UFZ-Bericht

UFZ-Bericht • UFZ-Bericht • UFZ-Bericht • UFZ-Bericht

UFZ - Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH

Nr. 20/1998 Dissertation

Methanmonooxygenase-Charakterisierung aus Typ II-Methanotrophen

Stephan Große

ISSN 0948-9452

Methanmonooxygenase- Charakterisierung aus Typ II-Methanotrophen

Der Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie
der Universität Leipzig
genehmigte

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

DOKTOR RERUM NATURALIUM
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Diplom-Biologe Stephan Große
geboren am 04. Mai 1969
in Borna

Beschluß über die Verleihung des Doktorgrades vom 06.07.1998

Gutachter :

- Prof. Dr. Hans-Peter Kleber
  Universität Leipzig, Institut für Biochemie, Talstraße 33, 04103 Leipzig
- Prof. Dr. Ulrich Stottmeister
  UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Sektion Sanierungsforschung, Permoserstr. 15, 04318 Leipzig
- Prof. Dr. Wolfgang Fritsche
  Friedrich-Schiller-Universität Jena, Institut für Mikrobiologie, Philosophenweg 12, 07743 Jena

Bibliographische Beschreibung

Stephan Große

Methanmonooxygenase- Charakterisierung aus Typ II-Methanotrophen

Universität Leipzig, Dissertation
S. 121, Lit. 160, Abb. 36, Tab. 41

Referat

Methanotrophe Bakterien sind in der Natur besonders in der Übergangszone von anaeroben, methanogenen Bedingungen zum aeroben Bereich zu finden. Die initiale Oxidation des als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle genutzten Methans wird durch ein Methanmonooxygenasesystem (MMO) katalysiert, das in einer löslichen (sMMO) und einer membrangebundenen Form (pMMO) vorliegen kann. Das hohe Oxidationspotential insbesondere der sMMO könnte den Einsatz bestimmter Methanotropher zur in situ Sanierung von Böden und Gewässern ermöglichen.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei im Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH isolierte methanotrophe Mikroorganismen (*Methylocystis* sp. GB 25 und *Methylosinus* sp. WI 14) durch elektronenmikroskopische sowie biochemische Untersuchungen charakterisiert und typisiert. Beide Stämme konnten den Typ II-Methanotrophen zugeordnet werden. Während *Methylocystis* sp. GB 25 nur eine pMMO mit hoher Substratspezifität exprimiert, ist *Methylosinus* sp. WI 14 in der Lage, neben der pMMO auch eine sMMO auszubilden. Die Expression der sMMO wird dabei maßgeblich von der Kupferkonzentration im Medium (bei Konzentrationen >0,1 µM erfolgt eine Repression) sowie von der angebotenen Stickstoffquelle reguliert. Die sMMO besteht aus drei Komponenten : einer Hydroxylase, einem Elektronentransferprotein sowie einer Reduktase. Alle Komponenten wurden durch chromatographische Methoden gereinigt und die wichtigsten kinetischen und molekularen Parameter bestimmt. Die sMMO konnte aus den gereinigten Komponenten rekonstituiert werden. Das Enzym verfügt über eine erstaunlich breite Substratspezifität und hydroxyliert neben Alkanen und Alkenen unterschiedlicher Kettenlänge auch nichthalogenierte und halogenierte Aromaten. Die hydroxylierten Produkte sollten durch Cometabolismus abbaubar sein. Gegen die gereinigte Komponente A (Hydroxylase) wurden monoklonale Antikörper gewonnen, mit denen ein alternativer sMMO-Nachweis in weiteren isolierten Stämmen möglich sein sollte. Auch die Folgeenzyme der dissimilatorischen Sequenz, die Methanoldehydrogenase (MDH), die Formaldehyddehydrogenase (FaDH) sowie die Formiatdehydrogenase (FDH) wurden nach vollständiger oder partieller Reinigung untersucht. Interessant ist, daß in beiden studierten Typ II-Methanotrophen die MDH potentiell eine funktionelle FaDH darstellt. Die FDH ist als einziges Enzym des dissimilatorischen Methanabbaus befähigt, Reduktionsäquivalente für die sMMO bereitzustellen.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1

1.1. Methanverwertung durch Mikroorganismen 1

1.1.1. Vorkommen und Bedeutung von Methan 1

1.1.2. Taxonomie, Ökologie und Morphologie C_1-verwertender Mikroorganismen 2

1.1.3. Abbau von C_1-Verbindungen 4

1.1.3.1. Dissimilatorischer Weg 5

1.1.3.2. Assimilatorischer Weg 10

1.2. Methanotrophe und ihr biotechnologisches Potential 12

1.3. Ziel der Arbeit 13

2. Material und Methoden 15

2.1. Mikroorganismen und Chemikalien 15

2.2. Nährmedien 15

2.3. Zellkultivierung 16

2.3.1 Kultivierungsbedingungen 16

2.3.2. Wachstumskontrolle und Zellernte 17

2.4. Zellaufschluß 17

2.4.1. Permeabilisierung 17

2.4.2. Alcoa 18

2.4.3. French Press 18

2.4.4. Ultraschall 18

2.5. Zellfraktionierung 18

2.6. Bestimmung und Definition der Enzymaktivitäten 19

2.6.1. Methanmonooxygenase 19

2.6.1.1. Gaschromatographischer Nachweis 19

2.6.1.2. Methanabhängiger Sauerstoffverbrauchstest 19

2.6.1.3. Photometrischer Nachweis 20

2.6.1.4. Naphthalentest 20

2.6.1.5. Komponenten der löslichen Methanmonooxygenase 21

2.6.1.5.1. Hydroxylase (Komponente A der sMMO) 21

2.6.1.5.2. NADH-Akzeptor Reduktase (Komponente C der sMMO) 21

2.6.2. Methanoldehydrogenasen 22

2.6.2.1. $NAD(P)^+$- abhängige Methanoldehydrogenase 22
2.6.2.2. $NAD(P)^+$- unabhängige Methanoldehydrogenase 22
2.6.3. Formaldehyddehydrogenasen 23
2.6.4. Formiatdehydrogenase 23
2.6.5. Hydroxypyruvatreduktase 23
2.6.6. Isocitratdehydrogenase 23
2.6.7. Isocitratlyase 24
2.6.8. Malatdehydrogenase 24
2.6.9. Definition der Enzymaktivitäten 24
2.7. Methoden zur Enzymreinigung 25
2.7.1. Reinigung der Hydroxylase (Komponente A der sMMO) 26
2.7.1.1. Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose FF 26
2.7.1.2. Gelfiltration an Superose 12 HR 26
2.7.2. Reinigung der Komponente B der sMMO 27
2.7.2.1. Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose FF 27
2.7.2.2. Gelfiltration an Superose 12 HR 27
2.7.3. Reinigung der NADH-Akzeptor Reduktase (Komponente C der sMMO) 27
2.7.3.1. Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose FF 27
2.7.3.2. Ammoniumsulfatfällung 28
2.7.3.3. Hydrophobe Interaktionschromatographie an TSK-Butyl 28
2.7.3.4. Affinitätschromatographie 28
2.7.3.5. Gelfiltration 29
2.7.4. Reinigung der Methanoldehydrogenasen 29
2.7.4.1. Ammoniumsulfatfällung 29
2.7.4.2. Hydrophobe Interaktionschromatographie an TSK-Butyl 29
2.7.4.3. Ionenaustauschchromatographie an EMD DEAE und DEAE Sepharose FF 29
2.7.4.4. Gelfiltration 30
2.7.5. Anreicherung der Formiatdehydrogenasen 30
2.8. Analytische Methoden 30
2.8.1. Elektrophoresen 30
2.8.1.1. Nichtdenaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese 30
2.8.1.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese 31
2.8.1.3. Isoelektrische Fokussierung 32

2.8.1.4. Aktivfärbung 32
2.8.1.5. Färbung mit Coomassie-Brillantblau 33
2.8.1.6. Silberfärbung 33
2.8.2. Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz 34
2.8.3. Bestimmung der relativen Molmasse 35
2.8.3.1. Gelfiltration 35
2.8.3.2. Methode nach Hedrick-Smith 35
2.8.3.3. SDS-Elektrophorese 35
2.8.4. Nachweis von Poly-ß-hydroxybuttersäure 36
2.8.5. Nachweis und Bestimmung von PQQ 36
2.8.6. Substratumsatz der Methanmonooxygenase 37
2.8.6.1. Gaschromatographie 37
2.8.6.2. HPLC 37
2.8.7. Atomabsorptionsspektroskopie 38
2.9. Elektronenmikroskopie 38
2.10. Gewinnung von monoklonalen Antikörpern gegen die Hydroxylase 38
3. Ergebnisse 41
3.1. Charakterisierung von *Methylocystis* sp. GB 25 und *Methylosinus* sp. WI 14 41
3.1.1. Morphologie 41
3.1.2. Aktivität von Enzymen des Assimilationsweges 45
3.2. Wachstum von *Methylocystis* sp. GB 25 und *Methylosinus* sp. WI 14 46
3.3. Methanmonooxygenase aus *Methylocystis* sp. GB 25 48
3.3.1. Aktivität der Methanmonooxygenase 48
3.3.2. Substratspezifität 50
3.4. Methanmonooxygenase aus *Methylosinus* sp. WI 14 51
3.4.1. Epigenetische Regulation 51
3.4.2. Partikuläre Methanmonooxygenase 53
3.4.3. Lösliche Methanmonooxygenase 54
3.4.3.1. Enzymlokalisation und Enzymstabilität 54
3.4.3.2. Temperatur und pH-Optimum 56
3.4.3.3. Substratspezifität 56
3.4.3.4. Komponenten der sMMO 58
3.4.3.4.1. Reinigung und Eigenschaften der Hydroxylase (Komponente A) 58

3.4.3.4.2. Reinigung und Eigenschaften des Elektronentransferproteins (Komponente B) 63
3.4.3.4.3. Reinigung und Eigenschaften der NADH-Akzeptor Reduktase (Komponente C) 67
3.4.3.5. Rekonstitution der sMMO 71
3.4.3.6. Hemmung der sMMO 72
3.4.3.7. Gewinnung von monoklonalen Antikörpern 72
3.5. Methanoldehydrogenasen 74
3.5.1. Methanoldehydrogenase aus *Methylocystis* sp. GB 25 74
3.5.1.1. Aufschlußbedingungen und Lokalisation 74
3.5.1.2. Enzymreinigung und Stabilität 75
3.5.1.3. Molare Masse und isoelektrischer Punkt 75
3.5.1.4. N-terminale Aminosäuresequenz 78
3.5.1.5. Prosthetische Gruppe 78
3.5.1.6. pH- und Temperaturoptimum 79
3.5.1.7. Substratspezifität 79
3.5.1.8. Einfluß verschiedener Verbindungen auf die Aktivität der MDH 80
3.5.2. Methanoldehydrogenase aus *Methylosinus* sp. WI 14 81
3.5.2.1. Aufschlußbedingungen und Lokalisation 81
3.5.2.2. Enzymreinigung und Stabilität 81
3.5.2.3. Molare Masse und isoelektrischer Punkt 83
3.5.2.4. N-terminale Aminosäuresequenz 83
3.5.2.5. Prosthetische Gruppe 84
3.5.2.6. pH- und Temperaturoptimum 85
3.5.2.7. Substratspezifität 85
3.5.2.8. Hemmung der MDH 86
3.6. Formaldehyddehydrogenasen 86
3.7. Formiatdehydrogenasen 87
4. Diskussion 88
4.1. Typisierung von *Methylocystis* sp. GB 25 und *Methylosinus* sp. WI 14 88
4.2. Kinetische und molekulare Eigenschaften von Methanmonooxygenasen 89
4.2.1. Regulation der Expression 90
4.2.2. Substratspezifität der Methanmonooxygenasen 91

4.2.3. Lösliche Methanmonooxygenase aus *Methylosinus* sp. WI 14 92
4.2.3.1. Molekulare Eigenschaften der Komponenten der löslichen Methanmonooxygenase sowie deren Untereinheiten 92
4.2.3.2. Kinetische Eigenschaften und Stabilität der löslichen Methanmonooxygenase 95
4.2.3.3. Monoklonale Antikörper zum Nachweis der sMMO 98
4.3. Kinetische und molekulare Eigenschaften von Dehydrogenasen des dissimilatorischen Methanabbaus 100
4.3.1. Methanoldehydrogenasen 100
4.3.2. Formaldehyddehydrogenasen 104
4.3.3. Formiatdehydrogenasen 106
5. Zusammenfassung 107
6. Literaturverzeichnis 112

Verzeichnis der in der Arbeit verwendeten Abkürzungen :

ABTS	2,2´-Azino-bis (3-Ethylbenzthiazolin)-6-sulfonsäure
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
BPB	Bromphenolblau
CoA	Coenzym A
DAB	Diaminobenzidin
DCPIP	2,6-Dichlorphenolindophenol
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTE	Dithioerythrit
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FAD	Flavinadenindinukleotid
FaDH	Formaldehyddehydrogenase
FDH	Formiatdehydrogenase
FID	Flammen-Ionisations-Detektor
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
HAT	Hypoxanthin-Aminopterin-Thymin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICDH	Isocitratdehydrogenase
ICL	Isocitratlyase
INT	Iodnitrotetrazoliumchlorid
MDH	Methanoldehydrogenase
MMO	Methanmonooxygenase
sMMO	lösliche Methanmonooxygenase
pMMO	membrangebundene Methanmonooxygenase
MMOB	Elektronentransferprotein der sMMO (Komponente B)
MMOC	Reduktase der sMMO (Komponente C)
MMOH	Hydroxylase der sMMO (Komponente A)
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
M_r	relative Molmasse
NAD^+	Nikotinsäureamiddinukleotid
$NADP^+$	Nikotinsäureamiddinukleotidphosphat
NBT	Nitroblautetrazolium

NMS	Nitrat-Mineralsalz
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PES	Phenazinethosulfat
PHB	Poly-β-hydroxybuttersäure
pI	isoelektrischer Punkt
PMS	Phenazinmethosulfat
POD	Peroxidase
PQQ	Pyrrolochinolinchinon
RNA	Ribonucleinsäure
RSA	Rinderserumalbumin
RuMP	Ribulosemonophosphat
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCC	Tricarbonsäurecyclus
TEMED	N,N,N′,N′- Tetramethylethylendiamin
TMPD	N,N,N′,N′- Tetramethyl p-phenylendiamin (Wurster's Blau)
TPQ	6-Hydroxy-phenylalanin-3,4-dion
TTQ	4-(2′-Tryptophyl)-tryptophan-6,7-dion
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
ZAM	Ziege-anti-Maus

1.Einleitung

1.1. Methanverwertung durch Mikroorganismen

1.1.1. Vorkommen und Bedeutung von Methan

Die Fähigkeit zur Bildung von Methan (Methanogenese) ist auf Vertreter der Archaea beschränkt. Diese wachsen im wesentlichen in drei Habitaten : in anaeroben Gewässersedimenten, in Biogasanlagen sowie im Pansen der Wiederkäuer. Sie werden als Methanogene bezeichnet und sind stark sauerstoffempfindlich.

Die Methanproduktion im Boden unterliegt jahreszeitlichen Schwankungen, die vor allem mit Temperaturveränderungen (JONES und NEDWELL 1993) und Schwankungen des Wassergehaltes (WHALEN und REEBURGH 1990) zu erklären sind. Es konnte gezeigt werden, daß insbesondere in den Feuchtgebieten der Erde mit 21 % oder ungefähr 115 Tg (CRILL et al. 1991) der Hauptanteil des atmosphärischen Methans produziert wird. Davon entfallen ca. 60 % auf tropische, 34 % auf nördliche (Tundra) und ca. 4% auf die subtropischen Feuchtgebiete (BARTLETT und HARRIS 1993). Gleichzeitig hängt die tatsächliche Methanemission aber sehr stark von der Besiedlung des Bodens mit Methanotrophen ab, die gebildetes Methan in den sauerstoffhaltigen oberen Bodenschichten oxidieren können (TORN und CHAPIN 1993). So wird z. B. das in gefluteten Reisfeldern gebildete Methan (575 Tg/Jahr) zu 80 % in den oberen Bodenschichten wieder oxidiert (REEBURGH et al. 1993). Anderseits konnten CONRAD et al. (1995) zeigen, daß aufgrund fehlender Besiedlung durch Methanotrophe in einem hypersalinen See auf Sinai keine Oxidation des gebildeten Methans stattfindet und dieses somit vollständig freigesetzt wird.

Neben der natürlichen Methanproduktion hat auch der Mensch sehr stark zur Erhöhung der weltweiten Methanemission beigetragen. Während vor etwa 300 Jahren der Methangehalt der Atmosphäre noch ungefähr 0,8 p.p.m.v. (parts per million by volume) betrug, stieg er seit dieser Zeit auf etwa 1,7 p.p.m.v. (CRUTZEN 1991). Vor allem auf extensive Viehzucht, dem Anlegen von ausgedehnten Reisfeldern sowie dem Verbrennen von Biomasse vorwiegend in den Tropen und Subtropen ist die Erhöhung der Methanemission zurückzuführen (WHALEN 1993). Weiterhin verursachte auch die Industrialisierung eine nicht zu vernachlässigende Mehrbelastung der Atmosphäre mit Methan, z.B. durch undichte Erdgasleitungen (nachzulesen im Bericht zur Methanfreisetzung durch Stoffverluste bei der Erdgasversorgung der BRD, 1989) oder der Methanfreisetzung in Kohleminen (SLY et al. 1993). Es wurde versucht, diesen

Methanausstoß durch die Entwicklung von Biofiltern zur Rückhaltung von Methan in Kohleminen (SLY et al. 1993) oder auch durch mikrobiologische Sensorsysteme (OKADA et al. 1981) zu vermindern.

Methan ist das am meisten vorkommende organische Gas in der Atmosphäre und hat einen großen Einfluß auf chemische Reaktionen in der Atmosphäre. In der Troposphäre ist es in photochemische Prozesse eingebunden, die die Konzentration von Ozon (Absorption von ultraviolettem Licht) und Hydroxylradikalen (mitverantwortlich für den Abbau fast aller natürlicher und durch den Menschen produzierter Gase) maßgeblich bestimmen (LELIEVELD et al. 1993). In der Stratosphäre ist Methan eine der bedeutendsten Quellen für Wasserdampf und damit auch für Hydroxylradikale, die durch die Reaktion mit Chlorwasserstoff die Ozonkiller Chlorid- und Hypochloritradikale produzieren. Weiterhin spielt Methan eine große Rolle bei der globalen Erwärmung (Treibhauseffekt). Es wurde nachgewiesen, daß in den 80-er Jahren ca. 12% des Temperaturanstiegs durch Methan verursacht wurde (HOUGHTON et al. 1990). Obwohl die Konzentration von Methan in der Atmosphäre weitaus geringer als die des Kohlendioxids ist, absorbiert es die terrestrische Strahlung im Bereich von 4-100 nm wesentlich effektiver. Durch Reemission dieser Strahlung kommt es dann zur globalen Erwärmung. Die Effizienz dieser Reemission ist pro mol Methan ca. 26fach stärker als pro mol Kohlendioxid (LELIEVELD et al. 1993).

1.1.2. Taxonomie, Ökologie und Morphologie C_1-verwertender Mikroorganismen

Unter methylotrophen Bakterien versteht man Mikroorganismen, die auf die aerobe Verwertung von C_1-Verbindungen (Methan, Methylamin, Methanol u.a.) spezialisiert sind. Sie lassen sich nach ihrem Verwertungsspektrum in obligat, fakultativ und eingeschränkt fakultativ methylotrophe Organismen unterteilen. Der letztgenannten Gruppe gehören eine Vielzahl von Vertretern z.B. der Gattungen *Acetobacter*, *Paracoccus* u.a. an (LIDSTROM, 1991). Die obligat methylotrophen Bakterien kann man in die obligaten Methanverwerter (Methanotrophe) und die obligaten Methanol- bzw. Methylaminverwerter einteilen.

Bereits 1906 beschrieb SÖHNGEN einen Organismus, der auf Methan wuchs und den er *Bacillus methanicus* nannte. Seit dieser Zeit wurden viele Versuche unternommen, die Methanotrophen nach den verschiedensten Gesichtspunkten einzuordnen und zu klassifizieren (HANSON 1980, HANSON et al. 1991). Bis heute ist es aber noch nicht gelungen, die unterschiedlichen Vertreter in ein internationales System einzuordnen (GREEN 1992). WHIT-

TENBURY et al. (1970a) verglichen über 100 Methanotrophe hinsichtlich ihrer Morphologie und Physiologie und ordneten sie 5 Gattungen zu, die in drei Typen eingeteilt werden können.

Die Gattungen *Methylomonas* und *Methylobacter* wurden als Typ I- methanotroph beschrieben (ANTHONY 1982). Sie assimilieren den Kohlenstoff hauptsächlich über den Ribulosemonophosphatweg (vgl. 1.1.3.2.) , sind durch großflächige Endomembranen vertikal zur Cytoplasmamembran, einem Ruhestadium, das den Cysten von Azotobacter ähnelt, und einem G+C-Gehalt der DNA von 50-54% (MEYER et al. 1986) gekennzeichnet. Des weiteren verfügen sie nicht über einen kompletten Tricarbonsäurecyclus (es fehlt die 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase).

Den Typ II- Methanotrophen gehören die Gattungen *Methylosinus* und *Methylocystis* (ANTHONY 1982) an. Sie assimilieren den Kohlenstoff hauptsächlich über den Serinweg (1.1.3.2.) und besitzen ausgedehnte Endomembranen, die parallel zur und peripher an der Cytoplasmamembran verlaufen. Der G+C-Gehalt liegt zwischen 61-63% (MEYER et al. 1986). Sie verfügen über einen kompletten Tricarbonsäurecyclus. Sämtliche Vertreter der beschriebenen Gattungen sind Gram-negativ und kommen in sehr verschiedenen Formen (Kurzstäbchen, Vibrionen, Kokken u.a.) vor.

Die vorstehend beschriebenen Typen der Methanotrophen ergänzend, wurde der Typ X eingeführt, da Vertreter der Gattung *Methylococcus* (ursprünglich als Typ I-methanotroph beschrieben) nicht richtig in das o.g. Schema einzuordnen waren. So konnten Enzyme des Serinweges sowie die Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase (CO_2-Assimilation über den Calvin-Cyclus) in geringen Konzentrationen nachgewiesen werden (WHITTENBURY und KRIEG 1984). Weiterhin wuchsen sie bei höheren Temperaturen und wiesen einen höheren G+C-Gehalt als die meisten Typ I-Methanotrophen auf (GREEN 1992). Die wesentlichsten Unterscheidungsmerkmale der Methanotrophen sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

Die Methylotrophen sind ubiquitär verbreitet (KIGHTLEY et al. 1995). Sie konnten aus den verschiedensten Lebensräumen, einschließlich Süß- und Salzwasser, isoliert werden. Ein Beispiel des Kommensalismus zwischen Methanogenen, Methylotrophen und Phytoplankton stellen eutrophierte Seen dar (HANSON und WATTENBERG 1991). Im anaeroben Hypolimnion wird anfallende Biomasse durch die Methanogenen in Methan umgewandelt, das dann im Epilimnion durch die Methylotrophen verwertet wird. Das gebildete Kohlendioxid wird anschließend vom Phytoplankton fixiert und in Biomasse bzw. Sauerstoff umgewandelt, so daß sich der Kreislauf schließt.

Tab. 1: Eigenschaften der unterschiedlichen Typen der Methanotrophen.
(nach HANSON et al. 1991)

Eigenschaft	Typ I	Typ II	Typ X
Zellmorphologie	Kurzstäbchen	Stäbchen	Kokken
Wachstum bei 45°C	-	-	+
Membrananordnung			
Membranstapel ungeordnet	+	-	+
Membranen parallel zur Zellperipherie	-	+	-
G+C-Gehalt der DNA (mol %)	49-60	62-67	59-65
Stickstoffixierung	-	+	+
Ruhestadium			
Exosporen	-	Einige Stämme	-
Lipidcysten	Einige Stämme	Einige Stämme	Einige Stämme
Kohlenstoffixierung			
RuMP-Weg	+	-	+
Serin-Weg	-	+	Selten
Calvin-Cyclus	-	-	+
vollständiger Citratcyclus	-	+	-
Isocitratdehydrogenase			
NAD^+- abhängig (nur)	-	-	+
$NADP^+$- abhängig (nur)	-	+	-
NAD^+- und $NADP^+$- abhängig	+	-	-

1.1.3. Abbau von C_1-Verbindungen

C_1-Verbindungen können - im Gegensatz zu Verbindungen mit Ein- und Mehrfachbindungen zwischen den Kohlenstoffatomen - direkt endoxidiert werden. Sie dienen oft als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle. Die Enzymstrukturen der obligat C_1-verwertenden Mikroorganismen weichen meist erheblich von denen der fakultativ C_1-verwertenden ab. So verfügen z.B. die Typ I- Methanotrophen generell nicht über einen intakten Tricarbonsäurecyclus (HIGGINS et al. 1982). Die Umschaltung zwischen Assimilation und Dissimilation erfolgt auf der Stufe des Formaldehyds (Abb. 1). Dieser wird in Abhängigkeit der vorhandenen Enzyme (Typeinteilung der Methanotrophen, vgl. 1.1.2.) über den Serin- bzw. RuMP-Weg assimiliert.

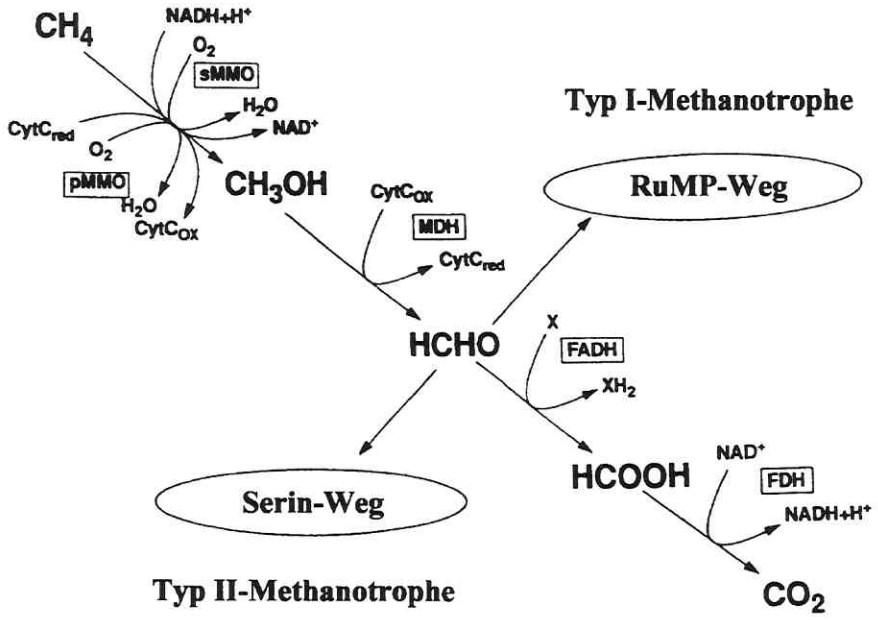

Abb. 1: Umschaltung zwischen dissimilatorischem und assimilatorischem Weg des Methanabbaus (HANSON und HANSON 1996).

1.1.3.1. Dissimilatorischer Weg

Der erste Schritt des Methanabbaus wird durch ein Monooxygenasesystem katalysiert, das unter Nutzung von molekularen Sauerstoff und einem Elektronendonator (meist NADH) Methan zu Methanol hydroxyliert (ANTHONY 1986). Das Enzymsystem kann, wie in Abb. 2 dargestellt, in zwei Formen vorkommen. Eine membrangebundene (pMMO) und eine lösliche (sMMO) Methanmonooxygenase konnten bisher z.B. bei *Methylosinus trichosporium* OB3b nachgewiesen und charakterisiert werden. Die beiden Systeme sind aus unterschiedlichen Komponenten aufgebaut. Sie differieren in ihrer Substratspezifität und Cyanidempfindlichkeit sowie ihren Elektronendonatoren (STIRLING und DALTON 1979). Die Induktion der Enzymkomplexe wird dabei maßgeblich von den Wachstumsbedingungen, insbesondere dem Kupfergehalt des Mediums, bestimmt (TUKHVATULLIN et al. 1996). Nicht alle Methanotrophen sind aber in der Lage, zwei MMO-Systeme zu synthetisieren. So wurden z.B. bei *Methylomonas methanica* (COLBY et al. 1976) und *Methylococcus capsulatus* (Foster-Davis) (RIBBONS und MICHEAOVER 1970) bisher nur die pMMO nachgewiesen.

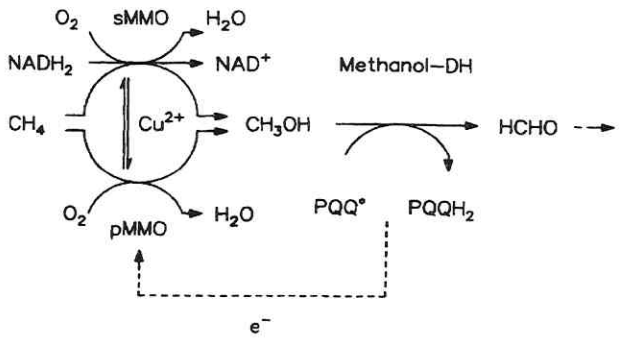

Abb. 2: Postulierter 1.Schritt des Abbaus von Methan über die zwei MMO-Systeme (nach BEDARD und KNOWLES 1989).

Bisher gelang es aber noch nicht, die membrangebundene Monooxygenase bis zur Homogenität zu reinigen (LIPSCOMB 1994). Das liegt vor allem an der äußerst geringen Stabilität der Komponenten der pMMO nach Zellaufschluß. In letzter Zeit gelang es aber, die pMMO im zellfreien Extrakt zu stabilisieren (CHAN et al. 1993). Weiterhin war es möglich, die pMMO durch Einsatz von milden Detergenzien (u.a. Dodecyl-β-D-Maltosid) zu solubilisieren (ZAHN und DISPIRITO 1996). SHIEMKE et al. (1995) wiesen nach, daß nach Solubilisierung eine pMMO-Aktivität nur durch Zugabe von verschiedenen Chinolen (Abb. 3), nicht aber mit NADH als Elektronendonator gemessen werden konnte. Neueste Arbeiten deuten darauf hin, daß Kupfer nicht nur einen entscheidenden Einfluß bei der Expression, sondern auch auf die Stabilität der pMMO hat (COOK und SHIEMKE 1996). Ähnlich wie bei der sMMO das Eisen, scheint bei der pMMO Kupfer in die Aktivierung des Sauerstoffs bei der Methanoxidation eingebunden zu sein (SEMRAU et al. 1995).

Im Gegensatz zur pMMO konnte die sMMO bereits in drei Stämmen (*Methylosinus trichosporium* OB3b, FOX et al. 1989; *Methylococcus capsulatus* Bath, PILKINGTON und DALTON 1990; *Methylocystis* sp. M, NAKAJIMA et al. 1992) gereinigt und charakterisiert werden. Der molekulare Aufbau eines sMMO-Systems ist in Abb. 4 schematisch dargestellt, wenngleich die Komponenten der verschiedenen Spezies natürlich mehr oder weniger differieren.

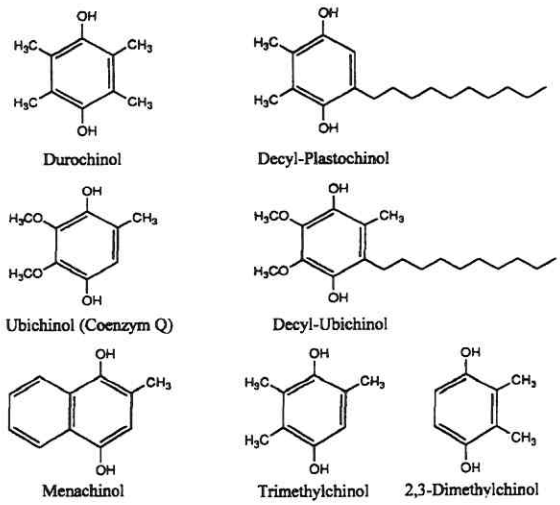

Abb. 3: Elektronendonatoren der pMMO nach Solubilisierung (SHIEMKE et al. 1995).

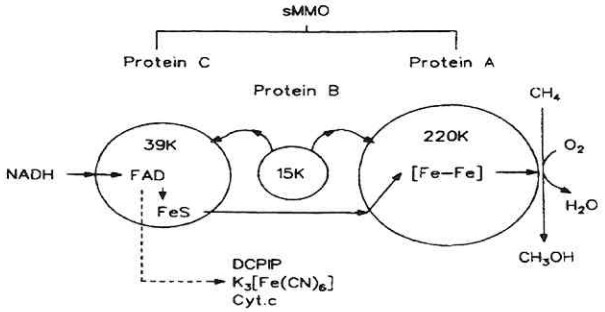

Abb. 4: Lösliche Methanmonooxygenase aus *Methylosinus trichosporium* OB3b nach DALTON (1991).

Die Pfeile zwischen den Komponenten der sMMO kennzeichnen den Elektronentransfer vom NADH zur Hydroxylase (Protein A). Protein C (NADH-Akzeptor Reduktase) ist als einzige Komponente in der Lage, auch in vitro Elektronen vom NADH auf z.B. DCPIP zu übertragen. Die Rolle des Proteins B ist weitgehend ungeklärt. Es sorgt wahrscheinlich für einen gerichteten Elektronentransfer und steigert die Effizienz des Systems um etwa das 10fache (ANTHONY 1986). Über den Hydroxylierungsmechanismus gibt es bisher nur Hypothesen, die einen ähnlichen Ablauf über die Bildung eines hochreaktiven Porphyrin π-Kationradikals Fe(IV)=O wie bei den Cytochrom P-450 abhängigen Oxidationsreaktionen postulieren (LIPSCOMB 1994). Die NADH-Akzeptor Reduktase sowie die Komponente B können dabei in vitro durch die Zugabe von Wasserstoffperoxid ersetzt werden (Abb. 5).

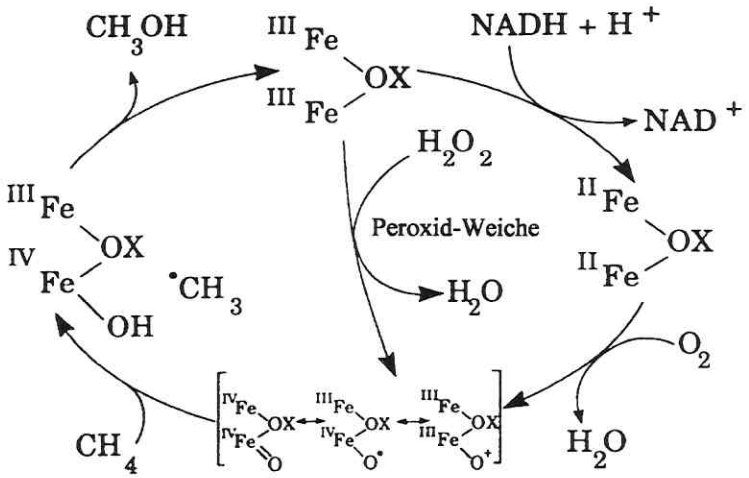

Abb. 5: Postulierter Reaktionsmechanismus der sMMO (FROLAND et al. 1992).

Insbesondere die Hydroxylase wurde in letzter Zeit vor allem mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse intensiv untersucht. Es konnte u.a. in dem Protein aus *Methylosinus trichosporium* OB3b (STHEINMANN 1995) gezeigt werden, daß der Eisenkomplex im aktiven Zentrum der Hydroxylase zwar ähnlich dem im Hämoerythrin (Sauerstoff-bindendes Protein, H_r) sowie dem in der Ribonukleotidreduktase (Synthese von RNA, RNR) aufgebaut ist (Abb. 6), der Mechanismus der Hydroxylierung aber voneinander abweicht (KURTZ 1997). Im inaktivierten Zustand liegt das Fe_2-Zentrum oxidiert als Fe(III)•Fe(III) (H_{ox}) vor. Während der katalytischen Reaktion wird es durch zwei Elektronen (übertragen vom NADH durch die Reduktase) zum Fe(II)•Fe(II) (H_{red}) reduziert und reagiert in Anwesenheit der Komponente B mit O_2 zu verschiedenen reaktiven Intermediaten (ROSENZWEIG et al. 1995).

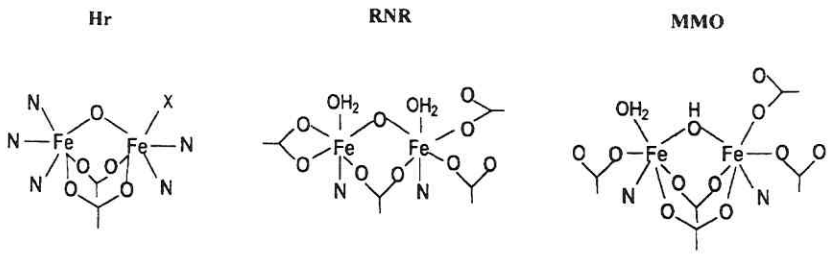

Abb. 6: Struktur der aktiven Zentren verschiedener binuklearer Eisen-Proteine (SHTEINMANN 1995).

Das im initialen Schritt durch die MMO aus Methan gebildete Methanol wird über eine Methanoldehydrogenase in Formaldehyd umgewandelt. Die Methanoldehydrogenasen der Methylotrophen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Elektronenakzeptoren, relativer Molmassen und Substratspezifitäten (ANTHONY 1986). Eine $NAD(P)^+$- unabhängige Dehydrogenase mit einer sehr breiten Substratspezifität wurde erstmalig von ANTHONY und ZATMAN (1964) beschrieben. In vitro läßt sich das Enzym mit dem artifiziellen Elektronenakzeptor PMS nachweisen (HIGGINS et al. 1981). SALISBURY et al. (1979) beschrieben PQQ (Abb. 7) als ein Coenzym, das in Methanoldehydrogenasen universell vorkommt und in die Elektronenübertragung involviert ist (Trivialname: Methoxatin).

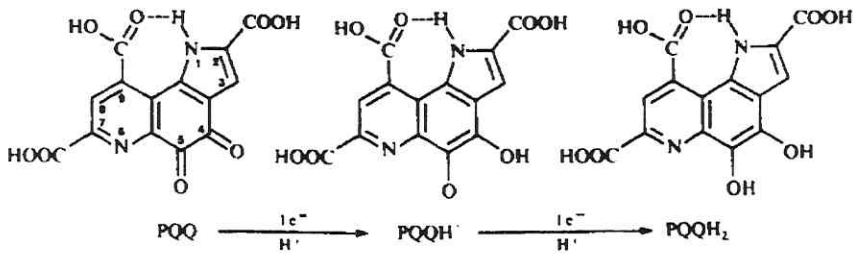

Abb. 7 : Prosthetische Gruppe der Methanoldehydrogenase: Pyrrolochinolinchinon. Das mittlere Redoxpotential von PQQ/$PQQH_2$ beträgt +90mV bei pH 7,0 und +419mV bei pH 2,0 , was darauf hinweist, daß es sich um ein $2e^-/2H^+$ Redoxsystem handelt (DUINE et al. 1981).

Auf der Oxidationsstufe des Formaldehyds erfolgt die Verzweigung des assimilatorischen (vgl. 1.1.3.2.) und dissimilatorischen Methanabbaus. Letzterer führt über einen linearen Abbauweg (Formaldehyd- und Formiatdehydrogenase, im allgemeinen $NAD(P)^+$- abhängig, DIJKHUIZEN und SOKOLOV 1991) bzw. über einen cyclischen Abbauweg (nur Typ I-Methanotrophe, Abb. 8) zum Kohlendioxid. Im linearen Abbauweg steigt dabei die freie Energie mit der jeweiligen Oxidationsstufe an (Tab. 2). Durch die relativ niedrige freie Energie scheint die Oxidation vom Methan zum Methanol einer der limitierenden Schritte des Methanabbaus zu sein (ROKEM und GOLDBERG 1991).

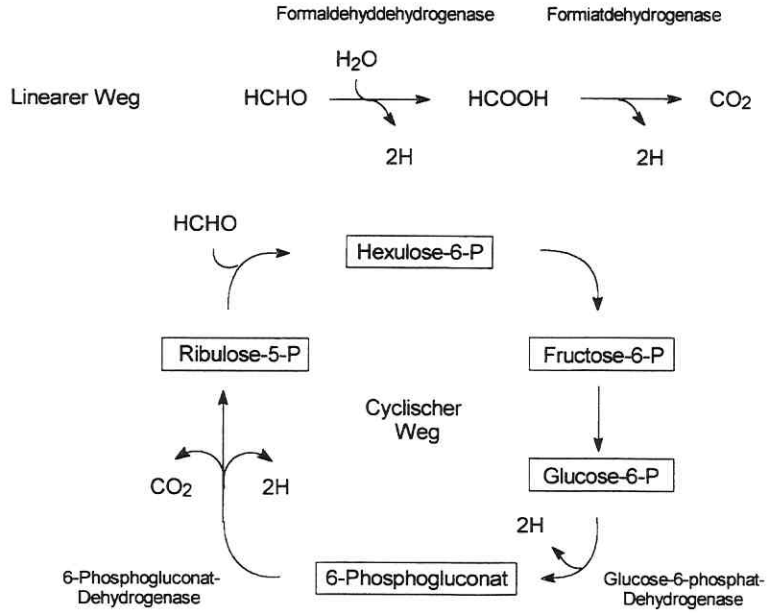

Abb. 8 : Linearer und cyclischer Abbauweg des Formaldehyds (LIDSTROM 1991) (letzterer enthält Enzyme des RuMP-Cyclus).

