

Phylogenie, Funktion und Struktur radikalischer Menachinon- Methyltransferasen

Vom Fachbereich Biologie
der Technischen Universität Darmstadt

zur Erlangung des Grades
Doctor rerum naturalium
(Dr.rer.nat.)

genehmigte Dissertation von Dennis Wilkens

Erstgutachter: Prof. Dr. Jörg Simon
Zweitgutachter: PD Dr. Arnulf Kletzin



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

Darmstadt 2024

Wilkins, Dennis: Phylogenie, Funktion und Struktur radikalischer Menachinon-Methyltransferasen

Darmstadt, Technische Universität Darmstadt

Jahr der Veröffentlichung der Dissertation auf TUPrints: 2024

URN: urn:nbn:de:tuda-tuprints-269635

Tag der mündlichen Prüfung: 22.03.2024

Veröffentlicht unter CC BY-NC 4.0 International

<https://creativecommons.org/licenses/>

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Zusammenfassung | 1 |
| 2 | Einleitung | 5 |
| 2.1 | Isoprenoide und isoprenoide Chinone | 5 |
| 2.2 | Menachinon und Methylmenachinon | 7 |
| 2.3 | Rolle von Methylmenachinon in <i>Wolinella succinogenes</i> | 8 |
| 2.4 | Menachinon-Biosynthese | 9 |
| 2.5 | Klassischer Menachinon-Biosyntheseweg | 10 |
| 2.6 | Futalosin-Biosyntheseweg | 11 |
| 2.7 | Biosynthese der Isoprenoid-Seitenkette | 12 |
| 2.8 | Radikalische <i>S</i> -Adenosylmethionin (SAM)-Superfamilie | 12 |
| 2.9 | Klassen der radikalischen SAM-Methyltransferasen | 13 |
| 2.10 | Menachinon-Methyltransferasen | 14 |
| 3 | Ziele der Arbeit | 17 |
| 4 | Material & Methoden | 19 |
| 4.1 | Chemikalien | 19 |
| 4.2 | Mikroorganismen | 21 |
| 4.3 | Plasmide | 22 |
| 4.4 | Oligonukleotide | 23 |
| 4.5 | Sonstige Materialien | 26 |
| 4.6 | Medien | 26 |
| 4.7 | Puffer und Lösungen | 27 |
| 4.8 | Mikrobiologische Methoden | 29 |
| 4.8.1 | Kultivierung von <i>E. coli</i> | 29 |
| 4.9 | Molekularbiologische Methoden | 29 |
| 4.9.1 | Amplifikation von DNA-Fragmenten | 29 |
| 4.9.2 | Agarose-Gelelektrophorese | 30 |
| 4.9.3 | Isolierung von DNA | 30 |
| 4.9.4 | Sequenzierung von DNA | 30 |
| 4.9.5 | Circular Polymerase Extension Cloning (CPEC) | 30 |
| 4.9.6 | Ortsgerichtete Mutagenese | 30 |
| 4.9.7 | Herstellung und Transformation chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen | 31 |
| 4.9.8 | Heterologe Genexpression in <i>E. coli</i> | 31 |
| 4.9.9 | Konstruktion von <i>E. coli</i> Mutanten | 32 |
| 4.10 | Biochemische Methoden | 34 |
| 4.10.1 | Reinigung heterolog produzierter Proteine aus <i>E. coli</i> | 34 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4.10.2 | Proteinbestimmung nach Bradford | 35 |
| 4.10.3 | Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) | 35 |
| 4.10.4 | Western-Blot | 35 |
| 4.10.5 | Blaue Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese | 36 |
| 4.10.6 | Größenausschluss-Chromatographie | 36 |
| 4.10.7 | Protein Thermal Shift Assay | 36 |
| 4.10.8 | MTAN Aktivitätsassay | 37 |
| 4.10.9 | Rekonstitution des Eisen-Schwefel-Clusters von MenK | 37 |
| 4.10.10 | Aktivitätsassay von MenK | 37 |
| 4.10.11 | Chinon-Extraktion | 38 |
| 4.10.12 | Chinon-Analyse mittels HPLC | 38 |
| 4.10.13 | NMR-Analyse | 38 |
| 4.10.14 | Massenspektrometrie | 38 |
| 4.11 | Bioinformatische Methoden | 39 |
| 4.11.1 | Sequenz-basierte Datenbanksuche | 39 |
| 4.11.2 | Sequenz-basierte Clusteranalyse | 39 |
| 4.11.3 | Sequenzalignments und phylogenetische Stammbäume | 39 |
| 4.11.4 | Korrelationsanalyse | 40 |
| 4.11.5 | Proteinstrukturvorhersage | 40 |
| 5 | Ergebnisse | 41 |
| 5.1 | Bioinformatische Analyse von MenK/MqnK/MenK2-Sequenzen | 41 |
| 5.1.1 | Clusteranalyse von CPDH-ähnlichen rSAM-Enzymen | 41 |
| 5.1.2 | Charakterisierung des MenK/MqnK/MenK2 Clusters | 45 |
| 5.1.3 | Identifizierung von Motiven in Sequenzen von MenK/MqnK/MenK2-Cluster-Enzymen | 45 |
| 5.2 | Vorkommen und Funktion von MenK/MqnK/MenK2 in Bakterien und Archaea | 47 |
| 5.2.1 | Taxonomische Analyse von MqnK/MenK/MenK2 | 47 |
| 5.2.2 | Korrelationsanalyse zwischen respiratorischen Oxidoreduktasen und Menachinon-Derivaten | 50 |
| 5.3 | Heterologe Produktion von MenK/MqnK/MenK2-Enzymen | 55 |
| 5.3.1 | Heterologe Produktion von MenK/MqnK/MenK2-Enzymen in <i>E. coli</i> | 55 |
| 5.3.2 | MMK- und DMMK-Synthese durch MenK und MenK2 aus <i>Collinsella tanakaei</i> | 56 |
| 5.3.3 | MenK im syntrophem Mikroorganismus <i>Syntrophus aciditrophicus</i> | 62 |
| 5.3.4 | Produktion von DMK-Derivaten in <i>E. coli</i> | 63 |
| 5.3.5 | Steigerung der MK-Produktion durch Inaktivierung des UQ-Biosynthesewegs | 65 |
| 5.4 | Präparation und Charakterisierung von MenK/MqnK/MenK2-Enzymen | 67 |
| 5.4.1 | Aufreinigung von <i>AeMenK</i> , <i>AeMenK2</i> , <i>CtMenK</i> , <i>CtMenK2</i> und <i>WsMqnK</i> | 67 |
| 5.4.2 | Massenbestimmung von <i>CtMenK</i> | 70 |
| 5.4.3 | Proteinstabilität von MenK | 72 |
| 5.4.4 | MenK-Enzymassay mit <i>CtMenK</i> | 77 |
| 5.4.5 | Inhibition von <i>CtMenK</i> | 81 |
| 5.4.6 | Substratspektrum von <i>CtMenK</i> | 83 |
| 5.5 | Strukturvorhersage und -analyse von MenK und MenK2 | 84 |
| 5.5.1 | Primär- und Sekundärstruktur | 84 |
| 5.5.2 | Strukturanalyse mittels AlphaFold | 87 |
| 5.5.3 | Aufbau des katalytischen Zentrums | 92 |

| | |
|--|------------|
| 6 Diskussion | 95 |
| 6.1 Phylogenie von MenK/MqnK/MenK2-Enzymen | 95 |
| 6.2 Rolle von MMK in mikrobiellen Elektronentransportketten | 97 |
| 6.2.1 MMK-assoziierte Elektronendonator-Oxidoreduktasen | 97 |
| 6.2.2 MMK-assoziierte Elektronenakzeptor-Oxidoreduktasen | 98 |
| 6.2.3 Syntrophe CO ₂ -Reduktion gekoppelt an Fettsäureoxidation in <i>Syntrophus aciditrophicus</i> | 101 |
| 6.2.4 Die Rolle von 7,8-DMMK | 102 |
| 6.2.5 Menachinone: mehr als nur ein Redoxmediator | 103 |
| 6.3 Struktur, Funktion und Reaktionsmechanismus von MenK/MqnK/MenK2 | 104 |
| 6.3.1 Primärstruktur von MenK/MqnK/MenK2-Enzymen | 104 |
| 6.3.2 Membranlokalisierung von MenK/MqnK/MenK2 und MK | 105 |
| 6.3.3 Interaktion zwischen MenK/MqnK/MenK2 und MK | 106 |
| 6.3.4 Initialreaktion der radikalischen SAM-Domäne | 107 |
| 6.3.5 Reaktionsmechanismus der Klasse C RSMTs | 108 |
| 6.3.6 Inhibierung von MenK/MqnK/MenK2 | 110 |
| 6.4 Biotechnologische Anwendungsmöglichkeiten | 111 |
| 6.4.1 Chinonproduktion in <i>E. coli</i> | 111 |
| 6.4.2 Heterologe Produktion von MenK/MqnK/MenK2 in <i>E. coli</i> | 113 |
| Schlussfolgerungen und Ausblick | 114 |
| Literaturverzeichnis | 116 |
| Anhang | 139 |
| Abkürzungsverzeichnis | 157 |
| Beitrag anderer | 161 |
| Publikationen | 162 |
| Konferenzbeiträge | 163 |
| <i>Curriculum Vitae</i> | 164 |
| Danksagung | 165 |
| Ehrenwörtliche Erklärung | 166 |



Kapitel 1

Zusammenfassung

Menachinon (MK) ist das am häufigsten vorkommende mikrobielle Chinon. Insbesondere in der anaeroben Atmung übernehmen MK und seine methylierten Derivate, Methylmenachinon (MMK) und Dimethylmenachinon (DMMK), die Rolle von membrangebundenen Redoxmediatoren. Die zusätzlichen Methylgruppen in MMK und DMMK führen zu einer Erniedrigung des Redoxpotenzials, was den Mikroorganismen ermöglicht, auf Elektronenakzeptoren mit negativem Redoxpotenzial zurückzugreifen.

Die Methylierung von MK zu MMK bzw. DMMK wird durch die Menachinon-Methyltransferasen MenK/MqnK und MenK2 katalysiert, die sich in die Klasse C der radikalischen SAM-Methyltransferasen (RSMT) einordnen. Bislang wurden methylierte MK-Derivate durch biochemische Analysen lediglich in vereinzelt Mikroorganismen nachgewiesen. Daher blieb die phylogenetische Verbreitung dieser methylierten MK-Derivate unklar. Mithilfe von Cluster- und phylogenetischen Analysen wurden in dieser Arbeit insgesamt 828 MenK/MqnK/MenK2-Proteinsequenzen identifiziert. Die überwiegende Anzahl dieser Sequenzen stammt von Mikroorganismen, bei denen bisher noch keine biochemische Untersuchung zur Fähigkeit der Produktion methylierter Menachinone durchgeführt wurde. Zusätzlich dazu wurden durch diese Analysen charakteristische Signaturmotive aufgedeckt. Diese Motive ermöglichen eine präzise Unterscheidung der Enzyme innerhalb der MqnK/MenK/MenK2-Familie von anderen radikalen SAM-Enzymen. Ein spezifisches Motiv davon ermöglicht zudem eine klare Differenzierung zwischen der MenK- und der MenK2-Subfamilie. Um diese Erkenntnisse zu

verifizieren, wurden repräsentative, mutmaßliche *menK*- und *menK2*-Gene aus *Collinsella tanakaei* (*CtMenK* und *CtMenK2*) und *Ferrimonas marina* separat in *Escherichia coli* (Wildtyp oder *ubiE*- oder *ubiCA*-Deletionsmutante) exprimiert. Dabei wurde festgestellt, dass die entsprechenden Zellen methylierte Derivate von endogenem MK und Demethylmenachinon (DMK) produzieren.

Die mittels biochemischer Aufreinigung gewonnenen *CtMenK*- und *CtMenK2*-Proteine wurden durch Größenausschluss-Chromatographie und Nativ-Gelelektrophorese analysiert und zeigten eine Neigung zur Oligomerisierung. Durch Denaturierungs- und Stabilitätsexperimente konnte jedoch nachgewiesen werden, dass es sich höchstwahrscheinlich um monomere Proteine handelt. Die Enzymaktivität des gereinigten *CtMenK* wurde durch die Anwendung eines Enzymassays bestätigt. Aufgrund einer geringen Grundaktivität wurde überprüft, ob die entstehenden Reaktionsprodukte eine inhibitorische Wirkung auf die enzymatische Reaktion haben. In entsprechenden Inhibitionstests wurde gezeigt, dass *CtMenK* lediglich in geringem Maße durch die entstehenden Reaktionsprodukte *S*-Adenosylhomocystein und Methylthioadenosin gehemmt wird, während 5'-Desoxyadenosin keine signifikante Hemmung aufwies.

Die Strukturvorhersagen der MenK/MqnK/MenK2-Familie mittels AlphaFold offenbarten neue Erkenntnisse über den strukturellen Aufbau, insbesondere die Identifizierung des aktiven Zentrums und des Substratkanals. Diese Erkenntnisse haben zur Identifikation neuer Aminosäuren geführt, die möglicherweise eine entscheidende Rolle in

der enzymatischen Reaktion spielen könnten. Es wird vermutet, dass ein Argininrest im aktiven Zentrum als Base fungiert und für die Deprotonierung des C-8-Atoms des MKs nach dem radikalen Angriff des Methylenradikals verantwortlich ist. Das protonierte Wasserstoffion würde in einem nachfolgenden Schritt wieder auf das resonanzstabilisierte Anion des MKs übertragen, um 8-MMK zu bilden.

In dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass es möglich ist, den Methylierungsstatus des Chinon/Chinol-Pools mikrobieller Spezies oder Gemeinschaften anhand ihrer (Meta-)Genome vorherzusagen. Dieser Beitrag wird sich als bedeutsam für das künftige Design mikrobieller Chinon/Chinol-Pools im Rahmen synthetisch-biologischer Ansätze erweisen.

Summary

Menaquinone (MK) is the most abundant microbial quinone. Particularly in anaerobic respiration, MK and its methylated derivatives, methylmenaquinone (MMK) and dimethylmenaquinone (DMMK), act as membrane-bound redox mediators. The additional methyl groups in MMK and DMMK reduce the redox potential, allowing microorganisms to utilise electron acceptors with a negative redox potential.

The methylation of MK to MMK or DMMK is catalysed by menaquinone methyltransferases, MenK/MqnK and MenK2, which belong to class C of radical SAM methyltransferases (RSMTs). While the biochemical analysis of methylated MK derivatives has been limited to certain microorganisms, the phylogenetic distribution of these methylated MK derivatives has remained unclear. In this study, a total of 828 MenK/MqnK/MenK2 protein sequences were identified by cluster and phylogenetic analyses. The majority of these sequences are from organisms that have not been biochemically screened for the ability to produce methylated menaquinones. In addition, these analyses have revealed characteristic signature motifs that allow precise differentiation of enzymes within the MqnK/MenK/MenK2 family from other radical SAM enzymes. A specific motif allows a clear distinction between the MenK and MenK2 subfamilies. To validate these findings, representative putative *menK* and *menK2* genes from *Collinsella tanakaei* (*CtMenK* and *CtMenK2*) and *Ferrimonas marina* were separately expressed in *Escherichia coli*. It was observed that the corresponding cells produced methylated derivatives of endogenous MK and demethylmenaquinone.

The purified *CtMenK* and *CtMenK2* proteins obtained by biochemical purification were analysed by size exclusion chromatography and native gel electrophoresis and showed a tendency towards oligomerisation. However, denaturation and stability

experiments indicated that the proteins were likely to be monomeric. The enzyme activity of purified *CtMenK* was confirmed by an enzyme assay. Due to the low baseline activity, the reaction products were tested for inhibitory activity. In inhibition assays, *CtMenK* was minimally inhibited by the resulting reaction products *S*-adenosylhomocysteine and methylthioadenosine, while 5'-deoxyadenosine showed no significant inhibition.

AlphaFold-based structure predictions of the MenK/MqnK/MenK2 family provided new insights into the structural components, in particular the identification of the active centre and the substrate channel. These results led to the identification of new amino acids that may play a critical role in the enzymatic reaction. It is hypothesised that an arginine residue in the active centre acts as a base, responsible for the deprotonation of the C-8 atom of MK after the radical attack of the methylene radical. The protonated hydrogen ion would then transfer back to the resonance-stabilised anion of MK in a subsequent step to form 8-MMK.

This study demonstrates for the first time the possibility of predicting the methylation status of the quinone/quinol pool of microbial species or communities based on their (meta)genomes. This contribution will be important for future design considerations of microbial quinone/quinol pools in synthetic biology approaches.



Kapitel 2

Einleitung

2.1 Isoprenoide und isoprenoide Chinone

Isoprenoide bilden eine äußerst vielfältige und umfassende Gruppe von Verbindungen mit mehr als 80 000 bekannten Verbindungen, die in der Natur weit verbreitet sind. Ihre Bedeutung erstreckt sich sowohl auf den Primärstoffwechsel als auch auf den Sekundärstoffwechsel (Rudolf *et al.*, 2021).

Im Bereich des Primärstoffwechsels sind Isoprenoide essenzielle Bestandteile, die für grundlegende Zellfunktionen unverzichtbar sind. Diese Verbindungen sind integraler Bestandteil von Chinonen, die eine zentrale Rolle im Elektronentransport übernehmen, von photosynthetischen Pigmenten wie Phytol in Chlorophyll und den Carotinoidpigmenten, von Sterolen, die die Stabilität von Zellmembranen gewährleisten, sowie von prenylierten Proteinen (Bohlmann & Keeling 2008; Rudolf *et al.*, 2021).

Isoprenoide, die im Rahmen des Sekundärstoffwechsels gebildet werden, spielen eine entscheidende Rolle bei der Anpassung von

Organismen an biotische und abiotische Faktoren. Diese Verbindungen umfassen die Herstellung von insektiziden und antibakteriellen Substanzen, die Bereitstellung von Antioxidantien zum Schutz der Zellen, die Bildung von Molekülen zur Förderung der Thermotoleranz, sowie die Implementierung von Schutzmechanismen gegen schädliche Lichtexposition, um nur einige ihrer vielfältigen Funktionen zu nennen (Gershenzon & Dudareva 2007; Rudolf *et al.*, 2021).

Die hohe Diversität der Isoprenoide wird durch zwei grundlegende Bausteine ermöglicht, nämlich Isopentenylpyrophosphat (IPP) mit seinem allylischen Isomer Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP). Die Zwischenprodukte der C_{5n} allylische Diphosphate, die durch die Verknüpfung dieser C_5 -Einheiten entstehen, fungieren als Prenyl-Donor für die Alkylierung anderer chemischer Strukturen (Prenylierung) (Abb. 2.1) (Sacchetti & Poulter 1997). Die Grundstruktur des erhaltenen Polypyrophosphats (PPP) wird durch Isopren-Einheiten repräsentiert, wobei jedes Isopren einer C_5 -Einheit entspricht.

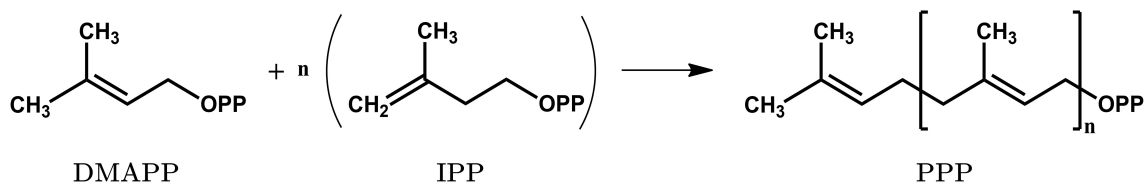


Abbildung 2.1: Kondensation von IPP und DMAPP zur Synthese von höheren Isoprenoiden mit ersichtlicher Isopren-Grundstruktur (C_5). DMAPP, Dimethylallylpyrophosphat; IPP, Isopentenylpyrophosphat; PPP, Polyprenyldiphosphat, OPP, Diphosphat.

Isoprenoide Chinone sind essentielle Bausteine von bakteriellen und archaealen Membranen und fungieren meist als Redoxvermittler in respiratorischen Elektronentransportnetzwerken, indem sie verschiedene Oxidoreduktasen verbinden (Nowicka & Kruk 2010; Dairi 2012). Die respiratorischen Elektronentransportnetzwerke sind das Resultat der beeindruckenden Anpassungsfähigkeit von Prokaryonten und der Diversität ihrer Energieerzeugungssysteme. Diese Netzwerke setzen sich aus einer Vielzahl von Proteinen zusammen, die aktiv an diesen Prozessen beteiligt sind. Bei den meisten dieser biochemischen Vorgänge übernehmen Chinone eine zentrale Funktion, da sie als lipidlösliche Moleküle in der Membran die Übertragung von Elektronen und Protonen zwischen den Proteinkomplexen effektiv ermöglichen. In besonderen Fällen wurde die direkte Interaktion von Proteinen postuliert, wie zum Beispiel bei der Hydrogenase und der Polysulfid-Reduktase von *Wolinella succinogenes*, wo eine Beteiligung von gebundenem Menachinon (MK) vermutet wird (Dietrich & Klimmek 2002). Die isoprenoide Chinone bestehen aus einer Kopfgruppe und einer hydrophoben Isoprenoid-Seitenkette, die ihnen eine lipidlösliche Eigenschaft verleiht und sie in den Lipiddoppelschichten der Membranen verankert. Je nach Organismus kann die Länge der hydrophoben Isoprenoid-Seitenkette sowie der Grad und die Positionierung der Seitenketten-Sättigung variieren. Die Kopfgruppe hingegen ist hydrophil und ermöglicht die Interaktion mit hydrophilen Teilen von Proteinen. Die Interaktion von Chinonen mit respiratorischen Proteinkomplexen in biologischen Membranen findet durch eine zweistufige Reduktion statt, die zuerst zur Bildung eines Semichinon-Radikals als Zwischenprodukt und anschließend zur Bildung der entsprechenden Chinolform (Hydrochinon) führt (Abb. 2.2). Die isoprenoiden Chinone sind aufgrund ihrer Fähigkeit zur reversiblen Reduktion und ihrer lipidlöslichen Seitenkette ideale Kandidaten für ihre Funktion als Redoxvermittler zwischen verschiedenen Proteinkomplexen.

Die meisten biologischen isoprenoide Chinone gehören entweder zu den Naphthochinonen oder zu den Benzochinonen. Ubichinone (UQ) und Plastochinone (PQ) sind die beiden wichtigsten Gruppen von Benzochinonen, die sich durch ihre Ringsubstitution unterscheiden (Abb. 2.3). Zu

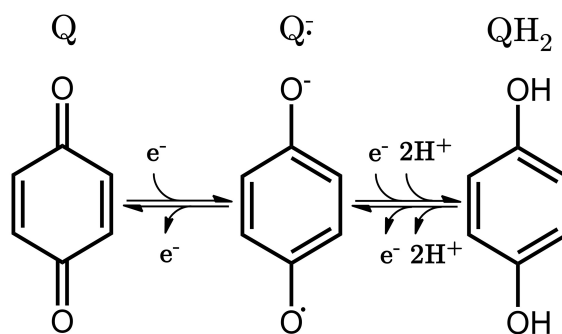


Abbildung 2.2: Reversible zweistufige Reduktion des chinoiden Systems: Vom Chinon (Q) über das instabile Semichinon-Radikal ($Q^{\cdot-}$) zum stabilen Hydrochinon (QH_2).

den Naphthochinonen gehören beispielsweise MK, 2-Demethylmenachinon (DMK), Methionachinon (MTQ) und Phyllochinon (PhQ) (Abb. 2.3). Neben ihrer physiologischen Funktion werden Chinonverbindungen auch als Biomarker zur Charakterisierung mikrobieller Spezies verwendet (Collins & Jones 1981). Ein Chinonprofil kann dazu beitragen, verschiedene Arten von Mikroorganismen zu differenzieren und zu identifizieren. Erstens die Art des Chinons, zweitens die variierenden Längen der Isoprenyl-Seitenketten, die üblicherweise mit Q_n abgekürzt werden und drittens die Sättigung oder Hydrierung dieser Isoprenyl-Seitenketten, die als $Q_n(H_n)$ dargestellt werden. In den meisten Fällen weisen Organismen eine Mischung aus unterschiedlichen Chinonen auf, wobei eines davon normalerweise als das vorherrschende respiratorische Chinon fungiert. Beispielsweise besitzen *Legionella*-Arten UQ mit Isoprenylketten, deren Länge je nach Art zwischen UQ_9 und UQ_{14} variiert (Lambert & Moss 1989). Eines dieser UQ ist typischerweise das dominante Chinon der jeweiligen Art. Es sind auch Organismen bekannt, in denen zwei unterschiedliche Chinone, sei es MK oder UQ, in vergleichbaren Konzentrationen vorkommen. Ein Beispiel hierfür ist die Entdeckung von MK_{12} , MK_{13} und MK_{14} in *Microcella alkaliphila*, wobei MK_{13} und MK_{14} in ähnlichen Anteilen vorhanden sind (Tiago *et al.*, 2006). Andere Arten, wie sie in der Ordnung der Solirubrobacterales zu finden sind, besitzen ausschließlich Menachinonvarianten,

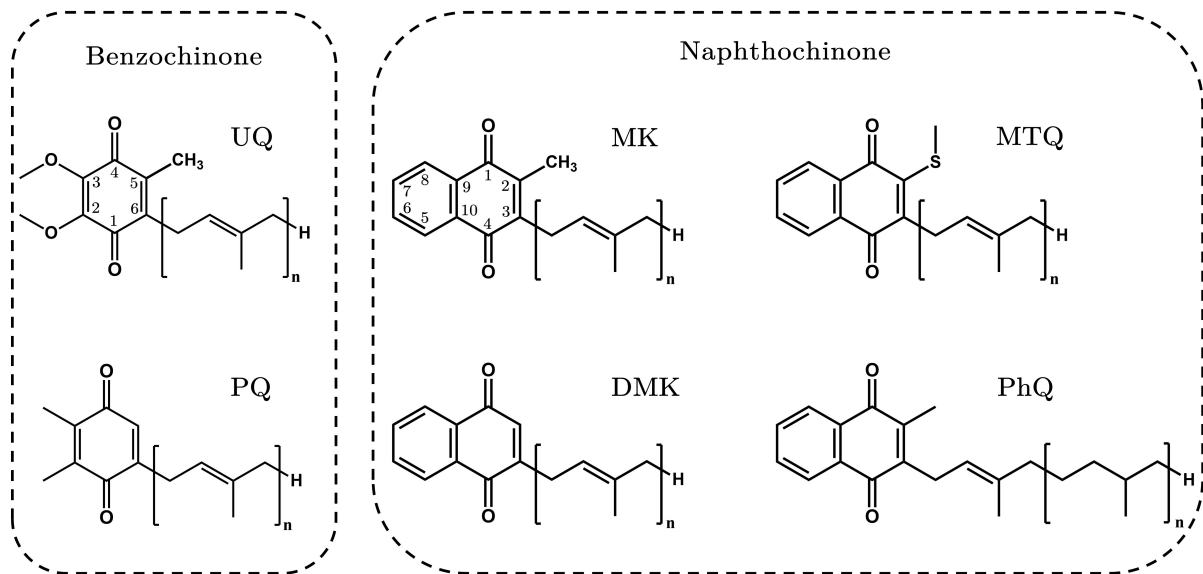


Abbildung 2.3: Struktur von isoprenoiden Benzo- und Naphthochinonen mit Nummerierung der Kohlenstoffatome des Ringsystems am Beispiel von UQ und MK. UQ, Ubichinon; PQ, Plastochinon; MK, Menachinon; DMK, Demethylmenachinon; MTQ, Methionachinon; PhQ, Phyllochinon.

die auf MK_7 basieren. Dazu gehören $\text{MK}_7(\text{H}_4)$, $\text{MK}_7(\text{H}_2)$ und DMK_7 (Kim *et al.*, 2012; Seki *et al.*, 2012; Vieira *et al.*, 2023).

Neben UQ und MK sind auch ungewöhnliche Chinone bekannt, die in bestimmten Archaeen und Bakterien auftreten. Beispielsweise können einige Archaeen aus der Ordnung Sulfolobales ein schwefelhaltiges Isoprenoidchinon namens Caldariellachinon aufweisen (Gambacorta *et al.*, 1993). Ebenso sind methylierte MK-Derivate wie Methylmenachinon (MMK) und Dimethylmenachinon (DMMK) in Mikroorganismen aus verschiedenen Phyla zu finden (Hein *et al.*, 2017). Die Untersuchung respiratorischer Chinone ist in der Taxonomie von großem Interesse, da die spezifische Art des Chinons, die Länge und Sättigung der Isoprenoidketten sowie das Verhältnis der einzelnen Chinone zueinander oft Rückschlüsse auf die phylogenetische Zugehörigkeit eines Mikroorganismus zulassen (Mannheim *et al.*, 1978). Es ist jedoch wichtig zu beachten, dass die Zusammensetzung des Chinonpools stark von den vorherrschenden Wachstumsbedingungen abhängt und entsprechend variieren kann. Zudem ist es unerlässlich, respiratorische Chinone für jede Art

separat zu untersuchen, da eine Übertragung von Erkenntnissen von einer Organismengruppe auf eine andere nicht möglich ist.

2.2 Menachinon und Methylmenachinon

MK wird evolutionär als das älteste isoprenoide Chinon betrachtet und ist zugleich das am häufigsten vorkommende respiratorische Chinon bei Mikroorganismen (Schoepp-Cothenet *et al.*, 2009; Schoepp-Cothenet *et al.*, 2013). Diese Erkenntnis wurde durch paläochemische Studien und molekulare Phylogenie bestätigt und steht im Einklang mit dem Auftreten von Menachinon zu Beginn der Evolution sowie seinem negativen Redoxpotenzial, was gut zur stark reduzierenden Erdatmosphäre in der Frühzeit passt. Doch mit der Zunahme von Sauerstoff in der Atmosphäre durch die oxygene Photosynthese, war die Verwendung von MK als Elektronenüberträger in anaeroben Mikroorganismen unvorteilhaft. Sauerstoff oxidiert Menachinon schnell und nicht katalytisch, was zur Ineffizienz von Menachinon/Menachinol als Elektronenüber-

träger in Gegenwart von Sauerstoff führt. Neben MK wurden auch demethylierte oder methylierte Formen identifiziert, wie DMK, verschiedene MMK und DMMK (Anh. Tab. S.1) (Collins & Fernandez 1984; Maruo *et al.*, 2008). Die Isoprenyl-Seitenkette von MKs und ihren Derivaten kann in Abhängigkeit vom Organismus aus einer variablen Anzahl von Isopreneinheiten bestehen, nämlich von 1 bis 15 (Collins & Jones 1981; Collins *et al.*, 1984; Timkina *et al.*, 2023). MMK ist in vielen Mikroorganismen beschrieben worden, einschließlich Bakterien der Phyla Actinomycetota (früher: Actinobacteria) und Pseudomonadota (früher: Proteobacteria) sowie Archaea der Phyla Thermoproteota (früher: Crenarchaeota) und Euryarchaeota. Im Gegensatz dazu wurde die Produktion von DMMK nur bei Bakterien der Klasse Coriobacteriia (Phylum Actinomycetota) nachgewiesen.

Die Standard-Redoxpotentiale bei pH 7 (E_0') sind im Vergleich zu UQ (E_0' (UQ/UQH₂) \approx +100 mV) bei DMK (E_0' (DMK/DMKH₂) \approx +40 mV) und MK (E_0' (MK/MKH₂) \approx -70 mV) negativer (Schoepp-Cothenet *et al.*, 2013). Untersuchungen haben gezeigt, dass das Hinzufügen von Methylgruppen zum Naphthochinonring von MK das Redoxpotenzial zu noch niedrigeren Werten verlagert (Unden & Bongaerts 1997; Schmid *et al.*, 1999; Nasiri *et al.*, 2009; Hein *et al.*, 2018).

2.3 Rolle von Methylmenachinon in *Wolinella succinogenes*

In natürlichen Umgebungen ermöglichen die unterschiedlichen Redoxpotenziale der Chinone den Mikroorganismen, die Zusammensetzung des Chinon/Chinol-Pools an ihre vorherrschende Art der Energieumwandlung anzupassen. Insbesondere scheint das Vorhandensein von methylierten MK-Derivaten in Elektronentransportketten, die Elektronenakzeptoren mit niedrigem Potenzial verwenden, besonders vorteilhaft zu sein.

Einer der am besten erforschten Mikroorganismen in Bezug auf MMK ist das Epsilonproteobakterium *W. succinogenes*. Dieser Mikroorganismus kann durch oxidative Phosphorylierung wachsen, wobei er Polysulfid (E_0' (Polysulfid/HS⁻)

\approx -275 mV) als Elektronenakzeptor und Wasserstoff oder Formiat als Elektronendonoren nutzt (Abb. 2.4). An dieser Elektronentransportkette sind die membrangebundenen respiratorischen Komplexe Polysulfidreduktase (PsrABC), [Ni-Fe]-Hydrogenase (HydABC) und Formiatdehydrogenase (FdhABC) beteiligt. Bei allen drei Enzymkomplexen befindet sich das katalytische Zentrum auf der periplasmatischen Seite (Kröger *et al.*, 2002; Gross *et al.*, 1998). Die Elektronen, die bei der Oxidation von Wasserstoff (Hyd) oder Formiat (Fdh) freigesetzt werden, gelangen vom katalytischen Zentrum über Eisen-Schwefel-Cluster in die membranintegrateden Dihäm-Cytochrom *b*-Untereinheiten (HydC und FdhC), welche die Reduktion von MMK katalysieren. Anschließend erfolgt die Übertragung der Elektronen von dem gebundenen MMK in der PsrC-Einheit über Eisen-Schwefel-Cluster auf den Bis-Molybdopterin-Guanin-Dinukleotid-Cofaktor, um Polysulfid zu reduzieren (Jormakka *et al.*, 2008). Unter diesen Wachstumsbedingungen enthält *W. succinogenes* gleiche Mengen an MK und MMK (Collins & Fernandez 1984). Es war nicht klar ersichtlich, ob MK oder MMK als Chinon für die Polysulfid-Atmung verwendet wird. In Experimenten mit Liposomen, die die Polysulfidreduktase und entweder Hydrogenase oder Formiatdehydrogenase enthielten, konnte die Aktivität der Polysulfid-Atmung unter Verwendung von MMK im Gegensatz zu MK nachgewiesen werden (Dietrich & Klimmek 2002). Die Fumarat-Atmung (E_0' (Fumarat/Succinat) \approx +30 mV) wurde ebenfalls in den Liposomen durchgeführt, indem die Formiatdehydrogenase und die Fumaratreduktase verwendet wurden (Abb. 2.4). Jedoch wurde keine Aktivität bei MMK beobachtet, während in diesem Fall nur eine Aktivität unter Verwendung von MK nachgewiesen wurde. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen verdeutlichen, dass die Polysulfidatmung von *W. succinogenes* auf die Anwesenheit von 8-MMK₆ angewiesen ist, während MK₆ nicht ausreichend ist.

Ein weiteres Beispiel ist die Sulfitatmung (E_0' (HSO₃⁻/HS⁻) \approx -116, mV) mit Formiat als Elektronendonator in *W. succinogenes* (Abb. 2.4). Die Sulfitreduktion wird durch das periplasmatische Oktahäm-Cytochrom *c* MccA katalysiert (Hermann *et al.*, 2015). Im heterobimetallischen aktiven Zentrum von MccA ist ein Cu(I)-Ion po-

sitioniert, das in unmittelbarer Nähe zum aktiven Häm *c*-gebundenen Eisen liegt. Darüber hinaus sind in *MccA* sieben konventionelle $[C_{x_2}CH]$ -Motive und ein einzigartiges $[C_{x_{15}}CH]$ -Motiv vorhanden, das für die Bindung von Häm 8 verantwortlich ist. Der zugehörige Elektronentransportweg scheint das Eisen-Schwefel-Protein *MccC* als direkten Redox-Partner von *MccA* einzuschließen. Ebenfalls in diesen Prozess involviert ist die membranständige Menachinoldehydrogenase *MccD*, welche ein Mitglied der *NrfD/PsrC*-Familie darstellt.

Es wurden *W. succinogenes*-Mutanten konstruiert, bei denen die Gene für *mccA*, *mccC* und *mccD* gezielt fehlten (Eller *et al.*, 2019). Unter diesen Bedingungen wurde beobachtet, dass das Wachstum von Zellen, in denen die Gene *mccA*, *mccC* oder *mccD* fehlten, unter Verwendung von Sulfid als Elektronenakzeptor gehemmt war. Um die Abhängigkeit von MMK zu untersuchen, wurde eine $\Delta mqnK::kan$ Mutante verwendet. Es wurde gezeigt, dass diese Mutante trotz des Fehlens von 8-MMK₆ in gewissem Maße über die Sulfidatmung im Vergleich zum Kontrollstamm wachsen konnte. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass sowohl MK₆ als auch 8-MMK₆ wichtige Bestandteile der Sulfidatmung sind (Eller *et al.*, 2019). Im Gegensatz zur Polysulfidatmung hängt die Sulfidatmung jedoch nicht ausschließlich von 8-MMK₆ ab. Die Analyse des Verhältnisses von MK₆ zu 8-MMK₆ ergab, dass MK₆ und 8-MMK₆ in etwa gleichen Mengen in den Zellen vorhanden waren, wenn diese auf Polysulfide, Sulfite oder Fumarat als Elektronenakzeptoren wuchsen (Eller *et al.*, 2019; Collins & Fernandez 1984). Es ist jedoch zu beachten, dass die Synthese von 8-MMK₆ unterdrückt wurde, wenn die Zellen Substanzen mit einem positiven Redoxpotentialen, wie Nitrat ($E_0'(\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-) \approx +433 \text{ mV}$) oder Lachgas ($E_0'(\text{N}_2\text{O}/\text{N}_2) \approx +1366 \text{ mV}$) als Elektronenakzeptoren verwendet wurden (Abb. 2.4).

2.4 Menachinon-Biosynthese

Die Synthese von Menachinon erfolgt durch die Kopplung eines Naphthochinon-Ringsystems mit einer Isoprenyl-Seitenkette, die getrennt synthetisiert werden. Es wurden zwei sich ausschließende Biosynthesewege für die Synthese der Kopfgruppe

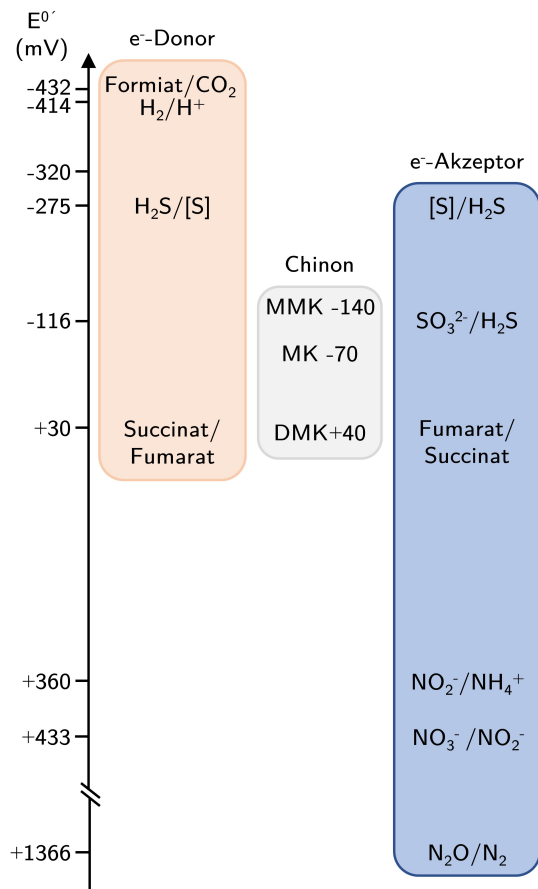


Abbildung 2.4: Redoxpotentiale typischer Elektronendonoren, Chinonen und Elektronenakzeptoren von *Wolinella succinogenes*. MMK, Methylmenachinon; MK, Menachinon; DMK, 2-Demethylmenachinon. Modifiziert nach Magalon & Alberge 2016.

beschrieben: der klassische MK-Biosyntheseweg (Men) und der Fufalosin-Weg (Mqn) (Dairi 2012). Der klassische MK-Biosyntheseweg ist seit Jahrzehnten bekannt und kommt beispielsweise in den Phyla Actinomycetota, Bacteroidota (früher Bacteroidetes), Cyanobacteriota (früher Cyanobacteria), Bacillota (früher Firmicutes) und Pseudomonadota vor (Zhi *et al.*, 2014). Der Fufalosin-Weg wurde erstmals 2008 bei *Streptomyces coelicolor* A3 (2) beschrieben und scheint phylogenetisch weiter verbreitet zu sein, da er bei vielen bakteriellen Phyla Bacillota, Actinomycetota, Thermodesulfobacteriota (früher Thermo-

desulfobacteria) und Campylobacterota (früher Proteobacteria), sowie in einigen Archaeen vorhergesagt wird (Hiratsuka *et al.*, 2008; Nowicka & Kruk 2010; Zhi *et al.*, 2014). Interessanterweise bevorzugen Mikroorganismen, die in anoxischen Lebensräumen leben, den Fualosin-Weg und sind gleichzeitig nicht in der Lage, UQ zu synthetisieren.

Die MK-Biosynthese beginnt mit Chorismat, einem zentralen Metaboliten des Shikimat-Wegs, der sich danach verzweigt und nach der Bildung des Naphthochinon-Rings wieder konvergiert (Dairi 2012). Die Synthese der Polyisoprenyl-Seitenkette erfolgt über den Mevalonat-Weg (MVA) und/oder den 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat-Weg (DXP), auch bekannt als Methylerythritol-4-Phosphat-Weg (MEP) (Abb. 2.5).

2.5 Klassischer Menachinon-Biosyntheseweg

Es gibt neun Enzyme, die am Men-Weg beteiligt sind: MenF, MenD, MenH, MenC, MenE, MenB, MenI, MenA und MenG (Abb. 2.5) (Nowicka & Kruk 2010). Der erste Schritt dieses Weges ist die Umwandlung von Chorismat in Isochorismat, die durch das Enzym MenF, auch bekannt als Isochorismatsynthase, katalysiert wird. MenF ist Teil der Menachinon, Siderophor, Tryptophan (MST)-Enzymfamilie, die Chorismat in unterschiedliche Vorläufermoleküle für verschiedene Biosynthesewege umwandelt. Hierzu gehören nicht nur respiratorische Chinone, sondern auch Folat, aromatische Aminosäuren sowie Siderophore (Shelton & Lamb 2018). Das Enzym MenD spielt eine entscheidende Rolle im Men-Weg, indem es Isochorismat und 2-Oxoglutarat in das Metabolit 2-Succinyl-5-enolpyruvyl-6-hydroxy-3-cyclohexen-1-carboxylat (SEPHCHC) umwandelt (Bhasin *et al.*, 2003). Dieses ist das erste spezifische Metabolit des Men-Wegs und dient in den folgenden Schritten zur Synthese von Menachinon (Shelton & Lamb 2018). MenD wird auch als SEPHCHC-Synthase bezeichnet und gehört zur Familie der Thiamindiphosphat (ThDP)-abhängigen Enzyme. Es verwendet zwei kovalente ThDP-Intermediate während der

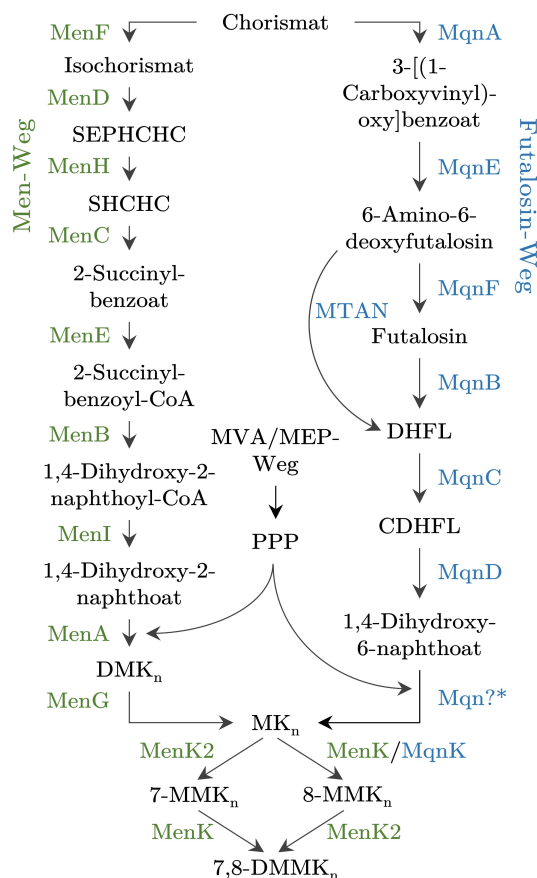


Abbildung 2.5: Überblick der zwei Biosynthesewege von Menachinon aus Chorismat: (I) Der klassische MK-Weg (Enzyme in Grün) und (II) der Fualosin-Weg (blau), erweitert durch Methylierungsreaktionen der MenK/MqnK/MenK2-Familie, die zur Bildung von MMK und DMMK führen. Beachtenswert ist, dass MenK2 ausschließlich in Men-Weg-nutzenden Mikroorganismen vorhanden ist. "Mqn?" bezieht sich auf die unklaren letzten Schritte im Fualosin-Weg. SEPHCHC, 2-Succinyl-5-enolpyruvyl-6-hydroxy-3-cyclohexen-1-carboxylat; SHCHC, 2-Succinyl-6-hydroxy-2,4-cyclohexadien-1-carboxylat; DHFL, Dehyloxanthin-Fualosin; CDHFL, zyklisches Dehyloxanthin-Fualosin; DMK, Demethylmenachinon; MK, Menachinon; MMK, Methylmenachinon; DMMK, Dimethylmenachinon; MVA, Mevalonat-Weg; MEP, Methylerythritol-4-Phosphat-Weg; PPP, Polyprenyldiphosphat.

Umwandlung von Isochorismat in SEPHCHC. Das Enzym MenH, auch bekannt als 2-Succinyl-6-hydroxy-2,4-cyclohexadien-1-carboxylat (SHCHC)-Synthase, ist im Men-Weg für den nächsten Schritt verantwortlich. Es gehört zur α/β -Hydrolase-Superfamilie und verwendet eine katalytische Triade bestehend aus Serin, Histidin und Aspartat, um Pyruvateliminierung aus SEPHCHC durch Abstraktion von α -Protonen zu initiieren und das Produkt SHCHC zu erhalten (Jiang *et al.*, 2008). Das Produkt SHCHC wird im nächsten Schritt durch das Enzym MenC in 2-Succinylbenzoat (OSB) umgewandelt. MenC gehört zur Enolase-Superfamilie und ist eine O-Succinylbenzoat-Synthase, die Wasser durch β -Eliminierung entfernt (Thompson *et al.*, 2000). OSB wird dann von MenE mit Coenzym A (CoA) durch eine Thioesterbindung unter Verwendung eines OSB-Adenosinmonophosphat-Intermediates ligiert.

MenE ist eine OSB-CoA-Synthetase und gehört zur ANL-Familie, zu der auch Acyl-CoA-Synthetasen, nicht-ribosomale Peptidsynthetase-Adenylierungsdomänen und Luciferasen gehören, von denen sich auch der Familienname ableitet (Matarlo *et al.*, 2015). MenB ist ein Enzym, das zur Familie der Crotonase-Superfamilie gehört und als 1,4-Dihydroxy-2-naphthoyl-CoA (DHNA-CoA)-Synthase bezeichnet wird (Li *et al.*, 2011). Das Enzym katalysiert die Umwandlung von OSB-CoA zu DHNA-CoA durch eine intramolekulare Claisen-Kondensationsreaktion. MenI hingegen ist das letzte Enzym in der Biosynthese der MK-Kopfgruppe und wird als DHNA-CoA-Thioesterase bezeichnet. Es katalysiert den hydrolytischen Schritt von DHNA-CoA zu 1,4-Dihydroxy-2-naphthoat und gehört zur sogenannten Hotdog-Faltblatt-Superfamilie (Chen *et al.*, 2013). In der cytoplasmatischen Membran wird die enzymatische Kopplung der MK-Kopfgruppe, 1,4-Dihydroxy-2-naphthoat, mit der Polyisoprenyl-Seitenkette aus dem MVA-Weg und/oder MEP-Weg durch das transmembrane Protein MenA katalysiert (Dhiman *et al.*, 2019). MenA wird auch als 1,4-Dihydroxy-2-naphthoat-Isoprenyltransferase bezeichnet und entfernt die DHNA-Carboxylatgruppe. Stattdessen wird sie durch den hydrophoben Polyisoprenyl-Seitenkette ersetzt, was zur Bildung von DMK führt. Schließlich wird DMK an der C-2-Position

des Naphthochinonrings durch MenG zu MK methyliert. MenG ist ein Klasse I *S*-Adenosyl-L-methionin (SAM)-abhängiges Methyltransferase (Lee *et al.*, 1997).

Der Men-Weg kann durch Modifikationen an MK erweitert werden, beispielsweise durch die Methylierung des Naphthochinonrings. Für diese enzymatische Katalyse sind die Menachinon-Methyltransferasen, MenK und MenK2, verantwortlich. Beide Enzyme methylieren positionsspezifisch. So methyliert MenK das MK am C-8-Atom zu 8-Methylmenachinon (8-MMK) (Hein *et al.*, 2017), während MenK2 MK am C-7-Atom zu 7-Methylmenachinon (7-MMK) methyliert. Besitzt ein Mikroorganismus beide Enzyme kommt es zur Bildung von 7,8-Dimethylmenachinon (7,8-DMMK) (Hein *et al.*, 2018).

2.6 Futasin-Biosyntheseweg

Der Biosyntheseweg von Menachinon über Futasin involviert insgesamt zehn Enzyme mit den Bezeichnungen MqnA, MqnE, MqnF, MqnB, MqnC, MqnD, MqnP, MqnL, MqnM und MqnG (Abb. 2.5). Das Enzym MqnA, das erste im Biosyntheseweg, ist eine Chorismat-Dehydratase und bewirkt die Dehydratisierung von Chorismat zu 3-[(1-Carboxyvinyl)-oxy]benzoat (Mahanta *et al.*, 2013). Anschließend katalysiert die radikalische SAM-Enzym Aminofutasin-Synthase, MqnE, die Umwandlung von 3-[(1-Carboxyvinyl)-oxy]benzoat in 6-Amino-6-desoxyfutasin (AFL) (Joshi *et al.*, 2018a). Das Metabolit AFL wird durch das Enzym Aminofutasin-Deaminase (MqnF) zu Futasin deaminiert (Goble *et al.*, 2013).

Nach der Bildung von Futasin erfolgt die weitere Umwandlung zu Dehypoxanthin-Futasin (DHFL) durch das Enzym Futasin-Hydrolase (MqnB) (Hiratsuka *et al.*, 2009). In einigen Mikroorganismen, wie *Campylobacter jejuni* und *Helicobacter pylori*, wurde eine modifizierte Variante des Futasin-Wegs beschrieben. Hierbei werden die Enzyme MqnF und MqnB durch das Enzym 5'-Methylthioadenosin-Nukleosidase (MTAN) ersetzt (Banco *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2011). MTAN katalysiert die direkte Umwandlung von AFL in

DHFL, ohne den Zwischenschritt der Futasolin-Bildung. Sowohl MqnB als auch MTAN gehören zur Gruppe der Glykosidasen und katalysieren in beiden Fällen die Umwandlung von Futasolin und AFL in DHFL.

Im nachfolgenden Schritt erfolgt die Umwandlung von DHFL zu zyklischem Dehypoxanthin-Futasolin (CDHFL) durch das zweite radikalische SAM-Enzym im Futasolin-Weg, MqnC ein DHFL-Cyclase (Cooper *et al.*, 2013). CDHFL wird dann durch MqnD (5,8-Dihydroxy-2-naphthoat-Synthase) in 1,4-Dihydroxy-2-naphthoat umgewandelt (Manion-Sommerhalter *et al.*, 2021). Es wird angenommen, dass die letzten Schritte im Futasolin-Weg durch vier Enzyme erfolgen: MqnP für die Prenylierungsreaktion, MqnL und MqnM für die Decarboxylierung und MqnG für die C-2-Methylierung von DMK (Ravcheev & Thiele 2016; Cotrim *et al.*, 2017; Joshi *et al.*, 2018b). Allerdings ist die genaue Reihenfolge dieser Reaktionen noch unklar.

Im Futasolin-Weg wird der Naphthochinonring durch die gleiche Methylierung wie im Men-Weg modifiziert, indem MK durch das Enzym MqnK, ein Homolog zu MenK, an der Position C-8 zu 8-MMK methyliert wird (Abb. 2.5) (Hein *et al.*, 2017). Bisher gibt es keine bekannten Mikroorganismen, die den Mqn-Weg verwenden und das Enzym MenK2 besitzen, was im Gegensatz zum Men-Weg steht. Dies bedeutet, dass im Mqn-Weg keine Synthese von 7-MMK oder 7,8-DMMK möglich ist.

2.7 Biosynthese der Isoprenoid-Seitenkette

Es gibt zwei Hauptwege für die Biosynthese von Isoprenoiden, die eine der größten und vielfältigsten Gruppen von Naturprodukten sind: den MVA-Weg und den DXP-Weg, auch als MEP-Weg bezeichnet (Zhao *et al.*, 2013).

Obwohl der MEP-Weg in den meisten Bakterien als der vorherrschende Weg zur Synthese von Isoprenoiden gilt, gibt es Ausnahmen. Einige Mikroorganismen aus den Phyla Actinomycetota, Bacteroidia, Chloroflexia, Bacillota und Pseudomonadota sowie Spirochaetota (früher Spirochaetes) besitzen homologe Enzyme zum MVA-Weg oder nut-

zen einen alternativen MVA-Weg. Im Gegensatz dazu nutzen Eukaryoten hauptsächlich den MVA-Weg zur Isoprenoid-Synthese, während die meisten Archaea einen alternativen MVA-Weg verwenden (Boucher & Doolittle 2000; Lange *et al.*, 2000; Lombard & Moreira 2010; Dellas *et al.*, 2013).

Die Biosynthese von Isoprenoidvorläufern erfolgt durch den MVA-Weg und den MEP-Weg, wobei diese unterschiedliche Ausgangsstoffe nutzen. Während der MVA-Weg auf Acetyl-CoA setzt, nutzt der MEP-Weg Glycerinaldehyd-3-phosphat und Pyruvat. Beide Wege führen jedoch in weiteren Schritten zur Produktion der gleichen Isoprenoidvorläufer, nämlich IPP und DMAPP (Abb. 2.1). IPP und DMAPP reagieren miteinander, um Geranyldiphosphat (GPP) zu bilden, welches dann durch die Zugabe eines weiteren IPP-Moleküls weiter verlängert wird, um Farnesyldiphosphat (FPP) zu bilden. Die Farnesyldiphosphat-Synthase (FPPS) katalysiert beide Reaktionen (Koyama 1999). FPP wird dann in weiteren Reaktionen mit IPP verlängert, um lange Polyprenyldiphosphate (PPP) zu erzeugen, deren Länge von der spezifischen Polyprenyldiphosphat-Synthase abhängt. In *E. coli* wird beispielsweise die Octaprenyldiphosphat-Synthase durch das *ispB*-Gen codiert (Okada *et al.*, 1997). Das PPP wird durch MenA mit 1,4-Dihydroxy-2-naphthoat gekoppelt, um DMK zu bilden (Abb. 2.5). Im Futasolin-Weg, wird die Kopplung des PPP jedoch wahrscheinlich durch das Enzym MqnP katalysiert.

2.8 Radikalische S-Adenosylmethionin (SAM)-Superfamilie

Die radikalische SAM-Superfamilie (RSS) ist eine Gruppe von Enzymen, die in vielen biologischen Prozessen eine wichtige Rolle spielen. Diese Enzyme enthalten ein konserviertes [Cx₃Cx₂C]-Motiv, das an der Koordination von drei Eisenatomen aus einem [Fe₄S₄]-Cluster beteiligt ist (Holliday *et al.*, 2018). Ein SAM Molekül bindet über die α-Amino- und α-Carboxylatgruppe des Methioninfragments an das vierte Eisenatom im [Fe₄S₄]-Cluster (Walsby *et al.*, 2002). SAM fungiert als Methylgruppendonator und Radikalinitia-

tor, indem es als Zwischenprodukt die Bildung eines 5'-Deoxyadenosyl (5-Ado)-Radikals ermöglicht (Broderick *et al.*, 2014). RSS-Enzyme katalysieren verschiedene Reaktionen wie Kohlenstoffmethylierung und -thiolierung, oxidative Decarboxylierung, Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungsbildung, Metallkofaktor-Biosynthese und mehr. Die Diversität der RSS-Reaktionen ist auf die konservierte Kerndomäne der RSS zurückzuführen, die in verschiedenen multidomänen Architekturen vorkommt (Holliday *et al.*, 2018). Die Kerndomäne der RSS-Enzyme besteht aus einem $\beta_8\alpha_8$ -Triosephosphatisomerase (TIM)-Barrel-Faltblatt, in dem sich das aktive Zentrum in der Nähe des $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Clusters befindet. Dieses TIM-Barrel-Faltblatt ist bei den meisten RSS-Enzymen vorhanden, aber es gibt auch einige Enzyme, die eine $\beta_6\alpha_6$ -drei-viertel-TIM-Barrel-Faltung aufweisen, die den Zugang von größeren Substraten ermöglicht (Wang *et al.*, 2014). Neben der Kern-Domäne können RSS-Enzyme auch andere Domänen enthalten, die für die jeweilige spezifische Reaktion erforderlich sind.

Zu Beginn der katalytischen Reaktion von Enzymen der radikalischen SAM-Superfamilie wird ein universeller Mechanismus befolgt. Dabei wird der $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ -Cluster durch einen externen Elektronendonator in den katalytisch aktiven $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{1+}$ -Zustand reduziert (Holliday *et al.*, 2018). SAM1 wird am einzigartigen Eisen des $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Clusters über die α -Amino- und α -Carboxylatgruppen chelatiert (Walsby *et al.*, 2002). Anschließend findet

ein Elektronentransfer vom $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{1+}$ -Cluster zum SAM1-Sulfoniumion statt, was die Spaltung der S-[5'-C]-Bindung und die Bildung eines 5-Ado-Radikals sowie eines Methionins zur Folge hat (Abb. 2.6, Schritt 1) (Broderick *et al.*, 2014). Das 5-Ado-Radikal bildet im Anschluss einen organometallischen Ω -Zwischenzustand mit dem einzigartigen Eisen des $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ -Clusters über eine Fe-C-Bindung. Der Ω -Zwischenzustand dient der Kontrolle und Speicherung des Radikals bis das Substrat positioniert ist, was zur homolytischen Spaltung der Bindung zwischen dem [5'-C] des 5-Ado und dem einzigartigen Eisen führt und das 5-Ado-Radikal regeneriert (Abb. 2.6, Schritt 2) (Horitani *et al.*, 2016). Schließlich abstrahiert das 5-Ado-Radikal ein Wasserstoffatom vom Substrat. Diese initiale Reaktion ist in der gesamten Radikal-SAM-Superfamilie zu finden und dient als Initiator für verschiedene Reaktionen (Broderick *et al.*, 2018).

2.9 Klassen der radikalischen SAM-Methyltransferasen

Die Mitglieder der Klasse A der RSMTs sind mit einer radikalischen SAM-Domäne ausgestattet, die zusätzlich zwei Cysteinreste enthält (Abb. 2.7). Diese Cysteinreste sind an der Katalyse der Übertragung von Methylgruppen auf sp^2 -hybridisierte

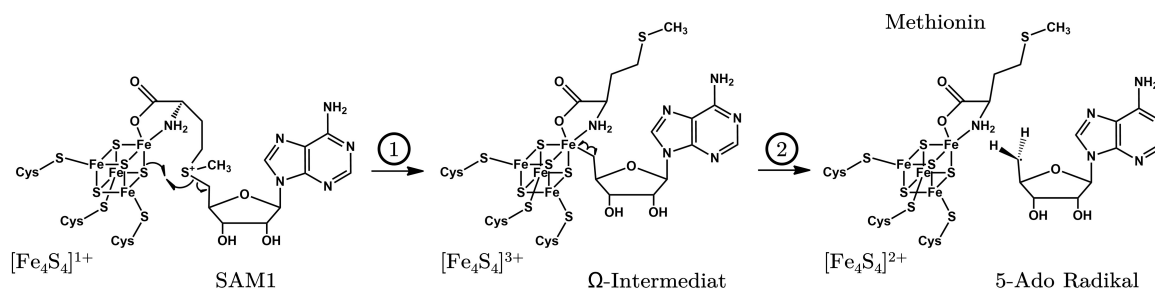


Abbildung 2.6: Initialreaktion der radikalischen SAM-Superfamilie. SAM1 wird am $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{1+}$ -Cluster chelatiert. 1) Der $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{1+}$ -Cluster überträgt ein Elektron auf das SAM1-Sulfoniumion, was zur Spaltung der S-[5'-C]-Bindung und zur Bildung eines 5-Ado-Radikals führt. Das entstandene 5-Ado-Radikal bildet daraufhin einen organometallischen Ω -Zwischenzustand mit dem einzigartigen Eisen des $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{2+}$ -Clusters. 2) Die homolytische Spaltung der Bindung zwischen dem [5'-C] des 5-Ado und dem einzigartigen Eisen führt zur Reaktivierung des 5-Ado-Radikals.

Kohlenstoffatome beteiligt (Boal *et al.*, 2011). Die am besten erforschten Enzyme dieser Klasse sind die Dual-spezifische RNA-Methyltransferase (RlmN) und die rRNA-Methyltransferase (Cfr), die eine wichtige Rolle bei der Methylierung von rRNA und tRNA spielen (Toh *et al.*, 2007; Vázquez-Laslop *et al.*, 2010; Benítez-Páez *et al.*, 2012).

Klasse B RSMTs zeichnen sich durch eine besondere N-terminale Cobalamin-bindende Domäne aus, die die Übertragung von Methylgruppen zwischen SAM und sp^2 - oder sp^3 -hybridisierten Kohlenstoffatomen sowie dem Phosphoratom von Phosphinaten katalysiert (Abb. 2.7). Diese Enzymklasse hat hauptsächlich sekundäre Metabolite wie Antibiotika als Substrate (Zhang *et al.*, 2011).

Die Klasse C RSMTs unterscheiden sich durch ihre charakteristische C-terminale Domäne, welche eine hohe Sequenzidentität zum radikalische SAM-Enzym sauerstoffunabhängige Coproporphyrinogen-III-Dehydrogenase (CPDH) aufweist (Abb. 2.7). Jedoch sollte beachtet werden, dass CPDH keine Methylierung katalysiert, sondern stattdessen die Decarboxylierung von zwei Propionat-Seitenketten in der Hämbiosynthese durchführt, um zwei Vinylgruppen an den Ringen A und B von Protoporphyrinogen IX zu erzeugen (Layer 2003; Rand *et al.*, 2010). Im Gegensatz dazu katalysiert die Klasse C die Methylübertragung auf sp^2 -hybridisierte Kohlenstoffatome durch zwei gebundene SAM-Moleküle (Bauerle *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2011). Typische Substrate dieser Klasse sind sekundäre Metabolite mit antitumoralen und antibiotischen Eigenschaften.

Derzeit ist die Klasse E ausschließlich durch das Enzym NifB repräsentiert. NifB ist für die radikalische SAM-abhängige Carbideinfügung in die Nitrogenase-Metallocofaktor-Gruppe verantwortlich und verfügt neben der radikalische SAM-Domäne über zwei weitere Bindungsstellen für $[Fe_4S_4]$ -Cluster (Abb. 2.7) (Wiig *et al.*, 2012; Hu & Ribbe 2016). Die radikalischen SAM-Methyltransferasen (RSMTs) sind eine Unterfamilie der RSS, zu der auch die Menachinon-Methyltransferasen gehören. RSMTs sind Enzyme, die nichtreaktive Kohlenstoff- oder Phosphoratom in verschiedenen Molekülen wie Primär- und Sekundärmetaboliten, Proteinen, Zuckern, Lipiden und RNA methylieren (Bauerle *et al.*, 2015). Die RSMTs werden je nach Domänenarchitektur,

Cofaktor-Ausstattung und Reaktionsmechanismus in vier Klassen (Klasse A, B, C und E) eingeteilt (Abb. 2.7). Ursprünglich wurden fünf Klassen von RSMTs definiert (A, B, C, D und E). Allerdings hat sich gezeigt, dass das Enzym MJ0619, das zuvor die Klasse D gebildet hat, fälschlicherweise als RSMT annotiert wurde. Tatsächlich handelt es sich bei MJ0619 um eine Tetraether-Lipidsynthase (Lloyd *et al.*, 2022).

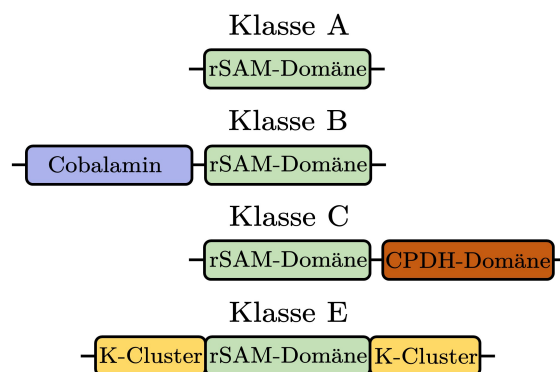


Abbildung 2.7: Allgemeine Domänenarchitektur der vier Klassen von radikalischen SAM-Methyltransferasen. rSAM Domäne, radikalische SAM Domäne; CPDH, Coproporphyrinogen-III-Dehydrogenase; K-Cluster, zusätzliche $[Fe_4S_4]$ -Cluster Bindestelle.

2.10 Menachinon-Methyltransferasen

Das Enzym, das für die Methylierung des Naphthochinonrings verantwortlich ist, wurde erstmals in *W. succinogenes* entdeckt und als MqnK bezeichnet (Hein *et al.*, 2017). Durch den Einsatz einer *mqnK*-Deletionsmutante von *W. succinogenes* wurde nachgewiesen, dass diese nicht mehr in der Lage war, MMK_6 zu produzieren. Zusätzlich konnte die MMK_6 -Produktion durch genomische Komplementierung mit dem nativen *mqnK*-Gen wiederhergestellt werden. Die Bezeichnung des Enzyms hängt vom vorherrschenden Menachinon-Biosyntheseweg in dem jeweiligen Mikroorganismus ab. Bei der Untersuchung von anderen Mikroorganismen wie *Adlercreutzia equolifaciens* wurde nicht nur

ein homologes Protein zu MqnK entdeckt, das aufgrund des Vorhandenseins des Men-Wegs als MenK bezeichnet wurde, sondern noch eine weitere MK Methyltransferase namens MenK2 (Hein *et al.*, 2017; Hein *et al.*, 2018). Der Unterschied zwischen MenK und MenK2 liegt in der Methylierungsposition des Naphthochinonrings. Daher wurden die Menachinon-Methyltransferasen in die Unterfamilien MenK/MqnK und MenK2 unterteilt, je nachdem, an welcher Position ihres MK- (oder MMK-) Substrats sie die spezifische Methylierung durchführen.

Zur Identifizierung der Methylierungsposition von MenK/MqnK wurden die Chinone aus von Fumarat-gewachsenen *W. succinogenes*-Zellen extrahiert und einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) unterzogen (Hein *et al.*, 2017). Mithilfe dieses Verfahrens wurde eine klare Trennung zwischen MK₆ und MMK₆ erreicht. Die isolierte MMK₆-Spezies aus *W. succinogenes* wurde im Anschluss daran anhand von ¹H,¹³C-heteronuklearer Mehrfachbindungskorrelation (HMBC)-kernmagnetischer Resonanzspektroskopie (NMR) sowie Massenspektrometrie (MS) als 8-MMK₆ identifiziert.

Um die Methylierungsposition von MenK2 zu bestimmen, wurde das *menK2*-Gen aus *A. equolifaciens* in *W. succinogenes* genomisch exprimiert (Hein *et al.*, 2018). Die unbekannte Chinon-Spezies wurde anschließend mithilfe von HPLC isoliert und ihre Struktur wurde durch HMBC-NMR und MS aufgeklärt. Es konnte festgestellt werden, dass es sich bei der identifizierten Spezies um 7-MMK₆ handelte. Anhand dieser Erkenntnisse wurde festgestellt, dass Enzyme wie MenK/MqnK die Methylierung am C-8-Atom des Naphthochinon-Ringsystems katalysieren, während MenK2 hingegen die Methylierung am C-7-Atom durchführt.

Bioinformatische Analysen haben gezeigt, dass MenK/MqnK/MenK2 in die Klasse C der RSMTs der radikalischen SAM-Superfamilie gehört. Diese Zuordnung basiert auf dem Vorhandensein einer CPDH Domäne und des konservierten [C_{x3}C_{x2}C]-Motivs (Hein *et al.*, 2017). Die Zugehörigkeit zur Klasse C der RSMTs wurde später durch in-vitro-Enzymassays bestätigt (Hein 2019). Eine detaillierte Untersuchung wurde bisher an den Enzymen MenK und MenK2 aus *Adlercreutzia equolifaciens* (*AeMenK*,

AeMenK2) durchgeführt (Hein *et al.*, 2017; Hein *et al.*, 2018). Es ist bekannt, dass diese beiden Enzyme, wie es typisch für die Klasse C ist, neben der radikalischen SAM-Domäne auch eine CPDH-Domäne besitzen (Abb. 2.8). Durch Sequenzalignments konnte man bei *AeMenK* und *AeMenK2* zusätzlich eine N-terminale Tripwire-Domäne und eine Linker-Domäne identifizieren, welche die radikalische SAM-Domäne mit der CPDH-Domäne verbindet (Hein *et al.*, 2018). Eine Änderung der Methylierungsposition von C-7 auf C-8 wurde erreicht, indem man die Linker- und CPDH-Domäne von *AeMenK2* mit *AeMenK* austauschte und das chimäre Enzym in *E. coli* produzierte. Chimäre Enzyme, die nur die Linker- oder CPDH-Domäne von MenK enthielten, führten nicht zur Methylierung von MK-Derivaten, obwohl sie in den entsprechenden *E. coli*-Zellen produziert wurden. Es scheint daher, dass die kombinierte Linker- und CPDH-Domäne die spezifische Methylierungsposition bei C-8 oder C-7 bestimmt.

Der [Fe₄S₄]-Cluster, der über das Motiv [C_{x3}C_{x2}C] in der radikalischen SAM-Domäne koordiniert wird, wurde durch UV/VIS-Absorptionsspektren sowie Eisen- und Sulfidgehaltsbestimmungen nachgewiesen (Hein 2019). Mithilfe der Cyclovoltammetrie konnte ein Standardredoxpotential von E₀' = -386 mV für [Fe₄S₄]-Cluster aus *AeMenK* bestimmt werden.

MenK/MqnK/MenK2



Abbildung 2.8: Domänenarchitektur der radikalen SAM-Menachinon-Methyltransferasen. TW, Tripwire; rSAM Domäne, radikalische SAM Domäne; CPDH, Coproporphyrinogen-III-Dehydrogenase.

In-vitro-Enzymassays mit *AeMenK* lieferten erste Erkenntnisse zum Reaktionsmechanismus (Hein 2019). Dabei kam SAM mit einer deuterierten Methylgruppe (CD₃-SAM) zum Einsatz. Die Ergebnisse zeigten, dass das 5-AdoH-Produkt ein Deuteriumatom enthielt. Dies deutete daraufhin, dass das 5-Ado-Radikal ein deuteriertes Wasser-

stoff von der Methylgruppe von SAM2 abstrahiert hat, wodurch das Methylenradikal entstand. Weiterhin wurde eine Massenverschiebung von +2 Da beim methylierten Produkt, 8-MMK, beobachtet. Dies legt nahe, dass die deuterierte Methylengruppe auf den Naphthochinonring übertragen wurde.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde ein Reaktionsmechanismus vorgeschlagen, bei dem das 5-Ado-Radikal ein Proton von SAM2 abstrahiert, um ein Methylenradikal zu erzeugen, das auf das MK übertragen wird (Abb. 2.9) (Hein 2019). Die Quelle des dritten Protons war jedoch unklar. Beobachtet wurde jedoch, dass sich die Methylgruppe im Laufe der Zeit von $-CD_2H$ zu $-CDH_2$ änderte. Es ist daher anzunehmen, dass das dritte Proton von einer Base stammt, die mit dem Lösungsmittel interagiert und im Laufe der Zeit Protonen aus dem Puffer an MK anreichert. Ein ähnlicher Effekt wurde auch bei TptI beobachtet, einem Enzym der Klasse C RSMTs, das die Methylierung des Thiazolrings im Thiopeptid Thiomuracin katalysiert (Zhang *et al.*, 2017b).

Die Verbreitung der Menachinon-Methyltransferasen in Bakterien und Archaea ist noch nicht vollständig geklärt. Zwar konnte die Anwesenheit von MenK/MqnK/MenK2 in einigen wenigen Mikroorganismen experimentell nachgewiesen werden, jedoch gibt es in der Literatur Beschreibungen von Mikroorganismen, die zur Synthese von MMK bzw. DMMK befähigt sind (Anh. Abb. S.1) (Hein *et al.*, 2017). Diese Fähigkeit wurde bisher nur in den bakteriellen Phyla Actinomycetota und Pseudomonadota innerhalb der Klassen Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria und Epsilonproteobacteria, sowie den archaealen Phyla Euryarchaeota und Thermoproteota nachgewiesen.

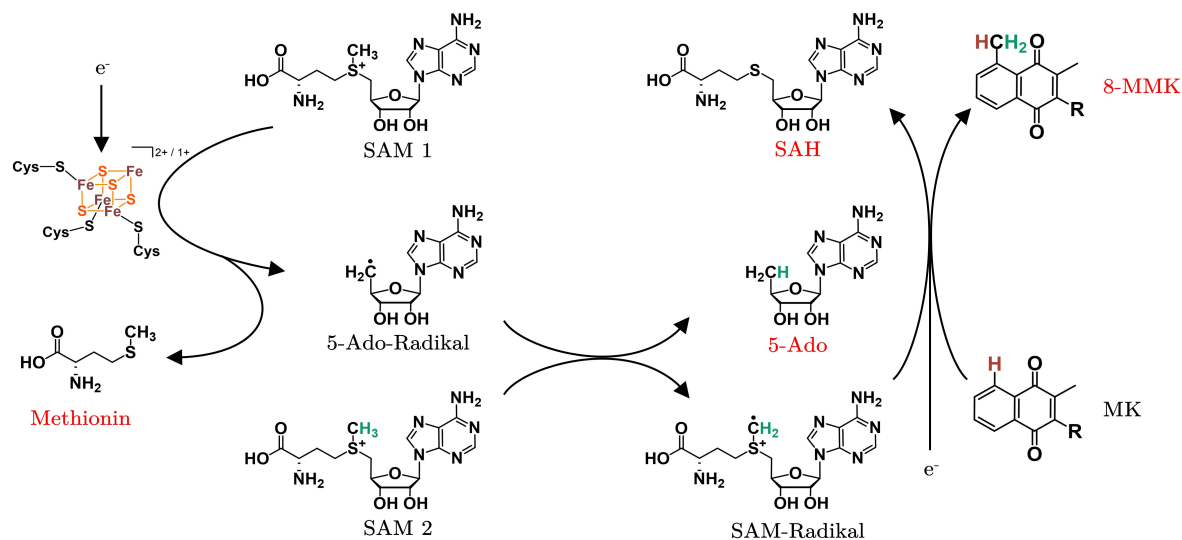


Abbildung 2.9: Schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus der radikalischen SAM-Menachinon-Methyltransferase *AeMenK*. Initiierung der Reaktion durch die Übertragung des Radikals auf SAM2 mit anschließender Bildung eines Methylen-Radikals. Übertragung des Methylen-Radikals auf Menachinon. Entstehende Produkte während der Reaktion sind rot markiert. SAM, *S*-Adenosyl-*L*-Methionin; SAH, *S*-Adenosylhomocystein; 5-Ado, 5'-Desoxyadenosin; MK, Menachinon; 8-MMK, 8-Methylmenachinon. Modifiziert nach Hein 2019.

Kapitel 3

Ziele der Arbeit

Im Verlauf dieser Forschungsarbeit bestanden die Hauptziele darin, die Phylogenie und Bedeutung sowie die Struktur und Funktion von methylierten Menachinonen umfassend zu untersuchen. Hieraus ergaben sich mehrere spezifische Teilziele.

Phylogenie der Menachinon-Methyltransferasen

Im Rahmen dieser Arbeit war das Ziel, die bislang unklare Phylogenie der methylierter MK-Derivate zu klären. Durch den Einsatz von Cluster- und phylogenetischen Analysen sollte eine eingehende Untersuchung der Verbreitung der MenK/MqnK/MenK2-Familie innerhalb der Archaea und Bakterien erfolgen. Besonderes Augenmerk lag dabei auf der Identifikation nicht charakterisierter MenK/MqnK/MenK2-Proteine. Die potenziellen Sequenzen dieser Proteine sollten im Anschluss durch Sequenzvergleiche auf sequenzielle Auffälligkeiten hin untersucht werden, wozu die Identifikation konservierter Aminosäuren und die Ableitung möglicher spezifischer Motive gehörten. Die bis dahin erlangten Ergebnisse sollten durch die heterologe Expression von potenziellen *menK/mqnK/menK2*-Kandidaten in *E. coli* bestätigt werden.

Produktion und Charakterisierung der Menachinon-Methyltransferasen

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Manipulation des Chinonpools von *E. coli* durch die Erstellung der Deletionsmutanten $\Delta ubiE$ und $\Delta ubiCA$. Dabei sollte einerseits getestet werden, ob die MenK/MqnK/MenK2-Familie

in der Lage ist, neben MK auch DMK zu methylieren, und andererseits sollte überprüft werden, ob eine Überproduktion methylierter MK-Derivate möglich ist. Des Weiteren war geplant, die MenK/MqnK/MenK2-Familie hinsichtlich Produktionsverhalten, Proteinausbeute, Oligomerisierungspotenzial, molekularer Massen und Proteinstabilität in *E. coli* zu charakterisieren. Darauf aufbauend sollten die Enzymaktivitäten durch Enzymassays überprüft werden, wobei auch mögliche Parameter für eine generell geringe Enzymaktivität der MenK/MqnK/MenK2-Familie im Enzymtest untersucht werden sollte. Hierfür sollten Inhibitionstests durchgeführt werden, um potenzielle Hemmungen durch die Reaktionsprodukte SAH, MTA und 5-Ado zu testen. Es sollte ebenfalls getestet werden, ob die Zugabe von gereinigtem MTAN einen positiven Effekt auf die Enzymaktivität haben könnte, indem die Reaktionsprodukte abgebaut werden.

Struktur und Reaktionsmechanismus der Menachinon-Methyltransferasen

Darüber hinaus sollten mithilfe von Strukturvorhersagen durch AlphaFold neue Erkenntnisse über den strukturellen Aufbau der MenK/MqnK/MenK2-Familie gewonnen werden. Hierbei liegt ein besonderer Fokus auf der Identifizierung des aktiven Zentrums und des Substratkanals, um ein verbessertes Verständnis des Reaktionsmechanismus zu erlangen.



