

Methanogenese und Energiekonservierung in drei ungewöhnlichen methanogenen Archaea

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Fabian Steiniger

aus

Waldbröl

Bonn, Mai 2022

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Uwe Deppenmeier
2. Gutachterin: Priv.-Doz. Dr. Christiane Dahl

Tag der Promotion: 19.08.2022

Erscheinungsjahr: 2022

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Steiniger, F., Sorokin, D. Y., & Deppenmeier, U. (2022). Process of energy conservation in the extremely haloalkaliphilic methyl-reducing methanogen *Methanonatronarchaeum thermophilum*. The FEBS Journal. 289 (2), 549-563. doi:10.1111/febs.16165.

Kröniger, L., **Steiniger, F.**, Berger, S., Kraus, S., Welte, C. U., & Deppenmeier, U. (2019). Energy conservation in the gut microbe *Methanomassiliicoccus luminyensis* is based on membrane-bound ferredoxin oxidation coupled to heterodisulfide reduction. The FEBS Journal. 286 (19), 3831-3843. doi:10.1111/febs.14948.

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
1. Einleitung	1
1.1 Methanogene Archaea: Ökologie und Bedeutung für den Menschen	1
1.2 Zentraler Stoffwechsel der methanogenen Archaea	2
1.3 Neue Vielfalt der methanogenen Archaeen	5
1.4 Ziel der Arbeit	7
2. Material & Methoden	9
2.1 Chemikalien und Geräte	9
2.2 Gase	10
2.3 Verwendete Organismen.....	11
2.4 Verwendete Plasmide	11
2.5 Kultivierung und Stammhaltung von Mikroorganismen	14
2.5.1 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>).....	14
2.5.1.1 Medien und Zusätze.....	14
2.5.1.2 Vorkulturen.....	14
2.5.1.3 Kulturen zu heterologen Produktion von Proteinen (oxische Bedingungen).....	15
2.5.1.4 Anoxische Produktion von Proteinen in <i>E. coli</i> BL21Δ <i>iscR</i>	15
2.5.2 Kultivierung von <i>Mmc. luminyensis</i>	16
2.5.3 Kultivierung von <i>Mna. thermophilum</i>	17
2.5.4 Kultivierung von <i>Mc. vulcani</i>	18
2.5.5 Kultivierung von <i>Pichia pastoris</i>	19
2.5.6 Kultivierung von <i>Clostridium pasteurianum</i> (<i>C. pasteurianum</i>).....	20
2.5.7 Stammhaltung	20
2.5.8 Verfolgung des Wachstums via Messung der OD _{600nm}	20
2.6 Molekularbiologische Methoden	21
2.6.1 PCR (Polymerase-Kettenreaktion) (Mullis <i>et al.</i> , 1986)	21
2.6.2 Isolierung von RNA	25
2.6.3 Quantitative Reverse Transkriptions-PCR (RT-qPCR)	26
2.6.4 Agarose-Gelelektrophorese	27
2.6.5 Restriktionsverdau.....	28
2.6.6 Ligation	29
2.6.7 Transformation zur Einbringung von DNS in Organismen	30
2.6.7.1 Hitzeschocktransformation zur Einbringung von DNS in <i>E. coli</i>	30
2.6.7.2 Transformation von <i>Pichia pastoris</i> (Wu & Letchworth, 2004)	31
2.6.8 Plasmidpräparation	31

2.6.9	Präparation genomischer DNS von <i>Mmc. luminyensis</i> und <i>Mna. thermophilum</i>	31
2.7	Proteinbiochemische Methoden	32
2.7.1	Zellaufschluss zur Generierung der Lysate für die Streptactin-Affinitätschromatographie.	32
2.7.2	Streptactin-Affinitätschromatographie	32
2.7.3	Diskontinuierliche SDS-PAGE	33
2.7.4	Silberfärbung (Blum et al., 1987)	35
2.7.5	Westernblot	35
2.7.6	Bradford-Assay (Bradford, 1976).....	38
2.7.7	Isolierung von Ferredoxin aus <i>C. pasteurianum</i>	38
2.7.8	Präparation von Cytoplasma- und Membranfraktion von <i>Mmc. luminyensis</i> und <i>Mna. thermophilum</i>	39
2.7.9	Interaktionsstudien mit Quervernetzungsreagenzien.....	40
2.7.10	Interaktionsstudien mit Streptactin-Säule und einer N-Hydroxysuccinimid-aktivierten Sepharosesäule	40
2.7.11	Enzymatische Analysen (Enzymassays)	41
2.7.11.1	Assays mit Methylviologen und 2-Hydroxyphenazin	41
2.7.11.2	Ellmans-Test.....	42
2.8	Analytische Methoden	43
2.8.1	Quantifizierung von Trimethylamin (TMA), Dimethylamin (DMA) und Monomethylamin (MMA)	43
2.8.2	Quantifizierung von Methan	44
2.8.3	Quantifizierung von Methanol und Formiat	44
2.8.4	Quantifizierung von Betain und Dimethylglycin (DMG)	45
2.9	Bioinformatische Methoden.....	45
2.9.1	Verwendete Software.....	45
2.9.2	Analyse von Protein-Protein-Interaktionen mittels ClusPro-Interaction Server.....	46
3.	Ergebnisse	47
3.1	<i>Methanonatronarchaeum thermophilum</i> (<i>Mna. thermophilum</i>): Die Untersuchung eines neuartigen Elektronentransportsystems	47
3.1.1	Wachstum von <i>Mna. thermophilum</i>	47
3.1.2	Methyltransferasen und Corrinoidproteine von <i>Mna. thermophilum</i>	57
3.1.3	Untersuchungen zum Energiestoffwechsel von <i>Mna. thermophilum</i>	59
3.1.3.1	Analyse der Transkriptabundanz der Gene der potentiell am Energiestoffwechsel beteiligten Enzymkomplexe.....	60
3.1.3.2	Aktivitätstests der Membranpräparationen von <i>Mna. thermophilum</i> mit dem artifiziellen Elektronenträger Methylviologen	63
3.1.3.3	Aktivitätstest mit dem artifiziellen Methanophenazin-Analogon 2-Hydroxyphenazin 70	

3.1.3.4 Nachweis des vollständigen Formiat:Heterodisulfid- und H ₂ :Heterodisulfid-Oxidoreduktase-Systems in Membranen von <i>Mna. thermophilum</i> mittels Ellmans-Reagenz	73
3.1.3.5 Einfluss des Cytochrom-spezifischen Inhibitors DPI auf die Elektronentransportsysteme in Membranen von <i>Mna. thermophilum</i>	75
3.1.3.6 Bioinformatische Analyse der an der Energiekonservierung von <i>Mna. thermophilum</i> beteiligten Membran-Komplexe	78
3.2 <i>Methanococcoides vulcani</i> (<i>Mc. vulcani</i>) – Betain als neuartiges Substrat für die Methanogenese	85
3.2.1 Wachstum von <i>Mc. vulcani</i>	86
3.2.2 Methyltransferasen und Corrinoid-Proteine von <i>Mc. vulcani</i>	95
3.3 Die Rolle eines Komplex I-Derivates im Energiemetabolismus von <i>Methanomassiliicoccus luminyensis</i> (<i>Mmc. luminyensis</i>)	97
3.3.1 Bioinformatische Untersuchung des Fpo-Komplexes und dessen Elektroneneinspeisemoduls	99
3.3.1.1 Bioinformatische Analyse von Fpol	100
3.3.1.2 Identifizierung und bioinformatische Analyse putativer Ferredoxine aus <i>Mmc. luminyensis</i>	104
3.3.1.3 Bioinformatische Analyse der putativen Interaktion zwischen Ferredoxin und Fpol	106
3.3.1.4 Bioinformatische Analyse von FpoB aus <i>Mmc. luminyensis</i>	110
3.3.1.5 Bioinformatische Analyse der putativen Interaktion zwischen Fpol und FpoB	112
3.3.1.6 Bioinformatische Analyse von FpoD	115
3.3.2 Biochemische Untersuchungen zur Rolle des Fpo-Komplexes im Fd _{red} :Heterodisulfid Oxidoreduktase-System in den Membranen von <i>Mmc. luminyensis</i>	120
3.3.2.1 Produktionsversuche der Fpo-Proteine in <i>Escherichia coli</i>	120
3.3.2.2 Produktionsversuche in <i>Pichia pastoris</i> (<i>P. pastoris</i>)	123
3.3.2.3 Synthetische Herstellung von Peptiden zur Antikörper-Produktion – Nachweise von Fpol in den Membranfraktionen von <i>Mmc. luminyensis</i>	124
3.3.2.4 Produktion von Antikörpern gegen HdrD	127
3.3.2.5 Versuche des Interaktionsnachweises von HdrD und Ferredoxin mit dem Fpo-Komplex	129
4. Diskussion	135
4.1 Bedeutung methanogener Archaea für den Menschen und die Umwelt	135
4.2 Neuartiger Stoffwechsel der Ordnung Methanomassiliococcales	139
4.3 <i>Mna. thermophilum</i> – Entdeckung eines neuartigen Elektronentransportsystems in den Membranen von Vertretern der Klasse Methanonatronarchaea	141
4.4 <i>Mc. vulcani</i> – Methylo trope Methanogenese mit unüblichen Substraten	147
4.5 Die Komplexe der methanogenen Energiekonservierung	150
4.5.1 Die Membran-gebundene Methyltransferase Mtr – Zentrale Rolle im Stoffwechsel von <i>Mc. vulcani</i>	150

4.5.2 Der Fpo-Komplex – Ein Komplex I-Analogon im Stoffwechsel von <i>Mc. vulcani</i> und <i>Mmc. luminyensis</i>	152
4.5.3 Vho-Hydrogenasen im Energiestoffwechsel von methanogenen Archaeen	163
4.5.4 Ech Hydrogenasen und deren Derivate im Stoffwechsel methanogener Archaeen	166
4.5.5 Rnf-Komplex: Element der Energiekonservierung in <i>Ms. acetivorans</i> und <i>Mc. vulcani</i>	169
4.5.6 Formiat-Dehydrogenasen im Stoffwechsel methanogener Archaeen – Membran-gebundene Formiat-Dehydrogenase in <i>Mna. Thermophilum</i>	171
4.5.7 Heterodisulfid-Reduktasen im Stoffwechsel methanogener Archaeen	174
4.5.7.1 MvhAGD/HdrABC – Bifurkationskomplex als wichtiges Element des methanogenen Archaeen	174
4.5.7.2 Die Membran-gebundene Heterodisulfid-Reduktase HdrDE in den Atmungsketten Cytochrom-haltiger methanogener Archaea – HdrD als zweite Heterodisulfidreduktase im Metabolismus von <i>Mmc. luminyensis</i>	176
4.6 Energiestoffwechsel von <i>Mna. thermophilum</i> , <i>Mmc. luminyensis</i> und <i>Mc. vulcani</i>	180
4.6.1 Methanogenese von <i>Mna. thermophilum</i>	180
4.6.2 Methanogenese von <i>Mmc. luminyensis</i>	183
4.6.3 Methanogenese von <i>Mc. vulcani</i>	184
5. Zusammenfassung.....	186
6. Literaturverzeichnis.....	188
7. Danksagung.....	213

Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption (spezifiziert durch Wellenlänge)
Abb.	Abbildung
AHT	Anhydrotetrazyklin
AmpR	Ampicillin-Resistenzkassette
α -Faktor	Signalpeptid zur extrazellulären Produktion von Proteinen in <i>P. pastoris</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATP, ADP, AMP	Adenosintri-, Adenosindi-, Adenosinmonophosphat
AOX1	Alkohohoxidase 1 aus <i>Pichia pastoris</i>
B, Bp	Basen, Basenpaare
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BV	Benzylviologen
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DNA
CoA, HS-CoA	Coenzym A
CoB, HS-CoB	Coenzym B; 7-Mercaptoheptanoylthreoninphosphat
CoM, HS-CoM	Coenzym M; Mercaptoethansulfonat
CoM-S-S-CoB	Heterodisulfid aus Coenzym M und Coenzym B
Ct	cycle threshold
CV	Säulenvolumen
Cys, C	Cystein
d	Tag
Da	Dalton
DMA	Dimethylamin
DMG	Dimethylglycin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA/DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxyribonukleosidtriphosphat
DPI	Diphenyliodoniumchlorid
DSMZ	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
e ⁻	Elektron/en
Ech	Energie-konservierende Hydrogenase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Eha	Komplexe Form der Energie-konservierenden Hydrogenase
Ehb	Komplexe Form der Energie-konservierenden Hydrogenase
et al.	et alii / et aliae (und andere)
FAD	Flavinadenindinukleotid
Fd	Ferredoxin
Fdh	Formiatdehydrogenase
FMN	Flavinmononukleotid
FNR	Ferredoxin:NADP ⁺ -Oxidoreduktase
Fpo	F ₄₂₀ H ₂ :Phenazin-Oxidoreduktase
F ₄₂₀	(N-L-Lactyl- γ -L-glutamyl)-L-glutaminsäure-phosphodiester des

	7,8-Didemethyl-8-hydroxy-5-desazariboflavin-5'-phosphats
g	Gramm
h	Stunde
HABA	4-Hydroxyazobenzen-2-carbonsäure
Hdr	Heterodisulfidreduktase
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
H ₂ Odest, H ₂ Oreinst	destilliertes Wasser, Reinstwasser
H ₄ MPT	Tetrahydromethanopterin
IC ₅₀	Konzentration eines Inhibitors, bei der die Aktivität eines Enzyms um 50 % reduziert wird
IMG	Integrated Microbial Genomes and Microbiomes
IOR	Indolpyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase
J	Joule
KanR	Kanamycin-Resistenzkassette
KM	Michaelis-Menten-Konstante
KP	Kaliumphosphat(-Puffer)
L	Liter
LB	Lysogeny Broth
M	molar (mol L ⁻¹)
Mbh	Membran-gebundene Hydrogenase
<i>Mc.</i>	<i>Methanococcooides</i>
MCR	Methyl-CoM-Reduktase
MeOH	Methanol
MFR	Methanofuran
min	Minute
MMA	Monomethylamin
<i>Mmc.</i>	<i>Methanomassiliococcus</i>
<i>Mna.</i>	<i>Methanonatronarchaeum</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
Mph	Methanophenazin
<i>Ms.</i>	<i>Methanosarcina</i>
Mtr	Methyl-H ₄ MPT:HS-CoM-Methyltransferase
MV	Methylviologen
Mbh	Membran gebundene Hydrogenase
Mvh	Methylviologen-reduzierende Hydrogenase
mRNA	messenger-RNA
MT1, MT2	Methyltransferasen 1 und 2 bei Substratdemethylierung
NAD(H)	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP(H)	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OD _x	optische Dichte (spezifiziert durch Wellenlänge)
ox	oxidiert
PAGE	Polyarcylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PpHIS4	Trifunktionales Protein aus der Histidinbiosynthese von <i>Pichia pastoris</i>

red	reduziert
RNA	Ribonukleinsäure
Rnf	‚Rhodobacter-Stickstofffixierungs-Komplex‘
rRNA	ribosomale RNA
RT-qPCR	quantitative PCR mit reverser Transkription
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser, S	Serin
sp., spp.	Spezies
Strep-long	Strep-Tag bei Produktion mit pBBR1_ <i>peI</i> B_strep-long mit sieben Aminosäure-Spacer zum produzierten Protein
s.u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
TAT	Twin Arginine Translocation
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMA, TMAO	Trimethylamin, Trimethylaminoxid
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
rpm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
Vho	F ₄₂₀ -nicht-reduzierende Hydrogenase
Vmax	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
v/v	Volumenkonzentration, Volumen pro Volumen

1. Einleitung

1.1 Methanogene Archaea: Ökologie und Bedeutung für den Menschen

Methanogene Archaeen spielen eine bedeutende Rolle in vielen Habitaten auf der Erde und beeinflussen ökologische Prozesse in globalem Ausmaß, die auch für den Menschen von Bedeutung sind. So nehmen die obligat anaeroben Organismen eine Schlüsselrolle im weltweiten Kohlenstoffkreislauf ein und verwerten die Endprodukte aus Fermentationsprozessen zu Methan. Dabei unterscheiden sich die Organismen jedoch in ihrem Substratspektrum. Generell ist neben der Umsetzung von CO_2 zu Methan mit Hilfe von molekularem Wasserstoff oder Formiat als Reduktionsmittel ebenso die Umsetzung der Methylgruppen von Acetat oder methylierten Verbindungen (Methanol, Methylamine, Methylsulfide) zu Methan möglich. Die meisten Arten sind auf die Nutzung von CO_2 in Kombination mit Wasserstoff beschränkt, wobei einige Arten ein teilweise deutlich erweitertes Substratspektrum zeigen. Im Allgemeinen ist der Prozess der Generierung von Methan (Methanogenese) aus den aufgeführten Substraten zur Schließung des globalen Kohlenstoffkreislaufes unabdingbar. Das produzierte Methan wird in oxischen Bereichen von methanotrophen Bakterien wieder zu CO_2 oxidiert, aber zum Teil auch in die Atmosphäre freigesetzt (Thauer et al., 2008; Liu & Whitman, 2008). Auch in anoxischen Bereichen kann ein Teil des Methans von einigen Spezies innerhalb der Archaea zu CO_2 oxidiert werden, wobei in den meisten Fällen Nitrat, Nitrit (Raghoebarsing et al., 2006; Welte et al., 2016; Timmers et al., 2017) oder Sulfat (Boetius et al., 2008) als Elektronenakzeptor dienen.

Unabhängig von der Biochemie der Methanogenese spielt Methan für den Menschen eine bedeutende Rolle, da es ein potentes Klimagas darstellt, dessen Einfluss auf das globale Klima eminent ist (Saunio et al., 2016; Reay et al., 2010). Methan ist als Klimagas etwa 34-Mal wirksamer als CO_2 (Myhre et al., 2013) und damit in Bezug zu den steigenden Methankonzentrationen in der Atmosphäre besonders problematisch (Saunio, 2016). Insgesamt sind methanogene Archaeen die Hauptquelle des biologisch produzierten Methangases. Auf natürliche Feuchtgebiete, als typischer Lebensraum der methanogenen Archaeen, sind dabei etwa 30-40 % des weltweiten Methanausstoßes zurückzuführen (Ciais et al., 2014). Generell besiedeln methanogene Archaeen eine Vielzahl anoxischer Lebensräume in welchen demzufolge Methan freigesetzt wird. Zu nennen sind typischerweise neben Sumpf- und Feuchtgebieten auch Reisfelder und anoxische Gewässersedimente (Thauer et al., 2008; Garcia et al., 2000). Auch Habitats mit aus menschlicher Sicht extremen Lebensbedingungen werden von den Organismen besiedelt, dazu zählen das ewige Eis, die Tiefsee oder hochalkalische Sodaseen (McGenity & Sorokin, 2010; Simankova et al., 2003; Ver Eecke et al., 2012; Sorokin et al., 2018). In der Tiefsee, aber auch in Permafrostböden, trägt die Produktion von Methan zur Bildung von Methanhydraten bei. Die Verbindung aus

Methan und Wasser entsteht unter hohem Druck und bei niedrigen Temperaturen. Aus den Hydraten können bei einem Anstieg der Wassertemperatur bzw. Bodentemperatur große Mengen Methan in die Atmosphäre freigesetzt werden (Judd et al., 2002; Li et al., 2022). Unter den gemäßigten Lebensräumen methanogener Archaea ist außerdem der Verdauungstrakt verschiedener Tiere, wie Wiederkäuern, und des Menschen zu nennen (Miller & Wollin, 1986). Die intensive landwirtschaftliche Haltung von Wiederkäuern ist dabei eine Quelle von beträchtlicher Methanfreisetzung mit Einfluss auf die globale Klimaerwärmung (Dalby et al., 2021). Die Entstehung von Methan hat, neben den genannten negativen Einflüssen auf das globale Klima, auch ein großes und für den Menschen nutzbares Potential als Energieträger. Die Methanogenese ist der zentrale Stoffwechselweg in Biogasanlagen. An dieser Stelle wird Methan effizient als erneuerbare Energiequelle genutzt (D'Silva et al., 2021; Ahring, 1995).

1.2 Zentraler Stoffwechsel der methanogenen Archaea

Der Prozess der Bildung von Methan beruht zentral auf der Reduktion des Kohlenstoffatoms der jeweils genutzten Verbindung auf eine Oxidationsstufe von -IV, welche die maximal reduzierteste Form des Kohlenstoffs darstellt. Dazu werden verschiedenste Enzyme sowie einige besondere, und für die methanogenen Archaeen einzigartige, Cofaktoren benötigt (Deppenmeier, 2002).

Die Bildung von Methan aus CO_2 und H_2 im Rahmen der sogenannten hydrogenotrophen Methanogenese (Abbildung 1) ist weitverbreitet und beruht auf der initialen Reduktion von CO_2 zu einem Formyl-Rest, welcher an Methanofuran gebunden wird. Als Elektronendonator dient an dieser Stelle reduziertes Ferredoxin (Fd_{red}). Im Anschluss erfolgt die Übertragung des C_1 -Körpers auf Tetrahydromethanopterin. Die entstehende Methenylgruppe wird darauffolgend zunächst zur Methylengruppe und im Folgenden zur Methylgruppe reduziert (Lyu et al., 2018). Als Elektronendonator dient dabei jeweils der reduzierte Cofaktor F_{420}H_2 . Dabei handelt sich um ein Deazaflavinderivat, welches in der oxidierten Form ein deutliches Absorptionsmaximum bei 420 nm Wellenlänge zeigt (Deppenmeier, 2002; Cheeseman et al., 1972). Anschließend wird die Methylgruppe von einer membranständigen Methyltransferase (Mtr) auf Coenzym M übertragen. Dabei werden durch die Mtr zwei Natriumionen vom Cytoplasma in das extrazelluläre Milieu transloziert, sodass ein Ionengradient entsteht welcher zur ATP(Adenosintriphosphat)-Synthese genutzt werden kann. Die Reduktion der Methylgruppe zu Methan erfolgt im nächsten Schritt mit Coenzym B als Elektronendonator. Als Produkt entsteht neben Methan ein Heterodisulfid aus Coenzym B und Coenzym M. Alle genannten oxidierten Cofaktoren werden mit Hilfe von molekularem Wasserstoff wieder reduziert. H_2 wird dabei von cytoplasmatischen Hydrogenasen oxidiert, welche dadurch, teilweise im Komplex mit weiteren Proteinen, wiederum in der Lage sind die oxidierten Cofaktoren (F_{420} , oxidiertes Ferredoxin (Fd_{ox}), Heterodisulfid) zu reduzieren (Ferry, 2020; Yan & Ferry, 2018; Ferry, 2010; Liu & Whitmann, 2008).

Die letztgenannten Ausführungen gelten fast ohne Ausnahme für alle hydrogenotrophen methanogenen Archaeen ohne Cytochrome. Doch auch einige Vertreter innerhalb der Methanosarcinales, welche über Cytochrome verfügen, sind zur Methanogenese ausgehend von H_2 und CO_2 befähigt (z.B. *Methanosarcina mazei*). Dabei verläuft die Reduktion von F_{420} zwar auch cytoplasmatisch (Michel et al., 1995), die Reduktion des Heterodisulfids und des oxidierten Ferredoxins (Fd_{ox}) verläuft jedoch über membranständige Enzyme (Mand & Metcalf, 2019; Welte & Deppenmeier, 2014; Thauer et al., 2008).

Besonders Arten innerhalb der Ordnung der Methanosarcinales sind teilweise, neben der Verwertung von H_2 und CO_2 , auch zur Verwertung weiterer Substrate für die Methanogenese, wie methylierter Verbindungen (methylotrophe Methanogenese) und Acetat (acetoklastische Methanogenese), befähigt. Beide genannten Verbindungen/Substanzklassen können beispielsweise von Arten des Genus *Methanosarcina* verwertet werden (Welte & Deppenmeier, 2014).

Die methylotrophe Methanogenese von Arten der Gattung *Methanosarcina*, beginnt mit der Übertragung der Methylgruppe von der jeweiligen methylierten Verbindung (Methanol, Methylamine und teils auch Methylsulfide) auf Coenzym M. Drei-Viertel der Methylgruppen werden im Anschluss, mit Coenzym B als Elektronendonator, zu Methan reduziert. Die restlichen Methylgruppen werden im oxidativen Zweig der Methanogenese zur Generierung von Reduktionsäquivalenten genutzt und dabei zu CO_2 oxidiert. Der Prozess beruht auf der Umkehr der Schritte bei der Reduktion von CO_2 zu Methyl-Coenzym M, welche zuvor beschrieben wurden. Dabei werden pro Methylgruppe zwei Moleküle F_{420} und ein Molekül Ferredoxin reduziert, welche in einer membranständigen Atmungskette reoxidiert werden. (Mand & Metcalf, 2019; Welte & Deppenmeier, 2014; Liu & Whitmann, 2008).

Die größte Menge Methan wird in der Natur aus Acetat freigesetzt, auch wenn die acetoklastische Methanogenese nur den Gattungen *Methanosarcina* und *Methanotherix* möglich ist, die zu den Methanosarcinales gehören. Das Schlüsselement der acetoklastischen Methanogenese ist in beiden Gattungen der CO-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthase Komplex. Dieser katalysiert die Spaltung von Acetyl-CoA in einen Carbonyl- und Methylrest. Der Carbonylrest wird im Anschluss zu CO_2 oxidiert, wobei Fd_{ox} als Elektronenakzeptor dient. Der Methylrest wird auf Tetrahydrosarcinapterin (Analogon zu Tetrahydromethanopterin) übertragen und ab dieser Stelle, wie bereits beschrieben, weiter zu Methan reduziert (Welte & Deppenmeier, 2014). Alle drei genannten Wege der Methanogenese sind in Abbildung 1 zusammengefasst dargestellt.

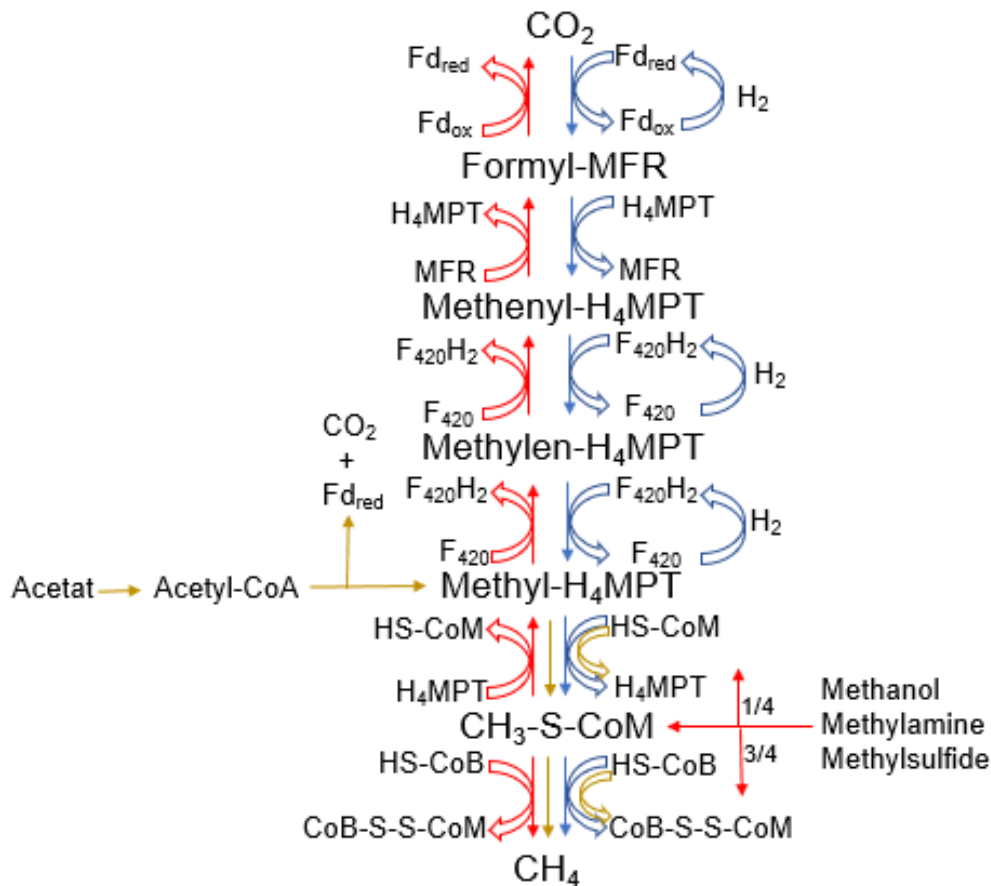


Abbildung 1: Schematische Darstellung der hydrogenotrophen (blau), methylotropen (rot) und acetoklastischen (gelb) Methanogenese. Methanofuran: MFR; Tetrahydromethanopterin: H₄MPT (Tetrahydrosarcinapterin in Methanosarcinales); HS-CoM: Coenzym M; HS-CoB: Coenzym B; CoB-S-S-CoM: Heterodisulfid.

Sowohl die hydrogenotrophen als auch acetoklastischen methanogenen Archaeen können die Reaktion der membranständigen Methyltransferase (Mtr) zur Ionentranslokalisierung und damit zur Energiekonservierung nutzen, wohingegen die methylotropen methanogenen Archaea den Ioneneinstrom nutzen, um die Methanogenese in die reverse Richtung voranzutreiben (Welte & Deppenmeier, 2014).

Die klassischen hydrogenotrophen methanogenen Archaeen besitzen keinerlei Atmungskette und einzig der Schritt der membranständigen Mtr dient der Energiekonservierung. Anders sieht dies bei den methylotropen oder/und acetoklastischen methanogenen Archaea aus. Während des Prozesses der Methanogenese entstehen reduzierte/oxidierte Cofaktoren. Die Elektronen von den reduzierten Cofaktoren, F_{420}H_2 (methylotrophe Methanogenese) und Fd_{red} (methylotrophe und acetoklastische Methanogenese) bzw. ebenso von H_2 , werden von verschiedenen Proteinkomplexen in eine membranständige Atmungskette eingespeist, wobei Heterodisulfid als finaler Elektronenakzeptor fungiert (Welte & Deppenmeier, 2014, Abbildung 2). Je nach Organismus liegen die Komplexe in verschiedenen Konstellationen vor.

Methanophenazin dient im Rahmen der Atmungskette als membranlöslicher Elektronenüberträger innerhalb der Cytoplasmamembran (Abken et al., 1998).

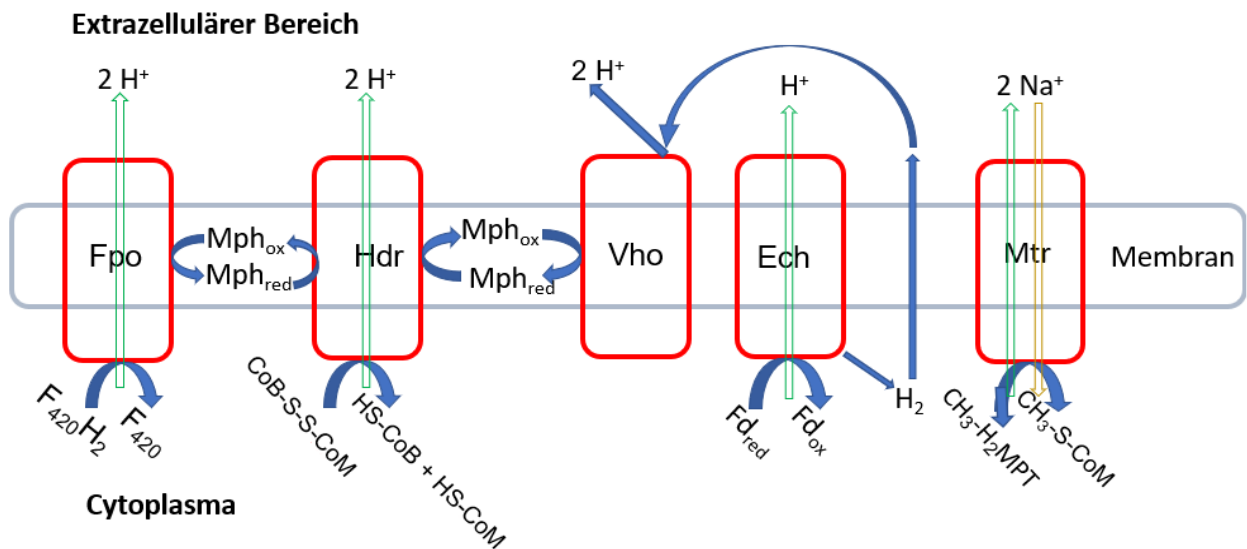


Abbildung 2: Membranständige Atmungskettenkomplexe des Modellorganismus *Methanosarcina mazei*. Die grünen Pfeile geben generell die Translokation von H^+ bzw. Na^+ in den extrazellulären Bereich an, wohingegen der gelbe Pfeil im Falle der membrangebundenen Methyltransferase (Mtr) die Rückreaktion des Enzymkomplexes im Rahmen der methylo trophen Methanogenese und den damit verbundenen Einstrom von Na^+ ins Cytoplasma kennzeichnet. Fpo: Fpo-Komplex; Hdr: Heterodisulfidreduktase HdrDE; Vho: Vho-Hydrogenase; Ech: Ech-Hydrogenase; Mph_{ox} : Oxidiertes Methanophenazin; Mph_{red} : Reduziertes Methanophenazin.

1.3 Neue Vielfalt der methanogenen Archaeen

In den vergangenen Jahren kam es zur Entdeckung von einigen methanogenen Archaeen, welche teils deutliche Abweichungen zu den bislang bekannten Organismen im Methan-Stoffwechsel zeigten. Einige Organismen wurden bislang nur auf Grundlage von Genomanalysen untersucht, wohingegen andere bereits biochemisch charakterisiert wurden, da sie in Reinkultur vorliegen (Borrel et al., 2019; Kurth et al., 2020). Dazu gehört mit *Methanomassiliicoccus luminyensis* (*Mmc. luminyensis*) ein Vertreter der Ordnung Methanomassiliicoccales welche von Dridi et al. (2012) durch die Isolierung und Charakterisierung des Organismus eingeführt wurde. Da der Organismus aus humanen Feces isoliert wurde, bestand ein hohes Interesse daran, den Stoffwechsel des Organismus weiter zu charakterisieren. Die Produktion von Methan aus Wasserstoff und Methanol weckte vor allem das Interesse am Energiestoffwechsel des Organismus, da genannte Substratkombination bis zum Zeitpunkt der Isolation von *Mmc. luminyensis* (Dridi et al., 2012) nur von wenigen Organismen, wie *Methanosphaera stadtmanae* (*Msp. stadtmanae*), bekannt war (Fricke et al., 2006). Der Stoffwechsel von *Mmc. luminyensis* weist im Vergleich zu *Msp. stadtmanae* trotz der Nutzung von Methanol und H_2 für die Methanogenese jedoch deutliche Unterschiede auf. Erste Untersuchungen auf genetischer Ebene (Lang et al., 2015) und insbesondere detaillierte biochemische Analysen (Kröninger et al., 2016) zeigten die

Besonderheiten des Stoffwechsels. So besitzt der Organismus sowohl die für hydrogenotrophe methanogene Archaea typische lösliche Heterodisulfidreduktase (HdrABC) (Kaster et al., 2011; Hedderich et al., 1990), welche im Komplex mit der Hydrogenase MvhAGD auftritt, als auch die Heterodisulfidreduktase HdrD die bislang nur aus Vertretern der Methanosarcinales bekannt war (Welte & Deppenmeier, 2014) und dort in Kombination mit der membranständigen Untereinheit HdrE auftritt. Letztere Untereinheit fehlt innerhalb der Vertreter der Methanomassiliicoccales (Kröninger et al., 2016). Sowohl HdrD als auch MvhAGD/HdrABC spielen, auf Grundlage der Ergebnisse von Kröninger et al. (2016), eine zentrale Rolle im Energiestoffwechsel von *Mmc. luminyensis*. Die Nutzung beider Heterodisulfidreduktasen im Energiestoffwechsel stellt ein Alleinstellungsmerkmal der Ordnung gegenüber allen anderen Ordnungen methanogener Archaea dar. Der Energiestoffwechsel von *Mmc. luminyensis* wird außerdem an zentraler Stelle, von einem „kopflösen“ Komplex I-Derivat (auch „kopflöser“ Fpo-Komplex) komplettiert, welches der Energiekonservierung dient (Kröninger et al., 2019; Kröninger et al., 2016). Klassischerweise enthält Komplex I eine funktionelle Untereinheit die NADH oxidieren kann, diese fehlt in *Mmc. luminyensis*, was für den Komplex zur Bezeichnung „kopflös“ führte (Kröninger 2018; Details Vgl. 3.3 und 4.5.2).

In Form von *Methanococcoides vulcani* (*Mc. vulcani*) wurde 2014 ein neuer Vertreter aus der Ordnung der Methanosarcinales beschrieben, der zur methylothropen Methanogenese befähigt ist. Dabei nutzt der Organismus neben den üblichen Substraten wie Trimethylamin (TMA), Dimethylamin (DMA), Monomethylamin (MMA) und Methanol ebenso Betain, Cholin und N,N-Dimethylethanolamin als Substrate. Das methanogene Archaeon liegt in Reinkultur vor und wurde aus Meeressedimenten isoliert (Haridon et al., 2014). Die Verwertung von Betain für die Methanogenese wurde mit *Methanlobus vulcani*, ebenso für einen weiteren Vertreter der Methanosarcinales beschrieben (Creighbaum, 2020; Creighbaum et al., 2019; Ticak et al., 2015).

Mit den Methanonatronarchaeales existiert außerdem eine Ordnung von methanogenen Archaea außerhalb des Phylums der Euryarchaeota. Für die Ordnung gelang es mit *Methanonatronarchaeum thermophilum* (*Mna. thermophilum*) einen Modellvertreter in Reinkultur zu bringen und zu charakterisieren (Sorokin et al., 2017). Der Organismus zeigt Wachstum mit methylierten Verbindungen (Methylierte Amine, Methanol) in Kombination mit molekularem Wasserstoff oder Formiat (Sorokin et al., 2018). Insbesondere die Nutzung von Formiat als Reduktionsmittel im Rahmen der methylothropen Methanogenese ist neuartig und daher von besonderem Interesse für weitere Untersuchungen. Wie auch *Mmc. luminyensis* besitzt *Mna. thermophilum* keine membrangebundene Methyltransferase, obwohl dies bis vor wenigen Jahren noch als charakteristisches Merkmal für alle methanogenen Archaea galt. Die metabolische Vielfalt der methanogenen Archaea ist insgesamt größer als angenommen und

sollte insbesondere mit Blick auf die Rolle des Methans als Klimagas näher untersucht werden (Söllinger & Urich, 2019).

1.4 Ziel der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurden drei methanogene Archaeen, *Mmc. luminyensis*, *Mna. thermophilum* und *Mc. vulcani*, hinsichtlich unterschiedlicher Aspekte des Stoffwechsels untersucht. Im Falle von *Mmc. luminyensis* stand der „kopfloste“ Fpo-Komplex im Mittelpunkt der Untersuchungen. So sollten dessen Interaktionen mit dem putativen Elektronendonator Ferredoxin und dem putativen Elektronenakzeptor der Heterodisulfid-Reduktase HdrD, die auf Grundlage des Stoffwechselmodells von Kröninger et al., (2016) postuliert wurden, näher analysiert werden. Der besondere Metabolismus von *Mmc. luminyensis*, welcher auf der Nutzung von methylierten Verbindungen in Kombination mit H₂ für die Methanogenese beruht (Kröninger, 2018) sollte damit noch detaillierter aufgeklärt werden, da der „kopfloste“ Fpo-Komplex des Organismus membrangebunden vorliegt und vermeintlich das einzige Element der Energiekonservierung im Rahmen der Methanogenese darstellt. Dazu sollten sowohl bioinformatische Interaktionsstudien als auch biochemische Analysen genutzt werden, um die genannten Interaktionspartner des Fpo-Komplexes zu verifizieren. Auch die Produktion von spezifischen Antikörpern gegen Untereinheiten des Fpo-Komplexes und der Interaktionspartner, zur Ermöglichung weitergehender Untersuchungen, war ein Ziel dieser Arbeit.

Für *Mna. thermophilum* lagen wie beschrieben einführende Studien von Sorokin et al. (2017/2018) vor, welche zeigten, dass der Organismus Methanogenese ausgehend von methylierten Verbindungen in Kombination mit molekularem Wasserstoff oder Formiat betreiben kann. In der vorliegenden Arbeit sollten darauf aufbauend detaillierte Wachstumsanalysen durchgeführt werden, um die Nutzung verschiedener Substrate durch den Organismus evaluieren zu können. Die generierten Wachstumsdaten sollten im Anschluss als Grundlage zum Vergleich mit weiteren Organismen, aber auch zur Erreichung von optimalen Biomassen für Folgeuntersuchungen dienen. Neben dem Wachstum lag ein besonderer Fokus auf dem Energiestoffwechsel des Organismus. Die Nutzung von Formiat in Kombination mit methylierten Verbindungen ist eine große Besonderheit und bislang einzigartig, sodass speziell die Rolle des Formiats untersucht wurde. Dabei sollte insbesondere die membrangebundene Energiekonservierung des Organismus analysiert werden, da auf Grundlage genomischer Analysen jeweils eine membrangebundene Formiat-Dehydrogenase, Hydrogenase und Heterodisulfid-Reduktase vorlagen. Eine Untersuchung und Aufklärung des respiratorischen Elektronentransports von *Mna. thermophilum* mittels verschiedener spezifischer Aktivitätstests, war daher eines der Hauptziele der vorliegenden Arbeit.

Für den Organismus *Mc. vulcani* stand in der vorliegenden Arbeit die Verwertung von Betain als besonderes Substrat im Mittelpunkt. Im Vergleich zu Modellspezies wie *Methanosarcina mazei* kann der Organismus neben TMA, DMA, MMA und Methanol wie bereits eingeführt weitere Substrate, unter anderem Betain, für die methylo trope Methanogenese verwerten (L`Haridon et al., 2014). Ziel dieser Arbeit war es daher, die Verstoffwech selung von Betain im Vergleich mit den anderen Substraten im Detail zu untersuchen. Dazu wurde ebenso das Auftreten möglicher Intermediate und Endprodukte analysiert, um den Weg der Methanogenese des Organismus aufzuklären. In Kombination mit bioinformatischen Analysen ließ dies ebenso Rückschlüsse auf den gesamten Energiemetabolismus zu.

2. Material & Methoden

2.1 Chemikalien und Geräte

Die verwendeten Chemikalien entsprachen mindestens dem Qualitätsstandard *per analysis* (p. a.). Falls nicht anders vermerkt wurden die Chemikalien von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich (München, Deutschland), Fluka (München, Deutschland), Serva (Heidelberg, Deutschland) oder VWR (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Als Lösungsmittel diente, wenn nicht anders angegeben destilliertes Wasser (H_2O_{dest}).

Die in Tabelle 1 aufgeführten Geräte wurden während dieser Arbeit genutzt.

Tabelle 1: Verwendete Geräte.

Gerät	Details und Hersteller
Anaerobenkammer	Vinyl (Coy Laboratory Products Inc., Michigan, USA)
Analysenwaage	Sartorius 1203 (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland)
Autoklav	Dampfsterilisator Varioklav Typ 300 E (H+P Labortechnik GmbH, Oberschleisheim, Deutschland)
Brutschrank	B 5050 (Heraus GmbH, Hanau, Deutschland)
Elektrophoresekammer	Horizon 58 Horizontal Gel Electrophoresis System (Biometra, Göttingen, Deutschland)
Tank Blot-Kammer	Hoefer™ TE62 Tank Blotting-Einheit, Fisher Scientific, Reinach, Schweiz
Elektrophoresenetzgerät	Consort Power Supplies EV202 (Consort nv, Turnhout, Belgien)
Geldokumentationsanlage	INTAS Gel Imager (NTAS GmbH, Göttingen, Deutschland)
Heizblock	TSC Thermo Shaker (Biometra, Göttingen, Deutschland)
Magnetrührer	Mag-O (Gerhardt GmbH, Hannoversch Münden, Deutschland)
Mikroskop	Leica DMLB (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Deutschland)
pH-Meter	pH 210 Microprocessor (Hanna Instruments, Kehl am Rhein, Deutschland)

Photometer	Helios Epsilon (Thermo Scientific, Waltham, USA) Jasco V-550 UV/VIS-Spektrometer, Jasco V-650 UV/VIS-Spektrophotometer (Labor und Datentechnik GmbH, Gross-Umstadt, Deutschland)
Präzisionswaage	Sartorius Handy (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland)
Schüttelinkubatoren	Heidolph Unimax 1010, Unimax 1000 (Heidolph Instruments, Kehl am Rhein, Deutschland)
Schüttler	IKA-Vibrax-VXR (Janke & Kunkel GmbH & Co.KG, Staufen, Deutschland)
Thermocycler	MyCycler™ (BioRad, München, Deutschland)
Ultraschall	Branson Sonifer B15 (G. Heinemann Ultraschall- und Labortechnik, Schäbisch Gemünd, Deutschland)
Vortexer	Vortex Genie 2™ (Bender & Hobein GmbH, Krefeld, Deutschland)
Zentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5417 (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) Beckman Coulter Avanti J-20XP, Beckman J2-HS Centrifuge (Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland)
Western Blotter	Mini-Semidry (Biozym Scientific GmbH, Oldenburg, Deutschland)

2.2 Gase

Die technischen Gase CO₂ (99,9 %), H₂ (99,9 %) und N₂ (99,9 %) wurden von der Firma Air Liquide (Düsseldorf, Deutschland) bezogen.

2.3 Verwendete Organismen

In der folgenden Tabelle sind alle genutzten Organismen dargestellt (Tabelle 2).

Tabelle 2: Verwendete Organismen, sowie deren Genotyp und Herkunft.

Organismus	Genotyp	Herkunft
<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) NEB5α	F ⁻ , Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15, Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , λ ⁻ , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	New England Biolabs GmbH (NEB), Frankfurt a.M., Ursprung: Hanahan, 1983
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hadSB</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻), <i>gal</i> , <i>dcm</i> (DE3)	Invitrogen (Carlsbad, USA)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3) Δ <i>iscR</i>	wie <i>E. coli</i> BL21 (DE3), Δ <i>iscR</i>	Akhtar & Jones, 2008
<i>Methanomassiliicoccus luminyensis</i> (<i>Mmc. luminyensis</i>)	Wildtyp	DSM 25720
<i>Methanonatronarchaeum thermophilum</i> AMET1 (<i>Mna. thermophilum</i>)	Wildtyp	DSM 28684
<i>Methanococcoides vulcani</i> SLH33 (<i>Mc. vulcani</i>)	Wildtyp	DSM 26966
<i>Pichia pastoris</i> (<i>P. pastoris</i>) = <i>Komagataella phaffii</i>	Δ <i>his4</i>	Invitrogen, (Carlsbad, USA)
<i>Clostridium pasteurianum</i> (<i>C. pasteurianum</i>)	Wildtyp	DSM 525

2.4 Verwendete Plasmide

Die im folgenden aufgelisteten Plasmide wurde im Rahmen dieser Arbeit verwendet (Tabelle 3).

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Plasmide. Die Gene *fpoB* (WYS_RS00415), *fpoC* (WYS_RS00410), *fpoD* (WYS_RS00405) und *fpoI* (WYS_RS00395) aus *Mmc. luminyensis* wurden für die Klonierungen in dieser Arbeit verwendet.

Plasmid	Funktion	Herkunft
pASK-IBA3 (pASK3)	Klonierungsvektor, AmpR, Tet-System, erlaubt Klonierung mit C-terminalem Strep-Tag	IBA, (Göttingen)
pASK-IBA5 (pASK5)	Klonierungsvektor, AmpR, Tet-System, erlaubt Klonierung mit N-terminalem Strep-Tag	IBA-Göttingen

pBBR1_ <i>pelB_streplong</i>	Klonierungsvektor, KanR, Gen kann unter Promotor <i>p264</i> des Genes <i>p0264</i> aus <i>Gluconobacter oxydans</i> , Periplasmatische Produktion (<i>pelB</i>), C-terminales Strep-Tag	Zeiser et al., 2014
pPIC9	Klonierungsvektor, AmpR, Integration in Genom von <i>P. pastoris</i> möglich.	Invitrogen (Carlsbad)
pG-KJE8	Vektor mit zwei in <i>E. coli</i> nutzbaren Chaperonsystemen, Chloramphenicolresistenz	Nishihara et al., 2000
pASK5_ <i>fpoB</i>	pASK-IBA5-Derivat, Produktion des rekombinanten FpoB-Proteins aus <i>Mmc. luminyensis</i>	Diese Arbeit
pASK5_ <i>fpoC</i>	pASK-IBA5-Derivat, Produktion des rekombinanten FpoC-Proteins aus <i>Mmc. luminyensis</i>	Diese Arbeit
pASK5_ <i>fpoD</i>	pASK-IBA5-Derivat, Produktion des rekombinanten FpoD-Proteins aus <i>Mmc. luminyensis</i>	Diese Arbeit
pASK5_ <i>fpoI</i>	pASK-IBA5-Derivat, Produktion des rekombinanten FpoI-Proteins aus <i>Mmc. luminyensis</i>	Diese Arbeit
pASK3_ <i>fpoB</i>	pASK-IBA3-Derivat, Produktion des rekombinanten FpoB-Proteins aus <i>Mmc. luminyensis</i>	Diese Arbeit
pASK3_ <i>fpoC</i>	pASK-IBA3-Derivat, Produktion des rekombinanten FpoC-Proteins aus <i>Mmc. luminyensis</i>	Diese Arbeit
pASK3_ <i>fpoD</i>	pASK-IBA3-Derivat, Produktion des rekombinanten FpoD-Proteins aus <i>Mmc. luminyensis</i>	Diese Arbeit
pASK3_ <i>fpoI</i>	pASK-IBA3-Derivat, Produktion des rekombinanten FpoI-Proteins aus <i>Mmc. luminyensis</i>	Diese Arbeit
pBBR1_ <i>pelB_strep-long_fpoB</i>	pBBR1-Derivat, Produktion des rekombinanten FpoB-Proteins aus <i>Mmc. luminyensis</i>	Diese Arbeit

pBBR1_pelb_strep-long_fpoD	pBBR1-Derivat, Produktion des rekombinanten FpoD-Proteins aus <i>Mmc. luminyensis</i>	Diese Arbeit
pBBR1_pelb_strep-long_fpol	pBBR1-Derivat, Produktion des rekombinanten Fpol-Proteins aus <i>Mmc. luminyensis</i>	Diese Arbeit
pPIC9_fpoD (N-Terminus)	pPIC9-Derivat, Produktion des rekombinanten FpoD-Proteins aus <i>Mmc. luminyensis</i> , Teil des C-Terminus fehlt	Diese Arbeit
pPIC9_fpol	pPIC9-Derivat, Produktion des rekombinanten Fpol-Proteins aus <i>Mmc. luminyensis</i>	Diese Arbeit
pASK3_MMC_hdrD	pASK-IBA3-Derivat, Produktion des rekombinanten HdrD-Proteins aus <i>Mmc. luminyensis</i>	Kröniger et al., 2016; Kröniger 2018
pPR1_WP_019177167	Produktion von Ferredoxin WP_019177167.1 aus <i>Mmc. luminyensis</i>	Kröniger et al., 2019
pASK5_fpoB1	pASK-IBA5-Derivat, Produktion des N-terminalen Anteils von FpoB aus <i>Mmc. luminyensis</i> in <i>E. coli</i>	Diese Arbeit
pASK5_fpoB2	pASK-IBA5-Derivat, Produktion des C-terminalen Anteils von FpoB aus <i>Mmc. luminyensis</i> in <i>E. coli</i>	Diese Arbeit
pASK5_fpoC1	pASK-IBA5-Derivat, Produktion des N-terminalen Anteils von FpoC aus <i>Mmc. luminyensis</i> in <i>E. coli</i>	Diese Arbeit
pASK5_fpoC2	pASK-IBA5-Derivat, Produktion des C-terminalen Anteils von FpoC aus <i>Mmc. luminyensis</i> in <i>E. coli</i>	Diese Arbeit
pASK5_fpoD1	pASK-IBA5-Derivat, Produktion des N-terminalen Anteils von FpoD aus <i>Mmc. luminyensis</i> in <i>E. coli</i>	Diese Arbeit

pASK5_fpoD2	pASK-IBA5-Derivat, Produktion des C-terminalen Anteils von FpoD aus <i>Mmc. luminyensis</i> in <i>E. coli</i>	Diese Arbeit
pASK5_fpoI1	pASK-IBA5-Derivat, Produktion des N-terminalen Anteils von FpoI aus <i>Mmc. luminyensis</i> in <i>E. coli</i>	Diese Arbeit
pASK5_fpoI2	pASK-IBA5-Derivat, Produktion des C-terminalen Anteils von FpoI aus <i>Mmc. luminyensis</i> in <i>E. coli</i>	Diese Arbeit

2.5 Kultivierung und Stammhaltung von Mikroorganismen

2.5.1 Kultivierung von *Escherichia coli* (*E. coli*)

2.5.1.1 Medien und Zusätze

LB-Medium (l⁻¹): 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl → pH 7,5

MI-Medium (l⁻¹): 32 g Trypton, 20 g Hefeextrakt → ad 950 ml + 50 ml 20xM9-Salze und je 1 ml 0,1 M CaCl₂, 1 M MgSO₄, und 1 mM FeNH₄-Citrat nach dem autoklavieren

20xM9-Salze (l⁻¹): 120 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 60 g KH₂PO₄, 10 g NaCl, 20 g NH₄Cl

Miller-LB-Medium (l⁻¹): 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g Glucose, 20,9 g MOPS (3-(N-Morpholino)propansulfonsäure) → pH 7,4 (NaOH)

Antibiotika: Alle Kulturen von *E. coli*-Stämmen, welche den pPIC9-, pASK5-Vektor oder pASK3-Vektor enthielten wurden vor Kulturbeginn mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt (Stammlösung 100 mg/ml in 50% [v/v] Ethanol). Die Anzucht von Stämmen welche den pBBR1-Vektor trugen erfolgte mit 50 µg/ml Kanamycin (Stammlösung 50 mg/ml in H₂O_{dest}). Die Anzucht der Stämme mit pG-KJE8-Vektor erfolgte zusätzlich mit 50 µg/ml Chloramphenicol.

2.5.1.2 Vorkulturen

Vorkulturen von *E. coli*-Stämmen wurden im 5 ml Maßstab angezogen und mit dem gewünschten Material aus vorhandenen Kulturen (5 µl), oder mit Material aus der Stammsammlung beimpft (Kulturmaterial mit 20 % [v/v] Glycerol bei -70°C eingefroren). Für

die Kultivierung, welche bei 37 °C und 180 rpm (revolutions per minute / Umdrehungen pro Minute) erfolgte, wurde LB-Medium genutzt.

2.5.1.3 Kulturen zu heterologen Produktion von Proteinen (oxische Bedingungen)

Die Kulturen zur Produktion der gewünschten Proteine in LB/MI-Medium mit Stämmen welche pASK-Plasmide enthielten wurden 0,5-1 %-ig aus einer Vorkultur, welche über Nacht gewachsen war, angeimpft (100 µg/ml Ampicillin). Die Bebrütung im Schikanekolben erfolgte bei 37°C und 180 rpm, bis eine OD_{600nm} von 0,3-0,7 erreicht war. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte die Induktion mit 0,2 µg/ml Anhydrotetrazyklin (AHT). Die weitere Inkubationszeit wurde variiert. Wenn nicht anders angegeben wurden die Ansätze bei 37 °C und 180 rpm für 3,5 Stunden durchgeführt, teils wurde die weitere Kultivierung jedoch auch bei 28°C/16 °C über Nacht durchgeführt. Falls die Produktionsstämme zusätzlich das pG-KJE8 Plasmid enthielten, wurde dem Medium zu Beginn der Kultivierung 10 mg/ml L-Arabinose zugefügt, um die Expression des DnaK-DnaJ-GrpE -Chaperons zu ermöglichen. Außerdem wurden 50 µg/ml Chloramphenicol hinzugefügt (Nishihara et al., 2000). Die Expression des GroEL-GroES Chaperons wurde durch die Zugabe von AHT zum Zeitpunkt der Induktion der Expression des gewünschten Genes gestartet. Die Stämme mit pBBR1-Vektoren wurden in LB-Medium angezogen und bei 30°C und 180 rpm bebrütet. Die Ernte erfolgte, wenn nicht anders angegeben drei Stunden nach Erreichen einer OD von 1,5.

2.5.1.4 Anoxische Produktion von Proteinen in *E. coli* BL21ΔiscR (Kuchenreuther et al., 2010)

Die anoxische Produktion [FeS]-Cluster-haltiger Proteine bietet sich nach dem Verfahren von Kuchenreuther et al. (2010) an, da im genutzten Stamm der Regulator IscR fehlt (ΔiscR), welcher die Expression der Gene reguliert dessen Genprodukte für die Beladung von Proteinen mit [FeS]-Clustern zuständig sind. Auch das Medium ist durch die Zugabe von Glucose und Fumarat optimal auf anoxische Bebrütung angepasst, wobei saure Gärungsprodukte durch eine relativ starke Pufferung (MOPS-Puffer) neutralisiert werden sollen.

Zunächst wurden 200 ml Miller-LB Medium (+ 100 µg/ml Ampicillin und 50 µg/ml Kanamycin) in einem 500 ml Schikane-Kolben 1 %-ig mit einer Vorkultur von *E. coli* BL21 ΔiscR angeimpft. Der Stamm trug jeweils das rekombinante pASK3/pASK5-Plasmid zur Produktion des gewünschten Proteins. Zu Beginn der Kultivierung erfolgte die Zugabe von 2 mM FeNH₄-Citrat, wobei die Inkubation anschließend bei 30°C und 180 rpm durchgeführt wurde, bis eine OD_{600nm} von etwa 0,5 bis 0,7 erreicht war. Zu diesem Zeitpunkt erfolgte die Induktion mit 0,2 µg/ml Anhydrotetrazyklin (AHT). Außerdem wurden 2 mM Cystein und und 25 mM Natrium-Fumarat

zugegeben. Die beiden letzten Schritte erfolgten im Anaeroben-Zelt (98 % N₂ und 2 % H₂), woraufhin die Kultur luftdicht mit einem Gummistopfen verschlossen wurde. Die weitere Inkubation erfolgte über Nacht (etwa 17 Stunden) bei 16 °C und 180 rpm. Inkubationszeiten und Temperaturen wurden teilweise variiert. Entsprechende Veränderungen wurden bei den jeweiligen Versuchen angegeben. Ferredoxin aus *M. luminyensis* wurde zudem heterolog in *E. coli* nach dem Protokoll von Kröninger et al. (2019) produziert.

2.5.2 Kultivierung von *Mmc. luminyensis*

Zur Kultivierung von *Mmc. luminyensis* wurde ein Komplexmedium nach Hippe et al. (1979) verwendet:

Basismedium (l⁻¹): 0,35 g K₂HPO₄, 0,23 g KH₂PO₄, 0,5 g NH₄Cl, 0,5 g MgSO₄ x 7 H₂O, 0,25 g CaCl₂ x 2 H₂O, 2,25 g NaCl, 0,002 g FeSO₄ x H₂O, 1 ml 10 x Wolin-Lsg., 0,3 ml 10 x SL-6-Lösung, 2 g Hefeextrakt, 2 g Casiton, 0,85 g NaHCO₃, Resazurin 0,001 g, 1 g Na-Acetat x 3 H₂O → pH 8,5 mit NaOH, dann Begasung mit N₂/CO₂ (80 %/20 %) bis pH 7 (Indikator: Klärung des getrübbten Mediums)

10 x SL6-Lösung: 100 mg ZnSO₄ x 7 H₂O, 30 mg MnCl₂ x 4 H₂O, 300 mg H₃BO₃, 200 mg CoCl₂ x 6 H₂O, 10 mg CuCl₂ x 6 H₂O, 20 mg NiCl₂ x 6 H₂O, 30 mg Na₂MoO₄ x 2 H₂O

10 x Wolin-Lösung: 20 mg Biotin, 20 mg Folat, 100 mg Pyridoxin-HCl, 50 mg Thiamin-HCl x 2 H₂O, 50 mg Riboflavin, 50 mg Nicotinsäure, 50 mg Ca-D-Pantothenat, 1 mg Vitamin B₁₂, 50 mg p-Aminobenzoat, 50 mg Liponsäure.

Nach Zugabe aller Bestandteile wurde das Medium mit Natronlauge auf pH 8,5 eingestellt und in Serumflaschen (50 ml bzw. 500 ml) umgefüllt. Anschließend erfolgte eine Begasung mit N₂/CO₂ (Verhältnis 80/20) bis ein pH-Wert von 7 erreicht wurde. Die pH-Veränderung war optisch an der Klärung des zuvor getrübbten Mediums erkennbar. Die Begasung sollte neben der Einstellung des pH-Wertes, vor allem zur Entfernung von Sauerstoff aus dem Medium beitragen. Bei Erreichen des gewünschten pH-Wertes wurden die Serumflaschen luftdicht verschlossen und autoklaviert. Vor der Inokulation (10 %-ig) wurde das Medium mit 2,5 mM Cystein, 3,8 mM Natriumsulfid und einem geeigneten Substrat für die Methanogenese versetzt (Methylamine oder Methanol (MeOH)). Zudem wurde bakteriellen Kontaminationen durch die Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin (100 mg/ml Stammlösung in 50 % [v/v] Ethanol) und 10 µg/ml Tetrazyklin (10 mg/ml Stammlösung in 70 % [v/v] Ethanol) vorgebeugt.

Nach Supplementierung der Zusätze wurde die Gasphase der Serumflasche mit einem Bar H₂ (100 %) versetzt. Zunächst erfolgte eine Begasung mit Ausgleichskanüle für eine Minute. Nach entfernen der Ausgleichskanüle wurde ein Überdruck von einem Bar H₂ eingestellt. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37°C.

2.5.3 Kultivierung von *Mna. thermophilum*

Zur Kultivierung von *Mna. thermophilum* wurde ein Komplexmedium nach Sorokin et al. (2017) und Hippe et al. (1979) verwendet:

Basismedium (l⁻¹): 0,35 g K₂HPO₄, 0,23 g KH₂PO₄, 0,5 g NH₄Cl, 0,5 g MgSO₄ x 7 H₂O, 0,25 g CaCl₂ x 2 H₂O, 116,9 g NaCl, 0,002 g FeSO₄ x H₂O, 1 ml 10 x Wolin-Lsg., 1 ml 10 x SL-6-Lösung, 1 ml Spurenelementlösung (DSMZ_Medium 1369), 1 ml Selenit-Wolframat Lösung (DSMZ_Medium 385) 2 g Hefeextrakt, 2 g Casiton, 106 g Na₂CO₃, Resazurin 0,001 g, 1 g Na-Acetat x 3 H₂O → pH 9,5 mit HCl, dann Begasung mit N₂ für 10 Minuten und eine Minute mit N₂/CO₂

10 x SL6-Lösung (l⁻¹): 100 mg ZnSO₄ x 7 H₂O, 30 mg MnCl₂ x 4 H₂O, 300 mg H₃BO₃, 200 mg CoCl₂ x 6 H₂O, 10 mg CuCl₂ x 6 H₂O, 20 mg NiCl₂ x 6 H₂O, 30 mg Na₂MoO₄ x 2 H₂O

10 x Wolin-Lösung (l⁻¹): 20 mg Biotin, 20 mg Folat, 100 mg Pyridoxin-HCl, 50 mg Thiamin-HCl x 2 H₂O, 50 mg Riboflavin, 50 mg Nicotinsäure, 50 mg Ca-D-Pantothenat, 1 mg Vitamin B₁₂, 50 mg p-Aminobenzoat, 50 mg Liponsäure.

Spurenelementlösung (l⁻¹) (DSMZ_Medium 1369; Pfennig & Lippert, 1966): 2,2 g FeSO₄ x 7 H₂O, 100 mg ZnSO₄ x 7 H₂O, 30 mg MnCl₃ x 4 H₂O, 30 mg H₃BO₃, 20 mg CoCl₂ x 6 H₂O, 30 mg CuCl₂ x 2 H₂O, 30 mg NiCl₂ x 6 H₂O, 30 mg Na₂MoO₄ x 2 H₂O, 5 g EDTA

Selenit-Wolframat Lösung (l⁻¹): 0,5 g NaOH, 3 mg Na₂SeO₃ x 5 H₂O, 4 mg Na₂WO₄ x 2 H₂O

Hämin-Lösung: 50 mg Hämin in 1 ml 1 M NaOH auflösen und mit destilliertem Wasser auf 100 ml auffüllen und sterilfiltrieren.

Eisensulfid-Schlamm: 15,4 g FeSO₄ x 7 H₂O, 12,3 g Na₂S x 9 H₂O, auf 100 ml mit destilliertem Wasser auffüllen, 10 Minuten mit N₂ begasen und luftdicht verschließen.

Puffer-Zelltrockenmasse (l⁻¹): 12,1 g Tris, 0,5 g NH₄Cl, 0,25 g CaCl₂ x 2 H₂O, 116,9 g NaCl → pH 9,5 mit NaOH/HCl

Nach Zugabe aller Grundbestandteile wurde das Medium mit Salzsäure auf pH 9,5 eingestellt und in Serumflaschen (50 ml bzw. 500 ml) umgefüllt. Anschließend erfolgte eine Begasung mit N₂ für 10 Minuten und kurz vor Verschließung der Flaschen eine Begasung mit N₂/CO₂ (80 % / 20 %) für etwa eine Minute. Im Anschluss wurden die Serumflaschen luftdicht verschlossen und autoklaviert. Vor der Inokulation (10 %-ig) erfolgte die Zugabe von 1,5 mM Cystein, 0,5 mM Natriumsulfid und einem geeigneten Substrat für die Methanogenese (Methylamine oder Methanol (MeOH)). Außerdem wurden 1 ml 10 x Wolin-Lösung, 1 ml Hämin-Lösung und 250 µl Eisen-Sulfid-Schlamm pro Liter sowie 100 µM Natrium 2-Mercaptoethansulfonat (Coenzym M) hinzugefügt. Für die Kulturen, die mit Formiat wachsen sollten, wurde außerdem Formiat

hinzugefügt, wohingegen für die Kulturen, welche auf H_2 wachsen sollten, eine Gasatmosphäre von 200 kPa H_2 (100 %) in den Serumflaschen eingestellt wurde, wobei die Serumflasche zunächst eine Minute mit H_2 durchgast wurde. Die Gasatmosphäre wurde außerdem in regelmäßigen Intervallen erneuert. Die Bebrütung der Kulturen erfolgte bei 50 °C und das Wachstum konnte durch die Messung der OD_{600nm} in regelmäßigen Abständen überprüft werden. Zur Bestimmung der Zelltrockenmasse wurden die Kulturen bei den jeweils gewünschten optischen Dichten abzentrifugiert (8.500 rpm, 10 Minuten, 20 °C). Im Anschluss erfolgte ein Waschschriff mit dem angegebenen Puffer, der durch eine Na^+ -Konzentration von 2 M die Zell-Lyse verhindern sollte. Die Zellen wurden in 500 ml des Puffers gelöst und erneut abzentrifugiert. Danach erfolgte die Aufnahme des Pellets in ein definiertes Volumen des Puffers und die Trocknung bei 120°C im Heizschrank. Das Trockengewicht wurde schließlich mittels Feinwaage bestimmt und das Gewicht der Pufferbestandteile vom Gesamtgewicht abgezogen, um das Zelltrockengewicht zu erhalten. Außerdem wurde das Gewicht der Gefäße, in welchen die Trocknung stattfand, zuvor ebenso mittels Feinwaage bestimmt, um es vom Gesamtgewicht abziehen zu können.

2.5.4 Kultivierung von *Mc. vulcani*

Für die Kultivierung von *Mc. vulcani* wurde ein Komplexmedium auf Basis von DSMZ-Medium 141 genutzt.

Basismedium (l⁻¹): 0,34 g KCl, 4 g $MgCl_2 \times 6 H_2O$, 3,45 g $MgSO_4 \times 7 H_2O$, 0,5 g NH_4Cl , 0,14 g $CaCl_2 \times 2 H_2O$, 0,14 g K_2HPO_4 , 18 g NaCl, 10 ml modifizierte Wolin Spurenelementlösung, 1 g Na-Acetat, 2 g Hefeextrakt, 2 g Trypton/Pepton, 5 g $NaHCO_3$, 1 ml 10 x Wolin Vitamin-Lösung, 2 ml $Fe(NH_4)_2 (SO_4)_2 \times 6 H_2O$ -Lösung (0,1 % [w/v]), Resazurin 0,001 g.

10 x Wolin-Lösung (l⁻¹): 20 mg Biotin, 20 mg Folat, 100 mg Pyridoxin-HCl, 50 mg Thiamin-HCl $\times 2 H_2O$, 50 mg Riboflavin, 50 mg Nicotinsäure, 50 mg Ca-D-Pantothenat, 1 mg Vitamin B₁₂, 50 mg p-Aminobenzoat, 50 mg Liponsäure.

Modifizierte Wolin Spurenelementlösung (l⁻¹): Zunächst wurden 1,5 g Nitrilotriessigsäure in etwa 800 ml H_2O_{dest} gelöst und der pH-Wert mit KOH-Lösung auf 6,5 eingestellt. Im Anschluss wurden folgende Substanzen gelöst: 3 g $MgSO_4 \times 7 H_2O$, 0,5 g $MnSO_4 \times H_2O$, 1 g NaCl, 0,1 g $FeSO_4 \times 7 H_2O$, 0,18 g $CoSO_4 \times 7 H_2O$, 0,1g $CaCl_2 \times 2 H_2O$, 0,18 g $ZnSO_4 \times 7 H_2O$, 0,01 g $CuSO_4 \times 5 H_2O$, 0,02 g $KAl(SO_4)_2 \times 12 H_2O$, 0,01 g H_3BO_3 , 0,01 g $Na_2MoO_4 \times 2 H_2O$, 0,03 g $Na_2SeO_3 \times 5 H_2O$, 0,04g Na_2WO_4 . Nach Einstellung des pH-Wertes mit KOH auf PH 7,0 wurde die Lösung mit H_2O_{dest} auf 1 l aufgefüllt.

Hämin-Lösung: 50 mg Hämin in 1 ml 1 M NaOH auflösen und mit destilliertem Wasser auf 100 ml auffüllen und sterilfiltrieren.

Puffer-Zelltrockenmasse (l⁻¹): 0,34 g KCl, 4 g MgCl₂ x 6 H₂O, 3,45 g MgSO₄ x 7 H₂O, 0,5 g NH₄Cl, 0,14 g CaCl₂ x 2 H₂O, 12,1 g Tris, 18 g NaCl → pH 7,5 mit NaOH/HCl

Zunächst wurde das Basismedium (ohne Wolin-Vitaminlösung) hergestellt und auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt. Im Anschluss wurde das Medium in 50 ml bzw. 0,5 l Serumflaschen gefüllt und mit N₂/CO₂ begast bis ein pH-Wert von 7 - 7,5 erreicht war. Nach der Autoklavierung der Flaschen erfolgte die Zugabe der Wolin-Vitaminlösung, 1ml Hämin-Lösung sowie der methylierten Substrate (MeOH/Methylamine). Die Reduktion des Rest-Sauerstoffs konnte durch die Zugabe von 2,5 mM Cystein und 3,8 mM Natriumsulfid erreicht werden. Die Kulturen wurden bei 30 °C inkubiert und das Wachstum durch die Messung der OD_{600nm} in regelmäßigen Abständen überprüft. Zur Bestimmung der Zelltrockenmasse wurden die Kulturen bei den jeweils gewünschten optischen Dichten abzentrifugiert (8.500 rpm, 10 Minuten, 20 °C). Im Anschluss erfolgte ein Waschschriff mit dem angegebenen Puffer. Die Zellen wurden in 500 ml des Puffers gelöst und erneut abzentrifugiert. Danach erfolgte die Aufnahme des Pellets in ein definiertes Volumen des Puffers und die Trocknung bei 120°C im Heihschrank. Das Trockengewicht wurde schließlich mittels Feinwaage bestimmt und das Gewicht der Pufferbestandteile vom Gesamtgewicht abgezogen, um das Zelltrockengewicht zu erhalten. Außerdem wurde das Gewicht der Gefäße, in welchen die Trocknung stattfand, zuvor mittels Feinwaage ermittelt, um es vom Gesamtgewicht abziehen zu können.

2.5.5 Kultivierung von *Pichia pastoris* (*P. pastoris*)

Zur Kultivierung des Organismus und zur Proteinüberproduktion mit Hilfe des Organismus kam es zum Einsatz folgender Medien:

YPG-Medium (l⁻¹): 20 g Hefeextrakt, 10 g Pepton, 20 g Glucose

BMGY (l⁻¹): 10 g Hefeextrakt, 20 g Pepton, 100 mM Kalium-Phosphatpuffer, pH 6,0, 13,4 % YNB (Yeast-Nitrogen-Base), 4 x 10⁻⁵ % Biotin, 1 % (v/v) Glycerol

BMMY (l⁻¹): 10 g Hefeextrakt, 20 g Pepton, 100 mM Kalium-Phosphatpuffer, pH 6,0, 13,4 % YNB (Yeast-Nitrogen-Base), 4 x 10⁻⁵ % Biotin, 0,5 % (v/v) Methanol

Allen Kulturen wurden außerdem 100 µg/ml Ampicillin (100 mg/ml Stammlösung in 50 % [v/v] Ethanol) zur Vorbeugung bakterieller Kontaminationen zugesetzt.

Generell wurde *Pichia pastoris* in YPG-Medium angezogen und bei 30 °C und 180 rpm inkubiert.

Am Vortag von Expressionskulturen wurde eine Kultur 1 %-ig in BMGY-Medium angeimpft und bei 30°C und 180 rpm über Nacht inkubiert. Nach Erreichen einer OD_{600nm} zwischen 2 und 6 erfolgte die Ernte der Zellen (3 Minuten, 4000 rpm) welche anschließend in BMMY Medium (Methanol zur Induktion) auf eine OD_{600nm} von 1 resuspendiert wurden. Die Kultur wurde in

einen 500 ml Schikanekolben (Mit Watte verschlossen) überführt und bei 180 rpm und 30 °C inkubiert. Nach 12 Stunde erfolgte die Zugabe von weiteren 0,25 % Methanol. Insgesamt 24 Stunden nach Kulturbeginn wurden die Zellen geerntet und in etwa 15 ml Puffer W aufgenommen. Der Zellaufschluss erfolgte via French press (11.000 Psi). Das Lysat wurde bei 15.000 rpm für 30 Minuten zentrifugiert (4°C) und anschließend via Streptactin-Affinitätschromatographie (2.7.2) behandelt, um das gewünschte Protein mit Strep-tag aufzureinigen. Die Analyse der Elutionsfraktionen erfolgte mittels SDS-PAGE-Analysen und Westernblot.

2.5.6 Kultivierung von *Clostridium pasteurianum* (*C. pasteurianum*)

C. pasteurianum wurde unter anoxischen Bedingungen in Glukose-Hefeextrakt-Medium bei 30°C bebrütet. Das Medium wurde zuvor für 10 Minuten mit N₂ begast, luftdicht verschlossen und autoklaviert.

Glukose-Hefeextrakt-Medium (l⁻¹): 20 g Hefeextrakt, 20 g Glucose, 20 g CaCO₃

Falls die Kulturen zur Produktion von Ferredoxin genutzt werden sollten, erfolgte außerdem vor der Inokulation die Zugabe von 1,2 mM FeCl₃, 15 µM Eisenammoniumcitrat und 50 µM L-Cystein.

2.5.7 Stammhaltung

Zur Konservierung von *E. coli*-Stämmen wurde zunächst eine Vorkultur über Nacht in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum angezogen (37°C und 180 rpm). 800 µl der Vorkultur wurden mit 200 µl Glycerol (100 % (v/v)) versetzt und in ein Cryo-Vial überführt. Die Lagerung erfolgte bei -70°C. Die Stammhaltung von *Mc. vulcani*, *Mmc. luminyensis* und *Mna. thermophilum* erfolgte durch die Abnahme von 2 ml Kultur in der späten exponentiellen Phase. Das Kulturmaterial wurde anschließend in eine mit H₂ durchgaste, Serumflasche mit 2 ml 80 % [v/v] Glycerol (5 mM Dithiothreitol) überführt. Die Lagerung der anoxischen Gefäße erfolgte ebenso bei -70°C. *P. pastoris* wurde mit 100 µg/ml Ampicillin in YPG-Medium angezogen und mit 30 % Glycerin versetzt. Die Lagerung erfolgte bei -70°C.

2.5.8 Verfolgung des Wachstums via Messung der OD_{600nm}

Um den Verlauf des Wachstumes einer Kultur überprüfen zu können, wurde die optische Dichte in Küvetten im Photometer bei 600 nm folgendermaßen bestimmt. Zunächst wurde ein Leerwert mit dem entsprechenden Medium bestimmt. Nach animpfen der Kultur erfolgte die Messung der optischen Dichte bei 600 nm in regelmäßigen Abständen und wurde vom Leerwert abgezogen. Ab einer OD_{600nm} von 0,3 erfolgte die Verdünnung des Kulturmaterials, um Streulichteffekte zu vermeiden die dafür sorgen, dass die Werte unterbestimmt werden.

2.6 Molekularbiologische Methoden

2.6.1 PCR (Polymerase-Kettenreaktion) (Mullis *et al.*, 1986)

Die Polymerase Kettenreaktion ist ein Verfahren zur selektiven *in-vitro*-Amplifikation von DNS-Sequenzen. Benötigt werden dazu zwei gegenläufige Oligonukleotid-Primer, die je an einer Seite des zu amplifizierenden DNS-Fragmentes an die komplementären Einzelstränge binden (rahmen gewünschte Sequenz ein). Ausgehend von den freien 3'-OH-Enden dieser Primer sind DNS-Polymerasen in der Lage das gewünschte DNS-Fragment zu amplifizieren.

Die Reaktion läuft zyklisch ab und wird mehrere Male in der gleichen Reihenfolge wiederholt. Zunächst erfolgte einmalig eine initiale Denaturierung der DNS bei 95°C, um die Doppelstränge vollständig aufzuschmelzen. Die weiteren Schritte wurden jeweils zyklisch wiederholt. Am Anfang jedes Zyklus erfolgte eine weitere deutlich kürzere Denaturierung bei 95°C. Daraufhin erfolgte ein Annealing-Schritt der je nach Schmelztemperatur bzw. Annealing-Temperatur der Primer bei etwa 50-70°C durchgeführt wird. In diesem Schritt kam es zur Anlagerung der Primer an ihre komplementäre DNS-Sequenz. In einem weiteren Schritt kam es von den Primern ausgehend zur Elongation der gewünschten DNS-Sequenz bei 72°C. Dabei wurden eine DNS-Polymerase, sowie alle vier in der DNS vorhandenen desoxy-Nukleosidtriphosphate (dNTPs) benötigt. Die genutzte DNS-Polymerase ist hitzestabil und erträgt die hohen Temperaturen, besonders während der Denaturierung, ohne größere Aktivitätsverluste. So musste diese nicht nach jedem Zyklus neu hinzugegeben werden. Die Elongationszeit hing von der Länge des gewünschten DNS-Fragmentes und der Geschwindigkeit der DNS-Polymerase ab. Nach der Elongation begann wieder ein neuer Zyklus mit der Denaturierung. Da die DNS in jedem Zyklus verdoppelt, d.h. exponentiell vermehrt wurde, reichten meist 30-40 Zyklen zur ausreichenden Amplifikation des Fragmentes aus. Zuletzt erfolgte eine finale Elongation, bei der noch nicht komplett amplifizierte DNS-Fragmente vervollständigt wurden. Dies erfolgte ebenfalls bei 72°C.

Für die Amplifikation der Fragmente für die Klonierung wurde die Q5-Polymerase verwendet, welche eine geringe Fehlerrate aufgrund einer Proofreading-Funktion aufweist:

Reaktionsansatz: 10 µl 5X Q5 Reaction Buffer, 10 µl 5X Q5 High GC Enhancer (optional), 1 µl 10 mM dNTPs, 2,5 µl Primer forward, 2,5 µl Primer reverse, 1 µl Template DNS (aufgereinigter Vektor oder genomische DNS), 0,5 µl Q5 High-Fidelity DNA Polymerase → ad H₂O_{reinst} 50 µl

PCR Thermocycler-Programm:

Initiale Denaturierung: 98°C, 10 Minuten (1x)

Die drei folgenden Zyklen wurden je 30-mal wiederholt:

1. Denaturierung: 98°C, 10 Sekunden

2. Annealing: 50-70°C, 20 Sekunden

3. Elongation: 72°C 10-20 Sekunden pro 1 kb

Abschließende Elongation: 72 °C, 2 Minuten (1x)

Lagerung: 4-12 °C

Für die Screening-PCR/Kolonie-PCR zur Überprüfung von klonierten Konstrukten wurde mit der DreamTaq-DNS-Polymerase gearbeitet. Für die pPIC9 und pASK-Konstrukte wurden außerdem die entsprechenden Screening-Primer genutzt. Das Screening für pBBR1-Vektoren erfolgte mit dem pASK_rev-Primer und der forward Primer der jeweiligen Klonierung.

Reaktionsansatz: 5 µl Kulturmaterial in H₂O_{reinst}, 0,5 µl Primer forward, 0,5 µl Primer reverse, 0,2 µl dNTPs (25 mM), 5 µl Dreamtaq Green Buffer (10x), 1 µl DMSO (100 %), 0,2 µl Taq-Polymerase → ad 50 µl H₂O_{reinst}

PCR Thermocycler-Programm:

Initiale Denaturierung: 95°C, 10 Minuten (1x)

Die drei folgenden Zyklen wurden je 30-mal wiederholt:

1. Denaturierung: 95°C, 30 Sekunden

2. Annealing: 50-70°C, 1 Minute

3. Elongation: 72°C 1 min pro 1000 Basenpaare Länge des Amplifikats

Abschließende Elongation: 72 °C, 5 Minuten (1x)

Lagerung: 4-12 °C

Die längerfristige Lagerung der PCR-Produkte erfolgte bei 4°C, bis zur Nutzung während der Klonierung bzw. der Analyse mittels Agarose-Gelelektrophorese.

Für die PCR wurden die in der folgenden Tabelle aufgeführten Primer genutzt (Tabelle 4).

Tabelle 4: Liste der verwendeten Primer. Die Gene *fpoB* (WYS_RS00415), *fpoC* (WYS_RS00410), *fpoD* (WYS_RS00405) und *fpoI* (WYS_RS00395) aus *Mmc. luminyensis* wurden für die Klonierungen in dieser Arbeit verwendet.

Bezeichnung	Zielstruktur	Sequenz (5' → 3')	Funktion
pASK_for	pASK-Vektor-Rückgrat	GAGTTATTTTACCACTCCCT	Screening pASK-Vektoren
pASK_rev	pASK-Vektor-Rückgrat	CGCAGTAGCGGTAAACG	Screening pASK-Vektoren
pPIC9_for	pPIC9-Vektorrückgrat	GACTGGTTCCAATTGACAAGC	Screening pPIC9-Vektoren
pPIC9_rev	pPIC9-Vektorrückgrat	GCAAATGGCATTCTGACATCC	Screening pPIC9-Vektoren
<i>fpoB</i> _pASK5_for	<i>fpoB</i>	ATGGTAGGTCTCAGCGCCAGCGCCAAGGA GTTCTGGAG	Klonierung <i>fpoB</i> in pASK5
<i>fpoB</i> _pASK5_rev	<i>fpoB</i>	ATGGTAGGTCTCATATCAATCTTCCAAGAA GGTGCCCTTCA	Klonierung <i>fpoB</i> in pASK5
<i>fpoB</i> _pASK3_for	<i>fpoB</i>	ATGGTAGGTCTCAAATGG ATCTGAGCCTTTATCCCC ATGC	Klonierung <i>fpoB</i> in pASK3
<i>fpoB</i> _pASK3_rev	<i>fpoB</i>	ATGGTAGGTCTCAGCGC TATCTTCCAAGAAGGTGC CCTTCA	Klonierung <i>fpoB</i> in pASK5
<i>fpoC</i> _pASK5_for	<i>fpoC</i>	ATGGTAGGTCTCAGCGCCAACGAGAGCGT ACAACCTCACCG	Klonierung <i>fpoC</i> in pASK5
<i>fpoC</i> _pASK5_rev	<i>fpoC</i>	ATGGTAGGTCTCATATCACGGCCCCCCTA CGGTGTAGT	Klonierung <i>fpoC</i> in pASK5
<i>fpoC</i> _pASK3_for	<i>fpoC</i>	ATGGTAGGTCTCAAATGAACGAGAGCGTA CAACTCACCG	Klonierung <i>fpoC</i> in pASK3
<i>fpoC</i> _pASK3_rev	<i>fpoC</i>	ATGGTAGGTCTCAGCGCTCGGCCCCCCTA CGGTGTAGT	Klonierung <i>fpoC</i> in pASK5
<i>fpoB</i> _pBBR1 (pelB)_for	<i>fpoB</i>	ACTGTACGTAGATCTGAG CCTTTATC	Klonierung <i>fpoB</i> in pBBR1_pelB
<i>fpoB</i> _pBBR1 (pelB)_rev	<i>fpoB</i>	ACTGGGCGCGCCATCTT CCAAGAAGGTG	Klonierung <i>fpoB</i> in pBBR1_pelB
<i>fpoB</i> _pPIC9-for	<i>fpoB</i>	ACTGTACGTAGATCTGAG CCTTTATC	Klonierung <i>fpoB</i> von pASK3 in pPIC9
<i>fpoB/D/I</i> _pPIC9_rev	<i>fpoB</i>	ACTGCCTAGGTTATTTTT CGAACTGCG	Klonierung <i>fpoB/D/I</i> mit Strep-tag von pASK3 in pPIC9
<i>fpoB</i> 1_pASK5_for	<i>fpoB</i>	ATGGTAGGTCTCAGCGCCGATCTGAGCCT TTATCCCCATGC	Klonierung N-terminaler Bereich <i>fpoB</i> in pASK5

<i>fpoB1_pASK5_rev</i>	<i>fpoB</i>	ATGGTAGGTCTCATATCAGACCTCGCATTG ACGCGGGG	Klonierung N-terminaler Bereich <i>fpoB</i> in pASK5
<i>fpoB2_pASK5_for</i>	<i>fpoB</i>	ATGGTAGGTCTCAGCGCCCTGCTAGTCAA CGGATGGATCAG	Klonierung C-terminaler Bereich <i>fpoB</i> in pASK5
<i>fpoB2_pASK5_rev</i>	<i>fpoB</i>	ATGGTAGGTCTCATATCAATCTTCCAAGAA GGTGCCCTTCA	Klonierung C-terminaler Bereich <i>fpoB</i> in pASK5
<i>fpoC1_pASK5_for</i>	<i>fpoC</i>	ATGGTAGGTCTCAGCGCCAACGAGAGCGT ACAACTCACCG	Klonierung N-terminaler Bereich <i>fpoC</i> in pASK5
<i>fpoC1_pASK5_rev</i>	<i>fpoC</i>	ATGGTAGGTCTCATATCAGGAGCACGAGG ACAGGTGGTA	Klonierung N-terminaler Bereich <i>fpoC</i> in pASK5
<i>fpoC2_pASK5_for</i>	<i>fpoC</i>	ATGGTAGGTCTCAGCGCCAGGAACGTGAT CGTGGAGATCAC	Klonierung C-terminaler Bereich <i>fpoC</i> in pASK5
<i>fpoC2_pASK5_rev</i>	<i>fpoC</i>	ATGGTAGGTCTCATATCACGGCCCCCTA CGGTGTAGT	Klonierung C-terminaler Bereich <i>fpoC</i> in pASK5
<i>fpoD_pASK5_for</i>	<i>fpoD</i>	ATGGTAGAAGACAAGCGCCCCGAGATGT GGATCAACATGG	Klonierung <i>fpoD</i> in pASK5
<i>fpoD_pASK5_rev</i>	<i>fpoD</i>	ATGGTAGAAGACAATATCACCTGTCCGTCT CGCCATGC	Klonierung <i>fpoD</i> pASK5
<i>fpoD_pASK3_for</i>	<i>fpoD</i>	ATGGTAGGTCTCAAATGC CCGAGATGTGGATCAAC ATGG	Klonierung <i>fpoD</i> in pASK3
<i>fpoD_pASK3_rev</i>	<i>fpoD</i>	ATGGTAGGTCTCAGCGC TCCTGTCCGTCTCGCCA TGC	Klonierung <i>fpoD</i> in pASK3
<i>fpoD_pBBR1(pelB)_for</i>	<i>fpoD</i>	ACTGTACGTACCCGAGAT GTGGATC	Klonierung <i>fpoD</i> in pBBR1_pelB
<i>fpoD_pBBR1(pelB)_rev</i>	<i>fpoD</i>	ACTGGGCGCGCCCCCTGT CCGTCTCGCC	Klonierung <i>fpoD</i> in pBBR1_pelB
<i>fpoD_pPIC9_for</i>	<i>fpoD</i>	ACTGTACGTACCCGAGAT GTGGATC	Klonierung <i>fpoD</i> von pASK 3 in pPIC9
<i>fpoB/D/I_pPIC9_rev</i>	<i>fpoD</i>	ACTGCCTAGGTTATTTTT CGAACTGCG	Klonierung <i>fpoB/D/I</i> mit Strep-tag von pASK3 in pPIC9
<i>fpoD1_pASK5_for</i>	<i>fpoD</i>	ATGGTAGGTCTCAGCGCCACCATCACCGG CTCCGAGCC	Klonierung N-terminaler Bereich <i>fpoD</i> in pASK5
<i>fpoD1_pASK5_rev</i>	<i>fpoD</i>	ATGGTAGGTCTCATATCACAGATCGGTACC GATGGCGGC	Klonierung N-terminaler Bereich <i>fpoD</i> in pASK5

<i>fpoD2_pASK5_for</i>	<i>fpoD</i>	ATGGTAGGTCTCAGCGCCGGAAACCTGAC CCTCTTCCTGT	Klonierung C-terminaler Bereich <i>fpoD</i> in pASK5
<i>fpoD2_pASK5_rev</i>	<i>fpoD</i>	ATGGTAGGTCTCATATCAGTCAGCCACCTT GTTGCCGTTT	Klonierung C-terminaler Bereich <i>fpoD</i> in pASK5
<i>fpol_pASK5_for</i>	<i>fpol</i>	ATGGTAGGTCTCAGCGCCTCTGAAGTCAA GAAGTCCCGCAA	Klonierung <i>fpol</i> in pASK5
<i>fpol_pASK5_rev</i>	<i>fpol</i>	ATGGTAGGTCTCATATCACTGCACCTCCTG CATGGTGAG	Klonierung <i>fpol</i> in pASK5
<i>fpol_pASK3_for</i>	<i>fpol</i>	ATGGTAGGTCTCAAATGT CTGAAGTCAAGAAGTCCC GCAA	Klonierung <i>fpol</i> in pASK3
<i>fpol_pASK3_rev</i>	<i>fpol</i>	ATGGTAGGTCTCAGCGC TCTGCACCTCCTGCATGG TGAG	Klonierung <i>fpol</i> in pASK3
<i>fpol_pBBR1(pelB)_for</i>	<i>fpol</i>	ACTGTACGTATCTGAAGT CAAGAAG	Klonierung <i>fpol</i> in pBBR1_pelB
<i>fpol_pBBR1(pelB)_rev</i>	<i>fpol</i>	ACTGGGCGCGCCCTGCA CCTCCTGCATG	Klonierung <i>fpol</i> in pBBR1_pelB
<i>fpol_pPIC9_for</i>	<i>fpol</i>	ACTGTACGTATCTGAAGT CAAGAAG	Klonierung <i>fpol</i> von pASK3 in pPIC9
<i>fpoB/D/I_pPIC9_rev</i>	<i>fpol</i>	ACTGCCTAGTTATTTTT CGAACTGCG	Klonierung <i>fpoB/D/I</i> mit Strep-tag von pASK3 in pPIC9
<i>fpol1_pASK5_for</i>	<i>fpol</i>	ATGGTAGGTCTCAGCGCCTCTGAAGTCAA GAAGTCCCGCAA	Klonierung N-terminaler Bereich <i>fpol</i> in pASK5
<i>fpol1_pASK5_rev</i>	<i>fpol</i>	ATGGTAGGTCTCATATCAGTACTCCGGGGT CACGATCATA	Klonierung N-terminaler Bereich <i>fpol</i> in pASK5
<i>fpol2_pASK5_for</i>	<i>fpol</i>	ATGGTAGGTCTCAGCGCCGCTCGTTCAC CCGGGAAGAG	Klonierung C-terminaler Bereich <i>fpol</i> in pASK5
<i>fpol2_pASK5_rev</i>	<i>fpol</i>	ATGGTAGGTCTCATATCACTGCACCTCCTG CATGGTGAG	Klonierung C-terminaler Bereich <i>fpol</i> in pASK5

2.6.2 Isolierung von RNA

Um die Gesamt-RNA aus *Mna. thermophilum* zu isolieren, wurde eine Extraktion mittels TRI Reagent® (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) durchgeführt. Dazu wurden 3 Liter Kultur von *Mna. thermophilum* in der exponentiellen Phase geerntet und abzentrifugiert (17.000 x g, 30 min, 4 °C). Das Zellpellet wurde anschließend in 10 ml TRI-Reagent resuspendiert. Die Lösung wurde dann in 1,5 ml Eppendorfgefäße transferiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um den Zellaufschluss zu gewährleisten. Alle folgenden Schritte

wurden unter einer Sterilbank durchgeführt, um Kontaminationen mit RNAsen zu verhindern. Pro ml der Suspensionen wurden zunächst 100 µl 1-Bromo-3-chloropropan hinzugefügt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation (10 min / 4 °C / 20.000 x g) und die obere Phase aller Gefäße wurde vereinigt. Die vereinigten Überstände wurden mit 1 ml Isopropanol versetzt, für 10 Sekunden gemischt, und für 10 Minuten bei -20°C inkubiert, um die Nukleinsäuren zu fällen. Nach einem Zentrifugationsschritt (20.000 x g, 10 min, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und das entstandene Nukleinsäurepellet mit 1 mL eiskaltem, 75 %-igem [v/v] Ethanol gewaschen und im Anschluss unter der Sterilbank getrocknet. Nach der Trocknung wurde das Pellet in 90 µl 90 µL H₂O_{reinst} gelöst und mit 10 µL 10 x DNase-Puffer sowie 5 µL DNase I versetzt. Danach erfolgte eine Inkubation für Stunden und 37°C, um die DANN vollständig zu entfernen. Die weitere Aufreinigung der RNA erfolgte schließlich mit dem Monarch® RNA Cleanup Kit (10 µg) nach Angaben des Herstellers (New England Biolabs). Falls nach der Aufreinigung Rest-DNA vorhanden war, wurde der DNase-Verdau und die anschließende Aufreinigung der RNA wiederholt. Die Messung des RNA-Gehaltes erfolgte mittels der Messung der Absorption bei 260 nm. DNA-Kontaminationen wurden durch PCR-Analysen (2.6.1) und anschließende Auftragung auf Agarosegele (2.6.4) untersucht. Wenn bei Nutzung der Primer welche normalerweise für die RT-qPCR dienten nach 35 Reaktionszyklen kein Produkt auf dem Agarosegel erkennbar war, konnte der Ansatz für die RT-qPCR genutzt werden.

2.6.3 Quantitative Reverse Transkriptions-PCR (RT-qPCR)

Die RT-qPCR wurde zur relativen Quantifizierung der mRNA-Gehalte verschiedener Gene aus *Mna. thermophilum* im Vergleich zur mRNA-Menge eines Referenzgens genutzt. Dies ermöglichte Aussagen über die Relevanz von Genen bzw. dessen zugehörigen Proteinen für den Energiestoffwechsel, da relevante Gene häufig stark exprimiert werden. Die aufgereinigte RNA (2.6.2) wurde dazu zunächst via reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Darauf folgte eine PCR mit Primern (Tabelle 5), die spezifisch für die Zielgene waren und zur Amplifikation von Abschnitten von etwa 200 Basenpaaren genutzt werden konnten. Je mehr mRNA von einem Gen vorhanden war, desto mehr cDNA entstand. Bei der anschließenden PCR entstanden daher ebenso schneller mehr Amplifikate im Vergleich zu Genen bei welchen wenig mRNA vorhanden war. Die Amplifikate ließen sich mit dem Farbstoff SYBR-Green, welcher an doppelsträngige DNA bildet, detektieren. Mit Hilfe eines PCR-Gerätes, welches über einen optischen Detektor verfügte, konnte das SYBR Green-Signal erkannt und quantifiziert werden. Nach jedem Elongationsschritt wurden außerdem die Schmelzkurve der einzelnen Amplifikate bestimmt, um die Bildung unspezifischer Produkte erkennen zu können.

Die RT-qPCR in der vorliegenden Arbeit wurde mittels des Luna® Universal One-Step RT-qPCR Kits (New England Biolabs) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Pro Ansatz wurden 100 ng RNA eingesetzt.

Tabelle 5: Für die RT-qPCR genutzte Primer. Alle Zielstrukturen befanden sich im Genom von *Mna. thermophilum*.

Bezeichnung	Zielstruktur a)	Sequenz (5' → 3')
<i>fdhA_for</i>	<i>fdhA</i>	CTGGCGGGCTACTCAAATC
<i>fdhA_rev</i>	<i>fdhA</i>	GTTGGTGTCTGCGTTTCCT
<i>vhoG_for</i>	<i>vhoG</i>	GCCGGTTGAAGAGGAATACA
<i>vhoG_rev</i>	<i>vhoG</i>	GTGCATTTTCCGCAACTTTT
<i>hdrE_for</i>	<i>hdrE</i>	AATGGATGGGAGACGCAGAG
<i>hdrE_rev</i>	<i>hdrE</i>	AGTGCCATGAATCCCCAGAA
<i>atpC_for</i>	<i>atpC</i>	TGGAGCCAGAAGAAGTCGAG
<i>atpC_rev</i>	<i>atpC</i>	ATTACTTCCGGACAGTCGCA
<i>mbha_for</i>	<i>mbha</i>	TACAAGCCCTACCACTCGTG
<i>mbha_rev</i>	<i>mbha</i>	GCCCAAAGAAGGTGTGAGTG
<i>mcrβ_for</i>	<i>mcrβ</i>	AGGCCTCGGGTTCCAAATAA
<i>mcrβ_rev</i>	<i>mcrβ</i>	GGCTTCAGTTACTGCGGATG
<i>ftr_for</i>	<i>ftr</i>	ACAACACAGGCATAATGGGC
<i>ftr_rev</i>	<i>ftr</i>	CGACTTTTGATCCGGCTGAG
<i>mrpE_for</i>	<i>mrpE</i>	ATATAACCGGCCTCCCAACT
<i>mrpE_rev</i>	<i>mrpE</i>	ATCGATGCTCACAGTCAACG
<i>gap-dh_for</i>	<i>gap-dh</i>	CGTGGACCAATAAACGCCAT
<i>gap-dh_rev</i>	<i>gap-dh</i>	CGGTTGATTTCGATGCCATGT
<i>rib_for</i>	S15-RNA	TTGGAAGAAAACGATGCTGA
<i>rib_rev</i>	S15-RNA	GATCGGCTTCTTCTGTTTTG

a) *vho*: Vho-Hydrogenase (Untereinheit G / IMG-ID: 2787455716); *fdh*: Formiat-Dehydrogenase (Untereinheit A / IMG-ID: 2787455229); *hdr*: Heterodisulfid-Reduktase (Untereinheit E / IMG-ID: 2787456243); *15S*: Ribosomale 15S-Untereinheit (IMG-ID: 2787455393); *ftr*: Formyltransferase (IMG-ID: 2787456510); *mcr*: Methyl-Coenzym M Reduktase (Untereinheit β / IMG-ID: 2787456578); *gap-dh*: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (IMG-ID: 2787455518); *mbh*: Membrangebundene Hydrogenase (Untereinheit α / IMG-ID: 2787456596); *atp*: ATP-Synthase (Untereinheit c / IMG-ID: 2787455897); *mrp*: Na⁺/H⁺-Antiporter (Untereinheit E / IMG-ID: 2787455947). IMG: Integrated Microbial Genomes and Microbiomes-Datenbank.

