

**Untersuchungen zur Physiologie und
Energiekonservierung im acetogenen
Bakterium
Eubacterium callanderi KIST612**

**Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften**

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Dennis Litty
aus Landau in der Pfalz

Frankfurt (2021)
(D30)

vom Fachbereich Biowissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Sven Klimpel
1. Gutachter: Prof. Dr. Volker Müller
2. Gutachter: Prof. Dr. Klaas Martinus Pos

Datum der Disputation:

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Die Gruppe der acetogenen Bakterien	1
1.1.1 <i>Eubacterium callanderi</i> KIST612	3
1.2 Biochemie des Wood-Ljungdahl-Weges	3
1.3 Prinzipien der Energiekonservierung in acetogenen Bakterien	7
1.4 ATP-Synthasen/ATPasen: Schlüsselenzyme der Energiekonservierung	11
1.4.1 Bakterielle F ₁ F ₀ -ATP-Synthasen	12
1.4.2 Vakuoläre V ₁ V ₀ -ATPasen	17
1.4.3 Archäelle A ₁ A ₀ -ATP-Synthasen	18
1.5 Zielsetzung der Arbeit	21
2 Material und Methoden	23
2.1 Organismen	23
2.2 Plasmide	23
2.3 Oligonukleotide	24
2.4 Nährmedien, Supplemente und Substrate	26
2.4.1 Präparation anaerober Nährmedien	27
2.4.2 Nährmedien zur Anzucht von <i>E. callanderi</i>	28
2.4.3 Spurenelementlösung	29
2.4.4 Vitaminlösung	29
2.4.5 Substrate	30
2.4.6 Nährmedien zur Anzucht von <i>E. coli</i>	30
2.5 Kultivierung von Organismen	31
2.5.1 Anaerobe Zellanzucht von <i>E. callanderi</i> KIST612	31
2.5.2 Zellanzucht von <i>E. coli</i>	31
2.5.3 Bestimmung der optischen Dichte	31
2.5.4 Reinheitskontrollen	32
2.5.5 Stammhaltung	32
2.6 Analytische Bestimmung von Metaboliten	32
2.6.1 Enzymatische Bestimmung der Formiat- oder Glukosekonzentration	33
2.6.2 Gaschromatographische Bestimmung der Acetat-, Butyrat-, Ethanol- und Methanol-Konzentration	33

2.6.3	Gaschromatographische Bestimmung der H ₂ - oder CO-Konzentration	34
2.7	Bestimmung des pH-Wertes	34
2.8	Bestimmung der Na ⁺ - und K ⁺ -Konzentration	34
2.9	Techniken zum Arbeiten mit DNA	35
2.9.1	Molekularbiologische Standardmethoden	35
2.9.2	Agarosegel-Elektrophorese	36
2.10	Zellernte und Herstellung von gewaschenen Membranen aus <i>E. callanderi</i>	36
2.11	Produktion und Reinigung von Proteinen	37
2.11.1	Reinigung der A ₁ A ₀ -ATP Synthase aus <i>E. callanderi</i>	37
2.11.2	Reinigung des c-Rings aus der angereicherten A ₁ A ₀ -ATP-Synthase von <i>E. callanderi</i>	40
2.11.3	Produktion und Reinigung der F ₁ F ₀ -ATP-Synthase aus <i>A. woodii</i> in <i>E. coli</i> DK8	41
2.11.4	Produktion und Reinigung der F ₁ F ₀ -ATP-Synthase aus <i>E. coli</i>	41
2.11.5	Produktion und Reinigung der F ₁ F ₀ ATP Synthase aus <i>P. modestum</i> in <i>E. coli</i> DK8	41
2.11.6	Produktion und Reinigung einzelner Untereinheiten der A ₁ A ₀ -ATP-Synthase aus <i>E. callanderi</i> in <i>E. coli</i> DK8	43
2.12	Herstellung polyklonaler Antikörper	44
2.13	Messung der ATP Hydrolyse-Aktivität	44
2.13.1	Bestimmung der Abhängigkeit der ATP-Hydrolyse-Aktivität vom pH, der Temperatur und der Methanol-Konzentration	45
2.13.2	Messung der Na ⁺ -Abhängigkeit der ATP-Hydrolyse	45
2.13.3	Hemmung der ATP-Hydrolyse durch DCCD	46
2.14	Rekonstitution von ATP-Synthasen in Liposomen	47
2.14.1	Messung der ²² Na ⁺ -Translokation	48
2.14.2	Messung der H ⁺ -Translokation	49
2.15	Messung der ATP-Synthese-Aktivität	49
2.15.1	Messung des Einflusses von $\Delta\psi$, $\Delta pNa/\Delta pH$ oder $\Delta\tilde{\mu}Na^+/\Delta\tilde{\mu}H^+$ auf die ATP-Synthese	50
2.15.2	Messung der Na ⁺ -Abhängigkeit der ATP-Synthese	51
2.15.3	Hemmstoffexperimente der ATP-Synthese mit DCCD und Ionophoren	51
2.16	Verfahren zur Proteinbestimmung	52
2.16.1	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (1976)	52

2.16.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry (1951)	52
2.17 Verfahren zur Auftrennung von Proteinen mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese	53
2.17.1 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese	53
2.17.2 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese	54
2.18 Western Blot-Analyse zum Nachweis von Proteinen	55
2.19 Verfahren zur Proteinfärbung	55
2.19.1 Unspezifische Proteinfärbung mit Coomassie-Brilliant-Blau	56
2.19.2 Spezifische Färbung von Proteinen mit ATP-Hydrolyse-Aktivität	56
2.19.3 Markierung der c-Untereinheit mit NCD-4	56
2.20 Identifikation von Proteinen mittels LC-MS/MS und MALDI	57
2.21 Elektronenmikroskopische Untersuchungen	57
2.22 Chemikalien und Gase	57
3 Ergebnisse	58
3.1 Untersuchungen des Wachstums von <i>E. callanderi</i> KIST612	58
3.1.1 Wachstum und Produktbildung auf Glukose	58
3.1.2 Wachstum und Produktbildung auf Methanol	60
3.1.3 Wachstum und Produktbildung auf Formiat	63
3.1.4 Wachstum und Produktbildung auf CO oder H ₂ + CO ₂	64
3.2 Bioinformatische Analyse der A ₁ A ₀ -ATP-Synthase aus <i>E. callanderi</i> KIST612	67
3.3 Reinigung der A ₁ A ₀ -ATP-Synthase aus <i>E. callanderi</i>	69
3.3.1 Herstellung von gewaschenen Membranen	69
3.3.2 Solubilisierung der A ₁ A ₀ -ATP-Synthase	70
3.3.3 Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation	71
3.3.4 Anionenaustausch-Chromatographie an DEAE	73
3.3.5 Gelfiltration an Superose 6	74
3.3.6 Zusammenfassung der Reinigung der A ₁ A ₀ -ATP-Synthase	75
3.4 Produktion einzelner Untereinheiten der A ₁ A ₀ -ATP-Synthase aus <i>E. callanderi</i> und Generierung von Antikörpern	77
3.5 Identifizierung der Untereinheiten der A ₁ A ₀ -ATP-Synthase in der gereinigten Enzympräparation	81
3.6 Größenbestimmung der gereinigten A ₁ A ₀ -ATP-Synthase	84
3.7 Elektronenmikroskopische Aufnahmen der A ₁ A ₀ -ATP-Synthase	86
3.8 Biochemische Charakterisierung der A ₁ A ₀ -ATP-Synthase	87

3.8.1	Bestimmung des pH-Optimums	88
3.8.2	Bestimmung des Temperaturoptimums	88
3.8.3	Untersuchung des Einflusses von Methanol auf die ATP-Hydrolyse	89
3.8.4	Untersuchung der Na ⁺ -Abhängigkeit der ATP Hydrolyse-Aktivität	90
3.8.5	Hemmung der ATP-Hydrolyse-Aktivität durch DCCD	91
3.9	Nachweis des Na ⁺ -Transports der A ₁ A ₀ -ATP-Synthase in Proteoliposomen	94
3.10	Untersuchung des H ⁺ -Transports der A ₁ A ₀ -ATP-Synthase in Proteoliposomen	95
3.11	Nachweis der ATP-Synthese und energetische Charakterisierung der A ₁ A ₀ -ATP-Synthase aus <i>E. callanderi</i>	97
3.11.1	Nachweis der ΔμNa ⁺ -getriebenen ATP-Synthese	97
3.11.2	Nachweis der Na ⁺ -Abhängigkeit der ATP-Synthese	99
3.11.3	Hemmung der ATP-Synthese-Aktivität durch DCCD	101
3.11.4	Untersuchung des Einflusses von ΔpNa ⁻ , Δψ- oder Δ $\tilde{\mu}$ Na ⁺ auf die ATP-Synthese	102
3.12	Heterologe Reinigung der F ₁ F ₀ -ATP-Synthasen von <i>A. woodii</i> , <i>E. coli</i> oder <i>P. modestum</i>	104
3.13	Untersuchung der ΔpNa/ΔpH-, Δψ- oder Δ $\tilde{\mu}$ Na ⁺ /Δ $\tilde{\mu}$ H ⁺ -getriebenen ATP-Synthese in den F ₁ F ₀ -ATP-Synthasen von <i>A. woodii</i> , <i>E. coli</i> und <i>P. modestum</i>	109
3.14	Reinigung und Charakterisierung des c-Rings aus <i>E. callanderi</i>	112
3.14.1	Isolierung des c-Rings	112
3.14.2	Größenbestimmung des c-Rings	113
3.14.3	Elektronenmikroskopische Aufnahmen des c-Rings	114
4	Diskussion	116
4.1	Die Butyratproduktion in <i>E. callanderi</i>	116
4.2	Die Rolle der A ₁ A ₀ -ATP-Synthase in der Na ⁺ -Bioenergetik von <i>E. callanderi</i>	121
4.3	Bioenergetische Konsequenzen einer A ₁ A ₀ -ATP-Synthase mit V-Typ c-Untereinheiten	123
4.4	Die Triebkräfte der ATP-Synthese	126
4.5	Anpassungen von ATP-Synthasen acetogener Bakterien an ein Leben am thermodynamischen Limit	130
5	Zusammenfassung	138
6	Literaturverzeichnis	141

Abkürzungsverzeichnis

ACMA	9-Amino-6-Chloro-2-Methoxyacridin
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Rinderserumalbumin
CHES	2-Cyclohexylaminoethansulfonsäure
CODH/ACS	CO-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthase
CoFeSP	Corrinoid-FeS-Protein
DDM	<i>n</i> -Dodecyl- β -D-Maltopyranosid
DCCD	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid
DEAE	Diethylaminoethyl
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
ETH 2120	N,N,N',N'-Tetracyclohexyl-1,2-phenylendioxydiacetamid
Ech-Komplex	Fd:H ⁺ Oxidoreduktase
FDH	Formiat-Dehydrogenase
Fd ²⁻	reduziertes Ferredoxin
FID	Flammenionisationsdetektor
HDCCR	wasserstoffabhängige CO ₂ -Reduktase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
IPGT	Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MTHFR	Methylen-THF-Reduktase
NCD-4	N-Cyclohexyl-N'-(4-(dimethylamino)naphthyl)carbodiimide
OD ₆₀₀	optische Dichte gemessen bei 600 nm
PEG	Polyethylenglykol
PHB	Polyhydroxybuttersäure
PFOR	Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase
pmf	protonenmotorische Kraft (engl.: <i>proton motive force</i>)
PMF	Peptide-Mass-Fingerprinting
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Rnf-Komplex	Fd:NAD ⁺ Oxidoreduktase
smf	natriumionenmotorische Kraft (engl.: <i>sodium motive force</i>)

TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TCS	3,3',4',5-Tetrachlorosalicylanilid
TCD	Wärmeleitfähigkeitsdetektor (engl.: <i>thermal conductivity detector</i>)
THF	Tetrahydrofolat
TMH	transmembrane α -Helix
WLW	Wood-Ljungdahl-Weg

1 Einleitung

1.1 Die Gruppe der acetogenen Bakterien

Die Gruppe der acetogenen Bakterien umfasst alle obligat anaeroben Bakterien, die den Wood-Ljungdahl-Weg (WLW) nutzen, um zwei Mol CO₂ zu einem Mol Acetyl-CoA zu reduzieren (Müller, 2003; Drake *et al.*, 2008; Ragsdale, 2008). Das zentrale Intermediat Acetyl-CoA wird dann zu Acetat, Ethanol, Butyrat oder 2,3-Butandiol reduziert. Obwohl Acetat das Hauptprodukt im Stoffwechselweg acetogener Bakterien ist, wird es nicht von allen Vertretern dieser Gruppe unter allen Wachstumsbedingungen gebildet (Drake, 1994; Schuchmann und Müller, 2016). Zudem sind auch andere Bakteriengruppen wie beispielsweise Essigsäurebakterien oder fermentierende Bakterien in der Lage, Acetat aus organischen Kohlenstoffverbindungen wie Alkoholen oder Zuckern zu bilden (Müller, 2008), weshalb die Fähigkeit zur Bildung von Acetat kein Alleinstellungsmerkmal von acetogenen Bakterien ist. Gleichwohl nehmen acetogene Bakterien eine bedeutende Rolle in ihrem jeweiligen Ökosystem sowie im anaeroben und globalen Kohlenstoffkreislauf ein (Drake *et al.*, 2006). Das im Stoffwechselweg der acetogenen Bakterien gebildete Acetat ist nicht nur die dominierende organische Verbindung in Böden (Tani *et al.*, 1993), sondern stellt auch ca. 10 % der weltweit in terrestrischen Böden auf biologischem Weg gebildeten Menge an Acetat dar (Wood, 1991; Drake *et al.*, 1997).

Erstmals beschrieben wurde die Acetogenese im Jahre 1932, als Mikroorganismen im Abwasserschlamm entdeckt wurden, die in der Lage waren, H₂ + CO₂ in Acetat umzuwandeln (Fischer *et al.*, 1932). Nur vier Jahre später konnte mit *Clostridium aceticum* das erste acetogene Bakterium isoliert werden, welches H₂ + CO₂ unter Bildung von Acetat gemäß Gl. 1 umsetzen konnte (Wierenga, 1936):



Weitere sechs Jahre nach der Isolierung von *C. aceticum* wurde mit *Moorella thermoacetica* (ehemals *Clostridium thermoaceticum*) der zweite acetogene Organismus isoliert (Fontaine *et al.*, 1942).

Dieser zeigte sich in der Lage, Glukose unter Bildung von Acetat gemäß Gl. 2 umzusetzen:



In der Folge wurden eine Vielzahl weiterer acetogener Bakterien aus unterschiedlichsten Habitaten isoliert wie beispielsweise *Acetobacterium woodii* aus Teichsedimenten (Balch *et al.*, 1977), *Clostridium ljungdahlii* aus Hühnerabfällen (Tanner *et al.*, 1993), *Clostridium formicoaceticum* aus Abwässern (Andreesen *et al.*, 1970) oder *Thermoanaerobacter kivui* aus Seesedimenten (Leigh *et al.*, 1981). Die Gruppe der acetogenen Bakterien umfasst heute mehr als 100 verschiedene Vertreter aus insgesamt 23 Gattungen, welche ubiquitär verbreitet sind und unterschiedlichste anaerobe Ökosysteme besiedeln können (Drake *et al.*, 2008).

Eine Besonderheit acetogener Bakterien ist ihre Fähigkeit, auf einer Reihe an unterschiedlichen Wachstumssubstraten zu wachsen sowie ihre hohe metabolische Produktvielfalt (Bengelsdorf *et al.*, 2016). Neben dem heterotrophen Wachstum auf C5- oder C6-Zuckern (Fontaine *et al.*, 1942; Andreesen *et al.*, 1970), Alkoholen (Bache und Pfennig, 1981; Eichler und Schink, 1984; Buschhorn, 1989; Kremp *et al.*, 2018), Methylgruppen (Traunecker *et al.*, 1991; Kreft und Schink, 1994; Kremp *et al.*, 2018; Lechtenfeld *et al.*, 2018), Aldehyden (Lux *et al.*, 1990) und Carbonsäuren (Weghoff *et al.*, 2015; Moon *et al.*, 2021), sind sie auch in der Lage, chemolithoautotroph mit Gasen wie CO₂, CO und H₂ zu wachsen (Müller, 2003; Drake *et al.*, 2008). Diese enorme metabolische Flexibilität begünstigt die Verbreitung und Besiedlung unterschiedlichster Lebensräume, wobei breite Spannen an Temperaturen, Salinitäten und pH-Werten toleriert werden können (Breznak, 1994, Balch *et al.*, 1977, Ollivier *et al.*, 1994). Die Fähigkeit acetogener Bakterien, Industrieabgase (H₂, CO₂ oder CO) oder günstige Rohstoffe wie Glycerin, Cellulose sowie Methanol und Formiat verwerten zu können, hat in den letzten Jahrzehnten zu einem zunehmenden Interesse zur Verwendung dieser als Biokatalysatoren für die biotechnologische Herstellung einer Reihe wertvoller Biokraftstoffe und Biowerkstoffe wie beispielsweise Ethanol, Butyrat, Butanol und 2-3-Butandiol geführt (Bengelsdorf *et al.*, 2018; Humphreys und Minton, 2018; Müller, 2019). Als vielversprechende Kandidaten zur biotechnologischen Produktion von Biokraftstoffen und Biowerkstoffen kommen

allerdings nur wenige acetogene Organismen in Frage, da mehr als 90 % aller bisher isolierten acetogenen Vertreter ausschließlich Acetat als einziges Produkt produzieren (Müller und Frerichs, 2013). Vielversprechende Kandidaten gehören dabei hauptsächlich den Vertretern der Gattungen *Clostridium* und *Eubacterium* an (Daniell *et al.*, 2012; Bengelsdorf *et al.*, 2016).

1.1.1 *Eubacterium callanderi* KIST612

Die Fähigkeit von acetogenen Bakterien, eine hohe Vielfalt von Substraten wie Industrieabgase (Syngas), Methanol, Formiat und CO zu verwerten, hat in den letzten Jahrzehnten zu einem zunehmenden Interesse zur Verwendung dieser als industrielle Plattform für die Produktion einer Vielzahl von Biokraftstoffen und Biowerkstoffen geführt (Bengelsdorf *et al.*, 2018; Müller, 2019). Ein besonders vielversprechender Kandidat zur biotechnologischen Nutzung als Produktionsplattform ist das Gram-positive, stäbchenförmige, mesophile acetogene Bakterium *Eubacterium callanderi* KIST612. Dieses wurde während der Anreicherung CO-konsumierender acetogener Bakterien aus einem industriellen anaeroben Fermenter isoliert (Chang *et al.*, 1997) und zeigte sich in Fermentationen mit CO in der Lage, neben Acetat auch Butyrat zu produzieren. Butyrat ist dabei von besonderem biotechnologischem Interesse, da es u. a. für die Herstellung von Biokunststoffen auf Cellulose-Basis wie z. B. Cellulose-Acetat-Butyrat-Polymere sowie als Butyrat-Ester zur Herstellung von Aromastoffen in der Lebensmittelindustrie verwendet wird und zusätzlich Ausgangsprodukt für den Biokraftstoff Butanol ist (Dürre, 2007; Dwidar *et al.*, 2012). Die Fähigkeit, Industrieabgase zu metabolisieren und dabei als einer der wenigen acetogenen Bakterien überhaupt in der Lage zu sein, Butyrat zu produzieren (Chang *et al.*, 2001), macht *E. callanderi* KIST612 daher besonders interessant für biotechnologische Anwendungen.

1.2 Biochemie des Wood-Ljungdahl-Weges

Der Wood-Ljungdahl-Weg dient bei acetogenen Bakterien nicht nur der Reduktion von CO₂ zu Acetyl-CoA, sondern spielt zudem eine wichtige Rolle bei der Energiekonservierung und bei der Assimilation von CO₂ in Zellkohlenstoff zur Bildung von Biomasse (Müller, 2003; Drake *et al.*, 2008). Der Stoffwechselweg, welcher als einer der ursprünglichsten Wege der Energiekonservierung gilt (Lane und Martin,

2012; Martin, 2012), wird jedoch nicht ausschließlich von acetogenen Bakterien genutzt, sondern kann zusätzlich auch in methanogenen Archaeen und Sulfatreduzierern gefunden werden (Stupperich *et al.*, 1983; Spormann und Thauer, 1988; Schauder *et al.*, 1989; Ljungdahl, 1994). Der WLW spielt im heterotrophen wie im autotrophen Stoffwechsel von acetogenen Bakterien eine zentrale Rolle. Während des heterotrophen Wachstums von acetogenen Bakterien mit C6-Zuckern als Energie- und Kohlenstoffquelle ist die Glykolyse durch die Umwandlung von Pyruvat in Acetyl-CoA über eine Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (PFOR) an den WLW gekoppelt (Schuchmann und Müller, 2016). Das bei dieser Reaktion entstehende CO₂ wird dann im WLW mit den bei der Glykolyse gebildeten Reduktionsäquivalenten reduziert, um ein weiteres Acetyl-CoA zu erzeugen. Daneben eignet sich der WLW gut für die Umwandlung anderer C1-Substrate wie CO (Diender *et al.*, 2015), Formiat oder Methanol (Cotton *et al.*, 2019), welche auf unterschiedlichen Wegen in den WLW gelangen (Abb. 1).

Der WLW ist ein verzweigter linearer Stoffwechselweg, der aus zwei zusammenlaufenden Reaktionszweigen besteht. Im Methyl-Zweig wird CO₂ in mehreren Reaktionen zu Methyl-Tetrahydrofolat (THF) umgewandelt. Dabei wird in einer ersten Reaktion ein Mol CO₂ zu Formiat reduziert. In den meisten acetogenen Bakterien wird diese Reaktion durch eine Formiat-Dehydrogenase (FDH) mit NADH oder NADPH als Elektronendonator katalysiert (Yamamoto *et al.*, 1983; Wang *et al.*, 2013; Maia *et al.*, 2015), während in *A. woodii* und *T. kivui* die Reaktion durch eine kürzlich entdeckte wasserstoffabhängige CO₂-Reduktase (HDCR) katalysiert wird, bei der die Elektronen direkt aus molekularem Wasserstoff gewonnen werden (Schuchmann und Müller, 2013; Schwarz *et al.*, 2018). In *E. callanderi* KIST612 wird die Reduktion von CO₂ zu Formiat durch eine FDH mit NADH als Elektronendonator katalysiert (Dietrich *et al.*, 2021). Formiat wird dann in einer durch ATP-Hydrolyse angetriebenen Reaktion an den C1-Träger THF gebunden, wobei Formyl-THF entsteht (Himes und Harmony, 1973; Lovell *et al.*, 1988). Nachdem Wasser in einer anschließenden Reaktion von Formyl-THF abgespalten wird, wird die enzymgebundene Methenylgruppe schrittweise zu einer Methylgruppe reduziert. In einem ersten Reduktionsschritt wird Methenyl-THF durch eine Methenyl-THF-Cyclohydrolase zu Methenyl-THF reduziert. Der Elektronendonator für diese Reaktion

ist entweder NADH oder NADPH (O'Brien *et al.*, 1973; Moore *et al.*, 1974; Ragsdale und Ljungdahl, 1984). In einem zweiten Reduktionsschritt wird die THF-gebundene Methenylgruppe über Methylen-THF zu Methyl-THF reduziert. Der Elektronendonator für den zweiten Reduktionsschritt, der von einer Methylen-THF-Reduktase (MTHFR) katalysiert wird, ist bei verschiedenen acetogenen Bakterien unterschiedlich. Generell lassen sich die Methylen-THF-Reduktasen von acetogenen Bakterien in vier unterschiedliche Klassen einteilen (Öppinger *et al.*, 2021). Die einfachste Form ist vom Typ I und besteht nur aus MetF, welches die irreversible Reduktion von Methylen-THF mit NADH oder NADPH als Elektronendonator katalysiert. Dieser Typ kommt beispielsweise in *Blautia producta* vor (Wohlfarth *et al.*, 1990). Typ II, welcher u. a. in *E. callanderi* KIST612 (Dietrich *et al.*, 2021) oder *C. aceticum* (Wiechmann und Müller, 2021) aufzufinden ist, besteht aus MetF und einer zusätzlichen, FeS und Zink enthaltenden MetV-Untereinheit. Dieser Typ nutzt dabei reduziertes Ferredoxin als Elektronendonator. Die MTHFR vom Typ III besteht aus den Untereinheiten MetV, MetF und einer RnfC-ähnlichen Untereinheit (RnfC2), welche die NADH-Bindestelle aufweist. Dieser Typ ist beispielsweise in *A. woodii* vorzufinden und verwendet NADH als Elektronendonator (Bertsch *et al.*, 2015). Der Aufbau von Methylen-THF-Reduktasen des Typs IV ist am komplexesten. Dabei bilden die Untereinheiten MetV und MetF einen Komplex mit den Heterodisulfid-ähnlichen Untereinheiten HdrCBA und einer Methylviologen-reduzierenden Hydrogenase-ähnlichen Untereinheit MvhD. Es wird angenommen, dass Enzymkomplexe dieses Typs NADH als Elektronendonator für die gleichzeitige Reduktion von Methylen-THF und einem zweiten, noch unbekanntem Elektronenakzeptor verwenden. Diese Klasse an MTFHR ist beispielsweise in *Sporomusa ovata* vorzufinden (Kremp *et al.*, 2020). Im letzten Schritt des Methylzweigs erfolgt die Übertragung der Methylgruppe von Methyl-THF auf ein Corrinoid-FeS-Protein (CoFeSP) durch eine Methyltransferase.

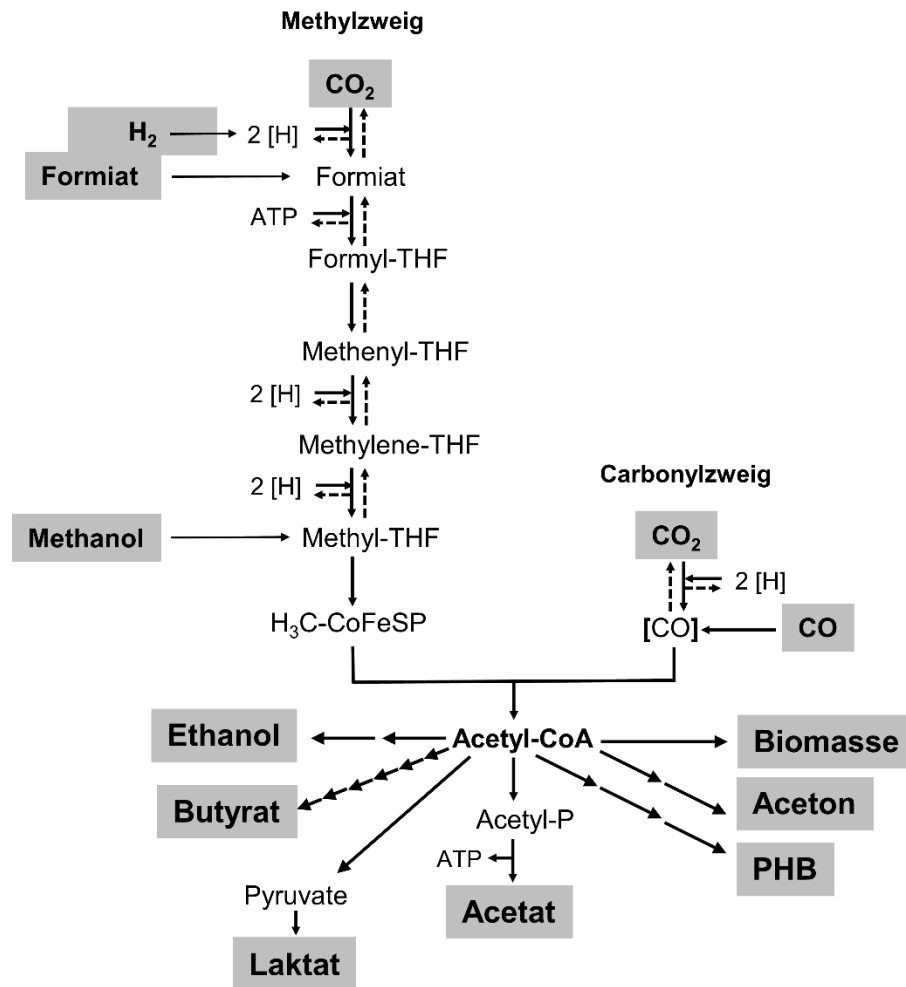


Abb. 1. Der Wood-Ljungdahl-Weg der CO₂-Reduktion. Im WLW werden zwei Moleküle CO₂ zum zentralen Zwischenprodukt Acetyl-CoA reduziert. Die Eintrittspunkte für andere C1-Substrate sind angegeben. Das zentrale Intermediat Acetyl-CoA ist der Vorläufer von Biomasse und einer Reihe von natürlichen Endprodukten. Die Stoffwechselwege, die von Acetyl-CoA zu den Endprodukten führen, sind mit Ausnahme des Wegs der Acetat-Bildung nicht vollständig und es fehlen Zwischenprodukte, Reduktionsäquivalente sowie erzeugtes ATP. CoFeSP, Corrinoid/Eisen-Schwefel-Protein; THF, Tetrahydrofolat; CoA, Coenzym A; [H], Reduktionsäquivalente; PHB, Polyhydroxybuttersäure.

Im Carbonylzweig des Wood-Ljungdahl-Weges wird ein weiteres Mol CO₂ durch die bifunktionale CODH/ACS in einer Ferredoxin-abhängigen Reaktion zu CO reduziert. In einer weiteren Teilreaktion des Enzymkomplexes wird die Methylgruppe von Methyl-THF mit CO und Coenzym A (CoA) zum zentralen Intermediat des WLW, Acetyl-CoA, kondensiert (Ragsdale und Wood, 1985; Wood *et al.*, 1986). Das gebildete Acetyl-CoA wird dann entweder in den anabolen Stoffwechsel geschleust, um die Zelle mit organischem Material für die Biomasseproduktion zu versorgen, oder unter den meisten Bedingungen zum Hauptprodukt Acetat umgewandelt (Schaupp und

Ljungdahl, 1974; Eden und Fuchs, 1982). Bei der Bildung von Acetat wird Acetyl-CoA zunächst mit Hilfe einer Phosphotransacetylase zu Acetyl-Phosphat umgesetzt, welches dann in einer zweiten, ATP-generierenden Reaktion zu Acetat umgewandelt wird. Insgesamt ist die Energiebilanz des WLW ausgeglichen: Zwar wird bei der Acetatkinase-Reaktion mittels Substratkettenphosphorylierung ein Mol ATP gewonnen. Allerdings wird im Methylzweig bei der Aktivierung von Formiat zu Formyl-THF auch ein Mol ATP investiert, weshalb der Nettogewinn an ATP insgesamt gleich Null ist (Müller, 2003; Schuchmann und Müller, 2014). Aus diesem Grund stellt sich die Frage, wie acetogene Bakterien Energie in Form von ATP konservieren. Dies wird im nächsten Kapitel näher beleuchtet.

1.3 Prinzipien der Energiekonservierung in acetogenen Bakterien

Alle lebenden Organismen benötigen ständig chemische Energie für drei zentrale zelluläre Prozesse: 1. chemische Arbeit (ATP), 2. mechanische Arbeit (Beweglichkeit) und 3. osmotische Arbeit (Stofftransport) (Müller und Grüber, 2003; von Ballmoos *et al.*, 2009). Zur Bereitstellung dieser Energie nutzen Organismen insgesamt zwei zentrale Energiewährungen: Zum einen den transmembranen, elektrochemischen Ionengradienten $\tilde{\mu}_{\text{Ion}}$ (Mitchell, 1966; Weber und Senior, 2003) und zum anderen den universellen Energieträger ATP (Lipmann, 1941). Dabei können beide Energiewährungen mit Hilfe der ATP-Synthase ineinander umgewandelt werden (Mitchell, 1966; Senior, 1988; Cross und Müller, 2004). Die Synthese von ATP kann grundsätzlich über zwei verschiedene Mechanismen erfolgen. Auf direktem Wege erfolgt dies durch Übertragung einer Phosphorylgruppe auf Adenosindiphosphat (ADP) in einer gekoppelten chemischen Reaktion. Diese Form der Energiekonservierung wird auch Substratkettenphosphorylierung genannt. Um die Phosphorylierung von ADP über einen direkten Kopplungsmechanismus energetisch zu ermöglichen, muss eine Reaktion ein Phosphorylgruppentransferpotential aufweisen, welches negativer als $-31,8 \text{ kJ/mol}$ ist (Thauer *et al.*, 1977). In der Natur sind nur wenige Enzyme bekannt, welche eine solche stark exergone Reaktion katalysieren und die direkte Phosphorylierung von ADP ermöglichen (Tab. 1) (Thauer *et al.*, 1977; Teague und Dobson, 1999; Mayer und Müller, 2013a; Müller und Hess, 2017). Bei acetogenen Bakterien spielt vor allem die Acetatkinase-Reaktion eine wichtige Rolle bei der Energiegewinnung mittels Substratkettenphosphorylierung.

Daneben führt bei Butyrat-produzierenden acetogenen Organismen ebenfalls die Butyratkinase-Reaktion zur Erzeugung von ATP.

Tab. 1. Enzyme, die energetisch die direkte Phosphorylierung von ADP ermöglichen.

Enzym	Reaktion	ΔG° (kJ/mol)
Acetatkinase	Acetylphosphat + H ₂ O → Acetate + P _i	- 44,8
Argininkinase	Argininphosphat + H ₂ O → Arginin + P _i	- 45
Butyratkinase	Butyrylphosphat + H ₂ O → Butyrat + P _i	- 35,6
Carbamatkinase	Carbamylphosphat + H ₂ O → Carbamat + P _i	- 39,3
Kreatinkinase	Kreatinphosphat + H ₂ O → Kreatin + P _i	- 43,3
Phosphoglyceratkinase	1,3-Bisphosphoglycerat + H ₂ O → Phosphoglycerat + P _i	- 51,9
Pyruvatkinase	Phosphoenolpyruvat + H ₂ O → Pyruvat + P _i	- 51,6

Eine Strategie acetogener Bakterien zur Erhöhung der ATP-Ausbeute durch Substratkettenphosphorylierung ist die modulartige Kopplung des WLW mit anderen Stoffwechselwegen (Schuchmann und Müller, 2016). Voraussetzung dafür ist, dass das zusätzliche Stoffwechselmodul mit dem WLW kompatibel ist und dass das gesamte Redox-Gleichgewicht erhalten bleibt. Ein bekanntes Beispiel dafür ist die Kopplung der Glykolyse an den WLW (Ragsdale und Pierce, 2008). Dabei entstehen bei der Oxidation von Glukose durch die Glykolyse zwei Pyruvat, wobei durch Substratkettenphosphorylierung zwei ATP generiert und zwei NADH gebildet werden. Das gebildete Pyruvat wird anschließend mit Hilfe der PFOR zu Acetyl-CoA und CO₂ decarboxyliert. Dabei wird zusätzlich reduziertes Ferredoxin bereitgestellt. Bei der Acetogenese wird das bei der PFOR-Reaktion entstandene CO₂ im WLW mit den bei der Glykolyse gebildeten Reduktionsäquivalenten reduziert, um ein weiteres Mol Acetyl-CoA zu erzeugen. Insgesamt werden so aus einem Mol Glukose drei Mol Acetat und 4 Mol ATP durch Substratkettenphosphorylierung gebildet. Dies ist die höchste ATP-Ausbeute, welche durch Substratkettenphosphorylierung in acetogenen Bakterien erreicht werden kann (Müller *et al.*, 2001; Schuchmann und Müller, 2016). Weitere Beispiele zur Erhöhung der ATP-Ausbeute in acetogenen Bakterien sind die modulartige Kopplung des WLW mit dem Lactat-Stoffwechsel (Weghoff *et al.*, 2015) oder dem Ethanol-Stoffwechsel (Bertsch *et al.*, 2016). Die Kompatibilität des WLW mit zusätzlichen Stoffwechselmodulen ebnet den Weg zur Überlebensfähigkeit in vielen

ökologischen Lebensräumen. Allerdings reicht unter autotrophen Wachstumsbedingungen die alleinige Substratkettenphosphorylierung, wie im vorherigen Kapitel bereits erläutert, nicht aus, um das Überleben zu sichern. Aus diesem Grund ist ein weiterer, indirekter Kopplungsmechanismus zur Energiekonservierung notwendig: die chemiosmotische Kopplung (Mitchell, 1961). Bei dieser Form der Energiekonservierung werden zunächst Ionen (H^+ oder Na^+) mit Hilfe eines membranständigen Proteinkomplexes durch die Membran transloziert, wodurch ein elektrochemischer Ionengradient ($\Delta\tilde{\mu}_{ion}$) entsteht. Der aufgebaute Gradient kann dann von der ATP-Synthase genutzt werden, um die Synthese von ATP anzutreiben (Gl. 3):



Die ATP-Synthese ist demnach eine endergone Reaktion. Das für die Reaktion als Triebkraft benötigte elektrochemische Ionenpotential $\Delta\tilde{\mu}_{ion}$ wird entsprechend des genutzten Kopplungsions auch als protonenmotorische Kraft (engl.: *proton motive force*, *pmf*) bzw. natriumionenmotorische Kraft (engl.: *sodium motive force*, *smf*) bezeichnet und setzt sich aus einem chemischen Gradienten ($\Delta pH/\Delta pNa$) und dem elektrischen Feld ($\Delta\psi$) zusammen (Gl. 4 + 5).

$$\Delta\tilde{\mu}_{H^+} = pmf = \Delta\psi - \frac{2,3 \cdot RT}{F} \cdot \Delta pH \quad (\text{Gl. 4})$$

$$\Delta\tilde{\mu}_{Na^+} = smf = \Delta\psi - \frac{2,3 \cdot RT}{F} \cdot \Delta pNa \quad (\text{Gl. 5})$$

mit $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ = elektrochemischer Protonengradient (V), $\Delta\tilde{\mu}_{Na^+}$ = elektrochemischer Na^+ -Gradient (V), *pmf* = protonenmotorische Kraft, *smf* = natriumionenmotorische Kraft, $\Delta\psi$ = elektrisches Feld (V), R = allgemeine Gaskonstante = $8,3145 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$, T = Temperatur (in Kelvin) = $303,15 \text{ K}$ bei $30 \text{ }^\circ\text{C}$, F = Faraday-Konstante = $96,485 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1} \text{ V}^{-1}$, ΔpH bzw. ΔNa = Konzentrationsdifferenz an H^+ bzw. Na^+ zwischen den Membrankompartimenten.

Acetogene Bakterien nutzen im Wesentlichen zwei unterschiedliche ionentranslozierende Membranproteinkomplexe und haben entweder eine $Fd:NAD^+$ Oxidoreduktase (Rnf-Komplex) (Biegel und Müller, 2010) oder eine $Fd:H^+$ Oxidoreduktase (Ech-Komplex) (Schölmerich und Müller, 2019). In beiden Fällen dient

reduziertes Ferredoxin als Elektronendonator (Schuchmann und Müller, 2014). Während der Rnf-Komplex reduziertes Ferredoxin ($E^{\circ'} = 450 - 500 \text{ mV}$) zur Reduktion von NAD^+ ($E^{\circ'} = -414 \text{ mV}$) nutzt (Hess *et al.*, 2013; Schuchmann und Müller, 2014), katalysiert der Ech-Komplex den exergonen Elektronentransfer von reduziertem Ferredoxin typischerweise auf Protonen ($E^{\circ'} = -414 \text{ mV}$), wodurch diese zu H_2 reduziert werden (Tersteegen und Hedderich, 1999; Hedderich und Forzi, 2005). Die freiwerdende Energie der exergonen Reaktionen kann jeweils genutzt werden, um einen Ionengradienten entlang der Cytoplasmamembran aufzubauen. In beiden Fällen kann der Ionengradient entweder ein H^+ - oder ein Na^+ - Gradient sein. Die Energie, die erforderlich ist, um ein Ion über die Membran zu transportieren, kann über folgende Gleichung (Gl. 6) bestimmt werden:

$$\Delta G = - n \cdot F \cdot \Delta \tilde{\mu}_{\text{Ion}} \quad (\text{Gl.6})$$

mit ΔG = Änderung der freien Gibbs-Energie, n = die Anzahl der translozierten Ionen, F = Faraday-Konstante und $\Delta \tilde{\mu}_{\text{Ion}}$ = elektrochemischer Ionengradient. Demnach führt ein niedriges $\Delta \tilde{\mu}_{\text{Ion}}$ zu einem niedrigeren ΔG , welches für die Translokation von einem Ion erforderlich ist. Unter physiologischen Bedingungen liegt das elektrochemische Potential meist zwischen -150 bis -220 mV (Thauer *et al.*, 1977; Schink, 1997; Hess *et al.*, 2013; Mayer und Müller, 2013a; Müller und Hess, 2017). Die freiwerdende Energie für die Translokation eines Ions müsste somit zwischen $-14,5$ und $-21,2 \text{ kJ/mol}$ liegen. Wie bereits erwähnt, wird der erzeugte Gradient von der ATP-Synthase genutzt, um die ATP-Synthese anzutreiben. Die für die Synthese von ATP benötigte Energie wird dabei durch das Phosphorylierungspotential ΔG_{P} in der Zelle bestimmt (Gl. 7):

$$\Delta G_{\text{P}} = - n \cdot F \cdot \Delta \tilde{\mu}_{\text{Ion}} \quad (\text{Gl.7})$$

mit ΔG_{P} = Phosphorylierungspotential, n = Ionen/ATP-Verhältnis, F = Faraday-Konstante und $\Delta \tilde{\mu}_{\text{Ion}}$ = elektrochemischer Ionengradient. Unter Standardbedingungen beträgt das Phosphorylierungspotential $31,8 \text{ kJ/mol}$. Im Gegensatz dazu wird unter zellulären Bedingungen üblicherweise von einem Wert zwischen $50 - 60 \text{ kJ/mol}$ ausgegangen, welcher sich durch die bisher gemessenen Membranpotentiale von -150 bis -220 mV und der Annahme von 3 bis 5 translozierenden Ionen ergibt (Müller, 2003; Müller und Hess, 2017). Allerdings wurde das

Phosphorylierungspotential unter zellulären Bedingungen bislang nur für wenige Organismen bestimmt. Dabei konnte nur bei Mitochondrien aus Leberzellen einer Ratte während der aeroben Succinat-Atmung ein ΔG_P von 64 kJ/mol ermittelt werden (Slater *et al.*, 1973). In Bakterien und Eukaryoten waren die ermittelten Potentiale deutlich niedriger (*Streptococcus lactis* (46,6 kJ/mol ATP; Zellsuspensionsexperimente mit ruhenden Zellen während der Oxidation von Glukose (Maloney, 1983)), *E. coli* (48 kJ/mol ATP; Zellsuspensionsexperimente mit ruhenden Zellen und wachsenden Zellen während der Oxidation von Glycerin (Kashket, 1982)) und *Saccharomyces cerevisiae* (50 kJ/mol ATP, Zellsuspensionsexperimente mit ruhenden Zellen während der Oxidation von Glukose (Wallace *et al.*, 1994)). Für das acetogene Bakterium *A. woodii* konnte ebenfalls das intrazelluläre Phosphorylierungspotential bestimmt werden (Spahn *et al.*, 2015). Dieses liegt mit $30,2 \pm 0,9$ kJ/mol während der Acetogenese aus CO, $32,1 \pm 0,3$ kJ/mol während der Acetogenese aus $H_2 + CO_2$ und $37,9 \pm 1,3$ kJ/mol während der Acetogenese aus Fruktose deutlich unter allen bisherigen experimentell bestimmten Potentialen.

1.4 ATP-Synthasen/ATPasen: Schlüsselenzyme der Energiekonservierung

ATP-Synthasen sind zentraler Bestandteil des Energiestoffwechsels in allen lebenden Zellen (Cross und Müller, 2004). In Abhängigkeit von strukturellen und funktionellen Merkmalen lassen sich ATP-Synthasen/ATPasen in drei verschiedene Klassen einteilen: F_1F_0 -ATP-Synthasen, V_1V_0 -ATPasen und A_1A_0 -ATP-Synthasen. Alle drei Klassen stammen von einem gemeinsamen Vorläufer ab und weisen daher eine ähnliche Grundstruktur auf (Cross und Taiz, 1990; Nelson, 1992b; Cross und Müller, 2004; Müller *et al.*, 2005). Sie bestehen aus einer hydrophilen Kopf-Domäne (F_1 , V_1 , A_1), welche Nukleotide und Phosphat bindet sowie die ATP-Synthese bzw. ATP-Hydrolyse katalysiert und einer membranständigen, ionengetriebenen Domäne (F_0 , V_0 , A_0 ; Abb. 2). Die beiden Teile sind über einen zentralen Stiel und ein bis drei periphere Stiele miteinander verbunden (Boyer, 1997; Müller und Grüber, 2003). Die Stiele dienen ausschließlich der funktionellen Kopplung der beiden Domänen und weisen selbst keine katalytische Aktivität auf (Grüber *et al.*, 2001a).

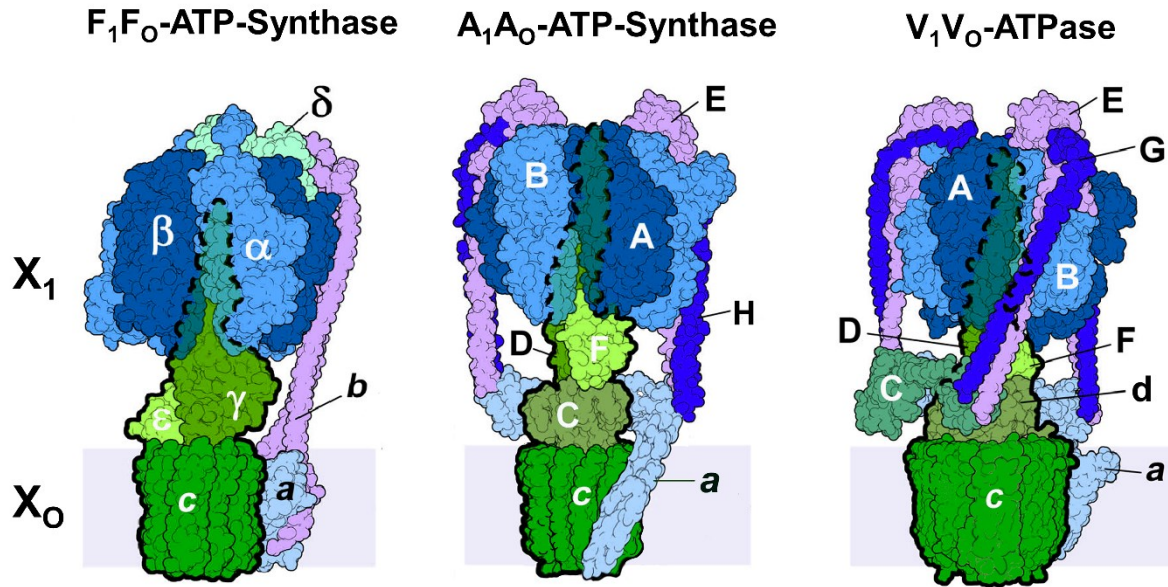


Abb. 2. Schematische Darstellung der drei Klassen von ATP-Synthasen/ATPasen. F₁F_o-ATP-Synthasen bestehen in ihrer einfachsten Form aus 8, A₁A_o-ATP-Synthasen aus 9 und V₁V_o-ATPasen aus 10 Untereinheiten. Alle drei Klassen bestehen aus einer hydrophilen X₁-Domäne (A₁, V₁ oder F₁) und einer membranständigen Rotordomäne X_o (A_o, V_o oder F_o). Untereinheiten mit ähnlicher Struktur bzw. Funktion sind mit den gleichen Farben dargestellt. Modifiziert nach Zubareva *et al.* (2020).

Bei der ATP-Hydrolyse katalysiert die hydrophile Kopfdomäne die exergone Spaltung von ATP zu ADP und P_i (Boyer, 1997; Capaldi und Aggeler, 2002). Durch Rotationsbewegung des zentralen Stiels wird die erzeugte Energie auf die membrangebundene Rotordomäne übertragen, was zur Ionentranslokation und zum Aufbau eines elektrochemischen Gradienten führt (Yoshida *et al.*, 2001; Junge *et al.*, 2009). In umgekehrter Reihenfolge wird bei der ATP-Synthese die Energie des Gradienten über die Rotation des c-Rings in der Kopfdomäne genutzt, um ATP zu synthetisieren (von Ballmoos *et al.*, 2009). Während die ATP-Hydrolyse von allen drei Klassen katalysiert werden kann, sind *in vivo* nur F₁F_o-ATP-Synthasen und A₁A_o-ATP-Synthasen zur ATP-Synthese befähigt (Kane, 2006; Forgac, 2007).

1.4.1 Bakterielle F₁F_o-ATP-Synthasen

Zu der am besten untersuchten Klasse gehören die F₁F_o-ATP-Synthasen, welche hauptsächlich in Bakterien, Chloroplasten und Mitochondrien, vereinzelt aber auch in Archaeen zu finden sind. Während F₁F_o-ATP-Synthasen aus Chloroplasten und Mitochondrien *in vivo* nur ATP-Synthese betreiben, katalysieren bakterielle F₁F_o-ATP-Synthasen in Abhängigkeit der Wachstumsbedingung sowohl ATP-Synthese als auch

ATP-Hydrolyse (Boyer, 1997; Capaldi und Aggeler, 2002). Die bakterielle F_1F_0 -ATP-Synthase ist strukturell am einfachsten aufgebaut und besteht in ihrer einfachsten Form aus acht Untereinheiten mit einer Stöchiometrie von $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon ab_2c_8 - 15$. Die cytoplasmatische F_1 -Domäne besteht aus einem alternierenden $\alpha_3\beta_3$ -Hexamer, einem zentralen Stiel, der aus den Untereinheiten γ und ϵ gebildet wird und der δ -Untereinheit (Wilkins und Capaldi, 1992; Wilkins und Capaldi, 1998). Die Achse des Stiels bildet dabei die γ -Untereinheit, welche in den zentralen Hohlraum des Hexamers ragt. Diese bildet mit der ϵ -Untereinheit einen stabilen Komplex, welcher nicht-kovalent mit dem membrangebundenen c -Ring interagiert. Die δ -Untereinheit ist über dem $\alpha_3\beta_3$ -Hexamer lokalisiert und verbindet dieses mit dem peripheren Stiel (Weber, 2007). Die katalytischen Nukleotid-Bindestellen befinden sich in den in den β -Untereinheiten an den Interaktionsflächen zu den α -Untereinheiten (von Ballmoos *et al.*, 2008). Zusätzlich enthält jede α -Untereinheit eine nicht-katalytische Nukleotid-Bindestelle. Diese können ATP sowie andere Purinnukleotide binden und sind höchstwahrscheinlich an der Regulation der Enzymaktivität beteiligt. Die Synthese und Hydrolyse von ATP findet an den Grenzflächen der α - und β -Untereinheiten statt. Durch Interaktionen der γ -Untereinheit mit jeder der β -Untereinheiten wird eine Asymmetrie innerhalb der $\alpha_3\beta_3$ -Hexamer bedingt, welche die Nukleotid-Bindestellen jeder β -Untereinheiten in einen unterschiedlichen Zustand versetzt (Boyer, 1993; Abrahams *et al.*, 1994). Dabei durchlaufen die drei β -Untereinheiten bei einer 360° -Rotation der γ -Untereinheit drei Konformationszustände: offen (engl.: *open*), fest (engl.: *tight*) und lose (engl.: *loose*). In der offenen Konformation bindet je nach Katalyserichtung ADP und P_i oder ATP an die erste Bindetasche. Nach der Bindung kommt es zu einer Rotation der γ -Untereinheit um 120° , wodurch die Nukleotide festgebunden werden (feste Konformation). Nachdem ATP synthetisiert oder hydrolysiert wurde, kommt es durch erneute Rotation des zentralen Stiels um 120° zu einem Übergang in die lose Konformation, bei der das gebundene Nukleotid entlassen wird. Insgesamt werden bei einer 360° -Rotation drei ATP synthetisiert bzw. hydrolysiert (Boyer, 1989; Yoshida *et al.*, 2001; Nakanishi-Matsui *et al.*, 2010). Dieser Bindungswechsel-Mechanismus verläuft in allen drei Klassen von ATP-Synthasen/ATPasen nach dem gleichen Prinzip.

Die membranständige F_0 -Domäne besteht aus einem c -Ring, welcher mit einer a -Untereinheit interagiert und einem Dimer aus zwei b -Untereinheiten (von Ballmoos *et al.*, 2009). Die b -Untereinheiten bestehen aus einem membrangebundenen Teil, welche mit der a -Untereinheit und dem c -Ring interagieren, und einem löslichen Teil, welcher als peripher Stiel mit der δ -Untereinheit interagiert (Greie *et al.*, 2000). Die Funktion des peripheren Stiels ist es, eine Leerlaufdrehung des katalytischen $\alpha_3\beta_3$ -Hexamers bei Rotation des c -Rings zu verhindern. Der membrangebundene Rotor besteht aus 8 bis 17 c -Untereinheiten (Pogoryelov *et al.*, 2009; Watt *et al.*, 2010; Schulz *et al.*, 2017; Kühlbrandt, 2019). In F_1F_0 -ATP-Synthasen besteht eine c -Untereinheit typischerweise aus zwei transmembranen α -Helices (TMH). Diese sind über eine hydrophile Schleife miteinander verbunden, welche mit den anderen c -Untereinheiten des Rotors interagiert. Die c -Untereinheiten von F_1F_0 -ATP-Synthasen enthalten in der Mitte der zweiten TMH entweder ein konserviertes Glutamat oder Aspartat, welches essentiell für die Ionenbindung ist. Eine Ausnahme stellt der heteromere c -Ring aus *A. woodii* dar, welcher aus 9 c -Untereinheiten mit zwei TMH's und einer Ionenbindestelle und einer c -Untereinheit aus 4 TMH's mit nur einer Ionenbindestelle besteht (Matthies *et al.*, 2014). Die meisten F_1F_0 -ATP-Synthasen nutzen Protonen als Kopplungionen; einige anaerobe Bakterien wie *A. woodii*, *Clostridium paradoxum*, *Propiogenium modestum* oder *Ilyobacter tartaricus* dagegen Natriumionen (Laubinger und Dimroth, 1988; Neumann *et al.*, 1998; Fritz und Müller, 2007). Im Falle von Na^+ -abhängigen F_1F_0 -ATP-Synthasen erfolgt die Koordination des Na^+ an drei konservierten Aminosäuren (Q...ES/T), welche das Na^+ -Bindemotiv darstellen, und weiteren nicht konservierten Aminosäuren (meist A, Y, V), welche für die Stabilisierung der Na^+ -Bindetasche essentiell sind (Abb. 3) (Dimroth *et al.*, 1992; Rahlfs und Müller, 1997; Müller *et al.*, 2001; Murata *et al.*, 2005; Meier *et al.*, 2009). In F-Typ c -Untereinheiten befindet sich das konservierte Glutamin des Na^+ -Bindemotivs in der ersten TMH, während das Glutamat und das Serin/Threonin in der zweiten TMH zu finden sind. Im Falle von H^+ -abhängigen F_1F_0 -ATP-Synthasen erfolgt die Koordination des Protons zwischen dem Carboxylsauerstoff des konservierten Carboxylats und der Carbonylgruppe einer nicht konservierten Aminosäure (meist F) (Pogoryelov *et al.*, 2009). Im Vergleich zur Na^+ -Bindetasche ist der Abstand zwischen den an der Komplexierung von Protonen beteiligten Aminosäuren der H^+ -Bindetasche

deutlich geringer, wodurch H^+ -abhängige F_1F_0 -ATP-Synthasen keine Natriumionen komplexieren können.

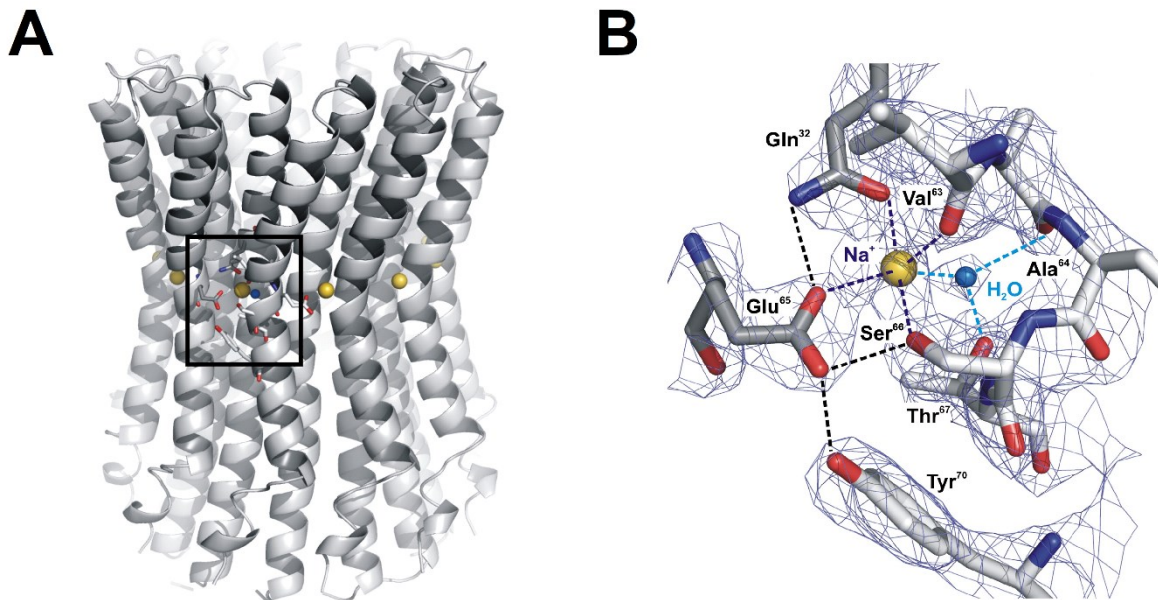


Abb. 3. Die Na^+ -Bindestelle im c_{11} -Ring der F_1F_0 -ATP-Synthase aus *I. tartaricus*. (A) Der c -Ring setzt sich zusammen aus 11 c -Untereinheiten bestehend aus jeweils zwei TMH's und einer konservierten Na^+ -Bindestelle. Die Koordination von Na^+ erfolgt zwischen zwei c -Untereinheiten. (B) Die an der Na^+ -Koordination beteiligten Aminosäuren sind dargestellt. Neben dem konservierten Glutamin in TMH 1 sowie dem konservierten Serin und Threonin in TMH 2 sind weitere Aminosäuren an der Stabilisierung der Na^+ -Bindetasche beteiligt. Nach Meier *et al.* (2009).

Unabhängig der Ionenspezifität sind die konservierten Ionenbindestellen immer an den Außenflächen des c -Rings, die in Richtung der Doppellipidschicht zeigen, angeordnet (Pogoryelov *et al.*, 2007; Pogoryelov *et al.*, 2010). Diese Anordnung ermöglicht es, dass die Translokation von Ionen nur an der Grenzfläche zwischen der c - und der a -Untereinheit stattfindet. Die a -Untereinheit, welche aus fünf TMH's besteht (Long *et al.*, 1998; Wada *et al.*, 1999), bildet zwei wässrige Halbkanäle, die sich an den gegenüberliegenden Seiten der Membran öffnen (Pogoryelov *et al.*, 2009). Diese sind durch einen konservierten Arginin-Rest getrennt, welcher sich an der ac -Grenzfläche befindet (Valiyaveetil und Fillingame, 1997). Es wird angenommen, dass das konservierte Arginin als Barriere fungiert, welches die beiden Halbkanäle trennt und sicherstellt, dass nur c -Untereinheiten mit negativ geladenem Glutamat/Aspartat von einer Kanalhälfte zur anderen gelangen können (Pogoryelov *et al.*, 2009; Matthies *et al.*, 2014; Hahn *et al.*, 2018). Der Mechanismus der Ionentranslokation ist in allen ATP-

Synthasen/ATPasen konserviert (Pogoryelov *et al.*, 2009; Zhou und Sazanov, 2019) (Abb. 1). In Richtung der ATP-Synthese tritt ein Ion über den periplasmatischen Halbkanal in die *a*-Untereinheit ein, was zur Protonierung des konservierten Carboxylats der *c*-Untereinheit führt. Dies führt zu einer Konformationsänderung der Ionenbindestelle und zu einer Rotationsbewegung des *c*-Rings. Im zweiten Halbkanal, welcher in Richtung des Lumens geöffnet ist, wird das gebundene Ion abgegeben und das Carboxylat kehrt in seinen Ausgangszustand zurück. Die Rotationsbewegung des *c*-Rings führt zur Rotation des zentralen Stiels. Dabei wird die Rotationsenergie in die Kopfdomäne übertragen (Pogoryelov *et al.*, 2009; Mayer und Müller, 2013b). Die Ionentranslokation in Hydrolyse-Richtung erfolgt in umgekehrter Reihenfolge.

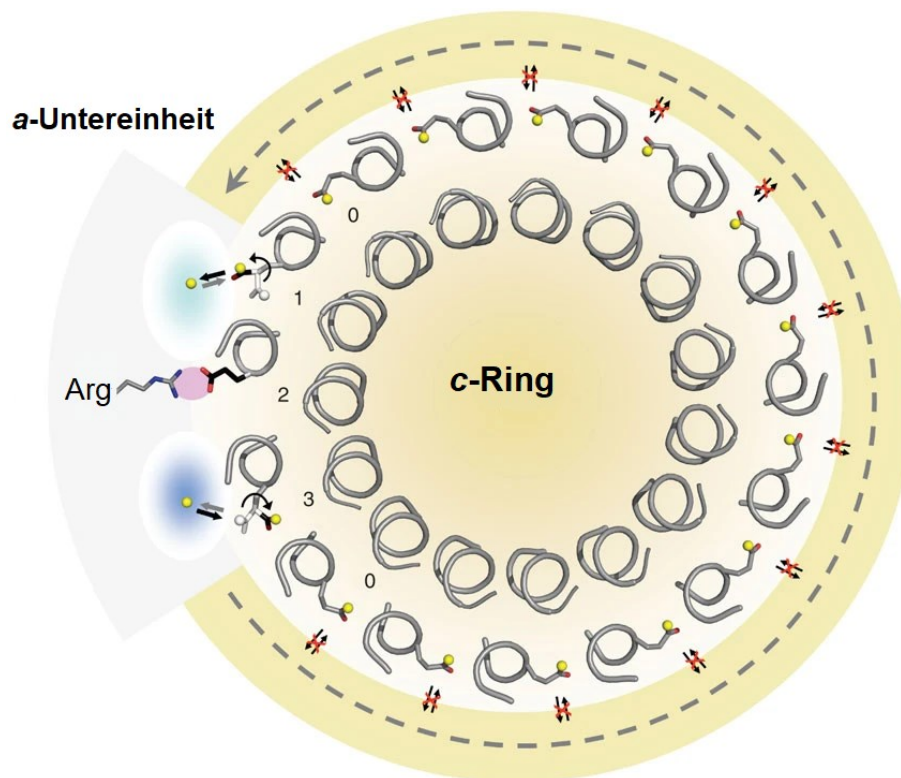


Abb. 4. Modell zur Ionentranslokation in der F_o -Domäne. Die *a*-Untereinheit bildet zwei wässrige Halbkanäle, die sich an den gegenüberliegenden Seiten der Membran öffnen. Diese sind durch einen konservierten Arginin-Rest getrennt, welcher sich an der *ac*-Grenzfläche befindet. In ATP-Synthese-Richtung tritt ein Ion über den periplasmatischen Halbkanal in die *a*-Untereinheit ein, was zur Protonierung des konservierten Carboxylats der *c*-Untereinheit führt (Zustand 1). Dies führt zu einer Konformationsänderung der Ionenbindestelle und zur Rotationsbewegung des *c*-Rings (Zustand 2). Im zweiten Halbkanal, welcher in Richtung des Lumens geöffnet ist, wird gebundene Ion abgegeben (Zustand 3) und das Carboxylat kehrt in seinen Ausgangszustand zurück (Zustand 0). Modifiziert nach Pogoryelov *et al.* (2009).

