

## Summary

This thesis describes the results of spectroscopic investigations, with a focus on X-ray absorption spectroscopy, on the three oxygen-tolerant Ni-Fe hydrogenases from *Ralstonia eutropha*. A general introduction to hydrogenases and to the XAS technique is given in **Chapter 1**. A basic characterization of the metal cofactors with respect to structural and redox features in the catalytic cycle has been achieved. The main results are summarized as follows.

In **Chapter 2** the results of the characterization of the particularly complex NAD<sup>+</sup>-reducing soluble hydrogenase (SH) are shown. XAS investigations revealed the presence of a non-standard Ni-Fe site in the SH where the Ni is not only coordinated by four thiols from cysteines, but presumably also by oxygen atoms from sulfenates. Activation of the SH for H<sub>2</sub> catalysis involves removal of an oxygen species from Ni. At the then vacant coordination site, hydrogen species may bind. A tentative reaction scheme for activation and H<sub>2</sub> turnover is presented which comprises the available information from XAS, EPR, and FTIR. The absence of EPR-detectable Ni(III) states points to an unusual catalytic pathway for H<sub>2</sub> oxidation in the SH. Possible reasons for the O<sub>2</sub>-tolerance of the SH are discussed.

To dwell on the apparent structural flexibility of the Ni-Fe site in the SH, a specific mutant, H16L, has been investigated. This protein shows a bias from H<sub>2</sub>-cleavage to –production (**Chapter 3**). XAS, EPR, and FTIR results revealed that in the mutant, the Ni-Fe site is modified compared to the wildtype, towards a more standard-like configuration. In addition, in these investigations two pathways of electron transfer in the enzyme were unraveled. Reductive activation of the SH involves a [2Fe-2S] cluster in the HoxU subunit, whereas electron transfer out of the Ni-Fe site occurs via a [4Fe-4S] cluster in HoxY. These findings are related to the catalytic activity of the SH in the presence of oxygen.

The regulatory hydrogenase (RH) functions as a H<sub>2</sub>-sensor. Previous studies pointed to the presence of unusual Fe-S clusters in this enzyme. In **Chapter 4**, XAS investigations at the Fe K-edge are presented, which allowed monitoring the EPR-invisible reduction of Fe-S clusters in the RH and their structural characterization. The XAS data point to the presence of two [2Fe-2S] clusters and to one [4Fe-3S-3O] cluster in the RH. The reduction of these Fe-S clusters may be the first step in H<sub>2</sub>-sensing and initiate the signal transduction chain, leading to the expression of the energy converting Ni-Fe hydrogenases in *R. eutropha*.

Advanced microbiology techniques have allowed isolating the large subunit of the RH. Thereby, for the first time XAS investigations not only on the Ni, but also on the Fe of the Ni-Fe site have become feasible (**Chapter 5**). Two populations of the enzyme have been characterized. In one of these, the Ni is absent, but the Fe is present, carrying its

one CO and two CN ligands. These results provide good evidence that the Fe with its diatomic ligands first is assembled into the Ni-Fe binding site during the sophisticated maturation process.

The membrane-bound hydrogenase (MBH) recently has gained much interest because it is promising for biotechnological applications. In **Chapter 6**, the first XAS results and EPR investigations on the metal cofactors in this enzyme are presented. In comparison, the standard-hydrogenase of *D. gigas* has been studied. Pronounced differences in the structures of the Ni-Fe site and the Fe-S clusters in the MBH compared to *D. gigas* were uncovered which may be related to the oxygen-tolerant catalytic behavior of the MBH.

**Chapter 7** provides a comprehensive overview of the spectroscopic results on the four hydrogenases investigated in this thesis. The obtained results are evaluated critically. The current information on the basis of the available spectroscopic information is condensed into tentative reaction schemes of the structural organization, relative positioning of cofactors in the protein, and sequence of redox events in the catalytic cycle of the three hydrogenases of *R. eutropha*. It is emphasized that further experiments can be designed and are required to clarify the particular reasons, at the atomic level, for oxygen-tolerant hydrogen catalysis.