2.6.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Methode wurde genutzt, um DNS-Fragmente nach ihrer Größe aufzutrennen und dadurch die Länge der Fragmente zu analysieren. Die standardisierten Gele bestanden aus 30 ml 1xTAE-Puffer in dem 0,3 g Agarose aufgekocht wurden, sodass diese in einer Konzentration von 1 % (w/v) vorlag. Vor dem Gießen wurde die Lösung mit 1, 5 µl Gele-Red-Konzentrat (Carl

Roth GmbH) versetzt. Die Flüssigkeit wurde in eine Gelelektrophorese-Kammer (mit Kamm zur Herstellung von Lade-Vertiefungen) gegossen und nach Erstarren mit 1xTAE-Puffer überschichtet. Die Proben (5-20 µl) wurden anschließend aufgetragen. Des Weiteren wurden 5-10 µl des DNA-Größenmarkers GeneRuler 1 kb (Kilobasen) DNA Ladder von Thermo Fisher aufgetragen. Die Auftrennung der DNS erfolgte bei einer Spannung von 90 V. Anschließend wurde das Gel im UV-Durchlicht betrachtet und fotografiert (Videosystem Intas, Göttingen), um die Auswertung der Bandenmuster durchführen zu können.

2.6.5 Restriktionsverdau

Restriktionsverdau wurden genutzt um spezifisch geschnittene Vektoren und PCR-Fragmente für weitere Arbeiten wie Klonierungen oder die Transformation in *Pichia pastoris* zu generieren. In einigen Fällen wurden Enzyme genutzt, welche die Hydrolyse des DNS-Doppelstranges an ihrer Erkennungssequenz katalysieren, wohingegen für Klonierungen mit pASK-Vektoren, das Restriktionsenzym *Bsal* verwendet wurde welches die Hydrolyse der DNS einige Basenpaare entfernt von dessen Erkennungssequenz katalysiert (generiert außerdem 5'-Überhang).

Als Grundlage für die Restriktionsverdau wurden mittels Plasmidpräparation (2.6.8) aus *E. coli* aufgereinigte Vektoren und mittels Gene-Jet-Purification-Kit (Thermo Scientific, Schwerte) aufgereinigte PCR-Ansätze verwendet.

Alle Restriktionsverdau wurden im 20 µl Maßstab für 60 Minuten bei 37°C durchgeführt. Nach 30 Minuten erfolgte außerdem erneut die Zugabe der Hälfte der Menge der zu Beginn eingesetzten Menge der Restriktionsenzyme. Des Weiteren wurden zu diesem Zeitpunkt im Falle von Plasmiden, welche zur Klonierung genutzt wurden, 2 µl alkalische Phosphatase hinzugegeben, um deren Enden zu dephosphorylieren und eine Religation zu verhindern.

Folgende Zusammensetzungen wurden genutzt. Die genannten Puffer und Enzyme wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA) bezogen:

Klonierungen in pASK5/pASK3:

	pASK5	DNS-Fragment (aus PCR mit Primern für Klonierung, Ansatz aufgereinigt)
DNS	5 µl	12 µl
10*Puffer G	2 µl	2 µl
<i>Bsal</i>	1 µl	1 µl
H ₂ O _{reinst}	12 µl	5 µl

Klonierungen in pPIC9

	pPIC9	DNS-Fragment (aus PCR mit Primern für Klonierung, Ansatz aufgereinigt)
DNS	5 µl	10 µl
10*Puffer <i>Bam</i> HI	2 µl	2 µl
<i>Bam</i> HI	1 µl	1 µl
<i>Sna</i> BI	2 µl	2 µl
H ₂ O _{reinst}	10 µl	5 µl

Klonierungen in pBBR1_ *pelB* *streplong*

	pBBR1	DNS-Fragment (aus PCR mit Primern für Klonierung, Ansatz aufgereinigt)
DNS	5 µl	10 µl
10*Puffer <i>Bam</i> HI	2 µl	2 µl
<i>Ascl</i>	1 µl	1 µl
<i>Sna</i> BI	1 µl	1 µl
H ₂ O _{reinst}	11 µl	6 µl

Linearisierung von pPIC9-Plasmiden zur Transformation in *Pichia pastoris* (2.6.7.2)

	pPIC9
DNS	10 µl
10*Puffer B	2 µl
<i>Stu</i> I	2 µl
H ₂ O _{reinst}	6 µl

2.6.6 Ligation

Die Methode wurde im Rahmen von Klonierungen verwendet, um das gewünschte Gen/Genfragment nach Restriktionsverdau in den ebenso via Restriktionsverdau behandelten Vektor einzubringen. Dazu wurde das Enzym T4-DNA-Ligase genutzt (Thermo Scientific, Schwerte). Das Enzym verbindet dabei Phosphatreste am 5´-Ende von DNS-Strängen mit freien 3´-Hydroxygruppen.

Die wie unter 2.6.5 beschriebenen vorbereiteten Vektoren/DNS-Fragmente wurden zunächst mittels Gene-Jet-Purification-Kit (Thermo Scientific, Schwerte) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Anschließend wurde die Ligation angesetzt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ansatz enthielt 12 µl des gewünschten DNS-Fragmentes/Genes, 4 µl des Vektors, 2 µl des im Kit enthaltenen 10xPuffers, 1 µl Polyethylenglykol 40 (PEG 40) und 1 µl T4 DNA-Ligase.

2.6.7 Transformation zur Einbringung von DNS in Organismen

2.6.7.1 Hitzeschocktransformation zur Einbringung von DNS in *E. coli*

Unter Transformation wird die Aufnahme freier DNS durch Prokaryoten verstanden. In dieser Arbeit handelte es sich dabei um Plasmid-DNS aus Ligationsansätzen, oder in Form aufgereinigter Plasmide. Dazu wurden kompetente Zellen der Firma NEB (*E. coli* NEB5α und *E. coli* BL21(DE3)) genutzt. Für die Transformation von Ligationsansätzen wurde *E. coli* DH5α verwendet, wohingegen für aufgereinigte Plasmide je nach Verwendungszweck sowohl *E. coli* DH5α, *E. coli* BL21(DE3) als auch *E. coli* BL21 Δ*iscR* genutzt wurden. Da kompetente Zellen von *E. coli* BL21 Δ*iscR* nicht kommerziell erhältlich waren, wurden diese selbst hergestellt. Dazu wurde eine Kultur in 100 ml LB-Medium (2.5.1; 50 µg/ml Kanamycin) angezogen (37°C; 180 rpm) bis eine optische Dichte von 0,6 erreicht war. Anschließend erfolgte die Kühlung der Zellen auf Eis für 20 Minuten und die Ernte in sterilen Zentrifugen-Bechern (8000 rpm, 10 min, 4 °C). Das Zellpellet wurde in 2,7 ml eiskaltem 100 mM CaCl₂ aufgenommen und mit dem gleichen Volumen 50 % [v/v] Glycerin versetzt. Dann erfolgte die Aliquotierung in sterilen 1,5 ml Eppendorfgefäßen mit Volumina von 100 µl. Die Gefäße wurden umgehend in Flüssigstickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70°C.

Zu Beginn des Transformations-Protokolls wurden 50 µl kompetenter Zellen auf Eis aufgetaut und mit 2,5 µl Ligationsansatz oder 1 µl aufgereinigtem Plasmid versetzt. Anschließend erfolgte eine 45-minütige Inkubation auf Eis. Danach wurden die Ansätze für 30 Sekunden (10 Sekunden bei *E. coli* BL21-Stämmen) bei 42°C im Wasserbad inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein weiterer 5-minütiger Inkubationsschritt auf Eis.

Nach der Aufnahme der DNS erfolgte die Regeneration der Zellen für eine Stunde in 1 ml LB-Medium (ohne Antibiotikum). Die Inkubation erfolgte bei 37°C und bei 180 rpm. Im Anschluss wurden 50-100 µl des Mediums auf einer LB -Platte (1,5 % Agarose) mit dem je nach Plasmid benötigten Antibiotikum ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Der Rest des Mediums wurde eine Minute bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet im Rücklauf resuspendiert und mit der Suspension ebenso Verfahren wie mit den 100 µl des Mediums. Am folgenden Tag waren auf den Platten einzelne Kolonien gewachsen. Die Klone konnten im Anschluss für weitere Untersuchungen eingesetzt werden.

Im Falle von Klonierungen wurde eine Screening-PCR (2.6.1) durchgeführt, um die korrekte Integration des gewünschten Inserts zu bestätigen.

2.6.7.2 Transformation von *P. pastoris* (Wu & Letchworth, 2004)

Eine 50 ml Kultur in YPG-Medium wurde zunächst auf eine OD_{600nm} von etwa 2 angezogen und geerntet (4000 rpm, 3 Minuten). Auf Grundlage der Annahme, dass bei einer OD_{600nm} von 1, 5×10^7 Zellen pro ml vorliegen wurden 8×10^8 Zellen pro Transformation vorbereitet (etwa 350 mg Feuchtgewicht). Alle Ansätze wurden in 8 ml Transformationspuffer resuspendiert und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden im Anschluss für fünf Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert und in 1,5 ml 1 M eiskaltem Sorbitol zentrifugiert. Dann wurden die Zellen dreimal mit 1,5 ml 1 M Sorbitol gewaschen (Pelletieren stets 3 Minuten bei 4000 rpm). Anschließend erfolgte die Resuspendierung der Zellen in 1 M Sorbitol in einer Konzentration von 10^{10} Zellen pro ml (pro Ansatz etwa 80-100 μ l). Dann erfolgte für jeden Ansatz die Zugabe von 5 μ l linearisierter Plasmid DNS (2.6.5), wobei es sich um verschiedene pPIC9-Konstrukte handelte. Der Ansatz wurde im Folgenden in Elektroporations-Küvetten überführt (0,2 cm). Nach einer Inkubation von 5 Minuten auf Eis erfolgte ein Elektroporationspuls bei 1,5 kV, 25 μ F und 186 Ω . Anschließend wurden pro Ansatz je 2 μ l, 20 μ l und 200 μ l auf RDB (Regeneration Dextrose *Medium*) -Agarplatten ausgestrichen. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 30 °C, bis Kolonien ersichtlich waren (ca. 3 Tage). Die Klone wurden im Anschluss via Kolonie-PCR (2.6.1) auf die genomische Integration des genutzten Vektors analysiert.

Transformationspuffer: 100 mM Lithium-Acetat, 10 mM Dithiothreitol, 0,6 M Sorbitol, 10 mM Tris-HCl \rightarrow pH 7.5 (Einstellen mit HCl)

RDB-Agar: 1 M Sorbitol, 1% (w/v) Glucose, 0,00004% (w/v) Biotin, 1,34% (w/v) Yeast Nitrogen Base (YNB) (YNB und Biotin sterilfiltriert), 2 % Agar

2.6.8 Plasmidpräparation

Zur Plasmidpräparation wurden 2-4 ml einer über Nacht bei 180 rpm und 37°C gewachsenen Kultur verwendet (*E. coli*). Das Material wurde abzentrifugiert und im Anschluss mittels eines Kits zu Plasmidpräparation (GeneJet™ Plasmid Miniprep, Thermo-Scientific, Schwerte) nach Herstellerangaben behandelt. Alle Plasmide welche neu erstellt wurden, wurden außerdem zur Kontrolle des korrekten Aufbaus sequenziert (LightRun Tube, Eurofins-Genomics).

2.6.9 Präparation genomischer DNS von *Mmc. luminyensis* und *Mna. thermophilum*

Um genomische DNS von *Mmc. luminyensis* oder *Mna. thermophilum* als Matrize für die PCR zu generieren wurde 1 ml Kulturmaterial abzentrifugiert und das Pellet in 300 μ l H_2O_{reinst} aufgenommen. Nach Resuspendierung des Pelletes enthielt die entstandene Lösung die genomische DNS des Organismus.

2.7 Proteinbiochemische Methoden

2.7.1 Zellaufschluss zur Generierung der Lysate für die Streptactin-Affinitätschromatographie (2.7.2)

Im Anschluss an die Kultivierung von *E. coli* zur Produktion von Proteinen (2.5.1) erfolgte die Ernte des Kulturmaterials für 15 Minuten bei 8000 rpm. Die Protokolle für die Aufreinigung von Proteinen unter anoxischen und oxischen Konditionen unterschieden sich dabei leicht. Für die Aufreinigung unter anoxischen Bedingungen wurde das Pellet in 7 ml Puffer W (anoxisch vorbereitet; Begasung mit N₂, 5 mM Dithiothreitol und 1 µg/ml Resazurin, dann luftdicht verschlossen) resuspendiert und mit 3 ml Lysispuffer (CellLytic B Cell Lysis Reagent, SigmaAldrich) sowie 2 µl Protease-Inhibitor-Mix (Protease Inhibitor Cocktail, SigmaAldrich) versetzt. Für die Aufreinigung unter oxischen Bedingungen wurden 10 ml Puffer W verwendet, aber kein Lysispuffer zugesetzt. Nach einer 30-minütigen Inkubation (entfiel bei Aufreinigung unter oxischen Bedingungen) wurden die Zellen für weitere 30 Minuten mittels Ultraschall aufgeschlossen. Um Zelltrümmer und unlösliche Bestandteile zu entfernen, erfolgte ein 30-minütiger Zentrifugationsschritt bei 15.000 rpm und 4 °C. Der Überstand wurde im Anschluss in die Streptactin-Affinitätschromatographie eingesetzt. Das Pellet mit unlöslichem Material wurde für 10 Minuten in 8 M Harnstoff (500 µl-3 ml) aufgekocht und via SDS-PAGE (2.7.3) und Westernblot (2.7.5) analysiert.

2.7.2 Streptactin-Affinitätschromatographie

Die Methode beruht auf der Aufreinigung von heterolog produzierten Proteinen welchen ein Strep-tag angefügt wurde. Dabei ist an die Säulenmatrix das Polypeptid Streptactin gebunden, welches eine hohe Affinität zur Aminosäuresequenz des Strep-Tags aufweist.

Das Säulenmaterial (Strep-Tactin®, IBA, Göttingen) wurde zunächst in geeigneter Menge (1-2 ml der 50 %-igen Suspension) auf eine Säule geladen. Dann erfolgte das Equilibrieren des Säulenmaterials mit einigen Säulenvolumina Puffer W. Im Anschluss wurde das aus dem Zellmaterial gewonnene Lysat (2.7.1 (*E. coli*) oder 2.5.5 (*P. pastoris*)) aufgetragen, wobei eine Inkubation von fünf Minuten auf der Säule erfolgte. Nach Durchfluss des Lysats erfolgte ein Waschschrift mit 5 Säulenvolumina Puffer W. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte fraktioniert mit 6 x 0,5 ml Puffer E. Puffer E enthält Desthiobiotin, welches eine höhere Affinität zu Streptactin als der Strep-tag besitzt und die gebundenen Proteine mit Strep-tag damit freisetzt. Um das Säulenmaterial mehrfach zu verwenden, erfolgte nach jeder Aufreinigung ein Regenerationsschritt mit Puffer R, bis die Säule eine intensiv orange Färbung annahm. Puffer R enthält HABA (2-(4-Hydroxyphenylazo)benzoesäure) in einer Konzentrationen von 1 mM, welches Desthiobiotin kompetitiv verdrängt. Zum Abschluss wurde die Säule mit Puffer W gewaschen, bis die orange Färbung (verursacht durch gebundenes HABA) vollständig entfernt war. Im Falle der hier durchgeführten Aufreinigung [FeS]-Cluster-haltiger Proteine, zeigte die

Säule meist eine graue Verfärbung. Diese sichtbaren Verunreinigungen wurden durch das Waschen mit 10 Säulenvolumina 500 mM NaOH entfernt. Dies diente gleichzeitig der Regeneration der Säule und der Schritt mit Puffer R entfiel. Da die Aufreinigung von einigen Proteinen unter anoxischen Bedingungen erfolgte (Atmosphäre 98 % N₂ und 2 % H₂), wurde den 10 min mit N₂ begasten Puffern 5 mM DTT (Dithiothreitol) zugesetzt. Als Redoxindikator wurde außerdem 1 µg/ml Resazurin hinzugefügt. Im oxidierten Zustand zeigt Resazurin eine blaue Färbung. Unter reduzierenden Bedingungen wird Resazurin zunächst zum rosa-farbigem Resorufin und schließlich zum farblosen Dihydroresorufin reduziert (Twigg, 1945).

Puffer und Lösungen:

Wenn nicht anders vermerkt diente H₂O_{dest} als Lösungsmittel.

Puffer W: 100 mM Tris, 150 mM NaCl → pH 8

Puffer E: Puffer W mit 2,5 mM Desthiobiotin

Puffer R: Puffer W mit 1 mM HABA (2-(4-Hydroxyphenylazo)benzoesäure)

Die genutzten Puffer für die anoxische Aufreinigung von Proteinen wurden für 10 Minuten mit N₂ begast und luftdicht verschlossen. Kurz vor dem Verschließen erfolgte die Zugabe von 5 mM DTT.

2.7.3 Diskontinuierliche SDS-PAGE

Die Methode dient der Auftrennung von Proteinen in einem Gel nach Ihrem Molekulargewicht (Laemmli, 1970), wobei eine Fokussierung in scharfe Banden erreicht wird, da Polyacrylamid-Gele im Vergleich zu Agarose-Gelen Poren mit einer besser definierten Form und Größe bilden. Zudem zeigen die Gele eine hohe Stabilität.

In dieser Arbeit wurde unter anderem die diskontinuierliche SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) angewandt, wobei die Probe zunächst durch ein Sammelgel läuft, welches eine geringere Konzentration an Acrylamid und N,N'-Methylen-Bisacrylamid aufweist und somit etwas größere Poren hat als das nachgeschaltete Trenngel. Das Sammelgel hat die Aufgabe die Probe an der Front zum Trenngel zu konzentrieren, um die Bandenschärfe zu verbessern. Im Trenngel erfolgt die eigentliche Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht, aufgrund der geringeren Porengröße und der Veränderung des pH-Wertes des Puffers. Das Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid bestimmt dabei die Porengröße.

Folgendes Protokoll wurde durchgeführt: Die Proben wurden zunächst mit H₂O_{dest} auf die gewünschte Proteinkonzentration verdünnt, sodass im Anschluss 1-5 µg Protein auf die Gele geladen werden konnten. Da die maximale Probemenge 10 µl war wurde bei Proben, welche

eine zu niedrige Proteinkonzentration besaßen, um eine Beladung mit 1 µg Protein zu erreichen, das maximale Volumen eingesetzt. Im Falle der analysierten unlöslichen Fraktionen ist anzumerken, dass stets das maximale Volumen geladen wurde, da keine Konzentrationsbestimmung erfolgte. 10 µl der Proben wurden jeweils mit 10 µl reduzierendem Probenpuffer versetzt. Die fertigen Proben wurden schließlich für 10-15 Minuten bei 85°C erhitzt. Die SDS-PAGE wurde in Gelkammern (BioRad, Hercules, Kalifornien, USA) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Nach Gießen des Trenngels wurde dieses mit Ethanol (70 % (v/v)) überschichtet. Nachdem das Trenngel erstarrt war, konnte das Ethanol abgegossen werden und mit dem Gießen des Sammelgels begonnen werden. Nach Fertigstellung der Gele konnten die aufbereiteten Proben (20 µl) sowie 5 µl eines Proteingrößen-Markers (Page Ruler Prestained Protein Ladder, MBI Fermentas) aufgetragen werden. Die Kammer wurde an eine Spannungsquelle angeschlossen, wobei die Spannung während des Laufs im Sammelgel auf 60 V eingestellt wurde und mit Erreichen des Trenngels auf 100 V erhöht wurde. Nachdem die Gele aus der Kammer entfernt wurden, wurden diese zur Analyse der Proteinbandenmuster via Silberfärbung (2.7.4) oder Westernblot (2.7.5) weiter analysiert.

Puffer und Lösungen:

Wenn nicht anders vermerkt diente $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ als Lösungsmittel.

Sammelgelpuffer: 0,56 M Tris → pH 6,6 (Einstellen mit HCl)

Trenngelpuffer: 1,87 M Tris → pH 8,8 (Einstellen mit HCl)

SDS-Lösung: 0,5 % [w/v] SDS

Ammoniumpersulfat(APS)-Lösung: 10 % APS [w/v]

Elektrodenpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS [w/v], $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ add 1000 ml
→ pH ca. 8.3 (nicht einstellen)

Probenpuffer: 2,0 ml Sammelgelpuffer, 0,1 ml Bromophenolblau (1 % [w/v] in Ethanol), 0,5 ml β-Mercaptoethanol, 5,0 ml Glycerin, $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ add 10 ml

Sammelgel (5 %): 0,33 ml Acrylamid-Lösung (Rotiphorese Gel 40), 0,4 ml Sammelgelpuffer, 0,4 ml SDS-Lösung, 0,87 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$

Trenngel (12,5 %): 2,0 ml Acrylamid-Lösung (Rotiphorese Gel 40), 1,2 ml Trenngelpuffer, 1,2 ml SDS-Lösung, 1,6 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$

Zur Polymerisation von Sammel- und Trenngel wurden den Lösungen vor dem Gießen 5 µl TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin) und 30 µl der APS-Lösung hinzugegeben.

Neben der genannten Methode wurden außerdem Gradientengele der Firma BioRad genutzt (4–20% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels), wobei der gleiche Laufpuffer wie zuvor beschrieben genutzt wurde. Der Lauf der Gradientengele erfolgte bei einer Spannung von 100 V. Die Methode wurde insbesondere zur Analyse der Quervernetzungsansätze (2.7.9)

genutzt, da Proteine von deutlich unterschiedlichem Molekulargewicht vorlagen. Je nach Ansatz wurden 1-20 µg Protein je Ladungstiefe aufgetragen. Die Proben wurden vor der Auftragung wie zuvor beschrieben aufbereitet.

2.7.4 Silberfärbung (Blum et al., 1987)

Die Methode diente der unspezifischen Visualisierung von Proteinen in SDS-Polyacrylamid-Gelen. Das Prinzip beruht auf der Bindung von Silberionen (Ag^+) an negativ geladene Seitenketten der Proteine und der anschließenden Reduktion durch Formaldehyd. Die Entstehung von elementarem Silber macht die Proteine als bräunliche Banden im Gel erkennbar.

Zunächst wurden die Proteine im Gel fixiert. Dazu erfolgte ein 20-minütiger Inkubationsschritt in Fixierungslösung. Im Anschluss erfolgten 10-minütige Waschschrte in 50 % Methanol [v/v] und $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$. Nach einer 1-minütigen Inkubation in Thiosulfatlösung, erfolgten zwei 1-minütige Waschschrte in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$, bevor eine 20-minütige Inkubation in Imprägnierungslösung folgte. Letztgenannter Schritt erfolgte in der Dunkelheit und bei 4°C (Kühlschrank). Anschließend wurde das Gel so lange in Entwicklungslösung inkubiert, bis die Banden klar sichtbar waren. Die Reaktion wurde durch die abschließende Inkubation des Gels in Stopplösung abgestoppt. Alle Schritte wurden, wenn nicht anders vermerkt, unter konstantem Schütteln und bei Raumtemperatur durchgeführt.

Puffer und Lösungen:

Wenn nicht anders vermerkt diente $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ als Lösungsmittel.

Fixierungslösung: 50 % Methanol [v/v], 12 % Eisessig [v/v], 25 µl Formaldehyd (37 % [v/v]) auf 50 ml Lösung

50 %-Methanol: 50% Methanol [v/v]

Thiosulfatlösung: 0,02% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ [w/v]

Imprägnierungslösung: 0,1 % AgNO_3 [w/v]

Entwicklungslösung: 3 % Na_2CO_3 [w/v], 50 µl Formaldehyd (37 % [v/v]) und ein Krümmel $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$ auf 50 ml Lösung

Stopplösung: 5 % Eisessig [w/v]

2.7.5 Westernblot

Der Westernblot beruht auf der Übertragung der Proteine aus dem SDS-Gel auf eine Membran (hier: Nitrocellulose (NC)), auf welcher im Anschluss spezifisch (Immundetektion) oder unspezifisch Proteine angefärbt werden können.

Für den Blot wurden SDS-Gele direkt nach deren Lauf verwendet. Daneben wurden 6 Lagen Whatman-Papier sowie die NC-Membran benötigt. Alle Bestandteile wurden auf die Größe

des Gels zurechtgeschnitten und in Towbinpuffer äquilibriert. Der Aufbau in der Blotting-Kammer erfolgte durch Auflegen von 3 Lagen Whatman-Papier, der NC-Membran, dem SDS-Gel und erneut drei Lagen Whatman-Papier (von unten nach oben). Die Kammer wurde an eine Spannungsquelle angeschlossen und für 30 Minuten einer Spannung von 15 V ausgesetzt. Die durch SDS maskierten und damit negativ geladenen Proteine, migrierten vom Gel aus zum Pluspol und damit auf die entsprechend platzierte Membran.

In dieser Arbeit wurde die Methode genutzt, um heterolog produzierte Proteine spezifisch anhand des Strep-Tags nachzuweisen. Nach dem Blot wurde die Membran dafür zunächst für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 5 % [w/v] Milchpulver-Lösung (Lösungsmittel: Phosphate Buffered Saline (PBS)) blockiert. Im Anschluss erfolgten drei 5-minütige Waschschrte mit PBS. Im Anschluss wurden 20 ml PBS und 5 µl der Lösung mit Streptactin-HRP (Meerrettichperoxidase)-Konjugat auf die Membran gegeben. In einem 1-2-stündigen Inkubationsschritt sollte das Konjugat spezifisch an den Strep-tag der heterolog produzierten Proteine binden. Um die Anzahl unspezifischer Bindungen zu verringern wurde danach ein Waschschrte (3 x 5 Minuten mit PBS) durchgeführt. Die Entwicklung des Ansatzes wurde durch die Zugabe von 20 ml PBS mit 200 µl 4-Chloro-1-naphthol-Lösung (3 % [v/v] in Methanol) und 20 ml Wasserstoffperoxid (30 % [v/v]) gestartet. Die am Streptactin befindliche HRP war damit befähigt 4-Chlor-1-naphthol, mit H₂O₂ als Oxidationsmittel, zu oxidieren. Die Proteinbanden nahmen durch das entstehende Oxidationsprodukt eine violette Färbung an. Abgestoppt wurde die Reaktion durch mehrmaliges Waschen der Membran in H₂O_{dest.}

Puffer und Lösungen:

Wenn nicht anders vermerkt diene H₂O_{dest} als Lösungsmittel.

Towbinpuffer: 50 mM Tris, 376 mM Glycin, 20 % [v/v] Methanol → pH 8,3 (nicht einstellen)

1 x PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 3,5 mM Na₂HPO₄ x 7 H₂O, 1,47 mM KH₂PO₄ → pH 7.3 (einstellen mit HCL)

Für die Gradientengele, welche zur Auftrennung der Quervernetzungsansätze (2.7.9) genutzt wurden erfolgte der Western Blot via Tank-Blotting in der Tank Blotting-Einheit Hoefer™ TE62. Dazu wurden die im Set enthaltenen Schaumstoffkissen sowie die benötigten Filterpapiere und die Blot-Membran in den genutzten Laufpuffer getaucht. Als Membranen wurden entweder Nitrocellulosemembranen (0,2 µm Porengröße) oder PVDF-Membran (0,2 µm Porengröße) genutzt. Die PVDF-Membranen wurden zuvor außerdem in Methanol getaucht. Für den Aufbau des Blots wurde zunächst ein Schaumstoffkissen in die vorgesehene Halterung gelegt, wobei zwei Filterpapiere, die genutzte Membran, das Gel und erneut zwei Filterpapiere folgten. Zum Schluss kam ein zweites Schaumstoffkissen dazu. Der Aufbau konnte im Anschluss in die Puffer-gefüllte Kammer gesetzt werden. Der Lauf erfolgte bei 300 mA für ca. 3 Stunden im

Kühlraum und unter ständigem Rühren (Magnetrührer). Der Erfolg des Blots wurde danach zunächst mit einer Ponceau-Roth-Färbung (0.5 % Ponceau S, 1 % Essigsäure in H₂O_{dest}) überprüft. Nach der Entfernung des roten Farbstoffs mit H₂O_{dest} erfolgte die weitere Entwicklung. Zunächst wurde die Membran für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 5 % [w/v] Milchpulver-Lösung (Lösungsmittel: Phosphate Buffered Saline (PBS)) blockiert. Danach erfolgten drei Waschschrte für je 5 Minuten in PBS. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem genutzten primären Antikörper in entsprechender Verdünnung für eine Stunde bei Raumtemperatur, wobei dann erneut drei Waschschrte für je 5 Minuten in PBS erfolgten. Darauffolgend wurde die Membran für eine Stunde mit dem sekundären Antikörper (goat anti-rabbit IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology, 1:5000 verdünnt) inkubiert, woraufhin erneut drei Waschschrte für je 5 Minuten in PBS folgten. Da der sekundäre Antikörper mit der Meerrettichperoxidase gekoppelt war, erfolgte die weitere Entwicklung des Blots ab diesem Schritt wie zuvor für das HRP-Streptactin-Konjugat beschrieben.

Laufpuffer (l⁻¹): 25 mM Tris; 192 mM Glycin, 18 % Methanol, 0,01 % SDS (pH 8,4 → einstellen nicht erforderlich)

Die in Tabelle 6 gelisteten primären Antikörper wurden genutzt.

Tabelle 6: Primäre Antikörper, welche im Rahmen der Western-Blots zur Detektion von HdrD und Fpol aus *M. luminyensis* dienten. Als sekundärer Antikörper wurde in allen Ansätzen der gleiche genutzt (goat anti-rabbit IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology, 1:5000 verdünnt).

Antikörper	Herkunft	Zielstruktur	Genutzte Verdünnung
Anti_HdrD	Kaninchen	HdrD aus <i>Mmc. luminyensis</i>	1:500
Anti_Fpol1	Kaninchen	Fpol aus <i>M.luminyensis</i>	1:100
Anti_Fpol2	Kaninchen	Fpol aus <i>Mmc. luminyensis</i>	1:100

Alle Antikörper wurden durch die Firma Davids-Biotechnologie (Regensburg, Deutschland) hergestellt. Das Antigen-Material zur Injektion in Kaninchen wurde im Falle des Antikörpers für HdrD von *Mmc. luminyensis* im Rahmen der vorliegenden Arbeit heterolog in *E. coli* auf Grundlage des Protokolls von Kröninger et al., (2016) hergestellt. Das Serum wurde von der genannten Firma außerdem mittels Affinitätschromatographie behandelt, um die Antikörper gegen HdrD spezifisch aufzureinigen. Fpol aus *Mmc. luminyensis* wurde mit einem Antiserum nachgewiesen, das gegen Oligopeptide erzeugt wurde, die immunogene Epitope umfassen

(3.3.2.3), die von der Fpol-Aminosäuresequenz abgeleitet sind (Davids Biotechnologie, Regensburg, Deutschland). Die Peptide zur Immunisierung der Kaninchen wurde dabei von der genannten Firma chemisch synthetisiert und vor der Injektion an Schlitzschnecken-Hämocyanin gekoppelt. Die Antikörper wurden ebenfalls durch Affinitätschromatographie aus dem Serum aufgereinigt (Davids Biotechnologie, Regensburg, Deutschland) und in einer Konzentration von $1,3 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$ in PBS mit 0,01% Thimerosal und 0,1% BSA gelagert.

2.7.6 Bradford-Assay (Bradford, 1976)

Der Test diente der Quantifizierung von Proteinen in Lösung und beruht auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie- Brilliant-Blau an Proteine und der damit verbundenen Bildung intensiv blauer Komplexe. 20 μl der Proben wurde jeweils mit 980 μl Bradford-Reagenz gemischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur und lichtgeschützt inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Absorption bei 595 nm. Zudem wurde eine Standardreihe mit verschiedenen Konzentrationen von Rinderserumalbumin (BSA erstellt). Als Nullwert diente eine Messung mit 20 μl Puffer E. Letztlich konnte auf Grundlage der Standardreihe eine Quantifizierung des Proteins in den Proben erfolgen.

2.7.7 Isolierung von Ferredoxin aus *C. pasteurianum*

Zunächst wurden drei Liter Kultur von *C. pasteurianum* wie unter 2.5.6 beschrieben angezogen und in der späten exponentiellen Phase geerntet (8.500 rpm, 10 min). Alle Schritte ab der Ernte erfolgten unter oxidischen Bedingungen. Das Pellet wurde in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ aufgenommen und die Zellen mittels Ultraschall lysiert. Die Entfernung der Zellreste erfolgte in einem weiteren Zentrifugationsschritt (12.000 rpm, 17 min, 4°C). Der Überstand wurde mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ auf 50 ml aufgefüllt. Dann erfolgte die Zugabe von 50 ml eiskaltem Aceton unter dauerhaftem Rühren, um den Großteil der Proteine auszufällen. Ferredoxine und Flavodoxine bleiben bei dieser Prozedur jedoch in Lösung. Ein anschließender Zentrifugationsschritt (12.000 rpm, 17 min, 4°C) entfernte alle ausgeflockten Proteine und der Überstand wurde für eine Anionenaustausch-Chromatographie zur Aufreinigung von Ferredoxinen eingesetzt (Säulenmaterial: DEAE-Cellulose; Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg, Deutschland). Nach Beladung der Säule konnten die Ferredoxine und Flavine als braun-gelber Ring identifiziert werden, wobei die Flavine durch einen Waschschrift mit 200 mM TrisxHCl-Puffer (pH 8,0) entfernt wurden. Dabei wurde der Waschschrift so lange durchgeführt, bis keine gelbe Flüssigkeit mehr von der Säule runter gespült wurde. Die Elution der Ferredoxine wurde mit einem 500 mM TrisxHCl-Puffer (pH 8,0) durchgeführt. Alle Elutionsfraktionen mit hohen Ferredoxin-Konzentrationen, welcher an einer bräunlichen Färbung erkennbar waren, wurden vereinigt und anschließend zur Entsalzung mit Entsalzungssäulen (Amicon Ultra-15 Zentrifugen-Filtereinheiten; Merck Millipore, Schwalbach, Deutschland) mit einem Ausschlussvolumen von 3 kDa auf eine Konzentration von etwa 100 μM aufkonzentriert und

bei -70°C gelagert. Für die Quervernetzungsversuche wurde dabei der Puffer durch einen Kaliumphosphatpuffer (50 mM, pH 7,0) ausgetauscht. Die Konzentrationsbestimmung für Ferredoxine erfolgte im Vergleich zu den anderen Proteinen in dieser Arbeit nicht mittels Bradfordtest (2.7.6), da Ferredoxine über wenige basische Aminosäuren verfügen. Aus diesem Grund wurde die Konzentration durch die Messung der Absorption bei 390 nm bestimmt. Im oxidierten Zustand absorbieren Ferredoxine mit zwei [4Fe-4S]-Clustern bei 390 nm mit einem Extinktionskoeffizienten von $30 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und im reduzierten Zustand mit $19 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Kaster 2010; Hong & Rabinowitz, 1970).

2.7.8 Präparation von Cytoplasma- und Membranfraktion von *Mmc. luminyensis* und *Mna. thermophilum*

Für die Präparation der Cytoplasma- und Membranfraktion wurden zunächst 5-10 Liter Kulturen in der Mitte der exponentiellen Phase (OD 0,2) geerntet ($17.000 \times g$, 30 min, 4 °C). Alle Schritte erfolgten unter anoxischen Bedingungen in der Anaerobenkammer, um Sauerstoff-sensitive Proteine vor der Oxidation zu schützen. Das erhaltene Pellet wurde nach der Ernte in Membranpräparationspuffer aufgenommen und resuspendiert, um Medienreste zu entfernen. Schließlich erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt ($17.000 \times g$, 30 min, 4 °C) und das erhaltene Pellet wurde in 20 ml Puffer gelöst. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall (Bandelin Sonoplus Sonicator, Bandelin Electronic, Berlin, Deutschland; 30 min; gepulste Ultraschallintervalle; 50 % Intensität) und die Zellreste wurde im Anschluss durch erneute Zentrifugation entfernt ($30.000 \times g$, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde dann in Ultrazentrifugationsröhrchen überführt und bei $300.000 \times g$ für 90 min bei 4 °C in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Danach wurde der Überstand, welcher die Cytoplasma-Fraktion darstellte, vorsichtig entfernt und das Pellet erneut in Puffer resuspendiert, wobei das Zentrifugationsröhrchen vollständig gefüllt wurde. Dies diente der Entfernung von Rückständen des Cytoplasmas. Die Membran wurde erneut durch eine Zentrifugation in der Ultrazentrifuge pelletiert ($300.000 \times g$, 90 Minuten, 4 °C) und in 500 µl bis 1 ml Puffer aufgenommen. Sowohl Cytoplasma- als auch Membranfraktion wurden in anoxischen Glasgefäßen gelagert und bei -70°C eingefroren. Die Ermittlung der Proteinkonzentration erfolgte mittels Bradford-Test (2.7.6). Zu Solubilisierung der Membranen erfolgte eine Inkubation des Pellets nach dem ersten Ultrazentrifugationsschritt im genutzten Puffer der zusätzlich 1 % [v/v] Triton X-100 enthielt für eine Stunde bei 4°C. Danach erfolgte ein Ultrazentrifugationsschritt ($300.000 \times g$, 90 Minuten, 4 °C) und der erhaltene Überstand enthielt die solubilisierten Membrankomponenten. Die Lagerung erfolgte ebenfalls unter anoxischen Bedingungen bei -70°C.

Puffer für Membranpräparation von *Mmc. luminyensis*: 50 mM Kalium-Phosphat-Puffer, 5 mM DTT, 1 mg/l Resazurin, pH 7

Puffer für Membranpräparation von *Mna. thermophilum*: 100 mM TrisxHCl, 2 M NaCl, 5 mM DTT, 1mg/l Resazurin, pH 8,5

Die genutzten Puffer wurden für 10 Minuten mit N₂ begast und luftdicht verschlossen. DTT wurde erst kurz vor dem Verschließen hinzugefügt.

2.7.9 Interaktionsstudien mit Quervernetzungsreagenzien

Die Versuche zur Quervernetzung wurden mit verschiedenen Reagenzien durchgeführt. So wurden Dimethyl Adipimidat (DMA), Dimethyl Suberimidat (DMS) und Disuccinimidyl suberate (DSS) genutzt. Die Reagenzien wurden für die Versuche frisch in 50 mM Lösungen angesetzt wobei H₂O_{reinst} (DMA/DMS) oder Dimethylsulfoxid (DSS) als Lösungsmittel dienten. Die genutzten Proteine in Form von HdrD oder Ferredoxin (1- 5 µg in 100 µl Ansatz), stammten aus einer anoxischen Überproduktion und lagen somit im nativen Zustand vor. Da Puffersubstanzen mit primären Aminogruppen wie Tris ebenso mit den Quervernetzern reagieren, wurde der Elutionspuffer bei der Strep-Tactin-Affinitätschromatographie auf Basis eines anoxischen Kalium-Phosphat-Puffers (50 mM / pH 8,0, 5 mM Dithiothreitol) angesetzt. Da Ferredoxin je nach Redoxstatus unterschiedlich starke Interaktionen mit Proteinen eingeht (Cassan et al., 2005; Sétif et al., 2009; Srivastava et al., 2014) wurden alle Versuche sowohl mit reduziertem als auch oxidiertem Ferredoxin durchgeführt. Das reduzierte Ferredoxin wurde nach dem Protokoll von Kröniger et al., (2019) durch die Reduktion mit Titancitrat hergestellt und der Redoxstatus durch die Absorption bei 390 nm verfolgt (2.7.7). Die Quervernetzungs-Reagenzien wurden in den vom Hersteller angegebenen Puffern gelöst und die Konzentration nach Herstellerangaben variiert (Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland). Die Zugabe der Membranpräparationen oder des Cytoplasmas von *Mmc. luminyensis* erfolgte in Mengen von 10-30 µg Protein pro Ansatz (100 µl). Die Inkubationszeit lag zwischen 2 – 30 Minuten bei 4°C. Der Stopp der Reaktion erfolgte durch die Zugabe von 50 mM Tris. Die Analyse erfolgte via Strep-Tactin-Affinitätschromatographie und anschließendem Western-Blot. Für den Quervernetzer 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)Carbodiimide (EDC) wurden die gleichen Konzentrationen der Membranpräparationen und von HdrD bzw. Ferredoxin genutzt. Die Durchführung der Quervernetzungsreaktion richtete sich nach dem Protokoll des Herstellers (Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland) und wurde unter anoxischen Bedingungen durchgeführt (98 % N₂ / 2 % H₂).

2.7.10 Interaktionsstudien mit Streptactin-Säule und einer N-Hydroxysuccinimid-aktivierten Sepharosesäule

Die Interaktionsversuche mit Strept-Tactin-Säule (Strep-Tactin®, IBA, Göttinge) und NHS-aktivierter Sepharose (NHS-Activated Sepharose™ 4 Fast Flow, VWR, Darmstadt) erfolgten zunächst durch die Bindung von Ferredoxin oder HdrD an die Säule (1 ml Säulenvolumen). Im Falle der Strept-Tactin Säule erfolgte der Prozess wie unter 2.7.2 beschrieben, wobei die

Elution der Proteine unterlassen wurde, um diese im beschriebenen Versuch nutzen zu können. Die kovalente Bindung von HdrD oder Ferredoxin an die NHS-aktivierte Säule erfolgte wie vom Hersteller (VWR, Darmstadt) angegeben. HdrD und Ferredoxin wurden dazu in Kaliumphosphatpuffer (50 mM; 5 mM Dithiothreitol) vorbereitet, um die Amino-reaktive Säule nicht durch Tris-Puffer abzusättigen. Nach der Vorbereitung der Säulen wurden Membran-Fractionen oder Cytoplasma-Fractionen in solubilisierter und nicht solubilisierter Form von *Mmc. luminyensis* (2.7.8) in Mengen von 100 µg Protein über die Säulen gegeben. Die Waschschritte erfolgten jeweils mit 5 Säulenvolumen anoxisch präpariertem Puffer W (2.7.2). Die Elution wurde in beiden Fällen mit 1ml 100 mM NaOH durchgeführt. Der Versuch fand vollständig unter anoxischen Bedingungen statt (98 % N₂ / 2 % H₂). Die Analyse der Elutionsfraktionen erfolgte nach Aufkonzentrierung mit Entsalzungssäulen (Amicon Ultra-15 Zentrifugen-Filtereinheiten; Merck Millipore, Schwalbach, Deutschland) mit einem Ausschlussvolumen von 3 kDa auf ein Volumen von 100 µl, mittels Bradfordassay und SDS-PAGE-Analysen sowie Western-Blot.

2.7.11 Enzymatische Analysen (Enzymassays)

2.7.11.1 Assays mit Methylviologen (MV) und 2-Hydroxyphenazin

Die enzymatischen Aktivitäten in den Cytoplasma-Membranen (1-5µg Protein) von *Mna. thermophilum* wurden in anoxisch präparierten Glasküvetten (N₂-Durchgasung) mit 700µL anoxisch präpariertem Puffer gemessen. Für die Analyse der H₂-abhängigen MV-Reduktion erfolgte der Test unter H₂-Atmosphäre, wobei ein 100 mM Tris/HCl-Puffer pH 9,5 mit 1 µg Resazurin pro ml, 2 M NaCl und 5 mM Dithiothreitol verwendet wurde. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 7mM Methylviologen gestartet. Die Formiat-Dehydrogenase-Aktivität wurde unter einer N₂-Atmosphäre mit dem gleichen Puffer analysiert, wobei die Reaktion durch die Zugabe von 10 mM Formiat gestartet wurde. Für die Messung der Heterodisulfid-Reduktase-Aktivität wurde ein 100 mM Tris/HCl-Puffer mit 2 M KCl, 5 mM Dithiothreitol und 1µg Resazurin pro ml verwendet. 7 mM MV wurden zugegeben und durch Zugabe von Titancitrat reduziert, bis eine Absorption von etwa 2,0 bei 604 nm erreicht war. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Membranen (1-5µg Protein) und 100 µM CoM-S-S-CoB gestartet. Durch das Absorptionsmaximum von Methylviologen bei 604 nm ($\epsilon_{604nm}: 13,6 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$) konnte in allen Fällen eine Oxidation/Reduktion der Substanz spektrophotometrisch verfolgt werden. Zur Bestimmung der optimalen pH-Werte wurde ein kombiniertes Puffersystem aus Tris/HCl, MOPS und Glycin-HCl (jeweils 50 mM-Endkonzentration) verwendet, wobei ebenso 2 M KCl oder 2 M NaCl und 1 µg/ml Resazurin enthalten waren. Für die Messung der Ionenkonzentration wurden die Konzentrationen von KCl und NaCl zwischen 0-4 M variiert. Alle Tests wurden bei 50°C durchgeführt. Das Heterodisulfid wurde für alle Enzymtests nach dem Protokoll von Welte & Deppenmeier (2011 a) synthetisiert.

Für die Messungen mit 2-Hydroxyphenazin (OH-Phen/Hydroxyphenazin) wurden ebenfalls luftdicht verschlossene und mit N₂ durchgaste Glasküvetten verwendet, die mit 700µL 100 mM Tris/HCl, pH 8,5, gefüllt waren und 2 M KCl, 5 mM Dithiothreitol, 1µg/ml Resazurin und 200 µM Hydroxyphenazin enthielten. Nach der Zugabe von Cytoplasma-Membranen von *Mna. thermophilum*, erfolgte der Start des Tests durch die Zugabe von 50 µM Formiat oder schrittweise Zugabe von H₂. Nach der vollständigen Oxidation von Formiat bzw. molekularem Wasserstoff, wurde 1 mM Heterodisulfid zugegeben und die Oxidation von Hydroxyphenazin gemessen. Die Reduktion und Oxidation von Hydroxyphenazin konnte spektrophotometrisch bei 420 nm Wellenlänge ($\epsilon_{\text{OH-Phen}_{\text{oxidiert}}}=2,9 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) analysiert werden (Brodersen et al., 1999; Bäumer et al., 1998).

Für die Experimente mit DPI wurde dieses in DMSO gelöst und zwei Minuten vor Start der Zugabe der Substrate zum Ansatz zugefügt.

Alle Enzymtests wurden bei 50 °C durchgeführt. Die genutzten Puffer wurden für 10 Minuten mit N₂ begast und luftdicht verschlossen. DTT wurde erst kurz vor dem Verschließen hinzugefügt.

Die Steigung der entstehenden Geraden in den spektro-photometrischen Assays, als Änderung der Absorption pro Minute (ΔE), wurde zur Berechnung der Volumenaktivität ($\mu\text{mol}/(\text{min} \times \text{ml}) = \text{U/ml}$) verwendet:

$$\text{Volumenaktivität [U/ml]} = (\Delta E \times V) / (\epsilon \times v \times d)$$

ΔE = Absorptionsänderung pro Minute

V = Gesamtvolumen des Ansatzes

v = Eingesetztes Volumen der Enzymlösung

d = Dicke des Strahlenganges (1 cm)

ϵ = Extinktionskoeffizient (hier: Methylviologen (604 nm) = 13,6 mM⁻¹ x cm⁻¹ oder Hydroxyphenazin (420 nm) = 2,9 mM⁻¹ x cm⁻¹)

Aus der Volumenaktivität wurde im Anschluss die spezifische Aktivität ermittelt, in dem der Quotient aus Volumenaktivität und Konzentration des Membranproteins gebildet wurde.

2.7.11.2 Ellmans-Test

Zur Ermittlung des Gesamt-Elektronentransports in den Membranen von *Mna. thermophilum* wurde das Ellmans-Reagenz (Ellman, 1959) genutzt, welches zur Detektion von freien Thiolgruppen verwendet werden kann. Dies diente der Detektion der Reduktion des

Heterodisulfids zu den beiden Thiole Coenzym M und Coenzym B. Zunächst wurde dazu ein durch N₂ Begasung anoxisch präpariertes Glasgefäß mit 200 µl 100 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,5, 2 M NaCl, 1 µg/ml Resazurin) sowie 5 mM Heterodisulfid gefüllt und mit Ti(III)-citrat reduziert bis der Redoxindikator farblos wurde. Anschließend erfolgte die Zugabe von 50 µg Membranprotein von *Mna. thermophilum* sowie falls vorgesehen die Zugabe von DPI in den entsprechenden Konzentrationen (Stammlösung in DMSO) und der Ansatz wurde für 5 Minuten bei 50°C vorinkubiert. Im Anschluss erfolgte der Start der Reaktion mit der Zugabe der Elektronendonatoren in Form von 10 mM Formiat oder Begasung mit H₂ (100 %). In gewünschten Abständen wurden dem Ansatz, der weiterhin bei 50°C inkubiert wurde, 5-20 µl entnommen und in 950 µl 150 mM Tris/HCl (pH 8,1) gegeben. Unmittelbar darauffolgend wurden 100 µl 5 mM 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB/Gelöst in 50 mM Natrium-Acetat) zugegeben, um die Thiolbildungsrate zu bestimmen. DTNB reagiert mit Thiolen unter der Freisetzung von 2-Nitro-5-Thionenzoat. Der Farbstoff kann bei 412 nm Wellenlänge photometrisch nachgewiesen werden und dient der Bestimmung der Thiol-Konzentrationen, da die Absorption proportional zur Konzentration ist ($\epsilon_{412\text{nm}} = 13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

2.8 Analytische Methoden

2.8.1 Quantifizierung von Trimethylamin (TMA), Dimethylamin (DMA) und Monomethylamin (MMA)

Probenmaterial zur Analyse der drei Methylamine wurde zu den gewünschten Zeitpunkten aus den Kulturen genommen, wobei die Proben zur Entfernung des Zellmaterials zunächst abzentrifugiert wurden (20.000 x g, 3 min). Der Überstand wurde zur Entfernung des Reduktionsmittels Natriumsulfid mit 0,5 % [v/v] H₂O₂ versetzt und erneut bei 20.000 x g für eine Minute zentrifugiert, um die entstandenen Präzipitate abzutrennen. Der geklärte Überstand konnte schließlich zur Analyse bezüglich TMA, DMA und MMA genutzt werden.

Die TMA Konzentration wurde mittels des Folin-Ciocalteu-Reagenzes quantifiziert (Ikawa et al., 2003). 50 µl des geklärten Kulturüberstandes wurden dazu zunächst mit 800 µl H₂O_{dest} und 125 µl Na₂CO₃-Lösung (20 % [w/v]) gemischt. Die Lösung wurde im Anschluss mit 50 µl Folin & Ciocalteu-Reagenz versetzt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die Messung der Absorption bei 745 nm. Zur Quantifizierung wurde außerdem eine Kalibrierkurve mit verschiedenen TMA-Konzentrationen aufgenommen, wobei TMA zunächst in definierten Konzentrationen nicht inokuliertem Medium zugefügt wurde. Die weiteren Schritte erfolgten dann wie beschrieben.

Die Quantifizierung von DMA erfolgte mit Hilfe der Kupfer-Thiocarbamat-Methode (Dowden, 1938). Zu Beginn wurden 50 µl des geklärten Medienüberstandes mit dem gleichen Volumen einer Kupfersulfat-haltigen Lösung versetzt (20 g Ammoniumacetat, 0,2 g CuSO₄, 10 g NaOH, 30 mL NH₄OH (30 %-Lösung), ad 100 mL H₂O_{dest}). Zusätzlich wurden 700 µl

Kohlenstoffdisulfid-Lösung (5 % [v/v] in Benzen) und 50 µl Essigsäure (30 % [v/v] in Wasser) zugefügt. Eine Durchmischung der Lösung erfolgte durch vortexen für 10 Sekunden.

Der organische Überstand konnte im Anschluss durch Zentrifugation (20.000 g, 1 min) von der wässrigen Phase getrennt und dessen Absorption bei 430 nm gemessen werden. Da Absorption und Konzentration von DMA korrelierten konnten auf Grundlage einer Kalibrierkurve die DMA-Konzentration der Proben ermittelt werden. Dazu wurden DMA-Lösungen mit definierten Konzentrationen in nicht inokuliertem Medium angesetzt und wie beschrieben zur Messung verwendet.

Für die Quantifizierung von MMA wurden 50 µl des geklärten Überstandes mit 200 µl 100 mM Natrium-Acetat (pH 5,6) und 300 µl Acetylaceton/Formaldehyd-Lösung (4 ml Acetylaceton, 10 ml 30 % [v/v] Formaldehyd, 136 ml H₂O_{dest}) gemischt. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 450 µl H₂O_{dest} und eine Inkubation bei 95°C für 5 Minuten. Die Proben wurden auf Eis abgekühlt und die Absorption bei 410 nm gemessen. Die Substanz N-Methyl-2,6-dimethyl-3,5-diacetyl-1,4-dihydropyridin, welche bei der Reaktion von MMA mit Acetylaceton und Formaldehyd entsteht, kann bei dieser Wellenlänge detektiert werden (Wang et al., 1999). Eine Kalibrierkurve wurde mit Lösungen definierter MMA-Konzentration zur Quantifizierung von MMA in den Proben aufgenommen.

2.8.2 Quantifizierung von Methan

Methan wurde mittels Gaschromatographie (GC) nachgewiesen. Dazu wurden 10-50 µl Proben mit einer Hamilton-Mikroliterspritze aus der Gasphase von Kulturen entnommen und in einen Gaschromatographen mit einem Flammenionisationsdetektor eingespritzt (PerkinElmer Clarus® 480, Rascon FFAP column 25 m x 0,25 micron; PerkinElmer, Waltham, USA). Für die Messungen wurde eine Injektortemperatur von 250°C, eine Säulentemperatur von 120°C und eine Detektortemperatur von 250°C genutzt. N₂ diente als Trägergas. Zu Quantifizierung wurde eine Kalibrierung mit verschiedenen Volumina 10 % [v/v] Methan (in 90 % [v/v] Argon) genutzt.

2.8.3 Quantifizierung von Methanol und Formiat

Methanol und Formiat wurden aus Kulturüberständen mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) quantifiziert. Zunächst wurden Proben der Kulturen entnommen und die Zellen durch Zentrifugation (20.000 x g, 3 min) entfernt. Im Anschluss erfolgte die Verdünnung der Überstände je nach erwartbarer Methanol- und/oder Formiat-Konzentration mindestens 1:2 mit Laufmittel (5 mM H₂SO₄ in H₂O_{reinst}), woraufhin die Probe in die HPLC-Anlage (Knauer, Berlin, Deutschland) mit einer Aminex-HPX-87H 300 mm x 7,8 mm Säule von Bio-Rad (München, Deutschland) injiziert wurde. Dabei wurde eine Flussrate von 0,6 ml pro Minute und eine Säulentemperatur von 65°C angewendet. Die Detektion der Substanzen erfolgte mittels Brechungsindexdetektor (Methanol/Formiat) und

UV-Detektor (Formiat), wobei Standardlösungen mit definierten Methanol- und Formiat Konzentrationen für die Quantifizierung genutzt wurden.

2.8.4 Quantifizierung von Betain und Dimethylglycin (DMG)

Die Trennung und Quantifizierung von Betain und DMG erfolgte mittels HPLC. Dazu wurde eine Asahipak NH₂ P-50G 3E-Säule (250 x 3,0 mm, Shodex) in Kombination mit der Vorsäule Asahipak NH₂ P-50G 3A (10 x 3,0 mm, Shodex) verwendet. Als Laufmittel diente 80 % [v/v] Acetonitril und die Säulentemperatur betrug 40°C (Flussrate; 1 ml/min). Genutzt wurde das SpectraSYSTEM-HPLC-System (Thermo Fisher Scientific), wobei ein Brechungsindexdetektor zur Detektion und Quantifikation der Substanzen diente (Shodex RI-101; Showa Denko Europe GmbH, München, Deutschland).

2.9 Bioinformatische Methoden

2.9.1 Verwendete Software

In Tabelle 7 ist die Software dargestellt, welche im Rahmen dieser Arbeit, verwendet wurde.

Tabelle 7: In der vorliegenden Arbeit verwendete Software.

Name	Funktion	Herkunft
UCSF Chimera	Visualisierung von PDB-Dateien	Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics, University of California
Chromas Lite 2.01	Analyse von Sequenzierungsergebnissen	Technelysium Pty Ltd
ClusPro	Modellierung von Protein-Protein-Interaktion	ClusPro-Interction-Server Vgl. 2.9.2
Clone Manager Professional 9.2	<i>in-silico</i> Klonierung	Scientific and Educational Software
Excel, 2017	Datenanalyse	Microsoft, Redmond, Washington state
Primer D-Signer	Generierung von Klonierungsprimern zur Insertion von DNA-Fragmenten in kommerziell erhältliche Plasmide (pASK-Vektoren)	IBA, Göttingen
Spectra Manager 1.54.03	Analyse der HdrD-Enzymtests	Jasco Corporation
Signalp-5.0	Vorhersage von Signalpeptiden	DTU Health Tech
Phobius	Vorhersage der Topologie und Signalpeptide von Proteinen	Stockholm Bioinformatics Centre
PROSITE	Analyse von Proteinen / Cofaktoren und Bindedomänen	Expasy
PHYRE2 Protein Fold Recognition Server	Vorhersage der dreidimensionalen Struktur von Proteinen auf Grundlage von Aminosäuresequenzen	Kelley et al., 2015

2.9.2 Analyse von Protein-Protein-Interaktionen mittels ClusPro-Interaction Server

Bei ClusPro handelt es sich um einen Algorithmus welcher Protein-Protein-Interaktionen mit passender Oberflächenkomplementarität ermittelt und sie auf Grundlage ihrer Eigenschaften klassifiziert. Dabei werden gezielt Interaktionen mit einem Abstand von maximal 9 Ångström und der niedrigsten Desolvatations- und Elektrostatischen-Energie ausgewählt. Die Modelle werden im Anschluss vom Programm weiter thermodynamisch untersucht, wobei die energetisch günstigsten dem Nutzer in der Reihenfolge ihrer Wahrscheinlichkeit angezeigt werden. Insgesamt werden dabei elektrostatische Kräfte, van-der-Waals-Kräfte und hydrophobe Wechselwirkungen gleich gewichtet, wobei der Nutzer die Wichtung zu Gunsten einer der Wechselwirkungen verändern kann (Kozakov et al., 2017; Kozakov et al., 2013; Kozakov et al., 2006; Comeau et al., 2004 a; Comeau et al., 2004 b).

Dem Programm wurden zur Nutzung PDB-Dateien von einem vermeintlichen Liganden und dem zugehörigen Rezeptor geliefert, wobei die Auswahl, ob ein Protein Ligand oder Rezeptor ist vom Nutzer erfolgt. Der Ligand wird 70.000x rotiert und für jede Rotation dreidimensional in einem Koordinatensystem zum Rezeptor gesetzt. Im Falle jeder einzelnen Rotation wird die Variante mit der höchsten Wahrscheinlichkeit einer Interaktion für das weitere Vorgehen verwendet. Die 1000 Rotations/Interaktions-Varianten mit den besten thermodynamischen Eigenschaften werden schließlich verwendet, um Varianten der Interaktion zu finden, wo die größte Interaktion bei einem Abstand von 9 Ångström zu finden ist.

Die Aussagekraft der Methode wurde von Comeau et al. (2004 a) an 48 Paaren von interagierenden Proteinen überprüft, wobei in 31 Fällen (ca. 65 %) unter den Top-10-Vorhersagen mindestens eine Interaktion zu finden war die annähernd oder vollständig dem nativen Zustand entsprach.

Die PDB-Dateien von FpoI, FpoB und Ferredoxin welche mittels der Software als potentielle Interaktionspartner analysiert wurden, wurden zuvor mittels der Software Phyre2 (Kelley et al., 2015) erstellt. Diese gleicht die eingespeiste Aminosäuresequenz mit gängigen Datenbanken ab, welche 3D-Strukturen ähnlicher/homologer Proteine enthalten und nutzt diese, um das gewünschte Protein in seiner dreidimensionalen Struktur zu modellieren.

3. Ergebnisse

3.1 *Methanonatronarchaeum thermophilum* (*Mna. thermophilum*): Die Untersuchung eines neuartigen Elektronentransportsystems

Das Wissen über die Physiologie und Biochemie von Vertretern der Klasse "Methanonatronarchaeia" und die Enzyme, die an der Methanogenese beteiligt sind, ist noch begrenzt. Der extrem haloalkaliphile und moderat thermophile Organismus *Mna. thermophilum* gehört zur Klasse "Methanonatronarchaeia" und wurde im Jahr 2017 aus einem alkalischen Sodasee isoliert und erstmals beschrieben (Sorokin et al., 2017; Sorokin et al., 2018). Von besonderer Bedeutung zeigte sich das Substratspektrum des Organismus. Wachstum und Methanogenese waren dem Organismus nur möglich, wenn neben methylierten Verbindungen wie Methanol oder Methylaminen ein Elektronendonator in Form von molekularem Wasserstoff oder Formiat zur Verfügung stand. Die Kombination von methylierten Verbindungen und Formiat als Substrate für die Methanogenese ist für den Organismus, als repräsentativem Vertreter der genannten Klasse und der Ordnung der Methanonatronarchaeales, einzigartig und daher von großem Interesse. Insbesondere die Möglichkeiten der Energiekonservierung im Rahmen des neuartigen Stoffwechselweges waren bislang nur auf Grundlage von Genomanalysen bekannt und biochemisch nicht bestätigt. In dieser Arbeit wurde daher ein besonderer Fokus auf die Methanogenese und den Energiestoffwechsel des Organismus und die biochemische Aufklärung des neuartigen Methanogenese-Weges gelegt. Dazu wurden zunächst detaillierte Wachstumsanalysen mit verschiedenen Substraten durchgeführt. Im Anschluss lag der Fokus auf der Untersuchung der Energie-konservierenden Komplexe in der Cytoplasma-Membran des Organismus.

3.1.1 Wachstum von *Mna. thermophilum*

Aus Wachstumsanalysen von Sorokin et al. (2017) war bekannt, dass *Mna. thermophilum* eine Methanbildung ausgehend von Methanol, TMA, DMA oder MMA in Kombination mit Wasserstoff oder Formiat zeigt. Detaillierte Untersuchungen fehlten dabei jedoch, da das Wachstumsverhalten nur oberflächlich analysiert wurde und Daten zu Substratpräferenzen, optimalen Substratkonzentrationen sowie Verdopplungszeiten/Wachstumsraten auf unterschiedlichen Substraten nicht vorhanden waren. Daher war es zunächst von Bedeutung die Umsetzung von verschiedenen Substraten und das Wachstum auf verschiedenen Substratkonzentrationen zu untersuchen, um für weitere Analysen auch eine Optimierung der Biomasseausbeute zu erzielen. Die maximale OD_{600nm} lag im Falle der Analysen von Sorokin et al. (2017) bei 0,17 und sollte in dieser Arbeit weiter gesteigert werden. Außerdem sollte in der vorliegenden Arbeit ein exakter Vergleich der Wachstumsparameter auf verschiedenen Substraten durchgeführt werden. Dazu wurden Wachstumskurven aufgenommen, wobei

parallel der Substratverbrauch, die Produktbildung und auch die Bildung von Intermediaten (bei Verstoffwechslung der Methylamine) mittels HPLC- und GC-Analysen untersucht wurden.

Zunächst erfolgten jedoch Analysen hinsichtlich der optimalen Substratkonzentration als Grundlage für die folgenden Wachstumsversuche. Der Organismus erreichte dabei ab einer Konzentration von 100 mM der Substrate Formiat und Methanol eine finale OD_{600nm} von 0,35 (Abbildung 3). Dieser Wachstumsertrag konnte auch mit zunehmender Konzentration der beiden Substrate nicht weiter gesteigert werden. Die Analyse zeigte ebenfalls, dass es bereits bei 80 mM Substratkonzentration zu einer verringerten Biomassebildung kam und die maximale OD_{600nm} mit weiterer Verringerung der Substratkonzentration stetig abnahm. Bis zu einer Konzentration von 100 mM nahm die finale optische Dichte pro 1 mM Substrat um 0,0034 zu. Dies bedeutete, dass die Substratkonzentration in diesem Konzentrationsbereich limitierend war. Erst ab einer Konzentration von 100 mM war dies nicht mehr der Fall und ein anderer Faktor schien limitierend zu sein. Für die weiteren Versuche wurde auf Grundlage der Daten eine Substratkonzentration von 100 mM verwendet. Anzumerken ist, dass die optische Dichte von 0,35 bereits doppelt so hoch war, wie im Falle der Analysen von Sorokin et al. (2017) beschrieben. Dies lag vor allem an der Verdopplung der Substratkonzentration, da Sorokin et al., (2017) die Wachstumsversuche nur mit 50 mM Methanol und Formiat durchführten.

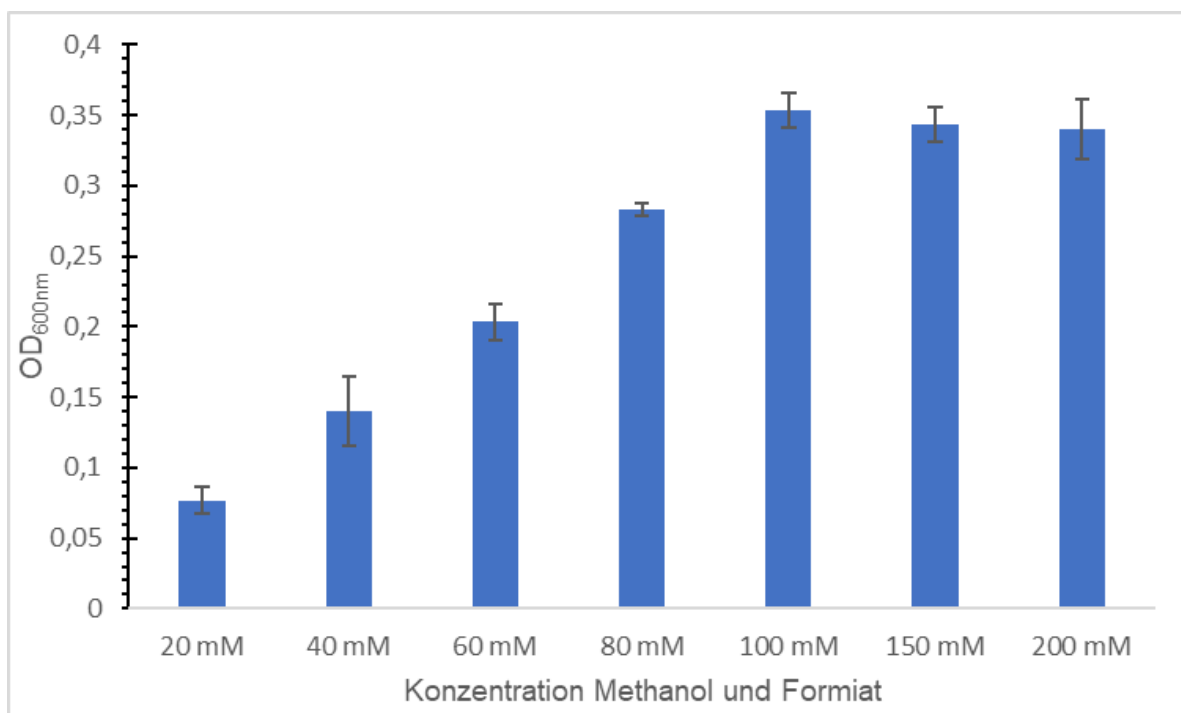


Abbildung 3: Finale OD_{600nm} von Kulturen von *Mna. thermophilum* in Abhängigkeit zur Substratkonzentration (Methanol und Formiat). Die Ergebnisse zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils drei Kulturen.

In einer weiteren detaillierten Wachstumsanalyse wurde *Mna. thermophilum* mit verschiedenen Substratkombinationen kultiviert (Abbildung 4-11). Die methylierten Verbindungen Methanol, TMA, DMA oder MMA wurden dabei jeweils mit Formiat oder H₂ als Elektronendonator für die Methanogenese kombiniert. Dabei konnte gezeigt werden, dass *Mna. thermophilum* auf allen Substraten Wachstum zeigte, aber deutliche Unterschiede hinsichtlich der Verdopplungszeiten und finalen optische Dichten vorhanden waren (Tabelle 8), obwohl äquimolare Mengen verfügbarer Methylgruppen zugesetzt wurden (Methanol 100 mM, TMA 33,3 mM, DMA 50 mM und MMA 100 mM). Formiat wurde für die Versuche ebenfalls in einer Konzentration von 100 mM eingesetzt. Bestätigt werden konnte dabei zunächst, dass dem Organismus ohne eine methylierte Verbindung im Medium kein Wachstum möglich war. Gleiches galt, wenn Formiat oder alternativ Wasserstoff nicht vorhanden waren. Die Methanogenese ausgehend von Acetat und H₂ + CO₂ war *Mna. thermophilum* ebenfalls nicht möglich.

Das schnellste Wachstum zeigte *Mna. thermophilum* bei der Verwendung der Substrate TMA und Formiat, wobei eine Verdopplungszeit von $44,5 \pm 4,5$ Stunden beobachtet werden konnte. Die Verdopplungszeiten für die Substrate Methanol und Formiat ($50 \pm 5,5$ Stunden) bzw. DMA und Formiat ($49,6 \pm 3,4$ Stunden) lagen auf ähnlichem Niveau und waren etwa 5 Stunden länger als mit TMA und Formiat (Abbildung 4, 5 und 6). Für MMA in Kombination mit Formiat wurde eine deutlich längere Verdopplungszeit von 74 ± 7 Stunden ermittelt (Abbildung 7). Die finalen OD-Werte lagen im Falle der Kulturen mit TMA und Methanol bei etwa 0,35. Die entsprechenden Werte für die Kulturen mit DMA und MMA waren mit 0,25 bzw. 0,08 vergleichsweise niedriger. Trotz der unterschiedlichen OD-Werte konnte beobachtet werden, dass der Verbrauch von Methylgruppen und Formiat, sowie die Bildung von Methan in einer 1:1:1 Stöchiometrie stattfanden. Im Falle von MMA war außerdem auffällig, dass die Kultur bereits die stationäre Phase erreicht hatte, obwohl die Substrate noch nicht vollständig verbraucht waren. Trotz Erreichen der stationären Phase waren die Zellen katabolisch aktiv und bildeten weiterhin Methan.

Beim Abbau von TMA und DMA stellte sich außerdem die Frage, ob die beiden Moleküle unmittelbar zu Methan und Ammonium abgebaut werden, oder ob zunächst Zwischenprodukte wie DMA und MMA auftraten. Im Falle der Kultur mit TMA und Formiat konnte nach Abnahme der TMA-Konzentration eine zwischenzeitliche Akkumulation von DMA (ca. 10 mM) und MMA (ca. 11,5 mM) im Medium gemessen werden. Auch in der Kultur mit DMA und Formiat wurde eine zwischenzeitliche Anreicherung von MMA (ca. 17,5 mM) im Kulturüberstand beobachtet. Alle Intermediate wurden im Laufe der Kultivierung wieder abgebaut und vollständig zu Methan metabolisiert. Ähnliches konnte bereits für *Ms. mazei* und *Mmc. luminyensis* gezeigt werden (Krätzer et al., 2009; Kröninger et al., 2017).

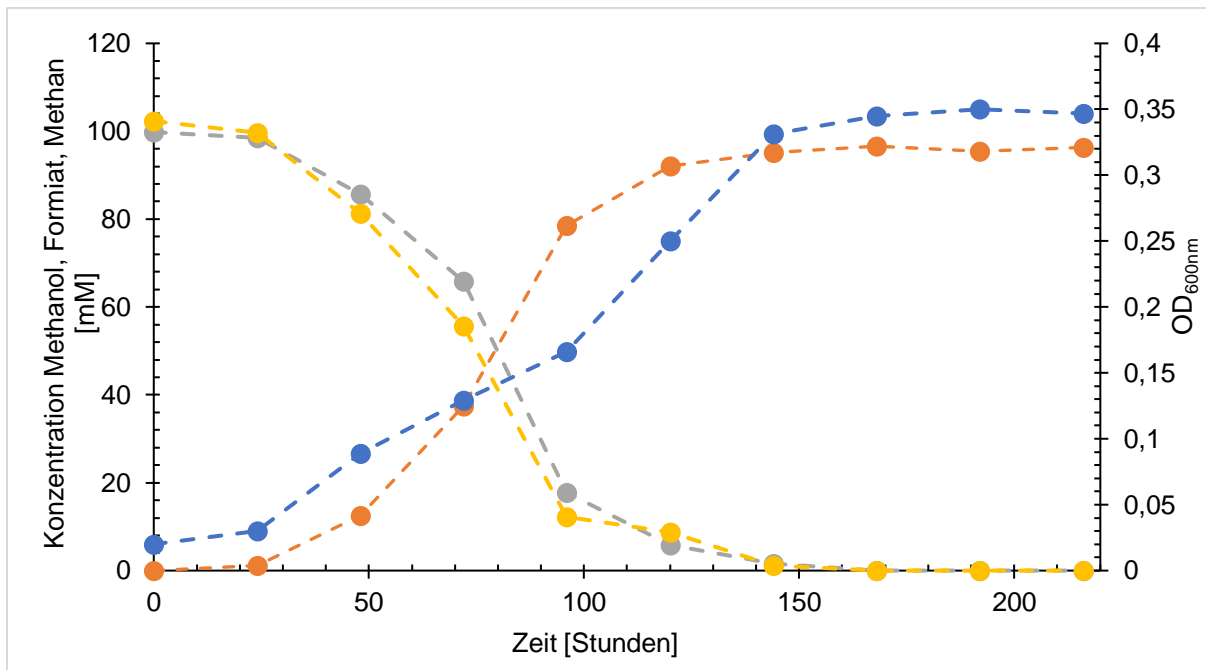


Abbildung 4: Wachstum, Substratverbrauch sowie Methanbildung von *Mna. thermophilum* während der Kultivierung mit 100 mM Formiat und 100 mM Methanol. Die Experimente wurden in 100-ml-Serumflaschen mit einer N₂(80 %)/CO₂(20 %)-Atmosphäre durchgeführt. Gelbe Kreise: Formiat; graue Kreise: Methanol; rote Kreise: Methan; blaue Kreise: optische Dichte (OD_{600nm}). Die Versuche wurden dreimal mit sehr ähnlichen Ergebnissen durchgeführt. Ein repräsentatives Experiment ist gezeigt.

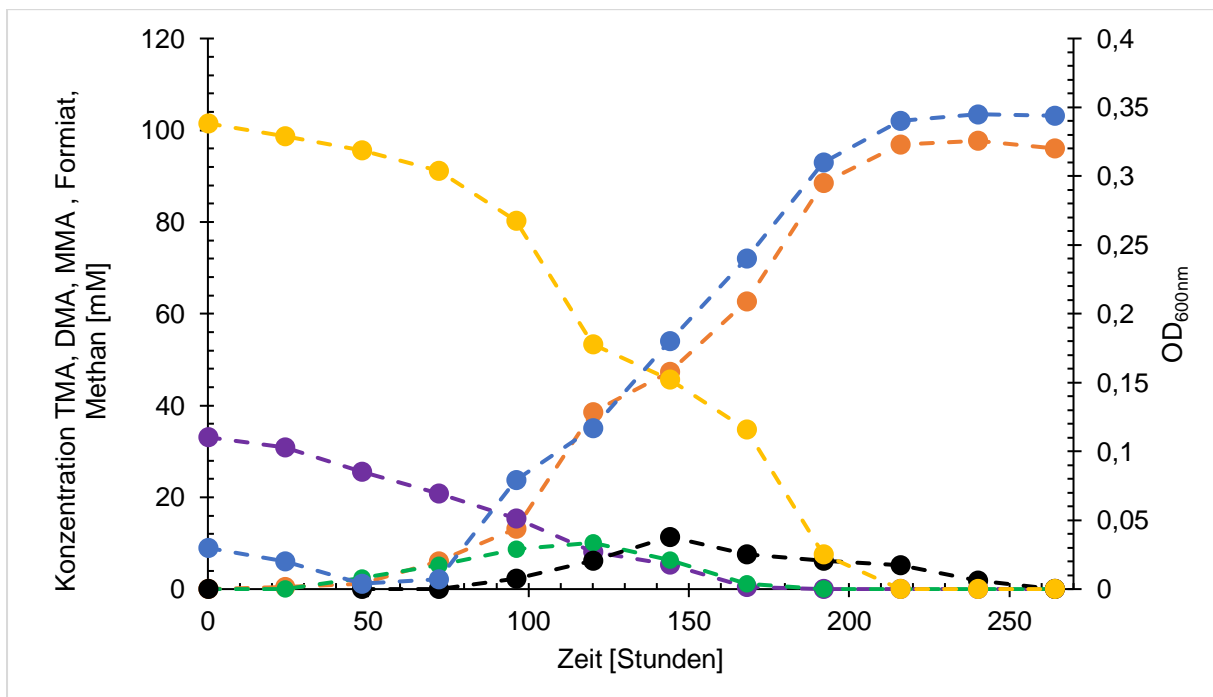


Abbildung 5: Wachstum, Substratverbrauch sowie Methanbildung von *Mna. thermophilum* während der Kultivierung mit 100 mM Formiat und 33,3 mM TMA. Die Experimente wurden in 100-ml-Serumflaschen unter N₂(80 %)/CO₂(20 %)-Atmosphäre durchgeführt. Gelbe Kreise: Formiat; violette Kreise: TMA; grüne Kreise: DMA; schwarze Kreise: MMA; rote Kreise: Methan; blaue Kreise: optische Dichte (OD_{600nm}). Die Versuche wurden dreimal mit äquivalenten Ergebnissen umgesetzt. Ein repräsentatives Experiment ist gezeigt.

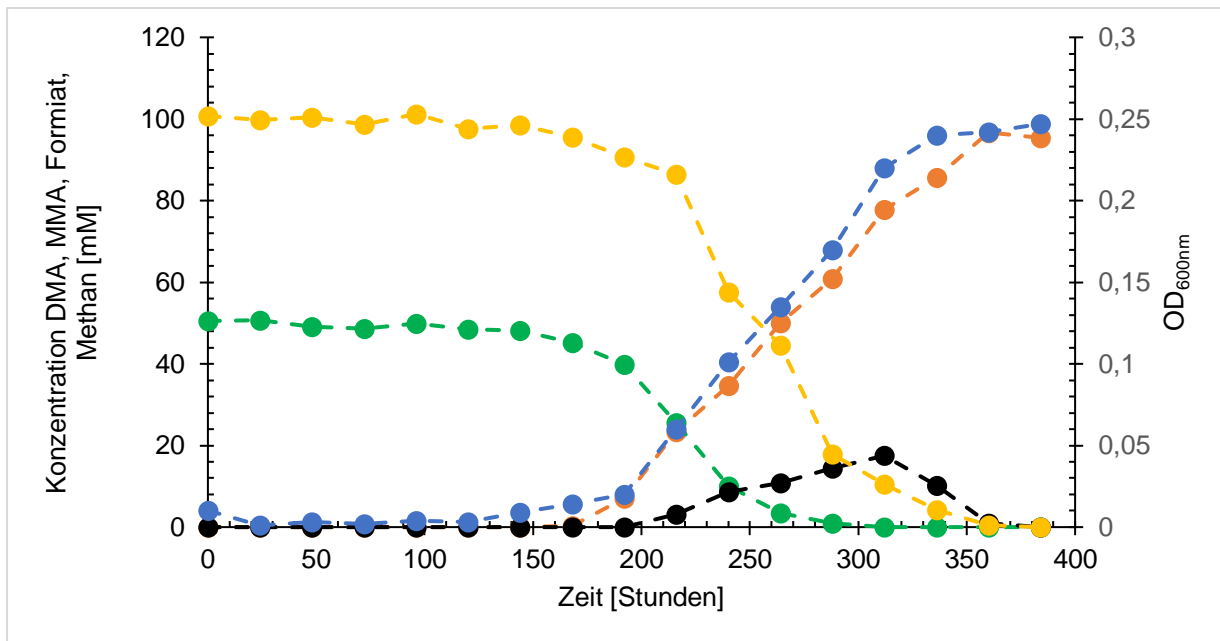


Abbildung 6: Wachstum, Substratverbrauch sowie Methanbildung von *Mna. thermophilum* während der Kultivierung mit 100 mM Formiat und 50 mM DMA. Die Experimente wurden in 100-ml-Serumflaschen unter N₂(80 %)/CO₂(20 %)-Atmosphäre durchgeführt. Gelbe Kreise: Formiat; grüne Kreise: DMA; schwarze Kreise: MMA; rote Kreise: Methan; blaue Kreise: optische Dichte (OD_{600nm}). In der Abbildung ist ein repräsentativer Versuch aus drei Ansätzen mit annähernd identischen Ergebnissen dargestellt.

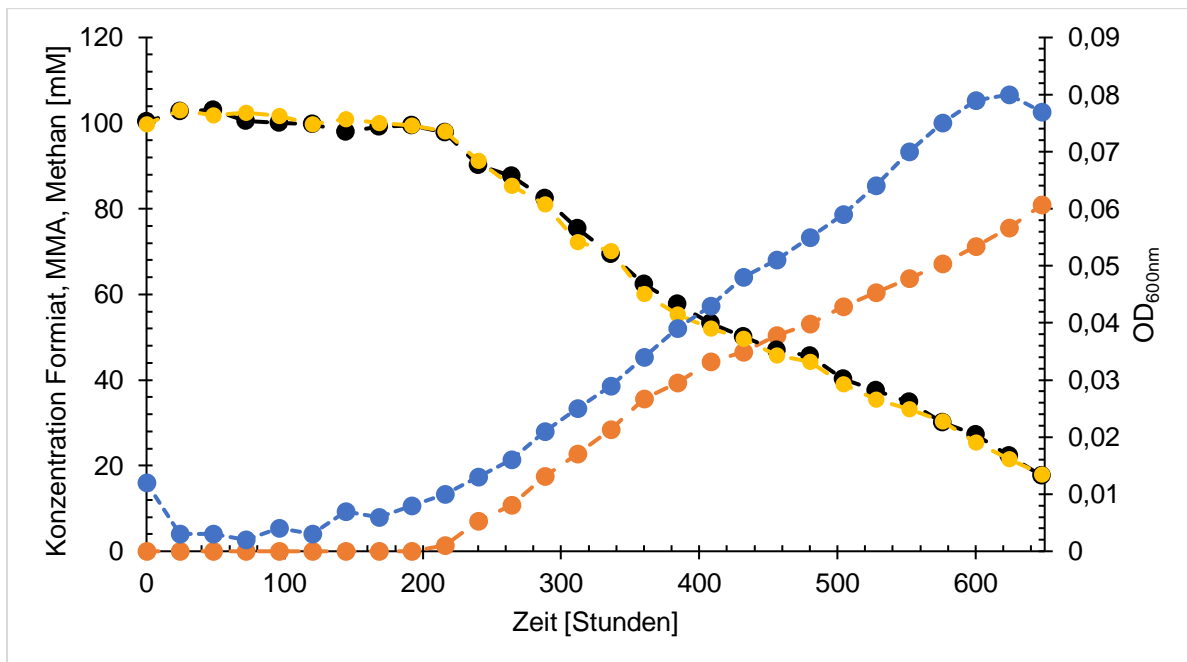


Abbildung 7: Wachstum, Substratverbrauch sowie Methanbildung von *Mna. thermophilum* während der Kultivierung mit 100 mM Formiat und 100 mM MMA. Die Experimente wurden in 100-ml-Serumflaschen unter N₂(80 %)/CO₂(20 %)-Atmosphäre durchgeführt. Gelbe Kreise: Formiat; schwarze Kreise: MMA; rote Kreise: Methan; blaue Kreise: optische Dichte (OD_{600nm}). Der Versuch wurde dreimal mit sehr ähnlichen Ergebnissen durchgeführt, wobei ein repräsentatives Experiment gezeigt ist.

Im Falle der Kulturversuche mit den genannten methylierten Verbindungen in Kombination mit molekularem Wasserstoff (200 kPa) anstelle von Formiat wurden vergleichsweise längere Verdopplungszeiten beobachtet (Tabelle 8). Die Verdopplungszeit lag im Falle von Methanol + H₂ bei 60,3 ± 4,1 Stunden (Abbildung 8). Mit TMA und Wasserstoff zeigte *Mna. thermophilum* eine etwas kürzere Verdopplungszeit von 55,8 ± 2,3 Stunden (Abbildung 9). Bei Wachstum auf DMA bzw. MMA in Kombination mit Wasserstoff zeigten sich Verdopplungszeiten von 65,2 ± 5,7 bzw. 127 ± 10,5 Stunden (Abbildung 10 und 11). Der Verbrauch von Methylgruppen und die Methanbildung erfolgte auch bei der Kultivierung mit Wasserstoff in äquimolaren Verhältnissen. Interessanterweise waren die Wachstumserträge in den Kulturen mit molekularem Wasserstoff mit finalen OD-Werten von 0,23 (Methanol und TMA), 0,125 (DMA) und 0,05 (MMA) deutlich geringer als in den Kulturen mit Formiat. Dies könnte an der schlechten Löslichkeit von H₂ bei hohen Salzkonzentrationen liegen (Ferrer et al., 2018). Der Substratmangel führt möglicherweise zu einem vermehrten katabolen Erhaltungsstoffwechsel und einem verminderten Anabolismus. Finale optische Dichten und Verdopplungszeiten sind für alle beschriebenen Wachstumsversuche in Tabelle 8 dargestellt.

Die Kulturen mit TMA oder DMA in Kombination mit Wasserstoff zeigten wie auch im Falle der Kulturen mit Formiat als Substrat eine Anreicherung von DMA (9,5 mM) bzw. MMA (12,5 mM / 16,2 mM) im Medium. Im Weiteren Kulturverlauf wurden die Intermediate wieder vollständig verbraucht.

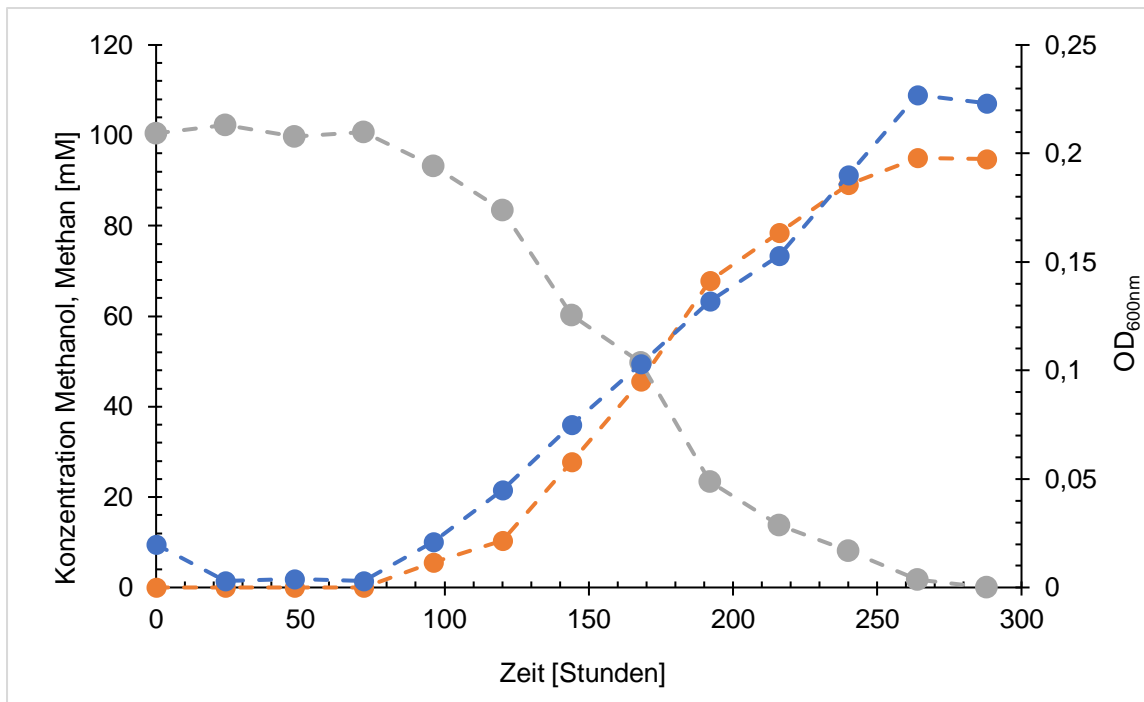


Abbildung 8: Wachstum, Substratverbrauch sowie Methanbildung von *Mna. thermophilum* während der Kultivierung mit H₂ (200 kPa / 100 %) und 100 mM Methanol. Die Experimente wurden in 100-ml-Serumflaschen unter H₂-Atmosphäre durchgeführt. Graue Kreise: Methanol; rote Kreise: Methan; blaue Kreise: optische Dichte (OD_{600nm}). Das Experiment wurde dreimal mit gleichwertigen Ergebnissen durchgeführt. An dieser Stelle ist ein repräsentatives Experiment gezeigt.

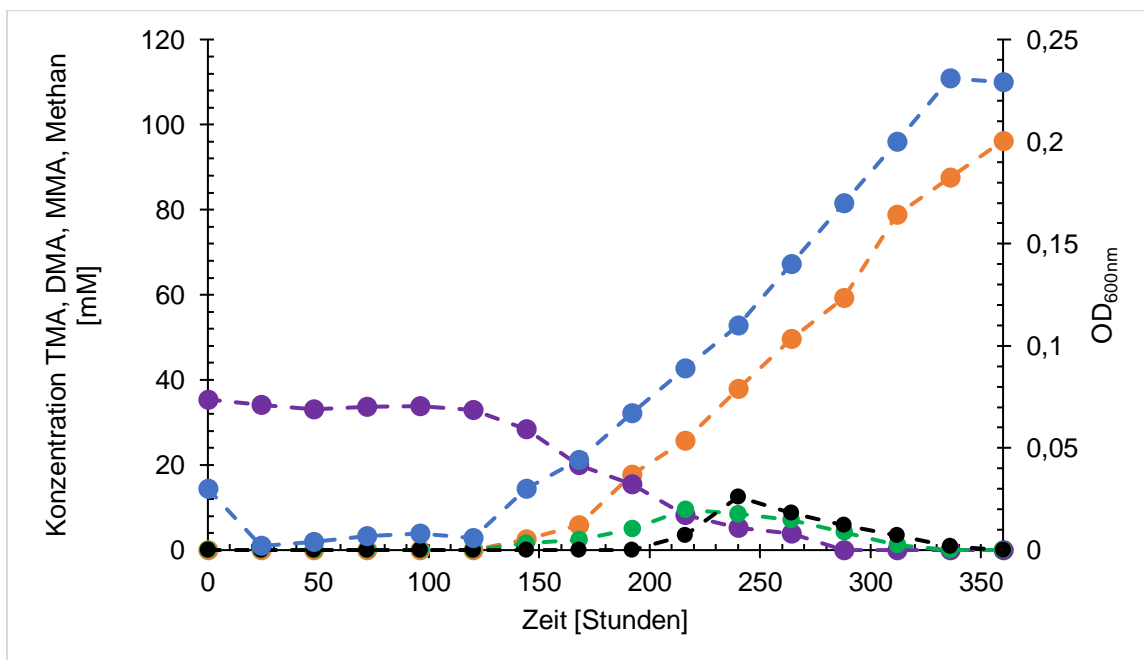


Abbildung 9: Wachstum, Substratverbrauch sowie Methanbildung von *Mna. thermophilum* während der Kultivierung mit H₂ (200 kPa / 100 %) und 33,3 mM TMA. Die Experimente wurden in 100-ml-Serumflaschen unter H₂-Atmosphäre durchgeführt. Violette Kreise: TMA; grüne Kreise: DMA; schwarze Kreise: MMA; rote Kreise: Methan; blaue Kreise: optische Dichte (OD_{600nm}). Die Versuche wurden dreimal mit sehr ähnlichen Ergebnissen durchgeführt. Ein repräsentatives Experiment ist gezeigt.

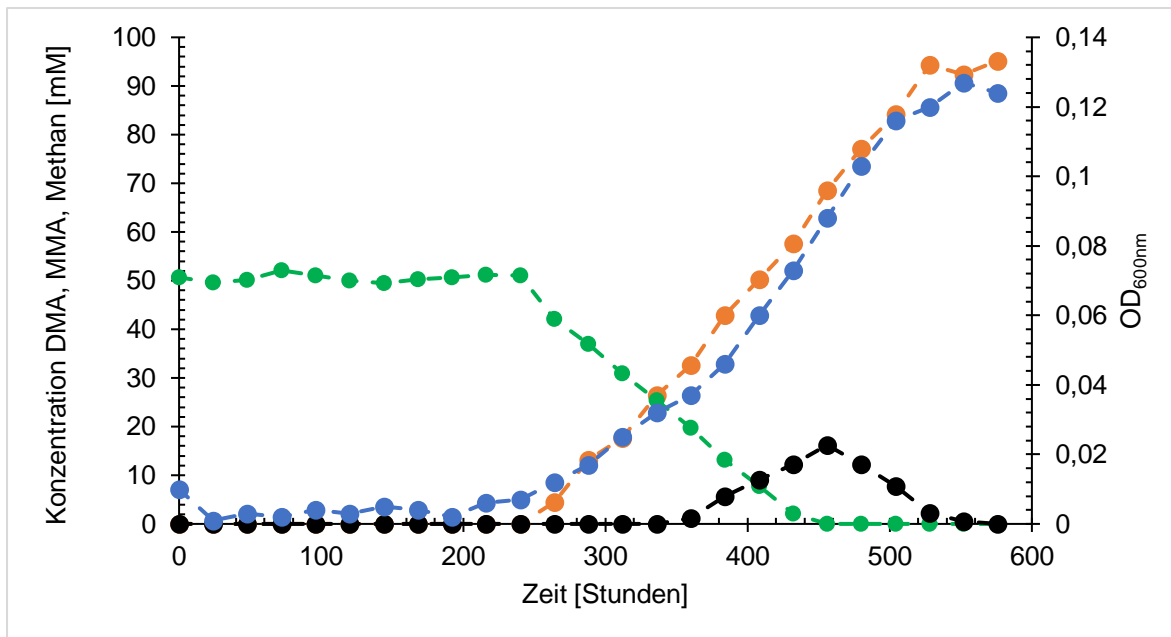


Abbildung 10: Wachstum, Substratverbrauch sowie Methanbildung von *Mna. thermophilum* während der Kultivierung mit H₂ (200 kPa / 100 %) und 50 mM DMA. Die Experimente wurden in 100-ml-Serumflaschen unter H₂-Atmosphäre durchgeführt. Grüne Kreise: DMA; schwarze Kreise: MMA; rote Kreise: Methan; blaue Kreise: optische Dichte (OD_{600nm}). Ein repräsentatives Ergebnis aus drei Versuchsansätzen ist gezeigt.

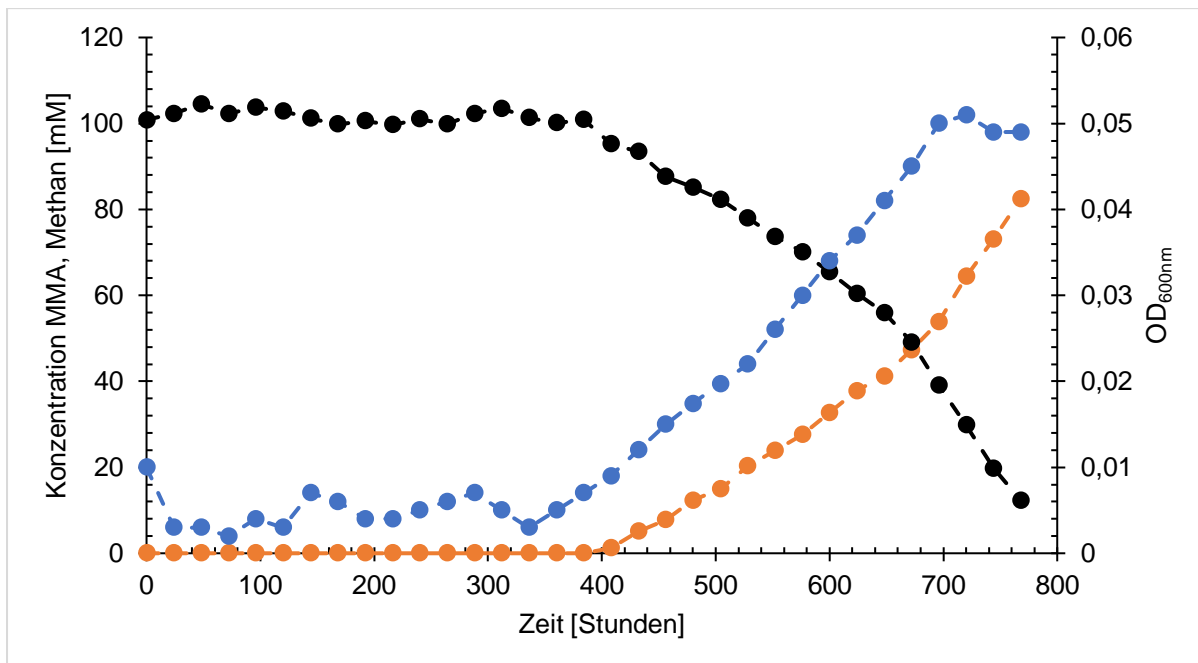


Abbildung 11: Wachstum, Substratverbrauch sowie Methanbildung von *Mna. thermophilum* während der Kultivierung mit H₂ (200 kPa / 100 %) und 100 mM MMA. Die Experimente wurden in 100-ml-Serumflaschen unter H₂-Atmosphäre durchgeführt. Schwarze Kreise: MMA; rote Kreise: Methan; blaue Kreise: optische Dichte (OD_{600nm}). Die Versuche wurden dreimal mit sehr ähnlichen Ergebnissen durchgeführt. Ein repräsentatives Experiment ist gezeigt.

