

*Strukturaufklärung der metallfreien Hydrogenase
aus methanogenen Archaea*

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Björn Mamat
aus Essen

Frankfurt am Main 2002
(D F 1)

Vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan:	Prof. Dr. W. E. Müller
1. Gutachter:	Prof. Dr. B. Ludwig
2. Gutachter:	Prof. Dr. R. Thauer

Datum der Disputation:

In memoriam Anneliese Kentrat

Die Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden im Zeitraum von Dezember 1998 bis Dezember 2001 am Max-Planck-Institut für Biophysik (Frankfurt am Main) in der Abteilung von Prof. Dr. Hartmut Michel unter der gemeinsamen Leitung von Dr. Ulrich Ermler (MPI für Biophysik) und Prof. Dr. Rudolf K. Thauer (MPI für terrestrische Mikrobiologie, Marburg) durchgeführt.

Inhaltsverzeichnis

Verwendete Abkürzungen	13
1 Zusammenfassung	15
2 Einleitung	19
2.1 Biologische Methanogenese	19
2.2 Eine metallfreie Hydrogenase	22
3 Ergebnisse	31
3.1 Das Enzym aus <i>Methanothermobacter marburgensis</i>	31
3.1.1 Überproduktion in <i>M. marburgensis</i>	31
3.1.2 Proteinreinigung	32
3.1.3 Kristallisation und native Datensammlung	33
3.1.4 Derivate für MIR bzw. SIR(AS)	35
3.1.5 MAD- und SAD-Experimente an Quecksilberderivaten	38
3.1.6 Metabolische SeMet-Markierung von <i>M. marburgensis</i> -Proteinen	39
3.1.7 MAD- und SAD-Experimente am SeMet-markierten Enzym	39
3.1.8 Merohedrale Zwillingsbildung	42
3.1.9 Strukturlösung durch Molekularen Ersatz	43
3.1.10 Kristallographische Verfeinerung	45
3.2 Das Enzym aus <i>Methanococcus jannaschii</i>	46
3.2.1 Expression und SeMet-Markierung	46
3.2.2 Proteinreinigung	46
3.2.3 Kristallisation und Datensammlung	47
3.2.4 Massenspektrometrie	49
3.2.5 Ein weiterer Fall von merohedraler Zwillingsbildung	50
3.2.6 Versuche zur Strukturlösung mit Molekularem Ersatz	51
3.3 Das Enzym aus <i>Methanopyrus kandleri</i>	51
3.3.1 Konstruktion von Hexahistidin-Fusionen	51
3.3.2 Expression und SeMet-Markierung	52
3.3.3 Proteinreinigung	52
3.3.4 Optimierte Kristallisation	54
3.3.5 MAD-Datensammlung	55
3.3.6 Strukturlösung mit SAD und MAD	56
3.3.7 Modellbau und Verfeinerung	59
3.4 Kristallstruktur des Apoenzyms aus <i>M. kandleri</i>	59

4	Diskussion	67
4.1	Methodische Innovationen	67
4.1.1	SeMet-Markierung in <i>M. marburgensis</i>	67
4.1.2	Produktion der Apoproteine aus <i>M. kandleri</i> und <i>M. jannaschii</i>	67
4.2	Eine „unmögliche“ Strukturbestimmung	68
4.3	An den Grenzen der Proteinkristallographie	71
4.4	Eine „heiße“ Proteinstruktur	72
4.5	Bindungsorte von Cofaktor und Substrat	74
4.6	Ausblick: Aufklärung des Katalysemechanismus	75
5	Material und Methoden	79
5.1	Material	79
5.1.1	Chemikalien	79
5.1.2	Antikörper	80
5.1.3	Verwendete Mikroorganismen	81
5.1.4	Medien zur Anzucht von Mikroorganismen	81
5.1.5	Plasmide	83
5.1.6	Oligodesoxynukleotide	83
5.1.7	Chromatographische Medien und Säulen	83
5.1.8	Instrumente und Geräte	84
5.2	Mikrobiologische Methoden	85
5.2.1	Fermentation von <i>Methanothermobacter marburgensis</i>	85
5.2.2	Herstellung von <i>E. coli</i> -Stammkulturen	85
5.2.3	Proteinexpression in <i>E. coli</i>	86
5.2.4	Produktion von SeMet-Protein in <i>E. coli</i>	86
5.3	Molekularbiologische Methoden	87
5.3.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	87
5.3.2	DNA-Restriktion	87
5.3.3	Gelelektrophorese und Isolierung von DNA-Fragmenten	87
5.3.4	Ligation	87
5.3.5	Polymerase-Kettenreaktion	87
5.3.6	DNA-Sequenzierung	88
5.3.7	Transformation	88
5.4	Biochemische Methoden	88
5.4.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	88
5.4.2	Aktivitätstest	88
5.4.3	SDS-PAGE	88
5.4.4	Native PAGE	89
5.4.5	Western-Blotting	89
5.4.6	Anaerobe Reinigung von Hmd aus <i>M. marburgensis</i> -Zellen	89
5.4.7	Reinigung vom Protein mit C-terminaler (His) ₆ -Peptidfusion	90
5.4.8	Reinigung der Enzyme von <i>M. kandleri</i> und <i>M. jannaschii</i>	91

5.4.9	Analytische HPLC-Gelfiltration	92
5.4.10	MALDI-TOF-Massenspektrometrie	92
5.4.11	TXRF-Spektroskopie	92
5.5	Kristallographische Methoden	92
5.5.1	Proteinkristallisation	93
5.5.2	Präparation von Schweratomderivaten	93
5.5.3	Einfrieren von Proteinkristallen	94
5.5.4	Datensammlung	95
5.5.5	Datenprozessierung	95
5.5.6	Pseudopräzessionsaufnahmen	96
5.5.7	Test auf Verzwilligung	96
5.5.8	Zum Phasenproblem in der Proteinkristallographie	96
5.5.9	Auswertung von Derivat-Daten	99
5.5.10	Patterson-Methode zur Lokalisierung von Schweratomen	99
5.5.11	Substrukturbestimmung mit direkten Methoden	99
5.5.12	Verfeinerung von Schweratomparametern	101
5.5.13	Bestimmung von NCS-Operatoren	102
5.5.14	Dichtemodifikation	102
5.5.15	Strukturbestimmung mittels Molekularem Ersatz	102
5.5.16	Manipulation von Elektronendichtekarten	102
5.5.17	Automatische Interpretation von Elektronendichtekarten	102
5.5.18	Modellbau und -verfeinerung	103
5.5.19	Verfeinerung mit verzwilligten Daten	103
5.5.20	Analyse von Strukturmodellen	103
5.5.21	Erstellen von Abbildungen	103
5.5.22	Weitere kristallographische Methoden	104
	Literatur	105
	Anhang: <i>Formyltransferase from three archaea</i>	125
	Publikationsliste	147
	Lebenslauf	149
	Danksagung	151

Verwendete Abkürzungen

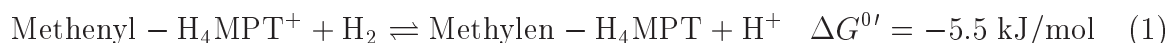
DESY	Deutsches Elektronen-Synchrotron
ESRF	<i>European Synchrotron Radiation Facility</i>
F ₄₂₀	Faktor 420
FOM	<i>Figure of Merit</i>
Hmd	H ₂ -bildende N ⁵ ,N ¹⁰ -Methylen-H ₄ MPT-Dehydrogenase
H ₄ MPT	5,6,7,8-Tetrahydromethanopterin
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galaktopyranosid
jHmd	Hmd aus <i>M. jannaschii</i>
kHmd	Hmd aus <i>M. kandleri</i>
MAD	<i>Multiple Wavelength Anomalous Dispersion</i>
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
MFR	Methanofuran
MIR	<i>Multiple Isomorphous Replacement</i>
MPD	2-Methyl-2,4-pentandiol
Mtd	F ₄₂₀ -abh. N ⁵ ,N ¹⁰ -Methylen-H ₄ MPT-Dehydrogenase
NCS	<i>Non-Crystallographic Symmetry</i>
NSLS	<i>National Synchrotron Light Source</i>
PEG	Polyethylenglykol
SAD	<i>Single Wavelength Anomalous Dispersion</i>
SIR(AS)	<i>Single Isomorphous Replacement (& Anomalous Scattering)</i>
(T)XRF	<i>(Total Reflection) X-Ray Fluorescence Spectroscopy</i>
XANES	<i>X-ray Absorption Near-Edge Spectrum</i>

Weitere allgemein gebräuchliche Abkürzungen wurden entsprechend den Anweisungen für Autoren des *European Journal of Biochemistry* verwendet. Die für methanogene Archaea verwendete Nomenklatur folgt für die *Methanobacteriales* der neuen Klassifikation nach [1]. Einige der alten Namen sind in der Literatur sehr verbreitet und werden nachfolgend den neuen Namen gegenübergestellt:

neuer Name:	alter Name:
<i>Methanothermobacter marburgensis</i>	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> Stamm Marburg
<i>Methanothermobacter thermoautotrophicus</i>	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> Stamm Delta H
<i>Methanothermobacter wolfei</i>	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> Stamm Winter oder <i>Methanobacterium thermoformicicum</i>

1 Zusammenfassung

In bestimmten methanogenen Archaea wurde vor einigen Jahren eine metallfreie Hydrogenase gefunden, die einen Zwischenschritt der Methanogenese katalysiert, den reversiblen und stereoselektiven Transfer eines Hydridions von Wasserstoff auf die an den C1-Carrier Tetrahydromethanopterin (H₄MPT) gebundene Methenyl-Gruppe:



Damit stellt dieses Enzym (Hmd) den ersten und einzigen rein organischen Hydrogenierungskatalysator dar, den man in der Natur kennt. Bei allen anderen Hydrogenasen wird H₂ an einem enzymgebundenen, zweikernigen Übergangsmetallkomplex aktiviert, worauf die heterolytische Spaltung über ein Metall-Hydrid-Intermediat erfolgt. Dagegen wird im Falle von Hmd nicht der Wasserstoff, sondern der Hydridakzeptor aktiviert. Aufgrund zahlreicher funktioneller und theoretischer Studien wurde ein Mechanismus vorgeschlagen, bei dem eine bifunktionelle Katalyse unter Beteiligung der konformationell aktivierten Lewis-Säure Methenyl-H₄MPT⁺ und einer unbekanntenen Brønsted-Base erfolgt.

Vor kurzem wurde entdeckt, daß für die enzymatische Aktivität ein niedermolekularer Cofaktor erforderlich ist, dessen chemische Natur allerdings noch nicht geklärt werden konnte. Für ein vollständiges Bild vom Reaktionsmechanismus ist ein atomares Modell des Enzyms einschließlich seines Cofaktors erforderlich. Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Bestimmung der Enzymstruktur mittels Röntgenkristallographie.

Um die Erfolgswahrscheinlichkeit zu erhöhen, wurden Enzyme von drei verschiedenen Organismen verwendet. Das Enzym aus *Methanothermobacter marburgensis* wurde in aktiver Form aus diesem moderat thermophilen Organismus isoliert, während die inaktiven Apoenzyme aus den Hyperthermophilen *Methanococcus jannaschii* und *Methanopyrus kandleri* in *E. coli* produziert wurden.

Von dem aus *M. marburgensis* gereinigten Enzym konnten Kristalle der apparenten Raumgruppe *P*622 erhalten werden, an denen native Daten bis zu einer Auflösung von 2.3 Å gesammelt wurden. Eine Evaluierung der an Kristallen des Enzyms aus *M. marburgensis* gemessenen Datensätze hinsichtlich ihrer Wilson-Statistiken ergab, daß sich diese in zwei Gruppen mit hohem ($\sim 80 \text{ \AA}^2$) und niedrigem ($\sim 40 \text{ \AA}^2$) mittlerem Temperaturfaktor aufteilen, was möglicherweise auf das Vorliegen einer „offenen“ und einer „geschlossenen“ Form hindeuten könnte.

Gute Daten bis zu mittlerer Auflösung konnten auch an einer konventionellen Röntgenquelle gesammelt werden. Weil zunächst keine Möglichkeit zur Produktion SeMet-markierten Enzyms in einem autotrophen Organismus zu bestehen schien, wurde versucht, die Struktur durch mehrfachen isomorphen Ersatz (MIR) unter Verwendung von Schweratomderivaten zu bestimmen. Dafür wurde in einer Großfermentation unter N-limitierten Bedingungen eine für die Strukturbestimmung ausreichende Menge an Proteinmaterial bereitgestellt.

An verschiedenen potentiellen Schweratomderivaten wurde eine große Anzahl von Diffraktionsdatensätzen gesammelt. Allerdings konnten in keinem Fall Schweratompositionen bestimmt werden. Für Quecksilberverbindungen konnte eine Bindung an das Protein durch unabhängige Methoden nachgewiesen werden. Da die hiermit behandelten Kristalle nicht isomorph zu den nativen Proteinkristallen waren, wurde in einem nächsten Schritt versucht, die Struktur über die anomale Dispersion des Quecksilbers an den nicht-isomorphen Derivaten zu bestimmen. Die entsprechenden MAD- und SAD-Experimente (*multiple* bzw. *single wavelength anomalous dispersion*) verliefen ebenfalls nicht erfolgreich, was zu diesem Zeitpunkt auf die unzureichende Qualität der Derivate bzw. der gesammelten Daten zurückgeführt wurde.

Durch Fermentation in Gegenwart von SeMet gelang Dr. Seigo Shima (MPI Marburg) ein Se-Einbau im autotrophen Archaeon *M. marburgensis*, so daß MAD- und SAD-Experimente an der Se-Kante durchgeführt werden konnten. Obwohl die Datenqualität bei einigen dieser Experimente sehr gut und die Anwesenheit der anomalen Streuatome gesichert war, gelang auch dieses Mal keine Bestimmung der Se-Positionen.

Eine nähere Untersuchung ergab die Ursache der bisherigen Fehlversuche: bei allen untersuchten Kristallen handelte es sich um perfekte merohedrale Zwillinge; die wahre Raumgruppe ist $P321$. Diese Wachstumsanomalie macht eine *de novo*-Strukturbestimmung unmöglich.

Für die beiden heterolog produzierten Apoenzyme aus *M. jannaschii* und *M. kandleri* wurden in dieser Arbeit effektive Expressions- und Reinigungsprotokolle entwickelt, um beide Proteinspezies sowohl in unmarkierter als auch in SeMet-markierter Form in großen Mengen produzieren zu können.

Für das Enzym aus *M. jannaschii* wurden ausschließlich Mikrokristalle erhalten, die zwar ausgezeichnete Diffraktionseigenschaften besaßen, aber lediglich ein Proteolysefragment von etwa der halben Masse des Vollängenproteins enthalten. Bemerkenswerterweise wurde auch an einigen dieser Kristalle das Phänomen der perfekten merohedralen Zwillingbildung im tetragonalen System ($I4_{(1)}$ bzw. $I4_{(1)}22$) beobachtet.

Vom Enzym aus *M. kandleri* wurden Kristalle erhalten, die sich zunächst aufgrund ihrer schlechten Beugungseigenschaften nicht für eine Strukturbestimmung zu eignen schienen. Durch seriellles Microseeding konnten die Kristalle des in *E. coli* produzierten, SeMet-markierten Proteins so weit verbessert werden, daß ein MAD-Experiment durchgeführt werden konnte.

Während klassische Methoden der Schweratomlokalisierung aufgrund der zahlreichen unabhängigen Se-Positionen (44) nicht erfolgreich waren, konnte mit vor kurzem entwickelten direkten Methoden (*Shake-and-Bake*) aus den anomalen Differenz-Magnituden des *Peak*-Datensatzes (SAD) eine zunächst partielle Se-Substruktur bestimmt werden.

Nach Verfeinerung der Schweratompositionen und Lokalisierung weiterer Positionen mit *Maximum-likelihood*-Methoden und extensiver Dichtemodifikation (vierfache Mittelung über die nicht-kristallographische Symmetrie und *Solvent Flattening*) konnte eine interpretierbare Elektronendichte erhalten werden. Die Struktur befindet sich im Stadium der Verfeinerung, wofür Daten bis zu einer Auflösung von 2.8 Å zur Verfügung

stehen.

Die Monomere im Apoprotein von *M. kandleri* bilden ein sehr eng assoziiertes Homodimer; zwei dieser Dimere sind im Kristall zu einem locker assoziierten Tetramer verbunden. Aufgrund dieser Anordnung kann davon ausgegangen werden, daß das Dimer die kleinste funktionelle Einheit darstellt.

Jedes Monomer besitzt zwei Domänen. Die N-terminale Domäne von etwa 255 Resten besitzt eine Faltung, wie sie für Dinukleotid-bindende Enzyme typisch ist, mit einem zentralen, verdrehten achtsträngigen β -Faltblatt. Die C-terminale Domäne von etwa 100 Resten besitzt dagegen weitgehend α -helikale Struktur und ist für die außerordentlich enge Assoziation des Homodimers verantwortlich. Beide Domänen sind durch eine gestreckte, flexible Verbindung verknüpft. Im Dimer entstehen dadurch zwei tiefe Spalten, die von Anteilen der N-terminalen Domäne eines und der C-terminalen Domäne des jeweils anderen Monomers begrenzt werden. Das aktive Zentrum liegt wahrscheinlich in dieser Spalte, wobei postuliert wird, daß der fest gebundene Cofaktor eher mit der größeren N-terminalen Domäne assoziiert ist und das Substrat zwischen den Domänen bindet. An der Bindung dürfte die C-terminale Domäne und möglicherweise auch direkt der Cofaktor beteiligt sein.

Die Struktur zeichnet sich durch außergewöhnlich hohe Temperaturfaktoren aus; diese Eigenschaft dürfte der Hauptgrund für die großen Schwierigkeiten bei der Interpretation der Elektronendichte (trotz relativ guter Phaseninformation) und bei der anschließenden Verfeinerung sein. Dies wird darauf zurückgeführt, daß es sich um eine „leere“ Struktur handelt, die erst durch Bindung des Cofaktors und möglicherweise des Substrates stabilisiert wird.

Die Struktur des Holoproteins aus *M. marburgensis* konnte durch Molekularen Ersatz gelöst werden. Hierzu wurden Daten von einem der wenigen mittlerweile gefundenen, winzigen Einkristalle mit einer Auflösung von 3.0 Å verwendet. Eine erste Verfeinerung zeigt, daß die Domänen hier eine etwas kompaktere Anordnung besitzen, was entweder auf die Bindung des Cofaktors oder die Kristallpackung zurückzuführen ist. Mit der nunmehr bekannten Struktur sollte in Zukunft mit geeigneten Methoden eine Verfeinerung auch unter Verwendung der verzwilligten Daten bei 2.3 Å möglich sein.

Eine detaillierte Diskussion der Kristallstruktur der metallfreien Hydrogenase und möglicher Implikationen für den Katalysemechanismus ist bei dem derzeitigen Stand der kristallographischen Arbeiten noch nicht möglich und daher auch nicht Gegenstand der vorliegenden Dissertation. Hierfür wäre vielmehr eine Struktur des ternären Komplexes von Protein, Cofaktor und Substrat bei möglichst atomarer Auflösung erforderlich. Die Verfügbarkeit eines ersten Modells stellt einen entscheidenden Beitrag auf dem Weg zu diesem Ziel dar. Zum einen zeigt es unmittelbar die weiteren Schritte auf, zum anderen stellt es die Möglichkeit bereit, jede zukünftige Struktur von Einzeldomänen oder komplexierten Proteinzuständen umgehend bestimmen zu können.

Im Verlaufe der Promotion wurden zusätzlich die Kristallstrukturen zweier Formylmethanofuran:Tetrahydromethanopterin-Formyltransferasen aus dem mesophilen Methanogenen *Methanosarcina barkeri* bei einer Auflösung von 1.85 Å und dem hyperthermophilen Sulfatreduzierer *Archaeoglobus fulgidus* bei einer Auflösung von 2.0 Å durch Molekularen Ersatz bestimmt. Diese beiden Strukturen wurden mit der bereits zuvor bestimmten Struktur des Enzyms aus dem hyperthermophilen Methanogenen *M. kandleri* verglichen. Außerdem wurden die enzymatischen Eigenschaften aller drei Formyltransferasen vergleichend untersucht.

Diese Arbeiten zeigen beispielhaft, wie sich sowohl der evolutionäre Ursprung als auch die Anpassung an spezifische Umgebungsbedingungen in den strukturellen und funktionellen Eigenschaften eines bestimmten Enzyms widerspiegeln. Das Manuskript mit diesen Ergebnissen befindet sich im Anhang der Dissertation.

Schließlich wurden im Rahmen der Promotion Beiträge zur Strukturbestimmung des ternären Komplexes einer F_{420} :NADP⁺-Oxidoreduktase aus *Archaeoglobus fulgidus* mit den beiden Substraten bei einer Auflösung von 1.65 Å geleistet. Die Struktur zeigt im atomaren Detail den Bindungsmodus beider Substrate und die geometrische Basis des stereospezifischen Hydridtransfers zwischen ihnen. Es stellt die erste bisher beschriebene Proteinstruktur mit gebundenem F_{420} dar. Dieses 5'-Deazaflavinderivat ist kennzeichnend für methanogene Archaeen, kommt aber auch in anderen Archaeen und bestimmten Bakterien wie *Mycobacterium tuberculosis* vor. Diese Ergebnisse wurden in der folgenden Arbeit publiziert:

Warkentin et al. (2001), *EMBO J.* 20(23), 6661–6669.

2 Einleitung

2.1 Biologische Methanogenese

In anaeroben Biotopen (limnischen und marinen Sedimenten, aber auch Intestinaltrakten von Wiederkäuern und Termiten) werden Biopolymere von fermentativen Bakterien zu Acetat, C1-Verbindungen (CO₂, Formiat, Methylverbindungen) und Wasserstoff umgesetzt. Am Ende des anaeroben Abbaus stehen dann die Methanogenen, die H₂/CO₂, Formiat (CO₂-reduzierender Weg), Methanol, Methylverbindungen (Methylo trope) und Acetat als Kohlenstoffquelle nutzen.

Die biologische Methanbildung ist ein Vorgang von globaler Bedeutung. Jährlich werden temporär etwa 10⁹ t Methan gebildet, wovon etwa 2/3 in benachbarten aeroben Habitaten durch methanotrophe Bakterien reoxidiert werden und der Rest in die Atmosphäre entweicht.

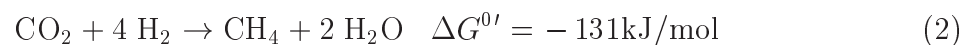
Dort trägt Methan als potentes Treibhausgas signifikant zur Erderwärmung bei. Etwa 60% der Methanemissionen stehen mit menschlichen Aktivitäten (Viehzucht und überflutete Reisfelder in der Landwirtschaft; Kohlebergbau) in Zusammenhang, was zu einer jährlichen Zunahme des atmosphärischen Methangehaltes um etwa 1% führt [2].

Die Methanhydratlager in marinen Sedimenten, in denen Methan als Clathrat im Kristallgitter von Eis gebunden vorliegt, stellen nach heutigem Kenntnisstand weitaus größere Energiereserven dar als alle anderen fossilen Energieträger zusammen. Sie könnten daher enorme wirtschaftliche Bedeutung erlangen, mit u. U. beträchtlichen Auswirkungen auf das Weltklima bei einer teilweisen Freisetzung in die Atmosphäre.

Phylogenetisch beschränkt sich die Methanogenese auf die Domäne der Archaea [3], und hier auf die Gruppe der Euryarchyota.

Das Interesse am methanogenen Stoffwechselweg erklärt sich vor allem damit, daß sich hier einige höchst bemerkenswerte Enzymreaktionen unter Beteiligung einer ganzen Reihe von einzigartigen Coenzymen [4] finden.

Am besten untersucht ist der von CO₂ und H₂ ausgehende Stoffwechselweg, der in Abb. 1 wiedergegeben ist (zur Übersicht siehe [5]–[11]):



In typischen natürlichen Habitaten beträgt der H₂-Partialdruck nur etwa 10 Pa, wodurch das ΔG der Gesamtreaktion nur noch etwa -30 kJ/mol beträgt. Damit kann weniger als 1 mol ATP pro mol gebildeten Methans gewonnen werden [12].

Die Reduktion von CO₂ zu CH₄ erfolgt schrittweise über eine Reihe Carrier-gebundener C1-Intermediate. Zunächst erfolgt die Reduktion zur Formylgruppe am C1-Carrier Methanofuran [13] durch die Formyl-MFR-Dehydrogenase. Diese endergone Reaktion wird durch einen elektrochemischen Protonen- bzw. Natriumgradienten angetrieben.

Die nächsten vier Reaktionsschritte werden von löslichen Enzymen katalysiert und verlaufen nahe am thermodynamischen Gleichgewicht. Die Formyltransferase katalysiert

den Transfer der an das Methanofuran gebundenen Formylgruppe auf das N^5 von Tetrahydromethanopterin (ein Tetrahydrofolat-Analogon; zur Numerierung s. Abb. 3).

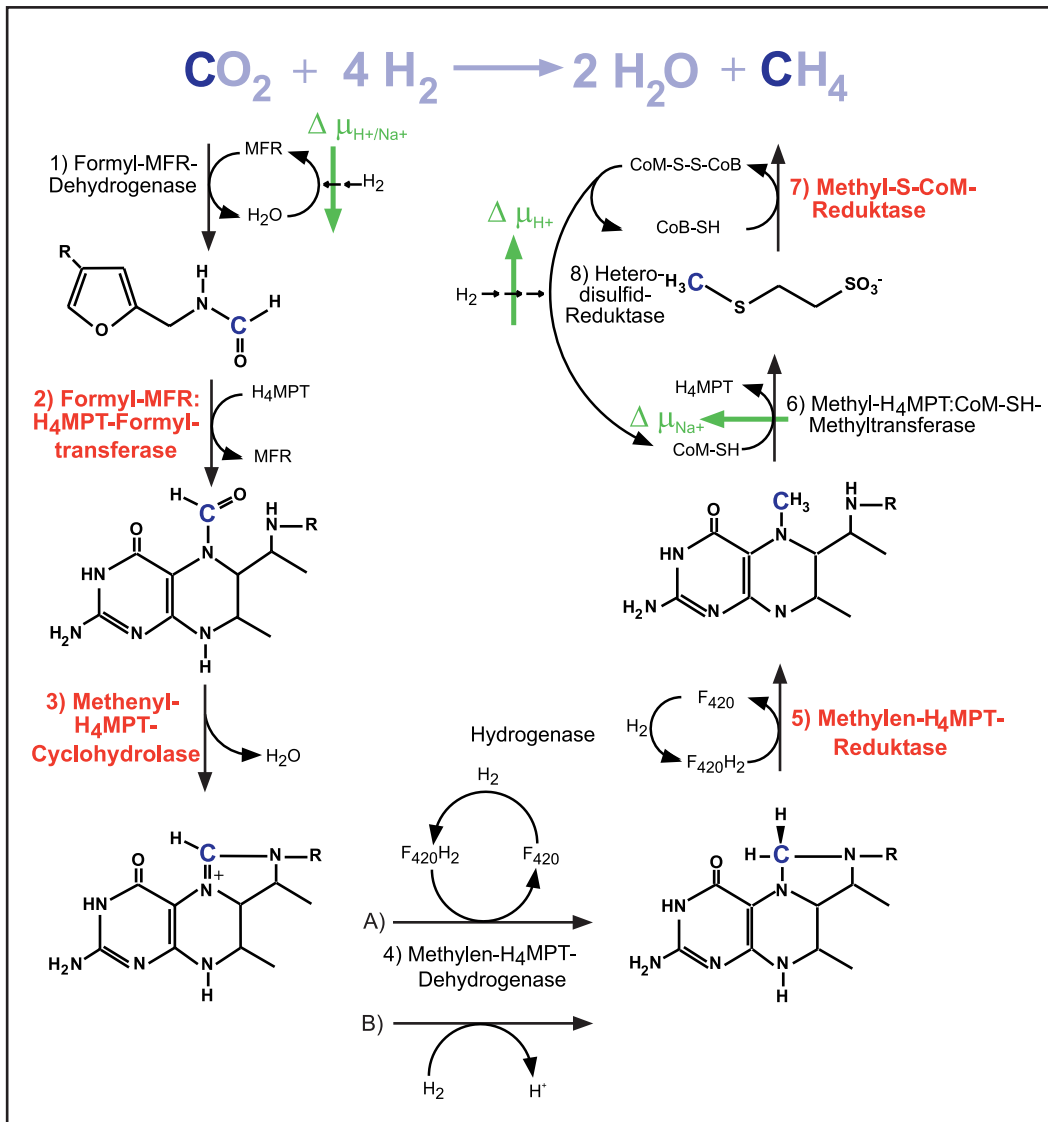


Abbildung 1: Reaktionsverlauf der biologischen Methanogenese, ausgehend von CO_2 und H_2 . Die Teilschritte sind in 2.1 beschrieben. Für den vierten Reaktionsschritt in der Sequenz gibt es zwei alternative Enzymsysteme, die F_{420} -abhängige, durch Mtd katalysierte Reaktion (A) sowie den von Hmd katalysierten direkten Hydridtransfer (B). Enzyme, deren Kristallstrukturen bereits publiziert wurden, sind in roter Farbe dargestellt.

In der nachfolgenden Cyclohydrolasereaktion erfolgt die Dehydrierung zum N^5, N^{10} -Methenyl- H_4 MPT. Für den nächsten Schritt, die Hydrogenierung zum Methylen-Intermediat, existieren zwei verschiedene Enzymsysteme: Die F_{420} -abhängige Methylen- H_4 -MPT-Dehydrogenase (Mtd) katalysiert den reversiblen Hydridtransfer vom 5'-Deazaflavinderivat F_{420} (Reaktion 4 A in Abb. 1).

Bei einigen Methanogenen existiert als zusätzliches System die H_2 -abhängige Methylen- H_4 MPT-Dehydrogenase (Hmd) oder metallfreie Hydrogenase, der sich die vorliegende Dissertation widmet (Reaktion 4 B in Abb. 1, s. 2.2).

Es folgt eine weitere F_{420} -abhängige Hydridtransfer-Reaktion, die von der Methylen- H_4 MPT-Reduktase katalysiert wird und N^5 -Methyl- H_4 MPT zum Produkt hat.

Nun wird die Methylgruppe in einer exergonischen Reaktion vom N^5 von H_4 MPT auf den dritten im Verlaufe der Reaktionsfolge beteiligten C1-Carrier, das Coenzym M (2-Mercaptoethansulfonat) transferiert. Diese exergonische Reaktion dient dem Aufbau eines elektrochemischen Na^+ -Gradienten an dem membrangebundenen Methyltransferase-Komplex. Über Na^+/H^+ -Austauscher sind methanogene Archaeen in der Lage, diesen in einen für die ATP-Synthese nutzbaren Protonengradienten zu wandeln; darüber hinaus besitzen einige Organismen auch Na^+ -abhängige ATP-Synthasen [14].

Den terminalen Schritt der Methanbildung stellt schließlich die Reaktion von Methyl-CoM und Coenzym B (ein 7-Mercaptoheptanoylthreoninphosphat) zum Heterodisulfid CoM-S-S-CoB und Methan an der Methyl-CoM-Reduktase dar, die das hochgradig ungesättigte Tetrapyrrolo-system F_{430} enthält. Die Reaktion ist zwar deutlich exergonisch, aber nach bisherigem Kenntnisstand nicht an eine Energiekonservierung gekoppelt.

Die Regeneration der beiden reduzierten Coenzyme aus dem Heterodisulfid erfolgt an der Heterodisulfid-Reduktase [15] und ist an den Aufbau eines elektrochemischen Protonengradienten gekoppelt [14], der für die positive Energiebilanz des gesamten Stoffwechselweges verantwortlich ist.

Neben den zahlreichen ungewöhnlichen Cofaktoren, die bereits erwähnt wurden, wurde mit Methanophenazin auch in jüngster Zeit noch ein neuer membrangebundener Redoxcarrier gefunden. Dieser vermittelt in *Methanosarcina*-Arten zwischen der membrangebundenen Hydrogenase und der Heterodisulfidreduktase [16, 17].

Von einer ganzen Reihe der methanogenen Enzyme wurden in unserer Arbeitsgruppe im Verlauf der letzten Jahre bereits Kristallstrukturen bestimmt und damit eine gute Grundlage für das Verständnis von Struktur und Funktion auf atomarer Ebene geschaffen (s. Markierung in Abb. 1); im einzelnen wurden von:

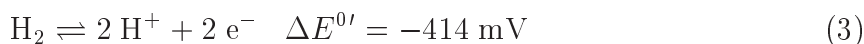
- der Formyltransferase zunächst aus *M. kandleri* [18], im Rahmen der vorliegenden Dissertation zusätzlich aus *M. barkeri* und dem Sulfatreduzierer *A. fulgidus* (s. Anhang),
- der Cyclohydrolase aus *M. kandleri* [19],
- der Methylen- H_4 MPT-Reduktase aus *M. kandleri* und *M. marburgensis* [20],

- der Methyl-CoM-Reduktase aus *M. marburgensis* [21, 22], *M. barkeri* und *M. kandleri* [23]

Drei der beschriebenen Enzyme, nämlich die Formyl-MFR-Dehydrogenase, Formyltransferase und Cyclohydrolase finden sich nicht nur in methanogenen Archaea, sondern auch in den phylogenetisch verwandten sulfatreduzierenden Archaea [24] und erstaunlicherweise auch in methylotrophen Bakterien [25].

2.2 Eine metallfreie Hydrogenase

Hydrogenasen sind Enzyme, die eine der formal einfachsten chemischen Reaktionen überhaupt katalysieren, die reversible Spaltung des Wasserstoff-Moleküls:



Diese Reaktion spielt in der Natur eine entscheidende Rolle: Unter anaeroben Bedingungen nutzen fermentative Bakterien (z. B. *Clostridia*) die H^+ -Reduktion, um überschüssige Redoxäquivalente zu entfernen.

Der freigesetzte Wasserstoff wird von einer ganzen Reihe unterschiedlicher Mikroorganismen als Energiequelle genutzt, z. B. von Methanogenen (siehe 2.1), Homoacetogenen, Sulfatreduzierern, Nitratreduzierern und Knallgasbakterien. Dementsprechend verbreitet sind Hydrogenasen im Organismenreich [26].

Man vermutet, daß jährlich etwa $6 \cdot 10^8$ t H_2 in der Biosphäre umgesetzt werden. Dabei sind die Partialdrücke von Wasserstoff in den meisten Habitaten sehr gering (1–10 Pa).

Bei näherer Betrachtung ist die Spaltung von Wasserstoff keineswegs trivial [27]. Wegen der geringen Acidität der H-H-Bindung ($\text{pK}_a \approx 35$) kann in Abwesenheit eines Katalysators keine Spaltung erfolgen.

Alle bekannten Hydrogenasen mit Ausnahme der hier diskutierten Hmd besitzen katalytisch aktive Metallzentren. Durch Bindung von H_2 an ein solches Metallzentrum wird der pK_a um bis zu 30 Einheiten reduziert. Damit wird eine heterolytische Spaltung über ein Metall-Hydrid-Intermediat möglich.

Man unterscheidet [NiFe]- und Nur-[Fe]-Hydrogenasen nach der Zusammensetzung ihrer aktiven Zentren. Lange Zeit wurde über die Struktur der aktiven Zentren spekuliert [28]. Erst mit der Verfügbarkeit von Kristallstrukturen für [NiFe]- [29]–[34], [NiFeSe]- [35] und [Fe]-Hydrogenasen [36]–[38] sowie begleitende spektroskopische Untersuchungen, vor allem mittels FTIR, konnte diese Frage geklärt werden: Binukleare Metallzentren sind – tief im Innern der Enzyme verborgen – kovalent an Cysteinreste (ein SeCys im Falle der [NiFeSe]-Hydrogenasen) gebunden und zusätzlich von niedermolekularen Liganden (CO , CN^-) koordiniert.

Entdeckung einer Hydrogenase

Vor einigen Jahren konnte in bestimmten methanogenen Archaea eine neuartige Hydrogenase gefunden werden, zunächst in *Methanothermobacter marburgensis* [41], später

auch in *Methanopyrus kandleri* [42] – dem bei der höchsten bekannten Temperatur lebenden methanogenen Organismus [43, 44] –, *M. wolfei* [45], *Methanothermobacter feravidus*, *Methanococcus igneus* [46], *Methanococcus thermolithotrophicus* [47], durch die Genomsequenzierungen dann auch in *Methanococcus jannaschii* [48] und *Methanothermobacter thermoautotrophicus* [49].

Damit scheint sie auf die Gruppen der *Methanobacteriales*, *Methanococcales* und *Methanopyrales* beschränkt zu sein, die Methan von CO₂ und H₂ ausgehend bilden.

Das lösliche Enzym besitzt einen Typ Untereinheit mit einem Molekulargewicht von etwa 40 kDa und tritt als Homodimer (*M. marburgensis*) oder Homotetramer (*M. kandleri* [42], *M. feravidus* und *M. igneus* [46]) auf. Die Aminosäuresequenz zeigt ein hohes Maß an Konservierung zwischen den einzelnen Spezies, aber keinerlei Verwandtschaft zu anderen bekannten Proteinsequenzen. Die Sequenz ist für einige Hmd-Spezies in Abb. 2 gezeigt.

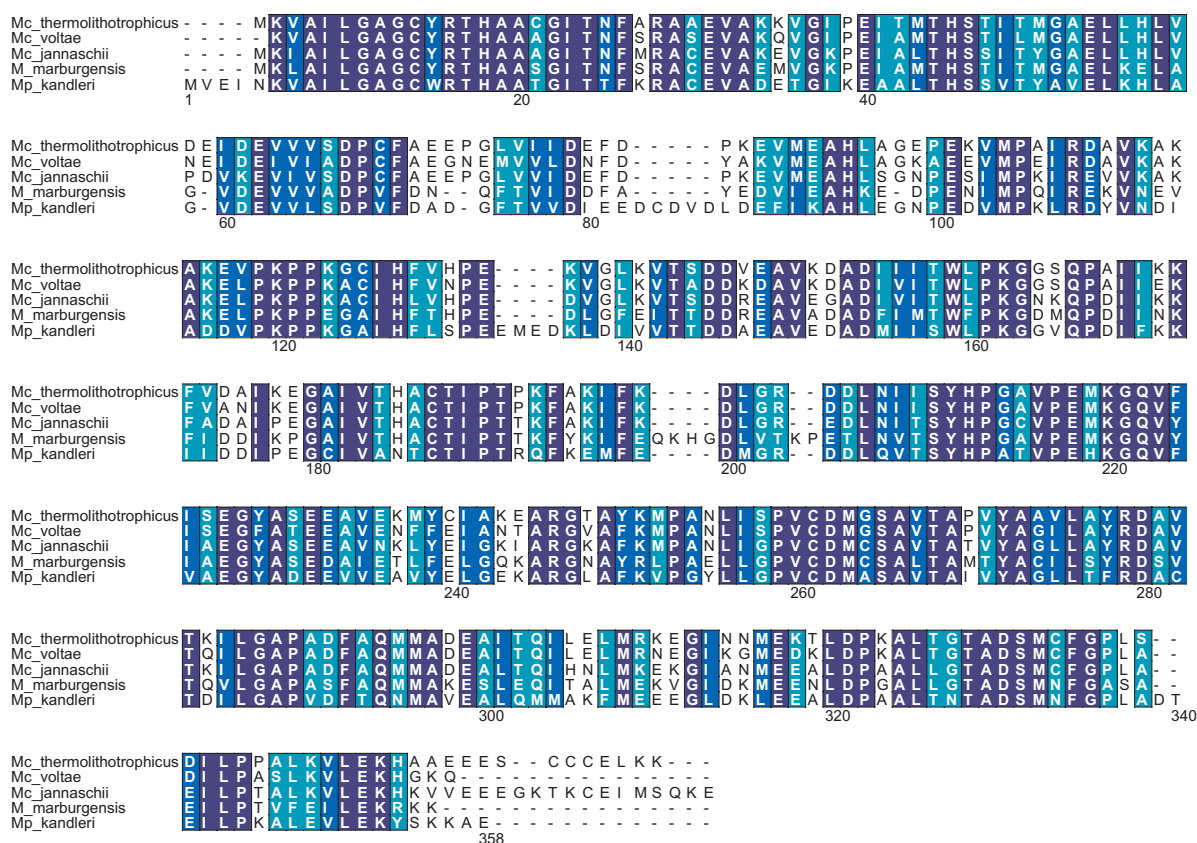


Abbildung 2: Aminosäuresequenzen der metallfreien Hydrogenase aus *Methanococcus thermolithotrophicus*, *M. voltae*, *M. jannaschii*, *Methanothermobacter marburgensis* und *Methanopyrus kandleri*. Die Numerierung bezieht sich auf das Enzym von *M. kandleri*. Das Alignment wurde mit dem Programm CLUSTALW [39] erzeugt, die Abbildung mit dem Programm ALSCRIPT [40].