1.4.2 Vakuoläre V_1V_0 -ATPasen

Die Klasse der V_1V_0 -ATPasen, welche hauptsächlich in Vakuolen eukaryotischer Zellen zu finden sind, bestehen meist aus 11 Untereinheiten mit einer Stöchiometrie von $A_3B_3CDE_3FG_3adc_4-9c''$ (Forgac, 2007; Banerjee und Kane, 2020). Die Grundstruktur der V_1V_0 -ATPasen entspricht der von F_1F_0 -ATP-Synthasen, allerdings sind V_1V_0 -ATPasen komplexer aufgebaut (Marshansky *et al.*, 2014). Der hexagonale Kopf der V_1 -Domäne wird in alternierender Reihenfolge aus den Untereinheiten A und B gebildet. Die katalytischen Zentren befinden sich dabei in den A-Untereinheiten (MacLeod *et al.*, 1998). Den zentralen Stiel, welcher die V_1 -Domäne mit der membranständigen V_0 -Domäne verbindet, bildet die D- und F-Untereinheit. Im Gegensatz zu F_1F_0 -ATP-Synthasen haben V_1V_0 -ATPasen drei periphere Stiele, welche von der E- und G-Untereinheit gebildet werden (Forgac, 2007; Abbas *et al.*, 2020). Dadurch weisen V_1V_0 -ATPasen eine höhere Elastizität während der Rotationsbewegung auf (Kane, 2006). Die membrangebundene V_0 setzt sich aus den Untereinheiten *a*, *d*, *c* und *c''* zusammen (Powell *et al.*, 2000; Nishi *et al.*, 2003). Dabei stellt die *a*-Untereinheit eine Fusion der *a*- und *b*-Untereinheit der bakteriellen F_1F_0 -ATP-Synthase dar, wobei der lösliche Teil eine Kragenstruktur um den zentralen Stiel ausbildet (Forgac, 1999). Der membranintegrale Teil besteht aus acht bis neun TMH's, welche die beiden wässrigen Halbkanäle ausbilden (Wilkens und Forgac, 2001). Dabei ist das für die Ionen-transportation essentielle, konservierte Arginin in der siebten TMH lokalisiert (Kawasaki-Nishi *et al.*, 2001). Der heteromere *c*-Ring besteht in fast allen V_1V_0 -ATPasen aus zwei verschiedenen *c*-Untereinheiten: *c* und *c''* (Wang *et al.*, 2007). Dabei entspricht diese V-Typ *c*-Untereinheit einer duplizierten *c*-Untereinheit von F_1F_0 -ATP-Synthasen (Mandel *et al.*, 1988). Allerdings ging im Laufe der Evolution eine Ionenbindestelle verloren, weshalb solche *c*-Untereinheiten nur eine konservierte Ionenbindestelle zwischen der dritten und vierten TMH aufweisen (Cross und Müller, 2004). Der Verlust der Ionenbindestelle wird als Ursache dafür angesehen, dass V_1V_0 -ATPasen *in vivo* kein ATP synthetisieren, sondern nur als reine Ionenpumpen dienen (Nelson, 1992b; Cross und Müller, 2004; Forgac, 2007). Die zusätzliche *c''*-Untereinheit besteht dagegen aus fünf TMH's mit nur einer konservierten Ionenbindestelle in der dritten Helix (Gibson *et al.*, 2002). Während die *c''*-Untereinheit im *c*-Ring in den meisten V_1V_0 -ATPasen einmal auftritt, variiert die Anzahl der *c*-Untereinheiten je nach Organismus. In niederen Eukaryoten wie beispielsweise

S. cerevisiae besteht der *c*-Ring aus fünf V-Typ *c*-Untereinheiten und einer *c*'-Untereinheit. Der *c*-Ring stellt demnach sechs Ionenbindestellen zur Translokation der Ionen bereit (Gibson *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2007). Im Gegensatz dazu besteht der *c*-Ring in *V₁V₀*-ATPasen höherer Eukaryoten wie beispielsweise *Rattus norvegicus* aus neun V-Typ *c*-Untereinheiten und einer *c*'-Untereinheit, wodurch insgesamt 10 Ionenbindestellen zur Ionen-translokation bereitgestellt werden (Abbas *et al.*, 2020).

1.4.3 Archäelle *A₁A₀*-ATP-Synthasen

Die dritte Klasse der ATP-Synthasen/ATPasen bilden die *A₁A₀*-ATP-Synthasen, welche einen Hybrid der beiden anderen Klassen darstellen (Müller und Grüber, 2003). Diese sind strukturell sehr nah verwandt zu den *V₁V₀*-ATPasen und sind hauptsächlich in Archaeen vorzufinden. Allerdings haben einige Bakterien wie *E. callanderi* oder *Thermus thermophilus* ebenfalls eine *A₁A₀*-ATP-Synthase (Toei *et al.*, 2007; Jeong *et al.*, 2015). Diese Organismen haben diese archäellen Enzyme höchstwahrscheinlich durch lateralen Gentransfer aufgenommen (Averhoff, 2009; Averhoff und Müller, 2010). Aus funktioneller Sichtweise sind *A₁A₀*-ATP-Synthasen dagegen näher mit *F₁F₀*-ATP-Synthasen verwandt, da sie unter physiologischen Bedingungen sowohl ATP synthetisieren als auch hydrolysieren können (Nelson und Taiz, 1989; Müller, 2004).

A₁A₀-ATP-Synthasen weisen typischerweise eine Stöchiometrie von $A_3B_3CDE_2H_2aC_x$ auf. Die Grundstruktur ist dabei sehr ähnlich zu *V₁V₀*-ATPasen, allerdings haben *A₁A₀*-ATP-Synthasen nur zwei periphere Stiele. Die erste archäelle *A₁A₀*-ATP-Synthase konnte aus dem hyperthermophilen, methanogenen Archaeon *Methanococcus jannaschii* gereinigt werden (Lingl *et al.*, 2003). In der Folge konnte eine Reihe weitere *A₁A₀*-ATP-Synthasen aus hyperthermophilen Vertretern (*Pyrococcus onnurineus* (Pisa *et al.*, 2007), *Thermococcus onnurineus* (Mayer *et al.*, 2015) und *Ignicoccus hospitalis* (Kreuter *et al.*, 2019)) gereinigt werden. Bisherige Versuche zur Reinigung intakter archäeller Enzyme aus mesophilen Vertretern blieben, aufgrund der hohen Instabilität dieser, erfolglos. *A₁A₀*-ATP-Synthasen bestehen aus einer hydrophilen *A₁*-Domäne, welche sich aus den Untereinheiten A,B,C,D,E,F und H zusammensetzt und einer hydrophoben Rotordomäne bestehend aus dem *c*-Ring und dem Stator, der *a*-Untereinheit. Den hexameren Kopfteil bilden alternierend die A- und

B-Untereinheiten (Lemker *et al.*, 2001). Dabei weisen die A-Untereinheiten die katalytischen Zentren auf. Die Untereinheiten C, D und F bilden den zentralen Stiel, welcher das A_3B_3 -Hexamers mit dem c-Ring verbindet (Grüber *et al.*, 2001b; Coskun *et al.*, 2004). Die D-Untereinheit entspricht dabei der γ -Untereinheit der F_1F_0 -ATP-Synthasen (Saijo *et al.*, 2011) und ragt in den zentralen Hohlraum des A_3B_3 -Hexamers (Grüber *et al.*, 2001b). Die F-Untereinheit besteht aus zwei Domänen: einer N-terminalen, globulären Domäne und einer flexiblen C-terminalen Domäne. Während die N-terminale mit der C- und D-Untereinheit interagiert, interagiert die C-terminale Domäne mit den B-Untereinheiten (Gayen *et al.*, 2007; Saijo *et al.*, 2011; Zhou und Sazanov, 2019). Die C-Untereinheit stellt das Verbindungsstück des zentralen Stiels mit dem c-Ring dar. Diese weist einen trichterförmigen, trimeren Aufbau mit zentraler Aushöhlung auf, wodurch sie sowohl mit der D-Untereinheit als auch mit der oberen Pore des c-Rings verbunden ist (Grüber und Marshansky, 2008; Lau und Rubinstein, 2010). Die beiden peripheren Stiele werden jeweils durch die E- und H-Untereinheiten gebildet. Während die H-Untereinheit aus einer längeren N-terminalen α -Helix und kürzeren C-terminalen α -Helix besteht, welche über eine Schlaufe miteinander verbunden sind, besitzt die E-Untereinheit ebenfalls eine längere N-terminale α -Helix, jedoch eine globuläre C-terminale Domäne (Lee *et al.*, 2010; Balakrishna *et al.*, 2012). Die globuläre Domäne bindet dabei an die Grenzflächen des A_3B_3 -Hexamers und die N-terminale Domäne an den hydrophilen Teil der a-Untereinheit (Vonck *et al.*, 2009). Die a-Untereinheit bildet den Stator der hydrophoben A_0 -Domäne. Dabei besteht die hydrophile N-terminale Domäne aus zwei überkreuzenden α -Helices, mehreren β -Faltblättern und Schleifen sowie vier $\beta\alpha\beta$ -Domänen, welche höchstwahrscheinlich die Verankerungsstellen der peripheren Stiele darstellen (Vonck *et al.*, 2009; Srinivasan *et al.*, 2011). Im Gegensatz dazu ist die aus 7 bis 8 TMH's bestehende C-terminale Domäne in der Membran integriert und bildet dabei zwei wässrige Halbkanäle aus, welche sich an den gegenüberliegenden Seiten der Membran öffnen (Zhou und Sazanov, 2019). Wie in F_1F_0 -ATP-Synthasen sind die beiden Halbkanäle durch einen konservierten Arginin-Rest getrennt, welcher sich an der ac-Grenzfläche befindet. Die Ionenströmung verläuft nach dem gleichen Prinzip wie bei F_1F_0 -ATP-Synthasen (Abb. 4).

Eine Besonderheit archäeller A_1A_0 -ATP-Synthasen ist die hohe Diversität in der Untereinhenzusammensetzung der Rotoruntereinheit. Während die meisten A_1A_0 -ATP-Synthasen einen Rotor aus 8-kDa großen F-Typ *c*-Untereinheiten mit zwei TMH's und einer Ionenbindestelle besitzen, setzen sich Rotoren anderer A_1A_0 -ATP-Synthasen aus verdoppelten, verdreifachten, vervierfachen, versechsfachten oder sogar verdreizehnfachten *c*-Untereinheiten zusammen (Cross und Müller, 2004; Grüber *et al.*, 2014). Dabei ist nicht nur die Größe einer Rotoruntereinheit unterschiedlich, sondern auch die Anzahl der Ionenbindestellen pro TMH. Neben *c*-Untereinheiten mit vier TMH's und zwei Ionenbindestellen oder sechs TMH's und zwei Ionenbindestellen, gibt es auch unter anderem auch welche mit 13 Ionenbindestellen in 26 TMH's.

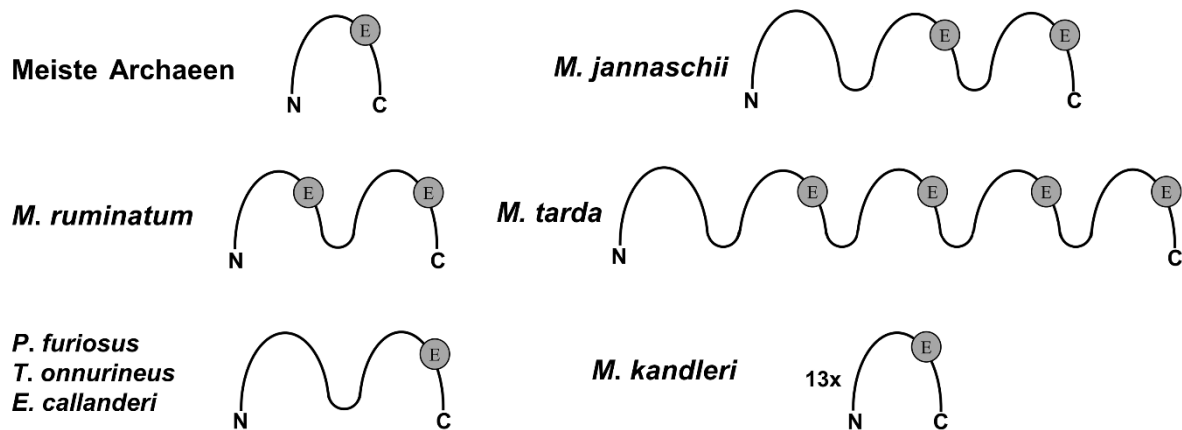


Abb. 5. Die Diversität an *c*-Untereinheiten in A_1A_0 -ATP-Synthasen. Die *c*-Untereinheiten ausgewählter Organismen unterscheiden sich in der Anzahl an TMH's und der Anzahl an Ionenbindestellen. Die Ionenbindestelle ist durch das konservierte Carboxylat (E) dargestellt. *M. ruminatum* = *Methanobrevibacter ruminatum*; *M. jannaschii* = *Methanocaldococcus jannaschii*; *M. tarda* = *Methanolinea tarda*; *M. kandleri* = *Methanopyrus kandleri*.

Während der duplizierte F-Typ anhand bioinformatischer Analyse der Genomsequenzen in den methanogenen Arten der Gattungen *Methanobrevibacter*, *Methanosphaera*, *Methanothermobacter* und *Methanobacterium* vorhergesagt wurde (Mayer *et al.*, 2012), konnte eine *c*-Untereinheit mit sechs TMH's und zwei Ionenbindestelle bereits aus *M. jannaschii* gereinigt werden (Ruppert *et al.*, 1999). Eine *c*-Untereinheit bestehend aus 26 TMH's und 13 Ionenbindestellen ist in *Methanopyrus kandleri* zu finden. Dabei besteht der *c*-Ring aus *M. kandleri* sehr wahrscheinlich aus nur einer solchen Rotoruntereinheit (Lolkema und Boekema,

2003). Die *c*-Untereinheit aus *Methanolinea tarda* besteht dagegen aus 5 TMH's mit 4 Ionenbindestellen in den letzten 4 TMH's (Yamamoto *et al.*, 2014). Erstaunlicherweise gibt es auch A_1A_0 -ATP-Synthasen mit V-Typ *c*-Untereinheiten. Neben den *c*-Untereinheiten der A_1A_0 -ATP-Synthasen aus *P. furiosus* und *T. onnurineus*, welche bereits isoliert werden konnten (Pisa *et al.*, 2007; Mayer *et al.*, 2012), ist dieser Typ nach bioinformatischen Genomanalysen auch in Vertretern der Gattungen *Desulfurococcus*, *Ignisphaera* und *Staphylothermus* vorzufinden (Grüber *et al.*, 2014). Auffällig dabei ist, dass es sich bei all den Vertretern um thermophile Organismen handelt. Bei Untersuchung aller verfügbaren Genomsequenzen bis 2014 konnte kein mesophiles Archaeon gefunden werden, welches eine A_1A_0 -ATP-Synthase mit dieser V-Typ *c*-Untereinheit hat (Grüber *et al.*, 2014). Überraschenderweise konnte bei Sequenzanalysen des Genoms des Bakteriums *E. callanderi* KIST612 ein Operon, welches für eine solche A_1A_0 -ATP-Synthase kodiert, gefunden werden (Jeong *et al.*, 2015). Dieses Strukturmerkmal würde vorhersagen, dass ein solches Enzym seine Fähigkeit zur ATP-Synthese verloren hat. Diese Annahme stünde jedoch im Widerspruch dazu, dass diese Organismen unter autotrophen Bedingungen leben können.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

E. callanderi KIST612 ist eines der wenigen acetogenen Bakterien, von denen bekannt ist, dass es neben dem Hauptprodukt Acetat zusätzlich Butyrat produziert. Diese Fähigkeit macht den Organismus als Produktionsplattform zur biotechnologischen Nutzung besonders interessant. Allerdings umfassten bisherige Untersuchungen zur Butyratbildung nur wenige Substrate wie CO oder $H_2 + CO_2$ und beschränkten sich hauptsächlich auf kontinuierliche Wachstumsexperimente im Bioreaktor. Weitere Substrate, die ebenfalls zur Butyratproduktion in *E. callanderi* KIST612 führen, wurden dagegen nicht untersucht. Aus diesem Grund wurde innerhalb der Arbeit das Wachstum von *E. callanderi* KIST612 auf einer Reihe weiterer Substrate untersucht mit dem Ziel, biotechnologisch vielversprechende Substrate zu finden, welche zur Butyratproduktion führen.

Eine Besonderheit von *E. callanderi* KIST612 ist das Vorhandensein von nur einem Operon, welches für eine A_1A_0 -ATP-Synthase mit einer *c*-Untereinheit, bestehend aus

vier TMH's und einer Ionenbindestelle, kodiert. Dieser Typ an *c*-Untereinheit kommt hauptsächlich in V_1V_0 -ATPasen vor, während F_1F_0 -ATP-Synthasen üblicherweise eine Ionenbindestelle in zwei TMH's aufweisen. Der strukturelle Unterschied in der *c*-Untereinheit wird im Allgemeinen als Ursache dafür gesehen, dass V_1V_0 -ATPasen nicht in der Lage sind, *in vivo* ATP zu synthetisieren. Da im Genom von *E. callanderi* KIST612 jedoch keine weiteren ATP-Synthase-Gene gefunden werden konnten, muss postuliert werden, dass ein solches Enzym trotz seiner V-Typ *c*-Untereinheit in der Lage ist, ATP zu synthetisieren. Um dies biochemisch nachzuweisen, sollte im Rahmen dieser Arbeit zunächst ein Reinigungsverfahren etabliert werden, das eine Reinigung des Enzyms ohne Verlust an Untereinheiten ermöglicht. Durch Einbau des Enzyms in Liposomen sollte nicht nur erstmalig ein biochemischer Beweis geliefert werden, dass ein solches Enzym trotz seiner ungewöhnlichen *c*-Untereinheit in der Lage ist, ATP zu synthetisieren, sondern zusätzlich untersucht werden, ob ATP-Synthasen mit diesem ungewöhnlichen Proteolipid einen anderen energetischen Schwellenwert aufweisen und mehr Energie benötigen als bakterielle F_1F_0 -ATP-Synthasen. Deshalb sollte das für die ATP-Synthese benötigte Potential mit den F_1F_0 -ATP-Synthasen aus *A. woodii*, *E. coli* und *P. modestum* verglichen werden, um so die physiologischen Konsequenzen eines Enzyms mit solchen *c*-Untereinheiten zu beleuchten. Von zentraler Bedeutung für die physiologischen Konsequenzen eines solchen Enzyms ist die Anzahl der Ionenbindestelle pro *c*-Ring. Aus diesem Grund sollte abschließend der *c*-Ring isoliert und die Größe des Rotors bestimmt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Organismen

Die in dieser Arbeit verwendeten Organismen sind in Tab. 2 aufgeführt.

Tab. 2. Verwendete Organismen

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. callanderi</i> KIST612	Wildtyp	Chang <i>et al.</i> (1997)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>fhuA2</i> [<i>lon</i>], <i>ompT</i> , <i>gal</i> (λ DE3) [<i>dcm</i>] Δ <i>hsdS</i>	Stratagene, Zuidoost, Niederlande
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ , <i>endA1</i> , <i>glnV44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>gyrA96</i> , ϕ 80' <i>lacZ</i> Δ M15, Δ (<i>lacZYA</i> , <i>argF</i>)U169, <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , λ ⁻	Hanahan (1983)
<i>E. coli</i> DK8	1100D (<i>uncB-uncC</i>) <i>ilv::Tn10</i>	Klionsky <i>et al.</i> (1984)

E. coli DH5 α wurde zur Vervielfältigung der in Tab. 3 aufgelisteten Plasmide verwendet. Der *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) diente zur heterologen Produktion einzelner Untereinheiten der ATP-Synthase von *E. callanderi* KIST612; *E. coli* DK8 zur heterologen Produktion der ATP-Synthase aus *A. woodii* bzw. *P. modestum*.

2.2 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tab. 3 aufgeführt.

Tab. 3. Verwendete Plasmide

Plasmid	Ursprungsvektor	Insert	Referenz
pKB3-His	pTrc99a	<i>atp</i> <i>IBE</i> ₁ <i>E</i> ₂ <i>E</i> ₃ <i>FHAGDC</i> von <i>A. woodii</i> ; <i>atpD</i> mit N-terminalem His ₆ -Tag	Brandt <i>et al.</i> (2013)
pPM001	pTrc99a	<i>unc</i> <i>IBE</i> ₁ <i>E</i> ₂ <i>E</i> ₃ <i>FHAGDC</i> von <i>P. modestum</i>	Diese Arbeit
pPM002	pTrc99a	<i>unc</i> <i>IBE</i> ₁ <i>E</i> ₂ <i>E</i> ₃ <i>FHAGDC</i> von <i>P. modestum</i> ; <i>atpD</i>	Diese Arbeit

pBWU13	pBR322	mit N-terminalem His ₆ -Tag <i>uncI</i> <i>BE</i> ₁ <i>E</i> ₂ <i>E</i> ₃ <i>FHAGDC</i> von <i>E. coli</i> ; <i>uncD</i> mit N-terminalem His ₆ -Tag	Miyata <i>et al.</i> (1997)
pTrc99a- <i>Eli</i> _2184	pTrc99a	<i>Eli</i> _2184 von <i>E. callanderi</i> mit N-terminalem His ₆ -Tag	Diese Arbeit
pTrc99a- <i>Eli</i> _2187	pTrc99a	<i>Eli</i> _2187 von <i>E. callanderi</i> mit N-terminalem His ₆ -Tag	Diese Arbeit
pTrc99a- <i>Eli</i> _2188	pTrc99a	<i>Eli</i> _2188 von <i>E. callanderi</i> mit N-terminalem His ₆ -Tag	Diese Arbeit
pTrc99a- <i>Eli</i> _2189	pTrc99a	<i>Eli</i> _2189 von <i>E. callanderi</i> mit N-terminalem His ₆ -Tag	Diese Arbeit
pTrc99a- <i>Eli</i> _2190	pTrc99a	<i>Eli</i> _21 von <i>E. callanderi</i> mit N-terminalem His ₆ -Tag	Diese Arbeit
pTrc99a- <i>Eli</i> _2191	pTrc99a	<i>Eli</i> _2184 von <i>E. callanderi</i> mit N-terminalem His ₆ -Tag	Diese Arbeit
pTrc99a- <i>Eli</i> _2192	pTrc99a	<i>Eli</i> _2184 von <i>E. callanderi</i> mit N-terminalem His ₆ -Tag	Diese Arbeit

2.3 Oligonukleotide

Die innerhalb dieser Arbeit verwendeten Starterolignucleotide wurden von der Firma Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) bezogen und sind in Tab. 4 aufgeführt.

Tab. 4. Verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')	Zielsequenz
pTrc99a_for	AAGCTTGGCTGTTTTGGCGGATGAGAGAA GATTTT	pTrc99a
pTrc99a_rev	GTCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGC TCACAATTC	pTrc99a
Eli2184_for	TAACAATTTACACAGGAAACAGACATGTC GATTCTGGATTCAATCAACAAGGCTGAAGA G	<i>Eli_2184</i>
Eli2184_rev	CTCATCCGCCAAAACAGCCAAGCTTTCAGT GGTGGTGATGATGATGTTGCGTTTCTACCC	<i>Eli_2184</i>
Eli2187_for	TAACAATTTACACAGGAAACAGACGTGAG TGCCGATAAAATTATTGAAAAAATCCTGGA AAAGGC	<i>Eli_2187</i>
Eli2187_rev	CTCATCCGCCAAAACAGCCAAGCTTCTAGT GGTGGTGATGATGATGCACCTCCACTTCAA	<i>Eli_2187</i>
Eli2188_for	TAACAATTTACACAGGAAACAGACATGTC TGAAACCAGTTATCCCTATGCAATAGGGCG	<i>Eli_2188</i>
Eli2188_rev	CTCATCCGCCAAAACAGCCAAGCTTCTAGT GGTGGTGATGATGATGAATAACGCCGAGT T	<i>Eli_2188</i>
Eli2189_for	TAACAATTTACACAGGAAACAGACATGAG TGAGCAAGCTAAATTAGCCGTTATCGGCCGA	<i>Eli_2189</i>
Eli2189_rev	CTCATCCGCCAAAACAGCCAAGCTTTTATA AAATATCTGCGCCAATGGCTTTTTCAATGTT ATCCTG	<i>Eli_2189</i>

Eli2190_for	TAACAATTTACACAGGAAACAGACATGAT TCAGCCCAATGAACAATCAACCATGAAGCA	<i>Eli_2190</i>
Eli2190_rev	CTCATCCGCCAAAACAGCCAAGCTTTTATT CATCGTCACCACTTCCTTCCATCAGTGCTA A	<i>Eli_2190</i>
Eli2191_for	TAACAATTTACACAGGAAACAGACATGAA TAAAGAGTACAAAACCATTAGTGAAGTCGT C	<i>Eli_2191</i>
Eli2191_rev	CTCATCCGCCAAAACAGCCAAGCTTTTATT CCTCCTCGTCTATGATATCATCGTCTTCAC	<i>Eli_2191</i>
Eli2192_for	TAACAATTTACACAGGAAACAGACATGGC TATTCGTGTAAATCCTACCCGGATGGAGCT	<i>Eli_2192</i>
Eli2192_rev	CTCATCCGCCAAAACAGCCAAGCTTTTAAAT TTTGATTTTCCGATACCATCATTTTCCTTAAC CTTCATCAAACGG	<i>Eli_2192</i>
PM_for	TAACAATTTACACAGGAAACAGACGATCT AAAAAGTTTATTTGAAAGAGTTCACAACCAT C	<i>uncl</i> aus <i>P. modestum</i>
PM_rev	CTCATCCGCCAAAACAGCCAAGCTTGGGA AGACACTCTTTATTTTCAATTTCTCTCAGCA G	<i>uncC</i> aus <i>P. modestum</i>
PM_his_for	TCACCATCACGGAGAAAATAAGGGAGTTAT TACC	<i>uncD</i> aus <i>P. modestum</i>
PM_his_rev	TGGTGATGTCCGCGCACCAAATTGCCTCCT TTTC	<i>uncD</i> aus <i>P. modestum</i>

2.4 Nährmedien, Supplemente und Substrate

Im Folgenden sind die Nährmedien, Supplemente sowie Substrate für die Kultivierung der innerhalb dieser Arbeit verwendeten Organismen beschrieben.

2.4.1 Präparation anaerober Nährmedien

Die Herstellung anaerober Nährmedien erfolgte in modifizierter Form nach Hungate (1969) und Bryant (1972). Die Zusammensetzung der verwendeten Medien zur Anzucht von *E. callanderi* ist in Kapitel 2.4.2 aufgeführt. Das Medium wurde entweder in einem Volumen von 50 ml in 120 ml-Serumflaschen oder in 500 ml in 1-l-Infusionsflaschen (Glasgerätebau Ochs, Bovenden/Lenglern) überführt. Um den Sauerstoffgehalt des Mediums zu reduzieren, wurde Carbonat-gepuffertes Medium für 20 min mit N₂/CO₂ (80:20 [v/v]) bzw. Phosphat-gepuffertes Medium für 20 min mit N₂ (100 %) durchgast. Nach dem Durchgasen wurden die Kulturgefäße mit einem Butyl-Gummistopfen (Glasgerätebau Ochs, Bovenden/Lenglern) gasdicht verschlossen und für 25 min bei 121 °C autoklaviert (SANOclav, Maschinenbau Wolf GmbH, Bad Überkingen, Deutschland). Die Lagerung der Medien erfolgte bei Raumtemperatur. Benötigte Supplemente und Substrate wurden erst unmittelbar vor der Inokulation aus anaeroben, sterilen Stammlösungen mit sterilen Einweg-Injektionsspritzen (Braun Melsungen AG, Melsungen) zugegeben. Gasförmige Wachstumssubstrate (H₂ + CO₂ oder CO) wurden mit Hilfe eines Sterilfilters (Porengröße 0,45 µm; Sarstedt, Nümbrecht) und unter mehrmaligem Wechsel von Gas-Vakuum-Zyklen dem Medium zugeführt.

Für die Anzucht von *E. callanderi* im 20-l-Maßstab wurde Carbonat-gepuffertes Basalmedium (CBBM) ohne Zugabe von Hydrogencarbonat (NaHCO₃) in 20-l-Steilbrustflaschen (Glasgerätebau Ochs, Bovenden/Lenglern) überführt. NaHCO₃ wurde separat ohne vorheriges Durchgasen in 250 ml Aliquots in 1-l-Infusionsflaschen autoklaviert. Die 20-l-Steilbrustflaschen wurden mit speziellen Gummistopfen verschlossen, in die mit Gummischläuchen verbundene Metallrohre eingearbeitet waren, über welche die Zu- und Ableitung von Flüssigkeiten bzw. Gasen erfolgte. Zur Vermeidung der Entstehung von Überdruck wurden die 20-l-Steilbrustflaschen mit offener Gasableitung autoklaviert. Nach dem Abkühlen des Autoklavs auf unter 60 °C wurde dieser geöffnet und die Gasableitung sofort mit einem mit einer Waschflasche verbundenen Gummischlauch verschlossen. Im Anschluss wurden dem Nährmedium steril über die Zuleitungen NaHCO₃, Reduktionsmittel, Vitaminlösung und das Wachstumssubstrat Methanol zugegeben. Das Medium wurde daraufhin über die Gas-

Zuleitung, welche mit einer mit Glaswolle gefüllten Glasolive versehen war, für 20 min mit N₂/CO₂ (80:20 [v/v]) durchgast.

2.4.2 Nährmedien zur Anzucht von *E. callanderi*

Zur anoxischen Anzucht von *E. callanderi* wurde in Abhängigkeit des verwendeten Substrats Phosphat-gepuffertes Basalmedium (PBBM) oder Carbonat-gepuffertes Basalmedium (CBBM) nach Chang *et al.* (1999) verwendet. Die Zusammensetzung von PBBM ist in Tab. 5 aufgeführt. Die einzelnen Bestandteile von CBBM unterscheiden sich nur geringfügig von denen von PBBM. Dabei enthält CBBM zusätzlich 10 ml/l 1 M Na₂HPO₄ anstelle von Phosphatpuffer und 2,1 g/l NaHCO₃.

Zur Herstellung von PBBM bzw. CBBM wurden alle festen Bestandteile nacheinander in demineralisiertem Wasser gelöst und anschließend Resazurin als Redoxindikator sowie die Spurenelementlösung zugegeben. Bei PBBM wurde der pH-Wert von 7,2 mittels 1 M NaOH eingestellt und das Medium zur Entfernung von Sauerstoff für 20 min mit N₂ (100 %) begast. Bei CBBM wurde der pH-Wert von 7,2 durch 20-minütiges Durchgasen mit N₂/CO₂ (80/20 % [v/v]) eingestellt. Nach dem Autoklavieren (25 min, 121 °C) wurde das Medium jeweils bei Raumtemperatur gelagert.

Tab. 5. Zusammensetzung von Phosphat-gepuffertem Basalmedium für die Anzucht von *E. callanderi* nach Chang *et al.* (1999).

Bestandteil	Konzentration		Einwaage	
NaCl	15,4	mM	0,9	g/l
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	1,3	mM	0,32	g/l
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	1,4	mM	0,2	g/l
NH ₄ Cl	18,7	mM	1	g/l
Hefeextrakt	0,2	% (w/v)	2	g/l
Spurenelementlösung	0,1	% (v/v)	10	ml/l
Na ₂ S · 9 H ₂ O-Lösung (2.5%)	0,06	% (v/v)	25	ml/l
Phosphatpuffer (1 M, pH 7,2) ^a	2	% (v/v)	20	ml/l
Vitaminlösung	0,2	% (v/v)	2	ml/l
Resazurinlösung (0,1 % [w/v])	4,4	µM	1	ml/l
Fruktose <u>oder</u>	20–200	mM		
Glukose <u>oder</u>	20–200	mM		
Na ⁺ -Formiat <u>oder</u>	20	mM		
Methanol	20–200	mM		
pH 7,2 ^b				

^a Phosphatpuffer: 1 M KH₂PO₄, 1 M Na₂HPO₄. pH 7,2 wurde mittels 32%iger HCl eingestellt.

^b Der pH-Wert wurde mittels 1 M NaOH eingestellt.

Die Zugabe von Phosphatpuffer, Vitaminlösung, Reduktionsmittel ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$ -Lösung) sowie des jeweiligen Wachstumssubstrats erfolgte unmittelbar vor der Inokulation aus sterilen und anaeroben Stammlösungen.

Zur Anzucht auf gasförmigen Substraten ($\text{H}_2 + \text{CO}_2$ (80:20 [v/v]) oder CO (100 %)) wurde die Gasphase der Kulturgefäße durch mehrere Gas-Vakuum-Zyklen gegen die Atmosphäre des entsprechenden Gases ausgetauscht.

2.4.3 Spurenelementlösung

Die Zusammensetzung der Spurenelementlösung ist in Tab. 6 aufgeführt. Zur Herstellung der Spurenelementlösung wurde zunächst Nitriollessigsäure in demineralisiertem Wasser gelöst und der pH-Wert mittels 1 M KOH auf 6,5 eingestellt. Die weiteren Bestandteile wurden anschließend nacheinander in angegebener Reihenfolge zugegeben und gelöst. Die Lagerung der Spurenelementlösung erfolgte bei 4 °C.

Tab. 6. Spurenelementlösung nach Chang *et al.* (1999).

Bestandteil	Konzentration		Einwaage	
Nitrioltriessigsäure	7,8	mM	1,5	g/l
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,3	mM	0,1	g/l
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,5	mM	0,1	g/l
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,7	mM	0,17	g/l
ZnCl_2	0,7	mM	0,1	g/l
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,7	mM	0,1	g/l
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,1	mM	0,02	g/l
H_3BO_3	0,2	mM	0,01	g/l
Na_2MoO_4	48,6	μM	0,01	g/l
Na_2SeO_3	0,1	mM	0,017	g/l
$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,1	mM	0,026	g/l
NaCl	17,1	mM	1,0	g/l

2.4.4 Vitaminlösung

Die Zusammensetzung der Vitaminlösung ist in Tab. 7 aufgeführt.

Tab. 7. Vitaminlösung nach Chang *et al.* (1999).

Bestandteil	Konzentration		Einwaage	
Biotin	41	µM	10	mg/l
DL-Ca-Panthothenat	50	µM	25	mg/l
Folsäure	45	µM	10	mg/l
Liponsäure	120	µM	25	mg/l
Nikotinsäure	205	µM	25	mg/l
Pyrodoxin-HCl	245	µM	50	mg/l
<i>p</i> -Aminobenzeosäure	185	µM	25	mg/l
Riboflavin	65	µM	25	mg/l
Thiamin-HCl	75	µM	25	mg/l
Vitamin B ₁₂	370	nM	0,5	mg/l

Die Lagerung der Vitaminlösung erfolgte lichtgeschützt bei 4 °C.

2.4.5 Substrate

Zur Anzucht von *E. callanderi* dienten als Wachstumssubstrate Fruktose (Endkonzentration: 20 mM – 200 mM), Glukose (20 mM – 200 mM), Na⁺-Formiat (20 mM) oder Methanol (20 mM – 200 mM). Zum Supplementieren der Medien wurden jeweils 2-M-Stammlösungen hergestellt. Dazu wurden die Substrate jeweils mit Hilfe eines Sterilfilters (Porengröße: 0,4 µm, Sarstedt, Nümbrecht) in sauerstofffreie, sterile 1-l-Infusionsflasche überführt und anschließend für jeweils 20 min mit N₂ (100%) über einen Sterilfilter (Porengröße 0,45 µm; Sarstedt, Nümbrecht) durchgast. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur. Gasförmige Wachstumssubstrate (H₂ + CO₂ oder CO) wurden mit Hilfe eines Sterilfilters (Porengröße 0,45 µm; Sarstedt, Nümbrecht) und unter mehrmaligem Wechsel von Gas-Vakuum-Zyklen dem Medium zugesetzt.

2.4.6 Nährmedien zur Anzucht von *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte im Komplexmedium 2xYT (10 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 16 g/l Trypton) nach Sambrook *et al.* (1989). Zur Herstellung von Agarplatten wurden dem Medium vor dem Autoklavieren Agar (Endkonzentration: 1,8 % [w/v]) zugegeben. Zur Selektion rekombinanter *E. coli*-Stämme wurde dem Medium nach dem Autoklavieren zusätzlich Ampicillin (Endkonzentration: 100 µg/ml) zugegeben.

2.5 Kultivierung von Organismen

2.5.1 Anaerobe Zellanzucht von *E. callanderi* KIST612

Die Kultivierung von *E. callanderi* KIST612 erfolgte in 5 ml Medium in 20-ml-Hungate-Röhrchen, in 50 ml Medium in 120-ml-Serumflaschen, 500 ml Medium in 1-l-Flaschen oder in 20 l Medium in 20-l-Steilbrustflaschen. Bei der Kultivierung mit CO als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle wurde PBBM als Nährmedium verwendet, während bei der Kultivierung mit allen anderen verwendeten Substraten CBBM verwendet wurde (siehe Kapitel 2.4.5). Das Medium wurde dabei mit einer adaptierten Stamm- oder Vorkultur auf eine optische Dichte (OD_{600}) von 0,1 inokuliert und die Kultur bei 37 °C inkubiert. Um einen besseren Gaseintrag zu erzielen, erfolgte die Anzucht auf $H_2 + CO_2$ oder CO schüttelnd (130 Upm, Universalschüttler Swip, Edmund Bühler GmbH, Hechingen), während die Inkubation bei Kultivierung mit allen anderen Substraten stehend erfolgte.

2.5.2 Zellanzucht von *E. coli*

Die Anzucht von *E. coli*-Stämmen erfolgte in 5 ml 2xYT-Medium in 15-ml-Reagenzgläser, in 200 ml 2xYT-Medium in 1-l-Schikanekolben, 2 l 2xYT-Medium in 5-l-Schikanekolben oder auf 2xYT-Festagarplatten bei 37 °C. Die Flüssigkulturen wurden schüttelnd bei 130 Upm angezogen. Zur Selektion rekombinanter *E. coli*-Stämme wurden dem Medium vor der Inokulation Ampicillin (Endkonzentration: 100 µg/ml) zugegeben.

2.5.3 Bestimmung der optischen Dichte

Um das Wachstum von Kulturen zu verfolgen, wurden während der Kultivierung zu unterschiedlichen Zeitpunkten je 1 ml Kulturflüssigkeit entnommen und diese anschließend in 1-ml-Kunststoffküvetten (Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland) überführt. Das Wachstum wurde anhand der Messung der optischen Dichte (OD_{600}) bei einer Wellenlänge von 600 nm im Spektralphotometer (U-1800, Hitachi, Düsseldorf) verfolgt. Als Leerwert wurde das jeweilige Medium verwendet. Bei anaerobem Kulturmedium wurde das Medium vor der Messung mit einer Spatelspitze Natrium-Dithionit versetzt, um so den im Medium enthaltenen Redoxindikator

Resazurin zu reduzieren. Sobald bei Proben eine OD₆₀₀ von 0,3 erreicht wurde, wurden diese mit dem entsprechenden Volumen an Medium verdünnt.

2.5.4 Reinheitskontrollen

Die verwendeten Kulturen wurden in regelmäßigen Abständen mikroskopisch (Phasenkontrastmikroskop Carl Zeiss AG, Jena) auf mögliche Kontaminationen untersucht.

2.5.5 Stammhaltung

Die Stammhaltung von *E. callanderi* erfolgte in 50 ml Medium in 120-ml-Serumflaschen. Dabei wurden Stammkulturen für jedes der verwendeten Wachstumssubstrate hergestellt, indem die Kulturen zunächst mindestens zwei Mal auf neues Medium mit dem entsprechenden Wachstumssubstrat überimpft und bei 37 °C bis zum Erreichen der spätexponentiellen Wachstumsphase angezogen wurden. Nach der Adaptation auf das jeweilige Substrat wurden die Kulturen in zweiwöchigem Abstand in frisches Medium überimpft und erneut bis zum Erreichen der spätexponentiellen Phase angezogen. Die anschließende Lagerung der Kulturen erfolgte bei 4 °C.

Zur dauerhaften Lagerung von *E. coli*-Stämmen wurden je 700 µl einer Übernachtkultur mit 300 µl einer sterilen 86%igen (v/v) Glycerin-Lösung vermischt und in Schraubdeckelgefäße überführt. Nach dem die Kulturen in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden, erfolgte die Lagerung bei – 70 °C.

2.6 Analytische Bestimmung von Metaboliten

Die innerhalb dieser Arbeit durchgeführten Analysen zur Bestimmung der Metabolite von *E. callanderi* erfolgte an wachsenden Zellen. Zur Metabolit-Bestimmung wurden zu verschiedenen Zeitpunkten während des Wachstums jeweils 1 ml der Kultur entnommen und die Zellen anschließend abzentrifugiert (13000 Upm, 5 min, Eppendorf 5417 R, Hamburg). Der zellfreie Überstand wurde zur weiteren Analyse bei 4 °C aufbewahrt, während das Zellpellet verworfen wurde. Die Analyse der Metabolit-Konzentrationen erfolgte dabei entweder mit Hilfe eines gekoppelt optisch-enzymatischen Tests oder gaschromatographisch.

2.6.1 Enzymatische Bestimmung der Formiat- oder Glukosekonzentration

Die Konzentration an Formiat oder Glukose wurde jeweils mittels gekoppelt optisch-enzymatischen Tests unter Verwendung kommerziell erhältlicher Assays (Formiat bzw. D-Glukose-Kit, Boehringer Mannheim, R-Biopharm AG, Darmstadt) nach Herstellerangaben bestimmt. Die bei den enzymatischen Reaktionen entstehende Menge an NADH ist dabei äquivalent zur gebildeten Menge an Formiat bzw. Glukose. Die Quantifizierung von NADH erfolgte im Spektralphotometer (Spektrophotometer U-1800; Scientific-Instruments, Schwäbisch Gmünd) bei einer Wellenlänge von 340 nm. Die Berechnung der Formiat- bzw. Glukose-Konzentration erfolgte mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes ($\epsilon_{\text{NADH}_{340\text{nm}}} = 6,3 \text{ l} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

2.6.2 Gaschromatographische Bestimmung der Acetat-, Butyrat-, Ethanol- und Methanol-Konzentration

Die Konzentration von Acetat, Butyrat (Isobutyrat sowie *n*-Butyrat), Ethanol und Methanol wurde gaschromatographisch bestimmt (Gaschromatograph Clarus 580 GC, Perkin Elmer, Waltham, USA). Das Gesamtvolumen eines Probenansatzes betrug 1 ml und war zusammengesetzt aus 400 μl des zellfreien Überstands, 500 μl Aceton, 50 μl 2 M Phosphorsäure und 50 μl des internen Standards 200 mM 1-Propanol. Die chromatographische Bestimmung erfolgte über die Kapillarsäule „Elite-FFAP“ 10 m x 0,32 mm (Perkin Elmer, Waltham, USA). Als Trägergas diente Helium mit einer Flussgeschwindigkeit von 40 cm/min und einem „*split flow*“ von 1:50. Die Injektionstemperatur betrug 250 °C. Zu Beginn jeder Messung wurde die Ofentemperatur bei 60 °C gehalten und im Anschluss mit einem linearen Gradienten (10 °C/min) auf 150 °C erhitzt. Die Detektion der organischen Säuren bzw. Alkohole erfolgte mittels Flammenionisationsdetektor (FID) bei 250 °C. Die Retentionszeiten für Acetat, Isobutyrat, *n*-Butyrat, Ethanol sowie Methanol betragen 10,8, 12,8, 13,2, 2,8 bzw. 2,5 min. Zur Bestimmung der Konzentration an organischen Säuren bzw. Alkohole in den einzelnen Proben wurde vor jedem Messdurchlauf jeweils eine Eichgerade mit definierten Stoffmengenkonzentrationen (0, 10, 25, 50, 75, 100 mM) des jeweiligen Alkohols bzw. organischer Säure erstellt, indem 400 μl der definierten Konzentrationen von Acetat, Butyrat, Ethanol oder Methanol aus einer 1-M-Stammlösung mit 500 μl Aceton, 50 μl 2 M Phosphorsäure und 50 μl 200 mM 1-Propanol versetzt und der Messansatz jeweils gaschromatographisch analysiert

wurde. Die Auswertung und Aufzeichnung der verschiedenen Messreihen erfolgte mit dem Programm „TC Navigator“ (PerkinElmer Inc., USA). Die Stoffmengenkonzentration der Proben wurde anschließend jeweils mit Hilfe der Steigung der Eichgeraden bestimmt.

2.6.3 Gaschromatographische Bestimmung der H₂- oder CO-Konzentration

Zur Bestimmung der Konzentration von H₂ oder CO wurde während der Kultivierung von *E. callanderi* je 50 µl der Gasphase mit Hilfe einer 100 µl-Hamilton-Gasspritze (Reno, Nevada, USA) entnommen. Die Gasspritze wurde dabei vor Probenentnahme mehrfach mit anaerobem, demineralisiertem Wasser gespült. Nach der Entnahme der Probe wurde diese in den Gaschromatographen (Clarus 580 GC; PerkinElmer, USA) injiziert. Die Auftrennung erfolgte mit Hilfe einer ShinCarbon ST 80/100 Säule (2m by 0.53 mm, Restek Corporation, Bellefonte, USA) bei einer Temperatur von 100 °C. Für die Bestimmung von H₂ diente N₂ als Trägergas, während für die Bestimmung von CO Helium als Trägergas verwendet wurde. Der Druck des jeweiligen Trägergases war 400 kPa mit einem split flow von 30 ml/s. Die Temperatur im GC-Ofen betrug 40 °C. Beide Gase wurden jeweils über einen Wärmeleitfähigkeitsdetektor (TCD) nachgewiesen. Die Auswertung und Aufzeichnung der verschiedenen Messreihen erfolgte mit dem Programm „TC Navigator“ (PerkinElmer Inc., USA). Zur Auswertung der Daten wurde eine Eichgerade mit definierten Volumina an H₂ oder CO aufgenommen. Die Stoffmengenkonzentration der Proben wurde anschließend jeweils mit Hilfe der Steigung der Eichgeraden bestimmt.

2.7 Bestimmung des pH-Wertes

Die Bestimmung des pH-Wertes in Puffern und Messansätzen erfolgte an der pH-Elektrode „Orion Star A214 Benchtop pH/ISE Meter“ (Thermo Electron Corp. Witchford, UK) nach Herstellerangaben.

2.8 Bestimmung der Na⁺- und K⁺-Konzentration

Die Konzentration von Na⁺ in Puffern und Messansätzen wurde mittels einer „Orion 84-111 ROSS“-Natriumelektrode (Thermo Electron Corp. Witchford, UK) nach Herstellerangaben bestimmt. Die Bestimmung der K⁺-Konzentration erfolgte mittels an

einer Kaliumelektrode (Orion 9319BN, Thermo Electron Corp. Witchford, UK) nach Angaben des Herstellers.

2.9 Techniken zum Arbeiten mit DNA

Im Folgenden sind die innerhalb dieser Arbeit verwendeten molekularbiologischen Arbeitstechniken beim Umgang mit Nukleinsäuren aufgeführt.

2.9.1 Molekularbiologische Standardmethoden

Die Amplifikation von DNA erfolgte mittels Polymerasekettenreaktion (Mullis *et al.*, 1986). Dazu wurden die Polymerasen „Phusion High-Fidelity DNA Polymerase“ (New England Biolabs, Ipswich, England) oder „Q5 High-Fidelity DNA Polymerase“ (New England Biolabs, Ipswich, England) nach Angaben des Herstellers verwendet. Zur Reinigung von PCR-Produkten wurde das „GenElute PCR Clean-Up Kit“ (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) verwendet. Chromosomale DNA von *P. modestum* wurde von der DSMZ bezogen. Die Klonierung von Plasmiden erfolgte unter Verwendung des „Gibson Assembly[®] Master Mix“ (New England Biolabs, Ipswich, England) nach Herstellerangaben. Die Herstellung von Plasmiden, bei denen zusätzlich eine Gensequenz eingefügt werden soll, welche für einen His₆-Tag kodiert, erfolgte unter Verwendung des „Q5[®] Site-Directed Mutagenesis Kit“ (New England Biolabs, Ipswich, England) nach Herstellerangaben. Die Herstellung von kompetenten Zellen wurde mit Hilfe der CaCl₂-Methode (Cohen *et al.*, 1972; Inoue *et al.*, 1990) durchgeführt. Die Transformation in kompetente *E. coli*-Zellen erfolgte wie in Hanahan (1983) beschrieben. Plasmid-DNA wurden aus 5 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur mit dem „GenElute Plasmid Miniprep Kit“ (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) nach Herstellerangaben isoliert. Die Isolierung genomischer DNA erfolgte mittels Phenol-Chloroform-Extraktion wie in Sambrook und Russell (2006) beschrieben. Die Konzentration von DNA-Lösungen sowie deren Reinheit wurden im Spektralphotometer („Nano-Drop“-Spektralphotometer ND-1000, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) bestimmt. Die Sequenzierung von PCR-Fragmenten wurde von der Firma SeqLab (Göttingen) durchgeführt. Die Probenvorbereitung erfolgte dabei nach Angaben des Herstellers.

2.9.2 Agarosegel-Elektrophorese

Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte, wie in Sambrook *et al.* (1989) beschrieben, in 0,8 oder 1,2 %igen (w/v) Agarose-TAE-Gelen. Zur Herstellung der Gele wurden 0,8 bzw. 1,2 % Agarose durch kurzes Aufkochen in TAE-Puffer (40 mM Tris/HCl, 1,3 mM Na-EDTA, 0,115 % [v/v] konzentrierte Essigsäure, pH 8,0) gelöst und nach dem Abkühlen mit 4 µl einer Ethidiumbromidlösung (1 % [w/v]) pro 50 ml TAE-Puffer versetzt. Als Laufmittel wurde ebenfalls TAE-Puffer verwendet. Zur Probenvorbereitung wurden die aufzutrennenden Proben mit 6x Auftragspuffer (0,15 M Saccharose, 0,5 M Harnstoff, 0,1 M Na-EDTA, 0,14 mM Bromphenolblau, pH 7,0) versetzt und anschließend auf das Gel aufgetragen. Zur Größenbestimmung wurde entweder der „Gene Ruler 100 bp Ladder“ oder der „GeneRuler 1 kb Ladder“ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, England) verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 120 V für 30 min. Die Visualisierung der einzelnen Fragmente und anschließende Dokumentation erfolgte mit Hilfe eines UV-Transilluminators (Vilber Lourmat, Bachofer, Reutlingen) bei einer Wellenlänge von 254 nm.

2.10 Zellernte und Herstellung von gewaschenen Membranen aus *E. callanderi*

Um festzustellen, welchen Einfluss unterschiedliche Wachstumssubstrate auf die ATPase-Aktivität von *E. callanderi* hat, wurden gewaschenen Membranen bei Wachstum auf unterschiedlichen Substraten hergestellt. Dazu wurde *E. callanderi* in PBBM oder CBBM mit Formiat (20 mM), Glukose (20 mM), Methanol (20 mM), H₂ + CO₂ (101 kPa, 80:20 [v/v]) oder CO (101 kPa, 100 %) als Wachstumssubstrat kultiviert. Die Zellen wurden während der exponentiellen Phase durch Zentrifugation (8000 Upm, 10 min, 4 °C, JA10 Rotor, Beckman Avanti J25, Beckmann Coulter, Krefeld) geerntet. Dabei wurden jeweils ca. 1 g der auf den verschiedenen Substraten gewachsenen Zellen (Zellfeuchtmasse) in 5 ml von Puffer A (50 mM Tris/HCl, 10 mM MgCl₂, 420 mM Saccharose, pH 7,5) aufgenommen. Nach Zugabe von Lysozym (20 mg · g⁻¹ Zellen) wurde die Suspension für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach einstündiger Inkubation wurde der Suspension PMSF (Endkonzentration: 0,5 mM) sowie eine Spatelspitze DNase I zugegeben. Die durch den Lysozym-Verdau entstandenen Protoplasten wurden anschließend durch dreimaliges Durchlaufen einer „French Pressure Cell Press“ (110 MPa, 1000 psi; Einstellung: high; SLM Aminco, SLM

Instruments, USA) aufgeschlossen. Nach dem Zellaufschluss wurde der Zellrohextrakt mit dem vierfachen Volumen von Puffer A verdünnt und die Zelltrümmer durch anschließende Zentrifugation (8000 Upm, 20 min, 4 °C, JA25-50, Beckman Avanti J25) entfernt. Die Membranen wurden durch Zentrifugation des gesammelten zellfreien Rohextrakts vom Cytoplasma getrennt (43000 Upm, 45 min, 4 °C, 70Ti Rotor, Beckmann Coulter, Krefeld) und zweimal mit Puffer B (50 mM Tris/HCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM NaCl, pH 7,5) gewaschen.

2.11 Produktion und Reinigung von Proteinen

Im Folgenden sind die Produktion und Reinigung der ATP Synthasen aus *A. woodii*, *E. coli*, *E. callanderi* und *P. modestum* sowie einzelner Untereinheiten der ATP Synthase aus *E. callanderi* beschrieben. Alle Reinigungsschritte wurden, sofern nicht anders aufgeführt, bei 4 °C durchgeführt.

2.11.1 Reinigung der A₁A_o-ATP Synthase aus *E. callanderi*

Zur Reinigung der A₁A_o-ATP Synthase wurde *E. callanderi* im 20-l-Maßstab mit 50 mM Methanol als Substrat unter anaeroben Bedingungen kultiviert und während der spätexponentiellen Wachstumsphase (OD₆₀₀ ≈ 1,2) in einer Durchlaufzentrifuge (14000 Upm, Rotor HCT 22.300, Contifuge Stratos, Heraeus, Osterode) geerntet. Im Folgenden sind die einzelnen Reinigungsschritte dargestellt. Alle chromatographischen Reinigungsschritte wurden an der FPLC-Anlage „Äkta Prime Plus“ (GE-Healthcare, Schweden) durchgeführt. Die verwendeten Puffer wurden vor Gebrauch an einer Membran-Vakuumpumpe mit Hilfe eines Cellulosenitratmembranfilters (NC 45/50 Cellulosenitratmembranfilter, Whatman GmbH, Dassel) filtriert und anschließend entgast. Die Detektion der eluierten Proteine erfolgte durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm.

2.11.1.1 Präparation von gewaschenen Membranen

Die Herstellung von gewaschenen Membranen aus ca. 15 g Zellen (Zellfeuchtmasse) wurde wie in Kapitel 2.10 beschrieben durchgeführt.

2.11.1.2 Solubilisierung von Membranproteinen

Zur Solubilisierung von Membranproteinen aus den gewaschenen Membranen von *E. callanderi* wurde das Detergenz *n*-Dodecyl-β-D-Maltopyranosid (DDM) verwendet.

Um die optimale Konzentration an DDM sowie die optimale Inkubationszeit bestimmen zu können, wurde der Einfluss von unterschiedlichen Konzentrationen an DDM (0,5, 1 bzw. 2 mg DDM pro mg Protein) auf die Ausbeute bei jeweils unterschiedlichen Inkubationszeiten untersucht (1, 2, 2,5 und 24 h). Dabei wurde zunächst jeder Ansatz unter leichtem Schütteln (30 Upm) inkubiert und das Solubilisat im Anschluss durch Zentrifugation (45000 Upm, 45 min, 4 °C, 70Ti Rotor, Ultrazentrifuge Optima L 100K) von den Membranen getrennt. Durch Vergleich der Gesamtaktivität des Solubilisats mit der Aktivität in den gewaschenen Membranen konnten die optimalen Bedingungen (1 mg DDM pro Protein und 2,5 h Inkubationszeit) ermittelt werden. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde die Solubilisierung unter diesen Bedingungen durchgeführt.

2.11.1.3 Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation

Im nächsten Schritt wurde die ATP-Synthase mittels Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation weiter angereichert. Dazu wurde zunächst mit Hilfe eines Gradientenmischers (Eigenbau) ein kontinuierlicher Saccharose-Gradient von 20 – 65 % gegossen, indem 19,5 ml einer 20%igen Saccharose-Lösung (100 mM HEPES, 5 mM MgCl₂, 0,05 mM PMSF, 20 % [w/v] Saccharose, 0,02 % [w/v] DDM, pH 7,5) in den vorderen Teil des Gradientenmischers und 20,5 ml einer 65%igen Saccharose-Lösung (100 mM HEPES, 5 mM MgCl₂, 0,05 mM PMSF, 65 [w/v] % Saccharose, 0,02 % [w/v] DDM, pH 7,5) in den hinteren Teil gegeben und der Gradient unter leichtem Rühren mit Hilfe einer Peristaltik-Pumpe (Flussrate: 2ml/min; Ismatec IPC, Ismatec, Wertheim, Deutschland) in Gradientenröhrchen (BECKMANN CORDLESS TUBE TOPPER®, Beckmann Coulter, Krefeld) gegossen wurde. Je gegossenem Gradienten wurden 2 ml des Solubilisats tropfenweise aufgetragen und anschließend mit 2 ml der 20%igen Saccharose-Lösung überschichtet. Nach Verschweißen der Gradientenröhrchen wurden diese für 20 h zentrifugiert (38000 Upm, 50VTi Rotor, Ultrazentrifuge Optima L 100K, Beckmann Coulter, Krefeld). Nach der Zentrifugation wurde jedes der Gradientenröhrchen mit Hilfe einer Peristaltik-Pumpe in 2-ml-Fractionen fraktioniert. Im Anschluss wurde die ATP-Hydrolyse-Aktivität der einzelnen Fractionen bestimmt (siehe Kapitel 2.13). Die Fractionen, welche eine ATP Hydrolyse-Aktivität aufwiesen, wurden vereinigt und zur weiteren Reinigung verwendet.

2.11.1.4 Anionenaustausch-Chromatographie an DEAE

Die weitere Reinigung der ATP-Synthase aus *E. callanderi* erfolgte mittels Anionenaustausch-Chromatographie an einer selbstgepackten Säule (Durchmesser: 2,6 cm; Höhe: 20 cm; XK26/20, GE-Healthcare, Uppsala, Schweden) mit dem schwachen Anionenaustauscher „DEAE Sepharose® Fast Flow“ (GE-Healthcare, Uppsala, Schweden) als Säulenmaterial. Die Säule wurde zunächst bei einer Flussrate von 3 ml/min mit dem dreifachen Säulenvolumen an Puffer C (100 mM HEPES, 5 mM MgCl₂, 10 % [v/v] Glycerin, 0,02 [w/v] % DDM, pH 7,5) äquilibriert. Im Anschluss wurde die Säule über einen 50-ml-Proben-Loop mit den vereinigten Fraktionen der Dichtegradientenzentrifugation bei einer Flussrate von 0,5 ml/min beladen und mit weiteren drei Säulenvolumen von Puffer C (Flussrate: 2 ml/min) gewaschen. Nach einer Stoßelution über drei Säulenvolumen mit 13 % Puffer D (100 mM HEPES, 5 mM MgCl₂, 10 % [v/v] Glycerin, 1 M NaCl, 0,02 [v/v] % DDM, pH 7,5; Flussrate: 2 ml/min) zur Abtrennung kontaminierender Proteine erfolgte die weitere Elution der gebundenen Proteine mit einem linearen NaCl-Gradienten (13 – 40 %) über neun Säulenvolumen bei einer Flussrate von 1 ml/min. Während der Elution wurden die einzelnen Fraktionen jeweils in einem Volumen von 4 ml gesammelt. Abschließend wurde die ATPase-Aktivität der einzelnen Fraktionen gemessen (siehe Kapitel 2.13). Nach der Elution wurde die Säule nacheinander mit jeweils 3 Säulenvolumen Puffer D, Puffer C und demineralisiertem Wasser (Flussrate jeweils: 3ml/min) gewaschen. Die Lagerung der Säule erfolgte nach Abschluss des Reinigungsvorgangs in 20 % Ethanol.

2.11.1.5 Größenausschluss-Chromatographie an Superose 6

Um die ATP-Synthase weiter zu reinigen, wurde im letzten Schritt eine Größenausschlusschromatographie (Superose 6, 10/300 GL Säule, 24 ml Säulenvolumen, GE-Healthcare, Uppsala, Schweden) durchgeführt. Dazu wurden zunächst die Fraktionen des vorangegangenen Reinigungsschritts, welche eine ATPase-Aktivität aufzeigten, vereinigt und mittels Ultrafiltration (Vivaspin 20, Cutoff 10 kDa, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen) auf ein Volumen von 1 ml konzentriert. Nach dem die Gelfiltrationssäule mit dem dreifachen Säulenvolumen an Puffer E (100 mM HEPES, 250 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 10 % [v/v] Glycerin, 0,02 [v/v] % DDM, pH 7,5; Flussrate: 0,5 ml/min) äquilibriert wurde, wurden pro Reinigungsvorgang jeweils 0,5 ml des Proteinkonzentrats über einen 2 ml-Loop auf die Säule beladen. Die

chromatographische Auftrennung erfolgte dabei isokratisch bei einer Flussrate von 0,5 ml/min. Bei Erreichen des Totvolumens (V_0) nach 8 ml wurden Fraktionen von jeweils 0,5 ml gesammelt. Von den einzelnen Fraktionen wurden abschließend die ATPase-Aktivitäten gemessen. Nach Beendigung des Reinigungsvorgangs wurde die Säule mit 2 Säulenvolumen demineralisiertem Wasser gewaschen. Eine langfristige Lagerung der Säule erfolgte in 20 % Ethanol.

Zur analytischen Bestimmung der molekularen Masse der gereinigten ATP Synthase aus *E. callanderi* wurde die Gelfiltrationssäule mit Hilfe des „Gel Filtration HMW Calibration Kit“ (GE-Healthcare, Uppsala, Schweden) nach Herstellerangaben kalibriert. Für die Kalibrierung wurden die Größenstandards Thyroglobulin (669 kDa), Ferritin (440 kDa), Aldolase (158 kDa), Conalbumin (75 kDa) und Ovalbumin (43 kDa) verwendet. Die Proteine wurden dabei in Puffer E gelöst. Die Kalibrierung erfolgte dabei wie oben beschrieben bei einer Flussrate von 0,5 ml/min.

2.11.2 Reinigung des c-Rings aus der angereicherten A_1A_0 -ATP-Synthase von *E. callanderi*

Zur Reinigung des c-Rings der A_1A_0 -ATP-Synthase aus *E. callanderi* wurden zunächst 8 – 10 mg der gereinigten Enzymprobe (siehe Kapitel 2.11.1.5) mit 1,5 % (w/v) *N*-Lauroylsarcosin versetzt und für eine Stunde bei 68 °C inkubiert, um eine Dissoziation des A_1 - und des A_0 -Komplexes zu erreichen. Während der Inkubation wurde die Probe in 5-minütigen Abständen per Hand geschüttelt, bevor sie für 30 min bei Raumtemperatur abgekühlt wurde. Der c-Ring wurde anschließend mittels fraktionierter Ammoniumsulfat-Fällung weiter gereinigt. Dazu wurde dem Ansatz langsam und unter permanentem Rühren Ammoniumsulfat zugegeben, bis eine Sättigung von 65 % erreicht wurde. Nach weiterer zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Probe für 20 min zentrifugiert (14000 Upm, 20 min, 4 °C; Centrifuge 5417, Eppendorf AG, Hamburg) und das Proteinpellet verworfen. Zur Entfernung weiterer Verunreinigungen wurde der abgenommene Überstand mit Hilfe eines Mikrofilters (0,2 µm Porengröße, Nalgene Labware, Rochester, USA) filtriert. Im Anschluss wurde der Ansatz zum Entfernen des Ammoniumsulfats mit dem 200-fachen Volumen des Dialysepuffer (10 mM Tris/HCl, 200 mM NaCl, 0,02 (v/v) % DDM, pH 8,0) über Nacht bei 4 °C dialysiert. Das Dialysat wurde anschließend mit Hilfe eines

„Vivaspin 6-Konzentrators“ (MWCO, Fa. Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen) nach Herstellerangaben auf ein Volumen von 100 µl konzentriert. Zur Überprüfung des Reinigungserfolgs wurden jeweils 20 µg Probe nach den einzelnen Reinigungsschritten mittels SDS-PAGE unter Verwendung eines 15%igen SDS-Gels nach Schagger und von Jagow (1987) aufgetrennt und die Proteine anschließend mittels Coomassie-Brilliant-Blau visualisiert.

2.11.3 Produktion und Reinigung der F₁F₀-ATP-Synthase aus *A. woodii* in *E. coli* DK8

Die heterologe Produktion und Reinigung der F₁F₀-ATP-Synthase aus *A. woodii* in *E. coli* DK8 erfolgte wie in Brandt *et al.* (2013) beschrieben.

2.11.4 Produktion und Reinigung der F₁F₀-ATP-Synthase aus *E. coli*

Die Produktion und Reinigung der F₁F₀-ATP-Synthase aus *E. coli* erfolgte wie in Wiedenmann *et al.* (2008) beschrieben. Das Plasmid pBWU13, welches das *unc*-Operon aus *E. coli* enthält, wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. von Baalmoos (Universität Bern, Schweiz) zur Verfügung gestellt.

