

Schlüsselenzyme der Methanogenese und der
Energiekonservierung im Darmbewohner
Methanomassiliicoccus luminyensis

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Lena Kröninger

aus Coesfeld

Bonn, 2018

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

1. Gutachter:	Prof. Dr. Uwe Deppenmeier
2. Gutachter:	Priv.-Doz. Dr. Christiane Dahl
Tag der Promotion:	2. Juli 2018
Erscheinungsjahr:	2018

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Kröninger, L; Berger, S; Welte, C; Deppenmeier, U (2016) Evidence for the involvement of two heterodisulfide reductases in the energy-conserving system of *Methanomassiliicoccus luminyensis*. *FEBS Journal* 283, S. 472-483.

Kröninger, L; Gottschling, J; Deppenmeier, U (2017) Growth characteristics of *Methanomassiliicoccus luminyensis* and expression of methyltransferase encoding genes. *Archaea* 2017, 2756573.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Methan – Entstehung und Bedeutung	1
1.2 Human-assoziierte, methanogene Archaeen	2
1.3 Energiekonservierung in methanogenen Archaeen	4
1.4 Der Modellorganismus <i>Methanomassiliicoccus luminyensis</i>	7
1.5 Zentrale Fragestellungen und Zielsetzung dieser Arbeit	9
2 Material und Methoden	10
2.1 Chemikalien und andere Materialien	10
2.1.1 Chemikalien	10
2.1.2 Gase	10
2.1.3 Enzyme	10
2.1.4 Antibiotika	11
2.1.5 Software	11
2.2 Organismen, Vektoren, Plasmide und Primer	12
2.2.1 Primer	12
2.2.2 Organismen	14
2.2.3 Vektoren und Plasmide	15
2.3 Mikrobiologische Methoden	15
2.3.1 Kultivierung von <i>Cl. pasteurianum</i>	15
2.3.2 Kultivierung von <i>E. coli</i>	16
2.3.3 Anzucht von methanogenen Organismen	18
2.3.4 Stammhaltung von Organismen	19
2.3.5 Messung der optischen Dichte	19
2.3.6 Bestimmung von Wachstumsparametern	20
2.3.7 Präparation von ruhenden Zellen	20
2.4 Molekularbiologische Methoden	21
2.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA	21
2.4.2 Isolierung von RNA	21
2.4.3 Bestimmung von RNA- und DNA-Konzentrationen	22
2.4.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	22
2.4.5 DNA-Auftrennung mittels Agarose-Gelelektrophorese	24
2.4.6 RNA-Auftrennung mittels denaturierender Agarose-Gelelektrophorese	25
2.4.7 Quantitative Reverse Transkriptions-PCR (RT-qPCR)	25
2.4.8 Restriktionsverdau	27
2.4.9 Ligation	28
2.4.10 Transformation in chemisch-kompetente <i>E. coli</i> -Stämme	28
2.4.11 Ortsspezifische Mutagenese	30
2.5 Biochemische Methoden	30
2.5.1 Anaerobe Protein-Überproduktion	30
2.5.2 Zellyse	31
2.5.3 Proteinaufreinigung mittels Streptactin-Affinitätschromatographie	32
2.5.4 Bestimmung von Proteinkonzentrationen	32

2.5.5	Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	33
2.5.6	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (native PAGE)	34
2.5.7	Silberfärbung	34
2.5.8	Immunologischer Nachweis mittels Western Blot	35
2.5.9	Fast Protein Liquid Chromatographie.....	36
2.5.10	Aufreinigung von Ferredoxin aus <i>Cl. pasteurianum</i>	37
2.5.11	Präparation von Cytoplasma und Membranfraktion	37
2.5.12	Kolorimetrische Quantifizierung von Eisen- und Schwefel.....	38
2.6	Analytische Methoden	39
2.6.1	Quantifizierung von MMA, DMA und TMA.....	39
2.6.2	Quantifizierung von Methanol und Methan durch Gaschromatographie.....	40
2.6.3	Quantifizierung von Acetat mittels Hochleistungsflüssigchromatographie.....	40
2.6.4	Bestimmung des Trockengewichts.....	41
2.6.5	Bestimmung des ATP-Gehalts von Zellsuspensionen	41
2.7	Enzymaktivitätstest.....	41
2.7.1	MV-abhängige Messung der Heterodisulfidreduktase-Aktivität.....	42
2.7.2	MV-abhängige Messung der Hydrogenase-Aktivität	42
2.7.3	Gekoppelter Enzymtest zur Messung der Ferredoxinreduktions-Aktivität	43
2.7.4	Thiolnachweis mittels Ellman-Test	43
2.7.5	<i>In gel</i> -Hydrogenasetest.....	44
3	Ergebnisse	45
3.1	Untersuchungen zum Wachstum von <i>M. luminyensis</i>	45
3.1.1	Wachstum auf Methanol + H ₂	45
3.1.2	Wachstum auf Methylaminen + H ₂	52
3.1.3	Wachstum auf weiteren Methylgruppendonoren.....	58
3.1.4	Einfluss der Gasphase auf das Wachstum von <i>M. luminyensis</i>	58
3.2	Substratpräferenzen von <i>M. luminyensis</i>	61
3.2.1	Transkriptionsstudien zu Genen der Substratdemethylierung	62
3.2.2	Substratumsetzung durch Substrat-adaptierte, ruhende Zellen.....	68
3.3	Untersuchungen zur Energiekonservierung in <i>M. luminyensis</i>	71
3.3.1	Transkriptionsstudien zu Genen methanogener Schlüsselenzyme	72
3.3.2	Charakterisierung der Heterodisulfidreduktase-Untereinheit HdrD.....	75
3.3.2.1	Bioinformatische Analyse von HdrD aus <i>M. luminyensis</i>	75
3.3.2.2	Generierung eines Überexpressionssystems für <i>hdrD</i> aus <i>M. luminyensis</i> ...	82
3.3.2.3	Heterologe Überproduktion von HdrD in <i>E. coli</i>	83
3.3.2.4	Enzymatische Charakterisierung von HdrD	86
3.3.2.5	Austausch konservierter Cysteine in HdrD durch Serine.....	92
3.3.3	Enzymatische Aktivitäten in Zellfraktionen von <i>M. luminyensis</i>	95
3.3.3.1	Hydrogenase-Aktivitäten im Cytoplasma und in der Membranfraktion.....	95
3.3.3.2	Heterodisulfidreduktase-Aktivitäten im Cytoplasma und in der Membranfraktion	98
3.3.4	Identifizierung des Kopplungsions zur ATP-Synthese	99
3.3.5	Untersuchung der Rolle der Methyl-CoM-Reduktase in <i>M. luminyensis</i>	104
3.3.6	Analyse des Fd _{red} -oxidierenden Systems in <i>M. luminyensis</i>	105
3.3.6.1	Charakterisierung der Indolpyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase aus <i>Ms. mazei</i>	108
3.3.6.2	Fd _{red} -Oxidation durch den Fpo/HdrD-Komplex	111
3.3.6.3	Berechnungen zur Translokationseffizienz des Fpo/HdrD-Komplexes	114

4 Diskussion	116
4.1 <i>M. luminyensis</i> in seinem natürlichen Habitat	116
4.1.1 Generierung und Verfügbarkeit von Methanol im Darm	117
4.1.2 Methylamine – Alternativsubstrate mit begrenzter Verfügbarkeit	120
4.1.3 Generierung und Verfügbarkeit des Elektronendonors H ₂ im Darm	124
4.2 Evaluierung des medizinischen Potentials von <i>M. luminyensis</i>	127
4.3 Energiekonservierung in <i>M. luminyensis</i> – Ein Vergleich mit anderen methanogenen Organismen	130
4.3.1 Die Methyltransferase Mtr – Eine Apomorphie methanogener Archaeen?	131
4.3.2 Die Methyl-CoM-Reduktase – Das Schlüsselenzym der Methanogenese	133
4.3.3 Der Zusammenhang zwischen Hydrogenasen, Ferredoxinen und H ₂	135
4.3.4 Der Redoxzyklus von Ferredoxin in <i>M. luminyensis</i>	137
4.3.4.1 Exkurs in den Anabolismus – Die Rolle der Ech-Hydrogenasen	140
4.3.5 Kombination verschiedener Heterodisulfidreduktasen	142
4.3.6 Fd _{red} -Oxidation an der ‚kopflosten‘ F ₄₂₀ H ₂ -Dehydrogenase	144
4.3.6.1 Vorkommen und Diversität von Komplex I-Homologen	146
4.3.7 Putativer Metabolismus von <i>M. luminyensis</i> – wie Anabolismus und Katabolismus ineinandergreifen	150
5 Zusammenfassung	157
6 Literaturverzeichnis	160
7 Danksagung	176

Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption (spezifiziert durch Wellenlänge)
Abb.	Abbildung
AHT	Anhydrotetrazyklin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP, ADP, AMP	Adenosintri-, Adenosindi-, Adenosinmonophosphat
B, Bp	Basen, Basenpaare
BES	Bromoethansulfonat
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
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
C _t	<i>cycle threshold</i>
CV	Säulenvolumen
Cys, C	Cystein
d	Tag
Da	Dalton
DMA	Dimethylamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxyribonukleosidtriphosphat
DPI	Diphenyliodoniumchlorid
DSMZ	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
e ⁻	Elektron/en
Ech	Energie-konservierende Hydrogenase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et alii / et aliae</i> (und andere)
ETH157	Na ⁺ -Ionophor
FAD	Flavinadenindinukleotid
Fd	Ferredoxin
FMN	Flavinmononukleotid
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
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
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
g	Gramm
h	Stunde
HABA	4-Hydroxyazobenzol-2-carbonsäure
Hdr	Heterodisulfidreduktase
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
H ₂ O _{dest} , H ₂ O _{reinst}	destilliertes Wasser, Reinstwasser
H ₄ MPT	Tetrahydromethanopterin

IC ₅₀	Konzentration eines Inhibitors, bei der die Aktivität eines Enzyms um 50 % reduziert wird
IOR	Indolpyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase
J	Joule
K _M	Michaelis-Menten-Konstante
KP	Kaliumphosphat(-Puffer)
L	Liter
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
M	molar (mol L ⁻¹)
Mcr	Methyl-CoM-Reduktase
MFR	Methanofuran
min	Minute
MMA	Monomethylamin
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MPh	Methanophenazin
Mtr	Methyl-H ₄ MPT:HS-CoM-Methyltransferase
MV	Methylviologen
Mvh	Methylviologen-reduzierende Hydrogenase
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
MT1, MT2	Methyltransferasen 1 und 2 bei Substratdemethylierung
NAD(H)	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP(H)	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OD	optische Dichte (spezifiziert durch Wellenlänge)
ox	oxidiert
PAGE	Polyarcylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
P _i , PP _i	anorganisches Phosphat, Pyrophosphat
red	reduziert
RNA	Ribonukleinsäure
Rnf	„ <i>Rhodobacter</i> -Stickstofffixierungs-Komplex“
rRNA	ribosomale RNA
RT-qPCR	quantitative PCR mit reverser Transkription
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser, S	Serin
SF6847	Protonophor
sp., spp.	Spezies
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMA, TMAO	Trimethylamin, Trimethylaminoxid
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
Vho	F ₄₂₀ -nicht-reduzierende Hydrogenase
V _{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
v/v	Volumenkonzentration, Volumen pro Volumen
w/v	Massekonzentration, Gewicht pro Volumen

1 Einleitung

1.1 Methan – Entstehung und Bedeutung

Kohlenstoff ist der zentrale Baustein aller lebenden Zellen und durchläuft in der Natur im Rahmen globaler Kohlenstoffzyklen verschiedene oxidative und reduktive Prozesse. Die Verbindung, welche die reduzierteste Form des Kohlenstoffs darstellt, ist Methan (CH_4). Dieses kann sowohl in geologischen Vorgängen (Etiope und Klusman 2002), als auch im Rahmen von biologischen Prozessen unter sauerstofffreien Bedingungen generiert werden. Methan ist eine energiereiche Verbindung, die im Zusammenhang mit der Energiegewinnung aus Biogas auf Grundlage von nachwachsenden Rohstoffen bereits umfangreich genutzt wird. Neben diesem für den Menschen positiven Aspekt ist Methan jedoch auch im ökologischen Kontext relevant, da es ein potentes Treibhausgas darstellt und sogar 25-fach schädlicher für das Klima ist als Kohlenstoffdioxid (CO_2 ; Boucher *et al.* 2009). Ein tiefgreifendes Verständnis der Prozesse, die zur Generierung von Methan führen, ist daher im Hinblick auf verschiedene Fragestellungen essentiell. Eine Untersuchung der biologischen Methansynthese ermöglicht auf der einen Seite die Biogasproduktion zu optimieren und auf der anderen Seite solchen Prozessen entgegen wirken zu können, in denen Methan freigesetzt wird und als Treibhausgas in die Atmosphäre gelangt.

Der Prozess der biologischen Methanproduktion läuft nur unter strikt anaeroben Bedingungen ab und wird Methanogenese genannt. Die Fähigkeit Methan zu generieren ist lediglich auf eine einzige Organismengruppe aus der Domäne der Archaeen innerhalb der Euryarchaeota beschränkt, die methanogenen Archaeen. Diese Gruppe umfasst bisher sieben beschriebene Ordnungen: Methanocellales, Methanopyrales, Methanococcales, Methanosarcinales, Methanobacteriales, Methanomicrobiales und Methanomassiliicoccales (Garcia *et al.* 2000; Borrel *et al.* 2013b). Allen methanogenen Organismen ist gemein, dass sie Endprodukte des Abbaus organischer Materie als Substrate verwenden und dadurch essentieller Bestandteil des Kohlenstoffzyklus sind. Methan als Stoffwechselendprodukt kann wiederum von methanotrophen Organismen unter aeroben Bedingungen oxidiert und als Substrat genutzt werden (Shively *et al.* 2001). Trotz der Nutzung energiereicher Verbindungen und den daraus resultierenden vergleichsweise geringen Wachstumsraten sind methanogene Archaeen in der Natur weit verbreitet. Sie sind sowohl in anoxischen Süßwassersedimenten (Laskar *et al.* 2017), als auch in Reisfeldern zu finden (Großkopf *et al.* 1998). Darüber hinaus stellen auch die Verdauungstrakte verschiedener Arthropoden und Säugetiere natürliche Habitate für methanogene Organismen dar (Lang *et al.* 2015). Die Produktion von Methan ist jedoch nicht nur natürlichen, sondern vor allem auch anthropogenen Ursprungs, da methanogene Vertreter in den Verdauungstrakten von Wiederkäuern vorkommen und die Ausweitung der Viehwirtschaft maßgeblich zur globalen Methanemission beiträgt (Stern und Kaufmann 1996). In den letzten Jahren sind methanogene Archaeen erstmals auch im Zusammenhang mit der menschlichen Mikrobiota und als Teil dessen diskutiert worden (Gaci *et al.* 2014). Die weitreichende Verbreitung der heterogenen, methanogenen Gruppe in verschiedensten Habitaten unterstreicht deren Bedeutung und erklärt, warum ihre Erforschung aus zahlreichen Gesichtspunkten höchst interessant und relevant ist.

1.2 Human-assoziierte, methanogene Archaeen

Das menschliche Mikrobiom ist in den vergangenen Jahren immer weiter in das Interesse der Forschung gerückt, da dessen Bedeutung für das Wohlergehen des Wirtes sehr hoch eingestuft wird. Vor allem der Darmtrakt des Menschen beinhaltet eine komplexe mikrobielle Flora, deren Einfluss auf den allgemeinen Gesundheitszustand und auf die Entstehung von Krankheiten bisher nur unzureichend verstanden ist. Während der Magen des Menschen aufgrund des niedrigen pH-Wertes noch weitestgehend unbesiedelt ist, nimmt die mikrobielle Dichte bis zum Dickdarm stark zu und erreicht Werte von bis zu 10^{11} bakterielle Zellen mL^{-1} (Sender *et al.* 2016), die mehrere Tausend verschiedene Spezies umfassen (The Human Microbiome Project Consortium 2012).

Während sich die meisten Studien vor allem mit der Rolle bakterieller Mikroorganismen im Darm beschäftigen, gehen nur wenige Untersuchungen auf die Rolle von Archaeen und im Speziellen von methanogenen Organismen in diesem Kontext ein. Die häufigsten methanogenen Archaeen, die als Bewohner des menschlichen Körpers bereits vor mehreren Jahrzehnten beschrieben wurden, sind *Methanobrevibacter smithii* und *Methanosphaera stadtmanae* (Miller *et al.* 1982; Miller und Wolin 1985). Beide Organismen besiedeln den Gastrointestinaltrakt des Menschen, der das dominierende human-assoziierte Habitat methanogener Archaeen ist. *M. smithii* ist darüber hinaus in seltenen Fällen auch in der Vaginalflora nachweisbar (Belay *et al.* 1990). Während *M. smithii* zu den hydrogenotrophen Methanarchaeen zählt, betreibt *M. stadtmanae* eine Methanbildung ausgehend von Methanol mit Wasserstoff (H_2) als Elektronendonator und vollzieht somit eine H_2 -abhängige methylotrophe Methanogenese (Fricke *et al.* 2006). Dies zeigt, dass sich verschiedene Methanogenesewege bei der Erschließung des menschlichen Körpers als Habitat durchgesetzt haben, wobei jedoch der acetiklastischen Methanogenese eine geringere Bedeutung zuzukommen scheint, da acetiklastische, methanogene Vertreter bisher nicht in aktiver Form in der menschlichen Mikrobiota nachgewiesen wurden. Die Stoffwechselvielfalt human-assoziiierter Bakterien und Archaeen ist generell groß, da der Gastrointestinaltrakt eine Vielzahl an verschiedenen Substraten und ökologischen Nischen bereithält. Sobald für den Menschen unverdauliche Verbindungen, z. B. komplexe Kohlenhydrate, den Trakt erreichen, beginnt deren Zersetzung durch Bakterien. Dabei entstehen energiearme Stoffwechselendprodukte, die im Darmlumen akkumulieren (falls es nicht zur Resorption durch den Wirtsorganismus kommt), da nur wenige Organismen in der Lage sind, sie weiterführend als Substrate zu nutzen. Auf dieser trophischen Ebene spielen die methanogenen Archaeen eine entscheidende Rolle, die bestimmte energiearme Verbindungen (z. B. Methylamine, $\text{H}_2 + \text{CO}_2$, usw.) als Substrate zur Energiekonservierung nutzen und somit die finale Stufe des Abbaus organischer Verbindungen bilden. Neben *M. stadtmanae* und *M. smithii* konnte mit Hilfe von PCR-basierten Analysen auch *Methanosarcina*-DNA in menschlichen Stuhlproben nachgewiesen werden (Scanlan *et al.* 2008). Ein Nachweis aktiver Zellen in diesem Bereich ist jedoch bislang nicht gelungen. Gleiches trifft auf *Methanobrevibacter arboriphilus* zu, der ebenfalls bislang nur auf DNA-Ebene in der intestinalen Mucosa identifiziert wurde (Oxley *et al.* 2010). Eine methanogene Spezies, die einen besonderen Stellenwert unter den human-assoziierten, methanogenen Vertretern einnimmt, ist *Methanobrevibacter oralis*. Während die übrigen methanogenen Organismen im Gastrointestinaltrakt des Menschen zu

finden sind, besiedelt *M. oralis* den Mundraum des Menschen. Dies ist vor allem deshalb erstaunlich, da der Mundraum durch stetigen Gasaustausch mit der Umwelt bekanntermaßen ein aerobes Habitat bildet. Der Organismus ist daher in aktiver Form in den Zahntaschen zu finden, in denen zumindest teilweise anaerobe Bedingungen vorherrschen. *M. oralis* wird mit der Entstehung von Parodontitis in Verbindung gebracht (Lepp *et al.* 2004) und wurde auch durch Illumina-Sequenzierung in DNA-Proben, die aus Hirnabszessen stammten, nachgewiesen (Drancourt *et al.* 2017). Darüber hinaus wurde vor wenigen Jahren ein methanogenes Archaeon beschrieben, das ebenfalls den menschlichen Darmtrakt besiedelt und nicht in die bis dahin bekannten methanogenen Ordnungen eingruppiert werden konnte. Dieses Archaeon, *Methanomassiliicoccus luminyensis*, gehört zur neuen siebten Ordnung der methanogenen Gruppe, den Methanomassiliicoccales, und wird in Kapitel 1.4 ausführlich thematisiert.

Inwiefern sich generell die Anwesenheit von methanogenen Organismen auf die Gesundheit des Menschen auswirkt, ist bisher nicht ansatzweise verstanden, obwohl diese Mikroorganismen keinesfalls eine Randgruppe innerhalb der menschlichen Mikrobiota bilden. Zahlreiche Studien, die sich auf diese Fragestellung beziehen, lieferten vor allem konträre Ergebnisse. So zeigten Untersuchungen, in denen Methan im Atem von Patienten und gesunden Kontrollprobanden detektiert wurde, dass Menschen, die an *Colitis ulcerosa*, Dickdarmpolyposis oder Dickdarmkrebs leiden, erhöhte Methanmengen aufweisen. Dies deutet auf eine Verbindung zwischen der Pathogenese und den methanogenen Archaeen hin (Piqué *et al.* 1984). Im Gegensatz dazu steht eine PCR-basierte Studie von Scanlan *et al.* (2008), bei der eine Reduktion des Vorkommens von methanogenen Organismen in Patienten festgestellt wurde, die an Dickdarmerkrankungen litten. Ähnliche Beobachtungen gibt es auch für die chronisch-entzündliche Darmerkrankung Morbus Crohn, bei der eine Reduktion des Methans im Atem von Patienten nachgewiesen wurde (Peled *et al.* 1987; Pimentel *et al.* 2003). Darüber hinaus wird einigen methanogenen Vertretern ein Einfluss auf das kardiovaskuläre System des Wirtes zugesprochen, da die Organismen die Konzentrationen bestimmter Verbindungen, wie Trimethylamin und Trimethylaminoxid, die zur Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen beitragen, reduzieren können (Brugère *et al.* 2014; Kapitel 1.4). Ob Menschen, die einen höheren Anteil dieser methanogenen Organismen aufweisen, tatsächlich seltener an kardiovaskulären Erkrankungen leiden, wurde bisher jedoch nicht abschließend gezeigt. Auch in Bezug auf das Essverhalten und den Körperfettanteil des Wirtes scheinen die methanogenen Archaeen Einfluss zu nehmen. So ist zwar bei adipösen Menschen der Anteil an methanogenen Organismen im Darm generell erhöht (Zhang *et al.* 2009), jedoch ist speziell das Vorkommen von *M. smithii* reduziert (Million *et al.* 2012; Million *et al.* 2013). Bei anorektischen Patienten stellt sich die Situation genau gegenteilig dar, da die Konzentration an *M. smithii* im Vergleich zur Kontrollgruppe stark erhöht ist (Armougom *et al.* 2009).

Im Allgemeinen scheint das Vorkommen von methanogenen Archaeen im Darm im Verlauf des menschlichen Lebens Schwankungen unterworfen zu sein. Kleinkinder unter zwei Jahren weisen zunächst keine methanogenen Vertreter auf (Ferrari *et al.* 1994; Rutili *et al.* 1996). Anschließend setzt die sukzessive Besiedlung ein, sodass ab einem Alter von fünf Jahren bereits die Mehrzahl aller Kinder methanogene Archaeen trägt (Rutili *et al.* 1996). Im distalen Colon können methanogene Organismen bis zu 12 % der anaeroben Gemeinschaft ausmachen, wobei *M. smithii* unter den methanogenen

Vertretern dominiert (Pochart *et al.* 1993). Aus diesem Grund und wegen der Bedeutung der Methanproduzierenden Archaeen bei der Entstehung verschiedener Krankheiten sind weiterführende Untersuchungen human-assoziierten, methanogener Archaeen essentiell. Die vorliegende Arbeit zielt auf ein tieferes Verständnis der Energiekonservierung und Methanogenese dieser Archaeen ab und versucht somit die zahlreichen mit Erkrankungen assoziierten Kohortenstudien, die in den letzten Jahren publiziert wurden, auf biochemischer Basis zu ergänzen.

1.3 Energiekonservierung in methanogenen Archaeen

Methanogene Archaeen werden aufgrund ihres Substratspektrums in drei Großgruppen eingeteilt. Während acetiklastische Methanarchaeen Acetat als Substrat nutzen, wachsen hydrogenotrophe, methanogene Archaeen auf CO_2 mit H_2 als Elektronendonator. Darüber hinaus nutzen methylotrophe Methanarchaeen methylierte Verbindungen wie Methanol oder Methylamine als Wachstumssubstrate. Die Art des Substrates bestimmt auch maßgeblich die Art der Energiekonservierung, die der entsprechende Organismus betreibt, um Adenosintriphosphat (ATP) generieren zu können. ATP ist die grundlegende ‚Energiewährung‘ aller biologischen Zellen und dessen Synthese kann auf zwei Wegen erfolgen. Während bei der Substratkettenphosphorylierung Phosphatgruppen direkt auf Adenosinmonophosphat (AMP) oder Adenosindiphosphat (ADP) übertragen werden, wodurch ATP generiert wird, kann ATP auch durch die sogenannten ATP-Synthasen im Zuge der Elektronentransportphosphorylierung produziert werden. Substratkettenphosphorylierung ist in methanogenen Archaeen als Mechanismus zur ATP-Generierung nicht beschrieben, wohingegen die ATP-Synthese mittels Elektronentransportphosphorylierung essentiell ist.

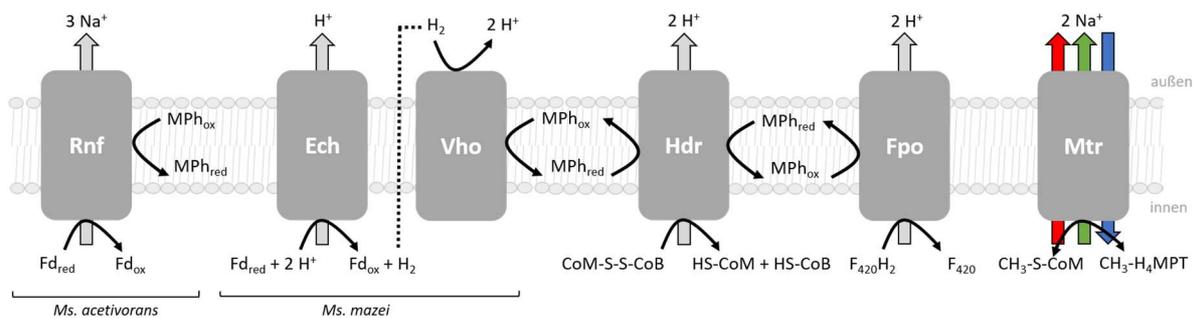


Abb. 1. Membrangebundene Schlüsselenzyme der methanogenen Energiekonservierung. Den farbigen Pfeilen ist zu entnehmen, in welche Richtung der Na^+ -Ionenstrom an der Methyltransferase Mtr bei den verschiedenen methanogenen Stoffwechselwegen abläuft (rot: acetiklastisch, blau: methylotroph, grün: hydrogenotroph). Archaeen ohne Cytochrome verfügen ausschließlich über die Methyltransferase Mtr zur Etablierung des Membranpotentials. Die übrigen Enzyme sind aus verschiedenen Cytochrom-enthaltenden, methanogenen Organismen bekannt. Rnf: *Rhodobacter*-Stickstofffixierungs-Komplex, Ech: Energie-konservierende Hydrogenase, Vho: F_{420} -nicht-reduzierende Hydrogenase, Hdr: Heterodisulfidreduktase, Fpo: F_{420}H_2 -Dehydrogenase, Mtr: Methyl- H_4MPT :HS-CoM-Methyltransferase.

Die Triebkraft der ATP-Synthasen, die anorganisches Phosphat (P_i) und ADP miteinander verknüpfen, ist die Ionenmotorische Kraft. Diese entsteht, wenn an der Cytoplasmamembran ein elektrochemischer Ladungsgradient erzeugt wird, indem positiv geladene Ionen (Protonen oder Na^+ -Ionen) aus der Zelle geschleust werden. Dadurch erhält die Außenseite der Membran einen Überschuss an positiver Ladung und es entsteht ein Konzentrationsgradient aufgrund der unterschiedlichen Verteilung der Ionen zwischen dem Zellinneren und -äußeren. Kommt es zu einem Rückfluss der Ionen entlang des Gradienten, wird die zuvor in Form des elektrochemischen Potentials gespeicherte Energie freigesetzt und durch enzymatische Katalyse mittels ATP-Synthase zur Generierung von ATP aus $ADP + P_i$ genutzt. An der Etablierung des elektrochemischen Potentials sind in methanogenen Archaeen verschiedene Enzyme und Enzymkomplexe beteiligt, die nachfolgend vorgestellt werden. Sind mehrere Enzyme in der Translokation von Protonen oder Na^+ -Ionen über die Membran involviert und stehen diese über Elektronenüberträger miteinander in Verbindung, spricht man von einer Atmungskette (Abb. 1).

Bei acetiklastischen und methylotrophen Methanarchaeen, die die Cytochrom-enthaltende, methanogene Organismengruppe bilden, ist die Atmungskette zentraler Bestandteil des Energiestoffwechsels der Zelle, da diese die Regenerierung bestimmter Cofaktoren der Methanogenese (F_{420} , Ferredoxin, Coenzym M, Coenzym B) an die Translokation von Protonen bzw. Na^+ -Ionen über die cytoplasmatische Membran koppelt. Das zentrale Enzym der Atmungsketten ist die Heterodisulfidreduktase, welche den terminalen Elektronenakzeptor, das Heterodisulfid (CoM-S-S-CoB) bestehend aus Mercaptoethansulfonat (Coenzym M) und 7-Mercaptoheptanoylthreoninphosphat (Coenzym B), reduziert (Abb. 1; Hedderich *et al.* 2005). Die Elektronen für diese Reduktion stammen aus der Oxidation von reduziertem Methanophenazin (MPh_{red}), das der membranlösliche Elektronenüberträger in acetiklastischen und methylotrophen Methanarchaeen ist (Bäumer *et al.* 1998; Abken *et al.* 1998; Beifuss *et al.* 2000). Die Reduktion von CoM-S-S-CoB, mit gleichzeitiger Oxidation von MPh_{red} , ist eine exergone Reaktion und setzt somit Energie frei. Diese Energie wird an der Heterodisulfidreduktase zur vektoriellen Translokation von zwei Protonen über die Membran genutzt, was zur Etablierung des elektrochemischen Gradienten beiträgt (Ide *et al.* 1999).

Der Elektronenüberträger MPH wird in *Methanosarcina mazei*, einem methanogenen Organismus, der alle ‚klassischen‘ Methanogenesewege vollziehen kann, unter anderem durch die Vho-Hydrogenase reduziert (Brodersen *et al.* 1999). Dabei handelt es sich um ein Enzym, das H_2 oxidiert und Elektronen auf MPh_{ox} überträgt. In diesem Schritt werden skalare Protonen generiert, da durch die Oxidation von H_2 zwei Protonen auf der Außenseite der Membran freigesetzt werden. In *Methanosarcina acetivorans* ist die Situation eine andere, da der Organismus nicht über eine Vho-Hydrogenase verfügt (Abb. 1). Eine analoge Funktion nimmt hier der Rnf-Komplex ein, da dieser ebenfalls in der Lage ist, MPh_{ox} zu reduzieren. Im Gegensatz zur Vho-Hydrogenase nutzt der Rnf-Komplex jedoch nicht H_2 , sondern reduziertes Ferredoxin (Fd_{red}) als Elektronendonator (Li *et al.* 2006). Auch in *Ms. mazei* wird während der Methanogenese Fd_{red} generiert. Die Aufgabe der Fd_{red} -Oxidation fällt hier wiederum der Ech-Hydrogenase zu, welche die Elektronen aus der Fd_{red} -Oxidation auf Protonen überträgt (Welte *et al.* 2010a). Zusammen setzen die Ech- und die Vho-Hydrogenase in *Ms. mazei* drei Protonen auf der

Außenseite der cytoplasmatischen Membran frei, während der Rnf-Komplex in *Ms. acetivorans* das Ausschleusen von drei Na⁺-Ionen katalysiert (Welte und Deppenmeier 2014). Wird Fd_{red} durch die Ech-Hydrogenase oder den Rnf-Komplex oxidiert, steht es der Methanogenese erneut in oxidiert Form zur Verfügung. Der Schritt ist essentiell, damit die Methanogenese nicht zum Erliegen kommt, da Fd_{ox} im Zuge der Umsetzung von Acetat bzw. im oxidativen Zweig der methylo trophen Methanogenese als Elektronenakzeptor fungiert, und somit zwingend in oxidiert Form benötigt wird (Abb. 2).

Ein weiteres Enzym, welches an der Etablierung des elektrochemischen Gradienten beteiligt ist, ist die membrangebundene Methyltransferase (Mtr). Das Enzym katalysiert während der acetiklastischen Methanogenese den Transfer der Methylgruppe von Tetrahydromethanopterin (H₄MPT; in Methanosarcinales Tetrahydrosarcinapterin, H₄SPT) auf Coenzym M und koppelt diese Reaktion an das Ausschleusen von zwei Na⁺-Ionen über die Membran (Gottschalk und Thauer 2001). Da im oxidativen Zweig des methylo trophen Weges die Methanogenese revers abläuft, indem eine Methylgruppe bis zum CO₂ aufoxidiert wird, katalysieren die Enzyme hier die Rückreaktionen. So schleust die Methyltransferase im oxidativen Zweig keine Na⁺-Ionen nach außen, sondern vollzieht den Methylgruppentransfer im Vergleich zur acetiklastischen Methanogenese rückwärts von Coenzym M auf H₄MPT unter Ioneneinstrom (Abb. 1).

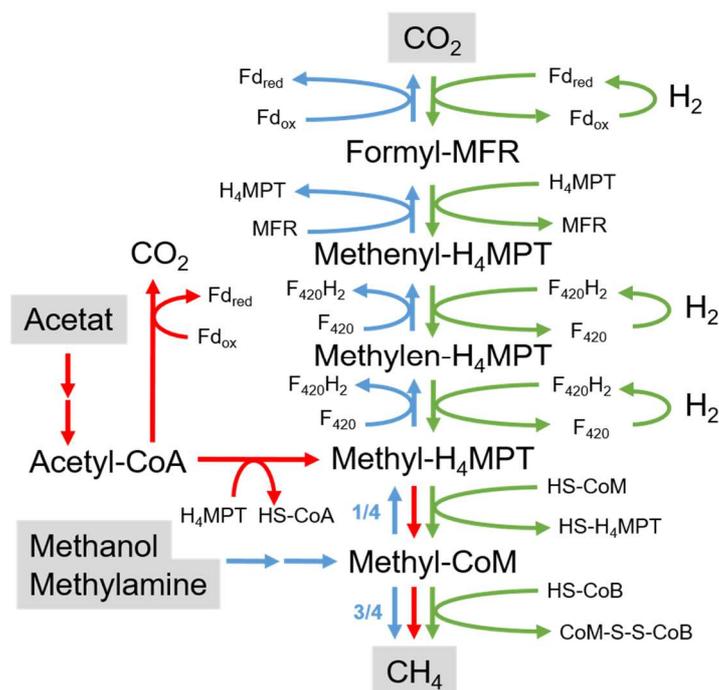


Abb. 2. Schematische Abbildung der drei klassischen Methanogenesewege. Rot: acetiklastisch, blau: methylo troph, grün: hydrogenotroph.

Die Aufteilung der methanogenen Substrate auf einen reduktiven und einen oxidativen Zweig, bei denen Methan bzw. CO₂ generiert wird, ist der Kernpunkt, in dem sich die acetiklastische und die methylo troph Methanogenese unterscheiden. Im Gegensatz zur acetiklastischen Methanogenese wird

im Zuge der Verstoffwechslung methylierter Verbindungen immer ein Teil der Methylgruppen über verschiedene Zwischenschritte zu CO_2 oxidiert. Die Elektronen, die bei der sukzessiven Oxidation der Methylgruppen zu CO_2 freigesetzt werden, werden auf verschiedene Elektronenüberträger (F_{420} und Fd) übertragen, wodurch Elektronendonoren entstehen (F_{420}H_2 , Fd_{red}), die zur Reduktion der übrigen Methylgruppen zu Methan im reduktiven Zweig benötigt werden (Welte und Deppenmeier 2014). Aus diesem Grund ist der oxidative Zweig der methylophen Methanogenese für die eigentliche Methanproduktion unerlässlich.

Ein weiteres Schlüsselenzym der Atmungskette von methanogenen Archaeen mit Cytochromen ist die F_{420}H_2 -Dehydrogenase (Fpo-Komplex). Das Enzym ist für die Oxidation und somit Regenerierung des Cofaktors F_{420}H_2 verantwortlich und überträgt Elektronen auf MPh_{ox} . Da diese Redoxreaktion Energie aufgrund des Redoxpotentialgefälles zwischen F_{420}H_2 und MPh_{ox} freisetzt, können während der Katalyse zwei Protonen über die Membran geschleust werden (Welte und Deppenmeier 2011b).

Hydrogenotrophe, methanogene Organismen besitzen keine Atmungskette, wie sie in den anderen methanogenen Gruppen zu finden ist. Das einzige membranständige Enzym, das bei diesen Archaeen in der Lage ist, den elektrochemischen Gradienten über der Membran aufzubauen, ist die Methyltransferase Mtr. Neben diesem Enzym sind hauptsächlich cytoplasmatische Proteine an der Methanogenese und Energiekonservierung beteiligt. Bei diesen Proteinen nimmt ein löslicher, bifurkierender Komplex bestehend aus einer Heterodisulfidreduktase und einer Methylviologen-reduzierenden Hydrogenase (Mvh) eine zentrale Rolle ein (Kaster *et al.* 2011). Dieser Komplex oxidiert H_2 und verteilt die Elektronen auf CoM-S-S-CoB und Fd_{ox} , wobei die erste Reduktionsreaktion exergon verläuft und die endergone Fd_{ox} -Reduktion antreibt. In hydrogenotrophen Methanarchaeen ist diese Reaktion der zentrale Energie-konservierende Schritt, da der energiereiche Elektronendonator Fd_{red} generiert wird. Fd_{red} , sowie F_{420}H_2 , welches durch F_{420} -reduzierende Hydrogenasen bereitgestellt wird, dienen als Elektronendonoren bei der sukzessiven Reduktion von CO_2 zu Methan, die durch unterschiedliche Reduktasen katalysiert wird.

1.4 Der Modellorganismus *Methanomassiliicoccus luminyensis*

M. luminyensis ist der erste und bisher einzige in Reinkultur verfügbare Vertreter der siebten methanogenen Ordnung, die Methanomassiliicoccales. Das Genom des Organismus ist sequenziert (Gorlas *et al.* 2012) und in Form von Contigs in den gängigen Genomdatenbanken hinterlegt. Es handelt sich um einen nicht-motilen Organismus, der eine kokkale Morphologie aufweist und einen Durchmesser von 850 nm erreicht (Dridi *et al.* 2012a). In Bezug auf sein Substratspektrum entspricht *M. luminyensis* zumindest in Teilen *Methanosphaera stadtmanae*, da das Archaeon gleichermaßen Methanol mit H_2 als Elektronendonator verstoffwechselt (Fricke *et al.* 2006). Im Gegensatz zu *M. stadtmanae* weist *M. luminyensis* jedoch ein größeres Substratspektrum auf, da der Organismus außer Methanol auch einige Methylamine als Methanogenesesubstrate nutzen kann (Dridi *et al.* 2012a; Lang *et al.* 2015; Brugère *et al.* 2014). Auch bei der Metabolisierung von Methylaminen ist H_2 als Elektronendonator unerlässlich. Bisher ist nicht bekannt, welche Substrate im natürlichen Habitat von

M. luminyensis, dem menschlichen Darm, dominieren und daher von *M. luminyensis* bevorzugt genutzt werden. Insbesondere aufgrund der Fähigkeit Trimethylamin (TMA) + H₂ als Substrate nutzen zu können, ist *M. luminyensis* auch medizinisch interessant. TMA entsteht im Gastrointestinaltrakt, wenn beispielsweise cholinreiche Nahrungsreste oder L-Carnitin durch Bakterien zersetzt werden (Koeth *et al.* 2013). Normalerweise wird TMA durch körpereigene Zellen absorbiert und in die Leber transportiert. Hier kommt es zur enzymatischen Oxidation von TMA zu Trimethylaminoxid (TMAO) durch die Flavin-Monooxygenase FMO3. Besitzen Menschen einen genetischen Defekt im *fmo3*-Gen, bleibt die TMA-Oxidation in der Leber aus, weshalb TMA akkumuliert und schließlich über den Blutkreislauf im gesamten Körper verteilt wird (Treacy *et al.* 1998). Aufgrund seines charakteristischen, fischartigen Geruchs ergeben sich für das entsprechende Individuum erhebliche soziale Beeinträchtigungen, da der Geruch über den Schweiß und den Atem ausgeschieden wird. Die Ursache und Symptomatik dieser genetischen Erkrankung wird unter dem Begriff Trimethylaminurie oder auch ‚Fisch-Geruch-Syndrom‘ erfasst. Selbst für den gesunden Organismus ist TMA und dessen Oxidationsprodukt TMAO von zentraler gesundheitlicher Bedeutung. TMAO wird mit der Entstehung von Gefäßerkrankungen wie Arteriosklerose in Verbindung gebracht (Wang *et al.* 2011b), weshalb geringe TMA/TMAO-Level auch für Menschen ohne genetische Disposition im *fmo3*-Gen wünschenswert sind. Sowohl zur Behandlung von Trimethylaminurie-Patienten, als auch zur Krankheitsprävention bei gesunden Menschen wurde *M. luminyensis* vor Kurzem als mögliches Probiotikum ins Gespräch gebracht. Als sogenanntes ‚Archaeobiotikum‘ soll *M. luminyensis* in Erkrankten, aber auch in gesunden Individuen kultiviert werden, um die Konzentrationen an TMA und TMAO zu reduzieren (Brugère *et al.* 2014). Da das Archaeon TMA verstoffwechselt (Lang *et al.* 2015) und dabei das für den menschlichen Organismus unschädliche Methan produziert, würde die Produktion beider Verbindungen, TMA und TMAO, minimiert bzw. nahezu vollständig eliminiert werden. Bevor *M. luminyensis* jedoch als Probiotikum Anwendung finden kann, ist dessen Erforschung im Hinblick auf physiologische und biochemische Fragestellungen unerlässlich.

Wenig ist bisher bekannt über den Energiestoffwechsel von *M. luminyensis*. Analysen des Genoms ergaben, dass der Organismus Gene für eine ungewöhnliche Enzymausstattung besitzt (Lang *et al.* 2015). Hierbei handelt es sich um den ersten Vertreter methanogener Organismen, in dessen Genom keine membranständige Methyltransferase (Mtr) kodiert ist (Kröninger *et al.* 2016). Des Weiteren sind auch keine Gene für eine Vho-Hydrogenase oder einen Rnf-Komplex zu finden. Im Gegensatz dazu sind zwei Ech-Hydrogenasen im Genom kodiert, ebenso in Teilen der Fpo-Komplex und die lösliche, aus hydrogenotrophen, methanogenen Archaeen bekannte Heterodisulfidreduktase, welche mit der Mvh-Hydrogenase assoziiert ist. Die membranständige Heterodisulfidreduktase, die aus der Atmungskette acetiklastischer und methylotropher Methanarchaeen bekannt ist, ist nur teilweise im Genom kodiert, da das Gen für die membranständige Untereinheit (HdrE) fehlt, während die katalytische Untereinheit (HdrD) kodiert ist. Auf welche Weise *M. luminyensis* mit dieser Enzymausstattung Methanogenese betreibt und Energie konserviert, war nicht bekannt und ist deswegen eine zentrale Fragestellung der vorliegenden Arbeit.

1.5 Zentrale Fragestellungen und Zielsetzung dieser Arbeit

Ein idealer Modellorganismus zeichnet sich dadurch aus, dass er zuverlässig im Labor kultiviert werden kann und in verhältnismäßig kurzer Zeit optimale Zelldichten erreicht. *M. luminyensis* wurde erst vor Kurzem erstmals beschrieben und in Reinkultur verfügbar gemacht (Dridi *et al.* 2012a), weshalb das Archaeon als Modellorganismus bisher nur wenig etabliert ist. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollte daher ein System zur stabilen Kultivierung dieses Archaeons ausgearbeitet werden, sodass *M. luminyensis* zukünftig als Modellorganismus für human-assoziierte, methanogene Archaeen fungieren kann. Dies ist vor allem deswegen essentiell, da methanogene Archaeen bis zu 12 % der Mikrobiota im menschlichen Colon ausmachen können (Pochart *et al.* 1993) und aufgrund der Verwertung bakterieller Stoffwechselendprodukte eine wichtige Nische im Ökosystem ‚Darm‘ besetzen. Da detaillierte Kenntnisse zur Physiologie des Organismus der Etablierung eines zuverlässigen Kultivierungssystems zugrunde liegen, sollten zunächst umfangreiche Wachstumsanalysen von *M. luminyensis* durchgeführt werden. Hierzu sollte auch die Klärung der Fragestellungen zählen, wie der Organismus bestimmte Substrate zu Methan umsetzt und wie der Verbrauch der Substrate mit der Erhöhung der Zelldichte korreliert. Vorangegangene Arbeiten belegen, dass der Organismus nur geringe Zelldichten hervorbringt (Brugère *et al.* 2014; Bang *et al.* 2017), weshalb auch die Erhöhung der Zellausbeute ein Ziel der vorliegenden Dissertation war. Um optimale Wachstumsbedingungen für *M. luminyensis* zu schaffen, sollte außerdem untersucht werden, ob das methanogene Archaeon bestimmte Substrate bevorzugt und ob die Verwertung präferierter Substrate ggf. zu einem besseren Wachstum führt. Da wenig über die Lebensweise von methanogenen Archaeen im Darm bekannt ist, sollte diese Untersuchung auch dazu beitragen, *M. luminyensis* besser in das trophische Netzwerk im Darm einordnen zu können. So wurde in der Literatur bisher nicht thematisiert, woher die Substrate stammen, die dieses Archaeon verwertet.

Des Weiteren sollte sich die vorliegende Arbeit mit dem Modus der Energiekonservierung bzw. Methanogenese von *M. luminyensis* beschäftigen, weil bisher nur wenige bioinformatische und physiologische Analysen dazu beitragen, den Stoffwechsel dieses Methan-produzierenden Archaeons aufzuklären (Lang *et al.* 2015). Biochemische Untersuchungen von *M. luminyensis* und im Allgemeinen von Mitgliedern der Methanomassiliicoccales wurden bislang nicht durchgeführt, sodass die wenigen Informationen zum Energiestoffwechsel der Methanomassiliicoccales noch immer hypothetischer Natur sind. Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher detaillierte biochemische Analysen durchgeführt werden, um so zu einem tieferen Verständnis der am Energiestoffwechsel beteiligten Prozesse bzw. der Funktionen der involvierten Enzyme in *M. luminyensis* beizutragen.

Da *M. luminyensis* im Zusammenhang mit sogenannten ‚Archaeobiotika‘ als Therapieansatz für Menschen mit Trimethylaminurie diskutiert wird (Brugère *et al.* 2014), ist dessen Untersuchung auf biochemischer und physiologischer Basis auch von medizinischem Interesse. Schließlich kann der Organismus erst dann verabreicht werden, wenn fundierte Kenntnisse über ihn vorliegen. Auf diese Weise könnte dem Auftreten unerwünschter Nebenwirkungen, z. B. durch Wechselwirkungen mit anderen Mitgliedern der Darmmikrobiota oder mit dem Wirt, entgegengewirkt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und andere Materialien

2.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien, die in dieser Arbeit verwendet wurden, entsprachen mindestens dem Qualitätsstandard *per analysis* (p. a.). Falls nicht anders deklariert, wurden die Chemikalien von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich (München, Deutschland), Fluka (heute Sigma Aldrich, München, Deutschland), Serva (Heidelberg, Deutschland) oder VWR (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

2.1.2 Gase

Die technischen Gase CO₂ (99,9 %), H₂ (99,9 %) und N₂ (99,9 %) wurden von der Firma Air Liquide (Düsseldorf, Deutschland) bezogen. Methan (10 %, Rest Argon) stammte von Linde Gase (Düsseldorf, Deutschland).

2.1.3 Enzyme

Enzyme, die im Rahmen der vorliegenden Dissertation verwendet wurden, können der nachfolgenden Tabelle entnommen werden (Tab. 1).

Tab. 1. Enzyme, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.

Enzym	Hersteller
Alkalische Phosphatase	Thermo-Scientific (Schwerte, Deutschland)
DNase I	Thermo-Scientific (Schwerte, Deutschland)
DreamTaq™-Polymerase	Thermo-Scientific (Schwerte, Deutschland)
Ferredoxin-NADP ⁺ -Reduktase aus <i>Spinacia oleracea</i>	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Phusion®-Polymerase	Thermo-Scientific (Schwerte, Deutschland)
Restriktionsenzyme (<i>Bsal</i> , <i>Dpnl</i>)	Thermo-Scientific (Schwerte, Deutschland)
T4-DNA-Ligase	Thermo-Scientific (Schwerte, Deutschland)

2.1.4 Antibiotika

Zur Gewährleistung der Reinheit von Kulturen und als Selektionsmarker bei Klonierungen wurden die nachfolgend aufgelisteten Antibiotika mit den genannten Konzentrationen in den entsprechenden Lösungsmitteln verwendet (Tab. 2).

Tab. 2. Antibiotika und deren eingesetzte Konzentrationen, sowie Lösungsmittel.

Antibiotikum	Lösungsmittel	Endkonzentration (mg L ⁻¹)
Ampicillin	50 % [v/v] Ethanol	100
Cefoxitin	H ₂ O _{dest}	50
Kanamycin	H ₂ O _{dest}	50
Tetrazyklin	50 % [v/v] Ethanol	10

2.1.5 Software

Die nachfolgende Tabelle (Tab. 3) enthält eine Auflistung der Software, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet wurde.

Tab. 3. Verwendete Software. Die Hersteller sind kursiv verzeichnet.

Software	Verwendung
UCSF Chimera <i>Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics, University of California</i>	Visualisierung von Proteinmodellen
Chromas Lite 2.01 <i>Technelysium Pty Ltd</i>	Analyse von DNA-Sequenzen
Clone Manager Professional 9.2 <i>Scientific and Educational Software</i>	Planung und <i>in silico</i> -Durchführung von Klonierungsstrategien, Erstellung von Vektorkarten
GraphPad Prism 7.0 <i>GraphPad Software Inc.</i>	Analyse von Enzymkinetiken
Microsoft Excel 2016 <i>Microsoft</i>	Datenanalyse und -auswertung
Phyre2 <i>Structural Bioinformatics Group, Imperial College, London</i>	Proteinmodellierung
Primer 3 <i>European Research Infrastructure for Biological Information (ELIXIR)</i>	Generierung von Primern für RT-qPCR

Primer D'Signer <i>IBA</i>	Generierung von Klonierungsprimern zur Insertion von DNA-Fragmenten in kommerziell erhältliche Plasmide (pASK-Vektoren)
Spectra Manager 1.54.03 <i>Jasco Corporation</i>	Generierung von Enzymkinetiken

2.2 Organismen, Vektoren, Plasmide und Primer

2.2.1 Primer

In dem Fall, dass es sich um Klonierungsprimer handelte und diese dafür vorgesehen waren, ein entsprechendes DNA-Fragment in einen Vektor zu klonieren, wurden die Primer mit Hilfe der Software Primer D'Signer (IBA, Göttingen, Deutschland) generiert. Primer, die für die quantitative RT-PCR (RT-qPCR) benötigt wurden, wurden mit Primer 3 (primer3.ut.ee/) entworfen. Hierbei war es besonders wichtig, dass sowohl die Schmelztemperaturen der einzelnen Primerpaare, als auch die Längen der DNA-Fragmente, die bei der Amplifizierung produziert wurden, annähernd übereinstimmten. Die Schmelztemperaturen lagen daher stets zwischen 50 und 62 °C. Die PCR-Produktlängen betragen 100 bis 200 Bp. Bei stark differierenden Produktlängen lässt sich kein quantitativer Vergleich zwischen verschiedenen Genen in Bezug auf deren Transkriptmengen ziehen, da generell mehr SYBR-Green an lange DNA-Fragmente als an kurze Fragmente bindet und dieses fälschlicherweise zur Annahme führen würde, dass ein Gen im Vergleich zu einem anderen Gen hochreguliert ist. Die vergleichbaren Schmelztemperaturen sind darüber hinaus notwendig, um zu gewährleisten, dass sich die Primerpaare aller Gene bei gleichen Bedingungen gleich gut an die DNA anlagern. Die folgende Tabelle (Tab. 4) enthält eine Auflistung aller verwendeten Primer, sowie deren Sequenz und Funktion.

Tab. 4. Verwendete Primer und ihre Eigenschaften. Bei Primern, mit denen eine Mutation in ein Gen eingeführt werden sollte, sind die Bereiche, in denen die Mutation vorliegt, unterstrichen dargestellt. Bei den hier gezeigten Sequenzen wurden stets Cystein-kodierende Codons (TGC) durch Serin-kodierende Codons ausgetauscht (TCG). Falls dem Terminus eines Primers Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme angehängt wurden, sind diese fett unterlegt. Diese waren stets spezifisch für das Enzym *Bsal*.

Bezeichnung	Zielstruktur	Sequenz (5' → 3')	Funktion
hdrD_C14_S_for	WP_019178460	CTCGCTTGCTTGC AA <u>TCGGGGT</u> - ACTGCGTACGC	Insertion einer Mutation (zum Cystein → Serin Austausch)
hdrD_C14_S_rev		GCGTACGCAGTAC CC <u>CGATTG</u> - CAAGCAAGCGAG	
hdrD_C77_S_for	WP_019178460	ACCGGCTGCG CC <u>CAGTCGGAG</u> - ACGGTCTGCCA	Insertion einer Mutation (Cystein → Serin)
hdrD_C77_S_rev		ATGGCAGACCGTCT CC <u>GACTG</u> - GGCGCAGCCGG	

hdrD_C185/6_S_for	WP_019178460	GGCGCGGACGAGTGGT <u>CGTCG</u> - ACCTCCCCGGCCCTA	Insertion einer Mutation (Cystein → Serin)
hdrD_C185/6_S_rev		TAGGGCCGGGGAGGT <u>CGACGA</u> - CCACTCGTCCGCGCC	
hdrD_C312/3_S_for	WP_019178460	AGGATGGCTCGAGGT <u>CGTCGG</u> - GCGCCGGAGGCGGC	Insertion einer Mutation (Cystein → Serin)
hdrD_C312/3_S_rev		GCCGCCTCCGGCGCC <u>CGACGA</u> - CCTCGAGCCCATCCT	
MMC_hdrD_for	WP_019178460	ATGGTAG GGTCTC AAATGGTAAA- AATG CCGGAATCAACAGAG	Klonierungs- primer zur Überproduktion von HdrD
MMC_hdrD_rev		ATGGTAG GGTCTC AGCGCTGGC- CTTCGAAGCGGAGGCCT	
atpB_for	WP_019178375	TGGGGTGAGTGATATCGTCG	RT-qPCR-Primer
atpB_rev		CGACATCACCAACTACTGCG	
echB_for	WP_019176385	AGTACCATGACGAAGGAGCC	RT-qPCR-Primer
echB_rev		CTCTTGAGGAAGCAGGGAGG	
ech2B_for	WP_019178472	GATCGCGTTCTTCATCTCCG	RT-qPCR-Primer
ech2B_rev		GATGGCCAGGATGATCAGGA	
fpoA_for	WP_019176183	TGGATTTGTGCCTCCGAT	RT-qPCR-Primer
fpoA_rev		TTTCGTTCTTTGCGTCCAGG	
hdrB_for	WP_019177711	CTTCTGGGTCCTGTCGAACT	RT-qPCR-Primer
hdrB_rev		CCAGTTCACCCAGGAAAAGC	
hdrD_q_for	WP_019178460	CCCTGGTCCACTATCCACTC	RT-qPCR-Primer
hdrD_q_rev		TCAAGGTGGACGAGGAGTTC	
hyd3_for	WP_019178464	ATAAATCCTCGGTCGTCCCC	RT-qPCR-Primer
hyd3_rev		TATGAGGTCCCCGAAGAAGC	
mtaC1_for	WP_019176359	ATAGATCTGAAGAGTGTA	RT-qPCR-Primer
mtaC1_rev		GCGGTAACGTCTCGCCT	
mtaC2_for	WP_019177725	TCAGACCTTGACGCAATT	RT-qPCR-Primer
mtaC2_rev		TCGGTGGTGTCAATCAATG	
mtaC3_for	WP_026069014	CCAGACTTTGATAATGTA	RT-qPCR-Primer
mtaC3_rev		TCAGTGACATCGTCTCTGG	
mtbC_for	WP_026069102	GTCTGCAAGAATCGAATT	RT-qPCR-Primer
mtbC_rev		TCCCCTTTCAAACGAGT	
mtmC1_for	WP_026068678	TGATGAAATGTTAGGACG	RT-qPCR-Primer
mtmC1_rev		CCCTTCCCGAGACCATTTC	

mtmC2_for mtmC2_rev	WP_026068679	AGAAGAAGTGCTGGCGT CCTTGGCTCAATCCGCTC	RT-qPCR-Primer
mtmC3_for mtmC3_rev	WP_049796371	ACAAGCTATATTGGCAGA CCCTTTCCCAGGCCTTGG	RT-qPCR-Primer
mtmC4_for mtmC4_rev	WP_019178518	GGACGAGATTCTAGCCAC CCCTTTCCCAGGCCGTTT	RT-qPCR-Primer
mttC_for mttC_rev	WP_026069100	CCAGATACTAGAAGACGC CTTCTCGCCGAATTTGC	RT-qPCR-Primer
mvhD_for mvhD_rev	WP_019177459	TTTATGGTCGCCTGGAACCT GAATCGCCCTGCTGAAGATG	RT-qPCR-Primer
ribos_for ribos_rev	WP_026068997 (ribosom. S15)	CTCATTCTCAGGGACCAGCA TGCATGTTCTCTTGTGGC	RT-qPCR-Primer
pASK_for pASK_rev	pASK-Vektor- Rückgrat	GAGTTATTTTACCACTCCCT CGCAGTAGCGGTAAACG	Screening auf Insertion v. DNA- Fragmenten in pASK-Vektoren

2.2.2 Organismen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die in Tab. 5 genannten Organismen verwendet, die größtenteils von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ; Braunschweig, Deutschland) bezogen wurden.

Tab. 5. Verwendete Organismen mit entsprechenden Genotypen. Alle Organismen wurden von der DSMZ bezogen, falls kein anderer Anbieter genannt ist.

Organismus	Genotyp	Referenz
<i>Clostridium pasteurianum</i>	Wildtyp	DSM 525
<i>Escherichia coli</i> : <i>E. coli</i> DH5	F ⁻ , Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15, 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>	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 und Jones 2008
<i>Methanomassiliicoccus luminyensis</i>	Wildtyp	DSM 25720
<i>Methanosarcina mazei</i> Gö1	Wildtyp	DSM 7222

Sowohl bei *E. coli* DH5 α , als auch bei *E. coli* BL21 (DE3) wurde jeweils auf ein kommerziell vertriebenes Derivat zurückgegriffen. Es handelte sich um Zellen des Typs NEB 5 alpha bzw. T7 express von New England Biolabs (NEB; Frankfurt a. M., Deutschland).

2.2.3 Vektoren und Plasmide

Die Vektoren, die im Rahmen der vorliegenden Dissertation verwendet bzw. generiert wurden, sind der folgenden Tabelle (Tab. 6) zu entnehmen.

Tab. 6. Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide und ihr Verwendungszweck.

Bezeichnung	Funktion	Referenz
pASK-IBA3	Klonierungsvektorrückgrat	IBA (Göttingen, Deutschland)
pASK3_MMC_hdrD	pASK-IBA3-Derivat, Produktion des rekombinanten HdrD-Proteins aus <i>M. luminyensis</i>	Diese Arbeit
pASK3_MMC_hdrD_C14S	Produktion von HdrD mit Cys→Ser Austausch an Position 14	Diese Arbeit
pASK3_MMC_hdrD_C77S	Produktion von HdrD mit Cys→Ser Austausch an Position 77	Diese Arbeit
pASK3_MMC_hdrD_C185S/ C186S	Produktion von HdrD mit Cys→Ser Austausch an Positionen 185 + 186	Diese Arbeit
pASK3_MMC_hdrD_C312S/ C313S	Produktion von HdrD mit Cys→Ser Austausch an Positionen 312 + 313	Diese Arbeit
pPR_mm_2093+4	Produktion der rekombinanten IOR aus <i>Ms. mazei</i>	C. Welte, Radboud Universität Nijmegen, Niederlande
pRKISC	Produktion von Eisen-Schwefel-Cluster-bindenden Proteinen in <i>E. coli</i>	Yamamoto <i>et al.</i> 1997

2.3 Mikrobiologische Methoden

2.3.1 Kultivierung von *Cl. pasteurianum*

Cl. pasteurianum wurde anaerob in Glukose-Hefeextrakt-Medium bei 30 °C ohne Schütteln angezogen. Die Zusammensetzung des Mediums erfolgte nach Angaben der DSMZ, die für den Organismus das Medium DSM 54 vorsieht (Tab. 7).

Tab. 7. Zusammensetzung des DSM 54-Mediums zur Anzucht von *Cl. pasteurianum*.

Zusatz	Menge
Glukose	20 g
Hefeextrakt	10 g
CaCO ₃	20 g
H ₂ O _{dest}	ad 1000 mL

Das Medium wurde zur Anaerobisierung für ca. 7 min mit N₂ durchgast und anschließend autoklaviert. Für die Isolierung von Ferredoxin aus *Cl. pasteurianum* wurden dem Medium vor dem Inokulieren 1,2 mM FeCl₃ (in Ethanol), 15 µM Eisenammoniumcitrat und 50 µM L-Cystein zugesetzt.

2.3.2 Kultivierung von *E. coli*

E. coli wurde in der vorliegenden Arbeit in verschiedenen Zusammenhängen als ‚molekularbiologisches Werkzeug‘ genutzt. Dabei erfolgte die Anzucht bei unterschiedlichen Bedingungen.

E. coli-Stämme, die rekombinante Plasmide zur Überproduktion von bestimmten Proteinen trugen und zur Vervielfältigung der Plasmide beitrugen, wurden standardmäßig in *Lysogeny Broth*-Medium (LB-Medium) angezogen, dessen Zusammensetzung in Tab. 8 dargestellt ist. Die aerobe Inkubation dieser *E. coli*-Stämme erfolgte bei 37 °C und 180 upm, um eine ausreichende Sauerstoffzufuhr zu gewährleisten. Sollten die Organismen auf LB-Agarplatten angezogen werden, wurde dem Medium vor dem Autoklavieren 1,5 % [w/v] Agar zugesetzt.

Tab. 8. Zusammensetzung des ‚Lysogeny Broth‘-Mediums für die Anzucht von *E. coli*.

Zusatz	Menge
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
Trypton	10 g
H ₂ O _{dest}	ad 1000 mL

Sollte *E. coli* zur Überproduktion von sauerstoffsensitiven Proteinen angezogen werden, erfolgte die Anzucht der Vorkultur zwar wie oben beschrieben unter aeroben Bedingungen, die Anzucht der Hauptkultur jedoch größtenteils unter anaeroben Bedingungen. Hierzu wurde ein Protokoll von Kuchenreuther *et al.* (2010) verwendet, bei dem der rekombinante *E. coli*-Stamm, der das Überproduktionsplasmid des sauerstoffsensitiven Proteins trug, bis zur Induktion der Überproduktion

aerob kultiviert wurde. Erst nach der Induktion wurde das Anzuchtgefäß luftdicht verschlossen, sodass der Restsauerstoff von *E. coli* zum Teil selbst reduziert und somit verbraucht wurde, und anaerobe Bedingungen geschaffen wurden.

Im Detail erfolgte die Anzucht von *E. coli* zur Überproduktion sauerstofflabiler Proteine in modifiziertem Miller-LB-Medium, dessen Zusammensetzung Tab. 9 zu entnehmen ist. Glukose fungierte in diesem Zusammenhang als Kohlenstoffquelle und wurde von *E. coli* anaerob durch gemischte Säuregärung umgesetzt. Dies führt prinzipiell zu einer Ansäuerung des Mediums, weswegen das Medium MOPS-Puffer enthielt, um diesem Effekt entgegen zu wirken. Darüber hinaus wurden vor der Inokulation 2 mM Eisenammoniumcitrat aus einer sterilen Stammlösung hinzugegeben, was insbesondere der Produktion von Proteinen mit Eisen-Schwefel-Clustern (hier: HdrD) zuträglich war. Bei Erreichen der gewünschten optischen Dichte erfolgte die Induktion (2.5.1). Darüber hinaus wurden der Kultur 2 mM Cystein und 25 mM Natriumfumarat hinzugefügt. Während Cystein vorwiegend als Reduktionsmittel wirkte und für anaerobe Bedingungen sorgte, verhinderte der Zusatz von Fumarat, dass nach Verbrauch der Glukose eine Umstellung des Metabolismus auf andere Gärungsprozesse erfolgte. Stattdessen setzte *E. coli* nun Fumarat um, was höhere Zellerträge im Vergleich zu denen gärender Zellen zur Folge hatte und so schließlich die Proteinausbeute erhöhte.

Tab. 9. Zusammensetzung des modifizierten Miller-LB-Mediums. Das Medium wurde verwendet, um sauerstoffsensitive Eisen-Schwefel-Proteine in *E. coli* überzuproduzieren (hier: HdrD).

Zusatz	Menge
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
Trypton	10 g
Glukose	4,5 g
MOPS	20,9 g
→ pH 7,4 mit NaOH einstellen	
H ₂ O _{dest}	ad 1000 mL

Ein weiteres Protokoll für die Anzucht von *E. coli*-Stämmen, die sauerstoffsensitive, Eisen-Schwefel-Cluster-tragende Proteine überproduzieren sollten, wurde für die Indolpyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase aus *Ms. mazei* verwendet. Hierbei wurde *E. coli* in *Maximum Induction-Medium* (MI-Medium; Tab. 10) angezogen. Vor dem Beimpfen wurde diesem Komplexmedium 0,1 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄ und 1 µM Eisenammoniumcitrat zugesetzt. Des Weiteren wurde das Medium 1 x mit M9-Salzlösung versetzt (Tab. 11). Neben diesen Zusätzen wurden außerdem FeSO₄ (100 µM), Cystein (1 mM) und Natriumsulfid (30 µM) hinzugegeben.

Tab. 10. MI-Basismedium.

Zusatz	Menge
Trypton	32 g
Hefeextrakt	20 g
H ₂ O _{dest}	ad 1000 mL

Tab. 11. 20 x M9-Salzlösung.

Zusatz	Menge
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	120 g
KH ₂ PO ₄	60 g
NaCl	10 g
NH ₄ Cl	20 g
H ₂ O _{dest}	ad 1000 mL

2.3.3 Anzucht von methanogenen Organismen

Sowohl die Anzucht von *Ms. mazei*, als auch die Anzucht von *M. luminyensis* erfolgte in Komplexmedium nach Hippe *et al.* (1979).

Tab. 12. Basismedium.

Zusatz	Menge
K ₂ HPO ₄	0,35 g
KH ₂ PO ₄	0,23 g
NH ₄ Cl	0,5 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,5 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,25 g
NaCl	2,25 g
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,002 g
Wolin-Lsg. (10x)	1 mL
SL-6	0,3 mL
Hefeextrakt	2 g
Casiton	2 g
NaHCO ₃	0,85 g
Resazurin	0,001 g
Natriumacetat	1 g
→ pH 8,5 mit NaOH einstellen	
H ₂ O _{dest}	ad 1000 mL

Tab. 13. 10 x SL-6.

Zusatz	Menge
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	100 mg
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	30 mg
H ₃ BO ₃	300 mg
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	200 mg
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	10 mg
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	20 mg
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	30 mg
H ₂ O _{dest}	ad 1000 mL

Tab. 14. 10 x Wolin-Lsg.

Zusatz	Menge
Biotin	20 mg
Folat	20 mg
Pyridoxin-HCl	100 mg
Thiamin-HCl x 2 H ₂ O	50 mg
Riboflavin	50 mg
Nicotinsäure	50 mg
D-Ca-Pantothenat	50 mg
Vitamin B ₁₂	1 mg
p-Aminobenzoat	50 mg
Liponsäure	50 mg
H ₂ O _{dest}	ad 1000 mL

Nach Herstellung des Mediums (Tab. 12-14) wurde der pH-Wert zunächst mit NaOH auf pH 8,5 titriert. Zur Einstellung des Carbonat-Puffersystems wurde der pH-Wert durch N₂/CO₂-Begasung (Verhältnis 80:20) auf pH 7 herabgesetzt. Dieser pH-Wert entsprach im Wesentlichen dem pH-Optimum beider Organismen. Darüber hinaus sorgte die Begasung größtenteils für die Entfernung des Sauerstoffes aus dem Medium. Die Kulturgefäße wurden nach dem Begasen luftdicht verschlossen und autoklaviert. Vor dem Inokulieren wurden 2,5 mM Cystein, 3,8 mM Natriumsulfid und ein entsprechendes Wachstumssubstrat aus sterilen, anaeroben Stammlösungen zugesetzt.

Darüber hinaus wurden zur Vorbeugung bakterieller Kontaminationen Antibiotika hinzugesetzt. Bei *Ms. mazei* handelte es sich hierbei um Ampicillin (100 mg L⁻¹) und bei *M. luminyensis* um Ampicillin (100 mg L⁻¹) und Tetrazyklin (10 mg L⁻¹), oder Ampicillin (100 mg L⁻¹) und Cefoxitin (50 mg L⁻¹).

2.3.4 Stammhaltung von Organismen

Zur dauerhaften Lagerung wurden *E. coli*-Stämme über Nacht in LB-Medium angezogen. Danach wurden 800 µL der Kulturen mit 200 µL sterilem 100 %-igem DMSO oder 75 %-igem [v/v] Glycerol versetzt und bei -70 °C aufbewahrt.

Die Lagerung von anaeroben Organismen erfolgte ebenfalls bei -70 °C. Allerdings wurden die Glasgefäße (Volumen: 7-9 mL), in denen die Lagerung stattfand, vor Zugabe der Organismen für 5 min mit 100 % H₂ begast. Erst dann wurden jeweils 2 mL einer exponentiellen Kultur in ein begastetes Gefäß gegeben, mit 2 mL anaerober 50 %-iger [w/v] Saccharose versetzt und direkt in den -70 °C-Gefrierschrank überführt. Während des Auftauens wurden die Zellen mit 100 % H₂ begast bis die Suspension vollständig flüssig war.

2.3.5 Messung der optischen Dichte

Der Wachstumsverlauf der prokaryotischen Kulturen wurde in dieser Arbeit photometrisch bestimmt. Dazu wurde zu einem gewünschten Zeitpunkt 1 mL der Kultur steril entnommen und in eine Plastikkuvette mit einer Schichtdicke von 1 cm überführt. Die Messung der optischen Dichte erfolgte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀). Die Wellenlänge wurde gewählt, da in diesem Bereich nahezu ausschließlich Lichtstreuung und keine Absorption stattfindet. Um Mehrfachstreuungen und somit eine Verfälschung der Ergebnisse auszuschließen, wurde ab einer OD₆₀₀ von 0,3 mit unbeimpftem Medium verdünnt.

Bei der Messung der OD₆₀₀ anaerober Kulturen wurde eine Spatelspitze Natriumdithionit zur Probe hinzugegeben, um das als Redoxindikator enthaltene Resazurin kurzfristig zu reduzieren. Dieses ist im reduzierten Zustand farblos und verfälscht die OD₆₀₀-Messungen so nicht.

2.3.6 Bestimmung von Wachstumsparametern

Zur Berechnung der Wachstumsrate μ wurde zunächst über die Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm (2.3.5) zu verschiedenen Zeitpunkten eine Wachstumskurve erstellt. Über die logarithmierte Auftragung der OD_{600} ($\ln OD_{600}$) gegen die Zeit, ließ sich die exponentielle Wachstumsphase einer Kultur ermitteln. Die Steigung der logarithmierten OD_{600} im exponentiellen Bereich entsprach der Wachstumsrate μ . Diese berechnete sich nach Formel 1. Auf Grundlage der Wachstumsrate konnte auch die Verdopplungszeit der Kultur berechnet werden (t_d ; siehe Formel 2).

$$\text{Formel 1:} \quad \mu = \frac{\ln\left(\frac{N_t}{N_0}\right)}{(t-t_0)}$$

$$\text{Formel 2:} \quad t_d = \frac{\ln(2)}{\mu}$$

Hier entsprach N_t der OD_{600} am Ende des Messintervalls und N_0 der OD_{600} am Anfang der Messung. Der gesamte Zeitraum musste in der exponentiellen Phase liegen. Der Term $t-t_0$ gab die Länge des Messintervalls wieder.

2.3.7 Präparation von ruhenden Zellen

Ruhende Zellen werden hergestellt, indem eine exponentielle Kultur geerntet wird und alle Komponenten, die zum Wachstum benötigt werden, durch Waschschriffe entfernt werden. Hierbei ist es essentiell, dass der Waschpuffer keine Komponenten mehr enthält, die für anabolische oder katabolische Prozesse genutzt werden können. Aufgrund dessen gehen die Zellen in einen ruhenden Zustand über, können jedoch durch die Zugabe geeigneter Substrate wieder zur Aufnahme des Energiestoffwechsels angeregt werden, wobei Zellwachstum aufgrund fehlender Wachstumssubstrate weiterhin ausbleibt.

Zur Herstellung von ruhenden *M. luminyensis*-Zellen wurde eine 500 mL-Kultur bis zur Mitte der exponentiellen Phase ($OD_{600} = 0,1-0,2$) angezogen (2.3.3) und per Zentrifugation geerntet (17.000 x g, 30 min, 10 °C). Dann wurden die Zellen zweimal mit Stabilisierungspuffer (SB-Puffer; Tab. 15) gewaschen (17.000 x g, 30 min, 10 °C) und in 6 bis 12 mL SB-Puffer aufgenommen (entsprach drei bis sechs Suspensionen mit je 2 mL). Zum Äquilibrieren und vollständigen Aushungern der Zellen wurden diese 5 bis 10 min bei 37 °C und 180 upm inkubiert. Des Weiteren wurden die Suspensionen jeweils 30 s mit 100 % H_2 übergast. Zur Initiierung der Methanbildung, die dem Erhaltungsstoffwechsel von *M. luminyensis* zugrunde liegt, wurden die Zellen mit MMA, DMA, TMA oder Methanol versetzt (Konzentration je nach Versuch). Die einsetzende Methanbildung wurde gaschromatographisch verfolgt (2.6.2).

Um zu testen, ob sich die Zugabe verschiedener Substanzen (ETH157, SF6847, Bromoethansulfonat) auf die Methanbildung auswirkt, wurden diese nach Zugabe des methylierten Substrates, sobald eine stabile Methanbildungsrate erreicht war, zu den Zellsuspensionen hinzupipettiert (ETH157/SF6847: 10 μ M, BES: 20 mM).

Tab. 15. Zusammensetzung des SB-Puffers zur Generierung von ruhenden Zellen. Der pH-Wert des Puffers liegt ohne Titration bei pH 7,4, was im Wesentlichen dem Optimum von *M. luminyensis* entspricht (Dridi *et al.* 2012a), sodass der pH-Wert nicht angepasst werden muss.

Zusatz	Konzentration (mM)
NaCl	17
KCl	6,7
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1,9
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,7
NH ₄ Cl	5,7
KH ₂ PO ₄	1,5
Na ₂ SO ₄	1,1
BisTris	20
Saccharose	200

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Isolierung von Plasmiden wurde eine 2 bzw. 10 mL-Kultur des *E. coli*-Stammes, der das Zielplasmid trug, in LB-Medium über Nacht bei 37 °C und 180 upm angezogen. Das Volumen der Kultur wurde hierbei an die Kopienzahl des Plasmids angepasst, wobei 2 mL Kultur für *high copy*-Plasmide und 10 mL für *low copy*-Plasmide verwendet wurden. Die Plasmid-Präparation erfolgte nach Herstellerangaben mit Hilfe des GeneJet™ Plasmid Miniprep Kits (Thermo-Scientific, Schwerte, Deutschland).

2.4.2 Isolierung von RNA

Um die Gesamt-RNA aus dem Organismus *M. luminyensis* zu isolieren, wurde eine Extraktion mittels TRI Reagent® (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) durchgeführt. Hierzu wurde eine 500 mL *M. luminyensis*-Kultur bis zur Mitte der exponentiellen Phase (OD₆₀₀ = 0,1-0,2) angezogen, entgast und vor der Ernte in -70 °C kaltem Ethanol für wenige Minuten abgekühlt. Danach wurden die Zellen aerob per Zentrifugation geerntet (17.000 x g, 30 min, 4 °C) und das Zellpellet wurde in 5 mL TRI Reagent® aufgenommen. Die Suspension wurde zu jeweils 1 mL in 2 mL-Eppendorfgefäße aufgeteilt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die Zellen aufzuschließen. Alle nun folgenden Schritte wurden unter der Sterilbank durchgeführt, um Kontaminationen durch RNasen entgegen zu wirken. Zu je 1 mL

der Zell-TRI-Reagent-Suspension wurden 100 µL 1-Bromo-3-chloropropan hinzugegeben. Zur Beschleunigung der Abtrennung der 1-Bromo-3-chloropropan-Phase von der TRI-Reagent-Phase wurde der Ansatz 10 min bei 4 °C und 20.000 x g zentrifugiert. Die oberen Phasen der einzelnen Aliquots wurden vereinigt, mit 500 µL Isopropanol versetzt und für 5-10 s gemischt. Danach wurde der Ansatz für 5-10 min bei -20 °C inkubiert, um 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. Danach wurde erneut kurz zentrifugiert (20.000 x g, 5 min, 4 °C) und das Pellet wurde unter der Sterilbank getrocknet. Das Nukleinsäurepellet, das zu diesem Zeitpunkt noch RNA und DNA enthielt, wurde in 90 µL H₂O_{reinst} aufgenommen und mit 10 µL 10 x DNase-Puffer versetzt. Dann wurden 5 µL DNase I hinzugegeben und der Ansatz wurde für 2 h bei 37 °C inkubiert, sodass es zum Abbau der DNA kam. Danach wurden erneut 5 µL DNase I hinzupipettiert und es wurde für eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Aufreinigung der RNA erfolgte nach dem DNase-Verdau mit Hilfe des RNA Clean & Concentrator™-5 Kits nach Herstellerangaben (Zymo Research, Freiburg, Deutschland).

2.4.3 Bestimmung von RNA- und DNA-Konzentrationen

Die Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen erfolgte mit Hilfe des BioPhotometers D30 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Dieses misst die Absorption bei 260 nm (A_{260}), welche charakteristisch für Nukleinsäuren ist, und berechnet hierrüber deren Konzentration. Als Leerwert der Messung wurde H₂O_{reinst} verwendet, da sowohl RNA, als auch DNA final in H₂O_{reinst} gelöst wurden. Die Messeinheit gibt auch die Verhältnisse A_{260}/A_{280} und A_{260}/A_{230} aus, welche ein Maß für Kontaminationen durch Proteine (A_{280}) und Lösungsmittel (A_{230}) sind. Bei reiner DNA und RNA liegen die Verhältnisse jeweils idealerweise bei 1,8 bis 2.

2.4.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren zur *in vitro*-Amplifizierung von DNA (Mullis *et al.* 1986). Hierbei werden sequenzspezifische Oligonukleotide, sogenannte Primer, verwendet, die an komplementäre DNA-Bereiche binden und als Ausgangspunkte für die DNA-Synthese durch die DNA-Polymerase fungieren (2.2.1). Die Temperatur, bei der sich die Primer an die DNA anlagern, liegt stets etwa 5 °C unterhalb der Schmelztemperatur der Primer. Für die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Primer wurde immer eine Anlagerungstemperatur von 55 °C in der PCR gewählt.

Die Phusion®-Polymerase (Thermo-Scientific, Schwerte, Deutschland) wurde bei PCR-Ansätzen verwendet, in denen Fragmente generiert wurden, die in Überexpressionsvektoren kloniert werden sollten. Diese Polymerase zeichnet sich durch eine schnelle Syntheserate (etwa 1 kB pro 15 s) und eine geringe Fehlerrate aus, da sie über eine 3'→5'-Korrekturlesefunktion verfügt. Die Zusammensetzung eines Phusion®-PCR-Ansatzes, sowie das entsprechende Programm, das mit Hilfe des MyCyclers™ (BioRad, München, Deutschland) gefahren wurde, sind in Tab. 16 und in Tab. 17 zu finden.

Tab. 16. Zusammensetzung einer Phusion®-basierten PCR. Als *forward*-Primer wurde der Primer bezeichnet, der an den Leitstrang anlagerte, während der *reverse*-Primer spezifisch an den Folgestrang band.

Zusatz	Menge (µL)
10 x HF- oder GC-Puffer (je nach Sequenz)	10
25 mM dNTPs	0,5
10 pmol µL ⁻¹ <i>forward</i> -Primer	0,5
10 pmol µL ⁻¹ <i>reverse</i> -Primer	0,5
100 % DMSO	2,5
Phusion®-Polymerase	0,2
DNA-Matrize	1
H ₂ O _{reinst}	ad 50

Als DNA-Matrize wurde bei der Phusion®-PCR Rohextrakt von *M. luminyensis* verwendet. Hierfür wurden zuerst 10 mL einer Kultur per Zentrifugation geerntet. Das Pellet wurde in 1 mL H₂O_{reinst} resuspendiert und 1 µL dieser Suspension wurde pro PCR-Ansatz eingesetzt.

Tab. 17. Ablauf einer Phusion®-basierten PCR. Die Anlagerungstemperatur betrug bei allen im Rahmen dieser Arbeit verwendeten PCR-Ansätzen 55 °C. Generell ist diese jedoch von der Basensequenz des Primers abhängig und kann von dem hier beschriebenen Wert abweichen.

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (s)	
Initiale Denaturierung	95	420	
Denaturierung	95	30	} 30 x
Anlagerung der Primer	55	30	
Elongation	72	15 s pro kB	
Finale Elongation	72	420	
Lagerung	12	∞	

Bei analytischen PCR-Ansätzen (Screening-PCR) wurde dagegen die DreamTaq™-Polymerase verwendet. Die Screening-PCR kam beim Überprüfen von Klonen auf die erfolgreiche Insertion eines DNA-Fragments in einen Vektor nach Ligation und Transformation zum Einsatz. Die DreamTaq™-Polymerase besitzt keine Korrekturlesefunktion und zeichnet sich durch eine Syntheserate von 1 kB pro min aus. Da PCR-Produkte analytischer PCR-Ansätze nicht für Klonierungen o. ä. verwendet wurden,

war das Auftreten von Fehlern in der Sequenz nicht weiter von Bedeutung. Die Zusammensetzung einer DreamTaq™-basierten PCR ist in Tab. 18 zu sehen.

Tab. 18. Zusammensetzung eines DreamTaq™-PCR-Ansatzes.

Zusatz	Menge (µL)
10 x DreamTaq™ Green Buffer	2,5
25 mM dNTPs	0,125
10 pmol µL ⁻¹ <i>forward</i> -Primer	0,125
10 pmol µL ⁻¹ <i>reverse</i> -Primer	0,125
100 % DMSO	1
DreamTaq™-Polymerase	0,125
DNA-Matrize	5
H ₂ O _{reinst}	ad 25

Der Ablauf der DreamTaq™-basierten PCR fand analog zum PCR-Programm der Phusion™-basierten PCR statt (Tab. 17), wobei die Elongationszeit jedoch aufgrund der geringeren Syntheserate verlängert wurde. Als DNA-Matrize wurde bei der Screening-PCR Zellmaterial einer auf Agarplatten angewachsenen Kolonie verwendet. Das Zellmaterial wurde steril entnommen und in 20 µL H₂O_{reinst} resuspendiert. 5 µL dieser Suspension wurden jeweils in einen Screening-PCR-Ansatz eingesetzt.

2.4.5 DNA-Auftrennung mittels Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese kommt zum Einsatz, wenn DNA-Fragmente ihrer Größe entsprechend aufgetrennt werden sollen. Aufgrund des teilweise negativ geladenen Rückgrats migriert die DNA im elektrischen Feld in Richtung Anode. Die Agarose, die im Gel enthalten ist, fungiert dabei als molekulares Sieb, wobei kleine DNA-Fragmente wegen sterischer Beeinträchtigungen schneller durch das Agarosesieb migrieren als größere Fragmente und es so zur Auftrennung entsprechend der Größe kommt.

Je nach Größe der DNA-Fragmente wurde die Agarose 1 bis 2 %-ig [w/v] in 1 x TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 10 mM EDTA, pH 8,5) durch Aufkochen gelöst. Die DNA-Proben wurden mit Ladepuffer (6 x Konzentrat; 0,125 % [w/v] Bromphenolblau, 20 % [w/v] Saccharose) versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 80 V für ca. eine Stunde. Als Größenstandard wurde je nach erwarteter DNA-Fragmentgröße der GeneRuler 1 kB (Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland) oder der O'GeneRuler 50 Bp (Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland) verwendet.

Zur Visualisierung der DNA wurde GelRed® (Biotium, Fremont, USA) nach Herstellerangaben verwendet. Der Farbstoff interkaliert mit der DNA und fluoresziert unter UV-Licht, sodass die DNA nach Inkubation in GelRed® unter UV-Licht sichtbar wird.

