

4 Auf dem Weg zur Genetik von Methanbakterien

Thomas Leisinger, ETH Zürich

Methanbakterien sind Archaeobakterien. Eine der grundlegenden Erkenntnisse auf dem Gebiet der Biologie während der vergangenen zehn Jahre ist nicht schlagartig aufgrund einiger weniger genialer Experimente, sondern schrittweise, durch den Vergleich einer grossen Zahl von Untersuchungsergebnissen, gewonnen worden. Es handelt sich um die Entdeckung des Reichs der Archaeobakterien im Jahre 1978 durch C. Woese und Mitarbeiter. Diese Forschungsgruppe ist von der Überlegung ausgegangen, dass die heute lebenden Organismen Belege ihrer individuellen Entwicklungsgeschichte in der Struktur von essentiellen Zellbausteinen mit sich tragen und dass folglich die Verwandtschaftsbeziehungen zwischen Organismen durch die vergleichende Analyse eines ausgewählten, in allen lebenden Zellen vorkommenden Strukturelements offengelegt werden können. Die experimentelle Umsetzung dieses Gedankens war erfolgreich, weil mit der ribosomalen Ribonukleinsäure (16S rRNA bzw. 18S rRNA) ein geeignetes Molekül als Leitfossil für die entsprechenden Untersuchungen gewählt worden war. Bei der 16S rRNA handelt es sich um ein lineares Makromolekül, in dem vier verschiedene Grundbausteine (Nukleotide) in unterschiedlicher Folge aneinandergereiht sind. Sie kommt in allen Bakterienzellen als unbedingt notwendiger Bestandteil des Proteinsynthese-Apparats vor und enthält insgesamt ca. 1500 Nukleotid-Bausteine. Das entsprechende Molekül in den Zellen von höheren Organismen (Pilze, Pflanzen, Tiere) ist die 18S rRNA. Sie ist etwas grösser als die 16S rRNA, ist aber nach demselben Prinzip aufgebaut. Die Reihenfolge der Nukleotidbausteine in den rRNA's verschiedener Organismen variiert, weil jede Entwicklungslinie im Verlauf der Evolution ihre eigene Geschichte durchgemacht, d. h. eine andere Folge von Mutationen akkumuliert hat. Unterschiede in der Nukleotidsequenz der 16S rRNA bzw. der 18S rRNA geben somit Aufschluss über den Grad der Verwandtschaft zwischen den verschiedenen heute lebenden Organismen. Wichtig für die Brauchbarkeit der aufgrund von vergleichenden Untersuchungen an rRNA aufgestellten Stammbäume ist die Tatsache, dass sich die Nukleotidsequenz von rRNA im Verlauf der Entwicklungsgeschichte nur verhältnismässig langsam verändert hat. Sie ist, verglichen mit anderen Zellkomponenten, konservativ gehandhabt worden, und man stellt sich vor, dass der Grund für diese Beständigkeit in der Komplexität der Proteinsynthese liegt. Die Kompliziertheit dieses Prozesses hat wahrscheinlich dazu geführt, dass sich die an ihm beteiligten Komponenten im Verlauf der Evolution nur in kleinen Schritten über sehr grosse Zeiträume hinweg verändern konnten.

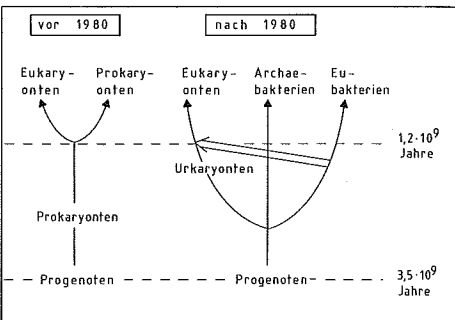


Bild 1 Vereinfachte Darstellung der Hypothesen über die frühe Evolution: Links, vor der Entdeckung der Archaeobakterien. Rechts, nach der Entdeckung der Archaeobakterien und ihrer Anerkennung als drittes Urreich der belebten Welt. Mit dem horizontalen Pfeil wird die Endosymbionten-Theorie angedeutet.