## Zusammenfassung

Diese Arbeit beschreibt die Ergebnisse der spektroskopischen Untersuchungen an den drei sauerstofftoleranten Ni-Fe-Hydrogenasen von *Ralstonia eutropha* mit einem Schwerpunkt auf Röntgenabsorptionsspektroskopie. Eine allgemeine Einführung in Hydrogenasen und die XAS-Technik wird in **Kapitel 1** gegeben. Die metallischen Kofaktoren wurden hinsichtlich ihrer Struktur- und Redox-Eigenschaften im katalytischen Zyklus charakterisiert. Die wichtigsten Ergebnisse werden im Folgenden zusammengefasst.

In **Kapitel 2** werden die Ergebnisse der Charakterisierung der besonders komplexen  $\text{NAD}^+$ -reduzierenden, löslichen Hydrogenasen (SH) gezeigt. XAS-Untersuchungen belegen die Anwesenheit eines nicht-standard Ni-Fe-Zentrums in der SH, in der das Ni nicht nur von vier Thiol-Gruppen der konservierten Zysteine koordiniert wird, sondern vermutlich auch von Sauerstoffatomen von Sulfenaten. Für die Aktivierung der SH für die  $\text{H}_2$ -Katalyse ist die Entfernung einer Sauerstoff-Spezies am Nickel entscheidend. An der freiwerdenden Koordinationsstelle könnte eine Wasserstoff-Spezies binden. Ein vorläufiges Reaktionsschema für die Aktivierung und den  $\text{H}_2$ -Umsatz, welches die vorhandenen Ergebnisse von XAS und EPR zusammenfasst, wird vorgestellt. Die Abwesenheit von EPR-detektierbaren Ni(III)-Zuständen deutet auf einen ungewöhnlichen Reaktionsweg der  $\text{H}_2$ -Oxidation in der SH hin. Mögliche Gründe für die  $\text{O}_2$ -Toleranz der SH werden diskutiert.

Um die offensichtliche strukturelle Flexibilität des Ni-Fe-Zentrums in der SH näher zu beleuchten, wurde eine spezielle Mutante (H16L) untersucht. Dieses Protein zeigt eine Präferenz für Wasserstoffherzeugung und nicht für Wasserstoffspaltung wie der Wildtyp (**Kapitel 3**). XAS-, EPR- und FTIR-Ergebnisse zeigen, dass das Ni-Fe-Zentrum in der Mutante verglichen mit dem Wildtyp eher eine Standardkonfiguration einnimmt. Zusätzlich wurden in diesen Untersuchungen zwei Elektronentransfer-Pfade im Enzym aufgedeckt. Bei der reduktiven Aktivierung der SH ist ein  $[\text{2Fe-2S}]$ -Cluster in der HoxU-Untereinheit involviert, wohingegen der Elektronentransfer aus dem Ni-Fe-Zentrum über einen  $[\text{4Fe-4S}]$ -Cluster in der HoxY-Untereinheit geschieht. Diese Erkenntnisse werden mit der katalytischen Aktivität der SH in Anwesenheit von Sauerstoff verknüpft.

Die regulatorische Hydrogenase (RH) ist ein  $\text{H}_2$ -Sensor. Frühere Studien deuten darauf hin, dass das Enzym ungewöhnliche Fe-S-Cluster enthält. In **Kapitel 4** werden XAS-Untersuchungen vorgestellt, die es ermöglichen, die durch EPR nicht detektierbare Reduktion von Fe-S-Clustern in der RH zu beobachten und sie strukturell zu charakterisieren. Die XAS-Daten deuten auf zwei  $[\text{2Fe-2S}]$ - und einen  $[\text{4Fe-3S-3O}]$ -

Cluster in der RH hin. Die Reduktion dieser Fe-S-Cluster könnte der erste Schritt in der Reaktionskaskade der H<sub>2</sub>-Detektion sein und außerdem am Beginn der Signalübertragungskette stehen, welche zur Expression der energieumwandelnden Ni-Fe-Hydrogenasen in *R. eutropha* führt.

Fortgeschrittene mikrobiologische Techniken ermöglichten die Isolation der großen Untereinheit der RH. Dadurch wurden erstmalig XAS-Untersuchungen nicht nur am Ni, sondern auch am Fe des Ni-Fe-Zentrums möglich (**Kapitel 5**). Charakterisiert wurden zwei Populationen des Enzyms, wobei in einer das Ni fehlt, aber das Fe mit seinen zwei CN- und einem CO-Liganden bereits vorhanden ist. Diese Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass das Fe mit seinen zweiatomigen Liganden während des komplizierten Reifungsprozesses zuerst in der Ni-Fe-Bindestelle eingebaut wird.

