

**Bindung des C₁-Carriers Tetrahydromethanopterin
und seiner Derivate an Enzyme des
Energistoffwechselweges methanbildender Archaeen**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Katharina Elisabeth Ceh
geb. Körner
aus Stuttgart

Frankfurt am Main 2009
(D 30)

vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Dieter Steinhilber

1. Gutachter: Prof. Dr. Bernd Ludwig

Institut für Molekulare Genetik

der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main

2. Gutachter: PD Dr. Ulrich Ermler

Max-Planck-Institut für Biophysik Frankfurt am Main

Datum der Disputation: 10. Juli 2009

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine weiteren Hilfsmittel und Quellen als die hier aufgeführten verwendet habe.

Katharina Ceh

Frankfurt am Main

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von September 2005 bis Februar 2009 unter Anleitung von PD Dr. Ulrich Ermler am Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt am Main in der Abteilung Molekulare Membranbiologie durchgeführt.

VERÖFFENTLICHUNGEN

Ceh, K., Demmer, U., Warkentin, E., Moll, J., Thauer, R. K., Shima, S. and Ermler, U. (2009) Structural basis of the hydride transfer mechanism in F(420)-dependent methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase, *Biochemistry* 48, 10098-10105.

Posterbeitrag:

Körner, K., Demmer, U., Warkentin, E., Shima, S., Thauer, R. K., and Ermler, U. Structural characterization of tetrahydromethanopterin (H₄MPT) binding enzymes involved in the methanogenic energy metabolism.
Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie und der Gesellschaft für Biochemie und Molekularbiologie.
Frankfurt am Main, März 2008.

SUMMARY

The aim of this thesis was a structural characterization of the binding of tetrahydromethanopterin derivatives to enzymes of the energy conserving CO₂-reducing methanogenic pathway. In this pathway the stepwise reduction of CO₂ proceeds via binding to the tetrahydrofolate analog tetrahydromethanopterin (H₄MPT) which is found i. a. in methanogenic archaea. Due to the adaptation of the thermophilic and hyperthermophilic source organisms (*Methanothermobacter marburgensis*, *Methanocaldococcus jannaschii* and *Methanopyrus kandleri*) to their extreme habitats by genomic, structural and enzymatic features, they are of special interest for structural biology.

The first enzyme investigated in this thesis is the eight subunits containing membrane bound complex of N⁵-methyl-H₄MPT:coenzyme M methyltransferase (MtrA-H). Firstly, it catalyzes the methyl group transfer from H₄MPT to the Co(I) of the prosthetic group (5'-hydroxybenzimidazolylcobamide; vitamin B_{12a}). In a second step, it transfers the methyl group to coenzyme M, which is coupled to an energy conserving vectorial sodium ion transport across the membrane.

The purification protocol for Mtr complex from *M. marburgensis* (670 kDa) previously established under anaerobic conditions was enhanced, simplified for isolation and purification under aerobic conditions and optimized for electron microscopic single particle reconstruction. Besides the preparation of the complete complex MtrA-H, the preparation of enzyme complex MtrA-G without the most hydrophilic subunit MtrH was chosen as a second approach. The purification method developed for this purpose improved the control over dissociation of MtrH from complex MtrA-G and enhanced the homogeneity of the sample significantly. Thus, the prerequisites for crystallization and subsequent X-ray studies were created as well as for electron microscopic single particle reconstruction, which was confirmed by experiments with MtrA-G (without MtrH) promising far better results.

Concurrently to the studies on the complete Mtr complex, cobamide containing subunit MtrA and H₄MPT binding subunit MtrH should be purified to homogeneity in quantities sufficient for crystallization and X-ray analysis. Therefore, MtrA and MtrH from source organisms mentioned above were cloned for heterologous expression in *E. coli*, expression conditions were optimized and purification protocols were established. The purified proteins were used for extensive crystallization experiments.

MtrA from *M. jannaschii* without its transmembrane helix could be produced in *E. coli* as a soluble protein. The holoprotein could be purified to homogeneity but crystallization failed presumably due to its exceptionally high solubility. MtrA from *M. kandleri* was produced in *E. coli* as a *StrepII* fusion protein without transmembrane helix only in marginal amounts.

The production of subunit MtrH in *E. coli* as a soluble protein was not possible regardless of the variants tested in this thesis. Attempts to refold and purify to homogeneity the *M. marburgensis* protein expressed in inclusion bodies were without success. Co-expression of MtrA and MtrH with the objective of improving folding and solubility also led to the production of inclusion bodies which could not be refolded and purified together.

The second enzyme analyzed in this thesis, F₄₂₀-dependent N⁵,N¹⁰-methylene-H₄MPT dehydrogenase (Mtd), catalyzes the reversible stereospecific hydride transfer between reduced F₄₂₀ (F₄₂₀H₂) and methenyl-H₄MPT⁺, the latter being thereby reduced to methylene-H₄MPT. The ternary complex involved in this reaction consists of the protein part, substrate (methylene-H₄MPT) and co-substrate (F₄₂₀) and was structurally characterized in this thesis. The purified recombinant enzyme from *M. kandleri* was co-crystallized with several H₄MPT and F₄₂₀ derivatives, the structure of the ternary complex was determined by X-ray crystallography and the binding of H₄MPT and F₄₂₀ was analyzed. In the structure solved in the thesis methenyl-H₄MPT⁺ and F₄₂₀H₂ are bound in a catalytically active conformation, but a resolution of 1.8 Å precludes a discrimination between either methylene-H₄MPT and F₄₂₀ or methenyl-H₄MPT⁺ and F₄₂₀H₂. Compared to the structure of *M. kandleri* Mtd (KMtd) without substrate and co-substrate bound, only marginal variations of the protein conformation were visible. Thus KMtd can be considered as a surprising and extreme example of an enzyme with an exceptionally rigid, preformed binding pocket.

ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit sollte die Bindung von Tetrahydromethanopterinderivaten an zwei Enzyme des methanogenen, CO₂-reduzierenden Energiestoffwechselweges strukturell charakterisiert werden. In jenem Stoffwechselweg verläuft die schrittweise Reduktion von CO₂ über die Bindung an den C₁-Carrier Tetrahydromethanopterin (H₄MPT), ein Tetrahydrofolat-Analogon, welches unter anderem in methanogenen Archaeen zu finden ist. Die thermophilen bzw. hyperthermophilen Ursprungsorganismen der untersuchten Enzyme, *Methanothermobacter marburgensis*, *Methanocaldococcus jannaschii* und *Methanopyrus kandleri*, sind aufgrund ihrer Anpassung an extreme Habitate durch spezielle genomische, strukturelle und enzymatische Eigenschaften von strukturbiochemischem Interesse.

Beim ersten in dieser Arbeit untersuchten Enzym handelte es sich um den aus acht Untereinheiten bestehenden membrangebundenen N⁵-Methyl-H₄MPT:Coenzym M-Methyltransferasekomplex (MtrA-H). Dieser katalysiert in einem zweistufigen Mechanismus den Methyltransfer von H₄MPT zum Co(I) der prosthetischen Gruppe 5'-Hydroxybenzimidazolylcobamid (Vitamin B_{12a}), um die Methylgruppe dann auf Coenzym M zu übertragen. Gleichzeitig findet ein der Energiekonservierung dienender vektorielles Natriumtransport über die Membran statt.

Für den Mtr-Komplex aus *M. marburgensis* (apparentes Molekulargewicht: 670 kDa) lag bereits ein Protokoll zur Reinigung unter anaeroben Bedingungen vor. Dieses wurde im Rahmen dieser Arbeit verbessert, für die Isolierung und Reinigung unter aeroben Bedingungen vereinfacht und für die Erfordernisse der zur Strukturbestimmung verwendeten elektronenmikroskopischen Einzelpartikel-messung, welche von Frau Dr. Dilem Hizlan (Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt) durchgeführt wurde, optimiert. Neben der Präparation des kompletten Komplexes MtrA-H wurde als alternative Strategie die Präparation des Enzymkomplexes MtrA-G unter möglichst vollständiger Abtrennung der hydrophilsten Untereinheit MtrH gewählt. Mit der zu diesem Zweck entwickelten Methode konnte das Abdissoziieren von MtrH besser als im etablierten Protokoll kontrolliert und somit die Homogenität der Probe deutlich verbessert werden. Dies schafft zum einen die Voraussetzungen für eine Kristallisation zur Röntgenstrukturanalyse, zum anderen war auch in ersten Versuchen bei der elektronenmikroskopischen Einzelpartikel-messung erkennbar, dass mit dem Mtr-Komplex ohne MtrH bessere Ergebnisse zu erzielen sind.

Parallel zu den Untersuchungen am Gesamtkomplex sollten die den Cobamid-Cofaktor bindende Untereinheit MtrA sowie die H₄MPT-bindende Untereinheit MtrH in für die Kristallisation und röntgenkristallographische Untersuchung ausreichender Menge und Qualität gereinigt werden. Hierfür wurden MtrA und MtrH aus oben genannten Organismen für die heterologe Expression in *E. coli* kloniert, die Expressionsbedingungen optimiert und Reinigungsprotokolle etabliert. Anschließend wurden die Untereinheiten umfangreichen Kristallisationsversuchen unterzogen.

Die Untereinheit MtrA aus *M. jannaschii* konnte ohne die C-terminale Transmembranhelix als lösliches Protein in *E. coli* produziert und als Holoprotein bis zur Homogenität gereinigt werden. Zur Kristallisation kam es jedoch vermutlich aufgrund der außergewöhnlich guten Löslichkeit nicht. Bei *M. kandleri* MtrA gelang die Herstellung von geringen Mengen teilweise löslichen *StreptII*-Fusionsproteins ohne C-terminale Transmembranhelix in *E. coli*.

Eine Produktion der Untereinheit MtrH in *E. coli* als lösliches Protein war bei keiner der in dieser Arbeit getesteten Varianten möglich. Mit dem in Einschlusskörperchen exprimierten Protein aus *M. marburgensis* wurde eine Reinigung und Rückfaltung versucht, was jedoch nicht bis zur Homogenität gelang. Auch eine Co-Expression der Untereinheiten MtrA und MtrH, durch welche eine bessere Faltung und Löslichkeit erreicht werden sollte, war nur in Einschlusskörperchen möglich, deren gemeinsame Reinigung und Rückfaltung jedoch nicht gelang.

Das zweite in dieser Arbeit untersuchte Enzym, die F₄₂₀-abhängige N⁵,N¹⁰-Methylen-H₄MPT-Dehydrogenase (Mtd), katalysiert den reversiblen, stereospezifischen Hydrid-Transfer zwischen reduziertem F₄₂₀ (F₄₂₀H₂) und Methenyl-H₄MPT⁺, welches hierbei zu Methylen-H₄MPT reduziert wird. Die Reaktion verläuft über einen ternären Komplex bestehend aus Protein, Substrat (Methylen-H₄MPT) und Cosubstrat (F₄₂₀), welcher strukturell charakterisiert werden sollte. Das gereinigte, rekombinante Enzym aus *M. kandleri* wurde mit verschiedenen H₄MPT- und F₄₂₀-Derivaten co-kristallisiert, die Struktur des ternären Komplexes röntgenkristallographisch bestimmt und die Bindung von H₄MPT und F₄₂₀ analysiert. Methenyl-H₄MPT⁺ und F₄₂₀H₂ sind in der in dieser Arbeit gelösten Kristallstruktur in katalytisch aktiver Konformation gebunden, jedoch kann bei einer Auflösung von 1,8 Å nicht beurteilt werden, ob Methylen-H₄MPT und F₄₂₀ oder Methenyl-H₄MPT⁺ und F₄₂₀H₂ vorlagen. Ein Vergleich mit der Struktur von *M. kandleri*-Mtd (KMtd) ohne Substrat und Cosubstrat ergab nur äußerst geringe Abweichungen in der Proteinkonformation, sodass sich KMtd überraschenderweise als Beispiel für ein Enzym mit ungewöhnlich starrer, vorgegebener Bindetasche erwies.

INHALT

Abkürzungen	VI
Abbildungen	VIII
Gleichungen	IX
Tabellen	X
1 Einleitung	
1.1 Methanogene Archaeen	1
1.2 Der C ₁ -Carrier Tetrahydromethanopterin (H ₄ MPT)	4
1.3 Die N ⁵ -Methyl-H ₄ MPT:Coenzym M-Methyltransferase (Mtr)	4
1.4 Die F ₄₂₀ -abhängige N ⁵ ,N ¹⁰ -Methylen-H ₄ MPT-Dehydrogenase (Mtd)	9
1.5 Ziel der Arbeit	13
2 Material	
2.1 Computerprogramme	14
2.2 Geräte und Chemikalien	15
2.2.1 Allgemeine Geräte	15
2.2.2 Molekularbiologischen Arbeiten	15
2.2.3 Bakterienkultivierung	16
2.2.4 Proteinpräparation	16
2.2.5 PAGE	16
2.2.6 Chromatographie	16
2.2.7 Säulen/-materialien	17
2.2.8 Elektrobotten	18
2.2.9 Kristallisation	18
2.2.10 Kristallisationskits	18
2.2.11 Röntgenographischen Methoden	18
2.2.12 Chemikalien	19
2.2.13 Enzyme, Proteine, Vergleichsstandards und Antikörper	20
2.2.14 Kits	21
2.2.15 Verbrauchsmaterialien	21
2.3 Plasmide	21
2.4 Mikroorganismen und Medien	22
2.4.1 Archaeen-Stämme	22
2.4.2 <i>Escherichia coli</i> -Stämme	22
2.4.3 Medien und Agarplatten	23
3 Methoden	
3.1 Planung der Vektorkonstrukte	24
3.2 Molekularbiologischen Methoden	26
3.2.1 Extraktion und Reinigung genomischer DNA aus Archaeen-Zellen	26
3.2.2 Herstellung künstlicher DNA-Fragmente mittels PCR	26
3.2.3 Restriktionsspaltung, Dephosphorylierung und Ligation von DNA	28
3.2.4 Herstellung von kompetenten E. coli-Zellen und Transformation	29
3.2.5 Plasmidpräparation	30
3.2.6 Agarosegelelektrophorese	30
3.2.7 Aufreinigung von DNA	30
3.2.8 Bestimmung von DNA-Konzentration und -Reinheit	30
3.2.9 Sequenzierung	31

3.3 Kultivierung von Bakterien	32
3.3.1 Bestimmung der Zelldichte	32
3.3.2 Kultivierung für die Plasmidpräparation	32
3.3.3 Kultivierung für die Proteinproduktion	32
3.3.4 Expressionstest und Optimierung der Proteinexpression	34
3.4 Proteinbiochemische Methoden	35
3.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration	35
3.4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)	35
3.4.3 Blaue Native Polyacrylamidgelelektrophorese (BN-Page)	36
3.4.4 Elektrophoretischer Proteintransfer und direkter ELISA (<i>Western Blot</i>)	37
3.4.5 Analytische Gelfiltration	37
3.4.6 Massenspektrometrie	38
3.5 Proteinreinigung	39
3.5.1 Membranpräparation aus <i>M. marburgensis</i> -Zellen	39
3.5.2 Isolierung und Reinigung des Mtr-Komplexes aus <i>M. marburgensis</i>	40
3.5.3 Reinigung von rekombinatem <i>M. marburgensis</i> MtrH (MMRMtrH)	42
3.5.4 Reinigung von rekombinatem des-[225-246]-MtrA (MJMtrA3) aus <i>M. jannaschii</i>	43
3.5.5 Reinigung und Rückfaltung von co-exprimierten des-[225-246]-MtrA und MtrH (MJMtrA3 + MJMtrH) aus <i>M. jannaschii</i>	44
3.5.6 Reinigung von rekombinatem des-[238-252]-MtrA mit C-terminalem <i>StreptII</i> -Anhängsel (MKMtrA) aus <i>M. kandleri</i>	45
3.5.7 Reinigung von rekombinanter F ₄₂₀ -abhängiger N ⁵ ,N ¹⁰ -Methylen tetrahydromethanopterin-Dehydrogenase (Mtd) aus <i>M. kandleri</i>	45
3.6 Röntgenkristallographische Methoden	46
3.6.1 Kristallisation	46
3.6.2 Datensammlung und –prozessierung	47
3.6.3 Lösung des Phasenproblems	48
3.6.4 Modellbau und Verfeinerung	49
3.6.5 Validierung von Proteinstrukturen	49
3.6.6 Strukturdarstellung	50
3.7 Elektronenmikroskopische Einzelpartikelmessung	50
3.7.1 Probenvorbereitung	50
3.7.2 Datensammlung und –prozessierung	51
3.7.3 Datenanalyse und Rekonstruktion	51
4 Ergebnisse	
4.1 Planung und Herstellung der Vektorkonstrukte	52
4.1.1 Sekundärstrukturanalyse zur Planung der Konstrukte MJmtrA1, MJmtrA2 und MJmtrA3	52
4.1.2 Sequenzvergleich zur Planung der Konstrukte MKmtrH1 und MKmtrH	52
4.1.3 Herstellung der Vektorkonstrukte	53
4.2 Der N⁵-Methyl-H₄MPT:Coenzym M-Methyltransferasekomplex aus <i>M. marburgensis</i>	54
4.2.1 Isolierung und Reinigung	54
4.2.2 Charakterisierung	59
4.2.3 Kristallisation	63
4.2.4 Elektronenmikroskopische Einzelpartikelmessung	63
4.3 Ergebnisse der heterologen Expression der Untereinheiten MtrA und MtrH	67

4.4 Rekombinantes des-[225-246]-MtrA (MJMtrA3) aus <i>M. jannaschii</i>	69
4.4.1 Reinigung	69
4.4.2 Charakterisierung	70
4.4.3 Kristallisation	71
4.5 Rekombinantes des-[238-252]-MtrA mit C-terminalem Streptococcus-Affinitätspeptid (MKMtrA) aus <i>M. kandleri</i>	72
4.6 Rekombinantes <i>M. marburgensis</i> MtrH (MMRMtrH)	74
4.7 Co-Expression und gemeinsame Reinigung von des-[225-246]-MtrA und MtrH (MJMtrA3+MJMtrH) aus <i>M. jannaschii</i>	75
4.8 Die F₄₂₀-abhängige N⁵,N¹⁰-Methylen-H₄MPT-Dehydrogenase (KMtd) aus <i>M. kandleri</i>	77
4.8.1 Co-Kristallisation von KMtd mit H ₄ MPT-Derivaten und F ₄₂₀	77
4.8.2 Strukturlösung	78
4.8.3 Strukturbeschreibung	80
5 Diskussion	
5.1 Der N⁵-Methyl-H₄MPT:Coenzym M-Methyltransferasekomplex aus <i>M. marburgensis</i>	88
5.1.1 Isolierung und Reinigung des Mtr-Komplexes	88
5.1.2 Der oligomere Zustand des Mtr-Komplexes	89
5.1.3 Abtrennung der Untereinheit MtrH	90
5.1.4 Strukturbestimmung	91
5.2 Die Untereinheit MtrA des N⁵-Methyl-H₄MPT:CoM-Methyltransferasekomplexes	92
5.2.1 Heterologe Expression in <i>E. coli</i>	92
5.2.2 Des-[225-246]-MtrA (MJMtrA3) aus <i>M. jannaschii</i>	93
5.2.3 Des-[238-252]-MtrA (MKMtrA) aus <i>M. kandleri</i>	94
5.3 Die Untereinheit MtrH des N⁵-Methyl-H₄MPT:CoM-Methyltransferasekomplexes	95
5.3.1 Heterologe Expression von <i>mtrH</i>	95
5.3.2 Rekombinantes MtrH (MMRMtrH) aus <i>M. marburgensis</i>	96
5.4 Die F₄₂₀-abhängige N⁵,N¹⁰-Methylen-H₄MPT-Dehydrogenase (KMtd) aus <i>M. kandleri</i>	97
5.4.1 Die Bindung von H ₄ MPT und F ₄₂₀ an KMtd	97
5.4.2 Die Hydrid-Transferreaktion	99
5.5 Ausblick	101
6 Literatur	103
7 Anhang	113

ABKÜRZUNGEN

A_λ	Absorbanz bei Wellenlänge λ
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure(rest)
AU	<i>absorption units</i> (Absorptionseinheiten)
bp	<i>base pairs</i> (Basenpaare)
BSA	Rinderserumalbumin
Cam	Chloramphenicol
Carb	Carbenicillin
Co-M//Co-M-SH	Coenzym M/reduziertes Coenzym M
CV	<i>column volume</i> (Säulenvolumen)
Da	Dalton
deion.	deionisiert
dest.	destilliert
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
FAD	Flavinadenindinukleotid
Fmd	Formylmethanofuran-Dehydrogenase
FOM	<i>figure of merit</i>
Frh	F ₄₂₀ -reduzierende Hydrogenase
Ftr	Formylmethanofuran:H ₄ MPT Formyltransferase
g	Erdbeschleunigung
Hmd	H ₂ -bildende Dehydrogenase
H ₄ MPT	5,6,7,8-Tetrahydromethanopterin
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare (1000 Basenpaare)
kDa	Kilodalton (1000 Dalton)
Lsg.	Lösung
M _r	Molekulargewicht
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption/ionisation time of flight</i>
Mch	Methenyl-H ₄ MPT-Cyclohydrolase
Mcr	Methyl-Coenzym M-Reduktase
Mer	Methylen-H ₄ MPT-Reduktase
Methenyl-H ₄ MPT ⁺	N ⁵ ,N ¹⁰ -Methenyl-5,6,7,8-Tetrahydromethanopterin
Methylen-H ₄ MPT	N ⁵ ,N ¹⁰ -Methylen-5,6,7,8-Tetrahydromethanopterin
MF	Methanofuran
min	Minuten
Mtd	F ₄₂₀ -abhängige N ⁵ ,N ¹⁰ -Methylen-H ₄ MPT-Dehydrogenase
Mtr	N ⁵ -Methyl-H ₄ MPT:Coenzym M Methyltransferase
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i> (Molekulares Ausschlussgewicht)
NCS	<i>non crystallographic symmetry</i> (nichtkristallographische Symmetrie)
OD/OD ₆₀₀	Optische Dichte (bei 600 nm)
p.a.	<i>pro analysis</i> (Reinheitsgrad für analytische Zwecke)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
RCSB	<i>Research collaboratory for Structural Bioinformatics</i> (Proteinstrukturdatenbank)
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SLS	<i>Swiss Light Source</i> (Synchrotron, Villigen, Schweiz)
U	Unit (μ mol umgesetzt Substrat pro Minute)
UE	Untereinheit

UV	Ultraviolettes Licht ($\lambda < 400 \text{ nm}$)
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	<i>weight per volume</i> (Gewicht pro Volumen)
ϵ	Extinktionskoeffizient

SI-Einheiten sind nicht aufgeführt. Abkürzungen für Chemikalien sind dem Chemikalienverzeichnis (Abschnitt 2.2.12) zu entnehmen.

ABBILDUNGEN

- 1.1: Der CO₂-reduzierende methanogene Stoffwechselweg in Methanobakterien, *Methanococci* und *Methanopyrales* und seine energiekonservierenden Kopplungsstellen. Seite 3
- 1.2: Tetrahydromethanopterin (H₄MPT) und sein Strukturanalogon Tetrahydrofolat (H₄F). Seite 5
- 1.3: Die Cofaktoren N⁵-Methyl-H₄MPT und Methyl-Coenzym M der N⁵-Methyl-H₄MPT:Coenzym M-Methyltransferase (Mtr). Seite 6
- 1.4: Cofaktor 5'-Hydroxybenzimidazolylcobamid (Vitamin B_{12a}) der N⁵-Methyl-H₄MPT:Coenzym M-Methyltransferase (Mtr). Seite 7
- 1.5: Zweidimensionales Modell der N⁵-Methyl-H₄MPT:Coenzym M-Methyltransferase (Mtr). Seite 8
- 1.6: Die von der F₄₂₀-abhängigen N⁵,N¹⁰-Methylen-H₄MPT-Dehydrogenase (Mtd) katalysierte, stereogene Reaktion. Seite 10
- 1.7: Die Domänenstruktur eines Monomers der F₄₂₀-abhängigen N⁵,N¹⁰-Methylen-H₄MPT-Dehydrogenase (Mtd) aus *M. kandleri*. Seite 11
- 1.8: *Ribbon*-Diagramm der Homohexamerstruktur von Mtd mit Blick in Richtung der dreifachen Achse. Seite 12
- 1.9: Die Helices α8 und α9 der sechs Monomere bilden ein um die dreifache Achse arrangiertes Bündel aus zwölf Helices. Seite 12
- 3.1: Übersicht über die Reinigung des Mtr-Komplexes aus *M. marburgensis*. Seite 41
- 4.1: Sequenzvergleich der Untereinheit MtrH der N⁵-Methyl-H₄MPT:Coenzym M-Methyltransferase (MtrH) aus *M. marburgensis* (MMR), *M. jannaschii* (MJ) und *M. kandleri* (MK) mit der Pterin bindenden 5-Methyltetrahydrofolat Corrinoideisen-Schwefel-Protein Methyltransferase aus *Moorella thermoacetica* (Q46389_MOOTH). Seite 53
- 4.2: Elutionsprofile und Coomassie-gefärbte SDS-Pages der zugehörigen Fraktionen der Ionenaustauschchromatographie auf DEAE-Sepharose des vollständigen Komplexes MtrA-H und des Komplexes MtrA-G ohne die 34 kDa-Untereinheit MtrH. Seite 56
- 4.3: Elutionsprofile und Coomassie-gefärbte SDS-Pages der zugehörigen Fraktionen der Ionenaustauschchromatographie auf Q-Sepharose der Mtr-Komplexe mit und ohne Untereinheit MtrH. Seite 57
- 4.4: Elutionsprofile und Coomassie-gefärbte SDS-Pages nach der Gelfiltration der Mtr-Komplexe mit und ohne Untereinheit MtrH auf Superose 6. Seite 58
- 4.5: Coomassie-gefärbte Blaue Native Page zur Molekulargewichtsbestimmung des Gesamtkomplexes MtrA-H. Seite 60
- 4.6: *Western Blot* mit Anti-*M. marburgensis* MtrH-Antikörpern nach Auftrennung der Untereinheiten der gereinigten Mtr-Komplexe mit und ohne Untereinheit MtrH auf einem 12 %-igen SDS-Gel. Seite 62
- 4.7: a) Elektronenmikroskopische Aufnahme des Mtr-Komplexes nach Negativfärbung mit 1 % Uranylacetat. Seite 64
b) Unter *Cryo*-Bedingungen entstandener Mikrograph des Mtr-Komplexes.
- 4.8: a) Iterative Berechnung der Struktur des Mtr-Komplexes. Seite 66
b) Oberflächendarstellung eines Strukturmodells des Mtr-Komplexes.
- 4.9: Gelfiltrationschromatogramm und Coomassie-gefärbte SDS-Page mit Proben der Produktion in *E. coli* und Reinigung von rekombinantem *M. jannaschii* des-[225-246]-MtrA (MJMtrA3). Seite 69
- 4.10: Elutionsprofil der Rechromatographie auf Superdex 200 von bereits durch Gelfiltration gereinigtem MJMtrA3. Seite 70

- 4.11: Coomassie-gefärbte SDS-Page und Aminosäuresequenz von *M. jannaschii* MtrA. Seite 71
- 4.12: Western Blot mit Anti-StrepII-Antikörpern von Proben der Expression in *E. coli* und Reinigung auf Strep-Tactin® von des-[238-252]MtrA mit C-terminalem StrepII-Affinitätspeptid aus *M. kandleri* (MKMtrA). Seite 73
- 4.13: Coomassie-gefärbte SDS-Page mit Proben der Produktion in *E. coli* und Reinigung von rekombinantem *M. marburgensis* MtrH (MMRMtrH). Seite 74
- 4.14: Gelfiltrationschromatogramm und Coomassie-gefärbte SDS-Page mit Proben der Co-Expression in *E. coli* und gemeinsamen Reinigung von *M. jannaschii* des-[225-246]-MtrA und MtrH (MJMtrA3 + MJMtrH). Seite 76
- 4.15: Kristalle von KMtd im Komplex mit dem Substrat Methylen-H₄MPT und dem Cosubstrat F₄₂₀. Seite 78
- 4.16: Übersicht der Bindetasche von Methylen-H₄MPT und F₄₂₀. Seite 81
- 4.17: Verknüpfung des Pterin-Imidazolidin-Phenyl-Ringsystems von Methylen-H₄MPT (grau) mit dem Proteininneren und dem Gegenmonomer. Seite 82
- 4.18: Wasserstoffbrückenbindungen und van-der-Waals-Kontakte zwischen Aminosäureresten in der Bindetasche von KMtd und dem Pterin-, Imidazolidin- und Phenylring von Methylen-H₄MPT. Seite 84
- 4.19: Die aromatischen Ringe von Methylen-H₄MPT befindet sich annähernd in einer Ebene. Seite 85
- 4.20: a) F₄₂₀ mit Wasserstoffbrückenbindungen und van-der-Waals-Kontakten zu relevanten Aminosäureresten in der Bindetasche. Seite 86
b) Der Deazaisoalloxazinring von F₄₂₀ liegt in einer gebogenen Konformation (*Butterfly*-Konformation) vor.
- 4.21: a) Der Deazaisoalloxazinring von F₄₂₀ und das Benzyl-Imidazolidin-Pyrazin-Ringsystem von Methylen-H₄MPT sind rechtwinklig zueinander angeordnet, sodass der zentrale Pyridinring von F₄₂₀ versetzt über dem Imidazolidinring von Methylen-H₄MPT zu liegen kommt. Seite 87
b) Der Imidazolidinring von Methylen-H₄MPT ist parallel, jedoch verschoben zum Deazaisoalloxazinring von F₄₂₀ orientiert.

GLEICHUNGEN

- 1.1: Zweistufiger Mechanismus der durch MtrA-H katalysierten Methyltransferreaktion von Methyl-H₄MPT zu Coenzym M. Seite 6
- 1.2: Zweistufiger Mechanismus der durch MtrA-H katalysierten Methyltransferreaktion von Methyl-H₄MPT zu Coenzym M. Seite 6
- 3.1: Proportionalität von Flugzeit, Masse und Ladung bei der Flugzeitmassen-Analyse (MALDI-TOF). Seite 39
- 3.2: Berechnung des Matthews-Koeffizienten V_M eines Proteinkristalls. Seite 48
- 3.3: Berechnung des Solvensgehaltes V_{Solv} eines Proteinkristalls. Seite 48
- 3.4: Berechnung der Patterson-Funktion $P(uvw)$ aus den Quadraten der Strukturfaktoramplituden $F(hkl)$. Seite 48
- 3.5: Berechnung von R_{cryst} einer Kristallstruktur. Seite 49
- 3.6: Berechnung von R_{free} einer Kristallstruktur. Seite 50

TABELLEN

2.1:	In dieser Arbeit verwendete Computerprogramme.	Seite 14
2.2:	Parameter der verwendeten Chromatographiesäulen.	Seite 17
2.3:	In dieser Arbeit eingesetzte Plasmide.	Seite 21
2.4:	In dieser Arbeit verwendete Archaeen-Stämme.	Seite 22
2.5:	In dieser Arbeit verwendete <i>E. coli</i> -Stämme.	Seite 22
3.1:	In dieser Arbeit verwendete Vektorkonstrukte.	Seite 25
3.2:	Übersicht über die durchgeführten PCR-Reaktionen.	Seite 27
3.3:	Temperaturprogramme für PCR-Reaktionen von MJMtrH und MJMtrA1.	Seite 27
3.4:	Temperaturprogramme für PCR-Reaktionen von MJMtrA2 und MJMtrA3.	Seite 27
3.5:	Übersicht über die Plasmidherstellung.	Seite 29
3.6:	Für Sequenzierungsreaktionen verwendete Primer.	Seite 31
3.7:	Übersicht über die zur Proteinexpression verwendeten Plasmide und <i>E. coli</i> -Stämme.	Seite 33
3.8:	Für die Kristallisation verwendete Proteinlösungen.	Seite 46
4.1:	Übersicht über das mit verschiedenen Methoden bestimmte Molekulargewicht des Gesamtkomplexes MtrA-H.	Seite 59
4.2:	Übersicht über die verschiedenen Methoden und Pufferbedingungen zur Abtrennung der Untereinheit MtrH vom gereinigten Gesamtkomplex.	Seite 61
4.3:	Übersicht über die Ergebnisse der durchgeführten Expressionsversuche der rekombinanten Untereinheiten MtrA und MtrH des Mtr-Komplexes.	Seite 68
4.4:	Zusammensetzung der selbst entwickelten <i>Screens</i> für die Proteinkristallisation.	Seite 72
4.5:	Kristallisationsbedingungen für die Co-Kristallisation von KMtd mit Methylen-H ₄ MPT und F ₄₂₀ .	Seite 77
4.6:	Parameter und Statistiken des Datensatzes des ternären Komplexes aus KMtd mit Methylen-H ₄ MPT und F ₄₂₀ .	Seite 78
4.7:	Verfeinerungstatistik des ternären Komplexes aus KMtd mit Methylen-H ₄ MPT und F ₄₂₀ .	Seite 79

1 Einleitung

1.1 Methanogene Archaeen

Archaeen bilden neben Bakterien und Eukaryoten die dritte Domäne des Lebens und werden weiter in Crenarchaeota und Euryarchaeota, zu welchen auch die methanbildenden Archaeen gehören, unterteilt (1). *Methanothermobacter marburgensis* wurde aus Klärschlamm isoliert und gilt mit einem pH- und Temperaturoptimum von 7 bzw. 65°C als thermophil (2-5). *Methanocaldococcus jannaschii* dagegen ist ein hyperthermophiles methanogenes Archaeon und kommt natürlicherweise in hydrothermalen Tiefseequellen (Weißer Raucher) bei 48-94°C, 200 atm, einem pH-Wert von 5,2-7,0 und bei einem eher moderaten Salzgehalt von 1,0-5,0 % vor (6, 7). *Methanopyrus kandleri* ist nicht nur ein extrem hyperthermophiles sondern ebenso ein stark halophiles Archaeon, das mit einem Temperaturoptimum von 98°C und einem intrazellulären Salzgehalt von 1,1 M trianionischem cDPG (cyclisches 2,3-Diphosphoglycerat) sowie bis zu 3 M K⁺ an seinen Lebensraum in hydrothermalen Schloten angepasst ist (8, 9).

Alle hier beschriebenen Methanbildner sind gram-positive, obligate Anaerobier und kommen mit H₂ und CO₂ als alleiniger Energie- und Kohlenstoffquelle aus. Nicht nur die Anpassung an extreme Habitats durch spezielle genomische, strukturelle und enzymatische Eigenschaften ist aus struktureller Sicht interessant. Auch die Tatsache, dass jährlich ca. 1 Milliarde Tonnen des Treibhausgases Methan als Abbauprodukt organischen Materials z.B. im Boden unter Reisfeldern oder im Verdauungstrakt von Wiederkäuern durch methanogene Archaeen gebildet werden, machen diese im Hinblick auf die globale Erwärmung zu einem wichtigen Forschungsobjekt (10, 11).

Der CO₂-reduzierende energiekonservierende Stoffwechselweg, wie er in oben genannten Methanogenen ohne Cytochrom vorkommt, besteht aus zwölf Reaktionsschritten (siehe Abbildung 1.1) (12). Zunächst wird Kohlendioxid durch die Formylmethanofuran-Dehydrogenase (Fmd) an den C₁-Carrier Methanofuran (MF) gebunden und hierbei zu Formylmethanofuran reduziert. Fmd enthält Eisen-Schwefel-Cluster und Molybdopterin bzw. ein entsprechendes Wolfram-Analogon als prosthetische Gruppen (13, 14). Durch die Formylmethanofuran:H₄MPT-Formyltransferase (Ftr) wird die Formylgruppe im nächsten Schritt auf Tetrahydromethanopterin (H₄MPT), ein Tetrahydrofolat-Analogon und weiteren C₁-Carrier, weitergegeben (15, 16). Im dritten Schritt wird nun Formyl-H₄MPT von der

Methenyl-H₄MPT-Cyclohydrolase (Mch) in *N*⁵,*N*¹⁰-Methenyl-H₄MPT umgewandelt, welches als nächstes zu *N*⁵,*N*¹⁰-Methylen-H₄MPT reduziert wird (17). Diese Reaktion wird durch zwei Enzyme katalysiert, zum einen wie in Abschnitt 1.4 ausführlich beschrieben durch die F₄₂₀-abhängige Methylen-H₄MPT-Dehydrogenase (Mtd), zum anderen durch eine F₄₂₀-unabhängige, H₂-bildende Dehydrogenase (Hmd), welche ein mononukleares Eisenzentrum besitzt und einen Hydridtransfer katalysiert (18, 19). Danach wird *N*⁵,*N*¹⁰-Methylen-H₄MPT durch die Methylen-H₄MPT-Reduktase (Mer) mittels F₄₂₀H₂ weiter zu *N*⁵-Methyl-H₄MPT reduziert (20). Die Methylgruppe wird schließlich durch die Methyl-H₄MPT:Coenzyme M-Methyltransferase (Mtr) an den dritten C₁-Carrier Coenzym M abgegeben (siehe Abschnitt 1.3). Methyl-Coenzym M wird im letzten Schritt der Methanogenese durch die Methyl-Coenzym M-Reduktase (Mcr), welche das Nickelporphinoid F₄₃₀ als prosthetische Gruppe enthält, zu Methan reduziert, wobei Coenzym B als Reduktionsmittel dient und mit Coenzym M zum Heterodisulfid oxidiert wird (21).

Der Energiegewinn beim methanogenen Stoffwechselweg ist aufgrund des unter natürlichen Bedingungen relativ niedrigen Wasserstoffpartialdrucks von 1-10 Pa gering ($\Delta G'$ zwischen -17 und -40 kJ/mol) (22, 23). Eine umso wichtigere Rolle spielt die Energiekonservierung, welche über chemiosmotische Mechanismen durch die Translokation von Natriumionen erfolgt. Die membrangebundenen Komplexe der Methyl-H₄MPT:Coenzyme M-Methyltransferase (Mtr) (siehe Abschnitt 1.3) und der [NiFe]-Hydrogenasen Eha und Ehb sind hieran beteiligt. Letztere nutzen den elektrochemischen Na⁺-Gradienten (ionenmotorische Kraft) zur Reduktion von Ferredoxin, welches bei der endergonen Fmd-Reaktion wiederum als Reduktionsmittel dient (24, 25). Eha/Ehb spielt jedoch in Methanogenen ohne Cytochrom für die Reduktion von CO₂ zu Methan nur insofern eine Rolle, als dass die Kopplung der Ferredoxin- mit der CoM-CoB-Heterodisulfid-Reduktion vermutlich nicht ganz vollständig ist. Dagegen ist der aus der [NiFe]-Hydrogenase Mvh und der Heterodisulfidreductase Hdr bestehende Komplex (Mvh-Hdr), welcher die exergone Reduktion des CoM-CoB-Heterodisulfids mit der Ferredoxin-Reduktion in einer Elektronengabelreaktion koppelt, im Cytoplasma lokalisiert (12, 26). Des Weiteren besitzen methanogene Archaeen eine natriumionenpumpende A₁A₀-ATPase und einen Na⁺/H⁺-Antiporter (27, 28).

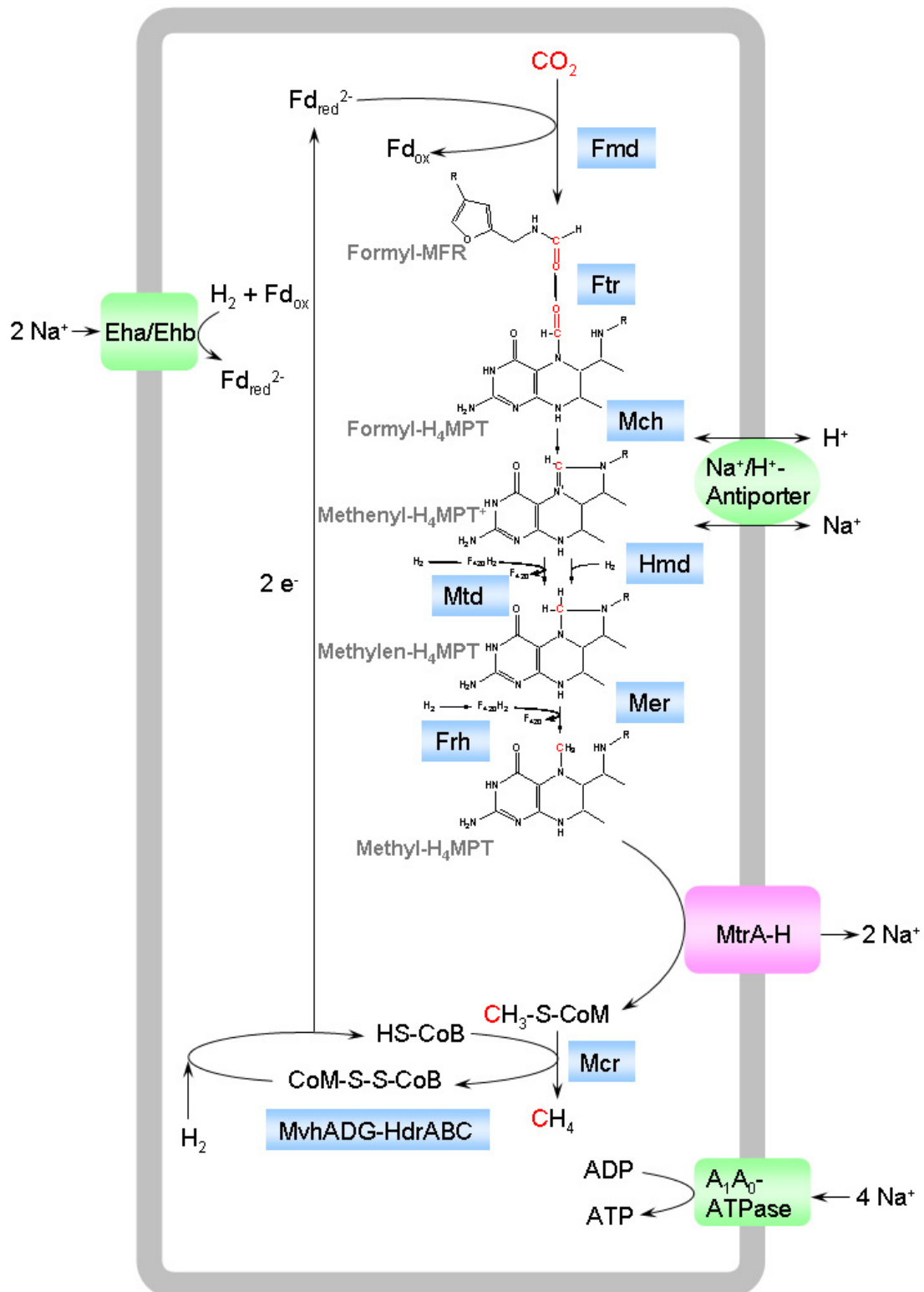


Abbildung 1.1: Der CO₂-reduzierende methanogene Stoffwechselweg in Methanobakterien, *Methanococci* und *Methanopyrales* und seine energiekonservierenden Kopplungsstellen. (nach Thauer *et al.* (12))

1.2 Der C₁-Carrier Tetrahydromethanopterin (H₄MPT)

Die Umwandlung von C₁-Einheiten zu Fumarat, Formaldehyd oder Methanol verläuft in methanogenen und Sulfat reduzierenden Archaeen, in vielen methylotrophen α -, β - und γ -Proteobakterien sowie in einigen *Planctomycetes* über Tetrahydromethanopterin (H₄MPT) (29-36), in allen anderen Organismen dagegen über Tetrahydrofolat (H₄F). H₄MPT und H₄F haben eine analoge Struktur (siehe Abbildung 1.2), jedoch besitzt H₄MPT an Position 1c eine elektronenspendende, mit dem aromatischen Ring und N¹⁰ konjugierte Methylgruppe, H₄F dagegen eine elektronenziehende Carbonylgruppe. Dementsprechend ist das Redox-Potential der Paare Methenyl-H₄MPT⁺/Methylen-H₄MPT mit -390 mV und Methylen-H₄MPT/Methyl-H₄MPT mit -310 mV um je ca. 100 mV negativer als das der entsprechenden Paare mit H₄F (37, 38).

Es liegen bereits einige Strukturen H₄MPT-bindender Enzyme vor, die der Formylmethanofuran:H₄MPT Formyltransferase (Ftr), der Methenyl-H₄MPT Cyclohydrolase (Mch), der F₄₂₀-abhängigen Methylen-H₄MPT-Dehydrogenase (Mtd), der H₂-bildende Methylen-H₄MPT-Dehydrogenase (Hmd), der F₄₂₀-abhängige Methylen-H₄MPT-Reductase (Mer) und der NADP-abhängige Methylen-H₄MPT-Dehydrogenase (MtdA) (39-44). Bisher konnten jedoch nur das H₄MPT-abhängige Formaldehyd-aktivierende Enzym (Fae) und die Formylmethanofuran:H₄MPT-Formyltransferase (Ftr) im Komplex mit H₄MPT oder einem seiner Derivate co-kristallisiert und röntgenkristallographisch beschrieben werden (45, 46). Darüber hinaus wurde die Konformation des an die H₂-bildende Methylen-H₄MPT-Dehydrogenase (Hmd) gebundene Methylen-H₄MPT durch zweidimensionale NMR-Spektroskopie bestimmt (47).

1.3 Die N⁵-Methyl-H₄MPT:Coenzym M-Methyltransferase (Mtr)

Primäre Natriumionenpumpen lassen sich in zwei Kategorien einteilen. Zur ersten werden z. B. ATP-abhängige Importer, Na⁺/H⁺-Antiporter und ATP-Synthasen gezählt. Zur zweiten Kategorie gehören Natriumionen translozierende Enzyme, die eine exergone Reaktion an den Aufbau eines elektrochemischen Gradienten koppeln. Dieser wiederum dient der Energiekonservierung und wird von anderen membrangebundenen Systemen (z. B. flagellaren Motoren, ATP-Synthasen, Permeasen) über chemiosmotische Mechanismen genutzt. Als Beispiele gelten die Methylmalonyl-CoA-Decarboxylase, die Glutaconyl-CoA-Decarboxylase, die Oxaloacetat-Decarboxylase und die Malonyl-CoA-Decarboxylase verschiedener

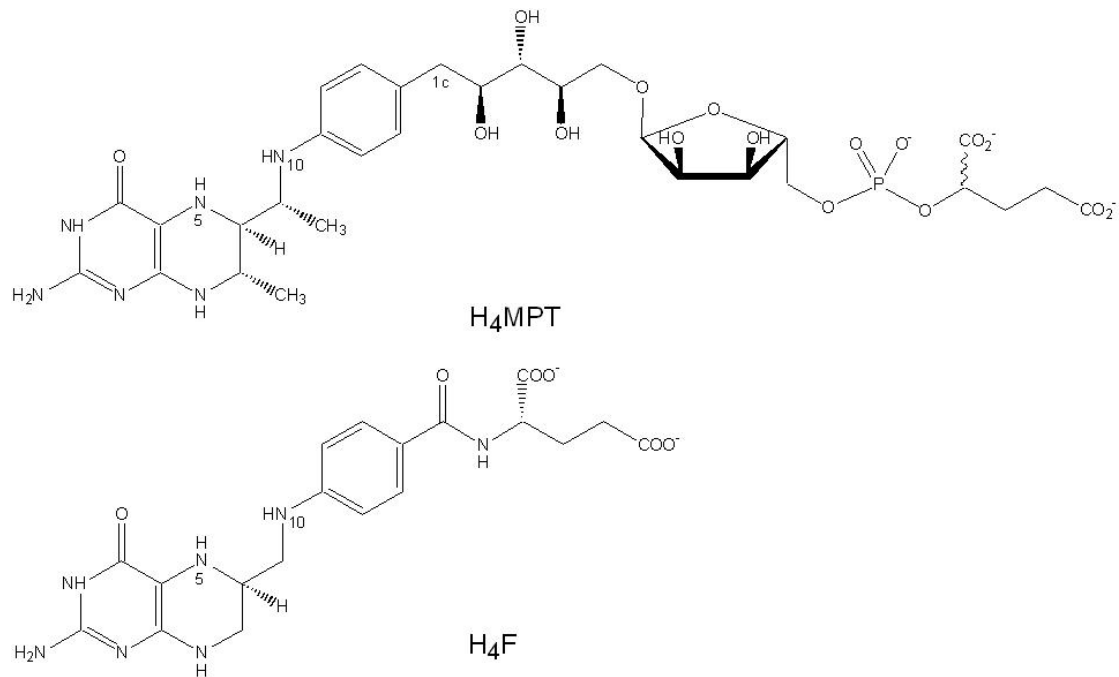
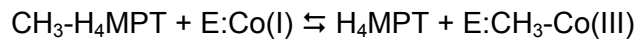


Abbildung 1.2: Tetrahydromethanopterin (H₄MPT) und sein Struktur analogon Tetrahydrofolat (H₄F).

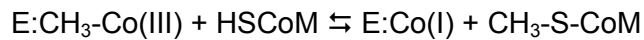
anaerober Bakterien, bei welchen der Na⁺-Transport auf Kosten der freien Decarboxylierungsenergie geschieht (48-50). Ähnlich wie bei der Methyl-H₄MPT:CoM-Methyltransferase (Mtr) (siehe unten) verläuft die Reaktion über einen zweistufigen Mechanismus, wobei der Carboxyltransfer in einer wasserlöslichen Untereinheit und die Decarboxylierungsreaktion in einem integralen Membranteil der Komplexe stattfindet. Ein weiteres Beispiel stellt die NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase aus marinen Bakterien sowie aus *Klebsiella pneumoniae* dar, bei der Na⁺ auf Kosten der freien Energie der Atmung transportiert wird (51-53).

Die für die N⁵-Methyl-H₄MPT:Coenzym M Methyltransferase (MtrA-H) codierende Transkriptionseinheit *mtrEDCBAFGH* findet sich universell in Methanogenen, so auch im Genom von *M. marburgensis*, *M. jannaschii* und *M. kandleri* (bei letzterem jedoch ohne *mtrF*) (6, 54, 55).

Der Gesamtkomplex besteht aus acht Untereinheiten (MtrA: 23 kDa, MtrB: 13 kDa, MtrC: 24 kDa, MtrE: 28 kDa, MtrF: 12 kDa, MtrG: 13 kDa und MtrH: 34 kDa) (54). Das Molekulargewicht wurde mittels Gelfiltration auf 670 kDa bestimmt, was für das Vorliegen eines Tetramer eines Heterooktamers spricht (56). Die durch MtrA-H katalysierte Reaktion, der Methyltransfer von Methyl-H₄MPT zu Coenzym M, verläuft über einen zweistufigen Mechanismus (57, 58):

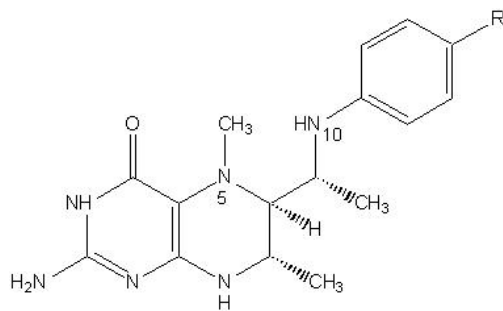


Gleichung 1.1



Gleichung 1.2

Hierbei wird die an den C₁-Carrier H₄MPT (siehe Abbildung 1.3) gebundene Methylgruppe zunächst auf das in der prosthetischen Gruppe 5'-Hydroxybenzimidazolylcobamid (Vitamin B_{12a}) (siehe Abbildung 1.4) enthaltene, enzymgebundene Co(I) übertragen, womit dieses zu Co(III) oxidiert wird (Gleichung 1.1). Im zweiten Reaktionsschritt geschieht dann der Transfer der Methylgruppe zu Coenzym M (siehe Abbildung 1.3 und Gleichung 1.2). Letzterer geht mit einem vektoriellen Natriumtransport über die Membran (1,7 Mol Na⁺ pro übertragenem Mol Methylgruppe) einher (59, 60).

*N*⁵-Methyl-H₄MPT

Methyl-Coenzym M

Abbildung 1.3: Die Cofaktoren *N*⁵-Methyl-H₄MPT und Methyl-Coenzym M der *N*⁵-Methyl-H₄MPT:Coenzym M-Methyltransferase (Mtr).

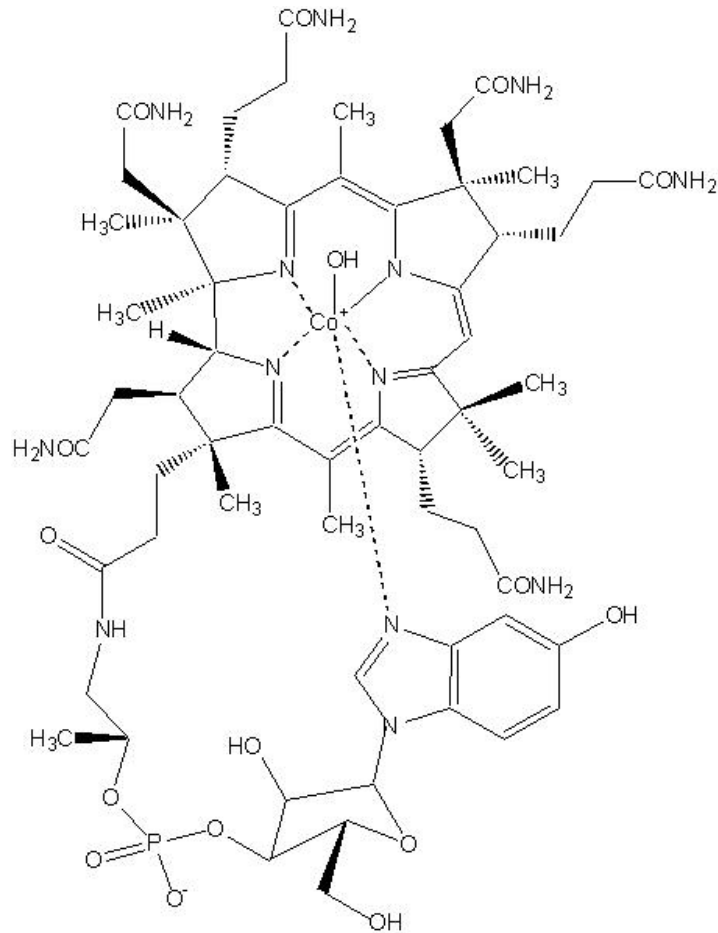


Abbildung 1.4: Cofaktor 5'-Hydroxybenzimidazolylcobamid (Vitamin B_{12a}) der N⁵-Methyl-H₄MPT:Coenzyme M-Methyltransferase (Mtr). Als axiale Liganden fungieren ein Hydroxyl- und ein 5'-Hydroxybenzimidazolylrest. Im gebundenen Zustand wird letzterer durch einen Histidinrest des Proteins ersetzt.