Ähnlichkeitsvergleiche zwischen rRNA's aus vielen verschiedenen Organismen haben gezeigt, dass einige Bakterien mit den normalen Bakterien (Eubakterien) und mit den untersuchten Zellen höherer Organismen (Eukaryonten) nur wenig verwandt sind, unter sich jedoch eine recht homogene Gruppe bilden. Diese eigenständige Gruppe von Bakterien wurde von Woese im Urreich der Archaeobakterien zusammengefasst und zwei anderen Urreichen der belebten Welt gegenübergestellt. Wie in Bild 1 schematisch dargestellt, hatten sich damit die Vorstellungen über die frühe

Evolution grundlegend geändert. Bisher wurden zwei Urreiche der Lebewesen unterschieden; Prokaryonten (Organismen ohne Zellkern, d. h. Bakterien) und Eukaryonten (Organismen mit Zellkern). Mit der Anerkennung der Archaeobakterien als selbständiges Urreich wurde die Gruppe der Prokaryonten zweigeteilt, so dass heute drei Urreiche, die Archaeobakterien, die Eubakterien und die Eukaryonten, unterschieden werden. Zu den Archaeobakterien gehören die Methanbakterien, die Halobakterien und die schwefelmetabolisierenden Archaeobakterien. Alle diese Organismen waren bereits vor der Schaffung des Archaeobakterien-Reichs bekannt. Ihre neuentdeckte Sonderstellung als abstammungsgeschichtlich eigenständige Gruppe hat das Interesse an ihrer Biochemie und ihrer Molekularbiologie belebt und bereits zu grundlegend neuen Einsichten geführt.

Methanbakterien sind strikte Anaerobier

In den letzten Jahren ist die Eigenständigkeit der Archaeobakterien durch den Nachweis einer Reihe von Besonderheiten in ihrer Zellstruktur weiter belegt worden. So ist die Chemie ihrer Zellwände und ihrer Membran-Lipide grundlegend verschieden vom chemischen Aufbau der entsprechenden Strukturen in Eubakterien. Auch der archaeobakterielle Proteinsynthese-Apparat unterscheidet sich stark vom eubakteriellen Gegenstück und weist eher eukaryontische Eigenschaften auf. Am auffallendsten jedoch sind die extremen Lebensbedingungen von Archaeobakterien in der Natur. Methanbakterien vermehren sich nur in komplett anaeroben Kompartimenten wie in Seesedimenten, in Sümpfen oder im Pansen von Wiederkäuern. Halobakterien benötigen Nährlösungen mit 15% bis 30% Kochsalz für optimales Wachstum, und gewisse schwefelmetabolisierende Archaeobakterien wachsen in 80° C heißen vulkanischen Quellen bei pH 1.0. Solche Bedingungen erinnern an Verhältnisse, wie sie in der Frühzeit der Erdgeschichte geherrscht haben. Die heutigen Archaeobakterien werden deshalb als direkte Nachfahren derjenigen Organismen angesehen, die vor einigen Milliarden Jahren auf der Erde vorgeherrscht haben. Ihr Überleben unter den heutigen Bedingungen auf der Erde haben sie sich durch Flucht in extreme ökologische Nischen gesichert.

Sauerstoff verhindert nicht nur das Wachstum der obligat anaeroben Methanbakterien, sondern tötet diese auch ab. Wegen ihrer Sauerstoffempfindlichkeit muss denn auch bei der Arbeit mit Methanbakterien ein erheblicher experimenteller Aufwand betrieben werden, um jeden Kontakt der Organismen mit Luftsauerstoff zu vermeiden. Dazu werden alle Manipulationen mit diesen Bakterien in einem Handschuhkasten vorgenommen, dessen Gasatmosphäre aus einem Stickstoff/Wasserstoff-Gemisch besteht und weniger als 10 ppm Sauerstoff enthält (Bild 2). Während die Züchtung von Methanbakterien in flüssigen Nährböden schon seit einiger Zeit recht gut beherrscht wird, bereitete es bis vor kurzem Schwierigkeiten, sie auf festen Nährböden zuverlässig zu kultivieren. Wir haben uns deshalb mit der Ausarbeitung von Methoden befasst, die gewährleisten, dass jede auf eine Agaroberfläche gebrachte Bakterienzelle zu einer sichtbaren Kolonie auswächst. Eine quantitative anaerobe Plattierungstechnik war Voraussetzung für geplante genetische Arbeiten mit Methanbakterien und erlaubte es, den Einfluss von mutagenen Agenzien, von UV-Strahlung, von Wachstumsinhibitoren und von Sauerstoff auf das Überleben der Organismen zu untersuchen.