Kapitel 4

Material & Methoden

4.1 Chemikalien

| Chemikalien | Summformel | Hersteller |
|--|--|----------------------------|
| 2-Propanol (HPLC) | C_3H_8O | Carl Roth, Karlsruhe |
| 4-Chloro-1-Naphthol | $C_{10}H_7ClO$ | Carl Roth, Karlsruhe |
| 5'-Deoxy-5'-Methylthioadenosin | $C_{11}H_{15}N_5O_3S$ | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| 5'-Deoxyadenosin | $C_{10}H_{13}N_5O_3$ | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Aceton (HPLC) | C_3H_6O | Carl Roth, Karlsruhe |
| Acetonitril (HPLC) | C_2H_3N | Carl Roth, Karlsruhe |
| Acrylamidlösung (37,5:1) | | Carl Roth, Karlsruhe |
| Agarose Standard | | Carl Roth, Karlsruhe |
| Albumin Fraktion V | | Carl Roth, Karlsruhe |
| Ameisensäure (LC-MS Grade) | CH_2O_2 | Carl Roth, Karlsruhe |
| Aminohexansäure | $C_6H_{13}NO_2$ | Carl Roth, Karlsruhe |
| Ammoniumeisen(II)-sulfat Hexahydrat | $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2 \cdot 6 H_2O$ | Carl Roth, Karlsruhe |
| Ammoniumeisen(III)-citrat | $C_6H_8O_7 \cdot x Fe^{3+} \cdot y NH_3$ | Carl Roth, Karlsruhe |
| Ammoniumperoxodisulfat | $(NH_4)_2S_2O_8$ | Carl Roth, Karlsruhe |
| Ampicillin Natriumsalz | $C_{16}H_{18}N_3NaO_4S$ | Carl Roth, Karlsruhe |
| Anhydrotetracyclin Hydrochlorid | $C_{22}H_{22}N_2O_7 \cdot HCl$ | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Biotin-Blocking-Puffer | | IBA GmbH, Göttingen |
| Bis-(2-hydroxyethyl)-aminotris- (hydroxymethyl)-methan | $C_8H_{19}NO_5$ | Carl Roth, Karlsruhe |
| Calciumchlorid | $CaCl_2$ | Carl Roth, Karlsruhe |
| Chloramphenicol | $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$ | Carl Roth, Karlsruhe |
| Chloroform (deuteriert) | $CDCl_3$ | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Coomassie® Brilliant Blue G250 | $C_{47}H_{48}N_3O_7S_2Na$ | Carl Roth, Karlsruhe |
| D-Mannitol | $C_6H_{14}O_6$ | Carl Roth, Karlsruhe |
| Dimethylsulfoxid | C_2H_6OS | Carl Roth, Karlsruhe |
| Essigsäure | $C_2H_4O_2$ | Carl Roth, Karlsruhe |
| Ethanol | CH_3CH_2OH | Carl Roth, Karlsruhe |
| Ethidiumbromidlösung 1 % | $C_{21}H_{20}BrN_3$ | Carl Roth, Karlsruhe |
| Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat | $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2 H_2O$ | Carl Roth, Karlsruhe |

| Chemikalien | Summformel | Hersteller |
|--|---|----------------------------|
| Flavin-adenin-dinucleotid Dinatriumsalz | $C_{27}H_{31}O_{15}N_9Na_2P_2$ | Carl Roth, Karlsruhe |
| Formiergas 95/5 | $x N_2 \cdot y H_2$ | Air Liquide, Frankfurt |
| Gel-Blottingpapiere Whatman® | | Carl Roth, Karlsruhe |
| Glucose Monohydrat | $C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$ | Carl Roth, Karlsruhe |
| Glycerin | $C_3H_8O_3$ | Carl Roth, Karlsruhe |
| Hefeextrakt | | Carl Roth, Karlsruhe |
| Imidazol | $C_3H_4N_2$ | Carl Roth, Karlsruhe |
| Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid | $C_9H_{18}O_5S$ | Carl Roth, Karlsruhe |
| Kanamycinsulfat | $C_{18}H_{36}N_4O_{11} \cdot H_2SO_4$ | Carl Roth, Karlsruhe |
| L-Arabinose | $C_5H_{10}O_5$ | Carl Roth, Karlsruhe |
| L-Cystein Hydrochlorid Monohydrat | $C_3H_7NO_2S \cdot HCl \cdot H_2O$ | Carl Roth, Karlsruhe |
| Luria/Miller-Agar | | Carl Roth, Karlsruhe |
| Luria/Miller-Medium | | Carl Roth, Karlsruhe |
| Menachinon-4 | $C_{31}H_{40}O_2$ | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Methanol (HPLC) | CH_3OH | Carl Roth, Karlsruhe |
| N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, 1,2-Bis-(dimethylamino)-ethan | $C_6H_{16}N_2$ | Carl Roth, Karlsruhe |
| Natriumacetat | $NaCH_3COO$ | Carl Roth, Karlsruhe |
| Natriumchlorid | $NaCl$ | Carl Roth, Karlsruhe |
| Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat | $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ | Carl Roth, Karlsruhe |
| Natriumdithionit | $C_4H_{10}O_2S_2$ | Carl Roth, Karlsruhe |
| Natriumhydroxid | $NaOH$ | Carl Roth, Karlsruhe |
| Natriumnitrat | $NaNO_3$ | Carl Roth, Karlsruhe |
| Natriumsulfid | Na_2S | Carl Roth, Karlsruhe |
| Nickel(II)-chlorid Hexahydrat | $NiCl_2 \cdot 6 H_2O$ | Carl Roth, Karlsruhe |
| Riboflavin-5'-monophosphat Natriumsalz | $C_{17}H_{20}N_4NaO_9P$ | Carl Roth, Karlsruhe |
| Roti® Load 1 | | Carl Roth, Karlsruhe |
| S-(5'-Adenosyl)-L-homocysteine | $C_{14}H_{20}N_6O_5S$ | Carl Roth, Karlsruhe |
| S-(5'-Adenosyl)-L-methionine iodide | $C_{15}H_{23}IN_6O_5S$ | Carl Roth, Karlsruhe |
| SERVA Blau G | | SERVA, Heidelberg |
| Salzsäure 37 % | HCl | Carl Roth, Karlsruhe |
| Sample Buffer Blue Native | | SERVA, Heidelberg |
| Spectinomycin -dihydrochlorid Pentahydrat | $C_{14}H_{24}N_2O_7 \cdot 2 HCl \cdot 5 H_2O$ | Carl Roth, Karlsruhe |
| Stickstoff | N_2 | Air Liquide, Frankfurt |
| Terrific-Broth-Medium | | Carl Roth, Karlsruhe |
| Transfermembran PVDF | | Carl Roth, Karlsruhe |
| Trichloressigsäure | CCl_3COOH | Carl Roth, Karlsruhe |
| Tris(hydroxymethyl)-aminomethan | $NH_2C(CH_2OH)_3$ | Carl Roth, Karlsruhe |
| Triton™-X100 | $C_{33}H_{60}O_{10}$ | Carl Roth, Karlsruhe |
| Trypton | | Carl Roth, Karlsruhe |
| Tween® 20 | | Carl Roth, Karlsruhe |
| Wasser (HPLC) | H_2O | Carl Roth, Karlsruhe |
| β -Nicotinamidadeninedinukleotidephosphate Tetranatriumsalz | $C_{21}H_{26}N_7Na_4O_{17}P_3$ | Carl Roth, Karlsruhe |
| N-Tris-(hydroxymethyl)-methyl-glycin | $C_6H_{13}NO_5$ | Carl Roth, Karlsruhe |

| Chemikalien | Summformel | Hersteller |
|-------------------------------------|---|----------------------|
| <i>n</i> -Hexan (HPLC) | C ₆ H ₁₄ | Carl Roth, Karlsruhe |
| di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat | Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O | Carl Roth, Karlsruhe |

4.2 Mikroorganismen

| Bezeichnung | Genotype | Referenz |
|---|---|------------------------------------|
| <i>E. coli</i> XL1-Blue | <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^qZΔM15</i> Tn10 (Tet ^r)] | Agilent, Kalifornien, USA |
| <i>E. coli</i> BL21 (DE3) | <i>fhuA2 [lon] ompT gal</i> (λ DE3) [<i>dcm</i>] Δ <i>hsdS</i> λ DE3 = λ <i>sBamHIo</i> Δ <i>EcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1)</i> <i>i21 Δnin5</i> | New England Biolabs, Frankfurt |
| <i>E. coli</i> BL21 (DE3) Δ <i>ubiE</i> | Derivat von BL21 (DE3), dem das <i>ubiE</i> -Gen fehlt, das für eine C-Methyltransferase kodiert, die an der Ubichinon und Menachinon Biosynthese beteiligt ist | Diese Arbeit |
| <i>E. coli</i> C43 (DE3) | F ⁻ <i>ompT hsdSB</i> (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>) <i>gal dcm</i> (DE3) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| <i>E. coli</i> C43 (DE3) Δ <i>ubiCA</i> | Derivat von C43 (DE3), bei dem die <i>ubiCA</i> -Gene fehlen, die für die ersten beiden Enzyme in der Biosynthese von Ubichinon kodieren | Diese Arbeit |
| <i>E. coli</i> C41 (DE3) | ⁻ <i>ompT hsdSB</i> (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>) <i>gal dcm</i> (DE3) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| <i>E. coli</i> Rosetta (DE3) | F ⁻ <i>ompT hsdSB</i> (<i>r_B⁻ m_B⁻</i>) <i>gal dcm</i> (DE3) pRARE (Cam ^R) | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| <i>E. coli</i> JM109 | <i>endA1 recA1 gyrA96 thi hsdR17</i> (<i>rk⁻, mk⁺</i>) <i>relA1 supE44</i> Δ(<i>lac-proAB</i>) [F' <i>traD36 proAB lacI^qZΔM15</i>] | Promega, Walldorf |
| <i>E. coli</i> TOP10 | F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZΔaM15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>recA1 araD139</i> Δ(<i>ara-leu7697 galU halK rpsK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i> | Thermo Fisher Scientific, Dreieich |
| <i>E. coli</i> EC135 | Derivat von TOP10, bei dem die <i>dam</i> und <i>dcm</i> -Gene fehlen, die für DNA Methyltransferasen kodieren | Zhang <i>et al.</i> , 2012 |

4.3 Plasmide

| Nr. | Bezeichnung | Eigenschaften | Referenz |
|-----|--------------------------|--|----------------------------|
| 1 | pACYC-Duet1 | IPTG induzierbarer Expressionsvektor mit zwei MCS und T7-Promotor; CM ^R | Novogene, Kalifornien, USA |
| 2 | pAC- <i>AeMenK</i> | Derivat von 1; zur Produktion von <i>AeMenK</i> in <i>E. coli</i> | Hein <i>et al.</i> , 2017 |
| 3 | pAC- <i>AeMenK2</i> | Derivat von 1; zur Produktion von <i>AeMenK2</i> in <i>E. coli</i> | Hein <i>et al.</i> , 2018 |
| 4 | pAC- <i>CtMenK</i> | Derivat von 1; zur Produktion von <i>CtMenK</i> in <i>E. coli</i> | Diese Arbeit |
| 5 | pAC- <i>CtMenK2</i> | Derivat von 1; zur Produktion von <i>CtMenK2</i> in <i>E. coli</i> | Diese Arbeit |
| 6 | pAC- <i>FmMenK</i> | Derivat von 1; zur Produktion von <i>FmMenK</i> in <i>E. coli</i> | Diese Arbeit |
| 7 | pAC- <i>WSMenK</i> | Derivat von 1; zur Produktion von <i>WSMenK</i> in <i>E. coli</i> | Diese Arbeit |
| 8 | pAC- <i>SaMenK</i> | Derivat von 1; zur Produktion von <i>SaMenK</i> in <i>E. coli</i> | Diese Arbeit |
| 9 | pET-28(a)+ | IPTG induzierbarer Expressionsvektor mit T7-Promotor zur Produktion von His-getaggtten Proteinen; Kan ^R | Novogene, Kalifornien, USA |
| 10 | pET- <i>AeMenK</i> | Derivat von 9; zur Produktion von <i>AeMenK</i> in <i>E. coli</i> | Hein 2019 |
| 11 | pET- <i>AeMenK2</i> | Derivat von 9; zur Produktion von <i>AeMenK2</i> in <i>E. coli</i> | Diese Arbeit |
| 12 | pET- <i>CtMenK</i> | Derivat von 9; zur Produktion von <i>CtMenK</i> in <i>E. coli</i> | Diese Arbeit |
| 13 | pET- <i>CtMenK2</i> | Derivat von 9; zur Produktion von <i>CtMenK2</i> in <i>E. coli</i> | Diese Arbeit |
| 14 | pET- <i>WSMenK</i> | Derivat von 9; zur Produktion von <i>WSMenK</i> in <i>E. coli</i> | Diese Arbeit |
| 15 | pET- <i>FldA</i> | Derivat von 9; zur Produktion von <i>FldA</i> in <i>E. coli</i> | Hein 2019 |
| 16 | pET- <i>Fpr</i> | Derivat von 9; zur Produktion von <i>Fpr</i> in <i>E. coli</i> | Hein 2019 |
| 17 | pET-MTAN | Derivat von 9; zur Produktion von MTAN in <i>E. coli</i> | Diese Arbeit |
| 18 | pET- <i>AeMenK_T7_24</i> | Derivat von 10; verringerte T7-Promotorexpression | Diese Arbeit |

| Nr. | Bezeichnung | Eigenschaften | Referenz |
|-----|---------------------------|--|--------------------------------|
| 19 | pET- <i>AeMenK2_T7_24</i> | Derivat von 11; verringerte T7-Promotorexpression | Diese Arbeit |
| 20 | pET- <i>CtMenK_T7_24</i> | Derivat von 12; verringerte T7-Promotorexpression | Diese Arbeit |
| 21 | pET- <i>CtMenK2_T7_24</i> | Derivat von 13; verringerte T7-Promotorexpression | Diese Arbeit |
| 22 | pET- <i>CtMenK_T7_29</i> | Derivat von 12; stark verringerte T7-Promotorexpression | Diese Arbeit |
| 23 | pCas9cr4 | Expressionsvektor mit Tetracyclin induzierbaren sgRNA und Arabinose-induzierbarem λ -Red-System; Sm ^R | Reisch & Prather 2017 |
| 24 | pKDsg-p15 | Expressionsvektor mit Tetracyclin-induzierbarer Cas9-Nuklease; Cm ^R | Reisch & Prather 2017 |
| 25 | pKDsg- <i>ubiE</i> | Derivat von 24; zur Deletion von <i>ubiE</i> in <i>E. coli</i> BL21 (DE3) | Diese Arbeit |
| 26 | pKDsg- <i>ubiCA</i> | Derivat von 24; zur Deletion von <i>ubiCA</i> in <i>E. coli</i> C43 (DE3) | Diese Arbeit |
| 27 | pUC19 | kleiner, high copy Klonierungsvektor für <i>E. coli</i> ; Amp ^R | New England Biolabs, Frankfurt |
| 28 | pUC19- <i>menA</i> | Derivat von 27; zur Produktion von <i>menA</i> in <i>E. coli</i> ; konstitutiver lac promoter | Diese Arbeit |

4.4 Oligonukleotide

| Bezeichnung | Sequenz 3'→5' | Beschreibung |
|------------------------|--|--|
| pAC_ <i>WsMenK_F</i> | GTTAAGTATAAGAAGGAGATATACATATGGCAGAGATG-AAGAAAATGG | |
| pAC_ <i>WsMenK_R</i> | CGAACTGCGGATGGCTCCATGCACTCATATCCTCTGAG-CTTAGGCG | |
| pAC_ <i>SaMenK_F</i> | AGTTAAGTATAAGAAGGAGATATACATATGATTTCAACC-CTTGTCGGTTATATGGCCCG | |
| pAC_ <i>SaMenK_R</i> | TCACTTTTCGAACTGCGGATGGCTCCATGCACTCAATT-CTTCCACAGGCAACCGCGTCTGC | Erstellung von Expressionsplasmiden zur Chinonaufreinigung |
| pAC_ <i>FmMenK_I_F</i> | AAGGAGATATACATATGTCATTAGCCGAACGC | |
| pAC_ <i>FmMenK_I_R</i> | GGATGGCTCCATGCACTCATGTCCGACGCTTTG | |
| pAC_ <i>FmMenK_O_F</i> | TCCGACATGAGTGCATGGAGCCATCCGCAGTTC | |
| pAC_ <i>FmMenK_O_R</i> | TTCGGCTAATGACATATGTATATCTCCTTC | |

| Bezeichnung | Sequenz 3'→5' | Beschreibung |
|--------------------------|---|--|
| pAC_ <i>Ct</i> MenK_I_F | GAAGGAGATATACATATGCTATCCGAACGCCTACTTTC | |
| pAC_ <i>Ct</i> MenK_I_R | GCTCCATGCACTGAACATCTTGCGCTCGCACTC | |
| pAC_ <i>Ct</i> MenK_O_F | CGCAAGATGTTTCAGTGCATGGAGCCATCCGCAGTTC | |
| pAC_ <i>Ct</i> MenK_O_R | GCGTTCCGATAGCATATGTATATCTCCTTC | |
| pAC_ <i>Ct</i> MenK2_I_F | ATAAGAAGGAGATATACATATGCTTTTCAGAAAGAATG | Erstellung von Expressionsplasmiden zur Chinonaufreinigung |
| pAC_ <i>Ct</i> MenK2_I_R | GCTCCATGCACTCTTCTGGGTGCCGTCGCCAAAGAGC | |
| pAC_ <i>Ct</i> MenK2_O_F | ACGGCACCCAGAAGAGTGCATGGAGCCATC | |
| pAC_ <i>Ct</i> MenK2_O_R | AGCATTCTTTCTGAAAGCATATGTATATCTCCTTCTTAT- AC | |
| pAC_linear_F | ATGTATATCTCCTTCTTATACTTAAC | |
| pAC_linear_R | GTGCATGGAGCCATCCGCAGTTCGAAAAGTGAAATAAT- CGAGTCTGGTAAAGAAACCGCTGCTGCG | |
| pET_ <i>Ws</i> MenK_I_F | TGGTGCTCGAGCATATCCTCTGAGCTTAGG | |
| pET_ <i>Ws</i> MenK_I_R | GCGGCAGCCATATGGCAGAGATGAAGAAAATG | |
| pET_ <i>Ws</i> MenK_O_F | ATCTCTGCCATATGGCTGCCGCGCGGCACC | |
| pET_ <i>Ws</i> MenK_O_R | CTAAGCTCAGAGGATATGCTCGAGCACCACCAC | |
| pET_ <i>Ct</i> MenK_I_F | GGTGGTGCTCGAGTTGGTCCGCGCCCGCCGCTT- CGTC | Erstellung von Expressionsplasmiden zur Proteinproduktion |
| pET_ <i>Ct</i> MenK_I_R | GCGCGGCAGCCATATGCTATCCGAACGCCTAC | |
| pET_ <i>Ct</i> MenK_O_F | CGTTCGGATAGCATATGGCTGCCGCGCGGCACCAG | |
| pET_ <i>Ct</i> MenK_O_R | GGCGGGCGCGGACCAACTCGAGCACCACCAC | |
| pET_ <i>Ct</i> MenK2_I_F | GTGGTGCTCGAGCTTCTGGGTGCCGTCGCCAAAG | |
| pET_ <i>Ct</i> MenK2_I_R | GCGCGGCAGCCATATGCTTTTCAGAAAGAATG | |
| pET_ <i>Ct</i> MenK2_O_F | TCTGAAAGCATATGGCTGCCGCGCGGCACC | |
| pET_ <i>Ct</i> MenK2_O_R | GACGGCACCCAGAAGCTCGAGCACCACCAC | |
| pET_MTAN_I_F | TGCGGCCGCAAGCTTTTAGCCATGTGCCAG | |
| pET_MTAN_I_R | TCCGGATCCGAATTCATGAAAATCGGCATC | |
| pET_MTAN_O_F | AATGATGCCGATTTTCATGAATTCGGATCC | |
| pET_MTAN_O_R | GCACATGGCTAAAAGCTTGCGGCCGCACTC | |
| p_T7_24_F | CGACTCACTTTTGAGGAATTGTGAG | Änderung der T7 Promotor Sequenz |
| p_T7_24_R | CTCACAATTCCTCAAAGTGAGTCG | |
| p_T7_29_F | CGACTCACTCTCTGGGAATTGTGAG | |
| p_T7_29_R | CTCACAATTCCTCAGAGAGTGAGTCG | |
| pETup | ATGCGTCCGGCGTAGA | Sequenzierung der pACYC und pET Plasmide |
| T7 | TAATACGACTCACTATAGGG | |

| Bezeichnung | Sequenz 3'→5' | Beschreibung | |
|---------------|---|---|--|
| T7term | CTAGTTATTGCTCAGCGGT | | |
| DuetUP2 | TTGTACACGGCCGCATAATC | Sequenzierung der pACYC und pET Plasmide | |
| DuetDOWN2 | GCTAGTTATTGCTCAGCGG | | |
| UbiE_vfb_F | AGCCGAATGATGAAGCTTATCAAC | Erstellung der Deletionsmutante $\Delta ubiE$ | |
| UbiE_vfb_R | GGTTTAAAAGGCATTTCCGGTCTCCTGCTCAATGCCTGCTTCATCAAAAAATTGTTCC | | |
| UbiE_hfb_F | GGAACAATTTTTTGTGATGAGCAGGCATTGAGCAGGAGACCGGAAATGCCTTTTAAACC | | |
| UbiE_hfb_R | TGGCGTTCGCTGAACACCAGAATC | | |
| UbiE_sgRNA_F | AGCTTTCGCTAAGGATGATTT | | |
| UbiE_sgRNA_R | GCCTGCAGTCTAGACTCGAG | | |
| UbiE_Seq_F | GCGCAGGATAACTACC | | |
| UbiE_Seq_R | CAGGGTCGAACTCTG | | |
| UbiCA_vfb_F | ATCGGTAAAGCGTAAGGTTTC | | Erstellung der Deletionsmutante $\Delta ubiCA$ |
| UbiCA_vfb_R | TCCGGCTTTTTTACATCAGCCGAACTCTCCGTTACATAAC | | |
| UbiCA_hfb_F | TATGTAACGGAGAGTTCCGGCTGATGTAAAAAAGCCGGATG | | |
| UbiCA_hfb_R | AGACGTGCGTTTTGACGATTG | | |
| UbiCA_sgRNA_F | AACGTTAAGCGGGCCGGAGCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG | | |
| UbiCA_sgRNA_R | GCTCCGGCCCCGCTTAACGTTGTGCTCAGTATCTCTATCACTG | | |
| UbiCA_Seq_F | GTTGGCGAGCTCATC | | |
| UbiCA_Seq_R | AGACGTGCGTTTTGAC | | |
| CPEC2F | CGGGCTCACACTTTGCTAT | | |
| gamR | TTTATAACCTCCTTAGAGCTCGA | | |
| sgRNA_seq | AGCTTTCGCTAAGGATGATTT | | |
| pUC_MenA_F | TCGTTTACACAGGAAACAGCTATGACTGAACAACAAATTAGCCGAACTC | Erstellung des Expressionsplasmids pUC19-menA | |
| pUC_MenA_R | TCCGGGCTGGCTTAATTATGCTGCCCACTG | | |
| pUC_linear_F | TGGGCAGCATAATTAAGCCAGCCCCGACAC | | |
| pUC_linear_R | GCTGTTTCCTGTGTGAAACGAGATCTCGCTCACAATTCACACAACATAC | | |
| pBR1_seq | CGAAAAGTGCCACCTGAC | | |

4.5 Sonstige Materialien

| Enzyme und Antikörper | Hersteller |
|---|----------------------------------|
| Q5-Polymerase | New England Biolabs, Frankfurt |
| OneTaq-Polymerase | New England Biolabs, Frankfurt |
| PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase | Agilent, Kalifornien, USA |
| Restriktionsendonukleasen | New England Biolabs, Frankfurt |
| Lysozym | Carl Roth, Karlsruhe |
| Xanthinoxidase | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| 6x His polyklonaler Antikörper | ProteinTech, Planegg-Martinsried |
| HRP-konjugiertes Ziege-Anti-Kaninchen-IgG | ProteinTech, Planegg-Martinsried |
| Strep-Tactin [®] HRP-Konjugat | IBA GmbH, Göttingen |
| NEBuilder [®] HiFi DNA Assembly Master Mix | New England Biolabs, Frankfurt |
| Kits | Hersteller |
| GenElute [™] Bacterial Genomic DNA Kit | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| GenElute [™] PCR Clean-Up Kit | Sigma-Aldrich, Taufkirchen |
| Roti [®] -Nanoquant | Carl Roth, Karlsruhe |
| Thermal Shift [™] Dye Kit | Thermo Scientific, Dreieich |
| Größenstandards | Hersteller |
| 1 kb Plus DNA Ladder | New England Biolabs, Frankfurt |
| DNA Ladder 100 bp | New England Biolabs, Frankfurt |
| Color Prestained Protein Standard | New England Biolabs, Frankfurt |
| SERVA Native Marker Liquid Mix | SERVA, Heidelberg |

4.6 Medien

| LB-Flüssigmedium (1 L) | | LB-Festmedium (1 L) | | LBGN-Flüssigmedium (1 L) | |
|-------------------------------|------|----------------------------|------|---------------------------------|------|
| Trypton | 10 g | Trypton | 10 g | Trypton | 10 g |
| Hefeextrakt | 5 g | Hefeextrakt | 5 g | Hefeextrakt | 5 g |
| NaCl | 10 g | NaCl | 10 g | NaCl | 10 g |
| pH-Wert | 7 | Agar | 15 g | Glycerin | 5 ml |
| | | pH-Wert | 7 | Natriumnitrat | 10 g |
| | | | | pH-Wert | 7 |

| TB-Flüssigmedium (1 L) | | SOB-Flüssigmedium (1 L) | | SOC-Flüssigmedium (1 L) | |
|---------------------------------|---------|--------------------------------|--------|--------------------------------|--------|
| Casein | 12 g | Trypton | 20 g | Trypton | 20 g |
| Hefeextrakt | 24 g | Hefeextrakt | 5 g | Hefeextrakt | 5 g |
| K ₂ HPO ₄ | 12,54 g | NaCl | 0,5 g | NaCl | 0,5 g |
| KH ₂ PO ₄ | 2,31 g | KCl | 0,18 g | KCl | 0,18 g |
| Glycerin | 5 ml | MgSO ₄ | 2,4 g | MgSO ₄ | 2,4 g |
| pH-Wert | 7,2 | pH-Wert | 7,5 | Glucose | 4 g |
| | | | | pH-Wert | 7,5 |

4.7 Puffer und Lösungen

Agarose-Gelelektrophorese

50 x TAE-Puffer

| | |
|---------------|--------|
| Tris/HCl | 2 M |
| Natriumacetat | 25 mM |
| EDTA | 0,5 mM |
| pH-Wert | 7,8 |

Western Blot

Anodenpuffer I

| | |
|----------|-----------------|
| Tris/HCl | 0,3 M (pH 10,4) |
| Methanol | 20 % (v/v) |

Anodenpuffer II

| | |
|----------|-----------------|
| Tris/HCl | 25 mM (pH 10,4) |
| Methanol | 20 % (v/v) |

Kathodenpuffer

| | |
|-----------------|----------------|
| Tris/HCl | 25 mM (pH 9,4) |
| Methanol | 20 % (v/v) |
| Aminohexansäure | 40 mM |

10-fach PBS-Puffer (1 L)

| | |
|---|--------|
| NaCl | 72,0 g |
| Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O | 14,2 g |
| NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O | 2,8 g |

Entwicklerlösung

| | |
|-------------------------------|-------|
| 4-Chloro-1-Naphthol | 60 mg |
| Ethanol | 5 ml |
| PBS | 20 ml |
| H ₂ O ₂ | 80 µl |

SDS-Gelelektrophorese

Sammelgelpuffer

| | |
|----------|-------|
| Tris/HCl | 0,5 M |
| pH-Wert | 6,8 |

Trenngelpuffer

| | |
|----------|-------|
| Tris/HCl | 1,5 M |
| pH-Wert | 8,8 |

Lämmli-Puffer

| | |
|----------|-----------------|
| Tris/HCl | 0,25 M (pH 8,5) |
| Glycin | 1,92 M |
| SDS | 1 % (w/v) |

Färbelösung

| | |
|-----------------------------------|-------------|
| Coomassie [®] Blau R 250 | 0,2 % (w/v) |
| Ethanol | 45 % (v/v) |
| Essigsäure | 10 % (v/v) |

Entfärbelösung

| | |
|------------|------------|
| Ethanol | 20 % (v/v) |
| Essigsäure | 5 % (v/v) |
| Glycerin | 1 % (v/v) |

Blaue Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

10-fach nativer Kathodenpuffer

| | |
|-------------|-----------------|
| Tricin/HCl | 500 mM (pH 7,0) |
| BisTris/HCl | 150 mM |

10-fach nativer Anodenpuffer

| | |
|-------------|-----------------|
| BisTris/HCl | 500 mM (pH 7,0) |
|-------------|-----------------|

Proteinreinigung

Puffer W

| | |
|----------|----------------|
| Tris/HCl | 40 mM (pH 8,0) |
| NaCl | 200 mM |
| Imidazol | 40 mM |

Puffer E

| | |
|----------|----------------|
| Tris/HCl | 40 mM (pH 8,0) |
| NaCl | 200 mM |
| Imidazol | 250 mM |

SEC Puffer

| | |
|----------|----------------|
| Tris/HCl | 40 mM (pH 8,0) |
| NaCl | 200 mM |

Enzymassay

Assay-Puffer

| | |
|----------|----------------|
| Tris/HCl | 40 mM (pH 8,0) |
| NaCl | 25 mM |
| Glycerin | 10 % (v/v) |
| DT | 10 mM |

4.8 Mikrobiologische Methoden

4.8.1 Kultivierung von *E. coli*

E. coli XL1-Blue diente zur Plasmidkonstruktion und -vermehrung und wurde in LB-Medien bei 37 °C schüttelnd (180 rpm) kultiviert. *E. coli* BL21 (DE3) wurde für die Protein- und Chinonproduktion verwendet und in TB-Medium schüttelnd (130 rpm) bei 30 °C inkubiert. Die Kultivierung auf LB-Agarmedien fand abhängig vom Plasmid bei 30 bzw. 37 °C statt. Die Kulturen von *E. coli* C43 (DE3) zur Aufreinigung von Chinonen wurden in LBNG-Medium inkubiert. Dieses Medium setzte sich aus LB-Medium mit 5 g/L Glycerin und 10 g/L Natriumnitrat zusammen. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C unter Schütteln (100 rpm). Alle Flüssigkulturen wurden unter mikroaeroben Bedingungen kultiviert. Bei Bedarf wurden den Medien vor dem Beimpfen Kanamycin (50 µg/ml), Chloramphenicol (25 µg/ml), Spectinomycin (50 µg/ml), Ampicillin (100 µg/ml) oder in Kombination zugesetzt, um einen Selektionsdruck zu erzeugen.

4.9 Molekularbiologische Methoden

4.9.1 Amplifikation von DNA-Fragmenten

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten oder Genen zur Erstellung von Plasmiden oder doppelsträngige DNA (dsDNA)-Fragmenten wurde die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) mit der Q5-Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt) nach Angaben des Herstellers durchgeführt (Tab. 4.8 und 4.9). Um den Genotyp zu überprüfen, wurden die Genom- oder Plasmidbereiche unter Verwendung der OneTaq-Polymerase (New England Biolabs, Frankfurt) gemäß den Anweisungen des Herstellers amplifiziert (Tab. 4.10 und 4.11). Hierfür wurden Zellen aus Kulturen oder Kolonien verwendet.

Tabelle 4.8: Reaktionsansatz für die Q5-Polymerase zur Amplifikation von DNA-Fragmenten.

| Komponenten | 50 µl Reaktion |
|-----------------------|----------------|
| DNA Templat | 50 ng |
| 10 mM dNTPs | 1 µl |
| 10 µM Forward Primer | 2,5 µl |
| 10 µM Reverse Primer | 2,5 µl |
| 5x Q5-Reaktionspuffer | 10 µl |
| Q5-Polymerase | 0,5 µl |
| ddH ₂ O | ad 50 µl |

Tabelle 4.9: Thermocycler-Bedingungen für die Q5-Polymerase.

| Schritt | Temperatur | Zeit | 30 Zyklen |
|------------------|------------|---------|-----------|
| Denaturierung | 98 °C | 30 s | |
| Denaturierung | 98 °C | 10 s | |
| Annealing | 55 °C | 30 s | |
| Extension | 72 °C | 30 s/kb | |
| Finale Extension | 72 °C | 2 min | |

Tabelle 4.10: Reaktionsansatz für die OneTaq-Polymerase zur Amplifikation von DNA-Fragmenten.

| Komponenten | 25 µl Reaktion |
|---------------------------|----------------|
| Kolonie | var. |
| 10 mM dNTPs | 0,5 µl |
| 10 µM Forward Primer | 0,5 µl |
| 10 µM Reverse Primer | 0,5 µl |
| 5x OneTaq-Reaktionspuffer | 5 µl |
| OneTaq-Polymerase | 0,2 µl |
| ddH ₂ O | ad 25 µl |

Tabelle 4.11: Thermocycler-Bedingungen für die OneTaq-Polymerase.

| Schritt | Temperatur | Zeit | 30 Zyklen |
|------------------|------------|---------|-----------|
| Denaturierung | 94 °C | 30 s | |
| Denaturierung | 94 °C | 30 s | |
| Annealing | 60 °C | 30 s | |
| Extension | 68 °C | 60 s/kb | |
| Finale Extension | 68 °C | 5 min | |

4.9.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde ein 0,8%iges (w/v) Agarosegel in 1x TAE-Puffer verwendet (Kap. 4.7). Das Gel wurde mit 1x TAE-Puffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit 6x Loading Dye versetzt und mit dem Größenstandard 1 kb Plus DNA Ladder oder dem DNA Ladder 100 bp (New England Biolabs, Frankfurt) auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente fand bei einer konstanten Spannung von 100 V in einer Rotiphorese[®] Kammer (Carl Roth, Karlsruhe) statt. Zur Färbung wurde das Gel in 0,02% (v/v) Ethidiumbromid für 10 min inkubiert. Die Fluoreszenzdetektion erfolgte mittels INTAS GelStick Manager (Intas, Göttingen).

4.9.3 Isolierung von DNA

Für die Isolierung von Plasmid-DNA oder DNA-Fragmenten wurde das GenElute[™] Plasmid Miniprep-Kit bzw. das GenElute[™] PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) nach Angaben des Hersteller verwendet. Der Elutionspuffer wurde durch ddH₂O ersetzt. Die Konzentration der isolierten DNA wurde mittels der A_{260nm} und die Reinheit über das Verhältnis von A_{260nm} zu A_{280nm} mit dem Spektrophotometer DeNovix DS-11 (DeNovix North Carolina, USA) bestimmt.

4.9.4 Sequenzierung von DNA

Zur Sequenzüberprüfung wurde die isolierte DNA von der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg) mittels der Sanger-Methode sequenziert. Die erhaltenen Elektropherogramme wurden mit ApE (Version 3.1.3; Davis & Jorgensen 2022) und Clone Manager 9 (Sci Ed Software Colorado, USA) ausgewertet.

4.9.5 Circular Polymerase Extension Cloning (CPEC)

CEPC ermöglicht eine primerlose Assemblierung von zwei oder mehreren DNA-Fragmenten (Quan & Tian 2011). Dabei wurden DNA-Fragmente in einer vorangegangenen PCR amplifiziert, so dass sie komplementäre Überhänge besitzen. Die DNA-Fragmente wurden einer Behandlung mit DpnI

unterzogen und für eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend mit dem GenElute[™] PCR Clean-Up Kit aufgereinigt. In einer weiteren PCR Reaktion werden die DNA-Fragmente über die Q5-Polymerase assembliert (Tab. 4.12 und 4.13). Nach der PCR wurden kompetente *E. coli* XL1-Blue Zellen mit 5 µl aus dem PCR-Ansatz transformiert.

Tabelle 4.12: Reaktionsansatz für eine CPEC-PCR.

| Komponenten | 25 µl Reaktion |
|-----------------------|----------------|
| DNA-Fragmente | je 100 ng |
| 10 mM dNTPs | 1,6 µl |
| 5x Q5-Reaktionspuffer | 4 µl |
| Q5-Polymerase | 0,2 µl |
| ddH ₂ O | ad 25 µl |

Tabelle 4.13: Thermocycler-Bedingungen für eine CPEC-PCR.

| Schritt | Temperatur | Zeit | 10 Zyklen |
|------------------|------------|---------|-----------|
| Denaturierung | 98 °C | 30 s | |
| Denaturierung | 98 °C | 10 s | |
| Annealing | 55 °C | 30 s | |
| Extension | 72 °C | 15 s/kb | |
| Finale Extension | 72 °C | 5 min | |

Für komplexe Assemblierungen wurde der NEBuilder[®] HiFi DNA Assembly Master Mix (New England Biolabs, Frankfurt) nach Angaben des Herstellers verwendet.

4.9.6 Ortsgerichtete Mutagenese

Eine Möglichkeit zur Mutation von DNA ist die ortsgerichtete Mutagenese, bei der Aminosäuren ausgetauscht, entfernt oder hinzugefügt werden können. Die ortsgerichtete Mutagenese wurde mit der PfuUltra-DNA-Polymerase (Agilent, Kalifornien, USA) durchgeführt (Tab. 4.14 und 4.15). Hierbei wurde das gewünschte Insert mithilfe von zwei komplementären Primern in die Ziel-DNA eingefügt, wobei die gewünschte Mutation bereits in den Primern enthalten war. Durch Amplifikation mittels PCR konnte schließlich das Plasmid mit der gewünschten Mutation erzeugt werden. Nach Erhalt des Plasmids wurde dieses mittels Agarosegelelektrophorese verifiziert und die

PCR-Produkte wurden für 1 Stunde bei 37 °C mit DpnI inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze mit dem GenElute™ PCR Clean-Up Kit gereinigt und sequenziert. Kompetente *E. coli*-Zellen wurden durch Hitzeschock mit dem Plasmid transformiert.

Tabelle 4.14: Reaktionsansatz für eine ortsgerichtete Mutagenese-PCR.

| Komponenten | 50 µl Reaktion |
|------------------------------|----------------|
| DNA-Fragmente | je 100 ng |
| 10 mM dNTPs | 1 µl |
| 10 µM Forward Primer | 1 µl |
| 10 µM Reverse Primer | 1 µl |
| 10x PfuUltra-Reaktionspuffer | 5 µl |
| PfuUltra-Polymerase | 1 µl |
| ddH ₂ O | ad 50 µl |

Tabelle 4.15: Thermocycler-Bedingungen für eine ortsgerichtete Mutagenese-PCR.

| Schritt | Temperatur | Zeit | 30 Zyklen |
|------------------|------------|---------|-----------|
| Denaturierung | 95 °C | 2 min | |
| Denaturierung | 98 °C | 20 s | |
| Annealing | 55 °C | 20 s | |
| Extension | 72 °C | 15 s/kb | |
| Finale Extension | 72 °C | 3 min | |

4.9.7 Herstellung und Transformation chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung von chemisch-kompetenten *E. coli*-Zellen wurde die Calciumchlorid-Methode verwendet. 40 ml LB-Medium wurde mit 100 µl einer frischen Übernackkultur inokuliert und bei 30 °C schüttelnd (140 rpm) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,6 inkubiert. Anschließend wurde die Kultur für 10 min auf Eis inkubiert und für 5 min bei 3000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment wurde in 2,7 ml eiskalter 100 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert. Danach wurden 2,3 ml einer eiskalten 50 %igen Glycerol-Lösung hinzugegeben. Die Zellen wurden aliquotiert und in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Aliquots wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C

gelagert.

Für die Hitzeschock-Transformation wurden 50 µl Zellen mit 50 ng Plasmid oder 5 µl CPEC-Reaktionsansatz gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte bei 42 °C für 40 s. Unmittelbar danach wurden die Zellen 2 weitere Minuten auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 600 µl SOC-Medium wurden die Zellen schüttelnd bei 37 °C inkubiert. Nach einer 1-stündigen Inkubation wurden die Zellen auf einem Selektionsagar ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

4.9.8 Heterologe Genexpression in *E. coli*

Für die Expression von Genen zur Aufreinigung von Chinonen, insbesondere *menK/mqnK/menK2*-Gene, wurde das Expressionsplasmid pACYC-Duet1 eingesetzt. Das Plasmid enthält eine Chloramphenicol-Resistenz, einen IPTG-induzierbaren T7-Promotor sowie ein His-tag zur Bestätigung der produzierten Proteine im Western Blot. Die Gene *menK/mqnK/menK2* wurden aus Zellen des entsprechenden Bakteriums mit den Primern pAC_XXX_I_F und pAC_XXX_I_R amplifiziert. Das Plasmid-Backbone wurde mit den Primern pAC_XXX_O_F und pAC_XXX_O_R amplifiziert. Die Amplifikate wurden mithilfe von CPEC durch die überlappenden Bereiche miteinander verbunden und das resultierende Produkt wurde zur Transformation in *E. coli* XL1-Blue verwendet. Die erhaltenen Kolonien wurden mittels PCR und Sequenzierung mit den Primern DuetUP2 und DuetDOWN2 auf das Vorhandensein des Zielgens überprüft (Abb. 4.1a).

Für die Expression von Genen zur Reinigung von Proteinen, insbesondere *menK/menK2*, *fldA*, *fpr* und *mtaN*-Gene, wurde das Expressionsplasmid pET-28(a)+ verwendet. Das Plasmid trägt eine Kanamycin-Resistenz, einen IPTG-induzierbaren T7-Promotor sowie einen His-tag zur Aufreinigung der Proteine mittels Affinitätschromatographie. Die *menK/menK2* Gene wurden aus Zellmaterial des entsprechenden Bakteriums amplifiziert, während die Gene *fldA*, *fpr* und *mtaN* aus *E. coli* amplifiziert wurden. Die Primer pET_XXX_I_F und pET_XXX_I_R wurden für die Amplifikation der Gene verwendet, während die Primer

pET_xxx_O_F und pET_xxx_O_R für die Amplifikation der Plasmid-Backbones eingesetzt wurden. Die Amplifikate wurden durch CPEC miteinander verbunden und in *E. coli* XL1-Blue mit dem CPEC-Produkt transformiert. Die erhaltenen Kolonien wurden mittels PCR und Sequenzierung mit den Primern pETup und T7term auf das Vorhandensein des Zielgens überprüft (Abb. 4.1b). Anschließend wurden *E. coli* BL21 (DE3) Zellen mit den erhaltenen Plasmiden pAC-xxx und pET-xxx transformiert. Zur Synthese von Trimethylmenachinon (TMMK) wurden *E. coli* BL21 (DE3) mit den Plasmide pET-*CtMenK* und pAC-*CtMenK2* transformiert. Die pET-xxx-T7_24 Plasmide wurden basierend auf den pET-xxx Plasmiden durch ortsgerichtete Mutagenese modifiziert, um die Expressionsstärke der Gene *menK* und *menK2* zu reduzieren. Hierzu wurden die Primer p_T7_24_F und p_T7_24_R sowie p_T7_29_F und p_T7_29_R verwendet. Die eingefügte Mutation führte zu einer Veränderung der letzten 5 Basen in der nativen T7 Promoter-Sequenz (Yiyuan 2019). 500 ml TB-Medium wurde mit 5 ml einer *E. coli* BL21 (DE3) Vorkultur inokuliert und schüttelnd (140 rpm) bei 37 °C inkubiert. Die Expression der *menK/mqnK/menK2*, *fpr*, *fldA* und *mtaN* Gene wurde bei einer OD₆₀₀ von 0,7 durch die Zugabe von 0,5 mM bis 0 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert, abhängig vom Gen. Für die Expression der *menK/mqnK/menK2* Gene wurde zusätzlich 0,25 mM Ammoniumeisen(III)-citrat und 0,5 mM L-Cystein zugegeben. Die Expressionskulturen wurden für 12 h schüttelnd (140 rpm) bei 30 °C inkubiert.

4.9.9 Konstruktion von *E. coli* Mutanten

Die Deletion von Genen im Genom von *E. coli* basieren auf dem scarless Cas9 assisted recombineering (no-SCAR) System (Reisch & Prather 2017). Dieses System wurde verwendet, um die Deletionsmutanten Δ*ubiE* von *E. coli* B121 (DE3) und Δ*ubiCA* von *E. coli* C43 (DE3) zu erstellen. Die Zielspezifität der Cas9 wird durch die 20 bp lange sgRNA Sequenz bestimmt, die auf dem Plasmid pKDsgrNA-xxx kodiert ist (Abb. 4.2a). Zum designen der sgRNA wurde ein protospacer adja-

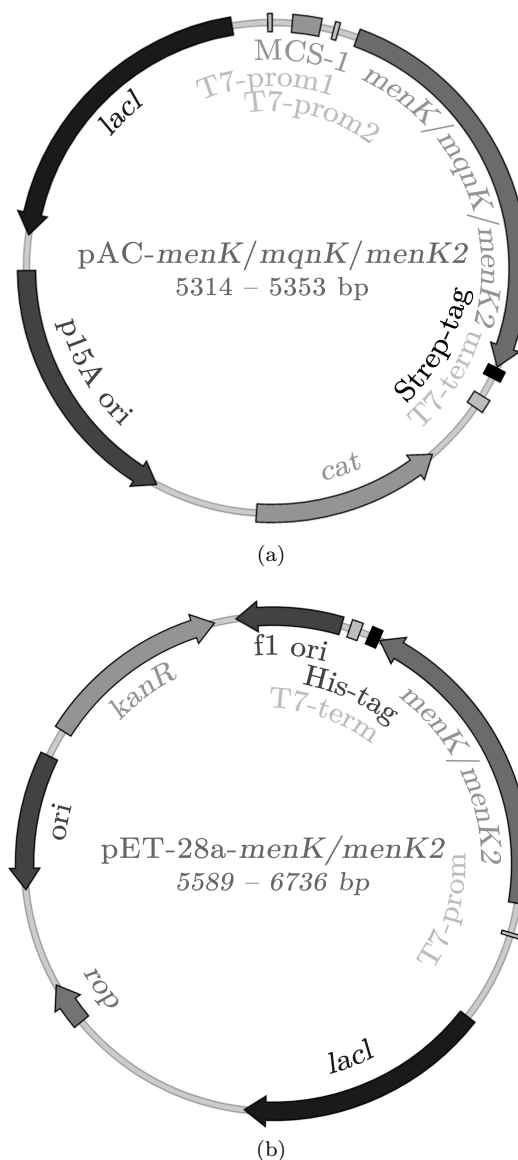


Abbildung 4.1: Plasmidkarten für die heterologe Genexpression in *E. coli*. (a) Plasmid pAC-xxx zur Expression von *menK/mqnK/menK2* aus verschiedenen Organismen. Es enthält einen induzierbaren T7-Promotor und eine Chloramphenicol Resistenz. (b) Plasmid pET-xxx zur Expression von *menK*, *mqnK*, *menK2*, *fpr*, *fldA* und *mtaN* zur Proteinaufreinigung. Es enthält einen induzierbaren T7-Promotor und eine Kanamycin Resistenz.

cent motif (PAM) (5'-NGG-3') in den *ubiE* und *ubiCA*-Genen identifiziert. Die ersten 20 Basen vom PAM in 5'-Richtung bilden die sgRNA Zielsequenz. Zur Integration der 20 bp sgRNA in das Plasmid pKDsgRNA-xxx wurde über eine zwei Fragmenten CPEC Klonierung durchgeführt. Die sgRNA diente dabei, als überlappende Sequenzregion. Das erste Fragment wird unter Verwendung der Primer UbiE_sgRNA_F bzw. UbiCA_sgRNA_F und gamR amplifiziert, während das zweite Fragment mit den Primern UbiE_sgRNA_R bzw. UbiCA_sgRNA_R und CPEC2F amplifiziert wird. Die eingefügte sgRNA-Sequenz wurde durch Sequenzierung mit dem Primer sgRNA_seq verifiziert.

Das λ -Red-Rekombinationssystem ist verantwortlich für die Integration der Donor-DNA ins Genom, während die CRISPR-Cas9-Gegenselektion zur Identifizierung von Deletionsmutanten dient. Das λ -Red ist neben der sgRNA auf dem Plasmid pKDsgRNA-xxx kodiert. Für die Erstellung der Donor-dsDNA wurden die vorderen und hinteren flankierenden Sequenzregionen der *ubiE*- und *ubiCA*-Gene mit den entsprechenden Primern Ubi_xxx_vfb_F und Ubi_xxx_vfb_R bzw. Ubi_xxx_hfb_F und Ubi_xxx_hfb_R amplifiziert und über die CPEC-Methode zu einem Fragment zusammengefügt.

Die *E. coli* Zellen wurden mit dem Plasmid pCas9cr4 transformiert und bei 37 °C inkubiert (Abb. 4.2b). Anschließend wurden die Zellen mit dem Plasmid pKDsgRNA-xxx transformiert und bei 30 °C inkubiert. 4 ml SOB Medium mit 25 μ g/ml Chloramphenicol und 50 μ g/ml Spectinomycin wurden mit einer Kolonie inokuliert und bei 30 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert. Eine Stunde vor dem Erreichen der OD₆₀₀ von 0,5 wurde das λ -Red mit 1,2% L-Arabinose induziert. Die Kultur wurde für 5 min auf Eis gekühlt und anschließend für 10 min bei 3000 g und 4 °C sedimentiert. Das Sediment wurde in 1 ml eiskaltem Wasser resuspendiert und 1 ml Glycerol/Mannitol-Lösung (20 % (v/v)/1,5 % (w/v)) auf den Boden vom Reaktionsgefäß gegeben, damit sich eine Grenzschicht ausbildet. Die Zellen wurden für 10 min bei 3000 g und 4 °C zentrifugiert und das Sediment in 400 μ l resuspendiert.

Zu 50 μ l gewaschenen *E. coli*-Zellen wurden 300 ng Donor-dsDNA dazu gegeben und in eine 1 mm Elektroporations Küvette überführt. Die Zellen

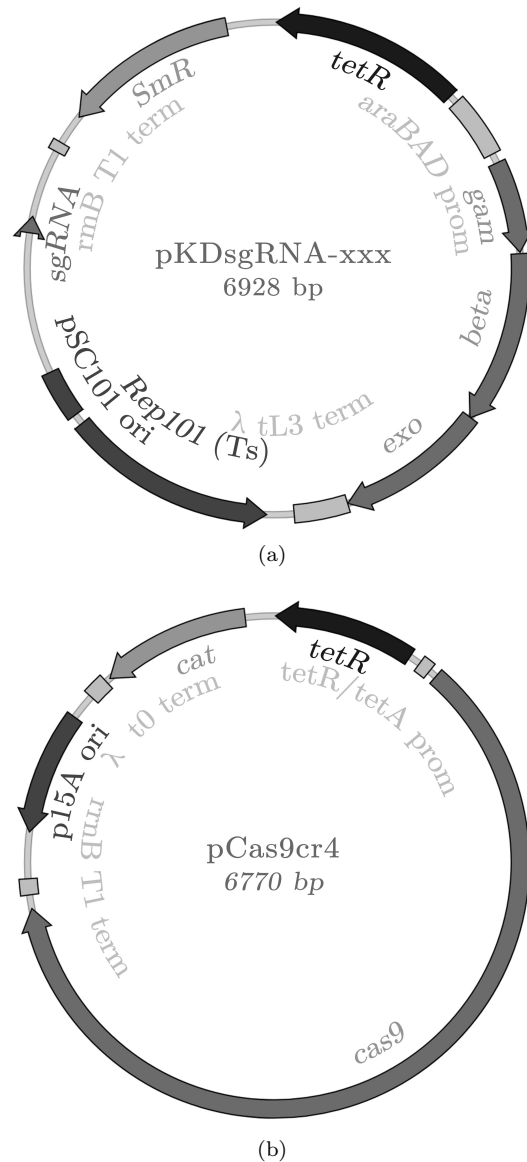


Abbildung 4.2: Plasmidkarte von pKDsgRNA-xxx und pCas9cr4. (a) pKDsgRNA-xxx zur gezielten Genomeditierung in Bakterien mit dem Arabinose-induzierbaren λ -Red-System und Tetracyclin-induzierbarer sgRNA-Expression. (b) pCas9cr4 mit der Cas9-Nuklease unter Kontrolle eines Tetracyclin-induzierbaren Promotors.

wurden mit 1,8 kV, 200 Ω und 25 mF gepulst und in 1 ml SOC Medium mit 1,2% Arabinose bei 30 °C für 30 min inkubiert. Die Zellen wurden auf LB Agarplatten mit 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Chloramphenicol, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Spectinomycin und 1 $\mu\text{g}/\text{l}$ Anhydrotetracyclin ausplattiert und bei 30 °C für 3 Tage inkubiert. Die Genotypisierung der Kolonien fand per PCR und Sequenzierung statt.

Die Entfernung des Plasmids pKDsgRNA-xxx fand über den temperatursensitiven Replikationsursprung statt, durch die Inkubation der Zellen bei 37 °C. Anschließend wurden die Zellen mit dem Plasmid pKDsgRNA-p15a transformiert und in SOC Medium mit 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Spectinomycin und 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Anhydrotetracyclin bei 30 °C über Nacht inkubiert. Durch die Induktion der Cas9 und der p15A sgRNA wurde das Plasmid pCas9cr4 geschnitten und das Plasmid pKDsgRNA-p15a wieder über den temperatursensitiven Replikationsursprung entfernt.

Zur Erzeugung der Mutante *E. coli* C43 (DE3) ΔubiCA pUC-*menA* wurde das Plasmid pUC-*menA* hergestellt (Abb. 4.3). Hierzu wurde das *menA*-Gen durch eine zwei Fragmenten CPEC-PCR in den Vektor pUC19 eingefügt. Während der Amplifikation des pUC19-Backbones für die CPEC-Methode wurde im selben PCR-Ansatz eine ortsgerichtete Mutagenese durchgeführt, um den lac-Operator zu deaktivieren und einen konstitutiven lac-Promotor zu erhalten (Kim *et al.*, 2010). Nach Erhalt wurde das pUC-*menA* Plasmid sequenziert, um dessen korrekte Zusammensetzung zu bestätigen. Anschließend erfolgte die Transformation von *E. coli* C43 (DE3) ΔubiCA .

4.10 Biochemische Methoden

4.10.1 Reinigung heterolog produzierter Proteine aus *E. coli*

Die Kulturen von *E. coli* BL21 (DE3), die zur Produktion von MenK, MenK2, Fpr, FldA und MTAN eingesetzt wurden, wurden durch Zentrifugation (bei 12 000 g für 10 min und bei 4 °C) sedimentiert. Das Sediment wurde in 30 ml Puffer W resuspendiert und im Potter-Elvehjem Homogenisator homogenisiert (Kap. 4.7). Nach der Zugabe von 10 mg Lysozym wurde die Zellsuspension

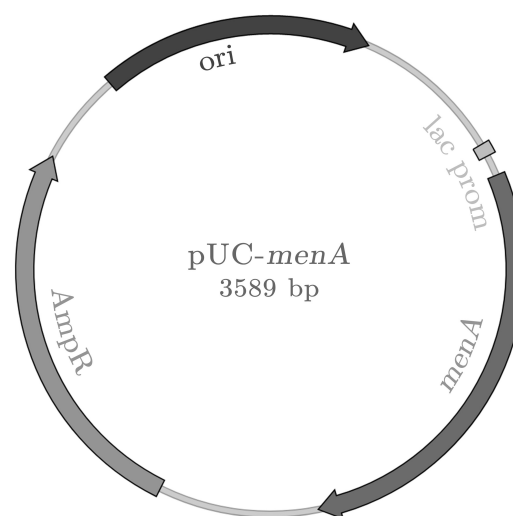


Abbildung 4.3: Plasmidkarte von pUC-*menA* zur heterologen Genexpression von *menA* in *E. coli*. Das Plasmid enthält einen lac-Promotor, der konstitutiv aktiv ist, und eine Ampicillin-Resistenz.

sion für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels FrenchPress (American Instrument Company, Silver Spring, USA) bei 20 000 psi. Das Zellysate wurde in einer Ultrazentrifuge sedimentiert (Beckman 45 Ti Rotor, 100 000 g , 45 min und 4 °C). Der Überstand wurde durch einen 0,45 μm Spritzenfilter filtriert um Makropartikel vor der Säulenaffinitätschromatographie zu entfernen. Für die Proteine Fpr und FldA wurde dem Überstand 50 μM Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) bzw. Flavinmononukleotid (FMN) hinzugegeben und für 30 min bei 4 °C inkubiert.

Die Reinigung erfolgte mittels immobilisierter Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) unter Verwendung des Chromatographiesystemes ÄKTA Purifier (GE Healthcare, Freiburg). Als Affinitätssäule wurde eine HisTrapTM FF 5 ml Säule (Cytiva, Mörfelden-Walldorf) verwendet mit einer Flussrate von 5 ml/min. Die Säule wurde mit 5 Säulenvolumen Puffer W äquilibriert. Der filtrierte Überstand wurde auf die Säule aufgetragen, mit anschließendem Waschen mit 15 Säulenvolumen Puffer W. Das Protein wurde mit 5 Säulenvolumen Puffer E eluiert (Kap. 4.7). Die Proteinmenge in den Eluatfraktionen wurden mit PierceTM Proteinkonzentratoren (Thermo Scientific, Dreieich)

ankonzentriert. Das Protein wurde anschließend für weitere Tests verwendet.

4.10.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Konzentrationsbestimmung von Proteine erfolgte nach der Bradford-Methode und wurde mit dem Roti[®]-Nanoquant (Carl Roth, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. 20 μ l Proteinlösung wurden mit 980 μ l Roti[®]-Nanoquant gemischt. Die Kalibriergerade wurde auf Basis von Referenzlösungen aus Albumin Fraktion V erstellt.

4.10.3 Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Analyse von Proteinen in Ganzzelllysaten oder gereinigten Fraktionen wurde die denaturierende SDS-PAGE mit 10 bzw. 12,5 % SDS-Gelen (Laemmli 1970) durchgeführt. Die Proben wurden mit 4-fach denaturierendem Probenpuffer (Roti[®] Load 1; Carl Roth, Karlsruhe) gemischt und für 10 min bei 95 °C denaturiert. Die denaturierten Proben wurden zusammen mit dem Größenstandard Color Prestained Protein Standard (New England Biolabs, Frankfurt) auf das SDS-Gel aufgetragen (Tab. 4.16). Die elektrophoretische Auftrennung wurde mit der Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad, Hercules, USA) bei einer Stromstärke von 40 mA pro SDS-Gel durchgeführt.

Das SDS-Gel wurde mit dH₂O gewaschen und danach für 30 min in einer 20 % (w/v) Trichloressigsäure-Lösung fixiert. Anschließend wurde es für weitere 30 min in Coomassie-Färbelösung bei Raumtemperatur inkubiert. Die Entfärbung erfolgte durch mehrmaliges Waschen mit Entfärbelösung.

4.10.4 Western-Blot

Die durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels Western-Blot auf eine PVDF-Membran (Roti[®] PVDF, Carl Roth, Karlsruhe) übertragen. Die PVDF-Membran wurde für

Tabelle 4.16: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele.

| Komponenten | Sammelgel | | Trenngel | |
|-------------------|------------|-------------|-------------|--------|
| | 4 % | 10 % | 10 % | 12,5 % |
| Rotiphorese Gel30 | 1 ml | 5 ml | 6,25 ml | |
| dH ₂ O | 3,4 ml | 6 ml | 4,75 ml | |
| Sammelgelpuffer | 1,5 ml | | | |
| Trenngelpuffer | | 3,75 ml | 3,75 ml | |
| 10 % (w/v) SDS | 60 μ l | 150 μ l | 150 μ l | |
| 10 % (w/v) APS | 20 μ l | 50 μ l | 50 μ l | |
| TEMED | 12 μ l | 25 μ l | 25 μ l | |

15 s in Methanol und danach für 5 min in Anodenpuffer 2 inkubiert (Kap. 4.7). Auf der Anodenplatte wurden vier in Anodenpuffer 1 getränkte Whatman-Papiere, zwei in Anodenpuffer 2 getränkten Whatman-Papieren, die PVDF-Membran, das SDS-Gel und sechs in Kathodenpuffer getränkten Whatman-Papieren gestapelt (Kap. 4.7). Der Proteintransfer erfolgte für 70 min bei 0,1 A pro Gel (Semi Dry Transfer Cell; Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA).

Für die chromogene Detektion von Proteinen mit einem His-tag wurde die PVDF-Membran eine Stunde lang bei Raumtemperatur in Blocking-Puffer (1 % (w/v) BSA in PBS mit 0,1 % Tween[®] 20) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer (PBS-Puffer mit 0,1 % Tween[®] 20) wurde die PVDF-Membran eine Stunde in PBS-Puffer inkubiert, der einen 1:5000 verdünnten 6x His-tag monoklonalen Antikörper (ProteinTech, Planegg-Martinsried) enthielt. Die Membran wurde dreimal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend in PBS-Puffer mit 1:10 000 HRP (Meerrettichperoxidase) konjugiertem Sekundärantikörper (ProteinTech, Planegg-Martinsried) für eine Stunde inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran zweimal mit Waschpuffer und einmal mit PBS gewaschen.

Um Proteine mit einem Strep-tag chromogen nachzuweisen, wurde die PVDF-Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur in einem Blocking-Puffer (3 % (w/v) BSA in PBS mit 0,5 % Tween[®] 20) inkubiert. Zusätzlich wurde ein Biotin-Blocking-Puffer (IBA GmbH, Göttingen) im Verhältnis 1:1000 hinzugefügt. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer erfolgte eine weitere In-

kubation der Membran für eine Stunde in einem PBS-Puffer mit einem Strep-Tactin[®] HRP-Konjugat Antikörper (IBA GmbH, Göttingen) in einer Verdünnung von 1:4000. Anschließend wurde die Membran zweimal mit Waschpuffer gewaschen und einmal mit PBS gewaschen.

Die Visualisierung der His- und Strep-getaggtten Proteine erfolgte über die chromogene Detektion der HRP-Aktivität. Die Membran wurde bis zur gewünschte Intensität in frisch angesetzter Entwicklerlösung inkubiert. Die Reaktion wurde durch das Waschen der Membran mit dH₂O gestoppt.

4.10.5 Blaue Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die native Gelelektrophorese erfolgte mit SERVA Gel[™] N Vertikal-Nativgelen (Serva, Heidelberg). Der Kathodenpuffer wurde mit 1 % (w/v) SERVA Blue G Lösung bis zu einer Endkonzentration von 0,002 % versetzt. 25 µg gereinigtes Proteine wurde mit 2x Probenpuffer gemischt (Kap. 4.7). Die vorbereiteten Proben wurden elektrophoretisch mit dem Perfect Blue[™] vertikales Doppelgelsystem (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) aufgetrennt. Die Stromspannung wurde von 50 V nach 10 min auf 200 V erhöht. Nach 2/3 des Elektrophoreselaufs wurde der gefärbte Kathodenpuffer gegen ungefärbten Kathodenpuffer ausgetauscht. Nach Abschluss der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Gel für 30 min in einer 20 % (w/v) Trichloressigsäure-Lösung fixiert, mit dH₂O gewaschen und anschließend für weitere 30 min in Coomassie-Färbelösung bei Raumtemperatur inkubiert. Die Entfärbung erfolgte durch mehrmaliges Waschen mit einer Entfärbelösung.

Zur Bestimmung der Molekulargewichte wurde der dekadische Logarithmus der Molekulargewichte, der SERVA Native Marker Proteine, in Abhängigkeit der relativen Migrationsdistanz (Rf) dargestellt. Das Molekulargewichte der unbekannt Proteine wurde dann durch Interpolation anhand des Graphen berechnet.

4.10.6 Größenausschluss-Chromatographie

Zur Erhöhung der Reinheit von aufgereinigten Proteinen und zur Bestimmung der apparenten

molekularen Massen wurde das Chromatographiesystem ÄKTA Purifier in Kombination mit einer HiLoad[™] 16/600 Superdex[™] 200 pg Säule (Cytiva, Mörfelden-Walldorf) verwendet. Die Equilibrierung der Säule erfolgte mit 3 CV SEC Puffer bei einer Flussrate von 1 ml/min. Während der Laufzeit wurde die Säule auf 5°C gekühlt (Kap. 4.7).

Zur Kalibrierung der SEC Säule wurden RNase A, Myoglobin, Albumin, Formiatdehydrogenase, Aldolase und Glutamat-Dehydrogenase als Proteinstandards verwendet. Die Verteilungskoeffizient (K_{av}) der Standards wurden gegen den Logarithmus ihrer Molekulargewichte aufgetragen. Das Molekulargewicht eines unbekannt Proteins kann anhand der Kalibriergeraden bestimmt werden, sobald ihr K_{av} -Wert aus ihrem Elutionsvolumen berechnet wurde. Für die Proteindenaturierungsexperimente wurde eine Superose[®] 6 HR 10/30 Säule (Cytiva, Mörfelden-Walldorf) eingesetzt. Guanidiniumchlorid und Harnstoff wurden in SEC-Puffer gelöst. Das Protein (3 mg/ml) wurde vor der chromatographischen Auftrennung für eine Stunde bei 25 °C im entsprechenden Denaturierungspuffer inkubiert. Als Laufmittel wurde der Denaturierungspuffer bei einer Flussrate von 0,5 ml/min verwendet.

4.10.7 Protein Thermal Shift Assay

Der Protein-Thermal-Shift-Assay misst die Proteinfaltung in Echtzeit und führt durch Temperatursteigerung zur Exposition hydrophober Oberflächen, die mit SYPRO[®] Orange interagieren und ein Fluoreszenzsignal bei 570 nm erzeugen. Zur Bestimmung der Schmelztemperatur T_m wird die Ableitung zweiten Grades verwendet, wobei ein höherer T_m -Wert auf eine größere Proteinstabilität hinweist. Für die Durchführung des Protein Thermal Shift Assays wurde der Protein Thermal Shift[™] Dye Kit (Thermo Fisher Scientific, Dreieich) gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet. Die Experimente wurden in optischen klaren 0,1 ml PCR-Gefäßen (MicroAmp[®] Fast Reaction Tubes und MicroAmp[®] Optical Strip; Applied Biosystems, Massachusetts, USA) durchgeführt. Die Proteinprobe wurde in 20 µl Reaktionen verdünnt, die sowohl den Puffer als auch 8x SYPRO[®] Orange (Thermal Shift[™] Dye Kit, Thermo Scientific, Dreieich) enthielten. Die Endprotein-

konzentration betrug 0,5 mg/ml. Die Schmelzkurven wurden im Real-Time PCR System (StepOne Plus, Applied Biosystems, Massachusetts, USA) bei 21 °C für 2 min initialisiert und dann bei einer Aufheizrate von 1 °C alle 1:30 Minuten bis 99 °C erhitzt. Die Fluoreszenzintensität wurde bei jeder Temperatur gemessen. Jede Bedingung wurde in dreifacher Ausführung durchgeführt, um die Zuverlässigkeit der Ergebnisse zu gewährleisten (n = 3).

Der Wendepunkt der Schmelzkurve wurde zur Berechnung der ΔT_m als Maß für die Proteinstabilität verwendet. Testpuffer wie Tris-, Phosphat-, HEPES-, BisTris- und Carbonatpuffer wurden im pH-Bereich von 6 bis 9 eingesetzt. Die pH-Einstellung erfolgte durch Zugabe von HCl oder NaOH. Zusätzlich wurde die Ionenstärke durch die Puffer- und Salzkonzentration (Pufferkonzentration: 0 - 300 mM; Salzkonzentration: 0 - 400 mM) variiert. Dieser Assay wurde eingesetzt, um die Bedingungen für maximale Proteinstabilität zu ermitteln, sowie zur Untersuchung der Proteinstruktur.

4.10.8 MTAN Aktivitätsassay

Die qualitative Detektion der MTAN Aktivität erfolgte über einen Xanthinoxidase gekoppelten spektrophotometrischen Assay (Dunn *et al.*, 1994). Die Reaktion wurde in Assay-Puffer mit 0,2 U Xanthinoxidase in einem Endvolumen von 500 μ l durchgeführt (Kap. 4.7). Die Konzentration der potenziellen Inhibitoren 5'-Methylthioadenosin (MTA), *S*-Adenosylhomocystein (SAH) und 5'-Deoxyadenosin (5-Ado) betrug jeweils 1 mM. Die Reaktion verlief bei 37 °C und wurde mit einem DeNovix DS-11 Spektrophotometer bei 305 nm aufgezeichnet.

4.10.9 Rekonstitution des Eisen-Schwefel-Clusters von MenK

Die chemische Rekonstitution der Eisen-Schwefel-Cluster in den MenK Proteinen erfolgte unter Ausschluss von Sauerstoff in einem Anaerobenzelt (Coy Laboratory Products, Grass Lake, USA) statt. Alle Lösungen wurden vor der Verwendung anaerobisiert. Das gereinigte Protein in Puffer E wurde mit 5 % (v/v) Glycerin und einer 1 M Natriumdithionit (DT)-Lösung versetzt, um eine End-

konzentration von 5 mM zu erreichen. Anschließend wurde die Lösung für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde eine $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ -Lösung schrittweise hinzugegeben bis ein 4-8 facher Überschuss an Eisen vorlag. Nach einer Inkubation von 15 min auf Eis wurde eine dem Eisen äquivalente Stoffmenge NaS_2 -Lösung langsam zugegeben. Die Lösung wurde für 16 h bei 4 °C inkubiert. Das überschüssige Eisen und Sulfid wurden mit einer Assay-Puffer equilibrierten PD-10 Säule (GE Healthcare Life Sciences, Freiburg) entfernt (Kap. 4.7). Das rekonstituierte Protein wurde dann im weiteren Aktivitätsassay von MenK verwendet.

4.10.10 Aktivitätsassay von MenK

Alle Lösungen wurden vor dem Gebrauch anaerobisiert. MK_4 wurde in DMSO/Isopropanol (60 : 40) gelöst. Zum Enzymassay wurden 50 μ M MenK, 120 μ M MK_4 , 1 mM SAM, 1 mM NADPH, 50 μ M Flavodoxin (FldA) und 50 μ M Flavodoxin-Reduktase (Fpr) in Assay-Puffer in einem Gesamtvolumen von 200 μ l zugegeben. Im Inhibitionsassay, der auf dem Aktivitätsassay basiert, wurden zusätzlich potenzielle Inhibitoren wie SAH, MTA oder 5-Ado in einer Konzentration von 1 mM hinzugefügt. Gleichzeitig wurde der Aktivitätsassay unter Zugabe von 25 μ M MTAN durchgeführt. Für die Testung von artifiziellen Substraten wurde das MK_4 im Aktivitätsassay durch 1,4-Naphthochinon, 2-Hydroxy-1,4-naphthochinon und 2-Hydroxy-3-(3-methylbut-2-en-1-yl)naphthalen-1,4-dion (Lapachol) in gleicher Konzentration ersetzt. Die Enzymansätze wurden unter anaeroben Bedingungen für 12 h bei 30 °C inkubiert. Die Reaktionen wurden mit 200 μ l Acetonitril gestoppt und für 30 min bei 21 000 g zentrifugiert.

Der Übertand wurde mit einem Elite LaChroma HPLC System (Autosampler L-2200, Pumpe L-2130, Säulenofen L-2350, DAD-Detektor L-2450; Hitachi High Technologies America, Schaumburg, USA) analysiert. Zur Detektion von MK_4 wurde 100 % Methanol als mobile Phase verwendet. Für 1,4-Naphthochinon wurde eine mobile Phase aus 30 % Acetonitril und 70 % (H_2O + 0,1 % Ameisensäure) eingesetzt. Bei 2-Hydroxy-1,4-naphthochinon bestand die mobile Phase aus 20 % Acetonitril und 80 % (H_2O + 0,1 % Ameisensäure). Lapachol wurde unter Verwendung einer mobilen Phase aus 50 % Acetonitril und 50 %

(H₂O + 0,1 % Ameisensäure) detektiert. Als Säule diente die OmniSpher 5 C18 150 x 4,6 mm (Agilent, Kalifornien, USA) mit einer Flussrate von 1 ml/min und einer Säulenofentemperatur von 40 °C.

4.10.11 Chinon-Extraktion

Die kultivierten Zellen wurden bei 12 000 *g* für 10 min zentrifugiert. Das Sediment wurde in 2 ml dH₂O resuspendiert und anschließend mit 8 ml Isopropanol/*n*-Hexan (4 : 1) gemischt. Das Lösungsgemisch wurde bei Raumtemperatur für 15 min schüttelnd inkubiert, gefolgt von einer 10 minütigen Zentrifugation bei 9000 *g*. Die obere Phase wurde abgenommen und in einem Zentrifugalverdampfer zur Trocknung eingedampft. Auf die restliche Phase wurde wieder *n*-Hexan gegeben und der Vorgang ein weiteres Mal wiederholt.

Das erhaltene Extrakt wurde in 1 ml Aceton gelöst und in einem neuen Reaktionsgefäß im Zentrifugalverdampfer zur Trocknung eingedampft. Das erhaltene Chinon-Rohextrakt wurde in 200 μ l Acetonitril gelöst und mittels HPLC analysiert.

4.10.12 Chinon-Analyse mittels HPLC

Zur Analyse der Chinone aus extrahierten Chinon-Rohextrakten wurde das Elite LaChroma HPLC System verwendet. Als Säule diente eine OmniSpher 5 C18 150 x 4,6 mm und eine OmniSpher 5 C18 250 x 4,6 mm. Die Auftrennung von Chinonen mit acht Isopren-Einheiten erfolgte isokratisch mit einer mobilen Phase aus 70 % Methanol und 30 % Isopropanol. Die Flussrate betrug 1 ml/min bei einer Säulenofentemperatur von 40 °C. Die MK-Derivate wurden bei einer Wellenlänge von 249 nm mittels UV/VIS Detektion erfasst.

4.10.13 NMR-Analyse

Die NMR-Spektren wurden mit einem Bruker DRX 500 MHz Spektrometer (Bruker, Billerica, USA) in Verbindung mit einem 5 mm PABBO Probenkopf aufgezeichnet. Als Lösungsmittel wurde CDCl₃ bei einer Temperatur von 303 K verwendet. Das Lösungsmittel diente als Referenz der ¹H- und ¹³C-NMR Spektren bei 7,20 ppm und

77,20 ppm. Die Zuordnung der chemischen Verschiebung erfolgte mit ¹H-, ¹³C- und ¹³C-DEPT-135 1D Spektren, 2D ¹H-¹H COSY (correlated spectroscopy), 2D ¹H-¹H NOESY (nuclear overhauser enhancement correlated spectroscopy), 2D ¹H-, ¹³C HSQC (heteronuclear single quantum correlation) und 2D ¹H-, ¹³C HMBC (heteronuclear multiple bond correlation) Spektren unter der Verwendung der Bruker Pulssequenzen zg30, zgpg30, dept135, cosygpmf, noesygptp, invietgpsi und inv4gplrl2ndqf. Die 1D-Spektren wurden mit einem Anregungspuls von 30° und einer Repetitionszeit von 3,7 s (¹H) und 1,5 s (¹³C) aufgenommen. Die 128 Scans (¹H) und 8000 Scans (¹³C) wurden addiert und die Fourier-Transformierte mit einer digitalen Auflösung von 0,08 Hz (¹H) und 0,26 Hz (¹³C) berechnet. Die HMBC Spektren wurden mit einer Matrix aus 1000 Datenpunkten (f2, ¹H Dimension) und 256 Inkrementen (Datenpunkte in der f1 ¹³C Dimension) aufgenommen. Das Spektrum wurde für eine heteronukleare Kopplungskonstante von 9 Hz optimiert. Die Rohdaten wurden mit Topspin (Bruker Biospin, Karlsruhe, Deutschland) bearbeitet und die 2D-Daten wurden mit MestReNova 11.0.3 (Metrelab Research S.L.) analysiert.

4.10.14 Massenspektrometrie

Die Massenspektren für Chinone wurden an einem Impact II Quadrupol-Time-of-Flight (QToF) Massenspektrometer (Bruker, Billerica, USA) aufgezeichnet. Für die hochauflösende Massenspektrometrie (HRMS) wurde die Ionisierungsquelle APCI (atmospheric pressure chemical ionization) mit einer Koronaentladung von 5 kV verwendet. Als Lösungsmittel wurde Methanol verwendet. Es wurden Elektrosprayionisation (ESI) HPLC und Matrix-Assistierte Laser-Desorption-Ionisierung-Flight of time (MALDI-TOF) MS-Verfahren für die Analyse von CtMenK verwendet. Die Proteinkonzentration betrug 3 mg/ml. Für die ESI HPLC-Analyse wurde das Impact II Massenspektrometer eingesetzt. Eine ReproSil Gold 300 C4 3 μ m 50x2 mm Säule (Dr. Maisch, Ammerbuch-Entringen) wurde verwendet, um die Probe zu trennen. Als Laufmittel wurde ein lineares Gradientenverfahren von 5 % (Acetonitril + 0,1 % Ameisensäure) und 95 % (H₂O + 0,1 % Ameisensäure) zu 95 % (Acetonitril + 0,1 % Ameisensäure)

und 5 % (H₂O + 0,1 % Ameisensäure) in einer Laufzeit von 20 min und einer Gesamtlaufzeit von 40 min angewendet. Die Säulentemperatur wurde während des gesamten Laufvorgangs bei 25 °C gehalten. Das Massenspektrometer wurde im positiven Ionisierungsmodus mit einer ESI-Quelle verwendet. Die CID (Kollisionsinduzierte Dissoziations)-Spektren wurden mit einer Kollisionsenergie von 70 eV aufgenommen. Der Massebereich lag zwischen 800 und 5000 m/z. Stickstoff wurde als Trägergas verwendet. Für die MALDI TOF MS-Analyse von CtMenK wurde ein Autoflex speed TOF/TOF Spektrometer (Bruker, Billerica, USA) mit einer DHAP-Matrix verwendet. Die Messmethode erfolgte im Linear-Modus.

4.11 Bioinformatische Methoden

4.11.1 Sequenz-basierte Datenbanksuche

Eine PSI-BLAST (Position-Specific Iterative Basic Local Alignment Search Tool) Analyse wurde mit einem Datensatz bestehend aus sechs MK Methyltransferasen und sechs weiteren Klasse C RSMTs Sequenzen in der nicht redundanten Datenbank von NCBI mit den folgenden Einstellungen durchgeführt: Substitutionsmatrix PAM250; gap existence cost 14; gap extension cost 2 und PSI-BLAST threshold 0,005 (Altschul 1997). Der Datensatz bestand aus den Sequenzen MenK und MenK2 von *Adlercreutzia equolifaciens* DSM 19450 (GenBank accession numbers BAN75994 und BAN76985), *Wolinella succinogenes* DSM 1740 MqnK (CAE09279), *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 MqnK (CAL34513), *Thermoproteus tenax* Kra 1 MqnK (CCC80926), *Shewanella oneidensis* MR-1 MenK (AAN57484), sowie TpdI von *Nonomuraea* sp. Bp3714-39 (ACS83777), NosN von *Streptomyces actuosus* ATCC 25421 (AWT44901), Blm-Orf8 von *Streptomyces verticillus* ATCC15003 (AAG02372), Jaw5 von *Streptomyces roseovorticillatus* HP-891 (BAO98806), YtkT von *Streptomyces* sp. TP-A0356 (ADZ13556) und C10P von *Streptomyces zelensis* NRRL 11183 (ARK19493). Die erhaltenen Datensätze wurden zur Sequenz-basierten Clusterbildung weiterverwendet. Um MK Methyltransferasen anhand von

spezifischen MqnK/MenK/MenK2 Motiven zu identifizieren, wurde die Datenbank mittels eines PHI-BLAST (Pattern Hit Initiated BLAST) durchsucht (Zhang *et al.*, 1998). Die erhaltenen Sequenzen wurden dann in Alignments und phylogenetischen Stammbäumen weiter verwendet. Die erfassten Sequenzen wurden in Alignments zusammengeführt und in phylogenetischen Stammbäumen analysiert. Zur Bestimmung der phylogenetischen Verwandtschaften wurde der NCBI Taxonomy Browser genutzt, um die Mikroorganismen bis zur Stammebene zu analysieren (Schoch *et al.*, 2020).

4.11.2 Sequenz-basierte Clusteranalyse

Zur Identifizierung von MK Methyltransferasen wurde das Programm CLANS (cluster analysis of sequences) verwendet. CLANS ist eine Java Anwendung, basierend auf dem Fruchterman-Reingold Algorithmus zur Visualisierung von kraftbasierten zwei- und dreidimensionalen paarweise Ähnlichkeiten zwischen und innerhalb von Proteinfamilien (Frickey & Lupas 2004). Die anziehenden und abstoßenden Kräfte zwischen jedem Sequenzpaar wurden im Verhältnis zum negativen Logarithmus zum p -Wert von jedem high-scoring segment pairs (HSPs) aus einem all-against-all BLAST berechnet. Ein dreidimensionaler Graph wurde durch die zufällige Positionierung der Sequenzen in einem Raum erstellt, gefolgt von der Ausrichtung der Sequenzen anhand der Kraftvektoren, bis das System ein Äquilibrium erreichte. Durch eine netzwerk-basierte Clusteranalyse konnten die Proteinfamilien im dreidimensionalen Graph klassifiziert werden. Der p -Wert cut off wurde auf 10^{-45} oder für Subcluster auf 10^{-80} festgelegt.

4.11.3 Sequenzalignments und phylogenetische Stammbäume

Die geclusterten Aminosäuresequenzen wurden aus CLANS extrahiert und mit ClustalOmega 1.2.2 command-line Version alignt (Sievers & Higgins 2017). Um Konsensussequenzen zu definieren wurden Aminosäurepositionen, welche eine Identität von >95 % besaßen, in den jeweiligen

Clustern identifiziert und zu spezifischen Motiven manuell zusammengefasst.

Zur Erstellung des phylogenetischen Stammbaums, der HemN-ähnlichen RSMTs der Klasse C, wurden die Aminosäuresequenzen mit ClustalX 2.1 aligniert. Die Software MrBayes (Ronquist *et al.*, 2012) wurde für Bayes'sche Inferenz und das phylogenetische Modell verwendet. Die Aminosäureanalyse wurde über ein gemischtes Set aus evolutionären Modellen (Poisson, JTT, Dayhoff, MtREV, MtMam, WAG, rtREV, cpREV, VT und BLOSUM) integriert. Zwei parallele Läufe wurden gestartet mit jeweils sechs Ketten unter der Verwendung vom Metropolis gekoppelten Markov chain Monte Carlo Algorithmus, bestehend aus fünf heißen und einer kalten Kette. Die Anzahl der Generationen wurde auf 1 000 000 für die Markov-Ketten-Monte-Carlo Analyse festgelegt und die Laufdiagnose wurde jede 100. Generation berechnet. Die Anzahl der diskreten Kategorien, die zur Annäherung an die Gamma-Verteilung dienen, wurde auf 8 festgelegt. HemN wurde als Ausreißer definiert. Anschließend konvergierten die beiden Läufe gegen die stationäre Verteilung mit einer durchschnittlichen Splitfrequenz-Standardabweichung von <0,01. Phylogenetische Bäume wurden mit iTOL (Letunic & Bork 2016) erstellt.

4.11.4 Korrelationsanalyse

Für die Analyse wurden 65 643 Proteome aus der IMG (Integrated Microbial Genomes and Microbiomes)-Datenbank ausgewählt. Der Datensatz enthielt sowohl Proteome von Isolaten als auch von unkultivierten Mikroorganismen. Zur Beurteilung der genetischen Ausstattung für die MK-Biosynthese wurden die annotierten Proteine der Enzyme im Men- und Mqn-Weg identifiziert und auf ihre Vollständigkeit überprüft. Ein vollständiger Biosyntheseweg wurde definiert, wenn mindestens 5 von 9 Enzymen im Men-Weg, 4 von 7 im Mqn-Weg oder 3 von 5 im modifizierten Mqn-Weg (durch Verwendung von MTAN) vorhanden waren. Die MqnK, MenK und MenK2-Proteinesequenzen in den Proteomen wurden durch spezifische Motive identifiziert. Die respiratorischen Enzyme wurden aufgrund von Literaturhinweisen auf eine potenzielle Interaktion mit einem MK-Derivat ausgewählt (Anh. Tab. S.2; S.3). Annotierte Enzyme wurden dann mittels KEGG-Datenbank identifiziert (Anh.

Tab. S.4). Ein Enzym galt als vollständig, wenn alle Untereinheiten für die katalytische Funktion vorhanden waren. Wurden nicht annotierte Enzyme entdeckt, wurden diese mittels BLAST+ 2.11.0 durch eine lokale Blast-Suche mit Referenzsequenzen in den 65 643 Proteomen eingengt (Anh. Tab. S.5)(Camacho *et al.*, 2009). Die Enzymkandidaten wurden dann mittels einer Sequenz-basierten Clusteranalyse untersucht und der gesuchte Enzymcluster anhand der Referenzsequenz identifiziert. Um eine Korrelation zu erzeugen, wurden die Daten zur genetischen Ausstattung für die MK/MMK/DMMK-Produktion sowie zur Enzymausstattung einzeln in den Proteomen abgeglichen.

4.11.5 Proteinstrukturvorhersage

Die Homologiemodelle der Menachinon-Methyltransferasen wurden mithilfe des SWISS-Model-Servers (Waterhouse *et al.*, 2018) erstellt. Als Vorlage diente die Kristallstruktur der Coproporphyrinogen III Oxidase (CPDH) von *E. coli* (Layer 2003). Weitere Proteinstrukturen wurden mithilfe von AlphaFold2 generiert (Jumper *et al.*, 2021). Dabei wurde das Online-Tool ColabFold v1.3 verwendet (Mirdita *et al.*, 2021). Zur Visualisierung und zum Vergleich der Strukturmodelle kam PyMOL v2.0.6 von Schrödinger LLC zum Einsatz.

Kapitel 5

Ergebnisse

5.1 Bioinformatische Analyse von MenK/MqnK/MenK2-Sequenzen

5.1.1 Clusteranalyse von CPDH-ähnlichen rSAM-Enzymen

In dieser Studie wurden 12 Klasse C radikalische S-Adenosylmethionin (SAM)-Methyltransferasen (RSMTs) als Startsequenzen für eine PSI-BLAST Analyse verwendet. Das Set beinhaltete sechs Menachinon MTs sowie sechs weitere Klasse C RSMTs. Die ausgewählten Sequenzen umfassten die experimentell bestätigten MenK/MqnK/MenK2 Enzyme von *Adlercreutzia equolifaciens*, *Wolinella succinogenes* und *Shewanella oneidensis*, sowie die MqnK-Kandidaten aus den MMK-produzierenden Mikroorganismen *Campylobacter jejuni* und *Thermoproteus tenax*. Die Sequenzen der zusätzlichen Klasse C RSMTs wurden aus *Nonomuraea* sp. Bp3714-39 (TpdI), *Streptomyces actuosus* ATCC25421 (NosN), *Streptomyces verticillus* ATCC15003 (Blm-Orf8), *Streptomyces roseoverticillatus* HP-891 (Jaw5), *Streptomyces* sp. TP-A0356 (YtkT) und *Streptomyces zelensis* NRRL 11183 (C10P) verwendet (Tab. 5.1). Die Auswahl der Sequenzen basierte auf der größtmöglichen phylogenetischen Vielfalt an MenK/MqnK/MenK2 Sequenzen und der Einbeziehung der Diversität der Klasse C RSMTs, um eine möglichst eindeutige Clusterung zu erreichen.

In der PSI-BLAST-Analyse wurden insgesamt 569 857 verwandte Proteinsequenzen identifiziert. Da die benötigte Rechenkapazität für die Clusteranalyse exponentiell mit der Anzahl

der Sequenzen ansteigt, war eine Reduktion der Sequenzen notwendig. Die Anzahl der Sequenzen wurde auf 14 365 reduziert, indem das konservierte Motiv [Y/VxGGT] verwendet wurde. Dieses Motiv befindet sich in der radikalischen SAM-Domäne und ist in allen bekannten MenK/MqnK/MenK2-Sequenzen sowie den Sequenzen der Klasse C RSMTs vorhanden. Der erhaltene Datensatz von 14 365 Sequenzen wurde anschließend einer cluster analysis of sequences (CLANS) Analyse unterzogen und dabei in 15 Cluster unterteilt, wobei jedes Cluster zwischen 7744 und 31 Sequenzen enthielt. Neben den Startsequenzen wurden auch 13 weitere charakterisierte Proteine identifiziert, dadurch wurden die einzelnen Cluster spezifisch Proteinfamilien zugeordnet (Tab. 5.1). Die acht größten Cluster wurden nach den jeweiligen enthaltenen Enzymen HemW, HemZ, ChuW, HutW, MenK/MqnK/MenK2, Jaw5, NosN und C10P annotiert (Abb. 5.1).

Der HemW Cluster, welcher die größte Anzahl an Sequenzen mit 7744 aufwies, ist gekennzeichnet durch das Vorhandensein von HemW Proteinen. Dieses Protein ist in *Lactococcus lactis* als Häm-Chaperon aktiv und gehört zur Superfamilie der radikalischen SAM-Enzyme (Abicht *et al.*, 2012). Das während der Häm-Biosynthese produzierte Häm wird auf HemW übertragen und dort kovalent gebunden. HemW unterzieht sich in Gegenwart des [Fe₄S₄]-Clusters einer Dimerisierung, lokalisiert sich an der Membran und interagiert mit seinem Zielprotein. Der genaue Mechanismus der Häm-Übertragung ist noch nicht vollständig bekannt. Es wird jedoch angenommen, dass ein intakter [Fe₄S₄]-Cluster

Tabelle 5.1: Auflistung bekannter radikalischer SAM-Enzyme aus der Clusteranalyse, wobei die fett gedruckten Enzyme den Startsequenzen zugeordnet sind.

| Proteinname | Accessionnr. | Mikroorganismen |
|-----------------|----------------|--|
| Blm-Orf8 | AAG02372.1 | <i>Streptomyces verticillus</i> |
| C10P | ARK19493.1 | <i>Streptomyces zelensis</i> |
| ChuW | WP_000993317.1 | <i>Escherichia coli</i> |
| ChuW | ASJ24187.1 | <i>Laribacter hongkongensis</i> |
| HutW | WP_080284587.1 | <i>Vibrio cholerae</i> |
| HutW | AIC83437.1 | <i>Vibrio alginolyticus</i> |
| Jaw5 | WP_120753176.1 | <i>Streptomyces roseoverticillatus</i> |
| MenK | WP_022738066.1 | <i>Adlercreutzia equolifaciens</i> |
| MenK | WP_011074137.1 | <i>Shewanella oneidensis</i> |
| MenK2 | WP_022739874.1 | <i>Adlercreutzia equolifaciens</i> |
| MqnK | CAE09279.1 | <i>Wolinella succinogenes</i> |
| NocN | ADR01089.1 | <i>Nocardia</i> sp. ATCC 202099 |
| NosN | AQM75227.1 | <i>Streptomyces</i> sp. |
| NosN | ACR48343.1 | <i>Streptomyces actuosus</i> |
| PbtM2 | AGY49586.1 | <i>Planobispora rosea</i> |
| PbtM3 | AGY49595.1 | <i>Planobispora rosea</i> |
| TbtI | ADG87272.1 | <i>Thermobispora bispora</i> |
| Tlm-Orf11 | ABL74954.1 | <i>Streptoalloteichus hindustanus</i> |
| TpdI | ACS83777.1 | <i>Nonomuraea</i> sp. Bp3714-39 |
| TpdL | ACS83774.1 | <i>Nonomuraea</i> sp. WU8817 |
| TpdU | ACS83765.1 | <i>Nonomuraea</i> sp. WU8817 |
| YtkT | WP_055490826.1 | <i>Streptomyces</i> sp. TP-A0356 |
| Zbm-Orf26 | ACG60749.1 | <i>Streptomyces flavoviridis</i> |

erforderlich ist und ein radikalischer Mechanismus möglicherweise beteiligt ist (Haskamp *et al.*, 2018). Eine detaillierte Analyse der Clustersequenzen offenbarte, dass 47 % der Sequenzen als HemW annotiert wurden, während 38 % als CPDH identifiziert wurden. Zusätzlich wurden 6 % der Sequenzen als hypothetische Proteine und 1 % als radikalische SAM-Proteine annotiert.

Der zweitgrößte Cluster HemZ umfasste 2359 Sequenzen und beinhaltete das Protein HemZ, welches als Ferrochelatase bekannt ist und die Synthese von Häm *b* aus Protoporphyrin IX katalysiert (Homuth *et al.*, 1999; Parish *et al.*, 2005). HemZ gehört zu den radikalischen SAM-Proteinen, jedoch wie HemW nicht zu den RSMTs, da beide Enzyme keine Methylierungsreaktion katalysieren. 43 % der Sequenzen im HemZ-Cluster wurden als HemZ annotiert, während 44 % als Coproporphyrinogen III-Oxidase identifiziert wurden.

Die Cluster ChuW mit 980 Sequenzen und HutW mit 842 Sequenzen wiesen eine hohe Verwandtschaft auf, waren jedoch voneinander zu unterscheiden. Beide Enzyme gehören der Klasse C-RSMTs an und katalysieren den sauerstoffunabhängigen Häm-Abbau, indem sie den Porphyrinring öffnen und methylieren, um ein offenes Tetrapyrrol zu erhalten (Sofia 2001; LaMattina *et al.*, 2016). Von insgesamt 1822 Sequenzen wurden 89 % als ChuW bzw. HutW annotiert.

Mit 828 Sequenzen bildete der MKMT-Cluster den fünftgrößten Cluster und umfasste die MK-Methyltransferasen MqnK, MenK und MenK2. 89 % der Clustersequenzen wurden als Coproporphyrinogen III-Oxidase annotiert.

