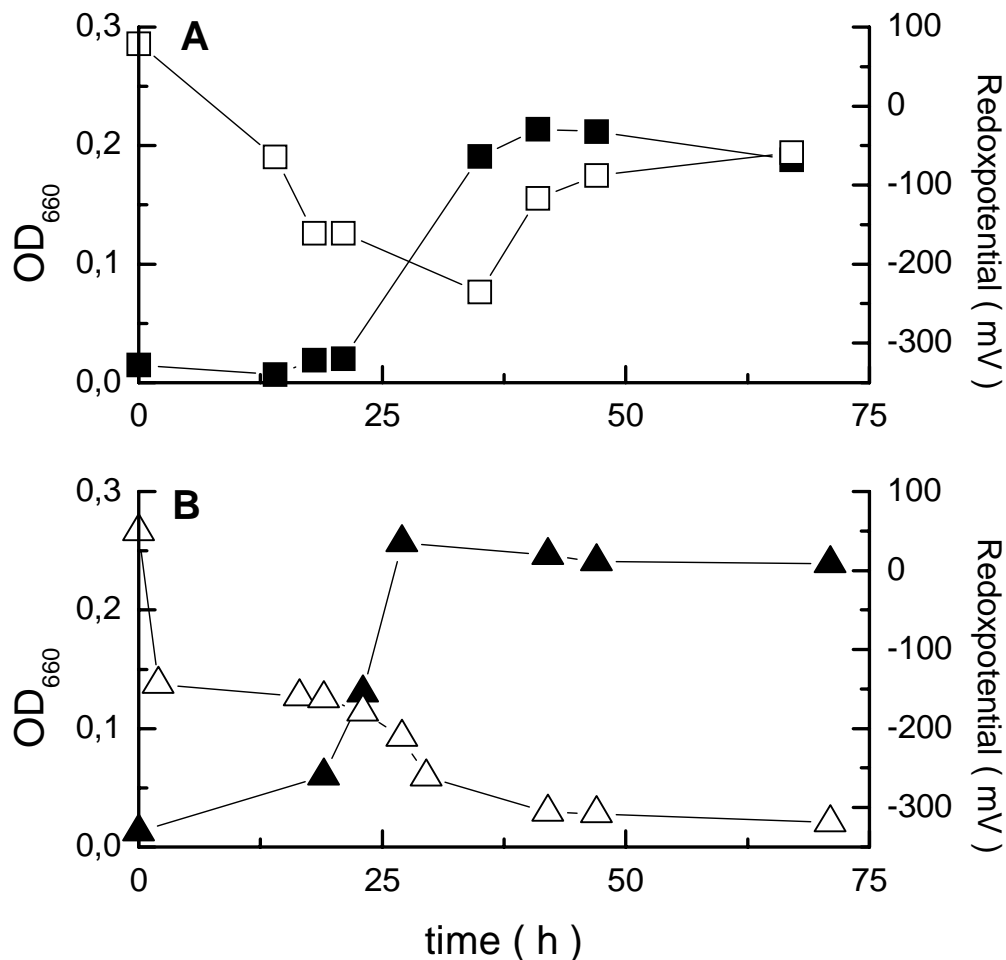


Abbildung 3-30: Redoxpotentialmessungen in wachsenden Kokulturen von *G. sulfurreducens* und *W. succinogenes*. A) Wachstum unter Acetat-limitierten Bedingungen (10 mM Acetat plus 15 mM Nitrat); (■)OD₆₆₀, (□) Redoxpotential in der Kultur bezogen auf die Standardwasserstoffelektrode. B) Wachstum unter Nitrat-Limitierung (20 mM Acetat plus 10 mM Nitrat); (▲)OD₆₆₀, (△)Redoxpotential in der Kultur bezogen auf die Standard Wasserstoff Elektrode.

3.5.5 Induzierbarkeit des Systems

Es wurde erwartet, dass die beiden Bakterien für die syntrophe Acetatoxidation und damit für den Elektronentransport über Cystein spezielle Elektronen übertragende Enzyme verwenden, da in beiden Reinkulturen keine Elektronenübertragung vom bzw. zum Cystein notwendig war.

Die hohe Spezifität, mit der Cystein genutzt wurde, ließ auch spezifische Redoxkomponenten in den Zellen vermuten. Die Induktion eines speziellen enzymatischen Apparates wurde geprüft, indem die Acetatoxidation in Kokultursuspensionen mit der Acetatoxidation in einer Suspension verglichen wurde, für die Reinkultur-Suspensionen unmittelbar vor dem Experiment miteinander gemischt wurden. Wie in Abb. 3-31 dargestellt, wurde Acetat in beiden Fällen mit gleicher Rate und ohne erkennbare Verzögerung abgebaut. Alle benötigten Enzyme waren also auch in den Reinkulturen vorhanden. Dies wird durch Versuche bestätigt, in denen Chloramphenicol in unterschiedlichen Konzentrationen (20 g/ml – 100 µg/ml) eingesetzt wurde, um die Proteinbiosynthese zu hemmen. Bei geringen Konzentrationen (20 µM) wurden die Raten beider Suspensionen nicht beeinflusst (Daten nicht gezeigt), wogegen höhere Konzentrationen (100 µM) auch die Bakterien in der Kokultur schädigten (Abb 3-31b).

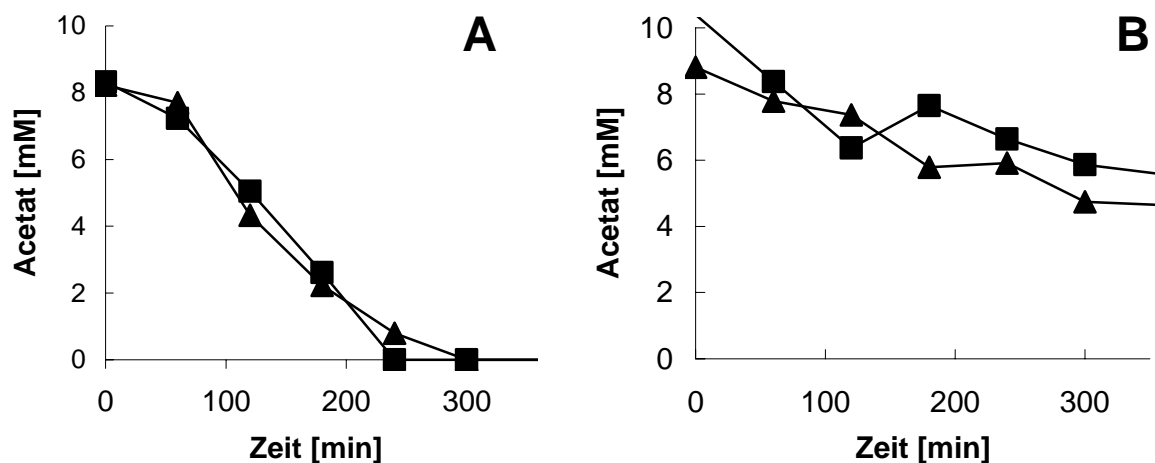


Abbildung 3-31 Vergleich der Oxidation von Acetat in Zellsuspensionsmischungen von *G. sulfurreducens* und *W. succinogenes* Reinkulturen mit der Acetatoxidation in Kokultursuspensionen A) Acetatoxidation in Kokultursuspension von *G. sulfurreducens* und *W. succinogenes* (■) verglichen mit der Acetatoxidation einer Mischsuspension der beiden Reinkulturen (▲); B) Der Zusatz von 100 µg Chloramphenicol/mg Zellprotein bewirkte sowohl in der Reinkulturmischung (▲) als auch in der Kokultursuspension (■) eine Hemmung der Acetatoxidation, das Ausmaß der Hemmung war in beiden Fällen gleich. Die Ansätze enthielten Bakterien ($OD_{660} = 1,5$), 100 µM Cystein, 10 mM Acetat, 10 mM Nitrat in Bicarbonat-gepuffertem Medium.

3.5.6 Biochemie der Cystinreduktion

3.5.6.1 Bildung freier Thiolgruppen in *Geobacter sulfurreducens* Zellsuspensionen – Cystinreduktion

Da die Enzyme der Cystinreduktion offensichtlich bereits in der Reinkultur von *G. sulfurreducens* induziert waren, wurden Experimente zur Cystinreduktion im Folgenden mit der Reinkultur durchgeführt.

In Zellsuspensionen wurde Cystin mit Acetat als Elektronendonator mit einer Rate von $4 \text{ nmol} \times (\text{mg}^{-1} \text{ Zellprotein}) \times \text{min}^{-1}$ reduziert. Wurde Wasserstoff als Elektronendonator eingesetzt, war die Rate mit $5,6 \text{ nmol} \times (\text{mg}^{-1} \text{ Zellprotein}) \times \text{min}^{-1}$ leicht erhöht. Es wurde jedoch auch ohne zugesetzten Elektronendonator eine Cystinreduktion beobachtet, die mit einer Rate von $3,4 \text{ nmol} \times (\text{mg}^{-1} \text{ Zellprotein}) \times \text{min}^{-1}$ in der gleichen Größenordnung lag und möglicherweise auf die Oxidation von Speicherstoffen wie Glycogen zurückzuführen war (Abb. 3-32).

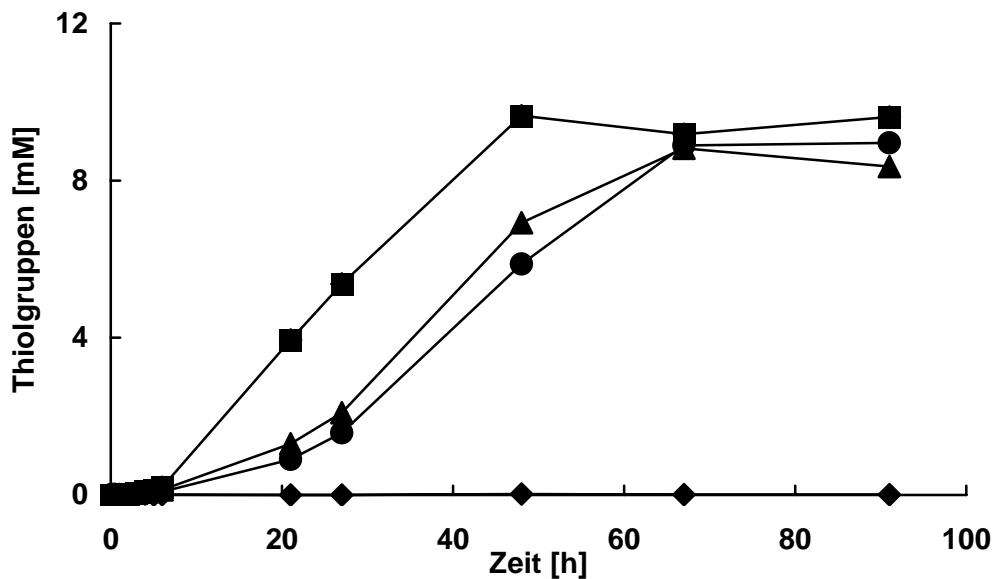


Abbildung 3-32: Bildung von Thiolgruppen in dichten Kokultursuspensionen aus Cystin mit unterschiedlichen Elektronendonoren: Wasserstoff (Ansatz mit 100 % H₂ gesättigt) (■), 10 mM Acetat (▲), ohne externen Elektronendonator (●), Kontrolle mit Wasserstoff ohne Zellen (◆). Alle Ansätze enthielten 5 mM Cystin (fest zugesetzt) als Elektronenakzeptor.

Alle gemessenen Raten waren im Vergleich zur Acetatoxidationsrate von $200 - 250 \text{ nmol} \times (\text{mg}^{-1} \text{ Zellprotein}) \times \text{min}^{-1}$ ungewöhnlich gering. Da sich Wasserstoff als Elektronendonator eignet, wurde dieser in den folgenden Experimenten anstelle von Acetat eingesetzt, da so die Elektronentransportkette stark verkürzt und auf die Enzyme der Acetatoxidation verzichtet werden konnte. Wasserstoff sollte auch aufgrund seines sehr niedrigen Redoxpotentials sehr gut als Elektronendonator geeignet sein.

Lokalisation der Cystin-reduzierenden Aktivität

Von Interesse war die Lokalisation der Cystin reduzierenden Aktivität in *Geobacter sulfurreducens*. Dazu wurde die Cystin-Reduktion in verschiedenen Fraktionen von *G. sulfurreducens*-Reinkulturen mit Wasserstoff als Elektronendonator durchgeführt. In ersten Versuchen wurde Palladium als Katalysator eingesetzt, um die Elektronen in die Elektronentransportkette einzuschleusen. In Kontrollen wurde jedoch beobachtet, dass Palladium Cystin mit Wasserstoff

direkt reduzieren konnte. Daher wurde auf den weiteren Einsatz von Palladium verzichtet. Da Reinkulturen von *G. sulfurreducens* jedoch eine aktive, membranständige Hydrogenase haben (Galushko und Schink 2000) wurde diese endogene Hydrogenase (Tab. 3-6) im Folgenden als Hilfsenzym genutzt.

Tabelle 3-6: Hydrogenase-Aktivität in verschiedenen Fraktionen von *G. sulfurreducens*, gemessen als Wasserstoff-abhängige Reduktion von Benzylviologen

	Aktivität [$\mu\text{mol} \times (\text{mg Protein})^{-1} \times \text{min}^{-1}$]
Periplasma	0
Membran	0,6
Cytoplasma	0,23

Eine Messung der Cystinreduktase-Aktivität im Rohextrakt von *G. sulfurreducens* sowie in den einzelnen Fraktionen war nur bei Einsatz relativ hoher Proteinkonzentrationen (>1mg Protein/ml Ansatz) möglich. Die ermittelten Aktivitäten sind in Abb. 3-33 und Tabelle 3-6 aufgeführt.

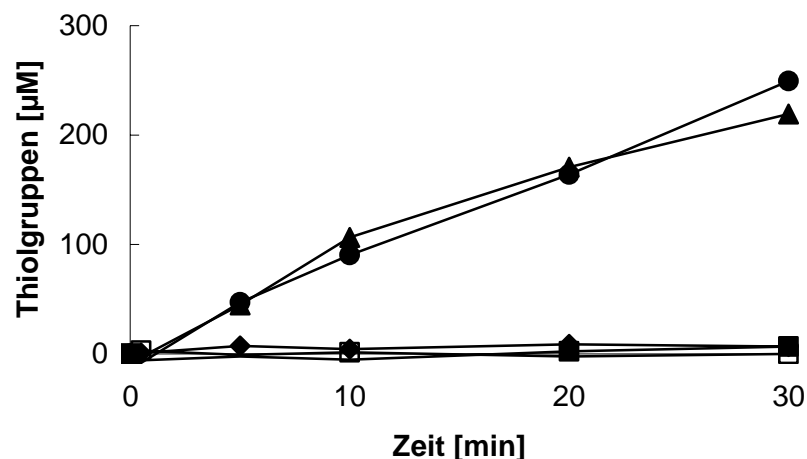


Abbildung 3-33: Reduktion von Cystin in verschiedenen Fraktionen von *G. sulfurreducens*: (◆) Membranfraktion, (●) cytoplasmatische Fraktion, (■) periplasmatische Fraktion, (□) Membran + Periplasma, (▲) Membran + Cytoplasma. Alle Ansätze waren Wasserstoff gesättigt und enthielten 5 mM MgCl_2 und 500 μM Cystin in KPP 50 mM, pH 8.