Das Enzym katalysiert den direkten, stereoselektiven und reversiblen Hydridtransfer von H_2 auf Methenyl- H_4MPT^+ , wie in Abb. 3 gezeigt, und wird nach der Rückreaktion als H_2 -bildende N^5, N^{10} -Methylen- H_4MPT -Dehydrogenase (Hmd) bezeichnet (zur Übersicht siehe [50, 51]).

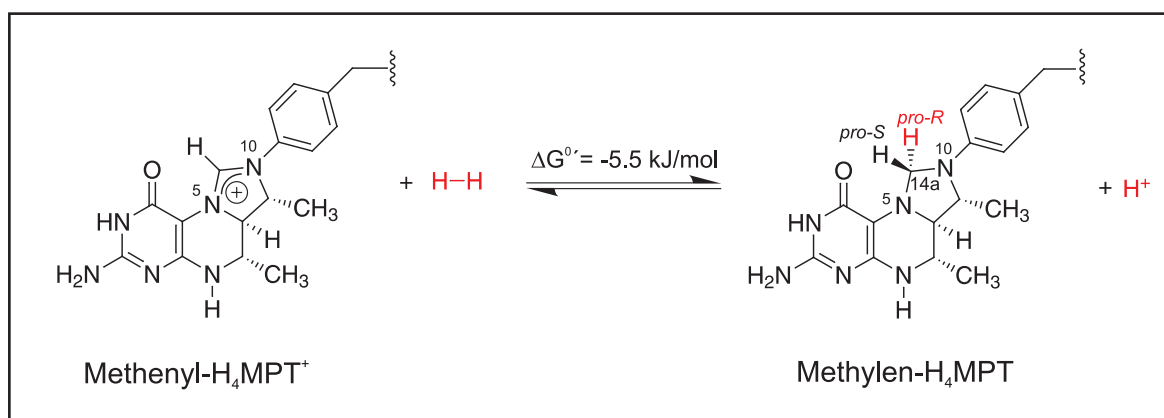


Abbildung 3: Die metallfreie Hydrogenase katalysiert einen stereoselektiven, reversiblen Hydridtransfer von molekularem Wasserstoff auf die an den C1-Carrier Tetrahydromethanopterin (H_4MPT) gebundene Methenyl-Gruppe, ein Intermediat der Methanogenese, unter Bildung von Methylen- H_4MPT .

Das weitgehend auf Archaeen beschränkte Tetrahydromethanopterin (H_4MPT) ist ein Strukturanalogon des Tetrahydrofolats (H_4F), das in den Gruppen der Eucarya und Bacteria als C1-Carrier dient (Abb. 4). Der wichtigste Unterschied ist, daß H_4MPT eine Methylen-Gruppe in *para*-Position zu N^{10} besitzt, während H_4F hier eine elektronenziehende Carbonylfunktion trägt (Pfeile). Dadurch wird das N^{10} im Falle des H_4MPT deutlich basischer (pKa von 2.4 gegenüber -1.2) [52].

Das führt dazu, daß der Carbokationencharakter der N^5, N^{10} -Methenylgruppe im Methenyl- H_4MPT^+ stärker ist als beim entsprechenden H_4F -Derivat [50]. Außerdem reduziert sich das Redoxpotential des Methenyl/Methylen- H_4MPT -Paares auf $E^{0'} = -390$ mV gegenüber -300 mV beim Methenyl/Methylen- H_4F -Paar [53], und nähert sich damit stark dem Redoxpotential der Wasserstoffelektrode bei pH 7.0 (-414 mV) [50]. Das erklärt die hohe Reversibilität der durch Hmd katalysierten Reaktion ($\Delta G^{0'} = -5.5$ kJ/mol).

Bemerkenswerterweise konnten mit allen gängigen analytischen Methoden wie AAS, ICP-MS [45, 46] oder TXRF [54]¹ keine Metalle in stöchiometrischen Mengen festgestellt werden, vor allem kein Nickel oder Eisen.

¹AAS: Atomabsorptions-Spektroskopie, ICP-MS: Induktiv gekoppelte Plasma-Massenspektrometrie, TXRF: *Total Reflection X-Ray Fluorescence Spectroscopy*

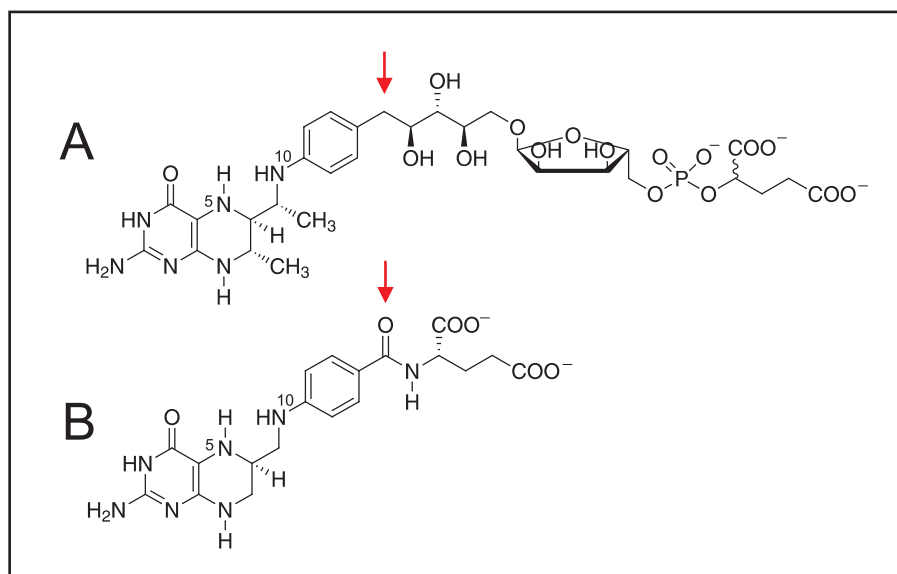


Abbildung 4: Strukturen von Tetrahydromethanopterin (A) und Tetrahydrofolat (B). Für die verschiedenen chemischen Eigenschaften am bedeutsamsten ist die unterschiedliche Substitution mit einer Methylene- (A) bzw. Carbonylfunktion (B) in *para*-Stellung zu N^{10} (durch rote Pfeile markiert).

Nachweis des organischen Cofaktors

Bereits in [55] wurde darauf hingewiesen, daß sich das UV-Spektrum von Hmd aus *M. marburgensis* von einem typischen Proteinspektrum unterscheidet: Neben Schultern bei 320 und 300 nm ist die Absorption bei 280 nm um den Faktor 2.7 größer, als es dem Tyr/Trp-Gehalt entsprechen würde [45].

Die Tatsache, daß die Enzymaktivität durch Sauerstoff zerstört wird, erschien mit dem Vorliegen eines reinen Proteinkatalysators kaum kompatibel, zumal ein radikalischer Mechanismus für eine Hydrogenierungskatalyse äußerst unwahrscheinlich ist [56]. Die heterologe Expression der Enzyme aus *Methanopyrus kandleri* und *Methanococcus jannaschii* führt zu vollständig inaktiven Proteinen, die gleichwohl in allen biochemischen Eigenschaften (SEC, MALDI-TOF-MS, CD², Fluoreszenz) kaum von den aus den entsprechenden Archaeen gereinigten, aktiven Enzymen zu unterscheiden sind [54].

Eine nähere Untersuchung dieses Widerspruches führte konsequenterweise zur Entdeckung eines organischen Cofaktors, der bei Entfaltung aus dem Enzym extrahiert werden kann [57]. Der elegante Nachweis gelang mit dem in Abb. 5 gezeigten Kreuz-Rekonstitutionsexperiment. Die Affinität des Cofaktors zum Enzym ist dabei hoch genug, eine schnelle Reaktivierung des inaktiven Apoproteins auch unter den Bedingungen des Enzymassays zu ermöglichen.

²SEC: *Size Exclusion Chromatography*, MALDI-TOF-MS: *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight - Mass Spectrometry*, CD: *Circular dichroismus-Spektroskopie*

Wie sich in den nachfolgenden Experimenten zeigte, besitzt der isolierte Cofaktor eine molekulare Masse von deutlich unter 1000 Da; er ist sauerstoffempfindlich (was höchstwahrscheinlich die Inaktivierung von Hmd durch O₂ bedingt), thermolabil (50% Inaktivierung bei 50° C innerhalb von 2 min) und lichtempfindlich im UV (auch bei oberhalb 300 nm). Er bindet stark an Anionentauscher ([57, 54]; Buurman und Thauer, pers. Mitteilung).

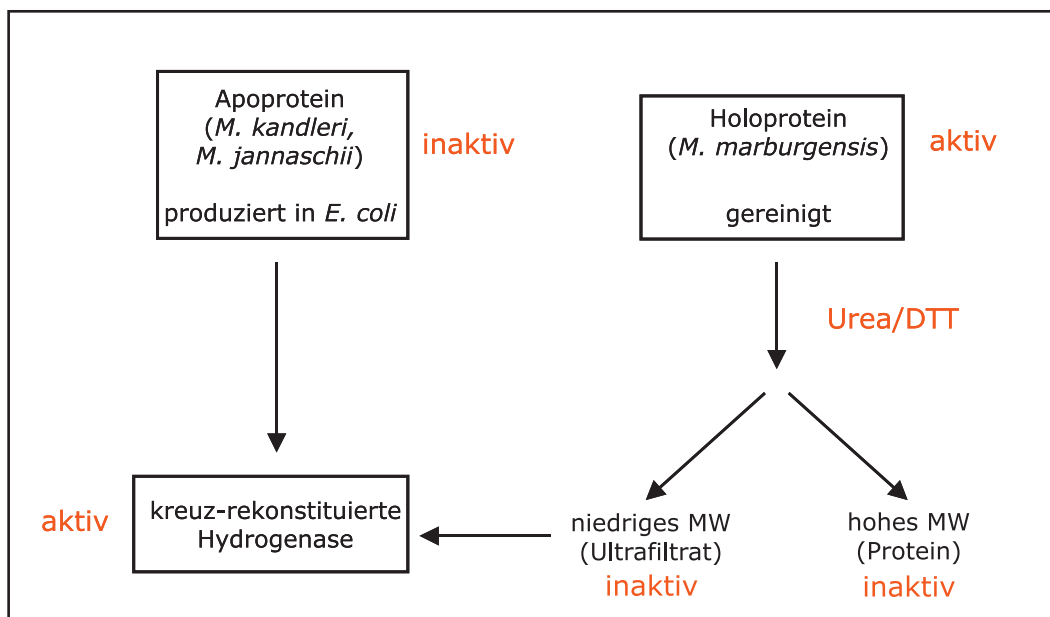


Abbildung 5: Experiment zum Nachweis eines Cofaktors in der metallfreien Hydrogenase durch Kreuz-Rekonstitution. Verändert nach [57].

Enzymatische Eigenschaften

Die beschriebene Reaktion wird von Hmd mit hoher spezifischer Aktivität katalysiert (bis zu 1500 U/mg); dabei ist der apparente K_m für H₂ mit etwa 0.1 mM zehnfach höher als bei typischen Metallohydrogenasen. Die Aktivierungsbarriere der Reaktion liegt in der Größenordnung von 30–50 kJ/mol [58, 47].

Das Enzym wird im Gegensatz zu anderen Hydrogenasen nicht durch Nitrit, Acetylen, CO, Cyanid oder Azid inhibiert, wie diese aber durch Sauerstoff [45]. Es ist nicht in der Lage, Methylviologen-Farbstoffe zu reduzieren.

Nur in Gegenwart des Substrates Methenyl-H₄MPT⁺ katalysiert Hmd den einfachen und doppelten Austausch zwischen H₂ und H⁺ oder D⁺ aus H₂O bzw. D₂O [59, 60] und die Umsetzung von *para*- in *ortho*-Wasserstoff [61], wie er für Hydrogenasen typisch ist:





Der Hydridtransfer erfolgt in der enzymkatalysierten Reaktion stereospezifisch auf die *pro*-R-Position, wie mittels heteronuklearer HSQC³-NMR-Spektroskopie gezeigt wurde [62]. Dies bedeutet gegenüber der unkatalysierten Hydrogenierung mittels NaBH₄, die in die *pro*-S-Position erfolgt [63], eine umgekehrte Stereospezifität.

Zusätzlich katalysiert Hmd einen direkten Austausch des *pro*-R-Wasserstoffes von Methylen-H₄MPT mit Protonen des Wassers, der deutlich schneller erfolgt als die Rückreaktion zum Methenyl-H₄MPT⁺ [64].

Modellreaktionen und Katalysemechanismus

Für die Formulierung eines möglichen Katalysemechanismus ist die Beobachtung wichtig, daß Hmd nur in Gegenwart des Substrates Methenyl-H₄MPT⁺ Hydrogenaseaktivität zeigt. Es stellte sich nun die Frage, welche metallfreien Modellsysteme das Enzymverhalten erklären könnten.

Die Möglichkeit einer säurekatalysierten Hydrogenierung ungesättigter Kohlenwasserstoffe wurde erstmalig in [65] postuliert und später für Isobuten und Cyclohexen in Gegenwart von AlBr₃ bei hohen Drücken und Temperaturen gezeigt [56]. Mit der Supersäure HF-TaF₅ gelang erstmalig auch die Hydrogenierung eines aromatischen Systems [66]. Als Supersäuren werden Säuren bezeichnet, die stärker als 100%ige Schwefelsäure (Brønsted-Säuren) bzw. AlCl₃ (Lewis-Säuren) sind [67].

Olah [67, 68] (Nobelpreis für Chemie 1994) beschrieb die reversible Reaktion von Carbokationen mit H₂ in „supersauren“ Lösungen. Diese Reaktion verläuft über ein pentakoordiniertes 3-Zentren-2-Elektronen-Intermediat (Carbonium-Ion).

Für die durch Hmd katalysierte Reaktion wurde von Berkessel und Thauer ein Mechanismus analog zur Olah-Chemie postuliert [69].

Dabei soll der Imidazolidinium-Ring von Methenyl-H₄MPT⁺ bei der Bindung an das Enzym eine Konformationsänderung erfahren, die die konjugative Stabilisierung der positiven Ladung aufhebt und zu einer Lokalisierung derselben am C14a (s. Abb. 3) führt [50, 63, 70], wodurch dieses „superelektrophile“ Eigenschaften erhält.

Im Gegensatz zu Metallohydrogenasen würde demnach der Hydridakzeptor und nicht das H₂-Molekül aktiviert. Ein solcher Mechanismus setzt voraus, daß Wasser keinen Zugang zum aktiven Zentrum hat, weil dieses sonst sofort unter OH⁻-Abstraktion mit dem „heißen“ Carbokation reagieren müßte.

Allerdings konnte in 2D-Transfer-NOESY⁴-Experimenten nur eine geringe Konformationsänderung für Methylen-H₄MPT bei Bindung an das Enzym beobachtet werden

³Heteronuclear Single Quantum Coherence

⁴Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy

[70], wobei sich der hierbei beobachtete Zustand zweifellos vom Übergangszustand unterscheiden kann.

Theoretische Studien belegen, daß eine Konformationsänderung des Imidazolidinium-Ringes dessen Lewis-Acidität beeinflussen kann [71]. *Ab initio*-Studien zeigen aber nur eine schwache Interaktion zwischen H_2 und einem solchen kationischen Zentrum [72].

Dagegen scheinen für die konzertierte Aktion des Substrates, der Lewis-Säure Methenyl- H_4MPT^+ , und einer Brønsted-Base Reaktionswege mit niedriger Aktivierungsbarriere zu existieren [73].

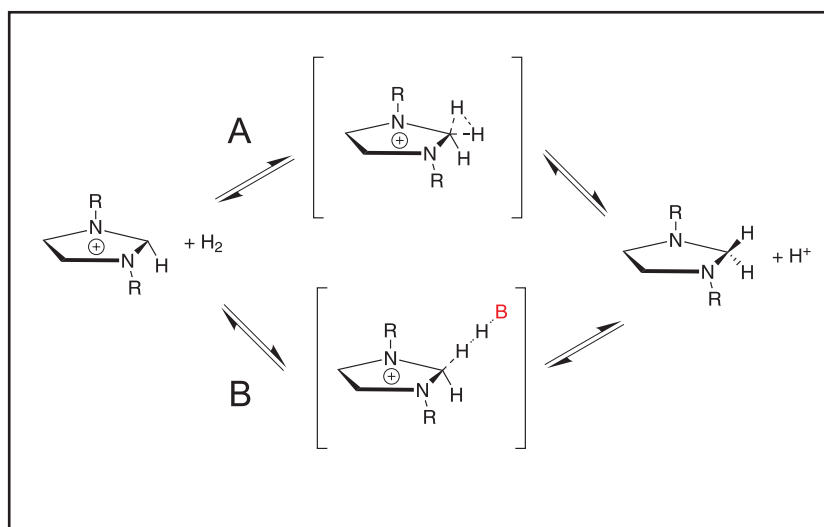


Abbildung 6: Diskutierte Reaktionswege für eine enzymkatalysierte metallfreie Hydrogenierung über ein pentakoordiniertes, nichtklassisches Dreizentren-Zweielektronen-Intermediat (Carboniumion) analog der Chemie von Carbokationen in Supersäuren (A) bzw. über ein ternären Van-der-Waals-Übergangskomplex unter Beteiligung einer Base (B).

Die beiden Alternativen des „reinen“ Olah-Mechanismus und einer bifunktionellen Katalyse sind in Abb. 6 gegenübergestellt. Momentan sprechen die meisten Befunde für die zweite Variante. Ohne Kenntnis des Cofaktors (der offensichtlich essentiell für den Katalysemechanismus ist und durchaus die Rolle der Base spielen könnte) wird aber jeder vorgeschlagene Mechanismus eher spekulativen Charakter haben.

In der Chemie existiert auch ein Beispiel für eine rein basenkatalysierte homogene Hydrogenierung, nämlich die Umsetzung von Benzophenon zu Benzhydrol in Gegenwart von Kalium-*tert*-butoxid, die bei 130–210° C und 100–135 bar H_2 mit bis zu 95% Ausbeute erfolgt [65, 56].

Ein interessantes Beispiel für eine heterogene, säurekatalysierte Hydrogenierung stellt die Umsetzung von Ethen zu Ethan am protonierten Zeolith ZSM-5 dar, die bei einer Temperatur von 818 K mit einer Ausbeute von 95% erfolgt [74].

In einer theoretischen Studie konnte gezeigt werden, daß die Aktivierungsbarriere der Hydrogenierung von Formimin und Formaldehyd an den Brønstedt-Säurepositionen des protonierten Zeolithsystems $\equiv\text{Si}-\text{O}(\text{H})-\text{AlH}_2-\text{O}-\text{Si}\equiv$ sogar auf Werte von 30 bzw. 60 kJ/mol gesenkt wird [75]. Die Modellrechnungen zeigen, daß Protonierung der Doppelbindung und Spaltung der H-H-Bindung zwar konzertiert, aber sequentiell an zwei benachbarten Sauerstoffen abläuft [75].

Biologische Bedeutung

Warum nun besitzen einige methanogene Organismen Hmd zusätzlich zur F_{420} -abhängigen Hydrogenase (Mtd) für die Erzeugung von Methylen- H_4MPT aus Methenyl- H_4MPT^+ ?

Eine mögliche Antwort ergibt sich daraus, wie die Expression beider Genprodukte reguliert wird. Bereits in [46] wurde gezeigt, daß Hmd in einer Ni-limitierten Batch-Kultur verstärkt exprimiert wird und unter diesen Bedingungen bis zu 5% des cytoplasmatischen Proteins ausmachen kann.

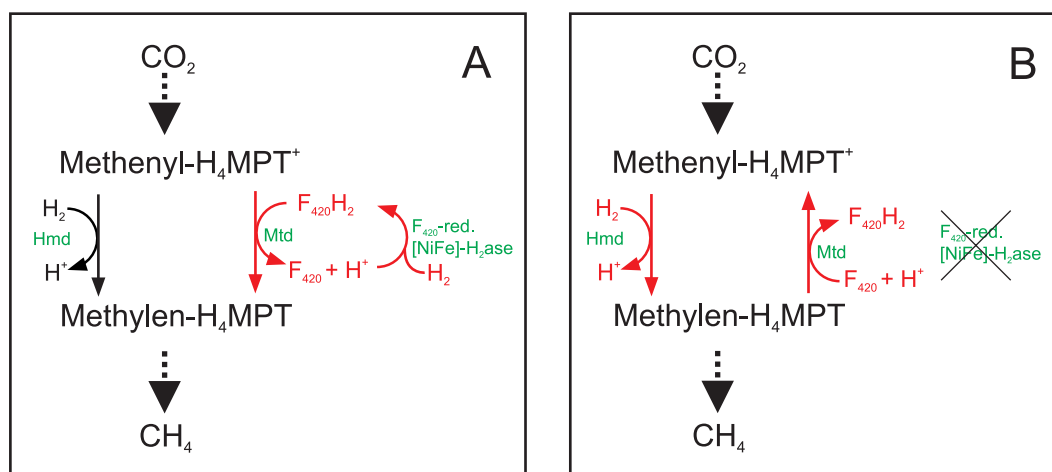


Abbildung 7: Postuliertes Zusammenspiel der H_2 -bildenden und der F_{420} -abhängigen Methylen-Tetrahydromethanopterin-Dehydrogenase (Hmd und Mtd) in *M. marburgensis*. Unter nicht limitierten Bedingungen erfolgt der Hydridtransfer auf das Methenyl-Intermediat überwiegend vom reduzierten F_{420} , das von einer $[\text{NiFe}]\text{-H}_2\text{ase}$ bereitgestellt wird (A). Unter Ni-limitierten Bedingungen wird das Hmd/Mtd-System überproduziert und übernimmt die Bereitstellung von reduziertem F_{420} , das vom Organismus für verschiedene Hydridtransfer-Reaktionen benötigt wird (B).

Für *Methanothermobacter thermoautotrophicus* wurde in [76] anhand von Northern-Blot-Analysen eine Induktion der Hmd-Expression bei hohem Wasserstoff-Partialdruck postuliert.

Eine sorgfältigere Untersuchung für *Methanothermobacter marburgensis* unter Verwendung von Chemostatenkulturen zeigte, daß Hmd und Mtd unter Ni-limitierten Be-

dingungen um ein Mehrfaches überexprimiert werden, wohingegen die F_{420} -reduzierende [NiFe]-Hydrogenase unter diesen Bedingungen kaum exprimiert wird [77]. Die Induktion von Hmd bei Ni-Mangel findet auf Transkriptionsebene statt, dagegen konnte keine Abhängigkeit der Expression vom Wasserstoff-Partialdruck festgestellt werden [78].

Daraus wurde das in Abb. 7 gezeigte Modell für die Anpassung der Mikroorganismen an ein verändertes Ni-Angebot in der Umwelt abgeleitet. Demnach dient das Hmd/Mtd-System bei Ni-Mangel nicht nur zur Bereitstellung von Methylen- H_4 MPT, sondern auch von reduziertem F_{420} .

Das Interesse an der bemerkenswerten metallfreien Hydrogenase ist bei weitem nicht nur akademischer Natur. Hydrogenierungsreaktionen sind von größter Bedeutung auch in der Prozeßchemie. So waren etwa 1996 bei Novartis-Vorgänger Ciba-Geigy mehr als 90% aller katalytischen Produktionsprozesse Hydrogenierungen [79].

Dabei finden ausschließlich Metallkatalysatoren etwa auf Basis von Platin und Palladium Verwendung. Um so verständlicher ist vor diesem Hintergrund das Interesse, von der Natur zu lernen, wie sie einen höchst effizienten metallfreien Hydrogenierungskatalysator realisiert.

Für ein vollständiges Verständnis des ungewöhnlichen Katalysemechanismus ist ein atomares Modell von Hmd einschließlich des unbekanntes Cofaktors essentiell. Da Hmd in Lösung nach dem bisherigen Kenntnisstand immer in oligomerer Form, mindestens aber als Dimer vorliegt [50], ist ausschließlich die Methode der Röntgenkristallographie hierfür geeignet. Andere Methoden wie die mehrdimensionale NMR-Spektroskopie sind dagegen nicht leistungsfähig genug, die Struktur eines Proteins in dieser Größe zu bestimmen.

3 Ergebnisse

3.1 Das Enzym aus *Methanothermobacter marburgensis*

3.1.1 Überproduktion in *M. marburgensis*

Der Nickel-Bedarf von *M. marburgensis* für optimales Wachstum wurde bereits in [80] gezeigt. Wie in der Einleitung beschrieben, wird die metallfreie Hydrogenase unter Ni-Mangel verstärkt exprimiert. Diese Erkenntnis wurde in der vorliegenden Arbeit für die Proteinproduktion genutzt.

In den Glasfermentern, die üblicherweise für die Fermentation von *M. marburgensis* verwendet werden, gelang keine Anzucht unter Ni-limitierten Bedingungen, was auf einen Ni-Eintrag aus dem Stahl des Rührwerkes zurückgeführt wurde.

Um in einer einzigen Fermentation genügend Proteinmaterial für die Strukturbestimmung bereitzustellen, wurde der Organismus im 250 l-Maßstab in einem Fermenter mit einem emaillierten Reaktionsraum und Titan-Rührwerk fermentiert (Abb. 8).

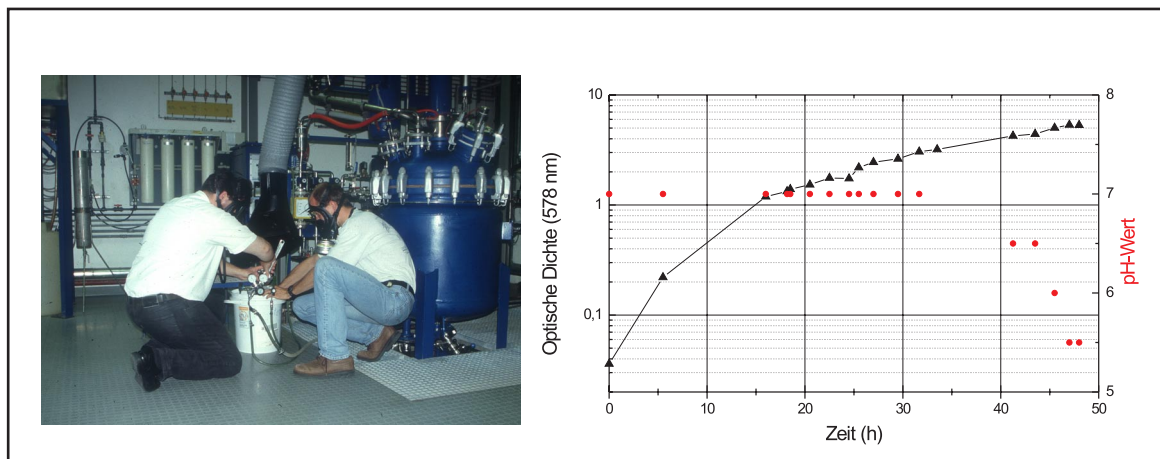


Abbildung 8: Fermentation von *M. marburgensis* im Pilotmaßstab im Archaeenzentrum der Universität Regensburg. Links: Der Verfasser installiert gemeinsam mit Herrn Dipl.-Ing. Thomas Hader (links im Bild) die kontinuierliche H_2S -Versorgung. Rechts: Zeitlicher Fermentationsverlauf; aufgetragen sind Zelldichte und pH-Wert der Kultur gegen die Fermentationsdauer.

Dabei konnte unter Verwendung einer kontinuierlichen H_2S -Zufuhr eine Ausbeute von 1,5 kg Zellen erzielt werden. Gegen Ende der Fermentation sank der pH-Wert des Mediums deutlich ab; dieser Parameter sollte daher bei ähnlichen Fermenterläufen unbedingt kontrolliert werden.

Nach Ergebnissen von Dr. Shantanu Chowdhury (MPI Marburg) ist die Quelle des Nickels bei den für kleine Anzuchten verwendeten Glasfermentern nicht der Stahl, son-

dern das zur Medienbereitung verwendete entsalztes Wasser. Wurde hochreines Wasser zur Medienbereitung verwendet, konnte auch hier eine Ni-Limitierung erreicht werden.

3.1.2 Proteinreinigung

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Reinigungsprozedur wurde in [81] entwickelt und umfaßt eine Zinkchlorid-Fällung sowie zwei chromatographische Schritte unter Verwendung von Anionenaustauschern (siehe 5.4.6). Ein großer Teil der Reinigungen wurde von Dr. Seigo Shima (Marburg) durchgeführt.

Bei Verwendung der unter Ni-limitierten Bedingung gewachsenen Zellen konnte eine gegenüber unter normalen Bedingungen fermentierten Zellen mehrfach höhere Proteinausbeute erzielt werden. So konnten aus 10 g Zellen etwa 10 mg gereinigte, hochaktive Hmd isoliert werden (Dr. Seigo Shima, pers. Mitteilung).

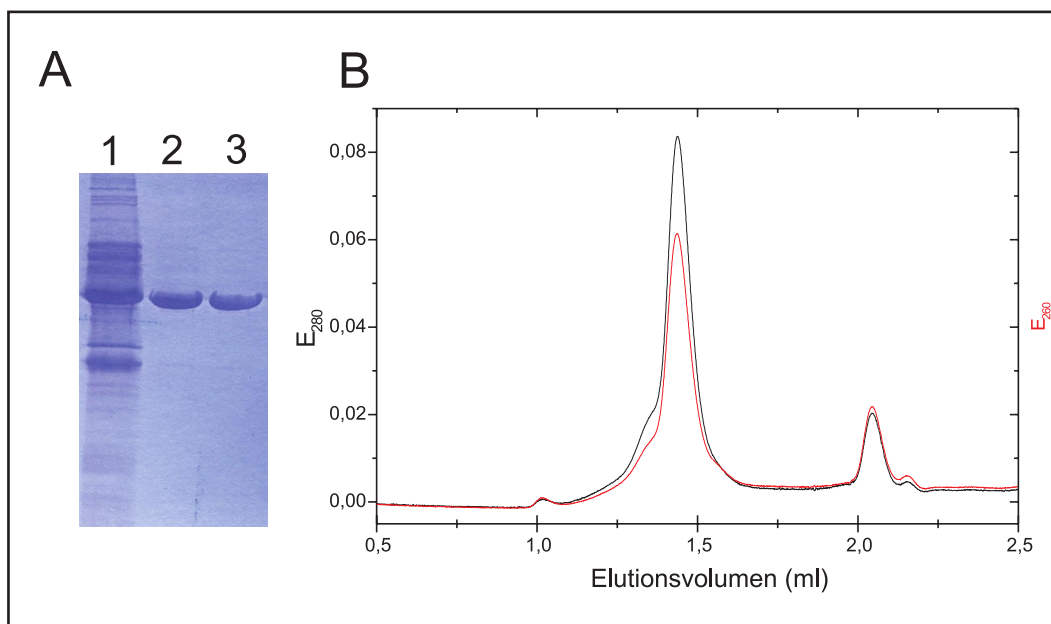


Abbildung 9: A: Reinigung der aktiven metallfreien Hydrogenase aus *M. marburgensis*. Die SDS-PAGE zeigt die Präparation nach dem ersten und dem zweiten chromatographischen Schritt (Spur 1: Q Sepharose HP Pool, 2-3: Mono Q Pool). B: Eine aerobe Probe des gereinigten Enzyms in der Gelfiltration (Superose 12, 50 mM MOPS/KOH pH 7.0, 300 mM NaCl, 12° C).

Die in Abb. 9 B gezeigte Gelfiltration wurde unter aeroben Bedingungen durchgeführt. Neben dem Protein ist im Elutionsprofil eine weitere Probenkomponente festzustellen, die offenbar kein Protein ist, wie das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm zeigt. Vermutlich handelt es sich hierbei um den unbekanntes Cofaktor oder ein Fragment davon.

3.1.3 Kristallisation und native Datensammlung

Erste winzige, durch Verwendung von Ammoniumsulfat als Fällungsmittel erzeugte Kristalle wurden bereits in [55] beschrieben.

Größere, für eine erste Charakterisierung geeignete Kristalle wurden von Gudrun Hartmann und Seigo Shima erhalten und von Dr. Ulrich Ermler untersucht, was zur Raumgruppenzuordnung $P6_x22$ führte [81].

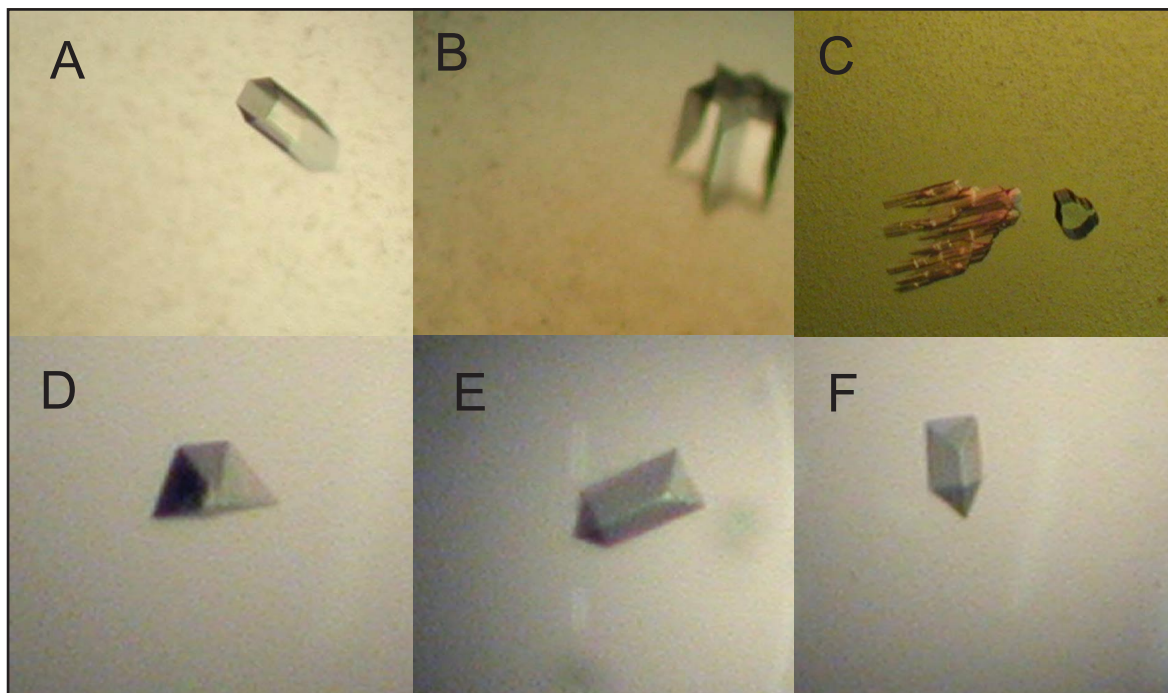


Abbildung 10: Kristalle der SeMet-markierten metallfreien Hydrogenase aus *M. marburgensis*. A–C: Typische merohedrale Zwillinge der apparenten Raumgruppe $P622$ mit maximalen Dimensionen von 100–300 μm . Gezeigt sind die wichtigsten beobachteten Morphologien, hexagonale Säulchen (A), sechsstrahlige Sterne (B) und unregelmäßige, aus parallelverwachsenen Subindividuen gebildete Kristalle (C). D–F: Die Photos zeigen denselben unverzwilligten Kristall (Raumgruppe $P321$) von etwa 50 μm Größe in verschiedenen Orientierungen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmalig genügend vollständige Daten gesammelt, um anhand einer Pseudopräzessionsaufnahme die Abwesenheit von Schraubenachsen festzustellen. Die apparente Raumgruppe der Kristalle ist also $P622$; die typischen Zelldimensionen liegen bei $138.5 \pm 1 \text{ \AA}$ (a, b) und $98.8 \pm 1 \text{ \AA}$ (c).

Vor allem während der Suche nach Schweratomderivaten traten Kristalle auf, die sich bei unveränderter Morphologie und unveränderten Zelldimensionen als der Raumgruppe $P321$ zugehörig erwiesen. Diese Beobachtung erschien zwar etwas ungewöhnlich, aber

ein solcher Verlust an kristallographischer Symmetrie durch subtile Änderungen der Kristallpackung ist durchaus vorstellbar.

Bei den genannten Zelldimensionen war in *P622* ($z = 12$) von $n = 1$, in *P321* ($z = 6$) von $n = 2$ Molekülen in der asymmetrischen Einheit auszugehen, entsprechend einem Matthews-Koeffizienten von $V_M = 3.6 \text{ \AA}^3/\text{Da}$ bzw. einem Lösungsmittelgehalt von $\sim 66 \%$. Es wurden eine Reihe nativer Datensätze gesammelt. Der beste „native“ Datensatz wurde an einem Kristall gesammelt, der im Rahmen der Suche nach Schweratomderivaten mit 0.5 mM Quecksilberacetat behandelt wurde. Er zeigt zwar die typische Änderung der apparenten Raumgruppe nach *P6* (s. u.), allerdings konnte bei diesem Kristall in einem XRF/XANES⁵-Experiment an der Synchrotron-Meßstation X31 (EMBL Hamburg) keine Quecksilber-Bindung nachgewiesen werden. An diesem Kristall wurde zunächst ein Labordatensatz mit 2.6 \AA und später ein Synchrotrondatensatz bis zu einer Auflösung von 2.3 \AA gesammelt (Tabelle 1, Datensätze 7 und 8).