Die membrangebundene Hydrogenase (MBH) hat in letzter Zeit viel Aufmerksamkeit auf sich gezogen, da sie vielversprechend für biotechnologische Anwendungen ist. In **Kapitel 6** werden die ersten XAS-Ergebnisse und EPR-Untersuchungen der metallischen Kofaktoren in diesem Enzym vorgestellt. Zum Vergleich wurde die Standard-Hydrogenase aus *D. gigas* untersucht. Ausgeprägte Unterschiede in den Strukturen des Ni-Fe-Zentrums und der Fe-S-Cluster in der MBH im Vergleich zu *D. gigas* wurden ermittelt. Diese könnten das sauerstofftolerante katalytische Verhalten der MBH determinieren.

**Kapitel 7** gibt einen zusammenfassenden Überblick über die spektroskopischen Ergebnisse zu den vier Hydrogenasen, die in dieser Arbeit untersucht wurden. Die erhaltenen Resultate werden kritisch diskutiert. Die spektroskopischen Ergebnisse und weitere Informationen werden in vorläufigen Reaktionsmodellen zusammengefasst, die die strukturelle Organisation, die relative Anordnung der Kofaktoren im Protein und die Sequenz der Redoxreaktionen im katalytischen Zyklus der drei Hydrogenasen von *R. eutropha* enthalten. Weitere Experimente sollten durchgeführt werden und sind notwendig, um die spezifischen Grundlagen, auf atomarer Ebene, für die sauerstofftolerante Wasserstoffkatalyse zu klären.

## List of Publications

### a) Publications in Scientific Journals

T. Burgdorf, S. Löscher, P. Liebisch, E. van der Linden, M. Galander, F. Lendzian, S. P. Albracht, W. Meyer-Klaucke, B. Friedrich, H. Dau, M. Haumann

**Structural and oxidation state changes at its non-standard Ni-Fe site during activation of the NAD-reducing hydrogenase from *Ralstonia eutropha* detected by X-ray absorption, EPR, and FTIR spectroscopy**

*J. Am. Chem. Soc.* 127, 576-592 (2005)

T. Buhrke, S. Löscher, E. Schlodder, I. Zebger, L. K. Andersen, P. Hildebrandt, W. Meyer-Klaucke, H. Dau, B. Friedrich, M. Haumann

**Reduction of unusual iron-sulfur clusters in the H<sub>2</sub>-sensing regulatory Ni-Fe hydrogenase from *Ralstonia eutropha***

*J. Biol. Chem.* 280, 19488-19495 (2005)

S. Löscher, T. Burgdorf, T. Buhrke, B. Friedrich, H. Dau, M. Haumann

**Non-standard structures of the Ni-Fe cofactor in the regulatory and in the NAD-reducing hydrogenase from *Ralstonia eutropha***

*Biochem. Soc. Trans.* 33, 25-27 (2005)

S. Löscher, I. Zebger, L. K. Andersen, P. Hildebrandt, W. Meyer-Klaucke, M. Haumann

**The structure of the Ni-Fe site in the isolated HoxC subunit of the hydrogen sensor from *Ralstonia eutropha***

*FEBS lett.* 579, 4287-4291 (2005)

S. Löscher, T. Burgdorf, I. Zebger, P. Hildebrandt, H. Dau, B. Friedrich, M. Haumann

**Bias from H<sub>2</sub>-cleavage to -production and coordination changes at the Ni-Fe active site in the NAD<sup>+</sup>-reducing hydrogenase from *Ralstonia eutropha***

*Biochemistry* 45, 11658-11665 (2006)

M. Haumann, M. Barra, P. Loja, S. Löscher, Krivanek, A. Grundmeyer, L.-E. Andreasson, H. Dau

**Bromide Does Not Bind to the Mn<sub>4</sub>Ca Complex in Its S<sub>1</sub> State in Cl<sup>-</sup>-Depleted and Br<sup>-</sup>-Reconstituted Oxygen-Evolving Photosystem II: Evidence from X-ray Absorption Spectroscopy at the Br K-Edge**

*Biochemistry* 45, 13101-13107 (2006)

S. Löscher, M. Ludwig, A. De Lacey, B. Friedrich, H. Dau, M. Haumann

**Characterization of the Ni-Fe active site and the Fe-S clusters of the membrane-bound hydrogenase from *Ralstonia eutropha* by X-ray absorption spectroscopy**