2.4.6 RNA-Auftrennung mittels denaturierender Agarose-Gelelektrophorese

Zur Herstellung eines denaturierenden Gels, mit dem RNA elektrophoretisch aufgetrennt werden kann, wurden zunächst 0,5 g Agarose in 36 mL H₂O_{dest} durch Aufkochen gelöst. Anschließend wurden 5 mL 10 x MOPS-Puffer (400 mM MOPS, 100 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA, pH 7) und 9 mL 37 % [v/v] Formaldehyd hinzugegeben. Das Gel wurde in eine Elektrophoresekammer eingefüllt und härtete dort aus. Dann wurden 1 bis 3 µg RNA im Verhältnis 1:1 mit Ladebuffer (95 % [v/v] Formamid, 18 mM EDTA, 0,025 % [w/v] SDS, 0,02 % [w/v] Xylencyanol, 0,02 % [w/v] Bromphenolblau) versetzt. Die Proben wurden für 10 bis 15 min bei 65 °C inkubiert und noch heiß in die Geltaschen pipettiert. Vor dem Auftragen der Proben wurde das Gel mit 1 x MOPS überschichtet. Die Elektrophorese wurde für eine Stunde bei 80 V betrieben. Danach erfolgte wie auch bei der DNA-Elektrophorese die Färbung der RNA mit GelRed® (2.4.5).

2.4.7 Quantitative Reverse Transkriptions-PCR (RT-qPCR)

Die RT-qPCR ist ein Verfahren zur relativen Quantifizierung der mRNA eines Zielgens im Vergleich zu einem konstitutiv exprimierten Gen. Die Methode ermöglicht somit Aussagen darüber, ob ein Gen unter bestimmten Bedingungen stärker oder schwächer exprimiert wird, da sich das Verhältnis der mRNA dieses Gens zu der mRNA des konstitutiv exprimierten Gens verschiebt, wenn es hoch- oder herunterreguliert wird. Dem Versuch zugrunde liegt die reverse Transkription. Hierbei wird die Gesamt-RNA enzymatisch durch die reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Danach erfolgt eine PCR mit Primern, die für die Zielgene spezifisch sind, sodass aus dem Gesamt-cDNA-Pool nur bestimmte Sequenzen amplifiziert werden. Je mehr mRNA eines Gens als Ausgangsmatrix für die reverse Transkription zur Verfügung steht, desto mehr cDNA des entsprechenden Gens wird letztendlich produziert. Da die cDNA die Ausgangsmatrix für die folgende PCR ist, werden bei hochregulierten Genen früher große Mengen an PCR-Produkten generiert. Zur Detektion und Quantifizierung der PCR-Produkte wird ein Farbstoff, beispielsweise SYBR Green, eingesetzt. Dieser bindet an die doppelsträngige DNA, die während der PCR generiert wird. Wird die DNA aufgeschmolzen, wird SYBR Green wieder freigesetzt und kann optisch detektiert werden. Mit Hilfe eines PCR-Apparates, der über einen optischen Detektor verfügt, kann das SYBR Green-Signal erkannt und quantifiziert werden. Das Schmelzen der DNA-Doppelstränge findet nach jedem Elongationsschritt in einer Schmelzkurve statt, bei der die Temperatur schrittweise erhöht wird bis der Doppelstrang aufgetrennt und SYBR Green freigesetzt wird. Die Schmelzkurve gibt Auskunft über die Spezifität der Primer in einem Ansatz, da sich weitere (unspezifische) Amplifikate in zusätzlichen Signalen in der Schmelzkurve widerspiegeln würden.

Die RT-qPCR wurde in der vorliegenden Arbeit mit dem QRT-PCR One Step Kit LRox (biotech rabbit, Hennigsdorf, Deutschland) nach Herstellerangaben durchgeführt, wobei die Primerkonzentration $5 \text{ pmol } \mu\text{L}^{-1}$ betrug und $200 \text{ ng RNA pro } 20 \text{ } \mu\text{L}$ -Ansatz eingesetzt wurden. Das Programm, welches die reverse Transkription, die eigentliche PCR und die Detektion des SYBR Green-Signals in der Schmelzkurve beinhaltet, ist in Tab. 19 dargestellt. Der Versuch wurde im CFX Connect™ Cyclor (Biorad, München, Deutschland) durchgeführt. Dieser Cyclor verfügt standardmäßig über eine Software zur Bestimmung des *cycle threshold* (C_t -Wert) der Proben. Bei dem C_t -Wert handelt es sich um einen Wert, der angibt, bei welcher Wiederholung des PCR-Zyklus die Intensität des SYBR Green-Signals einen bestimmten Schwellenwert überschreitet. Je mehr mRNA und somit cDNA in einem Ansatz ist, desto früher überschreitet das Signal den Schwellenwert und desto niedriger ist der C_t -Wert.

Die Berechnungen des ΔC_t -Wertes und des Quotienten ($\Delta\Delta C_t$), der das Verhältnis der Transkript-abundanzen vom Zielgen zum Referenzgen angibt, wurde anhand der Formeln 3 und 4 berechnet:

$$\text{Formel 3:} \quad \Delta C_t = C_{t \text{ Zielgen}} - C_{t \text{ S15}}$$

$$\text{Formel 4:} \quad \Delta\Delta C_t = 2^{-\Delta C_t}$$

Tab. 19. Programm einer RT-qPCR. Der hier gezeigte Ablauf ist angepasst auf das QRT-PCR One Step Kit LRox (biotech rabbit, Hennigsdorf, Deutschland). Die Detektion des SYBR Green-Signals erfolgte nach jeder Temperaturerhöhung in der Schmelzkurve.

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (s)	
Reverse Transkription	45-55	600	
Initiale Aktivierung	95	120	
Denaturierung	95	5	} 40 x
Anlagerung der Primer	55	30	
Elongation	60	15 s pro kB	
Schmelzkurve	35 – 95	jeweils 5 s	

Bei allen RT-qPCR-Ansätzen wurde zuvor eine Standard-PCR (2.4.4) ausgehend von den RNA-Präparationen durchgeführt. DNA-Polymerasen binden generell nur an DNA und nicht an RNA, sodass davon ausgegangen werden kann, dass keine DNA-Kontaminationen in den RNA-Proben enthalten waren, wenn kein PCR-Produkt entstand. Um dieses Ergebnis noch einmal zu verifizieren, wurde bei der RT-qPCR außerdem eine Kontrolle mitgeführt, die keine reverse Transkriptase enthielt. Auch diese Kontrolle sollte in dem Fall, dass die RNA-Präparationen keine DNA-Kontaminationen aufwiesen, negativ ausfallen, d. h. den Schwellenwert nicht oder erst sehr spät überschreiten.

Die Zusammensetzung eines RT-qPCR-Ansatzes ist in Tab. 20 gezeigt. Bei der Negativkontrolle, die keine reverse Transkriptase enthielt, wurde das entsprechende Volumen durch $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ ersetzt.

Tab. 20. Zusammensetzung eines RT-qPCR-Ansatzes. Die Mengenangaben der genannten Komponenten wurden den Herstellerangaben des QRT-PCR One Step LRox Kits (biotech rabbit, Hennigsdorf, Deutschland) entsprechend angepasst.

Zusatz	Menge (μL)
qPCR Green Mix (Puffer)	1
100 ng μL^{-1} RNA	2
5 pmol μL^{-1} <i>forward</i> -Primer	1
5 pmol μL^{-1} <i>reverse</i> -Primer	1
Reverse Transkriptase	1
H ₂ O _{reinst}	ad 20

2.4.8 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die in der Lage sind, den DNA-Doppelstrang an einer definierten Stelle zu schneiden. Hierbei können sogenannte *sticky ends* oder *blunt ends* entstehen. Bei *sticky ends* handelt es sich um Schnittstellen, die 5'- oder 3'-Überhänge besitzen. Sollen an überlappende Enden DNA-Segmente angehängt werden, ist es essentiell, dass diese komplementäre Überhänge aufweisen. Bei der Generierung von *blunt ends* dagegen werden Leit- und Folgestrang an identischer Position geschnitten, wodurch keine Überhänge entstehen. An diese Enden können beliebige DNA-Sequenzen angehängt werden, die ebenfalls über glatte Enden verfügen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zum einen Typ III- (*Bsa*I, Klonierung), zum anderen Typ IV-Restriktionsenzyme (*Dpn*I, ortsspezifische Mutagenese) verwendet. Typ III-Restriktionsenzyme erkennen ihre Zielsequenzen zwar an einer bestimmten Position, schneiden die DNA jedoch an einer anderen Stelle wenige Basenpaare entfernt. Typ IV-Restriktionsenzyme wiederum erfassen bestimmte methylierte Erkennungssequenzen und verdauen diese.

Die Zusammensetzung eines enzymatischen Verdau ist in Tab. 21 dargestellt. Der Ansatz wurde für 2 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde erneut 1 μL des entsprechenden Restriktionsenzym hinzupipettiert und es wurde für eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert. Beim Verdau von Plasmiden wurde 30 min vor Ende der Inkubation die alkalische Phosphatase hinzugegeben. Diese entfernt die 5'-Phosphatenden, die beim Restriktionsverdau entstehen, sodass es nicht zur Religation des Vektors kommen kann, da die Abspaltung des 5'-Phosphats der Energie liefernde Schritt der Religation ist. Die Aufreinigung von Restriktionsverdau erfolgte mit Hilfe des GeneJet™ PCR Purification Kits (Thermo-Scientific, Schwerte, Deutschland) nach Herstellerangaben.

Tab. 21. Zusammensetzung eines Restriktionsverdaus.

Zusatz	Menge (μL)
PCR-Produkt oder Plasmid-DNA	10 bzw. 5
10 x Puffer (Enzym-spezifisch)	2
Enzym (<i>Bsal</i> oder <i>DpnI</i>)	1
H ₂ O _{reinst}	ad 20

2.4.9 Ligation

In der Ligation können DNA-Fragmente mit komplementären oder glatten Enden miteinander verknüpft werden, die im Zuge eines Restriktionsverdaus (2.4.8) generiert wurden. Der Prozess wird enzymatisch durch die T4-DNA-Ligase katalysiert, welche ATP-abhängig kovalente Bindungen zwischen 3'-Hydroxyenden und 5'-Phosphatenden knüpft. Ein Ligationsansatz setzte sich wie in Tab. 22 dargestellt zusammen, wobei es essentiell war, dass die Konzentration des PCR-Produktes, das in den Vektor inseriert werden sollte, die des Vektors deutlich überstieg.

Tab. 22. Zusammensetzung eines Ligationsansatzes.

Zusatz	Menge (μL)
PCR-Produkt	15
Vektor	2
10 x Ligationspuffer	2
T4-DNA-Ligase	1

Der Ansatz wurde 30-60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die T4-DNA-Ligase durch Hitze inaktiviert (10 min, 65 °C). Ein Teil des Ligationsansatzes (1-2 μL) wurde ohne vorherige Aufreinigung in kompetente Zellen mittels Transformation (2.4.10) eingebracht.

2.4.10 Transformation in chemisch-kompetente *E. coli*-Stämme

Zur Vervielfältigung von rekombinanten Plasmiden wurde ein kommerziell verfügbares, chemisch-kompetentes *E. coli* DH5 α -Derivat (NEB 5 alpha; NEB, Frankfurt a. M., Deutschland) verwendet. Durch genetische Modifikationen ist der Stamm in der Fähigkeit Fremd-DNA erkennen und abbauen zu können stark eingeschränkt und eignet sich daher gut für die Vervielfältigung von rekombinanten Konstrukten. Sollte nach Einbringen des rekombinanten Plasmids die Überexpression des Zielgens, welches in dem Plasmid enthalten war, stattfinden, wurde der Vektor in *E. coli* BL21 (DE3) transformiert. *E. coli* BL21

(DE3) ist aufgrund bestimmter Mutationen im Abbau von Proteinen beeinträchtigt, sodass das Zielprotein in großen Mengen produziert und intrazellulär akkumuliert werden kann, was für eine ergiebige Aufreinigung essentiell ist. Auch in diesem Fall wurde ein kommerziell erhältlicher *E. coli* BL21 (DE3)-Stamm verwendet (T7 express; NEB, Frankfurt a. M., Deutschland). Die Transformationen in NEB 5 alpha und T7 express wurden jeweils nach Herstellerangaben durchgeführt. Von Ligationsansätzen wurden jeweils 1-2 µL eingesetzt, von aufgereinigten Plasmiden nur 1 µL.

Die Überproduktion von Eisen-Schwefel-Cluster-haltigen Proteinen (hier: HdrD) wurde in einem speziellen *E. coli* BL21 (DE3)-Derivat durchgeführt. Dieses besitzt eine Deletion im *iscR*-Gen (*E. coli* BL21 (DE3) Δ *iscR*), welches für den Repressor des *isc*-Operons kodiert. Das *isc*-Operon (iron sulfur cluster) ist für die Assemblierung von Eisen-Schwefel-Clustern essentiell. Die Überexpression des *isc*-Operons aufgrund der Deletion des negativen Regulators IscR führt zur Effektivitätssteigerung bei der Produktion von Eisen-Schwefel-Cluster-haltigen Proteinen (Akhtar und Jones 2008; Kuchenreuther *et al.* 2010). Da kompetente *E. coli* BL21 (DE3) Δ *iscR*-Zellen nicht kommerziell erhältlich sind, wurden zunächst chemisch-kompetente Zellen des Stammes generiert. Dazu wurden 100 mL LB-Medium (2.3.2) mit einer ü. N. angezogenen Vorkultur inokuliert. Das Medium enthielt außerdem Kanamycin (50 mg L^{-1}), da das *iscR*-Gen durch eine Kanamycin-Resistenzkassette ersetzt ist. Dann wurden die Zellen bei 37 °C und 180 upm inkubiert bis eine OD_{600} von ca. 0,6 erreicht wurde. Die Zellen wurden für 20 min auf Eis abgekühlt und anschließend per Zentrifugation in sterilen Zentrifugenbechern geerntet ($14.000 \times g$, 10 min, 4 °C). Das Zellpellet wurde in 2,7 mL eiskaltem 0,1 M CaCl_2 aufgenommen und mit 2,7 mL 50 % [v/v] Glycerin versetzt. Die Suspension wurde zu jeweils 250 µL in sterile Eppendorfgefäße überführt und die Zellen wurden in Flüssigstickstoff bei -70 °C schockgefroren. Die Lagerung der Zellen erfolgte bis zur Verwendung bei -70 °C.

Zum Einbringen eines rekombinanten Plasmids in die chemisch-kompetenten *E. coli* BL21 (DE3) Δ *iscR*-Zellen wurden die Zellen zunächst für 10 min auf Eis aufgetaut. Dann wurden 1-2 µL des entsprechenden Plasmids hinzupipettiert und die Zellen wurden weiter für ca. 20 min auf Eis inkubiert, sodass sich die Plasmide an die Zellen anlagern konnten. Zur Aufnahme der Konstrukte ins Zellinnere wurde ein einminütiger Hitzeschock bei 42 °C durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen erneut für 10 min auf Eis inkubiert und schließlich mit 800 µL LB-Medium versetzt. Zur Regeneration wurde die Zellsuspension für eine Stunde bei 37 °C und 180 upm inkubiert. Danach wurde die Kultur geerntet (5 min , $20.000 \times g$) und das Zellpellet wurde in 100 µL LB-Medium aufgenommen. Davon wurden 10 bzw. 90 µL auf LB-Platten mit Kanamycin und dem entsprechenden Antibiotikum, dessen korrespondierendes Resistenzgen auf dem Plasmid kodiert war (z. B. Ampicillin bei pASK-Derivaten), ausplattiert und ü. N. bei 37 °C inkubiert.

Das Screening der Klone auf die Aufnahme eines Konstrukts ins Zellinnere erfolgte bei allen verwendeten Stämmen zunächst mittels Kolonie-PCR (2.4.4). Wurde ein Ligationsansatz in einen Stamm transformiert, wurden aus positiv getesteten Klonen Plasmide isoliert und zur Verifizierung sequenziert.

2.4.11 Ortsspezifische Mutagenese

Die ortsspezifische Mutagenese ist ein Verfahren zur gezielten Veränderung einer Gensequenz und somit der Aminosäuresequenz des Proteins, für die die Gensequenz kodiert. In dieser Arbeit wurde die ortsspezifische Mutagenese verwendet, um bestimmte Cysteine in HdrD, die für die Koordinierung von Eisen-Schwefel-Clustern verantwortlich gemacht wurden, durch Serine zu ersetzen und dadurch möglicherweise die Koordinierung der Cluster zu beeinträchtigen.

Ausgangspunkt der Mutagenese war der Überproduktionsvektor von HdrD (pASK3_MMC_hdrD). Des Weiteren wurden Primer benötigt, die die entsprechende Mutation enthielten (TCG für Cystein → TGC für Serin), sowie stromaufwärts und -abwärts jeweils 15 Bp-lange Bereiche besaßen, die mit dem Vektor komplementär waren. Die Primer lagerten in einer PCR (2.4.4) an den Vektor an und dienten als Ausgangspunkt für die Amplifizierung des gesamten Plasmidrückgrats inklusive der Mutation. Damit abgesehen von der gewünschten Mutation keine weiteren Mutationen auftraten, war es essentiell eine DNA-Polymerase mit einer geringen Fehlerrate zu verwenden, wie z. B. die Phusion®-Polymerase. Die Elongationszeit musste ebenfalls an die Vektorlänge angepasst werden. In der vorliegenden Arbeit wurde für die Mutagenese von pASK3_MMC_hdrD eine Elongationszeit von 1,5 min gewählt. Nach der PCR enthielt der Ansatz ein Gemisch der ursprünglichen Plasmide, die noch das nicht-mutierte Gen enthielten, und der neu-synthetisierten, mutierten Plasmide. Eine Unterscheidung dieser beiden Plasmidtypen war nun anhand der Methylierung möglich. Während das ursprüngliche, nicht-mutierte Plasmid in *E. coli* repliziert worden war, der genomische, aber auch Plasmid-DNA durch DNA-Methyltransferasen methyliert, verfügten die in der PCR generierten Plasmide nicht über methylierte Bereiche. Deswegen kam die Typ IV-Restriktionsendonuklease *DpnI* (2.4.8) zum Einsatz. Diese erkennt und verdaut bestimmte methylierte Sequenzen und trug somit zur Degradation der ursprünglichen, nicht-mutierten Plasmide bei. War der Verdau erfolgreich, enthielt der Ansatz nun nur noch die linearen PCR-Produkte des gesamten mutierten Vektors. Der gesamte Ansatz wurde in NEB 5 alpha-Zellen transformiert (2.4.10) und die Zellen wurden ü. N. inkubiert. Der Stamm ist nicht nur in der Lage das Plasmid aufzunehmen und zu replizieren, sondern ligiert es auch, sodass wieder ein zirkuläres Plasmid entsteht. Die Klone wurden gepickt und in LB-Medium angezogen. Anschließend erfolgte die Isolierung der Plasmide (2.4.1), sowie eine Überprüfung der Mutation durch Sequenzierung der Plasmide.

2.5 Biochemische Methoden

2.5.1 Anaerobe Protein-Überproduktion

Bei Proteinen, die sauerstoffsensitive Cofaktoren oder prosthetische Gruppen enthalten, ist es essentiell, dass diese unter anaeroben Bedingungen überproduziert und isoliert werden, wenn sie ihre Funktionalität behalten sollen. In dieser Arbeit traf dies insbesondere für HdrD- und HdrD-Mutanten, die Indolpyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase und das heterolog produzierte Ferredoxin aus *M. luminyensis* zu, da diese jeweils sauerstoffsensitive Eisen-Schwefel-Cluster besitzen. Für die Überproduktion der einzelnen Proteine wurden unterschiedliche Protokolle verwendet, da sich diese jeweils für ein entsprechendes Protein als geeignet erwiesen hatten.

Die heterologe Produktion von HdrD aus *M. luminyensis* erfolgte in modifiziertem LB-Medium, das neben den bekannten Bestandteilen auch Glukose als Substrat und MOPS als Pufferkomponente enthielt (2.3.2). 200 mL des Mediums wurden mit 2 mM Eisenammoniumcitrat versetzt und mit *E. coli* BL21 (DE3) Δ iscR pASK3_MMC_hdrD inokuliert. Die Kultur wurde zunächst aerob bei 30 °C und 180 upm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 angezogen und die Induktion der Überproduktion von HdrD erfolgte durch Zugabe von Anhydrotetrazyklin (AHT; 1 µg mL⁻¹). Unmittelbar nach Zugabe von AHT wurden der Kultur 2 mM Cystein und 25 mM Natriumfumarat zugesetzt. Während Cystein als Schwefelquelle und Reduktionsmittel fungierte, konnte Fumarat von *E. coli* als Substrat zur Fumaratatmung verwendet werden. Dies verhinderte, dass der Organismus nach dem vollständigen Verbrauch von Glukose auf (weitere) Gärungsprozesse umschaltete, was die Zellausbeute im Vergleich zur Atmung stark herabgesetzt hätte. Nach Zugabe von AHT, Cystein und Fumarat wurde die Kultur mit einem Gummistopfen luftdicht verschlossen und ü. N. bei 16 °C und 80 upm inkubiert. Dadurch, dass *E. coli* den Restsauerstoff verbrauchte und Cystein als Reduktionsmittel enthalten war, wurden schnell anaerobe Bedingungen im Kulturgefäß herbeigeführt, sodass Sauerstoff die Produktion des sauerstoffsensitiven Proteins HdrD nicht mehr störte. Am Folgetag wurden die Zellen anaerob per Zentrifugation geerntet (14.000 x g, 15 min, 4 °C). Das Zielprotein wurde direkt nach der Ernte isoliert (2.5.3), da eine zwischenzeitliche Lagerung des Zellpellets bei -70 °C die Proteinausbeute enorm herabsetzte.

Die Produktion der Indolpyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase aus *Ms. mazei* erfolgte in 200 mL MI-Medium. Das Medium wurde wie in 2.3.2 beschrieben komplettiert und mit *E. coli* T7 express pPR_mm_2093+4 inokuliert. Die Kultur wurde aerob bei 37 °C und 180 upm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 bis 1 inkubiert. Danach erfolgte die Induktion durch Zugabe von Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG; 200 µM). Darüber hinaus wurden 1 mM FeSO₄, 300 µM Natriumsulfid und 100 µM Thiamin hinzupipettiert und das Kulturgefäß wurde mit einem Gummistopfen luftdicht verschlossen. Dann wurde die Kultur zur Überproduktion ü. N. bei 30 °C und 80 upm inkubiert. Auch hier wurden die Zellen am Folgetag geerntet, um direkt die Isolierung des Zielproteins vorzunehmen (s. o.).

Die Überproduktion des Ferredoxins WP_19177167 aus *M. luminyensis* erfolgte nach Böhringer (2016).

2.5.2 Zellyse

Sowohl zur Aufreinigung eines überproduzierten Proteins, als auch zur Präparation des Cytoplasmas und der Membranfraktion eines Organismus bedurfte es des Aufschlusses der entsprechenden Zellen. Der Aufschluss von Zellen erfolgte routinemäßig durch Einsatz des Ultraschalls und bei *E. coli* in Kombination mit Lysisreagenz (CellLytic™ B Cell Lysis Reagent; Sigma-Aldrich, München, Deutschland). Dazu wurden die geernteten Zellen je nach Versuch in einem entsprechenden Puffer aufgenommen. Sollte ein sauerstoffsensitives Protein aus *E. coli*-Zellen isoliert werden, wurden diese in Puffer W (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mg L⁻¹ Resazurin, 5 mM DTT, pH 8; 1 mL pro 100 mL Kultur) aufgenommen. War das Ziel die Isolierung von Zellmembranen und Cytoplasma von *M. luminyensis*, wurde das geerntete Zellpellet in Kaliumphosphatpuffer (KP; 40 mM, 1 mg L⁻¹

Resazurin, 5 mM DTT, pH 7) resuspendiert. Zur Isolierung von Ferredoxin aus *Cl. pasteurianum* (2.5.10) wurden die Zellen zum Zellaufschluss in H_2O_{reinst} aufgenommen. Pro 1 mL Zellsuspension wurde 1 min mit dem Ultraschall (Bandelin Sonoplus Sonicator, Bandelin Electronic, Berlin, Deutschland) beschallt. Es handelte sich um gepulste Ultraschallintervalle mit einer Intensität von 50 %.

2.5.3 Proteinaufreinigung mittels Streptactin-Affinitätschromatographie

Zur Aufreinigung eines Proteins mit Hilfe der Streptactin-Affinitätschromatographie bedurfte es der in Tab. 23 dargestellten Puffer. Das Säulenmaterial Streptactin Superflow®, sowie das zur Elution benötigte Desthiobiotin waren kommerziell erhältlich (IBA, Göttingen, Deutschland).

Tab. 23. Für die Streptactin-Affinitätschromatographie benötigte Puffer.

Puffer	Bestandteile
Puffer W	100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8
Puffer E	Puffer W + 2,5 mM Desthiobiotin
Puffer R	Puffer W + 1 mM HABA

Die Streptactin-Affinitätschromatographie wurde verwendet, um heterolog überproduzierte Proteine aus *E. coli*-Zelllysate aufzureinigen. Die Prozedur wurde bei allen in dieser Arbeit isolierten Proteinen in der Anaerobenkammer (Coy Laboratory Products, Grass Lake, USA) durchgeführt, da alle heterolog produzierten Proteine sauerstoffsensitive Eisen-Schwefel-Cluster enthielten. Neben den oben gezeigten Bestandteilen enthielten die Puffer daher auch 5 mM Dithiothreitol (DTT) als Reduktionsmittel und Resazurin als Redoxindikator (1 mg L^{-1}), und wurden 5 min mit 100 % N_2 durchgast. Nach der Zelllyse (2.5.2) wurden zunächst Zelltrümmer und ganze Zellen durch Zentrifugation entfernt ($30.000 \times g$, 10 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$). Das geklärte Zelllysate wurde über eine zuvor mit Puffer W äquilibrierte Streptactin-Säule gegeben. Die beladene Säule wurde 5 x mit einfachem Säulenvolumen (CV) Puffer W gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Danach erfolgte die Elution in sechs Schritten zu je 500 μL mit Puffer E. Schließlich wurde die Säule so lange mit Puffer R versetzt, bis das Säulenmaterial eine orange Färbung besaß, und final wieder mit Puffer W bis zur vollständigen Entfernung von HABA gespült.

2.5.4 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Proteinkonzentrationen wurden routinemäßig nach der von Bradford (1976) etablierten Methode bestimmt. Dazu wurden 980 μL Bradford-Reagenz (Sigma Aldrich, München, Deutschland) mit 20 μL einer Proteinprobe versetzt und das Gemisch wurde 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Danach wurde die Absorption bei 595 nm (A_{595}) gemessen. Anhand einer Kalibrierkurve mit bovinem

Rinderserumalbumin (BSA) konnte ausgehend von der Absorption bei 595 nm die Proteinkonzentration in einer Probe berechnet werden.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Ferredoxin-haltigen Lösungen war nicht nach der zuvor beschriebenen Methode durchführbar, da Ferredoxine saure Proteine sind und häufig nicht über die basischen Aminosäuren verfügen, die für die Bestimmung nach Bradford essentiell sind. Daher wurde die Konzentration von Ferredoxin-haltigen Lösungen mit Hilfe der Absorption dieser Proteine bei 390 nm ermittelt. Im oxidierten Zustand absorbieren Ferredoxine mit zwei [4Fe-4S]-Clustern bei 390 nm mit $30 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und im reduzierten Zustand mit $19 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Kaster 2010; Hong und Rabinowitz 1970).

2.5.5 Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist ein Verfahren, bei dem Proteine in einer Gelmatrix aufgrund ihrer Größe in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden. Die Methode wurde in dieser Arbeit in modifizierter Form nach Laemmli (1970) durchgeführt.

Tab. 24. Zusammensetzung einer SDS-PAGE. Die hier gezeigten Mengenangaben beziehen sich auf ein 12,5 %-iges Trenngel und ein 5 %-iges Sammelgel.

Komponente	Volumen (μL)	
	Sammelgel	Trenngel
Rotiphorese Gel 40 (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)	250	2000
Trenngelpuffer (1,8 M Tris, pH 8,8)	-	1200
Sammelgelpuffer (600 mM Tris, pH 6,8)	400	-
SDS (0,5 % [w/v])	400	1200
H ₂ O _{reinst}	950	1600
TEMED (VWR, Darmstadt, Deutschland)	5	5
APS (10 % [w/v])	30	30

In Tab. 24 ist die Zusammensetzung eines 12,5 %-igen Gels dargestellt, welches für Proteine zwischen 20 und 60 kDa geeignet ist. Das Sammelgel besaß stets eine Acrylamidkonzentration von 5 %. Die Proben wurden vor Auftragung auf das Gel 1:1 mit Ladepuffer (0,01 % [w/v] Bromphenolblau, 0,05 % [v/v] β -Mercaptoethanol, 50 % [v/v] Glycerol) versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Um die molekulare Masse der Proteine anhand ihrer Laufstrecke bestimmen zu können, wurde ein Standard mit Proteinen definierter Größen (PageRuler™ Prestained Protein Ladder; Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland) mitgeführt und anhand dessen eine Kalibrierkurve erstellt. Im Sammelgel wurden die Proteinproben bei 60 V aufkonzentriert und schließlich im Trenngel bei 100 V aufgetrennt.

2.5.6 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (native PAGE)

Die Gele für die native PAGE wurden kommerziell erworben (Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels; BioRad, München, Deutschland). Da in diesem Verfahren weder SDS, noch β -Mercaptoethanol oder Hitze zur Denaturierung der Proteine zum Einsatz kommen, migrieren die Proteine in ihrer nativen Form durch das Gel. Da die Eigenladung der Proteine nicht durch SDS maskiert wird, findet die Auftrennung nicht nur nach der Größe, sondern auch nach der Ladung statt. Der Elektrodenpuffer, in dem die native PAGE vollzogen wurde, ist in Tab. 25 zu finden.

Tab. 25. Zusammensetzung des Elektrodenpuffers der nativen PAGE.

Zusatz	Konzentration (mM)
Tris	10
Glycin	76
→ pH 8,3 – 8,5 (keine Titration)	
→ ggf. 0,01 % [v/v] Triton X-100 bei der Auftrennung solubilisierter Membranproteine	

Der Ladepuffer (5 mL Glycerol, 0,5 mL 1 % [w/v] Bromphenolblau in 100 % Ethanol, ad 10 mL Elektrodenpuffer) wurde mit den Proben zu gleichen Anteilen verdünnt und diente der Visualisierung der Lauffront, sowie der Beschwerung der Proben, sodass diese in die Geltaschen absinken. Als Standard wurde das Amersham High Molecular Weight Calibration Kit for Native Electrophoresis (GE Healthcare, München, Deutschland) verwendet.

2.5.7 Silberfärbung

Die Silberfärbung wurde zur Visualisierung von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen benutzt. Die Methode beruht auf der Bindung der divalenten Silberionen an Proteine in der Gelmatrix. Die Silberionen werden an den Proteinen zu elementarem Silber reduziert und bilden Silberkeime, die weitere Silberionen reduzieren. Elementarsilber besitzt eine dunkle Färbung, wodurch es die Proteine sichtbar macht. Das Detektionslimit dieser Methode liegt bei etwa 1 ng Protein pro Bande. Eine Auflistung aller für die Silberfärbung benötigten Lösungen ist in Tab. 26 zu finden.

Das Gel wurde zunächst für 20 min in Fixierlösung inkubiert. Danach wurde es für ca. 10 min in 50 % [v/v] Methanol inkubiert und danach 10 min mit H_2O_{reinst} gewaschen. Das Gel wurde durch Zugabe einer Thiosulfatlösung neutralisiert (1 min) und erneut zweimal mit H_2O_{reinst} gewaschen. Dann erfolgte die Zugabe der Imprägnierlösung, die die Silberionen enthielt und die eigentliche Färbung einleitete, bei 4 °C im Dunkeln für 20 min. Nach der Imprägnierung wurde das Gel ein letztes Mal mit H_2O_{reinst} gewaschen und schließlich so lange in der Entwicklerlösung inkubiert bis Proteinsignale zu sehen waren.

Tab. 26. Lösungen, die für die Silberfärbung benötigt werden.

Lösung	Bestandteile
Fixierlösung	50 % [v/v] Methanol, 12 % [v/v] Essigsäure, 0,05 % [v/v] Formaldehyd
Thiosulfatlösung	0,02 % [w/v] Thiosulfat
Imprägnierlösung	0,1 % [w/v] Silbernitrat
Entwicklerlösung	3 % [w/v] Na ₂ CO ₃ , 0,1 % [w/v] Formaldehyd

2.5.8 Immunologischer Nachweis mittels Western Blot

Während die Silberfärbung eine Methode zur unspezifischen Anfärbung von Proteinen ist, ist der Western Blot (Towbin *et al.* 1979) ein spezifisches Verfahren, um bestimmte Zielproteine nachweisen zu können. Hierzu werden die Proteine zunächst im elektrischen Feld von einem SDS-Gel oder einem nativen Gel auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Dann erfolgt die Visualisierung der Proteine durch die Zugabe von entsprechenden Antikörpern oder Konjugaten, die mit einem Reporterprotein gekoppelt sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Streptactin-Konjugat verwendet, das zum einen spezifisch an Proteine mit einem Strep-tag bindet, zum anderen an die Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist. Die Meerrettich-Peroxidase katalysiert die Oxidation von 4-Chloro-1-naphthol mit H₂O₂ als Elektronenakzeptor, wodurch der Farbstoff 4-Chloro-1-naphthon entsteht. Die Detektion mittels Western Blot ist deutlich sensitiver als die Silberfärbung und eignet sich deshalb insbesondere zum Nachweis von Proteinen, die nur in kleinen Mengen (ng-Bereich) vorhanden sind.

Für den Western Blot wurde zuerst eine SDS- oder eine native PAGE durchgeführt (2.5.5, 2.5.6) und das jeweilige Gel in eine Semi-dry Blotting Apparatur (Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland) zur Übertragung der Proteine auf eine 0,45 µm Nitrocellulosemembran (BioRad, München, Deutschland) überführt. Der Blot wurde durch Whatman-Papier an der Anode und der Kathode ermöglicht. Alle Blot-Komponenten wurden in Towbin-Puffer äquilibriert (Tab. 27). Der Proteintransfer erfolgte bei 15 V für 45 min.

Tab. 27. Zusammensetzung des Towbin-Puffers.

Zusatz	Menge
Tris	1,52 g
Glycin	7,2 g
Methanol	100 mL
H ₂ O _{dest}	ad 500 mL
→ pH 8,3	

Die Membran wurde nach dem Transfer der Proteine in 20 mL Blockierlösung (5 % [w/v] Milchpulver in 1 x PBS; Tab. 28) für 1 h inkubiert, um unspezifische Bindestellen abzudecken und Hintergrundreaktionen zu minimieren. Anschließend erfolgte ein dreimaliges Waschen der Membran für jeweils 5 min mit 20 mL PBS-Tween-Puffer (0,1 [v/v] Tween 20 in 1 x PBS) und ein einstündiger Inkubationsschritt in 20 mL PBS-Tween-Puffer, der 5 µL *StrepMAB-Classic* enthielt (IBA, Göttingen, Deutschland). Nach jeweils zwei Waschschritten mit 20 mL PBS-Tween-Puffer bzw. 20 mL 1 x PBS-Puffer wurde die Membran mit 20 mL PBS-Puffer, 20 µL 30 % [v/v] H₂O₂ und 200 µL 30 % [w/v] 4-Chloro-1-naphthol (in Methanol) überschichtet. Bis zur sichtbaren Reaktion wurde der Ansatz im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.

Tab. 28. Zusammensetzung des 1 x PBS-Puffers.

Zusatz	Menge
NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	0,256 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
H ₂ O _{dest}	ad 1000 mL
→ pH 7,4	

2.5.9 Fast Protein Liquid Chromatographie

Die Fast Protein Liquid Chromatographie (FPLC) kann verwendet werden, um die molekulare Größe eines Proteins, sowie dessen Oligomerisierungszustand zu bestimmen. Die Methode beruht auf dem Prinzip, dass kleine Proteine langsamer durch eine FPLC-Säule migrieren als größere Proteine und daher einen späteren Elutionszeitpunkt erfahren. In der vorliegenden Arbeit wurde die Chromatographie mit dem Protein HdrD aus *M. luminyensis* durchgeführt, welches heterolog in *E. coli* überproduziert worden war. Es kam ein Äkta-System mit einer HiLoad 16/60 Superdex 75 pg-Säule (GE-Healthcare, München, Deutschland) zum Einsatz, die sich besonders für die Auftrennung von Proteinen mit Größen zwischen 3 und 80 kDa eignet. Zur Ermittlung des Ausschlussvolumens der Säule wurde Dextranblau appliziert, das aufgrund seiner großen Masse sehr schnell durch die Säule migrierte und damit die Laufmittelfront markierte. Das Ausschlussvolumen der Säule betrug 44,1 mL und das gesamte Säulenvolumen 120 mL. Zur Kalibrierung wurden Proteine (Aldolase, Katalase, Thyroglobulin, Ferritin, BSA) mit definierter molekularer Masse auf die Säule aufgetragen, anhand derer eine Kalibrierkurve erstellt werden konnte. Diese ergab sich aus den k_{av} -Werten der Proteine (Formel 5), die gegen den Logarithmus der molekularen Massen aufgetragen wurden. Hierbei entsprach V_e dem Elutionsvolumen, V_0 dem Ausschlussvolumen von 44,1 mL und V_c dem Säulenvolumen von 120 mL.

Formel 5:
$$k_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_c - V_0}$$

Die Flussrate betrug $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ und der Maximaldruck auf der Säule belief sich auf $0,3 \text{ MPa}$. Als Puffer wurde ein 50 mM Kaliumphosphat-Puffer mit 150 mM NaCl und pH 7 verwendet. Die Konzentration des aufgereinigten und in die FPLC injizierten Proteins HdrD betrug zwischen 1 und $1,5 \text{ mg mL}^{-1}$.

2.5.10 Aufreinigung von Ferredoxin aus *Cl. pasteurianum*

Als Grundlage für die Aufreinigung von Ferredoxin aus *Cl. pasteurianum* dienten vier 500 mL -Kulturen, die wie oben beschrieben (2.3.1) angezogen wurden. Die Zellen wurden aerob geerntet und in $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ aufgenommen. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall (2.5.2). Zelltrümmer und ganze Zellen wurden per Zentrifugation entfernt ($30.000 \times g$, 10 min , $4 \text{ }^\circ\text{C}$) und der Überstand wurde auf 50 mL mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ aufgefüllt. Zum Überstand wurde das gleiche Volumen an 100% Aceton unter ständigem Rühren auf Eis hinzugefügt, wodurch es zum Ausfällen der Proteine kam. Aufgrund ihrer Ladung und ihrer geringen Größe waren Ferredoxine und Flavine von dieser Fällung ausgenommen und verblieben in Lösung, während die übrigen Proteine präzipitierten. Das Präzipitat wurde mittels Zentrifugation entfernt ($30.000 \times g$, 10 min , $4 \text{ }^\circ\text{C}$) und der Überstand wurde in die Anionenaustauschchromatographie eingesetzt. Hierbei wurde ein Säulenmaterial aus Diethylaminoethyl-Cellulose (DEAE-Cellulose; Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg, Deutschland) verwendet, für das Ferredoxine eine hohe Affinität aufweisen. Die Ferredoxine waren nach dem Auftragen auf die Säule als brauner Ring zu erkennen, der dem Säulenmaterial auflag. Um ebenfalls bindende Flavine zu entfernen, wurde das Säulenmaterial mit einem Tris-Puffer mit einer geringeren Konzentration gewaschen (200 mM Tris-HCl, pH 8) bis keine gelbe Lösung mehr aus der Säule austrat. Die Elution der Ferredoxine erfolgte mit einem hochmolaren Tris-Puffer (500 mM Tris-HCl, pH 8), wobei Elutionsfraktionen mit einer hohen Ferredoxinkonzentration an ihrer gelb-bräunlichen Färbung zu erkennen waren. Alle gefärbten Einzelfraktionen wurden schließlich vereinigt und mit Hilfe von Entsalzungssäulen (Amicon Ultra-15 Zentrifugen-Filtereinheiten; Merck Millipore, Schwalbach, Deutschland) mit einem *cutoff* von 3 kDa auf eine Konzentration von $105 \text{ } \mu\text{M}$ bzw. $0,7 \text{ mg mL}^{-1}$ aufkonzentriert und bei $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

2.5.11 Präparation von Cytoplasma und Membranfraktion

Alle Präparationsschritte wurden in der Anaerobenkammer durchgeführt, um der Beschädigung sauerstoffsensitiver Proteine entgegen zu wirken. Zur Isolierung der Membranen und des Cytoplasmas von *M. luminyensis* wurde eine 500 mL -Kultur bis zur Mitte der exponentiellen Phase ($\text{OD}_{600} = 0,1-0,2$) inkubiert. Dann wurden die Zellen per Zentrifugation ($17.000 \times g$, 30 min , $4 \text{ }^\circ\text{C}$) geerntet und das Pellet wurde in anaerobem Kaliumphosphat-Puffer (KP; 50 mM , 5 mM DTT, 1 mg L^{-1} Resazurin, pH 7) aufgenommen. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall (2.5.2) und die Entfernung von Zelltrümmern und ganzen Zellen per Zentrifugation ($30.000 \times g$, 10 min , $4 \text{ }^\circ\text{C}$). Das Pellet wurde in

KP-Puffer resuspendiert und in Ultrazentrifugenröhrchen (Volumen: 9 mL) überführt. Die Röhrchen wurden komplett mit KP-Puffer aufgefüllt, um Sauerstoffeinström während der Zentrifugation zu vermeiden. Nun folgte ein Zentrifugationsschritt bei $300.000 \times g$ für 90 min bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Nach der Zentrifugation wurden Überstand und Pellet voneinander getrennt. Der Überstand enthielt das verdünnte Cytoplasma, während die Membranen das Pellet bildeten. Das Cytoplasma wurde anaerob abgefüllt und bei $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Die Membranen wurden erneut in KP-Puffer aufgenommen und zum Waschen eine weitere Stunde bei $300.000 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert. Zuletzt wurde das Membranpellet in $100\text{-}200 \text{ }\mu\text{L}$ KP-Puffer aufgenommen, in anaerobe Glas-Kryoröhrchen gegeben und bis zur Verwendung bei $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Die Proteinbestimmung erfolgte mittels Bradford-Test (2.5.4).

Sollten Membranproteine solubilisiert werden, wodurch die Löslichkeit dieser Proteine für wässrige Lösungsmittel erhöht wird, wurden die Membranen nach dem ersten Ultrazentrifugationsschritt in KP-Puffer (s. o.) mit $1 \text{ } \%$ [v/v] Triton X-100 aufgenommen. Das Gemisch wurde in anaerobe Glasgefäße überführt und 2 h auf Eis inkubiert. Dann erfolgte der zweite Ultrazentrifugationsschritt ($300.000 \times g$, 1 h, $4 \text{ }^\circ\text{C}$), wobei die solubilisierten Membranproteine anschließend im Überstand zu finden waren und dieser für weitere Tests verwendet wurde, während das Pellet verworfen wurde.

2.5.12 Kolorimetrische Quantifizierung von Eisen- und Schwefel

Einige Proteine besitzen besondere Cofaktoren, die aus Eisen- und Schwefelatomen aufgebaut sind. Hierbei handelt es sich um sogenannte Eisen-Schwefel-Cluster. Die Anzahl der Eisen- und Schwefelatome kann variieren, am häufigsten und stabilsten sind jedoch $[4\text{Fe-}4\text{S}]$ - und $[2\text{Fe-}2\text{S}]$ -Cluster. Eisen-Schwefel-Cluster sind an Redoxreaktionen beteiligt, die die Enzyme katalysieren, da sie als Elektronenüberträger fungieren. In dem Fall, dass Eisen-Schwefel-Cluster als Elektronenakzeptor agieren, wird ein Eisenatom des Clusters von Fe(III) zu Fe(II) reduziert. Dieser Prozess wird reversiert, wenn das Eisen-Schwefel-Cluster Elektronen abgibt. Um nachweisen zu können, dass ein Eisen-Schwefel-Protein ausreichend mit Eisen und Schwefel beladen ist, sollte die molare Konzentration der entsprechenden Proteinlösung bestimmt (2.5.4) und mit den molaren Eisen- und Schwefelkonzentrationen abgeglichen werden.

Um die Schwefelkonzentration einer Lösung zu ermitteln, wurden $200 \text{ }\mu\text{L}$ der Probe mit $300 \text{ }\mu\text{L}$ $1 \text{ } \%$ [w/v] Zinkacetat versetzt und sofort mit $15 \text{ }\mu\text{L}$ $12 \text{ } \%$ [w/v] NaOH neutralisiert. Das Gemisch wurde eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dann erfolgten die Zugabe von $75 \text{ }\mu\text{L}$ $0,1 \text{ } \%$ [w/v] N,N-Dimethyl-p-phenylendiamin (DMPD) und der Zusatz von $75 \text{ }\mu\text{L}$ 23 mM FeCl_3 (in $1,2 \text{ M}$ HCl), woraufhin erneut 30 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Schließlich wurde die Absorption bei 670 nm gemessen. Diese kommt zustande, wenn DMPD mit säurelabilem Schwefel unter sauren und oxidierenden Bedingungen Methylenblau bildet, das bei genannter Wellenlänge nachweisbar ist (Fogo und Popowsky 1949). Als Standard diente eine Na_2S -Kalibrierkurve.

Die Eisenbestimmung beruhte auf der Reduktion von Fe(III) zu Fe(II) durch Ascorbinsäure und der anschließenden Chelatbildung von Fe(II) mit Ferrozin. Der Fe(II) -Ferrozin-Chelatkomplex kann bei 593 nm gemessen werden, sodass Eisen auf diese Weise kolorimetrisch quantifiziert werden kann.

Dafür wurden 100 µL einer Probe mit 100 µL 1 % [v/v] HCl angesäuert und das Gemisch wurde bei 20.000 x g für 1 min zentrifugiert. Danach erfolgte eine zehnmütige Inkubation bei 80 °C, wonach die Probe erneut auf Raumtemperatur abgekühlt wurde. Es wurden schrittweise 500 µL 7,5 % [w/v] Ammoniumacetat, 100 µL 4 % [w/v] Ascorbinsäure, 100 µL 2,5 % [w/v] SDS und 1,5 % [w/v] Ferrozin hinzugefügt. Schlussendlich wurde ein weiteres Mal zentrifugiert (20.000 x g, 5 min) und die photometrische Messung bei 593 nm vorgenommen. Die Eisenkonzentration wurde auf Grundlage einer Ammoniumeisensulfat-Standardreihe berechnet.

2.6 Analytische Methoden

2.6.1 Quantifizierung von MMA, DMA und TMA

Vor der eigentlichen Quantifizierung von MMA, DMA und TMA im Medium wurden die Zellen durch Zentrifugation (20.000 x g, 3 min) vom Medium getrennt. Natriumsulfid, welches als Reduktionsmittel im Medium enthalten war, wurde durch Zugabe von 0,3 % [v/v] H₂O₂ ausgefällt und das Präzipitat wurde durch Zentrifugation (20.000 x g, 1 min) entfernt. Der geklärte Überstand wurde zur Bestimmung der einzelnen Methylaminkonzentrationen weiterverwendet. Die drei genannten Methylamine können von *M. luminyensis* als Substrat verwendet werden und im Zuge dieser Arbeit wurde getestet, wie der Organismus diese Substrate konsumiert.

Zur Quantifizierung von MMA wurden 50 µL des geklärten Überstandes mit 200 µL 100 mM Natriumacetat (pH 5,6) und 300 µL Acetylaceton/Formaldehyd-Lösung (4 mL Acetylaceton, 10 mL 30 % [v/v] Formaldehyd, 136 mL H₂O_{dest}) versetzt. Danach wurden 450 µL H₂O_{dest} hinzupipettiert und das Gemisch wurde für 5 min bei 95 °C in 2 mL *safe-lock* Eppendorf-Gefäßen inkubiert. Die Proben wurden auf Eis abgekühlt und die Absorption wurde bei 410 nm gemessen. Bei dieser Wellenlänge kann N-Methyl-2,6-dimethyl-3,5-diacetyl-1,4-dihydropyridin nachgewiesen werden, welches während der Reaktion von MMA mit Acetylaceton und Formaldehyd entsteht (Wang *et al.* 1999). Zur Berechnung der MMA-Konzentration in der Probe wurde eine MMA-Kalibrierkurve erstellt, in der die Absorption bei 410 nm mit einer definierten MMA-Konzentration korreliert wurde.

DMA wurde auf Grundlage der Kupfer-Thiocarbamat-Methode quantifiziert (Dowden 1938). Zur Bestimmung der DMA-Konzentration wurden 50 µL des geklärten Überstandes mit 50 µL einer CuSO₄-haltigen Lösung (20 g Ammoniumacetat, 0,2 g CuSO₄, 10 g NaOH, 30 mL NH₄OH, ad 100 mL H₂O_{dest}) versetzt. Dann wurden schrittweise 500 µL Kohlenstoffdisulfid in Benzen (5 % [v/v]) und 50 µL 30 % [v/v] Essigsäure hinzugegeben. Danach wurde für 1 min bei 20.000 x g zentrifugiert und der Überstand wurde vom Präzipitat getrennt. Die Absorption wurde bei 430 nm gemessen und die DMA-Konzentration im Überstand wurde über eine DMA-Kalibrierkurve berechnet.

TMA-Konzentrationen wurden mit Hilfe von Folin & Ciocalteu-Phenol-Reagenz bestimmt (Ikawa *et al.* 2003). Dazu wurden 50 µL des geklärten, zellfreien Mediums mit 783 µL H₂O_{dest} verdünnt und mit 125 µL 20 % [w/v] Na₂CO₃ versetzt. Danach wurden 42 µL Folin & Ciocalteu-Phenol-Reagenz (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) hinzugefügt und das Gemisch wurde 30 min bei Raumtemperatur

inkubiert. Dann erfolgte die Messung der Absorption bei 745 nm. Eine TMA-Kalibrierkurve mit definierten TMA-Konzentrationen wurde mitgeführt, um anhand der Absorption Rückschlüsse auf die entsprechende TMA-Konzentration im Medium schließen zu können.

2.6.2 Quantifizierung von Methanol und Methan durch Gaschromatographie

Sowohl Methanol, welches ein Substrat von *M. luminyensis* ist, als auch Methan, das Stoffwechselprodukt des Organismus, konnten mit Hilfe der Gaschromatographie (GC) nachgewiesen werden.

Zur Quantifizierung des Methanolgehalts im Medium, der sich im Zuge des Wachstums von *M. luminyensis* reduziert, wurden die Zellen zunächst durch Zentrifugation (20.000 x g, 3 min) entfernt. Vom zellfreien Überstand wurden 1 µL-Proben in einen Gaschromatographen (Shimadzu GC-14A; Shimadzu, Duisburg, Deutschland) mit einer Chromosorbssäule (Agilent Chromosorb 101, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) und einem Flammenionisationsdetektor injiziert. Die Säulentemperatur betrug hierbei 100 °C und die Injektor- und Detektortemperaturen 220 °C. N₂ wurde als Trägergas verwendet. Die Methanolkonzentration in den Medienüberständen wurde mit Hilfe einer Methanol-Standardkurve berechnet.

Methan wurde ebenfalls gaschromatographisch nachgewiesen und anhand eines 10 %-igen Methan-Standards quantifiziert. Hierzu wurden 25 bzw. 50 µL-Proben aus der Gasphase von *M. luminyensis*-Kulturen oder -Suspensionen entnommen und in einen Gaschromatographen mit einem Flammenionisationsdetektor gespritzt (PerkinElmer Clarus® 480, Rascon FFAP column 25 m x 0,25 micron; PerkinElmer, Waltham, USA). Die Messungen wurden bei einer Säulentemperatur von 120 °C, einer Injektortemperatur von 150 °C und einer Detektortemperatur von 250 °C vorgenommen. N₂ diente erneut als Trägergas.

2.6.3 Quantifizierung von Acetat mittels Hochleistungsflüssigchromatographie

Acetat, welches die Hauptkohlenstoffquelle von *M. luminyensis* unter den untersuchten Bedingungen darstellt, wurde mittels Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) in zellfreien Überständen nachgewiesen und schließlich quantifiziert. Die HPLC-Proben wurden präpariert, indem 300 µL des zellfreien Mediums mit 300 µL 5 mM H₂SO₄ versetzt wurden. Präzipitierende Substanzen wurden durch Zentrifugation entfernt (20.000 x g, 3 min) und 20 µL des Überstandes wurden jeweils bei der HPLC als Probe eingesetzt. Es kam eine Aminex HPX-87H-Säule (BioRad, München, Deutschland; 300 mm x 7,8 mm) zum Einsatz, wobei 5 mM H₂SO₄ als Eluent mit einer Flussrate von 0,3 mL min⁻¹ verwendet wurde und die Säulentemperatur 25 °C betrug.

2.6.4 Bestimmung des Trockengewichts

Zur Trockengewichtsbestimmung wurden 500 mL-Kulturen von *M. luminyensis* wie bereits beschrieben angezogen (2.3.3). Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden 50 mL-Proben entnommen. Die Zellen wurden geerntet und per Zentrifugation gewaschen (6000 x g, 20 min, 10 °C). Der Überstand wurde entfernt und die Pellets wurden bei 70 °C für zwei Tage getrocknet. Danach wurden sie zur Bestimmung des Zelltrockengewichts gewogen.

2.6.5 Bestimmung des ATP-Gehalts von Zellsuspensionen

Ruhende Zellen zeigen aufgrund der Entfernung aller Substrate durch verschiedene Waschschriffe keine ATP-Bildung mehr. Die ATP-Bildung kann jedoch gezielt durch Zugabe eines geeigneten Methanogenesesubstrates eingeleitet werden.

Um die ATP-Konzentration von Zellsuspensionen von *M. luminyensis* bestimmen zu können, wurden zunächst ruhende Zellen präpariert (2.3.7). Diese wurden nach der Äquibrierung mit 160 mM Methanol versetzt und es wurden in kurzen zeitlichen Abständen 100 µL-Proben aus der Suspension entnommen. Die Proben wurden jeweils mit 40 µL 3 M Perchlorsäure versetzt und auf Eis überführt. Hier wurden sie für 40 bis 120 min unter gelegentlichem Invertieren inkubiert. Danach wurden zur Neutralisierung 13 µL einer gesättigten K₂CO₃-Lösung und 20 µL eines 400 mM Natrium-TES-Puffers (pH 7,4) hinzugegeben. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation (20.000 x g, 3 min) entfernt und der Überstand wurde bei der enzymatischen ATP-Bestimmung eingesetzt, wobei die Luciferase zum Einsatz kam. Dieses Enzym oxidiert unter ATP-Verbrauch in Anwesenheit von Sauerstoff Luciferin zu Oxoluciferin. Da bei der Reaktion genau ein Lichtquant pro gebildetem Oxoluciferin und verbrauchtem ATP freigesetzt wird, ist die Lichtintensität proportional zum ATP-Verbrauch. Von den Proben wurden 1-20 µL mit 950 µL ATP-Bestimmungspuffer versetzt (5 mM Na₂HAsO₄, 4 mM MgSO₄, 20 mM Glycylglycin, pH 8) und das Gemisch wurde in 9 mL-Szintillationsgefäße pipettiert. Luciferase wurde in Form von 50 µL des Glühwürmchen-Laternenextraktes (Sigma-Aldrich, München, Deutschland; nach Herstellerangaben komplettiert) zugesetzt. Die Lichtemission wurde mit Hilfe eines Szintillationszählers (LS 6500; Beckman Coulter, Brea, USA) quantifiziert. Als geeignetes Programm erwies sich jenes zur Messung von Tritium (³H), wobei der Messzeitraum 0,2 min betrug und sich das Energiefenster auf 0 bis 1000 belief. Aufgrund der Koinzidenzschaltung des Detektors war die Lichtintensität proportional zum Quadrat der ATP-Konzentration. Die ATP-Konzentration Proben, die auf den Zellsuspensionen basierten, ließ sich anhand einer geeigneten ATP-Kalibrierkurve ermitteln.

2.7 Enzymaktivitätstest

Im Zuge dieser Arbeit wurden verschiedene Enzyme charakterisiert, wobei der Fokus insbesondere auf der Reaktionsgeschwindigkeit, mit der diese ihre Substrate umsetzten, und auf der Affinität, die die Enzyme für ihre Substrate hatten, lag. Diesen Fragestellungen wurde nicht nur in Bezug auf

aufgereinigte Enzyme (HdrD aus *M. luminyensis* und die IOR aus *Ms. mazei*), sondern auch auf Enzyme, die in bestimmten Zellfraktionen (Cytoplasma und Membranen) von *M. luminyensis* vorlagen, nachgegangen.

Generell wurden enzymatische Reaktionen entweder direkt photometrisch verfolgt, indem ein Substrat verwendet wurde, dass im Zuge der Reaktion seine Absorption ändert (z. B. Methylviologen bei HdrD aus *M. luminyensis*) oder die Reaktion wurde an eine weitere Enzymreaktion gekoppelt, im Zuge derer eine photometrische Messung möglich war (IOR aus *Ms. mazei*). Die Enzymgeschwindigkeit wurde stets in *units* (U) angegeben, wobei eine *unit* definiert war als ein μmol Substrat, das pro Minute umgesetzt wird. Die Reaktionsgeschwindigkeit eines Enzyms ließ sich mit folgender Formel berechnen:

$$\text{Formel 6:} \quad \frac{U}{\text{mg}} = \frac{\Delta E/\text{min} \times V_d}{\epsilon \times d} \div c$$

Hierbei entsprach V_d dem Verdünnungsfaktor, ϵ dem molaren Extinktionskoeffizienten der Substanz (in $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$), dessen Umsetzung photometrisch verfolgt wurde, d der Schichtdicke der Küvette (in cm) und c der Konzentration der Proteinlösung (in mg mL^{-1}), die in den Test eingesetzt wurde. Darüber hinaus gab der Term $\Delta E/\text{min}$ die Änderung der Absorption pro Minute direkt nach dem Reaktionsstart wieder.

2.7.1 MV-abhängige Messung der Heterodisulfidreduktase-Aktivität

Die Reduktion des Heterodisulfids CoB-S-S-CoM zu HS-CoB und HS-CoM wird enzymatisch durch sogenannte Heterodisulfidreduktasen katalysiert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden diese Enzyme in aufgereinigter Form (HdrD aus *M. luminyensis*), sowie in den verschiedenen Zellfraktionen von *M. luminyensis* analysiert. Dazu wurden 600 μL Kaliumphosphat-Puffer (KP; 40 mM, 5 mM DTT, 1 mg L^{-1} Resazurin, pH 7) in mit N_2 begaste (3 min) und luftdicht verschlossene Quarzküvetten pipettiert. Dann wurden 8 mM Methylviologen (MV) hinzugegeben und MV_{ox} wurde mit Titan(III)-citrat reduziert, bis die Absorption, die bei 604 nm gemessen wurde (A_{604}), ca. 2 bis 2,5 betrug. Danach wurden 5-10 μg aufgereinigtes HdrD oder 15-20 μg Membranen bzw. 10-25 μg Cytoplasma von *M. luminyensis* hinzugegeben. Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 0,1 mM Heterodisulfid, welches als Elektronenakzeptor der Reaktion fungierte. Die Oxidation von MV_{red} , die mit der Reduktion des Heterodisulfids einherging, war als Reduktion der Absorption bei 604 nm zu beobachten.

2.7.2 MV-abhängige Messung der Hydrogenase-Aktivität

Hydrogenasen sind Schlüsselenzyme fast aller methanogenen Organismen und kommen, je nach Methanogeneseweg, in unterschiedlichen Zellfraktionen vor. Um Hydrogenasen im Cytoplasma und in der Membranfraktion von *M. luminyensis* nachweisen zu können, wurde ein Test verwendet, bei dem

H₂ als Elektronendonator fungierte, während der artifizielle Elektronenüberträger Methylviologen (MV_{ox}) als Elektronenakzeptor agierte.

In einer mit N₂ durchgasten, luftdicht verschlossenen Küvette wurden 700 µL Kaliumphosphat-Puffer (KP; 40 mM, 5 mM DTT, 1 mg L⁻¹ Resazurin, pH 7) mit 8 mM MV versetzt. Zur Gewährleistung anaerober Bedingungen wurde MV_{ox} mit Titan(III)-citrat minimal anreduziert. Danach erfolgte die Zugabe von 10-30 µg Cytoplasma oder von 30-70 µg Membranen von *M. luminyensis*. Der Reaktionsstart erfolgte, indem die Küvette für ca. 10 s mit 100 % H₂ übergast wurde. Die Absorption wurde bei 604 nm verfolgt, da bei dieser Wellenlänge ein starker Anstieg aufgrund der voranschreitenden Reduktion von MV_{ox} zu verzeichnen war.

2.7.3 Gekoppelter Enzymtest zur Messung der Ferredoxinreduktions-Aktivität

Um die Aktivität der IOR aus *Ms. mazei* zu untersuchen, wurden grundsätzlich zwei unterschiedliche Elektronenakzeptoren verwendet.

Im ersten Testsystem fungierte MV_{ox} als Elektronenakzeptor. Hierbei wurden 600 µL Kaliumphosphat-Puffer (KP; 40 mM, 5 mM DTT, 1 mg L⁻¹ Resazurin, pH 7) in mit N₂ begaste und luftdicht verschlossene Quarzküvetten pipettiert. Dann wurden 8,3 mM Phenylpyruvat, 3,6 mM Coenzym A (CoA) und 0,2 mM Thiaminpyrophosphat hinzugegeben. Der Zusatz von MV_{ox} erfolgte in Endkonzentrationen von 0,1 bis 8 mM. Zur Anaerobisierung wurde gerade so wenig Titan(III)-citrat in die Küvette gespritzt, dass der Puffer farblos wurde. Dann erfolgte der Reaktionsstart durch Zugabe von 1 µg IOR. Die Reduktion von MV_{ox} zu MV_{red} wurde bei 604 nm verfolgt, da diese bei der MV_{ox}-Reduktion zunahm.

Im zweiten IOR-Aktivitätstest wurde Fd_{ox} als Elektronenakzeptor verwendet. Hierzu wurden 600 µL KP-Puffer (s. o.) neben den oben genannten Komponenten (außer MV_{ox}) mit 250 µM NADP⁺ und 1,2 µg Fd:NADP⁺-Reduktase aus *Spinacea oleracea* (24 mU mg⁻¹; Sigma Aldrich, München, Deutschland) versetzt, bevor auch hierbei anaerobe Bedingungen mit Hilfe von Titan(III)-citrat geschaffen wurden. Außerdem wurde Fd_{ox} aus *Cl. pasteurianum* (0,2 bis 6,5 µM) als Elektronenakzeptor eingesetzt. Der Reaktionsstart erfolgte durch Zusatz der IOR (1 µg), wobei die Absorption bei 340 nm gemessen wurde, die sich aus der Reduktion von NADP⁺ zu NADPH ergab.

2.7.4 Thiolnachweis mittels Ellman-Test

Zur Bestimmung der Thiolbildungsrate, die *M. luminyensis*-Membranen in Kombination mit HdrD zeigten, wurde ein modifizierter, diskontinuierlicher Ellman-Test verwendet (Ellman 1959). Der Test beinhaltet 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB). DTNB reagiert mit Thiolen unter Bildung des Farbstoffes 2-Nitro-5-thiobenzoat (TNB⁻), der photometrisch bei 412 nm (A₄₁₂) nachgewiesen werden kann, sodass die Absorption direkt proportional zur Thiolkonzentration der Lösung ist.

Die Reaktionsgefäße wurden vor Zugabe der Testkomponenten mit N₂ begast (3 min). Jeder Ansatz (Volumen: 320-340 µL) enthielt KP-Puffer (50 mM, 5 mM DTT, 1 mg L⁻¹ Resazurin, pH 7), 3,1 mM Coenzym A, 0,4 mM Thiaminpyrophosphat, 3,1 mM Phenylpyruvat und 1,4 mM Heterodisulfid. Die Reduktion zur Anaerobisierung des Ansatzes erfolgte durch Zugabe von Titan(III)-citrat. Dann wurden 10 µg IOR, 10 µg HdrD und 100 µg *M. luminyensis*-Membranen unter strikt anaeroben Bedingungen hinzugegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Ferredoxins (10 µg), das aus *M. luminyensis* stammte und heterolog produziert worden war (Böhringer 2016), gestartet. In zweiminütigen Abständen wurden 20 µL-Proben entnommen und mit 950 µL 150 mM Tris-HCl (pH 8,1) versetzt. Unmittelbar danach wurden 100 µL DTNB (5 mM in 50 mM Natriumacetat) hinzupipettiert. Die Messung der Absorption erfolgte bei 412 nm. Über den Extinktionskoeffizienten von DTNB bei 412 nm im basischen Milieu ($\epsilon = 13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ließ sich die Rate berechnen, mit der das System Thiole bildete.

2.7.5 *In gel*-Hydrogenasetest

Hydrogenasen ließen sich nicht nur mit Hilfe von photometrischen Tests nachweisen (2.7.2), sondern auch in einem sogenannten *in gel*-Test, bei dem die beiden Zellfraktionen von *M. luminyensis*, die Cytoplasma- und die Membranfraktion, auf eine native PAGE aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt wurden (2.5.6). Hierzu war es wichtig, dass die Membranproteine vor dem Auftragen auf das Gel solubilisiert worden waren (2.5.11), da die hydrophoben Eigenschaften der Membranproteine die Migration im Gel normalerweise erschweren. Um die Funktionalität der sauerstoffsensitiven Hydrogenasen zu gewährleisten, wurde die native PAGE in der Anaerobenkammer durchgeführt. Dabei enthielt der Elektrodenpuffer zusätzlich zu den in Tab. 25 dargestellten Komponenten 5 mM DTT als Reduktionsmittel und 1 mg L⁻¹ Resazurin als Redoxindikator.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der löslichen Proteine und der solubilisierten Membranproteine wurde das native Gel in 100 mM KP-Puffer (pH 7) mit 0,5 M Benzylviologen (BV_{ox}) und 1 mM Triphenyltetrazoliumchlorid inkubiert. H₂, welches in der Gasatmosphäre der Anaerobenkammer enthalten war, diente als Elektronendonator, der durch die Hydrogenasen oxidiert wird. Die freigesetzten Elektronen wurden im Zuge dessen auf BV_{ox} übertragen, welches im reduzierten Zustand gefärbt ist und so die Hydrogenasen, die BV_{ox} reduzieren, im Gel als rote Signale sichtbar machte.

3 Ergebnisse

Der Organismus *M. luminyensis* ist zum jetzigen Zeitpunkt der einzige Stamm der neu entdeckten, methanogenen Ordnung Methanomassiliococcales, der in Reinkultur verfügbar ist. Bislang war lediglich bekannt, dass *M. luminyensis* ausgehend von Methylaminen oder Methanol mit H₂ als Elektronendonator Methan bildet (Dridi *et al.* 2012a; Brugère *et al.* 2014; Lang *et al.* 2015). Auf welche Weise der Organismus diese Substrate umsetzt, ob er Präferenzen für ein bestimmtes Substrat zeigt und welche Enzyme an der Umsetzung der Substrate beteiligt sind, war dagegen nicht bekannt. Darüber hinaus lieferte die Anzucht von *M. luminyensis* bisher nur relativ geringe Zelldichten im Vergleich zu anderen methanogenen Vertretern. In vorangegangenen Publikationen wurden finale optische Dichten (OD₆₀₀) von lediglich 0,16 beschrieben (Brugère *et al.* 2014). Damit der Organismus zukünftig jedoch als Modellorganismus für human-assoziierte, methanogene Archaeen fungieren kann, ist es unerlässlich, das Wachstum von *M. luminyensis* zunächst zu studieren und dahingehend zu optimieren, dass das Archaeon ausreichend hohe Zelldichten in möglichst kurzer Zeit generiert. Ein reproduzierbares und stabiles System zur Kultivierung von *M. luminyensis* ist dabei absolut notwendig und Kenntnisse über die Physiologie des Organismus liegen der Etablierung eines solchen Systems zwingend zugrunde.

3.1 Untersuchungen zum Wachstum von *M. luminyensis*

3.1.1 Wachstum auf Methanol + H₂

Bis jetzt war über die Physiologie und die Biochemie von Mitgliedern der Ordnung Methanomassiliococcales, sowie über die an der Methanogenese beteiligten Enzyme wenig bekannt. Eine detaillierte Wachstumsanalyse von *M. luminyensis* sollte daher zunächst zu einem besseren Verständnis in Bezug auf physiologische Gesichtspunkte beitragen. Da noch nicht untersucht wurde, bei welcher Substratkonzentration der Organismus optimal wächst, wurde *M. luminyensis* in Komplexmedium mit verschiedenen Methanolkonzentrationen angezogen, wobei eine H₂-Atmosphäre bereitgestellt wurde (200 kPa). Das Wachstum der Kulturen mit 20, 40, 60 und 80 mM Methanol als Substrat wurde über einen Zeitraum von 16 Tagen analysiert und über die optische Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) verfolgt. Zudem wurde zu jedem Messzeitpunkt eine Probe zur Ermittlung des Trockengewichts und der im Medium verbliebenen Methanolkonzentration entnommen. Mit Hilfe der graphischen Auftragung der logarithmierten OD₆₀₀ gegen die Zeit (Abb. 3) konnten die unterschiedlichen Wachstumsphasen identifiziert werden. Allen Kulturen war gemein, dass sie eine lag-Phase von etwa zwei Tagen aufwiesen. Danach setzte das exponentielle Wachstum ein, das umso länger andauerte, je mehr Methanol am Anfang im Medium enthalten war. In Bezug auf die Kulturen, die anfangs 20, 40, 60 und 80 mM Methanol enthielten, wurde die stationäre Phase nach 6,5 d (20 mM), 8 d (40 mM), 9,5 d (60 mM) bzw. 12 d (80 mM) erreicht. Die Wachstumsraten aller Kulturen betragen etwa $0,38 \pm 0,04 \text{ d}^{-1}$ und zeigten keine signifikante Abhängigkeit von der ursprünglich eingesetzten Substratkonzentration. Die Verdopplungszeiten (t_d) der Ansätze beliefen sich in diesem Zusammenhang auf jeweils $1,8 \pm 0,2 \text{ d}$.

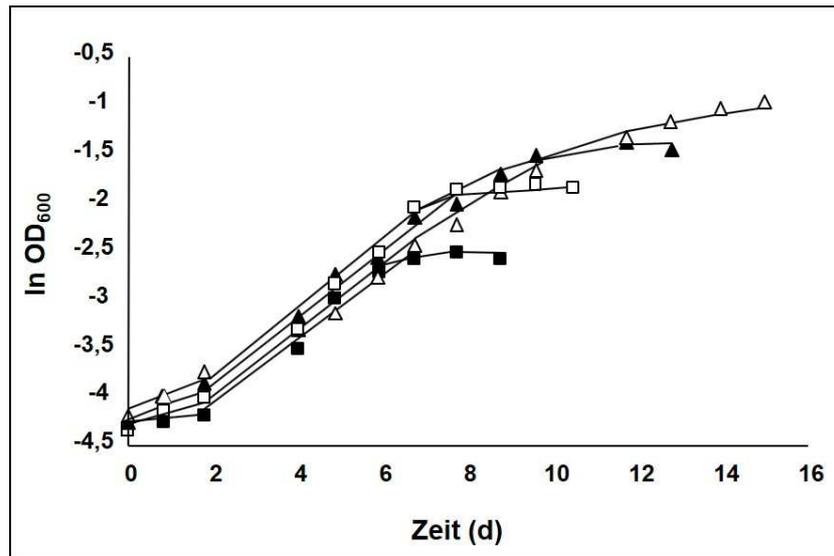


Abb. 3. Wachstum von *M. luminyensis*-Kulturen in Komplexmedium mit unterschiedlichen Methanolkonzentrationen. Die Methanolkonzentrationen betragen 20 mM (■), 40 mM (□), 60 mM (▲) und 80 mM (△) (modifiziert nach Kröninger *et al.* 2017).

Darüber hinaus korrelierte die OD_{600} , die die Kulturen erreichten, mit der eingesetzten Methanolkonzentration, da die finale OD_{600} umso höher war, je mehr Methanol das Medium enthielt (Abb. 4). Bis zu einer Methanolkonzentration von 80 mM nahm die finale OD_{600} der Kulturen pro 1 mM Methanol um 0,004 in einem linearen Zusammenhang zu, was darauf hindeutete, dass die Substratkonzentration in diesem Bereich das Wachstum limitierte.

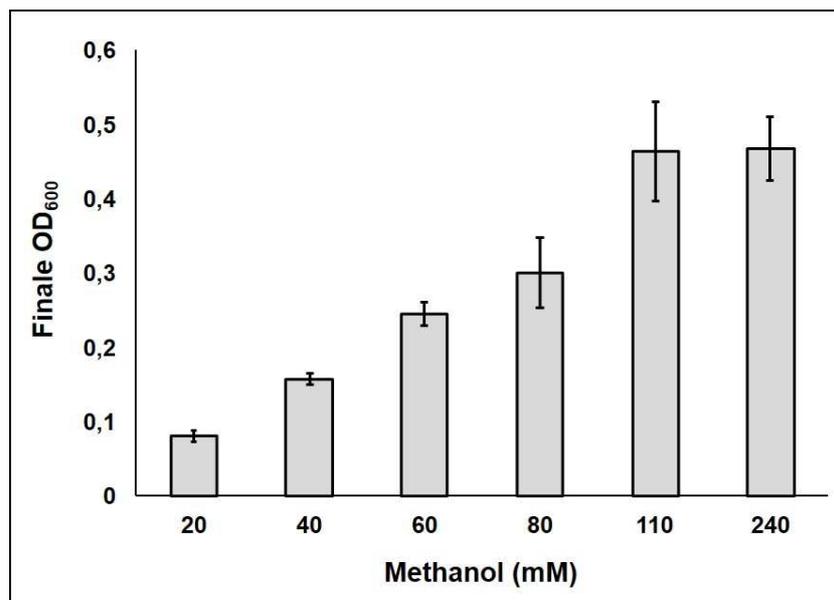


Abb. 4. Finale OD_{600} in Abhängigkeit von der Methanolkonzentration im Medium. Die Werte geben Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens drei durchgeführten Wachstumsversuchen wieder (modifiziert nach Kröninger *et al.* 2017).

Um zu testen, unter welchen Bedingungen die Methanolkonzentration im Medium das Wachstum nicht mehr begrenzt, wurde die Konzentration erneut erhöht, sodass den *M. luminyensis*-Kulturen zu Anfang des Wachstumsversuches 110 bzw. 240 mM Methanol (+ 200 kPa H₂) zur Verfügung standen. Aufgrund des Zusammenhangs, dass zur Erhöhung der OD₆₀₀ um 0,004 eine Methanolkonzentration von 1 mM nötig war, wurde erwartet, dass eine Kultur mit 110 mM Methanol eine OD₆₀₀ von 0,44 erreichen würde. Die erwartete, finale OD₆₀₀ konnte experimentell bestätigt werden, da sie sich auf 0,45 ± 0,08 belief (Abb. 4). Bei Kulturen, die 240 mM Methanol enthielten, wurde eine finale OD₆₀₀ von 0,96 vorhergesagt, was durch Wachstumsversuche jedoch nicht verifiziert werden konnte, da diese Kulturen nur eine OD₆₀₀ von 0,46 ± 0,04 erreichten. Dies warf die Hypothese auf, dass bei hohen Substratkonzentrationen (> 110 mM) nicht mehr das Substrat, sondern ein anderer Faktor das Wachstum von *M. luminyensis* begrenzt.

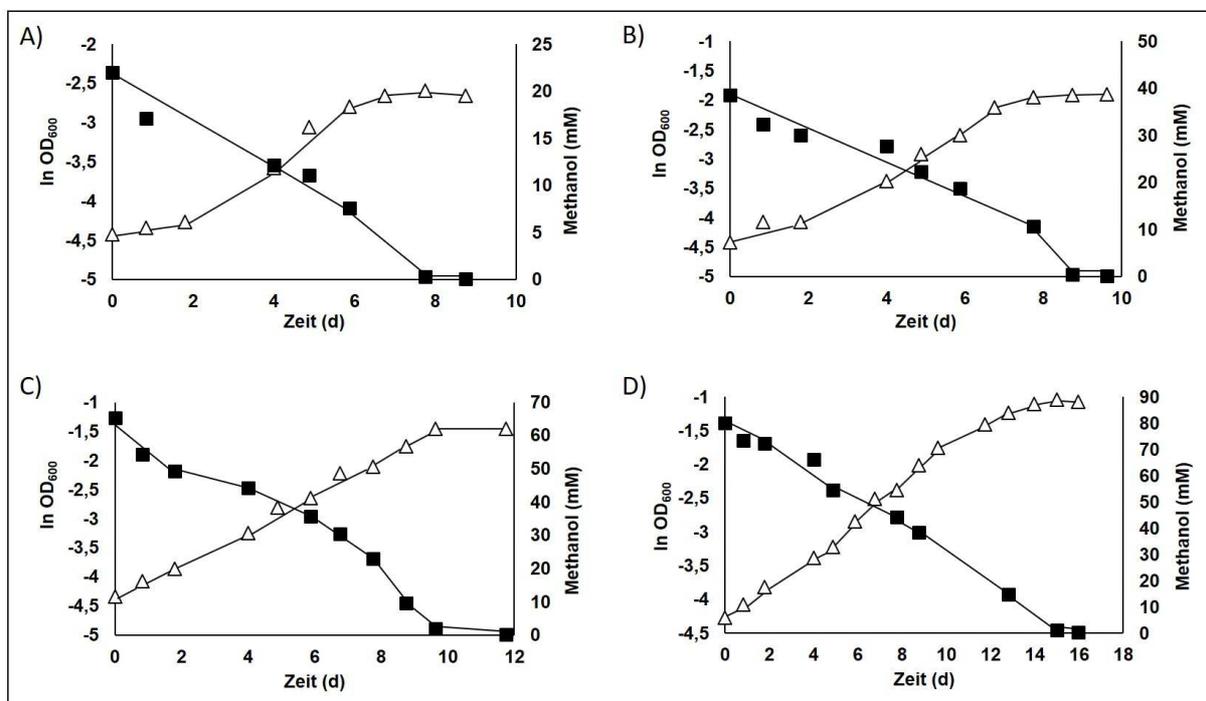


Abb. 5. Methanolkonzentration im Medium und logarithmierte OD₆₀₀ von *M. luminyensis*-Kulturen über die Zeit. A) Kultur mit 20 mM Methanol B) 40 mM Methanol C) 60 mM Methanol D) 80 mM Methanol. In OD₆₀₀ (△), Methanolkonzentration (■).

Neben der OD₆₀₀ wurden die Methanolkonzentrationen der Medienüberstände der Kulturen mit 20, 40, 60 und 80 mM Methanol gaschromatographisch bestimmt und über die Zeit verfolgt. Dies sollte die Vermutung verifizieren, dass Methanolkonzentrationen unter 110 mM das Wachstum von *M. luminyensis* limitierten. Es zeigte sich, dass zeitgleich mit der Zunahme der OD₆₀₀ eine Abnahme der Methanolkonzentration im Medium zu verzeichnen war (Abb. 5). Zu Beginn der stationären Phase war das Substrat in allen Kulturüberständen nahezu komplett verbraucht. Der Zeitpunkt, an dem Methanol komplett umgesetzt war, hing stark von der Methanolkonzentration ab, die dem Medium am Anfang des Experiments hinzugefügt worden war. Je mehr Methanol das Medium enthielt, desto größer war die Zeitspanne bis dieses komplett verbraucht war (20 mM Methanol, 7 d; 40 mM, 9 d, 60 mM, 10 d;

80 mM, 15 d), sodass die stationäre Phase umso später einsetzte, je mehr Methanol den Zellen zur Verfügung stand.

Ein weiterer Hinweis darauf, dass die Substratverwertung direkt mit der Erhöhung der Zellmasse der Kulturen einherging, ergab sich aus der Korrelation des Methanolverbrauchs mit der OD_{600} im Bereich der exponentiellen Phase (Abb. 6). Aus der Steigung der Regressionsgeraden ging hervor, dass *M. luminyensis* 24 ± 2 mM Methanol umsetzte, um eine OD_{600} von 0,1 zu erreichen. Darüber hinaus zeigte sich, dass ein linearer Zusammenhang zwischen der OD_{600} und dem Trockengewicht bestand, da eine theoretisch berechnete OD_{600} von 1 einer Zellausbeute von $0,59 \text{ g Trockengewicht L Kultur}^{-1}$ entsprach (Abb. 6, Insert). Aus diesen Daten ließ sich auch der Wachstumsertrag (Y_{CH_4}) von *M. luminyensis* berechnen. Dieser ist definiert als das Trockengewicht (g), das pro mol Substrat (Methanol) bzw. pro mol Produkt (Methan) generiert wird. Für methanogene Archaeen wird klassischerweise der Y_{CH_4} -Wert angegeben, indem Bezug auf das Produkt genommen wird. Für *M. luminyensis* betrug der Y_{CH_4} -Wert für Methanol $2,4 \text{ g Trockengewicht mol Methan}^{-1}$.

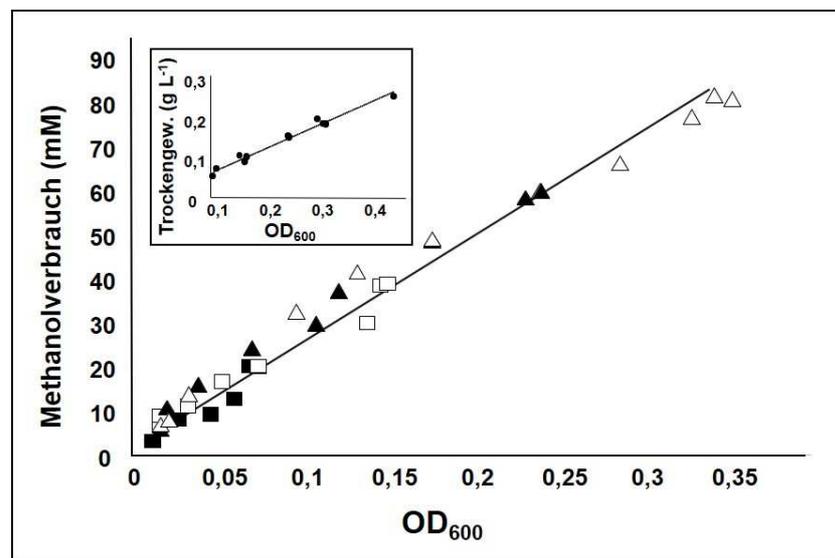


Abb. 6. Korrelation zwischen der OD_{600} und dem Methanolverbrauch von *M. luminyensis* auf Komplexmedium. Die anfängliche Methanolkonzentration im Medium betrug 20 mM (■), 40 mM (□), 60 mM (▲) bzw. 80 mM (△). Insert: Korrelation zwischen dem Trockengewicht und der OD_{600} (modifiziert nach Kröninger *et al.* 2017).

Der Methanolverbrauch und die Methanproduktion wurden noch nicht simultan bestimmt. Bisher war lediglich bekannt, dass *M. luminyensis* grundsätzlich ausgehend von Methanol + H_2 Methan generiert. Jedoch wurde nicht untersucht, ob der Methanolverbrauch direkt proportional zur Methanproduktion ist. Theoretisch ist es möglich, dass Methanol nicht nur als Energiequelle, sondern auch als Kohlenstoffquelle im Metabolismus von *M. luminyensis* fungiert. In diesem Fall wäre zu erwarten, dass der Methanolverbrauch der Kulturen die Methanproduktion übersteigt, da das Substrat bzw. dessen Methylgruppen nicht nur in den Katabolismus, aus dem Methan hervorgeht, sondern auch in den Anabolismus einfließen. Ist dies nicht der Fall, stellt sich die Frage, welche Kohlenstoffquelle

M. luminyensis tatsächlich nutzt und inwiefern diese Quelle während des Wachstums des Organismus verbraucht wird und schließlich das Wachstum limitiert. Um die Stöchiometrie zwischen Methanolverbrauch und Methanproduktion zu untersuchen, wurde *M. luminyensis* in Komplexmedium mit 150 mM Methanol und einer H₂-Atmosphäre (200 kPa) angezogen. Der Gasphase wurden täglich Proben entnommen, in denen Methan gaschromatographisch nachgewiesen und quantifiziert wurde. Methan besitzt eine geringe Löslichkeit in Wasser, sodass es nach der Methanogenese größtenteils direkt in die Gasphase des Kulturgefäßes übergeht. Darüber hinaus wurden die Zellen durch Zentrifugation vom Medium abgetrennt und die Methanolkonzentration des Medienüberstandes wurde ebenfalls per Gaschromatographie bestimmt. Es war zu beobachten, dass 150 mM Methanol innerhalb von 25 Tagen komplett zu äquimolaren Methanmengen umgesetzt wurden (Abb. 7). Alle Proben, die aus unabhängigen Versuchen zu unterschiedlichen Zeitpunkten hervorgingen, zeigten eine Stöchiometrie von $0,98 \pm 0,02$ von Methanolverbrauch zu Methanproduktion. Dies war ein Beweis dafür, dass das Substrat Methanol nicht in den Anabolismus, sondern lediglich in die Methanogenese einfließt. Die Verdopplungszeiten der Kulturen mit 150 mM Methanol + H₂ betragen $1,9 \pm 0,1$ d und korrelierten mit den Wachstumsparametern, die mit geringeren Methanolkonzentrationen bestimmt worden waren. Daher konnte ausgeschlossen werden, dass hohe Methanolkonzentrationen das Wachstum von *M. luminyensis* einschränken oder gar vollständig inhibieren.