Tabelle 1: Native Datensätze, die an Kristallen des Enzyms aus *M. marburgensis* gesammelt wurden (Quelle: Synchrotron-Meßplatz oder konventioneller Röntgengenerator (Ru200); s. 5.5.4; (★) höchste Auflösungsschale)

Nr.	ID	Quelle	$\lambda/\text{\AA}$	Raumgruppe	Zelle a/b, c (Å)	Auflösung (★)/Å	Vollst. (★)/%	R_{merge} (★)/% ⁶	$I/\sigma(I)$ (★)	Red. (★)
1	hmdh9	BW6	1.059	<i>P622</i>	138.53, 98.20	50.0-2.8 (2.83-2.80)	96.4 (83.5)	7.9 (24.8)	24.29 (3.87)	5.78 (2.03)
2	Ir01 ⁷	BM14	1.087	<i>P622</i>	138.54, 98.45	50.0-2.95 (3.00-2.95)	98.9 (98.3)	8.0 (35.9)	11.16 (3.24)	3.17 (3.22)
3	sthmd2	BM14	0.9918	<i>P622</i>	138.62, 98.73	50.0-3.0 (3.05-3.00)	92.5 (97.0)	13.1 (36.6)	9.60 (3.46)	2.42 (2.56)
4	nat19	Ru200	1.5418	<i>P622</i>	138.72, 98.34	30.0-3.3 (3.34-3.30)	99.5 (100.0)	10.5 (41.7)	8.77 (3.93)	5.46 (5.37)
5	nat25	Ru200	1.5418	<i>P622</i>	138.84, 98.64	30.0-3.0 (3.03-3.00)	94.5 (95.0)	9.3 (38.4)	8.71 (3.82)	4.95 (4.92)
6	nat26	Ru200	1.5418	<i>P622</i>	138.54, 98.39	30.0-3.0 (3.03-3.00)	99.0 (98.4)	6.1 (24.4)	8.59 (4.37)	4.65 (4.69)
7	dev60 ⁸	Ru200	1.5418	<i>P3</i>	138.72, 99.18	50.0-2.6 (2.63-2.60)	92.0 (78.5)	6.6 (30.3)	7.99 (1.74)	1.65 (1.45)
8		BW7B	0.8423	<i>P3</i>	138.39, 99.05	50.0-2.3 (2.33-2.30)	79.0 (71.9)	4.6 (21.4)	5.61 (1.76)	1.40 (1.22)

⁵X-Ray Fluorescence/X-ray Absorption Near-Edge Spectrum

⁶Inkubation 16 h 10 mM K_3IrCl_6 , aber keine Bindung im XRF/XANES-Experiment (BM14)

⁷Inkubation 0.5 mM HgAc , trotz der geänderten Raumgruppe keine Hg-Bindung im XRF/ XANES-Experiment detektierbar (X31)

⁸ $R_{\text{merge}} = \sum_{hkl} \sum_{j=1}^N |I_{hkl} - I_{hkl}(j)| / \sum_{hkl} N \cdot I_{hkl}$

Tabelle 2: Kristallisationsbedingungen der metallfreien Hydrogenase aus *M. marburgensis*.

Parameter	Bedingung
Temperatur	4° C
Reservoirlösung	1.8–2.2 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 1.8% PEG 8000, 100 mM Puffer pH 6.0–9.0 (Cacodylat/HCl, MES/NaOH, Tris/HCl, Bicin/KOH)
Proteinkonz.	10–24 mg/ml in 10 mM MOPS/KOH pH 7.0
Protein:Reservoir	1:1
Trofenvolumen	2–5 µl

3.1.4 Derivate für MIR bzw. SIR(AS)

Die Phasenbestimmung mittels MIR (*Multiple Isomorphous Replacement*) bzw. SIR(AS) (*Single Isomorphous Replacement and Anomalous Scattering*) unter Verwendung von Schweratomderivaten lag nahe, weil zunächst keine Möglichkeit gesehen wurde, in einem autotrophen Organismus SeMet-markiertes Protein herzustellen.

Zudem konnte eine genügende Zahl von Kristallen für Derivatisierungszwecke erhalten werden, die hinreichend gute Beugungseigenschaften aufwiesen, um eine Derivatdatensammlung auch mit dem Röntgengenerator im Labor zu erlauben.

Eine Methode zum schnellen Testen zahlreicher Schweratomverbindungen in Lösung besteht darin, das veränderte Mobilitätsverhalten derivatisierter Proteine in einer nativen Gelelektrophorese zu nutzen [82]. Diese Experimente ergaben Hinweise auf die Bindung von Quecksilber(II) (mit den Verbindungen Quecksilberacetat, Ethylmercuriphosphat, Mersalylsäure und dem K₂HgI₄/KI-System), Platin(II) (K₂PtCl₄) und Gold(III) (KAuCl₄), wogegen Behandlung mit Iridium(III) und Trimethyl-Bleiacetat keine veränderte Mobilität bewirkte. Für einen Teil der getesteten Verbindungen sind die Ergebnisse in Abb. 11 gezeigt. Diese schnell verfügbaren Resultate wurden zur Grundlage der Derivatisierungsversuche an Kristallen genommen.

Spätere XRF/XANES-Experimente an derivatisierten Kristallen bestätigten diese Ergebnisse für Quecksilberverbindungen (Bindung) und Iridium (keine Bindung). Auch die kristallographischen Befunde bestätigen weitgehend die Implikationen der nativen PAGE-Experimente. Damit erscheint diese Methode sehr brauchbar, um in kurzer Zeit für eine Derivatisierung geeignete Schweratomverbindungen identifizieren zu können.

Eine weitere Möglichkeit, um eine Schweratomderivatisierung unabhängig von kristallographischen Studien nachzuweisen, liegt in der Massenspektrometrie [83]. Die definierte Bindung von Quecksilber an das Enzym in Lösung wurde von Dr. Seigo Shima mittels MALDI-TOF-MS nachgewiesen.

Im Falle gefärbter Schwermetallverbindungen kann die Bindung auch an das kristallisierte Protein direkt visuell verfolgt werden, weil die Konzentration des farbgebenden Komplexes im Proteinkristall größer wird als in der umgebenden Lösung und diese damit

eine intensivere Farbe erhalten. Beispiele hierfür sind ein Pt(terpy)-Komplex (*red platinum*) und das Ta₆Br₁₂-Cluster [84]. In beiden Fällen konnten intensiv orangefarbene bzw. grünlichblaue Kristalle erhalten werden. Allerdings gibt die Anfärbung keinen Hinweis darauf, ob die Bindung an spezifische Stellen im Protein erfolgt.

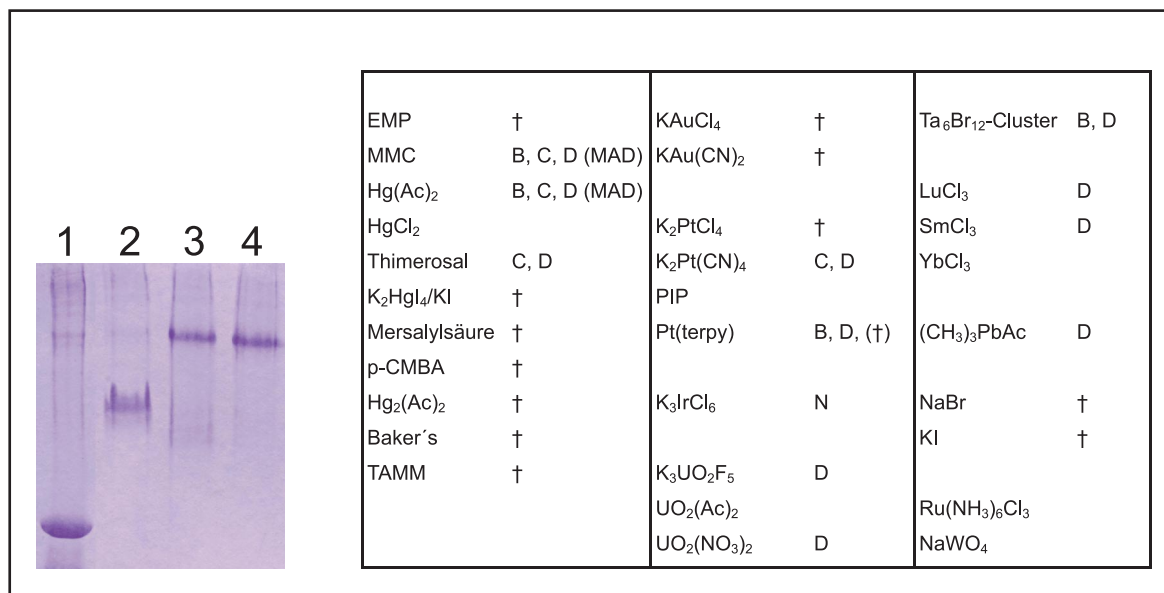


Abbildung 11: Screening nach Schweratomderivaten für die metallfreie Hydrogenase aus *M. marburgensis*. Links: Mobilitätsverschiebungen in einer nativen PAGE deuten auf eine Schweratombindung in Lösung hin; in Spur 1 wurde das unbehandelte Enzym aufgetragen, in den Spuren 2–4 Proben nach Präinkubation mit Mersalylsäure (2), Quecksilberacetat (3) und K₂HgI₄ + KI (4). Rechts: Übersicht über die Derivatisierungsversuche an Proteinkristallen. Verwendete Abkürzungen: EMP, Ethylmercuriphosphat, MMC, Methylmercurichlorid, p-CMBA, para-Chloromercuribenzoessäure, Baker's, 1,4-Diacetoxymercuri-2,3-dimethoxybutan, TAMM, Tetrakis(acetoxymercuri)methan. Symbole: †, Kristalle bei Inkubation zerstört; B, Bindung detektiert (XANES, MALDI oder Anfärbung); C, Raumgruppe geändert (*P622* → *P6*, *P321* → *P3*); D, Datensätze gesammelt; N keine Bindung nachweisbar etwa im XANES-Experiment.

Eine Übersicht über die hergestellten und kristallographisch charakterisierten potentiellen Derivate gibt Abb. 11. Insgesamt wurden hunderte von derivatisierten Kristallen montiert und etwa 50 vollständige Datensätze gesammelt; die wichtigsten Datensätze sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

Tabelle 3: Derivat-Datensätze von mit verschiedenen Schwermetallen behandelten Kristallen des Enzyms aus *M. marburgensis*. Für weitere Erläuterungen vgl. Tabelle 1.

Nr.	ID (Der.)	Quelle	$\lambda/\text{\AA}$		Zelle a/b, c (\AA)	Auflösung (\star)/ \AA	Vollst. (\star)/%	R_{merge} (\star)/%	$I/\sigma(I)$ (\star)	Red. (\star)
1	dev18 (HgAc)	X11	0.9101	<i>P6</i>	138.44, 98.46	50.0-3.0 (3.07-3.00)	85.1 (87.1)	6.2 (26.2)	10.83 (2.94)	1.90 (1.85)
2	dev52 (HgAc)	X11	0.9101	<i>P6</i>	138.35, 99.19	30.0-3.0 (3.03-3.00)	97.7 (85.5)	8.1 (17.3)	16.0 (7.14)	2.72 (2.62)
3	dev56 ($\text{K}_3\text{UO}_2\text{F}_5$)	X11	0.9101	<i>P6</i>	138.30, 98.20	30.0-2.9 (2.93-2.90)	92.9 (71.9)	5.6 (29.4)	16.17 (1.4)	2.74 (1.62)
4	dev61 ($\text{Ta}_6\text{Br}_{12}$)	Ru200	1.5418	<i>P622</i>	138.61, 98.29	30.0-4.0 (4.05-4.00)	98.7 (99.0)	5.6 (10.3)	7.41 (4.06)	3.74 (3.56)
5	dev63 ($\text{Ta}_6\text{Br}_{12}$)	Ru200	1.5418	<i>P321</i>	138.41, 98.26	30.0-3.5 (3.54-3.50)	99.2 (97.9)	10.7 (35.3)	6.29 (2.39)	2.86 (2.41)
6		X11	0.9101	<i>P321</i>	137.98, 98.11	30.0-3.9 (3.94-3.90)	96.5 (54.5)	6.4 (12.5)	19.0 (4.4)	3.83 (1.51)
7	dev72 ($\text{K}_2\text{Pt}(\text{CN})_4$)	Ru200	1.5418	<i>P6</i>	138.70, 98.60	30.0-3.5 (3.54-3.50)	99.8 (99.8)	15.7 (22.4)	6.79 (3.95)	3.47 (3.42)
8	dev73 (HgAc)	Ru200	1.5418	<i>P6</i>	138.77, 99.20	30.0-3.5 (3.54-3.50)	96.6 (97.7)	10.2 (29.4)	5.48 (2.72)	2.28 (2.18)
9	dev80 (HgAc)	Ru200	1.5418	<i>P6</i>	139.44, 99.38	30.0-3.5 (3.54-3.50)	96.1 (93.5)	10.7 (28.8)	5.42 (2.69)	2.20 (2.04)
10	dev83 (Thimerosal)	Ru200	1.5418	<i>P622</i>	139.03, 99.14	30.0-3.5 (3.54-3.50)	93.0 (91.8)	9.3 (19.0)	6.89 (3.75)	3.26 (3.28)
11	dev87 (MMC)	X11	0.9101	<i>P6</i>	138.44, 98.50	50.0-3.0 (3.07-3.00)	83.0 (85.8)	6.2 (27.0)	10.66 (2.87)	1.85 (1.77)
12	dev88 (MMC)	X11	0.9101	<i>P3</i>	138.42, 99.33	30.0-3.2 (3.24-3.20)	94.2 (94.2)	7.7 (26.9)	8.61 (2.44)	1.53 (1.53)
13	dev93 ($\text{K}_2\text{Pt}(\text{CN})_4$)	X11	0.9101	<i>P3</i>	138.58, 98.47	30.0-3.0 (3.03-3.00)	94.4 (93.2)	9.2 (44.3)	10.6 (1.6)	2.47 (2.32)
14	dev102 (SmCl_3)	Ru200	1.5418	<i>P321</i>	139.01, 98.73	30.0-4.0 (4.05-4.00)	94.0 (87.7)	2.1 (2.9)	5.02 (3.12)	1.73 (1.68)
15	dev105 ($((\text{CH}_3)_3\text{PbAc})$)	Ru200	1.5418	<i>P6</i>	139.07, 99.53	30.0-3.5 (3.54-3.50)	90.6 (73.9)	9.5 (26.1)	6.36 (3.18)	3.25 (2.79)
16	dev107 ($\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$)	Ru200 Ru200	1.5418	<i>P622</i>	138.99, 98.49	30.0-3.3 (3.34-3.30)	98.0 (98.6)	7.2 (26.4)	8.04 (4.07)	4.15 (4.25)
17	dev109 ($((\text{CH}_3)_3\text{PbAc})$)	Ru200	1.5418	<i>P622</i>	138.70, 98.67	30.0-4.0 (4.04-4.00)	91.1 (97.0)	6.1 (9.6)	6.86 (4.33)	3.64 (3.52)
18	dev110 (LuCl_3)	Ru200	1.5418	<i>P622</i>	138.18, 96.89	30.0-4.0 (4.04-4.00)	93.2 (95.1)	6.3 (9.6)	6.39 (3.83)	3.33 (3.16)
19	dev114 (Pt(terpy))	Ru200	1.5418	<i>P622</i>	138.97, 98.82	30.0-4.0 (4.04-4.00)	97.7 (94.5)	10.8 (27.1)	7.02 (3.64)	3.46 (3.29)
20	coxtal (HgAc)	BW7B	0.8423	<i>P622</i>	138.51, 98.50	50.0-3.0 (3.07-3.00)	91.7 (93.4)	7.4 (30.4)	14.77 (4.04)	3.55 (3.58)
21	tp15cuk (HgAc)	Ru200	1.5418	<i>P6</i>	138.03, 99.17	30.0-3.1 (3.14-3.10)	100.0 (100.0)	11.5 (31.6)	11.84 (6.17)	9.36 (9.26)
22	tp22cuk (HgAc)	Ru200	1.5418	<i>P6</i>	137.71, 98.89	30.0-3.1 (3.14-3.10)	97.7 (97.7)	11.2 (32.1)	5.75 (2.83)	3.53 (2.51)

Die Behandlung mit Quecksilberverbindungen und mit $\text{K}_2\text{Pt}(\text{CN})_4$ führte zu einem systematischen Verlust an Kristallsymmetrie, so daß die Raumgruppen $P3$ (für native $P321$) bzw. $P6$ (für $P622$) resultierten. Dies ist ein starker Hinweis auf Schweratombindung. Möglicherweise besitzen Quecksilber und Platin eine ähnliche Bindungsposition und können so einen gleichartigen kristallographischen Effekt verursachen.

Dagegen wurde bei Derivatisierung mit dem $\text{Pt}(\text{terpy})$ -Komplex keine Änderung der apparenten Raumgruppe beobachtet. Ein alternativer Bindungsort wäre nicht überraschend, weil die Bindung dieses Komplexes an Proteine häufig nicht mit einem Ligandenaustausch verbunden ist.

Trotz intensiver Bemühungen konnten für keinen der zahlreichen gemessenen Derivatdatensätze Schweratompositionen gefunden werden. Als entscheidendes Problem wurde dabei zunächst angesehen, daß gerade die vielversprechendsten Derivate (wie Quecksilber) nicht isomorph zu den nativen Kristallen waren. Allerdings konnten auch in anomalen Differenz-Pattersonkarten keine Schweratompositionen gefunden werden.

3.1.5 MAD- und SAD-Experimente an Quecksilberderivaten

Wie beschrieben, konnte für Quecksilber mit nicht-kristallographischen Methoden eine Bindung an Hmd gezeigt werden. Andererseits trat bei den mit Quecksilber behandelten Kristallen das Problem der veränderten Raumgruppe und damit der Nicht-Isomorphie auf. Um dieses Problem zu umgehen, wurde versucht, die anomalen Streueigenschaften des Quecksilbers durch MAD- und SAD-Experimente⁹ an der Hg-Kante für eine Strukturbestimmung zu nutzen. Die zu diesem Zweck gesammelten Daten sind in Tabelle 4 zusammengefaßt.

Allerdings war die Datenqualität bei zwei an der Meßstation X31 (EMBL Hamburg) durchgeführten MAD-Experimenten sehr schlecht, was vor allem an der äußerst geringen Strahlintensität an dieser Quelle lag. Der Umstand, daß in diesen Fällen keine Hg-Positionen bestimmt werden konnten, wurde also zunächst auf ein Signal/Rausch-Problem zurückgeführt.

Später konnten allerdings qualitativ bessere SAD-Daten an der Station BM14 (ESRF¹⁰) gesammelt werden (s. Tabelle 4); auch hier gelang keine Lokalisierung der anomalen Streuatome.

⁹MAD, *Multiple Wavelength Anomalous Dispersion*, SAD, *Single Wavelength Anomalous Dispersion*

¹⁰*European Synchrotron Radiation Facility*, Grenoble, Frankreich

Tabelle 4: SAD- und MAD-Datensätze, die an mit Quecksilberacetat (HgAc) und Methylmercurichlorid (MMC) derivatisierten Kristallen des Enzyms aus *M. marburgensis* gesammelt wurden. In allen Fällen wurden die Friedel-Paare bei der Skalierung getrennt behandelt. Für weitere Erläuterungen vgl. Tabelle 1.

Nr.	ID (Der.)	Typ	Quelle	$\lambda/\text{\AA}$		Zelle a/b, c (Å)	Auflösung (Å)	Vollst. (%)	R_{merge} (%)	$I/\sigma(I)$ (*)	Red. (*)
1	dev51 (HgAc)	MAD-peak	X31	1.0022	<i>P3</i>	138.47, 99.19	30.0-2.9 (2.93-2.90)	90.1 (68.9)	7.3 (28.3)	11.96 (3.40)	2.09 (1.70)
2		MAD-rem.	X31	0.9322	<i>P3</i>	137.72, 98.69	30.0-2.9 (2.93-2.90)	58.2 (40.8)	9.8 (30.3)	8.78 (2.40)	1.14 (1.09)
3		MAD-infl.	X31	1.0069	<i>P3</i>	137.83, 98.72	30.0-3.0 (3.03-3.00)	91.6 (73.3)	7.4 (25.0)	12.16 (4.13)	1.94 (1.65)
4	dev86 (MMC)	MAD-peak	X31	1.0022	<i>P6</i>	137.39, 98.34	30.0-3.6 (3.64-3.60)	96.5 (90.9)	12.4 (33.3)	12.35 (5.21)	3.00 (3.53)
5		MAD-rem.	X11	0.9101	<i>P6</i>	138.59, 99.23	30.0-3.0 (3.03-3.00)	95.4 (90.5)	7.4 (26.1)	18.80 (4.50)	3.47 (3.36)
6		MAD-infl.	X31	1.0066	<i>P6</i>	137.87, 98.65	30.0-3.8 (3.84-3.80)	97.1 (90.5)	14.0 (37.4)	4.05 (2.36)	2.25 (2.08)
7	tp10 (HgAc)	SAD	BM14	1.0022	<i>P6</i>	137.83, 98.79	50.0-3.2 (3.27-3.20)	99.8 (99.9)	11.4 (28.7)	14.87 (4.97)	4.16 (4.18)
8	tp22 (HgAc)	SAD	BM14	1.0022	<i>P6</i>	138.08, 100.04	35.0-2.75 (2.81-2.75)	99.9 (99.9)	10.4 (27.1)	15.82 (4.5)	4.14 (4.14)
9	tp15 (HgAc)	SAD	BM14	1.0022	<i>P6</i>	137.33, 98.82	50.0-3.0 (3.07-3.0)	96.4 (94.5)	8.6 (24.4)	12.79 (3.63)	3.07 (2.80)

3.1.6 Metabolische SeMet-Markierung von *M. marburgensis*-Proteinen

Durch Zusatz von 2.5 mM L-SeMet zum Medium bei der Fermentation von *M. marburgensis* gelang der Einbau von Selen in die Proteine. Wie der Massenunterschied von markierten und unmarkierten Proben für Hmd und andere methanogene Proteine in der MALDI-TOF-Massenspektrometrie zeigte, lag die Inkorporationseffizienz bei etwa 80% (Dr. Seigo Shima, pers. Mitteilung).

3.1.7 MAD- und SAD-Experimente am SeMet-markierten Enzym

Gegenüber den zuvor verwendeten Schweratomderivaten hat die Verwendung von SeMet-markierten Proteinkristallen den Vorteil, daß sicher von der Anwesenheit einer definierten Anzahl Streuatome ausgegangen werden kann.

Für die Kristalle der Raumgruppe *P622* ($n = 1$) wurden 14 Selenpositionen erwartet. Prinzipiell sollte bei hinreichend guter Primärdatenqualität eine Strukturbestimmung mittels MAD möglich sein.

Nachdem erste Se-SAD-Datensätze, die unter Verwendung sehr kleiner Kristalle an dem Mikrofokus-Meßplatz ID13 (ESRF) gesammelt wurden (1 und 2 in Tabelle 5) von

unzureichender Datenqualität waren, gelang die Aufnahme eines exzellenten MAD-Peak-Datensatzes an der Station ID29 (ESRF) (Datensatz 3 in Tabelle 5).

Kurz danach konnte an der Meßstation X12C (NSLS¹¹) ein MAD-Experiment mit nahezu optimaler Datenqualität bei allen drei Wellenlängen durchgeführt werden (Datensätze 7–9). Vor der Datensammlung wurde am verwendeten Kristall die Röntgenabsorptionskante gemessen und daraus die realen und imaginären Komponenten der anomalen Streufaktoren bestimmt (Abb. 12).

Trotz der ausgezeichneten Datenqualität gelang weder mit Patterson-, noch mit direkten Methoden eine Bestimmung der Se-Substruktur.

Tabelle 5: MAD- und SAD-Datensätze, die an Kristallen des in *M. marburgensis* SeMet-markierten Enzyms gesammelt wurden. Bei allen Datensätzen wurden die Friedel-Paare in der Skalierung getrennt behandelt. Weitere Erläuterungen: s. Tabelle 1.

Nr.	ID	Typ	Quelle	$\lambda/\text{\AA}$		Zelle a/b, c (\AA)	Auflösung (\star)/ \AA	Vollst. (\star)/%	R_{merge} (\star)/%	$I/\sigma(I)$ (\star)	Red. (\star)
1	tse5	SAD	ID13	0.9755	<i>P622</i>	139.50, 98.10	50.0-3.8 (3.87-3.80)	99.6 (100.0)	9.8 (18.1)	18.73 (8.16)	5.95 (5.66)
2	tse2	SAD	ID13	0.9755	<i>P622</i>	139.50, 97.87	50.0-3.3 (3.36-3.30)	99.2 (99.6)	10.6 (18.3)	16.61 (5.05)	3.66 (3.55)
3	x92	MAD- <i>peak</i>	ID29	0.9787	<i>P622</i>	138.28, 97.10	50.0-2.60 (2.66-2.60)	96.0 (96.3)	5.4 (30.0)	11.31 (4.18)	2.13 (2.07)
4	x12	MAD- <i>peak</i>	ID29	0.9788	<i>P321</i>	139.08, 97.84	30.0-3.5 (3.62-3.50)	98.8 (99.7)	11.4 (17.1)	21.06 (17.55)	3.60 (3.59)
5	x12	MAD- <i>infl.</i>	ID29	0.9790	<i>P321</i>	139.67, 98.23	30.0-3.5 (3.62-3.50)	97.9 (99.1)	12.3 (24.9)	19.03 (12.83)	3.12 (3.12)
6	x2 ¹²	MAD- <i>peak</i>	X12C	0.9787	<i>P622</i>	138.44, 97.80	50.0-2.9 (2.97-2.90)	99.9 (100.0)	6.3 (35.0)	24.09 (4.63)	7.84 (5.82)
						<i>P321</i>	138.44, 97.80	50.0-2.9 (2.97-2.90)	99.9 (100.0)	4.1 (31.3)	23.06 (3.45)
7	x2	MAD- <i>infl.</i>	X12C	0.979	<i>P622</i>	138.63, 97.94	50.0-3.0 (3.07-3.00)	99.9 (100.0)	6.4 (30.9)	29.01 (4.81)	4.73 (4.70)
						<i>P321</i>	138.63, 97.94	50.0-3.0 (3.07-3.00)	99.9 (100.0)	3.8 (26.2)	19.99 (3.27)
8	x2	MAD- <i>rem.</i>	X12C	0.95	<i>P622</i>	138.78, 98.05	50.0-3.0 (3.07-3.00)	99.9 (100.0)	5.3 (26.8)	17.39 (3.63)	3.26 (3.25)
						<i>P321</i>	138.78, 98.05	50.0-3.0 (3.07-3.00)	93.4 (90.2)	3.2 (23.0)	12.54 (2.58)
9	thmd1	SAD	ID29	0.9791 0.9791	<i>P321</i>	138.99, 98.02	50.0-3.0 (3.07-3.00)	84.4 (82.3)	8.0 (34.4)	12.52 (2.67)	1.72 (1.79)
10	thmd2	SAD	ID29	0.9791	<i>P321</i>	138.82, 98.01	50.0-3.3 (3.38-3.30)	99.7 (99.7)	10.6 (35.0)	12.74 (4.16)	4.38 (4.35)

¹¹National Synchrotron Light Source, Brookhaven National Laboratory, NY, USA

¹²Die Daten sind für die drei Wellenlängen jeweils sowohl in der apparenten Raumgruppe *P622* als auch in der wahren Raumgruppe *P321* prozessiert).

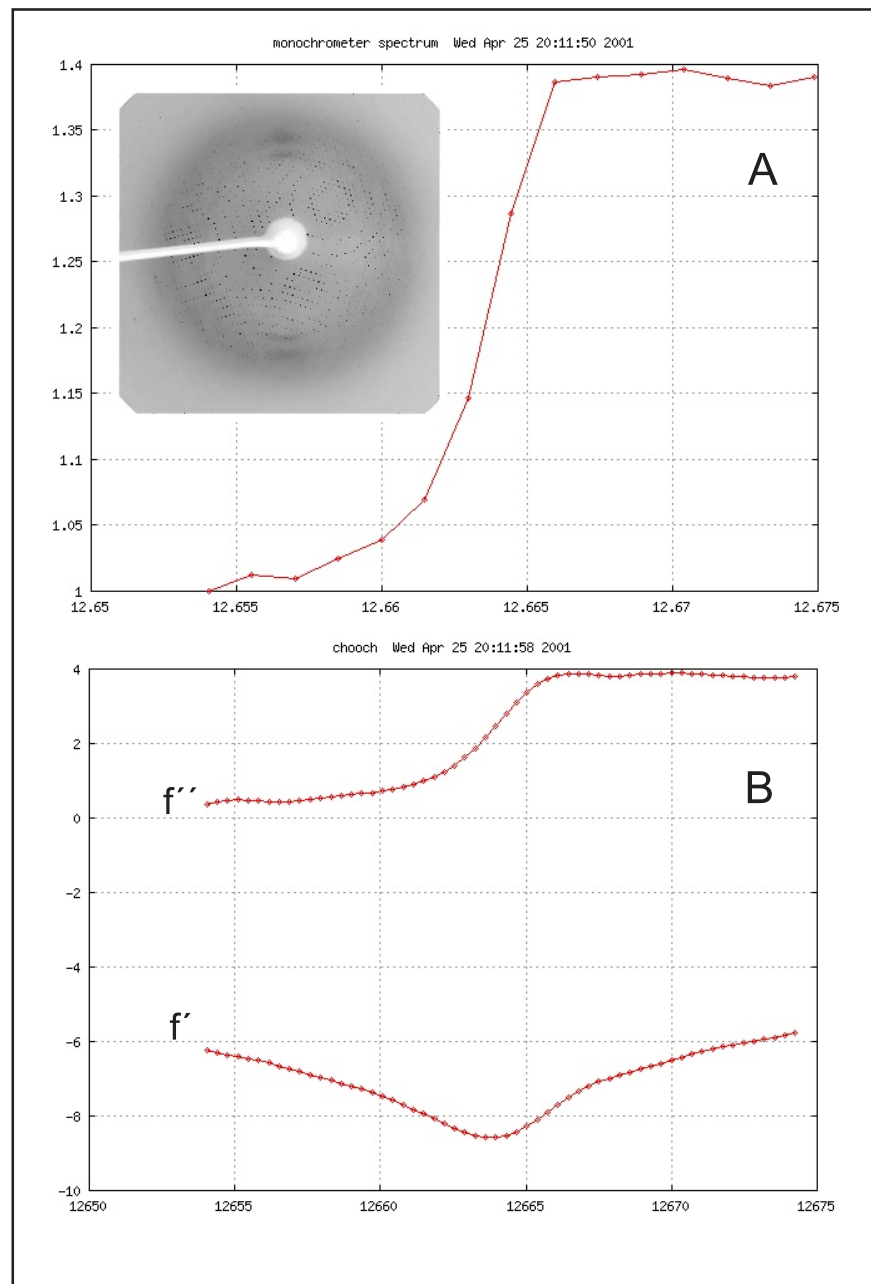


Abbildung 12: MAD-Experiment unter Verwendung eines Kristalls der in *M. marburgensis* SeMet-markierten metallfreien Hydrogenase, durchgeführt an der Synchrotron-Station X12C (Brookhaven). Das Insert in Abbildung A zeigt ein Oszillationsbild des verwendeten Kristalls der apparenten Raumgruppe $P622$ ($\lambda=0.979$ Å, $d=125$ mm, $\Delta\phi=0.5^\circ$, $t = 120$ Sekunden, Brandeis B1 CCD-Detektor). Aus dem Röntgenfluoreszenzspektrum (A) wurden mittels CHOOCH [85] die Röntgenenergien und f'' , f' für das Absorptionsmaximum (12.670 keV, $f'' = 3.9$) bzw. den Wendepunkt (12.664 keV, $f' = -8.6$) bestimmt (B).

3.1.8 Merohedrale Zwillingsbildung

Nachdem die Strukturbestimmung trotz der Verfügbarkeit von Se-MAD-Daten von ausgezeichneter Qualität nicht gelang, lag der Verdacht nahe, daß ein prinzipielles kristallographisches Problem bestand.

Ein hierdurch motivierter Zwillings-Test, basierend auf dem Stanley-Faktor $\langle I^2 \rangle / \langle I \rangle^2$, erbrachte den eindeutigen Nachweis, daß die apparente Raumgruppe $P622$, die in nahezu allen Fällen beobachtet wurde, durch perfekte merohedrale Zwillingsbildung nach $(-h -k l)$ zustande kommt. Die in einigen Fällen beobachtete Raumgruppe $P321$ stellt die wahre Symmetrie der Kristalle dar. Die meisten dieser Kristalle unterscheiden sich in der Morphologie nicht von den perfekten Zwillingen und stellen partielle Zwillinge mit hohem Zwillingsanteil dar.

Im Rahmen der Versuche zur Strukturlösung wurden schätzungsweise 10^4 – 10^5 Kristalle visuell inspiziert. Diese besaßen ausnahmslos die in Abb. 10 A–C gezeigte sechseckige Morphologie. Zudem wurden Diffraktionsdaten von mehreren hundert Kristallen gemessen, die sich in der ganz überwiegenden Zahl der Fälle als perfekte Zwillinge, zumindest aber als partielle Zwillinge mit hohem Zwillingsanteil herausstellten¹³.

Gegen Ende der Arbeiten wurde in den Ansätzen von SeMet-markierter Hmd in einem einzigen Tropfen eine abweichende Kristallmorphologie gefunden (Abb. 10 D–F). Insgesamt konnten 10 sehr kleine Kristalle (max. Dimension 40–80 μm) für kristallographische Zwecke gewonnen werden. Die Kristallisationsbedingung in diesem Ansatz entsprach exakt der am häufigsten verwendeten Bedingung.

Größere Kristalle im selben Tropfen, Kristalle in den benachbarten Tropfen in demselben Ansatz und alle Kristalle in benachbarten Ansätzen besaßen die übliche Zwillingsmorphologie.

Zwei der Kristalle wurden an der Station ID29 (ESRF) in Form eines SAD-Experimentes an der Se-Kante gemessen (Datensätze 9 und 10 in Tabelle 5). Bemerkenswerterweise besaßen beide Kristalle die Raumgruppe $P321$, eine Zwillingsbildung war nicht nachweisbar. Damit stellen diese Kristalle die einzigen jemals beobachteten Einkristalle des Enzyms aus *M. marburgensis* dar.

Interessanterweise liegt hier also ein Fall vor, bei dem „reine“ Einkristalle neben perfekten Zwillingen beobachtet werden konnten. Die Kristallmorphologie (im Querschnitt dreizählige Symmetrie der Einkristalle, sechszählige Symmetrie der Zwillinge) vermittelt eine intuitive Vorstellung davon, wie das Zwillingsgesetz zur Anwendung kommt. Solche Erscheinungen sind bei Kristallen anorganischer Substanzen gut bekannt, für Proteinkristalle wurde ein derartiges Phänomen nach Kenntnis des Verfassers noch nie beschrieben.

Versuche zur Bestimmung der Se-Substruktur mit *SnB* und SHELXD verliefen erfolglos. Das ist allerdings nicht überraschend, weil aufgrund der schwachen Beugung der

¹³Die exakte Bestimmung des Zwillingsanteils ist zumindest bei niedrig aufgelösten Daten aus statistischen Gründen kaum möglich.

winzigen Kristalle die Meßfehler größer sind als die zu erwartenden anomalen Differenzen.

3.1.9 Strukturlösung durch Molekularen Ersatz

Aus der Raumgruppe der Kristalle ($P321$) und den Zelldimensionen konnte nach der Strukturaufklärung des Enzyms aus *M. kandleri* mit großer Sicherheit vom Vorliegen eines Dimers in der asymmetrischen Einheit ausgegangen werden.

Unter Verwendung von Daten eines der unverzwilligten Kristalle (Datensatz 10 in Tabelle 5) und dem Modell eines Dimers vom Enzym aus *M. kandleri* als Suchmodell wurde mit dem Programm EPMR [86] ebenso wie bei Verwendung von (in der wahren Raumgruppe prozessierten) verzwilligten Daten zunächst keine Lösung erhalten.

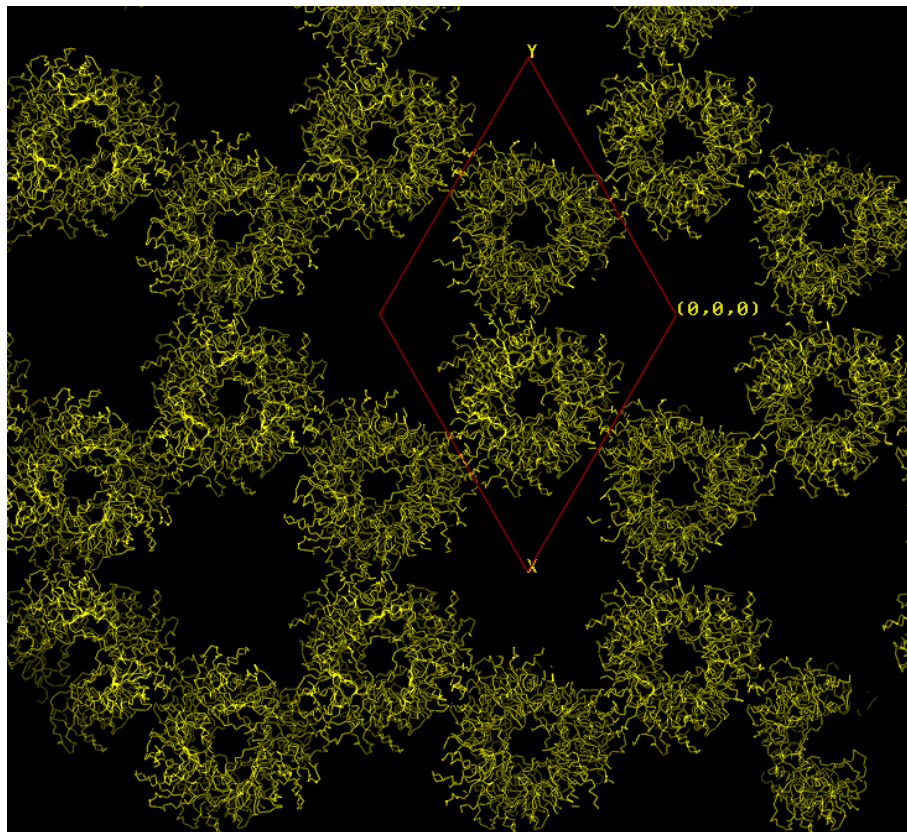


Abbildung 13: Kristallpackung der metallfreien Hydrogenase aus *M. marburgensis* in der Raumgruppe $P321$; Blick in z -Richtung. Gut erkennbar sind die „riesigen“ Kanäle, die sich in dieser Richtung durch das Gitter ziehen.

Erst bei Verwendung eines mit dem Programm MOLEMAN aus dem Dimer abgeleiteten poly-Ala-Modells und bei Begrenzung der Auflösung auf 5.0 Å konnte mit den

unverzwillingten Daten eine Lösung erhalten werden (R-Faktor 0.57 , Korrelationskoeffizient 0.44), die eine sinnvolle Packung in $P321$ ergab, wie eine Inspektion mit dem Programm O ergab (Abb. 13).

Aufgrund der flexiblen Verbindung der beiden Domänen wurde vermutet, daß sich die Struktur des Holoproteins aus *M. marburgensis* möglicherweise durch eine ausgeprägte Domänenbewegung von der des Apoproteins aus *M. kandleri* unterscheiden könnte (allerdings kann die Domänenbewegung nicht so groß sein, daß sich der hydrodynamische Radius des Dimers signifikant ändert, weil sich Apo- und Holoprotein in der analytischen Gelfiltration nicht unterscheiden lassen [54]).

Daher wurden die $2 \cdot 2$ Domänen des Dimers anschließend mit dem Software-Paket CNS als individuelle *Rigid bodies* gegen die unverzwillingten Daten bei einer Auflösung von 3.5 Å verfeinert, zunächst immer noch unter Verwendung des poly-Ala-Modells. Tatsächlich führten die Domänen im Verlauf der Verfeinerung eine deutlich sichtbare Bewegung hin zu einer etwas kompakteren Anordnung durch, die nach einigen hundert Verfeinerungszyklen konvergierte (Abb. 14).