Erstaunlicherweise war die gefundene Aktivität fast vollständig im Cytoplasma lokalisiert. Die gefundenen Raten waren sehr gering, lagen jedoch im Bereich dessen, was auch in der Zellsuspension gefunden wurde. Um die Cystinreduktionsrate zu erhöhen, wurden die Bedingungen im Testansatz variiert. Dazu wurden alternative Puffersysteme (Bicarbonat Puffer pH 7,2 (Kultur-Medium); KPP; Tris/HCl; jeweils mit und ohne Zusatz von SL10, Selenit-Wolframat Lösung, MgCl_2) eingesetzt. Auch wurde die Präparation der Zellextrakte in Anwesenheit von 2 mM

Titaniumcitrat durchgeführt, um einer Enzyminaktivierung während der Präparation vorzubeugen. Schließlich wurde dem Testansatz 10 μM PMS als Elektronenmediator zugesetzt. All diese Versuche waren jedoch erfolglos.

In der Kokultur ist für die Elektronenübertragung auf das Cystin von einem membranständigen oder periplasmatischen Prozess auszugehen. Eine derartige Aktivität konnte beobachtet werden, wenn statt des Cystins der artifizielle Elektronenakzeptor DTNB eingesetzt wurde (Tab. 3-7). Dieser wurde sowohl von ganzen Zellen, als auch von Rohextraktpräparationen mit relativ hoher Aktivität reduziert. Durch eine weitere Fraktionierung konnte diese Aktivität der Membranfraktion zugeordnet werden. Dabei stimulierte DTNB das Wachstum der Kokultur nicht. Somit konnte die DTNB-reduzierende Aktivität nicht mit der Cystin-Reduktion in Zusammenhang gebracht werden.

Tabelle 3-7: Lokalisation der Cystin-Reduktase-Aktivität in verschiedenen Zellkompartimenten von *G. sulfurreducens* im Vergleich zur DTNB Reduktion, jeweils mit Wasserstoff als Elektronendonator.

Cystin Reduktion	$\text{nmol} \times (\text{mg Protein})^{-1} \times \text{min}^{-1}$	DTNB Reduktion	$\text{nmol} \times (\text{mg Protein})^{-1} \times \text{min}^{-1}$
Zellsuspension:	3-5	Zellsuspension:	275
		Rohextrakt:	15
Membran Fraktion:	0,7	Membran Fraktion:	52
Cytoplasmatische Fraktion:	5	Lösliche Fraktion:	4,8
Periplasmatische Fraktion:	0		
Membran + Periplasma Fraktion:	0		
Membran + Cytoplasma Fraktion:	7,3		

3.5.7 Das Sulfid / Schwefel Paar als alternativer Elektronenüberträger

3.5.7.1 Wachstum mit Sulfid

Die elektronenübertragende Komponente im Cystein ist die Thiolgruppe. Das legte den Schluss nahe, dass auch freier Schwefel diese Elektronenübertragung übernehmen könnte. Analog zu der schon bekannten syntrophen Interaktion zwischen *Desulfuromonas acetoxidans* und *Chlorobium limicola* (Biebl und Pfennig 1978) mit einem reinen Schwefel / Sulfid Kreislauf. Es wurden daher Wachstumsversuche mit der *Geobacter sulfurreducens* / *Wolinella succinogenes* Kokultur unter Zusatz verschiedener Konzentrationen von Sulfid durchgeführt. Die Kokultur reagierte empfindlich auf Sulfid als Reduktionsmittel. In Anwesenheit von 1 mM Sulfid wurde kein Wachstum beobachtet. Mit 200 μM oder weniger Sulfid jedoch wuchs die Kultur sogar ohne Cystein- oder Cystinzusatz (Abb. 3-34).

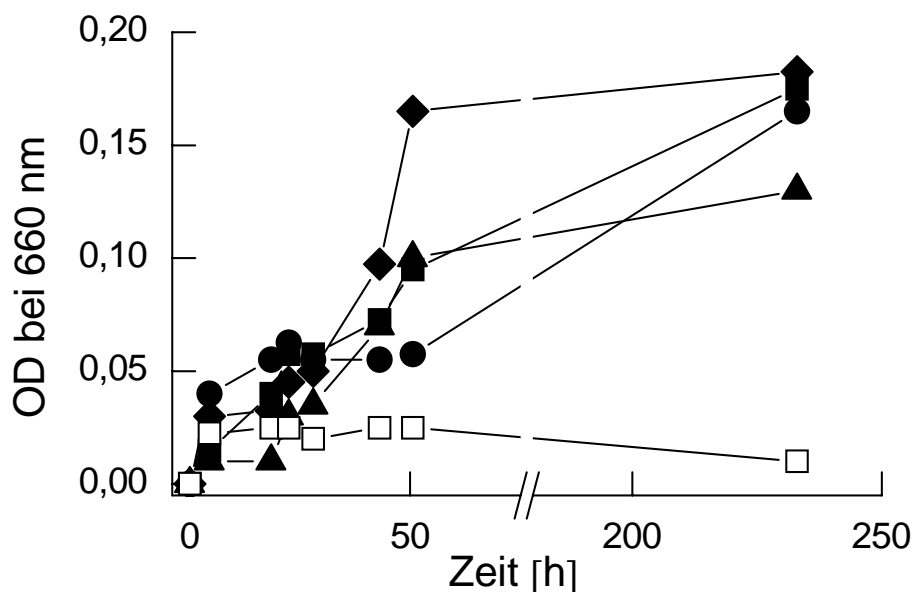


Abbildung 3-34: Wachstum der Kokultur von *G. sulfurreducens* und *W. succinogenes* unter Einfluss von Sulfid. Die Ansätze enthielten 10 μM (▲), 50 μM (◆), 100 μM (■), 200 μM (●) oder 400 μM (□) Sulfid in Bicarbonat-gepuffertem Medium mit 20 mM Acetat plus 10 mM Nitrat, ohne Cystein oder Cystin

Die Wachstumsrate und die maximale optische Dichte waren ähnlich denen von Kokulturen, die mit Cystein oder Cystin wuchsen. Allerdings wurde in der Kultur mit Sulfidzusatz eine sichtbare Trübung zwei Stunden nach Animpfen beobachtet. Mikroskopisch konnte diese Trübung kolloidalen Schwefelkugeln zugeordnet werden, die im weiteren Verlauf des Wachs-

tums wieder verschwanden. Es wird vermutet, dass durch *Geobacter sulfurreducens* dieser kolloidale Schwefel zu Sulfid rückreduziert wurde.

3.5.7.2 Schwefelreduktion und Sulfidoxidation in der Zellsuspension

Zellsuspensionen von *Geobacter sulfurreducens* reduzieren Polysulfid mit Acetat als Elektronendonator mit einer Rate von $38 \text{ nmol} \times (\text{mg}^{-1} \text{ Zellprotein}) \times \text{min}^{-1}$. Ohne Acetatzusatz wird Polysulfid mit beinahe identischer Rate ($35 \text{ nmol} \times (\text{mg}^{-1} \text{ Zellprotein}) \times \text{min}^{-1}$) reduziert, was wiederum auf Speicherstoffe zurückzuführen sein könnte. Im Vergleich dazu wird aus Acetat und Cystin kein Sulfid gebildet (Abb. 3-35).

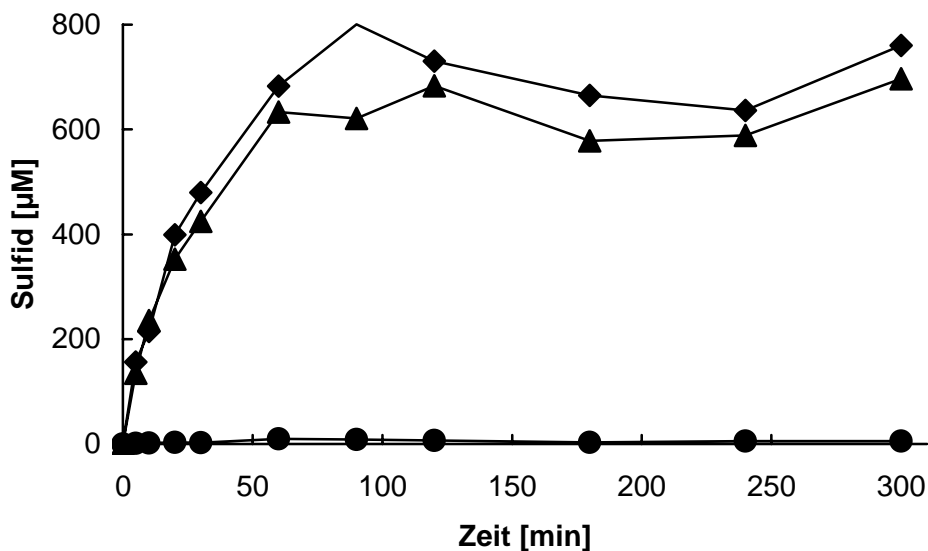


Abbildung 3-35: Bildung von Sulfid in Zellsuspensionen von *G. sulfurreducens*. Ansätze: Polysulfid (1 mM) mit 10 mM Acetat als Elektronendonator (◆); Polysulfid (1 mM) ohne externen Elektronendonator (▲) und Cystin (1 mM) mit 10 mM Acetat als Elektronendonator (100 µM) (●)

In Zellsuspensionen der Kokultur wurde Polysulfid mit Acetat mit einer Rate von $35 - 43 \text{ nmol} \times (\text{mg}^{-1} \text{ Zellprotein}) \times \text{min}^{-1}$ reduziert. Ebenso oxidierten Kokultursuspensionen Sulfid mit Nitrat ($64 \text{ nmol} \times (\text{mg}^{-1} \text{ Zellprotein}) \times \text{min}^{-1}$). Eine Rereduktion von zuvor oxidiertem Sulfid nach Zusatz von Acetat konnte, wie auch schon in Kapitel 1.5.4.3 für Cystein und Cystin gezeigt, auch hier beobachtet werden. Ebenso wurde vorher mit Acetat zu Sulfid reduzierter Schwefel (Polysulfid) nach Zugabe von Nitrat wieder reoxidiert (Abb. 3-36).

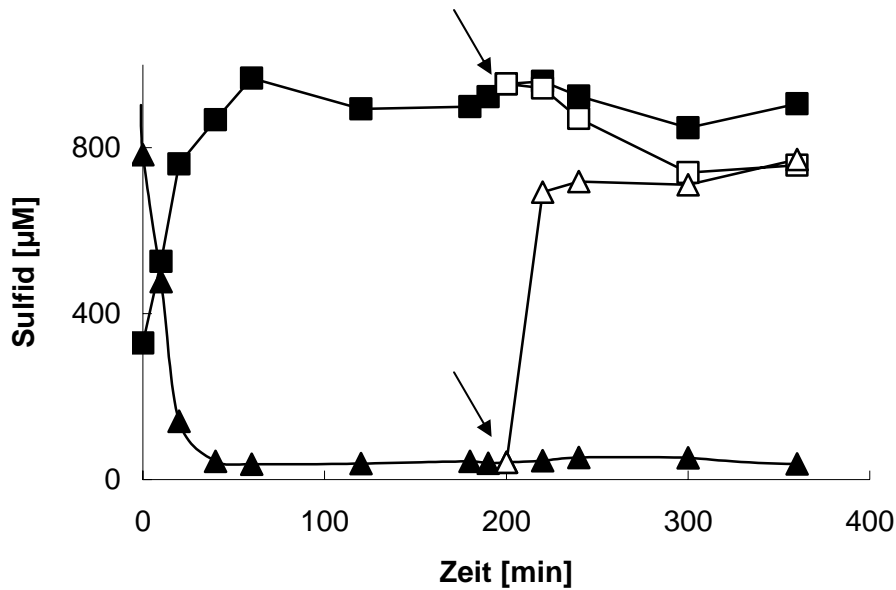


Abbildung 3-36: Polysulfid-Reduktion bzw. Sulfid-Oxidation in Zellsuspensionen ($OD_{660}=1,5$) der *G. sulfurreducens* / *W. succinogenes* Kokultur. Ansatz mit 1 mM Polysulfid als Elektronendonator und 1 mM Acetat als Elektronenakzeptor (■), der Pfeil zeigt die Zugabe von 2 mM Nitrat zu einer der beiden Parallelen an. Ansatz mit 1 mM Nitrat und 1 mM Sulfid (▲), der Pfeil zeigt die Zugabe von 2 mM Acetat zu einer der beiden Parallelen an. Die Zugabe von Acetat führte zu einer erneuten Sulfidbildung (△), die Zugabe von Nitrat hatte eine Abnahme der Sulfidkonzentration zur Folge (□), die Konzentrationen der unbehandelten Parallelen blieben dagegen unverändert.

3.5.8 Bildung von Sulfid aus Cystein

Da das Schwefel / Sulfid Paar die Funktion von Cystein und Cystin in der Kokultur übernehmen konnte, wäre es möglich, dass die beobachtete Elektronen übertragende Funktion gar nicht direkt durch Cystein selbst übernommen wird, sondern dass vielmehr durch die Bakterien zuerst die Schwefelgruppe aus dem Cystein abgespalten würde und diese dann in Form eines Sulfid / Schwefel-Kreislaufs die Elektronenübertragung katalysierte. Diese Möglichkeit war auch deshalb nicht auszuschließen, weil die Cystin-Reduktion bzw. die Cysteinoxidation über die Bildung bzw. das Verschwinden der freien Thiolgruppe gemessen wurde und auch Sulfid in diesem Test reagierte. In der Tat wurde in ausgewachsenen *Geobacter sulfurreducens* Rein- sowie in ausgewachsenen Cystein-reduzierten Kokulturen eine beträchtliche Sulfid-Konzentration bis zu 200 μM gefunden, genug für eine Elektronenüberträger-Funktion. Wurde jedoch in Zellsuspensionen die Bildung von Sulfid aus Cystein oder Cystin durch *G. sulfurreducens* verfolgt, so wurde eine signifikante Sulfidbildung aus Cystein oder aus Cystin erst nach einer langen Inkubationszeit (20 h) gefunden (Abb. 3-37). In den ersten 300 min des Experiments, in denen eine Kokultursuspension üblicherweise 10 mM Acetat oxidierte, lagen die gebildeten Sulfidmengen unter 10 μM . Eine Freisetzung von Sulfid aus Cystein als Überträger für den Elektronentransport bei der Acetatoxidation wurde somit nicht belegt.