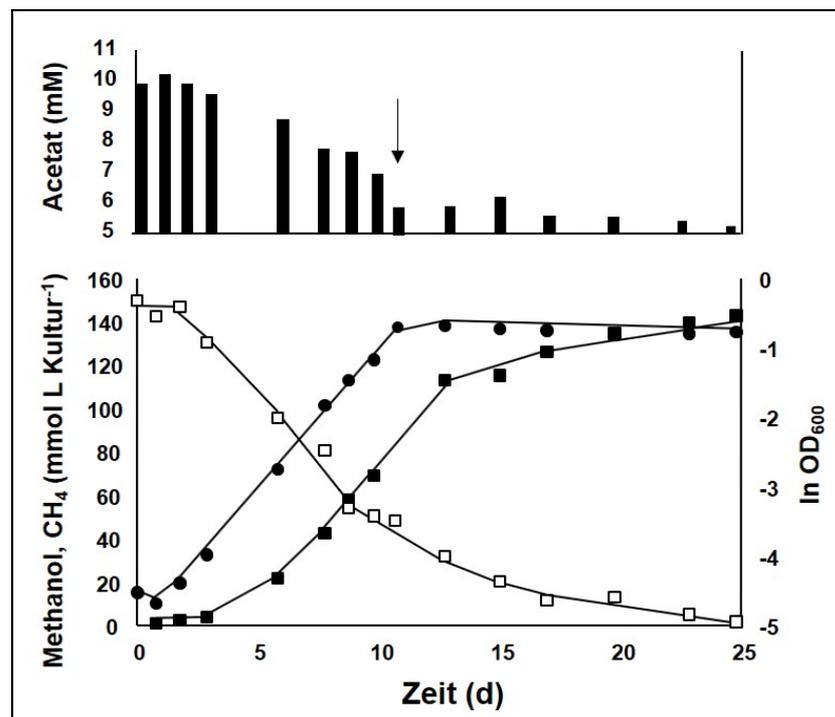


Abb. 7. Wachstumsparmeter und Acetatverbrauch während des Wachstums auf Komplexmedium mit 150 mM Methanol + H₂ als Substrate. Dargestellt sind die logarithmierte OD₆₀₀ (●), die Methanolkonzentration im Medium (□), die Methankonzentration (CH₄) in der Gasphase (■) und die Acetatkonzentration (schwarze Balken, oben) über die Zeit. Der schwarze Pfeil markiert den Zeitpunkt des Beginns der stationären Phase. Das Methanol/Methan-Verhältnis wurde aus der Methanolverbrauchs- und der Methanbildungsrate während der exponentiellen Phase berechnet (modifiziert nach Kröninger *et al.* 2017).

Beim Wachstum fiel außerdem auf, dass die stationäre Phase einsetzte, bevor Methanol vollständig zu Methan umgesetzt war. Zu diesem Zeitpunkt (Abb. 7, Tag 10) enthielt das Medium noch etwa 40 mM Methanol, sodass bis dahin lediglich 110 mM Methanol verbraucht worden waren. Folglich war die Methanolkonzentration in diesem Wachstumsversuch in der Tat nicht die wachstumslimitierende Komponente.

Aus den Methanmengen, die über die Zeit gebildet wurden, ließ sich auch die Methanbildungsrate der Kulturen berechnen. Die Methanbildungsrate korrelierte mit der OD_{600} und mit der Wachstumsphase der Kulturen, da am Ende der exponentiellen Phase die höchste Methanbildungsrate zu beobachten war. Diese betrug $14 \text{ mmol Methan L Kultur}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (Abb. 8). Sobald die stationäre Phase erreicht wurde (Tag 10), reduzierte sich die Methanbildung sukzessive bis sie schließlich vollständig zum Erliegen kam (ab Tag 20).

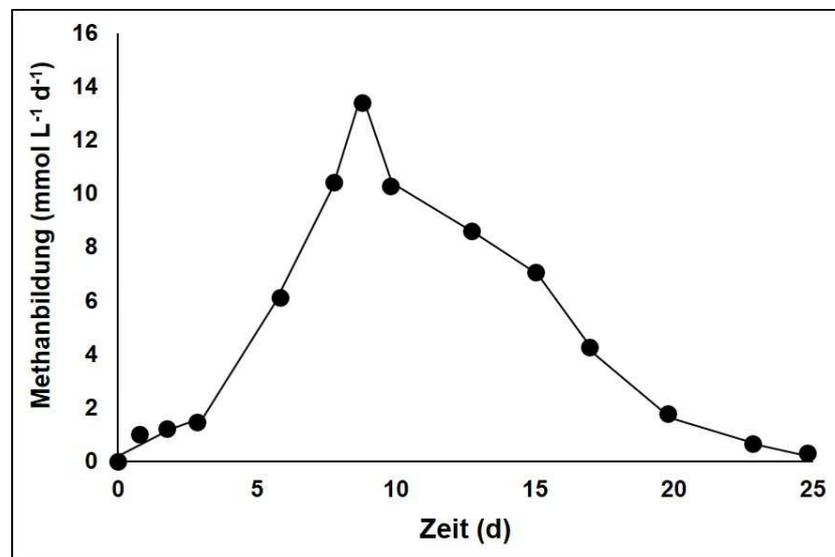


Abb. 8. Methanbildungsrate von *M. luminyensis* in Abhängigkeit von der Zeit. Die Kultur wurde mit 150 mM Methanol + H_2 (200 kPa) in Komplexmedium angezogen. Methan wurde gaschromatographisch in der Gasphase detektiert und quantifiziert. Eines von drei unabhängigen Experimenten ist gezeigt.

Eine detaillierte Analyse des Wachstums zeigte, dass die Kulturen eine maximale OD_{600} von ca. 0,5 erreichten, jedoch nur 110 mM Methanol verbrauchten. Das restliche Substrat wurde während der stationären Phase verbraucht, was sich in einer weiterhin detektierbaren Methanbildung widerspiegelte (Abb. 8, nach 10 Tagen), während die OD_{600} stagnierte (Abb. 7, ab Tag 10). Diese Phase dauerte etwa zehn Tage und endete erst, als kein Methanol mehr verfügbar war. Beim Wachstum war H_2 nicht der limitierende Faktor, da die Kulturen nach jeder Probenahme mit H_2 übergast wurden (3.1.4). Darüber hinaus wurde untersucht, ob die Salze im Medium, Acetat, Vitamine, Spurenelemente (inklusive Wolframat und Selenit), Eisenionen, Aminosäuren, Hefeextrakt oder Pepton das Wachstum von *M. luminyensis* limitierten, indem ihre Mengen im Medium verdoppelt wurden und das Wachstum der Kulturen erneut analysiert wurde. Es wurde jedoch festgestellt, dass die Verdopplung der genannten Komponenten keine Auswirkungen auf das Wachstum hatte. Des Weiteren wurde das Medium mit

Pansensaft von fistulierten Schafen und Flüssigextrakt von Schlamm aus einer Biogasanlage, sowie mit zellfreiem Extrakt von *Methanosarcina mazei* und *Methanotorris igneus* versetzt. Auf Grundlage dieses Versuchs sollte geklärt werden, ob *M. luminyensis* auf Verbindungen angewiesen ist, die der Organismus selbst nicht synthetisieren kann und die durch andere Organismen bereitgestellt werden müssen. Durch die Anzucht von *M. luminyensis* auf den Extrakten der methanogenen Archaeen sollte diese Fragestellung im Hinblick auf methanogene Cofaktoren untersucht werden. Jedoch wirkte sich der Zusatz dieser Komponenten letztendlich nicht auf die finale OD₆₀₀ aus, sodass der wachstumslimitierende Faktor von *M. luminyensis* nicht abschließend ermittelt werden konnte.

Wie aus der Bestimmung der Stöchiometrie zwischen Methanolverbrauch und Methanproduktion bereits hervorging, fungiert Methanol bei der Anzucht von *M. luminyensis* nicht als Kohlenstoffquelle, da Methanol im Verhältnis 1:1 zu Methan umgesetzt wird und somit lediglich in den Katabolismus einfließt. Im Medium, auf dem *M. luminyensis* angezogen wurde, waren Hydrogencarbonat (HCO₃⁻) und Acetat neben komplexen Bestandteilen als Kohlenstoffquellen enthalten. In wässriger Lösung reagiert HCO₃⁻ mit H⁺ zu CO₂ (und H₂O), das in die Gasphase übergeht bis sich ein Gleichgewicht zwischen dem gelösten HCO₃⁻ und dem CO₂ in der Gasphase einstellt. CO₂ kann von *M. luminyensis* nicht als Kohlenstoffquelle verwendet werden, da der Organismus nicht autotroph ist (Lang *et al.* 2015). Aus diesem Grund wurde Acetat als mögliche Kohlenstoffquelle in Betracht gezogen. Mit Hilfe der HPLC wurde in zellfreien Kulturüberständen untersucht, wie sich die Acetatkonzentration im Laufe des Wachstums veränderte. Es war zu beobachten, dass die Acetatkonzentration von anfangs 10,5 mM auf 5,5 mM in der frühen stationären Phase reduziert wurde (Abb. 7). Da kein vollständiger Verbrauch von Acetat stattfand, konnte eine Wachstumslimitierung durch Acetat ausgeschlossen werden. Aus der Korrelation zwischen Acetatverbrauch und Zellwachstum wurde berechnet, dass 16,5 mmol Acetat (oder 33 mmol Kohlenstoffatome) zur Bildung von 1 g Trockengewicht benötigt wurden (Abb. 9).

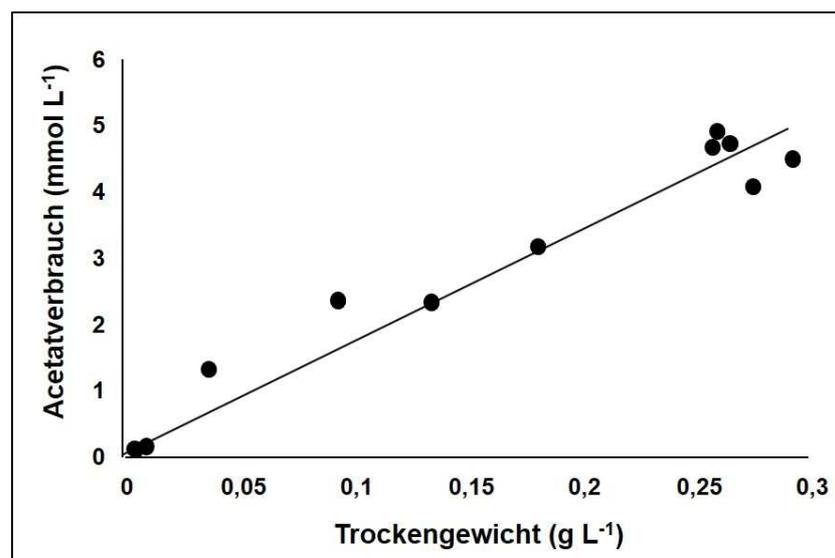


Abb. 9. Abhängigkeit der Trockengewichtsgenerierung vom Acetatverbrauch in der exponentiellen Wachstumsphase von *M. luminyensis*. Die Zellen wurden in Komplexmedium mit 150 mM Methanol + H₂ (200 kPa) angezogen (modifiziert nach Kröninger *et al.* 2017). Die Korrelation ergab sich auf Grundlage von drei unabhängigen Kulturen.

Nimmt man an, dass die Trockenmasse von *M. luminyensis* wie in *E. coli* zu 47 % aus Kohlenstoff besteht (Folsom und Carlson 2015), ergibt sich ein Gesamtkohlenstoffgehalt von 39,2 mmol pro g Trockengewicht. Dies bedeutet, dass 84 % des zellulären Kohlenstoffs ausgehend von Acetat generiert wurden. Der restliche Kohlenstoff stammte vermutlich aus Carboxylierungsreaktionen (z. B. Pyruvat-Synthase-Reaktion; WP_081579999.1, WP_019178606.1, WP_026068932.1; WP_019178604.1), in denen Pyruvat aus Acetyl-CoA und CO₂ generiert werden kann, welches dann in den Anabolismus einfließt. Darüber hinaus enthalten auch komplexe Medienbestandteile wie Pepton und Hefeextrakt organische Verbindungen, die von *M. luminyensis* genutzt werden könnten.

3.1.2 Wachstum auf Methylaminen + H₂

Neben Methanol sind auch Methylamine als Wachstumssubstrate von *M. luminyensis* beschrieben (Brugère *et al.* 2014; Lang *et al.* 2015). Diese fungieren ebenfalls nicht als Kohlenstoffquellen, sondern fließen lediglich in den Katabolismus, d. h. die Energiekonservierung und die Methanogenese, ein. Um die Verstoffwechslung von Methylaminen zu untersuchen, wurde *M. luminyensis* mit verschiedenen Methylaminen und einer H₂-Atmosphäre (200 kPa) angezogen, wobei spezifische Wachstumsparameter bestimmt wurden.

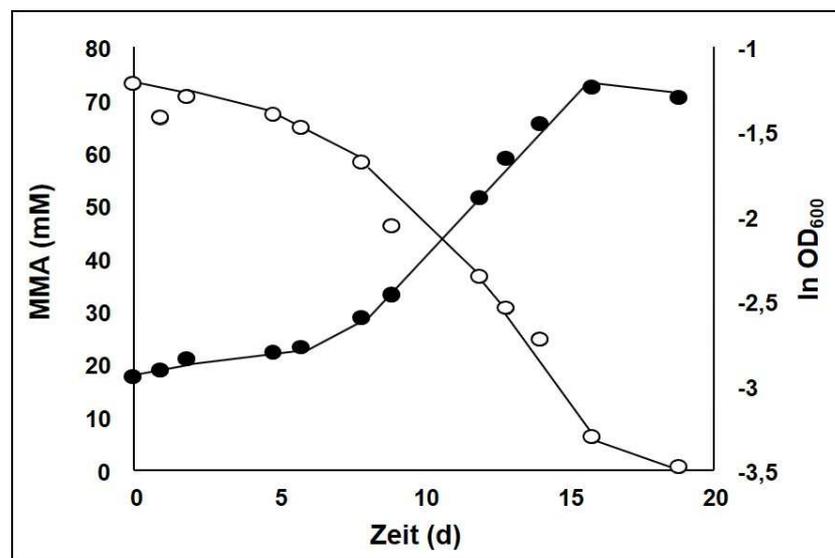


Abb. 10. Wachstum von *M. luminyensis* mit MMA + H₂. *M. luminyensis* wurde auf Komplexmedium mit 75 mM MMA + H₂ (200 kPa) angezogen. Dargestellt sind die logarithmierten Werte der OD₆₀₀ (●) und die MMA-Konzentration (○) (modifiziert nach Kröninger *et al.* 2017). Eines von drei unabhängigen Experimenten ist gezeigt.

Zunächst wurde untersucht, wie Monomethylamin (MMA) von *M. luminyensis* zu Methan umgesetzt wird. Dazu wurden Kulturen auf 75 mM MMA in Komplexmedium angezogen. MMA wurde in Anwesenheit von H₂ innerhalb von 18 d vollständig verbraucht (Abb. 10). Der Verbrauch von MMA korrelierte mit der Zunahme der OD₆₀₀, was auf Zellwachstum zurückzuführen war. Final betrug die

OD₆₀₀ etwa 0,3 und stimmte mit der finalen OD₆₀₀ überein, die mit der gleichen Menge Methanol erreicht wurde. Da MMA und Methanol nur über jeweils eine Methylgruppe verfügen, die in die Energiekonservierung bzw. Methanogenese einfließen können, führten gleiche Konzentrationen der Substanzen zu vergleichbaren Zellerträgen. Die Verdopplungszeit von *M. luminyensis* war mit MMA im Vergleich zur Verdopplungszeit auf Methanol leicht erhöht, da die Zellen $2,3 \pm 0,5$ d für eine Teilung benötigten. Am Ende der exponentiellen Phase bzw. beim Übergang in die stationäre Phase war kein MMA im Medium mehr nachweisbar, was bedeutete, dass eine Konzentration von 75 mM MMA das Wachstum limitierte.

Um das Wachstum von *M. luminyensis* mit DMA als Substrat zu untersuchen, wurde der Organismus mit 37,5 mM DMA + H₂ angezogen. DMA besitzt im Gegensatz zu Methanol und MMA zwei Methylgruppen, sodass nur die Hälfte der DMA-Konzentration benötigt wurde, um äquimolare Konzentrationen zu Methanol und MMA in Bezug auf die Methylgruppen zu erhalten. Darüber hinaus bedeutet dies, dass nur die Hälfte der DMA-Konzentration erforderlich war (37,5 mM), um den gleichen Zellertrag zu generieren wie mit 75 mM Methanol oder MMA. Zur Analyse des Wachstumsverhaltens wurden die OD₆₀₀ und die DMA-Konzentration im Medium über die Zeit verfolgt. Nach der Inokulation des Mediums wurde DMA sukzessive verbraucht, während sich die OD₆₀₀ zeitgleich erhöhte (Abb. 11). Die Zellen wuchsen mit einer Rate von $0,32 \pm 0,07$ d⁻¹, was einer Verdopplungszeit von $2,2 \pm 0,5$ d entsprach. Zu dem Zeitpunkt, als DMA komplett verbraucht war (Tag 10), stagnierte das Wachstum der Kulturen und diese gingen in die stationäre Phase über. Die OD₆₀₀ betrug zum Zeitpunkt der Wachstumsstagnation 0,28, was gut mit den finalen OD₆₀₀-Werten der Kulturen, die auf 75 mM Methanol bzw. MMA angezogen wurden (jeweils 0,3), übereinstimmte.

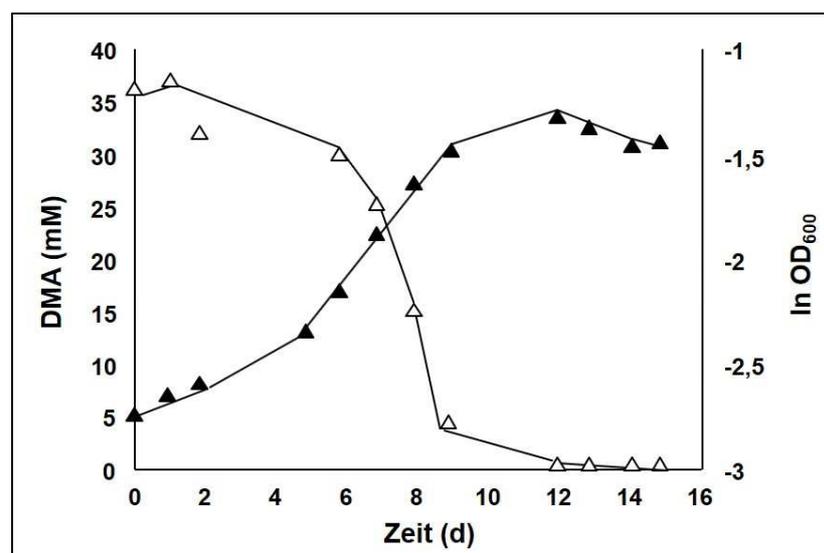


Abb. 11. Wachstum von *M. luminyensis* auf DMA + H₂. *M. luminyensis* wurde in Komplexmedium mit 37,5 mM DMA + H₂ (200 kPa) angezogen. Dargestellt sind die logarithmierte OD₆₀₀ (▲) und die MMA-Konzentration (△) im zeitlichen Verlauf (modifiziert nach Kröninger *et al.* 2017). Eines von drei unabhängigen Experimenten ist gezeigt.

TMA besitzt drei Methylgruppen, die in *Methanosarcina*-Spezies schrittweise zu Methan reduziert werden (Krätzer *et al.* 2009). Bei der Verstoffwechslung von TMA sind bei dieser Gattung daher DMA und MMA als Intermediate nachweisbar. Diese werden temporär im Medium akkumuliert, bevor auch sie schließlich als Substrate fungieren und zu Methan reduziert werden (Krätzer *et al.* 2009). Auf Grundlage dieser Beobachtung wurde vermutet, dass auch *M. luminyensis* bei Wachstum auf TMA DMA und MMA als Intermediate bildet, und diese temporär im Medium nachgewiesen werden können. Deshalb wurde bei Wachstumsversuchen mit TMA nicht nur die TMA-Konzentration im Medium untersucht, sondern auch die MMA- und die DMA-Konzentration. Da TMA drei Methylgruppen trägt, wurde die Konzentration entsprechend angepasst, sodass äquimolare Mengen an Methylgruppen im Vergleich zu Methanol/MMA (jeweils 75 mM) und DMA (37,5 mM) im Medium enthalten waren. Aus diesem Grund wurde eine TMA-Konzentration von 25 mM eingesetzt, die einer Methylgruppenkonzentration von 75 mM entsprach. Die Kulturen, die auf 25 mM TMA + H₂ (200 kPa) wuchsen, zeigten eine Verdopplungszeit von $2,1 \pm 0,4$ d (Abb. 12). Verglichen mit den Verdopplungszeiten, die die Kulturen auf den übrigen Methylaminen zeigten, war dies die kürzeste Verdopplungszeit, die innerhalb dieser Substratklasse beobachtet werden konnte. Im Gegensatz zum Wachstum mit Methanol als Methylgruppendonor war das Wachstum geringfügig langsamer ($t_d = 1,8$ d). Die finale OD₆₀₀ der Kulturen, die 25 mM TMA + H₂ als Substrate enthielten, betrug 0,28 und stimmte mit den OD₆₀₀-Werten überein, die für äquimolare Substratkonzentrationen in Bezug auf die Methylgruppen für Methanol, MMA und DMA festgestellt wurden.

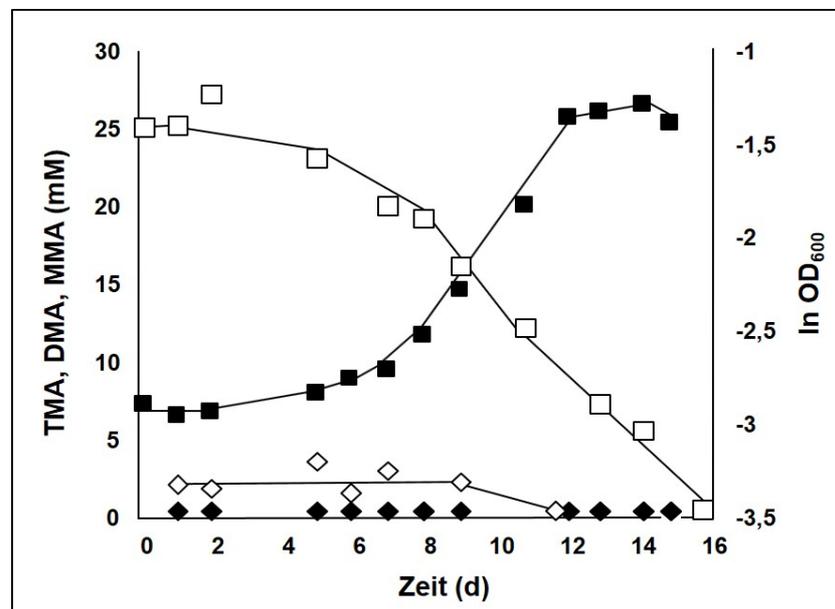


Abb. 12. Wachstum von *M. luminyensis* auf TMA + H₂ und Methylaminkonzentration im Medium. Die TMA-Konzentration betrug vor dem Inokulieren 25 mM. Dargestellt sind die TMA-Konzentration (□), die DMA-Konzentration (◇), die MMA-Konzentration (◆) und die logarithmierte OD₆₀₀ (■) im zeitlichen Verlauf (modifiziert nach Kröninger *et al.* 2017). Eines von drei unabhängigen Experimenten ist gezeigt.

Überraschenderweise konnten die Intermediate des TMA-Abbaus, die in *Methanosarcina mazei* gebildet werden (Krätzer *et al.* 2009), in *M. luminyensis* nicht bzw. nur in sehr geringen Konzentrationen detektiert werden. Während die TMA-Konzentration nach dem Beimpfen des Mediums sukzessive abnahm und mit der Erhöhung der OD₆₀₀ einherging, konnte DMA nur kurzzeitig zwischen Tag 1 und Tag 10 nachgewiesen werden. Hierbei betrug die Konzentration durchgehend maximal 4 mM. Etwa zu dem Zeitpunkt, als die Kulturen die stationäre Phase erreichten (Tag 10), wurde DMA vollständig verbraucht und konnte nicht mehr detektiert werden. Im Gegensatz dazu war der Nachweis von MMA während des kompletten Versuchszeitraums nicht möglich, sodass angenommen wird, dass MMA nicht als Intermediat während der TMA-Verstoffwechslung durch *M. luminyensis* gebildet wird.

Um die Effizienz der Energiekonservierung von *M. luminyensis* bei Wachstum auf TMA mit der Effizienz auf Methanol vergleichen zu können, wurde anhand des Trockengewichts und der Methanbildung von Kulturen, die auf TMA angezogen wurden, der Wachstumsertrag (Y_{CH_4}) bestimmt. Dieser betrug 2,4 g Trockengewicht mol Methan⁻¹ und stimmte somit exakt mit dem Wert überein, der für Zellen bestimmt worden war, die Methanol + H₂ als Substrate nutzten (3.1.1). Diese Beobachtung deutete darauf hin, dass beide Substrate gleichermaßen geeignete Energiequellen für *M. luminyensis* darstellen.

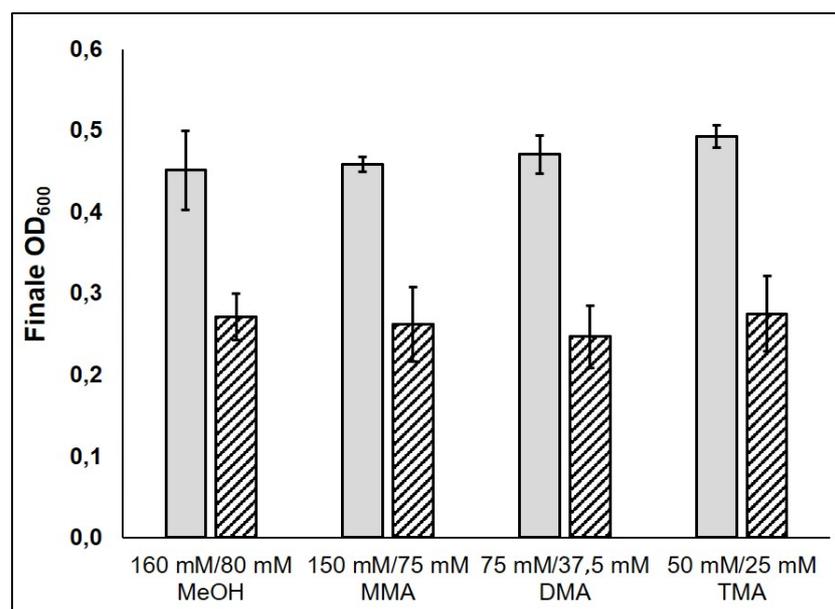


Abb. 13. Einfluss der Substratkonzentration auf die finale OD₆₀₀. *M. luminyensis* wurde unter wachstums-limitierenden Substratkonzentrationen (schraffiert; 80 mM Methanol, 75 mM MMA, 37,5 mM DMA, 25 mM TMA) und nicht-limitierenden Konzentrationen (grau; 160 mM Methanol, 150 mM MMA, 75 mM DMA, 50 mM TMA) mit H₂ (200 kPa) in Komplexmedium angezogen. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der finalen OD₆₀₀-Werte ergaben sich jeweils aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Wachstumsversuchen.

Bei Wachstum auf Methanol wurde bereits gezeigt, dass durch eine Erhöhung der Methanolkonzentration im Medium der Zellertrag signifikant erhöht wurde (3.1.1). Erst wenn dem Organismus mehr als 110 mM Methanol zur Verfügung standen, begrenzte nicht mehr die

Methanolkonzentration, sondern eine bisher nicht identifizierte Komponente das Wachstum. Analog wurde getestet, ob auch durch Erhöhung der Methylaminkonzentration im Medium die finale OD_{600} gesteigert werden konnte. Dazu wurde die Substratkonzentration im Vergleich zu den vorherigen Methylaminkonzentrationen verdoppelt, sodass jeweils 75 bzw. 150 mM Methylgruppenäquivalente zur Verfügung standen. Sowohl bei TMA, als auch bei DMA und MMA führte eine Verdopplung der Konzentration im Medium zu einer signifikanten Steigerung der finalen OD_{600} (Abb. 13). Wie auch bei der Anzucht auf Methanol führte die Verdopplung der Methylaminmenge jedoch nicht zu einer proportionalen Steigerung des Zellertrages, was erneut darauf hindeutete, dass ein anderer Faktor als das Substrat für die Wachstumslimitierung verantwortlich war. Da anhand der finalen OD_{600} -Werte keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden konnten, fand der Übergang der Zellen in die stationäre Phase, unabhängig vom eingesetzten Substrat, vermutlich immer nach einem Verbrauch von 110 mM Methylgruppenäquivalent statt.

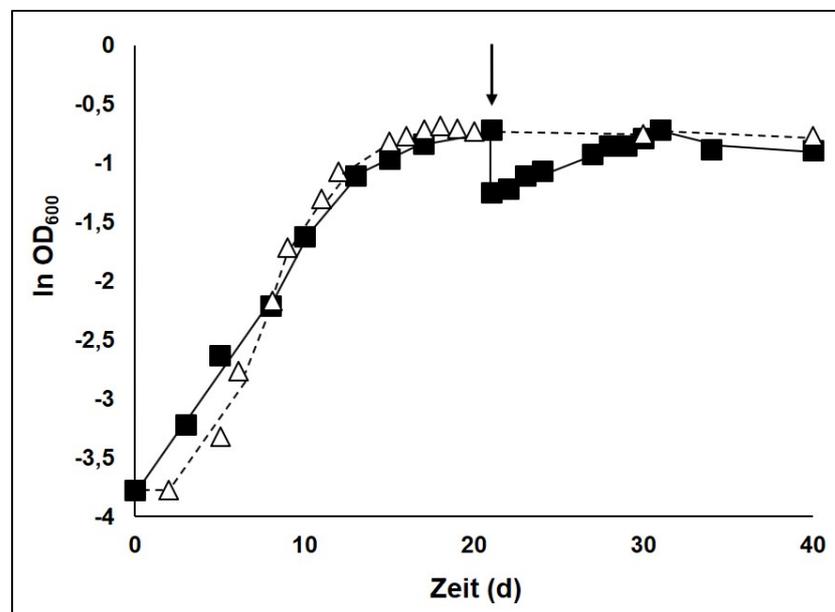


Abb. 14. Einfluss des Zusatzes von frischem Medium auf das Zellwachstum. Beim Erreichen der stationären Phase wurde das Volumen der Kultur durch Zugabe von frischem Medium verdoppelt. Substrat wurde hingegen nicht erneut hinzugefügt, sodass den Zellen lediglich 240 mM Methanol + H₂, die vor dem Inokulieren hinzugegeben wurden, zur Verfügung standen. Der Pfeil verdeutlicht den Zeitpunkt der Medienzugabe zur stationären *M. luminyensis*-Kultur (■). Einer Kontrollkultur (Δ) wurde kein frisches Medium hinzugesetzt.

Um zu zeigen, dass die Zellen nach dem Übergang in die stationäre Phase weiterhin aktiv waren und tatsächlich eine Komponente im Medium und nicht das Substrat das Wachstum begrenzte, wurde eine *M. luminyensis*-Kultur mit 240 mM Methanol + H₂ (200 kPa) in 100 mL Komplexmedium anzogen. Diese Substratkonzentration entsprach durch Einbeziehen des Kulturvolumens einer absoluten Methanolmenge von 24 mmol. Es war zu erwarten, dass den Zellen beim Erreichen der stationären Phase immer noch ca. 130 mM Methanol (13 mmol) zur Verfügung standen, wenn 110 mM Methanol (11 mmol) zum Erreichen der stationären Phase benötigt wurden (3.1.1). Beim Einsetzen der

Wachstumsstagnation wurde der Kultur frisches Medium ohne weiteres Substrat zugesetzt, was sich in der Wachstumskurve in der Abnahme der OD₆₀₀ an Tag 20 widerspiegelte (Abb. 14, Pfeil). Nach dem Zusatz des frischen Mediums war erneut Wachstum zu verzeichnen bis die OD₆₀₀ einen Wert erreichte, der der OD₆₀₀ vor dem Zusatz des neuen Mediums entsprach. Eine Kontrollkultur, der kein frisches Medium zugesetzt wurde, wies nach der exponentiellen Phase kein weiteres Wachstum mehr auf, obwohl noch Restsubstrat vorhanden war. Ein interessanter Aspekt eröffnete sich im Hinblick auf die finale Zellmasse der Kulturen. Beim Erreichen der stationären Phase vor dem Zusatz des frischen Mediums (Tag 20) betrug die absolute Proteinmenge 98 ± 3 mg (Kulturvolumen: 100 mL), d. h., dass mit anfänglich 24 mmol Methanol hier nur eine vergleichsweise geringe Proteinmenge generiert worden war. Nach Zusatz des Mediums lag zwar beim erneuten Erreichen der stationären Phase (Tag 30) eine vergleichbare OD₆₀₀, aber ein größeres Kulturvolumen vor (190 mL), was in die Berechnung der absoluten Proteinmenge einfluss. Beim Erreichen der ‚zweiten‘ stationären Phase betrug die absolute Proteinmenge 162 ± 6 mg ausgehend von initialen 24 mmol Methanol. Insgesamt lässt sich also festhalten, dass zwar nicht die finale OD₆₀₀, aber die gebildete Proteinmenge pro mmol Substrat durch die Zugabe des frischen Mediums erhöht wurde. Während die nicht-supplementierte Kultur einen Proteingehalt von $4,1$ mg Protein mmol Methanol⁻¹ aufwies, was auf der unvollständigen Umsetzung des Substrates bis zum Beginn der stationären Phase basierte, betrug der Proteingehalt bei der supplementierten Kultur $6,8$ mg mmol Methanol⁻¹. Diese Kultur verbrauchte das Substrat nahezu vollständig während der beiden exponentiellen Phasen. Dies zeigte, dass bei gleichbleibender, absoluter Substratmenge 60 % mehr Zellprotein generiert werden konnte als ohne Zusatz des frischen Mediums. Wird die Verdünnung der Kultur durch das Medium herausgerechnet und die OD₆₀₀ auf die zur Verfügung stehende Substratmenge bezogen, wird der Unterschied noch einmal anders deutlich. Dann erreichte die mit frischem Medium supplementierte Kultur eine theoretische OD₆₀₀ von mehr als 0,9 mit 240 mM Methanol, während der nicht-supplementierte Ansatz bei OD₆₀₀ 0,5 verblieb (Daten nicht gezeigt).

Dieser Versuch war ein weiteres Indiz dafür, dass nicht die Verfügbarkeit des Substrats (Methanol) das Wachstum bestimmte. Dass eine Komponente des Mediums das Wachstum limitierte, erschien ebenfalls unwahrscheinlich, da durch die Verdopplung der Medienbestandteile keine Wachstumssteigerung herbeigeführt werden konnte. Deshalb warf das Experiment die Vermutung auf, dass *M. luminyensis* selbst während des Wachstums toxische, wachstumshemmende Stoffwechselendprodukte generiert, deren Konzentration durch die Zugabe des frischen Mediums temporär verdünnt wurde. Dies ermöglichte kurzzeitig Wachstum bis schließlich erneut so hohe Konzentrationen an toxischen Stoffwechselendprodukten erreicht wurden, dass diese das Wachstum wieder inhibierten. Es kann außerdem nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass die Zelldichte das Wachstum maßgeblich beeinflusst und etwa *Quorum Sensing* dazu beiträgt, dass ab einer gewissen Zelldichte keine Zellteilung mehr eingeleitet wird.

3.1.3 Wachstum auf weiteren Methylgruppendonoren

Nicht nur Methanol und Methylamine können in methylotrophen Methanarchaeen als Methanogenese-substrate verwendet werden, sondern auch Glycin-Betain und Cholin. Von *Methanococoides* spp. ist bekannt, dass diese Glycin-Betain durch Demethylierung zu N,N-Dimethylglycin umsetzen und die abgespaltene Methylgruppe zu Methan reduzieren können (Watkins *et al.* 2014). Darüber hinaus können einige Vertreter der Gattung *Methanococoides* Cholin als Substrat verwenden, indem sie von dieser Verbindung ebenfalls Methylgruppen abspalten und zu Methan reduzieren (Watkins *et al.* 2012). Glycin-Betain und Cholin sind generell weit verbreitete Verbindungen. Während Cholin u. a. in Phosphatidylcholin, einem Bestandteil der Zellmembranen, in Acetylcholin, einem Neurotransmitter, und in lecithinreichen Lebensmitteln wie Eiern, einigen Fleischsorten und Soja enthalten ist, findet Glycin-Betain vor allem im Zusammenhang mit Salz- und Trockenstress als kompatibles Solut Erwähnung. Darüber hinaus fungiert Glycin-Betain als Substrat der Methioninsynthese (Zeisel und da Costa 2009). Da Cholin auch im Gastrointestinaltrakt, dem Habitat von *M. luminyensis*, nachzuweisen ist, weil regelmäßig über die Nahrung aufgenommenes Cholin den Darm erreicht (Zeisel und da Costa 2009), kam es als mögliches Substrat des Archaeons in Betracht.

M. luminyensis wurde zur Untersuchung der Fragestellung, ob Glycin-Betain oder Cholin als Substrate verwendet werden können, in Komplexmedium mit 25 mM Glycin-Betain bzw. 25 mM Cholin mit H₂ als Elektronendonator inkubiert. Die Zelldichte wurde über zwei Monate regelmäßig kontrolliert, wobei keine Zunahme der Zelldichte detektiert werden konnte. Somit eignen sich beide Verbindungen nicht als Substrate von *M. luminyensis*. Um Glycin-Betain und Cholin als Substrate für *M. luminyensis* nutzbar zu machen, müssen die Verbindungen zunächst durch ebenfalls im Darm vorkommende Bakterien zu Methylaminen (z. B. TMA) umgesetzt werden, was Borrel *et al.* (2014) bereits postulierten. Methylamine wiederum können von *M. luminyensis* als Substrate verwendet werden. Das trophische Netzwerk im Darm wird in Kapitel 4.1 noch ausführlich thematisiert.

3.1.4 Einfluss der Gasphase auf das Wachstum von *M. luminyensis*

H₂ ist als Elektronendonator beim Wachstum von *M. luminyensis* unerlässlich (Dridi *et al.* 2012a; Lang *et al.* 2015). Ohne dieses Molekül findet keine Methanbildung statt und es kommt nicht zum Wachstum, da der Organismus nicht die Energie generieren kann, die für Wachstumsprozesse essentiell ist.

Um zu untersuchen, welcher Partialdruck für das Wachstum des Organismus optimal ist, wurde *M. luminyensis* mit einer definierten Substratmenge (80 mM Methanol), aber mit Gasatmosphären unterschiedlicher H₂-Partialdrücke angezogen. Diese betragen zwischen 100 kPa (annähernd Atmosphärendruck) und 200 kPa, was einem Überdruck von 1 bar im Vergleich zum Atmosphärendruck entsprach und in den vorangegangenen Untersuchungen zum Wachstum auf den unterschiedlichen Methylgruppendonoren verwendet wurde, um eine optimale Versorgung mit dem Elektronendonator H₂ zu gewährleisten. Es zeigte sich, dass der Druck, mit dem H₂ auf die Kulturgefäße gegeben wurde, keinen Einfluss auf das Wachstum von *M. luminyensis* hatte, da der Organismus bei allen untersuchten

Druckverhältnissen die gleiche finale OD_{600} erreichte, die $0,32 \pm 0,03$ betrug (Abb. 15). Darüber hinaus zeigten alle Ansätze mit $1,8 \pm 0,1$ d vergleichbare Verdopplungszeiten. Da die Kulturen nach jeder Probennahme mit H_2 übergast wurden und die H_2 -Gasphase somit vollständig erneuert wurde, war der Druck nicht entscheidend für das Wachstum des Organismus, da durch das Übergasen in regelmäßigen Abständen neues Substrat bereitgestellt wurde. Generell ist *M. luminyensis* folglich nicht auf einen hohen H_2 -Partialdruck angewiesen, solange periodisch neues Gas (H_2) zugeführt wird.

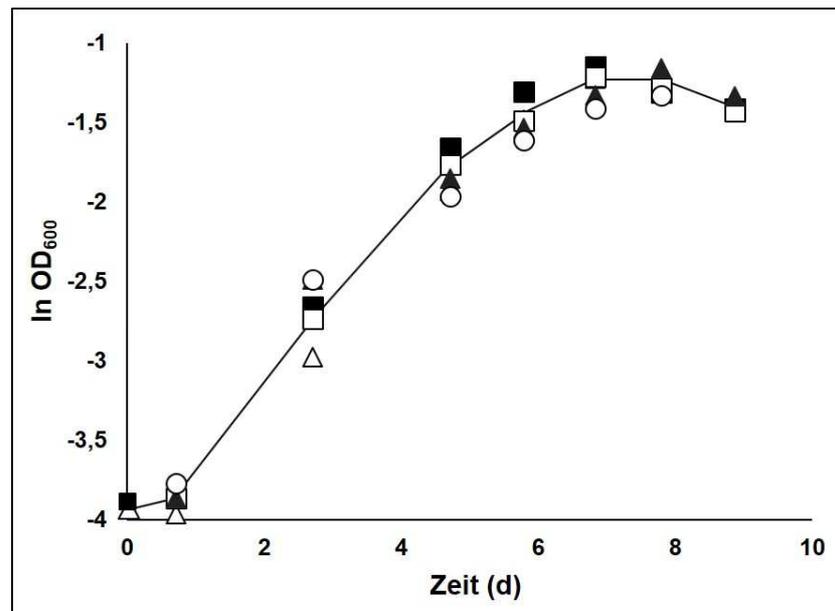


Abb. 15. Einfluss des H_2 -Partialdruckes auf das Wachstum von *M. luminyensis*. Der Organismus wurde mit 80 mM Methanol in Komplexmedium angezogen. Die Gasatmosphäre wurde nach jeder OD_{600} -Bestimmung vollständig erneuert. Der Druck der H_2 -Gasatmosphäre betrug 100 kPa (○), 125 kPa (▲), 150 kPa (□), 175 kPa (△) und 200 kPa (■).

In vorangegangenen Versuchen hatte sich herausgestellt, dass *M. luminyensis* zum Erreichen von einer OD_{600} von 1 theoretisch eine Methanolkonzentration von 240 mM benötigt und diese OD_{600} einem Trockengewicht von $0,59 \text{ g L Kultur}^{-1}$ entspricht (3.1.1). Darüber hinaus ist für die Reduktion eines Methanolmoleküls ein H_2 -Molekül als Elektronendonator erforderlich, da die Umsetzung von Methanol und H_2 im Verhältnis von 1:1 erfolgt.

Die Kulturen, die unterschiedliche H_2 -Partialdrücke enthielten (Abb. 15), erreichten eine OD_{600} von ca. 0,32, was bedeutete, dass diese rechnerisch genau 77 mM Methanol zu Methan umsetzten und ein Zelltrockengewicht von $0,19 \text{ g L Kultur}^{-1}$ erreichten. Da das Volumen der Kulturen 50 mL betrug, belief sich der absolute Methanolverbrauch auf 3,9 mmol. Aufgrund des äquimolaren Bedarfs an Methanol und H_2 konnte gefolgert werden, dass die Kulturen zeitgleich 77 mM H_2 oxidierten. Dies entsprach einer absoluten H_2 -Menge von 3,9 mmol, welche unter den Versuchsbedingungen ($37 \text{ }^\circ\text{C}$) ein Volumen von 97,4 mL einnahm ($25,3 \text{ mL mmol}^{-1}$). Das Volumen der Gasphase betrug in 100 mL-Kulturgefäßen jedoch nur 50 mL, wenn 50 mL Flüssigkultur enthalten waren und kein Überdruck herrschte (101,3 kPa). Dieses H_2 -Volumen kam einer absoluten H_2 -Menge von 2,0 mmol gleich. Bei H_2 -Partialdrücken von

125 kPa, 150 kPa, 175 kPa und 200 kPa beliefen sich die absoluten H₂-Mengen in den Gefäßen dagegen auf 2,4 mmol H₂, 2,9 mmol H₂, 3,4 mmol H₂ bzw. 3,9 mmol H₂. Dies bedeutete, dass ohne wiederholtes Übergasen mit H₂ ein H₂-Partialdruck von genau 200 kPa (entsprach einer H₂-Menge von 3,9 mmol) nötig war, um das Wachstum der Kulturen nicht durch die Verfügbarkeit von H₂ zu begrenzen. Unter den gezeigten Bedingungen (Verbrauch von 3,9 mmol Methanol) musste eine Kultur folglich nur einmal am Anfang des Versuchs mit mindestens 200 kPa 100 % H₂ begast werden, damit bis zum Erreichen der stationären Phase, wenn Methanol vollständig verbraucht war, keine Wachstumslimitierung durch H₂ eintrat. Da die Kulturen regelmäßig übergast wurden, wurde der Wachstumsbegrenzung jedoch auch bei niedrigen H₂-Partialdrücken (< 200 kPa) entgegengewirkt, wodurch verhindert wurde, dass Kulturen mit geringeren H₂-Partialdrücken ein vermindertes Wachstum zeigten. Der Versuch verdeutlichte auch, dass die Gasatmosphäre bei höheren Methanolkonzentrationen (> 77 mM) und einem konstanten H₂-Partialdruck von 200 kPa periodisch ausgetauscht werden musste, damit keine Wachstumslimitierung durch H₂ eintrat.

Ein weiterer Versuch, bei dem die H₂-Gasatmosphäre teilweise durch N₂ ersetzt wurde, lieferte ähnliche Ergebnisse. Hierbei wurde *M. luminyensis* ebenfalls mit 80 mM Methanol angezogen (entsprach 4 mmol Methanol in 50 mL-Kulturen), wobei die Gasatmosphäre zu 100 % oder nur zu 90 %, 80 % und 70 % aus H₂ bestand, der Druck jedoch immer 200 kPa betrug (Daten nicht gezeigt). Solange die Kulturen in regelmäßigen Abständen mit H₂ übergast wurden, wirkte sich der verminderte H₂-Anteil nicht negativ auf das Wachstum aus. Dies warf die Vermutung auf, dass erst längere Zeiträume ohne erneutes Übergasen dazu führen, dass Kulturen mit einem verringerten H₂-Anteil in der Gasphase im Wachstum limitiert werden. Im Detail entsprachen Gasatmosphären mit 70 %, 80 % oder 90 % H₂ bei einem Druck von 200 kPa absoluten H₂-Mengen von 2,7 mmol, 3,1 mmol und 3,5 mmol (100 % entsprachen 3,9 mmol), wenn der Versuch wie zuvor mit 50 mL-Kulturen in 100 mL-Kulturgefäßen durchgeführt wurde. Dies bedeutete, dass der verminderte H₂-Anteil generell das Wachstum bzw. die vollständige Umsetzung von 4 mmol Methanol begrenzt hätte, wenn nicht in regelmäßigen Abständen mit H₂ übergast worden wäre. Da *M. luminyensis* jedoch in allen Wachstumsexperimenten, die ihm Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, regelmäßig während des Wachstums mit H₂ übergast wurde, war die Versorgung mit H₂ stets optimal und die H₂-Verfügbarkeit beeinträchtigte das Wachstum nicht.

Aus den Daten ließ sich auch berechnen, wie viel H₂ zur Trockengewichtsgenerierung benötigt wurde. Basierend auf der Annahme, dass die Elementarzusammensetzung von *M. luminyensis* ähnlich zur Elementarzusammensetzung von *E. coli* ist (C₁H_{1,7}N_{0,2}O_{0,4}; Folsom und Carlson 2015), ergab sich bei der Biomassegenerierung ein Bedarf von 1,34 mmol H₂ g Trockengewicht⁻¹. Durch Acetat (C₂H₃O₂ bzw. C₁H_{1,5}O₁) konnten jedoch nur 1,18 mmol H₂ g Trockengewicht⁻¹ bereitgestellt werden, sodass sich eine Differenz von 0,16 mmol H₂ g Trockengewicht⁻¹ ergab, die durch H₂ in der Gasphase gedeckt werden musste. Da im Versuch insgesamt nur 9,5 mg Biomasse generiert wurden (0,05 L mit 0,19 g Trockengewicht L⁻¹), betrug der absolute H₂-Bedarf 1,45 µmol, was nur etwa 0,04 % der über die Gasphase zugeführten H₂-Menge von 4 mmol entsprach. Folglich war der Bedarf an H₂ für den Anabolismus vernachlässigbar klein gegenüber dem H₂-Bedarf für die Methanogenese.

3.2 Substratpräferenzen von *M. luminyensis*

M. luminyensis zeigt in Bezug auf die Methylgruppendonoren, deren Methylgruppen zu Methan reduziert werden können, eine verhältnismäßig große Bandbreite, da der Organismus sowohl Methanol, als auch Methylamine als Substrate nutzen kann. Welches Substrat jedoch im natürlichen Habitat von *M. luminyensis* verfügbar ist und bevorzugt vom Organismus genutzt wird, war bisher nicht bekannt. Dies ist zum einen der Tatsache geschuldet, dass relativ wenig über die abiotische Zusammensetzung des Darminhalts bekannt ist. Zum anderen ist fast nichts über die Physiologie methanogener Organismen im Darm und im Speziellen über die Physiologie von *M. luminyensis* veröffentlicht.

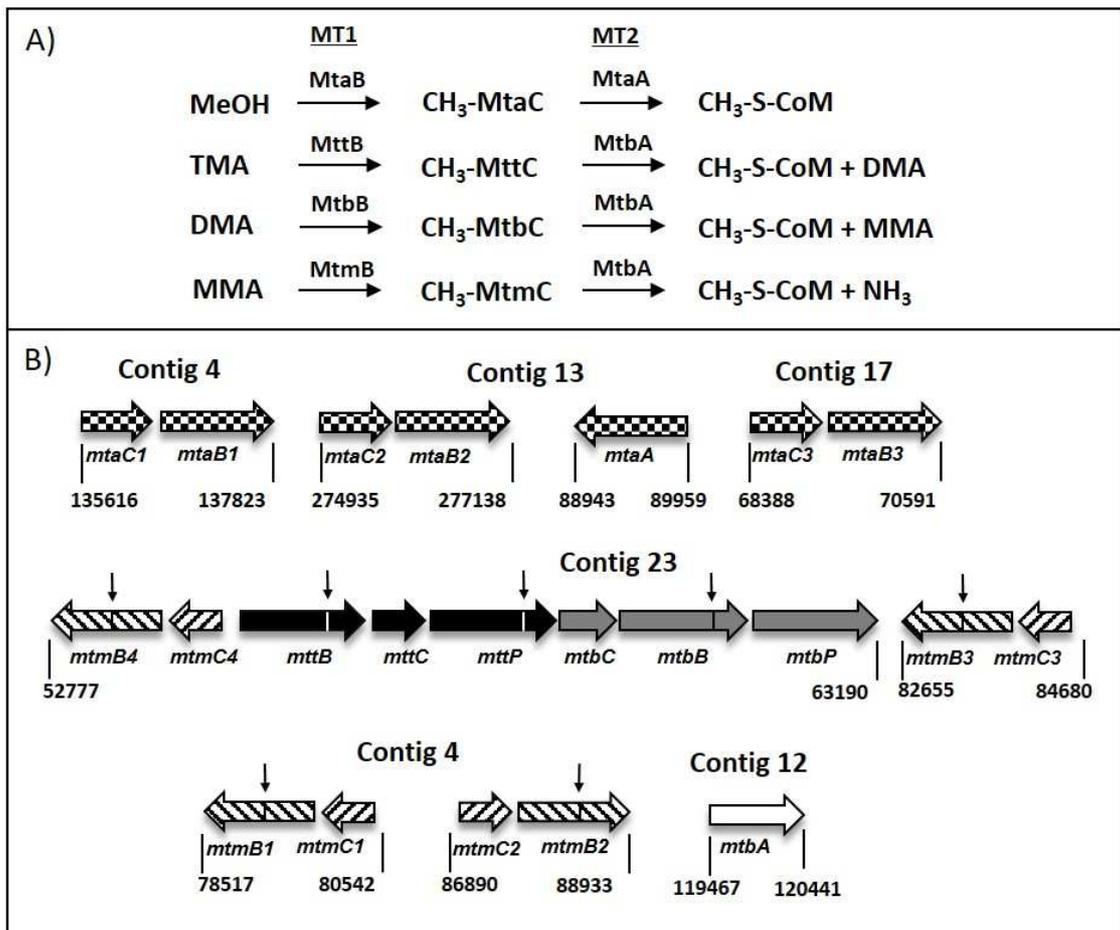


Abb. 16. Gencluster, die für Enzyme der Demethylierung von C1-Substraten kodieren. A) Ablauf des Methylgruppentransfers und beteiligte Enzyme. B) Gencluster, die für Enzyme des Methylgruppentransfers kodieren. Vertikale Pfeile zeigen an, wo ein Pyrolysin kodierendes Amber-Codon (UAG) lokalisiert ist. Gene, die am TMA-, DMA-, MMA- oder Methanolverbrauch beteiligt sind, sind schwarz, grau, schraffiert oder kariert unterlegt. Weiß unterlegte Gene sind generell in der Methylaminverstoffwechslung involviert. Genaue Genbezeichnungen sind der Primertabelle zu entnehmen (Tab. 4) (modifiziert nach Kröninger *et al.* 2017).

Bei der Untersuchung des Genoms von *M. luminyensis* fiel auf, dass dieser Organismus für die Metabolisierung eines einzelnen Substrates teilweise bis zu vier stark homologe Gencluster besitzt, die für Isoenzyme gleicher Funktion kodieren (Abb. 16). Es stellte sich daher die Frage, welche Gencluster

beim Wachstum auf einem entsprechenden Substrat transkribiert und welche Isoenzyme letztendlich produziert werden.

3.2.1 Transkriptionsstudien zu Genen der Substratdemethylierung

Um zu untersuchen, welche Gene in *M. luminyensis* an der Umsetzung der Methylgruppen von Methanol oder von den drei Methylaminen zu Methan beteiligt sind, wurde eine quantitative RT-PCR durchgeführt. Dazu wurden *M. luminyensis*-Kulturen auf dem entsprechenden Substrat bis zur Mitte der exponentiellen Phase angezogen und geerntet. Die RNA wurde isoliert und mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben (2.4.7). Durch den Einsatz von Gen-spezifischen Primern konnte mit Hilfe der quantitativen PCR genau ermittelt werden, wie viel cDNA vom Zielgen im Vergleich zur cDNA eines Referenzgens im Ansatz vorhanden war. Da die cDNA-Menge proportional zur Transkriptmenge ist, gibt die PCR genaue Rückschlüsse darauf, wie viel mRNA von einem bestimmten Gen im Vergleich zur Referenz vorliegt. Die Gene, welche in diesem Versuch im Mittelpunkt standen, kodieren für Proteine, die am Methylgruppentransfer vom C1-Substrat auf HS-CoM beteiligt sind (Abb. 16). Bei diesen Proteinen handelt es sich um substratspezifische Corrinoidproteine, welche als primäre Methylgruppenakzeptoren während der Demethylierung des spezifischen Substrates durch die MT1-Methyltransferasen fungieren. Im Genom von *M. luminyensis* gibt es einzelne Gene, die für Corrinoidproteine kodieren, die an der Metabolisierung von TMA (*mttC*) und DMA (*mtbC*) beteiligt sind. Im Gegensatz dazu sind die Gene, die für Proteine des Methanolverbrauchs kodieren, in drei (*mtaC1-3*) und jene für die MMA-Demethylierung sogar in vier Kopien vorzufinden (*mtmC1-4*).

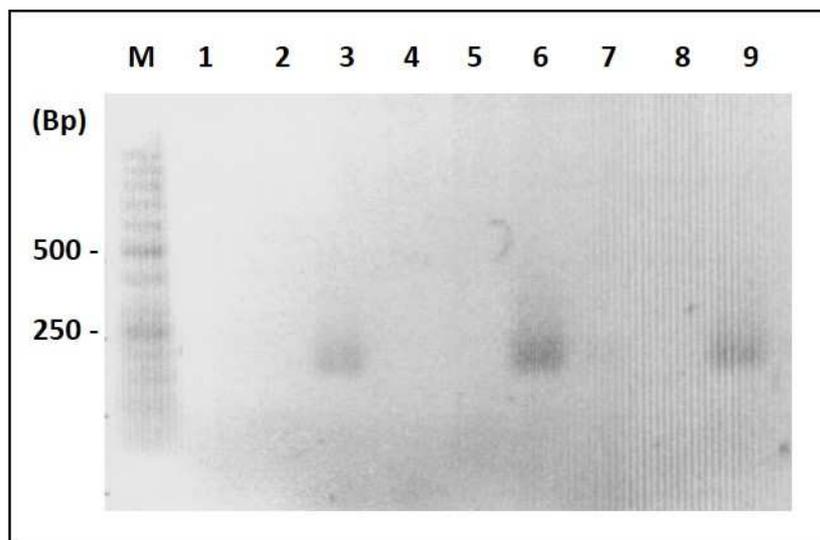


Abb. 17. Spezifität der *mtaC*-Primer. Folgende Primerkombinationen wurden in die PCR eingesetzt: *mtaC1_for* + *mtaC2_rev* (1), *mtaC1_for* + *mtaC3_rev* (2), *mtaC1_for* + *mtaC1_rev* (3), *mtaC2_for* + *mtaC1_rev* (4), *mtaC1_for* + *mtaC3_rev* (5), *mtaC2_for* + *mtaC2_rev* (6), *mtaC3_for* + *mtaC1_rev* (7), *mtaC3_for* + *mtaC2_rev* (8), *mtaC3_for* + *mtaC3_rev* (9). Als Standard (M) diente der 50 Bp O'Gene Ruler (Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland).

Die für die Corrinoidproteine kodierenden Gene weisen hohe Sequenzhomologien auf, sodass zunächst sichergestellt werden musste, dass die Primer nur an ihr spezifisches Zielgen anlagerten. Dazu wurden Sequenzalignments aller Gene erstellt und jene Bereiche identifiziert, die die geringsten Übereinstimmungen aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Auf Grundlage dieser Bereiche wurden die Primer generiert, die später in die quantitative RT-PCR eingesetzt werden sollten. Die Primerspezifität wurde vor Beginn der Transkriptionsstudien für die einzelnen Gene überprüft, indem die Primer untereinander kombiniert und in eine Standard-PCR eingesetzt wurden, die chromosomale DNA von *M. luminyensis* als Matrize enthielt. In Bezug auf die Oligonukleotide, die an die *mtaC*-Gene binden (Methanol-Demethylierung), zeigte sich, dass nur in den Ansätzen PCR-Produkte generiert wurden, die beide Primer des gleichen Zielgens enthielten (Abb. 17, Bahnen 4/7/10). Wurden dagegen Primer unterschiedlicher *mtaC*-Gene kombiniert, wurde kein Fragment generiert. Dies deutete darauf hin, dass die *mtaC*-Primer eine hohe Spezifität aufwiesen und es nicht zu Kreuzamplifizierungen kam.

Bei den *mtmC*-Primern stellte sich die Situation noch einmal komplexer dar, da die *mtmC*-Gene in vierfacher Ausführung im Genom vorliegen. Auch hier wurden die *mtmC*-Oligonukleotide untereinander kombiniert und es wurde getestet, ob andere Primerkombinationen als die korrekten Primerpaarungen in der PCR zur Generierung eines Amplifikats führten. Es war zu beobachten, dass nur dann ein PCR-Produkt generiert wurde, wenn die *mtmC*-Primer des gleichen *mtmC*-Gens miteinander kombiniert wurden (Abb. 18, Bahnen 4/8/12/16) und andere Kombinationen keine Produkte hervorriefen.

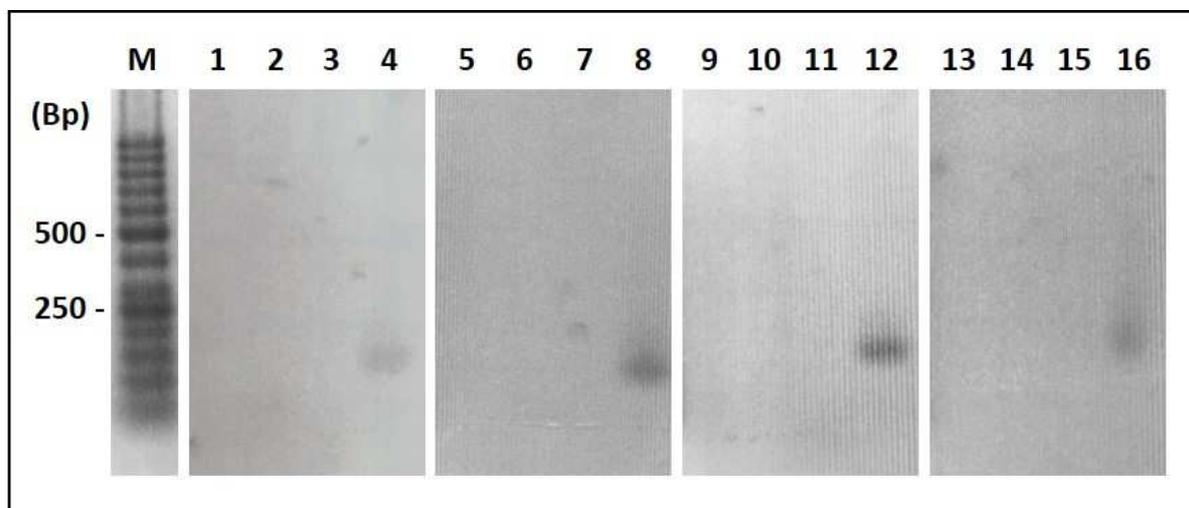


Abb. 18. Spezifität der *mtmC*-Primer. Folgende Primerkombinationen wurden in die PCR eingesetzt: *mtmC1_for* + *mtmC2_rev* (1), *mtmC1_for* + *mtmC3_rev* (2), *mtmC1_for* + *mtmC4_rev* (3), *mtmC1_for* + *mtmC1_rev* (4), *mtmC2_for* + *mtmC1_rev* (5), *mtmC2_for* + *mtmC3_rev* (6), *mtmC2_for* + *mtmC4_rev* (7), *mtmC2_for* + *mtmC2_rev* (8), *mtmC3_for* + *mtmC1_rev* (9), *mtmC3_for* + *mtmC2_rev* (10), *mtmC3_for* + *mtmC4_rev* (11), *mtmC3_for* + *mtmC3_rev* (12), *mtmC4_for* + *mtmC1_rev* (13), *mtmC4_for* + *mtmC2_rev* (14), *mtmC4_for* + *mtmC3_rev* (15), *mtmC4_for* + *mtmC4_rev* (16). Als Standard (M) diente der 50 Bp O'Gene Ruler (Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland).

Somit konnte gezeigt werden, dass die *mtmC*-Primer trotz der hohen Sequenzhomologien der *mtmC*-Gene hohe Spezifität für ihr entsprechendes *mtmC*-Gen aufwiesen. Darüber hinaus ist auch festzuhalten, dass keine Produkte generiert wurden, die nicht den erwarteten Größen entsprachen. Dies

ist wichtig, da zwei *mtmC*-Gene (*mtmC3*, *mtmC4*) auf dem gleichen Contig und in direkter Nachbarschaft lokalisiert sind (Abb. 16), und generell der *forward*-Primer des einen Gens in Kombination mit dem *reverse*-Primer des zweiten Gens theoretisch ein PCR-Produkt zur Folge hätte haben können, das den gesamten Bereich zwischen den beiden *mtmC*-Genen umfasst. Da dies jedoch nicht beobachtet werden konnte, wurde die Spezifität der Primer ein weiteres Mal unterstrichen.

Da nicht nur die Sequenzhomologie innerhalb der *mtaC*- bzw. *mtmC*-Gene relativ hoch ist, sondern auch die der Gene, die an der Verstoffwechslung von DMA und TMA beteiligt sind, wurden auch die *mtbC*- und *mttC*-Primer gegeneinander getestet. Auch hier lieferten nur die Kombination des *mtbC*-*forward*- und des *mtbC*-*reverse*-Primers bzw. die entsprechende Zusammensetzung der *mttC*-Primer PCR-Produkte (Abb. 19), sodass erneut von einer hohen Spezifität der Primer für das richtige Zielgen ausgegangen werden konnte.

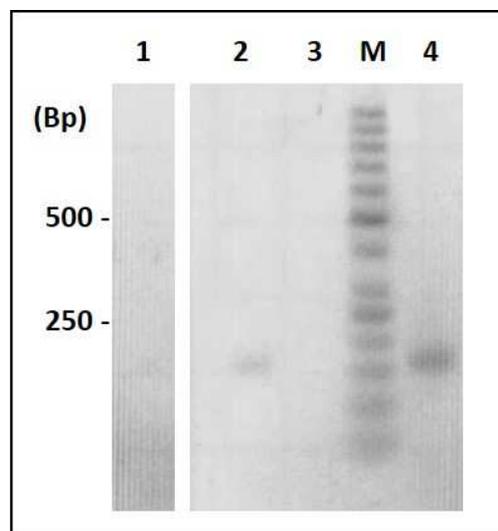


Abb. 19. Spezifität der *mtbC*- und *mttC*-Primer. Folgende Primerkombinationen wurden in die PCR eingesetzt: *mtbC*_for + *mttC*_rev (1), *mtbC*_for + *mtbC*_rev (2), *mttC*_for + *mtbC*_rev (3), *mttC*_for + *mttC*_rev (4). Als Standard (M) diente der 50 Bp O'Gene Ruler (Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland).

Da alle Primerpaare spezifisch für ihre jeweiligen Zielgene waren, konnten diese zur Ermittlung der Transkriptmengen der Gene in die quantitative RT-PCR eingesetzt werden. Als Referenzgen wurde ein Gen gewählt, welches für die ribosomale 15S-Untereinheit kodiert (15S-Gen). Es ist sehr wahrscheinlich, dass dieses Gen während der exponentiellen Phase stark exprimiert wird, da die Ribosomen die Kernenzyme der Proteinbiosynthese bilden. Für das 15S-Gen wurden ebenfalls Primer generiert, die spezifisch an das Gen bzw. dessen cDNA anlagerten (*ribos_for* + *ribos_rev*).

Zum einen lieferte die quantitative RT-PCR Unterschiede in den Transkriptionsmustern der Kulturen, die auf verschiedenen Substraten angezogen worden waren, zum anderen aber auch Übereinstimmungen in Bezug auf Gene, die für Proteine kodieren, welche an der Methanol-Demethylierung beteiligt sind. Bei allen Kulturen zeigte das Gen *mtaC2* unabhängig vom Substrat hohe und vergleichbare Transkriptmengen, wobei die maximale relative mRNA-Menge erwartungsgemäß bei

Wachstum auf Methanol beobachtet wurde (Abb. 20). Hier war die Transkriptabundanz von *mtaC2* 15-fach erhöht im Vergleich zum S15-Referenzgen. Dies deutete darauf hin, dass das Gen *mtaC2* eine wichtige Funktion im Methanolstoffwechsel besitzt und dessen Genprodukt MtaC2 der dominierende Methylgruppenakzeptor bei der Methanol-Demethylierung ist. Im Gegensatz dazu zeigten die Gene *mtaC1* und *mtaC3* eine zehnfach- bzw. 50-fach geringere Transkriptabundanz im Vergleich zur Referenz, weswegen ihnen bzw. ihren Genprodukten MtaC1 und MtaC3, eine geringere Bedeutung im Methanol-Demethylierungsprozess zuzukommen scheint. Bei allen untersuchten Substraten stellte sich die Situation gleichermaßen dar, da alle Zellen erhöhte *mtaC2*- und sehr niedrige *mtaC1*- und *mtaC3*-mRNA-Mengen aufwiesen, was auf eine konstitutive Expression von *mtaC2* in *M. luminyensis* hindeutete und vermuten ließ, dass das Corrinoidprotein MtaC2 unabhängig vom Substrat gebildet wird. Die direkte Nachbarschaft und gleiche Orientierung der *mtaB*- und *mtaC*-Gene im Genom weist zudem darauf hin, dass *mtaB* und *mtaC* eine Transkriptionseinheit bilden. Dies ist in anderen methanogenen Organismen bereits beschrieben (Sauer *et al.* 1997; Krätzer *et al.* 2009). Aufgrund der hohen Transkriptmenge von *mtaC2* ist davon auszugehen, dass hauptsächlich das Corrinoidprotein MtaC2 zusammen mit der Methyltransferase MtaB2 an der Demethylierung von Methanol in *M. luminyensis* beteiligt ist.

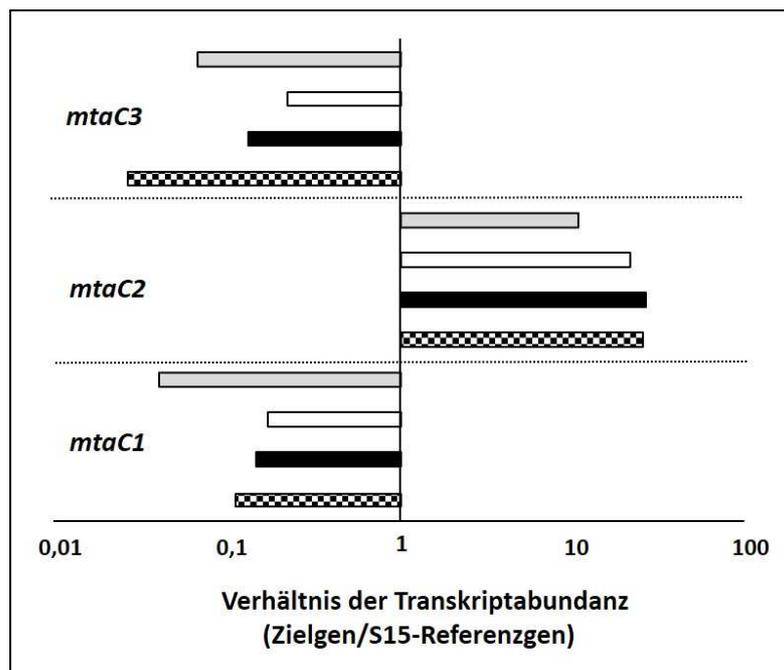


Abb. 20. mRNA-Abundanz der Gene (*mtaC1-3*), die für Corrinoidproteine kodieren, die an der Methanolumsetzung beteiligt sind. Die *M. luminyensis*-Zellen, aus denen die RNA isoliert wurde, wurden auf Methanol (karierte Balken), MMA (schwarze Balken), DMA (weiße Balken) bzw. TMA (graue Balken) angezogen, und in der Mitte der exponentiellen Phase geerntet ($OD_{600} = 0,15$). ΔC_t -Werte wurden berechnet, indem die relative Menge des 15S-Transkripts als Referenz genutzt wurde ($C_t \text{ Zielgen} - C_t \text{ S15}$). Das Verhältnis der Transkriptabundanz wurde mit Hilfe der Formel $2^{-\Delta C_t}$ bestimmt (modifiziert nach Kröninger *et al.* 2017).

Bei Zellen, die auf Methanol angezogen wurden, wurden die Gene (*mtmC1-4*, *mtbC*, *mttC*), die für die Corrinoidproteine des Methylaminabbaus kodieren, nur in sehr geringem Umfang transkribiert. Dies

zeigte sich dadurch, dass der Quotient, der als Verhältnis der Transkriptabundanz des untersuchten Gens im Vergleich zum Referenzgen definiert war, bei Genen, die an der Methyaminumsetzung beteiligt sind, sehr geringe Werte annahm (*mtmC1*, 0,009; *mtmC2*, 0,050; *mtmC3*, 0,013; *mtmC4*, 0,006; *mtbC*, 0,001; *mttC*, 0,016).

Während die Transkriptmengen der Gene (*mtaC1-3*), die für die Corrinoide des Methanolabbaus kodieren, noch unabhängig vom Substrat bei allen Kulturen vergleichbar waren (Abb. 20), zeigten sich bei der Betrachtung der Gene, die für die Corrinoide des Methyaminabbaus kodieren, gravierende Unterschiede zwischen Kulturen mit unterschiedlichen Substraten. Wurden die Zellen auf TMA angezogen, stieg die mRNA-Menge des *mttC*-Gens, welches für das Corrinoide des TMA-Abbaus kodiert, um das 75-fache im Vergleich zur Menge, die es bei Methanol-Kulturen besaß (Abb. 21, A). Darüber hinaus waren auch die Transkriptmengen der Gene *mtbC* (200-fach) und *mtmC4* (250-fach) stark erhöht. Diese Beobachtung überraschte nicht, da die genomische Organisation der Gene (Abb. 16) auf ein Operon hindeutet, das die Gene *mttC*, *mttB*, *mtbC* und *mtbB* umfasst, und an das sich stromaufwärts direkt das *mtmC4B4*-Operon anschließt. Neben den Genen, die in direkter Nachbarschaft liegen, war auch das Gen *mtmC1*, was für ein Corrinoide der MMA-Verstoffwechslung kodiert, bei Wachstum auf TMA über 100-fach hochreguliert im Vergleich zum Wachstum auf Methanol. Somit waren insgesamt zwei Gene, die am MMA-Demethylierungsprozess beteiligt sind, auf TMA im Vergleich zu Methanol hochreguliert (*mtmC1*, *mtmC4*).

Wurden die Zellen auf DMA als Methylgruppendonator angezogen, waren lediglich die Gene *mtbC*, welches für das Corrinoide der DMA-Demethylierung kodiert, und *mtmC1* vielfach hochreguliert, was darauf hindeutete, dass ihnen bzw. ihren Genprodukten eine zentrale Rolle bei der Metabolisierung von DMA zukommt (Abb. 21, B). Überraschenderweise wurde das Gene *mttC*, welches mit *mtbC* das putative Operon ausbildet, nicht im gleichen Ausmaß transkribiert. Diese Beobachtung deutete darauf hin, dass das Operon nur bei Wachstum auf TMA vollständig transkribiert wird (s. o.) und es bei Wachstum auf DMA möglich ist, die Gene, die für Proteine des DMA-Abbaus kodieren (*mtbC*, *mtbB*), getrennt zu transkribieren. Dies lässt vermuten, dass nicht nur im Bereich zwischen *mtmB4* und *mttB* ein Promotor für die Transkription des gesamten Operons, sondern auch stromaufwärts von *mtbB* ein DMA-abhängiger Promotor zu finden ist. Die zeitgleiche Hochregulierung von *mtbC* und *mtmC1* scheint darüber hinaus den Abbauweg von DMA in *M. luginosus* zu reflektieren. Es wird vermutet, dass DMA in *M. luginosus* zunächst durch MtbB und MtbC demethyliert wird, wobei MMA entsteht, welches wiederum direkt durch MtmB1 und MtmC1 demethyliert wird.

Als die Zellen auf MMA angezogen und in Bezug auf die Transkriptmengen der Corrinoide-kodierenden Gene untersucht wurden, stellte sich die Transkription dieser Gene noch einmal anders dar, da lediglich das Gen *mtmC1* bei Wachstum auf MMA hochreguliert war (Abb. 21, C). Die übrigen Gene, die für MMA-abhängige Corrinoide kodieren, zeigten im Gegensatz dazu auf MMA zwar höhere Transkriptmengen als bei Methanol-Kulturen, im Vergleich zu DMA und TMA jedoch vergleichbare oder sogar geringere Mengen. Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass unter den untersuchten Bedingungen die MMA-Demethylierung über die Methyltransferase MtmB1 auf das Corrinoide MtmC1 erfolgte und die übrigen Proteine eine untergeordnete Rolle spielten.

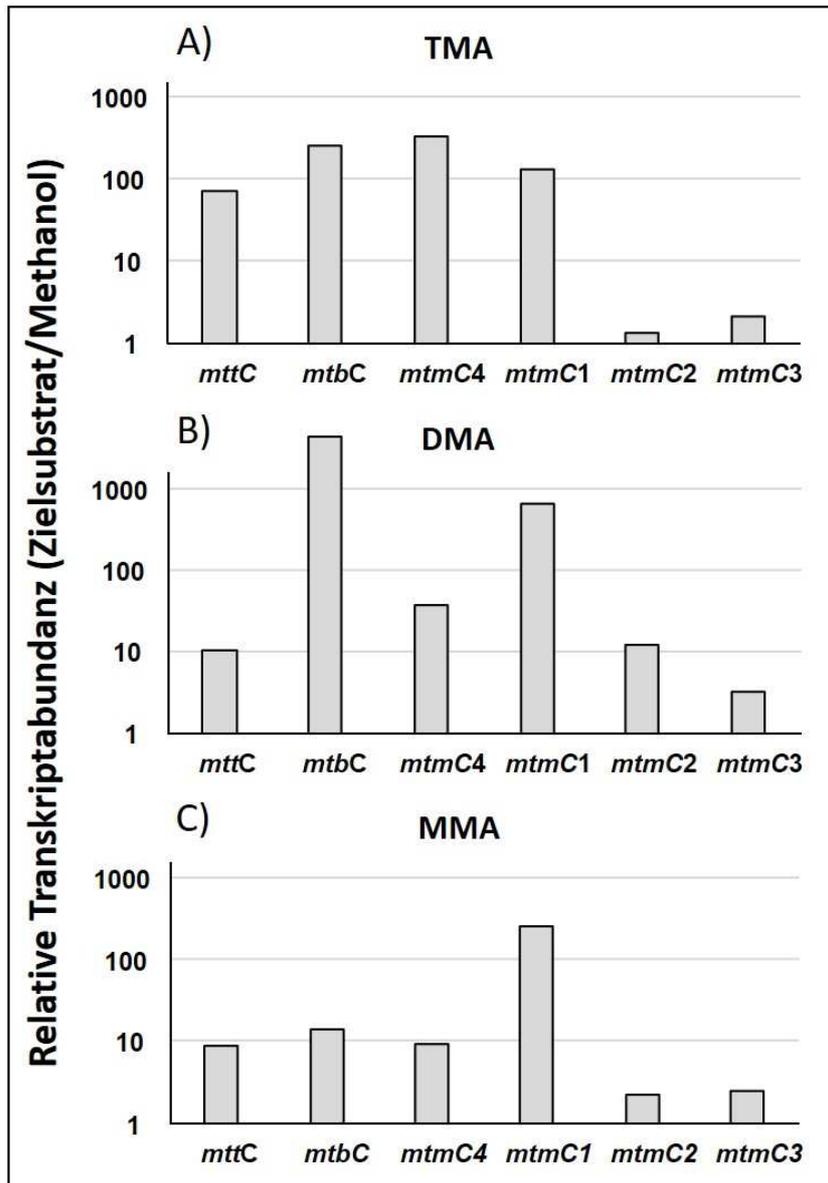


Abb. 21. Transkriptabundanz der Gene *mtmC1-4*, *mtbC* und *mttC* bei Wachstum auf Methylaminen im Vergleich zum Wachstum auf Methanol. ΔC_i -Werte wurden durch Subtraktion des C_i -Wertes der Referenz vom C_i -Wert des Zielgens berechnet. Die relative Transkriptabundanz wurden ermittelt, indem der ΔC_i -Wert eines Zielgens bei Wachstum TMA (A), DMA (B) oder MMA (C) vom ΔC_i -Wert des entsprechenden Gens bei Wachstum auf Methanol subtrahiert wurde (modifiziert nach Kröninger *et al.* 2017).

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die Gene, welche für Proteine der Methanol-Demethylierung kodieren, bei allen Substraten vergleichbare Transkriptmengen aufwiesen, da *mtaC2* bei Wachstum auf allen Substraten im Vergleich zum Referenzgen die höchste Transkriptabundanz zeigte. Die Transkripte der Gene *mtaC1* und *mtaC3* waren dagegen generell nur in sehr geringen Konzentrationen vorhanden. Änderte sich das Substrat, veränderten sich zwar nicht die mRNA-Mengen der Methanol-abhängigen Gene, aber die mRNA-Konzentrationen jener Gene, die für Proteine des Methylaminabbaus kodieren. So zeigten MMA-Kulturen hohe Transkriptmengen von *mtmC1* (Corrinoidprotein des MMA-Abbaus), DMA-Zellen hohe mRNA-Mengen von *mtbC* (DMA-Abbau) und *mtmC1* (MMA-Abbau), sowie TMA-

Kulturen hohe Transkriptmengen der Gene *mttC* (TMA-Abbau), *mtbC*, *mtmC1* und *mtmC4* (ebenfalls MMA-Abbau). Diese Beobachtungen waren Hinweise darauf, dass Methanol das bevorzugte Substrat von *M. luminyensis* ist, da die Gene, die für Proteine kodieren, die an dessen Verstoffwechslung beteiligt sind, konstitutiv und unabhängig vom Substrat stark transkribiert werden. Die Gene, welche für Proteine des Methylaminabbaus kodieren, unterliegen dagegen einer stringenten Regulation, da nur die entsprechenden Transkripte gebildet werden, wenn das Substrat vorhanden ist, welches die Genprodukte der transkribierten Gene umsetzen können.

3.2.2 Substratumsetzung durch Substrat-adaptierte, ruhende Zellen

Einen weiteren Hinweis darauf, dass Methanol der favorisierte Methylgruppendedonor für *M. luminyensis* ist, lieferten Experimente mit ruhenden Zellen. Dazu wurden Zellen auf Methanol + H₂ oder TMA + H₂ angezogen und in der exponentiellen Phase geerntet. Durch Waschen mit einem substratfreien Puffer wurden sowohl Methanol und TMA, als auch Acetat entfernt, sodass der Organismus nach dem Waschen weder Energiestoffwechsel, noch Zellwachstum betreiben konnte. Nach Zugabe des methylierten Substrates konnten Energiestoffwechsel und Methanogenese wiederaufgenommen werden, zu Wachstum konnte es aufgrund des fehlenden Acetats als Kohlenstoffquelle jedoch weiterhin nicht kommen. Wenn ruhende Zellen auf Grundlage von Kulturen generiert wurden, denen Methanol als Substrat zur Verfügung stand, zeigten diese die höchste Methanbildungsrate auf Methanol (Abb. 22). Die Methanbildungsrate betrug hierbei 164 nmol Methan min⁻¹ mg Protein⁻¹, da die Zellen aufgrund ihrer Anzucht bereits an Methanol adaptiert waren.

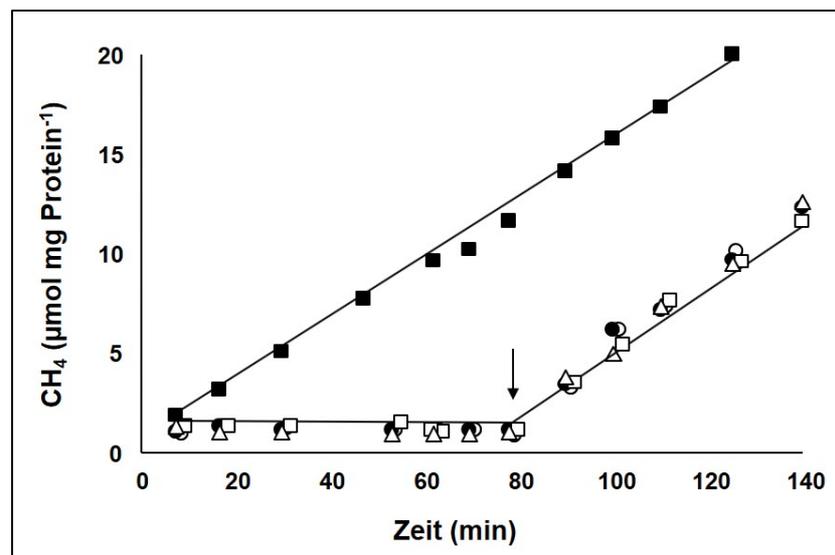


Abb. 22. Methanbildung Methanol-adaptierter, ruhender Zellen nach Substratzugabe. Die Zellen wurden mit Methanol (■), TMA (●), DMA (□) oder MMA (○) versetzt, oder erhielten kein Substrat (△). Durch den Pfeil wird der Zeitpunkt gekennzeichnet, an dem die Methylaminansätze mit 75 mM Methanol versetzt wurden (modifiziert nach Kröniger *et al.* 2017). Gezeigt ist eines von drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

Erfolgte dagegen der Zusatz von Methylaminen zu den auf Methanol-adaptierten Zellen, war keine Methanbildung zu verzeichnen. Die Beobachtung verdeutlichte, dass die Methanol-adaptierten Zellen nicht in der Lage waren Methylamine zu Methan umzusetzen. Dieses Ergebnis spiegelte auch die Transkriptionsstudien wider, bei denen gezeigt wurde, dass die *mtmC*-, *mtbC*- und *mttC*-Gene bei Wachstum auf Methanol im Vergleich zur Referenz nur schwach transkribiert werden und es erst bei Wachstum auf dem entsprechenden Methylamin zur Hochregulierung kommt (3.2.1). Den ruhenden Methanol-adaptierten Zellen schien somit die Proteinausstattung zu fehlen, um Methylamine verstoffwechseln zu können. Um auszuschließen, dass die Zellsuspensionen, denen Methylamine als Substrate zugesetzt wurden, inaktiv waren, sondern tatsächlich nicht in der Lage waren, Methylamine zu Methan umzusetzen, wurde nach etwa 80 min Methanol als Substrat hinzugegeben (Abb. 22, Pfeil). Der Methanolzusatz führte unmittelbar zur Methanbildung, wobei die Methanbildungsrate mit der Rate der ruhenden Zellen, die bereits zu Anfang des Experiments mit Methanol versetzt worden waren, übereinstimmte. Dies zeigte, dass die Zellen aktiv waren und ihnen lediglich die Enzymsausstattung zur Umsetzung von Methylaminen aufgrund der Adaptation an Methanol fehlte.