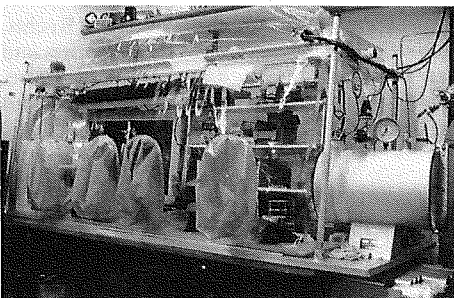


Bild 2 Anaerobenkammer zur Manipulation von Methanbakterien in einer sauerstofffreien Gasatmosphäre.

Als Beispiel ist in Bild 3 ein Experiment dargestellt, in dem die Sauerstoffempfindlichkeit einiger Methanbakterien geprüft worden ist. Es scheint, dass recht grosse Unterschiede in bezug auf die Sauerstoff-Toleranz verschiedener Stämme bestehen. Während Vertreter der Gattung *Methanococcus* unmittelbar nach dem Kontakt mit Sauerstoff exponentiell abgetötet wurden, ertrugen andere Methanbakterien den Kontakt mit Luftsauerstoff über mehrere Stunden, ohne Schaden zu leiden. Die biochemische Erklärung für dieses unterschiedliche Verhalten steht noch aus, der selektive Vorteil begrenzter Sauerstoff-Toleranz für die Besiedlung neu entstandener anaerober Ökosysteme durch Methanbakterien liegt jedoch auf der Hand.

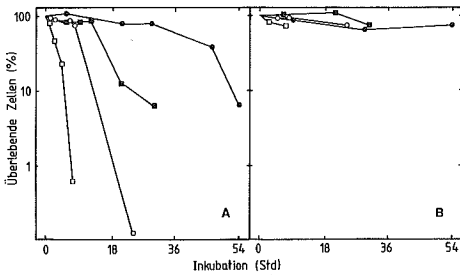
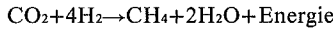


Bild 3 Sauerstoff-Empfindlichkeit von Methanbakterien. Anaerob geerntete Zellen wurden gewaschen und während verschiedener Zeiten in Luft (A) oder in einem Gemisch von 80% N₂ und 20% CO₂ (B) gehalten. *Methanosarcina barkeri*; *Methanobrevibacter arboriphilus*; *Methanobacterium thermoautotrophicum*; *Methanococcus vannielii*.

Methanbakterien produzieren Biogas

Fast alle Methanbakterien können mit Wasserstoff als Energiequelle und CO₂ als Kohlenstoffquelle wachsen und gleichzeitig Methan bilden. Die Summengleichung der entsprechenden Stoffwechselreaktion lautet:



Einige Arten von Methanbakterien verwerten neben CO₂ auch andere Verbindungen wie Ameisensäure, Methanol, Methylamin, Kohlenmonoxid und Essigsäure für Wachstum und Methanbildung. Methanbildung als energieliefernder Prozess kommt einzig bei Methanbakterien vor. Die Biochemie dieses Vorgangs wird zur Zeit intensiv bearbeitet. Gewisse Teilschritte der Methanogenese werden bereits verstanden, andere müssen noch identifiziert und charakterisiert werden. Die bisherigen Arbeiten über den Mechanismus der Methanbildung haben zur Entdeckung einer Reihe von neuen Cofaktoren (Elektronenüberträger und Überträger von C1-Einheiten) geführt, die noch in keinem anderen biologischen System beobachtet worden sind.

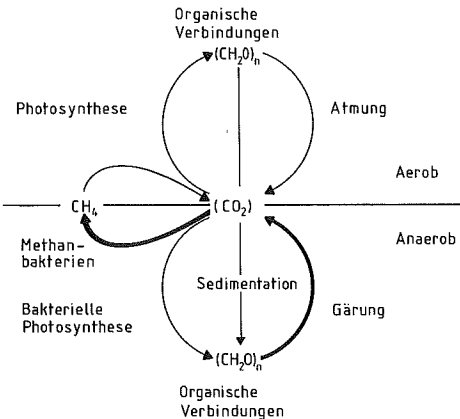


Bild 4 Schema des Kohlenstoff-Kreislaufs in der Natur. Methanbakterien sind – zusammen mit gärenden Mikroorganismen – am Abbau von organischer Substanz unter anaeroben Bedingungen beteiligt (dick ausgezogene Linie). Das dabei gebildete Methan wird durch Methanoxidierende Bakterien sowie durch photochemische Oxidation zu CO₂ umgewandelt.