Tabelle 8: Finale OD_{600nm}-Werte und Verdopplungszeiten (t_d) der Kulturen von *Mna. thermophilum* auf unterschiedlichen Substraten.

Substrate ^{a)}	Methanol		TMA		DMA		MMA	
	OD _{600nm}	t _d [h]	OD _{600nm}	t _d [h]	OD _{600nm}	t _d [h]	OD _{600nm}	t _d [h]
Formiat	0,35	50 ± 5,5	0,35	44,5 ± 4,5	0,25	49,6 ± 3,4	0,08	74 ± 7
H ₂	0,23	60,3 ± 4,1	0,23	55,8 ± 2,3	0,125	65,2 ± 5,7	0,05	127 ± 10,5

a) Formiat, Methanol, MMA: 100 mM; DMA: 50 mM; TMA: 33,3 mM; H₂: 200 kPa / 100 %

Zur optimalen Vergleichbarkeit des Wachstums von *Mna. thermophilum* mit anderen methanogenen Archaeen wurden einige weitere Parameter erhoben. *Mna. thermophilum* bildete pro OD_{600nm}-Einheit eine Trockenbiomasse von 534,2 ± 47,6 mg/l (Abbildung 12). Außerdem war in der exponentiellen Phase die Korrelation von Biomasse und der Methanbildung erkennbar. Dazu wurde die gebildete Menge an Methan in den Kulturen zu unterschiedlichen OD-Werten in der exponentiellen Phase bestimmt (Abbildung 13). Der Versuch wurde auf Grundlage der Ergebnisse aus Abbildung 3 mit 100 mM verfügbaren Methylgruppen und 100 mM Formiat durchgeführt, um optimale Wachstumsbedingungen in Bezug auf die Substrate zu gewährleisten. In den Kulturen mit H₂ wurde mit einer Gasphase von 100 % H₂ und einem Druck von 2 bar gearbeitet. Im Falle der Kulturen mit Methanol und Formiat konnte auf dieser Basis eine gebildete Menge von 25,9 ± 3,4 mM Methan bestimmt werden, um eine optische Dichte von 0,1 zu erreichen. Bei Wachstum auf TMA und Formiat betrug die Menge des gebildeten Methans zur Erreichung einer OD von 0,1 27,4 ± 2,5 mM. Im Falle des Wachstums auf molekularem Wasserstoff in Kombination mit Methanol war die Bildung von 41 ± 4,6 mM Methan nötig, um eine OD von 0,1 zu erreichen. Für die Kulturen welchen TMA und H₂ als Substrat zur Verfügung standen betrug der Wert 37,4 ± 5,1 mM Methan x 0,1 OD⁻¹. In Summe mit der Korrelation von OD und Biomasse konnten daraus Biomasseerträge pro gebildetem mol Methan für die vier Kulturen berechnet werden. Diese lagen bei 2,1 ± 0,3 g Trockengewicht x mol Methan⁻¹ (MeOH + Formiat), 1,9 ± 0,2 g Trockengewicht x mol Methan⁻¹ (TMA + Formiat), 1,3 ± 0,2 g Trockengewicht x mol Methan⁻¹ (MeOH + H₂) und 1,4 ± 0,1 g Trockengewicht x mol Methan⁻¹ (TMA + H₂).

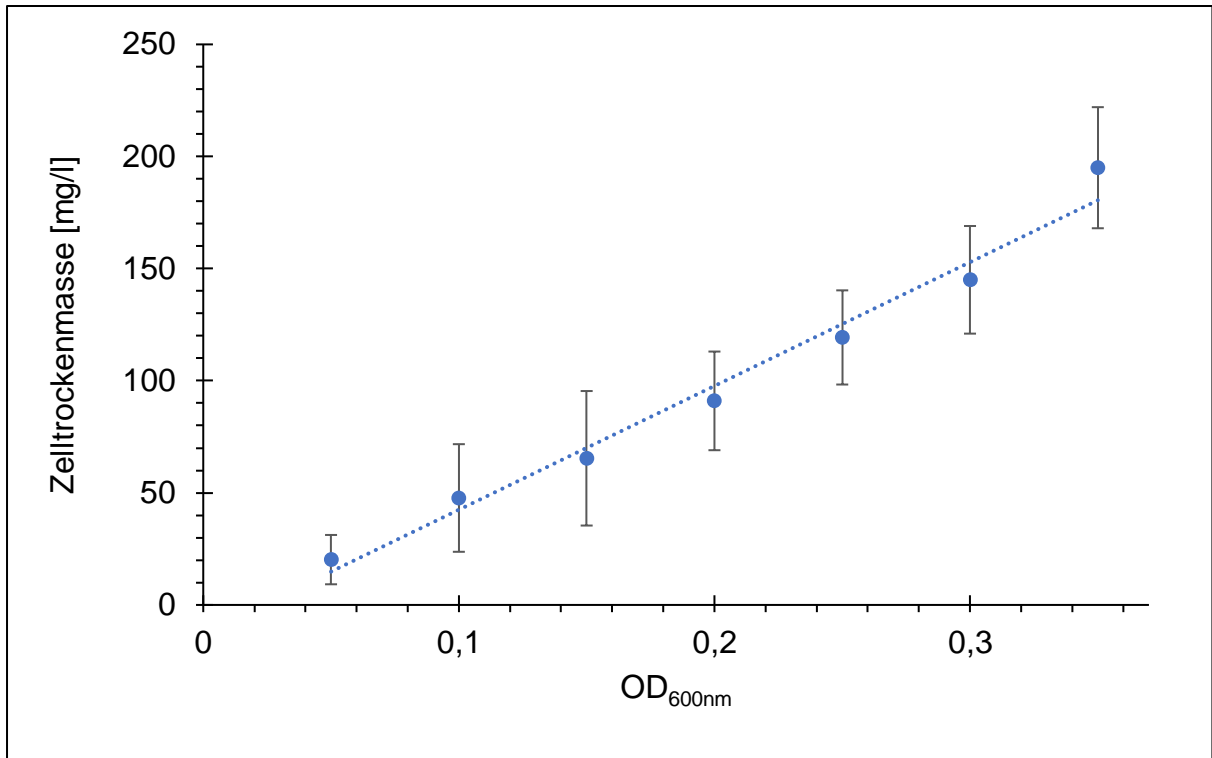


Abbildung 12: Abhängigkeit von Biomasseausbeute und OD_{600nm} in Kulturen von *Mna. thermophilum*. Für jede OD lagen drei Werte vor, aus denen Mittelwert und Standardabweichung (Fehlerbalken) gebildet werden konnten. Die Trockenbiomasse pro Liter pro OD_{600nm} lag bei $534,2 \pm 37,6$ mg.

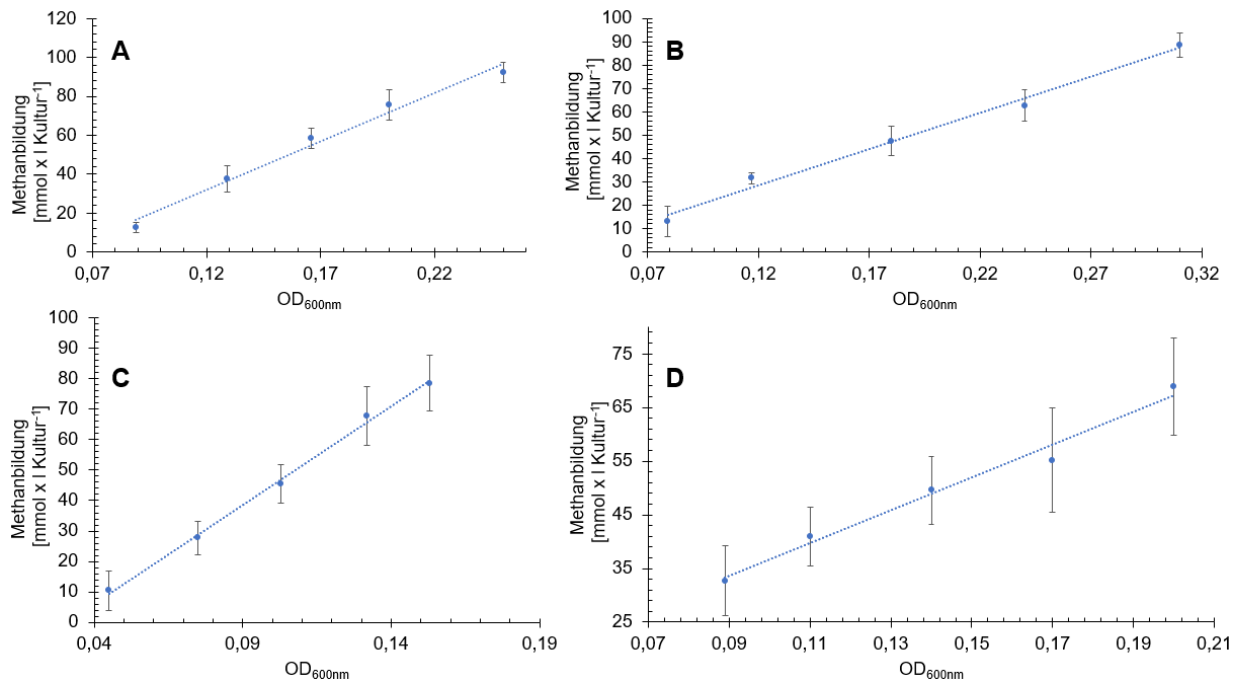


Abbildung 13: Korrelation von Methan- und Biomassebildung in Kulturen von *Mna. thermophilum*. Für jeden Messpunkt wurden drei Werte erhoben, wobei die Bildung von Mittelwerten erfolgte. Die Standardabweichungen sind mit Fehlerbalken dargestellt. Die Kultivierung erfolgte mit 100 mM Formiat + 100 mM Methanol (A), 100 mM Formiat + 33,3 mM TMA (B), 100 mM Methanol + 2 bar H₂ (100 %) (C), 33,3 mM TMA + 2 bar H₂ (100 %) (D).

3.1.2 Methyltransferasen und Corrinoide von *Mna. thermophilum*

Der Abbau der genutzten Substrate Methanol und der drei Methylamine erfordert spezifische Methyltransferasen (B-Proteine), welche die Methylgruppe der Substrate auf ein spezifisches Corrinoideprotein (C-Proteine) übertragen. Für das Corrinoideprotein liegen wiederum spezifische Methyltransferasen (A-Proteine) vor, welche die Methylgruppe auf Coenzym M übertragen und damit unmittelbar in den Energiestoffwechsel einschleusen. Die A-Proteine sind jeweils spezifisch für die Corrinoideproteine zur Metabolisierung von Methylaminen und Methanol, wohingegen die B-Proteine auch für jedes der drei Methylamine spezifisch sind. Eine bioinformatische Analyse zeigte, dass alle, auf Grundlage des Substratspektrums erwarteten, Gene, welche für die Methyltransferasen und Corrinoideproteine für die Nutzung von Methylaminen und Methanol kodieren, in *Mna. thermophilum* vorhanden sind (Abbildung 14). Da sich die Methyltransferasen und Corrinoideproteine für die verschiedenen Substrate teilweise stark ähneln, wurde die Zuordnung der entsprechenden Proteine bzw. zugehörigen Gene auf Grundlage von Vergleichen mit den bereits zugeordneten Methyltransferasen und Corrinoideproteinen von *Methanosarcina mazei* (Krätzer et al., 2009) und *Methanomassiliicoccus luminyensis* (Kröninger et al., 2017) vorgenommen. Grundlage dazu bildeten Blast-Analysen mit den entsprechenden Proteinen aus den beiden genannten Organismen. Dabei konnten sowohl für die Nutzung von Methanol als auch der Methylamine jeweils zwei Gene welche für spezifische A Proteine (Corrinoide:Coenzym M-Methyltransferase) kodieren ermittelt werden. Für die B-Proteine (Substrat:Corrinoide-Methyltransferase) und C-Proteine (Corrinoideproteine) war pro Substrat (Methanol, TMA, DMA, MMA) mindestens ein spezifisches Gen vorhanden, wobei diese häufig auf dem Genom in direkter Nachbarschaft lagen und vermutlich einem Operon angehörten. Anzumerken ist, dass auf Grundlage von Versuchen mit ruhenden Zellen von Sorokin et al. (2017) auch eine Metabolisierung von Methylsulfiden möglich ist. Möglicherweise ist eine der annotierten Methyltransferasen (B-Proteine) bzw. zugehörigen Corrinoide-Proteine (C-Proteine) auch an der Verstoffwechslung der genannten Substanzen beteiligt. Ein Gen für ein A-Protein des Methylsulfid-Stoffwechsels (*mtsA*: WP_086636843.1) konnte im Genom des Organismus identifiziert werden.

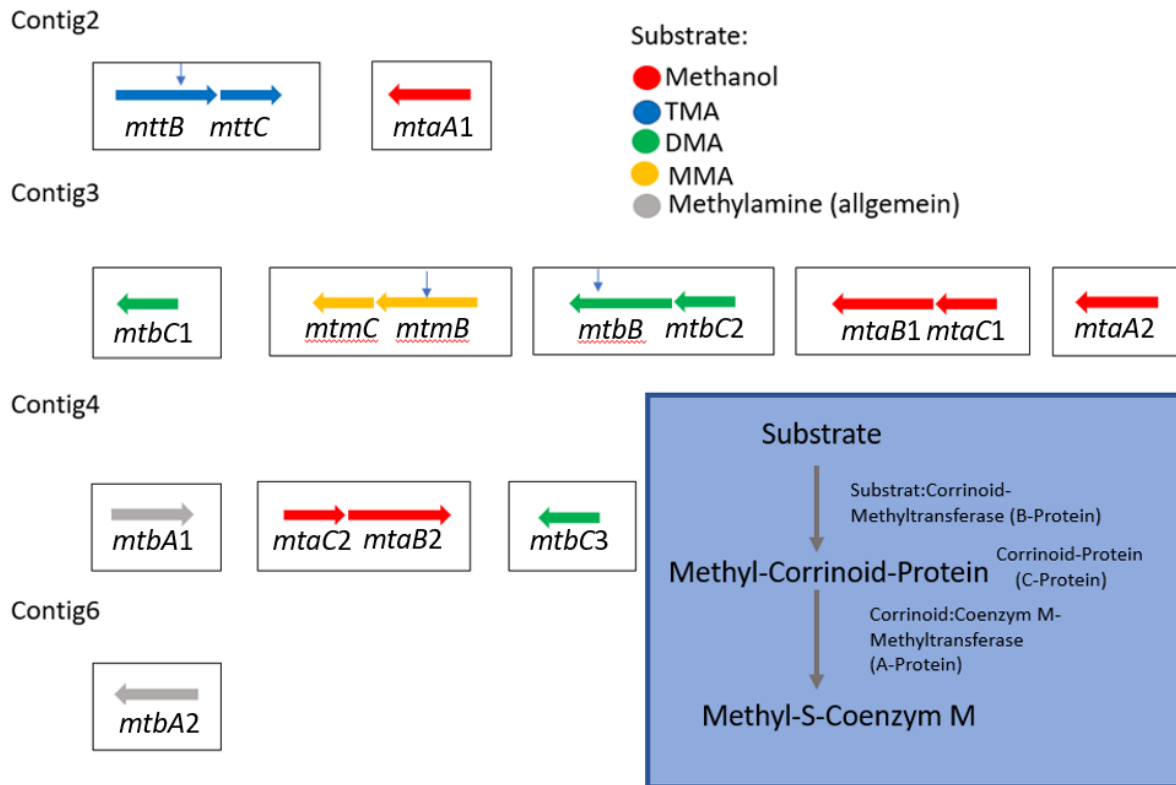


Abbildung 14: Methylgruppentransfer von methylierten Substraten in *Mna. thermophilum*. Die blaue Box beinhaltet das allgemeine Reaktionsschema der Übertragung von Methylgruppen vom spezifischen Substrat auf Coenzym M (CoM), über die drei beteiligten Proteine: Substrat: Corrinoid-Methyltransferasen (B-Protein) übertragen Methylgruppen vom Substrat auf ein Corrinoid-haltiges Methylgruppen-akzeptierendes Protein (C-Protein). Von den methylierten Corrinoid-Proteinen werden die Methylgruppen auf HS-CoM übertragen, was durch Corrinoid-Coenzym-M-Methyltransferasen (A-Protein) katalysiert wird. Die Abbildung zeigt zudem die Lokalisierung der Gene für die Verwertung verschiedener methylierter Substrate. B- und C-Proteine sind substratspezifisch und werden von den Genen *mtaB/C* für Methanol, *mttB/C* für TMA, *mtbB/C* für DMA und *mtmB/C* für MMA-Verwertung kodiert. Es existieren zwei Arten von A-Proteinen, MtaA und MtbA, die MtaC und MttC, MtbC bzw. MtmC für die Methylierung von HS-CoM verwenden. Gene, die in unmittelbarer Nähe zueinander lokalisiert sind und potentiell in einem Operon vorliegen sind gemeinsam von einer schwarzen Box umrahmt. Contig 2: *mttB*: OIJ19433.1/OIJ19434.1; *mttC*: WP_086636534.1; *mtaA1*: WP_086636593.1. Contig 3: *mtbC1*: WP_086636757.1; *mtmB*: OIJ18809.1/OIJ18808.1; *mtmC*: WP_086636534.1; *mtbB*: OIJ19071.1/OIJ19070.1; *mtbC2*: WP_086637115.1; *mtaB1*: WP_086637136.1; *mtaC1*: WP_086637137.1; *mtaA2*: WP_086637345.1 Contig 4: *mtbA1*: WP_161490776.1; *mtaC2*: WP_086637445.1; *mtaB2*: WP_086637136.1; *mtbC3*: WP_086637468.1; Contig 5: *mtbA2*: WP_143406904.1. Methyltransferasen (B-Proteine), die die Methanogenese aus TMA, DMA und MMA einleiten, besitzen mit Pyrrolysin eine besondere Aminosäure, welche durch ein einzelnes UAG-Codon kodiert wird. Da die gängigen Genombibliotheken das Codon als Stoppcodon bewerten, sind für die entsprechenden Gene jeweils zwei Identifikationsnummern angegeben. Die Gene sind daher mit einem blauen Pfeil markiert.

3.1.3 Untersuchungen zum Energiestoffwechsel von *Mna. thermophilum*

Auf Grundlage der Wachstumsexperimente und der Daten von Sorokin et al. (2017 und 2018), die für *Mna. thermophilum* eine Methanogenese ausgehend von Methanol, TMA, DMA oder MMA in Kombination mit Formiat oder Wasserstoff zeigten, konnten auch erste Modelle für einen potenziellen Energiestoffwechsel aufgezeigt werden. Sorokin et al. (2017) und Borrel et al. (2019) postulierten auf Grundlage bioinformatischer Analysen, dass jeweils eine membrangebundene Formiat-Dehydrogenase (FdhGHI) bzw. eine membrangebundene Hydrogenase (VhoGAC) Formiat bzw. Wasserstoff oxidieren und die Elektronen über einen unbekanntes Elektronenüberträger in der Membran auf eine ebenfalls membrangebundene Heterodisulfid-Reduktase (HdrDE) transferiert werden. Letzteres Enzym reduziert Heterodisulfid welches im Rahmen der Reduktion von Methyl-S-CoM zu Methan entsteht. Methyl-S-CoM entsteht bei der unter 3.1.2 beschriebenen Übertragung von Methylgruppen von den methylierten Substraten auf Coenzym M. Methyl-Coenzym M wird schließlich von der Methyl-Coenzym M Reduktase (MCR) zu Methan und Heterodisulfid umgesetzt. Dazu wird Coenzym B als Elektronendonator genutzt. Das aus Coenzym B und M bestehende Heterodisulfid wird also im Rahmen der zuvor postulierten Atmungskette wieder reduziert. Eine teilweise Oxidation der Methylgruppen zu CO₂ wie im Fall der methylo trophen Methanogenese von *Methanosarcina mazei* (Welte & Deppenmeier, 2014) ist nicht möglich, da die membrangebundene Methyltransferase (Mtr) in *Mna. thermophilum* fehlt (Sorokin et al., 2017). Damit ist eine Übertragung der Methylgruppe von Methyl-Coenzym M auf Tetrahydromethanopterin nicht möglich. Der oxidative Zweig der Methanogenese ist ansonsten bis auf die fehlende Formyl-Methanofuran-Dehydrogenase vollständig und vermutlich für die Bereitstellung von C₁-Körpern für den Anabolismus zuständig (4.3). Für die ATP Synthese ist außerdem eine ATP Synthase vorhanden, welche den im Rahmen der beschriebenen Atmungskette aufgebauten elektrochemischen Ionen-Gradienten zur Synthese von ATP nutzt. Ein weiterer wichtiger Membrankomplex ist daneben der Na⁺/H⁺- Antiporter Mrp, welcher aus mehreren Untereinheiten besteht und aus anderen Organismen als Regulator der Na⁺-Konzentration und zur pH-Homöostase bekannt ist (Ito et al., 2017). Neben der genannten Vho-Hydrogenase enthält der Organismus zudem eine Mbh-Hydrogenase, die zur Familie der Ech-Typ Hydrogenasen gehört und auf dieser Basis unter Energieverbrauch die Reduktion von Ferredoxin mit Wasserstoff als Elektronendonator katalysieren kann. Auch die reverse Reaktion ist möglich. Die Bereitstellung von reduziertem Ferredoxin für den Anabolismus könnte eine mögliche Aufgabe sein, wobei eine Beteiligung am Energiemetabolismus nicht ausgeschlossen werden kann. Die Untersuchung Rolle der Mbh-Hydrogenase im Stoffwechsel des Organismus im Vergleich zur Vho-Hydrogenase, war daher von besonderem Interesse.

Die genannten Reaktionen und Funktionen der Enzymkomplexe im Stoffwechsel von *Mna. thermophilum* wurden bislang nur auf Grundlage von Genom-Annotationen postuliert und sollen in dieser Arbeit experimentell verifiziert werden, um den Energiestoffwechsel der neuen Ordnung der Methanotropharchaeales detailliert aufzuklären. Um die Bedeutung der einzelnen Komplexe und Enzyme für den Energiestoffwechsel genauer zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit verschiedene biochemische Analysen durchgeführt.

3.1.3.1 Analyse der Transkriptabundanz der Gene der potentiell am Energiestoffwechsel beteiligten Enzymkomplexe

Als erste Grundlage für die biochemischen Analysen diente eine quantitative Untersuchung der RNA-Gehalte in den Zellen. Dazu wurde jeweils eine Untereinheit der genannten Komplexe hinsichtlich der Transkriptabundanz des zugehörigen Genes untersucht. Da viele der Komplexe (3.1.3) aus mehreren Untereinheiten bestehen, die auf dem Genom auf Grundlage bioinformatischer Analysen in einem Operon organisiert sind, wurde jeweils das erste Gen des jeweiligen Operons zur Generierung von Primern genutzt. Die PCR-Produkte hatten zur Vergleichbarkeit allesamt eine Länge von etwa 200 Basenpaaren. Als Referenz dienten die Gene der ribosomalen 15S Untereinheit und der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAP-DH). Die Ernte der Kulturen zur RNA-Präparation erfolgte stets in der exponentiellen Phase.

In Abbildung 15 sind die Ergebnisse der Reversen Transkriptase-quantitativen PCR (RT-q-PCR) dargestellt, wobei die Kulturen zur RNA-Präparation auf Formiat in Kombination mit Methanol angezogen wurden. Deutlich wurde, dass die RNA des Referenzgens der ribosomalen 15S Untereinheit verhältnismäßig in großen Mengen vorlag. Dies war aufgrund der verstärkten Proteinbiosynthese in der exponentiellen Phase erwartbar. Die Transkriptabundanz des *gap-dh*-Genes war hingegen geringer, was vermutlich daran lag, dass das zugehörige Protein, wie für viele methanogene Archaeen beschrieben, keine Rolle im Energiestoffwechsel spielt und nur zur Synthese von Zuckern für den Anabolismus benötigt wird (Hensel et al. 1994; Schäfer & Schönheit, 1993; Danson & Hough, 1992). Im Falle der Gene, welche die Proteine des Energiestoffwechsels kodieren, waren vor allem die Gene der MCR und Vho-Hydrogenase mit großer Transkriptabundanz vorhanden und überstiegen die Menge der RNA des Genes von der 15S ribosomalen Untereinheit um das 1,3-fache bzw. 1,4-fache. Dies untermauerte die vermutete zentrale Bedeutung von beiden Enzymen im Energiestoffwechsel des Organismus. Auch die untersuchten Gene der Untereinheiten der Formiat-Dehydrogenase (0,4-fach), Heterodisulfid-Reduktase (0,4-fach) und ATP-Synthase (0,3-fach) zeigten in Bezug auf das Gen der 15S ribosomalen Untereinheit eine vergleichsweise hohe Transkriptabundanz, was ebenfalls auf eine wichtige Rolle der zugehörigen Enzyme im Energiestoffwechsel schließen ließ. Das Gen der untersuchten Untereinheit der Mbh-Hydrogenase zeigte dagegen eine geringe Transkriptabundanz von 0,1

im Vergleich zum ribosomalen Gen. Der deutliche Unterschied zur RNA-Menge von *vho* war ein erstes Indiz, dass die Vho-Hydrogenase eine entscheidende Rolle im Energiestoffwechsel von *Mna. thermophilum* spielt, wohingegen die Mbh-Hydrogenase eher eine untergeordnete Funktion ausübt und vermeintlich, wie von Kurth et al. (2020) postuliert, an der Bereitstellung von reduziertem Ferredoxin für den Anabolismus beteiligt ist. Auch das genutzte Gen des Na⁺/H⁺-Antiporters (*mrp*) zeigte mit etwa 0,3 im Vergleich zum ribosomalen Gen eine verhältnismäßig hohe Transkriptabundanz, was die potentielle Wichtigkeit für die pH-Homöostase und die Na⁺-Ionen-Konzentration in der Zelle untermauerte. Das Formyltransferase-Gen (*ftt*) war nur in einer sehr geringen Transkriptmenge vorhanden. Dies war ein erster experimenteller Hinweis, dass der oxidative Zweig der Methanogenese, auch auf Grund der fehlenden membrangebundenen Methyltransferase (Sorokin et al., 2017), keine Rolle für den Energiestoffwechsel von *Mna. thermophilum* spielte.

Auffällig war außerdem, dass sich die Verhältnisse der Transkriptabundanz bei Wachstum von *Mna. thermophilum* auf Formiat als Substrat bzw. Elektronendonator für die Methanogenese im Verhältnis zu molekularem Wasserstoff (Abbildung 16) kaum unterschieden. Dies ließ vermuten, dass die Genexpression bezüglich *vho* bzw. *mbh* und *fdh* nicht reguliert ist und diese unter jeglichen Wachstumsbedingungen in großen Mengen vorliegen. Dies wiederum könnte eine Adaptation an einen Substrat-armen Lebensraum darstellen, in welchem jedes verfügbare Substratmolekül möglichst schnell umgesetzt werden muss.

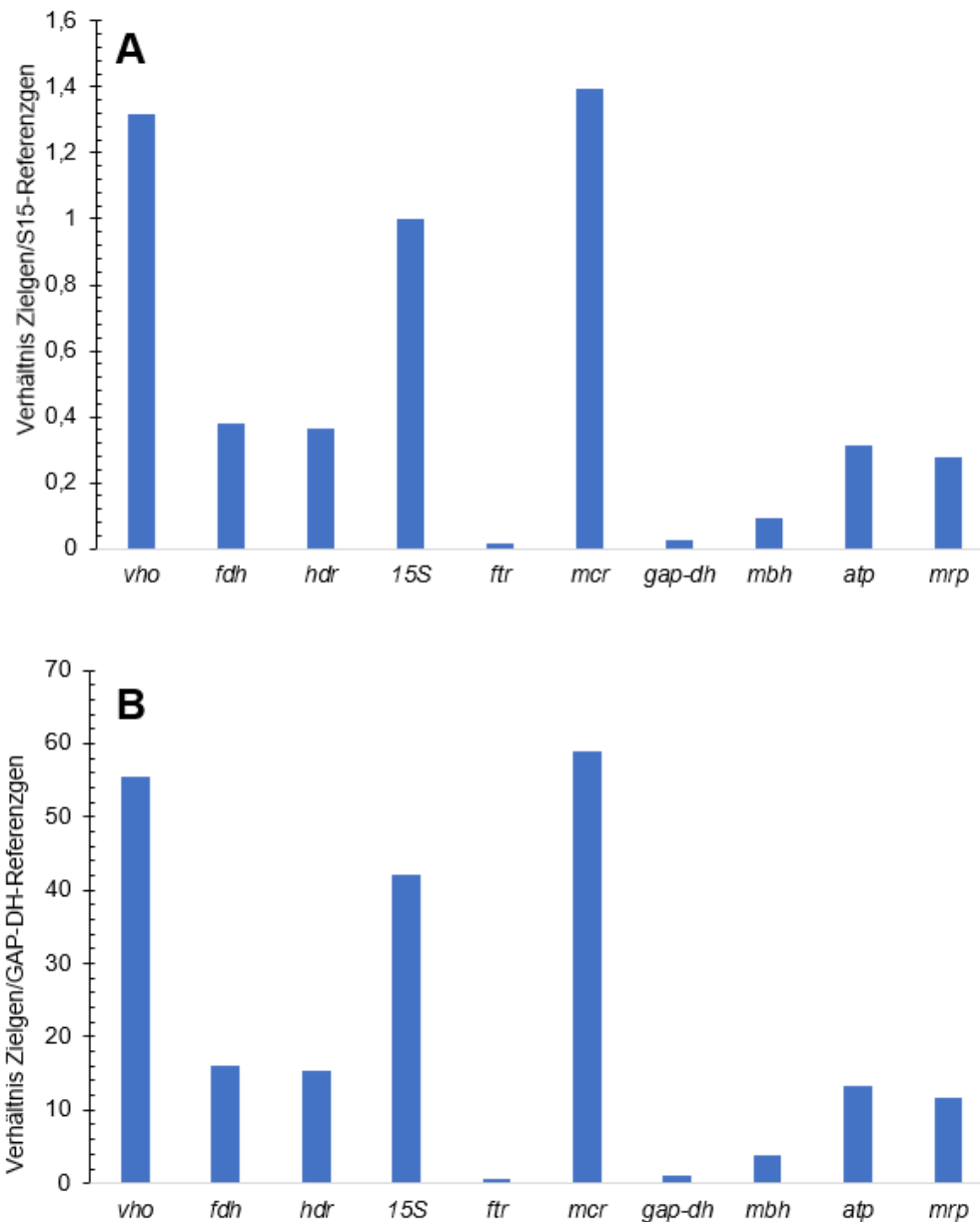


Abbildung 15: Transkriptabundanz (mRNA) von Genen die für methanogene Schlüsselenzyme kodieren im Vergleich zu Referenzgenen. *Mna. thermophilum* wurde auf 100 mM Methanol in Kombination mit 100 mM Formiat kultiviert und in der frühen exponentiellen Phase geerntet. Im Anschluss erfolgte die RNA-Präparation (Luna-Kit, NEB). ΔC_t -Werte wurden berechnet, indem die relative mRNA-Menge des ribosomalen 15S-Genes (A) bzw. des Genes der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (B) als Referenz genommen wurde (Gen von Interesse -Referenzgen). Das in der Abbildung dargestellte Verhältnis (Zielgen/Referenzgen) wurde durch die Berechnung von $2^{-\Delta C_t}$ ermittelt. Die beiden Abbildungen zeigen ein repräsentatives Ergebnis, welches durch drei biologische Replikate bestätigt wurde. Die Transkriptabundanz der Gene für die folgenden Enzyme und Membrankomplexe wurde untersucht: *vho*: Vho-Hydrogenase (Untereinheit G / IMG-ID: 2787455716); *fdh*: Formiat-Dehydrogenase (Untereinheit A / IMG-ID: 2787455229); *hdr*: Heterodisulfid-Reduktase (Untereinheit E / IMG-ID: 2787456243); *15S*: Ribosomale 15S-Untereinheit (IMG-ID: 2787455393); *ftr*: Formyltransferase (IMG-ID: 2787456510); *mcr*: Methyl-Coenzym M Reduktase (Untereinheit β / IMG-ID: 2787456578); *gap-dh*: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (IMG-ID: 2787455518); *mbh*: Membranegebundene Hydrogenase (Untereinheit α / IMG-ID: 2787456596); *atp*: ATP-Synthase (Untereinheit c / IMG-ID: 2787455897); *mrp*: Na^+/H^+ -Antiporter (Untereinheit E / IMG-ID: 2787455947). Bei Komplexen mit mehreren Untereinheiten wurde jeweils das erste Gen des zugehörigen Operons verwendet. Details sind unter 2.6.3 beschrieben.

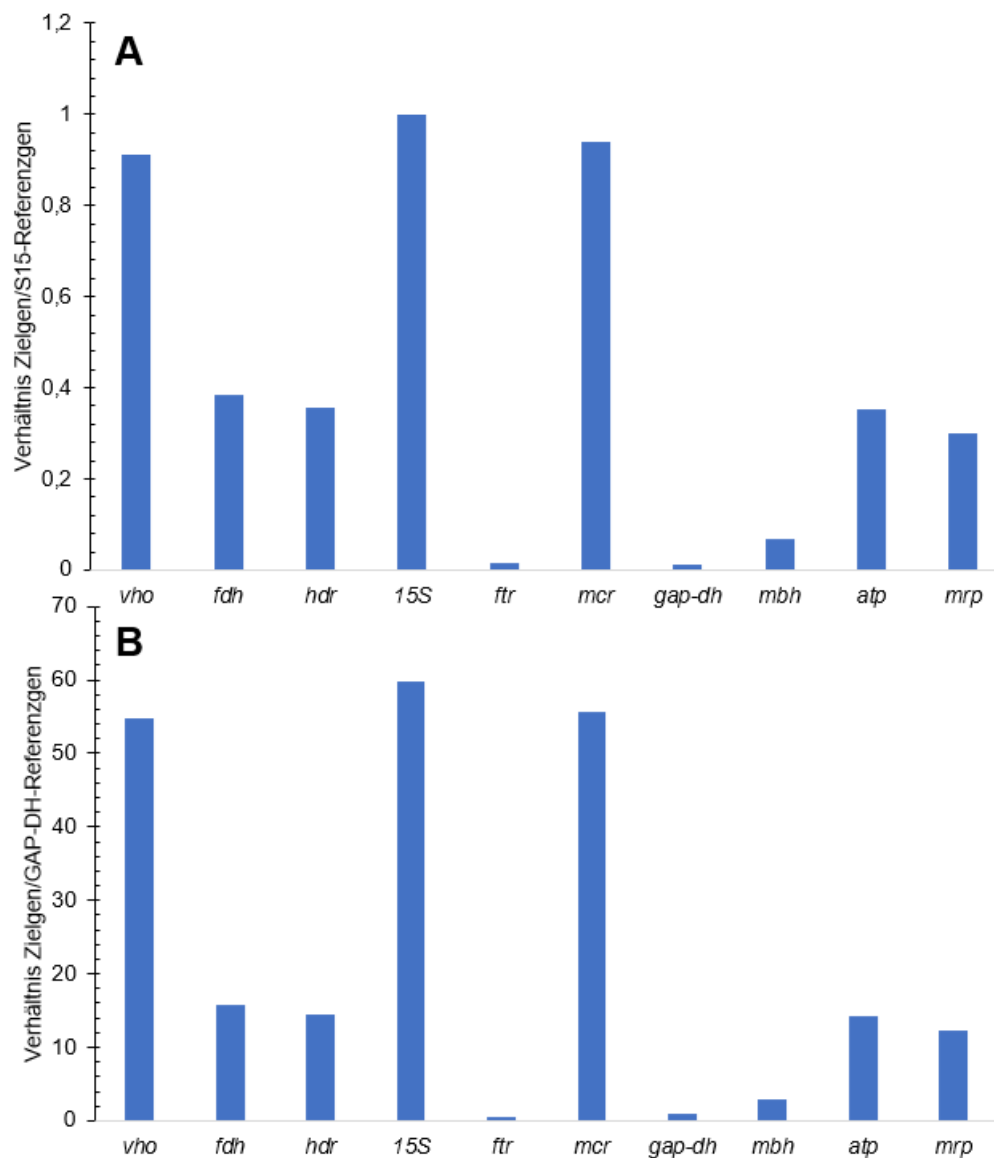


Abbildung 16: Transkriptabundanz (mRNA) von Genen die für methanogene Schlüsselenzyme kodieren im Vergleich zu Referenzgenen. *Mna. thermophilum* wurde für den Versuch auf 100 mM Methanol in Kombination mit molekularem Wasserstoff (100 %/200 kPa) kultiviert und in der frühen exponentiellen Phase geerntet. Neben der Kultivierung erfolgten die weiteren Schritte wie in Abbildung 15 beschrieben. Abkürzungen: Vgl. Abbildung 15. A: Referenz ribosomales 15S-Gen; B: Referenz Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase-Gen.

3.1.3.2 Aktivitätstests der Membranpräparationen von *Mna. thermophilum* mit dem artifiziellen Elektronenträger Methylviolet

Im Folgenden wurden die zentralen Enzymkomplexe des Energiestoffwechsels, welche vermutlich an der Energiekonservierung beteiligt sind (VhoGAC, FdhGHI und HdrDE) in Membranpräparationen von *Mna. thermophilum* näher untersucht.

Die Membranpräparation von *Mna. thermophilum* erfolgte erstmals im Rahmen dieser Arbeit. Um die Integrität der Membran über einen längeren Zeitraum (3 Stunden Ultrazentrifuge) zu

gewährleisten wurde ein Puffer mit 2 M NaCl gewählt. Bei einer Konzentration von 0 bzw. 1 M NaCl wurde kein oder ein nur sehr kleines Membranpellet erhalten. Auf Grundlage der Daten von Sorokin et al. (2017) sind mindestens 2 M Na⁺ für die langfristige Stabilität der Zellen essenziell. Eine bestimmte Konzentration von Ionen könnte daher für die Stabilität und Integrität der Membranen notwendig sein. Unterschiedliche pH-Werte des Puffers (pH 7,5; 8,5 oder 9,5) hatten keinen Effekt auf die Qualität der Membranpräparationen, sodass letztlich ein pH von 8,5 ausgewählt wurde (100 mM TrisxHCl; 2.7.8).

Die Aktivitäten der Membranpräparationen hinsichtlich Wasserstoff- und Formiat-Oxidation sowie Heterodisulfid-Reduktion wurden zunächst mit Methylviologen als artifiziellem Elektronenüberträger durchgeführt. Für alle drei Reaktionen konnte mit steigender Proteinmenge (Membranprotein) eine lineare Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit beobachtet werden (Abbildung 17-19). Die Hydrogenase-Aktivität der Präparationen, welche mit einer Gasphase von 100 % H₂ in den Küvetten gemessen wurde, betrug 31.2 ± 8.3 U/mg Membranprotein (Tabelle 9) und war auf Grundlage der Daten aus der quantitativen PCR zum Großteil auf die Vho-Hydrogenase (VhoGAC) zurückzuführen. Anzumerken ist jedoch auch, dass sich die Aktivitäten von Vho- und Mbh-Hydrogenase mit Methylviologen als Elektronenakzeptor nicht unterscheiden lassen, da MV unspezifisch mit [FeS]-Clustern reagiert und beide Enzymkomplexe diese enthalten.

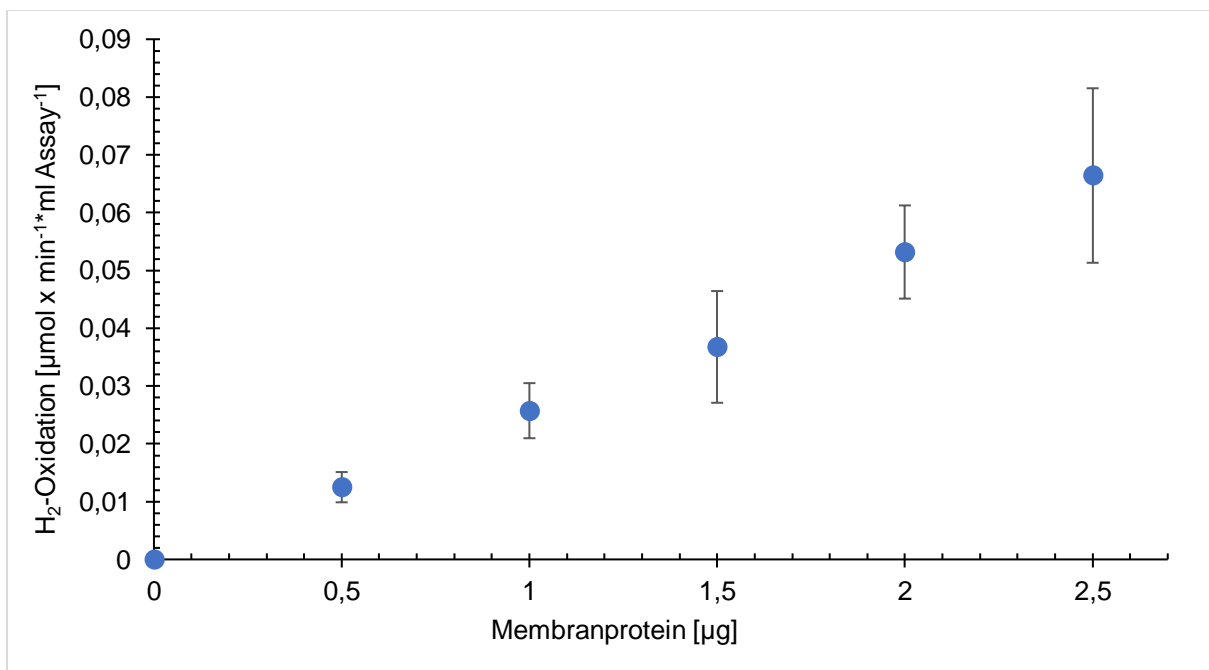


Abbildung 17: Reaktionsgeschwindigkeit der Oxidation von molekularem Wasserstoff mit Methylviologen als Elektronenakzeptor in Abhängigkeit der Menge an Membranprotein von *Mna. thermophilum*. Die Abbildung zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen, die aus Messungen mit vier unterschiedlichen Membranpräparationen ermittelt wurden. Das Wachstum des Organismus erfolgte auf Formiat bzw. Wasserstoff in Kombination mit Methanol. Puffer: 100 mM Tris/HCl (pH 9,5, 2 M NaCl) ; 50°C; Gasatmosphäre: H₂. Die Reaktionsgeschwindigkeit hinsichtlich der Oxidation von H₂ betrug 31.2 ± 8.3 U/mg Membranprotein.

Zur Messung der Formiat-Dehydrogenase (FdhGHI)-Aktivität wurde N_2 als Gasatmosphäre verwendet und oxidiertes Methylviologen diente als Elektronenakzeptor. Die Messungen wurden durch die Zugabe von 10 mM Formiat gestartet. In den Membranpräparationen von *Mna. thermophilum* wurde eine Formiat-Dehydrogenase-Aktivität von $19,05 \pm 4,6$ U/mg Membranprotein ermittelt (Tabelle 9). Diese Aktivität war auf die membrangebundene Formiat-Dehydrogenase (FdhGHI) zurückzuführen, da auf Basis von Genomanalysen keine weitere Formiat-Dehydrogenase im Organismus vorlag.

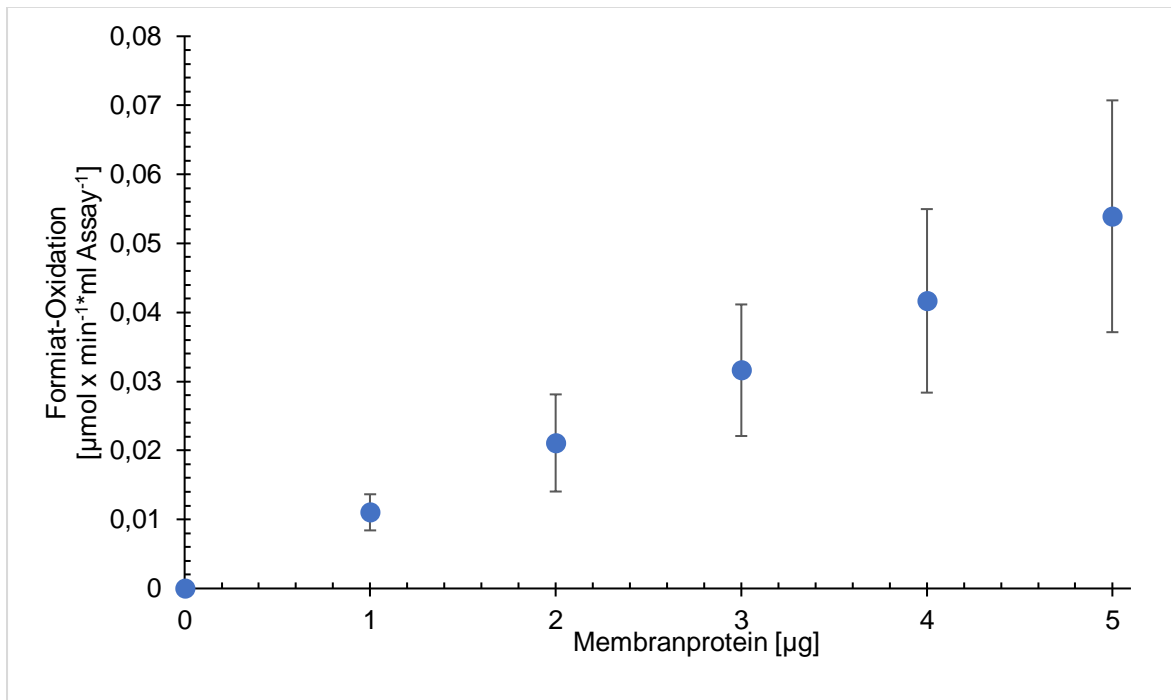


Abbildung 18: Reaktionsgeschwindigkeit der Oxidation von Formiat mit Methylviologen als Elektronenakzeptor in Abhängigkeit der Menge an Membranprotein von *Mna. thermophilum*. Die Abbildung zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen, die aus vier unterschiedlichen Membranpräparationen ermittelt wurden. Das Wachstum des Organismus erfolgte auf Formiat bzw. molekularem Wasserstoff in Kombination mit Methanol. Puffer: 100 mM Tris/HCl (pH 9,5, 2 M NaCl) ; 50°C ; Gasatmosphäre: N_2 . Die Aktivität der Formiat-Dehydrogenase betrug $19,05 \pm 4,6$ U/mg Membranprotein.

Die Aktivität der Heterodisulfid-Reduktase wurde mit reduziertem Methylviologen als Elektronendonator und Heterodisulfid als Elektronenakzeptor unter N_2 -Atmosphäre gemessen. Der Komplex zeigte eine Aktivität von $10,7 \pm 1,4$ U/mg Membranprotein (Tabelle 9). Da der Organismus, neben der membrangebundenen Heterodisulfid-Reduktase (HdrDE), keine weitere Heterodisulfid-Reduktase enthält und auch die lösliche Heterodisulfid-Reduktase HdrABC fehlt, war die Aktivität vollständig auf HdrDE zurückzuführen ist. Die Ergebnisse verdeutlichten in der Gesamtheit, dass alle erwarteten Enzymkomplexe in den Membranen von *Mna. thermophilum*, die vermutlich an der Energiekonservierung beteiligt sind katalytisch aktiv waren und hohe Aktivitäten aufwiesen.

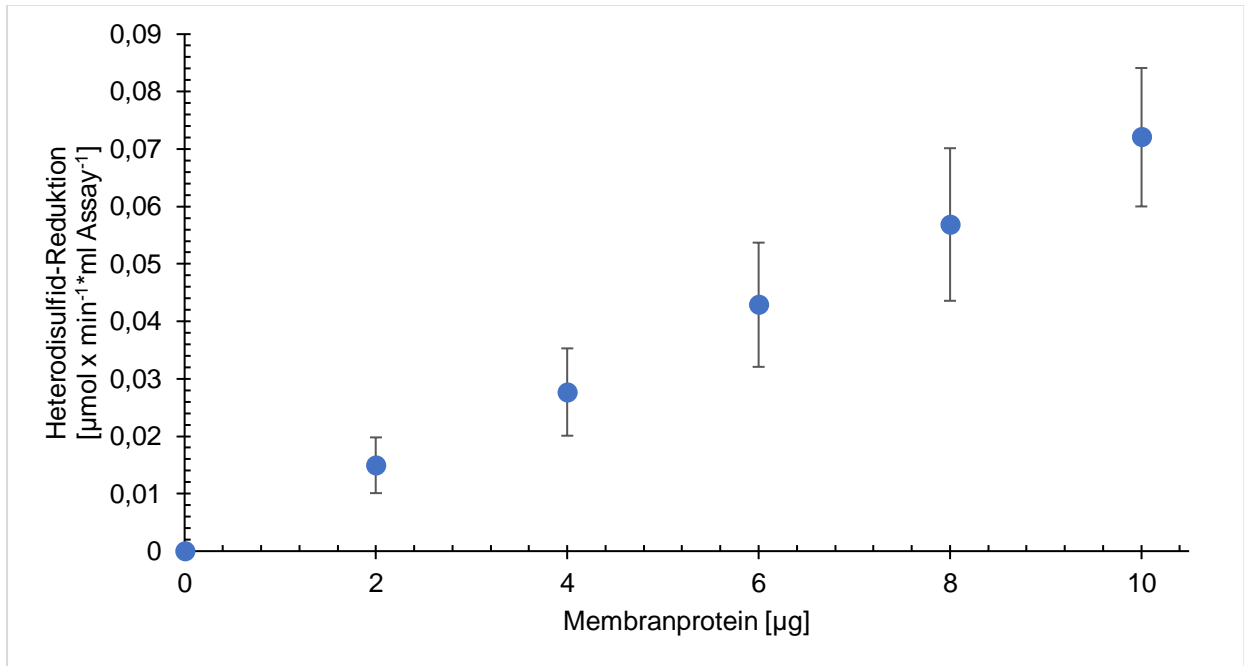


Abbildung 19: Reaktionsgeschwindigkeit der Reduktion von Heterodisulfid (CoM-S-S-CoB) mit reduziertem Methylviologen als Elektronendonator in Abhängigkeit der Menge an Membranprotein von *Mna. thermophilum*. Die Abbildung zeigt Mittelwerte und Standardabweichungen, die aus vier unterschiedlichen Membranpräparationen ermittelt wurden. Das Wachstum des Organismus erfolgte auf Formiat bzw. Wasserstoff in Kombination mit Methanol. Pufferbedingungen: Hdr: 100 mM Tris/HCl (pH 7,5, 2 M KCl); 50°C; Gasatmosphäre: N₂. Die Aktivität hinsichtlich der Heterodisulfid-Reduktion betrug $10,7 \pm 1,4$ U/mg Membranprotein.

Im Anschluss an die grundlegenden Tests wurde untersucht in welchem Maße die einzelnen Enzyme an die harschen physikochemischen Umweltbedingungen des natürlichen Habitats von *Mna. thermophilum* adaptiert sind und welche Bedingungen für eine optimale Enzymaktivität benötigt werden. Dies war auch für weitere kombinierte Tests verschiedener Enzymkomplexe von Bedeutung, um eine ausreichende Aktivität der Komplexe unter den gleichen Pufferbedingungen zu gewährleisten.

Das natürliche Habitat des Organismus ist ein hochalkalischer Sodasee und erwartungsgemäß liegen die Wachstumsoptima daher bei einem pH-Wert von etwa 9,5-9,8 und einer Na⁺-Konzentration von 4 M (Sorokin et al., 2017). Die katalytischen Untereinheiten von Formiat-Dehydrogenase und Vho-Hydrogenase sind mit hoher Wahrscheinlichkeit im extrazellulären Bereich lokalisiert (Wu et al., 2000; Dubini et al., 2003; Eismann et al., 1995; Jormakka et al., 2003; Jormakka et al., 2002) und sind damit unmittelbar den genannten Bedingungen ausgesetzt. Die katalytische Untereinheit der Heterodisulfid-Reduktase ist hingegen im Cytoplasma lokalisiert und damit den Bedingungen im Cytoplasma exponiert (Welte & Deppenmeier, 2014). Aufgrund der Osmoadaptation des Organismus, die auf einer "salt-in"-Strategie beruht liegen im Cytoplasma etwa 2,2 M K⁺-Ionen vor (Sorokin et al., 2017). Außerdem ist mit großer Wahrscheinlichkeit davon auszugehen, dass auch der pH-Wert im

Cytoplasma deutlich weniger alkalisch als im extrazellulären Raum ist, wie bereits für andere alkaliphile Organismen beschrieben (Horikoshi, 2004). Daher war es wie bereits angemerkt auch für weitere Analysen, die auf die Enzymaktivitäten in Kombination abzielten, von Bedeutung, die Aktivitäten der bedeutenden Membrankomplexe unter verschiedenen Bedingungen zu testen, um Bedingungen zu ermitteln bei denen jeweils die gewünschten Komplexe (Fdh bzw. Vho in Kombination mit Hdr) eine ausreichende Aktivität zeigten.

Die drei Enzymaktivitäten in den Membranpräparationen wurden daher zunächst auf den optimalen pH-Wert (pH-Werte von 6,5-10,5; Abbildung 20) und das präferierte zweiwertige Kation (2 M K^+ oder 2 M Na^+ ; Abbildung 20) sowie die optimale Ionenstärke (1-4 M Na^+/K^+ ; Abbildung 21) getestet. Bezüglich der Temperatur wurden alle Ansätze bei 50°C durchgeführt, welches die optimale Wachstumstemperatur von *Mna. thermophilum* darstellt (Sorokin et al., 2017).

Die höchste Hydrogenase-Aktivität lag bei einem pH-Wert von 9,5 und in Anwesenheit von 2 M NaCl anstelle von KCl vor ($31,4 \pm 6,3$ U/mg Membranprotein = 100 %). Auch bei einem pH-Wert von 8,5 lagen noch etwa 90 Prozent der genannten maximalen Aktivität vor. Bei pH-Werten von 10,5 und 7,5 lag diese hingegen deutlich unter 50 % und bei einem pH-Wert von 6,5 sogar unter 10 %. Außerdem ist anzumerken, dass die Aktivität mit Natriumchlorid anstelle von Kaliumchlorid in allen Fällen etwa 20 Prozent höher war. Daher erfolgte die Bestimmung der optimalen Ionenkonzentration mit NaCl, bei einem pH-Wert von 9,5. Die höchste Aktivität wurde dabei bei einer Na^+ -Konzentration von 1 M erreicht (Aktivität: $46,9 \pm 7,4$ U/mg Protein = 100 %). Auch bei 0 und 2 M NaCl lag die Aktivität noch bei über 60 %. Bei einer Konzentration von 4 M lag eine Aktivität von 39,8 % des Maximums vor.

Die Formiat-Dehydrogenase zeigte bezogen auf den optimalen pH-Wert die höchste Aktivität bei einem pH-Wert von 9,5 in Anwesenheit von 2 M NaCl. Die Aktivität lag bei $19,6 \pm 3,7$ U/mg Membranprotein. Auch bei pH 8,5 bzw. 10,5 waren noch Aktivitäten von 40 % bis 60 % des Maximums bei pH 9,5 vorhanden. Bei pH-Werten von 6,5 bzw. 7,5 war keinerlei bzw. nur noch eine sehr geringe Aktivität messbar. Ähnlich wie im Falle der Hydrogenase-Aktivität zeigte auch die Formiat-Dehydrogenase eine tendenziell etwas höhere Aktivität mit Na^+ anstelle von K^+ . Die Messungen hinsichtlich der optimalen Ionenkonzentration erfolgten daher bei einem pH-Wert von 9,5 und mit unterschiedlichen Konzentrationen von Natriumchlorid. Die höchste Aktivität lag mit $27,5 \pm 4,2$ U/mg/Membranprotein in Abwesenheit von NaCl vor. Mit zunehmender NaCl-Konzentration nahm die Aktivität schrittweise ab, wobei bei 4 M NaCl noch eine Aktivität von 33,5 % des Maximums vorlag. Für Hydrogenase-Aktivität und Formiat-Dehydrogenase-Aktivität der Membranpräparationen ließ sich zusammenfassend festhalten, dass die zugehörigen Enzymkomplexe gut an die extremen physiko-chemischen Lebensbedingungen des natürlichen Habitats von *Mna. thermophilum* adaptiert sind und hohe Aktivitäten in einem breiten Bereich von Ionenkonzentrationen zeigen. Im Falle des pH-Wertes

sind die Enzyme optimal an das alkalische Wachstums-Milieu des Organismus angepasst. Da das katalytische Zentrum von Mbh-Hydrogenasen im Gegensatz zu Vho-Hydrogenasen auf der cytoplasmatischen Seite der Membran vorliegt (Hedderich, 2004) ist die höhere Hydrogenase-Aktivität bei alkalischen pH-Werten und die tendenziell höhere Aktivität mit NaCl statt KCl außerdem ein weiterer Hinweis darauf, dass die Vho-Hydrogenase den größten Anteil der Aktivität ausmacht und somit vermutlich die entscheidende Rolle im Energiemetabolismus von *Mna. thermophilum* einnimmt.

Die Heterodisulfid-Reduktase-Aktivität in Membranpräparationen von *Mna. thermophilum* zeigte hinsichtlich des optimalen pH-Wertes ein Maximum bei pH 7,5 (2 M KCl) mit $10,7 \pm 1,4$ U/mg Membranprotein. Auch bei einem pH-Wert von 8,5 waren noch etwa 50 % der Aktivität vorhanden. Bei pH 10,5 fiel die Aktivität mit nur noch 6 % des Maximums hingegen deutlich ab. Gleiches galt für einen pH-Wert von 6,5. Die Aktivität fiel in diesem Bereich deutlich unter 20 Prozent des Maximums. In Anwesenheit von Kaliumchlorid war die Aktivität außerdem etwas höher als mit Natriumchlorid, sodass die Bestimmung der optimalen Ionenkonzentration mit Kaliumchlorid bei einem pH-Wert von 8,5 erfolgte. Die höchste Aktivität wurde im Falle einer KCl-Konzentration von 3 M ermittelt. Bei Konzentrationen von 2 und 4 M KCl waren noch 49,9 % bzw. 52,9 % der Aktivität vorhanden. Die höheren Aktivitäten mit KCl im Vergleich zu NaCl und die optimale Aktivität im Bereich von 3 M KCl zeigten vermutlich eine Adaptation des Enzyms an die Anreicherung von etwa 2,2 M KCl in den Zellen auf Grund der durch Sorokin et al. (2017) vorgeschlagenen "salt-in" Strategie des Organismus zur Osmoprotektion. Das Optimum bei einem pH-Wert im neutralen Bereich stellt vermeintlich ebenso eine Anpassung an die Bedingungen im Cytoplasma dar.

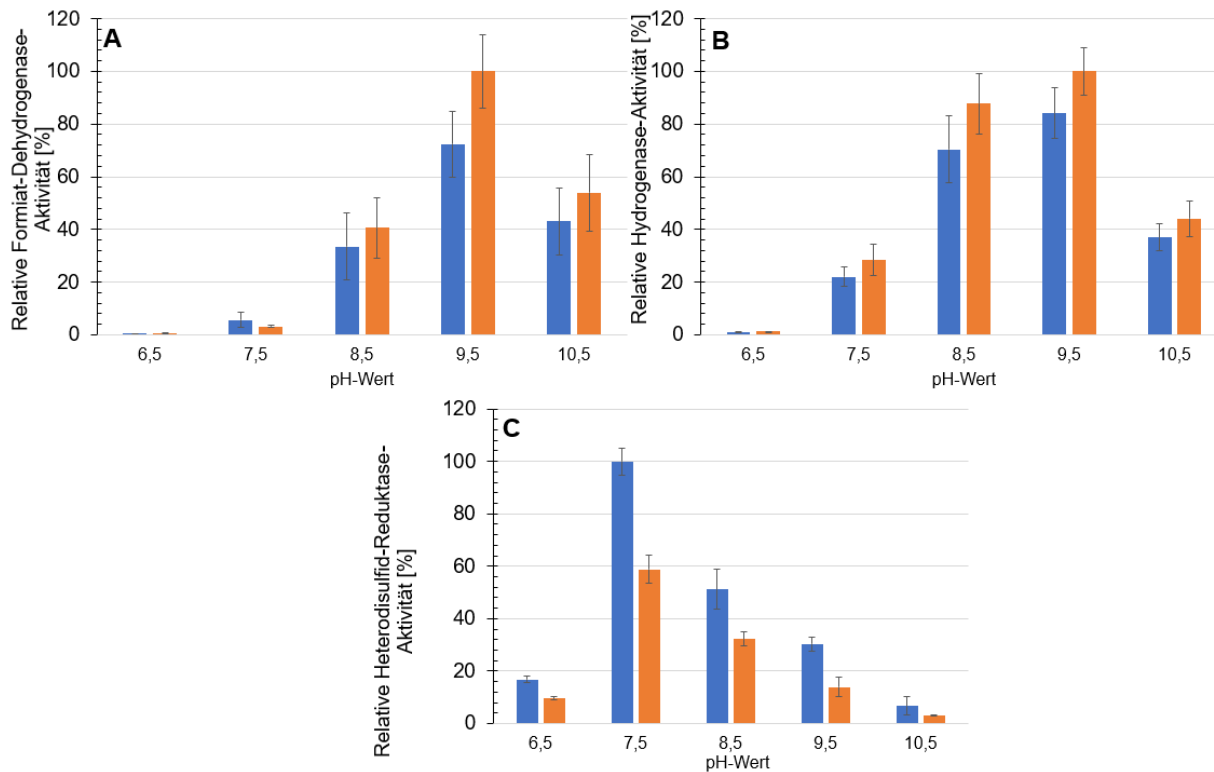


Abbildung 20: Relative Aktivität von Hydrogenase, Formiat-Dehydrogenase (Fdh) und Heterodisulfid-Reduktase (Hdr) in Membranpräparationen von *Mna. thermophilum* in Abhängigkeit vom pH-Wert. Die Analyse wurde mit dem artifiziellen Elektronenträger MV in anoxischen Glasküvetten mit Gummistopfen durchgeführt (2.7.11.1). Für die Bestimmung der Hydrogenase-Aktivität diente molekularer Wasserstoff als Gasatmosphäre, während die Fdh- und Hdr-Aktivität unter Stickstoffatmosphäre gemessen wurden. (A) FdhGHI-Aktivität (100 % = $19,6 \pm 3,7$ U mg Membranprotein); (B) Hydrogenase-Aktivität (100 % = $31,4 \pm 6,3$ U/mg Membranprotein); (C) HdrDE-Aktivität (100 % = $10,1 \pm 2,3$ Membranprotein). Orange Balken: Experimente mit 2 M NaCl; Blaue Balken: Experimente mit 2 M KCl. Die Werte stellen den Durchschnitt von drei verschiedenen Experimenten mit unterschiedlichen Membranpräparationen dar. Die Standardabweichungen sind durch Fehlerbalken angegeben.

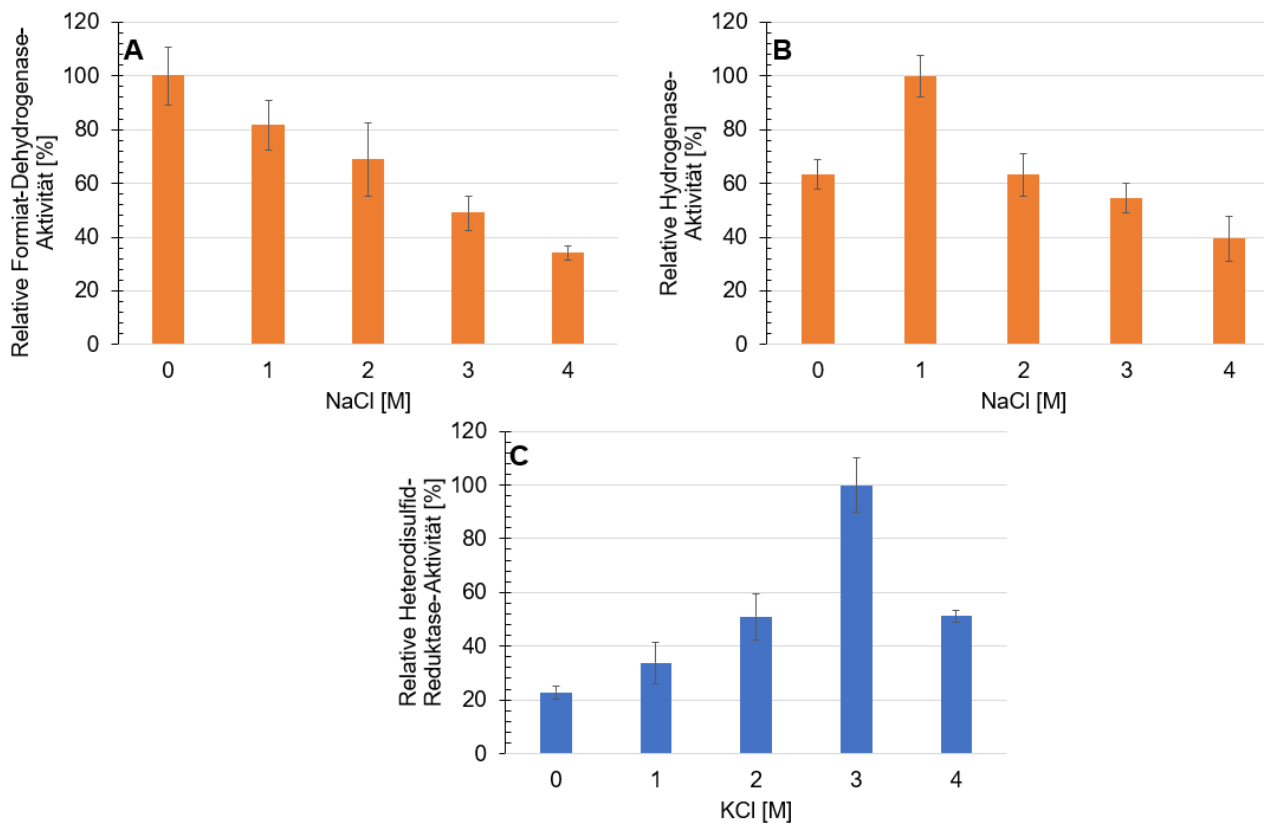


Abbildung 21: Relative Aktivität von Hydrogenase, Formiat-Dehydrogenase (Fdh) und Heterodisulfid-Reduktase (Hdr) in Membranpräparationen von *Mna. thermophilum* in Abhängigkeit der Ionenkonzentration. Die Analyse wurde mit dem artifiziellen Elektronenträger Methylviologen in anoxischen Glasküvetten mit Gummistopfen durchgeführt (2.7.11.1). Für die Bestimmung der Hydrogenase-Aktivität diente 100 % molekularer Wasserstoff als Gasatmosphäre, während die Fdh- und Hdr-Aktivität unter einer Stickstoffatmosphäre (100 %) gemessen wurden. (A) FdhGHI-Aktivität (pH 9,5), 100 % = $27,5 \pm 4,2$ U/mg Membranprotein; (B) Hydrogenase-Aktivität (pH 9,5), 100 % = $46,9 \pm 7,4$ U/mg Membranprotein; (C) HdrDE-Aktivität (pH 8,5), 100 % = $10,9 \pm 3,2$ U/mg Membranprotein. Die Werte stellen den Durchschnitt von drei verschiedenen Experimenten mit unterschiedlichen Membranpräparationen dar. Die Standardabweichungen sind durch Fehlerbalken angegeben.

3.1.3.3 Aktivitätstest mit dem artifiziellen Methanophenazin-Analogon 2-Hydroxyphenazin

Nach der ersten Charakterisierung der Membrankomplexe mit Methylviologen, erfolgten weitere Tests mit dem Elektronenträger 2-Hydroxyphenazin (OH-Phen/Hydroxyphenazin). 2-Hydroxyphenazin ist ein Derivat des funktionellen Chinon-Analogons der methanogenen Archaeen in Form von Methanophenazin, welches jedoch wesentlich besser wasserlöslich und damit hervorragend für Enzymtests geeignet ist (Brodersen et al., 1999). Im Gegensatz zu Methylviologen erfolgt die Elektronenübertragung auf 2-Hydroxyphenazin nicht über [FeS]-Cluster, sondern über die Häm-Gruppen der membranintegralen Cytochrom(b-Typ)-Untereinheiten der am Elektronenfluss beteiligten Enzymkomplexe. Insbesondere für die Hydrogenase-Aktivität erlaubt OH-Phen eine erste Differenzierung zwischen den Aktivitäten von Vho- und Mbh-Hydrogenase. Letztere gehört zu den Hydrogenasen des Ech-Typs und

überträgt folglich Elektronen von molekularem Wasserstoff auf Ferredoxin und umgekehrt. An der genannten Reaktion sind keine Cytochrome beteiligt (Welte & Deppenmeier, 2014; Brodersen et al., 1999; Abken et al., 1998). Die Vho Hydrogenase hingegen überträgt Elektronen über ein membrangebundenes Cytochrom (VhoC), auf einen membranlöslichen Elektronenträger, im Falle von *Methanosarcina*-Spezies Methanophenazin (Deppenmeier, 2004). Da Sorokin et al. (2017) aufgrund von massenspektrometrischen Untersuchungen eine Methanophenazin-Ähnliche Substanz als Elektronenüberträger in den Membranen von *Mna. thermophilum* postulierten, war es naheliegend Tests mit 2-Hydroxyphenazin durchzuführen. Neben der Vho-Hydrogenase (VhoGAC), enthalten auch die Formiat-Dehydrogenase (FdhGHI) und die Heterodisulfid-Reduktase (HdrDE) jeweils ein membranintegrales Cytochrom des b-Typs (FdhI bzw. HdrE), welches vermutlich mit Methanophenazin oder einem Derivat reagiert (3.1.3.6). Daher wurde auch die Elektronenübertragung von Formiat auf Hydroxyphenazin als auch von reduziertem Hydroxyphenazin auf Heterodisulfid durch Membranpräparationen von *Mna. thermophilum* näher untersucht.

Die Versuche wurden bei einem pH-Wert von 8,5 und einer Konzentration von 2 M NaCl durchgeführt, um allen beteiligten Enzymkomplexen Bedingungen zu liefern, die auf Grundlage der Versuche mit Methylviologen eine hohe Aktivität ermöglichten. Die spektrophotometrischen Tests zeigten, dass die Elektronenübertragung von Wasserstoff bzw. Formiat auf 2-Hydroxyphenazin (420 nm: $\epsilon_{\text{OH-Phen-oxidiert}}=2.9 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$), durch Membranpräparationen von *Mna. thermophilum* katalysiert wurde. Nach vollständigem Verbrauch von Wasserstoff oder Formiat konnte durch die Zugabe von Heterodisulfid eine Reoxidation des reduzierten 2-Hydroxyphenazins beobachtet werden (Abbildung 22). In Abwesenheit von Membranen oder der spezifischen Elektronendonatoren bzw. -akzeptoren fand keinerlei Reaktion statt. Zusammenfassend erfolgte nach der Zugabe von molekularem Wasserstoff bzw. Formiat eine Reduktion des 2-Hydroxyphenazins einhergehend mit einer Absorptionsabnahme, wobei nach Zugabe des Heterodisulfids die Reoxidation des reduzierten 2-Hydroxyphenazins erfolgte. Daneben konnte auf Grundlage von Versuchen mit verschiedenen Mengen Formiat gezeigt werden, dass die Oxidation von Formiat und die Reduktion von 2-Hydroxyphenazin, auf Grundlage von Berechnungen mit dem Extinktionskoeffizienten von OH-Phen (2.7.11.1), in äquimolaren Verhältnissen erfolgte (Abbildung 23). Dies war ein Beleg, dass die Reaktion hochspezifisch von FdhGHI katalysiert wird und das genannte Enzym, die erste beschriebene membrangebundene Formiat-Dehydrogenase in methanogenen Archaeen ist, welche putativ direkt am Energiestoffwechsel teilnimmt. Die durchgeführten Versuche bewiesen in ihrer Gesamtheit erstmals das Vorliegen des H₂:Heterodisulfid und des Formiat:Heterodisulfid Oxidoreduktase-Systems in den Membranen von *Mna. thermophilum* und waren ein Indiz, dass Methanophenazin oder ein Derivat als Elektronenträger in den Membranen des Organismus fungiert. Das

Formiat:Heterodisulfid Oxidoreduktase-System wurde erstmals überhaupt experimentell bewiesen und stellt eine Besonderheit der Klasse Methanonatronarchaeia dar. Aufbauend auf den Nachweis des möglichen Elektronentransfers mit 2-Hydroxyphenazin konnten ebenso genaue Aktivitäten für die Einzelreaktionen bestimmt werden. So fand die Reduktion von 2-Hydroxyphenazin ausgehend von Formiat durch FdhGHI mit einer Rate von $1,4 \pm 0,6$ U/mg Membranprotein statt. Im Falle von molekularem Wasserstoff als Reduktionsmittel lag die Rate bei $9,6 \pm 2$ U/mg Membranprotein. Diese hohe Aktivität war ein weiteres deutliches Indiz dafür, dass die Vho-Hydrogenase, und nicht die Mbh Hydrogenase, die entscheidende Rolle im Energiestoffwechsel des Organismus spielt. Wie zuvor beschrieben findet die Elektronenübertragung auf 2-Hydroxyphenazin über die Cytochrom-Untereinheit von VhoGAC statt. Die Mbh-Hydrogenase hingegen besitzt keine Cytochrom-Untereinheit und ist damit vermeintlich nicht am Elektronentransfer auf 2-Hydroxyphenazin beteiligt. Dies bedeutet, die genannte hohe Aktivität ist wohl vollständig auf VhoGAC zurückzuführen. In einigen Fällen wurden zwar unspezifische Reaktionen von Ech-Typ-Hydrogenasen mit 2-Hydroxyphenazin beschrieben (Meuer et al., 1999), dies ist jedoch an dieser Stelle nicht der Fall, wie die im folgenden beschriebenen Analysen zeigten (3.1.3.5). Die Aktivität der Heterodisulfid-Reduktase (HdrDE) bezüglich der Oxidation von reduziertem 2-Hydroxyphenazin bzw. Reduktion von Heterodisulfid betrug $0,6 \pm 0,2$ U/mg.

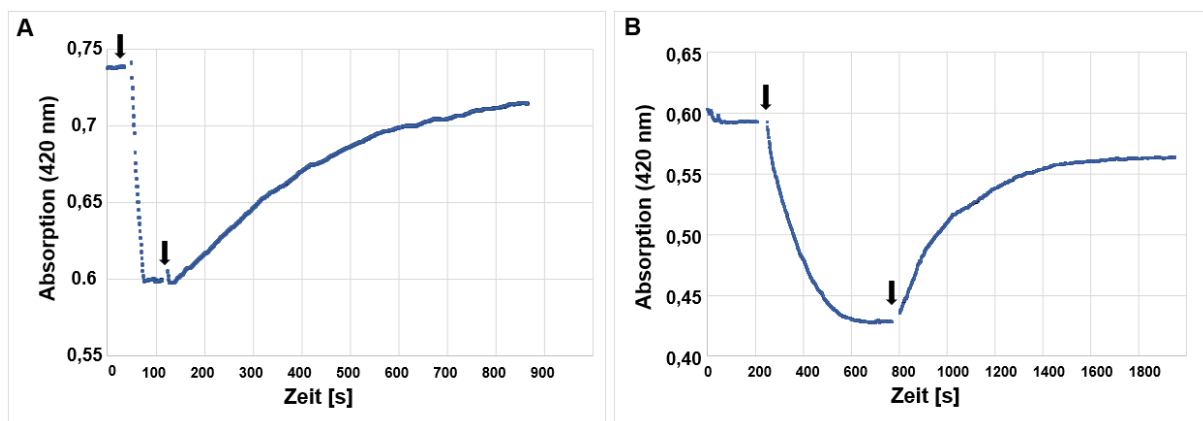


Abbildung 22: Membrangebundener Elektronentransport in *Mna. thermophilum* mit OH-Phen. A: Reduktion von OH-Phen durch VhoGAC in Gegenwart von H₂ und Reoxidation durch HdrDE. B: Reduktion von OH-Phen durch FdhGHI in Anwesenheit von Formiat und Reoxidation durch HdrDE. Der vollständige Assay enthielt in beiden Fällen 700µL100mMTris/HCl-Puffer (pH 8,5, 2 M NaCl, 5 mM Dithiothreitol, 1µg/mL Resazurin), 200 µM OH-Phen und 7,5 µg Membranprotein (Temperatur: 50°C). Die detaillierten Testbedingungen sind in unter 2.7.11.1 beschrieben. Pfeil 1: Zugabe von 50 µM Formiat bzw. H₂. Pfeil 2: Zugabe von 1 mM CoM-S-S-CoB. Das Experiment wurde dreifach mit verschiedenen Membranpräparationen durchgeführt. Ein repräsentatives Experiment ist abgebildet.

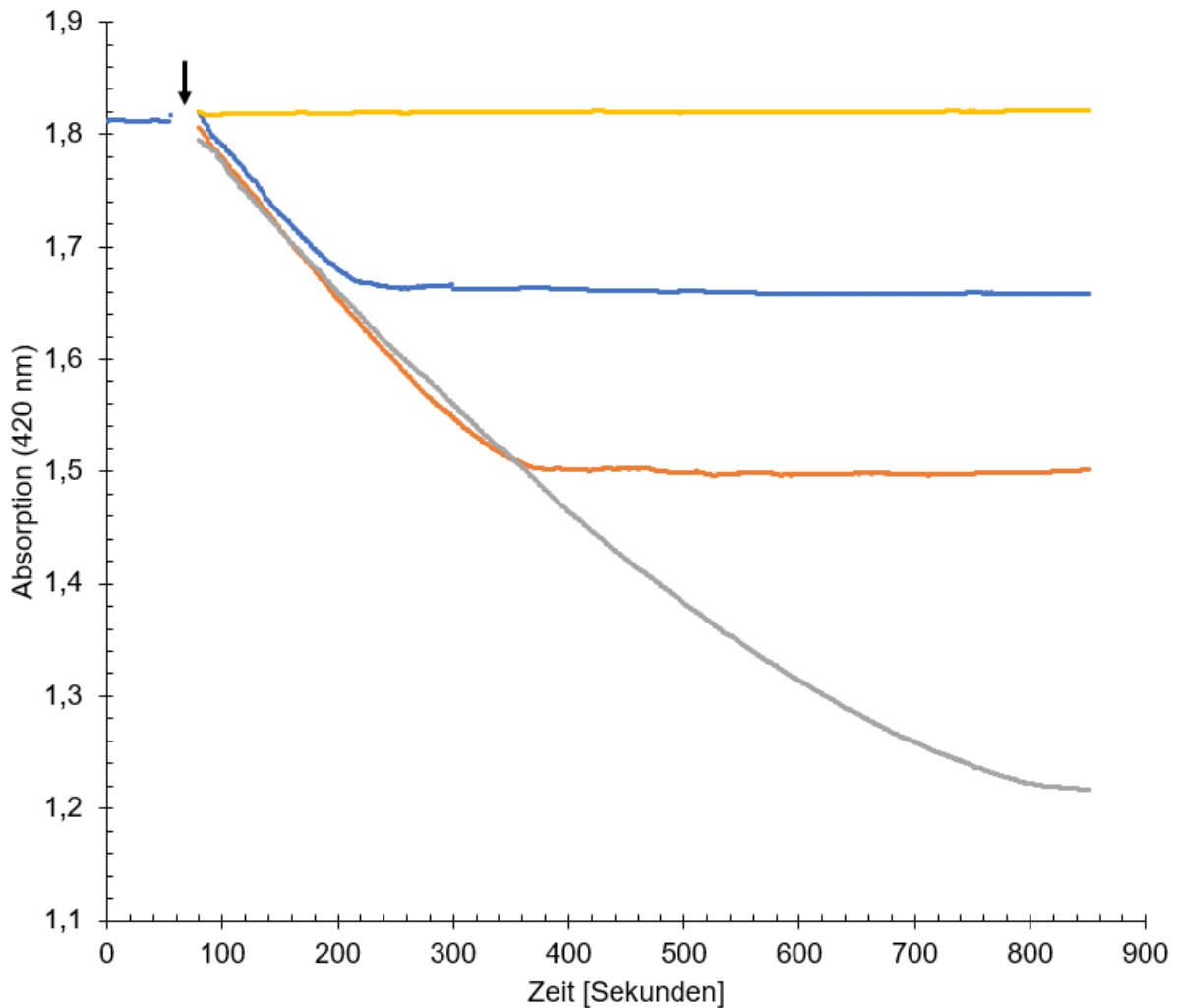


Abbildung 23: Spektrophotometrisch gemessene Reduktion von OH-Phen in Anwesenheit von Membranen von *Mna. thermophilum*, nach Zugabe von unterschiedlichen Konzentrationen Formiat. Der Zeitpunkt der Formiat-Zugabe ist mit einem schwarzen Pfeil markiert. Gelb: ohne Formiat, blau: 50 µM Formiat, rot: 100 µM Formiat, grau: 200 µM Formiat. Der vollständige Assay enthielt jeweils 700µL 100mMTris/HCl-Puffer (pH 8,5, 2 M NaCl, 5 mM Dithiothreitol, 1µg/mL Resazurin), 600 µM OH-Phen und 10 µg Membranprotein (Temperatur: 50°C).

3.1.3.4 Nachweis des vollständigen Formiat:Heterodisulfid- und H₂:Heterodisulfid-Oxidoreduktase-Systems in Membranen von *Mna. thermophilum* mittels Ellmans-Reagenz

Das H₂:Heterodisulfid- und das Formiat:Heterodisulfid-Oxidoreduktase-System wurden wie oben beschrieben erstmals mit Hilfe des Methanophenazin-Analogons 2-Hydroxyphenazin in Membranpräparationen von *Mna. thermophilum* nachgewiesen. Ein Nachweis ohne artifizielle Zugabe von 2-Hydroxyphenazin sollte die Ergebnisse hinsichtlich des Vorliegens der beiden Systeme verifizieren. Der natürlich vorkommende membranlösliche Elektronenträger in den Cytoplasma-Membranen, welcher vermutlich Methanophenazin oder ein Derivat darstellt (Sorokin et al., 2017), diente in diesem Falle der Elektronenübertragung zwischen den Membrankomplexen. Zur Detektion der beiden Oxidoreduktase-Systeme wurde die Reduktion des Heterodisulfids durch Membranpräparationen von *Mna. thermophilum* nach Zugabe von

Formiat oder H_2 mittels des Ellmans-Reagenzes analysiert. Dieses reagiert mit freien Thiolen, wie Coenzym M und Coenzym B, zu einem farbigen Produkt, welches bei 412 nm Wellenlänge quantifiziert werden kann (Ellman, 1959). Dazu wurden Membranen des Organismus unter anoxischen Bedingungen mit Heterodisulfid versetzt und die Reaktion mit der Zugabe von 10 mM Formiat bzw. Begasung mit H_2 gestartet. Zur Analyse mittels Ellmans-Reagenzes wurden regelmäßig kleine Proben der Ansätze entnommen. Ausgehend von molekularem Wasserstoff als Reduktionsmittel wurde für das H_2 :Heterodisulfid-Oxidoreduktase-System eine Aktivität von $784 \pm 51,4 \text{ nmol mg}^{-1}\text{min}^{-1}$ ermittelt (Abbildung 24). Da die Aktivität sich auf die freigesetzten Thiolgruppen bezieht und jede Reduktion des Heterodisulfids zu Coenzym B und Coenzym M zwei Thiolgruppen freisetzt, wurden folglich $392 \pm 25,7 \text{ nmol mg}^{-1}\text{min}^{-1}$ des Heterodisulfids reduziert. Für das neuartige Formiat:Heterodisulfid-Oxidoreduktase-System wurde eine spezifische Aktivität von $369 \pm 35 \text{ nmol mg}^{-1}\text{min}^{-1}$ in Bezug auf die Thiolfreisetzung ermittelt, was bezogen auf die Heterodisulfid-Reduktion einer Aktivität von $184,5 \pm 17,5 \text{ nmol mg}^{-1}\text{min}^{-1}$ entsprach (Abbildung 24). In Abwesenheit von Membranen, Heterodisulfid oder Formiat bzw. molekularem Wasserstoff, war erwartungsgemäß keinerlei Reaktion erkennbar. Das Vorliegen des H_2 :Heterodisulfid- und des Formiat:Heterodisulfid-Oxidoreduktase-Systems in Membranen von *Mna. thermophilum* wurde damit erstmals experimentell, ohne Zugabe von artifiziellen Elektronenträgern, bestätigt. Die entscheidenden Elemente der beiden Oxidoreduktase-Systeme stellten VhoGAC bzw. FdhGHI in Kombination mit HdrDE dar. Die Mbh-Hydrogenase war auf Grundlage der im Folgenden dargestellten Untersuchungen nicht am Energiestoffwechsel von *Mna. thermophilum* beteiligt (3.1.3.5).

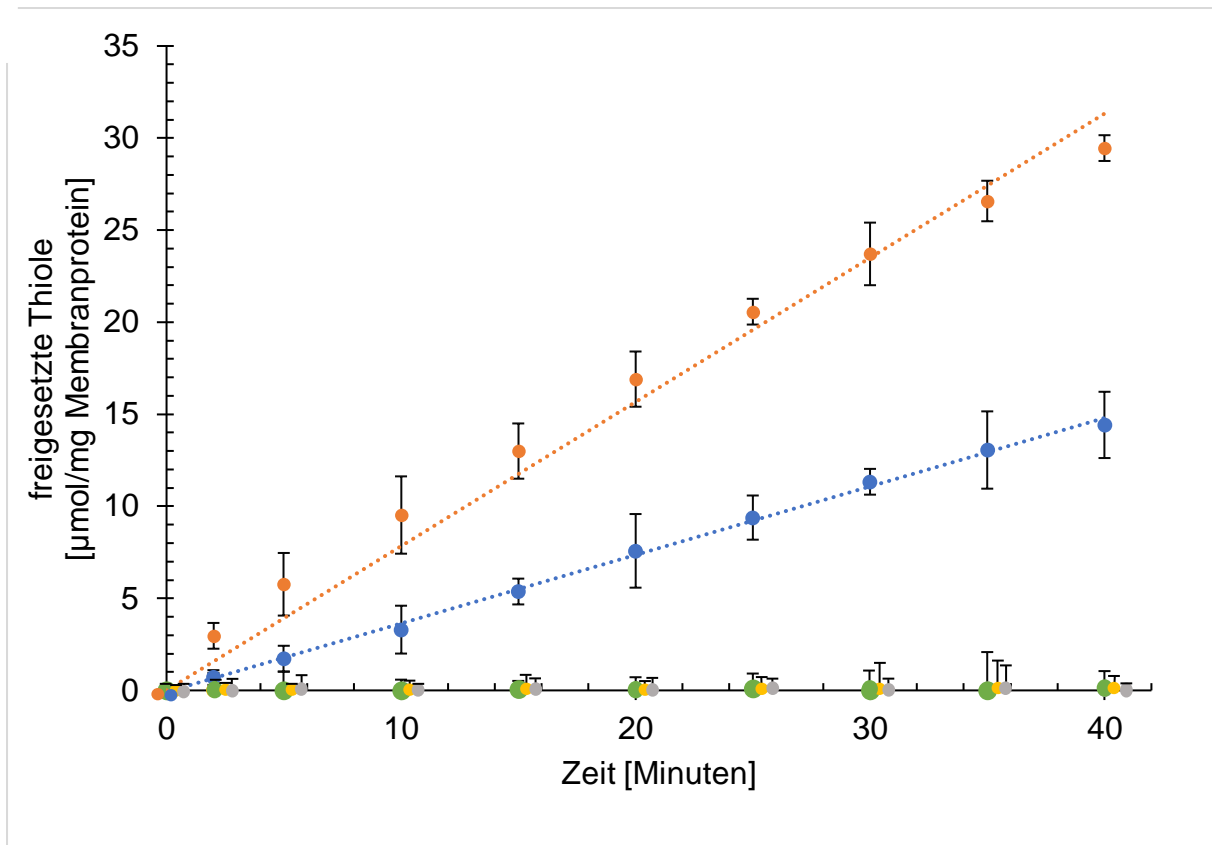


Abbildung 24: Elektronentransport von H₂ oder Formiat auf CoM-S-S-CoB katalysiert durch Membranen von *Mna. thermophilum*. Der komplette Ansatz enthielt 200µL 100 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,5, 2 M NaCl), 5 mM CoM-S-S-CoB und 50 µg Membranprotein (Temperatur: 50°C). Blaue Symbole: Vollständiger Assay mit 10 mM Formiat, Membranprotein und CoM-S-S-CoB. Orange Symbole: Vollständiger Assay mit H₂, Membranprotein und CoM-S-S-CoB. Grüne Symbole: Vollständiger Assay ohne Substrat (H₂/Formiat). Gelbe Symbole: Vollständiger Assay (Mit H₂ oder Formiat) ohne Membranen. Graue Symbole: Vollständiger Assay (Mit H₂ oder Formiat) ohne Heterodisulfid. Die Werte stellen den Durchschnitt von drei verschiedenen Experimenten mit unterschiedlichen Membranpräparationen dar. Die Standardabweichungen sind durch Fehlerbalken angegeben.

3.1.3.5 Einfluss des Cytochrom-spezifischen Inhibitors DPI auf die Elektronentransportsysteme in Membranen von *Mna. thermophilum*

Zur weiteren Verifizierung des Elektronenflusses in den Membranen von *Mna. thermophilum* wurde Diphenyliodoniumchlorid (DPI) auf seine Wirkung auf die beschriebenen membrangebundenen Elektronentransport-Systeme getestet. DPI ist ein potentieller Inhibitor von Flavoproteinen und Cytochromen (Ragan, 1976; Majander et al., 1994). (Abb. 5). Der Hemmstoff ist ebenfalls ein Analogon von Methanophenazin und blockiert beispielsweise den Elektronenfluss in den Membranen von *Methanosarcina mazei*, da diese Verbindung aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit mit Methanophenazin, die Elektronenübertragung an den Cytochrom-Untereinheiten inhibiert. (Brodersen et al., 1999). Auch der Gesamtelektronenfluss in den Membranen von *Mna. thermophilum* wurde durch die Zugabe steigender Mengen DPI in zunehmendem Maße gehemmt. Sowohl das mittels Elmans-Reagenz analysierte Formiat:Heterodisulfid-Oxidoreduktase-System als auch das H₂:Heterodisulfid-Oxidoreduktase-System wurden durch die DPI Zugabe inhibiert (Abbildung 25). So verringerte

sich die durch das Ellmansreagenz ermittelte Thiolbildungsrate bereits bei der Zugabe von 100 nmol DPI pro mg Membranprotein um 45 % (Formiat) respektive 33 % (H₂). Die Rest-Aktivität der Formiat:Heterodisulfid-Oxidoreduktase-System und H₂:Heterodisulfid-Oxidoreduktase-System lag nach Zugabe von 1 µmol DPI pro mg Membranprotein bei nur noch 14 % bzw. 12 %. Die starke Hemmung sprach eindeutig für das Vorliegen eines Methanophenazin-ähnlichen Elektronenträgers in den Membranen von *Mna. thermophilum*. Dass die Messung der drei Einzelreaktionen (Formiat- und H₂-Oxidation, Heterodisulfid-Reduktion) mit Methylviologen bis hin zu Konzentrationen von 3 µM DPI pro mg Membranprotein nicht inhibiert wurde (Tabelle 9), zeigte, dass DPI tatsächlich spezifisch die Reaktionen an den Cytochrom-Untereinheiten in den Membranen (VhoC, FdhI, HdrE; Vgl. 3.1.3.6) inhibierte und keinen Einfluss auf den Elektronenfluss über die [FeS]-Cluster in HdrDE, FdhGI und VhoGAC hatte. Dazu ist anzumerken, dass Methylviologen als Elektronenüberträger unmittelbar mit [FeS]-Clustern interagiert und diese reduziert bzw. oxidiert, wohingegen Methanophenazin respektive 2-Hydroxyphenazin mit den Häm-Gruppen in den membranintegralen Untereinheiten der Enzymkomplexe reagiert und diese reduziert bzw. oxidiert.

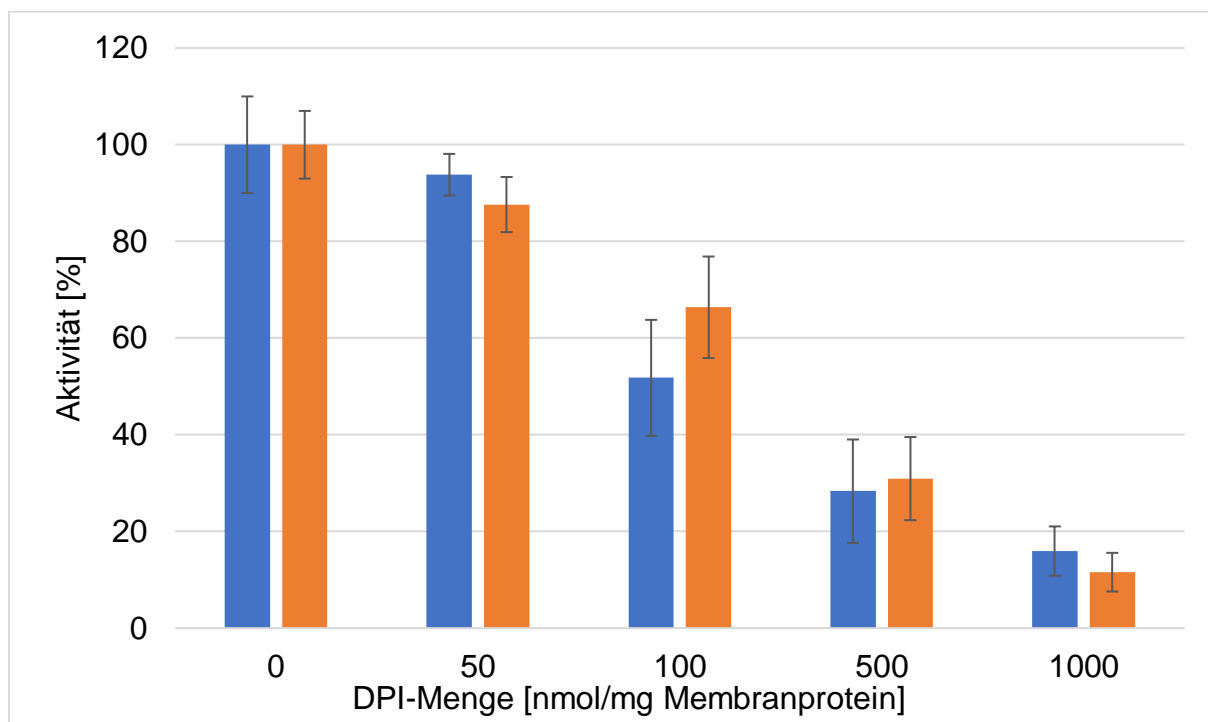


Abbildung 25: Einfluss von DPI auf den Elektronenfluss in der Atmungskette von *Mna. thermophilum*. Die Ansätze enthielten 200 µL 100 mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,5, 2 M NaCl), 5 mM Heterodisulfid und 50 µg Membranprotein (Temperatur: 50°C). Nach Zugabe von DPI (wie angegeben) und einer Inkubationszeit von 5 Minuten wurde die Reaktion durch Begasung mit H₂ oder durch Zugabe von 10 mM Formiat gestartet. Die 100%ige Aktivität entsprach 360 ± 17 nmol bzw. 269 ± 21 nmol CoM-S-S-CoB-Reduktion pro Minute und pro mg Membranprotein mit H₂ und Formiat als Elektronendonator. Das Experiment wurde in dreifacher Ausführung mit verschiedenen Membranpräparationen durchgeführt. Die Standardabweichungen sind durch Fehlerbalken angegeben. Blaue Balken: H₂ + CoM-S-S-CoB. Orangefarbene Balken: Formiat + CoM-S-S-CoB.

Tabelle 9: Spezifische Aktivitäten der zentralen Membrankomplexe des Energiestoffwechsels von *Mna. thermophilum* mit dem artifiziellen Elektronenträger Methylviologen (MV).

	Elektronendonator	Elektronenakzeptor	DPI ^{a)}	Spezifische Aktivität ^{b) c)} [U/mg Membranprotein]
Fdh	Formiat	MV _{ox}	-	19,05 ± 4,6
Fdh	Formiat	MV _{ox}	+	18,6 ± 0,5
Hydrogenase	H ₂	MV _{ox}	-	31,2 ± 8,3
Hydrogenase	H ₂	MV _{ox}	+	31,7 ± 0,3
Hdr	MV _{red}	CoM-S-S-CoB	-	10,7 ± 1,4
Hdr	MV _{red}	CoM-S-S-CoB	+	11,1 ± 2,1

a) 3 µM DPI pro mg Membranprotein wurden zugesetzt. Vor Reaktionsstart 5 min Vorinkubation.

b) Versuchsansatz Hydrogenase und Fdh: 100 mM Tris/HCl (pH 9,5, 2 M NaCl); Versuchsansatz Hdr: 100 mM Tris/HCl (pH 7.5, 2 M KCl); Temperatur 50°C

c) Die Experimente wurden vier Mal mit Membranpräparationen aus Kulturen durchgeführt, die mit Methanol in Kombination mit Formiat oder H₂ gewachsen sind.

d) Der Einfluss von DPI wurde durch eine 5-minütige Vorinkubation des Ansatzes mit der angegebenen DPI Menge analysiert.

Auch in Versuchen mit 2-Hydroxyphenazin konnte gezeigt werden, dass DPI die Elektronenübertragung durch FdhGHI bzw. VhoGAC von Formiat bzw. Wasserstoff auf den genannten Elektronenakzeptor inhibiert (Abbildung 26). Mit einer Konzentration von 2 µmol DPI pro mg Membranprotein konnte eine fast vollständige Inhibition der Elektronenübertragung auf 2-Hydroxyphenazin erzielt werden. Dies war sowohl im Falle der Hydrogenase als auch der Formiat-Dehydrogenase erkennbar. Da die genannte DPI Konzentration ebenso keinen Effekt auf die Reaktionen mit Methylviologen hatte (Tabelle 9), konnte erneut verifiziert werden, dass DPI die Elektronenübertragung an den Cytochrom-Untereinheiten von Formiatdehydrogenase (FdhI) und Vho-Hydrogenase (VhoC) inhibiert und vermeintlich Methanophenazin oder zumindest ein Methanophenazin-ähnliches Molekül als Elektronenüberträger in den Membranen von *Mna. thermophilum* dient. Der Versuch bestätigte zudem abschließend, dass nicht die Mbh-Hydrogenase, sondern die Vho-Hydrogenase die entscheidende Rolle im Energiemetabolismus von *Mna. thermophilum* spielt. Ech-Typ-Hydrogenasen, wie die Mbh-Hydrogenase, zeigen teilweise auch eine unspezifische Aktivität hinsichtlich der Reduktion von 2-Hydroxyphenazin, reagieren jedoch, im Vergleich zu Vho-Hydrogenasen, nicht auf die Zugabe von bis zu 100 µM DPI, da der Elektronenfluss nicht über eine Cytochrom-Untereinheit erfolgt (Meuer et al., 1999). Daher konnte im Versuch mit dem Hemmstoff DPI verifiziert werden, dass die Vho-Hydrogenase die zentrale Rolle innerhalb des H₂:Heterodisulfid Oxidoreduktase-Systems in den Membranen von *Mna. thermophilum*

einnimmt. Die Möglichkeit der fast vollständigen Hemmung der Hydrogenase-Aktivität durch 2000 nmol DPI pro mg Membranprotein (entspricht 2,8 μM) war dafür ein klares Indiz.