Der Jaw5-Cluster bestand aus insgesamt 118 potenziellen Jaw5-Sequenzen. Jaw5 ist an der Synthese des Antimykotikums Jawsamycin in *Streptomyces roseoverticillatus* HP-891 (früher

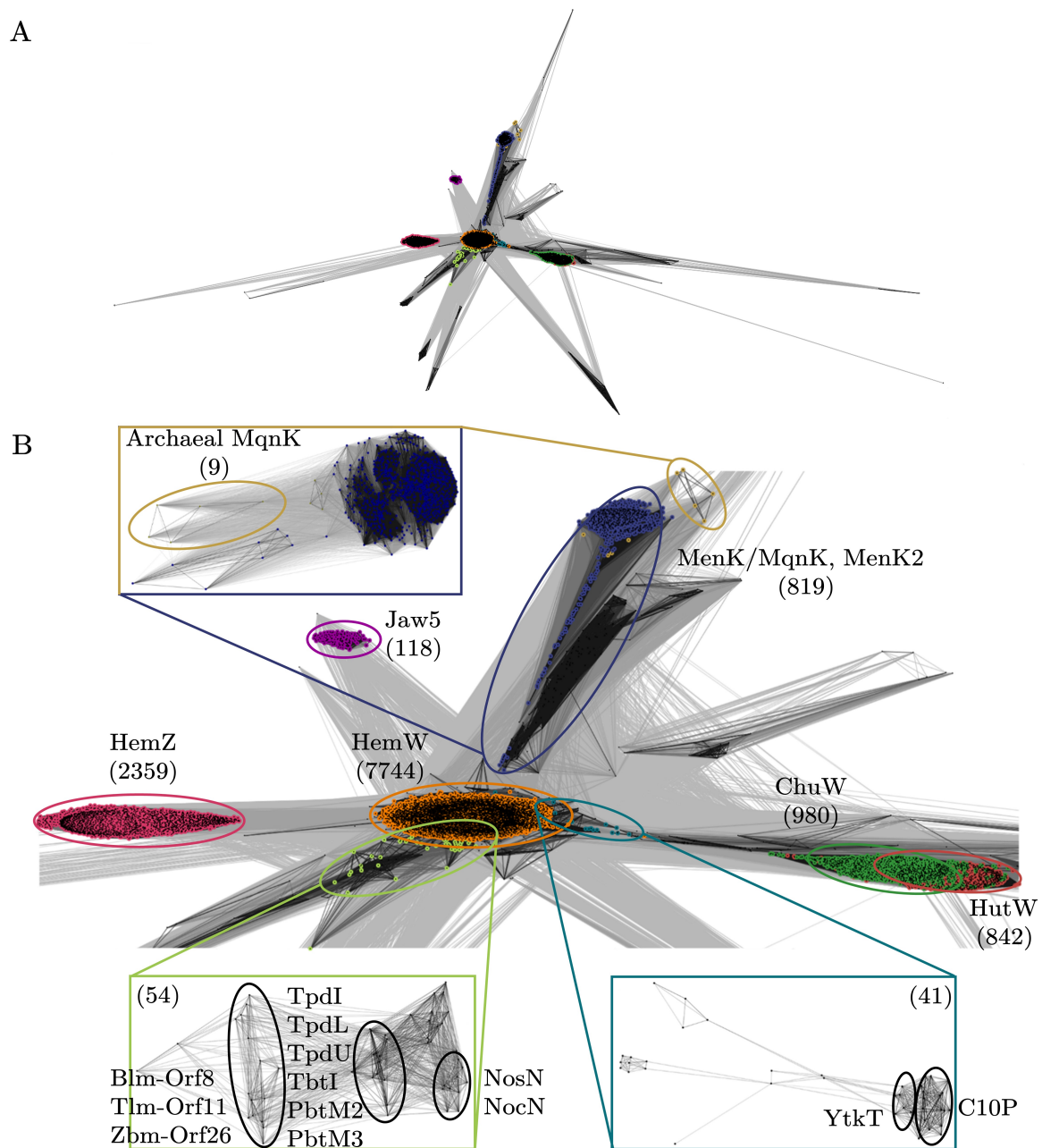


Abbildung 5.1: Clusteranalyse von 14 365 CPDH-ähnlichen radikalischen SAM-Sequenzen mit Hilfe von CLANS. (A) Übersicht der Clusteranalyse, wobei jeder Punkt eine einzelne Sequenz darstellt und jede Linie den p -Wert zwischen zwei Punkten visualisiert. Dunklere Linien repräsentieren eine höhere paarweise Ähnlichkeit (niedriger p -Wert), während hellere Linien eine geringere paarweise Ähnlichkeit (hoher p -Wert) darstellen, die näher am cut-off von 10^{-45} liegen. Jeder Cluster wird durch eine unterschiedliche Farbe hervorgehoben. (B) Nahaufnahme mit Bezeichnungen der Cluster sowie Einschüben, die Analysen der Subcluster MenK/MqnK/MenK2, NosN und C10P mit einem cut-off-Wert von 10^{-80} präsentieren.

Streptovercillium fervens) beteiligt und wird als Klasse C RSMTs klassifiziert (Watanabe *et al.*, 2006a; Watanabe *et al.*, 2006b). Die Mehrheit der Sequenzen im Cluster (74%) wurden als radikalische SAM-Proteine annotiert.

Der NosN Cluster stellte den Cluster mit der größten Diversität an Enzymen dar und umfasste die Enzyme NosN, NocN, Blm-Orf8, Tlm-Orf11, Zbm-Orf26, TpdI, TpdL, TpdU, TbtI, PbtM2 and PbtM3 (Du *et al.*, 2000; Tao *et al.*, 2007; Galm *et al.*, 2009; Morris *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2009; Ding *et al.*, 2010; Tocchetti *et al.*, 2013; Burkhardt *et al.*, 2017; Mahanta *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017b). Diese Enzyme sind an der Herstellung einer Vielzahl von Antibiotika wie Nosiheptid, Thiomuracin, GE2270, Bleomycin, Zorbamycin und Tallysomyin beteiligt und gehören alle zur Klasse C RSMTs. Insgesamt konnten 54 Sequenzen den entsprechenden Enzymen zugeordnet

werden.

Zum letzten Cluster C10P gehörten 41 Sequenzen, die die Enzyme C10P und das Homolog YtkT umfassten. C10P ist für die Produktion des Naturprodukts CC-1065 verantwortlich, während YtkT an der Synthese von Yatakemycin beteiligt ist (MacMillan & Boger 2009; Huang *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2017). Beide Enzyme sind mit der Klasse C RSMTs assoziiert.

Eine Bayes'sche phylogenetische Analyse wurde anhand von 23 ausgewählten CPDH-ähnlichen RSMTs der Klasse C durchgeführt (Abb. 5.2). Als Sequenzen dienten die zehn charakterisierten Startenzymen sowie 13 Enzyme zur Clusteridentifikation (Tab. 5.1). Die Enzyme HemW und HemZ wurden aufgrund ihrer fehlenden Fähigkeit zur Methylierung in der durchgeführten bayes'schen phylogenetischen Analyse nicht

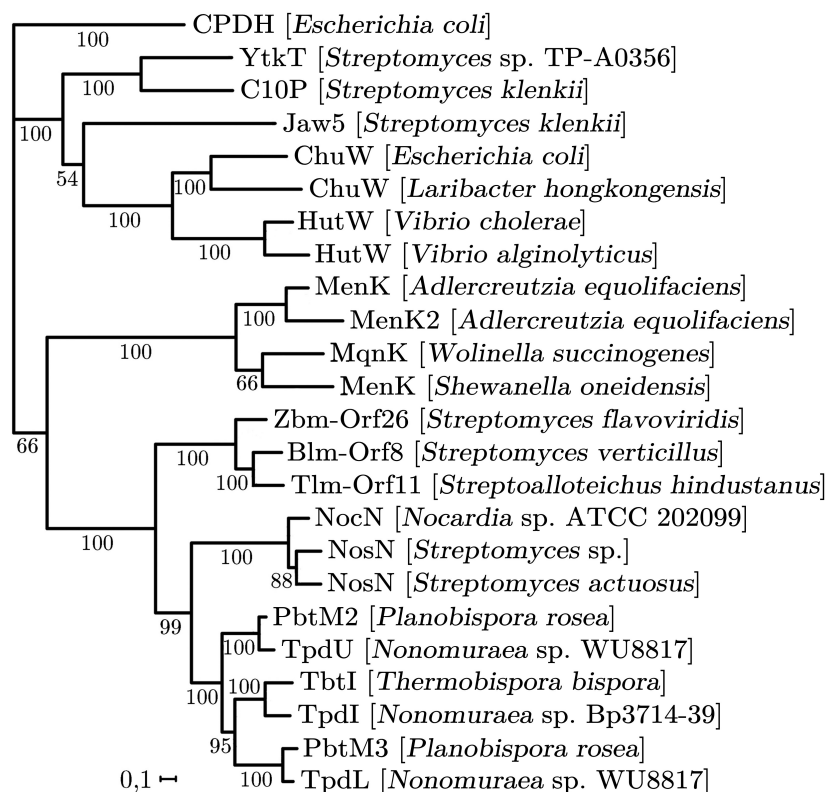


Abbildung 5.2: Bayes'sche Inferenz-Phylogenie von 23 CPDH-ähnlichen RSMTs der Klasse C, einschließlich *Ec*CPDH als Ausreißer, erhalten mit MrBayes. Die Zahlen unter den Ästen sind Maximum-Likelihood-Bootstrap-Werte. Der Maßstabsbalken zeigt 0,1 geschätzte Substitutionen pro Position.

berücksichtigt. Allerdings wurde CPDH aufgrund seiner ähnlichen Domäne zur Klasse C RSMTs als Ausreißer in die Analyse aufgenommen.

Der resultierende phylogenetische Stammbaum zeigte große Übereinstimmungen mit der zuvor durchgeführten Clusteranalyse. Die MK Methyltransferasen und Jaw5 wurden in einzelne Kladen aufgeteilt und besitzten nur eine geringe Ähnlichkeit zu den anderen Klassen C RSMTs. Die phylogenetische Verwandtschaft zwischen ChuW und HutW, die auch in der Clusteranalyse ersichtlich war, wurde auch im Stammbaum bestätigt. Eine ähnliche Beziehung ließ sich auch zwischen den Enzymen aus den Clustern NosN und C10P feststellen, deren phylogenetische Verwandtschaft innerhalb der Cluster mit dem Stammbaum korrelierte.

5.1.2 Charakterisierung des MenK/MqnK/MenK2 Clusters

Der MenK/MqnK/MenK2 Cluster wurde durch die Verwendung der sechs MenK/MqnK/MenK2 Startsequenzen eindeutig identifiziert und umfasste 828 Sequenzen. Auffällig war das Vorhandensein eines Subclusters aus 9 archaealen MqnK Sequenzen, der sich vom MenK/MqnK/MenK2 Cluster abgrenzte (Abb. 5.1B). Die Sequenzen wurden von 763 individuellen Stämmen abgeleitet, die sich wiederum auf 297 unterschiedliche Arten aufteilten, aus 16 etablierten und 4 Kandidaten-Phyla. Von diesen Arten waren 237 taxonomisch einer Familie zugeordnet (Abb. 5.3). 61% der Sequenzen wurden den *Campylobacteraceae* zugeordnet, gefolgt von den *Shewanellaceae* (11%) und den *Eggerthellaceae* (10%). Diese Familien stellten somit die am häufigsten vertretenen Familien innerhalb der Clusteranalyse dar.

Im Cluster wurden 39 Mikroorganismen identifiziert, bei denen eine MMK/DMMK Produktion experimentell bestätigt wurde (Abb. 5.3). Diese Mikroorganismen gehörten zu den Phyla Pseudomonadota, Actinomycetota, Campylobacterota und Thermoproteota. In den anderen 16 Phyla wurden bisher keine MMK/DMMK-produzierenden Mikroorganismen beschrieben, obwohl sie ein potentiell MenK/MqnK/MenK2-Enzym besitzen. Bei einem Vergleich dieser Ergebnisse zeigte sich ei-

ne erhebliche Diskrepanz zwischen den bekannten MMK/DMMK-Produzenten (39 Arten) und den Mikroorganismen, die durch die Clusteranalyse als potenzielle Produzenten vorhergesagt wurden (237 Arten).

Bei Mikroorganismen, die sowohl ein *menK*- als auch ein *menK2*-Gen besitzen, besteht die Fähigkeit zur Produktion von DMMK. In der Klasse der Coriobacteriia (Phylum Actinomycetota) wurden insgesamt 41 MenK2-Sequenzen in den Familien *Coriobacteriaceae* und *Eggerthellaceae* identifiziert (siehe Kap. 5.1.3 für Klassifizierungskriterien). Aufgrund der Korrelation des Cluster-Zerfalls (bei Verringerung des *p*-Werts) mit dem phylogenetischen Verwandtschaftsgrad der Sequenzen und nicht mit der enzymatischen Methylierungsspezifität war es nicht möglich, MenK- und MenK2-Sequenzen durch die Clusteranalyse zu unterscheiden.

5.1.3 Identifizierung von Motiven in Sequenzen von MenK/MqnK/MenK2-Cluster-Enzymen

Durch Sequenzalignments der 828 Sequenzen aus dem MenK/MqnK/MenK2 Cluster wurden sechs charakteristische Motive manuell identifiziert (Tab. 5.2). Die identifizierten Motive befinden sich in der radikalischen SAM-Domäne und im Linker. Das [LYxHxPFCxxxCxxCxF]-Motiv leitet sich vom radikalischen SAM-Motiv [CxxxCxxC] ab und war in nahezu allen MenK/MqnK/MenK2-Sequenzen vorhanden, während es auch in den Proteinsequenzen von HemW, ChuW und HutW teilweise vorkam. Weitere identifizierte Motive waren [GxxFxxxYxGGGT], [RxSxGxQxFxxxxL] und [NxFxxxxY], die eine ähnlich gute Identifizierung von MenK/MqnK/MenK2-Sequenzen wie das [LYxHxPFCxxxCxxCxF]-Motiv ermöglichten. Für eine präzisere Bestimmung waren die Motive [YFxxxRxEx] und [QxTxYPLx] besser geeignet, da sie kaum Überlappungen mit anderen Clustersequenzen aufwiesen.

Das signifikanteste Motiv war [QxTxYPLx]. Es dient einerseits dazu, Sequenzen der MenK/MqnK/MenK2-Familie von anderen radikalischen SAM-Sequenzen zu unterscheiden, da es ausschließlich im MKMT-Cluster vorkam.

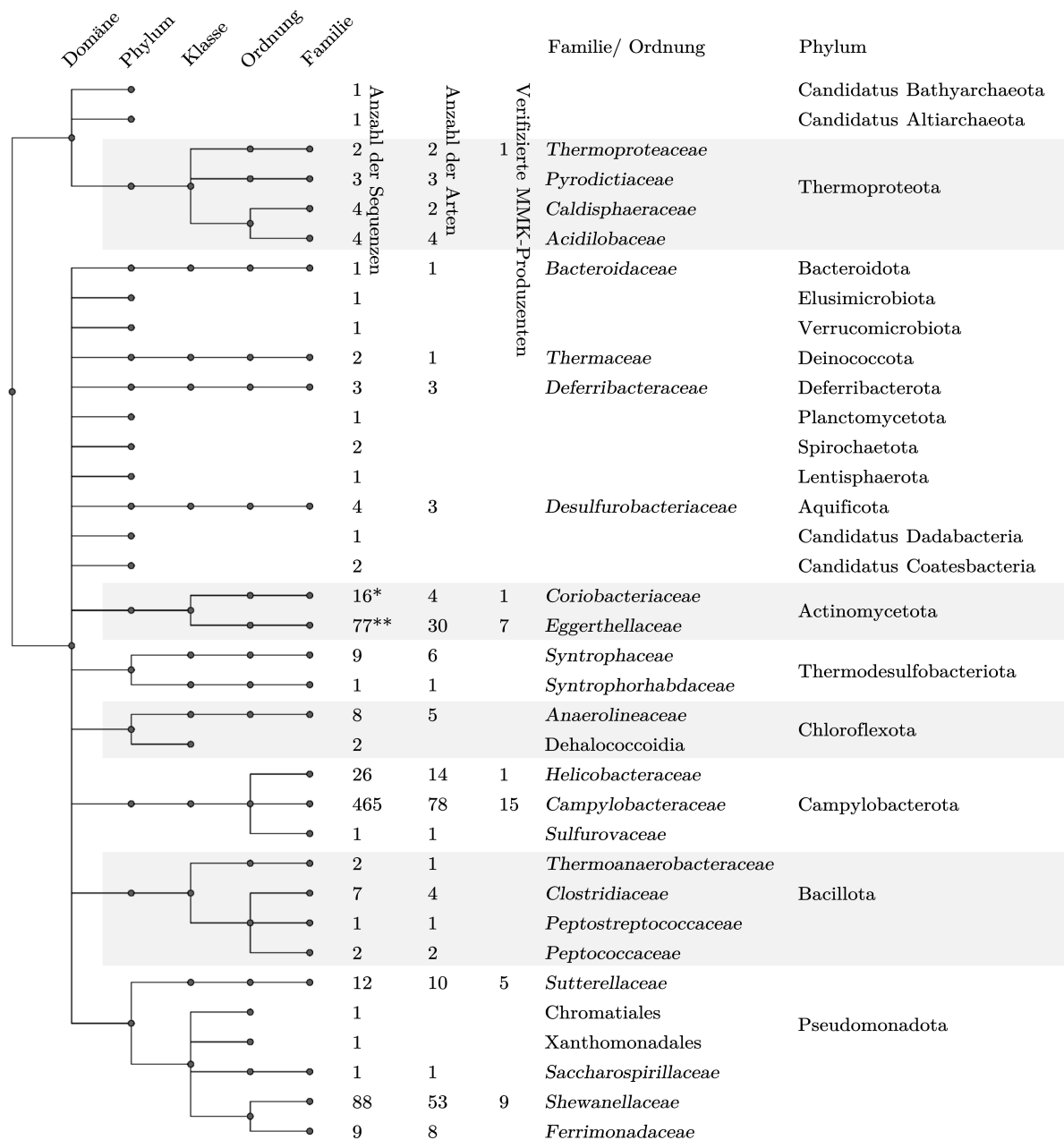


Abbildung 5.3: Phylogenetische Verteilung des MenK/MqnK/MenK2 Clusters mit 763 nicht identischen Proteinsequenzen der MenK/MqnK/MenK2-Familie aus insgesamt 237 verschiedenen Arten. Die Anzahl der Sequenzen pro Familie sowie die Anzahl der Arten innerhalb jeder Familie werden angegeben. Zusätzlich wird die Anzahl der verifizierten MMK/DMMK-produzierenden Mikroorganismen in den jeweiligen Familien angegeben. *7 von 16 Sequenzen gehören zu MenK2-Proteinen; **31 von 77 Sequenzen gehören zu MenK2-Proteinen.

Tabelle 5.2: Verteilung der MenK/MqnK/MenK2-Motive in den Proteinsequenzen der acht größten radikalischen SAM-Enzym Cluster.

| Domäne und Motiv | Cluster ^a | | | | | | | |
|-------------------|----------------------|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------|--------------|
| | HemW (7744) | HemZ (2359) | ChuW (980) | HutW (842) | MKMT (828) | Jaw5 (118) | NosN (54) | C10P (41) |
| radikalischen SAM | | | | | | | | |
| LYxHxPFCxxxCxxCxF | 2278 | 6 | 324 | 783 | 795 | 0 | 0 | 5 |
| YFxxxRxE | 11 | 0 | 0 | 0 | 759 | 010 | 8 | 0 |
| GxxFxxxYxGGGT | 49 | 1 | 2 | 9 | 772 | 0 | 0 | 1 |
| RxSxGxQxFxxxxL | 5959 | 0 | 0 | 0 | 801 | 0 | 45 | 32 |
| Linker | | | | | | | | |
| QxTxYPLx | 0 | 0 | 0 | 0 | 743 | 0 | 0 | 3 |
| NxFxxxxY | 158 | 25 | 10 | 388 | 787 | 0 | 14 | 0 |

^aDie Zahl in Klammern gibt die Anzahl der in der CLANS-Analyse berücksichtigten Sequenzen an.

Andererseits kann es auch verwendet werden, um eine Unterscheidung zwischen MenK und MenK2 vorzunehmen. Dafür wurde das Motiv in neun Varianten unterteilt (Abb. 5.4). Das Motiv [QxTxYPLM] und [QxTxSPLY] stellten die primären Varianten dar, während die übrigen Varianten auf dem [QxTxYPLM]-Motiv basierten, welche ein oder zwei Aminosäuresubstitutionen aufwiesen.

Das Motiv [QxTxYPLM] wurde in 88% der untersuchten Sequenzen nachgewiesen und war somit das am häufigsten vorkommende Motiv. Das Motiv [QxTxSPLY] hingegen wurde nur in 41 Sequenzen gefunden, die eine eigene Klade bildeten. Innerhalb dieser Klade war das MenK2 von *A. equolifaciens* enthalten. Jede dieser Sequenzen konnte einem spezifischen Mikroorganismus zugeordnet werden. Es wurde auch festgestellt, dass jedes der untersuchten Genome dieser Mikroorganismen für ein kanonisches MenK-Enzym (MenK mit dem Motiv [QxTxYPLM]) kodierte. Diese Beobachtungen legten nahe, dass das Motiv [QxTxSPLY] spezifisch für MenK2-Sequenzen ist, während das Motiv [QxTxYPLM] in MenK-Sequenzen vorkommt. Bei genauerer Untersuchung der beiden Motive wurde deutlich, dass das Tyrosin als Indikatoraminosäure fungiert und die Verschiebung um 3 Aminosäurepositionen eine Unterscheidung zwischen MenK und MenK2 ermöglicht (Abb. 5.4).

5.2 Vorkommen und Funktion von MenK/MqnK/MenK2 in Bakterien und Archaea

5.2.1 Taxonomische Analyse von MqnK/MenK/MenK2

Durch die Identifizierung spezifischer Signatur-Motive konnte eine Unterscheidung zwischen RSMTs und der MenK/MqnK/MenK2-Familie erreicht werden. Diese Erkenntnis wurde genutzt, um einen umfassenden Überblick über die Anzahl der Mikroorganismen zu erhalten, die ein Mitglied der MenK/MqnK/MenK2-Familie in ihrem Genom kodierten.

Durch die Analyse der NCBI Proteindatenbank mit Hilfe der Signatur-Motive [LYxHxPFCxxxCxxCxF] und [QxTxYPLM]/[QxTxSPLY] und deren Varianten wurden insgesamt 3011 MenK-Sequenzen und 115 MenK2-Sequenzen identifiziert. Diese 3166 Sequenzen stammten von insgesamt 492 verschiedenen Arten, die taxonomisch einer Familie zugeordnet werden konnten (Abb. 5.5). Sequenzen die zu Mikroorganismen gehörten die nicht bis zur Familie klassifiziert waren, wurden in dieser Analyse nicht verwendet. Die Familien wurden wiederum 13 bakteriellen Phyla und einem archaealen Phylum zugeordnet. Unter den 13 bakteriellen Phyla, die durch die Motivanalyse identifiziert wurden, befanden sich

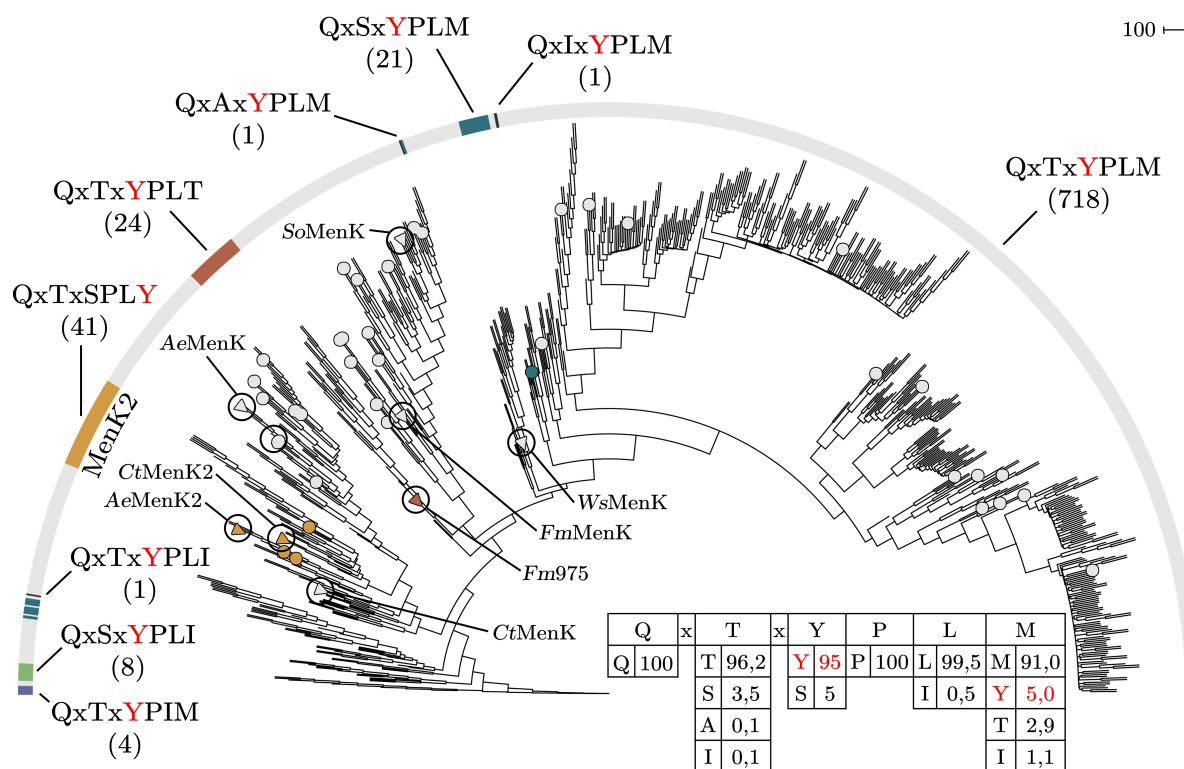


Abbildung 5.4: Bootstrap-Konsensbaum und Verteilung des [QxTxYPLx]-Signaturmotivs in 819 bakteriellen Sequenzen aus dem MKMT-Cluster. Die Punkte repräsentieren Enzyme aus experimentell charakterisierten MMK-produzierenden Arten, während die Dreiecke MenK/MqnK/MenK2-Enzyme darstellen, die experimentell bestätigt wurden. Die Farben im Halbkreis beziehen sich auf die neun Varianten des [QxTxYPLx]-Motivs. Die Zahlen unter den Motiven geben die Anzahl der Sequenzen an. Die Tabelle zeigt die prozentuale Verteilung einzelner Aminosäuren innerhalb des [QxTxYPLx] Motivs (angegeben in Prozenten für jede Position). Der Maßstabsbalken zeigt 100 Bootstrap Partitionen.

die bekannten Phyla aus der Clusteranalyse, aber auch neu identifizierte Phyla wie Nitrospirota und Acidobacteriota. Die Verwendung der Signatur-Motive ermöglichte ebenfalls die Identifizierung von MqnK-Proteinen im archaealen Phylum Thermoproteota, was mit den Ergebnissen der Clusteranalyse übereinstimmt. Jedoch konnten keine Kandidaten des Phylums Euryarchaeota mittels dieser Analyse identifiziert werden, obwohl bei einigen Vertretern, dieses Phylums eine MMK-Produktion experimentell nachgewiesen wurde (Anh. Tab. S.1).

Es wurde festgestellt, dass bestimmte Phyla und Familien eine höhere Anzahl an Mikroorganismen mit MenK/MqnK/MenK2-Kandidaten aufwiesen

als andere (Abb. 5.5). Im Phylum Pseudomonadota wurden die meisten identifizierten Mikroorganismen mit MqnK oder MenK gefunden. Von diesen Mikroorganismen waren 64% (228 Arten) auf nur zwei Familien verteilt, nämlich die *Campylobacteraceae* und die *Shewanellaceae*. Die Familie *Eggerthellaceae* im Phylum Actinomycetota machte 80% (63 Mikroorganismen) des Actinomycetota-Phylums aus und stellte somit die nächste größere Gruppe von Mikroorganismen mit MenK/MqnK-Kandidaten dar. Insgesamt machten diese drei Familien 60% aller in dieser Arbeit untersuchten Mikroorganismen aus, während die restlichen Mikroorganismen auf weitere 47 Familien aufgeteilt waren.

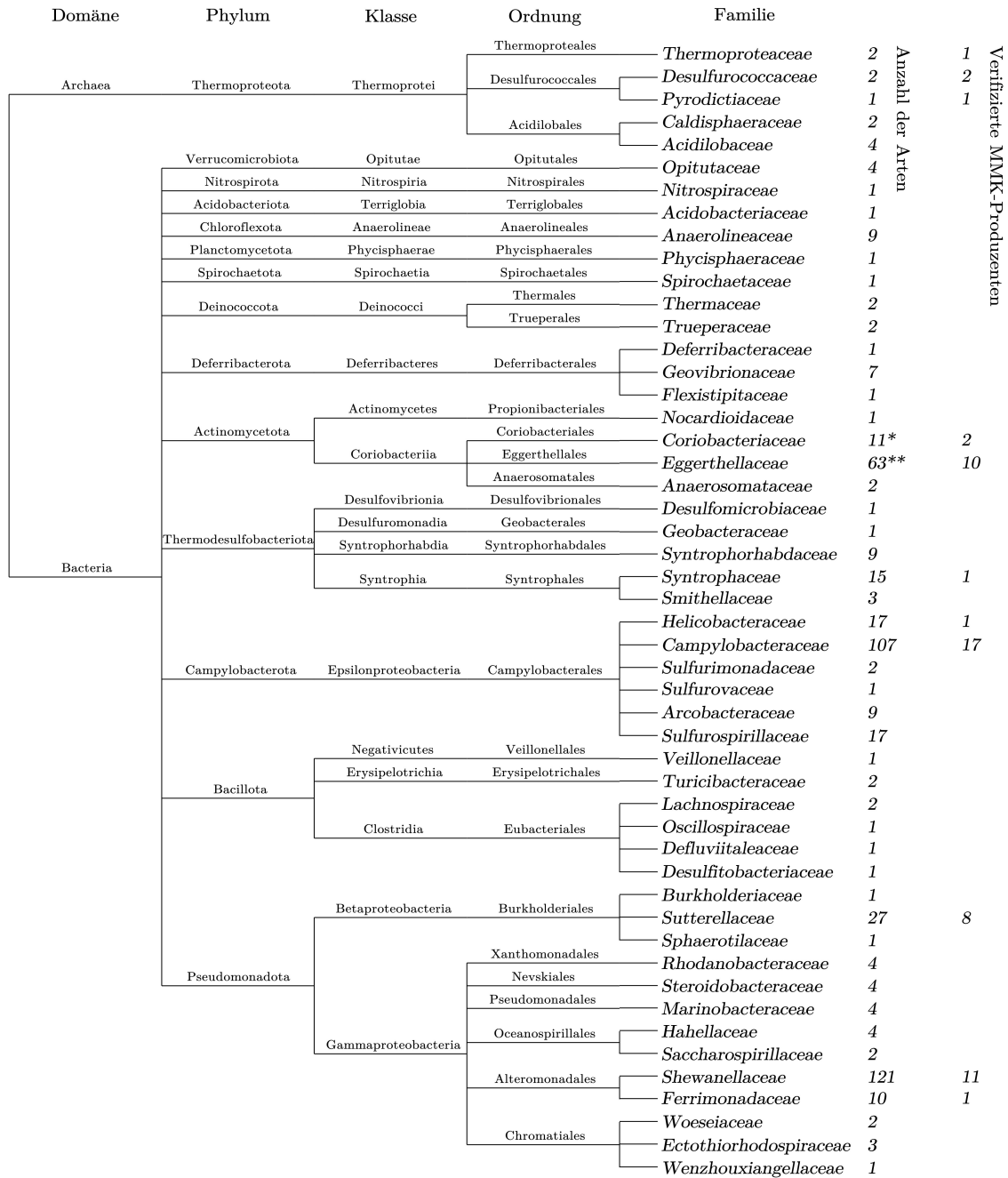


Abbildung 5.5: Phylogenetische Verteilung von 492 Stämmen von Mikroorganismen mit einem MqnK- oder MenK-Kandidaten. Die Anzahl der Arten innerhalb jeder Familie werden angegeben, sowie die Anzahl der verifizierten MMK/DMMK-produzierenden Mikroorganismen in den jeweiligen Familien. *7 von 11 sind Mikroorganismen mit einem zusätzlichen MenK2; **41 von 63 sind Mikroorganismen mit einem zusätzlichen MenK2.

Von den 68 biochemisch bestätigten MMK/DMMK-enthaltenen Mikroorganismen waren 59 durch Sequenzen der MenK/MqnK/MenK2-Kandidaten in der Motiv Analyse vertreten (Abb. 5.5; Anh. Tab. S.1). Lediglich bei den Euryarchaeota-Phyla konnten keine homologen Sequenzen zu MqnK/MenK identifiziert werden, obwohl eine MMK-Produktion nachgewiesen wurde. Bei einem weiteren archaealen und zwei weiteren bakteriellen Mikroorganismen konnten keine homologen MenK/MqnK/MenK2-Sequenzen identifiziert werden, während für drei weitere Mikroorganismen noch keine genomischen Daten verfügbar waren.

MenK2-Sequenzen wurden bei 46 von insgesamt 492 Arten gefunden, die den Familien *Coriobacteriaceae* und *Eggerthellaceae* (Klasse Coriobacteriia; Phylum Actinomycetota) zugeordnet werden können. Darüber hinaus enthielten diese Mikroorganismen immer auch ein kanonisches MenK-Enzym im entsprechenden Genom. Daher blieb die Fähigkeit zur Bildung von DMMK ein einzigartiges Merkmal der *Coriobacteriaceae* und *Eggerthellaceae*.

5.2.2 Korrelationsanalyse zwischen respiratorischen Oxidoreduktasen und Menachinon-Derivaten

Durch die Anwendung der Clusteranalyse wurde festgestellt, dass die Verbreitung von methylierten MKs wie MMK und DMMK weitreichender ist als zuvor angenommen. Obwohl sie weit verbreitet sind, ist die Rolle von MMK nur teilweise verstanden, während es für DMMK noch keine Anhaltspunkte zu seiner Funktion gibt. In einem bioinformatischen Ansatz wurde untersucht, ob es eine Verbindung zwischen der Fähigkeit zur Produktion von MK/MMK/DMMK und MK-abhängigen respiratorischen Oxidoreduktasen gibt. Für diese Untersuchung wurden 65 643 Proteome als Grundlage verwendet, die aus der IMG (Integrated Microbial Genomes and Microbiomes) Datenbank stammten. Falls die Proteome von experimentell bestätigten MMK/DMMK-Produzenten nicht in IMG vorhanden waren, wurden sie ergänzt. Insgesamt waren 64 102 Bakterien, 1540 Archaeen

und 1 Eukaryot in den untersuchten Proteomen vertreten (Abb. 5.6). Bei dem Eukaryoten handelt es sich um *Entamoeba histolytica* HM-1:IMSS. Die genaue Verwendung von MMK ist bisher unbekannt, scheint jedoch an Elektronentransportketten in der Membran beteiligt zu sein (Nandi *et al.*, 2011). Diese wurden in 35 Phyla eingeteilt, wobei die fünf größten Phyla 92,9 % aller Mikroorganismen umfassten. Diese Phyla waren Pseudomonadota (48,5 %), Bacillota (21,3 %), Actinomycetota (15,5 %), Bacteroidota (6,5 %) und Euryarchaeota (1,1 %). Eine weitere Unterteilung der Phyla ergab 82 Klassen. Die größten Klassen waren Gammaproteobacteria (31,2 %; Pseudomonadota), Bacilli (16,6 %; Bacillota), Actinomycetes (15,1 %; Actinomyceota), Alphaproteobacteria (8,9 %; Pseudomonadota) und Betaproteobacteria (6,0 %; Pseudomonadota).

Im Rahmen der Korrelationsanalyse wurden menachinonabhängige respiratorische Oxidoreduktasen in den Proteomen identifiziert. Hierbei wurden sämtliche Enzyme einbezogen, bei denen in der Literatur entweder eine Interaktion mit MK beschrieben wurde oder bei denen das interagierende Chinon noch nicht eindeutig bestimmt wurde (Anh. Tab. S.4). Wenn für diese Oxidoreduktasen keine vorhandenen Datenbankeinträge zur Verfügung standen, erfolgte eine Clusteranalyse, ähnlich der Vorgehensweise bei MenK/MqnK/MenK2. Dabei wurden alle potenziellen Kandidaten berücksichtigt, die bei einer vorangegangenen Blast-Suche mit einer Referenzsequenz identifiziert wurden (Anh. Tab. S.5). Um den MK-Pool in jedem Mikroorganismus vorherzusagen, wurden die Proteine aus den Biosynthesewegen für MK/MMK/DMMK analysiert. Anschließend wurde für jeden Mikroorganismus das MK-Derivat mit dem niedrigsten Redoxpotenzial aus dem vorhergesagten MK-Pool mit den vorhandenen Oxidoreduktasen im Genom verglichen. Die Einzelergebnisse aller Mikroorganismen wurden daraufhin zusammengefasst und eine Korrelation erstellt.

Die respiratorischen Oxidoreduktasen wurden dann für eine einfachere Klassifizierung in zwei Gruppen unterteilt: Elektronendonator-Oxidoreduktasen und Elektronenakzeptor-Oxidoreduktasen. Die zwei Gruppen wurden basierend auf dem Elektronenfluss zum oder aus dem

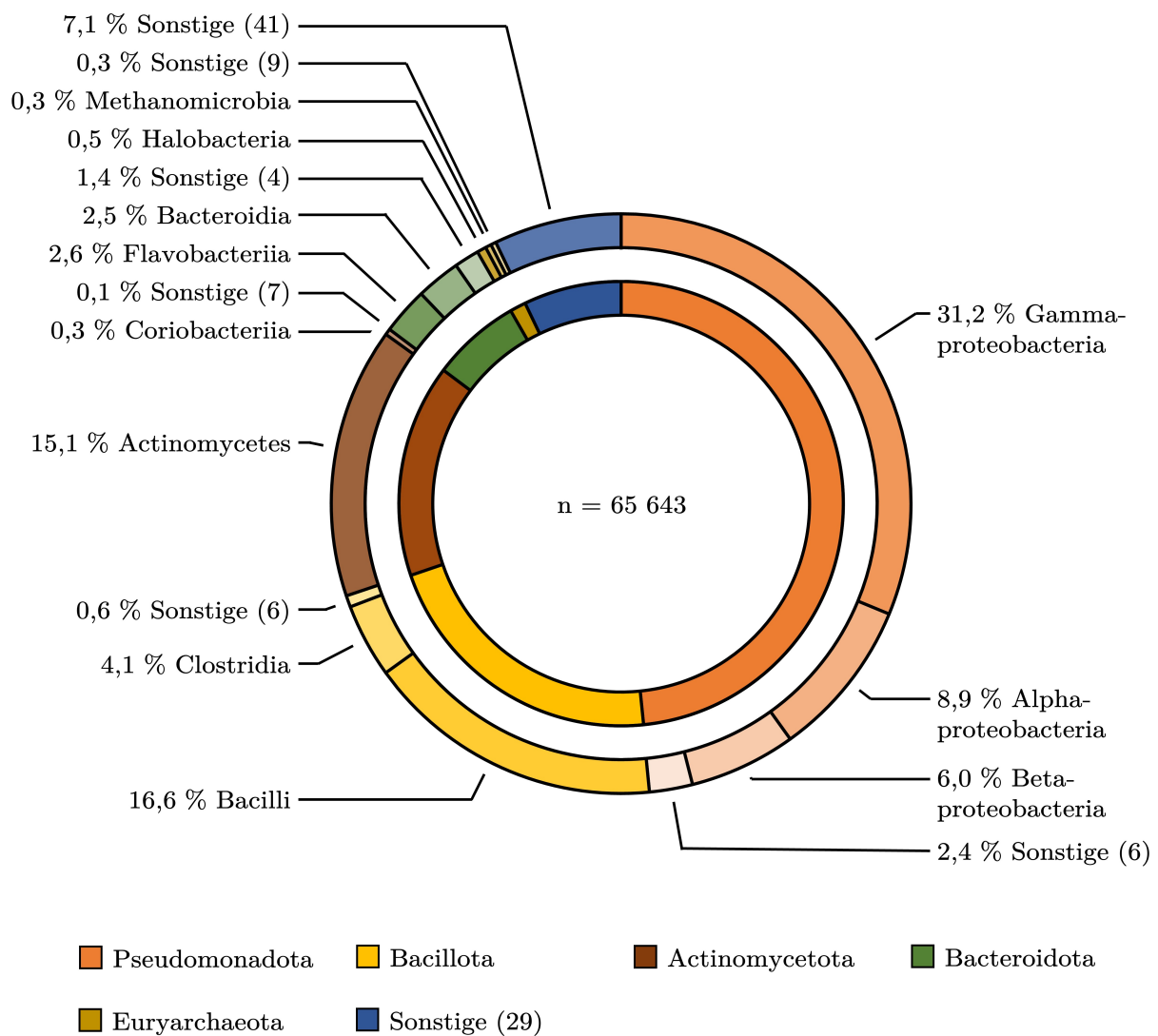


Abbildung 5.6: Taxonomische Einordnung der 65 643 Stämme von Mikroorganismen aus der Korrelationsanalyse. Der innere Ring steht für die Phyla, während der äußere Ring die dazugehörigen Klassen angibt. Die Zahlen in Klammern geben die verbleibende Anzahl von Phyla bzw. Klassen an.

MK/MKH₂-Pool definiert. Elektronendonator-Oxidoreduktasen übertragen Elektronen von einem Elektronendonator in den MK/MKH₂-Pool, während Elektronenakzeptor-Oxidoreduktasen Enzyme sind, die den MK/MKH₂-Pool als Elektronendonator verwenden und die Elektronen auf einen Elektronenakzeptor übertragen. Insgesamt wurden 57 verschiedene Enzyme identifiziert, die MK entweder als Elektronen-

akzeptor oder -donator nutzen (Anh. Tab. S.2; S.3). Von diesen Enzymen waren 23 Elektronendonator-Oxidoreduktasen und 37 Elektronenakzeptor-Oxidoreduktasen, wobei es wichtig ist zu erwähnen, dass einige dieser Enzyme eine bidirektionale Funktion aufweisen. Um festzustellen, welche Enzyme in den Genomen kodiert waren, wurde nach vorhandenen Proteinannotationen gesucht (Anh. Tab. S.4).

Enzyme, die nicht annotiert waren, wurden mithilfe einer Clusteranalyse identifiziert. Dazu wurden alle Proteome mittels BLAST-Suche auf Übereinstimmungen mit den entsprechenden Referenzsequenzen analysiert (Anh. Tab. S.5). Die resultierenden Treffer wurden dann einer Clusteranalyse unterzogen, wobei die potenziellen Proteincluster anhand der Referenzsequenzen identifiziert wurden. Ein Enzym oder Enzymkomplex galt als vorhanden, wenn alle zuvor definierten Untereinheiten im Genom nachgewiesen wurden.

Um das Potenzial der Mikroorganismen zur Biosynthese von MK und methylierten MK-Derivaten zu bewerten, wurden die MK-Biosynthesewege in den Proteomen mit Hilfe der Kegg-Datenbank analysiert. Dies umfasste den Men-Weg, den Mqn-Weg und den modifizierten Mqn-Weg. Zusätzlich wurden Enzyme wie MenK, MqnK und MenK2 mithilfe der neu identifizierten MenK/MenK2 Signatur-Motive erkannt (Abb. 5.2). Durch das Vorhandensein der Mqn-/Men-Enzyme aus den Biosynthesewegen sowie von MenK/Mqn2/MenK2 wurde die potenzielle MK-Zusammensetzung des Chinon-Pools für jeden Mikroorganismus vorhergesagt.

Von den 65 643 Mikroorganismen verfügten 30 438 über keinen MK-Biosyntheseweg, während 33 560 zur Biosynthese von MK in der Lage wären (Tab. 5.3; 5.4). Von diesen Mikroorganismen verfügten 28 497 über den Men-Weg, während 5063 Mikroorganismen den Mqn-Weg aufwiesen. Nur bei 1656 Mikroorganismen war ausschließlich der DMK-Weg vorhanden. Die Synthese von 8-MMK wäre bei 898 Mikroorganismen möglich und davon wären 44 Mikroorganismen in der Lage, 7,8-DMMK zu synthetisieren. Für die Korrelationsanalyse wurde jeder Mikroorganismus anhand des am höchsten methylierten MK-Derivats berücksichtigt. Anhand einer Matrix wurde das Vorkommen der Oxidoreduktasen in den Proteomen mit dem am höchsten methylierten MK-Derivat im potenziellen Chinon-Pool verglichen, um mögliche Korrelationen festzustellen und Rückschlüsse auf mögliche Enzyme zu ziehen, die von MMK/DMMK abhängig sind.

Zunächst wurden die Akzeptor-Oxidoreduktasen betrachtet, wobei insbesondere die Korrelation zwischen 8-MMK und Elektronenakzeptor-Oxidoreduktasen entscheidend war. Das erste

erwähnenswerte Enzym war die Fumarat-Reduktase Mfr, die in 417 Proteomen gefunden wurde (Tab. 5.3) (Guccione *et al.*, 2010). Die Korrelation zu anderen MKs war deutlich geringer. In Mikroorganismen mit DMMK schien sie nicht vorhanden zu sein. Das nächste Enzym war die CO₂-Reduktase, auch bekannt als Formiat-Dehydrogenase (Fdh). Fdh ist eine bifunktionale Oxidoreduktase, die CO₂ zu Formiat reduzieren kann oder unter physiologischen Bedingungen Formiat zu CO₂ oxidieren kann (Dietrich & Klimmek 2002; Agne *et al.*, 2021). Wie Mfr war Fdh am häufigsten in Mikroorganismen mit MMK vertreten und nur noch in wenigen Mikroorganismen mit MK zu finden. Die nächste Akzeptor-Oxidoreduktase war das Enzym Psr, eine Polysulfid-Reduktase (Dietrich & Klimmek 2002). Psr zeigte eine starke Korrelation zu 8-MMK mit 143 Mikroorganismen. Sie war kaum in anderen MK-produzierenden Mikroorganismen zu finden. Das letzte Enzym mit erhöhter Korrelation war die Sulfit-Reduktase MccA (Eller *et al.*, 2019). Insgesamt trat sie in 127 Mikroorganismen auf, die MMK produzierten, während sie nur geringfügig in Mikroorganismen vorkam, die MK produzierten oder gar kein MK aufwiesen. Andere Enzyme zeigten ebenfalls eine Korrelation zu MMK auf, wie die Cytochrom *bd*-Oxidase Cyd mit 747 Mikroorganismen, Chinol-Dehydrogenase Cym mit 95 Mikroorganismen und die Tetrathionat-Reduktase Tsd mit 438 Mikroorganismen, jedoch waren diese Enzyme stärker in Mikroorganismen mit MK oder ohne MK vertreten (Bott & Niebisch 2003; MacMillan & Boger 2009; Kurth *et al.*, 2017).

Im Gegensatz zu 8-MMK zeigte 7,8-DMMK keine eindeutige Korrelation zu spezifischen Enzymen. Obwohl es bei den Enzymen Arsenat-Reduktase Arr (23), Dimethylsulfoxid-Reduktase Dms (38) und Cyd (44) vereinzelte Treffer gab, waren diese Enzyme auch in anderen Mikroorganismen mit MK und DMK, sowie ohne MK zu finden (Lis *et al.*, 2013; Sambasivarao & Weiner 1991; Bott & Niebisch 2003).

Im Vergleich zu den Korrelationen der Elektronenakzeptor-Oxidoreduktasen fielen die Korrelationen der Elektronendonator-Oxidoreduktasen mit MMK geringer aus. Eine vergleichbare Korrelation wurde bei Fdh beobachtet, da es sich um eine bifunktionale

Tabelle 5.3: Korrelationsanalyse von 65 643 Proteomen zwischen terminalen Elektronenakzeptor-Oxidoreduktasen und DMK, MK, MMK und DMMK.

| Elektronenakzeptor | Enzym | kein MK | DMK | MK | MMK | DMMK |
|-----------------------------|---|---------|------|--------|-----|------|
| Adenosinphosphosulfat | Adenylylsulfat-Reduktase (Apr) | 1172 | 65 | 295 | 2 | 0 |
| Apr | Chinon-modifizierende Oxidoreduktase (Qmo) | 195 | 19 | 203 | 2 | 0 |
| Arsenat | Arsenat-Reduktase (Arr) | 133 | 22 | 148 | 34 | 23 |
| chlorierte Phenole | C1-OHPA-Dehalogenase (Cpr) | 677 | 0 | 26 | 0 | 0 |
| Cytochrom <i>c</i> | Menachinol-Oxidoreduktase (Act) | 138 | 9 | 382 | 0 | 0 |
| | Ubichinol-Cytochrom <i>c</i> -Reduktase (Qcr) | 108 | 78 | 8923 | 0 | 0 |
| Distickstoffmonoxid DMSO | Distickstoffoxid-Reduktase (Nos) | 1481 | 0 | 53 | 3 | 0 |
| | Dimethylsulfoxid-Reduktase (Dms) | 110 | 407 | 8317 | 45 | 38 |
| Fumarat | Fumarat-Reduktase (Frd) | 662 | 524 | 12 323 | 5 | 0 |
| | Fumarat-Reduktase (Tfr) | 166 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| | Fumarat-Reduktase (Mfr) | 55 | 35 | 170 | 417 | 1 |
| Heterodisulfid | Heterodisulfid-Reduktase (Hme) | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 |
| | Heterodisulfid-Reduktase (Hdr) | 196 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Kohlenstoffdioxid | Formiat-Dehydrogenase (Fdh) | 0 | 1 | 120 | 199 | 0 |
| Nitrat | Nitrat-Reduktase (Nar) | 5370 | 88 | 17 275 | 17 | 0 |
| | Nitrat-Reduktase (Nap) | 2926 | 491 | 8159 | 130 | 0 |
| Nitrit | Nitrit-Reduktase (Nrf) | 16 | 485 | 7052 | 75 | 0 |
| Perchlorat | Perchlorat-Reduktase (Pcr) | 0 | 0 | 9 | 0 | 0 |
| Polysulfid | Polysulfid-Reduktase (Psr) | 0 | 2 | 10 | 143 | 0 |
| Dms, Arr, Nap, NrfA | Chinol-Dehydrogenase (CymA) | 4 | 4 | 1266 | 95 | 0 |
| Sauerstoff | Cytochrom <i>bd</i> Ubichinol-Oxidase (Cyd) | 17 972 | 1268 | 29 720 | 747 | 44 |
| | Cytochrom <i>aa</i> ₃ Menachinol-Oxidase (Qox) | 7 | 20 | 5889 | 3 | 0 |
| Schwefel, Tetrathionat | Sulfit-Dehydrogenase (Soe) | 2270 | 7 | 51 | 0 | 0 |
| Selenat | Selenat-Reduktase (Ynf) | 0 | 0 | 1256 | 0 | 0 |
| Selenit | Selenit-Reduktase (Srr) | 6 | 6 | 38 | 6 | 0 |
| Stickstoffmonoxid | Chinol-abh. Stickstoffoxid-Reduktase (qNOR) | 2809 | 277 | 2930 | 65 | 0 |
| | dissimilatorische Sulfitreduktase (Dsr) | 110 | 22 | 5924 | 3 | 0 |
| Sulfit | anaerobe Sulfit-Reduktase (Asr) | 1369 | 11 | 2348 | 0 | 1 |
| | Sulfit-Reduktase (Mcc) | 26 | 0 | 21 | 127 | 0 |
| Tetrachlorethen | Tetrachlorethen-Dehalogenase (Pce) | 160 | 1 | 77 | 3 | 0 |
| | Trichlorethen-Dehalogenase (Tce) | 0 | 0 | 11 | 0 | 0 |
| Tetrathionat | Tetrathionat-Reduktase (Ttr) | 531 | 7 | 3656 | 48 | 0 |
| | Thiosulfat-Dehydrogenase (Tsd) | 4765 | 39 | 2580 | 438 | 0 |
| Thiosulfat | Thiosulfat-Reduktase (Phs) | 2 | 2 | 2189 | 0 | 0 |
| | Thiosulfat-Reduktase (Tsr) | 10 | 0 | 4 | 1 | 0 |
| TMAO | Trimethylamin- <i>N</i> -Oxid-Reduktase (Tor) | 140 | 43 | 7209 | 57 | 0 |
| Vinylchlorid | Vinylchlorid-Reduktase (Vcr) | 0 | 0 | 6 | 0 | 0 |
| Gesamt | | 30 427 | 1656 | 32 662 | 854 | 44 |

Oxidoreduktase handelt, die sowohl bei den Akzeptor-Oxidoreduktasen als auch bei den Elektronendonator-Oxidoreduktasen zu finden ist (Tab. 5.4). Bei den Elektronenakzeptor-Oxidoreduktasen agiert Fdh, wie schon erwähnt als CO₂-Reduktase. Die zweite signifikante Korrelation betraf die Hydrogenase Hyd. Als zweites Enzym wurde sie in 788 Mikroorganismen identifiziert, die MMK produzieren (Dietrich & Klimmek 2002). Ebenso wurde sie auch bei 759 Mikroorganismen nachgewiesen, die in der Lage sind, MK zu produzieren. Des Weiteren wurden zusätzliche Enzyme

identifiziert, bei denen zwar keine eindeutige Korrelation festgestellt wurde, sie jedoch in den Proteomen potenzieller MMK-produzierender Mikroorganismen im Vergleich zu MK relativ häufig vorkamen. In diese Kategorie fiel insbesondere die NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase ϵ Nuo, eine Variante der Nuo-Enzymfamilie, die im Phylum Campylobacterota anzutreffen ist und Flavodoxin als Elektronendonator verwendet (Weerakoon & Olson 2008). Es ist jedoch anzumerken, dass die Anzahl der Mikroorganismen mit MK und ohne MK höher war als die der MMK-produzierenden Mikroorganismen. Ein

Tabelle 5.4: Korrelationsanalyse von 65 643 Proteomen zwischen Elektronendonator-Oxidoreduktasen und DMK, MK, MMK und DMMK.

| Elektronendonator | Enzym | kein MK | DMK | MK | 8-MMK | 7,8-DMMK |
|---------------------------------|--|---------|------|--------|-------|----------|
| Disulfidbrücken | Dithiol-Oxidoreduktase (Dsb) | 11 838 | 522 | 10 518 | 89 | 0 |
| F ₄₂₀ H ₂ | F ₄₂₀ H ₂ :Chinon-Oxidoreduktase (Fqo) | 0 | 5 | 1 | 0 | 0 |
| Flavodoxin, Ferredoxin | NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase (ϵ Nuo) | 913 | 28 | 1097 | 642 | 0 |
| Ferredoxin | ETF:MMK-Oxidoreduktase (EMO) | 5397 | 478 | 12 611 | 23 | 14 |
| Formiat | Formiat-Dehydrogenase-N (Fdn) | 14 | 6 | 5420 | 0 | 0 |
| | Formiat-Dehydrogenase (Fdh) | 0 | 1 | 120 | 199 | 0 |
| Glukose | membrangb. Glukose-Dehydrogenase (mGDH) | 8989 | 11 | 7085 | 0 | 0 |
| Glycerol-3-phosphate | Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase (Glp) | 208 | 730 | 9396 | 1 | 0 |
| L-Laktat | L-Laktat-Dehydrogenase (lld) | 13 760 | 471 | 14 140 | 9 | 0 |
| Malate | Malat-Dehydrogenase (Mqo) | 7851 | 98 | 19 412 | 705 | 0 |
| NADPH | NADPH:Chinon-Reduktase (Qor) | 30 421 | 1647 | 28 803 | 853 | 44 |
| | NAD(P)H-Dehydrogenase (Lpd) | 127 | 81 | 8851 | 0 | 0 |
| | NAD(P)H-Dehydrogenase (Wrb) | 15 966 | 135 | 13 961 | 16 | 1 |
| Pyruvat | Pyruvat:Menachinon-Oxidoreduktase (Cid) | 15 966 | 135 | 13 961 | 16 | 1 |
| | Pyruvat-Dehydrogenase (Pqo) | 5317 | 51 | 14 009 | 23 | 0 |
| Succinat | Succinat-Dehydrogenase (Sdh) | 17 462 | 384 | 17 551 | 95 | 0 |
| Sulfid | Sulfid:Chinon-Oxidoreduktase (SQR) | 9024 | 286 | 9522 | 62 | 0 |
| Sulfit | Sulfit-Dehydrogenase (Soe) | 2270 | 7 | 51 | 0 | 0 |
| Thiosulfat | Thiosulfat-Dehydrogenase (Tsd) | 4765 | 39 | 2580 | 438 | 0 |
| | Thiosulfat-Dehydrogenase (Dox) | 31 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Typ I Cytochrom <i>c</i> 3 | Menachinon-Reduktase (Qrc) | 18 | 2 | 116 | 0 | 0 |
| Wasserstoff | Hydrogenase (Hyd) | 19 | 11 | 759 | 788 | 0 |
| | Hydrogenase (Hyb) | 1117 | 74 | 5388 | 11 | 0 |
| Gesamt | | 30 427 | 1656 | 32 662 | 854 | 44 |

weiteres identifiziertes Enzym war Tsd, auch bekannt als Thiosulfat-Dehydrogenase. Tsd zeigt die Fähigkeit, als Tetrathionat-Reduktase zu wirken, wobei die Reaktionsrichtung dieser Enzyme je nach Mikroorganismus variiert (Kurth *et al.*, 2017). Es handelt sich dabei um ein lösliches Dihäm-Cytochrom *c*-Enzym und sollte nicht mit dem membrangebundenen Eisen-Schwefel-Molybdoenzym Ttr verwechselt werden (Calisto & Pereira 2021).

In Bezug auf die DMMK-produzierenden Mikroorganismen wurden nur bei zwei Enzymen Treffer festgestellt. Zum einen handelte es sich um EMO (14 Mikroorganismen), eine membrangebundene ETF:MMK-Oxidoreduktase, die elektronenübertragende Flavoproteine als Elektronendonoren nutzt (Agne *et al.*, 2021). Zum anderen Qor, eine NADPH:Chinon-Reduktase, die NADPH als Elektronendonoren verwendet und in sämtlichen DMMK-produzierenden Mikroorganismen gefunden wurde (Maruyama *et al.*, 2003).

5.3 Heterologe Produktion von MenK/MqnK/MenK2-Enzymen

5.3.1 Heterologe Produktion von MenK/MqnK/MenK2-Enzymen in *E. coli*

Im Rahmen der zuvor durchgeführten Clusteranalyse wurden potenzielle MenK/MqnK/MenK2-Enzyme identifiziert. Um die bioinformatische Klassifizierung zu bestätigen, wurden ausgewählte Proteine auf ihre Methyltransferase-Aktivität überprüft, indem diese Enzyme heterolog in *E. coli* BL21 (DE3) produziert wurden. Die Verwendung von *E. coli* bot sich aufgrund der Produktion von MK und dem Fehlen einer MK-Methyltransferase an, was eine direkte Identifizierung methylierter MK-Derivate ermöglichte. Als Kontrolle wurden die Enzyme MenK und MenK2 aus *Adlercreutzia equolifaciens* (AeMenK und AeMenK2) ebenfalls in *E. coli* produziert. Darüber hinaus wurde versucht, das bekannte MqnK-Enzym aus *Wolfinella succinogenes* (WsMqnK) heterolog in *E. coli*

zu produzieren, was bisher nicht erfolgreich war. Das erste potenzielle MenK-Protein in dieser Arbeit stammte aus dem Gammaproteobacterium *Ferrimonas marina*. *F. marina* besitzt neben dem potenziellen MenK-Enzym mit dem Motiv [QxTxYPLM] (*FmMenK*) ein zweites Protein mit dem abweichendem Motiv [QxTxYPLT] (*Fm975*), das aufgrund seiner Tyrosinposition ebenfalls zum MenK-Typ gezählt wurde. Es wurde zuvor beschrieben, dass Zellen von *F. marina* nur MK₇, UQ₇ und UQ₈ enthalten, wenn sie in einem komplexen Medium mit Pepton und Hefeextrakt wachsen (Katsuta *et al.*, 2005).

Die *menK/mqnK/menK2*-Gene wurden aus den entsprechenden Genomen amplifiziert und in das Plasmid pACYCDuet-1 inseriert, wobei sie unter der Kontrolle eines IPTG-induzierbaren T7-Promotors standen. Die Produktion der Proteine wurde mittels SDS-PAGE und Westernblot unter Verwendung des C-terminalen Streptags verifiziert (Abb. 5.7). Dabei konnte die Produktion aller Proteine, AeMenK (55,6 kDa), AeMenK2 (51,9 kDa), WsMqnK (52,9 kDa), *FmMenK* (52,3 kDa) und *Fm975* (50,2 kDa), in ähnlichen Mengen in den *E. coli*-Zellen nachgewiesen werden.

Nach der Bestätigung der Produktion der MenK/MqnK/MenK2-Enzymen wurden die Chinone aus den Zellkulturen extrahiert und daraufhin mittels HPLC analysiert. Die Identifizierung der MKs erfolgte anhand ihrer Retentionszeit und ihres UV-Vis-Spektrums. Darüber hinaus erfolgte die Verifizierung aller MKs mittels Massenspektrometrie, wobei jede Masse präzise nachgewiesen werden konnte. Die Anwesenheit von AeMenK bzw. AeMenK2 in *E. coli* BL21 (DE3) führte zur Produktion von 8-MMK₈ und 7-MMK₈ (Abb. 5.8B, C). Diese beiden Menachinonspezies wurden als Standards verwendet, um die weiteren Menachinonspezies zu bestimmen. Jedes Menachinon besitzt ein charakteristisches UV-Vis-Spektrum, anhand dessen sie an ihren Absorptionsmaxima unterschieden werden können. Das 8-MMK₈ weist drei Maxima bei 249, 263 und 345 nm auf, während das 7-MMK₈ drei Maxima bei 255, 271 und 334 nm besitzt.

Die Produktion von WsMqnK in *E. coli* führte, wie in *W. succinogenes*, zur Methylierung von MK zu 8-MMK (Abb. 5.8C). Bei *F. marina* wurde das Enzym *FmMenK* erfolgreich als funktionelles MenK bestätigt. Neben den endogenen MK₈ und DMK₈

konnte auch das 8-MMK₈ nachgewiesen werden (Abb. 5.8E). Allerdings führte die erfolgreiche heterologe Produktion von Fm975 nicht zur nachweisbaren Produktion einer methylierten MK₈-Spezies (nicht gezeigt). Daher war es nicht möglich, eine funktionelle Zuordnung zur MK-Methylierung für Fm975 vorzunehmen.

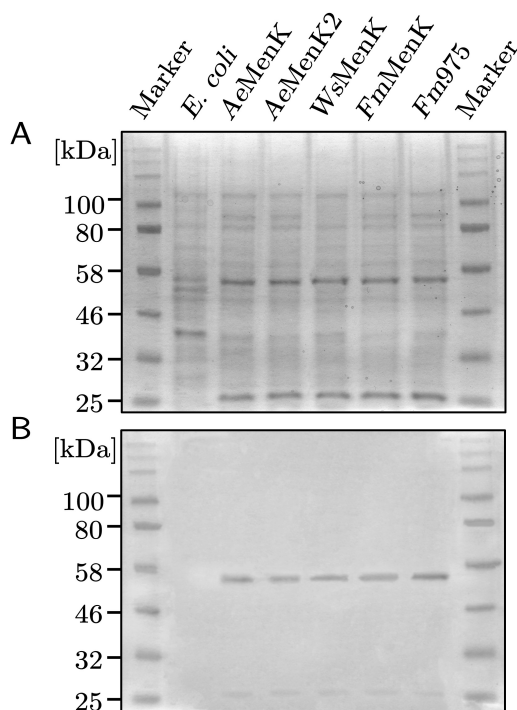


Abbildung 5.7: SDS-PAGE (A) und Western-Blot (B) von heterolog produzierten MenK/MqnK/MenK2-Proteinen aus *A. equolofaciens* (AeMenK 55,6 kDa; AeMenK2 51,9 kDa), *W. succinogenes* (WsMqnK 52,9 kDa) und *F. marina* (FmMenK 52,3 kDa; Fm975 50,2 kDa) in *E. coli*. Die Trennung erfolgte unter Verwendung eines 12,5%igen SDS-Gels und 25 µg Gesamtzellprotein. Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran wurden die Strep-getaggt Proteine mittels eines Immunassays unter Verwendung eines Strep-Tactin-HRP-Konjugats nachgewiesen (Kap. 4.10.3, 4.10.4).

5.3.2 MMK- und DMMK-Synthese durch MenK und MenK2 aus *Collinsella tanakaei*

Zusätzlich zu *F. marina* wurde auch das Coriobacterium *Collinsella tanakaei* ausgewählt, das zwei potenzielle MenK-Enzyme in seinem Genom kodiert. In der Aminosäuresequenz des ersten Enzyms war das Signaturmotiv [QxTxYPLM] zu finden, während das zweite Enzym das Signaturmotiv [QxTxSPLY] besaß. Somit wurde sowohl ein MenK-Enzym (*CtMenK*) als auch ein MenK2-Enzym (*CtMenK2*) für *C. tanakaei* vorhergesagt. Die heterolog in *E. coli* produzierten potenziellen *CtMenK*- und *CtMenK2*-Enzyme konnten sowohl in der SDS-PAGE als auch im Western-Blot nachgewiesen werden (*CtMenK*: 53,2 kDa; *CtMenK2*: 52,1 kDa) (Abb. 5.9A, B).

Die HPLC Analyse des Chinonprofils der *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen, die *CtMenK2* produzierten, zeigte neben MK₈ das Vorhandensein von 7-MMK₈ (Retentionszeit: 13,3 min) (Abb. 5.9C, D). Im Gegensatz dazu führte die Produktion von *CtMenK* in den *E. coli*-Zellen im Vergleich zum Wildtyp zum Auftreten von vier neuen Chinonverbindungen, während DMK₈ nicht nachgewiesen wurde. Das zusätzliche Chinon mit der höchsten Intensität eluierte mit einer Retentionszeit von 14,6 min von der HPLC-Säule und zeigte das charakteristische UV-Vis-Absorptionsspektrum von 8-MMK₈ (Abb. 5.9E, F). Bei einer Retentionszeit von 17,3 min wurde ein weiteres MK-Derivat eluiert. Das UV-Vis-Absorptionsspektrum dieses Chinons zeigte drei Maxima bei 251, 261 und 357 nm (Abb. 5.9G). Besonders das letzte Absorptionsmaximum, das sich im längeren Wellenlängenbereich im Vergleich zu dem von 8-MMK befand, deutete neben der längeren Retentionszeit auf eine Doppelmethylierung (DMMK) hin. Allerdings unterschieden sich die Maxima deutlich von denen des zuvor beschriebenen 7,8-DMMK₈ (Hein *et al.*, 2017). Zwei weitere Chinonverbindungen wurden mit Retentionszeiten von 10,7 und 12,7 min nachgewiesen und mittels ihres UV-Vis-Spektrums als 8-MMK₇ und DMMK₇ identifiziert. 7-MMK₈ wurde nicht nachgewiesen, was die Annahme stützte, dass es sich nicht bei den DMMK-Spezies um 7,8-DMMK handelte.

Das detektierte DMMK-Derivat wurde isoliert

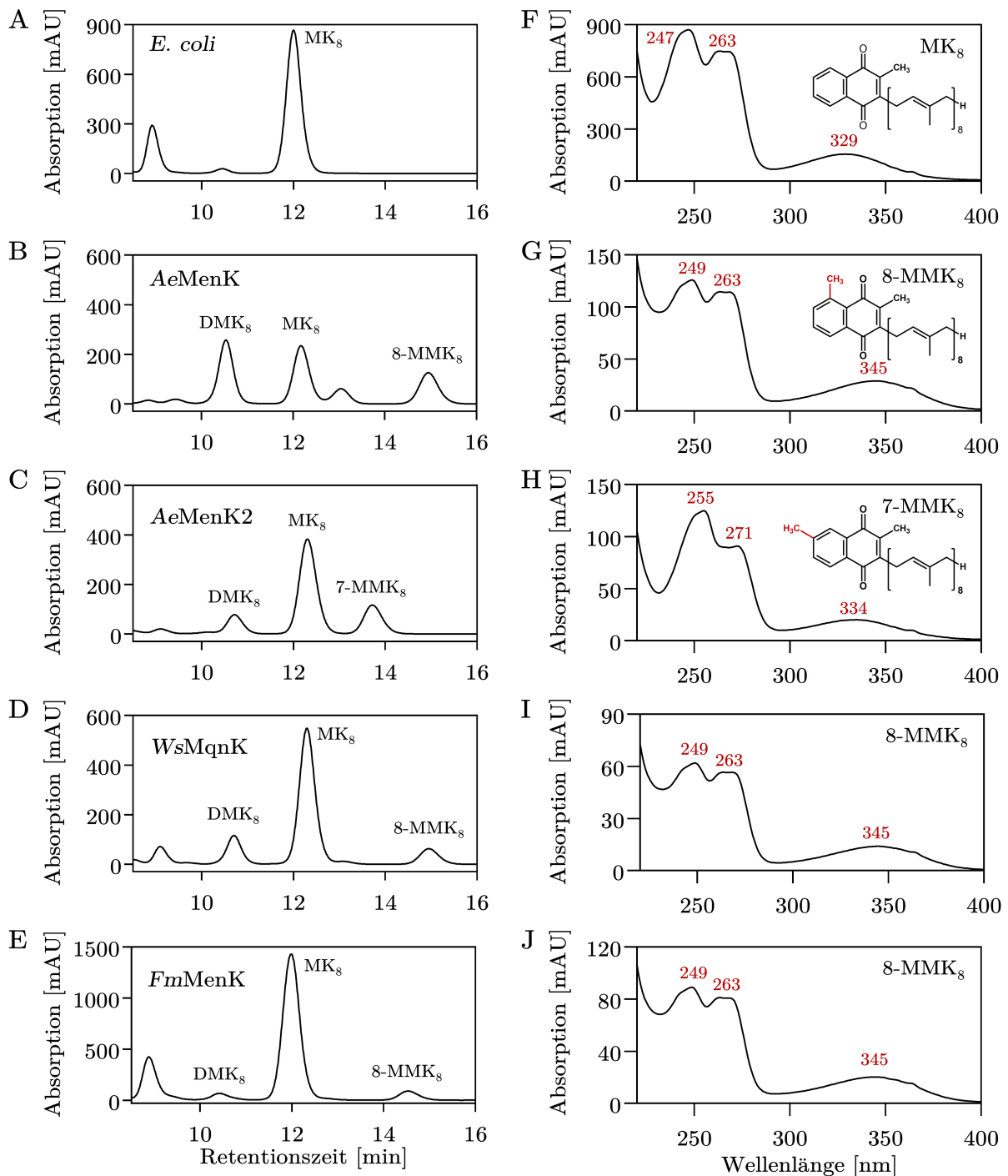


Abbildung 5.8: Analyse der in *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen produzierten Chinone. HPLC-Chromatogramm der gereinigten Chinone aus (A) *E. coli*, (B) *E. coli* AeMenK, (C) *E. coli* AeMenK2, (D) *E. coli* WsMqnK und (E) *E. coli* FmMenK. UV/VIS-Absorptionsspektrum der gereinigten MK/MMKs aus (F) *E. coli*, (G) *E. coli* AeMenK, (H) *E. coli* WsMqnK und (I) *E. coli* FmMenK. Absorption wurde bei 249 nm gemessen.

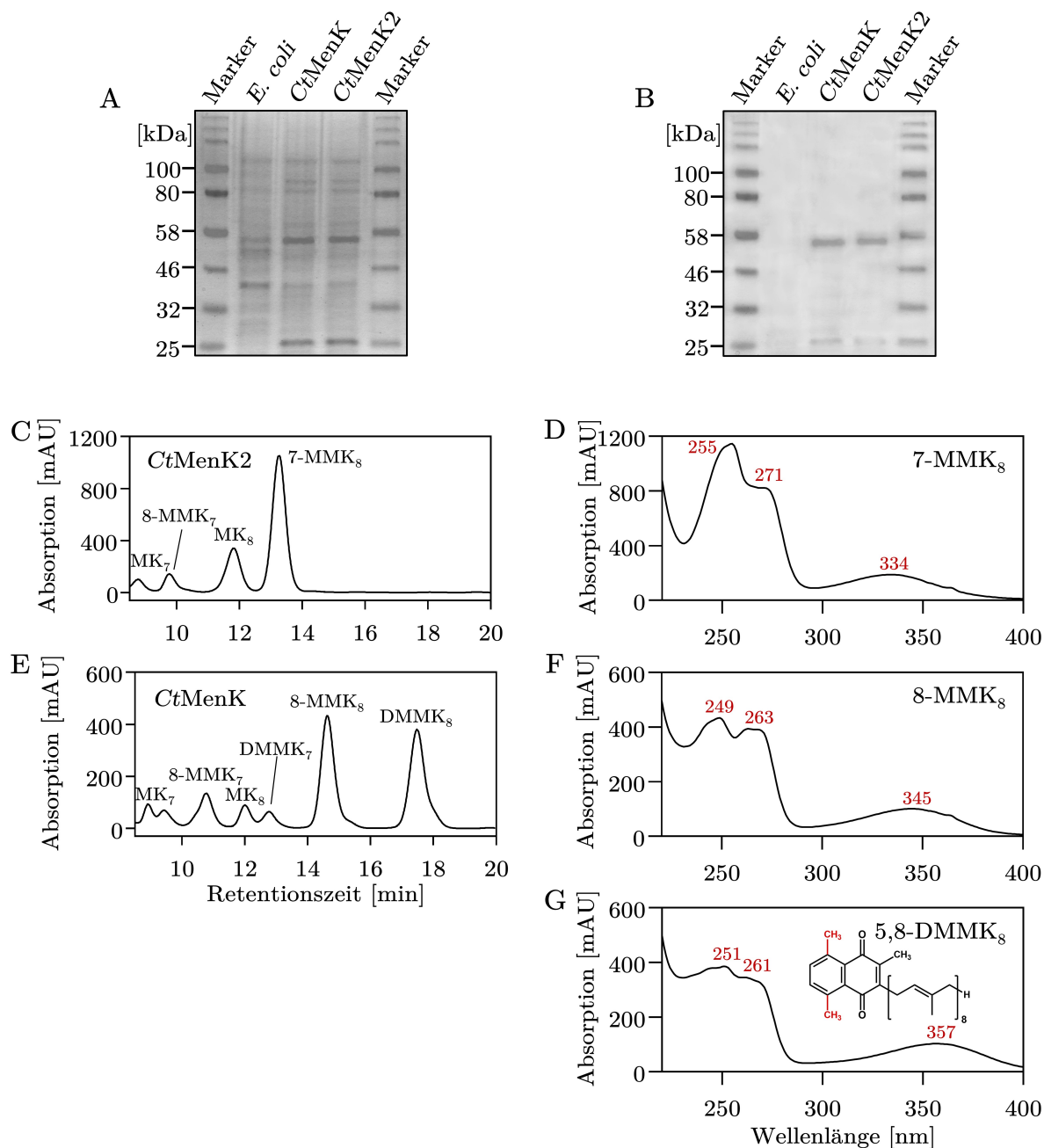


Abbildung 5.9: Analyse der CtMenK und CtMenK2 produzierenden *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen. (A) SDS-PAGE und (B) Western-Blot von heterolog produziertem MenK und MenK2 aus *C. tanakaie* (CtMenK 53,2 kDa; CtMenK2 52,1 kDa) in *E. coli*. Die Trennung erfolgte unter Verwendung eines 12,5%igen SDS-Gels und 25 μ g Gesamtzellprotein. Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran wurden die Strep-getaggten Proteine mittels eines Immunassays unter Verwendung eines Strep-Tactin-HRP-Konjugats nachgewiesen (Kap. 4.10.3, 4.10.4). HPLC-Chromatogramm der gereinigten Chinone aus (C) *E. coli* CtMenK2 mit dem UV/VIS-Absorptionsspektrum von (D) 7-MMK₈, sowie (F) *E. coli* CtMenK von (F) 8-MMK₈ und (G) 5,8-DMMK₈. Absorption wurde bei 249 nm gemessen.

und mittels hochauflösender Massenspektrometrie untersucht, wobei eine Masse von 745,59238 m/z festgestellt wurde (Abb. 5.10A). Diese Masse entsprach der Summenformel $C_{53}H_{76}O_2$ mit einer Masse von 745,59181 m/z (Abweichung von 0,57 mDa). Diese Ergebnisse bestätigte die Annahme eines Menachinons mit zwei Methylgruppen. Um die genauen Positionen der Methylgruppen am Naphthochinonring im DMMK zu bestimmen, wurden NMR-Spektren aufgenommen und mit anderen Menachinon-Derivaten verglichen (Abb. 5.10B). Die Wasserstoffatome der Methylgruppen im Naphthochinonsystem von DMMK zeigten im 1H -Spektrum chemische Verschiebungen von 2,62 ppm und 2,06 ppm, die im typischen Bereich für aromatische $-CH_3$ -Gruppen lagen. Das Signal bei 2,06 ppm entsprach der Methylgruppe am C-2-Atom des Naphthochinonsystems. Das Signal bei 2,62 ppm ähnelte dem Signal von 8-MMK bei 2,67 ppm und wies auf eine Methylierung am C-8-Atom hin. Diese Methylierung am C-8-Atom wurde erwartet, da 8-MMK in der HPLC-Analyse nachgewiesen wurde und wahrscheinlich als Substrat für die Produktion des DMMK diente. Allerdings fehlte das erwartete dritte Signal für die zusätzliche Methylgruppe.

Bei der Analyse der chemischen Verschiebung der Wasserstoffatome im aromatischen Ringsystem, die typischerweise im Bereich > 7 ppm liegen, fiel auf, dass das Duplett-Signal bei 7,94 ppm von 8-MMK nicht mehr vorhanden war. Dieses Signal gehörte den Protonen am C-5-Atom, die im 8-MMK am nächsten am chinoiden System liegen und aufgrund der elektronenziehenden Eigenschaft dieses Systems am stärksten entschirmt werden, was zu ihrer hohen chemischen Verschiebung führte. Da dieses Signal im NMR-Spektrum von DMMK nicht detektierbar war, ließ dies auf eine Methylierung des C-5-Atoms schließen. Somit befinden sich die Methylgruppen an den Positionen C-5 und C-8. Da diese Positionen chemisch äquivalent sind, wiesen sie auch die gleiche chemische Verschiebung auf, weshalb im Spektrum nur ein Signal beobachtet wurde. Die Integration der Signale im NMR-Spektrum korreliert proportional zur Anzahl der beteiligten Protonen. In diesem Fall wies das größere Integral des Signals bei 2,62 ppm im Vergleich zum Signal bei 2,06 ppm auf eine doppelte Anzahl von Protonen hin, was wiederum auf das Vorhandensein von

zwei Methylgruppen hinwies. Basierend auf diesen Beobachtungen wurde das DMMK, das durch die doppelte Methylierung von *CtMenK* entstanden war, als 5,8-DMMK identifiziert. Diese Ergebnisse legten nahe, dass *CtMenK* das MK_8 -Molekül an der Position C-8 methyliert und überraschenderweise das resultierende 8-MMK₈ in einem zweiten Methylierungsschritt an der Position C-5 methyliert, was zur Bildung von 5,8-DMMK₈ führt. Es konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass auch die Synthese von 5-MMK₈ stattfand, da dies die gleiche Retentionszeit wie 8-MMK₈ in der HPLC-Analyse aufweisen dürfte. Im Anhang befindet sich eine umfassende Analyse der chemischen Verschiebungen der einzelnen MK-Derivate für alle 1H - und ^{13}C -NMR-Spektren (Anh. Tab. S.8, S.9).

Das Enzym *CtMenK*, ebenso wie sein Paraloges *CtMenK2*, sind beide im Genom von *C. tanakaei* kodiert. Aufgrund des ungewöhnlichen Methylierungsmusters von *CtMenK* an den Positionen C-8 und C-5 ergibt sich die Möglichkeit einer dreifachen Methylierung von MK in Kombination mit *CtMenK2*, welches die Position C-7 methyliert. Um diese Möglichkeit zu untersuchen und festzustellen, ob zusätzliche Methylgruppen an der Kopfgruppe eventuell zu sterischen Hinderungen führen könnten, wurden die *CtmenK*- und *CtmenK2*-Gene in *E. coli* B121 (DE3) exprimiert. Dies wurde mithilfe von zwei Plasmiden durchgeführt, dem pET-Plasmidsystem für das *CtmenK*-Gen und dem pAC-Plasmidsystem für das *CtmenK2*-Gen.

Die Analyse des Chinonprofils der *E. coli* B121 (DE3)-Zellen, die *CtMenK* und *CtMenK2* produzierten, zeigte das Vorhandensein von einfach methylierten MK-Derivaten von *CtMenK* (8-MMK₈) und *CtMenK2* (7-MMK₈) (Abb. 5.11A). Darüber hinaus konnte 5,8-DMMK₈ (Retentionszeit: 81,1 min) und auch 7,8-DMMK₈ (Retentionszeit: 73,3 min) identifiziert werden, letzteres als ein Produkt der konsekutiven Methylierung von *CtMenK* und *CtMenK2* (Abb. 5.11C). Ebenfalls wurde das demethylierte Derivat 7,8-DMDMK₈ (Retentionszeit: 64,0 min) identifiziert (Abb. 5.11B). Weitere Elutionsmaxima, die aufgrund ihres UV-Vis-Spektrums als dreifach methylierte Derivate erkannt wurden, waren 5,7,8-TMMK₈ (Retentionszeit: 87,8 min) und 5,7,8-TDMMK₈ (Retentionszeit: 77,8 min)

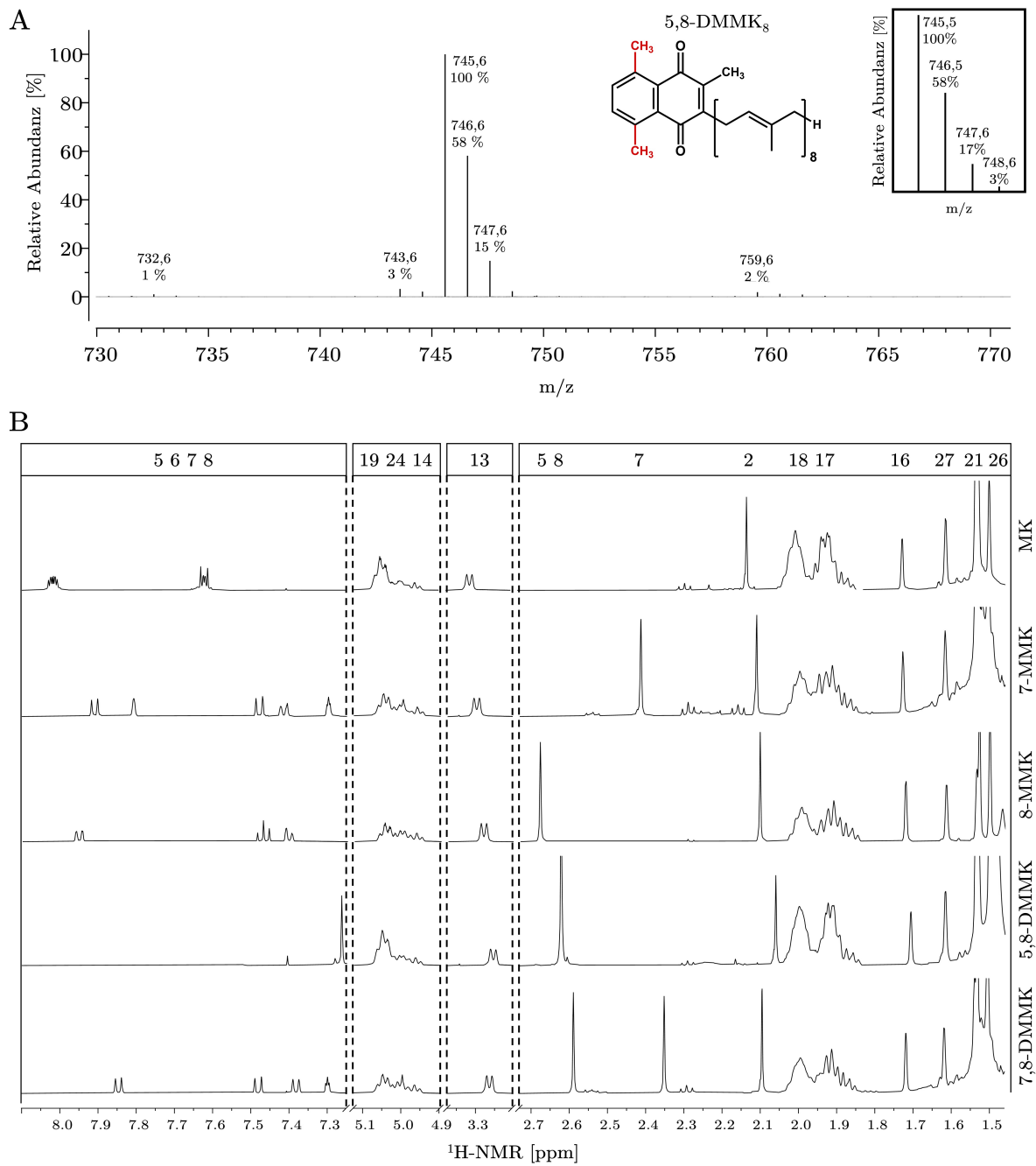


Abbildung 5.10: Bestimmung der Methylgruppenposition von 5,8-DMMK. (A) Massenspektrometrische Analysen von HPLC aufgereinigtem 5,8-DMMK₈ aus *E. coli* BL21 (DE3) *CtMenK*-Zellen mittels ESI. (B) ¹H-NMR-Spektrum von MK, 7-MMK, 8-MMK, 5,8-DMMK und 7,8-DMMK im Bereich von 1,5 bis 8,00 ppm.