Die Bedeutung der Methanbildung in der Umwelt wird aus dem in Bild 4 dargestellten Kreislauf des Kohlenstoffs deutlich. Organisches Material wie Kohlenhydrate, Eiweisse und Fette, das durch Sedimentation in anaerobe Kompartimente gelangt (auch Hausmüll in geordneten Depo-nien), wird durch eine Vielfalt von gärenden Mikroorganismen zuerst in einfache Bruchstücke und dann zu Kohlendioxid, Wasserstoff und Essigsäure abgebaut. Der gebildete Wasserstoff übt dabei starke Produkthemmung aus und muss, soll der komplexe anaerobe Abbauprozess nicht zum Erliegen kommen, aus dem System entfernt werden. Die wichtige Funktion der Entfernung von Wasserstoff erfüllen die Methanbakterien, die damit eine hohe Abbauproduktivität von anaeroben Systemen ermöglichen bzw. einen wesentlichen Beitrag zur Aufrechterhaltung des Kohlenstoff-Kreislaufs leisten. Es leuchtet ein, dass Methanbakterien in der Natur immer mit gärenden Mikroorganismen vergesellschaftet sind, die ihnen Kohlendioxid und Wasserstoff oder auch Essigsäure als Wachstumssubstrate zuführen (Bild 5). Unter Laborbedingungen dagegen können Methanbakterien auf einem Gemisch von 20% CO₂ und 80% H₂ in Reinkultur gezüchtet werden. Bei der biotechnologischen Nutzung von Methanbakterien stand bis zum Beginn der siebziger Jahre die sogenannte Stabilisierung von Klärschlamm, d. h. der anaerobe Abbau dieser Abfall-Biomasse in Faultürmen, im Vordergrund. Das dabei anfallende Biogas, ein Gemisch aus unge-fähr 60% Methan, 40% Kohlendioxid und Spuren von Schwefelwasserstoff, wurde als Nebenpro-duk-t betrachtet. In den vergangenen zehn Jahren sind bedeutende Anstrengungen unternommen worden, die anaerobe Vergärung von Biomasse bezüglich Biogasproduktion zu optimieren und diese saubere, erneuerbare Energiequelle rationell zu nutzen. Diese Entwicklung äussert sich bei-spielsweise darin, dass in der Schweiz zwischen 1976 und 1984 etwa 130 Biogasanlagen auf landwirtschaftlichen Betrieben errichtet worden sind. Neuerdings zeichnet sich ab, dass ein ratio-neller Betrieb von anaeroben Abbau-Systemen dann gewährleistet ist, wenn industrielles Abwas-ser mit hohem Gehalt an organischer Substanz als Ausgangsmaterial eingesetzt werden kann. Bei der Kostenberechnung können dann sowohl der Reinigungseffekt als auch die Biogasproduktion positiv veranschlagt werden.

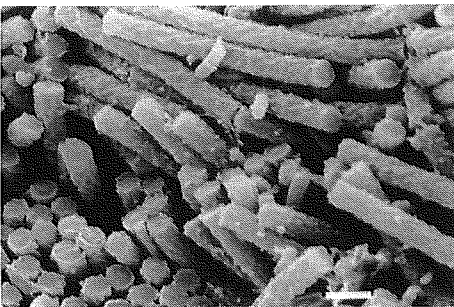


Bild 5 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von *Methanotherix soehngenii*, einem langsam wachsenden Acetat-verwertenden Methanbakterium. Der an der EAWAG entdeckte Organismus spielt eine entscheidende Rolle beim anaeroben Abbau von organischem Abfallmaterial. (Die Länge des Balkens beträgt 1µ. Foto: Prof. A. Zehnder, Agricultural University of Wageningen.)

Wie ist das Genom von Methanbakterien organisiert?