2.11.5 Produktion und Reinigung der F₁F₀ ATP Synthase aus *P. modestum* in *E. coli* DK8

Zur heterologen Produktion der F₁F₀-ATP-Synthase aus *P. modestum* wurde eine frisch transformierte *E. coli* DK8 pPM002 Kultur in 200 ml 2xYT-Medium (+ 100 µg/ml Ampicillin) schüttelnd (130 Upm) bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die Vorkultur wurde verwendet, um jeweils zwei 2-l-Hauptkulturen auf eine OD₆₀₀ von 0,1 zu inokulieren. Die Hauptkulturen wurden ebenfalls schüttelnd bei 37 °C inkubiert bis eine OD₆₀₀ von 0,8 – 1 erreicht wurde. Danach wurde die Genexpression durch Zugabe von 1 mM Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Nach weiterer zweistündiger Inkubation wurden die Zellen durch Zentrifugation (8000 Upm, 20 min, Beckman Avanti J25, JA10 Rotor, Beckmann Coulter, Krefeld) geerntet. Insgesamt konnten bei der Ernte eine Ausbeute von ca. 15 – 20 g Zellen (Zellfeuchtmasse) erreicht werden. Zur Herstellung von gewaschenen Membranen wurden die Zellen in 20 ml TMG-Puffer (50 mM Tris/HCl, 10 mM MgCl₂, 10 % (v/v) Glycerin, pH 7,5) aufgenommen. Nach Zugabe von PMSF (Endkonzentration: 0,5 mM) sowie einer Spatelspitze DNase I

wurden die Zellen durch zweimaliges Durchlaufen einer „French Pressure Cell Press“ (110 MPa, 1000 psi; Einstellung: high; SLM Aminco, SLM Instruments, USA) aufgeschlossen. Die entstandenen Zelltrümmer wurden durch anschließende Zentrifugation (8000 Upm, 20 min, 4 °C, JA25-50, Beckman Avanti J25) entfernt. Die Membranen wurden durch Zentrifugation des gesammelten zellfreien Rohextrakts (8000 Upm, 10 min, 4 °C, JA25-50, Beckman Avanti J25) vom Cytoplasma getrennt und zweimal mit jeweils 25 ml TMG-Puffer gewaschen. Die gewaschenen Membranen wurden im Anschluss in 15 ml TMG-Puffer resuspendiert und durch Zugabe von 1 mg DDM pro mg Protein für 2,5 h bei 4 °C solubilisiert. Das Solubilisat wurde durch Zentrifugation (45000 Upm, 45 min, 70Ti Rotor, Ultrazentrifuge Optima L 100K, Beckmann Coulter, Krefeld) von den Membranen getrennt und zur weiteren Reinigung mittels Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie eingesetzt. Dazu wurde zunächst 4 ml des Säulenmaterials Ni²⁺-NTA-Agarose (Fa. Macherey-Nagel GmbH & Co.KG, Düren) mit 60 ml TMG-Puffer äquilibriert. Das Solubilisat wurde anschließend mit dem Säulenmaterial für 1 h bei 4 °C unter Schütteln (90 Upm) inkubiert. Nach dem Inkubationsschritt wurde das beladene Säulenmaterial zurück in den Säulenkörper überführt und mit 80 ml Waschpuffer (50 mM Tris/HCl, 20 mM Imidazol, 200 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 10 % (v/v) Glycerin, 0,1% (w/v) DDM, pH 7,5) gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Die Elution der F₁F₀-ATP-Synthase erfolgte durch Zugabe von 15 ml Elutionspuffer I (50 mM Tris/HCl, 200 mM Imidazol, 200 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 10 % (v/v) Glycerin, 0,1% (w/v) DDM, pH 7,5), wobei während der Elution insgesamt 5 Fraktionen mit einem Volumen von jeweils 3 ml gesammelt wurden. Von den einzelnen Fraktionen wurde abschließend die ATPase-Aktivität gemessen und Fraktionen, welche Aktivität aufwiesen, vereinigt. Verbleibende Proteinrückstände des Säulenmaterial wurden nach der Elution durch Verwendung von 50 ml Elutionspuffer II (50 mM Tris/HCl, 800 mM Imidazol, pH 7,5) entfernt. Die Lagerung des Säulenmaterials erfolgte in 20 % Ethanol. Der Reinigungserfolg der einzelnen Fraktionen wurde mittels SDS-PAGE unter Verwendung eines 12,5%igen SDS-Gels nach Schägger und von Jagow (1987) und anschließender Visualisierung mit Coomassie-Brilliant-Blau G250 überprüft. Die aufgetragene Proteinmenge betrug jeweils 20 µg.

2.11.6 Produktion und Reinigung einzelner Untereinheiten der A₁A₀-ATP-Synthase aus *E. callanderi* in *E. coli* DK8

Zur heterologen Produktion der einzelnen Untereinheiten A, B, C, D, E, F und H der A₁A₀-ATP-Synthase aus *E. callanderi* wurde jeweils das entsprechende Plasmid in *E. coli* DK8 transformiert und jeweils eine Kolonie in 5 ml 2xYT-Medium (+ 100 µg/ml Ampicillin) bei 37 °C unter Schütteln (130 Upm) über Nacht inkubiert. Diese Vorkultur wurde verwendet, um jeweils 200 ml einer Hauptkultur auf eine OD₆₀₀ von 0,1 zu inokulieren, bevor die jeweilige Hauptkultur, welche ebenfalls schüttelnd bei 37 °C inkubiert wurde, nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,8 – 1 mit 1 mM IPTG induziert wurde. Nach weiterer zweistündiger Inkubation wurden die Zellen durch Zentrifugation (8000 Upm, 20 min, 4 °C, JA10, Beckman Avanti J25) geerntet. Die Zellen (jeweils ca. 3 g Zellfeuchtmasse) wurden jeweils in 10 ml TMG-Puffer (50 mM Tris/HCl, 10 mM MgCl₂, 10 % (v/v) Glycerin, pH 7,5) aufgenommen und nach Zugabe von PMSF (Endkonzentration: 0,5 mM) sowie einer Spatelspitze DNase I durch zweimaliges Durchlaufen einer „French Pressure Cell Press“ (110 MPa, 1000 psi; Einstellung: high) aufgeschlossen. Die entstandenen Zelltrümmer wurden durch anschließende Zentrifugation (8000 Upm, 20 min, 4 °C, JA25-50, Beckman Avanti J25) entfernt. Der daraus erhaltene zellfreie Rohextrakt wurde zur weiteren Reinigung der einzelnen Untereinheiten verwendet. Dazu wurde der jeweilige zellfreie Rohextrakt mit jeweils 4 ml Ni²⁺-NTA-Agarose, welche zuvor mit 60 ml TMG-Puffer äquilibriert wurde, für 1 h bei 4 °C unter Schütteln (90 Upm) inkubiert. Nach der Inkubation wurde das beladene Säulenmaterial zurück in den Säulenkörper überführt und mit 80 ml Waschpuffer B (50 mM Tris/HCl, 20 mM Imidazol, 200 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 10 % [v/v] Glycerin, pH 7,5) gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Die Elution der einzelnen Untereinheiten erfolgte jeweils durch Zugabe von 15 ml Elutionspuffer I (50 mM Tris/HCl, 200 mM Imidazol, 200 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 10 % [v/v] Glycerin, pH 7,5), wobei während der Elution insgesamt 5 Fraktionen mit einem Volumen von jeweils 3 ml gesammelt wurden. Verbleibende Proteinrückstände des Säulenmaterials wurden nach der Elution durch Verwendung von 50 ml Elutionspuffer II (50 mM Tris/HCl, 800 mM Imidazol, pH 7,5) entfernt. Die Lagerung des Säulenmaterials erfolgte in 20 % Ethanol. Der Reinigungserfolg der einzelnen Elutionsfraktionen jeder gereinigten Untereinheit wurde mittels SDS-PAGE unter Verwendung eines 12,5%igen SDS-Gels nach Schagger und von Jagow (1987) und anschließender Visualisierung

mit Coomassie-Brilliant-Blau G250 überprüft. Die aufgetragene Proteinmenge betrug jeweils 20 µg.

2.12 Herstellung polyklonaler Antikörper

Um die Untereinheiten A, B, C, D, E, F und H der A₁A₀-ATP-Synthase aus *E. callanderi* immunologisch mittels Western-Blot-Analyse nachweisen zu können, wurden jeweils 250 µg der heterolog gereinigten Untereinheiten (siehe Kapitel 2.11.6) mittels SDS-PAGE, unter Verwendung des Puffersystems von Schägger und von Jagow (1987) aufgetrennt. Um Verunreinigungen zu vermeiden, wurden die Arbeiten mit Nitril-Handschuhen und unter Verwendung von Einwegmaterialien durchgeführt. Materialien, die zur Mehrfachbenutzung bestimmt waren, wie z. B. die Bestandteile der Gel-Guss-Apparatur, wurden zuvor gründlich mit 0,1 M NaOH gereinigt. Nachdem die einzelnen Untereinheiten mit Coomassie-Brilliant-Blau G250 visualisiert und aus dem SDS-Gel ausgeschnitten wurden, wurden diese zur Herstellung der Antikörper an die Firma Davids Biotechnologie GmbH (Regensburg) versendet. Zur Produktion der polyklonalen Antikörper wurden "New Zealand White Rabbits" verwendet. Die Immunisierung erfolgte dabei nach dem 63-Tage-Protokoll.

2.13 Messung der ATP Hydrolyse-Aktivität

Die Bestimmung der ATP-Hydrolyse-Aktivität erfolgte durch einen diskontinuierlichen Assay nach der Methode von Heinonen und Lahti (1981), bei dem das durch die Hydrolyse von ATP freigesetzte Orthophosphat photometrisch bei einer Wellenlänge von 355 nm quantifiziert werden kann.

Die ATP-Hydrolyse-Aktivität während der Reinigung der ATP-Synthasen aus *A. woodii*, *E. coli*, oder *P. modestum* wurde standardmäßig in ATP-Hydrolyse-Puffer (100 mM Tris, 100 mM Maleinsäure, 10 mM MgCl₂, 5 mM NaCl, pH 7,3) gemessen. Im Gegensatz dazu wurde die ATP-Hydrolyse-Aktivität während der Reinigung der ATP-Synthase aus *E. callanderi* im gleichen Puffer, der zusätzlich 20 % Methanol (v/v) enthielt, gemessen. Das Gesamtvolumen eines Messansatzes betrug jeweils 1200 µl. Zur Messung der ATP-Hydrolyse-Aktivität wurde je nach Reinigungsschritt 10 – 50 µg der Enzymprobe (Proteinkonzentration: 1 – 2 mg/ml) mit dem entsprechenden Volumen an ATP-Hydrolyse-Puffer vermischt und bei 37 °C bzw. 30 °C bei Messung

der ATP-Synthase aus *A. woodii* für 3 min vorinkubiert. Nach der Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 2,5 mM Na₂-ATP (Endkonzentration) gestartet und dem Testansatz zu bestimmten Zeitpunkten (0, 2, 4, 6 und 8 min) eine Probe von jeweils 200 µl entnommen. Zum Abstoppen der Reaktion wurden diese unmittelbar nach Probennahme mit 40 µl einer 30%igen (w/v) TCA-Lösung versetzt. Nachdem die Probe im Anschluss für 5 min zentrifugiert wurde (13000 Upm), wurden jeweils 200 µl des Überstandes mit 1 ml AAM-Reagenz (50 % [v/v] Aceton, 625 mM H₂SO₄, 2,5 mM (NH₄)₆Mo₇O₂₄) gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das bei der Reaktion von Orthophosphat und Ammoniummolybdat entstehende Phosphomolybdat, welches in Aceton gelöst im sauren Milieu eine Gelbfärbung aufweist, wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 355 nm quantifiziert (U-1800, Hitachi, Düsseldorf). Die Konzentration an freiwerdendem Orthophosphat wurde mithilfe einer Eichgerade bestimmt, die mit unterschiedlichen Mengen an KH₂PO₄ (0 – 100 nmol) erstellt wurde.

2.13.1 Bestimmung der Abhängigkeit der ATP-Hydrolyse-Aktivität vom pH, der Temperatur und der Methanol-Konzentration

Zur Bestimmung des Einflusses des pH-Werts bzw. der Temperatur auf die ATP-Hydrolyse-Aktivität der A₁A₀-ATP-Synthase aus *E. callanderi* wurde das gereinigte Enzym für 3 min bei dem entsprechenden pH-Wert (5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, bzw. 9) bzw. der angegebenen Temperatur (20, 25, 30, 35, 40, 45 bzw. 50 °C) inkubiert, bevor die Reaktion bei der entsprechenden Temperatur durch Zugabe von 2,5 mM Na₂-ATP gestartet wurde. Die Reaktionstemperatur für die Bestimmung des pH-Optimums wurde auf 37 °C eingestellt. Der für die Bestimmung des pH-Optimums verwendete Puffer enthielt 50 mM MES, 50 mM Tris, 50 mM HEPES, 50 mM CHES, 10 mM MgCl₂, 5 mM NaCl und 20 % (v/v) Methanol. Bei der Untersuchung des Einflusses von Methanol auf die ATP-Hydrolyse wurde dagegen die Methanol-Konzentration des ATP-Hydrolyse-Puffers variiert (0, 5, 10, 15, 20 bzw. 30 % Methanol). Die Durchführung der Messung war dabei wie in Kapitel 2.13 beschrieben.

2.13.2 Messung der Na⁺-Abhängigkeit der ATP-Hydrolyse

Zur Bestimmung der Na⁺-Abhängigkeit der ATP-Hydrolyse-Aktivität der A₁A₀-ATP-Synthase aus *E. callanderi* wurde die gereinigte Enzymprobe vor Messung der ATP-

Hydrolyse-Aktivität mittels einer HiTrap-Desalt™-Säule (16 x 25 mm, GE Healthcare, Schweden) nach Herstellerangaben an der FPLC-Anlage „Äkta Prime Plus“ mit Puffer F (100 mM HEPES, 5 mM MgCl₂, 10 % [v/v] Glycerin, 0,02 % DDM, pH 7,5) entsalzt. Dabei wurden alle verwendeten Lösungen und Puffer mit MilliQ-Wasser angesetzt, wobei die Lösungen und Puffer zur Reduktion der Kontamination mit Na⁺ zusätzlich in Plastikgefäßen gelagert wurden. Zur Bestimmung der ATP-Hydrolyse-Aktivität wurde ATP-Hydrolyse-Puffer ohne Zugabe von NaCl (100 mM Tris, 100 mM Maleinsäure, 10 mM MgCl₂, 20 % Methanol, pH 7,3) verwendet. Die entsprechende Konzentration an NaCl (0, 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2 oder 5 mM) wurde mit Hilfe von geeigneten NaCl-Stammlösungen eingestellt. Bei Untersuchung des Einflusses von Li⁺ bzw. K⁺ auf die ATP-Hydrolyse-Aktivität wurden die entsprechenden Konzentrationen mit Hilfe von geeigneten LiCl- bzw. KCl-Stammlösungen eingestellt. Die Reaktion wurde jeweils bei 37 °C durch Zugabe von 2,5 mM Tris-ATP (Endkonzentration) gestartet.

2.13.3 Hemmung der ATP-Hydrolyse durch DCCD

Bei Experimenten mit dem Inhibitor N',N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCCD) wurde die gereinigte A₁A₀-ATP-Synthase aus *E. callanderi* zum Erreichen von Na⁺-freien Bedingungen zunächst mittels HiTrap-Desalt™-Säule mit Puffer F (100 mM HEPES, 5 mM MgCl₂, 10 % [v/v] Glycerin, 0,02 % DDM, pH 7,5) entsalzt (siehe Kapitel 2.13.2). Zur Untersuchung der Abhängigkeit der pH-Werts auf die maximale Inhibition der ATP-Hydrolyse wurde das Reaktionsgemisch mit jeweils 250 µM DCCD für 25 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor 20 mM NaCl zugegeben wurde. Der ATP-Hydrolyse-Puffer enthielt 50 mM MES, 50 mM Tris, 50 mM HEPES, 50 mM CHES, 10 mM MgCl₂, und 20 % (v/v) Methanol und wurde jeweils auf pH 6, 6,5, 7 und 8 eingestellt.

Zur Untersuchung der Konkurrenz zwischen DCCD und Na⁺ um die gleiche Bindestelle der c-Untereinheit wurden jeweils 10 µg des gereinigten Enzyms (Proteinkonzentration: 1 mg/ml) in 1200 µl des ATP-Hydrolyse-Puffers mit steigenden Konzentrationen von DCCD (0, 25, 50, 100, 200 oder 500 µM; gelöst in Ethanol) in Gegenwart oder Abwesenheit von 20 mM NaCl für 25 min bei Raumtemperatur vorinkubiert. Bei Inkubation ohne NaCl, wurde dem Ansatz erst nach 25-minütiger

Inkubation 20 mM NaCl zugegeben. Die Reaktion wurde jeweils wie in Kapitel 2.13 beschrieben durch Zugabe von 2,5 mM Tris-ATP (Endkonzentration) gestartet.

2.14 Rekonstitution von ATP-Synthasen in Liposomen

Die Rekonstitution der gereinigten ATP Synthasen aus *E. coli*, *E. callanderi* oder *P. modestum* in Liposomen erfolgte in modifizierter Form nach Knol *et al.* (1998). Alle Schritte wurden, sofern nicht anders angegeben, bei 4 °C durchgeführt. Zur Herstellung von Liposomen wurden zunächst mittels Sonifikation kleine, unilamellare Vesikel generiert. Dazu wurde eine Suspension von 100 mg/ml Phosphatidylcholin Typ II S aus Sojabohnen zur Messung der $^{22}\text{Na}^+$ -Translokation in Liposomenpuffer A (50 mM Tris/HCl, 10 mM MgCl_2 , pH 7,5) oder zur standarmäßigen Messung der ATP-Synthese in Liposomenpuffer B (100 mM Tris, 100 mM Maleinsäure, 5 mM MgCl_2 , 200 mM NaCl, 0,5 mM KCl, pH 7,5) gelöst und anschließend für 20 min beschallt (60 W, 30 % Amplitude, 0,5 s Interval; Branson Sonifier 250, Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, USA). Nach der Ultraschallbehandlung wurde die entsprechende gereinigte ATP-Synthase zu der transluzenten Suspension gegeben, um ein Lipid:Protein-Verhältnis von 30:1 zu erhalten. Um den Einbau der Enzyme in der richtigen Orientierung zu gewährleisten, wurden zusätzlich 0,1 % DDM zugegeben und der Ansatz für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Suspension für 30 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln (40 Upm) gemischt und das DDM durch kontinuierliche Zugabe von jeweils 80 mg Bio-Beads™ SM-2-Adsorbentien, Bio-Rad, München, Deutschland), nach Inkubation für 1, 2 und 4 h, kontinuierlich entfernt. Zum Entfernen der Bio-Beads wurde der gesamte Ansatz über eine Polyethylen-Säule gegeben (14 ml Volumen, 15,9 mm Durchmesser, Protino® Columns, MN, Deutschland). Proteoliposomen, welche die rekonstituierte ATP-Synthase enthielten, wurden durch Zentrifugation (43000 Upm, 30 min, 70.2 Ti-Rotor, Beckman Optima L90-K) gesammelt und anschließend bei Versuchen zur Messung der Na^+ - und H^+ -Translokation in Liposomenpuffer A oder bei Versuchen zur Messung der ATP-Synthese in ATP-Synthesepuffer (100 mM Tris, 100 mM Maleinsäure, 5 mM MgCl_2 , 15 mM NaCl, 200 mM KCl, 5 mM KH_2PO_4 , pH 7,5) jeweils einmalig gewaschen (30 min, 43000 Upm, 70.2 Ti-Rotor, Beckman Optima L90-K) und danach im gleichen Puffer gelöst. Die Proteinkonzentration wurde je nach Experiment auf 0,5 – 1 mg/ml eingestellt.

2.14.1 Messung der $^{22}\text{Na}^+$ -Translokation

Zur Messung der $^{22}\text{Na}^+$ -Translokation durch die ATP Synthase aus *E. callanderi* wurden je 250 μl der Proteoliposomen mit 750 μl Transportpuffer (50 mM Tris/HCl, 5 mM MgCl_2 , 2 mM NaCl, pH 7,5) in einem 3,5-ml-Glasgefäß vermischt. Bei der Untersuchung des Einflusses von Ionophoren (ETH 2120, TCS) wurde dem Ansatz zusätzlich das entsprechende Ionophor (Endkonzentration jeweils: 30 μM , Stammlösungen jeweils in Ethanol gelöst) zugegeben. Um einen Einfluss des Lösungsmittels auszuschließen, enthielten die Kontrollansätze Ethanol in einer Endkonzentration von 0,3 % (v/v). Nach Zugabe von jeweils 10 μl $^{22}\text{Na}^+$ (1 μCi , Trägerfrei) wurden die Ansätze für je 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden diese für jeweils 5 min bei 37 °C vorinkubiert und die jeweilige Messreihe durch Entnahme von 80 μl Probe gestartet. Nach einer Inkubation von weiteren 2 bzw. 4 min wurden erneut 80 μl Probe entnommen, bevor die Reaktion nach einer Messdauer von insgesamt 5 min durch Zugabe von 2,5 mM Tris-ATP (Endkonzentration) gestartet wurde. Erneut wurde im Abstand von 0, 2, 4, 7 und 11 min jeweils 80 μl Probe entnommen. Pro Messreihe wurden zu den Zeitpunkten 0, 2, 4, 5, 7, 9, 12 und 16 min jeweils 80 μl Probe entnommen. Diese wurden jeweils unmittelbar nach Probenentnahme auf eine mit 3 ml Saccharose-Lösung (420 mM) äquilibrierte Kationenaustauscher-Säule (25 g, Dowex[®] 50 WX8, 100-200 Mesh) gegeben, mit 1 ml Saccharose-Lösung (420 mM) eluiert und anschließend in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß mit 60 μl einer 1:10 verdünnten Detergens-Lösung (W5 Geschirrspülmittel, Apfel Aroma, Lidl Co. KG, Deutschland) versetzt. Zur Bestimmung der jeweiligen Gesamtradioaktivität wurden gegen Ende jeder Versuchsreihe drei Mal je 10 μl Probe entnommen und in jeweils 1,5-ml-Reaktionsgefäße gegeben, in denen 60 μl Detergens-Lösung und 1 ml Saccharose-Lösung (420 mM) vorgelegt waren. Nach Beendigung einer Messreihe wurden die entnommenen Proben jeweils in 20-ml-Szintillations-Gefäße (Fa. Carl Roth GmbH, Karlsruhe) überführt und mit 4 ml einer Szintillationslösung (ROTISZINT[®]eco plus) vermischt. Die Messung der Radioaktivität bzw. der Zerfälle pro Minute (cpm) erfolgte in einem Szintillations-Zähler (Programm methode: „C14 10 min“; Wallac 1409 Liquid Scintillation Counter, Messfenster 1-1024, Fa. Wallac Oy, Turku, Finnland).

2.14.2 Messung der H⁺-Translokation

Zur Messung einer möglichen ATP-getriebenen H⁺-Translokation der A₁A₀-ATP-Synthase von *E. callanderi* wurden je 250 µl der Proteoliposomen (Proteinkonzentration: 1 mg/ml) in eine Fluoreszenzküvette überführt und mit 4 µM 9-Amino-6-Chloro-2-Methoxyacridin (ACMA) versetzt und der Ansatz für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte in einem Fluoreszenzspektrometer (F-4500, Hitachi, Tokyo, Japan) bei einer Anregungswellenlänge von 410 nm und einer Detektionswellenlänge von 490 nm. Nachdem die Fluoreszenz ein konstantes Niveau erreicht hatte, wurde eine mögliche H⁺-Translokation durch Zugabe von 2,5 mM Tris-ATP (Endkonzentration) initiiert. Als Kontrollansatz wurde das Experiment unter den gleichen Reaktionsbedingungen mit 250 µg der in Proteoliposomen rekonstituierten H⁺-abhängige F₁F₀-ATP-Synthase aus *E. coli* (Proteinkonzentration: 1 mg/ml) durchgeführt. Die Fluoreszenzlöschung wurde jeweils durch Zugabe von 20 µl gesättigter (NH₄)₂SO₄-Lösung überprüft.

2.15 Messung der ATP-Synthese-Aktivität

Die Messung der ATP-Synthese-Aktivität der rekonstituierten ATP-Synthasen aus *A. woodii*, *E. callanderi*, *E. coli* oder *P. modestum* erfolgte mit Hilfe eines kontinuierlichen Luciferin/Luciferase-Assays (ATP Biolumineszenz-Assay-Kit CLS II, Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz). Das Prinzip des Assays beruht auf der Umsetzung von Luciferin zu Licht in Anwesenheit von ATP. Die bei der Reaktion entstehende Menge an emittiertem Licht ist somit proportional zur Menge an gebildetem ATP. Der Vorteil des verwendeten Assays ist, dass in Abhängigkeit der Menge an gebildetem ATP ein konstantes Lichtsignal erzeugt wird, wodurch kontinuierliche Messungen durchgeführt werden können. Die Messung des emittierten Lichts erfolgte dabei in einem Luminometer (FLUOstar Omega, BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland). Die ATP-Synthese-Aktivität der rekonstituierten Enzyme erfolgte mit Ausnahme bei Messung der ATP-Synthase aus *A. woodii*, welche bei 30 °C durchgeführt wurde, jeweils bei 37 °C. Die Messung der ATP Synthese wurde jeweils in 96-Well-Mikrotiterplatten (Sarstedt, Nümbrecht) durchgeführt. Je Ansatz wurden 250 µl der entsprechenden Proteoliposomen mit 50 µl des „ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II“ (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz) vermischt. Zur Aufnahme einer ATP-Basislinie wurde das Reaktionsgemisch zunächst für 3 min

bei der entsprechenden Temperatur inkubiert, bevor die Reaktion durch Zugabe von 0,5 mM K-ADP und 2 μ M Valinomycin (jeweils Endkonzentrationen) gestartet wurde.

2.15.1 Messung des Einflusses von $\Delta\psi$, $\Delta pNa/\Delta pH$ oder $\Delta\tilde{\mu}Na^+/\Delta\tilde{\mu}H^+$ auf die ATP-Synthese

Der Einfluss der Triebkräfte $\Delta\psi$, ΔpNa oder $\Delta\tilde{\mu}Na^+$ wurde an den rekonstituierten ATP-Synthasen von *A. woodii*, *E. callanderi* oder *P. modestum* untersucht. Im Gegensatz dazu wurde am rekonstituierten Enzym aus *E. coli* der Einfluss von ΔpH bzw. $\Delta\tilde{\mu}H^+$ anstelle von $\Delta pNa/\Delta\tilde{\mu}Na^+$ untersucht. Die Berechnung der jeweils erzeugten Potentiale (mV) erfolgte mit Hilfe der Nernst-Gleichung (Gl. 8):

$$U = -\frac{RT}{zF} \cdot \ln \frac{c_{\text{innen}}}{c_{\text{au\ss}en}} \quad (\text{Gl. 8})$$

Wobei U das erzeugte Potential (in V), R die allgemeine Gaskonstante, T die Temperatur (in Kelvin), z die Anzahl der translozierten Ionen, F die Faraday-Konstante und c die Konzentration innerhalb und au\ss erhalb der Proteoliposomen ist.

Bei Untersuchungen des Einflusses der Triebkräfte $\Delta\psi$, $\Delta pNa/\Delta pH$ oder $\Delta\tilde{\mu}Na^+/\Delta\tilde{\mu}H^+$ auf die ATP-Synthese wurde der Liposomenpuffer B sowie der ATP-Synthesepuffer wie folgt modifiziert: Bei Erzeugung eines K^+ /Valinomycin-Diffusionspotenzial ($\Delta\psi$) wurde die KCl-Konzentration des Liposomenpuffers B auf 0,5 mM und die NaCl-Konzentration auf 205 mM NaCl erh\o oht. Der ATP-Synthesepuffer enthielt 100 mM Tris, 100 mM Maleins\o aure, 200 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 5 mM NaH_2PO_4 pH 7,5. Dabei wurde im ATP-Synthesepuffer zus\o atzlich die KCl-Konzentration auf 5, 10, 15, 20, 30, 50, 100, 200 oder 500 mM eingestellt. Das Na^+ -Potential (ΔpNa) wurde erzeugt, indem die Konzentration an KCl im Liposomenpuffer B auf 5 mM und die NaCl-Konzentration auf 205 mM ver\o andert, w\o ahrend die NaCl-Konzentration im ATP-Synthesepuffer zwischen 1 – 15 mM variiert wurde. Die ΔpNa -getriebene ATP-Synthese wurde nur durch Zugabe von 0,5 mM K-ADP (finale Konzentration) gestartet. Zur Erzeugung des elektrochemischen Na^+ -Gradienten ($\Delta\tilde{\mu}Na^+$) wurde $\Delta\psi$ konstant bei 60 mV gehalten, indem die KCl-Konzentration im Liposomenpuffer B auf 5 mM und im Synthesepuffer auf 45 mM ver\o andert wurde. Zus\o atzlich wurde ein steigendes ΔpNa durch \o Anderung der NaCl-Konzentration im ATP-Synthesepuffer auf 5, 15, 25, 35, 45, 55, 105 oder 200 mM erzeugt.

Die ΔpH - oder $\Delta\tilde{\mu}\text{H}^+$ -getriebene ATP-Synthase für die ATP-Synthase von *E. coli* wurde durchgeführt wie in Wiedenmann *et al.* (2009) beschrieben. Dabei wurde das Enzym in einem Liposomenpuffer, welcher aus 10 mM HEPES, 10 mM MgSO_4 , 0,1 mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, 10 % [w/v] Saccharose, 0,5 mM K_2SO_4 , pH 6,5 besteht, rekonstituiert. Zur Messung der ΔpH - oder $\Delta\tilde{\mu}\text{H}^+$ -getriebenen ATP-Synthase wurden zunächst 25 μl des „ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II“ mit 225 μl des entsprechenden alkalischen Puffers (100 mM MOPS, 100 mM Tricin, 0,5 mM KCl, 5 mM NaH_2PO_4 , 0,5 mM ADP, pH 7 – 9) vermischt und für 5 min eine ATP-Basislinie aufgenommen. Gleichzeitig wurden 10 μl der Proteoliposomen (Proteinkonzentration: 25 mg/ml) mit 10 μl eines sauren Puffers (100 mM MES/NaOH, 0,5 mM KCl, pH 5,75) vermischt und für 5 min bei 37 C inkubiert. Durch Zugabe der Suspension zum alkalischen Puffer wurde die ΔpH -getriebene ATP-Synthase initiiert. Die erzeugten Potentiale betragen ca. 90, 120, 150 und 180 mV. Bei Messung der $\Delta\tilde{\mu}\text{H}^+$ -getriebenen ATP-Synthase wurde ein konstantes $\Delta\psi$ von ca. 120 mV durch Änderung der KCl-Konzentration im alkalischen Puffern auf 50 mM erzeugt. Dagegen wurde ein steigender ΔpH durch variierende pH-Werte des alkalischen Puffers (pH 6,25, 7,75, 8,25, oder 8,75) erzeugt.

2.15.2 Messung der Na^+ -Abhängigkeit der ATP-Synthase

Zur Überprüfung der Na^+ -Abhängigkeit der ATP-Synthase der A_1A_0 -ATP-Synthase aus *E. callanderi* wurde das Enzym vor der Rekonstitution mittels HiTrap-Desalt™-Säule mit Puffer F (100 mM HEPES, 5 mM MgCl_2 , 10 % [v/v] Glycerin, 0,02 % DDM, pH 7,5) entsalzt. Die $\Delta\psi$ -getriebene ATP-Synthase-Aktivität wurde bei einem Potential von 120 mV gemessen. Der verwendete Liposomenpuffer B enthielt dabei die gleiche Konzentration an NaCl (0, 0,2, 0,5, 1, 2, 5 oder 20 mM) wie der ATP-Synthesepuffer. Der ATP-Synthesepuffer enthielt 45 mM KCl. Die Messung der $\Delta\psi$ -getriebenen-ATP-Synthase erfolgte wie in Kapitel 2.16.2 beschrieben.

2.15.3 Hemmstoffexperimente der ATP-Synthase mit DCCD und Ionophoren

Zur Untersuchung des Einflusses der Ionophore TCS und ETH 2120 auf die $\Delta\tilde{\mu}\text{Na}^+$ -getriebene ATP-Synthase der A_1A_0 -ATP-Synthase aus *E. callanderi* wurden 100 μg des rekonstituierten Enzyms für 10 min bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden Ionophor (Endkonzentration: 30 μM) inkubiert, bevor die $\Delta\tilde{\mu}\text{Na}^+$ -getriebene ATP-Synthase wie in Kapitel 2.15 beschrieben gemessen wurde.

Bei Experimenten mit dem Inhibitor DCCD wurde die gereinigte A₁A₀-ATP-Synthase aus *E. callanderi* zum Erreichen von Na⁺-freien Bedingungen zunächst mittels HiTrap-Desalt™-Säule mit Puffer F (100 mM HEPES, 5 mM MgCl₂, 10 % [v/v] Glycerin, 0,02 % DDM, pH 7,5) entsalzt. Im Anschluss wurde das Enzym für 30 min bei Raumtemperatur mit 300 µM DCCD in Gegenwart oder Abwesenheit oder nur in Gegenwart von 200 mM NaCl inkubiert, bevor es in Proteoliposomen rekonstituiert wurde. Die untersuchten Ionophore sowie DCCD wurden in Ethanol gelöst. Um einen inhibitorischen Effekt durch Ethanol auszuschließen, wurden die Kontrollansätze zusätzlich mit 0,2 % (v/v) Ethanol durchgeführt. Die Messung der ATP-Synthese erfolgte wie in Kapitel 2.15 beschrieben.

2.16 Verfahren zur Proteinbestimmung

2.16.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (1976)

Zur Bestimmung der Konzentration cytosolischer Proteine nach Bradford (1976) wurden je 200 µl der zu untersuchenden Proteinlösung in einer Küvette mit 1 ml Bradford-Reagenz (0,1 g Coomassie Brilliant Blue G 250 in 50 ml Ethanol gelöst, 100 ml Phosphorsäure, ad 1 l H₂O_{dest.}) vermischt. Die Erstellung einer Eichgerade erfolgte mit Hilfe von Rinderserumalbumin (BSA). Dazu wurden jeweils in Doppelbestimmung 0, 25, 50, 75 und 100 µl einer BSA-Lösung (Proteinkonzentration: 0,1 mg/ml) mit demineralisiertem Wasser auf ein Volumen von 200 µl aufgefüllt und anschließend ebenfalls mit 1 ml Bradford-Reagenz versetzt. Nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion der einzelnen Proben bei jeweils 595 nm im Spektralphotometer (U-1800, Hitachi, Düsseldorf) bestimmt.

2.16.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry (1951)

Die Bestimmung der Konzentration von Membranproteinen erfolgte nach Lowry *et al.* (1951). Dabei wurden je 100 µl der zu untersuchenden Proteinlösung in einer Küvette nacheinander mit 20 µl SDS (100 mM), 1 ml einer frisch hergestellten Lowry-Lösung (24 ml 2 % [w/v] Na₂CO₃ in 0,1 M NaOH gelöst, 0,5 ml 2 % [w/v] K-Na-Tartrat, 0,5 ml 1 % [w/v] CuSO₄) und 100 µl Folin-Ciocalteu-Reagenz-Lösung versetzt. Zur Erstellung einer Eichgerade wurde zusätzlich jeweils in Doppelbestimmung 0, 25, 50, 75 und 100 µl einer BSA-Lösung (Proteinkonzentration: 0,1 mg/ml) mit demineralisiertem

Wasser auf ein Volumen von 100µl aufgefüllt und anschließend ebenfalls mit den einzelnen Lösungen versetzt. Nach kurzem Mischen der Ansätze und anschließender 20-minütiger Inkubation bei 37 °C wurde die Extinktion der einzelnen Proben bei jeweils 650 nm im Spektralphotometer (U-1800, Hitachi, Düsseldorf) bestimmt.

2.17 Verfahren zur Auftrennung von Proteinen mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese

2.17.1 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen mittels denaturierender Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) erfolgte nach Schägger und von Jagow (1987). Dabei wurden 12,5 oder 15%ige Polyacrylamid-Gele verwendet. Um auch Proteinproben mit einer geringen Proteinkonzentration nach gelelektrophoretischer Auftrennung auf Polyacrylamid-Gelen sichtbar machen zu können, wurden diese vorher mittels Trichloressigsäure (TCA) gefällt. Dazu wurden die entsprechenden Proteinproben in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß mit demselben Volumen an 1 M TCA versetzt und anschließend zentrifugiert (13000 Upm, 5 min, Mikro 22 Zentrifuge, Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen). Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurden die gefällten Proteine in 10 µl 0,1 M NaOH aufgenommen. Alle Proben wurden vor dem Auftragen mit jeweils 5 µl 3x Auftragspuffer (150 mM Tris/HCl, 36 % [v/v] Glycerin, 12 % [w/v] SDS, 6 % [v/v] 2-Mercaptoethanol, 0,03 % [w/v] Serva Blau G 250, pH 6,8) versetzt und jeweils für 10 min bei 100 °C inkubiert. Als Größenstandard wurden jeweils 5 µl des Protein-Markers „PageRuler Prestained Protein Ladder“ (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte zunächst bei einer Spannung von 80 V bis die Proteine ins Trenngel eingelaufen waren. Daraufhin wurde die Spannung auf 120 V erhöht.

Für eine denaturierende PAGE in der zweiten Dimension wurden die mittels Coomassie Brilliant-Blau R 250 gefärbten Proteine eines nativen Gels ausgeschnitten, in ein 2-ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml Solubilisierungspuffer (2 % [w/v] SDS, 60 mM Na₂CO₃, 0,67 [v/v] Mercaptoethanol) versetzt. Anschließend wurde der Ansatz für 20 min bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln für 20 Minuten inkubiert und das ausgeschnittene Protein in eine Tasche eines 12,5%igen SDS-Gel

nach Schägger und von Jagow (1987). überführt. Damit das ausgeschnittene Proteine nicht aus der Tasche diffundieren konnte, wurde diese mit einer Overlay-Lösung (0,1 M Tris, 0,1 M Tricin, 0,1 % [w/v] SDS, 0,5 % [w/v] Agarose, pH 8,25) überschichtet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte wie oben beschrieben.

2.17.2 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinkomplexen in ihrem nativen Zustand erfolgte mittels „high resolution Clear-Native PAGE“ nach Wittig *et al.* (2007). Das Trenngel des nativen Gels bestand dabei aus einem kontinuierlichen Acrylamid-Gradienten von 5 – 13 %, welches mit Hilfe eines Gradientenmischers (Eigenkonstruktion) und einer Peristaltikpumpe (ismaTec, MS-reglo, Glattbrugg) hergestellt wurde. Zum Gießen des Trenngels wurden in die vordere Kammer des Gradientenmischers 858 µl AB-Mix (48 % [w/v] Acrylamid, 1,9 % [w/v] Bisacrylamid), 1,1 ml 3x Gelpuffer (150 mM BisTris, 1,5 M Aminohexansäure, 0,05 % [v/v] Triton X-100), 500 µl Glycerin (86 %), 1,34 ml H₂O_{dest.}, 20 µl 10 % [w/v] Ammoniumperoxodisulfat (APS) sowie 2 µl N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) gegeben. In die hintere Kammer des Gradientenmischers wurden 330 µl AB-Mix, 1,1 ml 3x Gelpuffer, 1,87 ml H₂O_{dest.}, 20 µl 10 % APS und 2 µl TEMED gegeben. Um eine gleichmäßige Polymerisation des Trenngels zu gewährleisten, wurde es nach dem Gießen mit 1 ml Isopropanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel (250 µl AB-Mix, 1 ml 3x Gelpuffer, 1,75 ml H₂O_{dest.}, 25 µl 10 % APS und 2,5 µl TEMED) aufgegossen. Die Lagerung des 3x Gelpuffers erfolgte bei Raumtemperatur, während alle anderen Substanzen bzw. Puffer bei 4 °C gelagert wurden. Vor dem Auftragen der aufzutrennenden Proteinproben wurden diese mit 10x Probenpuffer (43,5 % [v/v] Glycerin, 0,1 % [w/v] Ponceau S) versetzt. Als Proteinstandard wurden 5 µl des „High molecular weight calibration kit for electrophoresis“ (Amersham Biosciences, England) verwendet. Zur gelelektrophoretischen Auftrennung wurden als Laufpuffer der Kathodenpuffer (50 mM Tricin, 7,5 mM Imidazol, 0,02 % [w/v] DDM, 0,01 % [w/v] Na-Desoxycholat) und der Anodenpuffer (25 mM Imidazol, pH 7) verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 4 °C und einer Spannung von 80 V bis die Proteine ins Trenngel eingelaufen waren. Im Anschluss wurde die Spannung auf 120 V erhöht.

2.18 Western Blot-Analyse zum Nachweis von Proteinen

Die Übertragung von Proteinen auf eine Nitrocellulosemembran sowie der anschließende immunologische Nachweis der einzelnen Untereinheiten der A₁A₀-ATP-Synthase aus *E. callanderi* erfolgte wie in Sambrook *et al.* (1989) beschrieben. Dazu wurden die Proteine, nachdem sie mittels SDS-PAGE aufgetrennt wurden, nach dem Semidry-Verfahren bei 60 mA für eine Stunde (Semidry-Elektroblottingkammer, Biometra, Göttingen) auf eine Nitrocellulosemembran (ProtranBA85, Fa. Schleicher & Schüll, Dassel) übertragen. Als Anodenpuffer I wurde ein Puffer bestehend aus 300 mM Tris, 20 % Methanol, pH 10,4, als Anodenpuffer II einer aus 25 mM Tris, 20 % Methanol, pH 10,4 und als Kathodenpuffer einer aus 25 mM Tris, 20 % Methanol, 40 mM 6-Aminohexansäure, pH 9,4 verwendet. Nach dem Transfer wurde die Membran zur Absättigung eine Stunde in 50 ml 1x PBST-Puffer (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, 0.5 ml/l Tween-20-Lösung, pH 7,4) mit 5 % (w/v) Magermilchpulver bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran für 10 min mit 20 ml 1x PBST-Puffer wurde diese mit dem entsprechenden Primärantikörper (Anti-A, Anti-B, Anti-C, Anti-D, Anti-E, Anti-F oder Anti-H) in 20 ml 1x PBST-Puffer für eine Stunde unter Schütteln inkubiert. Die Verdünnung des entsprechenden Primärantikörpers betrug jeweils 1:10000. Nach erneutem dreimaligem Waschen der Membranen mit 1x PBST-Puffer, wurde diese eine Stunde mit dem Sekundärantikörper (α Rabbit IgG (H+L)-HRP-Conjugate, Bio-Rad, Hercules; in 1x PBST gelöst, Verdünnung: 1:10000) inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde erneut durch dreimaliges Waschen mit 1x PBST-Puffer für 10 min entfernt. Die Detektion der von den Antikörpern gebundenen Proteine erfolgte nach Inkubation der Membran in einem Gemisch aus 4 ml Lösung A (20 mM Tris/HCl, 50 mg Luminol in 200 ml H₂O_{dest.}, pH 8,6), 2 μ l 30 % (v/v) H₂O₂-Lösung und 400 μ l Lösung B (1,1 mg/ml *p*-Hydroxycoumarinsäure in DMSO) für 2 min. Die anschließende Dokumentation der Fluoreszenz erfolgte am „Intas ECL Chemostar Transilluminator“ (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen) nach Angaben des Herstellers.

2.19 Verfahren zur Proteinfärbung

In Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Verfahren zur Proteinfärbung in Polyacrylamid-Gelen verwendet.

2.19.1 Unspezifische Proteinfärbung mit Coomassie-Brilliant-Blau

Die unspezifische Färbung von in Polyacrylamid-Gelen aufgetrennten Proteinen erfolgte mittels Coomassie Brilliant-Blau R 250 (Weber und Osborne, 1969). Dazu wurden die Polyacrylamid-Gele für mindestens vier Stunden bei Raumtemperatur unter kontinuierlichem Schütteln (Heidolph Unimax 2010, VWR, Darmstadt) in einer Coomassie-Färbelösung (50 % [v/v] Methanol, 10 % [v/v] Essigsäure, 0,05 % [w/v] Coomassie Serva Blue R 250) inkubiert. Zum Entfärben des Hintergrunds wurde das Gel mehrfach mit Entfärbungslösung (50 % [v/v] Methanol, 10 % [v/v] Essigsäure) gewaschen. Die Entfärbungslösung wurden dabei über einen Aktivkohlefilter regeneriert. Nachdem die entsprechende Entfärbung des Gel-Hintergrunds erreicht war, wurde es zur Erhöhung des Kontrasts über Nacht in demineralisiertes Wasser eingelegt und im Anschluss daran dokumentiert.

2.19.2 Spezifische Färbung von Proteinen mit ATP-Hydrolyse-Aktivität

Zur Identifikation von ATP-hydrolysierenden Proteinkomplexen wurden die zu untersuchenden Proteine zunächst mittels nativer PAGE aufgetrennt (siehe Kapitel 2.17.2) und das native Gel im Anschluss für eine Stunde in Reaktionspuffer (35 mM Tris/HCl, 270 mM Glycin, 14 mM MgSO₄, 0,2 % [w/v] Pb(NO₃)₂, 8 mM Na₂-ATP, pH 8,3) unter kontinuierlichem Schütteln für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Durch die ATP-Hydrolyse-Aktivität wurde Orthophosphat freigesetzt, welches mit dem im Reaktionspuffer enthaltenen Bleinitrat komplexierte und als weißer Niederschlag auf der Höhe der aufgetrennten, ATP-hydrolysierenden Proteinkomplexe sichtbar wurde. Zum Abstoppen der Reaktion, wurde das native Gel anschließend für 30 min in 50 % (v/v) Methanol inkubiert.

2.19.3 Markierung der c-Untereinheit mit NCD-4

Zur spezifischen Markierung der c-Untereinheit der A₁A₀-ATP-Synthase aus *E. callanderi* wurden 10 µg der gereinigten, Na⁺-freien, Enzymprobe mit 60 oder 200 nmol NCD-4 über Nacht bei Raumtemperatur in Gegenwart oder Abwesenheit von 200 mM NaCl inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Protein mittels SDS/PAGE auf einem 12,5%igem Schägger-Gel aufgetrennt und die Fluoreszenz nach Anregung mit UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm (Vilber Lourmat, Bachofer, Reutlingen) detektiert.

2.20 Identifikation von Proteinen mittels LC-MS/MS und MALDI

Um die einzelnen Untereinheiten der A_1A_0 -ATP-Synthase aus *E. callanderi* zu identifizieren, wurden massenspektrometrische Untersuchungen durchgeführt. Hierzu wurden 20 µg des gereinigten Enzyms mittels SDS-PAGE aufgetrennt, die einzelnen Proteine aus dem SDS-Gel ausgeschnitten und anschließend zur massenspektrometrischen Analyse an das Functional Genomics Center Zürich der ETH Zürich (Schweiz) gesendet. Die Vorbereitung der Proben sowie die anschließende Analyse mittels „Peptide-Mass-Fingerprinting“ (PMF) wurde von Dr. Peter Hunziker durchgeführt. Alle MS/MS-Proben wurden mit Hilfe der Software „Mascot“ analysiert (Matrix Science, London, UK) und mit der bioinformatischen Proteindatenbank UniProt abgeglichen. Die Auswertung der MS/MS basierten Peptid- und Proteinidentifikation erfolgte mit Hilfe des Programms „Scaffold“ (Proteome Software Inc., Portland, USA).

2.21 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden freundlicherweise von Dr. Janet Vonck (Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt) durchgeführt. Die eingesetzte Proteinkonzentration betrug 0,2 mg/ml. Dabei wurden Proteine mit 1% (w/v) Uranylacetat negativ kontrastiert und Aufnahmen mit einem Elektronenmikroskop (Philips CM 120, FEI, Eindhoven) angefertigt.

2.22 Chemikalien und Gase

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien stammen von den Firmen AppliChem GmbH (Darmstadt), Merck KGaA (Darmstadt), Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim), SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg), New England Biolabs (Frankfurt am Main) oder Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim), sofern nicht anders angegeben. Die verwendeten Gase CO (100 %), N_2 (100 %), das $N_2:CO_2$ -Gasgemisch (80:20 [v/v]) sowie das $H_2:CO_2$ -Gasgemisch (80:20 [v/v]) wurden von Praxair Deutschland GmbH (Düsseldorf) bezogen.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen des Wachstums von *E. callanderi* KIST612

E. callanderi KIST612 ist ein Gram-positives acetogenes Bakterium, welches in der Lage ist, auf einer Reihe an verschiedenen Wachstumssubstraten wie beispielsweise C6-Zuckerverbindungen (u. a. Glukose und Fruktose), C1-Verbindungen wie Methanol, Formiat, Synthesegas (H_2 , $CO_2 + CO$), $H_2 + CO_2$ oder CO zu wachsen (Chang *et al.*, 1997; Chang *et al.*, 2001; Chang *et al.*, 2007; Roh *et al.*, 2011). Dabei ist *E. callanderi* eines der wenigen acetogenen Bakterien, von denen bekannt ist, dass es neben dem Hauptprodukt Acetat zusätzlich Butyrat produziert (Schiel-Bengelsdorf und Dürre, 2012). Diese Fähigkeit macht den Organismus als Produktionsplattform zur biotechnologischen Nutzung besonders interessant. Butyrat ist ein zentrales Intermediat, welches zur Herstellung von biotechnologisch wertvollen Produkten wie beispielsweise Butanol oder höherkettigen Alkoholen verwendet werden kann (Bengelsdorf und Dürre, 2017). Die Untersuchungen zur Bildung von Butyrat in *E. callanderi* KIST612 umfasste bisher nur wenige Substrate wie CO und $H_2 + CO_2$ und beschränkten sich hauptsächlich auf kontinuierliche Wachstumsexperimente im Bioreaktor (Chang *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2017). Dabei konnte festgestellt werden, dass *E. callanderi* in der Lage ist, Butyrat aus CO zu produzieren, jedoch nicht aus $H_2 + CO_2$. Die Butyratproduktion aus CO wurde jedoch nur in Bioreaktoren mit Zellrecycling oder in Batch-Kulturen mit Zugabe von Acetat beobachtet. Weitere Substrate, die ebenfalls zur Butyratproduktion in *E. callanderi* KIST612 führen, wurden bisher nicht untersucht. Aus diesem Grund wurde innerhalb der Arbeit das Wachstum von *E. callanderi* KIST612 sowie dessen Fähigkeit zur Butyratproduktion auf einer Reihe weiterer Substrate untersucht. Das Wachstum sowie die Fähigkeit zur Butyratproduktion wurde in geschlossenen Batchkulturen mit den Substraten Glukose, Formiat, Methanol, $H_2 + CO_2$ oder CO untersucht.

3.1.1 Wachstum und Produktbildung auf Glukose

Zur Untersuchung des Wachstums und der Produktbildung von *E. callanderi* auf Glukose wurde zunächst die optimale Substratkonzentration im Medium bestimmt. Dazu wurde der Organismus in CBBM mit jeweils unterschiedlichen Mengen an Glukose (0, 20, 40, 80, 120 bzw. 200 mM) transferiert. Die Inokulation erfolgte auf eine

OD₆₀₀ von 0,1 aus adaptierten Kulturen (zwei Transfers auf einer Vorkultur mit 20 mM Glukose als Kohlenstoff- und Energiequelle) und das Wachstum bei 37 °C wurde über einen Zeitraum von 24 h verfolgt (Abb. 6). Es zeigte sich bei allen Glukosekonzentrationen ein identisches Wachstumsverhalten. Die finale OD₆₀₀ wurde jeweils nach ca. 13 h erreicht und betrug 4,5. Die Wachstumsrate μ lag jeweils bei 0,33 h⁻¹ und die Verdopplungszeit t_d bei 2,1 h.

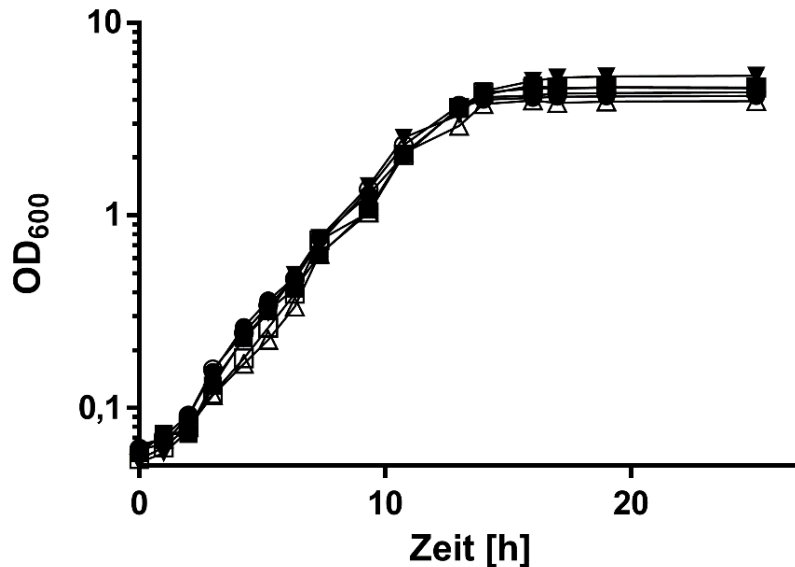


Abb. 6. Wachstum von *E. callanderi* in Abhängigkeit von unterschiedlichen Mengen an Glukose. *E. callanderi* KIST612 wurde bei 37 °C in 500 ml CBBM mit 20 (●), 40 (○), 80 (▼), 120 (△), 160 (■) oder 200 (□) mM Glukose kultiviert. Das Wachstum wurde photometrisch anhand der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei biologisch unabhängigen Experimenten (n = 3).

Da die Konzentration an Glukose keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten von *E. callanderi* hatte, wurde der Organismus zur Untersuchung des Produktspektrums in CBBM mit 20 mM Glukose kultiviert. Neben dem Wachstum wurde zusätzlich die Glukose-Konzentration, das Produktspektrum und der pH-Wert während der gesamten Kultivierungsdauer bestimmt (Abb. 7). Nach Überimpfen einer an Glukose angepassten Vorkultur (zwei Transfers) auf frisches Medium begann das Wachstum sofort mit einer Wachstumsrate von 0,34 h⁻¹ und dauerte insgesamt 13 h, bevor die stationäre Phase erreicht wurde. Parallel zum Wachstum nahm die Konzentration an Glukose kontinuierlich mit einer Rate von 1,4 mmol l⁻¹ · h⁻¹ bis auf eine Restkonzentration von 1,2 mM nach 24 h ab. Im gleichen Zeitraum fiel der pH-Wert von 7,2 auf 4,5. Der Glukoseverbrauch ging mit einer kontinuierlichen Bildung an

Acetat ($2,8 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) einher. Nach einer Kultivierung von 24 h wurde eine Endkonzentration von 32,1 mM Acetat erreicht, was einem Acetat:Glukose-Verhältnis von 1,7:1 entsprach. Interessanterweise wurde Butyrat erst in der spät-exponentiellen Wachstumsphase ab 10 h gebildet und die Konzentration nahm in der Folge kontinuierlich zu, bis nach etwa 17 h eine Endkonzentration von 4,3 mM erreicht wurde. Dies entsprach einem Butyrat:Glukose-Verhältnis von 0,23:1. Im Gegensatz dazu wurde Isobutyrat nur in sehr geringen Mengen ab der spät-exponentiellen Wachstumsphase gebildet. Die Endkonzentration lag bei 0,3 mM. Die Bildung von Ethanol begann dagegen erst nach Eintreten der stationären Wachstumsphase nach 13 h. Es wurden jedoch nur geringe Mengen an Ethanol im Bereich von 0,4 – 0,7 mM gebildet.

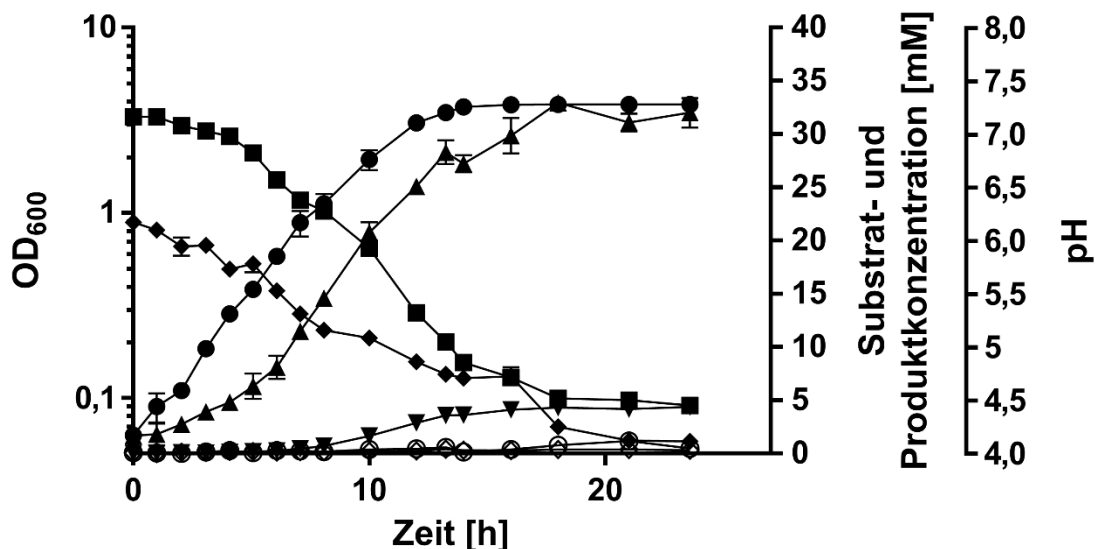


Abb. 7. Wachstum und Produktspektrum von *E. callanderi* auf 20 mM Glukose. *E. callanderi* KIST612 wurde bei 37 °C in 500 ml CBBM mit 20 mM Glukose kultiviert. Das Wachstum (●) wurde photometrisch anhand der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) bestimmt. Der pH (■) wurde mittels pH-Elektrode bestimmt. Die Konzentration an Glukose (◆) wurde mit Hilfe eines gekoppelt optisch-enzymatischen Tests bestimmt. Die gebildete Menge an Acetat (▲), Butyrat (▼), Isobutyrat (◇) und Ethanol (○) wurde gaschromatographisch untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei biologisch unabhängigen Experimenten ($n = 3$).

3.1.2 Wachstum und Produktbildung auf Methanol

Als nächstes wurde das Wachstum und die Produktbildung von *E. callanderi* KIST612 auf Methanol untersucht. *E. callanderi* ist eines der wenigen acetogenen Bakterien, welche Methanol verstoffwechseln können. Dies konnte bereits für nah-verwandte *E. limosum*-Stämme gezeigt werden (Pacaud *et al.*, 1985; Loubiere und Lindley,

1991). *E. callanderi* KIST612 sollte nach Vorhersage der Genomsequenz ebenfalls in der Lage sein, Methanol (+ CO₂) als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle verwerten zu können (Roh *et al.*, 2011). Bei Transfer einer auf Glukose-adaptierten Kultur in CBBM mit 60 mM Methanol konnte nach einer lag-Phase von 8 h exponentielles Wachstum beobachtet werden (Daten nicht nicht gezeigt). Die Wachstumsrate betrug 0,04 h⁻¹ und die Verdopplungszeit ca. 17,61 h.

Um den Einfluss der Methanol-Konzentration auf das Wachstumsverhalten von *E. callanderi* zu untersuchen, wurde der Organismus als nächstes in CBBM mit jeweils unterschiedlichen Mengen an Methanol (0, 20, 40, 80, 120 bzw. 200 mM) kultiviert (Abb. 8). Nach der Inokulation auf eine OD₆₀₀ von 0,1 aus zweifach adaptierten Kulturen zeigte sich bereits bei Wachstum auf 20 mM Methanol die maximale Wachstumsrate von 0,04 h⁻¹. Die stationäre Wachstumsphase wurde bei allen Ansätzen nach ca. 50 h erreicht und die finale OD₆₀₀ betrug jeweils 1.

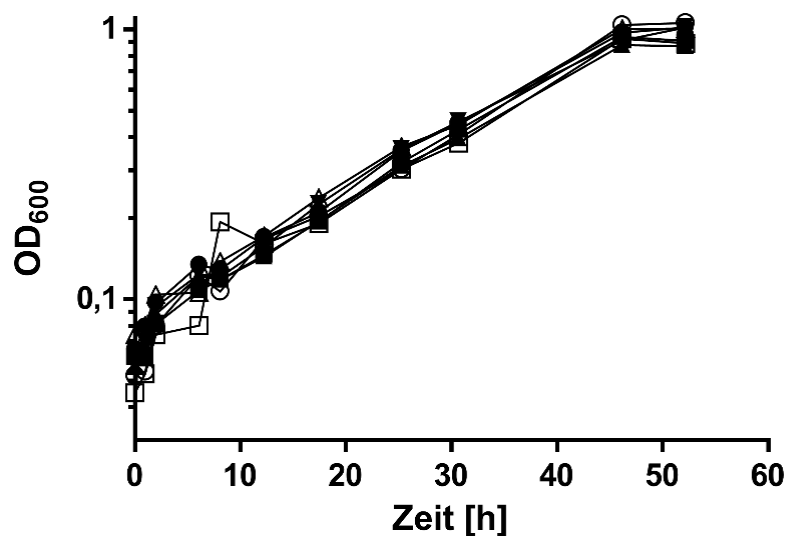


Abb. 8. Wachstum von *E. callanderi* auf Methanol in Abhängigkeit der Methanol-Konzentration. *E. callanderi* KIST612 wurde bei 37 °C in 500 ml CBBM mit 20 (●), 40 (○), 80 (▼), 100 (△), 120 (▲), 160 (■) oder 200 (□) mM Methanol kultiviert. Das Wachstum wurde photometrisch anhand der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀) bestimmt. Alle Messwerte bestehen aus dem Mittelwert ± SEM von drei biologisch unabhängigen Replikaten.

Da die Wachstumsrate von *E. callanderi* bereits bei 20 mM Methanol maximal war, wurde diese Konzentration zur Untersuchung der Produktbildung während des Wachstums verwendet. Nachdem eine Methanol-adaptierte Kultur (zwei Transfers) auf

CBBM mit 20 mM Methanol transferiert wurde, begann das exponentielle Wachstum sofort mit einer Verdopplungszeit von 17,61 h und dauerte etwa 55 h, bevor die stationäre Phase begann (Abb. 9). Gleichzeitig zum Wachstum nahm die Konzentration an Methanol kontinuierlich mit einer Geschwindigkeit von $0,29 \text{ mmol l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ auf eine Restkonzentration von 3,4 mM nach einer Kultivierungsdauer von 75 h ab. Der Verbrauch an Methanol ging mit der Bildung von Acetat einher. Die Endkonzentration betrug 12 mM, was einem Acetat:Methanol-Verhältnis von 0,53:1 entspricht. Der pH-Wert stieg während der Kultivierung von 7,3 auf 7,6 leicht an.

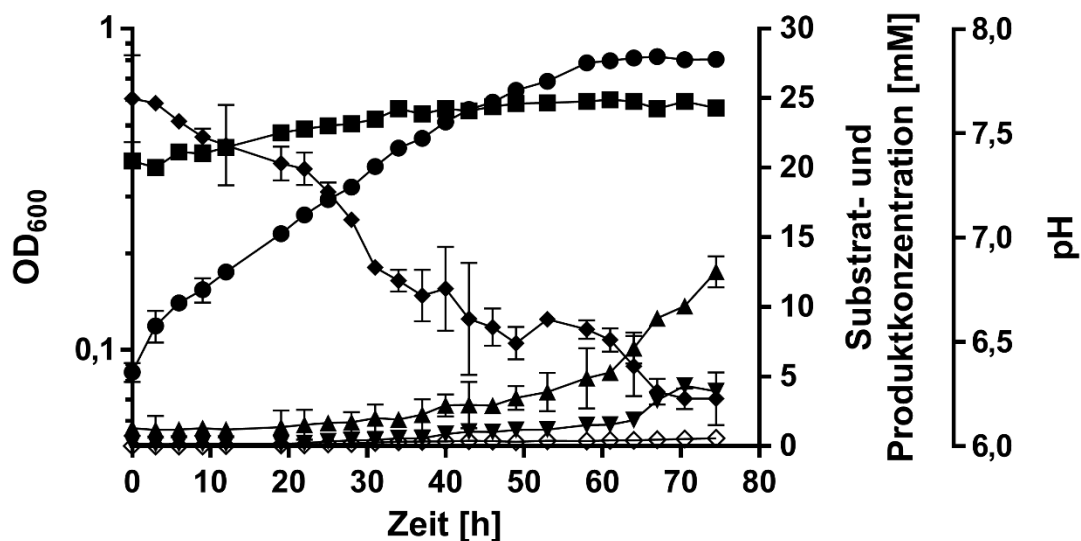


Abb. 9. Wachstum und Produktspektrum von *E. callanderi* auf 20 mM Methanol. *E. callanderi* KIST612 wurde bei 37 °C in 500 ml CBBM mit 20 mM Methanol kultiviert. Das Wachstum (●) wurde photometrisch anhand der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) bestimmt. Der pH (■) wurde mittels pH-Elektrode bestimmt. Die Konzentration an Acetat (▲), Butyrat (▼), Isobutyrat (◇) sowie Methanol (◆) wurde gaschromatographisch bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei biologisch unabhängigen Experimenten ($n = 3$).

Erstaunlicherweise zeigte sich am Ende der exponentiellen Wachstumsphase erneut die Bildung von Butyrat. Nach einer Kultivierungsdauer von ca. 40 h wurde Butyrat konstant mit einer Bildungsrate von $0,1 \text{ mmol l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ produziert, bevor die Butyrat-Konzentration nach einer Kultivierungsdauer von ca. 67 h nicht mehr anstieg. Die Endkonzentration betrug 3,7 mM, was einem Butyrat:Methanol-Verhältnis von 0,17:1 entsprach. Isobutyrat wurde dagegen nur in sehr geringen Mengen (0,5 mM) produziert, während die Bildung von Ethanol nicht beobachtet werden konnte.