Manuscript to be submitted

S. Löscher, L. Schwartz, M. Stein, S. Ott, M. Haumann

**Facilitated formation of a bridging-hydride binding site by azadithiolate protonation in an Fe-Fe hydrogenase active-site biomimetic**

Manuscript to be submitted

**b) Further Publications**

S. Löscher, H. Dau, M. Haumann

**Hydrogen is the fuel: Catalysis at nickel-iron active sites of hydrogenases tracked by X-ray absorption spectroscopy**

Research with Synchrotron Radiation (2006) , Freie Universität Berlin, Shaker Verlag,

P. Loja, M. Barra, S. Löscher, O. Kirilenko, P. Liebisch, M. Mertin, F. Schäfers, M. Haumann, H. Dau

**X-ray absorption spectroscopy to study catalytic metal centers: A new BioXAS experiment at BESSY beamline KMC-I**

Research with Synchrotron Radiation (2006) , Freie Universität Berlin, Shaker Verlag

M. Haumann, P. Liebisch, M. Barra, P. Loja, S. Löscher, O. Kirilenko, M. Mertin, Schäfers, A. Magnusson, M. Anderlund, S. Ott, H. Dau

**Chemical mimics for small-molecule catalysis by proteins investigated by X-ray absorption spectroscopy**

Research with Synchrotron Radiation (2006), Freie Universität Berlin, Shaker Verlag

**c) Annual Reports**

S. Löscher, T. Buhrke, T. Burgdorf, W. Meyer-Klaucke, B. Friedrich, H. Dau, M. Haumann

**The Ni-Fe and Fe-S cofactors of oxygen-insensitive hydrogenases from *Ralstonia eutropha* studied by Ni and Fe XAS**

EMBL Annual Report 2004

S. Löscher, O. Lenz, W. Meyer-Klaucke, B. Friedrich, H. Dau, M. Haumann

**The membrane-bound [NiFe] hydrogenase of *Ralstonia eutropha* studied by XAS**

EMBL Annual Report 2005

P. Loja, M. Barra, S. Löscher, P. Liebisch, M. Mertin, F. Schäfers, M. Haumann, H. Dau

**EXAFS on ultra-dilute biological samples and model compounds at beamline KMC-1**

BESSY Annual Report 2005

S. Löscher, O. Lenz, M. Ludwig, H. Dau, B. Friedrich, M. Haumann

**Oxygen sensitive mutants of the oxygen tolerant [NiFe] hydrogenases from *Ralstonia eutropha* studied by XAS**

EMBL Annual Report 2006

S. Löscher, A. De Lacey, M. Haumann

**Active and inactive states of the Ni-Fe hydrogenase of *Desulfovibrio gigas* studied by XAS**

EMBL Annual Report 2006

**d) Contributions to Scientific Conferences**

S. Löscher, T. Burgdorf, P. Liebisch, E. van der Linden, S. P. J. Albracht, W. Meyer-Klaucke, B. Friedrich, H. Dau, M. Haumann

**Spectroscopic Characterization of Oxygen-Insensitive [NiFe] Hydrogenases**

International Conference on Hydrogenases, Reading, UK (2004) Poster

S. Löscher, T. Buhrke, B. Friedrich, H. Dau, M. Haumann

**BioXAS at the Ni and Fe K-Edges on the Regulatory H<sub>2</sub>-Sensing Ni-Fe Hydrogenase from *Ralstonia eutropha***

COST Meeting on Hydrogenases, Porto, Portugal (2005) Poster

S. Löscher, H. Dau, M. Haumann

**The Ni-Fe and Fe-S Sites in the H<sub>2</sub>-Sensing Regulatory Hydrogenase from *Ralstonia eutropha* studied by Ni and Fe XAS**

EMBO Workshop: BioXAS on metalloproteins and organism tissue, Hamburg, Germany (2005) Poster

S. Löscher, T. Buhrke, T. Burgdorf, O. Lenz, H. Dau, B. Friedrich, M. Haumann

**The Ni-Fe Site of O<sub>2</sub>-Tolerant Hydrogenases: Variations on a Common Theme**

ICBIC-12, Ann Arbor; M, USA (2005) Poster

S. Löscher, M. Haumann

**Characterization of Oxygen-Insensitive Ni-Fe Hydrogenases from *Ralstonia eutropha* by X-ray absorption spectroscopy**

EUROBIC-8, Aveiro, Portugal (2006) Poster

S. Löscher, M. Haumann

**Bias from H<sub>2</sub>-cleavage to -production and coordination changes at the Ni-Fe active site in the NAD<sup>+</sup>-reducing hydrogenase from *Ralstonia eutropha***