Laut Sekundärstrukturvorhersagen sind die hydrophobsten Untereinheiten MtrC, MtrD und MtrE integrale Membranproteine mit jeweils sieben (MtrC) bzw. sechs (MtrD und MtrE) Transmembranhelices. MtrA, MtrB, MtrF, und MtrG besitzen je eine Transmembranhelix, wogegen MtrH als hydrophilste Untereinheit vermutlich keinen Membrananker hat (54).

Nur die Funktionen und Eigenschaften der Untereinheiten MtrA, MtrH und MtrE sind teilweise bekannt. MtrA besitzt als zweithydrophilste Untereinheit eine C-terminale Transmembranhelix von 20 AS und enthält eine Corrinoid-Bindestelle, wobei His-84 die prosthetische Gruppe in *base-off/His-on*-Konfiguration bindet (55, 61-64). Vermutlich finden in Verbindung mit der Methylierung bzw. Demethylierung der Untereinheit Konformationsänderungen statt. Wie diese wiederum mit der Translokation von Natriumionen verknüpft sind, bleibt jedoch zu klären.

MtrH enthält keinen Membranteil und vermittelt wahrscheinlich den Methylgruppentransfer zum Cob(I)amid (65). Aufgrund dieser Annahme ist davon auszugehen, dass die Untereinheiten MtrA und MtrH zumindest während der Methylübertragung in engem Kontakt zueinander stehen müssen.

MtrE besitzt neben sechs Transmembranhelices einen großen, aus 62 AS bestehenden cytoplasmatischen *Loop*, welcher vermutlich eine Zink-Bindestelle enthält (66). Aufgrund des Aminosäurerestes Asp183 in der vierten Transmembranhelix wird angenommen, dass Untereinheit MtrE den Methyltransfer zu CoM und damit die Na^+ -abhängige Teilreaktion katalysiert (58). Eine vergleichbare Aspartatgruppe hat sich bei anderen Na^+ -translozierenden Enzymen bzw. in der C-Untereinheit der *E. coli*-ATPase als essenziell für die Natrium- bzw. Protonentranslokation erwiesen (67-69). Ein Modell, das den Wissensstand bezüglich Größe, Hydrophobizität, Topologie, Cofaktorgehalt und Funktionen der Untereinheiten einbezieht, ist in Abbildung 1.5 dargestellt (70).

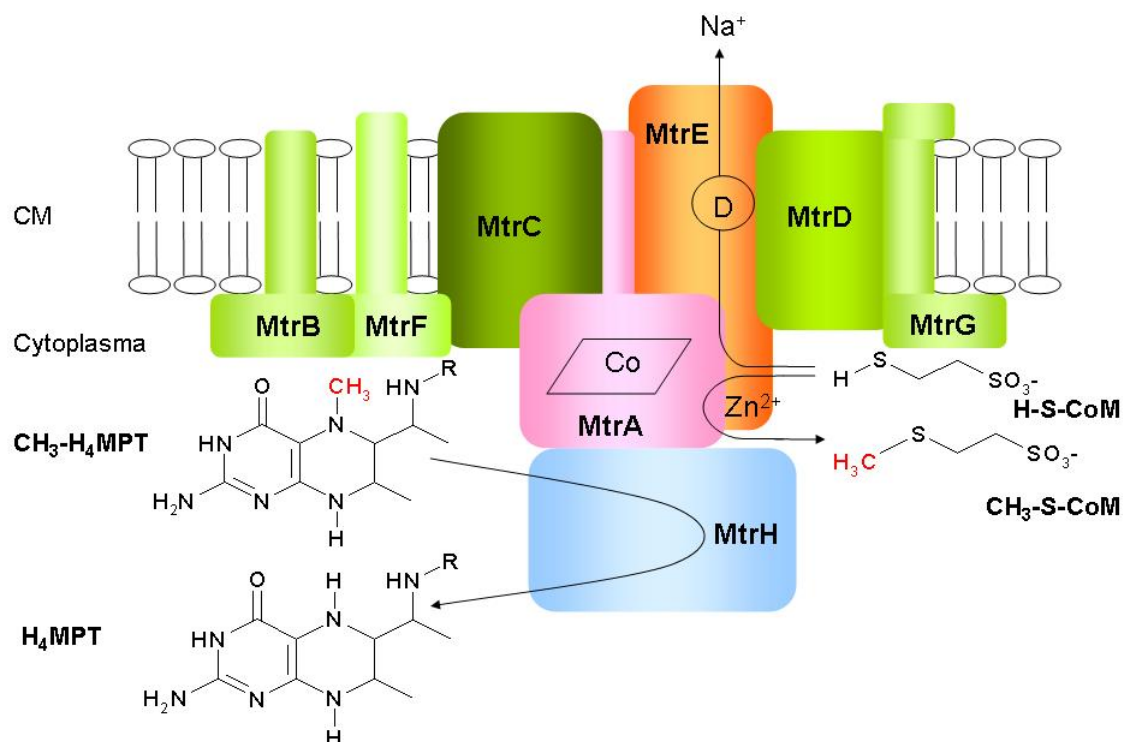


Abbildung 1.5: Zweidimensionales Modell der N^5 -Methyl- H_4MPT :Coenzym M-Methyltransferase (Mtr). Die Topologie der Untereinheiten entspricht der Sekundärstrukturvorhersage. Co: Cobalt(I) in 5'-Hydroxybenzimidazolylcobamid (Vitamin B_{12a}), D: Asp183 in der Transmembranhelix von MtrA. (nach Gottschalk und Thauer (70))

1.4 Die F_{420} -abhängige N^5, N^{10} -Methylen- H_4 MPT-Dehydrogenase (Mtd)

Der reversible Schritt der Reduktion von Methenyl- H_4 MPT⁺ oder Methenyl- H_4 F⁺ zu Methylen- H_4 MPT bzw. Methylen- H_4 F wird von vier verschiedenen Dehydrogenasefamilien katalysiert. Die H_2 -bildende Methylen- H_4 MPT-Dehydrogenase (Hmd) und die F_{420} -abhängige Methylen- H_4 MPT-Dehydrogenase (Mtd) kommen in methanogenen bzw. in methanogenen und Sulfat reduzierenden Archaeen vor, die NAD(P)-abhängigen Methylen- H_4 MPT-Dehydrogenasen (MtdA und MtdB) werden in methylotrophen Archaeen angetroffen, und die NAD(P)-abhängigen Methylen- H_4 F-Dehydrogenasen (z. B. F_oLD) übernehmen die entsprechende Reaktion in allen übrigen Organismen (71-74).

Mtd katalysiert den reversiblen Hydrid-Transfer zwischen dem C5-Atom von reduziertem F_{420} ($F_{420}H_2$) und dem C14-Atom von Methenyl- H_4 MPT⁺ (siehe Abbildung 1.6) (72). Die Reaktion ist *Re*-seitenspezifisch aus Sicht des H_4 MPT- und *Si*-seitenspezifisch aus Sicht des F_{420} -Moleküls, d. h. der *pro-R* Wasserstoff am C14 des Methylen- H_4 MPT bzw. der *pro-S* Wasserstoff am C5 des $F_{420}H_2$ wird übertragen (75, 76). Die Stereospezifität der enzymatischen Reaktion steht im Gegensatz zu derjenigen einer entsprechenden Hydridübertragung in wässriger Lösung, bei der die *pro-S*-CH-Bindung am C14 des Methylen- H_4 MPT reaktiver ist. Dies wird darauf zurückgeführt, dass sich in letzterem Fall das *pro-S*-Proton in antiperiplanarer Position zu den freien Elektronenpaaren der Stickstoffatome im Imidazolidinring befindet. Es wird also vermutet, dass der Imidazolidinring durch das Protein in eine Konformation gezwungen wird, in der die *pro-R*-Bindung reaktiver ist (47).

Da Mtd keine prosthetische Gruppe bindet, verläuft die Reaktion über einen ternären Komplex bestehend aus Protein, Substrat (Methylen- H_4 MPT) und Cosubstrat (F_{420}). Bei 1 M $(NH_4)_2SO_4$ beträgt $V_{max} = 4000$ U/mg ($k_{cat} = 2400$ s⁻¹), der apparente K_m -Wert für N^5, N^{10} -Methyl- H_4 MPT 80 μ M und für F_{420} 20 μ M (77).

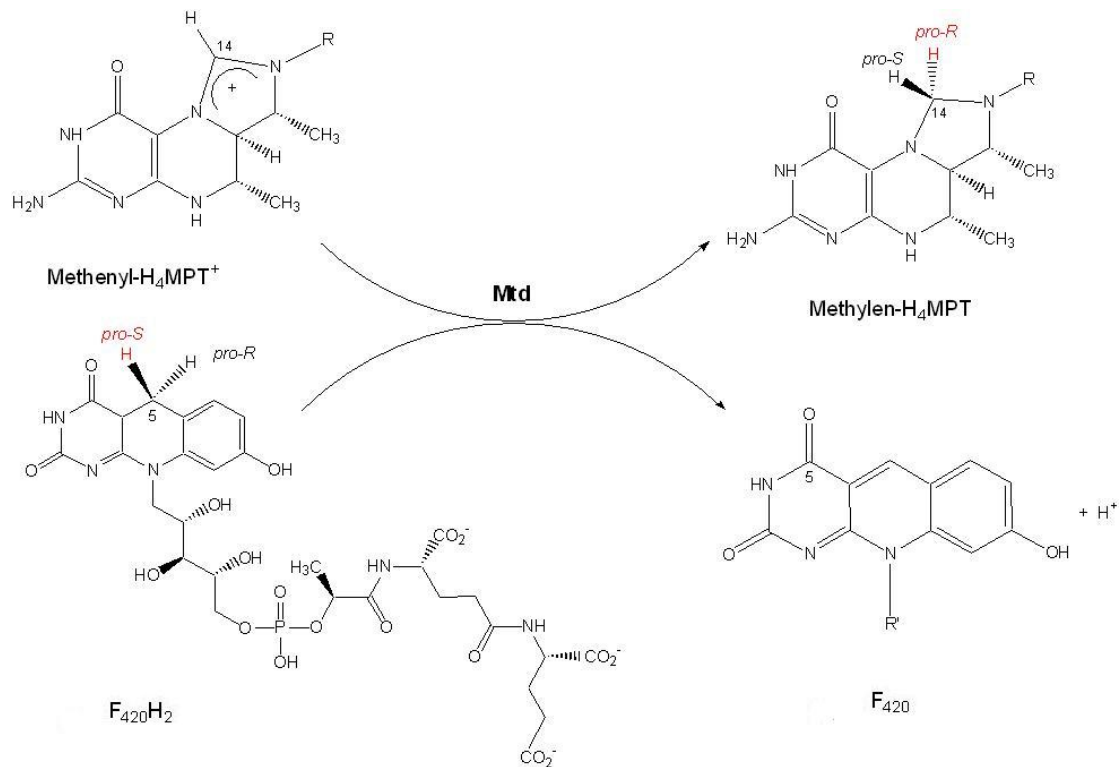


Abbildung 1.6: Die von der F_{420} -abhängigen N^5, N^{10} -Methylen- H_4MPT -Dehydrogenase (Mtd) katalysierte, stereogene Reaktion. F_{420} ist ein grün-blau fluoreszierendes 5'-Deazaflavin-Derivat und wird vorwiegend in Archaeen, aber auch in *Streptomyces*, Cyanobakterien, Mycobakterien und einigen Eukaryoten angetroffen (78).

Unter normalen Wachstumsbedingungen, d. h. bei ausreichendem Nickelgehalt im Medium, katalysiert Mtd die Methenyl- H_4MPT^+ -Reduktion. F_{420} wiederum wird von einer [NiFe]-Hydrogenase, der F_{420} -reduzierenden Hydrogenase (Frh), reduziert. Unter Nickellimitierung wird jedoch keine Frh produziert und die H_2 -bildende Methylen- H_4MPT -Dehydrogenase (Hmd) und Mtd übernehmen gemeinsam die entsprechende Funktion und ersetzen das Nickelenzym (79-81).

Die F_{420} -abhängige N^5, N^{10} -Methylen- H_4MPT -Dehydrogenase (Mtd) konnte aus *M. marburgensis*, *M. barkeri*, *M. kandleri* und *A. fulgidus* isoliert werden (72, 77, 82-84). Mtd aus *M. kandleri* ist ein aus sechs 36 kDa-Untereinheiten aufgebauter Proteinkomplex mit einem apparenten Molekulargewicht von 300 kDa. Das Enzym zeigt nur bei sehr hohen Salzkonzentrationen (z.B. 2 M $(NH_4)_2SO_4$, 2 M Na_2HPO_4 , 1,5 M K_2HPO_4 und 2 M NaCl) Aktivität, ist jedoch relativ sauerstoffunempfindlich und äußerst hitzestabil (77).

Wie von Hagemeyer *et al.* (41) für die Kristallstruktur der rekombinanten Mtd aus *M. kandleri* beschrieben (RCSB-Proteindatenbankeintrag 1QV9), haben die sechs Monomere jeweils eine Größe von 51 x 47 x 23 Å und sind aus drei Domänen aufgebaut (siehe Abbildung 1.7). Die α , β -Domäne setzt sich aus einem

gewundenen, sechssträngigen parallelen β -Faltblatt (β 1- β 6) zusammen, welches von drei α -Helices (α 2- α 4) auf der Vorder- und zwei α -Helices (α 1 und α 6) auf der Rückseite flankiert wird. Die Helixbündeldomäne wird von den Helices α 5, α 7, α 8 und α 9 gebildet. Die β -Faltblatt-Domäne befindet sich am C-Terminus, besteht aus zwei antiparallelen β -Strängen (β 7 und β 8) und ist über Wasserstoffbrückenbindungen mit Helix α 6 und einem *Loop*, der sich an β 2 anschließt, mit der α , β -Domäne verknüpft.

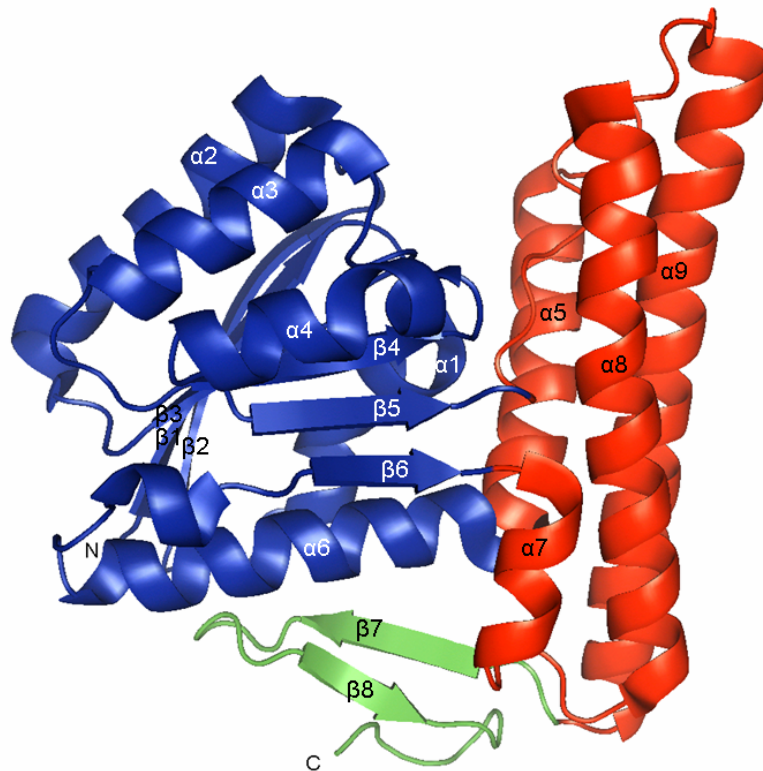


Abbildung 1.7: Die Domänenstruktur eines Monomers der F_{420} -abhängigen N^5, N^{10} -Methylen- H_4 MPT-Dehydrogenase (Mtd) aus *M. kandleri*. Die α , β -Domäne ist in blau, die Helixbündeldomäne in rot und das C-terminale β -Faltblatt in grün dargestellt.

Die Größe des Hexamers, welches treffender als ein Trimer von Dimeren beschrieben werden kann, beträgt $90 \times 90 \times 55 \text{ \AA}$. Die Dimere bestehen aus zwei dicht gepackten, um jeweils 180° gedrehten Monomeren. Vier Wasserstoffbrückenbindungen der Hauptkette verknüpfen die zwei sechssträngigen parallelen β -Faltblätter (β 1- β 6) in antiparalleler Weise zu einem zwölfsträngigen β -Faltblatt. Eine zweite Kontaktfläche in Form eines Helixbündels wird von den Helices α 1 und α 5 und ihren symmetrieverwandten Partnern gebildet. Das Hexamer setzt sich schließlich aus drei Dimeren zusammen, wobei sich die Helices 8 und 9

der sechs Monomere in Form eines Bündels aus zwölf Helices um eine dreifache Achse anordnen (siehe Abbildung 1.8 und 1.9).

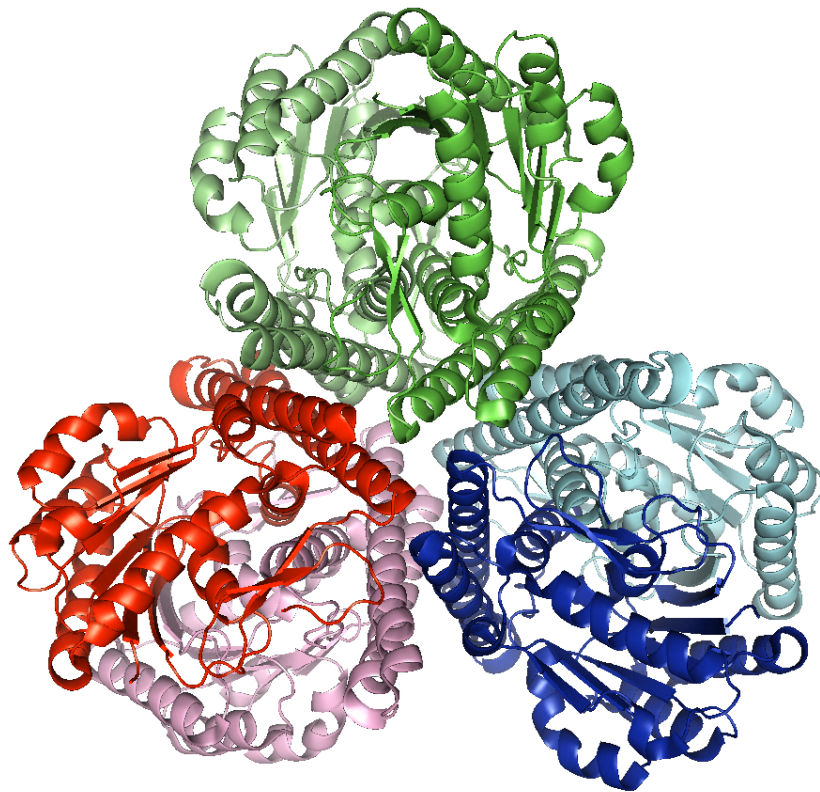


Abbildung 1.8: *Ribbon*-Diagramm der Homohexamerstruktur von Mtd mit Blick in Richtung der dreifachen Achse. Die drei Dimere (grün, blau und rot eingefärbt) setzen sich aus jeweils zwei um 180° gedrehten Monomeren (jeweils dunkel und hell eingefärbt) zusammen.

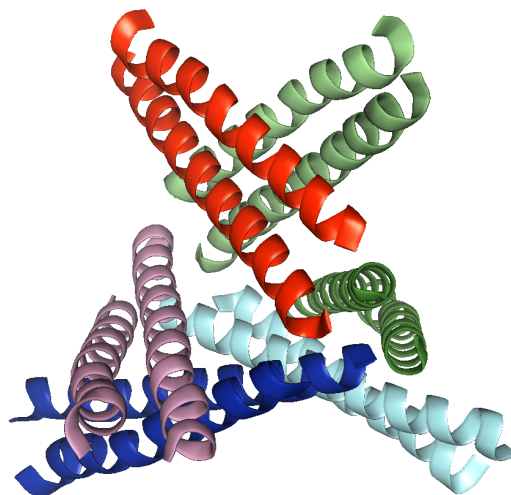


Abbildung 1.9: Die Helices α_8 und α_9 der sechs Monomere bilden ein um die dreifache Achse arrangiertes Bündel aus zwölf Helices. Diese ungewöhnliche Quarternärstruktur ergibt eine äußerst kompakte Anordnung der Monomere.

1.5 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die strukturelle Charakterisierung der Bindung von H₄MPT-Derivaten an zwei Enzyme des methanogenen, CO₂-reduzierenden Energiestoffwechselweges. Für die N⁵-Methyl-H₄MPT:Coenzym M-Methyltransferase (Mtr) aus *M. marburgensis* lag bereits ein Protokoll zur Reinigung unter anaeroben Bedingungen vor (56). Dieses sollte für die aerobe Reinigung vereinfacht und für die Erfordernisse der zur Strukturbestimmung verwendeten elektronenmikroskopischen Einzelpartikelmessung optimiert werden. Dazu wurden zwei Strategien gewählt, zum einen die Präparation des kompletten, acht Untereinheiten umfassenden Komplexes MtrA-H, zum anderen die Präparation des Enzymkomplexes MtrA-G unter möglichst vollständiger Abtrennung der Untereinheit MtrH. Der gereinigte Komplex sollte sodann elektronenmikroskopisch untersucht werden.

Parallel dazu sollten die den Cob(I)amid-Cofaktor bindende Untereinheit MtrA sowie die H₄MPT-bindende Untereinheit MtrH in für die Kristallisation und röntgenkristallographische Untersuchung ausreichender Menge und Qualität gereinigt werden. Hierfür wurden MtrA und MtrH aus *M. jannaschii* und *M. kandleri* bzw. aus *M. marburgensis*, *M. jannaschii* und *M. kandleri* für die heterologe Expression in *E. coli* kloniert, die Expressionsbedingungen optimiert und ein Reinigungsprotokoll etabliert. Anschließend wurden die Untereinheiten umfangreichen Kristallisationsversuchen unterzogen.

Als zweites H₄MPT-bindendes Enzym sollte die F₄₂₀-abhängige N⁵,N¹⁰-Methylen-H₄MPT-Dehydrogenase (Mtd) aus *M. kandleri* im Komplex mit Substrat (Methylen-H₄MPT) und Cosubstrat (F₄₂₀) strukturell charakterisiert werden. Das gereinigte, rekombinante Enzym wurde mit verschiedenen H₄MPT- und F₄₂₀-Derivaten co-kristallisiert und die Struktur röntgenkristallographisch bestimmt. Anhand dieser Struktur sollte die Bindung von H₄MPT und F₄₂₀ analysiert werden.

2 Material

2.1 Computerprogramme

Tabelle 2.1: In dieser Arbeit verwendete Computerprogramme.

Programm	Anwendung	Hersteller/Referenz
<i>blastp, bl2seq</i>	Datenbankabfrage, Sequenzabgleich	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi (85),(86) http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi (87)
<i>ccp4-suite</i>	Verschiedene Programme für die Proteinkristallographie	<i>Daresbury Laboratory</i> , Warrington, UK (88)
<i>Chromas 2.33</i>	Darstellung von Elektropherogrammen (DNA-Sequenzierung)	<i>Technelysium</i> , Tewantin, Australien
<i>Clone Manager 9.0</i>	Erstellung von Vektorkarten	<i>Scientific and Educational Software</i> , Cary, USA http://www.scied.com
<i>Coot</i>	Interaktives Grafikprogramm zum Modellbau von Proteinstrukturen	http://www.ysbl.york.ac.uk/~emsley/cool/ (89)
<i>Crystal</i>	Entwicklung von Kristallisationsscreens, <i>Liquid Handling Roboting</i>	<i>Hamilton Robotics</i> , Martinsried
<i>DALI</i>	3D-Strukturvergleich von Proteinen	http://ekhidna.biocenter.helsinki.fi/dali_server/ (90, 91)
<i>IsisDraw</i>	Abbildung von chemischen Formeln	<i>MDL Information Systems</i> , Frankfurt
<i>PredictProtein, SOSUI</i>	Sekundärstrukturvorhersage	http://www.predictprotein.org/ (92),(93) http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/ (94),(95),(96)
<i>PRODRG</i>	Berechnung von Strukturmodellen	http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/prodrgr/ (97)
<i>PyMOL</i>	Grafikprogramm zur 3D-Darstellung von Biomolekülen	<i>DeLano Scientific</i> , San Francisco, USA http://pymol.sourceforge.net/
<i>The Sequence Manipulation Suite</i>	Analyse und Formatierung von DNA- und Protein-Sequenzen	http://www.bioinformatics.org/sms2/index.html (98)
<i>Webcutter 2.0</i>	Simulation des enzymatischen Verdaus v. Nukleotidsequenzen	http://users.unimi.it/~camelot/tools/cut2.html
<i>XDS</i>	Prozessierung von röntgenkristallographischen Daten	http://www.mpimf-heidelberg.mpg.de/~kabsch/xds/html_doc/XDS.html (99)

2.2 Geräte und Chemikalien

2.2.4 Allgemeine Geräte

Analysenwaage	R180D-*D1	<i>Sartorius, Göttingen</i>
Eismaschine		<i>Ziegra, Isernhagen</i>
Gefrierschrank (-20°C)		<i>Liebherr, Ochsenhausen</i>
(-80°C)		<i>Colora, Lorch</i>
Heizplatte mit Magnetrührer	<i>Ikamag[®] Ret</i>	<i>IKA Werke, Staufen</i>
Kühlschrank (4°C)		<i>Liebherr, Ochsenhausen</i>
Laborwaage	PM 4600 DeltaRange [®]	<i>Mettler Toledo, Gießen</i>
Mikrowellengerät		<i>Sharp Electronics, Hamburg</i>
pH-Elektrode	InLab [®] Semi-Micro pH	<i>Mettler Toledo, Gießen</i>
pH-Meter	766 Calimatic	<i>Knick Elektronische Messgeräte, Berlin</i>
Pipetten	2 µL	<i>Rainin, Oakland, USA</i>
	10/20/200/1000/5000 µL	<i>Gilson, Villiers-le-bel, Frankreich</i>
	Multipette [®] plus	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
Pumpe		<i>Biometra, Göttingen</i>
Spektrophotometer	Ultrospec 2100 pro	<i>Amersham Biosciences</i>
Trockenschrank (80°C)		<i>Binder, Tuttlingen</i>
<i>Ultra pure</i> Wasser-System	Milli-Q Plus	<i>Millipore, Schwalbach</i>
Ultraschallbad	Sonorex	<i>Bandelin electronic, Berlin</i>
Rotoren	Sorvall [®] SS34	<i>DuPont Instruments, Bad Homburg</i>
	Sorvall [®] GSA	
	Sorvall [®] SL-3000	
Schüttelbrett	GFL-3015	<i>GFL, Großburgwedel</i>
Schüttelgerät	Vortex Genie 2	<i>Bender & Holbein, Zürich, Schweiz</i>
Zentrifugen	5415C	<i>Eppendorf, Hamburg</i>
	4K15	<i>Sigma, Osterode am Harz</i>
	Sorvall [®] RC5B	<i>DuPont Instruments, Bad Homburg</i>
Zentrifugenbecher	26 mL, 250 mL, 500 mL	<i>Nalgene, Rochester, USA</i>

2.2.5 Molekularbiologische Arbeiten

Agarosegelelektrophorese-Kammer		<i>Eigenbau MPI für Biophysik, Frankfurt</i>
Geldokumentationsanlage	Gel-DocEQ	<i>BioRad, München</i>
Spannungsquelle	PowerPac [™] BASIC	<i>BioRad, München</i>
	PowerPac [™] HC	
Thermocycler	T Gradient	<i>Biometra, Göttingen</i>
Thermoblock	TB 1	<i>Biometra, Göttingen</i>
Vakuumzentrifuge	Concentrator 5301	<i>Eppendorf, Hamburg</i>

2.2.6 Bakterienkultivierung

Brutschrank (37°C)	BK-600	<i>Heraeus, Hanau</i>
Dampfsterilisator		<i>Holzner, Nussloch</i>
	V-150	<i>Systech, Lauf/a. d. Pegnitz</i>
Kulturschüttler	LAB-Shaker	<i>Adolf Kühner, Birsfelden, Schweiz</i>
Rotor	JLA-8.1000	<i>Beckman Coulter, Krefeld</i>
Sterilbank	Microflow	<i>Nunc, Wiesbaden</i>
Zentrifuge	Avanti™ J-20 XPI	<i>Beckman Coulter, Krefeld</i>
Zentrifugenbecher	1 L	<i>Beckman Coulter, Krefeld</i>

2.2.7 Proteinpräparation

Dialyseknöpfe		<i>Hampton Research, Aliso Viejo, USA</i>
Dispergiergerät	T 50 basic ULTRA-TURRAX®	<i>IKA-Werke, Staufen</i>
Einmal-Filterhalter	150 mL, 250 mL	<i>Nalgene, Rochester, USA</i>
Hochdruckhomogenisator	Microfluidizer®	<i>Microfluidics, Newton, USA</i>
Konzentratoren	0,5 mL, 4 mL, 15 mL (MWCO: 10, 30, 100 kDa)	<i>Millipore, Schwalbach</i>
Rotoren	70Ti, 70.1Ti, 45Ti, SW 40Ti	<i>Beckman Coulter, Krefeld</i>
Ultraschallgenerator	Branson Sonifier 250	<i>G. Heinemann, Schwäb. Gmünd</i>
Ultrazentrifuge	L8-M Ultracentrifuge	<i>Beckman Coulter, Krefeld</i>
Zentrifugenbecher	26 mL, 70 mL	<i>Beckman Coulter, Krefeld</i>

2.2.8 PAGE

Elektrophorese-Apparatur		<i>Eigenbau MPI für Biophysik, Frankfurt</i>
Geltrockner		<i>Biometra, Göttingen</i>
Spannungsquelle	PowerPac™ BASIC PowerPac™ HC	<i>BioRad, München</i>

2.2.9 Chromatographie

Chromatographie-Anlagen	ÄKTA purifier™ SMART	<i>GE Healthcare, München</i>
Steuerungssoftware	UNICORN Version 3.21 SMART Manager	<i>GE Healthcare, München</i>

2.2.11 Elektroblotten

Blotapparatur		Eigenbau MPI für Biophysik, Frankfurt
Spannungsquelle	PowerPac™ BASIC PowerPac™ HC	BioRad, München

2.2.12 Kristallisation

Deckgläser		
Kristallisationsplatten	AxyGem™ Crystallography Plate CrystalQuick™ RW XRL™ Plates	Axygen Biosciences, Union City, USA Greiner Bio-One, Frickenhausen Molecular Dimensions, Cambridge, UK, Olympus, Hamburg
Kristallaufnahmen	Camedia C-3030 Zoom DFL420	Leica Microsystems, Wetzlar Olympus, Hamburg
Mikroskope	Leica M165 C Olympus SZ-CTV	Leica Microsystems, Wetzlar Olympus, Hamburg
Pipettierroboter	Hamilton STARlet Mosqito Cartesian	Hamilton Robotics, Martinsried TTP LabTech, Melbourn, UK Hamilton Robotics, Martinsried
Steuerungssoftware	Crystal	Hamilton Robotics, Martinsried
Versiegelung	Crystal Clear Tape	Henkel, Düsseldorf

2.2.13 Kristallisationskits

<u>Crystal Screen™ und Crystal Screen II™</u>	Hampton Research, Aliso Viejo, USA
100 verschiedene Pufferlösungen zur Proteinkristallisation	
<u>Highest Probability Salt Screen</u>	Axygen Biosciences, Union City, USA
96 verschiedene Pufferlösungen zur Proteinkristallisation	
<u>JB-Screen 1-10</u>	Jena-Biosciences, Jena
240 verschiedene Pufferlösungen zur Proteinkristallisation	
<u>JB-Screen Membrane 1-3</u>	Jena-Biosciences, Jena
72 verschiedene Pufferlösungen zur Proteinkristallisation	
<u>pHClear und pHClear II</u>	Qiagen, Hilden
96 verschiedene Pufferlösungen zur Proteinkristallisation	
<u>Precipitant Synergy™ Primary 64</u>	Emerald BioSystems, Bainbridge Island, USA
64 verschiedene Pufferlösungen zur Proteinkristallisation	
<u>Structure Screen 1 und 2</u>	Molecular Dimensions, Cambridge, UK
96 verschiedene Pufferlösungen zur Proteinkristallisation	

2.2.14 Röntgenographische Methoden

<i>Cryo-loops</i>		Hampton Research, Aliso Viejo, USA
Detektor	R-Axis IV ⁺⁺	Rigaku, Sevenoaks, UK
Goniometerkopf		Rigaku, Sevenoaks, UK
Röntgengenerator	MicroMax™-007 HF	Rigaku, Sevenoaks, UK
Steuerungssoftware	StructureStudio™	Rigaku, Sevenoaks, UK
Tiefemperaturgenerator	X-stream™ 2000	Rigaku, Sevenoaks, UK

2.2.15 Chemikalien

Gängige Laborchemikalien sind nicht aufgeführt. Soweit nicht anders beschrieben, wurden alle Chemikalien mit Reinheitsgrad *p.a.* verwendet.

Acrylamid 30 %/Bisacrylamid 0,8 %	<i>Roth, Karlsruhe</i>
Agarose, „SeaKem® LE Agarose“	<i>Cambrex, Rockland, USA</i>
6-Aminocaprinsäure	<i>Calbiochem, Darmstadt</i>
Ampicillin (Natrium-Salz)	<i>Gerbu, Gaiberg</i>
AHT (Anhydrotetracyclin Hydrochlorid)	<i>Fisher Scientific, Schwerte</i>
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	<i>Koch-Light, Haverhill, UK</i>
Bacto-Agar	<i>Difco Laboratories, Augsburg</i>
Bacto-Casaminoacids	<i>Difco Laboratories, Augsburg</i>
Bacto-Trypton	<i>Difco Laboratories, Augsburg</i>
BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat)	<i>Roth, Karlsruhe</i>
Bis-TRIS-Propan	<i>Gerbu, Gaiberg</i>
(1,3-Bis(tris(hydroxymethyl)methylamino)propan)	
BugBuster® Protein Extraction Reagent	<i>Novagen, Darmstadt</i>
D-Biotin	<i>Fluka, München</i>
Bradford-Reagenz „Bio-Rad Protein Assay“	<i>Bio-Rad Laboratories, München</i>
Bromphenolblau Natriumsalz	<i>Roth, Karlsruhe</i>
Carbenicillin (Dinatrium-Salz)	<i>Gerbu, Gaiberg</i>
CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonium]-1-propan sulfonat)	<i>Sigma-Aldrich, München</i>
Chloramphenicol	<i>Gerbu, Gaiberg</i>
Cholat (Na-Salz)	<i>Sigma-Aldrich, München</i>
Coomassie Brilliant Blue G-250	<i>Serva, Heidelberg</i>
Coomassie Brilliant Blue R-250	<i>Serva, Heidelberg</i>
DTT (Dithiothreitol)	<i>Gerbu, Gaiberg</i>
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure), Natriumsalz	<i>Gerbu, Gaiberg</i>
Ethidiumbromid	<i>Roth, Karlsruhe</i>
Ficoll 400	<i>Sigma-Aldrich, München</i>
Glucose Monohydrat	<i>Roth, Karlsruhe</i>
Glycerin (99,5 %)	<i>Gerbu, Gaiberg</i>
Guanidinhydrochlorid	<i>Fluka, München</i>
Hefeextrakt (granuliert)	<i>Merck, Darmstadt</i>
HEPES	<i>Roth, Karlsruhe</i>
(2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	
Imidazol	<i>Fluka, München</i>
IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid)	<i>Gerbu, Gaiberg</i>
Kanamycinsulfat	<i>Gerbu, Gaiberg</i>
LDAO (N,N-Dimethyldodecylamin-N-oxid)	<i>Fluka, München</i>
LM (n-Dodecyl-β-D-maltosid)	<i>Glycon, Luckenwalde</i>
MES (2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure)	<i>Gerbu, Gaiberg</i>
MOPS	<i>Gerbu, Gaiberg</i>
(3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure)	
Natrium/Kalium-Tartrat	<i>Fluka, München</i>
NBT (Nitroblau-Tetrazoliumchlorid)	<i>Biomol, Hamburg</i>
OG (n-Octyl-β-D-glucosid)	<i>Glycon, Luckenwalde</i>
PEG 400 (Polyethylenglykol 400)	<i>Fluka, München</i>
Phenol/Chloroform	<i>Roth, Karlsruhe</i>
PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid)	<i>Biomol, Hamburg</i>
D(+)-Saccharose	<i>Gerbu, Gaiberg</i>

SDS (Natriumdodecylsulfat)	<i>Gerbu</i> , Gaiberg
TEMED	<i>Amersham Biosciences</i> , Freiburg
(<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl- <i>p</i> -ethylendiamid)	
Tricin	<i>Gerbu</i> , Gaiberg
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan) <i>Ultra Qualität</i>	<i>Roth</i> , Karlsruhe
Triton X100 (<i>t</i> -Octylphenoxypolyethoxyethanol)	<i>Koch-Light</i> , Haverhill, UK
Tween 20 (Monolaureat)	<i>Koch-Light</i> , Haverhill, UK
Vitamin B _{12a} (Hydroxocobalamin Hydrochlorid)	<i>Sigma-Aldrich</i> , München
Xylencyanol FF	<i>Fluka</i> , München

2.2.16 Enzyme, Proteine, Vergleichsstandards und Antikörper

In dieser Arbeit verwendete Enzyme sind nur aufgeführt soweit nicht in Kits enthalten.

Anti-Kaninchen IgG (ganzes Molekül) F(ab') ₂ -Fragment-Alkalische Phosphatase-Konjugat aus Ziege	<i>Sigma-Aldrich</i> , München
Anti- <i>M. marburgensis</i> MtrH-Antikörper aus Kaninchen	<i>Genovac</i> , Freiburg
Anti-Polyhistidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat aus Maus	<i>Qiagen</i> , Hilden
Anti-Strep-Alkalische Phosphatase-Konjugat aus Maus	<i>Qiagen</i> , Hilden
Benzonase [®] Nuclease (250 U/μL)	<i>Novagen</i> , Darmstadt
BSA	<i>Pierce Perbio</i> , Bonn
DNase I	<i>Roche Diagnostics</i> , Mannheim
Ferritin	<i>Fluka</i> , München
Gel Filtration Calibration Kits LMW und HMW	<i>GE Healthcare</i> , München
1 kb DNA Ladder	<i>New England Biolabs</i> , Frankfurt
Phusion [®] High-Fidelity DNA Polymerase	<i>Finnzymes</i> , Espoo, Finnland
Prestained Protein Marker, Broad Range (6–175 kDa)	<i>New England Biolabs</i> , Frankfurt
Proteinase K	<i>Fluka</i> , München
RNase	<i>Sigma-Aldrich</i> , München
Restriktionsenzyme:	
	<i>Bam</i> HI
	<i>Bgl</i> II
	<i>Eco</i> RI
	<i>Mun</i> I
	<i>Nco</i> I
	<i>Nde</i> I
SAP (<i>shrimp alkaline phosphatase</i>) (1 U/μL)	<i>MBI Fermentas</i> , St. Leon-Rot
T4-DNA-Ligase (2U/μL)	<i>MBI Fermentas</i> , St. Leon-Rot
	<i>Epicentre</i> , Madison, USA

2.2.17 Kits

HiSpeed® Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
ProteoExtract® All-in-One Trypsin Digestion Kit	Calbiochem, Darmstadt
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
Zero Blunt® PCR Cloning Kit	Invitrogen, Carlsbad, USA

2.2.18 Verbrauchsmaterialien

Gängiges Labormaterial ist nicht aufgeführt.

Dialyseschläuche	Visking (MWCO ca. 14 kDa)	Roth, Karlsruhe
Filterpapier	Whatman® Paper Grade I	Schleicher & Schuell, Kassel
Küvetten	UV/Vis Kunststoff	Sarstedt, Nümbrecht
Nitrocellulosefilter	0,2 µm, 0,45 µm	Pall, East Hills, USA
PCR-Reaktionsgefäße	200 µL	Sarstedt, Nümbrecht
PVDF-Membran	Imobilon P	Millipore, Schwalbach
Sterilfilter	0,2 µm, 0,45 µm	Flow Laboratories, Meckenheim

2.3 Plasmide

Tabelle 2.3: In dieser Arbeit eingesetzte Plasmide.

Vektor	Anwendung	Resistenz	Replikon	Hersteller/Referenz
pCR®-Blunt	linearisierter Klonierungsvektor für PCR-Produkte mit stumpfen Enden	Kan Zeocin™	pUC	Invitrogen, Carlsbad, USA (100),(101)
pET-22b(+)	Expressionsvektor mit T7 <i>lac</i> -Promotor	Amp	ColE1	Novagen, Darmstadt (102),(103)
pACYCDuet-1	Expressionsvektor mit zwei Polylinkern und zwei T7 <i>lac</i> - Promotoren zur Koexpression von zwei Genen	Cam	P15A	Novagen, Darmstadt (104)

2.4 Mikroorganismen und Medien

2.4.4 Archaeen-Stämme

Tabelle 2.4: In dieser Arbeit verwendete Archaeen-Stämme.

Stamm	Beschreibung	Quelle/Referenz
<i>Methanothermobacter marburgensis</i> (DSM 2133) (<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> strain Marburg)	Mesophiles methanogenes Archaeon	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig (3),(2)
<i>Methanocaldococcus jannaschii</i> (DSM 2661)	Hyperthermophiles methanogenes Archaeon	Dr. Seigo Shima, Marburg GenBank Nr. NC_000909, (6)
<i>Methanopyrus kandleri</i> AV19 (DSM 6324)	Hyperthermophiles methanogenes Archaeon	GenBank Nr. NC_003551, (105)

Methanothermobacter marburgensis-Zellen wurden von Frau Johanna Moll am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg angezogen (5), *Methanocaldococcus jannaschii*-Zellen wurden von Herrn Dr. Seigo Shima (Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg) zur Verfügung gestellt.

2.4.5 *Escherichia coli*- Stämme

Tabelle 2.5: In dieser Arbeit verwendete *E. coli*-Stämme.

Stamm	Beschreibung	Genotyp	Resistenz	Quelle/ Referenz
DH5α	Klonierungsstamm, Herstellung von Plasmid-DNA	F ⁻ , φ80 <i>dlacZ</i> ΔM15, Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>rk</i> , <i>mk</i> ⁺), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , λ ⁻ , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	–	(106),(107)
TOP10	Klonierungsstamm, Herstellung von Plasmid-DNA	F ⁻ , <i>mcrA</i> , Δ(<i>mrr-hsdRMS- mcrBC</i>), φ80 <i>lacZ</i> ΔM15, Δ <i>lacX74</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> , Δ(<i>ara-leu</i>)7697, <i>galU</i> , <i>galK</i> , <i>endA1</i> , <i>nupG</i>	–	Invitrogen, Carlsbad, USA

Stamm	Beschreibung	Genotyp	Resistenz	Quelle/ Referenz
BL21(DE3)	Starke Überexpression mit T7 Promotor	F ⁻ , <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B(r_B⁻m_B⁺)</i> , <i>gal</i> , λ(DE3)	–	Novagen, Darmstadt (103)
Rosetta(DE3)pLysS	Eingeschränkte Expression und geringe Basalexpression, Plasmid mit 6 Genen für tRNA von seltenen Codons	F ⁻ , <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B(r_B⁻m_B⁺)</i> , <i>gal</i> , λ(DE3), pLysSRARE, (Cam ^R)	Cam	Novagen, Darmstadt (108)

2.4.6 Medien und Agarplatten

LB-Medium:	1,0 % (w/v) NaCl, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1,0 % (w/v) Trypton
M9-Minimalmedium:	6,0 g/L Na ₂ HPO ₄ , 3,0 g/L KH ₂ PO ₄ , 1 g/L NH ₄ Cl, 0,5 g/L NaCl, 1 mM MgSO ₄ , 0,2 mM CaCl ₂ , 0,2 % Casaminoacids, 0,4 % (w/v) Glucose
SOC-Medium:	0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 2 % (w/v) Trypton, 5 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgSO ₄ , 20 mM Glucose, pH 7,0 (NaOH)
TB-Medium (109):	23,1 g/L KH ₂ PO ₄ , 12,54 g/L K ₂ HPO ₄ , 12 g/L Trypton, 24 g/L Hefeextrakt, 0,4 % (v/v) Glycerin

Festagarplatten enthielten 1,5% (w/v) Bacto-Agar.

Ampicillin:	100 mg/mL in H ₂ O (steril filtriert)
Carbenicillin	50 mg/mL in H ₂ O (steril filtriert)
Chloramphenicol:	34 mg/mL in Ethanol
Kanamycin:	30 mg/mL in H ₂ O (steril filtriert)

Antibiotika-Stammlösungen wurden wie oben beschrieben hergestellt und als 1:1000-Verdünnung eingesetzt.

3 Methoden

3.1 Planung der Vektorkonstrukte

Das Vektorkonstrukt MMRmtrH/pET22b+ zur rekombinanten Expression der Mtr-Untereinheit MtrH aus *M. marburgensis* in *E. coli* wurde von Frau Dr. Priyamvada Acharya (Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt) zur Verfügung gestellt.

Vor der Planung der Vektorkonstrukte zur rekombinanten Expression der Mtr-Untereinheit MtrA aus *M. jannaschii* wurde eine Sekundärstrukturanalyse mit Hilfe der Programme *PredictProtein* und *SOSUI* durchgeführt. Daraufhin wurden drei verschiedene Konstrukte, zum einen zur vollständigen Expression (MJmtrA1), zum anderen zur Expression zweier um die C-terminale Transmembranhelix verkürzter Proteine MJmtrA2 (achtzehn C-terminale AS fehlen) und MJmtrA3 (22 C-terminale AS fehlen), angefertigt.

Zur Klonierung von *mtrH* aus *M. jannaschii* wurde die entsprechende Sequenz aus der Datenbank entnommen (GenBank Nr. NC_000909) (6).

Zwei weitere Konstrukte wurden zur Co-Expression der verkürzten Untereinheit MtrA mit der Untereinheit MtrH angefertigt (MJmtrA3/pACYC-Duet1 und MJmtrH/pACYC-Duet1), um eventuell eine bessere Faltung und Löslichkeit der Untereinheit MtrH zu erreichen. Hintergrund dieses Ansatzes war, dass MtrA und MtrH für die Methylübertragung im Komplexverbund in Kontakt miteinander stehen müssen. Wie stark der Zusammenhalt dieses binären Komplexes außerhalb des Gesamtkomplexes MtrA-H ausfällt, ist jedoch unklar. Der pACYC-Duet 1-Vektor kann aufgrund seines von pET-Vektoren verschiedenen Replikationsursprungs und abweichender Antibiotikaresistenz mit diesen zusammen exprimiert werden.

Zur heterologen Expression von *M. kandleri* MtrA wurden fünfzehn C-terminale Aminosäuren durch ein Affinitätspeptid (*StrepII*) ersetzt.

Für die Produktion von *M. kandleri* MtrH in *E. coli* wurden zwei verschiedene Vektorkonstrukte benutzt. Das eine enthielt eine vollständig Version des Gens (pCHis₆-tet(mtrH1) bzw. MKmtrH1), im zweiten wurde nach einem Sequenzvergleich von MtrH aus *M. marburgensis*, *M. jannaschii* und *M. kandleri* mit der 5-Methyltetrahydrofolat Corrinoid/Eisen-Schwefel-Protein Methyltransferase aus *Moorella thermoacetica* (*Clostridium thermoaceticum*) das Gen um die für die elf N-terminalen Aminosäuren codierenden Basenpaare verkürzt (pCHis₆-tet(mtrH2) bzw. MKmtrH2). Außerdem wurde jeweils ein C-terminales His₆-Affinitätspeptid angehängt. Die für die Produktion der Mtr-Untereinheiten aus *M. kandleri*

verwendeten Plasmide wurden nach Absprache von Herrn PD Dr. Thorsten Selmer (Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg) angefertigt. Eine Übersicht über die verwendeten Vektorkonstrukte ist in Tabelle 3.1, Vektorkarten sind im Anhang (Abschnitt 7.2) zu finden.

Tabelle 3.1: In dieser Arbeit verwendete Vektorkonstrukte.

Organismus	Klon	Vektor	Anwendung	Affinitäts-peptid	Quelle
<i>M. marburgensis</i>	MMRmtrH	MMRmtrH/pET22b+	rekombinante Produktion	–	Dr. Priyamvada Acharya, Frankfurt
<i>M. jannaschii</i>	MJmtrA1	MJmtrA1/pCRblunt	Subklonierung von PCR-Produkten	–	–
		MJmtrA1/pET22b+	Rekombinante Produktion mit Transmembranhelix	–	–
<i>M. jannaschii</i>	MJmtrA2	MJmtrA2/pCRblunt	Subklonierung von PCR-Produkten	–	–
		MJmtrA2/pET22b+	Rekombinante Produktion ohne Transmembranhelix (18 C-terminale AS fehlen)	–	–
<i>M. jannaschii</i>	MJmtrA3	MJmtrA3/pCRblunt	Subklonierung von PCR-Produkten	–	–
		MJmtrA3/pET22b+	Rekombinante Produktion ohne Transmembranhelix (22 C-terminale AS fehlen)	–	–
		MJmtrA3/pACYC-Duet1	Coexpression mit MJMtrH ohne Transmembranhelix (22 C-terminale AS fehlen)	–	–
<i>M. jannaschii</i>	MJmtrH	MJmtrH/pCRblunt	Subklonierung von PCR-Produkten	–	–
		MJmtrH/pET22b+	Rekombinante Produktion	–	–
		MJmtrH/pACYC-Duet1	Coexpression mit MJMtrA3	–	–
<i>M. kandleri</i>	MKmtrA	pCSt_tet(mtrA)	Rekombinante Produktion ohne Transmembranhelix (15 C-terminale AS fehlen)	C-terminales StreptII-Anhängsel	Dr. Thorsten Selmer, Marburg
<i>M. kandleri</i>	MKmtrH1	pCHis_tet(mtrH1)	Rekombinante Produktion	C-terminales His ₆ -Anhängsel	Dr. Thorsten Selmer, Marburg
<i>M. kandleri</i>	MKmtrH2	pCHis_tet(mtrH2)	Rekombinante Produktion (11 N-terminale AS fehlen)	C-terminales His ₆ -Anhängsel	Dr. Thorsten Selmer, Marburg

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Extraktion und Reinigung genomischer DNA aus Archaeen-Zellen

Zur Extraktion der genomischen DNA aus Archaeen-Zellen nach Kiener *et al.* (110) und Marmur und Doty (111) wurden 2 g *Methanocaldococcus jannaschii*-Zellen unter flüssigem Stickstoff mit Mörser und Stößel aufgeschlossen und in 14 mL Saccharose-TE-Puffer (20 mM TRIS/HCl pH 8,0, 5 mM EDTA pH 8,0, 10 % Saccharose) mit 2,8 mg Proteinase K resuspendiert. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C wurde mit 2 % SDS (Endkonzentration) versetzt und wiederum 1 h bei 60 °C inkubiert. Nach Zugabe von 3,5 mL 5 M NaCl-Lösung wurde 1 h auf Eis inkubiert und schließlich zentrifugiert (20000 x g, 4 °C, 30 min).

Die DNA wurde durch Zugabe des einfachen Volumens an eisgekühltem Isopropanol aus dem Überstand gefällt und auf einen Glasstab gewickelt. Nach Waschen mit 70 % Ethanol ließ man die DNA trocknen und löste sie schließlich in 10 mL TE-Puffer (20 mM TRIS/HCl pH 8,0, 5 mM EDTA pH 8,0). Anschließend wurde 1 mg Proteinase K zugegeben und bei 37 °C für 1 h inkubiert.

Durch dreimalige Zugabe von Phenol/Chloroform im Verhältnis 5:1, zehnmütiger Inkubation unter Schütteln und anschließender Zentrifugation (4500 x g, 4 °C, 20 min) wurde die DNA von Protein gereinigt.

Zur Entfernung von Salzen und Nukleotiden wurde Na-Acetat-Puffer (3 M Na-Acetat pH 5,2) im Verhältnis 1:10 sowie das dreifache Volumen an eisgekühltem Ethanol und zentrifugiert (4500 x g, 4 °C, 20 min). Das Pellet wurde mit 1 mL eisgekühltem Ethanol (70 % v/v) gewaschen, nach erneutem Zentrifugieren (4500 x g, 4 °C, 20 min) an der Luft getrocknet und schließlich in 3 mL TE-Puffer resuspendiert.

Um RNA zu entfernen wurde 20 µg/mL RNase (Endkonzentration) zugegeben, dreimal mit Phenol/Chloroform extrahiert, erneut mit Na-Acetat sowie Ethanol gefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen und in 3 mL TE-Puffer resuspendiert.

3.2.2 Herstellung künstlicher DNA-Fragmente mittels PCR

Die für MtrH und MtrA aus *M. jannaschii* codierenden Genabschnitte bzw. deren verkürzte Varianten wurden mittels Polymerasekettenreaktion amplifiziert. Dabei wurden durch entsprechende *Primer* Restriktionsschnittstellen zur Klonierung in verschiedene Zielvektoren eingeführt (siehe Tabelle 3.2). Die *Primer*-Sequenzen sind im Anhang (Abschnitt 7.3) zu finden.

Tabelle 3.2: Übersicht über die durchgeführten PCR-Reaktionen.