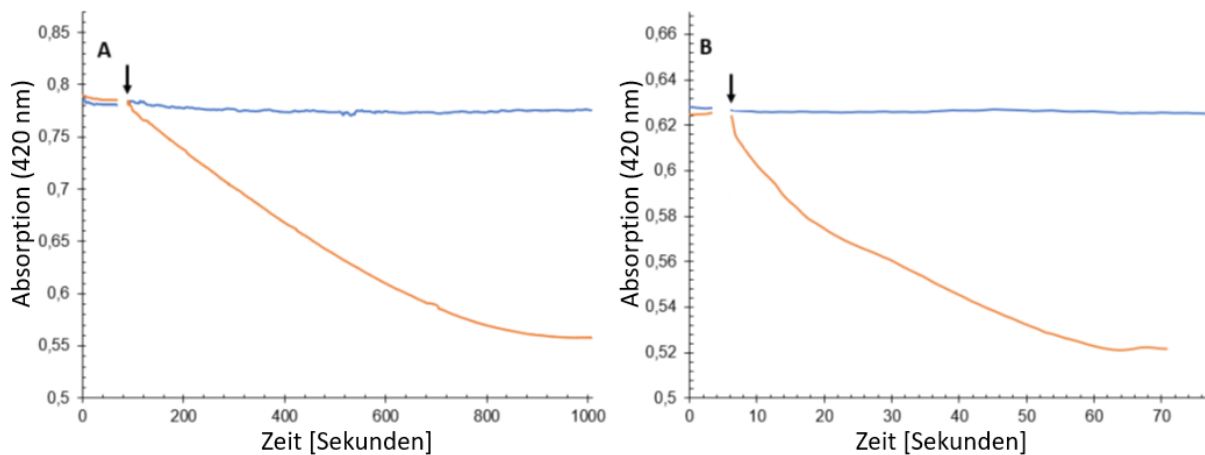


Abbildung 26: Spektrophotometrisch gemessene Reduktion von OH-Phen in Anwesenheit von Membranen von *Mna. thermophilum*, nach Zugabe (schwarzer Pfeil) von 70 μM Formiat (A; FdhGHI) bzw. H_2 (B; VhoGAC). Die blaue Kurve zeigt jeweils den Ansatz mit 2000 nmol DPI pro mg Membranprotein und die rote Kurve den Ansatz ohne DPI. A: Der vollständige Assay enthielt jeweils 700 μL 100mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,5, 2 M NaCl, 5 mM Dithiothreitol, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Resazurin), 250 μM OH-Phen und 5 μg Membranprotein (Temperatur: 50°C). B: Der vollständige Assay enthielt jeweils 700 μL 100mM Tris/HCl-Puffer (pH 8,5, 2 M NaCl, 5 mM Dithiothreitol, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Resazurin), 200 μM OH-Phen und 1 μg Membranprotein (Temperatur: 50°C). Das Experiment wurde in dreifacher Ausführung mit verschiedenen Membranpräparationen durchgeführt. Ein repräsentativer Ansatz ist gezeigt.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass VhoGAC, FdhGHI und HdrDE, wie von Sorokin et al., 2017 postuliert, die entscheidenden Elemente des respiratorischen Elektronentransports in *Mna. thermophilum* sind. Auf Basis der durchgeführten Versuche wird molekularer Wasserstoff von der Vho-Hydrogenase oxidiert, wobei die Elektronen auf den membranlöslichen Elektronenträger Methanophenazin oder ein potentiell Derivat dazu transferiert werden. Das reduzierte Methanophenazin bzw. dessen Derivat dient HdrDE als Elektronendonator, wobei die Elektronen zur Reduktion des Heterodisulfids genutzt werden. Im Falle der Oxidation von Formiat durch FdhGHI werden die Elektronen ebenfalls auf Methanophenazin oder ein Derivat übertragen, welches schließlich von HdrDE als Elektronendonator verwendet wird.

3.1.3.6 Bioinformatische Analyse der an der Energiekonservierung von *Mna. thermophilum* beteiligten membrangebundenen Enzymkomplexe

Die in dieser Arbeit untersuchten und zentral am Energiestoffwechsel von *Mna. thermophilum* beteiligten Enzymkomplexe in Form von Formiat-Dehydrogenase, Vho-Hydrogenase und Heterodisulfid-Reduktase bestehen allesamt aus mehreren Untereinheiten die zahlreiche Cofaktoren enthalten, welche am Elektronentransport beteiligt sind. Da alle Enzymkomplexe

isoliert betrachtet bereits im Detail in anderen Organismen untersucht und die Cofaktoren bekannt sind, wurden in Alignments mit den entsprechenden Untereinheiten aus Organismen in denen diese detailliert charakterisiert wurden, jene Aminosäuren identifiziert, welche an der Bindung der Cofaktoren beteiligt sind. Im Falle der Vho-Hydrogenase lagen Analysen zu den homologen Untereinheiten in *Methanosarcina mazei* vor (Deppenmeier, 1995; Deppenmeier et al., 1995). Daneben lagen Kristallstrukturen von homologen Untereinheiten oder gesamten Komplexen aus einigen Bakterien, wie *Cupriavidus necator*, *Escherichia coli*, *Allochromatium vinosum* oder *Wollinella succinogenes* vor, die ebenfalls für die Identifikation der relevanten Aminosäuren genutzt werden konnten (Vignais & Billoud, 2007; Gross et al., 2004; Volbeda et al., 2013; Volbeda et al., 2012; Fritsch et al., 2011; Ogata et al., 2010). Bei den Analysen wurde die typische große (VhoA) und kleine Untereinheit (VhoG) von Hydrogenasen identifiziert, wobei VhoA, dass für die H₂-Oxidation entscheidende [NiFe]-Zentrum enthält, welches von vier Cystein-Resten koordiniert wird. VhoG enthält drei [FeS]-Cluster. Wie unter 3.1.3.2 beschrieben liegen beide Untereinheiten extrazellulär vor. Die kleine Untereinheit enthält auf Grundlage von Analysen der Software SignalP-5.0, welche zur Vorhersage von Signalpeptiden genutzt werden kann, eine TAT-Signalsequenz für die Translokation über die Cytoplasmamembran. Die große Untereinheit besitzt kein Signalpeptid. Diese bioinformatische Vorhersage stützt die vorliegenden biochemischen Untersuchungen, die eine Co-Translokation von VhoA mit VhoG (TAT-Signalpeptid) postulieren (Wu et al., 2000; Eismann et al., 1995). Die beiden genannten extrazellulären Untereinheiten sind mit der membrangebundenen Untereinheit assoziiert (VhoC), welche zwei HämB Cofaktoren enthält, deren zentrales Eisen-Ion jeweils von zwei Histidin-Resten als fünfter und sechster Ligand koordiniert wird (Volbeda et al., 2013; Gross et al., 2004). Nach der Oxidation von H₂ in der großen Untereinheit und der Weiterleitung der Elektronen über die drei [FeS]-Cluster in der kleinen Untereinheit, werden die Elektronen über die Cytochrom-haltige Untereinheit auf Methanophenazin bzw. ein Phenazin-Derivat (3.1.3.3/3.1.3.4) übertragen. An dieser Stelle erfolgt die Inhibition der Reaktion durch DPI, da dieses die Elektronenübertragung von den Häm-Gruppen auf Methanophenazin hemmt (3.1.3.5). Der schematische Aufbau der Hydrogenase VhoGAC von *Mna. thermophilum* mit den bioinformatisch identifizierten relevanten Aminosäuren und Cofaktoren ist in Abbildung 27 A dargestellt.

Die Formiat-Dehydrogenase von *Mna. thermophilum* besteht ebenfalls aus drei entscheidenden Untereinheiten. Besonders in *Escherichia coli* ist diese in Form der Formiat-Dehydrogenase N, welche im Rahmen der Nitratatmung eine bedeutende Rolle spielt, gut untersucht. So liegen für das Enzym von *E. coli* Kristallstrukturen vor, die eine detaillierte Analyse der Cofaktoren ermöglichten (Jormakka et al., 2002; Jormakka et al., 2003). Die Untereinheit FdhG enthält den Cofaktor Bis-Molybdopterin-Guanin-Dinukleotid (Bis-MGD) welcher zentral für die Katalyse der Formiatoxidation benötigt wird. Bis-MGD wird in *E. coli*

unter anderem von einem Selenocystein koordiniert. In *Mna. thermophilum* ist an Stelle des Selenocysteins ein Cystein-Rest (C189) vorhanden, der dieselbe Funktion ausübt. Das Vorliegen von Cystein anstelle von Selenocystein in der katalytischen Untereinheit von Formiat-Dehydrogenasen ist nicht ungewöhnlich und besonders für lösliche Formen von Formiat-Dehydrogenasen methanogener Archaea vielfach beschrieben (Ferry, 1990; Heider & Böck, 1992). In einigen Organismen, wie *Clostridium thermoaceticum* oder *Campylobacter jejuni*, ist das Molybdat des Cofaktors außerdem durch Wolframat ersetzt (Smart et al., 2009; Ljungdahl & Andreesen, 1975). Neben dem beschriebenen Cystein-Rest konnte in FdhG ein Histidin-Rest (H190) identifiziert werden, der auch in der Untereinheit von *E. coli* vorhanden ist und auf Grundlage der erwähnten Kristallstrukturen die Abstraktion des α -Protons von Formiat ermöglicht. Außerdem liegt ein [4Fe4S]-Cluster vor welches die Elektronen aus der Untereinheit in die nächste Untereinheit in Form von FdhH transferiert, in der vier [4Fe4S]-Cluster enthalten sind. Daneben liegt in FdhH eine C-terminale Transmembranhelix vor, die die Untereinheit in der Membran verankert. Von den [FeS]-Clustern in FdhH erfolgt die Weiterleitung der Elektronen auf die membranintegrale Untereinheit FdhI welche zwei Häm b-Gruppen enthält. Als fünfter und sechster Ligand des zentralen Eisenions dienen, wie im Falle von VhoC, jeweils zwei Histidin-Reste. Wie auch in VhoC erfolgt ausgehend von den Häm-Gruppen die Elektronenübertragung auf Methanophenazin oder ein Phenazin-Derivat bzw. im Fall von *E. coli* auf Menachinon. An dieser Stelle kommt wie zuvor beschrieben der inhibitorische Effekt von DPI zum Tragen. Von Relevanz ist zusätzlich die extrazelluläre Lokalisation von FdhG und FdhH. So liegt in FdhG von *E. coli* eine TAT-Signalsequenz vor, welche die Translokation der Untereinheit in das Periplasma ermöglicht. Es liegen Hinweise vor, dass die Untereinheit FdhH, welche kein Signalpeptid enthält, mit der großen Untereinheit gemeinsam über die Membran transloziert wird (Jormakka et al., 2002; Lüke et al., 2008; Hatzixanthis et al., 2003). Auch FdhG aus *Mna. thermophilum* enthält auf bioinformatischer Grundlage (SignalP-5.0-Software) ein TAT-Signalpeptid. Die kleine Untereinheit besitzt erwartungsgemäß kein Signalpeptid und wird vermutlich wie im Falle von *E. coli* mit der großen Untereinheit über die Membran Co-transloziert. Schematisch ist der Aufbau von FdhGHI in Abbildung 27 C ersichtlich. Weitere Details zu Formiat-Dehydrogenasen sind unter 4.5.6 beschrieben.

Die Heterodisulfid-Reduktase HdrDE ist insbesondere für *Methanosarcina thermophila* und *Methanosarcina barkeri* umfassend charakterisiert, wobei jedoch Kristallstrukturen fehlen (Simianu et al., 1998; Heiden et al., 1993; Heiden et al., 1994; Künkel et al., 1997). Der Enzymkomplex besteht aus zwei Untereinheiten und nutzt reduziertes Methanophenazin als Elektronendonator. Dabei werden die Elektronen zunächst auf die membranintegrale Untereinheit HdrE übertragen welche zwei Häm b-Gruppen enthält. Da keine Kristallstrukturen vorliegen, sind keine exakten Informationen über die fünften und sechsten Liganden

vorhanden, wobei eine der Häm-Gruppen mit hoher Wahrscheinlichkeit von zwei Histidinen koordiniert wird (Simianu et al., 1998; Künkel et al., 1997). Für die zweite Häm-Gruppe liegen experimentelle Daten vor, welche für eine Koordination durch einen Histidin- und einen Methionin-Rest sprechen (Künkel et al., 1997). Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass eine der Häm-Gruppen keinen sechsten Liganden besitzt und nur durch ein Histidin koordiniert wird. Diese Möglichkeit wird auf der vorliegenden experimentellen Grundlage als wahrscheinlicher angesehen (Simianu et al., 1998). Vermutlich ist auch nur letztere Häm-Gruppe zentral an der Elektronenübertragung beteiligt (Murakami et al., 2001). Für *Mna. thermophilum* können auf Grundlage von Alignments mit den Enzymen von *Methanosarcina barkeri* und *Methanosarcina thermophila* H95, H246 und H228 als wahrscheinliche Häm-Liganden angesehen werden. H63 spielt vermutlich keine Rolle bei der Koordination der Häm-Gruppen, da dieser Aminosäure-Rest nach der Vorhersage der Transmembran-Topologie von HdrE durch die Phobius-Software eindeutig nicht in den Transmembranhelices lokalisiert ist. Da keine biochemischen Analysen dazu verfügbar sind kann jedoch nicht definitiv ausgeschlossen werden, dass der Histidin-Rest in der Realität nicht doch in einer Transmembranhelix vorliegt. Von HdrE werden die Elektronen auf HdrD übertragen, wobei die Untereinheit kein Signalpeptid besitzt und cytoplasmatisch aber membranassoziiert vorliegt (Welte & Deppenmeier, 2014). HdrD enthält vier [4Fe4S]-Cluster, welche alle an der Elektronenübertragung beteiligt sind. Da HdrD ein Fusionsprotein aus den Untereinheiten HdrB und HdrC der löslichen Heterodisulfid-Reduktase darstellt (Künkel et al., 1997) und für diese eine Kristallstruktur vorliegt (Wagner et al., 2017), konnte der Mechanismus der Elektronenübertragung und die an der Koordination der [FeS]-Cluster beteiligten Cystein-Reste genau definiert werden. Zwei der Cluster sind klassische kubische [4Fe4S]-Cluster des Ferredoxin-Typs. Die beiden Cluster leiten die Elektronen zu den beiden zusätzlichen [FeS]-Clustern weiter, die zentral an der Reduktion des Heterodisulfids beteiligt sind. Die beiden non-kubanen [4Fe4S]-Cluster zeigen große Besonderheiten im Aufbau und stellen jeweils Fusionscluster aus einem [3Fe4S]- und einem [2Fe2S]-Cluster dar. Der schematische Aufbau von HdrDE aus *Mna. thermophilum* ist in Abbildung 27 B ersichtlich.

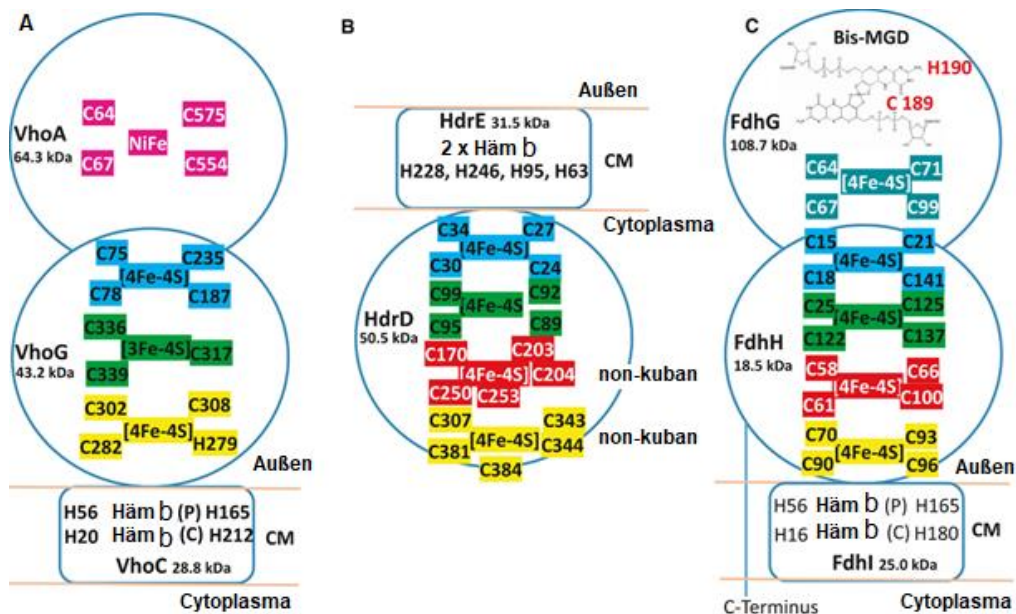


Abbildung 27: Schematischer Aufbau und Cofaktoren der Atmungskettenkomplexe von *Mna. thermophilum*. (A) Vho-Hydrogenase, (B) Heterodisulfid-Reduktase, (C) Formiat-Dehydrogenase. Die Vorhersage der Gesamtstruktur und der koordinierenden Aminosäuren basiert auf Homologien mit den entsprechenden Enzymen aus *E. coli* (FdnGHI, b1474-b1476), *Methanosarcina mazei* (VhoGAC, AAM32008-AAM32010) und *Methanosarcina barkeri* (HdrDE, AKJ40005-AKJ40006). [4Fe-4S]: [4Fe-4S]-Cluster; Bis-MGD: Bis-Molybdopterin-Guanin-Dinukleotid. Der Molybdat-Rest wird durch C189 koordiniert; His190 ist an der Abstraktion des Protons von Formiat beteiligt. NiFe: Nickel-Eisen-Cluster der katalytischen Untereinheit der Hydrogenase; non-kubane [4Fe-4S]-Cluster: HdrD enthält zwei ungewöhnliche non-kubane [4Fe-4S]-Cluster, die durch die Fusion eines [3Fe-4S]-Clusters und eines [2Fe-2S]-Clusters entstehen. CM: Cytoplasma-Membran. Identifikationsnummern: VhoGAC: WP_086636999.1 - WP_086637001.1; FdhGHI: WP_201721220.1/ WP_086636543.1/ WP_086636545; HdrDE: WP_086637509.1/ WP_086637510.1.

Im Rahmen der Reaktionen von FdhGHI und VhoGAC, werden durch die Oxidation von Formiat bzw. H₂ Protonen im extrazellulären Bereich freigesetzt. Die Reduktion des Heterodisulfids sorgt außerdem für den Verbrauch von Protonen im Cytoplasma. Daneben werden mit großer Wahrscheinlichkeit bei der Reduktion von Methanophenazin bzw. ein Derivat durch FdhGHI oder VhoGAC zwei Protonen aus dem Cytoplasma genutzt, wohingegen diese bei der Oxidation des Methanophenazins an der Heterodisulfid-Reduktase in den extrazellulären Raum entlassen werden. Für Vho-Hydrogenase und Heterodisulfidreduktase wurde dies für *Methanosarcina mazei* gezeigt (Welte & Deppenmeier, 2014), wohingegen dies für die Formiat-Dehydrogenase für FdhN von *E. coli* beschrieben wurde, wobei Menachinon als Elektronenträger dient (Jormakka et al., 2002; Jormakka et al., 2003). Die genannten Prozesse tragen vermutlich auch in *Mna. thermophilum* zur Energiekonservierung an der Cytoplasma-Membran bei, wobei die Rolle des Methanophenazins noch detailliert experimentell untersucht werden muss. Der gebildete elektrochemische Protonengradient, kann schließlich vielfältig genutzt werden. Wichtige Funktionen des Gradienten liegen vermeintlich in der Aufrechterhaltung des intrazellulären pH-Wertes und der Natrium-Ionen-Homöostase, welche wohl zentral durch den Mrp(Na⁺/H⁺)-

Antiporter reguliert werden. Daneben kann der Protonengradient der Herstellung von ATP durch die ATP-Synthase dienen. Diese kann Natrium-Ionen oder Protonen-abhängig sein, wobei sich dies auf Grundlage einiger Aminosäurereste der Untereinheit K (C-Ring) bestimmen lässt. Für die Nutzung von Natrium-Ionen werden vier zentrale Aminosäuren benötigt, die die Bindung des Natrium-Ions ermöglichen (P---Q----ET). Dies wurde auf Grundlage der entsprechenden Untereinheit der Natrium-Ionen-abhängigen ATP-Synthase von *Acetobacterium woodii* untersucht und konnte universell auf weitere Organismen übertragen werden, wobei ein Austausch einzelner Aminosäuren gegen funktionell ähnliche Reste möglich ist (Rahlf's & Müller, 1997; Reidlinger & Müller, 1994; Grüber et al., 2014). Auch ein verlängerter C-Terminus und einige weitere Aminosäure-Reste sind zwar typisch für Natrium-abhängige ATP-Synthasen, die vier genannten Reste an der entsprechenden Position sind jedoch entscheidend. Fehlt eine der Aminosäuren und ist nicht durch ein funktionelles Analogon ersetzt, ist die ATP-Synthase nicht Natrium-Ionen abhängig (Rahlf's & Müller, 1997). Für einige Natrium-abhängige ATP-Synthasen ist zudem beschrieben, dass diese neben Natrium-Ionen auch Protonen nutzen können, wobei dies auf der anderen Seite für rein Protonen-abhängige Komplexe nicht gilt (Schlegel et al., 2012 a).

Die entsprechende Untereinheit der A_1A_0 -ATP-Synthase von *Mna. thermophilum* wurde in Alignments mit der beschriebenen Untereinheit der ATP-Synthase von *Acetobacterium woodii* verglichen (Abbildung 28). Dabei wurde ersichtlich, dass von den beschriebenen Aminosäuren, welche für eine potentielle Na^+ -Bindung zentral sind, nur zwei konserviert vorlagen. Dagegen waren ein Glutamin-Rest und ein Threonin-Rest jeweils durch Alanin, also eine funktionell nicht ähnliche Aminosäure, ersetzt. Dies bedeutete, dass die ATP-Synthase von *Mna. thermophilum* mit hoher Wahrscheinlichkeit Protonen-abhängig ist und damit den im Rahmen der Atmungskette aufgebauten Protonengradienten unmittelbar zur Synthese von ATP nutzen kann.

<i>M. thermo</i>	-MEIE-----FGVNLAALLAIAI	AFAPAWAISKVGVASAGAIENPE----	VSGITI	48	
<i>A. woodii</i>	MEGLDFIKACSAIGAGIAM-IAGVG	GIGGFAAGK-----GAEAVGRQPEAQSDIIRTML		55	
	::	::*...*	::* . *... .:* .*	::* *...:**	::
<i>M. thermo</i>	IYVAFAP	ALAIYGLLISLLLVFGI---		72	
<i>A. woodii</i>	LGAAVAP	TGIYGLIVALILLFANPFF		82	
	:	.*.**:	.****::**:*.*.		

Abbildung 28: Alignment der Aminosäuresequenz der Untereinheit K der ATP-Synthasen von *Acetobacterium woodii* (*A. woodii*) und *Methanotrophonarchaeum thermophilum* (*M. thermo*). Grün markiert sind jene Aminosäuren, die in *Acetobacterium woodii* für die Natrium-Ionen-Spezifität der ATP-Synthase verantwortlich sind. Die dazu abweichenden Aminosäuren in *Mna. thermophilum* sind ebenso markiert (magenta). Deutlich wird, dass das Na^+ -Bindemotiv, welches aus den vier markierten Aminosäuren im Protein von *A. woodii* besteht, in *Mna. thermophilum* nur teilweise konserviert vorliegt. Identifikationsnummern (NCBI): *Mna. thermophilum*: WP_086637171.1; *A. woodii*: WP_014354630.1.

Zusammenfassend ließ sich festhalten, dass die Energiekonservierung von *Mna. thermophilum* je nach Substrat-Verfügbarkeit zentral durch das Formiat:Heterodisulfid-Oxidoreduktase-System und das H₂:Heterodisulfid-Oxidoreduktase-System ermöglicht wird. Der gebildete Protonengradient kann durch die ATP-Synthase zur Generierung von ATP genutzt werden.

3.2 *Methanococcoides vulcani* (*Mc. vulcani*) – Betain als neuartiges Substrat für die Methanogenese

Der Stoffwechsel von Vertretern der Ordnung Methanosarcinales wurde primär an den drei Modellorganismen *Methanosarcina mazei*, *Methanosarcina acetivorans* und *Methanosarcina barkeri* untersucht (Welte & Deppenmeier, 2014). Auch zu *Methanotherix thermoacetophila* als Vertreter der Familie Methanosaetaceae liegen einige Daten vor (Welte & Deppenmeier, 2011 b). Zu einigen erst in der vergangenen Dekade isolierten Vertretern der Ordnung, wie *Methanococcoides vulcani* (*Mc. vulcani*), sind hingegen noch wenige biochemische Untersuchungen vorhanden. Die Analyse neu isolierter Organismen könnte die bekannte Vielfalt methanogener Stoffwechselwege noch einmal erhöhen. *Mc. vulcani* wurde im Jahre 2014 aus Meeressedimenten isoliert und weist einige Besonderheiten hinsichtlich des Substratspektrums auf. Neben Methanol und methylierten Aminen ist der Organismus in der Lage auch Methanogenese ausgehend von Betain, Cholin und N, N- Dimethylethanolamin zu betreiben (L'Haridon et al., 2014). Dabei stellte sich die Frage wie der Abbau der Verbindungen im Detail abläuft. Besonders die Verwertung von Betain war von hohem Interesse, da es in marinen Ökosystemen allgegenwärtig ist und in Bakterien und Archaeen bis hin zu Küstenpflanzen, marinen Protozoen und Säugetieren vorkommt (Oren, 1990; Bohin, 2000; Sleator & Hill, 2002; Welsh, 2000). Der Abbau verläuft in anaeroben Mikroorganismen auf vielfältige Weise. Aus einigen Bakterien ist beschrieben, dass diese Betain zu TMA und Acetat umsetzen können (Oren, 1990). Im Falle von *Mc. vulcani* hieße dies, dass Betain aufgenommen und zu TMA umgesetzt wird, um dieses im Anschluss zur Methanogenese zu nutzen. Eine weitere Option ist die direkte Abspaltung einer Methylgruppe von Betain durch eine spezifische Methyltransferase mit Übertragung der Methylgruppe auf ein zugehöriges Corrinoid-Protein. Dabei war außerdem unklar, ob der Organismus in der Lage war alle drei Methylgruppen eines Betain-Moleküls zu nutzen, oder ob nur ein Teil der Methylgruppen verwertet werden konnte. Generell war das Wachstumsverhalten des Organismus schlecht untersucht, sodass eine detaillierte Charakterisierung hinsichtlich des Wachstums auf unterschiedlichen Substraten erfolgte. Anzumerken ist, dass der Energiestoffwechsel des Organismus auf Grundlage von bioinformatischen Analysen jenem von *Methanosarcina acetivorans* stark ähnelte. Neben der genetischen Information für die Untereinheiten des Fpo-Komplexes (IMG-ID: 2642592412-2642592424 / 2642594075) und der membrangebundenen Heterodisulfid-Reduktase HdrDE (IMG-ID: 2642594146 / 2642594145) fanden sich die Gene, die für die Untereinheiten des Rnf-Komplexes (IMG-ID: 2642592293 – 2642592300) kodieren. Die Gene für die Untereinheiten der Ech-Hydrogenase waren nicht vorhanden. Mit *vhoA* (IMG-ID: 2642592519) und *vhoG* (IMG-ID: 2642592518) waren die beiden löslichen Untereinheiten der Vho-Hydrogenase, zwar im Genom annotiert, aber das Gen für die membranintegrale Cytochrom-Untereinheit *vhoC* fehlte. Wie unter 3.1.3.6 beschrieben wird zur Translokation der Untereinheiten VhoA und VhoG in das Periplasma, ein TAT-Signalpeptid in VhoG benötigt.

Eine Analyse mit der Software SignalP-5.0 zur Detektion von Signalpeptiden zeigte jedoch, dass das entsprechende TAT-Signalpeptid nicht vorlag und im Vergleich zum Protein aus *Ms. mazei* die zwei namensgebenden Argininreste des TAT-Peptids fehlten. Daher handelte es sich in Summe um keine Vho-Hydrogenase und eine Beteiligung der Hydrogenase an der Energiekonservierung in der Membran konnte ausgeschlossen werden. Da die große und kleine Untereinheit der meisten Hydrogenasen ähnlich sind könnte es sich ebenso um eine Hydrogenase mit einer anderen Funktion handeln (Ogata et al., 2009; Volbeda et al., 1996). Aufgrund dessen, dass die Gene für die lösliche Heterodisulfid-Reduktase HdrABC (IMG-ID: 2642593940 / 2642592172 / 2642592171) ebenso vorlagen, konnte über eine Interaktion der beiden Hydrogenase-Untereinheiten mit HdrABC, ähnlich wie im Falle des MvhAGD/HdrABC-Komplexes (4.5.7.1), spekuliert werden. Ech-Hydrogenase und Vho-Hydrogenase spielen die entscheidende Rolle im Energiestoffwechsel von *Ms. mazei* und *Methanosarcina barkeri*. In *Ms. acetivorans* ist dies nicht der Fall. Dasselbe gilt auf Grundlage der Genomanalyse auch für *Mc. vulcani*. Die Enzyme des oxidativen Zweiges der Methanogenese liegen ebenfalls wie in *Ms. acetivorans* vollständig vor. Das gleiche gilt für die Methyl-Coenzym M Reduktase (Webster et al., 2019). Daher wurde der Fokus in dieser Arbeit insbesondere auf die Besonderheiten des Organismus in Bezug auf das ausgedehnte Substratspektrum gelegt. Dazu wurden detaillierte Wachstumsanalysen durchgeführt, die auch Rückschlüsse auf den Energiemetabolismus zuließen.

3.2.1 Wachstum von *Mc. vulcani*

Die Wachstumsanalysen mit *Mc. vulcani* zeigten, dass der Organismus generell zum Wachstum auf TMA, DMA, MMA, Methanol und Betain befähigt ist (Abbildung 29 - Abbildung 33). Für das Wachstum auf den drei Methylaminen wurden die Konzentrationen zur Vergleichbarkeit so gewählt, dass jeweils eine Methylgruppen-Konzentration von 150 mM vorlag (50 mM TMA, 75 mM DMA und 150 mM MMA). Bei Wachstum auf TMA zeigte der Organismus eine Verdoppelungszeit von $28,1 \pm 7,7$ Stunden und erreichte eine maximale optische Dichte von 0,9. Mit DMA als Substrat war die Verdopplungszeit mit $20,2 \pm 4,5$ Stunden etwas schneller. Die maximale optische Dichte betrug 1,05. Für MMA lag die Verdopplungszeit bei $34,5 \pm 9,7$ Stunden und die maximale optische Dichte bei 0,5 (Tabelle 10). Für die Kultivierung auf TMA und DMA stellte sich zudem die Frage, ob die drei bzw. zwei Methylgruppen unmittelbar zu Methan metabolisiert werden, oder ob die Demethylierung sukzessive erfolgt und Intermediate in Form von DMA und MMA entstehen. Diesbezüglich war in den Kulturen mit TMA und DMA, eine zeitweise Anreicherung der Intermediate DMA und MMA bzw. MMA zu beobachten. Eine direkte Umwandlung von TMA bzw. DMA in Methan und Ammonium erfolgte demnach nicht und der Prozess lief schrittweise ab. In der Kultur mit TMA lagen nach etwa 100 Stunden 25 mM DMA vor. Die größte Konzentration MMA wurde nach 120 Stunden mit 20 mM gemessen. Im Laufe der Kultivierung nahm die Konzentration beider

Substanzen bis zu deren vollständigen Verbrauch ab. Im Falle der Kultivierung mit DMA lag nach 110 Stunden mit 37 mM die höchste Konzentration von MMA vor. Dieses wurde im Rahmen des weiteren Wachstumsprozesses jedoch ebenso vollständig verbraucht. Mit Methanol als Substrat betrug die Verdopplungszeit $39,3 \pm 10,2$ Stunden. Dabei wurde eine Konzentration von 50 mM gewählt, da Konzentrationen von >70 mM kein Wachstum von *M. coccoides* mehr ermöglichten. Die Konzentration nahm im Laufe der Kultivierung kontinuierlich ab. Die maximale optische Dichte betrug 0,4. Auffällig war in den Wachstumsversuchen, dass Methan in Konzentrationen von etwa 112,5 mM (Methylamine) bzw. 37,5 mM (Methanol) gebildet wurde. Dies entsprach 75 Prozent der eingesetzten Methylgruppenkonzentration und untermauerte damit die Vermutung, dass der Stoffwechsel identisch zu jenem von *Ms. acetivorans* abläuft. Dabei werden 75 % der Methylgruppen zu Methan reduziert und weitere 25 % zu CO₂ oxidiert, um Reduktionsäquivalente für die Reduktion der 75 % der Methylgruppen zu generieren. Da *Ms. acetivorans* und *Mc. vulcani* die gleiche Ausstattung an Atmungsketten-Enzymen besitzen (3.2) ist davon auszugehen, dass die Methanogenese generell in beiden Organismen identisch abläuft.

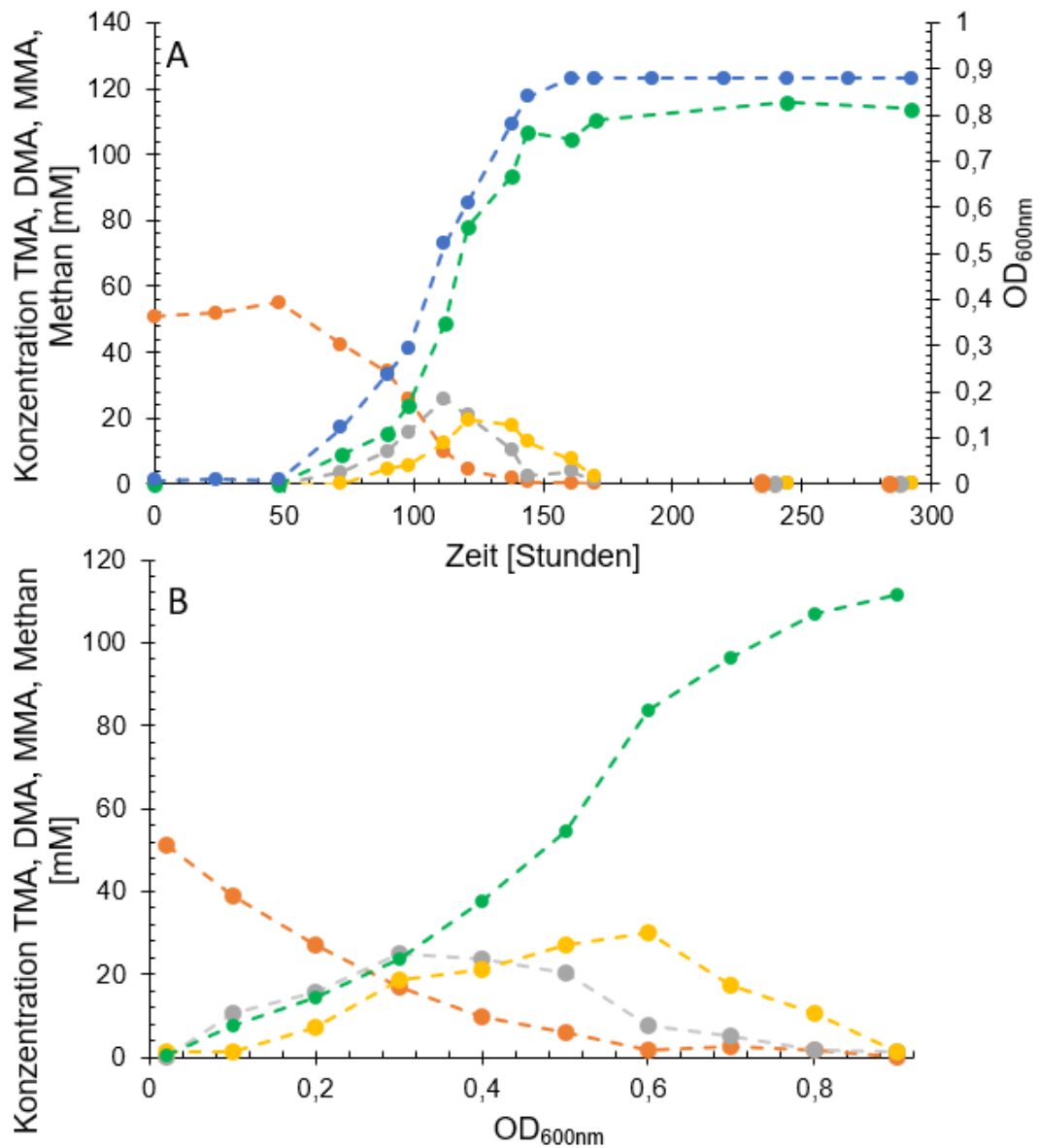


Abbildung 29: Wachstum, Substratverbrauch und Methanbildung von *Mc. vulcani* während der Kultivierung auf 50 mM TMA. Die Experimente wurden in 100-ml-Serumflaschen unter einer N₂(80 %)/CO₂(20 %)-Atmosphäre durchgeführt. Orange Kreise: TMA; graue Kreise: DMA; gelbe Kreise: MMA; grüne Kreise: Methan; blaue Kreise: optische Dichte (OD_{600nm}). Die Versuche wurden jeweils dreimal mit äquivalenten Ergebnissen durchgeführt. Ein repräsentatives Experiment ist gezeigt. A: Wachstum, Substratverbrauch und Produktbildung gegen Zeit; B: Substratverbrauch und Produktbildung in Bezug zur OD_{600nm}.

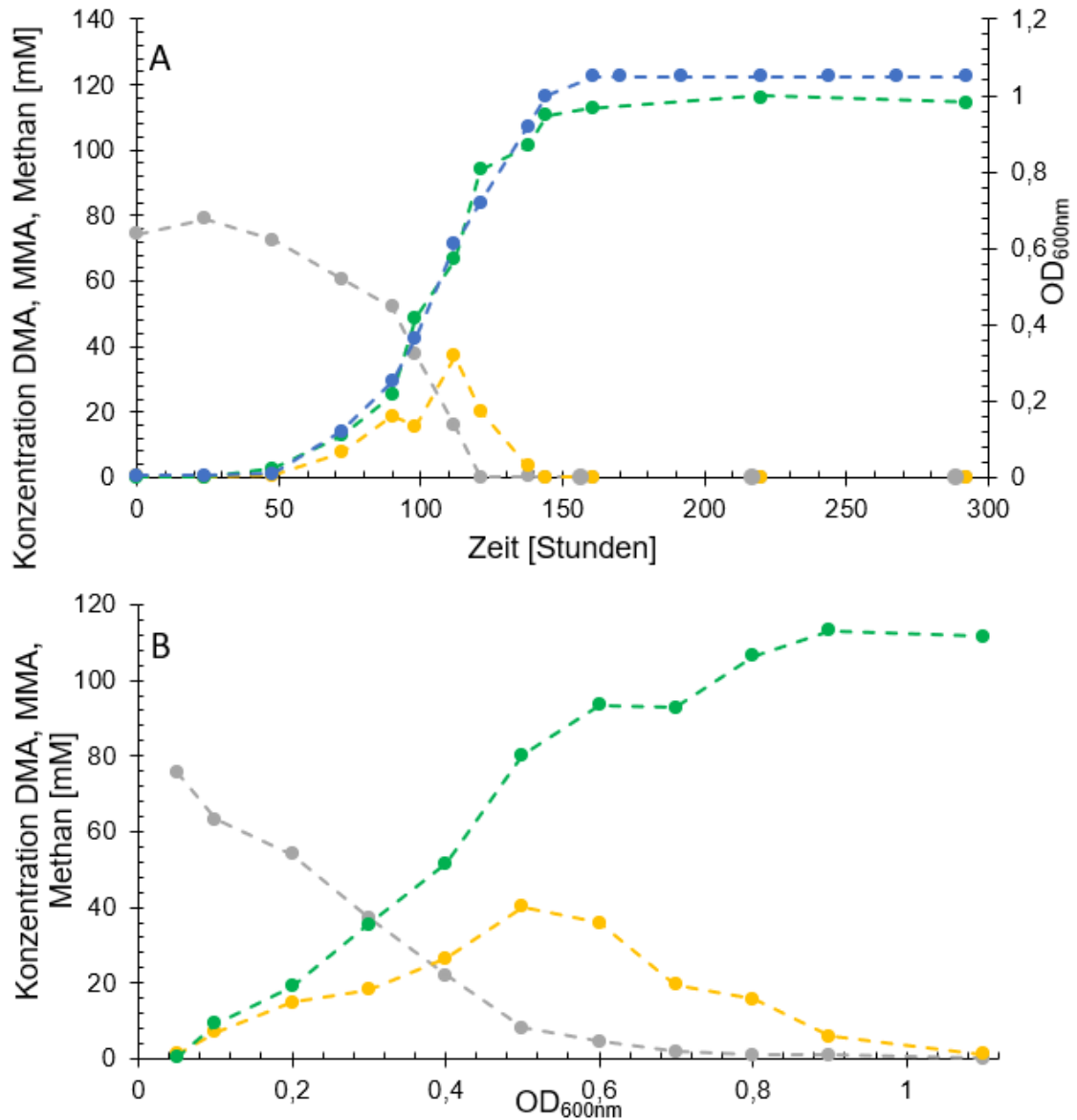


Abbildung 30: Wachstum, Substratverbrauch und Methanbildung von *Mc. vulcani* während der Kultivierung auf 75 mM DMA. Die Experimente wurden in 100-ml-Serumflaschen unter einer N₂(80 %)/CO₂(20 %)-Atmosphäre durchgeführt. Graue Kreise: DMA; gelbe Kreise: MMA; grüne Kreise: Methan; blaue Kreise: optische Dichte (OD_{600nm}). Die Versuche wurden jeweils dreimal mit sehr ähnlichen Ergebnissen durchgeführt, wobei ein repräsentatives Experiment gezeigt ist. A: Wachstum, Substratverbrauch und Produktbildung gegen Zeit; B: Substratverbrauch und Produktbildung in Bezug zur OD_{600nm}.

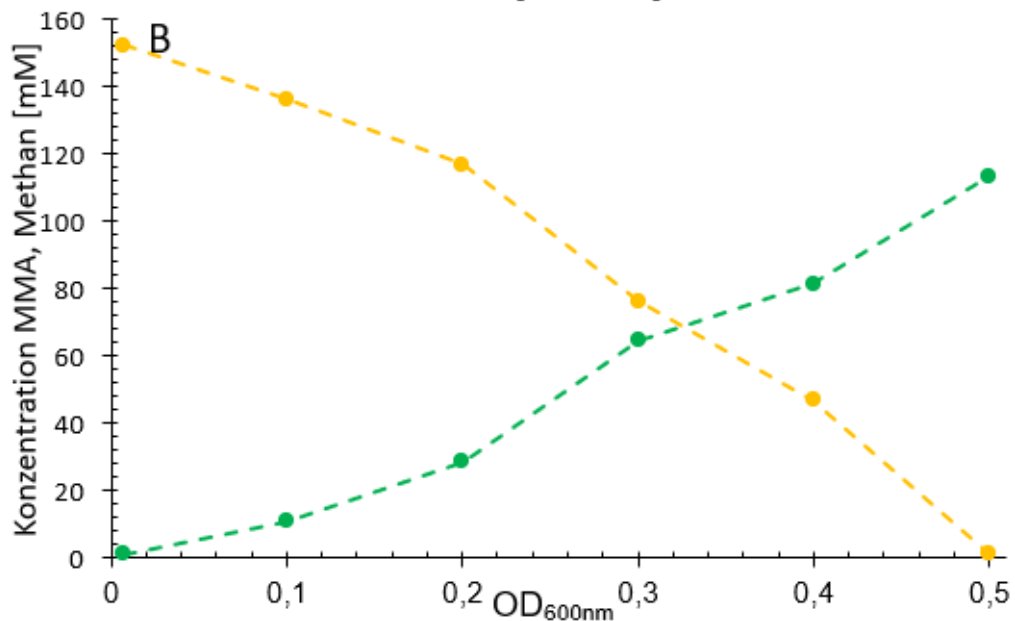
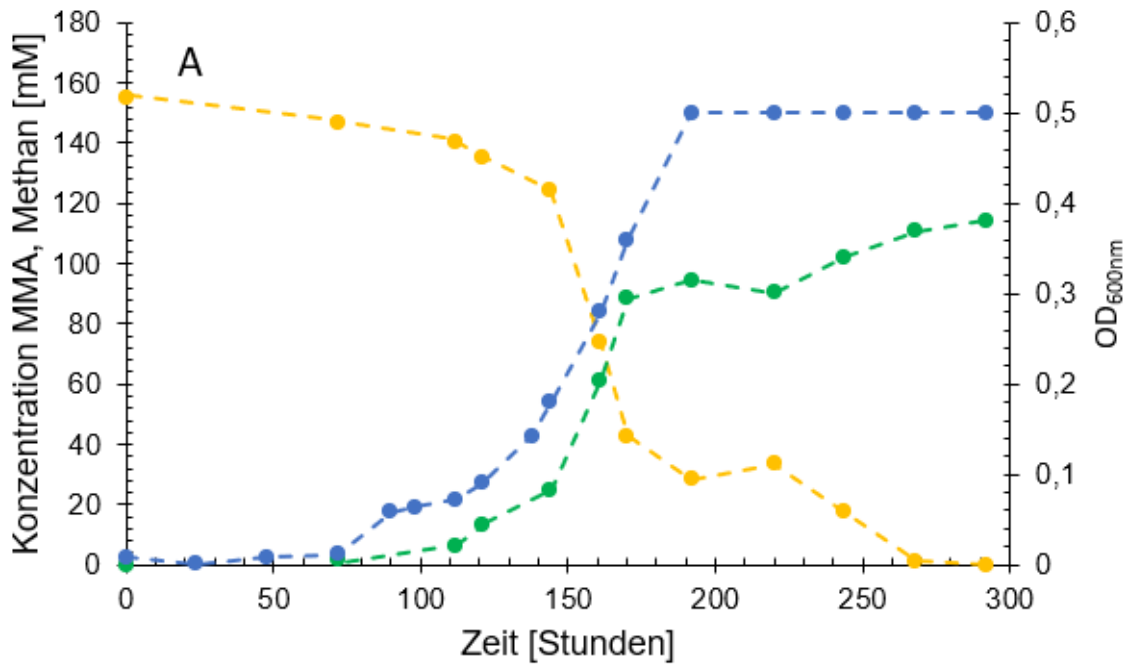


Abbildung 31: Wachstum, Substratverbrauch und Methanbildung von *Mc. vulcani* während der Kultivierung auf MMA. Die Experimente wurden in 100-ml-Serumflaschen unter einer N₂(80 %)/CO₂(20 %)-Atmosphäre durchgeführt und das Medium enthielt 150 mM MMA. Gelbe Kreise: MMA; grüne Kreise: Methan; blaue Kreise: optische Dichte (OD_{600nm}). Die Versuche wurden jeweils dreimal mit äquivalenten Ergebnissen durchgeführt. Die Resultate eines repräsentativen Experiments sind dargestellt. A: Wachstum, Substratverbrauch und Produktbildung gegen Zeit; B: Substratverbrauch und Produktbildung in Bezug zur OD_{600nm}.

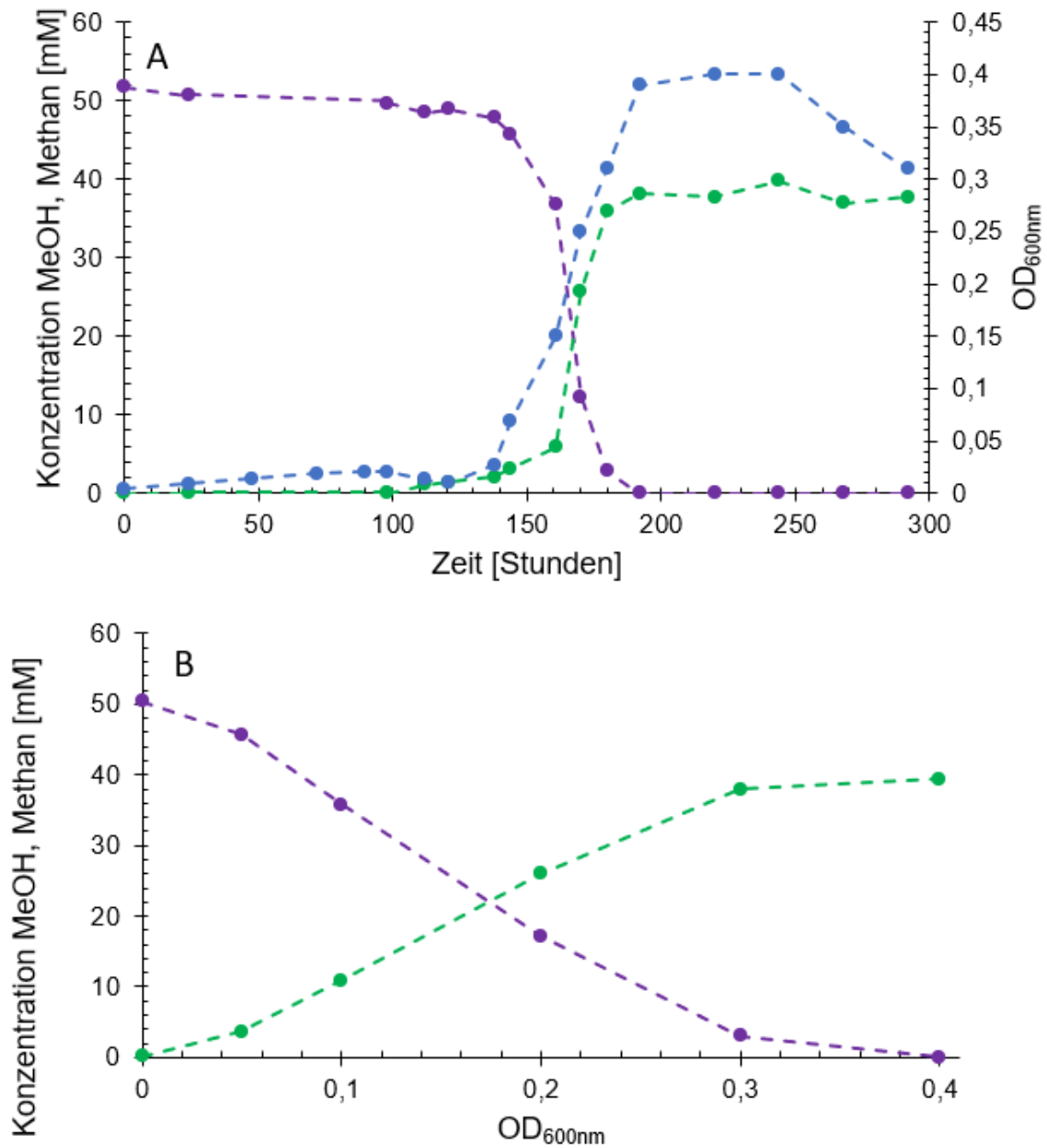


Abbildung 32: Wachstum, Substratverbrauch und Methanbildung von *Mc. vulcani* während der Kultivierung auf 50 mM Methanol. Die Experimente wurden in 100-ml-Serumflaschen unter einer N₂ (80 %)/CO₂ (20 %)-Atmosphäre durchgeführt. Violette Kreise: MeOH; grüne Kreise: Methan; blaue Kreise: optische Dichte (OD_{600nm}). Die Versuche wurden jeweils dreimal mit sehr ähnlichen Ergebnissen durchgeführt. Ein repräsentatives Experiment ist gezeigt. A: Wachstum, Substratverbrauch und Produktbildung gegen Zeit; B: Substratverbrauch und Produktbildung in Bezug zur OD_{600nm}.

Die Besonderheit von *Mc. vulcani* lag vor allem in der Nutzung von Betain als Substrat. Aufgrund des Fakts, dass Betain drei Methylgruppen enthält wurde es zu Vergleichbarkeit mit den drei Methylaminen in einer Konzentration von 50 mM eingesetzt. Im Kulturversuch wurde eine kontinuierliche Abnahme von Betain über die Zeit, bis zum vollständigen Verbrauch, beobachtet. Daneben konnte eine Akkumulierung von Dimethylglycin (DMG), der demethylierten Form des Betains, bishin zu einer Konzentration von 50 mM am Ende der Kultivierung beobachtet werden. Gleichzeitig wurden etwa 38,1 mM Methan gebildet. Die Ergebnisse zeigten, dass nur eine Methylgruppe des Betains für die Methanogenese verwendet wird und damit Dimethylglycin als Endprodukt sekretiert wird. Dazu passen die Beobachtungen, dass der Organismus kein Wachstum auf Dimethylglycin oder Monomethylglycin zeigte. Dabei konnte festgehalten werden, dass die Demethylierung einer Methylgruppe des Betains unmittelbar erfolgt. DMG entsteht als Endprodukt und Betain wird nicht zunächst zu Acetat und TMA metabolisiert. Letztere Möglichkeit wurde zuvor genannt, spielt aber vor allem in Mischkulturen eine Rolle, wobei Bakterien-Spezies Betain mit TMA als Endprodukt abbauen und methanogene Archaeen im Anschluss TMA zu Methan metabolisieren (Naumann et al., 1983; Mouné et al., 1999). Zusammenfassend erzielte der Organismus auf Betain eine Verdopplungszeit von $26,4 \pm 5,7$ Stunden. Die maximale optische Dichte wurde bei 0,5 detektiert.

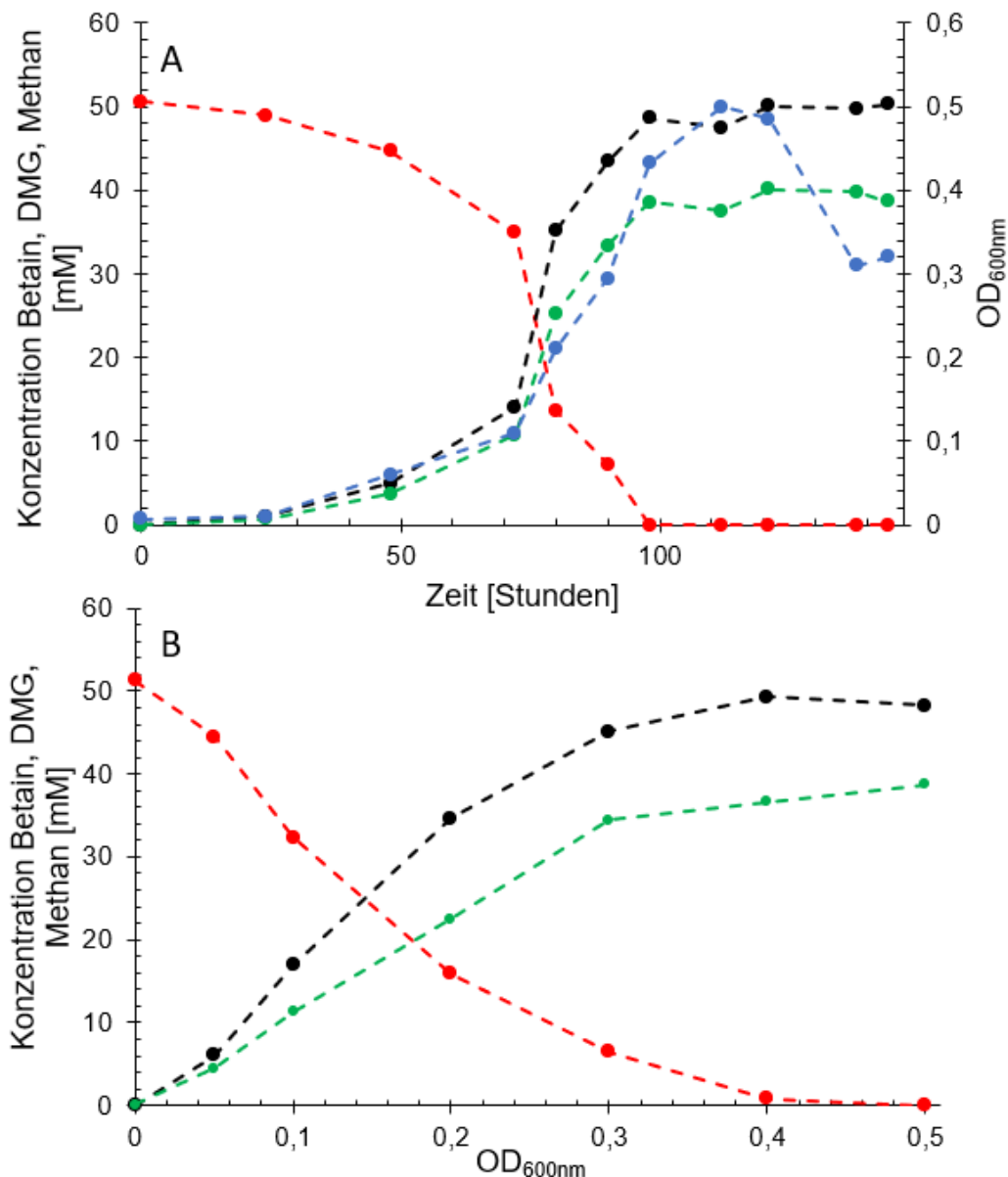


Abbildung 33: Wachstum, Substratverbrauch und Methanbildung einer Kultur von *Mc. vulcani* bei Wachstum auf 50 mM Betain. Die Experimente wurden in 100-ml-Serumflaschen unter einer N₂ (80 %)/CO₂ (20 %)-Atmosphäre durchgeführt. Rote Kreise: Betain; Schwarze Kreise: Dimethylglycin (DMG); grüne Kreise: Methan; blaue Kreise: optische Dichte (OD_{600nm}). Die Versuche wurden jeweils dreimal mit äquivalenten Ergebnissen durchgeführt, wobei ein repräsentatives Resultat dargestellt ist. A: Wachstum, Substratverbrauch und Produktbildung gegen Zeit; B: Substratverbrauch und Produktbildung in Bezug zur OD_{600nm}.

Ein Blick auf die maximal erreichte OD_{600nm} von *Mc. vulcani* in Bezug auf die verfügbare Menge an Methylgruppen offenbarte, dass im Falle von TMA, DMA und Methanol mit Werten von 0,006 OD/mM, 0,007 OD/mM und 0,008 OD/mM die höchsten Wachstumserträge pro Methylgruppe erzielt wurden. Für MMA und das neuartige Substrat Betain lagen diese mit 0,0033 OD/mM deutlich geringer (Tabelle 10). Im Falle von MMA wurden die 150 mM Substrat bzw. Methylgruppen vollständig verbraucht, was bedeutet, dass im Vergleich zu DMA oder TMA, die ebenso vollständig metabolisiert wurden, eine größere Menge der Methylgruppen

katabolisiert wurde, ohne gleichzeitig Anabolismus zu betreiben. Für Betain ist anzumerken, dass vom Substrat nur 1/3 der Methylgruppen genutzt wurde, da DMG als Endprodukt vorlag. Wird dies in der Berechnung berücksichtigt führt dies zu Erträgen von 0,01 OD/mM und damit zum höchsten Wert unter den fünf genannten Substraten. Dasselbe Ergebnis spiegelte sich unter Bezug der gebildeten Trockenbiomasse pro gebildetem Molekül Methan wider. Diese konnte ausgehend von einer bestimmten Trockenbiomasse von $320,4 \pm 37,1 \text{ mg} \times \text{l}^{-1} \text{OD}_{600\text{nm}}^{-1}$ (Abbildung 34) und der Korrelation von Biomassebildung und Methanbildung in der exponentiellen Phase berechnet werden konnte (Tabelle 10). Zunächst erfolgte dazu die Angabe des gebildeten Methans pro einer erreichten OD von 0,1, die aus der genannten Korrelation kalkuliert wurde. Für die Kultur auf TMA konnte darauf aufbauend bestimmt werden, dass $16,5 \pm 2,1 \text{ mM}$ Methan gebildet werden müssen, um eine OD von 0,1 zu erreichen. Für die Kulturen auf DMA bzw. MMA betrug die Werte $14,3 \pm 2,2$ bzw. $25,7 \pm 3,7 \text{ mM}$ Methan $\times 0,1 \text{ OD}^{-1}$. Für Betain und Methanol lagen die Werte mit $11,3 \pm 1,2$ und $12,8 \pm 1,7 \text{ mM}$ Methan $\times \text{OD}^{-1}$ deutlich niedriger. Dies spiegelte sich in hypothetischen Wachstumserträgen von $1,9 \pm 0,4 \text{ g}$ Trockengewicht $\times \text{mol Methan}^{-1}$ (TMA), $2,2 \pm 0,2 \text{ g}$ Trockengewicht $\times \text{mol Methan}^{-1}$ (DMA), $1,3 \pm 0,2 \text{ g}$ Trockengewicht $\times \text{mol Methan}^{-1}$ (MMA), $2,5 \pm 0,3 \text{ g}$ Trockengewicht $\times \text{mol Methan}^{-1}$ (Methanol) und $2,8 \pm 0,2 \text{ g}$ Trockengewicht $\times \text{mol Methan}^{-1}$ (Betain) wider. Zum Abschluss der Wachstumsexperimente ist anzumerken, dass keinerlei Wachstum und Methanbildung in Kulturen mit Cholin oder Dimethylethanolamin detektiert werden konnte. Mögliche Ursachen werden unter 4.4 intensiv analysiert.

Tabelle 10: Verdopplungszeiten, maximale $\text{OD}_{600\text{nm}}$ -Werte, Trockengewichte und Wachstumsausbeuten pro gebildetem mol Methan von *Mc. vulcani* auf unterschiedlichen Substraten.

Substrat	t_d [h]	Maximale $\text{OD}_{600\text{nm}}$	Trockengewicht ^{a)} [mg/l Kultur]	g Trockengewicht/ pro mol Methan
TMA (50 mM)	$28,1 \pm 7,7$	0,9	288,4	$1,9 \pm 0,4$
DMA (75 mM)	$20,2 \pm 4,5$	1,05	336,4	$2,2 \pm 0,2$
MMA (150 mM)	$34,9 \pm 9,7$	0,5	160,2	$1,3 \pm 0,3$
MeOH (50 mM)	$39,3 \pm 10,2$	0,4	128,2	$2,5 \pm 0,2$
Betain (50 mM)	$26,4 \pm 5,2$	0,5	160,2	$2,8 \pm 0,2$

- a) Die Berechnung des Trockengewichtes von $320,4 \pm 37,1 \text{ mg} \times \text{l}^{-1} \text{OD}_{600\text{nm}}^{-1}$ erfolgte auf Basis der Abhängigkeit zwischen Biomasse und optischer Dichte (Abbildung 34). Darauf aufbauend konnte die Berechnung der Wachstumserträge anhand der Korrelation zwischen Methanbildung und Biomassebildung in der exponentiellen Wachstumsphase durchgeführt werden.

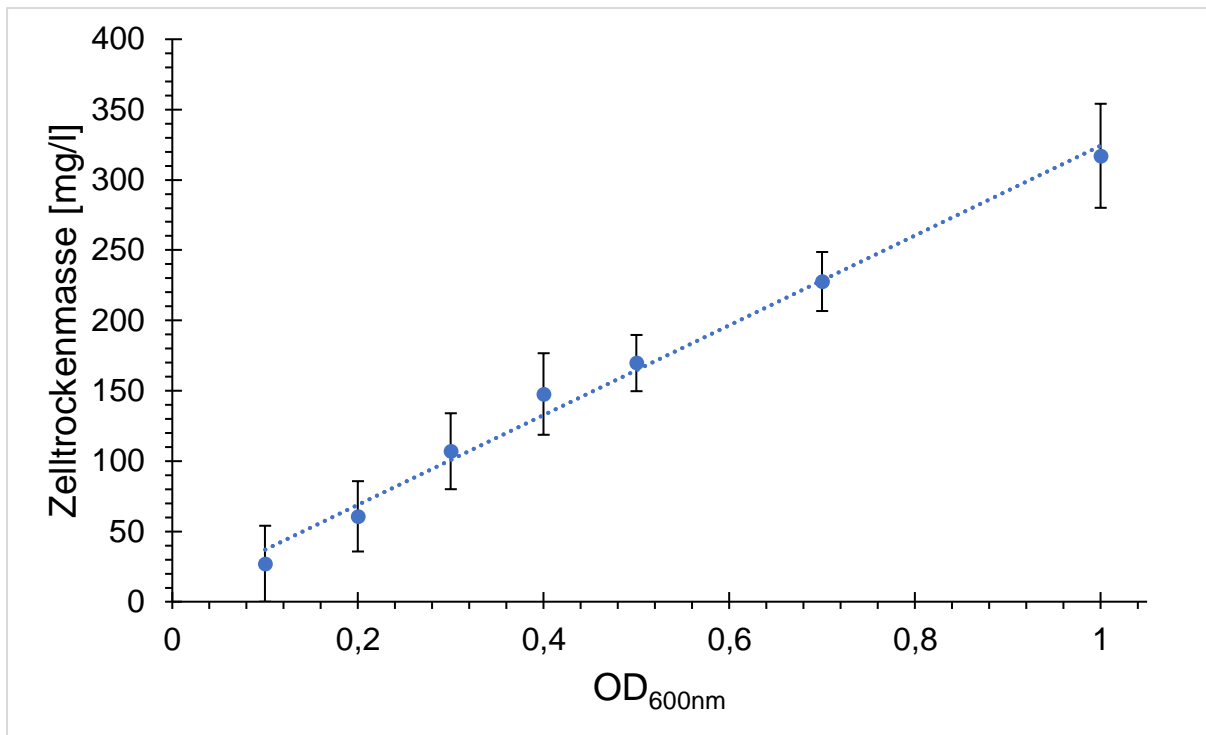


Abbildung 34: Abhängigkeit von Zelltrockenmasse und OD_{600nm} in Kulturen von *Mc. vulcani*. Für jede OD_{600nm} lagen drei Werte vor aus denen Mittelwert und Standardabweichung (Fehlerbalken) gebildet werden konnten. Die Trockenbiomasse betrug $320,4 \pm 37,1 \text{ mg} \times \text{l}^{-1} \text{ OD}_{600\text{nm}}^{-1}$.

3.2.2 Methyltransferasen und Corrinoid-Proteine von *Mc. vulcani*

Die Ergebnisse hinsichtlich des Substratspektrums von *Mc. vulcani* konnten ebenso bioinformatisch untermauert werden (Abbildung 35), da spezifische Methyltransferasen und zugehörige Corrinoidproteine für TMA, DMA, MMA, Methanol und Betain identifiziert werden konnten. Dazu erfolgten BlastP-Analysen mit homologen Sequenzen aus *Methanosarcina mazei* und *Methanomassiliicoccus luminyensis*. Auf die Blast-Analysen aufbauend wurden die zugehörigen Gene identifiziert. Ebenso konnten Corrinoidprotein:Coenzym M-Methyltransferasen und die zugehörigen Gene identifiziert werden, die für die Methanol- bzw. Methylamin-Verstoffwechslung benötigt werden. Für die drei Methylamine ist dazu nur ein Protein notwendig (MtbA). Außerdem wurden Gene, die für Permeasen kodieren, identifiziert, welche den Transport der Methylamine aus dem Medium in die Zelle ermöglichen (Krätzer et al., 2009).

Für die Betain-Corrinoidprotein-Methyltransferase, das zugehörige Corrinoidprotein, die Permease und die Corrinoidprotein:Coenzym M-Methyltransferase erfolgte die Blast Analyse mit den Sequenzen der entsprechenden Proteine von *Desulfitobacterium hafniense* und *Methanobolus vulcani* B1d (Creighbaum et al, 2019). Damit konnte für Betain ein komplett eigenständiger Weg der Methylgruppenübertragung auf Coenzym M in *Mc. vulcani* identifiziert werden. Teilweise lagen die Gene, wie auch im Falle der anderen Substrat-spezifischen Gene, in einem Operon vor.

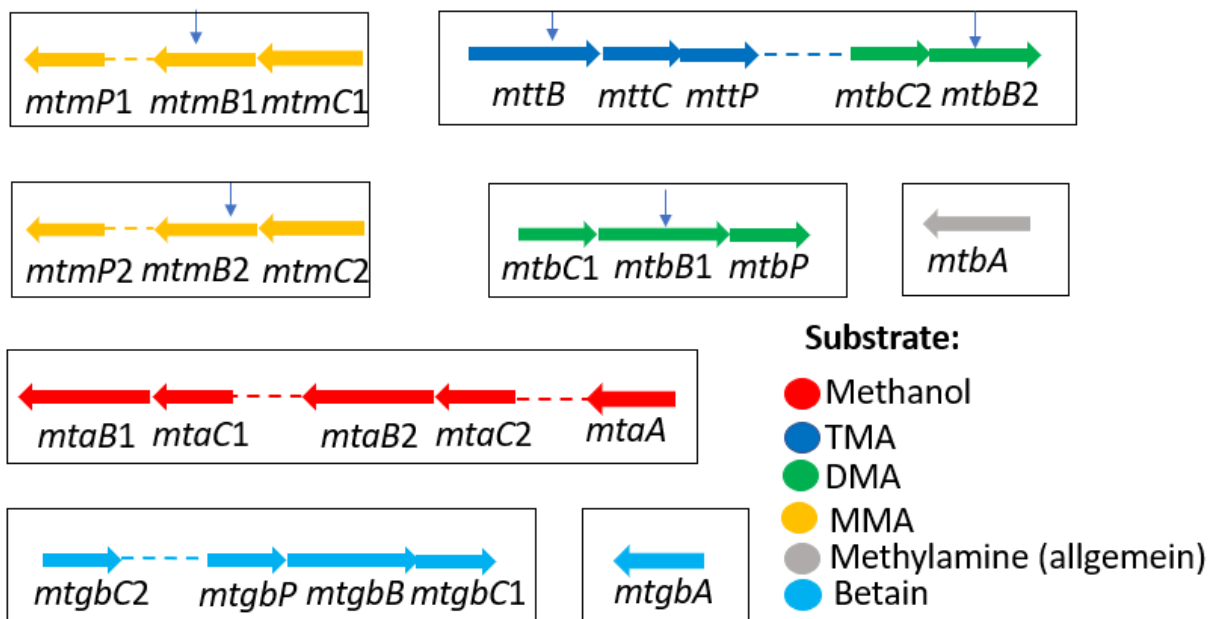


Abbildung 35: Schematische Darstellung der in *Mc. vulcani* für die Metabolisierung verschiedener methylierter Substrate vorhandenen Gene. Als Grundlage dienten Blast-Analysen mit den entsprechend zugeordneten Methyltransferasen und Corrinoidproteinen und den zugehörigen Gensequenzen aus *Ms. mazei* und *Mmc. luminyensis* (Krätzer et al.; 2009; Kröniger et al., 2017) bzw. im Falle von Betain *Desulfitobacterium hafniense* und *Methanobolus vulcani* B1d. Die Gen-Identifikationsnummern entstammen der IMG (Integrated Microbial Genomes & Microbiomes)-Datenbank aus dem Genom des Stammes *Methanococcoides vulcani* SLH 33 (=DSM 26966 / Genom-Identifikationsnummer: 2642422537): *mtmP1*: 2642594321; *mtmB1*: 2642594323/2642594325; *mtmC1*: 2642594326; *mtmP2*: 2642592079; *mtmB2*: 2642592072 /2642592081; *mtmC2*: 2642592073; *mtbC1*: 2642593146; *mtbB1*: 2642593147; *mtbP*: 2642593148; *mtbC2*: 2642592315; *mtbB2*: 2642592316; *mttB*: 2642592310; *mttC*: 2642592311; *mttP*: 2642592312; *mtbA*: 2642592986; *mtaB1*: 2642594009; *mtaC1*: 2642594010; *mtaB2*: 2642594011; *mtaC2*: 2642594012; *mtgbC2*: 2642593631; *mtaA1*: 2642594015; *mtgbA*: 2642594002; *mtgbP*: 2642593632; *mtgbB*: 2642593633; *mtgbC*: 2642593634. Das allgemeine Reaktionsschema und die Bezeichnung der Gene sind Abbildung 14 zu entnehmen (zusätzlich P-Proteine = Permeasen). Methyltransferasen (B-Proteine), die die Methanogenese aus TMA, DMA und MMA einleiten, besitzen mit Pyrrolysin eine besondere Aminosäure, welche durch ein einzelnes UAG-Codon kodiert wird. Da die gängigen Genombibliotheken das Codon zum Teil als Stoppcodon bewerten, sind für die entsprechenden Gene teilweise zwei Identifikationsnummern angegeben. Die Gene sind entsprechend mit einem blauen Pfeil markiert. Gene, die in unmittelbarer Nähe liegen, wurden mit schwarzen Boxen umrahmt. So fern zwischen den Genen von Interesse mindestens ein weiteres Gen lag, welches nicht unmittelbar mit der Demethylierung von Substraten in Verbindung stand, wurde dies mit gestrichelten Linien dargestellt.

3.3 Die Rolle eines Komplex I-Derivates im Energiemetabolismus von *Methanomassiliicoccus luminyensis* (*Mmc. luminyensis*)

Der Stoffwechsel und die Physiologie von Vertretern der Ordnung Methanomassiliicoccales wurden in den vergangenen Jahren am einzigen in Reinkultur vorhandenen Modellvertreter *Methanomassiliicoccus luminyensis* intensiv untersucht (Kröniger et al., 2016; Kröniger et al., 2017; Kröniger et al., 2019; Kröniger 2018; Lang et al., 2015). In dem Zuge gelang es den Energiestoffwechsel und die Methanogenese genauer aufzuklären. So ist dem Organismus die Methanbildung ausgehend von methylierten Verbindungen, wie Methanol und methylierten Aminen, in Kombination mit molekularem Wasserstoff möglich. Dabei sind zwei verschiedene Typen von Heterodisulfid-Reduktasen im Stoffwechsel beteiligt, was ein Alleinstellungsmerkmal unter den methanogenen Archaeen darstellt. Außerdem fehlt die in den meisten methanogenen Archaeen vorhandene membrangebundene Methyltransferase (Mtr). Dies führte zu einem Stoffwechselmodell, welches im ersten Schritt die Übertragung der Methylgruppen von den jeweiligen methylierten Substraten auf Coenzym M vorsieht. Die Methylgruppe von Coenzym M wird schließlich durch eine Methyl-CoM-Reduktase zu Methan reduziert, wobei zusätzlich das gemischte Disulfid aus den Coenzymen M und B entsteht (CoM-S-S-CoB). Ausgehend von zwei Molekülen methylierter Substrate entstehen schließlich zwei Moleküle des Heterodisulfids. Ein Heterodisulfid wird von der ersten am Stoffwechsel beteiligten Heterodisulfid-Reduktase (HdrABC), welche löslich im Cytoplasma vorliegt reduziert. HdrABC liegt im Komplex mit einer Hydrogenase vor (MvhAGD), welche die Abhängigkeit des Wachstums des Organismus von molekularem Wasserstoff erklärt. Neben dem Heterodisulfid reduziert der genannte Komplex (4.5.7.1) zusätzlich ein Ferredoxin (Fd_{red}) welches einem membrangebundenen Komplex I Analogon („kopfloser“ Fpo-Komplex) als Elektronendonator dient. Die Elektronen werden über die Untereinheiten des Komplexes vermeintlich auf die zweite Heterodisulfid-Reduktase HdrD übertragen, welche schließlich das zweite Heterodisulfid reduziert. Somit stehen die Coenzyme M und B für einen erneuten Zyklus der Methanogenese bereit. Die großen Besonderheiten des Stoffwechsels liegen vor allem im genannten Komplex I Analogon, dem sogenannten „kopflosten“ -Fpo-Komplex. Die Elektronenaufnahme, welche vermutlich ausgehend von reduziertem Ferredoxin erfolgt ist ungewöhnlich. Generell ist der Komplex I der Atmungskette, auch Nuo-Komplex (NADH:Chinon Oxidoreduktase) genannt, in den Modellorganismen *Escherichia coli* und *Thermus thermophilus* auf Basis von Kristallstrukturanalysen gut untersucht. Der Komplex besteht in beiden Organismen aus 13 bzw. 14 Untereinheiten, wobei sich diese in drei funktionellen Modulen anordnen (Efremov et al., 2010; Baradaran et al., 2013; Sazanov & Hinchliffe, 2006). Das erste Modul NuoEFG dient der Elektronenaufnahme und oxidiert den Elektronendonator des Komplexes in Form von NADH. Über einen Flavin-Cofaktor und [FeS]-Cluster werden die Elektronen auf das zweite funktionelle Modul in Form von NuoBCDI

übertragen. Die Elektronen werden dort über zwei [FeS]-Cluster in NuoI und ein [FeS]-Cluster in NuoB auf ein Chinon transferiert, welches mit NuoD interagiert. Nach Reduktion des Chinons wird dieses in die Lipidmembran freigesetzt und dient anderen Atmungskettenkomplexen als Elektronendonator. Das dritte funktionelle Modul NuoAKJHLMN ist, im Vergleich zu den beiden zuvor genannten Modulen, membranintegral und für die Protonentranslokation des Komplexes zuständig. Da die Redoxreaktionen im Modul NuoBCDI, allen voran die Übertragung der Elektronen auf den Chinonkopf, exergon sind, ist die Translokation von bis zu vier Protonen möglich. Die Anzahl der translozierten Protonen ist vom Redoxpotential des Chinons abhängig, welches im jeweiligen Organismus vorkommt. In *Methanosarcina*-Spezies liegt der Komplex als F₄₂₀H₂:Methanophenazin-Oxidoreduktase vor, was zur Bezeichnung Fpo Komplex führte, wobei die grundlegenden Untereinheiten identisch sind und der größte Unterschied in den Untereinheiten für die Elektronenaufnahme von NADH bzw. F₄₂₀H₂ liegt (Welte & Deppenmeier, 2014). Die Bezeichnung der homologen Untereinheiten erfolgt daher mit den gleichen Buchstaben. So ist beispielsweise FpoD homolog zu NuoD.

Im Falle von *Mmc. luminyensis* liegt eine der Besonderheiten im Fehlen des genannten NADH-oxidieren Moduls NuoEFG, welches auch als Kopfmodul bezeichnet wird. Auch alternative Kopfmodule, wie beispielsweise in *Methanosarcina* spp. vorhanden, fehlen. Daher besteht der Komplex aus nur 11 Untereinheiten und wird als "kopflös" bezeichnet. Eine Interaktion des Komplexes mit Ferredoxin als Elektronendonator wurde postuliert und bereits biochemisch auf Grundlage von Aktivitätstests mit Membranpräparationen des Organismus bestätigt (Kröninger et al., 2019). Als Elektronenakzeptor des Komplexes dient laut aktuellem Modell, die Heterodisulfid-Reduktase HdrD, welche die Elektronen auf Heterodisulfid überträgt (Kröninger, 2018). Dies begründet sich unter anderem durch das Fehlen von Chinonen oder Methanophenazin in den Membranen des Organismus (Becker et al., 2016). Ein ähnlicher Vorgang der Elektronenübertragung von Komplex I auf HdrD ist für andere Organismen bislang nicht beschrieben. Die Interaktion von "kopflösen"-Komplex I Derivaten mit Ferredoxin als Elektronendonator wird hingegen für verschiedene Organismen postuliert und ist teilweise experimentell bestätigt (4.5.2). Im Falle von *Mmc. luminyensis* lagen wie beschrieben biochemische Nachweise der Elektronenübertragung von Ferredoxin auf das Heterodisulfid durch Membranpräparationen des Organismus vor (Kröninger et al., 2019), jedoch gelang dies nur mit Zugabe von HdrD. Somit ist HdrD nicht, oder nur in geringem Maße membranassoziiert und die potentielle Interaktion mit dem Fpo-Komplex ist schwach. Dies bestätigten auch Aktivitätstest, die nur eine marginale Heterodisulfid-Reduktase-Aktivität mit Methylviologen als artifiziellem Elektronendonator in den Membranpräparationen des Organismus aufzeigten (Kröninger et al., 2016).

Da auch vier zentrale Untereinheiten des Fpo-Komplexes, in Form von FpoBCDI, nur membranassoziiert sind und in diesen die Schritte der Elektronenübertragung über verschiedene [FeS]-Cluster stattfinden, war es von großer Bedeutung zu verifizieren, dass der Komplex während der Membranpräparation stabil bleibt und der gesamte Fpo-Komplex in der Membranfraktion vorliegt. Dieser spezifische Nachweis, würde untermauern, dass die genannte Fd_{red} :Heterodisulfid-Oxidoreduktase-Aktivität in den komplexen Membranfraktionen vom Fpo-Komplex ausgeht. Da kein geeigneter Aktivitätstest für den Fpo-Komplex bzw. dessen Subkompartimente vorlag, waren spezifische Antikörper gegen mindestens eine der vier genannten Untereinheiten nötig, um Membranpräparationen bzw. die cytoplasmatische Fraktion auf das Vorhandensein des löslichen Teils vom Fpo-Komplex zu überprüfen. Daneben könnte die Interaktion des Komplexes mit Ferredoxin und HdrD mit spezifischen Antikörpern weitergehend analysiert werden. Diesbezüglich wurden in dieser Arbeit auch bioinformatische Ansätze genutzt, da die Interaktion zwischen Ferredoxin bzw. HdrD und dem Fpo-Komplex vermeintlich sehr schwach ist, was eine biochemische Interaktionsanalyse deutlich erschwerte. HdrD ist wie beschrieben nach der Membranpräparation auf Grundlage der Aktivitätstests in der cytoplasmatischen Fraktion zu finden und Ferredoxin geht als Elektronendonator eine vermutlich ebenso nur sehr schwache Interaktion mit dem Komplex ein (Medina & Gómez-Moreno, 2004). In den von Kröninger et al., 2019 durchgeführten Aktivitätstests musste Ferredoxin ebenso wie HdrD artifiziell zu den Membranpräparationen zugefügt werden, um eine Fd_{red} :Heterodisulfid-Oxidoreduktase-Aktivität zu erzielen, was die These der schwachen Interaktion untermauert.

3.3.1 Bioinformatische Untersuchung des Fpo-Komplexes und dessen Elektroneneinspeisemoduls

Auf Grundlage des Modells von Komplex I aus *Escherichia coli* und *Thermus thermophilus* (Baradaran et al., 2013; Efremov et al., 2010; Sazanov, 2015), dessen zentrale Untereinheiten wie bereits angemerkt, zu den Untereinheiten des Fpo-Komplexes homolog sind, konnte zunächst auf die Untereinheiten des Fpo-Komplexes geschlossen werden, welche in *Mmc. luminyensis* potentiell für die Aufnahme und Abgabe der Elektronen genutzt werden. Der Komplex 1 aus *E. coli* nutzt das Elektronen-Einspeisemodul NuoEFG zur Oxidation von NADH und überträgt die Elektronen auf Nuol, welches zwei [4Fe4S]-Cluster als prosthetische Gruppen besitzt. Neben Nuol gehören außerdem NuoB, NuoC und NuoD zum membranassoziierten Anteil des Nuo-Komplexes, der zwischen dem Elektroneneinspeisemodul und dem membranständigen Anteil des Komplexes lokalisiert ist. Von Nuol werden die Elektronen über die beiden [FeS]-Cluster des Proteins auf ein spezielles [4Fe4S]-Cluster in NuoB weitergeleitet. Von dort aus erfolgt die Reduktion des in NuoD gebundenen Kopfteils des Chinons. Die Untereinheit NuoC welche in den meisten Organismen eigenständig vorliegt, in *E. coli* jedoch mit NuoD fusioniert ist, spielt beim Elektronentransfer

keine Rolle, besitzt allerdings Wichtigkeit für die Stabilität und Integrität des Komplexes (Baradaran et al., 2013).

Auf Grundlage des beschriebenen Elektronenflusses von Komplex I in *E. coli* kann ebenso die Situation hinsichtlich der Elektroneneinspeisung im Komplex I-Analogen von *Mmc. luminyensis* betrachtet werden. Homologe zu NuoEFG sind in *Mmc. luminyensis* nicht zu finden. Ebenso fehlen weitere bekannte Elektronenaufnahmemodule von Komplex 1-Analoga aus methanogenen Archaeen wie FpoF aus dem Genus *Methanosarcina*, welches $F_{420}H_2$ oxidiert. Daher gehört der Fpo-Komplex aus *Mmc. luminyensis* zu den sogenannten „kopflösen“ Komplex 1-Derivaten, welche kein Elektroneneinspeisemodul besitzen. Dies warf die Frage auf, wie der Komplex aus den membranassoziierten Untereinheiten FpoBCDI und dem membrangebundenen Anteil FpoAHJKLMN die putative Elektronenaufnahme von Ferredoxin ermöglichte. Dabei kommt besonders FpoBCDI eine bedeutende Rolle zu. Die Untereinheit FpoI ist auf Grundlage des Elektronenflusses in *E. coli* (von NuoEFG zunächst auf Nuol), die erste Untereinheit im potentiellen Elektronenfluss von Komplex I aus *Mmc. luminyensis*. FpoI ist daher vermutlich die Untereinheit, welche die Elektronen vom postulierten Elektronendonator Fd_{red} aufnehmen kann. Daher soll der Fokus zunächst auf der hypothetischen Interaktion zwischen Ferredoxin und FpoI liegen.

3.3.1.1 Bioinformatische Analyse von FpoI

FpoI aus *Mmc. luminyensis* stellt ein Protein mit einem Molekulargewicht von 28,4 kDa dar, welches, auf Grundlage bioinformatischer Vorhersagen, vier kubische [4Fe4S]-Clustern des Ferredoxin-Typs als prosthetische Gruppen enthält. Diese könnten an der Elektronenaufnahme von Ferredoxin und an der Elektronenweiterleitung zum [FeS]-Cluster in FpoB beteiligt sein. In Abbildung 36 ist die Aminosäuresequenz des Proteins dargestellt, wobei die vier [4Fe4S]-Cluster-Bindedomänen und die zugehörigen Cysteinreste entsprechend markiert sind. Die FpoI-Analoga der aus der Literatur bereits bekannten Organismen, wie *E. coli*, *Thermus thermophilus* (*T. thermophilus*), *Methanosarcina mazei* (*Ms. mazei*) oder *Methanotheroxillum thermoacetophila* (*Mtx. thermoacetophila*) besitzen allesamt nur zwei [4Fe4S]-Cluster des Ferredoxin-Typs (Baradaran et al., 2013; Berrisford & Sazanov, 2009; Welte & Deppenmeier, 2014), was einen ersten deutlichen Unterschied des Fpo-Komplexes von *Mmc. luminyensis* zu Komplex 1-Derivaten aus anderen Organismen darstellt. Dies gilt auch im Vergleich zu weiteren „kopflösen“ Derivaten, wie im Falle von *Mtx. thermoacetophila* (Welte & Deppenmeier, 2011 b). Ein vergleichendes Alignment von FpoI/Nuol verschiedener Organismen (Abbildung 37) zeigt die Cystein-Reste der beiden [4Fe4S]-Clustern, welche in allen Spezies hoch konserviert vorliegen. Im Falle von *Mmc. luminyensis* stellt sich die Frage, welche Rolle die beiden zusätzlichen [FeS]-Cluster in FpoI spielen. Zum einen ist fraglich, ob alle Cluster benötigt werden bzw. funktionell sind und zum anderen, ob die zusätzlichen

Cluster potentiell mit der Elektroneneinspeisung in Verbindung stehen, oder auch für die Elektronenabgabe benötigt werden. Die genetische Herkunft der beiden zusätzlichen Cluster scheint dabei in einer Duplikation des Genes *fpol* zu liegen. Der C-terminale und N-terminale Bereich des Proteins weisen deutliche Homologien auf (Abbildung 36). Homologien zeigen insbesondere jeweils die beiden [FeS]-Cluster Bindedomänen des Ferredoxin-Typs mit den jeweiligen vier konservierten Cysteinresten. Neben den Cysteinresten existieren jedoch einige weitere Homologien, welche die Annahme einer zumindest partiellen Duplikation des *fpol*-Genes stützen. Über die biochemische und molekulare Rolle der Duplikation kann jedoch wie bereits eingeführt weiterhin nur gemutmaßt werden.

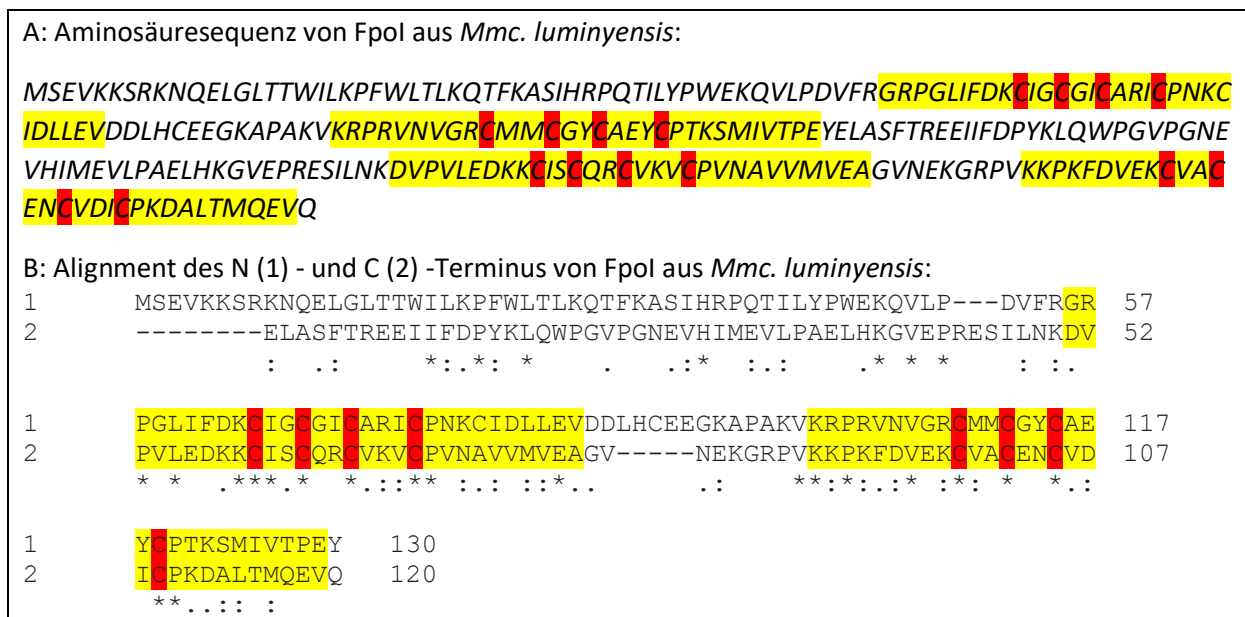


Abbildung 36: Aminosäuresequenz (250 Aminosäuren) von Fpol (NCBI-ID: WP_019176178.1) aus *Mmc. luminyensis* (A) und Alignment zur Überprüfung von Homologien der N (1) - und C (2) -Termini des Proteins (B). In Gelb sind die Bereiche der [FeS]-Cluster-Bindedomänen des Ferredoxin-Typs dargestellt. Die zugehörigen Cysteinreste sind in roter Farbe dargestellt.

<i>E. coli</i>	MTLKELLVGFQTQVRSIWMIGLHAFKRETRMYPPEPVYLPPRYRGRIVLTRDPDGEERC	60
<i>T. thermophilus</i>	MTLKALAQSLGITLK-----YLFSPVTVPYDPAPVALKPRFHGRHVLTRHPNGLEKC	53
<i>Ms. mazei</i>	MVLKNIKYALKN-----IPKERVTRLCPEVESPLSERFRGLQTLTLD-----KSKC	44
<i>M. thermophila</i>	MVLKSLKYTLKT-----ALTTTEVTRLYPEVMMELPANERGIHELD-----ATTC	45
	*.** : : * * : * . : * * *	
<i>E. coli</i>	VACNLCAVACPVCISLQKAET-----KDGRWYPEFFRINFSRCIFCGLCEEAAPTPTAI	114
<i>T. thermophilus</i>	IGCSLCAAACPAYAIYVEPAENDPENPVSAGERYAKVYEINMLRCIFCGLCEEAAPTPTAI	113
<i>Ms. mazei</i>	IGCGICANTCPNSAIKIVKAPIA---PGS--EKRWFPQIDIGHCLFCGLCIDQCPKCAL	99
<i>M. thermophila</i>	IGCGSCARVCPNSCIEMVPKYG--NPLK--NRKMQFPQIDYGRCTFCGLCVDECPVSC	101
	:.*. ** .** .* : : * * * * * : ** .:	
<i>E. coli</i>	QLTPDF--EMGEYKRQDLVYEKEDLLISGPGKYPEYNFYRMAGMAIDGKDKGEAENEAKP	172
<i>T. thermophilus</i>	VLGYDF--EMADYEYSDLVYGKEDMLVDVVGTKPQRRE-----AKRTGKP	156
<i>Ms. mazei</i>	SSGKEYCKGMVKAHKDLLMTPEKLAREVDIQEG-----DE-R-----	136
<i>M. thermophila</i>	KMGKRT--EIAGWDRKDIVYGPDRIVAKKFSKKEVAEL-----EAEAKRQAEKAKKAAA	153
	: : .*: : : :	
<i>E. coli</i>	IDVKS-LLP-----	180
<i>T. thermophilus</i>	VKVGY-VVPYVRPELEGFKAPTEGGKR	182
<i>Ms. mazei</i>	-----	136
<i>M. thermophila</i>	AAAKKAAKAKKENKAKTKPSEGGEA	180

Abbildung 37: Alignment der Aminosäuresequenzen von Fpol aus vier Spezies. Gelb markiert sind die Cystein-Reste, welche die beiden [4Fe4S]-Cluster koordinieren. Blau markiert sind die Lysinreste im C-terminalen Bereich von Fpol aus *Methanotherix thermoacetophila*, welche für eine putative Interaktion mit Ferredoxin in Betracht kommen (Welte & Deppenmeier, 2011 b). *E. coli*: *Escherichia coli* (WP_089587389.1); *T. thermophilus*: *Thermus thermophilus* (WP_011174264.1); *Ms. mazei*: *Methanosarcina mazei* (WP_015412577.1); *M. thermophila*: *Methanotherix thermoacetophila* (WP_011696231.1).

Die bioinformatisch vorhergesagte dreidimensionale Struktur von Fpol aus *Mmc. luminyensis* ist in Abbildung 38 dargestellt. Zur Modulation wurde die Phyre2-Software verwendet, welche auf Basis von Datenbanken mit bekannten Kristallstrukturen in der Lage ist, die dreidimensionale Struktur von Proteinen anhand der Aminosäuresequenzen zuverlässig zu rekonstruieren (Kelley et al., 2015).

Der N-terminale Bereich des Proteins ragt laut der Strukturvorhersage deutlich erkennbar aus dem kompakteren C-terminalen Anteil des Proteins heraus. Der exponierte N-Terminus besteht aus zwei Alpha-Helices (eine lange und eine kürzere), welche eine auffällige Anzahl positiv-geladener Aminosäurereste aufweisen. Möglicherweise dient der Bereich der Interaktion mit weiteren Proteinen des membranassoziierten, hydrophilen Anteils des Fpo-Komplexes (FpoB, FpoC, FpoD), oder aber er ist an der potentiellen Interaktion mit Ferredoxin beteiligt. Dabei gilt zu beachten, dass Ferredoxine generell einen Überschuss an sauren Aminosäureresten aufweisen, was für eine negative Nettoladung sorgt (Armstrong et al., 1988). Der Überschuss an positiven Ladungen im N-terminalen Bereich von Fpol könnte daher für eine potentielle Interaktion mit Ferredoxin förderlich sein. Im Falle von Fpol aus *Mtx. thermoacetophila* ist in diesem Zusammenhang anzumerken, dass Welte & Deppenmeier (2011) den Überschuss von Lysinresten im C-terminalen Bereich (Abbildung 37) für die Interaktion mit Ferredoxin verantwortlich machten. Der Organismus besitzt ebenso einen

kopflosten Fpo-Komplex der vermutlich mit Ferredoxin interagiert (Welte & Deppenmeier, 2011 b). Ein Vergleich mit Fpol aus *Mmc. luminyensis* scheint dennoch eher schwierig, da keine Ansammlung von Lysinen am C-Terminus erkennbar ist. Wie beschrieben ist der N-Terminus des Proteins in dieser Hinsicht eher als potentieller Interaktionsort zu betrachten. Der N-Terminus von Fpol aus *Mtx. thermoacetophila* liegt auf Basis einer Phyre2-Modulation nicht derart exponiert vor, wie im Falle von Fpol aus *Mmc. luminyensis*, zudem erscheint die Ladung ausgeglichener. Ein weiterer deutlicher Unterschied zwischen Fpol aus *Mmc. luminyensis* und *Mtx. thermoacetophila* liegt außerdem in der zuvor beschriebenen Duplikation der [4Fe4S]-Cluster im Falle des Proteins von *Mmc. luminyensis*. Dies erschwert direkte Vergleiche zwischen den beiden jeweiligen Fpol-Proteinen, wobei die Interaktion mit Ferredoxin in den beiden Spezies womöglich auf unterschiedliche Weise erfolgt.

Abgesehen vom N-Terminus besitzt der restliche Bereich von Fpol aus *Mmc. luminyensis* eine relativ ausgeglichene Oberflächenladung und enthält die vier [4Fe4S]-Cluster, auf Grundlage der Lokalisation der zugehörigen koordinierenden Cysteinreste im Strukturmodell, in räumlicher Nähe zueinander, was die Möglichkeit der direkten Elektronenübertragung untereinander untermauert. Page et al. (1999) machten einen Abstand von 14 Ångström als maximalen möglichen Abstand des Elektronentransfers zwischen prosthetischen Gruppen in Proteinen aus. Der genaue Abstand zwischen den Clustern kann im vorhergesagten Modell von Fpol nicht berechnet werden, da nur die Cysteinreste dargestellt sind. Die gesamten Cluster fehlen jedoch, da die Phyre2-Modulation zu dessen exakter Vorhersage nicht in der Lage ist. Letztlich konnte allerdings die räumliche Nähe der Cysteinreste als Anhaltspunkt für den putativen direkten Elektronentransfer zwischen den vier bioinformatisch vorhergesagten kubischen [4Fe4S]-Clustern genommen werden.