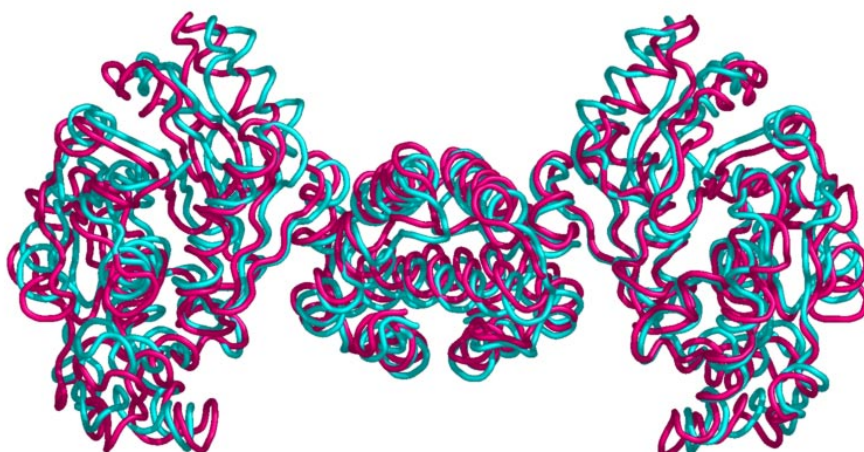


Abbildung 14: Domänenanordnung für Hmd aus *M. kandleri* (kHmd; grün) und *M. marburgensis* (tHmd; rot); das Modell für *M. marburgensis* wurde durch *Rigid-Body-Verfeinerung* und *Simulated Annealing* des kHmd-Dimers gegen die unverzwillingten tHmd-Daten erhalten (Darstellung und Raytracing mit dem Programm PyMol erzeugt).

Das vollständige Modell des Enzymdimers aus *M. kandleri*, mit dem der Molekulare Ersatz zunächst nicht möglich war, wurde nun mit dem Programm O auf das poly-Ala-Modell positioniert und in gleicher Weise verfeinert. Hierbei zeigte sich das gleiche Verhalten. Anschließend wurde das Modell zur weiteren Verbesserung einem *Simulated Annealing* in CNS unterzogen.

Das so gewonnene Modell wurde unter Verwendung von MOLEMAN einer zufälligen

Rotation/Translation unterzogen und dann als Suchmodell für die weiteren Versuche zum Molekularen Ersatz verwendet.

Hiermit konnte nicht nur für die unverzwilligten Daten eine noch bessere Lösung erhalten werden (R-Faktor 0.52, Korrelationskoeffizient 0.48), sondern auch für Daten eines perfekten Zwillings (Datensatz 6 in Tabelle 5 in P321), wobei hier Lösungen für beide Zwillingsdomänen – also beide Einkristallgitter, die zum Aufbau des Zwillings beitragen – gefunden wurden.

Bei Verwendung des besten „nativen“ Datensatzes (Nr. 8 in Tabelle 1) von einem Hg-behandelten Zwillings der apparenten Raumgruppe *P6* ist von zwei kristallographisch unabhängigen Dimeren in jeder Zwillingsdomäne auszugehen. Eine erste Dimerposition konnte wie oben beschrieben gefunden werden; die Suche nach einem zweiten Dimer erbrachte aber nur eine Position in der anderen Zwillingsdomäne. Daher wurde das zweite Dimer hier basierend auf den zusätzlichen in der Raumgruppe *P321* vorhandenen Symmetrieelementen positioniert.

3.1.10 Kristallographische Verfeinerung

Das Modell wurde in einer ersten Verfeinerungsrunde einer *Rigid-Body*-Verfeinerung und einem *Simulated Annealing* gegen die unverzwilligten Daten (Datensatz 9 in Tabelle 5) bei einer Auflösung von 3.0 Å unterzogen; dabei wurde das Programm CNS [87] verwendet. Sowohl der kristallographische als auch der freie R-Wert sanken dabei auf 41.0 bzw. 48.0 %.

Diese Zahlen erscheinen außerordentlich hoch, und unter gewöhnlichen Umständen könnte man an der Richtigkeit der MR-Lösung zweifeln. Allerdings ist der aus einem Wilson-Plot bestimmte durchschnittliche B-Faktor für diesen Datensatz mit 80 Å² fast ebenso hoch wie im Falle des Apoproteins aus *M. kandleri* (85 Å²), siehe 4.4.

Die nach dieser Verfeinerungsrunde berechnete $2F_o - F_c$ -Elektronendichtekarte zeigt eine klar zusammenhängende Elektronendichte und deutliche Beiträge der experimentellen Daten, wie Unterschiede im Hauptkettenverlauf bei einigen Loops zeigen. Die Identifizierung einzelner Seitenketten ist bei der begrenzten Auflösung und dem hohen Maß an Sequenzidentität zwischen beiden Enzymen allerdings sehr schwierig. Trotzdem sollte ausgehend von diesen Arbeiten ein Bau der korrekten Aminosäuresequenz in die Elektronendichte möglich sein.

Bisher konnte in der Elektronendichte kein Hinweis auf die Anwesenheit des Cofaktors gefunden werden.

Im Falle der verzwilligten Datensätze (mit den tatsächlichen Raumgruppen *P321* bei 2.9 Å und *P3* bei 2.3 Å) wurde eine Verfeinerung zunächst mit den Zwillingsmodulen von CNS [87] versucht. Der Zwillingsanteil wurde in beiden Fällen mit CNS zu $\alpha \approx 0.44$ bestimmt, was erneut auf das Vorliegen nahezu perfekter Zwillinge hindeutet.

In der anschließenden *Simulated-Annealing*-Verfeinerung mit dem *twin-lsq*-Protokoll waren die Werte von R und R_{free} zunächst besser als für die unverzwilligten Daten in einem Bereich von 35–38%. Im Laufe der Verfeinerung sank der R-Faktor bis auf etwa

25% (18–20% im Bereich niedriger Auflösung) ohne daß die Aminosäuresequenz des Modells korrigiert worden wäre, dagegen stieg der R_{free} auf über 40%. Die anschließend berechnete $2F_o - F_c$ -Karte zeigte keine zusammenhängende Elektronendichte.

Vermutlich ist CNS nicht in der Lage, ein Modell gegen Daten eines nahezu perfekten Zwillings zu verfeinern, weil die intern durchgeführte „Entzwilligung“ der Daten zu nahezu unendlich großen Fehlern bei den korrigierten Strukturfaktoramplituden führt.

Weitere Verfeinerungsversuche sollten daher mit dem Programm SHELXL [88] durchgeführt werden, das mit einem anderen mathematischen Ansatz direkt gegen verzwilligte Daten verfeinern kann, auch wenn der Zwillingsanteil genau 0.5 beträgt.

3.2 Das Enzym aus *Methanococcus jannaschii*

3.2.1 Expression und SeMet-Markierung

Die Expression des unmarkierten Proteins aus *M. jannaschii* (jHmd) und die SeMet-Inkorporation erfolgte unter den für Hmd aus *M. kandleri* (kHmd) optimierten Bedingungen. Lediglich der Induktionszeitpunkt wurde früher gewählt, da im Gegensatz zur Situation bei kHmd die Wachstumskurve des Expressionsstammes durch die Proteinexpression nicht wesentlich verändert wurde. So konnte auch bei einem frühen Induktionszeitpunkt eine hohe Zelldichte und damit eine optimale Proteinausbeute erreicht werden. Die experimentellen Details finden sich unter 5.2.3, 5.2.4.

3.2.2 Proteinreinigung

Die Aufreinigung der rekombinant hergestellten jHmd erfolgte ganz analog zur kHmd: Nach einem Hitzefällungsschritt, der den überwiegenden Teil der Proteine des mesophilen Wirtsorganismus entfernt, erfolgt eine Adsorption an eine hydrophobe Interaktions-Säule zum Auswaschen der Nukleinsäuren. Für den letzten Reinigungsschritt wurde ein Anionenaustauscher gewählt. Die Einzelheiten des Reinigungsprotokolls finden sich in 5.4.8. Gegenüber der Reinigung ist lediglich der Gradient zur Elution des Proteins vom Anionenaustauscher verschieden gewählt.

Im Fall der jHmd wurden für das unmarkierte Protein eine Ausbeute von 50 mg, im Falle des SeMet-markierten Proteins eine Ausbeute von 15 mg je Liter Kultur erhalten. In Abb. 15 A ist beispielhaft die Aufreinigung am Beispiel des SeMet-markierten Proteins gezeigt.

In der analytischen Gelfiltration (Abb. 15 B) wurden für jHmd immer zwei Spezies gefunden, von denen die kleinere stark dominiert. Die größere Spezies besitzt etwa die doppelte apparente Größe der kleineren und stellt höchstwahrscheinlich einen höheren Oligomerzustand dar. Vermutlich handelt es sich bei der dominierenden Form um das Dimer, bei der höhermolekularen Form um das Tetramer.

Die Erhöhung des Oligomerisierungsgrades ist eine häufig beobachtete Strategie thermostabiler Proteine, sich an die extremen Umgebungsbedingungen anzupassen [89, 90].

Dies wurde etwa im Fall der Formyltransferase von *M. kandleri* ausführlich untersucht [18, 91, 92].

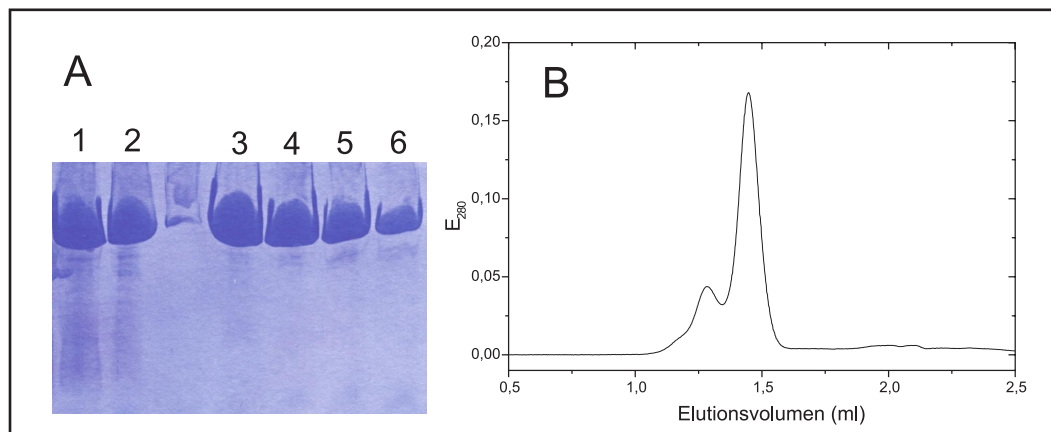


Abbildung 15: Reinigung des in *E. coli* produzierten, SeMet-markierten Enzyms aus *M. jannaschii*. A: SDS-PAGE; Spur 1: Hitzefällungsüberstand, 2: Eluat der hydrophoben Interaktionschromatographie, 3-6: Fraktionen der Anionenaustauschers (Resource Q). B: Analytische Gelfiltration (Superdex 200, 50 mM MOPS/KOH pH 7.0, 150 mM NaCl, 12° C). Das Protein eluiert in zwei Maxima bei etwa 90 und 180 kDa, die dem Dimer und Tetramer entsprechen.

3.2.3 Kristallisation und Datensammlung

Da Expression und Reinigung des Apoproteins von *M. jannaschii* größere Mengen an homogenem Material lieferte, als für die anderen Proteinspezies verfügbar waren, wurde hier besonders intensiv nach Kristallisationsbedingungen gesucht (s. 5.5.1). Trotz dieser intensiven Bemühungen konnten nur einige wenige Mikrokristalle mit Ammoniumsulfat als Fällungsmittel erhalten werden, die zudem nicht reproduziert werden konnten (Abb. 16 A). Zusätzlich wurden bei einer weiteren Bedingung kristalline Aggregate erhalten (Abb. 16 B).

Überraschenderweise zeigten die Kristalle trotz winziger Dimensionen gute Beugungseigenschaften, wie in einem Experiment an dem Mikrofokus-Meßplatz ID13 (ES-RF) festgestellt wurde (Abb. 16 C). Die Beugungsgrenze der besten Kristalle lag bei etwa 2 Å, wobei die Kristallabmessungen nur etwa 20 μm betragen. Zudem verlief die Beugungsgrenze nicht abrupt wie bei den anderen in dieser Arbeit diskutierten Hmd-Kristallspezies, so daß größere Kristalle dieser Form durchaus bis zu atomarer Auflösung beugen dürften.

Aufgrund der extrem kleinen Kristallabmessungen und des enormen Strahlungsschadens im hochfokussierten Strahl konnte kein Datensatz bis zu hoher Auflösung gemessen werden. Einen Überblick über die gemessenen Daten gibt Tabelle 7.

Tabelle 6: Kristallisationsbedingungen für das Fragment der metallfreien Hydrogenase aus *M. jannaschii*

Parameter	Bedingung
Temperatur	18° C
Reservoirlösung	1.8–2.0 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 100 mM Cacodylat/HCl pH 6.0
Proteinkonzentration	20–40 mg/ml
Protein:Reservoir	1:1
Tropfenvolumen	2–4 µl

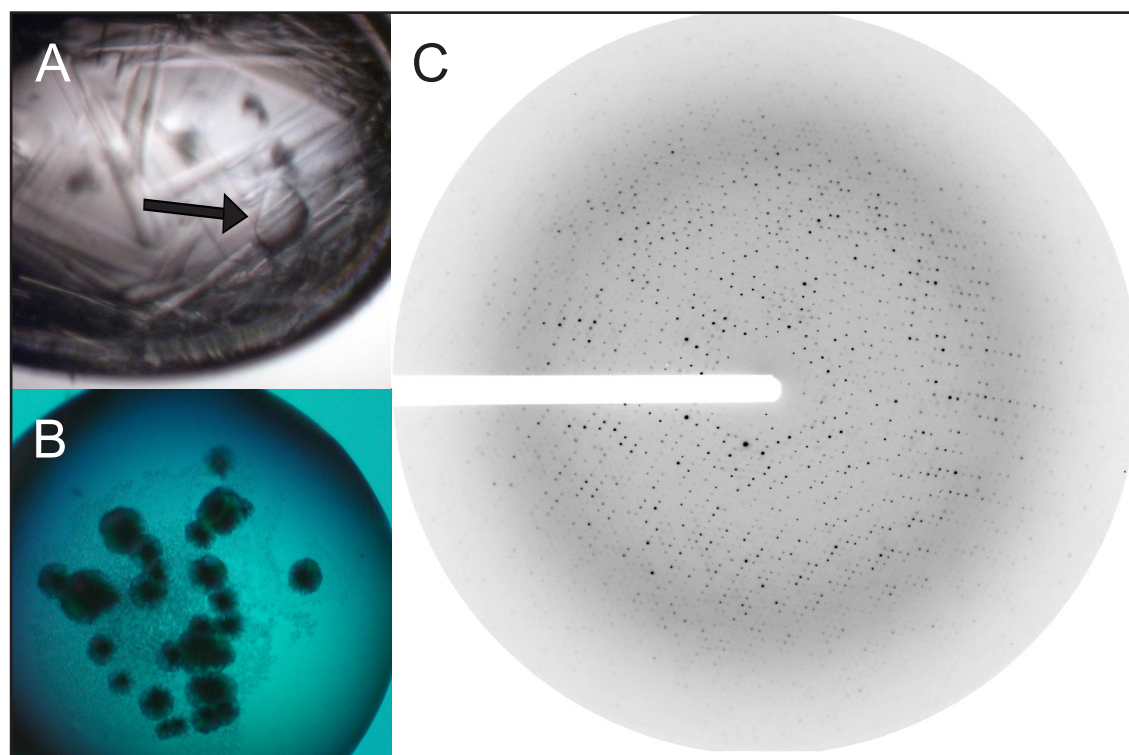


Abbildung 16: A: Mikrokristall des in *E. coli* produzierten Enzyms aus *M. jannaschii*, für Synchrotronmessung montiert. Der Kristall ist etwa 20 µm groß. B: Sphärolithe, die bei einer anderen Kristallisationsbedingung erhalten wurden (0.1 M Imidazol-Malat, 2.15 M Ammoniumsulfat, 0.18% β-Octylglucosid, pH 5.5). C: Beugungsbild eines der Mikrokristalle wie in A gezeigt an der Microfokus-Station ID 13, ESRF. Der Abstand Kristall-Detektor (MarCCD) beträgt 150 mm. Die Diffraktion reicht bis zum Rand des Detektors, entsprechend 2.3 Å. Abbildung mit dem Programm FIT2D erstellt.

Tabelle 7: Datensätze, die an den Mikrokristallen des heterolog produzierten Enzyms aus *M. jannaschii* gemessen wurden. Für weitere Erläuterungen s. Tabelle 1

Nr.	ID	Quelle	$\lambda/\text{\AA}$	Raumgr.	Zelle a/b, c (\AA)	Auflösung (\star)/ \AA	Vollst. (\star)/%	R_{merge} (\star)/%	$I/\sigma(I)$ (\star)	Red. (\star)
1	jhmd3	ID13	0.957	$I4$ oder $I4_1$	127.78, 170.98	50.0-2.8 (2.85-2.80)	81.8 (84.6)	8.5 (30.8)	5.82 (1.51)	1.74 (1.66)
2	no_2_set	ID29	0.9791	$I422$ oder $I4_122^{14}$	128.49, 171.64	50.0-2.74 (2.77-2.74)	85.7 (87.8)	8.1 (38.8)	8.32 (1.65)	2.45 (2.18)

Da die beschriebenen Kristalle trotz intensiver Bemühungen nicht reproduziert werden konnten, wurde das vorhandene Material einer intensiveren Untersuchung unterzogen. Zunächst wurde das im Kristallisationsüberstand der betreffenden Ansätze vorhandene Protein untersucht. Wie eine SDS-PAGE zeigte, lag dieses als Vollängenprotein vor. In der analytischen Ultrafiltration erwies es sich als in hohem Maße aggregiert.

Diese Befunde weisen auf ausgeprägt hydrophobe Eigenschaften des Proteins hin. Für weitere Kristallisationsversuche könnte der Zusatz von Detergentien hilfreich sein. Die bereits erhaltenen kristallinen Aggregate in Gegenwart von β -Octylglucosid unterstützen diese Überlegung.

3.2.4 Massenspektrometrie

Die gewaschenen Mikrokristalle selbst wurden in Kooperation mit Ralf Krüger (Universität Frankfurt) einer massenspektrometrischen Untersuchung unterzogen.

Dabei stellte sich heraus, daß das kristallisierte Protein eine Masse von lediglich 19.4 kDa besitzt (Abb. 17), was etwa der halben Masse des Vollängenproteins entspricht.

Aufgrund der Reinheit der für die Kristallisation verwendeten Proteinprobe und der beobachteten Menge an Mikrokristallen kann mit großer Sicherheit ausgeschlossen werden, daß es sich bei diesen um ein kontaminierendes Fremdprotein handelt. Demnach stellt es offenbar ein proteolytisch erhaltenes Fragment dar.

Die geringe vorhandene Probenmenge und -qualität schloß die Ansequenzierung mittels *Spray sequencing* (ESI-MS/MS) aus.

¹⁴apparente Punktgruppe 422 durch perfekte merohedrale Zwillingsbildung

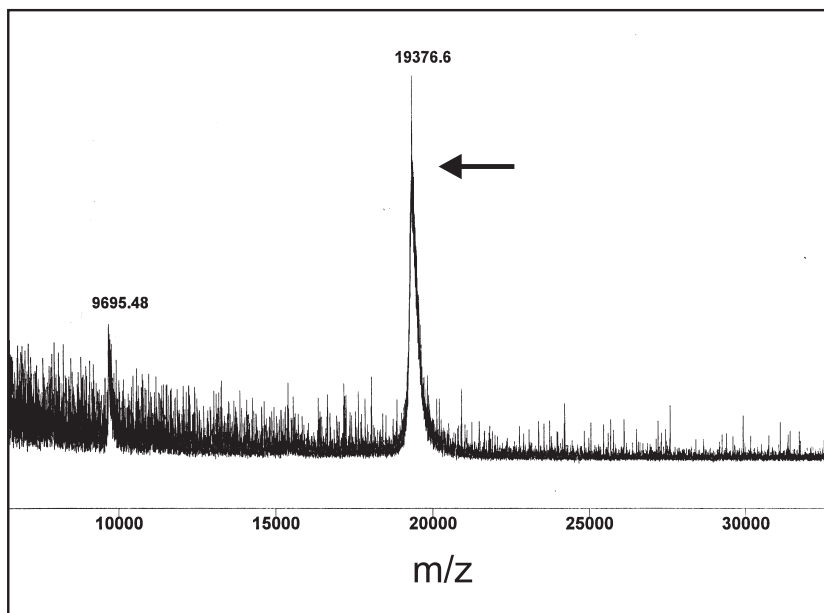


Abbildung 17: Massenspektrum eines der Mikrokristalle, die für das heterolog produzierte Enzym aus *M. jannaschii* erhalten wurden. Die experimentell bestimmte Masse von 19.4 kDa ist nur etwa halb so groß wie für das Vollängenprotein erwartet. Als Matrix wurde Dihydroxy-Benzoessäure verwendet.

3.2.5 Ein weiterer Fall von merohedralem Zwillingsbildung

Die ersten Datensätze, die an der Mikrofokus-Station ID13 (ESRF) gesammelt wurden, wurden in der tetragonalen Raumgruppe *I4* prozessiert (Tabelle 7).

Ein weiterer, besserer Datensatz, der später an einem geringfügig größeren Kristall an dem Meßplatz ID29 (ESRF) gesammelt wurde, konnte in der höher symmetrischen Raumgruppe *I422* prozessiert werden (Tabelle 7). Daraufhin wurden die älteren Daten noch einmal reevaluiert. Tatsächlich lassen sich diese Daten nur in *I4* prozessieren.

Ausgehend von der massenspektrometrisch bestimmten molekularen Masse für ein Proteinmolekül bzw. Dimer von 19400 Da und den Zelldimensionen von 128 Å (*a, b*) und 171 Å (*c*) könnten in der Raumgruppe *I4* ($z = 8$) zwischen $n = 4$ ($V_M = 4.5$ Å³/Da, Lösungsmittelgehalt $\sim 73\%$) und $n = 8$ ($V_M = 2.3$ Å³/Da, Lösungsmittelgehalt $\sim 46\%$) Moleküle in der asymmetrischen Einheit vorliegen. Dabei sprechen die guten Beugungseigenschaften eher für eine relativ dichte Packung.

Die Zellkonstanten für beide Raumgruppen sind die gleichen. Merohedrale Zwillingsbildung ist im tetragonalen System bekannt. Die apparente Punktgruppe 422 könnte aus der Punktgruppe 4 durch perfekte merohedrale Zwillingsbildung nach (k, h, -l) vorgetauscht werden. Ein Zwillings-Test basierend auf dem Stanley-Faktor bestätigte diesen Verdacht und zeigte eindeutig die Anwesenheit von perfekter merohedralem Zwillingsbildung ($\langle I^2 \rangle / \langle I \rangle^2$ ist 1.54 ± 0.08 über 40 Auflösungsschalen von 50.0–2.8 Å).

3.2.6 Versuche zur Strukturlösung mit Molekularem Ersatz

Ausgehend von der Struktur der Hmd aus *M. kandleri* lag der Verdacht nahe, daß die Proteolyse an der gut zugänglichen Verbindung zwischen der N- und der C-terminalen Domäne ansetzt. Die experimentell beobachtete Masse ist mit keiner für eine der beiden Domänen allein erwarteten Massen kompatibel. Allerdings stimmt sie gut mit der Masse überein, die man für das Dimer aus zwei C-terminalen Domänen erwarten würde.

Folglich wurde dieses Dimer als Suchmodell für Versuche zum Molekularen Ersatz verwendet, die in den beiden nach den vorliegenden Informationen möglichen Raumgruppen $I4$ oder $I4_1$ unter Verwendung der unverzwilligten Daten durchgeführt wurden.

Auf diese Weise gelang es nicht, eine Lösung zu finden. Eine mögliche Strukturlösung wird aber auch durch die große erwartete Zahl von Molekülen in der asymmetrischen Einheit außerordentlich erschwert. Im Falle der verzwilligten Daten kommen die dem jeweiligen Zwillingsgitter zugeordneten Moleküle hinzu. Berücksichtigt man außerdem, daß das proteolytische Fragment nicht genau bekannt ist, dürfte sich die Struktur des kristallisierten Fragmentes durch Molekularen Ersatz kaum bestimmen lassen.

3.3 Das Enzym aus *Methanopyrus kandleri*

3.3.1 Konstruktion von Hexahistidin-Fusionen

Für die erleichterte Aufreinigung des rekombinanten Proteins wurden im Falle der Hmd von *M. kandleri* (kHmd) zwei Varianten mit N- bzw. C-terminaler Hexahistidin-Fusion mittels Einschritt-PCR-Insertion erzeugt.

Die verwendeten Oligodesoxynukleotid-Primer sind mit ihren wichtigsten Konstruktionsmerkmalen unter 5.1.6 aufgelistet.

Das Konzept bestand darin, ausgehend von dem im Plasmid pHmd2 (s. Tabelle 12) vorhandenen *hmd*-Gen durch PCR modifizierte Genabschnitte zu synthetisieren, die für den N- oder den C-terminalen Bereich mit jeweils einer Hexahistidin-Fusion kodieren.

Für die anschließende Rekombination wurden die Schnittstellen *NdeI/XhoI* für den N-Terminus und *SacI/BamHI* für den C-Terminus verwendet.

Nach der Amplifizierung unter Verwendung von *Taq*-Polymerase (Promega) wurden die erhaltenen Produkte zunächst unter Verwendung eines T/A-Klonierungssystems (Stratagene) in den *blunt end*-Klonierungsvektor pCR 2.1 kloniert. Mit diesem Vektor wurde *E. coli*-Stamm XL1 Blue (Stratagene) transformiert und die Klone über Blau/Weiß-Selektion auf LB/Kan/X-Gal/IPTG-Platten identifiziert. Nach Plasmidisolation und Restriktion der modifizierten Vektoren und des ursprünglichen Plasmids pHmd wurden die Fragmente in der gewünschten Weise rekombiniert und ergaben so die beiden Konstrukte pHmd2NHis und pHmd2CHis. Alle Konstrukte wurden durch DNA-Sequenzierung auf die korrekte Sequenz überprüft.

3.3.2 Expression und SeMet-Markierung

Für die Expression des kHmd-Apoenzym in *E. coli* wurden verschiedene Stämme (HMS-174(DE3), BL21(DE3) und B834(DE3)), Medien (LB-, TB- und TP-Medium) und Expressionsbedingungen (bezüglich Temperatur, Induktionszeitpunkt und – durch Verwendung normaler oder Schikanekolben – Belüftung) erprobt. Die größte Menge an löslichem Protein konnte bei Verwendung von TP-Medium [93], Anzucht im Schikanekolben, einer Temperatur von 37° C und später Induktion ($OD_{600}=1.2-1.3$) mit dem methioninautotrophen Stamm B834(DE3)/pLysS erhalten werden, der auch zur SeMet-Markierung verwendet wurde. Die Expression war mit diesem Stamm besser als bei Verwendung der Expressionsstämme BL21(DE3) und HMS174(DE3), wie es bereits für andere Proteine beschrieben wurde [94]. Die Skalierung zu größeren Kulturvolumina verlief nicht sehr erfolgreich, so daß mit einem maximalen Kulturvolumen von 400 ml in 2 l-Schikanekolben gearbeitet wurde.

Während die Expression des unmarkierten und des C-terminal Histidin-markierten Proteins genügend Material für die Reinigung und Kristallisation lieferte, wurde das mit einer N-terminalen Histidin-Fusion versehene Protein nur in geringem Maße exprimiert.

Für die Markierung mit SeMet muß ein synthetisches Medium verwendet werden. Auch hier wurden verschiedene synthetische Minimal- und Vollmedien verwendet. Die besten Ergebnisse hinsichtlich Zelldichte und der Menge des exprimierten Proteins wurden mit dem ursprünglich zur Isotopenmarkierung für heteronukleare NMR-Spektroskopie entwickelten LeMaster-Medium [95] in einer leicht modifizierten Form erhalten.

Die Inkorporation von SeMet wurde qualitativ mittels TXRF¹⁵-Spektroskopie und halbquantitativ durch den Massenunterschied in der MALDI-TOF-MS nachgewiesen. Die MALDI-Experimente wurden von Jörg Kahnt (MPI Marburg) durchgeführt und ergaben eine Inkorporationseffizienz von etwa 90%.

3.3.3 Proteinreinigung

Das Gel in Abb. 18 A zeigt das Ergebnis einer Aufreinigung der kHmd mit einer C-terminalen Hexahistidinfusion im Mikromaßstab. Hierbei wurde Zellextrakt aus einer 3 ml-Expressionskultur präpariert und im 1.5ml-Reaktionsgefäß zunächst einer Hitzefällung und dann einer Reinigung mit einer geringen Menge Ni-NTA-Agarose im Batch-Verfahren unterzogen.

Dieses Experiment zeigt, daß das mit der Hexahistidin-Fusion versehene Protein thermostabil ist (bezugnehmend auf die Löslichkeit, da die Aktivität als Kriterium nicht zur Verfügung steht).

Für die Präparation des Proteins in größerem Maßstab wurde auf den Hitzefällungsschritt verzichtet, um eine möglichst schonende Reinigung zu gewährleisten. Da die Bindung an Ni-NTA-Agarose vergleichsweise niedrigaffin war (Elution in Gegenwart von

¹⁵ Total Reflection X-ray Fluorescence

60 mM Imidazol), war als weiterer chromatographischer Schritt ein Anionenaustauscher erforderlich. Das Reinigungsprotokoll ist in 5.4.7 wiedergegeben.

Das in dieser Weise gereinigte Protein ist in Abb. 18 in einem analytischen Gelfiltrationslauf gezeigt. Trotz der großen Reinheit und der Abwesenheit hochmolekularer Aggregate gelang es nicht, das C-terminal Histidin-markierte Protein zu kristallisieren.

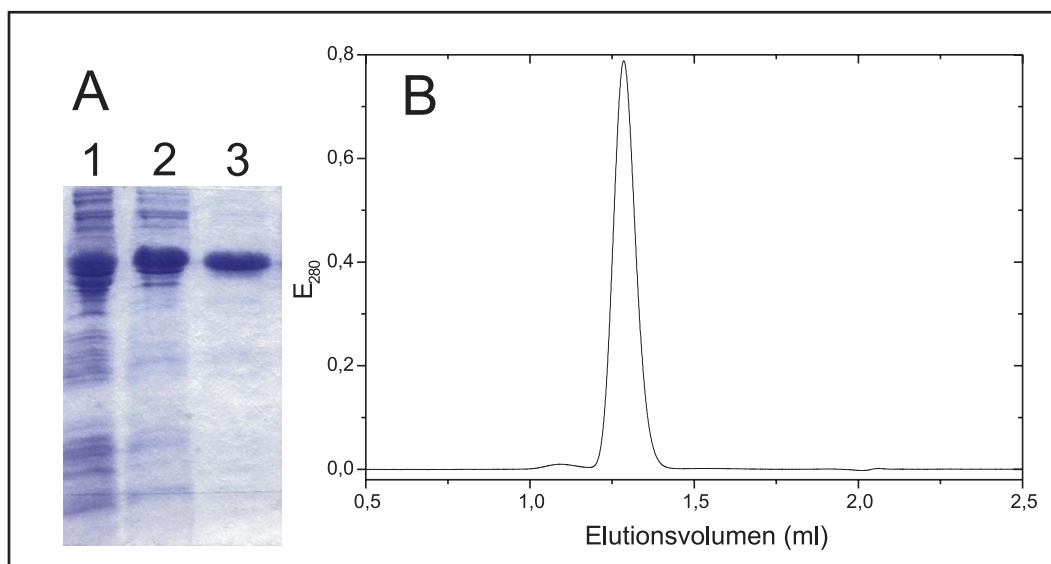


Abbildung 18: Reinigung der in *E. coli* heterolog exprimierten metallfreien Hydrogenase aus *M. kandleri* über die C-terminale Hexahistidin-Fusion. A: SDS-PAGE (Spur 1: Zellextrakt, 2: Hitzefällungsüberstand, 3: Eluat von Ni-NTA-Agarose, im Batchverfahren erhalten). B: Gelfiltrationsprofil des gereinigten Enzyms (Superose 12, 50 mM MOPS/KOH pH 7,0, 300 mM NaCl, 12° C).

Daraus ergab sich die Notwendigkeit, für das Protein ohne Hexahistidin-Fusion eine effiziente Reinigungsprozedur zu entwickeln. Die Hitzefällung stellt einen sehr effizienten Schritt dar, um den größten Teil der Proteine des Expressionswirtes zu entfernen. Zugleich führt sie aber zu einer Anreicherung der Nukleinsäuren.

Nachdem verschiedene Versuche zur schnellen und quantitativen Entfernung der Nukleinsäuren erfolglos blieben, erwies sich die hydrophobe Interaktionschromatographie als ideale Methode.

Unter geeigneten Bedingungen kann kHmd an eine Phenyl-Sepharose adsorbiert werden; die Nukleinsäuren binden dagegen nicht an diese Matrix und können so aus der Probe fast vollständig entfernt werden. Es folgt ein weiterer chromatographischer Schritt auf einem Anionenaustauscher. Die experimentellen Details sind in 5.4.8 beschrieben.

Bei der Auswahl der verwendeten Säulen wurde Wert darauf gelegt, daß sich diese für sehr hohe volumetrische Flußraten eignen. Damit ist die Reinigung großer Mengen an Protein in wenigen Stunden möglich. Dabei ist das Protokoll effizient genug, um hochreines Protein auch aus nur schwach exprimierenden Zellen zu gewinnen (Abb. 19

A). Geringe Kontaminationen mit hochmolekularen Nucleinsäuren können leicht in einer anschließenden Größenausschlußchromatographie entfernt werden (Abb. 19 B).

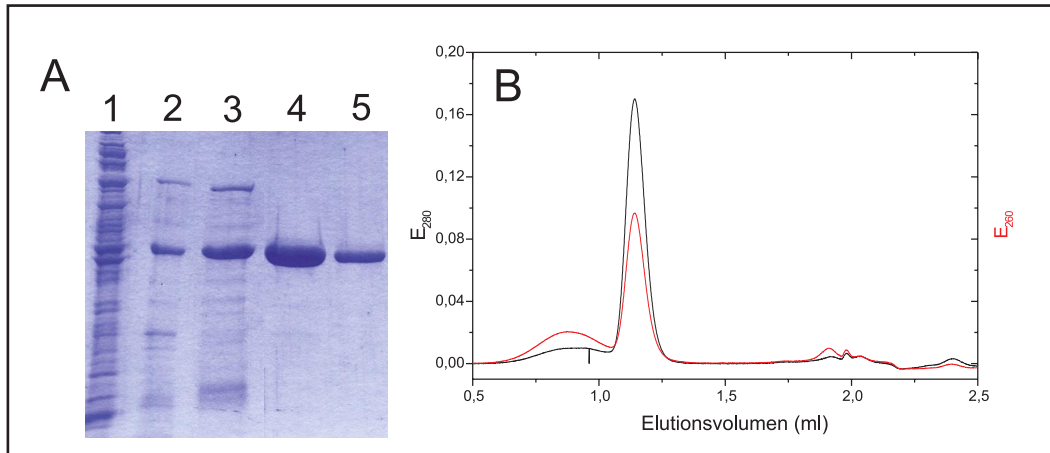


Abbildung 19: Reinigung des Enzyms von *M. kandleri* aus schwach überexprimierenden *E. coli*-Zellen mittels Hitzefällung, hydrophober Interaktions- und Anionenaustausch-Chromatographie. A: SDS-PAGE (Spur 1: Zellextrakt, 2: Hitzefällungsüberstand, 3: Eluat der Phenyl-Sepharose, 4+5: Fraktionen aus Mono Q). B: Gelfiltration des gereinigten Proteins zum Entfernen von Spuren an Nucleinsäuren (Superose 12, 50 mM MOPS/KOH pH 7.0, 300 mM NaCl 12° C).

3.3.4 Optimierte Kristallisation

Erste Kristalle des Enzyms aus *M. kandleri* wurden von Dr. Seigo Shima erhalten. Diese gehören der Raumgruppe $P2_1$ ($z = 2$) an, bei typischen Zelldimensionen von $a = 87.5$, $b = 57$ und $c = 167.5$ Å mit $\beta = 101^\circ$. Diese Zellparameter sind kompatibel mit dem Vorliegen von $n = 2$ ($V_M = 5.25$ Å³/Da, Lösungsmittelgehalt $\sim 76\%$), $n = 3$ ($V_M = 3.5$ Å³/Da, Lösungsmittelgehalt $\sim 65\%$) oder $n = 4$ ($V_M = 2.63$ Å³/Da, Lösungsmittelgehalt $\sim 53\%$) Molekülen in der asymmetrischen Einheit.

Zunächst war die Kristallisation der kHmd äußerst schlecht reproduzierbar, zudem traten die erhaltenen Kristalle fast immer in Clustern auf. Die Kristallgrößen waren recht gering, und isolierte Kristalle zeigten sehr schlechte Beugungseigenschaften (typische Beugungsgrenze bei 3.5–4.0 Å).

Offensichtlich bestand ein Problem bei der Bildung von Kristallisationskeimen. Durch serielles *Microseeding* gelang es, sowohl die Reproduzierbarkeit der Kristalle, als auch deren Größe und Beugungseigenschaften so weit zu verbessern, daß eine Strukturbestimmung mittels MAD an den SeMet-markierten Kristallen möglich erschien. Ohne und mit Seeding erhaltene Kristalle sind in Abb. 20 gegenübergestellt.

Tabelle 8: Kristallisationsbedingungen für das Enzym aus *M. kandleri*. Nach Äquilibration über Nacht wurde die Kristallisationskammer geöffnet und es wurden mittels *Microseeding* Kristallisationskeime eingeführt.

Parameter	Bedingung
Temperatur	4° C
Reservoirlösung	24% MPD, 100 mM MgCl ₂ , 100 mM Bicin/KOH pH 9.0
Proteinkonzentration	12 mg/ml in 10 mM MOPS/KOH pH 7.0
Protein:Reservoir	1:1
Tropfenvolumen	4–10 µl

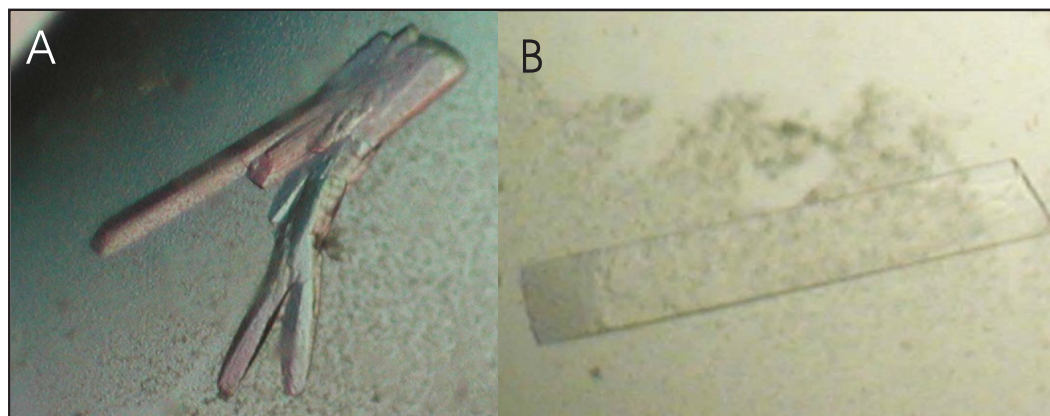


Abbildung 20: Kristalle der Raumgruppe $P2_1$ des heterolog produzierten, SeMet-markierten Proteins aus *M. kandleri*, die ohne (A) und mit (B) Verwendung von Seeding-Techniken erhalten wurden. Die längste Dimension ist 150 µm (A) bzw. 1100 µm (B).