3.1.3 Wachstum und Produktbildung auf Formiat

Neben Methanol ist Formiat ein vielversprechendes Substrat zur biotechnologischen Produktion von wertvollen Biochemikalien, da es als Abfallprodukt kostengünstig ist und zudem sehr leicht transportiert und gelagert werden kann (Cotton *et al.*, 2019). Als Wachstumssubstrat für *E. callanderi* KIST612 wurde es bisher nicht beschrieben, obwohl es ein Zwischenprodukt des WLW ist. Nach einem Transfer von Glukose-adaptierten Kulturen auf CBBM mit 20 mM Formiat wuchs *E. callanderi* nach einer 10-stündigen lag-Phase auf eine finale OD₆₀₀ von 0,25 (Daten nicht gezeigt). Um das Wachstum auf Formiat (+ CO₂) näher zu untersuchen, wurden auf Formiat adaptierte Zellen (zwei Transfers auf 20 mM Formiat) auf frisches CBBM mit 20 mM Formiat kultiviert (Abb. 10). Die Zellen wuchsen mit einer ähnlichen Wachstumsrate wie auf Methanol ($\mu = 0,03 \text{ h}^{-1}$), jedoch war die finale OD₆₀₀ im Vergleich dazu viel geringer (OD₆₀₀ = 0,25). Die Verdopplungszeit betrug 17,3 h und die stationäre Wachstumsphase wurde nach ungefähr 30 h erreicht. Das Wachstum ging mit einer konstanten Abnahme von 0,54 mmol l⁻¹ · h⁻¹ Formiat einher, wobei Formiat erst nach 53 h vollständig verwertet wurde. Parallel dazu nahm die Acetatkonzentration mit einer Bildungsrate 0,13 mmol l⁻¹ · h⁻¹ bis zu einer Endkonzentration von 5,9 mM nach 53 h zu. Die Bildung von Butyrat und Ethanol konnte nicht beobachtet werden. Isobutyrat wurde dagegen in geringen Mengen produziert. Die Konzentration gegen Ende der Kultivierung betrug dabei 0,5 mM. Der pH-Wert stieg durch den Verbrauch während der Kultivierung von 7,3 auf 7,8 leicht an.

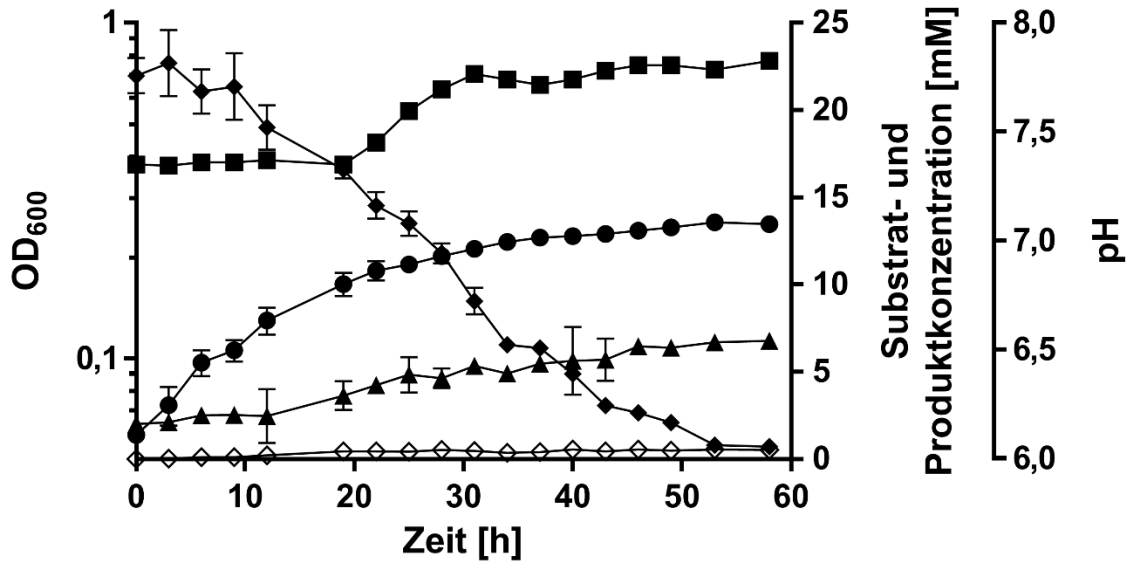


Abb. 10. Wachstum und Produktspektrum von *E. callanderi* auf 20 mM Formiat. *E. callanderi* KIST612 wurde bei 37 °C in 500 ml CBBM mit 20 mM Formiat kultiviert. Das Wachstum (●) wurde photometrisch anhand der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600}) bestimmt. Der pH (■) wurde mittels pH-Elektrode bestimmt. Die Konzentration an Formiat (◆) wurde mit Hilfe eines gekoppelt optisch-enzymatischen Tests bestimmt. Die gebildete Menge an Acetat (▲) und Isobutyrat (◇) wurde gaschromatographisch untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei biologisch unabhängigen Experimenten ($n = 3$).

3.1.4 Wachstum und Produktbildung auf CO oder H₂ + CO₂

E. callanderi KIST612 ist dafür bekannt, Butyrat aus CO zu produzieren, jedoch nicht aus H₂ + CO₂. Die Butyratproduktion aus CO wurde bisher nur in Bioreaktoren mit Zellrecycling (Chang *et al.*, 2001) oder in Batch-Kulturen mit Zugabe von Acetat (Park *et al.*, 2017) beschrieben. Ohne Zusatz von Acetat konnten dagegen nur geringe Mengen an Butyrat (~ 1 mM) beobachtet werden. Um diese Beobachtungen zu bestätigen, wurde erneut das Wachstum sowie die Produktbildung von *E. callanderi* KIST612 auf CO oder H₂ + CO₂ in geschlossenen Batch-Kulturen untersucht.

Zur Untersuchung des Wachstums und der Produktbildung auf CO wurde eine an CO adaptierte Vorkultur von *E. callanderi* KIST612 (zwei Transfers) auf frisches Medium mit 1 bar Überdruck von CO (100 %) überimpft. Nach Überimpfen der Kultur begann das sofortige Wachstum der Kultur mit einer Wachstumsrate von 0,06 h⁻¹ bis die spät-exponentielle Wachstumsphase nach ca. 30 h erreicht wurde (Abb. 11A). Die Verdopplungszeit betrug 11,5 h. Nach 50 h wurde die stationäre Wachstumsphase mit einer finalen OD_{600} von 0,74 erreicht. Während die Konzentration von CO innerhalb

der ersten 30 h kontinuierlich mit einer Rate von $3,1 \text{ mmol l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ abnahm, stieg die Acetat-Konzentration im gleichen Zeitraum konstant mit einer Bildungsrate von $0,2 \text{ mmol l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ an. CO wurde jedoch nicht vollständig verbraucht. Gegen Ende der Kultivierung befanden sich von ursprünglich $300 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ nur noch ca. $190 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ CO im Medium. Die Endkonzentration von Acetat lag bei $9,8 \text{ mM}$. Acetat war das einzige Hauptprodukt. Dagegen wurden Butyrat, Isobutyrat und Ethanol nur in sehr geringen Mengen produziert. Die Endkonzentration lag bei jeweils $0,3 \text{ mM}$. Der pH-Wert blieb während der gesamten Kultivierungsdauer bei pH 7,3. Insgesamt konnten bei Kultivierung von *E. callanderi* KIST612 auf CO die gleichen Produkte bzw. Produktmengen festgestellt werden wie bereits in Park *et al.* (2017) beschrieben. Die ermittelten Wachstumsparameter ($\mu = 0,06 \text{ h}^{-1}$ und $t_d = 11,5 \text{ h}$) stimmten ebenfalls überein.

Bei Kultivierung von *E. callanderi* KIST612 auf $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ zeigte sich ein ähnlicher Wachstumsverlauf (Abb. 11B). Nach dem Überimpfen einer an $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ adaptierten Vorkultur (zwei Transfers) auf frisches Medium mit 1 bar Überdruck von $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ (80/20 % [v/v]) begann das Wachstum sofort mit einer Wachstumsrate von $0,05 \text{ h}^{-1}$, bevor nach 26 h die spät-exponentielle Wachstumsphase erreicht wurde. Die Verdopplungszeit betrug $14,4 \text{ h}$. In der Folge stieg die OD_{600} langsamer an bis nach 30 h die stationäre Phase erreicht wurde. Die finale OD_{600} betrug $0,45$ nach einer Kultivierungsdauer von 51 h. Innerhalb der gesamten Kultivierungsdauer nahm die Konzentration an H_2 kontinuierlich mit einer Rate von $3,3 \text{ mmol l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ auf eine Restkonzentration von $20 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ ab. Der pH-Wert blieb während der gesamten Kultivierungsdauer gleich. Gleichzeitig zur Abnahme von $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ nahm die Acetatkonzentration mit einer Rate von $0,4 \text{ mmol l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ auf eine Endkonzentration von $17,8 \text{ mM}$ zu. Erneut war Acetat das einzige Hauptprodukt, während Butyrat und Isobutyrat nur in sehr geringen Mengen (jeweils $0,3 \text{ mM}$) gebildet wurden. Die Bildung von Ethanol konnte dagegen nicht beobachtet werden. Die Untersuchungen bestätigen die Beobachtungen von Park *et al.* (2017), dass *E. callanderi* auf $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ in geschlossenen Batch-Experimenten Butyrat nur in sehr geringen Mengen produziert.

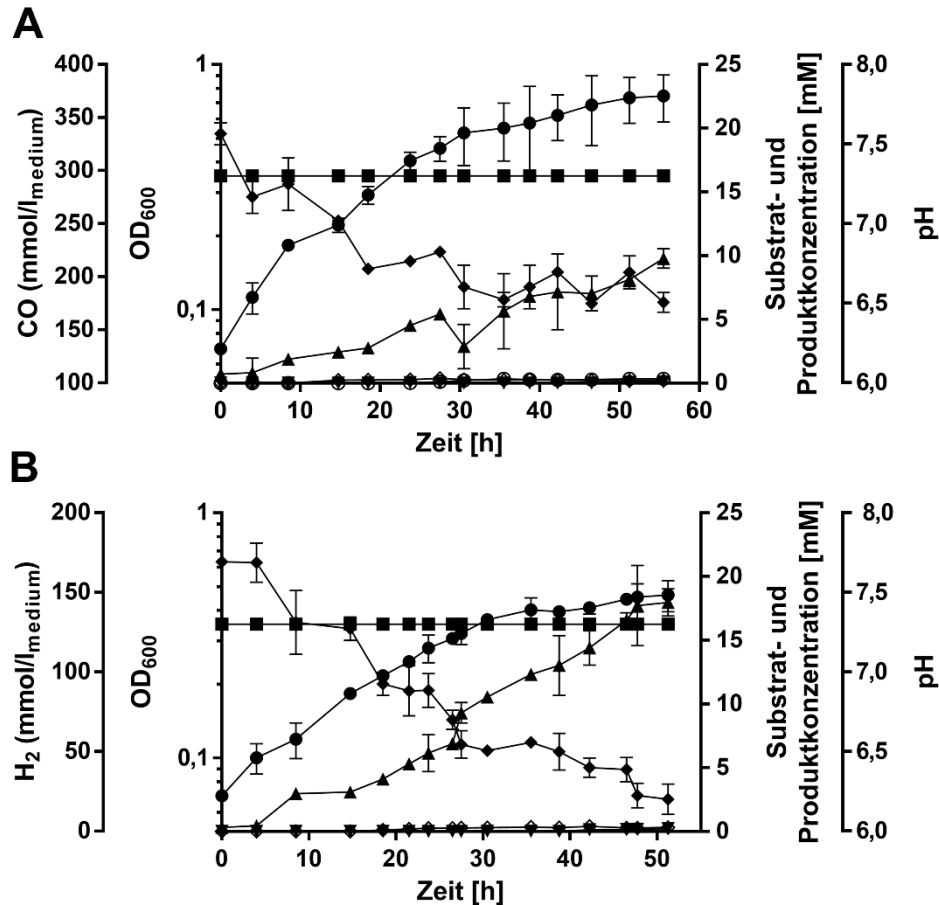


Abb. 11. Wachstum und Produktspektrum von *E. callanderi* auf CO und H₂ + CO₂. *E. callanderi* KIST612 wurde bei 37 °C in 500 ml PBBM mit einem Überdruck von 1 bar CO (100 %) (A) oder in 500 ml CBBM mit einem Überdruck von 1 bar H₂ + CO₂ (80:20 [v/v]) kultiviert (B). Das Wachstum (●) wurde photometrisch anhand der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀) bestimmt. Der pH (■) wurde mittels pH-Elektrode bestimmt. Die gebildete Menge an Acetat (▲), Butyrat (▼), Isobutyrat (◇) und Ethanol (○) wurde gaschromatographisch untersucht. Die Konzentration an CO und H₂ (◆) wurde ebenfalls gaschromatographisch bestimmt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte ± SEM von drei biologisch unabhängigen Experimenten (n = 3).

Insgesamt konnten innerhalb der Arbeit mit Glukose und Methanol zwei Wachstumssubstrate gefunden werden, bei denen *E. callanderi* Butyrat produziert. Im nächsten Teil der Arbeit sollte ein Schlüsselenzym der Energiekonservierung während des autotrophen Wachstums von *E. callanderi* – die ATP-Synthase – näher untersucht werden.

3.2 Bioinformatische Analyse der A₁A₀-ATP-Synthase aus *E. callanderi* KIST612

Die Untersuchung der Genomsequenz von *E. callanderi* KIST612 ergab einen außergewöhnlichen Fund. Insgesamt wurde nur ein Gencluster gefunden, welches aber potenziell für eine archäelle A₁A₀-ATP-Synthase mit einer c-Untereinheit, bestehend aus vier Transmembranhelices und einer Ionenbindestelle kodiert (Jeong *et al.*, 2015). Die genetische Organisation des putativen A₁A₀-ATP-Synthase-Operons ist in Abb. 12A dargestellt.

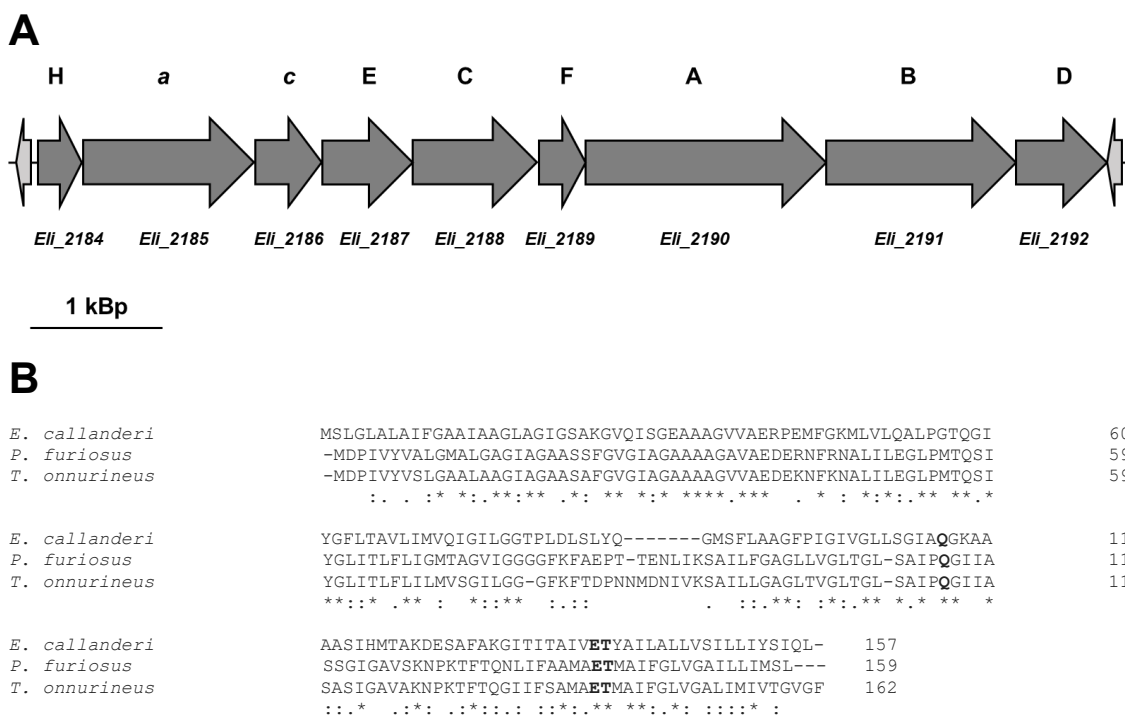


Abb. 12. Genetische Organisation des Operons der A₁A₀-ATP-Synthase aus *E. callanderi* und Vergleich der c-Untereinheit. (A) Das Operon der putativen A₁A₀-ATP-Synthase umfasst neun Gene. Die abgeleiteten Untereinheiten (H, a, c, E, C, A, B, D, und C) sind jeweils angegeben. (B) Die Aminosäuresequenz der c-Untereinheit aus *E. callanderi* (accession number: E3GN14) wurde mit den Sequenzen der c-Untereinheit aus *P. furiosus* (accession number: Q8U4B0) und *T. onnurineus* (accession number: B6YV10) verglichen. Das Na⁺-Bindemotiv (Q..ET) ist **fett** hervorgehoben. Der Vergleich wurde mit dem Programm Clustal Omega durchgeführt.

Stromaufwärts des A₁A₀-ATP-Synthase-Operons befindet sich auf dem Komplementärstrang das Gen *Eli_2183* (117 Bp), welches für ein hypothetisches Protein kodiert, das eine Identität von 41 % zum Dynein-Protein 3 von *S. cerevisiae* aufweist. Das erste Gen des A₁A₀-ATP-Synthase-Operons, *Eli_2184*, ist 309 Bp lang und kodiert für die H-Untereinheit mit einer abgeleiteten molekularen Masse von

11,4 kDa. Das daraus abgeleitete Protein weist eine Ähnlichkeit von 53 % zur H-Untereinheit der A₁A₀-ATP-Synthase aus *Methanothermobacter marburgensis* auf. Das nächste Gen des Operons, *Eli_2185*, welches eine Überlappung von 3 Bp mit *Eli_2184* aufweist, ist 1875 Bp lang und kodiert für die a-Untereinheit der A₀-Domäne. Das abgeleitete Genprodukt hat eine molekulare Masse von 69,8 kDa und ist zu 31 % bzw. 26 % identisch mit der entsprechenden Untereinheit aus *M. jannaschii* (Lingl *et al.*, 2003) bzw. *Methanosarcina mazei* Gö1 (Wilms *et al.*, 1996). Interessanterweise befindet sich 14 Bp stromabwärts von *Eli_2185* das 474 Bp lange Gen *Eli_2186*, welches für die c-Untereinheit mit einer abgeleiteten molekularen Masse von 15,7 kDa kodiert. Die c-Untereinheit besteht, wie in den A₁A₀-ATP-Synthasen aus *P. furiosus* und *T. onnurineus* aus vier TMH's und nur einer konservierten Na⁺-Bindestelle (Q...ET) zwischen TMH 3 und 4 (Abb. 12B). Die Ähnlichkeit / Identität zur c-Untereinheit aus *P. furiosus* beträgt 51 / 35 %. *Eli_2187* (606 Bp) befindet sich 36 Bp stromabwärts von *Eli_2186*. Das abgeleitete Protein (22,6 kDa) ist als E-Untereinheit in V₁V₀-ATPasen annotiert. Es konnten keine signifikanten Ähnlichkeiten zur entsprechenden Proteinsequenz der E-Untereinheit in A₁A₀-ATP-Synthasen gefunden werden. Vier Basenpaare stromabwärts von *Eli_2187* befindet sich das 972 Bp lange Gen *Eli_2188*, welches für die C-Untereinheit (36,4 kDa) kodiert. Die Ähnlichkeit / Identität des abgeleiteten Proteins beträgt 47 / 26 % zur C-Untereinheit der A₁A₀-ATP-Synthase aus *P. furiosus* (Pisa *et al.*, 2007). Zehn Basenpaare stromabwärts von *Eli_2188* ist das 318 Bp lange *Eli_2189*, das für ein Polypeptid mit einer molekularen Masse von 11,3 kDa kodiert. Das abgeleitete Protein ist dabei zu 27 % identisch zur F-Untereinheit der A₁A₀-ATP-Synthase aus *Methanosarcina barkeri*. *Eli_2190* (1806 Bp) liegt 26 Bp stromabwärts von *Eli_2189* und kodiert für die A-Untereinheit (66,8 kDa). Das abgeleitete Genprodukt ist zu 59 % identisch zu der entsprechenden Untereinheit von *M. jannaschii* und *T. onnurineus*. *Eli_2191* (1410 Bp) kodiert für die B-Untereinheit. Die abgeleitete molekulare Masse beträgt 52,3 kDa und das abgeleitete Genprodukt ist zu 71, 67 bzw. 30 % identisch zur B-Untereinheit der A₁A₀-ATP-Synthase aus *P. furiosus*, *T. onnurineus* bzw. *M. barkeri*. Vier Basenpaare stromabwärts von *Eli_2191* befindet sich mit *Eli_2192* (636 Bp) das letzte Gen des putativen A₁A₀-ATP-Synthase-Operons. Das abgeleitete Protein hat eine molekulare Masse von 23,9 kDa. Bei Vergleich der Proteinsequenz konnte eine Identität von 42 % bzw. 39 % zur D-Untereinheit der Enzyme aus

M. jannaschii bzw. *T. onnurineus* festgestellt werden. Stromabwärts des putativen A_1A_0 -ATP-Synthase-Operons befindet sich auf dem Komplementärstrang das Gen *Eli_2193* (138 Bp). Für das abgeleitete Protein konnten keine Ähnlichen gefunden werden.

3.3 Reinigung der A_1A_0 -ATP-Synthase aus *E. callanderi*

Das Genom von *E. callanderi* KIST612 weist nur ein ATP-Synthase-Operon auf, welches für eine A_1A_0 -ATP-Synthase mit einer *c*-Untereinheit, bestehend aus vier TMH's und einer Ionenbindestelle, kodiert. Dieser Typ an *c*-Untereinheit kommt hauptsächlich in V-Typ ATPasen vor, während F-Typ ATP-Synthasen üblicherweise eine Ionenbindestelle in zwei TMH's aufweisen. Der strukturelle Unterschied in der *c*-Untereinheit wird im Allgemeinen als Ursache dafür gesehen, dass V-Typ ATPasen nicht in der Lage sind, *in vivo* ATP zu synthetisieren (Cross und Müller, 2004). Da im Genom von *E. callanderi* jedoch keine weiteren ATP-Synthase-Gene gefunden werden konnten, muss postuliert werden, dass ein solches Enzym trotz seiner V-Typ *c*-Untereinheit in der Lage ist, ATP zu synthetisieren. Um dies biochemisch nachzuweisen, wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst ein Reinigungsverfahren etabliert, das eine Reinigung des Enzyms ohne Verlust an Untereinheiten ermöglicht.

3.3.1 Herstellung von gewaschenen Membranen

Ein wichtiger Faktor bei der Reinigung eines Enzyms ist es festzustellen, unter welchen Wachstumsbedingungen das zu reinigende Enzym in möglichst großen Mengen gebildet wird. Dabei ist neben der spezifischen Aktivität die gebildete Biomasse auf dem jeweiligen Wachstumssubstrat von entscheidender Bedeutung. Denn nur unter Beachtung der optimalen Wachstumsbedingungen können bestmögliche Enzymausbeuten im anschließenden Reinigungsverfahren erzielt werden. Aus diesem Grund wurde der Einfluss des Wachstumssubstrats auf die ATPase-Aktivität von gewaschenen Membranen untersucht. Dazu wurde *E. callanderi* KIST612 auf Komplexmedium mit 20 mM Glukose, 20 mM Methanol, 20 mM Formiat, 101 kPa $H_2 + CO_2$ oder 101 kPa CO als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle bei 37 °C kultiviert und die Zellen während der spät-exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Nach dem Aufschluss der Zellen mittels French-Press und dem Entfernen von Zelltrümmern wurden die jeweiligen gewaschenen Membranen durch Zentrifugation

hergestellt und im Anschluss die ATP-Hydrolyse-Aktivität bestimmt. Die gewaschenen Membranen aus $H_2 + CO_2$ -gewachsenen Zellen wiesen mit einer spezifischen Aktivität von $68,3 \text{ mU} \cdot \text{mg}^{-1}$ die höchste Aktivität auf. Die ATP-Hydrolyse-Aktivität gewaschener Membranen aus Methanol-, Formiat- und CO-gewachsenen Zellen war jeweils ähnlich hoch ($54, 41,3$ und $50,7 \text{ mU} \cdot \text{mg}^{-1}$). Die geringste spezifische Aktivität zeigten dagegen die gewaschenen Membranen aus Zellen, welche auf Glukose kultiviert wurden ($24 \text{ mU} \cdot \text{mg}^{-1}$). Aufgrund der geringen Ausbeute an Zellmasse aus $H_2 + CO_2$ -gewachsenen Kulturen (finale $OD_{600} = 0,45$) und den technischen Schwierigkeiten, Kulturen im 20-l-Maßstab auf gasförmigen Substraten zu kultivieren, wurde für weitere Reinigungen 20 mM Methanol als Wachstumssubstrat verwendet. Durch die Ernte in der spät-exponentiellen Wachstumsphase (Ernte bei $OD_{600} = 0,8$) konnten aus einer auf Methanol-gewachsenen 20-l-Kultur ca. 15 g Zellen (Zellfeuchtmasse) erzielt werden, die zur Präparation von gewaschenen Membranen und der weiteren Reinigung verwendet wurden.

3.3.2 Solubilisierung der A_1A_0 -ATP-Synthase

Um die A_1A_0 -ATP-Synthase möglichst effizient aus den gewaschenen Membranen zu isolieren, wurde zunächst der Einfluss von unterschiedlichen Konzentrationen an DDM bei unterschiedlichen Inkubationszeiten auf die Ausbeute untersucht. Dazu wurden jeweils 5-ml-Fraktionen von gewaschenen Membranen in Puffer B (Proteinkonzentration: 10 mg/ml) mit unterschiedlichen Konzentrationen an DDM (0,5, 1 oder 2 mg DDM pro mg Protein) unter leichtem Schütteln für jeweils 1, 2, 2,5 oder 24 h bei 4 °C inkubiert und das Solubilisat im Anschluss durch Zentrifugation von den gewaschenen Membranen getrennt. Anschließend wurde die ATP-Hydrolyse-Aktivität des jeweiligen Solubilisats bestimmt. Durch Vergleich der Gesamtaktivität in der jeweiligen Membran-Fraktion mit der des jeweiligen Solubilisats wurde die Ausbeute der einzelnen Bedingungen ermittelt (Abb. 13). Die Gesamtausbeute nahm bei allen DDM-Konzentrationen mit zunehmender Inkubationsdauer zu, wobei ab einer 2,5-stündigen Inkubation nur noch eine geringfügige Erhöhung der Ausbeute erzielt werden konnte. Während bei einer Erhöhung der DDM-Konzentration von 0,5 auf 1 mg DDM pro mg Protein die Ausbeute nach 24 h von ca. 70 % auf 85 % gesteigert werden konnte, führte die weitere Erhöhung der DDM-Konzentration auf 2 mg DDM pro mg Protein zu ähnlichen Ausbeuten. Die spezifische Aktivität lag bei

allen getesteten Bedingungen zwischen $87,5 - 99,4 \text{ mU} \cdot \text{mg}^{-1}$. Insgesamt konnten die besten Ausbeuten mit einer Konzentration von 2 mg DDM pro mg Protein und einer Inkubation von 24 h bei 4°C erreicht werden. Da mit einer Konzentration von 1 mg DDM pro mg Protein nach einer 2,5-stündigen Inkubation bei 4°C jedoch ähnliche hohe Ausbeuten erzielt werden konnten, wurde die Solubilisierung standardmäßig bei diesen Bedingungen durchgeführt. Bei einer präparativen Reinigung im 20-l-Maßstab betrug die spezifische ATP-Hydrolyse-Aktivität des Solubilisats $96,2 \text{ mU} \cdot \text{mg}^{-1}$ und die Ausbeute lag bei 81 %.

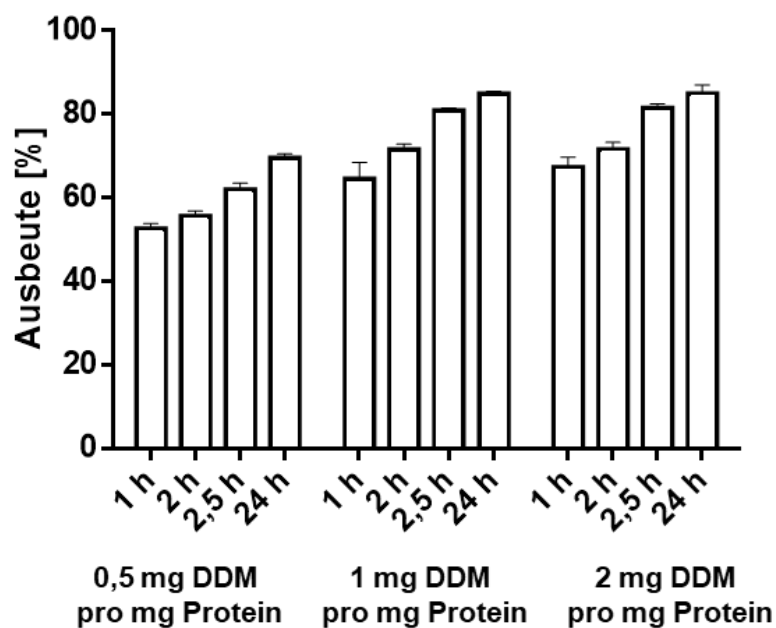


Abb. 13. Ausbeute des Solubilisats in Abhängigkeit der DDM-Konzentration und der Inkubationsdauer. Zur Herstellung des Solubilisats wurden jeweils 5 ml der gewaschenen Membranen in Puffer B (50 mM Tris/HCl, 10 mM MgCl_2 , 20 mM NaCl, pH 7,5; Proteinkonzentration: 10 mg/ml) aufgenommen und mit 0,5, 1 oder 2 mg DDM pro mg Protein unter leichtem Schütteln für 1, 2, 2,5 oder 24 h bei 4°C inkubiert. Das Solubilisat wurde durch Zentrifugation von den gewaschenen Membranen getrennt und anschließend jeweils die ATP-Hydrolyse-Aktivität bei 37°C bestimmt. Pro Enzymtest wurden jeweils $50 \mu\text{g}$ des Solubilisats eingesetzt. Die Ausbeute wurde jeweils durch Vergleich der Gesamtaktivität in der jeweiligen Membranfraktion mit der des entsprechenden Solubilisats ermittelt. Die spezifische Aktivität lag bei allen getesteten Bedingungen zwischen $87,5 - 99,4 \text{ mU} \cdot \text{mg}^{-1}$. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von drei biologisch unabhängigen Experimenten ($n = 3$), die jeweils in Triplikaten bestimmt wurden.

3.3.3 Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation

Die weitere Reinigung der A_1A_0 -ATP-Synthase aus *E. callanderi* erfolgte mittels Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation. Dazu wurden jeweils 2 ml des

Solubilisats auf 40 ml des gegossenen Saccharose-Gradienten (20 – 65 %) in Gradienten-Röhrchen gegeben. Nach Überschichten mit jeweils 2 ml 20%iger Saccharose-Lösung und anschließendem Verschließen der Röhrchen wurde das aufgetragene Solubilsat durch Zentrifugation (43000 Upm, 50VTi Rotor, 4 °C, 19 h) aufgetrennt. Im Anschluss wurde jeder Gradient mit Hilfe einer Peristaltik-Pumpe in 2 ml-Fractionen fraktioniert und die ATP-Hydrolyse-Aktivität der einzelnen Fractionen bestimmt (Abb. 14). Insgesamt wurden 20 Fractionen aliquotiert, wobei die Saccharose-Konzentration in den einzelnen Fractionen von 65 % (Fraction 1) kontinuierlich bis auf 20 % (Fraction 20) abnahm. Es zeigten nur die Fractionen 5 – 11 ATP-Hydrolyse-Aktivität, wobei die maximale Aktivität in den Fractionen 6 und 7 festgestellt werden konnte und in den folgenden Fractionen kontinuierlich abnahm. Da die spezifische Aktivität in Fraction 11 sehr gering war, wurden zur weiteren Reinigung nur die Fractionen 5 – 10 verwendet. Die spezifische ATP-Hydrolyse-Aktivität der vereinigten Fraction (Gesamtvolumen: 28 ml; Gesamtprotein: 23 mg) betrug $308 \text{ mU} \cdot \text{mg}^{-1}$, was einem Anreicherungsfaktor von 5,7 entspricht. Die Ausbeute nach der Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation lag bei 48,2 %.

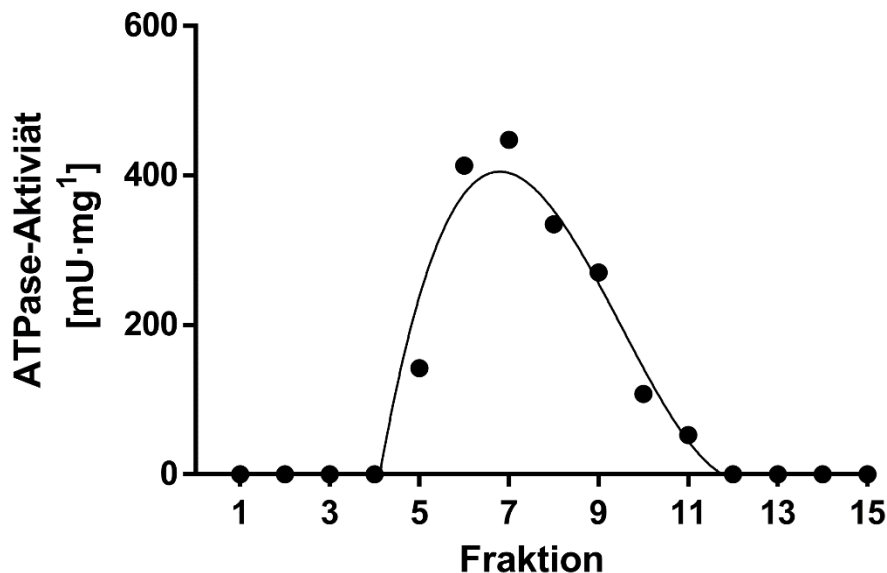


Abb. 14. Auftrennung des Solubilisats aus *E. callanderi* mittels Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation. Pro Gradientenröhrchen wurden 2 ml des Solubilisats auf 40 ml eines kontinuierlichen Saccharose-Gradienten (20 – 65 %) gegeben und mit 2 ml 20%iger Saccharose-Lösung überschichtet. Durch anschließende Zentrifugation der verschlossenen Röhrchen (43000 Upm, 50VTi Rotor, 19 h, 4 °C) wurden die Proteine nach ihrer Dichte getrennt. Nach Fraktionieren des Gradienten in je 2 ml, wurde die ATP-Hydrolyse-Aktivität der einzelnen Fractionen bestimmt. Dargestellt ist die ATP-Hydrolyse-Aktivität der einzelnen Fractionen eines repräsentativen Saccharose-Gradienten.

3.3.4 Anionenaustausch-Chromatographie an DEAE

Im nächsten Reinigungsschritt wurde eine Anionenaustausch-Chromatographie unter Verwendung des schwachen Anionenaustauschers „DEAE Sepharose® Fast Flow“ (GE-Healthcare, Uppsala, Schweden) als Säulenmaterial durchgeführt. Dazu wurden zunächst die vereinigten Fraktionen der Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation auf die voräquilibrierte Säule geladen. Nach einem Waschschrift mit Puffer C (100 mM HEPES, 5 mM MgCl₂, 10 % [v/v] Glycerin, 0,02 [w/v] % DDM, pH 7,5) und anschließender Stoßelution mit 13 % Puffer D (100 mM HEPES, 5 mM MgCl₂, 10 % [v/v] Glycerin, 1 M NaCl, 0,02 [v/v] % DDM, pH 7,5) über jeweils drei Säulenvolumen erfolgte die weitere Elution der gebundenen Proteine mit einem linearen NaCl-Gradienten (13 – 40 %) über neun Säulenvolumen. Die eluierten Proteine wurden dabei in 4-ml-Schritten fraktioniert. Durch den gewählten Gradienten ergaben sich insgesamt fünf verschiedene Absorptionsmaxima (E₂₈₀). Zur Detektion der ATP-Synthase wurden alle Fraktionen auf ATP-Hydrolyse-Aktivität untersucht. Die Elution der Proteine mit ATP-Hydrolyse-Aktivität erfolgte dabei zwischen 230 – 250 mM NaCl (Abb. 15). Nach Vereinigung der Fraktionen mit ATP-Hydrolyse-Aktivität wiesen diese eine spezifische Aktivität von 703 mU · mg⁻¹ auf, was einem Anreicherungsfaktor von 13 entspricht. Die Ausbeute lag nach diesem Reinigungsschritt bei 19,7 %.

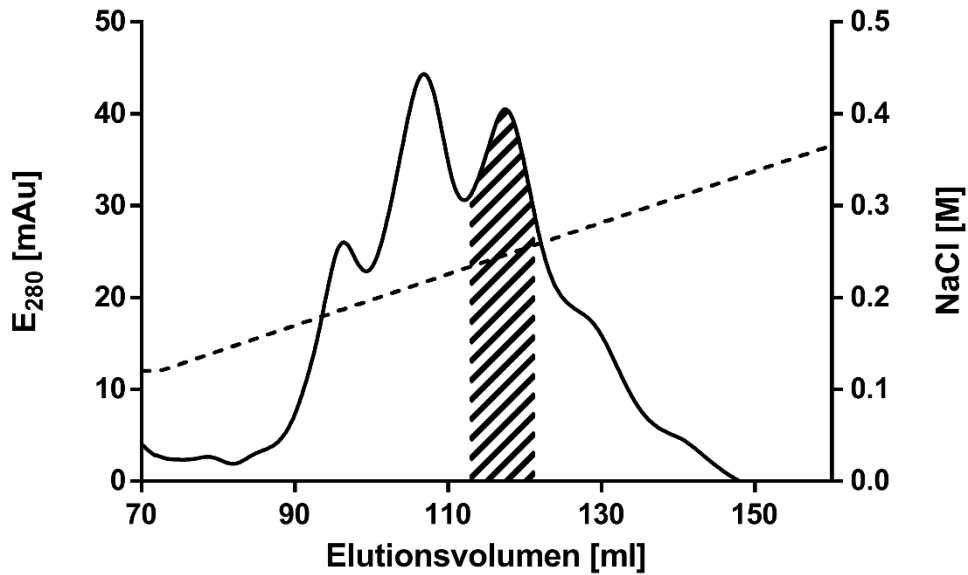


Abb. 15. Repräsentatives Elutionsprofil der Anionenaustausch-Chromatographie an DEAE zur Reinigung der A_1A_0 -ATP-Synthase aus *E. callanderi*. Die vereinigten Fraktionen der Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation wurden chromatographisch an einer DEAE-Säule (Säulenmaterial: „DEAE Sepharose® Fast Flow“) aufgetrennt. Nach Beladen der vereinigten Fraktion, einem Waschschrift über drei Säulenvolumen mit Puffer C (Flussrate: 2 ml/min) und anschließender Stoßelution mit 13 % von Puffer D (Flussrate: 2 ml/min) wurde zur Elution der A_1A_0 -ATP-Synthase ein linearer NaCl-Gradient von 130 – 400 mM NaCl (Flussrate: 1 ml/min; Gesamtlänge: 9 Säulenvolumen) verwendet. Die Fraktionsgrößen betragen jeweils 4 ml. (—): Extinktion bei einer Wellenlänge von 280 nm (E_{280}); (---) NaCl-Konzentration des Gradienten; schraffierter Bereich: vereinigte Fraktionen mit ATP-Hydrolyse-Aktivität.

3.3.5 Gelfiltration an Superose 6

Die weitere Reinigung der A_1A_0 -ATP-Synthase erfolgte mittels Größenausschlusschromatographie. Dazu wurden die vereinigten Fraktionen des vorherigen Reinigungsschrittes (Gesamtvolumen: 8 ml) mittels Ultrafiltration (Vivaspin 20, Cutoff 10 kDa, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen) auf ein Volumen von 1 ml konzentriert und pro Durchlauf jeweils 500 μ l über Gelfiltration an Superose 6 (10/300 GL Säule, 24 ml, GE Healthcare) aufgereinigt. Die chromatographische Auftrennung erfolgte isokratisch bei einer Flussrate von 0,5 ml/min mit Puffer E (100 mM HEPES, 250 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 10 % [v/v] Glycerin, 0,02 [v/v] % DDM, pH 7,5; Flussrate: 0,5 ml/min). Bei Erreichen des Totvolumens (V_0) nach ca. 7,5 ml wurden Fraktionen von jeweils 0,5 ml gesammelt und diese jeweils auf ATP-Hydrolyse-Aktivität überprüft (Abb. 16). Insgesamt zeigten sich bei der Elution zwei distinkte Peaks, wobei Proteine mit ATP-Hydrolyse-Aktivität nur im ersten Peak bei einem Volumen von 10,5 – 12,5 ml eluieren. Die Fraktionen

des zweiten Peaks (Elutionsvolumen 14 – 17 ml) wiesen dagegen keine ATP-Hydrolyse-Aktivität auf. Nach Vereinigung der Fraktionen mit ATP-Hydrolyse-Aktivität zeigten diese eine spezifische Aktivität von $1277 \text{ mU} \cdot \text{mg}^{-1}$. Dies entspricht einem Anreicherungsfaktor von 23,6. Nach der Gelfiltration betrug die Ausbeute 12,2 %.

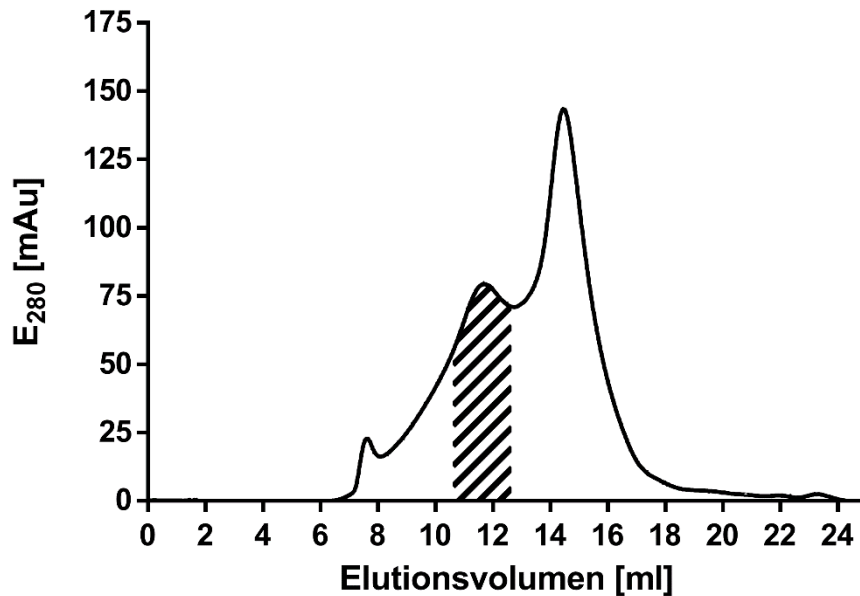


Abb. 16. Repräsentatives Elutionsprofil der Größenausschlusschromatographie an Superose 6 zur Reinigung der A_1A_0 -ATP-Synthase aus *E. callanderi*. Pro Lauf wurden je $500 \mu\text{l}$ des ankonzentrierten DEAE-Eluats auf die Säule geladen und mit Puffer E bei einer Flussrate von $0,5 \text{ ml/min}$ aufgetrennt. Die Fraktionsgrößen betrug jeweils $0,5 \text{ ml}$. (—): Extinktion bei einer Wellenlänge von 280 nm (E_{280}); schraffierter Bereich: vereinigte Fraktionen mit ATP-Hydrolyse-Aktivität.

3.3.6 Zusammenfassung der Reinigung der A_1A_0 -ATP-Synthase

Der Reinigungserfolg der A_1A_0 -ATP-Synthase aus *E. callanderi* wurde routinemäßig durch Bestimmung der ATP-Hydrolyse-Aktivität nach jedem Reinigungsschritt verfolgt. Eine repräsentative Reinigung ist in Tab. 8 zusammenfassend dargestellt. Zur Reinigung der A_1A_0 -ATP-Synthase aus *E. callanderi* KIST612 wurden gewaschene Membranen von ca. 15 g Zellen (Zellfeuchtmasse) hergestellt und mit 1 mg DDM pro mg Membranprotein solubilisiert. Die ATP-Synthase wurde mittels Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation ($20 - 65 \%$) weiter gereinigt. Die anschließende Reinigung mittels Anionenaustausch-Chromatographie (DEAE) sowie einer Größenausschluss-Chromatographie (Superose 6) führte insgesamt zu einer 23,6-

fachen Anreicherung der Aktivität mit einer spezifischen Aktivität von 1277 mU·mg⁻¹ und einer Ausbeute von 12,2 %.

Tab. 8. Zusammenfassung der Reinigung der A₁A₀-ATP-Synthase aus *E. callanderi*.

Reinigungs-schritt ^a	Gesamt-protein [mg]	Volumen [ml]	Gesamt-Aktivität [U]	Spez. Aktivität [mU/mg]	Anreicherung [x-fach]	Ausbeute [%]
Gewaschene Membranen	272	14	14,69	54	1	100
Solubilisat	124	8	11,9	96,2	1,8	81
Saccharose-Dichtegradient	23	28	7,08	308	5,7	48,2
DEAE	4,1	9	2,89	703	13	19,7
Gelfiltration	1,4	1	1,79	1277	23,6	12,2

^a: Die Reinigung erfolgte aus ca. 15 g Zellen (Zellfeuchtmasse).

Zur Überprüfung des Reinigungserfolges wurden die vereinigten Fraktionen der einzelnen Reinigungsschritte zusätzlich mittels SDS-PAGE nach Schagger und von Jagow (1987) gelelektrophoretisch aufgetrennt und die einzelnen Proteine mittels Coomassie visualisiert. Wie in Abb. 17 zu erkennen, wurde nach der Gelfiltration eine Anreicherung von 13 Proteinen erreicht mit apparenten molekularen Massen von 180, 70, 68, 66, 58, 39, 26, 25, 14, 12 und 11 kDa. Die erwarteten molekularen Massen der einzelnen Untereinheiten der A₁A₀-ATP-Synthase sind: 69,8 (a-Untereinheit), 66,8 (A-Untereinheit), 52,3 (B-Untereinheit), 36,4 (C-Untereinheit), 23,9 (D-Untereinheit), 22,6 (E-Untereinheit), 15,7 (c-Untereinheit), 11,4 (H-Untereinheit) und 11,3 kDa (F-Untereinheit). Bei dem Protein mit einer apparenten molekularen Masse von 68 kDa könnte es sich um einen SDS-resistenten ac-Komplex handeln, wie dies bereits bei den gereinigten A₁A₀-ATP-Synthasen aus *P. furiosus* (Pisa *et al.*, 2007) und *T. onnurineus* (Mayer *et al.*, 2015) beobachtet werden konnte. Da die beiden Proteine mit den apparenten molekularen Massen von 68 und 66 kDa bei Verwendung eines 12,5%igen SDS-Gels nicht separiert werden konnten, wurde zur Trennung der beiden Proteine ein 15%iges SDS-Gel verwendet. Dadurch konnten die beiden Proteine voneinander getrennt werden. Insgesamt stimmen die apparenten molekularen Massen von 9 Proteinen mit den erwarteten molekularen Massen der A₁A₀-ATP-

Synthese überein. Um festzustellen, ob es sich bei den Proteinen um die einzelnen Untereinheiten handelte, wurden im weiteren Verlauf der Arbeit zunächst spezifische Antikörper für die einzelnen Untereinheiten generiert, um so einen immunologischen Nachweis dieser mittels Western-Blot-Analyse zu ermöglichen.

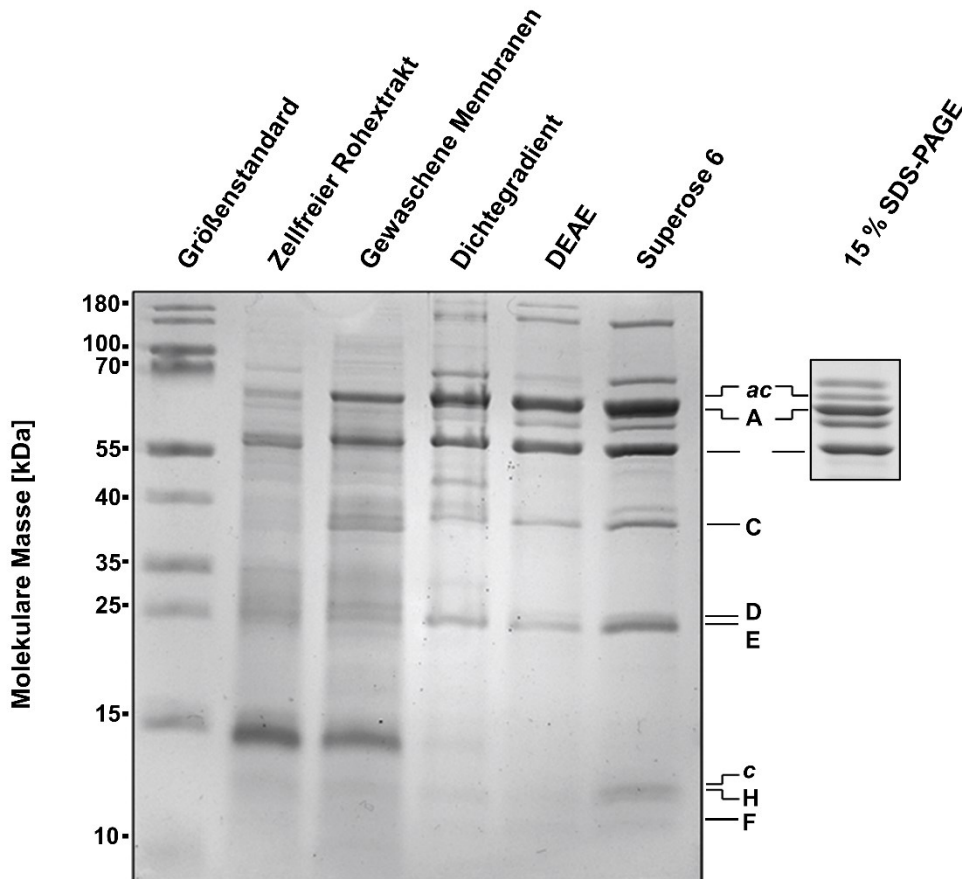
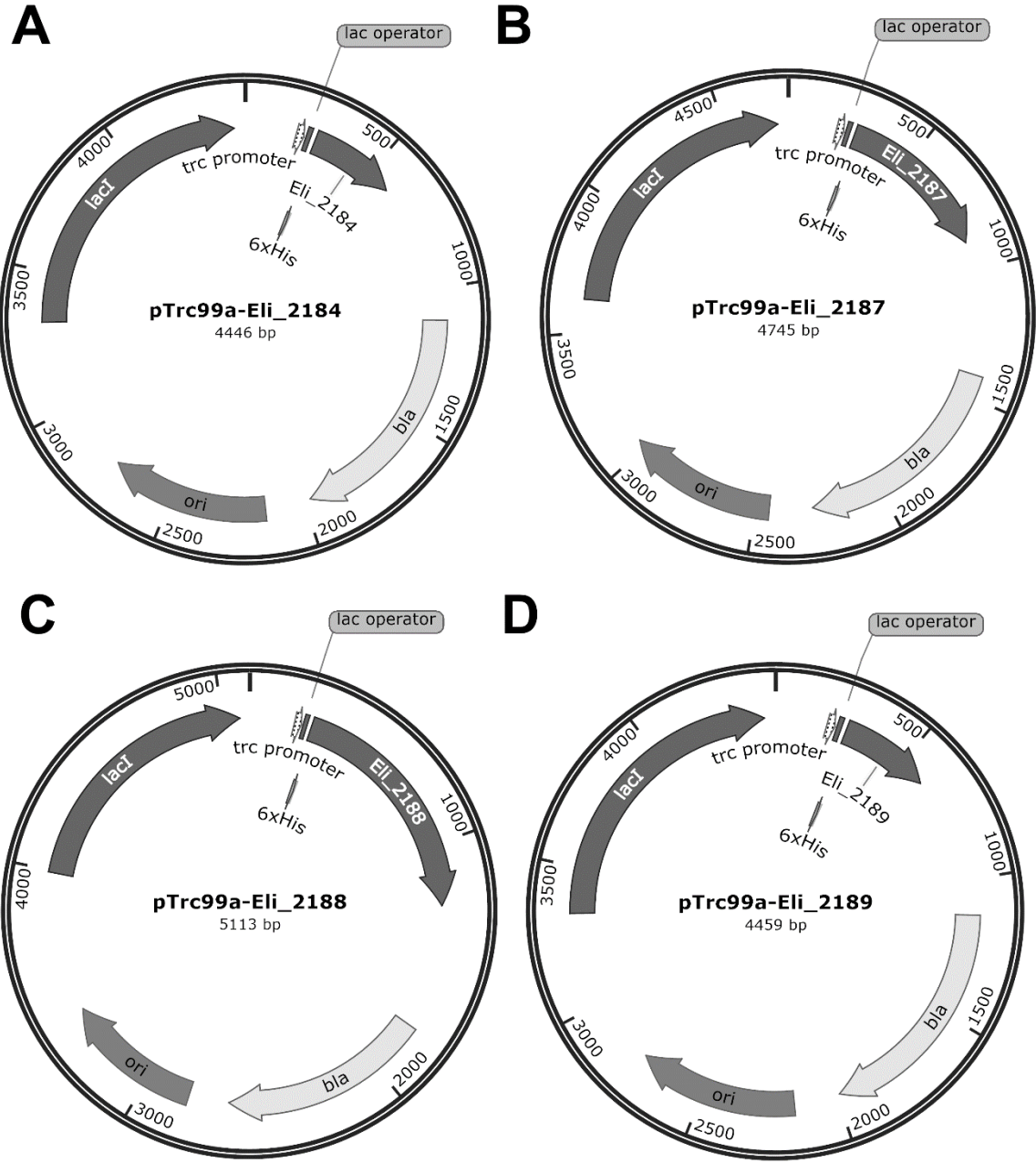


Abb. 17. SDS-PAGE zur Überprüfung der Reinigung der A₁A₀-ATP-Synthase aus *E. callanderi*. 20 µg Proteinprobe des jeweiligen Reinigungsschritts wurden in einem 12,5%igen SDS-Polyacrylamidgel nach Schägger und von Jagow (1987) aufgetrennt und mit Coomassie-Brillant-Blau gefärbt. Zur weiteren Separation der Proteine mit den apparenten molekularen Massen von 68 und 66 kDa wurde ein 15%iges SDS-Gel verwendet. Als Größenstandard wurden 3 µl des „PageRuler Prestained Protein Ladder“ (Thermo Fisher Scientific, Deutschland) verwendet. Die einzelnen Untereinheiten der A₁A₀-ATP-Synthase aus *E. callanderi* sind gekennzeichnet. Diese wurde im weiteren Verlauf der Arbeit mittels „Peptide-Mass-Fingerprinting“ oder immunologisch nachgewiesen (siehe Kapitel 3.5).

3.4 Produktion einzelner Untereinheiten der A₁A₀-ATP-Synthase aus *E. callanderi* und Generierung von Antikörpern

Zur Bestimmung der Untereinheitenzusammensetzung der A₁A₀-ATP-Synthase aus *E. callanderi* sowie zur routinemäßigen Kontrolle des Reinigungserfolges war es notwendig, spezifische Antikörper für die einzelnen Untereinheiten zu generieren. Aufgrund des hydrophoben Charakters der Untereinheiten a und c, welches zu

Problemen bei der Immunisierung von Hasen führt, wurde auf eine Herstellung der beiden Antikörper verzichtet. Aus diesem Grund wurden innerhalb der Arbeit nur Antikörper gegen die einzelnen Untereinheiten der A₁-Domäne generiert. Dazu wurden die mittels PCR amplifizierte DNA-Bereiche der einzelnen Gene, welche für die Untereinheiten A, B, C, D, E, F und H kodieren, mittels Gibson-Assembly in den Vektor pTrc99a kloniert. Zur Reinigung der einzelnen Untereinheiten wurden die entsprechenden Plasmide (Abb. 18) in den ATP-Synthase-defizienten *E. coli*-Stamm DK8 transformiert und die Kulturen jeweils in 2x-YT-Medium bei 37 °C angezogen. Die Genexpression wurde bei einer OD₆₀₀ von 1,0 durch Zugabe von IPTG zu einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Nach vierstündigem Wachstum wurden die Zellen geerntet, gewaschen und in der French-Press aufgeschlossen. Nach Entfernung von Zelltrümmern wurde jede einzelne Untereinheit durch Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt (siehe Kapitel 2.11.6). Pro Untereinheit konnten jeweils aus einer 200-ml-Kultur 2,5 – 3,1 mg Gesamtprotein gereinigt werden. Zur Überprüfung des Reinigungserfolges wurden je 20 µg des Eluats der einzelnen Untereinheiten in einem 12,5%igen SDS-Gel nach Schägger und von Jagow (1987) gelelektrophoretisch aufgetrennt und die einzelnen Proteine mittels Coomassie visualisiert. Zum Vergleich wurde die gereinigte A₁A₀-ATP-Synthase mitaufgetrennt. Wie in Abb. 19 zu erkennen, konnten alle Untereinheiten der A₁-Domäne gereinigt werden. Es zeigte sich mit Ausnahme bei der Reinigung der F-Untereinheit jeweils nur ein distinktes Protein mit einer apparenten molekularen Masse von 67 kDa (A-Untereinheit), 58 kDa (B-Untereinheit), 39 kDa (C-Untereinheit), 26 kDa (D-Untereinheit), 25 kDa (E-Untereinheit) und 12 kDa (H-Untereinheit). Die apparenten molekularen Massen stimmten dabei mit den erwarteten molekularen Massen der einzelnen Untereinheiten überein. Bei der Reinigung der F-Untereinheit ergaben sich zwei distinkte Proteine (11 kDa und 25 kDa), wobei das Protein mit der apparenten molekularen Masse von 11 kDa mit der erwarteten molekularen Masse der F-Untereinheit übereinstimmt.



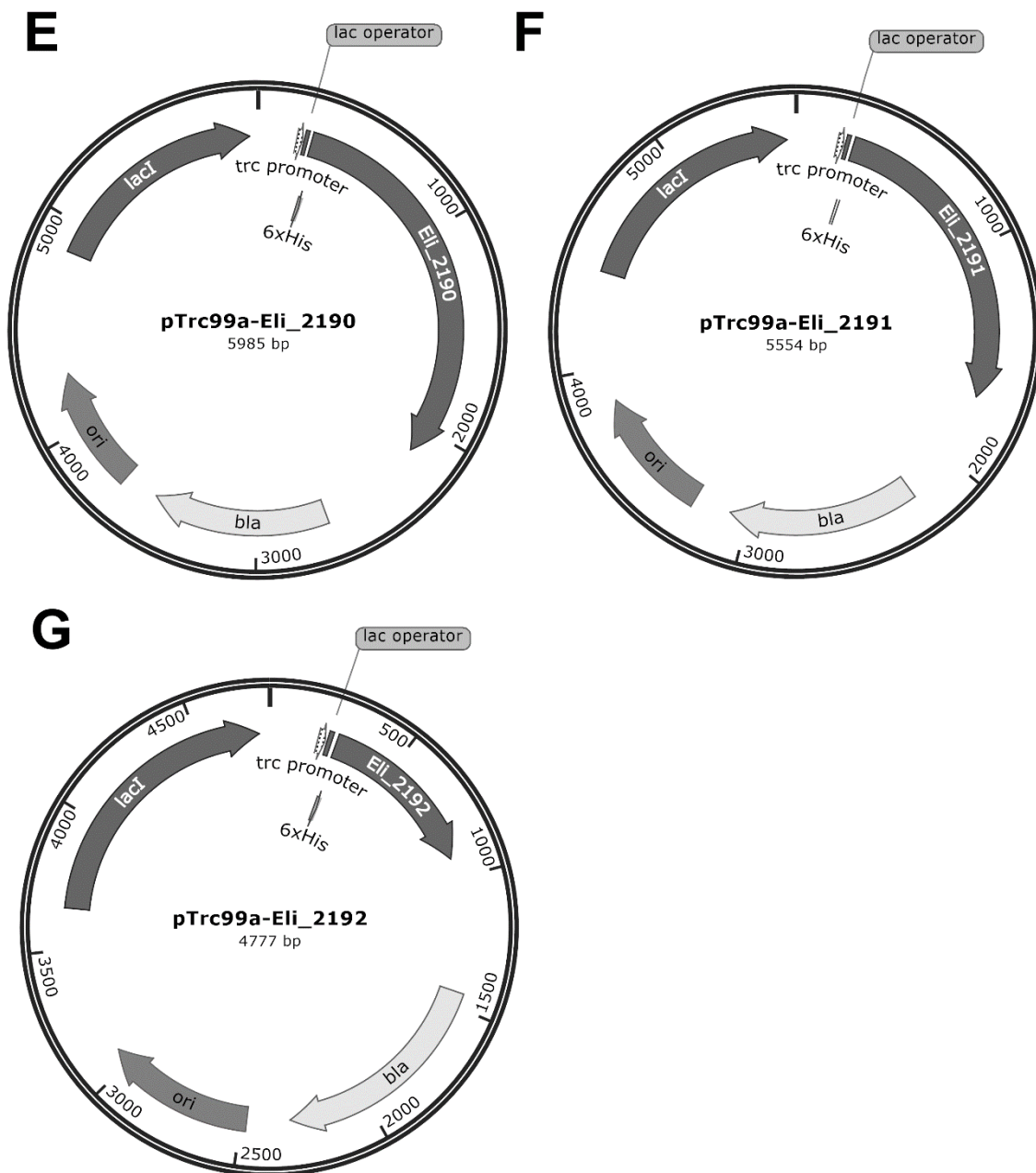


Abb. 18. Physikalische Karte der Plasmide zur Produktion der Untereinheiten, A, B, C, D, E, F und H der A_1A_0 -ATP-Synthase von *E. callanderi*. Die Plasmide pTrc99a-Eli_2184 (A), pTrc99a-Eli_2187 (B), pTrc99a-Eli_2188 (C), pTrc99a-Eli_2189 (D), pTrc99a-Eli_2190 (E), pTrc99a-Eli_2191 (F) und pTrc99a-Eli_2192 (G) wurden jeweils mittels Gibson Assembly erzeugt. **bla**: Ampicillin-Resistenzkassette; **ori**: Replikationsursprung; **lacI**: Lac-Repressor; **Eli_2184**, **Eli_2187**, **Eli_2188**, **Eli_2189**, **Eli_2190**, **Eli_2191** oder **Eli_2192**: 5'-Sequenzfragment des für die H-, E-, C-, F-, A-, B- oder D-Untereinheit kodierenden Gens aus *E. callanderi*.

Zur Herstellung von Antikörpern wurden die einzelnen Untereinheiten erneut mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Dabei wurden jeweils 250 μ g Probe verwendet. Nachdem die

einzelnen Untereinheiten mit Coomassie-Brilliant-Blau G250 visualisiert und aus dem SDS-Gel ausgeschnitten wurden, wurden diese zur Herstellung der Antikörper an die Firma Davids Biotechnologie GmbH (Regensburg) versendet. Nach Erhalt der entsprechenden Antisera wurden diese im weiteren Verlauf der Arbeit zur Identifizierung der einzelnen Untereinheiten mittels Western-Blot-Analyse eingesetzt.