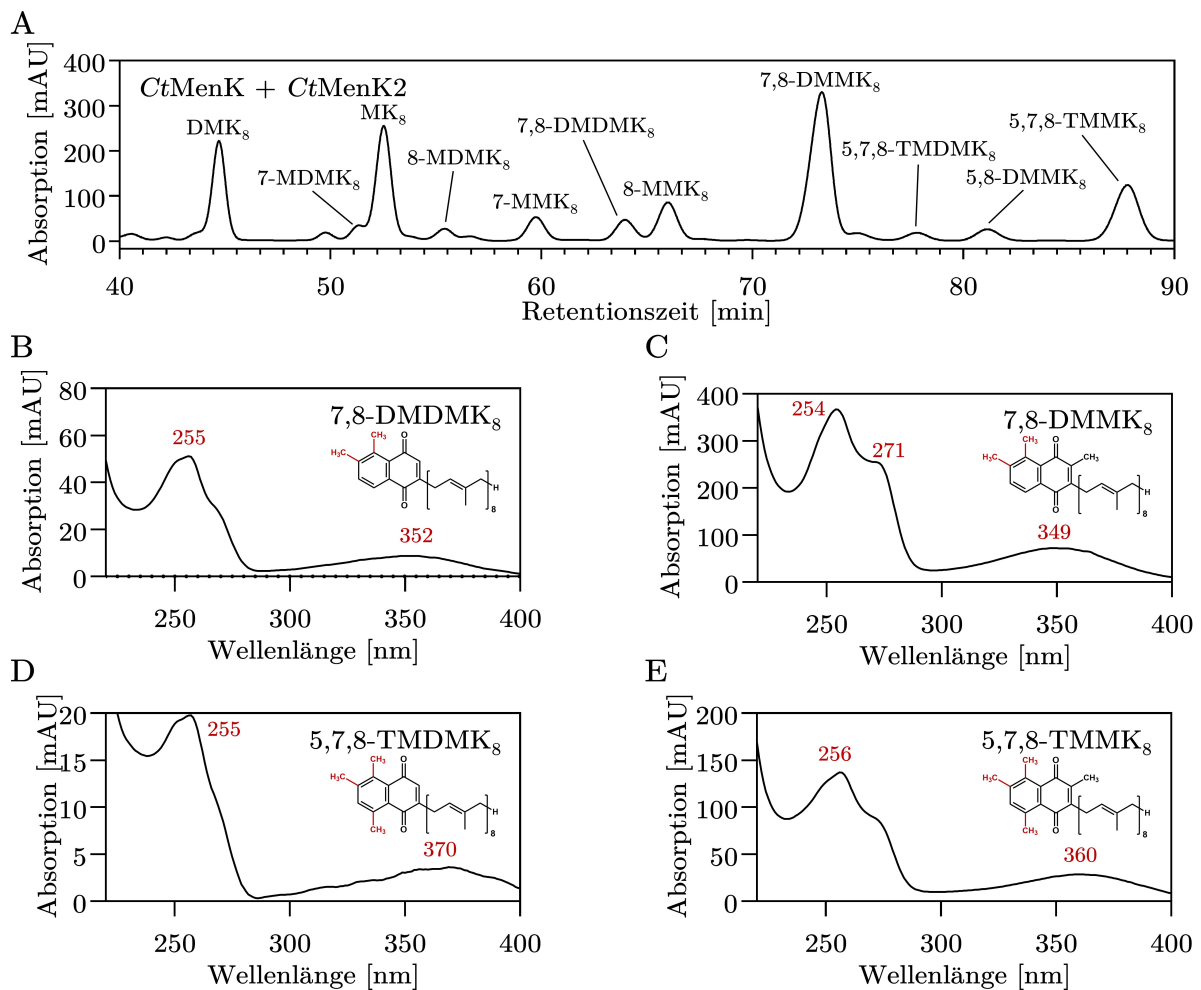


Abbildung 5.11: Chinonanalyse der *CtMenK* und *CtMenK2* produzierenden *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen. HPLC-Chromatogramm der gereinigten Chinone aus (A) *E. coli CtmenK CtmenK2*. UV/VIS-Absorptionsspektrum der gereinigten MK-Derivate (B) 7,8-DMDMK₈, (C) 7,8-DMMK₈, (D) 5,7,8-TMDMK₈ und (E) 5,7,8-TMMK₈. Zur besseren Auftrennung wurde eine OmniSpher 5 C18 150 x 4,6 mm in Kombination mit einer OmniSpher 5 C18 250 x 4,6 mm verwendet. Absorption wurde bei 249 nm gemessen.

(Abb. 5.11D, E). Das MK-Derivat 5,7-DMMK₈ bzw. 5,7-DMDMK₈ konnte nicht nachgewiesen werden. Beim Vergleich der entsprechenden UV-Vis-Absorptionsspektren wurde festgestellt, dass durch die zusätzliche Methylierung bei 5,7,8-TMMK₈ und 5,7,8-TMDMK₈ das dritte Absorptionsmaximum in den längerwelligen Bereich verschoben wurde im Vergleich zu den DMMK-Derivaten. Zudem führte die dritte Methylierung zu einer weiteren Abschwächung

der Schulter zwischen 260 und 280 nm, wobei dies bei 5,7,8-TMDMK besonders ausgeprägt war. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Produktion von 5,7,8-TMMK durch *CtMenK* und *CtMenK2* möglich ist und dass bestehende Methylierungen die Methylierungsposition nicht beeinflussen.

5.3.3 MenK im syntrophen Mikroorganismus *Syntrophus aciditrophicus*

Die Arbeitsgruppe Stoffwechselbiochemie der Mikroorganismen aus der Universität Freiburg von Prof. Dr. Matthias Boll führte Untersuchungen zur CO₂-Reduktion mithilfe von Elektronen aus der β -Oxidation gesättigter Fettsäuren in *Syntrophus aciditrophicus* durch (Agne *et al.*, 2021). Dabei wurde festgestellt, dass *S. aciditrophicus* ein Genom aufweist, das für eine FDH kodiert. In präparierten Membranfraktionen konnte auch eine FDH-Aktivität nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurden keine Gene gefunden, die für membrangebundene [NiFe]-Hydrogenasen kodieren und es konnte auch keine Hydrogenase-Aktivität gemessen werden. Überraschenderweise wurde in der Membran von *S. aciditrophicus* ausschließlich MMK nachgewiesen, wobei die Anzahl der Isopreneinheiten zwischen 5 und 8 Einheiten variierte. Die höchste Konzentration an MMK wurde bei MMK₇ gemessen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Genom von *S. aciditrophicus* SB auf ein MenK/MqnK/MenK2-Enzym hin untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass *S. aciditrophicus* den klassischen Men-Weg der MK-Synthese aufweist, einschließlich eines MenK-Enzyms (*SaMenK*). Die Aminosäuresequenz von *SaMenK* enthält die sechs Signaturmotive der MenK/MqnK/MenK2-Familie, einschließlich des [QxTxYPLM]-Motivs, das verwendet wird, um MqnK/MenK von MenK2-Sequenzen zu unterscheiden. Aufgrund dieses Motivs wurde die Bildung von 8-MMK₇ durch *SaMenK* vorhergesagt, was durch die Membrananalyse bestätigt wurde. *SaMenK* wurde mithilfe des pACYC-Plasmidsystems in *E. coli* BL21 (DE3) produziert, und die Bildung von *SaMenK* wurde durch Westernblot und Immunodetektion bestätigt (Abb. 5.12A, B). Das Chinonprofil dieser Zellen zeigte neben DMK₈ und MK₈ eine zusätzliche Chinonspezies (Abb. 5.12C). Diese Chinonspezies wurde aufgrund ihrer Retentionszeit von 15,9 min und ihres charakteristischen Absorptionsspektrums mit Maxima bei 249, 264 und 345 nm als 8-MMK₈ identifiziert (Abb. 5.12D). Diese Ergebnisse bestätigen, dass *SaMenK* funktional für die Synthese von 8-MMK₈ verantwortlich ist.

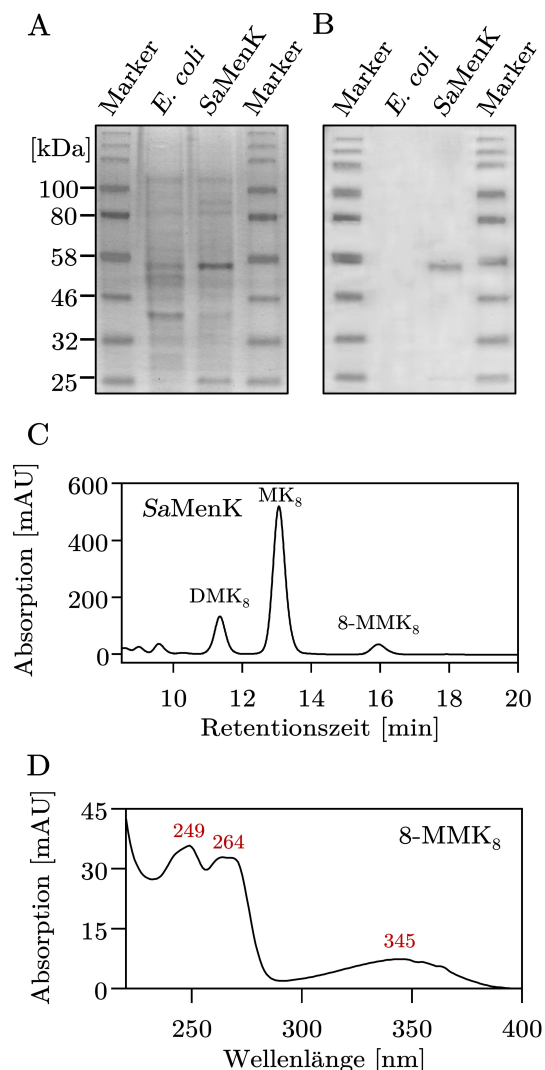


Abbildung 5.12: Funktionelle Analyse der Methyltransferase-Aktivität von MenK aus *Syntrophus aciditrophicus*. (A) SDS-PAGE und (B) Western-Blot von heterolog produziertem *SaMenK* in *E. coli*. Die Trennung erfolgte unter Verwendung eines 12,5%igen SDS-Gels und 25 μ g Gesamtzellprotein. Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran wurden die Strep-getaggten Proteine mittels eines Immunassays unter Verwendung eines Strep-Tactin-HRP-Konjugats nachgewiesen (Kap. 4.10.3, 4.10.4). (C) HPLC-Chromatogramm der gereinigten Chinone und (D) UV/VIS-Absorptionsspektrum des gereinigten 8-MMK₈. Absorption wurde bei 249 nm gemessen.

5.3.4 Produktion von DMK-Derivaten in *E. coli*

Wie in den vorangegangenen Ergebnissen gezeigt wurde, eignet sich *E. coli* als Produktionswirt für die funktionelle Charakterisierung von MenK/MqnK/MenK2-Enzymen. Neben MK wurde in *E. coli* auch DMK nachgewiesen und die Enzyme *AeMenK* und *AeMenK2* waren in der Lage, DMK zu methylieren, wodurch die Bildung der methylierten DMK-Derivate 8-MDMK und 7-MDMK ermöglicht wurde (Hein 2019). Es war jedoch noch nicht bekannt, ob DMK ausschließlich von den MenK- und MenK2-Enzymen aus *A. equolifaciens* als Substrat verwendet werden konnte oder ob dies eine allgemeine Fähigkeit der MenK/MqnK/MenK2-Enzyme darstellte.

Die Methylierung von DMK konnte bisher nicht eindeutig durch HPLC-Analysen bestimmt werden, da die DMK-Derivate 7-MDMK₈ und 8-MDMK₈ die gleiche Retentionszeit wie MK aufwiesen. Aufgrund des höheren Gehalts an MK in *E. coli* kam es zu einer Überlagerung der MDMK-Signale. Um dieses Problem zu lösen, wurde eine Mutante von *E. coli* BL21 (DE3) konstruiert, bei der das *ubiE*-Gen fehlte. Das Gen *ubiE* kodiert für eine Methyltransferase, die die Methylierung des Naphthochinonrings von MK am C-2-Atom bewirkt und ist auch unter dem Namen MenG bekannt (Abb. 2.3; 2.5). Durch die Deletion von *ubiE* sollte daher die Bildung von MK unterbunden werden und es sollte ausschließlich zur Bildung von DMK kommen. Es ist jedoch wichtig zu beachten, dass UbiE auch für die Methylierung des C-5-Atoms in Ubichinon zuständig ist, was den sechsten Schritt in der Biosynthese von Ubichinon darstellt (Abb. 2.3). Daher sollte die Deletion von *ubiE* auch zum Verlust von Ubichinon führen.

Um das *ubiE*-Gen zu deletieren, wurde das scarless Cas9-assisted recombineering (no-SCAR) System eingesetzt (Reisch & Prather 2017). Dieses System basiert auf dem CRISPR/Cas9-System, das eine Guide-RNA verwendet, um die Cas9-Nuklease zu dirigieren und an einem spezifischen Punkt im Genom einen Doppelstrangbruch zu erzeugen. Da *E. coli* normalerweise keinen Mechanismus zur Reparatur solcher Doppelstrangbrüche besitzt, würde dies üblicherweise zum Zelltod führen. Durch die Kombination des CRISPR/Cas9-Systems mit dem λ -Red-System ist es jedoch *E. coli* möglich,

diese Doppelstrangbrüche mittels homologer Rekombination zu reparieren. Dabei wird *E. coli* eine DNA-Vorlage mit der gewünschten Mutation bereitgestellt und diese wird über homologe Rekombination in das Genom eingebaut.

Durch die Anwendung des no-SCAR-Systems war es möglich, das *ubiE*-Gen vollständig und ohne Rückstände aus dem Genom zu deletieren (Kap. 4.9.9). HPLC-Analysen der *E. coli* Δ *ubiE* Mutante zeigten, wie erwartet die Produktion von DMK₈, jedoch nicht von MK₈ und UQ₈ (Abb. 5.13). Der Verlust von UQ₈ führte bei *E. coli* Δ *ubiE* im Vergleich zum Wildtyp zu einem deutlichen Wachstumsnachteil. Die Mutante benötigte drei Tage für die Koloniebildung auf LB-Agar unter aeroben Bedingungen bei 37 °C und auch im Flüssigmedium war ein deutlich langsames Wachstum erkennbar.

Um die Substratspezifität gegenüber über DMK zu untersuchen, wurden die MenK und MenK2 Enzyme von *F. marina* und *C. tanakaei* in der *E. coli* Δ *ubiE*-Mutante produziert. Die Anwesenheit von *FmMenK* oder *CtMenK* in der Mutante führte zur Produktion von 8-MDMK₈ (Abb. 5.14B, C, F). Bei *CtMenK* wurde zusätzlich ein weiteres Maximum identifiziert, das als 5,8-DMDMK₈ eingeordnet wurde (Abb. 5.14G). In den *E. coli*

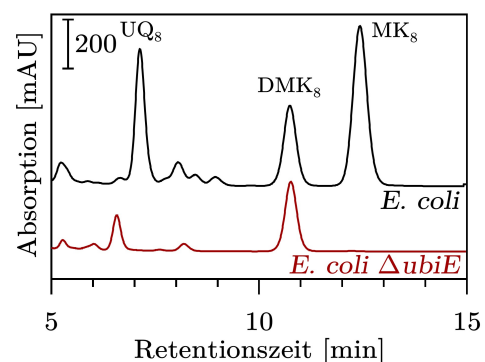


Abbildung 5.13: HPLC-Chromatogramm der gereinigten Chinone aus *E. coli* BL21 (DE3) (schwarz) und *E. coli* BL21 (DE3) Δ *ubiE* Mutante (rot). Die Zellen wurden in TB-Medium unter mikroaeroben Bedingungen gezogen (Kap. 4.8.1). Chinonextraktion, Trennung durch HPLC und die Detektion erfolgten wie in Kapitel 4.10.11 beschrieben. Absorption wurde bei 249 nm gemessen.

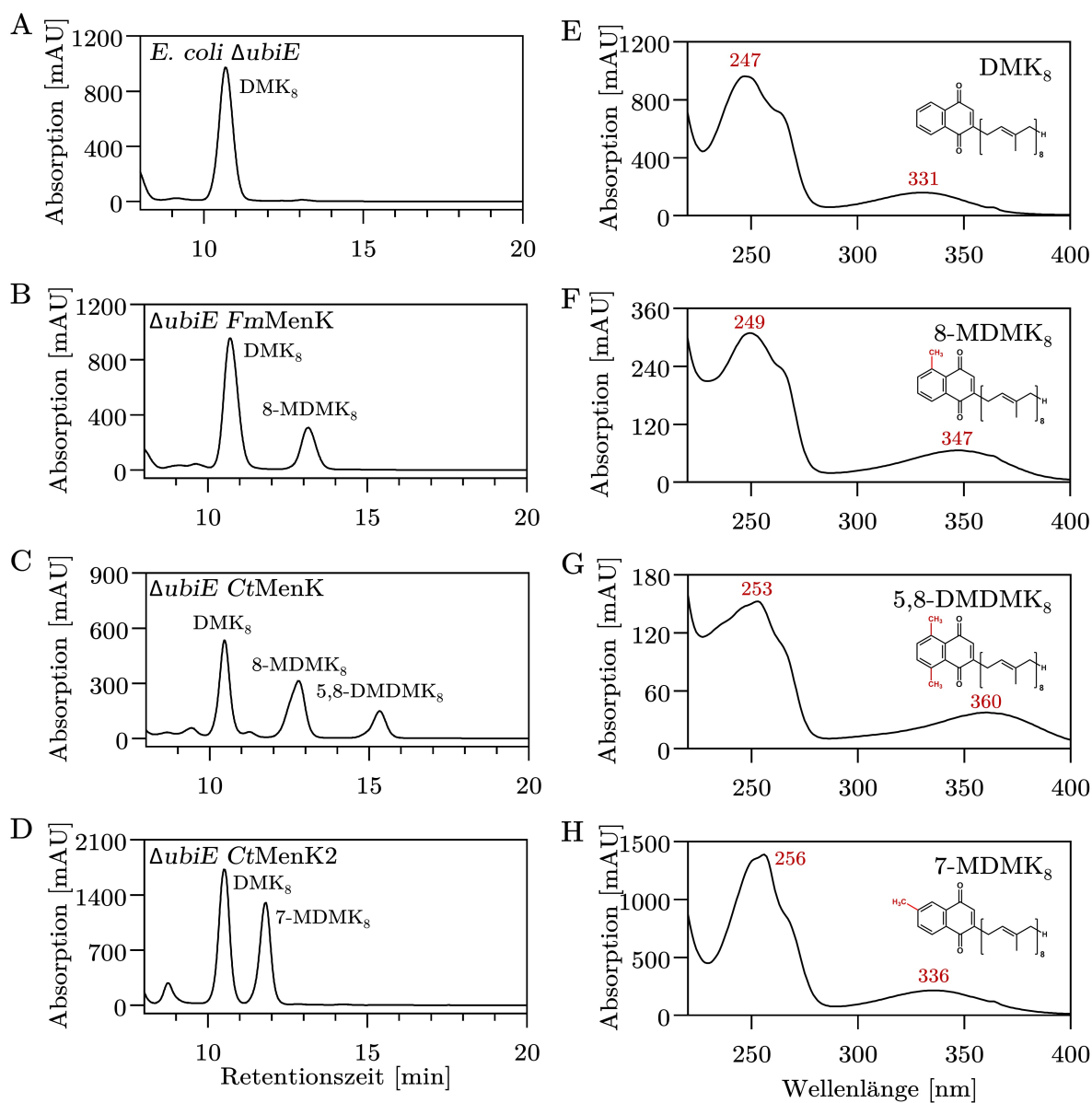


Abbildung 5.14: Chinonanalyse der *FmMenK*, *CtMenK* und *CtMenK2* produzierenden *E. coli* BL21 (DE3) $\Delta ubiE$ -Zellen. HPLC-Chromatogramm der gereinigten Chinone aus (A) *E. coli* $\Delta ubiE$, (B) $\Delta ubiE$ *FmMenK*, (C) $\Delta ubiE$ *CtMenK* und (D) $\Delta ubiE$ *CtMenK2*. UV/VIS-Absorptionsspektrum vom gereinigtem (E) DMK_8 aus *E. coli* $\Delta ubiE$, (F) 8-MDMK₈ aus $\Delta ubiE$ *FmMenK*, (G) 5,8-DMDMK₈ aus $\Delta ubiE$ *CtMenK* und (H) 7-MDMK₈ aus $\Delta ubiE$ *CtMenK2*. Absorption wurde bei 249 nm gemessen.

$\Delta ubiE$ *CtMenK*-Zellen wurden neben 8-MDMK₈ und 5,8-DMDMK₈ auch die DMK₇-Derivate, 8-MDMK₇ und 5,8-DMDMK₇, in geringen Mengen nachgewiesen (nicht gezeigt). In den *E. coli* $\Delta ubiE$ -Zellen, die *CtMenK2* produzierten, wurde 7-MDMK₈ nachgewiesen (Abb. 5.14D, H). Zur Bestätigung der zusätzlichen Methylierung wurden alle DMK₈- und DMK₇-Derivate einer Massenspektrometrie unterzogen (Anh. Abb. S.1; S.2). Die Ergebnisse zeigen, dass die *E. coli* $\Delta ubiE$ -Mutante ausschließlich DMK₈ produzierte und dabei weiterhin wachstumsfähig war. Diese Mutante erwies sich daher als geeigneter Produktionsstamm für MenK/MenK2, um das Methylierungspotenzial gegenüber DMK₈ zu untersuchen. Dadurch wurde bestätigt, dass *FmMenK*, *CtMenK* und *CtMenK2* DMK als Substrat verwenden können, genauso wie *AeMenK* und *AeMenK2*. Somit scheint die Fähigkeit zur Methylierung von DMK ein allgemeines Merkmal der MenK/MqnK/MenK2-Enzyme zu sein.

5.3.5 Steigerung der MK-Produktion durch Inaktivierung des UQ-Biosynthesewegs

Um weiterführende Experimente mit isolierten MK-Derivaten durchführen zu können, wurde untersucht, ob die MK-Produktion in *E. coli* gesteigert werden kann, um eine höhere Substratverfügbarkeit für die MenK/MqnK/MenK2-Enzyme zu ermöglichen und somit die Ausbeute an methylierten MK-Derivaten zu erhöhen. Zur Auswahl eines geeigneten *E. coli*-Stammes wurden insgesamt 8 Stämme auf ihren Gehalt an DMK und MK untersucht. Die Stämme wurden unter mikroaeroben Bedingungen mit begrenzter Sauerstoffzufuhr und langsamer Rotation im LBG-N-Medium kultiviert (Kap. 4.8.1). Der Gehalt an DMK und MK wurde mittels HPLC quantifiziert (Abb. 5.15). Es zeigte sich eine deutliche Variation im MK-Gehalt zwischen den verschiedenen *E. coli*-Stämmen. Im Stamm JM109 konnte weder DMK noch MK nachgewiesen werden, während im Stamm XL1-Blue der höchste MK-Gehalt mit 119 $\mu\text{g/g}$ TG beobachtet wurde, jedoch mit der größten Standardabweichung. Der Stamm C43 (DE3) wies eine niedrige Standardabweichung auf und einen MK-Gehalt von 111 $\mu\text{g/g}$ TG. Aufgrund seines niedrigen DMK-Gehalts,

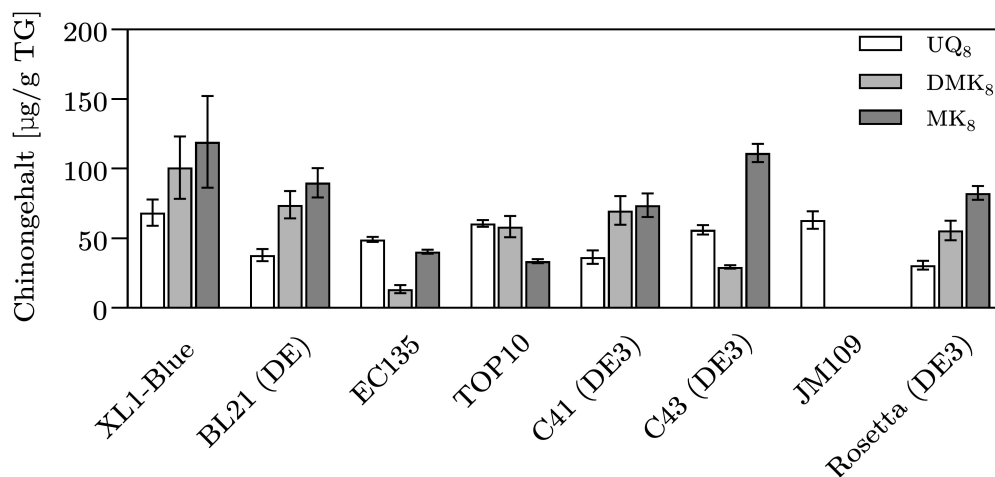


Abbildung 5.15: Analyse des Chinongehalts von 8 *E. coli*-Stämmen. Nach der Chinonextraktion wurde der Gehalt von UQ₈, DMK₈ und MK₈ in $\mu\text{g/g}$ Trockengewicht verschiedener *E. coli*-Stämme bestimmt (Kap. 4.10.11, 4.10.12).

seines hohen MK-Gehalts und seiner genetischen Ausstattung wurde der *E. coli*-Stamm C43 (DE3) für weitere Experimente ausgewählt. Der Stamm C43 (DE3) wurde aus dem Stamm BL21 (DE3) durch phänotypische Selektion von Mutationen zur Resistenz gegen toxische Proteine abgeleitet. Zusätzlich enthält er das T7-RNA-Polymerase-Gen. Ein erster Schritt zur Erhöhung des MK-Gehalts in *E. coli* C43 bestand darin, den UQ-Biosyntheseweg zu blockieren, da dieser mit dem MK-Biosyntheseweg um die gleichen Vorläufermoleküle wie Chorismatsäure und C40 Octaprenyl-Diphosphat (OPP) konkurrieren. Um den UQ-Weg zu blockieren, wurden die ersten beiden Gene *ubiC* und *ubiA* im UQ-Weg im Genom von C43 deletiert. Mit Hilfe des no-SCAR-Systems wurde die Mutante *E. coli* C43 (DE3) $\Delta ubiCA$ erstellt (Kap. 4.9.9). HPLC analytische Untersuchungen der C43 $\Delta ubiCA$ Mutante zeigten die Anwesenheit von DMK₈ und MK₈, jedoch nicht von UQ₈ (Abb. 5.16). Ähnlich wie die Mutante *E. coli* BL21 (DE3) $\Delta ubiE$ zeigte die Mutante C43 $\Delta ubiCA$ ein Wachstumsdefizit aufgrund des Fehlens von UQ₈.

Um das Wachstumsdefizit der *E. coli* C43 (DE3) $\Delta ubiCA$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp zu beheben, wurde LBG-N-Medium unter mikroaeroben Wachstumsbedingungen verwendet. Dieses Medium enthält Nitrat, das von *E. coli* unter anaeroben Bedingungen als Elektronenakzeptor verwendet wird. Zusätzlich findet der Elektronentransport über DMK₈ statt (Uden & Bongaerts 1997). Unter diesen Kultivierungsbedingungen zeigte die Mutante kein signifikantes Wachstumsdefizit im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 5.17A). Es gab jedoch auch keinen signifikanten Unterschied im DMK- und MK-Gehalt zwischen der Mutante und dem Wildtyp (Abb. 5.17B). Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass die Unterdrückung der Ubichinon-Biosynthese und die damit verbundene erhöhte Verfügbarkeit von Vorläufermoleküle keinen erkennbaren Vorteil für die Bildung von MK₈ aufwiesen.

Um das größere Angebot an OPP zu nutzen, wurde das Enzym MenA überproduziert. MenA, eine 1,4-Dihydroxy-2-naphthoat-Isoprenyltransferase, ist verantwortlich für die enzymatische Kopplung der MK-Kopfgruppe, 1,4-Dihydroxy-2-naphthoat, mit der Polyisoprenyl-Seitenkette OPP, was

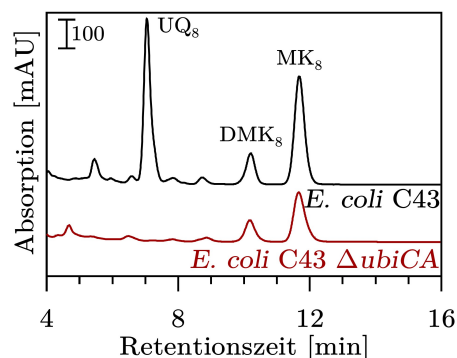


Abbildung 5.16: HPLC-Chromatogramm der gereinigten Chinone aus *E. coli* BL21 (DE3) und *E. coli* BL21 (DE3) $\Delta ubiCA$ Mutante. Die Zellen wurden in TB-Medium unter mikroaeroben Bedingungen gezogen (Kap. 4.8.1). Chinonextraktion, Trennung durch HPLC und die Detektion erfolgten wie in Kapitel 4.10.11 beschrieben. Absorption wurde bei 249 nm gemessen.

zur Bildung von DMK führt (Kap. 2.4). Als Expressionssystem diente das Plasmid pUCM19, das einen konstitutiven lac-Promotor enthielt. Die *E. coli* C43 (DE3) $\Delta ubiCA$ pUCM_MenA-Zellen zeigten ein geringfügiges Wachstumsdefizit im Vergleich zur C43 (DE3) $\Delta ubiCA$ -Mutante und zum Wildtyp und erreichten eine OD₆₀₀ von 1,8 (Abb. 5.17A). Obwohl ein Wachstumsnachteil zu beobachten war, wurde eine signifikante Erhöhung des DMK-Gehalts festgestellt, der um das 6,3-fache (187,0 $\mu\text{g/g}$ TG) höher war als bei der C43 (DE3) $\Delta ubiCA$ -Mutante (Abb. 5.17B). Der MK-Gehalt zeigte ebenfalls einen Anstieg um das 1,8-fache auf 210,3 $\mu\text{g/g}$ TG.

Um die gesteigerte MK-Produktion zu nutzen, wurde die Mutante C43 (DE3) $\Delta ubiCA$ pUC_MenA mit dem pET-Expressionssystem zur Produktion von *CtMenK* ausgestattet. Das System basierte auf dem pET28a-Plasmid, das das *CtMenK*-Protein unter der Kontrolle eines IPTG-induzierbaren T7-Promotors enthielt. Das System wurde erfolgreich für die Aufreinigung von *CtMenK* verwendet. Aufgrund einer hohen nicht-induzierten Expressionsrate kann dieses System in Abwesenheit eines externen Induktors zur Produktion von *CtMenK* in *E. coli* verwendet werden (siehe Kap. 5.4.1 für Induktionsversuche).

Die Mutante $\Delta ubiCA$ pUC_MenA pET_CtMenK zeigte im Vergleich zur $\Delta ubiCA$ -Mutante einen deutlichen Wachstumsnachteil. Die maximale OD₆₀₀ der Mutante war um das 1,9-fache reduziert und erreichte eine maximale OD₆₀₀ von 1,2 (Abb. 5.17A). Obwohl der MK-Gehalt keinen signifikanten Unterschied zur $\Delta ubiCA$ pUC_MenA-Mutante aufwies, wurde ein signifikanter Rückgang des DMK-Gehalts festgestellt (Abb. 5.17B). Die Synthese von 8-MMK₈ und 5,8-DMMK₈ konnte selbst unter Verwendung von IPTG nicht beobachtet werden. Dies deutet daraufhin, dass das pET-Expressionssystem unter diesen Wachstumsbedingungen nicht für die Überproduktion von MMK bzw. DMMK geeignet ist.

5.4 Präparation und Charakterisierung von MenK/MqnK/MenK2-Enzymen

5.4.1 Aufreinigung von AeMenK, AeMenK2, CtMenK, CtMenK2 und WsMqnK

Für eine weiterführende Charakterisierung der MenK/MqnK/MenK2 Proteine, war es notwendig diese Proteine in einer ausreichenden Konzentration und Reinheit zu isolieren. Dazu wurde das *AemenK*-Gen in das Plasmid pET-28(a)+ inseriert und in *E. coli* BL21 (DE3) heterolog produziert. Anschließend wurde das produzierte AeMenK über den angefügten His-Tag mittels Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) aufgereinigt. Die elektrophoretische Auftrennung der Reinigungsfractionen über eine SDS-PAGE ergab, dass AeMenK (57,6 kDa) zwar in ausreichender Menge von den *E. coli*-Zellen produziert wurde, jedoch wurde der Großteil des Proteins nicht an der Säule gebunden, sondern wurde im Durchfluss detektiert (Abb. 5.18). Die Ausbeute fiel mit nur etwa 4 mg/l TB-Medium gering aus, was weitere

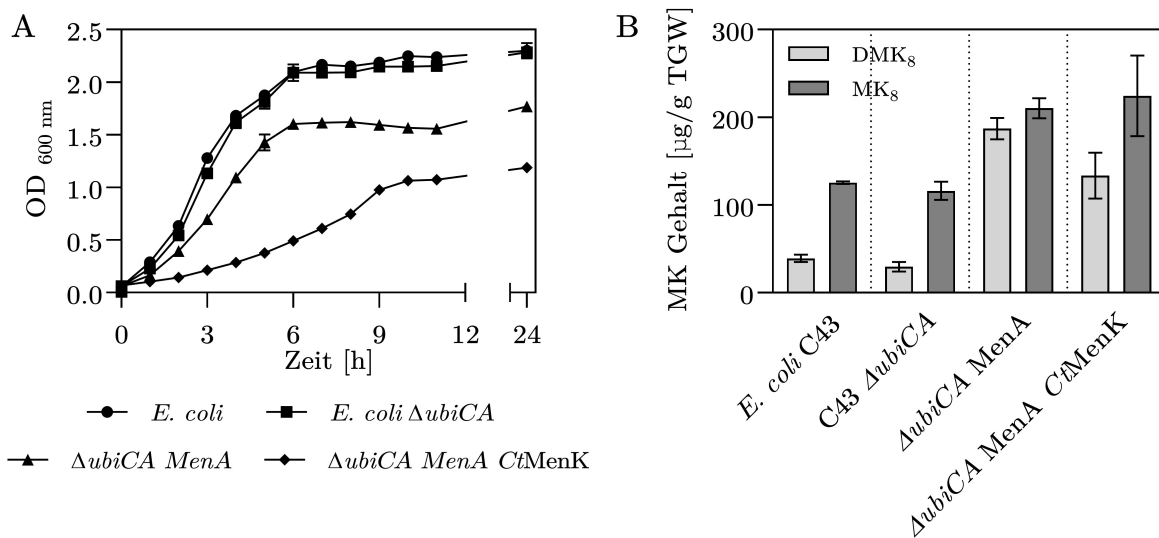


Abbildung 5.17: Unterschlagung der *E. coli* C43 (DE3) $\Delta ubiCA$ -Mutante auf Wachstum und Chinongehalt. (A) Wachstumskurve der C43 $\Delta ubiCA$ -Mutanten in LBG-N-Medium. (B) DMK- und MK-Gehalt von den C43 $\Delta ubiCA$ -Mutanten in $\mu\text{g/g}$ Trockengewicht.

Experimente aufgrund der geringen Proteinmenge erschwerte. Nur ein Bruchteil des produzierten Proteins konnte aufgereinigt werden. Diese Beobachtung wurde auch bei *AeMenK2*, *CtMenK*, *CtMenK2* und *WsMqnK* gemacht. Da bis dahin unklar war, ob es sich bei *MenK/MqnK/MenK2* um Membranproteine handelt, wurde eine Reinigung mit TritonTM-X100 durchgeführt. Durch TritonTM-X100 können Membranproteine solubilisiert werden und so zu einer verbesserten Aufreinigung führen. Die Aufreinigung von *AeMenK* wurde mit TritonTM-X100-Konzentrationen von 0, 0,5, 1 und 1,5 % durchgeführt, jedoch hatte keine der Kon-

zentrationen einen Einfluss auf die Aufreinigungseffizienz von *AeMenK* (nicht gezeigt). Durch die mikroskopische Untersuchung der *E. coli*-Zellen vor der Aufreinigung wurde festgestellt, dass sichtbare Partikel im Inneren der Zellen vorhanden waren. Es wurde vermutet, dass es sich bei diesen Partikeln um Einschlusskörper handelte, die aufgrund der großen Proteinmenge von *AeMenK* entstanden waren (nicht gezeigt).

Um gezielt gegen die hohe Expression und die daraus resultierenden Proteinaggregationen vorzugehen, wurden mehrere Methoden getestet. Dabei wurden drei verschiedene Ansätze verfolgt. Der erste Ansatz bestand darin, das nährstoffreiche TB-Medium durch das nährstoffärmere LB-Medium zu ersetzen. Im zweiten Ansatz wurde die Temperatur nach der Induktion von 30 °C auf 20 °C reduziert und im letzten Ansatz wurde die IPTG-Konzentration von 0,4 mM auf 0,2 mM gesenkt. Eine Analyse der aufgetrennten Zellysate mittels SDS-PAGE zeigte keine Unterschiede in der Gesamtproteinproduktion (Abb. 5.19A). Weitere Erkenntnisse lieferte die Proteinaufreinigung. Als Referenz diente eine Kultur, die im TB-Medium bei 30 °C inkubiert und mit einer IPTG-Konzentration von 0,4 mM induziert wurde. Zur Quantifizierung der Proteinmenge wurde die Absorption der Elutionsfraktion bei 260 nm integriert, wobei diese als 100 % festgelegt wurde. Die aufgereinigte Proteinmenge aus der Kultur, die im LB-Medium gezogen wurde, zeigte eine Reduktion um 68 % im Vergleich zur Referenz. In der Kultur, die bei 20 °C inkubiert wurde, war die Proteinmenge um 6,4 % gegenüber der Referenz verringert. Eine Halbierung der IPTG-Konzentration auf 0,2 mM führte zu einer Steigerung der Proteinmenge um 42,6 %. Es wurden signifikante Unterschiede nicht nur in der Proteinmenge, sondern auch in der Zellmasse festgestellt. Im Vergleich zur Referenz war die Zellmasse im LB-Medium um 76 % verringert, während sie bei 20 °C um 28 % verringert war. Es wurde kein Unterschied in der Zellmasse festgestellt, wenn eine IPTG-Konzentration von 0,2 mM vorlag. Die Ergebnisse zeigen, dass eine Reduzierung der IPTG-Konzentration einen positiven Einfluss auf die Proteinausbeute hatte.

Um die Proteinmenge in Abhängigkeit von der IPTG-Konzentration zu messen, wurde die Genexpression in *E. coli* B121 (DE3)-Zellen mit dem Plasmid pET-*CtMenK* mit verschiedenen Konzen-

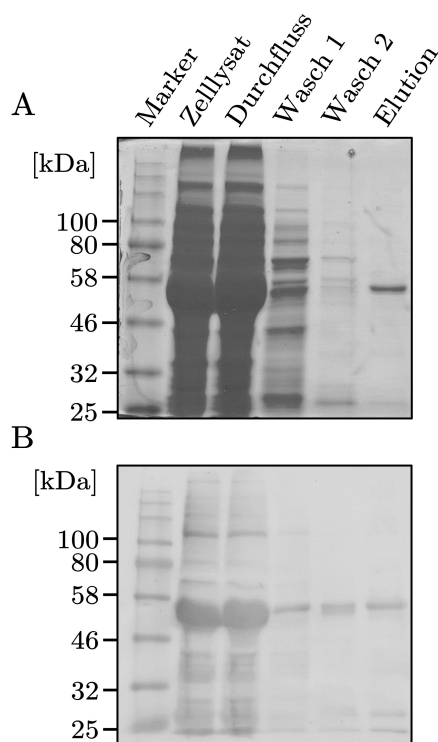


Abbildung 5.18: (A) SDS-PAGE und (B) Western-Blot der aufgereinigten Fraktionen der IMAC zur Aufreinigung von *AeMenK* aus *E. coli*. Die Trennung erfolgte unter Verwendung eines 12,5%igen SDS-Gels und 25 µg Gesamtzellprotein. Das His-getaggte *AeMenK* wurde mittels eines Immunoassays unter Verwendung eines primären anti-His-Antikörpers und eines sekundären HRP-gekoppelten Antikörpers nachgewiesen (Kap. 4.10.3, 4.10.4).

trationen von IPTG induziert. Die aufgetrennten Zellysate mittels SDS-PAGE zeigten bei IPTG-Konzentrationen von 0,05, 0,025, 0,01 und 0,005 mM keine Änderung der produzierten Proteinmenge (Abb. 5.19B). Nur die Abwesenheit von IPTG führte zu einer geringen oder keinen Produktion von *CtMenK*. Die aufgereinigten Proteinmengen aus den Kulturen, die mit IPTG-Konzentrationen von 0,05 bis 0,005 mM induziert wurden, zeigten im Vergleich zur Aufreinigung bei einer IPTG Konzentration von 0,2 mM keine signifikante Erhöhung der Proteinmenge. Überraschenderweise wies jedoch die Proteinaufreinigung von *CtMenK* aus der Kultur, die nicht induziert wurde, eine fünffach höhere Ausbeute als die Referenz auf. Die aufgereinigte Proteinmenge für *CtMenK* betrug 16 mg.

Um sicherzustellen, dass nicht eine noch niedrigere IPTG-Konzentration als 0,005 mM zu einer höheren Proteinproduktion führt, wurden Konzentrationen zwischen 5 und 1 μ M getestet (Abb. 5.19C). Die SDS-PAGE-Analyse der Zellysate ergab eine Abnahme der Proteinmenge ab 4 μ M IPTG. Allerdings führte dieser Effekt nicht zu einer Erhöhung der Proteinmenge in der Aufreinigung. Folglich war die Vermeidung einer IPTG-Induktion die optimale Methode, um die höchste aufreimbare

Menge an *CtMenK* zu erreichen.

Um zu prüfen, ob die Erkenntnis, dass die Verwendung von keinem IPTG zu einer höheren Proteinausbeute von *CtMenK* führt, auch auf andere MenK/MqnK/MenK2-Proteine anwendbar ist, wurde *E. coli* BL21 (DE3) mit den Plasmiden pET-*AeMenK*, pET-*AeMenK2*, pET-*CtMenK2* und *WsMqnK* transformiert. Die Expressionskulturen wurden nicht induziert und bei 30 °C weiter kultiviert, nachdem sie eine OD₆₀₀ von 0,5-0,6 erreicht hatten. Die Aufreinigungsfractionen wurden elektrophoretisch durch eine SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine *AeMenK2* (53,9 kDa) und *WsMqnK* (54,9 kDa) wiesen eine geringe Reinheit auf und lieferten nur eine geringe Proteinausbeute von 0,4 mg/L bzw. 4 mg/L TB-Kultur (Abb. 5.20). Die Proteinmenge von *AeMenK* (57,6 kDa) wurde zwar auf 20,8 mg/L TB-Kultur gesteigert, jedoch lässt sich vermuten, dass diese Menge auf Verunreinigungen in der Elutionsfraktion zurückzuführen ist. Nur die Proteine *CtMenK* und *CtMenK2* ließen sich in hoher Konzentration aufreinigen. Die Proteinmenge von *CtMenK* betrug 46 mg/L TB-Medium, während *CtMenK2* eine Proteinmenge von 43 mg/L TB-Medium aufwies. Die Reinheit beider Proteine konnte durch SDS-PAGE bestätigt werden (Abb. 5.20). Darüber hinaus zeigt

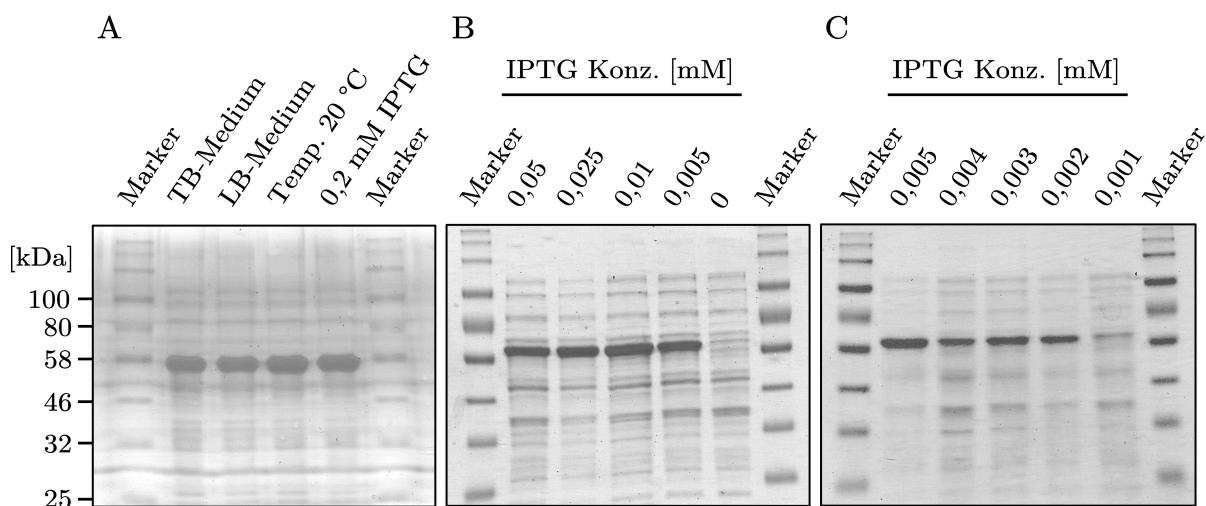


Abbildung 5.19: SDS-PAGE -Analyse von *E. coli* BL21 (DE3) *AeMenK* (A) und *CtMenK* (B, C) Zellysaten unter verschiedenen Expressionsbedingungen. Die Trennung erfolgte unter Verwendung eines 12,5%igen SDS-Gels und 25 μ g Gesamtzellprotein (Kap. 4.10.3).

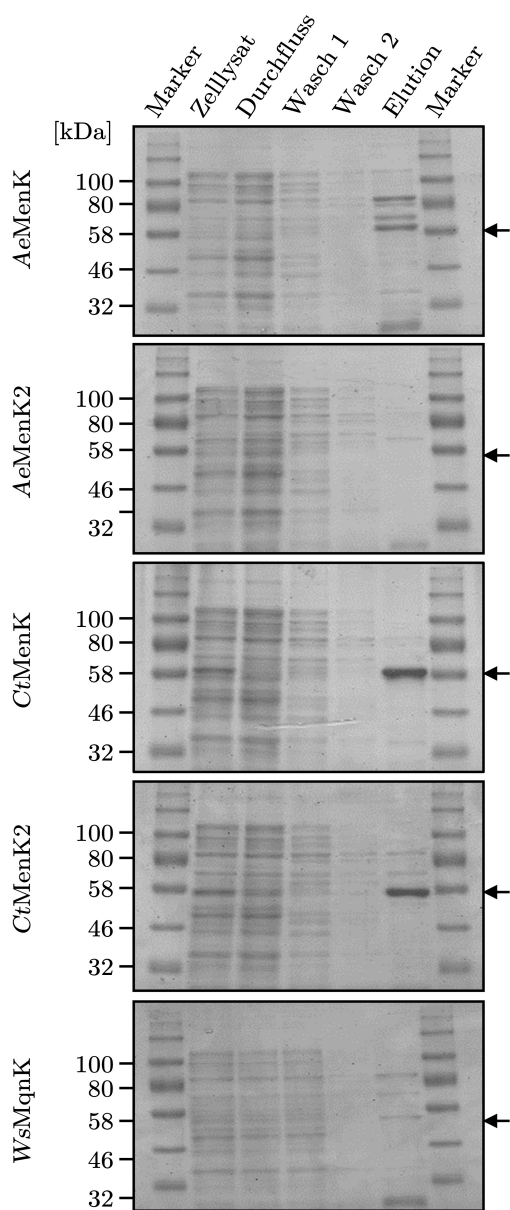


Abbildung 5.20: SDS-PAGE der aufgereinigten Fraktionen von *AeMenK* (57,6 kDa), *AeMenK2* (53,9 kDa), *CtMenK* (53,2 kDa), *CtMenK2* (54,1 kDa) und *WsMqnK* (54,9 kDa) aus nicht IPTG-induzierten *E. coli* Kulturen. Die Pfeile markieren die erwartete Größe der Proteine. Die Trennung erfolgte unter Verwendung eines 12,5%igen SDS-Gels und 25 µg Gesamtzellprotein (Kap. 4.10.3).

te sich eine ausgeprägte Proteinproduktion von *CtMenK* (53,2 kDa) und *CtMenK2* (54,1 kDa) in der Zellysat-Fraktion, selbst ohne die Zugabe von IPTG als Induktor.

Um eine vergleichbare Proteinausbeute für *AeMenK* und *AeMenK2* zu erzielen, wurde ein neuer Ansatz verfolgt. Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass die Plasmide von *AeMenK* und *AeMenK2* für eine ausreichende Proteinproduktion von IPTG abhängig sind. Daher wurde versucht, die Expressionsstärke des T7-Promotors zu reduzieren, um eine Aggregation der Proteine zu vermeiden. Durch ortsgerichtete Mutagenese der letzten 5 Basen in der T7-Promotorsequenz im Plasmid pET-*AeMenK/AeMenK2* zu TTTGA (T24) und CTCTG (T29) kann die Expression reguliert werden (Kap. 4.9.6). Es wurde bereits nachgewiesen, dass T24 zu einer um 31 % geringeren Expression im Vergleich zum nativen T7-Promotor führte, während T29 eine Reduktion von 75 % zeigte (Yiyuan 2019).

Unter Verwendung von pET-*AeMenK_T29* und einer Induktion von 0,25 mM IPTG wurde eine Proteinausbeute von 8 mg/L TB-Kultur erzielt, doppelt so hoch wie mit dem nativen T7-Promotor. Bei *AeMenK2* wurde hingegen keine Steigerung beobachtet. Die Plasmide pET-*AeMenK_T24* und pET-*AeMenK2_T24* erwiesen sich als ungeeignet für die Produktion von *AeMenK* und *AeMenK2*, da die Proteinausbeuten ähnlich wie beim nativen Promotor waren, unabhängig von variierenden IPTG-Konzentrationen (0,25, 0,025, 0,0025 und 0 mM). Aufgrund der besseren Aufreinigung wurden daraufhin weitere Experimente vor allem mit den Proteinen *CtMenK* und *CtMenK2* durchgeführt.

5.4.2 Massenbestimmung von *CtMenK*

Um Informationen über die Masse und mögliche Oligomerisierungszustände von MenK/MqnK/MenK2 zu erhalten, wurden verschiedene Methoden verwendet, um die Masse zu bestimmen. Dazu wurden die gereinigten Proteine *AeMenK*, *CtMenK* und *CtMenK2* mittels Größenausschluss-Chromatographie (SEC) aufgetrennt. Die aufgetrennten Proteinfractionen wurden bei 280 nm detektiert.

Die SEC-Analyse von *AeMenK* mit einer berech-

neten molekularen Masse von 57,6 kDa zeigte nicht nur einen Elutionsmaximum, sondern mehrere überlappende Elutionsmaxima (Abb. 5.21). Eine Identifikation von vier Proteinspezies gelang durch die Anwendung von Dekonvolution auf die überlagerten chromatographischen Maxima, die durch ein Gauß'sches Modell modelliert wurden.

Das erste Maximum hatte eine apparente molekulare Masse von 42,4 kDa, das zweite Maximum von 72,2 kDa, das dritte Maximum von 155,7 kDa und das vierte Maximum von 262,6 kDa. Das zweite Maximum besaß die höchste Absorption. Auffällig war auch ein Maximum bei einem Retentionsvolumen von 41 ml, der eine apparente

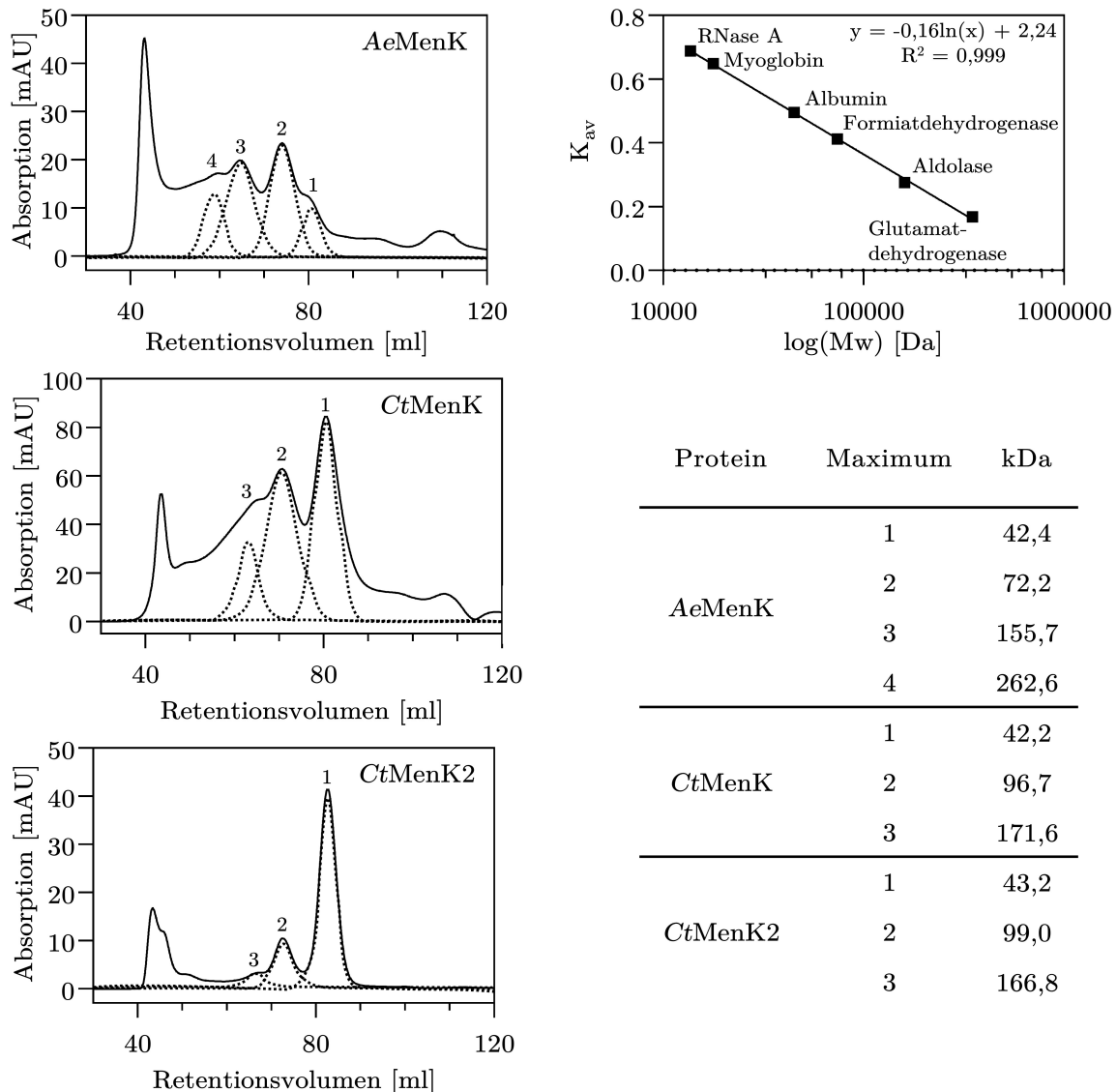


Abbildung 5.21: Bestimmung der apparenten molekularen Massen von AeMenK (8 mg), CtMenK (30 mg) und CtMenK2 (15 mg) mittels SEC. Die gestrichelten Linien kennzeichnen die dekonvolvierten Maxima der Proteinspezies, die jeweils nummeriert sind. Die Berechnung der apparenten molekularen Massen erfolgte unter Verwendung einer Kalibrierungsgeraden, die aus sechs Proteinen mit bekannten molekularen Massen erstellt wurde (siehe Kapitel 4.10.6). K_{av} , Verteilungskoeffizient.

molekulare Masse von mehr als 1000 kDa aufwies. *CtMenK* mit einer berechneten molekularen Masse von 53,2 kDa wies ein abweichendes Elutionsmuster im Vergleich zu *AeMenK* auf, da nur 3 dominante Elutionsmaxima identifiziert wurden (Abb. 5.21). Dabei war Maximum 1 am deutlichsten ausgeprägt und hatte eine apparente molekulare Masse von 42,2 kDa. Das zweite Maximum hatte eine apparente molekulare Masse von 96,7 kDa und das dritte Maximum von 171,6 kDa, wobei die Absorption mit den Maxima abnahm. Ähnlich wie bei *AeMenK* war auch bei 41 min ein weiteres Elutionsmaximum zu erkennen.

Bei *CtMenK2* mit einer berechneten molekularen Masse von 54,1 kDa wurden ebenfalls drei Elutionsmaxima identifiziert (Abb. 5.21). Allerdings zeigte Maximum 1 die höchste Absorption, während Maximum 2 und 3 eine deutlich geringere Absorption aufwiesen. Auch das Elutionsmaximum bei 41 min war im Vergleich zu *AeMenK* und *CtMenK* schwächer ausgeprägt. Die apparenten molekularen Massen der Maxima betragen 43,2 kDa (Maximum 1), 99,0 kDa (Maximum 2) und 166,8 kDa (Maximum 3). Aufgrund ihrer apparenten molekularen Masse lassen die Maxima in den Proben von *AeMenK* und *CtMenK* auf eine Oligomerisierung schließen, was darauf hindeutet, dass Monomere, Dimere, Trimere und sogar Tetramere vorhanden waren. Es ist jedoch zu beachten, dass die Oligomerisierung, insbesondere bei *AeMenK* und *CtMenK*, bis zur Auflösungsgrenze der SEC-Säule auftrat, während dies bei *CtMenK2* nicht der Fall war. Um die beobachteten Oligomerisierungszustände der MenK-Proteine zu bestätigen, wurde *AeMenK* mittels nativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Nativ-PAGE) aufgetrennt und die ersten drei gereinigten Maximumfraktionen aus der SEC aufgetragen. Bei der elektrophoretischen Auftrennung von *AeMenK* wurden in der Nativ-PAGE ebenfalls mehrere Oligomerisierungssignale beobachtet (Abb. 5.22A). Das erste Signal wurde bei 44 kDa sichtbar und zeigte aufgrund der niedrigen Proteinkonzentration vom ersten Maximum eine niedrige Intensität. In den Fraktionen war dieses Signal nicht mehr erkennbar, vermutlich aufgrund der intensiveren Prozessierung der Proben durch die SEC. Ein zweites Signal von deutlich stärkerer Intensität zeigte sich bei 76 kDa, während das

dritte Signal eine Größe von 160 kDa aufwies. Die molekularen Massen, die durch native-PAGE bestimmt wurden, stimmten mit den Ergebnissen der SEC überein. Um sicherzustellen, dass es sich nicht um Verunreinigungen aus der Proteinaufreinigung handelte, wurden alle Proben zusätzlich einer SDS-PAGE unterzogen (Abb. 5.22B). Dabei wurde sowohl in der Proteinklösung als auch in den Proben der Fraktionen nur eine Proteinspezies beobachtet, das der Größe von *AeMenK* entspricht. Die gleichen Beobachtungen wurden auch für *CtMenK* gemacht (nicht gezeigt).

Zur Bestimmung der exakten Molekülmasse eines *CtMenK*-Monomers und zur Erkennung möglicher Modifikationen wurde die Molekülmasse mittels MALDI-TOF- und Elektrospray-Ionisation (ESI) Massenspektrometrie gemessen (Abb. 5.22C, D). Die MALDI-TOF-Analyse zeigte zwei Hauptmaxima mit Masseneinheiten von 27 537 und 55 073 Da. Die ESI-MS von *CtMenK* ergab eine geringfügige Abweichung von 3 Da gegen über der MALDI-TOF-Analyse, wobei die Masse bei 55 070,65 Da lag. Die errechnete Masse für *CtMenK* mit His-Tag betrug 54 923,64 Da, basierend auf der mittleren Isotopenzusammensetzung. Dies ergab eine Abweichung von 147,01 Da im Vergleich zur Masse, die durch die Massenspektrometrie ermittelt wurde. Diese Diskrepanz könnte auf die aerobe Reinigung und die damit verbundene Oxidation von Aminosäuren zurückzuführen sein. Des Weiteren könnten auch Hydroxylierungen sowie potenzielle Substitutionen dazu beitragen. Um diese Hypothesen zu klären, wurde das Plasmid aus dem Produktionsstamm isoliert und das *Ctmenk*-Gen wurde einer Sequenzierung unterzogen. Dabei wurden keine Substitutionen festgestellt.

5.4.3 Proteinstabilität von MenK

Aufgrund vorheriger Beobachtungen zur Oligomerisierung von MenK- und MenK2-Proteine wurden weitere Untersuchungen zu diesem Thema durchgeführt. Dabei wurde der Zustand der Oligomere während einer schrittweisen Erhöhung von Harnstoff und Guanidinium-Hydrochlorid mittels SEC beobachtet. Sowohl Harnstoff als auch Guanidinium-Hydrochlorid haben eine

denaturierende Wirkung auf Proteine und sollten in diesem Experiment eine Dissoziation der Oligomere hervorrufen.

Es wurde eine graduelle Steigerung der Konzentration von Harnstoff bis zu 8 M durchgeführt (Abb. 5.23A). Die Erhöhung der Harnstoffkonzentration führte zu einer Verringerung der Retentionszeit, was auf eine verstärkte Oligomerisierung hindeutete. Dieses Phänomen wurde bis zu einer Konzentration von 6 M beobachtet. Bei einer Harnstoffkonzentration von 8 M schien es jedoch zu einer vollständigen Denaturierung und Entfaltung der Proteine sowie zur Auflösung

der meisten Oligomere zu kommen. Die gleichen Beobachtungen, nämlich die Oligomerisierung bei Konzentrationen bis zu 4 M und Denaturierung bei 6 und 8 M Harnstoff, wurden auch mittels Nativ-PAGE gemacht (Abb. 5.23B). Zur Verifizierung wurde ein zweites Denaturierungsmittel, Guanidinium-Hydrochlorid, bis zu einer Konzentration von 6 M verwendet. Auch mit Guanidinium-Hydrochlorid wurde eine verstärkte Oligomerisierung beobachtet, die mit zunehmender Konzentration einherging (Abb. 5.23C). Jedoch wurde bei hohen Konzentrationen keine Denaturierung festgestellt. Insgesamt wurde

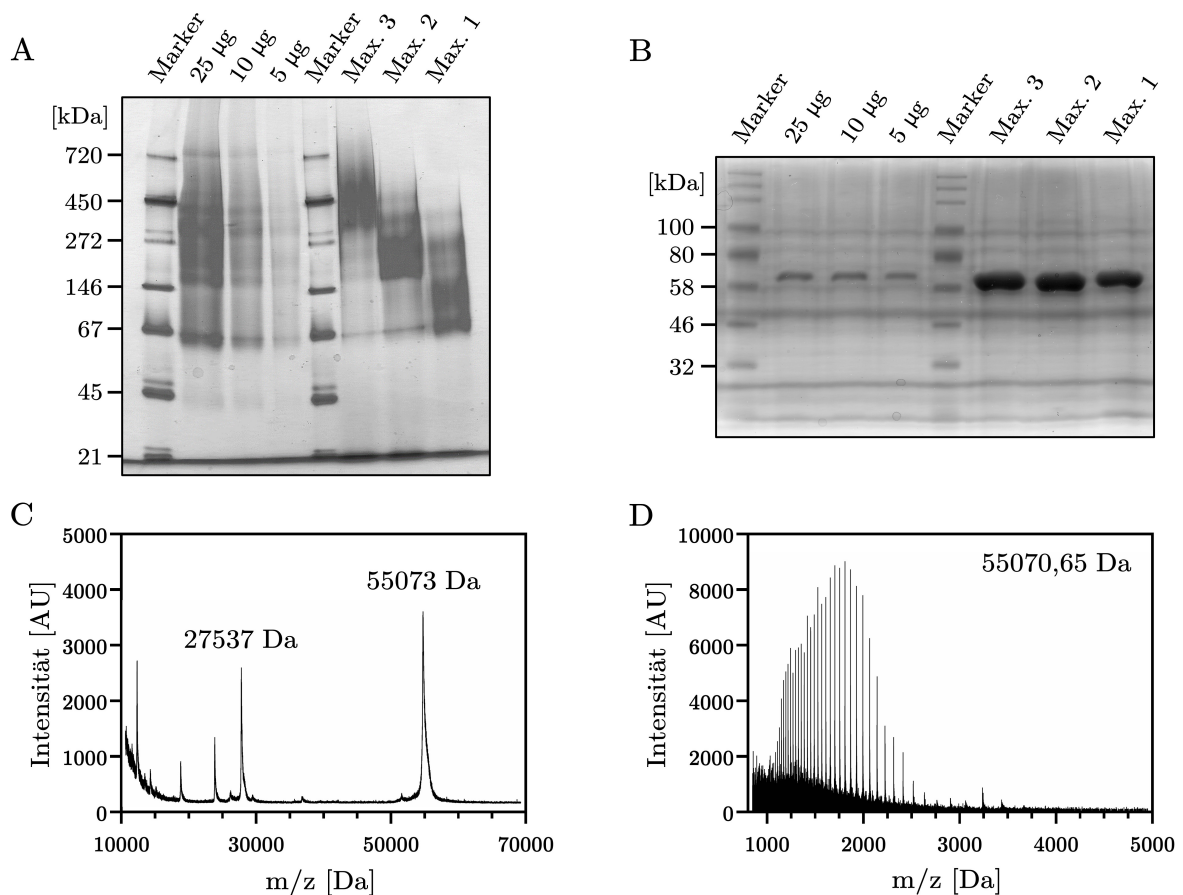


Abbildung 5.22: Massenbestimmung von *AeMenK* und *CtMenK*. (A) Elektrophoretische Auftrennung von gereinigtem *AeMenK* und SEC-Elutionsmaxima mittel (A) Nativ-PAGE und (B) SDS-PAGE. Die Trennung wurde mithilfe von 4-16 %igen Nativgelen und 12,5 %igen SDS-Gelen durchgeführt, wobei 25 µg Protein verwendet wurden, sofern nicht anders angegeben (Kap. 4.10.3, 4.10.5). (C) MALDI-TOF Massenspektrum von monomerem *CtMenK* und (D) Nicht-dekonvolviertes ESI-Spektrum im positiven Ionisierungszustand.

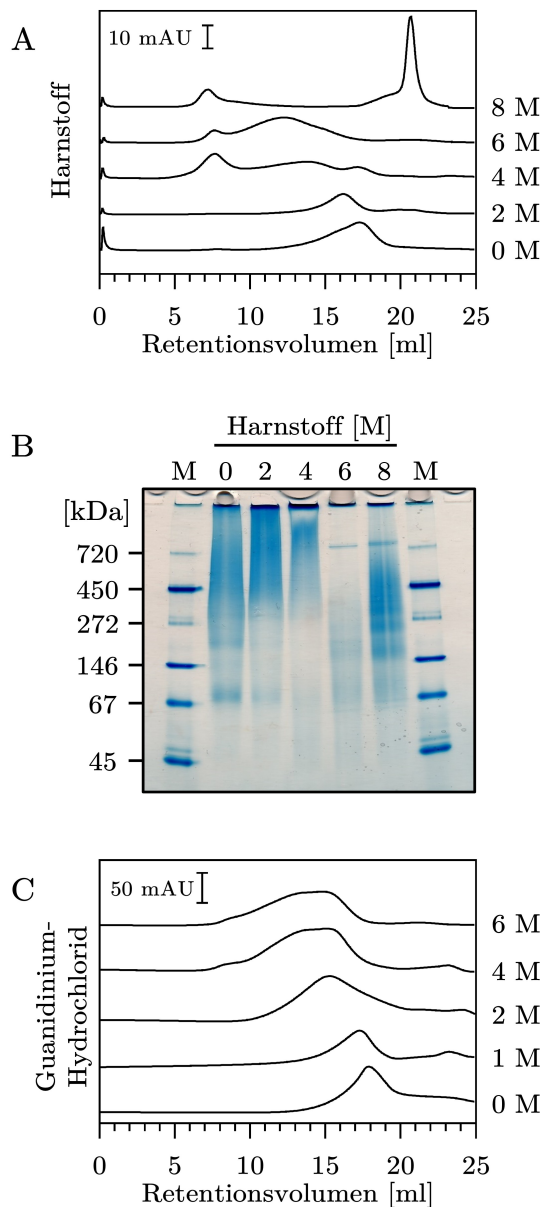


Abbildung 5.23: Denaturierungsexperimente mit *CtMenK* (3 mg/ml): (A) SEC und (B) Nativ-PAGE von *CtMenK*, das mit Harnstoff behandelt wurde, bei Konzentrationen von 8, 6, 4 und 2 M. Für die Nativ-Page wurde ein 4-16 % Nativgel mit einer Proteinmenge von 25 μ g verwendet (Kap. 4.10.5). (C) SEC von *CtMenK*, das mit Guanidiniumhydrochlorid behandelt wurde, bei Konzentrationen von 6, 4, 2 und 1 M (Kap. 4.10.6).

keine Auflösung der oligomeren Zustände in Dimere oder Monomere beobachtet, sondern nur eine verstärkte Oligomerisierung.

Um einen möglichen Einfluss der Proteinkonzentration auf die Oligomerisierung zu überprüfen, wurde *CtMenK* durch die Verwendung von unterschiedlichen Imidazolkonzentrationen in einem Bereich von 2 mg/ml bis 15 mg/ml aufgereinigt und anschließend mittels SEC untersucht (Abb. 5.24A). Es wurde festgestellt, dass unabhängig von der Konzentration eine gleichbleibende Oligomerisierung auftrat und es wurden keine Unterschiede festgestellt. Zusätzlich wurde die Stabilität der *CtMenK*-Proteinlösung mittels SEC untersucht. Es wurde festgestellt, dass nach Lagerung bei -80°C sowohl monomeres als auch oligomeres Protein ausfiel und eine signifikante Abnahme der Absorption auftrat (Abb. 5.24B). Nach Zugabe von 10 % Glycerin zur Proteinlösung wurde nach Lagerung bei -80°C ein reduzierter Proteinverlust im Vergleich zur Kontrolle beobachtet. Im Gegensatz dazu zeigte das isolierte Monomer von *CtMenK* ohne Anwesenheit von Oligomeren eine deutlich verbesserte Stabilität über 24 Stunden bei 4°C und nach Lagerung bei -80°C ohne Zugabe von Glycerin (Abb. 5.24C).

Zur Untersuchung der Proteininstabilität des monomeren *CtMenK* und zur Ableitung möglicher struktureller Eigenschaften wurde ein Thermal Shift Assay (TSA) durchgeführt. Hierbei wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYPRO Orange verwendet, der mit den hydrophoben Bereichen des Proteins wechselwirkt. Durch schrittweise Erhöhung der Temperatur wurde das Protein denaturiert und so die inneren hydrophoben Bereiche freigelegt. Die Interaktion der hydrophoben Bereiche mit SYPRO Orange wurde durch Fluoreszenzmessungen erfasst, wodurch eine proteinspezifische Schmelzkurve erhalten wurde. Das monomere *CtMenK* zeigte eine hohe Startfluoreszenz, die mit zunehmender Temperatur abnahm (Abb. 5.25A). Dies deutet auf eine hohe Anzahl von hydrophoben Aminosäuren hin, die sich an der Proteinoberfläche befinden und direkt mit SYPRO Orange interagieren, ohne denaturiert zu werden. Durch eine längere Haltezeit bei Erhöhung der Temperatur wurde die Ausgangsfluoreszenz reduziert, um vergleichbare

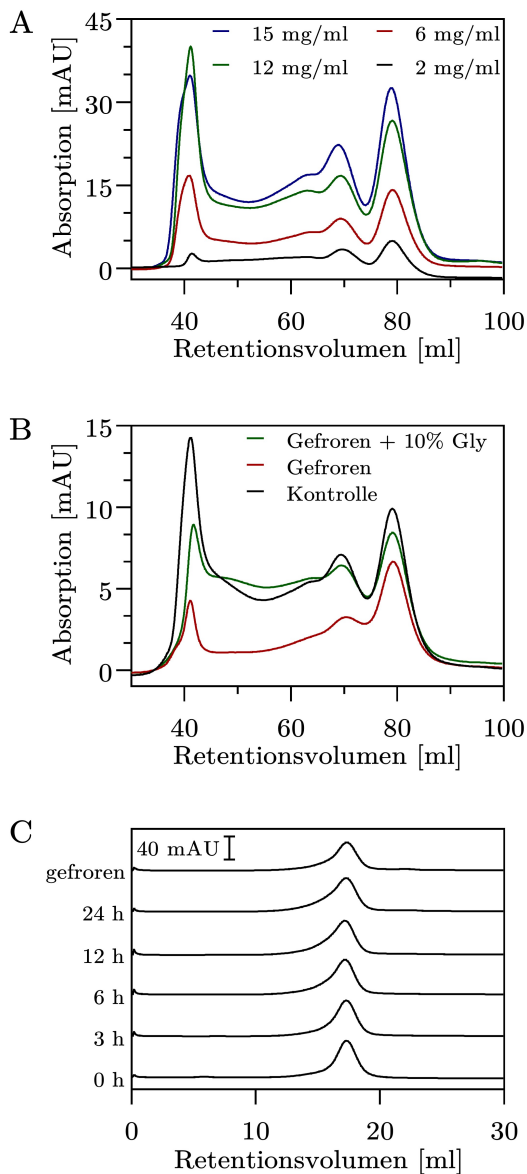


Abbildung 5.24: SEC mit oligomerem und monomeren *CtMenK*. (A) Untersuchung der Oligomerisierung von *CtMenK* in Abhängigkeit der aufgereinigten Proteinkonzentration von 15 mg/ml bis 2 mg/ml. (B) Untersuchung der Oligomerisierung von *CtMenK* in Abhängigkeit der Lagerung bei -80°C und der Zugabe von 10% Glycerin. (C) Stabilität von isoliertem monomeren *CtMenK* bei 4°C über 24 h und nach Lagerung bei -80°C (Kap. 4.10.6).

Schmelzkurven zu erhalten (Abb. 5.25B).

Es gibt verschiedene Faktoren, die die thermische Stabilität von Proteinen beeinflussen können, darunter der pH-Wert und die Art des Puffersystems. Aus diesem Grund wurden mehrere Tests mit unterschiedlichen Puffersystemen mit einer Konzentration von 50 mM durchgeführt, wobei sich Tris, Phosphat und BisTris als am geeignetsten erwiesen. Der pH-Wert wurde in Intervallen von 0,5 eingestellt, wobei der Bereich von 7 bis 9 durch den Tris- und Phosphat-Puffer abgedeckt wurde, während der Bereich von 6 bis 8 vom BisTris-Puffer abgedeckt wurde. Um diese Puffersysteme miteinander zu vergleichen, wurde die Schmelztemperatur (T_m) über die erste Ableitung der Fluoreszenzemission als Funktion der Temperatur ($-dF/dT$) berechnet (Kap. 4.10.7).

In Bezug auf das Tris-Puffersystem zeigte sich ein eindeutiger Trend bezüglich des T_m -Werts, wobei die thermische Stabilität mit zunehmendem pH-Wert abnahm. Ein pH-Wert von 7 wies den höchsten T_m -Wert auf (Abb. 5.25C). Im Gegensatz dazu zeigten die Phosphat- und BisTris-Puffersysteme keinen signifikanten Unterschied im T_m -Wert in Abhängigkeit vom pH-Wert (Abb. 5.25D; E). Dennoch wurde das Maximum für Phosphat bei einem pH-Wert von 6 und für BisTris bei einem pH-Wert von 6,5 erreicht (Abb. 5.25F). Insgesamt deuten alle Puffersysteme daraufhin, dass die maximale thermische Stabilität des monomeren *CtMenK* zwischen pH 6 und pH 7 liegt.

Bisher kam Tris-Puffer bei der Reinigung oder im MenK-Enzymassay zum Einsatz. Zusätzliche Untersuchungen wurden mittels des TSA durchgeführt, um den Einfluss der Puffer- und NaCl-Konzentration auf monomeres *CtMenK* zu untersuchen. Dabei wurde monomeres *CtMenK* in einem Tris-Puffer mit einem pH-Wert von 7 verwendet. Die thermische Stabilität von *CtMenK* wurde bei Tris-Pufferkonzentrationen von 0 mM bis 300 mM und einer NaCl-Konzentration von 50 mM gemessen (Abb. 5.26A). Es stellte sich heraus, dass die Tris-Konzentration keinen Einfluss auf den T_m -Wert hatte, jedoch wurde deutlich, dass Tris für eine höhere thermische Stabilität benötigt wird.

Um den Einfluss der NaCl-Konzentration zu untersuchen, wurden NaCl-Konzentrationen von

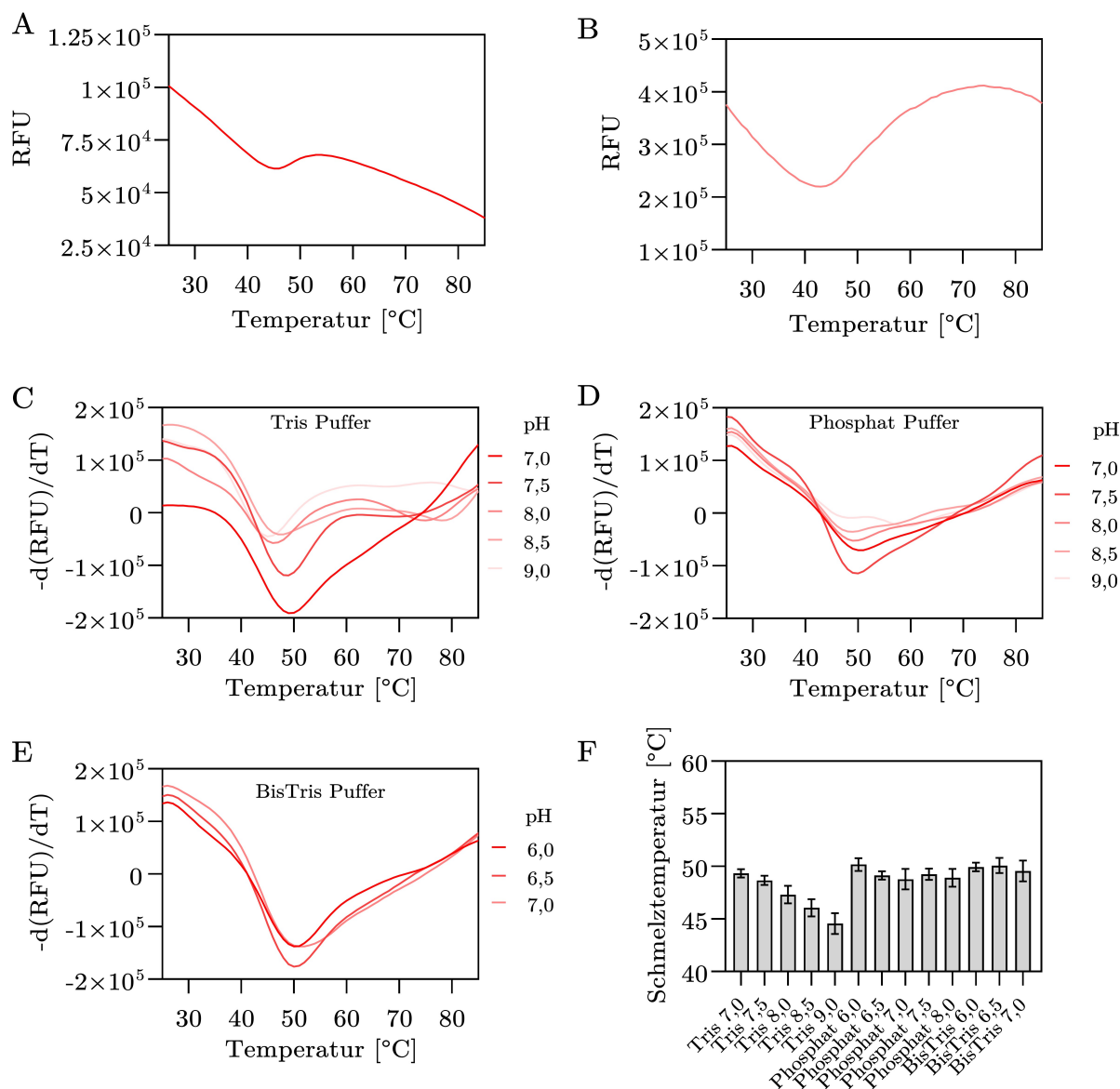


Abbildung 5.25: Einfluss des Puffersystems und des pH-Wertes auf die thermische Stabilität von monomerem *CtMenK* (0,5 mg/ml). (A) Schmelzprofil von monomerem *CtMenK* vor der Optimierung der TSA-Methode und (B) nach der Optimierung. Die abgeleiteten Schmelzprofile von monomerem *CtMenK* in den Puffersystemen (C) Tris, (D) Phosphat und (E) BisTris mit jeweils einer Konz. von 50 mM und varrierendem pH-Wert. (F) Schmelztemperaturen in Abhängigkeit der verschiedenen Puffersysteme und pH-Werte. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen von drei unabhängigen Messungen. RFU (Relative Fluorescence Unit) fungiert als Maßeinheit zur Darstellung der relativen Fluoreszenzintensität eines Fluoreszenzfarbstoffs.

0 mM bis 400 mM und eine Tris-Konzentration von 50 mM verwendet (Abb. 5.26B). Es zeigte sich, dass die NaCl-Konzentration kaum Auswirkungen auf die thermische Stabilität von CtMenK hatte. Erst ab einer NaCl-Konzentration von 300 mM wurde ein positiver Effekt beobachtet, der den Tm-Wert von 49,2 auf 51,0°C im Vergleich zur 0 mM-Kontrolle erhöhte. Bei niedrigeren Konzentrationen wurden keine Veränderungen im Tm-Wert festgestellt.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass das CtMenK-Protein in einem pH-Bereich von 6 bis 8 thermisch stabil war. Lediglich im Tris-Puffer zeigte CtMenK bei einem pH-Wert von 7 die höchste thermische Stabilität. Eine minimale Pufferkonzentration von 50 mM war erforderlich, während die NaCl-Konzentration nur einen geringfügigen positiven Einfluss zu haben schien. Dies ermöglicht einen breiten variablen Bereich für

die optimale Pufferzusammensetzung basierend auf der thermischen Stabilität von CtMenK.

5.4.4 MenK-Enzymassay mit CtMenK

Um eine eingehendere Untersuchung der MenK/MqnK/MenK2-Enzyme, insbesondere im Hinblick auf den Reaktionsmechanismus, durchzuführen, wurde ein Enzymassay für MenK entwickelt (Hein 2019). Dieser Assay ist ein *in vitro*-Test, der die Methylierung von MK durch MenK/MqnK/MenK2-Enzyme in einer lipidfreien Umgebung ermöglicht. Als Elektronendonator für die MenK/MqnK/MenK2-Enzyme wird NADPH in Kombination mit dem natürlichen Flavodoxin-Reduktase (Fpr)/Flavodoxin (FldA)-Redoxsystem von *E. coli* verwendet.

NADPH wird durch Fpr oxidiert, wodurch

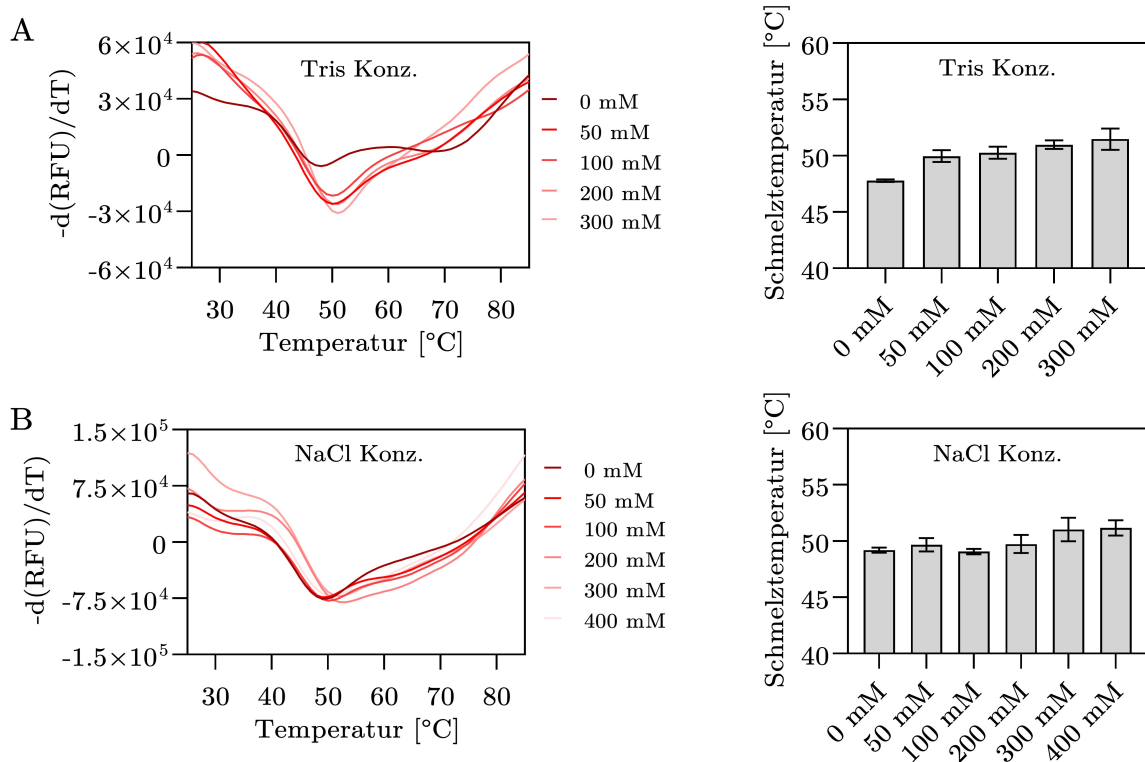


Abbildung 5.26: Einfluss der Puffer- und NaCl-Konzentration auf die thermische Stabilität von monomerem CtMenK. Die abgeleiteten Schmelzprofile in Abhängigkeit von (A) der Pufferkonzentration und (B) der NaCl-Konzentration, basierend auf den Daten des Protein Thermal Shift Assay. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen von drei unabhängigen Messungen.

zwei Elektronen auf den Fpr-Kofaktor FAD übertragen werden. Das reduzierte Fpr ist in der Lage, die Elektronen auf den Kofaktor FMN des Flavodoxins FldA zu übertragen. In seiner reduzierten Form fungiert FldA in biologischen Systemen als Elektronendonator für verschiedene Proteine. Innerhalb dieses spezifischen Systems erfolgt die Elektronenübertragung auf die Enzyme MenK/MqnK/MenK2 durch FldA (Abb. 5.27). Die Gene für FPR und FldA wurden aus *E. coli* MG1655 amplifiziert und mittels des pET-Expressionssystems in *E. coli* BL21 (DE3) expremiert (Kap. 4.10.1). Um die Proteine FPR und FldA mit ihren Kofaktoren FAD und FMN zu beladen, wurden jeweils 50 µM des entsprechenden Kofaktors zu den Proteinlösungen hinzugegeben, bevor die Proteinaufreinigung

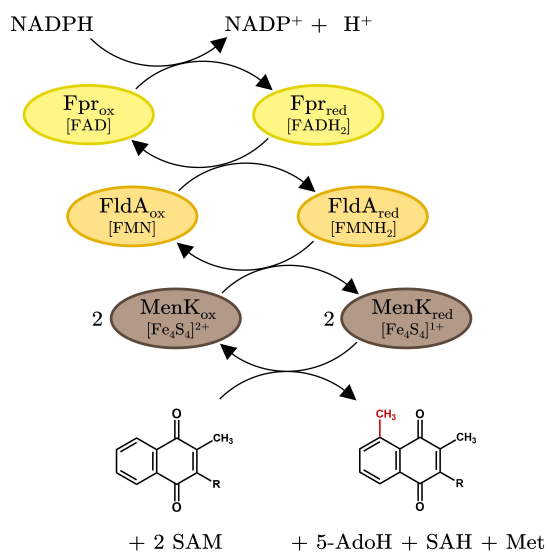


Abbildung 5.27: Schematische Darstellung des MenK-Enzymassays unter Einsatz des natürlichen Fpr/FldA-Redoxsystems. Hierbei erfolgt die Oxidation von NADPH durch Fpr, wobei die Elektronen auf FldA übertragen werden. Subsequent erfolgt die Elektronenübertragung von FldA auf MenK. Unter Anwesenheit von SAM führt MenK daraufhin die Methylierung von Menachinon durch. R, Isopren-Seitenkette; Fpr, Flavodoxin-Reduktase; FldA, Flavodoxin; 5-Ado, 5'-Desoxyadenosin; MTA, Methylthioadenosin. Modifiziert nach Hein 2019.

durchgeführt wurde. Die Proteine wurden über ihren C-terminalen His-Tag aufgereinigt und ihre Reinheit wurde mittels SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse bestätigt (Fpr, 31,5 kDa; FldA, 23,6 kDa) (Abb. 5.28A, B). Der Einbau der Kofaktoren wurde mittels UV/VIS-Spektroskopie durch die charakteristischen Maxima von FAD und FMN bei 398 und 456 nm, sowie 369 und 466 nm verifiziert. (Abb. 5.28C). Die Ausbeute an Fpr betrug 134 mg/l TB-Medium und an FldA 70 mg/l TB-Medium.