3.3.5 MAD-Datensammlung

Ein MAD-Experiment an der Se-Kante bei drei Wellenlängen wurde an der Meßstation ID29 (ESRF) durchgeführt. Ein Peak-Datensatz konnte bis zu einer Auflösung von 2.8 Å und guter Datenqualität gesammelt werden. Die Datensätze der zweiten und dritten Wellenlänge sind durch den zunehmenden Strahlenschaden von stetig abnehmender Qualität, obwohl der Effekt des Strahlenschadens so gut wie möglich durch Verschieben des sehr großen Kristalls im Strahl reduziert wurde. Die Statistiken der MAD-Daten sind in Tabelle 9 aufgeführt (Datensätze 3–5).

Tabelle 9: An Kristallen des in *E. coli* produzierten, SeMet-markierten Enzyms aus *M. kandleri* gemessene Datensätze (Raumgruppe $P2_1$. Neben MAD-Daten an der Se-Kante wurden drei potentielle Derivate gemessen (Datensätze 7–8). Zur Strukturlösung wurden die Datensätze 3 und 4 verwendet. Für weitere Erläuterungen s. Tabelle 1

Nr.	Typ	Quelle	$\lambda/\text{\AA}$	Zelle (a, b, c) (\AA)	$\beta/^\circ$	Auflösung (\star)/ \AA	Vollst. (\star)/%	R_{merge} (\star)/%	$I/\sigma(I)$ (\star)	Red. (\star)
1	MAD- <i>peak</i>	ID29	0.9787	87.37, 57.75, 167.54	100.81	30.0-3.0 (3.11-3.0)	95.3 (87.0)	10.0 (48.0)	15.53 (3.06)	2.76 (2.20)
2	MAD- <i>infl.</i>	ID29	0.9789	87.39, 57.52, 167.60	100.80	30.0-3.2 (3.31-3.20)	96.7 (96.2)	9.2 (33.2)	14.62 (3.52)	2.63 (2.28)
3	MAD- <i>peak</i>	ID29	0.9791	87.71, 56.12, 167.47	100.71	50.0-2.8 (2.87-2.80)	96.5 (87.2)	6.6 (40.9)	10.95 (2.61)	2.64 (2.42)
4	MAD- <i>infl.</i>	ID29	0.97923	88.08, 56.15, 168.55	100.64	50.0-3.2 (3.27-3.20)	98.4 (96.6)	7.0 (39.6)	12.18 (3.02)	2.91 (2.69)
5	MAD- <i>rem.</i>	ID29	0.915	88.49, 56.26, 168.93	100.70	30.0-3.5 (3.58-3.50)	81.1 (80.5)	6.0 (31.3)	9.29 (2.72)	2.25 (2.16)
6	Hg-SAD ¹⁶	BW7A	0.9999	86.32, 56.53, 165.94	100.91	20.0-3.5 (3.62-3.50)	91.7 (62.8)	6.4 (18.5)	16.36 (3.90)	2.84 (1.46)
7	Ta ₆ Br ₁₂	X13	0.8033	87.69, 56.69, 168.14	101.23	50.0-3.05 (3.16-3.05)	98.7 (90.9)	6.5 (33.1)	16.69 (3.95)	4.17 (3.40)
8	NaWO ₄	X13	0.8033	87.99, 56.64, 169.10	101.25	50.0-3.65 (3.78-3.65)	97.4 (86.4)	9.0 (27.3)	12.86 (2.90)	3.14 (2.67)

3.3.6 Strukturlösung mit SAD und MAD

Mit reinen Patterson-Methoden und der in dem Software-Paket SOLVE implementierten automatisierten Patterson-/Fourier-Prozedur gelang es nicht, die Selenpositionen zu lokalisieren.

Dagegen konnte mit den Direkten Methoden-Programmen *SnB* und SHELXD anhand der aus dem *Peak*-Datensatz berechneten anomalen Differenz-Magnituden eine partielle Substruktur bestimmt werden. Die Indikatoren der (partiellen) Lösung innerhalb von *SnB* sind in Abb. 21 gezeigt.

Beide Programme identifizierten einen gemeinsamen Satz von 31 Selen-Positionen in der asymmetrischen Einheit. Diese wurden in die Phasenverfeinerung mit den Software-Paketen SHARP und MLPHARE eingeführt. Weitere Positionen wurden unter Verwendung von Differenz-Fourier-Elektronendichtekarten identifiziert. So konnten schließlich 42 Positionen für die MAD-Phasenbestimmung mit SHARP unter Verwendung des *Peak*- und des *Inflexion Point*-Datensatzes (mit anomalen und dispersiven Beiträgen) genutzt werden.

¹⁶Absorptionskante sehr schwach ausgeprägt im XRF/XANES-Experiment

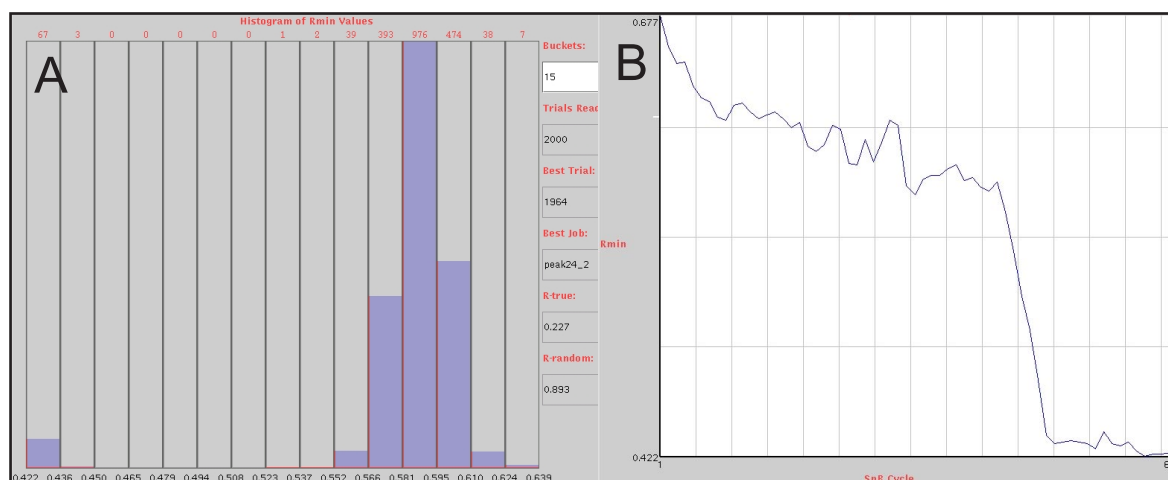


Abbildung 21: Lösung der Se-Substruktur unter Verwendung des MAD-Peak-Datensatzes (Nr. 3 in Tabelle 9) mit dem Direkte-Methoden-Programm *SnB* (*Shake-and-Bake*), das auf der Minimalfunktion basiert. Gezeigt sind zwei verschiedene Indikatoren einer (partiellen) Lösung, die bimodale Verteilung der Rmin-Werte (A) und Schrittfunktion von Rmin (B) im Falle einer (partiellen) Lösung.

Auch nach *Solvent flattening* unter Verwendung der Programme DM [96], SOLOMON [97] oder RESOLVE [98] war die mit den SHARP-Phasen berechnete Elektronendichte nicht direkt interpretierbar. Daher wurde nun versucht, die den einzelnen Monomeren in der asymmetrischen Einheit zuzuordnenden Elektronendichten zu mitteln.

Aufgrund der Ergebnisse der analytischen Gelfiltration wurde zu diesem Zeitpunkt von der Anwesenheit eines Trimers ($3 \cdot 11 = 33$ SeMet) in der asymmetrischen Einheit ausgegangen. Allerdings zeigte die Substruktur bei visueller Betrachtung eine zweizählige Symmetrie. Mit den bekannten Se-Positionen wurden von Eleanor J. Dodson (University of York, UK) unter Verwendung der Programme DISTANG und LSQKAB aus dem CCP4-Paket [99] zwei durch NCS verknüpfte Gruppen von Positionen ermittelt, die allerdings zahlreiche Positionen nicht berücksichtigten. Später konnte Clemens Vornrhein (Global Phasing Ltd., Cambridge, UK) durch Verwenden verschiedener Gruppen von Se-Positionen mit dem Programm FINDNCS eine „bestmögliche“ NCS-Matrix bestimmen (mit $2 \cdot 7$ Positionen). Daraufhin wurde vom Vorliegen eines Hmd-Dimers in der asymmetrischen Einheit ausgegangen.

Nach zweifacher NCS-Mittlung (unter Verwendung einer mit FINDNCS bestimmten Matrix) und *Solvent Flattening* innerhalb des Programms DM wurde eine im Bereich der helikalen Domäne interpretierbare Elektronendichte erhalten.

Während der Modellierung der $C\alpha$ -Kette eines Monomers wurden zweimal zwei benachbarten Se-Positionen in der Dimerisierungsdomäne gefunden. Dieser Befund konnte nur damit erklärt werden, daß das vermeintliche Monomer ein Dimer war und daß sich die beobachtete helikale Domäne aus zwei Untereinheiten aufbaut. Die nicht-kristallographische Symmetrie konnte leicht aus drei äquivalenten Se-Positionen abgeleitet werden.

Nach vierfacher NCS-Mittelung und *Solvent Flattening* war die Qualität der Elektronendichte so weit verbessert, daß der größte Teil der Hauptkette mit dem Programm O gebaut werden konnte. Eine Übersicht über die experimentelle Phasenbestimmung gibt Tabelle 10. Die Phasen sind offensichtlich von guter Qualität und erklären daher nicht die großen Schwierigkeiten, eine interpretierbare Elektronendichte zu erhalten. Die Qualität der erhaltenen Elektronendichte vor und nach Dichtemodifikation ist für den bestdefinierten Bereich exemplarisch in Abb. 22 gezeigt.

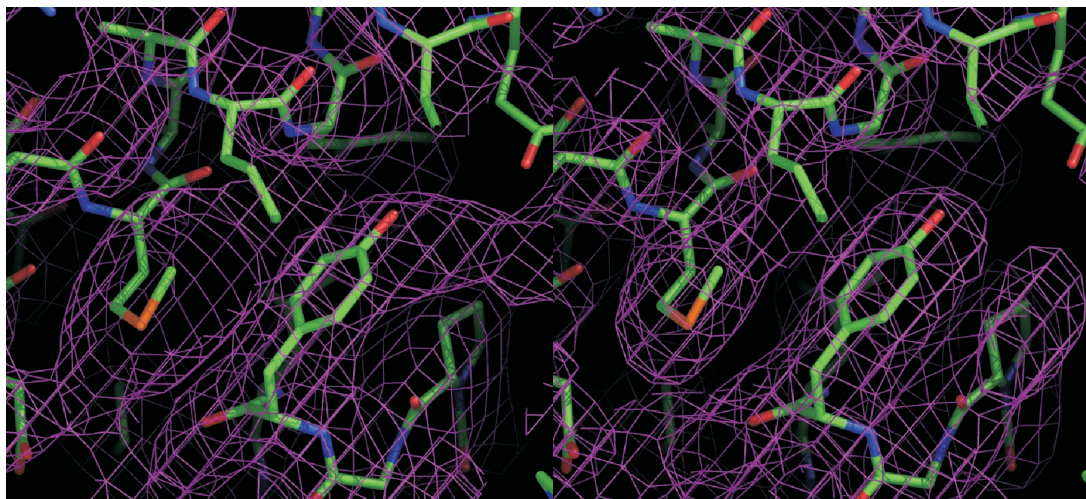


Abbildung 22: Repräsentativer Ausschnitt der für das Enzym aus *M. kandleri* erhaltenen Elektronendichte im Bereich der zentralen Dimerisierungseinheit; links experimentelle Elektronendichte, berechnet unter Verwendung der mit dem Programm SHARP verfeinerten MAD-Phasen, rechts der entsprechende Bereich nach zweifacher NCS-Mittelung und *Solvent Flattening*.

Tabelle 10: Experimentelle Phasenbestimmung mittels MAD; gezeigt sind die wesentlichen statistischen Parameter der Verfeinerung mit dem Programm SHARP und die mittlere *Figure of Merit* (FOM) vor und nach Dichtemodifikation. Diese wird nur für den Auflösungsbereich bis 3.0 Å angegeben, weil darüber hinaus kaum experimentelle Phaseninformation vorhanden ist.

	<i>Peak</i>	<i>Inflection Point</i>
$R_{\text{cullis}} \text{ ano bis } 2.7 \text{ \AA}$	0.69	0.85
$R_{\text{Kraut}} \text{ ano bis } 2.7 \text{ \AA}$	0.058	0.062
<i>Phasing Power</i> ano bis 2.7 Å	2.03	0.92
FOM vor Dichtemodifikation bis 3.0 Å	0.433 (31027 Reflexe)	
FOM nach Dichtemodifikation bis 3.0 Å (4fache NCS-Mitt. und <i>Solvent Flattening</i>)	0.742 (31027 Reflexe)	

3.3.7 Modellbau und Verfeinerung

Der graphische Modellbau mit dem Programm O [100, 101] wurde unterstützt durch die bekannten Se-Positionen, die die Lage der SeMet-Seitenketten markierten, weiterhin durch Bones (mit MAPMAN erzeugt) und durch eine automatisch berechnete partielle C_α -Kette, die mit dem Programm MAID berechnet wurde (als verbesserte Bones).

Der größte Teil des Modellbaus wurde von Dr. Ulrich Ermler durchgeführt, weil die vorhandene Elektronendichte nur mit größter Erfahrung interpretiert werden konnte. In einer ersten Modellbaurunde wurden etwa 85% des Modells gebaut; nach einer ersten Verfeinerung mit dem Programm CNS [87] konnte das Modell so weit vervollständigt werden, daß es 350 Reste umfaßt. Das N-terminale Methionin und die letzten 7 Aminosäuren am C-Terminus sind in der Dichte nicht definiert. Im Falle des C-Terminus wird diese Beobachtung auf die konformationelle Flexibilität zurückgeführt, wogegen das N-terminale Methionin bei in *E. coli* produzierten Proteinen häufig proteolytisch entfernt wird. Damit umfaßt das derzeitige Modell $4 \cdot 350 = 1400$ Aminosäurereste mit 10444 Atomen in der asymmetrischen Einheit; zur Zeit wurden noch keine Wasser in das Modell gebaut.

Nach einer weiteren Verfeinerungsrunde, die *Simulated Annealing*, eine individuelle Verfeinerung der Atompositionen sowie eine individuelle B-Faktor-Verfeinerung umfaßte, lagen der kristallographische und der freie R-Wert bei 29.4 und 37.1%. Der durchschnittliche B-Faktor aller Atome dieses Modells liegt bei 83 \AA^2 .

3.4 Kristallstruktur des Apoenzyms aus *M. kandleri*

Die vier Monomere in der asymmetrischen Einheit lassen sich eindeutig in zwei Dimere gruppieren. Diese beiden Dimere sind nur locker assoziiert, wogegen die Kontakte zwischen den beiden Monomeren jedes Dimers so eng sind, daß das Dimer klar die kleinste funktionelle Einheit des Enzyms darstellt (Abb. 23).

Dieser Befund ist kompatibel mit den Ergebnissen der analytischen Gelfiltration. Die dort beobachtete apparente Größe lag zwar für die beiden Enzyme aus *M. marburgensis* und *M. kandleri* zwischen der eines hypothetischen Dimers und Trimers, was sich aber zwanglos aus der nicht-sphärischen Gestalt des Moleküls erklären läßt.

Wie in Abb. 24 gezeigt, besitzt das Homodimer eine ausgesprochen gestreckte Form mit einer längsten Dimension von 100 \AA . Die Monomere lassen sich jeweils klar in zwei Domänen unterteilen.

Die größeren N-terminalen Domänen (Reste 1–255) mit Abmessungen von $50 \times 30 \times 26 \text{ \AA}^3$ besitzen eine α/β -Struktur und bilden die beiden peripheren Bereiche des Dimers. Die beiden kleineren, rein helikalen C-terminalen Domänen (Reste 256–350) treffen im Zentrum des Dimers zusammen. Dabei sind sie so eng miteinander verflochten, daß nur daß resultierende komplexe Helixbündel und nicht jeder individuelle helikale Bereich als Faltungseinheit betrachtet werden kann.

Das Helixbündel hat eine maximale Abmessung von 42 \AA (siehe untere Ansicht in

Abb. 24). Wie man in Abb. 24 oben gut erkennen kann, sind beide Domänen durch einen flexiblen Polypeptid-Linker, aber nur durch wenige nicht-kovalente Wechselwirkungen verbunden. In dieser Ansicht besitzt der helikale Kern des Dimers die Gestalt eines Trapezes, dessen längste Seite 33 Å lang ist.

Die flexible Verbindung zwischen den beiden Domänen jedes Monomers könnte ein Grund für die ungewöhnliche Flexibilität des gesamten Dimers sein, die sich in einem mittleren Temperaturfaktor von über 80 Å² manifestiert (Abb. 25).

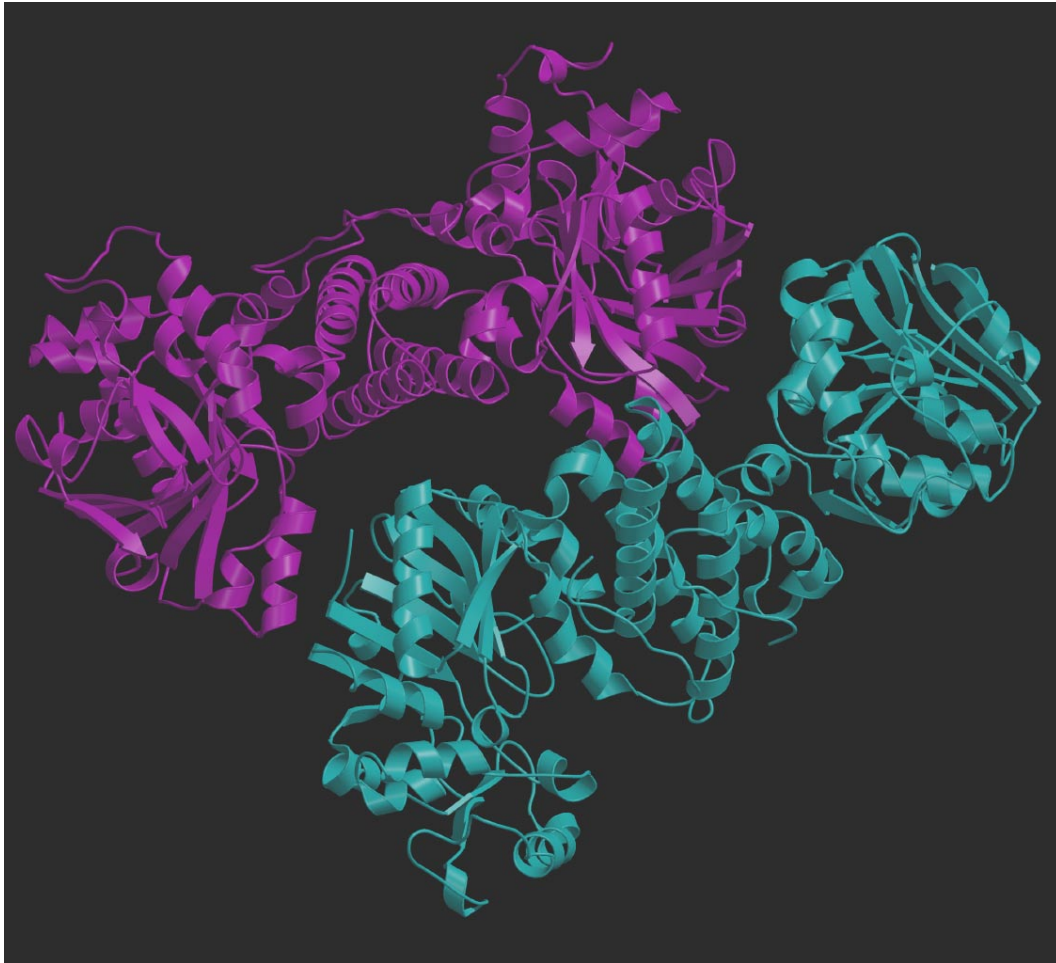


Abbildung 23: Assoziation der beiden Dimere im Tetramer der metallfreien Hydrogenase aus *M. kandleri*; die schematische Darstellung wurde mit den Programmen Molscrip und Raster3D erstellt.

Die vier Monomere in der asymmetrischen Einheit sind einander sehr ähnlich. Der Vergleich des ersten mit dem zweiten, dritten und vierten Monomer unter Verwendung des DALI-Servers [102, 103] erbrachte eine RMSD von 0.7, 1.2 und 0.9 Å. Wie eine Überlagerung der vier Monomere unter Verwendung des Programmes O zeigte, ist der

Verlauf der Hauptkette in der C-terminalen Domäne bei allen vier Monomeren nahezu identisch; die geringen Unterschiede beschränken sich überwiegend auf die N-terminale Domäne.

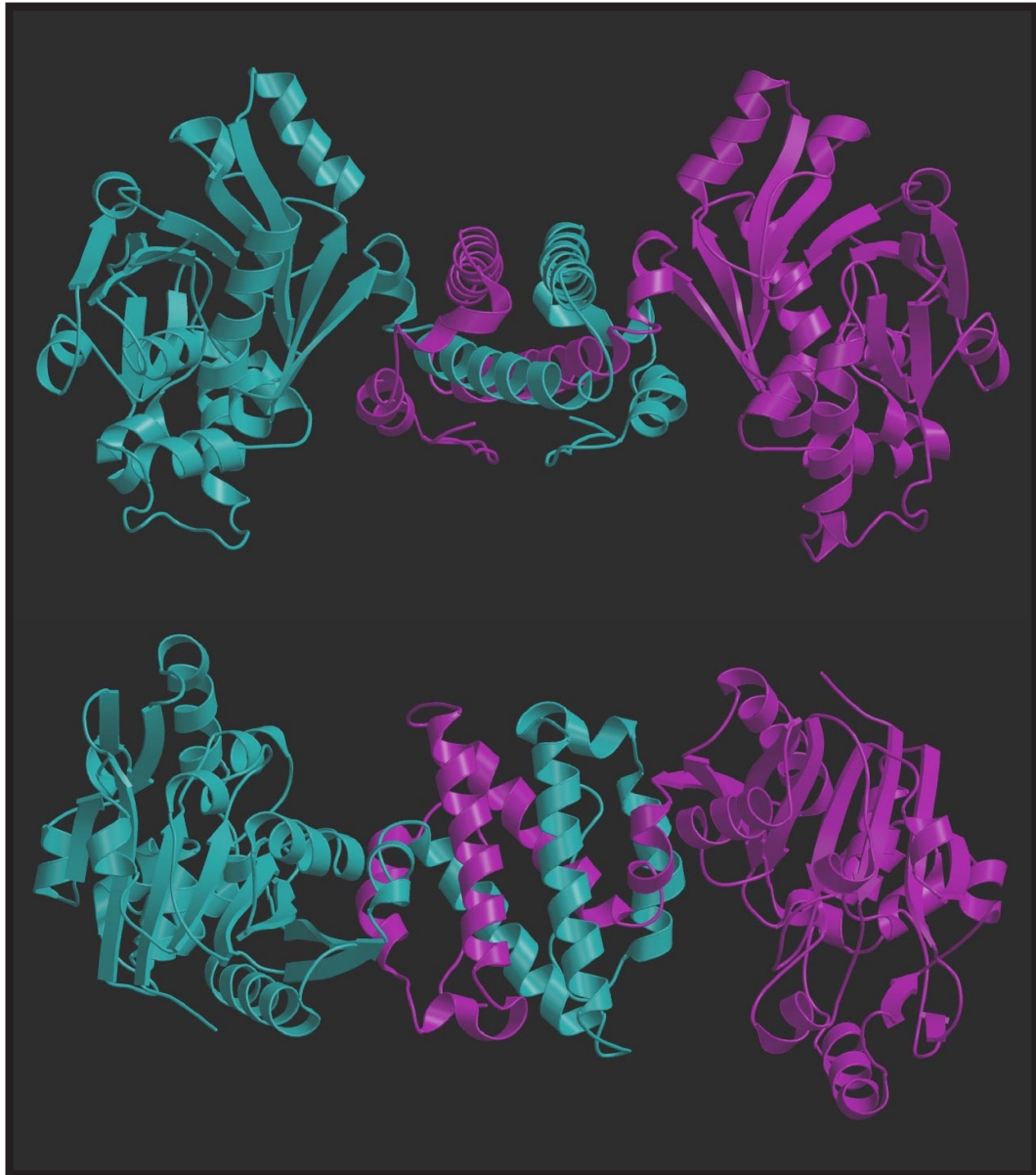


Abbildung 24: Schematische Darstellung des Enzym-Dimers aus *M. kandleri*. In der unteren Ansicht ist das Molekül gegenüber der oben gezeigten Ansicht um etwa 90° um die Längsachse rotiert. Die Abbildung wurde mit den Programmen Molscript und Raster3D erstellt.

Eine Übersicht über die beobachteten Sekundärstrukturelemente und die Faltungstopologie der kHmd gibt Abb. 26. Die Zuordnung der Sekundärstrukturelemente wurde basierend auf den $C\alpha$ -Koordinaten unter Verwendung des Programmes MolAuto [104] durchgeführt, weil mit dem auf dem Muster der Wasserstoffbrückenbindungen beruhenden DSSP [105] für die unzureichend verfeinerte Struktur keine vollständige Zuordnung möglich war.

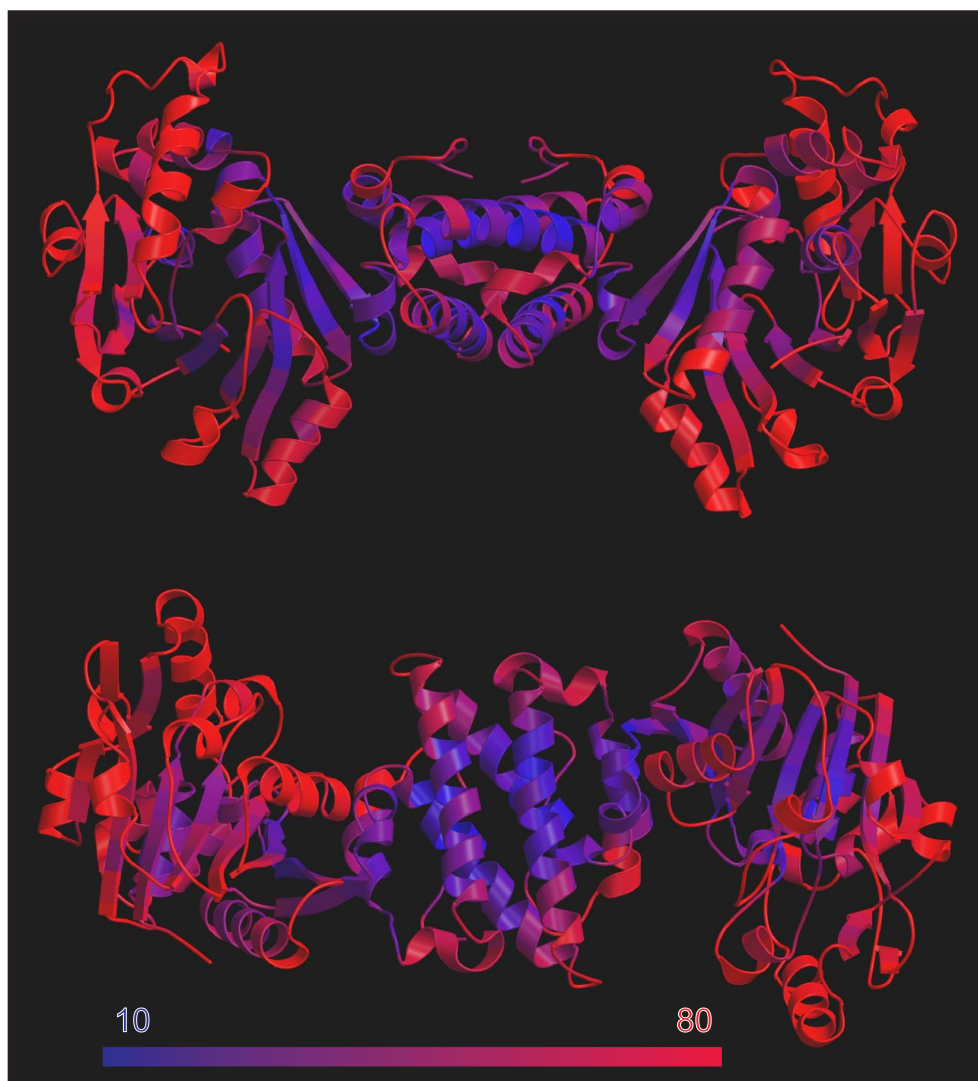


Abbildung 25: Darstellung der B-Faktor-Verteilung beim Enzymdimer aus *M. kandleri*; der durchschnittliche Temperaturfaktor der Protein-Nichtwasserstoffatome liegt bei 83 \AA^2 . Abbildung erstellt mit den Programmen Molscript und Raster3D.

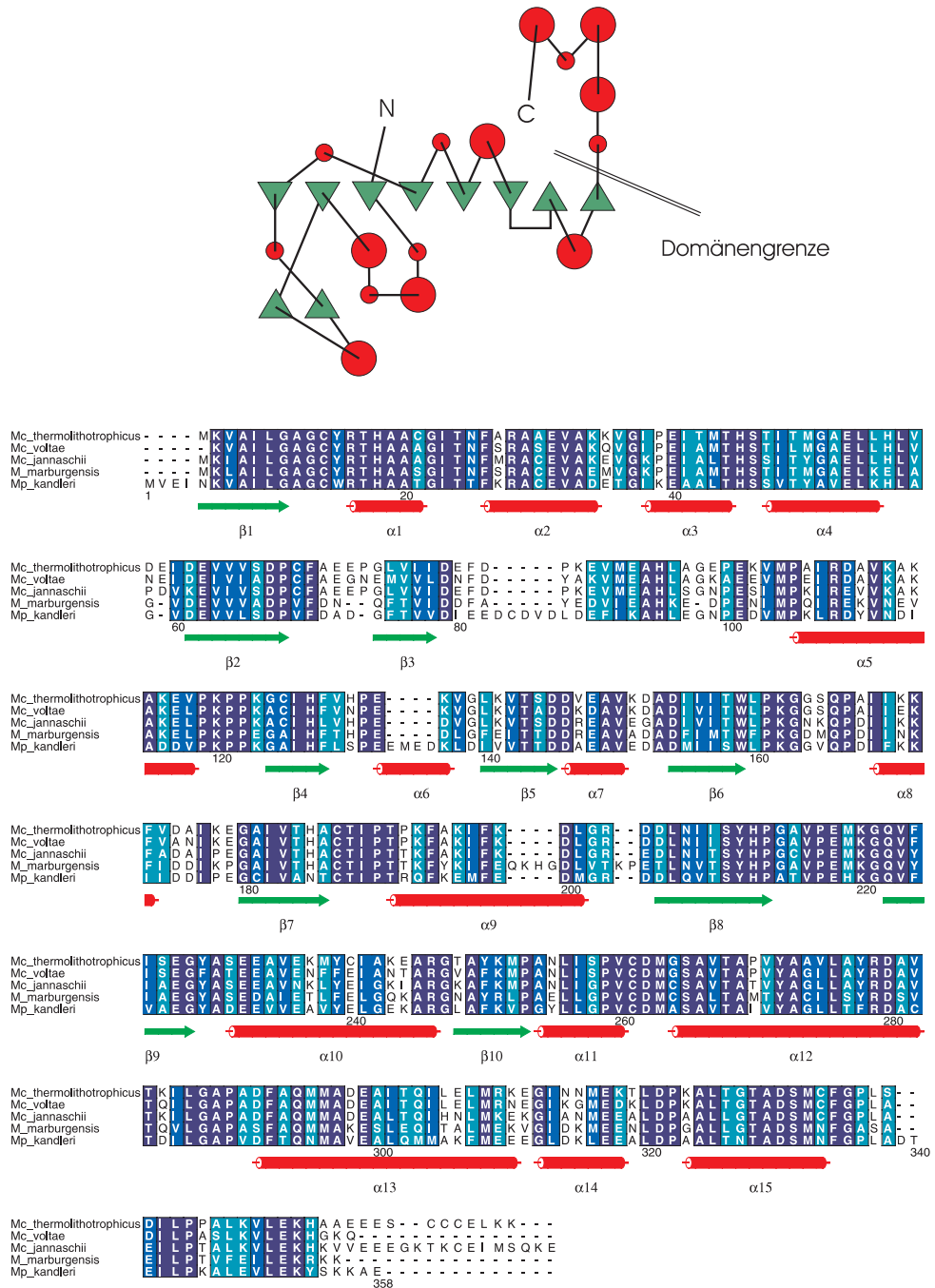


Abbildung 26: Oben: Darstellung der Faltungstopologie für das Monomer der metallfreien Hydrogenase aus *M. kandleri*; die Zuordnung der Sekundärstrukturelemente erfolgte mit dem Programm MolAuto. Unten: Zuordnung der wichtigsten beobachteten Sekundärstrukturelemente zur Aminosäuresequenz im Alignment mit einigen der aus anderen Organismen bekannten Sequenzen.

Die N-terminale Domäne besitzt als zentrales Faltungsmotiv ein doppelt verdrehtes, achsträngiges β -Faltblatt; die ersten sechs Stränge sind parallel, die letzten beiden Stränge sind ebenfalls parallel, aber verlaufen relativ zu den ersten sechs Strängen in umgekehrter Orientierung. Zwischen den β -Strängen befinden sich auf beiden Seiten der Faltblatt-Ebene α -Helices; als zusätzliche Erweiterung existiert ein kleines zweisträngiges paralleles β -Faltblatt.

Dieses Faltungsmotiv erinnert überraschenderweise stark an das der Dinukleotid-Bindungsdomäne. Auch diese ist häufig Teil eines Zweidomänen-Enzyms, in dem beide Domänen durch einen flexiblen Linker verbunden sind [106].

Das klassische, für die Dinukleotidbindung verantwortliche Strukturelement ist eine verdreht-planare Faltblattstruktur aus sechs parallelen β -Strängen – verbunden durch Helices auf beiden Seiten des Faltblattes – die sich topologisch in zwei $\beta\alpha\beta\alpha\beta$ -Abschnitte (Rossmann-Fold) gliedert. Bei vielen NAD(P)-bindenden Enzymen treten Modifikationen und Erweiterungen dieser klassischen Topologie auf [107].

Typisch für NAD(P)-bindende Domänen ist eine Glycin-reiche Schleife der allgemeinen Sequenz G(X)XGXXG zwischen dem ersten β -Strang und einer nachfolgenden Helix, die für die Bindung der Diphosphatgruppe von NAD(P) verantwortlich ist [108]. Dieses Motiv findet sich bei Hmd nicht, auch sonst konnten mittels PROSITE [109] keine bekannten Aminosäure-Sequenzmotive gefunden werden. Immerhin ist aber der Bereich zwischen dem ersten β -Sheet und der ersten α -Helix hochkonserviert; hier findet man das Sequenzmotiv GAGC.

Der Vergleich des derzeitigen Modells mit dem Topologie-basierten TOPS-Server [110] verlief aufgrund des hierbei verwendeten DSSP-Algorithmus zur Sekundärstrukturvorhersage nicht erfolgreich. Dagegen ergab eine Suche nach verwandten Strukturen unter Verwendung des DALI-Servers [102, 103] tatsächlich, daß die größte strukturelle Verwandtschaft zu bestimmten NAD(P)-abhängigen Enzymen besteht.

Bei Verwendung des vollständigen Dimers für den Vergleich war die mit deutlichem Abstand ähnlichste Struktur die der NAD-abhängigen menschlichen L-3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase (2HDH.pdb; [111], RMSD 4.4 Å auf 52% der überlagerten Sequenz). Verwendet man ein kHmd-Monomer für den Vergleich, so sind die ähnlichsten Strukturen eine NADP-abhängige 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (2PGD.pdb; [112], RMSD 2.5 Å auf 41% der überlagerten Sequenz) und eine NADPH-abhängige Acetohydroxysäure-Isomerase (1QMG.pdb; [113], RMSD 2.6 Å auf 40% der überlagerten Sequenz). Die Ähnlichkeit ist dabei weitgehend auf die N-terminale Domäne der Hmd beschränkt. Verwendet man den N-Terminus (Reste 1–255) für den Vergleich, so besitzen wiederum L-3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase und Acetohydroxysäure-Isomerase die größte Ähnlichkeit (RMSD 2.7, 2.6, 2.7 Å auf 49, 48, und 48 % der überlagerten Sequenz). Eine ähnliche Faltblattstruktur wurde auch bei einer in unserer Arbeitsgruppe aufgeklärten $F_{420}H_2:NADP^+$ -Oxidoreduktase [114] beobachtet. Eine Vergleich der N-terminalen Domäne von kHmd mit dieser Struktur (1JAY.pdb) unter Verwendung des DALI-Servers ergab eine RMSD von 2.6 Å auf 58% der überlagerten Sequenz.

In den Fällen der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase und der L-3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase liegt dabei tatsächlich das Strukturmotiv eines achtsträngigen β -Faltblattes vor, bei dem die parallelen Stränge 7 und 8 in umgekehrter Orientierung zu den parallelen Strängen 1–6 verlaufen. Bei der Acetohydroxysäure-Isomero-reduktase ist dagegen der klassische Rossmann-Fold noch weitergehend modifiziert, in diesem Fall zu einem zehnsträngigen β -Faltblatt.

Betrachtet man das aus jeweils drei langen und zwei kurzen Helices beider C-Termini gebildete komplexe Helixbündel, so ergibt die DALI-Suche keine wirklich signifikante Ähnlichkeit zu bekannten Strukturen. Interessanterweise besteht aber die größte Ähnlichkeit wieder zu einem der bereits oben erwähnten NADPH-abhängigen Enzyme, der Acetohydroxysäure-Isomero-reduktase; diese ist aber kaum signifikant (RMSD 6.4 Å auf 69% der überlagerten Sequenz).

Faßt man diese Beobachtungen zusammen, dann zeigt sich eine grundlegende Ähnlichkeit der Architektur des Hmd-Dimers zu bestimmten NAD(P)-abhängigen Enzymen. Diese beruht auf dem Zwei-Domänen-Charakter, der zentralen Faltungseinheit der N-terminalen Domäne, dem flexiblen Linker zwischen beiden Domänen und der helikalen C-terminalen Domäne, die für den Kontakt der Monomere verantwortlich ist.

Die N-terminale Domäne der Hmd unterscheidet sich vor allem in den kleineren Strukturelementen von den bekannten Dinukleotid-Bindungsdomänen. Einen wichtigen Unterschied bedeutet schließlich das Fehlen der an der NAD(P)-Bindung beteiligten Consensussequenz.

Das aus beiden Monomeren aufgebaute zentrale Helixbündel des kHmd-Dimers ähnelt keiner bisher bekannten Struktur. Schließlich ist die gestreckte Form des Dimers mit zwei äußerst flexiblen Verbindungen ungewöhnlich, die vermutlich zu der außerordentlich großen Dynamik des Moleküls führt.

In Abb. 27 ist die Oberflächengestalt des kHmd-Dimers gezeigt. Die tiefe Furche im Interdomänenbereich wird dabei sehr deutlich und stellt ohne Zweifel den wahrscheinlichsten Ort des katalytischen Geschehens im aktiven Enzym dar. Höchst bemerkenswert ist die Beobachtung, daß diese Spalte aus Anteilen der N-terminalen Domäne und zu einem beachtlichen Teil von Anteilen der C-terminalen Domäne des jeweils anderen Monomers gebildet wird.