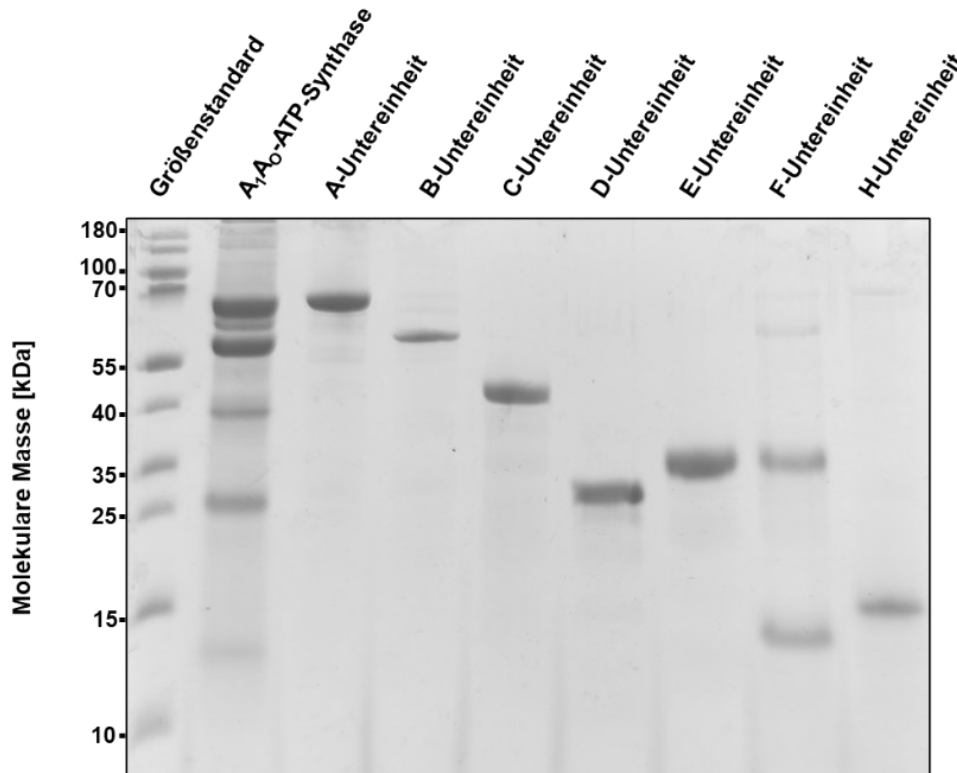


Abb. 19. SDS-PAGE zur Überprüfung der Reinigung einzelner Untereinheiten der A_1A_0 -ATP-Synthase aus *E. callanderi*. Die Produktion der Untereinheiten A, B, C, D, E, F und H erfolgte bei einer OD_{600} von 1,0 durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration: 1 mM). Nach vierstündigem Wachstum wurden die Zellen geerntet, gewaschen und in der French-Press aufgeschlossen. Die einzelnen Untereinheiten wurden nach der Herstellung des zellfreien Rohextrakts mittels Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie gereinigt. Die Eluate wurden in einem 12,5%igen SDS-Polyacrylamidgel nach Schägger und von Jagow (1987) aufgetrennt und mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt. Je Reinigungsschritt wurden 20 μ g Proteinprobe aufgetragen. Zum Vergleich wurden 20 μ g der gereinigten A_1A_0 -ATP-Synthase (vereinigte Fraktion nach der Gelfiltration) aufgetragen. Als Größenstandard wurden 3 μ l des „PageRuler Prestained Protein Ladder“ (Thermo Fisher Scientific, Deutschland) verwendet.

3.5 Identifizierung der Untereinheiten der A_1A_0 -ATP-Synthase in der gereinigten Enzympräparation

Der Nachweis der einzelnen Untereinheiten der A_1A_0 -ATP-Synthase in der gereinigten Enzympräparation erfolgte zum einen immunologisch mittels Western-Blot-Analyse unter Verwendung der generierten Antikörper, welche gegen die gereinigten Untereinheiten erzeugt wurden (siehe Kapitel 3.4). Zur Detektion einer jeder

Untereinheit wurden die entsprechenden Antikörper in einer Verdünnung von 1:10000 verwendet. Wie in Abb. 20 zu erkennen, konnten alle Untereinheiten der A_1A_0 -Domäne (A, B, C, D, E, F und H) spezifisch nachgewiesen werden. Dabei stimmten die apparenten molekularen Massen annähernd mit den erwarteten molekularen Massen überein. Die erwarteten molekularen Massen sind: 69,8 (*a*-Untereinheit), 66,8 (A-Untereinheit), 52,3 (B-Untereinheit), 36,4 (C-Untereinheit), 23,9 (D-Untereinheit), 22,6 (E-Untereinheit), 15,7 (*c*-Untereinheit), 11,4 (H-Untereinheit) und 11,3 kDa (F-Untereinheit).

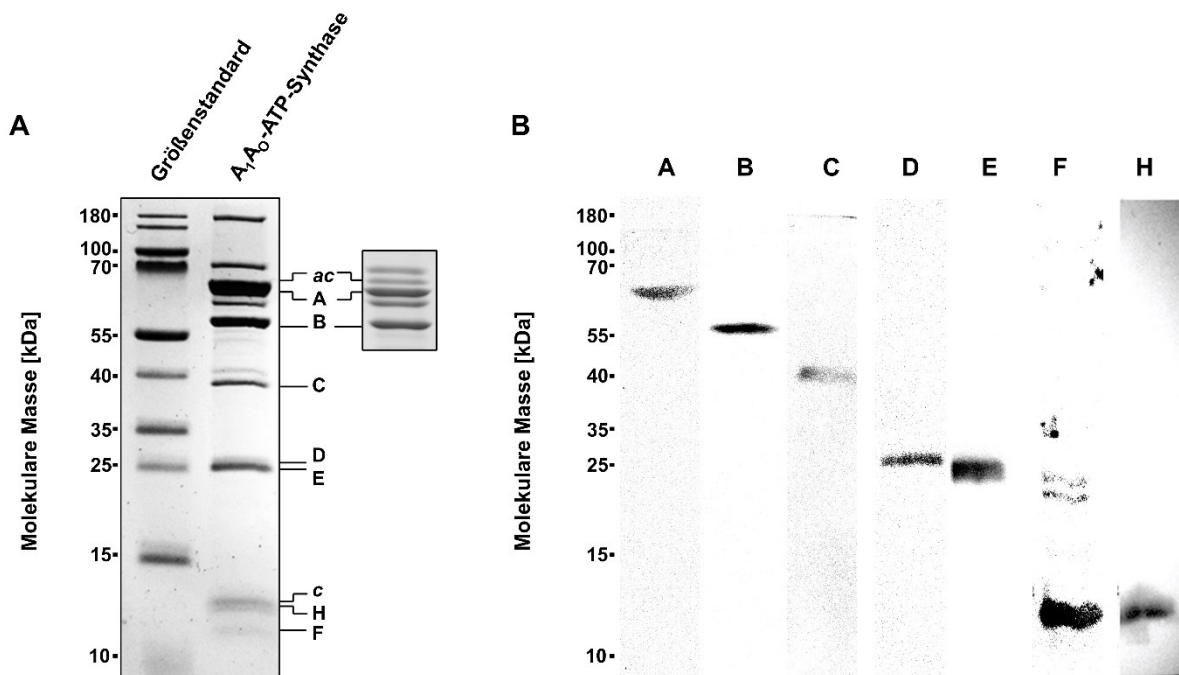


Abb. 20. Immunologischer Nachweis einzelner Untereinheiten in der gereinigten A_1A_0 -ATP-Synthase. Je 20 μ g des gereinigten Enzyms wurden in einem 12,5%igen SDS-Polyacrylamidgel nach Schagger und von Jagow (1987) aufgetrennt und mit Coomassie-Brillant-Blau gefärbt (A) oder die Untereinheiten A, B, C, D, E, F und H mittels Western-Blot-Analyse gegen spezifische Antikörper der einzelnen Untereinheiten detektiert (B). Alle verwendeten Antikörper wurden jeweils in einer Verdünnung von 1:10000 verwendet. Die Untereinheiten *a* und *c* wurden *via* MALDI-MS identifiziert.

Da für die membranständigen Untereinheiten *a* und *c* keine Antikörper vorlagen und ein immunologischer Nachweis demnach nicht möglich war, wurde parallel zum immunologischen Nachweis die einzelnen Proteine des SDS-Gels (Abb. 20A) mittels „Peptide-Mass-Fingerprinting“ (PMF) analysiert (Abb. 21). Zur massenspektrometrischen Analyse wurden diese aus dem SDS-Gel herausgeschnitten und an das Functional Genomics Center Zürich der ETH Zürich (Schweiz) gesendet. Die Vorbereitung der Proben sowie die anschließende Analyse mittels PMF wurde von Dr.

Peter Hunziker durchgeführt. Dabei konnten die membranständigen Untereinheiten *a* und *c* konnten ebenfalls identifiziert werden, wobei die *a*-Untereinheit zusammen mit der *c*-Untereinheit als *ac*-Subkomplex mit einer apparenten molekularen Masse 68 kDa vorlag. Einzelne *a*-Untereinheiten lagen nicht vor. Weiterhin konnten mit Ausnahme der D-Untereinheit alle Untereinheiten der der A_1A_0 -ATP-Synthase massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Das Protein mit einer apparenten molekularen Masse von 66 kDa konnte als A-Untereinheit identifiziert werden, das mit 58 kDa als B-Untereinheit, das mit 39 kDa als C-Untereinheit, das mit 26 kDa als E-Untereinheit, das mit 14 kDa als c-Untereinheit, das mit 12 kDa als H-Untereinheit und das mit einer apparenten molekularen Masse von 11 kDa als F-Untereinheit.

A-Untereinheit

MIQPNEQSTM	KQVGTIVKVA	GPLIVATGLA	DVQMFEDVVRV	SEKRLIGEVI	ELRGDRASIQ	VYEETAGLGP	GEPVYVTGEP
LSVDLAPGLI	ESIFDGIQRP	LTTIYNESGD	RISRGGIDVPK	LDRKWKPFV	PACQKGDVLK	PGDVIGTVQE	TPAVLQKIMM
PPKLEGTVDW	VFDGEANIVE	PIARIKKKDG	EIVEVPLRSL	WVRRGRPYT	EKIAPDEPMV	TGQRVIDTLF	PIAKGGIAAI
PGPFSGSKTV	VQHQLAKWAD	ADIIIVYIGCG	ERGNEMTDVL	MEFPELHDP	TGLSLMKRTV	LIANTSMPV	AAREASITYG
ITIAEYFRDM	GYKVAIMADS	TSRWAEALRE	MSGRLEEMPG	EEGYPAYLSS	RLAEFYERAG	FVKCLGSEDR	YGAISAIGAV
SPPGDISEP	VSQATLRIVK	VFWSLNAFLA	YKRHFPAIDW	LQSYSLYSOK	MNVYFDKSV	TDWSVHVRQT	MQILQEEAEL
DEIVRLVGVD	ALGFKDRITL	ECAQSIREDY	LHQSAFDDID	TYSSLEKQYA	MLSMILAWYE	KGVAALLENV	PFAKIITMDI
REK IARMKYV	PEDQKEERFP	ATAAEMEAEF	LALMEGSGDD	E			

B-Untereinheit

MNKEYKTI SE	VVGPLMLVDH	VEGVKYDELV	EIEQADGEKR	LGVLEVNGD	KAMVQLYESS	QGLRISNSKV	RFGHGIELG
VSROMLGRVF	DGMGRPTDGG	PEI IPEKKLD	INGSPMNPVA	RDYPAEFIQT	GVSADLGLNT	LVRGQKLPVF	SGSGLPHAQL
AAQIARQARV	LDNDEGFAVV	FAAIGITFEE	ADFFVKDFRR	TGAIERAVLF	MNYANDPAVE	RISTPRMAIT	CAEYLAYELD
MQVLVILTDI	TNYAEALREV	SAARKEVPGR	RGYPGYLYTD	LATLYERAGR	MRGKKSITQ	I PILSMPEDD	KTHPIPDLTG
YITIEGQIILS	RDLYRRGIEP	PIDVLPSSLR	LKDKGIGEGK	TRKDHADTMN	QLFSAYARGK	DAKELAVILG	DAALSDVDKI
YARFATEFEE	RYVSGGFETN	RTIIEETLSIG	WELLSILPRT	ELKRIKDEYI	DEYIPSPLE	DDDI TDEEE	

C-Untereinheit

MSETSYPYAI	GRIKVVQEAGL	IDRTRWNRLW	EADETEALKL	LDEIGYGAEA	KDHSQDLNLI	DAELTKTRNL	INEITPKDVT
TDLLIPTDVI	HNIAIKILKQ	LQRVEVENLL	LEGGIPLDI	LQKALEHGDY	SLLPECFREP	LKRLEDVTD	RVISVTIDNA
AYAQILETLLS	QQKHSSELLK	KYYKAKIDFT	NILTVLRANI	LWGTFKVKP	LLIPGGEIEE	KALLDATDIP	NEQLAKQLGH
GEHSILIKSV	LERYAQDGNL	SEVEQKFEA	AFNMIHERRS	DSFSIGPIAN	YLFQRQVEGK	ALRVMFAGKR	SGIKIPLAEL
GVI							

E-Untereinheit

MSADKIIEKI	LEKANEDVAL	IEQETAEKVQ	SSVAAIERT	ELTLNALKNK	EKADVEEVHR	RSQMLTRLDS	RKNILAVKRR
VIDEVFDKIV	YEALVTDDES	YEALVTKIVV	NGSETQTEKL	QVPEKDMKRY	SDGLLNKLN	ALKEAGKIGE	LTLDDETPASF
NSGVMILIGEM	SDVNGSFDVL	IDDAREKYER	EVAEMLFEEV	V			

F-Untereinheit

MSEQAKLAVI	GQDQSIMVFQ	ALGVR TVYAN	AAKDIEKAIH	ALAKEETA VI	YITEQAAALV	PEAIEKYKTE	PPPAIIPIPN
RFGTNLGMK	GIQDNIEKAI	GADIL					

H-Untereinheit

MSILDSINKA	EERAAEMRSE	AKAKARETLR	QAAEAAREKG	DALILEAKEA	SEAVLLQEEA	LAEKEMERVL	HDAGLADEKM
AENARTRVPK	AVEFILERVE	TQ					

a-Untereinheit

MIIPMKKAKL	IALKEDKEAL	LLSLQRCGEF	MAIPPDEETE	QTAKNEQIDL	DVQQADAMLR	FMQRYQKKKS	FFSDRPVYGY
DEFIKRNEKG	EALVQETSAI	SDKLSAAHSE	IMTLKSECSQ	LEPWLSMDVP	IEELRPTQYT	NFHIGYLPPL	VHEEIVAAVA
EHNAEIQLFQ	KTAEGQAAAL	VSFMEDDAAL	SDSIKVLGFV	EASLPRVTGT	ASEISKSNQE	KIELLEKIDIE	SYEKQMAELA
GSQQLLELLS	EQYKAERQRI	SVKFMETVET	VCVEGWVVRND	RMSVENVAVS	QVTDVYDLEY	SDPEEGEOPP	TALKNKKFKWK
PFESITDMYS	PPKPGTIDPT	PVSAPWFWVI	FGMMMGDFGY	GALMAIIFGL	MKKIMKPKGQ	FGMLVTLFLY	SSITTMIFGI
LFGSYFGETF	HPILFSPLDN	PVAMLVFSLV	IGVLHIFSGM	AIKITEQVRA	GHVLD AIFDQ	VSMMLLIAGA	GLIFLEQTRT
VGMVLAIVGA	VNIIIFTAGRE	KKNIVGKAFQ	GIMGLYDVTS	YLSLDILSYAR	ILALGLATGV	IAMVMNIIAGA	MVQINVLGFI
LSLVIYFIGH	VFNITMSLLS	AYVHDSRLQY	IEFFNKFYDG	GGYNFEPLAI	QTKSIDVIDN	SKEV	

c-Untereinheit

MSLGLALAI F	GAAIAAGLAG	IGSAKGVQIS	GEAAAAGVVAE	RPEMFGKMLV	LQALPGTQGI	YGFLTAVLIM	VQIGILGGTP
LDLSLYQGMS	FLAAGFPIGI	VGLLSGIAQG	KAAAASIHMT	AKDESFAFKG	ITITAI VETY	AILALLVSIL	LIYSIQL

Abb. 21. Ergebnisse der Identifizierung der Untereinheiten A, B, C, D, E, F, H, a und c der A_1A_0 -ATP-Synthase aus *E. callanderi* durch „Peptide-Mass-Fingerprinting“. Zur Analyse der Aminosäuresequenz der einzelnen Untereinheiten wurden die Proteine aus einem 12,5%igen Coomassie-gefärbten SDS-Gel herausgeschnitten und mittels PMF analysiert. Die identifizierten Aminosäuren sind gelb hervorgehoben.

Insgesamt konnten alle Untereinheiten in der gereinigten A_1A_0 -ATP-Synthase aus *E. callanderi* nachgewiesen werden.

3.6 Größenbestimmung der gereinigten A_1A_0 -ATP-Synthase

Nachdem alle neun Untereinheiten der A_1A_0 -ATP-Synthase in der gereinigten Enzympräparation nachgewiesen werden konnte, sollte untersucht werden, ob das gereinigte Enzym als intakter, stabil gekoppelter Gesamtkomplex vorliegt. Dazu wurde die Größe der gereinigten A_1A_0 -ATP-Synthase aus *E. callanderi* mittels nativer PAGE nach Wittig *et al.* (2007) untersucht. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung und der anschließenden Färbung des nativen Gels mit Coomassie-Brillant-Blau zeigten sich zwei dominante Enzymkomplexe mit apparenten molekularen Massen von ca. 430 und 690 kDa (Abb. 22).

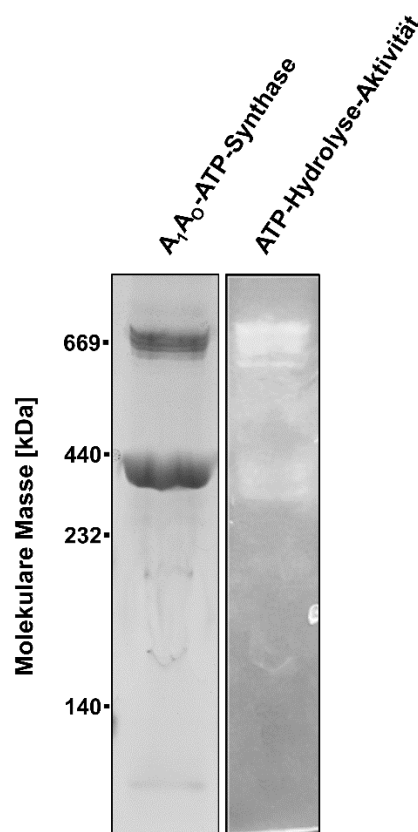


Abb. 22. Native PAGE der gereinigten A_1A_0 -ATP-Synthase aus *E. callanderi*. Jeweils 20 μ g Enzymprobe wurden in einem nativen Polyacrylamidgel (5 – 13 %) nach Wittig *et al.* (2007) aufgetrennt und Proteinkomplexe entweder unspezifisch mittels Coomassie-Brillant-Blau oder spezifisch mittels ATP-Hydrolyse-Aktivitätstest gefärbt. Zur spezifischen Färbung ATP-hydrolysierender Proteine wurde das native Gel im Anschluss für zwei Stunden in Reaktionspuffer (35 mM Tris/HCl, 270 mM Glycin, 14 mM $MgSO_4$, 0,2 % [w/v] $Pb(NO_3)_2$, 8 mM Na_2-ATP , pH 8,3) unter kontinuierlichem Schütteln bei 37 °C inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde das native Gel für 30 min in 50 % (v/v) Methanol inkubiert.

Bei Annahme einer Stöchiometrie von $A_3B_3CDE_2FH_2ac_{8-11}$ hätte der Gesamtkomplex eine vorhergesagte molekulare Masse von ca. 692 kDa – 740 kDa. Somit könnte es sich bei dem Proteinkomplex mit einer apparenten molekularen Masse von ca. 690 kDa um den intakten Gesamtkomplex handeln, während es sich bei dem Komplex mit einer apparenten Masse von ca. 430 kDa um einen A_3B_3CD -Subkomplex (theoretische molekulare Masse: 418 kDa) handeln könnte. Um zu überprüfen, ob die beiden Komplexe ATP-Hydrolyse-Aktivität aufweisen, wurde zusätzlich die ATP-Hydrolyse-Aktivität unter nativen Bedingungen untersucht (Abb. 22). Dazu wurde die aufgetrennte Enzymprobe des nativen Gels mit einem $Pb(NO_3)_2$ -haltigen Puffer in Gegenwart von Na_2 -ATP bei 37 °C inkubiert. Bei vorhandener ATP-Hydrolyse-Aktivität wird freies Phosphat mit $Pb(NO_3)_2$ komplexiert, welches durch einen weißen Niederschlag im nativen Gel zu erkennen ist. Beide Proteinkomplexe wiesen ATP-Hydrolyse-Aktivität auf. Bei dem 690-kDa-Komplex handelte es sich somit mit hoher Wahrscheinlichkeit um die vollständig assemblierte A_1A_0 -ATP-Synthase, während es sich beim 430-kDa-Komplex um einen Subkomplex handelte.

Insgesamt konnte mittels nativer PAGE nicht eindeutig verifiziert werden, ob mit dem innerhalb der Arbeit etablierten Reinigungsprotokoll eine stabile und intakte A_1A_0 -ATP-Synthase gereinigt werden konnte oder ob das Enzym aufgrund der verwendeten Nachweismethode dissoziierte. Aus diesem Grund wurde die native Größe des gereinigten Enzyms zusätzlich anhand einer analytischen Größenausschlusschromatographie an einer Superose-6-Säule bestimmt. Dazu wurden 100 µg der gereinigten A_1A_0 -ATP-Synthase auf die Säule geladen und mit Puffer E (100 mM HEPES, 250 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 10 % [v/v] Glycerin, 0,02 [v/v] % DDM, pH 7,5) bei einer Flussrate von 0,5 ml/min aufgetrennt. Die Elution der A_1A_0 -ATP-Synthase erfolgte in einem distinkten Peak mit einem Retentionsvolumen von 12,05 ml (Abb. 23). Die Kalibrierung der Säule erfolgte unter Verwendung des „Gel Filtration Calibration Kits HMW“ (GE Healthcare, Uppsala, Schweden), indem ein Gemisch aus Proteinen mit bekannter Größe (Thyroglobulin (669 kDa), Ferritin (440 kDa), Aldolase (158 kDa) und Conalbumin (75 kDa)) unter den gleichen Bedingungen chromatographisch aufgetrennt wurde. Die Eichkurve wurde anhand der logarithmierten molekularen Masse der einzelnen Standardproteine in Abhängigkeit des jeweiligen Kapazitätsfaktors (K_{av}) erstellt werden. Durch

Bestimmung des K_{av} der A_1A_0 -ATP-Synthase (0,29) konnte mithilfe linearer Regression die Größe des Enzymkomplexes bestimmt werden. Die ermittelte Größe der A_1A_0 -ATP-Synthase betrug ca. 661 kDa, was auf einen gekoppelten Gesamtkomplex schließen lässt.

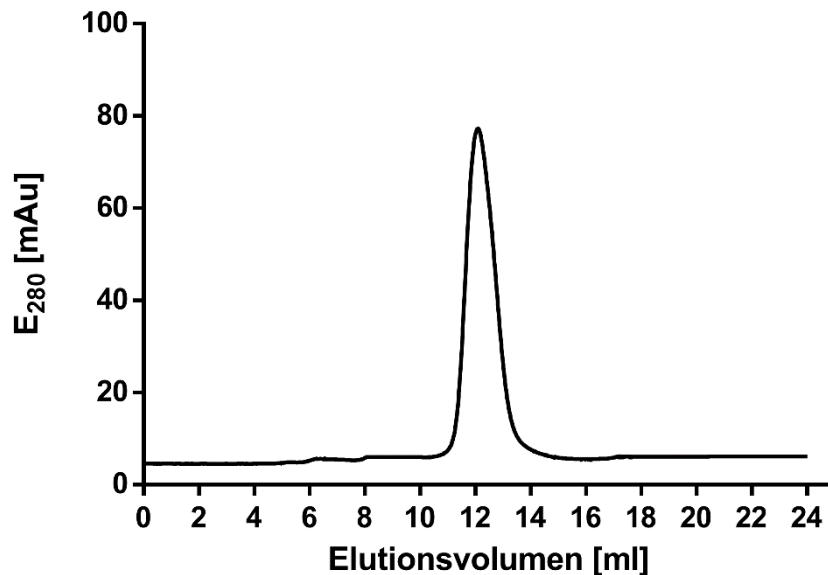


Abb. 23. Repräsentatives Elutionsprofil der analytischen Größenausschlusschromatographie an Superose 6 der A_1A_0 -ATP-Synthase aus *E. callanderi*. 100 μ l des konzentrierten Superose 6-Eluats (Proteinkonzentration: 1 mg/ml) wurden auf die Säule geladen und mit Puffer E bei einer Flussrate von 0,5 ml/min aufgetrennt. (—): Extinktion bei einer Wellenlänge von 280 nm (E_{280}).

Insgesamt ergaben beide Methoden zur Größenbestimmung ähnliche Ergebnisse, wobei durch Anwendung der analytischen Größenausschlusschromatographie eindeutig gezeigt werden konnte, dass ein intakter Gesamtkomplex gereinigt wurde. Dies ist für die weitere biochemische Charakterisierung des Enzyms von essenzieller Bedeutung.

3.7 Elektronenmikroskopische Aufnahmen der A_1A_0 -ATP-Synthase

Zur weiteren strukturellen Analyse des Gesamtkomplexes wurde die gereinigte A_1A_0 -ATP-Synthase von *E. callanderi* elektronenmikroskopisch untersucht. Dazu wurden Proteinpartikel der gereinigten Enzymprobe verwendet, welche mittels 1 % Uranylacetat kontrastiert wurden. Die Probenvorbereitung sowie die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden freundlicherweise von Dr. Janet Vonck (MPI für Biophysik, Frankfurt) durchgeführt. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen dabei einige hantelförmige Proteinkomplexe, welche der

Gesamtstruktur von ATP-Synthasen entsprechen (Abb. 24). Neben einer Ringstruktur, bei der es sich um eine „top-Ansicht“ des *c*-Rings handeln könnte, sind einige Aggregate bzw. kleinere Partikel zu erkennen. Dabei handelt es sich womöglich um dissoziierte Enzymkomplexe oder um Aggregate kontaminierender Proteine. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen verdeutlichen nochmals, dass die A_1A_0 -ATP-Synthase als intakter Gesamtkomplex gereinigt werden konnte.

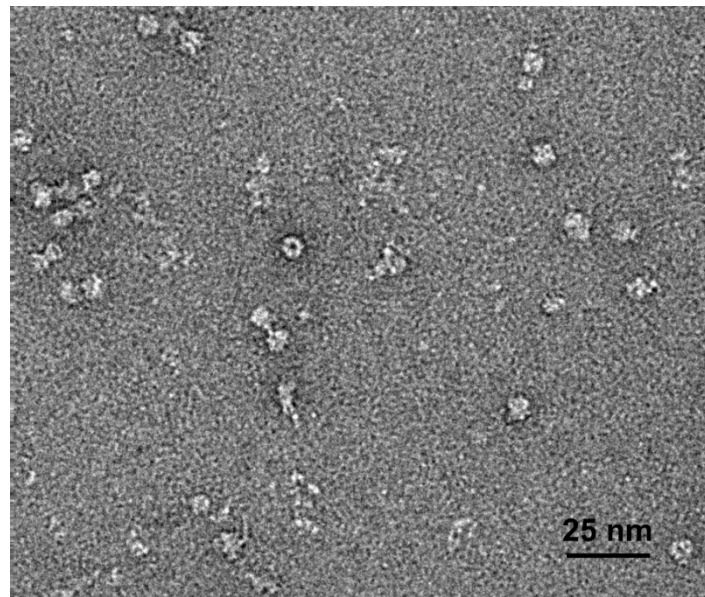


Abb. 24. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der gereinigten A_1A_0 -ATP-Synthase aus *E. callanderi*. Partikel der A_1A_0 -ATP-Synthase weisen hantelförmige Strukturen auf, während Partikel der A_0 -Domäne eine ringähnliche Struktur aufweisen. Der Längenmaßstab entspricht 25 nm.

3.8 Biochemische Charakterisierung der A_1A_0 -ATP-Synthase

Nachdem die A_1A_0 -ATP-Synthase aus *E. callanderi* ohne Verlust von Untereinheiten gereinigt werden konnte, wurde das Enzym zunächst anhand seiner ATP-Hydrolyse-Aktivität biochemisch charakterisiert. Dabei sollten zum einen grundlegende Eigenschaften des Enzyms wie z. B. pH- und Temperaturoptimum bestimmt werden, und zum anderen die vorhergesagte Na^+ -Abhängigkeit des Enzyms nachgewiesen werden. Dies wurde durch Messung der ATPase-Aktivität in Abhängigkeit von verschiedenen Mengen an Na^+ analysiert. Zusätzlich wurde unter Verwendung des Inhibitors DCCD untersucht, ob DCCD mit Na^+ um die gemeinsame Bindestelle in der *c*-Untereinheit konkurriert. Zur weiteren Untersuchung der Ionenspezifität wurde der an die ATP-Hydrolyse gekoppelte Ionentransport durch Rekonstitution des Enzyms in Liposomen und anschließender Messung des Na^+ -Transports gemessen.

3.8.1 Bestimmung des pH-Optimums

Zur Bestimmung des pH-Optimums der A_1A_0 -ATP-Synthase aus *E. callanderi* wurde die ATP-Hydrolyse-Aktivität über einen pH-Bereich von 5 bis 9 gemessen. Die ATP-Hydrolyse-Aktivität wurde dabei bei 37 °C bestimmt. Wie in Abb. 25 zu erkennen, konnte ATPase-Aktivität über einen pH-Bereich zwischen 5 und 9 nachgewiesen werden, wobei die optimale Aktivität im pH-Bereich zwischen 7 und 7,5 lag. Die ATPase-Aktivität verringerte sich jeweils bei pH-Werten von jeweils unter 6 und über 8 sehr stark. So lag die Aktivität bei einem pH-Wert von 5 nur noch bei 9,5 %, und bei einem von 9 bei 10 %. Insgesamt konnte die höchste Aktivität bei pH 7,5 ermittelt werden.

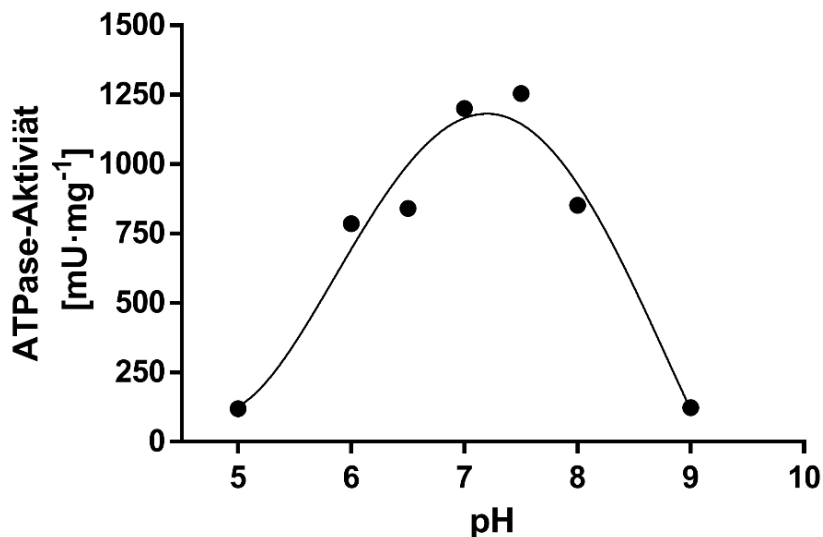


Abb. 25. pH-Abhängigkeit der ATP-Hydrolyse-Aktivität der A_1A_0 -ATP-Synthase aus *E. callanderi*. Der verwendete Puffer enthielt 50 mM MES, 50 mM Tris, 50 mM HEPES, 50 mM CHES, 10 mM $MgCl_2$, 5 mM NaCl und 20 % (v/v) Methanol und wurde auf den jeweiligen pH-Wert eingestellt. Pro Ansatz wurden 10 μ g Enzym verwendet. Die Reaktion wurde nach dreiminütiger Vorinkubation bei einer Temperatur von 37 °C durch Zugabe von 2,5 mM Na_2 -ATP (Endkonzentration) gestartet. Alle Messwerte bestehen aus dem Mittelwert \pm SEM von drei biologisch unabhängigen Experimenten ($n = 3$), die jeweils in Triplikaten durchgeführt wurden.

3.8.2 Bestimmung des Temperaturoptimums

Zur Bestimmung des Temperaturoptimums wurde die ATP-Hydrolyse-Aktivität bei unterschiedlichen Temperaturen zwischen 25 und 50 °C gemessen. Die optimale Aktivität konnte dabei in einem Temperaturbereich zwischen 30 und 40 °C bestimmt werden (Abb. 26). Die höchste Aktivität zeigte sich bei 35 °C. Bei Temperaturen unterhalb von 30 sowie oberhalb von 45 °C nahm die Aktivität dagegen stark ab.

Während die Aktivität bei 20 °C noch bei 43 % lag, zeigte sich bei einer Temperatur von 50 °C fast keine Aktivität (6,7 %) mehr.

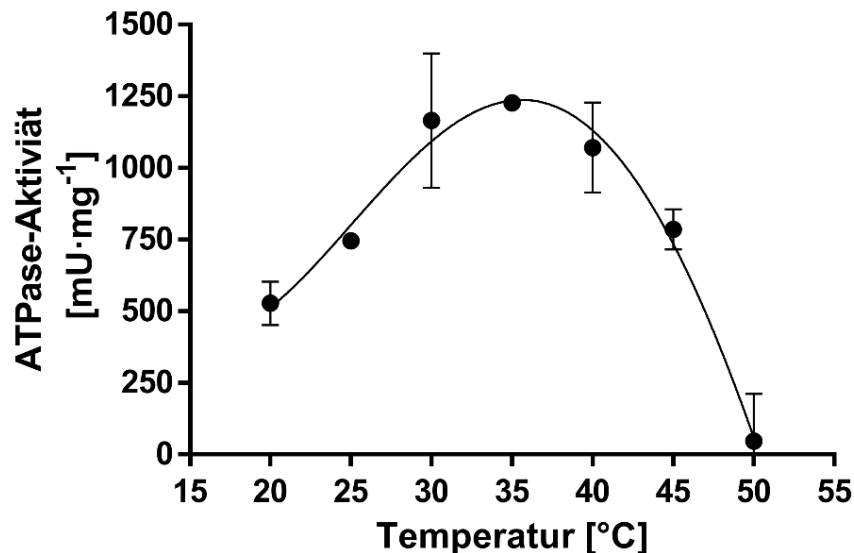


Abb. 26. Temperatur-Abhängigkeit der ATP-Hydrolyse-Aktivität der A_1A_0 -ATP-Synthase aus *E. callanderi*. Der verwendete Puffer enthielt 100 mM Tris, 100 mM Maleinsäure, 10 mM $MgCl_2$, 5 mM NaCl, 20 % (v/v) Methanol, pH 7,3. Pro Ansatz wurden 10 μ g Enzym verwendet. Die Reaktion wurde nach dreiminütiger Vorinkubation des Ansatzes bei der angegebenen Temperatur durch Zugabe von 2,5 mM Na_2 -ATP (Endkonzentration) gestartet. Alle Messwerte bestehen aus dem Mittelwert \pm SEM von drei biologisch unabhängigen Experimenten ($n = 3$), die jeweils in Triplikaten durchgeführt wurden.

3.8.3 Untersuchung des Einflusses von Methanol auf die ATP-Hydrolyse

Organische Lösungsmittel wie Methanol sind bekannte Aktivatoren der ATP-Hydrolyse-Aktivität von ATP-Synthasen (Anthon und Jagendorf, 1983; Braley und Piper, 1997). In Vorversuchen zeigte sich, dass die ATP-Hydrolyse-Aktivität durch die Anwesenheit von Methanol stimuliert werden konnte. Aus diesem Grund wurde der Einfluss von Methanol (0 bis 30 % (v/v)) auf die ATP-Hydrolyse untersucht. Wie in Abb. 27 zu erkennen, stimulierte Methanol die ATP-Hydrolyse-Aktivität, wobei erst bei einer Konzentration von 15 % Methanol die Aktivität stimuliert werden konnte. Die optimale Aktivität zeigte sich bei einer Methanol-Konzentration von 20 % Methanol. Die Aktivität wurde dabei um das 11,5-fache stimuliert.

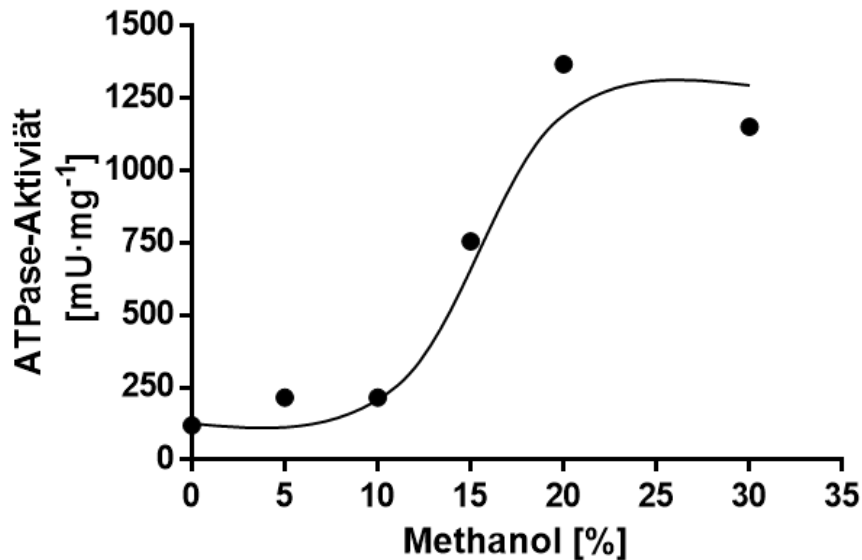


Abb. 27. Abhängigkeit der ATP-Hydrolyse-Aktivität der A_1A_0 -ATP-Synthase aus *E. callanderi* von der Methanol-Konzentration. Der verwendete Puffer enthielt 100 mM Tris, 100 mM Maleinsäure, 10 mM $MgCl_2$, 5 mM NaCl, pH 7,3 und den angegebenen Methanol-Konzentrationen. Pro Ansatz wurden 10 μg Enzym verwendet. Die Reaktion wurde nach dreiminütiger Vorinkubation des Ansatzes bei 37 °C durch Zugabe von 2,5 mM Na_2 -ATP (Endkonzentration) gestartet. Alle Messwerte bestehen aus dem Mittelwert \pm SEM von drei biologisch unabhängigen Experimenten ($n = 3$), die jeweils in Triplikaten durchgeführt wurden.

3.8.4 Untersuchung der Na^+ -Abhängigkeit der ATP Hydrolyse-Aktivität

Um die vorhergesagte Na^+ -Abhängigkeit der A_1A_0 -ATP-Synthase nachzuweisen und zudem biochemisch zu zeigen, dass das Enzym funktionell gekoppelt gereinigt werden konnte, sollte als nächstes der Einfluss von Na^+ auf die ATP-Hydrolyse-Aktivität untersucht werden. Dabei wurde die ATP-Hydrolyse-Aktivität des gereinigten Enzyms bei unterschiedlichen Konzentrationen an NaCl (0 – 5 mM) untersucht. Es ist bekannt, dass Na^+ -abhängige ATP-Synthasen neben Na^+ auch Li^+ als Kopplungssion nutzen können (Fritz und Müller, 2007). Aus diesem Grund wurde zudem der Einfluss von LiCl auf die ATP-Hydrolyse-Aktivität untersucht. Um auszuschließen, dass Chloridionen einen Einfluss auf die Aktivität haben, wurde zusätzlich die Aktivität bei unterschiedlichen KCl-Konzentrationen (0 – 5 mM) untersucht. Die ATP-Hydrolyse-Aktivität zeigte sich strikt abhängig von der Na^+ -Konzentration des Messpuffers (Abb. 28). Bei einer kontaminierenden Menge von 71 μM Na^+ im Messansatz betrug die ATP-Hydrolyse nur 326 $mU \cdot mg^{-1}$. Jedoch konnte die Aktivität durch Zugabe von Na^+ um das Vierfache gesteigert werden. Insgesamt folgte die Abhängigkeit der Aktivität von der Na^+ -Konzentration einer klassischen Michaelis-Menten-Kinetik. Der K_M -Wert betrug 0,3 mM, während die maximale Aktivität (v_{max}) mit 1280 $mU \cdot mg^{-1}$ bei 0,6 mM

lag. Die Zugabe von Li^+ stimulierte die ATP-Hydrolyse ebenfalls, jedoch in geringerem Ausmaß. Die maximale Aktivität wurde bei 2 mM mit $783 \text{ mU} \cdot \text{mg}^{-1}$ erreicht; der K_M -Wert lag bei 1 mM. KCl hatte dagegen keinen Einfluss auf die ATP-Hydrolyse-Aktivität.

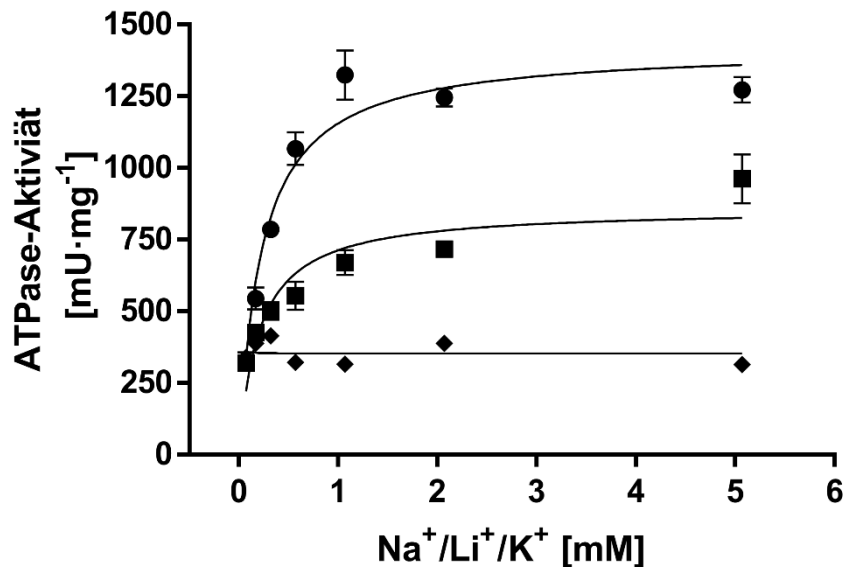


Abb. 28. Der Einfluss monovalenter Kationen auf die ATP-Hydrolyse-Aktivität der A_1A_0 -ATP-Synthase aus *E. callanderi*. Die ATP-Hydrolyse-Aktivität wurde bei 37°C gemessen. Der Messpuffer enthielt 100 mM Tris, 100 mM Maleinsäure, 10 mM MgCl_2 , 20 % (v/v) Methanol, pH 7,3. Pro Ansatz wurden $20 \mu\text{g}$ Enzym eingesetzt. Die Konzentration von Na^+ im natriumfreien Puffer wurde mithilfe einer Na^+ -selektiven Elektrode bestimmt und betrug $71 \mu\text{M}$. Die Konzentration an NaCl (●), LiCl (■) oder KCl (◆) wurde wie dargestellt zugegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2,5 mM Tris-ATP (Endkonzentration) gestartet. Alle Messwerte bestehen aus dem Mittelwert \pm SEM von drei biologisch unabhängigen Experimenten ($n = 3$), die jeweils in Triplikaten bestimmt wurden.

3.8.5 Hemmung der ATP-Hydrolyse-Aktivität durch DCCD

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die A_1A_0 -ATP-Synthase aus *E. callanderi* Na^+ -abhängig ist, sollte überprüft werden, ob das Enzym durch den Hemmstoff DCCD inhibiert werden kann. DCCD ist ein gängiger Hemmstoff für ATP-Synthasen, welcher kovalent an das hochkonservierte protonierte Carboxylat (E138 in Helix 4) in der c-Untereinheit bindet und dadurch die Bindung von Protonen bzw. Natriumionen inhibiert. Da DCCD und Na^+ in anderen Na^+ -ATP-Synthasen um die gleiche Bindestelle konkurrieren, musste das Enzym unter Na^+ -freien Bedingungen mit DCCD inkubiert werden (Laubinger und Dimroth, 1988; Spruth *et al.*, 1995; Fritz und Müller, 2007; Pisa *et al.*, 2007; McMillan *et al.*, 2011; Mayer *et al.*, 2012). Die kontaminierende Menge an Na^+ unter Na^+ -freien Bedingungen lag bei $73 \mu\text{M}$. Zunächst wurde der

Einfluss des pH-Werts auf die maximale Inhibition der ATP-Hydrolyse-Aktivität durch DCCD untersucht (Abb. 29). Insgesamt wurde der Einfluss von DCCD auf die ATP-Hydrolyse-Aktivität im pH-Bereich zwischen 6 und 8 bestimmt. Die Hemmwirkung von DCCD war dabei abhängig vom pH-Wert. Während bei pH 8 eine maximale Hemmung von 10,7 % zu beobachten war, zeigte sich die höchste Hemmwirkung bei pH 6 (51,9 %). Bei pH 6,5 zeigte sich eine vergleichbare Hemmung zu pH 6; allerdings war die maximal erzielbare spezifische Aktivität höher. Deshalb wurden die weiteren Hemmstoffexperimente mit DCCD bei diesem pH-Wert durchgeführt.

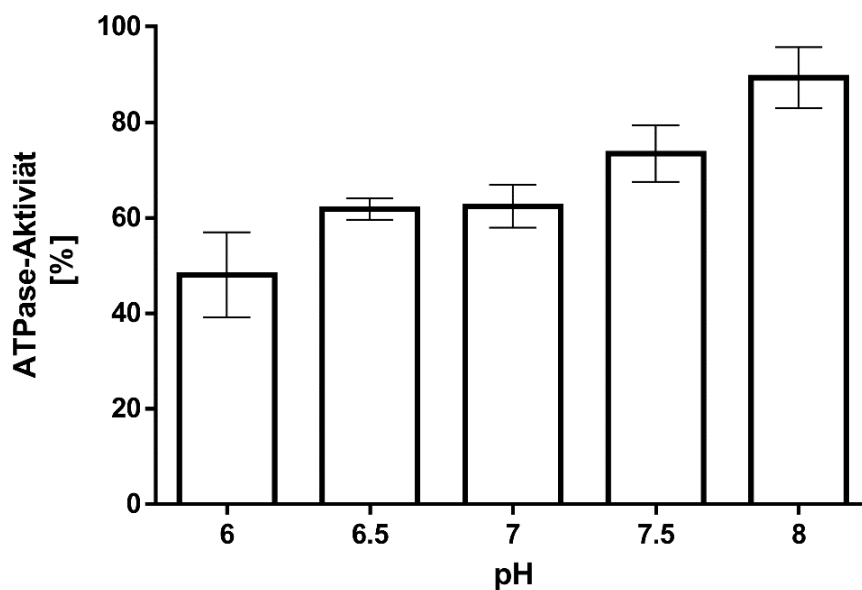


Abb. 29. Einfluss des pH-Werts auf die maximale Hemmbarkeit der ATP-Hydrolyse-Aktivität der A_1A_0 -ATP-Synthase aus *E. callanderi*. Der Messpuffer enthielt 50 mM MES, 50 mM Tris, 50 mM HEPES, 50 mM CHES, 10 mM $MgCl_2$, und 20 % (v/v) Methanol und wurde jeweils auf pH 6, 6,5, 7 und 8 eingestellt. Pro Ansatz wurden 20 μg Enzym eingesetzt. Nach 25-minütiger Vorinkubation des Ansatzes mit 250 μM DCCD (gelöst in Ethanol) bei Raumtemperatur und weiterer Inkubation für 3 min bei 37 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 mM NaCl und 2,5 mM Tris-ATP (jeweils Endkonzentration) gestartet. 100 % Aktivität entsprechen einer spezifischen Aktivität von 785, 973, 1200, 1253 bzw. 852 $mU \cdot mg^{-1}$ bei pH 6, 6,5, 7, 7,5 bzw. 8. Alle Messwerte bestehen aus dem Mittelwert \pm SEM von drei biologisch unabhängigen Experimenten ($n = 3$), die jeweils in Triplikaten durchgeführt wurden.

Um experimentell zu zeigen, dass DCCD und Na^+ tatsächlich um die gleiche Bindestelle in der c-Untereinheit konkurrieren, wurde als nächstes die Hemmung der ATP-Hydrolyse-Aktivität in Abhängigkeit von unterschiedlichen Konzentrationen an DCCD (0 – 500 μM) in gleichzeitiger An- bzw. Abwesenheit von NaCl untersucht (Abb. 30). DCCD inhibierte die A_1A_0 -ATP-Synthase aus *E. callanderi* mit einer halbmaximalen Hemmung bei 80 μM DCCD. Die maximale Hemmung von 43,8 %

wurde ab einer Konzentration von 200 μM DCCD erreicht. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von Na^+ während der Vorinkubation konnte die Hemmung dagegen nahezu komplett aufgehoben werden.

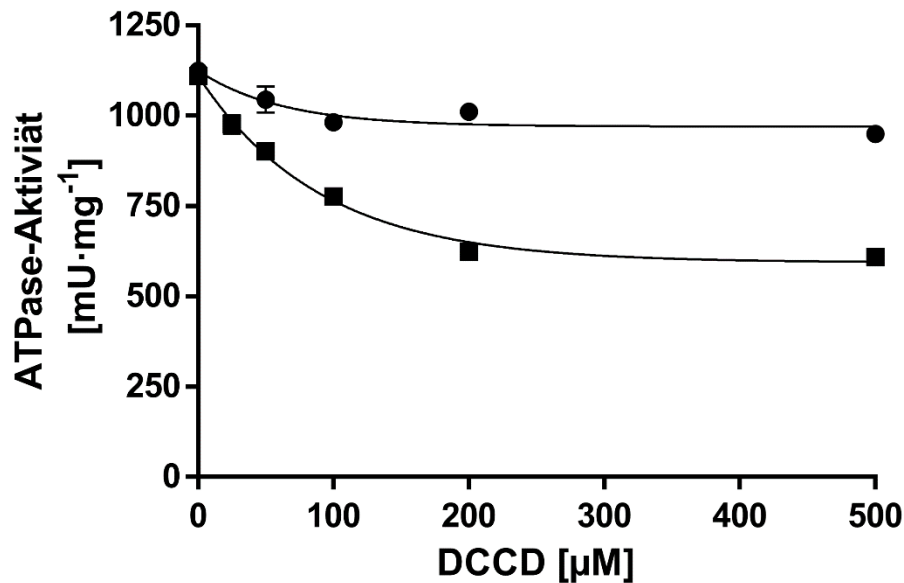


Abb. 30. Hemmung der ATP-Hydrolyse der A_1A_0 -ATP-Synthase aus *E. callanderi* durch DCCD und dessen Aufhebung durch Na^+ . Der Messpuffer enthielt 100 mM Tris, 100 mM Maleinsäure, 10 mM MgCl_2 , 20 % (v/v) Methanol, pH 6,5. Pro Ansatz wurden 20 μg Enzym eingesetzt. Nach Vorinkubation des Ansatzes für 25 min bei Raumtemperatur mit unterschiedlichen Konzentrationen an DCCD (0 – 500 μM ; Stammlösungen jeweils in Ethanol gelöst) in Gegenwart (●) oder Abwesenheit von 20 mM NaCl (■) und weiterer Inkubation für 3 min bei 37 °C wurde die Reaktion 2,5 mM Tris-ATP (Endkonzentration) gestartet. Bei Abwesenheit von NaCl während der Vorinkubation wurde dem Ansatz 20 mM NaCl vor dem Start der Reaktion zugegeben. Alle Messwerte bestehen aus dem Mittelwert \pm SEM von drei biologisch unabhängigen Experimenten ($n = 3$), die jeweils in Triplikaten durchgeführt wurden.

Die Konkurrenz von DCCD und Na^+ um die gleiche Bindestelle in der c -Untereinheit wurde zusätzlich mithilfe des fluoreszierenden Analogons von DCCD – NCD-4 – gezeigt. Dazu wurde die gereinigte Enzymprobe mit unterschiedlichen Mengen an NCD-4 in Gegenwart oder Abwesenheit von Na^+ vorinkubiert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung wurde das SDS-Gel mittels UV-Strahlung detektiert (Abb. 31). Während die c -Untereinheit in Abwesenheit von Na^+ mit NCD-4 markiert werden konnte, wurde bei gleichzeitiger Vorinkubation mit Na^+ die Bindung von NCD-4 verhindert. Insgesamt zeigen die Daten eindeutig, dass Na^+ das Kopplungsglied der A_1A_0 ATP-Synthase aus *E. callanderi* ist.

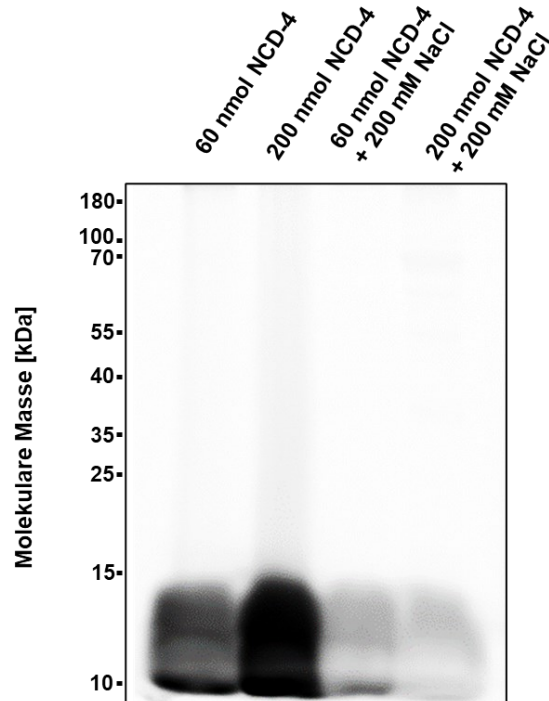


Abb. 31. Na⁺ verhindert die Markierung der c-Untereinheit der A₁A₀-ATP-Synthase aus *E. callanderi*. Jeweils 10 µg der gereinigten A₁A₀-ATP-Synthase wurden über Nacht bei Raumtemperatur mit 60 oder 200 nmol NCD-4 und in Gegenwart oder Abwesenheit von 200 mM NaCl inkubiert. Die Proben wurden in einem 12,5%igen SDS-Polyacrylamidgel nach Schägger und von Jagow (1987) aufgetrennt und die markierte c-Untereinheit nach Anregung mit UV-Licht detektiert. Die Daten repräsentieren das Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten (n = 3).

3.9 Nachweis des Na⁺-Transports der A₁A₀-ATP-Synthase in Proteoliposomen

Um den Na⁺-Transport durch die A₁A₀-ATP-Synthase zweifelsfrei nachzuweisen, wurde das gereinigte Enzym in Liposomen rekonstituiert. Die Liposomen bestehend aus Phosphatidylcholin Typ II S von Sojabohnen wurden dabei mittels Sonifikation hergestellt (siehe Kapitel 2.14). Nachdem das Enzym in Proteoliposomen rekonstituiert wurde, wurde zunächst überprüft, ob das eingebaute Enzym noch in der Lage war, ATP zu hydrolysieren. Die rekonstituierte A₁A₀-ATP-Synthase war aktiv und zeigte eine ATP-Hydrolyse-Aktivität von 621 mU · mg⁻¹. Nachdem gezeigt werden konnte, dass das Enzym noch funktionell ist, wurde überprüft, ob die ATP-Hydrolyse-Aktivität zu einer Na⁺-Translokation führt. Dazu wurde das rekonstituierte Enzym mit ²²Na⁺ inkubiert (siehe Kapitel 2.14.1). Nach Zugabe von 2,5 mM Tris-ATP (Endkonzentration) wurde ²²Na⁺ mit einer Rate von 0,6 nmol Na⁺ min⁻¹ mg⁻¹ Protein in das Lumen der Vesikel transportiert was zu einer abschließenden Akkumulation von 9,2 nmol Na⁺ min⁻¹ mg⁻¹ Protein führte (Abb. 32). In Anwesenheit des Protonophors

TCS zeigte sich eine geringfügige Stimulation der $^{22}\text{Na}^+$ -Translokation. Im Gegensatz dazu konnte bei der Vorinkubation mit dem Natriumionophor ETH 2120 oder in Abwesenheit von ATP kein $^{22}\text{Na}^+$ -Transport beobachtet werden. Die Daten der Experimente zeigen eindeutig, dass es sich um einen primären Na^+ -Transport handelt, welcher von der A_1A_0 -ATP-Synthase aus *E. callanderi* katalysiert wird.

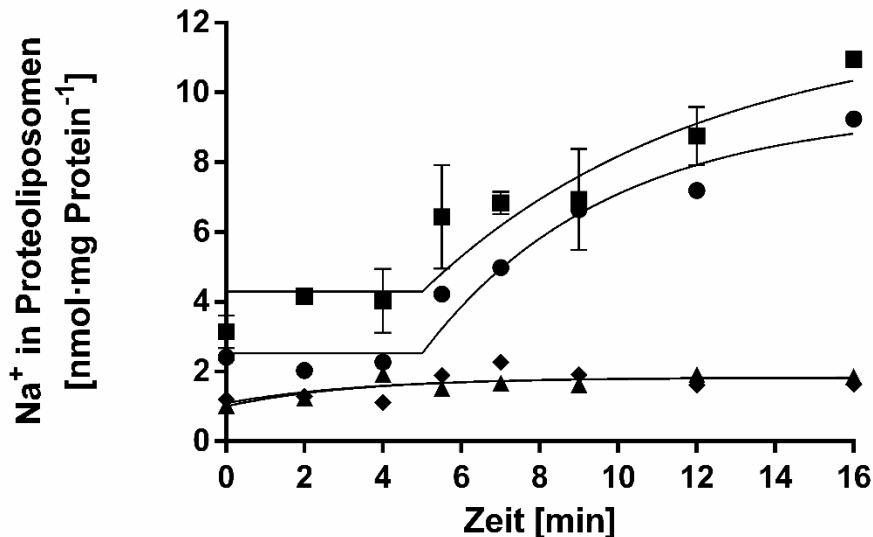


Abb. 32. ATP-abhängige Na^+ -Translokation der gereinigten A_1A_0 -ATP-Synthase aus *E. callanderi* in Proteoliposomen. 250 μg der rekonstituierten A_1A_0 -ATP-Synthase (Lipid-Protein-Verhältnis: 30:1) wurden in 750 μl Transportpuffer (50 mM Tris/HCl, 5 mM MgCl_2 , 2 mM NaCl, pH 7,5) gelöst. Nach 30-minütiger Vorinkubation bei Raumtemperatur mit 10 μl $^{22}\text{Na}^+$ (1 μCi , Träger-frei) und gleichzeitiger Anwesenheit von entweder 30 μM des Natriumionophors ETH 2120 (◆) oder 30 μM des Protonophors TCS (■), sowie weiterer 5-minütiger Inkubation des Ansatzes bei 37 °C, wurde die Reaktion durch Zugabe von 2,5 mM Tris-ATP (Endkonzentration) gestartet. Die Ionophore waren jeweils in Ethanol gelöst. Um einen inhibitorischen Effekt durch Ethanol auszuschließen, erfolgte die Vorinkubation mit Zugabe von 0,2 % (v/v) Ethanol anstelle der Ionophore (●). In (▲) wurden weder Ionophore noch ATP zugegeben. Die Daten repräsentieren das Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten ($n = 3$), welche jeweils in Doppelbestimmung durchgeführt wurden.

3.10 Untersuchung des H^+ -Transports der A_1A_0 -ATP-Synthase in Proteoliposomen

Mit Ausnahme der A_1A_0 -ATP-Synthase aus *M. acetivorans* nutzen alle bisher bekannten ATP-Synthasen entweder Na^+ oder H^+ als Kopplungssion zur ATP-Synthese. Die ATP-Synthase aus *M. acetivorans* kann dagegen unter physiologischen Bedingungen beide Ionengradienten verwenden (Schlegel *et al.*, 2012). Aus diesem Grund wurde zusätzlich untersucht, ob die A_1A_0 -ATP-Synthase aus *E. callanderi* ebenfalls in der Lage ist, Protonen zu transportieren. Die H^+ -Translokation wurde dabei

am rekonstituierten Enzym unter Verwendung des membrangängigen Fluoreszenzfarbstoffs ACMA überprüft, welcher bei sinkendem pH-Wert seine Fluoreszenz verliert. Ist das Enzym in der Lage, Protonen zu transportieren, kommt es nach Zugabe des Substrats ATP im Lumen der Vesikel zu einer Ansäuerung und somit zum Verlust der Fluoreszenz von ACMA. Diese Fluoreszenzlöschung („Quenching“) kann dabei photometrisch verfolgt werden. Die Fluoreszenzlöschung wurde in Liposomenpuffer A (50 mM Tris/HCl, 10 mM MgCl₂, pH 7,5) überprüft. Die kontaminierende Na⁺-Konzentration betrug 92 μM. Nach Zugabe von ATP konnte jedoch kein Quenching beobachtet werden (Abb. 33). Im Gegensatz dazu zeigte die in Proteolipsomen rekonstituierte gereinigte H⁺-abhängige F₁F₀-ATP-Synthase aus *E. coli* nach Zugabe von ATP eine Abnahme der Fluoreszenz von jeweils ca. 25 %. Die Fluoreszenzlöschung konnte durch Zugabe von 20 μl gesättigter (NH₄)₂SO₄-Lösung wieder aufgehoben werden.

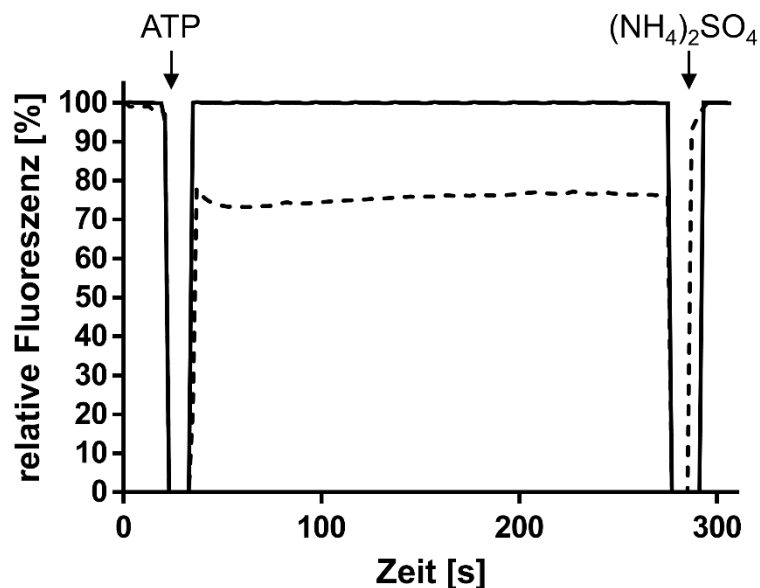


Abb. 33. Überprüfung einer möglichen H⁺-Translokation der A₁A₀-ATP-Synthase aus *E. callanderi*. 250 μl des rekonstituierten Enzyms in Liposomenpuffer A (50 mM Tris/HCl, 10 mM MgCl₂, pH 7,5; Proteinkonzentration: 1 mg/ml) wurden mit 4 μM ACMA versetzt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 410 nm und einer Detektionswellenlänge von 490 nm. Nachdem die Fluoreszenz ein konstantes Niveau erreicht hatte, wurde eine mögliche H⁺-Translokation durch Zugabe von 2,5 mM Tris-ATP (Endkonzentration) initiiert. Als Kontrollansatz wurde das Experiment unter den gleichen Reaktionsbedingungen mit 250 μg der in Proteolipsomen rekonstituierten H⁺-abhängigen F₁F₀-ATP-Synthase aus *E. coli* (---) durchgeführt. Die Löschung der Fluoreszenz wurde jeweils durch Zugabe von 20 μl gesättigter (NH₄)₂SO₄-Lösung überprüft. Die Daten repräsentieren das Ergebnis von zwei unabhängigen Experimenten (n = 2), welche jeweils in Doppelbestimmung durchgeführt wurden.

3.11 Nachweis der ATP-Synthese und energetische Charakterisierung der A_1A_0 -ATP-Synthase aus *E. callanderi*

Nachdem die A_1A_0 -ATP-Synthase aus *E. callanderi* bisher nur anhand der ATP-Hydrolyse-Richtung biochemisch charakterisiert wurde, wurde das Enzym als nächstes hinsichtlich seiner ATP-Synthese-Richtung charakterisiert.

3.11.1 Nachweis der $\Delta\tilde{\mu}Na^+$ -getriebenen ATP-Synthese

Zunächst sollte überprüft werden, ob das Enzym trotz seiner V-Typ c-Untereinheit in der Lage ist, *in vitro* ATP zu synthetisieren. Um dies nachzuweisen, wurde das gereinigte Enzym in Liposomen rekonstituiert und anschließend die $\Delta\tilde{\mu}Na^+$ -getriebene ATP-Synthese überprüft. Zur Untersuchung der $\Delta\tilde{\mu}Na^+$ -getriebenen ATP-Synthese wurde ein elektrochemisches Natriumpotential von ca. 270 mV angelegt, welches sich aus einem ΔpNa von ca. 75 mV und einem K^+ /Valinomycin-Diffusionspotenzial ($\Delta\psi$) von ca. 195 mV zusammensetzt. Das Prinzip der $\Delta\tilde{\mu}Na^+$ -getriebenen ATP-Synthese in Proteoliposomen ist in Abb. 35 schematisch dargestellt. ΔpNa (ca. 75 mV) wurde erzeugt, indem die Proteoliposomen während der Rekonstitution des Enzyms mit einer hohen Konzentration an NaCl (200 mM) beladen wurden und nach erfolgter Rekonstitution in einem Puffer mit einer geringen Konzentration an NaCl (15 mM) inkubiert wurden. Die Berechnung der artifiziell erzeugten Potentiale (mV) erfolgte mit Hilfe der Nernst-Gleichung (Gl. 8; siehe Kapitel 2.15.1). Dagegen wurde $\Delta\psi$ (ca. 195 mV) erzeugt, indem die Proteoliposomen zunächst mit einer geringen Konzentration an KCl (0,5 mM) beladen wurden und das rekonstituierte Enzym anschließend mit einem Puffer inkubiert wurde, welcher eine höhere Konzentration an KCl (200 mM) aufwies. Dabei wird das elektrische Feld durch Zugabe des Kaliumionophors Valinomycin induziert, indem Kaliumionen in das Lumen der Vesikel eintreten, während Chloridionen zurückgehalten werden.