Klon	Templat	Vorwärts-Primer (Schnittstelle)	Rückwärts-Primer (Schnittstelle)	Zielvektoren
MJmtrH	genom. DNA <i>M. jannaschii</i>	MJmtrH+ (<i>Nde</i> I)	MJmtrH– (<i>Eco</i> RI)	pET22b+, pACYC-Duet 1
MJmtrA1	genom. DNA <i>M. jannaschii</i>	MJmtrA+ (<i>Nde</i> I)	MJmtrA1– (<i>Bam</i> HI)	pET22b+
MJmtrA2	genom. DNA <i>M. jannaschii</i>	MJmtrA+ (<i>Nde</i> I)	MJmtrA2– (<i>Nco</i> I)	pET22b+
MJmtrA3	genom. DNA <i>M. jannaschii</i>	MJmtrA+ (<i>Nde</i> I)	MJmtrA3– (<i>Eco</i> RI)	pET22b+, pACYC-Duet 1

Ein Reaktionsansatz von 10-50 µL enthielt 0,3-1 µg Templat, 0,2 µM je *Primer*, 2 U *Phusion*[®] *High-Fidelity DNA Polymerase*, 1x *Phusion*[®] *HF Reaction Buffer* (*Finnzymes*, Espoo, Finnland) und 200 µM je dNTP. Die verwendeten Temperaturprogramme sind in Tabelle 3.3 und 3.4 zu finden. Der Erfolg der PCR-Reaktionen wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft.

Tabelle 3.3: Temperaturprogramme für PCR-Reaktionen von MJMtrH und MJMtrA1.

Programmschritt	MJMtrH			MJMtrA1		
	T/[°C]	Zeit/[s]		T/[°C]	Zeit/[s]	
Initiale Denaturierung	98	30		98	60	
Denaturierung	98	10	30 Zyklen	98	60	30 Zyklen
<i>Primer</i> -Anlagerung	45-56	30		60	60	
Kettenverlängerung	72	30		72	60	
Finale Kettensynthese	72	420		72	600	

Tabelle 3.4: Temperaturprogramme für PCR-Reaktionen von MJMtrA2 und MJMtrA3.

Programmschritt	MJMtrA2			MJMtrA3		
	T/[°C]	Zeit/[s]		T/[°C]	Zeit/[s]	
Initiale Denaturierung	98	300		98	180	
Denaturierung	98	60	30 Zyklen	98	30	34 Zyklen
<i>Primer</i> -Anlagerung	60,5	60		45-65	30	
Kettenverlängerung	72	60		72	30	
Finale Kettensynthese	72	600		72	600	

3.2.3 Restriktionsspaltung, Dephosphorylierung und Ligation von DNA

Zum analytischen Restriktionsverdau wurde folgende Reaktionsmischung angesetzt:

2 µL	DNA
je 0,33 µL	Restriktionsenzym
1-2 µL	Restriktionspuffer (Endkonzentration: 1x oder 2x)
H ₂ O	ad 10 µL

(autoklaviert)

Für eine präparative Restriktionsspaltung wurden 20 µg Vektor-DNA mit 50 U Restriktionsenzym und dem vom Hersteller empfohlenen Puffer in einem 50 µL-Ansatz 4 h bei 37 °C inkubiert.

Um eine Religation der durch Restriktionsenzyme linearisierten Plasmide zu verhindern, wurde mit Hilfe einer alkalischen Phosphatase die 5'-endständige Phosphatgruppe hydrolysiert. Hierfür wurde der Reaktionsansatz der Restriktionsspaltung mit 5,5 U Alkalischer Phosphatase aus Kaltwassergarnelen (SAP) und dem mitgelieferten SAP-Puffer versetzt und zunächst 1 h bei 37 °C inkubiert, dann 20 min zur Inaktivierung der Phosphatase auf 65 °C erhitzt.

Anschließend wurden die DNA-Fragmente in einem Agarosegel elektrophoretisch getrennt und die entsprechende Banden ausgeschnitten und gereinigt.

Zur Ligation wurden 200 ng Vektor-DNA (linearisierter pCR[®]-Blunt-Vektor bzw. mit geeigneten Restriktionsenzymen verdauter pET-22b(+)- oder pACYCDuet-1-Vektor) mit der entsprechenden Menge des einzubauenden DNA-Fragments (PCR-Produkt mit stumpfen Enden bzw. das Zielgen enthaltendes Bruchstück mit kompatiblen Enden) im Verhältnis 1:10, dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer, 10 mM ATP und 3 U T4-DNA-Ligase in einem Reaktionsansatz von 30 µL gemischt. Zunächst wurde bei 16 °C für 5 h inkubiert und anschließend die Ligase für 10 min bei 65 °C inaktiviert. Nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die durchgeführten Ligationen. Die Ligation von pCR[®]-Blunt-Vektor mit PCR-Produkten mit stumpfen Enden wurden nach Herstellerangaben (*Invitrogen*, Carlsbad, USA) ausgeführt.

Tabelle 3.5: Übersicht über die Plasmidherstellung.

Ausgangsvektor	Restriktions-spaltung	Eingesetzter Vektor	Restriktions-spaltung	Zielvektor
MJmtrA1/pCRblunt	<i>NdeI</i> , <i>Bam</i> HI	pET-22b(+)	<i>NdeI</i> , <i>Bam</i> HI	MJmtrA1/pET22b+
MJmtrA2/pCRblunt	<i>NdeI</i> , <i>NcoI</i>	pET-22b(+)	<i>NdeI</i> , <i>NcoI</i>	MJmtrA2/pET22b+
MJmtrA3/pCRblunt	<i>NdeI</i> , <i>EcoRI</i>	pET-22b(+)	<i>NdeI</i> , <i>EcoRI</i>	MJmtrA3/pET22b+
MJmtrA3/pCRblunt	<i>NdeI</i> , <i>EcoRI</i>	pACYC-Duet1	<i>NdeI</i> , <i>MunI</i>	MJmtrA3/pACYC-Duet1
MJmtrH/pCRblunt	<i>NdeI</i> , <i>EcoRI</i>	pET-22b(+)	<i>NdeI</i> , <i>EcoRI</i>	MJmtrH/pET22b+
MJmtrH/pCRblunt	<i>NdeI</i> , <i>EcoRI</i>	pACYC-Duet1	<i>NdeI</i> , <i>MunI</i>	MJmtrH/pACYC-Duet1

Zur Analyse der Klonierungen wurden je 3 μ L des Ligationsansatzes in *E. coli* DH5 α -Zellen oder One Shot[®] TOP10 *chemically competent E. coli* (Invitrogen, Carlsbad, USA) wie beschrieben transformiert (Abschnitt 3.2.4) und die Zellen angezogen. Aus den Kolonien der positiven Klone wurden sodann die Plasmide isoliert (siehe Abschnitt 3.2.5), diese mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut (siehe oben) und die entstandenen DNA-Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese (siehe Abschnitt 3.2.6) auf die Anwesenheit des Zielgens überprüft.

Des Weiteren wurden die hergestellten Plasmide durch Sequenzierung (siehe Abschnitt 3.2.9) kontrolliert.

3.2.4 Herstellung von kompetenten *E. coli*-Zellen und Transformation

Zur Herstellung Hitzeschock-kompetenter *E. coli*-Zellen wurde eine Variante der Rubidiumchlorid-Methode verwendet (112). 50 mL LB-Medium (ggf. mit geeignetem Antibiotikum) wurden mit 100 μ L einer Übernacht-Kultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3-0,5 bei 37 °C angezogen. Die Bakteriensuspension wurde kurz auf Eis gekühlt, zentrifugiert (3000 x g, 4 °C, 10 min), das Pellet in 15 mL eisgekühltem TF-Puffer 1 (30 mM K-Acetat pH 5,8, 10 mM CaCl₂, 100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 15 % (v/v) Glycerin) resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren (3000 x g, 4 °C, 10 min) wurde das Pellet in 2 mL eisgekühltem TF-Puffer 2 (10 mM MOPS/KOH pH 7,0, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15 % (v/v) Glycerin) resuspendiert. Je 100 μ L Bakteriensuspension wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Zur Transformation von 50 μ L kompetenten Zellen ließ man diese auf Eis auftauen und inkubierte nach Zugabe von 1 μ L Plasmid-Lösung für 30 min bei 0 °C. Nach dem Hitzeschock (42 °C, 60 s) kühlte man 2 min auf Eis. Die Zellen wurden nach Zugabe von 250 μ L SOC-Medium 1 h bei 37 °C geschüttelt und schließlich auf LB-Agar-Platten mit geeignetem Antibiotikum ausgestrichen. Die Transformanden wurden bei 37 °C über Nacht angezogen.

3.2.5 Plasmidpräparation

Plasmidpräparationen für analytische Zwecke wurden aus 5 mL LB-Kultur mit dem *QIAprep[®] Spin Miniprep Kit* (Qiagen, Hilden) nach Anleitung durchgeführt, wobei mit 50 µL Puffer EB (10 mM TRIS/HCl pH 8,5) eluiert wurde.

Für präparative Zwecke wurde Plasmid aus 100-250 mL LB-Kultur mit dem *HiSpeed[®] Plasmid Maxi Kit* (Qiagen, Hilden) nach Vorschrift isoliert und mit 1 mL Plasmidpuffer (10 mM TRIS/HCl pH 8,0) eluiert.

Die Ausbeute der Plasmidpräparationen wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm, die Reinheit durch Verhältnis der Absorptionen bei 260 und 230 nm sowie 260 und 280 nm ermittelt (siehe Abschnitt 3.2.8).

3.2.6 Agarosegelelektrophorese

Zur Analyse und Präparation von DNA-Fragmenten wurden diese in horizontalen Agarosegelen (1 % (w/v) in TBE-Puffer (45 mM TRIS, 45 mM Borsäure, 1 mM EDTA pH 8,0)) mit 1 µg/mL Ethidiumbromid zur Detektion bei UV-Licht elektrophoretisch bei Raumtemperatur und 90 V bzw. 120 mA getrennt (109). Die Proben wurden vor der Elektrophorese mit 6x DNA-Probenpuffer (0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol FF, 15 % Ficoll 400) versetzt, als interner Längenstandard wurden 5 µL *1 kb DNA Ladder* (New England Biolabs, Frankfurt) eingesetzt.

3.2.7 Aufreinigung von DNA

Die präparative Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem *QIAquick[®] Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben, wobei mit 30 µL EB-Puffer eluiert wurde.

Zur Abtrennung von kleineren Oligonukleotiden sowie Enzymen z.B. nach der PCR wurden die DNA-Proben nach Anleitung mit dem *QIAquick[®] PCR Purification Kit* (Qiagen, Hilden) gereinigt, die Elution erfolgte dabei mit 50 µL EB-Puffer.

3.2.8 Bestimmung von DNA-Konzentration und -Reinheit

Die DNA-Konzentration einer Probe kann durch Messung des Absorptionsmaximums bei 260 nm bestimmt werden, wobei $A_{260} = 1$ einer Konzentration von 50 µg/mL DNA entspricht.

Proteine hingegen zeigen ein Absorptionsmaximum bei 280 nm, sodass das Verhältnis A_{260}/A_{280} zur Überprüfung der Probe auf Kontaminationen genutzt werden kann. Hierbei gilt:

- $A_{260}/A_{280} = 1$: reine DNA
 $A_{260}/A_{280} > 1$: RNA-Verunreinigungen
 $A_{260}/A_{280} < 1$: Protein-Kontamination.

Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung der DNA-Konzentration stellt die Abschätzung anhand eines Vergleichs der Intensitäten der Banden im Agarosegel mit den Banden des DNA-Längenstandards mit bekannten Konzentrationen dar.

3.2.9 Sequenzierung

Zur Überprüfung der Klonierungen wurden die hergestellten Plasmide mittels der Didesoxymethode nach Sanger *et al.* (113) von den Firmen *Seq/ab* (Göttingen) oder *Agowa* (Berlin) sequenziert. Pro Sequenzierung wurden 0,7 ng DNA lyophilisiert und eingeschickt. Die verwendeten *Primer* und ihre Sequenzen sind in Tabelle 3.6, die Ergebnisse der Sequenzierungen im Anhang (Abschnitt 7.4) aufgeführt. Zur Überprüfung der Elektropherogramme wurde das Programm *Chromas 2.33* (*Technelysium*, Tewantin, Australien) verwendet.

Tabelle 3.6: Für Sequenzierungsreaktionen verwendete Primer.

Nr.	Vektor	Primer	Richtung	Sequenz 5' → 3'
1	MJmtrH/pCRblunt	M13 Reverse M13 Forward (-20)	rückwärts vorwärts	CAGGAAACAGCTATGAC GTAAAACGACGGCCAG
2	MJmtrH/pet22b+	T7-Promotor T7-Terminator	vorwärts rückwärts	AATACGACTCACTATAGGG GCTAGTTATTGCTCAGCGG
3	MJmtrA1/pCRblunt	M13 Reverse M13 Forward (-20)	rückwärts vorwärts	CAGGAAACAGCTATGAC GTAAAACGACGGCCAG
4	MJmtrA2/pCRblunt	M13 Reverse M13 Forward (-20)	rückwärts vorwärts	CAGGAAACAGCTATGAC GTAAAACGACGGCCAG
5	MJmtrA3/pCRblunt	M13 Reverse M13 Forward (-20)	rückwärts vorwärts	CAGGAAACAGCTATGAC GTAAAACGACGGCCAG
6	MJmtrH/pACYC-Duet1	Duet UP2 T7-Terminator	vorwärts rückwärts	TTGTACACGGCCGCATAATC GCTAGTTATTGCTCAGCGG
7	MJmtrA3/pACYC-Duet1	Duet UP2 T7-Terminator	vorwärts rückwärts	TTGTACACGGCCGCATAATC GCTAGTTATTGCTCAGCGG

3.3 Kultivierung von Bakterien

3.3.1 Bestimmung der Zelldichte

Zur Bestimmung der Zelldichte wurde die optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}), welche sich proportional zur Zelldichte verhält, mittels eines Photometers bestimmt.

3.3.2 Kultivierung für die Plasmidpräparation

Für die analytische Plasmidpräparation wurden 5 mL, für präparative Zwecke 100-250 mL LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt und mit plasmidtragenden *E. coli*-Bakterien von einer Agar-Platte bzw. mit 1-2,5 mL einer Übernachtskultur angeimpft. Nach 17 h Schütteln bei 37 °C wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (5000 x g, 4 °C, 10 min).

3.3.3 Kultivierung für die Proteinproduktion

Für die Proteinproduktion wurden von den entsprechenden plasmidtragenden *E. coli*-Stämmen (vgl. Tabelle 3.7) zunächst Glycerinkulturen angelegt. Hierzu wurden 5 mL LB-Medium mit einem geeigneten Antibiotikum versetzt und mit einer Kolonie von einer Festagarplatte angeimpft. Bei 37 °C wurde unter Schütteln bis zu einer OD_{600} von 0,5 angezogen, sodann auf Eis gekühlt und je 830 µL Zellkultur mit 170 µL sterilem Glycerin (37 % w/v) versetzt. Die Glycerinkulturen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Tabelle 3.7: Übersicht über die zur Proteinexpression verwendeten Plasmide und *E. coli*-Stämme.

Protein(e)	Beschreibung	Plasmid(e)	<i>E. coli</i> -Stamm
MMRMtrH	MtrH (33 kDa)	MMRmtrH/pET22b+	BL21 (DE3)
MJMtrA1	vollständiges MtrA (26 kDa) mit Transmembranhelix	MJmtrA1/pET22b+	BL21 (DE3)
MJMtrA2	des-[229-246]-MtrA (24 kDa) 18 C-terminale AS fehlen	MJmtrA2/pET22b+	BL21 (DE3)
MJMtrA3	des-[225-246]-MtrA (24 kDa) 22 C-terminale AS fehlen	MJmtrA3/pET22b+	BL21 (DE3)
MJMtrH	MtrH (36 kDa)	MJmtrH/pET22b+	BL21 (DE3)
MJMtrA1+MJMtrH	vollständiges MtrA (26 kDa) + MtrH (36 kDa)	MJmtrA1/pET22b+ & MJmtrH/pACYC-Duet1	BL21 (DE3)
MJMtrA2+MJMtrH	des-[229-246]-MtrA (24 kDa) + MtrH (36 kDa)	MJmtrA2/pET22b+ & MJmtrH/pACYC-Duet1	BL21 (DE3)
MJMtrA3+MJMtrH	des-[225-246]-MtrA (24 kDa) + MtrH (36 kDa)	MJmtrA3/pET22b+ & MJmtrH/pACYC-Duet1	BL21 (DE3) BL21 (DE3)
MKMtrA	des-[238-252]-MtrA (27 kDa) mit C-terminalem <i>StreptII</i> -Anhängsel 15 C-terminale AS fehlen	MJmtrH/pET22b+ & MJmtrA3/pACYC-Duet1 pCSt_tet(mtrA)	Rosetta(DE3)pLysS
MKMtrH1	MtrH (36 kDa) mit C-terminalem <i>His₆</i> -Anhängsel	pCHis_tet(mtrH1)	Rosetta(DE3)pLysS
MKMtrH2	des-[1-11]-MtrH (35 kDa) mit C-terminalem <i>His₆</i> -Anhängsel 11 N-terminale AS fehlen	pCHis_tet(mtrH2)	Rosetta(DE3)pLysS

Rekombinantes *M. marburgensis* MtrH (MMRMtrH):

Zur Produktion von rekombinantem MtrH aus *M. marburgensis* in *E. coli* BL21 (DE3) wurde mit Ampicillin komplementiertes LB-Medium mit 10 mL/L einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ = 0,7-0,8 angezogen. Es wurde mit 0,5 mM IPTG induziert und nach 3 h Schütteln bei 37 °C geerntet.

Des-[225-246]-MtrA (MJMtrA3) aus *M. jannaschii*:

MJMtrA3 aus *M. jannaschii* wurde in *E. coli* BL21 (DE3) produziert, indem Ampicillin-haltiges LB-Medium mit 100 mL/L einer Übernachtskultur angeimpft und bei 28 °C und langsamem Schütteln inkubiert wurde. Bei einer OD₆₀₀ = 0,7-0,8 wurde mit 0,3 mM IPTG induziert. Nach weiteren 5 h bei 28 °C und langsamem Schütteln wurden die Zellen abzentrifugiert.

Coexpression von des-[225-246]-MtrA und MtrH (MJMtrA3+MJMtrH) aus *M. jannaschii*:

Die Coexpression von des-[225-246]-MtrA und MtrH (MJMtrA3+MJMtrH) aus *M. jannaschii* wurde in die Plasmide MJmtrH/pACYCDuet-1 und MJmtrA3/pet22b+-tragenden *E.coli* BL21 (DE3)-Zellen durchgeführt.

Dazu wurde mit Ampicillin und Chloramphenicol versetztes LB-Medium mit 60 mL/L einer 15 h lang angezogenen Vorkultur angeimpft. Die Zellen ließ man bei 30 °C unter Schütteln bis zu einer $OD_{600} = 0,5-0,7$ wachsen und induzierte dann mit 0,3 mM IPTG. Nach weiteren 5 h bei 30 °C unter Schütteln wurde geerntet.

Des-[238-252]-MtrA mit C-terminalem StreptII-Anhängsel (MKMtrA) aus *M. kandleri*:

Zur Expression von MKMtrA in *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS-Zellen wurde mit Chloramphenicol und Carbenicillin versetztes TB-Medium mit 50 mL/L Übernachtskultur beimpft und bei 37 °C unter Schütteln bis zu einer $OD_{600} = 1$ angezogen. Sodann wurde mit 20 ng/mL AHT induziert und nach 6,5 h bei 25 °C und unter Schütteln geerntet.

Die Bakterien wurden geerntet, sobald die stationäre Phase erreicht war. Dazu wurde die Zellsuspension auf Eis gekühlt und abzentrifugiert (6000 x g, 4 °C, 20 min). Das Zellpellet wurde in 40 mL/L Kulturmedium STE-Puffer (10 mM TRIS/HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8,0) resuspendiert, erneut zentrifugiert (4500 x g, 4 °C, 20 min) und nach Verwerfen des Überstands bei -20 °C gelagert.

3.3.4 Expressionstests und Optimierung der Proteinexpression

Um zu überprüfen, ob das Protein nach der Expression je nach Wachstumsbedingungen in der löslichen oder membranständigen/unlöslichen Fraktion vorlag sowie um eine Maximierung der Ausbeute zu erreichen, wurden Expressionstests durchgeführt. Hierzu wurden sowohl verschiedene Medien (LB-, TB- und M9-Minimalmedium), verschiedene Temperaturen (25-37 °C) als auch unterschiedliche Konzentrationen zur Induktion (IPTG: 0,1-1 mM, AHT: 2-200 ng/mL) getestet. Im Abstand von jeweils 1 h wurde die OD_{600} von 1 mL Zellsuspension bestimmt und die Proben bei -20 °C eingefroren.

Zur Analyse wurden die Proben aufgetaut, zentrifugiert (13000 x g, RT, 10 min) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 50 μ L *BugBuster*[®] *Protein Extraction Reagent* (Novagen, Darmstadt) resuspendiert, mit 12,5 U

Benzonase[®] *Nuclease* (Novagen, Darmstadt) und 5 µg Lysozym versetzt und 30 min bei RT inkubiert. Bei den vor der Induktion genommenen Proben wurde zur Analyse der gesamten in der Zelle enthaltenen Proteine 15 µL dieses Zelllysats mit 5 µL 5x SDS-Probenpuffer (250 mM TRIS/HCl pH 6,8, 500 mM DTT, 10 % (w/v) SDS, 0,5 % Bromphenolblau, 10 % (v/v) Glycerin) versetzt und 15 min auf 99 °C erhitzt. Das restliche Lysat wurde zentrifugiert (13000 x g, RT, 10 min), das Pellet (unlösliche Fraktion/Membranfraktion) in 25 µL SDS-Lösung (1 % w/v) unter Erhitzen auf 99 °C gelöst und 5-15 µL davon mit 5 µL SDS-Probenpuffer versetzt. 10-15 µL des Überstand (lösliche Fraktion/cytosolische Fraktion) wurden ebenfalls mit 5 µL SDS-Probenpuffer versetzt und 15 min auf 99 °C erhitzt. Die Proben wurden anschließend per SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (siehe Abschnitt 3.4.2) und *Western Blot* (Abschnitt 3.4.4) analysiert.

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration einer Lösung wurde nach Bradford bestimmt (114). Dieser Test beruht auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums der freien kationischen Form von Coomassie Brilliant Blue G-250 (im Bradford-Reagenz „*Bio-Rad Protein Assay*“, *Bio-Rad Laboratories*, München enthalten) bei 470 nm zu 595 nm bei der anionischen, an Arginin und aromatische Aminosäurereste gebundenen Form.

Die Proteinbestimmung wurde anhand einer Eichgeraden, bei der A_{595} gegen die Konzentration an BSA (1-5 µg/mL) aufgetragen wurde, durchgeführt.

3.4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)

Für die SDS-Gelelektrophorese wurden vertikale Minigele mit 4 %-igem Sammelgel (4 % (w/v) Acrylamid, 0,1 % (w/v) Bisacrylamid, 125 mM TRIS/HCl pH 6,8, 0,1 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) APS, 0,01 % (v/v) TEMED) und 15 %-igem Trenngel (15 % (w/v) Acrylamid, 0,4 % (w/v) Bisacrylamid, 375 mM TRIS/HCl pH 8,8, 0,1 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) APS, 0,01 % (v/v) TEMED) nach der Methode von Laemmli (115) verwendet.

Je 15 µL Probe wurde mit 5 µL 5x Probenpuffer (250 mM TRIS/HCl pH 6,8, 500 mM DTT, 10 % (w/v) SDS, 0,5 % Bromphenolblau, 10 % (v/v) Glycerin) gemischt, bis zu 15 min auf 99 °C erhitzt und in die Geltaschen pipettiert. Als interner

Standard zum Größenvergleich wurden 8 μL *Prestained Protein Marker, Broad Range (6–175 kDa)* (*New England Biolabs*, Frankfurt) aufgetragen.

Danach wurden Anoden- und Kathodenraum mit Elektrophoresepuffer (25 mM TRIS/250 mM Glycin pH 8,3, 0,1 % (w/v) SDS) gefüllt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei konstanter Stromstärke (20 mA pro Gel) und Spannungsbegrenzung auf maximal 200 V bei 4 °C.

Anschließend wurde das Gel aus der Halterung entfernt und 15 min mit heißer Coomassie-Färbelösung (40 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250) behandelt. Sodann wurde der Hintergrund 30 min mit heißem Entfärber (40 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure) entfärbt und die Gele über Nacht in Wasser gewaschen.

Zur Dokumentation und Aufbewahrung wurden die sorgfältig gewaschenen Gele auf angefeuchtetes Filterpapier (Whatman® Paper Grade I, *Schleicher & Schuell*, Kassel) gelegt und bei 80 °C zwei Stunden unter Vakuum in einer Geltrockenanlage getrocknet.

3.4.3 Blaue native Polyacrylamidgelelektrophorese (BN-Page)

Zur elektrophoretischen Auftrennung von nativen Proteinen und Protein-Komplexen wurde die Blaue Native Gelelektrophorese nach Schagger in einer von Richers für Minigel-Apparaturen abgewandelten Form verwendet (116-118).

10 μL Probe wurde mit 10 μL Probenpuffer (50 mM Tricin, 7,5 mM Imidazol, 0,002 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250, 20 % Glycerin) versetzt und in die Taschen eines 3,5-18 % (w/v) Acrylamid enthaltenden Gradientengels (3,5-18 % (w/v) Acrylamid, 0,09-0,48 % (w/v) Bisacrylamid, 500 mM 6-Aminocapronsäure, 25 mM Imidazol/HCl pH 7,0, 0-16 % Glycerin, 0,4 % (w/v) APS, 0,04 % (v/v) TEMED) pipettiert.

Als interner Vergleichsstandard wurden 8 μg BSA und 25 μg Ferritin in 20 μL Probenpuffer aufgetragen.

Der Anodenraum wurde mit Anodenpuffer (25 mM Imidazol/HCl pH 7,0), der Kathodenraum mit Kathodenpuffer (50 mM Tricin, 7,5 mM Imidazol, 0,002 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250) gefüllt und zunächst 20 min bei 50 V bzw. 12 mA, dann 40 min bei 250 V bzw. 12 mA bei 4 °C aufgetrennt.

Die Proteinbanden wurden nach dem Lauf wie im Abschnitt 3.4.2 beschrieben mit Coomassie Brilliant Blue R-250 gefärbt und dokumentiert.

3.4.4 Elektrophoretischer Proteintransfer und direkter ELISA (*Western Blot*)

Um die durch SDS-Page aufgetrennten Proteine aus der Polyacrylamidmatrix auf PVDF-Membranen zu übertragen, wurde nach der Methode des *semi-dry*-Blottings mit diskontinuierlichem Puffersystem verfahren (119, 120). Ein Stapel aus mit Transferpuffer (25 mM TRIS/150 mM Glycin pH 8,3, 10 % (v/v) Methanol) getränkten Filterpapieren (Whatman® Paper Grade I, Schleicher & Schuell, Kassel), Gel und Membran (Imobilon P, Millipore, Schwalbach) wurde horizontal zwischen zwei Plattenelektroden gelegt. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes (60-70 mA/pro Gel, 1,5 h, 4 °C) wurden die Proteinbanden im Gel auf die Membran übertragen.

Anschließend wurde die Membran zunächst über Nacht bei 4 °C mit BSA geblockt (2 % (w/v) in TBST-Puffer (10 mM TRIS/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,05 % (w/v) Tween 20), dann mit konjugierten Antikörpern (Anti-Polyhistidin-Alkalische Phosphatase-Konjugat aus Maus oder Anti-Strep-Alkalische Phosphatase-Konjugat aus Maus; Qiagen, Hilden) in einer Verdünnung von 1:2000 in TBST-Puffer 2 h bei RT behandelt.

Anti-*M. marburgensis* MtrH-Antikörper wurden von der Firma Genovac (Freiburg) durch Immunisierung mit zwei synthetisch hergestellten Peptiden (AS 133-147: (C)AADESELEALKNTKL und AS 231-249: (C)PSAWDWLREYUKEHKEAWP), die mit den Immunstimulatoren KLH (*Keyhole limpet* Hämocyanin) und Ovalbumin konjugiert worden waren, aus Kaninchenserum gewonnen. Die Membran wurde 1,5 h mit Anti-*M. marburgensis* MtrH-Antikörpern in einer Verdünnung von 1:2000 in TBST-Puffer behandelt, mit TBST-Puffer gewaschen und schließlich 1,5 h mit sekundären Antikörpern (Anti-Kaninchen IgG F(ab')₂-Fragment-Alkalische Phosphatase-Konjugat aus Ziege; 1:3000 in TBST) behandelt.

Nach Waschen der Membran in TBST- und AP-Puffer (100 mM TRIS/HCl pH 9,5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) wurden die Antikörper durch eine Farbreaktion mit BCIP und NBT detektiert (121, 122).

3.4.5 Analytische Gelfiltration

Zur Überprüfung der Reinheit und Einheitlichkeit von Proteinproben, zur Molekulargewichtsbestimmung und Analyse des oligomeren Zustands von Proteinen bzw. Proteinkomplexen sowie zur Erprobung verschiedener Pufferzusammensetzungen wurde die Methode der analytischen Gelfiltration verwendet. Diese wurde mit Hilfe des SMART-Systems (GE Healthcare, München) bei 4 °C durchgeführt.

Hierbei wurde eine minimale Proteinprobe (ca. 100 µg, maximal 50 µL) auf einer geeigneten Gelfiltrationssäule (Superdex 200 PC 3.2/30 oder Superose 6 PC 3.2/30, CV: je 2,6 mL) über 1,2 CV mit einem entsprechenden Puffer bei einer Flussrate von 50 µL/min isokratisch eluiert. Die Detektion erfolgte mittels Messung der UV/Vis-Absorption bei bis zu drei Wellenlängen. Teilweise wurde darüber hinaus eine Fraktionierung des Eluats zur weiteren Analyse durchgeführt.

Zur Abschätzung des Molekulargewichts der eluierten Proteine wurde eine Probenmischung löslicher Standardproteine aufgetragen (*Gel Filtration Calibration Kits LMW und HMW*, GE Healthcare, München) und anhand des Elutionsprofils eine Eichgerade (siehe Anhang, Abschnitt 7.1) erstellt.

3.4.6 Massenspektrometrie

Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS):

Bei dieser Methode wird die flüssige Probe durch eine Kapillare in ein elektrisches Feld gebracht. Durch elektrostatische Kräfte und die Oberflächenspannung gelangen die Ionen in die Gasphase und werden beschleunigt. Am *Interface* gehen die Ionen vom Atmosphärendruck der Ionisationskammer zum Hochvakuum des Analysators über. Im Quadrupol-Analysator erfolgt die Auftrennung der Ionen nach ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis, sodass ein charakteristisches Spektrum entsteht. Dieses Spektrum wird mit Hilfe des Programms *Mascot* mit einer Datenbank verglichen und so das Protein identifiziert.

Die Analyse der Molekularmassen der Peptidfragmente nach einem Trypsin-Verdau von MJMtrA3 (heterolog exprimiertes des-[225-246]-MtrA aus *M. jannaschii*) wurde von der Firma *Proteome Factory* (Berlin) durchgeführt. Dazu wurden die zu untersuchenden Banden aus einem 15 %-igen SDS-Polyacrylamidgel ausgeschnitten und eingeschickt.

Der gereinigte Mtr-Komplex mit Untereinheit MtrH (MtrA-H) sowie der ohne Untereinheit MtrH gereinigte Komplex MtrA-G wurden in einem 15 %-igen SDS-Gel in ihre Untereinheiten aufgetrennt. Die entsprechenden Banden wurden ausgeschnitten und einem Trypsin-Verdau unterzogen. Dazu wurde das *ProteoExtract® All-in-One Trypsin Digestion Kit* (Calbiochem, Darmstadt) nach Vorschrift verwendet. Die verdauten Proben wurden von Herrn Dr. Julian Langer am Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt mittels ESI-MS analysiert.

Matrix-unterstützte Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie mit Flugzeitmassen-Analyse (MALDI-TOF):

Bei dieser Methode werden die Peptidfragmente oder Proteine mit einer Matrixsubstanz (α -Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure) co-kristallisiert. Die Matrix wird nun im Hochvakuum durch Laserbeschuss verdampft, sodass die zu untersuchenden Moleküle mitgerissen und gleichzeitig ionisiert werden. Die Ionen werden im elektrischen Feld beschleunigt und die Flugzeit mittels eines Flugzeitmassen-Analysators gemessen. Hierbei gilt:

$$tof \propto \sqrt{\frac{m}{z}}$$

Gleichung 3.1

tof: Flugzeit (*time of flight*)

m: Masse

z: Ladungszahl

Das erhaltene Masse/Ladungs-Spektrum wird ebenfalls durch Datenbankabgleich mittels des Programms *Mascot* analysiert.

Der Vorteil der Methode liegt darin, dass auch große Massen, d.h. komplette Proteine sowie hydrophobe Proben, detektiert werden können.

Innerhalb dieser Arbeit wurden Peptidfragmente nach Trypsinverdau von MJMtrA3 (heterolog exprimiertes des-[225-246]-MtrA aus *M. jannaschii*) und von verschiedenen Untereinheiten des Mtr-Gesamtkomplexes aus *M. marburgensis* sowie MKMtrA aus SDS-Polyacrylamidgelbanden von Herrn Jörg Kahnt am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg analysiert.

3.5 Proteinreinigung

3.5.1 Membranpräparation aus *M. marburgensis*-Zellen

Zur Präparation der Membranen aus *M. marburgensis* unter aeroben Bedingungen wurde das von Gärtner *et al.* (56) etablierte Protokoll modifiziert. 60 g Zellen wurden auf Eis aufgetaut und in 3-5 mL Lysepuffer 1 (50 mM MOPS/KOH pH 7,0, 10 mL MgCl₂, 2 mM DTT) pro g Bakterienfeuchtgewicht resuspendiert. Nach Zugabe von 30 mg DNase I wurde im Hochdruckhomogenisator (4 x 80 psi/100 bar, 0 °C) aufgeschlossen und das Zelldebris abzentrifugiert (15 000 x g, 2 x 30 min, 4 °C).

Aus dem Überstand wurde durch Ultrazentrifugation (100 000 x g, 3 h, 4 °C) die Membranfraktion abgetrennt. Diese wurde sodann in 50 mL Lysepuffer 1

resuspendiert, mit einem Dispergiergerät homogenisiert und erneut zentrifugiert (100 000 x g, 1 h, 4°C). Beim zweiten Waschschrift wurde in 50 mL Waschpuffer 1 (50 mM MOPS/KOH pH 7,0, 10 mL MgCl₂, 2 mM DTT, 0,05 % (w/v) LM) resuspendiert, homogenisiert und zentrifugiert (100 000 x g, 1 h, 4°C). Die Membranen wurden bis zur weiteren Verwendung mit 15 mL Waschpuffer in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C verwahrt.

Zur Reinigung des Mtr-Komplexes ohne Untereinheit MtrH (MtrA-G) wurde eine abgewandelte Version des oben beschriebenen Protokolls verwendet. 40 g Zellen wurden in 1,75 mL Lysepuffer 2 (50 mM TRIS/HCl pH 7,6, 2 mM DTT) pro g Bakterienfeuchtgewicht resuspendiert, durch Ultraschall-Behandlung (7 x 8 min mit je 5 min Pause, Puls: 50 %, Leistung: 5 W, 0 °C) aufgeschlossen und zentrifugiert (13 000 x g, 2 x 30 min, 4 °C).

Durch Ultrazentrifugation (150 000 x g, 2 h, 4°C) wurden die Membranen abgetrennt und der Überstand verworfen. Die Membranen wurden in 20 mL Lysepuffer 2 resuspendiert, homogenisiert und 8 min mit Ultraschall (Puls: 50 %, Leistung: 5 W, 0 °C) behandelt. Nach erneuter Ultrazentrifugation (150 000 x g, 1,5 h, 4°C) wurden die Membranen ein zweites Mal mit 20 mL Waschpuffer 2 (50 mM TRIS/HCl pH 7,6, 2 mM DTT, 0,05 % (w/v) LM) gewaschen indem sie ebenfalls homogenisiert, mit Ultraschall behandelt (8 min, Puls: 50 %, Leistung: 5 W, 0 °C) und abzentrifugiert (150 000 x g, 1,5 h, 4°C) wurden.

3.5.2 Isolierung und Reinigung des Mtr-Komplexes aus *M. marburgensis*

Die Reinigung des Gesamtkomplexes (MtrA-H) und des Mtr-Komplexes ohne Untereinheit MtrH (MtrA-G) wurde in abgewandelter Form nach Gärtner *et al.* (56) durchgeführt (zur Übersicht siehe Abbildung 3.1). Alle chromatographischen Reinigungsschritte erfolgten mit dem ÄKTA purifier™-System (GE Healthcare, München) bei RT, wobei durch Absorptionsmessung bei 280 nm und 365 nm, dem Absorptionsmaximums des Corrinoïd-Cofaktors, detektiert wurde. Die Fraktionen wurden mittels SDS-Page (siehe Abschnitt 3.4.2) auf ihren Gehalt an Mtr-Komplex überprüft.

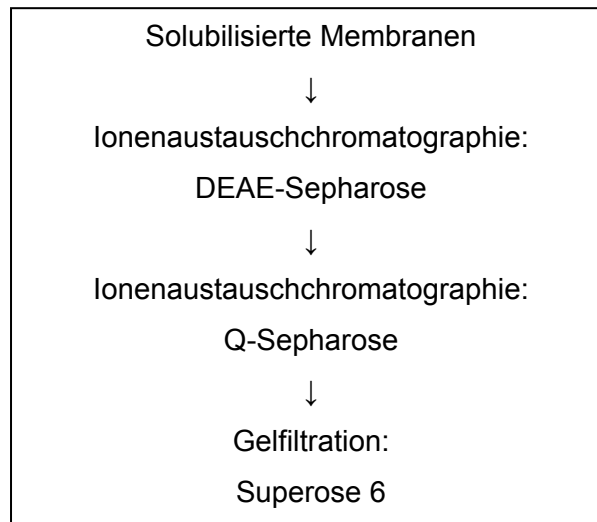


Abbildung 3.1: Übersicht über die Reinigung des Mtr-Komplexes aus *M. marburgensis*.

Solubilisierung:

Die wie in Abschnitt 3.5.1 beschriebenen präparierten Membranen wurden für den Gesamtkomplex (MtrA-H) in 80 mL Solubilisierungspuffer 1 (50 mM MOPS/KOH pH 7,0, 10 mL MgCl₂, 2 mM DTT, 2,5 % LM), für den Komplex ohne Untereinheit MtrH (MtrA-G) in 40 mL Solubilisierungspuffer 2 (50 mM TRIS/HCl pH 7,6, 2 mM DTT, 2,5 % LM) aufgenommen, homogenisiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Durch Ultrazentrifugation (100 000 x g, 1,5 h, 4°C) wurden verbliebene Membranteile abgetrennt.

Ionenaustauschchromatographie mit DEAE-Sepharose:

Das Membransolubilisat (siehe vorheriger Abschnitt) wurde durch eine 0,2 µm-Membran filtriert und einer Ionenaustauschchromatographie auf DEAE Sepharose™ FF (HR 16/10-Säule, CV: 19 mL) unterzogen. Eluiert wurde durch graduelle Erhöhung der NaCl-Konzentration von 0-60 % Puffer B in 5 CV und von 60-100 % Puffer B in 2 CV bei einer die Flussrate von 0,5 mL/min (Pufferlösungen wie folgt). Die Mtr enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt.

Puffer A.1 (für MtrA-H): 50 mM MOPS/KOH pH 7,0, 100 mM NaCl, 2 mM DTT, 0,1 % LM

Puffer B.1 (für MtrA-H): 50 mM MOPS/KOH pH 7,0, 1 M NaCl, 2 mM DTT, 0,1 % LM

Puffer A.2 (für MtrA-G): 50 mM TRIS/HCl pH 7,6, 2 mM DTT, 0,1 % LM

Puffer B.2 (für MtrA-G): 50 mM TRIS/HCl pH 7,6, 1 M NaCl, 2 mM DTT, 0,1 % LM

Ionenaustauschchromatographie mit Q-Sepharose:

Die vereinigten Fraktionen des vorherigen Abschnitts wurden mit der doppelten Menge Puffer A.1 (für MtrA-H) bzw. Puffer A.2 (für MtrA-G) versetzt, und auf einem stärkeren Anionentauscher (HiLoad™ 26/10 Q-Sepharose HP, CV: 53 mL) weiter gereinigt. Für MtrA-H wurde hierfür ein Gradient von 0-100 % Puffer B.1 über 2 CV, für MtrA-G von 0-100 % Puffer B.2 über 8 CV gewählt. Die Flussrate betrug 0,7 mL/min. Diejenigen Fraktionen, welche Mtr enthielten, wurden vereinigt.

Gelfiltration:

Die Proben vom vorherigen Abschnitt wurden auf maximal 1 mL eingengt (Konzentrator mit MWCO von 100 kDa), durch eine 0,2 µm-Membran filtriert und auf Superose 6 (16/60-Säule, CV: 120 mL) mit Gelfiltrationspuffer 1 (50 mM MOPS/KOH pH 7,0, 100 mM NaCl, 10 % (w/v) Glycerin, 2 mM DTT, 0,1 % LM) für MtrA-H und Gelfiltrationspuffer 2 (50 mM TRIS/HCl pH 7,6, 100 mM NaCl, 2 mM DTT, 0,1 % LM) für MtrA-G isokratisch über 1,2 CV mit einer Flussrate von 0,5 mL/min eluiert. Die als Mtr-haltig identifizierten Proben wurden vereinigt und die Ausbeute mittels Bradford-Test (siehe Abschnitt 3.4.1) bestimmt.

3.5.3 Reinigung von rekombinantem *M. marburgensis* MtrH (MMRMtrH)

Die gemäß Abschnitt 3.3.3 kultivierten *E. coli*-Bakterien wurden in 3 mL Lysepuffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0, 0,1 M NaCl, 1 mM EDTA pH 8,0) pro g Bakterienfeuchtgewicht resuspendiert und nach Zugabe von 267 µg/mL Lysozym und 67 µg/mL DNase I 30 min bei RT inkubiert. Durch Ultraschallbehandlung (15 min, Puls: 40 %, Leistung: 5 W, 0 °C) wurden die Zellen aufgeschlossen und die Zellbruchstücke und Einschlusskörperchen abzentrifugiert (43 000 x g, 30 min, 4 °C). Diese wurden anschließend mit 5 ml Waschpuffer (50 mM MOPS/KOH pH 7,0, 100 mM NaCl, 2 mM DTT, 0,005 % LM) gewaschen und erneut zentrifugiert (43 000 x g, 30 min, 4 °C).

Zur Solubilisierung der Einschlusskörperchen wurden diese in 1 mL Entfaltungspuffer (50 mM MOPS/KOH pH 7,0, 5 M Guanidinhydrochlorid, 100 mM NaCl, 2 mM DTT) aufgenommen und über Nacht unter Rühren bei 4 °C inkubiert. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation (43 000 x g, 30 min, 4 °C) abgetrennt.

Der Überstand wurde nun einer Gelfiltration auf Superdex 200 (Superdex 200 16/60 prep grade, CV: 120 mL) unterzogen, wobei mit 1,2 CV Entfaltungspuffer bei 4°C und einer Flussrate von 1 mL/min eluiert wurde. Die durch Absorption bei

280 nm als proteinhaltig identifizierten Fraktionen wurden vereinigt und mit einem Konzentrator mit einem MWCO von 10 kDa auf ca. 250 μ L eingengt.

Die Rückfaltung von MtrH wurde initiiert, indem die Proteinlösung langsam und unter Rühren bei RT in 25 mL Rückfaltungspuffer (50 mM MOPS/KOH pH 7,0, 10 mM NaCl, 2 mM DTT, 0,05 % LM) getropft wurde. Nach Rühren über Nacht bei RT wurde ausgefallenes Protein abzentrifugiert (43 000 x g, 30 min, 4 °C), der Überstand mittels eines Konzentrators mit 10 kDa-Membran auf 1 mL eingengt und durch eine 0,2 μ m-Membran filtriert.

Das rückgefaltete MtrH wurde nochmals einer Gelfiltration auf Superdex 200 (Superdex 200 16/60 *prep grade*, CV: 120 mL) mit 1,2 CV Rückfaltungspuffer bei 4°C, Flussrate 0,5 mL/min unterzogen. Detektiert wurde bei 280 nm. MtrH enthaltende Fraktionen wurden durch SDS-Page identifiziert.

3.5.4 Reinigung von rekombinantem des-[225-246]-MtrA (MJMtrA3) aus *M. jannaschii*

Die wie in Abschnitt 3.3.3 beschriebenen angezogenen *E. coli*-Zellen wurden in 7,5 mL Lysepuffer (50 mM MOPS/KOH pH 7,0, 100 mM NaCl, 1 mM PMSF, 0,1 mM Vitamin B_{12a}) pro g Bakterienfeuchtgewicht resuspendiert und mit 267 μ g/mL Lysozym und 67 μ g/mL DNase I 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde mittels Ultraschallbehandlung (15 min, Puls: 50 %, Leistung: 5 W, 0°C) aufgeschlossen und das Zelldebris durch Zentrifugation (43 000 x g, 30 min, 4 °C) entfernt. Weiterhin wurden die Zellmembranen in einem Ultrazentrifugationsschritt (150 000 x g, 1 h, 4 °C) pelletiert.

Der Überstand (lösliche Fraktion) wurde nun für 30 min auf 70 °C erhitzt und anschließend über Nacht auf 4 °C gekühlt, bis alle denaturierten *E. coli*-Proteine ausgefallen waren. Diese wurden durch Ultrazentrifugation entfernt (150 000 x g, 1 h, 4 °C).

Zur weiteren Reinigung wurde der Überstand durch eine 0,45 μ m-Membran filtriert und auf einer mit Puffer A (50 mM MOPS/KOH pH 7,0) äquilibrierten Q-Sepharose-Säule (HiLoad™ 26/10 Q-Sepharose HP, CV: 53 mL) einer Ionenaustauschchromatographie bei RT unterzogen. Zur Elution wurde ein Gradient von 0-100 % Puffer B (50 mM MOPS/KOH pH 7,0, 1 M NaCl) über 7 CV bei einer Flussrate von verwendet. Detektiert wurde mittels Absorptionsmessung bei 280 nm und 365 nm (Absorptionsmaximum von Vitamin B_{12a}). Die laut SDS-Page MJMtrA3 enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt.

Nach Zugabe von Vitamin B_{12a} bis zu einer Endkonzentration von 0,1 mM wurde zur Entfernung von ungebundenem Vitamin B_{12a} gegen 1 L Gelfiltrationspuffer (50 mM MOPS/KOH pH 7,0, 100 mM NaCl, 10 % (w/v) Glycerin) über Nacht bei 4 °C dialysiert.

Die Probe wurde sodann auf 1 mL eingeeengt (Konzentrator mit 10 kDa MWCO), durch eine 0,2 µm-Membran filtriert und in einer Gelfiltration auf Superdex 200 (Superdex 200 16/60 *prep grade*, CV: 120 mL) über 1,2 CV mit Gelfiltrationspuffer isokratisch bei 4 °C und einer Flussrate von 0,5 mL/min eluiert. Die Detektion erfolgte wiederum bei 280 nm und 365 nm. Nach einer SDS-Page zur Identifizierung von Fraktionen, die MJMtrA3 enthielten, wurden diese vereinigt und einem Bradford-Test unterzogen.

3.5.5 Reinigung und Rückfaltung von co-exprimierten des-[225-246]-MtrA und MtrH (MJMtrA3+MJMtrH) aus *M. jannaschii*

Das wie in Abschnitt 3.3.3 beschrieben gewonnene *E. coli*-Zellpellet wurde in 3 mL Lysepuffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8,0, 1 mM PMSF) pro g Bakterienfeuchtgewicht resuspendiert und mit 267 µg/mL Lysozym und 67 µg/mL DNase I 30 min bei RT inkubiert. Nach dem Ultraschallaufschluss (15 min, Puls: 50 %, Leistung: 5 W, 0 °C) wurde zentrifugiert (43 000 rpm, 30 min, 4 °C), das Pellet in 1 mL Waschpuffer (50 mM MOPS/KOH pH 7,0, 100 mM NaCl, 0,05 % LM) resuspendiert und erneut zentrifugiert (13 000 x g, 30 min, 4 °C).

Die Einschlusskörperchen wurden in 50 µL/mg Entfaltungspuffer (50 mM MOPS/KOH pH 7,0, 5 M Guanidinhydrochlorid, 100 mM NaCl, 2 mM DTT) aufgenommen und bei 4 °C über Nacht unter Rühren inkubiert. Anschließend wurde zentrifugiert (13 000 x g, 30 min, 4 °C) und der Überstand durch eine 0,2 µm-Membran filtriert.

Die Probe wurde nun einer Gelfiltration auf Superdex 200 (Superdex 200 PC 3.2/30, CV: 2,6 mL) mit 1,2 CV Entfaltungspuffer bei 4 °C und Flussrate 50 µL/min unterzogen.

Die laut Absorptionmessung bei 280 nm proteinhaltigen Fraktionen wurden auf 500 µL (Konzentrator mit 10 kDa MWCO) eingeeengt und unter Rühren langsam in das 100-fache Volumen an Rückfaltungspuffer (50 mM MOPS/KOH pH 7,0, 100 mM NaCl, 0,01 mM Vitamin B_{12a}, 0,5 % OG) getropft. Nach fortgesetztem Rühren bei 4 °C über Nacht wurde die Lösung auf 1 mL (Konzentrator mit 10 kDa MWCO) konzentriert und durch eine 0,2 µm-Membran filtriert.

Die rückgefaltete Proteine wurden wiederum einer Gelfiltration auf Superdex 200 (Superdex 200 PC 3.2/30, CV: 2,6 mL) bei 4 °C und Flussrate 50 µL /min unterzogen. Es wurde mit 1,2 CV Gelfiltrationspuffer (50 mM MOPS/KOH pH 7,0, 100 mM NaCl, 0,5 % OG) eluiert und zur Detektion die Absorption bei 280 nm gemessen, sowie die Fraktionen mittels SDS-Page analysiert.

3.5.6 Reinigung von rekombinatem des-[238-252]-MtrA mit C-terminalem StrepII-Anhängsel (MKMtrA) aus *M. kandleri*

Die nach der Beschreibung in Abschnitt 3.3.3 gewonnenen *E. coli*-Zellen wurden in 7,5 mL Lysepuffer (50 mM MOPS/KOH pH 7,0, 100 mM NaCl, 1 mM PMSF, 0,1 mM Vitamin B_{12a}) pro g Bakterienfeuchtgewicht resuspendiert und mit 267 µg/mL Lysozym und 67 µg/mL DNase I 30 min bei RT inkubiert. Nach der Ultraschallbehandlung (15 min, Puls: 50 %, Leistung: 5 W, 0 °C) wurde das Zelldebris durch Zentrifugation (43 000 x g, 30 min, 4 °C) pelletiert und die Zellmembranen aus dem Überstand durch Ultrazentrifugation (150 000 x g, 1 h, 4 °C) entfernt.

Zur Fällung der *E. coli*-Proteine wurde der Überstand (lösliche Fraktion) zunächst für 30 min auf 70 °C erhitzt, dann über Nacht auf 4 °C gekühlt. Denaturiertes Protein wurden durch Ultrazentrifugation entfernt (150 000 x g, 1 h, 4 °C).

Der MKMtrA enthaltende Überstand wurde auf 500 µL konzentriert (Konzentrator mit 10 kDa MWCO), durch eine 0,2 µm-Membran filtriert und auf eine mit Puffer W (100 mM TRIS/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl) äquilibrierte *Strep-Tactin*[®]-Säule (*Strep-Tactin*[®] Spin Column, CV: 1 mL) aufgetragen. Es wurde nach Angaben des Herstellers (*IBA*, Goettingen) nach viermaligem Waschen mit je 100 µL Puffer W mit 2 x 50 µL Puffer BE (100 mM TRIS/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 2 mM D-Biotin) eluiert. Die gewonnenen Proben wurden mittels *Western Blot* analysiert.

3.5.7 Reinigung von rekombinanter F₄₂₀-abhängiger N⁵,N¹⁰-Methylen-H₄MPT-Dehydrogenase (KMtd) aus *M. kandleri*

Die Reinigung der F₄₂₀-abhängigen N⁵,N¹⁰-Methylen-H₄MPT-Dehydrogenase (KMtd) aus *M. kandleri* wurde wie bei Klein und Thauer (123) beschrieben von Frau Ulrike Demmer am Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt durchgeführt.

Die Substrate H₄MPT und Methenyl-H₄MPT⁺ sowie das Cosubstrat F₄₂₀ wurden aus *M. marburgensis*-Zellen von Frau Johanna Moll am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg gereinigt (124, 125). Methylen-H₄MPT

entstand aus der spontanen Reaktion von H₄MPT mit Formaldehyd und anschließender Lyophilisierung. Chemisch synthetisiertes F₀ wurde von Herrn Prof. Dr. Thomas Carell (Fakultät für Chemie und Pharmazie, Ludwig-Maximilians-Universität München) zur Verfügung gestellt.

3.6 Röntgenkristallographische Methoden

3.6.1 Kristallisation

Um die Proteinlösungen für die Kristallisation zu verwenden, wurde falls nötig ein Pufferwechsel mittels Dialyse oder einer Entsalzungssäule (*PD-10 Desalting Column*, GE Healthcare, München) durchgeführt und bis zu einer geeigneten Proteinkonzentration eingeeengt. Die eingesetzten Proteinlösungen sind in Tabelle 3.8 aufgeführt. Alle Kristallisationsversuche wurden mittels Gasphasendiffusion durchgeführt.

Tabelle 3.8: Für die Kristallisation verwendete Proteinlösungen.