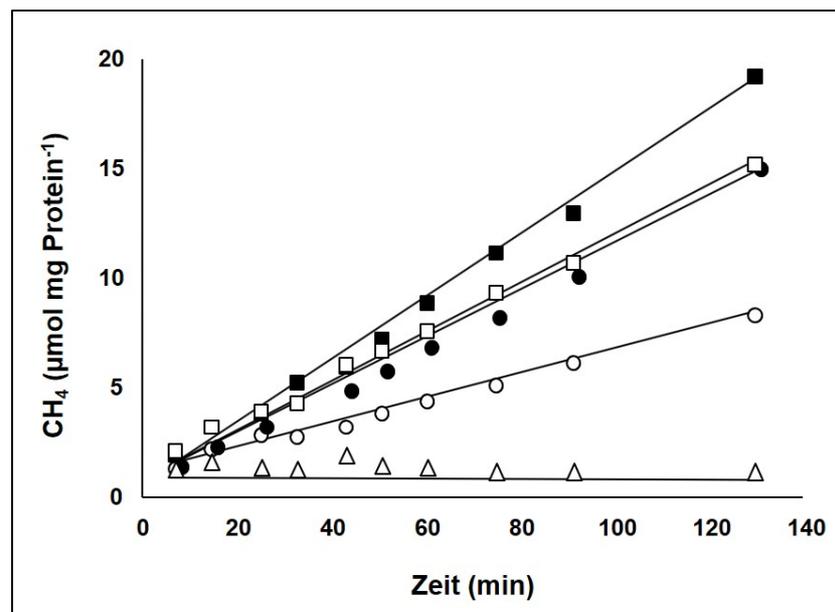


Abb. 23. Methanbildung TMA-adaptierter, ruhender Zellen. Den Zellsuspensionen wurden Methanol (■), TMA (●), DMA (□), MMA (○) oder kein Substrat (△) zugesetzt (modifiziert nach Kröninger *et al.* 2017). Gezeigt ist eines von drei unabhängig durchgeführten Experimenten.

Das gleiche Experiment wurde mit Zellen durchgeführt, die auf TMA + H₂ angezogen worden waren. Während die Methanbildungsrate TMA-adaptierter Zellen mit Methanol mit der Rate Methanol-adaptierter Zellen vergleichbar war (177 nmol Methan min⁻¹ mg Protein⁻¹), zeigten die Zellen nun von Anfang an Methanbildung mit TMA (150 nmol Methan min⁻¹ mg Protein⁻¹) und DMA (153 nmol Methan min⁻¹ mg Protein⁻¹) als Substrate. Lediglich die Umsetzung von MMA erfolgte langsamer. Hier betrug die Methanbildungsrate 59 nmol Methan min⁻¹ mg Protein⁻¹. In keinem der Experimente kam es ohne Zugabe eines methylierten Substrates zur Methanbildung, was bestätigte, dass alle Substrate durch die Waschschrte restlos entfernt worden waren und die Ergebnisse nicht verfälschten.

Dieser Versuch zeigte eindeutig, dass die Gene für die Methanolverstoffwechslung keiner Regulation unterliegen, da bei Methanol- und TMA-adaptierten Zellen mit Methanol als Substrat vergleichbare Methanbildungsraten bestimmt wurden. Es scheint somit eine konstitutive Expression der Gene, die für Proteine des Methanolverbrauchs kodieren, vorzuliegen. Im Gegensatz dazu unterliegen die Methylaminabbauwege einer stringenten Kontrolle, da bei Methanol-adaptierten, ruhenden Zellen keine Umsetzung von Methylaminen möglich war, bei TMA-adaptierten Zellen jedoch schon.

3.3 Untersuchungen zur Energiekonservierung in *M. luminyensis*

Bereits kurz nach der Erstbeschreibung von *M. luminyensis* fiel bei bioinformatischen Analysen auf, dass der Organismus und andere Vertreter der Methanomassiliicoccales über eine ungewöhnliche Enzymausstattung verfügen und sich nicht in die ‚klassischen‘ methanogenen Gruppen einordnen lassen (Lang *et al.* 2015). Lange Zeit basierte die grundlegende Unterscheidung zwischen Cytochrom-enthaltenden (methylo-trophe und acetiklastische Methanarchaeen) und Cytochrom-freien, methanogenen Organismen (hydrogenotrophe Methanarchaeen) auf dem Mechanismus der Heterodisulfidreduktion, da methanogene Archaeen entweder Heterodisulfidreduktasen mit Cytochromen (membranständige Heterodisulfidreduktasen) oder Heterodisulfidreduktasen ohne Cytochrome besitzen (lösliche Heterodisulfidreduktasen; Thauer *et al.* 2008). Von dieser Differenzierung abweichend handelt es sich bei *M. luminyensis* und anderen Vertretern der Methanomassiliicoccales um Hybride beider Großgruppen, da die Organismen sowohl über die lösliche Heterodisulfidreduktase HdrABC aus hydrogenotrophen, methanogenen Organismen, wie auch über einen Teil der membranständigen Heterodisulfidreduktase (HdrD) aus Cytochrom-enthaltenden, Methan-produzierenden Archaeen verfügen. Die lösliche Heterodisulfidreduktase bildet in *M. luminyensis* höchstwahrscheinlich wie in hydrogenotrophen, methanogenen Organismen einen Komplex mit der Mvh-Hydrogenase (MvhADG), sodass vermutet wird, dass dem Enzymkomplex die gleiche Funktion wie in diesen methanogenen Archaeen zukommt (Kaster *et al.* 2011; Wagner *et al.* 2017). Dabei handelt es sich um die Generierung des energiereichen Elektronendonors Fd_{red} , der durch Reduktion von Fd_{ox} entsteht. Die Reaktion ist stark endergon und wird nur durch Kopplung an die exergone Heterodisulfidreduktion, die gleichzeitig katalysiert wird, ermöglicht (Kaster *et al.* 2011). Hierbei fungiert H_2 als Elektronendonator. Die Rolle der Heterodisulfidreduktase-Untereinheit HdrD wurde in *M. luminyensis* dagegen bisher nicht untersucht. HdrD ist in methanogenen Organismen mit Cytochromen Teil der membranständigen Heterodisulfidreduktase HdrDE, welche den membranlöslichen Elektronenüberträger MPh_{red} oxidiert und Elektronen auf das Heterodisulfid überträgt (Heiden *et al.* 1994; Künkel *et al.* 1997; Bäumer *et al.* 1998). Während HdrD die katalytische Einheit des Komplexes bildet (Künkel *et al.* 1997), fungiert HdrE als Membrananker, der den Komplex in der Membran fixiert und die MPh -Bindestelle beinhaltet (Hedderich *et al.* 2005; Simianu *et al.* 1998). Ob HdrD auch ohne HdrE, wie in *M. luminyensis*, noch katalytisch aktiv ist und welche Funktion dem Protein in dessen Metabolismus zukommt, ist bisher nicht geklärt. Die Untersuchung der physiologischen Funktion von HdrD in *M. luminyensis* war daher ein Schwerpunkt dieser Arbeit.

Eine weitere entscheidende Fragestellung für das Verständnis des Stoffwechsels von *M. luminyensis* ist die Rolle der Hydrogenasen. Hydrogenasen oxidieren das Molekül H_2 , das für *M. luminyensis* als Elektronendonator unerlässlich ist (Dridi *et al.* 2012a; Lang *et al.* 2015). Aus anderen methanogenen Organismen sind sowohl lösliche, als auch membrangebundene Hydrogenasen bekannt (Thauer *et al.* 2010). Wie bereits erwähnt, besitzt der Organismus eine lösliche Mvh-Hydrogenase, die in hydrogenotrophen, methanogenen Archaeen einen Komplex mit den Untereinheiten HdrABC der löslichen Heterodisulfidreduktase bildet (Kaster *et al.* 2011). Aus Cytochrom-haltigen Methanarchaeen sind dagegen die membrangebundenen Vho- und die Ech-Hydrogenasen bekannt. Die Vho-

Hydrogenase ist hier für die Oxidation von H_2 an der Membran, sowie die Reduktion von MPh_{ox} verantwortlich (Deppenmeier *et al.* 1992; Abken *et al.* 1998). Im Genom von *M. luminyensis* ist dieses Protein allerdings nicht kodiert, wodurch H_2 in *M. luminyensis* vermutlich lediglich an der Mvh-Hydrogenase im Cytoplasma oxidiert wird. Anders stellt sich die Situation bei den Ech-Hydrogenasen dar. Diese zeichnen sich dadurch aus, dass sie in der Lage sind, Fd_{red} unter H_2 -Generierung oxidieren zu können (Meuer *et al.* 1999). In *M. luminyensis* finden sich zwei Gencluster, die für Hydrogenasen des Ech-Typs kodieren. Dies spricht dafür, dass den Ech-Hydrogenasen eine zentrale Aufgabe im Energiestoffwechsel von *M. luminyensis* zukommt. Ech-Hydrogenasen sind in Cytochrom-enthaltenden, methanogenen Archaeen wie *Methanosarcina mazei* gut beschrieben. Dort oxidieren die Enzyme den Elektronendonator Fd_{red} , der im oxidativen Zweig der methylotrophen Methanogenese bzw. bei der Umsetzung von Acetat generiert wird (Welte *et al.* 2010b; Welte und Deppenmeier 2011b). Welche Rolle Fd als Elektronenüberträger im Stoffwechsel von *M. luminyensis* spielt und inwiefern Ech-Hydrogenasen an dessen Oxidation oder Reduktion beteiligt sind, war ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit und wird in den folgenden Kapiteln ausführlich thematisiert.

Darüber hinaus enthält das Genom von *M. luminyensis* ein Gencluster, das für eine weitere putative Hydrogenase kodiert. Hierbei handelt es sich um eine klassische, membranständige Typ 3-Hydrogenase, wie sie in *E. coli* zu finden und beschrieben ist. Die Typ 3-Hydrogenase ist in *E. coli* zusammen mit der Formiat-Dehydrogenase an der Oxidation von Formiat beteiligt, da das Enzym die Elektronen aus der Formiatoxidation auf Protonen überträgt (McDowall *et al.* 2014). Eine Formiat-Dehydrogenase ist im Genom von *M. luminyensis* nicht kodiert, sodass die Funktion der Typ 3-Hydrogenase im Stoffwechsel des Organismus ungeklärt ist.

Neben den Genen, die für Heterodisulfidreduktasen und Hydrogenasen kodieren, enthält das Genom von *M. luminyensis* auch Gene, die für einen Enzymkomplex kodieren, der große Homologie zum Komplex I der Atmungskette, der NADH-Dehydrogenase, aufweist. Hierbei handelt es sich um die sogenannte $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase (auch Fpo-Komplex für $F_{420}H_2$:Phenazin-Oxidoreduktase), die die Oxidation von $F_{420}H_2$ katalysiert (Bäumer *et al.* 2000). $F_{420}H_2$ wird in methylotrophen Methanarchaeen im oxidativen Zweig der Methanogenese, d. h. bei der sukzessiven Oxidation einer Methylgruppe zu CO_2 , generiert (Deppenmeier *et al.* 1999). Für die Oxidation von $F_{420}H_2$ ist die Untereinheit FpoF des Komplexes essentiell (Welte und Deppenmeier 2011b). Ein Gen, das für die Untereinheit FpoF (sowie für FpoO, eine Untereinheit unbekannter Funktion) kodiert, fehlt jedoch in *M. luminyensis*, sodass die ursprüngliche Funktion des Fpo-Komplexes, die $F_{420}H_2$ -Oxidation, in *M. luminyensis* ausgeschlossen werden kann. Die Aufklärung der Funktion des sogenannten ‚kopflosten‘ Fpo-Komplexes war daher ein weiterer Kernpunkt der vorliegenden Dissertation.

3.3.1 Transkriptionsstudien zu Genen methanogener Schlüsselenzyme

Das Genom von *M. luminyensis* enthält zahlreiche Gene, die für Schlüsselenzyme unterschiedlicher Methanogenesewege kodieren. Allerdings ist nicht bekannt, ob diese Gene beim Wachstum des Organismus bzw. während der Methanogenese in signifikantem Ausmaß exprimiert werden, sodass es tatsächlich zur Bildung der entsprechenden Genprodukte kommt. Dies ist jedoch eine Voraussetzung,

wenn die Enzyme an der Energiekonservierung in *M. luminyensis* beteiligt sind. Deswegen wurde zunächst getestet, ob mRNA der Zielgene bei Wachstum auf Methanol + H₂ in den Zellen gefunden werden kann. Dazu wurden *M. luminyensis*-Kulturen auf Komplexmedium mit Methanol + H₂ angezogen und während der exponentiellen Phase geerntet (OD₆₀₀ = 0,08). Außerdem wurde eine Kontrollkultur mitgeführt, die weiter bis zur stationären Phase inkubiert wurde. Da die Kontrollkultur noch deutlich über die OD₆₀₀, bei der die Ernte der Kulturen für die RNA-Präparation stattfand, hinauswuchs, wurde verifiziert, dass die Ernte tatsächlich in der exponentiellen Phase erfolgte (Abb. 24).

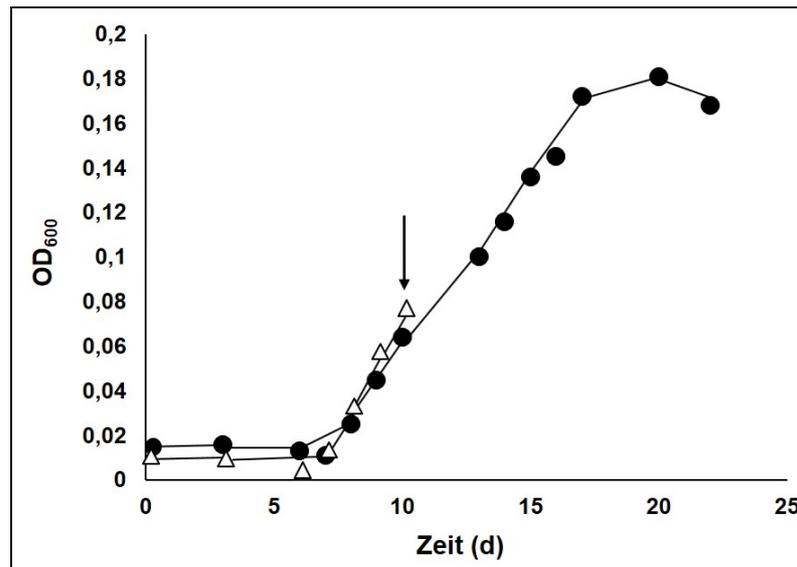


Abb. 24. Anzucht von *M. luminyensis* für die RNA-Präparation. Die Zellen wurden auf 75 mM Methanol + H₂ (200 kPa) angezogen. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt der Zellernte, wobei anhand einer Kontrollkultur, die bis zur stationären Phase inkubiert wurde, gezeigt wurde, dass nach dem Erntezeitpunkt noch Wachstum möglich war. Geerntete Kultur (Δ), Kontrollkultur (●).

Ausgehend von den geernteten Kulturen wurde die Gesamt-RNA-Menge der Zellen extrahiert. Diese wurde im Rahmen einer quantitativen RT-PCR zunächst in cDNA umgeschrieben, worauf sich die relative Quantifizierung der cDNA-Menge (und folglich der mRNA-Menge) durch eine SYBR Green-basierte qPCR anschloss. Ein Gen, welches für die ribosomale 15S-Untereinheit kodiert, fungierte als Referenzgen (15S-Gen) und wurde zur Berechnung des Quotienten ($\frac{\text{Zielgen}}{15\text{S-Gen}}$, siehe Legende Abb. 25) herangezogen, der angab, ob ein bestimmtes Gen im Vergleich zur Referenz höhere (Quotient > 1) oder niedrigere Transkriptmengen (Quotient < 1) aufwies (2.4.7). Die Transkriptionsstudien mit den Genen *fpoA*, *atpB*, *mvhD*, *hdrB*, *hdrD*, *echB*, *ech2B* und *hyd3* ergaben, dass nur von einem Hydrogenase-kodierenden Gen (*mvhD*) signifikante mRNA-Mengen vorlagen (Abb. 25; $\frac{\text{Zielgen}}{15\text{S-Gen}} = 0,5$). Hierbei handelte es sich um das Gen der löslichen Mvh-Hydrogenase, welche in hydrogenotrophen, methanogenen Organismen einen Komplex mit der ebenfalls löslichen Heterodisulfidreduktase HdrABC bildet (Kaster *et al.* 2011; Wagner *et al.* 2017). Es überraschte daher nicht, dass auch das Gen *hdrB*, welches für eine Untereinheit der löslichen Heterodisulfidreduktase kodiert, mit *mvhD* vergleichbare Transkriptmengen zeigte ($\frac{\text{Zielgen}}{15\text{S-Gen}} = 0,8$). Neben *mvhD* und *hdrB*

wies auch das Gen *fpoA*, welches für eine Untereinheit der $F_{420}H_2$ -Dehydrogenase kodiert, in *M. luminyensis* bei Wachstum auf Methanol + H_2 signifikante mRNA-Mengen auf ($^{Zielgen}/_{15S-Gen} = 0,6$), sodass diesem Komplex vermutlich eine zentrale Rolle während der Energiekonservierung zukommt. Darüber hinaus war die mRNA-Menge von *fpoA* mit der des Gens (*hdrD*) der Heterodisulfidreduktase-Untereinheit HdrD vergleichbar ($^{Zielgen}/_{15S-Gen-Gen} = 0,4$). Diese Beobachtung war so nicht zu erwarten, da der Untereinheit der eigentliche Komplexpartner HdrE (Künkel *et al.* 1997, Simianu *et al.* 1998) in *M. luminyensis* fehlt und deswegen vermutet wurde, dass HdrD in *M. luminyensis* nicht funktionell ist.

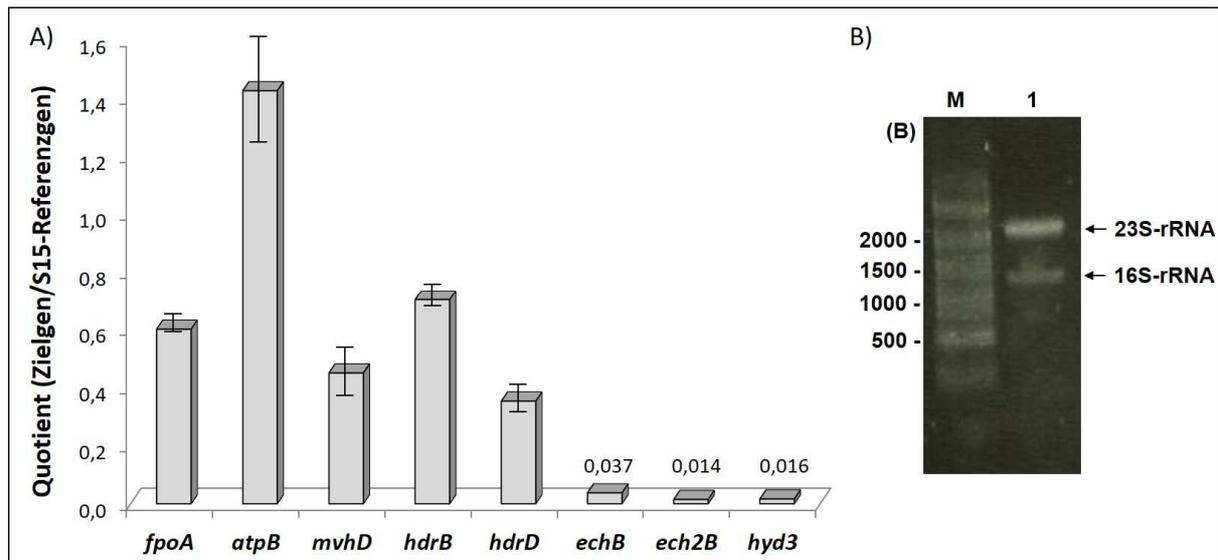


Abb. 25. mRNA-Abundanz von Genen, die für methanogene Schlüsselenzyme kodieren. A) *M. luminyensis* wurde auf Methanol + H_2 in Komplexmedium angezogen und während der exponentiellen Phase zur RNA-Extraktion geerntet. ΔC_t -Werte wurden berechnet, indem die relative mRNA-Menge des 15S-Gens als Referenz genommen wurde. Der Quotient ($^{Zielgen}/_{15S-Gen}$) wurde aus dem jeweiligen ΔC_t -Wert mit Hilfe der Formel $2^{-\Delta C_t}$ berechnet. Die obige Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis, das durch insgesamt drei unabhängige Experimente mit vergleichbaren Ergebnissen bestätigt wurde. B) Im denaturierenden Gel aufgetrennte RNA-Präparation: RiboRuler high range RNA ladder (M; Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland); 5 µg RNA aus *M. luminyensis* (1) (modifiziert nach Kröninger *et al.* 2016).

Im Vergleich zum Referenzgen lag für das Gen *atpB*, welches für eine Untereinheit der ATP-Synthase kodiert, eine sehr hohe Transkriptmenge vor ($^{Zielgen}/_{15S-Gen} = 1,5$). Da die ATP-Synthase das zentrale Enzym der Energiekonservierung fast aller Organismen ist, indem es die Synthese von ATP katalysiert, entsprach die hohe mRNA-Konzentration des ATP-Synthase-Gens den Erwartungen. Dass drei Gene, die für Untereinheiten membranständiger Hydrogenasen kodieren, dagegen nur mit sehr geringen mRNA-Mengen vertreten waren ($^{Zielgen}/_{15S-Gen}$ -Werte: *echB*, 0,037; *ech2B*, 0,014; *hyd3*, 0,016), warf die Frage auf, wofür *M. luminyensis* über eine derart hohe Anzahl an Hydrogenase-Genen verfügt. Aufgrund der geringen Transkriptmengen lag die Vermutung auf der Hand, dass weder den Ech-Hydrogenasen, noch der Typ 3-Hydrogenase bei der Energiekonservierung in *M. luminyensis* eine entscheidende Aufgabe zukommt.

3.3.2 Charakterisierung der Heterodisulfidreduktase-Untereinheit HdrD

Die Heterodisulfidreduktase-Untereinheit HdrD ist im Genom von *M. luminyensis* kodiert, allerdings fehlt ein Gen, das für dessen Komplexpartner HdrE kodiert. In acetiklastischen und methylophilen Methanarchaeen ist die Heterodisulfidreduktase HdrDE membranständig (Künkel *et al.* 1997; Simianu *et al.* 1998) und katalysiert den finalen Schritt in der Atmungskette, die Reduktion des Heterodisulfids, wobei MPH_{red} als Elektronendonator fungiert (Bäumer *et al.* 1998; Deppenmeier *et al.* 1999; Hedderich *et al.* 2005). Da von dem Gen *hdrD* während des exponentiellen Wachstums von *M. luminyensis* verhältnismäßig hohe Transkriptmengen vorliegen (3.3.1), scheint dem Protein HdrD auch ohne HdrE eine Schlüsselrolle in der Energiekonservierung des Organismus zuzukommen. Deswegen wurde bei der Aufklärung der Energiekonservierung zunächst ein Augenmerk auf HdrD gelegt.

3.3.2.1 Bioinformatische Analyse von HdrD aus *M. luminyensis*

HdrD-Homologe sind in zahlreichen methanogenen Archaeen zu finden, jedoch ist das Protein in methylophilen und acetiklastischen Methanarchaeen normalerweise mit der Untereinheit HdrE assoziiert (Künkel *et al.* 1997; Simianu *et al.* 1998). Zur Feststellung, ob sich HdrD aus *M. luminyensis* nur aufgrund des fehlenden Komplexpartners oder auch aufgrund struktureller Besonderheiten von homologen Proteinen abhebt, wurde ein detaillierter Vergleich von HdrD-Proteinen aus anderen Organismen mit HdrD aus *M. luminyensis* angestellt. Dafür wurden zu HdrD aus *M. luminyensis* (WP_019178460) homologe Strukturen mit Hilfe von NCBI BLASTp (Altschul *et al.* 1990) identifiziert (Tab. 29). Es fiel auf, dass das Protein auch in anderen Arten der Gattung *Methanomassiliicoccus*, wie *Candidatus Methanomassiliicoccus intestinalis* Issoire-Mx1, einem Darmbewohner (Borrel *et al.* 2013a), und dem Isolat RumEn M1, welches in Rinderpensensaft nachgewiesen wurde (Söllinger *et al.* 2016), zu finden ist. Bei HdrD-Homologen innerhalb der Gattung *Methanomassiliicoccus* wurden insgesamt die höchste Sequenzabdeckung (> 80 %) und die stärkste Identität (> 70 %) festgestellt. Im Vergleich zu homologen Proteinen aus anderen Gattungen gingen die Sequenzabdeckung und folglich die Identität drastisch zurück, was ein Indiz dafür ist, dass die Proteine nur noch entfernt verwandt sind. Zusätzlich zu den genannten *Methanomassiliicoccus*-Arten besitzen auch *Candidatus Methanoplasma termitum*, ein Archaeon, welches im Verdauungstrakt von Termiten anzutreffen ist (Lang *et al.* 2015), und *Candidatus Methanomethylophilus alvus* Mx1201 Proteine, die HdrD aus *M. luminyensis* ähneln. Die Sequenzabdeckung war jedoch im Vergleich zu den HdrD-Homologen aus der Gattung *Methanomassiliicoccus* signifikant geringer (< 60 %), wenngleich übereinstimmende Bereiche auch große Ähnlichkeiten zeigten (Identität: > 90 %). Beide Organismen werden der Ordnung Methanomassiliicoccales zugeordnet, was die generelle Verwandtschaft zu *M. luminyensis* belegt. Aus Genomanalysen von *Cd. Mp. termitum* und *Cd. M. alvus* Mx1201 ging außerdem hervor, dass das Gen *hdrD* wie in *M. luminyensis* im Genom vorliegt, *hdrE* jedoch fehlt (Lang *et al.* 2015; Borrel *et al.* 2012). Dies deutete darauf hin, dass Organismen der Gattung *Methanomassiliicoccus* den Organismen *Cd. Mp. termitum* und *Cd. M. alvus* Mx1201 metabolisch durchaus ähnlich sind und innerhalb der Methanomassiliicoccales ähnliche Stoffwechselwege konserviert sind.

Tab. 29. Ergebnis der NCBI BLASTp-Analyse (Altschul *et al.* 1990) der NCBI-Proteindatenbank auf Grundlage des Proteins HdrD aus *M. luminyensis* (WP_019178460).

Organismus	Annotation	Identität (%)	Abdeckung der Sequenz (%)	Zugangsnr.
<i>Candidatus</i> Methanomassiliicoccus intestinalis Issoire-Mx1	CoB-CoM-Heterodisulfidreduktase	80	89	AAGN25510.1
<i>Methanomassiliicoccus</i> Archaeon RumEn M1	Fe-S Oxidoreduktase	77	92	KQM11079.1
<i>Candidatus</i> Methanomethylophilus alvus	(Fe-S)-bindendes Protein	97	56	WP_015505521.1
Thermoplasmatales Archaeon BRNA1	(Fe-S)-bindendes Protein	92	56	WP_015493022.1
<i>Candidatus</i> Methanoplasma termitum	(Fe-S)-bindendes Protein	89	58	WP_082007322.1
<i>Archaeoglobales</i> Archaeon ex4484_92	(Fe-S)-bindendes Protein	87	40	OYT34737.1
<i>Geoglobus ahangari</i>	(Fe-S)-bindendes Protein	87	41	WP_048094776.1
<i>Methanosarcina thermophila</i>	Heterodisulfidreduktase-Untereinheit D (HdrD)	88	40	BAW29047.1
<i>Methanosarcina barkeri</i>	(Fe-S)-bindendes Protein	89	38	Mbar_A1599
<i>Methanosarcina mazei</i> Gö1	(Fe-S)-bindendes Protein	87	39	MM_1844

Darüber hinaus sind HdrD-Homologe in der nicht-methanogenen Ordnung Thermoplasmatales zu finden, was nicht überrascht, da die Methanomassiliicoccales sogar eine engere Verwandtschaft mit den Thermoplasmatales, als mit den übrigen methanogenen Ordnungen aufweisen (Borrel *et al.* 2014). Neben den Archaeen, die den Methanomassiliicoccales oder Thermoplasmatales zugeschrieben werden, konnten auch HdrD-ähnliche Proteine in Vertretern der Ordnung Archaeoglobales (dazu gehört auch *Geoglobus ahangari*) identifiziert werden. Die Gattung umfasst hyperthermophile Archaeen, die Proteine besitzen, die zu den aus methanogenen Organismen bekannten Heterodisulfidreduktasen homolog sind. In *Archaeoglobus fulgidus* beispielsweise, einem Sulfat-reduzierenden Archaeon, sind sowohl die lösliche Heterodisulfidreduktase HdrABC, als auch beide Untereinheiten der membranständigen Reduktase HdrDE im Genom kodiert (Hocking *et al.* 2014). Dies deutet an, dass Heterodisulfidreduktasen eine wichtige Rolle bei der Sulfatreduktion in *A. fulgidus* spielen. Jedoch entspricht die Funktion von HdrD in *A. fulgidus* im Gegensatz zu HdrD aus *M. luminyensis* vermutlich jener, die für HdrDE in Cytochrom-enthaltenden, methanogenen Archaeen beschrieben ist (s. u.), da die membranständige Untereinheit HdrE ebenfalls im Genom von *A. fulgidus* kodiert ist und es daher zur Bildung des vollständigen HdrDE-Heterodimers kommt (Hocking *et al.* 2014).

Gut beschrieben sind membranständige Heterodisulfidreduktasen in *Methanosarcina*-Spezies, welche sich aus den Untereinheiten HdrD und HdrE zusammensetzen (Künkel *et al.* 1997; Simianu *et al.* 1998).

Das Enzym HdrDE katalysiert die Reduktion des Heterodisulfids, wobei MPh_{red} als Elektronendonator fungiert (Bäumer *et al.* 1998; Deppenmeier *et al.* 1999). Beim Vergleich von HdrD aus *M. luminyensis* mit den HdrD-Untereinheiten verschiedener *Methanosarcina*-Arten fiel auf, dass die Sequenzabdeckung sehr gering war ($\leq 40\%$), was auf eine geringere Verwandtschaft zwischen HdrD aus *M. luminyensis* und HdrD aus *Methanosarcina* spp. hindeutete. Diese Beobachtung gab bereits einen ersten Hinweis darauf, dass sich die Proteine nicht nur aufgrund ihrer Sequenz, sondern auch bezüglich ihrer Funktion unterscheiden könnten. Um dieser Vermutung nachzugehen, wurde HdrD aus *M. luminyensis* mit den HdrD-Untereinheiten aus *Methanosarcina barkeri*, *Methanosarcina acetivorans* und *Methanosarcina mazei* anhand eines Sequenzalignments (Larkin *et al.* 2007) detaillierter verglichen. Es fiel auf, dass die Aminosäuresequenz des Proteins HdrD aus *M. luminyensis* länger ist als die Sequenz der HdrD-Untereinheiten aus den *Methanosarcina*-Arten. Diese Besonderheit kommt durch eine C-terminale Verlängerung zustande, wobei der C-Terminus 40 Aminosäuren mehr umfasst als die C-Termini der *Methanosarcina*-HdrD-Untereinheiten (Abb. 26, gerahmter Bereich). Nicht nur die C-terminale Verlängerung ist eine Eigenheit von HdrD aus *M. luminyensis* im direkten Vergleich mit HdrD-Homologen, sondern auch die Aminosäuren selbst, die Teil des C-Terminus sind. Durch die hohe Anzahl von Lysinresten im Bereich der Verlängerung (Abb. 26, unterstrichen) besitzt der C-Terminus eine stark positive Ladung, was darauf hindeutet, dass HdrD aus *M. luminyensis* eine hohe Affinität für negativ geladene Verbindungen oder negativ-geladene Proteine aufweist.

In Bezug auf bestimmte Konsensussequenzen sind sich alle HdrD-Proteine sehr ähnlich. Hierbei handelt es sich um die Aminosäuren, die Eisen-Schwefel-Cluster koordinieren (Abb. 26, grau). Schon lange ist bekannt, dass bestimmte Cysteinmotive für die Koordinierung von Eisen-Schwefel-Clustern verantwortlich sind. Diese weisen sich durch die Konsensussequenz CxxCxxCxxxC aus und binden spezifisch kubane [4Fe-4S]-Cluster (Hedderich *et al.* 1994; Hedderich *et al.* 2005). In allen gezeigten homologen HdrD-Strukturen sind zwei in dieser Art konservierte Cysteinmotive zur Koordinierung von [4Fe-4S]-Clustern im Bereich des N-Terminus lokalisiert, sodass gefolgert werden konnte, dass alle HdrD-Homologe mindestens zwei [4Fe-4S]-Cluster enthalten. Darüber hinaus konnten jedoch noch weitere hochgradig konservierte Cysteine innerhalb der Aminosäuresequenzen ausgemacht werden. Diese werden den sogenannten CCG-Domänen zugeordnet und zeichnen sich durch das Sequenzmotiv $CX_{31-32}CCX_{33-38}CxxC$ aus (Hedderich *et al.* 2005; Hamann *et al.* 2007; Hamann *et al.* 2009). Die HdrD-Homologe, die in Abb. 26 dargestellt sind, enthalten jeweils zwei CCG-Domänen, die im distalen Bereich (ausgehend vom N-Terminus) der Sequenzen lokalisiert sind. Bereits vor einigen Jahren wurde aufgrund von Untersuchungen, die auf EPR-Spektren beruhten, vermutet, dass neben den ‚klassischen‘ Cysteinmotiven auch die CCG-Domänen der Heterodisulfidreduktase-Untereinheiten an der Koordinierung von Eisen-Schwefel-Clustern beteiligt sind (Hamann *et al.* 2007). Allerdings gelang der endgültige experimentelle Nachweis lange Zeit nicht. Letztendlich wurde erstmals die Koordinierung eines Eisen-Schwefel-Clusters durch ein CCG-Motiv in der Untereinheit SdhE der Succinat:Chinon-Oxidoreduktase aus *Sulfolobus solfataricus* von Hamann *et al.* (2009) nachgewiesen. Des Weiteren gelang erst vor Kurzem auch der Nachweis der Eisen-Schwefel-Cluster-Koordinierung durch die CCG-Domänen der löslichen Heterodisulfidreduktase (HdrABC) des hydrogenotrophen,

methanogenen Organismus *Methanothermococcus thermolithotrophicus* durch Kristallisation des Mvh/Hdr-Komplexes (Wagner *et al.* 2017).

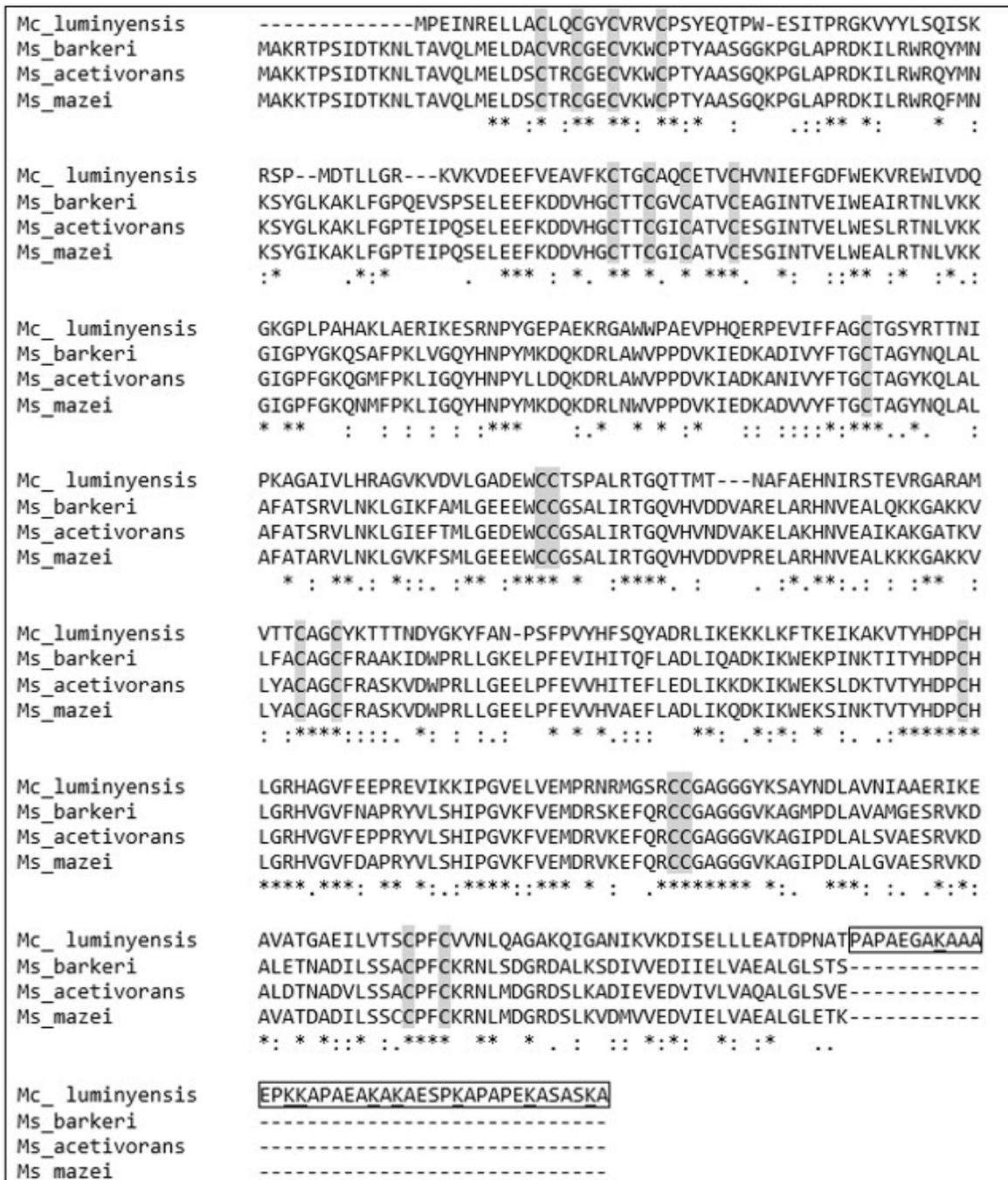


Abb. 26. Sequenzalignment von HdrD aus *M. luminyensis* gegen HdrD-Homologe aus *Methanosarcina*-Spezies. Cysteine, die an der Koordinierung von [4Fe-4S]-Clustern beteiligt sind, und Cystein-reiche Domänen sind grau unterlegt. Die C-terminale Verlängerung von HdrD aus *M. luminyensis* ist eingerahmt. Mc_luminyensis, *Methanomassiliococcus luminyensis* (WP_019178460); Ms_barkeri, *Methanosarcina barkeri* (Mbar_A1599); Ms_acetivorans, *Methanosarcina acetivorans* (MA0688); Ms_mazei, *Methanosarcina mazei* (MM_1844) (modifiziert nach Kröninger *et al.* 2016).

Inwiefern es ähnlich wie in HdrABC in HdrD zur Eisen-Schwefel-Cluster-Bindung durch CCG-Domänen kommt, wurde bisher nicht experimentell untersucht. Interessanterweise ist der N-Terminus von HdrD homolog zur Untereinheit HdrC der löslichen Heterodisulfidreduktase, während der C-Terminus von HdrD hohe Homologie zur Untereinheit HdrB der löslichen Heterodisulfidreduktase zeigt (Hedderich *et al.* 2005; Hamann *et al.* 2007). Während HdrC die ‚klassischen‘ Cysteinmotive aufweist, die [4Fe-4S]-Cluster binden, sind die CCG-Motive in HdrB zu finden (Hedderich *et al.* 2005; Wagner *et al.* 2017). Für HdrB aus *Methanothermococcus thermolithotrophicus* wurde anhand der Kristallisation des Proteins gezeigt, dass die CCG-Domänen der Untereinheit sogenannte nicht-kubane Eisen-Schwefel-Cluster koordinieren. Dabei handelt es sich um ungewöhnliche Fusionscluster, in denen ein [3Fe-4S]-Cluster mit einem [2Fe-2S]-Cluster verschmolzen ist, da diese jeweils ein Eisenion und einen anorganischen Schwefel teilen (Wagner *et al.* 2017). Aufgrund dieser Entdeckung ergab sich die Hypothese, dass auch in HdrD nicht nur zwei [4Fe-4S]-Cluster, die durch die ‚klassischen‘ Cysteinmotive koordiniert werden, zu finden sind, sondern auch nicht-kubane Cluster, die durch CCG-Motive gebunden werden, wie es in HdrB aus *M. thermolithotrophicus* der Fall ist (Wagner *et al.* 2017).

Anhand des Programms Phyre2 (Kelley *et al.* 2015) wurde HdrD aus *M. luminyensis* genauer in Bezug auf die Tertiärstruktur untersucht. Phyre2 führt BLAST-Analysen durch und ist in der Lage, das Zielprotein nicht nur mit einem einzigen homologen Protein, sondern je nach Domäne, mit unterschiedlichen Strukturen zu vergleichen und darauf basierend die wahrscheinlichste Tertiärstruktur zu berechnen. Das Ergebnis wurde mit Hilfe des Programms Chimera visualisiert (Pettersen *et al.* 2004).

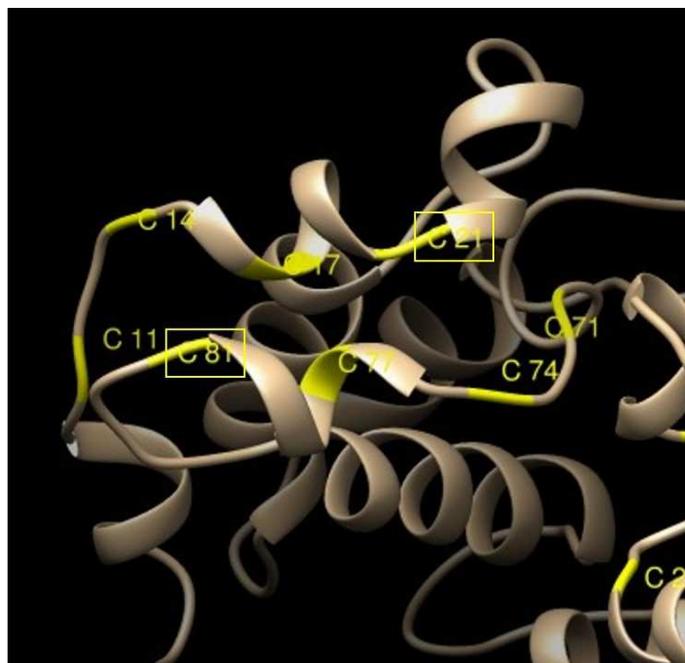


Abb. 27. Cysteinmotive zur Koordinierung von [4Fe-4S]-Clustern in *M. luminyensis*. Die gezeigten Cysteine sind im Bereich des N-Terminus lokalisiert. Cysteine, die eingerahmt sind, sind an der Stabilisierung des Eisen-Schwefel-Clusters beteiligt, das durch das jeweils andere Motiv gebunden wird. Die Berechnung der Struktur erfolgte mit Hilfe von Phyre2 (Kelley *et al.* 2015), die Darstellung mit Hilfe von Chimera (Pettersen *et al.* 2004).

Generell wurde das Protein mit großer Konfidenz im Bereich des N-Terminus basierend auf HdrC aus *M. thermolithotrophicus* und anderen Eisen-Schwefel-Cluster-haltigen Proteinen, wie der Succinat-Dehydrogenase aus *E. coli*, modelliert (Konfidenz > 99 %). Im Bereich des C-Terminus fand die Modellierung anhand von HdrB aus *M. thermolithotrophicus* und einem verwandten, aber bisher nicht charakterisierten Protein aus *Helicobacter pylori* statt (Konfidenz >> 99 %). Bei den ‚klassischen‘ Cysteinmotiven im N-terminalen Bereich des Proteins war zu erkennen, dass beide Motive in räumlicher Nähe zueinander lagen. Auffällig war, dass das jeweils letzte Cystein (Abb. 27; C21 bzw. C81) eines Motivs nah am jeweils anderen Motiv lokalisiert war. Dies warf die Vermutung auf, dass die Cysteine der Motive nicht nur an der Koordinierung eines einzelnen Eisen-Schwefel-Clusters beteiligt sind, sondern auch in den Koordinierungsprozess des jeweils anderen Motivs eingreifen und die Bindungen der Eisen-Schwefel-Cluster gegenseitig stabilisieren. Dieses Phänomen konnte auch anhand der Kristallstruktur der Untereinheit HdrC aus *M. thermolithotrophicus* untermauert werden, bei der ebenfalls das letzte Cystein eines ‚klassischen‘ Bindemotivs an der Koordinierung des jeweils anderen [4Fe-4S]-Clusters beteiligt war (Wagner *et al.* 2017).

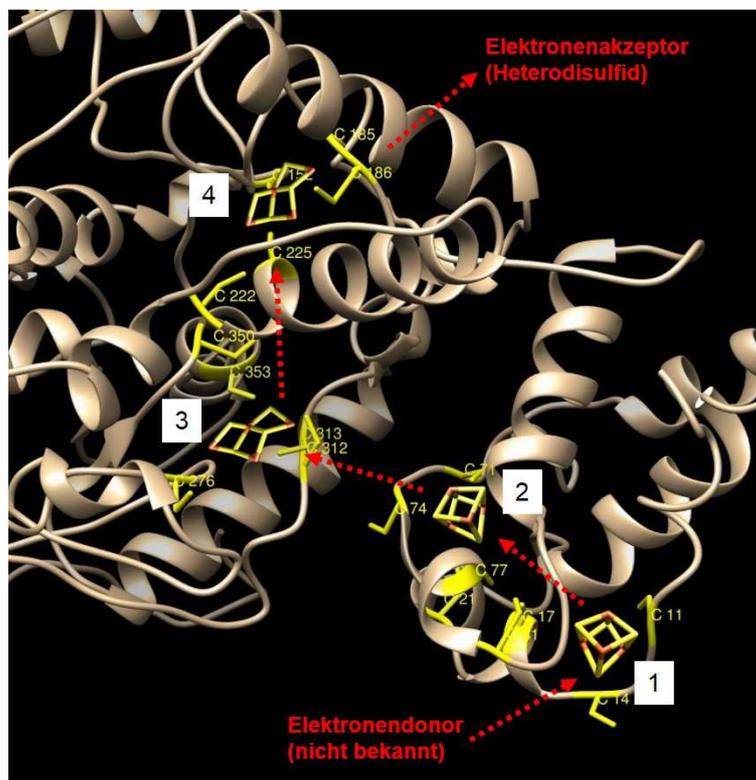


Abb. 28. Möglicher Elektronenfluss in HdrD aus *M. luminyensis*. Die Elektronen werden bei der Oxidation eines bisher nicht identifizierten Elektronendonors freigesetzt. Dann erfolgt die Weitergabe der Elektronen über zwei [4Fe-4S]-Cluster, die durch ‚klassische‘ Cysteinmotive gebunden werden (1, 2), und vermutlich über zwei nicht-kubane Cluster, die durch CCG-Motive koordiniert werden (3, 4). Final erfolgt die Reduktion des Heterodisulfids am distalen, nicht-kubanen Eisen-Schwefel-Cluster.

Über die CCG-Domänen in HdrB aus *M. thermolithotrophicus* ist bisher außer der Bindung nicht-kubaner Eisen-Schwefel-Cluster relativ wenig bekannt (Wagner *et al.* 2017). Ob derartige Eisen-

Schwefel-Cluster auch in HdrD aus *M. luminyensis* gebunden werden, ließ sich nur aufgrund der modellierten Struktur, aber ohne experimentelle Beweise nicht klar belegen oder ausschließen. Bei der Betrachtung der Cysteine der CCG-Domänen in der modellierten Proteinstruktur (Abb. 28) stach hervor, dass diese durch die Faltung des Proteins in räumlicher Nähe stehen. Dies macht eine Bindung von Eisen-Schwefel-Clustern prinzipiell möglich. Was hierbei im proximalen CCG-Motiv von HdrD aus *M. luminyensis* jedoch auffiel, war die Tatsache, dass das Glycin, welches normalerweise auf das duplizierte Cystein folgt, durch ein Threonin ersetzt ist. Wagner *et al.* (2017) postulierten, dass Glycin in dieser Position für die Koordinierung des nicht-kubanen Eisen-Schwefel-Clusters und die Substratbindung essentiell ist, und funktionell nur durch *cis*-Prolin ersetzt werden kann. Diese Beobachtung warf die Hypothese auf, dass das proximale CCG-Motiv von HdrD aus *M. luminyensis* u. U. nicht in der Lage ist, ein nicht-kubanes Eisen-Schwefel-Cluster zu binden. In diesem Fall würde der Elektronenfluss nicht über die ‚klassisch‘ gebundenen [4Fe-4S]-Cluster hinausgehen, da die Elektronen die Lücke, die zwischen den Clustern aufgrund der Abwesenheit des proximalen, nicht-kubanen Eisen-Schwefel-Clusters entstehen würde, nicht überspringen können. HdrD würde in diesem Fall vermutlich nur über zwei Elektronen-transferierende Eisen-Schwefel-Cluster verfügen. Ob Threonin in dieser Position tatsächlich die Bindung des nicht-kubanen Eisen-Schwefel-Clusters beeinträchtigt, ließe sich jedoch nur durch Kristallisation von HdrD aus *M. luminyensis* klären, was im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgenommen wurde. Deswegen wurde im Folgenden angenommen, dass HdrD analog zu HdrB und HdrC aus *M. thermolithotrophicus* (Wagner *et al.* 2017) über vier Eisen-Schwefel-Cluster verfügt.

Durch das Einfügen der vier Eisen-Schwefel-Cluster in das Proteinmodell im Bereich der konservierten Cysteine, ließ sich der Elektronenfluss in HdrD relativ gut analog zur löslichen Heterodisulfidreduktase aus *M. thermolithotrophicus* nachvollziehen (Wagner *et al.* 2017). Es ist möglich, dass der unbekannte Elektronendonator zunächst am proximalen [4Fe-4S]-Cluster oxidiert wird. Danach werden die Elektronen über das zweite [4Fe-4S]-Cluster, sowie die beiden nicht-kubanen Eisen-Schwefel-Cluster transferiert, und schließlich am distalen, nicht-kubanen Cluster auf das Heterodisulfid übertragen (Abb. 28). Dies deutet an, dass alle Eisen-Schwefel-Cluster für die katalysierte Reaktion absolut essentiell sind.

In der nachfolgenden Tabelle (Tab. 30) sind noch einmal zusammenfassend alle Eisen-Schwefel-Cluster-Bindemotive von HdrD aus *M. luminyensis* aufgelistet.

Tab. 30. Eisen-Schwefel-Cluster-Bindemotive in HdrD aus *M. luminyensis*. C + Nr.: Cystein an definierter Position im Protein; x: beliebige Aminosäure (Anzahl tiefgestellt, wenn > 3).

Cysteinmotiv	Klassifizierung	Geb. Eisen-Schwefel-Cluster	Position (relativ zum N-Terminus)
C11_{xx}C14_{xx}C17_{xxx}C21	‚klassisch‘	[4Fe-4S]	proximal
C71_{xx}C74_{xx}C77_{xxx}C81	‚klassisch‘	[4Fe-4S]	distal
C152_{x33}C185C186_{x34}C222_{xx}C225	CCG-Domäne	nicht-kuban	proximal
C276_{x33}C312C313_{x34}C350_{xx}C353	CCG-Domäne	nicht-kuban	distal

3.3.2.2 Generierung eines Überexpressionssystems für *hdrD* aus *M. luminyensis*

Zur genaueren strukturellen und funktionellen Analyse eines Proteins ist es essentiell, dass dieses in isolierter Form vorliegt. Dies lässt sich dadurch erreichen, dass das Protein aus dem Ursprungsorganismus aufgereinigt wird, oder dass es heterolog in einem geeigneten Produktionsstamm überproduziert und daraus aufgereinigt wird. Da *M. luminyensis* im Vergleich zu anderen Modellorganismen nur geringe Zelldichten erreicht, bot sich die direkte Aufreinigung von HdrD aus diesem Organismus nicht an. Stattdessen sollte eine heterologe Überproduktion in *E. coli* stattfinden und die Aufreinigung mit Hilfe einer Streptactin-Affinitätschromatographie erfolgen.

Zunächst wurde das Gen, welches für HdrD in *M. luminyensis* kodiert, mittels PCR unter Verwendung der Primer *hdrD_MMC_for* und *hdrD_MMC_rev* amplifiziert. Die Primer enthielten Schnittstellen für das Typ III-Restriktionsenzym *BsaI*, wodurch eine Insertion des PCR-Fragments in einen ebenfalls mit *BsaI* verdauten Vektor möglich war. Das Amplifikat wurde nach der PCR im Agarosegel aufgetrennt und mit GelRed™ gefärbt (Abb. 29). Für die anschließende Ligation wurde das PCR-Produkt mit einem kommerziellen Kit gereinigt. Beim Zielvektor handelte es sich um das kommerziell erhältliche Plasmid pASK-IBA3. Auf diesem Vektor ist neben einer Ampicillinresistenz, die zur Selektion benötigt wird, stromabwärts zur multiplen Klonierungsstelle ein Strep-tag kodiert, mit dem das Protein, dessen Gen in den Vektor inseriert wird, aufgereinigt werden kann. Darüber hinaus steht die Expression des Zielgens in diesem Plasmid unter der Kontrolle des *tet*-Promotors, sodass eine gezielte Induktion der Proteinproduktion in *E. coli* möglich ist. Auch der Vektor wurde aus *E. coli* aufgereinigt und ebenfalls im Gel aufgetrennt, sowie visualisiert (Abb. 29).

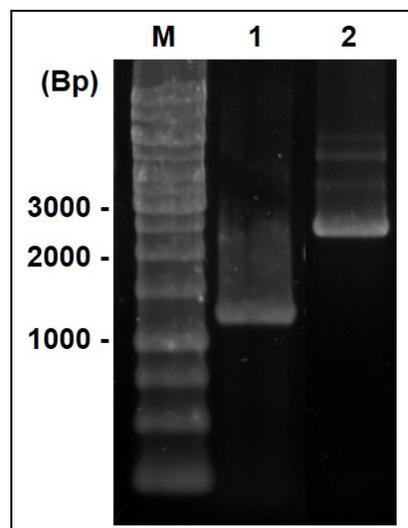


Abb. 29. *hdrD* aus *M. luminyensis* (1) und pASK-IBA3 (2). Das Gel zeigt das mittels PCR amplifizierte *hdrD*-Gen und den Vektor pASK-IBA3, die elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Als Standard diente der 1 kb GeneRuler (M; Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland).

Sowohl das *hdrD*-Amplifikat, als auch der Vektor pASK-IBA3 wurden mit *BsaI* verdaut. Nach dem Verdau wurden beide Produkte erneut aufgereinigt und mit Hilfe der T4 DNA-Ligase ligiert. Die

Transformation erfolgte in den Klonierungsstamm *E. coli* DH5 α . Die Anzucht der Zellen fand über Nacht auf Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten statt. Anschließend erfolgte die Analyse der transformierten Klone in Bezug auf die erfolgreiche Insertion des *hdrD*-Gens in den Vektor. Dazu wurde Material einzelner Kolonie-bildender Einheiten von der Platte entnommen und in eine Taq-basierte Kolonie-PCR eingesetzt. Zum Nachweis des Gens *hdrD* in pASK-IBA3 wurden die Primer pASK-for und pASK-rev verwendet. Diese binden einige Basen stromaufwärts bzw. stromabwärts von der multiplen Klonierungsstelle, sodass sie das inserierte DNA-Fragment flankieren. Die PCR-Produkte des Screenings wurden elektrophoretisch aufgetrennt und mit GelRed™ visualisiert, wodurch die Insertion von *hdrD* in pASK-IBA3 bestätigt wurde (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich zum PCR-Screening wurden positiv getestete Klone in LB-Medium mit Ampicillin angezogen und zur Plasmidpräparation herangezogen. Der Vektor wurde mit Hilfe der Primer pASK-for und pASK-rev sequenziert, um sicherzustellen, dass keine Mutationen in das *hdrD*-Gen während der PCR oder der Replikation des Vektors in *E. coli* eingebaut worden waren. Die Sequenzierung verifizierte schließlich, dass das Insert korrekt in den Vektor eingebracht wurde, sodass die Generierung des Überexpressionsvektors pASK3_MMC_hdrD erfolgreich war (Abb. 30).

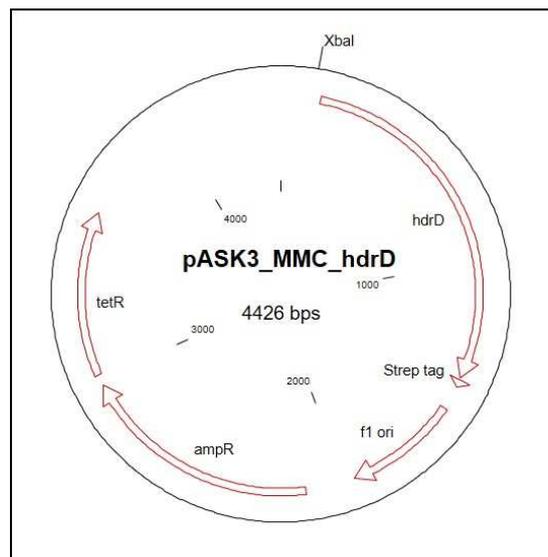


Abb. 30. Rekombinanter Vektor pASK3_MMC_hdrD zur Überproduktion von HdrD aus *M. luminyensis*. ampR: Ampicillin-Resistenzkassette, tetR: Für Tet-Repressor kodierendes Gen, f1 ori: f1-Replikationsursprung, *hdrD*: *hdrD*-Gen aus *M. luminyensis*.

3.3.2.3 Heterologe Überproduktion von HdrD in *E. coli*

Das Plasmid pASK3_MMC_hdrD, welches das Gen *hdrD* aus *M. luminyensis* trug, sollte zur heterologen Überproduktion von HdrD in einen Produktionsstamm eingebracht werden. Hierbei handelte es sich um *E. coli* T7 express, ein *E. coli* BL21(DE3)-Derivat, in das das Plasmid mittels Hitzeschock-Transformation eingeführt wurde. Die im Anschluss durchgeführte Überproduktion von HdrD in *E. coli* T7 express war jedoch zunächst nicht erfolgreich. Das Protein konnte zwar im Western Blot detektiert werden, was für dessen Produktion in *E. coli* T7 express sprach, es lag jedoch in der

Regel in unlöslicher Form in Proteinaggregaten im Pellet vor oder war im Durchlauf zu finden, sodass davon ausgegangen werden musste, dass es nicht an die Streptactin-Säule gebunden hatte (Daten nicht gezeigt). Es wurde vermutet, dass es in *E. coli* T7 express nicht zur korrekten Assemblierung der Eisen-Schwefel-Cluster in HdrD kam, wodurch die Faltung des Proteins beeinträchtigt wurde und die fehlgefalteten Proteine schließlich aggregierten. Aus diesem Grund lag eine weitere Strategie zur Überproduktion von HdrD darin, den Einbau der Eisen-Schwefel-Cluster in das Protein zu verbessern.

An der Synthese und Assemblierung von Eisen-Schwefel-Clustern ist in *E. coli* neben den *nif*- und *suf*-Clustern maßgeblich das sogenannte *isc*-Cluster beteiligt (Johnson *et al.* 2005). Zum einen können die *isc*-Gene zur Verbesserung der Eisen-Schwefel-Cluster-Assemblierung *in trans* in den Überproduktionsstamm eingebracht werden. In diesem Fall werden die *isc*-Gene auf einem Vektor (z. B. pRKISC; Yamamoto *et al.* 1997) in den Stamm eingeführt. Andererseits kann eine genetische Modifizierung des chromosomalen *isc*-Clusters einen direkten Einfluss auf die Beladung des Zielproteins mit Eisen-Schwefel-Clustern haben. Akhtar und Jones (2008) generierten einen *E. coli*-Stamm, in dem das Gen *iscR* deletiert war. IscR ist ein negativer Regulator des *isc*-Clusters, sodass dessen Entfernung zu einer erhöhten Transkriptionsrate des *isc*-Clusters und schließlich auch zu einer vermehrten Produktion der Isc-Proteine, die für die Biogenese von Eisen-Schwefel-Proteinen verantwortlich sind (Tokumoto und Takahashi 2001), führt. In diesem Stamm, der nachfolgend nur noch als *E. coli* Δ *iscR* bezeichnet wird, sollte das Protein HdrD aus *M. luminyensis* erneut überproduziert werden. Dafür wurden chemisch-kompetente *E. coli* Δ *iscR*-Zellen generiert und das rekombinante Plasmid pASK3_MMC_hdrD wurde mittels Hitzeschock in die Zellen eingebracht. Die Anzucht der transformierten Zellen erfolgte auf LB-Agarplatten, die Ampicillin zur Selektion auf das Überexpressionsplasmid und Kanamycin zur Selektion auf die Δ *iscR*-Mutation enthielten. Das Screening auf die erfolgreiche Insertion des Vektors in die Zellen erfolgte analog zum Screening der DH5 α -Zellen (s. o.) mit Hilfe einer Kolonie-PCR und den Primern *hdrD_MMC_for* und *hdrD_MMC_rev*.

Die Überproduktion von HdrD erfolgte nach einer modifizierten Methode nach Kuchenreuther *et al.* (2010). Hierbei wurde den Zellen Eisenammoniumcitrat als Eisenquelle und Cystein als Schwefelquelle zur Synthese der Eisen-Schwefel-Cluster zur Verfügung gestellt. Die Überproduktion wurde mit AHT eingeleitet und bei 16 °C durchgeführt. Bei höheren Temperaturen kam es zur Bildung von Einschlusskörperchen, in denen das Zielprotein aggregierte (Daten nicht gezeigt). Die Zellen, die das Protein produzierten, wurden nach der Überproduktion geerntet und mittels Ultraschall und Lysisreagenz aufgeschlossen. Alle Schritte fanden unter anaeroben Bedingungen statt, um der Degenerierung der sauerstoffsensitiven Eisen-Schwefel-Cluster in HdrD entgegen zu wirken.

Die Aufreinigung von HdrD erfolgte mit Hilfe der Streptactin-Affinitätschromatographie, da HdrD einen C-terminalen Strep-tag aufwies, der auf dem Überexpressionsplasmid stromabwärts von *hdrD* kodiert war (Abb. 30). Bereits die Färbungen der einzelnen Elutionsfraktionen wiesen auf eine erfolgreiche Produktion von HdrD und hohe Proteinkonzentrationen hin, da das Protein aufgrund der Eisen-Schwefel-Cluster eine gelb-bräunliche Färbung zeigte (Abb. 31, C). Die Elutionsfraktionen, die das Resultat der schrittweisen Eluierung des Proteins von der Streptactin-Säule waren, wurden mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt. Die Produktion von HdrD konnte durch die SDS-PAGE bestätigt werden, bei

der mit Hilfe der Silberfärbung bzw. des Western Blots ein Protein auf Höhe von 47 kDa detektiert wurde (Abb. 31). Dies entsprach der Größe, die für HdrD erwartet wurde, welches samt Strep-tag (ca. 1 kDa) eine Größe von ca. 47,7 kDa aufweist. Anhand des spezifischen Nachweises im Western Blot mit dem Streptactin-HRP-Konjugat, welches spezifisch an den Strep-tag bindet, wurde bewiesen, dass es sich bei dem detektierten Protein tatsächlich um HdrD handelte, da nur dieses einen C-terminalen Strep-tag trug. Die maximale Proteinausbeute belief sich auf 7,6 mg L Kultur⁻¹.

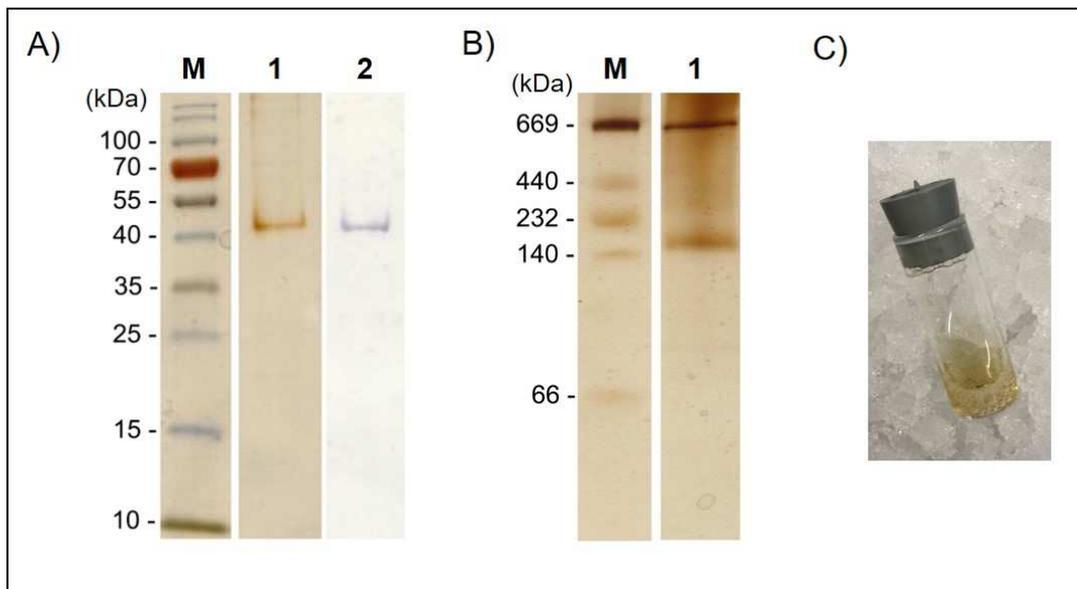


Abb. 31. Heterolog produziertes HdrD - aufgetrennt mittels SDS-PAGE (A) und nativer PAGE (B), sowie in der gefärbten Elutionsfraktion (C) (modifiziert nach Kröniger *et al.* 2016). A) Das SDS-Gel wurde nach der Auftrennung zum einen mittels Silberfärbung gefärbt (1), zum anderen wurde HdrD mit Hilfe des Streptactin-HRP-Konjugats im Western Blot nachgewiesen (2). Als Standard diente die PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland). B) Das native Gel wurde mit Hilfe der Silberfärbung gefärbt. Als Standard wurde das Amersham High Molecular Weight Calibration Kit for Native Electrophoresis (GE Healthcare, München, Deutschland) verwendet. C) HdrD-Elutionsfraktion.

Neben der fehlerfreien Synthese von HdrD, was auch die korrekte Assemblierung und den korrekten Einbau der Eisen-Schwefel-Cluster einschließt, ist für die Protein-Funktionalität der Oligomerisierungsgrad entscheidend. Im aeroben, nativen Gel war nach der Silberfärbung ein Proteinkomplex auf Höhe von 180 kDa sichtbar, was einem HdrD-Tetramer entsprach (Abb. 31, B). Darüber hinaus konnte bei 581 kDa ein weiterer Komplex beobachtet werden, der zu einem Dodecamer passte. Zur Verifizierung dieser Beobachtung wurde HdrD auch mit Hilfe der FPLC in Bezug auf den Oligomerisierungsgrad untersucht. Hierbei rief ein Proteinkomplex von 568 kDa das dominanteste Signal hervor, was ebenfalls einem Dodecamer entsprach. Dass HdrD tatsächlich als Homooligomer aktiv ist, erschien überraschend, da HdrD in methanogenen Archaeen mit Cytochromen zusammen mit HdrE lediglich ein Heterodimer bildet (Künkel *et al.* 1997; Simianu *et al.* 1998). Der hohe Oligomerisierungsgrad ging deswegen möglicherweise auf die Versuchsbedingungen zurück, die u. U. zur Aggregation des Proteins führten.

Wie bereits thematisiert wurde (3.3.2.1) sind Eisen-Schwefel-Cluster für die Funktionalität von HdrD entscheidend, da sie als Elektronentransportmodule in HdrD fungieren. Allerdings wurde die Anzahl an Eisen-Schwefel-Clustern bisher lediglich auf Grundlage bioinformatischer Analysen diskutiert. Deswegen sollte im Folgenden experimentell untersucht werden, über wie viele Eisen-Schwefel-Cluster das Protein HdrD verfügt. Aufgrund der Ähnlichkeit des C-terminalen Bereichs von HdrD zu HdrB aus *Methanothermococcus thermolithotrophicus* lag die Vermutung nah, dass HdrD ebenso wie HdrB nicht-kubane Eisen-Schwefel-Cluster über die CCG-Motive bindet und diese Cluster maßgeblich an der Elektronenweitergabe beteiligt sind (Wagner *et al.* 2017; Hedderich *et al.* 2005). Darüber hinaus schienen zwei [4Fe-4S]-Cluster durch die ‚klassischen‘ Cysteinmotive wie in HdrC aus *M. thermolithotrophicus* (Wagner *et al.* 2017) koordiniert zu werden.

Zur Klärung der Fragestellung, über wie viele Eisen-Schwefel-Cluster das heterolog produzierte HdrD verfügte, wurden der Eisen- und der Schwefelgehalt von HdrD ermittelt. Diese Untersuchung war essentiell, um später die katalytische Aktivität des Proteins bewerten zu können (3.3.2.4). Anhand kolorimetrischer Quantifizierungsmethoden konnte gezeigt werden, dass pro mol HdrD $7,0 \pm 0,3$ mol Nicht-Häm-Eisen und $8,1 \pm 1,2$ säurelabiler Schwefel enthalten waren. Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass während der Produktion des Proteins in *E. coli* nur eine teilweise Beladung mit Eisen-Schwefel-Clustern stattfand, da unter der Annahme, dass HdrD über vier Eisen-Schwefel-Cluster verfügt, höhere Eisen- und Schwefelgehalte erwartet wurden.

Da die Möglichkeit bestand, dass während der Produktion von HdrD nicht alle Eisen-Schwefel-Cluster korrekt gebildet bzw. nicht alle Eisen-Schwefel-Cluster-Bindemotive vollständig beladen wurden, wurde nach der Proteinüberproduktion eine chemische Rekonstituierung vorgenommen. Hierzu wurde HdrD ü. N. bei 25 °C in Eisenionen- und Schwefel-haltigem Puffer inkubiert (Hamann *et al.* 2007). Nach der Rekonstitution waren zwar höhere Gehalte an Eisen und Schwefel in HdrD zu verzeichnen (22 mol Fe bzw. 19 mol S pro mol HdrD), das Enzym war jedoch nahezu inaktiv (Reduktion der Aktivität um 90 %; siehe Aktivität in Kapitel 3.3.2.4), sodass sich die chemische Rekonstituierung insgesamt sogar negativ auf die enzymatische Aktivität von HdrD auswirkte. Auch eine Verkürzung der Inkubationsdauer im Eisenionen- und Schwefel-haltigen Puffer (1 h) und eine Reduktion der Inkubationstemperatur (4 °C) führten nicht dazu, dass das Protein neben erhöhten Eisen- und Schwefelgehalten auch eine höhere spezifische Aktivität zeigte. Daher lag die Vermutung nah, dass es während der chemischen Rekonstituierung zur unspezifischen Anlagerung von Eisen- und Schwefelionen an HdrD kam, wodurch die Inaktivierung des Enzyms herbeigeführt wurde.

3.3.2.4 Enzymatische Charakterisierung von HdrD

In acetiklastischen und methylo-trophen Methanarchaeen ist der durch HdrD katalysierte Prozess gut beschrieben. HdrD ist mit der membranintegralen Untereinheit HdrE assoziiert und somit in der cytoplasmatischen Membran verankert (Künkel *et al.* 1997; Simianu *et al.* 1998). Der Elektronendonator des Komplexes ist MPh_{red} (Bäumer *et al.* 1998; Deppenmeier *et al.* 1999), wobei es sich um den zentralen, membranlöslichen Elektronenüberträger in methanogenen Archaeen mit Cytochromen handelt (Abken *et al.* 1998). Die Elektronen, die bei der MPh_{red}-Oxidation freigesetzt werden, werden

zunächst auf ein *b*-Typ-Häm in HdrE übertragen (Ide *et al.* 1999; Heiden *et al.* 1994; Simianu *et al.* 1998). Danach erfolgt die Weitergabe der Elektronen über die Eisen-Schwefel-Cluster in HdrD an das katalytische Zentrum (Hedderich *et al.* 2005; Künkel *et al.* 1997; Ide *et al.* 1999). Hier kann es nun zur Heterodisulfidreduktion kommen, wobei das Heterodisulfid zu HS-CoM und HS-CoB reduziert wird. Der Elektronendonator von HdrDE ist somit in Cytochrom-haltigen, methanogenen Organismen bekannt und auch der Katalysemechanismus weitestgehend verstanden (Ide *et al.* 1999; Deppenmeier *et al.* 1999).

In *M. luminyensis* ist die Situation bisher unklar, da dem Organismus das Modul HdrE fehlt, welches normalerweise die Elektronen für die Heterodisulfidreduktion in HdrD bereitstellt (Ide *et al.* 1999; Simianu *et al.* 1998) und der Elektronendonator von HdrD daher nicht bekannt ist. In diesem Zusammenhang ist außerdem nicht geklärt, ob der Elektronendonator durch ein weiteres Enzym oder durch HdrD selbst oxidiert wird. Darüber hinaus ist auch nicht untersucht, ob HdrD ohne den Komplexpartner HdrE überhaupt funktionell ist und die Reduktion des Heterodisulfids katalysieren kann. Zur Untersuchung dieser Fragestellungen wurde das heterolog produzierte Protein HdrD daher zunächst in Bezug auf die katalytische Aktivität untersucht. Da der native Elektronendonator von HdrD in *M. luminyensis* nicht bekannt ist, wurde der artifizielle Elektronendonator MV_{red} (reduziertes Methylviologen) verwendet. MV besitzt im reduzierten Zustand eine blaue Färbung, die bei 604 nm (A_{604}) gemessen werden kann, und ist im oxidierten Zustand farblos. Aus diesem Grund gibt die Abnahme der Absorption bei 604 nm direkt Rückschluss darauf, ob MV_{red} in einem enzymatischen Test oxidiert werden kann.

Zum Nachweis der Heterodisulfidreduktion durch HdrD mit MV_{red} als Elektronendonator, wurden zunächst 2,5 bis 20 µg HdrD in den Test eingesetzt. Die Substratmengen betragen 80 µM Heterodisulfid und 7 mM MV_{ox}, wobei MV_{ox} durch die Zugabe von Titan(III)-citrat reduziert wurde bis die Absorption bei 604 nm ca. 2 betrug. Nach Komplettierung des Tests durch den Elektronendonator MV_{red}, den Elektronenakzeptor Heterodisulfid und das katalysierende Enzym HdrD kam es unmittelbar zur Abnahme der Absorption bei 604 nm (Daten nicht gezeigt), was ein klarer Beweis dafür war, dass HdrD in der Lage war, das Heterodisulfid unter den gegebenen Bedingungen zu reduzieren. Je mehr HdrD der Test enthielt, desto schneller nahm die Absorption bei 604 nm ab. Dies deutete darauf hin, dass HdrD *in vitro* - und höchstwahrscheinlich auch *in vivo* - als Heterodisulfidreduktase fungiert, obwohl der native Komplexpartner HdrE fehlt.

Zur Ermittlung der enzymkinetischen Parameter K_M und v_{max} wurde eine definierte Enzymmenge von 8 µg HdrD in die Tests eingesetzt. Durch das Einsetzen unterschiedlicher Substratkonzentrationen (2 bis 130 µM Heterodisulfid) wurde der Bereich ermittelt, bei dem das Enzym vollständig mit Substrat abgesättigt war. Hier erreichte die Geschwindigkeit, mit der das Enzym sein Substrat umsetzte, ihr Maximum (v_{max}) und ließ sich auch durch weitere Substratzugabe nicht mehr steigern. K_M war definiert als die Substratkonzentration (Heterodisulfidkonzentration), bei der die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit von HdrD zu beobachten war. K_M und v_{max} wurden für HdrD mittels nicht-linearer Regression mit Hilfe des Programms GraphPad Prism 7 bestimmt. Es bedurfte einer Heterodisulfidkonzentration von $20,1 \pm 4,1$ µM (K_M -Wert), um die halbmaximale Geschwindigkeit der Reaktion zu erreichen. v_{max} betrug $4,9 \pm 0,3$ U mg⁻¹, wobei eine Sättigung oberhalb von ca. 50 µM

Heterodisulfid einsetzte (Abb. 32). Das Protein wies zwar folglich eine relativ hohe Affinität zu seinem Substrat auf, da der K_M -Wert im mikromolaren Bereich angesiedelt war, zeigte jedoch nur eine relativ geringe spezifische Aktivität.

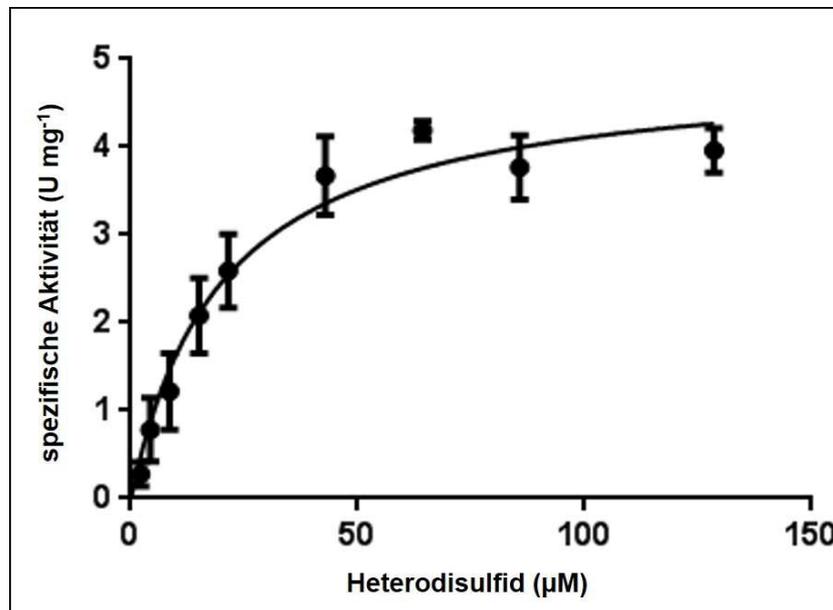


Abb. 32. Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von HdrD von der Konzentration des Substrates Heterodisulfid, dargestellt als Michaelis-Menten-Kinetik. Die Reaktion erfolgte bei 37 °C in einem KP-Puffer mit pH 7. Die Konzentration an MV_{red} betrug konstant 7 mM. Die Heterodisulfidkonzentration belief sich in den Tests auf 2 bis 130 µM. Die spezifische Aktivität betrug $4,9 \pm 0,3$ U mg⁻¹ bei einem K_M -Wert von $20,9 \pm 4,1$ µM. Die Berechnung der Parameter anhand nicht-linearer Regression erfolgte mit Hilfe des Programms GraphPad Prism 7. Die gezeigte Kinetik setzt sich aus den Mittelwerten von drei unabhängigen Experimenten zusammen.

Die geringe spezifische Aktivität des Enzyms kam vermutlich durch die unvollständige Beladung von HdrD mit Eisen-Schwefel-Clustern zustande, was sich mit der Feststellung deckte, dass die Eisen- und Schwefelgehalte des überproduzierten Proteins unter den Erwartungen lagen (3.3.2.3). Da jedoch generell eine katalytische Aktivität zu verzeichnen war, konnte davon ausgegangen werden, dass zumindest ein Teil der überproduzierten HdrD-Proteine korrekt und vollständig mit Eisen-Schwefel-Clustern beladen war. Es ist hervorzuheben, dass es sich bei der hier untersuchten Heterodisulfidreduktase-Untereinheit HdrD aus *M. luminyensis* um die erste methanogene Heterodisulfidreduktase handelt, die heterolog produziert werden konnte und katalytische Aktivität aufwies. Aus diesem Grund hebt sich das Ergebnis von ähnlichen Versuchen ab, in denen die heterologe Produktion von methanogenen Heterodisulfidreduktase-Untereinheiten zu inkorrekt mit Eisen-Schwefel-Clustern beladenen und somit inaktiven Enzymen führte (Hedderich *et al.* 2005). Deswegen bot sich eine weiterführende Untersuchung des heterolog in *E. coli* produzierten Proteins HdrD aus *M. luminyensis* an.

Die zuvor durchgeführten Tests wurden zur Bestimmung der Kenngrößen K_M und v_{max} bei Parametern durchgeführt, die den optimalen Wachstumsbedingungen von *M. luminyensis* entsprachen (37 °C und

pH 7). Um zu zeigen, dass diese Parameter tatsächlich auch für HdrD optimal waren, wurden die Temperatur und der pH-Wert im Test variiert. Berechnungen der entsprechenden Reaktionsgeschwindigkeiten ergaben, dass das Enzym in der Tat die höchste Aktivität bei pH 7 und zwischen 35 und 40 °C besaß (Abb. 33), was dem intrazellulären pH-Wert bzw. der optimalen Wachstumstemperatur von *M. luminyensis* (Dridi *et al.* 2012a) entsprach.

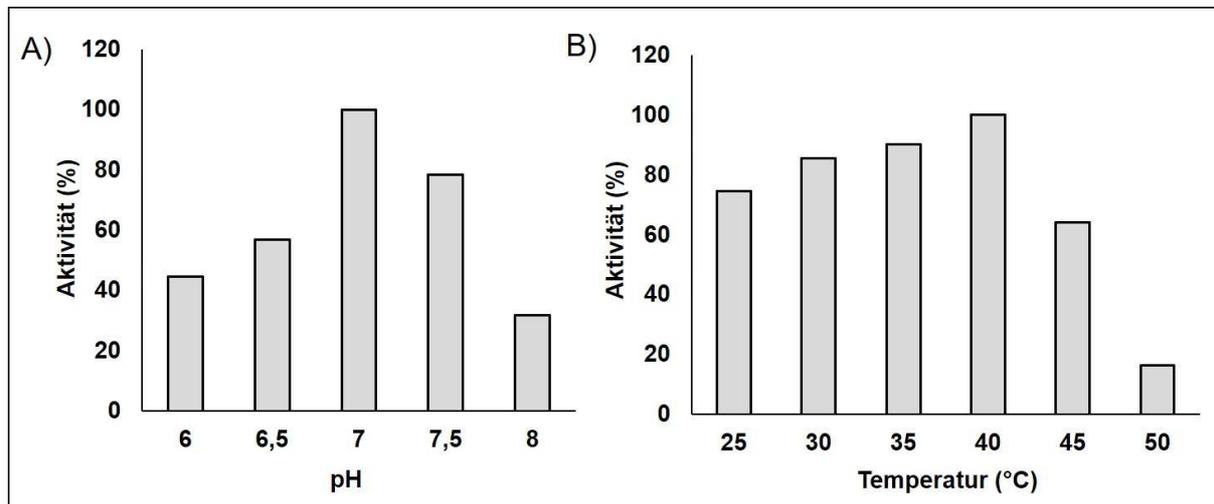


Abb. 33. pH- (A) und Temperaturoptimum (B) von HdrD aus *M. luminyensis*. In die Tests wurden jeweils 5 µg HdrD eingesetzt. 80 µM Heterodisulfid fungierten als Elektronenakzeptor, wobei MV_{red} (7 mM) wie bereits beschrieben als Elektronendonator verwendet wurde. Hier ist beispielhaft die Untersuchung einer Enzympräparation gezeigt, wobei dieses Ergebnis durch insgesamt drei unabhängige Präparationen bestätigt wurde. Eine Aktivität von 100 % entsprach einer spezifischen Aktivität von 4,9 U mg⁻¹.

In vivo werden bei acetiklastischen und methylotrophen Methanarchaeen die Elektronen, die zur Heterodisulfidreduktion bereitgestellt werden, durch HdrE, welches MPh_{red} oxidiert, bereitgestellt (Simianu *et al.* 1998; Ide *et al.* 1999; Bäumer *et al.* 1998). Dieser Prozess findet in *M. luminyensis* nicht statt, da die Untereinheit nicht im Genom des Archaeons kodiert ist. Da HdrD aus *M. luminyensis* jedoch einen verlängerten C-Terminus besitzt, dessen Funktion nicht bekannt ist, war es generell denkbar, dass dieser Terminus MPh_{red} bindet und es oxidiert, sodass HdrE als MPh_{red}-oxidierende Untereinheit obsolet wird. Enzymatische Reaktionen, in denen MPh involviert ist, können durch Diphenyliodoniumchlorid (DPI) inhibiert werden (Brodersen *et al.* 1999). Die Verbindung ähnelt MPh strukturell, sodass es mit MPh um Bindungsstellen an dessen Zielenzymen konkurriert und somit einen kompetitiven Inhibitor darstellt. Für HdrD aus *M. luminyensis* wurde getestet, ob sich die MV_{red}-abhängige Heterodisulfidreduktion durch Zugabe von DPI hemmen ließ. Aus *Methanosarcina mazei* ist bekannt, dass DPI die Heterodisulfidreduktase-Aktivität von gereinigten Membranfraktionen, die HdrDE enthalten und MPh_{red} oxidieren, signifikant reduziert (Brodersen *et al.* 1999; Beckmann *et al.* 2016). Auf Grundlage dieser Beobachtung wurde postuliert, dass DPI mit MPh um die Bindungsstelle in HdrE, dem Cytochrom, welches die Elektronen aus der MPh_{red}-Oxidation aufnimmt, konkurriert, wodurch es zur Hemmung kommt (Brodersen *et al.* 1999). Membranen von *Ms. mazei* dienen daher als Positivkontrolle für die Analyse von HdrD aus *M. luminyensis* im Zusammenhang mit dem Hemmstoff DPI.