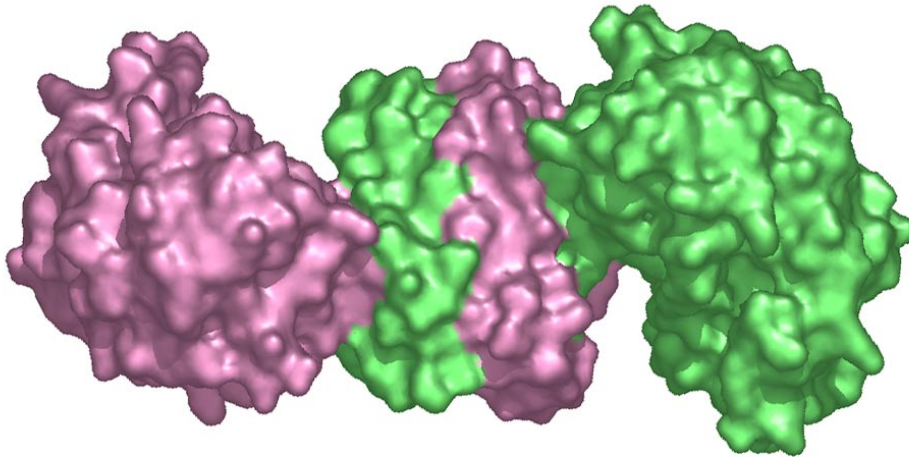


Abbildung 27: Oberflächentopographie des Enzym-Dimers aus *M. kandleri*. Die Anteile beider Monomere sind in hellgrün bzw. purpur eingefärbt. Die Abbildung wurde mit dem Program PyMol erstellt.

4 Diskussion

4.1 Methodische Innovationen

4.1.1 SeMet-Markierung in *M. marburgensis*

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, eignet sich Selen gut als anomales Streuatom für die Phasenbestimmung mittels MAD oder SAD und kann in Form von SeMet an der Stelle von normalem Met biosynthetisch in Proteine eingebaut werden. Diese behalten in der Regel trotz der unterschiedlichen chemischen Eigenschaften von SeMet gegenüber Met ihre volle biologische Aktivität.

Während Selen für höhere Organismen toxisch wirkt, können Bakterien wie *E. coli* bemerkenswerterweise auch dann überleben, wenn Methionin im Medium vollständig durch SeMet ausgetauscht wird. Durch Verwendung von methionin-auxotrophen Stämmen kann so eine Inkorporationseffizienz nahe 100% erreicht werden, was die Grundlage für die allerersten MAD-Experimente mit Selen legte [115].

Mittlerweile wurden auch für die die wichtigsten eukaryontischen Expressionssysteme wie die Hefen *Saccharomyces cerevisiae* [116], *Pichia pastoris* [117] und das Baculovirus-System [118] Protokolle für die SeMet-Inkorporation entwickelt. Dabei wurden aber in der Regel nur geringe Inkorporationseffizienzen von etwa 50-70% erreicht. Im Falle der beiden Hefen wurden interessanterweise mit methioninautotrophen Stämmen die besten Ergebnisse erzielt.

Analog dazu gelang die SeMet-Markierung in *M. marburgensis* mit einer Inkorporationseffizienz von etwa 80%. Das markierte Enzym besitzt dabei volle enzymatische Aktivität (Dr. Seigo Shima, pers. Mitteilung).

Diese methodische Errungenschaft ist bedeutsam, weil bisher noch keine Se-Markierung unter Verwendung eines archaealen Produktionssystems beschrieben wurde. Sie bietet für archaeale Proteine, die nicht in den üblichen bakteriellen Expressionssystemen produziert werden können, ein Konzept zur Strukturbestimmung von vermutlich recht genereller Gültigkeit.

4.1.2 Produktion der Apoproteine aus *M. kandleri* und *M. jannaschii*

Die erstaunliche Thermostabilität von Proteinen, die aus hyperthermophilen Organismen stammen, kann zu ihrer effizienten Trennung von dem Proteom eines mesophilen Expressionswirtes wie *E. coli* verwendet werden. So führt ein einfacher Hitzefällungsschritt in einem solchen Fall zu einer starken Anreicherung des Zielproteins. Häufig wird dabei aber übersehen, daß in dieser Prozedur auch Nukleinsäuren angereichert werden.

Für die beiden Hmd-Apoproteine aus den hyperthermophilen Organismen *M. kandleri* und *M. jannaschii* wurde daher ein nahezu identisches Reinigungsprotokoll entwickelt, in dessen Verlauf zunächst durch einen Hitzefällungs-Schritt der größte Teil der Proteine des mesophilen Wirtsorganismus entfernt werden. Eine sich daran anschließende hydrophobe Interaktions-Chromatographie dient der Entfernung der Nukleinsäuren.

Dabei werden die Zielproteine an die Säule gebunden und nach gründlichem Waschen der Säule in einem einzigen Schritt eluiert. Nach einer schnellen Entsalzung folgt ein weiterer chromatographischer Schritt unter Verwendung einer Anionenaustauscher-Säule.

Die Reinigungsmethode ist hocheffizient: Durch die weitgehende Identität des Protokolls für beide Proteine konnten beide Spezies parallel innerhalb weniger Stunden in großen Mengen isoliert werden.

4.2 Eine „unmögliche“ Strukturbestimmung

Wie im Ergebnisteil ausführlich beschrieben, wurden die ersten Versuche zur Strukturklärung an Kristallen des Enzyms aus *M. marburgensis* unternommen, die sich später als Zwillinge herausstellen sollten.

Die Zwillingsproblematik wurde lange Zeit nicht erkannt, weil die Hinweise darauf zunächst durch übergeordnete Probleme (Nichtisomorphie der Schweratomderivate, unzureichende Qualität von anomalen Derivatdaten) verdeckt wurden. Erst nachdem diese Probleme durch die Durchführung technisch nahezu optimaler MAD-Experimente an SeMet-markierten Kristallen beseitigt wurden, fiel der Zwillingscharakter der Kristalle auf.

Ausgezeichnete Darstellungen der Zwillingsproblematik findet man in [119]–[121]. Sind zwei Kristalle nicht gesetzmäßig miteinander verwachsen, so spricht man von nicht-merohedralem oder epitaxialer Zwillingsbildung. Diese ist in der Regel an der Kristallmorphologie zu erkennen, und das Diffraktionsbild zeigt die Gegenwart zweier verschiedener Gitter.

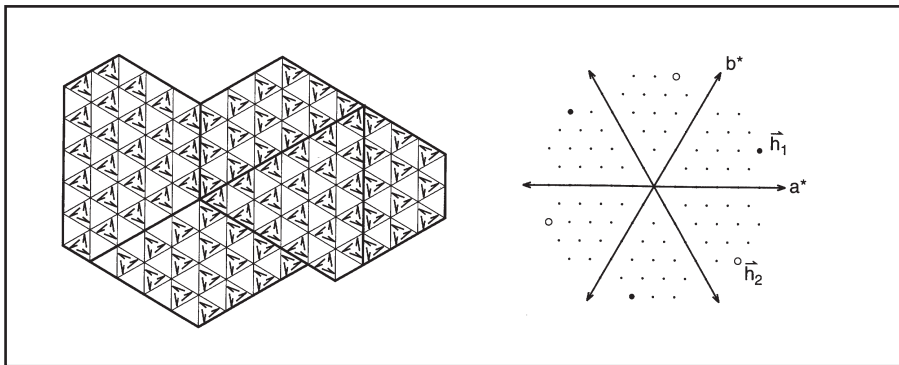


Abbildung 28: Hypothetischer merohedralem Zwilling, bei dem zwei Zwillingsdomänen in $P3$ (links) ein „normales“ Diffraktionsmuster (rechts) ergeben; h_1 und h_2 sind zwillings-verwandte Reflexe; wenn der Zwillingsanteil $\alpha \approx 0.5$ ist, sind ihre Intensitäten gleich groß und führen zu der apparenten Symmetrie $P6$; nach [120].

Dagegen sind im Falle der merohedralen Zwillingsbildung die Gitter der beteiligten Einkristalle gesetzmäßig übereinander gelagert. In Abb. 28 ist ein solcher hypothetischer Zwilling schematisch dargestellt. Bei Makromolekülen tragen fast immer nur zwei Einkristallgitter – die Zwillingsdomänen – zum Kristallaufbau bei, die durch eine Rotation um 180° verknüpft sind. Man spricht daher auch von hemihedraler Zwillingsbildung.

Das Beugungsbild eines solchen Zwillings erscheint wie das eines Einkristalls. Tatsächlich aber enthalten die beobachteten kristallographischen Intensitäten Beiträge beider Zwillingsdomänen; für die beiden durch das Zwillingsgesetz verknüpften Reflexe hkl und $h'k'l'$ sind die beobachteten Intensitäten

$$I_{obs,hkl} = (1 - \alpha)I_{true,hkl} + \alpha I_{true,h'k'l'} \quad (7)$$

$$I_{obs,h'k'l'} = \alpha I_{true,hkl} + (1 - \alpha)I_{true,h'k'l'} \quad (8)$$

mit dem Zwillingsanteil α , der definitionsgemäß der Anteil der untergeordneten Zwillingsdomäne ist. Die wahren Intensitäten ergeben sich demnach zu

$$I_{true,hkl} = \frac{(1 - \alpha)I_{obs,hkl} - \alpha I_{obs,h'k'l'}}{1 - 2\alpha} \quad (9)$$

$$I_{true,h'k'l'} = \frac{(1 - \alpha)I_{obs,h'k'l'} - \alpha I_{obs,hkl}}{1 - 2\alpha} \quad (10)$$

Die mathematische „Entzwilligung“ der Daten führt einen Fehler proportional zu $1/(1 - 2\alpha)$ ein; für $\alpha \rightarrow 0.5$ wird der Fehler damit unendlich groß.

Folglich haben die Fälle partieller ($\alpha \ll 0.5$) und perfekter ($\alpha \approx 0.5$) merohedraler Zwillingsbildung sehr unterschiedliche Konsequenzen.

Partielle merohedrale Zwillingsbildung kann im wesentlichen bei Kristallen der beobachteten Punktgruppen 3, 4, 6, 321 und 312 auftreten. Ist die Datenqualität hinreichend gut und α nicht sehr groß, können die Daten für alle gängigen Methoden der Strukturbestimmung herangezogen werden, vorausgesetzt die Zwillingsbildung wird erkannt und die Daten werden wie oben beschrieben korrigiert. In der Literatur gibt es Beispiele für Strukturbestimmungen mit MAD ($\alpha \approx 0.36$, [122]), MIR (α der verwendeten Derivate bis zu 0.28, [123]) und *ab initio* ($\alpha \approx 0.2$, [124]). Allerdings stellen die drei zitierten Beispiele keine typischen proteinkristallographischen Probleme dar, weil die verwendeten Kristalle in allen Fällen bis zu atomarer Auflösung beugen – damit sind auch die korrigierten Daten noch von hinreichender Qualität.

Anders sieht es für den Fall perfekter Zwillinge aus. Hier werden die Intensitäten der zwillingsverwandten Reflexe gleich groß; es überlagert dann die Symmetrie des Zwillingsoperators die wahre Laue-Symmetrie, so daß eine höhere apparente Symmetrie resultiert. Eine perfekte Zwillingsbildung kann bei Kristallen der apparenten Punktgruppen 321, 312, 422, 6 und 622 vorliegen.

Durch Molekularen Ersatz ist eine Strukturlösung hier problemlos möglich; Beispiele finden sich in [125]–[127]. Bekannt geworden ist das Beispiel der Bacteriorhodopsinkristalle aus kubischen Lipidphasen [128], deren Zwillingscharakter bei einer ersten Veröffentlichung [129] übersehen wurde, was zu falschen Ergebnissen führte. Auch für die Strukturlösung mittels MIR wurde eine Theorie entwickelt [130, 120], allerdings gelang die Anwendung für ein reales Problem bis heute nicht.

Perfekte Zwillingsbildung kann leicht erkannt werden, wenn das Volumen der Einheitszelle in der apparenten Raumgruppe nicht groß genug für ein Molekül ist. Enthält aber die asymmetrische Einheit mehr als ein Molekül wie bei beiden Fällen in dieser Arbeit, entfällt dieses Indiz. Ein weiterer Hinweis kann daraus entstehen, daß Differenz-Pattersonkarten in der falsch-hohen Symmetrie nicht interpretiert werden können.

Eine präzisere Auskunft gibt eine statistische Analyse der Intensitätsverteilung, die bei merohedralen Zwillingen charakteristische Anomalien aufweist [131]. Der Stanley-Faktor $\langle I^2 \rangle / \langle I \rangle^2$ ist ~ 2 bei unverzwilligten Kristallen und ~ 1.5 bei perfekten Zwillingen [132]. Ein ähnlicher Test basiert auf dem Wilson-Verhältnis $\langle F \rangle^2 / \langle F^2 \rangle$, das für azentrische Reflexe bei perfekten Zwillingen ~ 0.885 , bei unverzwilligten Kristallen ~ 0.785 beträgt. Für diese Tests müssen die Daten entweder normalisiert werden, oder die Berechnung wird in dünnen Auflösungsschalen durchgeführt. Um im Falle partieller Zwillinge den Zwillingsanteil zu bestimmen, definiert man den Parameter H [133, 120] für die durch das Zwillingsgesetz verknüpften beobachteten Reflexpaare $I_{obs,hkl}$ und $I_{obs,h'k'l'}$ als

$$H = \frac{|I_{obs,hkl} - I_{obs,h'k'l'}|}{I_{obs,hkl} + I_{obs,h'k'l'}} \quad (11)$$

Für azentrische Reflexe ist die erwartete kumulative Verteilung von H linear gegen H :

$$S(H) = \frac{H}{1 - 2\alpha} \quad (12)$$

Für einen gegebenen Intensitätsdatensatz und ein bestimmtes Zwillingsgesetz läßt sich die kumulative Verteilung von H auftragen und mit Standardgeraden für verschiedene Werte von α vergleichen; einfacher kann aus dem durchschnittlichen H oder H^2 der Zwillingsanteil α berechnet werden:

$$\langle H \rangle = \frac{1}{2 - \alpha} \quad (13)$$

$$\langle H^2 \rangle = \frac{(1 - 2\alpha)^2}{3} \quad (14)$$

Im Fall der Kristalle von Hmd aus *M. marburgensis* war die Zwillingsbildung in dem meisten Fällen perfekt, d. h. die Daten wurden in der apparenten falschen Raumgruppe $P622$ prozessiert. Folgerichtig konnten hier niemals Positionen von Schwer- oder anomalen Streuatomen bestimmt werden.

Bei einigen Schweratomderivaten lagen nur partielle Zwillinge (mit allerdings hohem Zwillingsanteil) vor, was sich darin manifestierte, daß die apparente Raumgruppe mit der tatsächlichen Raumgruppe $P321$ übereinstimmte. Auch in diesen Fällen konnten keine Schweratompositionen bestimmt werden, weil die isomorphen Differenzen zwar prinzipiell vorhanden, aber durch die großen zwillingsbedingten Fehler bei den beobachteten Intensitäten verdeckt wurden.

4.3 An den Grenzen der Proteinkristallographie

Die Strukturbestimmung des Apoenzyms aus *M. kandleri* gestaltete sich äußerst schwierig, was sich unter anderem darin ausdrückt, daß zwischen dem MAD-Experiment und dem ersten Modell ein Zeitraum von mehr als 6 Monaten lag.

Ursprünglich wurden die Schwierigkeiten vor allem auf die begrenzte Qualität der Kristalle und den starken Strahlenschaden im Verlauf des MAD-Experimentes zurückgeführt, bei dem trotz größter Bemühungen die Datenqualität für die zweite und dritte Wellenlänge stark abnimmt.

Eine große Herausforderung stellte zweifellos auch die Größe der Se-Substruktur mit 44 Positionen dar. Eine derart große Substruktur kann mit traditionellen Patterson-Methoden nicht gelöst werden. Allerdings wurde auch mittels *Shake-and-Bake* nur eine partielle Substruktur erhalten, was auf die Oxidationsempfindlichkeit von Selen zurückgeführt wurde.

Die für MAD-Experimente verwendete K-Kante des relativ leichten Elementes Selen ist in höherem Maße vom Oxidationszustand abhängig als etwa die L-Kanten von Schwermetallen. Die Oxidation von SeMet kann ein Problem für eine Strukturbestimmung mittels MAD darstellen, weil sich dabei sowohl die Position als auch die Form der Absorptionskante verändert, was die gemessenen anomalen Signale verschlechtern kann [134]. Typischerweise sind nicht alle, sondern nur bestimmte Selenpositionen betroffen. Es wurden Fälle beschrieben, in denen erst die individuelle Verfeinerung der realen und imaginären Komponenten der anomalen Streufaktoren für die einzelnen Selenpositionen zu einer interpretierbaren Elektronendichte führte [135].

Andererseits besitzt oxidiertes SeMet durch die ausgeprägtere *white line* nahe der Absorptionskante sogar bessere anomale Streueigenschaften als die reduzierte Form [136], so daß die gezielte vollständige Oxidation eines Proteinkristalls etwa mit H_2O_2 in einigen Fällen essentiell für Strukturbestimmungen war [137, 138].

Wie sich allerdings im Falle der Hmd später herausstellte, lieferte die MAD-Phasierung mittels SHARP nach Dichtemodifikation recht gute Phaseninformation. Daß die Dichtemodifikation derartig effektiv war, hängt auch damit zusammen, daß die Beiträge der zweiten Wellenlänge für die Verfeinerung mit SHARP sehr gering waren. Damit nähert sich die Situation dem Fall eines SAD-Experimentes an, bei dem die Dichtemodifikation essentiell für gute Phasen ist [139].

Die großen Schwierigkeiten bei der Interpretation der Elektronendichte ist daher vorwiegend auf die ungewöhnliche thermische Flexibilität des Apoproteins zurückzuführen.

Vor diesem Hintergrund erscheint der Erfolg der Strukturbestimmung bemerkenswert. Zwar wurden einzelne Strukturen mit ähnlich hohen Temperaturfaktoren beschrieben (siehe 4.4), aber hier handelt es sich um überwiegend helikale Strukturen, was die Interpretation der Elektronendichte wesentlich vereinfacht.

Für die Strukturbestimmung von Hmd aus *M. kandleri* mittels SAD/MAD-Techniken, wie sie in dieser Arbeit beschrieben wurde, waren folgende Punkte essentiell:

- Optimierung der Kristalle durch Microseeding
- Datensammlung an einer hochintensiven Synchrotronquelle der dritten Generation
- neue direkte Methoden mit Dual-Space-Refinement (*SnB*, SHELXD) für die Bestimmung großer Substrukturen
- *Maximum-likelihood*-Phasierung mit SHARP

Noch vor wenigen Jahren wäre diese Strukturbestimmung damit unmöglich gewesen, weil einige der genannten technischen Innovationen erst seit kurzem verfügbar sind; dies trifft in erster Linie für die *Shake-and-Bake*-Methoden zu.

4.4 Eine „heiße“ Proteinstruktur

Die gestreckte Architektur des Apoprotein-Dimers mit seine zwei flexiblen Verbindungen bewirkt seine ungewöhnlich hohe thermische Flexibilität.

Der durchschnittliche Temperaturfaktor aller Atome liegt für das Enzym aus *M. kandleri* bei $\sim 85 \text{ \AA}^2$ nach dem Wilson-Plot und bei $\sim 83 \text{ \AA}^2$ in dem verfeinerten Modell. Für einen anderen Datensatz (Datensatz 7 in Tabelle 9) liegt der nach der Wilson-Statistik abgeschätzte durchschnittliche B-Faktor bei 91 \AA^2 .

Derart hohe Temperaturfaktoren sind äußerst ungewöhnlich (typische Werte für Proteinstrukturen liegen bei $10\text{--}40 \text{ \AA}^2$) und wurden bisher erst in sehr wenigen Fällen beobachtet, etwa für einen mechanosensitiven Ionenkanal von *M. tuberculosis* [140, 141] und den Kaliumkanal aus *Streptomyces lividans* [142].

Man kann davon ausgehen, daß bei der in dieser Arbeit beschriebenen Strukturbestimmung die große Flexibilität des Proteinmoleküls in der verwendeten Kristallform, die sich in diesen „astronomischen“ B-Faktoren ausdrückt, jeden einzelnen Schritt außerordentlich kompliziert hat, von der Kristallisation über die Substrukturbestimmung und die Verfeinerung der Schweratomparameter bis hin zur Interpretation der Elektronendichte. Eine weitere Konsequenz ergibt sich für die kristallographische Verfeinerung. Die in der Kristallographie üblicherweise verwendeten Verfeinerungsmethoden sind nur

unzureichend in der Lage, diese spezielle und gravierende Form der Fehlordnung zu behandeln.

So konnten im zitierten Beispiel des mechanosensitiven Kanals [140] nur unter gleichzeitiger Verwendung mehrerer Modelle in der kristallographischen Verfeinerung [143]–[145] R-Werte von unter 40% erhalten werden. Vermutlich wird auch im Falle der hier diskutierten Struktur nur die Verwendung mehrerer Modelle zumindest für Teile der N-terminalen Domäne unter gleichzeitiger Anwendung strikter NCS-*Restraints* zu akzeptablen Verfeinerungsstatistiken führen. Letztendlich bedeutet das aber eine problematische Überparametrisierung der Verfeinerung; ein einziges Modell kann die beobachteten Daten nicht erklären, für die zuverlässige Ableitung mehrerer Modelle ist die Zahl der beobachteten Daten zu gering.

Zweifellos kann man nicht ausschließen, daß die verwendete Kristallform einen Einfluß auf die große beobachtete Flexibilität des Hmd-Moleküls hat; allerdings scheint diese doch eine intrinsische Eigenschaft des Moleküls zu sein. Abgesehen von den methodischen Schwierigkeiten, die sich aus dieser ungewöhnlichen Eigenschaft ergeben, stellt sich die Frage nach einer funktionellen Relevanz der enormen Flexibilität.

Da es sich hierbei um die „leere“ Struktur ohne den für die katalytische Funktion benötigten Cofaktor und ohne das Substrat handelt, erscheint es als sehr wahrscheinlich, daß die Bindung des Cofaktors (und unter Umständen zusätzlich die Bindung des Substrates) mit einer Konformationsänderung und Stabilisierung der Struktur verbunden ist. Eine solche Konformationsänderung könnte zur stärkeren Aneinanderlagerung der beiden Domänen führen, wodurch möglicherweise eine katalytische Tasche im Interdomänenbereich gebildet wird. Dabei würde dem Linkerbereich eine Gelenkfunktion zukommen. Orientierung und Gestalt des zentralen Helixbündels legen den Verdacht nahe, daß dieses eine solche Gelenkfunktion zusätzlich unterstützen könnte.

Es drängt sich nun die Frage auf, ob die im Falle des Holoproteins aus *M. marburgensis* beobachteten B-Faktoren deutlich geringer ausfallen. Für den unverzwilligten Kristall, dessen Daten für den Molekularen Ersatz und eine erste Verfeinerung verwendet wurden, liegt der mittlere aus dem Wilson-Plot vorhergesagte B-Faktor bei 80 Å und damit fast so hoch wie im Falle des Apoproteins aus *M. kandleri*. Dies ist ein sehr wichtiger Beleg dafür, daß die hohen B-Faktoren auch dort nicht in erster Linie aus der Kristallpackung resultieren, die in den beiden Kristallformen sehr verschieden ist.

Es ist nicht klar, ob der Cofaktor bei der Kristallisation unter aeroben Bedingungen überhaupt immer gebunden bleibt. In der ersten für Hmd aus *M. marburgensis* berechneten Elektronendichte konnte kein Hinweis auf seine Anwesenheit gefunden werden. Schließlich sprechen die Ergebnisse der analytischen Gelfiltration (Abb. 9) einer aeroben Enzymprobe für die Möglichkeit, daß der gebundene Cofaktor in Gegenwart von Sauerstoff verloren gehen kann.

Wie sieht es nun für andere Datensätze aus? Diese Frage wird zunächst einmal dadurch kompliziert, daß vorab nicht völlig ausgeschlossen werden kann, daß der Zwilingscharakter der meisten Datensätze zu systematischen Fehlern bei den vorhergesagten mittleren Temperaturfaktoren führt, denn diese Daten besitzen eine anomale Inten-

sitätsverteilung (siehe 4.2).

Glücklicherweise konnten während der Promotion genügend Datensätze gesammelt werden, um diesen Effekt zu evaluieren. So ist etwa der Wilson B-Faktor für die Mikrokristalle des jHmd-Fragmentes in den beiden Fällen der unverzwilligten und der verzwilligten Daten nahezu identisch ($\sim 48 \text{ \AA}^2$).

Interessanterweise scheinen die bei Hmd aus *M. marburgensis* für verschiedene Datensätze beobachteten B-Faktoren einer bimodalen Verteilung zu gehorchen, mit einer Gruppe um 40 \AA^2 (z. B. Datensatz 8 in Tabelle 1 mit 38 \AA^2) und einer Gruppe um 80 \AA^2 (z. B. Datensatz 6 in Tabelle 5 mit 75 \AA^2). Beide genannten Datensätze stammen von perfekten merohedralen Zwillingen. Auch wenn die meisten verfügbaren Datensätze an schweratombehandelten Kristallen gemessen wurden, befinden sich in der Gruppe mit niedrigem B-Faktor auch unbehandelte Kristalle, so daß es sich nicht um einen Effekt der Schweratombindung handeln kann. Er ist auch nicht davon abhängig, ob die verzwilligten Daten in der apparenten oder der wahren Raumgruppe prozessiert werden.

Es stellt sich also die Frage, ob die Unterschiede bei den beobachteten B-Faktoren möglicherweise auf das Vorliegen einer „offenen“ bzw. „geschlossenen“ Form (ohne bzw. mit gebundenem Cofaktor) zurückgeführt werden kann. Das würde bedeuten, daß die in dieser Arbeit gelöste Struktur von Hmd aus *M. marburgensis* ebenfalls das Apoprotein repräsentiert, und daß die deutliche beobachtete Domänenbewegung eher auf die Kristallpackung als auf die Bindung des Cofaktors zurückzuführen ist. Eine Konformationsänderung bei Cofaktor- und Substratbindung könnte also durchaus noch deutlicher ausfallen.

Interessant wäre also die Bestimmung der Struktur unter Verwendung von Daten mit niedrigem B-Faktor. Außerdem wird zu überprüfen sein, wie sich Daten von anerob gezüchteten Kristallen diesbezüglich verhalten.

4.5 Bindungsorte von Cofaktor und Substrat

Es stellt sich die Frage, inwieweit die beobachtete molekulare Architektur des Hmd-Apoproteins brauchbare Hypothesen bezüglich der Bindungsorte der beiden für die Katalyse benötigten „Spieler“ zuläßt, den unbekanntem Cofaktor und das Substrat.

Bei allen drei strukturell verwandten NAD(P)-abhängigen Enzymen (s. 3.4) ist gesichert, daß das jeweilige Substrat in dem Interdomänenbereich zwischen der Coenzymbindenden N-terminalen Domäne und einer helikalen C-terminalen Domäne bindet.

Ein interessanter Bezug ergibt sich zu einem dieser Enzyme, der Acetohydroxysäure-Isomeroreduktase (2HDH). Diese weist zwischen einer N-terminalen NADP-bindenden Domäne mit einem achtsträngigen, verdrehten β -Faltblatt und der C-terminalen helikalen Domäne, die an der Substratbindung und der Dimerisierung beteiligt ist, eine offenbar flexible Verbindung auf, der eine Gelenkfunktion zugeschrieben wird [113].

Interessanterweise konnte dieses Enzym trotz intensiver Bemühungen nur im Komplex mit dem Cofaktor NADPH und einem Analogon des Übergangszustandes kristallisiert werden. Diese Beobachtung wurde von den Autoren so interpretiert, daß die im

Komplex beobachtete Interaktion zwischen den Domänen in der offenen Form entfällt und so eine große Flexibilität entsteht, die für die Bindung von Cofaktor und Substrat essentiell ist. Es ist gut vorstellbar, daß bei Hmd eine ähnliche Situation vorliegt.

Aus der Architektur des Hmd-Dimers folgt fast zwingend, daß auch in diesem Fall eines der beiden Moleküle mehr an der N-terminalen Domäne, das andere mehr im Interdomänenbereich bindet; wahrscheinlich ist hierbei die C-terminale Dimerisierungsdomäne an der Bildung einer katalytischen Tasche beteiligt.

Bei näherer Betrachtung spricht einiges für eine Bindung des Cofaktors an der N-terminalen Domäne und des Substrates im Interdomänenbereich:

- Das charakteristische Faltungsmotiv in der N-terminalen Domäne, das den von NAD(P)-bindenden Proteinen bekannten Motiven stark ähnelt, tritt bei den bekannten Strukturen H₄MPT-abhängiger Enzyme (Formyltransferase [18], Cyclohydrolase [19] und Methylen-H₄MPT-Reduktase [20]) nicht auf.
- Es wird davon ausgegangen, daß die Interaktion H₄MPT-abhängiger Enzyme mit diesem Substrat im wesentlichen auf die Pterin-Kernstruktur beschränkt ist, während der flexible Rest des Moleküls nur schwach mit dem jeweiligen Enzym wechselwirkt. Dagegen kann man von einer stärkeren Bindung eines Cofaktors ausgehen. Im Falle der Hmd ist der Cofaktor groß genug, um eine solche Bindung eher an der N-terminalen Domäne wahrscheinlich erscheinen zu lassen.
- Die reine Analogie zu NAD(P)- und Flavin-bindenden Enzymen, bei denen der Cofaktor eine permanent gebundene prosthetische Gruppe darstellt.
- Wie in NMR-Experimenten gezeigt wurde, ist nur das Holoprotein in der Lage, das Substrat zu binden. Ursache hierfür könnte entweder ein indirekter Einfluß der Cofaktorbindung auf die Substratbindestelle oder eine bereits für die Bindung benötigte direkte Wechselwirkung von Cofaktor und Substrat sein. Ein Beispiel für eine solche direkte Interaktion ist die F₄₂₀H₂:NADP⁺-Oxidoreduktase [114], bei der das Substrat F₄₂₀ überwiegend mit dem zuvor gebundenen NADP(H) interagiert und nur wenige Wechselwirkungen mit dem Enzym besitzt. Es erscheint vor diesem Hintergrund plausibler, eine nur temporär besetzte Substratbindungstasche im Interdomänenbereich zu lokalisieren.

4.6 Ausblick: Aufklärung des Katalysemechanismus

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit ergeben sich unmittelbar eine Reihe von weiterführenden Experimenten. An erster Stelle steht sicherlich die weitere Verfeinerung der Struktur des Apoenzyms aus *M. kandleri* bei 2.8 Å Auflösung und der Modellbau und die Verfeinerung für das Enzym aus *M. marburgensis* unter Verwendung der unverzwillingten

Daten bis 3.0 Å. Allerdings besteht in beiden Fällen das Problem, daß sich die hochgradig beweglichen Strukturen vermutlich nicht durch ein einziges Modell zufriedenstellend beschreiben lassen werden.

Daher erscheint die Verwendung der verzwilligten Daten, die in einigen Fällen auf deutlich niedrigere B-Faktoren und damit möglicherweise auf die Anwesenheit eines „geschlossenen“ Zustandes hindeuten, ausgesprochen interessant. Hier stehen prinzipiell Daten bis 2.3 Å zur Verfügung. Zur Verfeinerung sollte das Programm SHELXL [88] verwendet werden

Inzwischen kann der unbekannte Cofaktor in größeren Mengen präpariert werden. Daher ist die Cokristallisation der in *E. coli* produzierten kHmd mit diesem Cofaktor ein wichtiges Ziel; es wäre durchaus denkbar, daß die Bindung des Cofaktors zu einer etwas kompakteren Konformation und somit zu einer besseren Kristallisation führt.

Die Cokristallisation erscheint erfolgversprechender als die Zugabe des Cofaktors zu bereits vorhandenen Kristallen des Apoproteins, einerseits wegen der vermuteten Domänenbewegung, andererseits weil es bisher keine Methode zum Konzentrieren des Cofaktors gibt. Dieser kann bisher nur in verdünnter Lösung bereitgestellt werden. Es wäre also denkbar, das Apoprotein zu einer verdünnten Lösung des Cofaktors zuzusetzen, und das Protein mit dem gebundenen Cofaktor anschließend über Ultrafiltration zu konzentrieren und in die Kristallisation einzusetzen. Diese Experimente müssen unter anaeroben Bedingungen durchgeführt werden.

Ein weiteres wichtiges Experiment stellt die anaerobe Kristallisation des aktiven Enzyms aus *M. marburgensis* dar. Hier stellt sich zunächst einmal die Frage, ob die an anerob gezüchteten Kristallen gemessenen Daten auf generell niedrigere Temperaturfaktoren hindeuten. Außerdem sollte für dieses Enzym noch einmal versucht werden, unter anaeroben Bedingungen neue Kristallisationsbedingungen zu finden.

Die Cokristallisation (oder das *Soaking*) beider Proteinspezies mit dem Substrat Methenyl-H₄MPT⁺ ist ein weiteres wichtiges Ziel, um ein vollständiges Bild des katalytischen Geschehens erhalten zu können. Hierbei ist der Befund aus der NMR-Spektroskopie wichtig, daß nur das aktive Enzym mit gebundenem Cofaktor das Substrat bindet, und zwar im Gegensatz zu der Darstellung in [54] auch bei den niedrigen Temperaturen der Kristallisation (Dr. Stefan Bartoschek, pers. Mitteilung). Eine Struktur des ternären Komplexes wäre nicht nur die beste Grundlage für ein Verständnis des Katalysemechanismus; die Substratbindung könnte vielmehr auch zu einer weiteren Stabilisierung des Proteins und damit zu besseren Kristallen führen.

Neben der Verwendung des Substrates erscheint die Cokristallisation mit einem Inhibitor besonders vielversprechend. Zwar ist derzeit kein Inhibitor für Hmd bekannt, mit der Verfügbarkeit eines hochempfindlichen Enzymassays kann ein solcher aber prinzipiell leicht identifiziert werden. Es wäre also denkbar, etwa eine Bibliothek von Folatanaloga auf Hmd-Inhibitoren hin zu screenen. Auch das *Docking* des Substrates sollte möglich sein, wenn eine Cokristallisation nicht gelingt, wenn die aus der NMR-Spektroskopie bekannte Konformation des enzymgebundenen Methylen-H₄MPTs und der Bindungsort des unbekanntes Cofaktors als Information genutzt werden können.

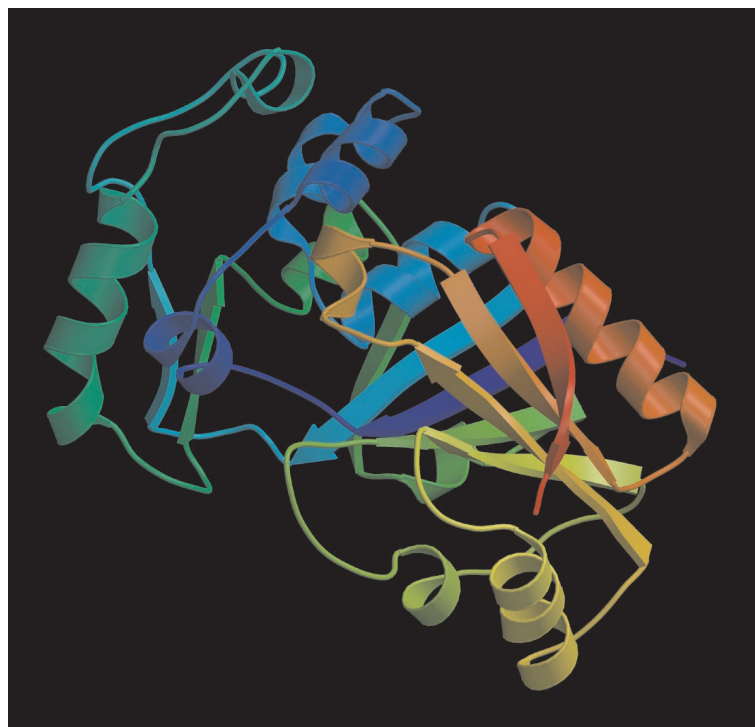


Abbildung 29: Möglicher Kandidat für eine separate Strukturbestimmung: N-terminale Domäne des Enzyms aus *M. kandleri* mit den Aminosäureresten 1–255.

In der vorliegenden Arbeit wird das Postulat aufgestellt, daß der unbekannte Cofaktor an die N-terminalen Domäne des Enzyms bindet. Es erscheint wahrscheinlich, daß diese Domäne allein (Abb. 29) wesentlich besser kristallisiert als das vollständige dimerе Enzym. Daher sollten die N-terminalen Domänen der bestuntersuchten Hmd-Enzyme (aus *M. kandleri*, *M. marburgensis* und *M. jannaschii*) in *E. coli* produziert werden. Zur Reinigung könnten diese mit einem N-terminalen Oligohistidin-Peptid vor einer TEV-Proteaseschnittstelle versehen werden. Bei Verwendung eines solchen Konstruktes kann das Zielprotein durch eine positive und eine negative Affinitätschromatographie mit intermediärer Proteolyse durch eine Oligohistidin-markierte TEV-Protease (am MPI für Biophysik vorhanden) äußerst effektiv erhalten werden. Die Bindung des Cofaktors an die isolierte Domäne könnte noch vor der Kristallisation in einem Kompetitionsassay untersucht werden.

Die Struktur des unbekanntes Cofaktors wird schließlich mit großer Wahrscheinlichkeit in naher Zukunft durch chemisch-analytische Methoden ($^1\text{H-NMR}$, HPLC-MS/MS) aufgeklärt werden können, da bereits Methoden zur Präparation dieses Faktors in mg-Mengen zur Verfügung stehen (Dr. Seigo Shima, pers. Mitteilung).

Diese Arbeiten sollten in nächster Zeit zu einem grundlegenden Verständnis vom Katalysemechanismus der metallfreien Hydrogenase führen.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Reagentien in der höchsten erhältlichen Reinheit von Sigma, Fluka, Merck, Aldrich oder Acros bezogen.

Cofaktoren

H₄MPT gereinigt aus *M. marburgensis*, MPI f. terrestr. Mikrobiologie
Methylen-H₄MPT durch Reaktion von H₄MPT mit Formaldehyd erhalten [146]

Schweratomverbindungen

<i>p</i> -Chloromercuribenzoessäure	Sigma, Taufkirchen
1,4-Diacetoxymercuri-2,3-dimethoxybutan (<i>Baker's Dimercurial</i>)	Anatrace, Inc., Maumee, OH, USA
Di- μ -iodobis(<i>en</i>)diplatin(II)nitrat (PIP)	ABCR GmbH, Karlsruhe
Ethylmercuriphosphat	Hampton Research, Laguna Niguel, USA
Ethylmercurithiosalicylat (Thimerosal)	Serva, Heidelberg
HgCl ₂	Sigma, Taufkirchen
Hg(Ac) ₂	Alfa Aesar Johnson Matthey, Karlsruhe
Hg ₂ (Ac) ₂	Anatrace, Inc., Maumee, OH, USA
KAu(III)Cl ₄	Alfa Aesar Johnson Matthey, Karlsruhe
KAu(I)(CN) ₂	Alfa Aesar Johnson Matthey, Karlsruhe
K ₂ HgI ₄	Alfa Aesar Johnson Matthey, Karlsruhe
K ₃ IrCl ₆	ABCR GmbH, Karlsruhe
K ₂ PtCl ₄	Alfa Aesar Johnson Matthey, Karlsruhe
K ₂ Pt(CN) ₄	Alfa Aesar Johnson Matthey, Karlsruhe
K ₃ UO ₂ F ₅	Dr. Ulrich Ermler, MPI f. Biophysik
LuCl ₃	Aldrich, Taufkirchen
Mersalylsäure	Sigma, Taufkirchen
Methylmercurichlorid	Alfa Aesar Johnson Matthey, Karlsruhe
Pt(II)(terpy)chlorid	Aldrich, Taufkirchen
Ru(NH ₃) ₆ Cl ₃	ABCR GmbH, Karlsruhe
L-Selenomethionin	Calbiochem, Schwalbach
SmCl ₃	ABCR GmbH, Karlsruhe
Ta ₆ Br ₁₂ -Cluster [84]	Prof. Dr. G. Schneider, Stockholm
Tetrakis(acetoxymercuri)methan (TAMM)	ABCR GmbH, Karlsruhe
Trimethylbleiacetat	Alfa Aesar Johnson Matthey, Karlsruhe
UO ₂ (Ac) ₂	Agar Scientific Co., Stansted, Essex, UK

UO ₂ (NO ₃) ₂	Alfa Aesar Johnson Matthey, Karlsruhe
YbCl ₃	Aldrich, Taufkirchen

Gase

H ₂ /CO ₂ (80%/20%)	Messer Griesheim, Frankfurt oder Siegen
H ₂ S	Messer Griesheim, Frankfurt oder Siegen
Formiergas N ₂ /H ₂ (95%/5%)	Messer Griesheim, Frankfurt oder Siegen
N ₂	Messer Griesheim, Frankfurt oder Siegen
N ₂ flüssig	Messer Griesheim, Frankfurt oder Siegen

5.1.2 Antikörper

Kaninchen-anti-Hmd	Eurogentec Belgium S. A., Herstal, Belgien/ diese Arbeit
Ziege-anti-Kaninchen-CIAP	Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen

Antikörper gegen Hmd von *M. marburgensis* wurden bei der Firma Eurogentec hergestellt. Hierfür wurde ein Kaninchen mit 100 µg gereinigter Hmd immunisiert; die Immunisierung wurde nach 2 Wochen, 4 Wochen und 8 Wochen wiederholt. Die Blutentnahme und Herstellung von Serum erfolgte nach 9 bzw. 12 Wochen.