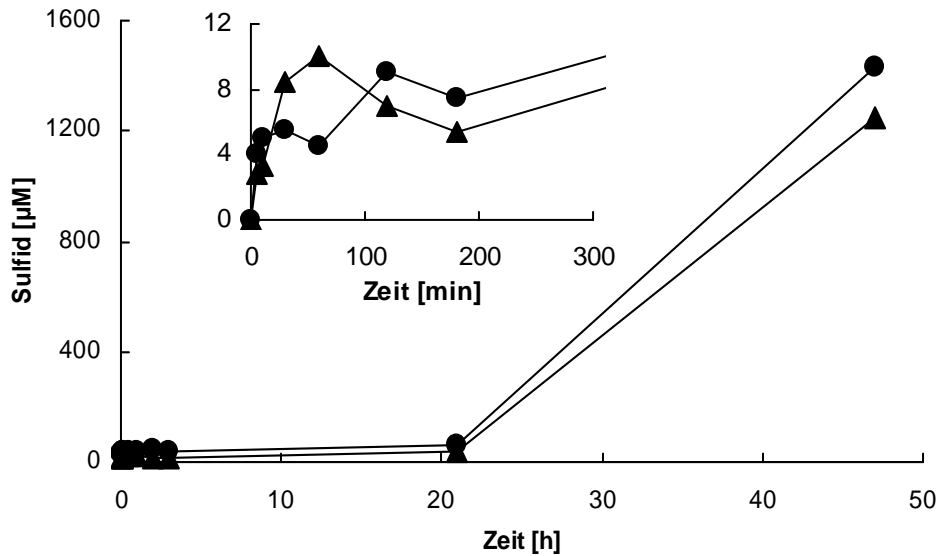


Abbildung 3-37: Sulfidbildung in dichten Zellsuspensionen von *G. sulfurreducens* aus 1 mM Cystein (●) bzw. 1 mM Cystin (▲). Die Einbettung zeigt vergrößert die ersten 300 Minuten. Die Ansätze enthielten 10 mM Acetat in Bicarbonat-gepuffertem Medium.

In Abbildung 3-38 wird die Sulfidbildung aus Cystein durch *G. sulfurreducens*-Suspensionen in Rein- und in Kokultur-Suspensionen der Reduktion von Polysulfid gegenübergestellt. Danach besteht ein großer Unterschied zwischen der Polysulfid-Reduktionsrate von $70 \mu\text{mol}/\text{mg} \times \text{min}$ einerseits und der Sulfidbildung aus Cystein andererseits, die sowohl in der Rein- als auch in der Kokultur im Bereich der Kontrolle ohne Cysteinzusatz lag.

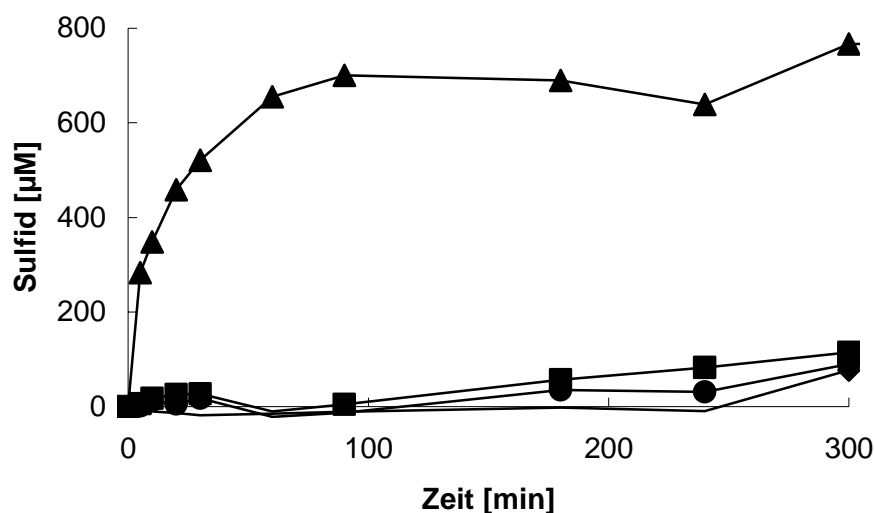


Abbildung 3-38: Bildung von Sulfid aus Cystein (1mM) in dichten Zellsuspensionen von *G. sulfurreducens* (●) bzw. in Suspensionen der Kokultur (■) und Vergleich mit der Bildung von Sulfid aus Polysulfid ($400 \mu\text{M}$) in *G. sulfurreducens* Reinkulturen (▲). Der Kontrollansatz enthielt eine *G. sulfurreducens* Zellsuspension ohne Polysulfid oder Cystein (◆). In allen Ansätzen wurden 10 mM Acetat als Elektronendonator eingesetzt.

4 Diskussion

4.1 Syntrophe Acetatoxidation durch Kokulturen von *G. sulfurreducens* und *W. succinogenes*

Die Wachstumsdaten der Kokultur, ebenso wie die der beiden Reinkulturen waren mit denen der Vorarbeiten identisch. Das syntrophe Wachstum mit Acetat und Nitrat schien nicht auf diese spezielle Assoziation beschränkt zu sein, was sich in Vorarbeiten mit *Desulfovibrio desulfuricans* anstelle von *Wolinella succinogenes* als syntrophem Partner (Cord-Ruwisch et al. 1998) andeutete. *Geobacter pelophilus* und *Geobacter bremensis*, beides nahe Verwandte von *G. sulfurreducens* (Straub et al. 1998), konnten ebenfalls mit *W. succinogenes* als Partner mit den gleichen Substraten und ähnlichen Raten kultiviert werden. Es ist anzunehmen, dass auch in diesen Assoziationen die gleichen energetischen und kinetischen Argumente gegen eine Elektronenübertragung über Wasserstoff sprechen. Gegen Wasserstoff als Elektronenüberträger spricht auch, dass keine Kultivierung mit Wasserstoff verwertenden Partnern, wie *Methanospirillum hungatei* oder *Acetobacterium woodii* möglich war. Beide Bakterienarten können Elektronen in syntrophen Interaktionen über den „interspecies hydrogen transfer“ aufnehmen (Schink 1985).

4.2 Zelluläre, exportierte Elektronenüberträger

4.2.1 Cytochrome als extrazelluläre Elektronenüberträger

G. sulfurreducens bildet Cytochrome in so großer Menge, dass die Zellen rot gefärbt erscheinen. Aus der Genomsequenz von *G. sulfurreducens* (Lloyd et al. 2003), geht hervor, dass es Gene für über einhundert verschiedene Cytochrome gibt. In verschiedenen Arbeiten wurde vor allem ein kleines lösliches Cytochrom *c*₇ betrachtet (Seeliger et al. 1998; Lloyd et al. 2003).

Mit einem neuen, modifiziertem Reinigungsschema ließen sich der für Proteine oftmals besonders kritische Schritt der hydrophoben Interaktion und das Lyophilisieren mit den in beiden Fällen auftretenden sehr hohen Salzkonzentrationen vermeiden. Das 9,6 kDa Cytochrom konnte so schonender als nach der schon etablierten Reinigungsmethodik (Seeliger et al. 1998) gereinigt werden. In der Zwischenzeit wurde eine weitere alternative Reinigung über Gelfiltration, Kationenaustauschchromatographie und Metall-Affinitätschromatographie beschrieben (Lloyd et al. 2003).

Es wird angenommen, dass dieses Cytochrom als Elektronenüberträger verschiedene Redoxkomponenten in der inneren und äußeren Zellmembran miteinander verbindet. Damit spielt es unter Umständen eine Schlüsselrolle in der Elektronenübertragung bei der Reduktion von Eisen(III). Wird das Cytochrom durch Mutagenese inaktiviert, so ist die Reduktion von Eisen(III)citrat und AQDS stark gehemmt, die Fumarat-Reduktion wird dagegen nicht beeinflusst (Lloyd et al. 2003). Das ist jedoch insofern nicht verwunderlich, als für die Fumarat-Reduktion mit Acetat nur die Enzyme des Citratzyklus benötigt werden, die entweder cytoplasmatisch oder an der Cytoplasmamembran lokalisiert sind. Eine periplasmatische Elektronenübertragung oder gar eine Abgabe der Elektronen auf einen externen Akzeptor z.B. über das Cytochrom ist dabei nicht beteiligt (Galushko und Schink 2000).

Die überwiegende Lokalisation des betrachteten c_7 Cytochroms im Periplasma, verbunden mit seiner geringen Größe von nur 9,6 kDa, ließ eine Abgabe ins Medium vermuten, die dann eine Funktion als extrazellulärer Elektronencarrier möglich machen würde. In der Tat konnten in Kulturüberständen von *G. sulfurreducens* Cytochrome in nicht unerheblichen Konzentrationen gefunden werden. Über den Sequenzvergleich des N-Terminus eines aus konzentriertem Kulturüberstand gewonnenen Cytochroms mit einer Größe von ca. 10kDa mit der des periplasmatischen 9,6 kDa Cytochroms konnte die Anwesenheit dieses Cytochroms im Kulturüberstand zweifelsfrei bestätigt werden. Dies bestätigt frühere Befunde, welche sich auf Ähnlichkeiten im Laufverhalten im SDS-Polyacrylamidgel und in der Chromatographie sowie auf ein identisches Redoxdifferenzspektrum des periplasmatischen und des Überstandscytochroms stützten (Seeliger et al. 1998). Auch in Kulturüberständen von *G. bremensis* und *G. pelophilus*, die ebenfalls Fe(III) reduzieren und mit *W. succinogenes* kokultivierbar sind, kann Cytochrom im Kulturüberstand gefunden werden (Straub und Schink 2003). Des Weiteren war bekannt, dass *G. sulfurreducens* das 9,6 kDa Cytochrom reduzieren und *W. succinogenes* es wieder reoxidieren konnte. Ebenso konnte das periplasmatische Cytochrom Eisen(III) (Ferrihydrit) reduzieren (Seeliger et al. 1998). Damit waren alle Bedingungen einer Elektronen übertragenden Funktion für das Cytochrom erfüllt. Es zeigte sich jedoch, dass die gefundenen Konzentrationen im Überstand geringer waren als ursprünglich gefunden; die eher hohen Konzentrationen von 100 – 200 nM wurden erst gegen Ende des exponentiellen Wachstums beobachtet. In Vergleich dazu waren die im Periplasma vorhandenen Mengen vergleichsweise hoch (20 nM im Kulturüberstand und 10 μ M im Periplasma). Die Diskrepanz zwischen früheren Arbeiten und den aktuellen Daten erklärt sich dadurch, dass die im Kulturüberstand gemessenen Cytochromkonzentrationen stark von der Art der Präparation abhingen. Nach Waschen der Zellen in Puffer wurde in diesem eine relativ hohe Konzentration von 200 nM nachgewiesen, was stark auf eine unspezi-

fische Abgabe unter Stressbedingungen, wie sie z.B. eine Zentrifugation für die Zellen darstellt, hindeutet. Das deckt sich ebenfalls damit, dass eine vermehrte Ausschüttung von Cytochrom ins Medium auch durch die Erhöhung der Ionenstärke, durch Zugabe von NaCl, Na₂SO₄ oder NaNO₃ zu den Reinkulturen von *G. sulfurreducens*, *G. bremensis* oder *G. pelophilus*, stimuliert werden konnte (Straub und Schink 2003). Die Abgabe von Cytochromen scheint daher eher ein unspezifischer Verlust infolge einer Stresssituation als eine gerichtete Abgabe zu sein. Das wurde ebenfalls durch die Analyse des im Überstand gefundenen Proteinmusters gestützt. Bei einer spezifischen Elektronenüberträgerfunktion des 9,6 kDa Cytochroms würde eine relativ hohe Konzentration dieses Cytochroms im Vergleich zu einer sehr geringen bzw. verschwindenden Konzentration anderer Proteine im Kulturüberstand erwartet, da man eine spezifische Abgabe des Elektronenüberträgers in das umgebende Medium erwarten würde. Wie die Analyse von konzentriertem Kulturüberstand gezeigt hat, ist das jedoch nicht der Fall. Es finden sich weitere Cytochrome und einer große Anzahl anderer Proteine im Kulturüberstand. Das Auftreten von höhermolekularen (40 und 80 kDa) Cytochromen spricht außerdem gegen eine Abgabe durch die Porine der äußeren Membran, da Proteine dieser Größe nicht durch diese Porine passen würden. In besonders hoher Konzentration trat im Kulturüberstand von *G. sulfurreducens* ein ca. 15 kDa großes Protein auf, welches nicht mit der Häm-spezifischen Färbemethode zu detektieren und daher kein *c*-Typ Cytochrom war. Eine weitergehende Analyse dieses Proteins wäre ob der beträchtlichen Konzentration interessant, wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgenommen, da auch dieses Protein keinen Einfluss auf die Elektronenübertragung in der Kokultur hatte. Wenn auch keine gezielte Abgabe von Cytochromen ins Medium gefunden wurde, so wäre doch eine Elektronen übertragende Funktion von „verlorenen“ oder z.B. durch Zellyse freigesetzten Cytochromen weiterhin denkbar, besonders wenn man annimmt, dass Bakterien am natürlichen Standort selten frei suspendiert leben, sondern meist in Biofilmen assoziiert sind. Hier könnte auch über Zellyse mit der Zeit eine relativ hohe Konzentration extrazellulärer Cytochrome erreicht werden. Gegen eine Cytochrom *c* vermittelte Elektronenübertragung sprechen jedoch auch die vergleichenden Wachstumsversuche sowie der Vergleich der Acetatoxidation mit und ohne Cytochromzugabe. Es wurde keine Stimulation des Wachstum oder der Acetatoxidation durch Zusatz von Cytochromen beobachtet. Da in diesen Versuchen konzentrierte Kulturüberstände eingesetzt wurden, konnte gleichzeitig ein Einfluss der anderen im Kulturüberstand enthaltenen Proteine, inklusive des 15 kDa Proteins, ausgeschlossen werden.