2<sup>nd</sup> Intern. IMBG Meeting on Metals in Biocatalysis, Autrans, France (2006) Poster

S. Löscher, H. Dau, M. Haumann

**Oxygen-Insensitive [NiFe] Hydrogenases Studied by X-ray Absorption Spectroscopy**

Physikerinnentagung, Darmstadt, Germany (2005) Poster



## Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich ganz besonders herzlich bei Priv.-Doz. Dr. Michael Haumann für die intensive Betreuung und Unterstützung meiner Arbeit bedanken. Die Zusammenarbeit, u.a. bei den zahlreichen Messterminen am Synchrotron, war sehr lehrreich für mich und wir entwickelten unkonventionelle Lösungsmöglichkeiten für diverse „Hard“- und „Software“-Probleme. Prof. Holger Dau danke ich für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe zu erstellen. Er ließ mir Platz für eigenständiges Arbeiten, hatte aber immer Zeit für Diskussionen und Beratung. Dank vielfältiger Kooperationen konnte ich mit verschiedenen nationalen und internationalen wissenschaftlichen Gruppen interdisziplinär zusammenzuarbeiten. Ihm und Michael Haumann danke ich dafür, dass ich in meiner Zeit an der FU die Möglichkeit bekommen habe, meine Arbeit auf interessanten Konferenzen vorzustellen und mir auf diese Weise ein Blick über den Tellerrand ermöglicht wurde.

Weiterhin möchte ich Herrn Prof. Dietmar Stehlik für die Übernahme des Zweitgutachtens danken, der diese Arbeit zusätzlich zu seinen intensiven Arbeitsaufgaben übernommen hat.

Bei den Mitarbeitern in meiner ersten Zeit an der FU möchte ich mich bedanken: Peter führte mich in die Praxis und Theorie von EXAFS ein, Claudia unterstützte mich bei den AAS-Messungen und Monika Fünning war zu jeder Zeit eine große Hilfe. Ganz besonders weiß ich das freundschaftliche Arbeitsklima in unserer Arbeitsgruppe zu schätzen. Mein außerordentlich herzlicher Dank gilt Joachim, der gerade in der Endphase meiner Arbeit eine große Hilfe war und auf den ich mich jederzeit verlassen konnte, sowie den Kollegen und Freunden, mit denen ich das Zimmer geteilt habe. Die harmonische Zeit dort mit Björn, Roland, Alexander und später André, trotz unterschiedlicher Arbeitsgebiete, hat meine Arbeit positiv beeinflusst. Außerdem danke ich den weiteren Diplomanden Jörg, Andreas, Martin, Boris, Georg und unserem Neuzugang Kerstin, die meinen Arbeitsalltag bereicherten.

Mein herzlicher Dank gilt Sylvia Luther, die mich in vielerlei Hinsicht mit Rat und Tat unterstützt hat. Barbara Sandow möchte ich danken, dass sie eine angenehme Atmosphäre für die Mitarbeiterinnen am Institut geschaffen und uns mit viel Leidenschaft unterstützt hat. Marion Badow war mir eine große Hilfe in allen administrativen Fragen.

Prof. Robert Bittl möchte ich für die Benutzung des EPR-Gerätes danken und seinen Mitarbeitern Dr. Chris Kay und Sven Keßen für die gute Zusammenarbeit bei den dortigen Messungen.

Die Grundlage für diese Arbeit beruhte auf der Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Bärbel Friedrich (HU-Berlin). Mein besonderer Dank gilt ihr und ihren Mitarbeitern, die mich unermüdlich mit Proben der Hydrogenasen von *R. eutropha* versorgt haben. Besonders möchte ich dafür Gordon Winter, Marcus Ludwig, Dr. Oliver Lenz, Dr. Antje Gebler, Dr. Tanja Burgdorf und Dr. Thorsten Buhrke danken, die mir mit großer Hilfsbereitschaft während der Probenbehandlung in ihrem Labor zur Seite standen und mir wichtige mikrobiologische Background-Informationen lieferten. Die gute Zusammenarbeit ließ sich auf vielen Meetings, Konferenzen und sonstigen Treffen intensivieren.