5.1.3 Verwendete Mikroorganismen

Archaea

Methanothermobacter marburgensis DSM 2133

E. coli-Stämme

Tabelle 11: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Stämme von *Escherichia coli*.

Stamm	Genotyp	Referenz
HMS 174(DE3)	<i>recA1 hsdR rif^r</i> (λ cIts857 <i>ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1</i>)	Novagen
BL21(DE3)	B F ⁻ <i>dcm ompT hsdS gal</i> (λ cIts857 <i>ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1</i>)	Novagen
B834(DE3)	B F ⁻ <i>dcm ompT hsdS gal met</i> (λ cIts857 <i>ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1</i>)	Novagen; [94]
XL1 Blue	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac⁻</i> F' [<i>proAB⁺ lacI^q lacZΔM15Tn10(tet^r)</i>]	Stratagene

5.1.4 Medien zur Anzucht von Mikroorganismen

LB (Luria Bertani)-Medium

10 g Trypton
5 g Hefeextrakt
10 g NaCl
pro 1 l, pH 7.0 mit 1 M NaOH

TB-Medium

12 g Trypton
24 g Hefeextrakt
4 ml Glycerol
pro 1 l, pH 7.0 mit 1 M NaOH

TP (Trypton Phosphat)-Medium [93]

20 g Trypton
15 g Hefeextrakt
8 g NaCl
2 g Na₂HPO₄
1 g KH₂PO₄
pro 1 l, pH 7.0 mit 1 M NaOH

LeMaster-Medium zur SeMet-Markierung [95]

L-Ala	0.5 g	L-Ser	2.1 g
L-Arg-HCl	0.58 g	L-Thr	0.233 g
L-Asp	0.4 g	L-Tyr	0.166 g
L-Cystin	0.033 g	L-Val	0.233 g
L-Glu	0.666 g	Adenin	0.5 g
L-Gln	0.333 g	Guanosin	0.666 g
Gly	0.542 g	Thymin	0.166 g
L-His	0.058 g	Uracil	0.5 g
L-Ile	0.233 g	Natriumacetat	1.5 g
L-Leu	0.233 g	Bernsteinsäure	1.5 g
L-Lys-HCl	0.417 g	NH ₄ Cl	0.75 g
L-Phe	0.133 g	NaOH	0.85 g
L-Pro	0.1 g	K ₂ HPO ₄	10.5 g

Die Komponenten werden in 950 ml dest. Wasser autoklaviert; Nach Zugabe von 10 g Glucose, 250 mg MgSO₄ · H₂O und 4.2 mg FeSO₄ wird mit 1 M HCl ein von pH 7.0 eingestellt, auf 1 l Endvolumen aufgefüllt und sterilfiltriert.

Medium für *M. marburgensis* [80]

21.2 g NH₄Cl
 68 g KH₂PO₄
 25.44 g NaCO₃
 3 ml 0.3% Resazurin
 10 ml Spurenelementlösung
 pro 10 l

Spurenelementlösung

90 g Titriplex I ad 800 ml
 pH 7.0 mit 10 M NaOH
 40 g MgCl₂ · 6 H₂O
 10 g FeCl₂ · 6 H₂O
 0.2 g CoCl₂ · 6 H₂O
 1.2 g NiCl₂ · 6 H₂O
 0.2 g NaMoO₄ · 4 H₂O
 pro 1 l

5.1.5 Plasmide

Tabelle 12: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.

Plasmid	Eigenschaften	Herkunft
pLysS	T7 Lysozym, Cm ^R	Novagen
pCR2.1	blunt end cloning b/w	Invitrogen, Groningen, NL
pHmd2	pET11a, hmd (<i>M. kandleri</i>), <i>NdeI/BamHI</i> , Amp ^R	S. Shima, Marburg
pHmd2CHis	Variante mit C-terminaler (His) ₆ -Fusion	diese Arbeit
pHmd2NHis	Variante mit N-terminaler (His) ₆ -Fusion	diese Arbeit
pHmd3	pET24b(+), hmd (<i>M. jannaschii</i>), Kan ^R	G. Buurman, Marburg [57, 54]

5.1.6 Oligodesoxynukleotide

Für die Einschnitt-Insertion der N- bzw. C-terminalen Hexahistidin-Peptide mittels PCR wurden folgende Oligodesoxynukleotide verwendet:

NHisFor: 5'-GAT ATA CAT ATG CAT CAC CAT CAC CAT CAC GTC GAG ATC AAC
AAA GTC GCG-3'

NHisRev: 5'-GGT TAC CCT CGA GGT GCG CCT TGA T-3'

CHisFor: 5'-ATC CTA GGA GCT CCC GTG GAC-3'

CHisRev: 5'-CTG AGC GGA TCC TTA GTG ATG GTG ATG GTG ATG CTC CGC
CTT CTT CGA GTA CTT-3'

Die für die Hexahistidin-Peptide kodierenden Sequenzen sind blau, Start- und Stop-Codons grün bzw. rot und die zur Reklonierung verwendeten Schnittstellen unterstrichen dargestellt. Verwendet wurden *NdeI* (NHisFor), *XhoI* (NHisRev), *SacI* (CHisFor) und *BamHI* (CHisRev). Die Synthese erfolgte am MPI für Biophysik durch Frau Heidi Müller.

5.1.7 Chromatographische Medien und Säulen

Ionenaustausch-Chromatographie

Q Sepharose Fast Flow	Amersham Biosciences, Freiburg
Q Sepharose High Performance	Amersham Biosciences, Freiburg
HiLoad 26/10 Q Sepharose High Performance	Amersham Biosciences, Freiburg
Resource Q 6 ml	Amersham Biosciences, Freiburg
Mono Q HR 10/10	Amersham Biosciences, Freiburg
Mini Q PC 3.2/3	Amersham Biosciences, Freiburg

Hydrophobe Interaktions-Chromatographie

Phenyl Sepharose Fast Flow (high sub)	Amersham Biosciences, Freiburg
Phenyl Sepharose High Performance	Amersham Biosciences, Freiburg
Source 15 Phe	Amersham Biosciences, Freiburg
HiPrep 16/10 Phenyl Sepharose FF (high sub)	Amersham Biosciences, Freiburg

Affinitäts-Chromatographie

Ni-NTA-Agarose	Qiagen AG, Hilden
----------------	-------------------

Größenausschluß-Chromatographie

Superdex 200 HR 10/30	Amersham Biosciences, Freiburg
Superdex 200 PC 3.2/30	Amersham Biosciences, Freiburg
Superose 12 PC 3.2/30	Amersham Biosciences, Freiburg
Superose 6 PC 3.2/30	Amersham Biosciences, Freiburg

Entsalzung

Sephadex G 25	Sigma Chemie, Deisenhofen
HiPrep 26/10 Desalting	Amersham Biosciences, Freiburg

5.1.8 Instrumente und Geräte

Generell finden sich die verwendeten Geräte bei den einzelnen Methodenbeschreibungen. Einige Großgeräte von genereller Bedeutung sind nachfolgend aufgelistet:

Zentrifugen und Rotoren

Beckmann L8-60M Ti45, Ti60, Ti70, Ti70.1	Beckman Instruments, München
Beckmann L8-70M Ti45, Ti60, Ti70, Ti70.1	Beckman Instruments, München
Beckmann TL 100 TLA 100.3	Beckman Instruments, München
Eppendorf bench-top	Eppendorf GmbH, Hamburg
Sorvall RC5B GS3, GSA, SS34	Du Pont de Nemours, Bad Homburg
Sorvall RC3B+ H6000A	Du Pont de Nemours, Bad Homburg

Chromatographiestationen

HiLoad	Amersham Biosciences, Freiburg
FPLC System	Amersham Biosciences, Freiburg
Smart System	Amersham Biosciences, Freiburg

Spektralphotometer

Lambda 40	Perkin Elmer Biosystems, Weiterstadt
Ultrospec Plus	Amersham Biosciences, Freiburg

Schüttelinkubator dreistöckig

Infors AG, Bottmingen, CH

5.2 Mikrobiologische Methoden

5.2.1 Fermentation von *Methanothermobacter marburgensis*

M. marburgensis (DSM 2133) wurde im 10l-Maßstab in Glasfermentern (Kesselvolumen 13 l) bei 65° C gezogen. Dabei wurde das in 5.1.4 beschriebene Mineralsalzmedium verwendet.

Der Fermenter wurde mit 80% H₂, 20% CO₂, 0.1% H₂S bei einer Flußrate von 2 l/min begast; die Geschwindigkeit des Rührwerkes lag bei 1000–1200 rpm. Das durch Begasung anaerobe, vorgewärmte Medium wurde mit 2–5% einer frischen Vorkultur angeimpft.

Das Wachstum der Kultur wurde durch regelmäßige Messung der OD₅₇₈ verfolgt. Bei einer OD₅₇₈ = 2 wurde die Gasflußrate auf 3.5 l/min erhöht. Bei Erreichen einer optischen Dichte von 6 wurden die Zellen auf 4° C gekühlt und in einer Durchflußzentrifuge (Centrifuge 17 RS, Heraeus, Osterode) anaerob geerntet. Die Zellen wurden anschließend in einem Anaerobenzelt (Coy, Ann Arbor, MI, USA) entweder direkt für die Reinigung der Hmd 5.4.6 verarbeitet oder in Glasflaschen abgefüllt und unter einer N₂-Atmosphäre gasdicht bei -80° C aufbewahrt.

Für die SeMet-Markierung wurde dem Medium 2.5 mM L-SeMet zugesetzt (Dr. Seigo Shima, Marburg).

Zur Produktion großer Mengen von Hmd wurde *M. marburgensis* unter Ni-limitierten Bedingungen im Archaeenzentrum der Universität Regensburg im Pilotmaßstab fermentiert. Der Lauf wurde gemeinsam mit Herr Dipl.-Ing. Thomas Hader durchgeführt. Kulturvolumen war 250 l in einem 300 l-Fermenter (Reaktionsraum aus emailliertem Stahl mit Titan-Rührwerk).

Die Fermentation erfolgte bei T = 65° C und p = 0.5 bar.

Für die kontinuierliche Versorgung mit H₂S wurde gasförmiger Schwefelwasserstoff über einen mit Inertgas spülbaren Edelstahl-Druckminderer (DruVa) aus einer Druckgasflasche (Messer Griesheim) entnommen und der H₂/CO₂-Zuleitung zum Fermenter über einen Edelstahl-Kleindurchflußmesser (Modell 10A6142CA, Bailey Fischer Porter) zudosiert. Alle Elemente dieses Gaszuges wurden über Swagelok-Anschlüsse mit Edelstahl-Rohrleitungen verbunden.

Angeimpft wurde mit 3 l einer Vorkultur von OD₅₇₈ = 4.5. Die Rührgeschwindigkeit wurde im Verlauf der Fermentation schrittweise erhöht (150 rpm, 250 rpm, 450 rpm), ebenso wie die Gasflußrate (zunächst 10 l/min H₂/CO₂ (80:20), 10 ml/min H₂S, später bis zu 50 l/min und 25 ml/min).

Die Zelldichte bei der Ernte war $3.7 \cdot 10^9$ Zellen/ml, die Ausbeute 1.5 kg Feuchtzellen aus 250 l Kulturvolumen (davon gingen 700 g durch einen Lagerschaden an den verwendeten Durchflußzentrifugen verloren).

5.2.2 Herstellung von *E. coli*-Stammkulturen

Für die Herstellung von Stammkulturen wurden 3 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie inokuliert und für 10 h bei 37° C im Schüttler inkubiert. 300 µl der Kultur wurden mit

300 μl einer Glycerol-Stocklösung (65 % Glycerol, 25 mM Tris/HCl, 100 mM MgSO_4 , pH 7.5) gemischt, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert.

5.2.3 Proteinexpression in *E. coli*

Zur Produktion der unmarkierten Apoproteine wurden 50 ml LB-Medium in einem 250 ml-Erlenmeyerkolben mit den Antibiotika Chloramphenicol (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und Kanamycin (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) im Falle von jHmd bzw. Ampicillin (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) im Falle von kHmd versetzt. Die Kultur wurde aus einer Glycerol-Stammkultur mit B834(DE3)/pLysS/pHmd2 bzw. B834(DE3)/pLysS/pHmd2CHis oder B834(DE3)/pLysS/pHmd3 inokuliert und über Nacht bei 37°C und 225 rpm inkubiert.

Für die Hauptkultur wurden 2 l-Schikanekolben mit 400 ml TP-Medium in gleicher Weise mit Antibiotika versetzt, und das vorgewärmte Medium 1:50 mit der Übernachtskultur angeimpft. Die Inkubation erfolgte wie bei der Vorkultur.

Bei einer OD_{600} von 0.6 (jHmd) bzw. 1.3 (kHmd) erfolgte die Induktion mit 0.5 mM IPTG. 3.5 h nach Induktion wurden die Kulturen auf Eis gekühlt und die Zellen geerntet (GS3-Rotor, 5000 rpm, 15 min). Die Zellen wurden in Sarstedt-Röhrchen transferiert und bei -80°C gelagert.

5.2.4 Produktion von SeMet-Protein in *E. coli*

Zur Produktion der SeMet-markierten Apoproteine in *E. coli* wurde das in 5.1.4 beschriebene LeMaster-Medium mit 1 mM MgSO_4 (1 M Stammlösung), 1 mM CaCl_2 (1 M Stammlösung), 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Thiamin-HCl (Stammlösung 10 mg/ml), 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Biotin (Stammlösung 10 mg/ml in DMSO) und den Antibiotika Chloramphenicol (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) und Kanamycin (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) im Falle von jHmd bzw. Ampicillin (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) im Falle von kHmd versetzt.

Für eine Vorkultur wurde zu einem Volumen von 20 ml dieses Mediums in einem 100 ml-Erlenmeyerkolben L-Methionin in einer Konzentration von 45 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Stammlösung 45 mg/ml) hinzugefügt. Das vorgewärmte Medium wurde nun aus einer Glycerol-Stammkultur mit B834(DE3)/pLysS/pHmd2 (und Derivaten für kHmd) bzw. B834(DE3)/pLysS/pHmd3 inokuliert und für mindestens 20 h bei 37°C und 225 rpm inkubiert. Es war dabei essentiell, daß sich die Vorkultur in der stationären Phase befanden.

Für die Hauptkultur wurde 1 l vorgewärmtes Medium in einem 5 l-Kolben (ohne Schikanen) vorbereitet wie oben beschrieben, wobei hier statt L-Met L-SeMet in einer Konzentration von 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Stammlösung 20 mg/ml) zugefügt wurde. Die Kultur wurde 1:2000 mit der stationären Vorkultur beimpft und bei 37°C und 175 rpm inkubiert. Bei einer OD_{600} von 0.5 wurde mit 0.5 mM IPTG (0.5 M Stammlösung) induziert. Etwa 6 h nach Induktion wurden die Zellen geerntet (GS3-Rotor, 5000 rpm, 15 min). Die OD_{600} betrug dann etwa 2.0.

5.3 Molekularbiologische Methoden

5.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Plasmidische DNA wurde mit Hilfe der Reinigungssysteme QIAprep Spin Miniprep im kleinen bzw. QIAfilter Midiprep (beide QIAGEN AG, Hilden) im größeren Maßstab nach den Angaben des Herstellers isoliert.

5.3.2 DNA-Restriktion

Die Restriktion plasmidischer DNA wurde in Ansätzen von 20–40 μ l Volumen durchgeführt. Enzymaktivität, Reaktionspuffer und Inkubationsbedingungen wurden nach den Angaben der Enzymhersteller gewählt.

5.3.3 Gelelektrophorese und Isolierung von DNA-Fragmenten

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in einem Flachbett-Agarosegel bei einer elektrischen Feldstärke von 5 V/cm. Hierzu wurde Agarose in einer Endkonzentration von 1.2–2% (je nach Größenbereich der zu analysierenden Fragmente) in TAE-Puffer aufgekocht (50 \times -Stocklösung enthält 2 M Tris, 1 M Essigsäure, 50 mM EDTA, pH 8.0). Vor dem Gießen der Flachbettgele wurde der Lösung Ethidiumbromid (0.1% Lösung) in einer Endkonzentration von 0.5 μ g/ml zugesetzt.

Als Größenstandards wurden die „100 bp ladder“- bzw. „1 kb ladder“-Marker von New England Biolabs verwendet.

Die DNA-Fragmente wurden nach der Elektrophorese über die Fluoreszenz der DNA-Ethidiumbromid-Komplexe auf einem UV-Durchlichttisch (TI 1, Biometra) sichtbar gemacht. War eine Klonierung der DNA-Fragmente geplant, erfolgte die Anregung bei 366 nm, sonst bei 254 nm.

Für die Isolation von DNA-Fragmenten aus dem Gel wurde die entsprechende Bande bei schwachem UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit den Extraktionssystemen QIAquick oder – bei kleineren Fragmenten (\leq 300 bp) – QIAex II (beide QIAGEN AG, Hilden) gereinigt.

5.3.4 Ligation

Für die Ligation wurde T4 DNA-Ligase verwendet. Die Reaktionsbedingungen wurden nach den Angaben der Enzymhersteller (MBI Fermentas, New England Biolabs) gewählt.

5.3.5 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion wurden zur Herstellung von Oligohistidin-Insertionen (s. 3.3.1) und zur Sequenzierung (s. 5.3.6) eingesetzt. Dabei wurde ein T3 Thermocycler (Biometra, Göttingen) verwendet.

5.3.6 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte basierend auf der Methode von Sanger [147]. Dabei wurde eine PCR-Sequenzierung unter Verwendung fluoreszenzmarkierter Oligonukleotide für das ALF-System (Amersham Biosciences, Freiburg) unter Verwendung der Reagentien und nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Elektrophorese und Auswertung der Sequenzen wurden von Frau Elisabeth Uloth, MPI für Biophysik durchgeführt.

5.3.7 Transformation

Die Herstellung chemisch kompetenter Zellen von *E. coli* und die Transformation mittels Temperaturschock erfolgte wie in [148] beschrieben.

5.4 Biochemische Methoden

5.4.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Proteinkonzentration wurde mit der Methode nach Bradford [149] unter Verwendung einer kommerziell erhältlichen Reagenzlösung (Bio-Rad Protein Assay) oder über die Absorption im UV bei gereinigten Proteinen nach [150] bestimmt.

5.4.2 Aktivitätstest

Die Enzymaktivität von Hmd wurde wie in [41] beschrieben bestimmt. Der Assay wurde bei 65° C unter anaeroben Bedingungen (N₂-Atmosphäre) in Quarzküvetten durchgeführt. Der Ansatz von 700 μ l enthielt 120 mM Kaliumphosphat pH 6.0, 40 μ M H₄MPT und 2 mM Formaldehyd; durch Reaktion von H₄MPT mit Formaldehyd wird spontan Methylen-H₄MPT gebildet [146].

Die enzymkatalysierte Reaktion wurde durch Zugabe von einer enzymhaltigen Probe gestartet und die Bildung von Methenyl-H₄MPT⁺ bei 336 nm photometrisch verfolgt ($\Delta\epsilon = 21.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [146]).

1 U Enzymaktivität entspricht der Bildung von 1 μ mol Methenyl-H₄MPT⁺ in einer Minute.

5.4.3 SDS-PAGE

Die diskontinuierliche SDS-PAGE zur denaturierenden Auftrennung von Proteingemischen wurde nach [151] durchgeführt. In der Regel wurden 12.5%ige Trenngele verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Stromstärke von 15 mA, die bei Erreichen des Trenngels durch die Markerfront auf 20-25 mA erhöht wurde. Zur Referenz dienten verschiedene kommerziell erhältliche Gemische von Markerproteinen.

Zur Detektion der Proteinbanden wurden die Gele anschließend mit Coomassie Brilliant Blue oder mit Silber gefärbt.

5.4.4 Native PAGE

Die native diskontinuierliche PAGE wurde für das Screenen von Schweratomverbindungen für die Eignung zur Präparation von Schweratomderivaten [82] eingesetzt.

Gegenüber der SDS-PAGE war hier kein SDS im Gel und im Laufpuffer anwesend. Der Probenauftragspuffer war frei von SDS und DTT. Zudem wurden die Proteinproben vor dem Auftrag auf das Gel nicht erhitzt.

5.4.5 Western-Blotting

Diese Methode wurde zum immunologischen Nachweis geringer Mengen verschiedener Hmd-Spezies in komplexen Proteingemischen verwendet. Das gegen Hmd aus *M. marburgensis* erzeugte Antiserum (5.1.2) besitzt eine Kreuzreaktivität gegen die Enzyme aus *M. jannaschii* und *M. kandleri* und konnte daher auch zu deren Nachweis verwendet werden.

Der Elektrotransfer von Proteinen aus einer SDS-PAGE auf eine PVDF-Membran erfolgte mit der *Semi-Dry*-Methode. Die Bindung des spezifischen Antikörpers wurde durch Bindung eines gegen ihn gerichteten Sekundärantikörpers nachgewiesen, der kovalent mit alkalischer Phosphatase gekoppelt ist (5.1.2). Die Detektion erfolgte durch eine enzymkatalysierte Farbreaktion.

Für alle Schritte wurden Standardprotokolle verwendet [152]; das verwendete Antiserum wurde in einer Verdünnung von 1:10000, der Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:20000 eingesetzt.

5.4.6 Anaerobe Reinigung von Hmd aus *M. marburgensis*-Zellen

Die Reinigung erfolgte wie in [81] beschrieben und umfaßte eine Zink-Fällung sowie zwei Anionenaustauscher-Säulen. Alle Schritte wurden unter Sauerstoffausschluß in einem anaeroben Zelt (Coy, Ann Arbor, MI, USA) in einer Atmosphäre von Formiergas (95% N₂, 5% H₂) in Gegenwart eines Palladiumkatalysators oder in gasdichten Gefäßen durchgeführt.

Zunächst wurden die Zellen gewogen und mit der doppelten Menge 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7.0 suspendiert.

Der Zellaufschluß erfolgte durch Beschallen (Sonoplus HD200 Desintegrator, Bandelin, Berlin) für eine Dauer von 3×8 min bei 180 W Leistung mit 5 min Pausenintervallen in einem eisgekühlten Rosettengefäß. Der erhaltene Zellextrakt wurde in Zentrifugenröhrchen transferiert und für 40 min bei 30000 g und 4° C in einer Beckman L8-70 Ultrazentrifuge abzentrifugiert.

Der Zellextrakt wurde nun in 1.5 ml-Aliquots mit 50 mM ZnCl₂ (Stammlösung 500 mM in 50 mM MOPS/KOH pH 7.0) versetzt und präzipitiertes Protein in einer Eppendorf-Zentrifuge für 10 min abzentrifugiert.

Die nachfolgenden chromatographischen Schritte wurden unter Verwendung einer FPLC-Anlage im anaeroben Zelt durchgeführt.

Der Fällungsüberstand wurde 1:2 mit 50 mM MOPS/KOH pH 7.0 verdünnt, filtriert und auf eine zuvor mit diesem Puffer äquilibrierte Q Sepharose-Säule (HiLoad 26/10) aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten 0–200 mM NaCl in 30 ml, 200–650 mM NaCl in 270 ml bei einer Flußrate von 4 ml/min. Es wurden Fraktionen von 6 ml aufgefangen. Die Fraktionen mit der höchsten Enzymaktivität wurden vereint, 1:2 mit 50 mM MOPS/KOH pH 7.0 verdünnt und auf eine mit diesem Puffer äquilibrierte Resource Q (6 ml) aufgetragen. Dieses Mal erfolgte die Elution mit einem Gradienten von 0–400 mM NaCl in 120 ml. Fraktionen von 2 ml wurden gesammelt und mittels SDS-PAGE und Aktivitätstest charakterisiert. Die Fraktionen mit der höchsten Aktivität wurden vereint, durch Ultrafiltration eingengt und in 10 mM MOPS/KOH pH 7.0 überführt.

Alternativ zur Resource Q konnte für den zweiten Chromatographieschritt auch eine Mono Q HR 10/10 verwendet werden, deren Reinigungsleistung besser ist.

5.4.7 Reinigung vom Protein mit C-terminaler (His)₆-Peptidfusion

Die tiefgefrorene Zellen aus 1 l Expressionskultur wurden mit einer Spatelspitze DNase I in 40 ml 50 mM Kaliumphosphat, 1 mM PMSF, pH 8.0 resuspendiert. Aufgrund der Expression von T7 Lysozym in dem verwendeten Expressionsstamm lysierten die Zellen bereits beim Auftauen.

Die Suspension wurde 3×2 min mit einer Ultraschallsonde (Branson Sonifier, output level 6, duty cycle 50 %) beschallt. Zelltrümmer und Membranen wurden anschließend in einem Ultrazentrifugationsschritt bei 40 krpm und 4° C für 40 min im Ti 45-Rotor sedimentiert.

Die nachfolgenden chromatographischen Schritte wurden bei 4° C durchgeführt.

Der Überstand wurde 1:1 mit 50 mM NaH₂PO₄, 600 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8.0 versetzt und über einen 0.2 µm-Filter gegeben. Anschließend wurde die Probe auf eine mit 50 mM Natriumphosphat, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8.0 äquilibrierte Ni-NTA-Agarosesäule (25 ml Bettvolumen) unter Verwendung einer HiLoad-Station aufgetragen (Flußrate 2 ml/min).

Die Säule wurde anschließend mit 50 mM Natriumphosphat, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8.0 gewaschen, bis der Durchlauf keine erhöhte UV-Absorption mehr zeigte. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit 40 mM Imidazol, die Elution des Proteins erfolgte dann mit 60 mM Imidazol.

Aufgrund der geringen Affinität der Hexahistidin-markierten kHmd war ein weiterer Reinigungsschritt erforderlich, für den ein Anionenaustauscher verwendet wurde.

Zunächst war ein Pufferwechsel erforderlich. Hierfür wurde das Eluat auf eine mit 50 mM MOPS/KOH, pH 7.0 äquilibrierte Sephadex G25-Säule (Säulenvolumen 80 ml) und in diesem Puffer eluiert.

Anschließend wurde die Probe auf eine mit demselben Puffer äquilibrierte Mono Q HR 10/10-Säule an einer FPLC-Station aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem NaCl-Gradienten von 0–300 mM in 20 ml und dann von 300–550 mM in 80 ml, wobei Fraktionen von 2 ml gesammelt wurden.

Die Fraktionen wurden auf einer SDS-PAGE analysiert und diejenigen mit hochreinem Protein vereint. Die Probe wurde anschließend per Ultrafiltration (Centriprep 50/Centricon 50) eingengt und in 25 mM MOPS/KOH pH 7.0 überführt.

5.4.8 Reinigung der Enzyme von *M. kandleri* und *M. jannaschii*

Die Reinigung der SeMet-markierten Proteine unterschied sich von derjenigen der unmarkierten Proteine dadurch, daß zu allen Puffern 10 mM DTT zum Schutz vor Oxidation zugesetzt werden. Alle chromatographischen Schritte werden bei 4° C durchgeführt.

Die tiefgefrorene Zellen aus 1 l Expressionskultur wurden mit einer Spatelspitze DNase I in 40 ml 50 mM Kaliumphosphat, 1 mM PMSF, pH 7 resuspendiert. Aufgrund der Expression von T7 Lysozym in dem verwendeten Expressionsstamm lysierten die Zellen bereits beim Auftauen.

Die Suspension wurde 3×2 min mit einer Ultraschallsonde (Branson Sonifier, output level 6, duty cycle 50 %) beschallt. Zelltrümmer und Membranen wurden anschließend in einem Ultrazentrifugationsschritt bei 40 krpm für 40 min im Ti 45-Rotor sedimentiert.

Der Überstand wurde auf 2 ml-Eppendorfgefäße verteilt und für 20 min einer Hitze-fällung bei 80° C unterzogen (Heizblock). Präzipitiertes Protein wurde anschließend in der Tischzentrifuge sedimentiert (10 min 14 krpm).

Dem Überstand wurde Ammoniumsulfat bis zu einer Konzentration von 600 mM zugesetzt (4 M Stammlösung). Nach Filtration über einen 0.2 µm-Filter wurde die Probe auf eine mit 50 mM MOPS/KOH, 1 M Ammoniumsulfat, 10% Glycerol, pH 7.0 äquilibrierte Phenyl-Sepharose FF-Säule (40 ml Bettvolumen) unter Verwendung eines HiLoad-Systems aufgetragen (Flußrate 4 ml/min). Die Säule wurde so lange mit dem Auftragspuffer gewaschen, bis der Durchlauf keine erhöhte UV-Absorption mehr zeigte.

Anschließend wurde das gebundene Protein mit 50 mM MOPS/KOH, 10% Glycerol, pH 7.0 eluiert und in einem möglichst kleinen Volumen gesammelt. Zum Pufferwechsel wurde das Eluat auf eine mit 50 mM MOPS/KOH, pH 7.0 äquilibrierte Sephadex G25-Säule geladen (Säulenvolumen 80 ml). Diese Säule kann mit sehr hoher Flußrate (bis 20 ml/min) betrieben werden.

Das Protein wurde gesammelt und auf eine mit 50 mM MOPS/KOH, pH 7.0 äquilibrierte Resource Q-Säule (6 ml Bettvolumen) aufgetragen, die bei einer Flußrate von 6 ml/min an einer FPLC-Station betrieben wurde. Das Protein wurde nun mit einem NaCl-Gradienten eluiert.

Die Wahl dieses Gradienten stellte den einzigen Unterschied bei der Aufreinigung der beiden Enzymvarianten dar; im Falle von jHmd wurde ein Gradient von 0–400 mM NaCl auf 250 ml gewählt, für die Reinigung von kHmd ein Gradient von 0–600 mM auf 250 ml. Das eluierte Protein wurde in Fraktionen von 5 ml gesammelt, die anschließend auf einer SDS-PAGE analysiert wurden. Die Fraktionen mit hochreinem Protein wurden vereinigt und unter Verwendung von Ultrafiltrationseinheiten (Centriprep 50/Centricon 50) eingengt und in 25 mM MOPS/ KOH pH 7.0 überführt.

5.4.9 Analytische HPLC-Gelfiltration

Die analytische Gelfiltration erlaubt es, den Oligomerisierungszustand einer gereinigten Proteinprobe zu untersuchen. Vor allem die Anwesenheit größerer Mengen an hochmolekularen Aggregaten und das Vorliegen von Gemischen verschiedener oligomerer Zustände können mit dieser Methode gezeigt werden.

Außerdem kann vom Laufverhalten die apparente molekulare Masse eines Proteinaggregates abgeleitet und damit in günstigen Fällen der Oligomerzustand bestimmt werden.

Allerdings ist für das Laufverhalten nicht die molekulare Masse, sondern eher der hydrodynamische Radius eines Proteinaggregates relevant, so daß bei nicht-sphärischen Partikeln die Ergebnisse stark verfälscht werden.

Die Experimente in dieser Arbeit wurden auf einem Smart-HPLC-System (Amersham Biosciences, Freiburg) durchgeführt. Gegebenenfalls wurde eine interne Kalibrierung mit Referenzproteinen bekannter molekularer Masse vorgenommen.

5.4.10 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Massenspektrometrische Untersuchungen wurden im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt, um die Inkorporation von Selen und die Bindung von Quecksilber bei der Herstellung von Schweratomderivaten zu studieren, und um die bei den Kristallisationsversuchen mit der jHmd erhaltenen Mikrokristalle zu charakterisieren.

Für die Messungen wurden Voyager DE-RP MALDI-TOF-Massenspektrometer (Perkin Elmer Biosystems, Weiterstadt) verwendet, entweder am MPI für terrestrische Mikrobiologie, Marburg durch Jörg Kahnt, oder (im Falle der jHmd-Mikrokristalle) am Institut für Analytische und Instrumentelle Chemie der Universität Frankfurt durch Ralf Krüger.

5.4.11 TXRF-Spektroskopie

Die TXRF-Messungen wurden einem EXTRA IIA TXRF-Spektrometer (Atomika Instruments GmbH, Oberschleißheim) unter Verwendung von MoK_α and WLa_α -Anregung durchgeführt. Zur internen Standardisierung wurde den Proteinproben Chrom bzw. Rubidium als Standard (0.1–1 mg/l) zugesetzt. Die Proteinproben wurden in 20 mM Tris-Acetatpuffer pH 7.0 transferiert. Die Dauer der Datenaufnahme für jede Messung betrug 1000 s.

5.5 Kristallographische Methoden

Rechenintensive Software-Programme wurden in der Regel auf Compaq Alpha-Arbeitsplätzen unter Tru64 UNIX oder auf PC-Arbeitsplätzen unter Linux eingesetzt. Soweit Programme nur im Quelltext verfügbar waren, wurden die Standardcompiler für die

jeweilige Sprache eingesetzt (Compaq Fortran-Compiler bzw. g77 für Fortran77, Compaq C-Compiler bzw. gcc für C, Compaq CXX bzw. g++ für C++).

Für bestimmte Programme wurden zusätzlich Sprachumgebungen für JAVA (*SnB*, *Tops*, *TopsEdit*) und Python (*PyMol*) verwendet.

Für Modellbau und -visualisierung wurden Grafik-Arbeitsplätze der Firma Silicon Graphics (*Indigo*², *Onyx*, *Octane*) in Verbindung mit dem *CrystalEyes Stereo-System* der Firma *Stereographics* (San Rafael, CA, USA) eingesetzt.

5.5.1 Proteinkristallisation

Alle Kristallisationsexperimente wurden als miniaturisierte Dampfdiffusionsexperimente [153] nach der Methode des hängenden Tropfens durchgeführt.

Die Reservoirlösung wurde in 24-Loch-Linbro-Zellkulturplatten (*ICN*, Meckenheim oder *Hampton Research*, Laguna Niguel, CA, USA) gegeben. Die Proteinlösung wurde mit der Reservoirlösung auf zuvor mit einer 2% Dichlor-Dimethylsilanlösung silanisierten Deckgläschen gemischt und auf die Kammer mit Reservoirlösung aufgesetzt, wobei zur Abdichtung *Basilon-Siliconpaste* (*Bayer AG*, Leverkusen) verwendet wurde.

Für die Suche nach neuen Kristallisationsbedingungen wurden in der Regel zunächst kommerziell erhältliche Sätze von Kristallisationsbedingungen getestet (*Crystal Screen I* und *II*, *Hampton Research*, Laguna Niguel, CA, USA), modifizierte *sparse matrix screens* [154], die auf dem Konzept des unvollständigen faktoriellen Screenings basieren [155].

Zusätzlich wurden – vor allem für *jHmd* – eigene Screens entwickelt, sowohl Sätze von *grid screens* auf Basis der publizierten erfolgreichen Kristallisationsbedingungen von Proteinen aus *M. jannaschii*, als auch *random screens*, die mit Hilfe des *CRYSTOOL-Servers* (<http://www-structure.llnl.gov/crystool>, [156]) generiert wurden.

Dabei wurde der genutzte Multiparameterraum aufgrund von Löslichkeitsinformationen aus zuvor durchgeführten *footprint screens* [157] begrenzt.

5.5.2 Präparation von Schweratomderivaten

Für die Herstellung von Schweratomderivaten wurden die Proteinkristalle in einen geeigneten Stabilisierungspuffer transferiert. Dieser entsprach im einfachsten Fall der Reservoirlösung, wobei die Konzentration des Fällungsmittels geringfügig erhöht wurde, um die Abwesenheit von Protein auszugleichen.

Dieser Lösung wurden die Schweratomverbindungen in Konzentrationen von in der Regel 0.5–10 mM zugesetzt.

Da die Schweratomverbindungen häufig in höherer Konzentration oder bei längerer Einwirkung zur Zerstörung der Kristalle führen, müssen in einem iterativen Prozeß Bedingungen gefunden werden, die zu einem Derivat führen, das einerseits noch gute Beugungseigenschaften aufweist und zum nativen Kristall isomorph ist, andererseits aber gut besetzte Schweratompositionen besitzt.

Für die Derivatisierungsversuche mit Lanthaniden mußte ein Stabilisierungspuffer verwendet werden, der MES/NaOH statt Cacodylat/HCl enthält, weil sich sonst eine zementartige Kolloidphase bildet.

5.5.3 Einfrieren von Proteinkristallen

Die Diffraktionsexperimente in dieser Arbeit wurden ausnahmslos an tiefgekühlten Proteinkristallen durchgeführt. Bei tiefen Temperaturen sind die Strahlungsschäden stark reduziert, weil radiolytisch freigesetzte Radikale im gefrorenen Kristall immobilisiert sind.

Zum Einfrieren wurden die Kristalle in einen geeigneten cryoprotektiven Puffer transferiert und dann möglichst schnell in einer auf einer Stahlnadel mit Magnethalter montierten Faserschlinge (Cryoloop, Hampton Research) eingefroren, entweder in einem durch einen Kryostaten (Oxford Cryosystems, Oxford, UK) erzeugten tiefkalten Stickstoffstrahl oder in flüssigem Stickstoff.

Die Kristalle wurden für die weitere Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert. Für den Transport diente ein Transport-Dewar (Taylor-Wharton).

Es wurden die folgenden Puffer zum Einfrieren der verschiedenen Kristallsorten verwendet:

Hmd aus <i>M. marburgensis</i>	100 μ l 1 M Na-Cacodylat/HCl pH 6.0
	500 μ l 4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
	275 μ l 80% Glycerol
	60 μ l 20% PEG 8000
	65 μ l H_2O

Für das Einfrieren von Lanthaniden-Derivaten wurde Cacodylat/HCl durch MES/NaOH ersetzt, weil Cacodylat mit Lanthaniden unlösliche Kolloide bildet.