Protein	Konzentration	Puffer
Mtr(A-H) aus <i>M. marburgensis</i>	22 mg/mL	50 mM MOPS/KOH pH 7,0 10 mM MgCl ₂ 100 mM Ammoniumsulfat 10 % Glycerin 2 mM DTT 0,1 % LM
MJMtrA3	20-92 mg/mL	10-50 mM MOPS/KOH pH 7,0 0-100 mM NaCl 0-100 mM Ammoniumsulfat 2,5-20 % Glycerin 0-1 mM DTT 0-2 mM Vitamin B _{12a}
KMtd	15 mg/mL	10 mM MES pH 5,5 5 mM Methylen-H ₄ MPT bzw. 5 mM Methenyl-H ₄ MPT ⁺ 1 mM F ₀ bzw. 5 mM F ₄₂₀

Zum Auffinden von initialen Kristallisationsbedingungen wurde die *sitting drop*-Methode in Kristallisationsplatten mit 96 Vertiefungen verwendet. Als Reservoirlösung wurden 90-100 µL der kommerziell erhältlichen *Sparse matrix screens* oder selbst entwickelte *Screens* eingesetzt. In den dafür vorgesehenen Vertiefungen wurden je 0,2-1 µL Proteinlösung und Reservoirlösung gemischt, die Platten mit Klebeband versiegelt und bei 4 °C oder 18 °C gelagert.

Zur Verfeinerung der erfolgreichen Bedingungen wurde die *Hanging drop*-Methode in Kristallisationsplatten mit 24 Vertiefungen, die mit silanisierten

Deckplättchen und Silikonfett abgedichtet wurden, verwendet. Das Volumen der Reservoirlösung betrug hier 0,5-1 mL, der Tropfen bestand aus 1 μ L Bodenlösung und 1 μ L Proteinlösung.

Die Co-Kristallisation von KMtd mit Substrat und Cosubstrat wurde von Frau Ulrike Demmer (Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt) im Anaerobenzelt und unter Rotlicht durchgeführt. Sämtliche Lösungen wurden dazu anaerobisiert und je 500 μ L Reservoirlösung in *Sitting drop*-Kristallisationsplatten mit 24 Vertiefungen gefüllt. Je 1 μ L Reservoirpuffer wurde mit 1 μ L Proteinlösung in den dafür vorhergesehenen Vertiefungen gemischt, die Platten mit Klebeband verschlossen und bei 20 °C gelagert.

Zum Einfrieren der Proteinkristalle vor der röntgenographischen Untersuchung wurde zunächst das Auftreten von Eisringen im Streubild der mit verschiedenen Glycerin- oder PEG-Konzentrationen als Frostschutzmittel versetzten Reservoirlösung überprüft. War die geringst mögliche Frostschutzmittelkonzentration gefunden, wurden die Kristalle darin kurz inkubiert, mit einem passenden *Cryo-loop* eingefangen und im laminaren Stickstoffstrom bei 100 K eingefroren. Bis zur Messung wurden die Kristalle in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.6.2 Datensammlung und -prozessierung

Sämtliche Daten zur Röntgenstrukturanalyse wurden am SLS (Synchrotron, Villigen, Schweiz), *Beamline* PX02 gemessen. Die Rotation pro *image* betrug standardmäßig 0,5° bei einer Wellenlänge von ca. 1 Å (12,3984 keV).

Die gesammelten Daten wurden mittels des Programms *XDS* prozessiert (99), wobei zunächst die möglichen Bravais-Typen bestimmt und die Reflexe entsprechend indiziert wurden. Die Raumgruppe konnte anhand der Statistiken für die jeweilige Raumgruppe sowie die Analyse von Auslöschungen durch Schraubenachsen bestimmt werden. Danach konnten die indizierten und integrierten Reflexintensitäten mittels der Programme *XSCALE* und *XDSCONV* skaliert und reduziert sowie die Friedel-Paare zusammengefasst werden.

Um die Anzahl von Monomeren pro asymmetrischer Einheit voraussagen zu können, wurde der Matthews-Koeffizient V_M nach Gleichung 3.2 mit dem Programm *MATTHEWS_COEFF* (*ccp4-suite*) berechnet. Werte von n , für die V_M zwischen 1,7 Å³/Da und 3,5 Å³/Da liegt, entsprechen nach Gleichung 3.3 einem Solvensgehalt von 27-65 %. Laut statistischen Untersuchungen liegt der Solvensgehalt von Proteinkristallen am häufigsten bei 43 % und der V_M somit bei 2,2 Å³/Da (126). Werte von n , für die V_M nahe dem statistischen Maximum liegt, sind somit wahrscheinlich.

$$V_M = \frac{V_Z}{n \cdot z \cdot M_r} \quad \text{Gleichung 3.2}$$

$$V_{Solv} = 1 - \frac{1,23}{V_M} \quad \text{Gleichung 3.3}$$

- V_M : Matthews-Koeffizient
 V_Z : Volumen der Elementarzelle
 n : Anzahl der Moleküle pro asymmetrische Einheit
 z : Anzahl der asymmetrischen Einheiten pro Elementarzelle
 M_r : Molekulargewicht
 V_{Solv} : Solvensgehalt

3.6.3 Lösung des Phasenproblems

Da für die in dieser Arbeit vorgestellte Proteinstruktur bereits ein hinreichend gutes Modell vorlag, konnte zur Lösung des Phasenproblems die Methode des molekularen Ersatzes angewendet werden. Dazu wurde das im Programmpaket *ccp4-suite* enthaltene Programm *AMoRe* benutzt (88, 127). Die mittels der Patterson-Funktion $P(uvw)$ (siehe Gleichung 3.4) aus den Quadraten der Strukturfaktoramplituden $F(hkl)$ durch Fourier-Transformation berechneten Differenzvektoren u , v , und w der Elektronendichteverteilung können als ursprungscentrierte Abstandsvektoren aufgrund ihres Betrags in Selbstvektoren (Länge 0), kurze intramolekulare Vektoren und lange intermolekulare Vektoren eingeteilt werden.

$$P(uvw) = \sum_{hkl} |F(hkl)|^2 \cdot e^{-2\pi i(hu+kv+lw)} \quad \text{Gleichung 3.4}$$

- uvw : Differenzvektor der Elektronendichte
 $|F(hkl)|$: Strukturfaktoramplitude

Liegt nun ein geeignetes Modell vor, können dessen intramolekulare Vektoren berechnet, verglichen und in einem Algorithmus durch eine entsprechende Rotationsfunktion zu einer übereinstimmenden Orientierung gebracht werden. Mit der aus der Indizierung erhaltenen Kristallsymmetrie können nun die intermolekulare Vektoren verglichen und durch eine Translationsfunktion ebenfalls angepasst werden. In einem Verfeinerungsschritt kann die Positionierung des Modells und die Anpassung an die beobachteten Daten weiter verbessert werden. Die Berechnung der Strukturfaktoren F_{calc} und der entsprechenden Phasen aus dem Modell sowie die

beobachteten Strukturfaktoren aus den Messdaten F_{obs} ermöglichen die Erstellung von Elektronendichtekarten.

3.6.4 Modellbau und Verfeinerung

Zum Modellbau wurde in dieser Arbeit das Grafikprogramm *Coot* benutzt (89), bei dem anhand des Vergleichs der $(2F_{obs} - F_{calc})$ -Elektronendichtekarte, die eine Hüllfunktion des Modells darstellt, mit der Differenz-Fourierkarte ($F_{obs} - F_{calc}$), die die Unterschiede zwischen dem Modell und den gemessenen Daten anzeigt, eine manuelle Anpassung des zuvor erstellten groben Modells vorgenommen wurde. Das neue, verbesserte Modell floss dann in die Verfeinerung mit dem Programm *REFMAC* ein (128), bei dem mittels Minimierung der Atomkoordinaten und des *B*-Faktors sowie durch die Einführung von *NCS-restraints* eine neue Elektronendichtekarte berechnet wurde, welcher wiederum im nächsten Schritt in *Coot* das Modell angepasst wurde. In mehreren Durchgängen wurde sich so Schritt für Schritt der tatsächlich vorliegenden Struktur angenähert.

Für die Substrate Methylen- H_4MPT und Methenyl- H_4MPT^+ sowie das Cosubstrat F_{420} wurden zunächst separat mit dem Programm *PRODRG* Modelle berechnet und manuell angeglichen (97). Diese wurden sodann in *Coot* in die Differenz-Fourierkarten modelliert und ebenfalls der schrittweisen Verfeinerung mittels *REFMAC* und *Coot* unterzogen.

3.6.5 Validierung von Proteinstrukturen

Um den Fortschritt der Verfeinerung und die Qualität der vorliegenden Struktur zu beurteilen, wurden die in *REFMAC* angegebenen *R*-Faktoren beobachtet (siehe Gleichung 3.5 und 3.6).

$$R_{cryst} = \frac{\sum_{hkl} |F_{obs}(hkl) - k \cdot F_{calc}(hkl)|}{\sum_{hkl} |F_{obs}(hkl)|} \quad \text{Gleichung 3.5}$$

$$R_{free} = \frac{\sum_{hkl \in T} |F_{obs}(hkl) - k \cdot F_{calc}(hkl)|}{\sum_{hkl \in T} |F_{obs}(hkl)|} \quad \text{Gleichung 3.6}$$

- $|F_{obs}(hkl)|$: Strukturfaktoramplitude aus den Messdaten
 $|F_{calc}(hkl)|$: Berechnete Strukturfaktoramplitude des Modells
 k: Auflösungsabhängiger Skalierungsfaktor

R_{cryst} ist hierbei ein Maß für die Übereinstimmung des Strukturmodells mit den Messwerten. R_{free} wird analog berechnet, jedoch ohne Einbeziehung eines zufällig ausgewählten Testdatensatzes von 5 % der Reflexe, der nur zur Validierung des Modells verwendet wird (129).

Darüber hinaus wurden in *Coot* die Bindungswinkel und -längen, die Rotamere der Seitenketten im Vergleich zu Standardwerten und die Ramachandran-Torsionswinkel überprüft. Ein dreidimensionaler Vergleich von Proteinstrukturen wurde mittels des Programms *DALI* durchgeführt (90, 91).

3.6.6 Strukturdarstellung

Für die Erstellung von Abbildungen der Strukturmodelle wurde das Grafikprogramm *PyMOL* verwendet. Um auch Elektronendichte anzeigen zu können, wurde mit *REFMAC* eine entsprechende Datei im mtz-Format erstellt, diese in *PyMOL* eingelesen und so modifiziert, dass nur der für die Abbildung relevante Teil zu sehen war.

3.7 Elektronenmikroskopische Einzelpartikelmessung

3.7.1 Probenvorbereitung

Sämtliche elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden von Frau Dr. Dilem Hizlan, Frau Dr. Janet Vonck und Frau Ming Yang am Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt durchgeführt.

Beim Verfahren mit Negativfärbung wurde die auf ein Trägernetz aufgetragene Probe des Mtr-Komplexes (MtrA-H) mit 1 % Uranylacetat als Kontrastmittel versetzt und luftgetrocknet. Das Kontrastmittel bildet um die Probenpartikel eine amorphe, vom Elektronenstrahl nicht durchdringbare Schicht, sodass die Partikel in der elektronenmikroskopischen Untersuchung hell vor dunklem Hintergrund erscheinen.

Zur Vorbereitung für die Messung unter *Cryo*-Bedingungen wurden 3 μL der Probe (MtrA-H; 0,8 mg/mL in 20 mM MOPS/KOH pH 7,0, 10 mM MgCl_2 , 0,05 % LM, 1 mM DTT) für 30 s auf ein beglimmtes (ionisiertes) Karbongitter (*Quantifoil Micro Tools*, Jena) aufgetragen. Nach Entfernen der überschüssigen Flüssigkeit wurden diese in flüssigem Ethan ($-180\text{ }^\circ\text{C}$) schockgefroren.

3.7.2 Datensammlung und -prozessierung

Das Negativfärbungsverfahren wurde dazu verwendet, die Qualität der Probenpräparation, z. B. deren Homogenität, zu beurteilen. Die Datensammlung für die Einzelpartikelmessungen geschah dann unter *Cryo*-Bedingungen. Die Bilder wurden mit einem *Philips CM120* Elektronenmikroskop (*Philips*, Hamburg) bei 120 V und geringer Strahlendosis mit 44 000-facher Vergrößerung auf einem *Kodak SO-163 Electron Emulsion Film* (*Eastman Kodak Company*, Rochester, USA) aufgenommen, welcher mit einem *Kodak D-19* Entwickler (*Eastman Kodak Company*, Rochester, USA) für 12 min entwickelt wurde. Die Negative wurde mittels eines *Zeiss SCAI Scanners* (*Carl Zeiss*, Jena) mit einer Pixelgröße von 7 μm eingelesen. Benachbarte Pixel wurden gemittelt, sodass die Probe schlussendlich mit einer Pixelgröße von 3,18 Å erfasst wurde.

3.7.3 Datenanalyse und Rekonstruktion

Zur Auswahl der Partikel wurde das Programmpaket *EMAN* verwendet (130). Die *CTF* (Kontrast-Transfer-Funktion) wurde mit *CTFFIND3* berechnet und mit dem Programm *ctfit* des *EMAN*-Programmpakets einberechnet (131). Für die Rekonstruktion wurden 7380 Einzelpartikel einbezogen. Die Klassensummen für Abbildung 4.8a wurden mit dem Programm *IMAGIC* (*Image Science Software*, Berlin) erstellt.

4 Ergebnisse

4.1 Planung und Herstellung der Vektorkonstrukte

4.1.1 Sekundärstrukturanalyse zur Planung der Konstrukte MJmtrA1, MJmtrA2 und MJmtrA3

Vor der Planung der Vektorkonstrukte zur rekombinanten Erzeugung von Untereinheit MtrA aus *M. jannaschii* wurde eine Sekundärstrukturanalyse mit Hilfe der Programme *PredictProtein* und *SOSUI* durchgeführt. Basierend auf der *PHD*-Methode, die *PredictProtein* verwendet, wurde eine die achtzehn C-terminalen Aminosäurereste (AS 228-245) umfassende Transmembranhelix identifiziert. Durch *SOSUI* ergab sich davon abweichend eine C-terminale Transmembranhelix von 22 Aminosäureresten (AS 224-245). Daraufhin wurden drei verschiedene Konstrukte, zum einen zur vollständigen Expression (MJmtrA1), zum anderen um die Hydrophobizität des Proteins zu senken zur Expression zweier verkürzter Proteine MJmtrA2 (achtzehn C-terminale AS fehlen) und MJmtrA3 (22 C-terminale AS fehlen), angefertigt.

4.1.2 Sequenzvergleich zur Planung der Konstrukte MKmtrH1 und MKmtrH

Für die Produktion von *M. kandleri* MtrH in *E. coli* wurden zwei verschiedene Vektorkonstrukte hergestellt. Das eine enthielt eine vollständig Version des Gens (pCHis₆_tet(mtrH1) bzw. MKmtrH1), im zweiten wurde das Gen um die für die elf N-terminalen Aminosäuren codierenden Basenpaare verkürzt (pCHis₆_tet(mtrH2) bzw. MKmtrH2). Diese Verkürzung wurde vorgenommen, da ein Sequenzvergleich von MtrH aus *M. marburgensis*, *M. jannaschii* und *M. kandleri* mit der 5-Methyltetrahydrofolat Corrinoid/Eisen-Schwefel-Protein Methyltransferase aus *Moorella thermoacetica* (*Clostridium thermoaceticum*), die ebenfalls Pterin bindet und deren Kristallstruktur bereits vorliegt (RCSB-Proteindatenbankeintrag 1F6Y) (132), zeigte, dass bei ansonsten großer Sequenzhomologie der Hauptunterschied aus jenen bei *M. thermoacetica* fehlenden 11 N-terminalen Aminosäuren bestand (siehe Abbildung 4.1). Außerdem wurde den Konstrukten MKmtrH1 und MKmtrH2 jeweils ein C-terminales His₆-Affinitätspeptid angehängt.

MRRMtrH	MFRFD-KEQIVLDIAGTKIGGQPGEYPTVLAGTIFYGGHSIIIEDEKAGVFDKDKAEALIK	59
MJMtrH	MFKFD-REQMVVEIAGRKIGGQPGEYPTALAGTIFYARHKIVEDERKGFIDKAAAEEDLIN	59
MKMtrH	MFYYPGKEQKVCIDICGVKVGQPGEYPTVLAGTIFYAGHKIVKDEDKGFIDEEAAEELIK	60
Q46389_MOOTH	-----MLIIGERINGMFGDIKRAIQ-----ER-----DPAPVQEWAR	32
	* * : : * * : : * * : :	
MRRMtrH	TQEEMSDVTGNPHIVQTFGQTPEAIVKYLEFVGDITDAPFFIDSTSGEARIAGAEYASEV	119
MJMtrH	KQAEMEDITGNPALVQVFGGTPEALVNYIDFVAEVWDGPMLLDSTSGEARMAAAKRATEA	119
MKMtrH	MEEELADETGNPMMAHIMGESEEAIRYLDWVADVTDAPIIIVDSTEAEVKVAAVKHAQEV	120
Q46389_MOOTH	RQEEGGARALDLNVGPAVQDKVSAMEWLVEVTQEVSNTLCLDSTNIKAIEAGLKKCKN-	91
	: * : : : . . .* : : . : : : : : : * * . : . : :	
MRRMtrH	GLEDRAIYNSVNMAADESELEALKNTKLSASIVLGFNPMDPTVEGKIGIWEDGA-GTIDK	178
MJMtrH	GYAKQCIYNSINVSIDEQEYQVLVESDLEASIVLCFDPMDPTVEGKINVLTTNGG-KTADK	178
MKMtrH	GLAERVVYNSINASVEDEEQAIKESDCNSAIVLAFNPMDASVEGRMKILTEGEEGVSEK	180
Q46389_MOOTH	----RAMINSTNAEREKVEKLFPLAVEHGAALIG-----LTMNKGTIPKDSD-TRLAF	139
	: : * * * : . * . : : : : : : : : : : : : : :	
MRRMtrH	GLLEMAADCgidkylMDVAVTPLGQAGAVRTSFAVKSkgypVgSGIHNVPSAWDwLR	238
MJMtrH	GMLELAEKAGIKYPLIDTAVTPLGNGAGAAVRASFAVKALFGYPVgSGIHNIpSAWDwLR	238
MKMtrH	GMLEISDECGIENPLIDTAYTPFGSGAGTAYKVTLAVKAKLGLPVGGAPHNVPSAWDwLR	240
Q46389_MOOTH	AMELVAAADEFGLPMEDLYIDPLILPANVAQDHAPEVLKTL-QQIKMLADPAPKTVLGLS	198
	. : : : : : * : * : * . * : * : : : : . * . : *	
MRRMtrH	EYKKEHKEAWP-----VCDVGSNLIQMAGGDFVLYGPIENARMAFPACAMADIFI	289
MJMtrH	EFRKQLREAGEREKAKDIHHVCDVGANLVQVMASGDFVLYGPIDNAYMTFPVAVMVDAIL	298
MKMtrH	DFMKKLKEEGKEEWAELAHESDWSNVVAATLCCDYLLFGPIENAPAIWPVAVMVDALI	300
Q46389_MOOTH	NVSQNCQ-----NRPLINRTFLAMAMACGLDAAIADACDEALIE	237
	: : : : : : : : : : : : : : : : : : : :	
MRRMtrH	SEAAKDIGTEA-VEDHPFFKLL---	310
MJMtrH	AEAAKELGIEP-IDTHPFKLV---	319
MKMtrH	VEANEDVGVEPQVEEHPANIVR---	322
Q46389_MOOTH	TAATAEILLNQTVYCDsFVKMFkTR	262
	* : : : : . . :	

Abbildung 4.1: Sequenzvergleich der Untereinheit MtrH der N^5 -Methyl- H_4 MPT:Coenzym M-Methyltransferase (MtrH) aus *M. marburgensis* (MMR), *M. jannaschii* (MJ) und *M. kandleri* (MK) mit der Pterin bindenden 5-Methyltetrahydrofolat Corrinoid/Eisen-Schwefel-Protein Methyltransferase aus *Moorella thermoacetica* (Q46389_MOOTH). Identische Aminosäurereste sind mit * gekennzeichnet, ähnliche mit Punkt und Doppelpunkt.

4.1.3 Herstellung der Vektorkonstrukte

Die in Tabelle 3.1 (siehe Abschnitt 3.1) aufgeführten Vektorkonstrukte wurden wie im Abschnitt 3.2 beschrieben hergestellt und das jeweilige Ergebnis anhand einer Sequenzierung überprüft (siehe Anhang, Abschnitt 7.4). Vektorkarten der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind ebenfalls im Anhang (Abschnitt 7.2) zu finden.

4.2 Der N^5 -Methyl- H_4 MPT:Coenzym M Methyltransferasekomplex aus *M. marburgensis*

4.1.4 Isolierung und Reinigung

Membranpräparation und Solubilisierung:

Für die Reinigung des Gesamtkomplexes MtrA-H wurden die *M. marburgensis*-Zellen wie in Abschnitt 3.5.1 beschrieben im Hochdruckhomogenisator aufgeschlossen. Dadurch konnte der Anteil an vollständigem, Untereinheit MtrH enthaltendem Komplex in der Membranfraktion erhöht werden. Wie hoch dieser Anteil war, konnte jedoch erst nach dem ersten säulenchromatographischen Reinigungsschritt anhand einer Analyse mittels SDS-Page der hierbei gesammelten Fraktionen bestimmt werden (siehe folgender Abschnitt). Um erwähnten Anteil zu erhöhen, wurden neben unterschiedlichen Aufschlussmethoden auch verschiedene Pufferlösungen zur Membranpräparation und Solubilisierung getestet. Die pH-Werte wurden zwischen 4,0 und 7,0, der NaCl-Gehalt von 0-2 M variiert und LM wurde gegen 2,5 % (w/v) CHAPS ausgetauscht. Es zeigte sich jedoch, dass dadurch kaum Einfluss auf den Gehalt der Fraktionen an MtrH genommen werden konnte, woraus geschlossen wurde, dass dieser vor allem vom möglichst schonenden Zellaufschluss abhängig war.

Dies wurde sich im Umkehrschluss bei der Reinigung des Komplexes MtrA-G ohne Untereinheit MtrH zunutze gemacht, indem die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen und die aus dem Lysat abgetrennten Membranen bei insgesamt zwei Waschrufen wiederum mit Ultraschall behandelt wurden (siehe Abschnitt 3.5.1). Durch diese Vorgehensweise bei der Membranpräparation wurde Untereinheit MtrH bereits größtenteils aus dem Komplexverband gelöst, wie sich nach der Analyse der bei der Ionenaustauschchromatographie auf DEAE-Sepharose gesammelten Fraktionen und der vollständig gereinigten Proben zeigte (siehe folgender Abschnitt).

Sowohl MtrA-H als auch MtrA-G wurden schließlich mit 2,5 % LM solubilisiert und die restlichen Membranteile durch Ultrazentrifugation abgetrennt.

Ionenaustauschchromatographie mit DEAE-Sepharose:

Für den ersten chromatographischen Reinigungsschritt wurde das Membransolubilisat (siehe vorheriger Abschnitt) auf den schwachen Anionenaustauscher DEAE Sepharose™ FF aufgetragen. Der Gesamtkomplex (MtrA-H) wurde bei 306-404 mM NaCl (23-34 % Puffer B.1) eluiert, der Komplex ohne Untereinheit MtrH (MtrA-G) bei 300-400 mM NaCl (30-40 % Puffer B.2) (siehe Abbildung 4.2).

Bei der Reinigung des Gesamtkomplexes MtrA-H erhielt man zunächst einige Fraktionen, die der zur Analyse durchgeführten SDS-Page zufolge zwar den Komplex, jedoch im Vergleich zu den anderen Untereinheiten nur geringe Mengen der 34 kDa-Untereinheit MtrH enthielten. Diesen folgten mehrere Fraktionen mit dem vollständigen, MtrH enthaltenden Komplex. Schließlich nahm der Gehalt an MtrA-H ab und stattdessen traten diverse Verunreinigungen hinzu (siehe SDS-Page, Abbildung 4.2). Bei der Vereinigung der Fraktionen galt es einen Kompromiss zu schließen zwischen der Menge an Gesamtkomplex einerseits und der Reinheit der Proben andererseits. Die Fraktionen mit geringerem Gehalt an Untereinheit MtrH wurden bei diesem ersten Reinigungsschritt mit vereinigt, da das Vorliegen eines Gleichgewichts zwischen dem Gesamtkomplex MtrA-H auf der einen Seite und Komplex MtrA-G plus lösliche Untereinheit MtrH auf der anderen nicht ausgeschlossen werden konnte und eine weitere Dissoziation so gering wie möglich gehalten werden sollte.

Um den Anteil an Fraktionen mit dem vollständigen Komplex MtrA-H zu erhöhen, wurden auch bei der Ionenaustauschchromatographie auf DEAE-Sepharose verschiedene Pufferzusammensetzungen zur Bindung und Elution getestet. Die pH-Werte wurden ebenfalls zwischen 4,0 und 7,0 sowie der NaCl-Gehalt von Puffer A.1 zwischen 0 mM und 450 mM variiert. Es zeigte sich jedoch, dass die Versuche die Bindung von MtrH an den restlichen Komplex MtrA-G kaum veränderten, woraus geschlossen wurde, dass letztere vor allem von der Membranpräparation abhängig war.

Bei der säulenchromatographischen Reinigung auf DEAE-Sepharose des Komplexes MtrA-G ohne Untereinheit MtrH wurden dagegen so gut wie keine Fraktionen mit MtrH eluiert (siehe Abbildung 4.2) und alle MtrA-G enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt.

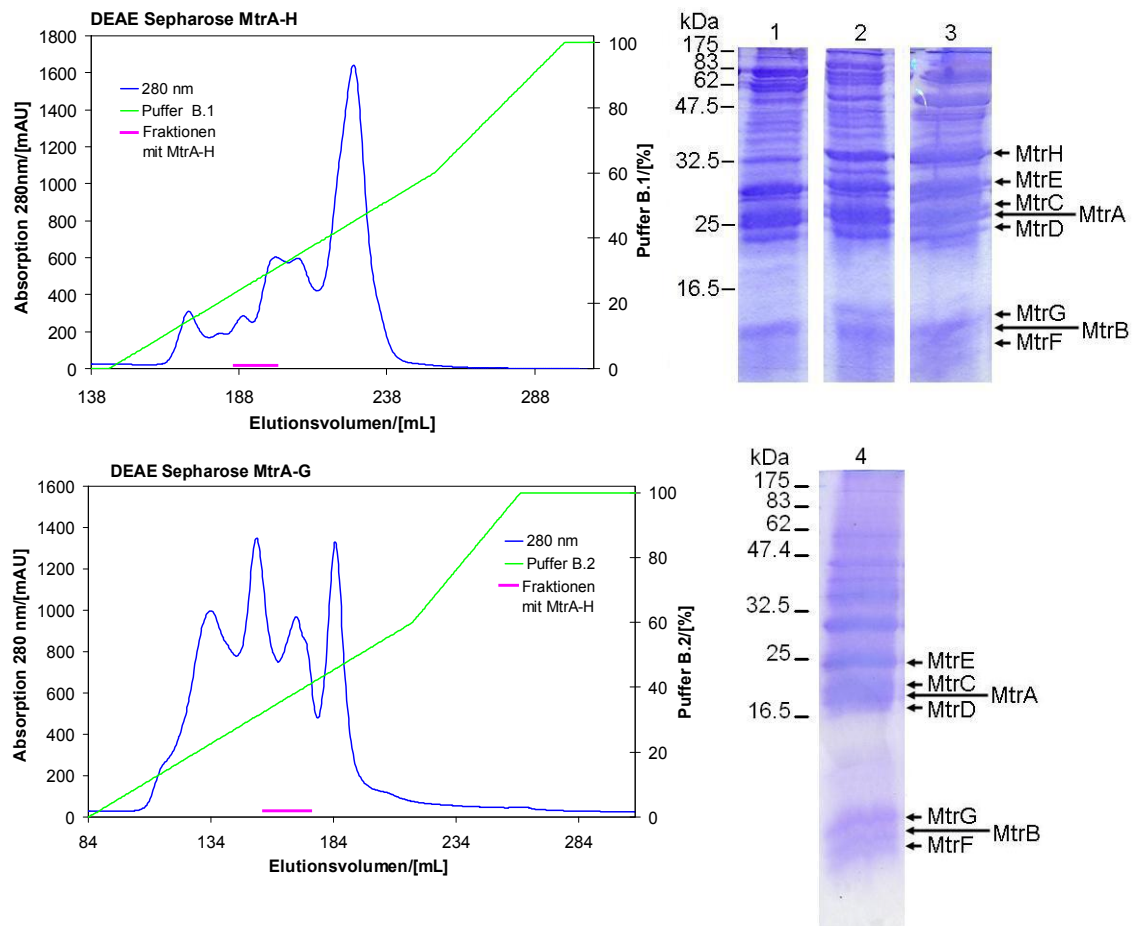


Abbildung 4.2: Elutionsprofile und Coomassie-gefärbte SDS-Pages der zugehörigen Fraktionen der Ionenaustauschchromatographie auf DEAE-Sepharose des vollständigen Komplexes MtrA-H und des Komplexes MtrA-G ohne die 34 kDa-Untereinheit MtrH. In Bahn 1 der SDS-Page ist eine Fraktion mit wenig MtrH zu sehen, in Bahn 2 befindet sich der vollständige Komplex MtrA-H, in Bahn 3 nimmt der Anteil an Verunreinigungen im Bereich zwischen 83 und 40 kDa neben dem Komplex MtrA-H zu. In Bahn 4 ist die Probe einer Fraktion nach dem modifizierten Reinigungsprotokoll zu sehen. Der Komplex besteht nur aus den Untereinheiten MtrA-G. Bei der dicken Bande bei ca. 30 kDa handelt es sich nicht um MtrH (siehe MALDI-Analyse, Abschnitt 4.2.2)

Ionenaustauschchromatographie mit Q-Sepharose:

Die vereinigten Fraktionen des vorherigen Abschnitts wurden einer weiteren Chromatographie auf einem starken Anionentauscher (Q-Sepharose HP) unterzogen. Der Gesamtkomplex (MtrA-H) wurde bei 748-829 mM NaCl (72-81 % Puffer B.1) eluiert, der Komplex ohne Untereinheit MtrH (MtrA-G) bei 530-590 mM NaCl (53-59 % Puffer B.2) (siehe Abbildung 4.3).

Nach Analyse der erhaltenen Fraktionen mittels SDS-Page zeigte sich beim Gesamtkomplex MtrA-H, dass nach diesem Reinigungsschritt wiederum einige Fraktionen auftraten, die zwar den Komplex jedoch nur geringe Mengen an Untereinheit MtrH enthielten. Diese wurden verworfen. Diejenigen Fraktionen, welche MtrA-H enthielten, wurden vereinigt.

Bei der Reinigung von MtrA-G traten dagegen nur Fraktionen mit sehr wenig MtrH auf und alle den Restkomplex enthaltende Fraktionen konnten zusammengeführt werden.

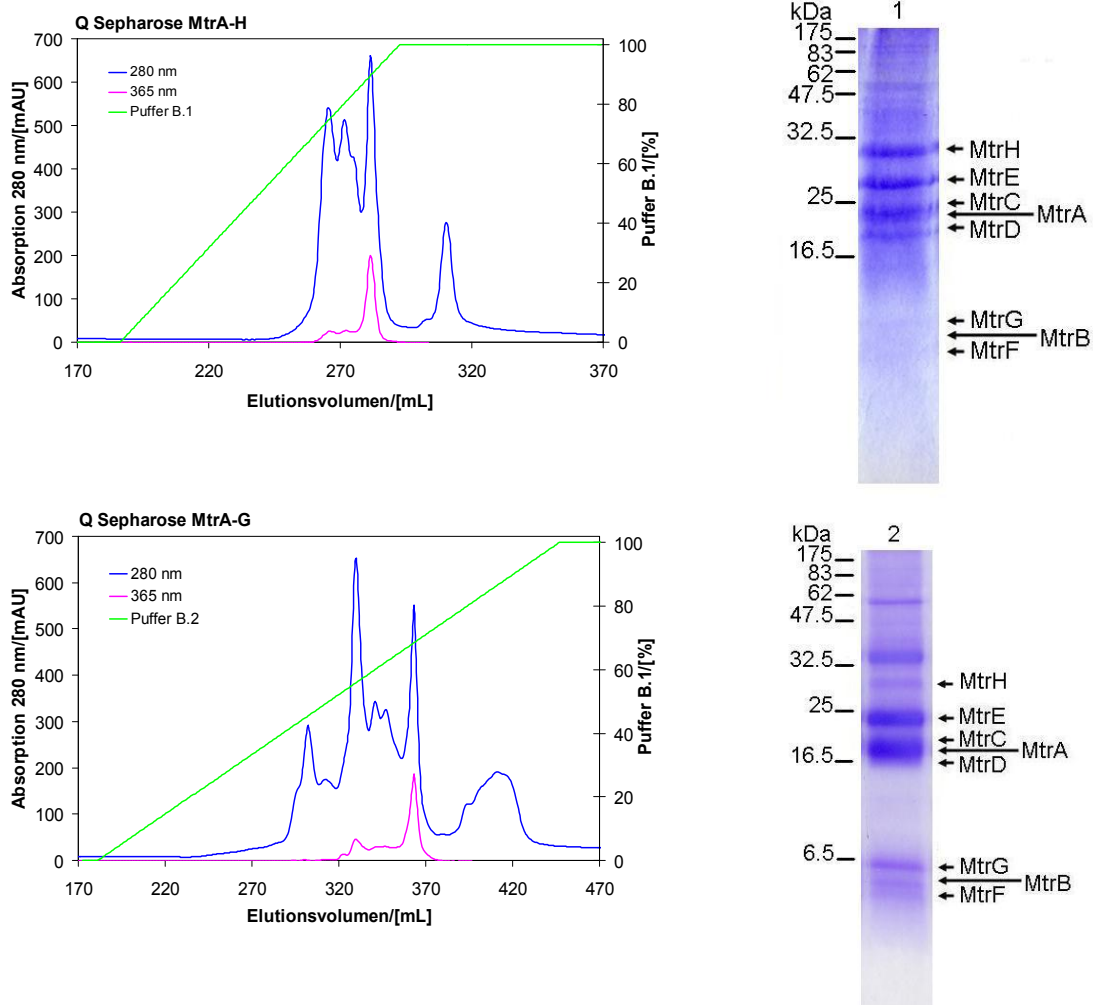


Abbildung 4.3: Elutionsprofile und Coomassie-gefärbte SDS-Pages der zugehörigen Fraktionen der Ionenaustauschchromatographie auf Q-Sepharose der Mtr-Komplexe mit und ohne Untereinheit MtrH. Auf Bahn 1 der SDS-Page ist der vollständigen Komplexes MtrA-H, auf Bahn 2 ist der Komplexes MtrA-G mit sehr geringem Gehalt an Untereinheit MtrH (34 kDa) nach dem zweiten Reinigungsschritt zu sehen.

Präparative Gelfiltration:

Als letzter Reinigungsschritt wurde mit den jeweils vereinigten Fraktionen der Ionenaustauschchromatographie auf Q-Sepharose eine Gelfiltration durchgeführt. Hierbei konnten einige niedermolekulare Verunreinigungen und ein nicht Basisliniengetrennter *Peak* bei ca. 350 kDa abgetrennt werden sowie Proteinkomplex MtrA-H in den für die Lagerung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ geeigneten Gelfiltrationspuffer mit 10 % (w/v) Glyceringehalt überführt werden. Die MtrA-H (66-77 mL; ca. 670 kDa) bzw. MtrA-G (63-80 mL; ca. 640 kDa) enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt (siehe Abbildung 4.4) und die Ausbeute auf 3-7 mg pro 60 g Bakterienfeuchtgewicht für MtrA-H bzw. 8 mg pro 60 g Bakterienfeuchtgewicht für MtrA-G mittels Bradford-Test bestimmt. MtrA-H war bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ mehrere Wochen stabil, wie durch analytische Gelfiltration gezeigt werden konnte.

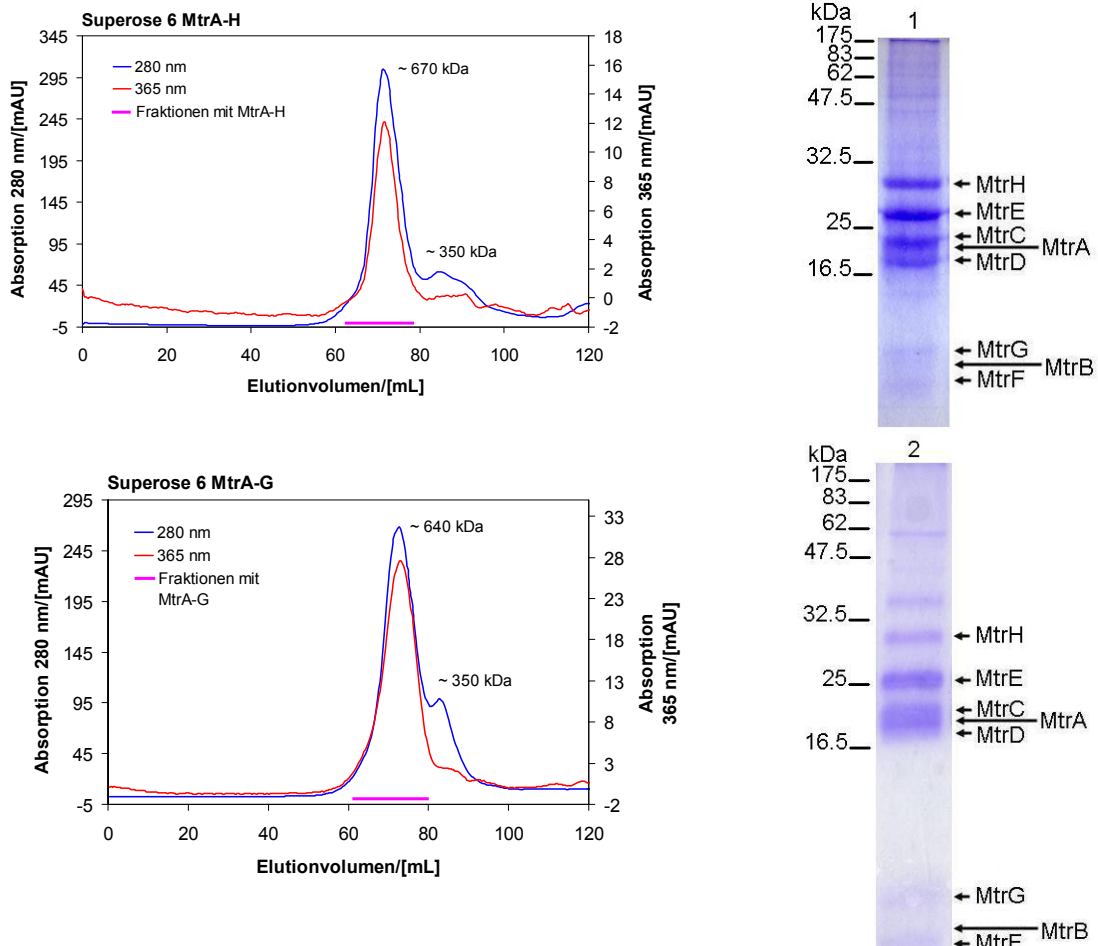


Abbildung 4.4: Elutionsprofile und Coomassie-gefärbte SDS-Pages nach der Gelfiltration der Mtr-Komplexe mit und ohne Untereinheit MtrH auf Superose 6. Es wurden jeweils nur die zum Hauptpeak bei 670 kDa bzw. 640 kDa gehörenden Fraktionen vereinigt. Auf Bahn 1 der SDS-Page ist der vollständige, gereinigte Komplex MtrA-H zu sehen. Auf Bahn 2 wurde der Komplex MtrA-G mit nur sehr wenig MtrH (34 kDa) nach dem letzten Reinigungsschritt aufgetragen. Die unidentifizierte Bande bei ca. 30 kDa konnte nicht abgetrennt werden.

4.2.2 Charakterisierung

Molekulargewichtsbestimmung:

Das Molekulargewicht des isolierten Gesamtkomplexes MtrA-H wurde bestimmt, um eine Aussage über den oligomeren Zustand treffen zu können. Dazu wurden verschiedene Methoden verwendet, die zum Teil zu unterschiedlichen Ergebnissen führten (siehe Tabelle 4.1). Bei sämtlichen präparativen und analytischen Gelfiltrationen zeigte sich neben einem Hauptpeak bei 670-770 kDa eine Schulter von 300-400 kDa (siehe Abbildung 4.4). Bei der Analyse der entsprechenden Fraktionen mittels SDS-Page konnte jedoch kein Unterschied zum Hauptpeak festgestellt werden. Durch Blaue Native Gelelektrophorese (BN-Page) wurde das Molekulargewicht auf ca. 300 kDa bestimmt (siehe Abbildung 4.5). Durch eine analytische Ultrazentrifugation des Gesamtkomplexes MtrA-H, welche von Dr. Vitali Vogel (Institut für Biophysik, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt) durchgeführt wurde, ergab sich ein Molekulargewicht von 620 kDa. Bei der von Dr. Dilem Hizlan (Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt) durchgeführten elektronenmikroskopischen Einzelpartikelmessung konnte das Molekulargewicht anhand der Größe des Komplexes auf ca. 600 kDa geschätzt werden.

Das mit Hilfe der Aminosäuresequenzen der Untereinheiten berechnete Molekulargewicht des Tetramers eines Heterooktamers liegt bei 672 kDa, womit der Hauptpeak der Gelfiltration sowie die Ergebnisse der Analytischen Ultrazentrifugation und der elektronenmikroskopischen Einzelpartikelmessung übereinstimmen. Das berechnete Molekulargewicht des Dimers eines Heterooktamers liegt bei 336 kDa. Mit diesem Wert decken sich der in der Gelfiltration auftretende Schulterpeak und das Ergebnis der BN-Page.

Tabelle 4.1: Übersicht über das mit verschiedenen Methoden bestimmte Molekulargewicht des Gesamtkomplexes MtrA-H.

Methode	Dimer eines Heterooktamers	Tetramer eines Heterooktamers
Berechnete Werte	336 kDa	672 kDa
Gelfiltration	Schulter bei 300-400 kDa	670-770 kDa
BN-Page	300 kDa	
Analytische Ultrazentrifugation		620 kDa
Elektronenmikroskopische Einzelpartikelmessung		600 kDa

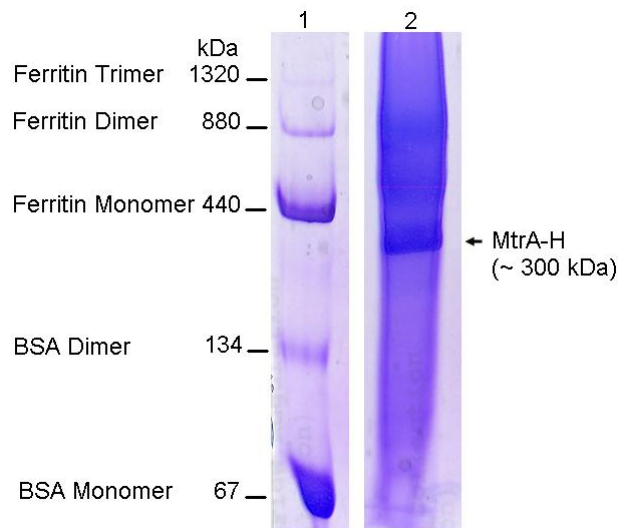


Abbildung 4.5: Coomassie-gefärbte Blaue Native Page zur Molekulargewichtsbestimmung des Gesamtkomplexes MtrA-H. Auf Bahn 1 sind die zur Größenabschätzung aufgetragenen Eichproteine zu sehen, auf Bahn 2 der Komplex MtrA-H. Dessen Molekulargewicht liegt nach dieser Methode bei ca. 300 kDa.

Abtrennung der Untereinheit MtrH vom Gesamtkomplex MtrA-H:

Neben der in Abschnitt 4.2.1 beschriebenen Entfernung von MtrH während der Membranpräparation wurde auch eine Abtrennung vom bereits gereinigten Gesamtkomplex versucht. Dazu wurden eine Verschiebung des pH-Wertes, eine Anzahl von Detergenzien, eine Hitzebehandlung und Pufferlösungen mit unterschiedlichem NaCl-Gehalt getestet (siehe Tabelle 4.2). Die Proben wurden mehrfach mit der jeweiligen Pufferlösung verdünnt und mittels eines Konzentrators mit 100 kDa-Membran eingengt. Der Austausch des Detergenz geschah anhand einer PD-10-Säule. Die Proben wurden anschließend per SDS-Page oder Gelfiltration auf Superose 6 analysiert.

Durch die angewendeten Methoden war es nicht möglich, MtrH abzutrennen und gleichzeitig den restlichen Komplex MtrA-G stabil zu halten. Entweder blieb der Gesamtkomplex MtrA-H bestehen, oder es kam bei zu harschen Bedingungen zur Bildung von höhermolekularen Aggregaten bzw. zur Präzipitation des Proteins.

Tabelle 4.2: Übersicht über die verschiedenen Methoden und Pufferbedingungen zur Abtrennung der Untereinheit MtrH vom gereinigten Gesamtkomplex.

Methode	Bedingung
pH-Wert	5,0
	7,0
	7,4
	8,5
	9,5
Detergenz	1 % (v/v) Triton X100
	40 mM OG
	2 % (v/v) LDAO
Hitzebehandlung/[°C]	2 % (w/v) Cholat
	42
	50
	55
Salzgehalt/[mM]	60
	100
	200
	500
	1000
	2000

ESI-MS-Analyse des Mtr-Komplexes:

Eine ESI-MS-Analyse der zu den verschiedenen Untereinheiten des Mtr-Komplexes gehörenden Banden im SDS-Gel wurde von Herrn Dr. Julian Langer am Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt durchgeführt. Die entsprechenden Banden wurden aus einem SDS-Polyacrylamidgel ausgeschnitten (siehe Abbildung 4.4) und das Masse-Ladungs-Verhältnis der Peptidfragmente nach einem Trypsin-Verdau bestimmt. Anhand eines Vergleichs dieses Spektrums mit einer Datenbank wurde die oberste Bande bei ca. 33 kDa als Untereinheit MtrH des Mtr-Komplexes aus *M. marburgensis* identifiziert. Bei den Präparationen des Mtr-Komplexes ohne Untereinheit MtrH (MtrA-G) konnte diese Bande nicht identifiziert werden. Es ist jedoch aufgrund der Ergebnisse des *Western Blots* mit Anti-*M. marburgensis* MtrH-Antikörpern (siehe folgender Abschnitt) davon auszugehen, dass es sich bei der besagten Bande auch um MtrH handelt. Die anderen Untereinheiten des Mtr-Komplexes konnten vermutlich aufgrund ihrer Hydrophobizität mittels ESI-MS nicht nachgewiesen werden.

Western Blot mit Anti-*M. marburgensis* MtrH-Antikörpern:

Der vollständig gereinigte Mtr-Komplex mit Untereinheit MtrH (MtrA-H) sowie der nach dem in dieser Arbeit neu etablierten Protokoll gereinigte Mtr-Komplex ohne Untereinheit MtrH (MtrA-G) (siehe Abschnitte 3.5.1 und 3.5.2) wurden per SDS-Page elektrophoretisch in ihre einzelne Untereinheiten aufgetrennt (siehe Abschnitt 3.4.2). Die aufgetrennten Peptide wurden sodann auf eine PVDF-Membran übertragen und die Untereinheit MtrH per direktem ELISA mit Anti-*M. marburgensis* MtrH-Antikörpern (primäre Antikörper) und Anti-Kaninchen IgG F(ab')₂-Fragment-Alkalische Phosphatase-Konjugat (sekundäre Antikörper) durch eine Farbreaktion nachgewiesen (siehe Abschnitt 3.4.4).

Wie in Abbildung 4.6 zu sehen, ist beim vollständigen Mtr-Komplex mit MtrH (MtrA-H) eine deutliche Bande bei ca. 33 kDa zu sehen, bei der es sich aufgrund der Farbreaktion um MtrH handeln muss. Bei der Präparation des Mtr-Komplexes ohne Untereinheit MtrH (MtrA-G) ist diese Bande nur sehr schwach ausgeprägt, d. h. eine Abtrennung der Untereinheit MtrH ist bis auf einen äußerst geringen Restgehalt so gut wie vollständig gelungen.

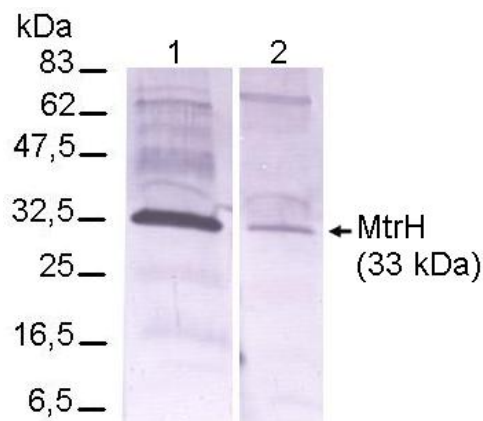


Abbildung 4.6: Western Blot mit Anti-*M. marburgensis* MtrH-Antikörpern nach Auftrennung der Untereinheiten der gereinigten Mtr-Komplexe mit und ohne Untereinheit MtrH auf einem 12 %-igen SDS-Gel. Es wurden jeweils 2 µg gereinigtes Protein eingesetzt. Auf Bahn 1 wurde der vollständige Mtr-Komplex mit Untereinheit MtrH (MtrA-H) aufgetragen. MtrH erscheint als deutliche Bande bei ca. 33 kDa. Auf Bahn 2 wurde der Mtr-Komplex nach der Präparation ohne Untereinheit MtrH aufgetrennt. Die 33 kDa-Bande von MtrH ist nur schwach sichtbar, eine Abtrennung von MtrH während der Reinigung ist also weitgehend gelungen.

4.2.3 Kristallisation

Für die Kristallisationsversuche des Gesamtkomplexes MtrA-H lag dieser im Kristallisationspuffer (50 mM MOPS/KOH pH 7,0, 10 mM MgCl₂, 100 mM Ammoniumsulfat, 10 % (w/v) Glycerin, 2 mM DTT, 0,1 % LM) mit einer Konzentration von 22 mg/mL vor. Es wurde nach der *sitting drop*-Methode in Kristallisationsplatten mit 96 Vertiefungen verfahren. Als Reservoirolösung wurden je 100 µL der *JB-Screens 1-10* eingesetzt. Pro Ansatz wurden je 0,3 µL Proteinlösung und Reservoirolösung gemischt und die Platten bei 18 °C gelagert. Auch nach mehreren Wochen wurden keine Kristalle gefunden.

4.2.4 Elektronenmikroskopische Einzelpartikelmessung

Die wie in Abschnitt 3.7.1 beschrieben mit Negativfärbung aufgenommenen Mikrographen des Mtr-Komplexes (MtrA-H) wurden zur Beurteilung der Homogenität der Probe verwendet (Abbildung 4.7). Darüber hinaus wurde aus diesen Aufnahmen von Frau Ming Yang (Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt) mittels der *Random-conical-tilt*-Methode ein erstes dreidimensionales Modell erstellt, dass für weitere Rekonstruktionen als Startmodell diente (133).

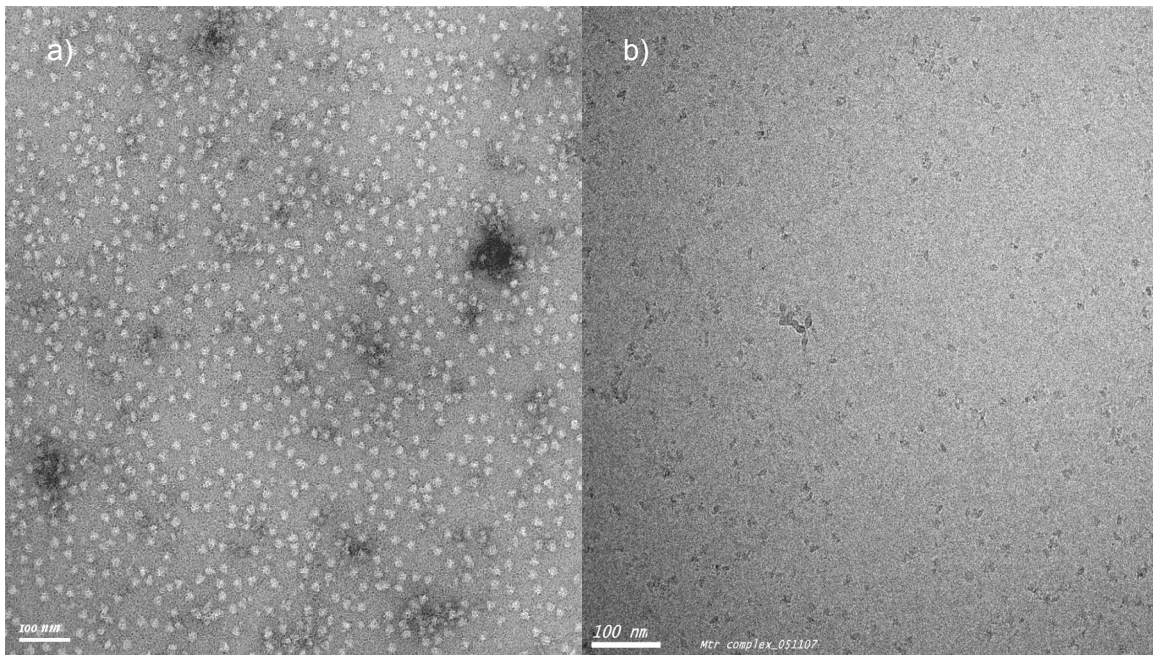


Abbildung 4.7: **a)** Elektronenmikroskopische Aufnahme des Mtr-Komplexes nach Negativfärbung mit 1 % Uranylacetat. Die Partikel erscheinen kontrastreich und hell vor dunklem Hintergrund. Dieses Verfahren wurde zur Beurteilung der Probenhomogenität sowie zur Erstellung eines Startmodells mittels *Random conical tilt* verwendet. **b)** Unter *Cryo*-Bedingungen entstandener Mikrograph des Mtr-Komplexes. Der Kontrast zwischen den einzelnen Partikeln und dem Bildhintergrund ist schwächer, jedoch werden bei der Rekonstruktion Artefakte aufgrund von mangelnder Färbung vermieden. (Bilder: Dr. Dilem Hizlan)

Aus den unter *Cryo*-Bedingungen aufgenommenen Mikrographen (vgl. Abschnitt 3.7.1) wurde von Frau Dr. Dilem Hizlan (Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt) in einer iterativen Vorgehensweise durch so genannte Rückprojektionen, d. h. simulierte Projektionen aus einer dreidimensionalen Rekonstruktion (dem Startmodell) mit definierten Winkeln, ein verbessertes Modell erstellt, das wiederum als Referenz für weitere Iterationen diente.