Verhältnismässig jung und von aktuellem Interesse ist die Erforschung des genetischen Materials von Methanbakterien. Weil Methanbakterien zu den Archaeobakterien gehören, interessiert es, ob ihre Eigenständigkeit auch an einer gegenüber Eubakterien und Eukaryonten verschiedenen Organisation des genetischen Materials zu erkennen ist. Besteht das Genom von Methanbakterien wie dasjenige von Eubakterien aus einem Hauptanteil chromosomaler DNA und verschiedenen nicht-essentiellen extrachromosomalen Elementen? Sind Gene für physiologisch verwandte Funktionen wie bei Eubakterien aneinandergrenzend angeordnet? Welche Code-Wörter werden in Methanbakterien bei der Ablesung genetischer Information verwendet? Wie unterscheidet sich die Basensequenz von ausgewählten Genen in Methanbakterien von der Basensequenz der entsprechenden Gene in Eubakterien und Eukaryonten? Es ist zu erwarten, dass die Beantwortung solcher Fragen zu einem besseren Verständnis der Verwandtschaftsbeziehungen zwischen Vertretern der drei Urreiche führt.

Bisher steht fest, dass Methanbakterien denselben genetischen Code wie die übrigen Organismen benutzen und dass die Menge von genetischer Information pro Zelle bei verschiedenen Methanbakterien etwa halb so gross ist wie im typischen Eubakterium *Escherichia coli*. Wie bei Eubakterien ist auch bei einem Methanbakterium eine Insertionssequenz (ein transponierbares genetisches Element) gefunden worden. Sie ist befähigt, in eine Reihe von Genen hineinzuspringen und dadurch laufend Änderungen in der Genomstruktur zu verursachen. Der Beitrag unseres Labors zur Charakterisierung der Genomorganisation von Methanbakterien hat bisher in der Isolierung und Charakterisierung eines extrachromosomalen Elements aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* bestanden. Es handelt sich um pME2001, ein kleines Plasmid vom Molekulargewicht 3×10^6 , das in jeder Zelle in vielen Kopien vorkommt, dessen Funktion jedoch (noch) nicht bekannt ist (Bild 6). Wir hoffen, dass das Plasmid pME2001 in Zukunft zur Einführung von DNA-Stücken in Methanbakterien verwendet werden kann. Deshalb haben wir entsprechende DNA-Vehikel, sogenannte Klonierungsvektoren, konstruiert, die auf pME2001 aufgebaut sind.

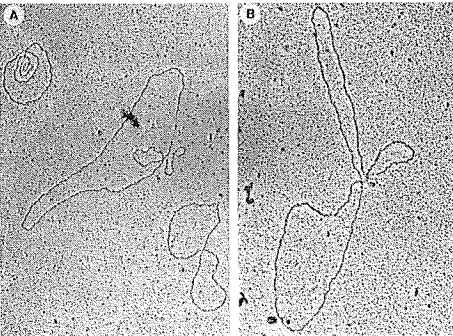


Bild 6 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Plasmid pME2001 aus *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Das Plasmid bildet Multimere, wobei in A zwei Monomere und ein Dimer, in B ein Trimer zu erkennen sind. (Aufnahme: Dr. D. Studer, Servicelabor für Elektronenmikroskopie, Institut für Zellbiologie ETH)

Neben diesem Plasmid sind neuerdings auch Methanbakterien-spezifische Bakteriophagen gefunden worden. Die Erscheinungsform des genetischen Materials von Archaeobakterien umfasst also dieselben Kategorien wie in anderen Organismen, nämlich Chromosom, Plasmide, Viren und transponierbare genetische Elemente.

Lässt sich genetisches Material in Methanbakterien einführen?

Neben der Charakterisierung des genetischen Materials müssen auch Methoden entwickelt werden, die es ermöglichen, Gene von Methanbakterien zu manipulieren, und die – zusammen mit biochemischen Methoden – zur genauen Abklärung der besonderen Stoffwechselleistungen von Methanbakterien eingesetzt werden können. Man kann erwarten, dass am zentralen Stoffwechselprozess der Methanbildung eine grosse Zahl verschiedener Gene beteiligt ist. Um diese zu identifizieren, ihre Funktion in der richtigen zellulären Umgebung zu prüfen und ihre Anordnung auf dem Genom zu bestimmen, muss eine eigentliche Genetik für ein ausgewähltes Methanbakterium entwickelt werden. Kernstück jeder Genetik ist ein Prozess, mit dem DNA von einem Spenderstamm auf einen Empfänger übertragen werden kann, sei es durch direkten Zellkontakt (Konjugation) oder in Hüllen von Bakteriophagen (Transduktion) oder als nackte DNA (Transformation). Wir haben uns deshalb zum Ziel gesetzt, eine Methode für die Transformation von *Mb. thermoautotrophicum* zu entwickeln.