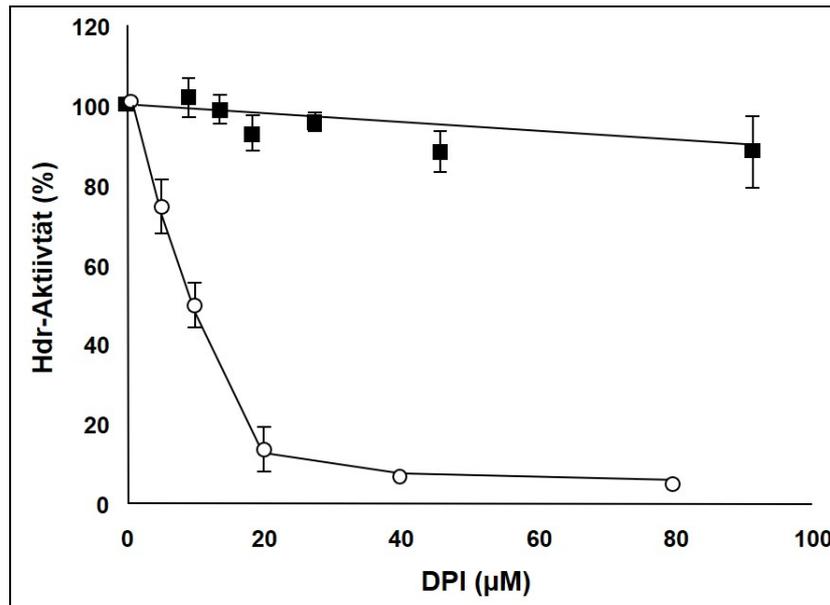


Abb. 34. Einfluss von DPI auf die Heterodisulfidreduktase-Aktivität (Hdr-Aktivität). Dargestellt sind die Aktivität des heterolog überproduzierten und aufgereinigten Proteins HdrD aus *M. luminyensis* (■) und des Heterodisulfid-reduzierenden HdrDE-Komplexes in Membranen von *Ms. mazei* (○). Aktivitäten von 100 % entsprachen 4,9 U mg Protein⁻¹ (für HdrD) bzw. einer Heterodisulfidreduktase-Aktivität von 250 mU mg Membranprotein⁻¹ (für HdrDE in *Ms. mazei*-Membranen) in Abwesenheit von DPI (modifiziert nach Kröninger *et al.* 2016).

Während die Heterodisulfidreduktion durch HdrDE in den Membranen von *Ms. mazei* sukzessive durch DPI gehemmt wurde (IC₅₀ = 10 µM), war bei HdrD aus *M. luminyensis* keine Hemmung nach Zugabe von DPI zu beobachten (Abb. 34). Wie später noch thematisiert wird, bindet MV_{red} vermutlich in dem Bereich, wo auch der bisher nicht identifizierte, native Elektronendonator von HdrD oxidiert wird (3.3.2.5). Da die Oxidation von MV_{red} an HdrD nicht durch DPI beeinträchtigt wurde, war anzunehmen, dass DPI nicht im Bereich der Bindestelle der Elektronendonoren am N-terminalen [4Fe-4S]-Cluster (Abb. 28) band. Da sich DPI und MPh strukturell ähneln, konnte auch ausgeschlossen werden, dass MPh in diesem Bereich bindet und als Elektronendonator fungiert.

Zusammengefasst führten vier Beobachtungen, die aus den Analysen zu HdrD bzw. der Literatur hervorgingen, letztendlich zur Annahme, dass MPh nicht im Stoffwechsel von *M. luminyensis* involviert ist: 1) Das Modul HdrE, welches MPh_{red} oxidieren kann und Elektronen an HdrD zur Heterodisulfidreduktion weiterleitet, ist in *M. luminyensis* nicht zu finden. Darüber hinaus hat DPI keinen Einfluss auf die enzymatische Aktivität von HdrD, sodass vermutlich auch HdrD selbst nicht MPh_{red} oxidiert. 2) MPh_{ox}-reduzierende Enzyme, wie die Vho-Hydrogenase oder der Rnf-Komplex, sind nicht im Genom kodiert. 3) Ob der Fpo-Komplex wie in *Ms. mazei* MPh_{ox} reduziert (Abken *et al.* 1998), ist fraglich, da die MPh_{red}-oxidierende Heterodisulfidreduktase-Untereinheit (HdrE) und somit der ‚Elektronenabnehmer‘ fehlt. Es wäre theoretisch denkbar, dass ein anderer Komplex als HdrDE die MPh_{red}-Oxidation katalysiert, allerdings ist ein solcher Komplex in den ansonsten sehr gut beschriebenen Stoffwechseln der methanogenen Archaeen bisher nicht bekannt und die Hypothese erscheint daher eher unwahrscheinlich. 4) In Membranfraktionen von *M. luminyensis* konnten bisher

kein MPh oder andere Chinol-Analoga nachgewiesen werden (Becker *et al.* 2016). Alles deutet deshalb darauf hin, dass MPh als Elektronenüberträger in *M. luminyensis* keine Rolle spielt und eine klassische Atmungskette, die mehrere membranständige Enzyme enthält, in dem Organismus fehlt.

Darüber hinaus wurde getestet, ob sich die katalytische Aktivität von HdrD durch Zugabe von Coenzym M (HS-CoM) hemmen ließ. Bei der Heterodisulfidreduktion wird HS-CoM als Produkt gebildet, sodass es im Rahmen einer Rückkopplungshemmung durchaus als hemmende Komponente wirken könnte. Als weiteres Produkt wird HS-CoB gebildet. Da HS-CoB nicht kommerziell erhältlich ist, konnte dessen Effekt auf die Enzymaktivität nicht untersucht werden. Es ist jedoch anzunehmen, dass sich HS-CoM und HS-CoB als Produkte derselben Reaktion gleich verhalten. Die Heterodisulfidreduktase-Aktivität von HdrD wurde in Anwesenheit von unterschiedlichen HS-CoM-Konzentrationen untersucht. Die Konzentrationen wurden mit 100-500 μM HS-CoM so gewählt, dass sie etwa fünf- bis 25-fach über dem K_M -Wert von HdrD für Heterodisulfid lagen (20,1 μM). Als Referenz diente die Aktivität, die das Enzym ohne Zugabe von HS-CoM besaß. Diese betrug etwa 4,9 U mg^{-1} und wurde als 100 %-ige Aktivität festgelegt.

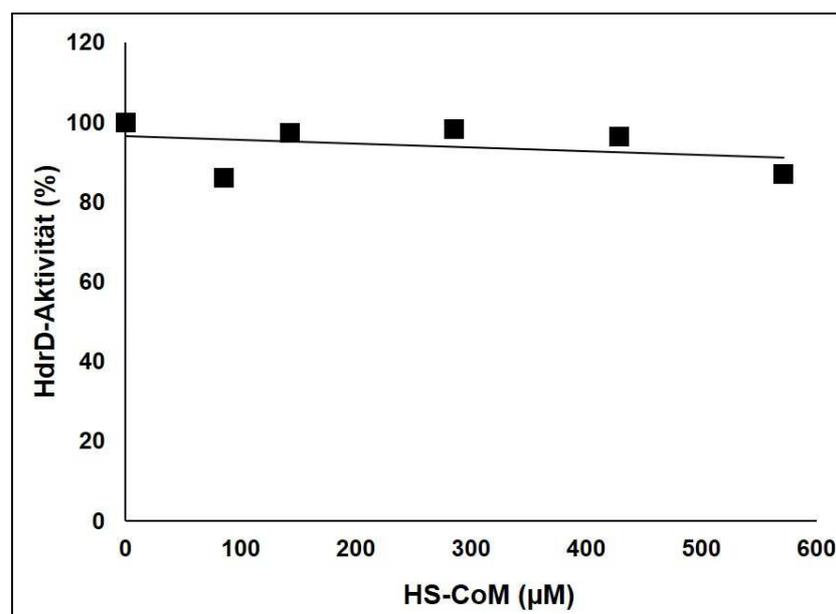


Abb. 35. Einfluss von HS-CoM auf die Aktivität von HdrD. Eine Aktivität von 100 % entsprach einer spezifischen Aktivität von 4,9 U mg^{-1} , die das heterolog überproduzierte und aufgereinigte Enzym ohne Zusatz des potentiellen Hemmstoffes HS-CoM zeigte. In den Test wurden jeweils 5 μg HdrD eingesetzt. 80 μM Heterodisulfid fungierten als Elektronenakzeptor, wobei MV_{red} (7 mM) als Elektronendonator verwendet wurde. Hier ist beispielhaft der Test einer Enzympräparation gezeigt.

Es war nicht zu beobachten, dass sich die Aktivität des Enzyms durch Zugabe von HS-CoM hemmen ließ. Im gesamten HS-CoM-Konzentrationsbereich wurden mindestens 85 % der Aktivität erreicht, die HdrD ohne HS-CoM-Zugabe besaß (Abb. 35). Somit konnte eine Rückkopplungshemmung von HdrD durch eines der Produkte der katalysierten Reaktion (HS-CoM) ausgeschlossen werden.

Die zu HdrD durchgeführten Untersuchungen haben gezeigt, dass HdrD eine funktionelle Heterodisulfidreduktase mit hoher Substrataffinität ohne Endproduktinhibierung ist. Da HdrD nicht durch DPI gehemmt wurde, ist anzunehmen, dass es nicht mit MPH interagiert. Damit stellte sich grundsätzlich die Frage nach einem Elektronendonator für HdrD.

3.3.2.5 Austausch konservierter Cysteine in HdrD durch Serine

Aus bioinformatischen Analysen war bereits hervorgegangen, dass HdrD aus *M. luminyensis* und HdrD-Homologe hoch konservierte Cysteinemotive aufweisen, die für die Koordinierung von Eisen-Schwefel-Clustern verantwortlich sind (3.3.2.1). Findet die Koordinierung von Eisen-Schwefel-Clustern an den Cysteinemotiven inkorrekt oder nur unvollständig statt, wirkt sich dies direkt auf die Aktivität des Enzyms aus, da die Eisen-Schwefel-Cluster die Elektronen-transferierenden Einheiten des Proteins darstellen und daher für den Katalysemechanismus unerlässlich sind.

Aufgrund der Eisen- und Schwefelbestimmung von HdrD und der spezifischen Aktivität des Proteins wurde vermutet, dass das überproduzierte Protein nur unvollständig beladen war (3.3.2.3, 3.3.2.4) und nicht jedes HdrD-Monomer über die beiden [4Fe-4S]-Cluster und die zwei nicht-kubanen Eisen-Schwefel-Cluster verfügte. Da aus der Bestimmung der Eisen- und Schwefelgehalten von HdrD jedoch nicht im Detail hervorgegangen war, ob in *E. coli* lediglich die Beladung der ‚klassischen‘ Cysteinemotive erfolgte oder ob der Produktionsstamm auch CCG-Motive als Eisen-Schwefel-Cluster-Bindemotive nutzte, wurden mit Hilfe ortsspezifischer Mutagenesen Mutanten von HdrD generiert. Bei diesen Mutanten wurden bestimmte Cysteine der konservierten Cysteinemotive, die für die Eisen-Schwefel-Cluster-Bindung verantwortlich sind, durch Serine ersetzt. In dem Fall, dass in dem Produktionsstamm keine Beladung des Proteins mit nicht-kubanen Eisen-Schwefel-Clustern im Bereich der CCG-Domänen erfolgt (wie in HdrB aus *Methanothermobacter marburgensis*; Hedderich *et al.* 2005), wurde erwartet, dass sich Mutationen in diesem Bereich nicht auf die Aktivität des überproduzierten HdrD-Proteins bzw. auf die Eisen- und Schwefelgehalte auswirken würden. Hat eine Veränderung der Aminosäuresequenz dagegen einen Einfluss auf diese beiden Parameter, wäre die Beobachtung ein Indiz dafür, dass in *E. coli* auch im Bereich der CCG-Domänen eine Beladung mit Eisen-Schwefel-Clustern stattfindet.

Aufgrund der Tatsache, dass für HdrD ein System vorlag, mit dem dieses Protein schnell aufgereinigt und auf seine Aktivität hin untersucht werden konnte, ließ sich ohne großen Aufwand testen, ob der Austausch einer einzelnen Aminosäure zur Inaktivierung des Enzyms in Bezug auf die Heterodisulfidreduktase-Aktivität führte. Damit hob sich die Untersuchung von HdrD von Studien ab, in denen bestimmte Cysteine in HdrB aus *Methanothermobacter marburgensis* durch Serine ersetzt wurden, aber lediglich die Auswirkungen dieser Aminosäure-Austausche im Hinblick auf die EPR-Spektren der HdrB-Mutanten analysiert wurden (Hamann *et al.* 2007). Mit Hilfe ortsspezifischer Mutagenesen wurden zunächst innerhalb des Überproduktionsvektors pASK3_MMC_hdrD Mutationen eingefügt, die dazu führten, dass bestimmte konservierte Cysteine in HdrD durch Serine ersetzt waren. Insgesamt wurden Plasmidderivate für vier Mutanten generiert, bei denen jeweils ein Cystein aus den konservierten Motiven zur Bindung von [4Fe-4S]-Clustern (C14 und C77), sowie die Doppelcysteine der

CCG-Domänen (C185/C186 und C312/C313) durch Serine substituiert waren. Die entsprechenden Basenaustausche wurden durch Sequenzierung der Plasmide verifiziert. Dies ist beispielhaft für das Plasmid pASK3_MMC_hdrD_C185S/C186S gezeigt (Abb. 36). Hier ist zu sehen, dass das TGC-Codon, welches für ein Cystein kodiert, zweimal durch das TCG-Codon, das für Serin kodiert, ersetzt wurde.

	C C
pASK3_MMC_hdrD	ggacgagtggtgctgcacctccccggccctaaggaccggccagaccaccatgaccaacgc
pASK3_MMC_hdrD_C185/6S	GGACGAGTGGTTCGTCGACCTCCCCGGCCCTAAGGACCGGCCAGACCACCATGACCAACGC
	***** * *****
	S S

Abb. 36. Basensequenz von pASK3_MMC_hdrD und pASK3_MMC_hdrD_C185S/C186S im Bereich des CCG-Motivs. Es ist nur ein Auszug der Sequenz gezeigt, die für das Protein HdrD kodiert. Übereinstimmende Basen (*), Cystein (C), Serin (S).

Die HdrD-Mutanten wurden wie bereits in Kapitel 3.3.2.3 beschrieben nach Kuchenreuther *et al.* (2010) in *E. coli* Δ *iscR* überproduziert und mittels Streptactin-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Mit Hilfe der SDS-PAGE und einer anschließenden Silberfärbung wurde verifiziert, dass es zur Synthese des entsprechenden mutierten Proteins kam und die Mutation keine Degradation oder unvollständige Synthese des Proteins bewirkte. Bei allen HdrD-Mutanten war eine Bande bei 47 kDa zu erkennen, was der Größe des Wildtyp-Proteins entsprach (47,7 kDa; Abb. 37). Zur Untersuchung, ob sich der Austausch der Cysteine auf die Funktionalität und die Beladung mit Eisen-Schwefel-Clustern auswirkte, wurden die HdrD-Mutanten in Bezug auf ihre Aktivität, ihre Eisen- und Schwefelgehalte, die Färbung der Elutionsfraktionen, sowie die Ausbeute der Proteinaufreinigung analysiert.

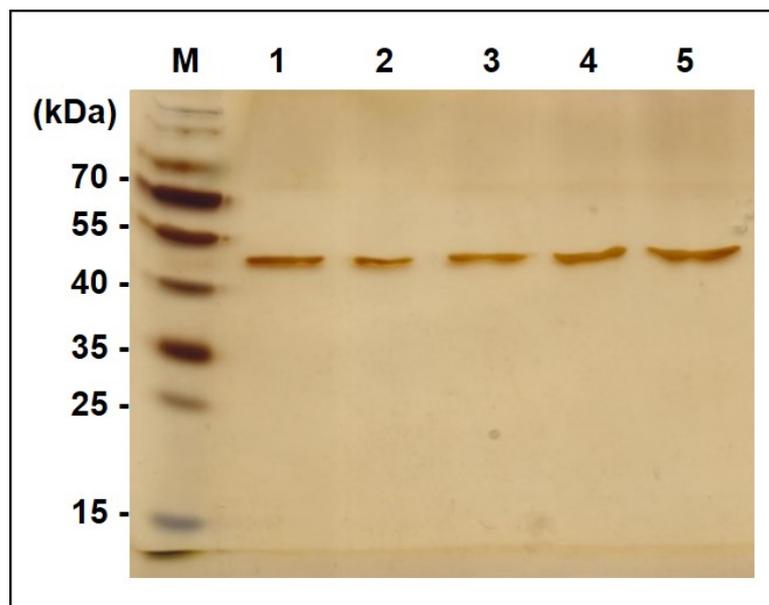


Abb. 37. HdrD-Mutanten aufgetrennt mittels SDS-PAGE und visualisiert durch Silberfärbung. Von den Proteinen wurden jeweils 2 μ g Protein aufgetragen. Als Standard diente die PageRuler™ Prestained Protein Ladder (M; Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland). HdrD-Wildtyp (1), HdrD_C14S (2), HdrD_C77S (3), HdrD_C185S/C186_S (4), HdrD_C312S/C313S (5).

Die Proteinausbeute der Mutanten HdrD_C14S und HdrD_C77S war mit der Ausbeute vergleichbar, die für das nicht-mutagenisierte Protein erzielt wurde, da diese 7,2 bzw. 5,9 mg L Kultur⁻¹ betrug (Wildtyp: 7,6 mg L Kultur⁻¹). Im Gegensatz dazu lieferten die Überproduktionen von HdrD_C185S/C186S und HdrD_C312S/C313S nur etwa 15 bzw. 25 % der Wildtyp-Ausbeute, da nur 1,1 bzw. 2,2 mg L Kultur⁻¹ produziert werden konnten. Dies spiegelte sich auch in der Färbung der Eluate der Aufreinigung wider, da diese im Vergleich zum Wildtyp und den Mutanten, in denen Cysteine der ‚klassischen‘ Bindemotive ausgetauscht waren, nur eine schwache, gelb-bräunliche Färbung zeigten. Generell schien somit der Austausch der Doppelcysteine der CCG-Motive durch Doppelserine einen negativen Einfluss auf die Produktion der HdrD-Mutanten gehabt zu haben. Es ist möglich, dass diese Cysteine nicht nur für die Bindung von Eisen-Schwefel-Clustern, sondern auch für die korrekte Faltung des Proteins wichtig waren. Der Austausch bewirkte vermutlich, dass der Produktionsstamm das Protein als fehlerhaft erkannte und schließlich Degradationsprozessen zuführte.

Zur Untersuchung, ob sich die Mutationen auf die Beladung des Zielproteins mit Eisen-Schwefel-Clustern auswirkten, wurden auch die Eisen- und Schwefelgehalte der Mutanten bestimmt. Die Eisengehalte (Fe) der HdrD-Mutanten unterschieden sich nicht signifikant von dem Fe-Gehalt des Wildtyp-Proteins (8,1 mol Fe pro mol HdrD), da die Werte 8,9 (HdrD_C14S), 9,3 (HdrD_C77S), 6,5 (HdrD_C185S/C186S) bzw. 11,1 mol Fe pro mol HdrD (HdrD_C312S/C313S) betragen. Darüber hinaus nahmen auch die Gehalte an säurelabilem Schwefel (S) ähnliche Werte an, da sich diese auf 8,9 (HdrD_C14S), 8,0 (HdrD_C77S), 9,3 (HdrD_C185S/C186S) und 10,2 mol S pro mol HdrD (HdrD_C312S/C313S) beliefen, und in der gleichen Größenordnung wie der Schwefelgehalt des Wildtyp-Proteins HdrD lagen (7,0 mol S pro mol HdrD). Da bei keiner Mutante eine Reduktion des Eisen- und Schwefelgehalts zu verzeichnen war, konnte davon ausgegangen werden, dass in *E. coli* prinzipiell alle Bindemotive mit den entsprechenden Eisen-Schwefel-Clustern beladen werden konnten. Insbesondere da die Eisen- und Schwefelgehalte der Mutanten HdrD_C14S und HdrD_C77S mit denen des Wildtyps vergleichbar waren, konnte geschlossen werden, dass auch die CCG-Motive in *E. coli* beladen wurden. Anderenfalls wäre es durch die Veränderung eines ‚klassischen‘ Bindemotivs und der daraus resultierenden Reduktion um ein [4Fe-4S]-Cluster zur Reduktion der Eisen- und Schwefelgehalte gekommen. Es schien so, dass sich die Kapazität, mit der der Produktionsstamm das Zielprotein mit Eisen-Schwefel-Clustern belud, gleichmäßig auf die übrigen Bindedomänen verteilte, wenn ein Bindemotiv durch den Austausch von Cysteinen nicht mehr zur Eisen-Schwefel-Cluster-Bindung befähigt war. Insgesamt war somit nicht die Fähigkeit des Produktionsstamms, CCG-Motive als Bindedomänen nutzen zu können, ausschlaggebend für den relativ geringen Anteil vollständig beladener HdrD-Monomere. Vielmehr schien die Kapazität, die der Stamm für die Beladung der Proteine mit Eisen-Schwefel-Clustern besaß, überschritten worden zu sein.

Da Eisen-Schwefel-Cluster für die Funktionalität von HdrD essentiell sind, wurde angenommen, dass sich der Austausch bestimmter Cysteine, die Teil Eisen-Schwefel-Cluster-bindender Domänen sind, auch auf die Aktivität des Proteins auswirkt. Um diese Hypothese zu untermauern, wurden die HdrD-Mutanten enzymatischen Tests unterzogen, wobei erneut MV_{red} als Elektronendonator und das Heterodisulfid als Elektronenakzeptor fungierten. Den Erwartungen entsprechend zeigte keine der

Mutanten eine signifikante Aktivität, die mit der des Wildtyp-Proteins vergleichbar war, da die Aktivitäten weniger als 5 % der Ursprungsaktivität betragen. Im Detail wurden für HdrD_C14S 180 mU mg⁻¹, für HdrD_C77S 158 mU mg⁻¹, für HdrD_C185S/C186S 123 mU mg⁻¹ und für HdrD_C312S/C313S nur 29 mU mg⁻¹ festgestellt. Dies war ein Hinweis darauf, dass sowohl die ‚klassisch‘ gebundenen, als auch die über CCG-Domänen koordinierten Eisen-Schwefel-Cluster für die Funktionalität des Proteins absolut essentiell sind. Darüber hinaus deutete das Ergebnis an, dass die Oxidation des artifiziellen Elektronendonors MV_{red} im Bereich der Bindungsstelle des nativen, bisher nicht identifizierten Elektronendonors erfolgt, da für den Transfer der Elektronen von MV_{red} auf das Heterodisulfid alle vier Eisen-Schwefel-Cluster benötigt wurden. Aus diesem Grund findet die Oxidation von MV_{red} vermutlich ebenfalls im Bereich des proximalen [4Fe-4S]-Clusters statt, wie es in Kapitel 3.3.2.1 bereits für den nativen Elektronendonator postuliert wurde.

Ein direkter Vergleich der HdrD-Mutanten mit dem Wildtyp-Protein ist noch einmal tabellarisch gegeben (Tab. 31). Es sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Präparationen pro Protein aufgeführt.

Tab. 31. Vergleich der HdrD-Mutanten mit dem Wildtyp-Protein.

	HdrD (Wildtyp)	HdrD_C14S	HdrD_C77S	HdrD_C185S/ C186S	HdrD_C312S/ C313S
Aktivität (mU mg⁻¹)	4900 ± 300	180 ± 22	158 ± 15	123 ± 21	29 ± 12
Ausbeute (mg L⁻¹)	7,6	7,2	5,9	1,1	2,2
Färbung des Eluats	gelb	gelb	gelb	schwach-gelb	schwach-gelb
S/HdrD	8,1 ± 1,2	8,9 ± 0,9	9,3 ± 3,4	6,5 ± 0,4	11,1 ± 1,2
Fe/HdrD	7,0 ± 0,3	7,3 ± 0,1	8,0 ± 0,1	9,3 ± 0,6	10,2 ± 0,2

3.3.3 Enzymatische Aktivitäten in Zellfraktionen von *M. luminyensis*

3.3.3.1 Hydrogenase-Aktivitäten im Cytoplasma und in der Membranfraktion

Da aus der quantitativen RT-PCR hervorgegangen war, dass lediglich von Genen, die für die lösliche Mvh-Hydrogenase kodieren, und nicht von den Genen der übrigen Hydrogenasen bei Wachstum auf Methanol + H₂ hohe Transkriptmengen vorliegen (3.3.1), sollte nun anhand von Enzymtests gezeigt werden, dass die Mvh-Hydrogenase auch auf Proteinebene aktiv ist und dass die Aktivitäten membranständiger Hydrogenasen vergleichsweise gering sind. Hierzu wurde *M. luminyensis* bis zur Mitte der exponentiellen Phase in Komplexmedium auf Methanol + H₂ angezogen, geerntet und zur Präparation der Cytoplasma- und Membranfraktionen verwendet (2.5.11). Im Rahmen eines Enzymtests, in dem MV_{ox} als Elektronenakzeptor und H₂ als Elektronendonator fungierten, wurde

untersucht, inwiefern das Cytoplasma und die Membranen von *M. luminyensis* Hydrogenase-Aktivität besaßen und welchen Anteil ihre Aktivitäten an der Gesamt-Hydrogenase-Aktivität einnahmen.

Tab. 32. Hydrogenase-Aktivitäten im Cytoplasma und in den Membranen von *M. luminyensis*. Die Präparationen basierten auf einer 500 mL-Kultur von *M. luminyensis*, die in der Mitte der exponentiellen Phase geerntet wurde ($OD_{600} = 0,2$). Der gezeigte Datensatz steht repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Ansätze, die alle vergleichbare Verteilungen der Aktivitäten aufwiesen.

	Cytoplasmafraktion	Membranfraktion
Proteinkonzentration (mg mL ⁻¹)	2,4	3,1
Fraktionsvolumen (mL)	10	0,2
Gesamtprotein (mg)	24	0,6
spezifische Aktivität (mU mg ⁻¹)	335 ± 25	217 ± 33
absolute Aktivität (mU)	8028 ± 600	135 ± 20
Anteil an Gesamt-Hydrogenase-Aktivität (%)	98	< 2

Es konnte gezeigt werden, dass beide Fraktionen, das Cytoplasma und die gereinigten Membranen, vergleichbare spezifische Aktivitäten aufwiesen, da sich die Werte auf 335 bzw. 217 mU mg Protein⁻¹ beliefen (Tab. 32). Aus der Berechnung der Gesamtaktivität, die sich aus der Summe der einzelnen absoluten Aktivitäten der Fraktionen ergab (ca. 8160 mU), und der Berechnung der Verhältnisse der Einzelaktivitäten zur Gesamtaktivität ging jedoch hervor, dass mehr als 98 % der Hydrogenase-Aktivität im Cytoplasma vorzufinden waren. Weniger als 2 % der Gesamt-Hydrogenase-Aktivität wurden dagegen auf die Membranfraktion von *M. luminyensis* zurückgeführt. Im Allgemeinen bestätigten diese Beobachtungen die Ergebnisse, die die quantitative RT-PCR geliefert hatte, da der Hauptteil der Hydrogenase-Aktivität in der löslichen Fraktion vorzufinden war. Diese Aktivität konnte auf die Mvh-Hydrogenase zurückgeführt werden, da es sich um die einzige lösliche Hydrogenase in *M. luminyensis* handelt und da das Gen, das für diese Hydrogenase kodiert, bei Wachstum auf Methanol signifikant exprimiert wird (3.3.1).

Interessanterweise wiesen die Membranen von *M. luminyensis* jedoch ebenfalls Hydrogenase-Aktivität auf, wenngleich diese Aktivität im Vergleich zur Cytoplasmafraktion gering war. Um auszuschließen, dass die Aktivität durch Verunreinigungen der Membranfraktion durch Cytoplasmarückstände verursacht wurde, wurde ein *in gel*-Hydrogenasetest durchgeführt. Diesem Test lag ein natives Gel zugrunde, auf das lösliche Proteine und solubilisierte Membranproteine von *M. luminyensis* aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Aufgrund der Präparation der Zellfraktionen und der Durchführung der nativen PAGE innerhalb einer Anaerobenkammer wurde gewährleistet, dass die Proteine ihre Aktivität beibehielten und nicht durch Sauerstoff inaktiviert wurden. Der Nachweis der Hydrogenase-Aktivität fand mit Hilfe eines BV_{ox}-haltigen Puffers statt. Beim Inkubieren des nativen Gels in diesem Puffer kam es zur Reduktion von BV_{ox}, wobei H₂, welches Bestandteil der Atmosphäre der

Anaerobenkammer war, als Elektronendonator für die Hydrogenasen fungierte. Überall dort, wo im Gel Enzyme lokalisiert waren, die BV_{ox} mit H₂ als Elektronendonator reduzieren konnten, war eine rote Färbung zu verzeichnen. Wäre die Hydrogenase-Aktivität in den Membranen durch Cytoplasma-kontaminationen hervorgerufen worden, wäre eine aktive Bande auf vergleichbarer Höhe in beiden Fraktionen zu detektieren gewesen, die auf die Mvh-Hydrogenase zurückgegangen wäre.

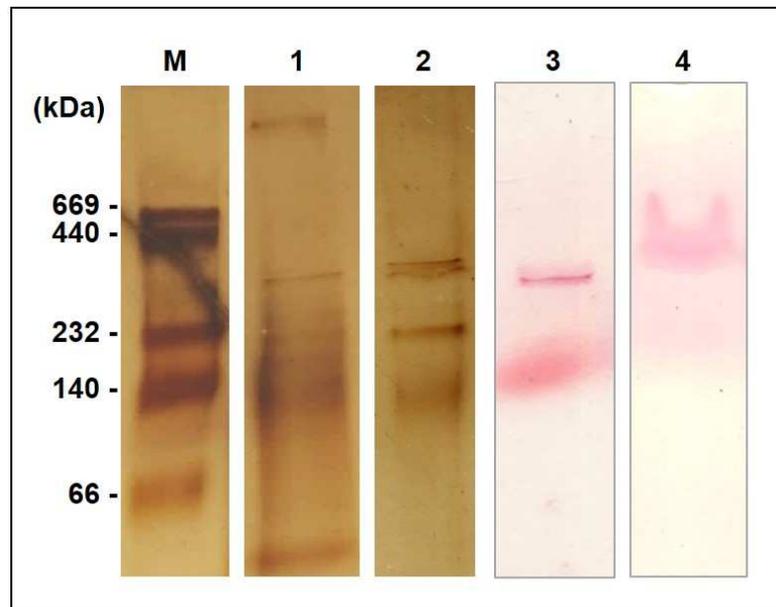


Abb. 38. *in gel*-Hydrogenase-Aktivitätstest von Zellfraktionen von *M. luminyensis*. Von jeder Fraktion wurden 20 µg Protein auf die native PAGE aufgetragen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine mittels Silberfärbung visualisiert und die Hydrogenase-Aktivität mit Hilfe des BV-basierten Tests nachgewiesen. Als Standard (M) wurde das Amersham High Molecular Weight Calibration Kit for Native Electrophoresis (GE Healthcare, München, Deutschland) verwendet, wobei dieser nur als Näherung verwendet werden kann, da die Auftrennung der Proteine in der nativen PAGE nicht nur aufgrund der Größe, sondern auch aufgrund der Eigenladung erfolgt. Cytoplasmatische Proteine (1) und solubilisierte Membranproteine nach Silberfärbung (2), cytoplasmatische Proteine (3) und solubilisierte Membranproteine im Hydrogenasetest (4).

Zunächst wurde durch eine Silberfärbung, die nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine in der nativen PAGE erfolgte, überprüft, dass nicht nur die löslichen Proteine aus dem Cytoplasma in das Gel eingelaufen waren, sondern auch die solubilisierten Membranproteine. Es war zu erkennen, dass in beiden Fraktionen Proteine vorlagen und aufgetrennt wurden (Abb. 38, Bahnen 1/2). Besonders bei Membranproteinen ist dies ein kritischer Faktor, da sie eine geringe Löslichkeit in Wasser aufweisen und sich schlecht in Gelen, die auf wässrigen Systemen beruhen, auftrennen lassen. Die Silberfärbung bestätigte jedoch die erfolgreiche Solubilisierung und Auftrennung der Membranproteine.

Nach Durchführung des BV_{ox}-basierten Hydrogenasetests war sowohl in der cytoplasmatischen Fraktion, als auch in den Membranen jeweils ein Signal zu detektieren (Abb. 38, Bahnen 3/4). Da sich die Signale aufgrund der Distanz, die sie im Gel zurückgelegt hatten, und des Laufverhaltens unterschieden, wurde gefolgert, dass es sich um unterschiedliche Hydrogenasen handelte. Die distinkte Bande in der Cytoplasmafraktion konnte aufgrund der vorausgegangenen Transkriptionsstudien und

der Tatsache, dass *M. luminyensis* nur über eine lösliche Hydrogenase verfügt, der Mvh-Hydrogenase zugeordnet werden. Darüber hinaus besaß das detektierte Protein eine Größe von ca. 260 kDa, was darauf hindeutete, dass es sich um den Mvh/Hdr-Komplex handelte (248 kDa; Setzke *et al.* 1994). Insgesamt bestätigte das Ergebnis des *in gel*-Tests somit den MV_{ox}-basierten, photometrischen Enzymtest (s. o.), der zeigte, dass 98 % der Gesamt-Hydrogenase-Aktivität durch die Mvh-Hydrogenase hervorgerufen wurden, da das Signal in der löslichen Fraktion stärker war als in der Membranfraktion, die jedoch auch eine geringe Aktivität zeigte. Ungünstigerweise konnte anhand des Tests nicht festgelegt werden, welche membranständige Hydrogenase die Hydrogenase-Aktivität hervorrief. Die Gene, die für die beiden Ech-Typ-Hydrogenasen und die Typ 3-Hydrogenase kodieren, zeigten vergleichbare Transkriptmengen (3.3.1), sodass die Aktivität generell auf alle drei Enzyme zurückzuführen sein könnte. Da ihr Anteil an der Gesamt-Hydrogenase-Aktivität jedoch nur 2 % betrug, spielen membranständige Hydrogenasen bei der Energiekonservierung in *M. luminyensis* vermutlich keine Rolle.

3.3.3.2 Heterodisulfidreduktase-Aktivitäten im Cytoplasma und in der Membranfraktion

Neben zahlreichen Genen, die für Hydrogenasen kodieren, besitzt *M. luminyensis* Gene, die für Heterodisulfidreduktasen kodieren. Hierbei handelt es sich zum einen um die Heterodisulfidreduktase HdrABC, die mit der Mvh-Hydrogenase assoziiert und im Cytoplasma lokalisiert ist, und die Untereinheit HdrD der normalerweise membranständigen Heterodisulfidreduktase. Mit Hilfe eines Enzymtests, bei dem MV_{red} als Elektronendonator fungierte und Elektronen auf das Heterodisulfid übertragen wurden, ließ sich feststellen, welche Zellfraktionen von *M. luminyensis* Heterodisulfidreduktase-Aktivität aufwiesen. Besonders in Bezug auf das Protein HdrD war diese Fragestellung sehr interessant, da nicht bekannt war, ob HdrD als eigenständiges Protein ohne HdrE aktiv ist und welche Lokalisation es ohne die Verankerung durch HdrE in der Membran (Künkel *et al.* 1997; Simianu *et al.* 1998) aufweist.

M. luminyensis wurde auf Methanol + H₂ bis zur Mitte der exponentiellen Phase angezogen, aufgeschlossen und als Grundlage zur Zellfraktionspräparation herangezogen (2.5.11). Sowohl das Cytoplasma von *M. luminyensis*, als auch die Membranfraktion wurden bezüglich der Heterodisulfidreduktase-Aktivität mit Hilfe des MV_{red}-basierten Tests untersucht. Interessanterweise waren über 99 % der Heterodisulfidreduktase-Aktivität im Cytoplasma von *M. luminyensis* vorzufinden (Tab. 33). Da bereits eine hohe Aktivität der Mvh-Hydrogenase nachgewiesen worden war (3.3.3.1) und die Heterodisulfidreduktase HdrABC normalerweise mit der Hydrogenase assoziiert ist (Kaster *et al.* 2011; Wagner *et al.* 2017), war davon auszugehen, dass die cytoplasmatische Heterodisulfidreduktase-Aktivität durch HdrABC zustande kam. Die Heterodisulfidreduktase-Aktivität der Membranfraktion war dagegen sehr gering, da in dieser Fraktion nur ca. 1 % der Gesamt-Heterodisulfidreduktase-Aktivität nachgewiesen wurde. Für den Metabolismus von *M. luminyensis* und von anderen Methanomassiliicoccales wurde bereits von Lang *et al.* (2015) postuliert, dass HdrD mit dem membranständigen Fpo-Komplex interagiert. Dies würde auf eine Assoziation des Proteins an die Membran hinweisen, was zur Heterodisulfidreduktase-Aktivität in der Membran geführt haben könnte. Da die Heterodisulfidreduktase-Aktivität jedoch verhältnismäßig gering war, scheint die Bindung

zwischen HdrD und dem Fpo-Komplex nur sehr schwach zu sein, wodurch es während der Präparation der Membranen zum Ablösen von HdrD kommt. Daher kann generell nicht ausgeschlossen werden, dass auch ein Teil der cytoplasmatischen Heterodisulfidreduktase-Aktivität durch HdrD hervorgerufen wurde.

Tab. 33. Heterodisulfidreduktase-Aktivitäten im Cytoplasma und in Membranfraktionen von *M. luminyensis*. Die Präparationen basierten auf einer 500 mL-Kultur von *M. luminyensis*, die in der Mitte der exponentiellen Phase geerntet wurde ($OD_{600} = 0,2$). Der gezeigte Datensatz steht repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Ansätze, die alle vergleichbare Verteilungen der Aktivitäten aufwiesen.

	Cytoplasmafraktion	Membranfraktion
Proteinkonzentration (mg mL ⁻¹)	2,4	3,1
Fraktionsvolumen (mL)	10	0,2
Gesamtprotein (mg)	24	0,6
spezifische Aktivität (mU mg ⁻¹)	2505 ± 360	875 ± 105
absolute Aktivität (mU)	60120 ± 8600	542 ± 66
Anteil an Gesamt-Heterodisulfidreduktase-Akt. (%)	> 99	< 1

Die Lokalisation von HdrD wird nachfolgend noch weiter thematisiert, da dessen Interaktion mit dem Fpo-Komplex ein zentraler Punkt der nachfolgenden Kapitel ist. Diese Kapitel werden Hinweise darauf liefern, dass HdrD in der Tat transient an die Membran gebunden ist, da der Fpo-Komplex Elektronen für die Reduktion des Heterodisulfids durch HdrD bereitstellt.

3.3.4 Identifizierung des Kopplungsions zur ATP-Synthese

In den vorangegangenen Kapiteln wurde untersucht, welche Enzyme Bestandteil des Energiekonservierenden Systems in *M. luminyensis* sind. Hierzu wurde zunächst das Genom analysiert und basierend auf Transkriptionsstudien untersucht, welche Gene während des Wachstums hohe Transkriptmengen aufweisen und welche Genprodukte folglich zur Energiekonservierung beitragen könnten (3.3.1). Hierbei zeigte sich, dass die Gene, die für beide Heterodisulfidreduktasen (HdrABC und HdrD), die lösliche Mvh-Hydrogenase, den Fpo-Komplex und die ATP-Synthase kodieren, bei Wachstum auf methylierten Substraten + H₂ stark exprimiert werden. Darüber hinaus wurde, soweit möglich, auch mit Hilfe enzymatischer Tests belegt, dass es zur Synthese der entsprechenden Genprodukte kommt, da die Aktivitäten der Proteine in Zellfraktionen von *M. luminyensis* nachgewiesen wurden (3.3.3.1, 3.3.3.2).

Kernpunkt der Energiekonservierung in allen lebenden Organismen ist die Translokation von positiv geladenen Ionen (Kopplungsionen) über die Cytoplasmamembran. Hierdurch wird ein

elektrochemischer Gradient generiert, da es nicht nur zu einem Konzentrationsgradienten zwischen dem Zellinneren und -äußeren in Bezug auf die translozierten Ionen kommt, sondern auch zu einem Ladungsgradienten, da außerhalb der Cytoplasmamembran positive Ladung angesammelt wird. Dadurch wird die cytoplasmatische Membran ähnlich einem Kondensator energetisch aufgeladen (Harold 1972). Gelangen die geladenen Ionen zurück ins Zellinnere, wird die anhand des elektrochemischen Gradienten gespeicherte Energie freigesetzt, wobei diese von der Zelle genutzt werden kann bzw. auch teilweise als Wärme verloren geht. Ein Kernaspekt in allen lebenden Zellen ist die Nutzung des elektrochemischen Gradienten zur ATP-Synthese. Hierbei schleust die ATP-Synthase, ein membranständiges Enzym, die Kationen, die Teil des elektrochemischen Gradienten sind, durch die cytoplasmatische Membran nach innen. Die dabei freiwerdende Energie wird zur Synthese von ATP aus ADP + Pi verwendet (Harold 1972). Welche Kopplungionen in methanogenen Archaeen zur Energiekonservierung wie oben beschrieben genutzt werden, hängt stark von der phylogenetischen Zuordnung des Organismus ab. Während in hydrogenotrophen, methanogenen Organismen lediglich Na⁺-Ionen zur Etablierung des elektrochemischen Gradienten herangezogen werden (Kaesler und Schönheit 1988), sind in methylotrophen und acetiklastischen Methanarchaeen auch Protonen Bestandteil des Gradienten (Welte und Deppenmeier 2014). Dass in hydrogenotrophen, methanogenen Archaeen lediglich Na⁺-Ionen aktiv nach außen geschleust werden, liegt darin begründet, dass diese Organismen zur Energiekonservierung lediglich über ein Ionen-translozierendes Enzym verfügen (Thauer *et al.* 2008). Hierbei handelt es sich um die Methyltransferase Mtr, welche spezifisch Na⁺-Ionen, aber nicht Protonen, nach außen transportiert (Becher *et al.* 1992; Gottschalk und Thauer 2001). Im Gegensatz dazu verfügen die übrigen methanogenen Archaeen zusätzlich über membranständige Enzyme, die spezifisch Protonen nach außen transferieren (Abb. 1; Welte und Deppenmeier 2014; Thauer *et al.* 2008). Es ist daher nicht überraschend, dass nicht nur die Energiekonservierung, sondern auch das Wachstum in hydrogenotrophen, methanogenen Organismen Na⁺-abhängig ist (Perski *et al.* 1981; Schönheit und Beimborn 1985; Kaesler und Schönheit 1988), während beide Vorgänge in methylotrophen und acetiklastischen Methanarchaeen von Na⁺-Ionen und Protonen abhängen (Blaut *et al.* 1987; Müller *et al.* 1990; Schlegel *et al.* 2012a; Welte *et al.* 2010b).

Um zu testen, welches Kopplungion *M. luminyensis* zur Energiekonservierung verwendet, wurden Experimente mit ruhenden Zellen durchgeführt, denen nach der Substratzugabe bestimmte Atmungskettenentkoppler (SF6847/Protonophor, ETH157/Na⁺-Ionophor) zugesetzt wurden. Derartige Entkoppler bewirken einen Zusammenbruch des elektrochemischen Membranpotentials, indem sie die Passage der Kopplungionen über die Cytoplasmamembran ermöglichen (Harold 1986), ohne dass die Ionen durch die ATP-Synthase zur Generierung von ATP genutzt werden. Ein dabei beobachteter Effekt ist die sogenannte Atmungskettenbeschleunigung (Blaut und Gottschalk 1984). Hierbei führt die Absenkung des elektrochemischen Gradienten dazu, dass die Ionentranslokation und somit auch die Gesamtreaktion durch die Atmungskettenenzyme beschleunigt wird. Dadurch, dass die Reaktionen an der Membran schneller ablaufen, wird letztendlich auch die Methanogenese beschleunigt und es ist eine erhöhte Methanbildungsrate nach Zugabe des entsprechenden Protonophors oder Ionophors zu verzeichnen (Blaut und Gottschalk 1984). Ist das Kation, welches durch ein bestimmtes Ionophor

transportiert wird, dagegen nicht Teil des elektrochemischen Gradienten, der für die ATP-Synthese genutzt wird, hat die Zugabe des Entkopplers keinen Einfluss auf die Methanbildungsrate.

Zur Untersuchung, ob der Zusatz von SF6847 (Protonophor) oder ETH157 (Na⁺-Ionophor) einen Einfluss auf die Methanbildungsrate von *M. luminyensis* hat, wurde der Organismus bis zur Mitte der exponentiellen Phase angezogen und zur Herstellung von ruhenden Zellen verwendet (2.3.7). Zu den Zellen wurden Methanol + H₂ gegeben, woraufhin die Methanbildung einsetzte, die gaschromatographisch verfolgt wurde. Nach dem Erreichen einer stabilen Methanbildungsrate wurden die Zellen mit SF6847 bzw. ETH157 versetzt. Danach wurde weiterhin die Menge des gebildeten Methans quantifiziert. Es war zu beobachten, dass nach der Zugabe von SF6847 eine signifikante Steigerung der Methanbildung eintrat (Abb. 39). Während die Methanbildungsrate vor Zugabe von SF6847 192 nmol mg Protein⁻¹ min⁻¹ betrug, belief sich diese danach auf 400 nmol mg Protein⁻¹ min⁻¹, was einer 100 %-igen Steigerung entsprach.

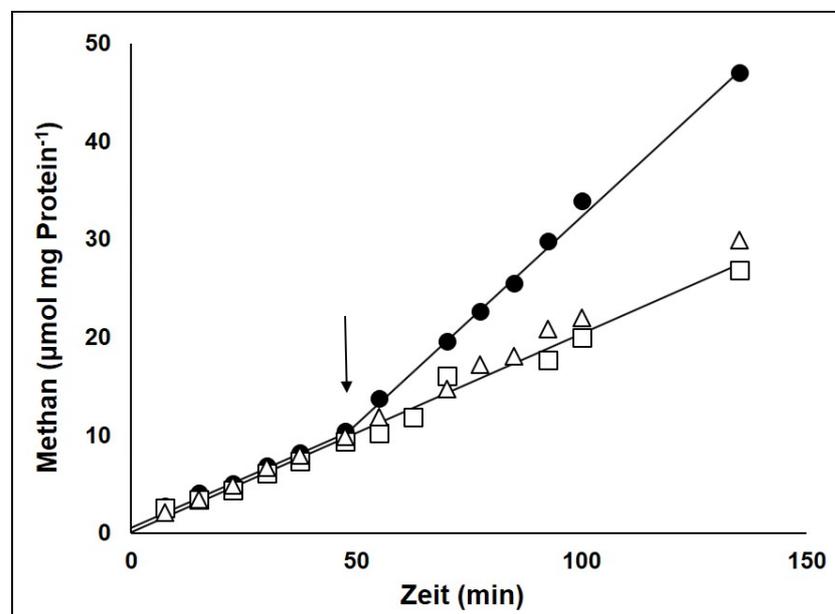


Abb. 39. Methanbildung von ruhenden *M. luminyensis*-Zellen nach Zugabe von SF6847 oder ETH157. Der Pfeil markiert den Zeitpunkt, an dem SF6847 (Protonophor; ●) oder ETH157 (Na⁺-Ionophor; △) hinzugegeben wurden. Eine Kontrollzellsuspension (□) wurde nicht supplementiert und zeigte eine konstante Methanbildung über die Zeit. Gezeigt ist eines von drei unabhängigen Experimenten.

Im Gegensatz dazu verhielten sich die Methanbildungsraten der Ansätze, die ETH157 bzw. keinen Entkoppler (Kontrolle) enthielten, ähnlich, da die Raten über den gesamten Messzeitraum konstant waren und sich beide auf ca. 190 nmol mg Protein⁻¹ min⁻¹ beliefen. Der Zusatz von ETH157 wirkte sich somit nicht auf die Methanbildungsrate aus und der Effekt der Atmungskettenbeschleunigung, der in der Erhöhung der Methanogeneserate resultierte, konnte lediglich mit dem Protonophor SF6847 beobachtet werden. Diese Beobachtung warf die Vermutung auf, dass in *M. luminyensis* lediglich Protonen zur Energiekonservierung über die Membran geschleust werden und Na⁺-Ionen nicht an der Etablierung des elektrochemischen Gradienten beteiligt sind. Dies ist nicht überraschend, da im Genom

von *M. luminyensis* keine Gene vorhanden sind, die für die Methyltransferase Mtr kodieren, welche in hydrogenotrophen und acetiklastischen Methanarchaeen für den Export von Na⁺-Ionen verantwortlich ist (Gottschalk und Thauer 2001). Darüber hinaus konnte aufgrund der Ergebnisse mit ETH157 ausgeschlossen werden, dass ein anderes Enzym in *M. luminyensis* in der Lage ist, Na⁺-Ionen nach außen zu schleusen. Es ergab sich allerdings die Frage, welcher membrangebundene Komplex indes für die Translokation von Protonen verantwortlich ist. Der einzige Komplex, der Ionen translozieren könnte und dessen Gene in ausreichender Menge transkribiert werden, ist der ‚kopfloste‘ Fpo-Komplex. Dieser ist damit wahrscheinlich das zentrale Energie-konservierende Enzym in *M. luminyensis*. Es ist bereits bekannt, dass der Fpo-Komplex spezifisch Protonen über die Cytoplasmamembran nach außen schleust (Bäumer *et al.* 2000). Um die Hypothese zu stützen, dass der ‚kopfloste‘ Fpo-Komplex auch in *M. luminyensis* nur Protonen transloziert, wurde ein weiteres Experiment mit ruhenden Zellen durchgeführt, in dem die *M. luminyensis*-Zellen in Puffern mit unterschiedlichen Na⁺-Konzentrationen aufgenommen wurden. Als Referenz wurde das gleiche Experiment mit *Ms. mazei* durchgeführt, da in diesem Organismus sowohl Protonen, als auch Na⁺-Ionen den elektrochemischen Gradienten bilden (Müller *et al.* 1990).

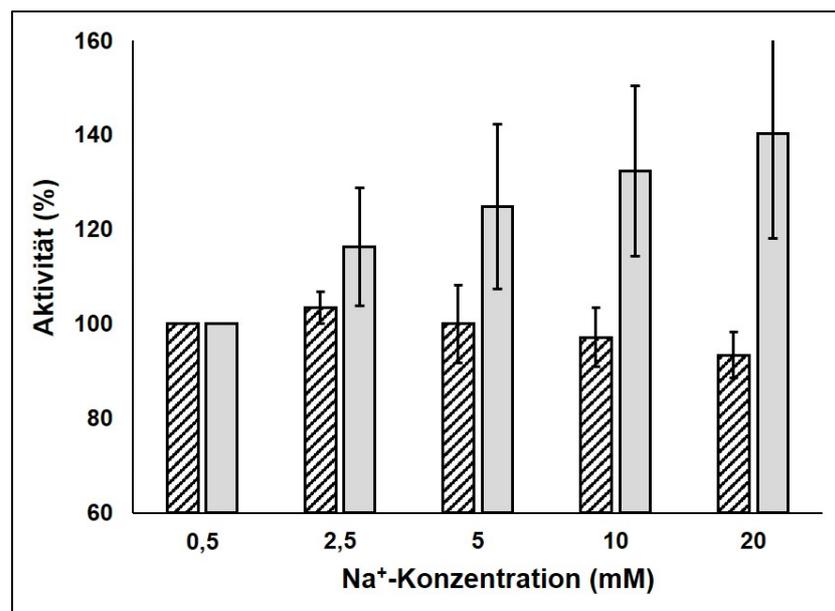


Abb. 40. Aktivität ruhender Zellen von *M. luminyensis* (schraffiert) und *Ms. mazei* (grau) in Abhängigkeit von der Na⁺-Konzentration im Puffer. Eine Aktivität von 100 % entsprach einer Methanproduktionsrate von 170 nmol mg Protein⁻¹ min⁻¹ bei *M. luminyensis* und 75 nmol mg Protein⁻¹ min⁻¹ bei *Ms. mazei*. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Die Bestimmung der Na⁺-Konzentration im Puffer wurde freundlicherweise von der AG Prof. Dr. V. Müller (Universität Frankfurt a. M., Deutschland) durchgeführt.

Während die Methanbildungsrate von *M. luminyensis* bei allen untersuchten Na⁺-Konzentrationen nahezu konstant war (Abb. 40), nahm diese bei *Ms. mazei* mit steigender Konzentration zu. Dieser Effekt konnte sowohl beobachtet werden, wenn den Zellen Na⁺ in Form von NaCl zugeführt wurde, als auch dann, wenn Na⁺ als Na₂SO₄ zugesetzt wurde, was zeigte, dass die Erhöhung der Aktivität

tatsächlich auf Na^+ zurückzuführen war. Der Effekt, dass Methanogenese und Wachstum in *Methanosarcina* spp. Na^+ -abhängig sind, ist gut beschrieben (Müller *et al.* 1986). In *M. luminyensis* scheint eine solche Abhängigkeit dagegen nicht gegeben zu sein. Diese Beobachtung untermauert erneut die Hypothese, dass der elektrochemische Gradient in *M. luminyensis* lediglich aus Protonen besteht und das zentrale Energie-konservierende Enzym, der ‚kopfloste‘ F₁F₀-Komplex, Protonen, aber nicht Na^+ -Ionen nach außen transloziert.

Eine Atmungskettenbeschleunigung stellt sich nur dann ein, wenn der passende Entkoppler, der das Kopplungsglied über die Cytoplasmamembran transportiert, zu den Zellen gegeben wird. Gleichzeitig bewirkt der Zusatz des Entkopplers einen Zusammenbruch des elektrochemischen Potentials über der Membran. Wird der elektrochemische Gradient eliminiert, sind Prozesse, die vom elektrochemischen Potential abhängen, nicht mehr möglich. Zu diesen Prozessen gehört auch die Reaktion, die die ATP-Synthase katalysiert. Da bereits aufgrund des Einflusses von SF6847 auf die Methanbildungsrate von *M. luminyensis* vermutet wurde, dass das elektrochemische Potential durch das Ausschleusen von Protonen über die cytoplasmatische Membran zustande kommt, sollte getestet werden, ob auch die ATP-Synthese durch SF6847 beeinflusst wird. Deswegen wurden ruhende Zellen generiert, denen vor Zugabe von Methanol + H_2 SF6847 bzw. ETH157 (jeweils 10 μM) zugesetzt wurden. Normalerweise kommt es nach der Zugabe geeigneter Substrate bei ruhenden Zellen zur Erhöhung der intrazellulären ATP-Konzentration, was enzymatisch mit Hilfe der Luciferase nachgewiesen werden kann (2.6.5). Ist der elektrochemische Gradient jedoch aufgrund der Anwesenheit eines Entkopplers eliminiert, ist die ATP-Synthese nicht mehr möglich.

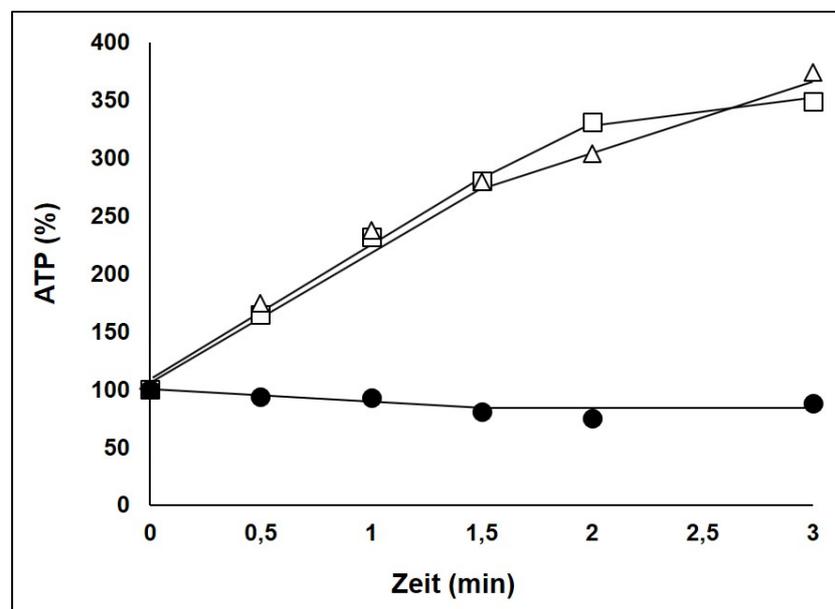


Abb. 41. ATP-Gehalt in Zellsuspensionen nach Zugabe von SF6847 (●) oder ETH157 (Δ) bzw. ohne Ionophor (□) mit Methanol + H_2 . Ein ATP-Gehalt von 100 % entspricht einer ATP-Konzentration von ca. 700 pmol ATP mg Protein⁻¹, welche zum Zeitpunkt t_0 gemessen wurde. Das Ergebnis steht repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Experimente.

Nur bei der *M. luminyensis*-Zellsuspension, die SF6847 enthielt, war zu erkennen, dass die ATP-Bildung ausblieb bzw. dass der ATP-Gehalt der Zellsuspension nach Zugabe von Methanol + H₂ (bei t₀) sogar leicht abnahm (Abb. 41). Es war also ein stark hemmender Effekt von SF6847 auf die ATP-Synthese zu beobachten. Im Gegensatz dazu zeigten die Zellen, die ETH157 bzw. keinen Entkoppler enthielten (Kontrolle), dass die ATP-Menge nach Zugabe der Substrate linear zunahm. Diese Zellen waren somit nicht in der ATP-Synthese gestört und zeigten ATP-Bildungsraten von 750 ± 60 pmol mg Protein⁻¹ min⁻¹. Die ATP-Bildungsexperimente lieferten schließlich den finalen Beweis, dass das elektrochemische Potential in *M. luminyensis* lediglich aus Protonen und nicht aus Na⁺-Ionen aufgebaut ist. Somit ist *M. luminyensis* der erste bekannte, methanogene Organismus, dessen Energiekonservierendes System komplett ohne Na⁺-translozierende Enzyme auskommt.

3.3.5 Untersuchung der Rolle der Methyl-CoM-Reduktase in *M. luminyensis*

In bisher allen beschriebenen methanogenen Organismen spielt die Methyl-CoM-Reduktase, das Enzym, welches letztendlich Methan generiert (Ellermann *et al.* 1988; Ermler *et al.* 1997), eine entscheidende Rolle und ist daher eine Apomorphie aller methanogener Archaeen. Deswegen werden auch die Gene, welche für die Methyl-CoM-Reduktase kodieren (*mcrBDCGA*), häufig als Marker verwendet, um methanogene Archaeen in Umweltproben per PCR nachzuweisen (Friedrich 2005). Auch *M. luminyensis* verfügt über die Methyl-CoM-Reduktase, was nicht überrascht, da der Organismus ebenfalls Methan generiert und das Enzym der Methanogenese zugrunde liegt (Ellermann *et al.* 1988). Da *M. luminyensis* jedoch aufgrund seiner Genausstattung und der enzymatischen Besonderheiten nicht den ‚klassischen‘ methanogenen Organismen entspricht, sollte auch experimentell verifiziert werden, dass die Methyl-CoM-Reduktase eine Schlüsselrolle in der Methanogenese von *M. luminyensis* einnimmt. Hierzu wurden ruhende Zellen von *M. luminyensis* generiert, die mit Methanol + H₂ als Substrate versetzt wurden. Nachdem sich eine stabile Methanbildung eingestellt hatte, erfolgte nach ca. 120 min der Zusatz von Bromoethansulfonat (BES) zu einer Suspension aktiver Zellen, während eine zweite Suspension als Kontrolle nicht mit BES versetzt wurde. BES ist ein Strukturanalogon von Coenzym M und bereits in geringen Konzentrationen (10 µM) ein starker Methanogeneseinhibitor (Gunsalus *et al.* 1978; Sparling und Daniels 1987). Es ist bekannt, dass die Verbindung sehr gezielt die reduktive Demethylierung von Methyl-CoM hemmt und sich dadurch sowohl auf das Wachstum, als auch auf die Methanogeneseraten methanogener Kulturen negativ auswirkt (Sparling und Daniels 1987; Smith und Mah 1978; Balch und Wolfe 1979). Auch bei ruhenden Zellen von *M. luminyensis* konnte dieser Effekt beobachtet werden, da nach Zugabe von BES (Abb. 42, Pfeil) die Methanmenge in der Gasphase der Zellsuspensionen konstant blieb, was bedeutete, dass die Methanbildung durch die BES-Zugabe komplett gehemmt wurde. Die Kontrollzellsuspension zeigte dagegen über den gesamten Messzeitraum eine konstante Methanbildungsrate, die ca. 180 nmol Methan mg Protein⁻¹ min⁻¹ betrug und somit mit Raten vergleichbar war, die bereits für ruhende Zellen von *M. luminyensis* bestimmt worden waren (3.2.2, 3.3.4). Dadurch konnte ausgeschlossen werden, dass nicht die Zugabe von BES, sondern eine abnehmende Fitness der Kulturen nach ca. zwei Stunden zur Reduktion der Methanbildungsrate führte.

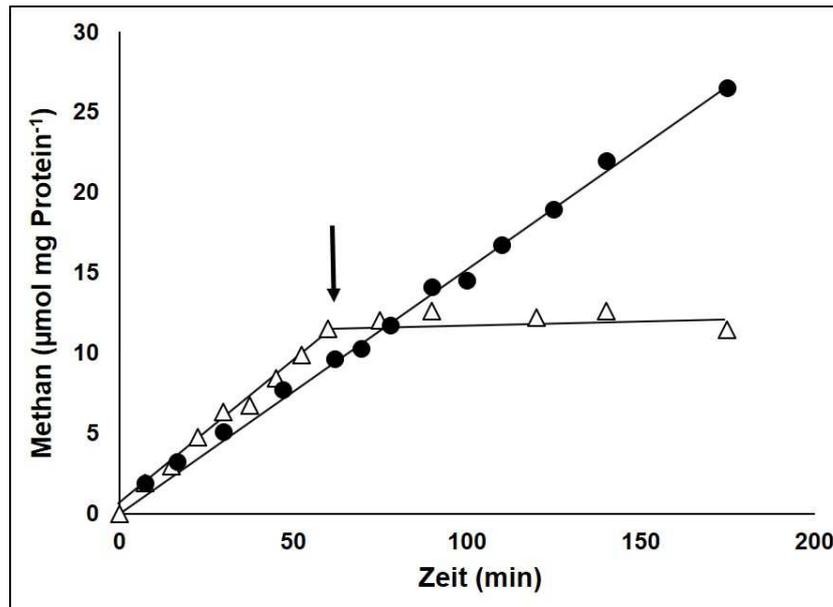


Abb. 42. Hemmung der Methanogenese ruhender Zellen durch Zusatz von BES. Die ruhenden Zellen wurden mit Methanol + H₂ versetzt, woraufhin die Methanbildung gaschromatographisch verfolgt wurde. Der Pfeil verdeutlicht den Zeitpunkt, zu dem 20 mM BES zu einer Zellsuspension gegeben wurden (△), während eine Kontroll suspension nicht mit BES versetzt wurde (●) und verdeutlichte, dass die Methanbildung über den gesamten Messzeitraum linear verlief.

Es konnte somit bewiesen werden, dass die Methyl-CoM-Reduktase ein Schlüsselenzym der Methanogenese in *M. luminyensis* ist, da die Methanbildung nach Zugabe von BES vollständig zum Erliegen kam. Insofern stellt sich die Situation in diesem Organismus wie in anderen methanogenen Vertretern dar, denn in allen beschriebenen Archaeen, die Methan produzieren können, katalysiert die Methyl-CoM-Reduktase die namensgebende Reaktion der Gruppe, die Methanproduktion.

3.3.6 Analyse des Fd_{red}-oxidierenden Systems in *M. luminyensis*

Auf Grundlage der vorangegangenen Untersuchungen kristallisierte sich immer mehr heraus, wie der Energiestoffwechsel bzw. die Methanogenese in *M. luminyensis* ablaufen könnte. Es wurde aufgrund von Transkriptionsstudien deutlich, dass nur die Gene, die für die Heterodisulfidreduktasen (HdrABC und HdrD), die lösliche Mvh-Hydrogenase, den ‚kopflösen‘ Fpo-Komplex und die ATP-Synthase kodieren, hohe mRNA-Mengen aufweisen (3.3.1). Sowohl die Transkriptionsstudien, als auch die photometrischen Aktivitätstests und der *in gel*-Test zeigten, dass membranständige Hydrogenasen eine sehr geringe Aktivität aufweisen und deswegen für den Katabolismus höchstwahrscheinlich von minderer Bedeutung sind (3.3.3.1). Nur ein einziges Enzym, das membranständig ist und dessen Gene hohe Transkriptmengen besitzen (abgesehen von den Genen der ATP-Synthase), kommt als zentrales Energie-konservierendes Enzym in Betracht. Hierbei handelt es sich um den Fpo-Komplex. Aufgrund der Untersuchungen an ruhenden Zellen konnte gezeigt werden, dass der elektrochemische Gradient in *M. luminyensis* lediglich aus Protonen, und nicht wie in hydrogenotrophen und acetiklastischen Methanarchaeen aus Na⁺-Ionen und Protonen, aufgebaut ist (3.3.4). Da neben dem Fpo-Komplex in

M. luminyensis kein weiteres Enzym bekannt ist, das als Protonen-translozierende Struktur in Frage kam, konnte gefolgert werden, dass nur der ‚kopfloste‘ Fpo-Komplex in *M. luminyensis* Protonen über die Membran schleust. Wie viele Protonen pro Reaktionszyklus gepumpt werden können, war jedoch nicht bekannt, da bislang sehr wenig über die Funktionsweise des ‚kopflosten‘ Komplexes bekannt ist.

Bei klassischen Fpo-Komplexen sind Elektronendonator und -akzeptor bekannt (Abken und Deppenmeier 1997; Bäumer *et al.* 2000). In *Methanosarcina mazei* fungiert $F_{420}H_2$ als Elektronendonator und wird an der Untereinheit FpoF des Komplexes oxidiert (Welte und Deppenmeier 2011b). Die Elektronen, die aus dieser Oxidation stammen, werden sukzessive über Eisen-Schwefel-Cluster bis zu Untereinheit FpoD des Komplexes transferiert (Deppenmeier 2004). Hier werden diese auf den Elektronenüberträger MPh_{ox} in der Membran (Abken *et al.* 1998) übertragen. Becker *et al.* (2016) konnten in *M. luminyensis* kein MPh nachweisen, sodass dieser Elektronenüberträger nicht als Elektronenakzeptor des Fpo-Komplexes in Frage kommt. Darüber hinaus scheint die Fluoreszenz des Organismus bei 420 nm, was ein Hinweis auf den methanogenen Cofaktor F_{420} ist (Dridi *et al.* 2012a), relativ gering zu sein. Lang *et al.* (2015) behaupteten sogar, dass überhaupt keine Fluoreszenz bei 420 nm zu messen war, was bedeuten würde, dass *M. luminyensis* kein F_{420} besitzt. F_{420} bzw. $F_{420}H_2$ ist jedoch nicht nur für den Katabolismus, sondern auch für den Anabolismus als Elektronenüberträger mit niedrigem Redoxpotential essentiell (Greening *et al.* 2016; Selengut und Haft 2010), sodass es in allen methanogenen Organismen, wenn auch teilweise mit niedrigen Konzentrationen, vorliegt (Welte 2011). Der niedrige F_{420} -Gehalt in *M. luminyensis* weist darauf hin, dass der Cofaktor auch bei diesem Organismus lediglich in Biosyntheseprozessen verwendet wird. Eine Funktion im Katabolismus scheint F_{420} dagegen nicht zuzukommen. Da anscheinend weder $F_{420}H_2$, noch MPh_{ox} als Elektronenüberträger mit dem ‚kopflosten‘ Fpo-Komplex von *M. luminyensis* interagieren, waren der Elektronendonator und der -akzeptor des Komplexes nicht bekannt, was dessen Untersuchung höchst schwierig gestaltete.

‚Kopfloste‘ Fpo-Komplexe sind nicht nur aus *M. luminyensis* und anderen Vertretern der Methanomassiliicoccales bekannt, sondern auch aus dem acetiklastischen, methanogenen Organismus *Methanosaeta thermoacetophila* (vormals *Methanosaeta thermophila*). Es wurde nachgewiesen, dass auch hier zwar die Untereinheiten FpoF und FpoO fehlen, aber MPh_{ox} als Elektronenakzeptor fungiert. Welte und Deppenmeier (2011a) konnten zeigen, dass Membranen von *M. thermoacetophila* in der Lage sind, Fd_{red} zu oxidieren. Da dem Organismus die Ech-Hydrogenase und der Rnf-Komplex, also weitere Enzyme, die Fd_{red} oxidieren können, fehlen, wurde postuliert, dass der Fpo-Komplex für die Fd_{red} -Oxidation verantwortlich ist. Des Weiteren wurden vor Kurzem erste Hinweise geliefert, dass die Untereinheit FpoI des ‚kopflosten‘ Komplexes mit Fd_{red} interagiert und das Elektroneneinspeisemodul darstellt (Berger 2015). Aufgrund der Erkenntnisse aus *M. thermoacetophila* lag auch beim Fpo-Komplex aus *M. luminyensis* und verwandten Organismen die Vermutung nah, dass der ‚kopfloste‘ Komplex die Oxidation von Fd_{red} katalysiert. Diese Hypothese wurde auch von Lang *et al.* (2015) aufgestellt, wobei sie diese Hypothese jedoch nicht experimentell untermauerten. Neben der Fd_{red} -Oxidation am ‚kopflosten‘ Fpo-Komplex postulierten die Autoren auch, dass die Heterodisulfidreduktase HdrD, deren Funktion noch nicht geklärt ist, die terminale Elektronen-übertragende Einheit darstellt. Zusammenfassend kann vermutet werden, dass die Elektronen, die aus der Fd_{red} -Oxidation am

‚kopflosten‘ Fpo-Komplex hervorgehen, über Eisen-Schwefel-Cluster des Fpo-Komplexes an HdrD weitergegeben werden und HdrD wiederum mit Hilfe der Elektronen das Heterodisulfid reduziert. HdrD würde in diesem Fall über eine gewisse Bindungsaffinität zum Fpo-Komplex verfügen. Aufgrund der Tatsache, dass die Membranen von *M. luminyensis* nur eine verhältnismäßig geringe Heterodisulfidreduktase-Aktivität aufwiesen (3.3.3.2), wurde gefolgert, dass die Interaktion von HdrD mit dem Fpo-Komplex transientser Natur ist. Dadurch konnte es während der Membranpräparation leicht zur Dissoziation des HdrD/Fpo-Komplexes kommen, weswegen nur eine geringe Heterodisulfidreduktase-Aktivität in den Membranen festgestellt wurde. Da jedoch ein Überproduktionssystem für HdrD im Rahmen dieser Arbeit etabliert worden war (3.3.2.3), sollte die Bildung des HdrD/Fpo-Komplexes durch die Zugabe von gereinigtem HdrD zu Membranen von *M. luminyensis* verstärkt herbeigeführt werden.

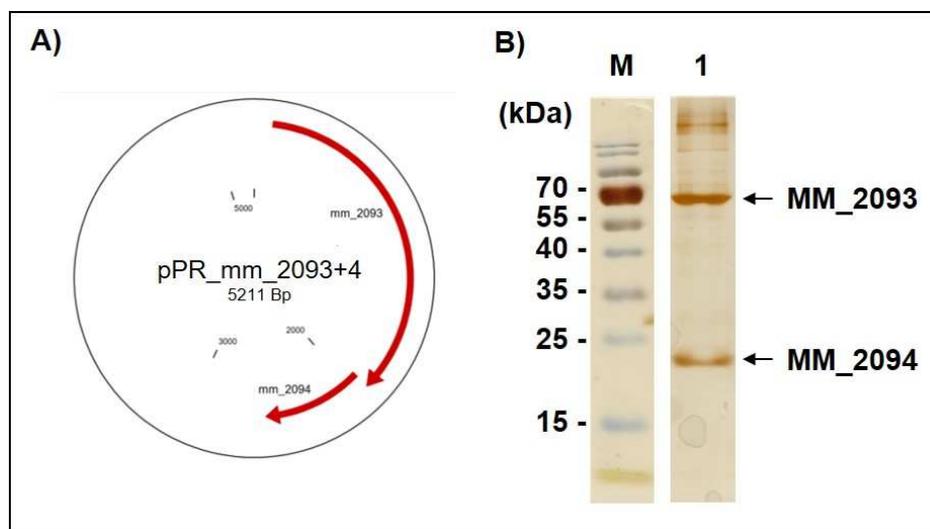


Abb. 43. Überexpressionsplasmid pPR_mm_2093+4 (A) und IOR-Aufreinigung (B). Das Plasmid wurde freundlicherweise von C. Welte (Radboud Universiteit Nijmegen, Niederlande) bereitgestellt (A). Nach der Aufreinigung wurde die IOR mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anhand einer Silberfärbung visualisiert, woraufhin Signale sichtbar wurden, deren Größen den erwarteten Größen der IOR-Untereinheiten entsprachen (B).

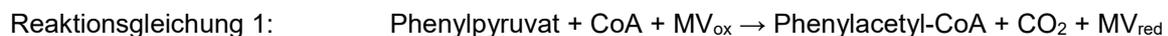
Um testen zu können, ob der HdrD/Fpo-Komplex in der Tat Fd_{red} oxidiert und Elektronen auf das Heterodisulfid überträgt, wurde Fd_{red} als Elektronendonator benötigt. Aufgrund seines sehr niedrigen Redoxpotentials von ca. -500 mV ist Fd_{ox} unter physiologischen Bedingungen nur schwer zu reduzieren (Kaster *et al.* 2011). Bereits vor geraumer Zeit wurde daher ein enzymatisches System zur Fd_{ox} -Reduktion entwickelt, mit Hilfe dessen Fd_{red} in Enzymtests bereitgestellt werden kann. Diesem System liegt die Indolpyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (IOR) aus *Ms. mazei* zugrunde (MM_2093/4), die Indolpyruvat bzw. bestimmte Derivate oxidiert, und Elektronen auf Fd_{ox} überträgt. Ein Überexpressionssystem der Gene *mm_2093* und *mm_2094*, welche für die IOR kodieren, war bereits verfügbar (Abb. 43, A; bereitgestellt durch C. Welte, Radboud Universiteit Nijmegen, Niederlande), allerdings fehlte bisher eine genaue Charakterisierung im Hinblick auf enzymkinetische Parameter. Da das IOR-basierte Fd_{ox} -Reduktionssystem für zahlreiche biochemische Fragestellungen und als

biochemisches ‚Werkzeug‘ interessant ist, in denen Ferredoxine oder Proteine mit Ferredoxindomänen in reduzierter Form benötigt werden, wurde die IOR tiefergehend untersucht und charakterisiert.

3.3.6.1 Charakterisierung der Indolpyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase aus *Ms. mazei*

Die IOR ist ein Enzym, das aus vier Untereinheiten besteht (Tetramer), wobei jeweils zwei identische große (MM_2093) und zwei identische kleine Untereinheiten (MM_2094) enthalten sind (Mai und Adams 1994). Während die große Untereinheit (MM_2093; 65 kDa) zwei [4Fe-4S]-Cluster enthält, können in der kleinen Untereinheit (MM_2094; 21 kDa) keine besonderen Domänen ausgemacht werden.

Die IOR wurde wie in 2.5.1 beschrieben überproduziert und mit Hilfe der Streptactin-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Die erfolgreiche Aufreinigung der beiden Untereinheiten wurde mittels SDS-PAGE und Silberfärbung bestätigt (Abb. 43, B). Die enzymatische Charakterisierung der IOR erfolgte zunächst mit MV_{ox} als Elektronenakzeptor, da der Redoxgrad dieses Elektronenüberträgers aufgrund seiner Absorption im reduzierten Zustand leicht verfolgt werden kann. Daher eignete sich der MV_{ox}-basierte Test sehr gut zur schnellen Überprüfung der IOR-Aktivität. Fungierte MV_{ox} als Elektronenakzeptor, katalysierte die IOR die in Reaktionsgleichung 1 gezeigte Reaktion, wobei Phenylpyruvat als Elektronendonator eingesetzt wurde. Dieses wurde an der IOR oxidiert und decarboxyliert, wobei auch eine Bindung der Phenylacetylgruppe an Coenzym A (CoA) erfolgte. Dem Test wurde außerdem Thiaminpyrophosphat zugesetzt, da pro IOR-Tetramer ein Thiaminpyrophosphat im Enzym enthalten ist (Mai und Adams 1994).



Um zu untersuchen, mit welcher Geschwindigkeit die IOR den artifiziellen Elektronenakzeptor MV_{ox} reduzierte, wurde eine Michaelis-Menten-Kinetik für die IOR mit MV_{ox} als Akzeptor erstellt. Hierzu wurde die Konzentration an MV_{ox} im Test variiert und es wurden jeweils die spezifischen Aktivitäten bei den entsprechenden MV_{ox}-Konzentrationen berechnet. Die spezifischen Aktivitäten wurden gegen die MV_{ox}-Konzentrationen aufgetragen, wodurch sich der in Abb. 44 gezeigte Kurvenverlauf ergab. Die IOR wies mit dem Elektronenakzeptor MV_{ox} eine verhältnismäßig hohe spezifische Aktivität auf, da sich v_{max} auf 22,8 ± 1,2 U mg⁻¹ belief. Darüber hinaus zeigte das Enzym eine relativ hohe Affinität für den Akzeptor, da der K_M-Wert im mikromolaren Bereich lag und einen Wert von 343 ± 73 µM annahm. Die hohe Aktivität und Affinität der IOR für den artifiziellen Elektronenakzeptor MV_{ox} deutete bereits darauf hin, dass das Enzym für den nativen Elektronenakzeptor Fd_{ox} eine noch höhere Affinität aufweisen würde.

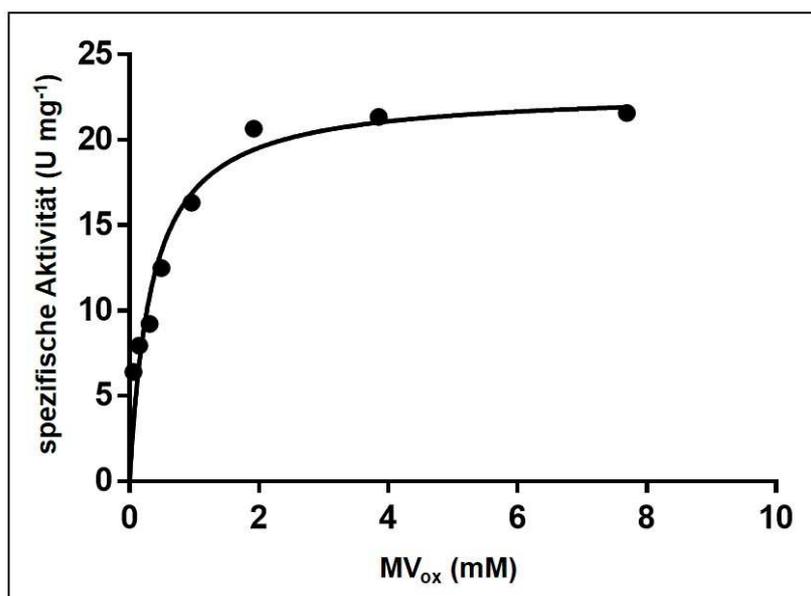
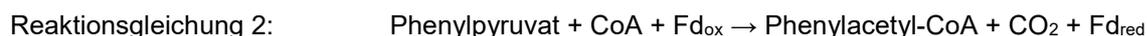


Abb. 44. Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der IOR aus *Ms. mazei* von der Konzentration des Elektronenakzeptors MV_{ox}, dargestellt als Michaelis-Menten-Kinetik. Die Reaktion erfolgte bei 37 °C in einem KP-Puffer mit pH 7. Zusätzlich enthielt der Ansatz 8,3 mM Phenylpyruvat, 3,6 mM Coenzym A und 190 µM Thiaminpyrophosphat. Es wurde jeweils 1 µg der IOR eingesetzt. Die maximale spezifische Aktivität betrug $22,8 \pm 1,2 \text{ U mg}^{-1}$ bei einem K_M -Wert von $343 \pm 73 \text{ µM}$. Die Bestimmung der kinetischen Parameter erfolgte mit Hilfe nicht-linearer Regression anhand des Programms GraphPad Prism 7 und ist hier beispielhaft für eine Enzympräparation gezeigt.

Um diese Hypothese zu testen, wurde nun Fd_{ox} als Elektronenakzeptor eingesetzt. Dieses Eisen-Schwefel-Protein wurde wie in 2.5.10 beschrieben aus *Cl. pasteurianum* aufgereinigt und in den IOR-Aktivitätstest eingesetzt, sodass die in Reaktionsgleichung 2 dargestellte Reaktion katalysiert wurde.



Während sich der Redoxgrad von MV aufgrund der Absorption sehr einfach feststellen ließ, war dieses bei Fd nicht ohne weiteres möglich. Obwohl beschrieben ist, dass sich die Absorption von Fd im oxidierten und reduzierten Zustand bei 390 nm unterscheidet und somit zwischen den Redoxgraden differenziert werden kann (Kaster 2010), war dieses im vorliegenden Test schwierig, da die Absorption bei 390 nm (A_{390}) durch Eisen-Schwefel-Cluster hervorgerufen wird, welche nicht nur in Fd, sondern auch in der IOR selbst enthalten waren. Sobald Fd_{ox} ($\epsilon = 30 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) reduziert wird, verändert sich zwar die Absorption bei 390 nm, da diese im reduzierten Zustand niedriger ist ($\epsilon = 19 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), allerdings geht die Fd_{ox}-Reduktion mit einer (zumindest kurzzeitigen) Oxidation der Eisen-Schwefel-Cluster der IOR einher, wenn diese Elektronen auf Fd_{ox} überträgt. Die Oxidation der Eisen-Schwefel-Cluster der IOR hätte wiederum eine Zunahme der Absorption bei 390 nm zur Folge. Aus diesem Grund eignete sich die Messung der Absorption bei 390 nm nicht dazu, den Redoxgrad von Fd zu überwachen. Darüber hinaus ist auch der Unterschied zwischen den Extinktionen der beiden Redoxgrade relativ gering, was die Differenzierung weiter erschwerte. Stattdessen kam ein gekoppelt-enzymatischer Test

zum Einsatz. Hierbei wurde Fd_{red} , welches zunächst von der IOR wie in Reaktionsgleichung 2 dargestellt generiert wurde, mit Hilfe der kommerziell erhältlichen Fd:NADP⁺-Reduktase aus *Spinacia oleracea* (Sigma Aldrich, München, Deutschland) wieder oxidiert. Dabei kam es zur Übertragung der Elektronen von Fd_{red} auf NADP⁺ (Reaktionsgleichung 3). Wird NADP⁺ zu NADPH reduziert, kann dies bei 340 nm (A_{340}) gemessen werden, da NADPH eine deutlich höhere Absorption bei dieser Wellenlänge aufweist als NADP⁺.



Zur Ermittlung enzymkinetischer Parameter im Zusammenhang mit der Reduktion von Fd_{ox} wurde die IOR mit unterschiedlichen Fd_{ox} -Mengen versetzt. Für jede Fd_{ox} -Konzentration wurde die entsprechende spezifische Aktivität bestimmt, indem die Rate berechnet wurde, mit der NADPH durch Einsatz der Fd:NADP⁺-Reduktase im Test generiert wurde. Aufgrund des Verhältnisses von Fd_{red} zu NADPH von 2:1 stimmte die NADPH-Bildungsrate mit der doppelten Fd_{ox} -Reduktionsrate überein.

Die IOR zeigte eine maximale spezifische Aktivität von $5,1 \pm 0,2 \text{ U mg}^{-1}$, mit der Fd_{ox} reduziert wurde (Abb. 45). Diese betrug damit nur etwa 25 % der Rate, die das Enzym mit MV_{ox} als Elektronenakzeptor aufwies, was jedoch durch die enorm hohe Affinität des Enzyms für Fd_{ox} kompensiert wurde. Mit einem K_M -Wert von $457 \pm 80 \text{ nM}$ lag die Affinität der IOR etwa um den Faktor 1000 höher als für MV_{ox} , was bedeutete, dass das Enzym den Elektronenakzeptor Fd_{ox} , der auch *in vivo* bereitsteht, mit einer hohen Affinität bindet. Da Ferredoxine aus Organismen nicht näher verwandter Phyla funktionell austauschbar sind (Tagawa und Arnon 1968; Kaster *et al.* 2011), war anzunehmen, dass die Aktivität der IOR aus *Ms. mazei* mit Fd_{ox} aus *Cl. pasteurianum* in etwa der Aktivität entsprach, die das Enzym *in vivo* zeigt. Die Austauschbarkeit der Ferredoxine war auch deswegen von Bedeutung, da die IOR in nachfolgenden Versuchen zur Reduktion eines Ferredoxins aus *M. luminyensis* herangezogen werden sollte. Es war wichtig, dass dieses Ferredoxin ebenso wie jenes aus *Cl. pasteurianum* als funktioneller Elektronenakzeptor der IOR fungierte. Interessanterweise lag die Affinität der IOR aus *Ms. mazei* für Fd_{ox} aus *Cl. pasteurianum* oberhalb derer, die für weitere Indolpyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktasen bestimmt wurden. Der K_M -Wert der IOR aus *Pyrococcus furiosus* beispielweise, der ebenfalls im Rahmen enzymatischer Tests ermittelt wurde (Mai und Adams 1994), betrug $48,4 \mu\text{M}$ und deutete darauf hin, dass die IOR aus *P. furiosus* etwa um den Faktor 100 weniger affin für Fd_{ox} ist als die IOR aus *Ms. mazei*. In der gleichen Größenordnung lagen auch die K_M -Werte der Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase aus *P. furiosus*, bei der sich der K_M -Wert auf $70 \mu\text{M}$ belief (Blamley und Adams 1993), und der IOR auf *Thermococcus profundus*, bei der der K_M -Wert $60 \mu\text{M}$ betrug (Ozawa *et al.* 2012). Somit hebt sich die IOR aus *Ms. mazei* mit einem K_M -Wert im nanomolaren Bereich stark von zuvor beschriebenen Enzymen ab, die die gleiche Reaktion katalysieren.