Das 9,6 kDa Cytochrom ist jedoch weiterhin von Interesse, da es in ungewöhnlich hoher Konzentration produziert wird. Des Weiteren zeigt der Vergleich mit anderen Organismen

(Champine et al. 2000; Lloyd et al. 2003), dass in vielen dissimilatorisch Eisen reduzierenden Bakterien ein solches kleines Cytochrom gefunden werden kann. So gibt es ähnliche niedermolekulare *c*-Typ Cytochrome z.B. in *Geobacter metallireducens*, *Geobacter humireducens* oder *Desulfuromonas acetoxidans* (Tab. 4-1). Auch in *G. pelophilus* und *G. bremensis* konnten im SDS-Gel Cytochrombanden mit einem Molekulargewicht bei ca. 10k Da beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 4-1: Vergleich der N-terminalen Aminosäure-Sequenzen von *c*₇ Cytochromen von *G. sulfurreducens* and *G. humireducens* (Lloyd et al. 2003), *G. metallireducens* (Afkar und Fukumori 1999; Champine et al. 2000) und *D. acetoxidans* (Bruschi et al. 1997) Aminosäurereste, die in allen Proteinen konserviert sind, sind fett gedruckt und solche, die in den *Geobacter*-Arten konserviert sind, sind unterstrichen (entnommen aus (Lloyd et al. 2003)).

<i>Geobacter sulfurreducens</i>	ALA ASP ASP ILE VAL LEU LYS <u>ALA</u> <u>LYS</u> <u>ASN</u> GLY ASP VAL LYS PHE PRO HIS
<i>Geobacter Humireducens</i>	ALA ASP SER VAL VAL TYR PRO <u>ALA</u> <u>LYS</u> <u>ASN</u> GLY ASN VAL THR PHE (N) HIS
<i>Geobacter metallireducens</i>	ALA ASP GLU LEU THR PHE LYS <u>ALA</u> <u>LYS</u> <u>ASN</u> GLY ASP VAL LYS PHE PRO HIS
<i>Desulfuromonas acetoxidans</i>	ALA ASP VAL VAL THR TYR GLU ASN LYS LYS GLY ASN VAL THR PHE ASP HIS

Dass es sich bei dem zu diesem Sequenzvergleich herangezogenen *G. sulfurreducens* Cytochrom um dasselbe handelt, wie das in dieser Arbeit betrachtete, zeigt der direkte Vergleich der Proteinsequenzen (Tab. 4-2).

Tabelle 4-2: Vergleich Proteinsequenz des „eigenen“ *c*₇ Cytochroms aus *G. sulfurreducens* mit der von Lloyd et al. (2003) publizierten. **A)** Cytochrom *c*₇ aus dieser Arbeit **B)** Cytochrom *c*₇ PpcA

A) ADDIVLKAKNGDVKFPKHAHQKAV**B**DCKKCKHEKGGPKIEGFGKEMA

B) ADDIVLKAKNGDVKFPKHAHQKAV**P**DCKKCKHEKGGPKIEGFGKEMA

A) HGKGCKGCHEEMKKGPTKCGECHKK

B) HGKGCKGCHEEMKKGPTKCGECHKK

Die beiden Sequenzen sind zu 98,6% identisch, die einzige unterschiedliche Aminosäure ist hervorgehoben. Die in dieser Arbeit verwendete Proteinsequenz wurde über direkte Sequenzierung des Proteins ermittelt, während die Sequenz von Lloyd et al. (2003) aus der Gensequenz rückübersetzt wurde, möglicherweise verwendet *G. sulfurreducens* einen genetischen Code der

nicht völlig mit dem übereinstimmt, der zur Ableitung der Proteinsequenz aus dem Gen verwendet wurde.

Besonders interessant ist, dass bei *D. acetoxidans* dem kleinen Cytochrom auch eine Schlüsselrolle bei der Schwefelreduktion zukommt (Ambler und LeGall 1971; Banci et al. 1996; Pereira et al. 1997). Damit lässt sich eine ähnliche Funktion bei der Schwefel- und evtl. auch bei der Cystin-Reduktion auch bei *G. sulfurreducens* vermuten. Die Klärung eines solchen Zusammenhangs setzt jedoch weitergehende molekularbiologische Untersuchungen voraus und wurde in diese Arbeit nicht aufgegriffen. Die Bedeutung niedermolekularer Cytochrome in der intrazellulären Elektronenübertragung in *G. sulfurreducens* ist weiterhin ungeklärt und sollte als Ansatzpunkt für weiterführende Arbeiten in Betracht gezogen werden.

4.2.2 *Einfluss von AQDS als Modellsubstanz für Huminsäuren*

Häufig im Zusammenhang mit der dissimilatorischen Eisenreduktion diskutierte extrazelluläre Elektronenüberträger sind die Huminstoffe (Lovley et al. 1996b). Dies sind hochmolekulare Assoziationen aus unterschiedlichen, oft schwer abbaubaren Substanzen. In diesen Assoziationen können auch redoxaktive Komponenten (häufig sind Chinone) enthalten sein. Huminstoffe sind weit verbreitet und können in huminstoffreichen Sedimenten auch als terminaler Elektronenakzeptor für die anaerobe Oxidation organischer Substanzen und Wasserstoff dienen. In Laborexperimenten werden die Huminstoffe selten direkt verwendet, meist werden sie durch die Modellsubstanz AQDS ersetzt. Auch in dieser Arbeit wurde AQDS als Modell für Huminstoffe eingesetzt. Die Eisenreduktion durch *G. metallireducens* ist durch Zugabe von AQDS stark zu stimulieren. Damit ergibt sich ein Modell der Huminstoff-vermittelten Eisenreduktion (Abb. 4-1).

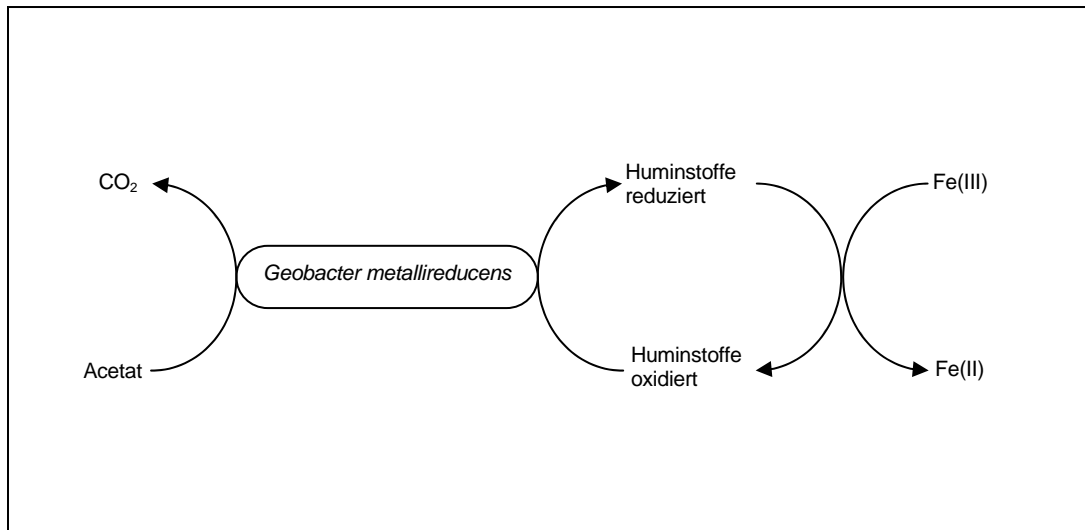


Abbildung 4-1: Modell für den Mechanismus durch den Huminsäuren die Eisen(III)reduktion durch *G. metallireducens* stimulieren (nach (Lovley et al. 1996b)).

Diese Hypothese geht davon aus, dass das praktisch unlösliche Eisen(III) nicht direkt von z.B. *Geobacter metallireducens* reduziert wird, sondern dass Huminstoffe als extrazelluläre Elektronenüberträger fungieren. Auch bei *G. sulfurreducens* wird die Rate der Eisen(III)Reduktion stark gesteigert (Lloyd et al. 1999). Dass AQDS von *G. sulfurreducens* dabei reduziert wird, ist an einem deutlichen Farbumschlag im Testansatz von hellgelb (AQDS) nach dunkelbraun (AHQDS) zu beobachten. Aufgrund dieser Befunde lag eine Funktion von AQDS als extrazellulärer Elektronencarrier in der Kokultur mit *W. succinogenes* natürlich nahe. Des Weiteren kann *W. succinogenes* anscheinend auch AHQDS mit Nitrat oder Fumarat reoxidieren (Lovley et al. 1999). Auch eine AQDS-abhängige Acetatoxidation in Suspensionen aus *G. metallireducens* und *W. succinogenes* wurde beschrieben (Lovley et al. 1999). Ähnliches konnte in dieser Arbeit mit *G. sulfurreducens* und *W. succinogenes* nicht beobachtet werden. In Kokultursuspensionen war zwar ein schneller Farbumschlag von gelb nach dunkelbraun zu beobachten, es konnte jedoch nie eine signifikante Acetatoxidation mit oder ohne AQDS-Zugabe beobachtet werden. Die Kokultur wuchs auch bei Zugabe von AQDS nicht. In keinem Fall war das Wachstum der Kokultur oder die Acetatoxidation durch AQDS stimulierbar. AQDS ist also zumindest für die Kokultur *G. sulfurreducens* mit *W. succinogenes* als extrazellulärer Elektronenüberträger auszuschließen. Eine Reoxidation des AHQDS in der Kokultur war dieser Arbeit in den Zellsuspensionsversuchen in keinem Fall, auch nicht unter Acetat-limitierten Bedingungen, zu beobachten. Daher muss vermutet werden, dass *W. succinogenes* entgegen der bei Lovley et al. (1999) postulierten Hypothese, doch nicht in der Lage ist AHQDS zu oxidieren und damit Wachstum in syntropher Kokultur mit AQDS als Elektronenüberträger zu ermöglichen.

4.2.3 Chinone als extrazelluläre Elektronenüberträger

Chinone sind wichtige zelluläre Elektronenüberträger in Pflanzen und Bakterien. Da sie meist mit einer Lipidseitenkette in der Zellmembran verankert sind, dienen sie in erster Linie zur Elektronenübertragung über die Membran bzw. zwischen membrangebundenen bzw. assoziierten Redoxkomponenten. Es gibt jedoch auch Chinone, denen dieser Membrananker fehlt und die somit wasserlöslich sind. Ein Beispiel ist das Menadion (Vitamin K₃). Eine solche wasserlösliche chinoide Verbindung mit niedrigem Molekulargewicht könnte von den Bakterien exportiert und dann als extrazellulärer Elektronenüberträger genutzt werden. In der Tat wurden bei *Shewanella oneidensis* Mutanten erzeugt, die nicht mehr in der Lage waren, wie der Wildtyp AQDS zu reduzieren (Newman und Kolter 2000). Es zeigte sich weiterhin, dass diese Mutanten einen Defekt in der Menachinonbiosynthese aufwiesen. In Kulturüberständen des Wildtyps von *Shewanella oneidensis* wurde eine chinoide Substanz gefunden und es zeigte sich, dass diese Substanz von den Mutanten nicht ausgeschüttet wurde. Diese Mutanten konnten jedoch wieder AQDS reduzieren, wenn die chinoide Substanz von außen ins Medium zugesetzt wurde. Daraus wurde gefolgert, dass ins Medium ausgeschiedene Chinone die Elektronen auf externe Elektronenakzeptoren übertragen können.

Sowohl *G. sulfurreducens* als auch in *W. succinogenes* besitzen Chinone. Somit drängte sich die Frage auf, ob auch hier einer der beiden Partner chinoide Substanzen in das Medium abgibt um einen extrazellulären Elektronenüberträger zur Verfügung zu stellen. Es konnte tatsächlich eine unbekannte Substanz aus Überständen extrahiert werden, die ein ungewöhnliches UV-Spektrum aufwies. Dieses Spektrum hatte jedoch keine Ähnlichkeit mit dem als Standard verwendeten Vitamin K₂. Interessant war jedoch, dass diese Substanz auch in den Zellen der Kokultur zu detektieren war. Damit konnte es sich um eine exportierte, potentielle Elektronenüberträgersubstanz handeln. Allerdings war die gleiche Substanz auch im Kontrollexperiment mit Kulturüberstand aus *Pseudomonas stutzeri* Kulturen zu finden. Damit wird es unwahrscheinlich, dass es sich bei der gefundenen Substanz um eine speziell für den Elektronentransport abgegebene Substanz handelt, da *P. stutzeri*, unter den gegebenen Bedingungen, keine Elektronen nach außen abgeben muss. Eine Funktion als externer Elektronenüberträger ist hier nicht notwendig. Daher handelt es sich bei der gefundenen Substanz wahrscheinlich um ein, zum jetzigen Zeitpunkt nicht näher zu spezifizierendes Abbauprodukt bzw. um einen bisher unbemerkten Medienbestandteil. Es bleibt jedoch anzumerken, dass damit eine chinoide Elektronen übertragende Substanz nicht völlig ausgeschlossen ist. Mit den hier eingesetzten Methoden wurden jedoch keine Hinweise auf die Anwesenheit einer solchen Substanz im Kulturüberstand der Kokultur

gefunden. Es ist denkbar, dass mit einem anderen Extraktionsverfahren, welches z.B. speziell für wasserlösliche Verbindungen angepasst ist, solche Substanzen nachgewiesen werden könnten. Einige Befunde (A. Galushko, pers. Mitteilung) weisen darauf hin, dass auch ohne Zusatz von Cystein ein, wenn auch sehr langsames, Wachstum beobachtet werden kann. In diesem Zusammenhang war die Untersuchung des intrazellulären Chinonmusters interessant, da es Hinweise darauf gab (A. Galuschko, pers. Mitteilung), dass in der Kokultur ein anders Chinonmuster verwendet würde als in der Reinkultur. Chinone, die ausschließlich in der Kokultur auftreten, wären sowohl im Hinblick auf die intrazellulären Elektronentransportmechanismen als auch für die Betrachtung der Elektronenabgabe nach außen von Bedeutung. Wäre es möglich, solche Chinone zu charakterisieren, so könnte gezielt versucht werden, diese auch im Kulturüberstand zu detektieren. Der Vergleich der massenspektroskopischen Analyse ergab jedoch, dass die dominanten Chinone der beiden Reinkulturen auch in der Kokultur dominierten. Fast alle Signale in der Kokultur konnten eindeutig Signalen in den Reinkulturen zugeordnet werden. So war die Kokultur vor allem durch das Menachinon-8 aus *G. sulfurreducens* und das Menachinon-6 aus *W. succinogenes* charakterisiert, auch das Menachinon-9 aus *G. sulfurreducens* war zu identifizieren. Es gab jedoch auch einige Veränderungen. So traten neue Substanzen auf, die in den Reinkulturen nicht zu beobachten waren, und andere Substanzen verschwanden. Zum Beispiel war das Menachinon-4 aus *W. succinogenes* in der Kokultur nicht mehr nachzuweisen. Eine Aufstellung ist in Tabelle 4-3 gegeben.