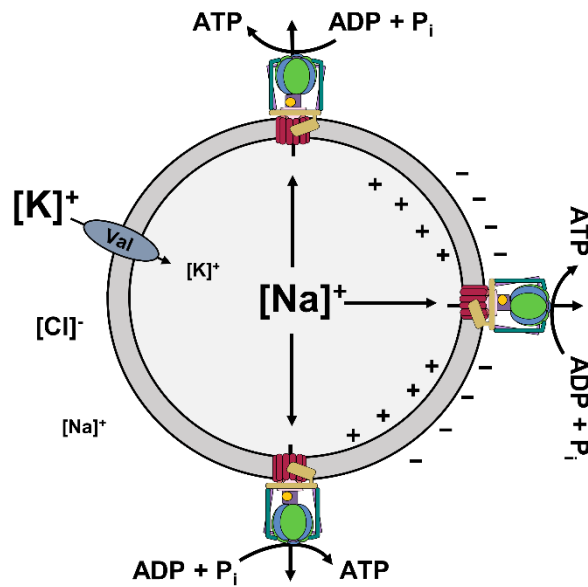


Abb. 34. Schema der artifizien $\Delta\tilde{\mu}_{\text{Na}^+}$ -getriebenen ATP-Synthese in Proteoliposomen.

Das elektrochemische Natriumpotential $\Delta\tilde{\mu}_{\text{Na}^+}$ setzt sich aus einem Natriumionenpotential (Δp_{Na}) und einem K^+ /Valinomycin-Diffusionspotential ($\Delta\psi$) zusammen. Δp_{Na} und $\Delta\psi$ werden jeweils durch Konzentrationsunterschiede von Na^+ bzw. K^+ erzeugt (Innerhalb: hohe Na^+ -Konzentration, geringe K^+ -Konzentration; Außerhalb: geringe Na^+ -Konzentration, hohe K^+ -Konzentration). Die Induktion von $\Delta\psi$ erfolgt durch Zugabe von Valinomycin (Val), indem Kaliumionen in das Lumen der Vesikel eintreten, während Chloridionen zurückgehalten werden. Die Berechnung der artifizien erzeugten Potentiale (mV) erfolgte mit Hilfe der Nernst-Gleichung (siehe Kapitel 2.15.1).

Erstaunlicherweise konnte nach Zugabe von Valinomycin und ADP die Synthese von ATP festgestellt werden (Abb. 35). Dabei wurde ATP konstant für 2 min gebildet. Die maximale ATP-Synthese betrug $99,2 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$. In Anwesenheit der verwendeten Ionophore TCS und ETH 2120 konnte dagegen keine ATP-Synthese beobachtet werden. TCS ist ein Protonophor, welches das $\Delta\psi$ durch Bewegung von Protonen vom Lumen zusammenbrechen lässt. Im Gegensatz dazu löst das Natriumionophor ETH 2120 den erzeugten Na^+ -Gradienten auf und führt zusätzlich zu einem Ladungsausgleich durch Bewegung von Na^+ entlang des elektrischen Feldes vom Lumen zum Puffer. Wurde kein ADP oder Valinomycin in den Ansatz gegeben, konnte ebenfalls kein ATP synthetisiert werden. Ein Δp_{Na} von 75 mV scheint somit nicht auszureichen, um die ATP-Synthese anzutreiben.

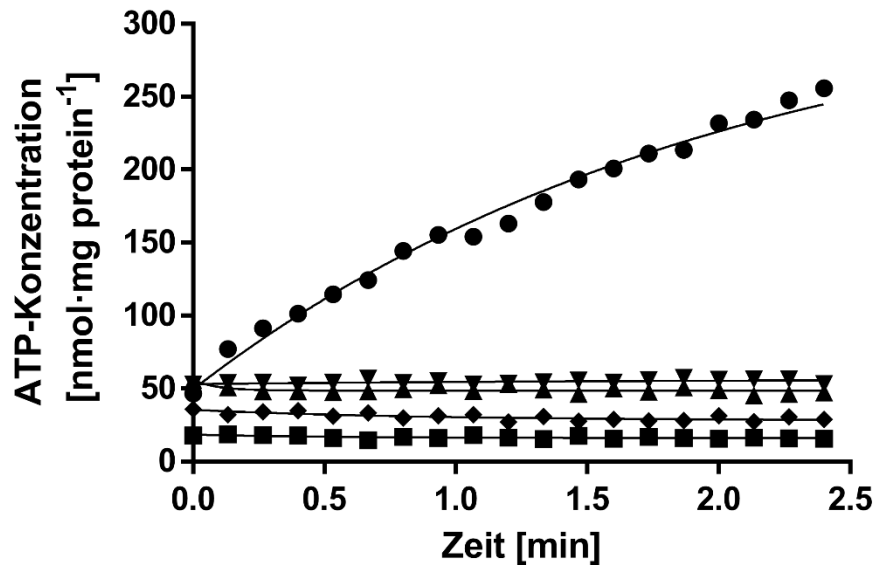


Abb. 35. Nachweis der $\Delta\tilde{\mu}\text{Na}^+$ -getriebenen ATP-Synthese der gereinigten A_1A_0 -ATP-Synthase aus *E. callanderi*. Proteoliposomen mit jeweils 100 μg der rekonstituierten A_1A_0 -ATP-Synthase aus *E. callanderi* wurden wie in Kapitel 2.15.2 beschrieben hergestellt. Die Proteoliposomen wurden in ATP-Synthesepuffer (100 mM Tris, 100 mM Maleinsäure, 5 mM MgCl_2 , 15 mM NaCl, 200 mM KCl, 5 mM KH_2PO_4 , pH 7,5) gelöst und für 10 min bei Raumtemperatur in Anwesenheit von 30 μM des angegebenen Ionophors (■ ETH 2120, ▲ TCS) vorinkubiert. Nach weiterer dreiminütiger Inkubation bei 37 °C wurde die ATP-Synthesereaktion durch Zugabe von 0,5 mM ADP und 2 μM Valinomycin (jeweils Endkonzentration) gestartet. Bei der Reaktion wurde ein $\Delta\tilde{\mu}\text{Na}^+$ von ca. 270 mV angelegt, welches sich aus einem $\Delta p\text{Na}$ von ca. 75 mV und einem $\Delta\psi$ von ca. 195 mV zusammensetzt. $\Delta p\text{Na}$ wurde erzeugt, indem die Proteoliposomen während der Rekonstitution des Enzyms mit einer hohen Konzentration an NaCl (200 mM) beladen wurden und nach erfolgter Rekonstitution in einem Puffer mit einer geringen Konzentration an NaCl (15 mM) inkubiert wurden. $\Delta\psi$ wurde erzeugt, indem die Proteoliposomen zunächst mit einer geringen Konzentration an KCl (0,5 mM) beladen wurden und das rekonstituierte Enzym anschließend mit einem Puffer inkubiert wurde, welcher eine höhere Konzentration an KCl (200 mM) aufwies. In (▼) wurde nur ein $\Delta p\text{Na}$ von 75 mV erzeugt, indem kein Valinomycin zugegeben wurde. Die Ionophore waren jeweils in Ethanol gelöst. Um einen inhibitorischen Effekt durch Ethanol auszuschließen, erfolgte in (●) die Vorinkubation in Gegenwart von 0,2 % (v/v) Ethanol. In (◆) wurde kein ADP zugegeben. Die Daten repräsentieren das Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten ($n = 3$), welche jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die A_1A_0 -ATP-Synthase aus *E. callanderi* trotz ihrer V-Typ c-Untereinheit in der Lage ist, einen artifiziell-erzeugten elektrochemischen Na^+ -Gradienten zu nutzen, um ATP zu synthetisieren.

3.11.2 Nachweis der Na^+ -Abhängigkeit der ATP-Synthese

Nachdem bereits für die ATP-Hydrolyse gezeigt werden konnte, dass die A_1A_0 -ATP-Synthase aus *E. callanderi* strikt Na^+ -abhängig ist und Na^+ als Kopplungssion für ihre katalytische Aktivität und energetische Kopplung benötigt, sollte dies ebenfalls am

rekonstituierten Enzym für die ATP-Synthese gezeigt werden. Zur Überprüfung der Na^+ -Abhängigkeit der ATP-Synthese wurde ein konstantes $\Delta\psi$ von 120 mV angelegt (K^+ _{innen}: 0,5 mM; K^+ _{außen}: 50 mM), während die Na^+ -Konzentration innerhalb bzw. außerhalb der Proteoliposomen in gleicher Menge (0 – 20 mM) variiert wurde, aber innen und außen immer gleich waren. Die Rekonstitution des Enzyms erfolgte dabei in einem Na^+ -freien Puffer. Die kontaminierende Menge an Na^+ betrug 81 μM . Wie in Abb. 36 zu erkennen, war die ATP-Syntheseaktivität strikt von der Na^+ -Konzentration abhängig. Maximale Aktivität konnte ab einer Konzentration von 5 mM NaCl ($77,4 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$) beobachtet werden. Ohne zusätzliches Na^+ betrug die ATP-Syntheserate nur $7,51 \text{ nmol}\cdot\text{min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$. Der K_M -Wert lag bei $1,1 \pm 0,4 \text{ mM}$ und war somit vergleichbar mit dem für die ATP-Hydrolyse ermittelten K_M -Wert.

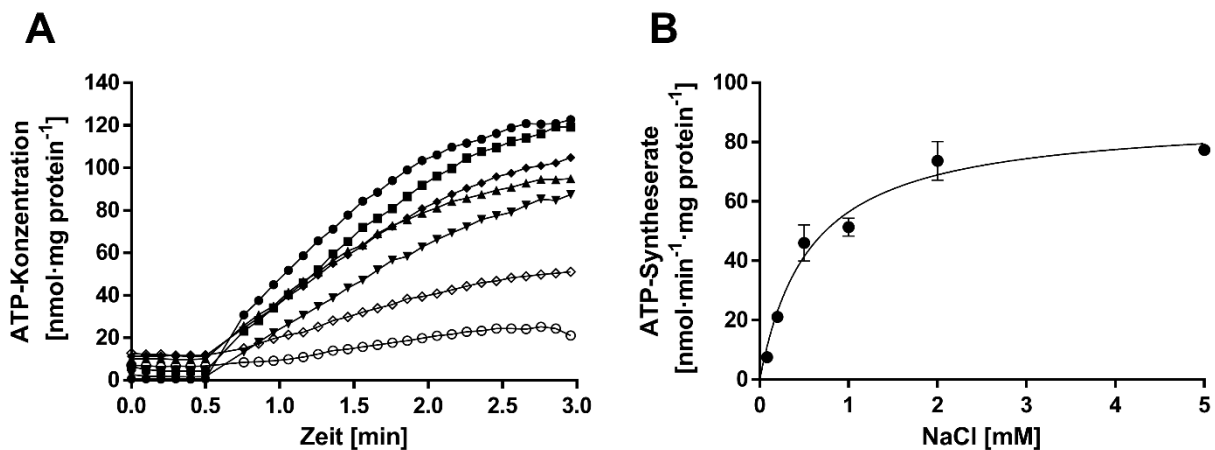


Abb. 36. Einfluss von Na^+ auf die $\Delta\psi$ -getriebene ATP-Synthese. (A) Darstellung der ATP-Synthese im zeitlichen Verlauf. Proteoliposomen mit jeweils 100 μg der rekonstituierten A_1A_0 -ATP-Synthase aus *E. callanderi* wurden wie in Kapitel 2.15.2 beschrieben hergestellt. Dabei wurde die Na^+ -Konzentration innerhalb bzw. außerhalb der Proteoliposomen in gleicher Menge (0 – 20 mM) variiert und jeweils ein konstantes $\Delta\psi$ von 120 mV als Triebkraft angelegt. $\Delta\psi$ wurde erzeugt, indem die Proteoliposomen zunächst mit einer geringen Konzentration an KCl (0,5 mM) beladen wurden und das rekonstituierte Enzym anschließend mit einem Puffer inkubiert wurde, welcher eine höhere Konzentration an K^+ (45 mM KCl + 5 mM KH_2PO_4) aufwies. Die kontaminierende Menge an Na^+ betrug 81 μM . Die ATP-Synthesereaktion wurde nach dreiminütiger Inkubation bei 37 °C durch Zugabe von 2 μM Valinomycin und 5 mM ATP (jeweils Endkonzentration) gestartet. (●) = 20 mM NaCl, (■) = 5 mM NaCl, (◆) = 2 mM NaCl, (▲) = 1 mM NaCl, (▼) = 0,5 mM NaCl, (◇) = 0,2 mM NaCl; (○) = ohne zusätzliches NaCl. (B) Darstellung der entsprechenden ATP-Syntheseraten in Abhängigkeit der NaCl-Konzentration. Die Daten repräsentieren das Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten ($n = 3$), welche jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

3.11.3 Hemmung der ATP-Synthese-Aktivität durch DCCD

Als nächstes sollte auch für die ATP-Synthese gezeigt werden, dass der an die c-Untereinheit bindende Inhibitor, DCCD, mit Na^+ um die gleiche Bindestelle konkurriert. Aus diesem Grund wurde das gereinigte Enzym unter Na^+ -freien Bedingungen vor der Rekonstitution in Proteoliposomen entweder mit nur 300 μM DCCD, 300 μM DCCD und gleichzeitig 200 mM NaCl oder nur 200 mM NaCl für 30 min vorkinkubiert. Die Messung der ATP-Synthese erfolgte anschließend bei einem konstanten $\Delta\psi$ von 120 mV (Abb. 37.). Während bei Anwesenheit von DCCD keine ATP-Synthese beobachtet werden konnte, wurde die Fähigkeit zur ATP-Synthese durch Vorinkubation mit Na^+ vollständig wiederhergestellt. Die ATP-Syntheserate betrug dabei $45,05 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$.

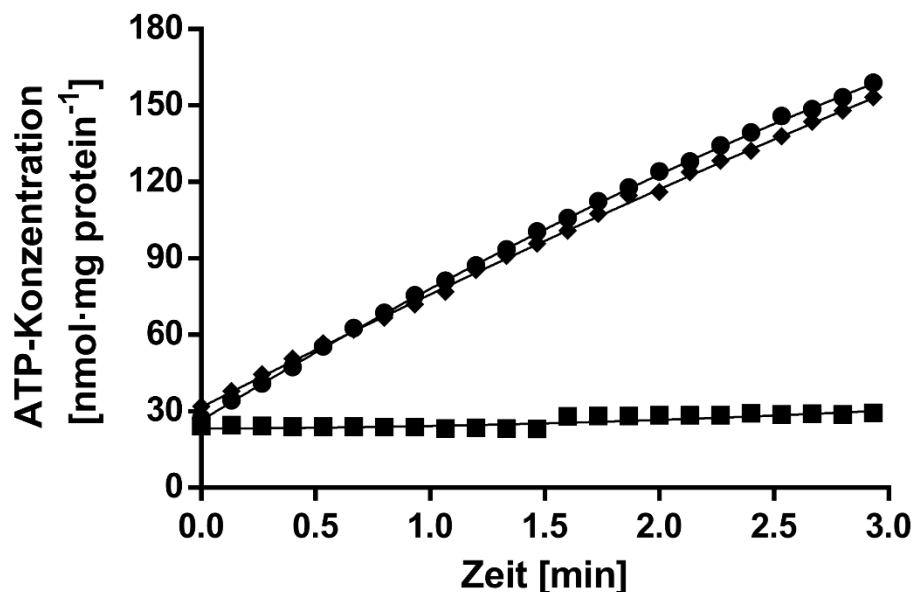


Abb. 37. Hemmung der $\Delta\psi$ -getriebenen ATP-Synthese der A_1A_0 -ATP-Synthase aus *E. callanderi* durch DCCD und dessen Aufhebung durch Na^+ . Die gereinigte A_1A_0 -ATP-Synthase wurde vor der Rekonstitution in Proteoliposomen für 30 min bei Raumtemperatur in Anwesenheit von 0,3 mM DCCD (■), 0,3 mM DCCD und 200 mM NaCl (◆) oder nur 200 mM NaCl (●) inkubiert. Die ATP-Synthese wurde bei einem konstanten $\Delta\psi$ von 120 mV gemessen. $\Delta\psi$ wurde erzeugt, indem die Proteoliposomen zunächst mit einer geringen Konzentration an KCl (0,5 mM) beladen wurden und das rekonstituierte Enzym anschließend mit einem Puffer inkubiert wurde, welcher eine höhere Konzentration an KCl (50 mM KCl) aufwies. Nach dreiminütiger Vorinkubation bei 37 °C wurde die ATP-Synthesereaktion durch Zugabe von 0,5 mM ADP und 2 μM Valinomycin (jeweils Endkonzentration) gestartet. Die Daten repräsentieren das Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten ($n = 3$), welche jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

3.11.4 Untersuchung des Einflusses von ΔpNa -, $\Delta\psi$ - oder $\Delta\tilde{\mu}Na^+$ auf die ATP-Synthese

Als nächstes wurde der Einfluss der einzelnen Triebkräfte ΔpNa , $\Delta\psi$ und das daraus zusammengesetzte $\Delta\tilde{\mu}Na^+$ auf die ATP-Synthese näher untersucht. Zur Untersuchung des Einflusses von $\Delta\psi$ betrug die KCl-Konzentration innerhalb der Proteoliposomen 0,5 mM, während die externe KCl-Konzentration zwischen 5 – 500 mM variiert wurde. Daraus ergaben sich $\Delta\psi$ -Werte von ca. 60 – 180 mV. Die interne bzw. externe Na^+ -Konzentration war konstant (205 mM). Zur Untersuchung des Einflusses von ΔpNa wurde die interne NaCl-Konzentration bei konstanten 205 mM gehalten, während die externe NaCl-Konzentration zwischen 1 – 15 mM variiert wurde. Die K^+ -Konzentration wurde dagegen jeweils konstant bei 0,5 mM gehalten. Dies entsprach einem erzeugten ΔpNa von 70 – 141 mV. Bei der Untersuchung des Einflusses von $\Delta\tilde{\mu}Na^+$ wurden die Proteoliposomen mit einem konstanten K^+ /Valinomycin-Diffusionspotential von 60 mV energetisiert, während ein variables ΔpNa durch unterschiedliche Na^+ -Konzentrationen außerhalb (5 – 200 mM) und konstanter Na^+ -Konzentration innerhalb der Proteoliposomen (200 mM) erzeugt wurde (siehe Kapitel 2.15.1). Wie in Abb. 38 zu erkennen, war die ATP-Synthese unabhängig von der Triebkraft. Der energetische Schwellenwert, bei dem die ATP-Synthese angetrieben werden konnte, war für ΔpNa (87 mV), $\Delta\psi$ (94 mV) und $\Delta\tilde{\mu}Na^+$ (94 mV) ähnlich. Bei allen drei Triebkräften stieg die ATP-Syntheserate linear mit zunehmendem Potential an, bis ab einem Potential von ca. 130 mV maximale ATP-Syntheseraten von 80 – 90 nmol · min⁻¹ mg Protein⁻¹ erzielt wurden. Die Ergebnisse zeigen, dass die ATP-Synthese allein durch ein ΔpNa oder $\Delta\psi$ angetrieben werden konnte; die Raten waren dabei identisch und der Schwellenwert war ähnlich hoch. Die beiden Triebkräfte ΔpNa und $\Delta\psi$ waren nicht synergetisch.

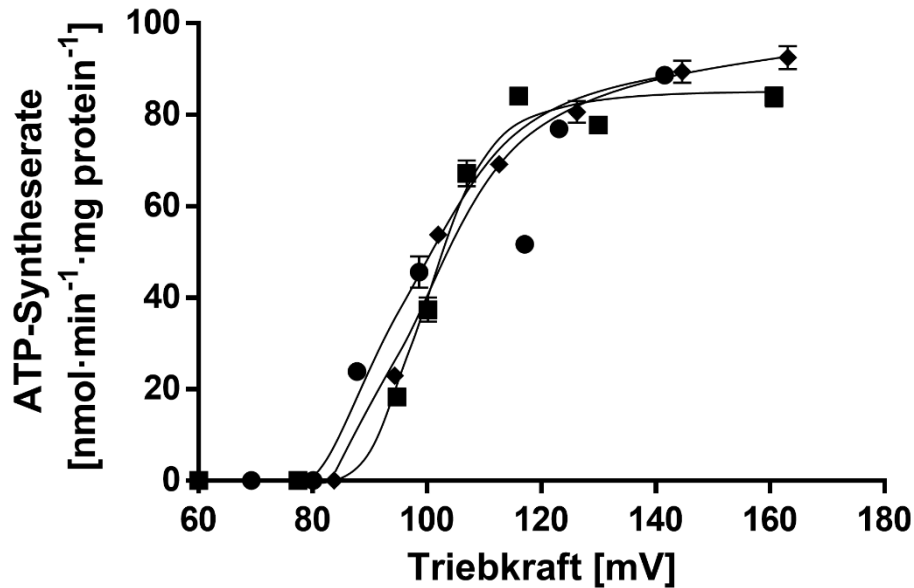


Abb. 38. Einfluss von $\Delta\psi$, pNa und $\Delta\bar{\mu}Na^+$ auf die ATP-Synthese der A_1A_0 -ATP-Synthase aus *E. callanderi*. $\Delta\psi$ (■) wurde erzeugt, indem Proteoliposomen mit jeweils 0,5 mM KCl beladen wurden und die KCl im ATP-Synthesepuffer auf 10 – 500 mM variiert wurde. Die interne bzw. externe Na^+ -Konzentration betrug jeweils 205 mM. pNa (●) wurde erzeugt, indem die $NaCl$ -Konzentration innerhalb der Proteoliposomen bei konstanten 205 mM gehalten, während die $NaCl$ -Konzentration im ATP-Synthesepuffer zwischen 1 – 15 mM variiert wurde. Bei $\Delta\bar{\mu}Na^+$ (◆) wurden die Proteoliposomen mit einem konstanten K^+ /Valinomycin-Diffusionspotential von 60 mV energetisiert, während ein variables ΔpNa durch unterschiedliche Na^+ -Konzentrationen außerhalb (5 – 200 mM) und konstanter Na^+ -Konzentration innerhalb der Proteoliposomen (200 mM) erzeugt wurde. Die Messung der ATP-Synthese erfolgte bei 37 °C (siehe Kapitel 2.15.1). Pro Reaktion wurden jeweils 100 μ g des rekonstituierten Enzyms eingesetzt. Alle Messwerte bestehen aus dem Mittelwert \pm SEM von drei biologisch unabhängigen Experimenten ($n = 3$), die jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

Als nächstes wurde die ATP-Syntheserate bei unterschiedlich zusammengesetzten $\Delta\bar{\mu}Na^+$ untersucht (Abb. 39). Das erzeugte $\Delta\bar{\mu}Na^+$ setzte sich dabei aus einem konstanten $\Delta\psi$ von 30, 45 oder 60 mV und variablen pNa zusammen. Erneut zeigte sich, dass nicht das angelegte $\Delta\psi$ entscheidend für die Höhe der ATP-Syntheserate war, sondern die Summe von $\Delta\psi$ und ΔpNa ($\Delta\bar{\mu}Na^+$). Unabhängig vom angelegten $\Delta\psi$ lag der Schwellenwert der $\Delta\bar{\mu}Na^+$ -getriebenen ATP-Synthese bei einem Gesamtpotential von ca. 90 mV. Maximale ATP-Syntheseraten (87,4 $nmol \cdot min^{-1} mg Protein^{-1}$) wurden erneut ab einem Potential von ca. 130 mV erreicht.

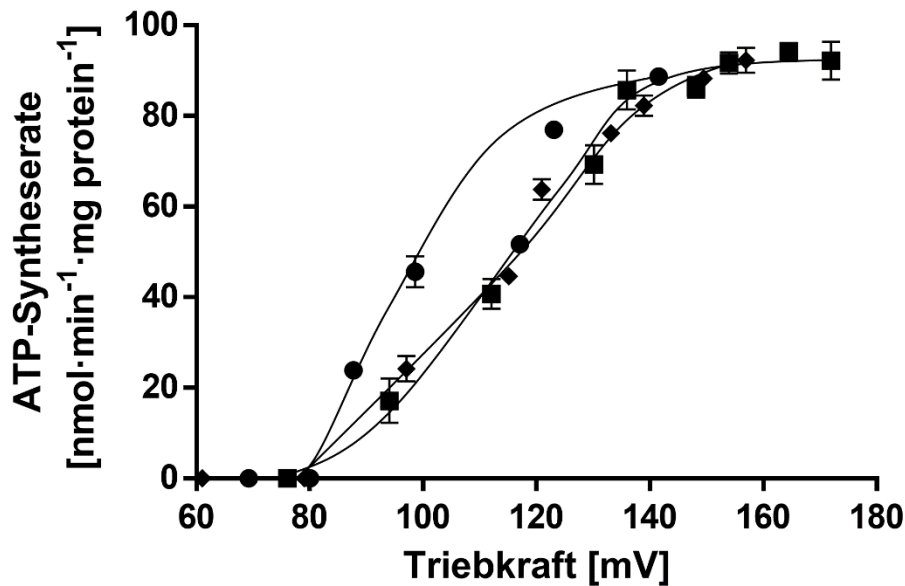


Abb. 39. Die $\Delta\tilde{\mu}\text{Na}^+$ -getriebene ATP-Synthese der A_1A_0 -ATP-Synthase aus *E. callanderi* ist unabhängig von verschiedenen Kombinationen von $\Delta\psi$ und $p\text{Na}$. Das erzeugte $\Delta\tilde{\mu}\text{Na}^+$ setzte sich dabei aus einem konstanten $\Delta\psi$ von 30 (■), 45 (◆) oder 60 mV (●) und variablen $p\text{Na}$ zusammen (siehe Kapitel 3.11.4). Die Messung der ATP-Synthese erfolgte bei 37 °C durch Zugabe vom 0,5 mM ADP und 2 μM Valinomycin (jeweils Endkonzentration). Pro Reaktion wurden jeweils 100 μg des rekonstituierten Enzyms eingesetzt. Alle Messwerte bestehen aus dem Mittelwert \pm SEM von drei biologisch unabhängigen Experimenten ($n = 3$), die jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

3.12 Heterologe Reinigung der F_1F_0 -ATP-Synthasen von *A. woodii*, *E. coli* oder *P. modestum*

Um den für die ATP-Synthese ermittelten energetischen Schwellenwert der A_1A_0 -ATP-Synthase aus *E. callanderi* mit dem der F_1F_0 -ATP-Synthasen aus *A. woodii*, *E. coli* und *P. modestum* vergleichen zu können, wurden die Enzyme in *E. coli* DK8 produziert und anschließend mittels Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie gereinigt. Die Produktion und Reinigung der Enzyme aus *A. woodii* und *E. coli* erfolgte wie in Brandt *et al.* (2013) bzw. wie in Wiedenmann *et al.* (2008). Beide Enzyme konnten mittels Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie bis zur apparenten Homogenität gereinigt werden (Abb. 40).

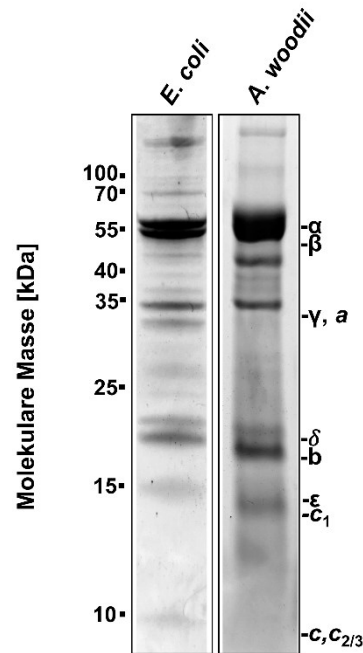


Abb. 40. SDS-PAGE der F_1F_0 -ATP-Synthasen aus *E. coli* und *A. woodii*. Die Produktion und Reinigung der Enzyme aus *E. coli* und *A. woodii* aus *E. coli* DK8 erfolgte wie in Wiedenmann *et al.* (2008) bzw. Brandt *et al.* (2013) beschrieben. Das Plasmid zur Expression der *E. coli* ATP-Synthase wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. von Baalmoos (Universität Bern, Schweiz) zur Verfügung gestellt. Jeweils 20 μg der mittels Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie gereinigten Enzyme wurden in einem 12,5%igen SDS-Polyacrylamidgel nach Schagger und von Jagow (1987) aufgetrennt und mit Coomassie-Brillant-Blau gefärbt.

Zur Produktion und anschließenden Reinigung der F_1F_0 -ATP-Synthase aus *P. modestum*, wurden zunächst die mittels PCR amplifizierten DNA-Bereiche, welche für die Untereinheiten der ATP-Synthase aus *P. modestum* kodieren, mittels Gibson-Assembly in den Vektor pTrc99a kloniert. Das erzeugte Plasmid pPM001 wurde mittels Sequenzierung sowie anhand eines Kontrollverdaus verifiziert. Beim Kontrollverdaus wurde das Restriktionsenzym *NdeI* verwendet (Abb. 41). Zur Verifizierung wurde die Fragmentgröße des isolierten Plasmids pPM001 mit der des Vektors pTrc99a verglichen. Während der Restriktionsverdaus des Vektors erwartungsgemäß zu dessen Linearisierung (erwartete Fragmentgröße: 4176 Bp) führte, konnten beim Restriktionsverdaus von pPM001 zwei Fragmente beobachtet werden, welche den erwarteten Größen von 4232 und 7387 Bp entsprechen.

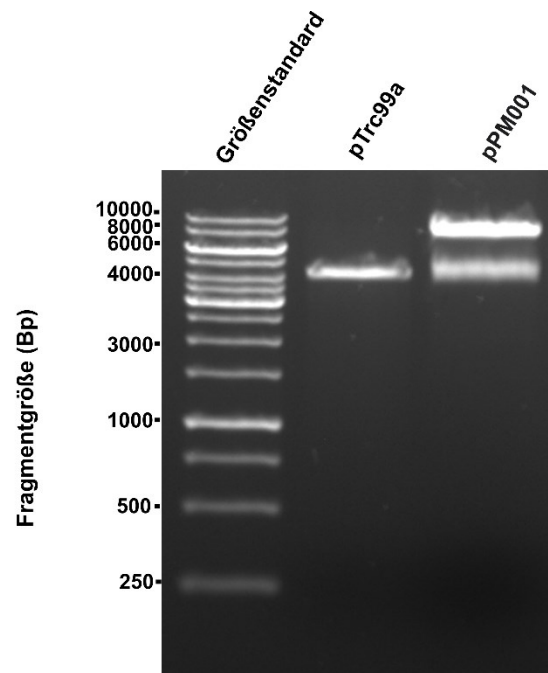


Abb. 41. Kontrollverdau des Plasmids pPM001. Zur Überprüfung der erfolgreichen Klonierung wurden 100 ng des Plasmids pPM001 sowie 100 ng des Vektors pTrc99a mit dem Restriktionsenzym *NdeI* versetzt und für 2 h bei 37 °C verdaut. Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in einem 1,2 %igen (w/v) Agarosegel. Als Größenstandard wurden 3 µl des „GeneRuler 1 kB DNA-Ladder“ (Thermo Fisher Scientific, Deutschland) verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 120 V für 30 min.

Nach der erfolgreichen Klonierung des ATP-Synthase-Operons in den Vektor pTrc99a, wurde innerhalb des Plasmids pPM001 unter Verwendung des „Q5[®] Site-Directed Mutagenesis Kit“ (New England Biolabs, Ipswich, England) eine Gensequenz an das 5'-Ende von *uncD* eingefügt, welche für einen His₆-Tag kodiert. Das Gen *uncD* kodiert für die β-Untereinheit der ATP-Synthase. Das erzeugte Plasmid pPM002 (Abb. 42) wurde mittels Sequenzierung verifiziert.

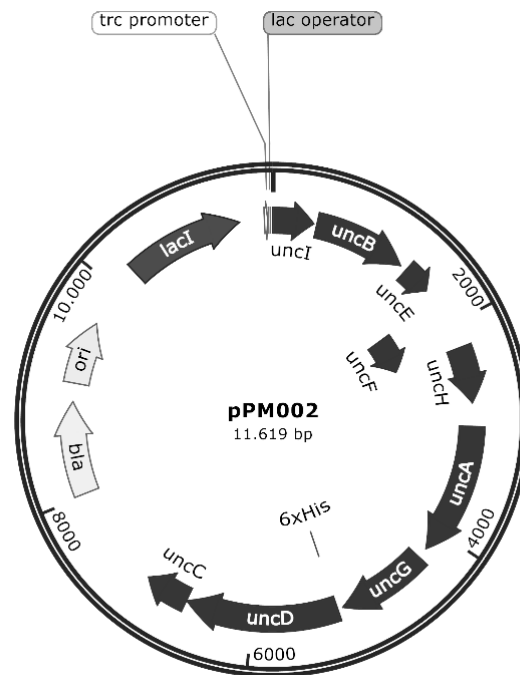


Abb. 42. Plasmidkarte von pPM002 zur Expression der F_1F_0 -ATP-Synthase aus *P. modestum*. Das Plasmid pPM002 wurde mittels Gibson Assembly erzeugt. **bla**: Ampicillin-Resistenzkassette; **ori**: Replikationsursprung; **lacI**: Lac-Repressor; **uncI**, **uncB**, **uncE**, **uncF**, **uncH**, **uncA**, **uncG**, **uncD**, **uncC**: 5'-Sequenzfragmente des F_1F_0 -ATP-Synthase-Operons aus *P. modestum*.

Zur Reinigung der F_1F_0 -ATP-Synthase aus *P. modestum* wurde das Plasmid pPM002 in *E. coli* DK8 transformiert und die Kulturen jeweils in 2x-YT-Medium bei 37 °C angezogen. Die Genexpression wurde bei einer OD_{600} von 0,8 – 1 durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Nach vierstündiger Induktion wurden die Zellen geerntet, gewaschen und mittels French Press aufgeschlossen. Nach Entfernung von Zelltrümmern, wurden die Membranen durch erneute Zentrifugation in einer Ultrazentrifuge vom Cytoplasma getrennt und zweimalig gewaschen. Die gewaschenen Membranen wurden im Anschluss durch Zugabe von 1 mg DDM pro mg Protein für 2,5 h bei 4 °C solubilisiert. Die Reinigung der F_1F_0 -ATP-Synthase aus *P. modestum* erfolgte durch Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie und anschließender Konzentration des Eluats (siehe Kapitel 2.11.5). Die spezifische ATP-Hydrolyse-Aktivität des konzentrierten Eluats betrug $4,2 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$. Zur Bestimmung des Reinigungserfolgs wurde nach jedem Reinigungsschritt die ATP-Hydrolyse-Aktivität gemessen. Eine repräsentative Reinigung ist in Tab. 9 zusammenfassend dargestellt. Insgesamt konnte bei der Reinigung eine 10,5-fache Anreicherung erzielt werden. Die Gesamtausbeute betrug 16,7 %.

Tab. 9. Zusammenfassung der Reinigung der F₁F₀-ATP-Synthase aus *P. modestum*.

Reinigungs- schritt ^a	Gesamt- protein [mg]	Volumen [ml]	Gesamt- Aktivität [U]	Spez. Aktivität [mU/mg]	Anreicherung [x-fach]	Ausbeute [%]
Gewaschene Membranen	231	25	92,4	0,4	1	100
Solubilisat	103	14	82,4	0,8	2	89
Konzentrat	3,7	2	15,5	4,2	10,5	16,7

^a: Die Reinigung erfolgte aus ca. 15 – 20 g Zellen (Zellfeuchtmasse).

Zusätzlich wurden nach jedem Reinigungsschritt je 20 µg Enzymprobe in einem 12,5%igen SDS-Gel nach Schagger und von Jagow (1987) gelelektrophoretisch aufgetrennt und die einzelnen Proteine mittels Coomassie visualisiert (Abb. 43A). Insgesamt konnte bei der Reinigung eine Anreicherung von 8 dominanten Proteinen mit apparenten molekularen Massen von 55, 50, 31, 30, 19, 17, 15 und 8 kDa erzielt werden. Diese stimmen mit den erwarteten molekularen Massen der einzelnen Untereinheiten der F₁F₀-ATP-Synthase aus *P. modestum* überein (α : 55,3 kDa, β : 50,3 kDa, γ : 31,6 kDa, a : 30,3 kDa, δ : 19,3 kDa, b : 17,2 kDa, ϵ : 15 kDa und c : 8,4 kDa). Die Identität der einzelnen Untereinheiten wurde massenspektrometrisch mittels PMF-Analyse bestätigt.

Als nächstes sollte überprüft werden, ob das Enzym funktionell gekoppelt gereinigt werden konnte. Dazu wurde das gereinigte Enzym unter nativen Bedingungen aufgetrennt und die ATP-Hydrolyse-Aktivität im nativen Gel untersucht (Abb. 43B). Im nativen Gel zeigten sich insgesamt vier Enzymkomplexe mit apparenten molekularen Massen von ca. 180, 200, 440 und 550 kDa. Dabei zeigte der 440- und der 550-kDa-Komplex zusätzlich ATP-Hydrolyse-Aktivität. Während es sich beim 440-kDa-Komplex höchstwahrscheinlich um einen F₁-Subkomplex handelt, entspricht der 550-kDa-Komplex der Größe der gesamten ATP-Synthase. Insgesamt zeigen die Daten, dass die gereinigte F₁F₀-ATP-Synthase aus *P. modestum* funktionell gekoppelt gereinigt werden konnte.

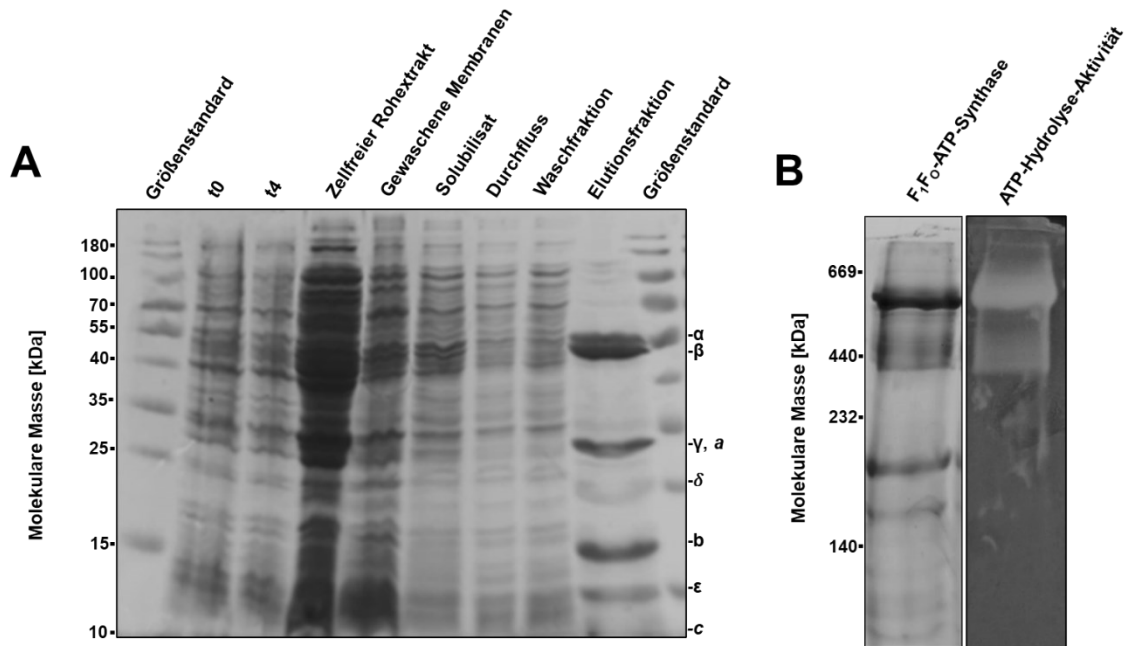


Abb. 43. SDS-PAGE zur Überprüfung der Reinigung der F_1F_0 -ATP-Synthase aus *P. modestum* (A) und native PAGE des gereinigten Enzyms (B). Pro Reinigungsschritt wurden 20 μ g Proteinprobe in einem 12,5%igen SDS-Polyacrylamidgel nach Schägger und von Jagow (1987) aufgetrennt und mit Coomassie-Brillant-Blau gefärbt. Als Größenstandard wurden 3 μ l des „PageRuler Prestained Protein Ladder“ (Thermo Fisher Scientific, Deutschland) verwendet. Die einzelnen Untereinheiten der F_1F_0 -ATP-Synthase aus *P. modestum* sind gekennzeichnet (A). Um die funktionelle Kopplung des Enzyms zu überprüfen, wurden jeweils 20 μ g der gereinigten Enzymprobe in einem nativen Polyacrylamidgel (5 – 13 %) nach Wittig *et al.* (2007) aufgetrennt und Proteinkomplexe entweder unspezifisch mittels Coomassie-Brillant-Blau oder spezifisch mittels ATP-Hydrolyse-Aktivitätstest gefärbt (B). Zur spezifischen Färbung ATP-hydrolysierender Proteine wurde das native Gel im Anschluss für eine Stunde in Reaktionspuffer (35 mM Tris/HCl, 270 mM Glycin, 14 mM $MgSO_4$, 0,2 % [w/v] $Pb(NO_3)_2$, 8 mM Na_2-ATP , pH 8,3) unter kontinuierlichem Schütteln für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde das native Gel für 30 min in 50 % (v/v) Methanol inkubiert.

3.13 Untersuchung der $\Delta pNa/\Delta pH$ -, $\Delta\psi$ - oder $\Delta\tilde{\mu}Na^+/\Delta\tilde{\mu}H^+$ -getriebenen ATP-Synthase in den F_1F_0 -ATP-Synthasen von *A. woodii*, *E. coli* und *P. modestum*

Um den für die ATP-Synthase ermittelten energetischen Schwellenwert der A_1A_0 -ATP-Synthase aus *E. callanderi* mit dem der F_1F_0 -ATP-Synthasen aus *A. woodii*, *E. coli* und *P. modestum* vergleichen zu können, wurden die gereinigten Enzyme aus *A. woodii*, *E. coli* und *P. modestum* jeweils in Proteoliposomen rekonstituiert und die energetischen Schwellenwerte von $\Delta\psi$ -, ΔpNa - und $\Delta\tilde{\mu}Na^+$ für die $Na^+F_1F_0$ -ATP-Synthasen aus *A. woodii* und *P. modestum* sowie $\Delta\psi$ -, ΔpH - und $\Delta\tilde{\mu}H^+$ für die $H^+F_1F_0$ -ATP-Synthase aus *E. coli* bestimmt (siehe Kapitel 2.15.1.). $\Delta\psi$ wurde erzeugt, indem Proteoliposomen mit jeweils 0,5 mM KCl beladen wurden und die KCl-Konzentration

im ATP-Synthesepuffer auf 10 – 500 mM variiert wurde. ΔpNa wurde erzeugt, indem die NaCl-Konzentration innerhalb der Proteoliposomen bei konstant 205 mM gehalten, während die NaCl-Konzentration im ATP-Synthesepuffer zwischen 1 – 15 mM variiert wurde. Zur Erzeugung von $\Delta \mu Na^+$ wurden die Proteoliposomen mit einem konstanten K^+ /Valinomycin-Diffusionspotential von 60 mV energetisiert, während ein variables ΔpNa durch unterschiedliche Na^+ -Konzentrationen außerhalb (5 – 200 mM) und konstanter Na^+ -Konzentration innerhalb der Proteoliposomen (200 mM) erzeugt wurde. ΔpH wurde erzeugt, indem Proteoliposomen mit einem sauren Puffer (pH 5,75) vermischt wurde und der Ansatz anschließend mit einem alkalischen Puffer (pH 7 – 9) vermischt wurde. Die erzeugten Potentiale betragen ca. 90, 120, 150 und 180 mV. Bei $\Delta \tilde{\mu} H^+$ wurden die Proteoliposomen mit einem konstanten K^+ /Valinomycin-Diffusionspotential von 60 mV und variablen ΔpH energetisiert.

Die drei rekonstituierten ATP-Synthasen konnten jeweils ein $\Delta \tilde{\mu} Na^+ / \Delta \tilde{\mu} H^+$ nutzen, um ATP zu synthetisieren (Abb. 44A – C). Allerdings zeigten sich erhebliche Unterschiede beim energetischen Schwellenwert von $\Delta \tilde{\mu} Na^+ / \Delta \tilde{\mu} H^+$. Während das Enzym aus *A. woodii* ATP bereits ab einem $\Delta \tilde{\mu} Na^+$ von ca. 90 mV synthetisieren konnte, waren die Schwellenwerte für die Enzyme aus *P. modestum* ($\Delta \tilde{\mu} Na^+ \geq 120$ mV) und *E. coli* ($\Delta \tilde{\mu} H^+ \geq 150$ mV) deutlich höher. Bei allen Enzymen nahm die $\Delta \tilde{\mu} Na^+ / \Delta \tilde{\mu} H^+$ -getriebene ATP-Synthese ab diesen Schwellenwerten mit steigendem Potential zu. Die maximale ATP-Syntheseraten waren 57,2, 357,4 und 577,8 $nmol \cdot min^{-1} mg Protein^{-1}$ für die Enzyme aus *A. woodii*, *P. modestum* und *E. coli*. Diese wurden jeweils bei einem $\Delta \tilde{\mu} Na^+ / \Delta \tilde{\mu} H^+$ von 160, 240 bzw. 250 mV erreicht. Im Vergleich zur A_1A_0 -ATP-Synthase aus *E. callanderi* war keines der Enzyme in der Lage, ein artifiziell erzeugtes $\Delta pNa / \Delta pH$ als einzige Triebkraft zu nutzen, um ATP zu synthetisieren. Ebenso konnten die Enzyme aus *P. modestum* und *E. coli* kein artifiziell erzeugtes $\Delta \psi$ als alleinige Triebkraft der ATP-Synthese nutzen. Einzig die ATP-Synthase aus *A. woodii* war zur $\Delta \psi$ -getriebenen ATP-Synthese befähigt. Allerdings lag der Startpunkt im Vergleich zur $\Delta \tilde{\mu} Na^+$ -getriebenen ATP-Synthese etwas höher ($\Delta \psi \geq 103$ mV) und die ATP-Syntheseraten waren bei Nutzung eines $\Delta \psi$ als einziger Triebkraft geringer. Bei einem $\Delta \psi$ von 169 mV betrug die maximale ATP-Syntheserate 50,2 $nmol \cdot min^{-1} mg Protein^{-1}$.

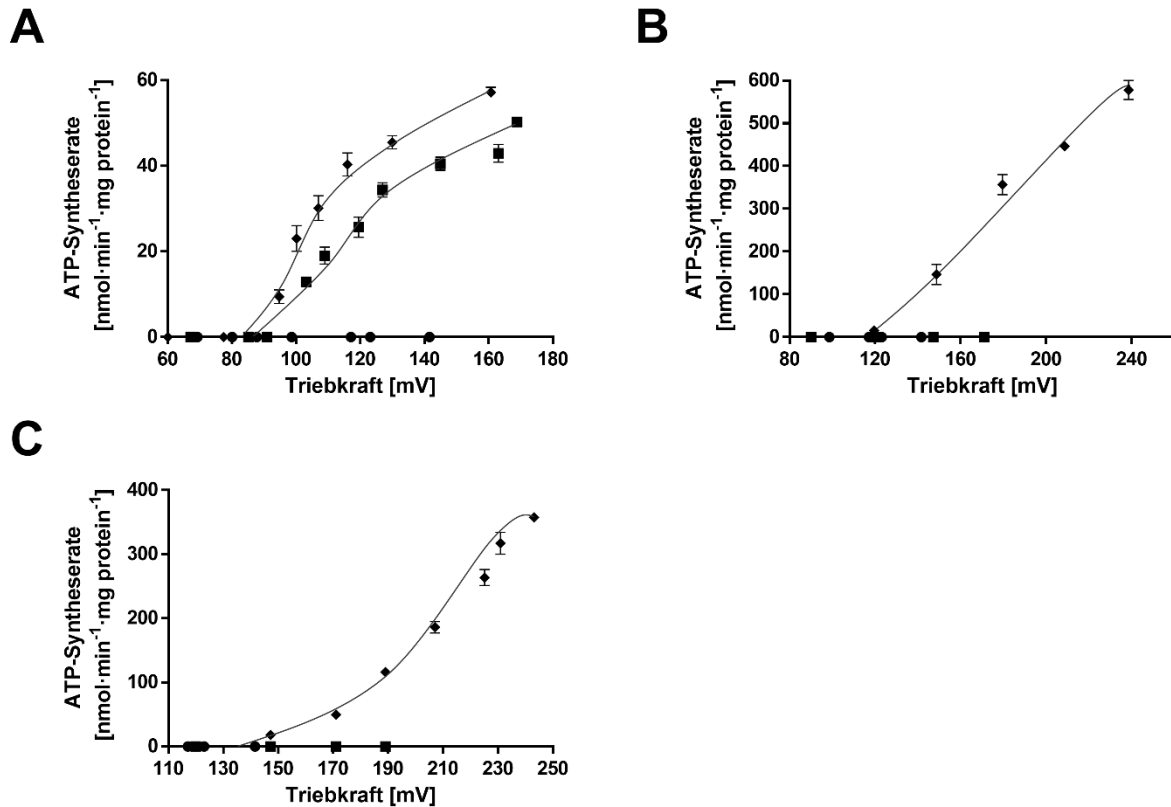


Abb. 44. Einfluss von $\Delta\psi$, pNa/pH und $\Delta\tilde{\mu}Na^+/\Delta\tilde{\mu}H^+$ auf die ATP-Synthese der F_1F_0 -ATP-Synthasen aus *A. woodii* (A), *E. coli* (B) und *P. modestum* (C). $\Delta\psi$ (■) wurde jeweils erzeugt, indem Proteoliposomen mit jeweils 0,5 mM KCl beladen wurden und die KCl im ATP-Synthesepuffer auf 10 – 500 mM variiert wurde. Die interne bzw. externe Na^+ -Konzentration betrug jeweils 205 mM. ΔpNa (●) wurde erzeugt, indem die NaCl-Konzentration innerhalb der Proteoliposomen bei konstanten 205 mM gehalten, während die NaCl-Konzentration im ATP-Synthesepuffer zwischen 1 – 15 mM variiert wurde. Bei $\Delta\tilde{\mu}Na^+$ (◆) wurden die Proteoliposomen mit einem konstanten K^+ /Valinomycin-Diffusionspotential von 60 mV energetisiert, während ein variables ΔpNa durch unterschiedliche Na^+ -Konzentrationen außerhalb (5 – 200 mM) und konstanter Na^+ -Konzentration innerhalb der Proteoliposomen (200 mM) erzeugt wurde. Bei der ATP-Synthese aus *E. coli* wurde ein ΔpH (●) erzeugt, indem Proteoliposomen mit einem sauren Puffer (pH 5,75) vermischt wurde und der Ansatz anschließend mit einem alkalischen alkalischen Puffer (pH 7 – 9) vermischt wurde. Bei $\Delta\tilde{\mu}H^+$ (◆) wurden die Proteoliposomen mit einem konstanten $\Delta\psi$ von 60 mV und variablen ΔpH energetisiert (B). Pro Reaktion wurden jeweils 100 μg des rekonstituierten Enzyms eingesetzt. Alle Messwerte bestehen aus dem Mittelwert \pm SEM von drei biologisch unabhängigen Experimenten ($n = 3$), die jeweils in Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

Insgesamt zeigen die Daten, dass $\Delta\psi$ und $\Delta pNa/\Delta pH$ keine äquivalenten Triebkräfte der F_1F_0 -ATP-Synthasen aus *A. woodii*, *E. coli* und *P. modestum* sind.

3.14 Reinigung und Charakterisierung des c-Rings aus *E. callanderi*

Die Gesamtanzahl an Ionenbindestellen in einem c-Ring ist von entscheidender Bedeutung für die Beantwortung einer Reihe wichtiger bioenergetischer Fragestellungen. Diese ist abhängig von der Gesamtanzahl an Rotoruntereinheiten pro c-Ring. Um die Größe und die Anzahl an Monomeren im c-Ring der A₁A₀-ATP-Synthase aus *E. callanderi* bestimmen zu können, war es daher notwendig, den intakten c-Ring zu isolieren.

3.14.1 Isolierung des c-Rings

Die Reinigung des c-Rings erfolgte aus der gereinigten A₁A₀-ATP-Synthase. Dazu wurde die gereinigte Enzymprobe mit 1,5 % (w/v) *N*-Lauroylsarcosin versetzt und für eine Stunde bei 68 °C inkubiert, wodurch die Dissoziation des A₁- und des A₀-Komplexes erreicht wurde. Durch anschließende Ammoniumsulfatfällung (65 % Sättigung) wurden die restlichen Untereinheiten gefällt, während der c-Ring in Lösung blieb. Nach der Filtration der Probe sowie anschließender Dialyse über Nacht, wurde das Dialysat auf ein Endvolumen von 100 µl eingeeengt. Insgesamt war die Ausbeute der Reinigung bei ca. 2,5 % der anfänglich eingesetzten Menge an gereinigter A₁A₀-ATP-Synthase. So konnten aus 8 mg eingesetzter Enzymmenge ungefähr 0,2 mg Protein gereinigt werden. Da der c-Ring einen Anteil von 20 – 22,5 % vom Gesamtkomplex ausmacht, entspricht dies einer Ausbeute bezogen auf den c-Ring von 10 – 12,5 %.

Der Reinigungserfolg wurde mittels SDS-PAGE unter Verwendung eines 15%igen SDS-Gels nach Schägger und von Jagow (1987) und anschließender Färbung der Proteine mit Coomassie-Brilliant-Blau überprüft. Wie in Abb. 45 zu erkennen, enthielt das Dialysat zwei Proteine mit apparenten molekularen Massen von 14 und 65 kDa. Während es sich bei dem 14-kDa-Protein höchstwahrscheinlich um ein c-Monomer handelt, könnte es sich bei dem 65-kDa-Protein um ein c-Oligomer handeln. Um dies zu verifizieren, wurden beide Proteine aus dem SDS-Gel geschnitten und zur massenspektrometrischen Analyse an das Functional Genomics Center Zürich der ETH Zürich (Schweiz) gesendet. Die Vorbereitung der Proben sowie die anschließende Analyse mittels PMF wurde von Dr. Peter Hunziker durchgeführt. Die

massenspektrometrische Analyse ergab, dass es sich bei beiden Proteinen um die c-Untereinheit der A_1A_0 -ATP-Synthase aus *E. callanderi* handelte.

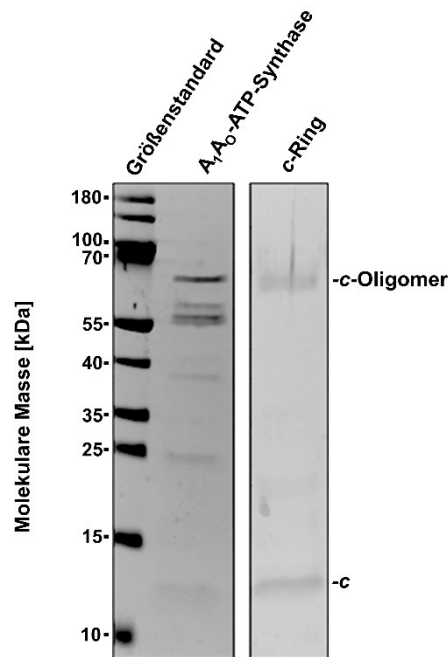


Abb. 45. SDS-PAGE zur Überprüfung der Reinigung des c-Rings aus *E. callanderi*. 20 μ g Proteinprobe des Dialysats wurden in einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel nach Schägger und von Jagow (1987) aufgetrennt und mit Coomassie-Brillant-Blau gefärbt. Zum Vergleich wurden 20 μ g der gereinigten A_1A_0 -ATP-Synthase aus *E. callanderi* aufgetragen. Als Größenstandard wurden 3 μ l des „PageRuler Prestained Protein Ladder“ (Thermo Fisher Scientific, Deutschland) verwendet. Einzelne c-Untereinheiten und das c-Oligomer sind gekennzeichnet. Der Nachweis erfolgte mittels „Peptide-Mass-Fingerprinting“.

3.14.2 Größenbestimmung des c-Rings

Um einen ersten Anhaltspunkt zur Größe und der Anzahl an Monomeren im c-Ring zu erhalten, wurde als nächstes die native molekulare Masse des gereinigten c-Rings bestimmt. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung unter nativen Bedingungen und anschließender Färbung der Proteine des nativen Gels mit Coomassie-Brillant-Blau zeigten sich drei Proteinkomplexe mit apparenten molekularen Massen von ca. 45, 65 und 160 kDa (Abb. 46). Während es sich bei den 45-kDa und 65-kDa-Komplexen höchstwahrscheinlich um c-Oligomere bestehend aus drei bzw. vier c-Untereinheiten handelt, könnte der 160-kDa-Komplex dem kompletten c-Ring bestehend aus 10 c-Untereinheiten entsprechen. Um dies zu überprüfen, wurde der 160-kDa Proteinkomplex aus dem nativen Gel geschnitten und unter denaturierenden Bedingungen in der zweiten Dimension gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe Kapitel 2.17.1). Nach anschließender Färbung der Proteine mit Coomassie-Brillant-

Blau zeigte sich im SDS-Gel ein Protein mit einer apparenten molekularen Masse von 14 kDa, bei der es sich um das c-Monomer handelt. Demnach könnte es sich bei dem 160-kDa-Proteinkomplex um einen intakten c-Ring handeln, welcher aus 11 – 12 Monomeren besteht.

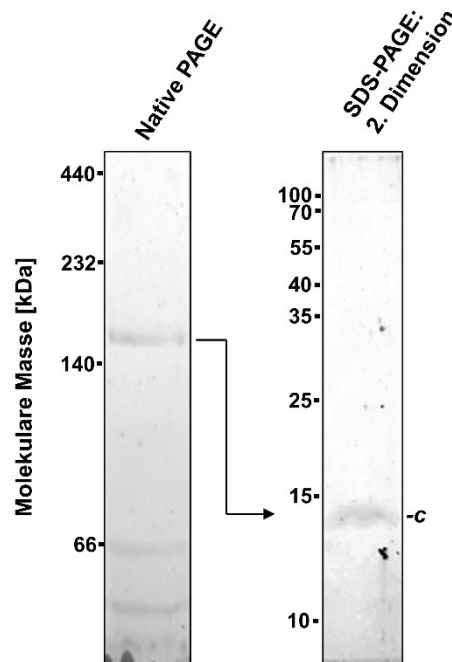


Abb. 46. Native PAGE des gereinigten c-Rings aus *E. callanderi* und denaturierende SDS-PAGE der zweiten Dimension. 50 µg des gereinigten c-Rings wurden in einem nativen Polyacrylamidgel (5 – 13 %) nach Wittig *et al.* (2007) aufgetrennt und die Proteinkomplexe mittels Coomassie-Brillant-Blau angefärbt. Der 160-kDa-Proteinkomplex wurde aus dem nativen Gel herausgeschnitten und anschließend denaturierend in der zweiten Dimension in einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel nach Schagger und von Jagow (1987) aufgetrennt und mit Coomassie-Brillant-Blau gefärbt.

3.14.3 Elektronenmikroskopische Aufnahmen des c-Rings

Zur weiteren Analyse des c-Rings wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt. Die Proteinpartikel wurden dabei mittels Negativkontrastierung durch 1 % Uranylacetat visualisiert. Die Vorbereitung der Proben sowie die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden von Dr. Janet Vonck (Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt am Main) durchgeführt. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen dabei sehr viele ringähnliche Proteinstrukturen, bei denen es sich um den c-Ring handelt.

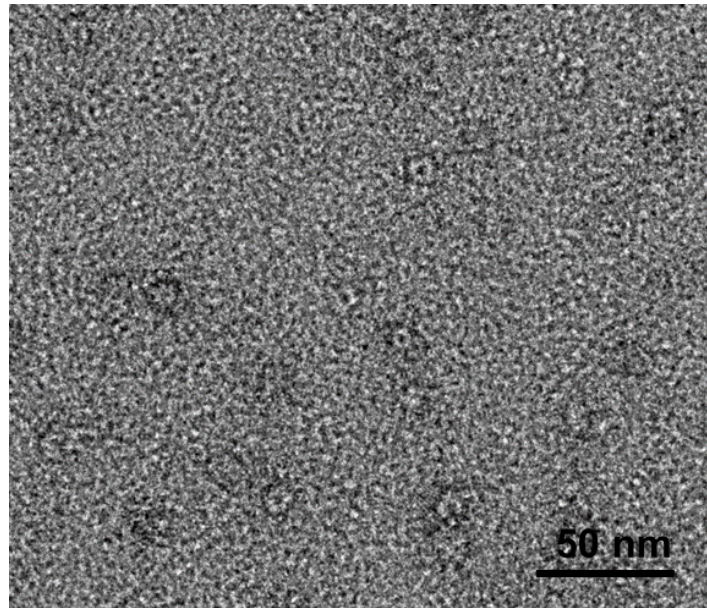


Abb. 47. Elektronenmikroskopische Aufnahmen des c-Rings aus *E. callanderi*. Partikel der c-Rings weisen ringähnliche Strukturen auf. Der Längenmaßstab entspricht 50 nm.

Des Weiteren sind wenige kleinere Proteinpartikel undefinierter Form zu erkennen, bei denen es sich entweder um Proteinaggregate kontaminierender Proteine oder um dissoziierte Subkomplexe des c-Rings handelt. Insgesamt konnte mit Hilfe der elektronenmikroskopischen Aufnahmen eindeutig gezeigt werden, dass ein intakter c-Ring gereinigt werden konnte. Eine genaue Bestimmung der Untereinheitenstöchiometrie des c-Rings war jedoch nicht möglich.