Während des Reinigungsprozesses kam das gereinigte *CtMenK* mit Sauerstoff in Berührung, was zur Oxidation des [Fe₄S₄]-Clusters führte. Um die katalytische Aktivität von *CtMenK* wiederherzustellen, war eine Rekonstitution des [Fe₄S₄]-Clusters erforderlich (Kap. 4.10.9). Hierfür wurde das Protein unter anaeroben Bedingungen mit DT, Ammoniumeisen(II)-sulfat und Sulfid behandelt. Die Rekonstitution des [Fe₄S₄]-Clusters wurde durch UV/VIS-Spektroskopie überprüft, da ein Absorptionsmaximum im Bereich von 400-420 nm für einen solchen Cluster charakteristisch ist (Abb. 5.29A). Zudem wurde ein Farbumschlag von der Proteinlösung von leicht rötlich zu dunkel braun bis schwarz beobachtet (Abb. 5.29B).

Die Unlöslichkeit von MK₈ oder MK₆ in Wasser stellt eine erhebliche Herausforderung für den MenK-Enzymassay dar und macht Menachinone mit langen Polyisopren-Seitenketten ungeeignet für einen MenK-Enzymassay. Um dieses Problem zu überwinden, wurde MK₄ verwendet, da es im Vergleich zu MK₈ geringere hydrophobe Eigenschaften aufweist. Es wurde dem MenK-Enzymassay in einer Lösung aus DMSO und Isopropanol zugesetzt. Im MenK-Enzymassay wurden neben MK₄ die Komponenten SAM, Fpr, FldA und *CtMenK* verwendet (Kap. 4.10.10). Nachfolgend erfolgte die Analyse des Enzymansatzes mittels HPLC, wobei neben MK₄ sowohl 8-MMK₄ als auch 5,8-DMMK₄ nachgewiesen wurden (Abb. 5.29C, E, F). Dies stimmt mit den Beobachtungen der Produktion von *CtMenK* in *E. coli* mit 8-MMK₈ und 5,8-DMMK₈ überein. Insgesamt wurden 21,5 % ± 5,1 % des MK₄-Substrats zu 8-MMK₄ (13,9 %) bzw. 5,8-DMMK₄ (7,6 %) innerhalb von 12 h umgesetzt.

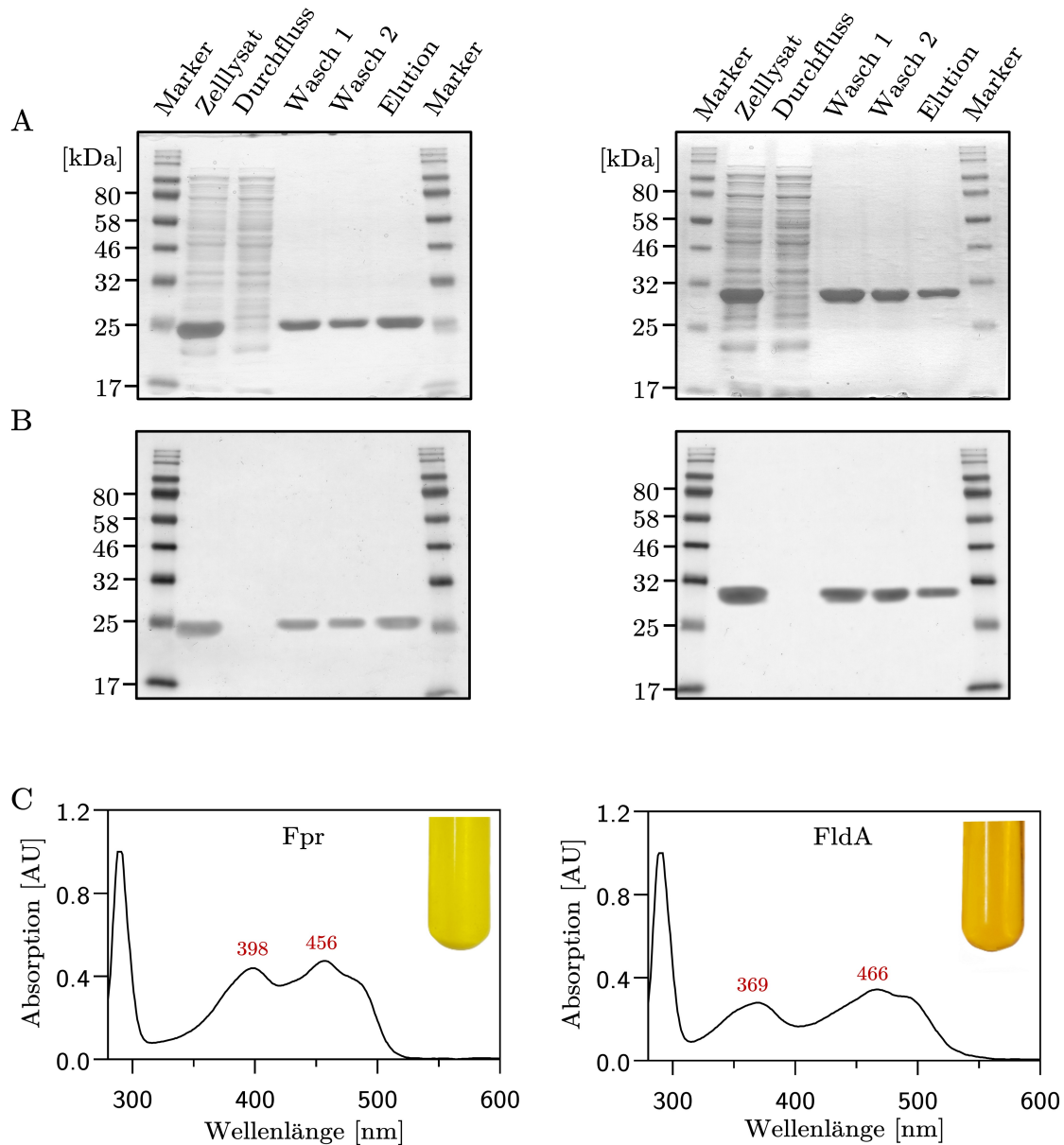


Abbildung 5.28: Reinigung und UV/VIS-Spektroskopie von Fpr und FldA. (A) SDS-PAGE-Analyse der Fpr- (links) und FldA-Reinigung (rechts). Die Trennung erfolgte unter Verwendung eines 12,5%-igen SDS-Gels mit einer Beladung von 25 μg Gesamtzellprotein und 10 μg Protein (Wasch, Elution). (Kap. 4.10.3). (B) Western-Blot-Analyse der Fpr- und FldA-Reinigung. Nach dem Transfer auf eine PVDF-Membran wurden die His-getagten Proteine mittels Immunassays unter Verwendung eines primären Anti-His-Antikörpers und eines sekundären HRP-gekoppelten Antikörpers nachgewiesen (Kap. 4.10.4). (C) UV/VIS-Spektren von Fpr und FldA (1,6 mg/ml) mit den charakteristischen Maxima der Kofaktoren FAD und FMN bei 398 und 456 nm, sowie 369 und 466 nm. In der oberen rechten Ecke sind Bilder der Proteinlösungen abgebildet.

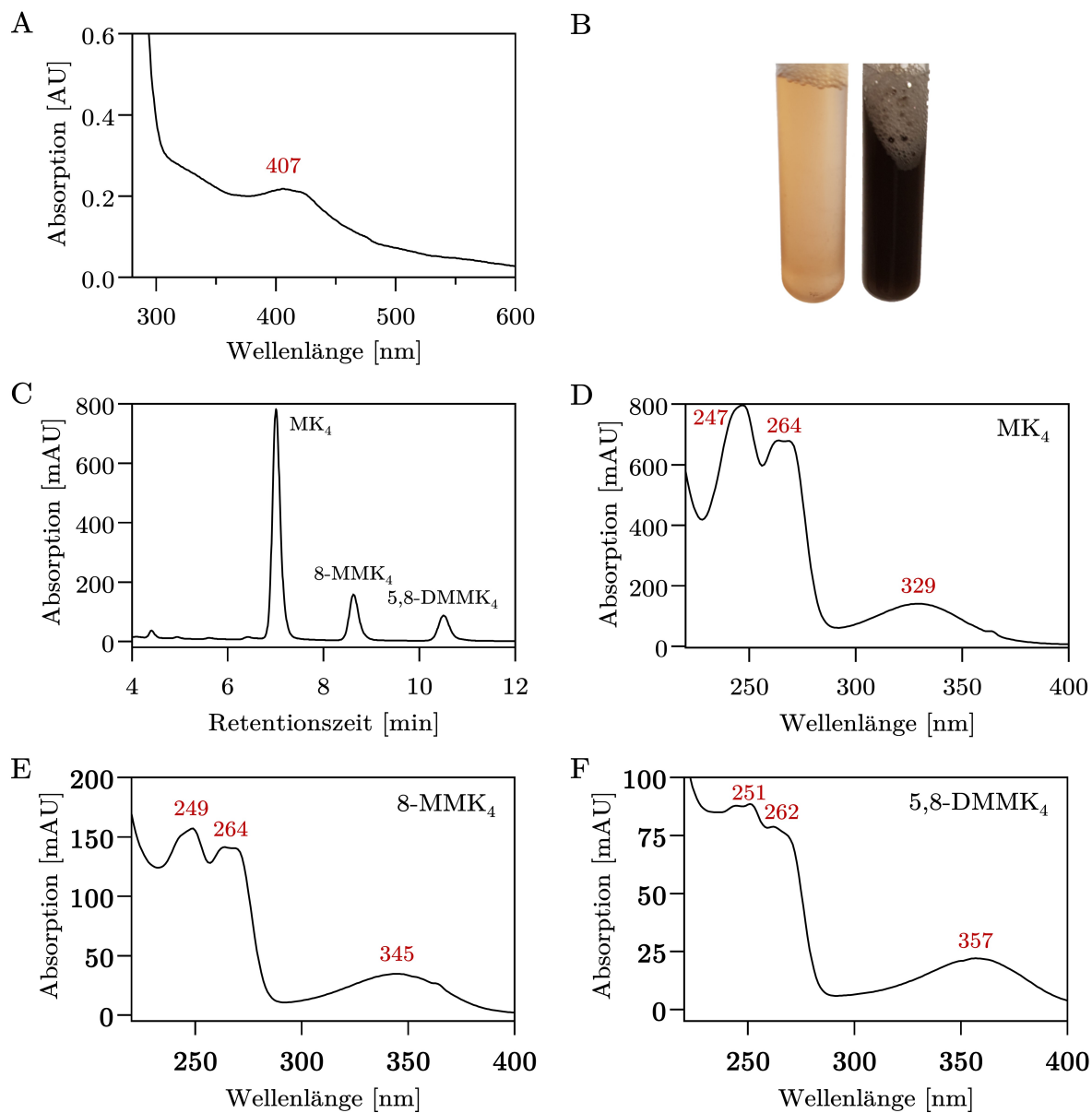


Abbildung 5.29: Rekonstitution und Enzymassay von *CtMenK*. (A) UV/VIS-Spektrum des rekonstituierten *CtMenK*-Enzyms mit dem charakteristischen Absorptionsmaximum des [Fe₄S₄]-Clusters zwischen 400 und 420 nm (Kap. 4.10.9). (B) Farbänderung der *CtMenK*-Proteinlösung (5 mg/ml) vor (hellrot) und nach der Rekonstitution (dunkelbraun bis schwarz). (C) HPLC-Chromatogramm des *CtMenK*-Enzymassays mit MK₄ als Substrat und den dazugehörigen UV/VIS-Spektren von (D) MK₄ sowie den erzeugten Produkten (E) 8-MMK₄ und (F) 5,8-DMMK₄ (Kap. 4.10.10). Das HPLC-Chromatogramm wurde bei 249 nm aufgenommen.

5.4.5 Inhibition von *CtMenK*

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass der MenK-Enzymassay bisher nur begrenzte Aktivität aufweist (Hein 2019). Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass die enzymatische Reaktion durch die entstehenden Reaktionsprodukte gehemmt wird. Bei der Methylierungsreaktion von MenK entstehen neben den methylierten Derivaten auch *S*-Adenosylhomocystein (SAH) und 5'-Deoxyadenosin (5-Ado). Darüber hinaus kann SAM bei längerer Lagerung oder unter Bedingungen mit einem pH-Wert über 1,8 und erhöhten Temperaturen zu 5'-methylthioadenosine (MTA) oder SAH zerfallen (Farooqui *et al.*, 1983). Im Verlauf des MenK-Enzymassays kommt es daher vermutlich zu einer zunehmenden Anreicherung von 5-Ado, SAH und MTA.

Es wurde beobachtet, dass sowohl SAH als auch 5-Ado eine inhibitorische Wirkung auf andere SAM-Enzyme wie BioB, LipA und ThiH haben (Challand *et al.*, 2009; Hutcheson & Broderick 2012). Diese Beobachtung legt nahe, dass auch MenK möglicherweise durch diese Verbindungen gehemmt wird. Daher wurde die Hypothese einer möglichen Inhibierung von MenK überprüft. Zur Validierung dieser Annahme wurde die MTA/SAH-Nukleosidase (MTAN) gereinigt und dem MenK-Enzymassay zugefügt. MTAN ist ein Enzym, das durch Abspaltung von Adenin die Umwandlung von 5-Ado, SAH und MTA in 5'-Deoxyribose (5-dR), *S*-Ribosyl-L-homocystein (SRH) und 5-Methylthioribose (MTR) katalysiert, wobei SAM nicht als Substrat verwendet wird (Abb. 2.5). Die Zugabe von MTAN zum MenK-Enzymassay würde die Eliminierung potenzieller Inhibitoren ermöglichen, was zu einer Steigerung der Enzymaktivität führen könnte.

Das MTAN-kodierende Gen wurde mittels Amplifikation aus dem Genom von *E. coli* BL21 (DE3) isoliert und in das pET-Expressionssystem inseriert. Anschließend wurde MTAN in *E. coli* BL21 (DE3) produziert und über den N-terminalen His-Tag aufgereinigt. Die erfolgreiche Proteinproduktion von MTAN (28,2 kDa) in *E. coli* sowie die Reinigung wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot verifiziert (Abb. 5.30A, B). Die Ausbeute an gereinigtem MTAN betrug 55,2 mg/ml.

Um die enzymatische Aktivität von MTAN zu

überprüfen, wurde ein enzymgekoppelter spektrometrischer Assay verwendet. Hierfür wurde die Xanthinoxidase eingesetzt, die Adenin als Substrat verwendet, das während der MTAN-Katalyse freigesetzt wird. Durch eine zweistufige Oxidation wird das Adenin in 8-Hydroxyadenin und schließlich in 2,8-Dihydroxyadenin umgewandelt (Abb. 5.30C). Die Absorptionzunahme von 2,8-Dihydroxyadenin wurde bei 305 nm spektrometrisch gemessen. MTA, SAH und 5-Ado wurden als Substrate für den MTAN-Assay verwendet. Für jedes der drei Substrate wurde eine deutliche Zunahme der Absorption bei 305 nm im MTAN-Assay festgestellt (Abb. 5.31A, B, C). Dies ließ sich auf die Bildung von 2,8-Dihydroxyadenin zurückführen. Dadurch wurde nachgewiesen, dass MTAN enzymatisch aktiv war und sowohl MTA, SAH als auch 5-Ado abbauen konnte.

Um eine mögliche Hemmung von *CtMenK* durch die Produkte 5-Ado, SAH und MTA nachzuweisen, wurden im MenK-Enzymassay Ansätze mit der Zugabe von je 1 mM 5-Ado, SAH und MTA erstellt. Diese Konzentration entsprach derjenigen von SAM im Enzymassay. Zusätzlich wurde ein weiterer Ansatz mit der Zugabe von 25 μ M MTAN durchgeführt, ohne einen potenziellen Inhibitor hinzuzufügen. Als Kontrolle diente ein Enzymansatz ohne die Zugabe von einem potenziellen Inhibitor oder MTAN. Der Enzymassay wurde für 12 h bei 30 °C inkubiert. Die HPLC-Analyse zeigte eine inhibitorische Wirkung von SAH und MTA (Abb. 5.31D). SAH führte zu einer Reduktion der 8-MMK₄-Produktion um 22,3 % (87,1 μ M) im Vergleich zur Kontrolle (112,1 μ M). Eine etwas stärkere Hemmung wurde bei MTA beobachtet, mit einer Verringerung um 26,7 % im Vergleich zur Kontrolle. Bei der Betrachtung der DMMK-Produktion war die Hemmung noch ausgeprägter. SAH führte zu einer Verringerung um 40,6 % (27,7 μ M) und MTA um 50,6 % (23 μ M) im Vergleich zur Kontrolle (46,6 μ M). Im Gegensatz dazu hatte 5-Ado keinen signifikanten Einfluss auf die MMK (39,6 μ M) und DMMK (113,9 μ M) Produktion.

Überraschenderweise zeigte der Enzymansatz mit MTAN eine signifikante Reduktion der MMK-Produktion um 19,7 % (90 μ M). Hingegen wurde eine Steigerung der DMMK-Produktion um 26,4 % (58,9 μ M) im Vergleich zur Kontrolle beobachtet. Diese Ergebnisse bestätigten die inhibi-

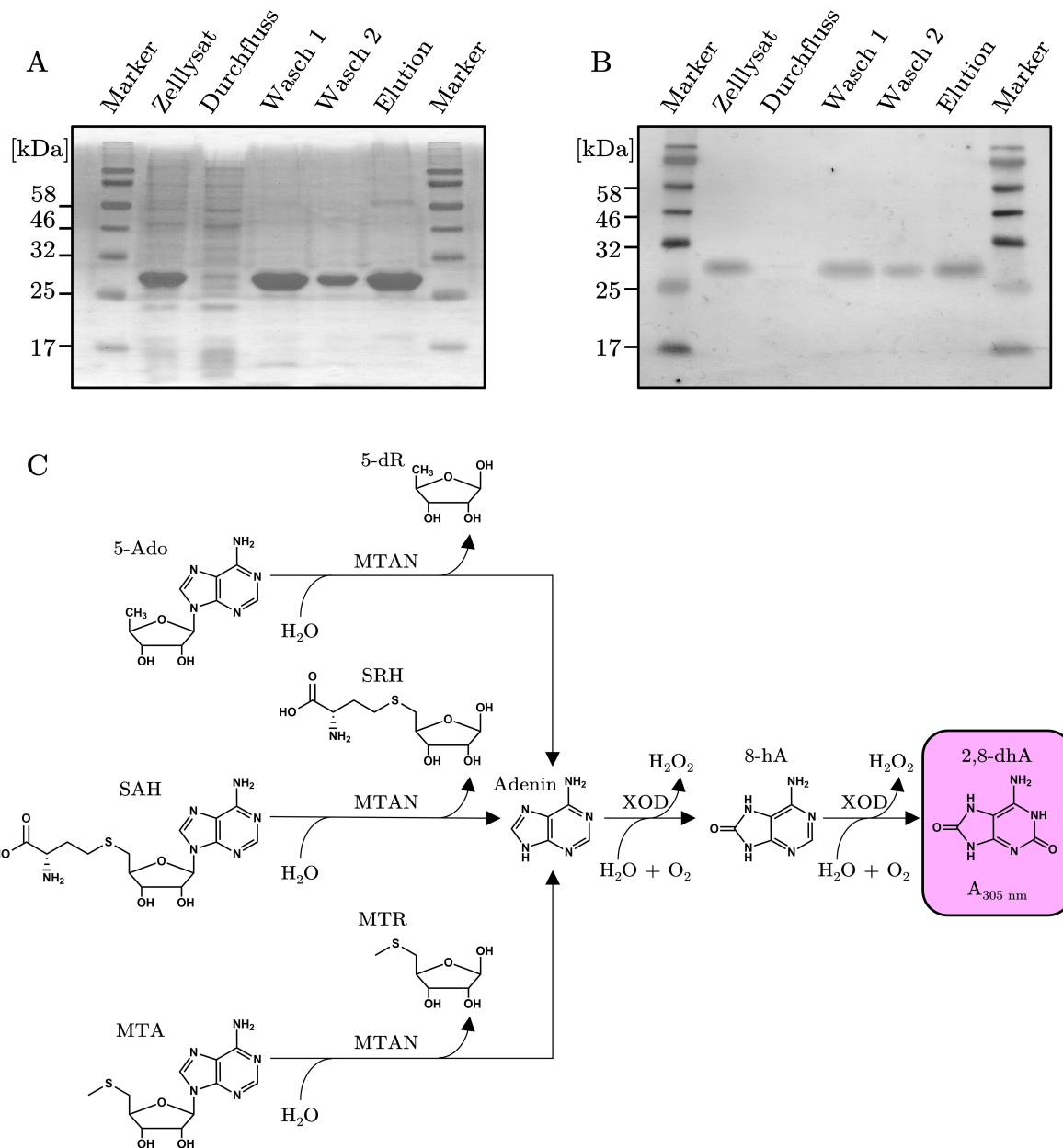


Abbildung 5.30: Analyse der Reingungsfractionen von MTAN durch (A) SDS-PAGE und (B) Western-Blot, nach Aufreinigung aus *E. coli*. Die Trennung erfolgte unter Verwendung eines 10%igen SDS-Gels und 25 µg Protein (Kap. 4.10.3). (C) Schematische Darstellung des MTAN-Assays als Kopplungszym-Methode zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität von MTAN. Während der Reaktion erfolgt die enzymatische Umsetzung von 5-Ado, SAH und MTA zu Adenin unter der Katalyse von MTAN. Das gebildete Adenin führt durch die gekoppelte Xanthinoxidase zur Bildung von 2,8-dhA (2,8-Dihydroxyadenin) mit einer Absorption bei 305 nm. 5-Ado, 5'-Desoxyadenosin; SAH, S-Adenosyl-L-Homocystein; MTA, Methylthioadenosin; 5-dR, 5-Desoxyribose; SRH, S-Ribosyl-L-homocystein; MTR, 5-Methylthioribose; XOD, Xanthinoxidase; 8-hA, 8-Hydroxyadenin; 2,8-dhA, 2,8-Dihydroxyadenin.

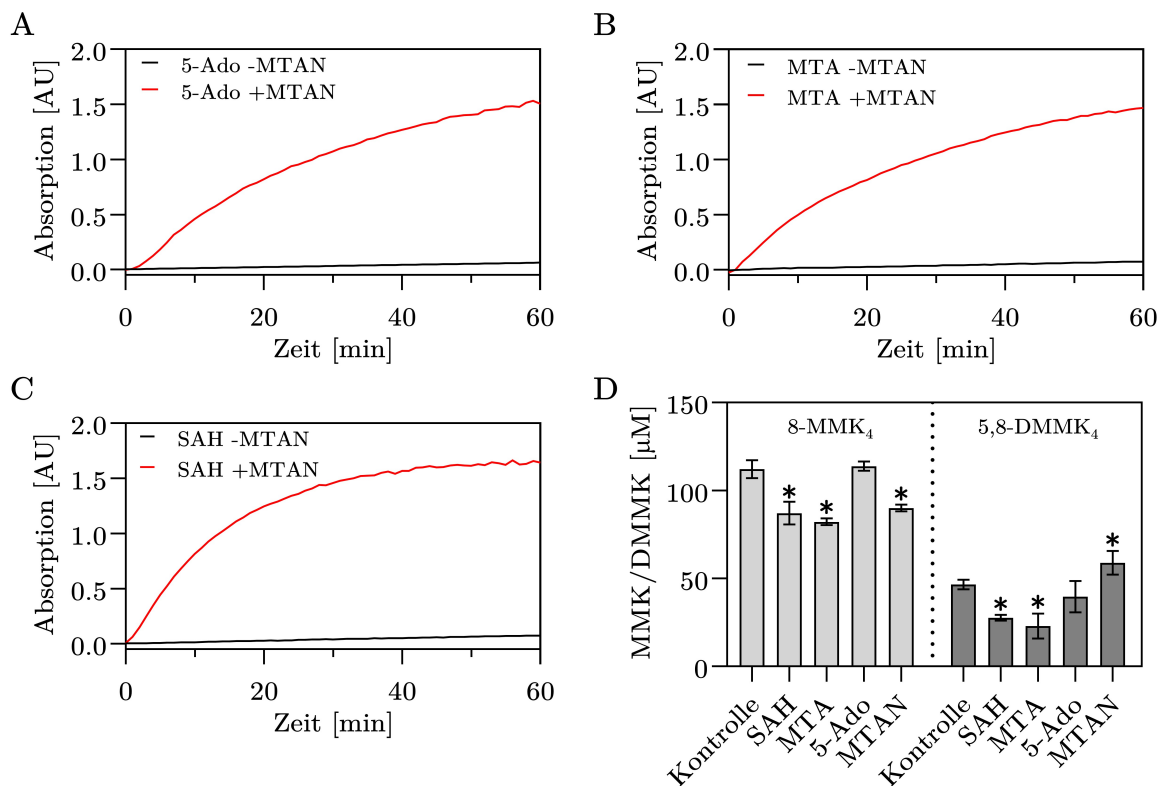


Abbildung 5.31: MTAN Aktivitätsassay und MenK-Enzymassay. (A) Verifizierung der katalytischen Fähigkeit von MTAN gegenüber (A) 5-Ado, (B) MTA und (C) SAH mittels eines spektrophotometrischen Assays. (D) Wirkung von 1 mM 5-Ado, MTA, SAH und 25 μ M MTAN auf die MMK- und DMMK-Produktion von *CtMenK* in μ M. Ein Enzymansatz ohne Zugabe eines Inhibitors oder MTAN wurde als Kontrolle verwendet. *, t-Test: $p = 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle.

torische Wirkung von SAH und MTA auf MenK. Im Gegensatz dazu scheint 5-Ado keine inhibitorische Wirkung auf MenK zu haben. Die Zugabe von MTAN zur Umsetzung von SAH, MTA und 5-Ado führte zu einer Verringerung der MMK-Produktion, während die DMMK-Produktion verbessert wurde.

5.4.6 Substratspektrum von *CtMenK*

Wie im oben beschriebenen MenK-Enzymassay wird MK₄ in einer Lösung aus DMSO und Isopropanol zugesetzt. Allerdings war die bisherige Ausbeute an methyliertem MK₄ gering. Um die Effizienz des Enzymassays zu verbessern, wäre es

möglicherweise von Vorteil, ein MK-Derivat zu verwenden, das besser in Wasser löslich ist als MK₄.

Es wurde gezielt nach Molekülen gesucht, die eine Grundstruktur von 1,4-Naphthochinon aufweisen und entweder keine oder nur eine kurze Seitenkette besitzen. Als potenzielle Substrate wurden die Moleküle 1,4-Naphthochinon, 2-Hydroxy-1,4-naphthochinon und 2-Hydroxy-3-(3-methylbut-2-en-1-yl)naphthalene-1,4-dion (Lapachol) verwendet. Zur Separation der potenziellen Substrate von ihren methylierten Derivaten wurde für jedes Molekül eine dedizierte HPLC-Methode entwickelt (Kap. 4.10.10). Die Identifikation erfolgt gleich wie bei den MKs über das UV-Vis-Spektrum. Dabei zeigt das 1,4-Naphthochinon ein

UV-Vis-Spektrum mit zwei Maxima bei 250 nm und 339 nm (Abb. 5.32 D). Für 2-Hydroxy-1,4-naphthochinon wurden drei Maxima bei 249 nm, 279 nm und 339 nm detektiert (Abb. 5.32 E). Lapachol zeigte im UV-Vis-Spektrum drei Maxima bei 251 nm, 282 nm und 335 nm (Abb. 5.32 F).

Im MenK-Enzymassay wurden die MK-Derivate anstelle von MK₄ verwendet. Diese wurden jeweils im Assaypuffer gelöst und dem Enzymassay zugesetzt. Die HPLC-Analyse des MenK-Enzymassays ergab, dass weder methylierte Derivate von 1,4-Naphthochinon noch von 2-Hydroxy-1,4-Naphthochinon detektiert wurden (Abb. 5.32 A, B). Die Massenspektrometrie der Enzymansätze zeigte ebenfalls keine methylierten Derivate mit der erwarteten Masse (nicht gezeigt). Bei Lapachol wurde neben dem eigenen Elutionsmaximum ein weiteres Maximum mit einer längeren Retentionszeit von 20 min detektiert (Abb. 5.32 C). Das UV-Vis-Spektrum des Derivats zeigte eine Verschiebung des dritten Maximums in den längerwelligen Bereich im Vergleich zum UV-Vis-Spektrum von Lapachol (Abb. 5.32 F). Diese Verschiebung ist bei den MKs bekannt und wird durch zusätzliche Methylgruppen am Naphthochinon-Ring verursacht. Jedoch war eine Massenspektrometrie-Analyse nicht möglich und trotz mehrfacher Wiederholungen des Experiments unter denselben Bedingungen konnte das Maximum bei 20 Minuten nicht reproduziert werden. Stattdessen zeigten die Ergebnisse, ähnlich wie bei den anderen beiden artifiziellen Substraten, keine methylierten Derivate. Aus diesen Ergebnissen wurde abgeleitet, dass weder 1,4-Naphthochinon noch 2-Hydroxy-1,4-naphthochinon als Substrate für CtMenK dienen können. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass Lapachol unter bisher unbekanntem Bedingungen möglicherweise als Substrat verwendet werden kann. Jedoch ist es aufgrund der unzureichenden Reproduzierbarkeit und der geringen Ausbeute an methyliertem Derivat nicht als geeignetes alternatives Substrat für den MenK-Enzymassay zu betrachten.

5.5 Strukturvorhersage und -analyse von MenK und MenK2

5.5.1 Primär- und Sekundärstruktur

In der Literatur werden RSMTs vor allem anhand ihrer Domänenstruktur unterschieden, so auch die MenK/MqnK/MenK2-Familie. Diese gehört zur Klasse C der RSMTs, für die eine radikalische SAM-Domäne und eine Coproporphyrinogen III-Dehydrogenase (CPDH)-Domäne beschrieben sind (Bauerle *et al.*, 2015). Basierend auf einem Sequenzalignment von 993 putativen MenK/MqnK/MenK2-Sequenzen wurde festgestellt, dass alle MenK/MqnK/MenK2-Enzyme vier Domänen besitzen: den N-terminalen Tripwire (28-57 As, \bar{x} =37 As), die radikalische SAM-Domäne (151-159 As, \bar{x} =153 As), die sogenannte Linker-Domäne (64-120 As, \bar{x} =100 As) und die C-terminale CPDH-Domäne (133-189 As, \bar{x} =150 As) (Abb. 5.33). Die Bezeichnung der CPDH-Domäne leitet sich von ihrer hohen Sequenzidentität zum radikalischen SAM-Enzym sauerstoffunabhängigen Coproporphyrinogen-III-Dehydrogenase ab, obwohl dieses keine Methylierung katalysiert. Besonders der Tripwire und die CPDH-Domäne weisen eine größere Variation in ihrer Länge zwischen den MenK/MqnK/MenK2-Enzymen auf. Zum Beispiel besitzt WsMqnK einen um 34 Aminosäuren längeren Tripwire im Vergleich zu CtMenK (Abb. 5.33). AeMenK hingegen hat eine 21 Aminosäuren längere CPDH-Domäne im Vergleich zu CtMenK.

Für die Analyse der Domänenidentität wurden paarweise Sequenzalignments der bisher sieben experimentell bestätigten MenK/MqnK/MenK2-Enzyme aus *C. tanakaei*, *A. equolifaciens*, *W. succinogenes*, *F. marina* und *S. aciditrophicus* durchgeführt. Die daraus resultierenden Identitäten wurden anschließend gemittelt. Dabei wurde festgestellt, dass der Tripwire eine Identität von $45 \pm 20\%$ aufwies. Die SAM-Domäne zeigte die höchste Identität mit $65 \pm 11\%$. Die Linker-Domäne wies eine Identität von $43 \pm 5\%$ auf, während die CPDH-Domäne mit $53 \pm 16\%$ die zweithöchste Identität aufwies. Die Unterschiede

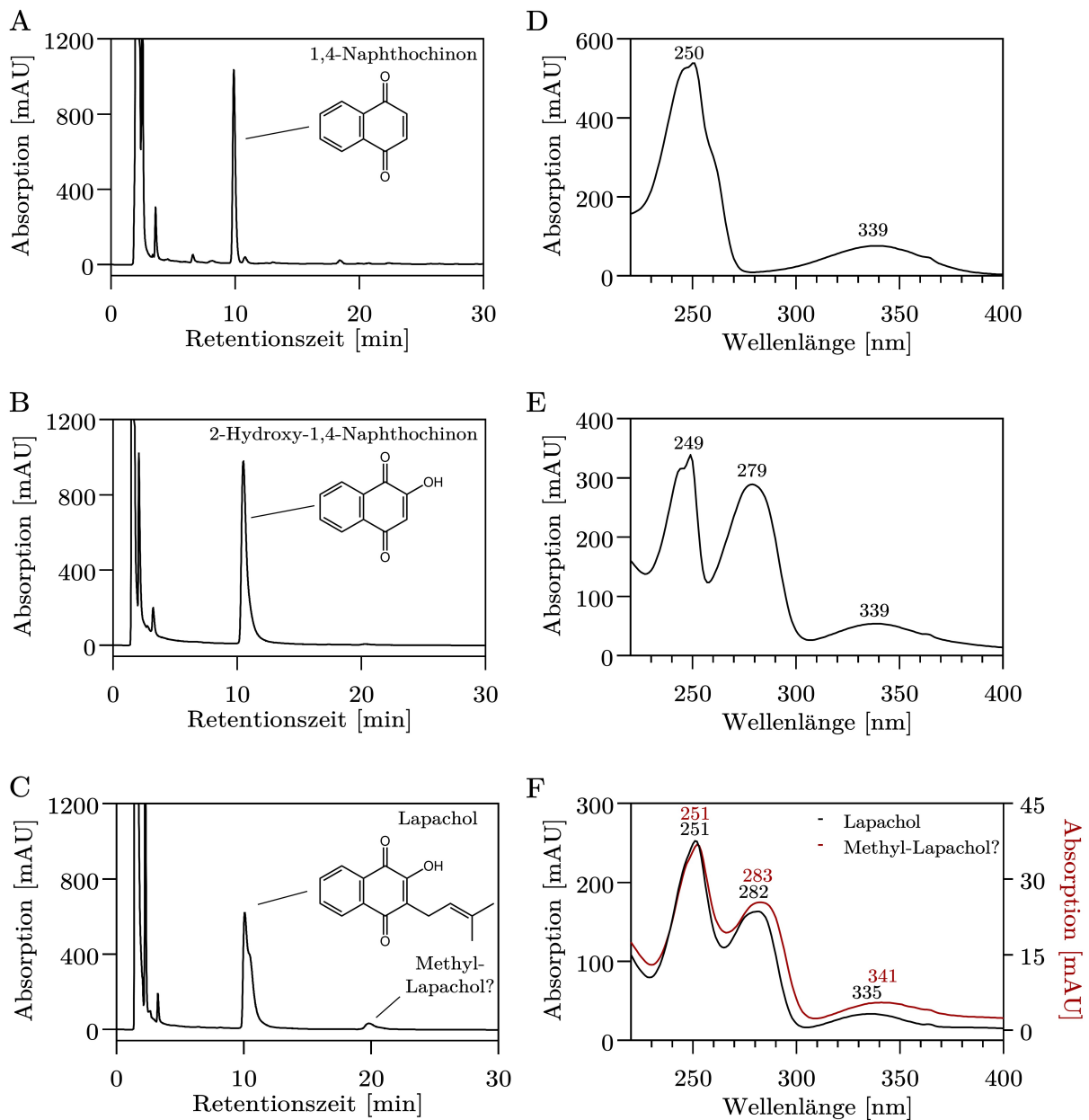


Abbildung 5.32: HPLC- und photospektrometrische Analyse der artifiziellen Substrate im MenK-Enzymassay. HPLC-Chromatogramm vom MenK-Enzymassay unter Verwendung der Substrate (A) 1,4-Naphthohochinon, (B) 2-Hydroxy-1,4-Naphthohochinon und (C) Lapachol. UV-Vis-Spektren der artifiziellen Substrate ((D) 1,4-Naphthohochinon; (E) 2-Hydroxy-1,4-Naphthohochinon; (F) Lapachol und möglicherweise detektierter methylierter Derivate. Die HPLC-Chromatogramm wurde bei 249 nm aufgenommen.

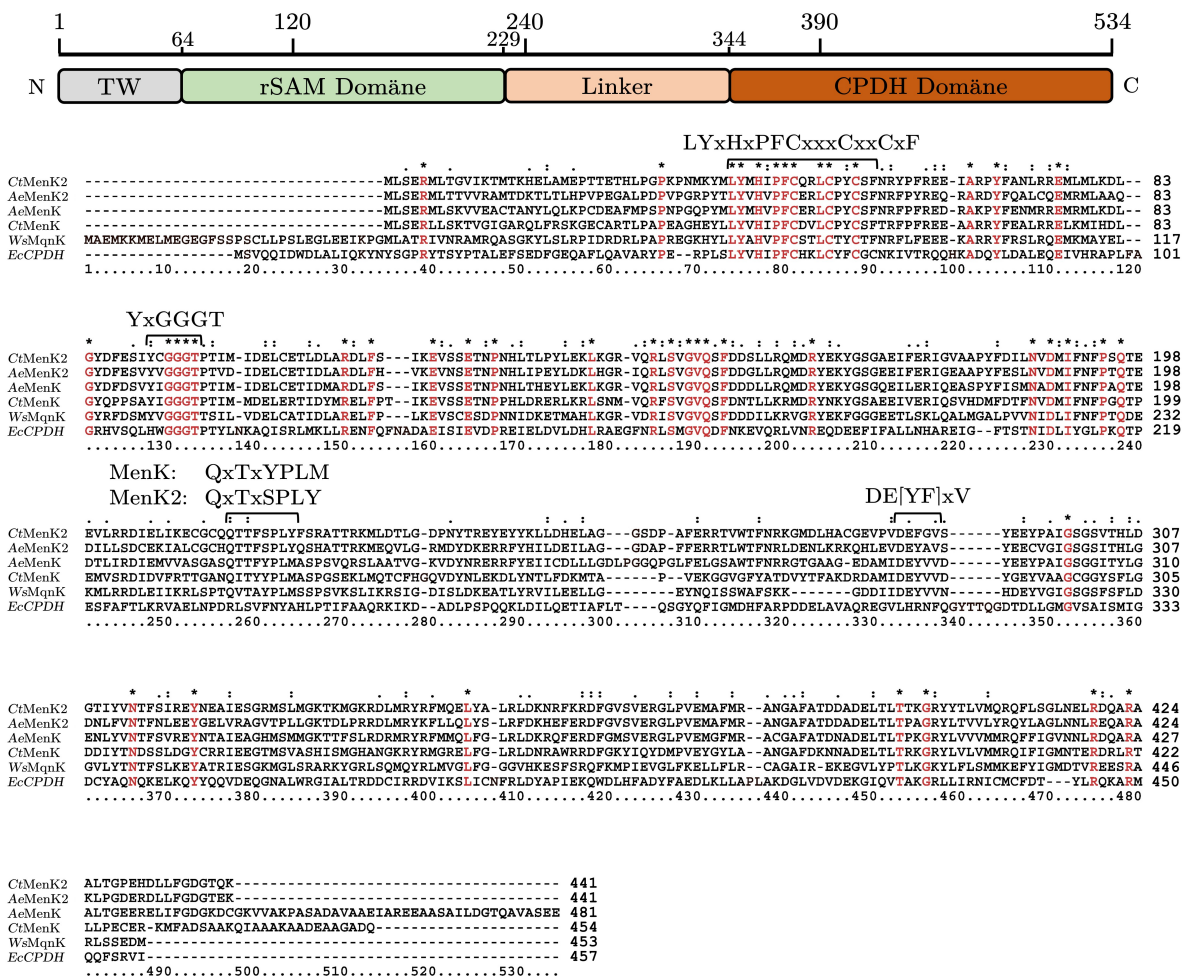


Abbildung 5.33: Domänenstruktur der radikalischen SAM MK Methyltransferasen der Klasse C sowie das Alignment der MenK/MqnK- und MenK2-Sequenzen aus *A. equolifaciens*, *C. tanakaei* und *W. succinogenes*, zusammen mit CPDH aus *E. coli*. Signaturmotive sind im Alignment markiert. Identische Aminosäuren sind in rot dargestellt. TW: N-terminale Tripwire-Domäne. *, streng konservierter Rest; (:) bezeichnet die Konservierung zwischen Gruppen mit sehr ähnlichen Eigenschaften, ähnlich den Werten über 0,5 in der Gonnet-PAM-250-Matrix; (.) bedeutet die Konservierung zwischen Gruppen mit schwach ähnlichen Eigenschaften, was den Werten $\leq 0,5$ und > 0 in der Gonnet-PAM-250-Matrix entspricht (Gonnet *et al.*, 1992).

in der Sequenzidentität erstreckten sich nicht nur zwischen verschiedenen Spezies, sondern auch innerhalb desselben Mikroorganismus bei den Enzymen MenK und MenK2. Ein Beispiel hierfür war *A. equolifaciens*, wo die Sequenzidentität 62 % (*AeMenK* gegen *AeMenK2*) betrug, im Gegensatz zu lediglich 46 % bei den entsprechenden Enzymen von *C. tanakaei* (*CtMenK* gegen *CtMenK2*).

Die Signatur-Motive zur Identifizierung von MenK/MqnK/MenK2 sind hauptsächlich in den radikalischen SAM- und Linker-Domänen lokalisiert (Abb. 5.33). Die Linker-Domäne enthält ebenfalls das charakteristische Motiv [QxTxYPLM/QxTxSPLY], das eine klare Unterscheidung zwischen MenK und MenK2 ermöglichte (Wilkins *et al.*, 2020). Basierend

auf dieser Erkenntnis wurde die Hypothese aufgestellt, dass das Tyrosin, welches zuvor als entscheidende Aminosäure für die Differenzierung betrachtet wurde, möglicherweise einen Einfluss auf die Methylierungsposition haben könnte. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde das Motiv [QxTxSPLY] in *AeMenK2* gezielt durch ortsgerichtete Mutagenese in das Motiv [QxTxYPLM] geändert. Trotz der Modifikation des Motivs wurde mittels HPLC-Analyse eine Produktion von 7-MMK₈ festgestellt (nicht gezeigt). Dies deutet daraufhin, dass die Veränderung des Motivs alleine nicht ausreichend ist für eine Änderung der Methylierungsspezifität.

Die Sekundärstrukturvorhersage von *CtMenK* bestand aus 17,2% β -Strängen, 46,9% α -Helices und 2% 3_{10} -Helices (Abb. 5.34). Insgesamt gibt es 4 β -Faltblätter: A besteht aus 9 gemischten Strängen, B aus 2 parallelen Strängen, C aus 3 antiparallelen Strängen und D aus 3 antiparallelen Strängen.

Die Sekundärstruktur von *CtMenK2*, repräsentativ für die MenK2-Enzyme, besteht zu 18,8% aus β -Strängen, zu 45,6% aus α -Helices und zu 1,8% aus 3_{10} -Helices (Abb. 5.34). Es gibt auch hier 4 β -Faltblätter: A besteht aus 4 antiparallelen Strängen, B aus 9 gemischten Strängen, C aus 2 parallelen Strängen und D aus 3 antiparallelen Strängen. Die radikalische SAM-Kerndomäne besteht sowohl bei *CtMenK* als auch bei *CtMenK2* aus 6 parallelen β -Strängen und 6 Helices, die später in der Tertiärstruktur ein $\beta_6\alpha_6$ Dreiviertel-TIM-Barrel bilden (Abb. 5.34). Obwohl die prozentuale Identität der Primärstruktur zwischen *CtMenK* und *CtMenK2* mit 46,2% sehr gering ist, besteht eine erhebliche Übereinstimmung in den Sekundärstrukturen. Diese Übereinstimmung ist vor allem auf eine stark konservierte radikalische SAM-Domäne zurückzuführen.

5.5.2 Strukturanalyse mittels AlphaFold

Bisherige Strukturvorhersagen für MenK/MqnK/MenK2 basierten auf Homologiemodellen von CPDH (PDB ID 1OLT) (Wilkens *et al.*, 2020). Diese Modelle waren ausreichend für erste strukturelle Erkenntnisse, erwiesen sich jedoch als ungeeignet für

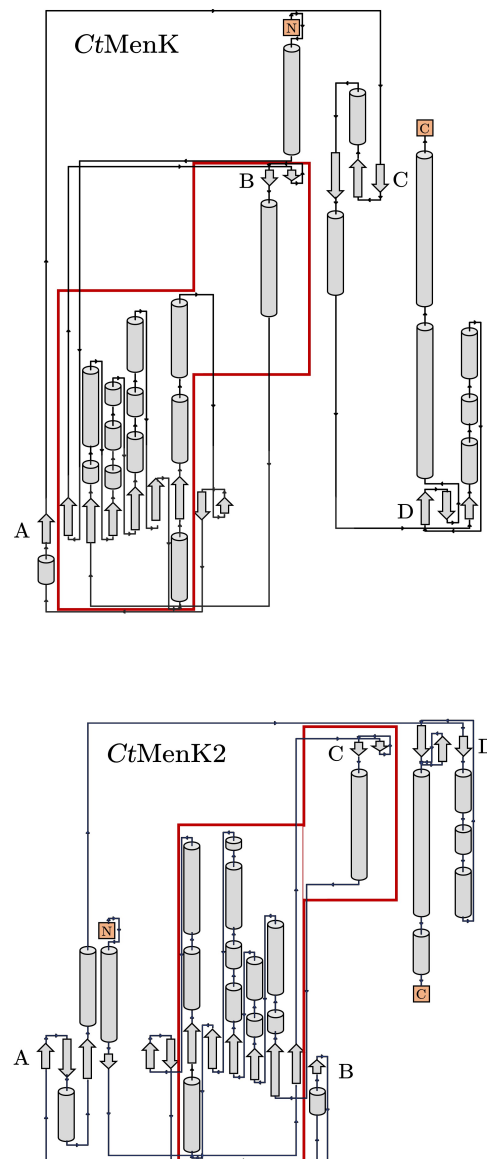


Abbildung 5.34: Proteintopologie von *CtMenK* und *CtMenK2*. α - und 3_{10} -Helices sind als Zylinder und β -Stränge als Pfeile dargestellt. Die Buchstaben A-D geben die Sekundärstrukturen der β -Faltblätter an. Rot markiert ist die radikalische SAM Domäne. Die Proteintopologie wurde mit PDBsum erstellt (Laskowski *et al.*, 2017).

weiterführende Untersuchungen. Durch die Verwendung von AlphaFold2 mittels ColabFold wurden neue Strukturvorhersagen berechnet, die zu neuen Erkenntnissen über die Struktur führten. Beim Vergleich der Homologiemodelle mit den Strukturmodellen von AlphaFold wurden strukturelle Ähnlichkeiten festgestellt. Trotzdem beträgt die RMSD (Root Mean Square Deviation) über 379 C_{α} -Atome 4,1 Å, obwohl beide Modelle auf derselben Sequenz von *CtMenK* basieren. Dies deutete auf erhebliche strukturelle Abweichungen der beiden Strukturvorhersagen hin. Zusätzlich fehlen im Homologiemodel der C- und der N-Terminus, die den Tripwire und die CPDH-Domäne betreffen. Insgesamt sind 75 Aminosäuren nicht vorhanden, welche eine entscheidende Rolle bei der Bildung des Substratkanals spielen, und deren Funktionen werden im Verlauf des Kapitels noch näher erläutert. Beim Vergleich der AlphaFold-Strukturvorhersage mit der vorhandenen Strukturvorhersage in den Datenbanken (ID AF-G1WKZ6-F1) wurde ein RMSD über 454 C_{α} -Atome von 0,55 Å festgestellt. Dabei zeigten sich minimale Abweichungen zwischen beiden Vorhersagen. Daher wurde in allen weiteren Untersuchungen ausschließlich mit der berechneten Strukturvorhersage von AlphaFold gearbeitet. Um die Qualität der Strukturvorhersage von AlphaFold zu überprüfen, wurden die vorherge-

sagten Strukturen einer Ramachandran-Analyse unterzogen. Dabei wurden die statistischen Verteilungen der Bindungswinkel der C_{α} -C-Carbonyl (Ψ)-Bindung und der C_{α} -N (Φ)-Bindung in den Peptidbindungen betrachtet. Bei der Strukturvorhersage für *CtMenK* nahmen 95,6% der Aminosäuren die energetisch bevorzugte Konformation ein, während 4,4% in einer energetisch akzeptablen Konformation lagen (Abb. 5.35). Die Rotamere wiesen zu 97,7% die energetisch bevorzugte Konformation auf, zu 2% die energetisch akzeptable Konformation und 0,3% fielen als Ausreißer heraus, da sie eine energetisch ungünstige Konformation aufwiesen. Es wurden keine unzulässigen Bindungen festgestellt, jedoch traten 9 (0,2%) unzulässige Winkel auf. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für das Strukturmodell von *CtMenK2* beobachtet, wobei 97% der Aminosäuren die energetisch bevorzugte Konformation einnahmen und 3% in einer energetisch akzeptablen Konformation vorlagen (Abb. 5.35). Bei den Rotameren von *CtMenK2* lagen 98,2% in der energetisch bevorzugten Konformation, 1,3% in der energetisch akzeptablen Konformation und 0,5% als Ausreißer. In der Struktur wurden keine unzulässigen Bindungen identifiziert, jedoch traten 11 (0,2%) unzulässige Winkel auf. Die statistischen Ergebnisse der Ramachandran-Analyse bestätigen die hohe Qualität der AlphaFold-Strukturvorhersagen. Die über-

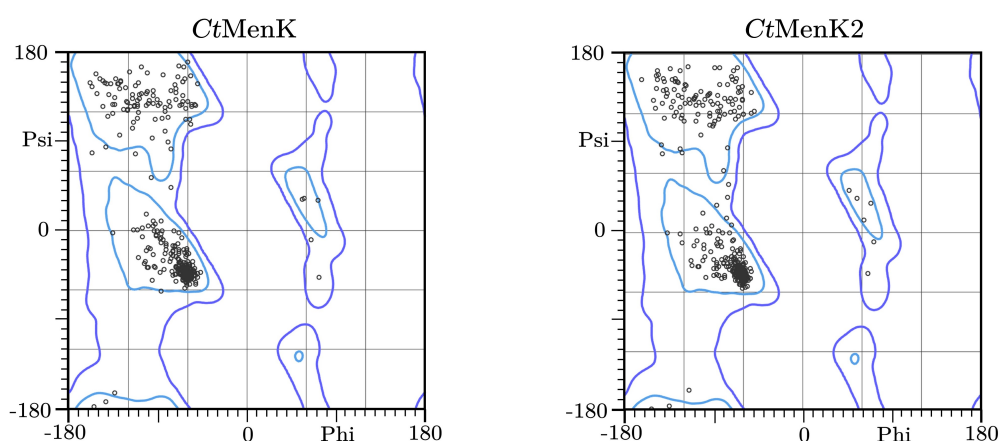


Abbildung 5.35: Ramachandran-Diagramm der AlphaFold-Struktur von *CtMenK* und *CtMenK2*. Darstellung der Torsionswinkel ψ und ϕ der C_{α} Bindungen und Einteilung in energetisch favorisierte (hellblaue) und energetisch günstige Konformationen (dunkelblaue Umrandung).

wiegende Mehrheit der Aminosäuren befand sich innerhalb der erlaubten Bereiche des Ramachandran-Plots, was auf günstige Dihedralwinkel-Konformationen hinwies. Die minimale Anzahl an Aminosäuren in nicht-erlaubten Bereichen deuteten auf eine geringe sterische Belastung hin. Diese Erkenntnisse, wenn zusammengefasst interpretiert, legten nahe, dass die Proteinstruktur stabil ist und biologisch plausibel erscheint.

Die RMSD zwischen *CtMenK* und *CtMenK2* beträgt 2,2 Å (über 427 C α -Atome). Ohne die Einbeziehung von Ausreißern verringerte sich der RMSD auf 0,9 Å (über 359 C α -Atome), was auf eine starke strukturelle Ähnlichkeit hinwies. Die Grundstruktur beinhaltet eine radikalische SAM-Kerndomäne, bestehend aus 6 parallelen β -Strängen, die in einem parallelen β -Faltblatt angeordnet sind, sowie 6 α -Helices, die sich entlang der äußeren Oberfläche des β -Faltblattes erstrecken (Abb. 5.36A). In Kombination ergaben dies eine $\beta_6\alpha_6$ Dreiviertel-TIM-Barrel. Die Domänen Tripwire, radikalische SAM Domäne, Linker und CPDH-Domäne sind nicht nur sequenziell voneinander getrennt, sondern zeigen auch in der dreidimensionalen Struktur eine deutliche räumliche Separation. Lediglich der Tripwire umschließt die radikalische SAM-Domäne, den Linker und die CPDH-Domäne (Abb. 5.36B).

Die Oberfläche der Strukturmodelle von *CtMenK* und *CtMenK2* weisen einige hydrophobe Aminosäuren auf (Abb. 5.36C). Es konnte jedoch kein Membrananker oder eine ähnliche Struktur identifiziert werden. Analysen mit MemProtMD und anderen Tools wiesen ebenfalls nicht auf mögliche Interaktionspunkte zwischen Membran und Protein hin (nicht gezeigt) (Newport *et al.*, 2018).

Um den Zugang von Kofaktoren wie dem [Fe $_4$ S $_4$]-Cluster sowie Substraten wie den beiden SAM-Molekülen und dem MK zum katalytischen Zentrum im Protein zu ermöglichen, werden Kanäle benötigt. Diese Kanäle wurden mithilfe von Caver PyMOL-Plugin V 3.0 und MOLEonline berechnet (Pavelka *et al.*, 2016; Berka *et al.*, 2012). Insgesamt gibt es jeweils vier Kanäle, die sowohl in *CtMenK* als auch in *CtMenK2* existieren (Abb. 5.37A). Die Kanäle in *CtMenK* sowie in *CtMenK2* weisen eine ähnliche Symmetrie auf. Aufgrund ihrer Dimensionen in Bezug auf Größe,

Durchmesser und Lage wurden drei der Kanäle als Zugang für das MK ausgeschlossen, wodurch lediglich ein potenzieller Kanal verblieb (Abb. 5.37A, dunkelblau).

Die Länge des Kanals im Bereich von *CtMenK* beläuft sich auf 41,4 Å, während sie bei *CtMenK2* 41,9 Å beträgt (Abb. 5.37B). Der Abstand vom Kanaleingang bis zur potenziellen Bindungsstelle, die für *CtMenK* als Y286 und für *CtMenK2* als Y288 definiert wurde (da dieses Tyrosin eine stark konservierte Aminosäure ist und höchstwahrscheinlich MK bindet), beträgt 27,9 Å für *CtMenK* und 33,5 Å für *CtMenK2*. Es ist jedoch zu beachten, dass die genaue Bindungsstelle für MK noch nicht bekannt ist. Die engste Stelle des Kanals hat einen Durchmesser von 3,2 Å für *CtMenK* und 1,8 Å für *CtMenK2* unter statischen Bedingungen (Abb. 5.37B). Wenn jedoch die Flexibilität der Seitenketten berücksichtigt wird, erhöht sich der Durchmesser deutlich und MK wäre in der Lage, den Kanal zu passieren.

Die beteiligten Aminosäuren in der Kanalstruktur stammen ausschließlich aus dem Tripwire, der CPDH-Domäne und dem C-terminalen Teil der Linker-Domäne. Die Linker-Domäne bildet über die drei antiparallelen β -Faltblätter eine Verbindung zur CPDH-Domäne, während die Tripwire-Domäne zusammen mit einer α -Helix und der CPDH-Domäne den Kanaleingang bilden. Um die Bedeutung des Tripwires zu untersuchen, wurde eine verkürzte Version des Tripwires von *WsMqnK* konstruiert und in *E. coli* produziert. *WsMqnK* wurde ausgewählt, da es im Vergleich zu anderen MenK/MqnK/MenK2 eine deutlich längere Tripwire-Domäne aufweist. Entsprechend wurden 34 Aminosäuren entfernt, um die gleiche Tripwire-Länge wie bei den MenKs und MenK2s aus *A. equolifaciens* und *C. tanakaei* zu erreichen. Im Vergleich zum Wildtyp-*WsMqnK* wurde festgestellt, dass die gekürzte Version eine signifikant geringere Menge an 8-MMK $_8$ produzierte (nicht gezeigt). Dies deutete daraufhin, dass der Tripwire eine wichtige Rolle spielt.

Sowohl die Kanäle von *CtMenK* als auch von *CtMenK2* bestehen größtenteils aus hydrophoben Aminosäuren (Abb. 5.37B). Jedoch zeigt der Kanaleingang von *CtMenK* im Gegensatz zu *CtMenK2* hydrophile Aminosäuren. Zusätzlich zu den hydrophoben Aminosäuren gibt es in beiden Kanälen vereinzelt Aminosäuren mit schwacher

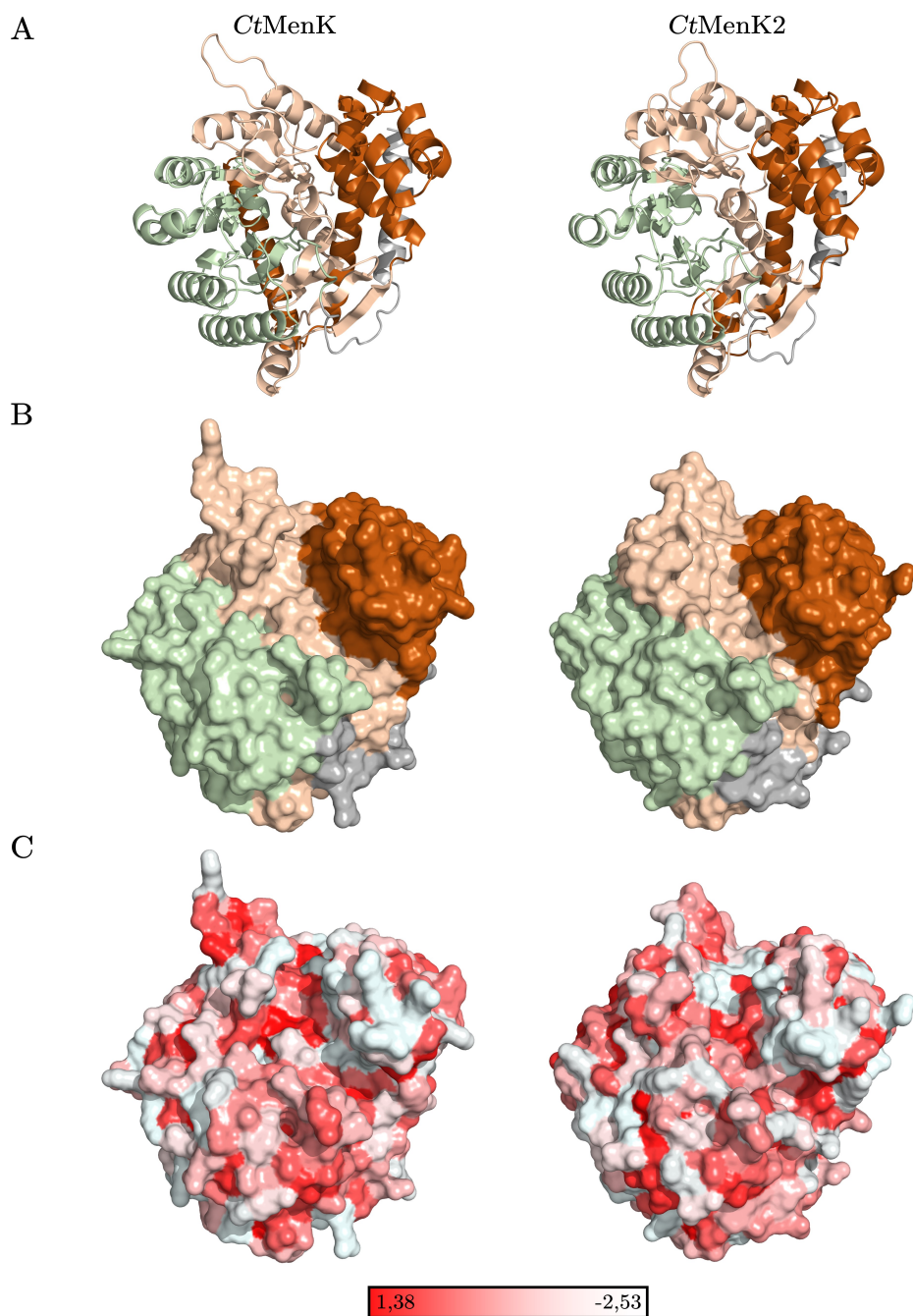


Abbildung 5.36: Darstellung der AlphaFold-Strukturvorhersage. (A) Cartoon-Darstellung und (B) Oberflächendarstellung mit kolorierter Domänenstruktur gemäß Abb. 5.33. (C) Hydrophobizitätsdarstellungen der Proteinoberfläche. Die hydrophoben Bereiche sind in Rot hervorgehoben, während die hydrophilen Bereiche in Weiß dargestellt sind. Zur Einteilung der Aminosäuren wurde die normalisierte Konsens-Hydrophobie-Skala verwendet, an der sich der Balken orientiert, angefangen von hydrophob (1,38; rot) bis hydrophil (-2,53; weiß) (Eisenberg *et al.*, 1984).

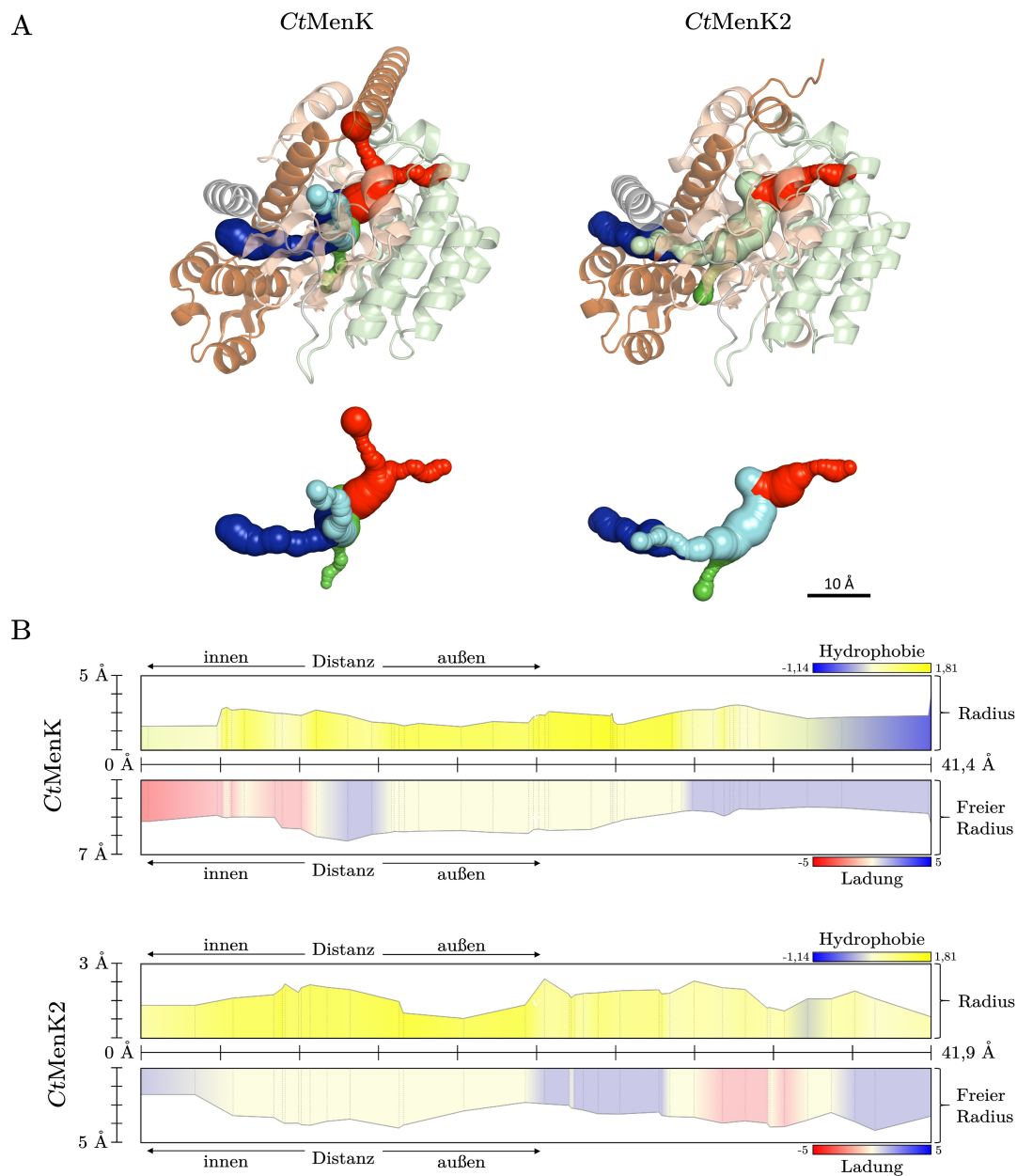


Abbildung 5.37: Innere Kanalnetzwerke von *CtMenK* und *CtMenK2*. (A) Darstellung potenzieller Kanäle (farblich getrennt), ausgehend vom katalytischen Zentrum und unter Berücksichtigung ihrer Lage im Protein mit kolorierter Domänenstruktur gemäß Abb. 5.33. (B) Darstellung der berechneten Eigenschaften des MK-Kanals (dunkelblauer Kanal in A) in Bezug auf die Distanz. Der Kanalradius wird zusammen mit der Hydrophobie angegeben, welche auf der normalisierten Hydrophobie-Skala von Cid *et al.*, 1992 basiert und von hydrophil (-1,14; blau) bis hydrophob (1,81; gelb) reicht. Die Ladung bezieht sich auf geladene Aminosäurereste und reicht von negativ (rot) bis positiv (blau). Gleichzeitig ist der freie Radius dargestellt, der den Kanalradius nur für die Hauptkette der Aminosäuren repräsentiert. Die Analysen wurden mittels Caver PyMOL-Plugin V 3.0 und MOLEonline generiert (Pavelka *et al.*, 2016; Berka *et al.*, 2012).

negativer oder positiver Ladung. Es besteht jedoch keine Korrelation in der Positionierung der geladenen Aminosäuren zwischen den Kanälen, abgesehen von den positiv geladenen Aminosäuren am Kanaleingang.

Das katalytische Zentrum des Proteins befindet sich im Inneren und enthält wichtige Kofaktoren wie den $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster und die beiden SAM-Moleküle (Abb. 5.38A). Der Kanal endet an der Bindungsstelle für SAM2, das für die Übertragung der Methylgruppe verantwortlich ist. Dieser Übergangsbereich stellt die potenzielle Bindungsstelle für die Kopfgruppe von MK dar. Daher muss MK bis auf 1-2 Isopreneinheiten bei MK_8 und MK_6 vollständig in das Protein eindringen, um das katalytische Zentrum zu erreichen (Abb. 5.38A). Es wird angenommen, dass die SAM-Moleküle und ihre Produkte, wie 5-Ado und SAH, aufgrund ihrer Größe über denselben Kanal in das Protein gelangen oder es verlassen.

5.5.3 Aufbau des katalytischen Zentrums

Ungeachtet der unterschiedlichen Aminosäuresequenzen wurde bei den Enzymen MenK/MqnK/MenK2 aus *A. equolifaciens*, *C. tanakaei* und *W. succinogenes* dieselbe strukturelle Architektur festgestellt.

Der $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster wird in der Mitte des Dreiviertel-TIM-Barrel durch das RSS-Cysteinmotiv $[\text{CxxxCxxC}]$ koordiniert (C47, C51, C54 in *CtMenK*). Dieses Motiv kann zum Signaturmotiv 41- $[\text{LYxHxPFCx}_3\text{Cx}_2\text{CxF}]$ -56 erweitert werden und ist in jeder MenK-Sequenz konserviert (Abb. 5.38B). Das vierte Eisenatom des $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Clusters wird durch die Amino- und Carboxylatgruppen von SAM1 koordiniert.

In CPDH aus *E. coli* ist die Carboxylatgruppe des Methioninrests von SAM1 an R184 gebunden, während Q172 die beiden Hydroxylgruppen des Riboserückgrats bindet (Layer 2003). Diese Aminosäuren sind ebenfalls in allen MenK-Sequenzen konserviert (R162 und Q150 in *CtMenK* in Abb. 5.38B). Der Adeninrest von SAM1 wird wahrscheinlich ähnlich wie bei CPDH durch die aromatischen Aminosäuren F53 (F68 in CPDH) und Y220 (F240 in CPDH) koordiniert. Das charakteristische Motiv $[\text{QxTxYPLM}]$, das in

der Linker-Domäne vorzufinden ist, zeigt sich ebenfalls im aktiven Zentrum von *CtMenK*. Hierbei unterscheidet es sich von dem Motiv in *CtMenK2*, $[\text{QxTxSPLY}]$, hauptsächlich durch die Positionierung des Tyrosinrests. Im Falle von *CtMenK* befindet sich der Tyrosinrest auf Position Y220, während er bei *CtMenK2* auf Position Y222 liegt. Diese Positionsverschiebung, insbesondere des Tyrosinrests, ermöglicht allein schon die Unterscheidung zwischen den Enzym-Subfamilien MenK und MenK2. Die Tyrosinreste sind in Richtung des aktiven Zentrums ausgerichtet und befinden sich unmittelbar in der Nähe der Carboxylatgruppe des Methioninrests von SAM2. Der Adeninanteil von SAM2 ist über π - π -Wechselwirkungen mit Y41 verbunden, das sich im zuvor erwähnten Cysteinmotiv befindet, wie bei CPDH (Y56). Es besteht die Möglichkeit, dass SAM2 in CPDH zusätzlich über das F310 gebunden ist, das sich im CPDH-spezifischen $[\text{KNFQGYTT}]$ -Motiv befindet. Dieses Motiv ist in den MenK/MqnK/MenK2-Proteinen nicht vorhanden und wird stattdessen durch das 284- $[\text{DEY}]$ -286-Motiv ersetzt (gemäß *CtMenK*-Nummerierung). In diesem Bereich erfolgt auch der Übergang vom Substratkanal ins aktive Zentrum, welcher in CPDH nicht vorhanden ist. Daher befindet sich Y286 nicht an derselben Position wie F310 in CPDH und könnte stattdessen eine wichtige Rolle in der MK-Bindung spielen. Die genaue Bindungsstelle von MK (oder MMK) ist bisher nicht bekannt, aber es wird vermutet, dass die potenzielle (Methyl-) Menachinon-Bindungstasche hauptsächlich aus konservierten hydrophoben Aminosäuren wie Tyrosin und Leucin besteht. Insbesondere Y286 könnte eine wichtige Rolle bei der Chinonbindung durch hydrophobe Wechselwirkungen spielen. Die konservierten Aminosäuren E285 und R417, die in CPDH nicht vorhanden sind, liegen unmittelbar an der potenziellen Bindungsstelle von MK. Es ist möglich, dass sie bei der Positionierung von MK eine Rolle spielen oder direkt am Reaktionsmechanismus als Base beteiligt sind (Kap. 6.3.5).

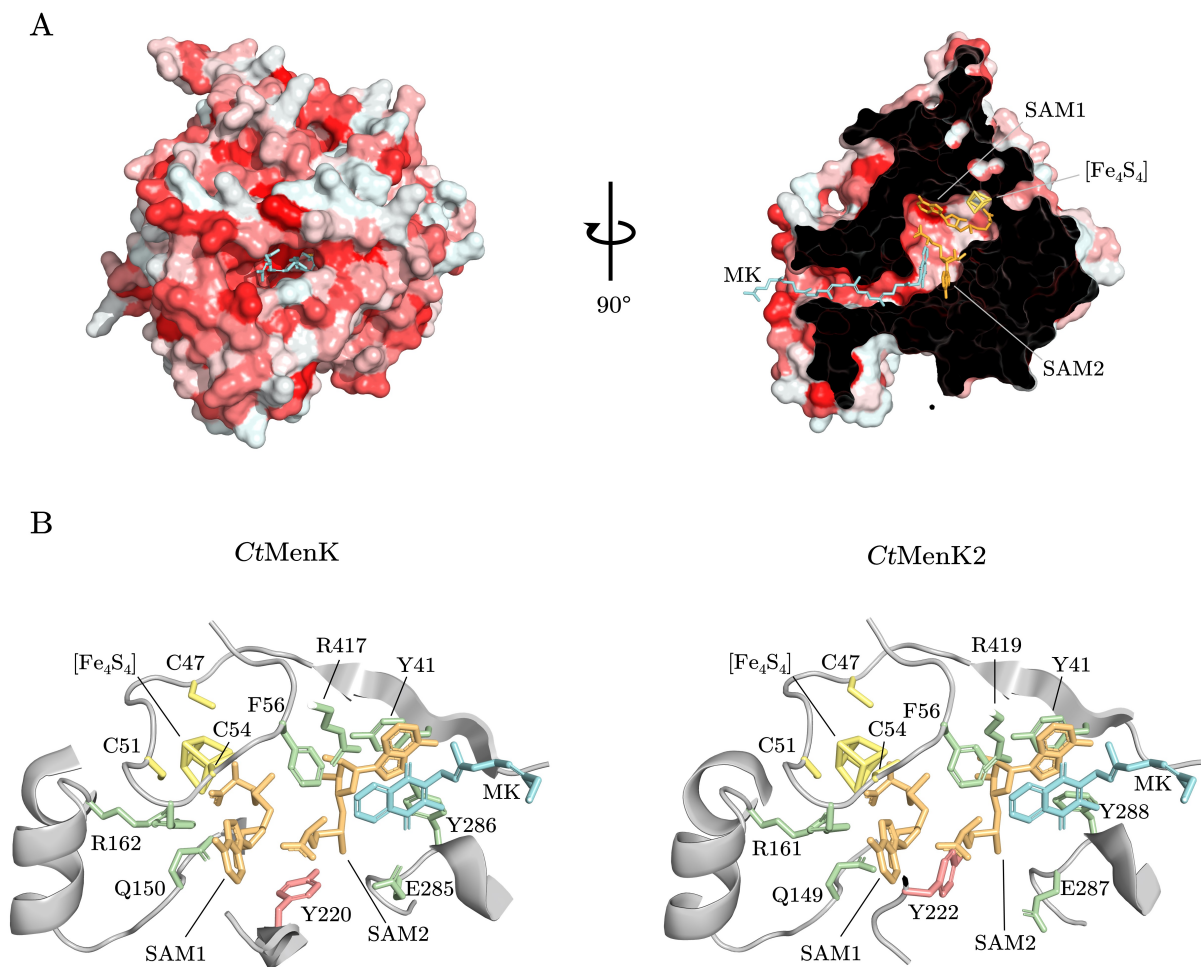


Abbildung 5.38: Abb. 1: Lage und Struktur des aktiven Zentrums in *CtMenK* und *CtMenK2*. (A) Darstellung der Hydrophobizität (nach Abb. 5.36) auf der Proteinoberfläche mit dem Kanaleingang sowie Querschnitt von *CtMenK* mit dem $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster (gelb), den 2 SAM-Molekülen (orange) und MK (hellblau). (B) Potenzielle Bindungsstelle für (Methyl)-Menachinon im aktiven Zentrum von *CtMenK* mit den konservierten Aminosäuren, die an den Bindungen des Kofaktors und Substrats beteiligt sind.



Kapitel 6

Diskussion

6.1 Phylogenie von MenK/MqnK/MenK2-Enzymen

In zahlreichen wissenschaftlichen Untersuchungen wurde das Vorkommen von methylierten MK-Derivaten wie MMK und DMMK in verschiedenen Mikroorganismen nachgewiesen (Anh. Tab. S.1). Eine Mehrheit dieser Mikroorganismen gehört den bakteriellen Phyla Actinomycetota (früher: Actinobacteria) und Pseudomonadota (früher: Proteobacteria) an. Zusätzlich wurde die Produktion von MMK auch bei Arten aus den archaealen Phyla Thermoproteota (früher: Crenarchaeota) und Euryarchaeota festgestellt, während die Produktion von DMMK bisher nur in der Klasse der Coriobacteriia (Phylum Actinomycetota) beobachtet wurde.

Bisher wurde die Verbreitung von MMK bzw. MenK/MqnK/MenK2 nur anhand biochemisch charakterisierter Mikroorganismen vermutet. Die bioinformatische Auswertung mittels Clusteranalyse hat jedoch das wahre Potenzial der Verbreitung von MenK/MqnK/MenK2-Enzymen aufgezeigt. Die Ergebnisse des MKMT-Clusters lieferten Hinweise darauf, dass zahlreiche Mikroorganismen die Fähigkeit besitzen, methylierte MK-Derivate zu synthetisieren. Dies wurde durch die erfolgreiche Bestätigung der vorhergesagten enzymatischen Aktivität der MenK- und MenK2-Proteine in den Mikroorganismen *Ferrimonas marina*, *Collinsella tanakaei* und *Syntrophus acitrophicus* veranschaulicht. Darüber hinaus wird diese Analyse durch früher identifizierte MenK/MqnK/MenK2-Proteine unterstützt, wie sie beispielsweise in *Adler-*

creutzia equolifaciens, *Shewanella oneidensis* und *Wolinella succinogenes* beobachtet wurden (Hein *et al.*, 2017; Hein *et al.*, 2018). Es wurden bisher 9 bakterielle Phyla identifiziert, die Mikroorganismen mit der Fähigkeit zur Bildung von MMK enthalten, von denen zuvor keine Kenntnis bestand (Abb. 5.5). Sogar innerhalb der bekannten Phyla wie Actinomycetota und Pseudomonadota wurde die Anzahl der betreffenden Mikroorganismen unterschätzt. Insgesamt sind nun bereits 492 verschiedene Stämme, die einer taxonomischen Familie zugeordnet sind, bekannt. Diese Ergebnisse wurden durch die biochemisch charakterisierten Mikroorganismen, die MMK/DMMK enthalten, bestätigt, da sie nahezu alle in der Analyse wiedererkannt wurden. Das Fehlen bestimmter Organismen wie *Sutterella stercoricanis* DSM17807 lies sich darauf zurückführen, dass keine Genomsequenzen verfügbar waren.

Diese Ergebnisse verdeutlichen eine klare Diskrepanz zwischen der Anzahl der Mikroorganismen, die potenzielle MqnK/MenK/MenK2-Kandidaten aufweisen, und jenen, bei denen die MMK/DMMK-Produktion biochemisch bestätigt worden war. Ein Problem bei der experimentellen Bestimmung der Chinon/Chinolpool-Zusammensetzung besteht darin, dass sie von den Wachstumsbedingungen abhängig ist. In vielen Laborkulturen, die aerob auf komplexen Medien gezüchtet werden, blieb die Fähigkeit zur Produktion von MMK/DMMK wahrscheinlich unbeobachtet, da solche Wachstumsbedingungen nicht den natürlichen Lebensraum widerspiegeln. Dank der neu identifizierten MenK/MqnK/MenK2-Sequenzen war es möglich, spezifische Motive abzuleiten. Neben der Analyse

von Proteinsequenzen in voller Länge sind die vorgestellten Signaturmotive nützlich, um Mitglieder der MqnK/MenK/MenK2-Familie von anderen radikalen SAM-Enzymen zu unterscheiden und MenK2-Homologe innerhalb der Familie anhand eines einzigen Signaturmotivs zu identifizieren (Tab. 5.2). Dies ist besonders hilfreich, da die automatisierte systematische Annotation in öffentlichen Datenbanken zu vielen funktionellen Fehlannotationen von RSMT-Enzymen der Klasse C geführt hat (Schnoes *et al.*, 2009). Zum Beispiel wurden 47% der 14 365 Proteine, die in der Clusteranalyse verwendet wurden, als Coproporphyrinogen-III-Oxidase annotiert, aufgrund ihrer hohen Sequenzähnlichkeit mit CPDH und der umfassenden Charakterisierung von *E. coli* CPDH.

Insbesondere die Unterscheidung zwischen MenK und MenK2 wird anhand eines einzigen Motivs ([QxTxYPLM/QxTxSPLY]) ermöglicht. Dadurch wurden 48 Arten identifiziert, die MenK2-Sequenzen besitzen (Abb. 5.5). Zudem wurde das Vorkommen von MenK2 auf zwei Familien eingegrenzt: die Familien *Coriobacteriaceae* und *Eggerthellaceae* (Klasse Coriobacteriia; Phylum Actinomycetota). Darüber hinaus wurde festgestellt, dass das Genom jedes dieser 48 Mikroorganismen, die MenK2 aufweisen, ein kodierendes Gen für ein kanonisches MenK-Enzym enthält. Dies legt nahe, dass die Funktion von MenK2 hauptsächlich in der Bildung von 7,8-DMMK liegt und es nicht unabhängig von MenK vorkommt.

Durch zusätzliche Untersuchungen wurde festgestellt, dass nicht alle Mikroorganismen in beiden Familien sowohl MenK als auch MenK2 besitzen. Einige Mikroorganismen können entweder nur MenK oder sowohl MenK als auch MenK2 aufweisen, während andere keines von beiden besitzen. Dies deutet daraufhin, dass die Verteilung und das Vorhandensein dieser Enzyme in beiden Familien variieren kann. Innerhalb der Familie *Coriobacteriaceae* gehören die Gattungen *Parvibacter*, *Collinsella* und *Senegalimassilia* zu den Mikroorganismen mit MenK und MenK2. Keine der anderen Gattungen innerhalb dieser Familien zeigt das Vorhandensein von MenK oder MenK2. In der Familie *Eggerthellaceae* besitzen die Gattungen *Adlercreutzia*, *Berryella*, *Cryptobacterium*, *Denitrobacterium*, *Eggerthella*,

Ellagibacter, *Enterorhabdus*, *Gordonibacter*, *Hugonella*, *Raoultibacter* und *Slackia* MenK und MenK2.

Eine interessante Ausnahme stellt bisher das archaeale Phylum der Euryarchaeota dar. Bei den bisher bekannten drei Mikroorganismen, die methylierte Menachinone aufweisen (*Natronobacterium gregoryi* SP2, *Thermoplasma acidophilum* DSM1728 und HO-63), wurden in ihren Genomen keine homologen Sequenzen der MenK/MqnK/MenK2-Familie identifiziert. Dieser Befund wird auch durch die Clusteranalyse bestätigt, bei der kein Mikroorganismus aus dem Phylum Euryarchaeota erkannt wurde.

Besonders bemerkenswert ist *N. gregoryi* SP2, da dieser Mikroorganismus neben MMK auch DMMK besitzt. Demnach müsste er nicht nur über das Gen *menK*, sondern auch über ein Gen für *menK2* verfügen oder über funktionelle Analoge. Interessanterweise verwendet dieser Mikroorganismus den Men-Weg zur Synthese von MK, was bei Archaea ungewöhnlich ist. Bisher wurde dies hauptsächlich in der Familie *Halobacteriaceae* (Phylum: Euryarchaeota) beobachtet, und es wird vermutet, dass sie den klassischen Men-Weg durch horizontalen Gentransfer (HGT) von Bakterien erworben haben (Zhi *et al.*, 2014). Obwohl *N. gregoryi* SP2 zur Familie *Natrialbaceae* gehört, gehört es immer noch zur selben Klasse der Halobacteria. Daher könnte der Men-Weg durch denselben HGT erlangt worden sein.

Zhi *et al.* (2014) haben durch phylogenetische Analysen festgestellt, dass die Men-Proteine aus Euryarchaeota zusammen mit den Proteinen von *Salinibacter ruber* (Phylum: Rhodothermota) eine Klade bilden. Wenn dies der Fall ist, handelt es sich im Fall *N. gregoryi* SP2 um einen zweiten HGT, da *N. gregoryi* SP2 nicht nur den Men-Weg, sondern auch die Gene für *menK* und *menK2* besitzen müsste, die ebenfalls transferiert worden sein müssen. Das Phylum Rhodothermota besitzt das Gen für MenK2 jedoch nicht. Daher müsste es zu einem HGT zwischen einem Mikroorganismus aus der Familie *Coriobacteriaceae* oder *Eggerthellaceae* gekommen sein, da diese die einzigen Mikroorganismen mit einem MenK2 sind. Dies würde das Vorkommen von DMMK außerhalb der Familien *Coriobacteriaceae* und *Eggerthellaceae* erklären. Allerdings erklärt dies nicht, warum potenzielle *menK/mqnK/menK2*-Kandidaten im

Genom nicht identifiziert wurden. Es besteht die Möglichkeit, dass das Genom unvollständig ist oder die Gene auf einem nicht sequenzierten Plasmid lokalisiert sind. Eine alternative Erklärung könnte sein, dass die Methylierung von MK und MMK durch ein nicht verwandtes Enzym erfolgt, das unabhängig durch konvergente Evolution entwickelt wurde.

Eine alternative Methode zur biochemischen Analyse des Chinonpools besteht darin, in (meta)genomischen Daten nach *menK/mqnK/menK2*-Genen zu suchen, um Informationen über das potenzielle Vermögen zur Synthese von MMK und DMMK zu erhalten. Mittels der Clusteranalyse wurde dieser Zusammenhang in der vorliegenden Arbeit erfolgreich hergestellt. Daher ist es nun möglich, die mögliche Zusammensetzung des Chinonpools anhand von Genomdaten vorherzusagen. In dieser Analyse wurde nicht nur der Cluster für die MenK/MqnK/MenK2-Familie identifiziert, sondern es war auch möglich, Cluster von anderen Proteinen der Klasse C RSMTs zu identifizieren (Abb. 5.1). Eine entsprechende Auswertung dieser Cluster könnte zusätzliche Erkenntnisse über die betreffenden Proteine liefern.

6.2 Rolle von MMK in mikrobiellen Elektronentransportketten

Aufgrund ihrer Fähigkeit, Elektronen zu transportieren, sind methylierte MK-Derivate besonders geeignet als Redoxvermittler in Elektronentransportketten (ETKs), insbesondere für Elektronenakzeptoren mit niedrigem Standardredoxpotential. Es wird angenommen, dass das Redoxpotential von Menachinon, das bei $E_0'(\text{MK}/\text{MKH}_2) \approx -70 \text{ mV}$ liegt, mit jeder zusätzlichen Methylgruppe am Naphthochinonringssystem negativer wird, und zwar um etwa 40-80 mV pro Methylgruppe. Demzufolge wurde für 8-MMK/8-MMKH₂ ein Redoxpotential von etwa -150 mV berichtet (Schoepp-Cothenet *et al.*, 2013; Unden & Bongaerts 1997'; Schmid *et al.*, 1999; Nasiri *et al.*, 2009; Hein *et al.*, 2018). Diese Eigenschaften prädestinieren methylierte

Chinone für die Beteiligung an Niederpotential-Elektronentransportketten, die bei anaeroben Atmungsprozessen auftreten und einen terminalen Elektronenakzeptor mit einem negativen Redoxpotential nutzen. Im Rahmen der Korrelationsanalyse wurden Enzyme identifiziert, die eine erhöhte Korrelation mit 8-MMK aufwiesen. Dies lässt darauf schließen, dass diese Enzyme möglicherweise in einer Wechselwirkung oder einem Zusammenhang mit der Nutzung von 8-MMK in den Elektronentransportketten eine Rolle spielen könnten.