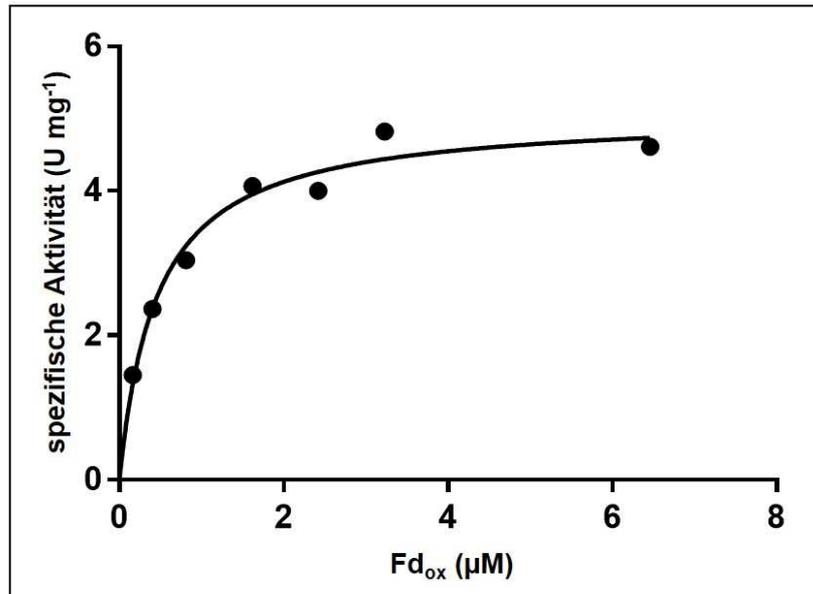


Abb. 45. Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der IOR aus *Ms. mazei* von der Konzentration des Elektronenakzeptors Fd_{ox}, dargestellt als Michaelis-Menten-Kinetik. Die Reaktion erfolgte bei 37 °C in einem KP-Puffer (50 mM) mit pH 7. Zusätzlich enthielt der Ansatz 250 μM NADP⁺, 8,3 mM Phenylpyruvat, 830 μM Coenzym A und 190 μM Thiaminpyrophosphat. Es wurden 1 μg der IOR und 1,2 μg Fd:NADP⁺-Reduktase (24 mU μg⁻¹) eingesetzt. Die maximale spezifische Aktivität betrug 5,1 ± 0,2 U mg⁻¹ bei einem K_M-Wert von 457 ± 80 nM. Die Bestimmung der kinetischen Parameter erfolgte mit Hilfe nicht-linearer Regression anhand des Programms GraphPad Prism 7 und ist hier beispielhaft für eine Enzympräparation gezeigt.

3.3.6.2 Fd_{red}-Oxidation durch den Fpo/HdrD-Komplex

Im Zuge der vorangegangenen Experimente kristallisierte sich immer weiter heraus, dass der Fpo-Komplex das zentrale Enzym der Energiekonservierung in *M. luminyensis* ist. Es wurden starke Hinweise darauf geliefert, dass einzig dieser Komplex Protonen über die cytoplasmatische Membran nach außen schleust und das elektrochemische Membranpotential aufbaut. Dieses wird bewerkstelligt, indem der Fpo-Komplex eine Redoxreaktion katalysiert, die exotherm verläuft, d. h. Energie freisetzt, und somit Energie zur Protonentranslokation bereitstellt. Diese Reaktion ist in methanogenen Organismen, die über einen vollständigen Fpo-Komplex verfügen, gut beschrieben. Hier wird F₄₂₀H₂ an FpoF oxidiert (Brüggemann *et al.* 2000; Welte und Deppenmeier 2011b) und die Elektronen werden über die Eisen-Schwefel-Cluster des Komplexes an MPh_{ox} übertragen. Aufgrund des Redoxpotentialgefälles zwischen F₄₂₀H₂ (-350 mV; Jacobson und Walsh 1984) und MPh_{ox} (-165 mV; Tietze *et al.* 2003) setzt diese Redoxreaktion Energie frei, die zur Translokation von zwei Protonen genutzt wird (Bäumer *et al.* 2000; Deppenmeier *et al.* 1999). Beim ‚kopflösen‘ Fpo-Komplex in *M. luminyensis* stellt sich jedoch eine andere Situation dar, da F₄₂₀H₂ und MPh_{ox} nicht als Elektronenüberträger in Betracht kommen (s. o.). Wie von Lang *et al.* (2015) postuliert, wird angenommen, dass der Fpo-Komplex ähnlich wie in *M. thermoacetophila* Fd_{red} oxidiert. Darüber hinaus ist es möglich, dass HdrD die Elektronen, die von Fd_{red} stammen und über die Eisen-Schwefel-Cluster des Fpo-Komplexes transferiert werden, aufnimmt und zur Reduktion des Heterodisulfids heranzieht.

Aus den Aktivitätsmessungen an *M. luminyensis*-Membranen (3.3.3.2) ging hervor, dass die Heterodisulfidreduktase-Aktivität in dieser Zellfraktion nur sehr gering war, was auf eine instabile HdrD/Fpo-Komplexbildung hinwies. Da jedoch ein System zur Produktion von aktivem HdrD generiert worden war (3.3.2.3), war es möglich HdrD im Überschuss zu den Membranen zu geben, um die Komplexbildung zwischen dem Fpo-Komplex und HdrD zu unterstützen. Neben den Membranen, die den Fpo-Komplex enthielten, und dem heterolog überproduzierten HdrD wurde ein Ferredoxin aus *M. luminyensis* als Elektronendonator eingesetzt (WP_019177167; Böhringer 2016). Dieses wurde mit Hilfe der IOR enzymatisch reduziert (3.3.6.1). Zur Untersuchung, ob Fd_{red} durch den möglichen Fpo/HdrD-Komplex oxidiert werden kann und dieses mit einer Heterodisulfidreduktion einhergeht, wurde die Konzentrationen an Thiolen im Test verfolgt. Wurde im Rahmen des Tests das Heterodisulfid zu den Thiolen HS-CoM und HS-CoB reduziert, spiegelte sich dies in einer linearen Zunahme der Thiolkonzentration über die Zeit wider. Ein Verfahren, mit dem Thiole quantifiziert werden können, ist der Ellman-Test, bei dem 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB) zum Einsatz kommt (Ellman 1959). DTNB reagiert mit Thiolen unter Freisetzung des Farbstoffes 2-Nitro-5-thiobenzoat (TNB^-), der photometrisch bei 412 nm (A_{412}) nachgewiesen werden kann, sodass die Absorption direkt proportional zur Thiolkonzentration der Lösung ist. Waren alle enzymatischen Komponenten inklusive ihrer Substrate im Test enthalten (*M. luminyensis*-Membranen, IOR, HdrD), sowie alle Verbindungen, die Elektronen abgeben bzw. aufnehmen konnten (Fd_{ox} , Heterodisulfid), war eine lineare Zunahme der Absorption bei 420 nm zu verzeichnen, was darauf zurückzuführen war, dass es zur Thiolbildung kam. Mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten von TNB^- wurde berechnet, wie viele Thiole pro Zeiteinheit gebildet wurden. Da pro reduziertem Heterodisulfidmolekül zwei Thiole entstehen, die mit DTNB zu jeweils einem TNB^- reagieren, betrug das Verhältnis von Heterodisulfid zu TNB^- 1:2 und musste in die Berechnung der Heterodisulfidreduktionsrate mit einbezogen werden.

Es konnte ermittelt werden, dass das System, das den Fpo-Komplex (als Bestandteil der Membranen), die IOR und HdrD, sowie Fd_{ox} , Phenylpyruvat, CoA und Heterodisulfid enthielt, $200,3 \pm 34,2$ nmol Thiole mg Membranprotein⁻¹ min⁻¹ generierte (Abb. 46, A). Dieser Wert ging aus vier unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten hervor und entsprach einer Heterodisulfidreduktionsrate von 100 nmol Heterodisulfid mg Membranprotein⁻¹ min⁻¹. Fehlten HdrD oder *M. luminyensis*-Membranen (mit Fpo) im Test (Abb. 46, C/D), war dagegen keine Thiolbildung zu verzeichnen, was ein Indiz dafür war, dass beide Komponenten für die Heterodisulfidreduktion essentiell waren. Darüber hinaus konnte keine Thiolbildung nachgewiesen werden, wenn Fd_{ox} im Ansatz fehlte (Abb. 46, B).

Aus dem Experiment ging somit zum ersten Mal hervor, dass *M. luminyensis*-Membranen, die den ‚kopflosen‘ Fpo-Komplex enthalten, in Kombination mit HdrD in der Lage sind, das Heterodisulfid zu reduzieren, was aufgrund der Thiolbildung über die Zeit nachgewiesen wurde.

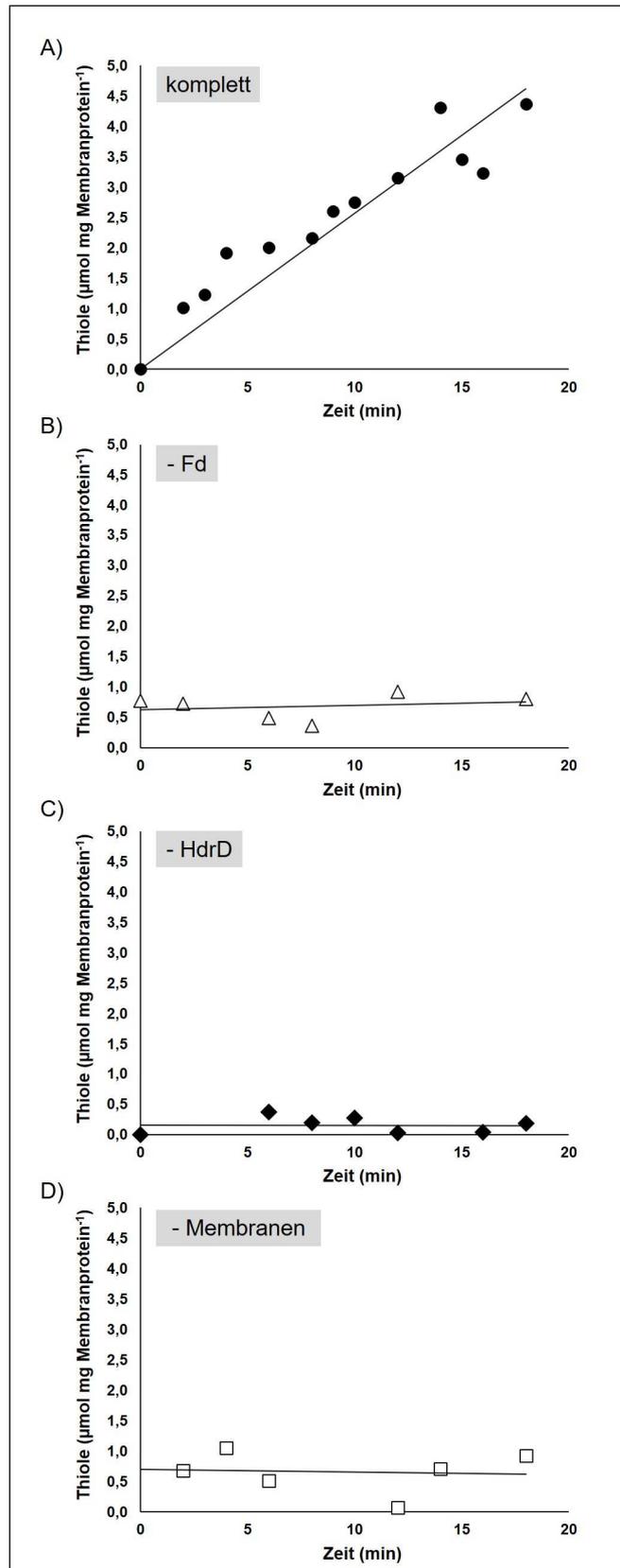


Abb. 46. Thiolbildung von *M. luminyensis*-Membranen mit Fd_{red} als Elektronendonator und HdrD als finale Elektronen-transferierende Einheit. Es konnte nur dann Thiolbildung festgestellt werden, wenn HdrD, *M. luminyensis*-Membranen, Fd und die IOR, sowie die entsprechenden Substrate im Test enthalten waren (A). Keine Thiolbildung konnte beobachtet werden, wenn Fd (B), HdrD (C) oder *M. luminyensis*-Membranen (D) fehlten.

3.3.6.3 Berechnungen zur Translokationseffizienz des Fpo/HdrD-Komplexes

In den vorangegangenen Versuchen konnte bewiesen werden, dass die Oxidation von Fd_{red} aufgrund eines Zusammenspiels aus dem Fpo-Komplex und HdrD möglich ist und das Heterodisulfid hierbei als Elektronenakzeptor fungiert. Da der ‚kopfloser‘ Fpo-Komplex in *M. luminyensis* mit HdrD als finale Elektronen-transferierende Einheit in der Lage ist, Fd_{red} zu oxidieren, unterscheidet sich dieser ‚kopfloser‘ Komplex maßgeblich von den Fpo-Komplexen anderer methanogener Archaeen.

Tab. 34. Energetisches Potential der unterschiedlichen Fpo-Komplexe. Berechnet wurden die Differenzen der Redoxpotentiale der Elektronendonoren und -akzeptoren unter Standardbedingungen ($\Delta E^{0'}$), die freie Energie der Redoxreaktion ($\Delta G^{0'}$) und die Anzahl der Protonen, die aufgrund der Enthalpie theoretisch über die Membran gepumpt werden können.

Komplex	e ⁻ -Donor	e ⁻ -Akzeptor	$\Delta E^{0'}$ (mV)	$\Delta G^{0'}$ (kJ mol ⁻¹)	translozierte Protonen (rechnerisch) ³⁾
klassischer Fpo-Komplex (z. B. <i>Ms. mazei</i>) ¹⁾	F ₄₂₀ H ₂	MPh _{ox}	185	-35,7	2,1
‚kopfloser‘ Fpo-Komplex (<i>M. thermoacetophila</i>) ²⁾	Fd _{red}	MPh _{ox}	335	-64,6	3,7
‚kopfloser‘ Fpo-Komplex (<i>M. luminyensis</i>)	Fd _{red}	Heterodisulfid	357	-68,9	3,9

1) Welte und Deppenmeier 2014

2) Welte und Deppenmeier 2011a

3) Berechnet anhand der Formel: $n = 2\Delta E^{0'} / \Delta\rho$ (Harold 1986)

Insbesondere in Bezug auf die klassischen Fpo-Komplexe ergeben sich deutliche Unterschiede in Bezug auf energetische Gesichtspunkte (Tab. 34). Beim Fpo-Komplex aus *Ms. mazei* beispielsweise handelt es sich um eine F₄₂₀H₂-Dehydrogenase, die F₄₂₀H₂ oxidiert und Elektronen auf MPh_{ox} überträgt (Deppenmeier *et al.* 1999). Aufgrund der Standardredoxpotentiale der beiden Elektronenüberträger lässt sich berechnen, welche Energie bei der katalysierten Redoxreaktion freigesetzt wird, die dann zur aktiven Protonentranslokation genutzt werden kann (Deppenmeier und Müller 2007). Unter der Annahme, dass das Membranpotential $\Delta\rho$ etwa -180 mV beträgt (Peinemann 1989), kann darüber hinaus berechnet werden, wie viele Protonen mit Hilfe der freien Energie über die cytoplasmatische Membran transloziert werden können (siehe Legende Tab. 34). Während der klassische Fpo-Komplex aus *Ms. mazei* zwei Protonen nach außen schleust (Deppenmeier *et al.* 1999; Bäumer *et al.* 2000), vermag der ‚kopfloser‘ Fpo-Komplex aus *M. thermoacetophila* theoretisch 3,7 Protonen über die Cytoplasmamembran zu translozieren, was bislang jedoch nicht experimentell belegt wurde. Der Unterschied bei der Anzahl translozierter Protonen liegt in der großen Differenz der Standardredoxpotentiale von Fd_{red} (-500 mV; Kaster *et al.* 2011) und MPh_{ox} (-165 mV; Tietze *et al.* 2003) im Gegensatz zu F₄₂₀H₂ (-350 mV; Jacobson und Walsh 1984) und MPh_{ox} begründet. Bei *M. luminyensis* ist der Betrag der freien Energie noch einmal höher, da bei der Fpo-vermittelten Fd_{red}-Oxidation in Verbindung mit der Reduktion des Heterodisulfids (-143 mV; Tietze *et al.* 2003) durch HdrD

ein Energiebetrag von $-68,9 \text{ kJ mol}^{-1}$ freigesetzt wird. Dadurch können theoretisch 3,9 Protonen über die Membran transloziert werden. Somit hat sich in *M. luminyensis* trotz der Tatsache, dass vermutlich nur ein membranständiges, Protonen-translozierendes Enzym vorliegt (der Fpo-Komplex), ein verhältnismäßig effizienter Protonentranslokationsapparat entwickelt.

4 Diskussion

4.1 *M. luminyensis* in seinem natürlichen Habitat

Zur Funktionalität des menschlichen Körpers trägt neben körpereigenen Zellen auch eine Vielzahl an prokaryotischen Zellen maßgeblich bei. Der Körper bietet Prokaryoten (sowie Viren und eukaryotischen Mikroben) verschiedene Habitate, die sich in der Organismendichte und -diversität stark unterscheiden. Lange fand die menschliche Mikrobiota im Hinblick auf Wechselwirkungen mit dem Wirt und auf die Entstehung von Krankheiten nicht ausreichend Beachtung. Heute weiß man, dass zwischen dem Menschen und seinen mikrobiellen Bewohnern eine komplexe mutualistische Beziehung besteht, in der die Organismen gleichermaßen voneinander profitieren. Von symbiontischen, kommensalen Vertretern der menschlichen Darmflora sind solche abzugrenzen, die pathogene Eigenschaften besitzen und dem Wirtsorganismus schaden. Dabei kann es sich zum einen um Organismen handeln, die temporär durch Infektionsprozesse Teil der Mikrobiota werden und infolgedessen zur Entwicklung einer akuten Erkrankung führen, und zum anderem um solche, die stetige Bewohner des menschlichen Körpers sind und nur unter bestimmten Bedingungen zur Pathogenese beitragen. Dies kann dann der Fall sein, wenn z. B. die Verabreichung von Antibiotika zu einer Dysbiose führt und das Wachstum einer opportunistisch-pathogenen Organismengruppe fördert.

Erst durch das Aufkommen und die zunehmende Etablierung von Metagenomanalysen als Werkzeug zur Untersuchung von Umweltproben rückte die Aufklärung der Zusammensetzung des menschlichen Mikrobioms in den Fokus der Forschung. Die bisher umfangreichste Studie, die sich mit den Mikrobiomen von fast 250 Probanden bezüglich der mikrobiellen Diversität befasste, wurde im Rahmen des Human Microbiome Projects getätigt (The Human Microbiome Project Consortium 2012). Hierbei wurden Proben von unterschiedlichen Körperstellen entnommen und es wurde basierend auf der Sequenzierung der 16S-rRNA determiniert, welche bakteriellen Spezies diese menschlichen Habitate aufwiesen. Aus der Studie ging hervor, dass sich die Mikrobiome zwischen den Probanden und zwischen den jeweiligen Körperregionen enorm unterschieden. Insbesondere im Gastrointestinaltrakt ist die mikrobielle Diversität sehr hoch. Die Artenvielfalt umfasst zum einen Phyla, deren Mitglieder häufig in hohen Konzentrationen nachgewiesen werden können (z. B. *Bacteroides* spp. und *Prevotella* spp.), zum anderen aber auch eine große Anzahl an mikrobiellen Gruppen, die jeweils nur geringe Abundanzen zeigen (Arumugam *et al.* 2011). Obwohl die Zusammensetzung der Mikrobiota im Verdauungstrakt stark durch äußere Einflüsse, wie die Ernährung, den Antibiotikaeinsatz und das Immunsystem des Wirtes, beeinflusst wird, scheinen drei mikrobielle Gruppen insgesamt zu dominieren. So lässt sich die Darmflora eines Menschen trotz individueller Eigenheiten in der Regel den sogenannten Enterotypen zuordnen. Hierbei wird zwischen dem *Bacteroides*-, dem *Prevotella*- und dem *Ruminococcus*-Enterotyp unterschieden, wobei die Bezeichnungen reflektieren, welche Spezies im jeweiligen Enterotyp dominieren und schließlich namensgebend sind (Arumugam *et al.* 2011). Während beim *Bacteroides*-Enterotyp im Darm vor allem *Bacteroides* spp. und *Parabacteroides* spp. dominieren, zeigen beim *Prevotella*-Enterotyp *Prevotella* spp. und *Desulfovibrio* spp. die höchste Abundanz. Die Darmmikrobiota von Probanden, die zum *Ruminococcus*-Enterotyp gehören, ist dagegen durch

Ruminococcus spp. und *Akkermansia* spp. geprägt. Die Einteilung des Darmmikrobioms in Enterotypen ist nicht statisch, da das Mikrobiom durch äußere Einflüsse (z. B. Ernährung und Medikamente) ständigen Schwankungen unterliegt. Diese Einflüsse können bewirken, dass Wechsel zwischen den Enterotypen erfolgen, sodass die Enterotypen-Einteilung vor allem eine Momentaufnahme ist (Wu *et al.* 2011; Knights *et al.* 2014). Um besser erfassen zu können, dass sich die Zusammensetzung der Mikrobiota verändern kann, wird mittlerweile von den sogenannten ‚Enterogradienten‘ gesprochen, was beinhaltet, dass die Diversität des Mikrobioms eine gewisse Dynamik aufweist (Bäckhed *et al.* 2012).

Soll die Rolle eines einzelnen Organismus im Kontext der Darmmikrobiota betrachtet werden, ist es zunächst wichtig, einen Überblick darüber zu bekommen, welche Substrate der Organismus konsumiert und wie diese produziert werden. Darüber hinaus muss analysiert werden, welche Produkte der Organismus selbst generiert und ob diese wiederum von anderen Organismen verbraucht werden. In jeder ökologischen Nische spielt außerdem interspezifische Konkurrenz eine Rolle. Diese Konkurrenz entsteht, wenn dem Organismus bestimmte Ressourcen, z. B. Nährstoffe, nicht allein zur Verfügung stehen, d. h., wenn diese auch durch andere Organismen verbraucht werden. Derartige Prozesse setzen eine hohe Anpassungsfähigkeit des Zielorganismus voraus, sodass ungünstige Bedingungen nicht direkt zum Absterben führen, sondern beispielsweise durch das Ausweichen auf einen anderen Nährstoff, und somit Konkurrenzvermeidung, ein Fortbestehen der Art möglich ist. Über die Lebensweise und das trophische Netzwerk von *M. luminyensis* ist in diesem Zusammenhang wenig bekannt. Deswegen soll nachfolgend diskutiert werden, welche Substrate im Habitat des Archaeons verfügbar sind, woher diese stammen und inwiefern der Organismus in der Lage ist, auf interspezifische Konkurrenz um bestimmte Substrate zu reagieren.

4.1.1 Generierung und Verfügbarkeit von Methanol im Darm

Aufgrund des Vorkommens aktiver Zellen von *M. luminyensis* in menschlichem Stuhl (Dridi *et al.* 2012a) gilt der Darm als bevorzugtes Habitat dieses human-assoziierten Archaeons. Neben *M. luminyensis* beherbergt dieser Lebensraum auch die methanogenen Archaeen *Methanosphaera stadtmanae* und *Methanobrevibacter smithii*, die ebenfalls im menschlichen Gastrointestinaltrakt in aktiver Form nachgewiesen wurden (Gaci *et al.* 2014). Im Gegensatz zum hydrogenotrophen Organismus *M. smithii* (Miller und Wolin 1986) und *M. stadtmanae*, der eine H₂-abhängige, methylotherpe Methanogenese betreibt (Fricke *et al.* 2006), ist *M. luminyensis* metabolisch vielseitig, da der Organismus sowohl Methanol, als auch die Methylamine Monomethylamin, Dimethylamin und Trimethylamin mit H₂ als Elektronendonator zu Methan umsetzen kann. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *M. luminyensis* diese Substrate jeweils im Verhältnis 1:1 zu Methan umsetzt (3.1.1). Als Kohlenstoffquelle zum Aufbau von Biomasse fungieren diese Verbindungen hingegen nicht. Stattdessen wird Acetat als Kohlenstoffquelle verwendet, da Wachstumsexperimente demonstrierten, dass die Konzentration von Acetat im Medium bis zum Erreichen der stationären Phase sukzessive abnahm (3.1.1). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Methanol der von *M. luminyensis* bevorzugte Methylgruppendonator ist, da nicht nur Zellen, die an Methanol adaptiert waren, sondern auch

solche, die auf Methylaminen angezogen worden waren, die höchste Methanbildung mit Methanol + H₂ zeigten. Die Methanbildungsraten, die die Zellen mit Methylaminen + H₂ erreichten, waren dagegen signifikant geringer (3.2.2). Mit Hilfe der quantitativen RT-PCR wurde diese Hypothese auch auf Transkriptionsebene untermauert, da Gene, die für Proteine der Methanol-Demethylierung kodieren, bei Wachstum auf allen Substraten die höchsten Transkriptabundanzen aufwiesen. Im Gegensatz dazu zeigten Gene, die für Enzyme der Methylamin-Demethylierung kodieren, nur bei Wachstum auf dem entsprechenden Methylamin eine signifikante Expression und unterlagen bei Wachstum auf Methanol offensichtlich einer strikten Repression (3.2.1). Diese Beobachtung warf die Hypothese auf, dass *M. luminyensis* in seinem natürlichen Habitat, dem Darm, bevorzugt Methanol verwertet und Methylamine erst dann verstoffwechselt werden, wenn kein Methanol zur Verfügung steht.

Methanol kann über verschiedene Routen in den menschlichen Körper gelangen. Die Verbindung selbst ist für den Menschen nicht schädlich, wird jedoch durch die Alkohol-Dehydrogenase 1b (ADH1b) zu Formaldehyd oxidiert (Cederbaum 2012). Formaldehyd wird wiederum eine karzinogene Wirkung und ein schädlicher Einfluss auf das Nervensystem zugesprochen (Tulpule und Dringen 2013). Darüber hinaus kann Formaldehyd durch die Aldehyd-Dehydrogenase zu Formiat oxidiert werden. Hohe Formiatkonzentrationen können zur lebensbedrohlichen Acidose führen, bei der es zum Absinken des pH-Wertes des Blutes kommt (MacAllister *et al.* 2011).

Methanol kann häufig auch im Faeces gesunder Menschen nachgewiesen werden, sodass es als Substrat von *M. luminyensis in situ* tatsächlich verfügbar ist. Eine Untersuchung von Garner *et al.* (2007), in der die Konzentrationen verschiedener flüchtiger, organischer Verbindungen in menschlichem Stuhl analysiert wurden, zeigte, dass 40 % der gesunden Probanden über detektierbare Methanolkonzentrationen im Stuhl verfügten. Auffällig war, dass der Anteil an Individuen mit Methanol im Stuhl bei Probanden, die an *Clostridium difficile*- bzw. *Campylobacter jejuni*-Infektionen litten, sogar höher war, da hier in 50 bzw. 56 % der Individuen Methanol detektiert wurde. Es ist bekannt, dass Methanol im menschlichen Darm als bakterielles Stoffwechselprodukt entsteht. Hierbei spielen vor allem bestimmte Vertreter der Gattung *Bacteroides* eine entscheidende Rolle (Jensen und Canale-Parola 1985, 1986; Dongowski *et al.* 2000), die Methanolbildungsaktivität aufweisen und generell in hohen Konzentrationen im menschlichen Intestinaltrakt vorkommen (Arumugam *et al.* 2011). Vor allem bei der Zersetzung von Pektin, einem komplexen Kohlenhydrat, das nicht vom Menschen selbst verstoffwechselt werden kann (Wolin 1981) und dementsprechend unverdaut in den Darm gelangt, kann Methanol in signifikanten Mengen entstehen (Siragusa *et al.* 1988). Pektin ist ein natürlicher Bestandteil von Pflanzen, sodass es im Speziellen nach dem Verzehr von Früchten o. ä. zur signifikanten Steigerung der Methanolkonzentration im Körper kommt. Diesen Effekt wiesen Lindinger *et al.* (1997) nach, indem sie die Methanolkonzentration im Atem von Probanden vor und nach dem Verzehr von Früchten quantifizierten. Die Generierung von Methanol wurde bereits früh auch für bestimmte Vertreter der Gattung *Clostridium* nachgewiesen, die unter anaeroben Bedingungen auf Pektin wachsen und Methanol produzieren können (Schink und Zeikus 1980). Diese physiologische Eigenschaft erklärt auch, warum Patienten, die an einer *Clostridium difficile*-Infektion leiden, erhöhte Methanolkonzentrationen im Stuhl aufweisen (Garner *et al.* 2007). Da Clostridien jedoch nicht in großen Mengen in einer gesunden,

menschlichen Darmmikrobiota zu finden sind, *Bacteroides* spp. hingegen schon (Arumugam *et al.* 2011), ist die Methanolproduktion ausgehend von Pektin in gesunden Menschen vermutlich vielmehr auf *Bacteroides* spp. zurückzuführen. Die hydrolytische Spaltung von methylierten Zuckerderivaten des Pektins in Methanol und Pektat wird auf die Pektin-Methylesterase zurückgeführt (Schink und Zeikus 1983), die in vielen Darmbakterien, wie beispielsweise *Bacteroides vulgatus*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Eubacterium eligens*, *Ruminococcus albus* oder *Enterobacter cloacae* vorzufinden ist (Dorokhov *et al.* 2015). Schätzungen zufolge nimmt jeder Mensch pro Tag etwa 5 g Pektin über die Nahrung auf, sodass dieses bzw. dessen Abbauprodukt Methanol für Organismen im Darm, und im Speziellen für *M. luminyensis*, eine stabile Energiequelle darstellt. Die ständige Verfügbarkeit von Methanol erklärt die Bevorzugung dieser Verbindung gegenüber anderen methylierten Verbindungen, die im Intestinaltrakt deutlich weniger vorkommen, wie sich im Folgenden herauskristalisieren wird.

Methanol kann nicht nur von Bakterien mit pektinolytischen Enzymen generiert werden, sondern entsteht auch natürlicherweise beim Reifungsprozess von Früchten und Gemüse, und kann über deren Konsum in den Körper eingebracht werden (Dorokhov *et al.* 2015). Darüber hinaus führt auch ein erhöhter Alkoholkonsum zu höheren Methanolkonzentrationen im menschlichen Körper, da nicht nur Bier und Wein Methanol enthalten (Gnekow und Ough 1976), sondern vor allem hochprozentige Spirituosen über hohe Methanolkonzentrationen verfügen (Bindler *et al.* 1988). Methanol entsteht im Herstellungsprozess von alkoholischen Getränken durch die Hydrolyse von Pektin durch Pektin-Methylesterasen und ist als Nebenprodukt unvermeidbar (Bindler *et al.* 1988). Eine weitere Methanolquelle ist Aspartam, das als Süßstoff in der Nahrungsmittelindustrie zum Einsatz kommt (Marinovich *et al.* 2013) und von dem durch Esterasen intestinaler Bakterien Methanol abgespalten wird (Oppermann *et al.* 1973; Ranney *et al.* 1975). Außerdem kann Methanol enzymatisch prinzipiell ausgehend vom Methylgruppendonator S-Adenosylmethionin, der an zahlreichen zellulären Prozessen im menschlichen Körper beteiligt ist, generiert werden (Axelrod und Daly 1965). Allerdings wurde der Prozess bisher nicht im Intestinaltrakt nachgewiesen, sodass S-Adenosylmethionin hier, wenn überhaupt, eine untergeordnete Rolle als Methanolquelle spielt.

Nur sehr wenige Organismen im Darm sind überhaupt in der Lage, Methanol als Substrat aufzunehmen und verstoffwechseln zu können. Ein Archaeon, das neben *M. luminyensis* Methanol als Substrat nutzt, ist *M. stadtmanae* (Fricke *et al.* 2006). Somit konkurrieren beide methanogenen Archaeen um das gleiche Substrat, was suggeriert, dass das Vorkommen des einen Organismus die Prävalenz des anderen maßgeblich beeinflusst und letztendlich ausschließt. Tatsächlich zeigte eine groß angelegte Studie, in der Stuhlproben von 500 Probanden bezüglich der Prävalenz der methanogenen Organismen *M. smithii*, *M. stadtmanae* und *M. luminyensis* untersucht wurden, dass *M. stadtmanae* und *M. luminyensis* tendenziell nicht in der gleichen Stuhlprobe vorkamen (Dridi *et al.* 2012b). Im Gegensatz dazu waren beide Organismen jeweils in Kombination mit *M. smithii* zu finden, der Methanol nicht als Substrat nutzen kann, sondern lediglich hydrogenotrophe Methanogenese betreibt (Miller und Wolin 1986). Methanol ist nicht nur als Wachstumssubstrat sehr wenig verbreitet, sondern zeigt sogar einen hemmenden Effekt auf das Wachstum vieler Darmorganismen (Caldwell 1989). Interessanterweise zeigen gerade *Bacteroides*-Arten, darunter auch die Darmbewohner *Bacteroides vulgatus* und

Bacteroides ovatus, eine relativ hohe Resistenz gegenüber Methanol, was die Hypothese stützt, dass die Generierung von Methanol im Darm vor allem auf *Bacteroides* spp. zurückzuführen ist (Caldwell 1989).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Bevorzugung von Methanol als Substrat gegenüber den Methylaminen durch *M. luminyensis* durchaus plausibel ist, da Pektin, von dem Methanol abgespalten werden kann, ständig in größeren Mengen über die Nahrung zugeführt wird und Methanol dadurch fast durchgehend verfügbar ist. Darüber hinaus sind nur sehr wenige Darmorganismen bekannt, die Methanol verstoffwechseln, sodass eine geringe interspezifische Konkurrenz um Methanol herrscht. Einzig die Diffusion von Methanol in das umgebende Darmepithel kann dazu führen, dass Methanol anderweitig verbraucht wird und nicht durch den Organismus *M. luminyensis* genutzt werden kann. Dadurch, dass *M. luminyensis* ein Substrat verwertet, das andere Darmmikroorganismen nicht metabolisieren können, wird dessen Wachstum überhaupt ermöglicht, da das Archaeon aufgrund seiner geringen Zelldichten und hohen Verdopplungszeiten (3.1) im Vergleich zu anderen Darmbewohnern ansonsten sicherlich nicht konkurrenzfähig wäre. Durch die Nutzung des energiearmen Stoffwechselprodukts anderer Darmbewohner als Substrat vermeidet *M. luminyensis* interspezifische Konkurrenz. Diese Aussage wird auch dadurch gestützt, dass bislang keine acetiklastischen Methanarchaeen im Darm gefunden wurden. Um das Substrat Acetat herrscht im Gegensatz zu Methanol eine große interspezifische Konkurrenz, da Acetat nicht nur ein mögliches Methanogenesesubstrat ist, sondern auch von zahlreichen anderen Darmorganismen verwendet wird. So ist beispielsweise von einigen Butyrat-produzierenden Darmbakterien, wie *Roseburia* spp. und *Agathobacter rectalis*, bekannt, dass es sich um Nettoacetatverbraucher handelt, die Acetat im Zuge der Butyratproduktion verstoffwechseln (Duncan *et al.* 2002; Rosero *et al.* 2016). Darüber hinaus wird Acetat auch neben anderen kurzkettigen Fettsäuren durch das Darmepithel absorbiert, wodurch der Wirt selbst ein weiterer Acetatkonsument ist (den Besten *et al.* 2013; Morrison und Preston 2016). Daher haben sich acetiklastische, methanogene Archaeen vermutlich nicht im Gastrointestinaltrakt durchsetzen können.

4.1.2 Methylamine – Alternativsubstrate mit begrenzter Verfügbarkeit

Im Gegensatz zu Methanol sind Methylamine für *M. luminyensis* nicht durchgehend verfügbar. Analysen, in denen flüchtige, organische Verbindungen in menschlichem Stuhl nachgewiesen wurden, zeigten, dass die Probanden nur dann über detektierbare Methylaminkonzentrationen verfügten, wenn sie an einer *Campylobacter jejuni*-Infektion litten (Garner *et al.* 2007). Dennoch lag der Anteil der Patienten, die diese Erkrankung besaßen und in denen erhöhte Trimethylaminkonzentrationen detektiert wurden, nur bei 6 %, was suggeriert, dass die Pathogenese nicht zwangsläufig mit der Akkumulierung von Trimethylamin (TMA) korreliert. TMA und dessen Demethylierungsprodukte Dimethylamin (DMA) und Monomethylamin (MMA) entstehen, wenn cholinreiche (z. B. Eier oder Sojaprodukte) oder L-Carnitin-haltige Nahrung aufgenommen wird und in den Verdauungstrakt gelangt. Vor allem Cholin ist im Zusammenhang mit der Generierung von TMA hervorzuheben, da diese

Verbindung essentieller Bestandteil einer ausgewogenen Ernährung ist (Brugère *et al.* 2014). Die Umsetzung von Cholin zu TMA im Darm geschieht durch einen enzymatischen Schritt, der durch die sogenannte Cholin-TMA-Lyase (CutCD) katalysiert wird. Das zu den Glycylradikalenzymen zählende Enzym CutC und ein spezifisches aktivierendes Enzym (CutD) wurden erstmals detailliert in *Desulfovibrio desulfuricans* untersucht (Craciun und Balskus 2012). Das Glycylradikalenzym katalysiert die Spaltung der C-N-Bindung in Cholin, sodass TMA und Acetaldehyd entstehen, und ermöglicht das Wachstum des Organismus mit Cholin als einziger Kohlenstoffquelle.

Die Gene *cutC* und *cutD* sind sehr weit verbreitet und auch in den Genomen von einigen Darmmikroorganismen auszumachen. So verfügen beispielsweise verschiedene Clostridienisolate, die aus menschlichem Stuhl stammen (z. B. *Cl. hathewayi* und *Cl. citroniae*), über die Gene, die für Proteine kodieren, die zur TMA-Produktion benötigt werden (Rath *et al.* 2017). Darüber hinaus finden sich diese auch in einigen *E. coli*-Isolaten (Craciun und Balskus 2012) und wenigen *Eubacterium*-, *Klebsiella*- und *Enterobacter*-Stämmen aus menschlichem Faeces (Rath *et al.* 2017). Untersuchungen zur Zusammensetzung des menschlichen Mikrobioms haben jedoch ergeben, dass *Escherichia*- und *Clostridium*-Stämme nur einen geringen Anteil an der mikrobiellen Dickdarmflora ausmachen (Arumugam *et al.* 2011), sodass es unwahrscheinlich erscheint, dass die gesamte TMA-Produktion im Darm auf diese Organismen zurückzuführen ist. Eine Analyse der Genome der häufig vorkommenden, kommensalen Darmbewohner *Bacteroides vulgatus* (Xu *et al.* 2007) und *Prevotella copri* mittels BLASTp (Altschul *et al.* 1990) ergab, dass nur *B. vulgatus* (und auch andere *Bacteroides*-Stämme) über ein Gen (*cutC*) verfügt, das für ein Protein kodiert, das homolog zur Cholin-TMA-Lyase aus *D. sulfuricans* ist (Bvu_1421; Sequenzabdeckung: 93 %, Identität: 32 %). *P. copri* hingegen besitzt kein homologes Protein, sodass es wahrscheinlich ist, dass der Organismus nicht in der Lage ist, TMA aus Cholin zu generieren. Diese Feststellung warf die Vermutung auf, dass im menschlichen Darm insbesondere Vertreter der Gattung *Bacteroides* an der Generierung von TMA beteiligt sind. Allerdings fanden Martínez-del Campo *et al.* (2015), die erst bei einer höheren Identität (> 60 %) von Homologie sprachen, keine CutC-Orthologen innerhalb der Gattung Bacteroidetes. Deswegen werden in Zukunft biochemische Analysen der CutC-Homologen von *B. vulgatus* bzw. Wachstumsversuche auf Cholin zeigen müssen, ob *Bacteroides* spp. tatsächlich Cholin zu TMA umsetzen können. Darüber hinaus sind putative Cholin-TMA-Lyasen auch in einigen Darmbakterien mit vergleichsweise geringer Abundanz (im Vergleich zu *Bacteroides* spp. und *Prevotella* spp.), wie *Alistipes* spp. und *Faecalibacterium* spp., mittels BLASTp-Analysen zu finden. Diesen kommt daher möglicherweise ebenfalls eine Rolle bei der TMA-Produktion im Darm zu.

Interessanterweise scheint eine westlich geprägte Ernährung, die den häufigen Verzehr von proteinreicher Nahrung und insbesondere Produkte tierischen Ursprungs beinhaltet, dazu zu führen, dass die Darmmikrobiota von *Bacteroides* spp. dominiert wird, während eine vorwiegend pflanzliche Ernährung die Dominanz von *Prevotella* spp. fördert (Wu *et al.* 2011). Der Unterschied in der Fähigkeit Cholin mit Hilfe der Cholin-TMA-Lyase als Substrat nutzen zu können, kann eine Erklärung für diese Beobachtung sein. Da *Bacteroides* spp. potentiell wichtige TMA- und Methanol-Produzenten ausgehend von Cholin bzw. Pektin im menschlichen Darm sind, erscheint es wahrscheinlich, dass das Vorkommen

von *M. luminyensis*, der beide Verbindungen als Substrate nutzen kann, mit dem Auftreten von *Bacteroides* spp. korreliert. Allerdings wurde diese Vermutung bisher nicht experimentell bestätigt. Darüber hinaus scheint *M. luminyensis* seinen methanogenen Konkurrenten *M. stadtmanae*, der ebenfalls im Darm vorkommt und Methanol + H₂ als Substrate verwendet, zu verdrängen, sobald eine fleischreiche Ernährung vorliegt, die viel Cholin (und L-Carnitin, s. u.) beinhaltet, da *M. luminyensis* im Gegensatz zu *M. stadtmanae* auch TMA als Substrat nutzen kann. Basiert die Ernährung dagegen vorwiegend auf pflanzlicher Nahrung, ist dies gleichbedeutend mit verhältnismäßig hohen Methanolkonzentrationen, die nicht nur *M. luminyensis*, sondern auch *M. stadtmanae* zum Wachsen nutzen kann. In diesem Fall erhöht sich die interspezifische Konkurrenz auf *M. luminyensis* und es kann dazu kommen, dass *M. stadtmanae* der dominierende H₂-verbrauchende, methanogene Methylgruppenkonsument wird.

TMA kann mit Hilfe der Darmbakterien nicht nur aus Cholin generiert werden, sondern auch ausgehend von L-Carnitin, das als Bestandteil fleischlicher Lebensmittel (z. B. rotes Fleisch) über die Nahrung aufgenommen wird. Untersuchungen, in denen Probanden L-Carnitin über die Nahrung erhielten, zeigten, dass die Aufnahme von L-Carnitin zur Steigerung der Trimethylaminoxidkonzentration im Blutplasma führte (Koeth *et al.* 2013; Fukami *et al.* 2015). Trimethylaminoxid (TMAO) ist das Oxidationsprodukt von TMA und wird enzymatisch in der menschlichen Leber gebildet (Brugère *et al.* 2014). Auf diese Weise stehen die TMAO- und TMA-Gehalte im Körper in direkter Beziehung. Die Bestimmung der Enterotypen der Probanden zeigte, dass insbesondere Individuen mit einer vegetarischen Ernährung, deren Darmmikrobiom dem *Prevotella*-Enterotyp zugeordnet wurde, geringere TMAO-Konzentrationen im Plasma aufwiesen, während der *Bacteroides*-Enterotyp, der bei Fleisch-konsumierenden Probanden dominiert, zu hohen TMAO-Konzentrationen nach dem Konsum von L-Carnitin führte (Koeth *et al.* 2013). Dies suggeriert, dass analog zur Umsetzung von Cholin auch die Metabolisierung von L-Carnitin vor allem durch *Bacteroides* spp. durchgeführt wird. Es ist denkbar, dass L-Carnitin, das den Darm erreicht, ebenso wie Cholin zunächst in TMA gespalten wird. Ein Enzym, welches in der Lage ist L-Carnitin in TMA zu zerlegen, ist vor Kurzem in dem human-pathogenen Bakterium *Acinetobacter baumannii* beschrieben worden (Zhu *et al.* 2014). Hierbei handelt es sich um ein Zwei-Komponenten-Enzym (CntAB), das aus einer Rieske-Typ-Oxygenase- und einer Reduktase-Untereinheit besteht. Eine BLASTp-Analyse (Altschul *et al.* 1990) innerhalb der Gattung *Bacteroides* auf Grundlage der NCBI-Datenbank ergab, dass Vertreter dieser Gattung überraschenderweise nicht über CntAB-Homologe verfügen. Dies widersprach der Hypothese, dass *Bacteroides* spp. über ein Enzym zur Generierung von TMA aus L-Carnitin verfügen (Koeth *et al.* 2013), die sich aus der Beobachtung ergeben hatte, dass Individuen des *Bacteroides*-Enterotyps nach der oralen Aufnahme von L-Carnitin höhere TMAO-Mengen im Blutplasma aufwiesen. Aufgrund dessen liegt die Vermutung nah, dass *Bacteroides* spp. über ein bisher nicht charakterisiertes Enzym verfügen, was die gleiche Reaktion wie die Carnitin-Oxygenase/Reduktase CntAB katalysiert. Jedoch besitzen auch *Escherichia/Shigella* spp. und selten *Citrobacter* spp. und *Klebsiella* spp. Gene, die für die Carnitin-Oxygenase/Reduktase kodieren, sodass auch diese als TMA-Produzenten im Darm in Betracht kommen (Rath *et al.* 2017). Da es sich hierbei allerdings um Organismen mit geringer Abundanz im

Darm handelt, kann die intestinale TMA-Produktion mit großer Wahrscheinlichkeit nicht allein auf diese Bakterien zurückgeführt werden.

Eine weitere Quelle für TMA, welches *M. luminyensis* als Substrat nutzen kann, ist TMAO, das Bestandteil verschiedener Lebensmittel (z. B. Meeresfrüchte und Fisch) ist und durch Bakterien der Darmflora zu TMA reduziert werden kann (Barrett und Kwan 1985). Insbesondere für einige Enterobacteriaceae wurde schon früh gezeigt, dass diese Bakterien zur sogenannten TMAO-Atmung fähig sind (z. B. *E. coli*, Méjean *et al.* 1994) und im Zuge dessen TMA generieren. Bisher ist nicht geklärt, ob TMAO selbst direkt vom menschlichen Körper absorbiert wird oder ob es bis in den Darm gelangt und erst dort durch Darmmikroorganismen zu TMA reduziert wird, was wiederum über das Darmepithel absorbiert wird. Klar ist jedoch, dass aus TMAO unter anaeroben Bedingungen letztendlich immer TMA entsteht, da TMAO aufgrund seines positiven Redoxpotentials (+ 130 mV; Buc *et al.* 1999) im Milieu des Darms als guter Elektronenakzeptor fungiert (Landfald *et al.* 2017). Die Fähigkeit, TMAO zu TMA reduzieren zu können, geht in Bakterien auf die TMAO-Reduktase zurück (Barrett und Kwan 1985). Dieses Enzym ist in *E. coli* (Méjean *et al.* 1994), aber auch in dem pathogenen Organismus *Salmonella typhimurium* beschrieben (Kwan und Barrett 1983). Beide Bakterien können (zumindest zeitweise) im menschlichen Darm vorkommen, sind jedoch keine typischen kommensalen Bewohner des Gastrointestinaltraktes. Eine Analyse der Genome von *Bacteroides* spp., *Alistipes* spp., *Faecalibacterium* spp. und *Prevotella* spp. mittel BLASTp (Altschul *et al.* 1990) ergab, dass diese häufig im Darm vorkommenden Bakterien nicht über Homologe der TMAO-Reduktase aus *E. coli* verfügen. Dies führte zu der Annahme, dass TMA im Darm nur zu einem geringen Anteil aus der Reduktion von TMAO durch Darmbakterien hervorgeht. Interessanterweise verfügt *Campylobacter jejuni* über eine TMAO-Reduktase (Sellars *et al.* 2002), was erklärt, warum der Faeces von Menschen, die an einer *C. jejuni*-Infektion leiden, tendenziell höhere TMA-Level zeigte (Garner *et al.* 2007). Die Tatsache, dass höhere TMA-Level mit *C. jejuni*-Infektionen korrelieren und nicht in gesunden Probanden festgestellt werden, deutet darauf hin, dass nur wenige kommensale Darmbakterien über eine TMAO-Reduktase verfügen und diesem Enzym in der Generierung von TMA im Darm eine untergeordnete Bedeutung zukommt. Stattdessen scheinen vor allem Cholin und L-Carnitin die Haupt-TMA-Quellen zu sein.

Da TMA aus proteinreicher Nahrung auf verschiedensten Wegen mit Hilfe der Darmmikrobiota gebildet werden kann, stellt es generell ein geeignetes und prinzipiell verfügbares Substrat für *M. luminyensis* dar. Allerdings ist *M. luminyensis* nicht der einzige Konsument von TMA im menschlichen Darm, da TMA sehr schnell über das Darmepithel vom Wirt aufgenommen und als TMAO über den Urin ausgeschieden wird (Al-Waiz *et al.* 1987; Fennema *et al.* 2016). Es ist folglich davon auszugehen, dass die TMA-Konzentrationen im Darm durch die Aufnahme durch den Wirt dauerhaft relativ gering sind und nur unter bestimmten Umständen, beispielsweise bei einer *C. jejuni*-Infektion, größere Mengen an TMA angehäuft werden. Im Rahmen einer gesunden Ernährung wird die Aufnahme von ca. 420-550 mg Cholin pro Tag empfohlen (entspricht 4-5 mmol Cholin d⁻¹). Gelangt Cholin in den Dickdarm, in dem die Mehrzahl der Darmmikroorganismen lebt, wird es wahrscheinlich direkt zu TMA umgesetzt, sodass temporär im Bereich des proximalen Colons durchaus höhere TMA-Konzentrationen akkumulieren können. Da es zeitgleich jedoch auch zur Absorption von TMA durch den Wirt kommt, kann die

Akkumulierung von TMA nur ein kurzzeitiger Effekt sein, sodass die höheren TMA-Konzentrationen nur kurzzeitig zum Wachstum von *M. luminyensis* beitragen können. Vergleich man die tägliche Aufnahme von Cholin mit der täglichen Dosis an Pektin, die bei 5 g liegt und aus der Methanol hervorgeht, wird klar, dass Methanol in größeren Mengen für *M. luminyensis* verfügbar ist. Da Pektin-Moleküle häufig über zahlreiche, mit Methylgruppen assoziierte Esterbindungen verfügen, können pro Pektin-Molekül mit Hilfe der Pektin-Methylesterase zahlreiche Methanol-Moleküle freigesetzt werden. Dagegen wird ein Cholin-Molekül nur in ein TMA-Molekül umgesetzt, was zusammen mit der geringeren täglichen Dosis unterstreicht, dass dessen Verfügbarkeit im Gegensatz zu Methanol deutlich geringer ist.

4.1.3 Generierung und Verfügbarkeit des Elektronendonors H₂ im Darm

Im Gegensatz zur Produktion von Methanol und Methylaminen durch Bakterien ist über die Produktion von H₂, das neben dem Methylgruppendonor beim Wachstum von *M. luminyensis* als Elektronendonator essentiell ist, verhältnismäßig wenig bekannt. Einen Großteil der für den Menschen unverdaulichen Lebensmittelbestandteile bilden die komplexen Kohlenhydrate, die beispielsweise Bestandteile pflanzlicher Zellwände sind (z. B. Cellulose). Gelangen diese in den Gastrointestinaltrakt des Menschen, kommt es zu deren Zersetzung durch Mikroorganismen des Darms, wobei vor allem kurzkettige Fettsäuren (Acetat, Propionat, Butyrat) und die Gase CO₂, H₂ und Methan als Produkte entstehen (Cummings 1983). Vor allem die Produktion von H₂ ist aufgrund der Tatsache, dass *M. luminyensis* das Gas als Substrat benötigt, im Rahmen der vorliegenden Arbeit relevant, sodass der Fokus im Folgenden auf diesem Gas liegt. Untersuchungen von Stuhlproben, die mit bestimmten Substraten versetzt wurden und deren Gasproduktion analysiert wurde, ergaben, dass auf Grundlage von pflanzlichen Nahrungsbestandteilen große Mengen an H₂ im Darm produziert werden. Ausgehend davon, dass pro Gramm Stärke etwa 330 mL H₂ generiert werden können (Weaver *et al.* 1989) und pro Tag etwa 40 g Stärke über die Nahrung aufgenommen werden, ergibt sich ein H₂-Volumen von 12 L, das theoretisch täglich im Darm produziert wird (Strocchi und Levitt 1992). Das Volumen an H₂, das über den Flatus und die Atmung abgegeben wird, liegt jedoch deutlich unter dieser Menge, was dafürspricht, dass H₂ nicht nur durch Darmorganismen produziert, sondern auch maßgeblich direkt von Darmorganismen verbraucht und so gar nicht erst ausgeschieden wird. Die hohe Verfügbarkeit macht H₂ generell zu einem sehr guten Substrat bzw. Elektronendonator. Neben den methanogenen Organismen, wie *M. luminyensis*, *M. stadtmanae* und *M. smithii*, die im Darm vorkommen, sind vor allem auch Sulfat-reduzierende (Rey *et al.* 2013), sowie acetogene Bakterien (Lajoie *et al.* 1988) am Verbrauch von H₂ beteiligt. Aufgrund des Verbrauchs von H₂ durch unterschiedliche mikrobielle Gruppen ergibt sich eine hohe interspezifische Konkurrenz um das Molekül (Cord-Ruwisch *et al.* 1988), die jedoch durch die große H₂-Menge, die im Darm generiert wird, kompensiert werden kann.

Über H₂-generierende Prozesse im menschlichen Darm ist bisher relativ wenig bekannt, außer dass diesen Vorgängen komplexe Kohlenhydrate zugrunde liegen, die über die Nahrung aufgenommen und vom Menschen nicht verstoffwechselt werden. Es wird angenommen, dass einige Darmbakterien H₂ produzieren, um überschüssige Elektronen bzw. Reduktionsäquivalente abzuleiten (Christl *et al.* 1992).

Würden die Organismen Reduktionsäquivalente bzw. reduzierte Elektronenüberträger akkumulieren, stünden den Zellen keine Elektronenakzeptoren mehr zur Verfügung und der Energiestoffwechsel würde zum Erliegen kommen. Ein in diesem Zusammenhang wichtiges Enzym ist die sogenannte konfurkierende Hydrogenase, die Elektronen von zwei Elektronendonoren auf einen Elektronenakzeptor überträgt (Kelly *et al.* 2015). Dieses Protein nutzt bestimmte reduzierte Elektronenüberträger (z. B. Fd_{red} und NADPH) als Elektronendonoren und transferiert Elektronen auf Protonen, wodurch H_2 entsteht, das wiederum von H_2 -verbrauchenden Organismen konsumiert werden kann (Rey *et al.* 2013).

Im Rahmen von Untersuchungen, in denen Bakterien, die aus Stuhlproben stammten, inkubiert wurden und die Gasphase der Kulturen per Gaschromatographie analysiert wurde, konnte festgestellt werden, dass *Clostridium* spp., aber auch *Bacteroides* spp. H_2 hervorbringen (McKay *et al.* 1982). Während sich innerhalb der Gattung *Clostridium* vor allem *Cl. perfringens*, *Cl. paraputrificum*, *Cl. butyricum* und *Cl. paraperfringens* durch hohe H_2 -Produktionsraten auszeichneten, zeigten bei der Gattung *Bacteroides* vor allem *B. fragilis* und *B. thetaiotaomicron* hohe H_2 -Gehalte in der Gasphase. Die genannten Clostridienarten werden jedoch vor allem mit bestimmten Erkrankungen (z. B. Gasbrand durch *Cl. perfringens*) in Verbindung gebracht und sind in einer gesunden, menschlichen Darmflora nur mit sehr geringer Abundanz zu finden. *Bacteroides* spp. hingegen sind mutualistische Bewohner des humanen Gastrointestinaltraktes mit hoher Abundanz (Arumugam *et al.* 2011) und könnten daher maßgeblich an der H_2 -Produktion im Darm beteiligt sein. Darüber hinaus besitzen einige Vertreter der Enterobacteriaceae, wie *Enterobacter cloacae* (Kumar und Das 2000), die Eigenschaft, aus komplexen Kohlenhydraten H_2 zu generieren. Ob auch andere häufig vorzufindende Darmmikroorganismen, wie beispielsweise *Eubacterium* spp., *Dorea* spp., *Butyrivibrio* spp. oder *Ruminococcus* spp., in deren Genomen Hydrogenasen kodiert sind (Thomas Franke, mündliche Mitteilung), tatsächlich in der Lage sind, H_2 zu generieren, werden zukünftige Untersuchungen mit Reinkulturen der Organismen klären müssen.

Die folgende Abbildung (Abb. 47) fasst das trophische Netzwerk von *M. luminyensis* im Darm noch einmal zusammen. Das Schema verdeutlicht, dass die Substrate des Organismus aus zahlreichen und sehr unterschiedlichen Prozessen hervorgehen können und unterstreicht dadurch die Komplexität des trophischen Netzwerks. Wird in Betracht gezogen, dass in dem gezeigten Netzwerk nur ein einziger Organismus im Fokus steht, kann ein erster Eindruck darüber gewonnen werden, welche Komplexität im gesamten Ökosystem ‚Darm‘ herrschen muss. Deswegen gestaltet sich die Untersuchung dieses Lebensraums generell sehr schwierig.

4.2 Evaluierung des medizinischen Potentials von *M. luminyensis*

Bisher ist sehr wenig bekannt über den Einfluss, den methanogene Organismen und im Speziellen *M. luminyensis* auf den Gesundheitszustand des Menschen haben. Jedoch deutet bisher nur eine einzige Studie, in der DNA von *Methanobrevibacter arboriphilus* in Hirnabszessen nachgewiesen wurde, darauf hin, dass methanogene Organismen bei pathogenetischen Prozessen eine Rolle spielen könnten (Drancourt *et al.* 2017). Allerdings beleuchtet die Untersuchung nicht die Fragestellung, ob das methanogene Archaeon direkt an der Entstehung des Hirnabszesses beteiligt war oder ob es erst nach der Manifestierung der Erkrankung zur Sekundärinfektion durch *M. arboriphilus* kam. Da der Nachweis von DNA außerdem keine Rückschlüsse auf die Anwesenheit aktiver Zellen erlaubt, ist der Zusammenhang zwischen der Entstehung des Hirnabszesses und der Abundanz von *M. arboriphilus*-DNA nicht gesichert.

Ganz im Gegensatz zu einem negativen Einfluss auf die Gesundheit des menschlichen Wirtes prägten Brugère *et al.* (2014) im Zusammenhang mit *M. luminyensis* den Begriff ‚Archaeobiotika‘. Dieser Terminus umfasst den Einsatz von *M. luminyensis* oder anderen Archaeen als Probiotika, die zur Behandlung bestimmter Erkrankungen angewendet werden. Besonders im Zusammenhang mit der sogenannten Trimethylaminurie ist die Therapie durch Ansiedlung von *M. luminyensis* im Darm von betroffenen Personen besonders interessant. Patienten, die an der Trimethylaminurie leiden, sind aufgrund einer Mutation im *fmo3*-Gen, welches für die Flavin-Monooxygenase 3 (FMO3) kodiert, nicht in der Lage eine (voll) funktionelle FMO3 zu bilden, welche normalerweise die Oxidation von TMA zu TMAO katalysiert (Mackay *et al.* 2011). TMA entsteht im Gastrointestinaltrakt vor allem bei der Degradation von Cholin- und L-Carnitin-haltiger Nahrung durch Bakterien der Darmflora (Koeth *et al.* 2013; Rath *et al.* 2017; Zeisel *et al.* 1989). Nach der Generierung wird TMA durch passive Diffusion in das Darmepithel aufgenommen und kann in den Blutkreislauf gelangen (Mackay *et al.* 2011). Im Rahmen von Detoxifizierungsprozessen wird die Verbindung in der Leber von gesunden Menschen zu TMAO oxidiert. TMAO wird aus der Leber wieder ins Blut abgegeben, zirkuliert im Körper und wird schlussendlich über den Urin ausgeschieden (Wranne 1955). Ist keine TMA-Oxidation aufgrund der genetischen Disposition möglich, akkumuliert statt TMAO jedoch TMA im Blut. Dieses wird über die Blutgefäße im gesamten Körper verteilt (Treacy *et al.* 1998) und hat aufgrund seines charakteristischen, fischartigen Geruchs einen starken Einfluss auf den Patienten, da der Geruch über den Schweiß, den Atem und den Urin abgegeben wird, und soziale Kontakte und das Wohlbefinden des Menschen stark beeinflusst (Dolphin *et al.* 1997). Während bisher vor allem eine symptomatische Behandlung der Krankheit erfolgt, indem die Patienten den Konsum tierischer Produkte (mit Cholin, Lecithin und L-Carnitin) einschränken (Mackay *et al.* 2011), könnte die Etablierung von *M. luminyensis* im Darm von Betroffenen u. U. eine normale, uneingeschränkte Ernährung erlauben. Dies ist vor allem deshalb essentiell, da ein konsequenter Verzicht auf Cholin zwar die Symptome der Trimethylaminurie abschwächt, aber auch negative Konsequenzen mit sich zieht, da ein dauerhaftes Cholindefizit zu Leberschäden, neurologischen Erkrankungen und sogar Krebs führen kann (Zeisel *et al.* 1997; Zeisel und da Costa 2009; Buchman *et al.* 1995; Mackay *et al.* 2011). Ist *M. luminyensis* im Darm eines Patienten kultiviert, setzt das Archaeon TMA, das von anderen Darmbakterien generiert wird, direkt zu

Methan um und sorgt somit für dessen Beseitigung, bevor eine Aufnahme durch den Wirt erfolgen kann. Die Abgabe von Methan erfolgt schließlich über den Flatus bzw. den Atem (Sahakian *et al.* 2010). Da bisher kein negativer Einfluss des geruchslosen Gases auf den menschlichen Körper festgestellt wurde, wäre dies ein idealer Weg, um TMA unmittelbar nach der Generierung aus dem Körper zu entfernen. Dies würde Trimethylaminurie-Patienten ein normales Leben erlauben und nicht auf künstliche Weise in die menschliche Darmmikrobiota eingreifen, da *M. luminyensis* ein natürlicher Bewohner des Gastrointestinaltraktes ist. Damit würde sich die Behandlung der Trimethylaminurie mit ‚Archaebiotika‘ auch stark von anderen therapeutischen Ansätzen abheben, bei denen TMA-produzierende Darmbakterien durch Zugabe von antibakteriellen Substanzen (z. B. Antibiotika) inaktiviert werden und somit ein starker Eingriff in die Mikrobiota erfolgt.

Selbst für den gesunden Organismus ist TMA und dessen Oxidationsprodukt TMAO von zentraler gesundheitlicher Bedeutung. TMAO wird mit der Entstehung von Gefäßerkrankungen wie Arteriosklerose oder Herzinfarkten in Verbindung gebracht (Wang *et al.* 2011b; Tang *et al.* 2014), wodurch geringe TMA/TMAO-Level auch für Menschen ohne genetische Disposition im *fmo3*-Gen wünschenswert sind. Wird *M. luminyensis* im Darmtrakt gesunder Menschen angesiedelt, würde dies die Akkumulierung von TMAO im Körper vermutlich maßgeblich herabsetzen, da es bereits im Darm zum Abbau des TMAO-Vorläufers TMA käme. Darüber hinaus können auch gesunde Menschen zeitweilig an Trimethylaminurie leiden. Besitzen Menschen keinen genetischen Defekt im *fmo3*-Gen, zeigen jedoch Symptome der Erkrankung, spricht man von der sogenannten ‚erworbenen Trimethylaminurie‘. Dieser pathologische Zustand kann verschiedene Ursachen haben und wird vor allem auf den übermäßigen Verzehr Cholin-haltiger Lebensmittel und Lebererkrankungen zurückgeführt, kann aber in seltenen Fällen auch im Zusammenhang mit der Menstruation beobachtet werden (Mackay *et al.* 2011). Um der ‚erworbenen Trimethylaminurie‘ und einer kardiovaskulären Erkrankung durch hohe TMAO-Konzentrationen vorzubeugen, ist der Einsatz von *M. luminyensis* als Probiotikum auch für gesunde Menschen interessant. Gerade in Bezug auf Individuen, die durch Fälle kardiovaskulärer Erkrankungen in der Familie erblich vorbelastet sind, bietet sich der Einsatz des Probiotikums besonders an.

Zusätzlich zur Bedeutung von *M. luminyensis* bei der Reduktion von TMA bzw. TMAO in Trimethylaminurie-Patienten und auch gesunden Menschen, ist bisher nicht dessen Potential im Zusammenhang mit der Verstoffwechslung von Methanol diskutiert worden. Methanol kann auf verschiedenen Wegen in den Gastrointestinaltrakt des Menschen gelangen, wobei es vor allem bei der Hydrolyse von Pektin, einem komplexen Kohlenhydrat pflanzlichen Ursprungs, entsteht (Lindinger *et al.* 1997). Gelangt Pektin in den Darm, wird es durch Organismen, die über Pektin-Methylesterasen verfügen, zersetzt, wobei Methanol freigesetzt wird (Dorokhov *et al.* 2015). Methanol stellt ein sehr energiearmes Substrat dar und kann nur durch sehr wenige Organismen weiter verstoffwechselt werden. Allerdings kann es aufgrund seiner geringen Größe und seiner neutralen Ladung durch die cytoplasmatische Membran der Darmepithelzellen diffundieren und so vom menschlichen Körper aus dem Darmlumen aufgenommen werden. Geben die Darmzellen Methanol wiederum ins Blut ab, wird dieses bis in die Leber transportiert. In den Hepatozyten wird es durch die Alkohol-Dehydrogenase 1 b

zu Formaldehyd (Cederbaum 2012) und durch die Aldehyd-Dehydrogenase weiter zu Formiat oxidiert (MacAllister *et al.* 2011). Während Methanol selbst nicht toxisch für den Körper ist, sind es dessen Oxidationsprodukte sehr wohl. Formaldehyd wird mit der Entstehung von Krebs und neurodegenerativen Erkrankungen in Verbindung gebracht (Tulpule und Dringen 2013). Hohe Formiatkonzentrationen führen im schlimmsten Fall zur Acidose, bei der es zum Absinken des pH-Wertes des Blutes und somit zur Störung der pH-Homöostase kommt (McMartin *et al.* 1980). Das Auftreten verschiedener Symptome, die nach der Aufnahme von Methanol einsetzen, wird als Methanolvergiftung bezeichnet. Kurzfristig und bei moderater Intoxikation stellen sich u. a. Kopfschmerzen, Schwindel und Schläfrigkeit ein. Bei langfristiger und schwerer Vergiftung kann es sogar zur Erblindung und zu schweren neurologischen Schäden bis hin zum Tod kommen (Kraut und Kurtz 2008). Werden mit einem Mal große Mengen an Methanol aufgenommen, spricht man von einer akuten Methanolvergiftung. Werden dagegen über einen längeren Zeitraum kleine, nicht akut toxische Mengen Methanol zugeführt, handelt es sich um eine chronische Methanolvergiftung. Insbesondere Menschen, die beruflich mit Methanol in Berührung kommen (z. B. Maler und Lackierer) können eine chronische Methanolvergiftung erleiden, da Methanol über die Haut und die Atmung aufgenommen werden kann (McCord 1931). Aber auch Menschen, die regelmäßig Methanol-haltige Getränke konsumieren (Hang und Woodams 2008), können eine chronische Methanolvergiftung erleiden. Nicht nur bei der akuten, sondern auch bei der chronischen Methanolvergiftung können gleichermaßen schwere Schäden entstehen. Aus der Symptomatik, die eine Methanolvergiftung mit sich bringt, geht hervor, wie schädlich Methanol für den menschlichen Körper ist. Um die Methanolkonzentrationen, die durch den Konsum pflanzlicher Nahrung im Darm erzeugt werden, und auf anderem Wege eingebrachtes Methanol möglichst schnell zu beseitigen, bevor es zu Formaldehyd und Formiat oxidiert werden kann, bietet sich erneut der Einsatz von *M. luminyensis* als Probiotikum an. Da der Organismus Methanol mit H_2 als Elektronendonator zu Methan reduziert und das Gas den Körper schnell verlässt, ließen sich in Anwesenheit von *M. luminyensis* die Konzentrationen an Methanol, Formaldehyd und Formiat minimieren, um schädlichen Effekten dieser Verbindungen auf den Wirtsorganismus entgegen wirken zu können.

Zusammengefasst besitzt *M. luminyensis* als Probiotikum ein großes Potential, da durch die Kultivierung des Organismus im menschlichen Darm der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen, die durch TMA/TMAO induziert werden können, entgegengewirkt wird. Darüber hinaus reduziert *M. luminyensis* die Methanolkonzentration im Darm, wodurch auch die Konzentrationen der Oxidationsprodukte Formaldehyd und Formiat sinken, die zur Entstehung neuronaler Erkrankungen und Schäden beitragen. Ist es zukünftig möglich probiotische Mikroorganismen nicht nur (aerob) über die Nahrung zu verabreichen, sondern auch anaerob in den Wirt einzubringen (z. B. in Sauerstoff- undurchlässigen Kapseln oder in Kombination mit starken Antioxidantien; Mizielińska *et al.* 2017; Khan *et al.* 2014), sollte über die Verabreichung von *M. luminyensis* als Probiotikum gegen kardiovaskuläre und durch Methanol hervorgerufene Erkrankungen nachgedacht werden. Die Ergebnisse, die im Rahmen dieser Arbeit erzielt wurden, könnten einen wichtigen Beitrag zur Entwicklung des ‚Archaebiotikums‘ leisten, da aufgezeigt wurde, wie die Anzucht von *M. luminyensis* verbessert bzw. wie der Biomassertrag signifikant erhöht werden kann. Eine ausreichende Zellmasse ist als ‚Inokulum‘ für

die erfolgreiche und nachhaltige Ansiedlung eines probiotischen Organismus im Darm absolut essentiell, damit der Organismus nicht direkt durch interspezifische Konkurrenten verdrängt wird. Darüber hinaus kann mit Hilfe des beschriebenen, stabilen Kultivierungssystems schnell getestet werden, wie *M. luminyensis* auf äußere Einflüsse reagiert, die bei der Verabreichung des ‚Archaebiotikums‘ zum Tragen kommen können (z. B. Sauerstoffeintrag). Im Zusammenhang mit *Faecalibacterium prausnitzii* beispielsweise ist bekannt, dass der anaerobe Organismus weniger Schaden durch Sauerstoff nimmt, wenn die Zellen mit Riboflavin und Cystein versetzt wurden (Khan *et al.* 2014). Deswegen werden die Verbindungen als Zusatzstoffe bei der Applizierung von probiotischen, anaeroben Organismen gehandelt, die während der Lagerung bzw. Verabreichung immer wieder Spuren von Sauerstoff ausgesetzt sein könnten. Ob sich derartige Verbindungen auch auf die Vitalität von *M. luminyensis* auswirken, könnte schnell und einfach getestet werden, da der Organismus nun zuverlässig kultiviert werden kann. Da außerdem große Teile des Stoffwechsels von *M. luminyensis* im Rahmen dieser Arbeit aufgeklärt wurden, kann der Organismus besser in das Ökosystem ‚Darm‘ eingeordnet werden. Da erwiesen ist, dass das Archaeon Methan als Stoffwechselprodukt generiert und die Verbindung nicht durch andere Darmorganismen genutzt werden kann, fördert die Methanproduktion nicht das Wachstum anderer Lebewesen in diesem Habitat, sodass nicht direkt in die trophischen Netzwerke anderer Darmbewohner eingegriffen wird. Außerdem könnten die Ergebnisse dieser Arbeit dazu beitragen, die Anforderungen von *M. luminyensis* an seinen Lebensraum besser zu verstehen, was ebenfalls wichtig ist, wenn der Organismus dauerhaft im Darm des Menschen angesiedelt werden soll.

4.3 Energiekonservierung in *M. luminyensis* – Ein Vergleich mit anderen methanogenen Organismen

Bereits kurz nach der Erstbeschreibung von *M. luminyensis* und der Einführung der Methanomassiliococcales als siebte methanogene Ordnung, erschienen umfangreiche bioinformatische Analysen der Genome von bereits sequenzierten Vertretern. So wurde am Beispiel von *Candidatus Methanoplasma termitum* versucht, den Stoffwechsel des Organismus anhand von bioinformatischen Daten zu rekonstruieren (Lang *et al.* 2015). Hypothesen zum Stoffwechsel von *Cd. M. termitum* und anderen Methanomassiliococcales, wie *M. luminyensis*, wurden allerdings bisher nicht durch biochemische Untersuchungen bestätigt. Die vorliegende Arbeit zielte deshalb darauf ab, den Stoffwechsel von *M. luminyensis* biochemisch zu untersuchen und bioinformatische Analysen sinnvoll zu ergänzen bzw. zu bestätigen. Dadurch wurde erstmals ein tieferer Einblick in die Energiekonservierung und Methanogenese von *M. luminyensis* möglich. Im Folgenden wird thematisiert, inwiefern sich die Methanomassiliococcales in Bezug auf bestimmte methanogene Schlüsselenzyme und Schlüsselreaktionen in die übrigen methanogenen Ordnungen einreihen. Darüber hinaus werden sich entscheidende Unterschiede zu anderen methanogenen Organismengruppen herauskristallisieren, wodurch der besondere Stellenwert der Ordnung Methanomassiliococcales innerhalb der methanogenen Archaeen deutlich wird.

4.3.1 Die Methyltransferase Mtr – Eine Apomorphie methanogener Archaeen?

M. luminyensis nutzt methylierte Verbindungen wie Methanol oder Methylamine als Substrate, was sich mit dem Substratspektrum methylotropher Methanarchaeen deckt. Ein Kernpunkt der methylotrophen Methanogenese ist die Erzeugung von Reduktionsäquivalenten durch oxidative Prozesse, die für die Methanbildung benötigt werden. Zur Generierung dieser Reduktionsäquivalente werden 25 % der Methylgruppen zu CO₂ oxidiert, während nur 75 % der Methylgruppen zu Methan reduziert werden (Welte und Deppenmeier 2014). Der oxidative Zweig ist für die methylotrophe Methanogenese essentiell, da der Stoffwechselweg F₄₂₀H₂ und Fd_{red} hervorbringt, die als Elektronendonoren zur Reduktion der Methylgruppen zu Methan (im reduktiven Zweig) benötigt werden. Aus Genomanalysen von *Cd. M. termitum* und *M. luminyensis* ging hervor, dass Gene, die für Schlüsselenzyme des methylotrophen Stoffwechsels kodieren, überraschenderweise nur teilweise vorzufinden sind (Lang *et al.* 2015), obwohl beide Organismen methylierte Verbindungen als Substrate nutzen. Insbesondere im Zusammenhang mit den Genen, die für Enzyme des oxidativen Zweigs der methylotrophen Methanogenese kodieren, ergibt sich eine besondere Situation, da die entsprechenden Gene in den Genomen der Methanomassiliicoccales vollständig fehlen (Lang *et al.* 2015) und es auf diese Weise nicht zur Generierung von Reduktionsäquivalente kommen kann. Dadurch ergibt sich die Abhängigkeit von *M. luminyensis* von H₂ als Elektronendonator (Dridi *et al.* 2012a; Lang *et al.* 2015), von dem methylotrophe, methanogene Organismen normalerweise unabhängig sind. Dies ist ein erster großer Unterschied zwischen *M. luminyensis* und methylotrophen Methanarchaeen.

Darüber hinaus zeigt sich in Bezug auf die Methyltransferase Mtr, welche Methylgruppen von Coenzym M auf H₄MPT überträgt und den initialen Schritt der Methylgruppenoxidation zu CO₂ katalysiert (Becher *et al.* 1992; Gottschalk und Thauer 2001; Gärtner *et al.* 1993), bei den Methanomassiliicoccales eine besondere Gegebenheit. Die Ordnung umfasst die ersten und bisher einzigen methanogenen Archaeen, die keine Methyltransferase Mtr besitzen. In allen übrigen bisher beschriebenen, methanogenen Vertretern konnten ohne Ausnahme Gene für diese Methyltransferase identifiziert werden (Fricke *et al.* 2006), sodass die *mtr*-Gene immer als eine grundlegende Apomorphie methanogener Organismen betrachtet wurden.

Bei der Methyltransferase Mtr handelt es sich um ein membranständiges Enzym, welches aus acht Untereinheiten (MtrA-H) besteht (Harms *et al.* 1995). Ein zentraler Bestandteil des Proteins ist die Corrinoiduntereinheit (MtrA), die die Methylgruppe, die bei der Demethylierung von Methyl-CoM bzw. Methyl-H₄MPT freigesetzt wird, kurzzeitig aufnimmt, bevor es schließlich zum Methylgruppentransfer auf H₄MPT bzw. HS-CoM kommt (Wagner *et al.* 2016). Die Methyltransferase Mtr ist in der Lage, sowohl die Demethylierung von Methyl-CoM und die Methylierung von H₄MPT, als auch die Rückreaktion zu katalysieren (Welte und Deppenmeier 2014). Welche Reaktionsrichtung bei einem bestimmten methanogenen Organismus zutrifft, hängt von der Art der Methanogenese ab.

In methylotrophen Methanarchaeen katalysiert die Methyltransferase Mtr den zweiseitigen Methylgruppentransfer von Coenzym M auf H₄MPT. Hierfür sind die Untereinheiten MtrH und MtrE essentiell, die die Methylgruppe über MtrA auf H₄MPT transferieren (Gottschalk und Thauer 2001;

Hippler und Thauer 1999; Gärtner *et al.* 1993). Die Reaktion ist energieaufwändig ($\Delta G^0 = +30 \text{ kJ mol}^{-1}$; Weiss *et al.* 1994), weshalb es an der Untereinheit MtrE während des Methylgruppentransfers zum Einstrom von Na^+ -Ionen ins Zellinnere kommt (Müller *et al.* 1990) und so Energie in Form des elektrochemischen Ionengradienten die endergone Reaktion antreibt. In hydrogenotrophen und acetiklastischen Methanarchaeen katalysiert die Mtr dagegen die Gegenreaktion, da diese Organismen CO_2 bzw. eine Methylgruppe zu Methan reduzieren und somit den oxidativen Zweig der methylotrophen Methanogenese in umgekehrter Reihenfolge durchführen (Gottschalk und Thauer 2001). In diesen methanogenen Archaeen kommt es nach der sukzessiven Reduktion von CO_2 bzw. nach der Umsetzung von Acetat bis zur Methylgruppe zum Mtr-abhängigen Transfer dieser Gruppe von H_4MPT auf Coenzym M (Becher *et al.* 1992), woran sich die finale Reduktion der Methylgruppe zu Methan an der Methyl-CoM-Reduktase anschließt (Ellermann *et al.* 1988). Im Gegensatz zur Gegenreaktion, dem Transfer der Methylgruppe von Coenzym M auf H_4MPT in methylotrophen, methanogenen Organismen, ist diese Reaktion exergon und setzt Energie frei ($\Delta G^0 = -30 \text{ kJ mol}^{-1}$). Diese wird zur Translokation von Na^+ -Ionen über die Cytoplasmamembran nach außen verwendet, sodass die Mtr in hydrogenotrophen und acetiklastischen, methanogenen Archaeen zum Aufbau des Membranpotentials beiträgt (Weiss *et al.* 1994; Wagner *et al.* 2016; Lienard *et al.* 1996). Interessanterweise wird das elektrochemische Potential in methanogenen Archaeen, die $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ als Substrate nutzen, allein durch die Translokation von Na^+ -Ionen aufgebaut und die Mtr ist das einzige Enzym, das Energie in Form des elektrochemischen Gradienten über der Cytoplasmamembran konserviert (Gottschalk und Thauer 2001). Die Organismen verfügen nicht über eine Atmungskette wie acetiklastische oder methylotrophe Methanarchaeen, bei denen verschiedene Enzyme zur Etablierung des elektrochemischen Membranpotentials beitragen (Welte und Deppenmeier 2014).

In allen ‚klassischen‘ methanogenen Organismen, die Acetat, $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ oder Methanol als Substrate nutzen, besteht der elektrochemische Gradient über der Cytoplasmamembran, der zur ATP-Synthese verwendet wird, entweder aus Protonen und Na^+ -Ionen (methanogene Archaeen mit Cytochromen; Schlegel *et al.* 2012a), oder allein aus Na^+ -Ionen (methanogene Archaeen ohne Cytochrome; Perski *et al.* 1982; Mountfort *et al.* 1986). Dadurch sind die Methanogenese und das Wachstum bei diesen Archaeen stets Na^+ -abhängig (Perski *et al.* 1981; Perski *et al.* 1982), jedoch nicht immer protonenabhängig. In Experimenten mit ruhenden Zellen zeigte sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit, dass eine Na^+ -Abhängigkeit in *M. luminyensis* nicht gegeben ist. Der Organismus wurde in Puffern mit unterschiedlichen Na^+ -Konzentrationen aufgenommen und es wurde untersucht, wie sich die Na^+ -Konzentrationen nach Zugabe der Substrate (Methanol + H_2) auf die Methanbildungsrate auswirken (3.3.4). Es war zu beobachten, dass die Methanbildungsrate des Organismus unabhängig von der Na^+ -Konzentration im Puffer war. Im Gegensatz dazu zeigte eine Kontrolle, in der die Methanbildung von *Ms. mazei* in Puffern mit unterschiedlichen Na^+ -Konzentrationen untersucht wurde, dass diese zunahm, je mehr Na^+ im Puffer enthalten war. Diesen Effekt wiesen Perski *et al.* (1982) und Blaut *et al.* (1987) bereits frühzeitig bei *Methanosarcina barkeri* nach, dessen Methanbildung mit Methanol als Substrat (aber nicht mit Methanol + H_2 ; Blaut *et al.* 1985) stark von der Na^+ -Konzentration abhing. Dies konnte ebenfalls in Experimenten mit den hydrogenotrophen Archaeen *Methanobacterium thermoautotrophicum* und *Methanobrevibacter arboriphilus*, sowie mit *Ms. barkeri* bei Wachstum auf

Acetat und $H_2 + CO_2$ beobachtet werden, sodass eine generelle Abhängigkeit aller methanogenen Stoffwechselwege von Na^+ postuliert wurde (Perski *et al.* 1982). Während Perski und Kollegen (1982) diese noch nicht auf die Mtr zurückführen konnten, ist heute klar, dass die Abhängigkeit der Methanogenese von Na^+ maßgeblich auf dieses Enzym zurückzuführen ist (Lienard *et al.* 1996; Weiss *et al.* 1994). Da *M. luminyensis* diese Abhängigkeit nicht zeigt, grenzen sich der Organismus und andere Methanomassiliicoccales klar von den übrigen bekannten methanogenen Organismen ab. Darüber hinaus zeigten Experimente, in denen ruhende Zellen mit dem Na^+ -Ionophor ETH157 versetzt wurden (3.3.4), dass der Zusatz von ETH157 weder einen Einfluss auf die Methanbildungsrate, noch auf die ATP-Syntheserate hat. Dies unterstreicht, dass der elektrochemische Gradient in *M. luminyensis* nicht aus Na^+ -Ionen besteht, welche die Mtr in acetiklastischen und hydrogenotrophen, methanogenen Archaeen über die cytoplasmatische Membran nach außen schleust (Müller *et al.* 1990; Welte und Deppenmeier 2014). Im Gegensatz dazu wirkte sich der Zusatz des Protonophors SF6847 stark auf die Methanbildungs- und die ATP-Syntheserate von *M. luminyensis* aus. Das Membranpotential wird demnach ausschließlich durch die Translokationen von Protonen über die Cytoplasmamembran generiert. Ein Organismus, der *M. luminyensis* zumindest in Bezug auf dessen Substrate entspricht und ebenfalls Methanol mit H_2 als Elektronendonator verstoffwechselt, ist *Methanosphaera stadtmanae* (Fricke *et al.* 2006). Aufgrund der ungewöhnlichen Substratkombination, die sonst nur aus den Methanomassiliicoccales bekannt ist, lässt sich fälschlicherweise vermuten, dass *M. stadtmanae* und die Methanomassiliicoccales ähnliche Stoffwechselwege vollziehen. Tatsächlich ist die Situation in *M. stadtmanae* jedoch eine andere, da der Organismus nicht nur über die *mtr*-Gene, die für die Methyltransferase kodieren, sondern auch über Gene für den gesamten oxidativen Zweig der methylotropen Methanogenese verfügt (Fricke *et al.* 2006). Die entsprechenden Enzyme scheinen an der Methanogenese zwar nicht direkt beteiligt zu sein, da der Organismus eine H_2 -abhängige, methylotrophe Methanogenese betreibt, sind jedoch prinzipiell vorhanden. Dadurch reiht sich *M. stadtmanae* im Gegensatz zu *M. luminyensis* und anderen Methanomassiliicoccales vielmehr in die ‚klassischen‘ methanogenen Gruppen ein (Ordnung: Methanobacteriales) und die Besonderheit der siebten methanogenen Ordnung, die keine *mtr*-Gene besitzen, wird noch einmal unterstrichen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Methanomassiliicoccales die ersten methanogenen Archaeen sind, die nicht über *mtr*-Gene verfügen, sodass die Gene zukünftig nicht mehr zur Abgrenzung von methanogenen Organismen zu nicht-methanogenen Archaeen verwendet werden können.

4.3.2 Die Methyl-CoM-Reduktase – Das Schlüsselenzym der Methanogenese

Generell ist es schwer, Apomorphien methanogener Archaeen festzulegen, da die sieben methanogenen Ordnungen aufgrund einer physiologischen Eigenschaft, der Methanbildung, und weniger ausgehend von phylogenetischen Gesichtspunkten zu einer Gruppe zusammengefasst werden. Obwohl sie einige Charakteristika teilen, bei denen es sich vornehmlich um methanogene Schlüsselenzyme handelt, bilden sie eine phylogenetisch diverse Gruppe. Ein Alleinstellungsmerkmal aller methanogenen Organismen ist die Methyl-CoM-Reduktase. Dieses Enzym katalysiert den finalen

Schritt der Methanogenese, indem es die Methylgruppe mit Coenzym B (HS-CoB) als Elektronendonator zu Methan reduziert (Wongnate und Ragsdale 2015; Ellermann *et al.* 1988).