Tab. 2: Thermodynamische Konstanten des Methanabbaus (RIBBONS und MICHEAOVER 1970).

Reaktion			$\Delta G_0'$(pH 7,0; kJ/mol)
$CH_4 + ½ O_2$	→	CH_3OH	-109,7
$CH_3OH + ½ O_2$	→	$HCHO + H_2O$	-188,2
$HCHO + ½ O_2$	→	$HCOOH$	-240,0
$HCOOH + ½ O_2$	→	$CO_2 + H_2O$	-244,7

1.1.3.2. Assimilatorischer Weg

Die Assimilation des Kohlenstoffs erfolgt bei Typ I- und Typ X- Methanotrophen auf der Oxidationsstufe des Formaldehyds. Im ersten Schritt kondensiert der Formaldehyd mit einer aktivierten Pentose, dem Ribulose-5-phosphat, das namensgebend für diesen Cyclus (Ribulosemonophosphatcyclus, RuMP) ist. Das daraus entstehende Hexulose-6-phosphat wird anschließend über eine Isomerase in Fructose-6-phosphat überführt. Dieses wird dann über die Glykolyse verstoffwechselt bzw. dient über Transaldolase- und Transketolasereaktionen zur Regenerierung des Ribulose-5-phosphats als Formaldehyd-Akzeptor. Für den RuMP-Weg, der

wesentlich intensiver als der Serinweg untersucht wurde (HIGGINS et al. 1981), sind zahlreiche Varianten bekannt, die von den verschiedenen Spezies genutzt werden (u.a. Entner-Doudoroff Variante).

Die Typ II- Methanotrophen assimilieren den Kohlenstoff über den Serinweg. Dabei reagiert Formaldehyd in einer ersten nichtenzymatischen Reaktion mit dem wichtigsten Coenzym des C_1-Transfers, der Tetrahydrofolsäure. Das entstehende Methylentetrahydrofolat überträgt den aktivierten Formaldehyd auf das Glycin. Diese Reaktion wird durch die Serinhydroxymethyltransferase katalysiert. Durch die nachfolgenden Reaktionen (Abb. 9) erfolgt die Einbindung in den Stoffwechsel bzw. die Rückgewinnung des primären Akzeptors. Die Schlüsselenzyme des Serinweges sind die Hydroxypyruvatreduktase, die Glyceratkinase, die Malatthiokinase sowie die Malyl-CoA-Lyase (ANTHONY 1991). Durch die Phosphoenolpyruvatcarboxylase erfolgt eine zweite Assimilation einer C_1-Verbindung, nämlich des Kohlendioxids. Obwohl bis jetzt in keinem der untersuchten Mikroorganismen die Schlüsselenzyme beider Assimilationswege in vergleichbaren Konzentrationen nachgewiesen wurden, verfügen einige Typ I- Methanotrophe, die den Kohlenstoff über den RuMP-Cyclus assimilieren, auch über signifikante Enzymaktivitäten des Serinweges (HIGGINS et al. 1981).

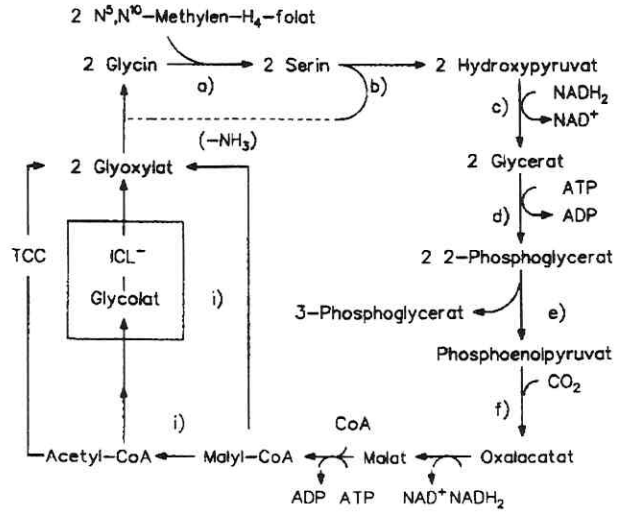

Abb. 9: Serinweg der Typ II-Methanotrophen.
a) Serinhydroxymethyltransferase; b) Serin-Glyoxylat-Aminotransferase; c) Hydroxypyruvatreduktase; d) Glyceratkinase; e) Enolase; f) Phosphoenolpyruvatcarboxylase; g) Malatdehydrogenase; h) Malatthiokinase; i) Malyl-CoA-Lyase ; ICL-Isocitratlyase

Das Acetyl-CoA wird in den Methanotrophen je nach Enzymausstattung weiter verwertet. Bei vorhandener Isocitratlyase (ICL) erfolgt die Rückgewinnung des Glyoxylats unter Einbeziehung von Enzymen des Tricarbonsäure- (TCC) und Glyoxylatcyclus. Bei fehlender ICL wird es möglicherweise direkt über Glycolat als Intermediat zum Glyoxylat oxidiert (ANTHONY 1975).

1.2. Methanotrophe und ihr biotechnologisches Potential

Methanotrophe Mikroorganismen nutzen Methan -ein reichlich vorkommendes, sehr billiges Substrat- als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle und können deshalb nahezu überall angesiedelt werden. Sie spielen dabei eine große Rolle bei der Verwertung des weltweit produzierten Methans (vgl. 1.1.1.) und haben somit positiven Einfluß bei der Klimaerhaltung sowie dem Ozonschutz. Neben dieser natürlichen Funktion verfügen Methanotrophe aber noch über ein enormes biotechnologisches Potential.

Zwischen 1960 und 1980 rückten die methanotrophen Mikroorganismen erstmalig in den Brennpunkt des biotechnologischen Interesses. Mit ihrer Hilfe konnte eine Massenproduktion von Zellprotein und Chemikalien (Methanol, Formaldehyd u.a.) -mit kleinstem technologischen Aufwand und äußerst billig- erreicht werden. Diese Anwendungsmöglichkeiten führten auch zur Isolation und Beschreibung sehr vieler neuer Methanotropher (WHITTENBURY et al. 1970a). In dieser Zeit wurden zahlreiche spezielle Forschungseinrichtungen bzw. -gruppen gegründet, die sich mit C_1-Metabolismus beschäftigten. Mit der Entwicklung neuer chemischer Synthesewege sowie den immer billiger werdenden Zellproteinen u.a. aus Sojabohnen und Fischmehl, nahm das Interesse an den Methanotrophen bzw. Methylotrophen jedoch schnell wieder ab (HANSON 1992).

Mit der Entdeckung und Charakterisierung der sMMO (FOX und LIPSCOMB 1988, GREEN und DALTON 1989) Ende der 80-er Jahre boten sich wieder neue interessante Anwendungsgebiete. Die breite Substratspezifität der sMMO (WHITTENBURY und DALTON 1983) ermöglicht den Einsatz der Methanotrophen bei der Entsorgung von problematischen Industrieabfällen. So ist z.B. *Methylosinus trichosporium* OB3b in der Lage, eine Vielzahl von Verbindungen, u.a. Aromaten wie Benzol und Toluol bzw. deren halogenierte Derivate im Rahmen eines Cometabolimus zu hydroxylieren (HANSON und BRUSSEAU 1994). Obwohl die Methanotrophen die meisten Hydroxylierungsprodukte nicht selbst verstoffwechseln können, bieten sie in Kombination mit anderen Bakterien interessante Anwendungsgebiete.

Trotz intensiver Forschung gelang es bisher nicht, Bakterien zu isolieren, die kurzkettige halogenierte Kohlenwasserstoffe, wie Trichlorethylen (TCE) und Chloroform, als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen können (HANSON 1992). Erstmalig demonstrierten WILSON und WILSON (1985) den Abbau (oxidative Dehalogenierung) von TCE durch im Boden befindliche Mikroorganismen. Die Autoren stellten dabei fest, daß ein Abbau nur dann erfolgte, wenn dem Boden Methan zugeführt wurde und schlußfolgerten, daß die Methanotrophen dafür verantwortlich waren. Insbesondere in den letzten Jahren gab es eine Vielzahl von Publikation, die sich mit dem Abbau von TCE -oft verantwortlich für Grundwasser- und Bodenkontaminierung und als starkes Mutagen bekannt (BODROSSY und KOVACS 1994)- beschäftigten (u.a. SMITH et al. 1997, ANDERSON und McCARTY 1997).

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit der Methanotrophen ergibt sich aus ihrer Fähigkeit, unter bestimmten Stoffwechselsituationen Biopolymere zu bilden (SHAH et al. 1996). Insbesondere die Poly-β-hydroxybuttersäure (PHB) spielt hierbei eine wichtige Rolle. PHB hat ähnliche physikalische Eigenschaften wie synthetische Plaste, z.B. Polypropylen (POIRIER et al. 1995), ist aber biologisch abbaubar.

1.3. Ziel der Arbeit

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Bakterienstämme *Methylocystis* sp. GB 25 (ursprünglich als ZIMET B 502 beschrieben, WENDLANDT et al. 1979) und *Methylosinus* sp. WI 14 wurden im Umweltforschungszentrum Leipzig/Halle, Sektion Sanierungsforschung, isoliert. *Methylocystis* sp. GB (Gasbakterien) 25 wird in der Stammsammlung des UFZ -aufgrund von Untersuchungen, die in der ehemaligen Sowjetunion durchgeführt wurden und über die es keine Unterlagen gibt- als Typ II- Methanotropher der Gattung *Methylocystis* geführt. Auch über den erst kürzlich isolierten Stamm *Methylosinus* sp. WI (Wasserisolat) 14 gibt es bisher keine Untersuchungen, die eine Typ-Zuordnung erlauben.

Durch morphologische sowie biochemische Untersuchungen soll deshalb eine Typisierung der beiden untersuchten Stämme nach dem System von WHITTENBURY et al. (1970a) erfolgen. Darüber hinaus war es von besonderem Interesse, die Ausbildung der MMO-Systeme (pMMO und sMMO) in *Methylosinus* sp. WI 14 und *Methylocystis* sp. GB 25 zu untersuchen. Neben wachsenden und ruhenden Zellen sollten dabei auch zellfreie Rohextrakte zum Einsatz kommen. Aufgrund der vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten von Methanotrophen, die vor allem auf die breite Substratspezifität der sMMO zurückzuführen sind, stand dieses Enzymsystem im Mittelpunkt der Untersuchungen. Falls eine sMMO unter entsprechenden Bedingun-

gen (Cu^{2+}-Konzentration, N-Quelle) in den untersuchten Stämmen exprimierbar ist, sollte sie nach Reinigung der Komponenten charakterisiert werden und die dabei erhaltenen Befunde mit denen aus anderen Methanotrophen verglichen werden.

Zur Einschätzung von limitierenden Schritten beim Methanabbau sollten weiterhin auch die Folgeenzyme charakterisiert werden. Die Methanoldehydrogenase (MDH) spielt dabei eine besonders große Rolle, da sie bei verschiedenen anderen methanotrophen Bakterien in den Rücktransport von Elektronen, insbesondere zur pMMO, involviert ist.

Durch die Gewinnung von monoklonalen Antikörpern gegen eine bis zur Homogenität gereinigte Komponente der sMMO aus einem der untersuchten Mikroorganismen sollte ein erster Schritt zur Entwicklung neuer Screening-Methoden zum Nachweis der sMMO erfolgen, der eine Alternative zu schon praktizierten gentechnischen Verfahren darstellen könnte.

2. Material und Methoden

2.1. Mikroorganismen und Chemikalien

Bei den untersuchten Stämmen handelte es sich um Reinkulturen, die in der Sektion Sanierungsforschung im Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle isoliert wurden. Die Untersuchung der Methanmonooxygenase sowie der Folgeenzyme des dissimilatorischen Methanabbaus erfolgte in den Stämmen *Methylocystis* sp. GB 25 (Gasbakterium) und *Methylosinus* sp. WI 14 (Wasserisolat). Zum Vergleich der in den elektronenmikroskopischen Untersuchungen nachgewiesenen intracytoplasmatischen Membranstrukturen wurde auch der zu den Typ I-Methanotrophen gehörende Stamm *Methylobacter* sp. GB 130 kultiviert. Die Stämme sind in der Abteilung Sanierungsforschung, Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH hinterlegt.

Für die Gewinnung des Apoproteins der PQQ-abhängigen Glucosedehydrogenase wurde *Pseudomonas aeruginosa* SG 26 (Institut für Mikrobiologie und experimentelle Therapie, Jena) verwendet.

Die Stämme wurden unter flüssigem Stickstoff gelagert. Abimpfungen erfolgten aller 4 Wochen auf Schrägagarröhrchen (Standardmedium für *Methylocystis* sp. GB 25, NMS-Medium für *Methylosinus* sp. WI 14).

Die Chemikalien für die Tests zur Substratspezifität der MMO wurden von verschiedenen Herstellern bezogen und waren GC-rein, alle anderen verwendeten Chemikalien für die Analyse bestimmt.

Formaldehyd wurde aus Paraformaldehyd nach QUAYLE (1982) hergestellt. Dazu wurden 300 mg Paraformaldehyd in 10 ml aqua dest. etwa 12 h in einem abgeschlossenen Gefäß erhitzt und die Lösung anschließend filtriert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte nach NASH (1953).

2.2. Nährmedien

Als Nährmedien für die Kultivierung der methanotrophen Bakterien dienten :

a) Standardmedium (pro l) : 470,0 mg $(NH_4)_2SO_4$, 435,5 mg K_2HPO_4, 340,0 mg KH_2PO_4, 35,6 mg $MgSO_4 \times 7H_2O$, 2,5 mg $FeSO_4 \times 5H_2O$, 1,850 mg $CaCl_2 \times 2H_2O$, 0,393 mg $CuSO_4 \times 5H_2O$, 0,308 mg $MnSO_4 \times H_2O$, 0,220 mg $ZnSO_4 \times 7H_2O$, 0,126 mg $NaMoO_4 \times 2H_2O$.

Eisensulfat- und Phosphat-Lösung wurden getrennt von den anderen Spurensalzen autoklaviert und danach dem Medium zugesetzt. Der pH-Wert wurde im Komplettmedium mittels NaOH auf 6,8 eingestellt. Für die Anzucht in Petrischalen erfolgte pro l Nährmedium eine Zugabe von 15 g Agar (Difco, USA).

b) NMS-Medium nach FOX et al.(1990) (pro l) : 850 mg $NaNO_3$, 860 mg K_2HPO_4, 530 mg KH_2PO_4, 170 mg K_2SO_4, 37 mg $MgSO_4$ x $7H_2O$, 7 mg $CaCl_2$, 5 mg $FeSO_4$ x $7H_2O$, 0,58 mg $ZnSO_4$ x $7H_2O$, 0,47 mg $MnSO_4$ x $7H_2O$, 0,17 mg KI, 0,12 mg H_3BO_3, 0,10 mg $CoCl_2$ x $5H_2O$, 0,10 mg $NaMoO_4$ x $2H_2O$.

Eisensulfat- und Phosphatlösung wurden getrennt autoklaviert und danach dem Medium zugesetzt. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 6,8 eingestellt.

Für die Kultivierung von *P. aeruginosa* SG 26 wurde folgendes Medium verwendet (VAN DER MEER et al. 1990) (pro l) :

14,8 g K_2HPO_4, 4,5 g KH_2PO_4, 6,5 g Natriumgluconat, 3,0 g $(NH_4)_2SO_4$, 0,5 g $MgCl_2$ x $6H_2O$, 15 mg $CaCl_2$, 15 mg $FeSO_4$ x $7H_2O$, 0,07 mg $ZnSO_4$ x $7H_2O$, 0,02 mg $NaMoO_4$ x $2H_2O$, 0,01 mg H_3BO_3, 0,01 mg $MnSO_4$ x $7H_2O$, 0,01 mg $CuSO_4$ x $6H_2O$.

Eisensulfat- und Phosphat-Lösung wurden getrennt autoklaviert und danach dem Medium zugesetzt. Natriumgluconat als Kohlenstoff- und Energiequelle wurde kalt sterilisiert der pH-Wert auf 7,2 eingestellt.

Alle verwendeten Nährmedien, Kulturgefäße u.a. wurden 20 min bei 121°C autoklaviert.

2.3. Zellkultivierung

2.3.1 Kultivierungsbedingungen

Die Stammkulturen der untersuchten Methanotrophen wurden auf Agarplatten mit dem jeweiligen Medium übertragen und in luftdichten Gefäßen analog zu den Flüssigkulturen mit Methan als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle kultiviert.

Eine Vorkultur von *Methylocystis* sp. GB 25 wurde durch Übertragung der auf Agarplatten (Standardmedium) gewachsenen Zellen in 1 l Erlenmeyerkolben angelegt. Pro Kolben wurden 100 ml des jeweiligen Mediums (für den Wachstumstest Standard- und NMS-Medium und nach Ermittlung des optimalen Mediums das Standardmedium) eingesetzt. Die optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}, d=1 cm ; Spekol 11, Carl Zeiss Jena, DDR) am Anfang der Kultivierung betrug etwa 0,1. In den Erlenmeyerkolben mit Spezialaufsätzen wurde anschließend 25 % der Gasphase durch Anlegen eines partiellen Vakuums mit Methan ersetzt. Die Kultivierung er-

folgte bei 38°C im Schüttelbad (SW-20C, Julabo, BRD). Nach 22 h wurde die Vorkultur in weitere 1 l Erlenmeyerkolben mit je 100 ml Medium (Endvolumen) übertragen. Die OD_{600} wurde auf 0.1 eingestellt. Die Kultivierung erfolgte wie die der Vorkultur.

Mit *Methylobacter* sp. GB 130 wurde wie vorstehend beschrieben verfahren. Die Kultivierung erfolgte aber bei 30°C im Schüttelbad (1083, GFL, BRD).

Die Kultivierung von *Methylosinus* sp. WI 14 erfolgte analog zu *Methylocystis* sp. GB 25, aber auf NMS-Medium und bei 30°C.

Die vom Schrägagarröhrchen abgeschwemmte Stammkultur von *P. aeruginosa* SG 26 wurde (ohne eine Vorkultur anzulegen) in 1 l Erlenmeyerkolben mit dem unter 2.2.1. beschriebenen Medium überführt. Die Kultivierung erfolgte bei 30°C und 200 rpm auf einem Schüttelinkubator (Modell OSFT-LS, CLF Laborgeräte, Emersacker, BRD).

2.3.2. Wachstumskontrolle und Zellernte

Das Zellwachstum wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}, d=1 cm, Spekol 11, Carl Zeiss Jena, DDR) kontrolliert. Über eine Eichkurve konnte daraus die Bakterientrockenmasse (BTM) für die Methanotrophen berechnet werden. Eine OD_{600} von 0,1 (OD_{600} bei Kulturansatz) entsprach dabei einer BTM von etwa 34 mg/l, eine OD_{600} von 1,0 (am Ende der exponentiellen Wachstumsphase) einer BTM von etwa 595 mg/l.

Am Ende der exponentiellen Wachstumsphase (OD_{600} etwa 1.0) erfolgte die Zellernte. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation, 20 min bei 6000 g und 0°C (K24 D, Zentrifugenbau Engelsdorf, DDR), gewonnen und zweimal mit Na-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,0) gewaschen. Das Pellet wurde eingefroren und bis zum Zellaufschluß bei -18°C aufbewahrt.

2.4. Zellaufschluß

2.4.1. Permeabilisierung

1 g Zellen (Feuchtgewicht) wurden in Na-Phosphatpuffer (25 mM, pH 7,0) resuspendiert und mit je 30 µl Toluol und Mercaptoethanol versetzt. Die Suspension wurde anschließend 10 min bei 30°C geschüttelt (Vibromix, VF 2, IKA-Labortechnik, BRD). Die permeabilisierten Zellen wurden 1:10 mit Puffer verdünnt und bis zur Bestimmung der Enzymaktivitäten bei 0°C aufbewahrt.

2.4.2. Alcoa

Beim Aufschluß mit Alcoa wurden ca. 1 g Bakterien (Feuchtgewicht) mit etwa 2 g Alcoa und 1 ml Na-Phosphatpuffer (25 mM, pH 7,0) versetzt. In einem vorgekühlten Mörser wurde der entstehende zähe Brei dreimal 10 min zerrieben. Zur Aufrechterhaltung der Konsistenz wurde mehrmals etwas Alcoa zugesetzt. Am Ende des Aufschlusses erfolgte eine portionsweise Extraktion mit ca. 3 ml Puffer und nachfolgend eine Zentrifugation für 30 min bei 10.000 g und 4°C (K24, Zentrifugenbau Engelsdorf, DDR).

2.4.3. French Press

Die eingefrorenen Bakterienzellen wurden in Na-Phosphatpuffer (25 mM, pH 7,0) bzw. für die Komponenten der sMMO in Tris/HCl-Puffer (25 mM, pH 7,2), der zur Stabilisierung 5 mM Natriumthioglycolat enthielt, aufgenommen (ca. 10-20 g BTM/l) und mit zwei Durchläufen an der French Press (Mini-Cell, 20.000 psi, ca. 4°C, Aminco, SLM Instruments Urbana, USA) aufgeschlossen. Die Abtrennung des Zellrohextraktes von den Zellrückständen erfolgte durch Zentrifugation, wie vorhergehend (2.4.2.) beschrieben.

2.4.4. Ultraschall

Die Zellen wurden wie bei 2.4.3. beschrieben suspendiert und mittels Ultraschallgerät (20 kH, Labsonic U, Braun, Melsungen, BRD) in 4 Intervallen von je 60 s mit Pausen von je 30 s aufgeschlossen. Der zellfreie Extrakt wurde wie in 2.4.2. beschrieben gewonnen.

2.5. Zellfraktionierung

Die durch unterschiedliche Aufschlußmethoden gewonnenen Zellrohextrakte wurden zur Abtrennung der cytoplasmatischen von der membrangebundenen Fraktion für 90 min bei 100.000 g und 0°C (XL-90, Rotor SW 30.1, Beckman Inc. Paolo Alto, USA) zentrifugiert. Der Überstand wurde als lösliche Fraktion bezeichnet, das Sediment einmal gewaschen, wie o.g. zentrifugiert und in Puffer resuspendiert (Membranfraktion).

2.6. Bestimmung und Definition der Enzymaktivitäten

2.6.1. Methanmonooxygenase

2.6.1.1. Gaschromatographischer Nachweis

Die Bestimmung der Aktivität der Methanmonooxygenasen (sMMO und pMMO) in intakten Zellen sowie im zellfreien Extrakt erfolgte nach HOU et al. (1979 und 1980) durch Messung des gebildeten Propylenoxids.

Dazu wurden 10 ml - fassende Headspacegefäße (Perkin-Elmer, BRD) mit je 1 ml der zu untersuchenden Probe gefüllt und gasdicht verschlossen, anschließend mit Hilfe einer gasdichten Spritze (Hamilton, Schweiz) 2 ml der Gasphase entnommen und durch Propylen ersetzt. Bei Verwendung von zellfreiem Extrakt wurde die Reaktion durch Zugabe von entsprechenden Mengen an NAD(P)H gestartet. Die Inkubation (15-30 min) erfolgte bei 30°C auf einem Schütteltisch (TB-125, Infors AG, Schweiz). Das gebildete Propylenoxid wurde mittels gasdichter Spritze direkt aus der Gasphase der Probengefäße entnommen und durch Gaschromatographie (Hewlett Packard 5890 II, 25 m Kapillarsäule Ultra 2, d=0,2 mm, Säulentemperatur: 50°C, Trägergas: Wasserstoff, Rate: 2,26 ml/min, FID) nachgewiesen. Die Identifizierung des gebildeten Produktes erfolgte durch Vergleich der Retentionszeit mit einem Standard (Propylenoxid). Durch Aufstellen einer Eichkurve mit unterschiedlichen Propylenoxidkonzentrationen (unter gleichen Bedingungen, wie bei den Probenansätzen) erfolgte eine Quantifizierung des gebildeten Propylenoxids.

Das eingesetzte Probenvolumen betrug jeweils 1 ml und enthielt für die verschiedenen Tests: a) in Na-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,5) suspendierte Zellen.

b) permeabilisierte Zellen

c) Na-Phosphatpuffer (50 mM, pH 6,0-8,0), $MgCl_2$ (5 mM), verschiedene Elektronendonatoren (0,4 mM-10 mM) und die jeweilige Probe (1-5 mg Protein).

2.6.1.2. Methanabhängiger Sauerstoffverbrauchstest

Die Aktivität der Methanmonooxygenase wurde mit einer weiteren Methode, durch Messung des O_2-Verbrauchs (Clark-O_2 Elektrode , RE K1-1, Oxytec, BRD) von Zellen bei Methanzugabe, bestimmt.

Dazu wurde die Meßkammer (isotherm 38°C) mit ca. 3 ml Na-K-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,0, 38°C) gefüllt und über ca. 5 min eine Basislinie aufgenommen. Bei Konstanz dieser

Nullinie wurden 100 µl einer Zellsuspension frisch kultivierter Zellen, zweimal mit Na-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,5) gewaschen und in diesem suspendiert, in die Meßzelle injiziert und über mindestens 2 min die Atmungsintensität registriert. Danach wurden 200 µl einer bei 38°C mit Methan gesättigten Na-Phosphatpufferlösung (50 mM, pH 7,0) zugegeben. Der daraus resultierende Sauerstoffverbrauch wurde über mindestens 2 min gemessen. Durch Zugabe einer gesättigten Natriumsulfitlösung konnte der Gesamtsauerstoffgehalt in der Meßzelle berechnet werden.

Die Berechnung des spezifischen Sauerstoffverbrauchs erfolgte nach folgender Formel :

$$A = \frac{\text{gelöster } O_2\,(\text{mol} / \text{l}) \cdot \text{Pr obenpeak}\,(\text{mm})}{\text{Zeit}\,(\text{min}) \cdot \text{Blindpeak}\,(\text{mm}) \cdot \text{Biomasse}\,(\text{g} / \text{l})}$$

Für die Berechnung wurde eine Sauerstoffsättigungskonstante von 211,3 mol/l bei 38°C in H_2O zugrunde gelegt (LANDOLT-BÖRNSTEIN 1962). Die resultierende Aktivität gibt - abzüglich der Atmungsaktivität (gleiche Berechnung unter Einsatz des erhaltenen Peaks für die Atmung) - die spezifische methanabhängige Aktivität in mol min^{-1} g^{-1} (U/g) an.

2.6.1.3. Photometrischer Nachweis

Alternativ wurde ein spektrophotometrischer Nachweis der sMMO durchgeführt. In eine luftdicht verschlossene Küvette mit ca. 5 mg Protein in Tris/HCl-Puffer (25 mM, pH 7,2, 1 ml Gesamtvolumen) wurden 100 µl Propylen mit Hilfe einer gasdichten Spritze injiziert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 mM NADH gestartet und die Extinktionsabnahme bei 340 nm spektrophotometrisch verfolgt.

2.6.1.4. Naphthalentest

Zur Unterscheidung der Monooxygenase-Aktivität in intakten Zellen (Naphthalenoxidation ausschließlich durch sMMO) wurde der Naphthalentest modifiziert nach KOH et al. (1993) durchgeführt.

Dazu wurden frisch geerntete Zellen zur Entfernung von gelöstem Methan zweimal mit NMS-Medium gewaschen und bei 6000 g und 0°C für je 15 min zentrifugiert (K24 D, Zentrifugenbau Engelsdorf, DDR). Die gewaschenen Zellen wurden in NMS-Medium aufgenommen und eine OD_{600} von ca. 0,2 eingestellt. Anschließend erfolgte eine Überführung von je 1 ml Zellsuspension in 10 ml - Probengefäße. Danach wurden 1 ml einer gesättigten und filtrierten

Naphthalenlösung (ca. 234 µmol) zugegeben. Das Gemisch wurde bei 25°C für 15-30 min auf einem Schütteltisch (TB-125, Infors AG, Schweiz) inkubiert. Es wurden zwei Kontrollen (a: durch Hitze abgetötete Zellen; b: steriles Medium) mitgeführt. Nach der Inkubation erfolgte ein Zusatz von 100 µl einer frisch zubereiteten o-Dianisidinlösung (4,21 mM). Die gebildete Diazoverbindung wurde spektrophotometrisch (Shimadzu UV 160-A, Kyoto, Japan) bei 525 nm bestimmt. Die Intensität des Farbstoffkomplexes ist proportional der Naphthol (1- und 2-)-Konzentration. Ein Extinktionskoeffizient von 3,8 l $mmol^{-1}$ cm^{-1} (KOH et al. 1993) wurde zur Quantifizierung benutzt.

2.6.1.5. Komponenten der löslichen Methanmonooxygenase

Die Komponenten der sMMO sind nach den oben beschriebenen Methoden nur in Kombination nachzuweisen, d.h. die spezifische Aktivität der jeweiligen Komponente kann nur dann bestimmt werden, wenn die beiden anderen im Überschuß im Reaktionsansatz vorhanden sind. Da aber nur relativ wenig Zellmaterial zur Verfügung stand und o.g. Testprinzip aufgrund der sehr geringen Stabilität der einzelnen Komponenten nicht reproduzierbar war, wurden zumindest die Komponenten A und C der sMMO nach alternativen Nachweismethoden bestimmt.

2.6.1.5.1. Hydroxylase (Komponente A der sMMO)

Die Komponente A der sMMO ist in Abwesenheit der anderen Komponenten bei Zugabe von H_2O_2 in der Lage, Propylen auch ohne NADH zu oxidieren (JIANG et al. 1993). Der Testansatz wurde nach FROHLAND et al. (1992) durchgeführt. Dazu wurden entsprechende Mengen Protein (ca. 1-5 mg) in Tris/HCl-Puffer (25 mM, pH 7,2, 1 ml Gesamtvolumen) in 10 ml fassende Headspacegefäße überführt und luftdicht verschlossen. 2 ml der Gasphase wurden anschließend durch Propylen ersetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 mM H_2O_2 gestartet und das gebildete Propylenoxid gaschromatographisch bestimmt (vgl. 2.6.1.1.).

2.6.1.5.2. NADH-Akzeptor Reduktase (Komponente C der sMMO)

Die Bestimmung der Reduktase erfolgte nach COLBY und DALTON (1979). Der Testansatz enthielt in 1 ml Endvolumen :

0,5 ml Na-Phosphatpuffer (0,1 M, pH 7,0); 0,9 mM $K_3Fe(CN)_6$, 0,09 mM DCPIP oder 0,05 mM Cytochrom c; entsprechende Enzymmengen (nach Ultrazentrifugation); aqua dest.

Die Reaktion wurde mit NADH (1 mM) gestartet und die Extinktionsänderung bei 412 nm ($K_3Fe(CN)_6$), 600 nm (DCPIP) bzw. 550 nm (Cytochrom c) und bei 25°C über 2 min registriert (Shimadzu UV 160-A, Kyoto, Japan). Als Leerwert diente der Testansatz ohne NADH.

2.6.2. Methanoldehydrogenasen

2.6.2.1. $NAD(P)^+$- abhängige Methanoldehydrogenase

Die Bestimmung der Aktivität der NAD(P)H- abhängigen Methanoldehydrogenase erfolgte nach ANTHONY und ZATMAN (1964). Der Testansatz enthielt in einem Endvolumen von 2 ml :

1 ml Na-Phosphatpuffer (0,1 M, pH 7,5); 1,5 mM NAD^+ bzw. $NADP^+$; entsprechende Enzymmengen; aqua dest.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 mM Methanol gestartet und die Extinktionszunahme bei 340 nm und 25°C über 2 min registriert (Shimadzu UV 160-A, Kyoto, Japan). Der Leerwert enthielt alle Komponenten außer dem Substrat.

2.6.2.2. $NAD(P)^+$- unabhängige Methanoldehydrogenase

Die Bestimmung der PMS/DCPIP vermittelten MDH-Aktivität wurde - modifiziert nach ANTHONY und ZATMAN (1964) - durchgeführt. Der Testansatz enthielt in 2 ml Endvolumen :

1 ml Na-Boratpuffer (50 mM, pH 9,0); 22,5 mM NH_4Cl; 0,13 mM DCPIP; 15 mM Methanol; 3,85 mM KCN; entsprechende Enzymmengen; aqua dest.

Die Reaktion wurde mit 1,65 mM PMS gestartet und die Extinktionsabnahme bei 600 nm und 25°C über 3 min registriert (Shimadzu UV 160-A, Kyoto, Japan). Der Leerwert enthielt alle Komponenten außer dem Substrat.

Mit einer weiteren Methode wurde die Aktivität der $NAD(P)^+$- unabhängigen Methanoldehydrogenase durch die Oxidation von Sorbinalkohol bestimmt. Der Testansatz erfolgte nach ARMSTRONG (1964) und enthielt in einem Endvolumen von 2 ml folgende Komponenten :

1 ml Na-Boratpuffer (50 mM, pH 9,0); 1,8 mM Sorbinalkohol; 22,5 mM NH_4Cl; entsprechende Enzymmengen; aqua dest.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1,65 mM PMS gestartet und die Extinktionszunahme bei 283 nm und 25°C über 2 min registriert (Shimadzu UV 160-A, Kyoto, Japan). Der Leerwert enthielt alle Komponenten außer dem Substrat.

2.6.3. Formaldehyddehydrogenasen

Die Aktivität der $NAD(P)^+$- abhängigen Formaldehyddehydrogenase wurde entsprechend dem unter 2.6.2.1. beschriebenen Testansatz, die der $NAD(P)^+$- unabhängigen entsprechend dem Testansatz von 2.6.2.2. bestimmt. Anstelle von Methanol wurde 50 mM Formaldehyd als Substrat eingesetzt. Der Leerwert enthielt die jeweiligen Komponenten außer dem Substrat.

2.6.4. Formiatdehydrogenase

Die Bestimmung der Formiatdehydrogenase erfolgte nach JOHNSON et al. (1964). Der Testansatz enthielt in einem Endvolumen von 1 ml :

0,5 ml MOPS (50 mM, pH 6,5); 25 mM K_2SO_4; 1 mM NAD^+; entsprechende Enzymmengen; aqua dest.

Die Reaktion wurde mit 5 mM Natriumformiat gestartet und die Extinktionszunahme bei 340 nm und 25°C über 1 min registriert (Shimadzu UV 160-A, Kyoto, Japan). Der Leerwert enthielt alle Komponenten außer dem Substrat.

2.6.5. Hydroxypyruvatreduktase

Die Bestimmung der Aktivität der Hydroxypyruvatreduktase erfolgte nach LARGE und QUAYLE (1963). Der Testansatz enthielt in 3 ml Endvolumen :

Na-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,5); 8 mM NADH; entsprechende Enzymmengen; aqua dest.

Die Reaktion wurde mit 1 mM Hydroxypyruvat gestartet und die Extinktionsabnahme bei 340 nm und 25°C über 3 min (Shimadzu UV 160-A, Kyoto, Japan) verfolgt. Der Leerwert enthielt alle Komponenten außer dem Substrat.

2.6.6. Isocitratdehydrogenase

Die Bestimmung der Aktivität der Isocitratdehydrogenase erfolgte nach LARGE und QUAYLE (1963). Der Testansatz enthielt in 2 ml Endvolumen :

1 ml K-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,5); 0,3 mM AMP; 3,75 mM $MgCl_2$; 8 mM NAD^+ bzw. $NADP^+$; entsprechende Enzymmengen; aqua dest.

Die Reaktion wurde mit 1 mM Kalium-(D,L)-isocitrat gestartet und die Extinktionszunahme bei 340 nm und 25°C über 3 min verfolgt (Shimadzu UV 160-A, Kyoto, Japan). Als Leerwert dienten alle Komponenten außer dem Substrat.

2.6.7. Isocitratlyase

Die Bestimmung der Isocitratlyase erfolgte nach LARGE und QUAYLE (1963). Der Testansatz enthielt in 2 ml Endvolumen :

1 ml Tris/HCl (50 mM, pH 7,2); 9 mM $MgCl_2$; 3,6 mM Cystein/HCl; 6 mM Phenylhydrazin; entsprechende Enzymmengen; aqua dest.

Die Reaktion wurde mit 3 mM Natrium-(D,L)-isocitrat gestartet und die Extinktionszunahme bei 324 nm und 25°C über 2 min verfolgt (Shimadzu UV 160-A, Kyoto, Japan). Der Leerwert enthielt alle Komponenten außer dem Substrat.

2.6.8. Malatdehydrogenase

Die Bestimmung der Aktivität der Malatdehydrogenase erfolgte nach LARGE und QUAYLE (1963). Der Testansatz enthielt in einem Endvolumen von 2 ml :

1 ml Na-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,0); 1 mM NADH; entsprechende Enzymmengen; aqua dest.

Die Reaktion wurde mit 1 mM Oxalacetat gestartet und die Extinktionsabnahme bei 340 nm und 25°C über 2 min registriert (Shimadzu UV 160-A, Kyoto, Japan). Als Leerwert dienten alle Komponenten außer dem Substrat.

2.6.9. Definition der Enzymaktivitäten

Die spezifische Aktivität der Methanmonooxygenase in intakten Zellen wurde im gaschromatographischen Test als µmol Produktbildung (Propylenoxid) / min x mg Trockenmasse bzw. pro mg Proteingehalt definiert (U/mg). Im methanabhängigen Sauerstoffverbrauchstest wurde die spezifische Aktivität als mol Substratumsatz (Sauerstoff) / min x g Trockenmasse definiert (U/g).

Die spezifische Aktivität der Reduktase-Komponente (Komponente C) der sMMO wurde durch Reduktion von $K_3Fe(CN)_6$ (ε =1 l $mmol^{-1}$ cm^{-1}), DCPIP (ε = 19,1 l $mmol^{-1}$ cm^{-1}) bzw. Cytochrom c (ε = 28 l $mmol^{-1}$ cm^{-1}) (BASFORD und HUENNEKENS 1955) bestimmt und als µmol Substratumsatz / min x mg Protein definiert (U/mg).

Für die NADH- bzw. NADPH- abhängigen Oxidoreduktasen wurde unter Berücksichtigung eines Extinktionskoeffizienten von 6,22 l $mmol^{-1}$ cm^{-1} die spezifische Aktivität als µmol Substratumsatz / min x mg Protein definiert (U/mg) und bei 340 nm spektrophotometrisch (Shimadzu UV 160-A, Kyoto, Japan) bestimmt.

Die pyridindinukleotidunabhängigen Dehydrogenasen wurden durch die Extinktionsabnahme von DCPIP bei 600 nm bestimmt. Zur Berechnung der Aktivität diente ein Extinktionskoeffizient von 19,1 l $mmol^{-1}$ cm^{-1}. Die Aktivität wurde als µmol Substratumsatz / min (U), die spezifische Aktivität als µmol Substratumsatz / min x mg Protein (U/mg) definiert.

Alternativ wurde die Methanoldehydrogenase (MDH)- Aktivität durch die Oxidation von Sorbinalkohol (2,4-Hexadien-1-ol) zu Sorbinaldehyd spektrophotometrisch durch Zunahme der Extinktion bei 283 nm bestimmt. Zur Berechnung der Aktivität diente ein Extinktionskoeffizient von 29 l $mmol^{-1}$ cm^{-1} (ARMSTRONG 1964). Die Aktivität wurde als µmol Substratumsatz / min (U), die spezifische Aktivität als µmol Substratumsatz / min x mg Protein (U/mg) definiert.

Die Isocitratlyase wurde durch die Extinktionszunahme von Phenylhydrazin bei 324 nm bestimmt (LARGE und QUAYLE 1963). Dabei entspricht eine Extinktionsänderung (ΔE) von 0,1 / min einer Volumenaktivität von 5,9 nmol/ml. Die Aktivität wurde als µmol Substratumsatz / min (U), die spezifische Aktivität als µmol Substratumsatz / min x mg Protein (U/mg) definiert.

Während der chromatographischen Trennung wurde die Proteinkonzentration durch Messung der Extinktion bei 280 nm bestimmt. Die Proteinbestimmungen zur Ermittlung der Enzymanreicherung erfolgten nach der Methode von BRADFORD (1976). Der Proteingehalt wurde mittels einer Eichkurve, die unter Verwendung von RSA als Standard mitgeführt wurde, bestimmt. Für die exakte Proteinbestimmung für die Kalkulation des Metallgehalts der Hydroxylase sowie des Coenzymgehalts der Methanoldehydrogenase wurde der direkte Peptidbindungsnachweis nach der Mikro-Biuret-Methode (JANATOWA et al. 1968) verwendet. Die Proteinbestimmung erfolgte durch Differenzmessung der Extinktion bei 390 nm und 290 nm. Als Eichprotein wurde RSA verwendet.

