



Sascha Hein

Jahrgang 1991. 2010–2015 Studium Biomolecular Engineering an der TU Darmstadt, Schwerpunkt: Weiße Biotechnologie; dort 2015–2019 Promotion am Fachbereich Biologie. Seit 2019 Postdoc in der Gruppe von Prof. Dr. J. Simon, TU Darmstadt.

VAAM-Promotionspreis 2020

Effizienter atmen – Biosynthese methylierter Menachinone

SASCHA HEIN

MIKROBIELLE ENERGIEUMWANDLUNG UND BIOTECHNOLOGIE, TU DARMSTADT

DOI: 10.1007/s12268-020-1389-z

© Der Autor 2020

Menachinone sind aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften membranständige Moleküle und kommen in sehr vielen Mikroorganismen vor. Sie lassen sich mittels zwei Elektronen zur jeweiligen Menachinol-Form reduzieren. In der Membran von Bakterien und Archaeen bilden Chinone einen Chinonpool und fungieren als universelle Redoxmediatoren. Mikroorganismen aus anaeroben Habitaten besitzen im Chinonpool oft neben dem klassischen Menachinon (MK) methylierte MK-Derivate wie Methylmenachinon (MMK) und Dimethylmenachinon (DMMK). Da die methylierten Menachinone bei negativeren Standardredoxpotenzialen als MK operieren, spielen sie eine entscheidende Rolle für spezifische Elektronentransportketten der anaeroben Atmung.

Das Ziel meiner Doktorarbeit war es, die Biosynthese von methylierten Menachinonen und die Position der zusätzlichen Methylgruppen zu entschlüsseln. Als Modellorganismen dienten die MMK-produzierenden Bakterien *Wolinella succinogenes* und *Adlercreutzia equolifaciens*. Stromaufwärts des Polysulfidreduktase-Genclusters von *W. succinogenes* identifizierten wir das Gen für eine radikalische S-Adenosylmethionin-Methyltransferase (RSMT) der Klasse C [1]. Mithilfe von entsprechenden Deletions- und Komplementationsmutanten stellten wir fest, dass diese Methyltransferase für die MMK-Synthese benötigt wird (Abb. 1A, [1]). Homolo-

ge dieser Methyltransferase identifizierten wir in diversen MMK- und DMMK-produzierenden Mikroorganismen und nannten sie abhängig vom jeweiligen MK-Biosyntheseweg MenK oder MqnK. Nach heterologer Expression der *mqnK/menK-Gene* aus *W. succinogenes*, *A. equolifaciens* oder *Shewanella oneidensis* in *Escherichia coli* bildet sich nicht nur das methylierte Menachinon, sondern auch das bisher nicht beschriebene Methyl-2-demethylmenachinon. Zur Bestimmung der exakten Position der Methylgruppe wurden die Menachinone mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) aus den Organismen gereinigt und mit hochauflösender Massenspektrometrie und zweidimensionaler NMR untersucht [1]. Im HMBC (*heteronuclear multiple bond correlation*)-NMR-Spektrum zeigte sich die methylierte Position als das Kohlenstoffatom C-8 (Abb. 1B).

In DMMK-produzierenden Organismen gelang die Identifizierung eines weiteren MenK-Homologs: MenK2 [2]. Es stellte sich heraus, dass dieses Enzym die Position C-7 von MK methyliert (Abb. 1A). Dies bedeutet, dass während der Biosynthese von DMMK die Methylgruppen von zwei unterschiedlichen Enzymen auf Menachinon übertragen werden (Abb. 1B).

Zum besseren funktionalen Verständnis dieser Enzymklasse erfolgte die heterologe Produktion von MenK aus *A. equolifaciens* in *E. coli* mit anschließender Reinigung. Es zeigte sich, dass MenK, wie alle RSMTs, ein sauerstoffsensibles und redoxaktives [4Fe-4S]-Zentrum

besitzt. In einem eigens entwickelten anaeroben Enzymtest bestimmte ich im Anschluss mittels LC-MS die Produktstöchiometrie und zeigte außerdem mit deuterierten Substraten, dass die Methylierung des nicht nukleophilen Kohlenstoffatoms über einen radikalischen Mechanismus erfolgt.

Mithilfe dieser Ergebnisse ist es möglich, *mqnK/menK/menK2-Gene* als Biomarker zur Vorhersage der MMK- und DMMK-Produktion zu nutzen. In Zukunft kann dieses Wissen essenziell sein, um biotechnologische Prozesse zur Methylierung von inerten sp^2 -hybridisierten Kohlenstoffatomen zu entwickeln.

Danksagung

Mein größter Dank gilt meinem Betreuer Jörg Simon und seiner Arbeitsgruppe für die tägliche Unterstützung. Des Weiteren möchte ich Reinhard Meusinger, Markus Gallei und Heribert Warzecha für die tolle Kooperation danken. ■

Literatur

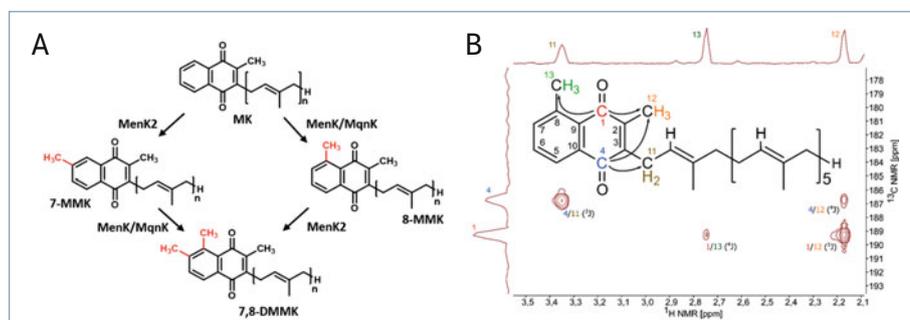
- [1] Hein S, Klimmek O, Polly M et al. (2017) A class C radical S-adenosylmethionine methyltransferase synthesizes 8-methylmenaquinone. *Mol Microbiol* 104:449–462
 [2] Hein S, von Irmer J, Gallei M et al. (2018) Two dedicated class C radical S-adenosylmethionine methyltransferases concertedly catalyze the synthesis of 7,8-dimethylmenaquinone. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* 1859:300–308

Funding: Open Access funding provided by Projekt DEAL.

Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Dr. Sascha Hein
 AG Simon
 Technische Universität Darmstadt
 Schnittspahnstraße 10
 D-64287 Darmstadt
 hein@bio.tu-darmstadt.de



▲ Abb. 1: Biosynthese und Struktur methylierter Menachinon-Derivate. **A,** Biosynthese von Methylmenachinon (MMK) und Dimethylmenachinon (DMMK) ausgehend von Menachinon (MK). Die Spezifität der identifizierten Enzyme bestimmt die Position der Methylierung. So methyliert MenK/MqnK stets an Position C-8 und MenK2 an Position C-7. Die Biosynthese von DMMK findet in zwei Stufen statt. **B,** Ausschnitt des HMBC-NMR-Spektrums von 8-Methylmenachinon (8-MMK). Mittels 4J -Kopplung zwischen C-1 und den Protonen an C-13 gelang die Bestimmung der Position der Methylgruppe an C-8.

Die VAAM dankt den Sponsoren der Promotionspreise: BASF SE, Bayer AG, New England Biolabs GmbH und Evonik Industries AG.