6.2.1 MMK-assozierte Elektronendonator-Oxidoreduktasen

Unter den Elektronendonator-Oxidoreduktasen haben zwei spezifische Enzyme besondere Aufmerksamkeit erregt: die Formiat-Dehydrogenase (Fdh) und die Hydrogenase (Hyd) (Tab. 5.4; Abb. 6.1B). Die Fdh ist ein membrangebundener Komplex, der aus den Untereinheiten FdhABC besteht. Sie ist für die Oxidation von Formiat zu Kohlendioxid und Wasserstoff verantwortlich. Die Hyd hingegen ist ein membrangebundener [NiFe]-Hydrogenase-Komplex, bestehend aus den Untereinheiten HydABC. Sie katalysiert die Reaktion von Wasserstoff zu Protonen und Elektronen. Bei Betrachtung der E_0' -Werte der beteiligten Redoxpaare ergibt sich ein Wert von $E_0'(\text{CO}_2/\text{HCO}_2^-) \approx -432 \text{ mV}$ und $E_0'(\text{H}^+/\text{H}_2) \approx -420 \text{ mV}$. Diese beiden Enzyme sind bisher die einzigen Elektronendonator-Oxidoreduktasen, bei denen eine Interaktion mit 8-MMK beschrieben wurde (Dietrich & Klimmek 2002; Klimmek *et al.*, 2004; Eller *et al.*, 2019). Es ist wichtig anzumerken, dass sowohl die Fdh als auch die Hyd nicht ausschließlich von 8-MMK abhängig sind, sondern auch in der Lage sind, Elektronen auf MK zu übertragen (Kröger *et al.*, 2002).

Neben den zuvor erwähnten Enzymen existiert ein weiteres Enzym, die Succinat:Chinon-Oxidoreduktase (SQR) aus *Thermoplasma acidophilum*, die bislang nur in begrenztem Umfang erforscht wurde (Abb. 6.1A). Dieses Enzym wurde im thermo- und acidophilen Archaeon *T. acidophilum*, als auch

im extrem thermophilen Bakterium *Thermus thermophilus* identifiziert (Schäfer *et al.*, 2002, Kolaj-Robin *et al.*, 2011). Das *sdh/frd*-Operon von *T. acidophilum* kodiert für vier Proteinuntereinheiten: A (Flavoprotein-Untereinheit), B (Eisen-Schwefelprotein-Untereinheit) und zwei kleine Untereinheiten C und D, die einen Membrananker bilden (Lancaster 2013). Die Untereinheiten A und B zeigen allgemein eine hohe Sequenzhomologie zu anderen Arten, und dies trifft auch auf die Succinat-Dehydrogenase (Sdh) aus *T. acidophilum* zu. Die Differenzierung zwischen Sdh- und Frd-Enzymen anhand ihrer Sequenzen ist herausfordernd. Dies könnte die fehlende aussagekräftige Korrelation zwischen Sdh und MMK in der Korrelationsanalyse erklären (Lancaster 2013). Möglicherweise ist eine präzisere Unterteilung der Sdh/Frd in Bezug auf ihre Subtypen notwendig, um relevante Ergebnisse zu erzielen, da die Klassifizierung in verschiedene Typen auf der Struktur der Membranankerproteine basiert. Auch die Ergebnisse der EPR-Spektroskopie deuten daraufhin, dass die charakteristischen Eisen-Schwefel-Cluster S1 [Fe₂S₂], S2 [Fe₄S₄] und S3 [Fe₃S₄] der „klassischen“ Sdhs in dieser archaischen Sdh ebenfalls vorhanden sind (Anemüller *et al.*, 1995). Im Gegensatz dazu unterscheidet sich der Membrananker von dem anderer Arten und besteht aus den beiden kleinen hydrophoben Untereinheiten C und D. Er enthält zudem zwei Häm-Gruppen und wird als Typ-A-Anker klassifiziert (Schäfer *et al.*, 2002). Die Sdh-Aktivität dieses Enzyms wurde durch Membranpräparationen mit künstlichen Elektronenakzeptoren bestätigt, die zudem eine MMK (früher: Thermoplasmachinon)-Abhängigkeit aufwiesen (Anemüller *et al.*, 1995). Darüber hinaus zeigte *T. acidophilum* bei Wachstum in einer anaeroben Umgebung eine erhöhte Menge an 8-MMK₇, die 97% des Gesamtchinons ausmacht (Shimada *et al.*, 2001). Bislang war es nicht möglich die Sdh zu isolieren, ohne dabei seine Enzymaktivität zu verlieren. Dies hat die Durchführung weiterführender Untersuchungen bislang verhindert. Daher ist noch ungeklärt, ob als mögliches Chinon auch andere MK-Derivate neben MMK in Frage kommen könnten.

6.2.2 MMK-assozierte Elektronenakzeptor-Oxidoreduktasen

Bei der Konstruktion einer vollständigen ETK, die aus einem Elektronendonator, Menachinon und einem Elektronenakzeptor besteht, müssen auch die Elektronenakzeptor-Oxidoreduktasen berücksichtigt werden. Im Rahmen der Korrelationsanalyse wurden drei eindeutige Enzyme identifiziert, die eine hohe Korrelation mit 8-MMK aufweisen: die Polysulfid-Reduktase (Psr), die Sulfitreduktase (Mcc) und die MMK:Fumarat-Reduktase (Mfr) (Tab. 5.3). Diese Enzyme spielen eine entscheidende Rolle bei der Bildung und dem Transfer von Elektronen innerhalb der ETKs. Die Psr wurde im Modellorganismus *W. succinogenes* untersucht, der durch oxidative Phosphorylierung wachsen kann und dabei Wasserstoff oder Formiat als Elektronendonoren verwendet, während Polysulfid als Elektronenakzeptor dient (Klimmek *et al.*, 1991; Klimmek *et al.*, 2004). In dieser ETK besteht der PsrABC-Komplex in Kombination mit dem zuvor erwähnten Fdh oder Hyd (Abb. 6.1B) (Dietrich & Klimmek 2002; Klimmek *et al.*, 2004). Polysulfid ist ein Elektronenakzeptor mit niedrigem Redoxpotential, mit einem E_0' (Polysulfid/HS⁻) \approx -420 mV. In Kombination mit der Hyd oder Fdh ist MK aufgrund seines zu positiven Redoxpotentials offensichtlich kein geeigneter Redoxvermittler für diese spezifische ETK, weshalb 8-MMK eine deutlich bessere Option darstellt. Um die Chinon-Abhängigkeit der Polysulfid-Reduktase zu untersuchen, wurde die Polysulfid-Atmung von *W. succinogenes* erfolgreich in Liposomen rekonstituiert (Dietrich & Klimmek 2002). Als Chinone wurden die Menachinon-Derivate MMK₆, MK₆, MK₄ und MK₁ verwendet. Zur Messung der Substratumsetzung wurde die Polysulfidreduktion photometrisch unter Verwendung von Tetrahydroboranaten verwendet, und die Abnahme der Absorption von Polysulfid bei 360 nm gemessen. Dabei wurde festgestellt, dass die Polysulfid-Reduktion strikt vom Vorhandensein von 8-MMK₆ in der liposomalen Membran abhängig war, während sich MK als unzureichend erwies. Das zweite Enzym aus der Korrelationsanalyse ist die kupferhaltige Octahaem-Cytochrom c-

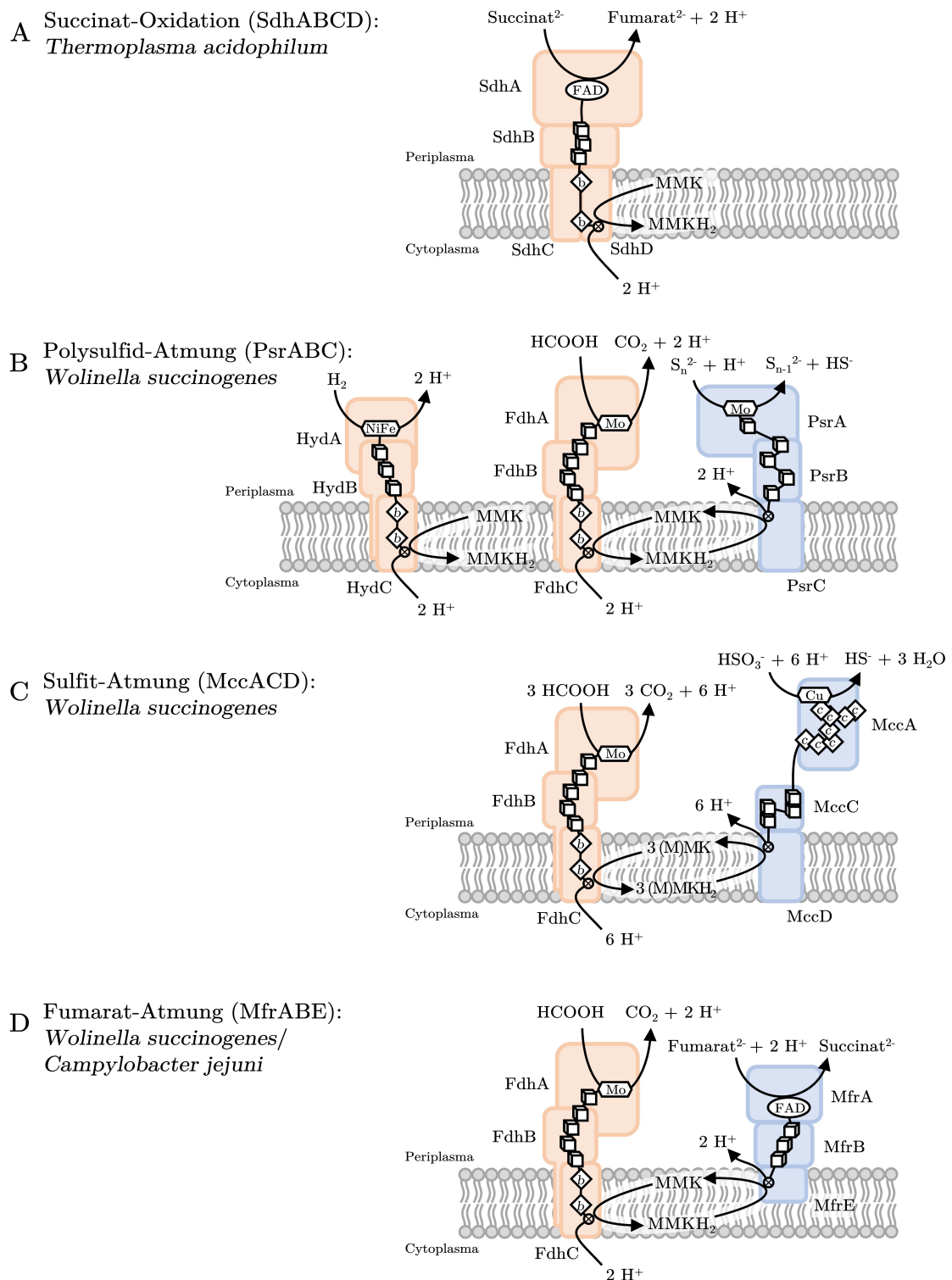


Abbildung 6.1: Bildunterschrift auf nächster Seite.

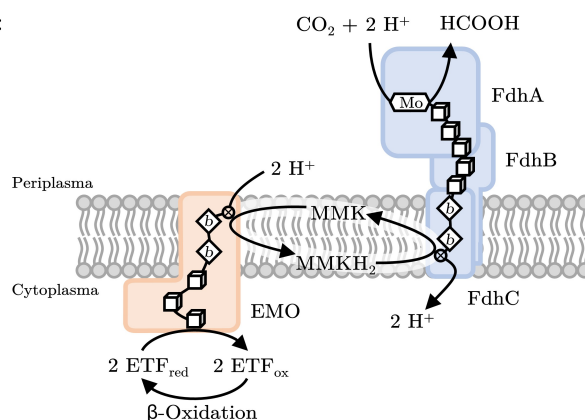
E CO_2 -Reduktion (EMO/ FdhABC):
Syntrophus aciditrophicus


Abbildung 6.1: Beispiele für Elektronentransportketten, an denen MMK beteiligt ist. A, Sdh Typ A-abhängige Succinat-Oxidation; B, Polysulfid-Atmung; C, Sulfit-Atmung; D, Mfr-abhängige Fumarat-Atmung; E, syntrophe CO_2 -Reduktion durch kurzkettenige Fettsäuren. Chinon reduzierende Enzymkomplexe sind orange und Chinol oxidierende Enzymkomplexe sind blau dargestellt. Es sind nur monomere Formen der Enzyme dargestellt. Würfel bezeichnen Eisen-Schwefel-Zentren, Rauten bezeichnen Häm *b*-Gruppen. Cu, Kupfer-Cofaktor; FAD, Flavin-Adenin-Dinukleotid; ETF, elektronenübertragendes Flavoprotein; EMO, ETF:MMK-Oxidoreduktase; Fdh, Formiat-Dehydrogenase; Hyd, Hydrogenase; MccA, Octahaem-Cytochrom *C*-Sulfit-Reduktase; Mfr, MMKH₂: Fumaratreduktase; (M)MK, Menachinon oder 8-Methylmenachinon; (M)MKH₂, Menachinol oder 8-Methylmenachinol; Mo, Molybdän-Cofaktor; NiFe, Nickel-Eisen-Cofaktor; Psr, Polysulfidreduktase.

Sulfitreduktase MccA, die eine Sechs-Elektronen-Reduktion von Sulfit zu Sulfid katalysiert. In *W. succinogenes*-Zellen ist die MccA für die Sulfitatmung von Bedeutung, und es wurde vorgeschlagen, dass das Eisen-Schwefel-Protein MccC und die mutmaßliche Chinol-Dehydrogenase MccD an dieser Reaktion beteiligt sind (Kern *et al.*, 2011; Hermann *et al.*, 2015). Die ETK besteht aus dem FdhABC- und dem MccACD-Komplex (Abb. 6.1C). Das Sulfit-Sulfid-Redoxpaar weist ein E_0' ($\text{HSO}_3^-/\text{HS}^-$) ≈ -116 mV auf und als primäres Menachinon wird das 8-MMK verwendet. Es wurde gezeigt, dass die *mqnK* Deletionsmutante von *W. succinogenes* immer noch in der Lage ist, die Formiat-Oxidation mit der Sulfitreduktion zu koppeln und dadurch zu wachsen, wenn auch in geringerem Umfang als die Zellen des Wildstammes (Eller *et al.*, 2019). Dies deutet daraufhin, dass MK die Funktion des MMK in dieser ETK übernehmen kann. Die vorliegende Hypothese wird durch die Zusammensetzung des Chinonpools von *W. succinogenes*-Zellen, die unter Sulfitbedingungen gewachsen sind, unterstützt. In diesem Chinonpool war sowohl

MK₆ als auch 8-MMK₆ in gleichen Mengen vorhanden (Eller *et al.*, 2019). Diese Beobachtung deutet daraufhin, dass das Enzym MccD die Fähigkeit besitzt, sowohl die reduzierte Form von MK₆ als auch von 8-MMK₆ zu oxidieren.

Als letzte Elektronenakzeptor-Oxidoreduktase, die in der Korrelationsanalyse identifiziert wurde, fungiert die unkonventionelle MMK:Fumarat-Reduktase (Mfr). Sie katalysiert die periplasmatische Reduktion von Fumarat und ermöglicht den Zwei-Elektronen-Transfer zwischen den Redoxpaaren MMK/MMKH₂ und Succinat/Fumarat (Abb. 6.1D) (Juhnke *et al.*, 2009; Weingarten *et al.*, 2009; Guccione *et al.*, 2010). Der E_0' -Wert für das Redoxpaar (Fumarat/Succinat) beträgt $\approx +30$ mV. Im Unterschied zu den klassischen FrdABC- oder FrdABCD-Komplexen, die ausschließlich MK verwenden und in der Korrelationsanalyse betrachtet wurden (mit Ausnahme der SQR aus *T. acidophilum* mit dem TypA-Anker, bei der bisher nur eine Sdh-Aktivität nachgewiesen wurde und noch keine Frd-Aktivität), ist die Mfr auf 8-MMK als Elektronendonator für die cytoplasmatische Reduktion von Fumarat zu

Succinat angewiesen (Lancaster & Simon 2002; Kröger *et al.*, 2002). In Untersuchungen mit *Campylobacter jejuni* wurde gezeigt, dass die Mfr zur zellulären Fitness unter Fumarat-abhängigen Wachstumsbedingungen beiträgt, aber die Aktivität allein nicht ausreicht, um ein signifikantes Wachstum in Abwesenheit von FrdA zu unterstützen (Guccione *et al.*, 2010). Dies deutet darauf hin, dass der Mfr- und der Frd-Komplex in einem komplementären Zusammenspiel agieren, um die Fumaratreduktion und das Zellwachstum sicherzustellen. Eine ähnliche Koexistenz der Frd- und Mfr-Komplexe wird wahrscheinlich auch in der Membran von *W. succinogenes* stattfinden, da Zellen, die mit Fumarat kultiviert werden, ungefähr gleiche Mengen an MK₆ und 8-MMK₆ enthalten (Eller *et al.*, 2019).

Andere Enzyme wie Tetrathionat-Reduktase (Ttr), Cytochrom *c*-Nitrit-Reduktase (Nrf), Trimethylamin-*N*-oxid-Reduktase (Tor) usw., die ebenfalls in Mikroorganismen vorkommen, die 8-MMK enthalten, zeigen deren Substrat/Produktpaare Redoxpotenziale, die außerhalb des Niedrigpotentialbereichs liegen. Beispielsweise beträgt das Redoxpotenzial für das Redoxpaar von Tsd E_0' (Tetrathionat/Thiosulfat) $\approx +198$ mV, Nrf E_0' ($\text{NO}_2^-/\text{NH}_4^+$) $\approx +340$ mV und Tor E_0' (TMAO/TMA) $\approx +130$ mV (Kurth *et al.*, 2015; Simon *et al.*, 2002; Gon *et al.*, 2001). Entsprechend ist verständlich, dass MK ein geeigneter Redoxvermittler für diese Reaktionen ist, da sein Redoxpotenzial für diese Systeme angemessen ist.

Ein weiteres Enzym, das keine Korrelation aufwies, jedoch in einer hohen Anzahl an MMK-produzierenden Mikroorganismen zu finden war, ist CymA. Die Tetrahäm-Cytochrom *c*-Chinoldehydrogenase CymA, spielt eine bedeutende Rolle in verschiedenen Arten der anaeroben Atmung, insbesondere bei *Shewanella*-Spezies. Die Deletion von *cymA* in *Shewanella putrefaciens* MR-1 führte dazu, dass *S. putrefaciens* MR-1 nicht mehr in der Lage war, Eisen(III), Mangan(IV), Nitrat und Fumarat als Elektronenakzeptoren zu nutzen (Myers & Myers 2000). Die Redoxpotenziale der Hämgruppen in CymA liegen bei -240 mV (Häm1), -265 mV (Häm2), -190 mV (Häm3) und -110 mV (Häm4). Es wurde festgestellt, dass ein intraproteinärer Elektronentransfer von Häm1 zu den Low-Spin-Hämgruppen nach der

Reduktion durch MKH₂ stattfindet (Marriott *et al.*, 2012). Allerdings wurde auch in *in vitro* Experimenten gezeigt, dass zur Reduktion von CymA Elektronen mit niedrigem Redoxpotenzial benötigt werden. Es wurde festgestellt, dass lediglich 20-30 % der CymA-Proteine durch das MK-Derivat Menadion und NADH reduziert wurden, was auf das Fehlen des gebundenen Cofaktors MK-7 zurückgeführt wurde (Marriott *et al.*, 2012). *In vivo* könnten diese Elektronen durch primäre Donor-Oxidoreduktasen wie die protonenpumpende NADH-Dehydrogenase, die Fdh oder die Hyd bereitgestellt werden. Kulturen von *S. putrefaciens* MR-1, die unter diesen Bedingungen angezogen wurden, enthielten im Chinonpool neben MK₇ auch 8-MMK₇. Der Gehalt von 8-MMK₇ lag dabei bei etwa 20 % (Myers & Myers 1993; Myers & Myers 2000). Dabei ist das Vorkommen von 8-MMK nicht überraschend, da die Familie der *Shewanellaceae* die größte Anzahl an Mikroorganismen umfasst, die 8-MMK produzieren. Eine detaillierte Untersuchung, ob CymA neben MK auch 8-MMK als Elektronendonator verwenden kann, wurde bisher noch nicht durchgeführt. Basierend auf den verwendeten Elektronendonator-Oxidoreduktasen, dem Redoxpotenzial von CymA und der geringen Reduktionsfähigkeit von Menadion gegenüber CymA ist es denkbar, dass sowohl MK als auch MMK an der Elektronentransportkette beteiligt sind, ähnlich wie bei Mcc. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um dies zu prüfen. Eine mögliche Herangehensweise wäre die Verwendung einer *menK*-Deletionsmutante von *S. putrefaciens* MR-1 oder die Durchführung des geschilderten *in vitro* Experiments mit methyliertem Menadion um weitere Erkenntnisse zu gewinnen.

6.2.3 Syntrophe CO₂-Reduktion gekoppelt an Fettsäureoxidation in *Syntrophus aciditrophicus*

Durch die Identifikation und Bestätigung der Methyltransferase-Aktivität von SaMenK aus *S. aciditrophicus* und der Detektion von 8-MMK₇ als zentralem Chinon in der Membran wurde eine neue ETK beschrieben. Die syntrophe Oxidation von kurzkettigen Fettsäuren, gekoppelt

mit der Zwei-Elektronen-Reduktion von CO_2 zu Formiat, wurde detailliert am Modellorganismus *S. aciditrophicus* aufgeklärt (Abb. 6.1E) (Agne *et al.*, 2021). Dabei wurden eine membrangebundene Oxidoreduktase namens EMO (ETF:MMK-Oxidoreduktase) und 8-MMK₇ als zentrale Redoxkomponenten der CO_2 -Reduktion durch Acyl-CoA identifiziert. Die membrangebundene EMO enthält zwei Häm *b*-Gruppen und drei Eisen-Schwefel-Zentren, die als Eintrittsstelle für Elektronen dienen, die von einem cytoplasmatischen elektronenübertragenden Flavoprotein ETF übertragen werden. Die Autoren berichteten über die Rekonstitution der ETK von Acyl-CoA zum Chinon/Chinolpool unter Verwendung von solubilisierter EMO und Proteoliposomen (Agne *et al.*, 2021). Dabei wurde der Transfer von der Hoch- und Niedrigpotential-Hämgruppe identifiziert. Es wird vermutet, dass reduziertes 8-MMK₇ zwei Elektronen an einen membrangebundenen Fdh-Komplex abgibt, der die Reduktion von CO_2 zu Formiat im periplasmatischen Raum katalysiert. EMO wurde in die Korrelationsanalyse aufgenommen, jedoch wurde keine eindeutige Korrelation festgestellt. Es wurde in Mikroorganismen mit 8-MMK und DMMK gefunden, aber auch in einer größeren Anzahl in anderen Varianten. Dies deutet auf eine weitreichende phylogenetische Verbreitung hin, wie sie auch in anderen phylogenetischen Untersuchungen beobachtet wurde (Agne *et al.*, 2021). EMO wurde sogar in Mikroorganismen gefunden, die nur MK besitzen. Dies spricht gegen eine reine Abhängigkeit von 8-MMK, wie es bei Psr der Fall ist. Daher sind weitere Untersuchungen erforderlich, um die Rolle von EMO in den nicht-MMK-produzierenden Mikroorganismen zu klären.

6.2.4 Die Rolle von 7,8-DMMK

Zur Bildung von 7,8-DMMK sind ausschließlich zwei Familien von Mikroorganismen, nämlich *Coriobacteriaceae* und *Eggerthellaceae*, befähigt. Bisher ist keine ETK bekannt, die in der Lage ist, DMMK zu verwenden oder davon abhängig zu sein. Das Redoxpotential von DMMK ist niedriger als das von 8-MMK, was darauf hindeutet, dass es an Redoxreaktionen mit noch niedrigeren Potentialen beteiligt sein könnte. Im Gegensatz zu 8-MMK zeigte die Korrelations-

analyse bei den Mikroorganismen, die DMMK enthalten, nur begrenzte Zusammenhänge. Bei der Betrachtung der Elektronendonator-Oxidoreduktasen waren nur zwei Enzyme in den DMMK-produzierenden Mikroorganismen vorhanden: die Chinon-Oxidoreduktase (Qor) und die membrangebundene Oxidoreduktase (EMO). Es ist jedoch wichtig zu beachten, dass diese beiden Enzyme nicht ausschließlich in Mikroorganismen vorkommen, die DMMK produzieren, und bisher wurde keine Abhängigkeit von DMMK nachgewiesen. Interessanterweise besitzen die Mikroorganismen, die DMMK enthalten, weder Fdh noch Hyd, die üblicherweise als Elektronendonator für 8-MMK fungieren. Auch die Elektronenakzeptor-Oxidoreduktasen sind nur spärlich vertreten, nämlich mit Cyd, Dms und Arr. Die Redoxpaare dieser Enzymkomplexe weisen Werte von $E_0'(\text{DMSO}/\text{DMS}) \approx +160 \text{ mV}$ und $E_0'(\text{As}_3^+/\text{As}_5^+) \approx +60 \text{ mV}$ auf, was gegen die Verwendung von MMK bzw. DMMK spricht (Wood 1981; Vink 1996). Infolgedessen lieferte die Korrelationsanalyse keine weiteren Hinweise auf die Funktion von DMMK.

Die begrenzte Anzahl experimentell untersuchter respiratorischer Enzyme in diesen Mikroorganismen steht im Kontrast zum Vorhandensein von MMK und DMMK. Es ist daher anzunehmen, dass diese Mikroorganismen bisher unbekannte Oxidoreduktasen besitzen, die auch bei niedrigeren Potentialen aktiv sind. *A. equolifaciens* weist beispielsweise 17 bisher nicht charakterisierte Membrananker vom PsrC/NrfD-Typ in seinem Genom auf (Hein *et al.*, 2018). Aufgrund der neu identifizierten Mikroorganismen, die das Gen *menK2* im Genom tragen, besteht die Möglichkeit, eine vergleichende Genomanalyse durchzuführen, um identische Oxidoreduktasen zu identifizieren, die ausschließlich in Mikroorganismen vorkommen, die auch DMMK enthalten. Dabei könnte der gleiche Ansatz wie bei der Korrelationsanalyse verwendet werden, da sich dieser bereits bei der Identifizierung von mit 8-MMK assoziierten Oxidoreduktasen als erfolgreich erwiesen hat. Um weitergehende Erkenntnisse über die Funktion dieser identifizierten Proteine zu gewinnen, wäre es notwendig, einen Modellorganismus und ein genetisches System zu etablieren, um Deletionsmutanten zu generieren. Durch die Untersuchung dieser Mutanten könnte aufschlussreiches Wissen

über die Rolle dieser Proteine gewonnen werden. Alle Mikroorganismen, die zur Produktion von DMMK befähigt sind, wurden bisher als Mitglieder der Mikrobiota von Säugetieren identifiziert. Das bedeutet, dass das natürliche Habitat dieser Mikroorganismen hauptsächlich im gastrointestinalen Bereich liegt. Es ist möglich, dass dieses Habitat eine entscheidende Rolle spielt, weshalb gerade diese Mikroorganismen auf DMMK angewiesen sind. Im gastrointestinalen Bereich kann der pH-Wert stark variieren und reicht von pH 1 bis pH 8 (Koziolok *et al.*, 2015). Der Dünndarm hat beispielsweise einen durchschnittlichen pH-Wert von 6, der in den proximalen Regionen auf 7-8 ansteigt. Der Dickdarm kann einen pH-Wert von 5 bis 8 aufweisen, wobei diese Werte aufgrund der regionalen Verteilung der Mikrobiota häufigen Schwankungen unterliegen. Für das Redoxpotenzial von MK bedeutet eine Verringerung des pH-Werts eine lineare Verringerung des Redoxpotenzials (Dharmaraj *et al.*, 2020). Möglicherweise produzieren diese Bakterien DMMK, um einer Absenkung des Redoxpotenzials durch den pH-Wert entgegenzuwirken, da MK bzw. 8-MMK bei einem zu niedrigen pH-Wert nicht mehr als effiziente Redoxvermittler fungieren können.

6.2.5 Menachinone: mehr als nur ein Redoxmediator

Neben seiner Funktion als Redoxvermittler erfüllt MK auch andere Aufgaben. In *Listeria monocytogenes* wurde beispielsweise festgestellt, dass MK die Fluidität der Cytoplasmamembran erhöht. Bei einigen Stämmen wurde während des Wachstums bei niedrigen Temperaturen ein Anstieg des MK-Gehalts beobachtet (Flegler *et al.*, 2021). Diese Zunahme dieses neutralen Isoprenoids führt zu einer Fluiditätssteigerung der Membran und erfüllt somit eine adaptive Funktion bei niedrigen Temperaturen. Auch bei einigen Arten von Haloarchaen (*Halobacterium salinarum*, *Halorubrum lacusprofundi*, *Halorubrum sodomense* und *Haloplanus natans*) wurde ein außergewöhnlich hoher Anteil an MK festgestellt, der bis zu 72% der Gesamtlipide ausmachen kann (Kellermann *et al.*, 2016). Die Autoren der Studie gehen davon aus, dass MK das hydrophobe Milieu beeinflusst und

die Fluidität der Membran erhöht, was wiederum direkte Auswirkungen auf die Permeabilitätseigenschaften hat. Aufgrund dieser Eigenschaften kann MK als Barriere für die Ionenpermeabilität dienen und als wirksames Schutzschild gegen oxidativen Stress fungieren (Anand *et al.*, 2019).

Weiterhin konnte in *B. subtilis* gezeigt werden, dass MK₇ an der komplexen Kolonieentwicklung beteiligt ist (Pelchovich *et al.*, 2013). Die Hemmung der Menachinon-Biosynthese in *B. subtilis* führte zum Verlust der Fähigkeit zur Entwicklung komplexer Kolonien, wobei dieser Phänotyp durch die Zugabe von exogenem MK₄ verringert wurde.

Ebenso kann MK als Elektronenakzeptor für Stoffwechselwege dienen, wie zum Beispiel bei der Häm-Biosynthese in *E. coli* (Möbius *et al.*, 2010). HemG katalysiert die Oxidation von Protoporphyrinogen IX und setzt dabei sechs Elektronen frei. Unter anaeroben Bedingungen werden diese Elektronen auf MK übertragen und dann weiter auf terminale Reduktasen, wie die Fumarat-Reduktase oder Nitrat-Reduktase.

Einige Bakterienarten produzieren keine Chinone; diese auxotrophen Arten können exogene Chinone oder deren biosynthetische Vorstufen verwenden. Wenn man Häm-auxotrophe *S. aureus* zusammen mit Chinon-auxotrophen *S. aureus* kultiviert, wurde das Wachstum und die Fitness beider Mutanten durch einen Chinon- und Häm-Austausch verbessert (Hammer *et al.*, 2014). Ein Austausch von Chinon kann auch zwischen verschiedenen Bakterienarten stattfinden. *Streptococcus agalactiae* kann in Gegenwart von Häm und MK₄ von der Fermentation zur Atmung übergehen (Franza *et al.*, 2016). Dabei wird Energie durch die Reduktion von Sauerstoff gewonnen, wobei als Elektronendonator die NADH Dehydrogenase verwendet wird und als Elektronenakzeptor die Cytochrom *bd* Oxidase (Yamamoto *et al.*, 2005). *S. agalactiae* kann jedoch auch aus dem Menachinon-Vorläufer 1,4-Dihydroxy-2-naphthoesäure (DHNA) DMK₁₀ synthetisieren. DHNA kann von Chinon-produzierenden Darmbakterien wie *E. coli*, *Eggerthella lenta*, *Eubacterium rectale* und mehreren Bacteroides-Arten produziert werden. Der Vorteil von DHNA gegenüber MK ist die bessere Löslichkeit und Diffusionsfähigkeit. DHNA wird von Chinon-auxotrophen Bakterien wie Mitgliedern der *Faecalibacterium*, *Bacteroides*, *Bilophila*, *Gordonibacter* und *Sutterella*

aufgenommen, wodurch sich ihr Stoffwechsel verändert (Fenn *et al.*, 2017). *Faecalibacterium prausnitzii* besitzt eine verkürzte Elektronentransportkette, die auf die Fumarat-Atmung ausgerichtet ist und auf extern bereitgestelltes Menachinon angewiesen ist. Diese stellen nun neue Nährstoffe für die Chinon-produzierenden Darmbakterien zur Verfügung.

Diese Beispiele verdeutlichen, dass die Funktionen von MK über die konventionelle Rolle als Elektronen- und Protonentransporter hinausgehen. Es ist daher anzunehmen, dass auch die methylierten Derivate ähnliche Funktionen aufweisen. Da sich MMK und DMMK strukturell kaum von MK unterscheiden, ist es wahrscheinlich, dass sie einen ähnlichen positiven Einfluss auf die Fluidität der Membran haben wie MK. Zudem könnte die hydrophobe Kopfgruppe von MMK, insbesondere von DMMK, eine stärkere Auswirkung auf die Membranpermeabilität haben.

Unabhängig von den spezifischen Eigenschaften ist es wahrscheinlich wichtiger, dass die Anpassung der Membranfluidität mit der aktiven Atmung koordiniert sein muss. Ein Mikroorganismus, der derzeit eine MMK-abhängige Polysulfid-Atmung betreibt, müsste bei einer Anpassung der Membranfluidität aufgrund einer Temperaturänderung MMK verwenden, um seine Polysulfid-Atmung aufrechtzuerhalten. Dies könnte notwendig sein, da eine signifikante Erhöhung der MK-Konzentration die Polysulfid-Atmung beeinträchtigen würde. Ähnliches könnte auch für DMMK-abhängige ETKs gelten.

Es ist ebenso denkbar, dass MMK oder DMMK als Elektronenakzeptoren für Stoffwechselwege dienen, für Elektronen mit einem zu negativen Redoxpotenzial für MK. MMK und DMMK könnten dann als Elektronensenken fungieren, und die Elektronen könnten, ähnlich wie bei MK, auf terminale Reduktasen weitergeleitet werden.

Auch in Bezug auf die komplexe Kolonienbildung könnten MMK und DMMK eine wichtige Rolle spielen. Gegenüber MK hätte diese den Vorteil, dass andere Spezies MMK und DMMK möglicherweise nicht als respiratorisches Chinon verwenden können, was bedeutet, dass sie möglicherweise weniger aufgenommen werden und so besser zur Koloniebildung beitragen könnten. Diese Hypothesen könnten durch *menK/mqnK/menK2*-Deletionsmutanten von MMK-produzierenden Mi-

kroorganismen experimentell erforscht werden, beispielsweise unter Verwendung von Mikroorganismen, die Koloniebildung betreiben oder starken Temperaturschwankungen ausgesetzt sind.

6.3 Struktur, Funktion und Reaktionsmechanismus von MenK/MqnK/MenK2

Die Identifizierung einer Vielzahl von Mikroorganismen, die MenK/MqnK/MenK2-Proteine im Genom kodieren, hat nicht nur zu Erkenntnissen über Phylogenie und Physiologie geführt, sondern auch unser Verständnis für die strukturellen und funktionellen Eigenschaften dieser Proteine erweitert. Die Untersuchung der strukturellen Merkmale der MenK/MqnK/MenK2-Proteine hat wertvolle Einblicke in die molekularen Mechanismen geliefert, die an der Methylierung beteiligt sind. Diese Ergebnisse haben dazu beigetragen, das Verständnis der Methylierungsprozesse zu vertiefen.

6.3.1 Primärstruktur von MenK/MqnK/MenK2-Enzymen

Die *menK/mqnK/menK2*-Gene befinden sich nicht in der Nähe respiratorischer Enzymgene auf den Genomen und auch nicht in spezifischen Genclustern. Darüber hinaus liegen die *menK*- und *menK2*-Gene nicht in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander. Daher wurden keine funktionellen Erkenntnisse aus der Genomlage abgeleitet.

Dennoch weisen alle MenK/MqnK/MenK2-Proteine die gleiche Domänenarchitektur auf, bestehend aus Tripwire, radikalischer SAM-Domäne, Linker und CPDH-Domäne (Abb. 5.33). Die radikalische SAM-Domäne erwies sich als am konserviertesten innerhalb der MenK/MqnK/MenK2-Proteine und ist auch in anderen Klassen C RSMTs vorhanden. Daher werden diese Domänen auch als „Plug and Play“-Domäne bezeichnet (Holliday *et al.*, 2018). Dies wird auch durch die räumliche Separierung der einzelnen Domänen reflektiert, wodurch durch die Verwendung unterschiedlicher Domänenkombinationen verschiedene Substrate methyliert

werden können (Bauerle *et al.*, 2015) (Abb. 2.7). Die starke Konservierung der radikalischen SAM-Domäne ist auf die Funktion der Initiierung der Reaktion zurückzuführen, die in jedem SAM-Enzym universell ist und daher stark konservierte Strukturen erfordert.

Der Tripwire weist eine geringere Konservierung auf und kommt auch in CPDH vor. Daher stellt er ein Unterscheidungsmerkmal zu anderen RSMTs der Klasse C dar, da diese keinen Tripwire besitzen. Für die CPDH aus *E. coli* wird angenommen, dass der Tripwire die Stabilisierung der Substratbindung unterstützt und eine potenzielle Umgestaltung der C-terminalen Domäne ermöglicht, um das aktive Zentrum zu verschließen (Layer 2003). Eine ähnliche Funktion ist auch für MenK/MqnK/MenK2-Proteine denkbar. Experimente mit einem MqnK-Derivat aus *W. succinogenes*, das einen verkürzten Tripwire enthielt, führten zu einer deutlichen Reduzierung des Gehalts an methylierten Menachinons (Kap. 5.5.2). Die α -helix im Tripwire ist für die Bildung des Eingangs des Substratkanals zusammen mit der CPDH-Domäne verantwortlich. Daher würde die Entfernung des Tripwires zu einer veränderten Kanalstruktur führen, die sich wahrscheinlich negativ auf die Interaktion mit dem Substrat auswirkt.

Die Linker-Domäne, die die geringste Konservierung aufweist, und die CPDH-Domäne, die die zweithöchste Konservierung aufweist, teilen mehrere gemeinsame Funktionen. Beide Domänen werden für die Methylierungsspezifität benötigt. Durch den Austausch der Linker- und CPDH-Domänen in *A. equolifaciens* MenK2 mit den entsprechenden Domänen von *A. equolifaciens* MenK wurde nach der heterologen Produktion des chimären Enzyms in *E. coli* eine Änderung der Methylierungsposition von C-7 auf C-8 erreicht (Hein *et al.*, 2018). Im Gegensatz dazu führten chimäre Enzyme, die nur die Linker- oder die CPDH-Domäne von MenK enthielten, nicht zu methylierten MK-Derivaten, obwohl diese chimären Enzyme in den jeweiligen *E. coli*-Zellen produziert wurden. Es war auch nur geringfügig möglich, die beteiligten Domänenbereiche einzugrenzen, um die veränderte Methylierungsposition zu erreichen. Dies deutet daraufhin, dass die kombinierten Linker- und CPDH-Domänen die Positionsspezifität der Methylierung an

C-8 oder C-7 bestimmen (Hein *et al.*, 2018). Im Strukturmodell wurde deutlich, dass beide Domänen an der Kanalbildung beteiligt sind. Die Linker-Domäne bildet den Übergang vom katalytischen Zentrum zum Kanal und fungiert somit als Bindungstasche für MK, während die CPDH-Domäne den Hauptkanal bildet und für die Führung des MKs zur Bindetasche verantwortlich ist. Dieses Zusammenspiel scheint eng aufeinander abgestimmt zu sein, da der Austausch der einzelnen Domänen nicht möglich ist.

6.3.2 Membranlokalisierung von MenK/MqnK/MenK2 und MK

Das Protein MenK/MqnK/MenK2 hat eine Größe von etwa 45 bis 55 kDa, abhängig vom Mikroorganismus. Es wird angenommen, dass es sich dabei um ein monomeres Protein handelt, so wie es auch bei CPDH der Fall ist (Layer 2003). Es gibt mehrere Gründe, die darauf hinweisen, dass das MenK/MqnK/MenK2-Protein in Form eines Monomers vorliegt. Erstens ist das monomere MenK/MqnK/MenK2 im Vergleich zu den Oligomeren stabiler (Abb. 5.24). Es kann ohne die Zugabe von Glycerin über einen längeren Zeitraum gelagert werden. Zudem wird das monomere *CtMenK2*-Protein in großen Mengen produziert, während die Oligomerisierung gering ist (Abb. 5.21). Im Gegensatz dazu zeigen die Proteine *AeMenK* und *CtMenK* eine steigende Oligomerisierung, die wahrscheinlich auf die Bildung von Aggregaten zurückzuführen ist. Dies wurde durch Denaturierungsexperimente bestätigt, bei denen festgestellt wurde, dass die oligomeren Zustände nicht durch die Anwesenheit von Denaturierungsmitteln denaturiert werden, sondern tatsächlich aggregierte Proteinstrukturen darstellen. (Abb. 5.23). Die beobachtete Oligomerisierung ist wahrscheinlich auf die Überexpression des Proteins in *E. coli* zurückzuführen, wodurch aggregierte Proteine in Einschlusskörpern eingelagert werden, welche bei der Proteinaufreinigung beobachtet wurden. Dies wird auch bestätigt durch die Herabsetzung der Expressionsstärke, sei es durch die Reduktion von

IPTG bei *CtMenK* oder durch die Modifikation des T7-Promotors bei *AeMenK*, wodurch eine erhöhte Proteinmenge aufgereinigt wurde. Dies geht einher mit einem verringerten Expressionsdruck, der zu einer geringeren Proteinproduktion führt und zu einer verminderten Belastung der *E. coli*-Proteinqualitätskontrollmechanismen, was wiederum die Aggregatbildung reduziert.

Bislang wurden in den Strukturmodellen des monomeren MenK/MqnK/MenK2 und durch bioinformatische Berechnungen kein intramembraner Bereich identifiziert. Lediglich die TSA-Analyse wies aufgrund der hohen Startfluoreszenz auf eine stark hydrophobe Oberfläche hin (Kap. 5.4.3). Auch die Strukturvorhersage zeigt hydrophobe Aminosäuren an der Oberfläche auf (Kap. 5.5.2). Daher ist es immer noch unklar, wie genau MenK/MqnK/MenK2 mit der Zellmembran assoziiert ist. Es wurde jedoch bereits gezeigt, dass MenA, die Prenyltransferase, die den ersten membranassoziierten Schritt der Menachinon-Biosynthese vermittelt, mit der konventionellen Plasmamembran von *Mycobacterium tuberculosis* verbunden ist (Puffal *et al.*, 2018; Dhiman *et al.*, 2019). Ebenso scheinen die nachfolgenden Proteine im Men-Weg, MenG und das Modifikationsenzym MenJ, das die Doppelbindung in der β -Isopren-Einheit der Polyprenylkette reduziert, um das Produkt MK₉(II-H₂) zu bilden, mit der intrazellulären Membrandomäne (IMD) von *Mycobacterium smegmatis* assoziiert zu sein (Upadhyay *et al.*, 2015; Upadhyay *et al.*, 2018; Puffal *et al.*, 2018). Die IMD ist eine metabolisch aktive biosynthetische Membrandomäne, die in der polaren Wachstumsregion der Zelle angereichert ist und bisher nur in Mykobakterien beobachtet wurde (Hayashi *et al.*, 2016). Eine ähnliche Assoziation mit der Zellmembran wie bei MenG ist auch für MenK/MqnK/MenK2 denkbar. Dies wirft die Frage auf, wie genau das Menachinon in der Membran vorliegt.

Durch Computersimulationen wurde die Position von Ubichinon in einer Lipiddoppelschicht berechnet. Eine detaillierte Analyse der strukturellen Eigenschaften und Wechselwirkungen zeigt, dass die polare Kopfgruppe des Ubichinons an der Grenzfläche zwischen Wasser und Lipiden in derselben Tiefe wie die Lipid-Glycerin-Gruppen lokalisiert ist und normal zur Membranebene ausgerichtet ist (Galassi & Arantes 2015).

Allerdings deuten Computersimulationen und Experimente mit gekürzten Seitenketten von MKs auf ein anderes Szenario hin. Es scheint, dass die hydrophobe Kopfgruppe von MK mit den Lipidseitenketten assoziiert ist und sich möglicherweise auch in der mittleren Region der Lipiddoppelschicht befindet (Feng *et al.*, 2022; Cleave *et al.*, 2021; Feng *et al.*, 2021; Cleave *et al.*, 2020). Dies deutet daraufhin, dass methylierte MKs, die eine noch hydrophobere Kopfgruppe besitzen, höchstwahrscheinlich im Bereich der Lipidseitenketten lokalisiert sind. Entsprechend dieser Annahme müsste der Kanaleingang von MenK/MqnK/MenK2 etwas tiefer als die Lipid-Glycerin-Gruppen der Membran liegen, damit das MK ins Protein eintreten kann. Daher bleibt weiterhin die Frage offen, wie das Membranassoziierte MenK/MqnK/MenK2-Protein Kontakt mit den in der Lipidseitenketten-assoziierten MK aufnimmt.

6.3.3 Interaktion zwischen MenK/MqnK/MenK2 und MK

Wenn es zur Interaktion zwischen dem Protein und MK kommt, kann das MK durch den Kanal, der durch den Tripwire und die CPDH-Domäne gebildet wird, ins katalytische Zentrum gelangen. Die Analyse des Kanals hat gezeigt, dass er hauptsächlich aus hydrophoben Aminosäuren besteht, was das Eindringen von MK ermöglicht. Es ist interessant festzustellen, dass das MK, wie zum Beispiel MK₈, fast vollständig in das Protein eintreten muss, bis auf 1-2 Isopren-Einheiten, um die MK-Bindestelle zu erreichen (Abb. 5.38). Bei MKs mit kürzeren Seitenketten wie MK₆ ist es vorstellbar, dass das MK₆ vollständig im Protein liegt. Dabei ist es wichtig, dass das Protein weiterhin mit der Membran assoziiert bleibt.

Die genaue Bindung von MK (oder MMK) ist bisher noch nicht verstanden. Es ist jedoch ersichtlich, dass die potenzielle Bindungstasche für (M)MK hauptsächlich aus konservierten hydrophoben Aminosäuren wie Tyrosin und Leucin besteht. Insbesondere die Aminosäure Y291 könnte eine wichtige Rolle bei der Chinonbindung durch hydrophobe Wechselwirkungen spielen

(Abb. 5.38). Die Positionierung der Seitenkette im Kanal könnte ebenfalls einen Einfluss auf die Positionierung der Kopfgruppe von MK haben. Bisherige Untersuchungen mit bekannten Substraten wie MK und DMK sowie allen methylierten Varianten an den Positionen C-5, C-7 und C-8 bis hin zu 5,7,8-TMMK und 5,7,8-TMDMK legen nahe, dass bereits vorhandene Methylierungen am Naphthochinonsystem keine sterische Hinderung verursachen (Abb. 5.11, 5.14). Somit scheinen diese Positionen nicht direkt an der Bindung von MK beteiligt zu sein. Enzymtests mit anderen Substraten wie 2-Hydroxy-1,4-Naphthochinon und Lapachol, die negativ ausgefallen sind, könnten auf die Hydroxylgruppe am C-2 zurückzuführen sein (Abb. 5.32). Möglicherweise führt die erhöhte Hydrophilie der Kopfgruppe durch die Hydroxylgruppe nicht zur korrekten Positionierung des Substrats. Es wurde jedoch auch das Substrat 1,4-Naphthochinon nicht methyliert, das keine Hydroxylgruppe aufweist und dieselbe Kopfstruktur wie DMK besitzt, jedoch keine Isopren-Seitenkette besitzt. Diese Beobachtungen legen nahe, dass die Seitenkette ein wesentlicher Faktor für die Methylierung darstellt und möglicherweise eine Rolle bei der korrekten Positionierung des Substrats spielt. Eine weitere Möglichkeit könnte der hydrophobe Kanal sein, sodass die hydrophile Kopfgruppe den Kanal nicht passieren kann, wenn es keine hydrophobe Seitenkette als treibende Kraft gibt. Bisher ist bekannt, dass MK₁₀, MK₈, MK₇, MK₆ und MK₄ methyliert werden können (Anh. Abb. S.1; Abb. 5.29). Die kürzeste Seitenkette eines MKs bestand aus 4 Isopren-Einheiten. Um die minimale Länge der Seitenkette weiter zu bestimmen, könnten Enzymassays mit MK₁, MK₂ und MK₃ durchgeführt werden, um festzustellen, ob die MK-Derivate mit kürzeren Seitenketten noch methyliert werden können.

6.3.4 Initialreaktion der radikalischen SAM-Domäne

Der Vergleich der Kristallstruktur von CPDH und der AlphaFold-Strukturen von *CtMenK* und *CtMenK2* zeigte, dass die Bindungsstellen für den [Fe₄S₄]-Cluster und die beiden SAM-Moleküle mit dem Protein CPDH identisch zu sein schei-

nen. Dies ist auf die konservierte radikalische SAM-Domäne zurückzuführen. Allerdings wurden im katalytischen Zentrum von MenK/MenK2 zwei Motive, nämlich [QxTxYPLM/QxTxSPLY] und [DEY], identifiziert, die in CPDH nicht vorhanden sind (Abb. 5.38). Das Motiv [DEY] enthält die Aminosäure Y291, welche als potenzielle Bindestelle für MK vermutet wird. Das Motiv [QxTxYPLM/QxTxSPLY] hingegen ermöglicht die Unterscheidung zwischen MenK und MenK2. Überraschenderweise scheint dieses Motiv jedoch keinen direkten Einfluss auf die Methylierungsposition zu haben. In einer gezielten Mutagenese-Studie wurde das Motiv [QxTxSPLY] in *AeMenK2* in das Motiv [QxTxYPLM] geändert, jedoch wurde keine Veränderung der Methylierungsspezifität festgestellt. Daher wird angenommen, dass das Tyrosin in diesem Motiv nicht primär an der Katalyse beteiligt ist, sondern wahrscheinlich nur das SAM2-Molekül koordiniert, ähnlich wie Y220 in CPDH (Layer 2003). Die Verschiebung um drei Aminosäurepositionen scheint dabei keinen Einfluss auf die Funktion zu haben. Dies könnte auf die Beteiligung mehrerer Aminosäuren zurückzuführen sein, die SAM2 stabilisieren, so dass die Positionierung des Tyrosins keinen drastischen Einfluss auf die Katalyse hat.

Die katalytische Reaktion radikaler SAM-Enzyme folgt einem universellen Mechanismus, bei dem der [Fe₄S₄]-Cluster eine zentrale Rolle spielt. Dieser Mechanismus ist auch bei den Enzymen MenK/MqnK/MenK2 zu finden. Zunächst wird der [Fe₄S₄]⁺²-Cluster von einem externen Elektronendonator zum katalytisch aktiven Zustand reduziert (Holliday *et al.*, 2018). In vielen *in vitro* Studien wurden starke Reduktionsmittel wie Natriumdithionit verwendet, um diesen Schritt zu erleichtern. Es wurde jedoch für den MenK-Enzymassay gezeigt, dass die Verwendung eines physiologischen Elektronendonors, wie des NADPH-Flavodoxin-Reduktase/Flavodoxin-Reduktionssystems, die Enzymaktivität im Vergleich zu Natriumdithionit erhöht (Hein 2019). Nach der Reduktion zum [Fe₄S₄]⁺¹-Cluster bindet das SAM1-Molekül über seine α -Amino- und α -Carboxylatgruppen an den Cluster (Abb. 6.2 Schritt 1) (Walsby *et al.*, 2002). Ein Elektronentransfer vom [Fe₄S₄]⁺¹-Cluster zum Sulfoniumion des SAM1 führt zur Spaltung

der S-[5'-C]-Bindung und zur Bildung eines 5'-Desoxyadenosyl (5'-dAdo)-Radikals und eines Methionins (Broderick *et al.*, 2014). Das 5'-dAdo-Radikal bildet ein organometallisches Ω -Zwischenprodukt mit dem einzigartigen Eisen des $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{+2}$ -Clusters. Das Radikal wird durch das Ω -Zwischenprodukt stabilisiert, bis das Substrat positioniert ist. Dies führt zur homolytischen Spaltung der Bindung zwischen dem [5'-C] des 5'-dAdo und dem einzigartigen Eisenion und regeneriert das 5'-dAdo-Radikal (Horitani *et al.*, 2016). Schließlich entzieht das 5'-dAdo-Radikal dem Substrat ein Wasserstoffatom, um die Reaktion zu initiieren. Es wurde festgestellt, dass der nachfolgende Reaktionsmechanismus sich zwischen den verschiedenen radikalischen SAM-Enzymen unterscheidet (Broderick *et al.*, 2018). Allerdings scheint die Verwendung von 2 SAMs und der zugehörige Reaktionsmechanismus innerhalb der Klasse C RSMTs wieder identisch zu sein.

6.3.5 Reaktionsmechanismus der Klasse C RSMTs

Die Analyse von Klasse C RSMTs wie beispielsweise TbtI, welches die Methylierung des Thiazolrings im Thiopeptids Thiomuracin katalysiert, NosN, das bei der Biosynthese von Nosiheptiden an der Methylierung von 3-Methyl-2-indolsäure beteiligt ist und C10P, das an der Cyclopropanierung des Naturprodukts CC-1065 beteiligt ist, zeigt einen einheitlichen Reaktionsmechanismus der Klasse C RSMTs auf (Mahanta *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2011; Jin *et al.*, 2018). Dies trägt dazu bei, den Reaktionsmechanismus von MenK/MqnK/MenK2 besser zu verstehen. Nachdem das 5'-dAdo-Radikal aus SAM1 gebildet wurde (Abb. 6.2 Schritt 1), erfolgt die Abstraktion eines Wasserstoffatoms von der Methylgruppe von SAM2, wodurch ein Methylenradikal entsteht. Dies wurde durch den Einsatz von deuteriertem SAM an der Methylgruppe (CD_3 -SAM) in TbtI, NosN und C10P nachgewiesen. Es wurde festgestellt, dass das 5'-dAdoH-Produkt ein Deuteriumatom enthält, was darauf hinweist, dass das 5'-dAdo-Radikal tatsächlich ein Wasserstoffatom von der Methylgruppe von SAM2 abstrahiert und ein Methylenradikal bildet (Zhang *et al.*, 2017b;

LaMattina *et al.*, 2016; Jin *et al.*, 2018). Des Weiteren stellten die Autoren fest, dass die methylierten Substrate eine Massenverschiebung von +2 Da aufwiesen, was auf die Übertragung der deuterierten Methylengruppe hinweist. Es wird vermutet, dass das dritte Proton entweder vom Substrat oder aus dem Lösungsmittel stammt. Eine Übertragung der SAM2-Methylgruppe auf eine Aminosäure im Enzym vor der Initiierung des Methylenradikals, ähnlich dem Mechanismus der Klasse A RSMTs, ist unwahrscheinlich, da TbtI mit radioaktiv markiertem SAM ($^{14}\text{CH}_3$ -SAM) keine Radioaktivität zeigte (Zhang *et al.*, 2017b). Bei den Experimenten mit CD_3 -SAM in TbtI wurde festgestellt, dass nach längerer Inkubationszeit des Enzymansatzes neben dem CHD_2 -Substrat vermehrt die Varianten CH_3 und CH_2D vorlagen (Zhang *et al.*, 2017b). Zhang *et al.* konnten zeigen, dass dieser Austausch von Protonen von TbtI und SAM abhängt und erst nach der Produktbildung stattfindet. Es wird vermutet, dass das Produkt mit dem Lösungsmittel im Austausch steht.

In Bezug auf AeMenK wurden ebenfalls Experimente mit CD_3 -SAM durchgeführt, bei denen die Abstraktion eines Wasserstoffatoms von der Methylgruppe von SAM2 durch das 5'-dAdo-Radikal nachgewiesen wurde (Hein 2019). Die Massenverschiebung von +2 Da des methylierten Substrats durch die Übertragung der CD_2 -Methylengruppe wurde ebenfalls beobachtet, ähnlich wie bei anderen Klasse C RSMTs. Bei längerer Inkubation des Enzymansatzes wurden neben dem CHD_2 -Substrat auch die Varianten CH_3 und CH_2D gemessen, ähnlich wie es auch bei TbtI beobachtet wurde. Es wird weiterhin angenommen, dass der Transfer der Methylgruppe eine Abstraktion des Protons am C-8-Atom durch eine Base, möglicherweise eine Aminosäure im Protein, zur Folge hat (Hein 2019). Nach dem Transfer könnte dieses Proton auf die Methylengruppe des MMK zurückübertragen werden. Wenn dieser Prozess reversibel ist und die Base im Austausch mit dem Lösungsmittel steht, könnte dies den Austausch der Protonen an der Methylgruppe erklären.

Die Strukturanalyse deutet daraufhin, dass die beiden Aminosäuren E285 und R417 als potenzielle Basen fungieren könnten (*CtMenK*-Nummerierung; Abb. 5.38B). Beide Aminosäuren sind in allen MenK/MqnK/MenK2-Enzymen

konserviert und können als Protonenakzeptoren/-donatoren wirken. Die Glutaminsäure hat einen pKs-Wert von etwa 4 und liegt bei einem pH-Wert von 8, wie im MenK-Enzymassay, deprotoniert vor und ist somit in der Lage, Protonen aufzunehmen. Glutaminsäure spielt in einigen Enzymen eine wichtige Rolle im katalytischen Zentrum und ist oft für den Protonentransfer verantwortlich (Dementin *et al.*, 2004; Goyal *et al.*, 2013). Daher könnte Glutamat als Base fungieren und ein Proton vom MK aufnehmen und auf das Methylen zurückübertragen. Jedoch weist E285 in den AlphaFold-Strukturen keine eindeutig konservierte Position im Loop auf (Abb. 5.38B). Die Distanz von der Carboxylgruppe von E285 zur Methylgruppe beträgt für *CtMenK* 4,2 Å und für *CtMenK2* 5,5 Å. Diese Variabilität zeigt sich auch bei *AeMenK* und *AeMenK2*.

Eine andere mögliche Base ist R417 (Abb.

5.38B). Obwohl Arginin bei physiologischem pH-Wert überwiegend protoniert vorliegt, da es einen pKs-Wert von 12,5 hat, kann dieser Wert durch verschiedene Umgebungsfaktoren wie Ladungen und Hydrophobizität beeinflusst werden. Da R417 in der Nähe der MK-Bindestelle liegt und die Umgebung dort stark hydrophob ist, könnte dies den pKs-Wert von Arginin senken. Ein ähnliches Phänomen wurde bereits beobachtet, bei den Asp-, Glu- und Lys-Resten in hydrophoben Umgebungen Störungen von bis zu 5 pKs-Einheiten aufweisen (Fitch *et al.*, 2002; Langsetmo *et al.*, 1991b; Langsetmo *et al.*, 1991a). Es wurden auch Enzyme identifiziert, bei denen offensichtlich Arginin-Reste im katalytischen Zentrum diese Funktion nutzen, wie zum Beispiel IMP-Dehydrogenase, Pektat-/Pektin-Lyasen oder Fumarat-Reduktase (Schlippe & Hedstrom 2005). Basierend auf dem bisherigen Wissensstand über

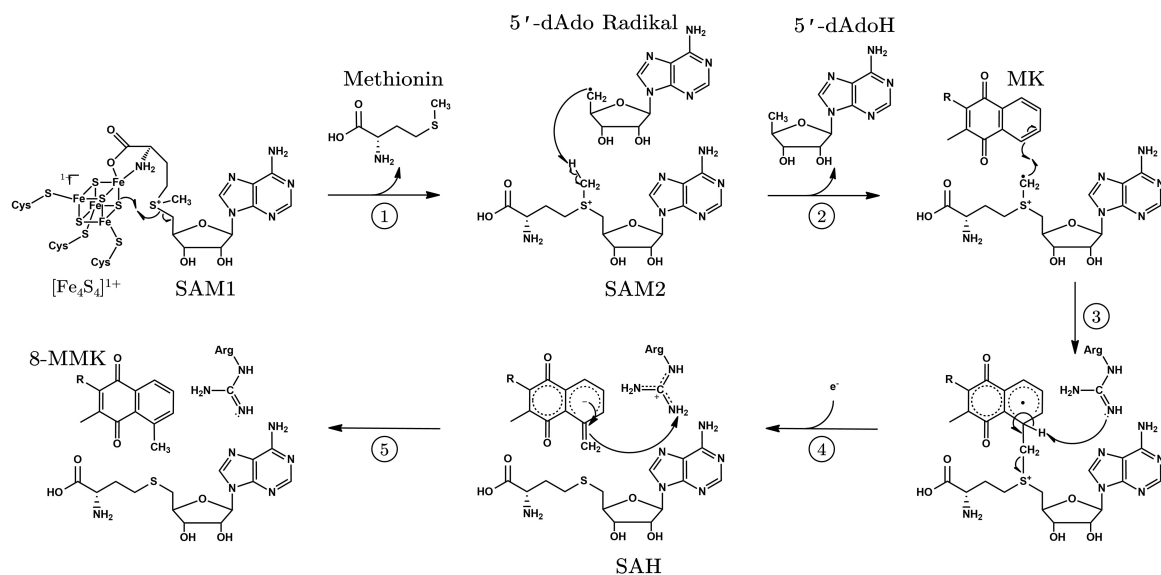


Abbildung 6.2: Vorausesagter Reaktionsmechanismus der radikalischen SAM-MK-Methyltransferasen. 1) Ein Elektronentransfer vom $[\text{Fe}_4\text{S}_4]^{+1}$ -Cluster zum Sulfoniumion des SAM1 führt zur Spaltung der S-[5'-C]-Bindung und zur Bildung eines 5'-dAdo-Radikals sowie eines Methionins. 2) Das 5'-dAdo-Radikal abstrahiert von SAM2 ein Wasserstoffatom, wodurch ein Methylenradikal und 5'-dAdoH entstehen. 3) Das entstandene Methylenradikal greift das C-8-Atom von MK an. 4) Durch die Deprotonierung des C-8-Atoms von MK durch Arg wird SAH freigesetzt. 5) Das entstandene Radikal wird durch ein Elektron vom $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ -Cluster reduziert. Durch die Protonierung durch Arg bildet sich 8-MMK. MK, Menachinon; 8-MMK, 8-Methylmenachinon; SAM, *S*-Adenosyl-L-Methionin; SAH, *S*-Adosylhomocystein; 5'-AdoH, 5'-Deoxyadenosin.

MenK/MqnK/MenK2 und den Reaktionsmechanismen anderer RSMTs der Klasse C lässt sich folgender Reaktionsmechanismus postulieren. Ausgehend vom 5'-dAdo-Radikal wird ein Wasserstoff von der Methylgruppe von SAM2 abstrahiert, wodurch ein Methylenradikal entsteht und 5'-dAdoH freigesetzt wird (Abb. 6.2 Schritt 2). Das Methylenradikal bindet an das C-8-Atom von MK und wird über das Naphthochinon-Ringsystem stabilisiert (Abb. 6.2 Schritt 3). Eine mögliche Deprotonierung des C-8-Atoms von MK, vermittelt durch eine Base im aktiven Zentrum, könnte dann die Spaltung von SAM2 und die Freisetzung von *S*-Adenosylhomocystein (SAH) auslösen (Abb. 6.2 Schritt 4). R417 ist ein möglicher Kandidat für diese Base, da dieser Argininrest in allen MenK/MqnK/MenK2-Sequenzen konserviert ist und sich in unmittelbarer Nähe der potenziellen MK-Bindungsstelle befindet. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass E285 an diesem Prozess beteiligt ist. Die positive Ladung wird durch den Guanidinium-Teil von R417 delokalisiert. Durch die Übertragung eines weiteren Elektrons, möglicherweise über den [Fe₄S₄]-Cluster, wird das Radikal reduziert, und das resultierende resonanzstabilisierte Anion würde über den konjugierten Guanidiniumrest von R417 protoniert, um 8-MMK zu erzeugen (Abb. 6.2 Schritt 5). Folglich stammen nur zwei Wasserstoffatome der übertragenen Methylgruppe von SAM2, während das dritte Wasserstoffatom von MK stammt. Dieses wird im vierten Schritt während der Deprotonierung auf R417 übertragen und im fünften Schritt auf die Methylengruppe übertragen. Es besteht auch die Möglichkeit eines Protonenaustauschs mit dem Lösungsmittel während der Delokalisierung des Protons durch R417, was die Anreicherung von CH₃ und CH₂D-MMK erklären könnte.

6.3.6 Inhibierung von MenK/MqnK/MenK2

Die Aktivität der Katalyse wird hauptsächlich durch die Inhibitoren SAH und MTA beeinflusst, die als Reaktionsprodukte bzw. Zerfallsprodukte von SAM entstehen. Interessanterweise hat das 5-Ado, das ebenfalls als Nebenprodukt gebildet wird, keinen Einfluss auf die Reaktion. Die Hem-

mung durch SAH betrug etwa 22,3%, während die Hemmung durch MTA bei 26,7% lag, bei gleicher Konzentration von Inhibitor und SAM (Abb. 5.31). Entsprechend ist zu beachten, dass eine so hohe Konzentration des Inhibitors nur vorliegen könnte, wenn die Hälfte des SAM katalytisch umgesetzt oder zerfallen ist. Daher ist es unwahrscheinlich, dass die geringe Aktivität im MenK-Enzymassay hauptsächlich auf eine Inhibition durch SAH oder MTA zurückzuführen ist, insbesondere da nur etwa 21% des MKs methyliert wurden. Diese niedrige Aktivität wäre für eine reine Inhibition durch SAH oder MTA zu groß. Durch Zugabe des Enzyms MTAN, das SAH, MTA und 5-Ado abbaut, kam es zu einer signifikanten Verringerung des MK-Gehalts, anstatt zu einer Erhöhung (Abb. 5.31). Lediglich bei der DMMK-Methylierung wurde ein Anstieg festgestellt. Es ist möglich, dass das abgespaltene Adenin von SAH und MTA die MenK-Reaktion inhibitorisch beeinflusst, was zu der beobachteten Verringerung führt. Dies sollte in weiteren MenK-Enzymassays untersucht werden. Bisher wurde die Ursache für den Anstieg des DMMK-Gehalts bei Zugabe von MTAN nicht geklärt. Es besteht die Möglichkeit, dass die inhibierende Wirkung von Adenin aufgrund der bereits vorhandenen C-8-Methylierung und der spiegelbildlichen Bindeposition im MenK keinen Einfluss auf die zweite Methylierung hat. Neben der Inhibierung gibt es mehrere Faktoren, die zur geringen Aktivität beitragen. Ein weiterer Faktor ist die Löslichkeit von MK₄. Eine potenzielle Lösung könnte darin bestehen, MK₁ als Substrat zu verwenden, sofern es dafür geeignet ist. Aufgrund seiner besseren Löslichkeit in Wasser könnte man somit auf die Verwendung von DMSO und Isopropanol im Enzymassay verzichten. Eine solche Änderung könnte dazu beitragen, die Effizienz der Reaktion zu verbessern. Es wäre auch sinnvoll, MenK-Enzymassays bei verschiedenen pH-Werten durchzuführen, da im TSA-Experiment gezeigt wurde, dass *Ct*MenK bei pH 6-7 thermisch stabiler war, während der Enzymassay bei einem pH-Wert von 8 durchgeführt wurde (Abb. 5.25). Es sind daher noch weitere Optimierungsschritte erforderlich, um das volle Potenzial von MenK/MqnK/MenK2 auszuschöpfen. Der Hauptgrund für die geringe Aktivität liegt aber in der Aggregation der MenK-Proteine. Es wird angenommen, dass MenK in seiner monomeren Form katalytisch aktiv ist, wäh-

rend die oligomerisierten Proteine entweder keine Aktivität mehr aufweisen oder nur eine geringe. Da die Berechnung der Proteinkonzentration jedoch auf das Gesamtprotein bezogen ist, führt dies zu einer deutlichen Überschätzung des katalytischen Umsatzes, da nur etwa 10-15 % als Monomer vorliegen (Abb. 5.21). Um genaue Ergebnisse zu erhalten, sollten die Enzymtests mit aufgereinigten monomeren Proteinen durchgeführt werden oder die Proteinproduktion so verbessert werden, dass es nicht zu einer Aggregation der Proteine kommt.

6.4 Biotechnologische Anwendungsmöglichkeiten

6.4.1 Chinonproduktion in *E. coli*

Zum Nachweis der Methyltransferase-Aktivität von MenK/MqnK/MenK2-Enzyme erwies sich das pAC-Expressionssystem als eine zuverlässige Methode. So wurde die Aktivität der MenK/MqnK/MenK2-Enzyme aus *C. tanakaei*, *F. marina* und *S. aciditrophicus* erfolgreich nachgewiesen (Abb. 5.8, 5.9, 5.12). In Kombination mit dem pET-Expressionssystem ist auch eine Koproduktion von zwei MenK/MqnK/MenK2-Proteinen möglich. Die Koproduktion von *CtMenK* und *CtMenK2* in *E. coli* führte hauptsächlich zur Synthese von 7,8-DMMK₈, jedoch wurde auch aufgrund der C-5 Methylierung von *CtMenK* das 5,7,8-TMMK₈ nachgewiesen (Abb. 5.11). Basierend auf den Konzentrationen wird angenommen, dass die C-5-Methylierung ein Artefakt aufgrund der Verwendung von *E. coli*-Zellen ist, da die Konzentration von 7,8-DMMK₈ deutlich höher ist als die von 5,8-DMMK₈ und 5,7,8-TMMK₈. Jedoch ist es nicht ausgeschlossen, dass dieses Methylierungsmuster auch in *C. tanakaei* vorkommt. Die Analyse der Chinonzusammensetzung aus *C. tanakaei*-Kulturen war bislang nicht erfolgreich, da die MK- bzw. MMK-abhängigen Wachstumsbedingungen bisher unbekannt sind. Diese Methode wurde durch die *E. coli* $\Delta ubiE$ -Mutante erweitert, bei der die Substratspezifität der MenK/MqnK/MenK2-Enzyme genauer auf die Methylierung von DMK untersucht wurde. Es wurde bestätigt, dass DMK und seine weiteren methylierten Varianten als Substrate fungieren

(Abb. 5.14).

Die Identifizierung von MK- und DMK-Derivaten erfolgte zuverlässig durch UV-Vis-Spektroskopie. Dabei hat jede Methylierungsposition unterschiedliche Auswirkungen auf das UV-Vis-Spektrum (Abb. 6.3). Eine Methylierung führte zu einer Verlagerung des Absorptionsbandes im Bereich von 320-355 nm in den längerwelligen Bereich, unabhängig von der Position. Dies war besonders bei den Methylierungen an den Positionen C-8 und C-5 deutlich erkennbar. Bei zunehmender Anzahl von Methylierungen addierten sich diese Verschiebungen. Die Methylierung an der Position C-7 führte zu einer Veränderung des zweiten Peaks in eine Schulter, während die Methylierung an der Position C-2 für diesen Peak verantwortlich ist. Basierend auf diesem Wissen können MK- und DMK-Derivate sicher und eindeutig identifiziert werden. Außerdem ist es möglich, den Methylierungsgrad von unbekanntem MK-Derivaten vorherzusagen. Dies ermöglicht eine verbesserte taxonomische Zuordnung von Mikroorganismen anhand ihrer MK-Pools, da die verschiedenen MMK-, DMMK- und demethylierten Varianten unterschieden werden können.

E. coli bietet sich aufgrund seiner Fähigkeit zur genetischen Zugänglichkeit sehr gut an für Chinonpool-Manipulationen. Die erste Manipulation des Chinonpools mit der *E. coli* $\Delta ubiE$ -Mutante führten erfolgreich zur Blockierung der UQ- und MK-Produktion und zur Anreicherung von DMK. Die Verwendung des LBGN-Mediums ermöglichte es, den Wachstumsnachteil aufgrund des Fehlens von UQ auszugleichen, indem es Nitrat als Elektronenakzeptor bereitstellte. Die Deletion von *ubiCA* führte dazu, dass der UQ-Weg blockiert wurde, was wiederum nur zur Bildung von DMK und MK führte. In Kombination mit der Überproduktion von MenA führte dies zu einem signifikanten Anstieg von DMK₈ und MK₈ in der Mutante (Abb. 5.17). Zur weiteren Steigerung der MK-Produktion könnten zusätzliche Ergänzungen wie die Überproduktion von MenD oder Dxr, einem Enzym der Seitenketten-Biosynthese, in Betracht gezogen werden. Bei der Überexpression der entsprechenden Gene wurde schon in Experimenten eine erhöhte MK-Produktion erreicht (Kong & Lee 2011). Darüber hinaus ist auch die Produktion von MK₇ durch die Einführung des Gens *hepPPS*

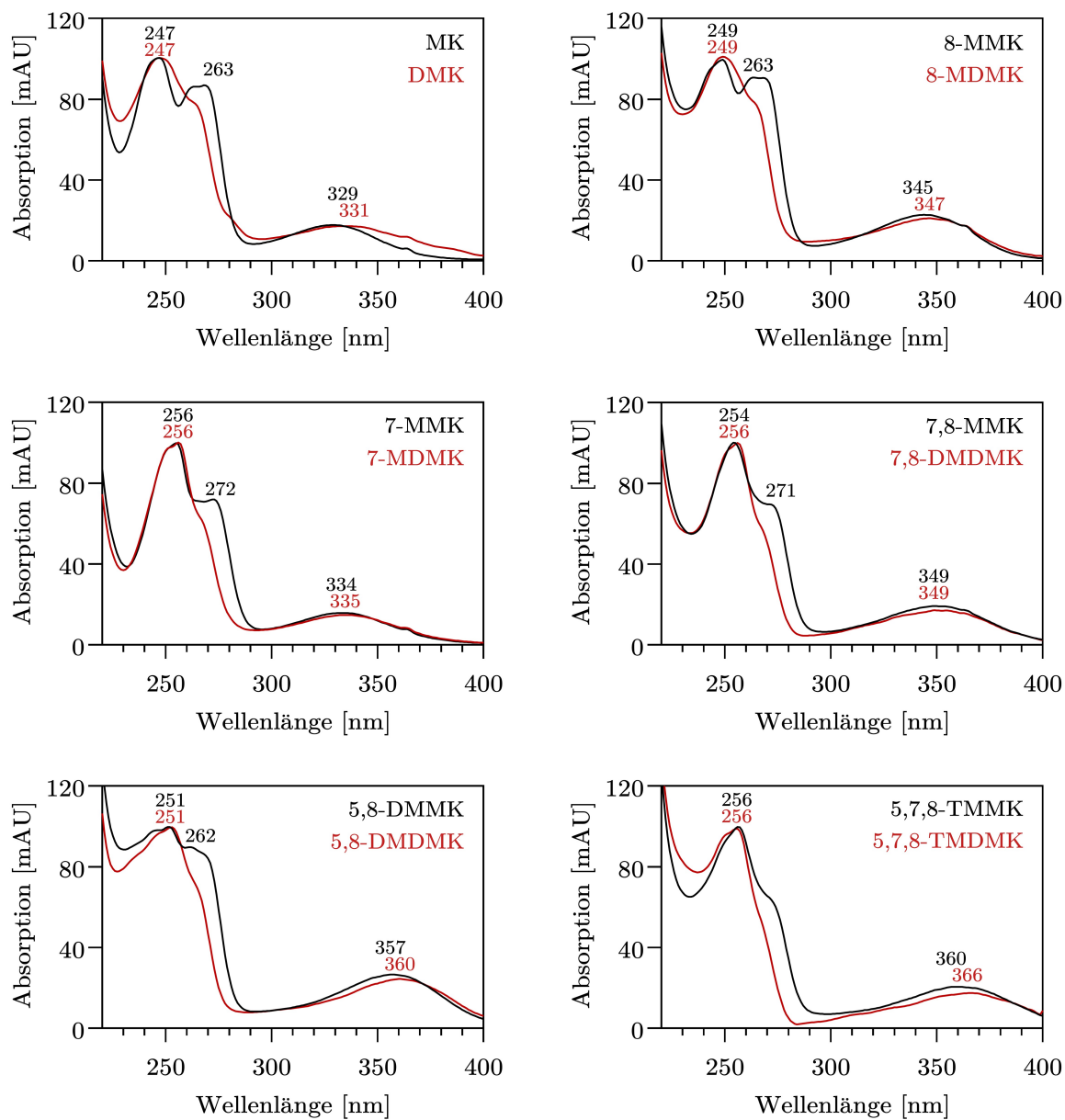


Abbildung 6.3: UV/Vis-Absorptionsspektren von Menachinon (MK), Demethylmenachinon (DMK) und verschiedenen methylierten MK/DMK-Derivaten. Eine Methylierung an Position C-2 (nicht vorhanden in DMK) verursacht ein Absorptionsmaximum bei etwa 262 nm, das mit zunehmender Methylierung der MK-Kopfgruppe weniger deutlich wird (Absorptionsschulter bei ca. 271 nm). Kumulative Methylierung an den Positionen C-8, C-7 oder C-5 verschieben das Absorptionsband von MK oder DMK bei 329 bzw. 331 nm zu längeren Wellenlängen von bis zu 360 nm bei trimethyliertem TMMK. Das UV/Vis-Absorptionsspektrum von 5,7,8-TMDMK wurde zum besseren Vergleich skaliert und kann vom tatsächlichen Absorptionsspektrum geringfügig abweichen. MK, Menachinon; DMK, 2-Demethylmenachinon; MMK, Methymenachinon; MDMK, Methyl-2-demethylmenachinon; DMMK, Dimethylmenachinon; DMDMK, Dimethyl-2-demethylmenachinon; TMMK, Trimethylmenachinon.

aus *B. subtilis* möglich, dessen Enzym für die Synthese des Heptaprenyldiphosphat (Seitenkette mit 7 Isopreneinheiten) verantwortlich ist (Gao *et al.*, 2020). Bisher war die Implementierung des pET-Expressionssystems in $\Delta ubiCA$ pUC19-Mutante erfolglos hinsichtlich der Produktion von MenK/MqnK/MenK2-Enzymen. Daher könnte die Koexpression der *menK/mqnK/menK2*-Gene im pUC19-Expressionssystem in Kombination mit dem *menA*-Gen erfolgversprechender sein. Durch eine erfolgreiche Produktion wäre es möglich, methylierte MK-Derivate in größeren Mengen zu reinigen.

6.4.2 Heterologe Produktion von MenK/MqnK/MenK2 in *E. coli*

Die Proteinproduktion mit dem pET-Expressionssystem in *E. coli* zur Proteinaufreinigung erwies sich als komplex. Eine zu starke Expression führte zur Aggregation der Proteine und zur Bildung von Einschlusskörpern. Erst durch eine starke Reduzierung der Expression war eine Aufreinigung der Proteine möglich (Abb. 5.20). Dabei scheint dies sogar organismusspezifisch zu sein, da die MenK- und MenK2-Proteine aus *C. tanakaei* eine bessere Produktion aufwiesen als die MenK/MqnK/MenK2-Proteine aus *A. equolifaciens* und *W. succinogenes*. Daher eignet sich *E. coli* nur begrenzt als Produktionsstamm für MenK/MqnK/MenK2-Enzyme. Möglicherweise könnte die Produktion stabiler in einem Mikroorganismus erfolgen, der eine eigene MenK/MqnK/MenK2-Produktion besitzt, wie beispielsweise *W. succinogenes*.

Für die heterologe Produktion von MenK/MqnK/MenK2 in *W. succinogenes* gibt es zwei mögliche Ansätze. Der erste Ansatz basiert auf der Integration des *menK/mqnK/menK2* Gens mit dem nativen *mqnK*-Promotor in eines der drei rRNA-kodierenden Gencluster im *W. succinogenes*-Genom. Hierzu wurde das Plasmid pRecovrDfor-cat verwendet, das durch doppelte homologe Rekombination in das Genom eingefügt wurde (Hein *et al.*, 2017). Das Plasmid enthielt partielle *W. succinogenes* 16S rRNA- und 23S rRNA-Gene sowie ein Chloramphenicol-

Resistenzgen in umgekehrter Orientierung. Der native Promotor von *W. succinogenes mqnK* wurde stromabwärts des 16S rRNA-Gens eingefügt, um das Plasmid pRecovrDfor-WsmqnK-cat zu erhalten. Das *menK/mqnK/menK2* Gen wurde dann in Vorwärtsorientierung stromabwärts des nativen Promotors eingefügt.

Der zweite Ansatz basiert auf einem Genexpressionssystem, das für die Produktion von heterologen Multi-Häm-Cytochromen *c* entwickelt wurde (Kern & Simon 2011). Dabei wurde ein Derivat des Plasmids pMK2 verwendet, das das Zielgen enthielt, das mit einem DNA-Sequenzfragment fusioniert wurde. Dieses Fragment kodierte für ein Signalpeptid der Cytochrom *c*-Nitritreduktase (NrfA) von *W. succinogenes* sowie zwei aufeinanderfolgende C-terminale Strep-Tags. Diese Region wurde von partiellen *nrfH*- und *nrfI*-Genen flankiert, die eine Rekombination des Plasmids mit dem Genom ermöglichen.

Im Vergleich zum ersten Ansatz weist der zweite Ansatz eine deutlich höhere Transformationsrate von *W. succinogenes*-Zellen auf, und die Expression des Zielgens kann durch die Verfügbarkeit von Nitrat im Wachstumsmedium gesteuert werden, da die Genexpression durch den *nrf*-Promotor kontrolliert wird. Infolgedessen stellen beide Ansätze eine vielversprechende Alternative sowohl für die Reinigung von Chinonen mit 6 Isopreneinheiten als auch für die Proteinreinigung dar.

Schlussfolgerungen und Ausblick

Zusammenfassend verdeutlicht diese Arbeit, dass die phylogenetische Verbreitung der MenK/MqnK/MenK2-Enzyme und die damit einhergehende Synthese von MMK und DMMK umfassender ist als bisher biochemisch bestätigt wurde. Eine Herausforderung bei der experimentellen Bestimmung der Zusammensetzung des Chinon/Chinol-Pools ist die Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen. Aufgrund dessen wurde die Fähigkeit zur MMK/DMMK-Produktion in vielen Laborkulturen, die aerob auf komplexen Medien gezüchtet wurden, übersehen, da diese Bedingungen nicht den natürlichen Lebensraum widerspiegeln. Um dieses Problem zu umgehen, ist eine präzise Vorhersage der MK- und MMK-Methyltransferasen entscheidend. Durch diese Arbeit wurden die Motive [QxTxYPML] für MenK/MqnK und [QxTxSPLY] für MenK2 identifiziert, welche eine genaue Vorhersage der MK- und MMK-Methyltransferasen ermöglichen. Somit ermöglicht das Wissen über MK- und MMK-Methyltransferasen die Vorhersage des Methylierungsstatus des Chinon/Chinol-Pools jeder mikrobiellen Spezies anhand ihres Genoms. Im Unterschied dazu sind bisher nur wenige ETKs bekannt, die MMK als Chinon verwenden und für DMMK existieren bislang keine bekannten Fälle. Die Vorhersage von DMMK-abhängigen ETKs gestaltet sich als herausfordernd, insbesondere aufgrund der Kultivierung von Bakterien wie *A. equolifaciens* in komplexen Medien. Trotzdem kodiert *A. equolifaciens* 17 Proteine der NrfD/PsrC-Familie in Genclustern, die oft für Eisen-Schwefel-Molybdän-Enzyme kodieren, deren Funktion noch nicht vollständig verstanden sind. Jedoch fehlen noch Deletionsmutanten der *menK*- und *menK2*-Gene von *A. equolifaciens*. Eine bioinformatische Herangehensweise zur Identifikation von Enzymkomplexen, die von DMMK abhängig sind, könnte die Verwendung

der Korrelationsanalyse umfassen. Diese Methode hat sich in dieser Arbeit als erfolgreiches Werkzeug zur Identifikation von MK assoziierter Enzymkomplexen erwiesen. Durch die Anwendung dieser Analyse auf die Klasse der Coriobacteria, sowohl auf Spezies mit als auch ohne MenK2, könnte man nach Korrelationen zwischen den Eisen-Schwefel-Molybdän-Enzymen und DMMK suchen. Dadurch wäre es möglich, potenzielle respiratorische DMMK-abhängige Enzyme zu identifizieren.

Sofern DMMK und/oder MMK für das Überleben im natürlichen Habitat unverzichtbar wäre, könnten die Produkte der *menK2/menK*-Gene sogar als vielversprechende Ziele für die pharmazeutische Behandlung von durch Coriobacteria verursachten Krankheiten in Betracht kommen. Die gezielte Bekämpfung coriobakterieller Krankheitserreger könnte durch Wirkstoffe erfolgen, die eine irreversible Hemmung der MenK/MenK2-Enzyme bewirken. Eine weitere Strategie könnte in der Entwicklung von Molekülen bestehen, die spezifisch an MMK bzw. DMMK binden. Durch diesen Ansatz könnte der bakterielle Elektronentransport gezielt beeinträchtigt werden. Erste Experimente mit sogenannten MK-bindenden Antibiotika haben sich als vielversprechend erwiesen (Li *et al.*, 2011). Die Verwendung von MMK und DMMK könnte somit eine gezielte Attacke gegen pathogene Mikroorganismen ermöglichen ohne die gesamte Mikrobiota anzugreifen.

Die Zusammensetzung des Chinon/Chinol-Pools wird seit langem als Biomarker in der mikrobiellen Taxonomie verwendet (Collins & Jones 1981; Nowicka & Kruk 2010). Darüber hinaus eignen sich Chinonprofile als Biomarker zur Charakterisierung von bakteriellen Gemeinschaften.

ten (Becker *et al.*, 2018). Diese kulturunabhängige Methode ermöglicht eine direkte chemische Analyse von Chinonen, wodurch eine höhere Reproduzierbarkeit und Zuverlässigkeit erreicht wird. Zudem liefert es quantitative Daten, die für die Gruppierung ganzer mikrobieller Populationen *in situ* nützlich sind, welche eine quantitative Bewertung von Verschiebungen in mikrobiellen Populationen über Zeit und Raum ermöglichen. Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit kann die Chinonprofilanalyse nicht nur um weitere MK- und DMK-Derivate wie MMK, DMMK, TMMK sowie MDMK, DMDMK und TMDMK erweitert werden, sondern ermöglicht auch die präzise Bestimmung der Methylierungsposition. Dies führt zu einer verbesserten Auflösung des Chinonprofils. Die neuen Erkenntnisse bezüglich der Verteilung von Methylmenachinon in verschiedenen Phyla ermöglichen zudem eine präzisere phylogenetische Klassifizierung der bakteriellen Gemeinschaften. Darüber hinaus erlaubt das Chinonprofil Rückschlüsse auf das Habitat, indem nicht nur die Mikroorganismenvielfalt, sondern auch Zonierungen von Redox-Prozessen abgeleitet werden können (Becker *et al.*, 2018). Die Kombination dieser Ergebnisse mit geochemischen Daten ermöglicht Schlussfolgerungen über Nischantrennungen zwischen mikrobiologischen Prozessen wie Photosynthese, anoxygene Photosynthese, Nitrifikation, Sulfatreduktion, Methanogenese, usw. Auf diese Weise könnten Chinone auch als Prozessbiomarker verwendet werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen die Eignung von *E. coli* als potenziellen Produktionsorganismus für eine erhöhte Produktion von MK. Durch die Deletion der *ubiCA*-Gene und die Überexpression von Schlüsselenzymen in der MK-Biosynthese konnte eine Überproduktion von MK₈ erzielt werden. Durch zusätzliche mikrobiologische Ansätze könnte das Produktspektrum erweitert werden, sodass auch die Produktion von MK₇ mit *E. coli* möglich wird (Gao *et al.*, 2020). MK₇, auch als Vitamin K₂ bekannt, spielt eine entscheidende Rolle in der Erhaltung der Knochengesundheit und der Prävention von Arterienverkalkung (Villa *et al.*, 2016; Myneni & Mezey 2017). Da die derzeit empfohlene Zufuhr von Vitamin K₂ über die Nahrung den Bedarf vieler Menschen nicht ausreichend abdecken kann,

steigt die Nachfrage nach Vitamin-K₂-Präparaten deutlich an. Daher erscheint die mikrobielle Produktion von MK₇ als attraktive Methode für die Industrie.