2.7. Methoden zur Enzymreinigung

Sämtliche chromatographische Reinigungsverfahren wurden an der FPLC (Controller LKB G250 Plus, Pharmacia, Uppsala, Schweden) durchgeführt. Die verwendeten Säulen und Puffer wurden mittels Thermostat (K20-E11, Funke, Medingen, BRD) auf konstant 4°C gekühlt.

2.7.1. Reinigung der Hydroxylase (Komponente A der sMMO)

2.7.1.1. Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose FF

Die nach Ultrazentrifugation gewonnene lösliche Proteinfraktion wurde auf eine mit Tris/HCl-Puffer (25 mM, pH 7,2), der 5 mM Natriumthioglycolat enthielt, äquilibrierte DEAE-Sepharose FF-Säule (Pharmacia, Uppsala, Schweden) aufgetragen und die Säule mit dem gleichen Puffer so lange gewaschen, bis kein Protein mehr im Durchlauf detektiert werden konnte. Anschließend wurde die Säule mit 0,2 M NaCl in Tris/HCl-Puffer (25 mM, pH 7,2 + 5 mM Natriumthioglycolat) gewaschen, bis kein Protein mehr im Durchlauf gemessen werden konnte. Der die Hydroxylase enthaltende Durchlauf wurde mittels Ultrafiltration (Amicon-Ultrafiltrationszelle 8010, Membran PM 100, Amicon, Danvers, USA) konzentriert und in Äquilibrierungspuffer aufgenommen. Diese Proteinlösung wurde anschließend wieder auf eine mit dem gleichen Puffer äquilibrierte DEAE-Sepharose FF-Säule aufgetragen und so lange gewaschen, bis kein Protein mehr im Durchlauf detektiert werden konnte. Anschließend wurden die gebundenen Proteine mit einem linearen Gradienten (10 Säulenvolumen) von 0-0,18 M NaCl in Tris/HCl-Puffer (25 mM, pH 7,2 + 5 mM Natriumthioglycolat) eluiert. Die Flußrate betrug 1 ml/min. Es wurden Fraktionen zu je 1,5 ml gesammelt und die Enzymaktivität enthaltenden Fraktionen gesammelt und mittels Ultrafiltration (vgl. oben) konzentriert.

2.7.1.2. Gelfiltration an Superose 12 HR

Die durch Ionenaustauschchromatographie angereicherte Hydroxylase wurde mit Hilfe eines Probenauftragsventils (V-7) über eine Probenauftragsschleife (500 µl) auf eine mit Na-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,4, 150 mM NaCl) äquilibrierte Kombination zweier Superose 12 HR-Säulen 10/30 (Pharmacia, Uppsala, Schweden) aufgetragen. Die Elution der Proteine erfolgte mit dem gleichen Puffer und einer Flußrate von 0,4 ml/min (Gegendruck 2 MPa). Das Ausschlußvolumen der Säulen (19 ml) wurde verworfen und anschließend je 0,5 ml Fraktionen gesammelt.

2.7.2. Reinigung der Komponente B der sMMO

2.7.2.1. Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose FF

Die Chromatographie der Komponente B der sMMO an DEAE-Sepharose FF erfolgte ähnlich wie unter 2.7.1.1. beschrieben. Nach dem Auftragen der löslichen Proteinfraktion wurde die Säule mit 0,15 M NaCl in Tris/HCl-Puffer (25 mM, pH 7,2) gewaschen, bis kein Protein mehr im Durchlauf detektiert werden konnte. Anschließend erfolgte eine Elution der Komponente B mit 0,3 M NaCl in Tris/HCl-Puffer (25 mM, pH 7,2). Die zwischen 0,15 M und 0,3 M NaCl eluierten Proteine wurden mittels Ultrafiltration (vgl. 2.7.1.1., Membran PM 10) konzentriert , in Tris/HCl-Puffer (25 mM, pH 7,2), der 0,15 M NaCl enthielt, aufgenommen und auf eine mit dem gleichen Puffer äquilibrierte DEAE-Sepharose FF-Säule aufgetragen. Anschließend wurde ein linearer Gradient von 0,15 M - 0,28 M NaCl in Tris/HCl -Puffer (25 mM, pH 7,2) angelegt (10 Säulenvolumen) und Fraktionen zu je 1,5 ml bei einer Flußrate von 1 ml/min gesammelt. Die Komponente B enthaltenden Fraktionen wurden durch Ultrafiltration (vgl. oben) konzentriert.

2.7.2.2. Gelfiltration an Superose 12 HR

Die angereicherte Komponente B wurde anschließend auf eine Kombination zweier Superose 12 HR-Säulen 10/30 aufgetragen. Die Elution erfolgte analog zu 2.7.1.2.

2.7.3. Reinigung der NADH-Akzeptor Reduktase (Komponente C der sMMO)

2.7.3.1. Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose FF

Die Chromatographie der Reduktase erfolgte ähnlich wie unter 2.7.1.1. beschrieben. Nach Auftragen der löslichen Proteinfraktion wurde die Säule mit 0,2 M NaCl in Tris/HCl-Puffer (25 mM, pH 7,2 + 5 mM Natriumthioglycolat) gewaschen, bis kein Protein mehr im Durchlauf detektiert werden konnte. Anschließend erfolgte die Elution der Reduktase mit 0,5 M NaCl in Tris/HCl-Puffer (25 mM, pH 7,2 + 5 mM Natriumthioglycolat). Die zwischen 0,2 M und 0,5 M NaCl eluierten Proteine wurden mittels Ultrafiltration (vgl. 2.7.1.1., Membran PM 10) konzentriert, in Tris/HCl-Puffer (25 mM, pH 7,2, 0,2 M NaCl enthaltend + 5 mM Natriumthioglycolat) aufgenommen und auf eine mit dem gleichen Puffer äquilibrierte DEAE-Sepharose FF-Säule aufgetragen. Die Elution der Proteine erfolgte mit einem linearen Gradienten (10 Säu-

lenvolumen) von 0,2 M - 0,5 M NaCl in Tris/HCl-Puffer (25 mM, pH 7,2 + 5 mM Natriumthioglycolat). Es wurden Fraktionen von je 1,5 ml gesammelt. Die Enzymaktivität enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, mittels Ultrafiltration (vgl. oben) konzentriert und in Tris/HCl-Puffer (25 mM, pH 7,2 + 5 mM Natriumthioglycolat) aufgenommen. Die Flußrate betrug 1 ml/min.

2.7.3.2. Ammoniumsulfatfällung

Die mittels Ionenaustauschchromatographie angereicherte Reduktase wurde bei 0°C über ca. 10 min mit Ammoniumsulfat versetzt und anschließend 20 min gerührt. Die Ammoniumsulfatkonzentration wurde schrittweise um je 20 % erhöht, bis eine Sättigung von 80 % erreicht war (COOPER 1981). Die betreffenden Fraktionen (0-20 %, 20-40 %, 40-60 %, 60-80 %) wurden zentrifugiert (30 min, 10.000g, 4°C, K24) und das jeweilige Präzipitat in Tris/HCl-Puffer (25 mM, pH 7,2 + 5 mM Natriumthioglycolat) aufgenommen.

2.7.3.3. Hydrophobe Interaktionschromatographie an TSK-Butyl

Die nach der fraktionierten Ammoniumsulfatfällung aktive Reduktase-Fraktion wurde durch Zugabe von festem Ammoniumsulfat auf eine Konzentration von 25 % Ammoniumsulfat gebracht und auf eine mit Tris/HCl-Puffer (25 mM, pH 7,2, 25 % Ammoniumsulfat enthaltend + 5 mM Natriumthioglycolat) äquilibrierte Fractogel TSK-Butyl 650 (M)-Säule (Merck, Darmstadt, BRD) aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit dem gleichen Puffer gewaschen, bis kein Protein mehr im Durchlauf detektiert werden konnte. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte mit einem linear fallenden Ammoniumsulfat-Gradienten (10 Säulenvolumen) bis 0 % Ammoniumsulfat. Es wurden Fraktionen zu je 1,5 ml gesammelt. Die Flußrate betrug 0,5 ml/min.

2.7.3.4. Affinitätschromatographie

Für die Affinitätschromatographie wurde die angereicherte Reduktase auf eine mit Tris/HCl - Puffer (25 mM, pH 7,2 + 5 mM Natriumthioglycolat) äquilibrierte Blue-Sepharose CL-6B bzw. 5'-AMP-Sepharose-Säule (beide Säulen Pharmacia, Uppsala, Schweden) aufgetragen. Die Säulen wurden mit dem Äquilibrierungspuffer gewaschen, bis im Durchlauf kein Protein mehr zu detektieren war. Die Elution der Proteine erfolgte mit unterschiedlichen NaCl-Kon-

zentrationen (0,5 M - 1 M NaCl) bzw. mit 1 mM NADH im Äquilibrierungspuffer. Es wurden Fraktionen zu je 1 ml gesammelt. Die Flußrate betrug 0,5 ml/min.

2.7.3.5. Gelfiltration

Die Gelfiltration der Reduktase erfolgte analog zu 2.7.1.2..

2.7.4. Reinigung der Methanoldehydrogenasen

2.7.4.1. Ammoniumsulfatfällung

Zu der nach Aufschluß mittels French Press und Ultrazentrifugation erhaltenen löslichen Proteinfraktion wurde unter ständigem Rühren über etwa 5 min festes Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigung von 60 % zugegeben. Nach Abtrennung des Präzipitats durch Zentrifugation (15.000 g, 30 min, K24) wurde weiteres Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigung von 90 % zugegeben und das präzipitierte Protein durch Zentrifugation (15.000g, 30 min, K24) abgetrennt. Das Pellet wurde in Na-Phosphatpuffer (25 mM, pH 7,0), der 30 % Ammoniumsulfat enthielt, resuspendiert.

2.7.4.2. Hydrophobe Interaktionschromatographie an TSK-Butyl

Die durch Ammoniumsulfatfällung angereicherte MDH wurde auf eine mit Na-Phosphatpuffer (25 mM, pH 7,0, 30 % Ammoniumsulfat enthaltend) äquilibrierte Fractogel TSK-Butyl 650 (M)-Säule aufgetragen. Die Säule wurde anschließend so lange gewaschen, bis kein Protein mehr im Durchlauf detektiert werden konnte. Die Elution der Proteine erfolgte analog zu 2.7.3.3. mit fallender Ammoniumsulfatkonzentration. Aktive Fraktionen wurden gesammelt und durch Ultrafiltration (vgl. 2.7.1.1., Membran YM 30) konzentriert, entsalzt und in Na-Phosphatpuffer (25 mM, pH 7,0) aufgenommen.

2.7.4.3. Ionenaustauschchromatographie an EMD-DEAE und DEAE-Sepharose FF

Die angereicherte MDH wurde auf eine mit Na-Phosphatpuffer (25 mM, pH 7,0) äquilibrierte Fractogel EMD-DEAE 650 (S)-Säule (Merck, Darmstadt, BRD) bzw. DEAE-Sepharose FF aufgetragen und anschließend mit dem gleichen Puffer gewaschen, bis kein Protein mehr im Durchlauf nachgewiesen werden konnte. Die Flußrate betrug 0,8 ml/min. Der Durchlauf wurde gesammelt und durch Ultrafiltration konzentriert.

2.7.4.4. Gelfiltration

Die angereicherte MDH wurde auf eine Kombination zweier Superose 12 HR -Säulen über ein Probenauftragsventil (V-7) mit Hilfe einer Probenauftragsschleife (200 µl) aufgetragen. Die Elution und das Sammeln der Proteine erfolgte analog zu 2.7.1.2.. Aktive Fraktionen wurden vereinigt und mittels Ultrafiltration (Mikrosep 30, Filtron, USA) konzentriert.

2.7.5. Anreicherung der Formiatdehydrogenasen

Die durch Ultrazentrifugation erhaltene lösliche Proteinfraktion wurde auf eine mit 0,1 M NaCl in Tris/HCl-Puffer (50 mM, pH 7,2) äquilibrierte DEAE-Sepharose FF-Säule aufgetragen und anschließend mit dem gleichen Puffer gewaschen, bis kein Protein mehr im Durchlauf nachgewiesen werden konnte. Danach wurden die gebundenen Proteine mit einem linearen Gradienten (10 Säulenvolumen) von 0,1 M - 0,3 M NaCl in Tris/HCl-Puffer (50 mM, pH 7,2) eluiert. Die Flußrate betrug 1 ml/min. Es wurden Fraktionen zu je 1,5 ml gesammelt und aktive Fraktionen durch Ultrafiltration (vgl. 2.7.1.1.) konzentriert.

2.8. Analytische Methoden

2.8.1. Elektrophoresen

2.8.1.1. Nichtdenaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Elektrophorese wurde in dem diskontinuierlichen Puffersystem nach DAVIS (1964) durchgeführt. Eine 0,5 l Elektrophoresekammer (Mini-Trans-Blot, BIO-RAD, BRD) ermöglichte die gleichzeitige Auftrennung von 10 Proben pro Küvette (2 Stück, 80 mm x 72 mm, ca. 6 ml). Folgende Stammlösungen wurden zubereitet :

Lösung A: 3,63 g Tris + 4,8 ml 1 M HCl auf 10 ml aqua dest. pH 8,8

Lösung B: 0,6 g Tris + 4,8 ml 1 M HCl auf 10 ml aqua dest. pH 6,7

Lösung C: 30 g Acrylamid + 0,8 g Bisacrylamid auf 100 ml aqua dest.

Lösung D: 10 g Acrylamid + 2,5 g Bisacrylamid auf 100 ml aqua dest.

Es wurde ein 5 %iges (w/v) Sammelgel (ca. 1 ml/Küvette) folgender Zusammensetzung verwendet :

0,5 ml Lösung B, 1 ml Lösung D, 0,4 ml APS (15 mg/ml), 5 µl TEMED, 3,1 ml aqua dest.

Das 7,5 %ige (w/v) Trenngel (ca. 5 ml pro Küvette) hatte folgende Zusammensetzung :

1,25 ml Lösung A, 2,5 ml Lösung C, 0,8 ml APS (15 mg/ml), 5 µl TEMED, 5,75 ml aqua dest.

Es wurden 20 µl Probe mit einem Proteingehalt von etwa 1 µg/µl je Slot aufgetragen. Die Proben enthielten 20 % (v/v) Probenpuffer folgender Zusammensetzung : 10 µl Glycerin, 10 µl BPB (0,1 % in aqua dest.) auf 100 µl aqua dest. Als Elektrodenpuffer diente eine 25 mM Tris/Glycin Lösung, pH 8,3. Die Proben wurden bei einer Stromstärke von 10 mA im Sammelgel konzentriert und bei 15 mA im Trenngel aufgetrennt.

2.8.1.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Elektrophorese wurde in einer 0,5 l Kammer (vgl. 2.8.1.1.) bzw. in einer 2,5 l Kammer (Protean II xi, BIO-RAD, BRD), die das Auftragen von 15 Proben pro Küvette (180 mm x 180 mm x 1 mm) gestattete, durchgeführt. Sammel- und Trenngel wurden nach SAMBROCK et al. (1989) hergestellt. Das Sammelgel (5 %, w/v) enthielt :

830 µl Acrylamid (30 %ig, w/v), 630 µl Tris/HCl (1 M, pH 6,8), 50 µl SDS (10 %ig, w/v), 400 µl APS (15 mg/ml), 5 µl TEMED, 3,1 ml aqua dest.

Für die kleine Kammer wurden ca. 1,5 ml und für die große Kammer ca. 5 ml Sammelgel benötigt. Das Trenngel (10 %, w/v) hatte pro 10 ml folgende Zusammensetzung :

3,3 ml Acrylamid (30 %ig, w/v), 2,5 ml Tris/HCl (1,5 M, pH 8,8),100 µl SDS (10 %ig, w/v), 800 µl APS (15 mg/ml), 5 µl TEMED, 3,3 ml aqua dest.

Für die kleine Kammer wurden 4-5 ml, für die große Kammer ca. 25 ml Trenngel eingesetzt.

Die pro Slot aufgetragene Proteinmenge richtete sich nach der anschließenden Färbemethode. Für die Coomassiefärbung wurden 20 µg aufgetragen, für die Silberfärbung maximal 1 µg. Zur Aufnahme der Proben wurde ein Probenpuffer folgender Zusammensetzung hergestellt:

50 mM Tris/HCl (pH 6,8), 100 mM Mercaptoethanol, 2 % SDS (w/v), 0,1 % BPB, 10 % Glycerin.

Vor dem Auftragen erfolgte ein Erhitzen der Proben auf 95°C für mindestens 10 min zur Denaturierung der Proteine. Als Elektrodenpuffer wurde eine Lösung aus 25 mM Tris, 250 mM Glycin und 0,1 % SDS verwendet (pH ca. 8,3, keine pH Einstellung mit HCl). Bis zur Einwanderung der Proben in das Trenngel wurde mit einer Stromstärke von 10 mA (kleine Kammer) bzw. 20 mA (große Kammer) und danach mit 15 mA bzw. 35 mA gearbeitet.

2.8.1.3. Isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung wurde mit der 2117 Multiphor II Elektrophoreseeinheit (Pharmacia, Uppsala, Schweden) in Verbindung mit dem Power Supply EPS 3500 (Pharmacia, Uppsala, Schweden) durchgeführt. Es wurden Fertiggele mit immobilisierten pH-Gradienten (SERVALYT Ampholine, pH 3,5-9,5, SERVA, Heidelberg, BRD) verwendet. Die Fokussierung erfolgte auf der mittels Thermostat auf 4°C abgekühlten Trägerplatte der Multiphorkammer. Dazu wurden die Elektroden über in Elektrodenpuffer getränkte Elektrodenstreifen (Pharmacia, Uppsala, Schweden, 1 M NaOH als Kathodenpuffer, 1 M H_3PO_4 als Anodenpuffer) auf das Gel aufgesetzt. Anschließend wurden etwa in der Mitte des Gels Probenauftragsstreifen (Filterpapier FN-8) aufgelegt und pro Streifen etwa 10 µl Probe aufgetragen. Die isoelektrische Fokussierung erfolgte nach WESTERMEIER (1990) durch Anlegen einer Spannung von 1500 V mit einer maximalen Stromstärke von 50 mA und einer Leistung von maximal 30 W für 1,5 h. Nach ca. 45 min wurde die Fokussierung kurz unterbrochen und die aufgelegten Probenauftragsstreifen entfernt. Nach Abschluß der Fokussierung wurde das Gel mit Coomassie-Brillantblau G 250 (vgl. 2.8.1.5.) gefärbt und so lange entfärbt, bis einzelne Banden sichtbar wurden. Zur Ermittlung der isoelektrischen Punkte der aufgetragenen Proben wurde gleichzeitig ein Proteinstandard für die isoelektrische Fokussierung (Testkit SERVA 9, SERVA, Heidelberg, BRD) folgender Zusammensetzung mitgeführt :

Amyloglucosidase	pI 3,5	Myoglobin Pferd)	pI 7,3
Ferritin	pI 4,4	Myoglobin (Wal)	pI 8,3
Albumin (Rind)	pI 4,7	Ribonuclease	pI 9,4
β-Lactoglobulin	pI 5,3	Cytochrom c	pI 10,7
Conalbumin	pI 5,9		

2.8.1.4. Aktivfärbung

Zur Aktivfärbung der NADH-Akzeptor Reduktase bzw. der Methanol-, Formaldehyd- und Formiatdehydrogenasen wurden Polyacrylamid-Gele nach nativer Elektrophorese in den entsprechenden Puffern (vgl. 2.6. ff.) aufgenommen.

Die Aktivfärbung der NADH-Akzeptor Reduktase erfolgte nach COLBY und DALTON (1979). Dazu wurden pro 10 ml Puffer 0,5 mM NADH und 10 mg NBT zugesetzt. Die Inku-

bation erfolgte bei 25°C im Dunkeln (ca. 10 min). Bei Enzymaktivität wurde eine dunkelviolette Bande sichtbar.

Für die Aktivfärbung der NAD(P)H- unabhängigen Dehydrogenasen wurden pro 10 ml Puffer 5,2 mg Ammoniumchlorid, 1 mg INT und 1,2 mg PMS eingesetzt. Die Reaktion wurde mit 20 µl Methanol bzw. 100 µl Formaldehyd gestartet. Nach einer Inkubation bei 25°C im Dunkeln (ca. 15 min) erfolgte die Auswertung anhand der gebildeten rötlichen Banden.

Für die Aktivfärbung der Formiatdehydrogenase wurden pro 10 ml Reaktionsansatz (50 mM MOPS, pH 6,5; 25 mM K_2SO_4; 1 mM NAD^+) 1 mg INT und 1,2 mg PMS eingesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 mM Natriumformiat gestartet. Nach Inkubation bei 25°C im Dunkeln (ca. 10 min) erfolgte die Auswertung anhand der gebildeten rötlichen Banden.

2.8.1.5. Färbung mit Coomassie-Brillantblau

Die Passivfärbung der Gele erfolgte in einem Gemisch aus 120 mg Coomassie-Brillantblau G 250 (SERVA, Heidelberg, BRD), 50 ml Methanol, 20 ml Essigsäure und 50 ml aqua dest. für mindestens 30 min. Anschließend wurden die Gele in einer Lösung, bestehend aus 30 % Methanol und 10 % Essigsäure in aqua dest., entfärbt (ca. 3 x 20 min).

Zur Konservierung wurden die aktiv bzw. passiv gefärbten Gele in einem Gemisch aus 10 % Glycerin und 40 % Ethanol in aqua dest. aufgenommen (mindestens 2 h) und anschließend zwischen zwei Folien gelegt und getrocknet.

2.8.1.6. Silberfärbung

Für die Silberfärbung nach MARCINKA et al. (1992) wurden die Gele für mindestens 1 h fixiert (40 % Methanol, 12 % Essigsäure, 100 µl 38 %iger Formaldehyd auf 200 ml aqua dest.). Nach drei Waschschritten (15 min in 30 % Methanol, 2 x 15 min in aqua dest.) erfolgte eine Vorinkubation in Thiosulfatlösung (20 mg $Na_2S_2O_3$ x $5H_2O$ auf 100 ml aqua dest.) Nach dreimaligem Waschen in aqua dest. (150 ml, je 20 s) wurden die Gele 20 min „versilbert" (200 mg $AgNO_3$, 20 mg Zitronensäure, 75 µl 38 %iger Formaldehyd auf 100 ml aqua dest.), anschließend gewaschen (1 min und 0,5 min in je 200 ml aqua dest.) und entwickelt (12 g $NaCO_3$, 0,8 mg $Na_2S_2O_3$ x $5H_2O$, 100 µl 38 %iger Formaldehyd auf 200 ml aqua dest.). Beim Erscheinen von sichtbaren Banden erfolgte die sofortige Überführung in die Stopper-Lösung (20 % Methanol, 200 mg Zitronensäure in 200 ml aqua dest.). Die Gele wurden anschließend zweimal gewaschen (je 30 min in 200 ml aqua dest. + 200 mg Zitronensäure), konserviert (25 % Ace-

ton, 8 % Glycerin, 200 mg Zitronensäure in aqua dest., mindestens 2 h) und zwischen zwei Folien getrocknet .

2.8.2. Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz

Zur Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz wurde eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (vgl. 2.8.1.2.) mit Chemikalien der höchsten Reinheitsstufe (geeignet für die HPLC) unter Verwendung von aqua tridest. durchgeführt. Die Probenvorbereitung erfolgte zur Vermeidung von Modifizierungen der zu untersuchenden Proteine bei 25°C in SDS-Probenpuffer. Das Trenngel wurde ca. 15 h vor der elektrophoretischen Trennung gegossen, um eine möglichst vollständige Polymerisation des Acrylamids zu erreichen (Beseitigung von freien Radikalen im Gel). Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Gel semi-dry geblottet (TOWBIN et al. 1979). Dazu wurden 4 Lagen Filterpapier (FN-8) in Transferpuffer (10 mM CAPS/NaOH, 10 % Methanol, pH 11,0) getränkt und luftblasenfrei auf die untere Elektrode der Blot-Kammer (Semi-Dry Elektroblotter, Modell HEP-1, OWL, Woburn, USA) gelegt. Danach wurde das Gel aufgelegt und die PVDF-Membran (0,2 µm, Trans-Blot, Bio-Rad, USA), die zuvor kurz durch Methanol und danach durch Transferpuffer gezogen wurde, aufgebracht. Abschließend wurden weitere 4 Lagen Filterpapier mit Transferpuffer getränkt, luftblasenfrei aufgelegt und die Kammer geschlossen. Die Elektroelution der Proteine aus dem Gel erfolgte bei 1 mA/cm^2 Gelfläche für 45 min und 1,5 mA/cm^2 für weitere 45 min. Nach dem Blotten wurde die PVDF-Membran kurz durch Methanol gezogen, mit Coomassie-Brillantblau G 250 gefärbt (120 mg Coomassie-Brillantblau G 250, 40 % Methanol, 1 % Eisessig in aqua tridest.) und mit 50 % Methanol solange entfärbt, bis die entsprechenden Proteinbanden sichtbar wurden. Die jeweiligen Proteinbanden wurden ausgeschnitten, nach Waschen in Methanol getrocknet und bei -20°C bis zur Analyse aufbewahrt.

Die Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz der jeweiligen Proteine erfolgte mit einem Sequencer Modell 473 A (Applied Biosystems, USA) nach der Edmann-Methode. Die gebildeten Phenylthiohydantoin-Aminosäuren wurden über HPLC mit Hilfe einer Reversed Phase-Säule bestimmt (EDMANN und HENSCHEN 1975). Mit Ausnahme des Cysteins konnten mit dieser Methode alle Aminosäuren bestimmt werden.

2.8.3. Bestimmung der relativen Molmasse

2.8.3.1. Gelfiltration

Zur Bestimmung der relativen Molmasse der nativen Proteine wurde eine Gelfiltration an Superose 12 HR (entsprechend 2.7.1.2.) durchgeführt. Dazu wurde eine Eichkurve mit folgenden Eichproteinen (Merck, Darmstadt, BRD) aufgestellt :

Cytochrom c (Pferd)	12.300 Da
Myoglobin (Pferd)	17.200 Da
Carboanhydrase (Rindererythrozyten)	30.000 Da
Ovalbumin (Huhn)	45.000 Da
Ovotransferrin (Huhn)	77.000 Da
Lactatdehydrogenase (Schweineherz)	145.000 Da

2.8.3.2. Methode nach Hedrick-Smith

Zur Bestimmung der relativen Molmasse mit der Methode nach HEDRICK und SMITH (1968) wurde mit dem unter 2.8.1.1. beschriebenen Puffersystem gearbeitet. Die Elektrophorese erfolgte in einzelnen Röhrchen ($\varnothing_i$ = 3 mm, h = 11 cm) mit unterschiedlichen Polyacrylamid-Konzentrationen (4-10 % PA) in einer Röhrchen-Elektrophoresekammer (Bio-Rad, USA). Zum Sammeln wurde mit einer Stromstärke von 1 mA, zum Trennen mit 1,5 mA pro Röhrchen gearbeitet. Nach Herauslösen der Gele aus den Röhrchen wurden diese aktiv gefärbt (vgl. 2.8.1.4.). Über eine Eichkurve konnte unter Verwendung von RSA durch Auswertung des Anstiegs aus der Funktion der jeweiligen R_f-Werte bezogen auf die Polyacrylamid-Konzentration die relative Molmasse des untersuchten Proteins berechnet werden.

2.8.3.3. SDS-Elektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese zur Bestimmung der relativen Molmasse wurde entsprechend 2.8.1.2. durchgeführt. Folgende Eichproteine wurden eingesetzt :

Eichproteine Combithek 1317474 (Boehringer Mannheim, BRD) :

Lysozym	14.300 Da
Trypsininhibitor	20.100 Da
Triosephosphatisomerase	26.600 Da
Aldolase	39.200 Da
Glutamatdehydrogenase	55.600 Da
Fructose-6-phosphatkinase	85.200 Da

SERVA 4 Testkit (SERVA, Heidelberg, BRD) :

Carboanhydrase	29.000 Da
Ovalbumin	45.000 Da
Rinderserumalbumin	67.000 Da
Phosphorylase B	97.400 Da

2.8.4. Nachweis von Poly-ß-hydroxybuttersäure

Der Nachweis von PHB erfolgte mittels Nilrot im Fluoreszensmikroskop (Optiphot X-2, Nikon, Japan) (LAW und SLEPECKY 1961).

2.8.5. Nachweis und Bestimmung von PQQ

Der Nachweis von PQQ erfolgte mit dem Apoenzym der Glucosedehydrogenase aus *Pseudomonas aeruginosa* SG 26 nach der Methode von VAN DER MEER et al. (1990). Zur Präparation des Apoenzyms wurden auf Gluconat gewachsene Zellen geerntet, abzentrifugiert (30 min, 10.000 g, 4°C, K24) und in Na-Phosphatpuffer (20 mM, pH 7,2) zweimal gewaschen. Anschließend wurden die abzentrifugierten Zellen in dem gleichen Puffer aufgenommen und mittels French Press (10.000 psi, zwei Durchläufe) aufgeschlossen. Die erhaltene Suspension wurde mit DNase (1 mg/ml) versetzt und bei Raumtemperatur 5 min inkubiert. Die Zellreste wurden 20 min bei 48.000 g und 4°C (Beckmann XL-90, Rotor SW 30.1) abzentrifugiert. Der Überstand wurde zweimal je 24 h bei 4°C gegen Tris/HCl-Puffer (20 mM, pH 8,0), der 10 mM EDTA sowie ca. 100 µl Toluol enthielt, dialysiert. Anschließend erfolgte eine weitere Dialyse für 24 h bei 4°C gegen Tris/HCl-Puffer (20 mM, pH 8,0), der 10 mM $MgCl_2$ enthielt. Das so erhaltene Glucosedehydrogenase-Apoenzym wurde bei -20°C aufbewahrt.

Zur Bestimmung von PQQ mit Hilfe des präparierten Apoenzyms wurden folgende Lösungen hergestellt :

KCN-Lösung, 0,15 M in Na-Phosphatpuffer (20 mM, pH 7,5),

Glucose-Lösung, 40 mM in Tris/HCl-Puffer (0,2 M, pH 8,0),

Wurster's Blau, 0,2 mM TMPD in aqua dest. (ca. 24 h nach der Herstellung verwendbar).

Das Apoenzym (50 µl) wurde mit 50 µl der zu untersuchenden Probe in einer Küvette (1,5 ml, d=1 cm) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 30 µl der KCN- sowie 500 µl der Glucose-Lösung zugegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500 µl Wurster's Blau gestartet und die Extinktionsabnahme bei 600 nm über 90 s photometrisch (Shimadzu UV-160 A, Kyoto, Japan) gemessen. Die Auswertung erfolgte anhand einer Eichkurve, die mit unterschiedlichen PQQ-Konzentrationen (Serva, BRD) erstellt wurde.

2.8.6. Substratumsatz der Methanmonooxygenase

2.8.6.1. Gaschromatographie

Für die Untersuchungen zur Substratspezifität der MMO wurden die leicht flüchtigen Stoffe über gaschromatographische Auftrennung bestimmt. Dazu wurden je 1 ml der zu untersuchenden Probe in 20 ml Headspace-Gefäße überführt und luftdicht verschlossen. Anschließend wurden je 2 µl des zu untersuchenden Substrates in die Probengefäße injiziert und die Reaktion durch Zugabe von 5 mM NADH gestartet. Nach 30 min Inkubation bei 30°C auf einem Schütteltisch (OSFT-LS, CLF Laborgeräte, Emersacker, BRD) wurden aus der Gasphase 50 µl mittels gasdichter Spritze entnommen und gaschromatographisch analysiert (vgl. 2.6.1.1.). Anhand der mit Hilfe von Standards ermittelten Retentionszeiten erfolgte die Identifikation der gebildeten Produkte.

2.8.6.2. HPLC

Der Nachweis des Umsatzes der Aromaten Benzol, Toluol und Xylol durch die sMMO erfolgte mittels HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan, Steuereinheit SCL-10A, Detektor SPD-10A, Pumpen LC-AS, Chromatopac C-R4AX, Entgaser DGU-4A, Autoinjektor SIL-10A). Es wurde an einer RP-4 Säule (Hypersil, 5 µm, VYDAC, Hesperia, USA) mit einer Flußrate von 0,7 ml/min gearbeitet. Als isokratisches Laufmittel wurde Acetonitril/aqua tridest./TFA, 95:4,9:0,1 (v/v), verwendet. Der Nachweis der Produkte erfolgte bei 280 nm durch Vergleich mit den Retentionszeiten der eingesetzten Standards.

2.8.7. Atomabsorptionsspektroskopie

Zur genauen Bestimmung der Kupfer- und Eisenkonzentration im Kulturmedium der Methanotrophen bzw. zur Bestimmung des Metallgehalts der Hydroxylase wurde ein Atomabsorptionsspektrum der entsprechenden Proben aufgenommen. Gereinigte Hydroxylase (ca. 1 mg) wurde nach Gelfiltration in 0,01 M HCl verdünnt und ein Atomabsorptionsspektrum (ICP-Massenspektrometrie, Elan 5000, Perkin Elmer, USA) aufgenommen.

2.9. Elektronenmikroskopie

Zellen von *Methylocystis* sp. GB 25, *Methylosinus* sp. WI 14 und *Methylobacter* sp. GB 130 (geerntet am Ende der logarithmischen Wachstumsphase) wurden nach zwei Waschschritten (25 mM Na-Phosphatpuffer, pH 7,0) in 3 % Glutardialdehyd (in Na-Phosphatpuffer, 50 mM, pH 7,4) über Nacht vorfixiert. Nach viermaligem Spülen der Proben (in Na-Phosphatpuffer, 100 mM, pH 7,4, je 45 min) erfolgte die Fixierung mittels Osmiumtetroxid (1 % OsO_4 in Na-Phosphatpuffer, 50 mM, pH 7,4, für 45 min). Anschließend wurden die Proben dreimal gewaschen (in Na-Phosphatpuffer, 50 mM, pH 7,4, je 45 min) und mittels steigender Ethanolkonzentration (30 %, 50 %, 70 %, 90 %, 100 %, je 45 min) entwässert. Danach erfolgte eine Blockkontrastierung (1 % Phosphorwolframsäure und 0,5 % Uranylacetat in 70 % Ethanol) und schrittweise Überführung in das Einbettungsmedium (DURCUPAN). Die mittels Ultramikrotom hergestellten Ultradünnschnitte wurden anschließend nach REYNOLDS (1963) schnittkontrastiert (1,33 g Bleinitrat, 1,76 g Natriumcitrat, 8 ml 1 M NaOH auf 50 ml aqua bidest.) und im Elektronenmikroskop (EM 900, Carl Zeiss, Oberkochen, BRD) betrachtet.

2.10. Gewinnung von monoklonalen Antikörpern gegen die Hydroxylase

Zur Gewinnung von monoklonalen Antikörpern gegen die sMMO wurde gereinigte Hydroxylase (Komponente A) verwendet. Zur ersten Immunisierung der zwei eingesetzten Versuchstiere (weibliche BALB/c-Mäuse) wurden je 100 µg Hydroxylase in kompletten Freund'schen Adjuvans emulgiert und subkutan den Versuchstieren appliziert. Nach 8 Wochen erfolgte die Reimmunisierung (intraperitoneal) mit der gleichen Emulsion und vier Wochen später die Nachimpfung (Boosterung) mit je 50 µg Hydroxylase in PBS. Nach weiteren vier Tagen wurde die Milz eines Versuchstieres entnommen und die Milzzellen mit einer Hybridomzellinie (P3X63Ag8.653) im Verhältnis 1:10 mittels 50 % (w/v) PEG 1500 (Boehringer Mannheim, BRD) fusioniert. Die fusionierten Zellen wurden anschließend durch Kultivierung auf HAT-

Medium (LITTLEFIELD 1964) selektiert. Als Feeder-Zellen wurden intraperitoneale Zellen verwendet. Anschließend erfolgte die Übertragung der Hybridomzellen auf ELISA-Platten nach der Methode der „Limitierten Verdünnung" (statistisch ca. 1 Klon pro Well). Der Test der Klone wurde nach folgenden Methoden durchgeführt:

a) *Direkter Nachweis*

Zum Nachweis relevanter Antikörper-produzierender Klone wurde gereinigte Hydroxylase auf 5 µg/ml in PBS verdünnt und je 50 µl dieser Lösung pro Well auf ELISA-Platten aufgetragen. Die Platten wurden ca. 24 h bei 4°C inkubiert und anschließend dreimal mit PBS/Tween 20 (0,05 %) (PBS/T) gewaschen. Danach wurden die Wells mit jeweils 50 µl Hybridomüberstand (1:3 verdünnt) für 1 h bei 4°C inkubiert und danach dreimal in PBS/T gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von ZAM-POD (Peroxidase-gekoppelte Ziege-anti-Maus-Antikörper, Dianova, BRD) und Inkubation für 1 h bei 4°C. Danach wurden die Platten dreimal mit PBS/T gewaschen und pro Well je 50 µl Substrat (50 mg ABTS, 0,82 g CH_3COONa, 0,89 g $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$, aqua dest. auf 100 ml und 20 µl H_2O_2) zugegeben. Nach ca. 20 min Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Auswertung mittels ELISA-Reader (*Emax*, Molecular Devices, USA).

b) *Nachweis mittels biotinylierter Hydroxylase*

Für die Biotinylierung wurden 350 µl gereinigte Hydroxylase (0,5 mg/ml) mit 0,5 mg NMS-Sulfo-Biotin (EHC-Spacer, Sigma, BRD) in 350 µl HEPES/HCl-Puffer (0,1 M, pH 8,5) versetzt. Nach der Inkubation (30 min bei Raumtemperatur, 90 min bei 4°C) erfolgte eine Zugabe von 5 mg Glycin (Inkubation über 15 min bei 4°C) zur Absättigung des nicht gebundenen Biotins. Anschließend wurde die Lösung auf 4 µg/ml (biotinylierte Hydroxylase) in PBS/Tween (0,05 %) verdünnt. Weiterhin wurden ELISA-Platten mit Ziege-anti-Maus-Antikörpern beschichtet, über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und dreimal mit PBS/Tween (0,05 %) gewaschen. Anschließend wurden die in PBS/Tween (0,05 %) 1:3 verdünnten Hybridomüberstände aufgetragen (50 µl pro Well), inkubiert (3 h bei 4°C) und dreimal mit PBS/Tween (0,05 %) gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe der biotinylierten Hydroxylase (vgl. oben, je 50 µl pro Well). Die Platten wurden 2 h bei 4°C inkubiert und nachfolgend dreimal in PBS/Tween (0,05 %) gewaschen. Zum Nachweis der gebundenen biotinylierten Hydroxylase wurden je Well 50 µl Peroxidase-gekoppeltes Streptavidin (1:2000, Amersham, GB) zugegeben. Die Inkubation der Platten erfolgte für 1 h bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/Tween (0,05 %) wurde die gebundene Peroxidase durch Zugabe von ABTS (vgl. direkter Nachweis) visualisiert. Die Auswertung erfolgte nach ca. 15 min im ELISA-Reader.

c) *Nachweis im Western Blot*

Auf ein 12 %iges PA-Gel (über Nacht polymerisiert) wurde 20 µg gereinigte Hydroxylase über die gesamte Breite auf das Sammelgel aufgetragen und elektrophoretisch in die α, β, und γ-Untereinheiten aufgetrennt (vgl. 2.8.1.2.). Anschließend wurde das Gel mittels Semi-Dry Elektroblotter (Modell HEP-1, OWL, Woburn, USA) (vgl. 2.8.2.) auf eine Nitrozellulosemembran (Hybond-C, 0,45 µm, Amersham, GB) geblottet (Transferpuffer: 25 mM Tris/HCl, 192 mM Glycin, 20 % Methanol, pH 8,3), mit Ponceau S (2 mg Ponceau-Rot auf 10 ml 2 % ige Essigsäure) gefärbt und mit PBS entfärbt. Die sichtbaren Banden wurden dokumentiert. Das Blocken der Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsdomänen erfolgte über Nacht in PBS/Tween 20 (0,2 %). Anschließend wurde der Blot in Streifen geschnitten und pro Streifen ca. 100 µl Hybridomüberstand (1:3 verdünnt in PBS/Tween, 0,2 %) aufgetragen. Nach 1 h Inkubation und dreimaligem Waschen mit PBS/Tween (0,2 %) erfolgte die Inkubation mit 100 µl Peroxidase-gekoppelten Ziege-anti-Maus-Antikörpern (1:4000 in PBS/Tween 20, 0,1 %) für 1 h bei Raumtemperatur. Die Membranstreifen wurden anschließend dreimal in PBS/Tween (0,2 %) und zweimal in PBS gewaschen. Die gebundenen Antikörper wurden nachfolgend durch Überführung der Streifen in eine DAB-Lösung (5 mg DAB auf 10 ml aqua dest. und 5 µl H_2O_2, 30 %ig) visualisiert. Die Reaktion wurde durch Überführung der Membranstreifen in Leitungswasser abgestoppt.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung von *Methylocystis* sp. GB 25 und *Methylosinus* sp. WI 14

3.1.1. Morphologie

Zellen von *Methylocystis* sp. GB 25 und *Methylosinus* sp. WI 14 erscheinen im lichtmikroskopischen Bild ähnlich den Vibrionen als Kurzstäbchen bzw. leicht gekrümmte Kurzstäbchen.