4 Diskussion

4.1 Die Butyratproduktion in *E. callanderi*

E. callanderi KIST612 ist neben *Clostridium carboxidivorans* (Liou *et al.*, 2005), *Clostridium drakei* (Küsel *et al.*, 2000; Liou *et al.*, 2005), *Oxobacter pfennigii* (Krumholz und Bryant, 1985) und *E. limosum* (Pacaud *et al.*, 1985; Loubiere und Lindley, 1991) eines der wenigen acetogenen Bakterien von denen bekannt ist, dass es neben dem Hauptprodukt Acetat auch Butyrat produziert. Diese Fähigkeit macht den Organismus als Produktionsplattform zur biotechnologischen Nutzung besonders interessant. Bisherige Untersuchungen zur Bildung von Butyrat in *E. callanderi* KIST612 umfassten allerdings nur ein geringes Substratspektrum und beschränkten sich hauptsächlich auf kontinuierliche Wachstumsexperimente im Bioreaktor (Chang *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2017). Dabei konnte festgestellt werden, dass *E. callanderi* in der Lage ist, Butyrat aus CO zu produzieren, jedoch nicht aus H₂ + CO₂. Die Butyratproduktion aus CO wurde dabei nur in Bioreaktoren mit Zellrecycling oder in Batch-Kulturen mit Zugabe von Acetat beobachtet. Dies stimmt mit den Beobachtungen der Wachstumsexperimente mit H₂ + CO₂ bzw. CO innerhalb der Arbeit überein. Um das Substratspektrum für *E. callanderi* KIST612 zu erweitern, wurde zusätzlich das Wachstum auf den Substraten Glukose, Formiat oder Methanol untersucht. Vor allem Methanol ist ein vielversprechender, alternativer Rohstoff für die industrielle Produktion von Biokraftstoffen unter Verwendung von acetogenen Bakterien, da es aus vielen nachhaltigen Rohstoffen wie Biomasse, festen Siedlungsabfällen, Biogas und CO₂ hergestellt werden kann (Cotton *et al.*, 2019). Ein großer Vorteil dieses Rohstoffs besteht darin, dass er vollständig löslich ist und daher die Schwierigkeiten und Herausforderungen, die gasförmige C1-Rohstoffe aufgrund ihres geringen Stoffaustauschs besitzen, umgeht. Zudem lässt sich Methanol leicht transportieren und lagern. Die Fähigkeit zum Wachstum auf Methanol konnte bisher nur in nahverwandten *E. limosum*-Stämmen gezeigt werden (Pacaud *et al.*, 1985; Loubiere und Lindley, 1991). Die Verwertung von Methanol erfordert das Vorhandensein eines Methanol-spezifischen Methyltransferase-Systems, das die Methylgruppe von Methanol auf Tetrahydrofolat überträgt (Kremp und Müller, 2021). In *E. callanderi* KIST612 konnte das entsprechende Gencluster (*Eli_2003 – ELI_2005*) bereits identifiziert werden (Chen *et al.*, 2016). Der Aufbau des Methyltransferase-Systems

entspricht dabei dem aus *A. woodii* (Kremp et al., 2018). *Eli_2003* kodiert für die Methyltransferase I, welche dem Substrat die Methylgruppe entzieht und auf das zentrale Kobaltatom des Corrinoide-Proteins (CoP) überträgt (Das et al., 2007; Visser et al., 2016). Dabei kodiert *Eli_2004* für das CoP. Von dort wird die Methylgruppe durch die Methyltransferase II, welche durch *Eli_2005* kodiert wird, auf Tetrahydrofolat übertragen (Visser et al., 2016; Kremp et al., 2018). Da Corrinoide in ihrem superreduzierten aktiven Zustand sehr reaktiv sind, unterliegen sie einer spontanen Autooxidation, die zu einer Inaktivierung des CoP führt. Um den Corrinoide-Cofaktor wieder in den aktiven Zustand zu versetzen, sind daher aktivierende Enzyme notwendig (Dürichen et al., 2019; Kißling et al., 2020). Das aktivierende Enzym des CoP wird in *E. callanderi* KIST612 von *Eli_0370* kodiert (Chen et al., 2016; Dietrich et al., 2021). Ähnlich wie bei *A. woodii* konnte auch bei *E. callanderi* KIST612 beim erstmaligen Transfer einer auf Glukose-adaptierten Kultur auf Methanol eine 8-stündige lag-Phase beobachtet werden. Dies deutet daraufhin, dass das Methyltransferase-System ebenfalls durch Methanol induziert wird. Das Wachstum von *E. callanderi* zeigte sich unabhängig von der Methanol-Konzentration. Die maximale Wachstumsrate ($\mu = 0,04 \text{ h}^{-1}$) wurde bereits ab einer Konzentration von 20 mM Methanol erreicht und war bis zu einer Konzentration von 200 mM Methanol konstant. Eine ähnlich hohe Toleranzgrenze gegenüber Methanol konnte auch in anderen Methanol-verwertenden acetogenen Bakterien wie *A. woodii* oder *S. ovata* beobachtet werden, wobei diese jeweils maximales Wachstum bei 60 mM zeigten (Tremblay et al., 2015; Kremp et al., 2018). Das hohe Toleranzvermögen ist in acetogenen Bakterien auf die direkte Übertragung der Methylgruppe auf Tetrahydrofolat zurückzuführen, bei dem es zu keiner Akkumulation des hochtoxischen Zwischenprodukts Formaldehyd kommt (Cotton et al., 2019). Dies macht acetogene Bakterien im Vergleich zu aeroben Organismen besonders attraktiv für die Nutzung als Produktionsplattform zur biotechnologischen Produktion von Biokraftstoffen aus Methanol. Die Nutzung von C₆-Zuckern wie Glukose erfolgt in *E. callanderi* über den Embden-Meyerhof-Parnas-Stoffwechselweg (Glykolyse). Bei Analysen des Genoms von *E. callanderi* KIST612 konnten alle Gene gefunden werden, die an der Glykolyse beteiligt sind (Kim et al., 2021). Die Aufnahme von Glukose und die Phosphorylierung zu Glukose-6-P erfolgt über ein Glukose-spezifisches Phosphotransferase-System (PTS). Interessanterweise sind die Gene in

E. callanderi KIST612, die für die Komponenten EIIA, EIIB und EIIC kodieren zu einem Gen fusioniert (*Eli_3252*). Ein solches PTS fehlt in vielen acetogenen Bakterien wie beispielsweise bei *A. woodii* oder *C. autoethanogenum*, *C. carboxidivorans* und *C. ljungdahlii*, weshalb diese Organismen im Vergleich zu *E. callanderi* KIST612 ein schlechteres Wachstum auf Glukose zeigen (Jiang *et al.*, 2012). Im Vergleich zu nahverwandten *E. limosum*-Stämmen zeigte sich ein ähnliches Wachstumsverhalten (Genthner *et al.*, 1981). Die ermittelten Wachstumsparameter ($\mu = 0,33 \text{ h}^{-1}$, $t_d = 2,1 \text{ h}$) waren dabei identisch.

Insgesamt produzierte *E. callanderi* KIST612 Butyrat nur bei Wachstum auf Glukose und Methanol in etwas größeren Mengen (3,7 – 4,3 mM). Dagegen wurden bei Wachstum auf Formiat, $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ und CO nur sehr geringe Mengen an Butyrat ($> 0,5 \text{ mM}$) gebildet. Die an der Butyratbildung beteiligten Gene konnten in *E. callanderei* KIST612 bereits identifiziert werden (Jeong *et al.*, 2015). Die Bildung von Butyrat aus Acetyl-CoA umfasst sechs Reaktionen (Abb. 48).

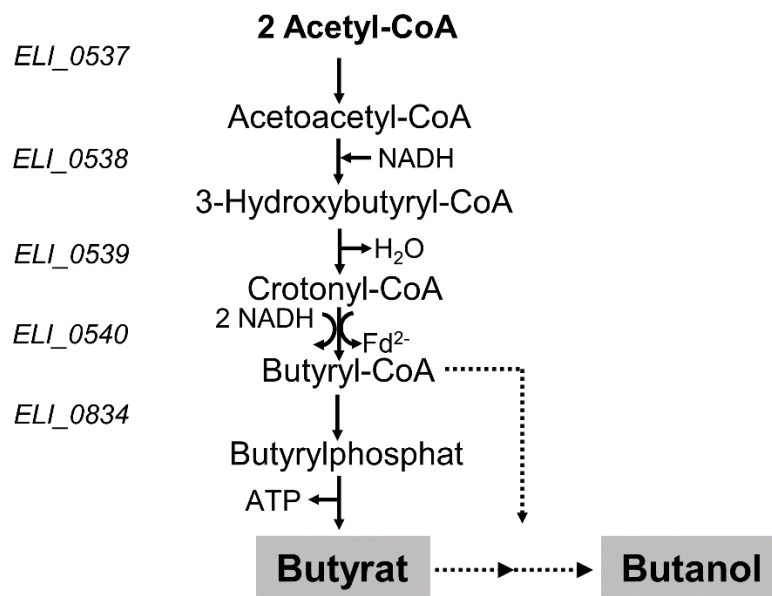


Abb. 48. Die Bildung von Butyrat aus Acetyl-CoA in *E. callanderi*. Butyrat ist Ausgangsstoff zur Bildung des biotechnologisch wertvollen Biokraftstoffs Butanol. Die an der Butyratbildung beteiligten Gene sind angegeben. *E. callanderi* weist kein Gen auf, welches für eine Butyratkinase kodiert.

In einem ersten Schritt werden zwei Moleküle Acetyl-CoA durch eine Thiolase zu Acetoacetyl-CoA kondensiert. Acetoacetyl-CoA wird dann mit NADH als Elektronendonator zu 3-Hydroxypropionyl-CoA reduziert. Nach Abspaltung von Wasser durch eine Crotonase (Crt) wird das gebildete Crotonyl-CoA dann durch eine elektronenbifurkierende Butyryl-CoA-Dehydrogenase zu Butyryl-CoA reduziert. Schließlich wird Butyryl-CoA über eine Phosphotransbuturylase phosphoryliert, bevor das entstandene Butyrylphosphat zu Butyrat umgesetzt wird. Die letzte Reaktion wird in anderen acetogenen Bakterien typischerweise durch eine Butyratkinase katalysiert. Allerdings konnte bei der Analyse des Genoms von *E. callanderi* KIST612 kein entsprechendes Gen gefunden werden. Die Reaktion wird deshalb höchstwahrscheinlich von einer Acetatkinase katalysiert, die bekanntermaßen eine Multisubstrat-Affinität besitzen (Schaupp und Ljungdahl, 1974; Ichikawa *et al.*, 1985). Für diese Annahme spricht, dass Butyratkinase-Aktivität im zellfreien Rohextrakt eines nahverwandten *E. limosum*-Stamms gemessen werden konnte, welcher ebenfalls kein Gen, das für eine Butyratkinase kodiert, besitzt (Lindley *et al.*, 1987). Die Affinität von multisubstrataffinen Acetatkinasen sind im Vergleich zu spezifischen Butyratkinasen jedoch geringer. Dies könnte eine Ursache sein, weshalb die beobachteten Ausbeuten an Butyrat auf Glukose und Methanol insgesamt eher gering sind. Generell ist die Produktion von Butyrat verbunden mit einem erhöhten Bedarf an Reduktionsäquivalenten und führt unter den meisten Bedingungen zu einer geringeren ATP-Ausbeute als bei der Acetogenese. Dieser bioenergetische Nachteil könnte ebenfalls erklären, wieso bei Wachstum auf allen getesteten Substraten bevorzugt Acetat gebildet wurde (Katsyv und Müller, 2020). Die Produktion von Butyrat auf Glukose und Methanol fand dabei zeitlich entkoppelt während der stationären Wachstumsphase statt. Die zeitliche Entkopplung konnte bereits in anderen Butyratproduzierenden acetogenen Bakterien wie beispielsweise *Butyribacterium methylotrophicum* oder *C. carboxidivorans* beobachtet werden (Grethlein *et al.*, 1991; Liou *et al.*, 2005). Die genaue Ursache, wieso der Kohlenstoff- und Elektronenfluss von der Acetat- in Richtung Butyrat-Produktion umgeleitet wird, ist bisher nicht bekannt. Möglicherweise führen höhere Konzentrationen an Acetat zu einer Feedback-Inhibition, wodurch die Butyratproduktion begünstigt wird. Tatsächlich konnte für *E. callanderi* KIST612 bei Wachstum auf CO in geschlossenen Batch-Experimenten gezeigt werden, dass die Butyratbildung durch externe Zugabe von 30 mM Acetat um

das Vierfache gesteigert werden kann (Park *et al.*, 2017). Diese Beobachtung war darauf zurückzuführen, dass Acetat wieder verbraucht wurde und somit zur Bildung von Butyrat führte. Die Wiederverwertung von Acetat konnte jedoch weder bei Wachstum auf Glukose noch bei Wachstum auf Methanol beobachtet werden. Die Bildung von Butyrat während der stationären Wachstumsphase ist meist verbunden mit einem niedrigerem pH-Wert in Folge der Ansäuerung des Mediums durch die Acetat-Bildung während der Kultivierung. Für andere acetogene Bakterien konnte bereits gezeigt werden, dass die Bildung von Butyrat bevorzugt bei niedrigeren pH-Werten ($\text{pH} < 6,5$) stattfindet (Grethlein *et al.*, 1991; Liou *et al.*, 2005). Als Ursache wird ein natürlicher Schutzmechanismus gegen eine zu starke Ansäuerung des Mediums durch die Bildung von Acetat angenommen, da die Produktion von Butyrat zu einer geringeren Säurebildung pro Substrat führt (Gössner *et al.*, 2008). Zusätzlich konnte in kontinuierlichen Fermentationsexperimenten mit CO gezeigt werden, dass die Butyrat-Produktion in *E. callanderi* KIST612 abhängig vom pH-Wert ist (Chang *et al.*, 1997). Dabei wurde Butyrat nur unter Bedingungen ohne konstanten pH-Wert produziert. Die pH-Abhängigkeit der Butyrat-Produktion könnte erklären, wieso bei Wachstum auf Formiat, $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ und CO kein Butyrat gebildet wurde. So stieg der pH-Wert während Kultivierung auf Formiat von 7,3 auf 7,8 aufgrund des Verbrauchs von Formiat als Salz der Ameisensäure. Die Alkalisierung war dabei stärker als die Ansäuerung des Mediums durch Produktion von Acetat. Dagegen blieb der pH-Wert bei der Kultivierung von $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ und CO konstant auf pH 7.3. Allerdings konnte innerhalb der Arbeit gezeigt werden, dass die Produktion von Butyrat nicht ausschließlich vom pH-Wert abhängig ist. So fand die Butyrat-Produktion bei Wachstum auf Methanol bei pH 7,5 statt. Die beobachteten Ausbeuten an Butyrat auf Methanol und Glukose waren insgesamt eher gering, jedoch sollte in Zukunft durch Optimierung der Medienzusammensetzung und pH-Optimierung möglich sein, die Ausbeute weiter zu erhöhen. Durch das bereits etablierte genetische System in *E. callanderi* KIST612 wurde zudem ein wichtiger Grundstein gelegt für die biotechnologische Nutzung dieses acetogenen Bakteriums zur Herstellung von Butyrat oder daraus abgeleiteten Produkten (Jeong *et al.*, 2020).

4.2 Die Rolle der A_1A_0 -ATP-Synthase in der Na^+ -Bioenergetik von *E. callanderi*

Die Untersuchung der Genomsequenz von *E. callanderi* KIST612 ergab einen außergewöhnlichen Fund. So wurde insgesamt nur ein Gencluster gefunden, welches für eine archäelle A_1A_0 -ATP-Synthase mit einer *c*-Untereinheit, bestehend aus vier Transmembranhelices und einer Ionenbindestelle, kodiert (Jeong *et al.*, 2015). Eine solche *c*-Untereinheit kommt typischerweise in V_1V_0 -ATPasen vor und wird als Ursache dafür angesehen, dass diese Enzyme *in vivo* nicht zur ATP-Synthese befähigt sind (Nelson, 1992b; Müller, 2004). Somit sollte die A_1A_0 -ATP-Synthase aus *E. callanderi* nach alleiniger bioinformatischer Vorhersage nicht in der Lage sein, ATP zu synthetisieren. Diese Annahme stünde jedoch im Widerspruch dazu, dass *E. callanderi* unter autotrophen Bedingungen wachsen kann. Die alleinige Substratkettenphosphorylierung führt unter diesen Bedingungen zu einer Netto-ATP-Ausbeute von Null. Daher müssen acetogene Bakterien unter diesen Bedingungen zusätzlich einen chemiosmotischen Kopplungsmechanismus zur Energiegewinnung nutzen. Zwingende Voraussetzung dafür ist das Vorhandensein einer ATP-Synthase. Somit müsste die A_1A_0 -ATP-Synthase aus *E. callanderi* trotz ihrer V-Typ *c*-Untereinheit in der Lage sein, *in vivo* ATP zu synthetisieren. Obwohl mit den A_1A_0 -ATP-Synthasen aus den hyperthermophilen Archaeen *P. furiosus* und *T. onnurineus* bereits zwei ähnliche Enzyme mit V-Typ *c*-Untereinheiten gereinigt werden konnten (Pisa *et al.*, 2007; Mayer *et al.*, 2015), war es bisher nicht möglich, einen biochemischen Beweis zu liefern, dass ein solches Enzym tatsächlich ATP synthetisieren kann. Das Problem des biochemischen Nachweises war technisch bedingt, aufgrund des thermophilen Charakters der Enzyme mit Temperaturoptima bei 80 °C. Denn unter diesen heißen Bedingungen (60 – 80 °C) sind alle für gewöhnlich verwendeten Liposomen-Systeme inaktiv und bisher konnten trotz aller Bemühungen keine geeigneten Lipide für diese Bedingungen gewonnen werden. Ein erster Hinweis, der darauf hindeutet, dass ein solches Enzym tatsächlich ATP synthetisieren kann, wurde bisher nur durch Messung der ATP-Synthese in ganzen Zellen sowie invertierten Membranvesikeln von *T. onnurineus* erbracht (Lim *et al.*, 2014). Durch Reinigung des Enzyms aus *E. callanderi* und Einbau dieses in Liposomen konnte erstmalig biochemisch gezeigt werden, dass die ATP-Synthese in einem solchen Enzym trotz seiner V-Typ *c*-Untereinheit möglich ist. Es konnte somit eindeutig gezeigt werden, dass das Enzym eine zentrale Rolle bei der Energiekonservierung einnimmt.

Daneben stellte sich die Frage, welches Kopplungssion das Enzym nutzt. Diese Fragestellung lässt sich anhand des konservierten Na⁺-Bindemotivs in der c-Untereinheit der jeweiligen ATP-Synthase bioinformatisch vorhersagen. Bioinformatische Analysen der c-Untereinheit von *E. callanderi* zeigten ein konserviertes Na⁺-Bindemotiv zwischen TMH 3 und 4 auf, daher wurde die Nutzung von Na⁺ als Kopplungssion postuliert. Dies konnte innerhalb der Arbeit biochemisch bestätigt werden. Sowohl ATP-Hydrolyse als auch ATP-Synthese zeigten sich strikt Na⁺-abhängig. Die ermittelten K_M-Werte waren dabei vergleichbar zu denen anderer Na⁺-abhängigen ATP-Synthasen wie *A. woodii* oder *P. modestum* (Laubinger und Dimroth, 1987; Fritz *et al.*, 2008). Zudem zeigten Hemmstoffexperimente mit DCCD, dass dieser mit Na⁺ um die gemeinsame Bindestelle in der c-Untereinheit konkurriert (Altendorf, 1977; Hermolin und Fillingame, 1989; Kluge und Dimroth, 1993; Spruth *et al.*, 1995). Die Hemmung des Enzyms konnte durch gleichzeitige Anwesenheit von Na⁺ vollständig aufgehoben werden. Natriumionen konkurrieren als physiologisches Kopplungssion um die Bindung an das konservierte Carboxylat der Na⁺-Bindestelle in der c-Untereinheit und verhindern so die Protonierung und demnach die Inhibition des Enzyms. Durch Einbau des Enzyms in Liposomen und anschließender Messung des direkten Na⁺-Transports oder der Messung der $\Delta\tilde{\mu}_{\text{Na}^+}$ -getriebenen ATP-Synthese konnte letztlich eindeutig bewiesen werden, dass die A₁A₀-ATP-Synthase aus *E. callanderi* einen elektrochemischen Na⁺-Gradienten zur Energiekonservierung nutzt. Die Antriebskraft wird dabei höchstwahrscheinlich durch einen Na⁺-abhängigen Rnf-Komplex aufgebaut (Jeong *et al.*, 2015). In Zellsuspensionsexperimenten mit H₂ + CO₂ konnte bereits eine Na⁺-Abhängigkeit gezeigt und die Na⁺-Abhängigkeit des Rnf-Komplexes mit gewaschenen Membranen aus Methanol-gewachsenen *E. callanderi*-Zellen bestätigt werden (Jeong *et al.*, 2015; Dietrich *et al.*, 2021). Da die Schlüsselenzyme des WLW in *E. callanderi* mit Ausnahme der Frage, ob die MTHFR Elektronen bifurkiert, mittlerweile ebenfalls gut charakterisiert sind, lässt sich ein Modell der Energiekonservierung während der Acetogenese aus H₂ + CO₂ postulieren (Abb. 49). Neben der Annahme, dass die MTHFR keine Elektronen bifurkiert, wurde ein Ionen/ATP-Verhältnis von 3,67 angenommen, da erste Versuche zur Größenbestimmung des c-Rings auf einen Rotor bestehend aus 11 Na⁺-Bindestellen hindeuteten. Die Energieausbeute während der Acetogenese aus H₂ + CO₂ beträgt 0,27 ATP pro gebildetem Acetat.

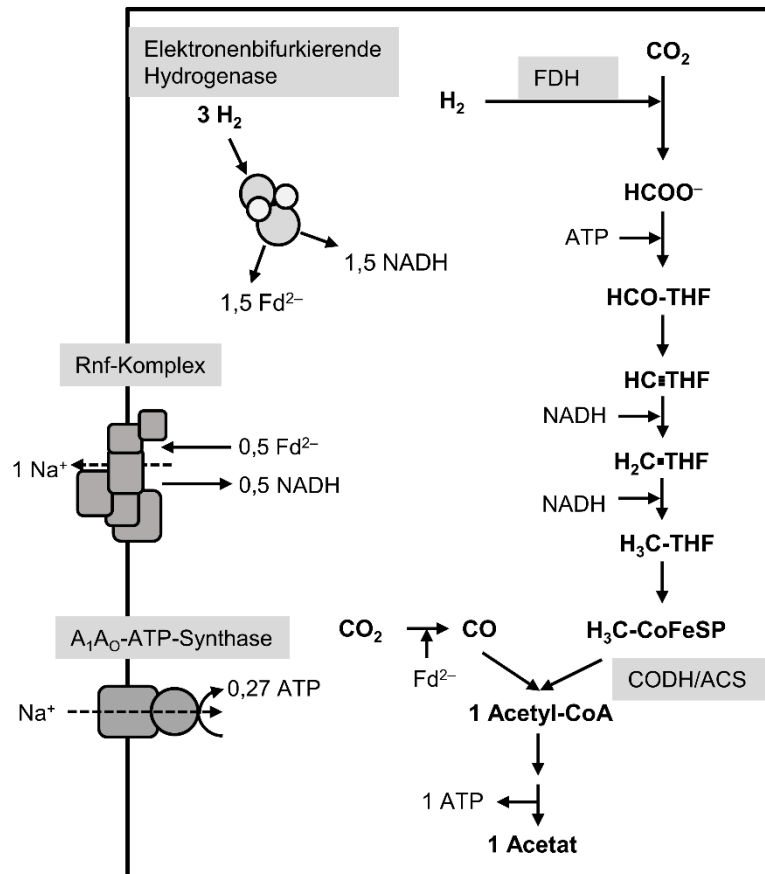


Abb. 49. Modell der Energiekonservierung in *E. callanderi* während der Acetogenese aus H₂ + CO₂. Es wurden folgende Stöchiometrien angenommen: Na⁺/ATP = 3,67 (A₁A₀-ATP-Synthase), 2 Na⁺/2 e⁻ (Rnf-Komplex). CoFeSP, Corrinoid/Eisen-Schwefel-Protein; FDH; Formiat-Dehydrogenase, Fd²⁻, reduziertes Ferredoxin; THF, Tetrahydrofolat.

4.3 Bioenergetische Konsequenzen einer A₁A₀-ATP-Synthase mit V-Typ c-Untereinheiten

Alle drei Klassen von ATP-Synthasen/ATPasen weisen eine ähnliche Grundstruktur auf, allerdings zeigen die einzelnen Klassen deutliche Funktionsunterschiede. Während bakterielle F₁F₀-ATP-Synthasen und archäelle A₁A₀-ATP-Synthasen unter physiologischen Bedingungen sowohl zur ATP-Synthese als auch zur ATP-Hydrolyse befähigt sind, dienen vakuoläre V₁V₀-ATPasen *in vivo* nur als reine Ionenspumpen (Nelson, 1992b; Müller, 2004). Als Ursache für die unterschiedliche Funktionsweise werden Unterschiede in der Struktur der c-Untereinheiten angenommen. Bakterielle c-Untereinheiten bestehen typischerweise aus zwei TMH's mit einer Ionenbindestelle. Im Gegensatz dazu besitzen c-Untereinheiten von V₁V₀-ATPasen vier TMH's mit nur einer Ionenbindestelle. Dieser Typ an c-Untereinheiten ist im Laufe der Evolution durch Genduplikation und Fusion einer F-Typ c-Untereinheit mit zwei TMH's und einer

Ionenbindestelle (Jones und Fillingame, 1998) sowie anschließendem Verlust einer Ionenbindestelle entstanden (Cross und Müller, 2004). Der Verlust einer Bindestelle in jeder zweiten *c*-Untereinheit geht mit einer Reduktion der Gesamtanzahl an Ionenbindestellen einher. Demnach hat ein Rotor einer V_1V_O -ATPase genau die Hälfte an Ionenbindestellen eines Rotors einer bakteriellen F_1F_O -ATP-Synthase. Es stellt sich daher die Frage, welche physiologischen Konsequenzen die unterschiedliche Anzahl von Ionenbindestellen pro *c*-Ring hat. Offensichtlich ändert sich in beiden Rotoren das Ionen/ATP-Verhältnis. Dieses ergibt sich aus der Anzahl der Ionenbindestellen im *c*-Ring und der zur ATP-Synthese genutzten drei katalytischen Untereinheiten der Kopfdomäne. Geht man beispielhaft von einem unter physiologischen Bedingungen üblichen Phosphorylierungspotential von 50 – 70 kJ/mol aus, würde man bei einem elektrochemischen Ionengradienten von – 180 mV ein Ionen/ATP-Verhältnis von 2,9 – 4 benötigen, um ein solches Potential zu erreichen. Besteht ein beispielhafter *c*-Ring aus 12 *c*-Untereinheiten mit jeweils zwei TMH's und einer Ionenbindestelle, ergibt sich ein Ionen/ATP-Verhältnis von 4. Kommt es nun zum Verlust jeder zweiten Ionenbindestelle, würde sich die Gesamtanzahl der Ionen um die Hälfte reduzieren, wodurch das Ionen/ATP-Verhältnis ebenfalls auf 2 reduziert wird. Ein solch niedriges Ionen/ATP-Verhältnis ist üblicherweise in V_1V_O -ATPasen zu finden. Demnach würde dieser Wert nicht mehr ausreichen, um bei einem elektrochemischen Potential von 180 mV ein Phosphorylierungspotential von 50 – 70 kJ/mol aufrechtzuerhalten. Das Enzym wäre somit nicht mehr in der Lage, ATP zu synthetisieren. Eine Möglichkeit dieses Problem zu umgehen, bestünde in der Verdopplung des elektrochemischen Potentials. Tatsächlich sind V_1V_O -ATPasen mit einem solchen Ionen/ATP-Verhältnis bei ausreichend hohem elektrochemischen Potential (ca. – 400 mV) zur ATP-Synthese befähigt (Futai *et al.*, 2000; Hirata *et al.*, 2000). Allerdings kommen solche Bedingungen *in vivo* nicht vor, weshalb V_1V_O -ATPasen unter physiologischen Bedingungen ausschließlich als Ionenpumpen dienen (Nelson, 1992a). Erstaunlicherweise gibt es aber A_1A_O -ATP-Synthasen mit V-Typ *c*-Untereinheiten, die, wie anhand des Enzyms aus *E. callanderi* gezeigt, dennoch in der Lage sind, unter physiologischen Bedingungen ATP zu synthetisieren. Es stellt sich daher die Frage wie es möglich ist, dass ein solches Enzym trotz seiner *c*-Untereinheit zur ATP-Synthese befähigt ist. Die einfachste Erklärung dafür liegt in der Erhöhung der Anzahl an *c*-Untereinheiten pro *c*-Ring, wodurch ebenfalls die Gesamtanzahl der

Ionenbindestellen und damit verbunden das Ionen/ATP-Verhältnis erhöht wird. Erste Reinigungen des *c*-Rings aus *E. callanderi* deuteten auf eine Stöchiometrie von ca. 11 Na⁺-Bindestellen pro Rotor hin, was einem Ionen/ATP-Verhältnis von 3,67 entsprechen würde. Bei Annahme eines $\Delta\tilde{\mu}_{\text{Na}^+}$ von 180 mV wäre das Enzym nun in der Lage, ATP zu synthetisieren. Tatsächlich besteht der *c*-Ring der A₁A₀-ATP-Synthase aus *P. furiosus* ebenfalls aus 9 – 10 V-typ *c*-Untereinheiten (Vonck *et al.*, 2009; Cossio *et al.*, 2018), was einem Ionen/ATP-Verhältnis von 3 – 3,3 entspricht. Dies deutet daraufhin, dass solche A₁A₀-ATP-Synthase ihre Rotorzusammensetzung anpassen, um ein ausreichend hohes Ionen/ATP-Verhältnis zu ermöglichen.

Erstaunlicherweise benötigte die A₁A₀-ATP-Synthase aus *E. callanderi* jedoch nur ein $\Delta\tilde{\mu}_{\text{Na}^+}$ von ca. 90 mV als Antriebskraft. Das Phosphorylierungspotential beträgt demnach nur 31,84 kJ/mol. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass bei einem Membranpotential von – 180 mV nur 1,9 Natriumionen transloziert werden müssten, um ein ATP zu synthetisieren. Dies steht im deutlichen Widerspruch zu der bisherigen Annahme, dass das geringe Ionen/ATP-Verhältnis in V₁V₀-ATPasen dazu führt, dass diese unter physiologischen Bedingungen kein ATP synthetisieren können (Nelson, 1992a; Forgac, 2007). Dies würde zudem nicht erklären, wieso der *c*-Ring in V₁V₀-ATPasen höherer Eukaryoten wie beispielsweise *Rattus norvegicus* aus 9 V-Typ *c*-Untereinheiten und einer *c*'-Untereinheit besteht, wodurch insgesamt 10 Ionenbindestellen zur Ionentranslokation bereitgestellt werden (Abbas *et al.*, 2020). So konnte bereits für die F₁F₀-ATP-Synthase aus Rindermitochondrien, welche ebenfalls einen *c*-Ring mit acht Ionenbindestellen besitzt, gezeigt werden, dass ein Ionen/ATP-Verhältnis von 2,7 zur ATP ausreicht (Watt *et al.*, 2010). Offensichtlich spielen weitere Faktoren eine Rolle bei der Frage wieso V₁V₀-ATPasen *in vivo* nicht zur ATP-Synthese in der Lage sind, während A₁A₀-ATP-Synthasen mit V-Typ *c*-Untereinheiten dazu befähigt sind. Mit der erfolgreichen Klonierung und Expression des A₁A₀-ATP-Synthase-Operons aus *E. callanderi* in den ATP-Synthase-defizienten *E. coli*-Stamm DK8 wurde bereits der Grundstein zur Aufklärung des molekularen Mechanismus dieser Enzyme geleistet (Westphal *et al.*, 2021). Diesen gilt es in zukünftigen Arbeiten anhand von Mutationsstudien und der Strukturanalyse vollständig aufzuklären.

4.4 Die Triebkräfte der ATP-Synthese

In den meisten aeroben Organismen wird die ATP-Synthese durch die protonenmotorische Kraft ($\Delta\tilde{\mu}H^+$) energetisiert, welche die Summe der thermodynamisch äquivalenten Triebkräfte $\Delta\psi$ und ΔpH ist (von Ballmoos *et al.*, 2008). Einige anaerobe Organismen koppeln die ATP-Synthese dagegen an die Na^+ -Translokation und nutzen daher einen elektrochemischen Na^+ -Gradienten ($\Delta\tilde{\mu}Na^+$), bestehend aus $\Delta\psi$ und ΔpNa als Triebkräfte (Laubinger und Dimroth, 1988; Neumann *et al.*, 1998; Fritz und Müller, 2007; Mayer *et al.*, 2012). In beiden Fällen besteht der elektrochemische Gradient somit aus einer elektrischen Komponente, dem Membranpotential, und einer chemischen Komponente, dem Ionenkonzentrationsgradienten (Mitchell, 1961). Nach Mitchells Theorie der chemiosmotischen Kopplung sind sowohl das Membranpotential als auch der transmembrane Ionengradient gleichwertige Antriebskräfte der ATP-Synthese. Während die thermodynamische Äquivalenz der beiden Triebkräfte unbestreitbar ist, ist die kinetische Äquivalenz in einer ATP-Synthase nicht zwangsläufig gewährleistet. Erste *in-vitro*-Experimente mit der gereinigten ATP-Synthase aus Chloroplasten deuteten auf eine kinetische Äquivalenz der beiden Triebkräfte hin und zeigten, dass die ATP-Synthese durch ΔpH als einzige Triebkraft angetrieben werden kann (Jagendorf und Uribe, 1966). Die Schlussfolgerung dieser Experimente wurde jedoch in Frage gestellt, da bei der verwendeten Methode zur Erzeugung von ΔpH mit Succinat als Puffersubstanz aufgrund der Membrandurchlässigkeit des Succinat-Monoanions ebenfalls ein $\Delta\psi$ erzeugt wurde (Kaim und Dimroth, 1998b). Weitere *in-vitro*-Experimente mit der gereinigten ATP-Synthase aus Mitochondrien deuteten ebenfalls auf eine kinetische Äquivalenz zwischen $\Delta\psi$ und ΔpH hin (Mitchell, 1966; Cockrell *et al.*, 1967). Die kinetische Äquivalenz wurde in der Folge in Frage gestellt, als ATP-Synthese-Experimente mit ganzen Zellen aus *S. lactis* zeigten, dass nicht alle Kombinationen von $\Delta\psi$ und ΔpH die ATP-Synthase unabhängig von der Gesamtantriebskraft antreiben konnten (Maloney und Wilson, 1975). Demnach mussten erst unterschiedliche kinetische Barrieren durch entweder $\Delta\psi$ oder ΔpH überwunden werden, bevor das Enzym in der Lage war, ATP zu synthetisieren. Tatsächlich konnte eine kinetische Äquivalenz der Kombination beider Triebkräfte nur für die H^+ -abhängigen ATP-Synthasen aus *Wolinella succinogenes* (Bokranz *et al.*, 1985), *Rhodospirillum rubrum* (Slooten und Vandenbranden, 1989) und Chloroplasten

von Spinatzellen (Hangarter und Good, 1982; Junesch und Gräber, 1991) und im Falle von Na^+ als Kopplungssion für das Enzym aus *P. modestum* (Wiedenmann *et al.*, 2009) gezeigt werden. Im Gegensatz dazu zeigten sich bei den Enzymen aus *Rhodobacter capsulatus* (Turina, 1994) und *E. coli* (Fischer und Gräber, 1999; Iino *et al.*, 2009) bei Kombination beider Triebkräfte keine kinetische Äquivalenz. Dabei auffällig ist, dass keines dieser Enzyme zur ATP-Synthese in der Lage war, wenn $\Delta\psi$ oder $\Delta\text{pH}/\Delta\text{pNa}$ als alleinige Triebkraft verwendet wurde. Dies konnte innerhalb der Arbeit für die ATP-Synthasen aus *E. coli* und *P. modestum* bestätigt werden. Offensichtlich werden die Enzyme erst durch die Kombination beider Triebkräfte aktiviert, wie dies bereits in früheren Studien vorgeschlagen wurde (Turina, 1994; Fischer und Gräber, 1999). Erstaunlicherweise gilt diese Beobachtung nicht für die ATP-Synthasen aus *A. woodii* und *E. callanderi* (Tab. 10). Innerhalb der Arbeit konnte für das Enzym aus *E. callanderi* gezeigt werden, dass $\Delta\psi$ und ΔpNa äquivalente Triebkräfte sind, welche unabhängig voneinander die ATP-Synthese antreiben können. Der Schwellenwert lag für $\Delta\psi$ bei 94 mV und für ΔpNa bei 87 mV. Es konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass ΔpNa als alleinige Antriebskraft zur ATP-Synthese ausreicht. Eine physiologische Bedeutung hat diese Beobachtung jedoch nicht. Ein ΔpNa von 87 mV entspricht einem Na^+ -Gradienten von ungefähr 1:25. Zwar wurde die intrazelluläre Na^+ -Konzentration für *E. callanderi* und andere acetogene Bakterien bisher nicht bestimmt, jedoch konnte diese bereits für methanogene Archaeen am Beispiel von *Methanosarcina barkeri* ermittelt werden (Müller *et al.*, 1988). Dort beträgt die intrazelluläre Na^+ -Konzentration nur etwa ein Fünftel der extrazellulären Konzentration, was einem ΔpNa von ca. 42 mV entspricht. Vor allem Bakterien sind in ihrer natürlichen Umwelt mit dem Problem stark schwankender Na^+ -Konzentrationen oder pH-Werte konfrontiert. Daher ist ein ausreichend hohes ΔpNa unter physiologischen Bedingungen von geringer Bedeutung. Ebenso spielt ΔpH nur bei acidophilen Bakterien oder in Chloroplasten während der Photosynthese eine wichtige Rolle (Witt *et al.*, 1976; von Ballmoos *et al.*, 2009). Aus diesem Grund ist für die meisten Organismen $\Delta\psi$ die relevante Triebkraft. Tatsächlich konnte innerhalb der Arbeit gezeigt werden, dass $\Delta\psi$, aber nicht ΔpNa als alleinige Triebkraft zur ATP-Synthese des Enzyms aus *A. woodii* ausreicht. Dies stimmt mit früheren Beobachtungen aus Fritz und Müller (2007) überein und lässt darauf schließen, dass nur $\Delta\psi$ einen aktivierenden Effekt auf das Enzym hat.

Tab. 10. Triebkräfte und Schwellenwerte der ATP-Synthese in unterschiedlichen ATP-Synthasen.

Organismus	c-Untereinheit	$\Delta\Psi$ (mV)	$\Delta pNa/\Delta pH$ (mV)	$\frac{\Delta\tilde{\mu}Na^+}{\Delta\tilde{\mu}H^+}$ (mV)	Referenz
<i>A. woodii</i>	F-Typ; V-Typ ^a	>103	-	>90	Diese Arbeit
<i>Bacillus</i> PS3	F-Typ	n.u.	n.u.	>180	Sone <i>et al.</i> (1977)
		>110 ^b	>110 ^b	>110 ^b	Soga <i>et al.</i> (2012)
Chloroplasten aus Spinatzellen	F-Typ	>35		>241	Kaim und Dimroth (1999)
<i>E. coli</i>	F-Typ	>40		>246	Kaim und Dimroth (1999)
		-	-	>280	Fischer und Gräber (1999)
		-	-	>190	Wiedenmann <i>et al.</i> (2009)
		-	-	>150	Diese Arbeit
<i>E. callanderi</i>	V-Typ	>87	>94	>90	Diese Arbeit
<i>P. modestum</i>	F-Typ	>45	-	>122	Kaim und Dimroth (1999)
		-	-	>175	Wiedenmann <i>et al.</i> (2009)
		-	-	>147	Diese Arbeit
		>30	>190	n.u.	Toei <i>et al.</i> (2007)
<i>W. succinogenes</i>	F-Typ	n.u.	n.u.	>150	Bokranz <i>et al.</i> (1985)

-: Potential führt nicht zur ATP-Synthese.

n.u.: nicht untersucht.

^a = Hybridrotor aus 9 F-Typ und 1 V-Typ c-Untereinheit.

^b = Potentiale wurden mit einer Variante ermittelt, bei der die C-terminale Domäne der ϵ -Untereinheit teilweise deletiert wurde.

Die genaue Ursache, wieso die meisten ATP-Synthasen eine Kombination beider Triebkräfte zur ATP-Synthese benötigen, während die Synthese von ATP in wenigen anderen Enzymen nur von einzelnen Triebkräften angetrieben werden kann, ist bisher unklar. Eine wichtige Rolle dabei könnte die C-terminale Domäne der ϵ -Untereinheit in

F₁F₀-ATP-Synthasen spielen. So konnte für die ATP-Synthase aus *Bacillus* PS3 gezeigt werden, dass diese in Abwesenheit eines Nukleotids im Puffer durch eine Konformationsänderung der ϵ -Untereinheit in einen inaktiven Zustand versetzt wird (Suzuki *et al.*, 2003). Neuere Studien legen die Möglichkeit nahe, dass die Aktivierung des Enzyms durch Konformationsänderung der ϵ -Untereinheit beide Triebkräfte benötigt, um die ATP-Synthese zu initiieren (Feniouk *et al.*, 2007; Saita *et al.*, 2010). Dies würde erklären, wieso in einer Variante des Enzyms, in der die C-terminale Region der ϵ -Untereinheit deletiert wurde, sowohl $\Delta\psi$ als auch ΔpH als alleinige Triebkraft zur ATP-Synthese ausreicht (Soga *et al.*, 2012). Zusätzlich liegt der Schwellenwert in dieser Variante bei nur 110 mV anstelle von 180 mV wie in einer Studie von Sone *et al.* (1977) gezeigt werden konnte. Obwohl die C-terminale Domäne der ϵ -Untereinheit in den meisten F₁F₀-ATP-Synthasen konserviert ist, variiert der inhibitorische Effekt der ϵ -Untereinheit in unterschiedlichen Arten (Krah *et al.*, 2018). So konnte für eine Variante der ATP-Synthase aus *E. coli*, in der ebenfalls die C-terminale Region der ϵ -Untereinheit deletiert wurde, nur ein Effekt auf die Geschwindigkeit der ATP-Synthese beobachtet werden (Iino *et al.*, 2009). Ob die C-terminale Domäne der ϵ -Untereinheit eine entscheidende Rolle bei der Inaktivierung des Enzyms aus *A. woodii* während der ATP-Synthese spielt, welche nur durch $\Delta\psi$ oder durch eine Kombination beider Triebkräfte angetrieben werden, gilt es in zukünftigen Arbeiten herauszufinden. Ebenso ist bisher unbekannt, ob ein solcher inhibitorischer Effekt auch in der in A₁A₀-ATP-Synthasen zur ϵ -Untereinheit homologen F-Untereinheit auftritt. Bei Vergleich der F-Untereinheit aus *E. callanderi* mit der homologen ϵ -Untereinheit aus *A. woodii* und *E. coli* zeigten sich nur wenige konservierte oder ähnliche Aminosäuren (Abb. 50). Andere Faktoren wie unterschiedliche Zusammensetzungen der Liposomen und unterschiedliche Reaktionsbedingungen könnten die Abhängigkeit der ATP-Synthese von $\Delta\psi$ und $\Delta\text{pH}/\Delta\text{pNa}$ ebenfalls beeinflussen. Dies würde erklären, wieso in *in-vitro*-Experimenten von Kaim und Dimroth (1999) die ATP-Synthese der ATP-Synthasen aus *E. coli* und *P. modestum* ausschließlich durch $\Delta\psi$ angetrieben werden konnte, während der ATP-Synthesemodus in anderen Studien nur durch eine Kombination aus beiden Antriebskräften initiiert werden konnte (Fischer und Gräber, 1999; Wiedenmann *et al.*, 2009).

<i>E. callanderi</i>	MSEQAKLAVIGDQD-----SIMVFQALGVRTVYANA AKD-----IEKAIHALAKE	45
<i>A. woodii</i>	MAETFRLKI IAPTGVFFDDDI ERVVIRGIEGELAILAEHTPLTTNVAIGTFNIIFADK--	58
<i>E. coli</i>	MAMTYHLDVVSAEQQMFSGLV EKI QVTGSE GELGIYPGHAPLLTAIKPGMIRIVKQHG--	58
	: : :.. : : * : : . : :	
<i>E. callanderi</i>	ETAVIYITEQAAALVPEAIEK-YKTEFFPAI IPIPNRFGTNGLG MKGIQ-----	93
<i>A. woodii</i>	KKKN GTLLGGIATINPRETII I LTDAAEWPEEIDIKRAQEAKERALKRIHDDK--FDTARA	116
<i>E. coli</i>	HEEFIYLSGGI LEVQPGNVTVLADTAIRGQDLDEARAMEAKRKAEEHISSSHGDVDYAQA	118
	. : : * . : : . : : . : * :	
<i>E. callanderi</i>	-DNIEKAIGADIL-----	105
<i>A. woodii</i>	RAALERAIARINSKENV----	133
<i>E. coli</i>	SAELAKAIAQLRVIELTKKAM	139
	: : ** .	

Abb. 50. Vergleich der ϵ -Untereinheit aus *A. woodii* und *E. coli* mit der homologen F-Untereinheit aus *E. callanderi*. Die N-Terminale Domäne der ϵ -Untereinheit aus *A. woodii* (accession number: P50009) und *E. coli* (accession number: P0A6E6) umfasst die ersten 88 Aminosäuren, die C-Terminale Domäne die restlichen Aminosäuren. Die N-terminale Domäne der F-Untereinheit aus *E. callanderi* (accession number: E3GN17) umfasst die ersten 85 Aminosäuren, die die C-Terminale Domäne die letzten 20 Aminosäuren. Der Vergleich wurde mit dem Programm Clustal Omega durchgeführt.

4.5 Anpassungen von ATP-Synthasen acetogener Bakterien an ein Leben am thermodynamischen Limit

Unter autotrophen Bedingungen müssen acetogene Bakterien mit einer Energielimitierung nahe dem thermodynamischen Limit auskommen (Müller, 2003). Die Änderung der freien Energie ($\Delta G^{0'}$) der Acetogenese aus $H_2 + CO_2$ beträgt unter Standardbedingungen – 95 kJ/mol (Thauer *et al.*, 1977) und würde bei Annahme eines Phosphorylierungspotential von 50 – 60 kJ/mol zur Synthese von mehr als einem Mol ATP erlauben. Allerdings ist die verfügbare Energie der hydrogenotrophen Acetogenese stark abhängig vom H_2 -Partialdruck in der Atmosphäre. Die in einer anoxischen Umwelt acetogener Bakterien bisher ermittelten H_2 -Partialdrücke liegen dabei in einer Größenordnung von 250 – 350 Pa und sind deutlich unter dem unter Standardbedingungen angenommenen H_2 -Partialdruck von 1013 hPa (Poehlein *et al.*, 2012; Schuchmann und Müller, 2012). Bei Berücksichtigung dieser H_2 -Partialdrücke liegt $\Delta G^{0'}$ unter physiologischen Bedingungen eher im Bereich von – 30kJ/mol und erlaubt somit nur die Synthese von weit weniger als 1 Mol ATP pro Mol gebildetem Acetat. Um ein Leben unter diesen extremen Energielimitierungen zu ermöglichen, sind daher bestimmte Anpassungen in der Energiekonservierung acetogener Bakterien notwendig. Damit verbunden sind spezielle Anpassungen in der ATP-Synthase. Eine mögliche Anpassung unter diesen starken Energielimitierungen ist die Nutzung von Na^+ anstelle H^+ als Kopplungssion (Müller, 2003, 2015; Müller und Hess, 2017). Das autotrophe Wachstum acetogener Bakterien ist meist verbunden mit der Produktion von hohen Konzentrationen an Acetat und in einigen wenigen Fällen Butyrat. Somit

weist die anaerobe Umgebung oftmals eine hohe Konzentration an organischen Säuren auf. In hohen Konzentrationen können diese als Protonophore dienen, welche in protonierter Form durch Diffusion in die Zelle gelangen und innerhalb der Zelle aufgrund des höheren pH-Werts im Cytoplasma dissoziieren. Die organischen Säuren wirken als eine Art Protonenshuttle und führen dazu, dass kein $\Delta\mu\text{H}^+$ aufgebaut werden kann, wodurch die $\Delta\mu\text{H}^+$ -getriebene ATP-Synthese letztlich zum Erliegen kommt. Im Gegensatz dazu können Natriumionen nicht durch organische Säuren zurück in die Zelle geschleust werden, weshalb eine Na^+ -Bioenergetik unter energielimitierenden Bedingungen von Vorteil ist (Martin, 2012; Mayer und Müller, 2013a). Ein weiterer Vorteil einer Na^+ -Bioenergetik ist, dass Zellmembranen im Allgemeinen durchlässiger gegenüber H^+ als gegenüber Na^+ sind (van de Vossenberg *et al.*, 1995; Lane und Martin, 2012). Die Permeabilität von Protonen nimmt dabei mit zunehmenden Temperaturen zu. Demnach müssen Organismen, welche eine H^+ -Bioenergetik aufweisen, in Abhängigkeit ihrer Wachstumstemperatur mit einem zunehmenden Verlust an Protonen zurechtkommen. Erstaunlicherweise deuten bioinformatische Vorhersagen daraufhin, dass ungefähr zwei Drittel aller acetogenen Bakterien eine H^+ -Bioenergetik aufweisen (Tab. 11). Vielmehr nutzen thermophile Vertreter wie *T. kivui* (Hess *et al.*, 2014) oder *M. thermoacetica* (Ivey und Ljungdahl, 1986) Protonen als Kopplungsignale. Daher müssen diese die Lipidzusammensetzung ihrer Membranen so anpassen, damit die Permeabilität gegenüber Protonen auf ein Minimum begrenzt wird (Nagle, 1987; Paula *et al.*, 1996; Haines, 2001; Mulkiđjanian *et al.*, 2008). Die vorhergesagte Ionenabhängigkeit der ATP-Synthasen acetogener Bakterien wurden allerdings erst für die gereinigten Enzyme aus *A. woodii* (Fritz und Müller, 2007), *E. callanderi* KIST612 (diese Arbeit), *M. thermoacetica* (Ivey und Ljungdahl, 1986) und *Moorella thermoautotrophica* (Das *et al.*, 1997) experimentell bestätigt. Die vorhergesagte Ionenspezifität anhand des konservierten Na^+ -Bindemotivs ist allerdings noch kein biochemischer Beweis dafür, dass ein Enzym tatsächlich Na^+ oder H^+ als Kopplungsignale verwendet. So weist beispielsweise die A_1A_0 -ATP-Synthase aus *M. acetivorans* ebenfalls das konservierte Na^+ -Bindemotiv auf, nutzt jedoch Na^+ und H^+ gleichzeitig (Schlegel *et al.*, 2012). Die c-Untereinheit des Enzyms aus *T. thermophilus* zeigt ebenfalls das Na^+ -Bindemotiv auf, jedoch konnte H^+ als Kopplungsignale festgestellt werden (Toei *et al.*, 2007; Zhou und Sazanov, 2019). Offenbar ist für die Bestimmung der Ionenspezifität mehr als dieses Motiv erforderlich.

So konnte in früheren Studien durch Mutationen in der a -Untereinheit der Na^+ -abhängigen F_1F_0 -ATP-Synthase von *P. modestum* bereits gezeigt werden, dass diese die Ionenspezifität beeinflussten (Kaim und Dimroth, 1998a). Daher gilt es, das genutzte Kopplungsign im Einzelfall biochemisch zu bestätigen.

Tab. 11. Verteilung, Größe und Ionenspezifität von c -Untereinheiten in ATP-Synthasen acetogener Bakterien.

Organismus	c-Untereinheit											
	V-Typ ^a			F-Typ 1 ^b			F-Typ 2 ^b			F-Typ 3 ^b		
	kDa	TMH	Na^+/H^+	kDa	TMH	Na^+/H^+	kDa	TMH	Na^+/H^+	kDa	TMH	Na^+/H^+
<i>Acetobacterium woodii</i> *	18	4	Na^+	8	2	Na^+	8	2	Na^+	-	-	-
<i>Acetobacterium wieringae</i>	-	-	-	10	2	Na^+	8	2	Na^+	8	2	Na^+
<i>Acetobacterium bakii</i>	-	-	-	10	2	Na^+	8	2	Na^+	8	2	Na^+
<i>Acetobacterium dehalogenans</i>	-	-	-	10	2	Na^+	8	2	Na^+	8	2	Na^+
<i>Acetoanaerobium noterae</i>	-	-	-	8	2	Na^+	-	-	-	-	-	-
<i>Acetoanaerobium sticklandii</i>	-	-	-	8	2	Na^+	-	-	-	-	-	-
<i>Acetohalobium arabaticum</i> *	19	2	Na^+	8	2	Na^+	-	-	-	-	-	-
<i>Acetonema longum</i>	-	-	-	8	2	H^+	-	-	-	-	-	-
<i>Acetitomaculum ruminis</i>	-	-	-	8	2	Na^+	-	-	-	-	-	-
<i>Alkalibaculum bacchi</i>	-	-	-	8	2	Na^+	-	-	-	-	-	-
<i>Blautia coccoides</i>	-	-	-	8	2	H^+	-	-	-	-	-	-
<i>Blautia hydrogenotrophica</i>	-	-	-	8	2	H^+	-	-	-	-	-	-
<i>Blautia luti</i>	-	-	-	8	2	H^+	-	-	-	-	-	-
<i>Blautia producta</i>	-	-	-	8	2	H^+	-	-	-	-	-	-
<i>Blautia schinkii</i>	-	-	-	8	2	H^+	-	-	-	-	-	-
<i>Blautia wexlerae</i>	-	-	-	8	2	H^+	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridium aceticum</i> *	19	4	Na^+	8	2	Na^+	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridium autoethanogenum</i>	-	-	-	8	2	H^+	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridium carboxidivorans</i>	-	-	-	8	2	H^+	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridium coskatii</i>	-	-	-	8	2	H^+	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridium difficile</i>	-	-	-	8	2	Na^+	-	-	-	-	-	-

Organismus	c-Untereinheit											
	V-Typ ^a			F-Typ 1 ^b			F-Typ 2 ^b			F-Typ 3 ^b		
	kDa	TMH	Na ⁺ /H ⁺	kDa	TMH	Na ⁺ /H ⁺	kDa	TMH	Na ⁺ /H ⁺	kDa	TMH	Na ⁺ /H ⁺
<i>Clostridium drakei</i>	-	-	-	8	2	H ⁺	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridium formicoaceticum</i> *	18	4	Na ⁺	8	2	Na ⁺	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridium ljungdahlii</i>	-	-	-	8	2	H ⁺	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridium magnum</i>	-	-	-	8	2	H ⁺	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridium methoxybenzovorans</i>	-	-	-	8	2	H ⁺	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridium ragsdalei</i>	-	-	-	8	2	H ⁺	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridium scatologenes</i>	-	-	-	8	2	H ⁺	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridium</i> sp. P21	-	-	-	8	2	H ⁺	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridium</i> sp. AWRP	-	-	-	8	2	H ⁺	-	-	-	-	-	-
<i>Clostridium ultunense</i>	-	-	-	8	2	Na ⁺	-	-	-	-	-	-
<i>Eubacterium aggregans</i>	16	4	Na ⁺	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Eubacterium callanderi</i>	16	4	Na ⁺	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Holophaga foetida</i>	-	-	-	8	2	H ⁺	-	-	-	-	-	-
<i>Moorella glycerini</i>	-	-	-	8	2	H ⁺	-	-	-	-	-	-
<i>Moorella humiferrea</i>	-	-	-	8	2	H ⁺	-	-	-	-	-	-
<i>Moorella mulderi</i>	-	-	-	8	2	H ⁺	-	-	-	-	-	-
<i>Moorella thermoacetica</i>	-	-	-	8	2	H ⁺	-	-	-	-	-	-
<i>Sporomusa acidovorans</i>	-	-	-	8	2	H ⁺	-	-	-	-	-	-
<i>Sporomusa aerivorans</i>	-	-	-	8	2	H ⁺	-	-	-	-	-	-
<i>Sporomusa malonica</i>	-	-	-	8	2	H ⁺	-	-	-	-	-	-
<i>Sporomusa termitida</i>	-	-	-	8	2	H ⁺	-	-	-	-	-	-
<i>Sporomusa ovata</i>	-	-	-	8	2	H ⁺	-	-	-	-	-	-
<i>Sporomusa sphaeroides</i>	-	-	-	8	2	H ⁺	-	-	-	-	-	-
<i>Sporomusa silvacetica</i>	-	-	-	8	2	H ⁺	-	-	-	-	-	-
<i>Thermoanaerobacter kivui</i>	-	-	-	8	2	H ⁺	-	-	-	-	-	-
<i>Thermacetogenium phaeum</i>	-	-	-	8	2	H ⁺	-	-	-	-	-	-
<i>Tindallia californiensis</i> *	17	4	Na ⁺	9	2	Na ⁺	-	-	-	-	-	-

Organismus	c-Untereinheit											
	V-Typ ^a			F-Typ 1 ^b			F-Typ 2 ^b			F-Typ 3 ^b		
	kDa	TMH	Na ⁺ /H ⁺	kDa	TMH	Na ⁺ /H ⁺	kDa	TMH	Na ⁺ /H ⁺	kDa	TMH	Na ⁺ /H ⁺
<i>Treponema azotonutricium</i>	-	-	-	8	2	H ⁺	-	-	-	-	-	-

^a = V-Typ: c-Untereinheit aus 4 TMH's mit einer Ionenbindestelle.

^b = F-Typ 1,2 oder 3: c-Untereinheit aus 2 TMH's mit einer Ionenbindestelle; die Ziffer gibt die Anzahl der für diese c-Untereinheit kodierenden Gene im ATP-Synthase-Operon an.

* = Organismen mit V-Typ und F-Typ c-Untereinheit in einem ATP-Synthase-Operon.

Die beiden weiteren Anpassungen der ATP-Synthase ergeben sich unmittelbar aus dem Phosphorylierungspotential, welches sich aus dem elektrochemischen Ionengradienten und aus dem Ionen/ATP-Verhältnis zusammensetzt. Letzteres ist abhängig von der Anzahl der c-Untereinheiten und der damit verbundenen Anzahl an Ionenbindestellen. Ein c-Ring mit einer reduzierten Anzahl an Ionenbindestellen würde die für die ATP-Synthase benötigte Energie drastisch reduzieren. Das Ionen/ATP-Verhältnis variiert in verschiedenen ATP-Synthasen und liegt in der Regel zwischen 2,3 und 4,3 (Pogoryelov *et al.*, 2009; Watt *et al.*, 2010; Schulz *et al.*, 2017; Kühlbrandt, 2019). Auf die bioenergetischen Auswirkungen des Ionen/ATP-Verhältnis wurde bereits in Kapitel 4.3 eingegangen. Umgekehrt führt ein niedrigerer elektrochemischer Ionengradient bei gleichbleibendem Ionen/ATP-Verhältnis ebenfalls zu einem niedrigeren Phosphorylierungspotential. Innerhalb der Arbeit konnten erstmalig die Schwellenwerte der $\Delta\tilde{\mu}_{\text{Na}^+}$ -getriebenen ATP-Synthase für die ATP-Synthasen aus den acetogenen Bakterien *A. woodii* und *E. callanderi* biochemisch ermittelt werden. Die ermittelten Werte liegen mit ca. 90 mV deutlich niedriger als alle bisher ermittelten Werte aus isolierten ATP-Synthasen anderer Organismen (Tab. 10) sowie experimentell ermittelten Werten aus ganzen Zellen wie beispielsweise methanogenen Archaeen (Blaut und Gottschalk, 1984; Müller *et al.*, 1993). Der Schwellenwert für das Enzym aus *A. woodii* stimmt dabei mit dem aus dem intrazellulären Phosphorylierungspotential bestimmten theoretischen Wert während der Acetogenese aus CO überein (Spahn *et al.*, 2015). Die ökophysiologische Bedeutung eines geringen $\Delta\tilde{\mu}_{\text{Na}^+}$ liegt auf der Hand: Bei gleichbleibendem Ionen/ATP-Verhältnis wird viel weniger freie Energie benötigt, um ein Mol ATP zu synthetisieren. Dies ist für Organismen wie acetogene Bakterien, welche nahe dem thermodynamischen Limit leben, von essentiellm Vorteil. Erste Reinigungen des c-Rings aus *E. callanderi* deuteten auf ca. 11 Na⁺-Bindestellen pro Rotor hin. Somit würde sich ein Ionen/ATP-

Verhältnis von 3,67 und demnach ein ΔG_P von 31,84 kJ/mol ergeben. Dabei ist jedoch zu beachten, dass sich eine genaue Ermittlung der Ionenbindestellen pro *c*-Ring meist nur durch Aufklärung der Kristallstruktur ergibt. Diese konnte bereits für den Hybridrotor aus *A. woodii* aufgeklärt werden und besteht aus 9 F-typ *c*-Untereinheiten und einer V-typ *c*-Untereinheit (Matthies *et al.*, 2014). Demnach ergibt sich für *A. woodii* ein Ionen/ATP-Verhältnis von 3,33 und ein ΔG_P von 28,9 kJ/mol. Die ermittelten Werte spiegeln dabei die Untergrenze wider, d. h. das Erreichen eines niedrigeren ΔG_P ist thermodynamisch nicht möglich. Insgesamt liegen die berechneten Werte deutlich unter den experimentell bestimmten Werten anderer Organismen: *S. lactis* (46,6 kJ/mol ATP; Zellsuspensionsexperimente mit ruhenden Zellen bei der Oxidation von Glukose (Maloney, 1983)), *E. coli* (48 kJ/mol ATP; Zellsuspensionsexperimente mit ruhenden Zellen und wachsenden Zellen bei der Oxidation von Glycerin (Kashket, 1982)), *S. cerevisiae* (50 kJ/mol ATP, Zellsuspensionsexperimente mit ruhenden Zellen bei der Oxidation von Glukose (Wallace *et al.*, 1994)) oder für Mitochondrien aus der Rattenleber (64 kJ/mol ATP; aerobe Atmung mit Succinat (Slater *et al.*, 1973)). Acetogene Bakterien benötigen demnach viel weniger Energie, um ein Mol ATP zu synthetisieren, welches ihren Lebensstil nahe dem thermodynamischen Limit repräsentiert.

Der Aufbau des elektrochemischen Na^+ -Gradienten ist in *A. woodii* und *E. callanderi* verbunden mit dem Vorhandensein eines Rnf-Komplexes. Im Falle von *A. woodii* konnte der Rnf-Komplex mittlerweile isoliert und biochemisch charakterisiert werden (Wiechmann *et al.*, 2020). Der membranintegrale Komplex besteht dabei aus sechs Untereinheiten und enthält Eisen-Schwefel-Zentren sowie Flavine als Elektronenträger. Zur Na^+ -Translokation wird dabei die Energie, die bei der exergonischen Elektronenübertragung von Ferredoxin auf NAD freigesetzt wird ($E^{0'} = -320 \text{ mV}$), genutzt. Das exakte Redoxpotential von Ferredoxin aus *A. woodii* und *E. callanderi* wurde bisher nicht experimentell bestimmt und ist daher unbekannt. Angenommen wird jedoch ein Wert von -500 mV , welcher auf den Redoxpotentialen der Ferredoxin-gekoppelten Redoxpaare CO_2/CO ($E^{0'} = -520 \text{ mV}$) und Acetyl-CoA/Pyruvat ($E^{0'} = -500 \text{ mV}$) beruht (Bar-Even, 2013; Schuchmann und Müller, 2014). Wie eingangs erläutert, liefert die Acetogenese aus $\text{H}_2 + \text{CO}_2$ unter physiologischen Bedingungen nur wenig Energie. Die freiwerdende Energie ist dabei

so gering, dass die Energie in Form von ATP nur über einen chemiosmotischen Kopplungsmechanismus gewonnen werden kann und verdeutlicht den Vorteil dieser Form der Energiekonservierung. Die Bereitstellung des elektrochemischen Ionengradienten kann unabhängig von der ATP-Synthese stattfinden. Die minimale Energiemenge, die benötigt wird, um die ATP-Synthese über den chemiosmotischen Kopplungsmechanismus anzutreiben, ist demnach nicht die benötigte Energie zur Herstellung von einem ATP, sondern die Energiemenge, die benötigt wird, um mindestens ein Ion über die Cytoplasmamembran zu translozieren. Bisher wurde ein minimales biologisches Energiequantum von -20 kJ/mol angenommen (Schink, 1997). Durch die ermittelten energetischen Schwellenwerte ($\Delta\tilde{\mu}_{\text{Na}^+}$) ist es nun möglich, die minimal erforderliche Energie der Translokation eines Ions in *A. woodii* und *E. callanderi* zu bestimmen. Bei einem $\Delta\tilde{\mu}_{\text{Na}^+}$ von ca. -90 mV beträgt die freiwerdende Energie zur Translokation eines Ions gemäß Gl. 6 nur $-8,7$ kJ/mol und ist damit nur halb so hoch als die bisher angenommene minimale Energiemenge. Diese Erkenntnis ist von entscheidender physiologischer Bedeutung, da dadurch der H_2 -Partialdruck, der autotrophes Wachstum ermöglicht, drastisch verringert werden kann. Die erste energetische Herausforderung der hydrogenotrophen Acetogenese ist die Reduktion von Ferredoxin mit H_2 ($E^{0'} = -420$ mV) als Elektronendonator. In beiden Organismen wird diese Reaktion durch eine elektronenbifurkierende Hydrogenase katalysiert, indem der endergone Elektronenfluss mit der exergonen Reduktion von NAD mit H_2 angetrieben wird (Schuchmann und Müller, 2012; Dietrich *et al.*, 2021). Dadurch lässt sich in beiden Organismen das minimale Redoxpotential von Ferredoxin, das die Erzeugung der ermittelten $\Delta\tilde{\mu}_{\text{Na}^+}$ ermöglicht, bestimmen. Die minimalen Redoxpotentiale von Ferredoxin betragen demnach -410 mV bei einem $\Delta\tilde{\mu}_{\text{Na}^+}$ von -90 mV. Diese entsprechen einem H_2 -Partialdruck von ca. 468 Pa und stimmen mit den experimentell ermittelten Grenzkonzentrationen an H_2 überein, welche in einer Größenordnung von 250 – 350 Pa liegen (Poehlein *et al.*, 2012; Schuchmann und Müller, 2012).

Insgesamt geht ein niedriges $\Delta\tilde{\mu}_{\text{Na}^+}$ nicht nur mit einem niedrigerem ΔG_{P} einher, sondern vereinfacht auch dessen Aufbau auf Substraten mit niedriger Energie. Dies ermöglichte ein Leben unter starken Energielimitierungen in Abwesenheit von

Sauerstoff mit anorganischen Gasen als potenziellen Kohlenstoff- und Energiequellen und die Besiedlung unterschiedlichster Lebensräume.

5 Zusammenfassung

1. Das Wachstum und die Fähigkeit zur Butyratproduktion von *E. callanderi* KIST612 wurde in geschlossenen Batch-Kulturen mit den Substraten Glukose, Methanol, Formiat, $H_2 + CO_2$ und CO untersucht. *E. callanderi* KIST612 zeigte sich nur bei Wachstum auf 20 mM Glukose oder 20 mM Methanol in der Lage, Butyrat in größeren Mengen (3,7 – 4,3 mM) zu produzieren. Das Hauptprodukt bei allen untersuchten Wachstumssubstraten war jedoch Acetat.