Durch Mittelung einzelner Bilder des gleichen Partikels verbessert sich das Kontrastverhältnis zwischen Bildsignal und Hintergrundrauschen. Diese so genannten Klassensummen entsprechen also verschiedenen „Ansichten“ des Moleküls und wurden dazu verwendet, deren unbekannte Winkelbeziehungen zu berechnen (134) (Abbildung 4.8a).

Das schlussendlich erhaltene Modell ließ sich als dreidimensionales, das Molekül umhüllendes Oberflächenbild darstellen (Abbildung 4.8b). Die Größe des Modellvolumens beträgt ungefähr $165 \times 105 \text{ \AA}$, was einem Molekulargewicht von ca. 600 kDa und damit einem Tetramer des acht Untereinheiten umfassenden Komplexes MtrA-H entspricht. Im Modell besteht das Molekül aus einem größeren, dreieckigen Teil von ca. $165 \times 64 \text{ \AA}$, welcher Regionen geringerer Dichte aufweist,

die als Einkerbung erscheinen, und einem kleineren, spitzen Teil von ca. 41 Å, sodass das Molekül insgesamt wie eine Pyramide erscheint. Im kleineren, oberen Teil des Modellmoleküls zeigen sich starke Unterschiede zwischen den einzelnen aufgenommenen Partikeln (siehe Abbildung 4.8a). In manchen Partikeln erscheint dieser Teil kugelförmig, in anderen zylindrisch, in wieder anderen ist er überhaupt nicht vorhanden. Dies wurde als eventuelle Flexibilität dieses Teils gedeutet. Anhand des Modells sind keinerlei Symmetrien innerhalb des Moleküls zu erkennen, auch über die Anordnung in der Membran konnte keine Aussage getroffen werden.

Ein Maß dafür, inwiefern ein Strukturmodell tatsächlich zutrifft, ist die Übereinstimmung zwischen Klassensummen und Rückprojektion. Der Kreuzkorrelationskoeffizient betrug im vorliegenden Fall 0,5. Außerdem sollte ein Modell die Beschreibung möglichst vieler unterschiedlicher Ansichten liefern sowie eine zusammenhängende Dichte bilden. Letztere zwei Eigenschaften, welche visuell überprüft werden können, trafen beim vorliegenden Modell zu, jedoch sind weitere Aufnahmen, insbesondere mit dem Mtr-Komplex ohne Untereinheit MtrH (MtrA-G) angebracht.

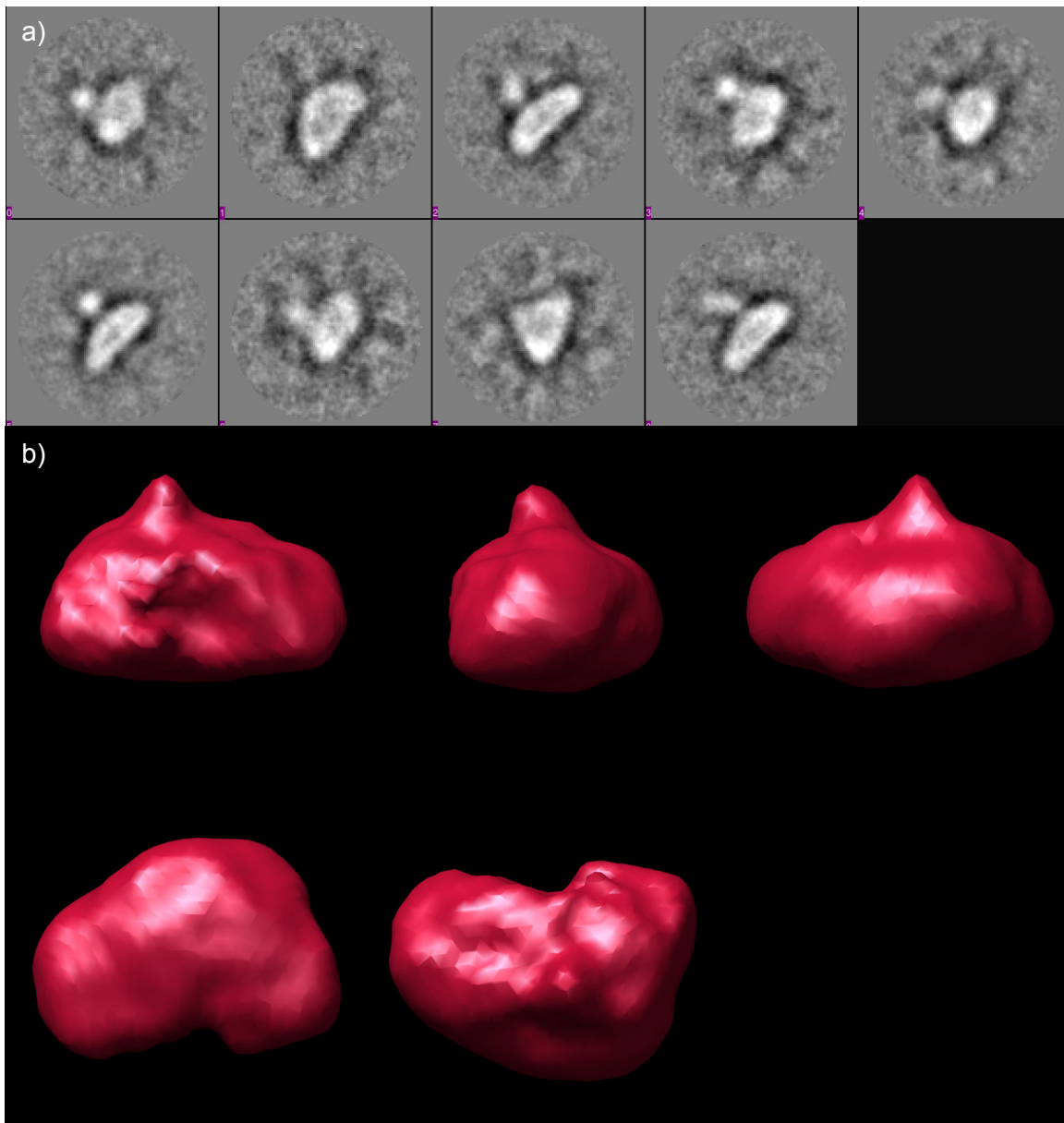


Abbildung 4.8: **a)** Iterative Berechnung der Struktur des Mtr-Komplexes. Aus 7380 Einzelpartikeln wurden neun Klassensummen berechnet. **b)** Oberflächendarstellung eines Strukturmodells des Mtr-Komplexes. Bei dem kleinen spitzen Teil im oberen Bereich könnte es sich um Untereinheit MtrH handeln. Der *cut-off*-Wert des Modellvolumens beträgt 30,2 Å. (Bilder: Dr. Dilem Hizlan)

4.3 Ergebnisse der heterologen Expression der Untereinheiten MtrA und MtrH

Mit sämtlichen hergestellten Vektorkonstrukten (siehe Tabelle 3.1) wurden Expressionstest durchgeführt, um die Abhängigkeit der Löslichkeit des Proteins von den Wachstumsbedingungen zu überprüfen sowie eine Maximierung der Proteinausbeute zu erreichen. Es wurden sowohl verschiedene Medien (LB-, TB- und M9-Minimalmedium), verschiedene Temperaturen (25-37 °C) als auch unterschiedliche Konzentrationen zur Induktion (IPTG: 0,1-1 mM, AHT: 2-200 ng/mL) getestet (siehe Abschnitt 3.3.4).

Tabelle 4.3 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse der durchgeführten Expressionsversuche zur Produktion der rekombinanten Untereinheiten MtrA und MtrH in *E. coli*. Bei MtrA aus *M. jannaschii* war die lösliche Expression abhängig von der Temperatur und der zur Induktion verwendeten IPTG-Konzentration. So wurde vollständiges MtrA mit C-terminaler Transmembranhelix (MJMtrA1) in LB-Medium bei 37 °C Anzuchttemperatur löslich, des-[229-246]-MtrA (MJMtrA2) jedoch nur teilweise löslich und des-[225-246]-MtrA (MJMtrA3) vollständig unlöslich produziert. Durch eine Absenkung der Temperatur nach der Induktion und eine Verringerung der IPTG-Konzentration wurden MJMtrA2 und MJMtrA3 jedoch ebenfalls löslich exprimiert. MtrA aus *M. kandleri* konnte bei den in Tabelle 4.3 aufgeführten Bedingungen zumindest teilweise als lösliches Protein in *E. coli* produziert werden.

MtrH wurde unabhängig vom Ursprungsorganismus, den Wachstumsbedingungen oder dem verwendeten Induktionssystem (*lac*-Operon oder *tet*-Repressor) immer unlöslich in Einschlusskörperchen exprimiert.

Bei der Co-Expression von MtrA3 und MtrH aus *M. jannaschii* zeigte sich ebenfalls, dass diese immer als Einschlusskörperchen produziert wurden. Hier konnte auch durch eine Änderung der Anzuchtbedingungen kein lösliches Protein erzeugt werden.

Tabelle 4.3: Übersicht über die Ergebnisse der durchgeführten Expressionsversuche der rekombinanten Untereinheiten MtrA und MtrH des Mtr-Komplexes.

Protein	Beschreibung	Anzuchtbedingungen			Löslichkeit
		Medium	T/[°C]	Induktion	
MJMtrA1	vollständiges <i>M. jannaschii</i> MtrA (26 kDa) mit Transmembranhelix	LB	37	0,6-1 ¹	löslich
MJMtrA2	<i>M. jannaschii</i> des-[229-246]-MtrA (24 kDa) 18 C-terminale AS fehlen	LB	37	0,3-0,6 ¹	löslich/unlöslich
		LB	37	1 ¹	unlöslich
		LB	28	0,1-0,6 ¹	löslich
MJMtrA3	<i>M. jannaschii</i> des-[225-246]-MtrA (24 kDa) 22 C-terminale AS fehlen	LB	37	0,5-1 ¹	unlöslich
		LB	28	0,1-0,6 ¹	löslich
MKMtrA	<i>M. kandleri</i> des- [238-252]-MtrA (27 kDa) mit C-terminalem <i>StreptII</i> - Affinitätspeptid 15 C-terminale AS fehlen	LB	37	2-200 ²	löslich/unlöslich
		LB	25	20 ²	löslich/unlöslich
		TB	25	20 ²	löslich/unlöslich
MMRMtrH	<i>M. marburgensis</i> MtrH (33 kDa)	LB	37	0,5 ¹	unlöslich
MJMtrH	<i>M. jannaschii</i> MtrH (36 kDa)	LB	37	0,25-1 ¹	unlöslich
		LB	30	0,5-1 ¹	unlöslich
		LB	25	0,5-1 ¹	unlöslich
MKMtrH1	<i>M. kandleri</i> MtrH (36 kDa) mit C-terminalem <i>His</i> ₆ - Affinitätspeptid	LB	37	2-200 ²	unlöslich
		LB	25	20 ²	unlöslich
		TB	25	20 ²	unlöslich
MKMtrH2	<i>M. kandleri</i> des-[1-11]-MtrH (35 kDa) mit C-terminalem <i>His</i> ₆ -Affinitätspeptid 11 N-terminale AS fehlen	LB	37	2-200 ²	unlöslich
		LB	25	20 ²	unlöslich
		TB	25	20 ²	unlöslich
Co-Expression MJMtrA3+MJMtrH	<i>M. jannaschii</i> des- [225-246]-MtrA (24 kDa) + <i>M. jannaschii</i> MtrH (36 kDa)	LB	30	0,3-1 ¹	unlöslich
		M9	28	0,3-1 ¹	unlöslich

¹[IPTG]/[mM]²[AHT]/[ng/mL]

4.4 Rekombinantes des-[225-246]-MtrA (MJMtrA3) aus *M. jannaschii*

4.4.1 Reinigung

Des-[225-246]-MtrA (MJMtrA3) aus *M. jannaschii* konnte wie in Abschnitt 3.3.3 beschrieben mittels des Vektors MJmtrA3/pET22b+ als lösliches Protein in *E. coli* BL21 (DE3) produziert werden (siehe SDS-Page, Abbildung 4.9). Anschließend wurde nach Zugabe von 0,1 mM Vitamin B_{12a} per Ultraschallbehandlung aufgeschlossen und nach Abtrennen der Zellmembranen mittels Ultrazentrifugation der Großteil der *E. coli*-Proteine durch Erhitzen auf 70 °C aus der löslichen Fraktion ausgefällt (siehe SDS-Page, Abbildung 4.9).

Zur weiteren Reinigung wurde MJMtrA3 einer Anionenaustauschchromatographie auf Q-Sepharose HP unterzogen und hierbei mit 422-443 mM NaCl (42-44 % Puffer B) eluiert. Die bei 365 nm absorbierenden Fraktionen wurden mittels SDS-Page untersucht (siehe Abbildung 4.9) und diejenigen, welche MJMtrA3 enthielten, vereinigt. Nach erneuter Zugabe von 0,1 mM Vitamin B_{12a} wurde zur Entfernung von ungebundenem Cofaktor gegen Gelfiltrationspuffer dialysiert. Durch die anschließende Gelfiltration auf Superdex 200 als letzter Reinigungsschritt konnte weiterer ungebundener Cofaktor abgetrennt werden (siehe Chromatogramm, Abbildung 4.9). Die MJMtrA3 enthaltenden Fraktionen (82-90 mL) wurden vereinigt und die Ausbeute mittels Bradford-Test auf 8 mg/L Kulturvolumen bestimmt.

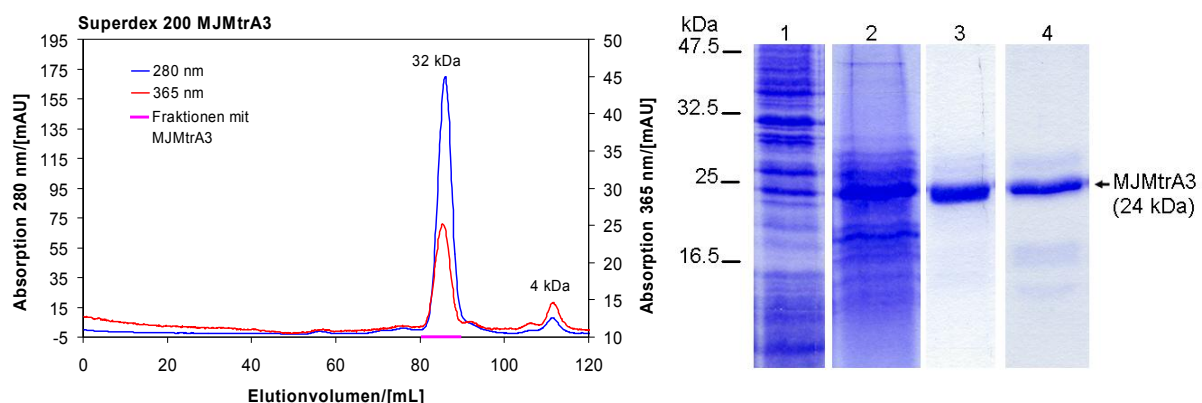


Abbildung 4.9: Gelfiltrationschromatogramm und Coomassie-gefärbte SDS-Page mit Proben der Produktion in *E. coli* und Reinigung von rekombinantem *M. jannaschii* des-[225-246]-MtrA (MJMtrA3). MJMtrA3 wird in der Gelfiltration als einzelner *Peak* bei ca. 32 kDa eluiert. Der kleine *Peak* bei ca. 4 kDa rührt von nicht gebundenem Cofaktor Vitamin B_{12a} her. Auf Bahn 1 der SDS-Page befindet sich die lösliche Fraktion einer Probe der Zellsuspension fünf Stunden nach Induktion. Auf Bahn 2 wurde der Überstand nach der Hitzefällung eines Großteils der *E. coli*-Proteine aufgetragen. Auf Bahn 3 ist eine Probe von MJMtrA3 nach der Ionenaustauschchromatographie zu sehen. Bahn 4 zeigt gereinigtes MJMtrA3 nach der präparativen Gelfiltration. Im Laufe der Reinigung ist eine zunehmende Anreicherung der 24 kDa-Bande von MJMtrA3 zu beobachten.

4.4.2 Charakterisierung

Proteinidentifizierung und Untersuchung der Cofaktor-Bindung durch analytische Gelfiltration:

MJMtrA3 wurde bei der analytischen Gelfiltration als basisliniengetrennter *Peak* eluiert (siehe Abbildung 4.10). Das Molekulargewicht konnte anhand einer Eichgerade (siehe Anhang, Abschnitt 7.1) auf ca. 31 kDa geschätzt werden. Die Absorption bei 365 nm lässt darauf schließen, dass der bei dieser Wellenlänge absorbierende Cofaktor Vitamin B_{12a} an das Enzym gebunden ist. Bei der Rechromatographie auf Superdex 200 von bereits mit Gelfiltration gereinigtem Protein trat nur ein schwacher niedermolekularer *Peak* bei ca. 1 kDa auf, bei dem es sich um nicht gebundenes Vitamin B_{12a} handelt. Es ist also davon auszugehen, dass der Cofaktor an MJMtrA3 relativ stabil und damit wahrscheinlich spezifisch gebunden ist.

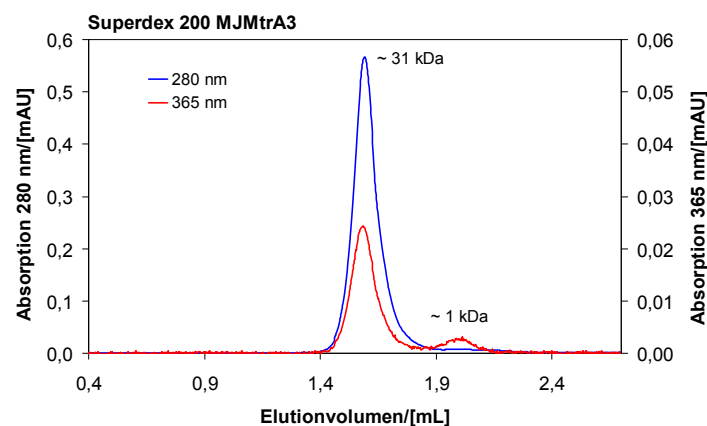


Abbildung 4.10: Elutionsprofil der Rechromatographie auf Superdex 200 von bereits durch Gelfiltration gereinigtem MJMtrA3. Das Protein wird als Basislinien getrennter *Peak* bei ca. 31 kDa eluiert. Der *Peak* von 1 kDa ist eine kleine Menge des nicht gebundenen Cofaktors Vitamin B_{12a}.

ESI-MS-Analyse:

Die Analyse wurde von der Firma *Proteome Factory* (Berlin) durchgeführt. Dazu wurde die zu untersuchende Bande aus einem SDS-Polyacrylamidgel ausgeschnitten (siehe Abbildung 4.11) und das Masse-Ladungs-Verhältnis der Peptidfragmente nach einem Trypsin-Verdau bestimmt. Dieses Spektrum wurde mit einer Datenbank verglichen und so das gereinigte Protein als Untereinheit A des Mtr-Komplexes aus *M. jannaschii* identifiziert. Die mit der Datenbank übereinstimmenden Fragmente sind in Abbildung 4.11 gezeigt. Die detektierten Fragmente und ihre Scores sind im Anhang (Abschnitt 7.5) aufgeführt.

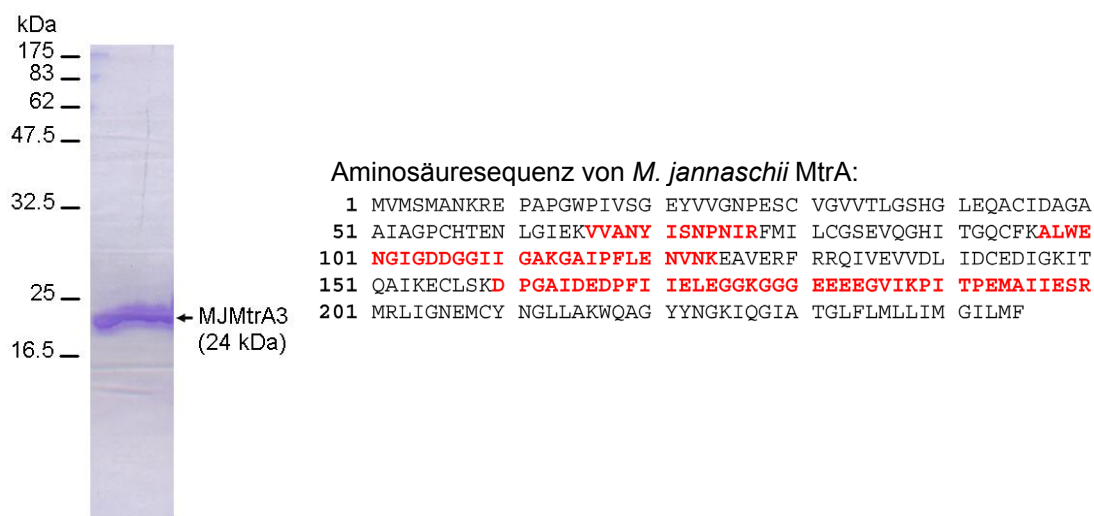


Abbildung 4.11: Coomassie-gefärbte SDS-Page und Aminosäuresequenz von *M. jannaschii* MtrA. Die Bande bei ca. 24 kDa wurde aus dem Gel ausgeschnitten, einem Trypsin-Verdau unterzogen und das Masse-Ladungsspektrum der Peptidfragmente mittels ESI-MS aufgenommen. Beim Vergleich dieser Peptidfragmente mit der Datenbanksequenz von *M. jannaschii* MtrA zeigte sich eine Übereinstimmung von 33 %. Die übereinstimmenden Fragmente der ESI-MS-Analyse sind rot gefärbt.

4.4.3 Kristallisation

Für die Kristallisation wurde gereinigtes MJMtrA3 gegen verschiedene Pufferlösungen dialysiert und anschließend bis zur gewünschten Konzentration eingengt. Die Ansätze wurden nach der *Sitting drop*-Methode in Kristallisationsplatten mit 96 Vertiefungen mit 90-100 μ L Reservoirlösung oder nach der *Hangig drop*-Methode in Platten mit 24 Vertiefungen mit 1 mL Reservoirlösung hergestellt. Es wurde sowohl der Gehalt an Puffersubstanz, Salz, Glycerin, Reduktionsmittel und Cofaktor Vitamin B_{12a} als auch die Proteinkonzentration variiert (siehe Tabelle 3.8). Letztere bewegte sich im Bereich von 20-92 mg/mL. Sämtliche im Materialteil (Abschnitt 2.2.10) aufgeführten, kommerziell erhältlichen *Screens*

sowie selbst hergestellte Reservoirlösungen (siehe Tabelle 4.4) kamen zum Einsatz. Außerdem wurden Tropfengrößen von 0,4-2 μL und verschiedene Lagerungstemperaturen (4 $^{\circ}\text{C}$ und 18 $^{\circ}\text{C}$) erprobt. Trotz dieser umfangreichen Versuche konnte keine Kristallisationsbedingung aufgefunden werden. Es zeigte sich darüber hinaus, dass das Protein selbst bei extremen Bedingungen (hohe Proteinkonzentration und hoher Fällungsmittelgehalt) stabil war und nur in geringem Maße ausfiel.

Tabelle 4.4: Zusammensetzung der selbst entwickelten *Screens* für die Proteinkristallisation.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Na/K-Tartrat/Ammoniumsulfat-Screen (96 Bedingungen)	100 mM Bis-TRIS-Propan 100-375 mM Ammoniumsulfat 1-1,55 M Na/K-Tartrat
Ammoniumsulfat/Glycerin-Screen (96 Bedingungen)	100 mM HEPES pH 8,5 1,5-2,02 M Ammoniumsulfat 0-15 % Glycerin

4.5 Rekombinantes des-[238-252]-MtrA mit C-terminalem *StreptII*-Affinitätspeptid (MKMtrA) aus *M. kandleri*

Zur Expression von des-[238-252]-MtrA (MKMtrA; 27 kDa) als lösliches Protein mit *StreptII*-Affinitätspeptid wurden mit pCSt_{tet}(mtrA) transformierte *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS-Zellen verwendet (siehe Abschnitt 3.3.3).

Nach dem Zellaufschluss durch Ultraschall wurde die lösliche Fraktion zur Fällung der *E. coli*-Proteine auf 70 $^{\circ}\text{C}$ erhitzt. Die weitere Reinigung gelang säulenchromatographisch durch Bindung von MKMtrA an *Strep-Tactin*[®] und anschließende Elution mit 2 mM D-Biotin (siehe Abschnitt 3.5.6). Die während der Aufreinigung gewonnenen Proben wurden mittels *Western Blot* mit Anti-*StreptII*-Antikörpern analysiert.

Wie auf den *Western Blots* in Abbildung 4.12 zu sehen, ließ sich MKMtrA nur teilweise als lösliches Protein in *E. coli* produzieren. Ein weiterer Teil befindet sich nach dem Zellaufschluss in der unlöslichen Fraktion. Insgesamt wurde MKMtrA in relativ geringen Mengen exprimiert. Darüber hinaus betrug das anhand von SDS-Page und *Western Blot* geschätzte Molekulargewicht von MKMtrA ca. 16,5 kDa, was vom berechneten Wert von 27 kDa stark abwich. Das C-terminale Ende von MKMtrA mit *StreptII*-Affinitätspeptid ließ sich jedoch durch *Western Blot* und die

Bindung von MKMtrA an die *Strep*-Tactin[®]-Säule nachweisen. Diese Bindung geschah nur unvollständig, da sich MKMtrA sowohl im Säulendurchfluss als auch in der Elutionsfraktion wiederfand. Darüber hinaus trat teilweise eine weitere Bande bei ca. 6 kDa auf, die jedoch nicht identifiziert werden konnte.

Als weitere Identifikationsmethode wurde eine MALDI-TOF-Fingerprint-Analyse nach dem Trypsin-Verdau der im *Western Blot* sichtbaren Banden versucht. MtrA aus *M. kandleri* konnte mit dieser Methode jedoch nicht nachgewiesen werden. Aufgrund der mangelnden Expression und der Schwierigkeiten bei der Identifikation wurden die Versuche mit pCSt_{tet}(mtrA) bzw. MKMtrA abgebrochen.

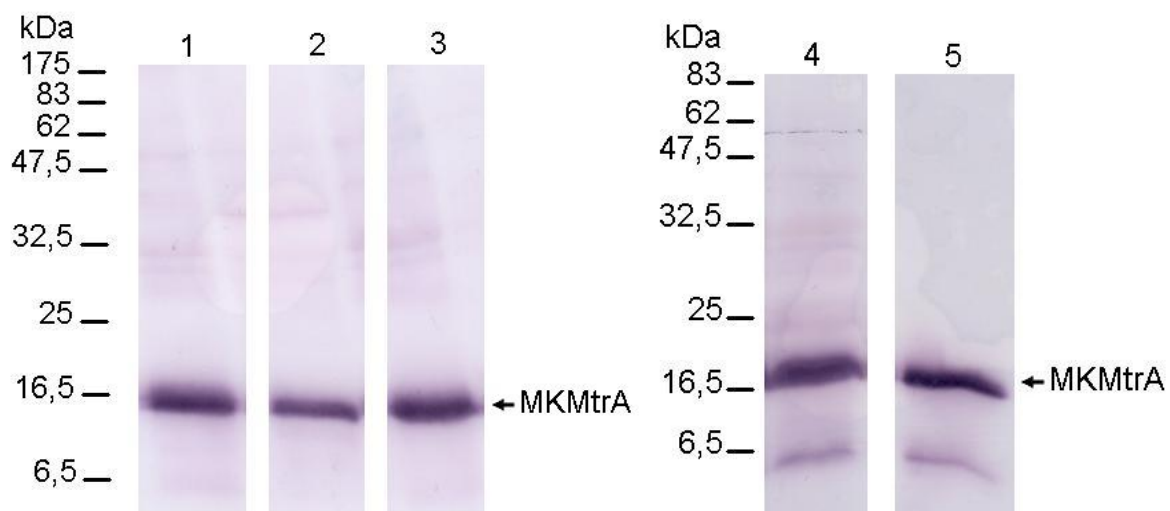


Abbildung 4.12: *Western Blot* mit Anti-*StreptII*-Antikörpern von Proben der Expression in *E. coli* und Reinigung auf *Strep*-Tactin[®] von des-[238-252]MtrA mit C-terminalem *StreptII*-Affinitätspeptid aus *M. kandleri* (MKMtrA). Auf Bahn 1 ist die lösliche Fraktion, auf Bahn 2 die unlösliche Fraktion nach dem Zellaufschluss zu sehen. In beiden Proben ist MKMtrA zu finden. Auf Bahn 3 wurde der Überstand nach der Hitze-fällung und Entfernung der *E. coli*-Proteine mittels Ultrazentrifugation aufgetragen. Auf Bahn 4 befindet sich der Durchfluss nach Auftragen der Probe auf die *Strep*-Tactin[®]-Säule. Auf Bahn 5 ist MKMtrA nach der Elution mit 2 mM D-Biotin zu sehen. Die zwei letzten Proben zeigen, dass MKMtrA nur teilweise an das Säulenmaterial gebunden wurde. Die schwächere Bande bei ca. 6 kDa konnte nicht identifiziert werden. Auffällig ist bei allen Proben das apparente Molekulargewicht von ca. 16,5 kDa, das vom errechneten Wert von 27 kDa stark abweicht.

4.6 Rekombinantes *M. marburgensis* MtrH (MMRMtrH)

Rekombinantes *M. marburgensis* MtrH, im folgenden MMRMtrH genannt, konnte, wie in Abschnitt 3.3.3 beschrieben, mittels des Plasmids MMRmtrH/pET22b+ in *E. coli* BL21 (DE3) in größeren Mengen als Einschlusskörperchen produziert werden (siehe Abbildung 4.13). Diese wurden nach dem Zellaufschluss mit Ultraschall mit 5 M Guanidinhydrochlorid solubilisiert. Nach einer Gelfiltration auf Superdex 200 im entfalteten Zustand wurden die durch Absorption bei 280 nm als proteinhaltig identifizierten Fraktionen vereinigt, konzentriert und bei 1000-facher Verdünnung mit 0,05 % LM rückgefaltet. Als abschließender Reinigungsschritt wurde wiederum eine Gelfiltration auf Superdex 200 durchgeführt und die eluierten Fraktionen mittels SDS-Page analysiert (siehe Abschnitt 3.5.3).

Die Gelfiltration des rückgefalteten Proteins ergab keinen basisliniengetrennten *Peak* und die Analyse der gesammelten Fraktionen mittels SDS-Page (siehe Abbildung 4.13) zeigte zwar eine Anreicherung von MMRMtrH, jedoch waren auch zahlreiche weitere Banden unklarer Identität zu sehen. Darüber hinaus bestand keine Möglichkeit, die korrekte Faltung des Proteins zu überprüfen, sodass weitere Rückfaltungs- und Reinigungsversuche eingestellt werden mussten.

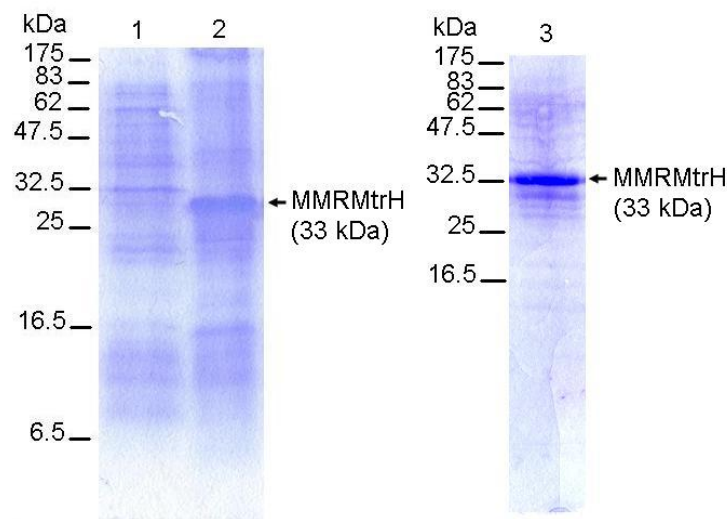


Abbildung 4.13: Coomassie-gefärbte SDS-Page mit Proben der Produktion in *E. coli* und Reinigung von rekombinantes *M. marburgensis* MtrH (MMRMtrH). Auf Bahn 1 befindet sich die lösliche Fraktion, auf Bahn 2 die unlösliche Fraktion einer Probe der Zellsuspension drei Stunden nach Induktion. MMRMtrH (33 kDa) ist in letzterer zu finden, da es in Einschlusskörperchen exprimiert wird. Auf Bahn 3 ist eine Probe von MMRMtrH nach der zweiten Gelfiltration im rückgefalteten Zustand zu sehen. Neben MMRMtrH sind noch zahlreiche weitere Banden mit unklarer Identität zu erkennen.

4.7 Co-Expression und gemeinsame Reinigung von des-[225-246]-MtrA und MtrH (MJMtrA3+MJMtrH) aus *M. jannaschii*

Die Co-Expression von des-[225-246]-MtrA und MtrH (MJMtrA3+MJMtrH) aus *M. jannaschii* wurde in zwei Plasmide mit den die entsprechenden Gensequenzen tragenden *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen durchgeführt (siehe Abschnitt 3.3.3). Hierzu wurden zwei Plasmidkombinationen, zum einen MJmtrA3/pET22b+ und MJmtrH/pACYC-Duet1, zum anderen MJmtrH/pET22b+ und MJmtrA3/pACYC-Duet1, verwendet. Bei der ersten Variante wurden sowohl MJmtrA3 als auch MJMtrH unlöslich in Einschlusskörperchen exprimiert. Bei der zweiten Kombination wurde MJMtrH zwar ebenfalls in Einschlusskörperchen, MJMtrA3 jedoch in nur sehr geringem Maße exprimiert, sodass diese Kombinationsmöglichkeit nicht weiter verfolgt wurde (siehe Abbildung 4.14).

Nach dem Zellaufschluss durch Ultraschall und dem Abtrennen der Einschlusskörperchen wurden diese mit 5 M Guanidinhydrochlorid solubilisiert. Die Proteine wurden zunächst im entfalteten Zustand einer Gelfiltration auf Superdex 200 unterzogen, in den gesammelten Fraktionen durch Absorption bei 280 nm identifiziert und vereinigt. Nach der Rückfaltung unter Zusatz von 0,5 % OG und 0,01 mM Vitamin B_{12a} im 100-fachen Volumen an Pufferlösung wurde erneut eine Gelfiltration auf Superdex 200 durchgeführt. Die Fraktionen wurden mittels SDS-Page untersucht (siehe Abschnitt 3.5.5).

Im Elutionsprofil der zweiten Gelfiltration waren sowohl höhermolekulare, auf Aggregation der Proteine hindeutende, als auch nicht basisliniengetrennte *Peaks* im mittleren und niedermolekularen Bereich zu sehen. Ein *Peak* der Absorptionskurve bei 365 nm bei etwa 40 kDa zeigte bei der SDS-Page-Analyse zwar eine Anreicherung von MJMtrA3, jedoch konnte kein gebundenes MJMtrH identifiziert werden (siehe Abbildung 4.14). Auch eine Variation der Entfaltung bei 3-7 M Guanidinhydrochlorid sowie unterschiedliche Bedingungen bei der Rückfaltung durch 10- bis 100-fache Verdünnung der Proteinprobe oder verschiedenen Detergenzien (0,05-1 % LM, 0,5-1 % OG) ermöglichten keine gemeinsame Reinigung von MJMtrA3 und MJMtrH.

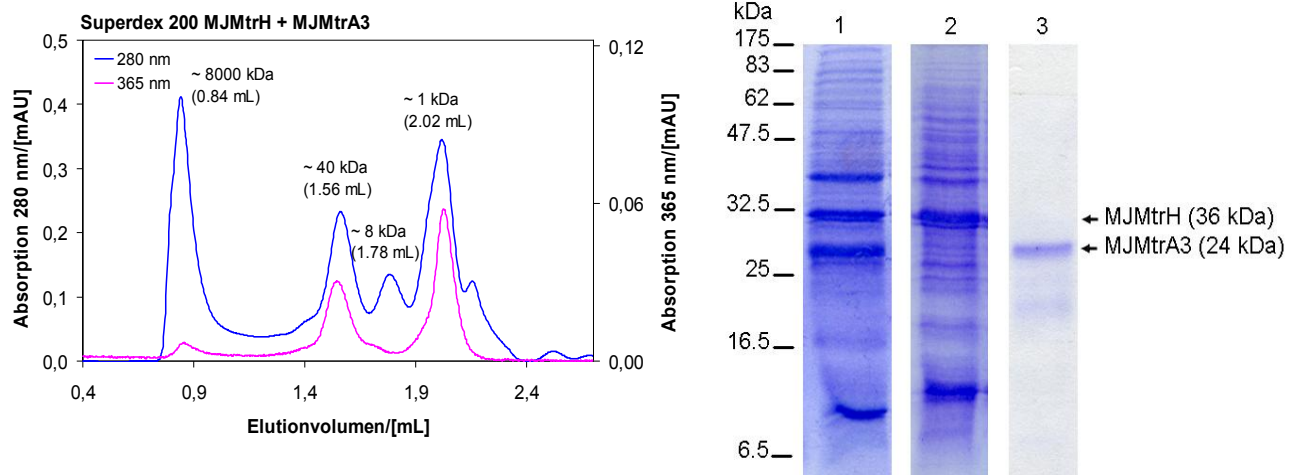


Abbildung 4.14: Gelfiltrationschromatogramm und Coomassie-gefärbte SDS-Page mit Proben der Co-Expression in *E. coli* und gemeinsamen Reinigung von *M. jannaschii* des-[225-246]-MtrA und MtrH (MJMtrA3 + MJMtrH). Die höhermolekularen *Peaks* im Elutionsprofil der Gelfiltration sind durch Aggregation der Proteine zu erklären. Eine Probe des 40 kDa-*Peaks* wurde mittels SDS-Page als MJMtrA3 identifiziert. Da dieses Vitamin B_{12a} bindet, ist bei 365 nm ebenfalls eine starke Absorption zu beobachten. Der *Peak* bei ca. 8 kDa konnte nicht zugeordnet werden. Der 1 kDa-*Peak* dagegen rührt von nicht gebundenem Cofaktor her. Auf Bahn 1 der SDS-Page befindet sich die unlösliche Fraktion einer Probe der Zellsuspension der Anzucht von MJmtrA3/pET22b+ und MJmtrH/pACYC-Duet1 tragenden *E. coli*-Zellen fünf Stunden nach Induktion. Sowohl MJMtrH als auch MJmtrA3 wurden exprimiert. Auf Bahn 2 wurde eine Probe der unlöslichen Fraktion des Co-Expressionsversuchs von MJmtrH/pET22b+ und MJmtrA3/pACYC-Duet1 in *E. coli* fünf Stunden nach Induktion aufgetragen. Bei dieser Plasmidkombination wurde nur MJMtrH exprimiert. Auf Bahn 3 ist eine Probe des 40 kDa-*Peaks* der gezeigten Gelfiltration zu sehen, die die Identifizierung von MJMtrA3 ermöglichte.

4.8 Die F_{420} -abhängige N^5, N^{10} -Methylen- H_4 MPT-Dehydrogenase (KMtd) aus *M. kandleri*

4.8.1 Co-Kristallisation von KMtd mit H_4 MPT-Derivaten und F_{420}

Die Co-Kristallisation von KMtd mit Substrat (H_4 MPT-Derivate) und Cosubstrat (F_{420} bzw. F_0) wurde in Zusammenarbeit mit Frau Ulrike Demmer (Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt) in *Sitting drop*-Kristallisationsplatten unter anaeroben Bedingungen und Rotlicht durchgeführt (siehe Abschnitt 3.6.1). Zum Einfrieren der Proteinkristalle vor der röntgenographischen Untersuchung wurden diese mit einem passenden *Cryo-loop* eingefangen, im laminaren Stickstoffstrom eingefroren und bis zur Messung in flüssigem Stickstoff gelagert.

Die Kristallisationsversuche wurden sowohl in Anwesenheit von Methylen- H_4 MPT als auch Methenyl- H_4 MPT⁺ sowie von F_{420} bzw. F_0 durchgeführt, jedoch wurden nur mit Methylen- H_4 MPT und F_{420} Kristalle erhalten, die besser als bis zu 2 Å streuten (siehe Abbildung 4.15). Die Kristallisationsbedingungen sind in Tabelle 4.5 aufgeführt.

Tabelle 4.5: Kristallisationsbedingungen für die Co-Kristallisation von KMtd mit Methylen- H_4 MPT und F_{420} .

Parameter	Wert
Kristallisationspuffer	10 mM MES pH 5,5 5 mM Methylen- H_4 MPT 1 mM F_{420}
Proteinkonzentration	15 mg/mL
Kristallisationsmethode	<i>sitting drop</i>
Reservoirpuffer	100 mM MES pH 6,5 100 mM Na-Acetat 31 % PEG 400 5 mM Methylen- H_4 MPT 1 mM F_{420}
Tropfengröße	2 μ L
Vorsättigung	50 % (v/v) des Reservoirpuffers
Temperatur	20 °C

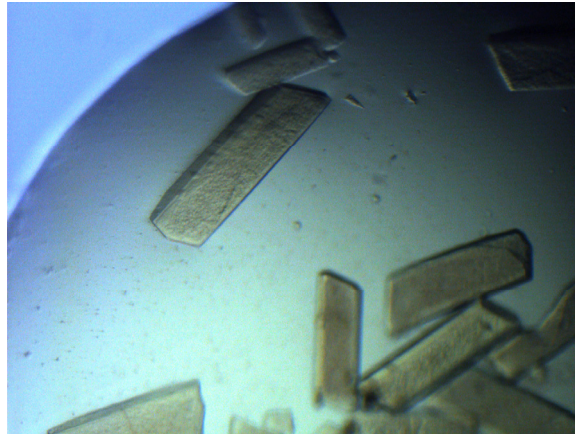


Abbildung 4.15: Kristalle von KMtd im Komplex mit dem Substrat Methylen-H₄MPT und dem Cosubstrat F₄₂₀. Die Kristalle entstanden unter anaeroben Bedingungen und Rotlicht bei 20 °C und streuten bis 1,8 Å.

4.8.2 Strukturlösung

Die Datensammlung zur Röntgenstrukturanalyse wurde am SLS (Synchrotron, Villigen, Schweiz), *Beamline* PX02 durchgeführt. In Tabelle 4.6 sind Parameter und Statistiken des für den ternären Komplex aus KMtd, Methylen-H₄MPT und F₄₂₀ aufgenommenen Datensatzes zusammengefasst.

Tabelle 4.6: Parameter und Statistiken des Datensatzes des ternären Komplexes aus KMtd mit Methylen-H₄MPT und F₄₂₀.

Datensatz	KMtd + Methylen-H ₄ MPT + F ₄₂₀
Wellenlänge/[Å]	0,9918
Raumgruppe	P2 ₁
Elementarzellparameter	
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> /[Å]	61,1; 165,5; 93,6
β /[°]	99,14
Auflösungsbereich/[Å] ¹	92,5-1,8 (1,9-1,8)
Anzahl unabhängiger Reflexe ¹	169 214 (11 197)
Vollständigkeit/[%] ¹	95,7 (94,6)
Multiplizität ¹	7,9 (7,7)
<i>R</i> _{merge} /[%]	6,4 (70,1)
<i>I</i> / σ ¹	17,2 (4,2)
Wilson B-Faktor/[Å ²]	29,5
Matthews-Parameter/[Å ³ Da ⁻¹]	2,3
Lösungsmittelgehalt/[%]	47

¹ Werte in Klammern beziehen sich auf die letzte Auflösungsschale

Die Phasierung von KMtd im Komplex mit Methylen-H₄MPT und F₄₂₀ geschah durch molekularen Ersatz mit Hilfe des im Programmpaket *ccp4-suite* enthaltenen Programm *AMoRe*. Als Modell wurde die von Hagemeyer *et al.* gelöste Struktur der Selenomethioninvariante des substratfreien Enzyms verwendet (41). Die

Verfeinerung geschah schrittweise mittels *REFMAC* und *Coot*. Für das Substrat Methylen-H₄MPT sowie das Cosubstrat F₄₂₀ wurden zunächst separat mit dem Programm *PRODRG* Modelle berechnet, manuell angeglichen und in *Coot* in die Differenz-Fourierkarten modelliert. Der ternäre Komplex wurde bis zu einem R_{cryst} von 20,3 % und einem R_{free} von 24,6 % im Auflösungsbereich von 92,5-1,8 Å verfeinert (siehe Tabelle 4.7). Die Proteinstruktur von KMtd mit gebundenem Substrat und Cosubstrat ist fast identisch mit derjenigen des substratfreien Enzyms, wie die *rms*-Abweichungen von ca. 0,3 Å für 100 % der C_α-Atome des Hexamers belegen. Methylen-H₄MPT war in allen sechs Untereinheiten nahezu vollständig besetzt, bei F₄₂₀ variierte die Besetzung jedoch zwischen 50 % und 70 %. Die im Abschnitt 4.8.3 beschriebenen Strukturen beziehen sich daher auf die am stärksten besetzte Bindestelle in Untereinheit B.

Tabelle 4.7: Verfeinerungstatistik des ternären Komplexes aus KMtd mit Methylen-H₄MPT und F₄₂₀.

Parameter	Wert
Auflösungsbereich/[Å]	92,5-1,8
Anzahl unabhängiger Reflexe	153 746
Anzahl der Reflexe im <i>test set</i>	8157
R_{cryst} /[%]	20,3
R_{free} /[%]	24,6
Anzahl von AS	1697
Anzahl von Nichtproteinmolekülen	
Methylen-H ₄ MPT	6
F ₄₂₀	6
Wasser	746
<i>rms</i> -Abweichungen	
Bindungslänge/[Å]	0,020
Bindungswinkel/[°]	2,3
Cruickshanks DPI/[Å]	0,15
Mittlerer B-Faktor/[Å ²]	27,979

4.8.3 Strukturbeschreibung

Die Bindetasche von Methylen-H₄MPT und F₄₂₀:

Methylen-H₄MPT und F₄₂₀ sind in eine Spalte zwischen der α , β - und der Helixbündel-Domäne eingebettet, welche von einem *Loop*-Segment zwischen Helix α 1 (Thr16-Asp25) und Faltblattstrang β 2 (Val33-Gly39) des Gegenmonomers, d. h. des um 180° gedrehten benachbarten Monomers, verengt wird (siehe Abbildung 4.16). Die *Si*-Seite des aus einem Pterin-, Imidazolidin- und Phenylrest bestehenden Ringsystems von Methylen-H₄MPT wird von dem Polypeptidsegment zwischen Faltblattstrang β 5 (Gly115-Val119) und Helix α 5 (Asp133-Thr151), welcher die α , β - und die Helixbündel-Domäne verbindet, sowie Helix α 1 flankiert. Auf der *Re*-Seite liegen die N-terminalen Stränge β 1 (Ala4-Lys10) und β 2 des zentralen β -Faltblatts sowie F₄₂₀. Letzteres wird auf der *Re*-Seite seines Deazaisoalloxazinrings vom C-terminalen Ende des zentralen β -Faltblatts und auf seiner *Si*-Seite von Methylen-H₄MPT eingeschlossen. Die F₄₂₀-Bindestelle wird von dem sich an Strang β 2 anschließenden *Loop* (Glu26-Asp32) des Gegenmonomers verengt, sodass F₄₂₀ nicht so tief in die Bindetasche eintaucht wie Methylen-H₄MPT. Die den Ringsystemen entgegengesetzten Enden von H₄MPT und F₄₂₀ weisen beide in Richtung Ausgang der Bindetasche, berühren einander jedoch nicht.

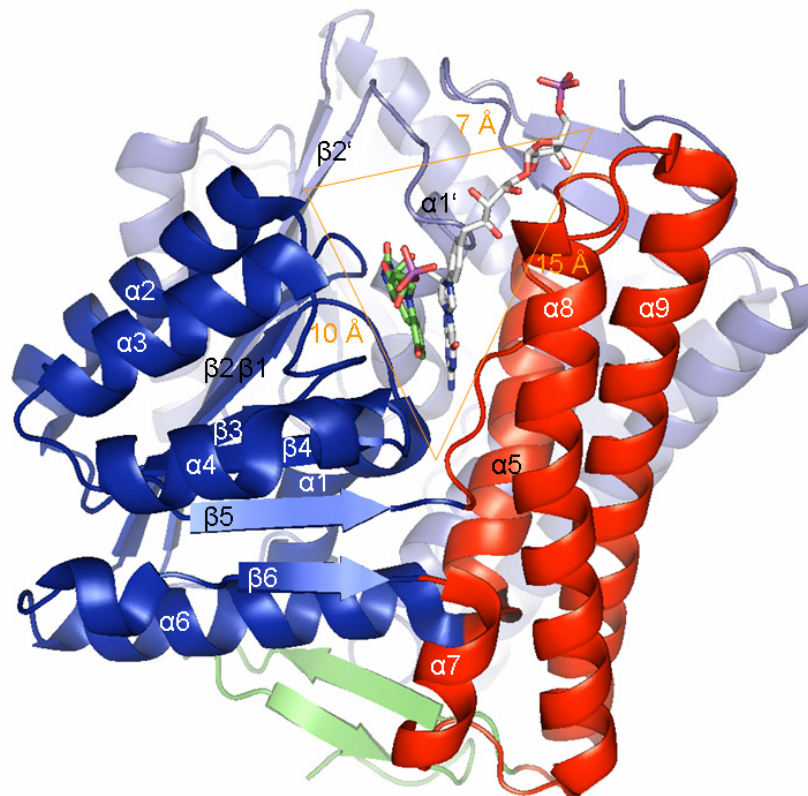


Abbildung 4.16: Übersicht der Bindetasche von Methylen- H_4 MPT und F_{420} . Die α , β -Domäne ist in blau, die Helixbündeldomäne in rot und das C-terminale β -Faltblatt in hellgrün dargestellt. Methylen- H_4 MPT (grau) ist vornehmlich an die Helixbündeldomäne, F_{420} (grün) an die α , β -Domäne gebunden. Ein Loop ($\alpha 1' \rightarrow \beta 1'$) des Gegenmonomers (hellblau) verengt die Bindetasche, deren ungefähre Abmessungen in orange angegeben sind.

Überraschenderweise geht die Bindung der verhältnismäßig sperrigen Moleküle nicht mit signifikanten Konformationsänderungen einher und stellt somit ein besonders ausgeprägtes Beispiel für eine vorgegebene Bindetasche dar. Ermöglicht wird diese Besonderheit durch die vielfältigen Verknüpfungen der exponierten Bindestelle mit dem Proteininneren. So wird die Innenwand der Bindetasche, an die sich das Pterin-Imidazolidin-Phenyl-Ringsystem von Methylen- H_4 MPT anheftet, aus den Seitenketten der Aminosäurereste Leu125, Met137, Tyr140 and Leu144 gebildet. Diese wiederum sind alle direkt mit dem hydrophoben Innenteil der helicalen Domäne verbunden, welche über die Wechselwirkungen mit den anderen Monomeren innerhalb des aus zwölf Helices bestehenden Bündels zusätzlich stabilisiert wird. Die gegenüberliegende Wand der Bindetasche wird von kurzen Loops nach den Strängen $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ (Phe67-Gly71) und $\beta 4$ (Ala94-Asp99) des starren zentralen β -Faltblatts gebildet. Das Loop-Segment des Gegenmonomers steht über die Aminosäurereste Asp25, Glu26 and Arg27 in Van-der-Waals-Kontakt zum Imidazolidin- und Pyrazinring von Methylen- H_4 MPT und wird durch ein Netzwerk

von Ionenbindungen zwischen Arg129 und Lys43 des betrachteten Monomers und Asp25, Glu26, Arg27, Asp29, Arg30, Asp162 und His266 des Gegenmonomers stabilisiert (siehe Abbildung 4.17).

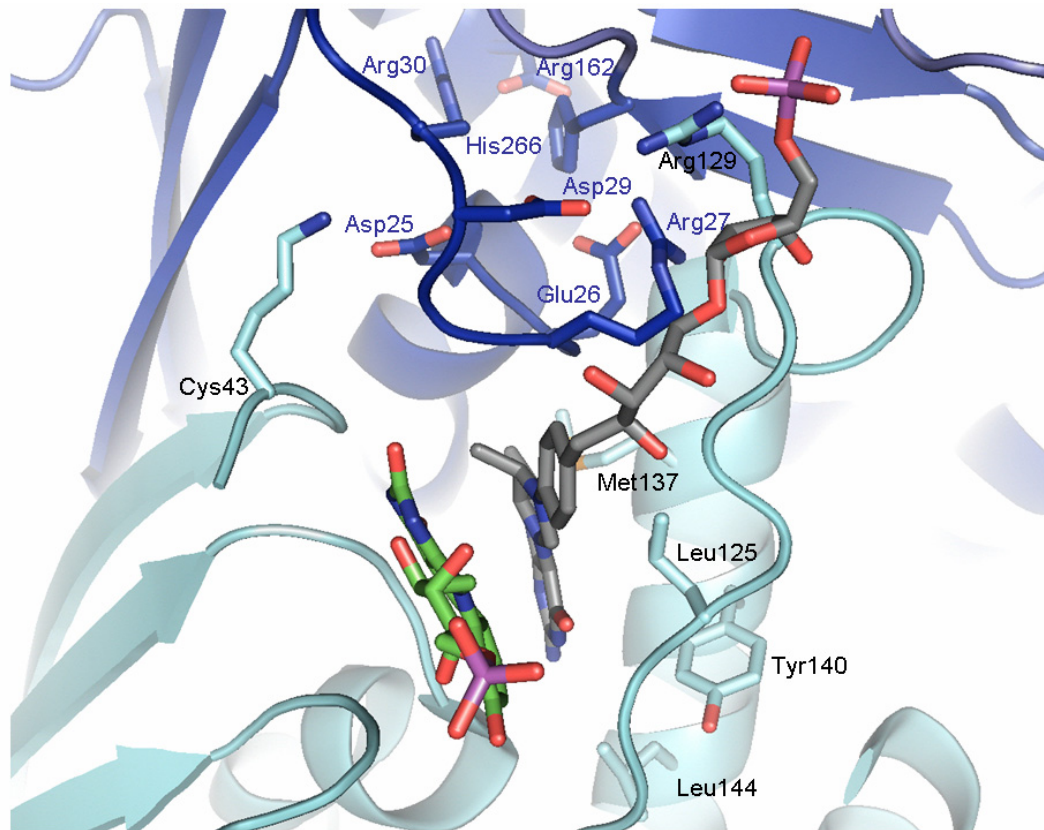


Abbildung 4.17: Verknüpfung des Pterin-Imidazolidin-Phenyl-Ringsystems von Methyl-H₄MPT (grau) mit dem Proteininneren und dem Gegenmonomer. F₄₂₀ ist in grün dargestellt. Das erste Monomer von KMTd ist in türkis, das Gegenmonomer in blau eingefärbt.