In ihrer Ultrastruktur (Untersuchung mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie) weisen sie bei Prokaryoten seltene intracytoplasmatische Membranen in typischer Anordnung auf. Sowohl bei *Methylocystis* sp. GB 25 (Abb. 10) als auch bei *Methylosinus* sp. WI 14 (Abb. 11) liegen diese Membranen stets peripher an der Cytoplasmamembran und füllen zumindest bei *Methylocystis* sp. GB 25 einen Großteil der Zelle aus. Bei letzterem wird das cytoplasmatische Kompartiment in Dreiecksform durch die Membranen abgeschnürt. Dieses Phänomen scheint sehr charakteristisch für diesen Stamm zu sein, da es generell im elektronenmikroskopischen Bild zu beobachten war. Bei den elektronendichten Einlagerungen zwischen den Membranen handelt es sich wahrscheinlich um Kupfer, das als metallischer Cofaktor der pMMO fungiert. Da diese Einschlüsse auch ohne Schnittkontrastierung zu registrieren waren, scheint es sich nicht um Artefakte während der Präparation zu handeln. Auch deutet ihre regelmäßige Anordnung (stets zwischen den Membranen, niemals darüber) in den Schnitten nicht darauf hin. Bei *Methylosinus* sp. WI 14 sind die intracytoplasmatischen Membranen -obwohl gleich angeordnet- weit weniger ausgeprägt. Ihr Auftreten korrelierte streng mit den Kultivierungsbedingungen. Bei Wachstum auf kupferarmen Medium scheint ein Abbau der intracytoplasmatischen Membranen zu erfolgen. Aus Abb. 12 wird ersichtlich, daß keine distinkten Membranen mehr zu erkennen sind.

In Abb. 13 sind zum Vergleich die intracytoplasmatischen Membranen des schon als Typ I-Methanotrophen charakterisierten Stammes *Methylobacter* sp. GB 130 (unveröffentlichte Ergebnisse) dargestellt. Die Membranen sind hier in großen Bündeln über die gesamte Zelle verteilt und verlaufen meist vertikal zur Cytoplasmamembran.

Aufgrund der intracytoplasmatischen Membranstruktur lassen sich sowohl *Methylocystis* sp. GB 25 als auch *Methylosinus* sp. WI 14 eindeutig den Typ II- Methanotrophen zuordnen.

Durch die Untersuchungen mittels Transmissionselektronenmikroskopie konnten in den Zellen der untersuchten Bakterien weiterhin große vesikelförmige Einschlüsse beobachtet werden, deren Inhalt bei der Präparation teilweise herausgewaschen wurde. Durch Färbung mit

Nilrot konnten diese als Poly-β-hydroxybuttersäure (PHB) identifiziert werden. Eine Quantifizierung des durch die Zellen gebildeten PHB erfolgte im Rahmen dieser Arbeit nicht.

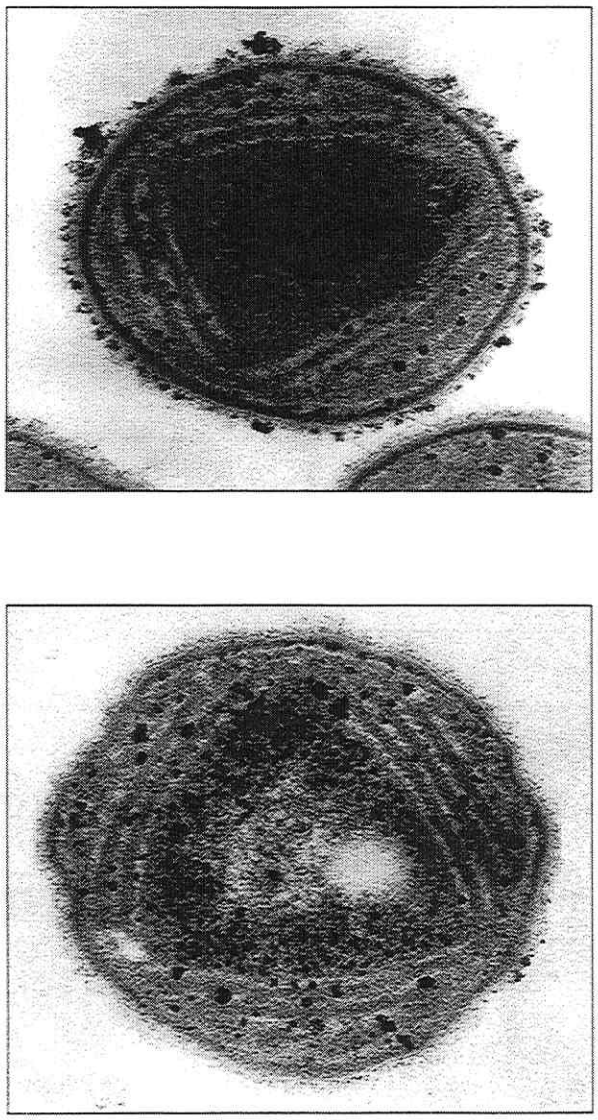

Abb. 10: Elektronenmikroskopische Darstellung der intrazellulären Membranstruktur von *Methylocystis* sp. GB 25 (100.000fach).

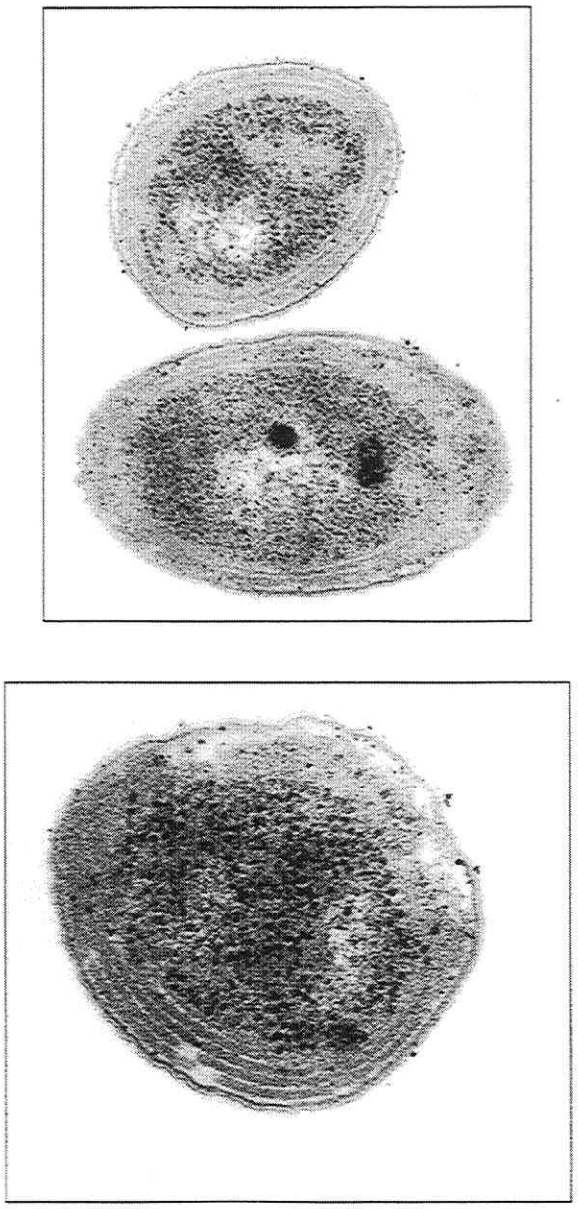

Abb. 11: Elektronenmikroskopische Darstellung der intrazellulären Membranstruktur von *Methylosinus* sp. WI 14 (gewachsen in Anwesenheit von 0,1 µM Cu^{2+}) (100.000fach).

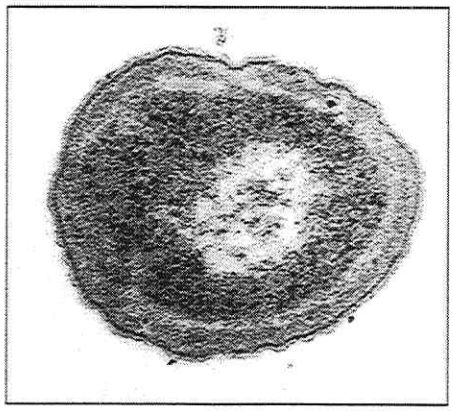

Abb. 12: Elektronenmikroskopische Darstellung der intrazellulären Membranstruktur von *Methylosinus* sp. WI 14 (in einem kupferarmen Medium kultiviert, 0,016 µM Cu^{2+}) (100.000fach).

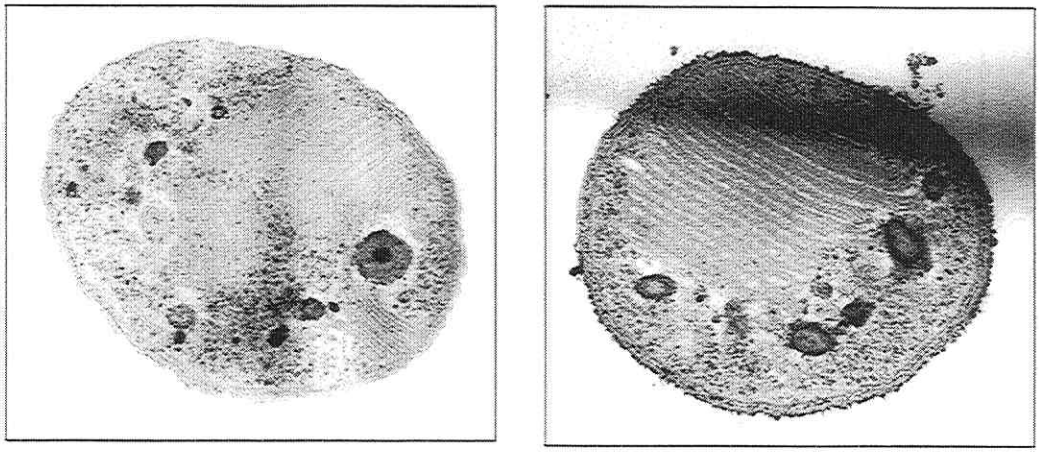

Abb. 13: Elektronenmikroskopische Darstellung der intrazellulären Membranstruktur von *Methylobacter* GB 130 (100.000fach).

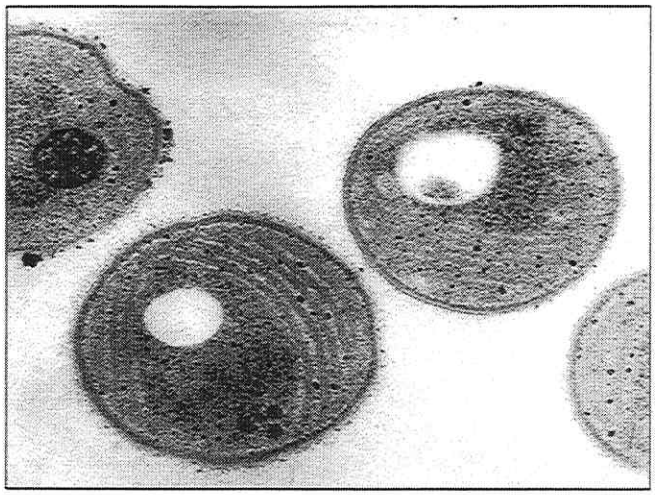

Abb. 14: Elektronenmikroskopische Darstellung von Poly-β-hydroxybuttersäure-enthaltenden Einschlüssen von *Methylocystis* sp. GB 25 (60.000fach).

3.1.2. Aktivität von Enzymen des Assimilationsweges

In den beiden untersuchten Stämmen kommt das Schlüsselenzym des Serinweges der Typ II-Methanotrophen, die Hydroxypyruvatreduktase (EC 1.1.1.29), mit relativ hoher spezifischer Aktivität vor (Tab. 3). Sowohl *Methylocystis* sp. GB 25 als auch *Methylosinus* sp. WI 14 verfügen außerdem über eine $NADP^+$- abhängige Isocitratdehydrogenase -ein weiteres typisches Enzym der Typ II- Methanotrophen-, die zur Aktivierung Mg^{2+} benötigt. Weiterhin konnte in beiden Stämmen die Malatdehydrogenase (Serinweg) sowie die Isocitratlyase (Rückgewinnung von Glycin als primären Akzeptor des Serinweges) nachgewiesen werden. Die einzelnen Enzymaktivitäten sind in Tab. 3 zusammengefaßt.

Tab. 3: Aktivität von Enzymen des Assimilationsweges aus *Methylocystis* sp. GB 25 und *Methylosinus* sp. WI 14.

Enzym	Spezifische Aktivität (mU/mg)[1]	
	Methylocystis sp. GB 25	*Methylosinus* sp. WI 14
Hydroxypyruvatreduktase	255	550
Isocitratdehydrogenase	59	51
Isocitratlyase	13	27
Malatdehydrogenase	101	132

[1]) Die Aktivität wurde im Rohextrakt bestimmt.

3.2. Wachstum von *Methylocystis* sp. GB 25 und *Methylosinus* sp. WI 14

Zur Erzielung einer möglichst hohen Biomasseausbeute im Schüttelkolben wurden die beiden Stämme auf unterschiedlichen Medien kultiviert.

Optimales Wachstum konnte bei *Methylocystis* sp. GB 25 durch Kultivierung auf Standardmedium (NH_4Cl als N-Quelle, 1,5 µM Cu^{2+}) erzielt werden. Unter diesen Bedingungen wurde die spezifische Wachstumsrate μ_{max} = 0,147 h^{-1} über Bestimmung der Bakterientrockenmasse (BTM) aus der OD_{600} ermittelt (Abb. 15). Auffallend ist, daß es keine lag-Phase gibt. Nach Zugabe des Substrates (Methan) schließt sich sofort eine logarithmische Wachstumsphase an, die nach etwa 16 h in die stationäre Wachstumsphase übergeht.

Bei Kultivierung auf kupferarmen Standardmedium (keine externe Kupferzugabe, der durch Chemikalienverunreinigungen bedingte Kupfergehalt lag bei 0,016 µM, gemessen durch Atomabsorption) und auf NMS-Medium ($NaNO_3$ als N-Quelle, sowohl kupferarm als auch mit 1,5 µM Kupfer) erfolgte kein bzw. nur Restwachstum (Tab. 4).

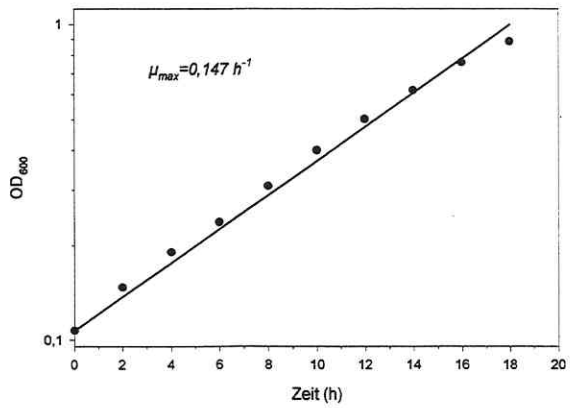

Abb. 15: Wachstum von *Methylocystis* sp. GB 25 auf Standardmedium (1,5 µM Cu^{2+}).

Tab. 4: Wachstum von *Methylocystis* sp. GB 25 auf unterschiedlichen Medien.

Medium	OD_{600} (Start)	pH (Start)	OD_{600}[1]	pH[1]
Standardmedium (ohne Kupfer)	0,107	6,8	0,125	6,8
Standardmedium (1,5 µM Cu^{2+})	0,107	6,8	0,947	5,8
NMS-Medium (ohne Kupfer)	0,153	6,8	0,180	6,6
NMS-Medium (1,5 µM Cu^{2+})	0,153	6,8	0,184	6,7

[1]) nach 18 h Wachstum (am Ende der exponentiellen Wachstumsphase)

Offensichtlich sind sowohl der Kupfergehalt im Medium als auch die verwendete Stickstoffquelle limitierende Wachstumsparameter für *Methylocystis* sp. GB 25.

Methylosinus sp. WI 14 wächst dagegen auf Standard- und NMS-Medium. Der Kupfergehalt (kupferarm bzw. 1,5 µM Cu^{2+}) beeinträchtigt das Wachstum auf NMS-Medium nur unwesentlich, aber signifikant auf Standardmedium (Tab. 5). Es konnte keine lag-Phase registriert werden, auch *Methylosinus* sp. WI 14 tritt nach Substratzugabe sofort in die logarithmische Wachstumsphase ein. Allerdings erfolgt die Biomassezunahme wesentlich langsamer als bei *Methylocystis* sp. GB 25. Aufgrund der Ergebnisse der enzymatischen Untersuchungen (vgl. 3.4.1.) wurde NMS-Medium (kupferarm) als Standardkultivierungsmedium gewählt. Eine spezifische Wachstumsrate μ_{max} = 0,068 h^{-1} konnte unter diesen Bedingungen ermittelt werden (Abb. 16).

Tab. 5: Wachstum von *Methylosinus* sp. WI 14 auf unterschiedlichen Medien.

Medium	OD_{600} (Start)	pH (Start)	OD_{600}[1]	pH[1]
Standardmedium (ohne Kupfer)	0,07	6,8	0,52	6,5
Standardmedium (1,5 µM Cu^{2+})	0,07	6,8	1,09	6,3
NMS-Medium (ohne Kupfer)	0,07	6,6	0,98	6,6
NMS-Medium (1,5 µM Cu^{2+})	0,07	6,6	0,85	6,5

[1]) nach 45 h Wachstum (am Ende der exponentiellen Wachstumsphase)

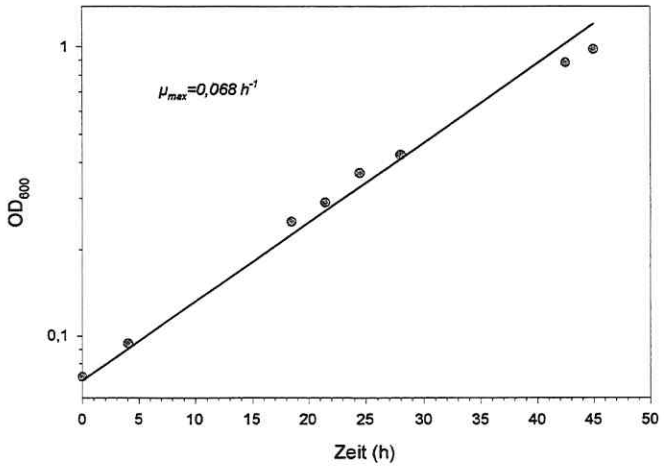

Abb. 16: Wachstum von *Methylosinus* sp. WI 14 auf NMS-Medium (kupferarm).

3.3. Methanmonooxygenase aus *Methylocystis* sp. GB 25

3.3.1. Aktivität der Methanmonooxygenase

MMO in intakten Zellen

Intakte Zellen von *Methylocystis* sp. GB 25 sind in der Lage, Propylen zu oxidieren. Die spezifische Aktivität von Zellen der logarithmischen Wachstumsphase konnte mit 0,11 U/mg bestimmt werden. Das gebildete Propylenoxid steigt dabei proportional zur eingesetzten Bakterientrockenmasse (Tab. 6).

Tab. 6: Abhängigkeit der Bildung von Propylenoxid von der eingesetzten Zellproteinmenge.

Zellprotein (mg)	Propylenoxidbildung (µmol/h)	Spezifische Aktivität (mU/mg BTM)
0,08	0,30	4,2
0,16	0,95	5,9
0,8	5,70	6,5
1,6	10,51	6,6
8	47,50	5,9

Die Methanmonooxygenaseaktivität intakter Zellen zeigt eine starke Abhängigkeit von der Wachstumsphase. Die höchsten spezifischen Aktivitäten wurden in der logarithmischen Wachstumsphase registriert (nach ca. 16 h). Auffallend ist der relativ starke Aktivitätsabfall am Ende dieser Phase (30 %), der sich mit dem Eintritt in die stationäre Wachstumsphase noch verstärkt. Die in Abhängigkeit von der Wachstumsphase über den Propylenoxidnachweis (Produktnachweis) und Methan-abhängigen Sauerstoffverbrauch (Cosubstratnachweis) gemessenen MMO-Aktivitäten stimmen sehr gut (Abb. 17) überein. Beide Methoden sind somit für die Erfassung der MMO-Aktivität gut geeignet. Der Sauerstoffverbrauchstest ist einfacher und schneller als der Propylenoxidnachweis mittels Gaschromatographie, aber wesentlich anfälliger gegenüber von Störfaktoren und nur für die Aktivitätsbestimmung unter Verwendung von intakten Zellen anwendbar. Die relativ hohe Anfangsaktivität ist darauf zurückzuführen, daß aufgrund des großen Testumfangs eine Vorkultur angelegt werden mußte. Die Zellen dieser Vorkultur wurden in der stationären Phase geerntet und bis zum Ansatz der Hauptkultur bei 4°C gelagert.

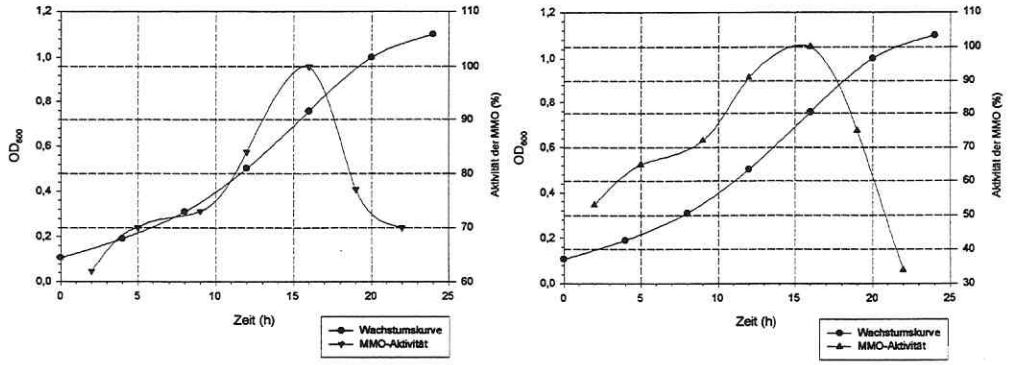

Abb. 17: Spezifische Aktivität der MMO aus *Methylocystis* sp. GB 25 in Abhängigkeit von der Wachstumsphase.

links: Propylenoxidation (100 % Aktivität = 0,11 U/mg BTM)

rechts: Methan-abhängiger Sauerstoffverbrauchstest (100 % Aktivität = 32 U/g BTM)

Die MMO ist in intakten Zellen relativ stabil. Bis zu einer Inkubationszeit von 2 h konnte ein proportionaler Anstieg des gebildeten Propylenoxids nachgewiesen werden. Erst danach erfolgt ein leichter Rückgang der MMO-Aktivität (Abb. 18).

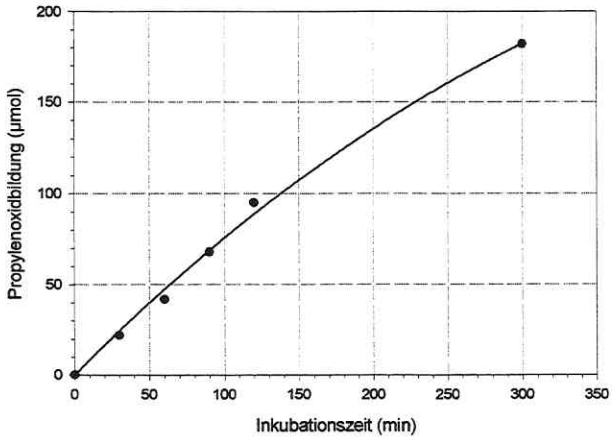

Abb. 18: Propylenoxidation intakter Zellen von *Methylocystis* sp. GB 25 (ca. 8 mg) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

Wie unter 3.2. beschrieben, hat die Kupferkonzentration im Kultivierungsmedium entscheidenden Einfluß auf das Wachstum von *Methylocystis* sp. GB 25. Die spezifische MMO-Aktivität scheint aber unabhängig (zumindest in dem Bereich, in dem ein Wachstum erfolgt) von der Kupferkonzentration im Medium zu sein (Tab. 7).

Tab. 7: Abhängigkeit der MMO-Aktivität aus *Methylocystis* sp. GB 25 von der Kupferkonzentration im Medium.

Cu^{2+} - Konz. im Medium (µM)	OD_{600} [1]	O_2-Aktivität MMO (U/g BTM)
0,15	0,566	27
0,5	0,812	34
1,5	0,825	28

[1]) nach 16 h Wachstum (OD_{600} am Start der Kultivierung lag bei 0,12)

MMO permeabilisierter Zellen

Weder im Propylentest noch im Methan-abhängigen Sauerstoffverbrauchstest konnte unter Verwendung von permeabilisierten Zellen von *Methylocystis* sp. GB 25 MMO-Aktivität nachgewiesen werden. Der Zusatz von NAD(P)H (5 mM) hatte keinen Effekt.

MMO im zellfreien Extrakt

Im zellfreien Extrakt von *Methylocystis* sp. GB 25 konnte keine MMO-Aktivität nachgewiesen werden. Weder durch Variation der Aufschlußmethode (Alcoa, Ultraschall, French Press) oder Zugabe von verschiedenen Ionen (Fe^{2+}, Cu^{2+}, Mg^{2+}) noch durch Verwendung verschiedener Elektronendonatoren (NADH, NADPH, TMPD, Ascorbat, Ubichinol) konnte eine Propylenoxidation nachgewiesen werden. Der Zusatz von Stabilisatoren (DTE, DTT u.a.) hatte ebenfalls keinen Effekt.

3.3.2. Substratspezifität

Die Untersuchungen zur Substratspezifität wurden mit intakten Zellen durchgeführt, da im zellfreien Extrakt keine MMO-Aktivität nachzuweisen war. Die MMO von *Methylocystis* sp. GB 25 ist durch eine sehr große Substratspezifität gekennzeichnet. Sie oxidiert Alkane nur bis zum Propan und Alkene bis zum Butylen. Naphthalen wird durch intakte Zellen nicht umgesetzt. Interessant ist, daß bei der Oxidation von Propan stets i-Propanol entsteht, n-Propanol konnte hingegen nicht nachgewiesen werden.

3.4. Methanmonooxygenase aus *Methylosinus* sp. WI 14

3.4.1. Epigenetische Regulation

Methylosinus sp. WI 14 wächst im Gegensatz zu *Methylocystis* sp. GB 25 sowohl auf kupferhaltigen als auch auf kupferarmen Medium (vgl. 3.2.). Intakte Zellen sind in der Lage, Naphthalen zu oxidieren (vgl. 2.6.1.4.) und somit eine sMMO zu exprimieren. Die Ausbildung der sMMO ist stark kupferabhängig (Tab. 8). Bereits bei einer Kupferkonzentration von 0,1 µM wird die Expression der sMMO zu über 60 % gehemmt, obwohl keine Verminderung des Wachstums nachweisbar war.

Tab. 8: Abhängigkeit der Aktivität der sMMO aus *Methylosinus* sp. WI 14 von der Kupferkonzentration im Medium.

Cu^{2+} - Konzentration (µM)	OD_{600} (Start)	OD_{600} (+24 h)	Spez. Aktivität[1] (mU/mg BTM)
0,016[2]	0,15	0,86	12,2
0,1	0,15	1,16	4,4
1,0	0,15	0,85	1,6
5,0	0,15	0,23	0

[1]) Die spezifische Aktivität bezieht sich auf die Naphthalenoxidation durch intakte Zellen.

[2]) durch Chemikalienverunreinigungen eingetragener Kupfergehalt

Höhere Kupferkonzentrationen (2-5 µM) wirken offenbar toxisch auf den Mikroorganismus. Auch eine Erhöhung der Eisenkonzentration im Medium (Eisen als Kupferantagonist) führte nicht zu einer erhöhten Kupfertoleranz hinsichtlich der Ausbildung der sMMO (Tab. 9). Es wird im Gegensatz deutlich, daß durch eine Erhöhung der Eisen- und Kupferkonzentration die sMMO zunehmend reprimiert wird. Die Ergebnisse zum Einfluß der Stickstoffquelle auf Wachstum und sMMO-Aktivität unter kupferarmen Bedingungen sind in Tab. 10 zusammengefaßt. Es ist ersichtlich, daß *Methylosinus* sp. WI 14 sowohl Nitrat als auch Ammonium sowie die Aminosäuren Serin und Cystein als N-Quelle verwerten kann. Die Expression der sMMO erfolgt aber nur bei Einsatz von Nitrat (in allen anderen Versuchen als N-Quelle benutzt) bzw. schwächer von Ammonium. Glycin und Alanin können dagegen nicht als N-Quelle genutzt werden.

Tab. 9: Aktivität der sMMO aus *Methylosinus* sp. WI 14 in Abhängigkeit von der Kupfer- und Eisenkonzentration im Medium.

Cu^{2+} - Konz. (µM)	Fe^{2+} - Konz. (µM)	OD_{600} (Start)	OD_{600} (+24 h)	Spez. Akt.[1] (mU/mg BTM)
0,016[2]	10	0,15	0,609	10,1
0,5	20	0,15	0,921	1,5
1,0	10	0,15	0,855	1,3
1,0	20	0,15	0,867	0,2
1,0	30	0,15	0,725	0
1,0	40	0,15	0,559	0
1,0	100	0,15	0,168	0

[1]) Die spezifische Aktivität bezieht sich auf die Naphthalenoxidation durch intakte Zellen.

[2]) vgl. Tab. 8

Tab. 10: Wachstum und sMMO-Expression von *Methylosinus* sp. WI 14 in Abhängigkeit von der Stickstoffquelle im Medium.

N-Quelle (je 10 mM N)	OD_{600} (Start)	OD_{600} (+45 h)	Spez. Akt.[1] (mU/mg BTM)
-	0,07	0,114	0
Kaliumnitrat	0,07	0,842	10,2
Ammoniumchlorid	0,07	0,492	7,6
Carnitin	0,07	0,071	0
Glycin	0,07	0,106	0
Alanin	0,07	0,108	0
Serin	0,07	0,601	0
Cystein	0,07	0,672	0

[1]) Die spezifische Aktivität bezieht sich auf die Naphthalenoxidation durch intakte Zellen.

Um auszuschließen, daß die Aminosäuren als C-Quelle genutzt werden können, wurden parallel zu den Ansätzen Schüttelkolben mitgeführt, die kein Methan enthielten. Es zeigte sich, daß in keinem Fall ein Wachstum erfolgte. Offensichtlich ist neben dem Kupfergehalt des Mediums auch die N-Quelle von entscheidender Bedeutung bei der Expression der sMMO in *Methylosinus* sp. WI 14. Die Menge des eingesetzten Methans (als einzige mögliche C-Quelle) hat einen Einfluß auf die Aktivität der sMMO (Tab. 11). Obwohl bei einem Gehalt von 15 % Methan in

der Gasphase das geringste Wachstum erfolgt, ist die sMMO-Aktivität gegenüber höheren Methankonzentrationen deutlich erhöht.

Tab. 11: Einfluß des zugesetzten Methans auf die sMMO-Expression.

Methangehalt[1] (%)	OD_{600} (Start)	OD_{600} (+22 h)	Spez. Akt.[2] (mU/mg BTM)
15	0,19	0,41	29,2
30	0,19	0,85	12,5
50	0,19	0,87	12,4

[1]) in der Gasphase des Schüttelkolbens

[2]) Die spezifische Aktivität bezieht sich auf die Naphthalenoxidation durch intakte Zellen.

3.4.2. Partikuläre Methanmonooxygenase

Es gibt keine Möglichkeit, eine pMMO-Aktivität in intakten Zellen von *Methylosinus* sp. WI 14 nachzuweisen, da bei jeder Art der Aktivitätsmessung die eventuell vorhandene sMMO mitbestimmt wird. Wie aber unter 3.4.1. beschrieben, läßt sich die sMMO-Aktivität durch den Naphthalentest messen und wird bei Kupferkonzentrationen über 1 µM bzw. Eisenkonzentrationen über 20 µM zu 98 % reprimiert. Da aber unter diesen Bedingungen ein kaum eingeschränktes Wachstum erfolgt, sollte unter diesen Voraussetzungen vorrangig die pMMO exprimiert werden. Untersuchungen zur pMMO wurden deshalb mit unter o.g. Bedingungen kultivierten Zellen von *Methylosinus* sp. WI 14 durchgeführt. Die Substratspezifität der pMMO intakter Zellen ist in Tab. 12 dargestellt.

Tab. 12: Substratspezifität der pMMO aus *Methylosinus* sp. WI 14.

Substrat	Produkt	Spez. Akt. (mU/mg BTM)
Methan	Methanol	n.b.[1]
Ethan	Ethanol	n.b.
Propan	i-Propanol	158
Ethylen	Ethylenoxid	n.b.
Propylen	Propylenoxid	25
Naphthalen	-[2]	-

[1]) nicht bestimmt; [2]) keine Aktivität

3.4.3. Lösliche Methanmonooxygenase

3.4.3.1. Enzymlokalisation und Enzymstabilität

Die sMMO-Aktivität wurde nach Zellaufschluß zu 100 % in der löslichen Fraktion gefunden. In der membrangebundenen Fraktion konnte keine Aktivität nachgewiesen werden. Als Aufschlußmethode wurde der French Press-Aufschluß gewählt, da dabei die höchsten Proteinmengen mit akzeptabler spezifischer Aktivität erzielt wurden (Tab. 13). Die schonendste Methode ist der Aufschluß mit Alcoa. Aufgrund der sehr geringen Proteinausbeute wurde darauf aber verzichtet.

Tab. 13: Abhängigkeit der Aktivität der sMMO von der Aufschlußmethode

Aufschlußmethode	Proteingehalt (mg/ml)	Spez. Akt. [1] (mU/mg)
Alcoa	0,8	29,2
French Press	8,2	17,3
Ultraschall	5,6	16,5

[1]) gemessen im ultrazentrifugierten Rohextrakt (Propylenoxidtest)

Die sMMO aus *Methylosinus* sp. WI 14 benötigt als Coenzym essentiell NADH, das durch NADPH ersetzt werden kann (Tab. 14).

Tab. 14: Aktivität der sMMO in Abhängigkeit vom verwendeten Elektronendonator.

Coenzym	Spez. Aktivität (mU/mg)[1]
-	0
0,2 mM NADH	0
0,5 mM NADH	4,5
1,0 mM NADH	8,0
2,0 mM NADH	13,0
5,0 mM NADH	19,3
2,0 mM NADPH	4,3
5,0 mM NADPH	15,5

[1]) gemessen im ultrazentrifugierten Rohextrakt (Propylenoxidtest)

Es fällt auf, daß sMMO-Aktivität erst bei sehr hohen Coenzymkonzentrationen registriert werden kann und auch bei Einsatz von 5 mM NADH bzw. NADPH noch keine Sättigung erreicht wird. Die Affinität der sMMO ist für NADH höher als für NADPH, obwohl die spezifische Aktivität nur wenig differiert.

Im ultrazentrifugierten Rohextrakt ist die sMMO relativ instabil. Schon nach 90 min verliert sie bei Raumtemperatur über 50 % und bei 4°C etwa 15 % ihrer Aktivität (Tab. 15). In intakten Zellen ist das Enzym hingegen wesentlich stabiler. Die Halbwertszeit beträgt etwa 4 Tage bei 4 °C und 80 Tage bei -18°C.

Tab. 15: Stabilität der sMMO aus *Methylosinus* sp. WI 14 im ultrazentrifugierten Rohextrakt.

Zeit (min)	Aktivität der sMMO[2] (%)[1]	Aktivität der sMMO[3] (%)
15	92	98
30	85	97
45	72	94
60	60	91
90	44	86

[1]) Die Aktivität wurde im Naphthalentest bestimmt; 100 % Aktivität entsprechen 1,5 mU/mg.

[2]) Inkubation bei 25°C; [3]) Inkubation bei 4 °C

Die Stabilität der sMMO konnte beim Zellaufschluß durch Zusatz von Natriumthioglycolat wesentlich erhöht werden. Andere Stabilisatoren bzw. Proteasehemmer hatten keinen bzw. nur einen geringen Einfluß auf die Enzymaktivität (Tab. 16).

Tab. 16: Einfluß verschiedener Stabilisatoren auf die sMMO-Aktivität.

Stabilisator	Konzentration (mM)	Aktivität der sMMO[1] (%)
-	-	100
Mercaptoethanol	1	123
Dithiothreitol	5	100
Natriumthioglycolat	5	227
Ammoniumeisen(II)sulfat	0,3	131
Glycerin	10 (%)	90
PMSF	1	98

[1]) Die Aktivität wurde im Naphthalentest bestimmt, 100 % Akt. entsprechen 0,55 mU/mg.

Deshalb wurde Natriumthioglycolat (5 mM) dem Rohextrakt zugesetzt und auch bei der Reinigung der Komponenten der sMMO als Pufferzusatz verwendet. Im ultrazentrifugierten Rohextrakt ist die sMMO extrem empfindlich gegenüber Verdünnung (mit Aufschlußpuffer, der 5 mM Natriumthioglycolat enthielt). Während in einer 1:2 verdünnten Probe noch ungefähr 80 % der entsprechenden Ausgangsaktivität gemessen wurden, konnte in einer 1:5 verdünnten Probe keinerlei Aktivität mehr nachgewiesen werden.

3.4.3.2. Temperatur und pH-Optimum

Die optimale sMMO-Aktivität konnte unter Verwendung von Tris/HCl-Puffer bei pH 7,2 und bei 30°C gemessen werden. Bei Temperaturen über 30°C kommt es zu einem drastischen Aktivitätsverlust. Im Bereich zwischen pH 6,5 und 7,5 schwanken die gemessenen Aktivitäten um etwa 10 %. Bei stärker saurem (unter 5,5) und besonders im basischen pH (über 8,0) sinkt die sMMO-Aktivität dagegen sehr schnell ab.

3.4.3.3. Substratspezifität

Die Bestimmung der Substratspezifität der sMMO wurde im ultrazentrifugierten Rohextrakt vorgenommen, da dafür aufgrund der relativ geringen Empfindlichkeit der Nachweismethoden stets hohe Proteinmengen (1-5 mg) erforderlich waren. Die Identifizierung der Produkte erfolgte durch Vergleich mit den Retentionszeiten der jeweiligen Standards. Die Ermittlung der spezifischen Aktivität für ausgewählte Verbindungen erfolgte über den Produktnachweis bzw. über die Substratabnahme mit Hilfe von entsprechenden Eichkurven. Besondere Schwierigkeiten gab es bei den höheren Kohlenwasserstoffen (ab C_5) bzw. bei den halogenierten Verbindungen, da diese selbst im höchsten Reinheitsgrad Verunreinigungen bis zu 5 % aufwiesen. Diese Fremdstoffe störten einerseits den Nachweis des jeweiligen Reaktionsproduktes, anderseits auch die sMMO, da eine Hemmung nicht ausgeschlossen werden konnte.

Aus Tab. 17 wird ersichtlich, daß die sMMO aus *Methylosinus* sp. WI 14 über eine sehr breite Substratspezifität verfügt. Alkane bis zum Heptan werden ebenso durch das Enzym oxidiert wie cyclische Kohlenwasserstoffe und Aromaten. Darüber hinaus kann die sMMO auch halogenierte Verbindungen hydroxylieren. Auffallend ist, daß bei der Oxidation der n-Alkane nie der korrespondierende n-Alkohol sondern immer die entsprechenden Isomere (aufgrund fehlender Standards nicht identifiziert) entstehen. Eine Verwertung von Anthracen, Diphenyl und Adamantan konnte mit den zur Verfügung stehenden Methoden (Gaschromatographie, HPLC bzw. Farbreaktionen) nicht nachgewiesen werden.

Tab. 17: Substratspezifität der sMMO aus *Methylosinus* sp. WI 14.

Substrat	Produkt	Spez. Akt.[1] (mU/mg)	Oxidation
Ethylen	Ethylenoxid	33,6	+
Propylen	Propylenoxid	25,4	+
Butylen	Butylenoxid	19,1	+
Propan	2-Propanol	334,3	+
Butan	i-Butanol	-[2]	+
Pentan	i-Pentanol	-	+
Hexan	i-Hexanol	-	+
Heptan	i-Heptanol	-	+
Diethylether	Ethanol, Acetaldehyd	205,7	+
Cyclohexan	Cyclohexanol	n.b.[3]	+
Benzol	Phenol	n.b.	+
Toluol	Kresol[4]	-	+
Xylol	Xylenol[4]	-	+
Naphthalen	Naphthol	1,2	+
Chlorpentan	Chlorpentanol	3,9	+
1,6-Dichlorhexan	1,6-Dichlorhexanol	n.b.	+
Chlorcyclohexan	Chlorcyclohexanol	-	+
Chlordiphenylmethan	?	-	?
Chlorbenzol	Chlorphenol[4]	-	+
Fluorbenzol	Fluorphenol[4]	-	+
Brombenzol	Bromphenol[4]	-	+
Chlornaphthalen	Chlornaphthol	0,8	+
Adamantan	?	-	?
Anthracen	?	-	?
Diphenyl	?	-	?