Die Produktion von MenK/MqnK/MenK₂-Enzymen ermöglicht zudem die Synthese methylierter MK-Derivate. Durch das umfassende Verständnis dieser Enzyme, das durch die vorliegende Arbeit gewonnen wurde, sowie durch weitere zukünftige Untersuchungen, besteht die Möglichkeit, durch gezieltes Protein-Engineering zusätzliche Substrate auf Basis der Naphthochinon-Struktur zu methylieren. Dies würde die Möglichkeit zur mikrobiellen Synthese spezifischer Moleküle eröffnen, wie beispielsweise 7-Methylmenadion aus Menadion, welches eine anticancerogene Wirkung aufweist (Ma *et al.*, 2014). Auch die Methylierung von Molekülen mit bereits anticancerogener Wirkung, wie beispielsweise 1,4-Naphthochinon zu Methyl-1,4-naphthochinon oder Lapachol zu Methyl-Lapachol, könnte neue Derivate hervorbringen und das Spektrum potenzieller Antikrebsmittel erheblich erweitern (Kishore *et al.*, 2014; Shankar Babu *et al.*, 2018). Insgesamt bieten die in dieser Arbeit präsentierten Erkenntnisse vielversprechende Ansätze für zukünftige Entwicklungen in der mikrobiellen Produktion von Vitamin K-Derivaten und naphthochinonbasierten Derivaten als potenzielle Antikrebsmittel.

Literaturverzeichnis

- Abicht, H. K., J. Martinez, G. Layer, D. Jahn & M. Solioz (2012). „*Lactococcus lactis* HemW (HemN) is a haem-binding protein with a putative role in haem trafficking“. In: *Biochemical Journal* 442.2, S. 335–343. DOI: 10.1042/bj20111618. URL: <https://doi.org/10.1042%2Fbj20111618>.
- Agne, M., S. Estelmann, C. S. Seelmann, J. Kung, D. Wilkens, H.-G. Koch, C. van der Does, S. V. Albers, C. von Ballmoos, J. Simon & M. Boll (2021). „The missing enzymatic link in syntrophic methane formation from fatty acids“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118.40, e2111682118. DOI: 10.1073/pnas.2111682118. URL: <https://doi.org/10.1073%2Fpnas.2111682118>.
- Akagawa-Matsushita, M., T. Itoh, Y. Katayama, H. Kuraishi & K. Yamasato (1992). „Isoprenoid quinone composition of some marine *Alteromonas*, *Marinomonas*, *Deleya*, *Pseudomonas* and *Shewanella* species“. In: *Journal of General Microbiology* 138.11, S. 2275–2281. DOI: 10.1099/00221287-138-11-2275. URL: <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-138-11-2275>.
- Altschul, S. (1997). „Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs“. In: *Nucleic Acids Research* 25.17, S. 3389–3402. DOI: 10.1093/nar/25.17.3389. URL: <https://doi.org/10.1093%2Fnar%2F25.17.3389>.
- Anand, A., K. Chen, L. Yang, Sastry, S. Poudel, Y. Seif, Hefner, S. Xu, R. Szubin & Feist (2019). „Adaptive evolution reveals a trade-off between growth rate and oxidative stress during naphthoquinone-based aerobic respiration“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116.50, S. 25287–25292. DOI: 10.1073/pnas.1909987116. URL: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1909987116>.
- Anemüller, S., T. Hettmann, R. Moll, M. Teixeira & G. Schäfer (1995). „EPR characterization of an archaeal succinate dehydrogenase in the membrane-bound state“. In: *European journal of biochemistry* 232.2, S. 563–568. DOI: 10.1099/ijsem.0.005056. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.563zz.x>.
- Argyrou, A., M. W. Vetting & J. S. Blanchard (2004). „Characterization of a new member of the flavoprotein disulfide reductase family of enzymes from *Mycobacterium tuberculosis*“. In: *Journal of Biological Chemistry* 279.50, S. 52694–52702. DOI: 10.1074/jbc.m410704200. URL: <https://doi.org/10.1074%2Fjbc.m410704200>.
- Bader, M. W., T. Xie, C.-A. Yu & J. C. Bardwell (2000). „Disulfide bonds are generated by quinone reduction“. In: *Journal of Biological Chemistry* 275.34, S. 26082–26088. DOI: 10.1074/jbc.m003850200. URL: <https://doi.org/10.1074%2Fjbc.m003850200>.
- Bae, S. S., Y.-h. Jung & K. Baek (2020). „*Shewanella maritima* sp. nov., a facultative anaerobic marine bacterium isolated from seawater, and emended description of *Shewanella intestini*“. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 70.2, S. 1288–1293. DOI: 10.1099/ijsem.0.003916. URL: <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.003916>.
- Banco, M. T., V. Mishra, A. Ostermann, T. E. Schrader, G. B. Evans, A. Kovalevsky & D. R. Ronning (2016). „Neutron structures of the *Helicobacter pylori* 5′-methylthioadenosine nucleosidase highlight proton sharing and protonation states“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113.48, S. 13756–13761.

- DOI: 10.1073/pnas.1609718113. URL: <https://doi.org/10.1073/pnas.1609718113>.
- Bauerle, M. R., E. L. Schwalm & S. J. Booker (2015). „Mechanistic diversity of radical *S*-adenosylmethionine (SAM)-dependent methylation“. In: *Journal of Biological Chemistry* 290.7, S. 3995–4002. DOI: 10.1074/jbc.r114.607044. URL: <https://doi.org/10.1074/jbc.r114.607044>.
- Becker, K. W., F. J. Elling, J. M. Schröder, J. S. Lipp, T. Goldhammer, M. Zabel, Elvert & K.-U. Hinrichs (2018). „Isoprenoid quinones resolve the stratification of redox processes in a biogeochemical continuum from the photic zone to deep anoxic sediments of the black sea“. In: *Applied and Environmental Microbiology* 84.10, e02736–17. DOI: 10.1128/aem.02736-17. URL: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02736-17>.
- Bender, K. S., C. Shang, R. Chakraborty, S. M. Belchik, J. D. Coates & L. A. Achenbach (2005). „Identification, characterization, and classification of genes encoding perchlorate reductase“. In: *Journal of Bacteriology* 187.15, S. 5090–5096. DOI: 10.1128/jb.187.15.5090-5096.2005. URL: <https://doi.org/10.1128/jb.187.15.5090-5096.2005>.
- Benítez-Páez, A., M. Villarroya & M.-E. Armengod (2012). „The *Escherichia coli* RlmN methyltransferase is a dual-specificity enzyme that modifies both rRNA and tRNA and controls translational accuracy“. In: *RNA* 18.10, S. 1783–1795. DOI: 10.1261/rna.033266.112. URL: <https://doi.org/10.1261/rna.033266.112>.
- Benoit, S. L., R. J. Maier, R. G. Sawers & C. Greening (2020). „Molecular hydrogen metabolism: A widespread trait of pathogenic bacteria and protists“. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 84.1, e00092–19. DOI: 10.1128/mmbr.00092-19. URL: <https://doi.org/10.1128/mmbr.00092-19>.
- Berka, K., O. Hanak, D. Sehnal, P. Banas, Navratilova, C.-M. Ionescu, R. Svobodova Varekova & Koca (2012). „MOLEonline 2.0: interactive web-based analysis of biomacromolecular channels“. In: *Nucleic Acids Research* 40.W1, W222–W227. DOI: 10.1093/nar/gks363. URL: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gks363>.
- Bertero, M. G., R. A. Rothery, M. Palak, C. Hou, D. Lim, F. Blasco, J. H. Weiner & N. C. J. Strynadka (2003). „Insights into the respiratory electron transfer pathway from the structure of nitrate reductase A“. In: *Nature Structural & Molecular Biology* 10.9, S. 681–687. DOI: 10.1038/nsb969. URL: <https://doi.org/10.1038/nsb969>.
- Bhasin, M., J. L. Billinsky & D. R. J. Palmer (2003). „Steady-State kinetics and molecular evolution of *Escherichia coli* MenD [(1R,6R)-2-Succinyl-6-hydroxy-2,4-cyclohexadiene-1-carboxylate Synthase], an anomalous thiamin diphosphate-dependent decarboxylase-carboligase“. In: *Biochemistry* 42.46, S. 13496–13504. DOI: 10.1021/bi035224j. URL: <https://doi.org/10.1021/bi035224j>.
- Bisaillon, A., R. Beaudet, F. Leine, E. Déziel & R. Villemur (2010). „Identification and characterization of a novel CprA reductive dehalogenase specific to highly chlorinated phenols from *Desulfitobacterium hafniense* strain PCP-1“. In: *Applied and Environmental Microbiology* 76.22, S. 7536–7540. DOI: 10.1128/aem.01362-10. URL: <https://doi.org/10.1128/aem.01362-10>.
- Boal, A. K., T. L. Grove, M. I. McLaughlin, N. H. Yennawar, S. J. Booker & A. C. Rosenzweig (2011). „Structural basis for methyl transfer by a radical SAM enzyme“. In: *Science* 332.6033, S. 1089–1092. DOI: 10.1126/science.1205358. URL: <https://doi.org/10.1126/science.1205358>.
- Bohlmann, J. & C. I. Keeling (2008). „Terpenoid biomaterials“. In: *The Plant Journal* 54.4, S. 656–669. DOI: 10.1111/j.1365-313x.2008.03449.x. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2008.03449.x>.
- Bott, M. & A. Niebisch (2003). „The respiratory chain of *Corynebacterium glutamicum*“. In: *Journal of Biotechnology* 104.1-3, S. 129–153. DOI: 10.1016/s0168-1656(03)00144-5. URL: [https://doi.org/10.1016/s0168-1656\(03\)00144-5](https://doi.org/10.1016/s0168-1656(03)00144-5).
- Boucher, Y. & W. F. Doolittle (2000). „The role of lateral gene transfer in the evolution of isoprenoid biosynthesis pathways“. In: *Molecular Micro-*

- biology* 37.4, S. 703–716. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2000.02004.x. URL: <https://doi.org/10.1046%2Fj.1365-2958.2000.02004.x>.
- Boughanemi, S., P. Infossi, M.-T. Giudici-Orticoni, B. Schoepp-Cothenet & M. Guiral (2020). „Sulfite oxidation by the quinone-reducing molybdenum sulfite dehydrogenase SoeABC from the bacterium *Aquifex aeolicus*“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1861.11, S. 148279. DOI: 10.1016/j.bbabi.2020.148279. URL: <https://doi.org/10.1016%2Fj.bbabi.2020.148279>.
- Bozal, N., M. J. Montes, D. Minana-Galbis, A. Manresa & E. Mercade (2009). „*Shewanella vesiculosa* sp. nov., a psychrotolerant bacterium isolated from an Antarctic coastal area“. In: *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY* 59.2, S. 336–340. DOI: 10.1099/ijs.0.000737-0. URL: <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.000737-0>.
- Bozal, N., M. J. Montes, E. Tudela, F. Jiménez & J. Guinea (2002). „*Shewanella frigidimarina* and *Shewanella livingstonensis* sp. nov. isolated from Antarctic coastal areas.“ In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52.1, S. 195–205. DOI: 10.1099/00207713-52-1-195. URL: <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-52-1-195>.
- Broderick, J. B., B. R. Duffus, K. S. Duschene & E. M. Shepard (2014). „Radical *S*-adenosylmethionine enzymes“. In: *Chemical Reviews* 114.8, S. 4229–4317. DOI: 10.1021/cr4004709. URL: <https://doi.org/10.1021%2Fcr4004709>.
- Broderick, W. E., B. M. Hoffman & J. B. Broderick (2018). „Mechanism of radical initiation in the radical *S*-adenosyl-l-methionine superfamily“. In: *Accounts of Chemical Research* 51.11, S. 2611–2619. DOI: 10.1021/acs.accounts.8b00356. URL: <https://doi.org/10.1021%2Facs.accounts.8b00356>.
- Brondijk, T. H. C., D. Fiegen, D. J. Richardson & J. A. Cole (2002). „Roles of NapF, NapG and NapH, subunits of the *Escherichia coli* periplasmic nitrate reductase, in ubiquinol oxidation“. In: *Molecular Microbiology* 44.1, S. 245–255. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2002.02875.x. URL: <https://doi.org/10.1046%2Fj.1365-2958.2002.02875.x>.
- Burkhart, B. J., C. J. Schwalen, G. Mann, J. H. Naismith & D. A. Mitchell (2017). „YcaO-dependent posttranslational amide activation: Biosynthesis, structure, and function“. In: *Chemical Reviews* 117.8, S. 5389–5456. DOI: 10.1021/acs.chemrev.6b00623. URL: <https://doi.org/10.1021%2Facs.chemrev.6b00623>.
- Calisto, F. & M. M. Pereira (2021). „The ion-translocating NrfD-like subunit of energy-transducing membrane complexes“. In: *Frontiers in Chemistry* 9.1, S. 663706. DOI: 10.3389/fchem.2021.663706. URL: <https://doi.org/10.3389%2Ffchem.2021.663706>.
- Camacho, C., G. Coulouris, V. Avagyan, N. Ma, J. Papadopoulos, K. Bealer & T. L. Madden (2009). „BLAST+: architecture and applications“. In: *BMC Bioinformatics* 10.1, S. 421. DOI: 10.1186/1471-2105-10-421. URL: <https://doi.org/10.1186%2F1471-2105-10-421>.
- Carlone, G. M. & F. A. L. Anet (1983). „Detection of Menaquinone-6 and a Novel Methyl-substituted Menaquinone-6 in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter fetus* subsp. fetus“. In: *Microbiology* 129.11, S. 3385–3393. DOI: 10.1099/00221287-129-11-3385. URL: <http://dx.doi.org/10.1099/00221287-129-11-3385>.
- Cecchini, G., C. R. Thompson, B. A. Ackrell, D. J. Westenberg, N. Dean & R. P. Gunsalus (1986). „Oxidation of reduced menaquinone by the fumarate reductase complex in *Escherichia coli* requires the hydrophobic FrdD peptide.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83.23, S. 8898–8902. DOI: 10.1073/pnas.83.23.8898. URL: <https://doi.org/10.1073%2Fpnas.83.23.8898>.
- Challand, M. R., T. Ziegert, P. Douglas, R. J. Wood, M. Kriek, N. M. Shaw & P. L. Roach (2009). „Product inhibition in the radical *S*-adenosylmethionine family“. In: *FEBS Letters* 583.8, S. 1358–1362. DOI: 10.1016/j.febslet.2009.03.044. URL: <https://doi.org/10.1016%2Fj.febslet.2009.03.044>.

- Chen, M., X. Ma, X. Chen, M. Jiang, H. Song & Z. Guo (2013). „Identification of a hotdog fold thioesterase involved in the biosynthesis of menaquinone in *Escherichia coli*“. In: *Journal of Bacteriology* 195.12, S. 2768–2775. DOI: 10.1128/jb.00141-13. URL: <https://doi.org/10.1128%2Fjb.00141-13>.
- Cid, H., M. Bunster, M. Canales & F. Gazitúa (1992). „Hydrophobicity and structural classes in proteins“. In: *Protein Engineering, Design and Selection* 5.5, S. 373–375. DOI: 10.1093/protein/5.5.373. URL: <http://dx.doi.org/10.1093/protein/5.5.373>.
- Clavel, T., C. Charrier, A. Braune, M. Wenning & Blaut (2009). „Isolation of bacteria from the ileal mucosa of TNFdeltaARE mice and description of *Enterorhabdus mucosicola* gen. nov., sp. nov.“ In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59.7, S. 1805–1812. DOI: 10.1099/ijs.0.003087-0. URL: <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.003087-0>.
- Clavel, T., C. Charrier, M. Wenning & D. Haller (2013). „*Parvibacter caecicola* gen. nov., sp. nov., a bacterium of the family *Coriobacteriaceae* isolated from the caecum of a mouse“. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63.7, S. 2642–2648. DOI: 10.1099/ijs.0.045344-0. URL: <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.045344-0>.
- Cleave, C. V., J. T. Koehn, C. S. Pereira, A. A. Haase, B. J. Peters, S. W. Croslow, K. G. McLaughlin, K. R. Werst, A. L. Goach, D. C. Crick, G. M. Arantes & D. C. Crans (2021). „Interactions of truncated menaquinones in lipid monolayers and bilayers“. In: *International Journal of Molecular Sciences* 22.18, S. 9755. DOI: 10.3390/ijms22189755. URL: <https://doi.org/10.3390%2Fijms22189755>.
- Cleave, C. V., H. A. Murakami, N. Samart, J. T. Koehn, P. Maldonado, H. D. Kreckel, E. J. Cope, A. Basile, D. C. Crick & D. C. Crans (2020). „Location of menaquinone and menaquinol headgroups in model membranes“. In: *Canadian Journal of Chemistry* 98.6, S. 307–317. DOI: 10.1139/cjc-2020-0024. URL: <https://doi.org/10.1139%2Fcjc-2020-0024>.
- Collins, M. D., M. Faulkner & R. M. Keddie (1984). „Menaquinone composition of some sporeforming *Actinomycetes*“. In: *Systematic and Applied Microbiology* 5.1, S. 20–29. DOI: 10.1016/s0723-2020(84)80048-x. URL: <https://doi.org/10.1016%2Fs0723-2020%2884%2980048-x>.
- Collins, M. D. & F. Fernandez (1984). „Menaquinone-6 and thermoplasmaquinone-6 in *Wolinella succinogenes*“. In: *FEMS Microbiology Letters* 22.3, S. 273–276. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1984.tb00740.x. URL: <https://doi.org/10.1111%2Fj.1574-6968.1984.tb00740.x>.
- Collins, M. D. & D. Jones (1981). „Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implication“. In: *Microbiological Reviews* 45.2, S. 316–354. DOI: 10.1128/mr.45.2.316-354.1981. URL: <https://doi.org/10.1128%2Fmr.45.2.316-354.1981>.
- Collins, M. D. & B. J. Tindall (1987). „Occurrence of menaquinones and some novel methylated menaquinones in the alkaliphilic, extremely halophilic archaeobacterium *Natronobacterium gregoryi*“. In: *FEMS Microbiology Letters* 43.3, S. 307–312. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1987.tb02163.x. URL: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1987.tb02163.x>.
- Collins, M. D. & F. Weddel (1986). „Respiratory quinones of sulphate-reducing and sulphur-reducing bacteria: A systematic investigation“. In: *Systematic and Applied Microbiology* 8.1–2, S. 8–18. DOI: 10.1016/s0723-2020(86)80141-2. URL: [http://dx.doi.org/10.1016/S0723-2020\(86\)80141-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0723-2020(86)80141-2).
- Collins, M. D. (1985). „Structure of thermoplasmaquinone from *Thermoplasma acidophilum*“. In: *FEMS Microbiology Letters* 28.1, S. 21–23. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1985.tb00756.x. URL: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1985.tb00756.x>.
- Connelly, K. R. S., C. Stevenson, H. Kneuper & F. Sargent (2016). „Biosynthesis of selenate reductase in *Salmonella enterica*: Critical roles for the signal peptide and DmsD“. In: *Microbiology* 162.12, S. 2136–2146. DOI: 10.1099/mic.

- 0.000381. URL: <https://doi.org/10.1099/2Fmic.0.000381>.
- Cooper, L. E., D. Fedoseyenko, S. H. Abdelwahed, S.-H. Kim, T. Dairi & T. P. Begley (2013). „*In vitro* reconstitution of the radical *S*-adenosylmethionine enzyme MqnC involved in the biosynthesis of futasine-derived menaquinone“. In: *Biochemistry* 52.27, S. 4592–4594. DOI: 10.1021/bi400498d. URL: <https://doi.org/10.1021%2Fbi400498d>.
- Cotrim, C. A., A. Weidner, N. Strehmel, T. B. Bisol, D. Meyer, W. Brandt, L. A. Wessjohann & M. T. Stubbs (2017). „A distinct aromatic prenyltransferase associated with the futasine pathway“. In: *ChemistrySelect* 2.29, S. 9319–9325. DOI: 10.1002/slct.201702151. URL: <https://doi.org/10.1002%2Fslct.201702151>.
- Czyzewski, B. K. & D.-N. Wang (2012). „Identification and characterization of a bacterial hydrosulphide ion channel“. In: *Nature* 483.7390, S. 494–497. DOI: 10.1038/nature10881. URL: <https://doi.org/10.1038%2Fnature10881>.
- Dairi, T. (2012). „Menaquinone biosyntheses in microorganisms“. In: *Natural Product Biosynthesis by Microorganisms and Plants, Part A*. Bd. 515. 1. Elsevier, S. 107–122. DOI: 10.1016/b978-0-12-394290-6.00006-9. URL: <https://doi.org/10.1016%2Fb978-0-12-394290-6.00006-9>.
- Davis, M. W. & E. M. Jorgensen (2022). „ApE, a plasmid editor: A freely available DNA manipulation and visualization program“. In: *Frontiers in Bioinformatics* 2.1, S. 818619. DOI: 10.3389/fbinf.2022.818619. URL: <https://doi.org/10.3389%2Ffbinf.2022.818619>.
- Dellas, N., S. T. Thomas, G. Manning & J. P. Noel (2013). „Discovery of a metabolic alternative to the classical mevalonate pathway“. In: *eLife* 2.1, e00672. DOI: 10.7554/eLife.00672. URL: <https://doi.org/10.7554%2FeLife.00672>.
- Dementin, S., B. Burlat, A. L. De Lacey, A. Pardo, G. Adryanczyk-Perrier, Guigliarelli & M. Rousset (2004). „A glutamate is the essential proton transfer gate during the catalytic cycle of the [NiFe] hydrogenase“. In: *Journal of Biological Chemistry* 279.11, S. 10508–10513. DOI: 10.1074/jbc.M312716200. URL: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M312716200>.
- Dharmaraj, K., J. I. R. Silva, H. Kahlert, U. Lendeckel & F. Scholz (2020). „The acid-base and redox properties of menaquinone MK-4, MK-7, and MK-9 vitamin K2 in DMPC monolayers on mercury“. In: *European Biophysics Journal* 49.3-4, S. 279–288. DOI: 10.1007/s00249-020-01433-0. URL: <https://doi.org/10.1007%2Fs00249-020-01433-0>.
- Dhiman, R. K., V. Pujari, J. M. Kincaid, M. A. Ikeh, T. Parish & D. C. Crick (2019). „Characterization of MenA (isoprenyl diphosphate:1,4-dihydroxy-2-naphthoate isoprenyltransferase) from *Mycobacterium tuberculosis*“. In: *PLOS ONE* 14.4, e0214958. DOI: 10.1371/journal.pone.0214958. URL: <https://doi.org/10.1371%2Fjournal.pone.0214958>.
- Dietrich, W. & O. Klimmek (2002). „The function of methyl-menaquinone-6 and polysulfide reductase membrane anchor (PsrC) in polysulfide respiration of *Wolinella succinogenes*“. In: *European Journal of Biochemistry* 269.4, S. 1086–1095. DOI: 10.1046/j.0014-2956.2001.02662.x. URL: <https://doi.org/10.1046%2Fj.0014-2956.2001.02662.x>.
- Ding, Y., Y. Yu, H. Pan, H. Guo, Y. Li & W. Liu (2010). „Moving posttranslational modifications forward to biosynthesize the glycosylated thiopeptide nocathiacin I in *Nocardia* sp. ATCC 202099“. In: *Molecular BioSystems* 6.7, S. 1180. DOI: 10.1039/c005121g. URL: <https://doi.org/10.1039%2Fc005121g>.
- Du, L., C. Sánchez, M. Chen, D. J. Edwards & B. Shen (2000). „The biosynthetic gene cluster for the antitumor drug bleomycin from *Streptomyces verticillus* ATCC 15003 supporting functional interactions between nonribosomal peptide synthetases and a polyketide synthase“. In: *Chemistry and Biology* 7.8, S. 623–642. DOI: 10.1016/s1074-5521(00)00011-9. URL: <https://doi.org/10.1016%2Fs1074-5521%2800%2900011-9>.
- Dunn, S. M., J. A. Bryant & M. W. Kerr (1994). „A simple spectrophotometric assay for plant 5'-deoxy-5'-methylthioadenosine nucleosidase using xanthine oxidase as a coupling enzyme“.

- In: *Phytochemical Analysis* 5.6, S. 286–290. DOI: 10.1002/pca.2800050603. URL: <https://doi.org/10.1002/pca.2800050603>.
- Eisenberg, D., E. Schwarz, M. Komaromy & R. Wall (1984). „Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot“. In: *Journal of Molecular Biology* 179.1, S. 125–142. DOI: 10.1016/0022-2836(84)90309-7. URL: [http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836\(84\)90309-7](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836(84)90309-7).
- Eller, J., S. Hein & J. Simon (2019). „Significance of MccR, MccC, MccD, MccL and 8-methylmenaquinone in sulfite respiration of *Wolinella succinogenes*“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1860.1, S. 12–21. DOI: 10.1016/j.bbabi.2018.10.002. URL: <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2018.10.002>.
- Elling, F. J., K. W. Becker, M. Könneke, J. M. Schröder, M. Y. Kellermann, M. Thomm & K.-U. Hinrichs (2015). „Respiratory quinones in Archaea: phylogenetic distribution and application as biomarkers in the marine environment“. In: *Environmental Microbiology* 18.2, S. 692–707. DOI: 10.1111/1462-2920.13086. URL: <http://dx.doi.org/10.1111/1462-2920.13086>.
- Farooqui, J., S. Kim & W. K. Paik (1983). „Measurement of isoelectric point of textitS-adenosyl-L-methionine and its metabolic products by an isoelectric focusing technique“. In: *Electrophoresis* 4.4, S. 261–265. DOI: 10.1002/elps.1150040402. URL: <https://doi.org/10.1002/elps.1150040402>.
- Feng, S., L. Kong, S. Gee & W. Im (2022). „Molecular condensate in a membrane: A tugging game between hydrophobicity and polarity with its biological significance“. In: *Langmuir* 38.19, S. 5955–5962. DOI: 10.1021/acs.langmuir.2c00876. URL: <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.2c00876>.
- Feng, S., R. Wang, R. W. Pastor, J. B. Klauda & W. Im (2021). „Location and conformational ensemble of menaquinone and menaquinol, and protein-lipid modulations in archaeal membranes“. In: *The Journal of Physical Chemistry B* 125.18, S. 4714–4725. DOI: 10.1021/acs.jpcc.1c01930. URL: <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.1c01930>.
- Fenn, K., P. Strandwitz, E. J. Stewart, E. Dimise, S. Rubin, S. Gurubacharya, J. Clardy & K. Lewis (2017). „Quinones are growth factors for the human gut microbiota“. In: *Microbiome* 5.1, S. 161. DOI: 10.1186/s40168-017-0380-5. URL: <http://dx.doi.org/10.1186/s40168-017-0380-5>.
- Fernandez, F. & M. D. Collins (1987). „Vitamin K composition of anaerobic gut bacteria“. In: *FEMS Microbiology Letters* 41.2, S. 175–180. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1987.tb02191.x. URL: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1987.tb02191.x>.
- Finster, K., W. Liesack & B. J. Tindall (1997). „*Sulfurospirillum arcachonense* sp. nov., a new microaerophilic sulfur-reducing bacterium“. In: *International Journal of Systematic Bacteriology* 47.4, S. 1212–1217. DOI: 10.1099/00207713-47-4-1212. URL: <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-47-4-1212>.
- Fitch, C. A., D. A. Karp, K. K. Lee, W. E. Stites, E. E. Lattman & E. B. García-Moreno (2002). „Experimental pKa values of buried residues: Analysis with continuum methods and role of water penetration“. In: *Biophysical Journal* 82.6, S. 3289–3304. DOI: 10.1016/s0006-3495(02)75670-1. URL: [https://doi.org/10.1016/s0006-3495\(02\)75670-1](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(02)75670-1).
- Flegler, A., V. Kombeitz & A. Lipski (2021). „Menaquinone-mediated regulation of membrane fluidity is relevant for fitness of *Listeria monocytogenes*“. In: *Archives of Microbiology* 203.6, S. 3353–3360. DOI: 10.1007/s00203-021-02322-6. URL: <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02322-6>.
- Franza, T., E. Delavenne, Derré-Bobillot, M. Boulay, E. Demey, J. Vinh, G. Lamberet & P. Gaudu (2016). „A partial metabolic pathway enables group b *Streptococcus* to overcome quinone deficiency in a host bacterial community“. In: *Molecular Microbiology* 102.1, S. 81–91. DOI: 10.1111/mmi.13447. URL: <http://dx.doi.org/10.1111/mmi.13447>.

- Frickey, T. & A. Lupas (2004). „CLANS: a Java application for visualizing protein families based on pairwise similarity“. In: *Bioinformatics* 20.18, S. 3702–3704. DOI: 10.1093/bioinformatics/bth444. URL: <https://doi.org/10.1093%2Fbioinformatics%2Fbth444>.
- Frolova, G. M., K. G. Pavel, A. A. Shparteeva, O. I. Nedashkovskaya, N. M. Gorshkova, E. P. Ivanova & V. V. Mikhailov (2005). „Lipid Composition of Novel Shewanella Species Isolated from Far Eastern Seas“. In: *Microbiology* 74.6, S. 664–669. DOI: 10.1007/s11021-005-0121-9. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s11021-005-0121-9>.
- Galassi, V. V. & G. M. Arantes (2015). „Partition, orientation and mobility of ubiquinones in a lipid bilayer“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1847.12, S. 1560–1573. DOI: 10.1016/j.bbabi.2015.08.001. URL: <https://doi.org/10.1016%2Fj.bbabi.2015.08.001>.
- Galm, U., E. Wendt-Pienkowski, L. Wang, N. P. George, T.-J. Oh, F. Yi, M. Tao, J. M. Coughlin & B. Shen (2009). „The biosynthetic gene cluster of zorbamycin, a member of the bleomycin family of antitumor antibiotics, from *Streptomyces flavoviridis* ATCC 21892“. In: *Mol. BioSyst.* 5.1, S. 77–90. DOI: 10.1039/b814075h. URL: <https://doi.org/10.1039%2Fb814075h>.
- Gambacorta, A., A. Trincone, B. Nicolaus, L. Lama & M. De Rosa (1993). „Unique Features of Lipids of Archaea“. In: *Systematic and Applied Microbiology* 16.4, S. 518–527. DOI: 10.1016/s0723-2020(11)80321-8. URL: <https://doi.org/10.1016%2Fs0723-2020%2811%2980321-8>.
- Gao, Q., H. Chen, W. Wang, J. Huang, Y. Tao & B. Lin (2020). „Menaquinone-7 production in engineered *Escherichia coli*“. In: *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 36.9, S. 132. DOI: 10.1007/s11274-020-02880-9. URL: <https://doi.org/10.1007%2Fs11274-020-02880-9>.
- Garg, N., A. J. Taylor & D. J. Kelly (2018). „Bacterial periplasmic nitrate and trimethylamine-*N*-oxide respiration coupled to menaquinol-cytochrome *c* reductase (Qcr): Implications for electrogenic reduction of alternative electron acceptors“. In: *Scientific Reports* 8.1, S. 15478. DOI: 10.1038/s41598-018-33857-2. URL: <https://doi.org/10.1038%2Fs41598-018-33857-2>.
- Georgi, T., V. Engels & V. F. Wendisch (2008). „Regulation of l-lactate utilization by the FadR-type regulator LldR of *Corynebacterium glutamicum*“. In: *Journal of Bacteriology* 190.3, S. 963–971. DOI: 10.1128/jb.01147-07. URL: <https://doi.org/10.1128%2Fjb.01147-07>.
- Gershenzon, J. & N. Dudareva (2007). „The function of terpene natural products in the natural world“. In: *Nature Chemical Biology* 3.7, S. 408–414. DOI: 10.1038/nchembio.2007.5. URL: <https://doi.org/10.1038%2Fnchembio.2007.5>.
- Goble, A. M., R. Toro, X. Li, A. Ornelas, H. Fan, S. Eswaramoorthy, Y. Patskovsky, B. Hillerich, R. Seidel, A. Sali, B. K. Shoichet, S. C. Almo, S. Swaminathan, M. E. Tanner & F. M. Raushel (2013). „Deamination of 6-aminodeoxyfutasoline in menaquinone biosynthesis by distantly related enzymes“. In: *Biochemistry* 52.37, S. 6525–6536. DOI: 10.1021/bi400750a. URL: <https://doi.org/10.1021%2Fbi400750a>.
- Gon, S., M.-T. Giudici-Orticoni, V. Méjean & C. Iobbi-Nivol (2001). „Electron transfer and binding of the *c*-type cytochrome TorC to the trimethylamine *N*-oxide reductase in *Escherichia coli*“. In: *Journal of Biological Chemistry* 276.15, S. 11545–11551. DOI: 10.1074/jbc.m008875200. URL: <https://doi.org/10.1074%2Fjbc.m008875200>.
- Gonnet, G. H., M. A. Cohen & S. A. Benner (1992). „Exhaustive matching of the entire protein sequence database“. In: *Science* 256.5062, S. 1443–1445. DOI: 10.1126/science.1604319. URL: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1604319>.
- Gopalasingam, C. C., R. M. Johnson, G. N. Chiduzza, T. Tosha, M. Yamamoto, Y. Shiro, S. V. Antonyuk, S. P. Muench & S. S. Hasnain (2019). „Dimeric structures of quinol-dependent nitric oxide reductases (qNORs) revealed by cryo-electron microscopy“. In: *Science Advances*

- 5.8, eaax1803. DOI: 10.1126/sciadv.aax1803. URL: <https://doi.org/10.1126%2Fsciadv.aax1803>.
- Goyal, P., J. Lu, S. Yang, M. R. Gunner & Q. Cui (2013). „Changing hydration level in an internal cavity modulates the proton affinity of a key glutamate in cytochrome *c* oxidase“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110.47, S. 18886–18891. DOI: 10.1073/pnas.1313908110. URL: <https://doi.org/10.1073%2Fpnas.1313908110>.
- Grein, F., A. R. Ramos, S. S. Venceslau & I. A. Pereira (2013). „Unifying concepts in anaerobic respiration: Insights from dissimilatory sulfur metabolism“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1827.2, S. 145–160. DOI: 10.1016/j.bbabi.2012.09.001. URL: <https://doi.org/10.1016%2Fj.bbabi.2012.09.001>.
- Grosche, A., H. Sekaran, Pérez-Rodríguez & C. Vetrani (2015). „*Cetia pacifica* gen. nov., sp. nov., a chemolithoautotrophic, thermophilic, nitrate-ammonifying bacterium from a deep-sea hydrothermal vent“. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65.4, S. 1144–1150. DOI: 10.1099/ijs.0.000070. URL: <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.000070>.
- Gross, R., J. Simon, F. Theis & A. Kröger (1998). „Two membrane anchors of *Wolinella succinogenes* hydrogenase and their function in fumarate and polysulfide respiration“. In: *Archives of Microbiology* 170.1, S. 50–58. DOI: 10.1007/s002030050614. URL: <https://doi.org/10.1007%2Fs002030050614>.
- Guccione, E., A. Hitchcock, S. J. Hall, F. Mulholland, N. Shearer, A. H. M. van Vliet & D. J. Kelly (2010). „Reduction of fumarate, mesaconate and crotonate by Mfr, a novel oxygen-regulated periplasmic reductase in *Campylobacter jejuni*“. In: *Environmental Microbiology* 12.3, S. 576–591. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2009.02096.x. URL: <https://doi.org/10.1111%2Fj.1462-2920.2009.02096.x>.
- Guiral, M., P. Tron, C. Aubert, A. Gloter, C. Iobbi-Nivol & M.-T. Giudici-Ortoni (2005). „A membrane-bound multienzyme, hydrogen-oxidizing, and sulfur-reducing complex from the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*“. In: *Journal of Biological Chemistry* 280.51, S. 42004–42015. DOI: 10.1074/jbc.M508034200. URL: <https://doi.org/10.1074%2Fjbc.M508034200>.
- Haja, D. K., C.-H. Wu, F. L. Poole, J. Sugar, S. G. Williams, A. K. Jones & M. W. W. Adams (2019). „Characterization of thiosulfate reductase from *Pyrobaculum aerophilum* heterologously produced in *Pyrococcus furiosus*“. In: *Extremophiles* 24.1, S. 53–62. DOI: 10.1007/s00792-019-01112-9. URL: <https://doi.org/10.1007%2Fs00792-019-01112-9>.
- Hammer, N. D., J. E. Cassat, M. J. Noto, L. J. Lojek, A. D. Chadha, J. E. Schmitz & Creech (2014). „Inter- and intraspecies metabolite exchange promotes virulence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*“. In: *Cell Host & Microbe* 16.4, S. 531–537. DOI: 10.1016/j.chom.2014.09.002. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2014.09.002>.
- Haskamp, V., S. Karrie, T. Mingers, S. Barthels, F. Alberge, A. Magalon, K. Müller, E. Bill, W. Lubitz, K. Kleeberg, P. Schweyen, M. Bröring, M. Jahn & D. Jahn (2018). „The radical SAM protein HemW is a heme chaperone“. In: *Journal of Biological Chemistry* 293.7, S. 2558–2572. DOI: 10.1074/jbc.RA117.000229. URL: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.RA117.000229>.
- Hayashi, J. M., C.-Y. Luo, J. A. Mayfield, T. Hsu, T. Fukuda, A. L. Walfield, S. R. Giffen, J. D. Leszyk, C. E. Baer, O. T. Bennion, A. Madhuri, S. A. Shaffer, B. B. Aldridge, C. M. Sasseti, S. J. Sandler, T. Kinoshita, D. B. Moody & Y. S. Morita (2016). „Spatially distinct and metabolically active membrane domain in *Mycobacteria*“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113.19, S. 5400–5405. DOI: 10.1073/pnas.1525165113. URL: <https://doi.org/10.1073%2Fpnas.1525165113>.
- Heim, S., A. Kunkel, R. K. Thauer & R. Hedderich (1998). „Thiol : fumarate reductase (Tfr) from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Identification of the catalytic sites for fumarate reduction and thiol oxidation“. In: *European Journal of Biochemistry* 253.1, S. 292–299.

- DOI: 10.1046/j.1432-1327.1998.2530292.x.
URL: <https://doi.org/10.1046%2Fj.1432-1327.1998.2530292.x>.
- Hein, S. (2019). „Struktur, Funktion und mikrobielle Biosynthese methylierter Menachinon-Derivate“. In: *TUprints* 449099814. URL: <https://tuprints.ulb.tu-darmstadt.de/id/eprint/8496>.
- Hein, S., O. Klimmek, M. Polly, M. Kern & J. Simon (2017). „A class C radical *S*-adenosylmethionine methyltransferase synthetizes 8-methylmenaquinone“. In: *Molecular Microbiology* 104.3, S. 449–462. DOI: 10.1111/mmi.13638. URL: <https://doi.org/10.1111%2Fmmi.13638>.
- Hein, S., J. von Irmer, M. Gallei, R. Meusinger & J. Simon (2018). „Two dedicated class C radical *S*-adenosylmethionine methyltransferases concertedly catalyse the synthesis of 7,8-dimethylmenaquinone“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1859.4, S. 300–308. DOI: 10.1016/j.bbabi.2018.01.010. URL: <https://doi.org/10.1016%2Fj.bbabi.2018.01.010>.
- Hermann, B., M. Kern, L. L. Pietra, J. Simon & O. Einsle (2015). „The octahaem MccA is a haem *c* copper sulfite reductase“. In: *Nature* 520.7549, S. 706–709. DOI: 10.1038/nature14109. URL: <https://doi.org/10.1038%2Fnature14109>.
- Hiratsuka, T., K. Furihata, J. Ishikawa, H. Yamashita, N. Itoh, H. Seto & T. Dairi (2008). „An alternative menaquinone biosynthetic pathway operating in microorganisms“. In: *Science* 321.5896, S. 1670–1673. DOI: 10.1126/science.1160446. URL: <https://doi.org/10.1126%2Fscience.1160446>.
- Hiratsuka, T., N. Itoh, H. Seto & T. Dairi (2009). „Enzymatic properties of futasolase, an enzyme essential to a newly identified menaquinone biosynthetic pathway“. In: *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 73.5, S. 1137–1141. DOI: 10.1271/bbb.80906. URL: <https://doi.org/10.1271%2Fbbb.80906>.
- Holliday, G. L., E. Akiva, E. C. Meng, S. D. Brown, S. Calhoun, U. Pieper, A. Sali, S. J. Booker & P. C. Babbitt (2018). „Atlas of the radical SAM superfamily: Divergent evolution of function using a “Plug and Play” domain“. In: *Methods in Enzymology*. Bd. 606. 1. Elsevier, S. 1–71. DOI: 10.1016/bs.mie.2018.06.004. URL: <https://doi.org/10.1016%2Fbs.mie.2018.06.004>.
- Homuth, G., A. Rompf, W. Schumann & D. Jahn (1999). „Transcriptional Control *Bacillus subtilis hemN* and *hemZ*“. In: *Journal of Bacteriology* 181.19, S. 5922–5929. DOI: 10.1128/jb.181.19.5922-5929.1999. URL: <https://doi.org/10.1128%2Fjb.181.19.5922-5929.1999>.
- Horitani, M., K. Shisler, W. E. Broderick, R. U. Hutcheson, K. S. Duschene, A. R. Marts, B. M. Hoffman & J. B. Broderick (2016). „Radical SAM catalysis via an organometallic intermediate with an Fe-[5'-C]-deoxyadenosyl bond“. In: *Science* 352.6287, S. 822–825. DOI: 10.1126/science.aaf5327. URL: <https://doi.org/10.1126%2Fscience.aaf5327>.
- Hu, Y. & M. W. Ribbe (2016). „Maturation of nitrogenase cofactor - the role of a class E radical SAM methyltransferase NifB“. In: *Current Opinion in Chemical Biology* 31, S. 188–194. DOI: 10.1016/j.cbpa.2016.02.016. URL: <https://doi.org/10.1016%2Fj.cbpa.2016.02.016>.
- Huang, W., H. Xu, Y. Li, F. Zhang, X.-Y. Chen, Q.-L. He, Y. Igarashi & G.-L. Tang (2012). „Characterization of yatakemycin gene cluster revealing a radical *S*-adenosylmethionine dependent methyltransferase and highlighting spirocyclopropane biosynthesis“. In: *Journal of the American Chemical Society* 134.21, S. 8831–8840. DOI: 10.1021/ja211098r. URL: <https://doi.org/10.1021%2Fja211098r>.
- Hutcheson, R. U. & J. B. Broderick (2012). „Radical SAM enzymes in methylation and methylthiolation“. In: *Metallomics* 4.11, S. 1149. DOI: 10.1039/c2mt20136d. URL: <https://doi.org/10.1039%2Fc2mt20136d>.
- Hwang, Y. J., G. I. Jang, B. C. Cho & Lee (2019). „*Shewanella psychromarinicola* sp. nov., a psychrophilic bacterium isolated from pelagic sediment of the Ross Sea (Antarctica)“. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 69.8, S. 2415–2423. DOI:

- 10.1099/ijsem.0.003490. URL: <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.003490>.
- Itoh, T., H. Funabashi, Y. Katayama-Fujimura, S. Iwasaki & H. Kuraishi (1985). „Structure of methylmenaquinone-7 isolated from *Alteromonas putrefaciens* IAM 12079“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 840.1, S. 51–55. DOI: 10.1016/0304-4165(85)90161-8. URL: [http://dx.doi.org/10.1016/0304-4165\(85\)90161-8](http://dx.doi.org/10.1016/0304-4165(85)90161-8).
- Jiang, M., X. Chen, Z.-F. Guo, Y. Cao, M. Chen & Z. Guo (2008). „Identification and Characterization of (1R,6R)-2-Succinyl-6-hydroxy-2,4-cyclohexadiene-1-carboxylate synthase in the menaquinone biosynthesis of *Escherichia coli*“. In: *Biochemistry* 47.11, S. 3426–3434. DOI: 10.1021/bi7023755. URL: <https://doi.org/10.1021/bi7023755>.
- Jin, J.-S., K. C. Lee, I.-S. Park, K. K. Kim, J. S. Ahn, Y. Benno, M. Hattori & J.-S. Lee (2014). „*Gordonibacter faecihominis* sp. nov., isolated from human faeces“. In: *Antonie van Leeuwenhoek* 106.3, S. 439–447. DOI: 10.1007/s10482-014-0212-6. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s10482-014-0212-6>.
- Jin, W.-B., S. Wu, X.-H. Jian, H. Yuan & G.-L. Tang (2018). „A radical *S*-adenosyl-L-methionine enzyme and a methyltransferase catalyze cyclopropane formation in natural product biosynthesis“. In: *Nature Communications* 9.1, S. 2771. DOI: 10.1038/s41467-018-05217-1. URL: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05217-1>.
- Jormakka, M., K. Yokoyama, T. Yano, M. Tamakoshi, S. Akimoto, T. Shimamura, P. Curmi & S. Iwata (2008). „Molecular mechanism of energy conservation in polysulfide respiration“. In: *Nature Structural & Molecular Biology* 15.7, S. 730–737. DOI: 10.1038/nsmb.1434. URL: <https://doi.org/10.1038/nsmb.1434>.
- Joshi, S., D. Fedoseyenko, N. Mahanta & T. P. Begley (2018a). „Aminofutalosine synthase (MqnE): A new catalytic motif in radical SAM enzymology“. In: *Methods in Enzymology*. Elsevier, S. 179–198. DOI: 10.1016/bs.mie.2018.05.002. URL: <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2018.05.002>.
- Joshi, S., D. Fedoseyenko, N. Mahanta, H. Manion, S. Naseem, T. Dairi & T. P. Begley (2018b). „Novel enzymology in futalosine-dependent menaquinone biosynthesis“. In: *Current Opinion in Chemical Biology* 47, S. 134–141. DOI: 10.1016/j.cbpa.2018.09.015. URL: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.09.015>.
- Juhnke, H. D., H. Hiltcher, H. R. Nasiri, H. Schwalbe & C. R. D. Lancaster (2009). „Production, characterization and determination of the real catalytic properties of the putative succinate dehydrogenase from *Wolinella succinogenes*“. In: *Molecular Microbiology* 71.5, S. 1088–1101. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2008.06581.x. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06581.x>.
- Jumper, J., R. Evans, A. Pritzel, T. Green, M. Figurnov, O. Ronneberger, K. Tunyasuvunakool, R. Bates, A. Židek, A. Potapenko, A. Bridgland, C. Meyer, S. A. A. Kohl, A. J. Ballard, A. Cowie, B. Romera-Paredes, S. Nikolov, R. Jain, J. Adler, T. Back, S. Petersen, D. Reiman, E. Clancy, M. Zielinski, M. Steinegger, M. Pacholska, T. Berghammer, S. Bodenstein, D. Silver, O. Vinyals, A. W. Senior, K. Kavukcuoglu, P. Kohli & D. Hassabis (2021). „Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold“. In: *Nature* 596.7873, S. 583–589. DOI: 10.1038/s41586-021-03819-2. URL: <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>.
- Katsuta, A., K. Adachi, S. Matsuda, Y. Shizuri & H. Kasai (2005). „*Ferrimonas marina* sp. nov.“ In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55.5, S. 1851–1855. DOI: 10.1099/ijms.0.63689-0. URL: <https://doi.org/10.1099/ijms.0.63689-0>.
- Kellermann, M. Y., M. Y. Yoshinaga, R. C. Valentine, L. Wörmer & D. L. Valentine (2016). „Important roles for membrane lipids in haloarchaeal bioenergetics“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1858.11, S. 2940–2956. DOI: 10.1016/j.bbamem.2016.08.010. URL: <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.08.010>.
- Kern, M., M. G. Klotz & J. Simon (2011). „The *Wolinella succinogenes* mcc gene cluster encodes

- an unconventional respiratory sulphite reduction system“. In: *Molecular Microbiology* 82.6, S. 1515–1530. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2011.07906.x. URL: <https://doi.org/10.1111%2Fj.1365-2958.2011.07906.x>.
- Kern, M. & J. Simon (2011). „Production of recombinant multiheme cytochromes *c* in *Wolinella succinogenes*“. In: *Research on Nitrification and Related Processes, Part A*. Elsevier, S. 429–446. DOI: 10.1016/b978-0-12-381294-0.00019-5. URL: <https://doi.org/10.1016%2Fb978-0-12-381294-0.00019-5>.
- Kim, K. K., K. C. Lee & J.-S. Lee (2012). „*Patulibacter ginsengiterrae* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field, and an emended description of the genus *Patulibacter*“. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62.Pt_3, S. 563–568. DOI: 10.1099/ij.s.0.032052-0. URL: <https://doi.org/10.1099%2Fij.s.0.032052-0>.
- Kim, S. H., Y. H. Park, C. Schmidt-Dannert & P. C. Lee (2010). „Redesign, reconstruction, and directed extension of the *Brevibacterium linens* C₄₀ carotenoid pathway in *Escherichia coli*“. In: *Applied and Environmental Microbiology* 76.15, S. 5199–5206. DOI: 10.1128/aem.00263-10. URL: <https://doi.org/10.1128%2Faem.00263-10>.
- Kishore, N., B. Binneman, A. Mahapatra, M. van de Venter, D. du Plessis-Stoman, Boukes, J. Marion Meyer & N. Lall (2014). „Cytotoxicity of synthesized 1,4-naphthoquinone analogues on selected human cancer cell lines“. In: *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 22.17, S. 5013–5019. DOI: 10.1016/j.bmc.2014.06.013. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2014.06.013>.
- Klimmek, O., W. Dietrich, F. Dancea, Y.-J. Lin, S. Pfeiffer, F. LÖhr, H. Rüterjans, R. Gross, J. Simon & A. Kröger (2004). „Chapter 10: Sulfur respiration“. In: *Respiration in Archaea and Bacteria*. Springer Netherlands, S. 217–232. DOI: 10.1007/978-1-4020-3163-2_10. URL: https://doi.org/10.1007%2F978-1-4020-3163-2_10.
- Klimmek, O., A. Kröger, R. Steudel & G. Holdt (1991). „Growth of *Wolinella succinogenes* with polysulphide as terminal acceptor of phosphorylative electron transport“. In: *Archives of Microbiology* 155.2, S. 177–182. DOI: 10.1007/bf00248614. URL: <https://doi.org/10.1007%2Fbf00248614>.
- Kolaj-Robin, O., S. R. O’Kane, W. Nitschke, C. Léger, F. Baymann & T. Soulimane (2011). „Biochemical and biophysical characterization of succinate: Quinone reductase from *Thermus thermophilus*“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1807.1, S. 68–79. DOI: 10.1016/j.bbabi.2010.10.009. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.10.009>.
- Kong, M. K. & P. C. Lee (2011). „Metabolic engineering of menaquinone-8 pathway of *Escherichia coli* as a microbial platform for vitamin K production“. In: *Biotechnology and Bioengineering* 108.8, S. 1997–2002. DOI: 10.1002/bit.23142. URL: <https://doi.org/10.1002%2Fbit.23142>.
- Koyama, T. (1999). „Molecular analysis of prenyl chain elongating enzymes“. In: *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 63.10, S. 1671–1676. DOI: 10.1271/bbb.63.1671. URL: <https://doi.org/10.1271%2Fbbb.63.1671>.
- Koziolek, M., M. Grimm, D. Becker, V. Iordanov, H. Zou, J. Shimizu, C. Wanke, G. Garbacz & W. Weitschies (2015). „Investigation of pH and temperature profiles in the GI tract of fasted human subjects using the intellicap system“. In: *Journal of Pharmaceutical Sciences* 104.9, S. 2855–2863. DOI: 10.1002/jps.24274. URL: <https://doi.org/10.1002%2Fjps.24274>.
- Kröger, A., S. Biel, J. Simon, R. Gross, G. Uuden & C. D. Lancaster (2002). „Fumarate respiration of *Wolinella succinogenes*: enzymology, energetics and coupling mechanism“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1553.1-2, S. 23–38. DOI: 10.1016/s0005-2728(01)00234-1. URL: <https://doi.org/10.1016%2Fs0005-2728%2801%2900234-1>.
- Kurth, J. M., C. Dahl & J. N. Butt (2015). „Catalytic protein film electrochemistry provides a direct measure of the tetrathionate/thiosulfate reduction potential“. In: *Journal of the American Chemical Society* 137.41, S. 13232–

13235. DOI: 10.1021/jacs.5b08291. URL: <https://doi.org/10.1021%2Fjacs.5b08291>.
- Kurth, J. M., A. Schuster, W. Seel, S. Herresthal, J. Simon & C. Dahl (2017). „TsdC, a unique lipoprotein from *Wolinella succinogenes* that enhances tetrathionate reductase activity of TsdA“. In: *FEMS Microbiology Letters* 364.4, S. 10.1093. DOI: 10.1093/femsle/fnx003. URL: <https://doi.org/10.1093%2Ffemsle%2Ffnx003>.
- Laemmli, U. K. (1970). „Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4“. In: *Nature* 227.5259, S. 680–685. DOI: 10.1038/227680a0. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/227680a0>.
- LaMattina, J. W., D. B. Nix & W. N. Lanzilotta (2016). „Radical new paradigm for heme degradation in *Escherichia coli* O157:H7“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113.43, S. 12138–12143. DOI: 10.1073/pnas.1603209113. URL: <https://doi.org/10.1073%2Fpnas.1603209113>.
- Lambert, M. A. & C. W. Moss (1989). „Cellular fatty acid compositions and isoprenoid quinone contents of 23 *Legionella species*“. In: *Journal of Clinical Microbiology* 27.3, S. 465–473. DOI: 10.1128/jcm.27.3.465-473.1989. URL: <https://doi.org/10.1128%2Fjcm.27.3.465-473.1989>.
- Lancaster, C. R. D. (2013). „The di-heme family of respiratory complex II enzymes“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1827.5, S. 679–687. DOI: 10.1016/j.bbabi.2013.02.012. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2013.02.012>.
- Lancaster, C. D. & J. Simon (2002). „Succinate:quinone oxidoreductases from ϵ -proteobacteria“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1553.1-2, S. 84–101. DOI: 10.1016/S0005-2728(01)00230-4. URL: <https://doi.org/10.1016%2Fs0005-2728%2801%2900230-4>.
- Lange, B. M., T. Rujan, W. Martin & R. Croteau (2000). „Isoprenoid biosynthesis: The evolution of two ancient and distinct pathways across genomes“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97.24, S. 13172–13177. DOI: 10.1073/pnas.240454797. URL: <https://doi.org/10.1073%2Fpnas.240454797>.
- Langsetmo, K., J. A. Fuchs & C. Woodward (1991a). „The conserved, buried aspartic acid in oxidized *Escherichia coli* thioredoxin has a pKa of 7.5. Its titration produces a related shift in global stability“. In: *Biochemistry* 30.30, S. 7603–7609. DOI: 10.1021/bi00244a032. URL: <https://doi.org/10.1021%2Fbi00244a032>.
- Langsetmo, K., J. A. Fuchs, C. Woodward & K. A. Sharp (1991b). „Linkage of thioredoxin stability to titration of ionizable groups with perturbed pKa“. In: *Biochemistry* 30.30, S. 7609–7614. DOI: 10.1021/bi00244a033. URL: <https://doi.org/10.1021%2Fbi00244a033>.
- Laskowski, R. A., J. Jabłońska, L. Pravda, R. S. Vařeková & J. M. Thornton (2017). „PDBsum: Structural summaries of PDB entries“. In: *Protein Science* 27.1, S. 129–134. DOI: 10.1002/pro.3289. URL: <http://dx.doi.org/10.1002/pro.3289>.
- Layer, G. (2003). „Crystal structure of coproporphyrinogen III oxidase reveals cofactor geometry of radical SAM enzymes“. In: *The EMBO Journal* 22.23, S. 6214–6224. DOI: 10.1093/emboj/cdg598. URL: <https://doi.org/10.1093%2Femboj%2Fcdg598>.
- Lee, P. T., A. Y. Hsu, H. T. Ha & C. F. Clarke (1997). „A C-methyltransferase involved in both ubiquinone and menaquinone biosynthesis: isolation and identification of the *Escherichia coli* *ubiE* gene“. In: *Journal of Bacteriology* 179.5, S. 1748–1754. DOI: 10.1128/jb.179.5.1748-1754.1997. URL: <https://doi.org/10.1128%2Fjb.179.5.1748-1754.1997>.
- Letunic, I. & P. Bork (2016). „Interactive tree of life (iTOL) v3: An online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees“. In: *Nucleic Acids Research* 44.W1, W242–W245. DOI: 10.1093/nar/gkw290. URL: <https://doi.org/10.1093%2Fnar%2Fgkw290>.
- Li, H.-J., X. Li, N. Liu, H. Zhang, J. J. Truglio, S. Mishra, C. Kisker, M. Garcia-Diaz & P. J. Tonge (2011). „Mechanism of the intramolecular claisen condensation reaction catalyzed

- by MenB, a crotonase superfamily member“. In: *Biochemistry* 50.44, S. 9532–9544. DOI: 10.1021/bi200877x. URL: <https://doi.org/10.1021%2Fbi200877x>.
- Lis, R. van, W. Nitschke, S. Duval & B. Schoepp-Cothenet (2013). „Arsenics as bioenergetic substrates“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1827.2, S. 176–188. DOI: 10.1016/j.bbabi.2012.08.007. URL: <https://doi.org/10.1016%2Fj.bbabi.2012.08.007>.
- Lloyd, C. T., D. F. Iwig, B. Wang, M. Cossu, W. W. Metcalf, A. K. Boal & S. J. Booker (2022). „Discovery, structure and mechanism of a tetraether lipid synthase“. In: *Nature* 609.7925, S. 197–203. DOI: 10.1038/s41586-022-05120-2. URL: <https://doi.org/10.1038%2Fs41586-022-05120-2>.
- Lombard, J. & D. Moreira (2010). „Origins and early evolution of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis in the three domains of life“. In: *Molecular Biology and Evolution* 28.1, S. 87–99. DOI: 10.1093/molbev/msq177. URL: <https://doi.org/10.1093%2Fmolbev%2Fmsq177>.
- Ma, W.-D., Y.-P. Zou, P. Wang, X.-H. Yao, Y. Sun, M.-H. Duan, Y.-J. Fu & B. Yu (2014). „Chimaphilin induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through a ROS-mediated mitochondrial pathway“. In: *Food and Chemical Toxicology* 70, S. 1–8. DOI: 10.1016/j.fct.2014.04.014. URL: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2014.04.014>.
- MacMillan, K. S. & D. L. Boger (2009). „Fundamental relationships between structure, reactivity, and biological activity for the duocarmycins and CC-1065“. In: *Journal of Medicinal Chemistry* 52.19, S. 5771–5780. DOI: 10.1021/jm9006214. URL: <https://doi.org/10.1021%2Fjm9006214>.
- Magalon, A. & F. Alberge (2016). „Distribution and dynamics of OXPHOS complexes in the bacterial cytoplasmic membrane“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1857.3, S. 198–213. DOI: 10.1016/j.bbabi.2015.10.015. URL: <https://doi.org/10.1016%2Fj.bbabi.2015.10.015>.
- Mahanta, N., D. Fedoseyenko, T. Dairi & T. P. Begley (2013). „Menaquinone biosynthesis: Formation of aminofutalosine requires a unique radical SAM enzyme“. In: *Journal of the American Chemical Society* 135.41, S. 15318–15321. DOI: 10.1021/ja408594p. URL: <https://doi.org/10.1021%2Fja408594p>.
- Mahanta, N., Z. Zhang, G. A. Hudson, W. A. van der Donk & D. A. Mitchell (2017). „Reconstitution and substrate specificity of the radical *S*-adenosyl-methionine thiazole C-methyltransferase in thiomuracin biosynthesis“. In: *Journal of the American Chemical Society* 139.12, S. 4310–4313. DOI: 10.1021/jacs.7b00693. URL: <https://doi.org/10.1021%2Fjacs.7b00693>.
- Mander, G. J., E. C. Duin, D. Linder, K. O. Stetter & R. Hedderich (2002). „Purification and characterization of a membrane-bound enzyme complex from the sulfate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus* related to heterodisulfide reductase from methanogenic archaea“. In: *European Journal of Biochemistry* 269.7, S. 1895–1904. DOI: 10.1046/j.1432-1033.2002.02839.x. URL: <https://doi.org/10.1046%2Fj.1432-1033.2002.02839.x>.
- Mander, G. J., A. J. Pierik, H. Huber & R. Hedderich (2004). „Two distinct heterodisulfide reductase-like enzymes in the sulfate-reducing archaeon *Archaeoglobus profundus*“. In: *European Journal of Biochemistry* 271.6, S. 1106–1116. DOI: 10.1111/j.1432-1033.2004.04013.x. URL: <https://doi.org/10.1111%2Fj.1432-1033.2004.04013.x>.
- Manion-Sommerhalter, H. R., D. Fedoseyenko, S. Joshi & T. P. Begley (2021). „Menaquinone biosynthesis: The mechanism of 5,8-dihydroxy-2-naphthoate synthase (MqnD)“. In: *Biochemistry* 60.25, S. 1947–1951. DOI: 10.1021/acs.biochem.1c00257. URL: <https://doi.org/10.1021%2Facs.biochem.1c00257>.
- Mannheim, W., W. Stieler, G. Wolf & R. Zabel (1978). „Taxonomic significance of respiratory quinones and fumarate respiration in *Actinobacillus* and *Pasteurella*“. In: *International Journal of Systematic Bacteriology* 28.1, S. 7–13.

- DOI: 10.1099/00207713-28-1-7. URL: <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-28-1-7>.
- Marcia, M., U. Ermler, G. Peng & H. Michel (2009). „A new structure-based classification of sulfide:quinone oxidoreductases“. In: *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 78.5, S. 1073–1083. DOI: 10.1002/prot.22665. URL: <https://doi.org/10.1002/prot.22665>.
- Marritt, S. J., T. G. Lowe, J. Bye, D. G. G. McMillan, L. Shi, J. Fredrickson, J. Zachara, D. J. Richardson, M. R. Cheesman, L. J. C. Jeuken & J. N. Butt (2012). „A functional description of CymA, an electron-transfer hub supporting anaerobic respiratory flexibility in *Shewanella*“. In: *Biochemical Journal* 444.3, S. 465–474. DOI: 10.1042/bj20120197. URL: <https://doi.org/10.1042/bj20120197>.
- Maruo, T., M. Sakamoto, C. Ito, T. Toda & Y. Benno (2008). „*Adlercreutzia equolifaciens* gen. nov., sp. nov., an equol-producing bacterium isolated from human faeces, and emended description of the genus *Eggerthella*“. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58.5, S. 1221–1227. DOI: 10.1099/ijs.0.65404-0. URL: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65404-0>.
- Maruyama, A., Y. Kumagai, K. Morikawa, K. Taguchi, H. Hayashi & T. Ohta (2003). „Oxidative-stress-inducible qorA encodes an NADPH-dependent quinone oxidoreductase catalysing a one-electron reduction in *Staphylococcus aureus*“. In: *Microbiology* 149.2, S. 389–398. DOI: 10.1099/mic.0.25796-0. URL: <https://doi.org/10.1099/mic.0.25796-0>.
- Matarlo, J. S., C. E. Evans, I. Sharma, L. J. Lavaud, S. C. Ngo, R. Shek, K. R. Rajashankar, J. B. French, D. S. Tan & P. J. Tonge (2015). „Mechanism of MenE inhibition by acyl-adenylate analogues and discovery of novel antibacterial agents“. In: *Biochemistry* 54.42, S. 6514–6524. DOI: 10.1021/acs.biochem.5b00966. URL: <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00966>.
- McMillan, D. G., S. J. Marritt, J. N. Butt & L. J. Jeuken (2012). „Menaquinone-7 is specific cofactor in tetraheme quinol dehydrogenase CymA“. In: *Journal of Biological Chemistry* 287.17, S. 14215–14225. DOI: 10.1074/jbc.M112.348813. URL: <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.348813>.
- Mirdita, M., K. Schütze, Y. Moriwaki, L. Heo, S. Ovchinnikov & M. Steinegger (2021). „ColabFold - Making protein folding accessible to all“. In: DOI: 10.1101/2021.08.15.456425. URL: <http://dx.doi.org/10.1101/2021.08.15.456425>.
- Möbius, K., R. Arias-Cartin, D. Breckau, A.-L. Hännig, K. Riedmann, R. Biedendieck, S. Schröder, D. Becher, A. Magalon, J. Moser & Jahn (2010). „Heme biosynthesis is coupled to electron transport chains for energy generation“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107.23, S. 10436–10441. DOI: 10.1073/pnas.1000956107. URL: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1000956107>.
- Molenaar, D., M. E. van der Rest, A. Drysch & R. Yücel (2000). „Functions of the membrane-associated and cytoplasmic malate dehydrogenases in the citric acid cycle of *Corynebacterium glutamicum*“. In: *Journal of Bacteriology* 182.24, S. 6884–6891. DOI: 10.1128/jb.182.24.6884-6891.2000. URL: <https://doi.org/10.1128/jb.182.24.6884-6891.2000>.
- Morotomi, M., F. Nagai & Y. Watanabe (2011). „*Parasutterella secunda* sp. nov., isolated from human faeces and proposal of *Sutterellaceae* fam. nov. in the order Burkholderiales“. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 61.3, S. 637–643. DOI: 10.1099/ijs.0.023556-0. URL: <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.023556-0>.
- Morris, R. P., J. A. Leeds, H. U. Naegeli, L. Oberer, K. Memmert, E. Weber, M. J. LaMarche, C. N. Parker, N. Burrell, S. Esterow, A. E. Hein, E. K. Schmitt & P. Krastel (2009). „Ribosomally synthesized thiopeptide antibiotics targeting elongation factor Tu“. In: *Journal of the American Chemical Society* 131.16, S. 5946–5955. DOI: 10.1021/ja900488a. URL: <https://doi.org/10.1021/ja900488a>.
- Moss, C. W., A. Kai, M. A. Lambert & C. Patton (1984). „Isoprenoid quinone content and cellular fatty acid composition of *Campylobacter* species“. In: *Journal of Clinical Microbiology*

- 19.6, S. 772–776. DOI: 10.1128/jcm.19.6.772-776.1984. URL: <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.19.6.772-776.1984>.
- Moss, C. W., M. A. Lambert-Fair, M. A. Nicholson & G. O. Guerrant (1990). „Isoprenoid quinones of *Campylobacter cryaerophila*, *C. cinaedi*, *C. fennelliae*, *C. hyointestinalis*, *C. pylori*, and *C. upsaliensis*“. In: *Journal of Clinical Microbiology* 28.2, S. 395–397. DOI: 10.1128/jcm.28.2.395-397.1990. URL: <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.28.2.395-397.1990>.
- Müller, F. H., T. M. Bandejas, T. Urich, M. Teixeira, C. M. Gomes & A. Kletzin (2004a). „Coupling of the pathway of sulphur oxidation to dioxygen reduction: Characterization of a novel membrane-bound thiosulphate:quinone oxidoreductase“. In: *Molecular Microbiology* 53.4, S. 1147–1160. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2004.04193.x. URL: <https://doi.org/10.1111%2Fj.1365-2958.2004.04193.x>.
- Müller, J. A., B. M. Rosner, G. von Abendroth, G. Meshulam-Simon, P. L. McCarty & A. M. Spormann (2004b). „Molecular identification of the catabolic vinyl chloride reductase from *Dehalococcoides* sp. strain VS and its environmental distribution“. In: *Applied and Environmental Microbiology* 70.8, S. 4880–4888. DOI: 10.1128/aem.70.8.4880-4888.2004. URL: <https://doi.org/10.1128%2Faem.70.8.4880-4888.2004>.
- Mustafa, G., C. T. Migita, Y. Ishikawa, K. Kobayashi, S. Tagawa & M. Yamada (2008). „Menaquinone as well as ubiquinone as a bound quinone crucial for catalytic activity and intramolecular electron transfer in *Escherichia coli* membrane-bound glucose dehydrogenase“. In: *Journal of Biological Chemistry* 283.42, S. 28169–28175. DOI: 10.1074/jbc.m804938200. URL: <https://doi.org/10.1074%2Fjbc.m804938200>.
- Myers, C. R. & J. M. Myers (1993). „Role of menaquinone in the reduction of fumarate, nitrate, iron(III) and manganese(IV) *Shewanella putrefaciens* MR-1“. In: *FEMS Microbiology Letters* 114.2, S. 215–222. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1993.tb06576.x. URL: <https://doi.org/10.1111%2Fj.1574-6968.1993.tb06576.x>.
- Myers, J. M. & C. R. Myers (2000). „Role of the tetraheme cytochrome CymA in anaerobic electron transport in cells of *Shewanella putrefaciens* MR-1 with normal levels of menaquinone“. In: *Journal of Bacteriology* 182.1, S. 67–75. DOI: 10.1128/jb.182.1.67-75.2000. URL: <https://doi.org/10.1128%2Fjb.182.1.67-75.2000>.
- Myneni, V. & E. Mezey (2017). „Regulation of bone remodeling by vitamin K2“. In: *Oral Diseases* 23.8, S. 1021–1028. DOI: 10.1111/odi.12624. URL: <http://dx.doi.org/10.1111/odi.12624>.
- Nagai, F., M. Morotomi, H. Sakon & R. Tanaka (2009). „*Parasutterella excrementihominis* gen. nov., sp. nov., a member of the family *Alcaligenaceae* isolated from human faeces“. In: *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY* 59.7, S. 1793–1797. DOI: 10.1099/ijs.0.002519-0. URL: <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.002519-0>.
- Nagai, F., Y. Watanabe & M. Morotomi (2010). „*Slackia piriformis* sp. nov. and *Collinsella tanakaei* sp. nov., new members of the family *Coriobacteriaceae*, isolated from human faeces“. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60.11, S. 2639–2646. DOI: 10.1099/ijs.0.017533-0. URL: <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.017533-0>.
- Nandi, N., T. Bera, S. Kumar, B. Purkait, A. Kumar & P. Das (2011). „Involvement of thermoplasmaquinone-7 in transplasma membrane electron transport of *Entamoeba histolytica* trophozoites: A key molecule for future rational chemotherapeutic drug designing“. In: *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 43.2, S. 203–215. DOI: 10.1007/s10863-011-9347-6. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s10863-011-9347-6>.
- Nasiri, H. R., R. Panisch, M. G. Madej, J. W. Bats, C. R. D. Lancaster & H. Schwalbe (2009). „The correlation of cathodic peak potentials of vitamin K3 derivatives and their calculated electron affinities“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1787.6, S. 601–608. DOI: 10.1016/j.bbabi.2009.02.013. URL:

- <https://doi.org/10.1016%2Fj.bbabi.2009.02.013>.
- Newport, T. D., M. S. P. Sansom & P. J. Stansfeld (2018). „The MemProtMD database: A resource for membrane-embedded protein structures and their lipid interactions“. In: *Nucleic Acids Research* 47.D1, S. D390–D397. DOI: 10.1093/nar/gky1047. URL: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gky1047>.
- Nijenhuis, I. & S. H. Zinder (2005). „Characterization of hydrogenase and reductive dehalogenase activities of *Dehalococcoides ethenogenes* strain 195“. In: *Applied and Environmental Microbiology* 71.3, S. 1664–1667. DOI: 10.1128/aem.71.3.1664-1667.2005. URL: <https://doi.org/10.1128%2Faem.71.3.1664-1667.2005>.
- Nonaka, H., G. Keresztes, Y. Shinoda, Y. Ikenaga, M. Abe, K. Naito, K. Inatomi, K. Furukawa, M. Inui & H. Yukawa (2006). „Complete genome sequence of the Dehalorespiring bacterium *Desulfitobacterium hafniense* Y51 and comparison with *Dehalococcoides ethenogenes* 195“. In: *Journal of Bacteriology* 188.6, S. 2262–2274. DOI: 10.1128/jb.188.6.2262-2274.2006. URL: <https://doi.org/10.1128%2Fjb.188.6.2262-2274.2006>.
- Nowicka, B. & J. Kruk (2010). „Occurrence, biosynthesis and function of isoprenoid quinones“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1797.9, S. 1587–1605. DOI: 10.1016/j.bbabi.2010.06.007. URL: <https://doi.org/10.1016%2Fj.bbabi.2010.06.007>.
- Oh, B. S., J.-S. Kim, S. Y. Yu, S. W. Ryu, S.-H. Park, S. W. Kang, J.-E. Park, S.-H. Choi, K.-I. Han, K. C. Lee, M. K. Eom, M. K. Suh, H. S. Kim, D. H. Lee, H. Yoon, B.-Y. Kim, J. H. Lee, J.-S. Lee & J. H. Lee (2020). „*Sutterella faecalis* sp. nov., isolated from human faeces“. In: *Journal of Microbiology* 58.2, S. 99–104. DOI: 10.1007/s12275-020-9396-9. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s12275-020-9396-9>.
- Okada, K., M. Minehira, X. Zhu, K. Suzuki, T. Nakagawa, H. Matsuda & M. Kawamukai (1997). „The *ispB* gene encoding octaprenyl diphosphate synthase is essential for growth of *Escherichia coli*“. In: *Journal of Bacteriology* 179.9, S. 3058–3060. DOI: 10.1128/jb.179.9.3058-3060.1997. URL: <https://doi.org/10.1128%2Fjb.179.9.3058-3060.1997>.
- Parish, T., M. Schaeffer, G. Roberts & K. Duncan (2005). „HemZ is essential for heme biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*“. In: *Tuberculosis* 85.3, S. 197–204. DOI: 10.1016/j.tube.2005.01.002. URL: <https://doi.org/10.1016%2Fj.tube.2005.01.002>.
- Park, H. Y. & C. O. Jeon (2013). „*Shewanella aestuarii* sp. nov., a marine bacterium isolated from a tidal flat“. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63.Pt12, S. 4683–4690. DOI: 10.1099/ijs.0.055178-0. URL: <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.055178-0>.
- Patridge, E. V. & J. G. Ferry (2006). „WrbA from *Escherichia coli* and *Archaeoglobus fulgidus* ss an NAD(P)H:quinone oxidoreductase“. In: *Journal of Bacteriology* 188.10, S. 3498–3506. DOI: 10.1128/jb.188.10.3498-3506.2006. URL: <https://doi.org/10.1128%2Fjb.188.10.3498-3506.2006>.
- Pavelka, A., E. Sebestova, B. Kozlikova, Brezovsky & J. Damborsky (2016). „CAVER: Algorithms for analyzing dynamics of tunnels in macromolecules“. In: *IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics* 13.3, S. 505–517. DOI: 10.1109/tcbb.2015.2459680. URL: <http://dx.doi.org/10.1109/TCBB.2015.2459680>.
- Pecsi, I., K. Hards, N. Ekanayaka, M. Berney, T. Hartman, W. R. Jacobs & G. M. Cook (2014). „Essentiality of succinate dehydrogenase in *Mycobacterium smegmatis* and its role in the generation of the membrane potential under hypoxia“. In: *mBio* 5.4, e01093–14. DOI: 10.1128/mbio.01093-14. URL: <https://doi.org/10.1128%2Fmbio.01093-14>.
- Pelchovich, G., S. Omer-Bendori & U. Gophna (2013). „Menaquinone and iron are essential for complex colony development in *Bacillus subtilis*“. In: *PLoS ONE* 8.11, e79488. DOI: 10.1371/journal.pone.0079488. URL: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0079488>.
- Puffal, J., J. A. Mayfield, D. B. Moody & Y. S. Morita (2018). „Demethylmenaquinone methyl

- transferase is a membrane domain-associated protein essential for menaquinone homeostasis in *Mycobacterium smegmatis*“. In: *Frontiers in Microbiology* 9.1, S. 3145. DOI: 10.3389/fmicb.2018.03145. URL: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03145>.
- Pukall, R., P. Schumann, C. Schütte, R. Gols & M. Dicke (2006). „*Acaricomes phytoseiuli* gen. nov., sp. nov., isolated from the predatory mite *Phytoseiulus persimilis*“. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56.2, S. 465–469. DOI: 10.1099/ijs.0.63930-0. URL: <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.63930-0>.
- Quan, J. & J. Tian (2011). „Circular polymerase extension cloning for high-throughput cloning of complex and combinatorial DNA libraries“. In: *Nature Protocols* 6.2, S. 242–251. DOI: 10.1038/nprot.2010.181. URL: <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.181>.
- Ramos, A. R. (2012). „The membrane QmoABC complex interacts directly with the dissimilatory adenosine 5'-phosphosulfate reductase in sulfate reducing bacteria“. In: *Frontiers in Microbiology* 3.1, S. 137. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00137. URL: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00137>.
- Rand, K., C. Noll, H. M. Schiebel, D. Kemken, T. Dülcks, M. Kalesse, D. W. Heinz & G. Layer (2010). „The oxygen-independent coproporphyrinogen III oxidase HemN utilizes harderoporphyrinogen as a reaction intermediate during conversion of coproporphyrinogen III to protoporphyrinogen IX“. In: *Biological Chemistry* 391.1, S. 55–63. DOI: 10.1515/bc.2010.006. URL: <https://doi.org/10.1515/bc.2010.006>.
- Ravcheev, D. A. & I. Thiele (2016). „Genomic analysis of the human gut microbiome suggests novel enzymes involved in quinone biosynthesis“. In: *Frontiers in Microbiology* 7.1, S. 128. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00128. URL: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00128>.
- Reisch, C. R. & K. L. Prather (2017). „Scarless Cas9 assisted recombineering (no-SCAR) in *Escherichia coli*, an Easy-to-Use system for genome editing“. In: *Current Protocols in Molecular Biology* 117.1, S. 31.8.1–31.8.20. DOI: 10.1002/cpmb.29. URL: <https://doi.org/10.1002/cpmb.29>.
- Ronquist, F., M. Teslenko, P. van der Mark, D. L. Ayres, A. Darling, S. Höhna, B. Larget, L. Liu, M. A. Suchard & J. P. Huelsenbeck (2012). „MrBayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space“. In: *Systematic Biology* 61.3, S. 539–542. DOI: 10.1093/sysbio/sys029. URL: <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>.
- Rudolf, J. D., T. A. Alsup, B. Xu & Z. Li (2021). „Bacterial terpenome“. In: *Natural Product Reports* 38.5, S. 905–980. DOI: 10.1039/d0np00066c. URL: <https://doi.org/10.1039/d0np00066c>.
- Sacchettini, J. C. & C. D. Poulter (1997). „Creating isoprenoid diversity“. In: *Science* 277.5333, S. 1788–1789. DOI: 10.1126/science.277.5333.1788. URL: <https://doi.org/10.1126/science.277.5333.1788>.
- Sakamoto, M., N. Ikeyama, T. Kunihiro, T. Iino, M. Yuki & M. Ohkuma (2018). „*Mesosutterella multiformis* gen. nov., sp. nov., a member of the family Sutterellaceae and *Sutterella megalosphaeroides* sp. nov., isolated from human faeces“. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 68.12, S. 3942–3950. DOI: 10.1099/ijsem.0.003096. URL: <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.003096>.
- Sakamoto, M., N. Ikeyama, M. Yuki, T. Murakami, H. Mori, T. Iino & M. Ohkuma (2021). „*Adlercreutzia hattorii* sp. nov., an equol non-producing bacterium isolated from human faeces“. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 71.12. DOI: 10.1099/ijsem.0.005121. URL: <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.005121>.
- Sambasivarao, D. & J. H. Weiner (1991). „Dimethyl sulfoxide reductase of *Escherichia coli*: an investigation of function and assembly by use of in vivo complementation“. In: *Journal of Bacteriology* 173.19, S. 5935–5943. DOI: 10.1128/jb.173.19.5935-5943.1991. URL: <https://doi.org/10.1128/jb.173.19.5935-5943.1991>.

- Schäfer, G., S. Anemüller & R. Moll (2002). „Archaeal complex II: ‘classical’ and ‘non-classical’ succinate:quinone reductases with unusual features“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1553.1–2, S. 57–73. DOI: 10.1016/S0005-2728(01)00232-8. URL: [http://dx.doi.org/10.1016/S0005-2728\(01\)00232-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0005-2728(01)00232-8).
- Schlippe, Y. V. G. & L. Hedstrom (2005). „A twisted base? The role of arginine in enzyme-catalyzed proton abstractions“. In: *Archives of Biochemistry and Biophysics* 433.1, S. 266–278. DOI: 10.1016/j.abb.2004.09.018. URL: <https://doi.org/10.1016%2Fj.abb.2004.09.018>.
- Schmid, R., F. Goebel, A. Warnecke & A. Labahn (1999). „Synthesis and redox potentials of methylated vitamin K derivatives“. In: *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2* 6.1, S. 1199–1202. DOI: 10.1039/a900190e. URL: <https://doi.org/10.1039%2Fa900190e>.
- Schnoes, A. M., S. D. Brown, I. Dodevski & P. C. Babbitt (2009). „Annotation error in public databases: Misannotation of molecular function in enzyme superfamilies“. In: *PLoS Computational Biology* 5.12, e1000605. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1000605. URL: <https://doi.org/10.1371%2Fjournal.pcbi.1000605>.
- Schoch, C. L., S. Ciufu, M. Domrachev, C. L. Hutton, S. Kannan, R. Khovanskaya, D. Leipe, R. Mcveigh, K. O’Neill, B. Robbertse, Sharma, J. P. Sullivan, L. Sun & Turner (2020). „NCBI Taxonomy: A comprehensive update on curation, resources and tools“. In: *Database* 1.2020, baaa062. DOI: 10.1093/database/baaa062. URL: <http://dx.doi.org/10.1093/database/baaa062>.
- Schoepp-Cothenet, B., C. Lieutaud, F. Baymann, A. Verméglio, T. Friedrich, D. M. Kramer & W. Nitschke (2009). „Menaquinone as pool quinone in a purple bacterium“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106.21, S. 8549–8554. DOI: 10.1073/pnas.0813173106. URL: <https://doi.org/10.1073%2Fpnas.0813173106>.
- Schoepp-Cothenet, B., R. van Lis, A. Atteia, F. Baymann, L. Capowiez, A.-L. Ducluzeau, S. Duval, F. ten Brink, M. J. Russell & W. Nitschke (2013). „On the universal core of bioenergetics“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1827.2, S. 79–93. DOI: 10.1016/j.bbabi.2012.09.005. URL: <https://doi.org/10.1016%2Fj.bbabi.2012.09.005>.
- Schreiner, M. E., C. Riedel, J. Holátko, M. Pátek & B. J. Eikmanns (2006). „Pyruvate:Quinone oxidoreductase in *Corynebacterium glutamicum*: Molecular analysis of the *pqo* Gene, significance of the enzyme, and phylogenetic aspects“. In: *Journal of Bacteriology* 188.4, S. 1341–1350. DOI: 10.1128/jb.188.4.1341-1350.2006. URL: <https://doi.org/10.1128%2Fjb.188.4.1341-1350.2006>.
- Seki, T., A. Matsumoto, R. Shimada, Y. Inahashi, S. Omura & Y. Takahashi (2012). „*Conexibacter arvalis* sp. nov., isolated from a cultivated field soil sample“. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 62.Pt_10, S. 2400–2404. DOI: 10.1099/ijs.0.036095-0. URL: <https://doi.org/10.1099%2Fijs.0.036095-0>.
- Shankar Babu, M., S. Mahanta, A. J. Lakhter, T. Hato, S. Paul & S. R. Naidu (2018). „Lapachol inhibits glycolysis in cancer cells by targeting pyruvate kinase M2“. In: *PLOS ONE* 13.2, e0191419. DOI: 10.1371/journal.pone.0191419. URL: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0191419>.
- Shelton, C. L. & A. L. Lamb (2018). „Unraveling the structure and mechanism of the MST(ery) enzymes“. In: *Trends in Biochemical Sciences* 43.5, S. 342–357. DOI: 10.1016/j.tibs.2018.02.011. URL: <https://doi.org/10.1016%2Fj.tibs.2018.02.011>.
- Shimada, H., Y. Shida, N. Nemoto & Oshima (2001). „Quinone profiles of *Thermoplasma acidophilum* HO-62“. In: *Journal of Bacteriology* 183.4, S. 1462–1465. DOI: 10.1128/jb.183.4.1462-1465.2001. URL: <http://dx.doi.org/10.1128/JB.183.4.1462-1465.2001>.
- Sievers, F. & D. G. Higgins (2017). „Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences“. In: *Protein Science* 27.1, S. 135–145. DOI: 10.1002/pro.3290. URL: <https://doi.org/10.1002%2Fpro.3290>.