Die Bindung von Methyl-H₄MPT:

Das Methyl-H₄MPT-Molekül kann in der Elektronendichtekarte vom Pterinring bis zur Phosphatgruppe identifiziert werden, die Hydroxyglutaratgruppe ist jedoch ungeordnet. Der Temperaturfaktor erhöht sich langsam vom Pterinring (N8: 22,64 Å²) am Grund der Bindetasche bis zur Ribitolgruppe (CX3: 27,68 Å²), und steigt dann vom Riboserest (C3J: 33,71 Å²) zur Phosphatgruppe (PA: 57,05 Å²) stark an (siehe Abbildung 4.18).

Pterin-, Imidazolidin- und Benzylring sind beinahe geradlinig angeordnet und füllen die Bindetasche mit den Abmessungen 15 x 10 x 7 Å³ in voller Länge aus (Abbildung 4.16). Nach der Benzylgruppe krümmt sich das Molekül und bleibt somit in Kontakt mit der Polypeptidkette (siehe Abbildung 4.17).

Wie erwartet liegen die sp^3 -konfigurierten Atome C6, C7 und C9 des Tetrahydropyrazin- und des Imidazolinderings sowie die Methylgruppen, welche an letztere kovalent gebunden sind, außerhalb der Ringebene. Die an C7 gebundene Methylgruppe ragt fast senkrecht zur Ringebene in Richtung der *Re*-Seite von Methylen- H_4 MPT (siehe Abbildung 4.19). Die Wechselwirkungen zwischen Methylen- H_4 MPT und der Polypeptidkette zeichnen sich durch wenige ausgeprägte Wasserstoffbrückenbindungen und eine große Anzahl von gleichmäßig auf das Molekül verteilten Van-der-Waals-Kontakten aus (siehe Abbildung 4.17). Anders ausgedrückt, der Pterin-, Imidazolidin- und der Benzylring passen sich ihren jeweiligen Bindestellen exakt an und sorgen somit sowohl für Bindestärke als auch Stabilität. Bemerkenswerterweise stehen die beiden an den Pyrazin- bzw. Imidazolidinring gebundenen Methylgruppen in Van-der-Waals-Kontakt zu den Aminosäureresten Glu26 und Ala28 des Gegenmonomers. Ein wichtiger invarianter Aminosäurerest ist Asn141, welcher über eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem N1-Atom und über die Amidgruppe seiner Seitenkette mit der NH_2 -Gruppe des Pyrimidinrings zweizählig verknüpft ist (siehe Abbildung 4.18). Ein weiterer hervorstechender, an der Bindung von Methylen- H_4 MPT beteiligter Aminosäurerest ist das invariante Asp122, welches über ein vollständig besetztes Wassermolekül N3 und die NH_2 -Gruppe des Pyrimidinrings bindet. Asp122 bildet darüber hinaus zwei Wasserstoffbrückenbindungen mit den Aminogruppen von Thr16 und Gly15. Letzteres befindet sich am positiv geladenen N-terminalen Ende von Helix α_1 , sodass durch die Wechselwirkungen mit Asp122 die beiden Peptidsegmente, die den Pterinring einschließen, verknüpft werden (siehe Abbildung 4.17). Sowohl Asn141 als auch Asp122 sind Teil des am stärksten konservierten Abschnitts des gesamten Proteins, welcher sich auf der *Si*-Seite von Methylen- H_4 MPT befindet.

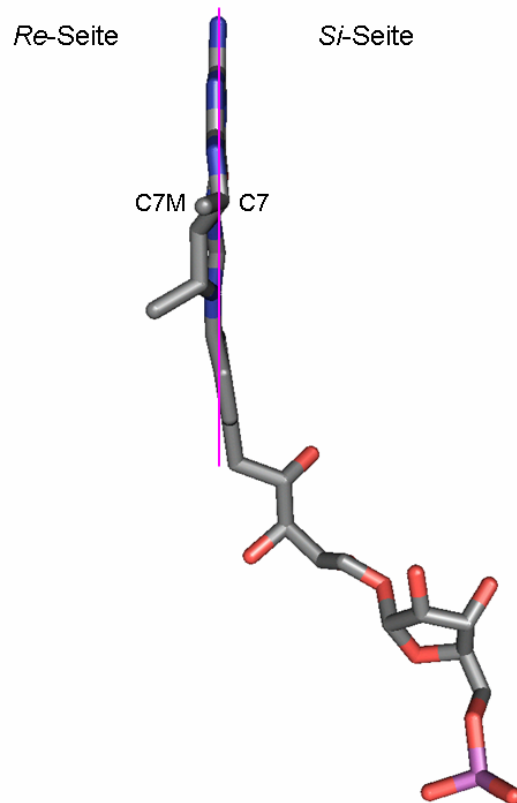


Abbildung 4.19: Die aromatischen Ringe von Methylen-H₄MPT befindet sich annähernd in einer Ebene. Die an Atom C7 gebundene Methylgruppe (C7M) ragt in Richtung der *Re*-Seite des Moleküls.

Die Bindung von F₄₂₀:

Das F₄₂₀-Molekül ist in der Elektronendichtekarte vom Deazaisoalloxazinring bis zur ersten Phosphatgruppe sichtbar. Der Deazaisoalloxazinring ist am tiefsten in die Bindetasche eingebettet, die Ribitol- und die Phosphatgruppe sind geradlinig auf den Eingang gerichtet. Die Phosphatgruppe ist bereits stark lösungsmittlexponiert, der übrige Teil von F₄₂₀ hat keinen Kontakt zum Protein und ist ungeordnet (siehe Abbildung 4.20a). Der Deazaisoalloxazinring von F₄₂₀ und das Benzyl-Imidazolidin-Pyrazin-Ringsystem von Methylen-H₄MPT sind rechtwinklig zueinander angeordnet, sodass der zentrale Pyridinring von F₄₂₀ versetzt über dem Imidazolidinring von Methylen-H₄MPT zu liegen kommt. Der Imidazolidinring ist parallel, jedoch verschoben zum Deazaisoalloxazinring orientiert (siehe Abbildung 4.21). Das dreigliedrige Ringsystem von F₄₂₀ liegt in einer gebogenen Konformation (*Butterfly*-Konformation) mit einem Biegewinkel von ca. 25° vor, die von strukturellen Vorgaben stabilisiert oder sogar induziert wird (siehe Abbildung 4.20b). Der zentrale Pyridinring wird durch Pro73, dessen starrer, hydrophober Ring auf die *Re*-Seite von F₄₂₀ gerichtet ist und welches gleichsam als Sperre fungiert, in seiner Position außerhalb der Ringebene gehalten. Der minimale Abstand zwischen dem C_v-Atom von Pro73 und dem C5-Atom von F₄₂₀ beträgt 2,74 Å. Pro73 ist streng konserviert und befindet

sich an der Spitze eines ungewöhnlichen *Loops* nach Faltblattstrang $\beta 3$. Dieser Strang bildet zusammen mit Strang $\beta 1$ den Schaltpunkt des β -Faltblatts, welches die entscheidende Stelle in allen α/β -Proteinen darstellt und bereits anhand der Struktur ohne Substrat und Cosubstrat als Bindestelle von F_{420} identifiziert wurde (41). Der Pyrimidinring von F_{420} ist von Methyl-H₄MPT weggedreht, insbesondere um dessen C9M-Methylgruppe, aber auch um Met44 auf der *Re*-Seite auszuweichen. Bemerkenswerterweise sind die polaren Atome O4F und N3F des Pyrimidinrings über Wasserstoffbrücken mit Asn13 und Val42 verbunden, welche ebenso mit Methyl-H₄MPT wechselwirken. Der Hydroxybenzylflügel des Deazaisalloxazins wird durch Met124 auf der *Si*-Seite und Asp99 auf der *Re*-Seite, dessen Carboxylatgruppe eine Wasserstoffbrückenbindung zur Hydroxygruppe bildet, von Methyl-H₄MPT weggedrückt (siehe Abbildung 4.20a). Der invariante Aminosäurerest Asp99 spielt, in Analogie zu Asp122, eine wichtige Rolle in der Verknüpfung der Verbindung zwischen dem F_{420} benachbarten Proteinabschnitt sowie dem *Loop* nach dem Faltblattstrang $\beta 3$ und ist an der Stabilisierung von Pro73 beteiligt. Darüber hinaus könnte die Wechselwirkung mit Asp99 für die Stereospezifität der Bindung von F_{420} verantwortlich sein.

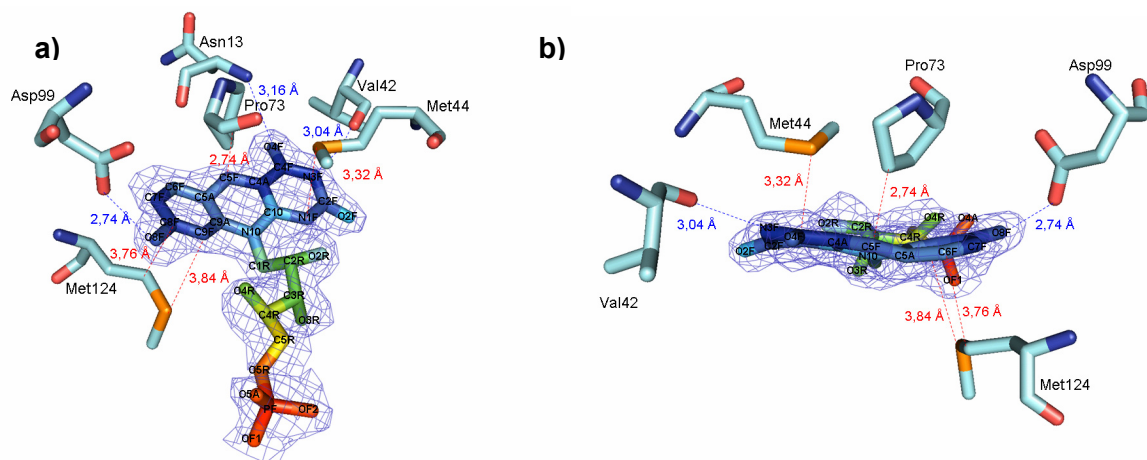


Abbildung 4.20: a) F_{420} mit Wasserstoffbrückenbindungen (blau) und van-der-Waals-Kontakten (rot) zu relevanten Aminosäureresten in der Bindetasche. Das Molekül ist nach Temperaturfaktoren eingefärbt (dunkelblau: $< 26 \text{ \AA}^2$, mittelblau: $< 28 \text{ \AA}^2$, hellblau: $< 30 \text{ \AA}^2$, hellgrün: $< 34 \text{ \AA}^2$, dunkelgrün: $< 39 \text{ \AA}^2$, orange: $< 50 \text{ \AA}^2$, rot: $> 50 \text{ \AA}^2$). b) Der Deazaisalloxazinring von F_{420} liegt in einer gebogenen Konformation (*Butterfly*-Konformation) vor.

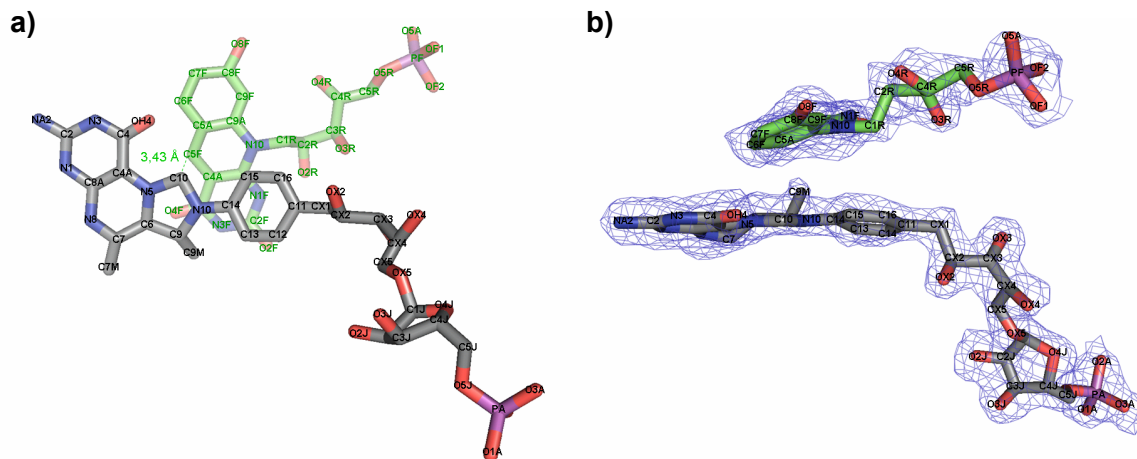


Abbildung 4.21: a) Der Deazaisalloxazinring von F₄₂₀ (grün) und das Benzyl-Imidazolidin-Pyrazin-Ringsystem von Methylen-H₄MPT (grau) sind rechtwinklig zueinander angeordnet, sodass der zentrale Pyridinring von F₄₂₀ versetzt über dem Imidazolidinring von Methylen-H₄MPT zu liegen kommt. Die mit 3,43 Å kürzeste Distanz befindet sich zwischen den am Hydridtransfer beteiligten Atomen C5 von Methylen-H₄MPT und C10 von F₄₂₀. b) Der Imidazolidinring von Methylen-H₄MPT ist parallel, jedoch verschoben zum Deazaisalloxazinring von F₄₂₀ orientiert.

5 Diskussion

5.4 Der N^5 -Methyl- H_4 MPT:Coenzym M-Methyltransferasekomplex aus *M. marburgensis*

5.1.1 Isolierung und Reinigung des Mtr-Komplexes

Im Rahmen dieser Arbeit gelang die Verbesserung und Vereinfachung der Isolierung und Reinigung des Mtr-Komplexes aus *M. marburgensis* unter aeroben Bedingungen. Eine entscheidende Hürde hierbei war, das Abdissoziieren der hydrophilsten, 34 kDa großen Untereinheit MtrH vom restlichen Komplex zu kontrollieren. Zwei Strategien wurden hierzu gewählt, zum einen die möglichst schonende Präparation des kompletten, acht Untereinheiten umfassenden Komplexes MtrA-H, zum anderen die Präparation des Enzymkomplexes MtrA-G unter möglichst vollständiger Abtrennung der Untereinheit MtrH.

Das von Gärtner *et al.* (56) für die anaerobe Reinigung etablierte Protokoll wurde modifiziert, indem die Zellen im Hochdruckhomogenisator aufgeschlossen wurden. Dadurch konnte der Gehalt an MtrH im Komplexverbund etwas erhöht werden. Bei der sich anschließenden Ionenaustauschchromatographie auf DEAE-Sephrose zeigte sich eine Auftrennung in verschiedene Fraktionen. Diejenigen, die zwar den Mtr-Komplex, jedoch im Vergleich zu den übrigen Untereinheiten wenig MtrH enthielten, diejenigen, welche alle acht Untereinheiten in gleicher Menge beinhalten und jene, welche neben dem Mtr-Komplex eine zunehmende Menge an anderen Proteinen umfassten. An der Anzahl der Fraktionen mit wenig MtrH sowie deren Gesamtproteingehalt konnte die Qualität der Membranpräparation abgelesen werden. Bei der folgenden Ionenaustauschchromatographie auf Q-Sephrose traten wiederum einige Fraktionen mit im Vergleich zu den übrigen Untereinheiten weniger MtrH auf. Die abschließende Gelfiltration zeigte, dass MtrA-H größtenteils als monodisperse Probe vorlag.

Vergleicht man die Reinigung unter anaeroben Bedingungen (56, 65) mit der in dieser Arbeit durchgeführten Präparation, fällt auf, dass bei letzterer die Salzkonzentration zur Elution von MtrA-H bei der säulenchromatographischen Reinigung insgesamt etwas höher lag. Die in der Literatur beschriebene vollständige Abtrennung von MtrH während der Ionenaustauschchromatographie auf Q-Sephrose konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Die Anzahl an Fraktionen mit wenig MtrH variierte von Präparation zu Präparation stark, nur die Art

des Zellaufschlusses schien einen gewissen Einfluss zu haben. Wann genau es hauptsächlich zu einem Verlust der Untereinheit MtrH kam, konnte nicht abschließend geklärt werden, die Membranpräparation schien jedoch von entscheidender Bedeutung zu sein. Es ist darüber hinaus möglich, dass schon der Zustand der Zellen bei der Ernte eine Rolle spielte, oder dass auch während der Reinigung weiteres MtrH abgetrennt wurde, ohne dass dies durch die Zusammensetzung der Pufferlösung zu kontrollieren war.

Um die Homogenität der Probe zu verbessern, wurde als alternative Strategie die Reinigung des Enzymkomplexes MtrA-G unter möglichst vollständiger Abtrennung der Untereinheit MtrH durchgeführt. Dies gelang durch die Behandlung der sedimentierten Membranen mit Ultraschall und mehrfaches Auswaschen von MtrH. Der Gehalt an MtrH der bei der anschließenden säulenchromatographischen Reinigung gesammelten Fraktionen lag an der Nachweisgrenze von mit *Coomassie Brilliant Blue* gefärbten SDS-Pages. Bei einer ESI-MS-Analyse der gereinigten Probe konnte kein MtrH mehr nachgewiesen werden. Bei der *Western Blot*-Analyse der Proben mit Anti-*M. marburgensis* MtrH-Antikörpern trat nur noch eine sehr schwache Bande auf, d. h. eine Abtrennung der Untereinheit MtrH ist bis auf einen äußerst geringen Restgehalt so gut wie vollständig gelungen. Auch die Ergebnisse der Präparation von MtrA-G ohne MtrH sprechen also dafür, dass die Membranpräparation eine entscheidende Rolle beim Verlust von MtrH spielt.

5.1.2 Der oligomere Zustand des Mtr-Komplexes

Um einen Aussage über den oligomeren Zustand des isolierten Gesamtkomplexes MtrA-H treffen zu können, wurde das Molekulargewicht mit verschiedenen Methoden bestimmt. Bei sämtlichen präparativen und analytischen Gelfiltrationen zeigte sich neben einem Hauptpeak bei 670-770 kDa eine Schulter von 300-400 kDa. Durch Blaue Native Gelelektrophorese (BN-Page) dagegen wurde das Molekulargewicht auf ca. 300 kDa bestimmt, die analytische Ultrazentrifugation ergab ein Molekulargewicht von 620 kDa und bei der elektronenmikroskopischen Einzelpartikelmessung wurde das Molekulargewicht anhand der Größe des Komplexes auf ca. 600 kDa geschätzt.

Für ein Tetramer eines Heterooktamers liegt das berechnete Molekulargewicht bei 672 kDa, womit der Hauptpeak der Gelfiltration sowie die Ergebnisse der Analytischen Ultrazentrifugation und der elektronenmikroskopischen Einzelpartikelmessung übereinstimmen. Das Dimer eines Heterooktamers hat ein

berechnetes Molekulargewicht von 336 kDa, welches mit dem in der Gelfiltration auftretenden Schulterpeak und dem Ergebnis der BN-Page in Einklang steht.

In der Literatur wird das mittels Gelfiltration bestimmte Molekulargewicht mit 670 kDa angegeben und dementsprechend der oligomere Zustand eines Tetramers angenommen (56), wofür auch die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse in überwiegender Zahl sprechen. Die widersprüchlichen Werte der Blauen Nativen Gelelektrophorese sowie der bei der Gelfiltration auftretenden Schulterpeak deuten jedoch darauf hin, dass die Probe möglicherweise nicht vollständig monodispers vorlag. Auch bei der analytischen Ultrazentrifugation traten Abweichungen der Sedimentationskonstanten bei verschiedenen Messungen auf. Als Grund für die aufgeführten Diskrepanzen kommt im Wesentlichen ein veränderlicher Gehalt an Untereinheit MtrH innerhalb des Komplexverbunds in Betracht, wie bereits in Abschnitt 5.1.1 diskutiert wurde. Weiterhin könnten Unterschiede im Detergenzgehalt der Probe vorliegen. Dadurch könnten im isolierten Stadium Dimer und Tetramer des Mtr-Komplexes im Gleichgewicht miteinander stehen. Auf welcher Seite dieses Gleichgewicht liegt, könnte wiederum in Zusammenhang mit der Bindung und Dissoziation von MtrH sowie dem Detergenzgehalt der Probe stehen.

5.1.3 Abtrennung der Untereinheit MtrH

Wie schon im Abschnitt 5.1.1 beschrieben, traten bei der Reinigung des Gesamtkomplexes MtrA-H, insbesondere bei den beiden durchgeführten Ionenaustauschchromatographien, Fraktionen mit nur geringem Gehalt an MtrH auf. Es ist davon auszugehen, dass die Abtrennung von MtrH überwiegend während der Membranpräparation geschehen war und während der Reinigung nur noch wenig MtrH vom Komplex abdissoziierte. Darüber hinaus konnten die Proben mit unterschiedlicher Menge an MtrH chromatographisch nicht vollständig voneinander getrennt werden. Neben der Entfernung von MtrH während der Membranpräparation wurde deshalb auch eine Abtrennung vom bereits gereinigten Gesamtkomplex versucht. Dazu wurden eine Verschiebung des pH-Wertes, eine Anzahl von Detergenzien, eine Hitzebehandlung und Pufferlösungen mit unterschiedlichem Salzgehalt getestet. Dies geschah in Anlehnung an Protokolle zur Reinigung von Cytochrom c-Oxidase unter Abtrennung von Untereinheit III (135-142).

Es war jedoch durch einen Austausch der Pufferlösung nicht möglich, MtrH gezielt abzutrennen und gleichzeitig den restlichen Komplex MtrA-G stabil zu halten. Entweder blieb der Gesamtkomplex MtrA-H bestehen, oder es kam bei zu harschen Bedingungen zur Bildung von höhermolekularen Aggregaten bzw. zur Präzipitation

des Proteins. Dies bestätigte den Befund, der schon während der Membranpräparation und Reinigung gemacht worden waren, dass nämlich der Gehalt an MtrH im Gesamtkomplex MtrA-H vermutlich weitgehend von den Bedingungen während der Membranpräparation abhing.

5.1.4 Strukturbestimmung

Die wenigen in dieser Arbeit mit dem Gesamtkomplex MtrA-H durchgeführten Kristallisationsversuche waren bisher nicht erfolgreich. Bei einem membrangebundenen Komplex dieser Größe war jedoch auch nicht von einer spontanen Kristallisation unter für lösliche Proteine optimierten Standardbedingungen, wie sie im verwendeten *JB-Screen* vorliegen, auszugehen. Bevor das Augenmerk verstärkt auf die Kristallisation gerichtet werden kann, muss zunächst die Homogenität der Proteinprobe sichergestellt werden. Hierzu muss vor allem das Abdissoziieren der Untereinheit MtrH vom Restkomplex kontrolliert werden. Die in dieser Arbeit erfolgreich durchgeführte Reinigung des Komplexes MtrA-G ohne Untereinheit MtrH eröffnet somit neue Möglichkeiten für das Auffinden von Kristallisationsbedingungen.

Der Schwerpunkt in der Strukturbestimmung des Gesamtkomplexes lag in dieser Arbeit auf der Herstellung von für die elektronenmikroskopische Untersuchung geeigneten Proteinproben. Auch hier stellte sich heraus, dass die Homogenität der Probe entscheidend war. Eine Hauptschwierigkeit bereitete so auch die Klassifizierung der Aufnahmen für die elektronenmikroskopische Einzelpartikelmessung. Das das pyramidenähnliche Molekül schien aus einem größeren, dreieckigen, eingekerbten Teil und einem kleineren, spitzen Teil zu bestehen. Jener kleinere Teil des Moleküls wies bei den verschiedenen aufgenommenen Partikeln starke Unterschiede auf, was als eventuelle Flexibilität dieses Teils gedeutet wurde. Da bereits bei der Aufreinigung des Mtr-Komplexes das Abdissoziieren der Untereinheit MtrH beobachtet wurde, lag die Annahme nahe, es könnte sich bei dem flexiblen Molekülteil um MtrH handeln. Das unterschiedliche Erscheinungsbild der Partikel einer Probe ließe sich damit erklären, dass es sich hierbei um Zustände mit verschiedener Anzahl an gebundenen MtrH-Untereinheiten handelte. Da jedoch anhand des Modells keinerlei Symmetrien innerhalb des Moleküls zu erkennen waren und auch über eine mögliche Anordnung in der Membran keine Aussage getroffen werden konnte, bleiben diese Aussagen Spekulation. Umso interessanter ist die Tatsache, dass die in dieser Arbeit erfolgreich durchgeführte Reinigung des Komplexes MtrA-G ohne Untereinheit MtrH

in den bisher erfolgten elektronenmikroskopischen Aufnahmen mit Negativfärbung weniger heterogen erschien. Es besteht also die berechtigte Hoffnung, mit nach dem neuen, in dieser Arbeit etablierten Reinigungsprotokoll präparierten Proben eine Strukturbestimmung durch elektronenmikroskopische Einzelpartikelmessung durchführen zu können.

5.2 Die Untereinheit MtrA des N⁵-Methyl-H₄MPT:CoM-Methyltransferase-komplexes

5.2.1 Heterologe Expression in *E. coli*

Die von Harms und Thauer beschriebene Überexpression von des-[214-239]-MtrA aus *M. marburgensis* in *E. coli* als lösliches Protein (143), welche von Frau Dr. Priyamvada Acharya am Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt reproduziert werden konnte, gab zur Hoffnung Anlass, MtrA aus *M. jannaschii* und *M. kandleri* auf analoge Weise heterolog exprimieren zu können.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Expressionsversuche ergaben, dass bei MtrA aus *M. jannaschii* die lösliche Expression abhängig von der Temperatur und der zur Induktion verwendeten IPTG-Konzentration war. Da vollständiges MtrA mit C-terminaler Transmembranhelix (MJMtrA1) bei Standardbedingungen (LB-Medium, 37 °C Anzuchttemperatur, Induktion mit 1 mM IPTG) löslich, des-[229-246]-MtrA (MJMtrA2) jedoch nur teilweise löslich und des-[225-246]-MtrA (MJMtrA3) vollständig unlöslich exprimiert wurde, ist anzunehmen, dass nicht die Hydrophobizität sondern die Proteinfaltung betreffende Faktoren die wichtigste Rolle spielten. Da durch Absenken der Anzuchttemperatur auf 28 °C auch MJMtrA2 und MJMtrA3 vollständig löslich produziert werden konnten und bei MJMtrA3 zudem noch eine sehr hohe Expressionsrate auffiel, wurde letzteres zur Aufreinigung weiterverwendet. Ob bereits während der heterologen Expression Cobalamin gebunden wurde, konnte nicht festgestellt werden. Bei Zugabe von 0,1 mM Vitamin B_{12a} zum Anzuchtmedium ließ sich keine Veränderung des exprimierten Proteins feststellen.

MtrA aus *M. kandleri* konnte ebenfalls teilweise als lösliches Protein in *E. coli* produziert werden, wurde allerdings in nur relativ geringen Mengen exprimiert. Ein Grund hierfür könnte das im Vektorkonstrukt pCSt_{tet}(mtrA) zur Induktion verwendete *tet*-Repressor-System sein. Für zukünftige Expressionsversuche sollte die Kombination von Vektor und Wirtszelle neu überdacht werden.

5.2.2 Des-[225-246]-MtrA (MJMtrA3) aus *M. jannaschii*

In dieser Arbeit konnte erstmalig um 22 C-terminale Aminosäuren verkürztes MtrA aus *M. jannaschii* bis zur Homogenität gereinigt werden. Die Reinigung von MtrA aus *M. marburgensis* als Apoprotein mit anschließender Rekonstituierung des Holoproteins wurde bereits beschrieben, jedoch konnte in jener Arbeit das Holoprotein nicht in monodispers Form erhalten werden (143). Im Unterschied zu dem bereits veröffentlichten Protokoll wurde im hier vorliegenden Fall Cofaktor Vitamin B_{12a} schon zum Lysepuffer zugegeben. Die MJMtrA3 enthaltenden Fraktionen konnten während der Reinigung durch ihre rötliche Farbe und die Absorption bei 365 nm identifiziert werden. Auch nach erneuter Zugabe von Vitamin B_{12a}, Dialyse und zweimaliger Gelfiltration blieben diese Eigenschaften erhalten.

Die bei SDS-Pages auftretende 24 kDa-Bande ließ sich per ESI-MS eindeutig als MJMtrA3 identifizieren. Das apparente Molekulargewicht stimmte mit dem anhand der Aminosäuresequenz berechneten überein und das in der Literatur beschriebene Auftreten verringerter elektrophoretischer Mobilität des denaturierten Proteins bzw. des Apoproteins im Vergleich zum rekonstituierten Holoprotein ließ sich nicht beobachten (56, 57, 143). Dies wurde als weiterer Hinweis gewertet, dass MJMtrA3 als korrekt gefaltetes Holoprotein mit gebundenem Cofaktor Vitamin B_{12a} gereinigt werden konnte.

Die Aufnahme eines UV/Vis-Spektrums des gereinigten Proteins zeigte ein Absorptionsmaximum bei 365 nm, das demjenigen von ungebundenem Vitamin B_{12a} entsprach. Dagegen sind bei rekonstituiertem MtrA aus *M. marburgensis* die für Cob(II)amid enthaltende Corrinoidproteine typischen Absorptionsmaxima von 278 nm, 315 nm, 424 nm und 492 nm zu finden. Die Präparation von MJMtrA3 fand im Gegensatz zu *M. marburgensis* MtrA ohne Reduktionsmittel, wie z. B. DTT, unter aeroben Bedingungen statt, sodass bei MJMtrA3 eventuell eine Bindung von Cob(III)alamin vorliegen könnte. Eine weitere Untersuchung mittels EPR- oder NMR-Spektroskopie könnte hier Klarheit schaffen.

Sowohl an MtrA gebundenes Cob(I)alamin als auch Methylcob(III)alamin werden als Zwischenstufen der vom Mtr-Komplex katalysierten Methylübertragungsreaktion angenommen (56, 57). Die Methylierungs- bzw. Demethylierungsreaktion und damit verbundene Oxidation und Reduktion von enzymgebundenem Cobalamin sind vermutlich der Auslöser von Konformationsänderungen, welche wiederum mit dem vektoriellen Natriumtransport über die Membran gekoppelt sind (58). EPR-spektroskopische Studien und Mutationsversuche mit rekonstituiertem MtrA aus *M. marburgensis* deuteten darauf hin, dass Cob(II)alamin in der *base-off/His-on*-

Konfiguration gebunden wird (55, 143). Anders als andere Cob(I)amid- und Cob(II)amid in *base-off/His-on*-Konfiguration bindende Enzyme, deren Kristallstrukturen zum Teil bereits vorliegen, besitzt MtrA jedoch nicht die Konsensus-Sequenz (DXHXXG - 41-42 AS – SXL - 21-22 AS - GG) (144-148). Die genaue Strukturbestimmung des MtrA-Holoproteins bleibt also nicht nur im Hinblick auf die in Abhängigkeit von der Oxidationsstufe des gebundenen Cobalamin zu erwartenden Konformationsänderungen interessant.

Zur röntgenographischen Strukturbestimmung von MJMtrA3 wurden umfangreiche Kristallisationsversuche unternommen. Zuerst wurden kommerziell erhältlichen *Screens* verwendet, wobei jedoch auffiel, dass MJMtrA3 auch nach Wochen bei nur sehr wenigen Bedingungen präzipitierte. Deshalb wurden die Proteinpufferlösung, Proteinkonzentration und Lagerungstemperatur der Kristallisationsansätze variiert. Da sich auch durch diese Maßnahmen keine Kristallisation herbeiführen ließ, wurden zwei eigene *Screens* mit je 96 Bedingungen entwickelt. Bei der Kristallisation wird die Löslichkeit des Proteins durch Zugabe von Fällungsmittel stetig verringert, bis die Sättigungsgrenze überschritten und ein metastabiler Zustand erreicht ist. In diesem Zustand ist die Kristallbildung, jedoch keine Keimbildung möglich. Bei weiter steigender Fällungsmittelkonzentration geht das System in einen labilen Zustand über, in dem Keimbildung und -wachstum möglich werden. Idealerweise findet die Kristallisation im Grenzbereich zwischen metastabilem und labilem Zustand statt (149). Als Fällungsmittel werden im allgemeinen Salze, wasserlösliche Polymere und organische Lösungsmittel verwendet, die mit dem Protein um die Lösungsmittelmoleküle konkurrieren. Daher wurden bei den selbst entwickelten *Screens* zum einen zwei Salze (Na/K-Tartrat und Ammoniumsulfat), zum anderen Ammoniumsulfat und Glycerin jeweils in unterschiedlicher Konzentration kombiniert. Doch auch dadurch ließ sich die äußerst gute Löslichkeit von MJMtrA3 nicht stark genug verringern, um eine Kristallbildung zu erreichen. Bedenkt man, dass *M. jannaschii*, der Ursprungsorganismus von MJMtrA3, ein extremophiles Archaeon ist, erscheint diese Eigenschaft jedoch nicht verwunderlich.

5.2.3 Des-[238-252]-MtrA (MKMtrA) aus *M. kandleri*

Die Produktion von des-[238-252]-MtrA (MKMtrA) aus *M. kandleri* gelang in *E. coli* zumindest teilweise als lösliches Protein. Wie SDS-Page und *Western Blot* mit Anti-*StreptII*-Antikörpern jedoch zeigten, betrug das apparente Molekulargewicht von MKMtrA ca. 16,5 kDa, wogegen sich der anhand der Aminosäuresequenz

berechnete Wert auf 27 kDa belief. Gründe hierfür könnten eine erhöhte elektrophoretische Mobilität des korrekt gefalteten Apoproteins sein, wie sie bereits für MtrA aus *M. marburgensis* beschrieben wurde (56, 57, 143). Wahrscheinlicher jedoch ist eine unvollständige Expression des Gens in *E. coli*, deren Produkte als niedermolekulare Banden im SDS-Gel auftraten. Bruchstücke, die den C-Terminus von MKMtrA enthielten, waren aufgrund des *StrepII*-Anhängsels im *Western Blot* nachweisbar.

Die Bindung von MKMtrA an eine *Strep*-Tactin[®]-Säule gelang zwar teilweise, jedoch war eine Reinigung auf diese Weise nicht möglich, da die Bindung nur unvollständig geschah. Dies könnte dadurch begründet sein, dass der C-Terminus mit dem *StrepII*-Anhängsel im gefalteten Zustand nicht richtig zugänglich ist und deswegen nicht an *Strep*-Tactin[®] gebunden werden kann.

Eine MALDI-TOF-*Fingerprint*-Analyse nach einem Trypsin-Verdau der im *Western Blot* sichtbaren Bande sollte Klarheit über das exprimierte Produkt bringen. MtrA aus *M. kandleri* konnte mit dieser Methode jedoch nicht eindeutig nachgewiesen werden. Ein neuerlicher Versuch mittels ESI-MS könnte eventuell Aufschluss bringen. Aufgrund der bereits auf der Expressionsebene aufgetretenen Schwierigkeiten wurden die Versuche mit MKMtrA abgebrochen.

5.3 Die Untereinheit MtrH des N⁵-Methyl-H₄MPT:CoM-Methyltransferasekomplexes

5.3.1 Heterologe Expression

MtrH enthält nur 38,1 % hydrophobe Aminosäurereste und besitzt laut Sekundärstrukturanalyse keine Transmembranhelices, womit es die hydrophilste Untereinheit des Methyltransferasekomplexes darstellt (54). Dennoch wurde sowohl MtrH aus *M. marburgensis*, als auch aus *M. jannaschii* und *M. kandleri* unabhängig von den Wachstumsbedingungen oder dem Induktionssystem unlöslich in Einschlusskörperchen exprimiert. Auch eine in Analogie zur ebenfalls Pterinbindenden 5-Methyltetrahydrofolat Corrinoid/Eisen-Schwefel-Protein Methyltransferase aus *Moorella thermoacetica* vorgenommenen Verkürzung um elf N-terminale Aminosäuren bei *M. kandleri* MtrH ermöglichte keine lösliche Expression in *E. coli*.

Wie sich herausstellte, wurde die Annotation der in dieser Arbeit zur Klonierung von *mtrH* aus *M. jannaschii* verwendeten Sequenz im März 2007 in der Datenbank (GenBank Nr. NC_000909, (6)) korrigiert. Das in dieser Arbeit heterolog exprimierte

MJMtrH besitzt deswegen 14 zusätzliche N-terminale Aminosäuren, welche vermutlich die Faltung des Proteins in *E. coli* weiter erschweren.

Zur heterologen Expression von *mtrH* wurden am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg bereits zahlreiche Versuche unternommen. MtrH aus *M. marburgensis* wurde als Maltosebindeprotein-, Hexahistidin-, Calmodulin- und Thioredoxininfusionsprotein in *E. coli* produziert, ferner wurde eine Co-Expression mit den Chaperonen GroEL und GroES versucht. Darüber hinaus wurde mit *Methanosarcina barkeri* ein weiterer Ursprungsorganismus sowie mit *Aspergillus nidulans* ein eukaryotisches Expressionssystem für *M. marburgensis mtrH* getestet. In allen aufgeführten Experimenten lag MtrH als unlösliches Protein in Einschlusskörperchen vor oder wurde erst gar nicht in nennenswerten Mengen produziert (150).

Alle bisher durchgeführten Experimente lassen vermuten, dass der Unterschied zwischen Archaeen und Bakterien zu groß ist, um eine heterologe Expression von *mtrH* zu ermöglichen. Die Isolierung und Reinigung von nativem MtrH aus dem Ursprungsorganismus oder ein archaeelles Expressionssystem könnten hier Abhilfe schaffen.

5.3.2 Rekombinantes MtrH (MMRMtrH) aus *M. marburgensis*

Rekombinant erzeugtes MtrH aus *M. marburgensis* (MMRMtrH) lag in Einschlusskörperchen vor, welche zunächst entfaltet, im entfalteten Zustand gereinigt und schließlich wieder rückgefaltet werden sollten. Während dieser Schritte war zwar eine Anreicherung von MMRMtrH zu beobachten, jedoch zeigte sich in der abschließenden Gelfiltration des rückgefalteten Proteins, dass die Probe nicht monodispers vorlag. Auch traten bei der Analyse mittels SDS-Page zahlreiche weitere Banden auf, deren Identität nicht geklärt werden konnte. Diese Heterogenität der Probe ist wahrscheinlich auf die inkorrekte Faltung und partielle Aggregation des Proteins zurückzuführen. Hinzu kommen vermutlich Abbauprodukte von MMRMtrH, da entfaltete Proteine besonders anfällig für Proteasen sind.

Da keine Möglichkeit bestand, die korrekte Faltung des Proteins zu überprüfen, wurden weitere Rückfaltungs- und Reinigungsversuche eingestellt. Als Alternative zu rekombinantem MtrH wurde bereits im vorhergehenden Abschnitt die Isolierung und Reinigung des Proteins aus dem Ursprungsorganismus genannt. Dies wurde bereits für MtrH aus *M. marburgensis* beschrieben (65). In genanntem Protokoll wurde der Mtr-Komplex mit LM solubilisiert und MtrH anschließend chromatographisch auf Q-Sepharose vom Komplex abgetrennt. Das Abdissoziieren der Untereinheit MtrH

vom Gesamtkomplex wurde auch in dieser Arbeit beobachtet, allerdings war eine chromatographische Abtrennung nicht vollständig möglich. Um eine für die Kristallographie ausreichende Homogenität der Probe zu erhalten, mussten weitere Reinigungsschritte durchgeführt werden.

Eine weitere Möglichkeit, MtrH aus *M. marburgensis* nativ zu reinigen, besteht in der Präparation unter anaeroben Bedingungen zusammen mit der F₄₂₀-reduzierende Hydrogenase (Frh). Frh befindet sich als lösliches Enzym nach dem Zellaufschluss in der cytosolischen Fraktion und kann über mehrere chromatographische Reinigungsschritte bis zur Homogenität aufgereinigt werden. Als störende Verunreinigung tritt während der Präparation in SDS-Page-Analysen eine Bande von ca. 35 kDa auf, die mittels MALDI-TOF als die lösliche Untereinheit MtrH des Mtr-Komplexes identifiziert wurde. Durch Gelfiltration konnte MtrH jedoch von Frh abgetrennt werden und lag schließlich als monodisperse Probe vor, wie analytische Gelfiltration und SDS-Page zeigten (Dr. Kezen Ma, Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg, *mündliche Mitteilung*). Diese Methode unter aeroben Bedingungen zu reproduzieren gelang innerhalb der vorliegenden Arbeit nicht, sie gab jedoch interessante Hinweise darauf, dass MtrH sich nach Dissoziation vom Mtr-Komplex in der cytosolischen Fraktion befindet und an andere, lösliche Proteine bindet. Es eröffnen sich damit neue Möglichkeiten, MtrH nativ zu reinigen und z. B. für die Rekonstruktion von MtrA-H aus MtrA-G zu verwenden.

5.4 Die F₄₂₀-abhängige N⁵,N¹⁰-Methylen-H₄MPT-Dehydrogenase (KMtd) aus *M. kandleri*

5.4.1 Die Bindung von H₄MPT und F₄₂₀ an KMtd

Ein Vergleich der von Hagemeyer *et al.* (41) veröffentlichten Struktur mit der in dieser Arbeit gelösten Kristallstruktur von KMtd in Komplex mit Substrat und Cosubstrat zeigte überraschenderweise, dass die Bindung der verhältnismäßig sperrigen Moleküle nicht mit signifikanten Konformationsänderungen einher geht. Ein Grund hierfür könnten die vielfältigen Verknüpfungen der exponierten Bindestelle mit dem Proteininneren, d. h. mit dem hydrophoben Kern der helicalen Domäne und dem zentralen β -Faltblatt, sein. Es handelt sich also um ein besonders ausgeprägtes Beispiel für ein Enzym mit einer vorgegebenen Bindetasche.

Die in dieser Arbeit vorgestellte Struktur des ternären Komplexes aus KMtd, H₄MPT-Derivat und F₄₂₀ bei 1,8 Å Auflösung sowie eine weitere, hier nicht gezeigte Struktur des binären Komplexes aus KMtd und H₄MPT-Derivat bei einer Auflösung

von 2,0 Å zeigten keine wesentlichen Unterschiede in der Substratbindung und -konformation. Es ist davon auszugehen, dass es sich bei dem ternären Komplex um die aktive Konformation handelte (siehe Abschnitt 5.4 2), sodass entweder Methylen- H_4MPT oder nach erfolgter Hydridübertragung auf F_{420} auch Methenyl- H_4MPT^+ vorgelegen haben könnte, wobei sogar eine Mischung der beiden Derivate denkbar ist. Eine Unterscheidung von Methylen- H_4MPT und Methenyl- H_4MPT^+ bzw. F_{420} und $F_{420}H_2$ war anhand der vorliegenden Strukturen nicht möglich. Allerdings wurden für die Kristallisation des ternären und des binären Komplexes Methylen- H_4MPT und F_{420} bzw. F_0 bei einem pH-Wert von 6,5, bei welchem das Reaktionsgleichgewicht auf der Seite von Methenyl- H_4MPT^+ und $F_{420}H_2$ liegt, verwendet. Dementsprechend wird im Folgenden von Methenyl- H_4MPT^+ und $F_{420}H_2$ ausgegangen.

Bei der Struktur von Methenyl- H_4MPT^+ im Komplex mit KMtd und $F_{420}H_2$ fällt vor allem die geradlinige Konformation des aus Pterin-, Imidazolidin- und Benzylrest bestehenden Ringsystems auf. Dies ist umso überraschender, wenn man die vorliegende Struktur mit denjenigen in wässriger Lösung und im Komplex mit der H_2 -bildenden Dehydrogenase (Hmd) sowie dem H_4MPT -abhängigen Formaldehyd-aktivierenden Enzym (Fae) vergleicht (45, 47). In Lösung und im Komplex mit Hmd befindet sich zwischen dem Pterin- und dem Imidazolidinring ein Knick mit einem Winkel von 50° bzw. 40° . Atom C7 weist daher auf die *Si*-Seite des Moleküls und der Benzylring befindet sich in äquatorialer Position zum Pterinring. Bei Fae beträgt der Knickwinkel 70° , wodurch C7 auf der *Re*-Seite und der Benzylring senkrecht zum Pterin steht. Bei KMtd dagegen befinden sich alle vier Ringe in nahezu einer Ebene und C7 weist auf die *Re*-Seite. Für die Anwesenheit von Methenyl- H_4MPT^+ in der hier vorliegenden Kristallstruktur spricht, dass bei diesem ein ausgedehntes, durchgängig konjugiertes π -Elektronensystem vorliegt, sodass Methenyl- H_4MPT^+ eher eine flache Konformation einnehmen kann als Methylen- H_4MPT . Das ausgesprochen starre Polypeptidgerüst von KMtd gibt jedoch für beide Derivate eine geradlinige Anordnung vor, sodass letztendlich nicht abschließend beurteilt werden kann, ob es sich bei dem im Komplex mit KMtd gebundenen H_4MPT -Derivat um Methylen- H_4MPT oder Methenyl- H_4MPT^+ handelt, welches aus dem bei der Kristallisation eingesetzten Methylen- H_4MPT durch Oxidation entstanden ist.

$F_{420}H_2$ liegt mit seinem dreigliedrigen Ringsystem in einer gebogenen Konformation (*Butterfly*-Konformation) vor. Diese charakteristische Eigenschaft des komplexgebundenen F_{420} taucht auch in weiteren Strukturen auf, wobei die Biegewinkel von 26° in der F_{420} -abhängigen sekundäre Alkoholdehydrogenase (Adf) über 27° in der Methylen- H_4MPT Reduktase (Mer) und 8° in der $F_{420}H_2$: $NADP^+$ Oxidoreduktase (Fno) bis zu 25° in KMtd variieren (43, 151, 152). Der Grund für

genannte Anordnung könnte sein, dass diese den Van-der-Waals-Kontakt des äußerst sperrigen H₄MPT-Moleküls zum C5-Atom von F₄₂₀ vereinfacht, ohne eine Abstoßung oder Überlappung hervorzurufen.

5.4.2 Die Hydrid-Transferreaktion

Alle bereits genannten Methylenpterin-Dehydrogenasen katalysieren die Hydridtransferreaktion in einem über einen ternären Komplex verlaufenden Mechanismus, welcher voraussetzt, dass der Hydriddonor und -akzeptor in Van-der-Waals-Kontakt zueinander stehen (71, 73, 74).

Die durch Mtd katalysierte Hydridtransferreaktion findet in einer vollständig vorgegebenen Bindetasche statt, deren Form durch die Anpassung sowohl an Methenyl-H₄MPT⁺ als auch an F₄₂₀H₂ bestimmt wird, wie die Überlagerung der Strukturen mit und ohne Substrat bzw. Cosubstrat zeigten. Methenyl-H₄MPT⁺ und F₄₂₀H₂ befinden sich Seite an Seite in der Bindetasche und bilden so den ternären, in kinetischen Studien vorhergesagten Komplex (77). Das H₄MPT-Derivat taucht tiefer in die Bindetasche ein als das Cosubstrat und wird vermutlich als erstes eingebettet. Anschließend dringt F₄₂₀ in die Bindetasche ein und wird größtenteils durch Wechselwirkungen mit Methylen-H₄MPT gebunden. Die Annahmen zu dieser Art von substratinduzierter Bindung werden durch die Beobachtungen bei mehreren Versuchen zur Substratbindung im kristallinen Zustand, bei denen F₄₂₀ nur gebunden werden konnte, wenn Methylen-H₄MPT bereits im aktiven Zentrum vorlag, unterstützt. Dennoch wirkt das hier postulierte Szenario überraschend, da z. B. in der Methylen-H₄MPT Reduktase (Mer), welche die Reduktion von Methylen-H₄MPT zu Methyl-H₄MPT über F₄₂₀H₂ katalysiert, die Reihenfolge der Bindung umgekehrt erfolgt.

Die Ringsysteme des Substrats und des Cosubstrats sind dicht gepackt in einer Weise angeordnet, dass die *Re*-Seite von Methenyl-H₄MPT⁺ der *Si*-Seite von F₄₂₀H₂ gegenüberliegt. Die immer noch unbeantwortete Frage, warum im Gegensatz zu über FAD und NADP verlaufenden Reaktionen (153) der Hydridtransfer bei F₄₂₀ immer auf der *Si*-Seite des Moleküls stattfindet, d. h. der *pro-S*-Wasserstoff übertragen wird, bleibt weiterhin offen, obwohl in der in dieser Arbeit gelösten Struktur die Bauweise des aktiven Zentrums eine Bindung von F₄₂₀H₂ nur in der oben beschriebenen Orientierung erlaubt.

Die Ringsysteme von Methenyl-H₄MPT⁺ und F₄₂₀H₂ sind näherungsweise rechtwinklig zueinander angeordnet. Die katalytisch aktiven Imidazolidin- und Pyridinringe liegen versetzt zueinander und bilden einen Winkel von 165-170°,

sodass die meisten der Ringatome in Van-der-Waals-Kontakt zueinander stehen. Die mit 3,43 Å kürzeste Distanz befindet sich zwischen den am Hydridtransfer beteiligten Atomen C5 und C10. Der Imidazolidinring liegt in sehr schwach ausgeprägter *Envelope*-Konformation vor, wobei das aufgeklappte C10 minimal zur *Re*-Seite hin orientiert ist. Anhand der Strukturdaten ist letztendlich nicht ersichtlich, warum C10 nicht dieselbe Stereokonformation wie in Lösung auf der *Si*-Seite einnimmt. Die Konformationen der Ringe bestimmen im Wesentlichen die Positionen der Wasserstoffatome an C10 und C5, sodass daran die Hydridübertragung direkt beobachtet werden kann. Die für einen Hydridtransfer plausible Geometrie spricht dafür, dass die Kristallstruktur die Konformation vor der Reaktion widerspiegelt.

Keiner der Aminosäurereste scheint direkt an der Hydridübertragungsreaktion beteiligt zu sein. Die Hauptaufgabe der Polypeptidkette ist somit, die sperrigen Methylen-H₄MPT- und F₄₂₀-Moleküle in für eine Hydridübertragung optimalem Abstand und bestmöglicher Orientierung auszurichten, was durch das feine Zusammenspiel vieler Aminosäurereste erreicht wird. Die starre Bindungstasche erscheint genau dafür geeignet, die Ringe in Konformationen mit Van-der-Waals-Kontakt zwischen den an der Hydridübertragung beteiligten Atomen einerseits aber ohne Zusammenstöße andererseits zu zwingen. Die *Butterfly*-Konformation von F₄₂₀H₂ und die vergleichsweise flache Geometrie von Methenyl-H₄MPT⁺ sind also unabdingbare Voraussetzungen für die Katalyse. Ein Knick zwischen dem Pterin- und dem Imidazolidinring wie von Methylen-H₄MPT in Lösung und in dem H₄MPT-abhängigen Formaldehyd-aktivierenden Enzym (Fae) würde zu einem Zusammenprall mit F₄₂₀H₂ führen oder die hydridübertragenden C-Atome außerhalb des notwendigen Van-der-Waals-Abstands rücken. Eine weitere Aufgabe der Polypeptidkette ist darüber hinaus, durch die Aminosäurereste Pro73, Leu125 und Glu26 die Atome C5 und C10 soweit zusammen zu drängen, dass deren Van-der-Waals-Radien überlappen, die Katalyse also gleichsam durch stereoelektronische Effekte verbessert wird. Die Auflösung der Kristallstruktur von 1,8 Å reicht jedoch nicht aus, eine für die Reaktionskatalyse eventuell maßgebliche Verformung der beteiligten Ringe zu ermitteln, wie sie z. B. in anderen Enzymen, die eine Hydridübertragung zwischen sperrigen Lösungsmittelmolekülen katalysieren, vorkommt.

5.5 Ausblick

Mit der in dieser Arbeit entwickelten Methode zur Reinigung des N^5 -Methyl- H_4 MPT:Coenzym M-Methyltransferasekomplexes ohne Untereinheit MtrH (MtrA-G) konnte das Abdissoziieren derselben Untereinheit besser als im für die Reinigung unter anaeroben Bedingungen etablierten Protokoll kontrolliert werden. Die bisherigen Komplexreinigungsversuche beschränkten sich auf *M. marburgensis* als Ursprungsorganismus, es bestünde jedoch die Möglichkeit, auf *M. jannaschii* oder *M. kandleri* auszuweichen und so noch bessere Ergebnisse entweder im Bezug auf die vollständige Abtrennung der Untereinheit MtrH oder auf die homogene Präparation des Mtr-Komplexes mit MtrH zu erzielen.

Mit dem nun zur Verfügung stehenden Protokoll zur Reinigung des Mtr-Komplexes ohne Untereinheit MtrH rückt zum ersten Mal eine Strukturaufklärung in den Bereich des Möglichen. Zum einen schafft die deutlich verbesserte Homogenität der Probe die Voraussetzungen für eine Kristallisation zur Röntgenstrukturanalyse. Hier kämen unter anderem speziell für Membranproteine geeignete Methoden wie *Lipidic cubic phase*- und *Lipidic sponge phase*-Kristallisation in Frage.