[1]) Die spezifische Aktivität wurde im ultrazentrifugierten Rohextrakt bestimmt.

[2]) Die Bestimmung der spezifischen Aktivität konnte nicht erfolgen, da keine eindeutige Produktidentifizierung möglich war.

[3]) nicht bestimmt

[4]) Die Stellung der eingeführten Hydroxylgruppe konnte nicht bestimmt werden.

3.4.3.4. Komponenten der sMMO

3.4.3.4.1. Reinigung und Eigenschaften der Hydroxylase (Komponente A)

Die Aktivitätsbestimmung der Hydroxylase erfolgte durch gaschromatographischen Nachweis der Propylenoxidbildung nach Zugabe von H_2O_2 (vgl. 2.6.1.5.1.). Die Anwesenheit der Komponenten B und C sowie des Coenzyms NADH ist für die Aktivität nicht erforderlich (Peroxid-Weiche, vgl. Abb. 5), so daß ein von der Stabilität dieser Komponenten unabhängiges reproduzierbares Testsystem gewährleistet war.

Reinigung der Hydroxylase

Die Reinigung der Hydroxylase (MMOH) erfolgte mittels Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration. Im ersten Schritt konnten durch einen Stufengradienten die beiden anderen Komponenten (Elektronentransferprotein und Reduktase) der sMMO sowie die Methanoldehydrogenase (MDH) abgetrennt werden. Anschließend wurde die eluierte MMOH-Fraktion entsalzt und auf die gleiche Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte jetzt mit einem linearen Gradienten (Abb. 19).

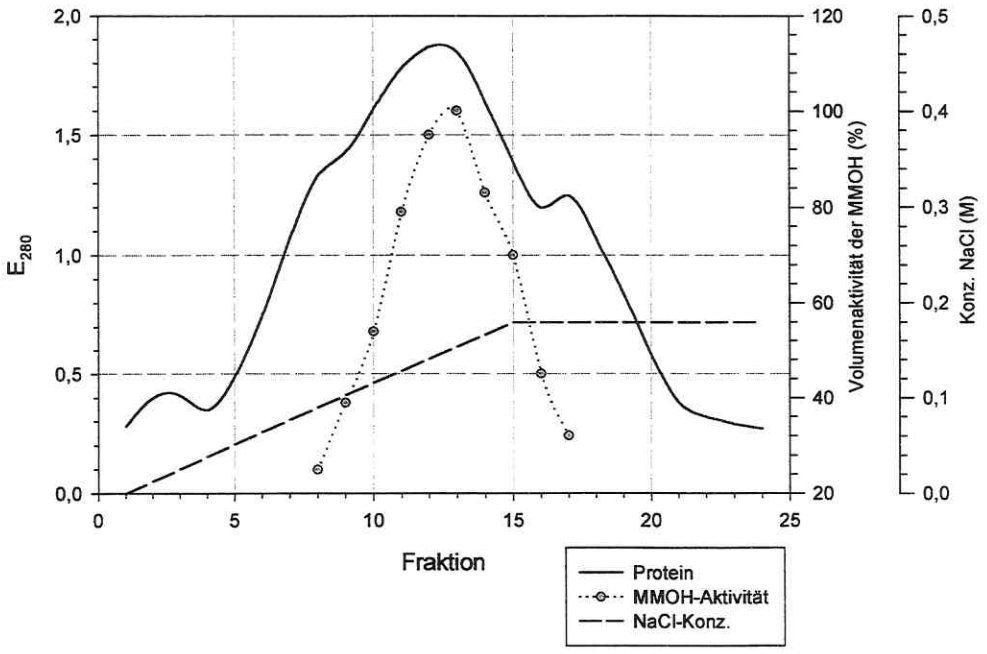

Abb. 19: Ionenaustauschchromatographie der angereicherten Hydroxylase an DEAE-Sepharose FF.

Durch die Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose FF konnte die MMOH etwa 9fach angereichert werden. In der abschließenden Gelfiltration (Abb. 20) erfolgte aufgrund des hohen Aktivitätsverlustes von über 65 % nur noch eine geringe Anreicherung (Tab. 18). Dieser Reinigungsschritt war aber zum Erlangen der elektrophoretischen Homogenität (Abb. 21) essentiell.

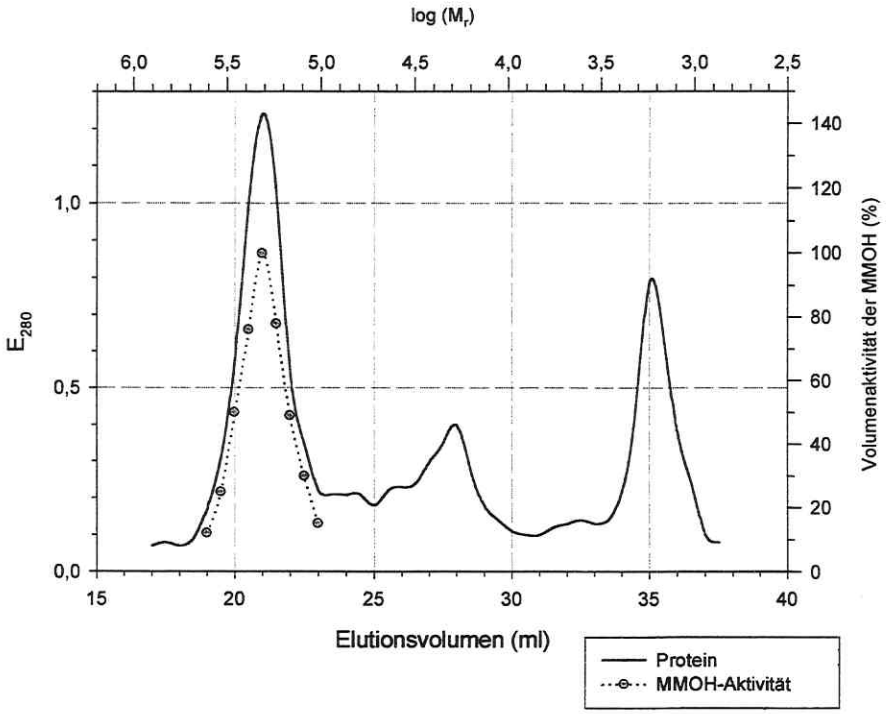

Abb. 20: Gelfiltration der angereicherten Hydroxylase an Superose 12.

Tab. 18: Reinigung der Hydroxylase der sMMO von *Methylosinus* sp. WI 14

Reinigungsschritt	Gesamtprotein (mg)	Gesamtaktivität (U)	Spez. Aktivität (mU/mg)	Ausbeute (%)	Anreicherung (-fach)
Rohextrakt (ultrazentrifugiert)	487	24	49,3	100	1
DEAE-Sepharose (0,2 M NaCl)	113	19	167,6	79	3,4
DEAE-Sepharose (0-0,18 M NaCl)	34	15	438,8	64	8,9
Gelfiltration	10	5	517,7	21	10,5

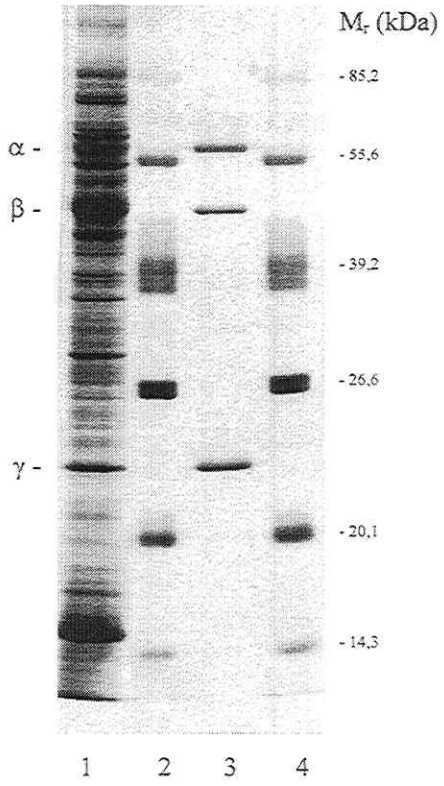

Abb. 21: SDS-Gelelektrophorese der Hydroxylase der sMMO aus *Methylosinus* sp. WI 14.
(Slot 1: ultrazentrifugierter Rohextrakt; Slot 3: gereinigte Hydroxylase; Slot 2 und 4: Proteinstandard wie ausgewiesen)

Der hohe Aktivitätsverlust im letzten Reinigungsschritt hängt wahrscheinlich auch damit zusammen, daß die verwendeten Superose 12 Säulen nicht über einen Kühlmantel verfügten und so nur behelfsmäßig gekühlt werden konnten.

Molare Masse und isoelektrischer Punkt

Die relative Molmasse der nativen MMOH konnte durch Gelfiltration mit 229 kDa bestimmt werden (Abb. 22). Nach Denaturierung und Reduktion der gereinigten MMOH (mit SDS bzw. Mercaptoethanol) werden in der elektrophoretischen Auftrennung drei distinkte Banden sichtbar (vgl. Abb. 21). Durch Vergleich der R_f-Werte mit Standardproteinen konnte die molare Masse der Untereinheiten (α = 57 kDa, β = 43 kDa und γ = 23 kDa) ermittelt werden. Unter Berücksichtigung der ermittelten relativen Molmasse des nativen Proteins kann eine $\alpha_2\beta_2\gamma_2$-Struktur abgeleitet werden.

Der isoelektrische Punkt des nativen Enzyms wurde mit 4,3 bestimmt (nicht dargestellt).

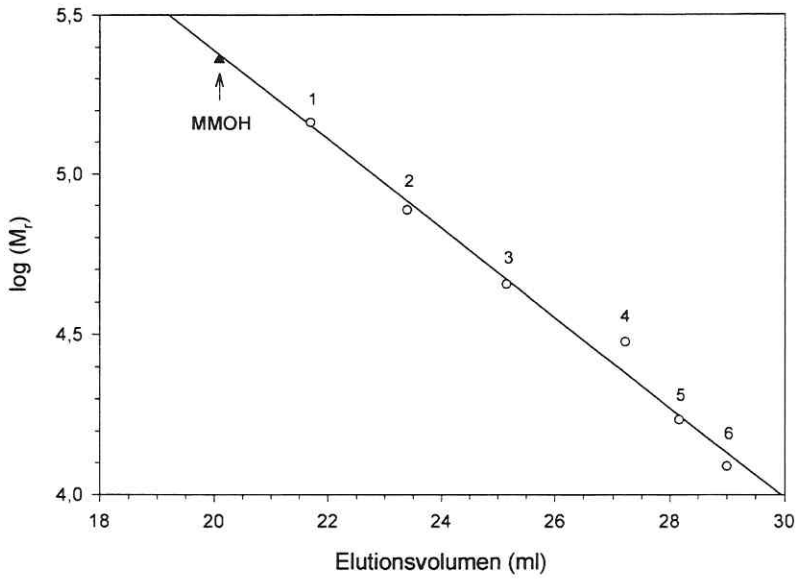

Abb. 22 : Bestimmung der relativen Molmasse (M_r) der Hydroxylase der sMMO aus *Methylosinus* sp. WI 14 mittels Gelfiltration.
Als Eichproteine wurden verwendet (relative Molmasse): 1 - Lactatdehydrogenase (145.000), 2 - Ovotransferrin (77.000), 3 - Ovalbumin (45.000), 4 - Carboanhydrase (30.000), 5 - Myoglobin (17.200), Cytochrom c (12.300).

N-terminale Aminosäuresequenz

Die N-terminalen Aminosäuresequenzen der α-, β- und γ- Untereinheiten der MMOH sind in Tab. 19 dargestellt. Besonders die N-terminale Sequenz der α-Unterheit ist reich an ungeladenen Aminosäuren (allein 6 Alaninreste), während die ß- (3 Serinreste, 3 Glutaminreste) und γ-Untereinheiten (u.a. 4 Glutaminsäurereste, 3 Lysinreste) fast ausschließlich aus geladenen Aminosäuren besteht.

Metallische Cofaktoren

Mit Hilfe der Atomabsorptionsspektrometrie wurde Eisen als in die Hydroxylierung involvierter Cofaktor in der gereinigten MMOH nachgewiesen. Der Gehalt konnte mit 3,6 mol pro mol MMOH bestimmt werden. Andere metallische Cofaktoren konnten nicht detektiert werden.

Tab. 19: N-terminale Aminosäuresequenzen der Untereinheiten der Hydroxylase der sMMO aus *Methylosinus* sp. WI 14.

Position	α-Untereinheit (57 kDa)	β-Untereinheit (43 kDa)	γ-Untereinheit (23 kDa)
1	Ala	Ser	Gly
2	Ile	Gln	Lys
3	Ser	Pro	Arg
4	Leu	Gln	Glu
5	Ala	Ser	Pro
6	Thr	Ser	Ile
7	Lys	Gln	His
8	Ala	Val	Asp
9	Ala	Thr	Asp
10	Thr	Lys	Ser
11	Asp	Arg	Thr
12	Ala	Gly	Thr
13	Leu	Leu	Ala
14	Lys	Thr	Glu
15	Val	Asp	Glu
16	Asn	Pro	Glu
17	Arg	Glu	Ala
18	Ala	Arg	Lys
19	Pro	Ala	Lys
20	Val	-[1]	-

[1]) Die Aminosäuren der β- und γ-Untereinheiten an Position 20 konnten aufgrund eines Gerätefehlers bei der Aufzeichnung der Aminosäuresequenz (nur 19 Aminosäuren wurden abgespeichert) nicht bestimmt werden.

Stabilität

Die gereinigte MMOH ist sehr instabil, besonders gegenüber Einfrieren bzw. Auftauen. Nach einmaligem Einfrieren (dabei spielte die Zeit im eingefrorenen Zustand keine Rolle, getestet wurde nach 24 h und 240 h) verliert die MMOH ihre Aktivität zu 80 %. Daran änderte auch der Zusatz von Stabilisatoren (Glycerin, Fe^{2+}- bzw. Fe^{3+}- Ionen u.a.) nichts. Bei Lagerung bei 4°C über 24 h blieben etwa 65 % der Aktivität erhalten.

In Abb. 23 sind die Elutionskurven von gereinigter MMOH -sofort nach der Reinigung und nach einmaligen Einfrieren und Auftauen (24 h bei -18°C)- nach Gelfiltration an Superose 12 dargestellt.

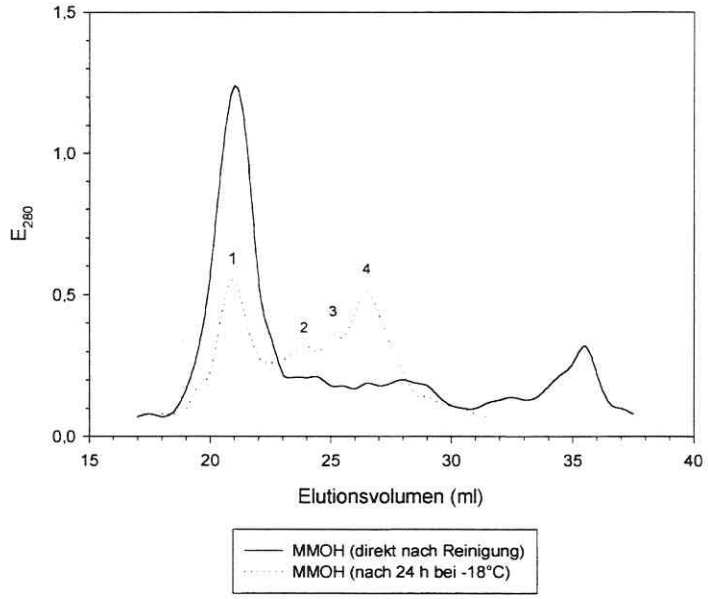

Abb. 23: Gelfiltration der gereinigten Hydroxylase der sMMO aus *Methylosinus* sp. WI 14 an Superose 12.

Für die gekennzeichneten Proteinpeaks konnten aus der Eichkurve die folgenden relativen Molmassen berechnet werden: 1 - 227.000, 2 - 57.000, 3 - 45.000, 4 - 28.000.

Die Abnahme des MMOH-Peaks (1) wird deutlich sichtbar. Gleichzeitig treten drei neue Proteinpeaks (2-4) mit relativen Molmassen von 57, 45 und 28 kDa auf. Die Molmassen entsprechen dabei recht gut den durch SDS-Gelelektrophorese ermittelten Werten der α-, β-, und γ-Untereinheiten der Hydroxylase. Offensichtlich zerfällt die MMOH beim Einfrieren bzw. Auftauen in ihre Untereinheiten. Mit diesen Fraktionen konnte auch nach Rekombination keine MMOH-Aktivität gemessen werden.

3.4.3.4.2. Reinigung und Eigenschaften des Elektronentransferproteins (Komponente B)

Reinigung der Komponente B

Die Komponente B (MMOB) der sMMO aus *Methylosinus* sp. WI 14 konnte durch Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose und Gelfiltration an Superose 12 gereinigt werden. Eine Bestimmung der spezifischen Aktivität bzw. des Anreicherungsfaktors konnte

nicht erfolgen, da zur Aktivitätsermittlung die Komponenten A und C benötigt werden. Aufgrund der geringen Ausbeute bei den Reinigungen der Komponenten A bzw. C und der geringen Stabilität (insbesondere von Komponente A) war es nicht möglich, ein reproduzierbares Testsystem zu etablieren. Statt dessen erfolgte die Identifizierung der Komponente B während der Reinigung über die Zunahme der sMMO-Aktivität (Propylenoxidation) im ultrazentrifugierten Rohextrakt bei Zugabe von Komponente B. Aus Tab. 20 wird ersichtlich, daß die sMMO-Aktivität im Rohextrakt durch Zugabe von gereinigter Komponente B gesteigert werden kann.

Tab. 20: Erhöhung der sMMO-Aktivität durch Zugabe von gereinigter Komponente B.

Zugabe von Komponente B (µg)	Aktivität der sMMO[1] (%)
-	100
10	158
20	179
50	203

[1]) Die Aktivität wurde durch Propylenoxidation im ultrazentrifugierten Rohextrakt bestimmt (100% = 22,5 mU/mg).

Der letzte Reinigungsschritt für die Komponente B ist in Abb. 24 dargestellt.

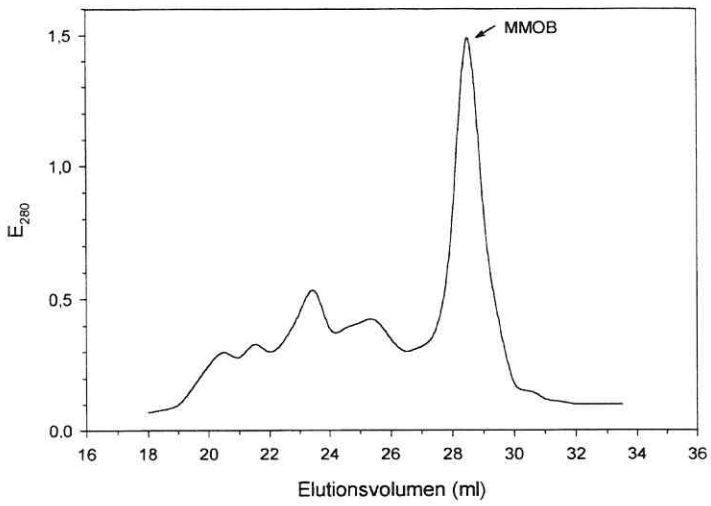

Abb. 24: Gelfiltration der Komponente B der sMMO aus *Methylosinus* sp. WI 14 an Superose 12.

Molare Masse und isoelektrischer Punkt

Die relative Molmasse der nativen MMOB konnte durch Gelfiltration an Superose 12 mit 18 kDa bestimmt werden (Abb. 25). Nach Denaturierung und Reduktion (mit SDS bzw. Mercaptoethanol) ist nach elektrophoretischer Auftrennung eine Bande bei 15 kDa erkennbar (Abb. 26). Offensichtlich ist die MMOB ein Monomer mit einer relativen Molmasse zwischen 15-18 kDa.

Der isoelektrische Punkt der MMOB konnte mit 4,6 ermittelt werden (nicht dargestellt).

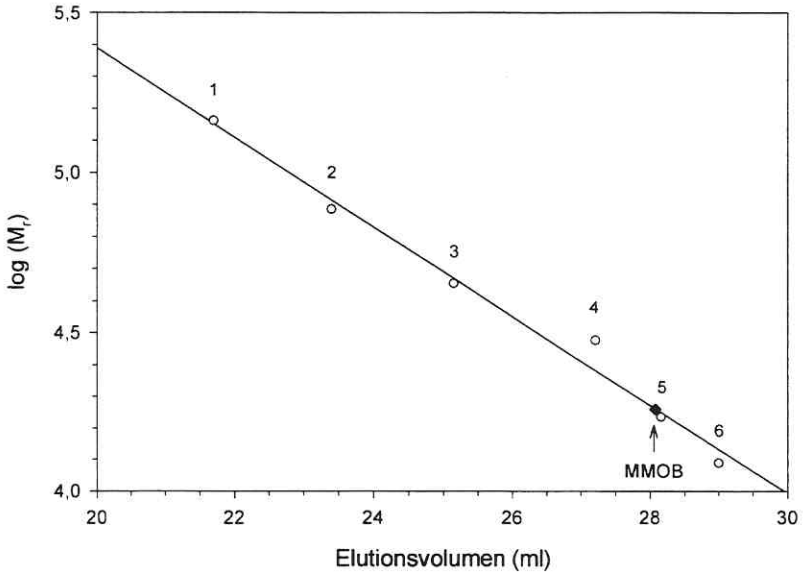

Abb. 25: Bestimmung der relativen Molmasse der Komponente B der sMMO aus *Methylosinus* sp. WI 14.

Als Eichproteine wurden verwendet (relative Molmasse): 1 - Lactatdehydrogenase (145.000), 2 - Ovotransferrin (77.000), 3 - Ovalbumin (45.000), 4 - Carboanhydrase (30.000), 5 - Myoglobin (17.200), Cytochrom c (12.300).

N-terminale Aminosäuresequenz

In Tab. 21 ist die N-terminale Aminosäuresequenz der MMOB dargestellt. Die Aminosäure an Position 16 konnte nicht eindeutig bestimmt werden. Es könnte sich dabei um ein Cystein handeln, das mit dem verwendeten Detektionsverfahren nicht erfaßt werden kann.

Tab. 21: N-terminale Aminosäuresequenz der Komponente B der sMMO aus *Methylosinus* sp. WI 14.

Position	1				5					10
Aminosäure	Thr	Ser	Ala	His	Asn	Ala	Tyr	Asn	Ala	Gly
Position	11				15					20
Aminosäure	Ile	Met	Ile	Gln	Thr	-	Gly	Asp	Glu	Phe

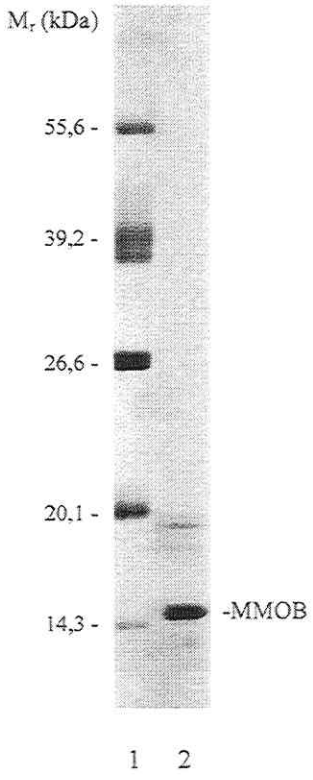

Abb. 26: SDS-Gelelektrophorese der Komponente B der sMMO aus *Methylosinus* sp. WI 14.
(Slot 1: Proteinstandards wie ausgewiesen, Slot 2: gereinigte Komponente B)

Metallische Cofaktoren

Bei der Untersuchung der Komponente B mittels Atomabsorptionsspektrometrie konnten keine Metalle nachgewiesen werden.

3.4.3.4.3. Reinigung und Eigenschaften der NADH-Akzeptor Reduktase (Komponente C)

Die Komponente C der sMMO aus *Methylosinus* sp. WI 14 (MMOC) konnte über einen spektrophotometrischen Test -in Abwesenheit von MMOH und MMOB- direkt nachgewiesen werden. Die MMOC ist in vitro in der Lage, Elektronen vom NADH auf eine Reihe von Akzeptoren zu übertragen (Tab. 22). Obwohl die höchsten spezifischen Aktivitäten mit DCPIP und Kaliumferricyanid erhalten wurden, waren diese auch am anfälligsten gegenüber Störfaktoren (u.a. Natriumthioglycolat, das zur Stabilisierung der MMOC eingesetzt wurde). Weiterhin sind die gemessenen Extinktionsänderungen für Kaliumferricyanid aufgrund des niedrigen Extinktionskoeffizienten am geringsten. Für die Bestimmung der Aktivität der MMOC wurde deshalb Cytochrom c als Elektronenakzeptor verwendet. Eine Reduktion des eingesetzten NADH bzw. NADPH erfolgte nur bei Zugabe eines der beschriebenen Akzeptoren. Optimale MMOC-Aktivität wurde bei pH 7,0 (Na-Phosphatpuffer, 0,05M) und 30°C erhalten.

Tab. 22: Spezifische Aktivität der Reduktase der sMMO in Abhängigkeit des verwendeten Elektronenakzeptors.

Elektronenakzeptor	Spez. Aktivität (U/mg)[1]
DCPIP	0,91
Cytochrom c	0,21
Kaliumferricyanid	2,38

[1]) gemessen im ultrazentrifugierten Rohextrakt

Reinigung der Reduktase

Die MMOC konnte durch Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose und Affinitätschromatographie an Blue-Sepharose fast vollständig gereinigt werden (Tab. 23). Durch den kontinuierlichen NaCl-Gradienten (0,2-0,5 M) bei der zweiten Chromatographie an DEAE-Sepharose konnte eine sehr hohe Anreicherung der MMOC erreicht werden (Abb. 27). Obwohl das Enzym nicht an Blue-Sepharose sowie 5´AMP-Sepharose bindet (der Anreicherungseffekt war für beide Säulen annähernd gleich, so daß nur die Blue-Sepharose verwendet wurde), wurde auch in diesem Schritt nochmals eine Anreicherung erzielt. Andere chromatographische Verfahren wie die hydrophobe Interaktionschromatographie an TSK-Butyl nach Ammoniumsulfatfällung sowie Gelfiltration an Superose 12 führten zur vollständigen irreversiblen Inaktivierung der MMOC.

Tab. 23: Reinigung der Reduktase der sMMO aus *Methylosinus* sp. WI 14.

Reinigungsschritt	Gesamtprotein (mg)	Gesamtaktivität (U)	Spez. Aktivität (U/mg)	Ausbeute (%)	Anreicherung (-fach)
Ultrazentrifugierter Rohextrakt	75,1	11,3	0,15	100	1
DEAE-Sepharose (0,2-0,5 M NaCl)[1]	6,8	12,3	1,82	109	12
DEAE-Sepharose (0,2-0,5 M NaCl)[2]	0,36	8,5	23,86	75	158
Blue-Sepharose	0,11	3,3	30,64	29	204

[1]) Stufengradient (in diesem Bereich eluierte die MMOC)

[2]) kontinuierlicher Gradient (Auftrennung innerhalb des Bereiches)

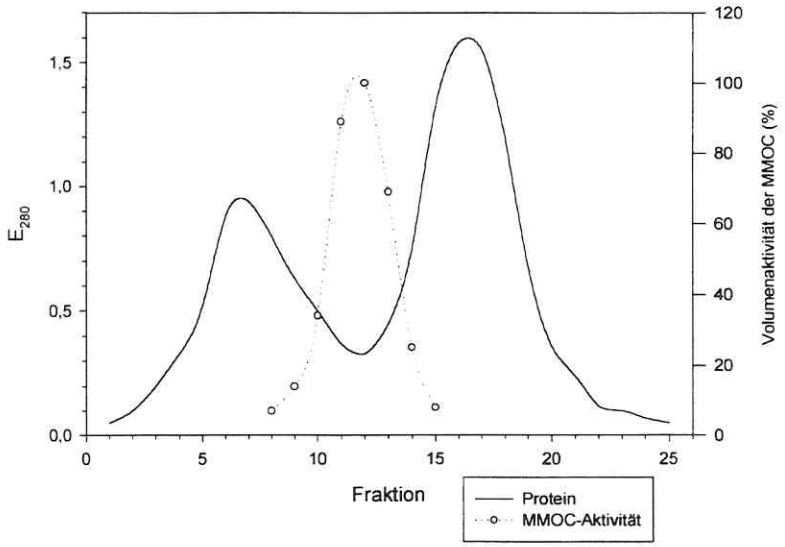

Abb. 27: Ionenaustauschchromatographie von vorgereinigter Reduktase der sMMO aus *Methylosinus* sp. WI 14 an DEAE-Sepharose FF.

Molare Masse und isoelektrischer Punkt

Die fast vollständig gereinigte MMOC erscheint nach Auftrennung in der SDS-Gelelektrophorese nicht als distinkte Bande (Abb. 28), sie wirkt eher diffus. Anhand von Standardproteinen konnte die relative Molmasse mit etwa 41 kDa bestimmt werden. Die MMOC ist ein monomeres Protein. Bei der kleinen Bande unterhalb der MMOC-Bande könnte es sich um ein Abbauprodukt der MMOC handeln.

Der isoelektrische Punkt konnte aufgrund der geringen Proteinausbeute nach der Reinigung nicht exakt bestimmt werden.

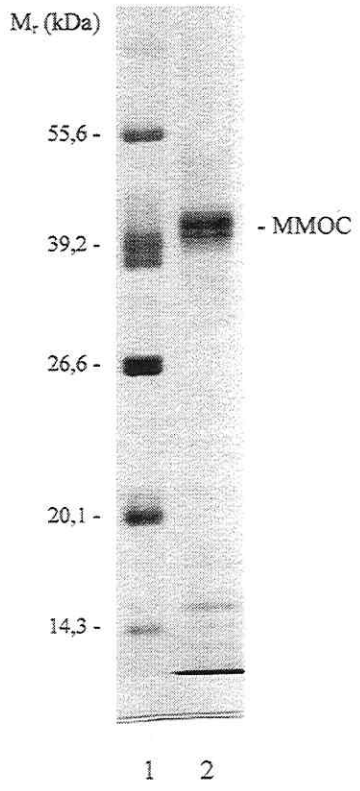

Abb. 28: SDS-Gelelektrophorese der Komponente B der sMMO aus *Methylosinus* sp. WI 14.
(Slot 1: Proteinstandards wie ausgewiesen, Slot 2: gereinigte MMOC)

N-terminale Aminosäuresequenz

In Tab. 24 ist die N-terminale Aminosäuresequenz der MMOC dargestellt. Die Aminosäure an Position 18 konnte nicht identifiziert werden. Möglicherweise handelt es sich um einen Cysteinrest.

Tab. 24: N-terminale Aminosäuresequenz der Reduktase der sMMO aus *Methylosinus* sp. WI 14.

Position	1				5					10
Aminosäure	Met	Tyr	Gln	Ile	Val	Ile	Glu	Thr	Glu	Asp
Position	11				15					20
Aminosäure	Gly	Gly	Asp	Trp	Val	Trp	Phe	-	Asp	-

Substratspezifität und K_m-Werte

Die MMOC kann sowohl NADH als auch NADPH als Elektronendonator mit etwa gleicher Aktivität nutzen. Die Affinität der MMOC für NADH ist aber etwa um den Faktor 10^3 höher als für NADPH (Tab. 25).

Tab. 25: K_m-Werte und v_{max} der Reduktase der sMMO aus *Methylosinus* sp. WI 14 für NAD(P)H.

Substrat	K_m-Wert (mM)	v_{max} (U/mg)
NADH	$6{,}38 \cdot 10^{-3}$	25,8
NADPH	5,2	24,1

Einfluß von verschiedenen Verbindungen auf die Reduktase

Die MMOC wird besonders stark durch Zn^{2+}, Cu^{2+} und Ni^{2+} -Ionen sowie durch EDTA gehemmt. Die Zugabe von Hg^{2+} (p-Chlormercuribenzoat) führt zum vollständigen Aktivitätsverlust des Enzyms. Positiven Einfluß auf die MMOC-Aktivität hat dagegen Fe^{2+} (Tab. 26).

Tab. 26: Einfluß verschiedener Substanzen auf die Aktivität der Reduktase der sMMO aus *Methylosinus* sp. WI 14.

Substanz	Konzentration (mM)	Aktivität der MMOC (%)[1]
-	-	100
Na^+	1	67
Zn^{2+}	1	8
Mg^{2+}	1	87
Li^+	1	87
Ca^{2+}	1	64
Mn^{2+}	1	81
Co^{2+}	1	68
Cu^{2+}	1	16
Ni^{2+}	1	22
Fe^{2+}	1	121
Hg^{2+}	0,01	0
EDTA	0,2	44
Cystein	1	97
NaN_3	1	79

[1]) 100 % Aktivität entsprechen 24,4 U/mg

Stabilität der Reduktase

Gereinigte MMOC verliert durch Lagerung bei 4°C innerhalb von 120 h etwa 90 % der Aktivität. Beim einmaligen Einfrieren gehen etwa 45 % der Aktivität verloren. Durch Zugabe von Fe^{2+} (2 mM $FeSO_4$) zum Reaktionsansatz konnten jedoch etwa 90 % der Ausgangsaktivität zurückgewonnen werden.

3.4.3.5. Rekonstitution der sMMO

Nach Anreicherung bzw. Reinigung der einzelnen Komponenten der sMMO wurden Rekonstitutionsversuche durchgeführt. Aufgrund der geringen Stabilität der MMOH erfolgten diese direkt im Anschluß an die Reinigung dieser Komponente. Für die Komponenten B und C wurden die jeweils jüngsten Chargen (gelagert bei -18°C) verwendet. Zum Reaktionsansatz wurden 2 mM $FeSO_4$ zugegeben, dieser mit 10 mM NADH gestartet und das gebildete Propylenoxid nach 20 min gaschromatographisch gemessen. Die Ergebnisse sind in Tab. 27 dargestellt.

Tab. 27: Rekonstitution der Komponenten der sMMO aus *Methylosinus* sp. WI 14

	Konzentration (mM)			Gebildetes Propylenoxid
Nr.	MMOH	MMOB	MMOC	(mM/min)
1	4,6	-	-	0
2	4,6	6,2	-	0
3	4,6	6,2	0,08	4,3
4	4,6	6,2	0,17	5,5
5	4,6	6,2	0,34	10,4
6	4,6	6,2	0,68	18,3
7	4,6	6,2	1,36	31,8
8	4,6	6,2	1,66	38,2
9	4,6	6,2	3,32	51,6
10	4,6	-	1,66	3,1
11	4,6	-	3,32	5,3

Es wird ersichtlich, daß nur bei Kombination aller Komponenten der sMMO maximale Aktivität erreicht wird. Dabei wirkt die Komponente B als Effektor und steigert die sMMO-Aktivität um etwa das 10fache.

Aufgrund der großen Menge an NAD(P)H im Testansatz war eine spektrophotometrische Erfassung des NAD(P)H- Verbrauchs durch Messung der Extinktion bei 340 nm nicht möglich.

3.4.3.6. Hemmung der sMMO

Die Hemmungsversuche wurden mit gereinigten Komponenten der sMMO im Propylentest durchgeführt und sind in Tab. 28 zusammengefaßt.

Tab. 28: Einfluß verschiedener Substanzen auf die Aktivität der sMMO aus *Methylosinus* sp. WI 14.

Substanz	Konzentration (mM)	Akt. der sMMO[1] (%)
-	-	100
Ni^{2+}	1	59
Cu^{2+}	1	4,9
Mg^{2+}	1	100
Mn^{2+}	1	86
Zn^{2-}	1	21
NaN_3	1	70
EDTA	0,2	3,5
KCN	1	87

[1]) gemessen nach Rekonstitution der Komponenten der sMMO im Propylentest

Die rekonstituierte sMMO aus *Methylosinus* sp. WI 14 wird stark durch Zn^{2+}- und Cu^{2+}-Ionen sowie durch EDTA gehemmt. Mg^{2+}, Mn^{2+} und KCN haben keinen bzw. nur geringen Einfluß auf die Aktivität des Gesamtenzyms.

3.4.3.7. Gewinnung von monoklonalen Antikörpern

Für die Gewinnung von monoklonalen Antikörpern gegen die sMMO wurde die gereinigte MMOH verwendet. Von insgesamt 780 getesteten Klonen wurden 20 Klone weitergeführt, die in mindestens einem der unter 2.10. beschriebenen Tests positiv waren (Tab. 29). Die im Western Blot positiven Hybridomzellen wurden anschließend rekloniert, erneut getestet und die dabei positiven reklonierten Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

Tab. 29: Test der ausgewählten monoklonalen Antikörper gegen die Hydroxylase der sMMO aus *Methylosinus* sp. WI 14.

	Durchgeführter Test :		
Platte / Well	a) direkt gekoppelte MMOH	b) biotinylierte MMOH	c) Western Blot[1]
1 / B2	++[2]	-[3]	γ-Untereinheit
1 / C8	++	++	-
1 / C11	++	++	-
1 / D3	-	+++[4]	-
2 / E6	+++	-	-
3 / C9	-	+++	-
4 / E2	+++	+++	β(α)-Untereinheit
5 / E11	+++	++	-
5 / F6	++	++	-
6 / G3	++	++	-
7 / B3	++	++	-
7 / B4	++	++	-
7 / G9	+++	-	γ-Untereinheit
8 / E4	+++	++	-
8 / D10[5]	+++	-	-
9 / E5	+++	++	α(β)-Untereinheit
10 / F9	+++	++	β(α)-Untereinheit
10 / G3	+++	-	γ-Untereinheit
13 / B2	-	+++	-
13 / C11	++	++	-

[1])Bindung an angegebene Untereinheit; [2]) 0,8 > ΔE (im Test) < 1,0; [3]) keine Reaktion; [4]) ΔE (im Test) > 1,0; [5]) Obwohl der Überstand der betreffenden Kavität im Test positiv war, konnten keine lebenden Zellen gefunden werden.

Im Western Blot konnten Antikörper-produzierende Klone nachgewiesen werden, die selektiv mit der γ-Untereinheit der MMOH reagieren. Dagegen gelang es nicht, Klone zu isolieren, die nur mit der α- bzw. β -Untereinheit reagieren (Abb. 29).

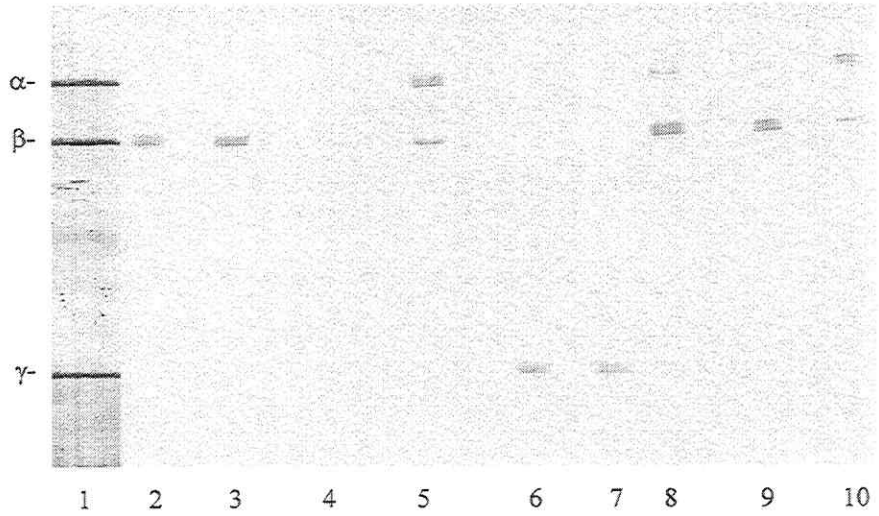

Abb. 29: Western Blot der reklonierten positiven Klone gegen die Hydroxylase der sMMO aus *Methylosinus* sp. WI 14.
Slot 1: Ponceau S-gefärbter Blot, Slot 2 und 3: 4 / E2 (reklonierte Hybridome, rH),
Slot 4 und 5: 9 / E5 (rH), Slot 6 und 7: 10 / G3 (rH), Slot 8 und 9: 10 / F9 (rH),
Slot 10: 9 / E5

3.5. Methanoldehydrogenasen

3.5.1. Methanoldehydrogenase aus *Methylocystis* sp. GB 25

Das in der initialen, durch die MMO katalysierten, Reaktion gebildete Methanol wird durch eine $NAD(P)^+$- unabhängige Methanoldehydrogenase (MDH) verwertet. Das Enzym benötigt für die Aktivierung essentiell Ammoniumionen (8 mM) und kann in einer PMS/DCPIP gekoppelten Reaktion nachgewiesen werden. Eine NAD^+- bzw. $NADP^+$- abhängige MDH-Aktivität war weder im Cytosol noch in der Membranfraktion nachweisbar.