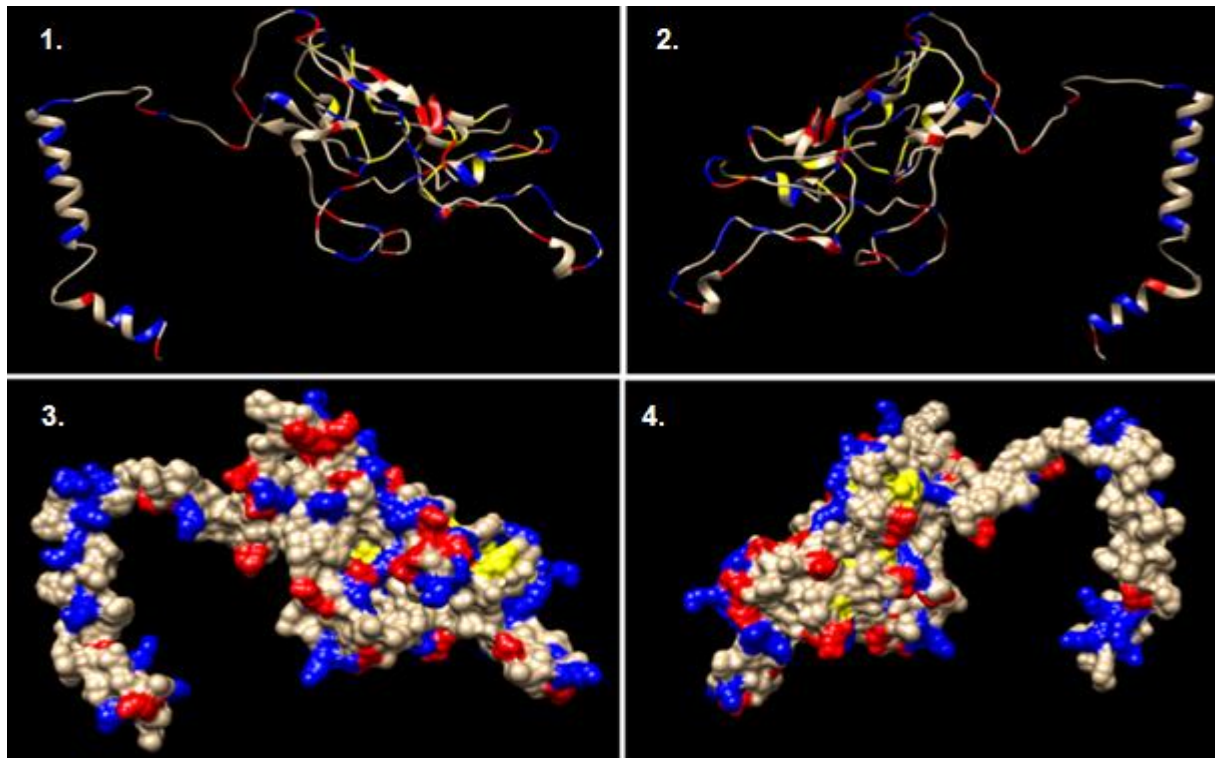


Abbildung 38: Phyre2 Modulation von Fpol aus *Mmc. luminyensis* (WP_019176178.1). Gezeigt sind Bändermodell (1., 2.) und Oberflächenstruktur (3., 4.) aus je zwei unterschiedlichen Ansichten. Blau: Positiv-geladene Aminosäuren; Rot: Negativ-geladene Aminosäuren; Gelb: Cysteinreste, die zur Bindung der [FeS]-Cluster benötigt werden (Abbildung 36).

3.3.1.2 Identifizierung und bioinformatische Analyse putativer Ferredoxine aus *Mmc. luminyensis*

Um die putative Interaktion von Fpol mit Ferredoxin bioinformatisch detailliert untersuchen zu können, erfolgte die Identifizierung von Ferredoxinen in *Mmc. luminyensis*. Ein Ferredoxin (WP_019177167.1) aus *Mmc. luminyensis* wurde bereits von Kröninger et al. (2019) identifiziert und erfolgreich heterolog in *E. coli* produziert. Anzumerken ist zunächst, dass Ferredoxine für den Labormaßstab häufig aus *Clostridium pasteurianum* (*C. pasteurianum*) aufgereinigt und genutzt werden (Biegel & Müller, 2010; Kaster et al., 2011, Welte, 2011; Welte & Deppenmeier 2011) und Ferredoxine in Experimenten oft funktionell, innerhalb unterschiedlicher Spezies, austauschbar sind (Tagawa & Arnon, 1968). Dies zeigte sich auch in den Untersuchungen von Kröninger et al. (2019), wobei in verschiedenen Tests zum Nachweis des Fd:Heterodisulfid Oxidoreduktase-Systems in Membranen von *Mmc. luminyensis* sowohl das Ferredoxin aus *Mmc. luminyensis* als auch jenes, welches aus Zellmaterial von *C. pasteurianum* aufgereinigt wurde, erfolgreich genutzt werden konnte.

Daher war anzunehmen, dass die Wahl des Ferredoxins eher geringe Auswirkungen auf die Möglichkeit der Untersuchung potentieller Interaktionen mit Fpol hatte. Für bioinformatische Untersuchungen wurde jedoch, dass Ferredoxin aus *Mmc. luminyensis* verwendet, um den nativen Bedingungen im Organismus möglichst nahe zu kommen. Zunächst erfolgte eine Blast-Analyse mit dem bereits erfolgreich für Aktivitätstests genutzten Ferredoxin

(WP_019177167.1) aus dem Organismus, die der Identifizierung weiterer potentieller Ferredoxine in *Mmc. luminyensis* diene. Dabei zeigte ein weiteres Ferredoxin (WP_019177326.1) hohe Homologien zum bereits genutzten Ferredoxin. Ein Alignment der beiden Proteine (Abbildung 39) bestätigte die erwartungsgemäß hohen Homologien und zeigte das beide Proteine zwei [4Fe4S]-Cluster koordinieren können. Dabei lagen wie auch im Falle von Fpol (3.3.1.1) je Cluster vier Cystein-Reste vor.

Für die weiteren Untersuchungen wurde schließlich das Ferredoxin WP_019177167.1 ausgewählt, da dieses Protein bereits von Kröninger et al. (2019) erfolgreich genutzt werden konnte und dem weiteren identifizierten Ferredoxin wie beschrieben relativ stark ähnelte, sodass für weitere Experimente kaum Unterschiede zu erwarten waren.

WP_019177326	--MIVSIEKHHGAVGSPQNATYLNDSVLTFFNDDNRRGRGVKLCVPGALELEEKR	57
WP_019177167	MAVKVKNEEVGGAEDVPSAIAKIENDIIVINEKDVDTGACVDECPNSAISMD---	57
	: * . *: * * * * . * * * . * * : : : : : . * * * * * . * * . * : : :	

Abbildung 39: Aminosäuresequenzen (57 Aminosäuren) zweier putativer Ferredoxine (WP_019177167.1 und WP_019177326.1) aus *Mmc. luminyensis*. In Gelb sind die Bereiche der [4Fe4S]-Cluster-Bindedomänen des Ferredoxin-Typs dargestellt. Die zugehörigen Cysteinreste sind in roter Farbe dargestellt.

Die Phyre2-Modulation des Ferredoxins zeigte vier β -Faltblätter und zwei α -Helices als zentrale Strukturelemente des globulären Proteins (Abbildung 40). Die Oberflächenladung des Proteins ist in der Gesamtheit eher negativ, wobei auch einige positive Aminosäurereste Oberflächen-exponiert vorliegen. Die negativ-geladenen Aminosäurereste an der Oberfläche könnten mit dem, zuvor beschriebenen, positiv-geladenen N-terminalen Bereich von Fpol interagieren.

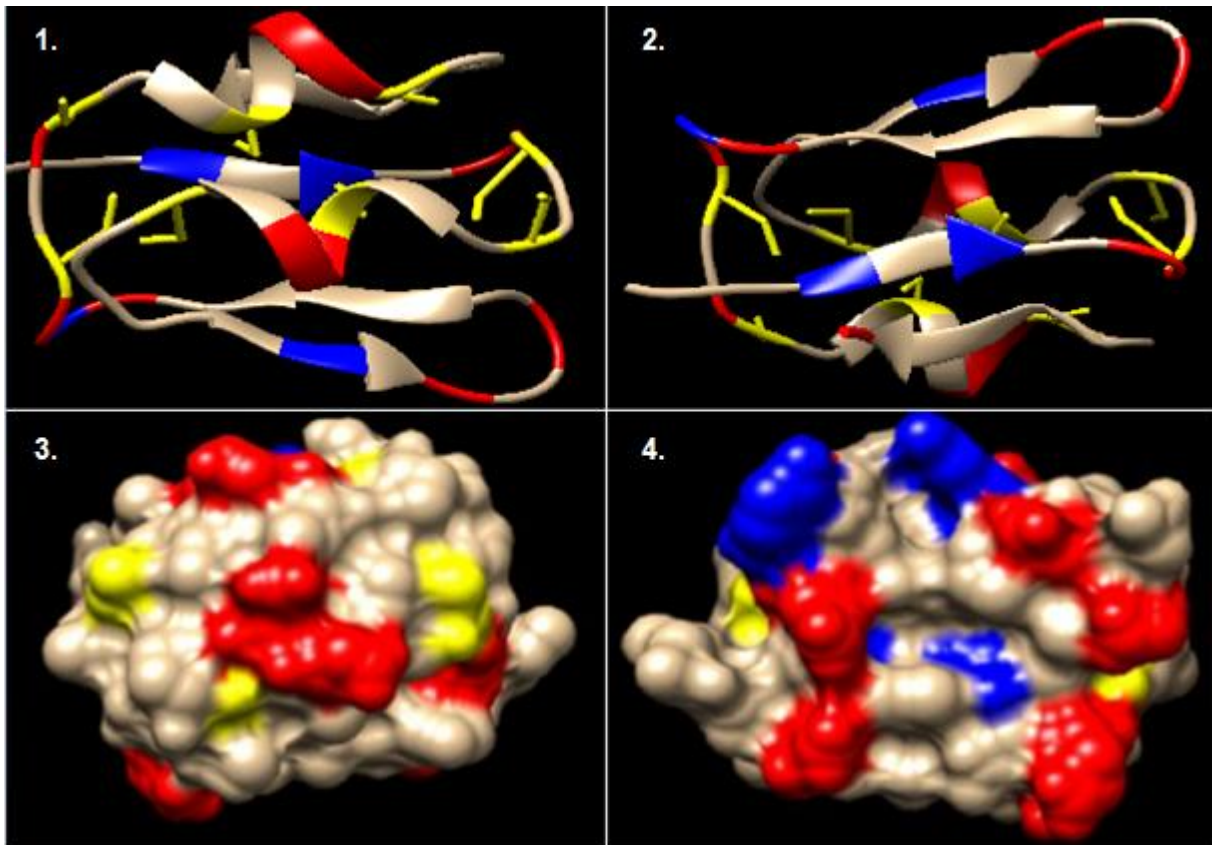


Abbildung 40: Phyre2-Modulation eines Ferredoxins (WP_019177167.1) aus *Mmc. luminyensis*. Gezeigt sind Bändermodell (1., 2.) und Oberflächenstruktur (3., 4.) aus zwei unterschiedlichen Ansichten. Blau: Positiv-geladene Aminosäuren; Rot: Negativ-geladene Aminosäuren; Gelb: Cysteinreste, die zur Bindung der [FeS]-Cluster benötigt werden (Abbildung 39).

3.3.1.3 Bioinformatische Analyse der putativen Interaktion zwischen Ferredoxin und Fpol

Auf Grundlage der Phyre2-Modelle von Fpol und des ausgewählten Ferredoxins aus *Mmc. luminyensis* (WP_019177167) konnte im Anschluss eine bioinformatische Analyse der möglichen Interaktion mittels ClusPro-Interaktionsserver (2.9.2) erfolgen. Unter den 10 Interaktionsmodellen, welche die höchste Wahrscheinlichkeit besaßen in der Realität einzutreten, waren neun zu finden, welche eine Interaktion des Ferredoxins mit Fpol am Übergang der N-terminalen Verlängerung in den kompakteren Anteil des Proteins vorhersagten. Dies bedeutete, dass die putative Interaktion mit großer Wahrscheinlichkeit tatsächlich an dieser Position stattfindet. Da sich die Modelle alle ähneln ist in Abbildung 41 eines der Modelle beispielhaft dargestellt, wobei es sich dabei um jenes mit der insgesamt höchsten Eintrittswahrscheinlichkeit handelt. Im Bereich der Bindung des Ferredoxins sind vier Argininreste und ein Lysinrest (Arg55, Arg57, Arg 108, Arg137, Lys47) von Fpol zu finden, welche möglicherweise an der Ausbildung der Interaktion beteiligt sind, da deren positive Ladung in Wechselwirkung mit den negativ-geladenen Aminosäuren des Ferredoxins treten könnte. Aufgrund der räumlichen Nähe der zugehörigen Cysteinreste scheint ein

Elektronenfluss zwischen den [FeS]-Clustern des Ferredoxins und von Fpol außerdem möglich.

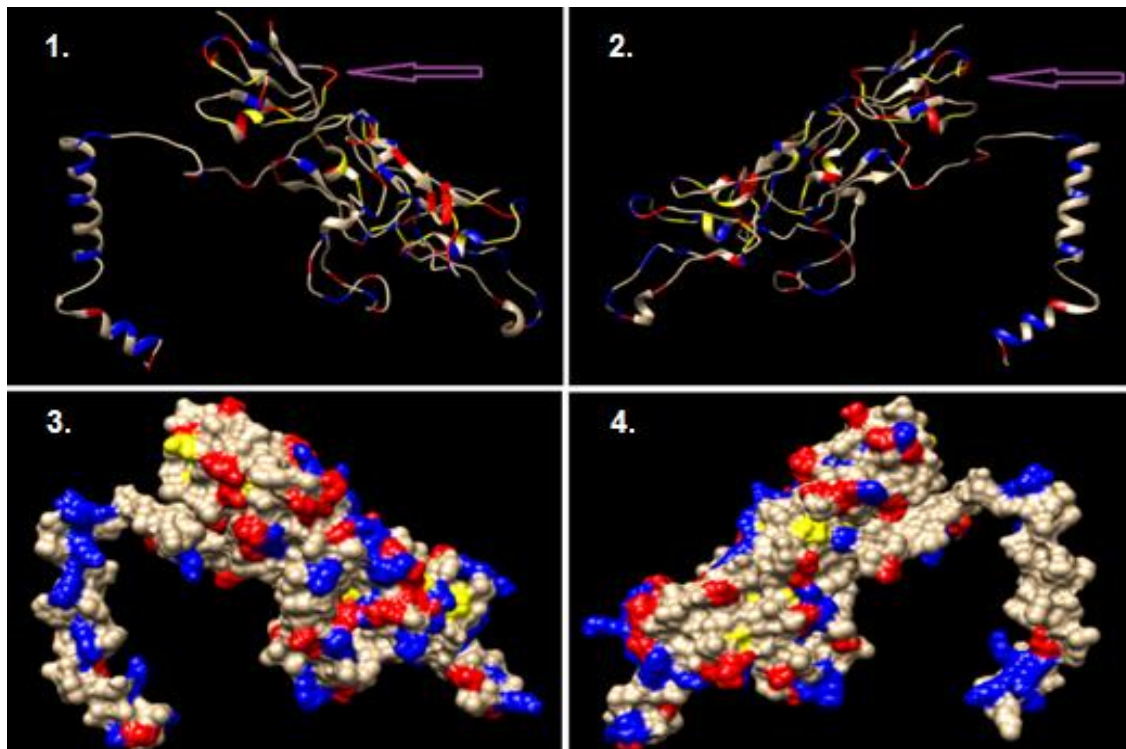


Abbildung 41: ClusPro-Modulation einer putativen Interaktion von Fpol (WP_019176178.1) und eines Ferredoxins (WP_019177167.1) aus *Mmc. luminyensis*. Gezeigt sind Bändermodell (1., 2.) und Oberflächenstruktur (3., 4.) aus zwei unterschiedlichen Ansichten. Beim Modell handelte es sich um jenes mit der höchsten Wahrscheinlichkeit für dessen Vorliegen in der Realität. Blau: Positiv-geladene Aminosäuren; Rot: Negativ-geladene Aminosäuren; Gelb: Cysteinreste. Zur leichteren Orientierung kennzeichnet der violette Pfeil das Ferredoxin.

Neben den neun genannten Modellen, welche allesamt eine Interaktion an genannter Position vorhersagten, ist unter den zehn Modellen mit der höchsten Eintrittswahrscheinlichkeit ebenso eines, welches auf der Interaktion des Ferredoxins mit dem exponierten N-Terminus beruht (Zwischen N-Terminus und kompakterem Bereich von Fpol; Abbildung 42). Ähnliches wurde schon unter 3.3.1.1 bei der Analyse von Fpol gemutmaßt, da viele positiv geladene Aminosäurereste vorliegen, welche mit dem oberflächlich hauptsächlich negativ geladenen Ferredoxin interagieren könnten. Deutlich wird im Modell, dass die Entfernung der [4Fe-4S]-Cluster von Ferredoxin und Fpol, auf Grundlage der Entfernung der zugehörigen Cysteinreste, verhältnismäßig groß ist und der Abstand wohl keinen Elektronenfluss zuließe. Eine Möglichkeit besteht jedoch darin, dass der N-Terminus als Aufnahmevorrichtung für reduziertem Ferredoxin dient und nach der Bindung von Fd_{red} seine Konformation ändert. Dies könnte Ferredoxin darauffolgend in eine geeignete Position zum Elektronentransfer auf Fpol bringen. Zudem steht möglicherweise auch das Vorliegen von 4 [4Fe-4S]-Clustern in Fpol mit der speziellen Aufnahmevorrichtung in Zusammenhang. Wie beschrieben hat Fpol in anderen Organismen nur zwei [4Fe4S]-Cluster und die beiden zusätzlichen Cluster in *Mmc.*

luminyensis spielen daher womöglich eine Rolle bei der Elektronenaufnahme durch den N-Terminus des Proteins. Eine Kombination der beiden möglichen Modelle (Abbildung 41 und 42) könnte darauf aufbauend ebenso eintreten. Dabei besteht die Möglichkeit, dass die erste Interaktion des Ferredoxins mit Fpol am N-Terminus erfolgt und dieser seine Konformation so ändert, dass Ferredoxin in eine zur Elektronenabgabe geeignete Position gebracht werden kann, beispielsweise in jene, welche in den weiteren neun Modellen vorhergesagt wurde. Dies würde zusammenfassend bedeuten, dass Ferredoxin vom N-terminalen Bereich des Proteins ähnlich einer exponierten Aufnahmevorrichtung gebunden und anschließend in eine stabilere Interaktion mit Fpol an geeigneter Stelle gebracht wird.

Da der N-terminale Bereich von Fpol jedoch mit einer Region ohne geordnete Sekundärstruktur wie Alpha-Helix oder Beta-Faltblatt beginnt, ist es ebenso möglich, dass die Phyre2-Vorhersage an dieser Stelle nicht exakt ist und sich der N-Terminus in der Realität näher am kompakteren Teil des Proteins befindet, sodass das Modell der Interaktion am verlängerten N-Terminus nicht gänzlich bestätigt werden kann. In Nuol von *E. coli* liegt der N-terminale Bereich auf Grundlage der vorhandenen Kristallstruktur beispielsweise wesentlich kompakter am restlichen Anteil des Proteins an (Baradaran et al., 2013). Außerdem besteht die Möglichkeit, dass der N-Terminus der Interaktion mit weiteren Proteinen des Fpo-Komplexes dient und er keine Rolle bei der Interaktion mit Ferredoxin besitzt. Letztlich ist eine Interaktion des Ferredoxins mit Fpol auf Grundlage der ClusPro-Modellierung an jener Position am wahrscheinlichsten, welche von den neun weiteren Modellen vorgesehen wurde, wobei eine Rolle des N-Terminus bei der potentiellen Annäherung des negativ-geladenen Ferredoxins nicht ausgeschlossen werden kann.

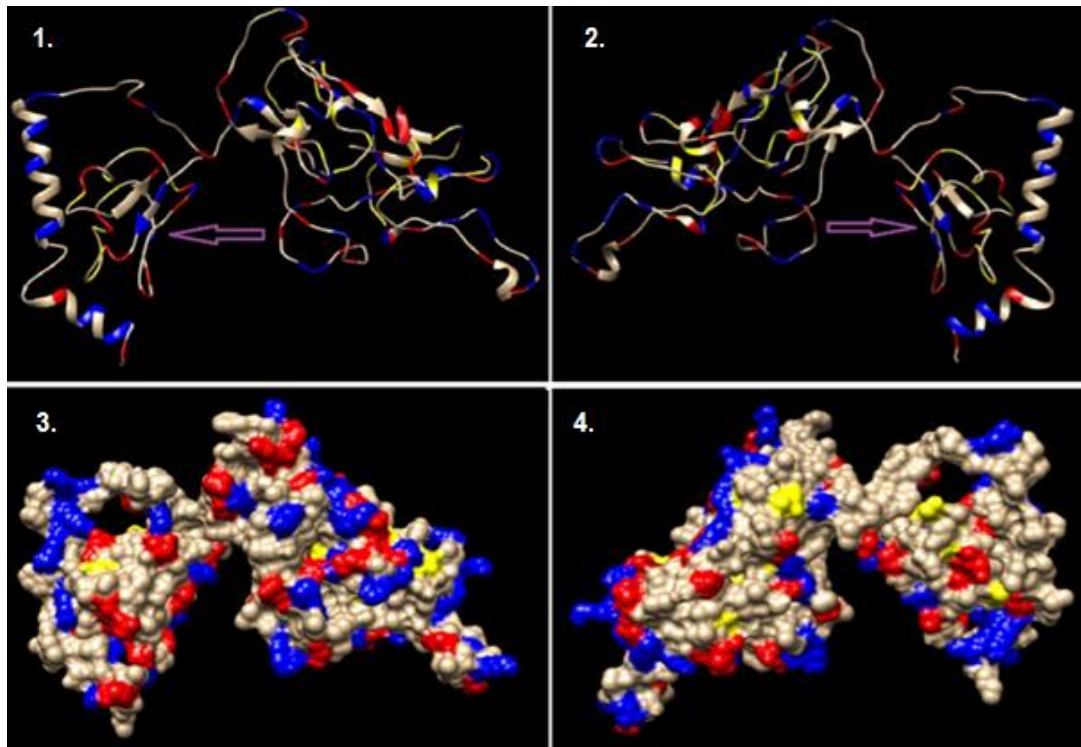


Abbildung 42: ClusPro-Modulation einer putativen Interaktion von Fpol (WP_019176178.1) und des Ferredoxins (WP_019177167.1) aus *Mmc. luminyensis*. Gezeigt sind Bändermodell (1., 2.) und Oberflächenstruktur (3., 4.) aus zwei unterschiedlichen Ansichten. Beim Modell handelte es sich um jenes mit der neunt-höchsten Wahrscheinlichkeit für dessen Vorliegen in der Realität. Blau: Positiv-geladene Aminosäuren; Rot: Negativ-geladene Aminosäuren; Gelb: Cysteinreste. Zur leichteren Orientierung kennzeichnet der violette Pfeil das Ferredoxin.

Auf Grundlage der genannten neun Modelle, welche eine Interaktion zwischen Fpol und Ferredoxin im Bereich des Übergangs von N-Terminus in den kompakteren Bereich von Fpol vorsehen, lässt sich ein putativer Elektronenfluss von Ferredoxin auf Fpol rekonstruieren, da sich die [FeS]-Cluster auf Grundlage der Position der zugehörigen Cysteinreste in räumlicher Nähe zueinander befinden. In Abbildung 43 wird in zwei Ansichten des wahrscheinlichsten Interaktionsmodells, welches ebenso in Abbildung 41 dargestellt ist, erkennbar, dass die Elektronen von Ferredoxin über die vier [FeS]-Cluster von Fpol übertragen und schließlich vom [FeS]-Cluster in FpoB akzeptiert werden könnten. Letzteres ist jedoch an dieser Stelle nur schematisch dargestellt.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Interaktion von Fpol und Ferredoxin auf Grundlage der ClusPro-Software an der beschriebenen Stelle (Übergang N-Terminus in kompakteren Bereich von Fpol) als wahrscheinlich erachtet werden kann und einen Elektronenfluss zuließe. In Zukunft ist es jedoch elementar das aufgestellte Interaktionsmodell durch experimentelle Untersuchungen zu bestätigen, um definitive Aussagen zu ermöglichen.

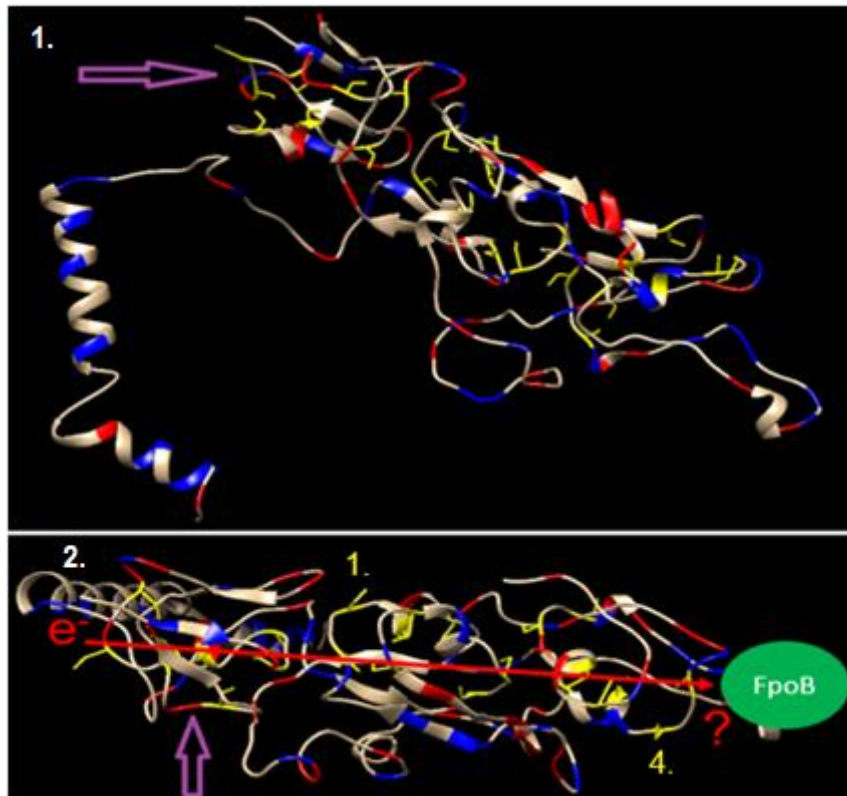


Abbildung 43: ClusPro-Modulation der Interaktion zwischen FpoI und Ferredoxin aus *Mmc. luminyensis* (Modell aus Abbildung 41). Der untere Ausschnitt (2.) zeigt das Modell in einer anderen Ansicht, wobei der putative Elektronenfluss von Ferredoxin (mit violetterm Pfeil markiert) über die vier [FeS]-Cluster (Unter Beachtung der Cystein-Reste (gelb)) in FpoI deutlich wird (Cluster 1. und 4. In Reihenfolge des möglichen Elektronenflusses). FpoB ist als Elektronenakzeptor des Modells schematisch dargestellt. Rot: Negativ-geladene Aminosäuren; Blau: Positiv-geladene Aminosäuren.

3.3.1.4 Bioinformatische Analyse von FpoB aus *Mmc. luminyensis*

Da auch FpoB bzw. NuoB am Elektronenfluss im gut untersuchten Komplex I der Modellorganismen *T. thermophilus* und *E. coli* beteiligt ist, erfolgte ebenso eine bioinformatische Analyse der Untereinheit aus *Mmc. luminyensis*. In Abbildung 44 ist ein Alignment der Aminosäuresequenzen von FpoB aus *Mmc. luminyensis* und dessen homologen Proteinen aus *Ms. mazei*, *E. coli* und *Homo sapiens* (*H. sapiens*) dargestellt. Dort wird deutlich, dass die vier Cysteinreste, welche ein [4Fe4S]-Cluster koordinieren (Sazanov & Hinchliffe, 2006), in Vertretern aller drei Domänen des Lebens hochkonserviert sind. Der Aufbau des Clusters und die Anordnung der Cysteine sind sehr speziell. Das [4Fe4S]-Cluster verursacht daher im Vergleich zu den Ferredoxin-ähnlichen Clustern in FpoI/NuoI einzigartige Signale im Rahmen der Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (Flemming et al., 2003). Das Cluster in FpoB von *Mmc. luminyensis* liegt exponiert an der Oberfläche des Proteins vor (Abbildung 45 und Abbildung 46) und ist damit für die Aufnahme von Elektronen von weiteren [FeS]-Clustern, z.B. von FpoI, gut zugänglich. Auch in *E. coli* liegt das Cluster auf Grundlage der Kristallstrukturen Oberflächen-exponiert vor (Baradaran et al., 2013).

<i>E. coli</i>	MD---YT--LTRI-----DPNGENDRYPLQ-KQEIVTDPLEQEVNKNVFMGKLN	43
<i>Mmc. luminyensis</i>	MDLSLY-----PH-----AVAMSAKEFVEWSSNAMDDALRASGVKKVVDKVTA	43
<i>Ms. mazei</i>	MGEVK-----ETKTNN---SKENPE-EEVPGVITTTTSAIHN-----FLKKTKAQ	41
<i>H. sapiens</i>	MGLSDNSGTLVAPKPKGILD PSTGKPVGANDPFFLEINNELADK-----GFLVTSTE	52
	*.	
<i>E. coli</i>	DMVNWGRKNSIWPNFGLS CCY VEMVTSFTAVHDVARFGAEVLRASPRQADLMVVAGMCF	103
<i>Mmc. luminyensis</i>	PLWSWGIRNAIYPLHFGVACCALEMAACSGPRFDNERFGM-VFRSSPRQCEVLLVNGWIS	102
<i>Ms. mazei</i>	DIINWGRKNSLWFMTQPMGC CCG VEMIATGCAHYDTRFGI-IPRNSPRHADVMIISGYVT	100
<i>H. sapiens</i>	ALITWARSGLMFMFTFGLACCAVEMIHTSMPRYDSERFGV-APRASPRQSDIMIVAGTLT	111
	: . * . . . : . : * * : * * . * * * * * * * * * * : * * * * * * * * * * *	
<i>E. coli</i>	TKMAPVIQRLYDQMLEPKWVISMGA CAN SGGM-YDIYSVVQGVDFKIPVDVYIPG CPP RP	162
<i>Mmc. luminyensis</i>	YKLRPALRRLYEEMPEPKWVIAMGECAISGGPWYDAYNVVQGTDTFIPVDVYIPG CPP RP	162
<i>Ms. mazei</i>	KKYLPALKRLWDQMPAPKWVIAMGDCAISGGPFYESYSTVQNIDEIFPIDVYIPG CPP RP	160
<i>H. sapiens</i>	NKMAPALRKVYDQMPPEPRYVISMGS CAN GGGYHYHSYSVVRGCDRVPVDIYVPG PP SA	171
	* * * * : * * * * * * * * . * * : * . . * . * . . * : * * * * * * * * * * *	
<i>E. coli</i>	EAYMQALMLLQESIGKERRPLSWVVG DQGVYRANMQSERERKRGERIAVTNLRTPDEI	220
<i>Mmc. luminyensis</i>	EAMIDGFLKLHQKIHVQMKGTFLD-----	187
<i>Ms. mazei</i>	EALIQGFVELQEKIKARKDRGTEY-----	184
<i>H. sapiens</i>	EALLYGILLLQKIRRTGTIER-----	193
	** : . : * : : *	

Abbildung 44: Alignment der Aminosäuresequenzen von FpoB/NuoB-Proteinen aus *Mmc. luminyensis* (WP_019176182.1), *Ms. mazei* (WP_011034408.1), *E. coli* (WP_000386733.1) und *Homo sapiens* (5XTB_C). Gelb markiert sind die durch die Domänen des Lebens hochkonservierten Cystein-Reste, welche das [4Fe4S]-Cluster des Proteins koordinieren.

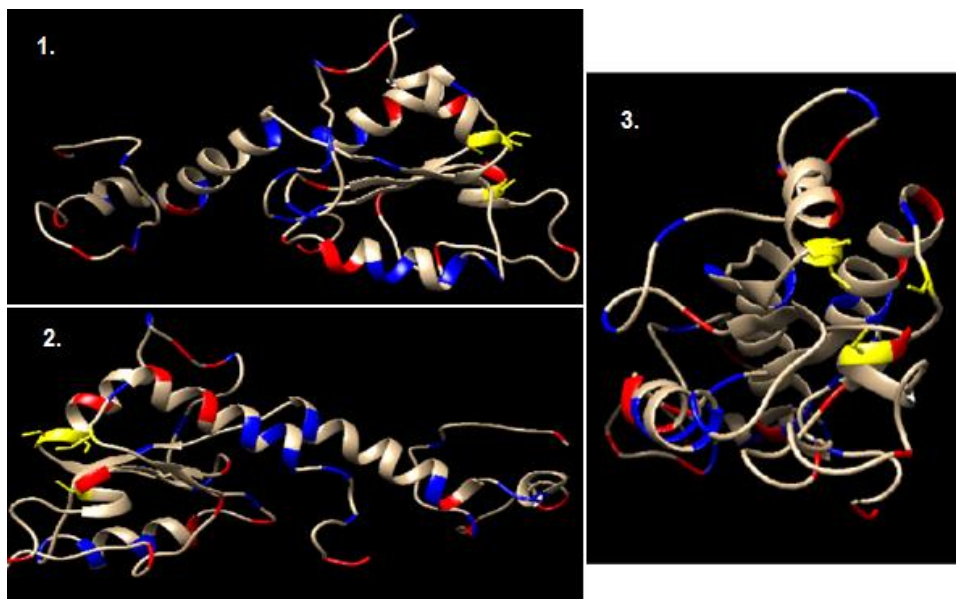


Abbildung 45: Phyre2-Modell von FpoB (WP_019176182.1) aus *Mmc. luminyensis* (Bänderstruktur) in verschiedenen Ansichten (1.-3.). Blau: Positiv-geladene Aminosäuren; Rot: negativ-geladene Aminosäuren; Gelb: Cysteinreste für Koordination des [4Fe4S]-Clusters.

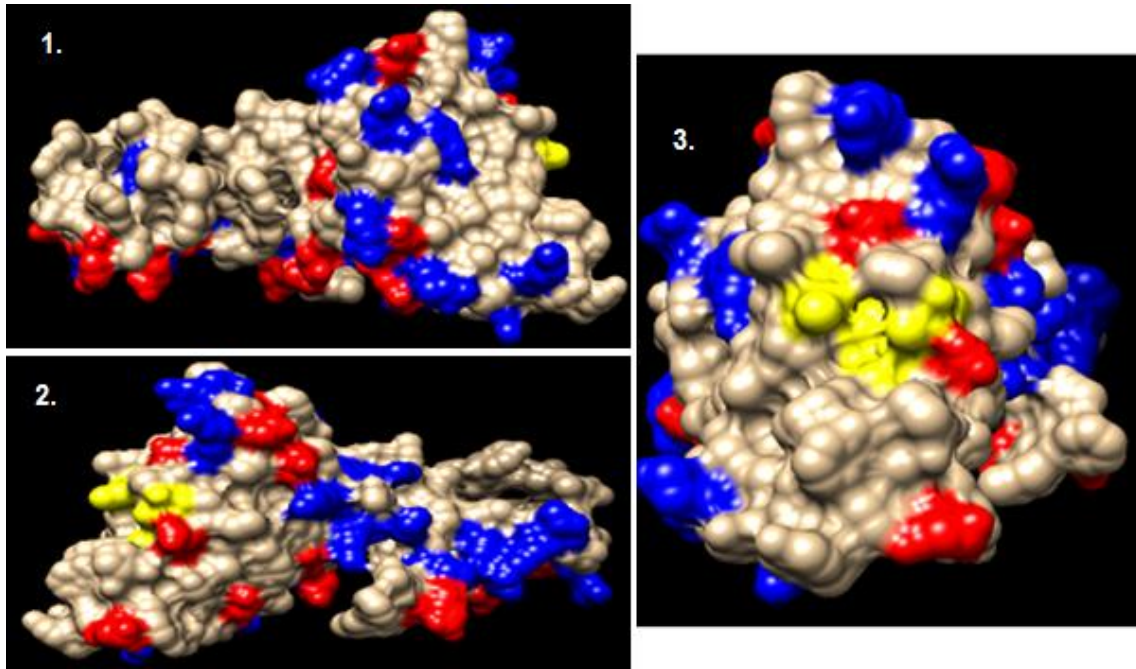


Abbildung 46: Phyre2-Modell von FpoB (WP_019176182.1) aus *Mmc. luminyensis* (Oberflächenstruktur) in verschiedenen Ansichten (1.-3). Blau: Positiv-geladene Aminosäuren; Rot: negativ-geladene Aminosäuren; Gelb: Cysteinreste für Koordination des [4Fe4S]-Clusters.

3.3.1.5 Bioinformatische Analyse der putativen Interaktion zwischen Fpol und FpoB

Nach detaillierter Betrachtung von FpoB erfolgten Analysen zur Interaktion mit Fpol. Das Oberflächen-exponierte [FeS]-Cluster von FpoB könnte wie beschrieben die Elektronen von einem der [FeS]-Cluster von Fpol aufnehmen. Das Cluster von Fpol welches die Elektronen potentiell abgibt könnte jenes sein, welches in Abbildung 43, auf Grundlage der zugehörigen Cysteinreste, als potentieller Interaktionsort mit FpoB spekuliert wurde (Cluster 4.). Natürlich kommen auch die anderen [FeS]-Cluster von Fpol für eine Elektronenübertragung auf das Cluster von FpoB in Frage, sodass generell nach Interaktionen gesucht wurde, welche einen Elektronentransfer zwischen FpoB und Fpol erlauben. Auf Grundlage des Modells der Interaktion von Ferredoxin und Fpol erfolgte die Modellierung der möglichen Anlagerung von FpoB. Den ClusPro-Interaktionsmodellen (Betrachtung der 10 Modelle mit der höchsten Eintrittswahrscheinlichkeit) war jedoch in keinem Fall eine räumliche Nähe der [4Fe4S] Cluster von Fpol und des [4Fe4S]-Clusters von FpoB zu entnehmen, wobei die Lokalisation der zugehörigen Cysteinreste als Anhaltspunkt diente. Allerdings zeigten alle zehn Modelle eine Interaktion von FpoB mit jenem N-terminalen Anhang, der zuvor bereits im Zusammenhang mit der Fpol-Ferredoxin-Interaktion beschrieben wurde. Dies sprach erstens dafür, dass die Interaktion von Ferredoxin und Fpol vermutlich so verläuft wie von neun der zehn wahrscheinlichsten Modelle vorgeschlagen, d.h. am Übergang des N-Terminus von Fpol in den kompakteren Bereich des Proteins. Zweitens könnte das für die Ferredoxin-Fpol-Interaktion als unwahrscheinlichere Variante erachtete Modell, für die Interaktion von FpoB

und FpoI zutreffen. Das Modell sieht demnach die Interaktion von FpoB und dem N-Terminus von FpoI vor, welcher danach eine Konformationsänderung erfährt und das [FeS]-Cluster von FpoB in eine geeignete Elektronentransferdistanz zu einem der entsprechenden [FeS]-Cluster in FpoI bringt. Eines der Modelle der Interaktion von FpoB mit dem N-Terminus von FpoI ist beispielhaft in Abbildung 47 dargestellt. Dabei besteht die Möglichkeit, dass der N-Terminus von FpoI nach Bindung von FpoB näher an den kompakten Teil von FpoI heranrückt und das [FeS]-Cluster von FpoB somit in direkte Nähe zu einem der [FeS]-Cluster in FpoI bringt. Im Detail ist der putative Elektronenfluss und die Möglichkeit der Konformationsänderung des N-Terminus von FpoI in Abbildung 48 dargestellt. Anzumerken ist, dass das Modell auf Grundlage der Kristallstruktur des hydrophilen Anteils des Nuo-Komplexes von *T. thermophilus* ebenso eine deutliche Interaktion von FpoB mit dem N-Terminus von FpoI zeigt, wobei dieser wesentlich kompakter ist und dem Protein anliegt. Einige Aminosäure-Reste am C-Terminus sind jedoch ebenso an der Interaktion beteiligt. (Sazanov & Hinchliffe, 2006). In der Kristallstruktur von Komplex I aus *T. thermophilus* ist außerdem erkennbar, dass FpoB sowohl mit FpoI als auch FpoD eine enge Interaktion eingeht, um den Elektronentransfer von den [FeS]-Clustern in FpoI auf den Chinonkopf in FpoD zu ermöglichen. Da es sich beim Modell aus *T. thermophilus* um eine Aufnahme des gesamten hydrophilen Anteils handelt, könnte dort die beschriebene Konformationsänderung schon stattgefunden und für die Annäherung der [FeS]-Cluster gesorgt haben. Ebenso ist wie zuvor bereits angemerkt denkbar, dass die Modulation des N-Terminus von FpoI aus *Mmc. luminyensis* durch Phyre2 nicht optimal erfolgte, da am Übergang zum kompakteren Bereich keine Sekundärstrukturen vorliegen. Potentiell liegt der N-Terminus in der Realität auch ohne die spekulierten Konformationsänderungen deutlich näher am kompakteren Bereich des Proteins an. Dennoch erschien eine Interaktion des N-Terminus von FpoI mit FpoB auf Grundlage der ClusPro-Modulation als wahrscheinlich. Eine zusätzliche Interaktion mit Aminosäure-Resten am C-Terminus von FpoI, wie im Falle von *T. thermophilus* ist ebenso denkbar, wenn die Struktur im Gesamtkomplex kompakter vorliegt und der Elektronentransfer auf das [FeS]-Cluster in FpoB von einem der [FeS]-Cluster in der Nähe des C-Terminus von FpoI erfolgt. Dies erscheint wahrscheinlich, wenn die Elektronenübertragung von Ferredoxin wie beschrieben auf das [4Fe4S]-Cluster in der Nähe des N-terminalen Bereichs von FpoI erfolgt und die Elektronen über die weiteren FeS-Cluster bis hin zum [4Fe4S]-Cluster im Bereich des C-Terminus transferiert werden, wo dann die Interaktion mit FpoB erfolgt. Da das [FeS]-Cluster in FpoB hochkonserviert vorliegt, ist dessen Funktionalität ebenso wahrscheinlich, sodass von der Aufnahme der Elektronen von einem der [FeS]-Cluster in FpoI ausgegangen werden konnte.

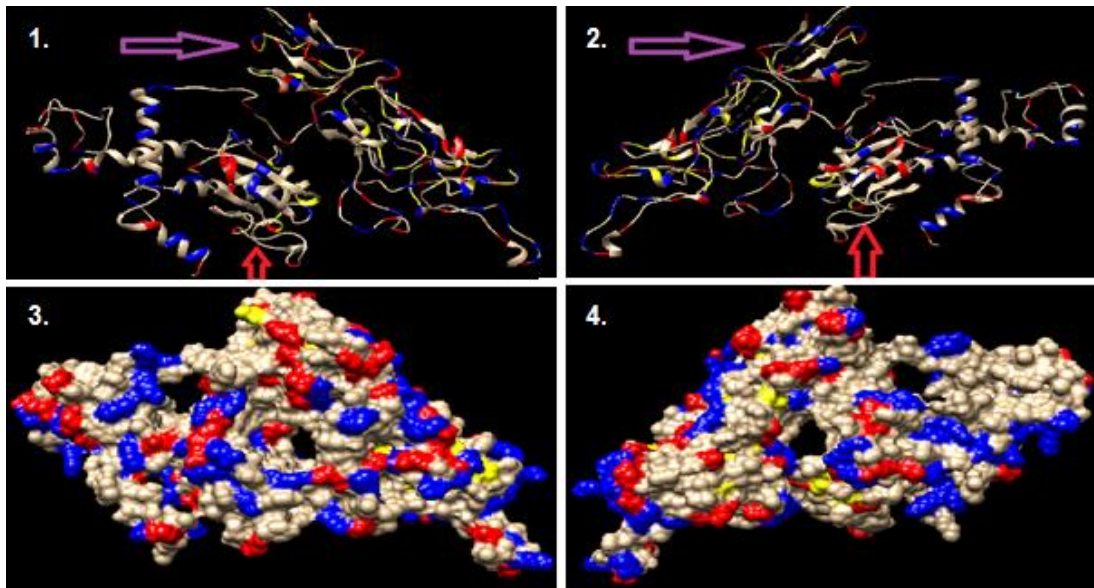


Abbildung 47: ClusPro-Modell der Interaktion zwischen Ferredoxin (WP_019177167.1), Fpol (WP_019176178.1) und FpoB (WP_019176182.1) aus *Mmc. luminyensis* in zwei unterschiedlichen Ansichten (jeweils als Bändermodell (1., 2.) und Oberflächenmodell (3., 4.)). Blau: Positiv-geladene Aminosäuren; Rot: negativ-geladene Aminosäuren; Gelb: Cysteinreste. Die Pfeile markieren Ferredoxin (violett) und FpoB (rot).

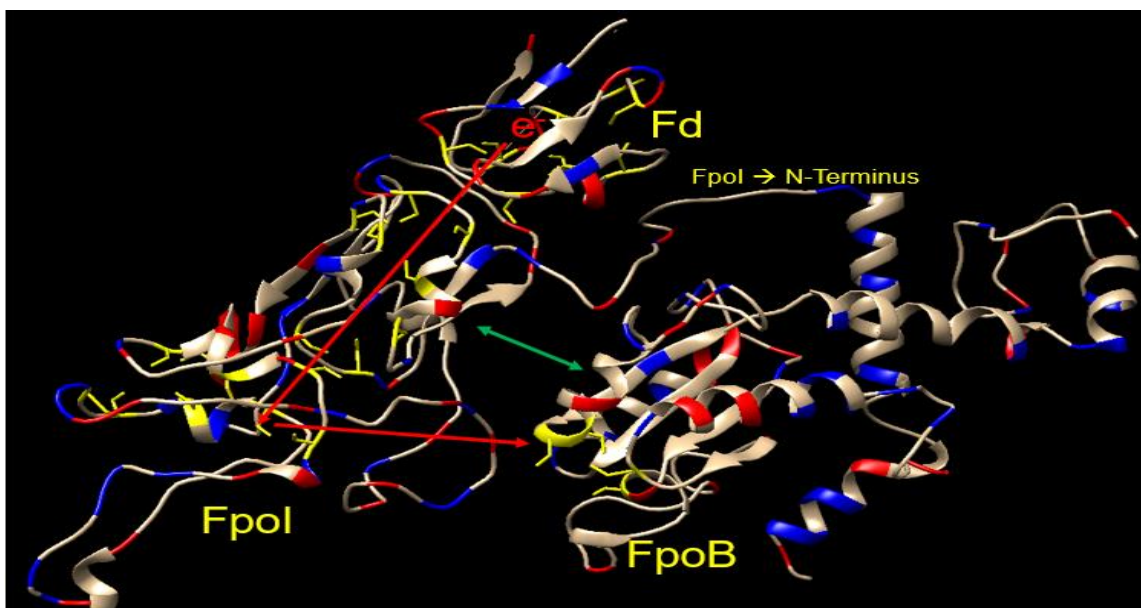


Abbildung 48: ClusPro-Modell der Interaktion zwischen Ferredoxin (Fd / WP_019177167.1), Fpol (WP_019176178.1) und FpoB (WP_019176182.1) aus *Mmc. luminyensis*. Der putative Elektronenfluss ist mit roten Pfeilen dargestellt und könnte durch eine Annäherung (Grüner Pfeil) des N-Terminus von Fpol an den kompakteren Bereich des Proteins ermöglicht werden, welche auf einer Konformationsänderung nach Bindung von FpoB beruht. Das [FeS]-Cluster von FpoB rückt damit in eine geeignete Elektronentransferdistanz zu den [FeS]-Clustern von Fpol. Blau: Positiv-geladene Aminosäuren; Rot: negativ-geladene Aminosäuren; Gelb: Cysteinreste.

Die Analyse einer weiteren Interaktion des Komplexes aus FpoI und FpoB mit FpoD war problematisch, da *Mmc. luminyensis* auf Grundlage der Untersuchungen von Becker et al. (2016) keine Atmungskettenchinone oder Methanophenazin in den Membranen enthielt und damit kein Elektronenakzeptor für die Elektronen aus FpoB in FpoD vorhanden ist. Ein direkter Elektronentransport auf HdrD konnte zudem ebenso nicht ausgeschlossen werden. Daher erfolgte eine bioinformatische Analyse von FpoD als Einzeluntereinheit. HdrD wurde schon von Kröninger (2018) bioinformatisch untersucht, wobei das Protein vier [4Fe4S]-Cluster enthält. Zwei der Cluster sind in sogenannten CCG-Domänen lokalisiert und stellen besondere non-kubane [4Fe-4S]-Cluster dar, die jeweils aus einem fusionierten [3Fe-4S]-Cluster und [2Fe-2S]-Cluster bestehen. Der Aufbau der Cluster wurde von Wagner et al. (2017) mittels Kristallstrukturanalysen der löslichen Heterodisulfidreduktase HdrABC aufgeklärt.

3.3.1.6 Bioinformatische Analyse von FpoD

Da der „kopfloose“ Fpo-Komplex aus *Mmc. luminyensis*, wie von Lang et al. (2015) und Kröninger et al. (2016) postuliert, in Kombination mit HdrD eine Ferredoxin:Heterodisulfid-Oxidoreduktase darstellt, ergibt sich die Frage nach der Interaktionsstelle des Komplexes mit der Heterodisulfid-Reduktase HdrD. Der von Baradaran et al. (2013) für Komplex 1 aus *E. coli*, auf Grundlage einer Kristallstruktur, verifizierte Elektronenfluss, führt wie beschrieben über die [FeS]-Cluster in NuoI und das [FeS]-Cluster in NuoB bis hin zum Chinon in der Chinon-Bindetasche in NuoD. Der Chinonkopf befindet sich während der Bindung im Protein etwa 20-30 Ångström von der Membran entfernt und spielt eine zentrale Rolle bei der Translokation der Protonen durch den Komplex, da Veränderungen in seinem Redoxzustand einhergehend mit Ladungsveränderungen, zu den entscheidenden Konformationsänderungen führen, welche die Protonentranslokation durch die membranständigen Untereinheiten des Komplexes ermöglichen (Baradaran et al., 2013). Bei der Übertragung der Elektronen des [FeS]-Clusters von NuoB (in unmittelbarer Nähe zur Chinonbindetasche) auf Chinon wird aufgrund der Unterschiede der Redoxpotentiale deutlich mehr Energie frei, als bei der Übertragung von [FeS]-Cluster auf [FeS]-Cluster zuvor, sodass die Konformationsänderung des gesamten Komplexes auf dieser Grundlage initiiert werden kann. Diese beruht zentral auf der Bewegung einer α -Helix (Bestandteil von NuoL), welche die membranassoziierten Untereinheiten horizontal durch die Membran verbindet (Baradaran et al., 2013). Jüngst wurde die Schlüsselrolle der Bindung des Chinons auf Grundlage von Kristallstrukturen und Untersuchungen durch Kryo-Elektronenmikroskopie des Komplexes I von *Thermus thermophilus* aufgeklärt. Dabei wurde deutlich, dass die Bindung des Chinons die Konformation des Komplexes dramatisch verändert und eine Translokation von Protonen überhaupt erst ermöglicht (Gutiérrez-Fernández et al., 2020). Dies wirft Fragen hinsichtlich des Prozesses der Elektronenübertragung für den Fpo-Komplex von *Mmc. luminyensis* auf. Untersuchungen von Becker et al. (2016) zeigten, dass dem Organismus

Atmungskettenchinone oder funktionelle Analoga wie Methanophenazin fehlen. Letzteres ersetzt Chinon funktionell in den Membranen von *Methanosarcina* spp. und *Methanothrix* spp., welche ebenso Fpo-Komplexe besitzen. In beiden Spezies überträgt der Fpo-Komplex die Elektronen auf Methanophenazin, auch wenn jeweils andere Elektronendonatoren ($F_{420}H_2$ bzw. $F_{d_{red}}$) vorliegen (Welte & Deppenmeier, 2014). Auf dieser Grundlage stellt sich die Frage, wie die Elektronenübertragung vom Fpo-Komplex auf HdrD in *Mmc. luminyensis* geschieht und wie diese genutzt werden kann, um Konformationsänderungen herbeizuführen die schließlich zur Protonentranslokation führen. Die zentralen Konformationsänderungen in NuoD/FpoD, welche normalerweise durch die Reduktion des Chinons/Methanophenazins entstehen, müssen in irgendeiner Form ersetzt werden. Rein bioinformatisch und ohne Kristallstruktur ist die Aussagekraft möglicher Ergebnisse vermutlich begrenzt. Einführende Analysen und eine bioinformatische Betrachtung von FpoD, könnten jedoch Hinweise auf die biochemische Rolle geben und werden daher im Folgenden ausgeführt.

In Abbildung 49 ist ein Alignment der Aminosäuresequenzen von FpoD/NuoD aus drei verschiedenen Spezies dargestellt. Dabei wurde *T. thermophilus* repräsentativ für Organismen mit Chinonen und *Ms. mazei* repräsentativ für methanogene Archaeen mit Methanophenazin verwendet. Die Sequenz von *Mmc. luminyensis* steht repräsentativ für die Ordnung der Methanomassiliicoccales. Untersuchungen von Becker et al. (2016) zeigten wie zuvor beschrieben, dass in *Mmc. luminyensis* beide genannten membranlöslichen Elektronenüberträger fehlen. Die zentralen Aminosäuren für die Bindung des hydrophilen Chinonkopfes, welche auf Grundlage von Kristallstrukturen (Komplex I, *T. thermophilus*) von Baradaran et al. (2013) sehr genau identifiziert werden konnten, sind dem Alignment zu entnehmen. Da NuoD von *E. coli* mit NuoC fusioniert vorliegt wurde an dieser Stelle NuoD aus *T. thermophilus* als Grundlage für das Alignment in Abbildung 49 verwendet, wobei die entscheidenden Aminosäuren für die Chinonbindung ebenso in der Untereinheit von *E. coli* vorliegen. Dabei handelt es sich insbesondere um einen Tyrosin-Rest und einen Histidin-Rest, welche jeweils Wasserstoffbrückenbindungen zu den beiden Ketogruppen des Chinonkopfes ausbilden. Eine weitere hochkonservierte Aminosäure stellt ein Aspartat dar, welches das genannte Histidin für die Bildung der Wasserstoffbrückenbindung in die richtige Orientierung bringt (Baradaran et al., 2013). Alle drei Aminosäuren sind wie bereits angemerkt in *T. thermophilus* konserviert, wobei in *Ms. mazei* erwartungsgemäß nur noch einer der Reste (Tyrosin) konserviert vorliegt, da Methanophenazin im Vergleich zu Chinonen eine deutlich größere Struktur aufweist (Abbildung 50). Methanophenazin enthält ein Drei-Ring-System, wohingegen Chinone Ein- oder zwei Ring-Systeme besitzen. Generell ist anzunehmen, dass weitere Aminosäuren an der Bindung beteiligt sind, als der konservierte Tyrosin-Rest und ähnliche Konformationsänderungen wie im Falle des Komplexes mit Chinon ermöglichen. In *Mmc. luminyensis* hingegen sind überraschenderweise alle drei an der Chinonbindung

beteiligten Reste konserviert, obwohl die Membranen des Organismus frei von Atmungskettenchinonen sind (Becker et al., 2016). Der Vergleich der FpoD Sequenzen aus weiteren Vertretern der Methanomassiliicoccales in Form von *Candidatus Methanomassiliicoccus intestinalis* und *Candidatus Methanomethylophilus alvus* (Alignment nicht dargestellt), zeigte, dass auch in weiteren Vertretern der Ordnung alle drei Reste hochkonserviert vorliegen. Den Abbildungen 51 und 52 ist außerdem die Struktur von FpoD aus *Mmc. luminyensis* auf Grundlage der Phyre2 Modulation zu entnehmen. Auch dort sind die drei genannten Aminosäuren markiert, welche im Falle von NuoD in *E. coli* oder *T. thermophilus* und weiteren Chinon-enthaltenden Organismen ein entsprechendes Chinon binden. Potentiell sind die drei Aminosäuren in *Mmc. luminyensis* konserviert, da wie beschrieben Konformationsänderungen der Aminosäuren in der Chinonbindetasche die Translokation von Protonen im membrangebundenen Teil des Fpo-Komplexes ermöglichen. Die konservierten Aminosäuren könnten dabei auch ohne gebundenes Chinon eine Rolle spielen, wobei die Ergebnisse von Gutiérrez-Fernández et al. (2020) dagegensprechen und eine Chinonbindung bzw. die eines Analogons als obligat für die entscheidenden Konformationsänderungen ansehen. Einige Gene, die für Proteine für die Biosynthese des Ubichinons kodieren, sind auch im Genom von *Mmc. luminyensis* zu finden, wobei der Biosyntheseweg unvollständig ist. Ein Biosyntheseweg für Menachinon fehlt vollständig. Möglicherweise übernimmt die Rolle des Chinons eine unbekannte Substanz, oder die Bindung von HdrD verursacht die entscheidenden Konformationsänderungen. Einige Möglichkeiten werden unter 4.5.2 diskutiert.

<i>Ms. mazei</i>	-----MEEMLESNEMIVHLGPOHPMPGPFRLNLKLGKETIMDAEVEMG	44
<i>T. thermophilus</i>	MREEFLEEIPLDAPPEEAKELRTEVMTLVNVPQHPSTLGLVRLMVTLSGEEVLEVVPHIG	60
<i>Mmc. luminyensis</i>	-----MPEMWINMGPQHPMTLGLWNLRVKVDGETITGSEPVIG	38
	* :::***** * .* :.:.*. * : * : *	
<i>Ms. mazei</i>	YIHKGIEKILENRTYLQGITIVDRICLVALTNEECYVGCVEKLLDIEPPERAQYIRVIL	104
<i>T. thermophilus</i>	YLHTGFYEKTMEYRQNYLQNIYTPRMDLHSFAHDLAYALAVEKLVGAVVPPRAETIRVIL	120
<i>Mmc. luminyensis</i>	YLHRGWVKMVENRTYPIIPLADRLCGSSFTWVSHVYCLAEDLMGVEVPERAKYIRVIS	98
	. * * * : * * * * * * . * : * : * . * . * . * . * * * : * * * *	
<i>Ms. mazei</i>	EELSRLQSHLLGLGEYGEFVGFVSMFYTIKEREDILTLDIMVTGARVTHSYLRFGGVDR	164
<i>T. thermophilus</i>	NELSRASHLVFLGTGLLGLALTFFFYAFRERETILDFEWVTGQRFHHNYIRIGGVKE	180
<i>Mmc. luminyensis</i>	DELQIRIGSHLMWLAAGTGLGNLTLFLYAMRERELFLDLFTELCGARMTTNYPRIGGVNR	158
	. * . * . : * * . * . * : * : * : * : * * * * * * : * * . * * : * * * * : *	
<i>Ms. mazei</i>	DLPEGFKEKTIPLVNLKLVKIRDYEEFMFSDTIYRERTIGIGVLTADEAKSLGVSGPVLK	224
<i>T. thermophilus</i>	DLPEEFVPELKKLLDVLPHRIDEYEALFAESPIFYERARGVGVIPPEVAIDLGLTGGSLLR	240
<i>Mmc. luminyensis</i>	DAPADFEKHVLKILDYFEKRMVEYEDLVDRNPIFRMRMDGLSYLKPQDAINLVAGPSLR	218
	* * * . * : * : * : * : * * : * : * : * * * : * * * * * * *	
<i>Ms. mazei</i>	ATGVVFDIRKNEPYLVYRDLDFKVCCTETAGDCFARVQVRLNEMRESIYIIEQCLDMIPN-	283
<i>T. thermophilus</i>	ASGVNYDVRKAYPYSGYETYTDFVPLGERGDVFDRLVRIEMRESVKIIEQALERLEP-	299
<i>Mmc. luminyensis</i>	GSGVKYDIRYNHPYEIYDELEWNMCTRDECDVYARYVRVMDMRMSCQIVRDAFKKMPKS	278
	. * * : * * * * * * : * : * : * * * * * * * : * * * * : *	
<i>Ms. mazei</i>	GPIFPEGTP-----YGKRTPVMRVPAGEVFHVRVEDPRGEMGMVMVS	324
<i>T. thermophilus</i>	GPVRDNPQITPPPRHLLETSMEAVIYHFKHYTEGFHPPKGEVYVPTESARGELGYIYVS	359
<i>Mmc. luminyensis</i>	GPIRVKPPR-----NAPVGTGFARLEDPRGESLVYIIG	311
	* * : * * : *	
<i>Ms. mazei</i>	DGSDRPYRVKVRGPFYPTLQALPPLIIGTTVADMVSISSMDGCTSEVDR	374
<i>T. thermophilus</i>	DGGSMPYRVKVRAPSFVNLQSLPYACKGEQVPMVAIIASLDVPMGDVDR	409
<i>Mmc. luminyensis</i>	DGTDKPSRVKVRSPFFVTLAAPVLMNGNKVADVPSIMGMLDVCMGETDR	361
	* * . * * * * * . * : * . : * * * * * : * * * * : * . : * * . * * * *	

Abbildung 49: Alignment von FpoD/NuoD aus drei verschiedenen Spezies. Grün markiert sind die Reste, welche in Organismen deren Komplex I die Elektronen auf Chinon überträgt für die Bindung des Chinons zentral sind und hochkonserviert vorliegen (Baradaran et al., 2013). *T. thermophilus*: WP_014630201.1; *Ms. mazei*: AAF65734.1; *Mmc. luminyensis*: WP_019176180.1.

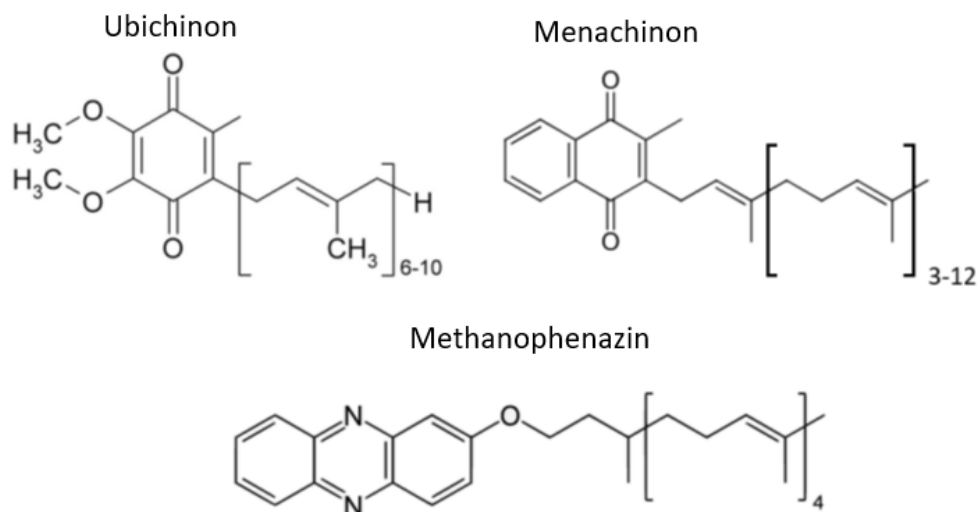


Abbildung 50: Strukturformeln der membranlöslichen Elektronenüberträger Ubichinon, Menachinon und Methanophenazin.

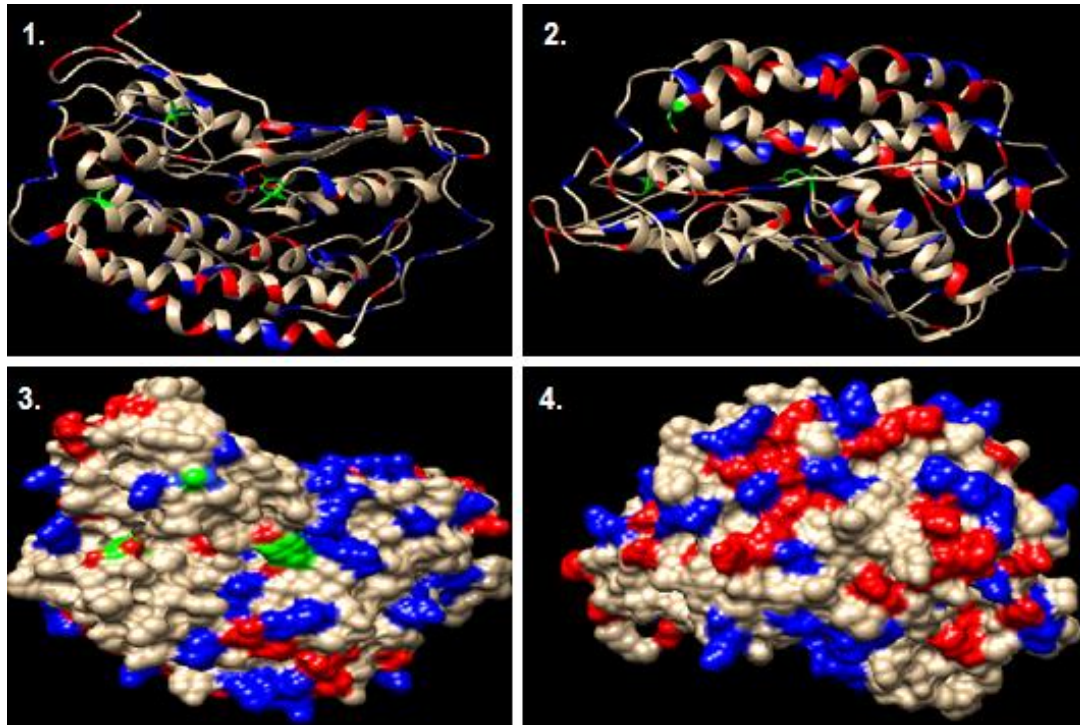


Abbildung 51: Phyre2-Modelle von FpoD (WP_019176180.1) aus *Mmc. luminyensis* (Bänderstruktur (1., 2.) und Oberflächenstruktur (3., 4.) in verschiedenen Ansichten. Blau: Positiv-geladene Aminosäuren; Rot: negativ-geladene Aminosäuren; Grün: Konservierte Aminosäuren für Chinonbindung in Organismen mit NADH:Chinon-Oxidoreduktase nach Baradaran et al. (2013).

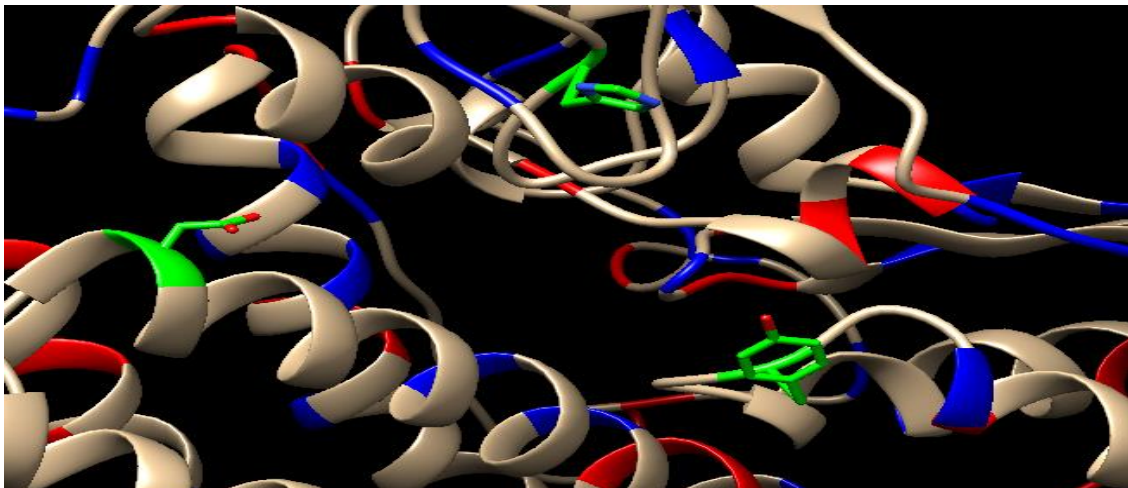


Abbildung 52: Ausschnitt von FpoD (WP_019176180.1) aus *Mmc. luminyensis*. In grün markiert, sind jene Aminosäuren (Aspartat, Histidin und Tyrosin), welche in Organismen mit NADH:Chinon-Oxidoreduktase, wie *E. coli* oder *T. thermophilus*, zentral für die Bindung des redoxaktiven Anteils des Chinons sind und nach Reduktion des Chinons an Konformationsänderungen beteiligt sind, welche im membrangebundenen Teil des Nuo-Komplexes letztlich zur Protonentranslokation führen (Baradaran et al., 2013). Die Stickstoffatome des Histidins sind außerdem blau und die Sauerstoffatome von Aspartat und Tyrosin rot markiert. Das Grundgerüst des Proteins ist in grau dargestellt. Blau: Positiv-geladene Aminosäuren; Rot: negativ-geladene Aminosäuren.

Detaillierte Aussagen der möglichen Interaktion von FpoD mit HdrD sind rein auf Basis bioinformatischer Analysen nicht durchführbar, da auch eine Interaktion von HdrD mit FpoI und

FpoB nicht ausgeschlossen werden kann. HdrD wurde wie bereits eingeführt biochemisch charakterisiert und die Rolle im Elektronentransportsystem in den Membranen von *Mmc. luminyensis* bestätigt (Kröniger et al., 2016; Kröniger, 2018; Kröniger et al, 2019). Detaillierte biochemische Analysen zum exakten Interaktionspartner und Interaktionsort fehlen jedoch bislang. Die beschriebenen Schwierigkeiten bei Interaktionsanalysen liegen in der vermutlich recht schwachen Interaktion von HdrD mit dem Fpo-Komplex oder einer bislang unbekanntem Membrankomponente.

3.3.2 Biochemische Untersuchungen zur Rolle des Fpo-Komplexes im Fd_{red}:Heterodisulfid Oxidoreduktase-System in den Membranen von *Mmc. luminyensis*

Die Rolle von Ferredoxin als Elektronendonator und HdrD als Elektronenakzeptor des kopflosen Fpo-Komplexes von *Mmc. luminyensis* wurde bereits von Kröniger et al. (2019) analysiert. Dabei wurden Membranpräparationen des Organismus für Versuche mit Ferredoxin als Elektronendonator und Heterodisulfid als Elektronenakzeptor genutzt. Der Elektronenfluss konnte in dem Zuge in verschiedenen Versuchsansätzen bestätigt werden, wobei jedoch kein spezifischer Nachweis der Interaktion des Fpo-Komplexes mit Ferredoxin oder HdrD erbracht wurde. Eine schwache Interaktion von Ferredoxin und HdrD mit dem Fpo-Komplex ist jedoch anzunehmen, da den Membranpräparationen zusätzlich heterolog produziertes Ferredoxin und HdrD zugesetzt werden musste, um eine Aktivität zu erzielen. Beide Proteine liegen nach der Membranpräparation in der cytoplasmatischen Fraktion vor (Kröniger, 2018). Da das Subkompartiment FpoBCDI des Fpo-Komplexes wie bereits eingeführt auch nur membranassoziiert, aber nicht membranintegral vorliegt und ein Verlust bei der Membranpräparation nicht ausgeschlossen werden kann, war es zunächst wichtig zu verifizieren, dass die genannten Untereinheiten in den Membranpräparationen enthalten sind. Dies würde untermauern, dass das von Kröniger (2018) identifizierte Fd_{red}:Heterodisulfid Oxidoreduktase-System in den Membranen von *Mmc. luminyensis* zentral vom Fpo-Komplex abhängig ist und keine unspezifische Reaktion vorliegt. Da kein einfacher Aktivitätstest zum Nachweis der Fpo-Subkompartimente existiert, war die Produktion spezifischer Antikörper gegen mindestens eine der löslichen Untereinheiten nötig, um einen eindeutigen Nachweis des Vorliegens des löslichen Anteils des Komplexes in den Membranpräparationen zu führen. Zur Produktion von Antikörpern, war es zunächst von großer Bedeutung die löslichen Untereinheiten heterolog zu produzieren, um Material für die Immunisierung eines Kaninchens zu erlangen. Die heterolog produzierten Untereinheiten könnten zudem detailliertere Analysen zur Protein-Protein-Interaktion zwischen den verschiedenen Peptiden erlauben.

3.3.2.1 Produktionsversuche der Fpo-Proteine in *Escherichia coli*

Die Gene der membranassoziierten Untereinheiten des Fpo-Komplexes von *Mmc. luminyensis* in Form von *fpoB*, *fpoC*, *fpoD* und *fpoI* wurden in Expressionsvektoren für die heterologe

Produktion in *E. coli* eingebracht. Dabei wurden generell der pASK3 und pASK5-Vektor genutzt. Beide Plasmide erlaubten eine induzierbare Genexpression unter Kontrolle des *tet*-Promotors und unterschieden sich in der Lage der Gensequenz welche jeweils für einen C (pASK3)- oder N (pASK5)-terminalen Strep-Tag kodierte. Nach Klonierung der entsprechenden Vektoren mit den jeweiligen Genen für die genannten Proteine erfolgten Produktionsversuche in *Escherichia coli* DH5 α , *E. coli* BL21 und *E. coli* BL21 Δ *iscR*. Die beiden letztgenannten Stämme sind genetisch so verändert, dass optimale Bedingungen für die Proteinproduktion vorliegen. Im Falle von *E. coli* BL21 Δ *iscR* ist außerdem ein Regulator-Gen deletiert, dessen Genprodukt die Expression von Genen, welche Proteine für die Biogenese von [FeS]-Clustern kodieren, reguliert (Schwartz et al., 2001). Die Deletion des Genes führt zur vermehrten Produktion der [FeS]-Cluster Biogenese Proteine und damit zu einer vermeintlich besseren Beladung von produzierten Proteinen mit [FeS]-Clustern, was im Falle von FpoI und FpoB eine Rolle spielen könnte, da diese vier bzw. ein [4Fe4S]-Cluster enthalten. Die Produktion der Fpo-Proteine wurde zunächst in *E. coli* DH5 α und *E. coli* BL21 durchgeführt, wobei die Induktion mit dem Induktor AHT bei einer OD von etwa 0,5 erfolgte. Nach der Induktion wurden die Kulturen bei 16°C, 30°C oder 37°C inkubiert und nach 4 Stunden bzw. nach Inkubation über Nacht (16°C) geerntet. In allen Fällen erfolgte eine Aufreinigung der Proteine aus dem geklärten Zelllysats mittels Streptactin-Affinitätschromatographie, wobei in keinem Fall eine erfolgreiche Produktion dokumentiert werden konnte. Auch die Produktion in *E. coli* BL21 Δ *iscR* unter anoxischen Bedingungen gelang bei verschiedenen Inkubationszeiten und Inkubationstemperaturen (16°C/37°C) nicht. In allen Fällen konnten mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung bzw. Western Blot und Detektion der Proteine mit Strep-Tag mittels Streptactin-HRP-Konjugat keine Produkte nachgewiesen werden. Auch die unlösliche Fraktion in Form des Pellets nach der Zentrifugation des Zell-Lysats wurde analog zur löslichen Fraktion bzw. den Elutionsfraktionen aus der Strep-Tactin-Affinitätschromatographie mittels SDS-PAGE und Western-Blot untersucht, wobei ebenso in allen Fällen kein gewünschtes Protein detektiert werden konnte.

Da die Proteine für die Produktion von spezifischen Antikörpern genutzt werden sollten war es ausreichend nur Anteile des gewünschten Proteins zu produzieren. Antikörper gegen ein Teilstück des Proteins könnten ebenso zur Detektion des Gesamtproteins genutzt werden. Daher wurden in einem weiteren Versuch nur Teilsequenzen der vier *fpo*-Gene in den pASK5-Vektor kloniert, um die Produktion von kleineren Fragmenten der Proteine (5-25 kDa) zu testen. Auch in diesem Fall gelang die Produktion in allen zuvor genannten Stämmen und unter den genannten verschiedenen Bedingungen nicht. Sowohl in der löslichen als auch unlöslichen Fraktion konnte keines der gewünschten Peptide nachgewiesen werden.

Da in allen Ansätzen auch keine unlöslichen Produkte detektiert werden konnten, war eine Co-Expression der gewünschten Gene gemeinsam mit Vektoren welche zusätzlich Chaperone

kodierten zwar wenig erfolgversprechend, wurde jedoch untersucht. So wurde die Produktion der genannten Proteine in *E. coli* BL21 und *E. coli* BL21 Δ *iscR* getestet, wobei die Stämme zusätzlich das pG-KJE8 Plasmid enthielten, welches die Co-Expression des GroEL-GroES Chaperonsystems und des DnaK-DnaJ-GrpE Chaperonsystems unter der Kontrolle eines Tetrazyklin bzw. Arabinose induzierbaren Promotors ermöglichte (Nishihara et al., 2000). Daneben wurden die pASK-Plasmide mit den gewünschten Genen eingebracht. Auch in diesen Fällen konnte sowohl in der löslichen als auch unlöslichen Fraktion keinerlei Produkt in SDS-PAGE und Westernblot (Strep-tag) detektiert werden.

Die gescheiterten Produktionsversuche und der Fakt, dass auch kein unlösliches Protein vorlag, könnten für einen Abbau der gewünschten Proteine durch Proteasen im Cytoplasma von *E. coli* sprechen. Eine weitere Möglichkeit zur erfolgreichen Produktion der Fpo-Proteine wurde daher in der periplasmatischen Translokation der produzierten Peptide gesehen, um einem potentiellen proteolytischen Abbau der gewünschten Proteine im Cytoplasma zu umgehen. Die Proteine (FpoB, FpoC, FpoD und FpoI) wurden dazu mit dem N-terminalen Signalpeptid *pelB* versehen, welches natürlicherweise zur Pektatlyase aus *Erwinia carotovora* gehört. Durch die Einbringung der Gensequenzen in den pBBR1_*pelB*_streplong-Vektor erfolgte die Fusion mit der für das Signalpeptid kodierenden Sequenz. Das Plasmid war so konstruiert, dass die eingebrachten Gene, mit der Sequenz für einen C-terminalen Strep-Tag und das genannte N-terminale Signalpeptid fusioniert wurden (Zeiser et al., 2014). Das 22 Aminosäuren lange Signalpeptid erlaubt in *E. coli* generell die Sec-abhängige Translokation von Proteinsequenzen in das Periplasma. Das Signalpeptid wird außerdem nach der Translokation an einer Erkennungssequenz vom restlichen Protein abgespalten (Choi & Lee, 2004). Die Expression der eingebrachten Sequenz stand im genutzten Vektor unter der Kontrolle von *p264*, einem Promotor einer ribosomalen Untereinheit aus *Gluconobacter oxydans* (Kallnik et al., 2010), der jedoch auch für die Expression in *E. coli* verwendet werden kann (Zeiser et al., 2014). Da der Promotor konstitutiv aktiv ist, bedurfte es keiner weiteren Induktion. Nach der erfolgreichen Einbringung von *fpoB*, *fpoC*, *fpoD* und *fpoI* in den beschriebenen Vektor, erfolgten Produktionsversuche bei 16°C und 30°C für 10- 24 Stunden. Im Anschluss wurden die Zellen wie in den Produktionsversuchen zuvor mittels Ultraschalls lysiert und vom geklärten Lysat wurde eine Strep-Tactin-Affinitätschromatographie durchgeführt. Auch in diesem Fall konnte bei der Analyse durch SDS-PAGE sowie anschließende Silberfärbung und Western-Blot keinerlei Produkt detektiert werden.

Anzumerken ist, dass sich auch die Codon-Nutzung in *E. coli* im Vergleich zum Archaeon *Mmc. luminyensis* als problematisch darstellen könnte. Dies hat aber in den bislang bekannten Fällen der Produktion von Proteinen aus Archaea in *E. coli* nicht zum totalen Ausfall der Produktausbeute geführt. So finden sich in der Literatur viele Beispiele, wobei durch entsprechende Verbesserungen in *E. coli* Stämmen mit Plasmiden, welche für seltene Codons

kodieren nur eine Steigerung der Produktion erzielt wurde. Auch ohne Codon-optimierte Stämme konnte das gewünschte Protein erfolgreich produziert werden. (Kim & Lee, 2006; Tegel et al., 2010). Ebenso wurde bereits gezeigt, dass die Produktion von Proteinen wie HdrD und Ferredoxin aus *Mmc. luminyensis*, generell in *E. coli* möglich ist, obwohl diese in *E. coli* seltene Codons enthalten (Kröninger, 2018). Daher kann die Codon-Nutzung nicht als grundlegendes Problem angesehen werden.

Letztlich wurden die Produktionsversuche in *E. coli* verworfen, da die Produktion der gewünschten Proteine aus unbekanntem Gründen nicht gelang.

3.3.2.2 Produktionsversuche in *Pichia pastoris* (*P. pastoris*)

Um eine Produktion der gewünschten Fpo-Proteine trotz der gescheiterten Versuche in *E. coli* dennoch zu ermöglichen, wurde außerdem *Pichia pastoris* als Produktionsorganismus ausgewählt. Die methylophile Hefe besitzt viele, für die Proteinproduktion herausragende, Eigenschaften. Dazu gehören vor allem das Erreichen von hohen Zelldichten (Demain & Veishnav, 2009), Ausbeuten von bis zu 10 mg Protein pro Liter Kultur (Werten et al., 1999; Nevalainen et al., 2005), die leichte Anzucht auf Komplexmedien und Minimalmedien und die lange Überdauerungsfähigkeit des Organismus (Demain & Veishnav, 2009). Auch die Produktion von Proteinen aus Archaeen in *P. pastoris* erzielte bereits mehrfach vielversprechende Ergebnisse und hohe Proteinausbeuten (Zappa et al., 2003; Labarre et al., 2007).

Für den Versuch wurde der pPIC9-Vektor ausgewählt, der in *E. coli* autonom replizierbar ist (ColE1-ori) und damit eine simple Klonierung erlaubt. Die Selektion erfolgte über eine durch den Vektor vermittelte Ampicillin-Resistenz. Da das Plasmid jedoch keinen Replikationsursprung enthält, der die autonome Replikation in *P. pastoris* erlaubt, musste dieser daher nach Einbringung in die Hefe in das Genom integrieren, um eine erfolgreiche Proteinproduktion zu ermöglichen. Die Selektion der erfolgreichen Genomintegration wurde auf einem Minimalmedium durchgeführt, welches kein Histidin enthielt, da der genutzte *P. pastoris*-Stamm Histidin auxotroph war. Dies lag am fehlenden *ppHIS4*-Gen, welches an der Histidinbiosynthese beteiligt ist und auf dem pPIC9-Plasmid vorliegt. Durch die Genomintegration des Plasmids war dem Stamm die Histidinbiosynthese wieder möglich, was eine effiziente Selektion erlaubte. Das Plasmid sollte im Bereich der Alkoholoxidase 1 (AOX1) im Genom integrieren, da auf dem Plasmid homologe Sequenzen dazu vorlagen. Die Expression des jeweils eingebrachten Gens stand unter der Kontrolle eines AOX1-Promotors, der eine kontrollierte Proteinproduktion ermöglichte, da der Promotor Methanol induzierbar ist. Die Zugabe von Methanol startete daher die Genexpression und damit einhergehend die Proteinproduktion. Anzumerken ist, dass die Restriktionsenzyme bei der Erstellung der pPIC9-Vektorkonstrukte so ausgewählt wurden, dass die Gensequenz, welche

für ein Signalpeptid für die extrazelluläre Translokation in *P. pastoris* kodiert entfernt wurde. Die extrazelluläre Translokation wird benötigt, wenn die gewünschten Proteine glykosyliert werden sollen. Dies war an dieser Stelle nicht der Fall. Da der pPIC9-Vektor keine Sequenz für einen Strep-tag enthielt, wurde die zugehörige Sequenz gemeinsam mit den Genen von Interesse aus den entsprechenden pASK3-Vektoren eingebracht.

Nach der erfolgreichen Einbringung des jeweiligen Plasmids mit den gewünschten *fpo*-Genen (*fpoB*, *fpoC*, *fpoD*, *fpoI*) mit Strep-tag in *Pichia pastoris* wurden Produktionsversuche mit allen vier Stämmen gestartet. Die Produktion der vier Proteine in *P. pastoris* war jedoch ebenso nicht erfolgreich und sowohl in der löslichen als auch der unlöslichen Fraktion konnte keinerlei gewünschtes Protein detektiert werden.

3.3.2.3 Synthetische Herstellung von Peptiden zur Antikörper-Produktion – Nachweise von Fpol in den Membranfraktionen von *Mmc. luminyensis*

Aufgrund der nicht erfolgreichen Produktion der gewünschten Fpo-Untereinheiten in ausreichender Menge in *E. coli* und *P. pastoris*, wurde eine weitere Strategie gewählt, um potentiell Antikörper zu erhalten. Diese wurde für Fpol angewendet, da das Protein nach aktuellem Modell der unmittelbare Elektronenakzeptor der Elektronen von Fd_{red} ist. Daher wären Antikörper zur Detektion des Proteins ein erster Schritt, um Analysen zu ermöglichen, ob das Protein tatsächlich mit Ferredoxin interagiert. Außerdem könnte wie beschrieben, der wichtige Nachweis erfolgen, dass der lösliche und membranassoziierte Teil des Fpo-Komplexes bei der Membranpräparation an den Membranen gebunden bleibt und nicht in die cytoplasmatische Fraktion übergeht.

Die an dieser Stelle genutzte Strategie sah die Identifizierung von kurzen Peptidsequenzen (10-20 Aminosäuren) des Proteins vor, welche potentiell als B-Zell-Epitop in Frage kamen. Die Peptide sollten anschließend chemisch synthetisiert und an KLH (Schlitzschnecken-Hämocyanin) gekoppelt werden. Letzteres dient der besseren Erkennung der kleinen Peptide durch das Immunsystem des Kaninchens. Die gekoppelten Peptide werden schließlich in Kaninchen injiziert, um Antikörper herzustellen. Schlussendlich besteht daraufhin die Möglichkeit, dass die gegen die Peptide gebildeten Antikörper auch zur Detektion des gesamten Proteins genutzt werden können, da diese an die entsprechenden Sequenzen binden (Geysen et al., 1985).

Von besonderer Wichtigkeit bei der Auswahl der Peptide war es, dass diese an der Oberfläche des Proteins lagen, sodass die Antikörper potentiell auch zur Detektion des nativen Fpol-Proteins genutzt werden können. Dies würde den Anwendungsbereich der Antikörper erweitern und verschiedene Analysen mit dem nativen Protein ermöglichen. Auf dieser Grundlage wurde die Tertiärstruktur des Proteins (Phyre2 Modulation, Abbildung 53) betrachtet, sowie eine Software (BcePred) genutzt, die anhand verschiedener Parameter B-

Zell-Epitope vorhersagte. Die genannte Software „BcePred“ nutzt für die Vorhersage der Epitope verschiedene Eigenschaften der Peptide. Dazu gehören die Hydrophilizität, die Polarität, die Zugänglichkeit und Oberflächen-Exponiertheit und auch die Beweglichkeit/Flexibilität der Aminosäuresequenz (Saha & Raghava, 2004). Die von der Software vorhergesagten Peptide konnten im Anschluss auf Grundlage des Phyre2-Modells validiert werden. Die Software schlug zwei 20 Aminosäuren lange Sequenzen vor, welche auf Grundlage des Phyre2-Modells auch an der Oberfläche des Proteins vorlagen. Im Organismus liegt Fpol zwar als Teil des Fpo-Komplexes vor und die Teilsequenzen könnten im nativen Zustand durch Interaktionspartner des löslichen oder membranintegralen Anteils maskiert sein, jedoch ist dies schwer vorhersehbar. Letztlich wäre allerdings ebenso schon eine Bindung der Antikörper an das denaturierte Protein ein Fortschritt. Die betreffenden Antikörper könnten für viele Untersuchungen, und vor allem zunächst für den Nachweis des löslichen Fpo-Anteils in Membranpräparationen, genutzt werden. In Absprache mit der Firma (Davids-Biotechnology, Regensburg) welche Peptidsynthese und Antikörperherstellung durchführte, wurden die Peptide wie von BcePred vorgeschlagen (Tabelle 11, Abbildung 53) verwendet, da auch die bioinformatische Vorhersage der Firma, welche hauptsächlich auf der Analyse der Hydrophilizität beruhte, ähnliche Ergebnisse lieferte.



Abbildung 53: Phyre2-Modell von Fpol aus *Mmc. luminyensis* in zwei Ansichten (1., 2.). Farblich markiert sind die beiden Peptidsequenzen welche chemisch synthetisiert und für die Antikörperproduktion genutzt wurden.

Tabelle 11: Peptidsequenzen aus Fpol von *Mmc. luminyensis*, welche chemisch synthetisiert und für die Antikörperproduktion genutzt wurden.

	Position im Gesamtprotein	Sequenz Antigen
Peptid 1	84-103	EVDDLHCEEKAPAKVKRPR
Peptid 2	212-231	VNEKGRPVKKPKFDVEKCVA

Die Antikörper gegen die beiden Peptidsequenzen in FpoI wurden schließlich jeweils aus dem Serum mittels Affinitätschromatographie von der genannten Firma aufgereinigt und zur Verfügung gestellt. Zunächst wurden die beiden Lösungen (je Antigen eine Lösung) in verschiedenen Verdünnungen getestet, wobei erkennbar wurde, dass nur bis zu einer Verdünnung von 1:100 ausreichende Signale auf dem Westernblot detektiert werden konnten. Daher wurde diese Verdünnung für die weiteren Versuche genutzt und getestet, ob FpoI und damit aller Wahrscheinlichkeit der vollständige lösliche Anteil des Fpo-Komplexes in den Membranen von *Mmc. luminyensis* vorkommen. Für die Western Blots wurden die Antikörper gegen FpoI bzw. die Teilsequenzen des Proteins als primäre Antikörper genutzt. Zur Detektion und farblichen Darstellung der Signale kam ein sekundärer Antikörper aus der Ziege zum Einsatz, welcher gegen IgG aus dem Kaninchen gerichtet und mit einer Meerrettich-Peroxidase konjugiert war (goat anti-rabbit IgG-HRP, Polyklonal, Santa-Cruz-Biotechnologie).

Dabei konnte mittels SDS-PAGE und anschließendem Westernblot von Cytoplasma- und Membran-Fraktion des Organismus gezeigt werden, dass sich FpoI vollständig in der Membran-Fraktion befand, da dort deutliche Signale für FpoI erkennbar waren. Die Analyse der cytoplasmatischen Fraktion zeigte keinerlei Signale für FpoI auf dem Westernblot (Abbildung 54). Erstens zeigten die Ergebnisse die erfolgreiche Produktion von Antikörpern, die die Detektion von FpoI in komplexen Proben ermöglichte. Zweitens erfolgte der Beweis, dass der lösliche Anteil des Fpo-Komplexes im Rahmen der Membranpräparation nicht in die cytoplasmatische Fraktion übergeht. Dies validierte die zuvor genannten Aktivitätstests von Kröninger (2018). Die Fd_{red} -Heterodisulfid Oxidoreduktaseaktivität in Membranpräparationen von *Mmc. luminyensis* ist somit mit hoher Sicherheit auf den Fpo-Komplex rückführbar, da die für den Elektronentransfer nötigen Untereinheiten vorhanden sind. Eine Analyse für FpoD, FpoB und FpoC erfolgte zwar aufgrund fehlender Antikörper nicht, jedoch ist davon auszugehen, dass die am Elektronenfluss beteiligten Peptide untereinander eine starke Interaktion zeigen. Daher ist anzunehmen, dass die Membranpräparationen den Gesamtkomplex mit allen löslichen bzw. membranassoziierten Untereinheiten enthielten. Im Falle des Komplexes I von *T. thermophilus* wurde die starke Interaktion der am Elektronentransfer beteiligten Untereinheiten (NuoBCDI) bereits nachgewiesen (Sazanov & Hinchliffe, 2006).

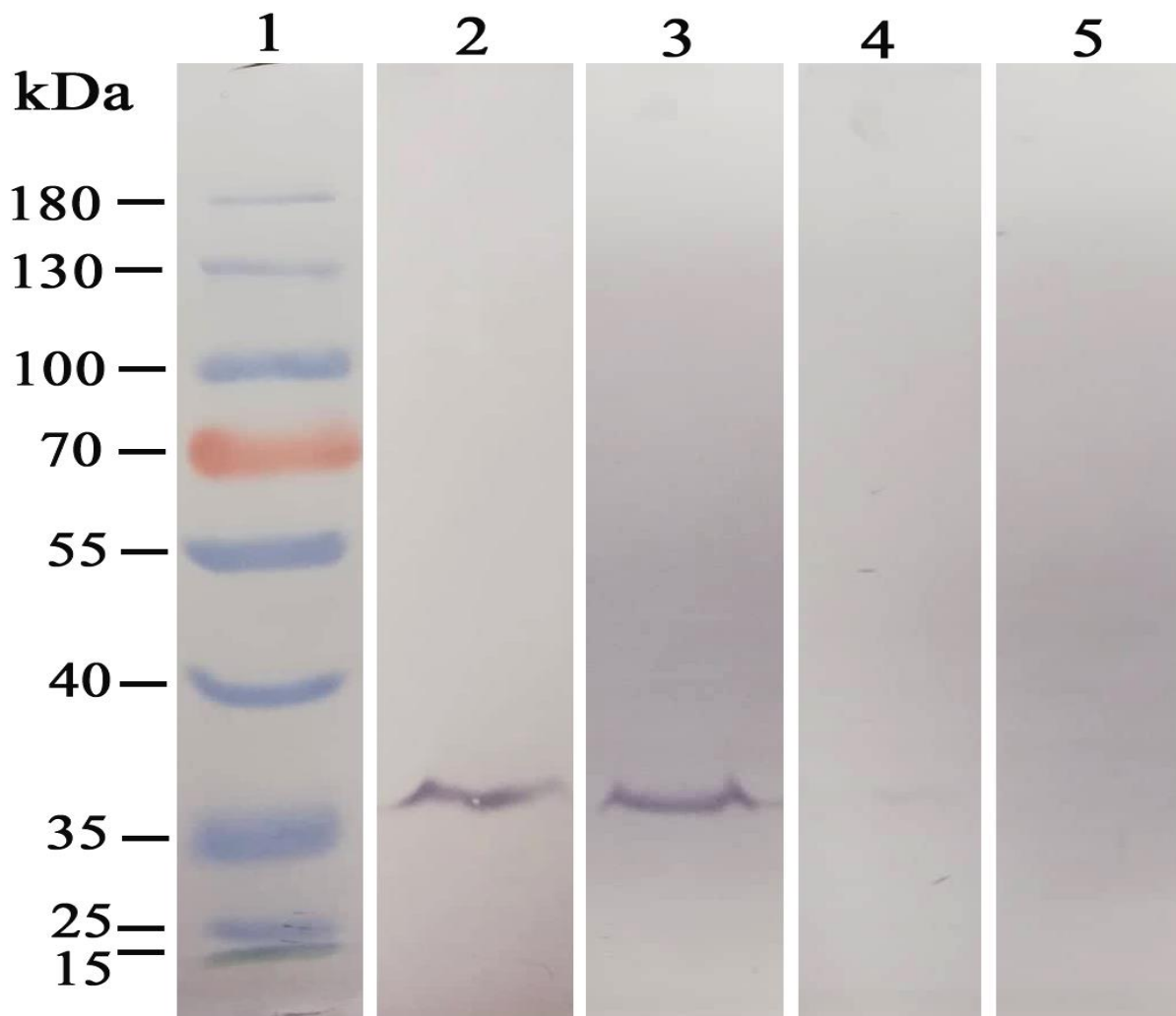


Abbildung 54: Auf SDS-PAGE folgender Western-Blot-Nachweis der Untereinheit Fpol des "kopfloren" Fpo-Komplexes in der Membranfraktion von *Mmc. luminyensis*. Spur 1: PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 bis 180 kDa (Fermentas); Spur 2+3: Membranfraktion (30 µg Protein) von *Mmc. luminyensis*; Spur: 4+5: Cytoplasma-Fraktion (30 µg Protein) von *Mmc. luminyensis*. Fpol wurde mit einem Antiserum nachgewiesen, das gegen die Oligopeptide H₂N-EVDDLHCEEKAPAKVKRPR-CONH₂ (Spur 2 + 4) bzw. H₂N-VNEKGRPVKKPKFDVEKCVA-CONH₂ (Spur 3 + 5) hergestellt wurde. Die Ergebnisse zeigten, dass Fpol als Teil des "kopfloren" Fpo-Komplexes ausschließlich in der Membranfraktion (Spur 2+ 3) zu finden ist. In der cytoplasmatischen Fraktion (Spur 4+5) wurden keine Signale von Fpol nachgewiesen (modifiziert nach Kröninger et al., 2019).

3.3.2.4 Produktion von Antikörpern gegen HdrD

Da HdrD aus *Mmc. luminyensis* unproblematisch und in großen Ausbeuten in *E. coli* BL21Δ*iscR* heterolog produzierbar war (Kröninger et al., 2016), wurde auch die Antikörperproduktion für Antikörper gegen HdrD durchgeführt. Nach Produktion und Aufreinigung des Proteins nach dem Protokoll von Kröninger (2018) wurde die Reinheit via SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung (Abbildung 55) überprüft.

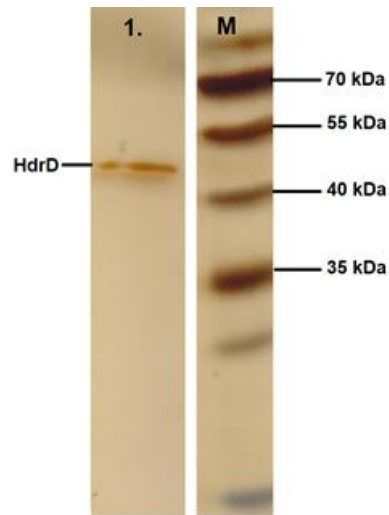


Abbildung 55: SDS-PAGE-Analyse und Detektion mittels Silberfärbung des Materials aus der heterologen Überproduktion von HdrD, welches für die Produktion von Antikörpern genutzt wurde. 1: HdrD - 5 µg; M: Prestained Protein Ladder, 10-180 kDa, Fermentas.

Da keine Verunreinigungen feststellbar waren, wurde das Material an die Firma Davids Biotechnology (Regensburg) übergeben, um die Produktion von Antikörpern in einem Kaninchen durchzuführen. Aus dem nach der Immunisierung erhaltenen Serum wurden die Antikörper gegen HdrD außerdem vom Hersteller mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die nach dem Gesamtprozess erhaltenen aufgereinigten Antikörper konnten in dieser Arbeit zur Detektion von HdrD genutzt werden. Dazu wurden SDS-PAGE Analysen mit aufgereinigtem HdrD aus einer heterologen Produktion in *E. coli*, Membran-Fraktionen und Cytoplasma-Fraktionen von *Mmc. luminyensis* durchgeführt. Nach einem anschließenden Western-Blot erfolgte die Detektion von HdrD mittels der produzierten Antikörper, welche in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt wurden. Die kolorimetrische Darstellung von HdrD auf den Westernblots wurde mittels anti-Kaninchen IgG-Antikörper aus der Ziege, welche mit einer Meerrettichperoxidase konjugiert waren, ermöglicht. In den Versuchen wurde deutlich, dass HdrD vollständig in der cytoplasmatischen Fraktion und nicht in der Membran-Fraktion von *Mmc. luminyensis* vorlag. Ein Signal von HdrD war auf dem Westernblot nur in der cytoplasmatischen Fraktion und der Kontrolle mit aufgereinigtem HdrD ersichtlich (Abbildung 56).