Tabelle 4-3: Aufstellung der Unterschiede im Signalmuster der Massenspektrogramme der beiden Reinkulturen und der Kokultur. Angegeben sind jeweils die Signale, die ausschließlich im entsprechenden Chromatogramm auftraten und keine Entsprechung in den anderen Chromatogrammen hatten. Bis auf das Menachinon-4 in *W. succinogenes* konnte keine dieser Substanzen anhand der eingesetzten Standards identifiziert werden.

Substanzen [M/Z] nur in der Kokultur nachweisbar	Substanzen [M/Z] nur in <i>G. sulfurreducens</i> nachweisbar	Substanzen [M/Z] nur in <i>W. succinogenes</i> nachweisbar
531,7	551,2	445,5 (MK4)
593,5	605,5	583,8
625,0	649,5	
675,7	703,7	
	788,0	

Eine spezifische Bedeutung dieser Veränderungen für den extrazellulären Elektronentransport in der Kokultur ist jedoch fraglich, da die Konzentrationen im Vergleich zu den Hauptchinonen sehr gering sind. Weitere Experimente wären notwendig, um die Bedeutung dieser Substanzen für die Bakterien genauer beurteilen zu können, und um auszuschließen, dass es sich um Verun-

reinigungen handeln könnte. Da sich letztlich ein anderer extrazellulärer Elektronenüberträger fand, wurde von weiterführenden Experimenten in diesem Zusammenhang Abstand genommen. Eine Identifizierung dürfte sich auch deshalb als schwierig erweisen, weil diese Substanzen nicht den Massen der Substanzen der verwendeten Chinon-Standardreihe zugeordnet werden können.

4.3 Cystein/Cystin-Paar als Elektronenüberträger

Im der vorliegenden Arbeit wurde das Cystin/Cystein-Redox Paar als der extrazelluläre Elektronenüberträger identifiziert, der in der syntrophen Acetatoxidation durch *Geobacter sulfurreducens* /*Wolinella succinogenes*-Kokulturen benutzt wird. Cystein erfüllt alle notwendigen Voraussetzungen für einen Elektronencarrier in dieser Kokultur: es ist im Medium mit relativ hohen Konzentrationen verfügbar, aufgrund seiner geringen Größe sollte es die äußere Membran von Gram-negativen Bakterien leicht passieren können und es wird von dem einen Partner reduziert sowie von dem zweiten Partner oxidiert.

Es wurde gezeigt, dass die Wirkung des Cysteins nicht darauf beruht, das Medium zu reduzieren, obwohl es ursprünglich zu diesem Zweck eingesetzt wurde. Mit anderen Reduktionsmitteln wie Ascorbat oder DTT können ähnliche reduzierte Bedingungen geschaffen werden. Ein Wachstum der *G. sulfurreducens*/ *W. succinogenes*-Kokultur blieb jedoch aus. Für DTT muss eine toxische Wirkung in Betracht gezogen werden, da auch die *G. sulfurreducens*-Reinkultur in DTT-reduziertem Medium im Wachstum gehemmt war. In Ascorbat reduziertem Medium wuchsen jedoch sowohl *G. sulfurreducens*- als auch *W. succinogenes*-Reinkulturen bei Zugabe einer alternativen Schwefelquelle gut. Zusätzlich konnte das Wachstum der Kokultur in Ascorbat-reduziertem Medium durch Zugabe von katalytischen Mengen Cystein ausgelöst werden. Dies spricht dafür, dass sich das Medium auch mit Ascorbat optimal reduzieren ließ. Cystein musste also in anderer Weise für das Wachstum essentiell sein. Der anfängliche Redoxzustand des Mediums scheint keine große Rolle zu spielen, da eine Kultivierung auch in unreduziertem anoxischem Medium möglich war. Auch war Cystein problemlos durch seine oxidierte Form Cystin zu ersetzen. Die Tatsache, dass sowohl Cystein als auch Cystin verwendbar war, war auch ein erster Hinweis auf einen Reduktions – Oxidations Kreislauf und damit auf eine Elektronenübertragung. Dafür sprach auch, dass relativ geringe Konzentrationen von unter 100 μM , ausreichten um ein normales Wachstum zu ermöglichen.

Das Verfolgen des Konzentrationsverhältnisses von Cystin zu Cystein während des Wachstums zeigte in allen Fällen, dass die Konzentration von Cystein in der wachsenden Kultur sehr gering

war, also der Elektronencarrier fast vollständig oxidiert vorlag. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Gesamtreaktion ist damit wahrscheinlich die Acetat-abhängige Cystinreduktion durch *G. sulfurreducens*. Die Konzentration des Cysteins blieb immer auf einem sehr geringen, aber messbaren Niveau, welches von der eingesetzten Cystein resp. Cystin-Menge abzuhängen schien. Bei äquivalenter Menge stellte sich dieser Wert sowohl bei Zugabe von Cystein zu Beginn des Versuches als auch beim Start mit Cystin ein. Das Auftreten eines solchen „steady-state“ Zustandes zeigt, dass während des Wachstums sowohl Cystein-Oxidation als auch Cystin-Reduktion stattfanden und sich beide Prozesse die Waage hielten. Das ist ein deutlicher Hinweis auf einen zyklischen Prozess. Am Ende des Wachstums ging die Konzentration dann komplett auf einen Wert unterhalb der Detektionsgrenze zurück, was auf die in diesen Versuchen vorherrschenden Acetat-limitierten Bedingungen zurückführbar ist, da zu berücksichtigen war, dass ein Teil des Acetats zum Zellmasseaufbau genutzt wurde.

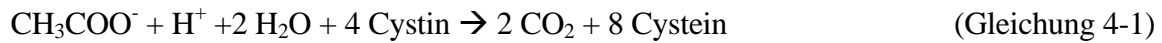
Eine besondere Eigenschaft des Cystins ist seine geringe Löslichkeit, in Konzentrationen von mehr als 400 – 500 μM fällt Cystin bei neutralem pH-Wert aus. Die geringe Löslichkeit von Cystin könnte der Grund sein, warum die Zugabe von Cystein oder Cystin in höherer Konzentration die Reaktionsrate nicht weiter steigerte. Dies könnte auch der Grund sein, warum ein schnelles Recycling des Carriers in der syntrophen Interaktion notwendig ist und Cystin nicht in der *G. sulfurreducens*-Reinkultur als terminaler Elektronenakzeptor nutzbar war.

In der Reinkultur ist die Rate der Cystinreduktion sehr gering, da dieses für die Bakterien kaum zugänglich ist. Allerdings ist die Funktion von Disulfiden wie Cystin oder anderen Thiolverbindungen als Elektronenakzeptor für verschiedene Eubacteria und Archaea beschrieben (Hedderich et al. 1999), besonders für *Desulfuromonas acetoxidans* (Pfennig und Biebl 1976), einen nahen Verwandten von *G. sulfurreducens* (Caccavo et al. 1994).

Cystein-Zugabe in geringen Konzentrationen unterstützte Wachstum oder Acetatoxidation mit abnehmender Rate, wahrscheinlich aufgrund von Cystein-Assimilation: unter der Annahme, dass 1 % der Gesamtzellmasse Schwefel ist (Schlegel 1992) und dass der Gesamtzellertrag der Kokultur bei $18 \text{ g} \times (\text{mol Acetat})^{-1}$ liegt (Cord-Ruwisch et al. 1998), würden in unseren Experimenten ca. 60 μM Cystein für die Zellmassebildung aufgenommen. Das führt zu einer Verknappung des zur Verfügung stehenden Elektronencarriers.

4.3.1 Energetische Betrachtungen

Mit Cystein als Elektronencarrier würde die Acetatoxidation durch *G. sulfurreducens* in der Kokultur der folgenden Gleichung folgen:



Unter Standardbedingungen liegt das Redoxpotential des Cystin/Cystein Paares bei -348 mV , und damit negativer als das Standardredoxpotential des $\text{CO}_2/\text{Acetat}$ Paares bei -290 mV (berechnet aus den freien Bildungsenthalpien, Werte aus (Thauer et al. 1977)). Damit ist die Gesamtreaktion unter Standardbedingungen endergon ($\Delta G^\circ = +44.3 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$). Das Redoxpotential des Cystin /Cystein Paares hängt jedoch stark von den realen Konzentrationen ab (Abb. 4-2), da bei der Reduktion eines Cystins zwei Moleküle Cystein gebildet werden. Mit Cystein und Cystin, beide bei einer Konzentration von $50 \mu\text{M}$ wie in den Versuchsansätzen im Kulturmedium vorgegeben, liegt das Gleichgewichts-Redoxpotential bei -219 mV . Im Vergleich dazu verschiebt sich das Redoxpotential des $\text{CO}_2 / \text{Acetat}$ Paares unter den in der Kultur vorherrschenden Bedingungen (10 mM Acetat; 0.3 atm CO_2) nur gering auf -283 mV . Unter diesen Bedingungen ist die Acetatoxidation mit Cystin exergon mit $\Delta G' = -49 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$ und liefert gerade genug Energie, um $2/3 \text{ mol}$ ATP pro Mol Acetat zu bilden. Das Redoxpotential von -219 mV ist im Bereich des in Acetat oxidierenden Kokulturen gemessenen Gesamtredoxpotentials, welches normalerweise zwischen -170 und -230 mV lag. Das stützt die Hypothese, dass dieses Paar als Elektronenakzeptor in der Acetat Oxidation durch *G. sulfurreducens* genutzt werden kann.

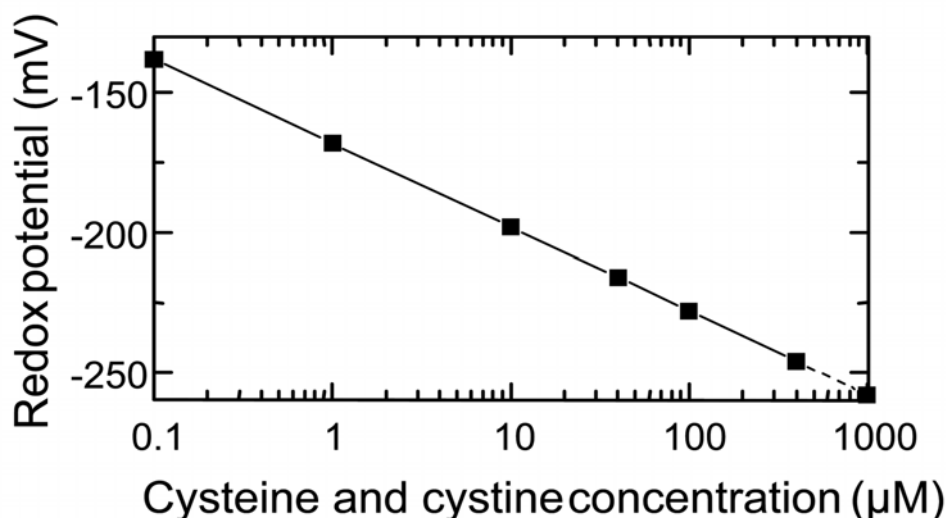


Abbildung 4-2: Redoxpotential des Cystin / Cystein Paares bei steigender Konzentration. Die Werte wurden für jeweils equimolare Konzentrationen von Cystein und Cystin bei einem pH-Wert von 7,0 und

einem Standardredoxpotential von -348 mV berechnet. Werte über 400 μM sind nur von theoretischer Bedeutung, da Cystein unter den gegebenen Bedingungen in wässrigen Lösungen ausfällt.

Vergleichbar der Situation mit dem Protonen / Wasserstoff Paar im “interspecies hydrogen transfer” (Schink 1997) kann das Redoxpotential des Cystein/Cystin Paares weiter beeinflusst werden, indem die reduzierte Form durch *W. succinogenes* entfernt wird. Bei $E_h = -200$ mV, würde das berechnete Konzentrationsverhältnis bei 99.64 μM Cystin zu 0.34 μM Cystein liegen. Offensichtlich wurde Cystein in der Kokultur sehr effizient oxidiert und es konnten keine freien Thiolgruppen detektiert werden, sogar unter Elektronenakzeptor-limitierten Bedingungen. Die freie Energie der Reaktion wird unter diesen Bedingungen auf einen Wert von $-66 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$ weiter verschoben.

4.3.2 Kinetische Betrachtungen

Das vielleicht wichtigste Argument gegen eine essentielle Rolle von Wasserstoff als Elektronencarrier in dieser Kokultur war, dass mit der ungewöhnlich geringe Wasserstoffkonzentration, die in der Kokultur gemessen wurde, nur weniger als 0,01% des totalen Elektronenflusses erklärbar war (Cord-Ruwisch et al. 1998). Cystein in einer Konzentration von 100 μM hat bei der gleichen Zelldichte in der Kultur eine Elektronentransportkapazität von $123 \mu\text{M} \times \text{min}^{-1}$ (Diffusionskoeffizient: $7.962 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \times \text{s}^{-1}$, berechnet nach (Schwarzenbach et al. 1993)). Damit lässt sich ungefähr 70 % des Gesamtelektronentransfers zwischen beiden Partnern erklären.

4.3.3 Biochemische Aspekte

Eine syntrophe Acetatoxidation in Kokultursuspensionen konnte nur in Anwesenheit von Cystein oder Cystin beobachtet werden, wobei schon geringe Zugaben von 100 μM Cystein ausreichten, um die maximale Rate der Acetatoxidation zu erreichen. Es wurde gezeigt, dass sowohl *G. sulfurreducens* Cystin reduzieren als auch *W. succinogenes* Cystein oxidieren konnte. Mischsuspensionen aus den beiden Reinkulturen oxidierten dabei Acetat mit der gleichen Rate wie Kokultursuspensionen. Daher muss davon ausgegangen werden, dass alle für die syntrophe Acetatoxidation notwendigen Enzyme bereits in den Reinkulturen aktiv sind. Im Falle einer Induktion hätte man ein verzögertes Einsetzen der Acetatoxidation erwartet. Speziell für die syntrophe Acetatoxidation synthetisierte Enzyme sind in dieser Kokultur damit unwahrscheinlich, was überrascht, da die Verwendung von Cystein als Überträger relativ spezifisch zu sein scheint. Es sei allerdings angemerkt, dass auch die Vorkulturen für diese Versuche in

Cystein reduziertem Medium kultiviert wurden und damit quasi eine Vorkultivierung mit dem potentiellen Überträger gegeben war. Für zukünftige Experimente sollte eine Vorkultivierung ohne Cystein in Betracht gezogen werden.