3.5.1.1. Aufschlußbedingungen und Lokalisation

Obwohl die spezifische Aktivität der MDH nach Zellaufschluß mit Alcoa am höchsten war, wurde diese Methode aufgrund der geringen Proteinausbeute nicht gewählt. Die größte Enzymausbeute konnte beim Aufschluß mittels French Press erzielt werden. Die MDH-Aktivität ist dabei zu 95 % in der löslichen Fraktion lokalisiert. Auch nach dem Waschen verblieb eine Restaktivität von etwa 5 % in der Membranfraktion.

3.5.1.2. Enzymreinigung und Stabilität

Die MDH konnte bis zur elektrophoretischen Homogenität gereinigt werden. Die essentiellen Reinigungsschritte waren dabei die Ammoniumsulfatfällung sowie die nachfolgende hydrophobe Chromatographie an TSK-Butyl, bei denen insgesamt eine 16fache Anreicherung erfolgte (Tab. 30). Das Enzym bindet unter den gewählten Bedingungen nicht an schwache Kationenaustauscher (EMD-DEAE). Da dabei aber zahlreiche Fremdproteine abgetrennt werden konnten, wurde dieser chromatographische Schritt mit in die Reinigung einbezogen. Obwohl nach der Gelfiltration ein Abfall der spezifischen Aktivität der MDH registriert wurde, konnte die elektrophoretische Homogenität nur durch diesen Reinigungsschritt erreicht werden. Insgesamt erfolgte eine 20fache Anreicherung bei einer Ausbeute von 29 %. Gereinigte MDH verliert in 24 h bei 4°C etwa 50 % und in 3 Monaten bei -18°C etwa 20 % ihrer Aktivität.

Tab. 30: Reinigung der Methanoldehydrogenase aus *Methylocystis* sp. GB 25.

Reinigungsschritt	Gesamtprotein (mg)	Gesamtaktivität (U)	Spez. Aktivität (U/mg)	Ausbeute (%)	Anreicherung (-fach)
Rohextrakt	336	37,8	0,112	100	1
Ultrazentrifugation	302	35,9	0,118	95	1
Ammoniumsulfat-fällung (60-90 %)	35	32,6	0,945	86	8
TSK-Butyl	8	28,8	1,740	76	16
EMD-DEAE	5	17,8	2,340	47	21
Gelfiltration	4	11,0	2,250	29	20

3.5.1.3. Molare Masse und isoelektrischer Punkt

Die relative Molmasse der MDH konnte durch Gelfiltration mit 122 kDa (Abb. 30) und nach der Methode von HEDRICK und SMITH (1968) mit 115 kDa (Abb. 31) bestimmt werden. Nach Denaturierung und Reduktion erscheint die MDH bei elektrophoretischer Auftrennung in einer Bande mit einer relativen Molmasse von 62 kDa (Abb. 32). Offensichtlich liegt das Enzym in einer α_2-Struktur vor. Der isoelektrische Punkt der MDH konnte mit 8,3 bestimmt werden (nicht dargestellt).

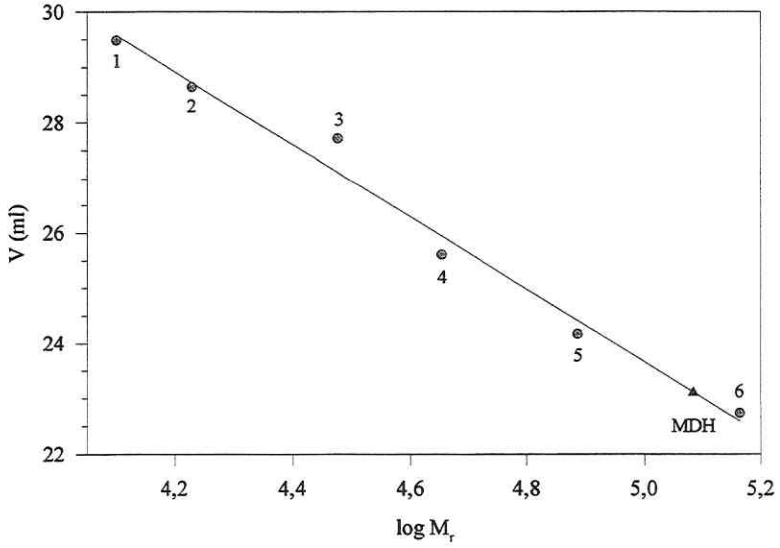

Abb. 30: Bestimmung der relativen Molmasse der nativen Methanoldehydrogenase aus *Methylocystis* sp. GB 25 mittels Gelfiltration an Superose 12.

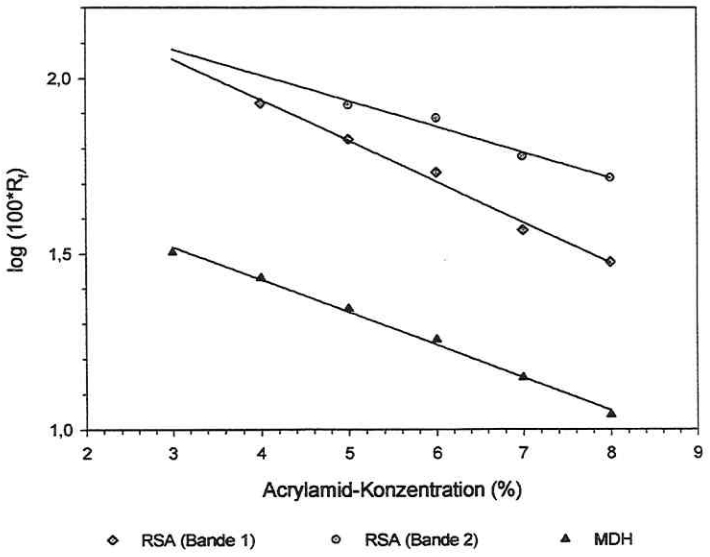

Abb. 31a: Bestimmung der relativen Molmasse der nativen Methanoldehydrogenase aus *Methylocystis* sp. GB 25 nach der Methode von HEDRICK und SMITH (1968).

- Ermittlung des Anstiegs aus den Funktionen f (log R_f) = a • (Konz. Acrylamid) + b

(Als Eichproteine dienten die Komplexe des RSA, Bd. 1: 136 kDa, Bd. 2: 68 kDa).

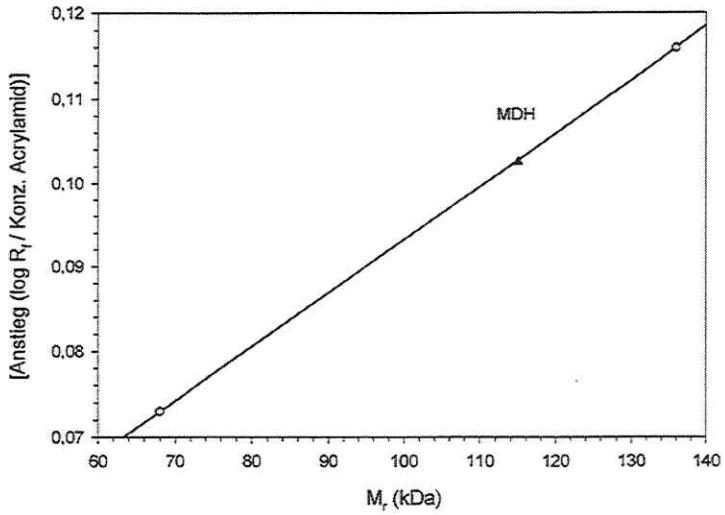

Abb. 31b: Bestimmung der relativen Molmasse (M_r) der nativen Methanoldehydrogenase aus *Methylocystis* sp. GB 25 nach der Methode von HEDRICK und SMITH (1968).
- Ermittlung der relativen Molmasse aus dem Anstieg der Funktion aus Abb. 31a.

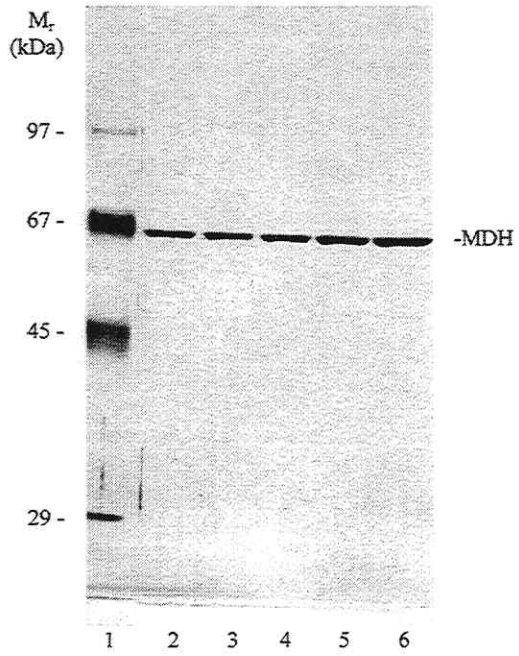

Abb. 32: SDS-Gelelektrophorese der Methanoldehydrogenase aus *Methylocystis* sp. GB 25.
Slot 1: Proteinstandard wie ausgewiesen (Serva 4, vgl. 2.8.3.3.); Slots 2-6: gereinigte MDH (0,3 µg, 0,4 µg, 0,5 µg, 0,75 µg sowie 1 µg Protein per Slot)

3.5.1.4. N-terminale Aminosäuresequenz

Die N-terminale Aminosäuresequenz der MDH ist in Tab. 31 dargestellt. Die Aminosäure an Position 14 konnte nicht bestimmt werden. Wahrscheinlich handelt es sich um einen Cysteinrest. Auffallend ist die große Anzahl von sauren Aminosäuren bzw. ihrer Amide (40 %) in der N-terminalen Region der MDH.

Tab. 31: N-terminale Aminosäuresequenz der Methanoldehydrogenase der sMMO aus *Methylocystis* sp. GB 25.

Position	1				5					10
Aminosäure	Asn	Asp	Arg	Leu	Glu	Ala	Leu	Thr	Lys	Ser
Position	11				15					20
Aminosäure	Glu	Asn	Asn	-	Ala	Met	Gln	Gly	Lys	Asn

3.5.1.5. Prosthetische Gruppe

PQQ konnte als prosthetische Gruppe der MDH mit Hilfe des Apoenzyms der Glucosedehydrogenase aus *Pseudomonas aeruginosa* SG 26 nachgewiesen werden. Auch im Absorptionsspektrum des partiell gereinigten Enzyms (nach Chromatographie an DEAE) ist ein Peak bei 345 nm (typisches Absorptionsmaximum von PQQ_{ox}) erkennbar (Abb. 33).

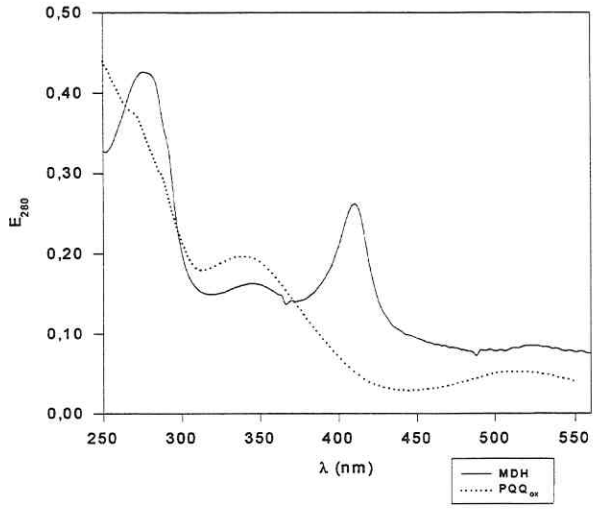

Abb. 33: Absorptionsspektrum der Methanoldehydrogenase aus *Methylocystis* sp. GB 25.

3.5.1.6. pH- und Temperaturoptimum

Optimale MDH-Aktivität wurde unter Verwendung von PMS als Elektronenakzeptor bei pH 9,0 (Natriumboratpuffer, 0,05 M) und 45 °C gemessen. Bei Temperaturen von über 50°C erfolgte eine nichtenzymatische Reduktion des DCPIP durch PMS.

3.5.1.7. Substratspezifität

Gereinigte MDH (nach Gelfiltration) zeigte im PMS gekoppelten Test ein erstaunliches Phänomen. Auch ohne Zusatz eines Substrates erfolgte die PMS vermittelte Reduktion des DCPIP, allerdings nur bei Aktivierung des Enzyms durch Ammoniumionen. Die Ermittlung der Substratspezifität (Tab. 32) erfolgte deshalb mit Enzymfraktionen nach Chromatographie an EMD-DEAE.

Tab. 32: Spezifische Aktivitäten und K_m-Werte der Methanoldehydrogenase aus *Methylocystis* sp. GB 25.

Substrat	Aktivität der MDH (%)[2]	K_m-Wert (mM)
Methanol	100	0,34
Ethanol	96	0,89
n-Propanol	43	1,30
2-Propanol	1	n.b.[3]
n-Butanol	42	0,19
n-Pentanol	42	0,11
n-Hexanol[1]	37	0,20
n-Heptanol[1]	32	0,20
n-Oktanol[1]	10	n.b.
Formaldehyd	78	0,10
Acetaldehyd	50	n.b.
Propionaldehyd	32	n.b.
Butyraldehyd[1]	4	n.b.
Crotonaldehyd	1	n.b.
Glutardialdehyd	56	n.b.

[1]) betreffende Substanzen wurden in 1-4 Dioxan gelöst; [2]) 100 % entsprechen einer Aktivität von 2,1 U/mg; [3]) nicht bestimmt

Die MDH oxidiert primäre Alkohole bis zum Oktanol und Aldehyde bis zum Propionaldehyd sowie den Glutardialdehyd, nicht hingegen Butyr- und Crotonaldehyd. Sekundäre Alkohole werden ebenfalls nicht umgesetzt. Das Enzym hat die höchste Affinität zum Formaldehyd und die niedrigste zu n-Propanol. Die ermittelten K_m-Werte zeigen dabei keine Abhängigkeit von der Kettenlänge des jeweiligen Substrates.

3.5.1.8. Einfluß verschiedener Verbindungen auf die Aktivität der MDH

Die Untersuchungen zur Hemmung der MDH wurden ebenfalls mit aktiven Enzymfraktionen nach Chromatographie an EMD-DEAE durchgeführt (vgl. 3.5.1.7.). Besonders stark wird die MDH durch Mn^{2+}- und Cu^{2+}-Ionen gehemmt. Dagegen haben Metallchelatoren, insbesondere das EDTA, im PMS-gekoppelten Test keinen hemmenden Einfluß auf die Enzymaktivität (Tab. 33).

Tab. 33: Einfluß von verschiedenen Verbindungen auf die Methanoldehydrogenase aus *Methylocystis* sp. GB 25.

Substanz	Konzentration (mM)	Aktivität der MDH (%)[1]
Cu^{2+}	0,1	70
Fe^{2+}	0,1	77
Ca^{2+}	1	97
Co^{2+}	1	78
Li^{-}	1	94
Zn^{2+}	1	100
Mn^{2+}	0,1	1
Mg^{2+}	1	100
Hg^{2+}	0,1	80
KCN	1	100
NaN_3	1	98
EDTA	1	108
DTE	0,1	100
PMS	2	80
SDS	4	53

[1]) 100 % entsprechen 2,1 U/mg

Möglicherweise ist die erhöhte Aktivität bei Zusatz von EDTA auf die Bindung von störenden Metallionen begründet. Die katalytische Aktivität des Enzyms wird durch Reduktion eventuell vorhandener Disulfidbrücken nicht beeinflußt (DTE). SH-Gruppen scheinen nicht im aktiven Zentrum lokalisiert zu sein, da das Enzym nur gering durch Hg^{2+}- Ionen gehemmt wird. Der im Ansatz eingesetzte Elektronenakzeptor PMS hemmt das Enzym erst in höheren Konzentrationen.

3.5.2. Methanoldehydrogenase aus *Methylosinus* sp. WI 14

Die Aktivität der MDH wurde im PMS/DCPIP-gekoppelten sowie im PMS/Sorbinalkohol-gekoppelten Test nachgewiesen. In beiden Fällen benötigt das Enzym zur Aktivierung essentiell Ammoniumionen (22 mM). Unter Verwendung von NAD^+ bzw. $NADP^+$ als Elektronenakzeptor konnte keine MDH-Aktivität -weder im Cytosol noch in der Membranfraktion- gemessen werden.

3.5.2.1. Aufschlußbedingungen und Lokalisation

Obwohl die ermittelte spezifische Aktivität der MDH beim Aufschluß mittels French Press ca. 15 % geringer war als beim Aufschluß mit Alcoa wurde dieser Zellaufschluß aufgrund der hohen Proteinausbeute (bis zum 10fachen des durch Alcoaaufschluß erhaltenen Proteins) gewählt.

Nach Ultrazentrifugation des zellfreien Rohextraktes konnten etwa 95 % der Enzymaktivität in der löslichen Fraktion gefunden werde. In der membrangebundenen Fraktion verblieb auch nach einem Waschschritt ein Restaktivität von 5 %.

3.5.2.2. Enzymreinigung und Stabilität

Die Bestimmung der MDH-Aktivität während der Reinigung erfolgte im Test mit Sorbinalkohol. Durch Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose FF konnte nur eine etwa 2fache Anreicherung erzielt werden (Tab. 34). Dennoch wurde diese Methode als erster Reinigungsschritt gewählt, da dadurch eine Trennung der MDH von den Komponenten der sMMO sowie der Formiatdehydrogenase erreicht werden konnte. Während alle anderen für den dissimilatorischen Methanabbau relevanten Enzyme an die Säule binden, erscheint die MDH im Säulendurchlauf. Somit fiel das Enzym quasi als Abfallprodukt bei der Reinigung der Komponenten der sMMO an, was natürlich aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Biomasse

ausgenutzt wurde. Durch anschließende Ammoniumsulfatfällung, gefolgt von einer hydrophoben Chromatographie an TSK-Butyl (MDH aus *Methylosinus* sp. WI 14 bindet im Gegensatz zur MDH aus *Methylocystis* sp. GB 25 nicht an diese Säule) erfolgte eine insgesamt etwa 10fache Anreicherung. Allerdings konnte die elektrophoretische Homogenität erst nach der Gelfiltration erreicht werden (Abb. 34), bei der die spezifische Aktivität der MDH jedoch wieder sank. Gereinigte MDH verliert innerhalb von 24 h bei 4°C etwa 30 %, bei -18°C etwa 5 % ihrer Aktivität.

Tab. 34: Reinigung der Methanoldehydrogenase aus *Methylosinus* sp. WI 14.

Reinigungsschritt	Gesamtprotein (mg)	Gesamtaktivität (U)	Spez. Aktivität (U/mg)	Ausbeute (%)	Anreicherung (-fach)
Rohextrakt (ultrazenrifugiert)	46,3	32,9	0,71	100	1
DEAE-Sepharose	18,2	29,1	1,60	88	2,3
Ammoniumsulfat-fällung (60-90 %)	4,7	23,0	4,9	70	6,9
TSK-Butyl	1,4	10,2	7,3	31	10,3
Gelfiltration	0,9	5,5	6,1	17	8,6

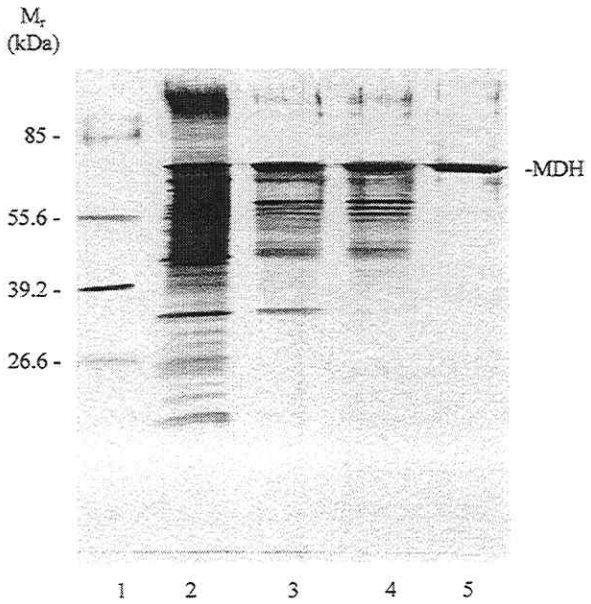

Abb. 34: SDS-Gelelektrophorese der Methanoldehydrogenase aus *Methylosinus* sp. WI 14.
Slot 1: Proteinstandard wie ausgewiesen; Slot 2: Rohextrakt nach Ultrazentrifugation;
Slot 3: MDH nach DEAE-Sepharose; Slot 4: MDH nach TSK-Butyl; Slot 5: MDH nach Gelfiltration

3.5.2.3. Molare Masse und isoelektrischer Punkt

Die relative Molmasse der nativen MDH wurde mit 140 kDa durch Gelfiltration bestimmt (Abb. 35). Bei Denaturierung und Reduktion konnte nach der elektrophoretischen Auftrennung nur eine Bande nachgewiesen werden. Durch Vergleich des R_f-Wertes mit dem von Standardproteinen wurde eine relative Molmasse von 70 kDa ermittelt. Unter Berücksichtigung der ermittelten Masse des nativen Enzyms ist eine α_2-Enzymstruktur wahrscheinlich.

Der isoelektrische Punkt des Enzyms konnte aufgrund der zu geringen aufgetragenen Proteinmenge nicht eindeutig bestimmt werden, liegt jedoch im basischen Bereich, da das Enzym unter den gewählten Bedingungen nicht an DEAE-Sepharose bindet.

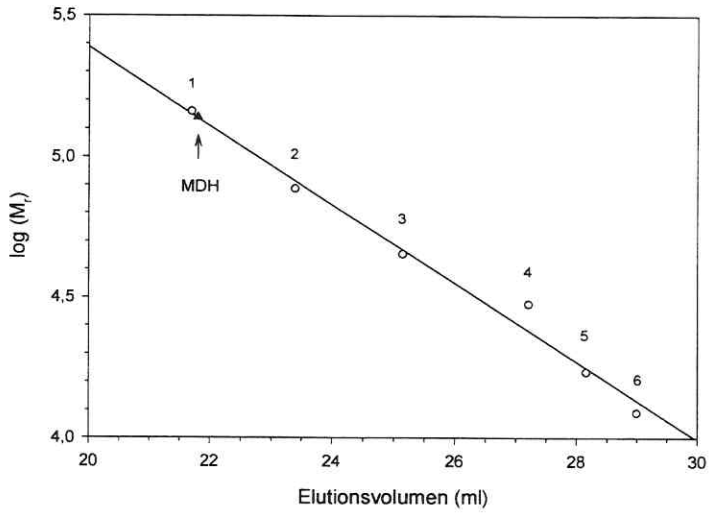

Abb. 35: Bestimmung der relativen Molmasse (M_r) der nativen Methanoldehydrogenase aus *Methylosinus* sp. WI 14.

3.5.2.4. N-terminale Aminosäuresequenz

Die N-terminale Aminosäuresequenz der MDH aus *Methylosinus* sp. WI 14 ist in Tab. 35 dargestellt. Ebenso wie bei der MDH aus *Methylocystis* sp. GB 25 fällt der große Anteil der sauren Aminosäuren sowie ihrer Amide (40 %) in der N-terminalen Region des Proteins auf.

Tab. 35: N-terminale Aminosäuresequenz der Methanoldehydrogenase der sMMO aus *Methylosinus* sp. WI 14.

Position	1				5					10
Aminosäure	Glu	Asp	Arg	Leu	Glu	Ala	Leu	Ala	Lys	Ser
Position	11				15					20
Aminosäure	Glu	Asp	Asn	Trp	Ala	Met	Gln	Gly	Lys	Asn

3.5.2.5. Prosthetische Gruppe

Mit Hilfe des Apoenzyms der Glucosedehydrogenase aus *Pseudomonas aeruginosa* SG 26 konnte PQQ als prosthetische Gruppe der MDH nachgewiesen werden. Über eine Eichkurve wurde der PQQ-Gehalt des gereinigten Enzyms mit 1,6 mol pro mol MDH bestimmt. Das entspricht einem rechnerischen Anteil von 0,8 mol PQQ pro Untereinheit (Abb. 36).

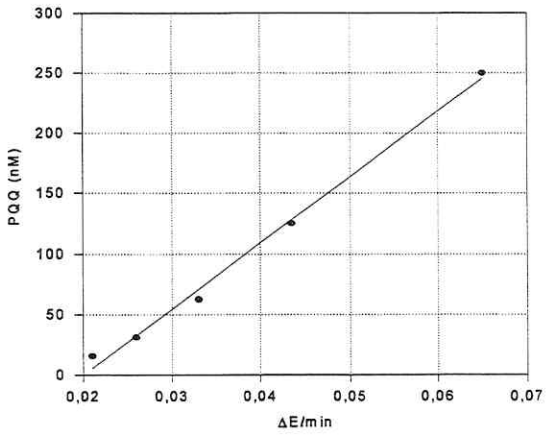

Abb. 36: Eichkurve für die PQQ-Bestimmung (Abhängigkeit der Aktivität des Apoenzyms der Glucosedehydrogenase von der PQQ-Konzentration).

3.5.2.6. pH- und Temperaturoptimum

Eine optimale MDH-Aktivität konnte im Test mit Sorbinalkohol (PMS-vermittelt) bei pH 9,0 (Natriumboratpuffer, 0,05 M) und bei 57°C gemessen werden. Die Aktivität des Enzyms ist dabei etwa 5fach höher als bei Raumtemperatur.

3.5.2.7. Substratspezifität

Die MDH verfügt über ein sehr breites Substratverwertungsspektrum. In Tab. 36 sind die spezifischen Aktivitäten und K_m-Werte für eine Reihe von Verbindungen dargestellt. Auch hier erfolgte die Ermittlung der Substratspezifität mit Enzymfraktionen vor der Gelfiltration (aufgrund der unspezifischen Aktivität der MDH nach Gelfiltration) im PMS/DCPIP-Test.

Tab. 36: Spezifische Aktivität und K_m-Werte der Methanoldehydrogenase aus *Methylosinus* sp. WI 14.

Substrat	Aktivität der MDH (%)[2]	K_m-Wert (mM)
Methanol	100	0,45
Ethanol	114	3,58
n-Propanol	91	3,69
2-Propanol	0	n.b.[3]
n-Butanol	172	6,38
n-Pentanol	115	1,34
n-Hexanol[1]	106	0,79
n-Heptanol[1]	98	0,58
n-Oktanol[1]	98	0,65
n-Nonanol[1]	5	n.b.
Sorbinalkohol	51	0,18
Formaldehyd	146	n.b.
Acetaldehyd	161	n.b.
Propionaldehyd	198	n.b.

[1]) gelöst in 1-4 Dioxan; [2]) 100% entsprechen einer Aktivität von 3,4 U/mg; [3]) nicht bestimmt

Das Enzym verwertet primäre Alkohole bis zum Oktanol sowie Aldehyde bis zum Propionaldehyd. Der sekundäre Alkohol i-Propanol wird dagegen nicht umgesetzt. Die höchste Affinität besitzt die MDH für den Sorbinalkohol, die niedrigste für Butanol. Die höchste spezifische Aktivität konnte unter Verwendung von Butanol gemessen werden. Die ermittelten K_m-Werte zeigen eine Abhängigkeit von der Kettenlänge des eingesetzten Substrates. Sie steigen bis zum C_4 an und fallen danach wieder ab.

3.5.2.8. Hemmung der MDH

Besonders stark wird die MDH im Test mit Sorbinalkohol (PMS-vermittelt) durch Fe^{2+}- und Cu^{2+}-Ionen gehemmt. Metallchelatoren, wie EDTA, haben dagegen kaum Einfluß auf die Enzymaktivität (Tab. 37). Die katalytische Aktivität des Enzyms wird durch Reduktion eventuell vorhandener Disulfidbrücken (DTE) nicht beeinflußt. Der eingesetzte Elektronenakzeptor PMS hemmt erst in höheren Konzentrationen (über 3 mM) die MDH.

Tab. 37: Einfluß verschiedener Verbindungen auf die Aktivität der Methanoldehydrogenase aus *Methylosinus* sp. WI 14

Substanz	Konzentration (mM)	Aktivität der MDH (%)[1]
Na^-	1	89
Cu^{2+}	0,1	62
Fe^{2+}	0,1	90
Ca^{2+}	1	92
Li^+	1	96
Zn^{2-}	1	89
Co^{2+}	1	91
Mg^{2+}	0,1	95
Mn^{2+}	1	100
EDTA	1	95
KCN	1	96
DTE	0,1	100
PMS	3	61

[1]) 100 % entsprechen 6,5 U/mg

3.6. Formaldehyddehydrogenasen

Eine NAD^+- bzw. $NADP^+$- abhängige Formaldehyddehydrogenase (FaDH) konnte weder in *Methylocystis* sp. GB 25 noch in *Methylosinus* sp. WI 14 nachgewiesen werden.

Eine Oxidation von Formaldehyd im ultrazentrifugierten Rohextrakt (sowohl bei *Methylocystis* sp. GB 25 als auch bei *Methylosinus* sp. WI 14) ließ sich ausschließlich unter Verwendung von PMS als Elektronenakzeptor nachweisen. Bei elektrophoretischer Auftrennung und nachfolgender Aktivfärbung wurde jeweils nur eine aktiv gefärbte Bande sichtbar. Diese ent-

sprach in ihrem R_f-Wert dem der entsprechenden MDH. Weiterhin konnte FaDH-Aktivität nur im für die MDH ermittelten optimalen pH- und Temperaturbereich gemessen werden.

3.7. Formiatdehydrogenasen

In beiden untersuchten Stämmen wurde eine im Cytosol lokalisierte NAD^+- abhängige Formiatdehydrogenase (FDH) nachgewiesen. Durch Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sepharose konnte die FDH 7- bzw. 15fach angereichert werden. Die Enzyme beider Stämme verfügen über eine extrem hohe Substratspezifität (Formiat ist das einzige umgesetzte Substrat) und können $NADP^+$ (auch in höherer Konzentrationen) nicht als Elektronenakzeptor nutzen. Die relative Molmasse der nativen FDH konnte nur bei *Methylosinus sp.* WI 14 mit etwa 385 kDa ermittelt werden.
Einige kinetische und molekulare Parameter der Formiatdehydrogenasen aus *Methylocystis* sp. GB 25 und *Methylosinus* sp. WI 14 sind in Tab. 38 zusammengefaßt.

Tab. 38: Kinetische und molekulare Eigenschaften der Formiatdehydrogenasen aus *Methylocystis* sp. GB 25 und *Methylosinus* sp. WI 14.

	Formiatdehydrogenase aus:	
	Methylocystis sp. GB 25	*Methylosinus* sp. WI 14
Lokalisation	Cytosol	Cytosol
Elektronenakzeptor	NAD^+	NAD^+
Aktivität im Rohextrakt (U/mg)	0,17	0,55
Aktivität nach DEAE (U/mg)	1,12	8,01
pH-Optimum	6,5	6,5
Relative Molmasse (kDa)	n.b.[1]	385[2]
Substratspezifität	nur Formiat	nur Formiat
K_m-Wert für:		
NAD^+	0,133	0,699
Natriumformiat	0,361	0,111

[1]) nicht bestimmt; [2]) bestimmt durch Gelfiltration

4. Diskussion

4.1. Typisierung von *Methylocystis* sp. GB 25 und *Methylosinus* sp. WI 14

Sowohl *Methylocystis* sp. GB 25 als auch *Methylosinus* sp. WI 14 lassen sich aufgrund ihrer intracytoplasmatischen Membranstruktur eindeutig den Typ II-Methanotrophen zuordnen. Die im Elektronenmikroskop sichtbaren Membranen verlaufen in beiden Organismen stets peripher und parallel zur Cytoplasmamembran. Die Ausbildung derartiger Strukturen ist für Prokaryoten relativ untypisch. Mit Ausnahme der phototrophen sowie der nitrifizierenden und einigen n-Alkan-verwertenden Bakterien kommen intracytoplasmatische Membranen nicht vor (WHITTENBURY et al. 1970b). Es wurde postuliert, daß die Vergrößerung der Oberfläche durch diese extensiven Lipidstrukturen ursächlich eine Anpassung an die Verwertung eines gasförmigen Substrates darstellt (Erhöhung der Aufnahme). Tatsächlich konnte ANTHONY (1982) nachweisen, daß methylotrophe Bakterien bei Wachstum auf Methanol keine Membranen ausbildeten. SCOTT et al. (1981) konnten bei Methanlimitation in einer methanotrophen Kultur einen raschen Abbau der Membranen zu Vesikeln nachweisen. Offensichtlich ist also die initiale Methanoxidation zum Methanol unmittelbar mit der Ausprägung der intracytoplasmatischen Membranstrukturen verknüpft. Es scheint sich dabei aber weniger um ein Stoffaufnahmephänomen (gasförmiges Substrat) als vielmehr um eine Assoziation der initialen Enzyme des Substratabbaus mit den intracytoplasmatischen Membranen zu handeln. PHELPS et al. (1992) registrierten bei Mutanten von *Methylosinus trichosporium* OB3b, die keine pMMO mehr ausbilden konnten, ein völliges Fehlen von intracytoplasmatischen Membranstrukturen. Das wird auch durch die vorstehend beschriebenen Ergebnisse bestätigt. Während *Methylocystis* sp. GB 25 nur eine membrangebundene MMO und demzufolge auch die intracytoplasmatischen Membranen ausbildet, konnte bei *Methylosinus* sp. WI 14 ein Abbau dieser Membranen bei Wachstum auf einem kupferarmen Medium beobachtet werden, obwohl nach wie vor Methan als gasförmiges Substrat verwertet wurde. Auch bei Typ I-Methanotrophen scheint Kupfer der maßgebliche Effektor bei der Ausbildung der Lipidstrukturen innerhalb der Zelle zu sein. KOH et al. (1993) zeigten, daß in *Methylomonas methanica* 68-1 bei Wachstum auf kupferfreiem Medium eine Abnahme der intracytoplasmatischen Membranen erfolgte. In *Methylomonas alba* registrierten COLLINS et al. (1991) sogar einen vollständigen Verlust dieser Strukturen. NGUYEN et al. (1994) zeigten, daß bei Kupferkonzentrationen von unter 20 µM im Medium der größte Anteil des Kupfers in der Zelle mit den Membranen assoziiert ist.

In beiden in dieser Hinsicht untersuchten Stämmen konnte das Schlüsselenzym des Serinweges, die Hydroxypyruvatreduktase, sowie weitere typische Enzyme dieser assimilatorischen Sequenz, wie die Malatdehydrogenase und eine $NADP^+$- abhängige Isocitratdehydrogenase, nachgewiesen werden. Durch diese biochemischen Ergebnisse wird die Zuordnung zu den Typ II-Methanotrophen bestätigt, die meist durch eine Hydroxypyruvatreduktase mit hoher spezifischer Aktivität von 100-200 mU/mg gekennzeichnet sind (YAMANAKA und MATSUMOTO, 1979). Beide Stämme verfügen auch über eine Isocitratlyase, durch die die Rückgewinnung des primären Akzeptors des Serinweges über den Glyoxylatcyclus erfolgt.

In der elektronenmikroskopischen Abbildungen der Zellen waren große Einschlüsse sichtbar, deren Inhalt als Poly-β-hydroxybuttersäure (PHB) identifiziert werden konnte. PHB dient den Bakterien als osmotisch inerter Reservestoff, vergleichbar dem Glykogen oder der Stärke in höheren Organismen (STEINBÜCHEL 1991). Die Synthese wird dabei maßgeblich durch das Verhältnis zwischen Coenzym A (CoA-SH) und Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) reguliert. Durch Kondensation zweier Acetyl-CoA-Moleküle zum Acetoacetyl-CoA wird ein CoA-SH (als wichtiges Coenzym im C_2-Transfer) wieder zurückgewonnen. Bei den Methanotrophen konnte die Vesikelbildung und PHB-Formierung insbesondere bei Methanüberschuß und Stickstofflimitation nachgewiesen werden (JENSEN und CORPE 1991). In dem methylotrophen Bakterium *Methylobacterium extorquens* ATCC 55366 konnten BOURQUE et al. (1995) unter ähnlichen Wachstumsbedingungen einen PHB-Gehalt von bis zu 46 % -auf die Trockenmasse bezogen- nachweisen. Dabei scheint auch der Kupfergehalt des Mediums die PHB-Bildung zu beeinflussen. Zellen von *Methylosinus* sp. WI 14 -auf kupferarmen Medium gewachsen- wiesen häufig wesentlich größere PHB-Einschlüsse als vergleichbare auf kupferhaltigem Medium gewachsenen Zellen auf. Ähnliche Befunde wurden auch bei *Methylococcus capsulatus* (Bath) (PRIOR und DALTON 1985) sowie bei *Methylomonas methanica* 68-1 (KOH et al. 1993) erhalten. Der Mechanismus der erhöhten PHB-Bildung in Abwesenheit von Kupfer ist dabei im wesentlichen noch ungeklärt.

4.2. Kinetische und molekulare Eigenschaften von Methanmonooxygenasen

Der Nachweis von MMO-Aktivität nach Zellaufschluß gelang nur für die sMMO, nicht hingegen für die pMMO. Die Ursache dafür dürfte in der sehr geringen Stabilität der pMMO liegen (SMITH und DALTON 1989). Offensichtlich wird in den untersuchten Stämmen die pMMO unter den gewählten Bedingungen noch während des Zellaufschlusses irreversibel inaktiviert. SEMRAU et al. (1995) konnten durch Zugabe von Kupfer zum Testansatz eine Aktivitätsstei-

gerung um 100 % erreichen. Eine Zugabe von Kupfer (0,1-10 mM) hatte aber bei *Methylocystis* sp. GB 25 und *Methylosinus* sp. WI 14 keinen Effekt.

Bisher gelang es noch nicht, die pMMO -vergleichbar der sMMO- zur Homogenität zu reinigen bzw. zu charakterisieren (HANSON und HANSON 1996). Bis vor kurzem wurden nur zwei sMMO-Systeme aus den Typ II-Methanotrophen *Methylosinus trichosporium* OB3b (FOX et al. 1989) sowie *Methylococcus capsulatus* (GREEN und DALTON 1985) umfassend charakterisiert. In den letzten Jahren konnte auch in den Typ I-Methanotrophen *Methylomonas methanica* 68-1 (KOH et al. 1993) sowie *Methylomonas* sp. GYJ3 (SHEN et al. 1997) sMMO-Aktivität nachgewiesen und die Komponenten zumindest teilweise isoliert werden.

4.2.1. Regulation der Expression

Die Oxidation von Methan durch die aeroben methanotrophen Bakterien wird stets durch eine Methanmonooxygenase, die zwei Reduktionsäquivalente benötigt, um die O-O Bindung zu spalten, katalysiert (LIPSCOMB 1994). Wie schon erwähnt, sind nur bestimmte Bakterien in der Lage, zwei Methanmonooxygenasesysteme (sMMO und pMMO) auszubilden. Alle bisher bekannten Stämme exprimieren aber eine pMMO (MURRELL 1992, BOWMAN et al. 1993). In den in der Arbeit untersuchten Stämmen konnte nur bei *Methylosinus* sp. WI 14 eine sMMO-Bildung nachgewiesen werden. Die Umschaltung von pMMO auf sMMO erfolgt dabei in Abhängigkeit vom Kupfergehalt des Mediums sowie der Stickstoffquelle. Schon bei Kupferkonzentrationen über 0,1 µM im Nährmedium wird die Ausbildung der sMMO in diesem Stamm reprimiert. Interessant ist der Einfluß der N-Quelle auf die sMMO-Expression. Obwohl *Methylosinus* sp. WI 14 die Aminosäuren Serin und Cystein als N-Quelle nutzen kann, erfolgt eine sMMO-Bildung nur bei Wachstum auf Nitrat bzw. Ammonium. Das ist ungewöhnlich, da bei diesen Versuchen stets auf kupferarmen Medium kultiviert und demzufolge eine sMMO-Expression bzw. eine pMMO-Repression (und damit ein vermindertes bzw. kein Wachstum) zu erwarten war. In der Literatur wurden bisher keine ähnlichen Versuche beschrieben. Hingegen konnte bei *Methylocystis* sp. GB 25 unter Kupferlimitation kein Wachstum registriert werden. Offensichtlich ist der Mikroorganismus nicht in der Lage, eine sMMO zu exprimieren.