2. In bioinformatischen Analysen des Genoms von *E. callanderi* KIST612 konnte nur eine A_1A_0 -ATP-Synthase gefunden werden, welche eine V-typ c-Untereinheit bestehend aus 4 TMH's mit nur einer Na^+ -Bindestelle aufweist. Diese konnte aus gewaschenen Membranen von *E. callanderi* durch Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation, Anionenaustausch-Chromatographie (DEAE) sowie einer Größenausschluss-Chromatographie (Superose 6) bis zur apparenten Homogenität gereinigt werden. Nach Produktion einzelner Untereinheiten (A, B, C, D, E, F und H) in *E. coli* und Generierung von Antikörpern, konnten alle Untereinheiten (A, B, C, D, E, F, H, a sowie c) in der gereinigten Enzympräparation immunologisch oder mittels „Peptide-Mass-Fingerprinting“ nachgewiesen werden. Es konnte somit erstmals eine A_1A_0 -ATP-Synthase aus einem mesophilen Organismus ohne Verlust von Untereinheiten gereinigt werden.

3. Der Gesamtkomplex wies unter nativen Bedingungen eine molekulare Masse von ca. 670 kDa auf. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigte sich anhand der hantelförmigen Strukturen, dass die A_1A_0 -ATP-Synthase als intakter Gesamtkomplex gereinigt werden konnte.

4. Die gereinigte A_1A_0 -ATP-Synthase wurde zunächst anhand ihrer ATP-Hydrolyse-Aktivität biochemisch charakterisiert. Die ATP-Hydrolyse-Aktivität hatte ein pH-Optimum von 7 – 7,5 und ein Temperaturoptimum bei 37 °C. Durch Messung der ATPase-Aktivität in Abhängigkeit von verschiedenen Mengen an Na^+ konnte die vorhergesagte Na^+ -Abhängigkeit des Enzyms nachgewiesen werden. Zudem zeigten Hemmstoffexperimente mit DCCD, dass dieser Inhibitor mit Na^+ um die gemeinsame

Bindestelle in der c-Untereinheit konkurriert. Dies bestätigte nochmals, dass das Enzym funktionell gekoppelt gereinigt werden konnte.

5. Zur weiteren Untersuchung der Ionenspezifität wurde der an die ATP-Hydrolyse gekoppelte Ionentransport durch Rekonstitution des Enzyms in Liposomen und anschließender Messung des Na^+ - oder H^+ -Transports gemessen. In den Proteoliposomen konnte mit Hilfe von $^{22}\text{Na}^+$ gezeigt werden, dass das Enzym Natriumionen translozieren kann. Während in Anwesenheit des Natriumionophors ETH 2120 kein $^{22}\text{Na}^+$ -Transport beobachtet werden konnte, führte die Anwesenheit des Protonophors TCS zu einer geringfügigen Stimulation der $^{22}\text{Na}^+$ -Translokation. Insgesamt konnte ein primärer Na^+ -Transport nachgewiesen werden, welcher von der A_1A_0 -ATP-Synthase aus *E. callanderi* katalysiert wird.

6. Durch Rekonstitution der A_1A_0 -ATP-Synthase aus *E. callanderi* in Liposomen konnte erstmals biochemisch nachgewiesen werden, dass ein solches Enzym trotz seiner V-Typ c-Untereinheit in der Lage ist, ATP zu synthetisieren. Durch die Zugabe von Ionophoren (ETH 2120 und TCS) konnte der elektrochemische Ionengradient aufgehoben werden, wodurch keine ATP-Synthese beobachtet werden konnte. Der erstmalige Nachweis der ATP-Synthese wurde bei einem $\Delta\tilde{\mu}\text{Na}^+$ von 270 mV erbracht.

7. Die ATP-Synthese zeigte sich ebenfalls abhängig von der Na^+ -Konzentration. Der K_M -Wert lag bei $1,1 \pm 0,4$ mM und war vergleichbar mit dem für die ATP-Hydrolyse ermittelten Wert. Ebenso konnte für die ATP-Synthese-Richtung gezeigt werden, dass DCCD mit Na^+ um die gemeinsame Bindestelle in der c-Untereinheit konkurriert.

8. Um den biochemischen Nachweis zu erbringen, dass die A_1A_0 -ATP-Synthase auch unter physiologisch relevanten Potentialen zur ATP-Synthese befähigt ist, wurde der energetische Schwellenwert der ATP-Synthese bestimmt. Dieser betrug 87 mV als Triebkraft für $\Delta p\text{Na}$, 94 mV als Triebkraft für $\Delta\psi$ und 90 mV als Triebkraft für $\Delta\tilde{\mu}\text{Na}^+$. Erstaunlicherweise konnte die ATP-Synthese der A_1A_0 -ATP-Synthase aus *E. callanderi* KIST612 sowohl durch $\Delta\psi$ als auch $\Delta p\text{Na}$ angetrieben werden. Unterschiedliche Kombinationen von $\Delta\psi$ und $\Delta p\text{Na}$ führten zu dem gleichen

energetischen Schwellenwert; $\Delta\psi$ und ΔpNa waren im Enzym aus *E. callanderi* KIST612 äquivalente Triebkräfte.

9. Der energetische Schwellenwert der A_1A_0 -ATP-Synthase aus *E. callanderi* KIST612 wurde mit dem der F_1F_0 -ATP-Synthasen aus *A. woodii*, *E. coli* und *P. modestum* verglichen. Dazu wurden die Enzyme im ATP-Synthase-defizienten *E. coli*-Stamm DK8 produziert und anschließend durch Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie gereinigt. Nach Einbau der Enzyme in Liposomen waren alle Enzyme in der Lage, ATP als Reaktion auf $\Delta\tilde{\mu}Na^+$ (*A. woodii* und *P. modestum*) oder $\Delta\tilde{\mu}H^+$ (*E. coli*) zu synthetisieren. Im Vergleich zum Enzym aus *E. callanderi* zeigten sich zwei auffällige Unterschiede. Erstens war keine der F_1F_0 -ATP-Synthasen in der Lage, $\Delta pNa/\Delta pH$ als alleinige Triebkraft zu nutzen. Während die ATP-Synthese in den Enzymen aus *E. coli* und *P. modestum* nur durch $\Delta\tilde{\mu}H^+$ bzw. $\Delta\tilde{\mu}Na^+$ angetrieben werden konnte, konnte das Enzym aus *A. woodii* zusätzlich auch durch $\Delta\psi$ als einzige Triebkraft angetrieben werden. Zweitens waren die energetischen Schwellenwerte der ATP-Synthese bei den F_1F_0 -ATP-Synthasen von *P. modestum* (120 mV) und *E. coli* (150 mV) signifikant höher als der bei der A_1A_0 -ATP-Synthase aus *E. callanderi*. Einzig der Schwellenwert des Enzyms aus *A. woodii* ($\Delta\tilde{\mu}Na^+ = 94$ mV) war vergleichbar. Der niedrigere bioenergetische Schwellenwert in beiden Organismen stellt eine Anpassung acetogener Bakterien an ein Leben nahe dem thermodynamischen Gleichgewicht dar.

10. Abschließend konnte der intakte *c*-Ring von *E. callanderi* aus der gereinigten A_1A_0 -ATP-Synthase gereinigt werden. Der isolierte *c*-Ring zeigte unter nativen Bedingungen eine Größe von ca. 160 kDa auf, was auf einen Ring bestehend aus 11 – 12 *c*-Monomeren hindeutete. Eine genaue Bestimmung der Untereinheitenstöchiometrie des *c*-Rings war jedoch nicht möglich.

6 Literaturverzeichnis

- Abbas, Y.M., Wu, D., Bueler, S.A., Robinson, C.V., und Rubinstein, J.L. (2020) Structure of V-ATPase from the mammalian brain. *Science* **367**: 1240-1246.
- Abrahams, J.P., Leslie, A.G.W., Lutter, R., und Walker, J.E. (1994) Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* **370**: 621-628.
- Altendorf, K. (1977) Purification of the DCCD-reactive protein of the energy-transducing adenosine triphosphatase complex from *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **73**: 271-275.
- Andreesen, J.R., Gottschalk, G., und Schlegel, H.G. (1970) *Clostridium formicoaceticum* nov. spec. isolation, description and distinction from *C. aceticum* and *C. thermoaceticum*. *Arch. Microbiol.* **72**: 154-174.
- Anthon, G.E., und Jagendorf, A.T. (1983) Effect of methanol on spinach thylakoid ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* **723**: 358-363.
- Averhoff, B. (2009) Shuffling genes around in hot environments: the unique DNA transporter of *Thermus thermophilus*. *FEMS Microbiol. Rev.* **33**: 611-626.
- Averhoff, B., und Müller, V. (2010) Exploring research frontiers in microbiology: recent advances in halophilic and thermophilic extremophiles. *Res. Microbiol.* **161**: 506-514.
- Bache, R., und Pfennig, N. (1981) Selective isolation of *Acetobacterium woodii* on methoxylated aromatic acids and determination of growth yields. *Arch. Microbiol.* **130**: 255-261.
- Balakrishna, A.M., Hunke, C., und Grüber, G. (2012) The structure of subunit E of the *Pyrococcus horikoshii* OT3 A-ATP synthase gives insight into the elasticity of the peripheral stalk. *J. Mol. Biol.* **420**: 155-163.
- Balch, W.E., Schoberth, S., Tanner, R.S., und Wolfe, R.S. (1977) *Acetobacterium*, a new genus of hydrogen-oxidizing, carbon dioxide-reducing, anaerobic bacteria. *Int. J. Syst. Bact.* **27**: 355-361.
- Banerjee, S., und Kane, P.M. (2020) Regulation of V-ATPase activity and organelle pH by phosphatidylinositol phosphate lipids. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**.
- Bar-Even, A. (2013) Does acetogenesis really require especially low reduction potential? *Biochim. Biophys. Acta.* **1827**: 395-400.
- Bengelsdorf, F.R., und Dürre, P. (2017) Gas fermentation for commodity chemicals and fuels. *Microb. Biotechnol.* **10**: 1167-1170.
- Bengelsdorf, F.R., Poehlein, A., Linder, S., Erz, C., Hummel, T., Hoffmeister, S. *et al.* (2016) Industrial acetogenic biocatalysts: A comparative metabolic and genomic analysis. *Front. Microbiol.* **7**: 1036.

- Bengelsdorf, F.R., Beck, M.H., Erz, C., Hoffmeister, S., Karl, M.M., Riegler, P. *et al.* (2018) Bacterial anaerobic synthesis gas (syngas) and CO₂ + H₂ fermentation. *Adv. Appl. Microbiol.* **103**: 143-221.
- Bertsch, J., Siemund, A.L., Kremp, F., und Müller, V. (2016) A novel route for ethanol oxidation in the acetogenic bacterium *Acetobacterium woodii*: The acetaldehyde/ethanol dehydrogenase pathway. *Environ. Microbiol.* **18**: 2913-2922.
- Bertsch, J., Öppinger, C., Hess, V., Langer, J.D., und Müller, V. (2015) Heterotrimeric NADH-oxidizing methylenetetrahydrofolate reductase from the acetogenic bacterium *Acetobacterium woodii*. *J. Bacteriol.* **197**: 1681-1689.
- Biegel, E., und Müller, V. (2010) Bacterial Na⁺-translocating ferredoxin:NAD⁺ oxidoreductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**: 18138-18142.
- Blaut, M., und Gottschalk, G. (1984) Coupling of ATP synthesis and methane formation from methanol and molecular hydrogen in *Methanosarcina barkeri*. *Eur. J. Biochem.* **141**: 217-222.
- Bokranz, M., Mörschel, E., und Kröger, A. (1985) Phosphorylation and phosphate-ATP exchange catalyzed by the ATP synthase isolated from *Wolinella succinogenes*. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **810**: 332-339.
- Boyer, P.D. (1989) A perspective of the binding change mechanism for ATP synthesis. *FASEB J.* **3**: 2164-2178.
- Boyer, P.D. (1993) The binding change mechanism for ATP synthase - some probabilities and possibilities. *Biochim. Biophys. Acta* **1140**: 215-250.
- Boyer, P.D. (1997) The ATP synthase - a splendid molecular machine. *Annu. Rev. Biochem.* **66**: 717-749.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteine-dye-binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Braley, R., und Piper, P.W. (1997) The C-terminus of yeast plasma membrane H⁺-ATPase is essential for the regulation of this enzyme by heat shock protein Hsp30, but not for stress activation. *FEBS Lett.* **418**: 123-126.
- Brandt, K., Müller, D.B., Hoffmann, J., Hübert, C., Brutschy, B., Deckers-Hebestreit, G., und Müller, V. (2013) Functional production of the Na⁺ F₁F₀ ATP synthase from *Acetobacterium woodii* in *Escherichia coli* requires the native AtpI. *J. Bioenerg. Biomembr.* **45**: 15-23.
- Bryant, M.P. (1972) Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. *Am. J. Clin. Nutr.* **25**: 1324-1328.
- Buschhorn, H. (1989) Physiologische, enzymatische und genetische Untersuchungen zum Ethanol-Stoffwechsel von *Acetobacterium woodii*. Doktorarbeit, Georg-August-Universität Göttingen.

- Capaldi, R.A., und Aggeler, R. (2002) Mechanism of the F₁F₀-type ATP synthase, a biological rotary motor. *Trends Biochem. Sci.* **27**: 154-160.
- Chang, I.S., Kim, B.H., Lovitt, R.W., und Bang, J.S. (2001) Effect of CO partial pressure on cell-recycled continuous CO fermentation by *Eubacterium limosum* KIST612. *Process Biochem.* **37**: 411-421.
- Chang, I.S., Kim, D., Kim, B.H., und Lovitt, R.W. (2007) Use of an industrial grade medium and medium enhancing effects on high cell density CO fermentation by *Eubacterium limosum* KIST612. *Biotechnol. Lett.* **29**: 1183-1187.
- Chang, I.S., Kim, B.H., Kim, D.H., Lovitt, R.W., und Sung, H.C. (1999) Formulation of defined media for carbon monoxide fermentation by *Eubacterium limosum* KIST612 and the growth characteristics of the bacterium. *J. Biosci. Bioeng.* **88**: 682-685.
- Chang, I.S., Kim, D.H., Kim, B.H., Shin, P.K., Yoon, J.H., Lee, J.S., und Park, Y.H. (1997) Isolation and identification of carbon monoxide utilizing anaerobe, *Eubacterium limosum* KIST612. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 1-8.
- Chen, J.X., Deng, C.Y., Zhang, Y.T., Liu, Z.M., Wang, P.Z., Liu, S.L. *et al.* (2016) Cloning, expression, and characterization of a four-component O-demethylase from human intestinal bacterium *Eubacterium limosum* ZL-II. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**: 9111-9124.
- Cockrell, R.S., Harris, E.J., und Pressman, B.C. (1967) Synthesis of ATP driven by a potassium gradient in mitochondria. *Nature* **215**: 1487-1488.
- Cohen, S.N., Chang, A.C., und Hsu, L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **69**: 2110-2114.
- Coskun, Ü., Radermacher, M., Müller, V., Ruiz, T., und Grüber, G. (2004) Three-dimensional organization of the archaeal A₁-ATPase from *Methanosarcina mazei* Gö1. *J. Biol. Chem.* **279**: 22759-22764.
- Cossio, P., Allegretti, M., Mayer, F., Muller, V., Vonck, J., und Hummer, G. (2018) Bayesian inference of rotor ring stoichiometry from electron microscopy images of archaeal ATP synthase. *Microscopy* **67**: 266-273.
- Cotton, C.A., Claassens, N.J., Benito-Vaquerizo, S., und Bar-Even, A. (2019) Renewable methanol and formate as microbial feedstocks. *Curr. Opin. Biotechnol.* **62**: 168-180.
- Cross, R.L., und Taiz, L. (1990) Gene duplication as a means for altering H⁺/ATP ratios during the evolution of F₀F₁ ATPases and synthases. *FEBS Lett.* **259**: 22227-22229.
- Cross, R.L., und Müller, V. (2004) The evolution of A-, F-, and V-type ATP synthases and ATPases: reversals in function and changes in the H⁺/ATP stoichiometry. *FEBS Lett.* **576**: 1-4.

- Daniell, J., Köpke, M., und Simpson, S.D. (2012) Commercial biomass syngas fermentation. *Energies* **5**: 5372-5417.
- Das, A., Ivey, D.M., und Ljungdahl, L.G. (1997) Purification and reconstitution into proteoliposomes of the F₁F₀ ATP synthase from the obligately anaerobic gram-positive bacterium *Clostridium thermoautotrophicum*. *J. Bacteriol.* **179**: 1714-1720.
- Das, A., Fu, Z.Q., Tempel, W., Liu, Z.J., Chang, J., Chen, L. *et al.* (2007) Characterization of a corrinoid protein involved in the C1 metabolism of strict anaerobic bacterium *Moorella thermoacetica*. *Proteins* **67**: 167-176.
- Diender, M., Stams, A.J., und Sousa, D.Z. (2015) Pathways and bioenergetics of anaerobic carbon monoxide fermentation. *Front. Microbiol.* **6**: 1275.
- Dietrich, H.M., Kremp, F., Öppinger, C., Ribaric, L., und Müller, V. (2021) Biochemistry of methanol-dependent acetogenesis in *Eubacterium callanderi* KIST612. *Environ. Microbiol.* **23**: 4505-4517.
- Dimroth, P., Laubinger, W., Kluge, C., Kaim, G., Ludwig, W., und Schleifer, K.H. (1992) Sodium-translocating adenosinetriphosphatase of *Propionigenium modestum*. In *Ion - Motive ATPases : Structure, Function, and Regulation*. Scarpa, A., Carafoli, E., und Papa, S. (eds). New York: New York Acad Sciences, pp. 310-322.
- Drake, H.L. (1994) Acetogenesis, acetogenic bacteria, and the acetyl-CoA pathway: past and current perspectives. In *Acetogenesis*. Drake, H.L. (ed). New York: Chapman and Hall, pp. 3-60.
- Drake, H.L., Küsel, K., und Matthies, C. (2006) Acetogenic Prokaryotes. In *The Prokaryotes*. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., und Stackebrandt, E. (eds). New York: Springer, p. 373.
- Drake, H.L., Gößner, A.S., und Daniel, S.L. (2008) Old acetogens, new light. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1125**: 100-128.
- Drake, H.L., Daniel, S., Küsel, K., Matthies, C., Kuhner, C., und Braus-Strohmeyer, S. (1997) Acetogenic bacteria: what are the *in situ* consequences of their diverse metabolic diversities? *Biofactors* **1**: 13-24.
- Dürichen, H., Diekert, G., und Studenik, S. (2019) Redox potential changes during ATP-dependent corrinoid reduction determined by redox titrations with europium(II)-DTPA. *Protein Sci.* **28**: 1902-1908.
- Dürre, P. (2007) Biobutanol: An attractive biofuel. *Biotechnol. J.* **2**: 1525-1534.
- Dwidar, M., Park, J.-Y., Mitchell, R.J., und Sang, B.-I. (2012) The future of butyric acid in industry. *Sci. World J.* **2012**: 471417.
- Eden, G., und Fuchs, G. (1982) Total synthesis of acetyl coenzyme A involved in autotrophic CO₂ fixation in *Acetobacterium woodii*. *Arch. Microbiol.* **133**: 66-74.

- Eichler, B., und Schink, B. (1984) Oxidation of primary aliphatic alcohols by *Acetobacterium carbinolicum* sp. nov., a homoacetogenic anaerobe. *Arch. Microbiol.* **140**: 147-152.
- Feniouk, B.A., Suzuki, T., und Yoshida, M. (2007) Regulatory interplay between proton motive force, ADP, phosphate, and subunit ϵ in bacterial ATP synthase. *J. Biol. Chem.* **282**: 764-772.
- Fischer, F., Lieske, R., und Winzler, K. (1932) Biologische Gasreaktionen. II. Über die Bildung von Essigsäure bei der biologischen Umsetzung von Kohlenoxyd und Kohlensäure zu Methan. *Biochem. Z.* **245**: 2-12.
- Fischer, S., und Gräber, P. (1999) Comparison of ΔpH - and $\Delta\psi$ -driven ATP synthesis catalyzed by the H^+ -ATPases from *Escherichia coli* or chloroplasts reconstituted into liposomes. *FEBS Lett.* **457**: 327-332.
- Fontaine, F.E., Peterson, W.H., McCoy, E., Johnson, M.J., und Ritter, G.J. (1942) A new type of glucose fermentation by *Clostridium thermoaceticum*. *J. Bacteriol.* **43**: 701-715.
- Forgac, M. (1999) Structure and properties of the vacuolar H^+ -ATPases. *J. Biol. Chem.* **274**: 12951-12954.
- Forgac, M. (2007) Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **8**: 917-929.
- Fritz, M., und Müller, V. (2007) An intermediate step in the evolution of ATPases - the F_1F_0 -ATPase from *Acetobacterium woodii* contains F-type and V-type rotor subunits and is capable of ATP synthesis. *FEBS J.* **274**: 3421-3428.
- Fritz, M., Klyszejko, A.L., Morgner, N., Vonck, J., Brutschy, B., Müller, D.J. *et al.* (2008) An intermediate step in the evolution of ATPases: a hybrid F_1F_0 rotor in a bacterial Na^+ F_1F_0 ATP synthase. *FEBS J.* **275**: 1999-2007.
- Futai, M., Omote, H., Sambongi, Y., und Wada, Y. (2000) Synthase (H^+ ATPase): coupling between catalysis, mechanical work, and proton translocation. *Biochim. Biophys. Acta.* **1458**: 276-288.
- Gayen, S., Vivekanandan, S., Biukovic, G., Gruber, G., und Yoon, H.S. (2007) NMR solution structure of subunit F of the methanogenic A_1A_0 adenosine triphosphate synthase and its interaction with the nucleotide-binding subunit B. *Biochem.* **46**: 11684-11694.
- Genthner, B.R., Davis, C.L., und Bryant, M.P. (1981) Features of rumen and sewage sludge strains of *Eubacterium limosum*, a methanol- and H_2 - CO_2 -utilizing species. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**: 12-19.
- Gibson, L.C., Cadwallader, G., und Finbow, M.E. (2002) Evidence that there are two copies of subunit c'' in V_0 complexes in the vacuolar H^+ -ATPase. *Biochem. J.* **366**: 911-919.

- Gössner, A.S., Picardal, F., Tanner, R.S., und Drake, H.L. (2008) Carbon metabolism of the moderately acid-tolerant acetogen *Clostridium drakei* isolated from peat. *FEMS Microbiol. Lett.* **287**: 236-242.
- Greie, J.C., Deckers-Hebestreit, G., und Altendorf, K. (2000) Secondary structure composition of reconstituted subunit *b* of the *Escherichia coli* ATP synthase. *Eur. J. Biochem.* **267**: 3040-3048.
- Grethlein, A.J., Worden, R.M., Jain, M.K., und Datta, R. (1991) Evidence for production of *n*-butanol from carbon monoxide by *Butyribacterium methylotrophicum*. *J. Ferment. Bioeng.* **72**: 58-60.
- Grüber, G., und Marshansky, V. (2008) New insights into structure-function relationships between archaeal ATP synthase (A₁A_o) and vacuolar type ATPase (V₁V_o). *Bioessays* **30**: 1096-1109.
- Grüber, G., Wieczorek, H., Harvey, W.R., und Müller, V. (2001a) Structure-function relationships of A-, F- and V-ATPases. *J. Exp. Biol.* **204**: 2597-2605.
- Grüber, G., Manimekalai, M.S., Mayer, F., und Müller, V. (2014) ATP synthases from archaea: the beauty of a molecular motor. *Biochim. Biophys. Acta* **1837**: 940-952.
- Grüber, G., Svergun, D.I., Coskun, Ü., Lemker, T., Koch, M.H., Schägger, H., und Müller, V. (2001b) Structural insights into the A₁ ATPase from the archaeon *Methanosarcina mazei* Gö1. *Biochem.* **40**: 1890-1896.
- Hahn, A., Vonck, J., Mills, D.J., Meier, T., und Kühlbrandt, W. (2018) Structure, mechanism, and regulation of the chloroplast ATP synthase. *Science* **360**: eaat4318.
- Haines, T.H. (2001) Do sterols reduce proton and sodium leaks through lipid bilayers? *Prog. Lipid Res.* **40**: 299-324.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
- Hangarter, R.P., und Good, N.E. (1982) Energy thresholds for ATP synthesis in chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* **681**: 397-404.
- Hedderich, R., und Forzi, L. (2005) Energy-converting [NiFe] hydrogenases: more than just H₂ activation. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **10**: 92-104.
- Heinonen, J.E., und Lahti, R.J. (1981) A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. *Anal. Biochem.* **113**: 313-317.
- Hermolin, J., und Fillingame, R.H. (1989) H⁺-ATPase activity of *Escherichia coli* F₁F_o is blocked after reaction of dicyclohexylcarbodiimide with a single proteolipid (subunit *c*) of the F_o complex. *J. Biol. Chem.* **264**: 3896-3903.

- Hess, V., Schuchmann, K., und Müller, V. (2013) The ferredoxin:NAD⁺ oxidoreductase (Rnf) from the acetogen *Acetobacterium woodii* requires Na⁺ and is reversibly coupled to the membrane potential. *J. Biol. Chem.* **288**: 31496-31502.
- Hess, V., Poehlein, A., Weghoff, M.C., Daniel, R., und Müller, V. (2014) A genome-guided analysis of energy conservation in the thermophilic, cytochrome-free acetogenic bacterium *Thermoanaerobacter kivui*. *BMC Genom.* **15**: 1139.
- Himes, R.H., und Harmony, J.A. (1973) Formyltetrahydrofolate synthetase. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **1**: 501-535.
- Hirata, T., Nakamura, N., Omote, H., Wada, Y., und Futai, M. (2000) Regulation and reversibility of vacuolar H⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* **275**: 386-389.
- Humphreys, C.M., und Minton, N.P. (2018) Advances in metabolic engineering in the microbial production of fuels and chemicals from C1 gas. *Curr. Opin. Biotechnol.* **50**: 174-181.
- Hungate, R.E. (1969) A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In *Methods in Microbiology*. Norris, J.R., und Ribbons, D.W. (eds). New York and London: Academic Press, pp. 117-132.
- Ichikawa, Y., Mori, N., Miki, S., Hosoi, N., und Kitamoto, Y. (1985) Purification and properties of acetate kinase from *Propionibacterium freudenreichii*. *J. Ferment. Technol.* **63**: 143-149.
- Iino, R., Hasegawa, R., Tabata, K.V., und Noji, H. (2009) Mechanism of Inhibition by C-terminal α -helices of the ϵ subunit of Escherichia coli F₀F₁-ATP synthase. *J. Biol. Chem.* **284**: 17457-17464.
- Inoue, H., Nojima, H., und Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28.
- Ivey, D.M., und Ljungdahl, L.G. (1986) Purification and characterization of the F₁-ATPase from *Clostridium thermoaceticum*. *J. Bacteriol.* **165**: 252-257.
- Jagendorf, A.T., und Uribe, E. (1966) ATP formation caused by acid-base transition of spinach chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **55**: 170-177.
- Jeong, J., Kim, J.-Y., Park, B., Choi, I.-G., und Chang, I.S. (2020) Genetic engineering system for syngas-utilizing acetogen, *Eubacterium limosum* KIST612. *Bioresour. Technol. Rep.* **11**: 100452.
- Jeong, J., Bertsch, J., Hess, V., Choi, S., Choi, I.G., Chang, I.S., und Müller, V. (2015) Energy conservation model based on genomic and experimental analyses of a carbon monoxide-utilizing, butyrate-forming acetogen, *Eubacterium limosum* KIST612. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**: 4782-4790.
- Jiang, W., Pinder, R.S., Patterson, J.A., und Ricke, S.C. (2012) Sugar phosphorylation activity in ruminal acetogens. *J. Environ. Sci. Health* **47**: 843-846.

- Jones, P.C., und Fillingame, R.H. (1998) Genetic fusions of subunit *c* in the F_o sector of H^+ -transporting ATP synthase. Functional dimers and trimers and determination of stoichiometry by cross-linking analysis. *J. Biol. Chem* **273**: 29701-29705.
- Junesch, U., und Gräber, P. (1991) The rate of ATP-synthesis as a function of ΔpH and $\Delta \Psi$ catalyzed by the active, reduced H^+ -ATPase from chloroplasts. *FEBS Lett.* **294**: 275-278.
- Junge, W., Sielaff, H., und Engelbrecht, S. (2009) Torque generation and elastic power transmission in the rotary F_oF_1 -ATPase. *Nature* **459**: 364-370.
- Kaim, G., und Dimroth, P. (1998a) A triple mutation in the *a* subunit of the *Escherichia coli/Propionigenium modestum* F_1F_o ATPase hybrid causes a switch from Na^+ stimulation to Na^+ inhibition. *Biochem.* **37**: 4626-4634.
- Kaim, G., und Dimroth, P. (1998b) ATP synthesis by the F_1F_o ATP synthase of *Escherichia coli* is obligatorily dependent on the electric potential. *FEBS Lett.* **434**: 57-60.
- Kaim, G., und Dimroth, P. (1999) ATP synthesis by F-type ATP synthase is obligatorily dependent on the transmembrane voltage. *EMBO J.* **18**: 4118-4127.
- Kane, P.M. (2006) The where, when, and how of organelle acidification by the yeast vacuolar H^+ -ATPase. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**: 177-191.
- Kashket, E.R. (1982) Stoichiometry of the H^+ -ATPase of growing and resting, aerobic *Escherichia coli*. *Biochem.* **21**: 5534-5538.
- Katsyv, A., und Müller, V. (2020) Overcoming energetic barriers in acetogenic C1 conversion. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **8**: 621166.
- Kawasaki-Nishi, S., Nishi, T., und Forgac, M. (2001) Arg-735 of the 100 kDa subunit *a* of the yeast V-ATPase is essential for proton translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 12397-12402.
- Kim, J.Y., Park, S., Jeong, J., Lee, M., Kang, B., Jang, S.H. *et al.* (2021) Methanol supply speeds up synthesis gas fermentation by methylotrophic-acetogenic bacterium, *Eubacterium limosum* KIST612. *Bioresour. Technol.* **321**: 124521.
- Kißling, L., Greiser, Y., Dürichen, H., und Studenik, S. (2020) Flavodoxin hydroquinone provides electrons for the ATP-dependent reactivation of protein-bound corrinoid cofactors. *FEBS J.* **287**: 4971-4981.
- Klionsky, D.J., William, S.A., Brusilow, A., und Simoni, R.D. (1984) *In vivo* evidence for the role of the ϵ subunit as an inhibitor of the proton-translocating ATPase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **160**: 1055-1060.
- Kluge, C., und Dimroth, P. (1993) Specific protection by Na^+ or Li^+ of the F_1F_o -ATPase of *Propionigenium modestum* from the reaction with dicyclohexylcarbodiimide. *J. Biol. Chem.* **268**: 14557-14560.

- Knol, J., Sjollem, K., und Poolman, B. (1998) Detergent-mediated reconstitution of membrane proteins. *Biochem.* **37**: 16410-16415.
- Krah, A., Zarco-Zavala, M., und McMillan, D.G.G. (2018) Insights into the regulatory function of the ϵ subunit from bacterial F-type ATP synthases: a comparison of structural, biochemical and biophysical data. *Open Biol.* **8**: 170275.
- Kreft, J.U., und Schink, B. (1994) O-demethylation by the homoacetogenic anaerobe *Holophaga foetida* studied by a new photometric methylation assay using electrochemically produced cob(I)alamin. *Eur. J. Biochem.* **226**: 945-951.
- Kremp, F., und Müller, V. (2021) Methanol and methyl group conversion in acetogenic bacteria: biochemistry, physiology and application. *FEMS Microbiol. Rev.* **45**: fuaa040.
- Kremp, F., Roth, J., und Müller, V. (2020) The *Sporomusa* type Nfn is a novel type of electron-bifurcating transhydrogenase that links the redox pools in acetogenic bacteria. *Sci. Rep.* **10**: 14872.
- Kremp, F., Poehlein, A., Daniel, R., und Müller, V. (2018) Methanol metabolism in the acetogenic bacterium *Acetobacterium woodii*. *Environ. Microbiol.* **20**: 4369–4384.
- Kreuter, L.J., Weinfurter, A., Ziegler, A., Weigl, J., Hoffmann, J., Morgner, N. *et al.* (2019) Purification of a crenarchaeal ATP synthase in the light of the unique bioenergetics of *Ignicoccus* species. *J. Bacteriol.* **201**.
- Krumholz, L.R., und Bryant, M.P. (1985) *Clostridium pfennigii* sp. nov. uses methoxyl groups of monobenzenoids and produces butyrate. *Int. J. Sys. Bacteriol.* **35**: 454-456.
- Kühlbrandt, W. (2019) Structure and mechanisms of F-Type ATP synthases. *Annu. Rev. Biochem.* **88**: 515-549.
- Küsel, K., Dorsch, T., Acker, G., Stackebrandt, E., und Drake, H.L. (2000) *Clostridium scatologenes* strain SL1 isolated as an acetogenic bacterium from acidic sediments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 537-546.
- Lane, N., und Martin, W.F. (2012) The origin of membrane bioenergetics. *Cell* **151**: 1406-1416.
- Lau, W.C., und Rubinstein, J.L. (2010) Structure of intact *Thermus thermophilus* V-ATPase by cryo-EM reveals organization of the membrane-bound V_0 motor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**: 1367-1372.
- Laubinger, W., und Dimroth, P. (1987) Characterization of the Na^+ -stimulated ATPase of *Propionigenium modestum* as an enzyme of the F_1F_0 type. *Eur. J. Biochem.* **168**: 475-480.
- Laubinger, W., und Dimroth, P. (1988) Characterization of the ATP synthase of *Propionigenium modestum* as a primary sodium pump. *Biochem.* **27**: 7531-7537.

- Lechtenfeld, M., Heine, J., Sameith, J., Kremp, F., und Müller, V. (2018) Glycine betaine metabolism in the acetogenic bacterium *Acetobacterium woodii*. *Environ. Microbiol.* **20**: 4512-4525.
- Lee, L.K., Stewart, A.G., Donohoe, M., Bernal, R.A., und Stock, D. (2010) The structure of the peripheral stalk of *Thermus thermophilus* H⁺-ATPase/synthase. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**: 373-378.
- Leigh, J.A., Mayer, F., und Wolfe, R.S. (1981) *Acetogenium kivui*, a new thermophilic hydrogen-oxidizing, acetogenic bacterium. *Arch. Microbiol.* **129**: 275-280.
- Lemker, T., Ruppert, C., Stöger, H., Wimmers, S., und Müller, V. (2001) Overproduction of a functional A₁ ATPase from the archaeon *Methanosarcina mazei* Gö1 in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **268**: 3744-3750.
- Lim, J.K., Mayer, F., Kang, S.G., und Müller, V. (2014) Energy conservation by oxidation of formate to carbon dioxide and hydrogen via a sodium ion current in a hyperthermophilic archaeon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**: 11497-11502.
- Lindley, N.D., Loubiere, P., Pacaud, D., Mariotto, C., und Goma, G. (1987) Novel products of the acidogenic fermentation of methanol during growth of *Eubacterium limosum* in the presence of high concentrations of organic acids. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 3557-3563.
- Lingl, A., Huber, H., Stetter, K.O., Mayer, F., Kellermann, J., und Müller, V. (2003) Isolation of a complete A₁A₀ ATP synthase comprising nine subunits from the hyperthermophile *Methanococcus jannaschii*. *Extremophiles* **7**: 249-257.
- Liou, J.S., Balkwill, D.L., Drake, G.R., und Tanner, R.S. (2005) *Clostridium carboxidivorans* sp. nov., a solvent-producing Clostridium isolated from an agricultural settling lagoon, and reclassification of the acetogen *Clostridium scatologenes* strain SL1 as *Clostridium drakei* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**: 2085-2091.
- Lipmann, F. (1941) Metabolic generation and utilization of phosphate bond energy. *Adv. Enzymol. Rel. S. Bi.* **1**: 99-162.
- Ljungdahl, L.G. (1994) The acetyl-CoA pathway and the chemiosmotic generation of ATP during acetogenesis. In *Acetogenesis*. Drake, H.L. (ed). New York: Chapman & Hall, pp. 63-87.
- Lolkema, J.S., und Boekema, E.J. (2003) The A-type ATP synthase subunit K of *Methanopyrus kandleri* is deduced from its sequence to form a monomeric rotor comprising 13 hairpin domains. *FEBS Lett.* **543**: 47-50.
- Long, J.C., Wang, S., und Vik, S.B. (1998) Membrane topology of subunit a of the F₁F₀ ATP synthase as determined by labeling of unique cysteine residues. *J. Biol. Chem.* **273**: 16235-16240.

- Loubiere, P., und Lindley, N.D. (1991) The use of acetate as an additional co-substrate improves methylotrophic growth of the acetogenic anaerobe *Eubacterium limosum* when CO₂ fixation is rate-limiting. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 2247-2251.
- Lovell, C.R., Przybyla, A., und Ljungdahl, L.G. (1988) Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Clostridium thermoaceticum* gene encoding thermostable formyltetrahydrofolate synthetase. *Arch. Microbiol.* **149**: 280-285.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., und Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Lux, M.F., Keith, E., Hsu, T., und Drake, H.L. (1990) Biotransformations of aromatic aldehydes by acetogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **67**: 73-77.
- MacLeod, K.J., Vasilyeva, E., Baleja, J.D., und Forgac, M. (1998) Mutational analysis of the nucleotide binding sites of the yeast vacuolar proton-translocating ATPase. *J. Biol. Chem.* **273**: 150-156.
- Maia, L.B., Moura, J.J., und Moura, I. (2015) Molybdenum and tungsten-dependent formate dehydrogenases. *J. Biol. Inorg. Chem.* **20**: 287-309.
- Maloney, P.C. (1983) Relationship between phosphorylation potential and electrochemical H⁺ gradient during glycolysis in *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **153**: 1461-1470.
- Maloney, P.C., und Wilson, T.H. (1975) ATP synthesis driven by a protonmotive force in *Streptococcus lactis*. *J. Membr. Biol.* **25**: 285-310.
- Mandel, M., Moriyama, Y., Hulmes, J.D., Pan, Y.-C.E., Nelson, H., und Nelson, N. (1988) cDNA sequence encoding the 16-kDa proteolipid of chromaffin granules implies gene duplication in the evolution of H⁺-ATPases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**: 5521-5524.
- Marshansky, V., Rubinstein, J.L., und Grüber, G. (2014) Eukaryotic V-ATPase: novel structural findings and functional insights. *Biochim. Biophys. Acta* **1837**: 857-879.
- Martin, W.F. (2012) Hydrogen, metals, bifurcating electrons, and proton gradients: the early evolution of biological energy conservation. *FEBS Lett.* **586**: 485-493.
- Matthies, D., Zhou, W., Klyszejko, A.L., Anselmi, C., Yildiz, O., Brandt, K. *et al.* (2014) High-resolution structure and mechanism of an F₁/V₁-hybrid rotor ring in a Na⁺-coupled ATP synthase. *Nat. Commun.* **5**: 5286.
- Mayer, F., und Müller, V. (2013a) Adaptations of anaerobic archaea to life under extreme energy limitation. *FEMS Microbiol. Rev.* **38**: 449-472.
- Mayer, F., und Müller, V. (2013b) Structure and function of ATP synthases from archaea. In *Encyclopedia of Biophysics*. Gordon, R. (ed). Heidelberg, Germany: Springer.

- Mayer, F., Leone, V., Langer, J.D., Faraldo-Gómez, J.D., und Müller, V. (2012) A *c* subunit with four transmembrane helices and one ion (Na⁺) binding site in an archaeal ATP synthase: implications for *c* ring function and structure. *J. Biol. Chem.* **287**: 39327-39337.
- Mayer, F., Lim, J.K., Langer, J.D., Kang, S.G., und Müller, V. (2015) Na⁺ transport by the A₁A₀-ATP synthase purified from *Thermococcus onnurineus* and reconstituted into liposomes. *J. Biol. Chem.* **290**: 6994-7002.
- McMillan, D.G., Ferguson, S.A., Dey, D., Schroder, K., Aung, H.L., Carbone, V. *et al.* (2011) A₁A₀-ATP synthase of *Methanobrevibacter ruminantium* couples sodium ions for ATP synthesis under physiological conditions. *J. Biol. Chem.* **286**: 39882-39892.
- Meier, T., Krah, A., Bond, P.J., Pogoryelov, D., Diederichs, K., und Faraldo-Gómez, J.D. (2009) Complete ion-coordination structure in the rotor ring of Na⁺-dependent F-ATP synthases. *J. Mol. Biol.* **391**: 498-507.
- Mitchell, P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic mechanism. *Nature* **191**: 144-148.
- Mitchell, P. (1966) Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **41**: 445-502.
- Miyata, S., Kozuka, S., Yasuda, Y., Chen, Y.H., Moriyama, R., Tochikubo, K., und Makino, S. (1997) Localization of germination-specific spore-lytic enzymes in *Clostridium perfringens* S40 spores detected by immunoelectron microscopy. *FEMS Microbiol. Lett.* **152**: 243-247.
- Moon, J., Dönig, J., Kramer, S., Poehlein, A., Daniel, R., und Müller, V. (2021) Formate metabolism in the acetogenic bacterium *Acetobacterium woodii*. *Environ. Microbiol.* **23**: 4214-4227.
- Moore, M.R., O'Brien, W.E., und Ljungdahl, L.G. (1974) Purification and characterization of nicotinamide adenine dinucleotide-dependent methylenetetrahydrofolate dehydrogenase from *Clostridium formicoaceticum*. *J. Biol. Chem.* **249**: 5250-5253.
- Mulkidjanian, A.Y., Galperin, M.Y., Makarova, K.S., Wolf, Y.I., und Koonin, E.V. (2008) Evolutionary primacy of sodium bioenergetics. *Biol. direct* **3**: 13.
- Müller, D.J., Dencher, N.A., Meier, T., Dimroth, P., Suda, K., Stahlberg, H. *et al.* (2001) ATP synthase: constrained stoichiometry of the transmembrane rotor. *FEBS Lett.* **504**: 219-222.
- Müller, V. (2003) Energy conservation in acetogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 6345-6353.
- Müller, V. (2004) An exceptional variability in the motor of archaeal A₁A₀ ATPases: from multimeric to monomeric rotors comprising 6-13 ion binding sites. *J. Bioenerg. Biomembr.* **36**: 115-125.

- Müller, V. (2008) Bacterial fermentation. In *Encyclopedia of life sciences*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd.
- Müller, V. (2015) Microbial life at the thermodynamic limit: how much energy is required to sustain life. *Environ. Microbiol. Rep.* **7**: 31-32.
- Müller, V. (2019) New Horizons in Acetogenic Conversion of One-Carbon Substrates and Biological Hydrogen Storage. *Trends Biotechnol.* **37**: 1344-1354.
- Müller, V., und Grüber, G. (2003) ATP synthases: structure, function and evolution of unique energy converters. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**: 474-494.
- Müller, V., und Frerichs, J. (2013) Acetogenic bacteria. In *Encyclopedia of life sciences*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd.
- Müller, V., und Hess, V. (2017) The minimum biological energy quantum. *Front. Microbiol.* **8**: 2019.
- Müller, V., Blaut, M., und Gottschalk, G. (1988) The transmembrane electrochemical gradient of Na⁺ as driving force for methanol oxidation in *Methanosarcina barkeri*. *Eur. J. Biochem.* **172**: 601-606.
- Müller, V., Blaut, M., und Gottschalk, G. (1993) Bioenergetics of methanogenesis. In *Methanogenesis*. Ferry, J.G. (ed). New York: Chapman & Hall, pp. 360 - 406.
- Müller, V., Lingl, A., Lewalter, K., und Fritz, M. (2005) ATP synthases with novel rotor subunits: new insights into structure, function and evolution of ATPases. *J. Bioenerg. Biomembr.* **37**: 455-460.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., und Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51**: 263-273.
- Murata, T., Yamato, I., Kakinuma, Y., Leslie, A.G., und Walker, J.E. (2005) Structure of the rotor of the V-type Na⁺-ATPase from *Enterococcus hirae*. *Science* **308**: 654-659.
- Nagle, J.F. (1987) Theory of passive proton conductance in lipid bilayers. *J. Bioenerg. Biomembr.* **19**: 413-426.
- Nakanishi-Matsui, M., Sekiya, M., Nakamoto, R.K., und Futai, M. (2010) The mechanism of rotating proton pumping ATPases. *Biochim. Biophys. Acta* **1797**: 1343-1352.
- Nelson, N. (1992a) The vacuolar H⁺-ATPase - one of the most fundamental ion pumps in nature. *J. Exp. Biol.* **172**: 19-27.
- Nelson, N. (1992b) Evolution of organellar proton-ATPases. *Biochim. Biophys. Acta* **1100**: 109-124.
- Nelson, N., und Taiz, L. (1989) The evolution of H⁺-ATPases. *Trends Biochem. Sci.* **14**: 113 - 116.

- Neumann, S., Matthey, U., Kaim, G., und Dimroth, P. (1998) Purification and properties of the F₁F₀ ATPase of *Ilyobacter tartaricus*, a sodium ion pump. *J. Bacteriol.* **180**: 3312-3316.
- Nishi, T., Kawasaki-Nishi, S., und Forgacs, M. (2003) The first putative transmembrane segment of subunit c" (Vma16p) of the yeast V-ATPase is not necessary for function. *J. Biol. Chem.* **278**: 5821-5827.
- O'Brien, W.E., Brewer, J.M., und Ljungdahl, L.G. (1973) Purification and characterization of thermostable 5,10-methylenetetrahydrofolate dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum*. *J. Biol. Chem.* **248**: 403-408.
- Öppinger, C., Kremp, F., und Müller, V. (2021) Is reduced ferredoxin the physiological electron donor for MetVF-type methylenetetrahydrofolate reductases in acetogenesis? A hypothesis. *Int. Microbiol.*, in press.
- Pacaud, S., Loubiere, P., und Goma, G. (1985) Methanol metabolism by *Eubacterium limosum* B2: Effects of pH and carbon dioxide on growth and organic acid production. *Curr. Microbiol.* **12**: 245-250.
- Park, S., Yasin, M., Jeong, J., Cha, M., Kang, H., Jang, N. *et al.* (2017) Acetate-assisted increase of butyrate production by *Eubacterium limosum* KIST612 during carbon monoxide fermentation. *Bioresour. Technol.* **245**: 560-566.
- Paula, S., Volkov, A.G., Vanhoek, A.N., Haines, T.H., und Deamer, D.W. (1996) Permeation of protons, potassium ions, and small polar molecules through phospholipid bilayers as a function of membrane thickness. *Biophys. J.* **70**: 339-348.
- Pisa, K.Y., Huber, H., Thomm, M., und Müller, V. (2007) A sodium ion-dependent A₁A₀ ATP synthase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *FEBS J.* **274**: 3928-3938.
- Poehlein, A., Schmidt, S., Kaster, A.-K., Goenrich, M., Vollmers, J., Thürmer, A. *et al.* (2012) An ancient pathway combining carbon dioxide fixation with the generation and utilization of a sodium ion gradient for ATP synthesis. *PLoS One* **7**: e33439.
- Pogoryelov, D., Yildiz, O., Faraldo-Gómez, J.D., und Meier, T. (2009) High-resolution structure of the rotor ring of a proton-dependent ATP synthase. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**: 1068-1073.
- Pogoryelov, D., Krah, A., Langer, J.D., Yildiz, Ö., Faraldo-Gómez, J.D., und Meier, T. (2010) Microscopic rotary mechanism of ion translocation in the F_o complex of ATP synthases. *Nat. Chem. Biol.* **6**: 891-899.
- Pogoryelov, D., Reichen, C., Klyszejko, A.L., Brunisholz, R., Müller, D.J., Dimroth, P., und Meier, T. (2007) The oligomeric state of c rings from cyanobacterial F-ATP synthases varies from 13 to 15. *J. Bacteriol.* **189**: 5895-5902.

- Powell, B., Graham, L.A., und Stevens, T.H. (2000) Molecular characterization of the yeast vacuolar H⁺-ATPase proton pore. *J. Biol. Chem.* **275**: 23654-23660.
- Ragsdale, S.W. (2008) Enzymology of the Wood-Ljungdahl pathway of acetogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1125**: 129-136.
- Ragsdale, S.W., und Ljungdahl, L.G. (1984) Purification and properties of NAD-dependent 5,10-methylenetetrahydrofolate dehydrogenase from *Acetobacterium woodii*. *J. Biol. Chem.* **259**: 3499-3503.
- Ragsdale, S.W., und Wood, H.G. (1985) Acetate biosynthesis by acetogenic bacteria. Evidence that carbon monoxide dehydrogenase is the condensing enzyme that catalyzes the final steps in the synthesis. *J. Biol. Chem.* **260**: 3970-3977.
- Ragsdale, S.W., und Pierce, E. (2008) Acetogenesis and the Wood-Ljungdahl pathway of CO₂ fixation. *Biochim. Biophys. Acta* **1784**: 1873-1898.
- Rahlfs, S., und Müller, V. (1997) Sequence of subunit c of the Na⁺-translocating F₁F₀ ATPase of *Acetobacterium woodii*: proposal for determinants of Na⁺ specificity as revealed by sequence comparisons. *FEBS Lett.* **404**: 269-271.
- Roh, H., Ko, H.J., Kim, D., Choi, D.G., Park, S., Kim, S. *et al.* (2011) Complete genome sequence of a carbon monoxide-utilizing acetogen, *Eubacterium limosum* KIST612. *J. Bacteriol.* **193**: 307-308.
- Ruppert, C., Kavermann, H., Wimmers, S., Schmid, R., Kellermann, J., Lottspeich, F. *et al.* (1999) The proteolipid of the A₁A₀ ATP synthase from *Methanococcus jannaschii* has six predicted transmembrane helices but only two proton-translocating carboxyl groups. *J. Biol. Chem.* **274**: 25281-25284.
- Saijo, S., Arai, S., Hossain, K.M., Yamato, I., Suzuki, K., Kakinuma, Y. *et al.* (2011) Crystal structure of the central axis DF complex of the prokaryotic V-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**: 19955-19960.
- Saita, E.-i., Iino, R., Suzuki, T., Feniouk, B.A., Kinosita, K., Jr., und Yoshida, M. (2010) Activation and stiffness of the inhibited states of F₁-ATPase probed by single-molecule manipulation. *J. Biol. Chem.* **285**: 11411-11417.
- Sambrook, J., und Russell, D.W. (2006) Purification of nucleic acids by extraction with phenol:chloroform. *CSH Protoc.* **2006**.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., und Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schägger, H., und von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**: 369-379.
- Schauder, R., Preuss, A., Jetten, M., und Fuchs, G. (1989) Oxidative and reductive acetyl-CoA carbon monoxide dehydrogenase pathway in *Desulfobacterium autotrophicum* Arch. *Microbiol.* **151**: 84-89.

- Schaupp, A., und Ljungdahl, L.G. (1974) Purification and properties of acetate kinase from *Clostridium thermoaceticum*. *Arch. Microbiol.* **100**: 121-129.
- Schiel-Bengelsdorf, B., und Dürre, P. (2012) Pathway engineering and synthetic biology using acetogens. *FEBS Lett.* **586**: 2191-2198.
- Schink, B. (1997) Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 262-280.
- Schlegel, K., Leone, V., Faraldo-Gomez, J.D., und Müller, V. (2012) Promiscuous archaeal ATP synthase concurrently coupled to Na⁺ and H⁺ translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **109**: 947-952.
- Schölmerich, M.C., und Müller, V. (2019) Energy conservation by a hydrogenase-dependent chemiosmotic mechanism in an ancient metabolic pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **116**: 6329-6334.
- Schuchmann, K., und Müller, V. (2012) A bacterial electron bifurcating hydrogenase. *J. Biol. Chem.* **287**: 31165–31171.
- Schuchmann, K., und Müller, V. (2013) Direct and reversible hydrogenation of CO₂ to formate by a bacterial carbon dioxide reductase. *Science* **342**: 1382-1385.
- Schuchmann, K., und Müller, V. (2014) Autotrophy at the thermodynamic limit of life: A model for energy conservation in acetogenic bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**: 809-821.
- Schuchmann, K., und Müller, V. (2016) Energetics and application of heterotrophy in acetogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **82**: 4056-4069.
- Schulz, S., Wilkes, M., Mills, D.J., Kühlbrandt, W., und Meier, T. (2017) Molecular architecture of the N-type ATPase rotor ring from *Burkholderia pseudomallei*. *EMBO Rep.* **18**: 526-535.
- Schwarz, F.M., Schuchmann, K., und Müller, V. (2018) Hydrogenation of CO₂ at ambient pressure catalyzed by a highly active thermostable biocatalyst. *Biotechnol. Biofuels* **11**: 237.
- Senior, A.E. (1988) ATP synthesis by oxidative phosphorylation. *Physiol. Rev.* **68**: 177-231.
- Slater, E.C., Rosing, J., und Mol, A. (1973) The phosphorylation potential generated by respiring mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **292**: 534-553.
- Slooten, L., und Vandenbranden, S. (1989) ATP-synthesis by proteoliposomes incorporating *Rhodospirillum rubrum* F₀F₁ as measured with firefly luciferase: dependence on Δψ and ΔpH. *Biochim. Biophys. Acta* **976**: 150-160.
- Soga, N., Kinosita, K., Jr., Yoshida, M., und Suzuki, T. (2012) Kinetic equivalence of transmembrane pH and electrical potential differences in ATP synthesis *J. Biol. Chem.* **287**: 9633-9639.

- Sone, N., Yoshida, M., Hirata, H., und Kagawa, Y. (1977) Adenosine triphosphate synthesis by electrochemical proton gradient in vesicles reconstituted from purified adenosine triphosphatase and phospholipids of thermophilic bacterium. *J. Biol. Chem.* **252**: 2956-2960.
- Spahn, S., Brandt, K., und Müller, V. (2015) A low phosphorylation potential in the acetogen *Acetobacterium woodii* reflects its lifestyle at the thermodynamic edge of life. *Arch. Microbiol.* **197**: 745-751.
- Spormann, A.M., und Thauer, R.K. (1988) Anaerobic acetate oxidation to CO₂ by *Desulfotomaculum acetoxidans* - demonstration of enzymes required for the operation of an oxidative acetyl-CoA/carbon monoxide dehydrogenase pathway. *Arch. Microbiol.* **150**: 374-380.
- Spruth, M., Reidlinger, J., und Müller, V. (1995) Sodium ion dependence of inhibition of the Na⁺-translocating F₁F_o-ATPase from *Acetobacterium woodii*. Probing the site(s) involved in ion transport. *Biochim. Biophys. Acta* **1229**: 96-102.
- Srinivasan, S., Vyas, N.K., Baker, M.L., und Quioco, F.A. (2011) Crystal structure of the cytoplasmic N-terminal domain of subunit I, a homolog of subunit a, of V-ATPase. *J. Mol. Biol.* **412**: 14-21.
- Stupperich, E., Hammel, K.E., Fuchs, G., und Thauer, R.K. (1983) Carbon monoxide fixation into the carboxyl group of acetyl Coenzyme A during autotrophic growth of *Methanobacterium*. *FEBS Lett.* **152**: 21-23.
- Suzuki, T., Murakami, T., Iino, R., Suzuki, J., Ono, S., Shirakihara, Y., und Yoshida, M. (2003) F_oF₁-ATPase/synthase is geared to the synthesis mode by conformational rearrangement of ε subunit in response to proton motive force and ADP/ATP balance. *J. Biol. Chem.* **278**: 46840-46846.
- Tani, M., Higashi, T., und Nagatsuka, S. (1993) Dynamics of low-molecular-weight aliphatic carboxylic-acids (LACAs) in forest soils. I. Amount and composition of lacas in different types of forest soils in Japan. *Soil Sci. Plant Nutr.* **39**: 485-495.
- Tanner, R.S., Miller, L.M., und Yang, D. (1993) *Clostridium ljungdahlii* sp. nov., an acetogenic species in clostridial rRNA homology Group-I. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**: 232-236.
- Teague, W.E., Jr., und Dobson, G.P. (1999) Thermodynamics of the arginine kinase reaction. *J. Biol. Chem.* **274**: 22459-22463.
- Tersteegen, A., und Hedderich, R. (1999) *Methanobacterium thermoautotrophicum* encodes two multisubunit membrane-bound [NiFe] hydrogenases. Transcription of the operons and sequence analysis of the deduced proteins. *Eur. J. Biochem.* **264**: 930-943.
- Thauer, R.K., Jungermann, K., und Decker, K. (1977) Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol. Rev.* **41**: 100-180.

- Toei, M., Gerle, C., Nakano, M., Tani, K., Gyobu, N., Tamakoshi, M. *et al.* (2007) Dodecamer rotor ring defines H⁺/ATP ratio for ATP synthesis of prokaryotic V-ATPase from *Thermus thermophilus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**: 20256-20261.
- Traunecker, J., Preuss, A., Diekert, G., und Preuss, A. (1991) Isolation and characterization of a methyl chloride utilizing, strictly anaerobic bacterium. *Arch. Microbiol.* **156**: 416-421.
- Tremblay, P.L., Høglund, D., Koza, A., Bonde, I., und Zhang, T. (2015) Adaptation of the autotrophic acetogen *Sporomusa ovata* to methanol accelerates the conversion of CO₂ to organic products. *Sci. Rep.* **5**: 16168.
- Turina, P. (1994) Influence of the transmembrane electrochemical proton gradient on catalysis and regulation of the H⁺-ATP synthase from *Rhodobacter capsulatus*. *Bioelectrochem. Bioenerg.* **33**: 31-43.
- Valiyaveetil, F.I., und Fillingame, R.H. (1997) On the role of Arg-210 and Glu-219 of subunit *a* in proton translocation by the *Escherichia coli* F₀F₁-ATP synthase. *J. Biol. Chem.* **272**: 32635-32641.
- van de Vossenberg, J.L., Ubbink-Kok, T., Elferink, M.G., Driessen, A.J., und Konings, W.N. (1995) Ion permeability of the cytoplasmic membrane limits the maximum growth temperature of bacteria and archaea. *Mol. Microbiol.* **18**: 925-932.
- Visser, M., Pieterse, M.M., Pinkse, M.W., Nijssen, B., Verhaert, P.D., de Vos, W.M. *et al.* (2016) Unravelling the one-carbon metabolism of the acetogen *Sporomusa* strain An4 by genome and proteome analysis. *Environ. Microbiol.* **18**: 2843-2855.
- von Ballmoos, C., Cook, G.M., und Dimroth, P. (2008) Unique rotary ATP synthase and its biological diversity. *Annu. Rev. Biophys.* **37**: 43-64.
- von Ballmoos, C., Wiedenmann, A., und Dimroth, P. (2009) Essentials for ATP synthesis by F₁F₀ ATP synthases. *Annu. Rev. Biochem.* **78**: 649-672.
- Vonck, J., Pisa, K.Y., Morgner, N., Brutschy, B., und Müller, V. (2009) Three-dimensional structure of A₁A₀ ATP synthase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* by electron microscopy. *J. Biol. Chem.* **284**: 10110-10119.
- Wada, T., Long, J.C., Zhang, D., und Vik, S.B. (1999) A novel labeling approach supports the five-transmembrane model of subunit *a* of the *Escherichia coli* ATP synthase. *J. Biol. Chem.* **274**: 17353-17357.
- Wallace, P.G., Pedler, S.M., Wallace, J.C., und Berry, M.N. (1994) A method for the determination of the cellular phosphorylation potential and glycolytic intermediates in yeast. *Anal. Biochem.* **222**: 404-408.
- Wang, S., Huang, H., Kahnt, J., Müller, A.P., Köpke, M., und Thauer, R.K. (2013) NADP-specific electron-bifurcating [FeFe]-hydrogenase in a functional

- complex with formate dehydrogenase in *Clostridium autoethanogenum* grown on CO. *J. Bacteriol.* **195**: 4373-4386.
- Wang, Y., Cipriano, D.J., und Forgac, M. (2007) Arrangement of subunits in the proteolipid ring of the V-ATPase. *J. Biol. Chem.* **282**: 34058-34065.
- Watt, I.N., Montgomery, M.G., Runswick, M.J., Leslie, A.G., und Walker, J.E. (2010) Bioenergetic cost of making an adenosine triphosphate molecule in animal mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**: 16823-16827.
- Weber, J. (2007) ATP synthase - the structure of the stator stalk. *Trends Biochem. Sci.* **32**: 53-56.
- Weber, J., und Senior, A.E. (2003) ATP synthesis driven by proton transport in F₁F₀ ATP synthase. *FEBS Lett.* **545**: 61-70.
- Weghoff, M.C., Bertsch, J., und Müller, V. (2015) A novel mode of lactate metabolism in strictly anaerobic bacteria. *Environ. Microbiol.* **17**: 670-677.
- Westphal, L., Litty, D., und Müller, V. (2021) Functional production of an archaeal ATP synthase with a V-type c subunit in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **1862**: 148378.
- Wiechmann, A., und Müller, V. (2021) Energy conservation in the acetogenic bacterium *Clostridium acetivum*. *Microorganisms* **9**: 258.
- Wiechmann, A., Trifunović, D., Klein, S., und Müller, V. (2020) Homologous production, one-step purification, and proof of Na⁺ transport by the Rnf complex from *Acetobacterium woodii*, a model for acetogenic conversion of C1 substrates to biofuels. *Biotechnol. Biofuels* **13**: 208.
- Wiedenmann, A., Dimroth, P., und von Ballmoos, C. (2008) $\Delta\Psi$ and ΔpH are equivalent driving forces for proton transport through isolated F₀ complexes of ATP synthases. *Biochim. Biophys. Acta* **1777**: 1301-1310.
- Wiedenmann, A., Dimroth, P., und von Ballmoos, C. (2009) Functional asymmetry of the F₀ motor in bacterial ATP synthases. *Mol. Microbiol.* **72**: 479-490.
- Wierenga, R.K. (1936) Over het verdwijnen van waterstof en koolzuur onder anaerobe voorwaarden. *Antonie van Leeuwenhoek* **3**: 263-273.
- Wilkins, S., und Capaldi, R.A. (1992) Monomaleimidogold labeling of the gamma-subunit of the *Escherichia coli* F₁ ATPase examined by cryoelectron microscopy. *Arch. Biochem. Biophys.* **299**: 105-109.
- Wilkins, S., und Capaldi, R.A. (1998) Electron microscopic evidence of two stalks linking the F₁ and F₀ parts of the *Escherichia coli* ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta* **1365**: 93-97.
- Wilkins, S., und Forgac, M. (2001) Three-dimensional structure of the vacuolar ATPase proton channel by electron microscopy. *J. Biol. Chem.* **276**: 44064-44068.

- Wilms, R., Freiberg, C., Wegerle, E., Meier, I., Mayer, F., und Müller, V. (1996) Subunit structure and organization of the genes of the A₁A₀ ATPase from the archaeon *Methanosarcina mazei* Gö1. *J. Biol. Chem.* **271**: 18843-18852.
- Witt, H.T., Schlodder, E., und Gräber, P. (1976) Membrane-bound ATP synthesis generated by an external electrical field. *FEBS Lett.* **69**: 272-276.
- Wittig, I., Carrozzo, R., Santorelli, F.M., und Schägger, H. (2007) Functional assays in high-resolution clear native gels to quantify mitochondrial complexes in human biopsies and cell lines. *Electrophoresis* **28**: 3811-3820.
- Wohlfarth, G., Geerligs, G., und Diekert, G. (1990) Purification and properties of a NADH-dependent 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase from *Peptostreptococcus productus*. *Eur. J. Biochem.* **192**: 411-417.
- Wood, H.G. (1991) Life with CO or CO₂ and H₂ as a source of carbon and energy. *FASEB J.* **5**: 156-163.
- Wood, H.G., Ragsdale, S.W., und Pezacka, E. (1986) The acetyl-CoA pathway: a newly discovered pathway of autotrophic growth. *Trends Biochem. Sci.* **11**: 14-18.
- Yamamoto, I., Saiki, T., Liu, S.M., und Ljungdahl, L.G. (1983) Purification and properties of NADP-dependent formate dehydrogenase from *Clostridium thermoaceticum*, a tungsten-selenium-iron protein. *J. Biol. Chem.* **258**: 1826-1832.
- Yamamoto, K., Tamaki, H., Cadillo-Quiroz, H., Imachi, H., Kyrpides, N., Woyke, T. *et al.* (2014) Complete genome sequence of *Methanolinea tarda* NOBI-1T, a hydrogenotrophic methanogen isolated from methanogenic digester sludge. *Genome Announc.* **2**: e00876-00814.
- Yoshida, M., Muneyuki, E., und Hisabori, T. (2001) ATP synthase - a marvellous rotary engine of the cell. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2**: 669-677.
- Zhou, L., und Sazanov, L.A. (2019) Structure and conformational plasticity of the intact *Thermus thermophilus* V/A-type ATPase. *Science* **365**.
- Zubareva, V.M., Lapashina, A.S., Shugaeva, T.E., Litvin, A.V., und Feniouk, B.A. (2020) Rotary ion-translocating ATPases/ATP synthases: Diversity, similarities, and differences. *Biochem.* **85**: 1613-1630.