Auch bei der elektronenmikroskopischen Einzelpartikelmessung ist die Einheitlichkeit der Probe von entscheidender Bedeutung, sodass hier ebenso die Hoffnung besteht, mit dem Mtr-Komplex ohne MtrH bessere Ergebnisse als die bisher erbrachten zu erzielen. Neben der Einzelpartikelmessung wäre MtrA-G überdies für die 2D-Kristallisation und eine anschließende elektronenkristallographische Analyse geeignet. Mit den Anti-MtrH-Antikörpern besteht darüber hinaus die Möglichkeit, MtrH durch eine Markierung mit an sekundäre Antikörper gebundenen Goldatomen in elektronenmikroskopischen Aufnahmen von MtrA-H zu lokalisieren und so weitere strukturelle Informationen zu erhalten.

Die Untereinheit MtrA aus *M. jannaschii* konnte ohne die C-terminale Transmembranhelix als lösliches Protein in *E. coli* produziert und als Holoprotein bis zur Homogenität gereinigt werden. Zur Kristallisation kam es jedoch vermutlich aufgrund der außergewöhnlich guten Löslichkeit nicht. Bei *M. kandleri* MtrA gelang die Herstellung von geringen Mengen teilweise löslichen *StreptII*-Fusionsproteins ohne C-terminale Transmembranhelix in *E. coli*. Eine Veränderung in der Kombination von Vektor und Wirtstamm oder der Wechsel zu einem archaellen Expressionssystem könnten die Expression von *M. kandleri* MtrA soweit verbessern, dass eine Reinigung und anschließende Kristallisationsversuche ermöglicht würden.

Zur heterologen Expression der Untereinheit MtrH wurden neben den Versuchen in dieser Arbeit bereits zahlreiche Varianten getestet. Eine Produktion als lösliches Protein war in keinem der Fälle möglich. Auch durch Entfaltung und Rückfaltung des in Einschlusskörperchen exprimierten Proteins konnte dieses nicht bis zur Homogenität aufgereinigt werden. Neben der Nutzung eines archaellen Expressionssystems verbleiben als Alternative die Isolierung und Reinigung aus dem Ursprungsorganismus, zu der im Abschnitt 5.3.2 Ansätze angedeutet wurden. Bis zu Homogenität gereinigtes MtrH könnte zur Rekonstruktion des Gesamtkomplexes MtrA-H aus MtrA-G verwendet werden und somit eine Lösung für die Schwierigkeit der Präparation des Mtr-Komplexes mit allen acht Untereinheiten bieten.

Die Kristallstruktur des ternären Komplexes aus der F_{420} -abhängigen N^5, N^{10} -Methylen- H_4 MPT-Dehydrogenase aus *M. kandleri* (KMtd), dem Substrat Methenyl- H_4 MPT⁺ und dem Cosubstrat $F_{420}H_2$ konnte in dieser Arbeit gelöst werden. Die Polypeptidkette ist nur indirekt durch Beeinflussung der Konformation und Orientierung von Methenyl- H_4 MPT⁺ und $F_{420}H_2$ an der Hydridübertragung beteiligt, sodass sich KMtd überraschenderweise als Beispiel für ein Enzym mit ungewöhnlich starrer, vorgegebener Bindetasche erwies. Methenyl- H_4 MPT⁺ und $F_{420}H_2$ sind in katalytisch aktiver Konformation gebunden, jedoch reichte die Auflösung der Kristallstruktur nicht aus, um zu beurteilen, ob Methylen- H_4 MPT und F_{420} oder nach erfolgter Hydridübertragung Methenyl- H_4 MPT⁺ und $F_{420}H_2$ vorlagen. Neben der Verbesserung der Auflösung wäre also auch die Co-Kristallisation von KMtd mit Methenyl- H_4 MPT⁺ ohne F_{420} interessant, um zu ergründen, ob dieses in wesentlich anderer Konformation als das in der vorliegenden Struktur gebundene H_4 MPT-Derivat vorliegt, wenn keine Möglichkeit einer Hydridübertragungsreaktion besteht. Anhand dieser Ergebnisse könnten dann eventuell weitere Rückschlüsse auf den Zusammenhang zwischen Konformation und Oxidationszustand der H_4 MPT-Derivate gezogen sowie zum ersten Mal eine röntgenkristallographische Struktur von Methenyl- H_4 MPT⁺ beschrieben werden.

6 Literatur

1. Woese, C. R., Kandler, O., and Wheelis, M. L. (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya, *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4576-4579.
2. Wasserfallen, A., Noelling, J., Pfister, P., Reeve, J., and de Macario, E. C. (2000) Phylogenetic analysis of 18 thermophilic *Methanobacterium* isolates supports the proposals to create a new genus, *Methanothermobacter gen. nov.*, and to reclassify several isolates in three species, *Methanothermobacter thermoautotrophicus comb. nov.*, *Methanothermobacter wolfeii comb. nov.*, and *Methanothermobacter marburgensis sp. nov.*, *Int J Syst Evol Microbiol* 50, 43–53.
3. Stettler, R., and Leisinger, T. (1992) Physical Map of the *Methanobacterium thermoautotrophicum* Marburg Chromosome, *J Bacteriol* 174, 7227-7234.
4. Zeikus, J. G., and Wolfe, R. S. (1972) *Methanobacterium thermoautotrophicus sp. n.*, an anaerobic, autotrophic, extreme thermophile, *J Bacteriol* 109, 707-715.
5. Schönheit, P., Moll, J., and Thauer, R. K. (1980) Growth parameters (K_s , μ_{max} , Y_s) of *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Arch Microbiol* 127, 59-65.
6. Bult, C. J., White, O., Olsen, G. J., Zhou, L., Fleischmann, R. D., Sutton, G. G., Blake, J. A., FitzGerald, L. M., Clayton, R. A., Gocayne, J. D., Kerlavage, A. R., Dougherty, B. A., Tomb, J. F., Adams, M. D., Reich, C. I., Overbeek, R., Kirkness, E. F., Weinstock, K. G., Merrick, J. M., Glodek, A., Scott, J. L., Geoghagen, N. S., and Venter, J. C. (1996) Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*, *Science* 273, 1058-1073.
7. Jones, W. J., Leigh, J. A., Mayer, F., Woese, C. R., and Wolfe, R. S. (1983) *Methanococcus jannaschii sp. nov.*, an extremely thermophilic methanogen from a submarine hydrothermal vent, *Arch Microbiol* 136, 254-261.
8. Huber, R., Kurr, M., Jannasch, H. W., and Stetter, K. O. (1989) A novel group of abyssal methanogenic archaeobacteria (*Methanopyrus*) growing at 110 °C *Nature* 342, 833.
9. Kurr, M., Huber, R., Koenig, H., Jannasch, H. W., Fricke, H., Trineone, A., Kristjansson, J. K., and Stetter, K. O. (1991) *Methanopyrus kandleri, gen. and sp. nov.* represents a novel group of hyperthermophilic methanogens, growing at 110 °C, *Arch Microbiol* 156, 239.
10. Ferry, J. G. (1993) *Methanogenesis. Ecology, physiology, biochemistry and genetics*, Chapman and Hall, New York.
11. Thauer, R. K. (1998) Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. 1998 Marjory Stephenson Prize Lecture, *Microbiology* 144 (Pt 9), 2377-2406.
12. Thauer, R. K., Kaster, A.-K., Seedorf, H., Buckel, W., and Hedderich, R. (2008) Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation, *Nature Reviews Microbiol* 6, 579-592.
13. Vorholt, J. A., Vaupel, M., and Thauer, R. K. (1996) A polyferredoxin with eight [4Fe-4S] clusters as a subunit of molybdenum formylmethanofuran dehydrogenase from *Methanosarcina barkeri*, *Eur J Biochem* 236, 309-317.
14. Hochheimer, A., Linder, D., Thauer, R. K., and Hedderich, R. (1996) The molybdenum formylmethanofuran dehydrogenase operon and the tungsten formylmethanofuran dehydrogenase operon from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Structures and transcriptional regulation, *Eur J Biochem* 242, 156-162.

15. Breitung, J., and Thauer, R. K. (1990) Formylmethanofuran: tetrahydromethanopterin formyltransferase from *Methanosarcina barkeri*. Identification of N^5 -formyltetrahydromethanopterin as the product, *FEBS Lett* 275, 226-230.
16. Breitung, J., Borner, G., Scholz, S., Linder, D., Stetter, K. O., and Thauer, R. K. (1992) Salt dependence, kinetic properties and catalytic mechanism of N -formylmethanofuran:tetrahydromethanopterin formyltransferase from the extreme thermophile *Methanopyrus kandleri*, *Eur J Biochem* 210, 971-981.
17. Breitung, J., Schmitz, R. A., Stetter, K. O., and Thauer, R. K. (1991) N^5, N^{10} -Methenyltetrahydromethanopterin cyclohydrolase from the extreme thermophile *Methanopyrus kandleri*: increase of catalytic efficiency (kcat/KM) and thermostability in the presence of salts, *Arch Microbiol* 156, 517-524.
18. Zirngibl, C., Van Dongen, W., Schwörer, B., Von Büнау, R., Richter, M., Klein, A., and Thauer, R. K. (1992) H_2 -forming methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase, a novel type of hydrogenase without iron-sulfur clusters in methanogenic archaea, *Eur J Biochem* 208, 511-520.
19. Shima, S., Pilak, O., Vogt, S., Schick, M., Stagni, M. S., Meyer-Klaucke, W., Warkentin, E., Thauer, R. K., and Ermler, U. (2008) The crystal structure of [Fe]-hydrogenase reveals the geometry of the active site, *Science* 321, 572-575.
20. Shima, S., Warkentin, E., Grabarse, W., Sordel, M., Wicke, M., Thauer, R. K., and Ermler, U. (2000) Structure of coenzyme F_{420} dependent methylenetetrahydromethanopterin reductase from two methanogenic archaea, *J Mol Biol* 300, 935-950.
21. Ermler, U., Merckel, M. C., Thauer, R. K., and Shima, S. (1997) Crystal Structure of methyl-coenzyme M reductase: the key enzyme of biological methane formation, *Structure* 5, 635-646.
22. Hoehler, T. M., Alperin, M. J., Albert, D. B., and Martens, C. S. (1998) Thermodynamic control on hydrogen concentrations in anoxic sediments, *Geochim Cosmochim Acta* 62, 1745-1756.
23. Conrad, R. (1999) Contribution of hydrogen to methane production and control of hydrogen concentrations in methanogenic soils and sediments, *FEMS Microbiol Ecol* 28, 193-303.
24. Kaesler, B., and Schönheit, P. (1989) The role of sodium ions in methanogenesis. Formaldehyde oxidation to CO_2 and $2 H_2$ in methanogenic bacteria is coupled with primary electrogenic Na^+ translocation at a stoichiometry of $2-3 Na^+/CO_2$, *Eur J Biochem* 184, 223-232.
25. Sapro, R., Bagramyan, K., and Adams, M. W. (2003) A simple energy-conserving system: proton reduction coupled to proton translocation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 7545-7550.
26. Li, F., Hinderberger, J., Seedorf, H., Zhang, J., Buckel, W., and Thauer, R. K. (2008) Coupled ferredoxin and crotonyl coenzyme A (CoA) reduction with NADH catalyzed by the butyryl-CoA dehydrogenase/Etf complex from *Clostridium kluyveri*, *J Bacteriol* 190, 843-850.
27. Schönheit, P., and Beimborn, D. B. (1985) Presence of a Na^+/H^+ antiporter in *Methanobacterium thermoautotrophicum* and its role in Na^+ dependent methanogenesis, *Arch Microbiol* 142, 354-361.
28. Schönheit, P., and Perskja, H. J. (1983) ATP synthesis driven by a potassium diffusion potential in *Methanobacterium thermoautotrophicum* is stimulated by sodium, *FEMS Microbiol Lett* 20, 263-267.
29. Gorris, L. G., Voet, A. C., and van der Drift, C. (1991) Structural characteristics of methanogenic cofactors in the non-methanogenic archaeobacterium *Archaeoglobus fulgidus*, *Biofactors* 3, 29-35.

30. Thauer, R. K., and Kunow, J. (1995) in *Sulfate Reducing Bacteria* (Barton, L. L., Ed.), pp 33-48, Plenum Press, New York.
31. Chistoserdova, L., Vorholt, J. A., Thauer, R. K., and Lidstrom, M. E. (1998) C₁ transfer enzymes and coenzymes linking methylotrophic bacteria and methanogenic Archaea, *Science* 281, 99-102.
32. Vorholt, J. A., Chistoserdova, L., Stolyar, S. M., Thauer, R. K., and Lidstrom, M. E. (1999) Distribution of tetrahydromethanopterin-dependent enzymes in methylotrophic bacteria and phylogeny of methenyl tetrahydromethanopterin cyclohydrolases, *J Bacteriol* 181, 5750-5757.
33. Krüger, M., Meyerdierks, A., Glockner, F. O., Amann, R., Widdel, F., Kube, M., Reinhardt, R., Kahnt, J., Bocher, R., Thauer, R. K., and Shima, S. (2003) A conspicuous nickel protein in microbial mats that oxidize methane anaerobically, *Nature* 426, 878-881.
34. Boetius, A., Ravensschlag, K., Schubert, C. J., Rickert, D., Widdel, F., Gieseke, A., Amann, R., Jorgensen, B. B., Witte, U., and Pfannkuche, O. (2000) A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane, *Nature* 407, 623-626.
35. Michaelis, W., Seifert, R., Nauhaus, K., Treude, T., Thiel, V., Blumenberg, M., Knittel, K., Gieseke, A., Peterknecht, K., Pape, T., Boetius, A., Amann, R., Jorgensen, B. B., Widdel, F., Peckmann, J., Pimenov, N. V., and Gulin, M. B. (2002) Microbial reefs in the Black Sea fueled by anaerobic oxidation of methane, *Science* 297, 1013-1015.
36. Chistoserdova, L., Jenkins, C., Kalyuzhnaya, M. G., Marx, C. J., Lapidus, A., Vorholt, J. A., Staley, J. T., and Lidstrom, M. E. (2004) The enigmatic *planctomycetes* may hold a key to the origins of methanogenesis and methylotrophy, *Mol Biol Evol* 21, 1234-1241.
37. Maden, B. E. (2000) Tetrahydrofolate and tetrahydromethanopterin compared: functionally distinct carriers in C₁ metabolism, *Biochem J* 350 Pt 3, 609-629.
38. Thauer, R. K., Klein, A. R., and Hartmann, G. C. (1996) Reactions with molecular hydrogen in microorganisms: Evidence for a purely organic hydrogenation catalyst, *Chemical reviews* 96, 3031-3042.
39. Ermler, U., Merckel, M., Thauer, R., and Shima, S. (1997) Formylmethanofuran: tetrahydromethanopterin formyltransferase from *Methanopyrus kandleri* - new insights into salt-dependence and thermostability, *Structure* 5, 635-646.
40. Grabarse, W., Vaupel, M., Vorholt, J. A., Shima, S., Thauer, R. K., Wittershagen, A., Bourenkov, G., Bartunik, H. D., and Ermler, U. (1999) The crystal structure of methenyltetrahydromethanopterin cyclohydrolase from the hyperthermophilic archaeon *Methanopyrus kandleri*, *Structure* 7, 1257-1268.
41. Hagemeyer, C. H., Shima, S., Thauer, R. K., Bourenkov, G., Bartunik, H. D., and Ermler, U. (2003) Coenzyme F₄₂₀-dependent methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase (Mtd) from *Methanopyrus kandleri*: a methanogenic enzyme with an unusual quaternary structure, *J Mol Biol* 332, 1047-1057.
42. Pilak, O., Mamat, B., Vogt, S., Hagemeyer, C. H., Thauer, R. K., Shima, S., Vonrhein, C., Warkentin, E., and Ermler, U. (2006) The crystal structure of the apoenzyme of the iron-sulphur cluster-free hydrogenase, *J Mol Biol* 358, 798-809.
43. Aufhammer, S. W., Warkentin, E., Ermler, U., Hagemeyer, C. H., Thauer, R. K., and Shima, S. (2005) Crystal structure of methylenetetrahydromethanopterin reductase (Mer) in complex with coenzyme F₄₂₀: Architecture of the F₄₂₀/FMN binding site of enzymes within the nonprolyl cis-peptide containing bacterial luciferase family, *Protein Sci* 14, 1840-1849.

44. Ermler, U., Hagemeyer, C. H., Roth, A., Demmer, U., Grabarse, W., Warkentin, E., and Vorholt, J. A. (2002) Structure of methylene-tetrahydromethanopterin dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens* AM1, *Structure* 10, 1127-1137.
45. Acharya, P., Goenrich, M., Hagemeyer, C. H., Demmer, U., Vorholt, J. A., Thauer, R. K., and Ermler, U. (2005) How an enzyme binds the C₁ carrier tetrahydromethanopterin. Structure of the tetrahydromethanopterin-dependent formaldehyde-activating enzyme (Fae) from *Methylobacterium extorquens* AM1, *J Biol Chem* 280, 13712-13719.
46. Acharya, P., Warkentin, E., Ermler, U., Thauer, R. K., and Shima, S. (2006) The structure of formylmethanofuran: tetrahydromethanopterin formyltransferase in complex with its coenzymes, *J Mol Biol* 357, 870-879.
47. Bartoschek, S., Buurman, G., Thauer, R. K., Geierstanger, B. H., Weyrauch, J. P., Griesinger, C., Nilges, M., Hutter, M. C., and Helms, V. (2001) Re-face stereospecificity of methylene-tetrahydromethanopterin and methylene-tetrahydrofolate dehydrogenases is predetermined by intrinsic properties of the substrate, *Chembiochem* 2, 530-541.
48. Dimroth, P. (1982) The generation of an electrochemical gradient of sodium ions upon decarboxylation of oxaloacetate by the membrane-bound and Na⁺-activated oxaloacetate decarboxylase from *Klebsiella aerogenes*, *Eur J Biochem* 121, 443-449.
49. Hilpert, W., and Dimroth, P. (1983) Purification and characterization of a new sodium-transport decarboxylase. Methylmalonyl-CoA decarboxylase from *Veillonella alcalescens*, *Eur J Biochem* 132, 579-587.
50. Buckel, W., and Semmler, R. (1983) Purification, characterisation and reconstitution of glutaconyl-CoA decarboxylase, a biotin-dependent sodium pump from anaerobic bacteria, *Eur J Biochem* 136, 427-434.
51. Tokuda, H., and Unemoto, T. (1982) Characterization of the respiration-dependent Na⁺ pump in the marine bacterium *Vibrio alginolyticus*, *J Biol Chem* 257, 10007-10014.
52. Ken-Dror, S., Lanyi, J. K., Schobert, B., Silver, B., and Avi-Dor, Y. (1986) An NADH:quinone oxidoreductase of the halotolerant bacterium *Ba1* is specifically dependent on sodium ions, *Arch Biochem Biophys* 244, 766-772.
53. Dimroth, P., and Thomer, A. (1989) A primary respiratory Na⁺ pump of an anaerobic bacterium: the Na⁺-dependent NADH:quinone oxidoreductase of *Klebsiella pneumoniae*, *Arch Microbiol* 151, 439-444.
54. Harms, U., Weiss, D. S., Gärtner, P., Linder, D., and Thauer, R. K. (1995) The energy conserving N⁵-methyltetrahydromethanopterin:coenzyme M methyltransferase complex from *Methanobacterium thermoautotrophicum* is composed of eight different subunits, *Eur J Biochem* 228, 640-648.
55. Harms, U., and Thauer, R. K. (1997) Identification of the active site histidine in the corrinoid protein MtrA of the energy-conserving methyltransferase complex from *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Eur J Biochem* 250, 783-788.
56. Gärtner, P., Ecker, A., Fischer, R., Linder, D., Fuchs, G., and Thauer, R. K. (1993) Purification and properties of N⁵-methyltetrahydromethanopterin:coenzyme M methyltransferase from *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Eur J Biochem* 213, 537-545.
57. Gärtner, P., Weiss, D. S., Harms, U., and Thauer, R. K. (1994) N⁵-Methyltetrahydromethanopterin:coenzyme M methyltransferase from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Catalytic mechanism and sodium ion dependence, *Eur J Biochem* 226, 465-472.

58. Weiss, D. S., Gärtner, P., and Thauer, R. K. (1994) The energetics and sodium-ion dependence of N^5 -methyltetrahydromethanopterin:coenzyme M methyltransferase studied with cob(I)alamin as methyl acceptor and methylcob(III)alamin as methyl donor, *Eur J Biochem* 226, 799-809.
59. Becher, B., Müller, V., and Gottschalk, G. (1992) N^5 -Methyltetrahydromethanopterin:coenzyme M methyltransferase of *Methanosarcina* strain Gö1 is an Na^+ -translocating membrane protein, *J Bacteriol* 174, 7656-7660.
60. Lienard, T., Becher, B., Marschall, M., Bowien, S., and Gottschalk, G. (1996) Sodium ion translocation by N^5 -methyltetrahydromethanopterin: coenzyme M methyltransferase from *Methanosarcina mazei* Gö1 reconstituted in ether lipid liposomes, *Eur J Biochem* 239, 857-864.
61. Stupperich, E., Juza, A., Hoppert, M., and Mayer, F. (1993) Cloning, sequencing and immunological characterization of the corrinoid-containing subunit of the N^5 -methyltetrahydromethanopterin: coenzyme M methyltransferase from *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Eur J Biochem* 217, 115-121.
62. Harms, U., and Thauer, R. K. (1996) The corrinoid-containing 23-kDa subunit MtrA of the energy-conserving N^5 -methyltetrahydromethanopterin:coenzyme M methyltransferase complex from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. EPR spectroscopic evidence for a histidine residue as a cobalt ligand of the cobamide, *Eur J Biochem* 241, 149-154.
63. Sauer, K., and Thauer, R. K. (1998) His84 rather than His35 is the active site histidine in the corrinoid protein MtrA of the energy conserving methyltransferase complex from *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *FEBS Lett* 436, 401-402.
64. Sauer, K., Harms, U., and Thauer, R. K. (1997) Methanol:coenzyme M methyltransferase from *Methanosarcina barkeri*. Purification, properties and encoding genes of the corrinoid protein MT1, *Eur J Biochem* 243, 670-677.
65. Hippler, B., and Thauer, R. K. (1999) The energy conserving methyltetrahydromethanopterin:coenzyme M methyltransferase complex from methanogenic archaea: function of the subunit MtrH, *FEBS Lett* 449, 165-168.
66. Vallee, B. L., and Auld, D. S. (1990) Active-site zinc ligands and activated H_2O of zinc enzymes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 220-224.
67. Di Berardino, M., and Dimroth, P. (1996) Aspartate 203 of the oxaloacetate decarboxylase beta-subunit catalyses both the chemical and vectorial reaction of the Na^+ pump, *EMBO J* 15, 1842-1849.
68. Braune, A., Bendrat, K., Rospert, S., and Buckel, W. (1999) The sodium ion translocating glutaconyl-CoA decarboxylase from *Acidaminococcus fermentans*: cloning and function of the genes forming a second operon, *Mol Microbiol* 31, 473-487.
69. Hoppe, J., and Sebald, W. (1984) The proton conducting F_0 -part of bacterial ATP synthases, *Biochimica et biophysica acta* 768, 1-27.
70. Gottschalk, G., and Thauer, R. K. (2001) The Na^+ -translocating methyltransferase complex from methanogenic archaea, *Biochimica et biophysica acta* 1505, 28-36.
71. Zirngibl, C., Hedderich, R., and Thauer, R. K. (1990) N^5, N^{10} -Methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* has hydrogenase activity, *FEBS Lett* 261, 112-116.

72. Mukhopadhyay, B., and Daniels, L. (1989) Aerobic purification of N^5, N^{10} -methylene tetrahydromethanopterin dehydrogenase, separated from N^5, N^{10} -methylene tetrahydromethanopterin cyclohydrolase, from *Methanobacterium thermoautotrophicum* strain Marburg, *Can J Microbiol* 35, 499-507.
73. Vorholt, J. A., Chistoserdova, L., Lidstrom, M. E., and Thauer, R. K. (1998) The NADP-dependent methylene tetrahydromethanopterin dehydrogenase in *Methylobacterium extorquens* AM1, *J Bacteriol* 180, 5351-5356.
74. Tan, L. U., Drury, E. J., and MacKenzie, R. E. (1977) Methylene tetrahydrofolate dehydrogenase-methenyl tetrahydrofolate cyclohydrolase-formyl tetrahydrofolate synthetase. A multifunctional protein from porcine liver, *J Biol Chem* 252, 1117-1122.
75. Kunow, J., Schwörer, B., Setzke, E., and Thauer, R. K. (1993) Si-face stereospecificity at C5 of coenzyme F₄₂₀ for F₄₂₀-dependent N^5, N^{10} -methylene tetrahydromethanopterin dehydrogenase, F₄₂₀-dependent N^5, N^{10} -methylene tetrahydromethanopterin reductase and F₄₂₀H₂:dimethylnaphthoquinone oxidoreductase, *Eur J Biochem* 214, 641-646.
76. Klein, A. R., and Thauer, R. K. (1995) Re-face specificity at C14a of methylene tetrahydromethanopterin and Si-face specificity at C5 of coenzyme F₄₂₀ for coenzyme F₄₂₀-dependent methylene tetrahydromethanopterin dehydrogenase from methanogenic Archaea, *Eur J Biochem* 227, 169-174.
77. Klein, A. R., Koch, J., Stetter, K. O., and Thauer, R. K. (1993) Two N^5, N^{10} -methylene tetrahydromethanopterin dehydrogenases in the extreme thermophile *Methanopyrus kandleri*: characterization of the coenzyme F₄₂₀-dependent enzyme, *Arch Microbiol* 160, 186-192.
78. DiMarco, A. A., Bobik, T. A., and Wolfe, R. S. (1990) Unusual coenzymes of methanogenesis, *Annual review of biochemistry* 59, 355-394.
79. Afting, C., Hochheimer, A., and Thauer, R. K. (1998) Function of H₂-forming methylene-tetrahydromethanopterin dehydrogenase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* in coenzyme F₄₂₀ reduction with H₂, *Arch Microbiol* 169, 206-210.
80. von Büнау, R., Zirngibl, C., Thauer, R. K., and Klein, A. (1991) Hydrogen-forming and coenzyme-F₄₂₀-reducing methylene tetrahydromethanopterin dehydrogenase are genetically distinct enzymes in *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Marburg), *Eur J Biochem* 202, 1205-1208.
81. Livingston, D. J., Fox, J. A., Orme-Johnson, W. H., and Walsh, C. T. (1987) 8-Hydroxy-5-deazaflavin-reducing hydrogenase from *Methanobacterium thermoautotrophicum*: 2. Kinetic and hydrogen-transfer studies, *Biochemistry* 26, 4228-4237.
82. Enßle, M., Zirngibl, C., Linder, D., and Thauer, R. K. (1991) Coenzyme F₄₂₀ dependent N^5, N^{10} -methylene tetrahydromethanopterin dehydrogenase in methanol grown *Methanosarcina barkeri*, *Annu Rev Microbiol* 155, 483-490.
83. Te Brommelstroet, B. W., Geerts, W. J., Keltjens, J. T., van der Drift, C., and Vogels, G. D. (1991) Purification and properties of N^5, N^{10} -methylene tetrahydromethanopterin dehydrogenase and N^5, N^{10} -methylene tetrahydromethanopterin reductase, two coenzyme F₄₂₀-dependent enzymes, from *Methanosarcina barkeri*, *Biochimica et biophysica acta* 1079, 293-302.
84. Schwörer, B., Breitung, J., Klein, A. R., Stetter, K. O., and Thauer, R. K. (1993) Formylmethanofuran: tetrahydromethanopterin formyltransferase and N^5, N^{10} -methylene tetrahydromethanopterin dehydrogenase from the sulfate-reducing *Archaeoglobus fulgidus*: similarities with the enzymes from methanogenic Archaea, *Arch Microbiol* 159, 225-232.

85. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaeffer, A. A., Zhang, J. H., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs., *Nucleic Acids Res* 25, 3389-3402.
86. Schaeffer, A. A., Aravind, L., Madden, T. L., Shavirin, S., Spouge, J. L., Wolf, Y. I., Koonin, E. V., and Altschul, S. F. (2001) Improving the accuracy of PSI-BLAST protein database searches with composition-based statistics and other refinements, *Nucleic Acids Res* 29, 2994-3005.
87. Tatusova, T. A., and Madden, T. L. (1999) Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences, *FEMS Microbiol Lett* 174 247-250
88. (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography, *Acta Crystallogr D* 50, 760-763.
89. Emsley, P., and Cowtan, K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics, *Acta Crystallogr D* 60, 2126-2132.
90. Holm, L., and Sander, C. (1993) Protein structure comparison by alignment of distance matrices, *J Mol Biol* 233, 123-138.
91. Holm, L. (1998) Unification of protein families, *Curr Opin Struct Biol* 8, 372-379.
92. Rost, B., Yachdav, G., and Liu, J. (2004) The PredictProtein Server, *Nucleic Acids Res* 32, W321-W326.
93. Rost, B. (1996) PHD: Predicting one-dimensional protein structure by profile based neural networks, *Computer Methods for Macromolecular sequence analysis* 266, 525-539.
94. Hirokawa, T., Boon-Chieng, S., and Mitaku, S. (1998) SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins, *Bioinformatics* 14, 378-379.
95. Mitaku, S., and Hirokawa, T. (1999) Physicochemical factors for discriminating between soluble and membrane proteins: hydrophobicity of helical segments and protein length, *Protein Eng* 11.
96. Mitaku, S., Hirokawa, T., and Tsuji, T. (2002) Amphiphilicity index of polar amino acids as an aid in the characterization of amino acid preference at membrane-water interfaces., *Bioinformatics* 18, 608-616.
97. Schüttelkopf, A. W., and van Aalten, D. M. (2004) PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes, *Acta Crystallogr D* 60, 1355-1363.
98. Stothard, P. (2000) The Sequence Manipulation Suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences, *Biotechniques* 28, 1102-1104.
99. Kabsch, W. (1993) Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants, *J Appl Cryst* 26, 795-800.
100. Bernard, P., Gabant, P., Bahassi, E. M., and Couturier, M. (1994) Positive-selection vectors using the F plasmid *ccdB* killer gene, *Gene* 148, 71-74.
101. Jaffe, A., Ogura, T., and Hiraga, S. (1985) Effects of the *ccd* function of the F plasmid on bacterial growth, *J Bacteriol* 163, 841-849.
102. Dubendorff, J. W., and Studier, F. W. (1991) Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with *lac* repressor, *J Mol Biol* 219, 45-59.
103. Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J., and Dubendorff, J. W. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes, *Methods Enzymol* 185, 60-89.
104. Selzer, G., Som, T., Itoh, T., and Tomizawa, J. (1983) The origin of replication of plasmid p15A and comparative studies on the nucleotide sequences around the origin of related plasmids, *Cell* 32, 119-129.

105. Slesarev, A. I., Mezhevaya, K. V., Makarova, K. S., Polushin, N. N., Shcherbinina, O. V., Shakhova, V. V., Belova, G. I., Aravind, L., Natale, D. A., Rogozin, I. B., Tatusov, R. L., Wolf, Y. I., Stetter, K. O., Malykh, A. G., Koonin, E. V., and Kozyavkin, S. A. (2002) The complete genome of hyperthermophile *Methanopyrus kandleri* AV19 and monophyly of archaeal methanogens, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 4644–4649.
106. Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors, *Gene* 33, 103-119.
107. Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *J Mol Biol* 166, 557-580.
108. Novy, R., and Morris, B. (2001) *inNovations* 13, 8-10.
109. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA.
110. Kiener, A., Koenig, H., Winter, J., and Leisinger, T. (1987) Purification and use of *Methanobacterium wolfei* pseudomurein endopeptidase for lysis of *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *J Bacteriol* 169, 1010-1016.
111. Marmur, J., and Doty, P. (1961) Thermal renaturation of deoxyribonucleic acids, *J Mol Biol* 3, 585-594.
112. Chung, C. T., Niemela, S. L., and Miller, R. H. (1989) One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution, *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 2172-2175.
113. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.
114. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
115. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680-685.
116. Schägger, H., and von Jagow, G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form, *Anal Biochem* 199, 223-231.
117. Schägger, H., Cramer, W. A., and von Jagow, G. (1994) Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis, *Anal Biochem* 217, 220-230.
118. Richers, S. (2008) Purification and characterisation of the respiratory supercomplex III/IV from *Corynebacterium glutamicum* and phospholipid analysis of membrane proteins, Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt a. M.
119. Renart, J., Reiser, J., and Stark, G. R. (1979) Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure, *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 3116-3120.
120. Kyse-Andersen, J. (1984) Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose, *J. Biochem. Biophys. Methods* 87, 203-209.
121. McGadey, J. (1970) A tetrazolium method for non-specific alkaline phosphatase, *Histochemie* 23, 180-184.
122. Knecht, D. A., and Dimond, R. L. (1984) Visualization of antigenic proteins on Western blots, *Anal Biochem* 136, 180-184.

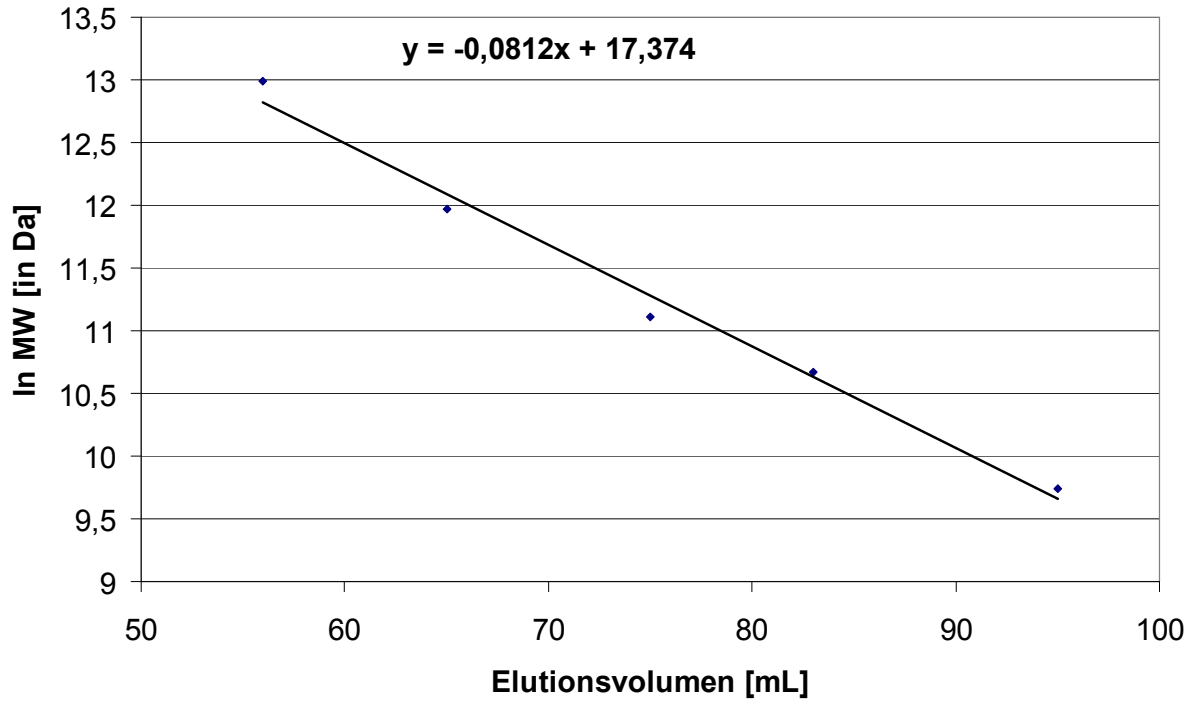
123. Klein, A. R., and Thauer, R. K. (1997) Overexpression of the coenzyme F₄₂₀-dependent N⁵,N¹⁰-methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase gene from the hyperthermophilic *Methanopyrus kandleri*, *Eur J Biochem* 245, 386-391.
124. Escalante-Semerena, J. C., Rinehart, K. L., Jr., and Wolfe, R. S. (1984) Tetrahydromethanopterin, a carbon carrier in methanogenesis, *J Biol Chem* 259, 9447-9455.
125. Shima, S., and Thauer, R. K. (2001) Tetrahydromethanopterin-specific enzymes from *Methanopyrus kandleri*, *Methods Enzymol* 331, 317-353.
126. Matthews, B. W. (1968) Solvent content of protein crystals, *J Mol Biol* 33, 491-497.
127. Navaza, J. (2001) Implementation of molecular replacement in AMoRe, *Acta Crystallogr D* 57, 1367-1372.
128. Murshudov, G. N., Vagin, A. A., and Dodson, E. J. (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method, *Acta Crystallogr D* 53, 240-255.
129. Brunger, A. T. (1992) Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures, *Nature* 355, 472-475.
130. Ludtke, S. J., Baldwin, P. R., and Chiu, W. (1999) EMAN: semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions, *J Struct Biol* 128, 82-97.
131. Mindell, J. A., and Grigorieff, N. (2003) Accurate determination of local defocus and specimen tilt in electron microscopy, *J Struct Biol* 142, 334-347.
132. Doukov, T., Seravalli, J., Stezowski, J. J., and Ragsdale, S. W. (2000) Crystal structure of a methyltetrahydrofolate- and corrinoid-dependent methyltransferase, *Structure* 8, 817-830.
133. Radermacher, M., Wagenknecht, T., Verschoor, A., and Frank, J. (1987) Three-dimensional reconstruction from a single-exposure, random conical tilt series applied to the 50S ribosomal subunit of *Escherichia coli*, *J Microsc* 146, 113-136.
134. Van Heel, M. (1987) Angular reconstitution: a posteriori assignment of projection directions for 3D reconstruction, *Ultramicroscopy* 21, 111-123.
135. Saraste, M., Penttilä, T., and Wikstrom, M. (1981) Quaternary Structure of Bovine Cytochrome Oxidase, *Eur J Biochem* 115, 261-268.
136. Penttilä, T. (1983) Properties and Reconstitution of a Cytochrome Oxidase Deficient in Subunit III, *Eur J Biochem* 133, 355-361.
137. Puettnner, I., Carafoli, E., and Malatesta, F. (1985) Spectroscopic and functional properties of subunit III-depleted cytochrome oxidase, *J Biol Chem* 260, 3719-3723.
138. Finel, M., and Wikstrom, M. (1988) Monomerization of cytochrome oxidase may be essential for the removal of subunit III, *Eur J Biochem* 176, 125-129.
139. Prochaska, L. J., and Reynolds, K. A. (1986) Characterization of electron-transfer and proton-translocation activities in bovine heart mitochondrial cytochrome c oxidase deficient in Subunit III, *Biochemistry* 25, 781-787.
140. Hill, B. C., and Robinson, N. C. (1986) Cyanide binding to bovine heart cytochrome c oxidase depleted of subunit III by treatment with lauryl maltoside, *J Biol Chem* 261, 15356-15359.
141. Rigell, C. W., Saussure, C. d., and Freire, E. (1985) Protein and lipid structural transitions in cytochrome c oxidase-dimyristoylphosphatidylcholine reconstitutions, *Biochemistry* 24, 5638-5646.
142. Rigell, C. W., and Freire, E. (1987) Differential detergent solubility investigation of thermally induced transitions in cytochrome c oxidase, *Biochemistry* 26, 4366-4371.

143. Harms, U., and Thauer, R. K. (1996) The corrinoid-containing 23-kDa subunit MtrA of the energy-conserving N^5 -methyltetrahydromethanopterin: coenzyme M methyltransferase complex from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. EPR spectroscopic evidence for a histidine residue as a cobalt ligand of the cobamide, *Eur J Biochem* 241, 149-154.
144. Luschinsky-Drennan, C., Huang, S., Drummond, J. T., Matthews, R. G., and Ludwig, M. L. (1994) How a protein binds B_{12} : A 3.0 Å X-ray structure of B_{12} domains of methionine synthase, *Science* 266.
145. Mancía, F., Keep, N. H., Nakagawa, A., Leadlay, P. F., McSweeney, S., Rasmussen, B., Bosecke, P., Diat, O., and Evans, P. R. (1996) How coenzyme B_{12} radicals are generated: the crystal structure of methylmalonyl-coenzyme A mutase at 2 Å resolution, *Structure* 4, 339-350.
146. Marsh, E. N. (1999) Coenzyme B_{12} (cobalamin)-dependent enzymes, *Essays in biochemistry* 34, 139-154.
147. Padmakumar, R., Taoka, S., Padmakumar, R., and Banerjee, R. (1995) Coenzyme B_{12} is coordinated by histidine and not dimethylbenzimidazole on methylmalonyl-CoA mutase, *J Am Chem Soc* 117 7033-7034.
148. Zelder, O., Beatrix, B., Kroll, F., and Buckel, W. (1995) Coordination of a histidine residue of the protein-component S to the cobalt atom in coenzyme B_{12} -dependent glutamate mutase from *Clostridium cochlearium*, *FEBS Lett* 369, 252-254.
149. McPherson, A. (1990) Current approaches to macromolecular crystallization, *Eur J Biochem* 189, 1-23.
150. Hippler, B. (1999) Der energiekonservierende N^5 -Methyltetrahydromethanopterin:Coenzym-M-Methyltransferasekomplex aus methanogenen Archaea. Struktur und Funktion der Untereinheiten MtrH und MtrE, Dissertation, Philipps-Universität, Marburg.
151. Warkentin, E., Mamat, B., Sordel-Klippert, M., Wicke, M., Thauer, R. K., Iwata, M., Iwata, S., Ermler, U., and Shima, S. (2001) Structures of $F_{420}H_2$:NADP⁺ oxidoreductase with and without its substrates bound, *EMBO J* 20, 6561-6569.
152. Aufhammer, S. W., Warkentin, E., Berk, H., Shima, S., Thauer, R. K., and Ermler, U. (2004) Coenzyme binding in F_{420} -dependent secondary alcohol dehydrogenase, a member of the bacterial luciferase family, *Structure* 12, 361-370.
153. Sumner, J. S., and Matthews, R. G. (1992) Stereochemistry and mechanism of hydrogen transfer between NADPH and methylenetetrahydrofolate in the reaction catalyzed by methylenetetrahydrofolate reductase from pig liver, *J Am Chem Soc* 114, 6949-6959.

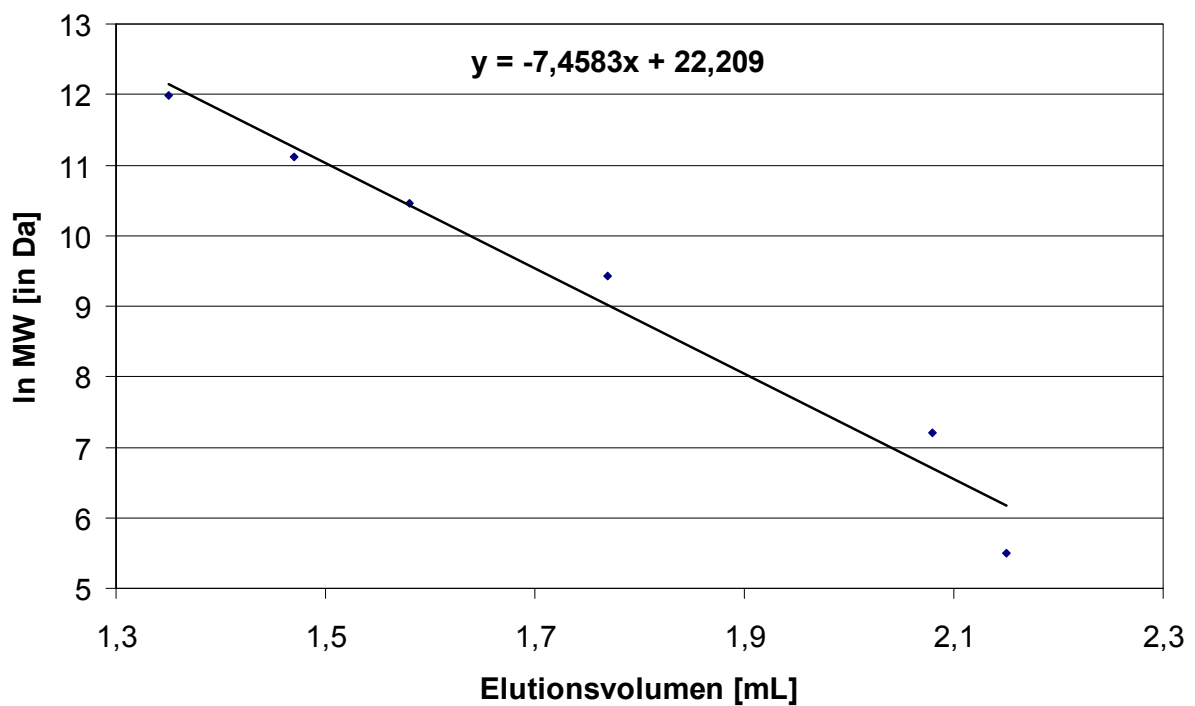
7 Anhang

7.1 Eichgeraden der Gelfiltrationssäulen

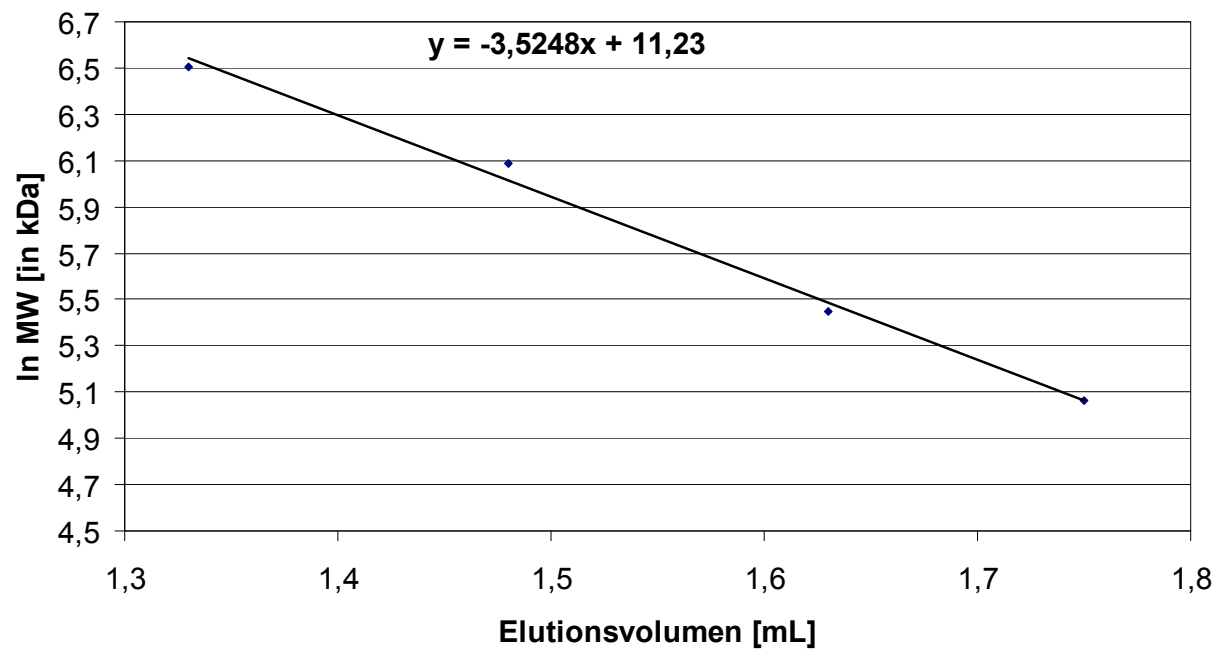
7.1.1 Eichgerade Superdex 200 16/60 prep grade



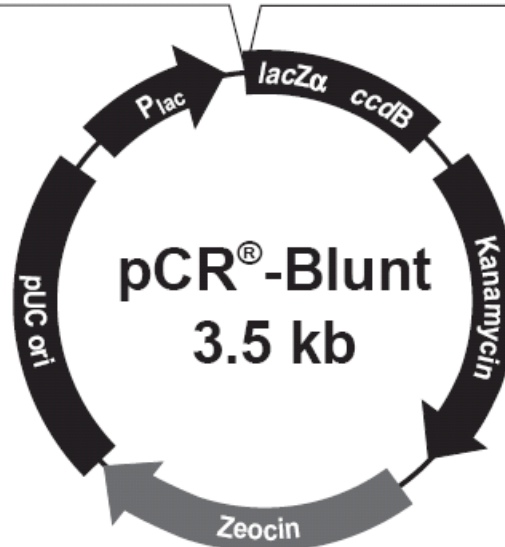
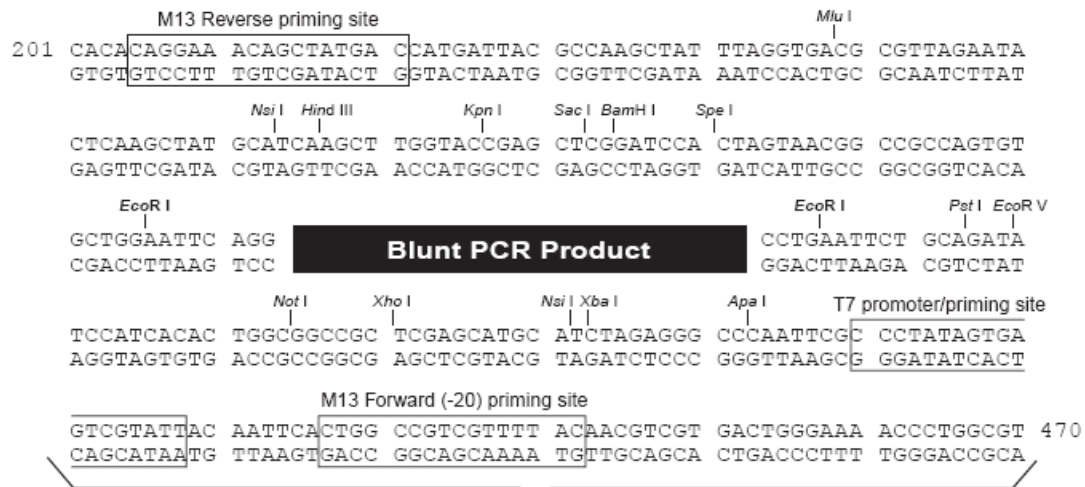
7.1.2 Superdex 200 PC 3.2/30



7.1.3 Superose 6 PC 3.2/30

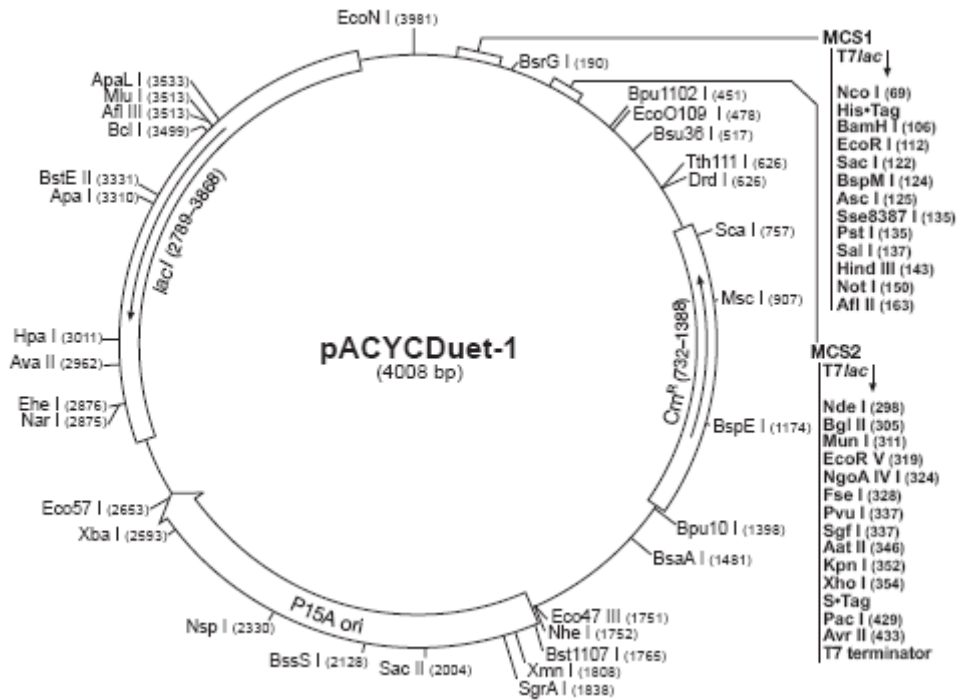


7.2 Vektorkarten



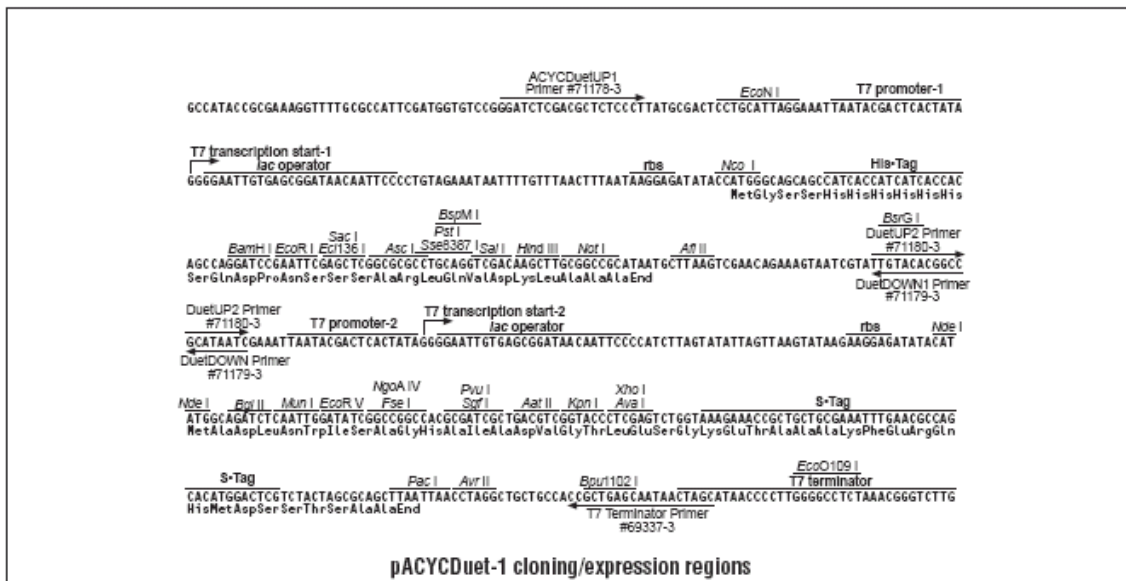
Comments for pCR®-Blunt
3512 nucleotides

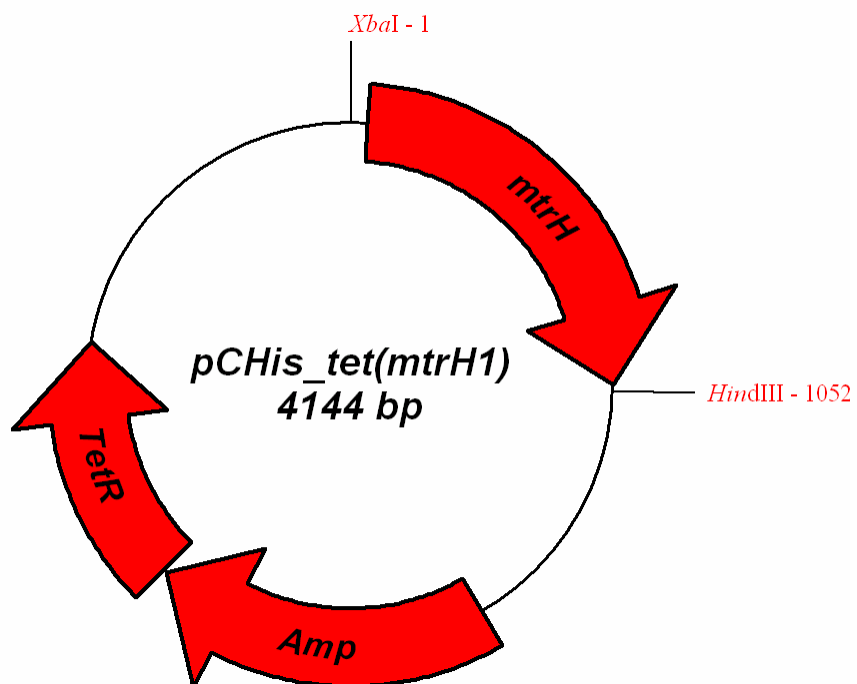
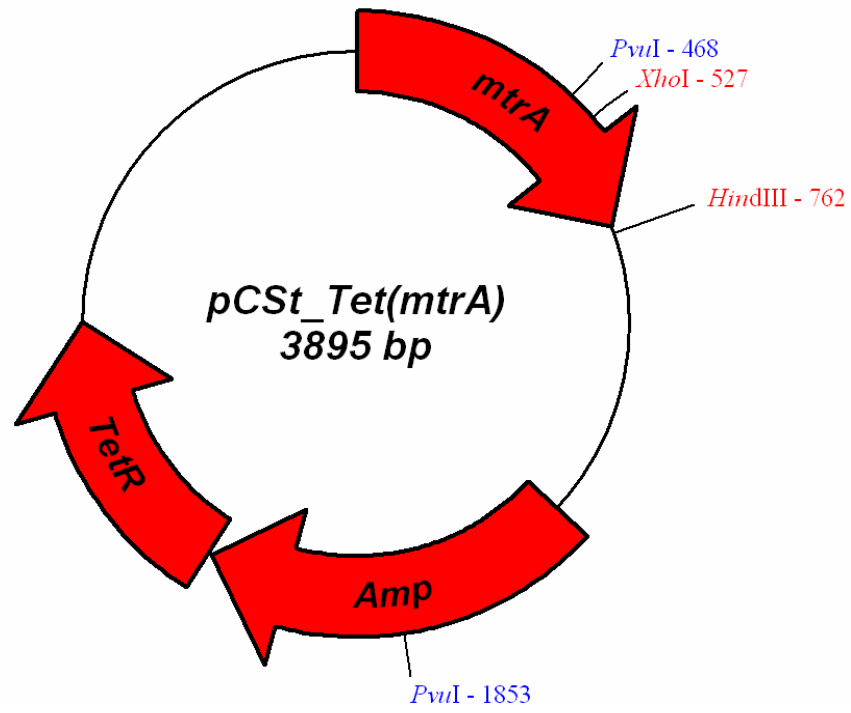
Lac promoter/operator region: bases 95-216
 M13 Reverse priming site: bases 205-221
LacZ-alpha ORF: bases 217-570
 T7 promoter priming site: bases 400-419
 M13 Forward (-20) priming site: bases 427-442
 Fusion joint: bases 571-579
ccdB lethal gene ORF: bases 580-882
 Kanamycin resistance ORF: bases 1231-2025
 Zeocin resistance ORF: bases 2231-2605
 pUC origin: bases 2673-3386

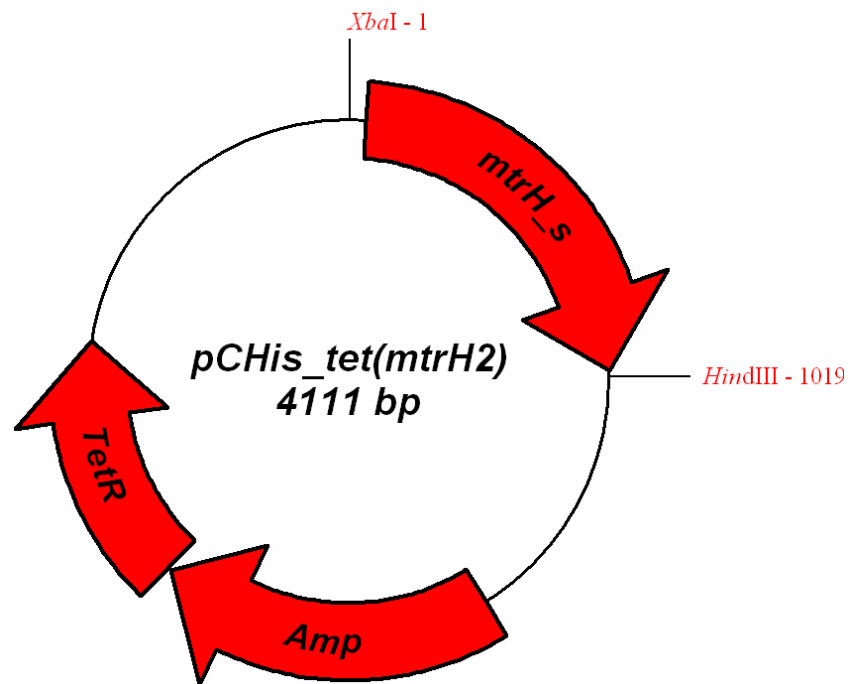


pACYCDuet-1 sequence landmarks

T7 promoter-1	3992-4008
T7 transcription start-1	1
His•Tag® coding sequence	83-100
Multiple cloning sites-1 (Nco I-Afl II)	69-168
T7 promoter-2	214-230
T7 transcription start-2	231
Multiple cloning sites-2 (Nde I-Avr II)	297-438
S•Tag™ coding sequence	366-410
T7 terminator	462-509
P15A origin	1750-2662
cat (Cm ^R) coding sequence	732-1388
lacI coding sequence	2789-3868







7.3 Primer-Sequenzen für die Polymerasekettenreaktion

Tabelle 7.1: Primer für die Amplifikation mittels PCR (siehe Abschnitt 3.2.2). Die Restriktionsschnittstellen sind gelb unterlegt.