Für die Unterstützung bei den zahlreichen Synchrotron-Messterminen am EMBL (DESY, Hamburg) danke ich Dr. Wolfram Meyer-Klaucke, der immer versucht hat unsere „Sonderwünsche“ was Zeit, Dauer und Messbedingungen betrifft, zu

erfüllen. Am BESSY (Berlin) danke ich Franz Schäfers für seinen Support bei so manchen Eisen-Messungen. Für ihre Hilfe bei verschiedenen Messterminen am EMBL und BESSY gilt mein Dank Peter, Paola, Alexander und Joachim aus unserer Arbeitsgruppe, mit denen auch besonders lange Nachtschichten erträglich waren.

Prof. Simon Albracht (Univ. Amsterdam) danke ich für den interessanten Forschungsaufenthalt in seinem Labor. Dort hatte ich, gemeinsam mit Dr. Ingo Zebger, die Möglichkeit mit seinen Mitarbeitern Dr. Eddy van der Linden und Winfried Roseboom FTIR-Messungen durchzuführen, denen für ihre Hilfe gedankt sei.

Die Zusammenarbeit mit den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Peter Hildebrandt des Max-Vollmer-Instituts der TU war besonders erfreulich. Hierbei möchte ich mich ganz herzlich bei Ingo bedanken, der mich bei meinen weiteren Messungen am FTIR-Spektrometer an der TU freundschaftlich unterstützt hat. Weiterhin möchte ich Dr. Markus Galander und Miguel Saggi für die Unterstützung bei den EPR-Messungen an der TU und Dr. Friedhelm Lenzian für zahlreichen Anregungen für die Auswertung der MBH-Daten danken. Als Kollaborationspartner für die AAS-Messungen gilt mein Dank Dr. Klaus Irrgang.

Dr. Hagen Stosnach der Firma Röntec (Berlin-Adlershof) danke ich für dafür, dass ich an dem dortigen PicoTax-TXRF-Spektrometer den Metallgehalt diverser Proteinproben bestimmen konnte.

Für die Kooperation mit den *D. gigas*-Proben danke ich Antonio DeLacey (Universidad Autonoma, Madrid). Bei Sascha Ott und Lennert Schwartz möchte ich mich für die Zusammenarbeit auf dem Gebiet der synthetischen Fe-Fe-Modelle bedanken und ihrem Interesse an unserer Arbeit am Synchrotron. Mikhail Antonkin danke ich für die Bereitstellung von Fe-S-Cluster-Proben zur Charakterisierung.

Ferner möchte ich denen danken, die mein wissenschaftliches Fortkommen geprägt haben. An erster Stelle ist Prof. Roland Glaser zu nennen, in dessen AG (Biophysik, HU-Berlin) ich in meiner mehrjährigen Tätigkeit als Tutorin erste experimentelle Erfahrungen sammeln konnte. In seiner Arbeitsgruppe gilt außerdem mein herzlicher Dank Frau Gabriele Reinke, die das Herz der AG war. Der Aufgeschlossenheit der Professoren Roland Glaser, Reinhart Heinrich (†2006) und Enrique Meléndez-Hevia verdanke ich die Möglichkeit im Zuge eines Sokrates-Stipendiums meine Diplom-Arbeit an der Universität La Laguna zu erstellen. Für die Unterstützung dort danke ich Prof. Meléndez-Hevia für seine intensive Betreuung und besonders Héctor Cabezas Roda, der mir mit seinen experimentellen Erfahrungen eine unschätzbare Hilfe war und den weiteren Mitarbeitern mit denen ich freundschaftlich verbunden bin.

Außerdem möchte ich Prof. Adela Ana Juknat für ihre herzliche Aufnahme und in ihrer Arbeitsgruppe an der Universidad de Buenos Aires danken. Dort hatte ich die Möglichkeit mit ihrer Betreuung eine Projektstudie zu erstellen.

Ohne den Rückhalt meiner Eltern, Familie und Freunde wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen und ich danke ihnen dafür ganz besonders herzlich. Sie haben mich in vielen meiner Entscheidungen bestärkt und an meiner Arbeit regen Anteil genommen. Bine und Pitti danke ich für ihre langjährige Freundschaft, die einen beständigen Gegenpol zu meiner wissenschaftlichen Arbeit darstellte.