Eine Abhängigkeit der sMMO-Expression von der Kupferkonzentration des Mediums konnte bei allen bisher isolierten Stämmen, die potentiell beide MMO-Systeme ausbilden können, beobachtet werden (PILKINGTON und DALTON 1991, NAKAJIMA et al. 1992). NIELSEN et al. (1996) demonstrierten, daß die sMMO-codierenden Gene in einem Operon organisiert sind und durch ein Regulatorprotein kontrolliert werden. Kupfer erhöht nach Bin-

dung an dieses regulatorische Protein dessen Affinität zur DNA im Bereich der Promotorregion des sMMO-Operons und verhindert somit die Transkription. Bei *Methylosinus trichosporium* OB3b konnte eine komplette Reprimierung der sMMO-Expression ab einem Kupfergehalt von 0,4 µM nachgewiesen werden (JAHNG und WOOD 1996). Auch eine Erhöhung der Eisenkonzentration (Eisen als Kupferantagonist) führte im Hinblick auf die sMMO-Expression nicht zu einer erhöhten Kupfertoleranz. ZAHN und DISPIRITO (1996) konnten im Gegenteil erst bei hohen Eisenkonzentrationen (bis zu 60 µM) optimale Aktivität der pMMO messen.

4.2.2. Substratspezifität der Methanmonooxygenasen

Die bisher meist in intakten Zellen untersuchten p- und sMMO´s weisen große Unterschiede in ihrem Substratverwertungsspektrum auf (BURROWS et al. 1984). Das gilt auch für *Methylocystis* sp. GB 25 und *Methylosinus* sp. WI 14. *Methylocystis* sp. GB 25 -exprimiert ausschließlich pMMO- verfügt über eine hohe Substratspezifität und oxidiert nur Alkane bis zum Propan sowie Alkene bis zum Butylen. Bei *Methylosinus* sp. WI 14 differiert die Substratspezifität in Abhängigkeit von der Kupferkonzentration des Mediums und somit von der Expression einer p- bzw. sMMO. Während bei Wachstum auf kupferhaltigem Medium eine ähnliche Substratverwertung wie bei *Methylocystis* sp. GB 25 nachgewiesen werden konnte, zeigt der Stamm bei Kultivierung auf kupferarmen Medium eine recht breite Substratspezifität. Neben n-Alkanen bis zum Heptan und Alkenen (wurden nur bis zum Butylen untersucht) werden auch cyclische Kohlenwasserstoffe, Aromaten und halogenierte Aromaten oxidiert. Die dabei entstehenden Hydroxylierungsprodukte können durch den methanotrophen Mikroorganismus meist nicht weiter verwertet und somit auch keine Reduktionsäquivalente regeneriert werden. Außerdem wirken die durch den Cometabolismus entstehenden Produkte oft toxisch auf den Mikroorganismus bzw. auf die sMMO selbst (CHANG und ALVAREZ-COHEN 1995).

Die erhaltenen Ergebnisse zur Substratspezifität der untersuchten Stämme belegen, daß nur bei *Methylosinus* sp. WI 14 die Ausbildung einer sMMO erfolgt. Die pMMO der meisten bisher untersuchten Stämme kann dagegen nur wenige Substrate oxidieren (DALTON et al. 1984). Somit ist die Substratspezifität ein hervorragendes Unterscheidungsmerkmal der p- bzw. sMMO. Die Oxidation von Naphthalen erfolgt z.B. ausschließlich durch die sMMO (HANSON und HANSON 1996), der Abbau von TCE (FITCH et al. 1996) -wenngleich mit geringerer Effizienz- auch durch die pMMO (ANDERSON und McCARTY 1997).

Interessant ist die Oxidation der Alkane durch *Methylosinus* sp. WI 14. In keinem Fall konnten durch Gaschromatographie die korrespondierenden n-Alkohole, sondern immer nur die Isomere nachgewiesen werden. Dagegen zeigten GREEN und DALTON (1989) bei Untersuchungen zur Substratspezifität von *Methylococcus capsulatus* (Bath), daß zumindest beim Umsatz von Pentan und Hexan stets auch 1-Pentanol bzw. 1-Hexanol entsteht. Die eingesetzten halogenierten Verbindungen werden durch *Methylosinus* sp. WI 14 stets zum entsprechenden Alkohol oxidiert. Eine Dehalogenierung erfolgt dabei nicht. Ähnliche Ergebnisse erhielten auch SULLIVAN und CHASE (1996) für die Oxidation von 1,2,3-Trichlorbenzol durch die sMMO aus *Methylosinus trichosporium* OB3b. Die Hydroxylierung des Aromaten erfolgte stets unter Beibehaltung der Chlorierung und führte zum 2,3,4- bzw. 3,4,5-Trichlorphenol.

4.2.3. Lösliche Methanmonooxygenase aus *Methylosinus* sp. WI 14

4.2.3.1. Molekulare Eigenschaften der Komponenten der löslichen Methanmonooxygenase sowie deren Untereinheiten

Wie unter 3.4.3. beschrieben ist nur *Methylosinus* sp. WI 14 in der Lage, eine sMMO auszubilden. Das Enzym besteht aus drei Komponenten : einer Hydroxylase (Komponente A), einer Reduktase (Komponente C) und einem Elektronentransferprotein (Komponente B). Fast alle bis jetzt gereinigten Methanmonooxygenasen sind nach diesem Prinzip aufgebaut (LIPSCOMB 1994), wobei Komponente B nicht essentiell für die katalytische Aktivität des Gesamtenzyms ist, diese aber verstärkt. Die einzige Ausnahme ist die sMMO von *Methylobacterium* sp. CRL-26, bei der bisher noch kein Elektronentransferprotein nachgewiesen werden konnte (PATEL und SAVAS 1987).

Ebenso wie in allen bisher beschriebenen sMMO's ist die Hydroxylase der sMMO aus *Methylosinus* sp. WI 14 aus drei Untereinheiten aufgebaut, die jeweils als Dimere im nativen Protein vorkommen. Die ermittelte Struktur sowie die relativen Molmassen weichen nur geringfügig von anderen gereinigten sMMO-Systemen ab (Tab. 39). Neben den angegebenen Stämmen konnte bisher eine sMMO nur noch in *Methylocystis* sp. M (NAKAJIMA et. al. 1992) sowie in *Methylomonas* sp. GYJ3 (SHEN et al. 1997), einem Typ I-Methanotrophen, gereinigt werden. Alle Methanmonooxygenasen sind von der Struktur her hochkonserviert und weisen ähnliche Eigenschaften auf.

Tab. 39: Molekulare Eigenschaften löslicher Methanmonooxygenasen

	Methylosinus sp. WI 14[1]	*Methylosinus trichosporium* OB3b[2]	*Methylosinus sporium* 5[3]	*Methylococcus capsulatus*[4]
Einordnung	Typ II	Typ II	Typ II	Typ X
Anzahl der Komponenten	Drei (A, B, C)	Drei (A, B, C)	Drei (A, B, C)	Drei (A, B, C)
Komponente A				
Molare Masse (nativ)	229.000	245.000	220.000	210.000
Anzahl der Untereinheiten	Drei	Drei	Drei	Drei
Molare Masse (denaturiert)	57.000, 43.000, 23.000	54.400, 43.000, 22.700	56.000, 40.000, 20.000	54.000, 42.000, 17.000
Struktur	$\alpha_2\beta_2\gamma_2$	$\alpha_2\beta_2\gamma_2$	$\alpha_2\beta_2\gamma_2$	$\alpha_2\beta_2\gamma_2$
Metallgehalt (mol/mol Prot.)	Fe 3,6	Fe 4,3	Fe 2,1	Fe 2,3
Isoelektrischer Punkt	4,3	-[5]	-	-
Komponente B				
Molare Masse (nativ)	18.000	15.000-31.000	-	17.000
Molare Masse (denaturiert)	15.000	15.000	-	15.700
Metallgehalt	kein	kein	-	kein
Isoelektrischer Punkt	4,6	4,3		4,0
Komponente C				
Molare Masse (nativ)	-	38.300	40.000	44.600
Molare Masse (denaturiert)	41.000	39.700	-	39.000
Spez. Akt. (U/mg)	30,6	26,1	-	6,0

[1]) eigene Ergebnisse; [2]) nach FOX et al. (1989); [3]) nach PILKINGTON und DALTON (1991); [4]) nach GREEN und DALTON (1985); [5]) keine Angaben

Die Hydroxylase der sMMO aus *Methylosinus* sp. WI 14 enthält 3,6 mol Eisen pro mol Protein als metallischen Cofaktor. Mit Ausnahme der MMOH der sMMO aus *Methylosinus trichosporium* OB3b (4,3 mol/mol Protein) konnte in allen anderen bisher untersuchten Hydroxylasen ein Eisengehalt von etwa 2-3 mol pro mol Protein bestimmt werden.

Komponente B scheint dagegen keine prosthetischen Gruppen bzw. metallischen Cofaktoren zu enthalten. Wie auch in anderen sMMO-Systemen ist Komponente B ein Monomer mit einer relativen Molmasse von etwa 15 kDa.

Die native Molmasse der Komponente C der sMMO aus *Methylosinus* sp. WI 14 konnte nicht bestimmt werden, da die Aktivität nach Gelfiltration vollständig verloren ging. FOX et al. (1989) wiesen in der Reduktase der sMMO aus *Methylosinus trichosporium* OB3b 1 mol FAD/mol Protein nach. Es wäre möglich, daß im untersuchten Stamm die prosthetische Gruppe des Enzyms durch die Gelfiltration abgetrennt wurde. Allerdings konnte auch durch Zugabe von FAD bzw. FMN zu gereinigten Reduktase-Fraktionen nach der Gelfiltration keine Aktivität wiederhergestellt werden. Es gelang auch nicht, im Spektrum der gereinigten aktiven Reduktase FAD nachzuweisen.

Beim Vergleich der N-terminalen Aminosäuresequenzen der Komponenten der sMMO wird die hochkonservierte Struktur deutlich (Tab. 40). In der Datenbank (Swiss Protein) konnten nur die N-terminalen Aminosäuresequenzen der sMMO von *Methylosinus trichosporium* OB3b (CARDY et al. 1991) bzw. *Methylococcus capsulatus* (Bath) gefunden werden. Alle anderen untersuchten löslichen Methanmonooxygenasen wurden bisher noch nicht sequenziert bzw. es liegen keine Veröffentlichungen dazu vor. Die Untereinheiten der Hydroxylase aus *Methylosinus* sp. WI 14 weisen eine besonders hohe Homologie zu *Methylosinus trichosporium* OB3b auf. So sind die α- und β- Untereinheiten identisch im Bezug auf die ersten 19 bzw. 20 aminoterminalen Aminosäuren. Die γ- Untereinheit weist nur eine 70 % ige Übereinstimmung auf. Die Homologie zu *Methylococcus capsulatus* (Bath) ist dagegen etwas geringer. So sind 80 % der N-terminalen Aminosäurereste der α- sowie 40 % der β- Untereinheit identisch. Für die γ- Untereinheit konnten keine Angaben gefunden werden. Interessant ist, daß die Positionen der Aminosäuren innerhalb der entsprechenden Untereinheiten zwischen *Methylosinus* sp. WI 14 *und Methylosinus trichosporium* OB3b sowie der α- Untereinheit von *Methylococcus capsulatus* (Bath) identisch sind, während bei der β- Untereinheit des letzteren Stammes eine Verschiebung um 3 Aminosäuren erfolgt ist. Die Aminosäureanordnung in den Untereinheiten der sMMO von *Methylosinus* sp. WI 14 scheint relativ weit verbreitet zu sein.

Tab. 40: Vergleich der N-terminalen Aminosäuren der Komponenten der sMMO verschiedener Methanotropher.

Position	*Methylosinus* sp. WI 14					*Methylosinus trichosporium* OB3b					*Methylococcus capsulatus*		
	Komp. A			Komp. B	Komp. C	Komp. A			Komp. B	Komp. C	Komp. A		
	α	β	γ			α	β	γ			α	(Pos.)	β
1	Ala	Ser	Gly	Thr	Met	Ala	Ser	Ala	Ser	Met	Ala		-
2	Ile	Gln	Lys	Ser	Tyr	Ile	Gln	Lys	Ser	Tyr	Leu		-
3	Ser	Pro	Arg	Ala	Gln	Ser	Pro	Arg	Ala	Gln	Ser		-
4	Leu	Gln	Glu	His	Ile	Leu	Gln	Glu	His	Ile	Thr	(1)	Ser
5	Ala	Ser	Pro	Asn	Val	Ala	Ser	Pro	Asn	Val	Ala	(2)	Met
6	Thr	Ser	Ile	Ala	Ile	Thr	Ser	Ile	Ala	Ile	Thr	(3)	Leu
7	Lys	Gln	His	Tyr	Glu	Lys	Gln	His	Tyr	Glu	Lys	(4)	Gly
8	Ala	Val	Asp	Asn	Thr	Ala	Val	Asp	Asn	Thr	Ala	(5)	Glu
9	Ala	Thr	Asp	Ala	Glu	Ala	Thr	Asn	Ala	Glu	Ala	(6)	Arg
10	Thr	Lys	Ser	Gly	Asp	Thr	Lys	Ser	Gly	Asp	Thr	(7)	Arg
11	Asp	Arg	Thr	Ile	Gly	Asp	Arg	Ile	Ile	Gly	Asp	(8)	Arg
12	Ala	Gly	Thr	Met	Gly	Ala	Gly	Arg	Met	Glu	Ala	(9)	Gly
13	Leu	Leu	Ala	Ile	Asp	Leu	Leu	Thr	-	Thr	Leu	(10)	Leu
14	Lys	Thr	Glu	Gln	Trp	Lys	Thr	Glu	Gln	Cys	Ala	(11)	Thr
15	Val	Asp	Glu	Thr	Val	Val	Asp	Trp	Lys	Arg	Ala	(12)	Asp
16	Asn	Pro	Glu	-	Trp	Asn	Pro	Glu	Thr	Arg	Asn	(13)	Pro
17	Arg	Glu	Ala	Gly	Phe	Arg	Glu	Ala	Gly	Met	Arg	(14)	Glu
18	Ala	Arg	Lys	Asp	-	Ala	Arg	Lys	Lys	Arg	Ala	(15)	Met
19	Pro	Ala	Lys	Glu	Asp	Pro	Ala	Ile	Ala	Pro	Pro	(16)	Ala
20	Val	-	-	Phe	-	Val	Ala	Ala	Phe	Ser	Thr	(17)	Ala

Ähnliche Motive konnten in einer mikrosomalen Dipeptidase (53 % Identität über 19 Aminosäuren zur α- Untereinheit), einer extrazellulären elastinolytischen Metalloprotease (47 % Identität über 17 Aminosäuren zur β- Untereinheit) sowie in einer Acetyl-Hydrolase (42 % Identität über 19 Aminosäuren zur γ- Untereinheit) gefunden werden. Inwieweit diese Übereinstimmungen katalytische oder nur strukturelle Funktionen beinhalten, ist dabei unklar.

In den Untersuchungen zur Hydroxylase konnte der Zerfall des gereinigten homogenen Enzyms beim Einfrieren und Auftauen demonstriert werden. Es wäre möglich, daß die Untereinheiten -aufgrund ihrer strukturellen Verwandtschaft zu proteolytisch wirksamen Enzymen- in einer Art Autokatalyse zu ihrem eigenen Abbau beitragen.

Auch die Komponenten B und C weisen eine hohe Homologie zu den entsprechenden Komponenten von *Methylosinus trichosporium* OB3b auf (70 % Identität innerhalb der ersten 20 Aminosäuren für B und 100 % innerhalb der ersten 11 Aminosäuren für C). Für *Methylococcus capsulatus* (Bath) konnten keine Angaben gefunden werden.

4.2.3.2. Kinetische Eigenschaften und Stabilität der löslichen Methanmonooxygenase

Für die sMMO aus *Methylosinus* sp. WI 14 konnte ein pH-Optimum von 7,2 sowie ein Temperaturoptimum von 30°C ermittelt werden. Unter diesen Bedingungen erfolgt ein optimales Zusammenwirken der Komponenten der sMMO, da sich diese ermittelten Werte auf das Gesamtsystem beziehen. Bei Untersuchungen mit der gereinigten Komponente C (im Test mit Cytochrom c als Elektronenakzeptor) konnten ähnliche optimale Parameter bestimmt werden. Für die sMMO aus *Methylosinus trichosporium* OB3b wurde ein Temperaturoptimum von 30°C (PILKINGTON und DALTON 1990) für *Methylococcus capsulatus* ein Optimum von 45°C (FOX et al. 1990) ermittelt.

Offensichtlich ist die Bereitstellung von Elektronen und damit die Reduktion der in der Komponente A vorhandenen Fe(III)•Fe(III)-Zentren von großer Bedeutung für die gesamte Hydroxylierungsreaktion. Das verdeutlichen auch die Versuche zur Rekombination (vgl. Tab. 27). Mit Erhöhung der Komponente C steigt die Aktivität des Gesamtenzyms an. Dagegen scheint Komponente B als Effektor bzw. Verstärker (etwa 10fach) zu wirken. Über das Zusammenwirken, insbesondere der Komponenten A und B, gibt es noch relativ wenig gesicherte Erkenntnisse.

Es konnte aber gezeigt werden, daß MMOB eine hohe Affinität zur oxidierten (inaktiven) MMOH hat und damit einen Komplex bildet. Dadurch wird verhindert, daß in der Zelle in Abwesenheit eines oxidierbaren Substrates ständig NADH oxidiert wird, da Komponente B den Elektronenfluß von der Reduktase zur Hydroxylase unter diesen Bedingungen verhindert (LIU und LIPPARD 1995). Die hohe Affinität der MMOB zur MMOH konnte auch bei der Reinigung der sMMO von *Methylosinus* sp. WI 14 beobachtet werden. Bei elektrophoretischer Auftrennung partiell gereinigter MMOH wurde stets auch eine Bande mit ca. 15 kDa nach Silberfärbung sichtbar. Diese konnte erst durch Gelfiltration abgetrennt werden.

Neben der Bereitstellung von Elektronen für die Hydroxylase hat die Reduktase auch eine regulatorische Funktion, indem sie das Zusammenwirken der Intermediate des katalytischen Cyclus steuert und die Produktausbeute in Abhängigkeit von der vorhandenen Energie reguliert (LIU et al. 1997). Dabei scheint auch die Reduktase direkt an die Hydroxylase zu koppeln. ROSENZWEIG und LIPPARD (1994) postulierten, daß pro mol Hydroxylase je zwei mol der Komponenten B und C an die α- bzw. β- Untereinheiten binden und die katalytische Reaktion modulieren.

Interessant ist auch das Bindungsverhalten der Komponente C der sMMO des untersuchten Stammes an Blue-Sepharose und 5´AMP-Sepharose. Obwohl NADH-abhängig, bindet das Enzym an diese Säulen für die Affinitätschromatographie nicht. Dagegen bindet die Komponente C der sMMO aus *Methylococcus capsulatus* (Bath) so fest an diese Säulen, daß eine Elution nur unter Einsatz von 1 mM NADH gelang (COLBY und DALTON 1979).

In den Versuchen zur Hemmung der sMMO aus *Methylosinus* sp. WI 14 konnte gezeigt werden, daß die Enzymaktivität insbesondere durch Metallionen wie Cu^{2+}, Zn^{2+} und Ni^{2+} sowie durch EDTA vermindert wird (vgl. Tab. 28). Dabei beruht die Hemmung durch Zn^{2+} und Ni^{2+} offensichtlich auf dem Einfluß dieser Ionen auf die Reduktase-Aktivität (vgl. Tab. 26), während Kupfer und EDTA auch die anderen Komponenten beeinflussen. Da Komponente B keine metallischen Cofaktoren enthält, ist es wahrscheinlich, daß diese Inhibitoren direkt auf das Eisen-enthaltende katalytische Zentrum der Hydroxylase einwirken. Bei Untersuchungen mit gereinigter sMMO aus *Methylococcus capsulatus* (Bath) konnten GREEN et al. (1985) eine Hemmung durch Kupfer und Zink nachweisen. Diese Ionen inhibierten die Reduktase, hatten aber keinen Einfluß auf die Hydroxylase. Weiterhin konnte keine Hemmung durch Nickel nachgewiesen werden. Die Aktivität der sMMO aus *Methylosinus trichosporium* OB3b wird dagegen auch durch Nickel sowie stärker noch durch Zink und Kupfer gehemmt (JAHNG und WOOD 1996). Dabei wirkt Kupfer sowohl auf die Reduktase als auch auf die Hydroxylase,

während Zink nur die Aktivität der Hydroxylase beeinflußt. Die kinetischen Parameter der sMMO aus den verschiedenen Stämmen sind somit relativ verschieden, obwohl die molekularen Eigenschaften (Zusammensetzung, Molmassen, N-terminale Aminosäuren) eine hohe Homologie aufweisen.

Trotz Zugabe von Stabilisatoren, insbesondere Natriumthioglycolat, sind die gereinigten Komponenten der sMMO aus *Methylosinus* sp. WI 14 sehr instabil. Während bei der Reduktase der Aktivitätsverlust hauptsächlich auf die Dissoziation des Cofaktors zurückzuführen ist und die Aktivität durch Zugabe von $FeSO_4$ rekonstituiert werden kann, scheint der Aktivitätsverlust der Hydroxylase auf molekularen Veränderungen zu beruhen. Das wird insbesondere bei dem gereinigten Enzym deutlich. Offensichtlich spielt dabei auch die Proteinkonzentration eine entscheidende Rolle. So verliert die gereinigte Hydroxylase bei Verdünnungen auf etwa 0,1 mg/ml innerhalb kurzer Zeit vollständig ihre Aktivität. Gleiches kann auch beim einmaligen Einfrieren beobachtet werden. Es scheint, daß die Untereinheiten nicht sehr fest miteinander verbunden sind und unter diesen Umständen dissoziieren. Inwieweit die Assoziation mit den anderen Komponenten eine stabilisierende Wirkung auf die Hydroxylase hat, ist bisher noch ungeklärt. Ähnlich hohe Aktivitätsverluste beim Einfrieren der Komponenten der sMMO wurden auch für andere Stämme beobachtet (COLBY et al. 1977, PILKINGTON und DALTON 1990). Durch tropfenweises Einfrieren in flüssigen Stickstoff direkt nach der Reinigung konnten FOX et al. (1989) die Aktivität der Komponenten der sMMO aus *Methylosinus trichosporium* OB3b weitgehend erhalten. JIANG und DALTON (1994) gelang es, durch chemische Modifikation mit Polyethylenglykol (PEG) die Thermostabilität der Hydroxylase zu erhöhen.

4.2.3.3. Monoklonale Antikörper zum Nachweis der sMMO

Monoklonale Antikörper bieten eine Reihe von interessanten Anwendungsmöglichkeiten in der Biologie bzw. Medizin. Sie lassen sich als spezifische analytische und präparative Reagenzien nahezu universell einsetzen. So ist es möglich, monoklonale Antikörper an eine feste Matrix zu koppeln und zur Reinigung von seltenen Proteinen (Affinitätschromatographie) zu nutzen. In der Medizin werden die Immunglobuline insbesondere in der klinischen Diagnostik verwendet und auch der Einsatz als Therapeutika, etwa in der Krebsbehandlung, gewinnt immer mehr an Bedeutung. Der Vorteil der monoklonalen Antikörper ist ihre hohe Spezifität. Da sie alle von einer Plasmazelle abstammen, erkennen sie -im Gegensatz zu den früher gebräuchlichen polyklonalen Antikörpern- jeweils dieselbe Domäne des entsprechenden Antigens, wodurch unspe-

zifische Kreuzreaktionen (die zu falsch positiven Ergebnissen führen können) mit anderen Proteinen nahezu ausgeschlossen sind.

Es konnten insgesamt 20 Klone isoliert werden, die gegen die gereinigte Hydroxylase der sMMO aus *Methylosinus* sp. WI 14 Antikörper bildeten. Die im Western Blot an die γ- Untereinheit der Hydroxylase bindenden Antikörper reagieren dabei nicht mit biotinylierter MMOH. Es ist möglich, daß sich Biotin bevorzugt an die γ- Untereinheit anlagert und die Bindungsstelle(n) dadurch maskiert. Es gelang auch nicht, Antikörper zu erhalten, die spezifisch nur die α- oder β- Untereinheit der MMOH erkennen. Stets wurde auch eine (mehr oder weniger starke) Kreuzreaktivität zur jeweils anderen registriert. Das könnte auf den hohen Verwandtschaftsgrad der α- und β- Untereinheiten zurückzuführen sein. GREEN und DALTON (1988) postulierten, daß in der Evolution die β- aus der α- Untereinheit entstanden sein könnte. In den Versuchsansätzen mit biotinylierter bzw. unsubstituierter MMOH wurden die Unterschiede im Bindungsverhalten der gewonnenen Antikörper deutlich. Durch Kopplung der MMOH an ELISA-Platten werden -wie auch durch die Biotinylierung- jeweils verschiedene Domänen maskiert (Epitope), die dann für die spezifischen Antikörper nicht mehr zugänglich sind.

Mit Hilfe der gewonnenen Antikörper gegen die Hydroxylase der sMMO aus *Methylosinus* sp. WI 14 sollte es möglich sein, einen Schnelltest zur Detektion von sMMO in anderen bekannten Methanotrophen bzw. von Isolaten aus Boden- oder Wasserproben zu entwickeln. Die zu untersuchenden Bakterien müßten dazu allerdings aufgeschlossen werden, da die sMMO intrazellulär lokalisiert ist. Die im Western Blot positiven Antikörper erkennen spezifische Domänen der Primärstruktur der sMMO und bieten -da die bisher untersuchten Methanmonooxygenasen hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz relativ ähnlich sind- ein erfolgversprechendes Anwendungsgebiet. Der große Nachteil liegt darin, daß für die Tests eine elektrophoretische Auftrennung der zu untersuchenden Proben erfolgen muß. Eine zweite Möglichkeit -dazu können die gegen direkt gekoppelte MMOH positiven Klone verwendet werden- besteht in der Kopplung der Antikörper an eine Platte (Fangantikörper). Anschließend werden die Proben aufgetragen und eventuell enthaltene sMMO mit einem zweiten Antikörper, an den z.B. eine Peroxidase gekoppelt wurde, detektiert. Drittens sollte es auch möglich sein, die Proben direkt an eine Platte zu binden und mit den spezifischen Antikörpern nachzuweisen.

Diese Verfahren könnten eine Alternative zu bereits praktizierten gentechnischen Verfahren darstellen. So gelang es MIGUEZ et al. (1997) durch Verwendung von Oligonukleotid-Fragmenten (30), die aus der bekannten DNA-Sequenz der α- und β- Untereinheit der Hydroxylase aus *Methylococcus capsulatus* konstruiert wurden, mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR),

13 sMMO-positive Kulturen in kontaminierten Bodenproben nachzuweisen. Durch Isolation eines 2,2 kB großen DNA-Fragments aus dem für die Komponente B codierenden Gens aus *Methylosinus trichosporium* OB3b und Vergleich mit Genproben verschiedener Methanotropher konnten TSIEN und HANSON (1992), ebenfalls sMMO-positive Bakterien detektieren.

Der Vorteil dieser Methoden ist der Nachweis der sMMO auf DNA-Ebene, so daß eine Expression der sMMO-codierenden Gene nicht erforderlich ist. Anderseits erlaubt der gentechnische Nachweis der sMMO nur eine Aussage zur potentiellen Fähigkeit des Mikroorganismus eine sMMO auszubilden. Der Nachteil besteht in dem relativ hohen Aufwand der Amplifizierung, der Reproduzierbarkeit sowie den relativ hohen Kosten für die Primersynthese.

4.3. Kinetische und molekulare Eigenschaften von Dehydrogenasen des dissimilatorischen Methanabbaus

4.3.1. Methanoldehydrogenasen

Das durch die MMO aus Methan gebildete Methanol wird in Methanotrophen ebenso wie in Methylotrophen, in denen das Methanol als C- und Energiequelle dient, gewöhnlich durch eine $NAD(P)^-$- unabhängige Methanoldehydrogenase (MDH) zum Formaldehyd oxidiert (ANTHONY 1986). Die MDH's aus methanotrophen Bakterien sind im Gegensatz zu denen aus obligat bzw. fakultativ methylotrophen Mikroorganismen jedoch noch relativ wenig beschrieben (GROSSE et al. 1997). Die Messung der Aktivität der MDH in vitro beruht auf der Fähigkeit des Enzyms, Elektronen auf den artifiziellen Elektronenakzeptor Phenazinmethosulfat (PMS) bzw. Phenazinethosulfat (PES) zu übertragen. Dabei benötigt das Enzym essentiell Ammoniumionen zur Aktivierung (ANTHONY 1986). Als Elektronenakzeptor in vivo wurde das Cytochrom c beschrieben. Offenbar wird die Kopplung der MDH mit dem Cytochrom durch Sauerstoff irreversibel zerstört (BEARD-MORE-GRAY und ANTHONY 1984).

In *Methylocystis* sp. GB 25 und *Methylosinus* sp. WI 14 wird das durch die MMO gebildete Methanol ebenfalls durch eine PMS-abhängige MDH, die zur Aktivierung essentiell Ammoniumionen benötigt, oxidiert. In beiden untersuchten Stämmen wurde das Enzym nach Zellaufschluß zu 95 % in der löslichen Fraktion gefunden. Eine $NAD(P)^+$- abhängige Enzymaktivität konnte dagegen weder in der löslichen noch in der membrangebundenen Fraktion nachgewiesen werden.

ANTHONY (1986) postulierte, daß die MDH wahrscheinlich ein membrangegundenes Enzym ist, da sie funktionell mit Komponenten der Atmungskette interagiert. Nach Zellaufschluß

wurden aber Unterschiede in der Lokalisation der MDH in Abhängigkeit von der Typ-Zuordnung des untersuchten Stammes gefunden. So beschrieben WADZINSKI und RIBBONS (1974), daß der Typ I-Methanotrophe *Methylococcus capsulatus* (später dem Typ X zugeordnet) sowohl eine membrangebundene als auch eine lösliche PMS-abhängige MDH ausbildet. Beim Vergleich der Eigenschaften stellten die Autoren aber fest, daß es sich um ein und dasselbe Enzym handelte. In dem Typ II-Methanotrophen *Methylosinus sporium* konnte MDH-Aktivität ausschließlich in der löslichen Fraktion gefunden werden (PATEL und FELIX 1976). FASSEL et al. (1992) wiesen die MDH im methylotrophen Bakterium *Methylobacterium* sp. AM 1 durch Markierung mit Gold-gekoppelten Antikörpern im Bereich des Periplasmas nach. Offensichtlich interagiert die MDH nur schwach mit der Cytoplasmamembran und erscheint in Abhängigkeit der Membrananordnung bzw. der Art des Zellaufschlusses in unterschiedlichen Zellfraktionen.

In Tab. 41 sind die für die MDH aus *Methylocystis* sp. GB 25 bzw. *Methylosinus* sp. WI 14 erhaltenen kinetischen und molekularen Parameter denen von gut untersuchten obligat und fakultativ methanotrophen Bakterien gegenübergestellt. Beide Enzyme bestehen aus je zwei identischen Untereinheiten, mit einer relativen Molmasse von 62.000 bzw. 70.000. Die N-terminalen Aminosäuresequenzen weisen eine Übereinstimmung von 80 % bezogen auf die ersten 20 Aminosäuren auf. Im Vergleich zu dem obligat Methylotrophen *Methylobacterium extorquens* AM 1 beträgt die Homologie 55 bzw. 60 % zur α- Untereinheit. NUNN et al. (1989) zeigten, daß die MDH in diesem Bakterium aus zwei identischen Untereinheiten (62.000 bzw. 8.500) mit einer $\alpha_2\beta_2$-Struktur besteht. Diese Untereinheiten waren sehr stark aneinander gebunden und konnten nur mit SDS bzw. hohen Konzentrationen Guanidinchlorid (6 M) voneinander getrennt werden. Dagegen bestehen die MDH des Typ I-Methanotrophen *Methylomonas methanica* (PATEL et al. 1978) sowie des Typ II-Methanotrophen *Methylosinus sporium* (PATEL und FELIX 1976) aus je einer Untereinheit mit einer relativen Molmasse von 60.000. Für die MDH des fakultativ Methylotrophen *Hyphomicrobium* X konnten DUINE et al. (1978) eine relative Molmasse von 120 kDa und eine α_2-Struktur nachweisen. Hieraus wird ersichtlich, daß im Gegensatz zur Lokalisation die molekularen Struktur der MDH sehr verschieden ist, und nicht durch die taxonomische Einordnung bestimmt wird.

Tab. 41: Molekulare und kinetische Eigenschaften von Methanoldehydrogenasen verschiedener Methylotropher.

	Methylocystis sp. GB 25[1]	*Methylosinus* sp. WI 14[1]	*Methylobacterium extorquens*[2]	*Hyphomicrobium* X[3]
Zuordnung	obligat methanotroph (Typ II)	obligat methanotroph (Typ II)	obligat methylotroph	fakultativ methylotroph
Lokalisation	Cytosol	Cytosol	Periplasma	membrangebunden
Relative Molmasse (nativ)	115.000-122.000	140.000	140.000	120.000
Relative Molmasse (denaturiert)	62.000	70.000	60.000, 8.500	60.000
Struktur	α_2	α_2	$\alpha_2\beta_2$	α_2
Prosthetische Gruppe	PQQ	PQQ	PQQ	PQQ
Gehalt (mol/mol Protein)	n.b.[4]	1,6	2	2,1
Isoelektrischer Punkt	8,3	hoch	hoch	
pH-Optimum	9,0	9,0	9,0	9,0
Substratspezifität				
Primäre Alkohole	C_1-C_8	C_1-C_9	C_1-C_6	C_1-C_6
Sekundäre Alkohole	nein	nein	nein	nein
Aldehyde	C_1-C_3 und Glutardialdehyd	C_1-C_3	nur C_1	nur C_1
Hemmung durch	Mn^{2+}, Cu^{2+}, Fe^{2+}	Cu^{2+}, Fe^{2+}	n.b.	KCN, Hydroxylamin

[1]) eigene Ergebnisse; [2]) DAY und ANTHONY (1990), MORRIS et al. (1995), TOYAMA et al. (1997); [3]) DUINE et al. (1978), FRANK und DUINE (1990);

[4]) nicht bestimmt

In früheren Untersuchungen wurde gezeigt, daß gereinigte MDH aus *Pseudomonas* sp. M 27 ein charakteristisches Absorptionsspektrum besitzt, welches auf die prosthetische Gruppe des Enzyms zurückzuführen ist (ANTHONY und ZATMAN 1967). Diese konnte als PQQ bzw. Derivat des PQQ identifiziert werden (DUINE 1991, MATHEWS 1995). Auch in beiden untersuchten Stämmen wurde PQQ mit Hilfe des Apoproteins der Glucosedehydrogenase aus *Pseudomonas aeruginosa* SG 26 als prosthetische Gruppe identifiziert. Für *Methylosinus* sp. WI 14 konnte der PQQ-Gehalt der MDH mit 1,6 mol pro mol Protein (0,8 mol pro Untereinheit) bestimmt werden. Unter Berücksichtigung von Fehlern bei der Messung (Proteinkonzentration u.a.) ist ein PQQ-Gehalt von 1 mol pro Untereinheit anzunehmen, was den für andere Methanoldehydrogenasen (vgl. Tab. 41) ermittelten Werten entspricht. Dagegen konnte in den untersuchten Stämmen keine Ca^{2+}- bzw. Ba^{2+}-Abhängigkeit, wie für die MDH aus *Methylobacterium extorquens* beschrieben (GOODWIN et al. 1996; GOODWIN und ANTHONY 1996), nachgewiesen werden.

Bei den Untersuchungen zur Substratspezifität wurde ein überraschender Befund erhalten. Gereinigte MDH (aus beiden Stämmen) ist in Abwesenheit eines Substrates nach Zugabe von Ammoniumionen in der Lage, das im optischen Test eingesetzte PMS zu reduzieren. Mit angereicherten Enzymfraktionen (nach Chromatographie an DEAE, aber vor der Gelfiltration) konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden. Es erscheint möglich, daß durch Gelfiltration eine Abtrennung der prosthetischen Gruppe vom Apoenzym erfolgt. Im Gegensatz zu den chinoiden Cofaktoren der Methylamindehydrogenase (TPQ und TTQ) ist das PQQ nicht kovalent an das Protein gebunden (TANIZAWA 1995). Durch Zugabe von PQQ zu gereinigter MDH von *Methylocystis* sp. GB 25 bzw. *Methylosinus* sp. WI 14 (nach Gelfiltration) konnte aber keine Enzymrekonstitution (PMS-Reduktion nur in Anwesenheit eines Substrates) erreicht werden. Bei der Reinigung der MDH des Methylotrophen *Methylobacterium extorquens* AM 1 erhielten DAY und ANTHONY (1990) ähnliche Ergebnisse.

Die MDH beider untersuchter Stämme oxidiert verschiedene primäre Alkohole und einige Aldehyde. Sekundäre Alkohole werden dagegen nicht verwertet, eine Eigenschaft der meisten bisher untersuchten Methanoldehydrogenasen (u.a. SPERL et al. 1984, DUINE et al. 1978). Sehr interessant ist die Aldehydoxidation durch die MDH aus *Methylocystis* sp. GB 25 bzw. *Methylosinus* sp. WI 14. Neben Formaldehyd werden auch Acet- und Propionaldehyd sowie der Glutardialdehyd (nur durch *Methylocystis* sp. GB 25) umgesetzt. Während die Formaldehydoxidation durch die MDH schon für einige Methylotrophe wie z.B. *Methylobacterium extorquens* (DAY und ANTHONY 1990) oder *Hyphomicrobium* X (DUINE et al. 1978)

demonstriert werden konnte, ist die Oxidation von Acetaldehyd bzw. Propionaldehyd sehr ungewöhnlich. Einzig die MDH des fakultativen Methylotrophen *Rhodopseudomonas acidophila* (BAMFORD und QUAYLE 1978) weist eine ähnlich breites Substratverwertungsspektrum wie die MDH aus den in dieser Arbeit untersuchten Stämmen auf. Bisher wurde aber noch kein Stamm beschrieben, dessen MDH den Glutardialdehyd oxidieren kann.

Maximale MDH-Aktivität konnte sowohl bei *Methylocystis* sp. GB 25 als auch bei *Methylosinus* sp. WI 14 bei pH 9,0 gemessen werden. Wahrscheinlich ist dieses pH-Optimum im unphysiologischen Bereich aber auf die Verwendung des artifiziellen Elektronenakzeptors PMS im in vitro Test zurückzuführen. Unter Verwendung von Cytochrom c als Elektronenakzeptor (bei Präparation der MDH unter Sauerstoffausschluß) konnten BEARDMORE-GRAY und ANTHONY (1984) ein pH-Optimum von 7,0 bestimmen. Es ist möglich, daß die im in vitro Test essentiellen Amino- bzw. Ammoniumgruppen erst bei hohem pH-Wert als Ersatz der Lysylreste fungieren, die im natürlichen System den Teil der MDH formieren, der an das Cytochrom c bindet (ANTHONY 1986).

Durch Metallionen (Cu^{2+}, Fe^{2+}) wurde die MDH der untersuchten Stämme besonders stark gehemmt. Dabei ist interessant, daß die Methanoldehydrogenase aus *Methylocystis* sp. GB 25 extrem empfindlich gegenüber Mn^{2+} ist, während die MDH aus *Methylosinus* sp. WI 14 dadurch nicht beeinflußt wird. Offensichtlich unterscheiden sich die Enzyme in ihren kinetischen Parametern, obwohl sie sehr ähnlich in ihren molekularen Eigenschaften sind. Weiterhin wurden beide Enzyme durch EDTA nicht gehemmt. Das ist wahrscheinlich auf die in vitro Testbedingungen zurückzuführen, da die meisten Methanoldehydrogenasen in vivo durch EDTA stark inhibiert werden, was offenbar durch die Kopplung der MDH mit Cytochrom c begründet ist (ANTHONY 1986).

4.3.2. Formaldehyddehydrogenasen

Die Oxidation von Formaldehyd ist in methylotrophen Bakterien bisher relativ wenig untersucht worden. Eine NAD^+- abhängige Formaldehyddehydrogenase (FaDH) konnte z.B. in *Methylococcus capsulatus* (Bath) (STIRLING und DALTON 1978), eine NAD^+- und GSH-abhängige in *Methylomonas albus* (ROITSCH und STOLP 1985) und eine DCPIP- abhängige in *Methylomonas methanica* (STRØM et al. 1974) nachgewiesen werden. Dagegen fanden PATEL und HOARE (1971) in *Methylococcus capsulatus* (Texas) überhaupt keine FaDH-Aktivität. Diese Beispiele verdeutlichen die erstaunliche Diversität der Aldehyddehydrogenasen bei den Methylotrophen. In *Methylocystis* sp. GB 25 und *Methylosinus* sp. WI 14 konnte keine

$NAD(P)^+$- abhängige Formaldehyddehydrogenase nachgewiesen werden (auch nicht bei Zugabe von Glutathion, GSH).