Die Reduktion von Cystin durch *G. sulfurreducens* wurde durch Acetat stimuliert, wenn die Zellen unter Elektronenlimitierung vorinkubiert wurden. Unerwarteterweise wurde eine hohe Hintergrundrate beobachtet. Wahrscheinlich ist diese auf Speicherstoffe in den Zellen zurückzuführen. Dies machte eine exakte Bestimmung der Stöchiometrie der Acetat-abhängigen Cystinreduktion schwierig. In Kokultur-Experimenten konnte eine Abhängigkeit der Cystinreduktion von der Anwesenheit von Acetat deutlich gezeigt werden. Nachdem die Zellen mit Nitrat ohne Acetat vorinkubiert waren, wurde nur nach Acetatzugabe eine Cysteinbildung beobachtet. Diese Cystinreduktion war ca. doppelt so schnell wie in Ansätzen ohne Nitrat-Vorinkubation. Das lässt vermuten, dass das von den Bakterien gebildete Cystin für die Bakterien besser verfügbar ist als von außen zugegebenes Cystin. Die dabei gemessenen Raten sind jedoch allesamt relativ gering. So lag die Rate der Cystinreduktion durch *G. sulfurreducens* nur im Bereich von $3 - 5 \text{ nmol} \times \text{mg (Protein)}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ und damit viel zu niedrig, um eine Acetatoxidationsrate von $200 - 250 \text{ nmol} \times \text{mg (Protein)}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ zu erklären. Wenn man in Betracht zieht, dass pro mol oxidiertem Acetat 8 mol Elektronen übertragen werden müssen, so würde man eine Cystinreduktionsrate von ca. $800 \text{ nmol} \times \text{mg (Protein)}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ erwarten. Eine mögliche Erklärung dafür liegt in der oben erwähnten Verschiebung des Redoxpotentials mit steigender Konzentration und der weiteren starken Verschiebung durch die Verschiebung des Konzentrationsverhältnisses vom reduzierten Cystein zum oxidierten Cystin. Es wurde gezeigt, dass Wasserstoff als alternativer Elektronendonator für die Cystinreduktion genutzt werden konnte. Ähnliches ist für Experimente zur Eisenreduktion beschrieben (Lloyd et al. 2003). Der Einsatz von Wasserstoff bietet sich an, da die Elektronen so über die Hydrogenase direkt an der Membran in die Elektronentransportkette eingeschleust werden. Damit sollten möglichst viele vorgeschaltete Elektronentransportschritte umgangen werden, um direkt die Cystin-Reduktase zu untersuchen. Ein weiterer Vorteil von Wasserstoff als Elektronendonator ist das niedrige Redoxpotential, auf dem die Elektronen anfallen, so dass die Cystinreduktion mit Wasserstoff erst ab einer Konzentration von 8 mM Cystein endergon wird. Die gemessenen Raten der Cystinreduktion mit Wasserstoff waren jedoch ebenfalls sehr gering und entsprachen denen mit Acetat als Elektronendonator oder ohne Zugabe eines externen Donors, also nur mit den schon im System enthaltenen Elektronen. Zusätzlich zeigte sich, dass die höchste Reduktionsaktivität nicht wie erwartet membranständig, sondern überraschenderweise cytoplasmatisch lokalisiert war. Diese Befunde, verbunden mit der sehr niedrigen Aktivität, geben zu der Vermutung Anlass, dass die hier beobachtete Aktivi-

tät nicht direkt mit der Cystin-Reduktion im Zuge der syntrophen Acetatoxidation in Zusammenhang steht. Vielmehr handelt es sich wahrscheinlich um einen Prozess, der für reduzierte Bedingungen im Cytoplasma der Bakterien sorgt. Der artifizielle Elektronenakzeptor DTNB dagegen wird an der Membran reduziert und das mit einer um einen Faktor 10 höheren Rate. Genau eine solche Aktivität würde man für die Cystin-Reduktion erwarten. Eine Aktivität diese Größenordnung konnte mit Cystein in dieser Arbeit nicht beobachtet werden. Es bleibt damit offen, ob es sich hierbei um die gesuchte Reduktase handelt oder nicht. Es wäre denkbar, dass die Aktivität einer solchen Reduktase z.B. durch erhöhte Cystin-Konzentrationen gehemmt wird und diese Hemmung durch DTNB umgangen wird. Ebenso ist es allerdings auch möglich, dass kein Zusammenhang zur Cystin-Reduktion besteht. Um diese Frage abschließend zu beantworten, sind weitere Experimente notwendig.

4.4 Andere Thiole

Für die betrachtete Kokultur *G. sulfurreducens*/*W. succinogenes* konnte das Cystin/Cystein-Paar zweifelsfrei als Elektronenüberträger nachgewiesen werden. Eine Cysteinkonzentration (50 – 100 μ M) wie in den hier durchgeführten Experimenten wird jedoch in den meisten natürlichen Systemen schwerlich erreicht. Eine Elektronen übertragende Funktion anderer Substanzen musste daher angenommen werden. Die Aktivität wichtiger anderer potentieller Überträger-substanzen wie z.B. Cytochrome oder chinoide Verbindungen inklusive der Huminstoffmodell-substanz AQDS wurde im Vorfeld ausgeschlossen bzw. konnte nicht bestätigt werden. Daher kommt anscheinend der redoxaktiven SH-Gruppe im Cystein eine wichtige Bedeutung zu. Alternative Überträger sollten also, vergleichbar dem Cystein, eine solche SH-Gruppe besitzen. Keine der untersuchten Thiolverbindungen hatte jedoch eine dem Cystein vergleichbare Wirkung, mehr noch zeigte sich ein deutlich hemmender Effekt auch auf das Wachstum der *G. sulfurreducens*-Reinkultur. Aussagen über die Ursache dieser Effekte sind schwer, da viele dieser Substanzen sehr reaktiv sind und somit toxische Effekte auf die Bakterien in Betracht gezogen werden müssen, die nicht in direktem Zusammenhang mit der Elektronenübertragung in der syntrophen Acetatoxidation stehen. Interessant ist jedoch, dass die sehr strukturnahen Verbindungen D-Cystein und DL-Homocystein keine wachstumsstimulierende Wirkung zeigen. Das bestätigt zum einen, dass es sich bei der Elektronenübertragung über das Cystin/Cystein-Paar um enzymkatalysierte Prozesse handelt, da eine rein chemische Redoxreaktion nicht zwischen D- und L-Cystein diskriminieren sollte. Zum anderen könnte die Wachstumshemmung auf eine Interaktion der D-Cysteins mit dem Enzymapparat hindeuten, der eine Inaktivierung der am Elektronentransport beteiligten Enzyme zur Folge hat.

Die Elektronenübertragung über das Cystin/Cystein-Paar scheint somit sehr spezifisch zu sein, jedoch kann diese Spezifität nicht zweifelsfrei der Redoxreaktion zugeordnet werden. Viele der anderen getesteten thiolhaltigen Substanzen zeigten eine Wachstumshemmung, eine potentielle Elektronenüberträgerkapazität diese Substanzen könnte daher durch toxische Effekte an anderer Stelle überdeckt worden sein.

4.5 Das Sulfid/Schwefel-Paar als Elektronenüberträger

Die einzige Substanz, die alternativ zum Cystein das Wachstum der Kokultur stimulierte, war Sulfid. Dabei wurden während des Wachstums das Auftreten und die Wiederauflösung von Schwefelkugeln beobachtet. Ein „Interspecies electron transfer“ durch einen Schwefel/Sulfid-Zyklus wurde für *Desulfuromonas acetoxidans* beschrieben (Biebl und Pfennig 1978). Hierbei wird die Acetatoxidation über einen Elektronentransfer zu dem phototrophen grünen Schwefelbakterium *Chlorobium limicola* gekoppelt (Biebl und Pfennig 1978). Dieser Elektronentransfer arbeitet mit Sulfidkonzentrationen von 53 – 92 μM (Biebl und Pfennig 1978). Die Acetatoxidation in *G. sulfurreducens* verläuft durch den Citrat-Zyklus (Mikoulinskaia et al. 1999; Galushko und Schink 2000), was ebenso für die Acetatoxidation durch *D. acetoxidans* gilt (Thauer 1988). Sulfidoxidation durch *W. succinogenes* wurde in der Vergangenheit beschrieben (Macy et al. 1986) und eine Sulfid-Dehydrogenase, welche die reversibel Sulfidoxidation und Schwefelreduktion katalysiert, wurde isoliert (Schröder et al. 1988). Das $\text{S}^0/\text{H}_2\text{S}$ -Paar mit einem Standard-Redoxpotential von -240 mV repräsentiert eine brauchbare Alternative zum Cystin/Cystein Paar für unsere Kokultur, auch vom energetischen Blickwinkel.

Betrachtet man die kinetischen Eigenschaften, so ist Sulfid, aufgrund seiner geringen Größe und des dadurch doppelt so großen Diffusionskoeffizienten ($1,39 \times 10^{-5}\text{ cm}^2 \times \text{s}^{-1}$; Nelson et al. 1986) als Elektronenüberträger sogar besser geeignet als Cystein. Mit einer Konzentration von $100\ \mu\text{M}$ Sulfid lassen sich $210\ \mu\text{M}$ Elektronen pro Minute übertragen, das entspricht, bei einer Acetat-Oxidationsrate von $21,6\ \mu\text{M} / \text{min}$ einer theoretischen Transportkapazität von 120 %. Damit könnte der gesamte Elektronenfluss erklärt werden.

Ähnlich der Situation mit Cystein/Cystin wurde in der Kokultur eine Acetat-abhängige Sulfidbildung beobachtet. Auch die Nitrat-abhängige Sulfidoxidation konnte gezeigt werden. Hierbei zeigte sich, wie schon mit Cystin beobachtet, eine hohe Hintergrundaktivität. Auch ohne

Acetat reduzieren *G. sulfurreducens*-Reinkulturen und Kokulturen Polysulfid mit hoher Rate. Das kann wiederum auf die vorhandenen Speicherstoffe zurückgeführt werden. In der Kokultur konnte die Acetat-Abhängigkeit wiederum dadurch nachgewiesen werden, dass in einer Kultur, welche zuvor Sulfid mit einer limitierten Konzentration Nitrat oxidiert hatte, nach Acetatzugabe eine Sulfidbildung beobachtet werden konnte.

Cystein spielt in intrazellulären Elektronentransportproteinen eine essentielle Rolle. So wird z.B. speziell in *c*-Typ Cytochromen die Häm-Gruppe über spezielle Häm-Bindungsmotive am Protein verankert; diese Bindungsmotive enthalten jeweils zwei Cysteine. Man kann also von einem intensiven Cystein-Metabolismus gerade in einem Bakterium wie *G. sulfurreducens* ausgehen, welches eine so große Zahl an Cytochromen enthält. Daraus folgt die Annahme, dass vielleicht Cystein gar nicht als Elektronenüberträger genutzt wurde, sondern dass vielmehr, z.B. im Zuge des Cystein-Metabolismus der Zellen, zuerst die Sulfidgruppe abgespalten wurde und dann auch bei Cystein- oder Cystinzugabe eigentlich immer ein Schwefel/Sulfid-Kreislauf vorlag. Dafür sprachen gleich mehrere Beobachtungen. Erstens konnte in stationären Kokulturen eine beträchtliche Sulfidkonzentration gemessen werden. Zweitens war die Sulfidbildungsrate mit $30 - 40 \text{ nmol} \times (\text{mg Protein})^{-1} \times \text{min}^{-1}$ mehr als doppelt so hoch wie die Rate der Bildung von Cystein ($6 - 22 \text{ nmol} \times (\text{mg Protein})^{-1} \times \text{min}^{-1}$). Drittens würden sich damit auch die Schwierigkeiten erklären, eine Cystin-Reduktase Aktivität im Zellextrakt von *G. sulfurreducens* zu lokalisieren. Dazu kam die methodische Unzulänglichkeit des Thiolgruppentests, der auch mit Sulfid reagierte und somit die Gefahr falsch positiver Cysteinmessungen bestand.

Die Untersuchung zeigte jedoch, dass eine signifikante Sulfidbildung aus Cystein erst nach 20 – 50 Stunden auftrat. Im dem Zeitraum, in dem typischerweise 10 mM Acetat in der Kokultur oxidiert wurde (max. 5 h), war die Sulfidkonzentration immer unter 10 μM , zu wenig um damit eine ausreichende Elektronenübertragung erklären zu können. Es kann also davon ausgegangen werden, dass eine Elektronenübertragung sowohl über das Cystin/Cystein-Paar als auch über das Schwefel/Sulfid-Paar möglich ist. Weitere Arbeiten sind notwendig um zu überprüfen, ob die Enzyme, welche die Cystinreduktion und die Cysteinoxidation in der *G. sulfurreducens* / *W. succinogenes* Kokultur katalysieren, zu denen in Beziehung stehen, die im Elektronentransfer durch den Schwefel/Sulfid-Kreislauf aktiv sind.

4.6 Ökologische Aspekte

Natürlich ist das hier untersuchte System eher artifiziell. Die nitratabhängige Acetatoxidation ist eigentlich nicht auf eine syntrophe Interaktion zweier verschiedener Bakterien angewiesen, und Cystein wird an natürlichen Standorten kaum in Konzentrationen größer als 10 μM vorkommen. Ungeachtet dessen kann diese Kooperation als Modell für eine syntrophe Interaktion angesehen werden, in der eine Elektronenübertragung durch einen anderen Überträger als Wasserstoff katalysiert wird.