Anhand der Untersuchungen mit ruhenden Zellen von *M. luminyensis*, die mit BES, einem Inhibitor der Methyl-CoM-Reduktase (Sparling und Daniels 1987; Gunsalus *et al.* 1978; Ellermann *et al.* 1988), versetzt wurden, konnte bewiesen werden, dass das Enzym auch in *M. luminyensis* eine Schlüsselrolle in der Methanogenese einnimmt. Wurden Zellen, die eine konstante Methanbildung über die Zeit zeigten, mit BES versetzt, kam es zur unmittelbaren Inhibierung der Methanbildung (3.3.5). Diese Beobachtung war darauf zurückzuführen, dass durch die Zugabe von BES spezifisch die Methyl-CoM-Reduktase in den Zellen inhibiert und die Reduktion des Substrates zu Methan verhindert wird. In Bezug auf dieses Enzym entspricht *M. luminyensis* daher den übrigen bekannten methanogenen Archaeen. Tatsächlich werden die Gene, die für die Methyl-CoM-Reduktase kodieren (*mcr*), häufig als Marker genutzt, um methanogene Archaeen in einer Umweltprobe mittels PCR nachweisen zu können, da alle Organismen der methanogenen Gruppe über dieses Enzym verfügen (Friedrich 2005). Im Gegensatz zur Methyltransferase Mtr kann die Methyl-CoM-Reduktase weiterhin als Apomorphie methanogener Archaeen betrachtet werden, da das Enzym auch in den Methanomassiliococcales zu finden ist.

Bei der Reaktion, die die Methyl-CoM-Reduktase katalysiert, wird nicht nur eine Methylgruppe zu Methan reduziert, sondern auch das Heterodisulfid bestehend aus CoM und CoB produziert. Dadurch wird der terminale Elektronenakzeptor aller methanogener Organismen, das Heterodisulfid, bereitgestellt. Die Methyl-CoM-Reduktase besteht aus einem Hexamer, welches drei verschiedene Untereinheiten (McrA-C) in jeweils zwei Kopien umfasst. Essentiell für die Funktionalität des Enzyms ist der Cofaktor F₄₃₀, der zweimal pro Hexamer gebunden wird (Ellefson und Wolfe 1981; Ermler *et al.* 1997). Es handelt sich hierbei um einen Porphyrinring, in dessen Zentrum ein redoxaktives Nickelion gebunden ist (Livingston *et al.* 1984; Färber *et al.* 1991; Pfaltz *et al.* 1982). Auf Grundlage der Kristallstruktur der Methyl-CoM-Reduktase konnte erstmals ein möglicher Katalysemechanismus postuliert werden (Ermler *et al.* 1997), der jedoch im Detail noch immer kontrovers diskutiert wird (Wongnate und Ragsdale 2015). Ermler und Kollegen (1997) postulierten, dass zunächst ein nukleophiler Angriff des redoxaktiven Nickelions an der Methylgruppe von Methyl-CoM erfolgt und der Elektronentransfer auf die Methylgruppe im Anschluss passiert. Ein zweites Modell schlägt dagegen vor, dass es zunächst zur homolytischen Spaltung von Methyl-CoM kommt und das Nickelion zunächst Coenzym M bindet (Chen *et al.* 2012). Im Zuge dieser Reaktion wird ein Methylradikal gebildet, welches durch die Aufnahme eines Elektrons zu Methan reduziert wird. Obwohl über die initialen Schritte der Katalyse wenig bekannt ist, konnten Wongnate und Ragsdale (2015) beweisen, dass zunächst die Bindung von Methyl-CoM und erst dann die Bindung von HS-CoB im aktiven Zentrum erfolgt. Diese Reihenfolge ist für den Katalysemechanismus essentiell. Darüber hinaus gilt es als erwiesen, dass die Reduktion des redoxaktiven Nickelions, das während der katalysierten Reaktion verschiedene Oxidationsgrade annimmt, zur Bildung radikalischer Intermediate von Methyl-CoM und HS-CoB führt (Wongnate *et al.* 2016). Diese sind für die weiteren Reaktionsschritte ausschlaggebend.

Trotz der cytoplasmatischen Lokalisation der Methyl-CoM-Reduktase ist diese dennoch maßgeblich an der Energiekonservierung beteiligt. Da das Redoxpotentialgefälle zwischen dem Elektronendonator

MPh_{red} (-165 mV; Tietze *et al.* 2003) und dem Elektronenakzeptor Heterodisulfid (-143 mV; Tietze *et al.* 2003) an der membranständigen Heterodisulfidreduktase nur sehr gering ist, wird nur wenig Energie während der Redoxreaktion freigesetzt (-4,2 kJ mol⁻¹; Deppenmeier und Müller 2007). Normalerweise würde dieser Energiebetrag nicht ausreichen, um Protonen über die Cytoplasmamembran zu translozieren, was jedoch experimentell widerlegt wurde, da die Heterodisulfidreduktase dennoch Protonen transloziert (Ide *et al.* 1999). Es wird angenommen, dass die Methyl-CoM-Reduktase maßgeblich dazu beiträgt, dass die Heterodisulfidreduktase Protonen über die Membran translozieren kann, indem das Enzym die Konzentration an Heterodisulfid in der Zelle konstant hochhält. Dies bewirkt eine Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts an der Heterodisulfidreduktase auf die Seite der Substrate. Durch die Konzentrationsdifferenz zwischen Substraten und Produkten kommt es zur Steigerung der freien Energie, sodass es schließlich zur Translokation von zwei Protonen pro zwei transferierte Elektronen kommen kann (Deppenmeier und Müller 2007).

4.3.3 Der Zusammenhang zwischen Hydrogenasen, Ferredoxinen und H₂

Besonders vielfältig ist der Metabolismus von *M. luminyensis* im Hinblick auf die Hydrogenasen. Diese spielen in fast allen methanogenen Organismen eine entscheidende Rolle und sind dort i. d. R. maßgeblich an der Energiekonservierung beteiligt (Thauer *et al.* 2010). Der Organismus *M. luminyensis* besitzt zahlreiche Gene, die für Hydrogenasen kodieren. Neben Genen, die für die lösliche Mvh-Hydrogenase und eine Typ 3-Hydrogenase kodieren, sind zwei Gencluster vorhanden, von denen sich Ech-Hydrogenasen ableiten lassen (Lang *et al.* 2015; Kröninger *et al.* 2016).

Die Ech-Hydrogenasen gehören zu den Energie-konservierenden Hydrogenasen, da diese Enzyme zur Etablierung des elektrochemischen Potentials beitragen und Homologien zum Komplex I der Atmungskette zeigen (Friedrich und Scheide 2000). Diese Hydrogenasen bestehen aus jeweils sechs Untereinheiten (EchA-F) und besitzen ein [NiFe]-Reaktionszentrum, welches kovalent gebunden wird (Künkel *et al.* 1998). Zur Weitergabe von Elektronen innerhalb des Enzyms verfügen bestimmte Untereinheiten über [4Fe-4S]-Cluster, die die Elektronen vom Elektronendonator zum -akzeptor leiten (Meuer *et al.* 1999). Bereits kurz nach der erstmaligen Isolierung einer Ech-Hydrogenase aus *Ms. barkeri* (Künkel *et al.* 1998) wurde aufgrund der Ähnlichkeit des Enzyms zur Typ 3-Hydrogenase aus *E. coli* vermutet, dass Ech-Hydrogenasen H₂ generieren. Die Typ 3-Hydrogenase ist in *E. coli* Teil der Formiat-Hydrogenlyase, einem Enzym, welches aus Formiat H₂ und CO₂ produziert und vermutlich Protonen über die cytoplasmatische Membran nach außen schleust (Andrews *et al.* 1997; Bagramyan und Trchounian 2003; McDowall *et al.* 2014; Kim *et al.* 2010). Aufgrund der Beobachtung, dass *Ms. barkeri* bei Wachstum auf Acetat Ferredoxine mit [4Fe-4S]-Clustern zur Methanogenese benötigt (Fischer und Thauer 1990), wurde zunächst postuliert und schließlich belegt, dass Fd_{red} als Elektronendonator der Ech-Hydrogenase fungiert (Meuer *et al.* 1999; Welte *et al.* 2010a). Da an invertierten Vesikeln der *Ms. mazei* Δ *ech*-Mutante im Gegensatz zum *Ms. mazei*-Wildtyp keine ATP-Bildung mit Fd_{red} als Elektronendonator in Abwesenheit von Heterodisulfid nachgewiesen wurde, wurde gefolgert, dass sich die *knockout*-Mutation direkt auf die Etablierung des Membranpotentials auswirkte

(Welte *et al.* 2010a). Daraus entstand die Hypothese der maßgeblichen Beteiligung der Ech-Hydrogenase an der Energiekonservierung. Durch die Hemmung der Fd_{red} -abhängigen ATP-Bildung bei invertierten Vesikeln des *Ms. mazei*-Wildtyps durch das Protonophor SF6847 und nicht durch das Na^+ -Ionophor ETH157 wurde abgeleitet, dass die Ech-Hydrogenase lediglich Protonen und nicht Na^+ -Ionen zur Energiekonservierung über die Membran transloziert (Welte *et al.* 2010b).

Ferredoxin (Fd) stellt in allen methanogenen Organismen einen zentralen und essentiellen Elektronenüberträger dar. Während Fd_{red} in acetiklastischen Methanarchaeen im Zuge der Umsetzung von Acetat an der CO-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthase generiert wird (Ferry 1992), wird es in methylophilen, methanogenen Organismen im Rahmen des oxidativen Zweigs der Methanogenese produziert (Welte und Deppenmeier 2014). Eine dritte Möglichkeit der Fd_{red} -Generierung ist in hydrogenotrophen, methanogenen Archaeen zu finden, die über einen Enzymkomplex verfügen, der die energetisch ungünstige Fd_{ox} -Reduktion durch Kopplung an die stark exergone Heterodisulfidreduktion ermöglicht (Kaster *et al.* 2011). Bei diesem Komplex handelt es sich um den Mvh/Hdr-Komplex (Wagner *et al.* 2017). In *M. luminyensis* wurde durch das Vorhandensein der Gene, die für die Mvh-Hydrogenase (*mvhADG*) und die lösliche Heterodisulfidreduktase kodieren (*hdrABC*), postuliert, dass der Mvh/Hdr-Komplex eine Schlüsselrolle in der Energiekonservierung des Organismus einnimmt. Diese Hypothese wurde durch Transkriptionsstudien gestützt (3.3.1), da von den Genen, die für die Mvh-Hydrogenase bzw. die lösliche Heterodisulfidreduktase kodieren, bei Wachstum auf Methanol + H_2 hohe Transkriptmengen vorlagen. Darüber hinaus bewiesen enzymatische Tests, dass das Cytoplasma von *M. luminyensis* hohe Hydrogenase- und Heterodisulfidreduktase-Aktivitäten aufwies (3.3.3.1, 3.3.3.2), was die Hypothese untermauerte, dass die lösliche Hydrogenase (MvhADG) und die lösliche Heterodisulfidreduktase (HdrABC) eine zentrale Aufgabe im Metabolismus einnehmen. Ein Durchbruch auf dem Gebiet der methanogenen Energiekonservierung war die Entdeckung, dass der Mvh/Hdr-Komplex eine sogenannte Bifurkationsreaktion katalysiert (Kaster *et al.* 2011). Hierbei handelt es sich um eine Redoxreaktion, bei der die Elektronen, die von einem einzigen Elektronendonator stammen, auf zwei unterschiedliche Elektronenakzeptoren übertragen und somit ‚aufgeteilt‘ werden. Am Mvh/Hdr-Komplex wird H_2 als Elektronendonator verwendet. H_2 ist in hydrogenotrophen Organismen und ebenso in *M. luminyensis* und anderen Vertretern der Methanomassiliococcales zum Wachstum unerlässlich (Lang *et al.* 2015; Dridi *et al.* 2012a), was aus der Notwendigkeit hervorgeht, dass es am bifurkierenden Komplex als Elektronendonator fungiert. Nach der Oxidation von H_2 , welche am [NiFe]-Zentrum in MvhA stattfindet, werden die Elektronen über verschiedene Eisen-Schwefel-Cluster der Untereinheiten MvhG, HdrA und MvhD sukzessive bis zum zentralen Flavin-Molekül der Heterodisulfidreduktase-Untereinheit HdrA transferiert (Wagner *et al.* 2017). Am Flavin kommt es zur Aufteilung der Elektronen, da diese nun einerseits über weitere Eisen-Schwefel-Cluster, die durch HdrA koordiniert werden, zur Ferredoxin-reduzierenden Domäne von HdrA weitergeleitet werden und es zur Reduktion von Fd_{ox} kommt. Andererseits werden zeitgleich Elektronen ausgehend vom Flavin über die Heterodisulfidreduktase-Untereinheiten HdrB und HdrC, welche [4Fe-4S]-Cluster und sogenannte nicht-kubane Eisen-Schwefel-Cluster als Elektronentransfermodule enthalten, zur Heterodisulfidreduktase-Domäne transferiert (Wagner *et al.* 2017). Hier kommt es zur Reduktion des Heterodisulfids, wobei diese Reaktion aufgrund des Redoxpotentialgefälles zwischen H_2 (-420 mV) und

Heterodisulfid (-143 mV; Tietze *et al.* 2003) exergon ist und somit Energie freisetzt. Das Redoxpotential von Fd (- 500 mV; Kaster *et al.* 2011) ist unter physiologischen Bedingungen deutlich niedriger als das von H₂, sodass eine H₂-abhängige Fd_{ox}-Reduktion unter Standardbedingungen energetisch nicht möglich ist. Da jedoch die gleichzeitig katalysierte Heterodisulfidreduktion Energie bereitstellt, kann der Elektronenfluss entgegen des Redoxpotentialgefälles auf Fd_{ox} erfolgen. Somit ist das Heterodisulfid als Elektronenakzeptor für die Fd_{ox}-Reduktion am Mvh/Hdr-Komplex absolut essentiell. Hinweise auf diesen Sachverhalt ergaben sich bereits sehr früh, da Gunsalus und Wolfe (1977) feststellten, dass die CO₂-Reduktion in hydrogenotrophen Methanarchaeen maßgeblich von der Methyl-CoM-Reduktase, die die Produktion von Heterodisulfid katalysiert, abhängt. Erst später wurde dies jedoch auf die Bifurkation am Mvh/Hdr-Komplex zurückgeführt, bei der das Heterodisulfid als Elektronenakzeptor fungiert (Kaster *et al.* 2011).

4.3.4 Der Redozyklus von Ferredoxin in *M. luminyensis*

Ferredoxin ist ein zentraler Elektronenüberträger aller methanogener Organismen. In methanogenen Archaeen sind verschiedene Mechanismen beschrieben, die zur Generierung von reduziertem Ferredoxin (Fd_{red}) führen. Aufgrund des sehr niedrigen Redoxpotentials (-500 mV; Kaster *et al.* 2011) kann Fd_{ox} unter physiologischen Bedingungen nur schwer reduziert werden. In hydrogenotrophen Methanarchaeen ist der Mvh/Hdr-Komplex für die Generierung von Fd_{red} verantwortlich, der auch im Genom von *M. luminyensis* kodiert ist. An diesem Komplex wird die endergone Fd_{ox}-Reduktion ermöglicht, indem zeitgleich die exergone Heterodisulfidreduktion katalysiert wird, die Energie zur Reduktion von Fd_{ox} bereitstellt. Dabei fungiert H₂ als Elektronendonator und die Aufteilung der Elektronen von einem Elektronendonator auf zwei Elektronenakzeptor wird unter dem Begriff ‚Bifurkation‘ erfasst (Kaster *et al.* 2011). Da der Mvh/Hdr-Komplex in *M. luminyensis* im Vergleich zu dem Komplex hydrogenotropher, methanogener Organismen große Übereinstimmungen zeigt, kann angenommen werden, dass dieser die gleichen Reaktionen katalysiert. Aufgrund der Transkriptionsstudien (3.3.1) und der enzymatischen Tests (3.3.3) wurde gefolgert, dass der Komplex in *M. luminyensis* in der Tat direkt an der Methanogenese beteiligt ist und eine Schlüsselrolle bei der Energiekonservierung spielt. Dabei erzeugt der Komplex Fd_{red}, welches der zentrale Elektronenüberträger zwischen den Enzymen der Methanogenese und dem Ionentranslokationsapparat in der Membran ist. Dies unterstreicht die Wichtigkeit des Eisen-Schwefel-Proteins im Stoffwechsel von *M. luminyensis*.

Die Generierung von Fd_{red} im Stoffwechsel des Organismus führte zu der Frage, wie der Elektronenüberträger regeneriert bzw. erneut oxidiert wird, damit es nicht zum Erliegen des Metabolismus kommt. Die Regenerierung/Oxidation von reduzierten Elektronenüberträgern ist in methanogenen Organismen mit Cytochromen an membranständige Enzyme gekoppelt, welche die Elektronen, die bei der Oxidation der reduzierten Verbindungen frei werden, in die Atmungskette einschleusen (Welte und Deppenmeier 2014). Im Gegensatz dazu besitzen hydrogenotrophe Methanarchaeen ohne Cytochrome keine membrangebundene Atmungskette. Bei diesen Organismen wird Fd_{red} im ersten Schritt der CO₂-Reduktion, bei der Generierung von Formyl-Methanofuran (Formyl-

MFR) durch die Formyl-MFR-Dehydrogenase (Karrasch *et al.* 1989), oxidiert und kann dem bifurkierenden Komplex auf diese Weise erneut als Elektronenakzeptor zur Verfügung stehen (Kaster *et al.* 2011). Aufgrund der Homologie des Mvh/Hdr-Komplexes von *M. luminyensis* zu dem Komplex hydrogenotropher, methanogener Organismen und der hohen Aktivität des Komplexes bei Wachstum auf Methanol + H₂, lag die Vermutung auf der Hand, dass Fd_{red} in *M. luminyensis* wie in hydrogenotrophen Methanarchaeen durch lösliche Proteine oxidiert wird. In *M. luminyensis* fehlt jedoch die Formyl-MRF-Dehydrogenase, die Fd_{red} oxidiert und Elektronen auf CO₂ überträgt (Karrasch *et al.* 1989). Diese Besonderheit hob *M. luminyensis* klar von den Organismen ab, die H₂ + CO₂ als Substrate zur Methanproduktion nutzen.

In Methan-produzierenden Archaeen mit Cytochromen sind andere Wege bekannt, in denen Fd_{red} oxidiert und Fd_{ox} somit wieder als Elektronenakzeptor verfügbar gemacht wird. In diesem Zusammenhang ist zum einen der Rnf-Komplex aus *Ms. acetivorans* zu nennen (Wang *et al.* 2011a), der bei Prokaryonten weit verbreitet ist und erstmals in *Rhodobacter capsulatus* beschrieben wurde. Dort spielt der Komplex bei der Stickstofffixierung als Überträger von Elektronen zur Nitrogenase eine entscheidende Rolle (Schmehl *et al.* 1993). Der Rnf-Komplex besteht aus sechs Untereinheiten (RnfA-E, RnfG), die Eisen-Schwefel-Cluster und Flavine zur Weitergabe von Elektronen enthalten (Biegel *et al.* 2011). Der Komplex ist in *Ms. acetivorans* zentraler Bestandteil der membrangebundenen Atmungskette bei Wachstum auf Acetat und maßgeblich an der Energiekonservierung beteiligt (Li *et al.* 2006). Während der Reaktion, die der Komplex katalysiert, wird Fd_{red} oxidiert und Elektronen auf MPh_{ox} übertragen (Schlegel *et al.* 2012b). Aufgrund des Redoxpotentialgefälles zwischen Fd_{red} und MPh_{ox} wird im Zuge dieser Reaktion Energie freigesetzt, die zur Translokation von Ionen über die cytoplasmatische Membran verwendet wird. Anhand von Experimenten mit invertierten Membranvesikeln konnten Schlegel *et al.* (2012) belegen, dass der Rnf-Komplex spezifisch Na⁺-Ionen über die Membran pumpt, was zu dem natriumreichen Habitat von *Ms. acetivorans* passt, da der Organismus in anoxischen Meerwassersedimenten zu finden ist (Li *et al.* 2006). Aufgrund der Tatsache, dass der Rnf-Komplex Fd_{red} oxidieren kann, wurde dieser als Fd_{red}-oxidierendes Enzym in *M. luminyensis* in Betracht gezogen. Allerdings fehlen *M. luminyensis* Gene, die für einen Rnf-Komplex kodieren, sodass ausgeschlossen werden kann, dass die Oxidation von Fd_{red} in diesem Archaeon Rnf-abhängig erfolgt. Darüber hinaus wurde widerlegt, dass das Membranpotential in *M. luminyensis* aus Na⁺-Ionen besteht, da der Zusatz des Na⁺-Ionophors ETH157 weder auf die Methanbildung, noch auf die ATP-Syntheserate ruhender Zellen einen Einfluss hatte (3.3.4). Auf Grundlage dieser Experimente konnte zusätzlich ausgeschlossen werden, dass eine dem Rnf-Komplex funktionell ähnliche, bisher nicht beschriebene Struktur die Fd_{red}-Oxidation in *M. luminyensis* an die Na⁺-Translokation koppelt.

Ein weiterer Mechanismus zur Fd_{red}-Oxidation ist in *Methanosarcina*-Arten zu finden, die in anoxischen Süßwassersedimenten zu finden sind. In diesen Arten fällt nicht dem Rnf-Komplex, sondern den sogenannten Energie-konservierenden Hydrogenasen (Ech) die Funktion der Fd_{red}-Oxidation zu, die in Kapitel 4.3.3 bereits kurz vorgestellt wurden (Meuer *et al.* 1999; Meuer *et al.* 2002; Welte *et al.* 2010b). In *Ms. mazei* sind Ech-Hydrogenasen gut untersucht, da sie zentraler Bestandteil der Energiekonservierung sind. In diesem Organismus wird Fd_{red} bei der Verstoffwechslung von Acetat an

der CO-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthase bzw. während der methylotrophen Methanogenese während der Oxidation der Methylgruppe zu CO₂ generiert (Welte und Deppenmeier 2014). Darüber hinaus verfügen *Methanosarcina* spp. über Gene, die für den Mvh/Hdr-Komplex kodieren (Buan und Metcalf 2010), der in hydrogenotrophen Methanarchaeen für die Reduktion von Fd_{ox} verantwortlich ist (Kaster *et al.* 2011). Die genaue Funktion des Mvh/Hdr-Komplexes ist in den Methanosarcinales jedoch unbekannt, da die Organismen den Komplex lediglich während der methylotrophen Methanogenese nutzen (Buan und Metcalf 2010). Die generelle Abundanz von Fd_{red} in allen Stoffwechselwegen von *Ms. mazei* belegt dessen Wichtigkeit für den methanogenen Metabolismus als einer der zentralen Elektronenüberträger. Die Oxidation von Fd_{red}, wodurch dieses wieder Fd_{ox}-reduzierenden Enzymen zugeführt werden kann, findet in *Ms. mazei* an der Ech-Hydrogenase statt, die Teil der membrangebundenen Atmungskette ist (Welte *et al.* 2010a; Welte *et al.* 2010b). Kommt es zur Oxidation von Fd_{red} an der Ech-Hydrogenase, werden die Elektronen auf Protonen übertragen und es wird H₂ generiert (Meuer *et al.* 1999). Da das Redoxpotentialgefälle zwischen Fd_{red} (-500 mV; Kaster *et al.* 2011) und Protonen (-420 mV) nur verhältnismäßig gering ist, setzt die Redoxreaktion nur einen relativ geringen Energiebetrag frei (-19,3 kJ mol⁻¹; Welte *et al.* 2010a), der jedoch zur Translokation von einem Proton über die cytoplasmatische Membran ausreicht. Da der Rnf-Komplex drei Na⁺-Ionen über die Membran transloziert (Schlegel *et al.* 2012b; Welte und Deppenmeier 2014), erscheint der Beitrag, den die Ech-Hydrogenase mit nur einem translozierten Proton zum Membranpotential leistet, gering. Bei der Bewertung der Energiebilanz und der Effektivität der beiden Fd_{red}-oxidierenden Enzyme (Ech und Rnf) muss jedoch auch die H₂-Generierung an der Ech-Hydrogenase im Zellinneren in Betracht gezogen werden. H₂ kann aufgrund seiner Größe und Ladung frei über die Cytoplasmamembran nach außen diffundieren und an der Vho-Hydrogenase, einer weiteren Hydrogenase in *Ms. mazei*, reoxidiert werden (Welte *et al.* 2010a; Ide *et al.* 1999). Die Vho-Hydrogenase ist wie die Ech-Hydrogenase Bestandteil der Atmungskette und reduziert MPh_{ox}, wobei es sich um den membranlöslichen Elektronenüberträger in methanogenen Organismen mit einer Atmungskette handelt (Brodersen *et al.* 1999). Die Vho-Hydrogenasen bestehen aus drei Untereinheiten (VhoGAC; Deppenmeier *et al.* 1995), wobei die membranständige Untereinheit (VhoC) ein *b*-Typ-Häm bindet, über das die Elektronen auf MPh_{ox} übertragen werden (Ide *et al.* 1999). Durch die Oxidation von H₂ an der Außenseite der Cytoplasmamembran werden außen Protonen freigesetzt, die zur Etablierung des Protonengradienten über der Membran beitragen. H₂ kann dabei wiederum aus dem Zellinneren stammen, wenn es durch die Ech-Hydrogenase erzeugt wurde. Da pro Molekül Fd_{red}, das an der Ech-Hydrogenase oxidiert wird, ein Proton aktiv nach außen transloziert und ein Molekül H₂ generiert wird, das nach außen diffundieren und an der Vho-Hydrogenase zu zwei Protonen oxidiert werden kann, ergeben sich in Summe letztendlich auch drei Protonen, die durch das Zusammenspiel der Ech- und der Vho-Hydrogenase über die Membran geschleust werden (Welte *et al.* 2010b). Insofern entspricht die Energiebilanz der Ech-Hydrogenase in Kombination mit der Vho-Hydrogenase jener des Rnf-Komplexes. In *Ms. acetivorans* und *Ms. mazei* haben sich in Bezug auf energetische Gesichtspunkte folglich gleichwertige Enzyme zur Oxidation von Fd_{red} entwickelt.

Während der Rnf-Komplex in *M. luminyensis* nicht kodiert ist, verfügt der Organismus interessanterweise über zwei Gencluster, die für Ech-Hydrogenasen kodieren. Aus diesem Grund lag

zu Beginn der Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit angestellt wurden, die Vermutung nah, dass die Ech-Hydrogenasen maßgeblich an der Oxidation von Fd_{red} in *M. luminyensis* beteiligt sind, welches durch den Mvh/Hdr-Komplex generiert wird. Aber sowohl die Transkriptionsstudien (3.3.1), als auch die enzymatischen Tests (3.3.3.1) widerlegten diese Hypothese. Beide Gene, die jeweils ein Ech-Hydrogenase-kodierendes Gencluster bei der quantitativen RT-PCR repräsentierten (*echB*, *ech2B*), zeigten im Vergleich zum Referenzgen sehr geringe Transkriptabundanz, was widerspiegelte, dass diese Gene nur sehr schwach exprimiert wurden (3.3.1). Darüber hinaus konnte mit Hilfe enzymatischer Tests gezeigt werden, dass die Membranfraktion, in der Ech-Hydrogenasen normalerweise lokalisiert sind (Meuer *et al.* 1999), nur eine äußerst geringe Hydrogenase-Aktivität aufwies (3.3.3.1). Es wurde deshalb trotz der zweifachen Ausführung der *ech*-Gene im Genom ausgeschlossen, dass Ech-Hydrogenasen maßgeblich am Energiestoffwechsel von *M. luminyensis* beteiligt sind. Diese Schlussfolgerung warf gleichzeitig die Frage auf, welche Funktion die Ech-Hydrogenasen in *M. luminyensis* besitzen, wenn eine Beteiligung im Katabolismus ausgeschlossen wird.

4.3.4.1 Exkurs in den Anabolismus – Die Rolle der Ech-Hydrogenasen

Aufgrund der Entdeckung, dass die Ech-Hydrogenasen in *M. luminyensis* nicht direkt an der Energiekonservierung beteiligt sind, stellte sich die Frage, wofür der Organismus über derartige Hydrogenasen verfügt. Die Ech-Hydrogenase katalysiert nicht nur die Fd_{red} -abhängige H_2 -Produktion, sondern auch die Gegenreaktion, in der Fd_{red} mit H_2 als Elektronendonator erzeugt wird (Meuer *et al.* 1999). Die treibende Kraft für den Elektronentransport entgegen des Redoxpotentialgefälles ist das elektrochemische Membranpotential, mit dessen Hilfe die endergone Fd_{ox} -Reduktion ermöglicht wird. Dieser Prozess wird auch als ‚reverser Elektronentransport‘ bezeichnet. In *Ms. barkeri* ist die Generierung von Fd_{red} durch die Ech-Hydrogenase gut beschrieben und es ist bekannt, dass Fd_{red} als Elektronendonator in verschiedenen Prozessen des Katabolismus, aber auch des Anabolismus fungiert (Hedderich und Forzi 2005). Auf Grundlage von Studien mit einer *Ms. barkeri*-Mutante, in der die Ech-Hydrogenase-kodierenden Gene deletiert wurden, konnte gezeigt werden, dass Fd_{red} der Elektronendonator für eine Vielzahl an löslichen Enzymen ist (Meuer *et al.* 2002). Zum einen liefert Fd_{red} Elektronen an die Formyl-MFR-Dehydrogenase, welche den initialen Reduktionsschritt von CO_2 während der hydrogenotrophen Methanogenese katalysiert, zum anderen stellt Fd_{red} Elektronen für die CO-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthase bereit (Ragsdale und Kumar 1996). Dieser Enzymkomplex benötigt Fd_{red} , wenn CO_2 zu Acetyl-CoA reduziert wird, z. B. beim autotrophen Wachstum (Hedderich und Forzi 2005). Acetyl-CoA kann in den Anabolismus eingehen und dem Aufbau von Zellmasse dienen (Simpson und Whitman 1993). Als weiteres Beispiel für ein Enzym des Anabolismus, das Elektronen aus der Oxidation von Fd_{red} bezieht, ist die Pyruvat: Fd -Oxidoreduktase zu nennen. Hierbei handelt es sich um ein Protein, das Acetyl-CoA und CO_2 mit Fd_{red} als Elektronendonator zu Pyruvat reduziert (Bock *et al.* 1996), sodass Pyruvat im Anschluss in den Anabolismus einfließen kann. Bei der Generierung von Pyruvat bzw. bei der Reduktion von CO_2 ist Fd_{red} aufgrund seines sehr niedrigen Redoxpotentials durch keinen anderen Elektronendonator ersetzbar. Da die Redoxpotentiale der Redoxpaare Formyl-MFR/ CO_2 bzw. Pyruvat+CoA/Acetyl-CoA+ CO_2 bei -500 bis -530 mV liegen (Hedderich und Forzi 2005),

ist ein Elektronendonator mit einem besonders niedrigen Redoxpotential, wie Fd_{red} , für die Redoxreaktionen unerlässlich. Somit wird klar, dass Ech-Hydrogenasen in methanogenen Organismen eine duale Funktion haben. Entweder sind diese Hydrogenasen maßgeblich an der Etablierung des Membranpotentials beteiligt, da sie Protonen aktiv nach außen translozieren bzw. Wasserstoff generieren, der außen von der Vho-Hydrogenase oxidiert werden kann. In diesem Fall fungiert Fd_{red} als Elektronendonator. Andererseits spielen die Ech-Hydrogenasen beim Anabolismus eine entscheidende Rolle, da sie die Zelle mit reduzierten Elektronenüberträgern mit einem sehr niedrigen Redoxpotential versorgen. Hierbei wird Fd_{red} mit H_2 als Elektronendonator generiert und die ionenmotorische Kraft über der cytoplasmatischen Membran als Triebkraft eingesetzt. Beide Prozesse finden nie gleichzeitig statt, sondern die Ech-Hydrogenasen nehmen immer nur eine der Funktionen an.

Da in *M. luminyensis* bei Wachstum auf Methanol + H_2 Ech-Hydrogenasen-kodierende Gene nur geringe Transkriptabundanzen zeigten (3.3.1) und die Hydrogenase-Aktivität in der Membranfraktion des Organismus gering war (3.3.3.1), wurde eine Beteiligung der Ech-Hydrogenasen am Energiestoffwechsel des Organismus ausgeschlossen. Vielmehr schien die Generierung von Fd_{red} die Hauptfunktion dieser Enzyme bei den untersuchten Wachstumsbedingungen zu sein. Dass Ech-Hydrogenasen auch die Reduktion von Fd_{ox} mit H_2 als Elektronendonator katalysieren können und die ionenmotorische Kraft diese Reaktion antreibt, wurde bereits für *Ms. barkeri* hypothetisiert (Meuer *et al.* 2002). Der Organismus verwendet Fd_{red} als Elektronendonator zwar größtenteils in der Methanogenese, aber auch zu sehr geringen Teilen bei autotrophem Wachstum. Im Gegensatz zu *Ms. barkeri* ist *M. luminyensis* jedoch nicht autotroph. Dies bedeutet, dass der Organismus kein CO_2 fixieren und als Kohlenstoffquelle zum Aufbau von Zellmasse nutzen kann. *Ms. barkeri* reduziert CO_2 unter verschiedensten Wachstumsbedingungen schrittweise zu Acetyl-CoA bzw. Pyruvat mit Fd_{red} als Elektronendonator (Meuer *et al.* 2002). Demgegenüber sind im Genom von *M. luminyensis* jedoch Gene zu finden, die jeweils für eine Acetyl-CoA-Synthetase kodieren (WP_019178160.1, WP_019176986.1, WP_019176334.1). Dieses Enzym ist in *Methanosaeta thermoacetophila* gut beschrieben, da es den initialen Schritt der Acetatverstoffwechslung, die ATP-abhängige Acetataktivierung, katalysiert (Berger *et al.* 2012). Da in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, dass der Acetatgehalt im Medium beim Wachstum von *M. luminyensis* sukzessive bis zum Erreichen der stationären Phase abnahm und der Acetatverbrauch direkt mit der Generierung von Zellmasse korrelierte (3.1.1), wurde Acetat als primäre Kohlenstoffquelle identifiziert. Da Acetat aufgrund des niedrigen pK_s -Wertes von 4,75 unter physiologischen Bedingungen vorwiegend deprotoniert vorliegt und die deprotonierte Form nicht über die Cytoplasmamembran diffundieren kann, ist ein Transportsystem essentiell, das Acetat in die Zelle einschleust. Da der Acetattransporter MM_0903 in *Ms. mazei* bereits beschrieben ist (Welte *et al.* 2014), war es möglich, in *M. luminyensis* basierend auf BLASTp-Analysen (Altschul *et al.* 1990) ebenfalls Acetattransportproteine auszumachen (WP_019178125.1, WP_019177344.1, WP_026069096.1). Wird Acetat über eines der putativen Transportsysteme eingeschleust, kommt es zur Aktivierung von Acetat durch die Acetyl-CoA-Synthetase, wobei ATP in AMP + PP_i hydrolysiert wird. Die Acetataktivierung ist folglich energieaufwendig, was später bei der Betrachtung der Energiebilanz von *M. luminyensis* noch interessant wird, da der Organismus am energetischen Limit lebt, das noch Leben ermöglicht. Nach der Generierung von Acetyl-CoA kann dieses entweder direkt in den Citrat-Zyklus einfließen, der in allen

Methanomassiliicoccales unvollständig ist (Lang *et al.* 2015), oder mit Hilfe von Fd_{red}, das die Ech-Hydrogenasen bereitstellen, zu Pyruvat reduziert werden. In der Tat enthält das Genom von *M. luminyensis* Gene, die für eine Pyruvat:Fd-Oxidoreduktase (POR) kodieren (*porA*, WP_019177572.1; *porB*, WP_019177571.1; *porC*, WP_026068932.1; *porD*, WP_019177573.1), sodass dieser Weg wahrscheinlich erscheint. Pyruvat wiederum kann weiter zu Phosphoenolpyruvat phosphoryliert werden oder als Vorläufer in die Biosynthese weiterer organischer Säuren (z. B. Oxalacetat) einfließen. Interessanterweise besitzen alle bekannten Vertreter der Methanomassiliicoccales Gene, die für Enzyme der Gluconeogenese kodieren, sodass angenommen werden kann, dass über diesen Stoffwechselprozess die Generierung von C6-Zuckern erfolgt. Diese werden beim Wachstum benötigt, da Zucker beispielsweise Bestandteile des S-Layers sind, der die archaeele Zelle umgibt und glykosylierte Proteine enthält (Albers und Meyer 2011).

4.3.5 Kombination verschiedener Heterodisulfidreduktasen

In methanogenen Archaeen sind zwei Wege realisiert, mit deren Hilfe das Heterodisulfid, der terminale Elektronenakzeptor methanogener Organismen, reduziert werden kann. Beide Wege umfassen sogenannte Heterodisulfidreduktasen, die zwar sich zwar in der Funktion ähneln, aber im Aufbau voneinander abweichen.

Aus methanogenen Vertretern ohne Cytochrome ist die lösliche Heterodisulfidreduktase (HdrABC) bekannt. Diese bildet zusammen mit der Mvh-Hydrogenase (s. o.) einen Komplex, der H₂ oxidiert und Elektronen auf das Heterodisulfid, sowie auf Fd_{ox} überträgt (Kaster *et al.* 2011; Wagner *et al.* 2017). In methanogenen Archaeen mit Cytochromen ist dagegen ein membranständiger, Heterodisulfid-reduzierender Komplex beschrieben (Künkel *et al.* 1997; Hedderich *et al.* 2005). Dieser Komplex besteht zum einen aus dem *b*-Typ-Cytochrom HdrE, das über Transmembranhelices verfügt und in der cytoplasmatischen Membran verankert ist. Darüber hinaus enthält der Komplex die lösliche, aber an HdrE assoziierte Untereinheit HdrD, welche die katalytische Aktivität vermittelt und Eisen-Schwefel-Cluster enthält, die zur Weitergabe von Elektronen essentiell sind (Simianu *et al.* 1998). Während die lösliche Heterodisulfidreduktase (HdrABC) in methanogenen Archaeen ohne Cytochrome nicht zum Aufbau des Membranpotentials beiträgt, ist die Heterodisulfidreduktase HdrDE in der Lage Protonen über die Membran nach außen zu translozieren und ist daher direkt an der Energiekonservierung beteiligt (Ide *et al.* 1999; Deppenmeier *et al.* 1999). Pro katalysierter Redoxreaktion werden hierbei zwei Protonen nach außen geschleust (Ide *et al.* 1999). Interessanterweise zeigt der N-Terminus der Untereinheit HdrD starke Homologien zur Untereinheiten HdrC der löslichen Heterodisulfidreduktase. Darüber hinaus ist der C-Terminus von HdrD homolog zu HdrB des löslichen Komplexes (Hedderich *et al.* 2005). Aufgrund der starken Homologie zwischen HdrD und HdrBC wurde postuliert, dass diese Untereinheiten die Heterodisulfidreduktase-Aktivität vermitteln, während die Untereinheiten HdrE und HdrA für die Interaktion mit den entsprechenden Elektronendonoren verantwortlich sind, die sich bei den Enzymkomplexen unterscheiden (Künkel *et al.* 1997).

Der Modus der Heterodisulfidreduktion galt immer als ein grundlegendes Unterscheidungsmerkmal zwischen methanogenen Archaeen mit und ohne Cytochrome, da diese abhängig vom Methanogeneseweg immer nur eine Art der Heterodisulfidreduktion durchführen. In *M. luminyensis* zeigt sich dagegen eine vollkommen neuartige Situation, da der Organismus die Gene, die für unterschiedliche Heterodisulfidreduktasen kodieren (*hdrABC* und *hdrD*), bei Wachstum auf Methanol + H₂ in vergleichbarem Umfang transkribierte (3.3.1). Überraschenderweise ist die membranständige Heterodisulfidreduktase in *M. luminyensis* nur teilweise vorhanden, da das Gen *hdrE* nicht im Genom zu finden ist. Im Gegensatz dazu liegt die lösliche Heterodisulfidreduktase (HdrABC) vollständig vor. Insofern unterscheidet sich der Organismus nicht nur deshalb von den ‚klassischen‘ methanogenen Organismen, da beide Heterodisulfidreduktasen gleichzeitig exprimiert werden und zur Energiekonservierung beitragen, sondern auch deswegen, weil eine ‚unvollständige‘ Heterodisulfidreduktase (HdrD) am Stoffwechsel beteiligt ist. Das alleinige Auftreten der Heterodisulfidreduktase-Untereinheit HdrD ist nicht nur aus *M. luminyensis* bekannt, sondern scheint ein Charakteristikum aller Vertreter der Methanomassiliococcales zu sein, da beispielsweise auch aus *Candidatus Methanomethylophilus alvus*, *Candidatus Methanomassiliococcus intestinalis* und *Candidatus Methanoplasma termitum* bekannt ist, dass *hdrE*-Gene fehlen (Borrel *et al.* 2014; Lang *et al.* 2015). Aufgrund der Involvierung beider Heterodisulfidreduktase-Typen im Stoffwechseln der Methanomassiliococcales scheinen die Organismen Hybride der ‚klassischen‘ methanogenen Vertreter zu sein. Somit lässt sich die Art der Heterodisulfidreduktion nicht mehr ohne Weiteres zur Klassifizierung methanogener Organismen verwenden bzw. es muss neben Organismen mit ausschließlich löslicher (hydrogenotrophe Methanarchaeen) oder membranständiger Heterodisulfidreduktasen (acetiklastische und methylotrophe Methanarchaeen) noch eine weitere Klasse geben, die Archaeen umfasst, in denen beide Heterodisulfidreduktasen zugleich am Energiestoffwechsel beteiligt sind. In diese Gruppe könnten dann die Methanomassiliococcales eingegliedert werden. Diese Besonderheit würde die Methanomassiliococcales auch von Organismen der Gattung *Methanosarcina* abgrenzen. *Methanosarcina* spp. verfügen zwar sowohl über Gene, die für die lösliche Heterodisulfidreduktase kodieren, als auch über Gene für die membranständige Heterodisulfidreduktase (Welte und Deppenmeier 2014), allerdings ist nur die membranständige Heterodisulfidreduktase während der Methanogenese aktiv. Der löslichen Heterodisulfidreduktase scheint lediglich im Zuge der methylotrophen Methanogenese eine nicht-essentielle, bisher nicht bekannte Funktion zuzukommen (Buan und Metcalf 2010).

Aufgrund der Kombination beider Heterodisulfidreduktasen im Zuge des Energiestoffwechsels und der Abwesenheit der Methyltransferase Mtr, die stets als gemeinsames Charakteristikum aller methanogenen Organismen betrachtet wurde, wurde erneut deutlich, dass sich *M. luminyensis* von den bisher bekannten methanogenen Archaeen abhebt.

4.3.6 F_{red}-Oxidation an der ‚kopflösen‘ F₄₂₀H₂-Dehydrogenase

Wie zuvor thematisiert wurde, spielen die Ech-Hydrogenasen in *M. luminyensis* vermutlich lediglich im Anabolismus eine entscheidende Rolle, da die Enzyme den Elektronendonator F_{red} erzeugen. Darüber hinaus verfügt der Organismus nicht über eine Na⁺-Ionen-translozierende Methyltransferase und andere Enzyme, wie die Vho-Hydrogenase oder der Rnf-Komplex, welche in methanogenen Archaeen mit einer Atmungskette an der Etablierung des Membranpotentials beteiligt sind. Daher stellte sich die Frage, auf welche Weise der Organismus Energie konserviert. *Ms. mazei* und andere Vertreter der Familie Methanosarcinaceae zeigen innerhalb der methanogenen Gruppe die höchste metabolische Vielfalt, da sie über alle ‚klassischen‘ methanogenen Stoffwechselwege Energie konservieren können. Im Zusammenhang mit der Methanogenese von *Methanosarcina* spp. und von hydrogenotrophen Methanarchaeen fällt ein Kofaktor auf, der bisher noch nicht beleuchtet wurde. Hierbei handelt es sich um den Elektronenüberträger F₄₂₀, dessen Benennung auf die charakteristische Absorption bei 420 nm zurückgeht (Eirich *et al.* 1978). Die reduzierte Form des Cofaktors (F₄₂₀H₂) fungiert bei der hydrogenotrophen Methanogenese als Elektronendonator und ist bei der sukzessiven Reduktion von CO₂ zu Methan absolut essentiell (Deppenmeier *et al.* 1999). Darüber hinaus besitzt der Elektronenüberträger die gegenteilige Funktion bei der methylotrophen Methanogenese, in der F₄₂₀ im oxidativen Zweig als Elektronenakzeptor fungiert (Welte und Deppenmeier 2011b). Während es in hydrogenotrophen Methanarchaeen zur Generierung von F₄₂₀H₂ mittels F₄₂₀-abhängiger, löslicher Hydrogenasen kommt (Vitt *et al.* 2014; Thauer *et al.* 2010), stellt sich der Regenerierungs- bzw. Oxidationsprozess von F₄₂₀H₂ im methylotrophen Stoffwechsel anders dar. Hierbei wird die Oxidation von F₄₂₀H₂ durch die membranständige F₄₂₀H₂-Dehydrogenase katalysiert (Abken und Deppenmeier 1997). Als Elektronenakzeptor der F₄₂₀H₂-Dehydrogenase fungiert MPh_{ox}, der lipophile Elektronenüberträger, der in der Membran von methanogenen Archaeen, die über eine Atmungskette verfügen, zu finden ist (Brodersen *et al.* 1999). Kommt es zur F₄₂₀H₂-Oxidation mit gleichzeitiger MPh_{ox}-Reduktion, wird aufgrund des Redoxpotentialgefälles zwischen F₄₂₀H₂ und MPh_{ox} Energie freigesetzt. Aus *Ms. mazei* ist bekannt, dass diese Energie ausreicht, um zwei Protonen mittels der F₄₂₀H₂-Dehydrogenase aktiv über die cytoplasmatische Membran nach außen zu schleusen (Bäumer *et al.* 2000), obwohl die Struktur des Proteinkomplexes sogar auf drei Kopplungsstellen hindeutet (Welte und Deppenmeier 2014; Efremov und Sazanov 2012). Somit trägt die F₄₂₀H₂-Dehydrogenase, die auch als Fpo-Komplex bezeichnet wird, maßgeblich zur Energiekonservierung des Organismus bei.

Der Fpo-Komplex zeigt hohe Homologien zur Protonen-translozierenden NADH-Dehydrogenase, bei der es sich um den Komplex I der mitochondrialen Atmungskette handelt bzw. die Teil bakterieller Atmungsketten sein kann (Bäumer *et al.* 2000; Efremov und Sazanov 2012). Aufgrund seiner Größe und der hohen Anzahl an Untereinheiten hebt sich der Komplex von den übrigen Komponenten der methanogenen Atmungskette ab, da der Proteinkomplex aus 13 Untereinheiten besteht. Vor allem die Funktion der Untereinheit FpoF, die den sogenannten ‚Kopf‘ der F₄₂₀H₂-Dehydrogenase bildet, ist gut beschrieben. Das Gen, welches für die Untereinheit kodiert (*fpoF*), ist nicht Bestandteil des *fpo*-Operons und besitzt keine bekannten, homologen Gene in Organismen, die über eine NADH-Dehydrogenase verfügen (Welte und Deppenmeier 2011b). Schon früh wurde gezeigt, dass F₄₂₀H₂ als Elektronendonator

in der Atmungskette von methanogenen Organismen fungieren kann (Deppenmeier *et al.* 1990), allerdings wurde FpoF als F₄₂₀H₂-oxidierendes Modul des Fpo-Komplexes, d. h. als Elektroneneinspeisemodul, erst deutlich später identifiziert, da FpoF aus *Archaeoglobus fulgidus* F₄₂₀H₂-Oxidations-Aktivität aufwies (Brüggemann *et al.* 2000) und eine *Ms. mazei* Δ fpoF-Mutante nicht mehr in der Lage war, F₄₂₀H₂ zu oxidieren (Welte und Deppenmeier 2011b). Darüber hinaus verfügen die Untereinheiten FpoA, FpoH, FpoJ, FpoK, FpoL, FpoM und FpoN über Transmembranhelices und sind in der Cytoplasmamembran lokalisiert, während die Untereinheiten FpoB, FpoC, FpoD und FpoI eine Domäne bilden, die in das Cytoplasma hineinragt. Den Untereinheiten FpoB und FpoI kommt eine besondere Bedeutung zu, da die Untereinheiten über Eisen-Schwefel-Cluster verfügen und beim Elektronentransfer vom Elektronendonator F₄₂₀H₂ zum Elektronenakzeptor MPh_{ox} eine zentrale Rolle spielen. Die Funktion von FpoO, einer Untereinheit, die ebenfalls über ein Eisen-Schwefel-Cluster verfügt, aber auch im ‚kopflosten‘ Fpo-Komplex von *M. luminyensis* fehlt, ist bisher nicht bekannt. Da eine zu FpoO homologe Struktur in der klassischen NADH-Dehydrogenase fehlt, lässt sich die Funktion von FpoO auch nicht von der NADH-Dehydrogenase ableiten.

Im Stoffwechsel von *M. luminyensis* ist ebenfalls ein Fpo-Komplex involviert, dessen Gene bei Wachstum auf Methanol + H₂ exprimiert werden (3.3.1). Allerdings wird der Komplex im Vergleich zur F₄₂₀H₂-Dehydrogenase aus *Ms. mazei* nicht vollständig gebildet, da Gene, die für die Untereinheiten FpoF und FpoO kodieren, im Genom von *M. luminyensis* fehlen. Da die Untereinheit FpoF in *Ms. mazei* die F₄₂₀H₂-oxidierende Untereinheit des Kopfes bildet, wird der unvollständige Komplex in *M. luminyensis* als ‚kopfloser‘ Fpo-Komplex bezeichnet.

‚Kopfloser‘ Fpo-Komplexe bzw. ‚kopfloser‘ Komplex I-Homologe sind nicht nur in *M. luminyensis* zu finden, sondern auch in einigen anderen methanogenen Organismen, wie *Methanosaeta thermoacetophila*, und zahlreichen bakteriellen Arten. Trotzdem ist über diese Proteine recht wenig bekannt. Komplex I-Homologe werden in Kapitel 4.3.6.1 noch eingehend vertieft, da ihnen eine Schlüsselrolle in der Energiekonservierung von Zellen aus allen Domänen des Lebens zukommt. Experimente mit *M. thermoacetophila*-Membranen, die in der Lage waren, Fd_{red} zu oxidieren, obwohl dezidierte Fd_{red}-oxidierende Enzyme fehlen (Rnf-Komplex oder Ech-Hydrogenase), wiesen darauf hin, dass ein weiteres Enzym Fd_{red} oxidieren kann. Als wahrscheinlichster Kandidat hierfür wurde der ‚kopfloser‘ Fpo-Komplex in Betracht gezogen (Welte und Deppenmeier 2011a). Im Rahmen dieser Arbeit konnten die gleichen Beobachtungen wie für *M. thermoacetophila* auch an *M. luminyensis*-Membranen getätigt werden (3.3.6.2), was die postulierte Funktion des Komplexes zu bestätigen scheint. Der grundlegende Unterschied zwischen *M. thermoacetophila* und *M. luminyensis* ist jedoch der Elektronenakzeptor, auf den die Elektronen übertragen werden, die bei der Fd_{red}-Oxidation freigesetzt werden. Im Gegensatz zu *M. thermoacetophila*, in dessen Membran MPh als Elektronenüberträger enthalten ist (Welte und Deppenmeier 2011a), konnte MPh in der Membran von *M. luminyensis* bisher nicht nachgewiesen werden (Becker *et al.* 2016). Auch dem Isolat ISO4-H5, welches im Pansen von Wiederkäuern vorkommt und ebenfalls zu den Methanomassiliicoccales zählt, fehlt MPh (Li *et al.* 2016), sodass die Abwesenheit von MPh ein Charakteristikum aller Vertreter der siebten methanogenen Ordnung zu sein scheint. Aufgrund der Beobachtung, dass der ‚kopfloser‘ Fpo-Komplex in

M. luminyensis nur in der Lage war, $F_{d_{red}}$ zu oxidieren, wenn HdrD als finale Elektronen-übertragende Einheit zur Verfügung stand und Heterodisulfid als Elektronenakzeptor fungierte, wurde postuliert, dass der Fpo-Komplex mit HdrD interagiert und es zur Elektronenübertragung vom Fpo-Komplex auf HdrD kommt. Da sich HdrD aus *M. luminyensis* aufgrund des verlängerten C-Terminus von HdrD-Homologen aus *Methanosarcina* spp. unterscheidet, in denen HdrD Teil des membranständigen HdrDE-Komplexes ist (Künkel *et al.* 1997; Simianu *et al.* 1998), lag die Hypothese auf der Hand, dass HdrD in *M. luminyensis* eine andere Funktion einnimmt. Bei der bioinformatischen Untersuchung des Proteins fiel neben der Länge des C-Terminus auf, dass dieser über zahlreiche Lysinreste verfügt, die sich durch eine positive Ladung auszeichnen (3.3.2.1). Dies deutete darauf hin, dass der Terminus eine Affinität für negativ geladene Verbindungen oder gar für Proteine mit negativ geladenen Domänen aufweist. Da der Fpo-Komplex als Interaktionspartner in Betracht gezogen wurde, wurden die löslichen Untereinheiten des Komplexes in Bezug auf Bereiche mit negativer Ladung untersucht. Jedoch konnten dabei keine Domänen festgestellt werden, in denen eine Anhäufung negativ geladener Aminosäuren vorliegt, sodass die Interaktionsschnittstelle von HdrD und dem Fpo-Komplex weiterhin nicht bekannt ist.

4.3.6.1 Vorkommen und Diversität von Komplex I-Homologen

Protonen-translozierende NADH-Dehydrogenasen bzw. Komplex I-Homologe (NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase; Nuo) sind in der Natur sehr weit verbreitet. Sie sind sowohl in der Atmungskette der Mitochondrien eukaryotischer Zellen, wie auch in der Atmungskette von Bakterien zu finden. Darüber hinaus sind sie in den Thylakoidmembranen pflanzlicher Chloroplasten lokalisiert. Die NADH-Dehydrogenase ist einer der größten, bisher bekannten Membranproteinkomplexe mit 14 Kernuntereinheiten und bis zu 32 weiteren akzessorischen Untereinheiten (Brandt 2006). Der Komplex ist in vielen Bakterien, wie *E. coli* und *Thermus thermophilus*, sehr gut untersucht. Hier ist er für bis zu 40 % des Protonentransports über die Membran verantwortlich und trägt damit maßgeblich zur Etablierung des Membranpotentials bei, das zur ATP-Synthese genutzt wird (Efremov und Sazanov 2011). Die Untereinheiten des Komplexes werden in drei strukturelle Elemente unterteilt. Zum einen gibt es die membranständige Domäne, deren Untereinheiten über Transmembranhelices verfügen und stark hydrophob sind (NuoAHJKLMN). Zum anderen umfasst der Komplex hydrophile Untereinheiten, in denen Bindestellen für prosthetische Gruppen, sowie die NADH-Bindestelle lokalisiert sind (Fearnley und Walker 1992). Die löslichen Untereinheiten werden in eine Kopfdomäne (NuoEFG), die die NADH-Bindestelle umfasst, sowie eine Verbindungsdomäne (NuoBCDI), die die lösliche und die membranständige Domäne verbindet, untergliedert (Friedrich 2001). Es gilt als erwiesen, dass NADH, der Elektronendonator des Komplexes, an der Untereinheit NuoF oxidiert wird und die Elektronen zunächst auf FMN übertragen werden. Das Flavin in NuoF ist außerdem die Stelle, an der der Umstieg von Zwei-Elektronen-Überträgern (NADH) auf Ein-Elektron-Überträger (Eisen-Schwefel-Cluster) stattfindet (Brandt 2006). Danach erfolgt die Weitergabe der Elektronen über eine Vielzahl an Eisen-Schwefel-Clustern innerhalb des Nuo-Komplexes in Richtung des Elektronenakzeptors. Die Bindung des Elektronenakzeptors erfolgt an NuoD an der Schnittstelle zwischen der Verbindungs- und der

Membrandomäne (Roth und Hägerhäll 2001; Prieur *et al.* 2001; Tocilescu *et al.* 2010). Teile der NuoBCDHI-Domäne zeigen starke Homologien zu Hydrogenasen und es wird angenommen, dass das aus Hydrogenasen bekannte redoxaktive [NiFe]-Zentrum im Laufe der Evolution durch eine Chinon-Bindestelle in NuoD ersetzt wurde, welche die Interaktion mit dem Elektronenakzeptor Ubichinon ermöglichte (Roth und Hägerhäll 2001). Im Gegensatz dazu zeigt die NuoLMN-Domäne starke Homologien zu Na⁺/H⁺-Antiportern, was ihre Rolle in der Protonentranslokation als Kopplungsstelle von Komplex I widerspiegelt (Mathiesen und Hägerhäll 2002; Moparthi und Hägerhäll 2011). Kommt es zur Oxidation von NADH an der NADH-Dehydrogenase und zur Reduktion von Ubichinon, wirkt sich dieser Prozess gravierend auf die Konformation des Komplexes aus. Die Konformationsänderung ermöglicht ein aktives Pumpen von Protonen über die cytoplasmatische Membran, wobei das Vorhandensein von vier Protonenkanälen (jeweils einer in NuoL, NuoM, NuoN und NuoAJK) auf die Translokation von vier Protonen pro Reaktionszyklus, d. h. vier Protonen pro oxidiertem NADH (4 H⁺/2 e⁻), hindeutet (Efremov und Sazanov 2011; Ohnishi *et al.* 2010). Diese Stöchiometrie konnte für die NADH-Dehydrogenase von Submitochondrialpartikeln, die aus Rinderherzgewebe stammten, bereits experimentell bewiesen werden (Galkin *et al.* 1999).

Die NADH-Dehydrogenase ist in ihrer Funktion und Struktur keineswegs konserviert, da zahlreiche Organismen bekannt sind, in denen bestimmte Untereinheiten, die im Nuo-Komplex von *E. coli* und anderen Organismen mit klassischer NADH-Dehydrogenase eine entscheidende Rolle spielen, veränderte Strukturen bzw. Funktionen aufweisen oder sogar vollständig fehlen.

In dem ϵ -Proteobakterium *Campylobacter jejuni* ist beschrieben, dass die Gene *nuoE* und *nuoF*, deren Genprodukte Teil der Kopfdomäne des Nuo-Komplexes in *E. coli* und für die NADH-Oxidation essentiell sind, fehlen (Weerakoon und Olson 2008). Es überrascht daher nicht, dass NADH am Komplex I in *C. jejuni* nicht als effektiver Elektronendonator fungiert (Hoffman und Goodman 1982). Darüber hinaus sind die Gene *nuoE* und *nuoF* an ihrem ursprünglichen Genlocus durch andere Gene (*nuoX* und *nuoY*) ersetzt (Smith *et al.* 2000), wobei die Funktionen von NuoX und NuoY erst vor Kurzem im Detail untersucht wurden. Während frühere Studien postulierten, dass die Proteine Elektroneneinspeisemodule darstellen, die Elektronen aus der Oxidation von Flavodoxinen beziehen (Weerakoon und Olson 2008), ist heute klar, dass die Proteine eine starke Affinität zu FADH₂ aufweisen und vermutlich ein Protein, das FAD als Cofaktor bindet, als Elektronendonator fungiert (Calderon-Gomez *et al.* 2017). Daher wird anhand des Komplexes aus *C. jejuni* deutlich, dass der Austausch der Kopfgruppe die Nutzung eines alternativen Elektronendonors ermöglicht. Ähnlich stellt sich die Situation auch in *Helicobacter pylori*, einem weiteren ϵ -Proteobakterium, dar, das nah mit *C. jejuni* verwandt ist (Parkhill *et al.* 2000). Hier sind die Gene *nuoE* und *nuoF* ebenfalls durch *nuoX* und *nuoY* ersetzt (Weerakoon und Olson 2008). Auch in *H. pylori* ist die Atmungskette unabhängig von NADH als Elektronendonator (Chen *et al.* 1999) und es wird ebenfalls vermutet, dass NuoX und NuoY (in *H. pylori* HP1264 und HP1265) an der Interaktion des Komplexes mit einem anderen Elektronendonator als NADH beteiligt sind. Da NuoX und NuoY selbst keine prosthetischen Gruppen zur Weitergabe von Elektronen besitzen, wurde vermutet, dass diese als Andockstelle für ein bisher nicht bekanntes Protein fungieren, das den Elektronendonator oxidiert und Elektronen in die Eisen-Schwefel-Cluster-Kaskade von Komplex I einspeist (Finel 1998).

Dass innerhalb der Energie-konservierenden Systeme von *C. jejuni* und *H. pylori* NADH als Elektronendonator keine Rolle spielt, wird auch daran deutlich, dass NADH-generierende Enzyme in diesen Organismen fehlen bzw. vor allem Flavodoxine als Elektronenakzeptoren verschiedener Enzyme fungieren (Finel 1998; Weerakoon und Olson 2008; Hughes *et al.* 1995; Hughes *et al.* 1998).

Neben ϵ -Proteobakterium verfügen auch Cyanobakterien, wie *Synechocystis* sp., und die Chloroplasten höherer Pflanzen, wie in *Arabidopsis thaliana*, über ungewöhnliche Komplex I-Homologe, denen neben NuoE und NuoF auch die Untereinheit NuoG fehlt (Battchikova *et al.* 2011). Es wird angenommen, dass der Komplex I, wie er in den Plastiden höherer Pflanzen zu finden ist, ursprünglich aus dem Komplex I von Cyanobakterien hervorgegangen ist. Dadurch sind die Komplexe beider Gruppen in Struktur und Funktion stark konserviert (Friedrich *et al.* 1995). Im Gegensatz zur genomischen Organisation der *nuo*-Gene in Bakterien sind die Gene, die für den Komplex I kodieren, in Cyanobakterien über das gesamte Genom verteilt bzw. nur in kleineren Operons organisiert (Battchikova *et al.* 2011). Darüber hinaus tritt der Komplex in verschiedenen Isoformen auf und ist an einer Vielzahl von zellulären Prozessen wie der CO₂-Fixierung, der Atmung und dem zyklischen Elektronentransport während der Photosynthese beteiligt (Battchikova und Aro 2007; Shikanai 2016). Der Elektronendonator des Komplexes war sowohl bei Cyanobakterien, als auch in den pflanzlichen Chloroplasten lange nicht bekannt. Untersuchungen, die sich mit dem Thema beschäftigten, lieferten ambivalente Aussagen, da aus ihnen ein großes Spektrum potentieller Elektronendonoren hervorging (Battchikova *et al.* 2011). Das Spektrum umfasste u. a. NADPH, da der aufgereinigte Komplex I aus *Synechocystis* sp. PCC 6803 NADPH-Oxidations-Aktivität aufwies (Matsuo *et al.* 1998; Deng *et al.* 2003). Da jedoch bis heute kein Elektroneneinspeisemodul zweifelsfrei identifiziert wurde, das für die Oxidation von NADPH verantwortlich ist und als primärer Elektronenakzeptor fungiert (analog zu NuoF bei der NADH-Oxidation), konnte die Hypothese, dass der Komplex NADPH oxidiert, nie endgültig verifiziert werden. Darüber hinaus wurde spekuliert, dass die Proteine HoxE, HoxF und HoxU mit dem Komplex I in Cyanobakterien, analog zu NuoE, NuoF und NuoG in *E. coli*, interagieren und es doch zur NADH-Oxidation kommen kann, da Homologien zwischen den Proteinen aus *Synechocystis* sp. und *E. coli* bestehen (Appel und Schulz 1996). Des Weiteren stellten Prommeenate *et al.* (2004) die Hypothese auf, dass der Komplex I in Cyanobakterien und höheren Pflanzen, wie *A. thaliana*, mit einem Elektroneneinspeisemodul assoziiert ist, das homolog zum Modul archaeeiler Komplex I-Derivate ist (s. o.). In methanogenen Archaeen fungiert F₄₂₀H₂ als Elektronendonator des Komplexes (Deppenmeier *et al.* 1990; Bäumer *et al.* 2000), was jedoch in Cyanobakterien nicht gebildet wird und daher nicht der Elektronendonator des ‚kopflösen‘ Komplex I-Homologs in Cyanobakterien sein kann. Außerdem wurde spekuliert, dass kein spezifisches Elektroneneinspeisemodul benötigt wird, an das der Elektronendonator bindet, sondern dass der ‚kopflöse‘ Komplex I direkt zur Elektronenaufnahme befähigt ist. Dieses Modell, das erstmals Friedrich *et al.* (1995) aufstellten, legt nahe, dass Fd_{red} entweder direkt an Komplex I oxidiert wird, oder es erst in einem Zwischenschritt zur Fd_{red}-Oxidation und NADP⁺-Reduktion durch die Fd:NADP⁺-Reduktase kommt, und NADPH als eigentlicher Elektronendonator von Komplex I fungiert. Später konnte in der Tat gezeigt werden, dass der ‚kopflöse‘ Komplex I in *A. thaliana* Fd_{red} als Elektronendonator und Chinon-Analoga als Elektronenakzeptoren nutzt (Yamamoto *et al.* 2011). Hierbei scheint das Protein CRR31, das sich an den Nuo-Komplex anlagert, essentiell zu sein und die Bindung von Fd zu vermitteln, indem

es eine Fd-Bindetasche bildet. Über den Prozess, im Zuge dessen am Komplex I Fd_{red} oxidiert wird, ist jedoch sehr wenig bekannt und auch die genaue Interaktionsstelle von Fd an Komplex I wurde bisher nicht identifiziert. Die Nutzung von Fd_{red} als Elektronendonator macht jedoch aus evolutionsbiologischer Sicht Sinn, da Ferredoxine sehr ursprüngliche Proteine sind (George *et al.* 1985) und zu der Zeit, als die Erdatmosphäre noch größtenteils anoxisch war, vermutlich in vielen Reaktionen als zentraler Elektronenüberträger fungierten. Heute sind Ferredoxine immer noch an vielen Redoxreaktionen beteiligt, wurden jedoch teilweise auch durch Elektronenüberträger, die weniger sensitiv gegenüber Sauerstoff sind (z. B. NADH), ersetzt. Aus diesem Grund gilt der ‚kopflose‘ Komplex als sehr ursprüngliche Variante von Komplex I. Der Komplex ging vermutlich aus Untereinheiten von Hydrogenasen und Antiporthern hervor und erhielt durch die Akquisition zusätzlicher Module neue Funktionen, wie z. B. die NADH-Oxidation (Friedrich und Weiss 1997; Moparthi und Hägerhäll 2011).

In Archaeen, die über ein Komplex I-Homolog verfügen, fehlen immer die Untereinheiten NuoE, NuoF und NuoG, und somit ist prinzipiell keine NADH-Oxidation möglich. Derartige Komplex I-Homologe sind innerhalb der archaeellen Domäne weit verbreitet und beispielsweise in *Sulfolobus solfataricus*, *Thermoplasma acidophilum*, *Halobacterium salinarium*, *Aeropyrum pernix* und *Archaeoglobus fulgidus*, sowie Vertretern der Methanosarcinales zu finden (Welte 2011). Jedoch handelt es sich nicht durchweg um ‚kopflose‘ Komplex I-Homologe. In methanogenen Organismen der Ordnung Methanosarcinales findet sich zusätzlich die Untereinheit FpoF, die den löslichen Domänen des Komplex I-Homologs aufliegt und an der die Oxidation des Elektronendonors $F_{420}H_2$ stattfindet (Brüggemann *et al.* 2000; Welte und Deppenmeier 2011b). Der Fpo-Komplex ist keinesfalls nur auf die methanogene Gruppe beschränkt, da beispielsweise auch *A. fulgidus* über einen $F_{420}H_2$ -oxidierenden Komplex I verfügt (Fqo; Kunow *et al.* 1994). Während die Elektronen in methanogenen Organismen jedoch auf MPh_{ox} übertragen werden, ist der Elektronenakzeptor in *A. fulgidus* ein Chinon-Derivat (Kunow *et al.* 1994; Bäumer *et al.* 1998).

Häufig finden sich auch ‚kopflose‘ Komplex I-Homologe, denen sowohl NuoEFG, als auch FpoF oder andere Kopfgruppen fehlen. Aus *Methanosaeta thermoacetophila* ist bekannt, dass der ‚kopflose‘ Fpo-Komplex in der Lage ist, Fd_{red} zu oxidieren und Elektronen auf MPh_{ox} zu übertragen (Welte und Deppenmeier 2011a). Insofern entspricht der Komplex in seiner Funktion den ‚kopflosen‘ NADH-Dehydrogenasen aus ϵ -Proteobakterien (s. o.), bei denen ebenfalls Fd_{red} als Elektronendonator in Betracht gezogen wird (Friedrich *et al.* 1995). Die Rate, mit der Fd_{red} an Membranen von *M. thermoacetophila* oxidiert wurde, betrug 470 mU mg^{-1} (Welte und Deppenmeier 2011a) und lag somit in der gleichen Größenordnung wie die Fd_{red} -Oxidationsrate von *M. luminyensis*-Membranen, die das Heterodisulfid mit ca. 100 mU mg^{-1} reduzierten (3.3.6.2). Da es sich bei Ferredoxinen um Ein-Elektron-Überträger handelt und das Heterodisulfid zwei Elektronen aufnehmen kann, entspricht die Heterodisulfidreduktionsrate einer Fd_{red} -Oxidationsrate von ca. 200 mU mg^{-1} . Dass die Rate, die an Membranen von *M. luminyensis* gemessen wurde, etwas niedriger war als die Rate, die für *M. thermoacetophila* bestimmt wurde, lag vermutlich am Elektronenakzeptor der Reaktion. Während es sich beim Elektronenakzeptor in *M. thermoacetophila* um MPh_{ox} handelt, wird in *M. luminyensis* ein Elektronentransport auf HdrD und schließlich auf das Heterodisulfid postuliert. Dieser Schritt scheint für

das Gesamtsystem, das die Fd:Heterodisulfid-Oxidoreduktase-Aktivität vermittelt, geschwindigkeitsbestimmend zu sein, wodurch die Gesamtreaktion in *M. luminyensis* insgesamt langsamer verläuft als das Fd:MPh-Oxidoreduktase-System in *M. thermoacetophila*. Generell wurden jedoch zum ersten Mal experimentelle Beweise geliefert, dass der Fpo-Komplex aus *M. luminyensis* direkt mit HdrD interagiert und Elektronen, die aus der Fd_{red}-Oxidation stammen, auf HdrD überträgt. HdrD wiederum fungiert dann als terminale Reduktase und reduziert das Heterodisulfid zu HS-CoM und HS-CoB, sodass die Cofaktoren wieder dem Mvh/Hdr-Komplex als Edukte zur Verfügung stehen.

4.3.7 Putativer Metabolismus von *M. luminyensis* – wie Anabolismus und Katabolismus ineinandergreifen

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation konnten zahlreiche Einblicke in den Metabolismus von *M. luminyensis*, dem bisher einzigen gut etablierten Modellorganismus der Methanomassiliicoccales, gewonnen werden. Daher ließ sich auf Grundlage folgender experimentell untermauerten Erkenntnisse der Stoffwechsel von *M. luminyensis* rekonstruieren:

1. Dem Organismus fehlen Gene, die für die Vho-Hydrogenase, die Methyltransferase Mtr oder den Rnf-Komplex kodieren, sodass diese Proteine nicht Teil des Stoffwechsels sind.
2. Die Methyl-CoM-Reduktase stellt in *M. luminyensis* ebenso wie in allen bekannten methanogenen Archaeen ein Schlüsselenzym dar, da das Enzym den finalen Schritt der Methanogenese katalysiert und Methan als Produkt aus der Reaktion hervorgeht (Ellermann *et al.* 1988).
3. Ech-Hydrogenasen kodierende Gene sind in zwei Kopien im Genom zu finden, allerdings wurden die Gene nur in geringem Ausmaß bei Wachstum auf methylierten Verbindungen mit H₂ als Elektronendonator transkribiert. Darüber hinaus war die Hydrogenase-Aktivität in den Membranen von *M. luminyensis*, wo die Ech-Hydrogenasen lokalisiert sind, sehr gering. Den Ech-Hydrogenasen kommt deswegen keine zentrale Funktion in der Energiekonservierung zu. Stattdessen generieren die Enzyme wahrscheinlich Fd_{red} als Elektronendonator für den Anabolismus. Der Prozess ist aufgrund des sehr niedrigen Redoxpotentials energetisch ungünstig, sodass zur Fd_{red}-Generierung Energie in Form des elektrochemischen Potentials investiert werden muss (Hedderich und Forzi 2005).
4. Ein wichtiger katabolischer Enzymkomplex in *M. luminyensis* ist der Mvh/Hdr-Komplex, was sich zum einen in der hohen Expression der Gene, die für die Mvh-Hydrogenase und die lösliche Heterodisulfidreduktase kodieren, zum anderen in den hohen Hydrogenase- und Heterodisulfidreduktase-Aktivitäten in der löslichen Fraktion widerspiegelte. Der Mvh/Hdr-Komplex ist in hydrogenotrophen, methanogenen Organismen gut beschrieben (Kaster *et al.* 2011). Hier oxidiert der Komplex H₂ und reduziert Fd_{ox}, sowie das Heterodisulfid. Aufgrund der großen Homologie zum Mvh/Hdr-Komplex aus hydrogenotrophen Methanarchaeen, wird postuliert, dass auch der Mvh/Hdr-Komplex aus *M. luminyensis* Fd_{red} produziert. Fd_{red} ist somit vermutlich der zentrale Elektronenüberträger in *M. luminyensis*.

5. Die Heterodisulfidreduktase-Untereinheit HdrD, welche einen Teil der membranständigen Heterodisulfidreduktase HdrDE aus methanogenen Organismen mit Cytochromen ist (Künkel *et al.* 1997; Simianu *et al.* 1998), ist ein wichtiger Bestandteil des Metabolismus, da vom *hdrD*-Gen bei Wachstum auf Methanol + H₂ hohe Transkriptmengen vorlagen. Das Enzym weist zudem trotz der relativ geringen Ähnlichkeit zu HdrD-Homologen anderer methanogener Ordnungen Heterodisulfidreduktase-Aktivität auf, sodass es auch im Stoffwechsel von *M. luminyensis* als Heterodisulfidreduktase fungiert. Da HdrD nicht wie in methanogenen Archaeen mit Cytochromen mit HdrE assoziiert ist, war nicht bekannt, woher das Enzym die Elektronen zur Heterodisulfidreduktion bezieht. Daher ergab sich die Hypothese, dass HdrD Elektronen aus der Interaktion mit dem ‚kopflosten‘ Fpo-Komplex bezieht.
6. Der Fpo-Komplex ist im Genom von *M. luminyensis* kodiert und die Gene wurden während des Wachstums transkribiert. Da jedoch die Untereinheit FpoF fehlt, welche für die F₄₂₀H₂-Oxidation essentiell ist (Welte und Deppenmeier 2011b), kann F₄₂₀H₂ als Elektronendonator des ‚kopflosten‘ Fpo-Komplexes ausgeschlossen werden. Da aus anderen Organismen bekannt ist, dass Fd_{red} am ‚kopflosten‘ Fpo-Komplex als Elektronendonator fungieren kann, wurde diese Funktion auch bei *M. luminyensis* in Betracht gezogen. Aufgrund der Feststellung, dass *M. luminyensis*-Membranen zusammen mit HdrD und dem Heterodisulfid als Elektronenakzeptor in der Lage waren, Fd_{red} zu oxidieren, wurde postuliert, dass der Fpo-Komplex direkt mit HdrD interagiert und der Fpo/HdrD-Komplex Fd:Heterodisulfid-Oxidoreduktase-Aktivität vermittelt. Der Fpo-Komplex überträgt hierbei die Elektronen an HdrD, die aus der Fd_{red}-Oxidation stammen, und HdrD wiederum reduziert das Heterodisulfid.

Basierend auf diesen Ergebnissen lässt sich nachvollziehen, wie die Methanogenese bzw. die Energiekonservierung in *M. luminyensis* und in anderen Vertretern der Methanomassiliicoccales, die eine ähnliche Enzymausstattung besitzen, ablaufen könnten (Abb. 48). Stehen dem Organismus Methylamine als Substrate zur Verfügung, können diese durch substratspezifische Permeasen ins Innere der Zelle transportiert werden. Durch Diffusion können nur wenige Substratmoleküle in die Zelle einströmen, da die Methylamin-Moleküle im physiologischen pH-Bereich protoniert vorliegen und so nicht in durch die Cytoplasmamembran diffundieren. Mit Hilfe von BLASTp-Analysen auf Grundlage von beschriebenen Permeasen aus *Ms. barkeri* (Burke *et al.* 1998; Paul *et al.* 2000) lassen sich in *M. luminyensis* Proteine identifizieren, die in die Substrataufnahme involviert sind. Es fällt auf, dass Gene, die für eine MMA- (MtmP), DMA- (MtbP) oder TMA-transportierende Permeasen (MttP) kodieren, nur jeweils einmal im Genom zu finden sind (WP_081579899.1, WP_049796368.1 bzw. WP_081579990). Dies ist aufgrund der Tatsache, dass Gene, die für Enzyme der Substratdemethylierung kodieren (3.2.1), in bis zu vier Kopien vorliegen, überraschend. Aus *Ms. acetivorans* beispielsweise ist bekannt, dass mehrere Gencluster für Permeasen zum Transport des gleichen Substrates kodieren (Dhungana 2014), was den Organismus im Vergleich zu *M. luminyensis* vielseitiger bei der Verwertung der Substrate erscheinen lässt. Da Hinweise darauf vorliegen, dass Methylamine nicht die bevorzugten Substrate von *M. luminyensis* sind und wahrscheinlich seltener als Methanol verstoffwechselt werden (4.1.2), ist die Beobachtung plausibel.

Die Verwertung von Methylaminen in *M. luminyensis* geschieht vermutlich nur dann, wenn kein Methanol im Habitat verfügbar ist (4.1.2).

Im Gegensatz zu den Methylaminen kann Methanol aufgrund seiner geringen Größe und der neutralen Ladung passiv durch die cytoplasmatische Membran diffundieren, sodass kein spezifisches Transportsystem nötig ist. Das macht die Bevorzugung von Methanol als Substrat auch aus energetischer Sicht plausibel, da Permeasen ihre Substrate zwar ATP-unabhängig transportieren, aber häufig elektrochemische Ionengradienten über der Membran die Transportprozesse antreiben. Die Energie, die in Form des Membranpotentials gespeichert ist, wird jedoch auch in anderen Reaktionen benötigt (z. B. ATP-Synthese), zumal die Energie, die *M. luminyensis* bereitsteht, ohnehin sehr gering ist, da vermutlich nur der Fpo/HdrD-Komplex Protonen über die Cytoplasmamembran transloziert. Befindet sich das methylierte Substrat in der Zelle, wird dieses durch die substratspezifische Methyltransferase MT1 demethyliert, wobei die Methylgruppe zunächst auf ein substratspezifisches Corrinoidprotein (MtmC, MtbC, MttC oder MtaC) übertragen wird. Anhand der Transkriptionsstudien konnte gezeigt werden, dass die Gene, die für Proteine der Methanol-Demethylierung kodieren, unabhängig vom Substrat stark transkribiert waren (3.2.1). Im Gegensatz dazu unterlagen die Gene, die für Enzyme der Methylamin-Demethylierung kodieren, einer stringenten Regulation, da diese nur dann exprimiert wurden, wenn das entsprechende Substrat zur Verfügung stand.

Eine weitere Methyltransferase (MT2) überträgt die Methylgruppe auf Coenzym M, wodurch Methyl-CoM generiert wird. Mit Hilfe der Methyl-CoM-Reduktase wird die Verbindung Methyl-CoM reduziert, wobei reduziertes Coenzym B (HS-CoB) als Elektronendonator fungiert. Als Produkte gehen zum einen Methan, zum anderen Heterodisulfid aus der Reaktion hervor. Da in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass beide Heterodisulfidreduktasen (HdrACB und HdrD) in der Energiekonservierung involviert sind, müssen wahrscheinlich zwei Moleküle Heterodisulfid generiert werden, um beide Heterodisulfidreduktasen mit Substrat versorgen zu können. Deswegen werden pro Stoffwechselzyklus jeweils zwei methylierte Verbindungen zu Methan reduziert und es kommt zur Generierung von zwei Molekülen Heterodisulfid. Jeweils ein Heterodisulfid-Molekül wird anschließend durch die lösliche Heterodisulfidreduktase HdrABC und die Untereinheit HdrD reduziert. Am Mvh/Hdr-Komplex kommt es neben der Heterodisulfidreduktion zur Reduktion von zwei Molekülen Fd_{red} (Ein-Elektron-Überträger; Buckel und Thauer 2018), wobei zwei Moleküle H_2 als Elektronendonator fungieren. Das Fd_{red} , das in dieser Reaktion generiert wird, kann am ‚kopflösen‘ Fpo-Komplex oxidiert werden, wobei die Elektronen über die Eisen-Schwefel-Cluster des Komplexes an HdrD transferiert werden und es hier zum zweiten Heterodisulfidreduktionsschritt kommt.

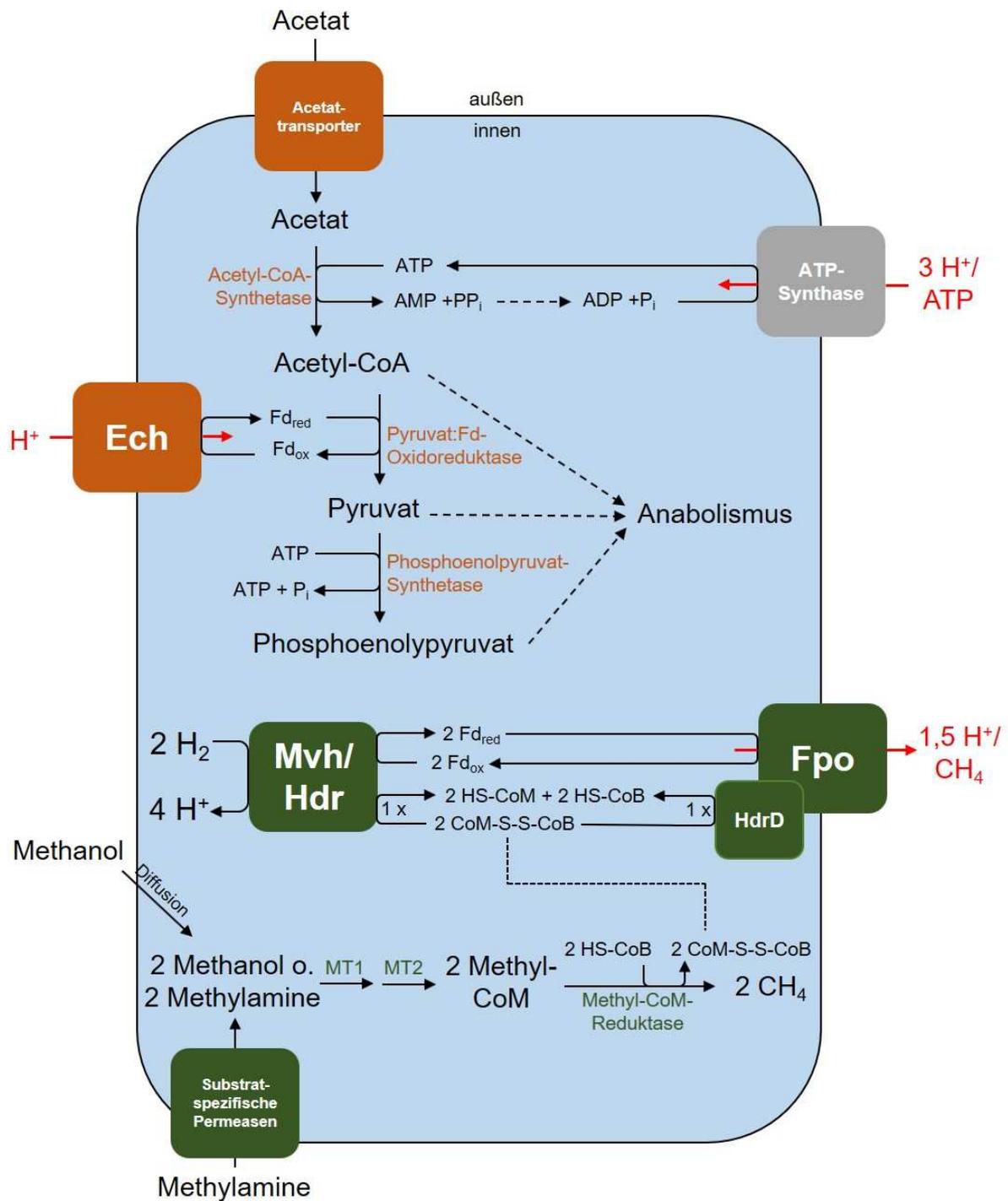


Abb. 48. Postulierter Stoffwechsel von *M. luminyensis*. Proteine, die am Anabolismus beteiligt sind, sind in orange dargestellt, während katabolische Enzyme grün unterlegt sind. In einem Reaktionszyklus, indem ein ATP-Molekül generiert wird, werden zwei Methylgruppenäquivalente verbraucht, da an beiden Heterodisulfidreduktasen jeweils ein Heterodisulfidmolekül benötigt wird. Coenzym A/B/M (CoA/B/M), Ech-Hydrogenase (Ech), F₄₂₀H₂-Dehydrogenase (Fpo), Ferredoxin (Fd), Heterodisulfidreduktase-Untereinheit HdrD (HdrD), Methyltransferase 1 (MT1), Methyltransferase 2 (MT2), Mvh/Hdr-Komplex (Mvh/Hdr).