- Sikorski, J., L. Alla, C. Alex, G. D. R. Tijana, N. Matt, L. Susan, C. Feng, T. Hope, C. Jan-Fang, S. Elizabeth, B. David, G. Lynne, P. Sam, O. Galina, P. Amrita, I. Natalia, M. Konstantinos, C. Amy, P. Krishna, C. Patrick, L. Miriam, H. Loren, C. Yun-Juan, D. J. Cynthia, B. Thomas, C. D. John, H. Cliff, R. Manfred, L. Elke, S. Stefan, G. Markus, B. Jim, A. E. Jonathan, M. Victor, H. Philip, C. K. Nikos & K. Hans-Peter (2010). „Complete genome sequence of *Sulfurospirillum deleyianum* type strain (5175)“. In: *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 2.2, S. 149–157. DOI: 10.4056/sigs.671209. URL: <https://doi.org/10.4056/sigs.671209>.
- Simon, J. (2002). „Enzymology and bioenergetics of respiratory nitrite ammonification“. In: *FEMS Microbiology Reviews* 26.3, S. 285–309. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2002.tb00616.x. URL: <https://doi.org/10.1111%2Fj.1574-6976.2002.tb00616.x>.
- Simon, J., O. Einsle, P. M. Kroneck & W. G. Zumft (2004). „The unprecedented *nos* gene cluster *Wolinella succinogenes* encodes a novel respiratory electron transfer pathway to cytochrome *c* nitrous oxide reductase“. In: *FEBS Letters* 569.1-3, S. 7–12. DOI: 10.1016/j.febslet.2004.05.060. URL: <https://doi.org/10.1016%2Fj.febslet.2004.05.060>.
- Simon, J., R. Gross, O. Einsle, P. M. H. Kronneck, A. Kröger & O. Klimmek (2002). „A NapC/NirT-type cytochrome *c* (NrfH) is the mediator between the quinone pool and the cytochrome *c* nitrite reductase of *Wolinella succinogenes*“. In: *Molecular Microbiology* 35.3, S. 686–696. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2000.01742.x. URL: <https://doi.org/10.1046%2Fj.1365-2958.2000.01742.x>.
- Sofia, H. J. (2001). „Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: functional characterization using new analysis and information visualization methods“. In: *Nucleic Acids Research* 29.5, S. 1097–1106. DOI: 10.1093/nar/29.5.1097. URL: <https://doi.org/10.1093%2Fnar%2F29.5.1097>.
- Stel, A.-X. van der & M. M. S. M. Wösten (2019). „Regulation of respiratory pathways in Campylobacterota: A review“. In: *Frontiers in Microbiology* 30.10, S. 1719. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01719. URL: <https://doi.org/10.3389%2Fmicb.2019.01719>.
- Stoffels, L., M. Krehenbrink, B. C. Berks & G. Uden (2012). „Thiosulfate reduction in *Salmonella enterica* is driven by the proton motive force“. In: *Journal of Bacteriology* 194.2, S. 475–485. DOI: 10.1128/jb.06014-11. URL: <https://doi.org/10.1128%2Fjb.06014-11>.
- Stoll, D. A., N. Danylec, S. T. Soukup, B. Hetzer, S. E. Kulling & M. Huch (2021). „*Adlercreutzia rubneri* sp. nov., a resveratrol-metabolizing bacterium isolated from human faeces and emended description of the genus *Adlercreutzia*“. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 71.9. DOI: 10.1099/ijsem.0.004987. URL: <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.004987>.
- Tao, M., L. Wang, E. Wendt-Pienkowski, N. P. George, U. Galm, G. Zhang, J. M. Coughlin & B. Shen (2007). „The tallysomyin biosynthetic gene cluster from *Streptoalloteichus hindustanus* E465-94 ATCC 31158 unveiling new insights into the biosynthesis of the bleomycin family of antitumor antibiotics“. In: *Mol. BioSyst.* 3.1, S. 60–74. DOI: 10.1039/b615284h. URL: <https://doi.org/10.1039%2Fb615284h>.
- Thompson, T. B., J. B. Garrett, E. A. Taylor, R. Meganathan, J. A. Gerlt & I. Rayment (2000). „Evolution of enzymatic activity in the enolase superfamily: Structure of *o*-Succinylbenzoate Synthase from *Escherichia coli* in complex with Mg²⁺ and *o*-Succinylbenzoate“. In: *Biochemistry* 39.35, S. 10662–10676. DOI: 10.1021/bi000855o. URL: <https://doi.org/10.1021%2Fbi000855o>.
- Thurl, S., I. Buhrow & W. Schäfer (1985). „New types of menaquinones from the thermophilic archaeobacterium *Thermoproteus tenax*“. In: *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* 366.2, S. 1079–1084. DOI: 10.1515/bchm3.1985.366.2.1079. URL: <http://dx.doi.org/10.1515/bchm3.1985.366.2.1079>.
- Tiago, I., P. V. Morais, M. S. da Costa & A. Veríssimo (2006). „*Microcella alkaliphila* sp. nov., a novel member of the family *Microbacteriaceae*

- isolated from a non-saline alkaline groundwater, and emended description of the genus *Microcella*“. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56.10, S. 2313–2316. DOI: 10.1099/ijs.0.64320-0. URL: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64320-0>.
- Timkina, E., I. J. Kolouchová, L. Kyselová, A. Palyzová, D. J. Murphy & T. Řezanka (2023). „Off-line two-dimensional LC–tandem MS of menaquinones from thermophilic bacteria“. In: *Food Chemistry* 431, S. 137112. DOI: 10.1016/j.foodchem.2023.137112. URL: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137112>.
- Tocchetti, A., S. Maffioli, M. Iorio, S. Alt, E. Mazzei, C. Brunati, M. Sosio & S. Donadio (2013). „Capturing linear intermediates and C-terminal variants during maturation of the thiopeptide GE2270“. In: *Chemistry and Biology* 20.8, S. 1067–1077. DOI: 10.1016/j.chembiol.2013.07.005. URL: <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.07.005>.
- Toffin, L., A. Bidault, P. Pignet, B. J. Tindall, A. Slobodkin, C. Kato & D. Prieur (2004). „*Shewanella profunda* sp. nov., isolated from deep marine sediment of the Nankai Trough“. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54.6, S. 1943–1949. DOI: 10.1099/ijs.0.03007-0. URL: <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.03007-0>.
- Toh, S.-M., L. Xiong, T. Bae & A. S. Mankin (2007). „The methyltransferase YfgB/RlmN is responsible for modification of adenosine 2503 in 23S rRNA“. In: *RNA* 14.1, S. 98–106. DOI: 10.1261/rna.814408. URL: <https://doi.org/10.1261/rna.814408>.
- Uden, G. & J. Bongaerts (1997). „Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1320.3, S. 217–234. DOI: 10.1016/s0005-2728(97)00034-0. URL: [https://doi.org/10.1016/s0005-2728\(97\)00034-0](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(97)00034-0).
- Upadhyay, A., F. L. Fontes, M. Gonzalez-Juarrero, M. R. McNeil, D. C. Crans, M. Jackson & D. C. Crick (2015). „Partial saturation of menaquinone in *Mycobacterium tuberculosis*: Function and essentiality of a novel reductase, MenJ“. In: *ACS Central Science* 1.6, S. 292–302. DOI: 10.1021/acscentsci.5b00212. URL: <https://doi.org/10.1021/acscentsci.5b00212>.
- Upadhyay, A., S. Kumar, S. A. Rooker, J. T. Koehn, D. C. Crans, M. R. McNeil, J. S. Lott & D. C. Crick (2018). „Mycobacterial MenJ: An oxidoreductase involved in menaquinone biosynthesis“. In: *ACS Chemical Biology* 13.9, S. 2498–2507. DOI: 10.1021/acscchembio.8b00402. URL: <https://doi.org/10.1021/acscchembio.8b00402>.
- Vandamme, P., L. Debruyne, E. De Brandt & E. Falsen (2010). „Reclassification of *Bacteroides ureolyticus* as *Campylobacter ureolyticus* comb. nov., and emended description of the genus *Campylobacter*“. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60.9, S. 2016–2022. DOI: 10.1099/ijs.0.017152-0. URL: <http://dx.doi.org/10.1099/ijs.0.017152-0>.
- Vázquez-Laslop, N., H. Ramu, D. Klepacki, K. Kannan & A. S. Mankin (2010). „The key function of a conserved and modified rRNA residue in the ribosomal response to the nascent peptide“. In: *The EMBO Journal* 29.18, S. 3108–3117. DOI: 10.1038/emboj.2010.180. URL: <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.180>.
- Venceslau, S. S., R. R. Lino & I. A. Pereira (2010). „The Qrc membrane complex, related to the alternative complex III, is a menaquinone reductase involved in sulfate respiration“. In: *Journal of Biological Chemistry* 285.30, S. 22774–22783. DOI: 10.1074/jbc.m110.124305. URL: <https://doi.org/10.1074/jbc.m110.124305>.
- Venkateswaran, K., D. P. Moser, M. E. Dollhopf, D. P. Lies, D. A. Saffarini, B. J. MacGregor, D. B. Ringelberg, D. C. White, M. Nishijima, H. Sano, J. Burghardt, E. Stackebrandt & K. H. Nealson (1999). „Polyphasic taxonomy of the genus *Shewanella* and description of *Shewanella oneidensis* sp. nov.“ In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 49.2, S. 705–724. DOI: 10.1099/00207713-49-2-705. URL: <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-49-2-705>.

- Vieira, S., K. J. Huber, A. Geppert, J. Wolf, M. Neumann-Schaal, M. Müsken & J. Overmann (2023). „*Baekduia alba* sp. nov., a novel representative of the order Solirubrobacterales isolated from temperate grassland soil“. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 73.5, S. 10. DOI: 10.1099/ijsem.0.005918. URL: <https://doi.org/10.1099/2Fijsem.0.005918>.
- Villa, J. K. D., M. A. N. Diaz, V. R. Pizziolo & H. S. D. Martino (2016). „Effect of vitamin K in bone metabolism and vascular calcification: A review of mechanisms of action and evidences“. In: *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 57.18, S. 3959–3970. DOI: 10.1080/10408398.2016.1211616. URL: <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2016.1211616>.
- Vink, B. (1996). „Stability relations of antimony and arsenic compounds in the light of revised and extended Eh-pH diagrams“. In: *Chemical Geology* 130.1-2, S. 21–30. DOI: 10.1016/0009-2541(95)00183-2. URL: <https://doi.org/10.1016%2F0009-2541%2895%2900183-2>.
- Walsby, C. J., D. Ortillo, W. E. Broderick, J. B. Broderick & B. M. Hoffman (2002). „An anchoring role for FeS clusters: Chelation of the amino acid moiety of *S*-adenosylmethionine to the unique iron site of the [4Fe-4S] cluster of pyruvate formate-lyase activating enzyme“. In: *Journal of the American Chemical Society* 124.38, S. 11270–11271. DOI: 10.1021/ja027078v. URL: <https://doi.org/10.1021%2Fja027078v>.
- Wang, J., R. P. Woldring, G. D. Román-Meléndez, A. M. McClain, B. R. Alzua & E. N. G. Marsh (2014). „Recent advances in radical SAM enzymology: New structures and mechanisms“. In: *ACS Chemical Biology* 9.9, S. 1929–1938. DOI: 10.1021/cb5004674. URL: <https://doi.org/10.1021%2Fcb5004674>.
- Wang, Y., H. Chen, Z. Liu, H. Ming, C. Zhou, X. Zhu, P. Zhang, C. Jing & H. Feng (2016). „*Shewanella gelidii* sp. nov., isolated from the red algae *Gelidium amansii*, and emended description of *Shewanella waksmanii*“. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66.8, S. 2899–2905. DOI: 10.1099/ijsem.0.001075. URL: <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.001075>.
- Watanabe, H., T. Tokiwano & H. Oikawa (2006a). „Biosynthetic Study of FR-900848: Origin of the Aminodeoxynucleoside Part“. In: *The Journal of Antibiotics* 59.9, S. 607–610. DOI: 10.1038/ja.2006.82. URL: <https://doi.org/10.1038%2Fja.2006.82>.
- (2006b). „Biosynthetic study of FR-900848: unusual observation on polyketide biosynthesis that did not accept acetate as origin of acetyl-CoA“. In: *Tetrahedron Letters* 47.9, S. 1399–1402. DOI: 10.1016/j.tetlet.2005.12.091. URL: <https://doi.org/10.1016%2Fj.tetlet.2005.12.091>.
- Waterhouse, A., M. Bertoni, S. Bienert, G. Studer, G. Tauriello, R. Gumienny, F. T. Heer, T. A. P. de Beer, C. Rempfer, L. Bordoli, R. Lepore & T. Schwede (2018). „SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes“. In: *Nucleic Acids Research* 46.W1, W296–W303. DOI: 10.1093/nar/gky427. URL: <https://doi.org/10.1093%2Fnar%2Fgky427>.
- Weerakoon, D. R. & J. W. Olson (2008). „The *Campylobacter jejuni* NADH:Ubiquinone oxidoreductase (complex I) utilizes flavodoxin rather than NADH“. In: *Journal of Bacteriology* 190.3, S. 915–925. DOI: 10.1128/jb.01647-07. URL: <https://doi.org/10.1128%2Fjb.01647-07>.
- Weingarten, R. A., M. E. Taveirne & J. W. Olson (2009). „The dual-functioning fumarate reductase is the sole succinate:Quinone reductase in *Campylobacter jejuni* and is required for full host colonization“. In: *Journal of Bacteriology* 191.16, S. 5293–5300. DOI: 10.1128/jb.00166-09. URL: <https://doi.org/10.1128%2Fjb.00166-09>.
- Wells, M., J. McGarry, M. M. Gaye, P. Basu, R. S. Oremland & J. F. Stolz (2019). „Respiratory selenite reductase from *Bacillus selenitireducens* strain MLS10“. In: *Journal of Bacteriology* 201.7, e00614–18. DOI: 10.1128/jb.00614-18. URL: <https://doi.org/10.1128%2Fjb.00614-18>.
- Welte, C. U., R. de Graaf, P. D. Martins, R. S. Jansen, M. S. M. Jetten & J. M. Kurth (2021). „A novel methoxydotrophic metabolism discovered

- in the hyperthermophilic archaeon *Archaeoglobus fulgidus*“. In: *Environmental Microbiology* 23.7, S. 4017–4033. DOI: 10.1111/1462-2920.15546. URL: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15546>.
- Wiig, J. A., Y. Hu, C. C. Lee & M. W. Ribbe (2012). „Radical SAM-dependent carbon insertion into the nitrogenase M-cluster“. In: *Science* 337.6102, S. 1672–1675. DOI: 10.1126/science.1224603. URL: <https://doi.org/10.1126/science.1224603>.
- Wilkens, D., R. Meusinger, S. Hein & J. Simon (2020). „Sequence analysis and specificity of distinct types of menaquinone methyltransferases indicate the widespread potential of methylmenaquinone production in bacteria and archaea“. In: *Environmental Microbiology* 23.3, S. 1407–1421. DOI: 10.1111/1462-2920.15344. URL: <http://dx.doi.org/10.1111/1462-2920.15344>.
- Wood, P. M. (1981). „The redox potential for dimethyl sulphoxide reduction to dimethyl sulphide“. In: *FEBS Letters* 124.1, S. 11–14. DOI: 10.1016/0014-5793(81)80042-7. URL: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(81\)80042-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(81)80042-7).
- Wu, S., X.-H. Jian, H. Yuan, W.-B. Jin, Y. Yin, L.-Y. Wang, J. Zhao & G.-L. Tang (2017). „Unified biosynthetic origin of the benzodipyrrole subunits in CC-1065“. In: *ACS Chemical Biology* 12.6, S. 1603–1610. DOI: 10.1021/acscchembio.7b00302. URL: <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00302>.
- Xiong, J., D. Chan, X. Guo, F. Chang, M. Chen, Q. Wang, X. Song & C. Wu (2020). „Hydrogen production driven by formate oxidation in *Shewanella oneidensis* MR-1“. In: *Applied Microbiology and Biotechnology* 104.12, S. 5579–5591. DOI: 10.1007/s00253-020-10608-w. URL: <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10608-w>.
- Yamamoto, Y., C. Poyart, P. Trieu-Cuot, G. Lamberet, A. Gruss & P. Gaudu (2005). „Respiration metabolism of Group B *Streptococcus* is activated by environmental haem and quinone and contributes to virulence“. In: *Molecular Microbiology* 56.2, S. 525–534. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2005.04555.x. URL: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04555.x>.
- Yiyuan, Z. (2019). „Part:BBa K3100022 -T7 promoter variants family member“. In: *International Genetically Engineered Machine*. URL: http://parts.igem.org/Part:BBa_K3100022.
- Yu, J., L. Hederstedt & P. J. Piggot (1995). „The cytochrome bc complex (menaquinone:cytochrome c reductase) in *Bacillus subtilis* has a nontraditional subunit organization“. In: *Journal of Bacteriology* 177.23, S. 6751–6760. DOI: 10.1128/jb.177.23.6751-6760.1995. URL: <https://doi.org/10.1128/jb.177.23.6751-6760.1995>.
- Yu, J. & N. E. L. Brun (1998). „Studies of the cytochrome subunits of menaquinone:cytochrome c reductase (bc complex) of *Bacillus subtilis*“. In: *Journal of Biological Chemistry* 273.15, S. 8860–8866. DOI: 10.1074/jbc.273.15.8860. URL: <https://doi.org/10.1074/jbc.273.15.8860>.
- Yu, Y., L. Duan, Q. Zhang, R. Liao, Y. Ding, H. Pan, E. Wendt-Pienkowski, G. Tang, B. Shen & W. Liu (2009). „Nosiheptide biosynthesis featuring a unique indole side ring formation on the characteristic thiopeptide framework“. In: *ACS Chemical Biology* 4.10, S. 855–864. DOI: 10.1021/cb900133x. URL: <https://doi.org/10.1021/cb900133x>.
- Yun, B.-R., S. Park, M.-K. Kim, J. Park & S. B. Kim (2018). „*Shewanella saliphila* sp. nov., *Shewanella ulleungensis* sp. nov. and *Shewanella litoralis* sp. nov., isolated from coastal seawater“. In: *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 68.9, S. 2960–2966. DOI: 10.1099/ijsem.0.002929. URL: <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.002929>.
- Zhang, G., W. Wang, A. Deng, Z. Sun, Y. Zhang, Y. Liang, Y. Che & T. Wen (2012). „A mimicking-of-DNA-methylation-patterns pipeline for overcoming the restriction barrier of bacteria“. In: *PLoS Genetics* 8.9, e1002987. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002987. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002987>.

- Zhang, Q., W. A. van der Donk & W. Liu (2011). „Radical-mediated enzymatic methylation: A tale of two SAMS“. In: *Accounts of Chemical Research* 45.4, S. 555–564. DOI: 10.1021/ar200202c. URL: <https://doi.org/10.1021%2Far200202c>.
- Zhang, X., K. W. Bayles & S. Luca (2017a). „*Staphylococcus aureus* CidC is a pyruvate:menaquinone oxidoreductase“. In: *Biochemistry* 56.36, S. 4819–4829. DOI: 10.1021/acs.biochem.7b00570. URL: <https://doi.org/10.1021%2Facs.biochem.7b00570>.
- Zhang, Z., A. A. Schäffer, W. Miller, T. L. Madden, D. J. Lipman, E. V. Koonin & S. F. Altschul (1998). „Protein sequence similarity searches using patterns as seeds“. In: *Nucleic Acids Research* 26.17, S. 3986–3990. DOI: 10.1093/nar/26.17.3986. URL: <https://doi.org/10.1093%2Fnar%2F26.17.3986>.
- Zhang, Z., N. Mahanta, G. A. Hudson, D. A. Mitchell & W. A. van der Donk (2017b). „Mechanism of a class C radical *S*-adenosyl-methionine thiazole methyl transferase“. In: *Journal of the American Chemical Society* 139.51, S. 18623–18631. DOI: 10.1021/jacs.7b10203. URL: <https://doi.org/10.1021%2Fjacs.7b10203>.
- Zhao, L., W.-c. Chang, Y. Xiao, H.-w. Liu & P. Liu (2013). „Methylerythritol phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis“. In: *Annual Review of Biochemistry* 82.1, S. 497–530. DOI: 10.1146/annurev-biochem-052010-100934. URL: <https://doi.org/10.1146%2Fannurev-biochem-052010-100934>.
- Zhi, X.-Y., J.-C. Yao, S.-K. Tang, Y. Huang, H.-W. Li & W.-J. Li (2014). „The fitalosine pathway played an important role in menaquinone biosynthesis during early prokaryote evolution“. In: *Genome Biology and Evolution* 6.1, S. 149–160. DOI: 10.1093/gbe/evu007. URL: <https://doi.org/10.1093%2Fgbe%2Fevu007>.

Anhang

Tabelle S.1: Zusammenstellung von Organismen, die MMK enthalten, sowie des MK-Biosynthesewegs und der Kandidaten für MenK/MqnK/MenK2. Die fettgedruckten Hinterlegungsnummern beziehen sich auf experimentell bestätigte MenK-Proteine. Beachten Sie, dass die tiefgestellte Zahl einer Chinonspezies (z. B. MK₆ oder MMK₆) die Anzahl der Prenyleinheiten in der Isoprenoid-Seitenkette angibt, während sich die vorangestellte Zahl auf die Position einer Methylgruppe bezieht (8-MMK bedeutet, dass sich die Methylgruppe am C-8-Atom von MMK befindet). Diese Tabelle ist eine aktualisierte Version von Tabelle 1 aus Hein *et al.*, 2017.

Zusammenstellung von Organismen, die MMK enthalten, sowie des MK-Biosynthesewegs und der Kandidaten für MenK/MqnK/MenK2. Die fettgedruckten Hinterlegungsnummern beziehen sich auf experimentell bestätigte MenK-Proteine. Beachten Sie, dass die tiefgestellte Zahl einer Chinonspezies (z. B. MK₆ oder MMK₆) die Anzahl der Prenyleinheiten in der Isoprenoid-Seitenkette angibt, während sich die vorangestellte Zahl auf die Position einer Methylgruppe bezieht (8-MMK bedeutet, dass sich die Methylgruppe am C-8-Atom von MMK befindet). Diese Tabelle ist eine aktualisierte Version von Tabelle 1 aus \cite{Hein_2017}.

| Organismen | Hauptnaphthochinone | MK-Bio-syntheseweg | Kandidat MqnK/MenK | Kandidat MenK2 | Referenz (MMK Identifikation) |
|--|---|--------------------|--------------------|----------------|---|
| Bakterien | | | | | |
| Actinomycetota (Phylum) | | | | | |
| Actinomycetes | | | | | |
| Micrococcales | | | | | |
| Micrococaceae | | | | | |
| <i>Acaritomes phytoseiuili</i> DSM 14247 | MK ₁₀ (H ₂), MMK ₁₀ (H ₂) | Men | Unbek. | | Puskall <i>et al.</i> , 2006 |
| Coriobacteriia | | | | | |
| Coriobacteriales | | | | | |
| Coriobacteriaceae | | | | | |
| <i>Collinsella tanakaei</i> DSM 22478 | Unbek. | Men | WP_009142032.1 | WP_009141643.1 | Nagai <i>et al.</i> , 2010; Wilkens <i>et al.</i> , 2021 |
| <i>Parvibacter caecicola</i> DSM 22242 | MMK ₆ , DMMK ₆ | Men | WP_123185446.1 | WP_123184544.1 | Clavel <i>et al.</i> , 2013 |
| Eggerthellales | | | | | |
| Eggerthellaceae | | | | | |
| <i>Adlercreutzia equolifaciens</i> subsp. <i>equolifaciens</i> DSM 19450 | MK ₅ , MMK ₅ , DMMK ₅ , MMK ₆ , DMMK ₆ | Men | WP_022738066.1 | WP_022739874.1 | Maruo <i>et al.</i> , 2008; Hein <i>et al.</i> , 2018; Stoll <i>et al.</i> , 2021 |
| <i>Adlercreutzia caecimuris</i> DSM 21839 | MMK ₆ , DMMK ₆ | Men | WP_016310135.1 | WP_016308740.1 | Clavel <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>Adlercreutzia hattorii</i> DSM 112284 | MMK ₆ , DMMK ₆ | Men | WP_173111267.1 | WP_173113064.1 | Sakamoto <i>et al.</i> , 2021 |
| <i>Adlercreutzia mucosicola</i> DSM 19490 | MMK ₆ | Men | WP_160344756.1 | WP_160344239.1 | Clavel <i>et al.</i> , 2009; Stoll <i>et al.</i> , 2021 |
| <i>Adlercreutzia muris</i> DSM 29508 | MMK ₅ , MMK ₆ , DMMK ₆ | Men | WP_151432019.1 | WP_151431272.1 | Stoll <i>et al.</i> , 2021 |

| | | | | | |
|--|--|---------------------|----------------|----------------|--|
| <i>Adlercreutzia rubneri</i> ResAG-91 | MMK ₅ , MK ₅ , DMMK ₅ , MK ₆ , MMK ₆ , DMMK ₆ | Unbek. ^a | - | - | Stoll <i>et al.</i> , 2021 |
| <i>Eggerthella lenta</i> DSM 2243 | MK ₆ , MMK ₆ | Men | WP_015759778.1 | WP_015760735.1 | Collins <i>et al.</i> , 1985; Fernandez and Collins, 1987; Maruo <i>et al.</i> , 2008 Maruo <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>Eggerthella sinensis</i> DSM 16107 | MK ₆ , MMK ₆ , DMMK ₆ | Men | WP_114545139.1 | WP_114546902.1 | Jin <i>et al.</i> , 2014 |
| <i>Gordonibacter pamelaiae</i> DSM 19378 | MK ₆ , MMK ₆ , DMMK ₆ | Men | WP_041239161.1 | Unbek. | Jin <i>et al.</i> , 2014 |
| <i>Gordonibacter urolithinfaciens</i> DSM 27213 | MK ₆ , MMK ₆ , DMMK ₆ | Men | WP_096227506.1 | Unbek. | Maruo <i>et al.</i> , 2008 |
| <i>Paraeggerthella hongkongensis</i> DSM 16106 | MK ₆ , MMK ₆ , DMMK ₆ | Men | WP_123191600.1 | Unbek. | Maruo <i>et al.</i> , 2008 |
| Pseudomonadota (Phylum) | | | | | |
| Betaproteobacteria | | | | | |
| Burkholderiales | | | | | |
| Sutterellaceae | | | | | |
| <i>Sutterella faecalis</i> KC/TC 15823 | MMK ₅ | Men | WP_139688272.1 | | Oh <i>et al.</i> , 2020 |
| <i>Mesosutterella multififormis</i> DSM 106860 | MK ₆ , MMK ₆ | Men | WP_116269714.1 | | Sakamoto <i>et al.</i> , 2018 |
| <i>Parasutterella excrementihominis</i> YIT 11859 | MK ₆ , MMK ₆ | Unbek. | WP_008810232.1 | | Nagai <i>et al.</i> , 2009 |
| <i>Parasutterella secunda</i> YIT 12071 | MK ₅ , MMK ₅ | Unbek. | WP_022473471.1 | | Morotomi <i>et al.</i> , 2011 |
| <i>Sutterella megalosphaeroides</i> DSM 106861 | MK ₅ , MMK ₅ | Men | WP_120175912.1 | | Sakamoto <i>et al.</i> , 2018 |
| <i>Sutterella parvirubra</i> YIT 11816 | MMK ₅ | Men | WP_008543498.1 | | Morotomi <i>et al.</i> , 2011 |
| <i>Sutterella stercoricanis</i> DSM 17807 | MK ₅ , MMK ₅ | Unbek. ^a | - | | Morotomi <i>et al.</i> , 2011 |
| <i>Sutterella wadsworthensis</i> DSM 14016 | MK ₅ , MMK ₅ | Men | WP_016475266.1 | | Morotomi <i>et al.</i> , 2011 |
| Thermodesulfobacteriota (Phylum) | | | | | |
| Syntrophia | | | | | |
| Syntrophales | | | | | |

| | | | | | | | | | |
|--|--|--|--|--|--|--|--|----------------|-----------------------------|
| <i>Syntrophaceae</i> | | | | | | | | | |
| <i>Syntrophus aciditrophicus</i> SB | | | | | | | | | Agne et al., 2021 |
| Campylobacterota (Phylum) | | | | | | | | | |
| Epsilonproteobacteria | | | | | | | | | |
| Campylobacterales | | | | | | | | | |
| Campylobacteraceae | | | | | | | | | |
| <i>Campylobacter coli</i> LMG 23344 | | | | | | | | WP_002778274.1 | Moss et al., 1990 |
| <i>Campylobacter concisus</i> UNSWCD | | | | | | | | WP_004318049.1 | Moss et al., 1990 |
| <i>Campylobacter curvus</i> DSM 6644 | | | | | | | | WP_018137390.1 | Fernandez and Collins, 1987 |
| <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i> 82-40 | | | | | | | | WP_010401553.1 | Carlone and Anet, 1983 |
| <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>venerealis</i> NCTC 10354 | | | | | | | | WP_010401553.1 | Moss et al., 1984 |
| <i>Campylobacter gracilis</i> ATCC 33236 | | | | | | | | WP_005869780.1 | Fernandez and Collins, 1987 |
| <i>Campylobacter hyointestinalis</i> subsp. <i>hyointestinalis</i> DSM 19053 | | | | | | | | WP_034961808.1 | Moss et al., 1990 |
| <i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i> NCTC 11168 | | | | | | | | WP_010891852.1 | Carlone and Anet, 1983 |
| <i>Campylobacter lari</i> NCTC 11845 | | | | | | | | WP_039627277.1 | Moss et al., 1990 |
| <i>Campylobacter mucosalis</i> DSM 21682 | | | | | | | | WP_034968875.1 | Moss et al., 1990 |
| <i>Campylobacter rectus</i> RM3267 | | | | | | | | WP_002944906.1 | Fernandez and Collins, 1987 |
| <i>Campylobacter sputorum</i> biovar <i>fecalis</i> NCTC 11416 | | | | | | | | | Moss et al., 1984 |
| <i>Campylobacter sputorum</i> INTA 08/209 | | | | | | | | WP_197050042.1 | Moss et al., 1984 |
| <i>Campylobacter upsaliensis</i> NCTC 11541 | | | | | | | | WP_027303731.1 | Moss et al., 1990 |
| <i>Campylobacter ureolyticus</i> ACS-301-V-Sch3b | | | | | | | | WP_016646478.1 | Vandamme et al., 2010 |
| <i>Sulfurospirillum arcachonense</i> DSM 9755 | | | | | | | | WP_08460737.1 | Finster et al., 1997 |

| | | | | |
|---|---|--------|-----------------------------|---|
| <i>Sulfurospirillum deleyianum</i> DSM 6946 | MK ₆ , MMK ₆ , MK ₅ | Mqn | WP_012856078.1 ^b | Sikorski et al., 2010; Collins and Weddel, 1986 |
| <i>Helicobacteraceae</i> | | | | |
| <i>Wolinella succinogenes</i> DSM 1740 | MK ₆ , 8-MMK ₆ | Mqn | CAE09279.1 | Collins and Fernandez, 1984; Hein et al., 2017 |
| Nautilales | | | | |
| Nautiliaceae | | | | |
| <i>Caminibacter pacificus</i> DSM 27783 | MK ₇ , MMK ₇ | Mqn | Unbek. | Grosche et al., 2015 |
| Gammaproteobacteria | | | | |
| Alteromonadales | | | | |
| <i>Ferrimonadaceae</i> | | | | |
| <i>Ferrimonas marina</i> DSM 16917 | MK ₇ | Men | WP_067659647.1 | Katsuta et al., 2005; Wilkens et al., 2021 |
| <i>Shewanellaceae</i> | | | | |
| <i>Shewanella aestuarii</i> JCM 17801 | MK ₇ , MMK ₇ | Men | WP_188843379.1 | Park et al., 2013 |
| <i>Shewanella algae</i> JCM 21037 | MK ₇ , MMK ₇ | Men | WP_025010617.1 | Bozal et al., 2002 |
| <i>Shewanella baltica</i> OS 185 | MK ₇ , MMK ₇ | Men | WP_012090507.1 | Bozal et al., 2002 |
| <i>Shewanella colwelliana</i> ATCC 39565 | MK ₇ , MMK ₇ | Men | WP_028763395.1 | Frolova et al., 2005 |
| <i>Shewanella fidelis</i> ATCC BAA-318 | MK ₇ , MMK ₇ | Men | WP_028766718.1 | Frolova et al., 2005 |
| <i>Shewanella frigidimarina</i> KCTC23109 | MK ₇ , MMK ₇ | Men | RPA58160.1 | Hwang et al., 2019 |
| <i>Shewanella frigidimarina</i> NCIMB 400 | MK ₇ , MMK ₇ | Men | WP_011635568.1 | Frolova et al., 2005 |
| <i>Shewanella gelidii</i> JCM 30804 | MK ₇ , MMK ₇ | Unbek. | WP_188922237.1 | Wang et al., 2016 |
| <i>Shewanella litoralis</i> JCM 32306 | MK ₇ , MK ₈ , MMK ₇ | Men | WP_160055451.1 | Yun et al., 2018 |
| <i>Shewanella maritima</i> JCM 33294 | MK ₇ , MMK ₇ | Men | WP_130599568.1 | Bae et al., 2020 |
| <i>Shewanella japonica</i> KCTC 12235 | MK ₇ , MMK ₇ | Men | WP_119969472.1 | Frolova et al., 2005 |
| <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1 | MK ₇ , MMK ₇ | Men | WP_011074137.1 | Venkateswaran et al., 1999; Hein et al., 2017 |
| <i>Shewanella profunda</i> DSM 15900 | MK ₇ , MMK ₇ , MK ₈ , MMK ₈ | Unbek. | WP_248993664.1 | Toffin et al., 2004 |

| | | | | |
|---|--|-----|-----------------------------|--|
| <i>Shewanella psychromarinicola</i> JCM 32090 | MK ₇ , MMK ₇ | Men | WP_124012976.1 | Hwang <i>et al.</i> , 2019 |
| <i>Shewanella putrefaciens</i> DSM 6067 | MK ₇ , 8-MMK ₇ | Men | WP_025008660.1 | Itoh <i>et al.</i> , 1985; Akagawa- Matsushita <i>et al.</i> , 1992 |
| <i>Shewanella saliphila</i> JCM 32304 | MK ₇ , MMK ₇ , MK ₈ , MMK ₈ | Men | WP_188919364.1 | Yun <i>et al.</i> , 2018 |
| <i>Shewanella ulleungensis</i> JCM 32305 | MK ₇ , MMK ₇ ; MK ₈ , MMK ₈ | Men | WP_188958710.1 | Yun <i>et al.</i> , 2018 |
| <i>Shewanella vesiculosa</i> LMG 24424 | MK ₇ , MMK ₇ | Men | WP_124017754.1 | Bozal <i>et al.</i> , 2009 |
| Archaea | | | | |
| Thermoproteota (Phylum) | | | | |
| Thermoprotei | | | | |
| Desulfurococcales | | | | |
| Desulfurococcaceae | | | | |
| <i>Aeropyrum pernix</i> K1 | DMK ₅ , MK ₅ , MMK ₅ , DMK ₆ , MK ₆ , MTK ₆ | Mqn | Unbek. | Elling <i>et al.</i> , 2016 |
| <i>Ignicoccus hospitalis</i> DSM 18386 | MK ₅ , MMK ₅ , MK ₆ , MMK ₆ , MK ₇ | Mqn | WP_011998375.1 | Elling <i>et al.</i> , 2016 |
| Pyrodictiaceae | | | | |
| <i>Pyrolobus fumarii</i> DSM 11204 | MK ₅ , MMK ₅ , MK ₆ , MMK ₆ , MMK ₇ | Mqn | WP_014025565.1 ^c | Elling <i>et al.</i> , 2016 |
| Thermoproteales | | | | |
| Thermoproteaceae | | | | |
| <i>Thermoproteus tenax</i> Kra 1 | MK ₄ , MK ₅ , MK ₆ and two monomethyl derivatives | Mqn | WP_014126183.1 ^d | Thurl <i>et al.</i> , 1985 |
| Euryarchaeota (Phylum) | | | | |
| Halobacteria | | | | |
| Natrialbales | | | | |
| Natrialbaceae | | | | |
| <i>Natronobacterium gregoryi</i> SP 2 | MK ₈ , MK ₈ (VIII-H ₂), MMK ₈ , MMK ₈ (VIII- | Men | Unbek. | Collins & Tindall, 1987 |

| | | | | |
|---|--|----------------------------|------------------|---|
| Thermoplasmatata, Thermoplasmatatales <i>Thermoplasmataceae</i> <i>Thermoplasma acidophilum</i> DSM 1728 <i>Thermoplasma acidophilum</i> HO-62 | H ₂ , DMMK _s , DMMK _s (VIII-H ₂) MK ₇ , MMK ₇ , various MTK _s MK ₇ , 8-MMK ₇ | Unbek. Unbek. Unbek. | Unbek. Unbek. | Elling <i>et al.</i> , 2016 Collins, 1985; Shimada <i>et al.</i> , 2001 |
| Eukaryota Evosea Archamoebae Mastigamoebida Entamoebidae <i>Entamoeba histolytica</i> HM-1:IMSS | MMK ₇ | Unbek. | Unbek. | Nandi <i>et al.</i> , 2011 |

^a Genomsequenz nicht verfügbar.

^b MenK-Motiv unterscheidet sich vom Signaturmotiv um einen Aminosäurerest (QxTxYPLM → QxSxYPLM).

^c Cystein-Motiv unterscheidet sich vom Signatur-Motiv um eine Aminosäure (LYxHxPFC_{x3}C_{x2}CxF → VYxHxPFC_{x3}C_{x2}CxF).

^d MenK-Motiv unterscheidet sich vom Signaturmotiv um einen Aminosäurerest (QxTxYPLM → QxTxYPLL).

Tabelle S.2: In der Korrelationsanalyse verwendete Akzeptor-Oxidoreduktasen. Unterstrichene Untereinheiten repräsentieren die analysierten Einheiten des jeweiligen Enzyms. Falls verfügbar, wurde die Identifikation des wechselwirkenden Chinons angegeben.

| Elektronenakzeptor | Oxidoreduktase | Untereinheiten | interagierendes Q | Literatur |
|---------------------------|----------------|-------------------|-------------------|-----------------------------------|
| Adenosin-5'-phosphosulfat | Apr | <u>Apr</u> AB | MK | Ramos 2012 |
| Apr | Qmo | QmoABC | MK | Ramos 2012 |
| Arsenat | Arr | <u>Arr</u> ABCD | MK | Lis <i>et al.</i> , 2013 |
| chlorierte Phenole | Cpr | <u>Cpr</u> A | MK | Bisaillon <i>et al.</i> , 2010 |
| Cytochrom c | Act | ActABCDEF | MK | Venceslau <i>et al.</i> , 2010 |
| | Qcr | <u>Qcr</u> ABC | MK | Yu & Brun 1998 |
| Distickstoffmonoxid | Nos | NosRZDFYL | MK | Simon <i>et al.</i> , 2004 |
| DMSO | Dms | <u>Dms</u> ABC | MK | Sambasivarao & Weiner 1991 |
| Fumarat | Frd | <u>Frd</u> ABCD | MK | Cecchini <i>et al.</i> , 1986 |
| | Tfr | <u>Tfr</u> AB | | Heim <i>et al.</i> , 1998 |
| | Mfr | <u>Mfr</u> ABE | MMK | Guccione <i>et al.</i> , 2010 |
| Heterodisulfid | Hme | <u>Hme</u> ABCDE | MK | Mander <i>et al.</i> , 2004 |
| | Hdr | <u>Hdr</u> DE | MK | Mander <i>et al.</i> , 2002 |
| Kohlenstoffdioxid | Fdh | <u>Fdh</u> ABC | MMK | Agne <i>et al.</i> , 2021 |
| Nitrat | Nar | <u>Nar</u> GHI | MK | Bertero <i>et al.</i> , 2003 |
| | Nap | <u>Nap</u> ABCDEF | MK | Brondijk <i>et al.</i> , 2002 |
| Nitrit | Nrf | <u>Nrf</u> ABCDEF | MK | Simon 2002 |
| Perchlorat | Pcr | <u>Pcr</u> ABCD | | Bender <i>et al.</i> , 2005 |
| Polysulfid | Psr | <u>Psr</u> ABC | MMK | Dietrich & Klimmek 2002 |
| Dms, STC, Nap, NrfA | CymA | <u>Cym</u> A | MK | McMillan <i>et al.</i> , 2012 |
| Sauerstoff | Cyd | <u>Cyd</u> AB | MK | Bott & Niebisch 2003 |
| | Qox | <u>Qox</u> ABCD | MK | Yu <i>et al.</i> , 1995 |
| Schwefel, Tetrathionat | Soe | <u>Soe</u> ABC | MK | Guiral <i>et al.</i> , 2005 |
| Selenat | Ynf | <u>Ynf</u> EF | | Connelly <i>et al.</i> , 2016 |
| Selenit | Srr | <u>Srr</u> ABCDEF | | Wells <i>et al.</i> , 2019 |
| Stickstoffmonoxid | qtNOR | <u>qt</u> Nor | MK | Gopalasingam <i>et al.</i> , 2019 |

| | | | | |
|----------------------------|-----|--------------------------|---------|-------------------------------|
| Sulfit | Dsr | Dsr <u>ABCD</u> | MK | Grein <i>et al.</i> , 2013 |
| | Asr | Asr <u>ABC</u> | | Czyzewski & Wang 2012 |
| | Mcc | Mcc <u>ABCDEFL-CcsA1</u> | MK, MMK | Eller <i>et al.</i> , 2019 |
| Tetrachlorethen | Pce | Pce <u>AB</u> | | Nonaka <i>et al.</i> , 2006 |
| | Tce | Tce <u>AB</u> | | Nijenhuis & Zinder 2005 |
| Tetrathionat | Ttr | Ttr <u>ABC</u> | MK | Calisto & Pereira 2021 |
| | Tsd | Tsd <u>AC</u> | MK | Kurth <i>et al.</i> , 2017 |
| Thiosulfat | Phs | Phs <u>ABC</u> | MK | Stoffels <i>et al.</i> , 2012 |
| | Tsr | Tsr <u>AB</u> | | Haja <i>et al.</i> , 2019 |
| TMAO | Tor | Tor <u>ACD</u> | MK | Garg <i>et al.</i> , 2018 |
| Vinylchlorid, Dichlorethen | Vcr | Vcr <u>AB</u> | | Müller <i>et al.</i> , 2004b |

Tabelle S.3: In der Korrelationsanalyse verwendete Donator-Oxidoreduktasen. Unterstrichene Untereinheiten repräsentieren die analysierten Einheiten des jeweiligen Enzyms. Falls verfügbar, wurde die Identifikation des wechselwirkenden Chinons angegeben.

| Elektronendonator | Abkürzung | Untereinheiten | Menachinon | Literatur |
|------------------------------------|------------------|-----------------------|-------------------|---------------------------------|
| Bildung von Disulfidbindungen | Dsb | DsbAB | MK | Bader <i>et al.</i> , 2000 |
| F ₄₂₀ H ₂ | Fqo | FqoABCDHIFJKLMN | MK | Welte <i>et al.</i> , 2021 |
| Flavodoxin, Ferredoxin | εNuo | εNuoDGH(EF oder XY) | MK | Stel & Wösten 2019 |
| Ferredoxin | EMO | EMO | MMK | Agne <i>et al.</i> , 2021 |
| Formiat | Fdn | FdmGHI | MK | Xiong <i>et al.</i> , 2020 |
| | Fdh | FdhABC | MK,MMK | Dietrich & Klimmek 2002 |
| Glukose | mGDH | mGDH | MK | Mustafa <i>et al.</i> , 2008 |
| Glycerol 3-phosphate | Gip | GlpABC | | Unden & Bongaerts 1997 |
| L-Laktat | lld | LldD | | Georgi <i>et al.</i> , 2008 |
| Malate | Mqo | Mqo | MK | Molenaar <i>et al.</i> , 2000 |
| NADPH | Qor | QorA | | Maruyama <i>et al.</i> , 2003 |
| | Lpd | LpdA | | Argyrou <i>et al.</i> , 2004 |
| | Wrb | WrbA | | Patridge & Ferry 2006 |
| Pyruvat | Cid | CidABC | MK | Zhang <i>et al.</i> , 2017a |
| | Pqo | pqo | MK | Schreiner <i>et al.</i> , 2006 |
| Succinat | Sdh | SdhABCD | MK | Pecsi <i>et al.</i> , 2014 |
| Sulfid | SQR | SQR | MK | Marcia <i>et al.</i> , 2009 |
| Sulfit | Soe | SoeABC | DMK | Boughanemi <i>et al.</i> , 2020 |
| Thiosulfat | Tsd | TsdAC | MK | Kurth <i>et al.</i> , 2017 |
| | Dox | DoxAD | | Müller <i>et al.</i> , 2004a |
| Typ I Cytochrom <i>c</i> 3 (TpIc3) | Qrc | QrcABCD | MK | Venceslau <i>et al.</i> , 2010 |
| Wasserstoff | Hyd | HydABC | MK,MMK | Dietrich & Klimmek 2002 |
| | Hyb | HybABCO | MK | Benoit <i>et al.</i> , 2020 |

Tabelle S.4: Untereinheiten der Oxidoreduktasen die in der Korrelationsanalyse verwendet wurden und mit Hilfe der Kegg Orthology Datenbank identifiziert wurden.

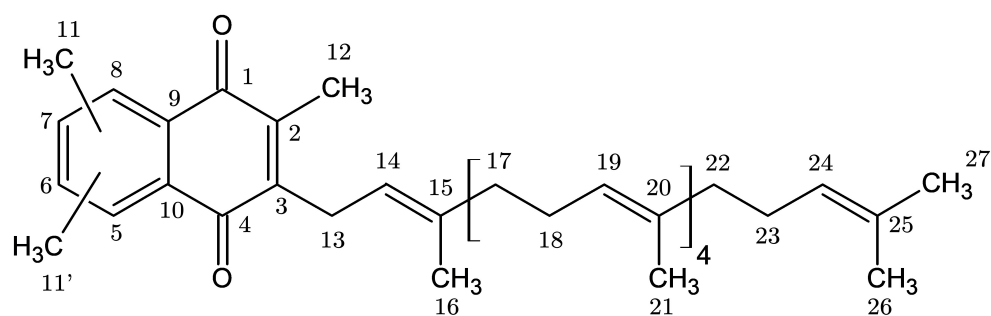
| Enzym | Kegg Orthology | Name |
|-------|----------------|--|
| AprA | K00394 | adenylylsulfate reductase, subunit A [EC:1.8.99.2] |
| AprB | K00395 | adenylylsulfate reductase, subunit B [EC:1.8.99.2] |
| AsrA | K16950 | anaerobic sulfite reductase subunit A |
| AsrB | K16951 | anaerobic sulfite reductase subunit B |
| AsrC | K00385 | anaerobic sulfite reductase subunit C |
| CydA | K00425 | cytochrome bd ubiquinol oxidase subunit I [EC:7.1.1.7] |
| CydB | K00426 | cytochrome bd ubiquinol oxidase subunit II [EC:7.1.1.7] |
| DmsA | K07306 | anaerobic dimethyl sulfoxide reductase subunit A [EC:1.8.5.3] |
| DmsB | K00184 | dimethyl sulfoxide reductase iron-sulfur subunit |
| DmsC | K00185 | dimethyl sulfoxide reductase membrane subunit |
| DsbA | K03673 | protein dithiol oxidoreductase (disulfide-forming) [EC:1.8.4.15] |
| DsbB | K03611 | protein dithiol:quinone oxidoreductase [EC:1.8.5.9] |
| DsrA | K11180 | dissimilatory sulfite reductase alpha subunit [EC:1.8.99.5] |
| DsrB | K11181 | dissimilatory sulfite reductase beta subunit [EC:1.8.99.5] |
| DsrC | K23077 | dissimilatory sulfite reductase related protein |
| FdnG | K08348 | formate dehydrogenase-N, alpha subunit [EC:1.17.5.3] |
| FdnH | K08349 | formate dehydrogenase-N, beta subunit |
| FdnI | K08350 | formate dehydrogenase-N, gamma subunit |
| FqoA | K22171 | F420H2:quinone oxidoreductase subunit A [EC:1.1.98.4] |
| FqoH | K22175 | F420H2:quinone oxidoreductase subunit H [EC:1.1.98.4] |
| FqoJ | K22177 | F420H2:quinone oxidoreductase subunit J [EC:1.1.98.4] |
| FqoK | K22178 | F420H2:quinone oxidoreductase subunit K [EC:1.1.98.4] |
| FqoL | K22179 | F420H2:quinone oxidoreductase subunit L [EC:1.1.98.4] |
| FqoM | K22180 | F420H2:quinone oxidoreductase subunit M [EC:1.1.98.4] |
| FqoN | K22181 | F420H2:quinone oxidoreductase subunit N [EC:1.1.98.4] |
| FrdA | K00244 | fumarate reductase flavoprotein subunit [EC:1.3.5.4] |
| FrdB | K00245 | fumarate reductase iron-sulfur subunit [EC:1.3.5.4] |
| FrdC | K00246 | fumarate reductase subunit C |
| FrdD | K00247 | fumarate reductase subunit D |
| GlpA | K00111 | glycerol-3-phosphate dehydrogenase [EC:1.1.5.3] |
| GlpB | K00112 | glycerol-3-phosphate dehydrogenase subunit B [EC:1.1.5.3] |
| GLpC | K00113 | glycerol-3-phosphate dehydrogenase subunit C |
| HdrD | K08264 | heterodisulfide reductase subunit D [EC:1.8.98.1] |
| HdrE | K08265 | heterodisulfide reductase subunit E [EC:1.8.98.1] |
| HmeC | K18500 | heterodisulfide reductase cytochrome b-like subunit |
| HmeD | K18501 | heterodisulfide reductase iron-sulfur subunit |
| HybC | K06281 | hydrogenase large subunit [EC:1.12.99.6] |
| HybO | K06282 | hydrogenase small subunit [EC:1.12.99.6] |
| HydA | K05927 | quinone-reactive Ni/Fe-hydrogenase small subunit [EC:1.12.5.1] |
| HydB | K05922 | quinone-reactive Ni/Fe-hydrogenase large subunit [EC:1.12.5.1] |
| LldD | K00101 | L-lactate dehydrogenase (cytochrome) [EC:1.1.2.3] |
| LpdA | K23842 | NAD(P)H dehydrogenase (quinone) [EC:1.6.5.2] |
| Mqo | K00116 | malate dehydrogenase (quinone) [EC:1.1.5.4] |
| NapA | K02567 | nitrate reductase (cytochrome) [EC:1.9.6.1] |
| NapB | K02568 | nitrate reductase (cytochrome), electron transfer subunit |

| | | |
|------|--------|---|
| NapC | K02569 | cytochrome c-type protein NapC |
| NarG | K00370 | nitrate reductase / nitrite oxidoreductase, alpha subunit [EC:1.7.5.1 1.7.99.-] |
| NarH | K00371 | nitrate reductase / nitrite oxidoreductase, beta subunit [EC:1.7.5.1 1.7.99.-] |
| NarI | K00374 | nitrate reductase gamma subunit [EC:1.7.5.1 1.7.99.-] |
| NrfA | K03385 | nitrite reductase (cytochrome c-552) [EC:1.7.2.2] |
| NrfB | K04013 | cytochrome c-type protein NrfB |
| NrfC | K04014 | protein NrfC |
| NrfD | K04015 | protein NrfD |
| phsA | K08352 | thiosulfate reductase / polysulfide reductase chain A [EC:1.8.5.5] |
| phsB | K08353 | thiosulfate reductase electron transport protein |
| phsC | K08354 | thiosulfate reductase cytochrome b subunit |
| PsrA | K08352 | thiosulfate reductase / polysulfide reductase chain A [EC:1.8.5.5] |
| PsrB | K16293 | polysulfide reductase chain B |
| PsrC | K16294 | polysulfide reductase chain C |
| QcrA | K03890 | ubiquinol-cytochrome c reductase iron-sulfur subunit |
| QcrB | K03891 | ubiquinol-cytochrome c reductase cytochrome b subunit |
| QcrC | K03889 | ubiquinol-cytochrome c reductase cytochrome c subunit |
| QmoA | K16885 | quinone-modifying oxidoreductase, subunit QmoA |
| QmoB | K16886 | quinone-modifying oxidoreductase, subunit QmoB |
| QmoC | K16887 | quinone-modifying oxidoreductase, subunit QmoC |
| QorA | K00359 | NADPH:quinone reductase [EC:1.6.5.5] |
| QoxA | K02826 | cytochrome aa3-600 menaquinol oxidase subunit II [EC:7.1.1.5] |
| QoxB | K02827 | cytochrome aa3-600 menaquinol oxidase subunit I [EC:7.1.1.5] |
| QoxC | K02828 | cytochrome aa3-600 menaquinol oxidase subunit III [EC:7.1.1.5] |
| QoxD | K02829 | cytochrome aa3-600 menaquinol oxidase subunit IV [EC:7.1.1.5] |
| QrcA | K23300 | menaquinone reductase, multiheme cytochrome c subunit [EC:1.97.-.-] |
| QrcB | K23302 | menaquinone reductase, molybdopterin-binding-like subunit |
| QrcC | K23301 | menaquinone reductase, iron-sulfur cluster-binding subunit [EC:1.97.-.-] |
| QrcD | K23303 | menaquinone reductase, integral membrane subunit |
| SdhA | K00239 | succinate dehydrogenase flavoprotein subunit [EC:1.3.5.1 1.3.5.4] |
| SdhB | K00240 | succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit [EC:1.3.5.1 1.3.5.4] |
| SdhC | K00241 | succinate dehydrogenase cytochrome b subunit |
| SdhD | K00242 | succinate dehydrogenase membrane anchor subunit |
| SoeA | K21307 | sulfite dehydrogenase (quinone) subunit SoeA [EC:1.8.5.6] |
| SoeB | K21308 | sulfite dehydrogenase (quinone) subunit SoeB |
| SoeC | K21309 | sulfite dehydrogenase (quinone) subunit SoeC |
| SQR | K17218 | sulfide:quinone oxidoreductase [EC:1.8.5.4] |
| TfrA | K18209 | fumarate reductase (CoM/CoB) subunit A [EC:1.3.4.1] |
| TfrB | K18210 | fumarate reductase (CoM/CoB) subunit B [EC:1.3.4.1] |
| TorA | K07811 | trimethylamine-N-oxide reductase (cytochrome c) [EC:1.7.2.3] |
| TorC | K03532 | trimethylamine-N-oxide reductase (cytochrome c), subunit TorC |
| TsdA | K19713 | thiosulfate dehydrogenase [EC:1.8.2.2] |
| TtrA | K08357 | tetrathionate reductase subunit A |
| TtrB | K08358 | tetrathionate reductase subunit B |
| TtrC | K08359 | tetrathionate reductase subunit C |
| WrbA | K03809 | NAD(P)H dehydrogenase (quinone) [EC:1.6.5.2] |
| YnfE | K07309 | Tat-targeted selenate reductase subunit YnfE [EC:1.97.1.9] |
| YnfF | K07310 | Tat-targeted selenate reductase subunit YnfF [EC:1.97.1.9] |
| YnfG | K07311 | Tat-targeted selenate reductase subunit YnfG |
| YnfH | K07312 | Tat-targeted selenate reductase subunit YnfH |

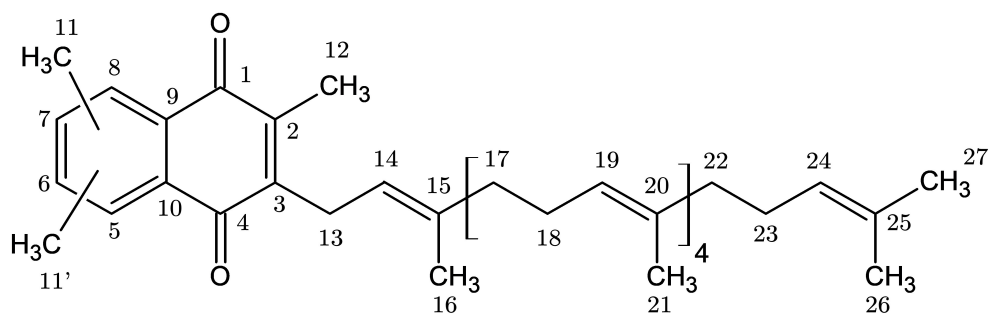
Tabelle S.5: Untereinheiten der Oxidoreduktasen die in der Korrelationsanalyse verwendet wurden und mit Hilfe von Referenzsequenzen in der Clusteranalyse identifiziert wurden.

| Enzym | Eintrag | Organismus |
|-----------------|------------------|---|
| ActA | Q3A1G9_SYNC1 | <i>Syntrophotalea carbinolica</i> DSM 2380 |
| ActB | Q3A1G8_SYNC1 | <i>Syntrophotalea carbinolica</i> DSM 2380 |
| ActC | Q3A1G7_SYNC1 | <i>Syntrophotalea carbinolica</i> DSM 2380 |
| ArrA | ARRA_SHESA | <i>Shewanella</i> sp. ANA-3 |
| ArrB | ARRB_SHESA | <i>Shewanella</i> sp. ANA-3 |
| CidA | CIDA_STAAN | <i>Staphylococcus aureus</i> N315 |
| CidB | CIDB_STAAN | <i>Staphylococcus aureus</i> N315 |
| CidC | A0A142G9E0_STAAU | <i>Staphylococcus aureus</i> N315 |
| CprA | CPRA_DESHD | <i>Desulfitobacterium hafniense</i> DSM 10664 |
| CymA | Q8E8S0_SHEON | <i>Shewanella oneidensis</i> MR-1 |
| doxA | DOXA_ACIAM | <i>Acidianus ambivalens</i> |
| doxD | DOXD_ACIAM | <i>Acidianus ambivalens</i> |
| EMO | Q2LWR1_SYNAS | <i>Syntrophus aciditrophicus</i> SB |
| FdhA | P28179_WOLSC | <i>Wolinella succinogenes</i> DSM 1740 |
| FdhB | FDHB_WOLSU | <i>Wolinella succinogenes</i> DSM 1740 |
| FdhC | P28180_WOLSC | <i>Wolinella succinogenes</i> DSM 1740 |
| MccA | MCCA_WOLSU | <i>Wolinella succinogenes</i> DSM 1740 |
| MccC | Q7MA99_WOLSU | <i>Wolinella succinogenes</i> DSM 1740 |
| MccD | Q7MA98_WOLSU | <i>Wolinella succinogenes</i> DSM 1740 |
| MfrA | MFRA_WOLSU | <i>Wolinella succinogenes</i> DSM 1740 |
| MfrB | MFRB_WOLSU | <i>Wolinella succinogenes</i> DSM 1740 |
| MfrE | MFRE_WOLSU | <i>Wolinella succinogenes</i> DSM 1740 |
| mGDH | DHG_ECOLI | <i>Escherichia coli</i> K12 |
| NosD (Klade I) | NOSD_STUST | <i>Stutzerimonas stutzeri</i> |
| NosD (Klade II) | Q7MRZ6_WOLSU | <i>Wolinella succinogenes</i> DSM 1740 |
| NosF (Klade I) | NOSF_STUST | <i>Stutzerimonas stutzeri</i> |
| NosF (Klade II) | Q7M9H2_WOLSU | <i>Wolinella succinogenes</i> DSM 1740 |
| NosY (Klade I) | NOSY_STUST | <i>Stutzerimonas stutzeri</i> |
| NosY (Klade II) | Q7MRZ1_WOLSU | <i>Wolinella succinogenes</i> DSM 1740 |
| NosZ (Klade I) | NOSZ_STUST | <i>Stutzerimonas stutzeri</i> |
| NosZ (Klade II) | Q7M9H4_WOLSU | <i>Wolinella succinogenes</i> DSM 1740 |
| NuoD | NUOD_CAMJR | <i>Campylobacter jejuni</i> RM1221 |
| NuoG | Q0P855_CAMJE | <i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 700819 |
| NuoH | NUOH_CAMJR | <i>Campylobacter jejuni</i> RM1221 |
| PceA | PCEA_DESHY | <i>Desulfitobacterium hafniense</i> Y51 |
| PceB | PCEB_DESHY | <i>Desulfitobacterium hafniense</i> Y51 |
| PcrA | PCRA_DECAR | <i>Dechloromonas aromatica</i> RCB |
| PcrB | PCRB_DECAR | <i>Dechloromonas aromatica</i> RCB |
| Pqo | A0A0H2UY89_SHIFL | <i>Shigella flexneri</i> 301 |
| qNOR | A0A0D6H8R3_ALCXX | <i>Alcaligenes xylosoxydans</i> |
| SrrA | ADH98988.1 | <i>Bacillus selenitireducens</i> MLS10 |
| SrrB | ADH98989.1 | <i>Bacillus selenitireducens</i> MLS10 |
| SrrC | ADH98990.1 | <i>Bacillus selenitireducens</i> MLS10 |
| TceA | AAF73916.1 | <i>Dehalococcoides mccartyi</i> |
| TceB | WP_010935885.1 | Multispecies <i>Dehalococcoides</i> |

| Enzym | Eintrag | Organismus |
|--------------|----------------|--|
| TsrA | Q8ZUB8_PYRAE | <i>Pyrobaculum aerophilum</i> ATCC 51768 |
| TsrB | Q8ZUB7_PYRAE | <i>Pyrobaculum aerophilum</i> ATCC 51768 |
| TsrC | Q8ZUB6_PYRAE | <i>Pyrobaculum aerophilum</i> ATCC 51768 |
| VcrA | AAQ94119.1 | <i>Dehalococcoides mccartyi</i> VS |

Tabelle S.8: ^1H chemische Verschiebungen der Spektren von MK_8 , 7- MMK_8 , 8- MMK_8 , 5,8- DMMK_8 und 7,8- DMMK_8 kalibriert am ^1H -Signal der verbleibende Protonen, in CDCl_3 bei 7,20 ppm.

| | MK_8 | 7- MMK_8 | 8- MMK_8 | 5,8- DMMK_8 | 7,8- DMMK_8 |
|-----|---------------|-------------------|-------------------|----------------------|----------------------|
| 1 | - | - | - | - | - |
| 2 | - | - | - | - | - |
| 3 | - | - | - | - | - |
| 4 | - | - | - | - | - |
| 5 | 7,61 | 7,89 | 7,93 | - | 7,84 |
| 6 | 8,02 | 7,39 | 7,45 | 7,26 | 7,37 |
| 7 | 8,02 | - | 7,39 | 7,26 | - |
| 8 | 7,61 | 7,80 | - | - | - |
| 9 | - | - | - | - | - |
| 10 | - | - | - | - | - |
| 11 | - | 2,40 | 2,67 | 2,62 | 2,35 |
| 11' | - | - | - | 2,62 | 2,59 |
| 12 | 2,13 | 2,10 | 2,08 | 2,06 | 2,09 |
| 13 | 3,31 | 3,28 | 3,26 | 3,25 | 3,26 |
| 14 | 4,96 | 4,97 | 4,94 | 4,97 | 4,97 |
| 15 | - | - | - | - | - |
| 16 | 1,73 | 1,71 | 1,70 | 1,71 | 1,72 |
| 17 | 1,92 | 1,88 | 1,89 | 1,91 | 1,91 |
| 18 | 2,00 | 2,00 | 1,97 | 2,00 | 1,98 |
| 19 | 5,05 | 5,03 | 5,03 | 5,06 | 5,03 |
| 20 | - | - | - | - | - |
| 21 | 1,53 | 1,52 | 1,51 | 1,53 | 1,53 |
| 22 | 1,92 | 1,9 | 1,89 | 1,88 | 1,88 |
| 23 | 1,99 | 2,0 | 1,97 | 1,99 | 1,99 |
| 24 | 5,00 | 4,94 | 4,98 | 5,00 | 5,00 |
| 25 | - | - | - | - | - |
| 26 | 1,53 | 1,52 | 1,52 | 1,54 | 1,52 |
| 27 | 1,62 | 1,60 | 1,60 | 1,62 | 1,61 |

Tabelle S.9: ^{13}C chemische Verschiebungen der Spektren von MK_8 , 7-MMK $_8$, 8-MMK $_8$, 5,8-DMMK $_8$ und 7,8-DMMK $_8$ kalibriert am ^{13}C -Signal der verbleibende Protonen in CDCl_3 bei 77,20 ppm.

| | MK_8 | 7-MMK $_8$ | 8-MMK $_8$ | 5,8-DMMK $_8$ | 7,8-DMMK $_8$ |
|-----|---------------|------------|------------|---------------|---------------|
| 1 | 185,4 | 185,7 | 186,4 | 188,3 | 188,3 |
| 2 | 143,3 | 143,0 | 143,5 | 142,8 | 143,9 |
| 3 | 146,1 | 146,0 | 143,6 | 145,8 | 145,1 |
| 4 | 184,4 | 184,4 | 183,9 | 187,4 | 184,7 |
| 5 | 133,6 | 126,3 | 124,2 | 139,1 | 124,6 |
| 6 | 126,6 | 133,9 | 131,4 | 136,6 | 134,2 |
| 7 | 126,6 | 144,0 | 136,2 | 136,6 | 144,2 |
| 8 | 133,6 | 126,2 | 139,7 | 139,1 | 139,1 |
| 9 | 133,1 | 132,0 | 128,9 | 131,5 | 130,5 |
| 10 | 133,1 | 130,2 | 132,7 | 136,6 | 132,0 |
| 11 | - | 21,6 | 21,8 | 23,3 | 21,4 |
| 11' | - | - | - | 23,3 | 17,2 |
| 12 | 13,0 | 12,7 | 11,9 | 12,9 | 13,1 |
| 13 | 26,5 | 26,8 | 24,7 | 25,8 | 25,6 |
| 14 | 119,6 | 118,9 | 118,3 | 119,9 | 119,3 |
| 15 | 137,5 | 137,3 | 136,3 | 137,4 | 137,3 |
| 16 | 17,2 | 15,8 | 15,4 | 16,2 | 16,4 |
| 17 | 40,1 | 39,6 | 38,6 | 39,7 | 39,7 |
| 18 | 27,0 | 26,5 | 24,5 | 26,7 | 26,6 |
| 19 | 124,7 | 124,2 | 123,5 | 124,5 | 124,2 |
| 20 | 134,7 | 134,9 | 133,7 | 135,1 | 134,3 |
| 21 | 16,6 | 15,8 | 15,1 | 16,2 | 16,0 |
| 22 | 39,7 | 39,6 | 38,5 | 39,8 | 39,7 |
| 23 | 25,8 | 27,1 | 24,7 | 26,9 | 26,4 |
| 24 | 124,5 | 124,3 | 123,3 | 124,5 | 124,4 |
| 25 | 131,1 | 131,1 | 130,1 | 131,3 | 131,2 |
| 26 | 17,6 | 17,6 | 16,5 | 17,9 | 17,7 |
| 27 | 26,0 | 24,3 | 24,7 | 25,9 | 25,5 |

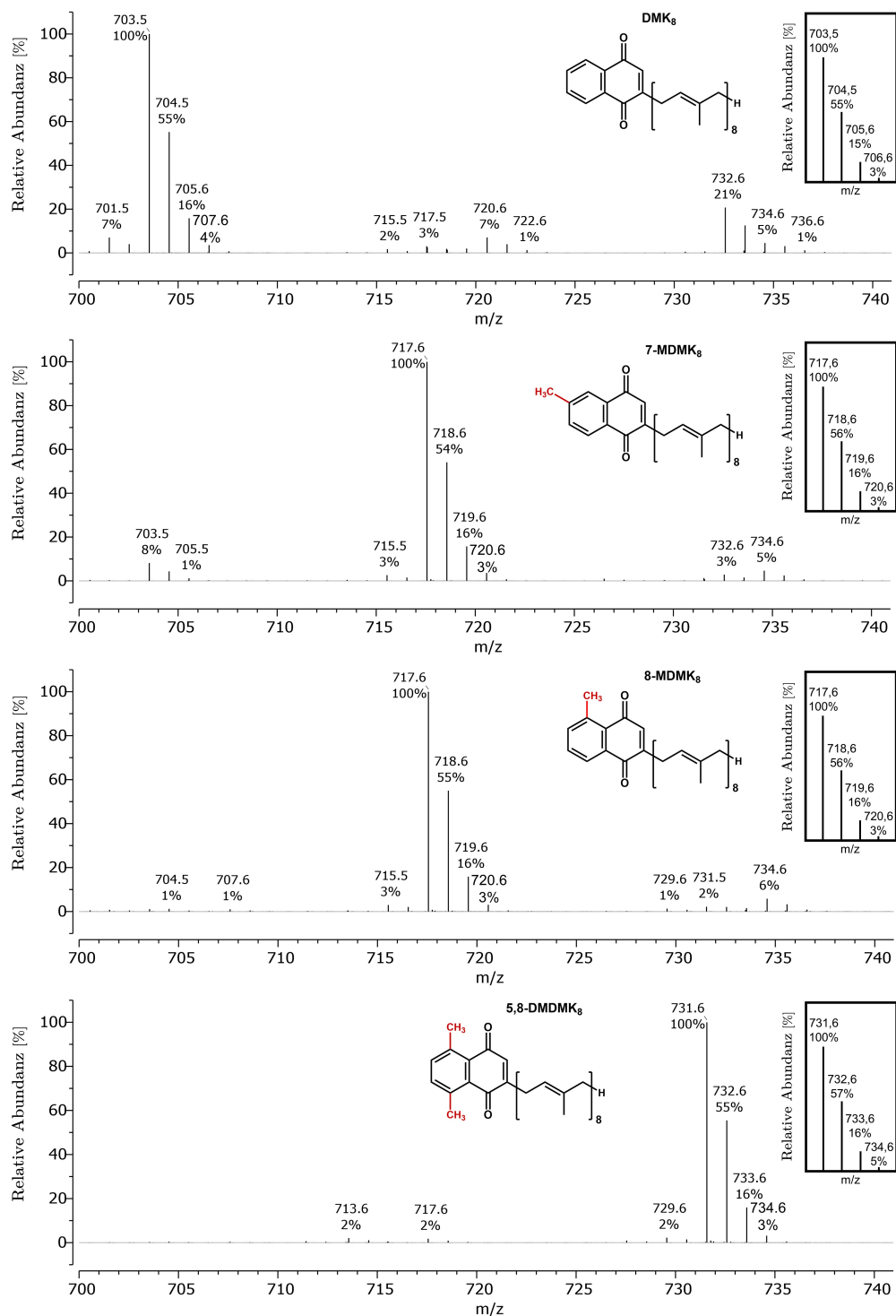


Abbildung S.1: ESI-Massenspektren von DMK₈, 7-MDMK₈, 8-MDMK₈, 5,8-DMDMK₈ und 5,8-DMMK₈. Die Einschübe zeigen simulierte Isotopenverteilungsmuster.

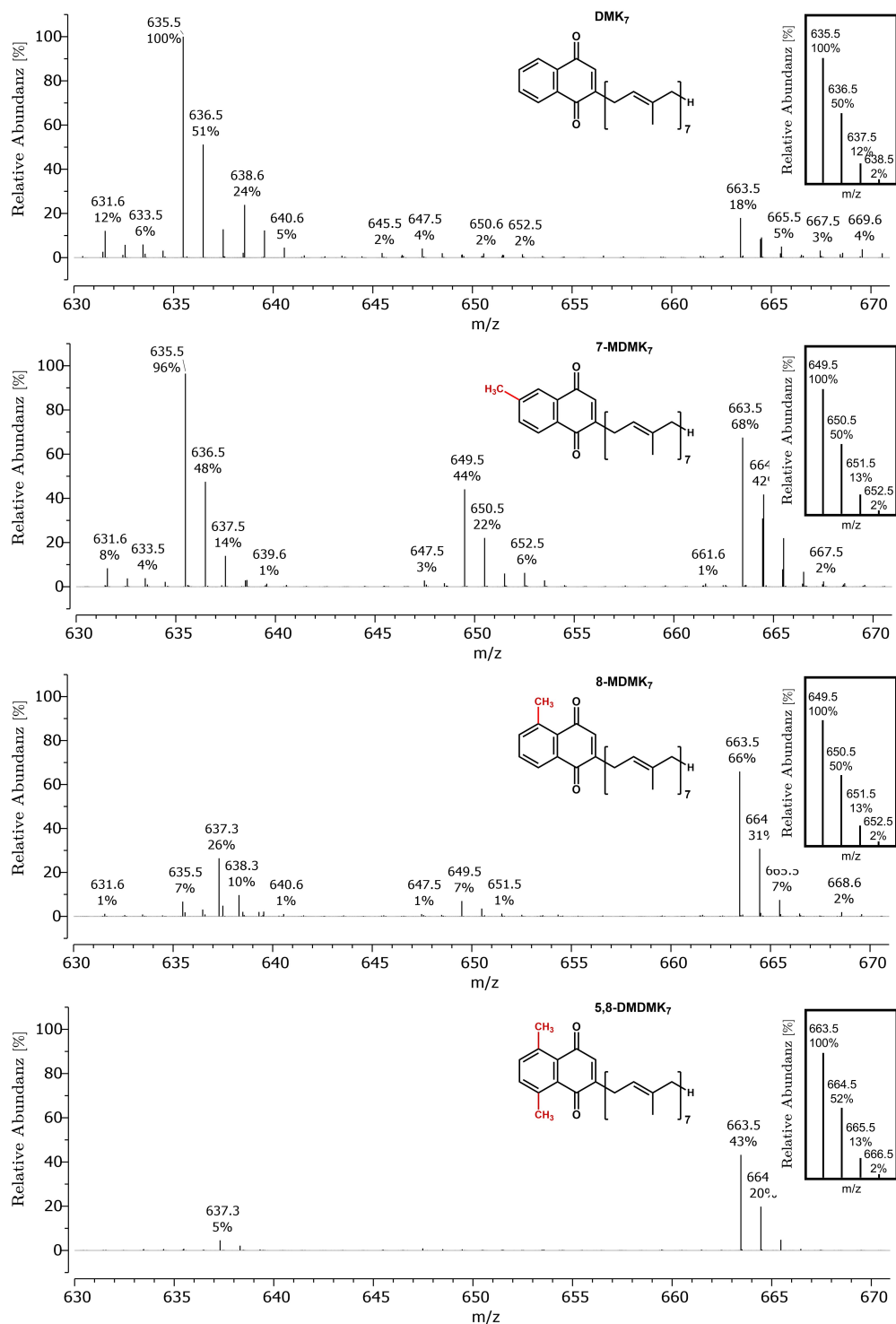


Abbildung S.2: ESI-Massenspektren von DMK₇, 7-MDMK₇, 8-MDMK₇, 5,8-DMDMK₇ und 5,8-DMMK₇. Die Einschübe zeigen simulierte Isotopenverteilungsmuster.

Abkürzungsverzeichnis

| | | | |
|-------------------------|--|-------------------------|---------------------------------------|
| εNuo | NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase | CoA | Coenzym A |
| g | Gravitationsfeldstärke | CPDH | Coproporphyrinogen-III-Oxidase |
| 2,8-dhA | 2,8-Dihydroxyadenin | CPEC | Circular Polymerase Extension Cloning |
| 5-Ado | 5'-Deoxyadenosin | CV | Säulenvolumen |
| 5-dR | 5'-Deoxyribose | Cyd | Cytochrom <i>bd</i> -Oxidase |
| 8-hA | 8-Hydroxyadenin | Cym | Chinol-Dehydrogenase |
| A^{n nm} | Absorption bei n nm | Da | Dalton |
| A | Ampere | ddH₂O | doppelt deionisiertes Wasser |
| Abb. | Abbildung(en) | dH₂O | einfach deionisiertes Wasser |
| ad | auf | DHFL | Dehypoxanthin-Futalosin |
| AFL | 6-Amino-6-desoxyfutalosin | DHNA | 1,4-Dihydroxy-2-naphthoat |
| α | Alpha | DMAPP | Dimethylallylpyrophosphat |
| APCI | Atmospheric Pressure Chemical Ionization | DMK | 2-Deethylmenachinon |
| Arr | Arsenat-Reduktase | DMMK | Dimethylmenachinon |
| As | Aminosäuren | Dms | Dimethylsulfoxid-Reduktase |
| AU | Absorptionseinheiten | DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| β | Beta | dsDNA | doppelsträngige DNA |
| BLAST | Basic Local Alignment Search Tool | DT | Natriumdithionit |
| CDHFL | zyklisches Dehypoxanthin-Futalosin | DXP | 1-Desoxy-D-Xylulose-5-Phosphat |
| °C | Grad Celsius | e⁻ | Elektron(en) |
| Cfr | rRNA-Methyltransferase | E⁰' | Standard-Redoxpotentiale bei pH 7 |
| CLANS | Cluster Analysis of Sequence | EMO | ETF:MMK-Oxidoreduktase |
| | | EPR | Elektronenspinresonanz |

| | | | |
|-----------------------|---|--------------------------|--|
| ESI | Elektrosprayionisation | KEGG | Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes |
| eV | Elektronenvolt | kV | Kilovolt |
| F | Fluoreszenzemission | l | Liter |
| FAD | Flavin-Adenin-Dinukleotid | LB | Lysogeny Broth |
| Fdh | Formiat-Dehydrogenase | M | Molar |
| FMN | Flavinmononukleotid | mA | Milliamper |
| FPP | Farnesyldiphosphat | MALDI-TOF | Matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight |
| g | Gramm | Mcc | Sulfit-Reduktase |
| GPP | Geranyldiphosphat | MccA | Sulfit-Reduktase |
| ° | Grad | Men | klassische MK-Biosynthese |
| h | Stunde | MEP | Methylerythritol-4-Phosphat |
| HGT | horizontalen Gentransfer | Met | Methionin |
| HMBC | heteronuklearer Mehrfachbindungskorrelation | mF | Millifarad |
| HPLC | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie | Mfr | MMK:Fumarat-Reduktase |
| Hyd | Hydrogenase | min | Minute |
| Hyd | Hydrogenase | MK | Menachinon |
| Hz | Hertz | ml | Milliliter |
| IMAC | immobilisierter Metallionen-Affinitäts- chromatographie | mM | Millimolar |
| IMD | intrazelluläre Membrandomän | MMK | Methylmenachinon |
| IMG | Integrated Microbial Genomes System | Mqn | Futalosin-MK-Biosynthese |
| IPP | Isopentenylpyrophosphat | MS | Massenspektrometrie |
| IPTG | Isopropyl- β -D- thiogalactopyranosid | MTA | 5'-Methylthioadenosin |
| K | Kelvin | MTAN | MTA/SAH-Nukleosidase |
| k_{av} | Verteilungskoeffizient | MTQ | Methionachinon |
| kb | Kilobasen | MTR | 5-Methylthioribose |
| kDa | Kilodoltan | μl | Mikroliter |
| | | μm | Mikrometer |
| | | mV | Millivolt |
| | | MVA | Mevalonat |

| | | | |
|----------------|---|----------------|--|
| NADPH | Nicotinamidadenindinukleotid-phosphat | RFU | Relative Fluorescence Unit |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information | RlmN | Dual-spezifische RNA-Methyltransferase |
| ng | Nanogramm | RMSD | Root Mean Square Deviation |
| nm | Nanometer | RNA | Ribonukleinsäure |
| NMR | Kernspinresonanzspektroskopie | rpm | Umdrehungen pro Minute |
| no-SCAR | Scarless Cas9 Assisted Recombineering | RSMT | radikalische SAM Methyltransferase |
| Nrf | Cytochrom <i>c</i> -Nitrit-Reduktase | RSS | radikalische SAM-Superfamilie |
| OD | Optische Dichte | s | Sekunde |
| OPP | Octaprenyl-Diphosphat | SAH | <i>S</i> -Adenosylhomocystein |
| OSB | 2-Succinylbenzoat | SAM | <i>S</i> -Adenosylmethionin |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese | SDH | Succinat-Dehydrogenase |
| PCR | Polymerase-Ketten-Reaktion | SDS | Sodium Dodecyl Sulfate |
| pH | <i>potentia hydrogenii</i> | SEC | Größenausschluss-Chromatographie |
| Φ | Phi | SEPHCHC | 2-Succinyl-5-enolpyruvyl-6-hydroxy-3-cyclohexen-1-carboxylat |
| PHI | Position Hit Initiated | SHCHC | 2-Succinyl-6-hydroxy-2,4-cyclohexadien-1-carboxylat |
| PhQ | Phyllochinon | SQR | Succinat:Chinon-Oxidoreduktase |
| ppm | Parts per million | SRH | <i>S</i> -Ribosyl-L-homocystein |
| PPP | Polypyrophosphat | T | Temperatur |
| PQ | Plastochinon | Tab | Tabelle(n) |
| % | Prozent | TB | Terrific Broth |
| Ψ | Psi | TEMED | Tetramethylethylendiamin |
| psi | Pfund pro Quadrat Zoll | TG | Trockengewicht |
| PSI | Position-Specific Iterative | TIM | Triosephosphatisomerase |
| Psr | Polysulfid-Reduktase | Tm | Schmelztemperatur |
| Psr | Polysulfid-Reduktase | TMMK | Trimethylmenachinon |
| PVDF | Polyvinylidenfluorid | Tor | Trimethylamin- <i>N</i> -oxid-Reduktase |
| Q | Chinon | | |
| Qor | NADPH:Chinon-Reduktase | | |
| Rf | relative Migrationsdistanz | | |

| | |
|------------|------------------------|
| TSA | Thermal Shift Assay |
| Tsd | Tetrathionat-Reduktase |
| Ttr | Tetrathionat-Reduktase |
| U | Units |
| UQ | Ubichinon |
| v/v | Volume per Volume |
| V | Volt |
| w/v | Weight per Volume |
| \bar{x} | arithmetisches Mittel |

Beiträge anderer

Die vorliegenden Daten in dieser Arbeit wurden, abgesehen von den folgenden Ausnahmen, von mir selbst erstellt, analysiert und ausgewertet:

Kapitel 5.3:

- Die Plasmide pAC-*AeMenK* und pAC-*AeMenK2* wurden von Dr. Sascha Hein angefertigt.
- Die NMR-Spektren der methylierten MK-Derivate wurden von Prof. Dr. Reinhard Meusinger (Fachbereich Chemie) aufgenommen.
- Die MS-Messungen der methylierten-MK-Derivate wurden von Christiane Rudolph (MS-Abteilung, Fachbereich Chemie) durchgeführt.

Kapitel 5.5:

- Christiane Rudolph (MS-Abteilung, Fachbereich Chemie) führte die ESI-Messungen von *CtMenK* durch, während Gül Sahinalp (MS-Abteilung, Fachbereich Chemie) die MALDI-TOF-Messungen von *CtMenK* durchführte.
- Dr. Sascha Hein war für die Erstellung der Plasmide *pet-FldA* und *pet-Fpr* verantwortlich.

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits in den folgenden wissenschaftlichen Publikationen veröffentlicht:

Wilkens, D. & Simon, J. (2023) Chapter 4: Biosynthesis and function of microbial methylmenaquinones. *Adv. Microb. Physiol.* 83:1-58. AcademicPress. doi: <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2023.05.002>.

Agne, M., Estelmann, S., Seelmann, CS., Kung, J., Wilkens, D., Koch, HG., van der Does, C., Albers, SV., von Ballmoos, C., Simon, J. & Boll, M. (2021) The missing enzymatic link in syntrophic methane formation from fatty acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 5; 118(40):e2111682118. doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.2111682118>.

Wilkens, D., Meusinger, R., Hein, S. & Simon J. (2021) Sequence analysis and specificity of distinct types of menaquinone methyltransferases indicate the widespread potential of methylmenaquinone production in bacteria and archaea. *Environ Microbiol.* 23:1407–1421. doi: <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15344>.

Konferenzbeiträge

Die Resultate dieser Arbeit wurden bereits auf verschiedenen nationalen und internationalen Konferenzen vorgestellt. (*, Präsentierender Autor)

VAAM-Jahrestagung 2019, Mainz, Deutschland

Poster: "Biodiversity of bacterial menaquinone methyltransferases, a novel family of class C radical SAM enzymes"

D. Wilkens*, S. Hein, J. Simon

VAAM-Jahrestagung 2020, Leipzig, Deutschland

Poster: "Distinct types of menaquinone methyltransferases predict the synthesis of various microbial methylmenaquinones"

D. Wilkens*, S. Hein, J. Simon

Perspectives in Bioenergetics 2021, Online

ePoster: "Distinct types of menaquinone methyltransferases predict the synthesis of various microbial methylmenaquinones"

D. Wilkens*, S. Hein, J. Simon

VAAM-Jahrestagung 2022, Online

ePoster: "Biosynthesis of methylmenaquinones"

D. Wilkens*, S. Hein, J. Simon

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name: Dennis Wilkens

Akademische Ausbildung

seit Nov. 2018 **Doktorand** in der Forschungsgruppe von Prof. Dr. Jörg Simon, Abteilung Mikrobielle Energiekonservierung und Biotechnologie am Fachbereich für Biologie der Technischen Universität Darmstadt

Aug. 2016 - Okt. 2018 **Master of Science Technische Biologie**, TU Darmstadt
Masterarbeit in der Abteilung Mikrobielle Energiekonservierung und Biotechnologie von Prof. Dr. Jörg Simon
Titel der Abschlussarbeit: Substratspezifität der Menachinon-Methyltransferasen MenK und MenK2

Okt. 2013 - Okt. 2016 **Bachelor of Science Biologie**, TU Darmstadt
Masterarbeit in der Abteilung Strahlenbiologie und DNA-Reparatur von Prof. Dr. Löbrich
Titel der Abschlussarbeit: Vergleichende 53BP1-Foci-Analysen Strahlen-induzierter DNA-Doppelstrangbrüche in Wildtyp-Mäusen und hTNF- α -Mäusen

Schulische Ausbildung

Mär. 2007 - Jul. 2013 **Abitur**, Goethe-Gymnasium Bensheim
Leistungsfächer Biologie und Chemie

Danksagung

Die Umsetzung dieser Arbeit wäre ohne die wertvolle Unterstützung und Zusammenarbeit vieler Personen nicht möglich gewesen. An dieser Stelle möchte ich meinen aufrichtigen Dank an alle Beteiligten aussprechen.

An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. Jörg Simon meinen aufrichtigen Dank aussprechen, der einen maßgeblichen Beitrag zum Erfolg dieser Dissertation geleistet hat. Seine fachliche Kompetenz, seine wertvollen Anleitungen und seine kontinuierliche Unterstützung haben meinen wissenschaftlichen Werdegang maßgeblich geprägt und die Realisierung dieser Arbeit ermöglicht.

Ein herzlicher Dank gebührt auch PD Dr. Arnulf Kletzin, der die Zweitkorrektur übernommen hat und damit wesentlich zur Qualität dieser Arbeit beigetragen hat.

Meinen Kollegen aus dem Fachbereich Chemie, Prof. Dr. Reinhard Meusinger, Dr. Schießer, Christiane Rudolph und Gül Sahinalp, möchte ich meinen herzlichen Dank aussprechen für die hervorragende Zusammenarbeit in den vergangenen Jahren. Ihre wertvollen Beiträge, ihr Fachwissen und ihre Unterstützung haben maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Den (ehemaligen) Mitgliedern der AG Simon, Kletzin und Pfeifer möchte ich meinen aufrichtigen Dank aussprechen. Ihr herausragendes Arbeitsklima, die lustigen Mittags- und Kaffeepausen haben nicht nur eine angenehme Atmosphäre geschaffen, sondern auch das wissenschaftliche Arbeiten zu einer bereichernden Erfahrung gemacht. Ihre stets hilfsbereite Art und das kollegiale Miteinander haben zu meiner persönlichen und fachlichen Entwicklung beigetragen. Ich bin ihnen von Herzen dankbar für die gemeinsame Zeit und die wertvollen Erfahrungen, die wir geteilt haben.

Ein besonderer Dank gebührt Vanessa Anstatt, die mich während des gesamten Prozesses bedingungslos unterstützt hat. Ihre Geduld, ihr Verständnis und ihre ständige Präsenz waren von unschätzbarem Wert. Ihre liebevolle Unterstützung hat mich durch Höhen und Tiefen getragen und mir die nötige Stärke gegeben, um diese Arbeit erfolgreich abzuschließen.

Abschließend möchte ich meiner Familie und meinen Eltern meine aufrichtige Dankbarkeit ausdrücken. Ohne ihre bedingungslose Unterstützung und Ermutigung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Ihr habt mich stets ermutigt, an mich geglaubt und mich in jeder Phase meines akademischen Weges unterstützt. Von ganzem Herzen danke ich euch dafür, dass ihr immer für mich da wart und mich auf meinem Weg begleitet habt.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe.

Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht. Die eingereichte elektronische Version stimmt mit der schriftlichen Version überein.

Darmstadt, 1. Februar 2024

.....

Dennis Wilkens