Auch wenn die Acetatoxidation in unseren Kokulturen von Cystein abhängt, so wurde dennoch Acetat auch in Cystein-freien Zellsuspensionen oxidiert, wenn auch mit sehr geringer Rate (A. Galuschko, pers. Mitteilung). Somit kann letztlich auch die Rolle eines exportierten Elektronenüberträgers nicht völlig ausgeschlossen werden. Am natürlichen Standort sollte der Hauptteil der Elektronen jedoch über das Schwefel/Sulfid-Paar übertragen werden, da an den meisten anoxischen Standorten Sulfid in ausreichender Konzentration verfügbar sein dürfte. Dass *G. sulfurreducens* Schwefel reduzieren kann, ist an sich natürlich nicht ungewöhnlich. Interessanterweise zeigte sich jedoch, dass *G. sulfurreducens* relativ sensitiv gegenüber höheren Sulfidkonzentrationen reagierte. Bei Konzentrationen über 400 μM konnte in der Kokultur kein Wachstum mehr beobachtet werden. Andererseits fällt Cystin bei neutralem pH-Wert aus und ist damit für die Bakterien nur noch schlecht verfügbar. Die Notwendigkeit einer Kooperation beruht in beiden Fällen darauf, dass beide Partner die Konzentration des Elektronenüberträgers in einem günstigen Konzentrationsbereich halten müssen. So kann auch hier, ähnlich der Situation beim Wasserstoff, der Elektronencarrier nicht als terminaler Elektronenakzeptor genutzt werden, da entweder nicht genügend Cystin bioverfügbar ist oder das Sulfid schnell für *G. sulfurreducens* toxisch wird. In den hier betrachteten syntrophen Interaktionen tritt der energetische Aspekt, der eine syntrophe Interaktion beim „interspecies hydrogen transfer“ erforderlich macht, in den Hintergrund. Vielmehr ist eine optimale Konzentration des Elektronenüberträgers in der Kultur aus den oben genannten Gründen von größerer Relevanz. Es ist also nicht zwangsläufig von Wasserstoff oder Formiat auszugehen, wenn man eine syntrophe Kokultur betrachtet, vielmehr bieten sich andere Überträger an, die unter bestimmten Bedingungen eine solche Funktion erfüllen. Die Energieausbeute der Bakterien kann sich mit einem solchen alternativen Elektronenüberträger im Vergleich zu Wasserstoff deutlich verschieben. Dabei muss es sich um Substanzen handeln, die entweder nur in geringer Konzentration vorhanden sind oder wie in den hier gezeigten Beispielen aus anderen Gründen eine bestimmte maximale Konzentration nicht übersteigen dürfen oder können. Es gibt in der Literatur Beispiele für syntrophe Ko-

operationen, in denen ebenfalls fraglich ist, ob die Elektronen über Wasserstoff übertragen werden (Daniel et al. 1999; Meckenstock 1999). Für diese Kooperationen könnten Überträger wie das hier beschriebene Cystin/Cystein-Paar eine Rolle spielen und es wäre interessant, diese Kulturen daraufhin zu überprüfen.

4.7 Anregungen für weiterführende Untersuchungen

Ungeklärt ist weiterhin, auf welche Weise die Elektronen auf das Cystein übertragen werden. Die gefundene Cystin reduzierende Aktivität war zu gering um damit den Elektronentransport während der Acetatoxidation zu erklären, außerdem ist eine Lokalisation im Cytoplasma unwahrscheinlich. Daher sollten sich weiterführende Experimente auf die DTNB-Reduktion konzentrieren, da sie sowohl aufgrund der Membranlokalisation als auch aufgrund der höheren Aktivität mit größerer Wahrscheinlichkeit die gesuchte Aktivität repräsentiert. Auch sollte die Schwefelreduktion durch *G. sulfurreducens* genauer untersucht werden, da sie vermutlich eine Schlüsselstellung auch in der syntrophen Acetatoxidation unter natürlichen Bedingungen einnimmt. Es sollte überprüft werden, ob Cystin- und Schwefel- Reduktion über die gleichen oder über verschiedene Wege realisiert werden. Da bekannt ist, an welchen Stellen im Citrat-Zyklus die Elektronen anfallen, wäre ebenfalls interessant die Elektronentransportketten zu untersuchen, über die die Elektronen zu Cystin- / Schwefel- Reduktase übertragen werden, hierbei sollte insbesondere die Rolle der Chinone sowie der Cytochrome betrachtet werden, insbesondere das 9,6 kDa Cytochrom *c*₇ spielt hierbei möglicherweise eine entscheidende Rolle. Für all diese Fragestellungen ist es besonders hilfreich, dass mittlerweile die gesamte Genomsequenz von *G. sulfurreducens* bekannt ist (www.tigr.org). Des Weiteren ist ein genetisches System beschrieben (Coppi et al. 2001), welches die Anwendung molekularer Techniken erleichtert.

5 Zusammenfassung

- Syntrophe Kokulturen von *Geobacter sulfurreducens* und *Wolinella succinogenes* oxidieren Acetat mit Nitrat als terminalem Elektronenakzeptor. In dieser Kokultur scheidet eine Elektronenübertragung über den „interspecies hydrogen transfer“ aus, weil die Wasserstoffkonzentration während des Wachstums so gering ist, dass eine Elektronenübertragung über Wasserstoff maximal 0,01% des tatsächlichen Elektronenflusses erklären könnte. Der Wachstumsertrag von *G. sulfurreducens* lässt erwarten, dass die Elektronen auf einem positiveren Redoxpotential übertragen werden als dem des Wasserstoffs in klassischen syntrophen Kokulturen.
- Es wurde angenommen das ein periplasmatisches 9,6 kDa-Cytochrom mit einem Standard-Redoxpotential von - 169 mV, das von *G. sulfurreducens* während des Wachstums sowohl in Rein- als auch in der Kokultur in das umgebende Medium abgegeben wird und das von *G. sulfurreducens* reduziert und von *W. succinogenes* oxidiert werden kann, die Elektronen überträgt. Die Abgabe des Cytochroms ins Medium erfolgte jedoch nicht spezifisch. Sie war durch äußere Einflüsse induzierbar. Die Analyse von Überstandskonzentraten zeigte eine Anzahl verschiedener Proteine im Kulturüberstand, davon mindestens zwei höhermolekulare c-Typ Cytochrome. Zusatz des Cytochroms stimulierte weder das Wachstum der Kokultur noch die Acetatoxidation in Kokultursuspensionen. Eine spezifische Elektronenübertragung durch das 9,6 kDa Cytochrom in der Kokultur wurde damit ausgeschlossen.
- Ein Export chinoider Substanzen als mögliche Elektronenüberträger in den Kulturüberstand konnte nicht eindeutig bestätigt werden. Auch im internen Chinonmuster konnten während des Wachstums in der Kokultur keine Veränderungen beobachtet werden, so dass speziell unter Kokulturbedingungen synthetisierte Chinone unwahrscheinlich sind.
- Es wurde eine strikte Abhängigkeit sowohl des Wachstums der Kokultur als auch der Acetatoxidation an die Anwesenheit von Cystein gefunden. Sowohl Cystein als auch Cystin konnte eingesetzt werden, und es war lediglich ein Zusatz in katalytischen Konzentrationen (10 - 100 µM) notwendig. Es wurde gezeigt, dass *G. sulfurreducens* Cystin reduziert und *W. succinogenes* Cystein oxidiert. Im Kokultorexperiment wurde die Acetat-Abhängigkeit der Cystin-Reduktion gezeigt. In der hier untersuchten *G. sulfurreducens* / *W. succinogenes* Kokultur erfüllt somit das Cystin / Cystein-Paar die Funktion des extrazellulären Elektronenüberträgers.

- Bei der eingesetzten Konzentration lag das Redoxpotential des Cystin / Cystein-Paares bei -219 mV. Damit wurde die Acetatoxidation mit Cystin mit $\Delta G^{0'} = -49 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$ exergon genug um $2/3$ mol ATP pro mol Acetat zu bilden. Zugewetztes Cystein wurde in der Kokultur rasch oxidiert, das gebildete Cystin jedoch nur langsam reoxidiert. Durch die damit verbundene Verschiebung des Konzentrationsgleichgewichts ist eine Erhöhung der freien Enthalpie der Cystinreduktion auf einen Wert von $-66 \text{ kJ} \times \text{mol}^{-1}$ möglich. Das in der wachsenden Kultur gemessene mittlere Redoxpotential lag zwischen -170 und -230 mV.
- Durch Zusatz von Sulfid zur Kokultur konnte die gleiche Stimulation wie mit Cystein erreicht werden. Während des Wachstums konnte dabei mikroskopisch die Bildung von kolloidalem Schwefel beobachtet werden, der im Verlauf des Wachstums wieder verschwand. In Zellsuspensionen konnte sowohl eine Acetat-abhängige Sulfidbildung als auch eine Nitrat-abhängige Sulfidoxidation beobachtet werden. Damit konnte gezeigt werden, dass in der Kokultur Elektronen alternativ sowohl über einen Cystin/Cystein-Kreislauf als auch über einen Schwefel/Sulfid-Kreislauf übertragen werden. Der Schwefel/Sulfid-Kreislauf ist dabei analog der Elektronenübertragung in *Chloropseudomonas ethylica* zu betrachten und vermutlich das benutzte System an natürlichen anoxischen Standorten.
- Es konnte keine weitere alternative Substanz mit Elektronen übertragender Wirkung gefunden werden. Weder Wachstum noch Acetatoxidation konnte selbst mit Substanzen mit hoher struktureller Ähnlichkeit zu Cystein, wie D-Cystein, Homocystein, Cysteamin oder 3-Mercaptopropionat gefunden werden. Auch AQDS keinen stimulierenden Effekt in der Kokultur.

6 Literaturverzeichnis

- Afkar E, Fukumori Y (1999) Purification and characterization of triheme cytochrome *c*₇ from the metal-reducing bacterium, *Geobacter metallireducens*. FEMS Microbiol Lett 175:205-210.
- Ambler RP, LeGall J (1971) The amino acid sequence of cytochrome *c*₃ from *Desulfovibrio desulfuricans* (strain el agheila z, NCBI 8380). FEBS Letters 18:347-350
- Banci L, Bertini I, Bruschi M, Sompornpisut P, Turano P (1996) NMR characterization and solution structure determination of the oxidized cytochrome *c*₇ from *Desulfuromonas acetoxidans*. Proc Natl Acad Sci U S A 93:14396 - 14400
- Barker HA (1940) Studies upon the methane fermentation. IV. The isolation and culture of *Methanobacterium omelianskii*. Antonie Leeuwenhoek 6:201 - 220
- Bergmeyer HU (1975) Neue Werte für die molaren Extinktions-Koeffizienten von NADH und NADPH zum Gebrauch im Routine-Laboratorium. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 13:507 - 508
- Berthelet M, Whyte LG, Greer CW (1996) Rapid, direct extraction of DNA from soils for PCR analysis using polyvinylpyrrolidone spin columns. FEMS Microbiol Lett 138:17-22
- Biebl H, Pfennig N (1978) Growth yields of green sulfur bacteria in mixed cultures with sulfur and sulfate reducing bacteria. Arch Microbiol 117:9-16
- Bleicher K, Winter J (1994) Formate production and utilization by methanogens and by sewage sludge consortia - interference with the concept of interspecies formate transfer. Appl Microbiol Biotechnol 40:910 - 915
- Boone DR, Bryant MP (1980) Propionate-degrading bacterium, *Syntrophobacter wolinii* sp. nov. gen. nov., from methanogenic ecosystems. Appl Environ Microbiol 40:626 - 632
- Boone DR, Johnson RL, Liu Y (1989) Diffusion of interspecies electron carriers H₂ and formate in methanogenic ecosystems and its implications in the measurement of K_m for H₂ or formate uptake. Appl Environ Microbiol 1989:7
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248 - 254
- Bronstein Iea (1991) Novel chemiluminescent adamantyl 1,2-dioxetane enzyme substrates. In: Stanley P, Kricka LJ (eds) Bioluminescence and Chemiluminescence, Current status. John Wiley, Chichester, England, pp 73 - 82
- Bruschi M et al. (1997) Biochemical and spectroscopic characterization of two new cytochromes isolated from *Desulfuromonas acetoxidans*. Biochemistry 36:10601-10608.
- Bryant MP, Wolin EA, Wolin MJ, Wolfe RS (1967) *Methanobacillus omelianskii*, a symbiotic association of two species of bacteria. Arch Microbiol 59:20-31

- Caccavo F, Jr., Lonergan DJ, Lovley DR, Davis M, Stolz JF, McInerney MJ (1994) *Geobacter sulfurreducens* sp. nov., a hydrogen- and acetate-oxidizing dissimilatory metal-reducing microorganism. *Appl Environ Microbiol* 60:3752-3759.
- Champine JE, Underhill B, Johnston JM, Lilly WW, Goodwin S (2000) Electron transfer in the dissimilatory Iron-reducing bacterium *Geobacter metallireducens*. *Anaerobe* 6:187-196
- Cline JD (1969) Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. *Limnol. Oceanogr.* 14:454 - 458
- Collins MD, Jones D (1981) Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implication. *Microbiol Rev* 45:316-354
- Coppi MV, Leang C, Sandler SJ, Lovley DR (2001) Development of a genetic system for *Geobacter sulfurreducens*. *Appl Environ Microbiol* 67:3180-3187.
- Cord-Ruwisch R, Lovley DR, Schink B (1998) Growth of *Geobacter sulfurreducens* with acetate in syntrophic cooperation with hydrogen-oxidizing anaerobic partners. *Appl Environ Microbiol* 64:2232-2236.
- Daniel R, Warnecke F, Potekhina JS, Gottschalk G (1999) Identification of the syntrophic partners in a coculture coupling anaerobic methanol oxidation to Fe(III) reduction. *FEMS Microbiol Lett* 180:197-203.
- Diekert GB, Thauer RK (1978) Carbon monoxide oxidation by *Clostridium thermoaceticum* and *Clostridium formicoaceticum*. *J Bacteriol* 136:597-606.
- Doong RA, Schink B (2002) Cysteine-mediated reductive dissolution of poorly crystalline iron(III) oxides by *Geobacter sulfurreducens*. *Environ Sci Technol* 36:2939-2945
- Emde R, Swain A, Schink B (1989) Anaerobic oxidation of glycerol by *Escherichia coli* in an amperometric poised-potential culture system. *Appl Microbiol Biotechnol* 32:170-175
- Förster S (1998) Physikochemische und biochemische Charakterisierung von Multihäm-*c*-Typ-Cytochromen aus *Desulfovibrio desulfuricans* (Essex 6) und *Geobacter sulfurreducens*. In: Fakultät für Biologie. Universität Konstanz, Konstanz
- Fukuzaki S, Nishio N, Shobayashi M, Nagai S (1990) Inhibition of the fermentation of propionate to methane by hydrogen, acetate, and propionate. *Appl Environ Microbiol* 56:719 -723
- Galushko AS, Schink B (2000) Oxidation of acetate through reactions of the citric acid cycle by *Geobacter sulfurreducens* in pure culture and in syntrophic coculture. *Arch Microbiol* 174:314-321.
- Gaspard S, Vazquez F, Holliger C (1998) Localization and solubilization of the Iron(III) reductase of *Geobacter sulfurreducens*. *Appl Environ Microbiol* 64:3188-3194.
- Goodhew CF, Brown KR, Pettigrew GW (1986) Haem staining in gels, a useful tool in the study of bacterial *c*-type cytochromes. *Biochim Biophys Acta* 852:288 - 294
- Harlow E, Lane D (1988) Antibodys. A laboratory manual. In. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor

New York, pp 53 - 121

- Hattori S, Kamagata Y, Hanada S, Shoun H (2000) *Thermacetogenium phaeum* gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic, thermophilic, syntrophic acetate-oxidizing bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* 50 Pt 4:1601-1609
- Hattori S, Luo H, Shoun H, Kamagata Y (2001) Involvement of formate as an interspecies electron carrier in a syntrophic acetate-oxidizing anaerobic microorganism in coculture with methanogens. *J Biosci and Bioeng* 91:294 - 298
- Hedderich R, Klimmek O, Kröger A, Dirmeier R, Keller M, Stetter KO (1999) Anaerobic respiration with elemental sulfur and with disulfides. *FEMS Microbiology Reviews* 22:353-381
- Holben E (1988) DNA Probe Method for the Detection of Specific Microorganisms in the Soil Bacterial Community. *Appl Environ Microbiol* 45:703 - 711
- Kölling M (2000) Comparison of Different Methods for Redox Potential Determinations in Natural Waters. In: Schüring J, Schulz HD, Fischer WR, Böttcher J, Duijnsveld WHM (eds) *REDOX Fundamentals, Processes and Applications*. Springer Verlag
- Kristjansson JK, Schönheit P, Thauer RK (1982) Different K_s values for hydrogen of methanogenic bacteria and sulfate reducing bacteria: an explanation for the apparent inhibition of methanogenesis by sulfate. *Arch Microbiol* 131:278 - 282
- Lämmler UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680 - 685
- Lange B, Vejdelek ZJ (1987) *Photometrische Analyse*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim
- Lee MJ, Zinder SH (1988a) Carbon monoxide pathway enzyme activities in a thermophilic anaerobic bacterium grown acetogenically and in a syntrophic acetate-oxidizing coculture. *Arch Microbiol* 150:513 - 518
- Lee MJ, Zinder SH (1988b) Hydrogen partial pressures in a thermophilic acetate-oxidizing methanogenic coculture. *Appl Environ Microbiol* 54:1457 - 1461
- Lee MJ, Zinder SH (1988c) Isolation and characterization of a thermophilic bacterium which oxidizes acetate in syntrophic association with a methanogen and which grows acetogenically on $H_2 - CO_2$. *Appl Environ Microbiol* 54:124 - 129
- Lloyd JR, Blunt-Harris EL, Lovley DR (1999) The periplasmic 9.6-kilodalton c-type cytochrome of *Geobacter sulfurreducens* is not an electron shuttle to Fe(III). *J Bacteriol* 181:7647-7649.
- Lloyd JR et al. (2003) Biochemical and genetic characterization of PpcA, a periplasmic c-type cytochrome in *Geobacter sulfurreducens*. *Biochem J* 369:153-161
- Lovley DR, Coates JD, Blunt-Harris EL, Phillips EJ, Woodward JC (1996a) Humic substances as electron acceptors for microbial respiration. *Nature* 382:445 - 448
- Lovley DR, Coates JD, Blunt-Harris EL, Phillips EJP, Woodward JC (1996b) Humic substances as electron acceptors for microbial respiration. *Nature* 382:445 - 448

- Lovley DR, Fraga JL, Coates JD, Blunt-Harris EL (1999) Humics as an electron donor for anaerobic respiration. *Environ Microbiol* 1:89-98.
- Macy JM, Schröder I, Thauer RK, Kröger A (1986) Growth of *Wolinella succinogenes* on H₂S plus fumarate and on formate plus sulfur as energy source. *Arch Microbiol* 144:147 - 150
- Magnuson TS, Hodges-Myerson AL, Lovley DR (2000) Characterization of a membrane-bound NADH-dependent Fe(3+) reductase from the dissimilatory Fe(3+)-reducing bacterium *Geobacter sulfurreducens*. *FEMS Microbiol Lett* 185:205-211.
- Magnuson TS et al. (2001) Isolation, characterization and gene sequence analysis of a membrane-associated 89 kDa Fe(III) reducing cytochrome c from *Geobacter sulfurreducens*. *Biochem J* 359:147-152.
- McInerney MJ, Bryant MP, Hespell RB, Costerton JW (1981) *Syntrophomonas wolfei* gen. nov. sp. nov., an anaerobic, syntrophic, fatty acid-oxidizing bacterium. *Appl Environ Microbiol* 41:1029 - 1039
- McInerney MJ, Bryant MP, Pfennig N (1979) Anaerobic bacterium that degrades fatty acids in syntrophic association with methanogens. *Arch Microbiol* 122:129 - 135
- McInerney MJ, Wofford NQ (1992) Enzymes involved in crotonate metabolism in *Syntrophomonas wolfei*. *Arch Microbiol* 158:344-349
- Meckenstock RU (1999) Fermentative toluene degradation in anaerobic defined syntrophic cocultures. *FEMS Microbiol Lett* 177:67-73.
- Mikoulińska O, Akimenko V, Galouchko A, Thauer RK, Hedderich R (1999) Cytochrome c-dependent methacrylate reductase from *Geobacter sulfurreducens* AM-1. *Eur J Biochem* 263:346-352.
- More M, Herrick J, Silva M, Ghiorse W, Madsen E (1994) Quantitative cell lysis of indigenous microorganisms and rapid extraction of microbial DNA from sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1572-1580
- Mountfort DO, Bryant MP (1982) Isolation and characterization of an anaerobic syntrophic benzoate-degrading bacterium from sewage sludge. *Arch Microbiol* 133:249 - 256
- Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9:255-262
- Newman DK, Kolter R (2000) A role for excreted quinones in extracellular electron transfer. *Nature* 405:94-97.
- Pereira IA, Pachero CI, Liu M-Y, Le Gall J, Xavier AV, Teixeira M (1997) Multiheme cytochromes from the sulfur-reducing bacterium *Desulfuromonas acetoxidans*. *Eur J Biochem* 248:323 - 328
- Pfennig N, Biebl H (1976) *Desulfuromonas acetoxidans* gen. nov. and sp. nov., a new anaerobic, sulfur-reducing, acetate-oxidizing bacterium. *Arch Microbiol* 110:3-12.

- Rooney-Varga JN, Anderson RT, Fraga JL, Ringelberg D, Lovley DR (1999) Microbial communities associated with anaerobic benzene degradation in a petroleum-contaminated aquifer. *Appl Environ Microbiol* 65:3056-3063.
- Rosner B (1994) Reinigung und Charakterisierung der Acetylenhydratase aus *Pelobacter acetylenicus* und Vergleich mit Acetylen-umsetzenden Enzymen aus aeroben Bakterien. In: Fakultät für Biologie. Universität Konstanz
- Schägger H, von Jagow G (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166:368-379
- Schink B (1885) Fermentation of acetylene by an obligate anaerobe, *Pelobacter acetylenicus* sp. nov. *Arch Microbiol* 142:295 - 301
- Schink B (1985) Fermentation of acetylene by an obligate anaerobe, *Pelobacter acetylenicus* sp. nov. *Arch Microbiol* 142:295 - 301
- Schink B (1991) Syntrophism among prokaryotes 2nd ed. In: Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Schleifer KH (eds) *The Prokaryotes*. Springer Verlag, New York, New York, pp 276 - 299
- Schink B (1997) Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol Mol Biol Rev* 61:262-280.
- Schink B, Stams AJM (2002) Syntrophism among prokaryotes. In: *The Prokaryotes*. Springer-Verlag, New York, pp 2 - 57
- Schlegel HG (1992) *Allgemeine Mikrobiologie*. 634
- Schnürer A, Houwen FP, Svensson BH (1994) Mesophilic syntrophic acetate oxidation during methane formation by a triculture at high ammonium concentration. *Arch Microbiol* 162:70-74
- Schnürer A, Schink B, Svensson BH (1996) *Clostridium ultunense* sp. nov., a mesophilic bacterium oxidizing acetate in syntrophic association with a hydrogenotrophic methanogenic bacterium. *Int J Syst Bact* 46:1145 - 1152
- Schnürer A, Svensson BH, Schink B (1997) Enzyme activities in and energetics of acetate metabolism by the mesophilic syntrophically acetate-oxidizing anaerobe *Clostridium ultunense*. *FEMS Microbiol Lett* 154:331 - 336
- Schocke L, Schink B (1997) Energetics of methanogenic benzoate degradation by *Syntrophus gentianae* in syntrophic coculture. *Microbiology* 143:2345 - 2351
- Schröder I, Kröger A, Macy JM (1988) Isolation of the sulfur reductase and reconstitution of the sulfur respiration of *Wolinella succinogenes*. *Arch Microbiol* 149:572 - 579
- Schwarzenbach RP, Gschwend PM, Imboden DM (1993) *Environmental Organic Chemistry*. Wiley - Interscience Publication
- Seeliger S (1998) Einfluß von Energetik und Kinetik auf die Konkurrenz bei sekundären Gärungen. In: Fakultät für Biologie. Universität Konstanz, Konstanz, p 105

- Seeliger S, Cord-Ruwisch R, Schink B (1998) A periplasmic and extracellular c-type cytochrome of *Geobacter sulfurreducens* acts as a ferric iron reductase and as an electron carrier to other acceptors or to partner bacteria. *J Bacteriol* 180:3686-3691.
- Shestopalov AI, Bogachev AV, Murtazina RA, Viryasov MB, P. SV (1997) Aeration-dependent changes in composition of the quinone pool in *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 404:272 - 274
- Snoeyenbos-West OL, Nevin KP, Anderson RT, Lovley DR (2000) Enrichment of *Geobacter* Species in Response to Stimulation of Fe(III) Reduction in Sandy Aquifer Sediments. *Microb Ecol* 39:153-167.
- Stams AJM, Kremer DR, Nicolay K, Weenk GH, Hansen TA (1984) Pathway of propionate formation in *Desulfobulbus propionicus*. *Arch Microbiol* 139:167-173
- Stieb M, Schink B (1986) Anaerobic degradation of isovalerate by a defined methanogenic coculture. *Arch Microbiol* 144:291-295
- Stookey LL (1970) Ferrozine, a new spectrophotometric reagent for iron. *Anal. Chem.* 42:799 - 781
- Straub KL, Hanzlik M, Buchholz-Cleven BE (1998) The use of biologically produced ferrihydrite for the isolation of novel iron-reducing bacteria. *Syst Appl Microbiol* 21:442-449.
- Straub KL, Schink B (2003) Evaluation of electron-shuttling compounds in microbial ferric iron reduction. *FEMS Microbiol Lett* 220:229-233
- Thauer RK (1988) Citric-acid cycle, 50 years on. Modifications and an alternative pathway in anaerobic bacteria. *Eur J Biochem* 176:497-508.
- Thauer RK, Jungermann K, Decker K (1977) Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol Rev* 41:100-180.
- Thomas PE, Ryan D, Levin W (1976) An improved staining procedure for the detection of the peroxidase activity of cytochrome P-450 on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 75:168 - 176
- Wallrabenstein C, Gorny N, Springer N, Ludwig W, Schink B (1995) Pure culture of *Syntrophus buswellii*, definition of its phylogenetic status, and description of *Syntrophus gentianae* sp. nov. *Syst Appl Microbiol* 18:62 - 66
- Widdel F (1980) Anaerober Abbau von Fettsäuren und Benzoesäure durch neu isolierte Arten Sulfat-reduzierender Bakterien. In: Universität Göttingen
- Widdel F (1988) Microbiology and ecology of sulfate- and sulfur-reducing bacteria. In: Zehnder AJB (ed) *Biology of Anaerobic Microorganisms*. John Wiley and Sons, New York, NY, pp 469 - 585
- Widdel F, Kohring GW, Mayer F (1983) Studies in dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids. III. Characterization of the filamentous gliding *Desulfonema limicola* gen. sp. nov., and *Desulfonema magnum* sp. nov. *Arch Microbiol* 134:286 - 294

- Widdel F, Pfennig N (1981) Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids. I. Isolation of a new sulfate-reducer enriched with acetate from saline environments. Description of *Desulfobacter postgatei* gen. sp. nov.. Arch Microbiol 129:395 - 400
- Wu W-M, Hickey RF, Jain M, Zeikus JG (1993) Energetics and regulations of formate and hydrogen metabolism by *Methanobacterium formicicum*. Arch Microbiol 159:57 - 65
- Zehnder AJB, Wuhrmann K (1976) Titanium(III)citrate as a nontoxic oxidation-reduction buffering system for the culture of obligate anaerobes. Science 194:1165 - 1166
- Zinder SH, Koch M (1984) Non-aceticlastic methanogenesis from acetate: acetate oxidation by a thermophilic syntrophic coculture. Arch Microbiol 138:263 - 272
- Zinder SH, Mah RA (1979) Isolation and characterization of a thermophilic strain of *Methanosarcina* unable to use H₂ - CO₂ for Methanogenesis. Appl Environ Microbiol 38:996 - 1008

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

“Cysteine- mediated electron transfer in syntrophic acetate oxidation by cocultures of *Geobacter sulfurreducens* and *Wolinella succionogenes*”
J. Kaden, A. S. Galuschko, and B. Schink (2002)
Arch. Microbiol. 178: 53 – 58.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Prof. Dr. Schink im Zeitraum von Oktober 1998 bis Juli 2003 am Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie im Fachbereich Naturwissenschaften, Sektion Biologie an der Universität Konstanz durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. B. Schink für die Überlassung des Themas, sein stetes Interesse an der Arbeit, und für die vielen wertvollen Diskussionen und Anregungen.

Herrn Professor Dr. A.M. Cook danke ich herzlich für die Übernahme des Koreferats.

Zu großem Dank bin ich vor allem Dr. Alexander S. Galushko verpflichtet. Die Zusammenarbeit mit ihm im Labor war für meine Arbeit von unschätzbarem Wert und die gemeinsamen privaten Aktivitäten möchte ich nicht missen.

Dr. Kristina L. Straub danke ich für ihr stetes hilfreiches Hinterfragen der experimentellen Arbeit und für die konstruktiven, kritischen Hinweise zur rechten Zeit.

Dirk Schmitt-Wagner möchte ich für die Hilfe bei molekularbiologischen Fragestellungen danken. Britta Müller gilt mein Dank für die vielen methodischen Tipps, die die tägliche Praxis um vieles leichter machten.

Bei der AG Cook möchte ich mich für die ständige Kooperationsbereitschaft bei der Benutzung von HPLC- und Proteinbiochemischem Equipment bedanken. Besonders sei in diesem Zusammenhang die Hilfs- und Diskussionsbereitschaft von J. Mampel, T. Tralau und H. Laue bei proteinbiochemischen Fragen erwähnt.

Natürlich gilt mein Dank allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Schink, mit denen ich im Laufe der Jahre zusammengearbeitet habe und die für eine stets freundliche und angenehme Atmosphäre im Labor sorgten. Insbesondere danke ich der Besetzung von M 942.

Meinen Eltern und meiner Freundin danke ich für die Unterstützung und den Rückhalt den sie mir während meiner gesamten Ausbildungszeit gaben.