Zunächst wurde nach Mutanten gesucht, mit denen sich die Übertragung von genetischem Material nachweisen lässt. Der archaeobakterielle Aufbau der Zellen von Methanbakterien erschwert die Gewinnung von geeigneten Resistenzmutanten, weil die Zielstellen der meisten gegen Eubakterien und Eukaryonten wirksamen Antibiotica und Hemmstoffe in Methanbakterien nicht vorhanden oder unempfindlich sind. Unter rund 50 geprüften Antibiotica und Hemmstoffen haben wir bisher ein einziges Antibioticum gefunden, das gegen *Mb. thermoautotrophicum* wirkt und

mit dem sich geeignete Resistenzmutanten gewinnen lassen. Auch bei der Suche nach wachsstoff-abhängigen (auxotrophen) Mutanten von Methanbakterien stösst man auf Schwierigkeiten. Sie liegen darin begründet, dass diese Bakterien keine Mechanismen für den aktiven Transport von Wuchsstoffen wie Aminosäuren und Vitaminen aus dem umgebenden Medium in die Zelle besitzen. Wir haben aber beobachtet, dass Aminosäuren und Vitamine mit lipophilem Charakter, wenn sie in hohen Konzentrationen angeboten werden, die Zellmembran von *Mb. thermoautotrophicum* mittels passiver Diffusion durchdringen. Diese Tatsache konnte zur Gewinnung von verschiedenen wachsstoffabhängigen Mutanten des Organismus ausgenutzt werden (Bild 7).

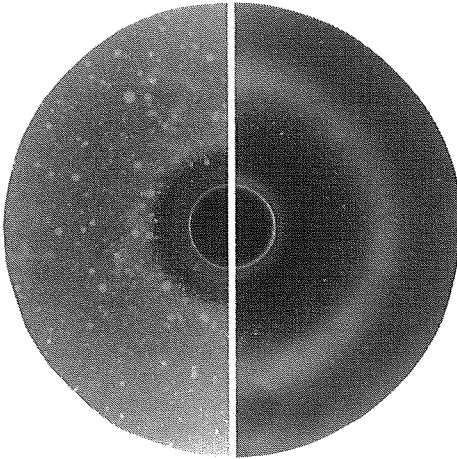


Bild 7 Wachstumsverhalten einer Adenosin-bedürftigen Mutante von *Methanobacterium thermoautotrophicum*. In die Mitte von Petrischalen mit Minimal-Agar ist ein Filterpapierblättchen mit 1 mg Adenosin aufgelegt worden. Auf der linken Hälfte ist das gleichmässige Wachstum des Adenosin-unabhängigen Wildtyps gezeigt. Rechts ist die Adenosin-abhängige Mutante eingesät worden, die nur in einem engen Konzentrationsbereich von Adenosin zu wachsen imstande ist.

Im weiteren geht es nun um die Ausarbeitung einer Methode für die Transformation von *Mb. thermoautotrophicum*. Dabei wird versucht, auxotrophe Empfängerzellen mit klonierter DNA aus dem wachsstoffunabhängigen Wildtyp zu Wuchsstoff-Unabhängigkeit zu transformieren. Erfahrungsgemäss kann die Ausarbeitung von Bedingungen, unter denen Transformation mit DNA gelingt, lange dauern. Empfängerzellen nehmen nur in einem ganz bestimmten physiologischen Zustand, den es empirisch zu finden gilt, nackte DNA auf. Ist die Hürde der Transformation einmal genommen, so eröffnen sich neue Perspektiven für die Analyse des archaebakteriellen Genoms, für das Studium des einzigartigen Stoffwechsels von Methanbakterien und möglicherweise auch für die gezielte Verbesserung von Eigenschaften, die bei der Nutzung dieser Organismen in der Abwasserreinigung und bei der Biogasproduktion von Bedeutung sind.