Obwohl in verschiedenen anderen Stämmen Formaldehyd als potentielles Substrat der MDH beschrieben wird (HANSON und HANSON 1996), scheint das Enzym nicht von physiologischer Bedeutung für die Formaldehydoxidation innerhalb der Zelle zu sein. DJUKHUIZEN et al. (1992) argumentieren, daß die MDH aufgrund ihrer niedrigen Affinität und spezifischen Aktivität, keine Funktion bei der Formaldehydverwertung übernehmen kann. HARMS et al. (1985) konnten bei Untersuchungen an Mutanten mit fehlender MDH keine verminderte Aldehydoxidation registrieren, was auf die Existenz eines separaten Enzyms hinweist. Dennoch ist es wahrscheinlich, daß die MDH mit ihrem umfangreichen Substratverwertungsspektrum bei den in dieser Arbeit untersuchten Stämmen als funktionelle Formaldehyddehydrogenase fungiert. Das belegen die hohe Affinität der MDH zum Formaldehyd sowie die im Gegensatz zu den in der Literatur beschriebenen Stämmen (HANSON und HANSON 1996) ermittelten hohen spezifischen Aktivitäten. Weiterhin wurde auch bei Aktivfärbung von Rohextrakten nach elektrophoretischer Auftrennung nur eine aktive Proteinbande (und zwar ausschließlich bei Zugabe von Ammoniumionen als Aktivator) nachgewiesen, die als MDH identifiziert werden konnte.

Wenn die MDH in den untersuchten Stämmen als funktionelle Formaldehyddehydrogenase fungiert, muß das Enzym natürlich auch reguliert werden. Wie kann zwischen dissimilatorischen und assimilatorischen Weg umgeschaltet werden, wenn Formaldehyd sowohl Produkt als auch Substrat für die MDH ist ? Wie schon beschrieben, ist der freie Formaldehyd eine Verbindung, die im Organismus mit einer Vielzahl von Polymeren bzw. Metaboliten nichtenzymatisch reagieren kann und somit ein stark toxisches Potential besitzt. Bei einigen methylotrophen Bakterien wurde gezeigt, daß die Affinität der MDH für Formaldehyd in vivo durch ein Protein modifiziert wird. Dieses wurde als „Protein M“ (Modifier) bezeichnet und ist im gleichen Kompartiment wie die MDH lokalisiert. Protein M hemmt nach Bindung an das Enzym spezifisch die Verwertung des Formaldehyds (PAGE und ANTHONY 1986). Somit kann die MDH das Methanol nur zum Formaldehyd oxidieren, der dann in den Zellstoffwechsel einbezogen werden kann. Die Feinregulation und auch die Bedingungen für die Expression des M-Proteins sind dabei allerdings noch nicht geklärt (FORD et al. 1985). Es ist aber wahrscheinlich, daß die MDH -aufgrund der potentiellen Befähigung sowohl Methanol als auch Formaldehyd zu oxidieren- in den untersuchten Stämmen auch über ein ähnliches regulatorisches Protein beeinflußt wird.

4.3.3. Formiatdehydrogenasen

Im Gegensatz zur Formaldehyddehydrogenase ist die Formiatdehydrogenase (FDH) innerhalb der Methanotrophen wieder relativ einheitlich. In den untersuchten Stämmen konnte jeweils eine hochspezifische NAD^+- abhängige FDH nachgewiesen werden. Die relative Molmasse der FDH aus *Methylosinus* sp. WI 14 wurde mit 385 kDa bestimmt. JOLLIE und LIPSCOMB (1991) gelang es, in *Methylosinus trichosporium* OB3b eine ähnliche NAD^+- abhängige FDH mit einer relativen Molmasse von etwa 400 kDa zu isolieren. Das Enzym enthält dabei Flavin, Eisen-Schwefel-Cluster sowie Molybdän. Die FDH ist äußerst wichtig im Stoffwechsel der Methanotrophen, da sie neben der FaDH das für die sMMO benötigte NADH bereitstellt (QUAYLE 1972). Das Enzym enthält außerdem oft Cofaktoren wie Molybdän, Wolfram (DEATON et al. 1987) oder Selen im Selenocystein (BOYINGTON et al. 1997), die in biologischen Systemen nur selten vorkommen. In den untersuchten Stämmen *Methylocystis* sp. GB 25 und *Methylosinus* sp. WI 14 ist die FDH offensichtlich als einziges Enzym der dissimilatorischen Sequenz befähigt, die von der sMMO benötigten Reduktionsäquivalente bereitzustellen, da eine $NAD(P)^+$- abhängige FaDH nicht nachzuweisen war.

5. Zusammenfassung

1. Die im UFZ Leipzig/Halle, Sektion Sanierungsforschung, isolierten und in der vorliegenden Arbeit untersuchten Stämme *Methylocystis* sp. GB 25 und *Methylosinus* sp. WI 14 lassen sich aufgrund ihrer charakteristischen intracytoplasmatischen Membranen, die parallel zur Cytoplasmamembran angeordnet sind sowie durch ihr Enzymmuster eindeutig den Typ II-Methanotrophen zuordnen. Die Hydroxypyruvatreduktase konnte als Schlüsselenzym des Serinweges mit einer spezifischen Aktivität von 255 mU/mg bzw. 550 mU/mg im Rohextrakt bestimmt werden. Beide Stämme verfügen außerdem über eine $NADP^+$-abhängige Isocitratdehydrogenase sowie eine Isocitratlyase, über die die Rückgewinnung des primären Akzeptors des Serinweges erfolgt.
2. Die optimalen Wachstumsparameter für die Kultivierung der untersuchten Stämme in Schüttelkolben konnten ermittelt werden. *Methylocystis* sp. GB 25 zeigt optimales Wachstum bei Kultivierung auf Standardmedium (1,5 µM Cu^{2+}) mit NH_4Cl als Stickstoffquelle und bei 38°C. Der Stamm wächst dagegen nicht auf kupferfreiem Medium sowie unter Verwendung von $NaNO_3$ als Stickstoffquelle. Die spezifische maximale Wachstumsrate beträgt 0,147 h^{-1}.

   Methylosinus sp. WI 14 wächst auf Standard- und NMS-Medium mit und ohne Kupfer. Optimales Wachstum konnte bei Kultivierung auf NMS-Medium mit $NaNO_3$ als Stickstoffquelle sowie ohne externe Kupferzugabe bei 30°C erreicht werden. Die spezifische maximale Wachstumsrate beträgt dabei 0,068 h^{-1}.
3. Die Methanmonooxygenase als primäres Enzym des Methanabbaus konnte in intakten Zellen von *Methylocystis* sp. GB 25 sowie *Methylosinus* sp. WI 14 über die Oxidation von Propylen durch Gaschromatographie sowie über den Methan-abhängigen Sauerstoffverbrauch durch Polarographie nachgewiesen werden.
4. Von den untersuchten Stämmen ist nur *Methylosinus* sp. WI 14 in der Lage, unter bestimmten Bedingungen zwei Methanmonooxygenasesysteme zu exprimieren. *Methylocystis* sp. GB 25 exprimiert ausschließlich die membrangebundene Methanmonooxygenase (pMMO).
5. Die pMMO aus *Methylocystis* sp. GB 25 und *Methylosinus* sp. WI 14 ist durch eine hohe Substratspezifität gekennzeichnet und verwertet nur kurzkettige Alkane (bis Propan) sowie Alkene (bis Butylen). Die Untersuchungen wurden mit intakten Zellen durchgeführt. Ein Nachweis der pMMO im zellfreien Extrakt gelang in beiden Stämmen nicht, was wahrscheinlich auf die äußerst geringe Stabilität des Enzyms zurückzuführen ist.

6. *Methylosinus* sp. WI 14 exprimiert bei Wachstum auf kupferarmen (bis etwa 0,1 µM Cu^{2+}) bzw. kupferfreien Medium eine lösliche Methanmonooxygenase (sMMO) anstelle der pMMO. Obwohl der Stamm unter diesen Bedingungen auch die Aminosäuren Serin und Cystein als Stickstoffquelle nutzen kann, erfolgt die sMMO-Expression nur bei Wachstum auf Ammonium bzw. Nitrat.
7. Die sMMO aus *Methylosinus* sp. WI 14 benötigt NADH als Elektronendonator, das durch NADPH ersetzt werden kann. Dabei ist aber die Affinität des Enzyms zu NADH um etwa 1000fach höher als zu NADPH, wenngleich sich die spezifischen Aktivitäten kaum unterscheiden. Offensichtlich ist NADH der natürliche Elektronendonator der sMMO. Optimale sMMO-Aktivität konnte bei pH 7,2 und 30°C gemessen werden.
8. Die sMMO aus *Methylosinus* sp. WI 14 besitzt ein sehr breites Substratverwertungsspektrum. Das Enzym oxidiert Alkane (bis zum Heptan), Alkene, cyclische gesättigte Kohlenwasserstoffe (Cyclohexan), Aromaten (Benzol, Xylol, Toluol) und ist zur Etherspaltung (Diethylether) befähigt. Auch halogenierte gesättigte Kohlenwasserstoffe sowie halogenierte Aromaten (u.a. Clorbenzol, Chlornaphthalen, Fluorbenzol) werden oxidiert. Diese Substrate können durch den Mikroorganismus jedoch nicht als C-Quelle verwertet sondern nur im Rahmen eines Cometabolismus zu den korrespondierenden Produkten hydroxyliert werden. Eine Dehalogenierung der getesteten halogenierten Aromaten erfolgte dabei nicht.
9. Die sMMO aus *Methylosinus* sp. WI 14 ist aus drei Komponenten -einer Hydroxylase, einem Elektronentransferprotein sowie einer Reduktase- aufgebaut, die mittels chromatographischer Verfahren bis zur elektrophoretischen Homogenität gereinigt werden konnten. Diese sind mit Ausnahme der Komponente B (Elektronentransferprotein) äußerst instabil und verlieren innerhalb kurzer Zeit ihre Aktivität. Der Aktivitätsverlust ist bei Komponente A irreversibel, da diese in ihre inaktiven Untereinheiten zerfällt. Die Aktivität der Komponente C (Reduktase) kann durch Zugabe von Fe^{2+}-Ionen zum Teil wieder rekonstituiert werden.
10. Die Hydroxylase der sMMO aus *Methylosinus* sp. WI 14 wurde durch Ionenaustauschchromatographie sowie Molekularsiebchromatographie mit einer Ausbeute von 21 % insgesamt 10,5fach zur elektrophoretischen Homogenität gereinigt. Die Aktivität der Hydroxylase kann auch in Abwesenheit der anderen Komponenten unter Verwendung von 10 mM H_2O_2 durch Propylenoxidation gaschromatographisch erfaßt werden. Das Enzym besteht aus drei Untereinheiten mit relativen Molmassen von 57.000, 43.000 und 23.000.

Die relative Molmasse der nativen Hydroxylase beträgt 229.000, so daß es offenbar in einer $\alpha_2\beta_2\gamma_2$-Substruktur vorliegt. Der isoelektrische Punkt des Enzyms beträgt 4,3. Die N-terminale Aminosäuresequenzen der drei Untereinheiten konnten ermittelt werden und zeigen eine hohe Homologie zur Hydroxylase der sMMO aus *Methylosinus trichosporium* OB3b (α- und β- Untereinheit identisch, γ- Untereinheit 70 % Homologie) bezogen auf die 20 N-terminalen Aminosäuren. Als metallischer Cofaktor konnte Eisen mit 3,6 mol pro mol Protein nachgewiesen werden. Die Hydroxylase ist äußerst instabil und zerfällt bei einmaligem Einfrieren bzw. Auftauen in ihre inaktiven Untereinheiten.

11. Die Komponente B der sMMO aus *Methylosinus* sp. WI 14 konnte ebenfalls durch Ionenaustauschchromatographie sowie Molekularsiebchromatographie bis zur elektrophoretischen Homogenität gereinigt werden. Die Reinigung konnte allerdings nicht bilanziert werden, da die Aktivität der Komponente B nur in Anwesenheit der beiden anderen gemessen werden konnte und ein stabiles reproduzierbares Testsystem aufgrund der extremen Instabilität, insbesondere der Hydroxylase, nicht etabliert werden konnte. Die relative Molmasse der Komponente B wurde mit 15.000-18.000 bestimmt. Aufgrund der Übereinstimmung der ermittelten Molmassen in der Gelfiltration bzw. bei SDS-Gelelektrophorese besteht das Protein offensichtlich nur aus einem Monomer. Der isoelektrische Punkt konnte mit 4,6 bestimmt werden. Die N-terminale Aminosäuresequenz der Komponente B weist eine 70 % ige Homologie zum Elektronentransferprotein der sMMO aus *Methylosinus trichosporium* OB3b auf. Gereinigte Komponente B erhöht die Aktivität der sMMO im ultrazentrifugierten Rohextrakt von *Methylosinus* sp. WI 14 um etwa 100 %.
12. Die Reduktase der sMMO aus *Methylosinus* sp. WI 14 wurde durch Ionenaustauschchromatographie sowie Affinitätschromatographie mit einer Ausbeute von 29 % insgesamt 204-fach angereichert. Die Aktivität des Enzyms kann auch in Abwesenheit der anderen Komponenten durch die Reduktion von NAD(P)H in Anwesenheit eines Elektronenakzeptors (u.a. Cytochrom c) spektrophotometrisch erfaßt werden. Die Reduktase besteht aus einem Monomer mit einer relativen Molmasse von 41.000. Die N-terminale Aminosäuresequenz weist eine Identität von über 60 % bezogen auf die ersten 19 N-terminalen Aminosäuren gegenüber der Reduktase der sMMO aus *Methylosinus trichosporium* OB3b auf. Die Reduktase hat eine hohe Affinität zu NADH (K_m=6,38 µM), aber nur eine geringe Affinität zu NADPH (K_m=5,2 mM). Das Enzym wird von Zn^{2+}-, Cu^{2+}- und Ni^{2+}-Ionen (1mM) sowie EDTA (0,2 mM) stark gehemmt. Die Zugabe von Hg^{2+}-Ionen (0,01mM) führt zum vollständigen Aktivitätsverlust, was auf das Vorkommen von

essentiellen Sulfhydrylgruppen im aktiven Zentrum des Enzyms schließen läßt. Die Reduktase ist ebenfalls äußerst instabil; bis zu 90% der Aktivität können aber durch Zugabe von Fe^{2+} (1-10 mM) rekonstituiert werden.

13. Die sMMO-Aktivität konnte durch Kombination der gereinigten Komponenten der sMMO aus *Methylosinus* sp. WI 14 wieder rekonstituiert werden. Dabei wirkt die Komponente B als Effektor und erhöht die Aktivität der sMMO etwa 10fach. Die rekonstituierte sMMO wird durch Cu^{2+}- und Zn^{2+}-Ionen sowie EDTA stark gehemmt. Dagegen hat KCN nur einen sehr geringen Einfluß auf die Aktivität.
14. Gegen die gereinigte Hydroxylase der sMMO aus *Methylosinus* sp. WI 14 wurden monoklonale Antikörper gewonnen, die die native sMMO (direkt gekoppelt bzw. biotinyliert) bzw. spezifisch die Untereinheiten der denaturierten sMMO erkennen. Dabei konnte stets eine Kreuzreaktivität zwischen α- und β- Untereinheit beobachtet werden, die auf eine evolutionäre Verwandtschaft der betreffenden Untereinheiten hinweist.
15. Das im initialen Schritt durch die pMMO bzw. sMMO gebildete Methanol wird sowohl in *Methylocystis* sp. GB 25 als auch in *Methylosinus* sp. WI 14 über eine $NAD(P)^+$-unabhängige Methanoldehydrogenase (MDH) oxidiert. Als prosthetische Gruppe des Enzyms konnte das PQQ identifiziert werden (MDH aus *Methylosinus* sp. WI 14: 1,6 mol PQQ / mol Protein). Offensichtlich ist die MDH aufgrund ihres chinoiden Cofaktors in beiden Stämmen (neben der Funktion im dissimilatorischen Methanabbau) in die Bereitstellung von Elektronen für die pMMO involviert.
16. Die MDH aus *Methylocystis* sp. GB 25 sowie aus *Methylosinus* sp. WI 14 wurde über verschiedene chromatographische Verfahren bis zur elektrophoretischen Homogenität gereinigt. Bei einer Ausbeute von 29 % bzw. 17 % konnte das Enzym 20fach bzw. 8,6fach angereichert werden. Die relative Molmasse der nativen MDH aus *Methylocystis* sp. GB 25 konnte mit 120.000, die der Untereinheiten mit je 62.000 (α_2-Struktur) bestimmt werden. Der isoelektrische Punkt des Enzyms liegt bei 8,3. Die relative Molmasse der nativen MDH aus *Methylosinus* sp. WI 14 konnte mit 140.000, die der Untereinheiten mit je 70.000 (α_2-Struktur) ermittelt werden. Die N-terminale Aminosäuresequenz der beiden Enzyme wurde bestimmt. In den ersten 20 N-terminalen Aminosäuren liegt eine Identität von 80 % vor.
17. Die MDH aus *Methylocystis* sp. GB 25 sowie aus *Methylocystis* sp. sind durch eine breite Substratspezifität gekennzeichnet und oxidiert neben 1-Alkoholen (bis 1-Oktanol) auch Aldehyde (bis zum Propionaldehyd). Interessant ist die Verwertung von Glutardialdehyd

durch die MDH aus *Methylocystis* sp. GB 25; eine MDH mit vergleichbarem Substratverwertungsspektrum wurde innerhalb der Methylotrophen bisher noch nicht beschrieben. Beide Enzyme werden durch Cu^{2+}- und Fe^{2+}-Ionen (0,1 mM) gehemmt. Hingegen inhibieren Mn^{2+}-Ionen (0,1 mM) ausschließlich die MDH aus *Methylocystis* sp. GB 25.

18. In keinem der beiden untersuchten Stämme konnte eine Formaldehyddehydrogenase -weder Pyridinnukleotid-abhängig noch -unabhängig- gefunden werden. Die MDH ist jedoch in der Lage, auch den Formaldehyd zu oxidieren. Offensichtlich stellt die MDH in den untersuchten Stämmen eine funktionelle Formaldehyddehydrogenase dar.
19. Sowohl in *Methylocystis* sp. GB 25 als auch in *Methylosinus* sp. WI 14 konnte eine NAD^+-abhängige Formiatdehydrogenase (FDH) nachgewiesen werden. Das Enzym wurde durch Ionenaustauschchromatographie 7fach bzw. 15fach angereichert und besitzt eine extrem hohe Substratspezifität. NAD^+ kann dabei nicht durch $NADP^+$ ersetzt werden. Die relative Molmasse der nativen FDH wurde für *Methylosinus* sp. WI 14 mit 385.000 ermittelt. Aufgrund einer fehlenden NAD^+-abhängigen Formaldehyddehydrogenase spielt die FDH zumindest in *Methylosinus* sp. WI 14 offenbar eine entscheidende Rolle bei der Bereitstellung von Elektronen (NADH) für die sMMO (adäquat zur Rolle der MDH für die pMMO).

6. Literaturverzeichnis

Anderson, J.E., McCarty, P.L.: Appl. Environ. Microbiol. **63** (1997), 687-693.

Anthony, C.: Sci. Prog. **62** (1975), 167-206.

Anthony, C.: The biochemistry of methylotrophs. Academic Press London (1982).

Anthony, C.: Adv. Microbiol. Physiol. **27** (1986), 113-210.

Anthony, C., In: I. Goldberg, J.S. Rokem (ed.), Biology of methylotrophs. Butterworth-Heinemann, Stoneham, Mass. (1991), 79-109.

Anthony, C., Zatman, L.J.: Biochem. J. **92** (1964), 614-621.

Anthony, C., Zatman, L.J.: Biochem. J. **104** (1967), 953-959.

Armstrong, J.: Biochem. Biophys. Acta **86** (1964), 194-197.

Bamforth, C.W., Quayle, J.R.: Biochem. J. **169** (1978), 674-679.

Bartlett, K.B., Harris, R.C.: Chemosphäre **26** (1993), 261-320.

Basford, R.E., Huennekens, F.M.: J. Amer. Chem. Soc. **77** (1955), 3873-3877.

Bedard, C., Knowles, R.: Mikrobiol. Rev. **53** (1989), 68-84.

Beardmore-Gray, M., Anthony, C., In : R.L. Crawford, R.S. Hanson (eds.), Microbial Growth on C_1 Compounds, Amer. Soc. Microbiol., Washington (1984), 97-105.

Bodrossy, L., Kovacs, K.L.: Ind. J. Exp. Biol. **32** (1994), 443-449.

Bourque, D., Pomerleau, Y., Groleau, D.: Appl. Microbiol. Biotechnol. **44** (1995), 367-376.

Bowman, J.P., Jimenez, L., Rosario, I., Hazen, T.C., Sayler, G.S.: Appl. Environ. Microbiol. **59** (1993), 2380-2387.

Boyington, J.C., Gladyshev, V.N., Khangulov, S.V., Stadtman, T.C., Sun, P.D.: Science **275** (1997), 1305-1308.

Bradford, M.M.: Anal. Biochem. **72** (1976), 248-254.

Burrows, K.J., Cornish, A., Scott, D., Higgins, I.J.: J. Gen. Microbiol. **5** (1984), 335-342.

Cardy, D.L., Laidler, V., Salmond, G.P., Murrell, J.C.: Mol. Microbiol. **6** (1991), 337-343.

Chan, S.I., Nguyen, H.-H.T., Shiemke, A.K., Lidstrom, M.E., In: J.C. Murell, D.P. Kelley (ed.), Microbial growth on C_1 compounds. Intercept Press, Ltd., Andover, UK (1993), 93-107.

Chang, H.-L., Alvarez-Cohen, L.: Biotechnol. Bioeng. **45** (1995), 440-449.

Colby, J., Dalton, H.: Biochem. J. **177** (1979), 903-908.

Colby, J., Dalton, H., Whittenbury, R.: Biochem. J. **151** (1976), 459-462.

Colby, J., Stirling, D.I., Dalton, H.: Biochem. J. **165** (1977), 395-402.

Collins, M.L.P., Buchholz, L.A., Remsen, C.C.: Appl. Environ. Microbiol. **57** (1991), 1261-1264.

Conrad, R., Frenzel, P., Cohen, Y.: FEMS Microbiol. Ecol. **610** (1995), 1-9.

Cook, S.A., Shiemke, A.K.: J. Inorgan. Biochem. **63** (1996), 273-284.

Cooper, T.G.: Biochemische Arbeitsmethoden, Walter de Gruyter, Berlin, New York (1981).

Crill, P.M., Harriss, R.C., Bartlett, K.B., In: J.E. Rogers, W.B. Whitman (ed.), Microbial production and consumtion of greenhouse gases. Am. Soc. Microbiol., Washington D.C. (1991), 91-109.

Crutzen, P.J.: Nature **350** (1991), 380-381.

Dalton, H., In: J.W. Kelley (ed.), Applications of enzyme biotechnology. Plenum Press, New York (1991), 55-68.

Dalton, H., Prior, S.D., Leak, D.J., Stanley, S.J.H., In: R.L. Crawford, R.S. Hanson (eds.), Microbial growth on C_1 compounds. Amer. Soc. Microbiol. (1984), 75-82.

Davis, B.J.: Ann. New York Acad. Sci. **121** (1964), 404-427.

Day, D.J., Anthony, C.: Meth. Enzymol. **188** (1990), 210-216.

Deaton, J.C., Soloman, E.I., Watt, G.D., Wetherbee, P.J., Durfor, C.N.: Biochem. Biophys. Res. Commun. **149** (1987), 424-430.

Dijkhuizen, L., Levering, P.R., de Vries, G.E., In: J.C. Murrell, H. Dalton (eds.), Methane and Methanol Utilizers, Plenum Press, New York (1992), 149-181.

Dijkhuizen, L., Sokolov, I.G., In: I. Goldberg, J.S. Rokem (eds.), Biology of Methylotrophs, Butterworth-Heinemann. Boston, London, Oxford, Singapore, Sydney, Toronto, Wellington (1991), 127-148.

Duine, J.A.: Eur. J. Biochem. **200** (1991), 271-284.

Duine, J.A., Frank, J., Verwiel, P.E.J.: Eur. J. Biochem. **118** (1981), 395-399.

Duine, J.A., Frank., J., Westerling, J.: Biochim. Biophys. Acta **524** (1978), 277-287.

Edmann, P., Henschen, A.: Protein sequence determination, 2nd Edn., Springer Verlag, Berlin (1975), 232-279.

Fassel, T.A., Buchholz, L.A., Perille Collins, M.L., Remsen, C.C.: Appl. Environ. Microbiol. **58** (1992), 2302-2307.

Fitch, M.W., Speitel, G.E., Georgiou, G.: Appl. Environ. Microbiol. **62** (1996), 1124-1128.

Ford, S., Page, D.M., Anthony, C.: J. Gen. Microbiol. **131** (1985), 2173-2182.

Fox, B.G., Froland, W.A., Dege, J.E., Lipscomb, D.: J. Biol. Chem. **264** (1989), 10023-10033.

Fox, B.G., Froland, W.A., Jollie, D.R., Lipscomb, J.D.: Meth. Enzymol. **188** (1990), 191-202.

Fox, B.G., Lipscomb, J.D.: Biochem.Biophys. Res. Comm. **154** (1988), 165-170.

Frank, J., Duine, J.A.: Meth. Enzymol. **188** (1990), 202-209.

Froland, W.A., Andersson, K.K., Lee, S.-K., Liu, Y., Lipscomb, J.D.: J. Biol. Chem. **267** (1992), 17588-17597.

Goodwin, M.G., Anthony, C.: Biochem. J. **318** (1996), 673-679.

Goodwin, M.G., Avezoux, A., Dales, S.L., Anthony, C.: Biochem. J. **319** (1996), 839-842.

Green, J., Dalton, H.: J. Biol. Chem. **260** (1985), 15795-15801.

Green, J., Dalton, H.: J. Biol. Chem. **263** (1988), 17561-17565.

Green, J., Dalton, H.: J. Biol. Chem. **264** (1989), 17698-17703.

Green, J., Prior, S.D., Dalton, H.: Eur. J. Biochem. **153** (1985), 137-144.

Green, P.N., In: J.C. Murrell, H. Dalton (ed.), Methane and methanol utilizers. Plenum Press, New York (1992), 23-84.

Grosse, S., Wendlandt, K.-D., Kleber, H.-P.: J. Basic Microbiol. **37** (1997), 269-279.

Hanson, R.S.: Adv. Appl. Microbiol. **26** (1980), 3-39.

Hanson, R.S., In: J.C. Murell, H. Dalton (ed.), Methane and methanol utilizers. Plenum Press, New York (1992), 1-22.

Hanson, R.S., Brusseau, G.A., In: G.R. Chaudry (ed.), Biological degradation and bioremediation of toxic chemicals. Dioscorides Press, Portland, Oreg. (1994), 227-297.

Hanson, R.S., Hanson, T.E.: Microbiol. Rev. **60** (1996), 439-471.

Hanson, R.S., Netrusov, A.I., Tsuji, K., In: A. Balows, H. Trüper, M. Dworkin, K.-H. Schleifer (eds.), The Prokaryotes., Springer-Verlag, New York (1991), 2350-2364.

Hanson, R.S., Wattenberg, E.V.: In. I. Goldberg, J.S. Rokem (eds.), Biology of Methylotrophs. Butterworth-Heinemann, Boston, London, Oxford, Singapore, Sydney, Toronto, Wellington (1991), 325-348.

Harms, N., de Vries, G.E., Maurer, K., Veltkamp, E., Stouthamer, A.H.: J. Bacteriol. **164** (1985), 1064-1070.

Hedrick, J.L., Smith, A.J.: Arch. Biochem. Biophys. **126** (1968), 155-164.

Higgins, I.J., Best, D.J., Hammond, R.C., Scott, D.: Microbiol. Rev. **45** (1981), 556-590.

Higgins, I.J., Best, D.J., Scott, D.: Basic Life Sci. **19** (1982), 383-402.

Hou, C.T., Patel, R.N., Laskin, A.I.: Adv. Appl. Microbiol. **26** (1980), 41-69.

Hou, C.T., Patel, R.N., Laskin, A.I., Barnabe, N.: Appl. Environ. Microbiol. **38** (1979), 127-134.

Houghton, J.T., Jenkins, G.J., Ephraums, J.J. (eds.): Climate Change, Cambridge University Press (1990).

Janatowa, J, Fuller, J.K., Hunter, M.J.: J. Biol. Chem. **243** (1968), 3612-3622.

Jahng, D., Wood, T.K.: Appl. Microbiol. Biotechnol. **45** (1996), 744-749.

Jensen, T.E., Corpe, W.A., In: I. Goldberg, J.S. Rokem (eds.), Biology of Methylotrophs, Butterworth-Heinemann (1991), 40-75.

Jiang, Y., Dalton, H.: Biochim. Biophys. Acta **1201** (1994), 76-84.

Jiang, Y., Wilkins, P.C., Dalton, H.: Biochim. Biophys. Acta **1163** (1993), 105-112.

Johnson, P.A., Jones-Mortimer, M.C., Quayle, J.R.: Biochim. Biophys. Acta **89** (1964), 350-354.

Jollie, D.R., Lipscomb, J.D.: J. Biol. Chem. **266** (1991), 21853-21863.

Jones, H.A., Nedwell, D.B.: FEMS Microbiol. Ecol. **12** (1993), 185-195.

Kightley, D., Nedwell, D.B., Cooper, M.: Appl. Environ. Microbiol. **61** (1995), 592-601.

Koh, S.-C., Bowman, J. P., Sayler, G.S.: Appl. Environ. Microbiol. **59** (1993), 960-967.

Kurtz, D.M.: JBIC **2** (1997), 159-167.

Landolt-Börnstein: Zahlenwerte und Funktionen, Bd.II, Teil 2, Eigenschaften der Materie in ihren Aggregatzuständen, Springer-Verlag, Berlin (1962).

Large, P.J., Quayle, J.R.: Biochem. J. **87** (1963), 386-388.

Law, J.H., Slepecky, R.A.: J. Bacteriol. **82** (1961), 33-36.

Lelieveld, J., Crutzen, P.J., Bruhl, C.: Chemosphäre **26** (1993), 739-768.

Lidstrom, M.E., In: A. Balows, H.G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, K.-H. Schleifer (eds.), The Prokaryotes. Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest **I** (1991), 431-445.

Lipscomb, J.D.: Annu. Rev. Microbiol. **48** (1994), 371-399.

Littlefield, D.W.: Science **145** (1964), 709-710.

Liu, K.E., Lippard, S.J.: Adv. Inorg. Chem. **42** (1995), 263-289.

Liu, Y., Nesheim, J.C., Paulsen, K.E., Stankovich, M.T., Lipscomb, J.D.: Biochemistry **36** (1997), 5223-5233.

Marcinka, K., Röhriing, C., Kluge, S.: Biochem. Physiol. Pflanzen **188** (1992), 187-193.

Mathews, F.S.: Meth. Enzymol. **258** (1995), 191-216.

Meyer, J., Haubold, R., Heyer, J., Böckel, W.: J. Basic Microbiol. **26** (1986), 155-160.

Miguez, C.B., Bourque, D., Sealy, J.A., Greer, C.W., Groleau, D.: Microb. Ecol. **33** (1997), 21-31.

Morris, C.J., Kim, Y.M., Perkins, K.E., Lidstrom, M.E.: J. Bacteriol. **177** (1995), 6825-6831.

Murell, C.J.: FEMS Microbiol. Rev. **88** (1992), 233-248.

Nakajima, T., Uchiyama, H., Yagi, O., Nakahara, T.: Biosci. Biotech. Biochem. **56** (1992), 736-740.

Nash, T.: Biochem. J. **55** (1953), 416-419.

Nguyen, H.-H.T., Shiemke, A.K., Jakobs, S.J., Hales, B.J., Lidstrom, M.E., Chan, S.I.: J. Biol. Chem. **269** (1994), 14995-15005.

Nielsen, A.K., Gerdes, K., Degn, H., Murrell, J.C.: Microbiol. **142** (1996), 1289-1296.

Nunn, D.N., Day, D., Anthony, C.: Biochem. J. **260** (1989) 857-862.

Okada, T., Karube, I., Suzuki, S.: Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. **12** (1981), 102-106.

Oldenhuis, R., Vink, R.L.J.M., Janssen, D.B., Witholt, B.: Appl. Environ. Microbiol. **55** (1989), 2819-2826.

Page, M.D., Anthony, C.: J. Gen. Microbiol. **132** (1986), 1553-1563.

Patel, R.N., Felix, A.: J. Bacteriol. **128** (1976), 413-424.

Patel, R.N., Hoare, D.S.: J. Bacteriol. **107** (1971), 187-192.

Patel, R.N., Hou, C.T., Felix, A.: J. Bacteriol. **133** (1978) 641-649.

Patel, R.N., Savas, J.C.: J. Bacteriol. **169** (1987), 2313-2317.

Phelps, P.A., Agarwal, S.K., Speitel, G.E., Georgiou, G.: Appl. Environ. Microbiol. **58** (1992), 3701-3708.

Pilkington, S.J., Dalton, H.: Meth. Enzymol. **188** (1990), 181-190.

Pilkington, S.J., Dalton, H.: FEMS Microbiol. Lett. **78** (1991), 103-108.

Poirier, Y., Nawrath, C., Somerville, C.: Bio/Technol. **13** (1995), 142-150.

Prior, S.D., Dalton, H.: J. Gen. Microbiol. **131** (1985), 155-163.

Quayle, J.A.: Adv. Microbiol. Physiol. **7** (1972), 19-203.

Quayle, J.A.: Meth. Enzymol. **90** (1982), 314-319.

Reeburgh, W.S., Whalen, S.C., Alpern, M.J., In: J.C. Murell, D.P. Kelley (ed.), Microbial growth on C_1 compounds. Intercept Press, Ltd., Andover, UK (1993), 1-14.

Reynolds, E.S.: J. Cell. Biol. **17** (1963), 208-213.

Ribbons, D.W., Micheaover, J.M.: FEBS Lett. **11** (1970), 41-44.

Roitsch, T., Stolp, H.: Arch. Microbiol. **143** (1985), 233-236.

Rokem, J.S., Goldberg, I., In: I. Goldberg, J.S. Rokem (eds.), Biology of Methylotrophs. Butterworth-Heinemann, Boston, London, Oxford, Singapore, Sidney, Toronto, Wellington (1991), 111-126.

Rosenzweig, A.C., Lippard, J.S.: Acc. Chem. Res. **27** (1994), 229-236.

Rosenzweig, A.C., Nordlund, P., Takahara, P.M., Frederick, C.A., Lippard, S.J.: Chemistry & Biology **2** (1995), 409-418.

Salisbury, S.A., Forrest, H.S., Cruse, W.B.T., Kennard, O.: Nature **280** (1979), 843.

Sambrock, J., Tritsch, E.F., Maniatis, T.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor Second Editon **3** (1989), 18.47-18.51.

Scott, D., Brannan, J., Higgins, I.J.: J. Gen. Microbiol. **125** (1981), 63-72.

Semrau, J.D., Christoserdov, A., Lebron, J., Costello, A., Davagnino, J., Kenna, E., Holmes, A.J., Finch, R., Murrell, J.C., Lidstrom, M.E.: J. Bacteriol. **177** (1995), 3071-3079.

Shah, N.N., Hanna, L.M., Taylor, R.T.: Biotechnol. Bioeng. **49** (1996), 161-171.

Shen, R.N., Yu, C.L., Ma, Q.Q., Li, S.B.: Arch. Biochem. Biophys. **345** (1997), 223-229.

Shiemke, A.K., Cook, S.A., Miley, M., Singleton, P.: Arch. Biochem. Biophys. **321** (1995), 421-428.

Shteinmann, A.A.: FEBS Lett. **362** (1995), 5-9.

Sly, L.I., Bryant, L.J., Cox, J.M., Anderson, J.M.: Appl. Microbiol. Biotechnol. **39** (1993), 400-404.

Smith, D.D.S., Dalton, H.: Eur. J. Biochem. **182** (1989), 668-671.

Smith, L.H., Kitanidis, P.K., McCarty, P.L.: Biotechnol. Bioeng. **53** (1997), 320-331.

Söhngen, N.L.: Parasitenkd. Infektionskr. **15** (1906), 513-517.

Sperl, G.T., Forrest, H.S., Gibson, D.T.: J. Bacteriol. **118** (1974), 541-550.

Steinbüchel, A.: Nachrichtenbl. Chem. Tech. Lab. **39** (1991), 1112-1124.

Stirling, D.I., Dalton, H.: J. Gen. Microbiol. **107** (1978), 19-29.

Stirling, D.I., Dalton, H.: Eur. J. Biochem. **96** (1979), 205-221.

Strøm, T., Ferenci, T., Quayle, J.R: Biochem. J. **144** (1974), 465-476.

Sullivan, J.P., Chase, H.A.: Appl. Microbiol. Biotechnol. **45** (1996), 427-433.

Tanizawa, K.: J. Biochem. **118** (1995), 671-678.

Torn, M.S., Chapin, F.S.: Chemosphäre **26** (1993), 357-368.

Towbin, H., Staehlin, T., Gordon, J.: Proc. Nat. Acad. Sci. **76** (1979), 4350-4354.

Toyama, H., Chistoserdova, L., Lidstrom, M.E.: Microbiology **143** (1997), 595-602.

Tsien, H.-C., Hanson, R.S.: Appl. Environ. Microbiol. **58** (1992), 953-960.

Tukhvatullin, I.A., Korshunova, L.A., Gvodzdev, R.I., Dalton, H.: Biochemistry (Moscow) **61** (1996), 886-891.

van der Meer, R.A., Groen, B.W., van Kleef, M.A.G., Frank, J., Jongejan, J.A., Duine, J.A.: Meth. Enzymol. **188** (1990), 260-283.

Wadzinski, A.M., Ribbons, D.W.: J. Bacteriol. **122** (1974), 1364-1374.

Wendlandt, K.-D., Brühl, E., Ambrosius J., Kranz, E., Karbaum, K., Lingner, G.: PS 148465 (1979).

Westermeier, R.: Electrophoresis in practice. Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo (1993).

Whalen, M.: Annu. Rev. Earth Planet. Sci. **21** (1993), 407-426.

Whalen, S.C., Reeburgh, W.S.: Nature **346** (1990), 160-162.

Whittenbury, R., Dalton, H., In: A. Hollaender, A.I. Laskin, P. Rogers (ed.), Basic Biology of New Developments in Biotechnology. New York: Plenum Press (1983), 439-460.

Whittenbury, R., Davies, S.L., Davey, J.F.: J. Gen. Microbiol. **61** (1970b), 219-226.

Whittenbury, R., Krieg, N.R., In: N.R. Krieg, J.G. Holt (ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams & Wilkins Co., Baltimore, **1** (1984), 256-262.

Whittenbury, R., Phillips, K.C., Wilkinson, J.F.: J. Gen. Microbiol. **61** (1970a), 205-218.

Wilson, J.T., Wilson, B.H.: Appl. Environ. Microbiol. **49** (1985), 242-243.

Yamanaka, K., Matsumoto, K.: Agric. Biol. Chem. **43** (1979), 1-7.

Zahn, J.A., DiSpirito, A.A.: J. Bacteriol. **178** (1996), 1018-1029.

Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Kleber und Herrn Prof. Stottmeister für die Überlassung des interessanten Themas, die ausgezeichnete fachliche Betreuung sowie die zahlreichen Anregungen bei der Anfertigung dieser Arbeit danken.

Ich danke allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, insbesondere Herrn Paller, für die fachliche und experimentelle Unterstützung.

Für die umfassende Unterstützung bei der Kultivierung der Mikroorganismen sowie für die Überlassung von umfangreicher Literatur danke ich Frau Dr. Wendlandt sowie ihren Mitarbeiterinnen Frau Rogge, Frau Oehme und Frau Knaak, Sektion Sanierungsforschung am Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH unter der Leitung von Herrn Prof. Stottmeister.

Ich danke Herrn Dr. Bär, Universitätsklinikum, Institut für Biochemie, für die Durchführung der N-terminalen Aminosäurebestimmungen.

Für die Unterstützung bei der Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen danke ich Herrn Dr. Hoheisel, Institut für Zoologie, und seinen Mitarbeiterinnen.

Bei Herrn Dr. Wagner sowie seiner Mitarbeiterin Frau Hahmann, Institut für Zoologie, möchte ich mich für die Hilfe bei der Gewinnung der monoklonalen Antikörper sowie den hilfreichen Diskussionen zu diesem Thema bedanken.

Für die Durchführung der Atomabsorptionsspektroskopie danke ich Herrn Dr. Wennrich und Herrn Steffen, Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Sektion Analytik.

Mein herzlicher Dank gilt Frau Dr. Vogel sowie Herrn Schwarz-Linek, Institut für organische Chemie, für die zeitweilige Möglichkeit der Nutzung eines Gaschromatographen sowie für die technische Hilfe bei der Gaschromatographie.

Weiterhin danke ich Herrn Beck, Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Sektion Sanierungsforschung, für die nutzbringenden fachlichen Diskussionen.

Für die Finanzierung des Projektes danke ich dem Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle.

UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH
Sektion Sanierungsforschung
Permoserstraße 15
D-04318 Leip zig
Telefon 0341/235-2220
Telefax 0341/235-2492