Dies validierte ebenso die Ergebnisse von Kröniger (2018), wobei eine Heterodisulfid-Reduktase Aktivität mit Benzylviologen als artifiziellem Elektronendonator fast ausschließlich in der cytoplasmatischen Fraktion detektiert werden konnte. In der Membranfraktion lagen marginale Aktivitäten vor. Außerdem musste zu den Aktivitätstests mit Membranen von *Mmc. luminyensis* zur Messung des Fd_{red} :Heterodisulfid Oxidoreduktase-Systems aufgereinigtes HdrD zugesetzt werden, um eine Aktivität zu erzielen. In den Membranfraktionen ist das Protein demnach nicht oder nur in äußerst geringen Mengen enthalten und daher wohl nur

schwach mit der Membran, oder dem Fpo-Komplex als postuliertem Interaktionspartner assoziiert.

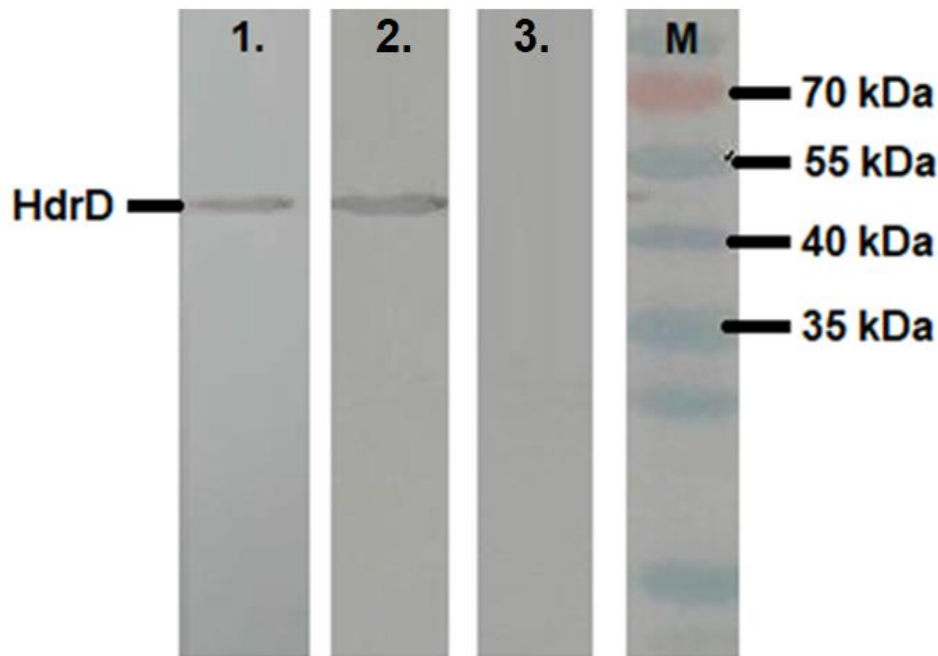


Abbildung 56: Western-Blot-Analyse von HdrD in Membranfraktionen und Cytoplasma von *Mmc. luminyensis*. Spur 1: Kontrolle - 5 µg aufgereinigtes HdrD; Spur 2: Cytoplasma (30 µg Protein) von *Mmc. luminyensis*; Spur 3; Membran-Fraktion (30 µg Protein) von *Mmc. luminyensis*; M: Marker, Prestained Protein Ladder, 10-180 kDa, Fermentas. HdrD wurde mittels eines Antiserums nachgewiesen, welches Antikörper gegen das komplette Protein enthielt (2.7.5). Die Ergebnisse zeigten, dass HdrD in der cytoplasmatischen Fraktion vorlag, da nur dort das Protein detektiert werden konnte.

3.3.2.5 Versuche des Interaktionsnachweises von HdrD und Ferredoxin mit dem Fpo-Komplex

Auf Grundlage der vorliegenden Ergebnisse und der Untersuchungen von Kröninger (2018) war davon auszugehen, dass sowohl Ferredoxin als auch HdrD eine nur schwache Interaktion mit dem Fpo-Komplex eingehen. Außerdem konnte insbesondere für HdrD nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass zwischen der Elektronenübertragung vom Fpo-Komplex auf HdrD eine zusätzliche Protein-Komponente zwischengeschaltet ist. Insgesamt stellen sich daher weiterführende Studien des Interaktionsnachweises, als schwierig dar. Schuller et al. (2019) gelang es bereits die Interaktion des „kopflosen“ Komplexes I mit Ferredoxin in Cyanobakterien nachzuweisen, wobei der genutzte Organismus in Form von *Thermosynechococcus elongatus* genetisch zugänglich war und die Aufreinigung des gesamten Komplexes mittels Strep-tag an einer Untereinheit gelang. Darauf folgende Interaktionsanalysen mit Ferredoxin zeigten eine, im Vergleich zu anderen Ferredoxin-abhängigen Enzymen, hohe Affinität des Komplexes zu Ferredoxin (Schuller et al., 2019). Anzumerken ist jedoch, dass die Interaktion im Vergleich zu anderen Protein-Protein-

Interaktionen unabhängig von Ferredoxinen eher schwach ist und Ferredoxin bei der Aufreinigung des Komplexes nicht mit aufgereinigt und für weitere Analysen artifiziell zugegeben wurde. Der Interaktionsnachweis gelang Schuller et al., (2019) mit aufgereinigten Komponenten und zeigte, dass das Protein NdhS mit einem positiv geladenen C-Terminus (5 Lysinreste) zentral an der Annäherung es Ferredoxins an den Komplex beteiligt ist. Diese Untereinheit ist jedoch spezifisch für Cyanobakterien und in „kopflösen“-Komplex I Derivaten aus anderen Organismen, wie *Mmc. luminyensis*, nicht zu finden (Details: 4.5.2).

Mmc. luminyensis ist nicht genetisch zugänglich und eine Aufreinigung des Komplexes oder dessen Untereinheiten aus dem Organismus auf klassischem Wege kam nicht in Betracht, da nur sehr geringe Biomasseerträge erreicht werden. Dies erschwerte zusammenfassend die Interaktionsanalysen mit putativ schwachen Interaktionspartnern wie HdrD und Ferredoxin. Einige Versuche wurden jedoch unternommen, wobei der Fokus auf eine schnelle Fixierung von Interaktionen durch Quervernetzungsreagenzien gelegt wurde. Durch die kovalente Verbindung zweier Proteine nach deren Annäherung können in der Theorie unter Umständen auch schwache Interaktionspartner analysiert werden. Anzumerken ist, dass in komplexen Proben wie Membranpräparationen viele interagierende Proteine vorhanden sind und die Spezifität der Interaktionsnachweise gegenüber aufgereinigten Proteinen leidet. Zunächst wurden Analysen mit Quervernetzungsreagenzien durchgeführt, welche zwei Proteine kovalent verbinden können, wenn diese eine gewisse Annäherung erreichen. Dazu wurden verschiedene Reagenzien verwendet, wobei der Fokus zunächst auf N-reaktiven Verbindungen lag, welche mit Aminosäuren mit primären Aminogruppen und dem N-Terminus von Proteinen reagieren konnten (Abbildung 57). Dazu zählten Dimethyl-Adipimidat (DMA-I, Dimethyl-Suberimidat (DMS-I) und Disuccinimidyl-Suberate (DSS-NHS). Diese enthielten verschiedene funktionelle Gruppen in Form von NHS-Estern (DSS-NHS) bzw. Imidoestern(DMA-I/DMS-I) und hatten Spacerlängen von 8,6 -11 Ångstroem, was einem kurzen bis mittleren Abstand zwischen den beiden jeweils Amino-reaktiven Gruppen bedeutete. Ebenso wurde mit EDC ein Quervernetzungsreagenz ohne Spacerabstand, welches zunächst mit Carboxylgruppen und im Anschluss mit Aminogruppen reagiert, getestet.

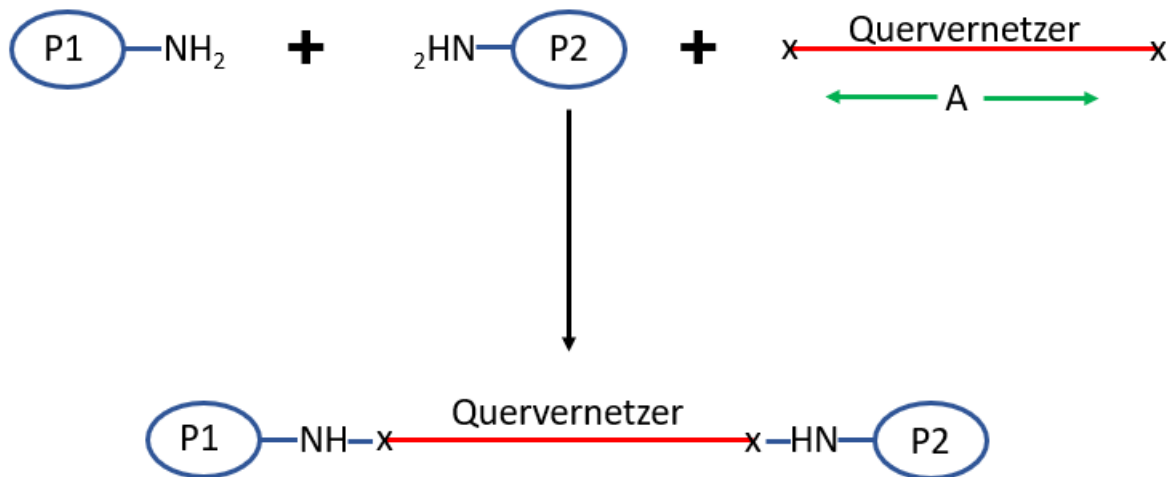


Abbildung 57: Schematische Darstellung einer Quervernetzungsreaktion. Bei der Annäherung von zwei Proteinen (P1 + P2) auf einen bestimmten Abstand, der von der Länge des Spacers (A) des Quervernetzers bestimmt wird, kommt es zur Reaktion der funktionellen Gruppen (x) des Quervernetzers mit den Aminogruppen von Proteinen. Die funktionellen Gruppen sind meist Imidoester (DMA/DMS) oder N-Hydroxysuccinimid-Ester (DSS). Ein ähnliches Schema gilt für den Quervernetzer EDC, wobei die Substanz zunächst mit einer Carboxylgruppe eines Proteins reagiert und dann die Zugabe eines zweiten Proteins erfolgt, wobei die Reaktion mit einer Aminogruppe stattfindet. In den durchgeführten Versuchen wurden HdrD oder Ferredoxin mit Membranpräparationen von *Mmc. luminyensis* inkubiert, um potentielle Interaktionspartner zu identifizieren.

In den Versuchsansätzen wurden HdrD oder Ferredoxin (Fd_{red} oder Fd_{ox}) aus *Mmc. luminyensis*, welche heterolog in *E. coli* produziert wurden, genutzt und gemeinsam mit Membranpräparationen von *Mmc. luminyensis* jeweils in solubilisierter und nicht solubilisierter Form sowie mit Cytoplasma des Organismus inkubiert. Da Ferredoxin je nach Redoxstatus unterschiedlich starke Interaktionen mit Proteinen eingeht (Cassan et al., 2005; Sétif et al., 2009; Srivastava et al., 2014) wurden alle Versuche sowohl mit reduziertem als auch oxidiertem Ferredoxin durchgeführt. Die Ansätze mit solubilisierten Membranen wurden durchgeführt, da in nicht solubilisierten Membranen Probleme mit zu vielen unspezifischen Quervernetzungen mit weiteren Proteinen auftreten könnten. Solubilierte Membranen hingegen können dazu führen, dass der Fpo-Komplex nicht mehr vollständig vorliegt und die Detergenzien zum Auftreten von Subkompartimenten des Komplexes führen. Letztlich wurden beide Ansätze getestet, um die optimalen Versuchsbedingungen zu eruieren. Die Versuche mit der cytoplasmatischen Fraktion dienten zum einen als Kontrolle und zum anderen um die Möglichkeit auszuschließen, dass HdrD mit weiteren Komponenten im Cytoplasma interagiert. Für EDC erfolgte zunächst die Inkubation mit HdrD bzw. Ferredoxin (1-5 μg in 100 μl) bei einem pH-Wert von 6,0, um die Reaktion mit der Carboxylgruppe zu ermöglichen. Im Anschluss erfolgte die Zugabe der Membran- oder Cytoplasma-Fraktionen (30 μg in 100 μl), wobei die Inkubation bei einem pH von 7,5 erfolgte, um die Reaktion mit Aminogruppen unter optimalen Bedingungen zu ermöglichen. Alle weiteren Quervernetzer wurden bei pH 8,0 genutzt und Proteine und Membranpräparationen wurden von Beginn an gemeinsam inkubiert. Die Konzentration der Quervernetzer wurde, wie vom Hersteller angegeben variiert und

bezogen auf HdrD bzw. Ferredoxin wurden Verhältnisse von einem fünf bis 500-fachen Überschuss des Quervernetzers eingesetzt. Ebenso wurde die Inkubationszeit von zwei bis 30 Minuten variiert. Kontrollansätze wurden außerdem durchgeführt in dem Quervernetzer, Membran- bzw. Cytoplasma-Fraktion oder HdrD/Fd_{red} aus den Ansätzen weggelassen wurden. Nach dem Versuch wurden die Proben mittels SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot analysiert, wobei Proteinkonjugate (HRP-Streptactin-Konjugat) gegen den Strep-tag von Ferredoxin bzw. HdrD und Antikörper gegen FpoI bzw. HdrD (3.3.2.3 / 3.3.2.4) zur Detektion der gewünschten Proteine genutzt wurden. In allen Fällen wurden keine aussagekräftigen oder unspezifische Ergebnisse erzielt, sodass der Ansatz der Quervernetzung verworfen wurde. Komplexe Proben wie Membranpräparationen, die große Enzymkomplexe enthalten und der Fakt, dass auch aufgereinigtes HdrD große Multimere bildet (Kröniger, 2018) machten eine Analyse der Proteingemische schwierig. Diese wandern in quervernetzter Form selbst in den genutzten Gradientengelen (4-20% / BioRad) nicht in das Gel ein. Eine geringere Konzentration der Reagenzien sorgte für keinerlei sichtbare Quervernetzung. Mit aufgereinigten Untereinheiten des Fpo-Komplexes als Interaktionspartner wäre die Interaktionsanalyse potentiell machbar gewesen, da unspezifische Interaktionen unwahrscheinlicher wären und klare Banden auf dem SDS-Gel mittels Massenspektrometrie analysiert werden könnten. Mit den komplexen Membranpräparationen war eine Untersuchung mittels Massenspektrometrie nicht zielführend.

Ein weiterer Ansatz lag in der Bindung von heterolog produziertem Ferredoxin respektive HdrD an einer Streptactin-Säule bzw. an einer NHS-aktivierten Sepharosesäule (VWR). Letzteres Säulenmaterial erlaubt die kovalente Bindung von Proteinen, da das Material mit Aminogruppen reagiert. Im Anschluss ist eine Affinitätschromatographie zur Suche nach Interaktionspartnern möglich. Diese können nach einem Waschschrift zur Entfernung unspezifischer Bindungspartner mit sauren oder basischen Lösungen eluiert werden. Dabei wurde darauf abgezielt, dass HdrD oder Ferredoxin kovalent an der Säule binden, was den Unterschied zu einer Streptactin-Säule darstellt (Abbildung 58). Nach der Bindung von HdrD bzw. Ferredoxin wurden, wie auch im Falle der Untersuchungen mit den Quervernetzern, jeweils solubilisierte und nicht solubilisierte Membranpräparationen sowie Cytoplasma von *Mmc. luminyensis* über die Säule gegeben. Alle weiteren Schritte erfolgten nach dem Herstellerprotokoll. Leider konnte auch in den genannten Ansätzen kein Interaktionspartner identifiziert werden. In den Versuchsansätzen eluierte entweder kein Protein (NHS-Säule) oder HdrD bzw. Ferredoxin ohne weiteres Protein (Streptactin-Säule). Dies bestätigte die Vermutung, dass die Interaktion zwischen HdrD und Ferredoxin mit dem Fpo-Komplex als vermeintlichem Interaktionspartner eher schwach ist. Der Nachweis der Interaktion ist vermutlich möglich, wenn der gesamte Komplex oder zumindest einzelne Untereinheiten

aufgereinigt werden könnten und wesentlich spezifischere Analysen wie im Falle von Schuller et al. (2019) in Cyanobakterien möglich wären.

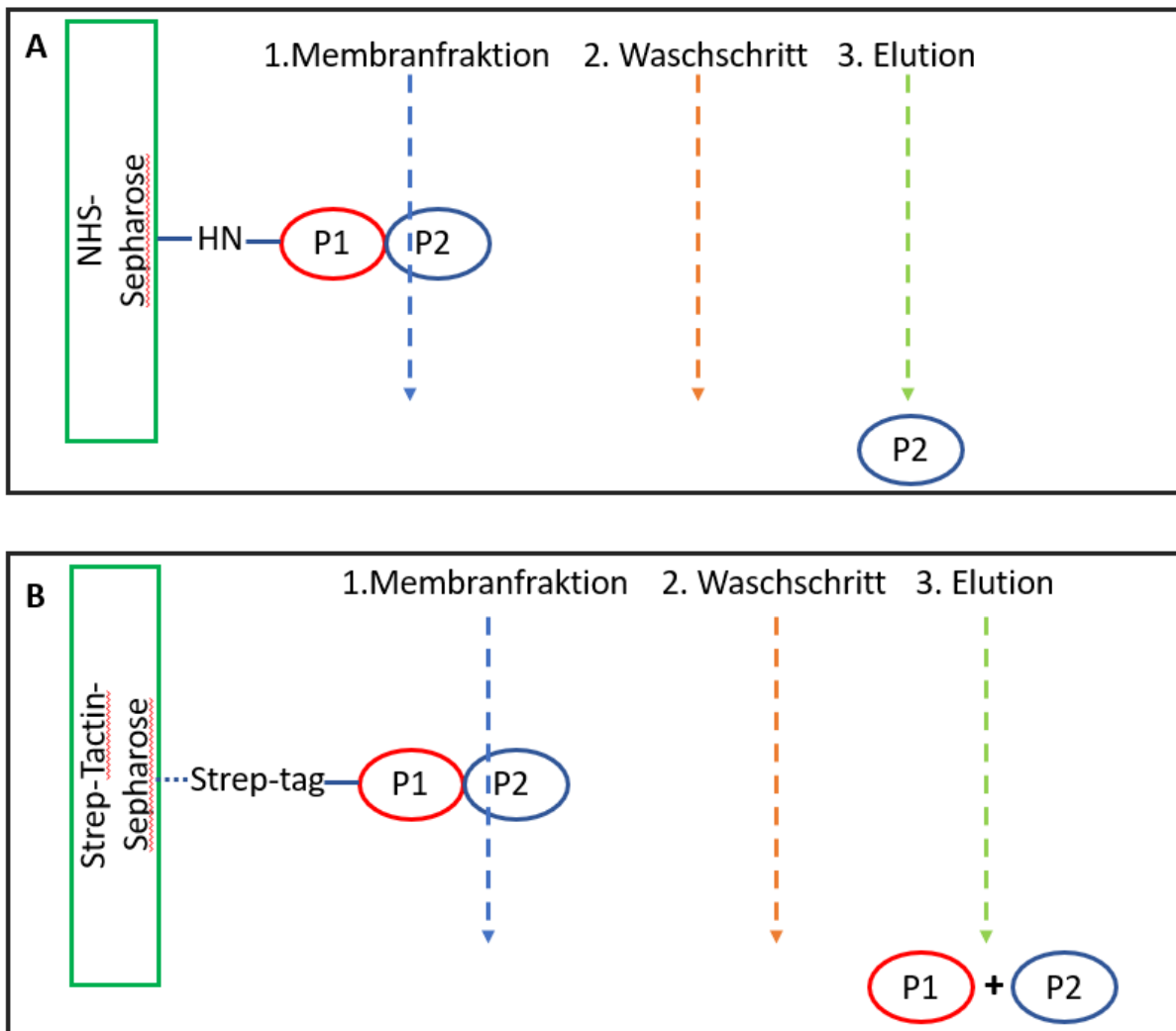


Abbildung 58: Schematische Darstellung der Versuchsansätze zur Analyse der Interaktion von HdrD oder Ferredoxin (P1) mit einer Komponente in den Membranfraktionen von *Mmc. luminyensis*, wie dem Fpo-Komplex bzw. dessen Untereinheiten (P2). Nach der Zugabe der Membranfraktionen, erfolgte ein Waschschrift und schließlich die Elution. Im Falle der Ansätze mit NHS-Ester (A) eluiert nur P2, da P1 für den Versuch kovalent an die Säule gebunden wird. Im Falle der Strep-Tactin-Sepharose-Säule eluieren sowohl P1 und P2, da keine kovalente Bindung zur Säule vorliegt.

Zusammenfassend konnte nachgewiesen werden, dass der membranassoziierte Anteil des Fpo-Komplexes auch nach der Membranpräparation am membranintegralen Kompartiment des Komplexes gebunden bleibt (3.3.2.3), was die Bedeutung der Aktivitätstests von Kröninger (2018) untermauerte. Die Ferredoxin:Heterodisulfid Oxidoreduktase-Aktivität des Organismus ist damit mit hoher Wahrscheinlichkeit unter anderem auf den Fpo-Komplex zurückzuführen. Ein eindeutiger Nachweis könnte jedoch nur mit aufgereinigten Untereinheiten oder Subkompartimenten des Komplexes ermöglicht werden, um spezifische Interaktions-Analysen durchführen zu können. Die Einführung eines genetischen Systems für *Mmc. luminyensis* würde die Möglichkeiten in dieser Hinsicht zukünftig erhöhen, da die Aufreinigung aus dem

Organismus selbst aufgrund der geringen Biomasseerträge (Kröninger, 2018) hohe Hürden aufweist. Die Möglichkeit der Einbringung von Untereinheiten mit Affinitätstags könnte die Aufreinigung in dieser Hinsicht deutlich vereinfachen.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden mit *Mc. vulcani*, *Mmc. luminyensis* und *Mna. thermophilum* drei methanogene Archaeen im Detail untersucht. Der Stoffwechsel der drei Organismen hat einige Elemente, welche bereits aus methanogenen Archaeen bekannt sind, doch zeigt in vielerlei Hinsicht Besonderheiten auf. Trotz der Nutzung ähnlicher Substrate läuft die Methanogenese und Energiekonservierung in allen drei untersuchten Organismen unterschiedlich ab, wobei einige Elemente identisch sind. In der folgenden Abhandlung werden die verschiedenen Formen der Methanogenese und Energiekonservierung erläutert und die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse dahingehend eingeordnet. Zunächst erfolgt eine Einführung zur Bedeutung der methanogenen Archaeen für den Menschen und eine kurze Erklärung der Besonderheiten der in dieser Arbeit untersuchten Organismen.

4.1 Bedeutung methanogener Archaea für den Menschen und die Umwelt

Die Untersuchung des Stoffwechsels methanogener Archaeen, wie im Rahmen der vorliegenden Arbeit, ist in vielerlei Hinsicht von großer Bedeutung, da die Auswirkungen der Organismen an vielen Stellen auch für den Menschen und die menschliche Gesundheit von Relevanz sind. So spielen methanogene Archaeen eine vielfältige Rolle in verschiedenen anoxischen Ökosystemen. Diese Organismen kommen beispielsweise in Sumpfgebieten oder Seen vor, besiedeln aber auch humanassoziierte Standorte wie den menschlichen Darm oder die Mundhöhle. Dabei sind sie an der Verwertung von Endprodukten aus Gärungsreaktionen wie Acetat, CO₂ und Wasserstoff beteiligt und spielen eine zentrale Rolle im globalen Kohlenstoffkreislauf. Auch methylierte Verbindungen wie TMA, DMA, MMA und Methanol sind ein wichtiger Teil des Substratspektrums (Liu & Whitman, 2008; Garcia et al., 2000), was auch in der vorliegenden Arbeit für die Organismen *Mc. vulcani* und *Mna. thermophilum* gezeigt werden konnte (3.1.1 / 3.2.1). Besondere Bedeutung für die Umwelt und das globale Klima haben methanogene Archaeen, da diese Methanproduzenten ein etwa 34-mal schädlicheres Klimagas als CO₂ freisetzen (Myhre et al., 2013). Gerade Feuchtgebiete, Sumpflandschaften, Gewässer- und Meeressedimente sowie der Gastrointestinaltrakt von Wiederkäuern sind wichtige Lebensräume der methanogenen Archaeen, die aufgrund der Methanemissionen einen großen Einfluss auf das globale Klima haben (L Bräuer et al., 2020; Kumar Pandey et al., 2015; St.-Pierre & Wright, 2013; Hook et al., 2010). Auch die abtauenden Permafrostböden stellen eine Quelle großer Methanemissionen dar, sodass von einer weiteren Steigung der Methankonzentration in der Atmosphäre ausgegangen werden kann (Knoblauch et al., 2018; Christensen et al., 2004). Neben der Rolle des Methans als Klimagas, dient es als Hauptbestandteil von Erdgas weltweit vor allem als wichtiger Energieträger. Die Produktion des Gases durch methanogene Archaeen in Biogasanlagen dient dabei als nachhaltigere Alternative (Horváth et al., 2016). Da methanogene Archaeen auch im menschlichen Darm, aber auch der Mundhöhle und dem Urogenitaltrakt, vorkommen, wurde außerdem der Einfluss

auf die menschliche Gesundheit in den letzten Jahren intensiv untersucht (Chibani et al., 2021; Bang & Schmitz, 2018; Brugère et al., 2014). Brugère et al. (2014) prägten dahingehend den Begriff der Archaeobiotika, angelehnt an die gesundheitsfördernde Wirkung von Probiotika. Dies gilt allen voran für Vertreter der Methanomassiliicoccales, wobei mit *Mmc. luminyensis* ein Vertreter der Gattung auch in der vorliegenden Arbeit im Detail untersucht wurde. Die Aufklärung der Biochemie der Organismen kann als Grundlage für Anwendungen im Gesundheitssektor dienen. Ein detailliertes Verständnis des Stoffwechsels der Organismen ist dabei auch von großer Bedeutung, da bei einigen Methanproduzenten auch negative Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit beobachtet werden konnten. Besonders die aus humanen Feces isolierten Arten *Methanobrevibacter smithii* (*M. smithii*) (Miller et al., 1982; Miller & Wollin, 1982) und *Methanosphaera stadtmanae* (Miller & Wollin, 1985) sind auch heute noch wichtiger Gegenstand der Forschung, wenn es um humanassoziierte methanogene Archaeen geht. Der Darm ist an dieser Stelle als der bedeutendste humanassoziierte Lebensraum zu nennen, da methanogene Archaeen obligate Anaerobier sind. Weitere, jedoch eher weniger wichtige, Lebensräume finden sich außerdem in Mundhöhle, Vaginaltrakt und Urogenitaltrakt (Djemai et al., 2021). Im menschlichen Darm ist *M. smithii* als Hauptvertreter der Methanproduzenten zu nennen (Eckburg et al., 2005). Der Organismus gehört zu den obligat hydrogenotrophen Methanbildnern (Miller et al., 1982) und wird insbesondere in Bezug mit krankhaften Veränderungen des Körpergewichtes in Verbindung gebracht (Million et al., 2013; Millon et al., 2012; Armougom et al., 2009). Ein verwandter Organismus wurde in Form von *Methanobrevibacter oralis* aus der Mundhöhle isoliert (Ferrari et al., 1994) und steht mit der Ausbildung von Parodontose und entzündlichen Erkrankungen des Gingivaltraktes in Zusammenhang (Efenberger et al., 2015; Bringuier et al., 2013; Lepp et al., 2004). Jüngst wurde mit *Candidatus Methanobrevibacter intestini* ein weiterer human-assoziiertes Vertreter der Gattung *Methanobrevibacter* identifiziert, wobei dieser nicht in Reinkultur vorliegt. In der genannten Studie wurden in 85 % der untersuchten Proben des menschlichen Gastrointestinaltraktes *Methanobrevibacter*-Spezies identifiziert, was den größten Anteil unter den methanogenen Archaea ausmacht (Chibani et al., 2021). Einen weiteren wichtigen humanassoziierten Organismus innerhalb der methanogenen Archaea stellt wie bereits angemerkt *Methanosphaera stadtmanae* (*Msp. stadtmanae*) dar. Der Organismus ist auf Methanol und Wasserstoff als Substrat für die Methanogenese angewiesen und divergiert damit in diesem Punkt deutlich von weiteren Vertretern der Ordnung Methanobacteriales, die hydrogenotrophe Methanogenese betreiben. *Msp. stadtmanae* war das erste kommensale Archaeon dessen Genom vollständig sequenziert wurde (Fricke et al., 2006). Der Organismus kommt im Intestinaltrakt vor und steht dort in Verbindung mit der Ausbildung chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen und Entzündungsreaktionen im Allgemeinen (Blais Lecours et al., 2014; Bang et al., 2014). Der große Einfluss der methanogenen Archaeen tangiert

zusammenfassend in vielen Bereichen das menschliche Wirken, daher ist eine detaillierte Untersuchung der methanogenen Stoffwechselwege und biochemischen Hintergründe unerlässlich. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit für einige Organismen mit teilweise neuartigen Stoffwechselwegen durchgeführt, die im Folgenden erörtert werden.

Die zentralen Stoffwechselwege der bereits langjährig bekannten Organismen sind in den meisten Fällen gut untersucht. Dabei wird klassischerweise zwischen Cytochrom-haltigen und nicht-Cytochrom-haltigen Organismen unterschieden. Letztere zeichnen sich durch eine reine hydrogenotrophe Methanogenese ausgehend von CO_2 und molekularem Wasserstoff aus. Dabei wird CO_2 vollständig zu Methan reduziert, wobei zunächst eine Übertragung des C_1 -Körpers auf Methanofuran erfolgt. Für die weiteren Reduktionsschritte wird der C_1 -Körper auf Tetrahydromethanopterin übertragen und in mehreren Stufen zur Methylgruppe reduziert. Schlussendlich erfolgt die Übertragung der Methylgruppe auf Coenzym M und davon ausgehend die abschließende Reduktion zu Methan. Molekularer Wasserstoff dient für alle Schritte als Reduktionsmittel. Spezifische Hydrogenasen nutzen dieses Gas zur Reduktion der benötigten Elektronenüberträger im methanogenen Stoffwechsel wie F_{420} , Fd_{ox} oder Heterodisulfid (CoM-S-S-CoB), deren reduzierte Derivate jeweils als unmittelbarer Elektronendonator für die Enzyme dienen (Liu & Whitman, 2008; Ferry, 2010; Costa & Leigh, 2014). Das Deazaflavinderivat F_{420}H_2 kann dabei als funktionelles NADH-Analogon im methanogenen Stoffwechsel angesehen werden und dient im Rahmen der hydrogenotrophen Methanogenese in zwei Reduktionsschritten als Elektronendonator. Nach der Oxidation des F_{420}H_2 zu F_{420} wird dieses von der F_{420} -abhängigen Hydrogenase wieder reduziert. Reduziertes Ferredoxin wird von der Formylmethanofuran-Dehydrogenase im ersten Schritt der Methanogenese, bei der Übertragung von CO_2 auf Methanofuran benötigt. Coenzym B dient der Methyl-Coenzym-M-Reduktase als Reduktionsmittel im letzten Schritt der Methanogenese, der Reduktion der Methylgruppe von Methyl-Coenzym-M zu Methan. Dabei entsteht das Heterodisulfid aus Coenzym B und Coenzym M, welches von einem Komplex aus Hydrogenase und Heterodisulfid-Reduktase gemeinsam mit Ferredoxin wieder reduziert wird (Kurth et al., 2020; Welte & Deppenmeier, 2014). Die hydrogenotrophen Organismen besitzen keine Atmungskette und konservieren Energie im Rahmen der Reaktion der membrangebundenen Methyltransferase (Mtr), die die Methylgruppe von Tetrahydromethanopterin auf Coenzym M überträgt. Dabei werden 1-2 Natriumionen über die Membran transloziert (Gottschalk & Thauer, 2001). Im Gegensatz dazu verfügen die Cytochrom-haltigen methanogenen Archaeen über eine komplexe Atmungskette. Den Organismen ist die Methanogenese ausgehend von CO_2 und Wasserstoff zwar generell in vielen Fällen auch möglich, jedoch können diese auch Substrate wie Acetat und methylierte Verbindungen zu Methan umsetzen. Bei der methylotrophen Methanogenese, ausgehend von methylierten Verbindungen wie Methanol, Methylsulfiden und methylierten Aminen, werden

die Methylgruppen mittels spezifischer Methyltransferasen und zugehöriger Corrinoid-Proteine auf den Methylgruppenträger Coenzym M übertragen. Ausgehend von Methyl-Coenzym M werden 75 % der Methylgruppen von der Methyl-Coenzym-M-Reduktase mit Coenzym B als Reduktionsmittel zu Methan reduziert. Dabei entsteht neben Methan das Heterodisulfid aus den Coenzymen B und M. Die restlichen 25 % der Methylgruppen werden zu CO₂ oxidiert. Dabei wird die Reaktion der membrangebundenen Methyltransferase reversibel unter Einstrom von Natrium-Ionen genutzt. Auch die weiteren Reaktionen bis hin zum CO₂ laufen revers ab. In diesem oxidativen Zweig der Methanogenese werden die methanogenen Cofaktoren wie F₄₂₀ und Fd_{ox} reduziert. Die reduzierten Elektronenüberträger werden benötigt, um die Reduktion der genannten 75 % der Methylgruppen, mit Hilfe von Coenzym B als Reduktionsmittel, zu Methan zu ermöglichen. Dazu muss letztlich Heterodisulfid reduziert werden, um Coenzym M und Coenzym B für den letztgenannten Schritt zu regenerieren. Dies geschieht über eine Atmungskette, in der die Elektronen von den reduzierten Verbindungen über verschiedene membranständige Enzymkomplexe zunächst auf den membranlöslichen Elektronenüberträger Methanophenazin übertragen werden (Welte & Deppenmeier, 2014). Für F₄₂₀H₂ geschieht dies über den Fpo-Komplex, der im Rahmen der Reaktion Protonen zur Energiekonservierung über die Membran transloziert (Bäumer et al., 2000; Deppenmeier et al., 1990). Die Elektronen von reduziertem Ferredoxin werden von der Ech-Hydrogenase zur Reduktion von Protonen zu molekularem Wasserstoff genutzt (Meuer et al., 1999; Welte et al., 2010 a). H₂ wird im Anschluss durch die ebenfalls membrangebundene Vho-Hydrogenase, einhergehend mit der Reduktion von Methanophenazin, oxidiert (Ide et al., 1999; Deppenmeier, 1995). Auch der Rnf-Komplex oxidiert Ferredoxin, überträgt die Elektronen, im Vergleich zur Ech-Hydrogenase, allerdings unmittelbar auf Methanophenazin. In *Methanosarcina*-Spezies kommen die Komplexe in unterschiedlichen Konstellationen vor (Welte & Deppenmeier, 2014). Die genannten Elektronenüberträger stehen somit wieder in oxidierter Form zur Verfügung. Die Elektronen von reduziertem Methanophenazin, werden von einer membrangebundenen Heterodisulfid-Reduktase zur Reduktion des Heterodisulfids genutzt, welches, wie beschrieben, aus Coenzym M und Coenzym B besteht. Diese beiden Cofaktoren stehen somit wieder als Methylgruppenträger (Coenzym M) bzw. Reduktionsmittel (Coenzym B) zur Verfügung (Evans et al., 2019; Hedderich et al., 2005). Die Ech-Hydrogenase transloziert wie auch der Fpo Komplex Protonen zur Energiekonservierung über die Membran (Welte et al., 2010 a; Welte et al., 2010 b), im Falle von Vho-Hydrogenase und Heterodisulfid-Reduktase wird durch skalare Protonen Energie konserviert (Welte & Deppenmeier, 2014). Im Rahmen der acetoklastischen Methanogenese wird die Carbonylgruppe des Acetats zu CO₂ oxidiert und die Methylgruppe auf Tetrahydromethanopterin übertragen und schlussendlich zu Methan reduziert. Bei der Oxidation der Carbonylgruppe wird auch reduziertes Ferredoxin gebildet, welches von den genannten Membran-Komplexen genutzt wird und letztlich zur

Reduktion des Heterodisulfids führt, wobei die freien Thiole Coenzym M und Coenzym B wieder der Methanogenese dienen können (Welte & Deppenmeier, 2014). Im Falle der Cytochrom-haltigen methanogenen Archaeen handelt es sich meist um *Methanosarcina*-Spezies und verwandte Gattungen. In den vergangenen Jahren kam es jedoch zur Entdeckung weiterer Cytochrom-haltiger und nicht Cytochrom-haltiger methanogener Archaeen die Besonderheiten hinsichtlich ihres Stoffwechsels und des Substratspektrums aufwiesen. In dieser Arbeit wurden drei Organismen untersucht die Besonderheiten im methanogenen Stoffwechsel, im Vergleich zu den gut charakterisierten Spezies, aufweisen. Da die Bedeutung methanogener Archaeen und das Verständnis deren Stoffwechsels generell auch hinsichtlich des Beitrages auf das globale Klima und die Bedeutung für den Menschen betrachtet werden sollte, war die Aufklärung der neuen Wege der Methanogenese von hohem Interesse. Besonders die Energiekonservierung mit verschiedenen Membrankomplexen aber auch das Substratspektrum spielten dabei eine Rolle. Zunächst soll ein Blick auf die an der Energiekonservierung methanogener Archaea beteiligten Membrankomplexe und auf ihre Rolle in den in dieser Arbeit untersuchten Organismen in Form von *Mna. thermophilum*, *Mc. vulcani* und *Mmc. luminyensis* erfolgen.

4.2 Neuartiger Stoffwechsel der Ordnung Methanomassiliicoccales

Der Energiestoffwechsel der Methanomassiliicoccales weckte mit der Isolierung und Charakterisierung von *Mmc. luminyensis* durch Dridi et al. (2012) das Interesse der Wissenschaft. Die ungewöhnliche Kombination der Substrate zur Methanogenese in Form von Methanol und Wasserstoff, war bislang nur aus wenigen Organismen wie *Methanosphaera stadtmanae* bekannt (Fricke et al., 2006). Wie zuvor eingeführt kann *Mmc. luminyensis* auch Methylamine in Kombination mit H₂ zu Methan umsetzen (3.3), was den Organismus an dieser Stelle bereits zu *Msp. stadtmanae* (Details: 4.6) abgrenzte, der auf Methanol und Wasserstoff beschränkt ist. Die Verwertung von Methylaminen und Methanol im Rahmen der methylotrophen Methanogenese war bislang einzig in Vertretern der Ordnung *Methanosarcinales* untersucht, wobei die Organismen jedoch die Reduktionsäquivalente für die Reduktion zu Methan selbst generieren, in dem ein Teil der Methylgruppen von Methyl-Coenzym M zu CO₂ oxidiert wird. Wasserstoff wird von den zugehörigen Organismen folglich nicht zur Methanbildung aus Methanol oder Methylaminen benötigt (Garcia et al., 2000; Ferry, 2010). Die membrangebundenen Elemente der Energiekonservierung der Organismen werden in den folgenden Absätzen noch eingehender erläutert, wobei der Fpo-Komplex von *Mmc. luminyensis* in dieser Arbeit im Detail analysiert wurde, um die Bedeutung des Komplexes für den Energiemetabolismus des Organismus weiter aufzuklären. Zwar wurden bereits Untersuchungen zum Energiemetabolismus von *Mmc. luminyensis* durch Kröninger et al. (2016) und Kröninger (2018) durchgeführt, jedoch fehlten einige wichtige Elemente insbesondere im Zusammenhang mit dem „kopflosten“ Fpo-Komplex des Organismus die in

dieser Arbeit näher analysiert wurden. *Mmc. luminyensis* als einziger in Reinkultur verfügbarer Vertreter der kompletten Ordnung, teilt sich mit den weiteren Organismen der Methanomassiliicoccales einige Besonderheiten.

So beruht die obligate Abhängigkeit der methylo trophen Methanogenese der Methanomassiliicoccales von Wasserstoff, zentral auf dem Fehlen der Gene dessen Genprodukte es in hydrogenotrophen methanogenen Archaeen erlauben CO₂ zu Methyl-Coenzym M zu metabolisieren. Dazu gehören auch die Gene, welche für die Untereinheiten der membrangebundenen Methyltransferase kodieren (4.5.1). Dies erklärt auf der einen Seite, warum CO₂ in Kombination mit H₂ nicht zu Methan verstoffwechselt werden kann. Auf der anderen Seite wird ebenso deutlich, warum es im Rahmen der Methanogenese aus methylierten Verbindungen nicht möglich ist, innerhalb des oxidativen Zweiges bzw. der Oxidation von Methyl-Coenzym M zu CO₂, Reduktionsäquivalente zur Reduktion von Methyl-Coenzym M zu Methan zu generieren, wie für *Methanosarcina* spp. beschrieben (Borrel et al., 2013).

Die Nutzung von TMA als Substrat durch *Mmc. luminyensis* umfasst im menschlichen Darm auch gesundheitliche Aspekte. Im Darm wird das Molekül bei der mikrobiellen Verstoffwechslung von verschiedenen Nahrungsbestandteilen gebildet (Zhang et al., 1999). Dazu zählen vor allem Cholin (Craciun & Basluskus, 2012), L-Carnitin (Ussher et al., 2013; Koeth et al., 2013), aber auch Trimethylaminoxid (TMAO) (Barrett & Kwan, 1985). Cholin wird dabei primär aus Nahrungsmitteln wie Ei, Soja und Kohl aufgenommen, wohingegen Carnitin vor allem in Fleisch vorkommt (Koeth et al., 2013). TMA kann außerdem durch bakterielle Reduktion von TMAO gebildet werden (Hoyles et al., 2018), welches in großen Mengen in Fisch und Schalentieren vorkommt (Lombardo et al., 2021; Simó & García-Cañas, 2020).

TMA entsteht also im menschlichen Darm durch die bakterielle Metabolisierung von Vorläufermolekülen. Verschiedene Problematiken, die mit der Substanz einhergehen und die Brugère et al. (2014) veranlassten die Methanomassiliicoccales aufgrund der Verstoffwechslung von TMA als Archaeobiotika zu bezeichnen, werden im Folgenden diskutiert. Zunächst ist TMA eng mit der Erkrankung Trimethylaminurie (TMAU) verbunden, welche auch als Fischgeruch-Syndrom bezeichnet wird. Erkrankte verströmen insbesondere über Schweiß, Atem und Urin einen Geruch nach verdorbenem Fisch und leiden somit in der Folge unter sozialen Problemen, nicht selten mit der Ausprägung schwerer psychischer Erkrankungen einhergehend (Messenger et al., 2013; Mackay et al., 2011). Im gesunden Organismus wird TMA zu 95 % in der Leber mittels des Enzyms FMO3 (Flavin enthaltende Monooxygenase) über eine N-Oxidation zu TMAO umgesetzt, wohingegen Personen mit Trimethylaminurie in den meisten Fällen Mutationen im *fmo3*-Gen aufweisen und daher nur eine inaktive oder schwach aktive Form des zugehörigen Enzyms produzieren können (Hernandez et al., 2003;

Treacy et al., 1998). Schließlich kommt es zur Akkumulation von TMA im Blut und in anderen Körperflüssigkeiten, was die Symptomatik der Erkrankung hervorruft. Neben TMAU-erkrankten Individuen kann TMA auch dem gesunden menschlichen Organismus schaden. So ist bekannt, dass die mikrobielle Verstoffwechslung von Cholin und L-Carnitin das Fortschreiten von Atherosklerose begünstigen kann (Liu et al., 2015; Koeth et al., 2013; Wang et al., 2011 (a)). Die mikrobielle Verstoffwechslung der genannten Komponenten führt zur Anreicherung von Betain und TMAO im Blutplasma. Die beiden Metabolite gelten als Risikofaktoren für die Ausprägung kardiovaskulärer Erkrankungen. Im Mausmodell konnte dabei für TMAO, als Oxidationsprodukt von TMA (durch FMO3), gezeigt werden, dass das Molekül die Ausbildung von Atherosklerose fördert (Bennett et al., 2013; Wang et al., 2011 (a)). Letztlich bedeutet dies, dass der TMA-Abbau über TMAO im gesunden Menschen auch zu schweren Gefäßerkrankungen führen kann. Eine Senkung der TMA-Konzentration im Darm wäre daher nicht nur für Menschen mit TMAU von großer Bedeutung, sondern könnte auch der Bekämpfung und Vorbeugung von weitverbreiteten und häufig schwerwiegenden Erkrankungen wie Schlaganfällen oder Herzinfarkten dienen. Die Metabolisierung von TMA im Zuge des Stoffwechsels von *Mmc. luminyensis* sollte daher weiterhin detailliert untersucht werden. Eine umfassende Kenntnis des Metabolismus könnte die Anwendung des Organismus als Archaeobiotikum vereinfachen.

4.3 *Mna. thermophilum* – Entdeckung eines neuartigen Elektronentransportsystems in den Membranen von Vertretern der Klasse Methanonatronarchaeia

Mit der Entdeckung und Charakterisierung des Organismus *Mna. thermophilum*, welcher auch in dieser Arbeit intensiv untersucht wurde, kam es zur Begründung der neuen Ordnung der Methanonatronarchaeales innerhalb der Klasse Methanonatronarchaeia. Alle bislang bekannten Organismen der Ordnung wurden in Proben aus hochsalinen Sodaseen identifiziert. Die Mikroorganismen sind nur entfernt mit den derzeit beschriebenen taxonomischen Gruppen methanogener Archaeen verwandt und stellen nach jüngsten phylogenetischen Analysen Mitglieder des neuen Phylums der Halobacteriota dar (Sorokin & Merkel, 2015 (a); Sorokin & Merkel, 2015 (b)). Die Organismen der Gattung *Methanonatronarchaeum* sind alkaliphil, halophil und moderat thermophil, was sich in Wachstumsoptima von *Mna. thermophilum* bei einem pH-Wert von etwa 9,5, einer Temperatur von etwa 50°C und einer Natrium-Ionen Konzentration von 4 M widerspiegelt (Sorokin et al., 2017). Die harschen Wachstumsbedingungen im Ökosystem führten auch zu einer Adaptation der Enzyme des Energiemetabolismus hinsichtlich ausreichender Aktivitäten bei hohen Ionenstärken und pH-Werten, was in dieser Arbeit gezeigt werden konnte (3.1.3.2). Neben *Methanonatronarchaeum* existiert mit *Candidatus Methanohalarchaeum* eine zweite Gattung innerhalb der Ordnung Methanonatronarchaeales, wobei bislang kein Vertreter in Reinkultur

vorliegt. Erste Analysen in Mischkulturen mit *Candidatus Methanohalarchaeum thermophilum* zeigten, dass dieser Organismus ebenfalls halophil und moderat thermophil ist, sein optimales Wachstum im Gegensatz zu *Mna. thermophilum* jedoch im neutralen pH-Bereich liegt (Sorokin et al., 2018). Der Energiestoffwechsel ist auf Grundlage von Analysen auf genetischer Ebene identisch zu *Mna. thermophilum*. Der Energiestoffwechsel von *Mna. thermophilum* wurde in der vorliegenden Arbeit im Detail untersucht, um insbesondere die Energiekonservierung an den Cytoplasma-Membranen des Organismus näher zu verstehen. Außerdem weist der Organismus einige Besonderheiten im Substratspektrum auf, welches in dieser Arbeit ebenso eingehend analysiert wurde (3.1.1/3.1.2). So sind die Organismen in der Lage die Methanogenese ausgehend von Formiat oder molekularem Wasserstoff in Kombination mit methylierten Verbindungen wie Methanol oder methylierten Aminen zu betreiben. Wie bereits für *Mmc. luminyensis* (4.2) eingeführt ist also auch der vorliegende Modellorganismus in Form von *Mna. thermophilum* im Rahmen seiner methylotrophen Methanogenese auf externe Elektronendonatoren angewiesen. Dies begründet sich ähnlich wie im Falle von *Mmc. luminyensis* durch das Fehlen der Gene, welche für die Untereinheiten der membrangebundene Methyltransferase Mtr kodieren. Damit ist der oxidative Zweig der Methanogenese nicht möglich. Im Umkehrschluss bedeutet dies auch, dass die Methanogenese ausgehend von H₂ und CO₂, wie auch experimentell in dieser Arbeit gezeigt (3.1.1), nicht ablaufen kann. Auch eine Formylmethanofuran Dehydrogenase (Fwd) fehlt dem Organismus was eine Übertragung der Carbonylgruppe von CO₂ auf Methanofuran, sowie die reverse Reaktion, nicht ermöglicht und damit die nicht vorliegende Fähigkeit der hydrogenotrophen Methanogenese unterstreicht (Sorokin et al., 2017). Die Methanbildung ist dem Organismus daher nur ausgehend von methylierten Verbindungen in Kombination mit Wasserstoff oder Formiat, möglich, was auch in der vorliegenden Arbeit im Detail mit verschiedenen methylierten Substraten gezeigt werden konnte (3.1.1). Die zugehörigen spezifischen Methyltransferasen für die einzelnen Substrate wurden zudem bioinformatisch identifiziert (3.1.2), wobei einige der zugehörigen Gene wie auch für *Mmc. luminyensis* und *Ms. mazei* beschrieben, mehrfach vorkommen (Kröniger et al., 2017; Krätzer et al., 2009). Die Gene für Permeasen, welche die Aufnahme der methylierten Amine ermöglichen, fehlen jedoch, im Vergleich zu *Ms. mazei* und *Mmc. luminyensis*. Dies könnte mit dem Wachstum unter alkalischen Bedingungen zusammenhängen, wobei die methylierten Amine deprotoniert werden und ungeladen ohne Transportprotein membrangängig sind. Die pK_s-Werte von TMA (9,81), DMA (10,73) und MMA (10,66), welche in etwa im Bereich des Wachstumsoptimums von *Mna. thermophilum* liegen stützen die genannte Theorie. Die ermittelten schnelleren Verdopplungszeiten auf TMA im Vergleich zu DMA oder MMA als Substrat (Tabelle 8) könnten unter anderem auch mit der schlechteren Substratverfügbarkeit von DMA und MMA zusammenhängen, da deren Basizität deutlich höher als von TMA ist.

Das Substratspektrum ist in Bezug auf die Nutzung von Formiat in Kombination mit Methanol oder methylierten Aminen einzigartig. Bislang war aus *Msp. stadtmannae* die Nutzung von Methanol und Wasserstoff und aus *Mmc. luminyensis* die Metabolisierung von Methanol oder methylierten Aminen in Kombination mit H₂ bekannt (Kröniger et al., 2017; Miller & Wolin, 1985). Formiat können beide Organismen nicht alternativ zu H₂ nutzen. Die Wachstumsanalysen für *Mna. thermophilum* im Rahmen dieser Arbeit waren daher von großer Bedeutung, um die Nutzung von Formiat als Elektronendonator für die methylo trope Methanogenese detailliert zu charakterisieren. Darauf aufbauende Analysen zum Energiemetabolismus dienten außerdem dazu den Stoffwechsel des Organismus im Detail zu verstehen und die Methanogenese aufzuklären. Die in der vorliegenden Arbeit generierten Wachstumsdaten für *Mna. thermophilum* zeigten je nach Substrat Verdopplungszeiten von 1,8 Tagen (TMA + Formiat) bis hin zu 5,3 Tagen (MMA + H₂) auf. Allgemein waren die Verdopplungszeiten mit molekularem Wasserstoff an Stelle von Formiat als Elektronendonator länger. Im Vergleich mit weiteren Organismen, welche Methanol und Wasserstoff als Substrat nutzen, lagen die Verdopplungszeiten in ähnlichen Bereichen. Für die Substrate TMA oder Methanol in Kombination mit H₂ zeigt *Mmc. luminyensis* beispielsweise Verdopplungszeiten von 2,1 bzw. 1,8 Tagen (Kröniger et al., 2017). Die in dieser Arbeit bestimmten Verdopplungszeiten für *Mna. thermophilum* auf den beiden genannten Substratkombinationen lagen bei 2,5 bzw. 2,3 Tagen. Organismen, die eine reine methylo trope Methanogenese ohne H₂ oder Formiat als Elektronendonator betreiben, zeigen meist deutlich schnellere Verdopplungszeiten. So weist der Wildtyp von *Ms. mazei* bei Wachstum auf methylierten Verbindungen wie TMA Verdopplungszeiten von etwa 0,3 Tagen auf (Welte et al., 2010 b). Von besonderem Interesse ist neben den Verdopplungszeiten außerdem ein Blick auf die erzielten Wachstumserträge (g Trockengewicht / mol Methan⁻¹), deren Bestimmung eine etablierte Methode ist, um die Effektivität der Energie-konservierenden Systeme von methanogenen Archaeen zu vergleichen. Die Wachstumserträge von *Mmc. luminyensis* liegen auf Methanol oder TMA in Kombination mit H₂ bei 2,4 g Trockengewicht x mol Methan⁻¹ (Kröniger 2018) und sind damit vergleichbar mit den in der vorliegenden Arbeit bestimmten Erträgen für *Mna. thermophilum* auf Methanol oder TMA in Kombination mit Formiat von 2,1 bzw. 1,9 g Trockengewicht x mol Methan⁻¹. Bei Wachstum auf molekularem Wasserstoff zeigte der Organismus hingegen geringere Erträge von 1,3 (MeOH + H₂) bzw. 1,4 (TMA + H₂) g Trockengewicht x mol Methan⁻¹. Die geringeren Erträge mit molekularem Wasserstoff könnten sich, trotz ähnlicher Redoxpotentiale von H₂ und Formiat, vor allem durch die schlechte Substratverfügbarkeit erklären, da die Löslichkeit von H₂ in gesättigten Salzlösungen sehr gering ist (Ferrer et al., 2018). Ein weiterer Organismus der Methanogenese ausgehend von Methanol und H₂ betreiben kann ist wie bereits eingeführt *Msp. stadtmannae*. Der Wachstumsertrag des Organismus mit Methanol und H₂ als Substrate liegt mit 4 g / mol

Methan⁻¹ (Miller & Wolin, 1985) etwa doppelt so hoch wie der von *Mmc. luminyensis* und vier Mal so hoch wie der in dieser Arbeit bestimmte Wachstumsertrag für *Mna. thermophilum* auf den gleichen Substraten. Im Vergleich mit weiteren Cytochrom-haltigen methanogenen Archaeen waren die Ausbeuten von *Mna. thermophilum* auch eher gering. Für *Methanosarcina barkeri* konnten beispielsweise Wachstumserträge von bis zu 7,2 g x mol Methan⁻¹ auf Methanol als Substrat bestimmt werden (Weimer & Zeikus, 1978). Smith & Mah (1978) ermittelten für einen *Methanosarcina*-Stamm bei Wachstum auf Methanol eine Ausbeute von 6 g x mol Methan⁻¹. Die geringeren Wachstumserträge von *Mna. thermophilum* im Vergleich zu *Methanosarcina* spp. hängen vermutlich mit verschiedenen Gründen zusammen. Die Bioenergetik der Metabolisierung von Methanol zu Methan (-106 kJ x mol⁻¹; Müller et al., 1993; Daniels et al., 1984) bzw. Methanol + H₂ zu Methan ($\Delta G_0'$ = -113 kJ x mol⁻¹; Thauer et al., 1977) ist zwar bezogen auf ein gebildetes Molekül Methan ähnlich, jedoch ist der H₂ Partialdruck unter Standardbedingungen von 1 bar, der zur Berechnung der freien Enthalpien herangezogen wurde, im Medium oder natürlichen Umfeld (etwa 0,001 bar; Daniels et al., 1984) bei weitem nicht gegeben. Gerade bei hohen Salzkonzentrationen ist die Löslichkeit des molekularen Wasserstoffs wie beschrieben besonders gering. Dies erschwert eine Vergleichbarkeit von reinen methylotrophen Organismen mit H₂ abhängigen methylotrophen Organismen auf bioenergetischer Ebene, auch wenn die Kultivierung in dieser Arbeit mit einer Gasphase von 100 % H₂ und einem Druck von 2 bar durchgeführt wurde, um eine möglichst gute Substratverfügbarkeit zu gewährleisten. Insgesamt korrelieren die Wachstumserträge in vielen Fällen nicht zwingend mit der theoretischen Bioenergetik der Substrate. Die Reaktion von H₂ + CO₂ zu Methan hat unter Standardbedingungen ein $\Delta G_0'$ von 130 kJ x mol Methan⁻¹ (Müller et al., 1993), doch die hydrogenotrophen Organismen zeigen nur Wachstumserträge von 1,0 bis höchstens 3,0 g Trockengewicht x mol Methan⁻¹ (Kaster et al. 2011; Zehnder & Wuhrmann 1977; Robertson & Wolfe 1970; Robinson & Tiedje 1984) und liegen damit deutlich unter den Erträgen für Organismen mit methylotrophen Stoffwechsel wie *Methanosarcina barkeri*, die mehr als doppelt so hoch sind (Weimer & Zeikus, 1978). Dies liegt zum einen an der fehlenden Atmungskette der hydrogenotrophen Organismen und der reinen Abhängigkeit der Energiekonservierung von der Reaktion der membrangebundenen Methyltransferase, als auch dem genannten Fakt, dass der H₂ Partialdruck in der Realität häufig nicht den Standardbedingungen entspricht, die der Berechnung der freien Enthalpie zu Grunde liegen. Statt einem Bar herrscht in natürlichen Umgebungen wie Gewässersedimenten oder dem Pansen von Wiederkäuern nur ein Wasserstoff-Partialdruck von etwa 0,001 bar (Zehnder et al., 1983; Thauer et al., 1977).

Zudem kann bezüglich der Wachstumserträge von *Mna. thermophilum* davon ausgegangen werden, dass der hohe energetische Aufwand für die Osmo- und pH-Adaptation, um unter den harschen Umweltbedingungen erfolgreich existieren zu können, den Ertrag schmälert. Dies

wurde bereits vielfach für andere halo(alkali)phile Organismen beschrieben (Oren, 1999; Trotsenko & Khmelenina, 2002). Die in dieser Arbeit bestimmte hohe mRNA-Abundanz für die Gene des Mrp-Antiporters (3.1.3.1) unterstützte die große Bedeutung der Osmoadaption im Organismus. Der Na^+/H^+ -Antiporter nutzt mit großer Wahrscheinlichkeit den im Rahmen des Energiestoffwechsels generierten Protonengradienten um gleichzeitig Na^+ aus der Zelle gegen den Konzentrationsgradienten zu entfernen. Die aufgenommenen Protonen können außerdem dazu dienen eine Alkalisierung des Cytoplasmas zu verhindern (Ito et al., 2017; Swartz et al., 2005). Der Aufwand für die Osmoadaptation und pH-Adaption entfällt im Falle von *Methanosarcina* spp., da die meisten Stämme generell nur an niedrige Salzkonzentrationen (Meerwasser) und ein pH-neutrales Milieu adaptiert sind (Spanheimer & Müller, 2008; Maestrojuan et al., 1992; Maestrojuan & Boone, 1991). Die Anzucht von *Methanosarcina barkeri* im genannten Beispiel mit Wachstumserträgen von bis zu $7,2 \text{ g} \times \text{mol Methan}^{-1}$ auf Methanol erfolgte bei nur 0,1 % NaCl im Medium (Weimer & Zeikus, 1978), sodass die Osmoadaption praktisch keine Rolle spielte. Auch *Mmc. luminyensis* ist ebenso nur ein schwach halophiler Organismus (Seck et al., 2018), wobei die vergleichsweise geringen Wachstumserträge mit der weniger effizienten membrangebundenen Energiekonservierung im Vergleich zu Cytochrom-haltigen methanogenen Archaeen zusammenhängen könnten (Kröninger, 2018).

Die Untersuchung der membrangebundenen Energiekonservierung von *Mna. thermophilum* war Gegenstand dieser Arbeit. Wie bereits eingeführt fehlen dem Organismus die membrangebundene Methyltransferase und die Formyl-Methanofuran-Dehydrogenase. Die Gene, die für die restlichen Enzyme des oxidativen Zweiges der Methanogenese kodieren sind zwar im Genom vorhanden, die zugehörigen Enzyme dienen allerdings vermeintlich der Bereitstellung von C_1 -Gruppen für den Anabolismus. Dazu passend konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Serin-Hydroxymethyltransferase (WP_086636906.1) identifiziert werden, welche hohe Homologien zum Enzym aus *Methanosphaera stadtmanae* zeigt. Die Enzyme wiesen 54,2 % identische Aminosäuren auf und 75,9 % aller Aminosäuren hatten zumindest ähnliche Eigenschaften. Für das Enzym aus *Methanosphaera stadtmanae* liegen experimentelle Daten vor, dass dieses C_1 -Körper von Serin auf Tetrahydromethanopterin und nicht auf Tetrahydrofolat überträgt (Lin & Sparling, 1998). Das Enzym aus *Methanosarcina barkeri* ist hingegen auf Grundlage der genannten Studie auf Tetrahydrofolat als Substrat beschränkt und zeigt wesentlich geringere Homologien zum Enzym von *Mna. thermophilum* als jenes von *Msp. stadtmanae*. Nur 33 % der Aminosäuren waren identisch und 54 % hatten ähnliche Eigenschaften. Dies unterstreicht, dass die vorhandenen Enzyme des oxidativen Zweiges der Methanogenese in *Mna. thermophilum* der Bereitstellung von C_1 -Gruppen in verschiedenen Redoxzuständen für den Anabolismus dienen und die Serin-Hydroxymethyltransferase die C_1 -Gruppen durch die Übertragung auf

Tetrahydromethanopterin in den Weg einschleust. Auch in *Msp. stadtmanae* dienen die Enzyme des oxidativen Zweiges der Bereitstellung von C₁-Körpern für den Anabolismus, wobei im Vergleich zu *Mna. thermophilum* auch die membrangebundene Mtr vorhanden ist (Fricke et al., 2006). Experimentell konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass das Gen der Formyltransferase (*ptr*) von *Mna. thermophilum*, welches entsprechend für eines der beteiligten Proteine kodiert, auf Transkriptebene im Verhältnis zu den Genen der am Energiestoffwechsel beteiligten Proteinen in geringer Abundanz vorhanden war (3.1.3.1). Dies untermauerte zusätzlich, dass der oxidative Zweig der Methanogenese in *Mna. thermophilum* keine Funktion im Energiestoffwechsel einnimmt und mit hoher Wahrscheinlichkeit der Bereitstellung von C₁-Gruppen für den Anabolismus dient.

Der Energiestoffwechsel von *Mna. thermophilum* ist zentral von jeweils einer membrangebundenen Hydrogenase (VhoGAC), Formiat-Dehydrogenase (FdhGHI) und Heterodisulfid-Reduktase (HdrDE) abhängig (3.1.3). Dabei ist anzumerken, dass bislang für methanogene Archaeen und deren Atmungsketten drei verschiedene Oxidoreduktase-Systeme beschrieben waren. Zu nennen ist erstens das F₄₂₀H₂:Heterodisulfid-Oxidoreduktase-System, an welchem in *Methanosarcina* spp. und verwandten Spezies der Fpo-Komplex (4.5.2) und die Heterodisulfid-Reduktase HdrDE (4.5.7.2) beteiligt sind (Deppenmeier et al., 1990; Bäumer et al., 1998; Deppenmeier, 2004). Daneben liegt in *Methanosarcina*-Spezies ein H₂:Heterodisulfid Oxidoreduktase-System vor, an welchem wie im Falle von *Mna. thermophilum* (3.1.3) eine Vho-Hydrogenase (4.5.3) und die genannte membrangebundene Heterodisulfid-Reduktase (4.5.7.2) beteiligt sind (Deppenmeier et al., 1991; Ide et al. 1999; Deppenmeier, 2004). Außerdem wurde in *Methanosarcina*-Spezies, ein Fd_{red}:Heterodisulfid Oxidoreduktase-System identifiziert, welches die Reduktion von Protonen zu Wasserstoff durch die membrangebundene Ech-Hydrogenase mit reduziertem Ferredoxin als Elektronendonator ermöglicht. Der freigesetzte molekulare Wasserstoff wird dann von der Vho-Hydrogenase verwertet (Welte & Deppenmeier, 2014). Auch in *Mtx. thermoacetophila* liegt ein Fd_{red}:Heterodisulfid Oxidoreduktase-System vor, wobei an der Oxidation von Fd_{red} vermeintlich ein „kopfloser“ Fpo-Komplex (4.5.2) beteiligt ist (Welte & Deppenmeier, 2011 b). In *Mna. thermophilum* konnte in dieser Arbeit neben dem H₂:Heterodisulfid Oxidoreduktase-System ein völlig neuartiges Formiat:Heterodisulfid Oxidoreduktase-System und damit ein viertes Elektronentransportsystem in Membranen von methanogenen Archaea identifiziert werden (3.1.3.4). Dies ist ein Alleinstellungsmerkmal von *Mna. thermophilum* und der Klasse Methanonatronarchaea und beruht zentral auf einer membrangebundenen Formiat-Dehydrogenase (4.5.6) und der bereits bekannten membrangebundenen Heterodisulfid-Reduktase (4.5.7.2). Die Erforschung des Energiestoffwechsels von *Mna. thermophilum* ist daher von hohem Interesse und wird im Folgenden, auf Grundlage der Einzelnen an der

Energiekonservierung beteiligten Enzymkomplexe und der dazu in der vorliegenden Arbeit generierten Daten, weiter eingeordnet und diskutiert.

4.4 *Mc. vulcani* – Methylotrophe Methanogenese mit unüblichen Substraten

Die Gattung *Methanococcoides* umfasst in Form von *Methanococcoides methylutens*, *Methanococcoides burtonii*, *Methanococcoides alaskense* und *Methanococcoides vulcani* vier Arten und deren Vertreter können der Familie Methanosarcinaceae zugeordnet werden (L'Haridon et al., 2020). Der in dieser Arbeit untersuchte Organismus *Mc. vulcani* wurde aus Meeressedimenten isoliert und ist in der Lage aus methylierten Verbindungen, nicht aber mit CO₂/H₂, Formiat oder Acetat, Methan zu produzieren (L'Haridon et al., 2014), was auch in der vorliegenden Arbeit auf Grundlage intensiver Wachstumsstudien bestätigt werden konnte (3.2.1). Zur Methanogenese benötigt der Organismus im Vergleich zu *Mmc. luminyensis* und *Mna. thermophilum* keinerlei externen Elektronendonator wie molekularen Wasserstoff oder Formiat. *Mc. vulcani* nutzt, auf Grundlage der Daten dieser Arbeit, die schon bekannte und detailliert in *Methanosarcina*-Spezies untersuchte Form der methylotropen Methanogenese, bei der 25 % der in den Stoffwechsel eingeschleusten Methylgruppen zu CO₂ oxidiert werden, um Reduktionsäquivalente für die Reduktion von 75 % der Methylgruppen zu Methan zu generieren. Dies wurde durch Wachstumsversuche auf Grundlage des Verhältnisses der eingesetzten Methylgruppen und des produzierten Methans erstmals experimentell für *Mc. vulcani* bestätigt (3.2.1). Insbesondere das erweiterte Substratspektrum des Organismus war jedoch von Bedeutung, da die Nutzung von Betain als Substrat für die Methanogenese eine Besonderheit darstellt und detaillierte Wachstumsanalysen bislang fehlten. Bioinformatisch konnten in dieser Arbeit unter anderem zunächst die Gene für spezifische Methyltransferase und zugehörige Proteine im Genom des Organismus für die TMA, DMA, MMA, Methanol und Betain-Verwertung identifiziert werden (3.2.2). In der vorliegenden Arbeit wurde *Mc. vulcani* außerdem auf TMA, DMA, MMA, Methanol und Betain angezogen und die Wachstumsparameter erfasst und verglichen (3.2). Die Verdopplungszeiten lagen je nach Substrat zwischen 0,85 und 1,6 Tagen. Diese Werte lagen in Bereichen, die auch für andere *Methanococcoides*-Stämme in einem ähnlichen Komplex-Medium bestimmt wurden, wobei die Verdopplungszeiten zwischen 0,55 und 1,1 Tagen betragen. (Watkins et al., 2014). In der vorliegenden Arbeit waren die Verdopplungszeiten auf den Methylaminen, ausgenommen MMA, und Betain in etwa gleich schnell (0,8-1,1 Tage), wohingegen die Verdopplungszeiten auf Methanol deutlich länger waren (1,6 Tage). Diese Tendenz war auch in den Untersuchungen von Watkins et al. (2014) für andere Arten der Gattung *Methanococcoides* zu beobachten. Verwandte Organismen aus der Ordnung Methanosarcinales zeigen auf Komplexmedien häufig deutlich schnellere Verdopplungszeiten und die Unterschiede zwischen Wachstum auf Methanol und methylierten Aminen sind geringer. So weist *Methanosarcina acetivorans* Verdopplungszeiten von etwa 0,37 Tagen (TMA) bzw. 0,26

Tagen (MeOH) (Buan & Metcalf, 2010) auf. Im Vergleich mit den Wachstumserträgen von *Methanosarcina* spp. liegen die Werte von *Methanococoides*-Spezies teilweise deutlich darunter. In dieser Arbeit wurden für TMA und Methanol beispielsweise Wachstumserträge von 1,9 bzw. 2,5 g Trockengewicht x mol Methan⁻¹ ermittelt. Diese lagen im Bereich der bestimmten Wachstumserträge in Untersuchungen zu *Methanococoides* sp. NM1 von Watkins et al. (2014), die mit 1,4 und 2,2 g / mol Methan⁻¹ bestimmt wurden. *Methanosarcina* spp. zeigen dagegen Wachstumserträge von 6,0 bis 7,2 g / mol Methan⁻¹ (Smith & Mah, 1978; Weimer & Zeikus, 1978) auf methylierten Verbindungen. Möglicherweise ist dies mit der im Vergleich höheren Salinität im Medium für *Methanococoides* spp. zu erklären, die Mechanismen zur Osmoadaption, wie die verstärkte Synthese von Glutamat nötig macht (Watkins et al., 2014). Die Wachstumserträge mit Betain als Substrat lagen in der vorliegenden Arbeit bei 2,8 g / mol Methan⁻¹ und damit höher als bei den anderen Substraten. Dies konnte bereits in den genannten Untersuchungen mit *Methanococoides* sp. NM1 gezeigt werden (Watkins et al., 2014).

Die Nutzung von Betain als Substrat für die Methanogenese ist eine große Besonderheit und wurde daher in der vorliegenden Arbeit detailliert untersucht. Generell findet bei allen methanogenen Archaeen mit methylotropher Methanogenese der Transfer der Methylgruppe vom vorliegenden Substrat auf Coenzym M identisch statt. Auf der Ebene von Methyl-Coenzym M ist die Methylgruppe unmittelbar im Energiestoffwechsel angekommen und kann zu Methan reduziert, oder eben auch zu CO₂ oxidiert werden. Die Übertragung der Methylgruppen der Substrate auf Coenzym M wird dabei zunächst durch verschiedene lösliche Methyltransferasen und zugehörige Corrinoideproteine katalysiert (Schema: Abbildung 14). Neben den bereits seit langen Jahren bekannten Substraten wie Methanol, TMA, DMA und MMA wurden in den vergangenen Jahren einige bislang unbekannte Substrate für die Methanogenese entdeckt, darunter Betain (Kurth et al., 2020). Im Jahr 2015 isolierten Ticak et al. einen ersten Betain verwertenden *Methanobolus* Stamm, an welchem in den folgenden Jahren weitere Untersuchungen erfolgten. Der Weg der Demethylierung von Betain durch eine spezifische Methyltransferase (MtgB) einem zugehörigem Corrinoideprotein (MtgC) und Corrinoide Aktivatorprotein sowie einer zugehörigen Corrinoide:CoenzymM Methyltransferase konnte schließlich durch Creighbaum et al. (2019), im genannten *Methanobolus* Stamm (*Methanobolus vulcani* B1d) nachgewiesen werden. Ein Transporter für Betain, die Betain:Corrinoideprotein Methyltransferase und das zugehörige Corrinoideprotein liegen in *Methanobolus vulcani* B1d in einem Operon vor. Selbiges konnte in *Mc. vulcani* in der vorliegenden Arbeit auf bioinformatischer Ebene ebenfalls gezeigt werden (3.2.2). Bis vor wenigen Jahren waren einzig Co-Kulturen von verschiedenen Bakterien und methanogenen Archaeen bekannt die Betain verstoffwechselten. *Clostridium sporogenes* und *Haloanaerobacter salinaris* können Betain im Rahmen von Stickland-Reaktionen in

Kombination mit anderen Aminosäuren zu TMA und Acetat metabolisieren (Naumann et al., 1983; Mouné et al., 1999). TMA kann schließlich von methanogenen Archaeen als Substrat genutzt werden (King, 1984). Der Weg der direkten Demethylierung des Betains wie er in *Mc. vulcani* vorkommt benötigt dagegen keine Interaktion mit weiteren Organismen. Die Demethylierung nur einer Methylgruppe des Betains mit DMG als Endprodukt wirft jedoch Fragen auf, da zwei Methylgruppen ungenutzt bleiben. Womöglich hängt der Prozess mit der Osmoadaption zusammen. Sowohl Betain als auch DMG haben Eigenschaften als kompatible Solute in halophilen Mikroorganismen (Galinski & Trüper, 1994; Menaia et al., 1993; Robertson et al., 1990). Das bedeutet, dass sowohl das Substrat als auch das Produkt des Energiestoffwechsels potentiell zur Osmoadaption genutzt werden können (Watkins et al., 2014). Generell sind Vertreter der Familie Methanosarcinaceae zwar auch in der Lage zur Osmoadaption Kalium-Ionen im Cytoplasma anzureichern, sowie Glutamat oder N ϵ -Acetyl- β -Lysin als Osmolyte zu produzieren, doch die Aufnahme von Betain aus dem Medium inhibiert die Produktion der weiteren Osmolyte (Roberts, 2005). Daher ist es für *Mc. vulcani* wahrscheinlich, dass es insbesondere bei hohen Salzkonzentrationen zur Nutzung von Betain bzw. DMG als Osmolyt kommt. In dieser Arbeit lag die NaCl-Konzentration des Mediums bei etwa 2 % [w/v], wobei ebenso einige weitere Salze vorlagen. DMG akkumulierte nicht in den Zellen und wurde sekretiert, da es in äquivalenten Mengen zum verbrauchten Betain im Medienüberstand detektiert werden konnte. Dies bedeutet, dass es möglicherweise erst bei höheren Salinitäten vom Organismus als kompatibles Solut genutzt wird.

Neben Betain können methanogene Archaeen, unter anderem einige *Methanococcooides*-Spezies, auch weitere quartäre Amine wie Tetramethylamin, Cholin oder Dimethylethanolamin unmittelbar für die Methanogenese verwerten (Kurth et al., 2020; Watkins et al., 2012). Neben der direkten Abspaltung der drei Methylgruppen von Cholin bis hin zum Endprodukt Ethanolamin (Watkins et al., 2012), sind aus Umweltstudien ebenso, wie im Falle des Betains, komplexe Abbauwege bekannt, welche zu TMA als Abbauprodukt führen. Dieses kann schließlich von methylotrophen methanogenen Archaeen als Substrat genutzt werden (Fiebig und Gottschalk, 1983; King, 1984). Der Nachweis der direkten Nutzung der Methylgruppen von Cholin und Dimethylethanolamin durch einige *Methanococcooides*-Spezies erweiterte das Substratspektrum der methanogenen Archaeen erneut, wobei anzumerken ist, dass auch der in dieser Arbeit genutzt *Methanococcooides vulcani* Stamm zur Verwertung von Cholin und N,N-Dimethylethanolamin (Dimethylethanolamin) befähigt sein sollte (L'Haridon et al., 2014). Jedoch konnten in der vorliegenden Arbeit kein Wachstum und keine Methanbildung in Kulturen mit Cholin oder Dimethylethanolamin nachgewiesen werden. Dabei wurden Konzentrationen von 10-50 mM genutzt, wobei L'Haridon et al. (2014) nur 5 mM einsetzten. Möglicherweise haben höhere Konzentrationen der beiden Verbindungen inhibierende Auswirkungen auf den Metabolismus des Organismus. Mögliche Methyltransferasen für die

Demethylierung von Cholin oder Dimethylethanolamin konnten zwar nicht identifiziert werden, jedoch liegen zwei Methyltransferase mit unbekannter Funktion vor, die potentiell an der Demethylierung der beiden Substanzen beteiligt sein könnten (IMG-Identifikationsnummer: 2642594196 und 2642593514). Eine weitere Option besteht darin, dass Cholin nur unspezifisch von einigen *Methanococcoides*-Stämmen verwertet wird, da die Metabolisierung des Cholins (5 mM) teilweise wochenlang dauert und nur ein Stamm identifiziert wurde, der das Cholin innerhalb von zwei Wochen vollständig umsetzte (Watkins et al., 2012). Möglichweise ist *Methanococcoides vulcani* daher nur in der Lage Cholin durch Methyltransferase für andere Substrate unspezifisch zu verwerten und zeigt daher nur langsames Wachstum, was im Laufe der Kultivierungsphase von ca. 4 Wochen in dieser Arbeit nicht der Fall war. In Summe war eine Reproduktion der Verwertung von Cholin und Dimethylethanolamin durch *Mc. vulcani* in dieser Arbeit nicht möglich (3.2.1).

Im Vergleich zur Betainverwertung kann im Falle der Kultivierung von Organismen mit Cholin und TMA in *Methanococcoides*-Stämmen eine klare Diauxie festgestellt werden. Dabei verwerten die Organismen zunächst vollständig TMA und dessen Intermediate und erst dann kommt es zur Verwertung von Cholin (Watkins et al., 2012). Dies könnte die These einer unspezifischen Verwertung durch Methyltransferasen für andere Substrate stützen. Im Fall von Betain in Kombination mit TMA wurden beide Substanzen gleichzeitig, von Beginn der Kultivierung an, zu Methan metabolisiert (Watkins et al., 2014). Neben dem Substratspektrum konnte auf Grundlage der Wachstumsdaten und bioinformatischen Analysen in der vorliegenden Arbeit außerdem der Energiestoffwechsel von *Mc. vulcani* näher analysiert werden. Dies wird in den folgenden Abschnitten auf Grundlage der zentralen Enzymkomplexe verschiedener methanogener Archaea im Detail erläutert.

4.5 Die Komplexe der methanogenen Energiekonservierung

Da in den, in der vorliegenden Arbeit untersuchten, Organismen verschiedene Atmungskettenkomplexe bzw. Membranproteine von methanogenen Archaea in unterschiedlichen Kombinationen vorkommen, werden diese im Folgenden schrittweise eingeführt und die Rolle im Stoffwechsel der drei untersuchten Organismen erläutert, um letztlich ein Gesamtbild des Stoffwechsels zu erhalten. Zunächst werden jeweils die grundlegenden Eigenschaften und das Vorkommen der Komplexe erläutert, und die Bedeutung, für die in dieser Arbeit untersuchten Organismen, insbesondere in Anbetracht der erzielten Ergebnisse, eingeordnet.

4.5.1 Die membrangebundene Methyltransferase (Mtr) – Zentrale Rolle im Stoffwechsel von *Mc. vulcani*

Die membrangebundene Methyltransferase (Mtr) ist gut untersucht und gilt sowohl in klassischen hydrogenotrophen methanogenen Archaeen als auch in methylotrophen und

acetoklastischen methanogenen Archaeen der Gattung *Methanosarcina* als Schlüsselement des methanogenen Metabolismus (Welte & Deppenmeier, 2014). Die einfachste Form der Methanogenese, die Metabolisierung von CO₂ und H₂ zu Methan erlaubt den obligat hydrogenotrophen Organismen, nur an einer Stelle den Aufbau eines Ionengradienten über die Cytoplasmamembran und damit die Konservierung von Energie. Die Übertragung der Methylgruppe von Tetrahydromethanopterin auf Coenzym M wird von der membranständigen Methyltransferase katalysiert, die den Transfer der Methylgruppe an eine Konformationsänderung des Enzymkomplexes, einhergehend mit der Translokation von zwei Natrium-Ionen über die Cytoplasma-Membran, koppelt (Gottschalk & Thauer, 2001). Der Enzymkomplex besteht aus den acht Untereinheiten MtrA-H (Harms et al., 1995), wobei MtrA jene Untereinheit darstellt, welche als Corrinoid-Protein den Transfer der Methylgruppe zentral vermittelt. Wagner et al. (2016) gelang es auf Grundlage von Kristallstrukturen darzustellen, wie das Vitamin-B12-haltige Protein den Methylgruppentransfer im Detail katalysiert. Nach der Bindung des Substrats durch MtrH, wird die Methylgruppe von Tetrahydromethanopterin zunächst auf Cobalamin in MtrA übertragen, wobei diese von dort aus auf Coenzym M transferiert wird (Wagner et al., 2016). Eine Konformationsänderung in MtrE ermöglicht im Zuge dessen vermutlich die Translokation der Natrium-Ionen (Gottschalk & Thauer, 2001). In hydrogenotrophen methanogenen Archaeen ist die Methyltransferase wie beschrieben der zentrale Bestandteil der Energiekonservierung, doch auch im Rahmen der acetoklastischen Methanogenese der Gattungen *Methanosarcina* und *Methanotherix* nimmt der Komplex eine wichtige Rolle in der Energiekonservierung ein. Nach dem Transfer der Methylgruppe von Acetyl-CoA auf Tetrahydromethanopterin, wird diese ebenfalls durch die membrangebundene Mtr auf Coenzym M übertragen (Welte & Deppenmeier, 2014). Innerhalb der methyloptrophen Methanogenese von *Methanosarcina* spp. spielt die membrangebundene Mtr ebenso eine Schlüsselrolle, wobei der Proteinkomplex in diesem Fall die reverse Reaktion katalysiert und die Methylgruppe von Coenzym M auf Tetrahydromethanopterin überträgt. Dies geschieht unter Einstrom von Natrium-Ionen in die Zelle.

Auch in *Mc. vulcani* spielt die membrangebundene Mtr (IMG-Identifikationsnummern (*mtrA-H*): 2642592173-2642592180) auf Basis des in dieser Arbeit aufgestellten Stoffwechselmodells (Detail 4.6.3) eine entscheidende Rolle im Metabolismus. Dabei kann eine identische Rolle wie im Falle von *Methanosarcina* spp. postuliert werden. Wie in dieser Arbeit gezeigt, ist dem Organismus das Wachstum und die Methanogenese mit methylierten Verbindungen möglich, ohne einen externen Elektronendonator zu benötigen. Die ermittelten Verhältnisse der eingesetzten Methylgruppenkonzentration zum gebildeten Methan (1:0,75) in den Wachstumsexperimenten untermauerten das Vorliegen des genannten Stoffwechselmodells. Dies bedeutet, dass etwa ein Viertel der Methylgruppen im Rahmen des oxidativen Zweiges der Methanogenese zu CO₂ reduziert werden, um Reduktionsäquivalente für die Reduktion

der restlichen 75 % der Methylgruppen von Methyl-Coenzym M zu Methan zu generieren. Der Mtr-Komplex führt dabei im Rahmen des oxidativen Zweiges der Methanogenese die reverse Reaktion aus.

In *Mmc. luminyensis* hingegen ist die membrangebundene Mtr wie unter 4.2 beschrieben nicht vorhanden. Dies gilt für fast alle Vertreter der Ordnung Methanomassiliococcales (Borrel et al., 2014). Ausnahmen stellen wenige Organismen dar, in denen Gene für vereinzelte Untereinheiten identifiziert wurden. Dazu liegen jedoch keine näheren Untersuchungen vor, da es sich einzig um Genomanalysen handelt (Speth & Orphan, 2018; Söllinger & Urich, 2019; Cozannet et al., 2021).

Auch in *Mna. thermophilum* und den bislang beschriebenen Vertretern der Methanonatronarchaeales sind die Gene für die membrangebundene Mtr nicht vorhanden (Sorokin et al., 2017). Dies begründet, dass Wasserstoff oder Formiat als externer Elektronendonator für die Methanogenese benötigt werden, da der oxidative Zweig der Methanogenese nicht möglich ist. In der vorliegenden Dissertation konnte die Abhängigkeit der methylotrophen Methanogenese des Organismus von H₂ oder Formiat bestätigt werden (3.1.1).

4.5.2 Der Fpo-Komplex – Ein Komplex I-Analogen im Stoffwechsel von *Mc. vulcani* und *Mmc. luminyensis*

Der Fpo-Komplex spielt in vielen methanogenen Archaeen eine zentrale Rolle im Rahmen der Energiekonservierung, so auch in den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Organismen *Mmc. luminyensis* und *Mc. vulcani*. Insbesondere das „kopfloste“ Derivat in *Mmc. luminyensis* wurde detailliert bezüglich Elektronenaufnahme und -abgabe analysiert. Um die Rolle des Komplexes im Stoffwechsel einzuordnen, soll zunächst eine generelle Betrachtung des Enzymkomplexes, welcher ein Analogon von Komplex I der Atmungskette darstellt, erfolgen. Komplex I (NADH:Chinon-Oxidoreduktase / Nuo-Komplex) und dessen Analoga spielen in den Atmungsketten vieler Organismen eine entscheidende Rolle. Dazu gehören Bakterien, Archaeen und alle Eukaryoten. Der Proteinkomplex ist eines der größten bekannten Membranproteine und besteht aus 45 Untereinheiten mit einer molekularen Masse von insgesamt 980 kDa im Falle der mitochondrialen Variante, welche eine NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase darstellt (Ohnishi et al., 2018; Carroll et al., 2006). Der prokaryotische Komplex I ist simpler aufgebaut und besteht in den meisten Fällen aus nur 14 Untereinheiten, welche gemeinsam eine molekulare Masse von etwa 550 kDa besitzen (Sazanov, 2007; Walker, 1992; Yagi & Matsuno-Yagi, 2003; Friedrich, 1998; Friedrich et al., 1995). Die 14 Untereinheiten sind dabei jene, welche die zentrale Funktion des Komplexes ausüben. Die weiteren Untereinheiten im mitochondrialen Komplex haben zusätzliche Aufgaben wie das Abfangen reaktiver Sauerstoffspezies und bilden eine Art Gerüst um die Kernuntereinheiten

(Baradaran et al., 2013; Efremov et al., 2010; Guénebaut et al., 1998). Aufgrund des identischen Aufbaus der zentralen Module von prokaryotischem und eukaryotischem Komplex I, spielt die Analyse der simpler aufgebauten prokaryotischen Variante auch für die Erforschung von Komplex I in Bezug auf die humane Gesundheit eine wichtige Rolle. Mutationen in den zentralen Untereinheiten des Komplexes sind häufig die Gründe für schwerwiegende neurodegenerative Erkrankungen (Storz, 2006; Schapira, 1998).

Der Komplex I aus *E. coli* und *Thermus thermophilus* (*T. thermophilus*), welcher eine NADH:Ubiquinon Oxidoreduktase bzw. NADH:Menachinon-Oxidoreduktase darstellt, wurde bereits detailliert analysiert, wobei die Untersuchungen ebenso Rückschlüsse auf viele weitere Komplex I Derivate erlauben. Es liegen Kristallstrukturen und Kryo-elektronenmikroskopische Untersuchungen der hydrophilen Domäne als auch des gesamten Komplexes vor, sodass Funktion und Aufbau der einzelnen Untereinheiten im Detail bekannt sind (Baradaran et al., 2013; Efremov et al., 2010; Berrisford & Sazanov, 2009; Sazanov & Hinchliffe, 2006; Schimpf et al., 2022). Die Oxidation von NADH und die darauffolgende Reduktion eines Chinons in der Membran sorgt für die Translokation von vier Protonen durch den Komplex, wobei die Anzahl je nach Redoxpotential des vom jeweiligen Organismus genutzten Chinons, variieren kann. (Baradaran et al., 2013). Generell besteht Komplex I wie bereits unter 3.3.1 beschrieben aus drei funktionellen Einheiten (Abbildung 59). Erstens dem Elektronenaufnahmemodul (NuoEFG), welches NADH oxidiert und die Elektronen über einen Flavin-Cofaktor schrittweise auf vier [FeS]-Cluster überträgt. Zweitens den Untereinheiten NuoBCDI, die sich zwischen dem Elektronenaufnahmemodul und dem membranintegralen Modul befinden. Diese als membranassoziiertes Modul bezeichnete Einheit nimmt die Elektronen vom Elektronenaufnahmemodul auf und überträgt diese über zwei [FeS]-Cluster in NuoI und ein [FeS]-Cluster in NuoB auf den in NuoD lokalisierten Redox-aktiven Anteil des Chinons. Neben den beiden genannten Modulen aus löslichen Untereinheiten existiert drittens noch der membranintegrale Bereich aus NuoAHJKLMN, in welchem die Protonentranslokation unmittelbar stattfindet (Baradaran et al., 2013; Friedrich & Scheide, 2000).

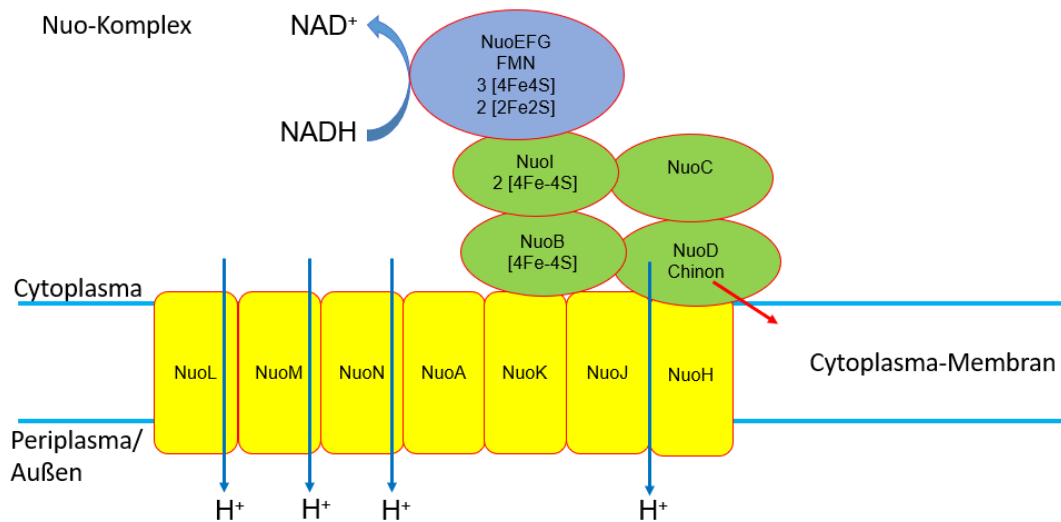


Abbildung 59: Schematischer Aufbau des NADH:Chinon Oxidoreduktase-Komplexes (Komplex I) aus *T. thermophilus* auf Grundlage der Kristallstrukturen von Baradaran et al. (2013). Gelb: Membranintegrale Untereinheiten. Grün: Membranassoziierte Untereinheiten, welche am Transfer der Elektronen von NuoEFG auf das Chinon beteiligt sind. Blau: Unmittelbar an der NADH-Oxidation beteiligte Untereinheiten.

Generell besitzt die bakterielle NADH:Chinon-Oxidoreduktase vier Protonen-Translokationsstellen (Friedrich & Scheide, 2000). Die Protonentranslokation findet wie bereits beschrieben im funktionellen Modul NuoAHJKLMN statt. Die einzelnen Proteine sind allesamt membranintegral. NuoL, NuoM, NuoN und NuoHJK sind dabei an der Translokation jeweils eines Protons beteiligt. Für die Translokation ist die Redoxenergie, die bei der Reduktion des [FeS]-Clusters in NuoB und besonders bei der Reduktion des Chinons frei wird, aufgrund der großen Potentialdifferenzen der Redoxpartner von besonderer Bedeutung (Efremov & Sazanov, 2012; Berrisford & Sazanov, 2009). Im Detail liegen die bei der Reduktion des Chinons entstehenden Hydroxylgruppen deprotoniert vor und die dadurch vorhandene negative Ladung sorgt für elektrostatische Wechselwirkungen mit umliegenden Aminosäureresten (Efremov & Sazanov, 2011), was zu Konformationsänderungen in zentralen Bereichen des Komplexes führt und die Protonentranslokation ermöglicht. Neueste Untersuchungen von Gutiérrez-Fernández et al., (2020) zeigten die Schlüsselrolle der alleinigen Bindung des Chinons, welche bereits entscheidende Konformationsänderungen auslöst und die Protonentranslokation überhaupt erst ermöglicht. Dazu passend liegen Daten vor, dass der Einlass des Chinons in die Bindekammer streng reguliert wird und mehrere Konformationsänderungen zur Öffnung nötig sind (Dhananjayan et al., 2022). Dies bestätigt die essentielle Rolle der Chinonbindung für den Mechanismus des Komplexes, die je nach Redoxstatus reguliert wird. Bindung und Reduktion des Chinons sowie der abschließende Austausch durch ein oxidiertes Chinon, sind entscheidende Prozesse für den Gesamtkomplex und die Konformationsänderungen zur Translokation der Protonen (Baradaran et al., 2013; Gutiérrez-Fernández et al., 2020; Dhananjayan et al., 2022). In *Methanosarcina* spp. kann

dem funktionellen Chinon-Analogen Methanophenazin, welches dem Fpo-Komplex des Organismus als Elektronenakzeptor dient, eine ähnliche Funktion zugeschrieben werden. Das Vorliegen von Methanophenazin als Elektronenüberträger in den Membranen wurde bislang für alle Vertreter der Methanosarcinales angenommen und daher auch für *Methanococcoides* spp. postuliert. In dieser Arbeit durchgeführte Alignments mit den Untereinheiten NuoD von *T. thermophilus* sowie FpoD von *Mc. vulcani* und *Ms. mazei* zeigten, dass die entscheidenden Aminosäuren für die Chinonbindung (Baradaran et al., 2013; Tyrosin, Histidin, Aspartat; Vgl. 3.3.1.6), nicht konserviert vorliegen. Sowohl in *Ms. mazei* als auch *Mc. vulcani* sind der Histidin-Rest gegen Prolin und der Aspartat-Rest gegen Phenylalanin ausgetauscht (Abbildung 60). Die ausgetauschten Aminosäuren stellen putativ in beiden Organismen eine Adaptation an das größere 3-Ring-System von Methanophenazin dar. Rechnerisch werden vom Komplex bei der Elektronenübertragung von $F_{420}H_2$ auf Methanophenazin zwei Protonen über die Membran transloziert. (Welte & Deppenmeier, 2014).

<i>T. thermophilus</i>	MREEFLEEIPLDAPPEEAKELRTEVMTLNVGPQHPSTGVLRLMVTLSGEEVLEVVPVPHIG	60
<i>Mc. vulcani</i>	-----MDENVAPSEMIIVHLGPGHPMQPGPFRNLNLRGETVVDAAEIELG	44
<i>Ms. mazei</i>	-----MEEMLESNEMIVHLGPGHPMQPGPFRNLNLRKGETIMDAEVEMG	44
	: : . * ::***** * : ** : * ** : : . . : *	
<i>T. thermophilus</i>	YLHTGFTEKTMEYRQTYLQNIYTYTPRMDLHSAFDLAYALAVEKLVGAVVPPRAETIRVIL	120
<i>Mc. vulcani</i>	FIHKGIEKILESQTYLQGIPIVDRICLTAMTNEEAYVGAVEKLADIEVPEPERSQYIRVIL	104
<i>Ms. mazei</i>	YIHKGIEKILENRTYLQGITIVDRICLVALTNEECYVGCVEKLLDIEPPERAQYIRVIL	104
	::*.*:** * : ***** . * : ** : : : . * . ***** . * ** : *****	
<i>T. thermophilus</i>	NELSRLASHLVFLGTGLLGLGALTPFFYAFRERETILDLEFVWVTGQRFHHNYIRIGGVKE	180
<i>Mc. vulcani</i>	EELSRLQSHLLGMGEFGEFIFVSMFMYTIKEREDILSLMDIVTGARVHTFLYGGVVRG	164
<i>Ms. mazei</i>	EELSRLQSHLLGLGEYGEFIFVSMFMYTIKEREDILTLDIVTGARVTHSYLRFGGVVRD	164
	:***** ** : * : * : : * : : : * * * : * * * . * : : : * * :	
<i>T. thermophilus</i>	DLPEEFVPELKKLLDVLPHRIDEYEALFAESPIFYERARGVGVIPPEVAIDLGLTGGSRLR	240
<i>Mc. vulcani</i>	DLPEGFKEKSAVVFAGLREQIADYRKLFDNDEIYKQRCFVGVILEAKTARDLVSGPALR	224
<i>Ms. mazei</i>	DLPEGFKEKTIPLVNLKLVIRDYEEFYSDTIYRERTIGIGVLTADAESLGVSGPVLR	224
	**** * : : : * . * : * . * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
<i>T. thermophilus</i>	ASGVNYDVRKAYPYSYETTYTFDVPVPLGERGDVFRMLVRIEMRESVKIIKQALERLEPG	300
<i>Mc. vulcani</i>	ATGVAFDIRKDEPYLVYKDLDFKVTATDGDIAARIDVRLDEMLEAMYIEQCLDQMPSPG	284
<i>Ms. mazei</i>	ATGVVFDIRKNEPYLVYRDLDFKVTETAGDCFARVQVRLNEMRESIYIEQCLDMIPNG	284
	. * : * * * * * . * . * * * * * : * * * : * * * : * * * : * *	
<i>T. thermophilus</i>	PVRDPNPQITPPPRHLLETSMEAVIYHFHYTEGFHPPKGEVYVPTESARGELGYIVSD	360
<i>Mc. vulcani</i>	PLFYEDSP-----YGVRTPVMRVPEGDVFHRVEDPRGEMGFYVVS	325
<i>Ms. mazei</i>	PIFPEGTP-----YGKRTPVMRVPEGEVDFHRVEDPRGEMGMVMVSD	325
	* : . : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	
<i>T. thermophilus</i>	GGSMFYRVKVRAPSFVNLQSLPYACKGEQVPDMVAIIASLDPVMDVDVDR	409
<i>Mc. vulcani</i>	GSDKPHRVKIRGVPYPTMQALPPLITGTTVADVAAIAGSMDGCTSEADR	374
<i>Ms. mazei</i>	GSDRPFYRVKVRGPPYPTLQALPPLIIGTTVADMVSIAGSMDGCTSEVDR	374
	* . * : * * * : * * : : * * * * * * * : * * * : * * * : * * *	

Abbildung 60: Alignment der NuoD bzw. FpoD Untereinheit der unterschiedlichen Komplex I-Derivate aus *T. thermophilus* (WP_014630201.1), *Ms. mazei* (AAF65734.1) und *Mc. vulcani* (WP_091688475.1). Grün markiert sind die auf Grundlage von Kristallstrukturen ermittelten Aminosäuren, welche im Falle des Komplexes von *T. thermophilus* für die Bindung des Chinon-Kopfes genutzt werden (Baradaran et al. (2013).