Primer	Sequenz (5'→3')	Schnittstelle
MJmtrH+	GTTTAAAAGCATATGTTCAACAATAAA	NdeI
MJmtrH-	TATTTTTTGAATTCCTTAGACCAATTTCTTG	EcoRI
MJmtrA+	TAAAAATT CATATG GTGATGTCTATGGCAA	NdeI
MJmtrA1-	TCTCACC GGATCCAATTAGAACATTAAGA	BamHI
MJmtrA2-	GAACAAA CCCATGG CAATTCATTGAATCTT	NcoI
MJmtrA3-	ACCAGTGG GAATTCCTTGAATCTTTCAATT	EcoRI

7.4 Gensequenzen

Sequenzierung 1 : MJmtrH/pCRblunt

1.1 Primer M13 Forward (-20)

```

1   TTTTGATGTA TACGACTCAC TATAGGGCGA ATTGGGCCCT CTAGATGCAT GCTCGAGCGG CCGCCAGTGT GATGGATATC
81  TGCAGAATTC AGGGTTTAAA AGCATATGTT CAACAATAAA TATATAAAAA TTATGAGGTG GAAATTATG TTTAAGTTTG
161 ACAGAGAGCA AATGGTCGTT GAAATTGCGG GGAGAAAAAT TGGAGGTCAG CCAGGAGAGT ATCCTACAGC TTTAGCAGGG
241 ACTATATTCT ATGCAAGACA CAAAATTGTT GAAGATGAGA GAAAAGGTAT CTTTGACAAA GCAGCGGCAG AGGATTTAAT
321 TAACAAACAG GCAGAGATGG AAGACATTAC TGGAAACCCA GCGTTAGTTC AGGTATTTGG AGGAACCCCA GAGCGGTTAG
401 TTAATTATAT TGACTTTGTT GCTGAGGTTT GGGATGGTCC AATGTTATTG GACTCTACAT CAGGAGAGC AAGAATGGCT
481 GCTGCAAAGA GAGCTACTGA AGCTGGATAT GCTAAGCAGT GTATTTATAA CTCTATTAAC GTTCTATTG ATGAGCAAGA
561 ATATCAGGTT TTAGTTGAAA GTGATTTGGA AGCATCAATT GTTTTATGTT TCGACCCAAT GGACCCAACT GTTGAAGGAA
641 AGATAAATGT CTTAACAAT GGTGGGAAAA CAGCAGATAA GGGGGATGTT AGAACTCGCT GAAAAGCAG GTATTAAGTA
721 TCCTTTAATC GATACAGCAG TTACACCATT AGTAACCGGA GCAGGAGCTG CTGTTAGAGC ATCATTGCT GTTAAAGCAC
801 TATTTGGATA TCCAGTAGGG AGTGGTATTC ACAACATTCC ATCAGCATGG GACTGGTTAA GAGAGTTTAG AAAACAGTTA
881 AGAGAAGCTG GAGAAAGAGA AAAGAAAGAN TCACACGTTG TGNNGGACA ACTATCCAGT ATGCGCAGAA

```

1.2 Primer M13 Reverse

```

1   NNNNNNACGC GNTCGCCAGC TATTTAGGTG AGCGTTAGAA TACTCAAGCT ATGCATCAAG CTTGGTACCG AGCTCGGATC
81  CACTAGTAAC GGCCGCCAGT GTGCTGGAAT TCAGGTTTTG AATTCCTAGA CCAATTTCTT GAATGGATGT GTATCTATTG
161 GTTCAATTCC TAATTCTTTT GCTGCCTCTG CAATAATTGC ATCAACCATA GCTACTGCTG GGAATGTCAT ATATGCATTG
241 TCAATTGGGC CATAAAGGAC AAAGTCTCCT GACGCCATAA CTGGACTAA GTTTGCTCCA ACATCACAAA CGTGGTGAAT
321 ATCTTTTGCT TTTTCTCTTT CTCCAGCTTC TCTTAACTGT TTTCTAAACT CTCTTAACCA GTCCCATGCT GATGGAATGT
401 TGTGAATACC ACTCCCTACT GGATATCCAA ATAGTGCTTT AACAGCAAAT GATGCTCTAA CAGCAGCTCC TGCTCCGTTA
481 CCTAATGGTG TAACATGCTG ATCGATTAAG GGATACTTAA TACCTGCTTT TTCAGCGAGT TCTAACATCC CCTTATCTGC
561 TGTTTTCCCA CCATTTGTTA AGACATTTAT CTTTCCTTCA ACAGTTGGGT CCATTGGGTC GAAACATAAA ACAATTGATG
641 CTTCCAATC ACTTTCAACT AAAACCTGAT ATTCTTGCTC ATCAATAGAA ACGTTAATAG AGTTATAAAT ACACTGCTTA
721 GCATATCCAG CTTACAGTAG TCTCTTTGCA GCAGCCATTC TTGCTTCTCC TGATGTAGAG TCCAATAACA TTGACCATC
801 CCAAACCTCA GCAACAAAGT CAATATAAAT AACTAACGCC TCTGGGGTTC CTCCAATAC CTGAACCTAAC GCTGGGTTTC
881 CAGTAATGTC TTCCATCTCT GCCTGTTGTA WTAATCCTCT GCGCTGCTTG TCAARAACCT TCNTCTCTTC

```

Sequenzierung 2 : MJmtrH/pet22b+

2.1 Primer T7-Promoter

```

1   GCTAACGTC TCCCCCTCTA GAATAATTTT GTTTAACTTT AAGAAGGAGA TATACATATG TTCAACAATA AATATATAAA
81  AATTATGAGG TGGGAAATTA TGTTTAAAGT TGACAGAGAG CAAATGGTGC TTGAAATTGC GGGGAGAAAA ATTGGAGGTC
161 AGCCAGGAGA GTATCCTACA GCTTTAGCAG GGACTATAT CTATGCAAGA CACAAAATTG TTGAAGATGA GAGAAAAGGT
241 ATCTTTGACA AAGCAGCGGC AGAGGATTTA ATTAACAAC AGGCAGAGAT GGAAGACATT ACTGGAACC CAGCGTTAGT
321 TCAGGTATTT GGAGGAACCC CAGAGGCGTT AGTTAATTAT ATTGACTTTG TTGCTGAGGT TTGGGATGGT CCAATGTTAT
401 TGGACTCTAC ATCAGGAGAA GCAAGAATGG CTGCTGCAAA GAGAGCTACT GAAGCTGGAT ATGCTAAGCA GTGTATTTAT
481 AACTCTATTA ACGTTTCTAT TGATGAGCAA GAATATCAGG TTTTAGTTGA AAGTGATTTG GAAGCATCAA TTGTTTTATG
561 TTTGACCCCA ATGGACCCAA CTGTTGAAGG AAAGATAAAT GTCTTAACAA ATGGTGGGAA AACAGCAGAT AAGGGGATGT
641 TAGAACTCGC TGA AAAAGCA GGTATTAAGT ATCCTTTAAT CGATACAGCA GTTACACCAT TAGGTAACGG AGCAGGAGCT
721 GCTGTTAGAG CATCATTTGC TGTAAAGCA CTATTTGGAT ATCCAGTAGG GAGTGGTATT CACAACATTC CATCAGCATG
801 GGACTGGTTA AGAGAGTTTA GAAAACAGTT AAGAGAAGCT GGAGAAAGAG AAAAAGCAA AGATATTCAC CACGTTTGTG
881 ATGTTGGAGC AAACCTTAGC CAAGTTATGG CGTCAGGAGA CTTTGTCTT TATGGGCCA ATTGACAATG CATATATGAC
961 ATTCCAGCA GTAGCTATGG TTGATGCATT ATTGCAGAGG CAGCAAAGA TTAGGATTGA CCAATAGATA CACATCCATT
1041 CAAGAAATTG GTCTAAGAATT

```

2.2 Primer T7-Terminator

```

1   TTGAACATAG CTCCTTCGGG CTTTGTAGC AGCCGGATCT CAGTGGTGGT GGTGGTGGTG CTCGAGTGGC GCCGCAAGCT
81  TGTCGACGGA GCTCGAATTC TTAGACCAAT TTCTTGAATG GATGTGTATC TATGGGTCA ATTCCCTAAT CTTTTGCTGC
161 CTCCTGCAATA ATTGCATCAA CCATAGCTAC TGCTGGGAAT GTCATATATG CATGTGCAAT TGGGCCATAA AGGACAAAGT
241 CTCCTGACGC CATAACTTGG ACTAAGTTTG CTCCAACATC ACAAACGTGG TGAATATCTT TTGCTTTTTT CTTTTCTCCA
321 GCTTCTCTTA ACTGTTTTCT AAACCTCTCT AACCAGTCCC ATGCTGATGG AATGTTGTGA ATACCACTCC CTA CTACTGGATA
401 TCCAAATAGT GCTTTAACAG CAAATGATGC TCTAACAGCA GCTCCTGCTC CGTTACCTAA TGGTGAACCT GCTGTATCGA
481 TTAAGGATA CTTAATACCT GCTTTTTT CAGCGAGTCTAA CATCCCCTTA TCTGCTGTTT TCCCACCATT TGTTAAGACA
561 TTTATCTTTC CTTCAACAGT TGGGTCCATT GGGTCGAAAC ATAAAACAAT TGATGCTTCC AAATCACTTT CAACTAAAAC
641 CTGATATCTT TGCTCATCAA TAGAAACGTT AATAGAGTTA TAAATACACT GCTTAGCATA TCCAGCTTCA GTAGCTCTCT
721 TTGACGACGC CATCTTGTCT TCTCCTGATG TAGAGTCCAA TAACATTGGA CCATCCCAA CCTCAGCAAC AAAGTCAATA
801 TAATTAACATA ACGCCTCTGG GGTTCCTCCA AATACCTGAA CTAACGCTGG GTTCCAGTA ATGCTTCCA TCTCTGCCTG
881 TTTGTTAATT AAATCCTCTG CCGCTGCTTT GTCAAAGATA CCTTTTCTCT CATCTTCAAC AATTTTGTGT CTTCATAGA
961 ATATAGTCCC TGCTAAAGCT GTAGGATACT CTCTGGCTG ACCTCCAATT TTCTCCCGCA ATTTCAACGA CCATTTGCTC
1041 TCTGTCAACT TAAACATAACTC

```

Sequenzierung 3 : MJmtrA1/pCRblunt

3.1 Primer M13 Forward (-20)

```

1   AGGGGGGTT CGAGGGCCAG TGATTGTAAT ACGACTCACT ATAGGGCGAA TTGGGCCCTC TAGATGCATG CTCGACGGCC
81  CGCCAGTGTG ATGGATATCT GCAGAATTCA GGAATTCATA TGGTGATGTC TATGGCAAAT AAAAGAGAAC CAGCACCAGG
161 ATGGCCAATT GTCTCTGGTG AATATGTTGT TGGAAATCCG GAAAGTTGTG TTGGAGTTGT AACTTTAGGT TCTCACGGTT
241 TGGAGCAAGC ATGATATCGAT GCAGGGGCTG CTATAGCAGG ACCTTGCCAC ACAGAAAAC TGGGTATTGA AAAGTTGTA
321 GCAAACATA TATCAAACCC AAACATTAGG TTTATGATTC TCTGTGGTTC AGAAGTCCAA GGGCATATAA CTGGACAGTG
401 TTTTAAAGCA TTATGGGAAA ATGGCATTGG AGACGATGGA GGTATTATTG GAGCTAAAAG GGCCATACCA TTCTTAGAGA
481 ACGTGAATAA AGAAGCAGTT GAAAGATTTA GAAGGCAGAT AGTTGAAGTT GTTGATTAA TTGACTGTGA AGATATTGGT
561 AAAATAACAC AAGCAATAAA AGAGTGTTTA AGTAAAGACC CAGGAGCTAT TGACGAAGAC CCATTATATA TTGAGTTAGA
641 AGGAGGAAAA GGAGGAGGAG AAGAGGAAGA GGGTGTATA AAACCAATA CACCAGAAAT GGCAATAATT GAGAGTAGAA
721 TGAGATTAAT TGGAAATGAA ATGTGCTATA ATGATTTGTT AGCAAAGTGG CAGGACGAT ATTATAATGT AAGATTCAAG
801 GAATTGCCAC TGGTTTGTTC TTAATGCTAC TAATATGGG AATCTTAATG TTCTAATGG ATCCGGTGAG ACCTGAATTC
881 CAGCACACTG CGGCCGTTA CTAGGGATCC GAGCTCGGTA CCAAGCTTGA TGCATAGCTT GAGTATTCTA ACGCGTCACC
961 TAATAGCTTT GCGTATCATG ATCATAGCTG TTTCTGGGG TGAAATTGTT ATCCGCCTCA CAATTCCACA CAACATACGA
1041 GGCCGGAAGC

```

3.2 Primer M13 Reverse

```

1   AGGCCATGAC TGATTAGCC AGCTATTTAG GTGACGCGTT AGAATACTCA AGCTATGCAT CAAGCTTGGT ACCGAGCTCG
81  GATCCACTAG TAACGGCCGC CAGTGTGCTG GAATTCAGGT CTCACCGGAT CCAATTAGAA CATTAGATT CCCATAATTA
161 GTAGCATTAA GAACAAACCA GTGGCAATTC CTGGAATCTT ACCATTATAA TATCCTGCCT GCCACTTTCG TAACAATCCA
241 TTATAGCACA TTTCAATTTCC AATTAATCTC ATTCTACTCT CAATTATTGC CATTTCTGGT GTTATTGGTT TTATAACACC
321 CTCCTCCTCT TCTCCTCCTC CTTTTCTCTC TTCTAACTCA ATTATAAATG GGTCTTCGTC AATAGTCTCT GGTCTTTAC
401 TTAACACTC TTTTATTGCT TGTGTTATTT TACCAATATC TTCACAGTCA ATTAAATCAA CAACTTCAAC TATCTGCCTT
481 CTAATCTTT CAACTGCTTC TTTATTCAG TTCTCTAAGA ATGGTATGGC CCCTTTAGCT CCAATAATAC CTCCATCGTC
561 TCCAATGCCA TTTTCCATA ATGCTTTAAA ACACGTGCCA GTTATATGCC CTTGGACTTC TGAACCCAG AGAATCATAA
641 ACCTAATGTT TGGGTTTGTG ATATAGTTTG CTACAACCTT TTCAATACCC AAGTTTTCTG TGTGGCAAG TCCTGTATA
721 GCAGCCCCTG CATCGATACA TGCTTGCTCC AAACCGTGAG AACCTAAAGT TACAACCTCA ACACAACCTT CCGGATTTCC
801 AACACATAT TCACCAGAGA CAATTGGCCA TCCTGGGTG TGGTCTCTT TTATTTGCCA TAGACATCAC CATATGAATT
881 CCTGAATCT GCAGATATCC ATCACACTGG CGGCCGCTCG AGCATGCATC TAGAGGGCCC AATTCGCCCT ATAGTGAGTC
961 GTATTACATT CACTGGACGT CTTTTACAG TCGTACTGG AAACCTGGC GTACCCACTT ATCGCTTGCA GCACATCCCC
1041 TTCGACGCTG GCGTAATAGG CGAAGAG

```

Sequenzierung 4 : MJmtrA2/pCRblunt

4.1 Primer M13 Forward (-20)

```

1   GGGGATTACG ACGGCAGTGA TTGTAATACG ACTCACTATA GGGCGAATTG GGCCCTCTAG ATGCATGCTC GAGCGGCCGC
81  CAGTGTGATG GATATCTGCA GAATTCAGGT AAAAATTCAT ATGGTGATGT CTATGGCAAA TAAAAGAGAA CCAGCACCAG
161 GATGGCCAAT TGTCTCTGGT GAATATGTTG TTGGAAATCC GGAAAGTTGT GTTGGAGTTG TAACTTTACG TTCTCACGGT
241 TTGGAGCAAG CATGTATCGA TGCAGGGGCT GCTATAGCAG GACCTTGCCA CACAGAAAAC TTGGGTATTG AAAAGGTTGT
321 AGCAAACAT ATATCAAACC CAAACATTAG GTTTATGATT CTCTGTGGTT CAGAAGTCCA AGGGCATATA ACTGGACAGT
401 GTTTTAAAGC ATTATGGGAA AATGGCATTG GAAACGATGG AGGTATTATT GGAGCTAAAG GGGCCATACC ATTCTTAGAG
481 AACGTGAATA AAGAAGCAGT TGAAGATTT AGAAGGCAGA TAGTTGAAGT TGTGTATTTA ATTGACTGTG AAGATATTGG
561 TAAAAATACA CAAGCAATAA AAGAGTGTTC AAGTAAAGAC CCAGGAGCTA TTGACAAAAG CCCATTTATA ATTGAGTTAG
641 AAGGAGGAAA AGGAGGAGGA GAAGAGAAAAG AGGGTGTAT AAAACCAATA CCACCAGAGA TGGAATAAT TGAGAGTAGA
721 ATGAGATTAA TTGAAATGA AATGTGCTAT AATGGATTGT TAGCAGAGTG GCAGGCAGGA TATTAGAATG GAAAGATTCA
801 ATGAATTGCC ATGGGTTTGC TCCCTGAATT CCAGCACACT GGCGGCCGTT ACTAGTGGAT CCGAGCTCGG TACCAAGCTT
881 GATGCATAGC TTGAGTATTC TAGCGCGTCA CCTAAATAGC TTGGCGTAAT CATGGTCATA GCTGCTTCCT GGGGTGAAAT
961 TGTATCCCGC TCACCATCCA CACAACATAC GAGCGGAGGC AATAAGTGTA AAGGCTGGGC GGACTGATGA GTGAGCTACC
1041 TCACATTAGA TTGGGGTTGC GGCTGCCTGC

```

4.2 Primer M13 Reverse

```

1   CGCCAATGAA TGATTACGCC AGCTATTTAG GTGACGCGTT AGAATACTCA AGCTATGCAT CAAGCTTGGT ACCGAGCTCG
81  GATCCACTAG TAACGGCCGC CAGTGTGCTG GAATTCAGGG AACAAACCCA TGGAATTC AATTGATCTTA CCATTATAAT
161 ATCCTGCCTG CCACCTTGGT ACAAATCCAT TATAGCACAT TTCATTTCCA ATTAATCTCA TTCTACTCTC AATTATTGCC
241 ATTTCTGGTG TTATTGGTTT TATAACACCC TCTTCTCTCT CTCTCTCTCC TTTTCTCTCT TCTAATCAA TTATAAATGG
321 GTCTTCGTC ATAGCTCCTG GGTCTTTACT TAAACACTCT TTTATGTGTT GTGTTATTTT ACCAATATCT TCACAGTCAA
401 TTAATCAAC AACTTCAACT ATCTGCCTTC TAAATCTTTC AACTGCTTCT TTATTCACGT TCTCTAAGAA TGGTATGGCC
481 CCTTAGCTC CAATAATACC TCCATCGTCT CCAATGCCAT TTTCCATAA TGCTTTAAA CACTGTCCAG TTATATGCCC
561 TTGGACTTCT GAACCACAGA GAATCATAAA CCTAATGTTT GGGTTTGATA TATAGTTTGC TACAACCTTT TCAATACCCA
641 AGTTTTCTGT GTGGCAAGGT CCTGCTATAG CAGCCCCTGC ATCGATACAT GCTTGCTCCA AACCGTGAGA ACCTAAAGTT
721 ACAACTCCAA CACAACCTTC CGGATTTCCA ACAACATATT CACCAGAGAC AATTGGCCAT CCTGGTGTG GTTCTCTTTT
801 ATTTGCCATA GACATACCA TATGAATTTT TACCTGAATT CTGCAGATAT CCATCACACT GGGGTGCGT CGAGCATGCA
881 TCTAGAGGGC TCATTCGCCC TATAGTGAGT CGTATTACAT TCACTGGCCG TCGATTTACA CGTCGTGACT GGGAAAACCC
961 TGGCGTTACC TACTTATCGG CATGCAGCAC ATCCCTCTTT CGCAGCTGAC GTAATAGCGA AGAGGCCCGC ACGATCGTCC
1041 TTCCAACAGT GCGCATCTAT ACGTACGGGT AGTTATG

```

Sequenzierung 5 : MJmtrA3/pCRblunt

5.1 Primer M13 Forward (-20)

```

1   GGGCGTTCGA CGGCAGTGAT TGTAATACGA CTCACTATAG GGGCAATTGG GCCCTCTAGA TGCATGCTCG AGCGGCCGCC
81  AGTGTGATGG ATATCTGCAG AATTCAGGAC CAGTGGGAAT TCCTTGAATC TTTC AATTAT AATATCTGCT CTGCCACTTT
161 GCTAACAATC CATTATAGCA CATTTCATTT CCAATTAATC TCATTTCTACT CTCAATTATT GCCATTTCTG GTGTTATTGG
241 TTTTATAACA CCCTCTTCTT CTCTCTCTCC TCCTTTCTCT CCTTCTAACT CAATTATAAA TGGGTCTTCG TCAATAGCTC
321 CTGGGTCTTT ACTTAAACAC TCTTTTATTG CTGTGTTTAT TTTACCAATA TCTTCACAGT CAATTAATC AACAACTTCA
401 ACTATCTGCC TTCTAAATCT TTCAACTGCT TCTTTATTCA CGTTCTCTAA GAATGGTATG GCCCTTTTAG CTCCAATAAT
481 ACCTCCATCG TCTCCAATGC CATTTTCCCA TAATGCTTTA AAACACTGTC CAGTTATATG CCCTTGGACT TCTGAACCAC
561 AGAGAATCAT AAACCTAATG TTTGGGTTTG ATATATAGTT TGCTACAACC TTTTCAATAC CCAAGTTTTC TGTGTGGCAA
641 GGTCTTGCTA TAGCAGCCCC TGATCGATA CATGCTTGCT CCAAACCGTG AGAACCTAAA GTTACAACCT CAACACAAC
721 TTCGGATTTT CCAACAACAT ATTCACCAGA GACAATTGGC CATCCTGGTG CTGGTTCTCT TTTATTTGCC ATAGACATCA
801 CCATATGAAT TTTTACCTGA ATTCACGAC ACTGGCGGCC GTTACTAGTG TATCCGAGCT CGGTACCAAG CTTGATGCAT
881 AGCTTGAGTA TTCTAACGCG TCACCTAAAT AGCTTGCGTA ATCATGGTCA TAGCTGTTTC CTGTGTGAAA TTGTTATCCG
961 CTCACAATC CACACACATA CGAGCCGGAG CATAAAGTGT AAAGCCTGGG TGCCTAATGA TGGAGTACT CACATTATGC
1041 GTTGGCTCA CTGCCGCTT TCAGTCGGAA ACCTGTCGTG CAGCTGCATA ATGATCGGCACG

```

5.2 Primer M13 Reverse

```

1   CCGCATGACT GATTACGCCA GCTATTTAGG TGACGCGTTA GAATACTCAA GCTATGCATC AAGCTTGGTA CCGAGCTCGG
81  ATCCACTAGT AACGGCCGCC AGTGTGCTGG AATTCAGGTA AAAATTCATA TGGTGATGTC TATGGCAAAT AAAAGAGAAC
161 CAGCACCAGG ATGGCCAAAT GTCTCTGGTG AATATGTTGT TGGAAATCCG GAAAGTTGTG TTGGAGTTGT AACTTTAGGT
241 TCTCACGGTT TGGAGCAAGC ATGTATCGAT GCAGGGGCTG CTATAGCAGG ACCTTGCCAC ACAGAAAAC TGGGTATTGA
321 AAAGTTGTA GCAAACATA TATCAAACCC AAACATTAGG TTTATGATTC TCTGTGGTTC AGAAGTCCAA GGCATATAA
401 CTGGACAGTG TTTTAAAGCA TTATGGGAAA ATGGCATTGG AGACGATGGA GGTATTATTG GAGCTAAAGG GGCCATACCA
481 TTCTTAGAGA ACGTGAATAA AGAAGCAGTT GAAAGATTTA GAAGGCAGAT AGTTGAAGTT GTTGATTTAA TTGACTGTGA
561 AGATATTGGT AAAATAACAC AAGCAATAAA AGAGTGTTTA AGTAAAGACC CAGGAGCTAT TGACGAAGAC CCATTTATAA
641 TTGAGTTAGA AGGAGGAAAA GGAGGAGGAG AAGAGGAAGA GGGTGTTTATA AAACCAATAA CACCAGAAAT GGCAATAATT
721 GAGAGTAGAA TGAGATTAAT TGGAAATGAA ATGTGCTATA ATGGATTGTT AGCAAAGTGG CAGGCAGGAT ATTATAATTG
801 AAAGATTCOA GGAATTCCCA CTGGTCTCTGA ATTCTCGAGA TATCCATCAC ACTGGCGGCC GCTCGAGCAT GCATCTAGAG
881 GGCCCAATTC GCCTATAGT GAGTCGTATT ACAATTCACC CCCGTCGTTT TACAACGTCG TGAAGGGGAA AACCTGCGGT
961 TACCCAACCT AATCGCCTTG CAGCACATCC CCCTTTCGCA GCTGCGTATA GCGAAGAGGC CGCACCGATC GCCCTTCCCA
1041 CAGTGCAGCAG CTATACGTAC GGCAGTTAGT TACACCTATA AAAGAGAGAG CCGTATCGTC TGTTTGTGAT GTACAGGAGT
1121 GAATATATGA CAG

```

Sequenzierung 6 : MJmtrH/pACYC-Duet1

6.1 Primer Duet UP2

```

1   TGTGAGCGGA TAACAATTCC CCATCTTAGT ATATTAGTTA AGTATAAGAA GGAGATATAC ATATGTTCAA CAATAAATAT
81  ATAAAAATTA TGAGGTGGGA AATTATGTTT AAGTTTGACA GAGAGCAAAT GGTGCTTGAA ATTGCGGGGA GAAAAATTGG
161 AGGTCAGCCA GGAGAGTATC CTACAGCTTT AGCAGGGACT ATATTCATAG CAAGACACAA AATTGTTGAA GATGAGAGAA
241 AAGGTATCTT TGACAAAGCA GCGGCAGAGG ATTTAATTTA CAAACAGGCA GAGATGGAAG ACATTACTGG AAACCCAGCG
321 TTAGTTCAGG TATTTGGAGG AACCCAGAG GCCTTAGTTA ATTATATTGA CTTTGTGCT GAGGTTTGGG ATGGTCCAAT
401 GTTATTGGAC TCTACATCAG GAGAAGCAAG AATGGCTGCT GCAAAGAGAG CTAAGTGAAGC TGGATATGCT AAGCAGTGTA
481 TTTATAACTC TATTAACGTT TCTATTGATG AGCAAGAATA TCAGGTTTTA GTTAAAAGTG ATTTGGAAGC ATCAATTGTT
561 TTAGTGTTCG ACCCAATGGA CCCAAGTGTG GAAGGAAAGA TAAATGTCTT AACAAATGGT GGGAAAACAG CAGATAAGGG
641 GATGTTAGAA CTCGCTGAAA AAGCAGGTAT TAAGTATCCT TTAATCGATA CAGCAGTTAC ACCATTAGGT AACGGAGCAG
721 GAGCTGCTGT TAGAGCATCA TTTGCTGTTA AAGCACTATT TGGATATCCA GTAGGGAGTG GTATTACAAA CATTCCATCA
801 GCATGGGACT GGTAAAGAGA GTTTAGAAAA CAGTTAAGAG AAGCTGGAGA AAGAGAAAAA GCAAAGATA TTCACCACGT
881 TTGTGATGTT GGAGCAAAC TAGTCCAAGT TATGGCGTCA GGAGACTTTG TCCTTTA

```

6.2 Primer T7-Terminator

```

1   CTGCGCTAGT AGACGAGTCC ATGTGCTGGC GTTCAAATTT CGCAGCAGCG GTTCTTTTAC CAGACTCGAG GGTACCGACG
81  TCAGCGATCG CGTGCCCGGC CGATATCCAA TTCTTAGACC AATTTCTTGA ATGGATGTTG ATCTATTGGT TCAATTCCTA
161 ATTCTTTTGC TGCCTCTGCA ATAATTGCAT CAACCATAGC TACTGCTGGG AATGTCATAT ATGCATTGTC AATTGGGCCA
241 TAAAGGACAA AGTCTCCTGA CGCCATAACT TGGACTAAGT TTGCTCCAAC ATCACAACG TGGTGAATAT CTTTGTCTTT
321 TTCTCTTTCT CCAGCTTCTC TTAAGTCTTT TCTAAACTCT CTTAACCAAT CCCATGCTGA TGGAAATTTG TGAATACCAC
401 TCCCTACTGG ATATCCAAAT AATGCTTTAA CAGCAATGA TGCTCTAACA GCAGCTCCTG CTCGTTACC TAATGGTGTA
481 ACTGCTGCAT CGATTAAAGG ATACTTAATA CCTGCTTTTT CAGCGAGTTC TAACATCCCC TTATCTGCTG TTTTCCCACC
561 ATTTG

```

Sequenzierung 7 : MJmtrA3/pACYC-Duet1

7.1 Primer Duet UP2

```

1  ATTGTGAGCG GATAACAATT CCCCATCTTA GTATATTAGT TAAGTATAAG AAGGAGATAT ACATATGGTG ATGTCTATGG
81  CAAATAAAAAG AGAACCAGCA CCAGGATGGC CAATTGTCTC TGGTGAATAT GTTGTGGAA ATCCGGAAAAG TTGTGTGGAA
161 GTTGTAACTT TAGGTTCTCA CGGTTTGGAG CAAGCATGTA TCGATGCAGG GGCTGCTATA GCAGGACCTT GCCACACAGA
241 AAACCTGGGT ATTGAAAAGG TTGTAGCAA CTATATATCA AACCCAAACA TTAGGTTTAT GATTCTCTGT GGTTCAGAAG
321 TCCAAGGGCA TATAACTGGA CAGTGTTTTA AAGCATTATG GGAAAATGGC ATTGGAGACG ATGGAGGTAT TATTGGAGCT
401 AAAGGGGCCA TACCATTCTT AGAGAACGTG AATAAAGAAG CAGTTGAAAAG ATTTAGAAGG CAGATAGTTG AAGTTGTTGA
481 TTTAATTGAC TGTGAAGATA TTGTA AAAAT AACACAAGCA ATAAAAGAGT GTTTAAGTAA AGACCCAGGA GCTATTGACG
561 AAGACCCATT TATAATTGAG TTAGAAGGAG GAAAAGGAGG AGGAGAAGAG GAAGAGG

```

7.2 Primer T7-Terminator

```

1  CTGCGCTAGT AGACGAGTCC ATGTGCTGGC GTTCAAATTT CGCAGCAGCG GTTCTTTTAC CAGACTCGAG GGTACCGACG
81  TCAGCGATCG CGTGGCCGGC CGATATCCAA TTCCTTGAAT CTTTCAATTA TAATATCCTG CCTGCCACTT TGCTAACAAT
161 CCATTATAGC ACATTTTCATT TCCAATTAAT CTCATTCTAC TCTCAATTAT TGCCATTTCT GGTGTTATTG GTTTTATAAC
241 ACCCTCTTCC TCTTCTCCTC CTCCTTTTCC TCCTTCTAAC TCAATTATAA ATGGGTCTTC GTC AATAGCT CCTGGGCTTT
321 TACTTAAACA CTCTTTTATT GCTTGTGTTA TTTTACCAAT ATCTTCACAG TCAATTAAAT CAACAACCTC AACTATCTGC
401 CTTCTAAATC TTTCAACTGC TTCTTTATTC ACGTTCTCTA AGAATGGTAT GGCCCTTTA GCTCCAATAA TACCTCCATC
481 GTCTCCAATG CCATTTTCCC ATAATGCTTT AAAACACTGT CCAGTTATAT GCCCTTGAC TTCTGAACCA CAGAGAATCA
561 TAAACCTAAT GTTTGGGTTT GATATATAGT TTGCTACAAC CTTTTCAATA CCCAAGTTT CTGTGTGGCA AGGTCCTGCT
641 ATAGCAGCCC CTGCATCGAT ACATGCTTGC TCCAAACCGT GAGAACCTAA AGTTACAAC CCAACACAAC TTTCCGGATT
721 TCCAACAACA TATTCACCAG AGACAATTGG CCATCCTGGT GCTGGTCTC TTTTATTTGC CATAGACATC ACCATATGTA
801 TATCTCCTTC TTATACTTAA CTAATATACT AAGATGGGGA ATTGTTATCC GCTCACAATT CCCCTATAGT GAGTCGTATT
881 AATTTGATT ATGCGGCCGT GTACAATACG ATTACTTTCT GTTCGACTTAA

```

7.5 Daten ESI-MS-Analyse von MJMtrA3

gil15569041 Mass: 26311 Score: 410 Queries matched: 71 eMFAI: 1.60
 S-methyltransferase subunit A [Methanocaldococcus jannaschii DSM 2661]

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	%	Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
162	601.5700	1201.1254	1200.6503	0.0396	0	(31)	13	1	K.GAIPFLENVVK.E
163	601.5700	1201.1254	1200.6503	0.0396	0	(36)	3.9	1	K.GAIPFLENVVK.E
164	601.5900	1201.1454	1200.6503	0.0429	0	(23)	86	1	K.GAIPFLENVVK.E
165	601.6000	1201.1854	1200.6503	0.0446	0	(38)	2.6	1	K.GAIPFLENVVK.E
166	601.6100	1201.2054	1200.6503	0.0462	0	(26)	42	2	K.GAIPFLENVVK.E
167	601.6100	1201.2054	1200.6503	0.0462	0	.39	2	1	K.GAIPFLENVVK.E
168	601.6200	1201.2254	1200.6503	0.0479	0	(31)	14	2	K.GAIPFLENVVK.E
169	601.6300	1201.2454	1200.6503	0.0496	0	(25)	52	4	K.GAIPFLENVVK.E
170	601.6400	1201.2654	1200.6503	0.0512	0	(25)	49	1	K.GAIPFLENVVK.E
171	601.6400	1201.2654	1200.6503	0.0512	0	(37)	3.5	2	K.GAIPFLENVVK.E
172	601.6500	1201.2854	1200.6503	0.0529	0	(32)	11	1	K.GAIPFLENVVK.E
173	601.6700	1201.3254	1200.6503	0.0562	0	(28)	27	2	K.GAIPFLENVVK.E
174	601.6700	1201.3254	1200.6503	0.0562	0	(33)	8.2	1	K.GAIPFLENVVK.E
175	601.7700	1201.5254	1200.6503	0.0729	0	(27)	51	1	K.GAIPFLENVVK.E
183	680.6100	1359.3054	1358.7306	0.0349	0	(69)	0.0018	1	K.VVANYISMPHR.F
184	680.6200	1359.3254	1358.7306	0.0364	0	(53)	0.083	1	K.VVANYISMPHR.F
70	680.6300	1359.3454	1358.7306	0.0379	0	(55)	0.14	1	K.VVANYISMPHR.F
71	680.6400	1359.3654	1358.7306	0.0394	0	(52)	0.26	1	K.VVANYISMPHR.F
72	680.6400	1359.3654	1358.7306	0.0394	0	(56)	0.11	1	K.VVANYISMPHR.F
185	680.6400	1359.3654	1358.7306	0.0394	0	(57)	0.029	1	K.VVANYISMPHR.F
186	680.6400	1359.3654	1358.7306	0.0394	0	(50)	0.14	1	K.VVANYISMPHR.F
187	680.6400	1359.3654	1358.7306	0.0394	0	(51)	0.12	1	K.VVANYISMPHR.F
188	680.6500	1359.3854	1358.7306	0.0409	0	(48)	0.24	1	K.VVANYISMPHR.F
189	680.6500	1359.3854	1358.7306	0.0409	0	(54)	0.057	1	K.VVANYISMPHR.F
190	680.6600	1359.3054	1358.7306	0.0423	0	73	0.00087	1	K.VVANYISMPHR.F
191	680.6600	1359.3054	1358.7306	0.0423	0	(54)	0.06	1	K.VVANYISMPHR.F
192	680.6600	1359.3054	1358.7306	0.0423	0	(55)	0.055	1	K.VVANYISMPHR.F
193	680.6800	1359.3454	1358.7306	0.0453	0	(44)	0.67	1	K.VVANYISMPHR.F
194	680.7000	1359.3854	1358.7306	0.0482	0	(47)	0.41	1	K.VVANYISMPHR.F
195	680.7200	1359.4254	1358.7306	0.0511	0	(55)	0.073	1	K.VVANYISMPHR.F
73	680.7400	1359.4654	1358.7306	0.0541	0	(55)	0.19	1	K.VVANYISMPHR.F
4	454.2100	1359.4082	1358.7306	0.0646	0	(29)	44	1	K.VVANYISMPHR.F
215	843.5900	1685.1654	1684.8420	0.0192	0	(56)	0.046	1	K.ALWENIGDDGGIIGAK.G
216	843.6200	1685.2254	1684.8420	0.0228	0	(64)	0.008	1	K.ALWENIGDDGGIIGAK.G
217	843.6600	1685.3054	1684.8420	0.0275	0	(56)	0.058	1	K.ALWENIGDDGGIIGAK.G
218	843.6600	1685.3054	1684.8420	0.0275	0	(89)	2.9e-05	1	K.ALWENIGDDGGIIGAK.G
219	843.6800	1685.3454	1684.8420	0.0299	0	(99)	2.9e-06	1	K.ALWENIGDDGGIIGAK.G
220	843.6800	1685.3454	1684.8420	0.0299	0	(56)	0.065	1	K.ALWENIGDDGGIIGAK.G
221	843.7000	1685.3854	1684.8420	0.0323	0	(84)	3.5e-05	1	K.ALWENIGDDGGIIGAK.G
17	562.8200	1685.4382	1684.8420	0.0354	0	(61)	0.050	1	K.ALWENIGDDGGIIGAK.G
222	844.1100	1686.2054	1684.8420	0.0809	0	59	2.6e-06	1	K.ALWENIGDDGGIIGAK.G
223	844.1400	1686.2654	1684.8420	0.0845	0	(62)	0.016	1	K.ALWENIGDDGGIIGAK.G
224	844.1400	1686.2654	1684.8420	0.0845	0	(71)	0.0018	1	K.ALWENIGDDGGIIGAK.G
225	844.1600	1686.3054	1684.8420	0.0869	0	(42)	1.5	1	K.ALWENIGDDGGIIGAK.G
226	844.1800	1686.3454	1684.8420	0.0892	0	(93)	1.3e-05	1	K.ALWENIGDDGGIIGAK.G
227	844.1900	1686.3654	1684.8420	0.0904	0	(56)	0.062	1	K.ALWENIGDDGGIIGAK.G
153	958.1300	1914.2454	1913.9258	0.0167	0	(47)	1.3	1	K.DFGAIDEDFFIILEGQK.G
238	958.1400	1914.2654	1913.9258	0.0177	0	(99)	7.1e-06	1	K.DFGAIDEDFFIILEGQK.G
239	958.1400	1914.2654	1913.9258	0.0177	0	(74)	0.00077	1	K.DFGAIDEDFFIILEGQK.G
240	958.1800	1914.3454	1913.9258	0.0219	0	(58)	0.033	1	K.DFGAIDEDFFIILEGQK.G
241	958.1800	1914.3454	1913.9258	0.0219	0	104	8.3e-07	1	K.DFGAIDEDFFIILEGQK.G
242	958.5700	1915.1354	1913.9258	0.0627	0	(38)	2.8	1	K.DFGAIDEDFFIILEGQK.G
243	958.6200	1915.2254	1913.9258	0.0679	0	(40)	1.9	1	K.DFGAIDEDFFIILEGQK.G
244	958.6600	1915.3054	1913.9258	0.0721	0	(54)	0.083	1	K.DFGAIDEDFFIILEGQK.G
52	639.6100	1915.9082	1913.9258	0.0983	0	(69)	0.0049	1	K.DFGAIDEDFFIILEGQK.G
262	1321.3000	2440.5854	2440.2155	0.0152	0	(21)	1.4e+02	1	K.GGGEREEOVIEPITPMALIESR.N
263	814.6300	2440.9882	2440.2155	0.0267	0	(29)	28	1	K.GGGEREEOVIEPITPMALIESR.N
264	814.6400	2440.8982	2440.2155	0.0280	0	(47)	0.37	1	K.GGGEREEOVIEPITPMALIESR.N
113	814.6700	2440.9882	2440.2155	0.0317	0	(70)	0.0055	1	K.GGGEREEOVIEPITPMALIESR.N
114	814.6900	2441.0482	2440.2155	0.0341	0	(63)	0.029	1	K.GGGEREEOVIEPITPMALIESR.N
115	814.6900	2441.0482	2440.2155	0.0341	0	(20)	4.4e+02	1	K.GGGEREEOVIEPITPMALIESR.N
116	814.8000	2441.3782	2440.2155	0.0476	0	(86)	0.00014	1	K.GGGEREEOVIEPITPMALIESR.N
117	814.9100	2441.7082	2440.2155	0.0612	0	(81)	0.00046	1	K.GGGEREEOVIEPITPMALIESR.N
118	814.9400	2441.7882	2440.2155	0.0649	0	(54)	0.23	1	K.GGGEREEOVIEPITPMALIESR.N
119	814.9400	2441.7882	2440.2155	0.0649	0	(63)	0.032	1	K.GGGEREEOVIEPITPMALIESR.N
120	819.7700	2456.2882	2456.2104	0.0032	0	(31)	50	1	K.GGGEREEOVIEPITPMALIESR.N + Oxidation (N)
122	819.9500	2456.8282	2456.2104	0.0252	0	(14)	2.5e+03	1	K.GGGEREEOVIEPITPMALIESR.N + Oxidation (N)
265	820.2100	2457.6082	2456.2104	0.0569	0	(25)	56	1	K.GGGEREEOVIEPITPMALIESR.N + Oxidation (N)
123	820.2300	2457.6682	2456.2104	0.0593	0	(18)	1e+03	1	K.GGGEREEOVIEPITPMALIESR.N + Oxidation (N)
124	820.2500	2457.7282	2456.2104	0.0618	0	(11)	4.5e+03	8	K.GGGEREEOVIEPITPMALIESR.N + Oxidation (N)
125	820.2800	2457.8182	2456.2104	0.0655	0	95	1.6e-05	1	K.GGGEREEOVIEPITPMALIESR.N + Oxidation (N)

DANKSAGUNG

Bei PD Dr. Ulrich Ermler möchte ich mich von Herzen für die exzellente fachliche Anleitung, die fürsorgliche und wohlwollende Betreuung während dieser Arbeit, seine stete (!) Diskussionsbereitschaft und seine Hilfe bei der Planung meiner weiteren Berufslaufbahn bedanken.

Dr. Seigo Shima und Prof. Dr. Rudolf Thauer vom Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg danke ich herzlich für ihre Unterstützung, ihr Interesse am Fortschritt meiner Arbeit und die vielen Denkanstöße und interessanten Diskussionen, die sich vor allem bei den Einladungen nach Hirschegg ergaben. Vielen Dank auch an Johanna Moll für die Anzucht der *M. marburgensis*-Zellen und Aufreinigung der H₄MPT-Derivate und F₄₂₀ sowie Jörg Kahnt für die MALDI-TOF-Analyse diverser Proteinproben.

Prof. Dr. Hartmut Michel danke ich für die zeitweilige Finanzierung dieser Arbeit und die Möglichkeit, in der Abteilung Molekulare Membranbiologie am Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt forschen zu können.

Prof. Dr. Bernd Ludwig sei für die Betreuung dieser Arbeit seitens der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt gedankt.

Allen derzeitigen und ehemaligen Kollegen und Mitarbeitern des Max-Planck-Instituts für Biophysik in Frankfurt, die ein reibungsloses Arbeiten im Labor ermöglichten, mit Rat und Tat zur Seite standen, für ein offenes Arbeitsklima und manche fröhliche Kaffeerunde sorgten, sei dafür herzlich gedankt. Mein besonderer Dank gilt Dr. Eberhard Warkentin, der mich geduldig und anschaulich in die Geheimnisse der Strukturaufklärung einführte und sogar im Ruhestand zur Verfügung steht. Ulrike Demmer danke ich für ihr Engagement bei der Kristallisation von KMtd und für die Unterstützung im Labor. Meiner Vorgängerin in der Arbeit am Mtr-Komplex, Dr. Priyamvada Acharya, danke ich für die freundliche Einführung in die Welt der Membranproteinkomplexe.

Bei Dr. Dilem Hizlan bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit, ich wünsche ihr viel Erfolg bei der elektronenmikroskopischen Einzelpartikelmessung des Mtr-Komplexes. Dr. Janet Vonck und Ming Yang sei an dieser Stelle ebenfalls gedankt.

Vielen Dank an Dr. Vitali Vogel vom Institut für Biophysik der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt für die Durchführung der analytischen Ultrazentrifugationsexperimente.

Meiner Familie danke ich herzlich für die liebevolle moralische und tatkräftige Unterstützung während meiner Doktorarbeitszeit. Mein besonderer Dank gilt meinem Mann Patrick, der, obwohl er oft auf mich verzichten musste, immer wieder Verständnis und Interesse für meine Arbeit aufbringen konnte. Ihm sei diese Arbeit gewidmet.

Für die Finanzierung dieser Arbeit danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Max-Planck-Gesellschaft.

PERSÖNLICHE ANGABEN

Katharina Elisabeth Ceh

geb. Körner

Geburtstag und -ort 28.06.1977 in Stuttgart
Familienstand verheiratet
Nationalität deutsch

Schulbildung

09.1983 - 06.1987 Grundschule in Stuttgart-Heumaden

09.1987 - 06.1996 Evangelisches Heidehof-Gymnasium Stuttgart
Abschluss: Abitur

Scheffel-Preisträgerin 1996
(Preis der Deutschen Literarischen Gesellschaft Karlsruhe für
das beste Abitur im Fach Deutsch)

Hochschulbildung

10.1996 - 07.2005 Studium der Chemie
Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau
Schwerpunktfach Biochemie
Abschluss: Diplom-Chemikerin

10.2004 - 07.2005 Diplomarbeit bei Prof. Dr. Georg E. Schulz
am Institut für Organische Chemie und Biochemie,
Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau
zum Thema „Mutagenese, Expression, Reinigung und
Kristallisation des monomeren Porin A aus
Mycobacterium smegmatis“

Promotion

09.2005 - 02.2009 Doktorarbeit bei PD Dr. Ulrich Ermler
am Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt am Main,
Abteilung für Molekulare Membranbiologie
zum Thema „Bindung des C₁-Carriers
Tetrahydromethanopterin und seiner Derivate an Enzyme des
Energistoffwechselweges methanbildender Archaeen“