Aufgrund des Redoxpotentialgefälles zwischen Fd_{red} und dem Heterodisulfid wird ein großer Energiebetrag freigesetzt ($\Delta G^0 = -68 \text{ kJ mol}^{-1}$), der theoretisch zur Translokation von 3,7 Protonen über die Membran und somit zur Etablierung des Membranpotentials herangezogen werden kann. Da ein gewisser Teil der Energie immer auch als Wärme verloren geht, ist anzunehmen, dass maximal drei Protonen im Zuge der Reaktion transloziert werden. Wie bereits erwähnt, werden in einem Reaktionszyklus insgesamt zwei Heterodisulfidmoleküle benötigt, die jedoch auf unterschiedlichen Wegen wieder reduziert werden (an der löslichen Heterodisulfidreduktase und am Fpo/HdrD-Komplex). Um zwei Heterodisulfidmoleküle generieren zu können, müssen zwei Methylgruppenäquivalente durch die Methyl-CoM-Reduktase zu Methan reduziert werden. Da in diesem Modell jedoch nur ein Heterodisulfidmolekül direkt am Protonentranslokationsprozess am Fpo/HdrD-Komplex beteiligt ist und bei der Reduktion des Heterodisulfids durch den Komplex vermutlich drei Protonen transloziert werden, ergibt sich ein Protonentranslokationsquotient von $1,5 \text{ H}^+$ pro Methylgruppe bzw. $1,5 \text{ H}^+$ pro Methan. Geht man davon aus, dass drei bis vier Protonen zur Synthese eines ATP-Moleküls benötigt werden (Welte und Deppenmeier 2014), reicht diese Protonentranslokationseffizienz gerade aus, um ein ATP-Molekül unter Verbrauch von zwei Methylgruppenäquivalenten generieren zu können. Da die Energieausbeute von *M. luminyensis* ohnehin gering ist (mit Methanol + H_2 zu Methan, $\Delta G^0 = -113 \text{ kJ mol}^{-1}$; Thauer *et al.* 1977), liegt es nah, dass nur drei Protonen für ein ATP-Molekül benötigt werden. ATP ist für viele zelluläre Prozesse essentiell und geht hier am Beispiel der Acetataktivierung direkt in den Anabolismus ein. Im Rahmen von Wachstumsexperimenten konnte gezeigt werden, dass Acetat in *M. luminyensis* als Kohlenstoffquelle fungiert (3.1.1). Wird Acetat durch Acetattransporter in die Zelle aufgenommen, kann dieses schrittweise reduziert werden, wobei das durch die Ech-Hydrogenasen bereitgestellte Fd_{red} als Elektronendonator verwendet wird. Die reduzierten Verbindungen, wie Acetyl-CoA oder Pyruvat, können dann direkt in Aufbauprozesse zellulärer Materie einfließen oder während der Gluconeogenese dem Aufbau höherer Zucker (C6-Zuckern) dienen. Teilweise wird auch hier erneut ATP benötigt (z. B. bei der Phosphorylierung von Pyruvat zu Phosphoenolpyruvat). Um den ATP-Bedarf zu decken, müssen große Mengen an Methylgruppendonoren verstoffwechselt werden, und es überrascht nicht, dass der Organismus, trotz des effektiven und bis zu einer bestimmten Konzentration vollständigen Verbrauchs seiner Substrate, nur wenig Zellmasse generiert.

M. luminyensis stimmt in Bezug auf die Energiebilanz eher mit den hydrogenotrophen, methanogenen Organismen als mit methanogenen Archaeen, die über Cytochrome verfügen, überein. Dies spiegelt sich auch in der Zellausbeute wider, die die Anzucht des Organismus lieferte. Die Bestimmung der Zellausbeute ist eine etablierte Methode, mit der die Effektivität des Energie-konservierenden Systems methanogener Archaeen verglichen werden kann. Der sogenannte Y_{CH_4} -Wert ist hierbei definiert als die Menge an Zelltrockengewicht (in g), die pro mol Methan aufgebaut wird. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ermittelt werden, dass *M. luminyensis* bei Wachstum auf Methanol und TMA (mit H_2 als Elektronendonator) jeweils Zellerträge von $2,4 \text{ g Zelltrockengewicht mol Methan}^{-1}$ erreicht (Tab. 35). Bei Cytochrom-enthaltenden Organismen, wie beispielsweise bei Mitgliedern der Gattung *Methanosarcina*, beträgt die Ausbeute bei Wachstum auf Methanol bzw. $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ bis zu $7\text{-}8 \text{ g Trockengewicht mol Methan}^{-1}$, während sich diese bei Organismen ohne Cytochrome nur auf maximal $3 \text{ g Trockengewicht mol Methan}^{-1}$ beläuft.

Tab. 35. Wachstumserträge verschiedener methanogener Archaeen mit bzw. ohne Cytochrome/n. Der Wachstumsertrag (Y_{CH_4}) ist definiert als das Zelltrockengewicht (TG; in g), das pro mol Methan, das der Organismus bildet, aufgebaut wird (modifiziert nach Kröninger *et al.* 2017).

Organismus	Substrat/e	Y_{CH_4} (g TG mol ⁻¹ CH ₄)	Referenz
<u>Organismen ohne Cytochrome:</u>			
<i>Methanobacterium marburgensis</i>	H ₂ + CO ₂	bis zu 3,0	1)
<i>Methanobrevibacter arboriphilus</i>	H ₂ + CO ₂	bis zu 2,7	2)
<i>Methanobacterium bryantii</i>	H ₂ + CO ₂	bis zu 2,5	3)
<i>Methanospirillum hungatei</i>	H ₂ + CO ₂	bis zu 1,0	4)
<i>Methanosphaera stadtmanae</i>	Methanol + H ₂	4,0	5)
<i>Methanomassiliicoccus luminyensis</i>	Methanol + H ₂	2,4	Diese Arbeit
	TMA + H ₂	2,4	Diese Arbeit
<u>Organismen mit Cytochromen:</u>			
<i>Methanosarcina barkeri</i>	H ₂ + CO ₂	bis zu 7,5	1)
	Methanol	bis zu 7,2	6)
	Acetat	bis zu 2,1	7)
<i>Methanosarcina</i> sp. strain 227	H ₂ + CO ₂	bis zu 8,7	8)
	Methanol	bis zu 6,0	8)
	Acetat	bis zu 2,7	8)

1) Kaster *et al.* 2011

2) Zehnder und Wuhrmann 1977

3) Robertson und Wolfe 1970

4) Robinson und Tiedje 1984

5) Miller und Wolin 1985

6) Weimer und Zeikus 1978

7) Smith und Mah 1980

8) Smith und Mah 1978

Generell wird angenommen, dass der ATP-Gewinn in hydrogenotrophen Organismen deutlich niedriger ist als in methanogenen Organismen, die über Cytochrome verfügen. Man geht davon aus, dass in hydrogenotrophen Methanarchaeen nur 0,5 ATP pro Methan generiert werden, während Cytochrom-enthaltende Archaeen 1 ATP pro Methan produzieren (Thauer *et al.* 2008, 2008; Kaster *et al.* 2011). Aufgrund des niedrigen Zellertrages und der Tatsache, dass die Cytochrome HdrE und VhoC in *M. luminyensis* fehlen, wird der Organismus den methanogenen Archaeen ohne Cytochrome zugeordnet. Dies lässt vermuten, dass auch die Energiebilanz in *M. luminyensis* mit der Bilanz von hydrogenotrophen, methanogenen Organismen vergleichbar ist. In dem für *M. luminyensis* postulierten Stoffwechselschema wird in der Tat nur 0,5 ATP pro Methan produziert, was die Hypothese stützt, dass die Methanomassiliicoccales und die Methanarchaeen ohne Cytochrome vergleichbare Energiebilanzen zeigen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass *M. luminyensis* und andere Methanomassiliicoccales eine ungewöhnliche Enzymausstattung besitzen und einen methanogenen Stoffwechsel betreiben, der einzigartig innerhalb der methanogenen Gruppe ist. Dabei zeigen die Organismen zwar Charakteristika der ‚klassischen‘ methanogenen Wege, kombinieren diese jedoch teilweise auf eine bisher nicht beschriebene Art. Dadurch ergeben sich Enzymkomplexe mit neuartiger Funktion (Fpo/HdrD-Komplex), die sich mit bekannten, konservierten Enzymen bzw. Enzymkomplexen (z. B. Mvh/Hdr-Komplex) zu einem komplexen Energie-konservierenden System zusammensetzen.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit der Untersuchung des im menschlichen Darm lebenden, methanogenen Archaeons *M. luminyensis*. Da der Organismus zum jetzigen Zeitpunkt immer noch der einzige in Reinkultur verfügbare Vertreter der Ordnung Methanomassiliicoccales ist, war dessen Erforschung aus verschiedenen Gründen relevant. Zum einen ist in *M. luminyensis* ein neuartiger Methanogeneseweg realisiert, was die Analyse des Organismus aus biochemischer Sicht interessant macht. Zum anderen ist die Untersuchung dieses methanogenen Archaeons wichtig, da *M. luminyensis* als potentielles Probiotikum im Zusammenhang mit der Erkrankung Trimethylaminurie in Frage kommt. Um unerwünschten Nebenwirkungen entgegen zu wirken und Wechselwirkungen zwischen *M. luminyensis* und dem menschlichen Wirt besser verstehen zu können, sind fundierte Kenntnisse über die Physiologie des Organismus absolut essentiell. Daher zielte die Dissertation auf die detaillierte Untersuchung dieses methanogenen Vertreters auf physiologischer, biochemischer und molekularbiologischer Basis ab.

1. Im Rahmen von Wachstumsanalysen konnte gezeigt werden, dass *M. luminyensis* die methylierten Substrate, Methanol und Methylamine, mit H_2 als Elektronendonator zu äquimolaren Methanmengen umsetzt. Die Zellen zeigten die höchste Methanbildungsrate am Ende der exponentiellen Phase.

2. Durch Optimierung der Wachstumsbedingungen wurde eine maximale OD_{600} von 0,5 erreicht, die bisher nicht mit *M. luminyensis* erzielt werden konnte. Zum Erreichen dieser Zelldichte war eine Konzentration an Methylgruppenäquivalenten von mindestens 110 mM nötig. Darüber hinaus mussten die Kulturen regelmäßig mit H_2 übergast werden, damit keine Limitierung durch den Elektronendonator einsetzte. Es spielte keine Rolle, welche der genannten methylierten Verbindungen als Substrat dienten, da mit äquimolaren Konzentrationen an Methylgruppenäquivalenten bei allen Substraten ähnliche Zellausbeuten erzielt wurden ($2,4 \text{ mol Methylgruppenäquivalent g Trockengewicht}^{-1}$). Geringere Methylgruppenäquivalent-Konzentrationen als 110 mM limitierten das Wachstum des Organismus, während höhere Konzentrationen nicht zu höheren Zellerträgen führten.

3. *M. luminyensis* nutzte Acetat als Kohlenstoffquelle und inkorporierte diese Verbindung während der exponentiellen Phase ($16,5 \text{ mmol Acetat g Trockengewicht}^{-1}$). Beim Erreichen der stationären Phase enthielt das Medium weiterhin Acetat, sodass eine Wachstumslimitierung durch Acetat ausgeschlossen werden konnte.

4. Bei der Untersuchung von Methanol- und TMA-adaptierten *M. luminyensis*-Zellen fiel auf, dass die Zellen Methanol mit der höchsten Rate zu Methan umsetzten, unabhängig von der Adaptation an ein bestimmtes Substrat. Waren die Zellen an Methanol angepasst, war überraschenderweise keine Methanogenese ausgehend von Methylaminen + H_2 zu verzeichnen. Dies deutete darauf hin, dass den Zellen die enzymatische Ausstattung zur Verstoffwechslung von Methylaminen fehlte. Lag dagegen eine Adaptation auf die Verwertung von Methylaminen vor, wurden auch diese Verbindungen zu Methan umgesetzt. Interessanterweise zeigten TMA-adaptierte Zellen ebenfalls die höchste Methanbildungsrate mit Methanol, was darauf hinwies, dass *M. luminyensis* auch bei Wachstum auf

Methylaminen Enzyme zur Methanol-Demethylierung produziert und Methanol als Substrat bevorzugt wird.

5. Zur Bestätigung der Hypothese, dass Methanol das präferierte Substrat von *M. luminyensis* ist, wurden Transkriptionsstudien durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Gene, die für Enzyme der Methanol-Demethylierung kodieren, unabhängig vom Wachstumssubstrat hohe Transkriptmengen aufwiesen. Im Gegensatz dazu lagen von Genen, die für Enzyme der Methylamin-Demethylierung kodieren, nur dann hohe mRNA-Mengen vor, wenn die Anzucht der Zellen auf dem entsprechenden Substrat erfolgte. Somit deuteten sowohl die Versuche mit den ruhenden Zellen, als auch die Transkriptionsstudien darauf hin, dass eine konstitutive Expression der Gene, die für Proteine der Methanol-Verstoffwechslung kodieren, vorlag. Im Gegensatz dazu unterlagen Gene, die für Proteine der Methylamin-Demethylierung kodieren, offensichtlich einer stringenten Regulation. Da Methanol im menschlichen Darm aus Pektin entsteht, welches ständig über die Nahrung aufgenommen wird, stellt die Verbindung eine zuverlässige Energiequelle dar und wird deswegen vermutlich gegenüber Methylaminen bevorzugt.

6. In *M. luminyensis* ist ein bisher nicht beschriebener methanogener Energiestoffwechsel realisiert. Das Genom von *M. luminyensis* enthält keine Gene, die für eine Methyltransferase Mtr, eine Vho-Hydrogenase oder einen Rnf-Komplex kodieren. Im Gegensatz dazu sind ein ‚kopfloser‘ Fpo-Komplex, eine lösliche Heterodisulfidreduktase, eine Methyl-CoM-Reduktase, eine Untereinheit der membranständigen Heterodisulfidreduktase (HdrD) und eine lösliche Mvh-Hydrogenase, sowie drei membranständige Hydrogenasen (Ech- bzw. Typ 3-Hydrogenasen) im Genom kodiert. Bei Wachstum auf Methanol + H₂ lagen von den Genen, die für den Fpo-Komplex, den löslichen Mvh/Hdr-Komplex und die Untereinheit HdrD kodieren, signifikante mRNA-Mengen vor. Demgegenüber zeigten die Gene, die für die drei membranständigen Hydrogenasen kodieren, nur sehr geringe Transkriptabundanzen.

7. Das Cytoplasma von *M. luminyensis* zeigte hohe Heterodisulfidreduktase- und Hydrogenase-Aktivitäten, welche durch den Mvh/Hdr-Komplex hervorgerufen wurden. Dies weist auf eine wichtige Funktion des Enzymkomplexes im Energiestoffwechsel von *M. luminyensis* hin. Die Membranfraktion verfügte dagegen über eine sehr geringe Hydrogenase-Aktivität (2 % der Gesamt-Aktivität), sodass membranständige Hydrogenasen bei der Energiekonservierung in diesem methanogenen Archaeon offensichtlich keine Rolle spielen. Die Methyl-CoM-Reduktase ist wie in allen bekannten methanogenen Organismen essentiell für die Methanogenese in *M. luminyensis*.

8. Die Untereinheit HdrD der eigentlich membranständigen Heterodisulfidreduktase HdrDE, welche aus methanogenen Archaeen mit Cytochromen bekannt ist, bildet in *M. luminyensis* ein funktionelles Enzym, das Heterodisulfidreduktase-Aktivität aufweist. Das Enzym konnte im Rahmen der vorliegenden Dissertation in *E. coli* Δ iscR überproduziert und enzymatisch charakterisiert werden, wobei HdrD eine spezifische Aktivität von 4,9 U mg⁻¹ und einen K_M-Wert von 20,1 µM zeigte. Es handelte sich um die erste in *E. coli* produzierte, methanogene Heterodisulfidreduktase, die auch funktionell war.

9. *M. luminyensis* nutzt nur Protonen als Kopplungionen zur Energiekonservierung an der Cytoplasmamembran. Die Methanbildung und die ATP-Synthese von *M. luminyensis*-Zellen zeigten

keine Abhängigkeit von Na^+ und wurden nicht durch das Na^+ -Ionophor ETH157 beeinflusst. Im Gegensatz dazu wirkte sich das Protonophor SF6847 stark auf beide Parameter aus. *M. luminyensis* ist daher das erste methanogene Archaeon, dessen Membranpotential nicht von Na^+ -Ionen abhängt, was ein Alleinstellungsmerkmal innerhalb der methanogenen Gruppe ist.

10. *M. luminyensis*-Membranen, die den ‚kopflösen‘ Fpo-Komplex enthalten, konnten in Kombination mit der Untereinheit HdrD Fd_{red} als Elektronendonator nutzen, sodass eine Fpo/HdrD-Komplexbildung postuliert wurde. Nach dieser Hypothese fungiert HdrD als terminale Reduktase, die das Heterodisulfid reduziert. Die Elektronen, die für diese Reaktion benötigt werden, stammen wahrscheinlich von Fd_{red} , welches der Fpo-Komplex oxidiert, und werden vom Fpo-Komplex an HdrD übertragen. Im Zuge dieser Reaktion können Protonen über die Cytoplasmamembran nach außen geschleust werden, wodurch das elektrochemische Membranpotential erzeugt wird.

Zusammengefasst lieferte die vorliegende Arbeit erstmals biochemische Daten zur Energiekonservierung in *M. luminyensis* und zur Physiologie dieses methanogenen Archaeons. Da methanogene Archaeen ein wichtiger Bestandteil des trophischen Netzwerks im Gastrointestinaltrakt sind und da *M. luminyensis* als ‚Archaeobiotikum‘ in Frage kommt, sind diese Kenntnisse von großer Bedeutung.

6 Literaturverzeichnis

- Abken, HJ; Deppenmeier, U** (1997) Purification and properties of an F₄₂₀H₂ dehydrogenase from *Methanosarcina mazei* Gö1. *FEMS Microbiology Letters* 154, S. 231–237.
- Abken, HJ; 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), S. 2027–2032.
- Akhtar, KM; Jones, PR** (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), S. 853–862.
- Albers, S-V; Meyer, BH** (2011) The archaeal cell envelope. *Nature Reviews Microbiology* 9 (6), S. 414–426.
- Altschul, SF; Gish, W; Miller, W; Myers, EW; Lipman, DJ** (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215 (3), S. 403–410.
- Al-Waiz, M; Mitchell, SC; Idle, JR; Smith, RL** (1987) The metabolism of ¹⁴C-labelled trimethylamine and its N-oxide in man. *Xenobiotica* 17 (5), S. 551–558.
- Andrews, SC; Berks, BC; McClay, J; Ambler, A; Quail, MA; Golby, P; Guest, JR** (1997) A 12-cistron *Escherichia coli* operon (*huf*) encoding a putative proton-translocating formate hydrogenlyase system. *Microbiology* 143, S. 3633–3647.
- Appel, J; Schulz, R** (1996) Sequence analysis of an operon of a NAD(P)-reducing nickel hydrogenase from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 gives additional evidence for direct coupling of the enzyme to NAD(P)H-dehydrogenase (complex 1). *Biochimica et Biophysica Acta* 1298 (2), S. 141–147.
- 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), e7125.
- Arumugam, M; Raes, J; Pelletier, E; Le Paslier, D; Yamada, T; Mende, DR; Fernandes, GR; Tap, J; Bruls, T; Batto, JM; Bertalan, M; Borruel, N; Casellas, F; Fernandez, L; Gautier, L; Hansen, T; Hattori, M; Hayashi, T; Kleerebezem, M; Kurokawa, K; Leclerc, M; Levenez, F; Manichanh, C; Nielsen, HB; Nielsen, T; Pons, N; Poulain, J; Qin, J; Sicheritz-Ponten, T; Tims, S; Torrents, D; Ugarte, E; Zoetendal, EG; Wang, J; Guarner, F; Pedersen, O; de Vos, WM; Brunak, S; Doré, J; Antolín, M; Artiguenave, F; Blottiere, HM; Almeida, M; Brechot, C; Cara, C; Chervaux, C; Cultrone, A; Delorme, C; Denariáz, G; Dervyn, R; Foerstner, KU; Friss, C; van de Guchte, M; Guedon, E; Haimet, F; Huber, W; van Hylckama-Vlieg, J; Jamet, A; Juste, C; Kaci, G; Knol, J; Lakhdari, O; Layec, S; Le Roux, K; Maguin, E; Mérieux, A; Melo Minardi, R; M’rini, C; Muller, J; Oozeer, R; Parkhill, J; Renault, P; Rescigno, M; Sanchez, N; Sunagawa, S; Torrejon, A; Turner, K; Vandemeulebrouck, G; Varela, E; Winogradsky, Y; Zeller, G; Weissenbach, J; Ehrlich, SD; Bork, P** (2011) Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 473 (7346), S. 174–180.
- Axelrod, J; Daly, J** (1965) Pituitary gland: enzymic formation of methanol from S-adenosylmethionine. *Science* 150 (3698), S. 892–893.
- Bäckhed, F; Fraser, CM; Ringel, Y; Sanders, ME; Sartor, RB; Sherman, PM; Versalovic, J; Young, V; Finlay, BB** (2012) Defining a healthy human gut microbiome: current concepts, future directions, and clinical applications. *Cell Host & Microbe* 12 (5), S. 611–622.
- Bagramyan, K; Trchounian, A** (2003) Structural and functional features of formate hydrogen lyase, an enzyme of mixed-acid fermentation from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 68 (11), S. 1159–1170.
- Balch, WE; Wolfe, RS** (1979) Specificity and biological distribution of coenzyme M (2-mercaptoethanesulfonic acid). *Journal of Bacteriology* 137 (1), S. 256–263.
- Bang, C; Vierbuchen, T; Gutschmann, T; Heine, H; Schmitz, RA** (2017) Immunogenic properties of the human gut-associated archaeon *Methanomassiliicoccus luminyensis* and its susceptibility to antimicrobial peptides. *PloS One* 12 (10), e0185919.

- Barrett, EL; Kwan, HS** (1985) Bacterial reduction of trimethylamine oxide. *Annual Review of Microbiology* 39, S. 131–149.
- Battchikova, N; Aro, EM** (2007) Cyanobacterial NDH-1 complexes: multiplicity in function and subunit composition. *Physiologia Plantarum* 131 (1), S. 22–32.
- Battchikova, N; Eisenhut, M; Aro, EM** (2011) Cyanobacterial NDH-1 complexes: novel insights and remaining puzzles. *Biochimica et Biophysica Acta* 1807 (8), S. 935–944.
- Bäumer, S; Ide, T; Jacobi, C; Johann, A; Gottschalk, G; Deppenmeier, U** (2000) The F₄₂₀H₂ dehydrogenase from *Methanosarcina mazei* is a redox-driven proton pump closely related to NADH dehydrogenases. *The Journal of Biological Chemistry* 275 (24), S. 17968–17973.
- Bäumer, S; Murakami, E; Brodersen, J; Gottschalk, G; Ragsdale, SW; 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, S. 295–298.
- Becher, B; Müller, V; Gottschalk, G** (1992) N⁵-methyl-tetrahydromethanopterin:coenzyme M methyltransferase of *Methanosarcina* strain Gö1 is an Na⁺-translocating membrane protein. *Journal of Bacteriology* 174 (23), S. 7656–7660.
- Becker, KW; Elling, FJ; Yoshinaga, MY; Söllinger, A; Ulrich, T; Hinrichs, KU** (2016) Unusual butane- and pentanetriol-based tetraether lipids in *Methanomassiliicoccus luminyensis*, a representative of the seventh order of methanogens. *Applied and Environmental Microbiology* 82 (15), S. 4505–4516.
- Beckmann, S; Welte, C; Li, X; Oo, YM; Kroeninger, L; Heo, Y; Zhang, M; Ribeiro, D; Lee, M; Bhabhade, M; Marjo, CE; Seidel, J; Deppenmeier, U; Manefield, M** (2016) Novel phenazine crystals enable direct electron transfer to methanogens in anaerobic digestion by redox potential modulation. *Energy & Environmental Science* 9 (2), S. 644–655.
- Beifuss, U; Tietze, M; Bäumer, S; Deppenmeier, U** (2000) Methanophenazine: structure, total synthesis, and function of a new cofactor from methanogenic archaea. *Angewandte Chemie* 39 (14), S. 2470–2472.
- Belay, N; Mukhopadhyay, B; de Macario, EC; Galask, R; Daniels, L** (1990) Methanogenic bacteria in human vaginal samples. *Journal of Clinical Microbiology* 28 (7), S. 1666–1668.
- Berger, S; Welte, C; Deppenmeier, U** (2012) Acetate activation in *Methanosaeta thermophila*: characterization of the key enzymes pyrophosphatase and acetyl-CoA synthetase. *Archaea* 2012, 315153.
- Berger, S** (2015) Energy conservation in acetoclastic methanogenic archaea and the human gut archaeon *Methanomassiliicoccus luminyensis*. Dissertation. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Biegel, E; Schmidt, S; Gonzalez, JM; Muller, 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), S. 613–634.
- Bindler, F; Voges, E; Laugel, P** (1988) The problem of methanol concentration admissible in distilled fruit spirits. *Food Additives and Contaminations* 5 (3), S. 343–351.
- Blamley, JM; Adams, MWW** (1993) Purification and characterization of pyruvate ferredoxin oxidoreductase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1161 (1), S. 19–27.
- Blaut, M; Gottschalk, G** (1984) Coupling of ATP synthesis and methane formation from methanol and molecular hydrogen in *Methanosarcina barkeri*. *European Journal of Biochemistry* 141 (1), S. 217–222.
- Blaut, M; Müller, V; Fiebig, K; Gottschalk, G** (1985) Sodium ions and an energized membrane required by *Methanosarcina barkeri* for the oxidation of methanol to the level of formaldehyde. *Journal of Bacteriology* 164 (1), S. 95–101.
- Blaut, M; Müller, V; Gottschalk, G** (1987) Proton translocation coupled to methanogenesis from methanol + hydrogen in *Methanosarcina barkeri*. *FEBS Letters* 215 (1), S. 53–57.

- Bock, AK; Kunow, J; Glasemacher, J; Schönheit, P** (1996) Catalytic properties, molecular composition and sequence alignments of pyruvate:ferredoxin oxidoreductase from the methanogenic archaeon *Methanosarcina barkeri* (strain Fusaro). *European Journal of Biochemistry* 237 (1), S. 35–44.
- Böhringer, C** (2016) Überproduktion der Heterodisulfidreduktase (HdrD) und eines Ferredoxins aus *Methanomassiliicoccus luminyensis*. Bachelorarbeit. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Borrel, G; Harris, HMB; Parisot, N; Gaci, N; Tottey, W; Mihajlovski, A; Deane, J; Gribaldo, S; Bardot, O; Peyretailade, E; Peyret, P; O'Toole, PW; Brugère, JF** (2013a) Genome sequence of „*Candidatus* Methanomassiliicoccus intestinalis“ Issoire-Mx1, a third Thermoplasmatales-related methanogenic archaeon from human feces. *Genome Announcements* 1 (4), e00453-13.
- Borrel, G; Harris, HMB; Tottey, W; Mihajlovski, A; Parisot, N; Peyretailade, E; Peyret, P; Gribaldo, S; O'Toole, PW; Brugère, JF** (2012) Genome sequence of „*Candidatus* Methanomethylophilus alvus“ Mx1201, a methanogenic archaeon from the human gut belonging to a seventh order of methanogens. *Journal of Bacteriology* 194 (24), S. 6944–6945.
- Borrel, G; O'Toole, PW; Harris, HMB; Peyret, P; Brugère, JF; 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), S. 1769–1780.
- Borrel, G; Parisot, N; Harris, HMB; Peyretailade, E; Gaci, N; Tottey, W; Bardot, O; Raymann, K; Gribaldo, S; Peyret, P; O'Toole, PW; Brugère, JF** (2014) Comparative genomics highlights the unique biology of Methanomassiliicoccales, a Thermoplasmatales-related seventh order of methanogenic archaea that encodes pyrrolysine. *BMC Genomics* 15 (679), S. 1–23.
- Boucher, O; Friedlingstein, P; Collins, B; Shine, KP** (2009) The indirect global warming potential and global temperature change potential due to methane oxidation. *Environmental Research Letters* 4, 044007.
- Brandt, U** (2006) Energy converting NADH:quinone oxidoreductase (complex I). *Annual Review of Biochemistry* 75, S. 69–92.
- Brodersen, J; Bäumer, S; Abken, HJ; Gottschalk, G; Deppenmeier, U** (1999) Inhibition of membrane-bound electron transport of the methanogenic archaeon *Methanosarcina mazei* Gö1 by diphenyleneiodonium. *European Journal of Biochemistry* 259 (1-2), S. 218–224.
- Brugère, JF; Borrel, G; Gaci, N; Tottey, W; O'Toole, PW; Malpuech-Brugère, C** (2014) Archaeobiotics. Proposed therapeutic use of archaea to prevent trimethylaminuria and cardiovascular disease. *Gut Microbes* 5 (1), S. 5–10.
- Brüggemann, H; Falinski, F; Deppenmeier, U** (2000) Structure of the F₄₂₀H₂:quinone oxidoreductase of *Archaeoglobus fulgidus*. Identification and overproduction of the F₄₂₀H₂-oxidizing subunit. *European Journal of Biochemistry* 267, S. 5810–5814.
- Buan, NR; Metcalf, WW** (2010) Methanogenesis by *Methanosarcina acetivorans* involves two structurally and functionally distinct classes of heterodisulfide reductase. *Molecular Microbiology* 75 (4), S. 843–853.
- Buc, J; Santini, CL; Giordani, R; Czjzek, M; Wu, LF; Giordano, G** (1999) Enzymatic and physiological properties of the tungsten-substituted molybdenum TMAO reductase from *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 32 (1), S. 159–168.
- Buchman, AL; Dubin, MD; Moukarzel, AA; Jenden, DJ; Roch, M; Rice, KM; Gornbein, J; Ament, ME** (1995) Choline deficiency: a cause of hepatic steatosis during parenteral nutrition that can be reversed with intravenous choline supplementation. *Hepatology* 22 (5), S. 1399–1403.
- Buckel, W; Thauer, RK** (2018) Flavin-based electron bifurcation, ferredoxin, flavodoxin, and anaerobic respiration with protons (Ech) or NAD⁺ (Rnf) as electron acceptors: a historical review. *Frontiers in Microbiology* 9, 401.
- Burke, SA; Lo, SL; Krzycki, JA** (1998) Clustered genes encoding the methyltransferases of methanogenesis from monomethylamine. *Journal of Bacteriology* 180 (13), S. 3432–3440.
- Calderon-Gomez, LI; Day, CJ; Hartley-Tassell, LE; Wilson, JC; Mendz, GL; Korolik, V** (2017) Identification of NuoX and NuoY ligand binding specificity in the *Campylobacter jejuni* complex I. *Journal of Bacteriology & Parasitology* 8 (2), S. 1–8.

- Caldwell, DR** (1989) Effects of methanol on the growth of gastrointestinal anaerobes. *Canadian Journal of Microbiology* 35 (2), S. 313–317.
- Cederbaum, AI** (2012) Alcohol metabolism. *Clinics in Liver Disease* 16 (4), S. 667–685.
- Chen, M; Andersen, LP; Zhai, L; Kharazmi, A** (1999) Characterization of the respiratory chain of *Helicobacter pylori*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 24 (2), S. 169–174.
- Chen, SL; Blomberg, MRA; Siegbahn, PEM** (2012) How is methane formed and oxidized reversibly when catalyzed by Ni-containing methyl-coenzyme M reductase? *Chemistry* 18 (20), S. 6309–6315.
- Christl, SU; Murgatroyd, PR; Gibson, GR; Cummings, JH** (1992) Production, metabolism, and excretion of hydrogen in the large intestine. *Gastroenterology* 102 (4), S. 1269–1277.
- Cord-Ruwisch, R; Seitz, HJ; Conrad, R** (1988) The capacity of hydrogenotrophic anaerobic bacteria to compete for traces of hydrogen depends on the redox potential of the terminal electron acceptor. *Archives of Microbiology* 149 (4), S. 350–357.
- Craciun, S; Balskus, EP** (2012) Microbial conversion of choline to trimethylamine requires a glyceryl radical enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 109 (52), S. 21307–21312.
- Cummings, JH** (1983) Fermentation in the human large intestine: evidence and implications for health. *Lancet* 1 (8335), S. 1206–1209.
- den Besten, G; van Eunen, K; Groen, AK; Venema, K; Reijngoud, DJ; Bakker, BM** (2013) The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of Lipid Research* 54 (9), S. 2325–2340.
- Deng, Y; Ye, JY; Mi, HL; Shen, YG** (2003) Separation of hydrophobic NAD(P)H dehydrogenase subcomplexes from cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 35 (8), S. 723–727.
- Deppenmeier, U** (2004) The membrane-bound electron transport system of *Methanosarcina* species. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 36 (1), S. 55–64.
- Deppenmeier, U; Blaut, M; Gottschalk, G** (1990) Membrane-bound F₄₂₀H₂-dependent heterodisulfide reductase in methanogenic bacterium strain Gö1 and *Methanobolus tindarius*. *FEBS Letters* 261 (1), S. 199–203.
- Deppenmeier, U; Blaut, M; Lentjes, 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), S. 261–269.
- 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, S. 505–511.
- Deppenmeier, U; Lienard, T; Gottschalk, G** (1999) Novel reactions involved in energy conservation by methanogenic archaea. *FEBS Letters* 457 (3), S. 291–297.
- Deppenmeier, U; Müller, V** Life close to the thermodynamic limit: how methanogenic archaea conserve energy. In: *Bioenergetics - Results and Problems in Cell Differentiation*, Bd. 45, S. 123–152.
- Dhungana, S** (2014) Examination of putative methylamine permease genes in *Methanosarcina acetivorans* C2A. Masterarbeit. Miami University.
- Dolphin, CT; Janmohamed, A; Smith, RL; Shephard, EA; Phillips, IR** (1997) Missense mutation in flavin-containing mono-oxygenase 3 gene, FMO3, underlies fish-odour syndrome. *Nature Genetics* 17 (4), S. 491–494.
- Dongowski, G; Lorenz, A; Anger, H** (2000) Degradation of pectins with different degrees of esterification by *Bacteroides thetaiotaomicron* isolated from human gut flora. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (4), S. 1321–1327.
- Dorokhov, YL; Shindyapina, AV; Sheshukova, EV; Komarova, TV** (2015) Metabolic methanol: molecular pathways and physiological roles. *Physiological Reviews* 95 (2), S. 603–644.

- Drancourt, M; Nkamga, VD; Lakhe, NA; Régis, JM; Dufour, H; Fournier, PE; Bechah, Y; Scheld, WM; Raoult, D** (2017) Evidence of archaeal methanogens in brain abscess. *Clinical Infectious Disease* 65 (1), S. 1–5.
- Dridi, B; Fardeau, ML; Ollivier, B; Raoult, D; Drancourt, M** (2012a) *Methanomassiliicoccus luminyensis* gen. nov., sp. nov., a methanogenic archaeon isolated from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62 (8), S. 1902–1907.
- Dridi, B; Henry, M; Richet, H; Raoult, D; Drancourt, M** (2012b) Age-related prevalence of *Methanomassiliicoccus luminyensis* in the human gut microbiome. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica* 120 (10), S. 773–777.
- Duncan, SH; Hold, GL; Barcenilla, A; Stewart, CS; Flint, HJ** (2002) *Roseburia intestinalis* sp. nov., a novel saccharolytic, butyrate-producing bacterium from human faeces. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52 (5), S. 1615–1620.
- Efremov, RG; Sazanov, LA** (2011) Structure of the membrane domain of respiratory complex I. *Nature* 476 (7361), S. 414–420.
- Efremov, RG; Sazanov, LA** (2012) The coupling mechanism of respiratory complex I - a structural and evolutionary perspective. *Biochimica et Biophysica Acta* 1817 (10), S. 1785–1795.
- Eirich, LD; Vogels, GD; Wolfe, RS** (1978) Proposed structure for coenzyme F₄₂₀ from *Methanobacterium*. *Biochemistry* 17 (22), S. 4583–4593.
- Ellefson, WL; Wolfe, RS** (1981) Component c of the methylreductase system of *Methanobacterium*. *The Journal of Biological Chemistry* 256 (9), S. 4259–4262.
- Ellermann, J; Hedderich, R; Böcher, R; Thauer, RK** (1988) The final step in methane formation: investigations with highly purified methyl-CoM reductase (component C) from *Methanobacterium thermoautotrophicum* (strain Marburg). *European Journal of Biochemistry* 172, S. 669–677.
- Ellman, GL** (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 82, S. 70–77.
- Ermiler, U; Grabarse, W; Shima, S; Goubeaud, M; Thauer, RK** (1997) Crystal structure of methyl-coenzyme M reductase: the key enzyme of biological methane formation. *Science* 278 (5342), S. 1457–1562.
- Etiopo, G; Klusman, RW** (2002) Geologic emissions of methane to the atmosphere. *Chemosphere* 49 (8), S. 777–789.
- Färber, G; Keller, W; Kratky, C** (1991) Coenzyme F₄₃₀ from methanogenic bacteria: complete assignment of configuration based on an X-ray analysis of 12,13-diepi-F₄₃₀ pentamethyl ester and on NMR spectroscopy. *Helvetica Chimica Acta* 74, S. 697–716.
- Fearnley, IM; Walker, JE** (1992) Conservation of sequences of subunits of mitochondrial complex I and their relationships with other proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1140 (2), S. 105–134.
- Fennema, D; Phillips, IR; Shephard, EA** (2016) Trimethylamine and trimethylamine N-oxide, a flavin-containing monooxygenase 3 (FMO3)-mediated host-microbiome metabolic axis implicated in health and disease. *Drug Metabolism and Disposition* 44 (11), S. 1839–1850.
- Ferrari, A; Brusa, T; Rutili, A; Canzi, E; Biavati, B** (1994) Isolation and characterization of *Methanobrevibacter oralis* sp. nov. *Current Microbiology* 29 (1), S. 7–12.
- Ferry, JG** (1992) Methane from acetate. *Journal of Bacteriology* 174 (17), S. 5489–5495.
- Finel, M** (1998) Does NADH play a central role in energy metabolism in *Helicobacter pylori*? *Trends in Biochemical Sciences* 23 (11), S. 412–414.
- Fischer, R; Thauer, RK** (1990) Ferredoxin-dependent methane formation from acetate in cell extracts of *Methanosarcina barkeri* (strain MS). *FEBS Letters* 269 (2), S. 368–372.
- Fogo, JK; Popowsky, M** (1949) Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide. *Analytical Chemistry* 21, S. 732–734.
- Folsom, JP; Carlson, RP** (2015) Physiological, biomass elemental composition and proteomic analyses of *Escherichia coli* ammonium-limited chemostat growth, and comparison with iron- and glucose-limited chemostat growth. *Microbiology* 161 (8), S. 1659–1670.

- Fricke, WF; Seedorf, H; Henne, A; Krüer, M; Liesegang, H; Hedderich, R; Gottschalk, G; Thauer, RK** (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), S. 642–658.
- Friedrich, MW** (2005) Methyl-coenzyme M reductase genes: unique functional markers for methanogenic and anaerobic methane-oxidizing *Archaea*. *Methods in Enzymology* 397, S. 428–442.
- Friedrich, T** (2001) Complex I: a chimaera of a redox and conformation-driven proton pump? *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 33 (3), S. 169–177.
- 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), S. 1–5.
- 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), S. 107–111.
- Friedrich, T; Weiss, H** (1997) Modular evolution of the respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase and the origin of its modules. *Journal of Theoretical Biology* 187 (4), S. 529–540.
- Fukami, K; Yamagishi, SI; Sakai, K; Kaida, Y; Yokoro, M; Ueda, S; Wada, Y; Takeuchi, M; Shimizu, M; Yamazaki, H; Okuda, S** (2015) Oral L-carnitine supplementation increases trimethylamine-N-oxide but reduces markers of vascular injury in hemodialysis patients. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 65 (3), S. 289–295.
- Gaci, N; Borrel, G; Tottey, W; O'Toole, PW; Brugère, JF** (2014) Archaea and the human gut: new beginning of an old story. *World Journal of Gastroenterology* 20 (43), S. 16062–16078.
- Galkin, AS; Grivennikova, VG; Vinogradov, AD** (1999) →H⁺/2e⁻ stoichiometry in NADH-quinone reductase reactions catalyzed by bovine heart submitochondrial particles. *FEBS Letters* 451 (2), S. 157–161.
- Garcia, JL; Patel, BKC; Ollivier, B** (2000) Taxonomic, phylogenetic, and ecological diversity of methanogenic *Archaea*. *Anaerobe* 6 (4), S. 205–226.
- Garner, CE; Smith, S; de Lacy Costello, B; White, P; Spencer, R; Probert, CSJ; Ratcliffe, NM** (2007) Volatile organic compounds from feces and their potential for diagnosis of gastrointestinal disease. *FASEB Journal* 21 (8), S. 1675–1688.
- Gärtner, P; Ecker, A; Fischer, R; Linder, D; Fuchs, G; Thauer, RK** (1993) Purification and properties of N⁵-methyltetrahydromethanopterin: coenzyme M methyltransferase from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *European Journal of Biochemistry* 213, S. 537–545.
- George, DG; Hunt, LT; Yeh, LS; Barker, WC** (1985) New perspectives on bacterial ferredoxin evolution. *Journal of Molecular Evolution* 22 (1), S. 20–31.
- Gnekow, B; Ough, CS** (1976) Methanol in wines and musts: source and amounts. *American Journal of Enology and Viticulture* 27, 1-6.
- Gorlas, A; Robert, C; Gimenez, G; Drancourt, M; Raoult, D** (2012) Complete genome sequence of *Methanomassiliicoccus luminyensis*, the largest genome of a human-associated *Archaea* species. *Journal of Bacteriology* 194 (17), S. 4745.
- Gottschalk, G; Thauer, RK** (2001) The Na⁺-translocating methyltransferase complex from methanogenic archaea. *Biochimica et Biophysica Acta* 1505 (1), S. 28–36.
- Greening, C; Ahmed, FH; Mohamed, AE; Lee, BM; Pandey, G; Warden, AC; Scott, C; Oakeshott, JG; Taylor, MC; Jackson, CJ** (2016) Physiology, biochemistry, and applications of F₄₂₀- and F_o-dependent redox reactions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 80 (2), S. 451–493.
- Großkopf, R; Janssen, PH; Liesack, W** (1998) Diversity and structure of the methanogenic community in anoxic rice paddy soil microcosms as examined by cultivation and direct 16S rRNA gene sequence retrieval. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (3), S. 960–969.
- Gunsalus, RP; Romesser, JA; Wolfe, RS** (1978) Preparation of coenzyme M analogues and their activity in the methyl coenzyme M reductase system of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Biochemistry* 17 (12), S. 2374–2377.

- Gunsalus, RP; Wolfe, RS** (1977) Stimulation of CO₂ reduction to methane by methyl-coenzyme M in extracts of *Methanobacterium*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 76 (3), S. 790–795.
- Hamann, N; Bill, E; Shokes, JE; Scott, RA; Bennati, M; Hedderich, R** (2009) The CCG-domain-containing subunit SdhE of succinate:quinone oxidoreductase from *Sulfolobus solfataricus* P2 binds a 4Fe-4S cluster. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 14 (3), S. 457–470.
- Hamann, N; Mander, GJ; Shokes, JE; Scott, RA; Bennati, M; Hedderich, R** (2007) A cysteine-rich CCG domain contains a novel 4Fe-4S cluster binding motif as deduced from studies with subunit B of heterodisulfide reductase from *Methanothermobacter marburgensis*. *Biochemistry* 46 (44), S. 12875–12885.
- Hanahan, D** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology* 166 (4), S. 557–580.
- Hang, YD; Woodams, EE** (2008) Methanol content of grappa made from New York grape pomace. *Bioresource Technology* 99 (9), S. 3923–3925.
- Harms, U; Weiss, DS; Gartner, P; Linder, D; Thauer, RK** (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), S. 640–648.
- Harold, FM** (1986) *The Vital Force: A Study of Bioenergetics*: W. H. Freeman and Company, New York.
- Harold, FM** (1972) Conservation and transformation of energy by bacterial membranes. *Bacteriological Reviews* 36 (2), S. 172–230.
- Hedderich, R; Forzi, L** (2005) Energy-converting NiFe hydrogenases: more than just H₂ activation. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 10 (2-4), S. 92–104.
- 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), S. 961–970.
- Hedderich, R; Koch, J; Linder, D; Thauer, RK** (1994) The heterodisulfide reductase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* contains sequence motifs characteristic of pyridine-nucleotide-dependent thioredoxin reductases. *European Journal of Biochemistry* 225 (1), S. 253–261.
- Heiden, S; Hedderich, R; Setzke, E; Thauer, RK** (1994) Purification of a two-subunit cytochrome-*b*-containing heterodisulfide reductase from methanol-grown *Methanosarcina barkeri*. *European Journal of Biochemistry* 221 (2), S. 855–861.
- 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), S. 494–498.
- Hippler, B; Thauer, RK** (1999) The energy conserving methyltetrahydromethanopterin:coenzyme M methyltransferase complex from methanogenic archaea: function of the subunit MtrH. *FEBS Letters* 449 (2-3), S. 165–168.
- Hocking, WP; Stokke, R; Roalkvam, I; Steen, IH** (2014) Identification of key components in the energy metabolism of the hyperthermophilic sulfate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus* by transcriptome analyses. *Frontiers in Microbiology* 5 (95), S. 1–20.
- Hoffman, PS; Goodman, TG** (1982) Respiratory physiology and energy conservation efficiency of *Campylobacter jejuni*. *Journal of Bacteriology* 150 (1), S. 319–326.
- Hong, JS; Rabinowitz, JC** (1970) Molar extinction coefficient and iron and sulfide content of clostridial ferredoxin. *The Journal of Biological Chemistry* 245 (19), S. 4982–4987.
- Hughes, NJ; Chalk, PA; Clayton, CL; Kelly, DJ** (1995) Identification of carboxylation enzymes and characterization of a novel four-subunit pyruvate:flavodoxin oxidoreductase from *Helicobacter pylori*. *Journal of Bacteriology* 177 (14), S. 3953–3959.
- Hughes, NJ; Clayton, CL; Chalk, PA; Kelly, DJ** (1998) *Helicobacter pylori* *porCDAB* and *oorDABC* genes encode distinct pyruvate:flavodoxin and 2-oxoglutarate:acceptor oxidoreductases which mediate electron transport to NADP. *Journal of Bacteriology* 180 (5), S. 1119–1128.

- Ide, T; Bäumer, S; Deppenmeier, U** (1999) Energy conservation by the H₂:heterodisulfide oxidoreductase from *Methanosarcina mazei* Gö1: identification of two proton-translocating segments. *Journal of Bacteriology* 181 (13), S. 4076–4080.
- Ikawa, M; Schaper, TD; Dollard, CA; Sasner, JJ** (2003) Utilization of the Folin-Ciocalteu phenol reagent for the determination of TMA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, S. 1811–1815.
- Jacobson, F; Walsh, C** (1984) Properties of 7,8-didemethyl-8-hydroxy-5-deazaflavins relevant to redox coenzyme function in methanogen metabolism. *Biochemistry* 23 (5), S. 979–988.
- Jensen, NS; Canale-Parola, E** (1985) Nutritionally limited pectinolytic bacteria from the human intestine. *Applied and Environmental Microbiology* 50 (1), S. 172–173.
- Jensen, NS; Canale-Parola, E** (1986) *Bacteroides pectinophilus* sp. nov. and *Bacteroides galacturonicus* sp. nov.: two pectinolytic bacteria from the human intestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology* 52 (4), S. 880–887.
- Johnson, DC; Dean, DR; Smith, AD; Johnson, MK** (2005) Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annual Review of Biochemistry* 74, S. 247–281.
- Kaesler, B; Schönheit, P** (1988) Methanogenesis and ATP synthesis in methanogenic bacteria at low electrochemical proton potentials. An explanation for the apparent uncoupler insensitivity of ATP synthesis. *European Journal of Biochemistry* 174 (1), S. 189–197.
- Karrasch, M; Borner, G; Enssle, M; Thauer, RK** (1989) Formylmethanofuran dehydrogenase from methanogenic bacteria, a molybdoenzyme. *FEBS Letters* 253 (1-2), S. 226–230.
- Kaster, AK** (2010) Energiestoffwechsel von Cytochrom-freien methanogenen Archaea bei Wachstum auf H₂ und CO₂. Dissertation. Philipps-Universität Marburg.
- Kaster, AK; Moll, J; Parey, K; Thauer, RK** (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), S. 2981–2986.
- Kelley, LA; Mezulis, S; Yates, CM; Wass, MN; Sternberg, MJE** (2015) The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols* 10 (6), S. 845–858.
- Kelly, CL; Pinske, C; Murphy, BJ; Parkin, A; Armstrong, F; Palmer, T; Sargent, F** (2015) Integration of an FeFe-hydrogenase into the anaerobic metabolism of *Escherichia coli*. *Biotechnology Reports* 8, S. 94–104.
- Khan, MT; van Dijk, JM; Harmsen, HJM** (2014) Antioxidants keep the potentially probiotic but highly oxygen-sensitive human gut bacterium *Faecalibacterium prausnitzii* alive at ambient air. *PLoS One* 9 (5), e96097.
- Kim, YJ; Lee, HS; Kim, ES; Bae, SS; Lim, JK; Matsumi, R; Lebedinsky, AV; Sokolova, TG; Kozhevnikova, DA; Cha, SS; Kim, SJ; Kwon, KK; Imanaka, T; Atomi, H; Bonch-Osmolovskaya, EA; Lee, JH; Kang, SG** (2010) Formate-driven growth coupled with H₂ production. *Nature* 467 (7313), S. 352–355.
- Knights, D; Ward, TL; McKinlay, CE; Miller, H; Gonzalez, A; McDonald, D; Knight, R** (2014) Rethinking „enterotypes“. *Cell Host & Microbe* 16 (4), S. 433–437.
- Koeth, RA; Wang, Z; Levison, BS; Buffa, JA; Org, E; Sheehy, BT; Britt, EB; Fu, X; Wu, Y; Li, L; Smith, JD; DiDonato, JA; Chen, J; Li, H; Wu, GD; Lewis, JD; Warrier, M; Brown, JM; Krauss, RM; Tang, WHW; Bushman, FD; Lusis, AJ; Hazen, SL** (2013) Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nature Medicine* 19 (5), S. 576–585.
- 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), S. 5108–5115.
- Kraut, JA; Kurtz, I** (2008) Toxic alcohol ingestions. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 3 (1), S. 208–225.
- 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), S. 472–483.

- Kröniger, L; Gottschling, J; Deppenmeier, U** (2017) Growth characteristics of *Methanomassiliicoccus luminyensis* and expression of methyltransferase encoding genes. *Archaea* 2017, 2756573.
- Kuchenreuther, JM; Grady-Smith, CS; Bingham, AS; George, SJ; Cramer, SP; Swartz, JR** (2010) High-yield expression of heterologous FeFe hydrogenases in *Escherichia coli*. *PloS One* 5 (11), e15491.
- Kumar, N; Das, D** (2000) Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08. *Process Biochemistry* 35, S. 589–593.
- Künkel, A; Vaupel, M; Heim, S; Thauer, RK; Hedderich, R** (1997) Heterodisulfide reductase from methanol-grown cells of *Methanosarcina barkeri* is not a flavoenzyme. *European Journal of Biochemistry* 244 (1), S. 226–234.
- Künkel, A; Vorholt, JA; Thauer, RK; Hedderich, R** (1998) An *Escherichia coli* hydrogenase-3-type hydrogenase in methanogenic archaea. *European Journal of Biochemistry* 252 (3), S. 467–476.
- Kunow, J; Linder, D; Stetter, KO; Thauer, RK** (1994) F₄₂₀H₂: quinone oxidoreductase from *Archaeoglobus fulgidus*: characterization of a membrane-bound mutisubunit complex containing FAD and iron-sulfur clusters. *European Journal of Biochemistry* 223, S. 503–511.
- Kwan, HS; Barrett, EL** (1983) Roles of menaquinone and the two trimethylamine oxide (TMAO) reductases in TMAO respiration in *Salmonella typhimurium*: Mu d(Ap^r lac) insertion mutations in *men* and *tor*. *Journal of Bacteriology* 155 (3), S. 1147–1155.
- Laemmli, UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, S. 680–685.
- Lajoie, SF; Bank, S; Miller, TL; Wolin, MJ** (1988) Acetate production from hydrogen and [¹³C]carbon dioxide by the microflora of human feces. *Applied and Environmental Microbiology* 54 (11), S. 2723–2727.
- Landfald, B; Valeur, J; Berstad, A; Raa, J** (2017) Microbial trimethylamine-N-oxide as a disease marker: something fishy? *Microbial Ecology in Health and Disease* 28 (1), 1327309.
- Lang, K; Schuldes, J; Klingl, A; Poehlein, A; Daniel, R; Brunea, 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), S. 1338–1352.
- Larkin, MA; Blackshields, G; Brown, NP; Chenna, R; McGettigan, PA; McWilliam, H; Valentin, F; Wallace, IM; Wilm, A; Lopez, R; Thompson, JD; Gibson, TJ; Higgins, DG** (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23 (21), S. 2947–2948.
- Laskar, F; Das Purkayastha, S; Sen, A; Bhattacharya, MK; Misra, BB** (2017) Diversity of methanogenic archaea in freshwater sediments of lacustrine ecosystems. *Journal of Basic Microbiology*.
- Lepp, PW; Brinig, MM; Ouverney, CC; Palm, K; Armitage, GC; Relman, DA** (2004) Methanogenic archaea and human periodontal disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 101 (16), S. 6176–6181.
- Li, Q; Li, L; Rejtar, T; Lessner, DJ; Karger, BL; Ferry, JG** (2006) Electron transport in the pathway of acetate conversion to methane in the marine archaeon *Methanosarcina acetivorans*. *Journal of Bacteriology* 188 (2), S. 702–710.
- Li, Y; Leahy, SC; Jeyanathan, J; Henderson, G; Cox, F; Altermann, E; Kelly, WJ; Lambie, SC; Janssen, PH; Rakonjac, J; Attwood, GT** (2016) The complete genome sequence of the methanogenic archaeon ISO4-H5 provides insights into the methylotrophic lifestyle of a ruminal representative of the Methanomassiliicoccales. *Standards in Genomic Sciences* 11 (59), S. 1–12.
- Lienard, T; Becher, B; Marschall, M; Bowien, S; Gottschalk, G** (1996) Sodium ion translocation by N⁵-methyltetrahydromethanopterin: coenzyme M methyltransferase from *Methanosarcina mazei* Gö1 reconstituted in ether lipid liposomes. *European Journal of Biochemistry* 239 (3), S. 857–864.
- Lindinger, W; Taucher, J; Jordan, A; Hansel, A; Vogel, W** (1997) Endogenous production of methanol after the consumption of fruit. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research* 21 (5), S. 939–943.
- Livingston, DA; Pfaltz, A; Schreiber, J; Eschenmoser, A** (1984) Factor F₄₃₀ from methanogenic bacteria: structure of the protein-free factor. *Helvetica Chimica Acta* 67, S. 334–351.

- MacAllister, SL; Choi, J; Dedina, L; O'Brien, PJ** (2011) Metabolic mechanisms of methanol/formaldehyde in isolated rat hepatocytes: carbonyl-metabolizing enzymes versus oxidative stress. *Chemico-Biological Interactions* 191 (1-3), S. 308–314.
- Mackay, RJ; McEntyre, CJ; Henderson, C; Lever, M; George, PM** (2011) Trimethylaminuria: causes and diagnosis of a socially distressing condition. *Clinical Biochemical Reviews* 32 (1), S. 33–43.
- Mai, X; Adams, MWW** (1994) Indolepyruvate ferredoxin oxidoreductase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *The Journal of Biological Chemistry* 269 (24), S. 16726–16732.
- Marinovich, M; Galli, CL; Bosetti, C; Gallus, S; La Vecchia, C** (2013) Aspartame, low-calorie sweeteners and disease: regulatory safety and epidemiological issues. *Food and Chemical Toxicology* 60, S. 109–115.
- Martínez-del Campo, A; Bodea, S; Hamer, HA; Marks, JA; Haiser, HJ; Turnbaugh, PJ; Balskus, EP** (2015) Characterization and detection of a widely distributed gene cluster that predicts anaerobic choline utilization by human gut bacteria. *mBio* 6 (2), e00042–15.
- Mathiesen, C; Hägerhäll, C** (2002) Transmembrane topology of the NuoL, M and N subunits of NADH:quinone oxidoreductase and their homologues among membrane-bound hydrogenases and bona fide antiporters. *Biochimica et Biophysica Acta* 1556, S. 121–132.
- Matsuo, M; Endo, T; Asada, K** (1998) Properties of the respiratory NAD(P)H dehydrogenase isolated from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC6803. *Plant & Cell Physiology* 39 (3), S. 263–267.
- McCord, CP** (1931) Toxicity of methyl alcohol (methanol) following skin absorption and inhalation. *Industrial and Engineering Chemistry* 23 (8), S. 931–936.
- McDowall, JS; Murphy, BJ; Haumann, M; Palmer, T; Armstrong, FA; Sargent, F** (2014) Bacterial formate hydrogenlyase complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 111 (38), S. 3948–3956.
- McKay, LF; Holbrook, WP; Eastwood, MA** (1982) Methane and hydrogen production by human intestinal anaerobic bacteria. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica* 90, S. 257–260.
- McMartin, KE; Ambre, JJ; Tephly, TR** (1980) Methanol poisoning in human subjects. Role for formic acid accumulation in the metabolic acidosis. *The American Journal of Medicine* 68 (3), S. 414–418.
- Méjean, V; Iobbi-Nivol, C; Lepelletier, M; Giordano, G; Chippaux, M; Pascal, MC** (1994) TMAO anaerobic respiration in *Escherichia coli*: involvement of the *tor* operon. *Molecular Microbiology* 11 (6), S. 1169–1179.
- 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, S. 325–335.
- Meuer, J; Kuettner, HC; Zhang, JK; Hedderich, R; Metcalf, WW** (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 of the USA* 99 (8), S. 5632–5637.
- Miller, TL; Wolin, MJ** (1985) *Methanosphaera stadtmaniae* gen. nov., sp. nov.: a species that forms methane by reducing methanol with hydrogen. *Archives of Microbiology* 141 (2), S. 116–122.
- Miller, TL; Wolin, MJ** (1986) Methanogens in human and animal intestinal tracts. *Systematic and Applied Microbiology* 7 (2-3), S. 223–229.
- Miller, TL; Wolin, MJ; de Macario, EC; Macario, AJL** (1982) Isolation of *Methanobrevibacter smithii* from human feces. *Applied and Environmental Microbiology* 43 (1), S. 227–232.
- 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), S. 1460–1466.

- Million, M; Maraninchi, M; Henry, M; Armougom, F; Richet, H; Carrieri, P; Valero, R; Racciah, 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), S. 817–825.
- Mizielnińska, M; Sobecka, K; Jarosz, M; Urbański, D; Stobińska, M; Łukawska, B; Olchawa, E; Bartkowiak, A** (2017) The influence of immobilization and packaging on the viability of probiotics stored at 25 °C. *World Scientific News* 77 (2), S. 124–143.
- Moparthy, VK; Hägerhäll, C** (2011) The evolution of respiratory chain complex I from a smaller last common ancestor consisting of 11 protein subunits. *Journal of Molecular Evolution* 72 (5-6), S. 484–497.
- Morrison, DJ; Preston, T** (2016) Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes* 7 (3), S. 189–200.
- Mountfort, DO; Mörschel, E; Beimborn, DB; Schönheit, P** (1986) Methanogenesis and ATP synthesis in a protoplast system of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Journal of Bacteriology* 168 (2), S. 892–900.
- Müller, V; Blaut, M; Gottschalk, G** (1986) Utilization of methanol plus hydrogen by *Methanosarcina barkeri* for methanogenesis and growth. *Applied and Environmental Microbiology* 52 (2), S. 269–274.
- Müller, V; Blaut, M; Heise, R; Winner, C; Gottschalk, G** (1990) Sodium bioenergetics in methanogens and acetogens. *FEMS Microbiology Letters* 87 (3-4), S. 373–376.
- 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.
- Ohnishi, T; Nakamaru-Ogiso, E; Ohnishi, ST** (2010) A new hypothesis on the simultaneous direct and indirect proton pump mechanisms in NADH-quinone oxidoreductase (complex I). *FEBS Letters* 584 (19), S. 4131–4137.
- Oppermann, JA; Muldoon, E; Ranney, RE** (1973) Metabolism of aspartame in monkeys. *The Journal of Nutrition* 103 (10), S. 1454–1459.
- Oxley, APA; Lanfranconi, MP; Würdemann, D; Ott, S; Schreiber, S; McGenity, TJ; Timmis, KN; Nogales, B** (2010) Halophilic archaea in the human intestinal mucosa. *Environmental Microbiology* 12 (9), S. 2398–2410.
- Ozawa, Y; Siddiqui, MA; Takahashi, Y; Urushiyama, A; Ohmori, D; Yamakura, F; Arisaka, F; Imai, T** (2012) Indolepyruvate ferredoxin oxidoreductase: An oxygen-sensitive iron-sulfur enzyme from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus profundus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 114 (1), S. 23–27.
- Parkhill, J; Wren, BW; Mungall, K; Ketley, JM; Churcher, C; Basham, D; Chillingworth, T; Davies, RM; Feltwell, T; Holroyd, S; Jagels, K; Karlyshev, AV; Moule, S; Pallen, MJ; Penn, CW; Quail, MA; Rajandream, MA; Rutherford, KM; van Vliet, AH; Whitehead, S; Barrell, BG** (2000) The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature* 403 (6770), S. 665–668.
- Paul, L; Ferguson, DJ; Krzycki, JA** (2000) The trimethylamine methyltransferase gene and multiple dimethylamine methyltransferase genes of *Methanosarcina barkeri* contain in-frame and read-through amber codons. *Journal of Bacteriology* 182 (9), S. 2520–2529.
- Peinemann, S** (1989) Kopplung von ATP-Synthese und Methanogenese in Vesikelpräparationen des methanogenen Bakteriums Stamm Gö1. Dissertation. Georg-August-Universität Göttingen.
- Peled, Y; Weinberg, D; Hallak, A; Gilat, T** (1987) Factors affecting methane production in humans. *Digestive Diseases and Sciences* 32 (3), S. 267–271.
- Perski, HJ; Schönheit, P; Thauer, RK** (1982) Sodium dependence of methane formation in methanogenic bacteria. *FEBS Letters* 143 (2), S. 323–326.
- Perski, HJ; Moll, J; Thauer, RK** (1981) Sodium dependence of growth and methane formation in *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Archives of Microbiology* 130 (4), S. 319–321.

- Pettersen, EF; Goddard, TD; Huang, CC; Couch, GS; Greenblatt, DM; Meng, EC; Ferrin, T** (2004) UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry* 25 (13), S. 1605–1612.
- Pfaltz, A; Jaun, B; Fässler, A; Eschenmoser, A; Jaenchen, R; Gilles, HH; Diekert, G; Thauer, RK** (1982) Factor F₄₃₀ from methanogenic bacteria: structure of the porphyrinoid ligand system. *Helvetica Chimica Acta* 65, S. 828–865.
- Pimentel, M; Mayer, AG; Park, S; Chow, EJ; Hasan, A; Kong, Y** (2003) Methane production during lactulose breath test is associated with gastrointestinal disease presentation. *Digestive Diseases and Sciences* 48 (1), S. 86–92.
- Piqué, JM; Pallarés, M; Cusó, E; Vilar-Bonet, J; Gassull, MA** (1984) Methane production and colon cancer. *Gastroenterology* 87 (3), S. 601–605.
- Pochart, P; Lémann, F; Flourié, B; Pellier, P; Goderel, I; Rambaud, JC** (1993) Pyxigraphic sampling to enumerate methanogens and anaerobes in the right colon of healthy humans. *Gastroenterology* 105 (5), S. 1281–1285.
- Prieur, I; Lunardi, J; Dupuis, A** (2001) Evidence for a quinone binding site close to the interface between NuoD and NuoB subunits of complex I. *Biochimica et Biophysica Acta* 1504 (2-3), S. 173–178.
- Prommeenate, P; Lennon, AM; Markert, C; Hippler, M; Nixon, PJ** (2004) Subunit composition of NDH-1 complexes of *Synechocystis* sp. PCC 6803: identification of two new *ndh* gene products with nuclear-encoded homologues in the chloroplast Ndh complex. *The Journal of Biological Chemistry* 279 (27), S. 28165–28173.
- Ragsdale, SW; Kumar, N** (1996) Nickel-containing carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase. *Chemical Reviews* 96 (7), S. 2515–2540.
- Ranney, RE; Mares, SE; Schroeder, RE; Hutsell, TC; Radzialowski, FM** (1975) The phenylalanine and tyrosine content of maternal and fetal blood fluids from rabbits fed aspartame. *Toxicology and Applied Pharmacology* 32, S. 339–346.
- Rath, S; Heidrich, B; Pieper, DH; Vital, M** (2017) Uncovering the trimethylamine-producing bacteria of the human gut microbiota. *Microbiome* 5 (54), S. 1–14.
- Rey, FE; Gonzalez, MD; Cheng, J; Wu, M; Ahern, PP; Gordon, JI** (2013) Metabolic niche of a prominent sulfate-reducing human gut bacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 110 (33), S. 13582–13587.
- Roberton, AM; Wolfe, RS** (1970) Adenosine triphosphate pools in *Methanobacterium*. *Journal of Bacteriology* 102 (1), S. 43–51.
- Robinson, JA; Tiedje, JM** (1984) Competition between sulfate-reducing and methanogenic bacteria for H₂ under resting and growing conditions. *Archives of Microbiology* 137 (1), S. 26–32.
- Rosero, JA; Killer, J; Sechovcová, H; Mrázek, J; Benada, O; Fliegerová, K; Havlík, J; Kopečný, J** (2016) Reclassification of *Eubacterium rectale* (Hauduroy *et al.* 1937) Prévot 1938 in a new genus *Agathobacter* gen. nov. as *Agathobacter rectalis* comb. nov., and description of *Agathobacter ruminis* sp. nov., isolated from the rumen contents of sheep and cows. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66 (2), S. 768–773.
- Roth, R; Hägerhäll, C** (2001) Transmembrane orientation and topology of the NADH:quinone oxidoreductase putative quinone binding subunit NuoH. *Biochimica et Biophysica Acta* 1504, S. 352–362.
- Rutili, A; Canzi, E; Brusa, T; Ferrari, A** (1996) Intestinal methanogenic bacteria in children of different ages. *The New Microbiologica* 19 (3), S. 227–243.
- Sahakian, AB; Jee, SR; Pimentel, M** (2010) Methane and the gastrointestinal tract. *Digestive Diseases and Sciences* 55 (8), S. 2135–2143.
- Sauer, K; Harms, U; Thauer, RK** (1997) Methanol:coenzyme M methyltransferase from *Methanosarcina barkeri*. Purification, properties and encoding genes of the corrinoid protein MT1. *European Journal of Biochemistry* 243, S. 670–677.
- Scanlan, PD; Shanahan, F; Marchesi, JR** (2008) Human methanogen diversity and incidence in healthy and diseased colonic groups using *mcrA* gene analysis. *BMC Microbiology* 8 (79), S. 1–8.

- Schink, B; Zeikus, JG** (1980) Microbial methanol formation: a major end product of pectin metabolism. *Current Microbiology* 4, S. 387–389.
- Schink, B; Zeikus, JG** (1983) Characterization of pectinolytic enzymes of *Clostridium thermosulfurogenes*. *FEMS Microbiology Letters* 17 (1-3), S. 295–298.
- Schlegel, K; Leone, V; Faraldo-Gómez, JD; Müller, V** (2012a) Promiscuous archaeal ATP synthase concurrently coupled to Na⁺ and H⁺ translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 109 (3), S. 947–952.
- Schlegel, K; Welte, C; Deppenmeier, U; Müller, V** (2012b) Electron transport during acetoclastic methanogenesis by *Methanosarcina acetivorans* involves a sodium-translocating Rnf complex. *The FEBS Journal* 279 (24), S. 4444–4452.
- Schmehl, M; Jahn, A; Meyer zu Vilsendorf, A; Hennecke, S; Masepohl, B; Schuppler, M; Marxer, M; Oelze, J; Klipp, W** (1993) Identification of a new class of nitrogen fixation genes in *Rhodobacter capsulatus*: a putative membrane complex involved in electron transport to nitrogenase. *Molecular & General Genetics* 241 (5-6), S. 602–615.
- Schönheit, P; Beimborn, DB** (1985) ATP synthesis in *Methanobacterium thermoautotrophicum* coupled to CH₄ formation from H₂ and CO₂ in the apparent absence of an electrochemical proton potential across the cytoplasmic membrane. *European Journal of Biochemistry* 148 (3), S. 545–550.
- Selengut, JD; Haft, DH** (2010) Unexpected abundance of coenzyme F₄₂₀-dependent enzymes in *Mycobacterium tuberculosis* and other actinobacteria. *Journal of Bacteriology* 192 (21), S. 5788–5798.
- Sellars, MJ; Hall, SJ; Kelly, DJ** (2002) Growth of *Campylobacter jejuni* supported by respiration of fumarate, nitrate, nitrite, trimethylamine-N-oxide, or dimethyl sulfoxide requires oxygen. *Journal of Bacteriology* 184 (15), S. 4187–4196.
- Sender, R; Fuchs, S; Milo, R** (2016) Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLoS Biology* 14 (8), e1002533.
- Setzke, E; Hedderich, R; Heiden, S; Thauer, RK** (1994) H₂:heterodisulfide oxidoreductase complex from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Composition and properties. *European Journal of Biochemistry* 220 (1), S. 139–148.
- Shikanai, T** (2016) Chloroplast NDH: a different enzyme with a structure similar to that of respiratory NADH dehydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1857 (7), S. 1015–1022.
- Shively, JM; English, RS; Baker, SH; Cannon, GC** (2001) Carbon cycling: the prokaryotic contribution. *Current Opinion in Microbiology* 4, S. 301–306.
- Simianu, M; Murakami, E; Brewer, JM; Ragsdale, SW** (1998) Purification and properties of the heme- and iron-sulfur-containing heterodisulfide reductase from *Methanosarcina thermophila*. *Biochemistry* 37 (28), S. 10027–10039.
- Simpson, PG; Whitman, WB** Anabolic pathways in methanogens (1993). In: Ferry J. G. (eds) Methanogenesis. Chapman & Hall Microbiology Series. Springer. Boston, MA.
- Siragusa, RJ; Cerda, JJ; Baig, MM; Burgin, CW; Robbins, FL** (1988) Methanol production from the degradation of pectin by human colonic bacteria. *The American Journal of Clinical Nutrition* 47 (5), S. 848–851.
- Smith, MA; Finel, M; Korolik, V; Mendz, GL** (2000) Characteristics of the aerobic respiratory chains of the microaerophiles *Campylobacter jejuni* and *Helicobacter pylori*. *Archives of Microbiology* 174 (1-2), S. 1–10.
- Smith, MR; Mah, RA** (1978) Growth and methanogenesis by *Methanosarcina* strain 227 on acetate and methanol. *Applied and Environmental Microbiology* 36 (6), S. 870–879.
- Smith, MR; Mah, RA** (1980) Acetate as sole carbon and energy source for growth of *Methanosarcina* strain 227. *Applied and Environmental Microbiology* 39 (5), S. 993–999.
- Söllinger, A; Schwab, C; Weinmaier, T; Loy, A; Tveit, AT; Schleper, C; Urich, T** (2016) Phylogenetic and genomic analysis of Methanomassiliicoccales in wetlands and animal intestinal tracts reveals clade-specific habitat preferences. *FEMS Microbiology Ecology* 92 (1), S. 1–12.

- Sparling, R; Daniels, L** (1987) The specificity of growth inhibition of methanogenic bacteria by bromoethanesulfonate. *Canadian Journal of Microbiology* 33 (12), S. 1132–1136.
- Stern, DI; Kaufmann, RK** (1996) Estimates of global anthropogenic methane emissions 1860–1993. *Chemosphere* 33 (1), S. 159–176.
- Strocchi, A; Levitt, MD** (1992) Maintaining intestinal H₂ balance: credit the colonic bacteria. *Gastroenterology* 102, S. 1424–1426.
- Tagawa, K; Arnon, DI** (1968) Oxidation-reduction potentials and stoichiometry of electron transfer in ferredoxins. *Biochimica et Biophysica Acta* 153 (3), S. 602–613.
- Tang, WHW; Wang, Z; Fan, Y; Levison, B; Hazen, JE; Donahue, LM; Wu, Y; Hazen, SL** (2014) Prognostic value of elevated levels of intestinal microbe-generated metabolite trimethylamine-N-oxide in patients with heart failure. *Journal of the American College of Cardiology* 64 (18), S. 1908–1914.
- Thauer, RK; Jungermann, K; Decker, K** (1977) Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriological Reviews* 41 (1), S. 100–180.
- Thauer, RK; Kaster, AK; 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, S. 507–536.
- Thauer, RK; Kaster, AK; Seedorf, H; Buckel, W; Hedderich, R** (2008) Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. *Nature Reviews Microbiology* 6 (8), S. 579–591.
- The Human Microbiome Project Consortium** (2012) Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 486 (7402), S. 207–214.
- 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), S. 333–335.
- Tocilescu, MA; Zickermann, V; Zwicker, K; Brandt, U** (2010) Quinone binding and reduction by respiratory complex I. *Biochimica et Biophysica Acta* 1797 (12), S. 1883–1890.
- Tokumoto, U; Takahashi, Y** (2001) Genetic analysis of the *isc* operon in *Escherichia coli* involved in the biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *Journal of Biochemistry* 130 (1), S. 63–71.
- Towbin, H; Staehelin, T; Gordon, J** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 76 (9), S. 4350–4354.
- Treacy, EP; Akerman, BR; Chow, LM; Youil, R; Bibeau, C; Lin, J; Bruce, AG; Knight, M; Danks, DM; Cashman, JR; Forrest, SM** (1998) Mutations of the flavin-containing monooxygenase gene (FMO3) cause trimethylaminuria, a defect in detoxication. *Human Molecular Genetics* 7 (5), S. 839–845.
- Tulpule, K; Dringen, R** (2013) Formaldehyde in brain: an overlooked player in neurodegeneration? *Journal of Neurochemistry* 127 (1), S. 7–21.
- Vitt, S; Ma, K; Warkentin, E; Moll, J; Pierik, AJ; Shima, S; Ermler, U** (2014) The F₄₂₀-reducing NiFe-hydrogenase complex from *Methanothermobacter marburgensis*, the first X-ray structure of a group 3 family member. *Journal of Molecular Biology* 426 (15), S. 2813–2826.
- Wagner, T; Ermler, U; Shima, S** (2016) MtrA of the sodium ion pumping methyltransferase binds cobalamin in a unique mode. *Scientific Reports* 6, 28226.
- 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), S. 699–703.
- Wang, M; Tomb, JF; Ferry, JG** (2011a) Electron transport in acetate-grown *Methanosarcina acetivorans*. *BMC Microbiology* 11 (165), S. 1–10.
- Wang, Z; Klipfell, E; Bennett, BJ; Koeth, R; Levison, BS; Dugar, B; Feldstein, AE; Britt, EB; Fu, X; Chung, YM; Wu, Y; Schauer, P; Smith, JD; Allayee, H; Tang, WHW; DiDonato, JA; Lusis, AJ; Hazen, SL** (2011b) Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature* 472 (7341), S. 57–63.

- Watkins, AJ; Roussel, EG; Parkes, RJ; Sass, H** (2014) Glycine betaine as a direct substrate for methanogens (*Methanococcoides* spp.). *Applied and Environmental Microbiology* 80 (1), S. 289–293.
- Watkins, AJ; Roussel, EG; Webster, G; Parkes, RJ; Sass, H** (2012) Choline and *N,N*-dimethylethanolamine as direct substrates for methanogens. *Applied and Environmental Microbiology* 78 (23), S. 8298–8303.
- Weaver, GA; Krause, JA; Miller, TL; Wolin, MJ** (1989) Constancy of glucose and starch fermentations by two different human faecal microbial communities. *Gut* 30, S. 19–25.
- Weerakoon, DR; Olson, JW** (2008) The *Campylobacter jejuni* NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) utilizes flavodoxin rather than NADH. *Journal of Bacteriology* 190 (3), S. 915–925.
- Weimer, PJ; Zeikus, JG** (1978) One carbon metabolism in methanogenic bacteria. *Archives of Microbiology* 119 (1), S. 49–57.
- Weiss, DS; Gartner, P; Thauer, RK** (1994) The energetics and sodium-ion dependence of N⁵-methyltetrahydromethanopterin:coenzyme M methyltransferase studied with cob(I)alamin as methyl acceptor and methylcob(III)alamin as methyl donor. *European Journal of Biochemistry* 226 (3), S. 799–809.
- Welte, C; Deppenmeier, U** (2011a) Membrane-bound electron transport in *Methanosaeta thermophila*. *Journal of Bacteriology* 193 (11), S. 2868–2870.
- Welte, C; Deppenmeier, U** (2011b) Re-evaluation of the function of the F₄₂₀ dehydrogenase in electron transport of *Methanosarcina mazei*. *The FEBS Journal* 278 (8), S. 1277–1287.
- Welte, C; Deppenmeier, U** (2014) Bioenergetics and anaerobic respiratory chains of acetoclastic methanogens. *Biochimica et Biophysica Acta* 1837 (7), S. 1130–1147.
- Welte, C; Kallnik, V; Grapp, M; Bender, G; Ragsdale, S; Deppenmeier, U** (2010a) Function of Ech hydrogenase in ferredoxin-dependent, membrane-bound electron transport in *Methanosarcina mazei*. *Journal of Bacteriology* 192 (3), S. 674–678.
- Welte, C; Krätzer, C; Deppenmeier, U** (2010b) Involvement of Ech hydrogenase in energy conservation of *Methanosarcina mazei*. *The FEBS Journal* 277 (16), S. 3396–3403.
- Welte, C; Kröninger, L; Deppenmeier, U** (2014) Experimental evidence of an acetate transporter protein and characterization of acetate activation in acetoclastic methanogenesis of *Methanosarcina mazei*. *FEMS Microbiology Letters* 359 (2), S. 147–153.
- Welte, C** (2011) Ferredoxin-dependent electron transport during methanogenesis from acetate. Dissertation. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Wolin, MJ** (1981) Fermentation in the rumen and human large intestine. *Science* 213 (4515), S. 1463–1468.
- Wongnate, T; Ragsdale, SW** (2015) The reaction mechanism of methyl-coenzyme M reductase: how an enzyme enforces strict binding order. *The Journal of Biological Chemistry* 290 (15), S. 9322–9334.
- Wongnate, T; Sliwa, D; Ginovska, B; Smith, D; Wolf, MW; Lehnert, N; Raugei, S; Ragsdale, SW** (2016) The radical mechanism of biological methane synthesis by methyl-coenzyme M reductase. *Science* 352 (6288), S. 953–958.
- Wranne, L** (1955) Urinary excretion of trimethylamine and trimethylamine oxide following trimethylamine-administration to normals and to patients with liver disease. *Acta Medica Scandinavica* 153 (6), S. 433–441.
- Wu, GD; Chen, J; Hoffmann, C; Bittinger, K; Chen, YY; Keilbaugh, SA; Bewtra, M; Knights, D; Walters, WA; Knight, R; Sinha, R; Gilroy, E; Gupta, K; Baldassano, R; Nessel, L; Li, H; Bushman, FD; Lewis, JD** (2011) Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* 334 (6052), S. 105–108.
- Xu, J; Mahowald, MA; Ley, RE; Lozupone, CA; Hamady, M; Martens, EC; Henrissat, B; Coutinho, PM; Minx, P; Latreille, P; Cordum, H; van Brunt, A; Kim, K; Fulton, RS; Fulton, LA; Clifton, SW; Wilson, RK; Knight, RD; Gordon, JI** (2007) Evolution of symbiotic bacteria in the distal human intestine. *PLoS Biology* 5 (7), e156.

- Yamamoto, H; Peng, L; Fukao, Y; Shikanai, T** (2011) An Src homology 3 domain-like fold protein forms a ferredoxin binding site for the chloroplast NADH dehydrogenase-like complex in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 23 (4), S. 1480–1493.
- Yamamoto, Y; Aiba, H; Baba, T; Hayashi, K; Inada, T; Isono, K; Itoh, T; Kimura, S; Kitagawa, M; Makino, K; Miki, T; Mitsuhashi, N; Mizobuchi, K; Mori, H; Nakade, S; Nakamura, Y; Nashimoto, H; Oshima, T; Oyama, S; Saito, N; Sampei, GI; Satoh, YJ; Sivasundaram, S; Tagami, H; Takahashi, H; Takeda, JI; Takemoto, K; Uehara, K; Wada, C; Yamagata, S; Horiuchi, T** (1997) Construction of a contiguous 874-kb sequence of the *Escherichia coli* -K12 genome corresponding to 50.0-68.8 min on the linkage map and analysis of its sequence features. *DNA Research* 4 (2), S. 169–178.
- Zehnder, AJB; Wuhrmann, K** (1977) Physiology of a *Methanobacterium* strain AZ. *Archives of Microbiology* 111 (3), S. 199–205.
- Zeisel, SH; Albright, CD; Shin, OH; Mar, MH; Salganik, RI; da Costa, KA** (1997) Choline deficiency selects for resistance to p53-independent apoptosis and causes tumorigenic transformation of rat hepatocytes. *Carcinogenesis* 18 (4), S. 731–738.
- Zeisel, SH; da Costa, KA** (2009) Choline: an essential nutrient for public health. *Nutrition Reviews* 67 (11), S. 615–623.
- Zeisel, SH; da Costa, KA; Youssef, M; Hensey, S** (1989) Conversion of dietary choline to trimethylamine and dimethylamine in rats: dose-response relationship. *The Journal of Nutrition* 119 (5), S. 800–804.
- Zhang, H; DiBaise, JK; Zuccolo, A; Kudrna, D; Braidotti, M; Yu, Y; Parameswaran, P; Crowell, MD; Wing, R; Rittmann, BE; Krajmalnik-Brown, R** (2009) Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 106 (7), S. 2365–2370.
- Zhu, Y; Jameson, E; Crosatti, M; Schäfer, H; Rajakumar, K; Bugg, TDH; Chen, Y** (2014) Carnitine metabolism to trimethylamine by an unusual Rieske-type oxygenase from human microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 111 (11), S. 4268–4273.

7 Danksagung

Zu guter Letzt ist es hier an der Zeit, mich bei den Leuten zu bedanken, die mich während meiner dreijährigen Forschungstätigkeit und der Abfassung dieser Dissertation tatkräftig unterstützt haben.

Zu allererst möchte ich mich bei Prof. Dr. Uwe Deppenmeier für die Möglichkeit bedanken, in seiner Arbeitsgruppe an dem spannenden und herausfordernden Thema ‚Methanogenese‘ forschen zu dürfen. Ich bin ihm außerdem sehr dankbar, dass er immer für fachliche Diskussionen zur Verfügung stand und meine Arbeit mit zahlreichen Ratschlägen und Anregungen bereicherte.

Des Weiteren danke ich Priv.-Doz. Dr. Christiane Dahl für die Übernahme des Koreferats und für viele konstruktive Gespräche bezüglich der Überproduktion von Proteinen mit Eisen-Schwefel-Clustern.

Ein weiteres Dankeschön geht an Prof. Dr. Lukas Schreiber und Prof. Dr. Sigurd Höger, die sich bereit erklärt haben, als Mitglieder meiner Prüfungskommission zu fungieren.

Dr. Corinna Bang und Prof. Dr. Ruth Schmitz-Streit von der Universität Kiel danke ich für die hilfreichen Diskussionen im Zusammenhang mit der Kultivierung von *M. luminyensis* – gerade zu Beginn meiner Arbeit. Bei Prof. Dr. V. Müller von der Universität Frankfurt a. M. möchte ich mich für die Natriumkonzentrationsbestimmung bedanken.

Darüber hinaus möchte ich an dieser Stelle allen ehemaligen und jetzigen Mitgliedern der AG Deppenmeier Danke sagen, mit denen ich in den vergangenen Jahren zusammenarbeiten durfte. Aus dem ‚Anaeroben-Labor‘ möchte ich insbesondere Dr. Stefanie Berger, Dr. Sarah Refai, Dr. Cornelia Welte und Thomas Franke hervorheben, die mich bei Bedarf zum einen bei experimentellen Dingen unterstützt haben, zum anderen aber auch immer für fachliche Debatten zur Verfügung standen. Thomas, nun wird die Promotion uns also tatsächlich scheiden... Von den ‚Goxies‘ sind vor allem Dr. Konrad Kosciow, Dr. Anna Siemen und Dr. Nageena Zahid herauszustellen, die mich lange im Labor begleitet haben und immer ein offenes Ohr hatten. Ein sehr großes Dankeschön geht außerdem an Elisabeth Schwab, die mir immer behilflich war und durch ihre unerschütterliche Art den Ruhepol der AG bildete, der so oft nötig war. Des Weiteren danke ich allen Studenten, die ich in den hinter mir liegenden Jahren betreuen durfte und die mich dabei unterstützt haben, den Stoffwechsel von *M. luminyensis* zu untersuchen.

Weiter möchte ich mich bei allen früheren und gegenwärtigen Mitgliedern des Instituts für Mikrobiologie und Biotechnologie für das angenehme Arbeitsklima und die große Hilfsbereitschaft bedanken.

Der größte Dank gebührt jedoch den Menschen, die mir abseits des Labors immer den Rücken gestärkt haben. Mama und Papa, vielen Dank für Eure immerwährende Unterstützung und die aufbauenden Worte, wenn diese einmal nötig waren. Ohne Euch wäre ich nicht dort, wo ich heute bin. Tobi, bei Dir möchte ich mich für Deine stets positive Art bedanken, durch die Du mich auch an Abenden von schwierigen Labortagen immer schnell aufzubauen wusstest. Peter, auch Dir danke ich für Dein stetiges Interesse an meiner Arbeit und die vielen bestärkenden Gespräche.