Die Wichtigkeit von Chinon oder eines Analogons als Elektronenakzeptor von Komplex I bzw. dessen Derivaten wirft Fragen hinsichtlich der postulierten Elektronenübertragung im

„kopfloren“-Fpo-Komplex von *Mmc. luminyensis* auf, welcher in der vorliegenden Arbeit im Detail analysiert wurde. Kröninger (2018) konnten in Membranen des Organismus eine Fd_{red}:Heterodisulfid Oxidoreduktase-Aktivität feststellen, die auf den „kopfloren“ Fpo-Komplex zurückgeführt wurde, welcher putativ reduziertes Ferredoxin als Elektronendonator und die Heterodisulfidreduktase HdrD als Elektronenakzeptor nutzt (Abbildung 61). In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass der lösliche, aber membranassoziierte Anteil des Fpo-Komplexes während der Membranpräparation nicht in die cytoplasmatische Fraktion übergeht und an der Membran erhalten bleibt (3.3.2.3). Dies verifiziert die von Kröninger (2018) auf Grundlage der Fd_{red}:Heterodisulfid Oxidoreduktase-Aktivität aufgestellte Hypothese.

Die postulierte Übertragung der Elektronen vom Fpo-Komplex auf HdrD und damit schließlich auf Heterodisulfid weist jedoch in der Theorie einige Schwierigkeiten auf. So wurde die Rolle des Chinons im Komplex von *T. thermophilus* oder *E. coli* bereits oben beschrieben. Die Bindung des Chinons ist zentral für die Konformationsänderungen im Komplex, die schließlich zur Translokation von Protonen führen. Ebenso gilt dies für die anschließende Reduktion des Chinons und den Austausch des reduzierten Chinons durch die oxidierte Form (Baradaran et al., 2013; Gutiérrez-Fernández et al., 2020). Da sich in den Membranen von *Mmc. luminyensis* keine Atmungskettenchinone oder funktionelle Analoga wie Methanophenazin detektieren lassen (Becker et al., 2016), ist fraglich wie die Protonentranslokation ermöglicht wird und an welcher Stelle eine Übertragung der Elektronen auf die [FeS]-Cluster in HdrD (Vgl. 4.5.7.2) erfolgt. Da die Chinonbindetasche in FpoD von *Mmc. luminyensis* auf Grundlage der bioinformatischen Analysen im Rahmen dieser Arbeit hochkonserviert vorhanden ist und die entscheidenden Aminosäuren zur Chinonbindung vorliegen (3.3.1.6), kann darüber spekuliert werden, ob gegebenenfalls ein neuartiges, bislang unbekanntes Chinon vorliegt. Einige spezielle Chinone sind in dieser Hinsicht für Archaea bereits beschrieben wurden (Elling et al., 2016). Möglicherweise ist in diesem Fall noch eine weitere Protein-Komponente zwischen Fpo-Komplex und HdrD zwischen geschaltet. Falls jedoch die Übertragung der Elektronen wie von Kröninger (2018) postuliert direkt vom Fpo-Komplex auf HdrD geschieht und FpoD daran beteiligt ist, kann ebenso über ein kovalent gebundenes Chinon in der Untereinheit spekuliert werden. Tryptophan-Tryptolochinon ist beispielsweise ein kovalent gebundener Chinon-ähnlicher Elektronenüberträger in Methylamin Dehydrogenasen, welcher aus der chemischen Modifikation von zwei Tryptophan-Resten des Proteins entsteht (Davidson, 2001). Sechs Tryptophan-Reste finden sich beispielsweise auch im FpoD Protein von *Mmc. luminyensis*, wohingegen die FpoD-Proteine von *T. thermophilus* und *Ms. mazei* einen bzw. keinen Tryptophan-Rest enthalten. Auch die Modifizierung anderer Aminosäuren zu einem Elektronenüberträger ist denkbar. So wurde dies bereits für Tyrosin-Reste im Photosystem II ausführlich beschrieben (Debus et al., 1988; Gerken et al., 1988; Ma & Barry, 1996; Schenck

& Maeda, 2018) und könnte auch im Falle des Tyrosin-Restes Y65 in FpoD von *Mmc. luminyensis* eine Rolle spielen. Zwar ist der genannte Rest in *E. coli* und *T. thermophilus* gemeinsam mit einem Histidin-Rest an der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zum Chinonkopf beteiligt, könnte in *Mmc. luminyensis* aber als Elektronenüberträger genutzt werden. Dies könnte schlussendlich dazu führen, dass keinerlei lösliches Chinon benötigt wird und die Elektronenübertragung dennoch über FpoD auf HdrD erfolgen kann. Weitere Untersuchungen könnten in Zukunft Aufschluss über die Beschaffenheit und den potentiellen Cofaktor der Untereinheit FpoD geben und damit auch die Analyse der hypothetischen Interaktion mit HdrD detaillierter ermöglichen. Da HdrD nach der Membranpräparation im Rahmen dieser Arbeit mittels spezifischer Antikörper in der cytoplasmatischen Fraktion detektiert werden konnte, ist von einer tendenziell eher schwachen Interaktion auszugehen (3.3.2.4). Dies untermauerte die Daten von Kröninger (2018) wobei aufgereinigtes HdrD zu den Membranpräparationen zugegeben werden musste, um genannte Fd_{red}:Heterodisulfid Oxidoreduktase-Aktivität zu erzielen. Gleiches galt für den putativen Elektronendonator des Komplexes in Form von reduziertem Ferredoxin, welches mit molekularem Wasserstoff als Reduktionsmittel durch den MvhAGD/HdrABC-Komplex (4.5.7.1) gebildet wird (Kröninger, 2018). Dem „kopflosen“ Fpo-Komplex von *Mmc. luminyensis* fehlt das NADH-oxidierende Modul NuoEFG. Auf Grundlage des Elektronenflusses im Komplex von *T. thermophilus*, ist daher Fpol jene Untereinheit, welche Elektronen unmittelbar von Fd_{red} aufnehmen kann. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit bioinformatisch untersucht, wobei gezeigt werden konnte, dass eine potentielle Interaktion von Ferredoxin mit Fpol entweder direkt an Fpol erfolgt (Abbildung 41), oder aber ein N-terminaler Anhang von Fpol als Aufnahmevorrichtung dient (Abbildung 42). Der Anhang erfährt dann potentiell eine Konformationsänderung um Fd_{red} in eine geeignete Position für den Elektronentransfer auf die [4Fe-4S]-Cluster in Fpol zu bringen (3.3.1.3). Für beide Varianten liegen an den hypothetischen Interaktionspunkten einige positiv geladene Aminosäuren in Fpol vor, welche der Interaktion mit dem eher negativ geladenen Ferredoxin (3.3.1.2) dienen könnten.

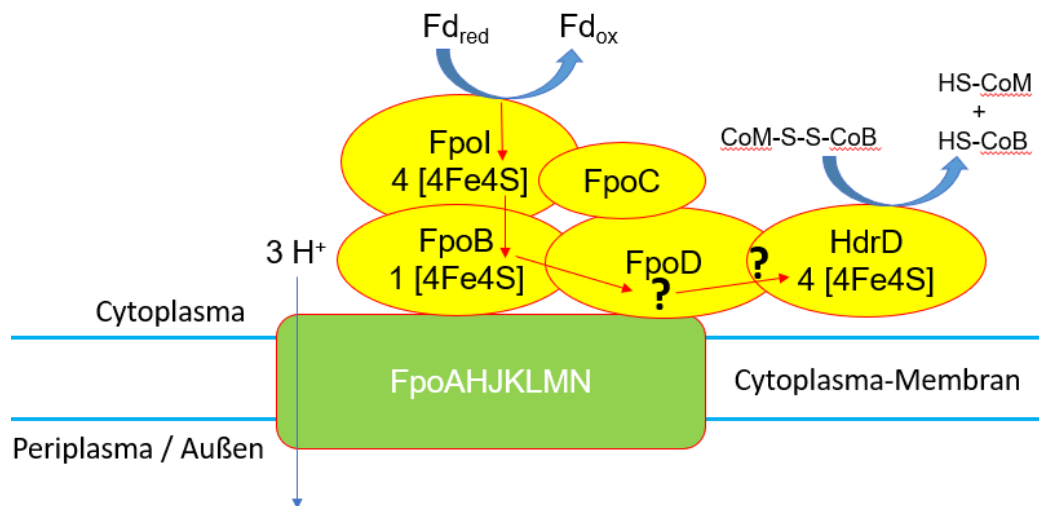


Abbildung 61: Schematische Abbildung des Fpo-Komplexes von *Mmc. luminyensis* und dessen putativen Interaktionspartner HdrD und Ferredoxin. Insbesondere die Interaktion mit HdrD und der mögliche Cofaktor von FpoD, welcher am Elektronentransport beteiligt ist, sind unklar. Grün: Membranintegrale Untereinheiten; Gelb: Lösliche aber membranassoziierte Untereinheiten.

Da auch weitere Organismen mit „kopflösen“ Fpo-Komplexen oder zu NuoEFG alternativen Kopfmodulen existieren (Abbildung 62), können die in der Literatur vorliegenden Untersuchungen dazu, möglicherweise zur weiteren Aufklärung der Elektronenübertragung im „kopflösen“ Fpo-Komplex von *Mmc. luminyensis* beitragen. Innerhalb der ϵ -Proteobakterien fehlen beispielsweise die Gene, welche für NuoE und für NuoF kodieren. NuoG ist hingegen vorhanden, enthält jedoch ein zusätzliches [FeS]-Cluster (Smith et al., 2000). Da NuoF für die Oxidation von NADH zentral ist und FMN als wichtigen Cofaktor gebunden hat, liegt es nahe, dass NADH nicht als Elektronendonator genutzt werden kann. Bei Betrachtung der genetischen Ausstattung von *Campylobacter jejuni* und dem nah Verwandten, ebenfalls humanpathogenen Vertreter *Helicobacter pylori*, fiel auf, dass sich zwei zusätzliche Gene im *nuo*-Operon befinden. Dabei handelt es sich um *cj1574* und *cj1575*, allgemein auch als *nuoX* und *nuoY* bezeichnet (Tomb et al., 1997; Smith et al., 2000). Neuere Untersuchungen in dieser Hinsicht zeigten, dass NuoX und NuoY eine hohe Affinität zu FAD und insbesondere dessen Flavin-Anteil haben (Calderon-Gomez et al., 2017). Dies bestärkte eine Theorie die die Interaktion des Komplexes mit Flavodoxin als Elektronendonator vorsieht (Abbildung 62 A). Flavodoxine sind kleine, saure Proteine mit FMN-Cofaktor, welche Ferredoxinen ähneln (Sancho, 2006). Die Proteine spielen in *Campylobacter jejuni* sowie *Helicobacter pylori* beispielsweise als Elektronendonator bzw. Elektronenakzeptor vieler Enzyme eine wichtige Rolle im Metabolismus (Taylor & Kelly, 2019; Weerakon & Olson, 2008; Freigang et al., 2002). Die Interaktion des Komplexes mit Flavodoxin als Elektronendonator in ϵ -Proteobakterien wird zusammenfassend auf Grundlage der Stoffwechselcharakteristika und bioenergetischer Berechnungen zur Anzahl der translozierten Protonen als hochwahrscheinlich angesehen (Taylor & Kelly, 2019). Da die Untereinheiten NuoX und NuoY in dem in dieser Arbeit

untersuchten Organismus *Mmc. luminyensis* nicht vorliegen kann eine Nutzung von Flavodoxin als Elektronendonator des Fpo-Komplexes mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

Eine weitere wichtige Gruppe von Bakterien welche das *nuo*-Operon nicht vollständig enthält sind Cyanobakterien. Sowohl innerhalb der genannten Organismengruppe als auch in Chloroplasten fehlt dem vorhandenen Komplex I-Derivat das Elektronen-Einspeisemodul NuoEFG (Battchikova & Aro, 2007). Homologa zu NuoY und NuoX der ϵ -Proteobakterien existieren ebenfalls nicht in Cyanobakterien, sodass auch eine Flavin/Flavodoxin-Reduktion durch das Komplex I-Derivat als unwahrscheinlich erscheint. Als Besonderheit erweist sich an dieser Stelle, dass zusätzliche Untereinheiten existieren, die nur in Cyanobakterien vorkommen und deren exakte Rolle teilweise noch nicht bekannt ist (Battchikova et al., 2011; Nowaczyk et al., 2011; Battchikova & Aro, 2007; Herranen et al., 2004).

Im Jahre 2019 gelang Schuler et al. die Aufreinigung des Komplexes aus dem thermophilen Cyanobakterium *Thermosynechococcus elongatus*. Untersuchungen mittels Cryo-Elektronenmikroskopie, umfassende Analysen zur Interaktion des Komplexes mit den akzessorischen Untereinheiten sowie Analysen des Elektronenflusses zeigten, dass, wie im Fall von *Mmc. luminyensis*, reduziertes Ferredoxin den Elektronendonator des Komplexes I in Cyanobakterien darstellt (Abbildung 62 A). Der Interaktionsnachweis gelang mit aufgereinigten Komponenten, wobei außerdem gezeigt werden konnte, dass das Protein NdhS, welches eine der zusätzlichen Untereinheiten in Cyanobakterien darstellt, mit einem positiv geladenen C-Terminus (5 Lysinreste) zentral an der Annäherung des negativ-geladenen Ferredoxins an den Komplex beteiligt ist. Das Vorliegen positiv geladener Aminosäuren-Reste konnte wie beschrieben auch an den in dieser Arbeit ermittelten putativen Interaktionsorten des Ferredoxins mit Fpol von *Mmc. luminyensis* gezeigt werden (3.3.1.3). Die Situation in Cyanobakterien stützt die Hypothese, dass positiv geladene Aminosäure-Reste eine wichtige Rolle bei der Interaktion mit Ferredoxin spielen, auch wenn die zusätzlichen Untereinheiten aus Cyanobakterien auf Basis von Blast-Analysen im Rahmen dieser Arbeit in *Mmc. luminyensis* nicht vorliegen. Die Elektronen von Ferredoxin werden auch in Cyanobakterien erwartungsgemäß unmittelbar auf das [FeS]-Cluster in der zu Nuol aus *E. coli* homologen Untereinheit übertragen und NdhS dient einzig der Interaktion (Schuller et al., 2019; Laughlin et al., 2020). Die Übertragung der Elektronen auf Nuol stützt die in dieser Arbeit aufgestellte These, dass Fpol in *Mmc. luminyensis* jene Untereinheit ist, welche mit großer Wahrscheinlichkeit die Elektronen von Fd_{red} aufnimmt.

Auch im Phylum der Bacteroidetes sind „kopfloose“ Komplex I-Analoga z.B. innerhalb der Gattungen *Prevotella* und *Bacteroides* verbreitet, wobei bislang keine detaillierteren Untersuchungen zu potenziellen Interaktionspartnern vorliegen (Franke, 2020; Franke &

Deppenmeier, 2018). Für den kopflosen Komplex I aus *Prevotella copri* (*P. copri*) wurde in diesem Zusammenhang postuliert, dass reduziertes Ferredoxin als Elektronendonator dient und der Komplex damit insgesamt eine Ferredoxin:Menachinon-Oxidoreduktase darstellt (Franke, 2020; Abbildung 62 A). Die Elektronenaufnahme des Komplexes könnte mit der Situation in *Mmc. luminyensis* vergleichbar sein, da keine zusätzlichen Untereinheiten wie in Cyanobakterien vorliegen. Genaue Untersuchungen zur potentiellen Interaktion mit reduziertem Ferredoxin fehlen jedoch bislang.

Komplex I-Analoga sind ebenso innerhalb der Archaea weit verbreitet (Friedrich & Scheide, 2000). Entsprechende Derivate finden sich beispielsweise in *Sulfolobus solfataricus* (She et al., 2001), *Thermoplasma acidophilum* (Ruepp et al., 2000), *Halobacterium salinarum* (Ng et al., 2000), *Archaeoglobus fulgidus* (Kunow et al., 1994) sowie Vertretern der Methanosarcinales (Welte & Deppenmeier, 2014). Den Organismen fehlt ebenfalls das Elektroneneinspeisemodul NuoEFG, sodass NADH nicht als Elektronendonator dienen kann. Detaillierte biochemische Analysen zeigten, dass das Komplex I-Analogon von *Archaeoglobus fulgidus* als $F_{420}H_2$:Menachinon Oxidoreduktase (Fqo-Komplex) fungiert (Kunow et al., 1994). Der Cofaktor $F_{420}H_2$ (reduzierte Form von F_{420}) dient dabei als Überträger von zwei Elektronen. Zur Elektronenaufnahme nutzt der Komplex ein alternatives Kopfmodul. Die Untereinheit FqoF liegt dem restlichen Fqo-Komplex auf und ist in der Lage $F_{420}H_2$ zu oxidieren (Brüggemann et al., 2000; Abbildung 62 A).

Innerhalb der methanogenen Archaea spielt der Cofaktor F_{420} wie zuvor bereits mehrfach beschrieben auch eine zentrale Rolle (Ferry, 2010). In Vertretern der Gattung *Methanosarcina*, welche auch zur acetoklastischen und methylotrophen Methanogenese befähigt sind, liegt ebenfalls ein Komplex I-Analogon, der Fpo-Komplex, vor. Dabei dient FpoF, welches ein zu FqoF homologes Protein darstellt und FAD enthält, als Elektroneneinspeisemodul und ist zur Oxidation von $F_{420}H_2$ befähigt (Abbildung 62 B). Zusätzlich enthält der Komplex im Falle von *Methanosarcina* spp. noch die Untereinheit FpoO, deren genaue Funktion bislang ungeklärt ist. Die Elektronenübertragung des Komplexes erfolgt auf den membranlösliche Elektronenträger Methanophenazin. (Welte & Deppenmeier, 2014; Deppenmeier, 2004). Sowohl FpoF und FpoO sind in *Mmc. luminyensis* nicht zu finden, sodass $F_{420}H_2$ als Elektronendonator des Komplexes ausgeschlossen werden kann. Der Fpo-Komplex (IMG-Identifikation: 2642592412-2642592424) mit FpoF (IMG-Identifikation: 2642594075) als Kopfmodul kommt jedoch in *Mc. vulcani* vor und die Gene der Untereinheiten konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit im Genom des Organismus durch Blast-Analysen mit den entsprechenden Genen aus *Ms. mazei* identifiziert werden. Auch die für *Methanosarcina* spp. typische zusätzliche Untereinheit FpoO liegt in *Mc. vulcani* vor (IMG-Identifikation: 2642592424) und das *fpoF*-Gen ist wie in *Ms. mazei* (Welte & Deppenmeier, 2014) nicht in

einem Operon mit den weiteren Genen der Untereinheiten des Komplexes lokalisiert. Im Stoffwechsel des Organismus spielt der Komplex mit großer Wahrscheinlichkeit eine identische Rolle wie in *Methanosarcina* spp. und dient der Reoxidation des im Rahmen des oxidativen Zweiges der Methanogenese entstehenden $F_{420}H_2$ (Kurth et al., 2020). Die potentielle Möglichkeit der Elektronenübertragung auf Methanophenazin wurde bereits beschrieben (Abbildung 60). Die in der vorliegenden Arbeit generierten Daten zeigen eindeutig, dass der Organismus keine weitere Elektronenquelle, wie beispielsweise H_2 , braucht, um die methylotrophe Methanogenese zu betreiben. Außerdem werden nur etwa 75 % der in den Wachstumsversuchen eingesetzten Methylgruppen zu Methan metabolisiert (Vgl 3.2.1). Beide Ergebnisse stützen wie bereits eingeführt ein Stoffwechselmodell wie in *Methanosarcina* spp., welches eine Oxidation von 25 % der Methylgruppen zu CO_2 vorsieht (4.6.3). Die Nutzung des Fpo-Komplexes im Energiemetabolismus von *Mc. vulcani* kann daher als hoch wahrscheinlich angesehen werden.

Auch in den Arten der obligat acetoklastischen Gattung *Methanotherix* (*Mtx.*) existiert ein Komplex I-Derivat. Dieser Komplex besitzt jedoch wie *Mmc. luminyensis* kein Elektroneneinspeisemodul, da dem Organismus beispielsweise NuoEFG oder FpoF fehlen. Die wahrscheinlichste Variante eines möglichen Elektronendonors findet sich in reduziertem Ferredoxin, welches innerhalb der acetoklastischen Methanogenese entsteht. Welte & Deppenmeier (2011 b) stellten dieses Modell auf Grundlage von Aktivitätstests mit präparierten Membranen aus *Mtx. thermoacetophila* auf, wobei mit Heterodisulfid als Elektronenakzeptor eine Aktivität hinsichtlich der Oxidation von Fd_{red} gezeigt werden konnte. Das Modell geht von einer direkten Interaktion von Fd_{red} mit dem „kopflosten“ Komplex I aus (Welte & Deppenmeier, 2011 b; Abbildung 62 B). Rein funktionell käme dabei, wie im Falle von *Mmc. luminyensis* Fpol als wahrscheinliches Elektronenaufnahmemodul in Frage, wenn die Reihenfolge des Elektronenflusses in *E. coli* zugrunde gelegt wird (Baradaran et al., 2013). Dazu passend wurde in Fpol von *Mtx. thermoacetophila* ein C-Terminus identifiziert, welcher eine Häufung von Lysinresten enthält. Das negative geladene Ferredoxin könnte mit den positiv geladenen Lysinresten interagieren (Welte & Deppenmeier, 2011 b), wie es auch für NdhS im Falle der Cyanobakterien beschrieben wurde. Gleiches gilt wie bereits eingeführt für die beiden putativen Interaktionsstellen mit Ferredoxin von Fpol aus *Mmc. luminyensis*, die in der vorliegenden Arbeit bioinformatisch ermittelt wurden, auch wenn der C-Terminus von Fpol keine Häufung von Lysin-Resten enthält (3.3.1.3). Weitere biochemische Untersuchungen könnten in Zukunft klären, welche der beiden Interaktionsstellen in der Realität vorliegt und wie die Elektronenübertragung im Detail erfolgt.

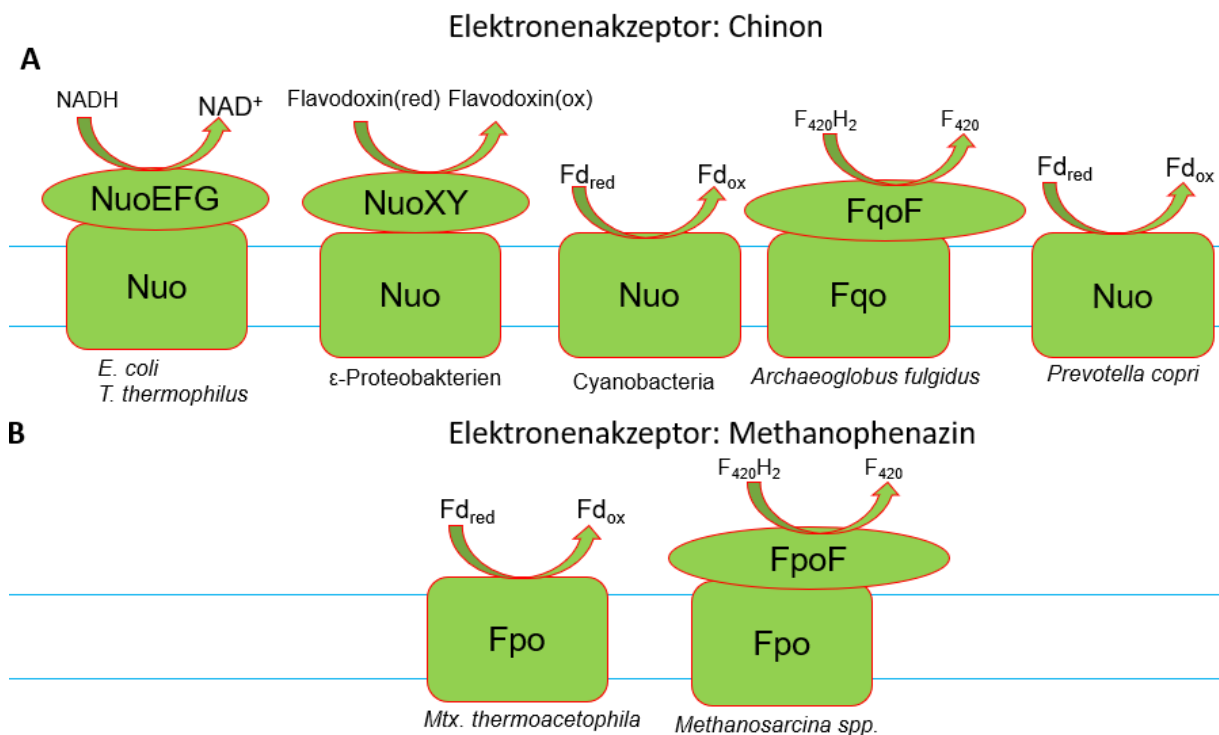


Abbildung 62: Schematische Darstellung von Komplex I-Analoga aus verschiedenen Organismen bzw. Organismengruppen und deren putativer Elektronenaufnahmemodule bzw. Elektronendonatoren. Als membranlösliche Elektronenakzeptoren der Komplexe dient entweder ein Chinon (A) oder Methanophenazin (B).

In Komplex I von Organismen mit NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase und damit auch in den Mitochondrien der Eukaryoten kommt es wie beschrieben zur Translokation von vier Protonen über die Cytoplasma-Membran (Baradaran et al., 2013). Je nach Redoxpotential des von weiteren Organismen genutzten Chinons können rechnerisch nur drei Protonen transloziert werden, wobei unklar ist, welche der beteiligten Untereinheiten in diesem Fall kein Proton transloziert. Durch die Konzentrationsabhängigkeit der Redoxpotentiale ist eine Translokation von vier Protonen ebenso denkbar, wenn die Konzentrationen der Redoxpartner entsprechend vorliegen. Bei Berücksichtigung der Standard-Redoxpotentiale von $F_{420}H_2$ und Methanophenazin transloziert der Fpo-Komplex von *Methanosarcina* spp. zwei Protonen (Welte & Deppenmeier, 2014), was somit auch für den Fpo-Komplex von *Mc. vulcani* gilt. Hinsichtlich der Translokation von Protonen ergibt sich für den „kopflösen“ Fpo-Komplex von *Mmc. luminyensis* rechnerisch ein Wert von drei, wenn die Standard-Redoxpotentiale von Ferredoxin als Elektronendonator und Heterodisulfid als Elektronenakzeptor zu Grunde gelegt werden (Kröninger, 2018). Sowohl im Falle des Komplexes von *Mmc. luminyensis* als auch von *Mc. vulcani* besteht daher die Möglichkeit, dass ein Teil der Membran-Untereinheiten, welche Protonen translozieren können inaktiviert sind. Eine experimentelle Bestätigung dafür liegt jedoch bislang nicht vor.

4.5.3 Vho-Hydrogenasen im Energiestoffwechsel von methanogenen Archaeen

In den meisten *Methanosarcina* spp. erfolgt nach Freisetzung von Wasserstoff durch die Ech-Hydrogenase (4.5.4), während der acetoklastischen und methylotrophen Methanogenese die Oxidation des Wasserstoffs durch die Vho-Hydrogenase, welche die Elektronen auf Methanophenazin überträgt und membrangebunden vorliegt. Durch die Möglichkeit der Oxidation von H₂ spielt der Enzymkomplex auch während der hydrogenotrophen Methanogenese von *Methanosarcina* spp. eine entscheidende Rolle (Ide et al., 1999; Welte & Deppenmeier, 2014). Auch in *Mna. thermophilum* kommt der Enzymkomplex vor. In der vorliegenden Arbeit wurde der Komplex detailliert biochemisch charakterisiert und die Rolle im Energiestoffwechsel des Organismus aufgeklärt (3.1.3). Eine kurze Einordnung des Komplexes soll als Grundlage für die Einordnung der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse dienen.

Die Vho-Hydrogenase liegt generell membrangebunden vor und kann in Anwesenheit von Detergenzien aufgereinigt werden (Deppenmeier et al., 1992; Kemner & Zeikus, 1994). Im Falle von *Ms. mazei* sind drei Isoenzymkomplexe beschrieben (Vho, Vht, Vhx), die allerdings bei der Aufreinigung nicht getrennt werden können (Deppenmeier et al., 1992). Dennoch liegen detaillierte Kenntnisse zur Biochemie des Enzymkomplexes vor. Die Vho-Hydrogenase katalysiert den Schritt der Übertragung der Elektronen von molekularem Wasserstoff auf das funktionelle Chinon-Analogon Methanophenazin. Bei Wachstum auf methylierten Verbindungen bzw. Acetat ist genannter Schritt daher, wie bereits eingeführt, der Wasserstoff-freisetzenden Ech-Hydrogenase (4.5.4) nachgeschaltet. Auch die Vho-Hydrogenase trägt der Energiekonservierung bei. Zwei Protonen werden auf der extrazellulären Seite freigesetzt, wenn der molekulare Wasserstoff oxidiert wird. Methanophenazin nimmt außerdem bei der Reduktion zwei Protonen aus dem Cytoplasma auf, wohingegen diese putativ durch die Heterodisulfid-Reduktase HdrDE (4.5.7.2) bei der Oxidation von Mph_{red} an der Außenseite der Membran abgegeben werden. Im Zuge der Reaktion werden zudem zwei Protonen auf der Innenseite Membran bei der Reduktion des Heterodisulfids verbraucht, so dass insgesamt eine vektorielle Protonenverschiebung mit der Stöchiometrie von 4H⁺/2e⁻ zu beobachten ist (Welte & Deppenmeier, 2014; Ide et al., 1998). Der Enzymkomplex besteht wie unter 3.1.3.6 eingeführt aus drei Untereinheiten, von denen zwei membranassoziiert vorliegen (VhoA und VhoG) und eine in der Membran verankert ist (VhoC). VhoA und VhoG sind die typischen Untereinheiten von [NiFe]-Hydrogenasen. VhoA stellt die große Untereinheit mit [NiFe]-Cofaktor dar und VhoG enthält die drei [FeS]-Cluster der kleinen Untereinheit (Vignais & Billoud, 2007). VhoC ist ein membranintegrales Cytochrom des b-Typs mit zwei Häm-Gruppen und überträgt die Elektronen im Falle von *Methanosarcina* spp. schlussendlich auf Methanophenazin (Kamlage & Blaut, 1992; Brodersen et al., 1999; Thauer et al., 2010; Welte & Deppenmeier, 2014).

Genetische und biochemische Daten stützen außerdem die Annahme, dass VhoA mit VhoG über die Cytoplasma-Membran Co-transloziert wird und an der Außenseite der Cytoplasma-Membran vorliegt (3.1.3.6). Dadurch werden die bei der Oxidation des Wasserstoffs entstehenden Protonen an der Außenseite der Cytoplasma-Membran freigesetzt und tragen wie beschrieben der Energiekonservierung bei (Welte & Deppenmeier, 2014).

Auch das Genom von *Mna. thermophilum* enthält Gene, die jeweils für die Untereinheiten einer Vho-Hydrogenase und einer Mbh-Hydrogenase (4.5.4) kodieren. Die Rolle der beiden Hydrogenasen im Stoffwechsel des Organismus wurde in der vorliegenden Arbeit auf verschiedenen Ebenen untersucht, wobei unter anderem geklärt werden sollte, welche der beiden Hydrogenasen am Energiemetabolismus des Organismus beteiligt ist. Auf Grundlage der Transkriptabundanz (3.1.3.1), der hohen Hydrogenase-Aktivitäten der Membran-Präparationen mit Hydroxyphenazin (3.1.3.3) und insbesondere der DPI-Inhibition des Elektronenflusses von H₂ auf Hydroxyphenazin (3.1.3.5) spielt die Vho-Hydrogenase die entscheidende Rolle im Energiestoffwechsel des Organismus. Die Tests hinsichtlich der Hydrogenase-Aktivität in Membranen von *Mna. thermophilum* wurden zunächst mit Methylviologen durchgeführt und zeigten eine Aktivität von 31.2 ± 8.3 U/mg (3.1.2.2) auf. Diese ist in vergleichbarer Größenordnung mit Daten für andere Hydrogenasen, wobei die Aktivitäten je nach Organismus und Messbedingungen leicht unterschiedlich ausfielen. Für den Modellorganismus *Ms. mazei* wurden beispielsweise Hydrogenase-Aktivitäten von 11,6 U/mg mit Methylviologen als Elektronenakzeptor in Membranpräparationen bestimmt (Deppenmeier et al., 1990; Brodersen et al., 1999). Im Falle von Hydroxyphenazin als Elektronenakzeptor, welches ein besser wasserlösliches Analogon des membranlöslichen Elektronenüberträgers Methanophenazin darstellt, lagen die Hydrogenase-Aktivitäten in Membranpräparationen von *Ms. mazei* mit 2,0-3,0 U/mg im Vergleich etwas niedriger (Brodersen et al., 1999; Ide et al., 1999). In den Membranpräparationen von *Mna. thermophilum* konnte in der vorliegenden Arbeit eine Hydrogenase-Aktivität von $9,6 \pm 2$ U/mg mit Hydroxyphenazin als Elektronenakzeptor bestimmt werden. Sowohl für Hydroxyphenazin als auch Methylviologen lagen die Aktivitäten mit den Membranpräparationen von *Mna. thermophilum* zusammenfassend etwas höher als von *Ms. mazei* und tendenziell fielen die Aktivitäten im Falle beider Organismen mit Hydroxyphenazin niedriger aus als mit Methylviologen. In den Membranen von *Ms. mazei* spielen eine Ech-Hydrogenase und eine Vho-Hydrogenase eine wichtige Rolle im Energiemetabolismus, was die hohen Aktivitäten erklärt. Die Tests mit Methylviologen, welches mit [FeS]-Clustern reagiert, ermöglichten keine Unterscheidung der Aktivität der beiden Hydrogenasen, da beide mehrere [FeS]-Cluster enthalten, die an der Reaktion beteiligt sind. Hydroxyphenazin reagiert hingegen wie auch Methanophenazin mit den Häm-Gruppen, welche nur in der Vho-Hydrogenase (VhoC), aber nicht in der Ech Hydrogenase vorkommen (Welte & Deppenmeier, 2014; Brodersen et al., 1999). Dass die

Vho-Hydrogenase das Hydroxyphenazin als Elektronenakzeptor nutzt, wurde bereits experimentell bewiesen (Ide et al., 1999; Abken et al., 1998). Auch im Falle der Ech-Hydrogenase (4.5.4) und anderer Hydrogenasen wurden teilweise unspezifische und eher geringe Aktivitäten hinsichtlich der Reduktion von Hydroxyphenazin gezeigt, wobei Ech-Hydrogenasen keine Cytochrom-Untereinheit enthalten. Daher war keine Inhibition der Enzymaktivitäten durch DPI, selbst bei Konzentrationen von 100 μM , möglich (Meuer et al., 1999). Dies war nur im Falle der Vho-Hydrogenase der Fall, da diese eine Cytochrom-Untereinheit enthält, welche sensitiv für eine Inhibition durch DPI ist. Insbesondere die strukturelle Ähnlichkeit von DPI zu Methanophenazin bzw. Hydroxyphenazin war dafür ausschlaggebend (Brodersen et al. 1999; Meuer et al., 1999). Auch in *Mna. thermophilum* kommen in Form der Mbh-Hydrogenase und der Vho-Hydrogenase zwei Hydrogenasen in den Membranen vor. Erstere ist eine komplexere Form der Ech-Hydrogenase und reagiert ebenso mit Methylviologen als Elektronenakzeptor (Silva et al., 2000). Die Möglichkeit der unspezifischen Reduktion von Hydroxyphenazin wurde bislang nicht untersucht, liegt jedoch nahe, da die katalytischen Untereinheiten homolog zu denen der Ech-Hydrogenase sind. Ebenso wie im Falle der Ech-Hydrogenase ist Methanophenazin jedoch nicht der natürliche Elektronenakzeptor der Mbh-Hydrogenase, da keine Cytochrom-Untereinheit vorliegt. Die Aktivitätsmessungen im Rahmen dieser Arbeit gaben jedoch zunächst nur begrenzt Aufschluss darüber, welche Hydrogenase die zentrale Rolle im Energiemeabolismus von *Mna. thermophilum* spielt, auch wenn die sehr hohe Aktivität hinsichtlich der Hydroxyphenazin-Reduktion ein erstes Indiz für die zentrale Bedeutung der Vho-Hydrogenase war. Dies wurde auch durch die in dieser Arbeit bestimmte hohe mRNA-Abundanz der Vho Hydrogenase-Gene im Vergleich zu den Genen, die für die Mbh-Hydrogenase-Untereinheiten kodieren gestützt (3.1.3.1). Der entscheidende Versuch zur Bedeutung der Hydrogenasen im Energiestoffwechsel wurde jedoch mit dem Inhibitor DPI durchgeführt. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Möglichkeit der annähernd vollständigen Hemmung der Hydrogenase-Aktivität der Membranen von *Mna. thermophilum* hinsichtlich der Reduktion von Hydroxyphenazin in Präsenz von 2,8 μM DPI (3.1.3.5) zeigte daher deutlich auf, dass die Vho-Hydrogenase den Großteil der H_2 :Hydroxyphenazin Oxidoreduktase-Aktivität in den Membranen von *Mna. thermophilum* ausmacht und daher im Energiestoffwechsel des Organismus bei der Verwertung von H_2 die entscheidende Rolle spielt. Auch die Hemmung der Thiolbildung durch die Membranfraktionen im Falle des Elmans-Test mit H_2 als Elektronendonator bei Zugabe von DPI (3.1.3.4) sprechen eindeutig für die entscheidende Rolle der Vho-Hydrogenase im Vergleich zur Mbh-Hydrogenase. Die Elektronen werden daher zusammenfassend auf Grundlage der Experimente mit Hydroxyphenazin als Methanophenazin-Analogon und der Inhibition durch DPI mit hoher Wahrscheinlichkeit von der Vho-Hydrogenase auf Methanophenazin oder ein Methanophenazin-Derivat übertragen. Sorokin et al., 2017 zeigten

durch massenspektrometrische Untersuchungen der Membranlipide des Organismus, dass ein vermeintliches Methanophenazin-Derivat in den Membranen des Organismus vorliegt. Dies konnte in dieser Arbeit durch die Untersuchung des Energiestoffwechsels weiter verifiziert werden, wobei in Zukunft weitere Analysen klären könnten, wie die Struktur des Methanophenazin-Derivates im Detail aussieht. Vom Methanophenazin oder dessen putativen Derivat ausgehend werden die Elektronen nach den Untersuchungen des Gesamtelektronentransportsystems in den Membranen des Organismus mithilfe des Ellmans-Reagenzes (3.1.3.4) auf die membrangebundene Heterodisulfid-Reduktase HdrDE (4.5.7.2) übertragen. Ein identisches Elektronentransportsystem ist aus den Cytoplasma-Membranen von *Methanosarcina mazei* und *Methanosarcina barkeri* bekannt (Welte & Deppenmeier, 2014).

4.5.4 Ech Hydrogenasen und deren Derivate im Stoffwechsel methanogener Archaeen

Wie bereits eingeführt sind Arten der Gattung *Methanosarcina*, wie beispielsweise *Ms. mazei*, in der Lage neben CO₂ und H₂ auch methylierte Verbindungen und Acetat für die Methanogenese zu nutzen. Im Rahmen der acetoklastischen Methanogenese und im oxidativen Zweig der methylotrophen Methanogenese wird unter anderem reduziertes Ferredoxin gebildet (Kurth et al., 2020). Dieses wird durch die membrangebundene Ech-Hydrogenase (Energie konservierende Hydrogenase) re-oxidiert, wobei gleichzeitig zwei Protonen zu molekularem Wasserstoff reduziert werden. Durch die Translokation von einem Proton trägt der Komplex dabei außerdem der Energiekonservierung bei (Welte et al., 2010 a). Der freiwerdende Wasserstoff wird im Anschluss wie unter 4.5.3 beschrieben durch die Vho-Hydrogenase verwertet. Auch die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Organismen *Mna. thermophilum* und *Mmc. luminyensis* enthalten das Gen-Material für Ech-Hydrogenasen oder verwandte Formen der Ech-Hydrogenase. Zur Einordnung der möglichen Bedeutung für den Metabolismus der beiden Organismen werden zunächst einige grundlegende Informationen zum Enzym-Komplex eingeführt, um diese dann in Bezug zur Rolle der Hydrogenasen in den beiden untersuchten Organismen zu setzen.

Die Ech-Hydrogenase wurde nach deren Entdeckung (Künkel et al., 1998) erstmals 1999 von Meuer et al. aus *Methanosarcina barkeri* in hoher Reinheit isoliert und charakterisiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass das Enzym, sowohl Fd_{red} nutzen kann, um H₂ freizusetzen als auch zur Katalyse der reversen Reaktion in der Lage ist. (Meuer et al., 1999). Für die aufgereinigte Ech-Hydrogenase konnte außerdem gezeigt werden, dass diese aus sechs Untereinheiten (EchA-F) besteht und drei [4Fe4S]-Cluster, sowie ein für viele Hydrogenasen typisches [NiFe]-Zentrum enthält (Meuer et al., 1999; Abbildung 63). Die große Ähnlichkeit zu Hydrogenase-3-Typ-Hydrogenasen aus *E. coli* (Künkel et al., 1998), ließ außerdem schnell die Aussage zu, dass der Enzymkomplex aus zwei membrangebundenen und vier hydrophilen,

aber membranassoziierten Untereinheiten besteht. EchA und EchB stellen dabei die membranintegralen Untereinheiten dar (Künkel et al., 1998). Neben der Oxidation des reduzierten Ferredoxins im Rahmen der methylo trophen und acetoklastischen Methanogenese, spielt der Enzymkomplex auch bei der hydrogenotrophen Methanogenese eine zentrale Rolle. Dabei ist jedoch die reverse Reaktion erforderlich (Meuer et al., 2002). Meuer et al. (2002) zeigten auf Grundlage von Wachstumsversuchen mit einer $\Delta echA-F$ Mutante von *Methanosarcina barkeri* ebenso, dass der Enzymkomplex bei autotrophem Wachstum ein zentrales Element der Bereitstellung von reduziertem Ferredoxin (Fd_{red}) ist, welches die Fixierung von CO_2 bzw. Synthese von Pyruvat aus Acetyl-CoA und CO_2 erlaubt.

Auch im Genom von *Mmc. luminyensis* sind die Gene für zwei Energie konservierende Hydrogenasen (Ech) vorhanden, deren Gene jedoch nur schwach exprimiert werden und die Enzyme daher im Energiestoffwechsel wahrscheinlich keine zentrale Rolle spielen. Daneben liegen Gene für eine weitere Hydrogenase, welche homolog zu Hyd-3-Hydrogenase aus *E. coli* ist, im Genom vor, die ebenso schwach exprimiert werden (Kröninger et al., 2016). Das durch die Reaktion des MvhAGD/HdrABC-Komplexes (4.5.7.1) freiwerdende Fd_{red} wird vermeintlich vom kopflosen Fpo-Komplex des Organismus reoxidiert (4.5.2), sodass die Ech-Hydrogenasen im vorgeschlagenen Modell des Energiestoffwechsels nach Kröninger et al., 2016 (4.6.2) keine Funktion einnehmen. Dies bestätigt auch die sehr niedrige, mit Methylviologen als Elektronenakzeptor ermittelte, Hydrogenase-Aktivität der Membranpräparationen des Organismus (Kröninger, 2018). Daher kann eine Funktion zur Bereitstellung von reduziertem Ferredoxin für den Anabolismus angenommen werden (Kröninger et al., 2016). Dies wurde beispielsweise wie bereits angemerkt auch für *Methanosarcina barkeri* beschrieben (Hedderich & Forzi, 2005; Meuer et al., 2002).

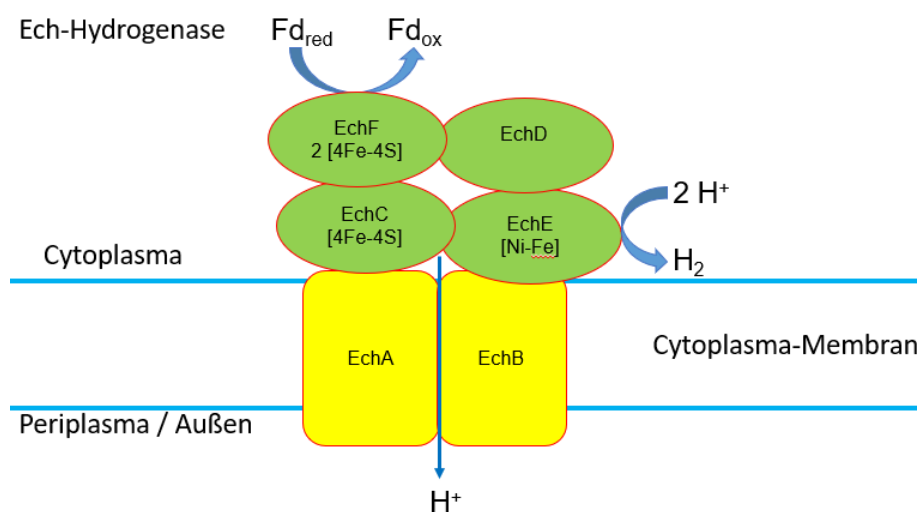


Abbildung 63: Schematischer Aufbau der Ech-Hydrogenase, welche in verschiedenen *Methanosarcina*-Spezies, unter anderem *Ms. mazei* und *Methanosarcina barkeri*, vorkommt (Welte & Deppenmeier, 2014). Gelb: Membranintegrale Untereinheiten; Grün: Lösliche aber membranassoziierte Untereinheiten.

In vielen methanogenen Archaeen kommen außerdem komplexere Varianten von Energie-konservierenden Hydrogenasen vor, welche jedoch grundsätzlich in ihrer Funktion der Ech-Hydrogenase ähneln. Letztere besteht wie beschrieben aus sechs Untereinheiten (EchA-F), wohingegen die komplexeren Varianten, die Energie-konservierende Hydrogenase A (EhaA-T) und die Energie-konservierende Hydrogenase B (EhbA-Q), 20 bzw. 17 Untereinheiten besitzen (Hedderich, 2004). Zwischen den einfachen Ech-Hydrogenasen und den komplexeren Formen Energie-konservierender Hydrogenasen gibt es grundsätzlich zentrale Elemente, die identische Funktionen ausüben. Wichtige Untereinheiten aller genannten Energie-konservierenden Hydrogenasen sind die typischen beiden Untereinheiten von [NiFe]-Hydrogenasen, welche allgemein im Zusammenhang mit Hydrogenasen im Energiestoffwechsel methanogener Archaea (s.u.) eine wichtige Rolle einnehmen. Die große Untereinheit besteht zentral aus einem durch vier Cysteine koordinierten Nickel/Eisen-Cofaktor, der das aktive Zentrum darstellt und zur Oxidation von Wasserstoff durch das Enzym unabdingbar ist. Die Cysteine sind dabei hochkonserviert, wobei stets zwei am C-Terminus und am zwei am N-Terminus des Proteins vorliegen. Die kleine Untereinheit dagegen enthält in den meisten [NiFe]-Hydrogenasen drei [FeS]-Cluster, die der Elektronenweiterleitung dienen. Das proximale Cluster bezieht die Elektronen unmittelbar vom [NiFe]-Zentrum und gibt diese an die übrigen Cluster ab (Fontecilla-Camps et al., 2007). Anzumerken ist, dass alle Hydrogenasen des Ech-Typs in ihrer kleinen Untereinheit nur eines statt drei Eisen-Schwefel-Cluster besitzen, welches als primärer Elektronenakzeptor obligat für die Reaktion der großen Untereinheit ist (Thauer et al., 2010).

Eha- und Ehb-Hydrogenase dienen häufig der Bereitstellung von reduziertem Ferredoxin für Biosyntheseprozesse (Thauer et al., 2008; Thauer et al., 2010). In einigen Fällen sind die Komplexe jedoch auch am Energiemetabolismus beteiligt, wobei die Ehb-Hydrogenase in *Msp. stadtmanae* ein wichtiges Beispiel darstellt (Fricke et al., 2006; Thauer et al., 2008).

Neben Eha und Ehb gibt es innerhalb der methanogenen Archaea weitere komplexe Formen Energie-konservierender Hydrogenasen. Auch MbhA-N stellt eine komplexe Form einer Energie-konservierende Hydrogenase bestehend aus 14 Untereinheiten dar. Der Enzymkomplex liegt beispielsweise in zwei Spezies innerhalb der Methanomicrobiales vor (*Methanospirillum hungatei* und *Methanocorpusculum labreanum*) (Thauer et al., 2010). Auch in *Mna. thermophilum* ist eine Mbh-Hydrogenase zu finden (Sorokin et al., 2017), die in der vorliegenden Arbeit hinsichtlich ihrer potenziellen Bedeutung für den Energiestoffwechsel im Detail analysiert wurde (3.1.3). Wie unter 4.5.3 beschrieben spielt auf Grundlage der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse die Vho-Hydrogenase die zentrale Rolle im Energiemetabolismus (H₂-Oxidation) von *Mna. thermophilum*. Kurth et al. (2020) postulierten für die Mbh-Hydrogenase eine Rolle bei der Bereitstellung von reduziertem Ferredoxin für den Anabolismus, wie zuvor für die Ech-Hydrogenasen von *Mmc. luminyensis* beschrieben. Mbh-

Hydrogenasen wurden bereits intensiv in *Pyrococcus furiosus* untersucht und katalysieren, wie auch Ech-Hydrogenasen, den Elektronentransfer von reduziertem Ferredoxin auf Wasserstoff und die reverse Reaktion (Silva et al., 2000; Sapra et al., 2000). Für alle an der Katalyse beteiligten Untereinheiten der Ech-Hydrogenase sind außerdem homologe Proteine in der Mbh-Hydrogenase vorhanden (Sapra et al., 2000). Daher können diese bei der Reduktion von Protonen zu molekularem Wasserstoff mit reduziertem Ferredoxin als Elektronendonator, ähnlich wie Ech-Hydrogenasen, ein Proton über die Membran translozieren. Die reverse Reaktion hingegen ist energieaufwändig (Sapra et al., 2003). Blast Analysen im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigten, dass alle 14 Untereinheiten (MbhA-N) aus der Mbh-Hydrogenase in *Pyrococcus furiosus* auch in *Mna. thermophilum* (IMG-ID: 2787456594-2787456607) vorliegen und diese auf genomischer Ebene in identischer Reihenfolge angeordnet sind.

4.5.5 Rnf-Komplex: Element der Energiekonservierung in *Ms. acetivorans* und *Mc. vulcani*

Eine der gut charakterisierten *Methanosarcina*-Spezies betreibt ihren Energiestoffwechsel ohne Ech- und Vho-Hydrogenase und nutzt für die Oxidation von Ferredoxin den Rnf-Komplex (Welte & Deppenmeier, 2014). Dabei handelt es sich um *Ms. acetivorans*, dessen Primärisolation aus marinen Sedimenten gelang (Sowers et al., 1984). Auch im Genom von *Mc. vulcani* ließ sich in der vorliegenden Arbeit ein Rnf-Komplex identifizieren (IMG-Identifikationsnummer: 2642592293 – 2642592300). Um die Rolle des Enzyms im Stoffwechsel einordnen zu können, erfolgt zunächst die Erklärung der Bedeutung des Komplexes im Stoffwechsel von *Ms. acetivorans*. *Ms. acetivorans* ersetzt Ech- und Vho-Hydrogenase im Stoffwechsel funktionell durch den Rnf (*Rhodobacter*-Stickstoff-Fixierungskomplex) -Komplex (Ferry, 2020). D.h. die Elektronen vom reduzierten Ferredoxin, welches im oxidativen Zweig der Methanogenese durch die Reaktion der Formyl-Methanofuran-Dehydrogenase oder im Rahmen der acetoklastischen Methanogenese gebildet wird, werden auf den membranlöslichen Elektronenträger Methanophenazin transferiert (Welte & Deppenmeier, 2014). Da *Mc. vulcani* auf Grundlage der Analysen in dieser Arbeit die Geninformation für Vho-Hydrogenase und Ech-Hydrogenase fehlen und ebenfalls zur methylotrophen Methanogenese befähigt ist, kann für den Rnf-Komplex des Organismus die gleiche Rolle wie im Falle von *M. acetivorans* vermutet werden. Für Rnf-Komplexe verschiedener Bakterien, allen voran *Acetobacterium woodii* und *Clostridium ljungdahlii* wurde eine Funktion als Ferredoxin:NADH-Oxidoreduktase gezeigt (Westphal et al., 2018; Biegel & Müller, 2010; Biegel et al., 2011; Tremblay et al., 2012; Hess et al., 2013). Der Na⁺- translozierende Komplex besteht dabei generell aus den membranintegralen Einheiten RnfA, RnfD und RnfE und den membranassoziierten Untereinheiten RnfB, RnfC und RnfG (Biegel et al., 2011; Biegel & Müller, 2010; Kuhns et al., 2020). In *Ms. acetivorans* liegen im Operon, welches den Komplex kodiert jedoch noch Gene für ein Cytochrom des c-Typs mit

sechs Häm-Gruppen und ein weiteres vermeintlich membrangebundenes Protein vor (Li et al., 2006; Schlegel et al., 2012 b; Abbildung 64). Das c-Typ Cytochrom ist vermutlich entscheidend an der Rolle des Komplexes in *Ms. acetivorans* beteiligt, die die Übertragung der Elektronen von reduziertem Ferredoxin auf den membranlöslichen Elektronenüberträger Methanophenazin betrifft (Ferry, 2020; Wang et al., 2011 b; Schlegel et al., 2012 b). Der Rnf-Komplex von *Mc. vulcani* enthält ebenso die zusätzliche Cytochrom-Untereinheit (IMG-ID: 2642592293) und das Membran-Protein unbekannter Funktion (IMG-ID: 2642592300), was die postulierte Möglichkeit der Elektronenübertragung auf Methanophenazin untermauert (4.5.2). Der Rnf-Komplex trägt mit großer Wahrscheinlichkeit auch zur Energiekonservierung von *Mc. vulcani* bei, da im Falle des Komplexes von *Ms. acetivorans* pro Reaktionszyklus drei Natrium-Ionen über die Cytoplasma-Membran transloziert werden (Ferry, 2020; Welte & Deppenmeier, 2014).

Auch während der acetoklastischen Methanogenese von *Ms. acetivorans* wird im Rahmen der Reaktion der Acetyl-CoA-Decarboxylase reduziert Ferredoxin gebildet, welches vom Rnf-Komplex reoxidiert wird (Kurth et al., 2020). Die acetoklastische Methanogenese ist *Mc. vulcani* jedoch nicht möglich (Harrodion et al., 2014), da dem Organismus, auf Grundlage von in dieser Arbeit durchgeführten Blast-Analysen, bereits die entscheidenden Enzyme zur Aktivierung von Acetat in Form der Acetatkinase und Phosphotransacetylase fehlen. Eine Acetyl-CoA-Synthetase wie sie in *Mtx. thermoacetophila* zur Aktivierung von Acetat im Rahmen der acetoklastischen Methanogenese genutzt wird (Welte & Deppenmeier, 2014) liegt zwar vor, ist aber vermutlich am Anabolismus beteiligt, um den Einbau von Acetat in Biomasse zu ermöglichen, wie dies bereits für andere Organismen beschrieben wurde (Schäfer et al., 1993). Außerdem besteht die Möglichkeit, dass es sich beim Enzym um eine allgemeine Acyl-CoA-Synthetase handelt, welche der Fettsäurebiosynthese dient (Zhang et al., 2012). Der Acetyl-CoA-Decarboxylase/Synthase-Komplex liegt ebenfalls vor (IMG-Identifikationsnummer: 2642593251-2642593256).

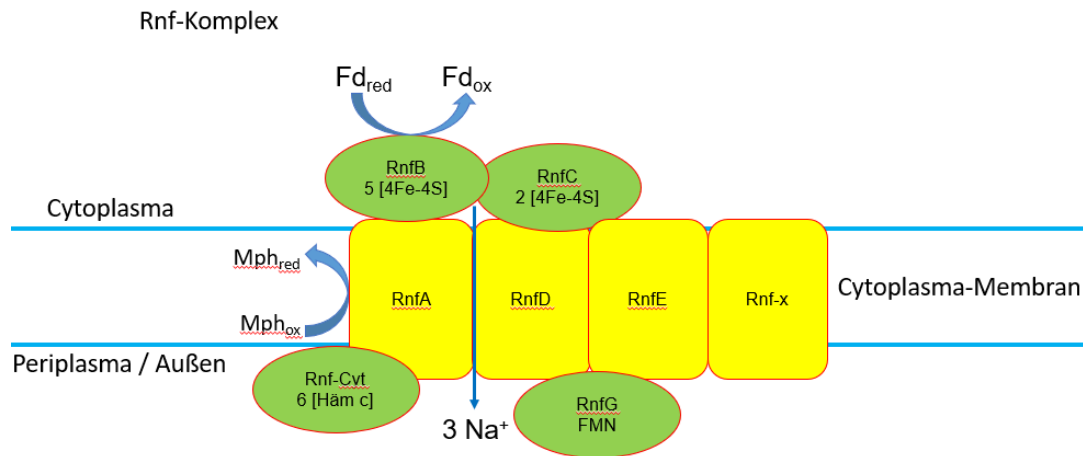


Abbildung 64: Schematischer Aufbau des Rnf-Komplexes aus *Methanosarcina acetivorans* auf Grundlage von Suharti et al. (2014). Grün: Untereinheiten mit Cofaktoren welche putativ am Elektronentransfer beteiligt sind. Gelb: Membranintegrale Untereinheiten ohne Cofaktoren.

4.5.6 Formiat-Dehydrogenasen im Stoffwechsel methanogener Archaeen – membrangebundene Formiat-Dehydrogenase in *Mna. Thermophilum*

Die Nutzung von Formiat als Elektronendonator für die methylotrophe Methanogenese ist ein einzigartiges Merkmal von *Mna. thermophilum* bzw. der Klasse Methanonatronarchaeia. Daher wurde dies in der vorliegenden Arbeit detailliert untersucht. Generell ist Formiat ein Produkt vieler Gärungen und daher insbesondere in anoxischen Umgebungen vertreten. Daher ist die Verbindung für eine Vielzahl von Bakterien und Archaeen als Substrat von großer Bedeutung. Formiat-Dehydrogenasen spielen auch im Stoffwechsel verschiedener methanogener Archaeen eine Rolle. So wird bei der hydrogenotrophen Methanogenese meist molekularer Wasserstoff als Elektronendonator genutzt, wobei einige Organismen ebenso Formiat verwerten können (Costa & Leigh, 2014). Im Rahmen der hydrogenotrophen Methanogenese dienen F_{420} -reduzierende-Hydrogenasen der Reduktion von F_{420} zu $F_{420}H_2$, als wichtigem Cofaktor der Methanogenese. Diese Enzyme können jedoch ebenso in einigen Organismen wie *Methanobacterium formicicum* durch lösliche F_{420} -reduzierende Formiat-Dehydrogenasen ersetzt werden (Ferry, 1990; Schauer & Ferry, 1986; Baron & Ferry, 1989; Sattler et al., 2013). Daneben sind HdrABC-Komplexe (4.5.7.1) beschrieben, die statt mit der Hydrogenase MvhAGD mit einer löslichen Formiat-Dehydrogenase interagieren und im Rahmen einer Elektronen-Bifurkation Formiat oxidieren und gleichzeitig Ferredoxin und Heterodisulfid reduzieren (Milton et al., 2018; Abdul Halim et al., 2021; Costa et al., 2010). Dies gilt z.B. für *Methanococcus maripaludis* oder *Methanoculleus thermophilus* deren Methanogenese ausgehend von CO_2 vollständig mit H_2 oder Formiat ablaufen kann (Abdul Halim et al., 2021; Yan & Ferry, 2018). Dazu interagiert der HdrABC Komplex entweder mit einer Hydrogenase oder einer Formiat-Dehydrogenase. Da HdrABC als Homodimer vorliegt, konnte zudem eine gleichzeitige Interaktion mit Hydrogenase und Formiat-Dehydrogenase gezeigt werden. Eine wichtige Untereinheit dabei ist MvhD (VhuD), welche sowohl für die

Interaktion mit MvhAG (VhuAG) als auch mit den beiden zentralen Untereinheiten der Formiat-Dehydrogenase entscheidend ist. (Milton et al., 2018; Costa et al., 2013). Letztlich spielen cytoplasmatische Formiat-Dehydrogenasen eine wichtige Rolle bei der Methanogenese (Reduktion von F_{420} , Fd_{ox} oder CoM-S-S-CoB (Yan & Ferry, 2018), aber keines dieser löslichen Enzyme ist an einem respiratorischen Elektronentransport beteiligt. Dies ist ein erster großer Unterschied zu der in dieser Arbeit untersuchten membrangebundenen Formiat-Dehydrogenase aus *Mna. thermophilum*, welche eine entscheidende Funktion im Rahmen einer Atmungskette besitzt. Membrangebundene Formiat-Dehydrogenasen, welche am Energiestoffwechsel von methanogenen Archaeen beteiligt sind, wurden ansonsten bislang nicht beschrieben. Diese spielen jedoch im Stoffwechsel von *E. coli* eine zentrale Rolle. Wenn Nitrat als terminaler Elektronenakzeptor der Atmungskette dient und als Substrat vorliegt, wird beispielsweise vermehrt die Formiat-Dehydrogenase N (FdhN) produziert, um Formiat als Elektronendonator der Atmungskette nutzen zu können (Jormakka et al., 2003; Sawers, 1994; Lüke et al., 2008; Darwin et al., 1993; Ferry, 1990). Für FdhN aus *E. coli* liegt eine Kristallstruktur vor, die das Verständnis des Reaktions-Mechanismuses von Formiat-Dehydrogenasen deutlich verbesserte (Jormakka et al., 2002) Die Formiat-Dehydrogenase N von *E. coli* besteht generell aus den drei Untereinheiten FdnG, FdnH und FdnI.

In *Mna. thermophilum* sind wie bereits eingeführt homologe Untereinheiten zur beschriebenen membrangebundenen Formiat-Dehydrogenase aus *E. coli* vorhanden (3.1.3.6), wobei die Gene für die drei Untereinheiten in einem Operon kodiert sind, und auf Grundlage der Daten aus der vorliegenden Arbeit eine hohe Transkriptabundanz aufweisen (3.1.3.1). Mit den Membranpräparationen von *Mna. thermophilum* wurden daher im Rahmen dieser Arbeit eine Vielzahl von Aktivitätstests rund um die Formiat-Dehydrogenase durchgeführt, um die Rolle im Energiemetabolismus im Detail aufzuklären. In den Membranpräparationen des Organismus waren auf dieser Grundlage hohe Aktivitäten hinsichtlich der Formiat-Oxidation mit Methylviologen ($19,05 \pm 4.6$ U/mg Membranprotein) oder Hydroxyphenazin ($1,4 \pm 0,6$ U/mg Membranprotein) als Elektronenakzeptor messbar (3.1.3.2 / 3.1.3.3). Die Aktivitäten waren etwa in ähnlicher Größenordnung wie für die Hydrogenase-Aktivitäten beschrieben. Der Elektronentransfer auf Hydroxyphenazin war ein erstes Indiz, dass die membrangebundene Cytochrom-b Untereinheit vermutlich Methanophenazin oder ein Analogon dazu als Elektronenakzeptor nutzt. Dies konnte auch durch die Hemmung der Elektronenübertragung von Formiat auf Hydroxyphenazin sowie des Gesamtelektronenflusses von Formiat auf Heterodisulfid durch den Inhibitor DPI bestätigt werden (3.1.3.5). Dieser Hemmstoff ist wie bereits beschrieben strukturell ähnlich zu Methanophenazin und inhibiert die Elektronenübertragung von entsprechenden membrangebundenen Enzymen auf Methanophenazin und dessen strukturellen Derivaten wie Hydroxyphenazin (Brodersen et al., 1999). Insbesondere die Hemmung der Elektronenübertragung durch DPI ist ein wichtiger

Hinweis, dass Methanophenazin oder ein Analogon als löslicher Elektronenüberträger in den Membranen des Organismus fungiert und die Formiat-Dehydrogenase dieses als Elektronenakzeptor nutzt. Dies wurde bereits ausführlich für membrangebundene Hydrogenasen beschrieben (Meuer et al., 1999). Die in dieser Arbeit beschriebene Elektronenübertragung von Formiat auf Heterodisulfid (3.1.3.4) in Membranen von methanogenen Archaeen ist vollständig neuartig und für Vertreter der Methanonatronarchaeales einzigartig. Dabei werden die Elektronen aus der Formiatoxidation über Methanophenazin oder ein Derivat auf HdrDE übertragen und dienen dort der Reduktion des Heterodisulfids. Ähnlich wie das H₂:Heterodisulfid-Oxidoreduktase-System dient das Formiat:Heterodisulfid-Oxidoreduktase-System jedoch nicht nur der Reduktion des Heterodisulfids um Coenzym M als Methylgruppenträger und Coenzym B als Reduktionsmittel für die Reduktion der Methylgruppe von Methyl-Coenzym M zu Methan bereitzustellen, sondern ebenfalls der Energiekonservierung. Zwar transloziert das Enzym nicht direkt Elektronen über die Membran, doch in *E. coli* ist beschrieben, dass bei der Reduktion von Menachinon zwei Protonen aus dem Cytoplasma verwendet werden. Diese werden in *E. coli* von der Nitratreduktase, welche Nitrat als terminalen Elektronenakzeptor der Atmungskette zu Nitrit reduziert und Menachinon als Elektronendonator benötigt, im Periplasma entlassen. Außerdem wird bei der Reduktion von Formiat im Periplasma ein Proton sowie, aufgrund der negativen Ladung des Formiats, ein positives Gegenion beispielsweise Na⁺ freigesetzt. Durch die Nitratreduktase werden zusätzlich zwei Protonen im Cytoplasma verbraucht (Jormakka et al., 2003). Die katalytischen Untereinheiten der Formiat-Dehydrogenase aus *Mna. thermophilum* liegen auf Grundlage in dieser Arbeit durchgeführter bioinformatischer Analysen auch an der Außenseite der Cytoplasmamembran vor (3.1.3.6). Ebenso ist es wahrscheinlich, dass die Formiat-Dehydrogenase in *Mna. thermophilum* für die Reduktion von Methanophenazin oder eines Analogons Protonen aus dem Cytoplasma nutzt. Diese werden bei der Oxidation von Methanophenazin durch die Heterodisulfid-Reduktase putativ in den extrazellulären Raum entlassen und dienen somit ebenso der Energiekonservierung. Außerdem verbraucht die Heterodisulfidreduktase bei der Reduktion des Heterodisulfids zwei Protonen im Cytoplasma. Identisches wurde in Summe für die kombinierte Reaktion von Vho-Hydrogenase und Heterodisulfid-Reduktase bereits beschrieben (Welte & Deppenmeier, 2014; 4.5.3). Insgesamt ist das Formiat:Heterodisulfid-Reduktase System wichtiger Bestandteil der Energiekonservierung des Organismus. Der erzeugte Protonengradient kann durch die ATP-Synthase des Organismus zur Herstellung von ATP genutzt werden. *Mna. thermophilum* ist zusammenfassend der erste methanogene Organismus, in welchem eine membrangebundene Formiat-Dehydrogenase eine zentrale Rolle im Energiestoffwechsel spielt. Lösliche Formiat-Dehydrogenasen liegen nicht im Organismus vor.

4.5.7 Heterodisulfid-Reduktasen im Stoffwechsel methanogener Archaeen

Heterodisulfid-Reduktasen oder ähnliche Proteine spielen im Stoffwechsel vieler Bakterien und Archaeen eine bedeutende Rolle. So sind diese Enzyme neben der Methanogenese, auch an der Acetogenese, der Sulfatatmung, der Nutzung von reduzierten Schwefelverbindungen als Elektronendonator, dem Abbau von Aromaten und weiteren Prozessen beteiligt (Appel et al., 2021). Dabei ist anzumerken, dass die Proteine bzw. einzelnen Untereinheiten homolog zu Untereinheiten der Heterodisulfid-Reduktasen aus methanogenen Archaeen sind. Die Enzyme üben jedoch andere Funktionen als die Reduktion des Heterodisulfids aus. In methanogenen Archaeen gibt es generell zwei Formen von Heterodisulfid-Reduktasen, die im Folgenden beschrieben werden sollen. In den in der vorliegenden Arbeit untersuchten methanogenen Archaeen spielen die Heterodisulfid-Reduktasen unterschiedliche Rollen. Insbesondere die Heterodisulfid-Reduktase aus *Mna. thermophilum* wurde in dieser Arbeit im Detail analysiert (3.1.3).

4.5.7.1 MvhAGD/HdrABC – Bifurkationskomplex als wichtiges Element des methanogenen Archaeen

Eine der beiden Heterodisulfid-Reduktasen, welche im Stoffwechsel methanogener Archaeen eine Rolle spielt, liegt in löslicher Form im Cytoplasma vor. Im Komplex mit, der ebenfalls cytoplasmatisch vorliegenden Hydrogenase MvhADG, ist die Heterodisulfid-Reduktase HdrABC befähigt Elektronen aus der Oxidation von H_2 zur Reduktion von Ferredoxin und Heterodisulfid zu nutzen. Ein Blick auf die Bioenergetik der Reaktion zeigt jedoch deutliche Besonderheiten auf. Unter physiologischen Bedingungen ist das Redoxpotential des Ferredoxins (-500 mV (Kaster et al., 2011)) deutlich geringer als jenes des Wasserstoffs (-414 mV), was die Reaktion unter Standardbedingungen nicht möglich macht. Andersherum ist das Redoxpotential des Heterodisulfids (-143 mV (Tietze et al., 2003)) jedoch deutlich positiver als jenes des Wasserstoffs, sodass an dieser Stelle eine exergone Reaktion vorliegt. Die bei der Heterodisulfid-Reduktion freiwerdende Energie, ermöglicht schlussendlich das Abfließen der eigentlich endergonen Reaktion, der Reduktion des Ferredoxins mit Wasserstoff. Der Gesamtprozess ist als Elektronenbifurkation beschrieben (Kaster et al., 2011; Buckel & Thauer, 2013). Wagner et al. (2017) gelang mit der Aufklärung der Kristallstruktur des MvhAGD/HdrABC-Komplexes aus *Methanothermococcus thermolithotrophicus* der Durchbruch bei der endgültigen Aufklärung des Mechanismus der Gesamtreaktion. MvhA stellt die typische Untereinheit einer [NiFe]-Hydrogenase dar, welches das namensgebende [NiFe]-Zentrum enthält und Wasserstoff oxidiert. Die Elektronen aus der Wasserstoffoxidation werden anschließend schrittweise über drei [FeS]-Cluster in MvhG auf das [FeS]-Cluster in MvhD weitergeleitet. Von dort aus erfolgt die Übertragung auf einen FAD-Cofaktor in HdrA, welcher zentral am Prozess der Elektronenbifurkation beteiligt ist. Die Hälfte der Elektronen wird im Anschluss über ein weiteres [FeS]-Cluster in HdrA auf HdrBC übertragen, die andere Hälfte

der Elektronen wird über andere [FeS]-Cluster in HdrA transferiert und schlussendlich zur Ferredoxin-Reduktion genutzt. Die Elektronen welche auf HdrBC transferiert werden, fließen über zwei [4Fe4S]-Cluster in HdrC auf zwei non-kubane [FeS]-Cluster in HdrB, welche das aktive Zentrum des Enzyms darstellen. Dort erfolgt die Reduktion des Heterodisulfids. Die Oxidation von zwei H₂ führt also schließlich wie bereits eingeführt zur Reduktion von einem Molekül Heterodisulfid und Ferredoxin (Wagner et al., 2017).

MvhAGD/HdrABC spielt in methanogenen Archaeen, welche eine obligat hydrogenotrophe Methanogenese betreiben, eine zentrale Rolle im Stoffwechsel. Der Komplex katalysiert die H₂-abhängige Reduktion von oxidiertem Ferredoxin und Heterodisulfid und stellt damit wichtige Reduktionsäquivalente (Fd_{red}, Coenzym B) bzw. Methylgruppenträger (Coenzym M) für die klassische hydrogenotrophe Methanogenese ausgehend von CO₂ bereit (Liu & Whitman, 2008; Costa & Leigh, 2014; Hedderich et al., 1990).

Auch im in dieser Arbeit untersuchten Organismus *Mmc. luminyensis* spielt der Komplex aus Heterodisulfidreduktase und Hydrogenase eine entscheidende Rolle. Der Komplex nutzt molekularen Wasserstoff als Substrat und reduziert Ferredoxin und Heterodisulfid. Letzteres kann in Form von Coenzym B und Coenzym M einem erneuten Zyklus der Methanogenese bereitstehen (Kröniger et al., 2016; Kröniger, 2018). Reduziertes Ferredoxin kann hingegen nicht unmittelbar im Rahmen der Methanogenese verwendet werden, da wie bereits beschrieben die Gene für die ersten sechs Schritte der Methanogenese ausgehend von CO₂ fehlen (Borrel et al., 2013). Fd_{red} dient jedoch putativ als Elektronendonator des „kopflosten“ Fpo-Komplexes (Kröniger et al., 2019), was in der vorliegenden Arbeit intensiv untersucht wurde (3.3.1 / 4.5.2).

Im Genom einiger Cytochrom-haltiger methanogener Archaea mit Atmungsketten wie *Methanosarcina mazei* sind die *hdrABC*-Gene ebenso vorhanden, wobei die Rolle der zugehörigen Proteine für den Stoffwechsel nicht zentral ist. In vielen Fällen liegt dabei außerdem nur *hdrABC*, nicht aber *mvhAGD* vor (Thauer et al., 2010). Auch in *Mc. vulcani* sind wie in *Methanosarcina* spp. die Gene welche HdrABC (IMG-ID: 2642593940 / 2642592172 / 2642592171) kodieren vorhanden (Webster et al., 2019; 3.2). HdrA ist auf Grundlage der Analysen aus der vorliegenden Arbeit außerdem im C-terminalen Bereich mit MvhD fusioniert, wie auch für *Methanosarcina* spp. beschrieben (Stojanovic et al., 2003). Die Geninformation für die Hydrogenase-Untereinheiten MvhA und MvhG liegt wie im Falle von *Ms. mazei* und *Ms. acetivorans* nicht vor. Verschiedene biochemische Analysen in *Methanosarcina acetivorans* zur Klärung der Bedeutung von HdrABC im Stoffwechsel führten zur Annahme, dass die Oxidation des reduzierten Ferredoxins aus dem oxidativen Zweig der Methanogenese durch HdrABC erfolgt, welches anschließend F₄₂₀ und Heterodisulfid reduziert (Yan & Ferry; 2018; Buckel & Thauer, 2018; Buan & Metcalf, 2010; Yan et al., 2017). Auch eine Rolle in der

acetoklastischen Methanogenese wurde spekuliert, wobei dem Rnf-Komplex eine Funktion als $Fd_{red}:F_{420}$ -Oxidoreduktase zugeschrieben wurde und der HdrABC-Komplex der Oxidation von $F_{420}H_2$ dient (Buckel & Thauer, 2018). Der biochemische Nachweis, dass der HdrABC-Komplex $F_{420}H_2$ oxidieren kann und dabei Ferredoxin und Heterodisulfid oxidiert, gelang Yan et al. 2017. Dabei kann die endergone Reaktion der Reduktion von Ferredoxin an die exergone Reaktion der Reduktion von Heterodisulfid ausgehend von $F_{420}H_2$ gekoppelt werden. Die Spezifität der Reaktion ist jedoch noch fraglich. So wird auf Grundlage des aktuellen Forschungsstandes angenommen, dass HdrABC in einigen Organismen möglicherweise an der Bereitstellung von geeigneten Mengen von reduziertem Ferredoxin für den Anabolismus beteiligt sein könnte (Thomas et al., 2021), was damit auch für Enzymkomplex in *Mc. vulcani* gelten könnte. Daneben könnten die im Rahmen der vorliegenden Arbeit zunächst als *vhoA* und *vhoG* identifizierten Gene (3.2) ebenso eine Rolle spielen. Die Genprodukte könnten ähnlich wie MvhAG mit dem HdrABC-Komplex interagieren und somit eine Wasserstoff-abhängige Reduktion von Ferredoxin und Heterodisulfid ermöglichen. Auch wenn der Organismus insgesamt nicht zur hydrogenotrophen Methanogenese befähigt ist, könnte der Komplex zur Bereitstellung von reduziertem Ferredoxin für den Anabolismus dienen, ähnlich wie für die hypothetische Reaktion mit $F_{420}H_2$ beschrieben. Eine Beteiligung am Energiestoffwechsel kann auf Grundlage des aktuellen Forschungsstandes als unwahrscheinlich angesehen werden.

4.5.7.2 Die membrangebundene Heterodisulfid-Reduktase HdrDE in den Atmungsketten Cytochrom-haltiger methanogener Archaea – HdrD als zweite Heterodisulfidreduktase im Metabolismus von *Mmc. luminyensis*

Die zweite bisher in methanogenen Archaeen bekannte Form der Heterodisulfid-Reduktasen stellt HdrDE dar. Diese Form der Heterodisulfid-Reduktase kommt nur in Cytochrom-haltigen methanogenen Archaeen mit membrangebundener Atmungskette vor und ist innerhalb von Vertretern der Ordnung der Methanosarcinales weit verbreitet (Welte & Deppenmeier, 2014). Reduziertes Methanophenazin dient dem Komplex aus HdrD und HdrE als Elektronendonator, wobei das Heterodisulfid aus den Coenzymen M und B den Elektronenakzeptor darstellt. Die katalytisch aktive Untereinheit HdrD ist generell über das Membranprotein HdrE mit der Membran assoziiert. HdrE ist ein membranintegrales Protein und enthält zwei Häm-Gruppen des b-Typs als Cofaktor, wohingegen HdrD vier [FeS]-Cluster als prosthetische Gruppen besitzt. (Hedderich et al., 2005; Künkel et al., 1997; Simianu et al., 1998; Wagner et al., 2017; Abbildung 27; 3.1.3.6). Bei der Oxidation von Methanophenazin werden außerdem zwei Protonen an der Außenseite der Membran freigesetzt. Des Weiteren werden bei der Reduktion des Heterodisulfids auf der cytoplasmatischen Seite der Membran zwei Protonen verbraucht,

sodass der Komplex auch der Energiekonservierung dient (Ide et al., 1999; Schlegel et al., 2012 b; Welte & Deppenmeier, 2014; Ferry, 2020).

In *Methanosarcina*-Spezies stellt HdrDE schlussendlich jene Komponente dar, welche die Elektronen von Methanophenazin auf den terminalen Elektronenakzeptor der Atmungskette das Heterodisulfid überträgt. Coenzym M und Coenzym B stehen somit wieder für die Methanogenese zur Verfügung (Kurth et al., 2020; Deppenmeier et al., 1999). Das membranlösliche Chinon-Analogon Methanophenazin wird in *Methanosarcina* spp. wie zuvor beschrieben sowohl durch die Vho-Hydrogenase bzw. den Rnf-Komplex als auch durch den Fpo-Komplex reduziert.

Auch in *Mc. vulcani* liegen die Gene welche für HdrDE (IMG-ID: 2642594146 / 2642594145) kodieren vor (Webster et al., 2019). HdrDE spielt mit großer Wahrscheinlichkeit eine zentrale im Energiestoffwechsel des Organismus und reduziert Heterodisulfid als terminalen Elektronenakzeptor der vorliegenden Atmungskette. Das durch den Fpo-Komplex (4.5.2) bzw. Rnf-Komplex (4.5.5) reduzierte Methanophenazin wird, wie im Falle von *Methanosarcina acetivorans* (Ferry, 2010), von HdrDE zur Reduktion von Heterodisulfid genutzt. Die Form der methylo trophen Methanogenese und insbesondere der Atmungskette wäre damit identisch zu *Ms. acetivorans*, wobei dies in der vorliegenden Arbeit auf Grundlage genomischer Daten und dem Fakt, dass nur 75 % der als Substrat eingesetzten Methylgruppen zu Methan reduziert werden bestätigt werden konnte (3.2.1). Da keine Gene für die Untereinheiten der Ech-Hydrogenase im Genom des Organismus vorliegen, kann außerdem eine Ferredoxin Oxidation wie im Falle von *Ms. mazei* und *Methanosarcina barkeri* ausgeschlossen werden.

In *Mna. thermophilum* nimmt die membrangebundene Heterodisulfid-Reduktase HdrDE ebenso eine bedeutende Rolle im Stoffwechsel ein und wurde in der vorliegenden Arbeit im Detail analysiert. Die hohen Heterodisulfid-Reduktase-Aktivitäten in Membranpräparationen des Organismus mit Methylviologen und Hydroxyphenazin, welche in dieser Arbeit ermittelt wurden, zeigten bereits die Bedeutung des Enzyms für den Energiestoffwechsel. Die Aktivitäten betragen $10,7 \pm 1,4$ U/mg mit reduziertem Methylviologen als Elektronendonator und $0,6 \pm 0,2$ U/mg mit reduziertem Hydroxyphenazin als Elektronendonator. Aus der Literatur sind einige gut untersuchte membrangebundene Heterodisulfid-Reduktasen bekannt und hinsichtlich ihrer Aktivität in Membranpräparationen untersucht wurden. In *Methanosarcina mazei* liegt die Heterodisulfid-Reduktase-Aktivität in Membranpräparationen bei 1,4 U/mg mit reduziertem Methylviologen bzw. 1,2-3,5 U/mg mit reduziertem Hydroxyphenazin als Elektronendonator (Brodersen et al., 1999; Ide et al., 1999). Im Falle von *Methanosarcina barkeri* ist die Heterodisulfid-Reduktase-Aktivität in Membranpräparationen mit reduziertem Benzylviologen als Elektronendonator mit 5,0 U/mg in ähnlichen Bereichen (Heiden et al., 1993). Letztlich kann festgehalten werden, dass die Größenordnung der Aktivitäten, die in der

vorliegenden Arbeit ermittelt wurden, im Bereich, der bereits für andere Organismen ermittelten Werte liegt, wobei die Methylviologen-abhängige Aktivität in den Membranen von *Mna. thermophilum* vergleichsweise etwas höher ausfällt. Der Nachweis der Formiat:Heterodisulfid Oxidoreduktase- und H₂:Heterodisulfid Oxidoreduktase-Aktivität mittels des Elmans-Reagenzes zeigte auf die Tests mit Methylviologen und Hydroxyphenazin aufbauend eindeutig, dass das Heterodisulfid den terminalen Elektronenakzeptor der Atmungsketten in den Membranen von *Mna. thermophilum*, ausgehend von molekularem Wasserstoff oder Formiat, darstellt. Dabei werden die Elektronen zunächst von Formiat bzw. molekularem Wasserstoff durch die Vho-Hydrogenase (4.5.3) bzw. die Formiat-Dehydrogenase (4.5.6) auf Methanophenazin bzw. ein Analogon von Methanophenazin übertragen. HdrDE nutzt schließlich reduziertes Methanophenazin bzw. ein Analogon als Elektronendonator und Heterodisulfid dient wie beschrieben als Elektronenakzeptor (Abbildung 65). Für das Formiat:Heterodisulfid Oxidoreduktase-System in Membranen von *Mna. thermophilum* konnten in dieser Arbeit, bezogen auf die Heterodisulfidreduktion, Aktivitäten von $184.5 \pm 17,5$ nmol mg Membranprotein⁻¹ min⁻¹ ermittelt werden. Für das H₂:Heterodisulfid-Oxidoreduktase-System betrug die Aktivität $392 \pm 25,7$ nmol mg Membranprotein⁻¹ min⁻¹. Die Atmungskettenraten waren damit vergleichbar mit denen von anderen methanogenen Archaeen wie *Mmc. luminyensis* (145 nmol mg Membranprotein⁻¹ min⁻¹, Kröniger, 2018) oder *Methanosarcina mazei* (200-500 nmol mg Membranprotein⁻¹ min⁻¹, Brodersen et al., 1999). Die Hemmung des Elektronentransports von H₂ bzw. Formiat auf das Heterodisulfid durch DPI bestätigte wie bereits beschrieben, dass Methanophenazin bzw. ein Analogon als löslicher Elektronenüberträger in den Membranen des Organismus fungiert (3.1.3.5), da dieses spezifisch die Aktivitäten Methanophenazin-abhängiger Enzyme hemmt (Brodersen et al., 1999). In Summe stehen durch die Reaktion der Heterodisulfid-Reduktase die beiden Thiole Coenzym M und Coenzym B aus der Reduktion des Heterodisulfids wieder für einen erneuten Zyklus der Methanogenese bereit.

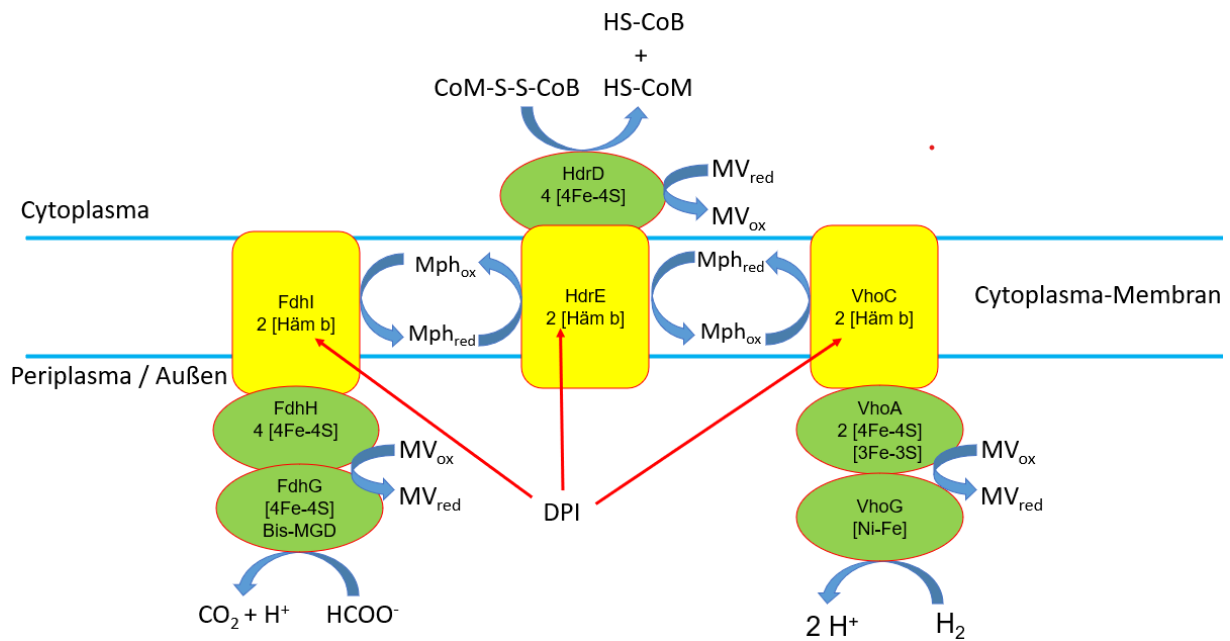


Abbildung 65: Respiratorische Elektronentransportsysteme in den Cytoplasma-Membranen von *Mna. thermophilum*, welche je nach vorhandenem Substrat genutzt werden können. Die H_2 -Oxidation erfolgt durch die Vho-Hydrogenase, wohingegen die Formiat-Oxidation durch die Formiat-Dehydrogenase erfolgt. In beiden Fällen wird Methanophenazin respektive ein Analogon als Elektronenakzeptor genutzt, wobei dieses die Elektronen zur Heterodisulfid-Reduktase HdrDE transportiert, wo die Reduktion des Heterodisulfids erfolgt. Außerdem präsentiert sind die Reaktionspunkte der Enzymkomplexe mit dem artifiziiellen Elektronenüberträger Methylviologen (MV) und die Inhibitionsstellen von DPI (rote Pfeile).

Mmc. luminyensis besitzt neben HdrABC eine zweite Heterodisulfidreduktase, welche zentral am Energiestoffwechsel beteiligt ist (Kröninger et al., 2016). Neben der bereits beschriebenen Heterodisulfid-Reduktase HdrABC liegt mit HdrD eine weitere vor. Die Rolle von HdrD wurde von Kröninger et al. (2016, 2019) aufgeklärt. Anzumerken ist zunächst, dass der aus *Methanosarcina* spp. bekannte Membrananker in Form von HdrE fehlt und nur das Gen für die Untereinheit HdrD im Genom des Organismus zu finden ist.

Kröninger (2018) gelang es auf Grundlage verschiedener Analysen und Aktivitätstests die Rolle von HdrD im Verbund mit dem Fpo-Komplex zu beleuchten. So wurde auf Grund der Fd_{red} :Heterodisulfid-Oxidoreduktase-Aktivität in Membranen des Organismus angenommen, dass HdrD unmittelbar mit dem Fpo-Komplex (4.5.2) interagiert und die Elektronen für die Heterodisulfidreduktion unmittelbar von diesem aufnimmt. Der Fpo-Komplex nutzt wie beschrieben putativ Fd_{red} als Elektronendonator, welches am MvhADG/HdrABC-Komplex generiert wird. Für die Rolle von HdrD konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch verifiziert werden, dass das Enzym keine starke Interaktion mit einer Membran-Komponente wie dem Fpo-Komplex eingeht, da es in der Cytoplasma-Fraktion detektiert werden konnte (3.3.2.4). Zukünftige Untersuchungen, die die potentielle Interaktion mit dem Fpo-Komplex im Detail analysieren sind daher zur weiteren Aufklärung des Prozesses noch nötig.

4.6 Energiestoffwechsel von *Mna. thermophilum*, *Mmc. luminyensis* und *Mc. vulcani*

Auf Grundlage der erzielten Ergebnisse und der Einordnung und Bedeutung der verschiedenen Elemente der Energiekonservierung und der Methanogenese können für die drei untersuchten Organismen abschließend Modelle des Gesamtstoffwechsel aufgestellt werden.

4.6.1 Methanogenese von *Mna. thermophilum*

Der Energiestoffwechsel von *Mna. thermophilum* wurde in dieser Arbeit detailliert untersucht. Ein besonderer Fokus lag dabei auf der Methanogenese ausgehend von Formiat in Kombination mit methylierten Verbindungen, da dies einen völlig neuartigen Weg der Methanogenese darstellt. Neben der Methanogenese mit Formiat als Elektronendonator, war der Organismus ebenso in der Lage molekularen Wasserstoff zu verwenden. Die Untersuchungen des Energiestoffwechsels im Rahmen dieser Arbeit und die Diskussion über die einzelnen Komponenten ergaben in Kombination, ein klares Modell der Energiekonservierung und der Methanogenese für den Organismus. Die Abhängigkeit der Methanogenese von Formiat und molekularem Wasserstoff begründete sich darin, dass *Mna. thermophilum* durch die fehlende membrangebundene Mtr nicht befähigt ist den oxidativen Zweig der Methanogenese zu nutzen, um Reduktionsäquivalente für die Reduktion von Methyl-Coenzym M zu Methan zu generieren. Daher nutzt der Organismus zur Reduktion des Heterodisulfids eine membrangebundene Atmungskette. Dabei besteht die Möglichkeit die Elektronen von der Oxidation des molekularen Wasserstoffs über die Vho-Hydrogenase auf Methanophenazin bzw. ein Derivat dazu zu übertragen. Das reduzierte Methanophenazin dient schließlich der Heterodisulfid-Reduktase HdrDE als Elektronendonator, um die Reduktion des Heterodisulfids zu ermöglichen. Dies ist dem Organismus auch mit Formiat möglich, wobei die Vho-Hydrogenase durch die membrangebundene Formiat-Dehydrogenase ersetzt wird (Abbildung 65). Die Reduktion des Heterodisulfids durch die beschriebenen Elektronentransportsysteme erlaubt schließlich die Aufrechterhaltung der Methanogenese. Coenzym M kann im Anschluss wieder Methylgruppen von den methylierten Substraten akzeptieren, wobei Methyl-Coenzym M entsteht. Die Methylgruppe wird schließlich mit Coenzym B als Elektronendonator zu Methan reduziert, wobei ebenso erneut Heterodisulfid entsteht, welches wiederum der beschriebenen Atmungskette als terminaler Elektronenakzeptor zur Verfügung steht (Abbildung 66).

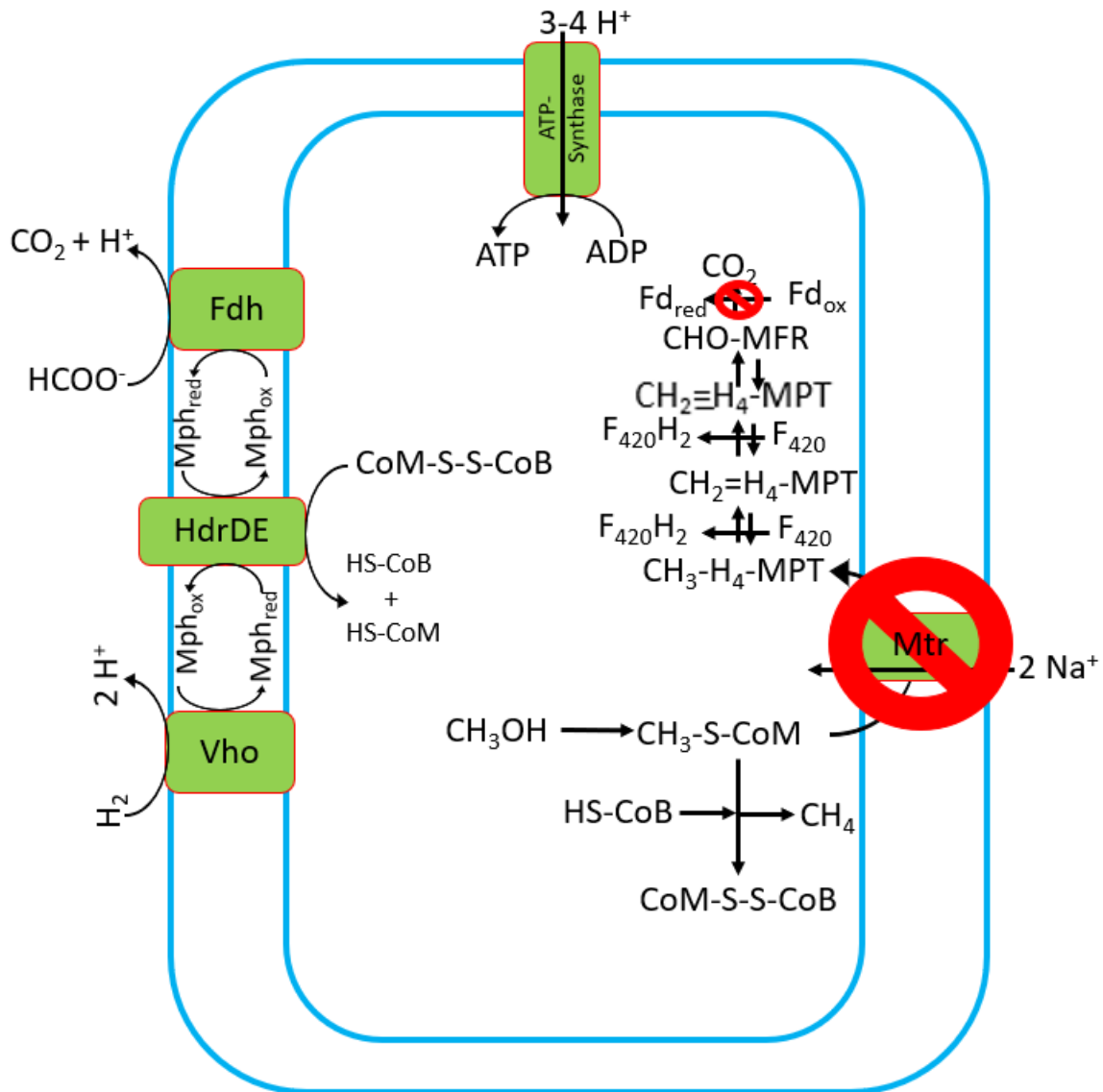


Abbildung 66: Postulierter Energiestoffwechsel von *Methanonatronarchaeum thermophilum* ausgehend von Methanol. Als externer Elektronendonator der Methanogenese kann Formiat (Fdh) oder alternativ molekularer Wasserstoff (Vho) genutzt werden. Methanophenazin (Mph) bzw. ein Analogon ist der Elektronenüberträger in den Membranen des Organismus und schematisch eingezeichnet, wobei eine Aufnahme bzw. Abgabe von zwei Elektronen pro Molekül möglich ist. Rot durchgestrichen sind die Enzymkomplexe, welche in *Mna. thermophilum* fehlen und die Methanogenese ausgehend von H_2/CO_2 oder methylierten Verbindungen ohne zusätzlichen externen Elektronendonator nicht möglich machen. Blau: Cytoplasma-Membran. Fdh: Formiat-Dehydrogenase FdhGHI; Vho: Hydrogenase VhoGAC; HdrDE: Heterodisulfidreduktase; Mtr: Membranegebundene Methyltransferase.

Der Stoffwechsel des Organismus ist durch die fehlenden Mtr auf externe Elektronendonatoren wie Formiat oder H_2 angewiesen, wohingegen Organismen die klassische methylotherme Methanogenese betreiben, durch die Oxidation von 25 % der Methylgruppen von Methyl-Coenzym M zu CO_2 selbst in der Lage sind Reduktionsäquivalente zu generieren (Welte & Deppenmeier, 2014). Beispiele sind der Stoffwechsel von *Ms. mazei* oder *Ms. acetivorans*. Auch die Methanogenese von *Msp. stadtmanae* ist ausgehend von

Methanol möglich, wobei H₂ als externer Elektronendonator dient. Der Stoffwechsel von *Msp. stadtmanae* unterscheidet sich jedoch dramatisch von jenem von *Mna. thermophilum*. Eine Vho-Hydrogenase oder membrangebundene Heterodisulfid-Reduktase sind nicht vorhanden. Molekularer Wasserstoff wird vom cytoplasmatischen MvhAGD/HdrABC Komplex zur Reduktion von Heterodisulfid und Ferredoxin genutzt. Die reduzierten Bestandteile des Heterodisulfids dienen wie bereits ausführlich geschildert unmittelbar der Methanogenese. Reduziertes Ferredoxin dient der Energiekonservierung an der Ehb-Hydrogenase, welche membrangebunden ist und die Reduktion von Protonen zu H₂ mit Fd_{red} als Elektronendonator zur Translokation von Natrium-Ionen über die Membran nutzt (Thauer et al., 2008; Abbildung 67).

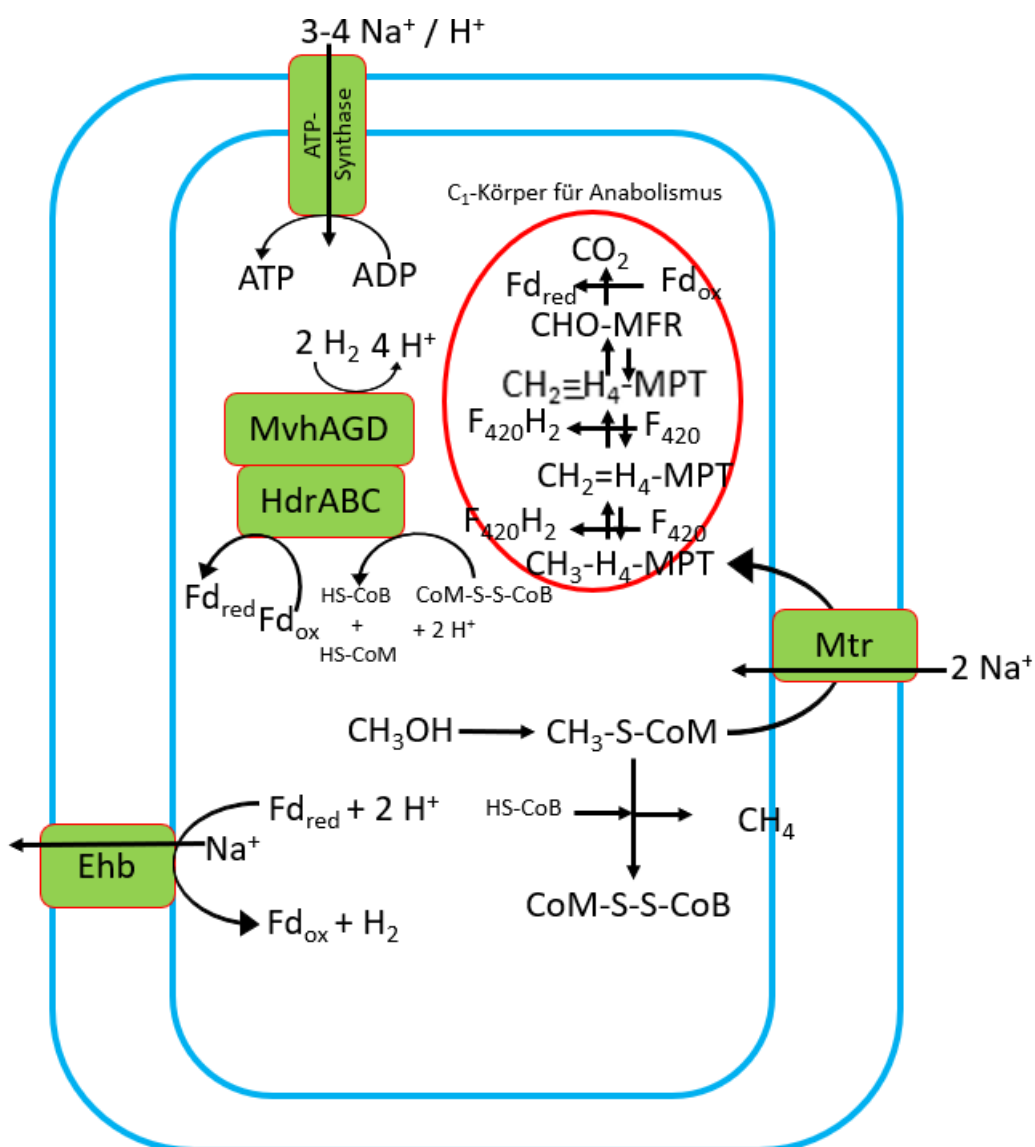


Abbildung 67: Methanogenese von *Msp. stadtmanae* ausgehend von Methanol und H₂. Der oxidative Zweig der Methanogenese (rot) wird auf Grundlage der vorliegenden Daten nur für den Anabolismus genutzt (Fricke et al., 2006; Thauer et al., 2008). Daher wird der Schritt der Mtr im Rahmen des Energiestoffwechsels nicht benötigt und ist der Übersicht halber in der Abbildung vorhanden. Blau: Cytoplasma-Membran.

4.6.2 Methanogenese von *Mmc. luminyensis*

Auch der Stoffwechsel von *Mmc. luminyensis* ist abhängig von methylierten Verbindungen in Kombination mit Wasserstoff als externem Elektronendonator. Die Methanogenese unterscheidet sich jedoch wiederum deutlich von jener aus *Mna. thermophilum* und *Msp. stadtmanae*. Nach dem Stoffwechselmodell von Kröninger et al. (2016/2019) werden ausgehend von zwei Molekülen Methanol zwei Moleküle Methan produziert. Dabei entstehen auf bekanntem Weg zwei Moleküle Heterodisulfid. Eines der beiden Moleküle wird ausgehend von H₂ durch den MvhAGD/HdrABC-Komplex reduziert, wobei ebenso reduziertes Ferredoxin entsteht. Letzteres wird vom membrangebundenen „kopflösen“-Fpo-Komplex als Elektronendonator genutzt, wobei dieser mit HdrD interagiert und die Elektronen unmittelbar der Reduktion des zweiten Heterodisulfids dienen. Die Reaktion des Fpo-Komplexes trägt durch die Translokation von Protonen der Energiekonservierung bei (Kröninger et al., 2019; Abbildung 68).

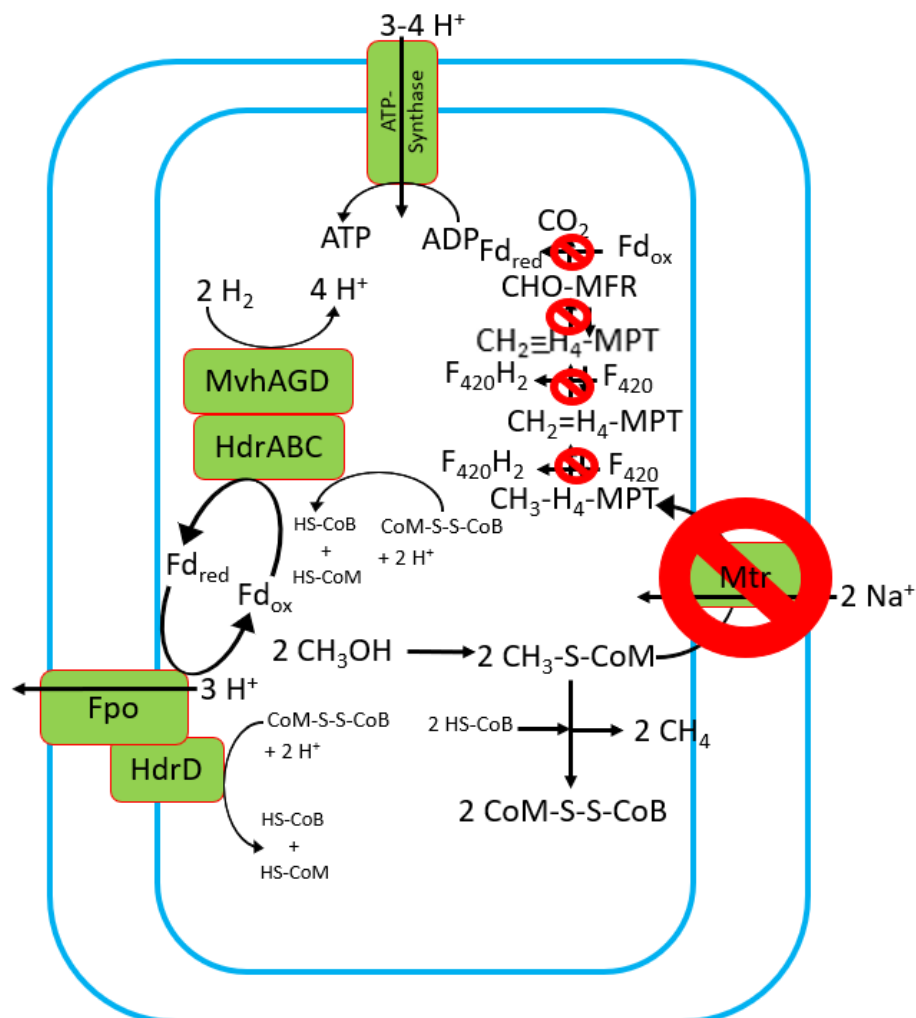


Abbildung 68: Methanogenese von *Methanomassiliicoccus luminyensis* ausgehend von Methanol und H₂ (Kröninger et al., 2016). Rot durchgestrichen sind die Enzymkomplexe, welche in *Mmc. luminyensis* fehlen und die Methanogenese ausgehend von H₂/CO₂ oder methylierten Verbindungen ohne zusätzlichen externen Elektronendonator nicht möglich machen. Blau: Cytoplasma-Membran.

Kröniger (2018) zeigte die Fd_{red} -Heterodisulfid-Oxidoreduktase-Aktivität der Membranen des Organismus in Kombination mit HdrD und führte sie auf den Fpo-Komplex in Kombination mit der Heterodisulfid-Reduktase HdrD zurück. In der vorliegenden Arbeit konnte mit spezifischen Antikörpern gezeigt werden, dass der lösliche Anteil des Fpo-Komplexes, welcher für den Elektronentransport entscheidend ist auch nach der Präparation der Cytoplasma-Membranen an dieser verbleibt und nicht im Laufe der Aufreinigungsschritte in die Cytoplasma-Fraktion übergeht. Dies untermauerte, dass die genannte Aktivität in den Membranpräparationen des Organismus auf den Fpo-Komplex zurückgeht und verifizierte das postulierte Stoffwechselmodell.

4.6.3 Methanogenese von *Mc. vulcani*

Für den Stoffwechsel von *Mc. vulcani* konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Methanogenese ausgehend von methylierten Verbindungen identisch zu *Ms. acetivorans* abläuft. Bei 75 % der Methylgruppen, welche auf Coenzym M übertragen werden, erfolgt die Reduktion zu Methan, wohingegen die restlichen 25 % zu CO_2 oxidiert werden, um Reduktionsäquivalente für die Reduktion der 75% der Methylgruppen zu Methan zu generieren (Welte & Deppenmeier, 2014). Die in dieser Arbeit ermittelten Verhältnisse der Methylgruppen der eingesetzten Substrate zum produzierten Methan zeigten deutlich auf, dass die Hypothese zutrifft. Bioinformatisch wurden ein Rnf-Komplex und ein Fpo-Komplex identifiziert, welche die im oxidativen Zweig der Methanogenese entstehenden reduzierten Elektronenüberträger in Form von Fd_{red} bzw. $2 F_{420}H_2$ re-oxidieren können. Beide Komplexe übertragen die Elektronen putativ auf Methanophenazin, welches der Heterodisulfid-Reduktase HdrDE als Elektronendonator dient. Diese reduziert Heterodisulfid, um Coenzym M und Coenzym B für die Methanogenese bereitzustellen (Abbildung 69). Sowohl Rnf-Komplex als auch Fpo-Komplex tragen im Stoffwechsel von *Ms. acetivorans* der Energiekonservierung des Organismus durch Translokation von Na^+ oder H^+ über die Cytoplasma-Membran bei (Welte & Deppenmeier, 2014). Selbiges gilt mit hoher Wahrscheinlichkeit für die Komplexe in *Mc. vulcani*.

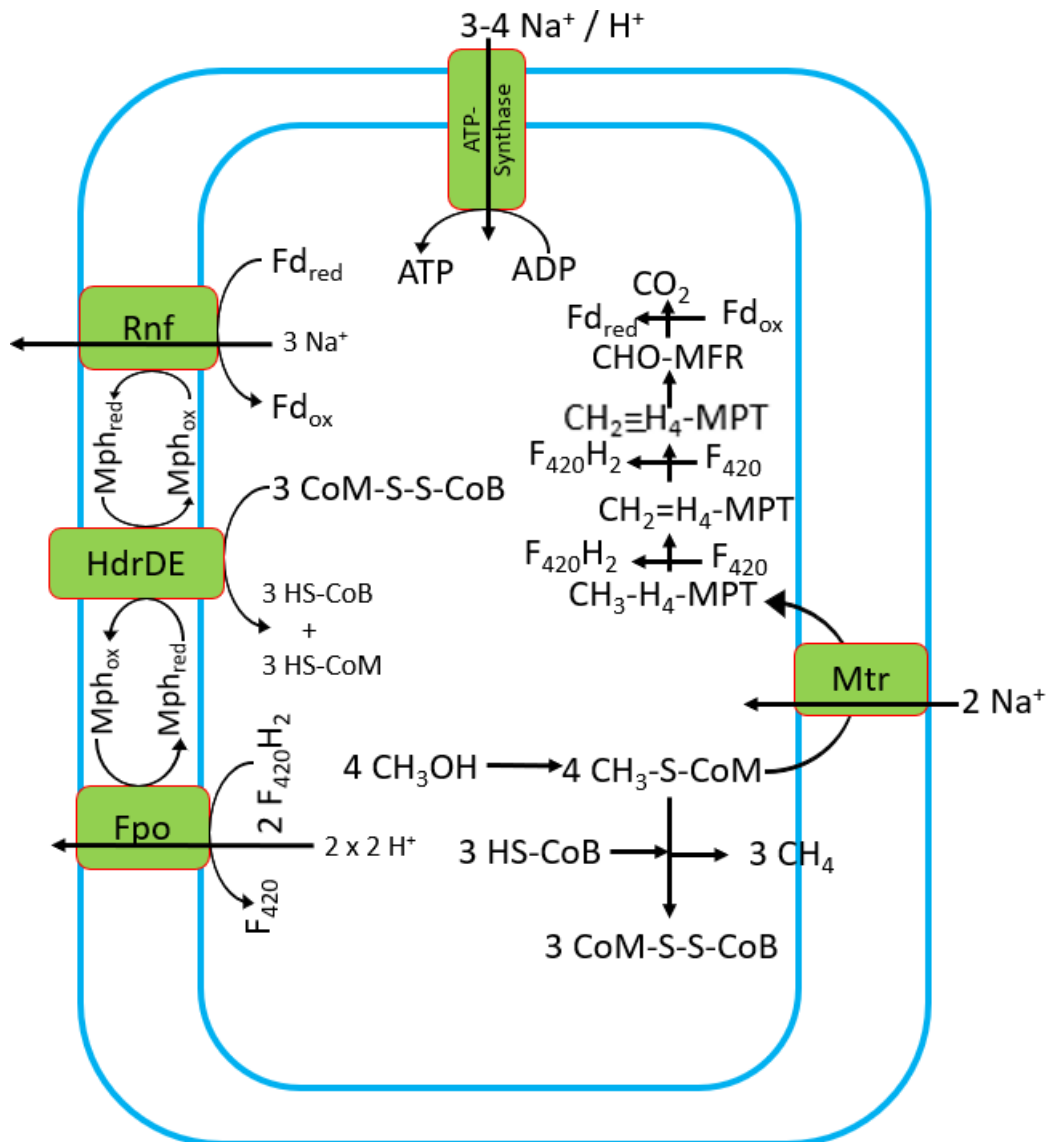


Abbildung 69: Methanogenese von *Mc. vulcani* ausgehend von Methanol. Zur Reduktion von drei Molekülen Methyl-Coenzym-M zu Methan, wird eine Methylgruppe ausgehend von Methyl-Coenzym-M zu CO_2 oxidiert, wobei Reduktionsäquivalente generiert werden. Methanophenazin ist der putative Elektronenüberträger in den Membranen des Organismus und schematisch eingezeichnet, wobei eine Aufnahme bzw. Abgabe von zwei Elektronen pro Molekül möglich ist. Blau: Cytoplasma-Membran.

5. Zusammenfassung

Die Untersuchung von Methanproduzenten ist aus verschiedenen Gründen von großem Interesse. So ist Methan auf der einen Seite ein hochwirksames Klimagas und auf der anderen Seite bei der Produktion in Biogasanlagen durch methanogene Archaeen eine nachhaltige Energiequelle. Auch im humanen Organismus kommen Methanproduzenten vor, deren Wechselwirkung mit dem Menschen bislang nur marginal untersucht wurde.

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit unterschiedlichen Aspekten der Methanogenese und des Energiestoffwechsels der methanogenen Archaeen *Mmc. luminyensis*, *Mc. vulcani* und *Mna. thermophilum*.

1. Der haloalkaliphile Organismus *Mna. thermophilum* betreibt Methanogenese ausgehend von methylierten Verbindungen in Kombination mit Formiat oder H₂. Die Substratkombination von methylierten Substanzen und Formiat ist für den Organismus einzigartig.

1.1 In umfangreichen Wachstumsexperimenten konnte gezeigt werden, dass dem Organismus Wachstum und Methanogenese mit Methanol, Trimethylamin (TMA), Dimethylamin (DMA) oder Monomethylamin (MMA) in Kombination mit H₂ oder Formiat möglich ist. Die schnellste Verdopplungszeit zeigte der Organismus dabei auf TMA mit Formiat (t_d : 44,5 ± 4,5 h). Die Verdopplungszeiten waren im Fall der Nutzung von methylierten Verbindungen in Kombination mit molekularem Wasserstoff anstelle von Formiat deutlich langsamer. Dies spiegelte sich auch in den Wachstumserträgen wider, welche bei der Nutzung von TMA oder Methanol mit Formiat 1,9 - 2,1 g Trockengewicht x mol Methan⁻¹ betragen. Bei der Substratkombinationen TMA oder Methanol mit molekularem Wasserstoff zeigten sich Wachstumserträge von nur 1,3 - 1,4 g Trockengewicht x mol Methan⁻¹.

1.2 Bioinformatische, transkriptionelle und enzymatische Untersuchungen des respiratorischen Elektronentransportes in den Cytoplasma-Membranen von *Mna. thermophilum* zeigten, dass der Energiemetabolismus des Organismus zentral von jeweils einer membrangebundenen Vho-Hydrogenase (VhoGAC), Formiat-Dehydrogenase (FdhGHI) und Heterodisulfid-Reduktase (HdrDE) abhängt. Die Analyse des durch Aktivitätstests verifizierten H₂:Heterodisulfid Oxidoreduktase-Systems bewies, dass dieses identisch zu *Ms. mazei* vorliegt und VhoGAC sowie HdrDE die entscheidende Rolle einnehmen. Das auf der Aktivität von FdhGHI und HdrDE beruhende Formiat:Heterodisulfid Oxidoreduktase-System konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals experimentell bestätigt werden und ist bislang einzigartig für *Mna. thermophilum*. Alle drei genannten Enzyme des Energiemetabolismus wiesen zudem Adaptationen an die harschen physikochemischen Bedingungen (Salinität und pH-Wert) des Habitats von *Mna. thermophilum* auf. Außerdem ergaben sich Hinweise, dass Methanophenazin oder ein Derivat als Elektronenüberträger in den Membranen des Organismus fungiert.

2. *Mc. vulcani* zeichnet sich durch ein besonders großes Substratspektrum für die methylo-trophe Methanogenese aus. Das Wachstumsverhalten auf den verschiedenen Substraten wurde in der vorliegenden Arbeit im Detail untersucht.

2.1 Dem Organismus war Wachstum und Methanogenese auf TMA, DMA, MMA, Methanol und Betain möglich. 75 % der eingesetzten Methylgruppen wurden dabei zu Methan metabolisiert, was den Schluss zuließ, dass die restlichen 25 % der Methylgruppen wie im Falle von *Methanosarcina* spp. zu CO₂ umgesetzt werden. Im Fall der Kulturen mit Betain konnte gezeigt werden, dass Dimethylglycin als Endprodukt akkumulierte und folglich nur eine Methylgruppe des Betains zu Methan verwertet werden kann. Die Wachstumserträge lagen mit $2,8 \pm 0,2$ g Trockengewicht x mol Methan⁻¹ auf Betain als Substrat am höchsten. Der geringste Wachstumsertrag wurde mit $1,3 \pm 0,2$ g Trockengewicht x mol Methan⁻¹ mit MMA erzielt.

2.2 Bioinformatisch konnten ein Rnf-Komplex, ein Fpo-Komplex und eine Heterodisulfid-Reduktase (HdrDE) identifiziert werden. Der oxidative Zweig der Methanogenese und die Methyl-CoM-Reduktase waren ebenso vollständig vorhanden. Dies ließ den Schluss zu, dass der Energiestoffwechsel wie in *Ms. acetivorans* abläuft. Die unter 2.1 genannten Wachstumsdaten belegten diese Theorie.

3. *Mmc. luminyensis* wurde aus humanen Feces isoliert und wird eine potentielle Rolle als Probiotikum zugeschrieben. Eine detaillierte Kenntnis der Biochemie und des Stoffwechsels war für eine mögliche medizinische Anwendung von entscheidender Bedeutung.

3. 1. Eine bioinformatische Analyse des „kopflösen“ Fpo-Komplexes, als zentralem Element der Energiekonservierung des Organismus, zeigte zwei potentielle Interaktionsstellen der Untereinheit Fpol mit dem putativen Elektronendonator des Komplexes in Form von Ferredoxin auf. Außerdem bewiesen weitere bioinformatische Untersuchungen, dass die Aminosäuren, welche für die Bindung eines Chinons im Komplex I von *T. thermophilus* entscheidend sind, auch in der Untereinheit FpoD von *Mmc. luminyensis* vorliegen. Bislang war auf Grundlage von massenspektrometrischen Untersuchungen angenommen worden, dass die Cytoplasma-Membranen des Organismus keine Atmungskettenchinone enthalten und die Elektronen vom Fpo-Komplex unmittelbar auf die Heterodisulfidreduktase HdrD übertragen werden. Dies ermöglichte Spekulationen über ein fest-gebundenes Chinon.

3. 2 Die Produktion von Antikörpern gegen Fpol erlaubte in dieser Arbeit den wichtigen Nachweis, dass die löslichen und membranassoziierten Untereinheiten des Fpo-Komplexes (FpoBCDI) im Rahmen der Membranpräparation an den Membranen erhalten bleiben und nicht in die Cytoplasma-Fraktion übergehen. Vorhergehende Untersuchungen zeigten, dass durch die Zugabe von reduziertem Ferredoxin, HdrD und Heterodisulfid eine Ferredoxin:Heterodisulfid Oxidoreduktase-Aktivität in Membranpräparationen von *Mmc. luminyensis* beobachtet werden konnte. Dabei wurde vermutet, dass die Reaktion durch den „kopflösen“ Fpo-Komplex katalysiert wird, der die Elektronen von Ferredoxin aufnimmt und auf HdrD überträgt. Der genannte Nachweis stützte diese Theorie. In der vorliegenden Arbeit konnten ebenso Antikörper gegen HdrD produziert werden, die zeigten, dass das Protein nach der Membranpräparation vollständig im Cytoplasma vorliegt und die putative Interaktion mit dem Fpo-Komplex damit eher schwach ist.

6. Literaturverzeichnis

- Abdul Halim, M. F., Day, L. A., & Costa, K. C. (2021). Formate-dependent heterodisulfide reduction in a Methanomicrobiales Archaeon. *Applied and Environmental Microbiology*. 87 (6), e02698-20.
- Abken, H.-J., Tietze, M., Brodersen, J., Bäumer, S., Beifuss, U., & Deppenmeier, U. (1998). Isolation and characterization of methanophenazine and function of phenazines in membrane-bound electron transport of *Methanosarcina mazei* Gö1. *Journal of Bacteriology*. 180 (8), 2027–2032.
- Ahring, B. K. (1995). Methanogenesis in thermophilic biogas reactors. *Antonie van Leeuwenhoek*. 67 (1), 91-102.
- Akhtar, K. M., & Jones, P. R. (2008) Deletion of *iscR* stimulates recombinant clostridial Fe–Fe hydrogenase activity and H₂-accumulation in *Escherichia coli* BL21(DE3). *Applied and Environmental Microbiology*. 78 (5), 853–862.
- Appel, L., Willistein, M., Dahl, C., Ermler, U., & Boll, M. (2021). Functional diversity of prokaryotic HdrA (BC) modules: Role in flavin-based electron bifurcation processes and beyond. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 1862 (4), 148379.
- Armougom, F., Henry, M., Vialettes, B., Raccach, D., & Raoult, D. (2009). Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in *Lactobacillus* in obese patients and Methanogens in anorexic patients. *PloS One*. 4 (9), 7125.
- Armstrong, F. A., Hill, H. A. O., & Walton, N. J. (1988). Direct electrochemistry of redox proteins. *Accounts of Chemical Research*. 21 (11), 407-413.
- Bang, C., Weidenbach, K., Gutschmann, T., Heine, H., & Schmitz, R. A. (2014). The intestinal archaea *Methanosphaera stadtmanae* and *Methanobrevibacter smithii* activate human dendritic cells. *PloS One*. 9 (6), e99411.
- Bang, C., & Schmitz, R. A. (2018). Archaea: forgotten players in the microbiome. *Emerging Topics in Life Sciences*. 2 (4), 459-468.
- Baradaran, R., Berrisford, J. M., Minhas, G. S., & Sazanov, L. A. (2013). Crystal structure of the entire respiratory complex I. *Nature*. 494 (7438), 443-448.
- Baron, S. F. & Ferry, J. G. (1989) Reconstitution and properties of a coenzyme F420-mediated formate hydrogenlyase system in *Methanobacterium formicicum*. *Journals of Bacteriology*. 171 (7), 3854–3859.
- Barrett, E. L., & Kwan, H. S. (1985). Bacterial reduction of trimethylamine oxide. *Annual Review of Microbiology*. 39 (1), 131-149.
- Battchikova, N., & Aro, E. M. (2007) Cyanobacterial NDH-1 complexes: multiplicity in function and subunit composition. *Physiologia Plantarum*. 131 (1), 22-32.
- Battchikova, N., Eisenhut, M., & Aro, E. M. (2011) Cyanobacterial NDH-1 complexes: Novel insights and remaining puzzles. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1807 (8), 935-944.

- Bäumer, S., Murakami, E., Brodersen, J., Gottschalk, G., Ragsdale, S. W., & Deppenmeier, U. (1998). The F₄₂₀H₂: heterodisulfide oxidoreductase system from *Methanosarcina* species: 2-hydroxyphenazine mediates electron transfer from F₄₂₀H₂ dehydrogenase to heterodisulfide reductase. *FEBS Letters*. 428 (3), 295-298.
- Becker, K. W., Elling, F. J., Yoshinaga, M. Y., Söllinger, A., Urich, T., & Hinrichs, K. U. (2016). Unusual butane- and pentanetriol-based tetraether lipids in *Methanomassiliicoccus luminyensis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 82 (15), 4505-4516.
- Bennett, B. J., de Aguiar Vallim, T. Q., Wang, Z., Shih, D. M., Meng, Y., Gregory, J., Allayee, H., Lee, R., Graham, M., Crooke, R., Edwards, P. A., Hazen, S. L., & Lusis, A. J. (2013). Trimethylamine-N-oxide, a metabolite associated with atherosclerosis, exhibits complex genetic and dietary regulation. *Cell Metabolism*. 17 (1), 49-60.
- Berrisford, J. M., & Sazanov, L. A. (2009). Structural basis for the mechanism of respiratory complex I. *Journal of Biological Chemistry*. 284 (43), 29773-29783.
- Biegel, E., & Müller, V. (2010). Bacterial Na⁺-translocating ferredoxin: NAD⁺ oxidoreductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107 (42), 18138-18142.
- Biegel, E., Schmidt, S., González, J. M., & Müller, V. (2011). Biochemistry, evolution and physiological function of the Rnf complex, a novel ion-motive electron transport complex in prokaryotes. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 68 (4), 613-634.
- Blais Lecours, P., Marsolais, D., Cormier, Y., Berberi, M., Haché, C., Bourdages, R., & Duchaine, C. (2014). Increased prevalence of *Methanospaera stadtmanae* in inflammatory bowel diseases. *PLoS One*. 9 (2), e87734.
- Blum, H., Beier, H., & Gross, H. J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8 (2), 93-99.
- Boetius, A., Ravensschlag, K., Schubert, C. J., Rickert, D., Widdel, F., Gieseke, A., Amann, R., Jørgensen, B., Wite, U., & Pfannkuche, O. (2000). A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature*. 407 (6804), 623.
- Bohin, J. P. (2000). Osmoregulated periplasmic glucans in Proteobacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 186 (1), 11-19.
- Borrel, G., O'Toole, P. W., Harris, H. M., Peyret, P., Brugere, J. F., & Gribaldo, S. (2013b). Phylogenomic data support a seventh order of methylotrophic methanogens and provide insights into the evolution of methanogenesis. *Genome Biology and Evolution*. 5 (10), 1769-1780.

- Borrel, G., Parisot, N., Harris, H. M., Peyretailade, E., Gaci, N., Tottey, W., Bardot, O., Raymann, K., Gribaldo, S., Peyret, P., O'Toole, P. W. & Brugère, J-F. (2014). Comparative genomics highlights the unique biology of Methanomassiliicoccales, a Thermoplasmatales-related seventh order of methanogenic archaea that encodes pyrrolysine. *BMC Genomics*. 15 (679), 1-23.
- Borrel, G., Adam, P. S., McKay, L. J., Chen, L. X., Sierra-García, I. N., Sieber, C., Letourneur, Q., Ghozlane, A., Andersen, G. L., Li, W. J., Hallam, S. J., Muyzer, G., de Oliveira, V. M., Inskeep, W. P., Banfield, J. F., & Gribaldo, S. (2019). Wide diversity of methane and short-chain alkane metabolisms in uncultured archaea. *Nature Microbiology*. 4 (4), 603–613.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72 (1), 248-254.
- Bringuiet, A., Khelaifia, S., Richet, H., Aboudharam, G., & Drancourt, M. (2013). Real-time PCR quantification of *Methanobrevibacter oralis* in periodontitis. *Journal of Clinical Microbiology*. 51 (3), 993-994.
- Brodersen, J., Bäumer, S., Abken, H. J., Gottschalk, G., & Deppenmeier, U. (1999). Inhibition of membrane-bound electron transport of the methanogenic archaeon *Methanosarcina mazei* Gö1 by diphenyliodonium. *European Journal of Biochemistry*. 259 (1-2), 218-224.
- Brugère, J. F., Borrel, G., Gaci, N., Tottey, W., O'Toole, P. W., & Malpuech-Brugère, C. (2014). Archaeobiotics: proposed therapeutic use of archaea to prevent trimethylaminuria and cardiovascular disease. *Gut Microbes*. 5 (1), 5–10.
- Brüggemann, H., Falinski, F., & Deppenmeier, U. (2000). Structure of the F₄₂₀H₂:quinone oxidoreductase of *Archaeoglobus fulgidus*. *The FEBS Journal*. 267 (18), 5810-5814.
- Buan, N. R., & Metcalf, W. W. (2010). Methanogenesis by *Methanosarcina acetivorans* involves two structurally and functionally distinct classes of heterodisulfide reductase. *Molecular Microbiology*. 75 (4), 843-853.
- Buckel, W., & Thauer, R. K. (2013). Energy conservation via electron bifurcating ferredoxin reduction and proton/Na⁺ translocating ferredoxin oxidation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 1827 (2), 94-113.
- Buckel, W., & Thauer, R. K. (2018). Flavin-based electron bifurcation, a new mechanism of biological energy coupling. *Chemical Reviews*. 118 (7), 3862-3886.
- Calderon-Gomez, L. I., Day, C. J., Hartley-Tassell, L. E., Wilson, J. C., Mendz, G. L., & Korolik, V. (2017). Identification of NuoX and NuoY ligand binding specificity in the *Campylobacter jejuni* complex I. *Journal of Bacteriology & Parasitology*. 8 (2), 1-8.
- Carroll, J., Fearnley, I. M., Skehel, J. M., Shannon, R. J., Hirst, J., & Walker, J. E. (2006). Bovine complex I is a complex of 45 different subunits. *Journal of Biological Chemistry*. 281 (43), 32724-32727.

- Cassan, N., Lagoutte, B., & Sétif, P. (2005). Ferredoxin-NADP⁺ reductase: kinetics of electron transfer, transient intermediates, and catalytic activities studied by flash-absorption spectroscopy with isolated photosystem I and ferredoxin. *Journal of Biological Chemistry*. 280(28), 25960-25972.
- Cheeseman, P., Toms-Wood, A., & Wolfe, R. S. (1972). Isolation and properties of a fluorescent compound, Factor₄₂₀, from *Methanobacterium* strain MoH. *Journal of Bacteriology*. 112 (1), 527-531.
- Chibani, C. M., Mahnert, A., Borrel, G., Almeida, A., Werner, A., Brugère, J. F., Gribaldo, S., Finn, R. D., Schmitz, R. A., & Moissl-Eichinger, C. (2022). A catalogue of 1,167 genomes from the human gut archaeome. *Nature Microbiology*. 7 (1), 48–61.
- Choi, J. H., & Lee, S. (2004). Secretory and extracellular production of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 64 (5), 625-635.
- Christensen, T. R., Johansson, T., Åkerman, H. J., Mastepanov, M., Malmer, N., Friberg, T., Crill, P., & Svensson, B. H. (2004). Thawing sub-arctic permafrost: Effects on vegetation and methane emissions. *Geophysical Research Letters*. 31 (4).
- Ciais, P., Sabine, C., Bala, G., Bopp, L., Brovkin, V., Canadell, J., Chhabra, A., DeFries, R., Galloway, J., Heimann, M., Jones, C., Le Quéré, C., Myneni R. B., Piao, S., & Thornton, P. (2014). Carbon and other biogeochemical cycles. Erschienen in "Climate change 2013: the physical science basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (Editoren: Stocker, T., Qin, D., Plattner, G. K., Tignor, M., Allen, S., Boschung, J., Nauels, A., Xia, Y., Bex, V., & Midgley, P.)". S. 465-570. Cambridge University Press. Cambridge. Vereinigtes Königreich.
- Comeau, S. R., Gatchell, D. W., Vajda, S., & Camacho, C. J. (2004 a). ClusPro: an automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes. *Bioinformatics*. 20 (1), 45-50.
- Comeau, S. R., Gatchell, D. W., Vajda, S., & Camacho, C. J. (2004 b). ClusPro: a fully automated algorithm for protein–protein docking. *Nucleic Acids Research*. 32 (2), 96-99.
- Costa, K. C., Wong, P. M., Wang, T., Lie, T. J., Dodsworth, J. A., Swanson, I., Burn, J. A., Hackett, M., & Leigh, J. A. (2010). Protein complexing in a methanogen suggests electron bifurcation and electron delivery from formate to heterodisulfide reductase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 107 (24), 11050-11055.
- Costa, K. C., Lie, T. J., Xia, Q., & Leigh, J. A. (2013). VhuD facilitates electron flow from H₂ or formate to heterodisulfide reductase in *Methanococcus maripaludis*. *Journal of Bacteriology*. 195 (22), 5160-5165.
- Costa, K. C., & Leigh, J. A. (2014). Metabolic versatility in methanogens. *Current Opinion in Biotechnology*. 29 (1), 70-75.

- Cozannet, M., Borrel, G., Roussel, E., Moalic, Y., Allioux, M., Sanvoisin, A., Toffin, L., & Alain, K. (2021). New Insights into the Ecology and Physiology of Methanomassiliicoccales from Terrestrial and Aquatic Environments. *Microorganisms*. 9 (1), 30.
- Craciun, S., & Balskus, E. P. (2012). Microbial conversion of choline to trimethylamine requires a glyceryl radical enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109 (52), 21307-21312.
- Creighbaum, A. J. (2020). Examination and reconstitution of the glycine betaine-dependent methanogenesis pathway from the obligate methylotrophic methanogen *Methanolobus vulcani* B1d. Dissertation. Miami University.
- Creighbaum, A. J., Ticak, T., Shinde, S., Wang, X., & Ferguson Jr., D. J. (2019). Examination of the glycine betaine-dependent methylotrophic methanogenesis pathway: insights into anaerobic quaternary amine methylotrophy. *Frontiers in Microbiology*. 10, 2572.
- Dalby, F. R., Hafner, S. D., Petersen, S. O., VanderZaag, A. C., Habtewold, J., Dunfield, K., Chantigny M.H., & Sommer, S. G. (2021). Understanding methane emission from stored animal manure: A review to guide model development. *Journal of Environmental Quality*. 50 (4), 817-835.
- Daniels, L., Sparling, R., & Sprott, G. D. (1984). The bioenergetics of methanogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Bioenergetics*. 768 (2), 113-163.
- Danson, M. J., & Hough, D. W. (1992, January). The enzymology of archaeobacterial pathways of central metabolism. In *Biochemical Society Symposium*. 58 (1), 7-21.
- Darwin, A., Tormay, P., Page, L., Griffiths, L., & Cole, J. (1993). Identification of the formate dehydrogenases and genetic determinants of formate-dependent nitrite reduction by *Escherichia coli* K12. *Microbiology*. 139 (8), 1829-1840.
- Davidson, V. L. (2001). Pyrroloquinoline quinone (PQQ) from methanol dehydrogenase and tryptophan tryptophylquinone (TTQ) from methylamine dehydrogenase. *Advances in Protein Chemistry*. 58 (1), 95-140.
- Debus, R. J., Barry, B. A., Sithole, I., Babcock, G. T., & McIntosh, L. (1988). Directed mutagenesis indicates that the donor to P 680⁺ in photosystem II is tyrosine-161 of the D1 polypeptide. *Biochemistry*. 27 (26), 9071-9074.
- Demain, A. L., & Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology Advances*. 27 (3), 297-306.
- Deppenmeier, U., Blaut, M., Mahlmann, A., & Gottschalk, G. (1990). Reduced coenzyme F₄₂₀: heterodisulfide oxidoreductase, a proton-translocating redox system in methanogenic bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 87 (23), 9449-9453.
- Deppenmeier, U., Blaut, M., & Gottschalk, G. (1991). H₂: heterodisulfide oxidoreductase, a second energy-conserving system in the methanogenic strain Gö1. *Archives of Microbiology*. 155 (3), 272-277.

- Deppenmeier, U., Blaut, M., Schmidt, B., & Gottschalk, G. (1992). Purification and properties of a F₄₂₀-nonreactive, membrane-bound hydrogenase from *Methanosarcina* strain Gö1. *Archives of Microbiology*. 157, 505-511.
- Deppenmeier, U., Blaut, M., Lentes, S., Herzberg, C., & Gottschalk, G. (1995). Analysis of the *vhoGAC* and *vhtGAC* Operons from *Methanosarcina mazei* Strain Gö1, Both Encoding a Membrane-bound Hydrogenase and a Cytochrome b. *European Journal of Biochemistry*. 227 (1-2), 261-269.
- Deppenmeier, U. (1995). Different structure and expression of the operons encoding the membrane-bound hydrogenases from *Methanosarcina mazei* Gö1. *Archives of Microbiology*. 164 (5), 370-376.
- Deppenmeier, U., Lienard, T., & Gottschalk, G. (1999). Novel reactions involved in energy conservation by methanogenic archaea. *FEBS Letters*. 457 (3), 291-297.
- Deppenmeier, U. (2002). The unique biochemistry of methanogenesis. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. 71 (1), 223-283.
- Deppenmeier, U. (2004). The membrane-bound electron transport system of *Methanosarcina* species. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 36 (1), 55-64.
- Dhananjayan, N., Wang, P., Leontyev, I., & Stuchebrukhov, A. A. (2022). Quinone binding in respiratory complex I: Going through the eye of a needle. The squeeze-in mechanism of passing the narrow entrance of the quinone site. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 21 (1), 1-12.
- Djemai, K., Drancourt, M., & Tidjani Alou, M. (2022). Bacteria and Methanogens in the Human Microbiome: a Review of Syntrophic Interactions. *Microbial Ecology*. 83 (3), 536–554.
- Dowden, H. C. (1938). The determination of small amounts of dimethylamine in biological fluids. *Biochemical Journal*. 32 (3), 455.
- Dridi, B., Fardeau, M. L., Ollivier, B., Raoult, D., & Drancourt, M. (2012). *Methanomassiliicoccus luminyensis* gen. nov., sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 62 (8), 1902-1907.
- D'Silva, T. C., Isha, A., Chandra, R., Vijay, V. K., Subbarao, P. M. V., Kumar, R., Chaudhary, V. P., Singh, H., Ali Khan, A., Tyagi, V. K., & Kovács, K. L. (2021). Enhancing methane production in anaerobic digestion through hydrogen assisted pathways – A state-of-the-art review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 151 (1), 111-536.
- Dubini A & Sargent F (2003) Assembly of Tat-dependent [NiFe] hydrogenases: identification of precursor-binding accessory proteins. *FEBS Letters*. 549 (1-3),141–146.
- Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S. R., Nelson, K. E., & Relman, D. A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. 308 (5728), 1635-1638.

- Efenberger, M., Agier, J., Pawłowska, E., & Brzezińska-Błaszczyk, E. (2015). Archaea prevalence in inflamed pulp tissues. *Central-European Journal of Immunology*. 40 (2), 194.
- Efremov, R. G., Baradaran, R., & Sazanov, L. A. (2010). The architecture of respiratory complex I. *Nature*. 465 (7297), 441-445.
- Efremov, R. G., & Sazanov, L. A. (2011). Respiratory complex I: 'steam engine' of the cell?. *Current Opinion in Structural Biology*. 21 (4), 532-540.
- Efremov, R. G., & Sazanov, L. A. (2012). The coupling mechanism of respiratory complex I—a structural and evolutionary perspective. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 1817 (10), 1785-1795.
- Eismann, K., Mlejnek, K., Zipprich, D., Hoppert, M., Gerberding, H., & Mayer, F. (1995). Antigenic determinants of the membrane-bound hydrogenase in *Alcaligenes eutrophus* are exposed toward the periplasm. *Journal of Bacteriology*. 177 (21), 6309–6312.
- Elling, F. J., Becker, K. W., Könneke, M., Schröder, J. M., Kellermann, M. Y., Thomm, M., & Hinrichs, K. U. (2016). Respiratory quinones in Archaea: phylogenetic distribution and application as biomarkers in the marine environment. *Environmental Microbiology*. 18 (2), 692-707.
- Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 82 (1), 70-77.
- Evans, P. N., Boyd, J. A., Leu, A. O., Woodcroft, B. J., Parks, D. H., Hugenholtz, P., & Tyson, G. W. (2019). An evolving view of methane metabolism in the Archaea. *Nature Reviews Microbiology*. 17 (4), 219-232.
- Ferrari, A., Brusa, T., Rutili, A., Canzi, E., & Biavati, B. (1994). Isolation and characterization of *Methanobrevibacter oralis* sp. nov. *Current Microbiology*. 29 (1), 7-12.
- Ferrer, M., Sorokin, D. Y., Wolf, Y. I., Ciordia, S., Mena, M. C., Bargiela, R., Koonin, E. V., & Makarova, K. S. (2018). Proteomic Analysis of *Methanonatronarchaeum thermophilum* AMET1, a Representative of a Putative New Class of Euryarchaeota, "Methanonatronarchaeia". *Genes*, 9 (2), 28.
- Ferry, J. G. (1990). Formate dehydrogenase. *FEMS Microbiology Reviews*. 7 (3-4), 377-382.
- Ferry, J. G. (2010). How to make a living by exhaling methane. *Annual Review of Microbiology*. 64 (1), 453-473.
- Ferry, J. G. (2020). *Methanosarcina acetivorans*: a model for mechanistic understanding of acetate and reverse methanogenesis. *Frontiers in Microbiology*, 11 (1), 1806.
- Flemming, D., Schlitt, A., Spehr, V., Bischof, T., & Friedrich, T. (2003). Iron-sulfur cluster N2 of the *Escherichia coli* NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) is located on subunit NuoB. *Journal of Biological Chemistry*. 278 (48), 47602-47609.
- Fontecilla-Camps, J. C., Volbeda, A., Cavazza, C., & Nicolet, Y. (2007). Structure/function relationships of [NiFe]- and [FeFe]-hydrogenases. *Chemical Reviews*. 107 (10), 4273–4303.

- Franke, T., & Deppenmeier, U. (2018). Physiology and central carbon metabolism of the gut bacterium *Prevotella copri*. *Molecular Microbiology*. 109 (4), 528–540.
- Franke, T. (2020). Aufklärung des zentralen Kohlenstoff-und Energiemetabolismus des Darmbakteriums *Prevotella copri*. Dissertation. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Freigang, J., Diederichs, K., Schäfer, K. P., Welte, W., & Paul, R. (2002). Crystal structure of oxidized flavodoxin, an essential protein in *Helicobacter pylori*. *Protein Science*. 11 (2), 253-261.
- Fricke, W. F., Seedorf, H., Henne, A., Krüer, M., Liesegang, H., Hedderich, R., Gottschalk, G., & Thauer, R. K. (2006). The genome sequence of *Methanosphaera stadtmanae* reveals why this human intestinal archaeon is restricted to methanol and H₂ for methane formation and ATP synthesis. *Journal of Bacteriology*. 188 (2), 642-658.
- Friedrich, T., Steinmüller, K., & Weiss, H. (1995). The proton-pumping respiratory complex I of bacteria and mitochondria and its homologue in chloroplasts. *FEBS Letters*. 367 (2), 107-111.
- Friedrich, T. (1998). The NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) from *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 1364 (2), 134-146.
- Friedrich, T., & Scheide, D. (2000). The respiratory complex I of bacteria, archaea and eukarya and its module common with membrane-bound multisubunit hydrogenases. *FEBS Letters*. 479 (1-2), 1-5.
- Galinski, E. A., & Trüper, H. G. (1994). Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews*. 15 (2-3), 95-108.
- Garcia, J. L., Patel, B. K., & Ollivier, B. (2000). Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic Archaea. *Anaerobe*. 6 (4), 205-226.
- Gerken, S., Brettel, K., Schlodder, E., & Witt, H. T. (1988). Optical characterization of the immediate electron donor to chlorophyll a⁺ II in O₂-evolving photosystem II complexes Tyrosine as possible electron carrier between chlorophyll a II and the water-oxidizing manganese complex. *FEBS Letters*. 237 (1-2), 69-75.
- Geysen, H. M., Barteling, S. J., & Meloen, R. H. (1985). Small peptides induce antibodies with a sequence and structural requirement for binding antigen comparable to antibodies raised against the native protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 82 (1), 178-182.
- Gottschalk, G., & Thauer, R. K. (2001). The Na⁺-translocating methyltransferase complex from methanogenic archaea. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 1505 (1), 28-36.
- Gross, R., Pisa, R., Sängler, M., Lancaster, C. R. D., & Simon, J. (2004). Characterization of the menaquinone reduction site in the diheme cytochrome b membrane anchor of *Wolinella succinogenes* NiFe-hydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*. 279 (1), 274-281.

- Grüber, G., Manimekalai, M. S., Mayer, F., & Müller, V. (2014). ATP synthases from archaea: the beauty of a molecular motor. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1837 (6), 940–952.
- Guénebaut, V., Schlitt, A., Weiss, H., Leonard, K., & Friedrich, T. (1998). Consistent structure between bacterial and mitochondrial NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Journal of Molecular Biology*. 276 (1), 105-112.
- Gutiérrez-Fernández, J., Kaszuba, K., Minhas, G. S., Baradaran, R., Tambalo, M., Gallagher, D. T., & Sazanov, L. A. (2020). Key role of quinone in the mechanism of respiratory complex I. *Nature Communications*. 11 (1), 1-17.
- Hanahan, D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*. 166 (4), 557–580.
- Harms, U., Weiss, D. S., Gärtner, P., Linder, D., & Thauer, R. K. (1995). The energy conserving N5-methyltetrahydromethanopterin: coenzyme M methyltransferase complex from *Methanobacterium thermoautotrophicum* is composed of eight different subunits. *European Journal of Biochemistry*. 228 (3), 640-648.
- Hatzixanthis, K., Palmer, T., & Sargent, F. (2003). A subset of bacterial inner membrane proteins integrated by the twin-arginine translocase. *Molecular Microbiology*. 49 (5), 1377-1390.
- Hedderich, R., Berkessel, A., & Thauer, R. K. (1990). Purification and properties of heterodisulfide reductase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* (strain Marburg). *The FEBS Journal*. 193 (1), 255-261.
- Hedderich, R. (2004). Energy-converting [NiFe] hydrogenases from archaea and extremophiles: ancestors of complex I. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 36 (1), 65-75.
- Hedderich, R., Hamann, N., & Bennati, M. (2005). Heterodisulfide reductase from methanogenic archaea: a new catalytic role for an iron-sulfur cluster. *Biological Chemistry*. 386 (10), 961–970.
- Hedderich, R., & Forzi, L. (2005). Energy-converting [NiFe] hydrogenases: more than just H₂ activation. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 10 (2-4), 92–104.
- Heiden, S., Hedderich, R., Setzke, E., & Thauer, R. K. (1993). Purification of a cytochrome b containing H₂:heterodisulfide oxidoreductase complex from membranes of *Methanosarcina barkeri*. *European Journal of Biochemistry*. 213 (1), 529–535.
- Heiden, S., Hedderich, R., Setzke, E., & Thauer, R. K. (1994). Purification of a two-subunit cytochrome-b-containing heterodisulfide reductase from methanol-grown *Methanosarcina barkeri*. *European Journal of Biochemistry*. 221 (2), 855-861.
- Heider, J., & Böck, A. (1992). Targeted insertion of selenocysteine into the alpha subunit of formate dehydrogenase from *Methanobacterium formicicum*. *Journal of Bacteriology*, 174 (3), 659-663.

- Hensel, R., Fabry, S., Biro, J., Bogedain, C., Jakob, I., & Siebers, B. (1994). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases from archaea: objects for studying protein thermoadaptation. *Biocatalysis*. 11 (2), 151-164.
- Hernandez, D., Addou, S., Lee, D., Orengo, C., Shephard, E. A., & Phillips, I. R. (2003). Trimethylaminuria and a human FMO3 mutation database. *Human Mutation*. 22 (3), 209-213.
- Herranen, M., Battchikova, N., Zhang, P., Graf, A., Sirpiö, S., Paakkanen, V., & Aro, E. M. (2004). Towards functional proteomics of membrane protein complexes in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiology*. 134 (1), 470-481.
- Hess, V., Schuchmann, K., & Müller, V. (2013). The ferredoxin:NAD⁺ oxidoreductase (Rnf) from the acetogen *Acetobacterium woodii* requires Na⁺ and is reversibly coupled to the membrane potential. *The Journal of Biological Chemistry*. 288 (44), 31496–31502.
- Hippe, H., Caspari, D., Fiebig, K., & Gottschalk, G. (1979) Utilization of trimethylamine and other N-methyl compounds for growth and methane formation by *Methanosarcina barkeri*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 76 (1), 494–498.
- Hong, J.S., & Rabinowitz, J.C. (1970) Molar extinction coefficient and iron and sulfide content of clostridial ferredoxin. *The Journal of Biological Chemistry*. 245 (19), 4982–4987.
- Hook, S. E., Wright, A. D., & McBride, B. W. (2010). Methanogens: methane producers of the rumen and mitigation strategies. *Archaea*. 2010 (1), 945785.
- Horikoshi, K. (2004). Alkaliphiles. *Proceedings of the Japan Academy. Series B*. 80 (4), 166-178.
- Horváth, I. S., Tabatabaei, M., Karimi, K., & Kumar, R. (2016). Recent updates on biogas production-a review. *Biofuel Research Journal*. 3 (2), 394.
- Hoyle, L., Jiménez-Pranteda, M. L., Chilloux, J., Brial, F., Myridakis, A., Aranas, T., Magnan, C., Gibson, G. R., Sanderson, J. D., Nicholson, J. K., Gauguier, D., McCartney, A. L., & Dumas, M. E. (2018). Metabolic retroconversion of trimethylamine N-oxide and the gut microbiota. *Microbiome*. 6 (1), 1-14.
- Ide, T., Bäumer, S., & Deppenmeier, U. (1999). Energy conservation by the H₂: heterodisulfide oxidoreductase from *Methanosarcina mazei* Go1: identification of two proton-translocating segments. *Journal of Bacteriology*. 181 (13), 4076-4080.
- Ikawa, M., Schaper, T. D., Dollard, C. A., & Sasner, J. J. (2003). Utilization of Folin–Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51 (7), 1811-1815.
- Ito, M., Morino, M., & Krulwich, T. A. (2017). Mrp antiporters have important roles in diverse bacteria and archaea. *Frontiers in Microbiology*. 8 (1), 2325.
- Jormakka, M., Tornroth, S., Byrne, B., & Iwata, S. (2002). Molecular basis of proton motive force generation: structure of formate dehydrogenase-N. *Science*. 295 (5561), 1863-1868.

- Jormakka, M., Byrne, B., & Iwata, S. (2003). Formate dehydrogenase—a versatile enzyme in changing environments. *Current Opinion in Structural Biology*. 13 (4), 418-423.
- Judd, A. G., Hovland, M., Dimitrov, L. I., Garcia Gil, S., & Jukes, V. (2002). The geological methane budget at continental margins and its influence on climate change. *Geofluids*. 2 (1), 109-126.
- Kallnik, V., Meyer, M., Deppenmeier, U., & Schweiger, P. (2010). Construction of expression vectors for protein production in *Gluconobacter oxydans*. *Journal of Biotechnology*. 150 (4), 460-465.
- Kamlage, B., & Blaut, M., (1992). Characterization of cytochromes from *Methanosarcina* strain Göl and their involvement in electron transport during growth on methanol. *Journal of Bacteriology*. 174 (12), 3921-3927.
- Kaster, A. K. (2010) Energiestoffwechsel von Cytochrom-freien methanogenen Archaea bei Wachstum auf H₂ und CO₂. Dissertation. Philipps-Universität Marburg.
- Kaster, A. K., Moll, J., Parey, K., & Thauer, R. K. (2011) Coupling of ferredoxin and heterodisulfide reduction via electron bifurcation in hydrogenotrophic methanogenic archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 108 (7), 2981–2986.
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., & Sternberg, M. J. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*. 10 (6), 845-858.
- Kemner, J. M., & Zeikus, J. G. (1994). Purification and characterization of membrane-bound hydrogenase from *Methanosarcina barkeri* MS. *Archives of Microbiology*. 161 (1), 47-54.
- Kim, S., & Lee, S. B. (2006). Rare codon clusters at 5'-end influence heterologous expression of archaeal gene in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*. 50 (1), 49-57.
- King G. M. (1984). Metabolism of trimethylamine, choline, and glycine betaine by sulfate-reducing and methanogenic bacteria in marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. 48 (4), 719–725.
- Knoblauch, C., Beer, C., Liebner, S., Grigoriev, M. N., & Pfeiffer, E. M. (2018). Methane production as key to the greenhouse gas budget of thawing permafrost. *Nature Climate Change*. 8 (4), 309-312.
- Koeth, R. A., Wang, Z., Levison, B. S., Buffa, J. A., Org, E., Sheehy, B. T., Britt, E. B., Fu, X., Wu, Y., Li, L., Smith, J. D., DiDonato, J. A., Chen, J., Li, H., Wu, G. D., Lewis, J. D., Warrier, M., Brown, J. M., Krauss, R. M., Tang, W. H., Bushman, F. D., Lysis, A. J., & Hazen, S. L. (2013). Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nature Medicine*. 19 (5), 576-585.
- Kozakov, D., Hall, D. R., Xia, B., Porter, K. A., Padhorny, D., Yueh, C., Beglov, D., & Vajda, S. (2017). The ClusPro web server for protein-protein docking. *Nature Protocols*, 12 (2), 255–278.
- Kozakov, D., Beglov, D., Bohnuud, T., Mottarella, S. E., Xia, B., Hall, D. R., & Vajda, S. (2013). How good is automated protein docking?. *Proteins*. 81 (12), 2159–2166.

- Kozakov, D., Brenke, R., Comeau, S. R., & Vajda, S. (2006). PIPER: an FFT-based protein docking program with pairwise potentials. *Proteins*, 65 (2), 392–406.
- Krätzer, C., Carini, P., Hovey, R., & Deppenmeier, U. (2009). Transcriptional profiling of methyltransferase genes during growth of *Methanosarcina mazei* on trimethylamine. *Journal of Bacteriology*. 191 (16), 5108-5115.
- Kröniger, L., Berger, S., Welte, C., & Deppenmeier, U. (2016). Evidence for the involvement of two heterodisulfide reductases in the energy-conserving system of *Methanomassiliicoccus luminyensis*. *The FEBS Journal*. 283 (3), 472-483.
- Kröniger, L., Gottschling, J., & Deppenmeier, U. (2017). Growth characteristics of *Methanomassiliicoccus luminyensis* and expression of methyltransferase encoding genes. *Archaea*. 2017 (1), 2756573.
- Kröniger, L., Steiniger, F., Berger, S., Kraus, S., Welte, C. U., & Deppenmeier, U. (2019). Energy conservation in the gut microbe *Methanomassiliicoccus luminyensis* is based on membrane-bound ferredoxin oxidation coupled to heterodisulfide reduction. *The FEBS Journal*. 286 (19), 3831-3843.
- Kröniger, L. (2018). Schlüsselenzyme der Methanogenese und der Energiekonservierung im Darmbewohner *Methanomassiliicoccus luminyensis*. Dissertation. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Kuchenreuther, J. M., Grady-Smith, C. S., Bingham, A. S., George, S. J., Cramer, S. P., & Swartz, J. R. (2010). High-yield expression of heterologous [FeFe] hydrogenases in *Escherichia coli*. *PLoS One*, 5 (11), e15491.
- Kuhns, M., Trifunović, D., Huber, H., & Müller, V. (2020). The Rnf complex is a Na⁺ coupled respiratory enzyme in a fermenting bacterium, *Thermotoga maritima*. *Communications Biology*. 3 (1), 1-10.
- Kumar Pandey, A., Das, N., Muthu Kumar, A., & Rao, S. (2015). Methanogens in the environment: an insight of methane yield and impact on global climate change. *International Letters of Natural Sciences*, 37.
- Künel, A., Vaupel, M., Heim, S., Thauer, R. K., & Hedderich, R. (1997). Heterodisulfide reductase from methanol-grown cells of *Methanosarcina barkeri* is not a flavoenzyme. *European Journal of Biochemistry*. 244 (1), 226-234.
- Künel, A., Vorholt, J. A., Thauer, R. K., & Hedderich, R. (1998). An *Escherichia coli* hydrogenase-3-type hydrogenase in methanogenic archaea. *European Journal of Biochemistry*. 252 (3), 467-476.
- Kunow, J., Linder, D., Stetter, K. O., & Thauer, R. K. (1994). F₄₂₀H₂: quinone oxidoreductase from *Archaeoglobus fulgidus*. *European Journal of Biochemistry*. 223 (2), 503-511.
- Kurth, J. M., den Camp, H. J. O., & Welte, C. U. (2020). Several ways one goal—methanogenesis from unconventional substrates. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 104 (16), 6839-6854.

- Labarre, C., van Tilbeurgh, H., & Blondeau, K. (2007). *Pichia pastoris* is a valuable host for the expression of genes encoding membrane proteins from the hyperthermophilic Archeon *Pyrococcus abyssi*. *Extremophiles*. 11 (2), 403-413.
- Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227 (5259), 680–685.
- Lang, K., Schuldes, J., Klingl, A., Poehlein, A., Daniel, R., & Brune, A. (2015). New mode of energy metabolism in the seventh order of methanogens as revealed by comparative genome analysis of “*Candidatus Methanoplasma termitum*”. *Applied and Environmental Microbiology*. 81 (4), 1338-1352.
- Laughlin, T. G., Savage, D. F., & Davies, K. M. (2020). Recent advances on the structure and function of NDH-1: The complex I of oxygenic photosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 1861 (11), 148254.
- L Bräuer, S., Basiliko, N., M P Siljanen, H., & H Zinder, S. (2020). Methanogenic archaea in peatlands. *FEMS Microbiology Letters*. 367 (20), 172.
- Lepp, P. W., Brinig, M. M., Ouverney, C. C., Palm, K., Armitage, G. C., & Relman, D. A. (2004). Methanogenic Archaea and human periodontal disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 101 (16), 6176-6181.
- L'Haridon, S., Chalopin, M., Colombo, D., & Toffin, L. (2014). *Methanococcoides vulcani* sp. nov., a marine methylotrophic methanogen that uses betaine, choline and N, N-dimethylethanolamine for methanogenesis, isolated from a mud volcano, and emended description of the genus *Methanococcoides*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 64 (6), 1978-1983.
- L'Haridon, S., Toffin, L., & Roussel, E. (2020). Genus *Methanococcoides*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (Editor: Whitman W.B.). John Wiley & Sons. Hoboken. USA.
- Li, Q., Li, L., Rejtar, T., Lessner, D. J., Karger, B. L., & Ferry, J. G. (2006). Electron transport in the pathway of acetate conversion to methane in the marine archaeon *Methanosarcina acetivorans*. *Journal of Bacteriology*. 188 (2), 702-710.
- Li, X. Y., Feng, J. C., Li, X. S., Wang, Y., & Hu, H. Q. (2022). Experimental study of methane hydrate formation and decomposition in the porous medium with different thermal conductivities and grain sizes. *Applied Energy*. 305 (1), 117852.
- Lin, Z., & Sparling, R. (1998). Investigation of serine hydroxymethyltransferase in methanogens. *Canadian Journal of Microbiology*. 44 (7), 652-656.
- Liu, Y., & Whitman, W. B. (2008). Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1125 (1), 171-189.

- Liu, T. X., Niu, H. T., & Zhang, S. Y. (2015). Intestinal microbiota metabolism and atherosclerosis. *Chinese Medical Journal*. 128 (20), 2805-2811.
- Ljungdahl, L. G., & Andreesen, J. R. (1975). Tungsten, a component of active formate dehydrogenase from *Clostridium thermoacetium*. *FEBS Letters*. 54 (2), 279–282.
- Lombardo, M., Aulisa, G., Marcon, D., Rizzo, G., Tarsisano, M. G., Di Renzo, L., Federici, M., Caprio, M., & De Lorenzo, A. (2021). Association of urinary and plasma levels of trimethylamine n-oxide (TMAO) with foods. *Nutrients*. 13 (5), 1426.
- Lüke, I., Butland, G., Moore, K., Buchanan, G., Lyall, V., Fairhurst, S. A., Greenblatt, J. F., Emili, A., Palmer, T., & Sargent, F. (2008). Biosynthesis of the respiratory formate dehydrogenases from *Escherichia coli*: characterization of the FdhE protein. *Archives of Microbiology*. 190 (6), 685-696.
- Lyu, Z., Shao, N., Akinyemi, T., & Whitman, W. B. (2018). Methanogenesis. *Current Biology*. 28 (13), 727-732.
- Ma, C., & Barry, B. A. (1996). Electron paramagnetic resonance characterization of tyrosine radical, M⁺, in site-directed mutants of photosystem II. *Biophysical Journal*. 71 (4), 1961-1972.
- Mackay, R. J., McEntyre, C. J., Henderson, C., Lever, M., & George, P. M. (2011). Trimethylaminuria: causes and diagnosis of a socially distressing condition. *The Clinical Biochemist Reviews*. 32 (1), 33.
- Maestrojuan, G. M., & Boone, D. R. (1991). Characterization of *Methanosarcina barkeri* MST and 227, *Methanosarcina mazei* S-6T, and *Methanosarcina vacuolata* Z-761T. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 41 (2), 267-274.
- Maestrojuan, G. M., Boone, J. E., Mah, R. A., Menaia, J. A., Sachs, M. S., & Boone, D. R. (1992). Taxonomy and halotolerance of mesophilic *Methanosarcina* strains, assignment of strains to species, and synonymy of *Methanosarcina mazei* and *Methanosarcina frisia*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 42 (4), 561-567.
- Majander, A., Finel, M., & Wikström, M. (1994). Diphenyleiodonium inhibits reduction of iron-sulfur clusters in the mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase (Complex I). *The Journal of Biological Chemistry*. 269 (33), 21037–21042.
- Mand, T. D., & Metcalf, W. W. (2019). Energy conservation and hydrogenase function in methanogenic archaea, in particular the genus *Methanosarcina*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 83 (4), e00020-19.
- McGenity, T. J. & Sorokin, D. Y. (2010). Methanogens and methanogenesis in hypersaline environments. Erschienen in „Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology (Editoren: Timmis, K. N., McGenity, T. J., van der Meer, J. R., & de Lorenzo, V.), S. 665–680. Springer-Verlag, Berlin. Deutschland.

- Medina, M., & Gómez-Moreno, C. (2004). Interaction of ferredoxin–NADP⁺ reductase with its substrates: optimal interaction for efficient electron transfer. *Photosynthesis Research*. 79 (2), 113-131.
- Menaia, J. A. G. F., Duarte, J. C., & Boone, D. R. (1993). Osmotic adaptation of moderately halophilic methanogenic Archaeobacteria, and detection of cytosolic N, N-dimethylglycine. *Experientia*. 49 (12), 1047-1054.
- Messenger, J., Clark, S., Massick, S., & Bechtel, M. (2013). A review of trimethylaminuria:(fish odor syndrome). *The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*. 6 (11), 45.
- Meuer, J., Bartoschek, S., Koch, J., Künkel, A., & Hedderich, R. (1999). Purification and catalytic properties of Ech hydrogenase from *Methanosarcina barkeri*. *European Journal of Biochemistry*. 265 (1), 325-335.
- Meuer, J., Kuettner, H. C., Zhang, J. K., Hedderich, R., & Metcalf, W. W. (2002). Genetic analysis of the archaeon *Methanosarcina barkeri* Fusaro reveals a central role for Ech hydrogenase and ferredoxin in methanogenesis and carbon fixation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 99 (8), 5632-5637.
- Michel, R., Massanz, C., Kostka, S., Richter, M., & Fiebig, K. (1995). Biochemical characterization of the 8-hydroxy-5-deazaflavin-reactive hydrogenase from *Methanosarcina barkeri* Fusaro, *European Journal of Biochemistry*. 233 (3), 727-735.
- Miller, T.L. & Wolin, M. J. (1985) *Methanosphaera stadtmanae* gen. nov., sp. nov.: a species that forms methane by reducing methanol with hydrogen. *Archives of Microbiology*. 141 (2), 116–122.
- Miller, T. L., & Wolin, M. J. (1986). Methanogens in human and animal intestinal tracts. *Systematic and Applied Microbiology*. 7 (2-3), 223-229.
- Miller, T. L., Wolin, M. J., de Macario, E. C., & Macario, A. (1982). Isolation of *Methanobrevibacter smithii* from human feces. *Applied and Environmental Microbiology*. 43 (1), 227-232.
- Miller, T. L., & Wolin, M. J. (1982). Enumeration of *Methanobrevibacter smithii* in human feces. *Archives of Microbiology*. 131 (1), 14-18.
- Million, M., Maraninchi, M., Henry, M., Armougom, F., Richet, H., Carrieri, P., Valero, R., Raccach, D., Vialettes, B., & Raoult, D. (2012). Obesity-associated gut microbiota is enriched in *Lactobacillus reuteri* and depleted in *Bifidobacterium animalis* and *Methanobrevibacter smithii*. *International Journal of Obesity*. 36 (6), 817–825.
- Million, M., Angelakis, E., Maraninchi, M., Henry, M., Giorgi, R., Valero, R., Vialettes, B., & Raoult, D. (2013). Correlation between body mass index and gut concentrations of *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium animalis*, *Methanobrevibacter smithii* and *Escherichia coli*. *International Journal of Obesity*. 37 (11), 1460–1466.
- Milton, R. D., Ruth, J. C., Deutzmann, J. S., & Spormann, A. M. (2018). *Methanococcus maripaludis* employs three functional heterodisulfide reductase complexes for flavin-based electron bifurcation using hydrogen and formate. *Biochemistry*. 57 (32), 4848-4857.

- Mouné, S., Manac'h, N., Hirschler, A., Caumette, P., Willison, J. C., & Matheron, R. (1999). *Haloanaerobacter salinarius* sp. nov., a novel halophilic fermentative bacterium that reduces glycine-betaine to trimethylamine with hydrogen or serine as electron donors; emendation of the genus *Haloanaerobacter*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 49 (1), 103–112.
- Müller, V., Blaut, M., & Gottschalk, G. (1993). Bioenergetics of methanogenesis. Eschienen in „Methanogenesis (Chapman & Hall Microbiology Series, Editor: Ferry, J. G.)“. S. 360-406. Springer, Boston, USA.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51 (1), S. 263–273.
- Murakami, E., Deppenmeier, U., & Ragsdale, S. W. (2001). Characterization of the Intramolecular Electron Transfer Pathway from 2-Hydroxyphenazine to the Heterodisulfide Reductase from *Methanosarcina thermophila*. *Journal of Biological Chemistry*. 276 (4), 2432-2439.
- Myhre, G., Shindell, D., Bréon, F. M., Collins, W., Fuglestedt, J., Huang, J., Koch, D., Lamarque, J.F., Lee, D., Mendoza, B., Nakajima, T., Robock, A., Stephens, G., Takemura, T. & Zhan, H. (2013). Anthropogenic and natural radiative forcing. Eschienen in „Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (Editoren: Stocker, T., Qin, D., Plattner, G. K., Tignor, M., Allen, S., Boschung, J., Nauels, A., Xia, Y., Bex, V., & Midgley, P.)“. S. 659– 740. Cambridge University Press, Cambridge. Vereinigtes Königreich.
- Naumann, E., Hippe, H., & Gottschalk, G. (1983). Betaine: New Oxidant in the Stickland Reaction and Methanogenesis from Betaine and L-Alanine by a *Clostridium sporogenes-Methanosarcina barkeri* Coculture. *Applied and Environmental Microbiology*. 45 (2), 474–483.
- Nevalainen, K. H., Te'o, V. S., & Bergquist, P. L. (2005). Heterologous protein expression in filamentous fungi. *Trends in Biotechnology*. 23, 468-474.
- Ng, W. V., Kennedy, S. P., Mahairas, G. G., Berquist, B., Pan, M., Shukla, H. D., Lasky, S., Baliga, N., Thorson, V., Sbrogna, J., Swartzell, S., Weir, D., Hall, J., Dahl, T., Welti, R., Goo, Y., Leithauser, B., Keller, K., Cruz, R., Danson, M., Hough, d., Maddocks, D., Jablonski, P., Krebs, M., Angewine, C., Dale, H., Isenbarger, T., Peck, R., Pohlschroder, M., Spudich, J., Jung, K-H., Maqsudul, A., Freitas, T., Hou, S., Daniels, C., Dennis, P., Omer, A., Ehardt, H., Lowe, T., Liang, P., riley, M., Hood, L., & DasSarma, S. (2000). Genome sequence of *Halobacterium* species NRC-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97 (22), 12176-12181.
- Nishihara, K., Kanemori, M., Yanagi, H., & Yura, T. (2000). Overexpression of trigger factor prevents aggregation of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 66 (3), 884-889.

- Nowaczyk, M. M., Wulfhorst, H., Ryan, C. M., Souda, P., Zhang, H., Cramer, W. A., & Whitelegge, J. P. (2011). NdhP and NdhQ: two novel small subunits of the cyanobacterial NDH-1 complex. *Biochemistry*. 50 (7), 1121-1124.
- Ogata, H., Kellers, P., & Lubitz, W. (2010). The crystal structure of the [NiFe] hydrogenase from the photosynthetic bacterium *Allochromatium vinosum*: characterization of the oxidized enzyme (Ni-A state). *Journal of Molecular Biology*. 402 (2), 428-444.
- Ogata, H., Lubitz, W., & Higuchi, Y. (2009). [NiFe] hydrogenases: structural and spectroscopic studies of the reaction mechanism. *Dalton Transactions*. 2003 (37), 7577-7587.
- Ohnishi, T., Ohnishi, S. T., & Salerno, J. C. (2018). Five decades of research on mitochondrial NADH-quinone oxidoreductase (complex I). *Biological Chemistry*. 399 (11), 1249-1264.
- Oren, A. (1990). Formation and breakdown of glycine betaine and trimethylamine in hypersaline environments. *Antonie van Leeuwenhoek*. 58 (4), 291-298.
- Oren, A. (1999). Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 63 (2), 334-348.
- Page, C. C., Moser, C. C., Chen, X., & Dutton, P. L. (1999). Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation–reduction. *Nature*. 402 (6757), 47–52.
- Pfennig, N., & Lippert, K. D. (1966). Über das Vitamin B12-Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien. *Archiv für Mikrobiologie*. 55 (3), 245-256.
- Ragan C. I. (1976). NADH-ubiquinone oxidoreductase. *Biochimica et Biophysica Acta*. 456 (3-4), 249–290.
- Raghoebarsing, A. A., Pol, A., Van de Pas-Schoonen, K. T., Smolders, A. J., Ettwig, K. F., Rijpstra, W. I. C., Schouten, S., Sinninghe Damsté, J., Op den Camp, H., Jetten, M., & Strous, M. (2006). A microbial consortium couples anaerobic methane oxidation to denitrification. *Nature*. 440, 918.
- Rahlfs, S., & Müller, V. (1997). Sequence of subunit c of the Na⁺-translocating F₁F₀ ATPase of *Acetobacterium woodii*: proposal for determinants of Na⁺ specificity as revealed by sequence comparisons. *FEBS Letters*. 404 (2-3), 269-271.
- Reay, D., Smith, P., & Van Amstel, A. (2010). Methane sources and the global methane budget. Erschienen in „Methane and climate change (Editoren: Reay, D., & Smith, P.)“. S. 1-13. Earthscan. London und Washington DC. Vereinigtes Königreich und USA.
- Reidlinger, J., & Müller, V. (1994). Purification of ATP synthase from *Acetobacterium woodii* and identification as a Na⁺-translocating F₁F₀-type enzyme. *European Journal of Biochemistry*. 223 (1), 275-283.
- Robertson, A. M., & Wolfe, R. S. (1970) Adenosine triphosphate pools in *Methanobacterium*. *Journal of Bacteriology*. 102 (1), 43–51.

- Roberts, M. F. (2005). Organic compatible solutes of halotolerant and halophilic microorganisms. *Saline Systems*. 1 (1), 1-30.
- Robertson, D. E., Noll, D., Roberts, M. F., Menaia, J. A., & Boone, D. R. (1990). Detection of the osmoregulator betaine in methanogens. *Applied and Environmental Microbiology*. 56 (2), 563-565.
- Robinson, J. A., & Tiedje, J. M. (1984). Competition between sulfate-reducing and methanogenic bacteria for H₂ under resting and growing conditions. *Archives of Microbiology*. 137 (1), 26-32.
- Ruepp, A., Graml, W., Santos-Martinez, M. L., Koretke, K. K., Volker, C., Mewes, H. W., Frishman, D., Stocker, S., Lupas, A., & Baumeister, W. (2000). The genome sequence of the thermoacidophilic scavenger *Thermoplasma acidophilum*. *Nature*. 407 (6803), 508-513.
- Saha, S., & Raghava, G. P. S. (2004). BcePred: prediction of continuous B-cell epitopes in antigenic sequences using physico-chemical properties. Erschienen in „Artificial Immune Systems (Editoren: Nicosia, G., Cutello, V., Bentley, P. J., & Timmis, J. I.)“. S. 197-204. Springer. Berlin. Deutschland.
- Sancho J. (2006). Flavodoxins: sequence, folding, binding, function and beyond. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*. 63 (7-8), 855–864.
- Sapra, R., Verhagen, M. F., & Adams, M. W. (2000). Purification and characterization of a membrane-bound hydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Journal of Bacteriology*. 182 (12), 3423-3428.
- Sapra, R., Bagramyan, K., & Adams, M. W. (2003). A simple energy-conserving system: proton reduction coupled to proton translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100 (13), 7545-7550.
- Sattler, C., Wolf, S., Fersch, J., Goetz, S., & Rother, M. (2013). Random mutagenesis identifies factors involved in formate-dependent growth of the methanogenic archaeon *Methanococcus maripaludis*. *Molecular Genetics and Genomics*. 288 (9), 413-424.
- Saunio, M., Jackson, R. B., Bousquet, P., Poulter, B., & Canadell, J. G. (2016). The growing role of methane in anthropogenic climate change. *Environmental Research Letters*. 11 (12), 120-207.
- Sawers, G. (1994). The hydrogenases and formate dehydrogenases of *Escherichia coli*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 66 (1), 57-88.
- Sazanov, L. A., & Hinchliffe, P. (2006). Structure of the hydrophilic domain of respiratory complex I from *Thermus thermophilus*. *Science*. 311 (5766), 1430–1436.
- Sazanov, L. A. (2007). Respiratory complex I: mechanistic and structural insights provided by the crystal structure of the hydrophilic domain. *Biochemistry*. 46 (9), 2275-2288.
- Sazanov, L. A. (2015). A giant molecular proton pump: structure and mechanism of respiratory complex I. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 16 (6), 375-388.

- Schäfer, T., & Schönheit, P. (1993). Gluconeogenesis from pyruvate in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: involvement of reactions of the Embden-Meyerhof pathway. *Archives of Microbiology*. 159 (4), 354-363.
- Schäfer, T., Selig, M., & Schönheit, P. (1993). Acetyl-CoA synthetase (ADP forming) in archaea, a novel enzyme involved in acetate formation and ATP synthesis. *Archives of Microbiology*. 159 (1), 72-83.
- Schapira, A. H. V. (1998). Human complex I defects in neurodegenerative diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 1364 (2), 261-270.
- Schauer, N. L. & Ferry, J. G. (1986) Composition of thecoenzyme F₄₂₀-dependent formate dehydrogenase from *Methanobacterium formicicum*. *Journal of Bacteriology*. 165 (2), 405-411.
- Schenck, C. A., & Maeda, H. A. (2018). Tyrosine biosynthesis, metabolism, and catabolism in plants. *Phytochemistry*. 149 (1), 82-102.
- Schimpf, J., Oppermann, S., Gerasimova, T., Santos Seica, A. F., Hellwig, P., Grishkovskaya, I., Wohlwend, D., Haselbach, D., & Friedrich, T. (2022). Structure of the peripheral arm of a minimalistic respiratory complex I. *Structure*. 30 (1), 80-94.
- Schlegel, K., Leone, V., Faraldo-Gómez, J. D., & Müller, V. (2012 a). Promiscuous archaeal ATP synthase concurrently coupled to Na⁺ and H⁺ translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109 (3), 947-952.
- Schlegel, K., Welte, C., Deppenmeier, U., & Müller, V. (2012 b). Electron transport during acetoclastic methanogenesis by *Methanosarcina acetivorans* involves a sodium-translocating Rnf complex. *The FEBS Journal*. 279 (24), 4444-4452.
- Schuller, J. M., Birrell, J. A., Tanaka, H., Konuma, T., Wulfhorst, H., Cox, N., Schuller, S. K., Thiemann, J., Lubitz, W., Sétif, P., Ikegami, T., Engel, B. D., Kurisu, G., & Nowaczyk, M. M. (2019). Structural adaptations of photosynthetic complex I enable ferredoxin-dependent electron transfer. *Science*. 363 (6424), 257-260.
- Schwartz, C. J., Giel, J. L., Patschkowski, T., Luther, C., Ruzicka, F. J., Beinert, H., & Kiley, P. J. (2001). IscR, an Fe-S cluster-containing transcription factor, represses expression of *Escherichia coli* genes encoding Fe-S cluster assembly proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98 (26), 14895-14900.
- Seck, E. H., Dufour, J. C., Raoult, D., & Lagier, J. C. (2018). Halophilic & halotolerant prokaryotes in humans. *Future Microbiology*. 13 (7), 799-812.
- Sétif, P., Hirasawa, M., Cassan, N., Lagoutte, B., Tripathy, J. N., & Knaff, D. B. (2009). New insights into the catalytic cycle of plant nitrite reductase. Electron transfer kinetics and charge storage. *Biochemistry*. 48 (12), 2828-2838.

- She, Q., Singh, R. K., Confalonieri, F., Zivanovic, Y., Allard, G., Awayez, M. J., Chan-Weiher, C., Groth Clausen, I., Curtis, B., De Moors, A., Erauso, G., Fletcher, C., Gordon, P., Heikamp-de Jong, I., Jeffries, A., Kozera, C., Medina, N., Peng, X., Thi-Ngoc, H.P., Redder, P., Schenk, M., Theriault, C., Tolstrup, N., Charlebois, R., Doolittle, W.F., Duguet, m., Gaasterland, T., Garret, R., Ragan, M., Sensen, C., & Van der Oost, J. (2001). The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 98 (14), 7835-7840.
- Silva, P. J., van den Ban, E. C., Wassink, H., Haaker, H., de Castro, B., Robb, F. T., & Hagen, W. R. (2000). Enzymes of hydrogen metabolism in *Pyrococcus furiosus*. *European Journal of Biochemistry*. 267 (22), 6541-6551.
- Simankova, M. V., Kotsyurbenko, O. R., Lueders, T., Nozhevnikova, A. N., Wagner, B., Conrad, R., & Friedrich, M. W. (2003) Isolation and characterization of new strains of methanogens from cold terrestrial habitats. *Systematic and Applied Microbiology*, 26 (2), 312–318.
- Simianu, M., Murakami, E., Brewer, J. M., & Ragsdale, S. W. (1998). Purification and properties of the heme-and iron- sulfur-containing heterodisulfide reductase from *Methanosarcina thermophila*. *Biochemistry*. 37 (28), 10027-10039.
- Simó, C., & García-Cañas, V. (2020). Dietary bioactive ingredients to modulate the gut microbiota-derived metabolite TMAO. New opportunities for functional food development. *Food & Function*. 11 (8), 6745-6776.
- Sleator, R. D., & Hill, C. (2002). Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence. *FEMS Microbiology Reviews*. 26 (1), 49-71.
- Smart, J. P., Cliff, M. J., & Kelly, D. J. (2009). A role for tungsten in the biology of *Campylobacter jejuni*: tungstate stimulates formate dehydrogenase activity and is transported via an ultra-high affinity ABC system distinct from the molybdate transporter. *Molecular Microbiology*. 74 (3), 742–757.
- Smith, M. R., & Mah, R. A. (1978). Growth and methanogenesis by *Methanosarcina* strain 227 on acetate and methanol. *Applied and Environmental Microbiology*. 36 (6), 870-879.
- Smith, M. A., Finel, M., Korolik, V., & Mendz, G. L. (2000) Characteristics of the aerobic respiratory chains of the microaerophiles *Campylobacter jejuni* and *Helicobacter pylori*. *Archives of Microbiology*. 174 (1-2), 1-10.
- Söllinger, A., & Urich, T. (2019). Methylotrophic methanogens everywhere—physiology and ecology of novel players in global methane cycling. *Biochemical Society Transactions*. 47 (6), 1895-1907.
- Sorokin, D. Y., Makarova, K. S., Abbas, B., Ferrer, M., Golyshin, P. N., Galinski, E. A., Ciordia, S., Mena, M. C., Merkel, A. Y., Wolf, Y. I., van Loosdrecht, M., & Koonin, E. V. (2017). Discovery of extremely halophilic, methyl-reducing euryarchaea provides insights into the evolutionary origin of methanogenesis. *Nature Microbiology*, 2 (1), 17081.

- Sorokin, D. Y., Merkel, A. Y., Abbas, B., Makarova, K. S., Rijpstra, W., Koenen, M., Sinninghe Damsté, J. S., Galinski, E. A., Koonin, E. V., & van Loosdrecht, M. (2018). *Methanonatronarchaeum thermophilum* gen. nov., sp. nov. and '*Candidatus* Methanohalarchaeum thermophilum', extremely halo(natrono)philic methyl-reducing methanogens from hypersaline lakes comprising a new euryarchaeal class Methanonatronarchaeia classis nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68 (7), 2199–2208.
- Sorokin DY & Merkel AY (2019 a) Class Methanonatronarchaeia. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (Editor: Whitman W. B.). John Wiley & Sons. Hoboken. USA.
- Sorokin DY & Merkel AY (2019 b) Genus *Methanonatronarchaeum*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (Editor: Whitman W.B.). John Wiley & Sons. Hoboken. USA.
- Sowers, K. R., Baron, S. F., & Ferry, J. G. (1984). *Methanosarcina acetivorans* sp. nov., an acetotrophic methane-producing bacterium isolated from marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*. 47 (5), 971-978.
- Spanheimer, R., & Müller, V. (2008). The molecular basis of salt adaptation in *Methanosarcina mazei* Gö1. *Archives of Microbiology*. 190 (3), 271-279.
- Speth, D. R., & Orphan, V. J. (2018). Metabolic marker gene mining provides insight in global *mcrA* diversity and, coupled with targeted genome reconstruction, sheds further light on metabolic potential of the Methanomassiliicoccales. 6 (1), e5614.
- Srivastava, A. P., Knaff, D. B., & Sétif, P. (2014). Kinetic studies of a ferredoxin-dependent cyanobacterial nitrate reductase. *Biochemistry*. 53 (31), 5092-5101.
- Storz, P. (2006). Reactive oxygen species-mediated mitochondria-to-nucleus signaling: a key to aging and radical-caused diseases. *Science's STKE: Signal Transduction Knowledge Environment*. 2006 (332).
- St-Pierre, B., & Wright, A. D. (2013). Diversity of gut methanogens in herbivorous animals. *Animal: An International Journal of Animal Bioscience*. 7 (1), 49–56.
- Suharti, S., Wang, M., De Vries, S., & Ferry, J. G. (2014). Characterization of the RnfB and RnfG subunits of the Rnf complex from the archaeon *Methanosarcina acetivorans*. *PLoS One*. 9 (5), e97966.
- Swartz, T. H., Ikewada, S., Ishikawa, O., Ito, M., & Krulwich, T. A. (2005). The Mrp system: a giant among monovalent cation/proton antiporters?. *Extremophiles*. 9 (5), 345-354.
- Tagawa, K., & Arnon, D. I. (1968). Oxidation-reduction potentials and stoichiometry of electron transfer in ferredoxins. *Biochimica et Biophysica Acta*. 153 (3), 602–613.
- Taylor, A. J., & Kelly, D. J. (2019). The function, biogenesis and regulation of the electron transport chains in *Campylobacter jejuni*: new insights into the bioenergetics of a major food-borne pathogen. *Advances in Microbial Physiology*. 74 (1), 239-329.

- Tegel, H., Tourle, S., Ottosson, J., & Persson, A. (2010). Increased levels of recombinant human proteins with the *Escherichia coli* strain Rosetta (DE3). *Protein Expression and Purification*. 69 (2), 159-167.
- Thauer, R. K., Jungermann, K., & Decker, K. (1977). Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriological Reviews*. 41 (1), 100-180.
- Thauer, R. K., Kaster, A. K., Seedorf, H., Buckel, W., & Hedderich, R. (2008). Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. *Nature Reviews Microbiology*. 6 (8), 579.
- Thauer, R. K., Kaster, A. K., Goenrich, M., Schick, M., Hiromoto, T., & Shima, S. (2010). Hydrogenases from methanogenic archaea, nickel, a novel cofactor, and H₂ storage. *Annual Review of Biochemistry*, 79 (1), 507-536.
- Thomas, C. M., Taib, N., Gribaldo, S., & Borrel, G. (2021). Comparative genomic analysis of *Methanimicrococcus blatticola* provides insights into host adaptation in archaea and the evolution of methanogenesis. *ISME Communications*. 1 (1), 1-11.
- Ticak, T., Hariraju, D., Arcelay, M. B., Arivett, B. A., Fiester, S. E., & Ferguson, D. J. (2015). Isolation and characterization of a tetramethylammonium-degrading *Methanococcoides* strain and a novel glycine betaine-utilizing *Methanobolus* strain. *Archives of microbiology*. 197 (2), 197-209.
- Tietze, M., Beuchle, A., Lamla, I., Orth, N., Dehler, M., Greiner, G., & Beifuss, U. (2003). Redox potentials of methanophenazine and CoB-S-S-CoM, factors involved in electron transport in Methanogenic archaea. *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology*. 4 (4), 333–335.
- Timmers, P. H., Welte, C. U., Koehorst, J. J., Plugge, C. M., Jetten, M. S., & Stams, A. J. (2017). Reverse methanogenesis and respiration in methanotrophic archaea. *Archaea*. 2017.
- Tomb, J. F., White, O., Kerlavage, A. R., Clayton, R. A., Sutton, G. G., Fleischmann, R. D., & Nelson, K. (1997). Corrections: The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature*. 388 (6642), 539–547.
- Treacy, E. P., Akerman, B. R., Chow, L. M., Youil, R., Bibeau, C., Lin, J., Bruce, A. G., Knight, M., Danks, D. M., Cashman, J. R., & Forrest, S. M. (1998). Mutations of the flavin-containing monooxygenase gene (FMO3) cause trimethylaminuria, a defect in detoxication. *Human Molecular Genetics*. 7 (5), 839-845.
- Tremblay, P. L., Zhang, T., Dar, S. A., Leang, C., & Lovley, D. R. (2012). The Rnf complex of *Clostridium ljungdahlii* is a proton-translocating ferredoxin:NAD⁺ oxidoreductase essential for autotrophic growth. *mBio*. 4 (1), e00406–e412.
- Trotsenko, Y. A., & Khmelenina, V. N. (2002). The biology and osmoadaptation of haloalkaliphilic methanotrophs. *Microbiology*. 71 (2), 123-132.

- Twigg, R. S. (1945). Oxidation-reduction aspects of resazurin. *Nature*. 155 (3935), 401.
- Ussher, J. R., Lopaschuk, G. D., & Arduini, A. (2013). Gut microbiota metabolism of L-carnitine and cardiovascular risk. *Atherosclerosis*. 231 (2), 456-461.
- Ver Eecke, H. C., Butterfield, D. A., Huber, J. A., Lilley, M. D., Olson, E. J., Roe, K. K., Evans, L. J., Merkel, A. Y., Cantin, H. V., & Holden, J. F. (2012). Hydrogen-limited growth of hyperthermophilic methanogens at deep-sea hydrothermal vents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109 (34), 13674–13679.
- Vignais, P. M., & Billoud, B. (2007). Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: an overview. *Chemical Reviews*. 107 (10), 4206-4272.
- Volbeda, A., Garcin, E., Piras, C., de Lacey, A. L., Fernandez, V. M., Hatchikian, E. C., Frey, M., & Fontecilla-Camps, J. C. (1996). Structure of the [NiFe] hydrogenase active site: evidence for biologically uncommon Fe ligands. *Journal of the American Chemical Society*. 118 (51), 12989-12996.
- Volbeda, A., Darnault, C., Parkin, A., Sargent, F., Armstrong, F. A., & Fontecilla-Camps, J. C. (2013). Crystal structure of the O₂-tolerant membrane-bound hydrogenase 1 from *Escherichia coli* in complex with its cognate cytochrome b. *Structure*. 21 (1), 184-190.
- Volbeda, A., Amara, P., Darnault, C., Mouesca, J. M., Parkin, A., Roessler, M. M., Armstrong F. A. & Fontecilla-Camps, J. C. (2012). X-ray crystallographic and computational studies of the O₂-tolerant [NiFe]-hydrogenase 1 from *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109 (14), 5305-5310.
- Wagner, T., Ermler, U., & Shima, S. (2016). MtrA of the sodium ion pumping methyltransferase binds cobalamin in a unique mode. *Scientific Reports*. 6 (1), 1-10.
- Wagner, T., Koch, J., Ermler, U., & Shima, S. (2017). Methanogenic heterodisulfide reductase (HdrABC-MvhAGD) uses two noncubane [4Fe-4S] clusters for reduction. *Science*. 357 (6352), 699-703.
- Walker, J. E. (1992). The NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) of respiratory chains. *Quarterly Reviews of Biophysics*. 25 (3), 253-324.
- Wang, H., Liu, L., & Ren, J. (1999). Determination of methyl isocyanate in air by fluorimetry. *Analyst*. 124 (9), 1327-1330.
- Wang, Z., Klipfell, E., Bennett, B. J., Koeth, R., Levison, B. S., Dugar, B., Feldstein, A. E., Britt, E. B., Fu, X., Chung, Y. M., Wu, Y., Schauer, P., Smith, J. D., Allayee, H., Tang, W. H., DiDonato, J. A., Lysis, A. J., & Hazen, S. L. (2011 a). Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature*. 472 (7341), 57-63.
- Wang, M., Tomb, J. F., & Ferry, J. G. (2011 b). Electron transport in acetate-grown *Methanosarcina acetivorans*. *BMC microbiology*. 11 (1), 165.

- Watkins, A. J., Roussel, E. G., Webster, G., Parkes, R. J., & Sass, H. (2012). Choline and N,N-dimethylethanolamine as direct substrates for methanogens. *Applied and Environmental Microbiology*. 78 (23), 8298–8303.
- Watkins, A. J., Roussel, E. G., Parkes, R. J., & Sass, H. (2014). Glycine betaine as a direct substrate for methanogens (*Methanococoides* spp.). *Applied and Environmental Microbiology*. 80 (1), 289–293.
- Webster, G., Mullins, A. J., Watkins, A. J., Cunningham-Oakes, E., Weightman, A. J., Mahenthiralingam, E., & Sass, H. (2019). Genome sequences of two choline-utilizing methanogenic archaea, *Methanococoides* spp., isolated from marine sediments. *Microbiology Resource Announcements*. 8 (18), e00342-19.
- Weerakoon, D. R., & Olson, J. W. (2008). The *Campylobacter jejuni* NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) utilizes flavodoxin rather than NADH. *Journal of Bacteriology*. 190 (3), 915-925.
- Weimer, P. J., & Zeikus, J. G. (1978). One carbon metabolism in methanogenic bacteria. *Archives of Microbiology*. 119 (1), 49-57.
- Welsh, D. T. (2000). Ecological significance of compatible solute accumulation by micro-organisms: from single cells to global climate. *FEMS Microbiology Reviews*. 24 (3), 263-290.
- Welte, C., Krätzer, C., & Deppenmeier, U. (2010 a). Involvement of Ech hydrogenase in energy conservation of *Methanosarcina mazei*. *The FEBS Journal*. 277 (16), 3396-3403.
- Welte, C., Kallnik, V., Grapp, M., Bender, G., Ragsdale, S., & Deppenmeier, U. (2010 b). Function of Ech hydrogenase in ferredoxin-dependent, membrane-bound electron transport in *Methanosarcina mazei*. *Journal of Bacteriology*. 192 (3), 674-678.
- Welte, C., & Deppenmeier, U. (2011 a). Proton translocation in methanogens. Erschienen in „Methods in Enzymology (Ausgabe: 494)“. S. 257-280. Academic Press. London/New York. Vereinigtes Königreich/USA.
- Welte, C., & Deppenmeier, U. (2011 b). Membrane-bound electron transport in *Methanosaeta thermophila*. *Journal of Bacteriology*. 193 (11), 2868-2870.
- Welte, C. (2011). Ferredoxin-dependent electron transport during methanogenesis from acetate. Dissertation. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Welte, C., & Deppenmeier, U. (2014). Bioenergetics and anaerobic respiratory chains of aceticlastic methanogens. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1837 (7), 1130-1147.
- Welte, C. U., Rasigraf, O., Vaksmaa, A., Versantvoort, W., Arshad, A., Op den Camp, H. J., Jetten, M. S., Lüke, C., & Reimann, J. (2016). Nitrate- and nitrite-dependent anaerobic oxidation of methane. *Environmental Microbiology Reports*. 8 (6), 941–955.
- Werten, M. W., van den Bosch, T. J., Wind, R. D., Mooibroek, H., & de Wolf, F. A. (1999). High-yield secretion of recombinant gelatins by *Pichia pastoris*. *Yeast*. 15 (11), 1087-1096.

- Westphal, L., Wiechmann, A., Baker, J., Minton, N. P., & Müller, V. (2018). The Rnf complex is an energy-coupled transhydrogenase essential to reversibly link cellular NADH and ferredoxin pools in the acetogen *Acetobacterium woodii*. *Journal of Bacteriology*. 200 (21), e00357-18.
- Wu, L. F., Chanal, A., & Rodrigue, A. (2000). Membrane targeting and translocation of bacterial hydrogenases. *Archives of Microbiology*. 173 (5-6), 319–324.
- Wu, S., & Letchworth, G. J. (2004). High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. *Biotechniques*, 36 (1), 152-155.
- Yagi, T., & Matsuno-Yagi, A. (2003). The proton-translocating NADH- quinone oxidoreductase in the respiratory chain: the secret unlocked. *Biochemistry*. 42 (8), 2266-2274.
- Yan, Z., Wang, M., and Ferry, J. G. (2017). A Ferredoxin- and F₄₂₀H₂-dependent, electron-bifurcating, heterodisulfide reductase with homologs in the domains Bacteria and Archaea. *mBio* 8 (1), e02285-16.
- Yan, Z. & Ferry, J. G. (2018) Electron bifurcation and confurcation in methanogenesis and reverse methanogenesis. *Frontiers in Microbiology*. 9 (1), 1322.
- Zappa, S., Hasche, A., & Boudrant, J. (2003). Expression of *Pyrococcus abyssi* recombinant alkaline phosphatase: influences of *Escherichia coli* rare codons and secretion by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Enzyme and Microbial Technology*. 32 (6), 751-756.
- Zehnder, A. J. B. & Wuhrmann, K. (1977) Physiology of a *Methanobacterium* strain AZ. *Archives of Microbiology*. 111 (3), S. 199–205.
- Zehnder, A. J. B., Ingvorsen, K. & Marti, T. (1982). Anaerobic Digestion. Erschienen in „Anaerobic Digestion (Editoren: Hughes, D.E., Stafford, D.A., Wheatley, B.I., Baader, W., Lettinga, G., Nyns, E.J., Verstraete, W. & Wentworth, R.L.)“. S. 45-68. Elsevier Biomedical Press. Oxford. England.
- Zeiser, J., Mühlenbeck, L. H., Schweiger, P., & Deppenmeier, U. (2014). Characterization of a periplasmic quinoprotein from *Sphingomonas wittichii* that functions as aldehyde dehydrogenase. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 98 (5), 2067-2079.
- Zhang, A. Q., Mitchell, S. C., & Smith, R. L. (1999). Dietary precursors of trimethylamine in man: a pilot study. *Food and Chemical Toxicology*. 37 (5), 515-520.
- Zhang, L., Ma, X., Yang, G., Zhu, B., Han, J., Yu, W., & Pan, K. (2012). Isolation and characterization of a long-chain acyl-coenzyme A synthetase encoding gene from the marine microalga *Nannochloropsis oculata*. *Journal of Applied Phycology*. 24 (4), 873-880.

7. Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Deppenmeier für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und des spannenden Themas bedanken. Zudem danke ich für die vielen hilfreichen wissenschaftlichen Diskussionen rund um die Methanogenese.

Bei Frau Priv.-Doz. Dr. Christiane Dahl bedanke ich mich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens und einige hilfreiche Gespräche zu Methoden der Proteinaufreinigung.

Ein weiterer Dank geht an Prof. Dr. Lukas Schreiber und Prof. Dr. Sigurd Höger, die sich bereit erklärt haben, als weitere Mitglieder meiner Promotionskommission zu fungieren.

Außerdem danke ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Deppenmeier für die angenehme Arbeitsatmosphäre und Laborzeit.

Insbesondere danke ich meiner Familie für die stetige Unterstützung und den Rückhalt während meiner gesamten Studienzeit, in jeglicher Hinsicht.