Für die Oxidation von SeMet-Resten unmittelbar vor dem Einfrieren:

Oxidationspuffer	100 μ l 1 M Na-Cacodylat/HCl pH 6.0
	500 μ l 4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
	275 μ l 80% Glycerol
	10 μ l 30% H_2O_2
	1155 μ l H_2O

Hmd aus <i>M. jannaschii</i>	100 μ l 1 M Na-Cacodylat/HCl pH 6.0
	480 μ l 4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
	280 μ l 80% Glycerol
	140 μ l H_2O

Hmd aus <i>M. kandleri</i>	100 μ l 1 M Bicin/NaOH pH 9.0
	100 μ l 1 M MgCl ₂
	320 μ l MPD
	480 μ l H ₂ O

5.5.4 Datensammlung

Alle in dieser Arbeit referierten Datensätze wurden an tiefgekühlten Kristallen mit der Oszillationsmethode gemessen. Zur Kühlung wurden Kryostaten der Firma Oxford Cryosystems (Oxford, UK) eingesetzt.

Ein Teil der Datensätze wurde im Institut unter Verwendung zweier Röntgeneratoren MSC Rigaku Ru-200 (erzeugt mittels einer rotierenden Anode CuK _{α} -Strahlung von 1.54 Å) und Mar345 bzw. MSC R-Axis 4++ Image-Plate-Detektoren aufgenommen.

Die Kristalle wurden unter Verwendung eines Goniometerkopfes auf ein Einkreis-Diffraktometer (Huber Diffraktionstechnik, München) montiert und mit einer senkrecht zur Achse des Röntgenstrahles positionierten CCD-Kamera justiert.

Ein großer Teil der Datensätze wurde an verschiedenen Synchrotronmeßplätzen gemessen, im einzelnen BW6 (Max-Planck-Gruppen für Strukturelle Molekularbiologie, DESY, Hamburg), BW7A, BW7B, X11, X13, X31 (alle EMBL Hamburg, DESY), BM14, ID13, ID14 (EH4), ID29 (alle ESRF, Grenoble, Frankreich) und X12C (NSLS, Brookhaven National Laboratory, New York, USA).

Dabei wurden verschiedene Diffraktometer und Image-Plate-Detektoren vom Typ Mar345 (BW7B, X31) oder CCD-Detektoren der Typen Mar165 (BW6, BW7A, X11, X13, BM14, ID13), ADSC Quantum Q4 (ID14, ID29) oder Brandeis B1 (X12C) verwendet.

Nach einer ersten Aufnahme wurde auf Basis von Mosaizität und Beugungsgrenze der Kristall-Detektor-Abstand und der Oszillationswinkel gewählt. Die Aufnahme wurde prozessiert und aufgrund der Indizierung mit dem Programm STRATEGY [158] ein optimaler Startwinkel berechnet, um vollständige Daten in einem möglichst kleinen Oszillationsbereich sammeln zu können [159].

5.5.5 Datenprozessierung

Für die Datenprozessierung wurden entweder die Programme DENZO, SCALEPACK und XDISP oder die integrierte HKL2000-Programmversion verwendet [160].

Für die iterative Verfeinerung des bei der Skalierung verwendeten Fehlermodells wurde das Programm SCERROR verwendet.

Nachdem für die Integration der Daten zunächst nur ein geschätzter Wert für die Mosaizität verwendet wurde, wurden die Daten anschließend mit der von SCALEPACK verfeinerten Mosaizität reprozessiert.

5.5.6 Pseudopräzessionsaufnahmen

Um die Anwesenheit von Schraubenachsen zu überprüfen, wurden Pseudopräzessionsaufnahmen mit dem Programm HKLPLOT [99] erzeugt.

5.5.7 Test auf Verzwillingung

Für den Test auf das Vorliegen perfekter Zwillingsbildung oder die Bestimmung des Zwillingsanteils wurde der Twinning-Server (<http://www.doe-mbi.ucla.edu/Services/Twinning/>) oder das Software-Paket CNS [87] verwendet.

5.5.8 Zum Phasenproblem in der Proteinkristallographie

Das Ziel einer kristallographischen Strukturbestimmung, die Ableitung eines atomaren Modells für das betreffende Makromolekül, setzt die Kenntnis der dreidimensionalen Elektronendichteverteilung $\varrho(x y z)$ in der Elementarzelle voraus.

Diese kann durch Fourier-Synthese aus den Strukturfaktoramplituden $|F(h k l)|$ der Reflexe $(h k l)$ und den Phasenwinkeln $\varphi(h k l)$ berechnet werden:

$$\varrho(x y z) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} |F(h k l)| \cos [2\pi (hx + ky + lz) - \varphi(h k l)] \quad (15)$$

Aus den Primärdaten eines kristallographischen Experimentes, den Intensitäten $I(h k l)$, können die Amplituden bestimmt werden:

$$I(h k l) = k \cdot |F(h k l)|^2 \quad (16)$$

Dagegen sind die Phasenwinkel experimentell nicht direkt zugänglich.

Isomorpher Ersatz

Gelingt es, eine geringe Anzahl von Schweratomen (deutlich schwerer als C, N, O, S) an definierte Stellen des kristallisierten Proteins zu binden, ohne dabei das Kristallgitter zu verändern, werden diese Schweratome in meßbarer Weise zu den Reflexintensitäten beitragen.

Die Strukturfaktoren des Derivates ergeben sich dann durch Vektoraddition aus den Anteilen des Proteins und der Schweratome:

$$\mathbf{F}_{PH} = \mathbf{F}_P + \mathbf{F}_H \quad (17)$$

Nach Harker [161] können bei bekannten Schweratompositionen die unbekanntenen Phasen des Proteinstrukturfaktors \mathbf{F}_P bestimmt werden, indem man einen Kreis mit dem Radius $|\mathbf{F}_P|$ zeichnet, von dessen Mittelpunkt aus den Vektor $-\mathbf{F}_H$, und an dessen Ende einen zweiten Kreis mit dem Radius $|\mathbf{F}_{PH}|$.

Diese sogenannte Harker-Konstruktion ergibt zwei gleich wahrscheinliche Lösungen für die Proteinphasenwinkel, zur Unterscheidung der richtigen Lösung muß man zwei oder mehr isomorphe Derivate verwenden. Daher wird diese Methode als die Methode des mehrfachen isomorphen Ersatzes (MIR) bezeichnet; in der Praxis ist die häufig schlechte Isomorphie der Schweratomderivate das größte Problem dieser Methode.

Anomale Dispersion

Für ein freies Elektron beträgt der Phasenunterschied der gestreuten zur einfallenden Röntgenwelle genau 180° ; für die Elektronen der inneren Schalen eines Atoms beobachtet man dagegen eine Abweichung aufgrund der starken Wechselwirkung mit dem Atomkern.

Dieses Phänomen wird als anomale Dispersion bezeichnet. Fern der Absorptionskante eines Elementes ist dieser Effekt nur sehr schwach ausgeprägt und daher vernachlässigbar, nicht aber in deren Nähe. An diesen Resonanzwellenlängen führt Photonenabsorption zur Ejektion von Elektronen aus kernnahen Orbitalen. Man unterscheidet nach Herkunft der Elektronen K-Kanten (1s), drei L-Kanten (2p), und fünf M-Kanten (3d).

Durch die anomale Dispersion addiert sich zum normalen atomaren Streufaktor f^0 , der wellenlängenunabhängig ist, eine komplexe anomale Komponente aus einem Realteil f' und einem Imaginärteil f'' :

$$f = f^0 + f' + f'' \quad (18)$$

Dabei führt f' zu Intensitätsunterschieden von Reflexen mit identischen Miller-Indizes bei verschiedenen Röntgenwellenlängen (sogenannte *dispersive* Differenzen), f'' führt zur Verletzung des Friedelschen Gesetzes, d. h. $F(h k l)$ und $F(\bar{h} \bar{k} \bar{l})$ sind nicht länger identisch (sogenannte *anomale* oder *Bijvoet*-Differenzen). Letztere wurden erstmals an den Reflexen 111 bzw. $\bar{1}\bar{1}\bar{1}$ des Minerals Zinkblende beobachtet [162].

Sowohl f' als auch f'' sind in hohem Maße energieabhängig. An den Absorptionskanten steigt f'' rapide an, während f' absinkt (Abb. 30).

Bei der MAD-Methode nach Hendrickson [164] werden an einer durchstimmbaren Synchrotronquelle Datensätze bei Wellenlängen mit maximalem f'' (*peak*), minimalem f' (*inflection point*) und ein oder zwei zusätzliche (*remote*) Datensätzen auf der hoch- und/oder niedrigerenergetischen Seite der Kante gesammelt.

Die MAD-Methode wurde erstmalig 1988 angewandt [164] und hat sich seitdem zur wichtigsten Methode für die Bestimmung neuer Proteinstrukturen entwickelt [165, 166]. Ausschlaggebend hierfür sind die enormen Vorteile gegenüber der Methode des mehrfachen isomorphen Ersatzes: Da ein einziger Kristall verwendet wird, entfällt das Problem der Nicht-Isomorphie. Die anomale Komponente des Streufaktors ist unabhängig vom Streuwinkel, während die normale Komponente mit zunehmendem Winkel stark abnimmt, daher können gute experimentelle Phasen bis zu hoher Auflösung bestimmt werden. Schließlich eignen sich biosynthetisch mit SeMet markierte Proteine ausgezeichnet für MAD-Experimente [115].

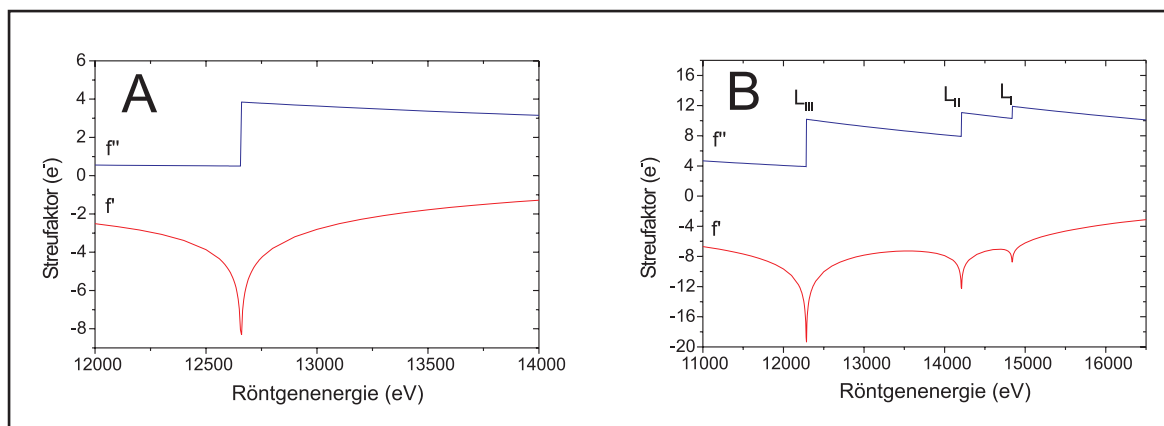


Abbildung 30: K-Röntgenabsorptionskante von Selen (A) und die drei L-Kanten von Quecksilber (B). Die in der vorliegenden Arbeit diskutierten MAD- und SAD-Experimente wurden an der Se-K- und der Hg- L_{III} -Kante durchgeführt. Die hier gezeigten Daten stammen von <http://brie.bmsc.washington.edu/scatter> und wurden nach der Approximation von Cromer und Liberman [163] berechnet. Diese liefert nur fern der Absorptionskanten genaue Ergebnisse. Die experimentell bestimmten Absorptionskanten haben eine eher sigmoidale Form. Vor allem unmittelbar vor den Kanten werden Übergänge hoher Wahrscheinlichkeit wirksam und ergeben das sogenannte *white line*-Feature. Für ein akkurates MAD-Experiment muß dieser *near edge*-Bereich (XANES) daher experimentell aus der Röntgenfluoreszenz bestimmt werden [85].

Allerdings erfordern die geringen beobachteten Differenzen eine präzise Messung; außerdem ist eine genaue Kontrolle der eingestellten Wellenlänge notwendig. Diese Forderungen können an modernen Synchrotronquellen allerdings routinemäßig erfüllt werden. So sind in einfachen Fällen Strukturbestimmungen in äußerst kurzer Zeit möglich [167].

Eine weitere Entwicklung geht dahin, in einem sogenannten SAD-Experiment nur einen Datensatz an der *Peak*-Wellenlänge zu messen. Mit den heute verfügbaren Methoden der Substrukturbestimmung (s. u.) und der Dichtemodifikation ist es bei guter Primärdatenqualität häufig auch hiermit möglich, eine interpretierbare experimentelle Elektronendichtekarte zu erhalten [168]–[170].

Als Alternative zur SeMet-Markierung hat sich in letzter Zeit die schnelle Inkorporation von Halogenidionen [171]–[175] oder Alkalimetallionen [175], mit geeigneten anomalen Streueigenschaften durch Inkubation eines Proteinkristalls in einem entsprechenden Cryopuffer erwiesen. Eine weitere Entwicklung geht dahin, die schwachen anomalen Streueigenschaften des natürlicherweise in Proteinen vorhandenen Schwefels zu nutzen [176].

Erst diese neuen Ansätze erlauben die Bestimmung von Proteinstrukturen mit hohem Durchsatz, die Grundlage der *Structural Genomics*-Projekte (z. B. für *M. thermoautotrophicus* [177]).

5.5.9 Auswertung von Derivat-Daten

Isomorphe und anomale Differenz-Patterson-Karten wurden unter Verwendung der Programme TRUNCATE, FFTBIG und NPO [99] erzeugt. Konnten in den Harker-Ebenen signifikante Maxima beobachtet werden, wurde die Lösung mit automatischen Dekonvolutionstechniken (5.5.10) oder die Substrukturbestimmung mit direkten Methoden (5.5.11) versucht.

Einen Hinweis auf das Vorliegen anomaler Streubeiträge geben zusätzlich Unterschiede in der Skalierungsstatistik vor allem bei hochredundanten Daten, wenn die Friedel-Paare getrennt oder gemeinsam behandelt werden.

5.5.10 Patterson-Methode zur Lokalisierung von Schweratomen

Die Differenz-Pattersonfunktion wird im Fall des MIR-Experimentes für isomorphe Differenzen zwischen Derivat- und Nativdaten, im Falle des SAD- oder MAD-Experimentes für anomale oder dispersive Differenzen definiert und lautet allgemein

$$P(u \ v \ w) = \frac{1}{V} \sum_{h \ k \ l} (|\Delta F|)^2 \cos(2\pi(hu + kv + lw)) \quad (19)$$

Dabei sind u , v und w die relativen (fraktionalen) Koordinaten in der Patterson-Zelle, die die gleichen Dimensionen der realen Zelle besitzt. Die Patterson-Karte weist Maxima an den Endpunkten von Vektoren zwischen Atomen (bzw. Schweratomen im Falle der Differenz-Pattersonkarte) in der realen Zelle auf; zusätzlich existiert für jedes Atompaar ein einzelnes Maximum.

Die Maxima sind in den meisten Fällen aufgrund von Symmetrie-Operatoren in bestimmten Schnittebenen der Patterson-Zelle, den sogenannten Harker-Ebenen konzentriert. Nur für eine kleine Anzahl von Schweratomen (z. B. 4–5) können deren Positionen aus der Patterson-Funktion abgeleitet werden, weil die Anzahl der Peaks in der Patterson-Map exponentiell mit der Anzahl der Atome N steigt ($N^2 - N$ Nicht-Ursprungs-Peaks).

Automatisierte Patterson-Dekonvolutionstechniken verwenden „geschärfte“ Patterson-Funktionen mit z. B. $\sqrt{E^3 F}$ statt F^2 , wodurch die Größe der löslichen Substrukturen deutlich zunimmt [178].

Zur automatischen Lösung von anomalen oder isomorphen Differenz-Patterson-Karten wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Programme SHELXS [178] oder SOLVE [179] verwendet.

5.5.11 Substrukturbestimmung mit direkten Methoden

Für kleine Moleküle ist bei atomarer Auflösung die Anzahl der gemessenen Reflexe weitaus größer als die Zahl der Parameter des atomaren Modells. Damit ist die Struktur

und demnach auch das Phasenproblem überdeterminiert und also im Prinzip lösbar. Dies ist die Grundlage für die direkte Abschätzung der Phasenwinkel.

Für direkte Methoden müssen die Strukturfaktoramplituden normalisiert werden, um Effekte wie beispielsweise die Abhängigkeit der Streufaktoren vom Bragg-Winkel zu korrigieren. Man erhält die sogenannten Magnituden $|E|$.

Das erwähnte hohe Daten-Parameter-Verhältnis impliziert, daß zwischen den experimentell zugänglichen Magnituden Korrelationen bestehen. Man bedient sich sogenannter Strukturinvarianten, v. a. der sogenannten Triplets: Für drei starke Reflexe, für die $H + K + L = 0$ gilt, ist die Summe der Triplettphasen mit hoher Wahrscheinlichkeit ebenfalls 0.

$$\varphi_{HK} = \varphi_H + \varphi_K + \varphi_{-H-K} \quad (20)$$

„Klassische“ direkte Methoden machen sich dies in der 1956 von Karle und Hauptmann (Nobelpreis für Chemie 1985) Tangenten-Formel [180] zunutze:

$$\tan \varphi_H = \frac{-\sum_k |E_K E_{H+K}| \sin(\varphi_K + \varphi_{-H-K})}{\sum_k |E_K E_{H+K}| \cos(\varphi_K + \varphi_{-H-K})} \quad (21)$$

Einen alternativen Ansatz stellt die sogenannte Minimalfunktion dar; das globale Minimum von $R\Phi$ stellt die Lösung des Phasenproblems dar [181]:

$$R\Phi = \frac{1}{\sum_{H,K} \kappa_{HK}} \sum \kappa_{HK} \left\{ \cos \Phi_{HK} - \frac{I_1(\kappa_{HK})}{I_0(\kappa_{HK})} \right\}^2 \quad (22)$$

mit

$$\kappa_{HK} = \frac{2}{N^{1/2}} |E_H E_K E_{H+K}| \quad (23)$$

wobei N die Anzahl der Atome, I_1 und I_0 die modifizierten Bessel-Funktionen sind.

Mit konventionellen direkten Methoden können nur kleine Strukturen mit < 100 Atomen gelöst werden, weil für größere Strukturen das Daten-/Parameterverhältnis zu schlecht wird.

In jüngster Zeit wurden neue Methoden entwickelt, die eine zyklische Phasenverbesserung in zwei Schritten umfassen (zur Übersicht s. [182, 183]): Zunächst werden in einem Verfeinerungsschritt die Phasen im reziproken Raum durch Anwendung der Beziehungen zwischen ihnen verbessert. Nach Fourier-Transformation folgt ein *Peak Picking*-Schritt im realen Raum, in dem an Stellen hoher Dichte neue Atompositionen addiert oder solche an Stellen niedriger Dichte aus dem Modell entfernt werden.

Mit dem verbesserten Modell werden nun neue Phasen berechnet und mit dem vorherigen Satz kombiniert.

Diese *Shake-and-Bake*-Methode hat die Lösung großer „kleiner“ Moleküle revolutioniert. Sie wurde in zwei Software-Programme implementiert: *SnB* [184]–[188] basiert auf der Minimal-Funktion, während SHELXD [189]–[191] auf der Tangenten-Formel beruht und einen etwas anderen Ansatz wählt, der als *half-baked* bezeichnet wird.

Im Falle von SHELXD kann eine Patterson-Dekonvolution ein gegenüber einem zufälligen Modell wesentlich besseres Startmodell liefern („integrierte Methode“). Eine weitere in SHELXD realisierte Strategie ist das gezielte Entfernen von Modellteilen; hierdurch werden falsche Positionen im weiteren Verlauf der Iteration mit hoher Wahrscheinlichkeit eliminiert [191].

Beide Programme erlauben die direkte Lösung von gegenüber konventionellen Methoden mindestens zehnfach größeren Strukturen bis hin zu kleineren Proteinen wie Lysozym [192]–[194]. Dieser Fortschritt ist umso bedeutender, als große „kleine Moleküle“ in der Vergangenheit häufig unlösbar waren, weil diese im Gegensatz zu Proteinen nicht immer mit Schweratomen derivatisiert werden können (Beispiele in [195]–[197]).

Für die Bestimmung vollständiger Strukturen mit direkten Methoden ist atomare Auflösung ($d \leq 1.1 \text{ \AA}$) eine zwingende Voraussetzung [198], weil für den *Peak picking*-Schritt die einzelnen Atome in der Elektronendichte klar separiert sein müssen. In jüngerer Zeit hat sich gezeigt, daß die geschilderten Methoden für die Bestimmung von Schweratom-Substrukturen aus isomorphen oder anomalen Differenz-Daten ebenfalls außerordentlich leistungsfähig sind [199, 200]. Wenn der Abstand der Atome in der Substruktur größer als die Auflösung der Daten ist (z. B. 3–4 Å), sind auch hier die Maxima in der Elektronendichte klar getrennt. Zudem sind auch Substrukturen bei mittlerer Auflösung in hohem Maße überdeterminiert.

Tatsächlich können mit diesen Verfahren heute einfache Substrukturen innerhalb weniger Sekunden und damit schon während eines MAD-Experimentes gelöst werden. Als besonders leistungsfähig haben sich diese Methoden für große Substrukturen erwiesen, für die eine Patterson-Dekonvolution ausgeschlossen ist. Den Rekord stellt momentan eine Struktur mit 160 Selen-Positionen dar [201].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zur Bestimmung von Selen-Substrukturen aus anomalen Differenz (SAD)-Daten wurden die Programme *SnB* Version 2.1 und SHELXD verwendet. Die Postprozessierung und Normalisierung erfolgte im Falle von *SnB* mit dem DREAR-Paket [202]–[205], wobei die Parameter nach den Vorschlägen in [200] angepaßt wurden. Bei SHELXD erfolgte die Normalisierung dagegen programmintern. Für Versuche zur Lösung kleiner Schweratom-Substrukturen wurde außerdem das Direkte-Methoden-Programm SHELXS verwendet.

5.5.12 Verfeinerung von Schweratomparametern

Die Verfeinerung von Schweratomparametern und die Berechnung experimenteller Phasen erfolgte unter Verwendung der beiden Programme MLPHARE [99] und SHARP [206].

Die in SHARP implementierten *Maximum-likelihood*-Methoden im Modulo-Raum liefern zwar wesentlich bessere Ergebnisse als MLPHARE, sind allerdings auch außerordentlich rechenintensiv. Daher wurde ergänzend MLPHARE herangezogen, etwa um einen Teil der zusätzlichen Selenpositionen zu lokalisieren, die dann in die SHARP-Verfeinerung integriert wurden.

5.5.13 Bestimmung von NCS-Operatoren

Sätze NCS-verwandter Selenpositionen wurden mit den Programmen DISTANG und LSQKAB aus dem CCP4-Paket [99] bestimmt. Ausgehend von den Selenpositionen wurden NCS-Matrices zwischen Molekülen mit dem Programm FINDNCS [207] berechnet. Schließlich wurden NCS-Matrices zwischen Molekülmodellen und molekularen Masken mit dem Programm O [100, 101] bestimmt. Für die NCS-Mittlung von Elektronendichten wurden molekulare Masken ausgehend von Bones oder Molekülmodellen unter Verwendung des Programmes MAMA erzeugt und durch Mittlung mit IMP verbessert (beide Programme von der Uppsala Software Factory, <http://alpha2.bmc.uu.se/usf/>).

5.5.14 Dichtemodifikation

Für *Solvent Flattening* und NCS-Mittlung wurde das Programm DM [96] verwendet; weitere für die Dichtemodifikation verwendete Programme waren SOLOMON [97] und RESOLVE [98].

5.5.15 Strukturbestimmung mittels Molekularem Ersatz

Für die Versuche zum Molekularen Ersatz wurden die Programme EPMR [86] und AMORE [208]–[210] verwendet.

5.5.16 Manipulation von Elektronendichtekarten

Für die Umwandlung von Elektronendichtekarten in verschiedene Formate wurden die Programme MAPMAN bzw. MAPPAGE (CCP4 → O) verwendet. Zur Skeletonisierung von Elektronendichtekarten wurde die BONES-Option von MAPMAN verwendet.

5.5.17 Automatische Interpretation von Elektronendichtekarten

Eine Methode zum automatischen Modellbau bei mittlerer Auflösung (ab etwa 2.5 Å) wurde in dem C++-Programm MAID [211] implementiert. Die Qualität der experimentellen Elektronendichten ließ im Falle der kHmd bei weitem keinen Bau des größten Teils der Hauptkette zu; allerdings wurden im bestdefinierten Teil der Dimerisierungsdomäne durch MAID einige Helices sogar mit der partiell korrekten Aminosäuresequenz gebaut. Das macht die große Leistungsfähigkeit dieses Verfahrens für weniger problematische Strukturen deutlich.

Im konkreten Fall wurden Fragmente erhalten, die als „verbesserte *Bones*“ als Orientierung für den manuellen Modellbau verwendet wurden.

Die leistungsfähigere wARP/ARP-Prozedur [212], die als Zwischenstadium ein Modell freier Atome verwendet, eignet sich nur bei hoher Auflösung ≤ 2.0 Å wegen des erforderlichen hohen Daten-/Parameterverhältnisses.

5.5.18 Modellbau und -verfeinerung

Der graphische Modellbau erfolgte mit O [100, 101]. An problematischen Bereichen, wo experimentelle oder $2F_o-F_c$ -Dichte keine eindeutige Modellierung ermöglichten, wurden die entsprechenden Modellteile entfernt und F_o-F_c -Omit-Elektronendichtekarten gerechnet.

Für die Verfeinerung von Modellen gegen unverzwillingte Daten wurde CNS [87] verwendet. Modelle mit größeren Fehlern wurden einem *Simulated Annealing* [213, 214] unter Verwendung von für die kristallographische Verfeinerung adaptierten *Slow Cooling*-Protokollen [215] unterzogen. Weiterhin wurden die Modelle einer individuellen Verfeinerung der Atomkoordinaten und der atomaren Temperaturfaktoren unterzogen. Für Bindungslängen und -winkel wurden dabei die Parameter aus [216] verwendet. Zu Validierungszwecken wurden 5% der Daten aus der Verfeinerung herausgenommen und zur Berechnung des „freien“ R-Wertes [217] benutzt.

5.5.19 Verfeinerung mit verzwillingten Daten

Für die Verfeinerung von Strukturmodellen gegen verzwillingte Daten wurde das Programm SHELXL [88] verwendet. Die Eingabedateien wurden mit Hilfe des Programms SHELXPRO erzeugt. Das letztere Programm diente auch zur Selektion einer Auswahl von Reflexen zur Berechnung des freien R-Wertes (unter Verwendung der Option zur Auswahl in dünnen Auflösungsschalen), sowie zur Berechnung von Elektronendichtekarten.

5.5.20 Analyse von Strukturmodellen

Die stereochemische Qualität von Proteinmodellen wurde mit PROCHECK [218] evaluiert. Für die Bestimmung von Sekundärstrukturanteilen wurde DSSP [105] und MolAuto [104] verwendet. Zum Vergleich mit bekannten Faltungsmustern wurden der TOPS-Server (<http://www.sander.embl-ebi.ac.uk/tops>) [110] sowie der DALI-Server (<http://www.ebi.ac.uk/dali>) [102, 103] verwendet.

5.5.21 Erstellen von Abbildungen

Für die schematische Darstellung von Strukturmodellen wurden die Programme MolAuto, MolScript [104] und Raster3D [219] verwendet. Weitere Abbildungen wurden mit BobScript [220], PyMol (<http://pymol.sourceforge.net>) und O erstellt. Schematische

Darstellungen von molekularen Topologien wurden mit dem Programm TOPS [110] unter Verwendung des TOPS-Servers (<http://www.sander.embl-ebi.ac.uk/tops>) oder der *Standalone*-Version des Programms erhalten. Abbildungen von Beugungsmustern wurden mittels FIT2D (<http://biocat1.iit.edu/fit2d/>) erzeugt.

5.5.22 Weitere kristallographische Methoden

Für die Bestimmung von Matthew-Koeffizienten und Lösungsmittelgehalt verschiedener Kristallformen wurde der Server http://www.structure.llnl.gov/Xray/comp/comp_cell_vm.html verwendet.

Die Berechnung von Real- und Imaginärteil der anomalen Streufaktoren aus experimentell bestimmten XRF/XANES-Daten erfolgte mit dem Programm CHOOCH [85].

Literatur

- [1] Wasserfallen, A., Nolling, J., Pfister, P., Reeve, J. und Conway, d. M. E. (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 thermautotrophicus* comb. nov., *Methanothermobacter wolfeii* comb. nov., and *Methanothermobacter marburgensis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 50 Pt 1, 43–53.
- [2] Hogan, K. B., Hoffman, J. S. und Thompson, A. M. (1991). Methane on the greenhouse agenda. *Nature* 354(6350), 181 – 182.
- [3] Woese, C. R., Kandler, O. und Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms - proposal for the domains archaea, bacteria, and eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87(12), 4576 – 4579.
- [4] DiMarco, A. A., Bobik, T. A. und Wolfe, R. S. (1990). Unusual coenzymes of methanogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* 59, 355 – 394.
- [5] Ferry, J. (1992). Biochemistry of methanogenesis. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 27(6), 473–503.
- [6] Weiss, D. S. und Thauer, R. K. (1993). Methanogenesis and the unity of biochemistry. *Cell* 72(6), 819 – 822.
- [7] Wolfe, R. S. (1996). 1776-1996: Alessandro Volta's combustible air. *ASM News* 62(10), 529 – 534.
- [8] Thauer, R. (1997). Biodiversity and unity in biochemistry. *Antonie Van Leeuwenhoek* 71(1-2), 21–32.
- [9] Thauer, R. (1998). Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. 1998 Marjory Stephenson Prize Lecture. *Microbiology* 144 (Pt 9), 2377–406.
- [10] Ferry, J. G. (1999). Enzymology of one-carbon metabolism in methanogenic pathways. *FEMS Microbiol. Rev.* 23(1), 13 – 38.
- [11] Ferry, J. G., Herausgeber (1993). Methanogenesis: Ecology, Physiology, Biochemistry and Genetics. Chapman & Hall.
- [12] Thauer, R. K. (1990). Energy-metabolism of methanogenic bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1018(2-3), 256 – 259.
- [13] Leigh, J., Rinehart KL, J. und Wolfe, R. (1985). Methanofuran (carbon dioxide reduction factor), a formyl carrier in methane production from carbon dioxide in *Methanobacterium*. *Biochemistry* 24(4), 995–9.

- [14] Deppenmeier, U., Muller, V. und Gottschalk, G. (1996). Pathways of energy conservation in methanogenic archaea. *Arch. Microbiol.* 165(3), 149 – 163.
- [15] Hedderich, R. und Thauer, R. K. (1988). *Methanobacterium thermoautotrophicum* contains a soluble enzyme system that specifically catalyzes the reduction of the heterodisulfide of coenzyme M and 7-mercaptoheptanoylthreonine phosphate with H₂. *FEBS Lett.* 234(1), 223 – 227.
- [16] Deppenmeier, U., Lienard, T. und Gottschalk, G. (1999). Novel reactions involved in energy conservation by methanogenic archaea. *FEBS Lett* 457(3), 291–7.
- [17] Beifuss, U., Tietze, M., Baumer, S. und Deppenmeier, U. (2000). Methanophenazine: Structure, total synthesis, and function of a new cofactor from methanogenic archaea. *Angew. Chem. Int. Ed.* 39(14), 2470–2472.
- [18] Ermler, U., Merckel, M., Thauer, R. und Shima, S. (1997). Formylmethanofuran: tetrahydromethanopterin formyltransferase from *Methanopyrus kandleri* - new insights into salt-dependence and thermostability. *Structure* 5(5), 635–46.
- [19] Grabarse, W., Vaupel, M., Vorholt, J., Shima, S., Thauer, R., Wittershagen, A., Bourenkov, G., Bartunik, H. und Ermler, U. (1999). The crystal structure of methenyltetrahydromethanopterin cyclohydrolase from the hyperthermophilic archaeon *Methanopyrus kandleri*. *Structure Fold Des* 7(10), 1257–68.
- [20] Shima, S., Warkentin, E., Grabarse, W., Sordel, M., Wicke, M., Thauer, R. und Ermler, U. (2000). Structure of coenzyme F₄₂₀ dependent methylenetetrahydromethanopterin reductase from two methanogenic archaea. *J Mol Biol* 300(4), 935–50.
- [21] Ermler, U., Grabarse, W., Shima, S., Goubeaud, M. und Thauer, R. (1997). Crystal structure of methyl-coenzyme M reductase: the key enzyme of biological methane formation. *Science* 278(5342), 1457–62.
- [22] Grabarse, W., Mahlert, F., Duin, E., Goubeaud, M., Shima, S., Thauer, R., Lamzin, V. und Ermler, U. (2001). On the mechanism of biological methane formation: structural evidence for conformational changes in methyl-coenzyme M reductase upon substrate binding. *J Mol Biol* 309(1), 315–30.
- [23] Grabarse, W., Mahlert, F., Shima, S., Thauer, R. und Ermler, U. (2000). Comparison of three methyl-coenzyme M reductases from phylogenetically distant organisms: unusual amino acid modification, conservation and adaptation. *J Mol Biol* 303(2), 329–44.
- [24] Vorholt, J. A., Hafenbradl, D., Stetter, K. O. und Thauer, R. K. (1997). Pathways of autotrophic CO₂ fixation and of dissimilatory nitrate reduction to N₂O in *Ferroglobus placidus*. *Arch. Microbiol.* 167(1), 19 – 23.

- [25] Chistoserdova, L., Vorholt, J., Thauer, R. und Lidstrom, M. (1998). C1 transfer enzymes and coenzymes linking methylotrophic bacteria and methanogenic Archaea. *Science* 281(5373), 99–102.
- [26] Vignais, P. M., Billoud, B. und Meyer, J. (2001). Classification and phylogeny of hydrogenases. *FEMS Microbiol. Rev.* 25(4), 455 – 501.
- [27] Adams, M. W. W. und Stiefel, E. I. (1998). Biochemistry - Biological hydrogen production: Not so elementary. *Science* 282(5395), 1842 – 1843.
- [28] Albracht, S. P. J. (1994). Nickel hydrogenases - in search of the active site. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenergetics* 1188(3), 167 – 204.
- [29] Volbeda, A., Charon, M., Piras, C., Hatchikian, E., Frey, M. und Fontecilla-Camps, J. (1995). Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Nature* 373(6515), 580–7.
- [30] Volbeda, A., Garcia, E., Piras, C., deLacey, A. L., Fernandez, V. M., Hatchikian, E. C., Frey, M. und Fontecilla-Camps, J. C. (1996). Structure of the [NiFe] hydrogenase active site: Evidence for biologically uncommon Fe ligands. *J. Am. Chem. Soc.* 118(51), 12989 – 12996.
- [31] Higuchi, Y., Yagi, T. und Yasuoka, N. (1997). Unusual ligand structure in Ni-Fe active center and an additional Mg site in hydrogenase revealed by high resolution X-ray structure analysis. *Structure* 5(12), 1671 – 1680.
- [32] Higuchi, Y., Ogata, H., Miki, K., Yasuoka, N. und Yagi, T. (1999). Removal of the bridging ligand atom at the Ni-Fe active site of [NiFe] hydrogenase upon reduction with H₂, as revealed by X-ray structure analysis at 1.4 angstrom resolution. *Structure* 7(5), 549 – 556.
- [33] Montet, Y., Amara, P., Volbeda, A., Vernede, X., Hatchikian, E. C., Field, M. J., Frey, M. und Fontecilla-Camps, J. C. (1997). Gas access to the active site of Ni-Fe hydrogenases probed by X-ray crystallography and molecular dynamics. *Nat. Struct. Biol.* 4(7), 523 – 526.
- [34] Matias, P. M., Soares, C. M., Saraiva, L. M., Coelho, R., Morais, J., Le Gall, J. und Carrondo, M. A. (2001). [NiFe] hydrogenase from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774: gene sequencing, three-dimensional structure determination and refinement at 1.8 angstrom and modelling studies of its interaction with the tetrahaem cytochrome c₃. *J. Biol. Inorg. Chem.* 6(1), 63 – 81.
- [35] Garcin, E., Vernede, X., Hatchikian, E., Volbeda, A., Frey, M. und Fontecilla-Camps, J. (1999). The crystal structure of a reduced [NiFeSe] hydrogenase provides an image of the activated catalytic center. *Structure Fold Des* 7(5), 557–66.

- [36] Peters, J., Lanzilotta, W., Lemon, B. und Seefeldt, L. (1998). X-ray crystal structure of the Fe-only hydrogenase (CpI) from *Clostridium pasteurianum* to 1.8 angstrom resolution. *Science* 282(5395), 1853–8.
- [37] Peters, J. W. (1999). Structure and mechanism of iron-only hydrogenases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9(6), 670 – 676.
- [38] Nicolet, Y., Piras, C., Legrand, P., Hatchikian, C. E. und Fontecilla-Camps, J. C. (1999). *Desulfovibrio desulfuricans* iron hydrogenase: the structure shows unusual coordination to an active site Fe binuclear center. *Structure* 7(1), 13 – 23.
- [39] Thompson, J. D., Higgins, D. G. und Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL-W - improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 22(22), 4673 – 4680.
- [40] Barton, G. (1993). ALSCRIPT: a tool to format multiple sequence alignments. *Protein Eng* 6(1), 37–40.
- [41] Zirngibl, C., Hedderich, R. und Thauer, R. K. (1990). N^5, N^{10} -Methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* has hydrogenase activity. *FEBS Lett.* 261(1), 112 – 116.
- [42] Ma, K., Zirngibl, C., Linder, D., Stetter, K. und Thauer, R. (1991). N^5, N^{10} -methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase (H_2 -forming) from the extreme thermophile *Methanopyrus kandleri*. *Arch Microbiol* 156(1), 43–8.
- [43] Kurr, M., Huber, R., König, H., Jannasch, H., Fricke, H., Trincone, A., Kristjansson, J. und Stetter, K. O. (1991). *Methanopyrus kandleri*, *gen* and *sp nov* represents a novel group of hyperthermophilic methanogens, growing at 110 degrees C. *Arch. Microbiol.* 156(4), 239 – 247.
- [44] Burggraf, S., Stetter, K. O., Rouviere, P. und Woese, C. R. (1991). *Methanopyrus kandleri* - an archaeal methanogen unrelated to all other known methanogens. *Syst. Appl. Microbiol.* 14(4), 346 – 351.
- [45] Zirngibl, C., Van Dongen, W., Schwörer, B., Von Bunau, R., Richter, M., Klein, A. und Thauer, R. (1992). H_2 -forming methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase, a novel type of hydrogenase without iron-sulfur clusters in methanogenic archaea. *Eur J Biochem* 208(2), 511–20.
- [46] Klein, A. R. (1995). F_{420} -abhängige Methylenetetrahydromethanopterin-Dehydrogenase und H_2 -bildende Methylenetetrahydromethanopterin-Dehydrogenase aus methanogenen Archaea. Dissertation, Phillips-Universität Marburg.

- [47] Hartmann, G., Klein, A., Linder, M. und Thauer, R. (1996). Purification, properties and primary structure of H₂-forming N⁵,N¹⁰-methylentetrahydromethanopterin dehydrogenase from *Methanococcus thermolithotrophicus*. *Arch Microbiol* 165(3), 187–93.
- [48] Bult, C., White, O., Olsen, G., Zhou, L., Fleischmann, R., Sutton, G., Blake, J., FitzGerald, L., Clayton, R., Gocayne, J., Kerlavage, A., Dougherty, B., Tomb, J., Adams, M., Reich, C., Overbeek, R., Kirkness, E., Weinstock, K., Merrick, J., Glodek, A., Scott, J., Geoghagen, N. und Venter, J. (1996). Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* 273(5278), 1058–73.
- [49] Smith, D., Doucette-Stamm, L., Deloughery, C., Lee, H., Dubois, J., Aldredge, T., Bashirzadeh, R., Blakely, D., Cook, R., Gilbert, K., Harrison, D., Hoang, L., Keagle, P., Lumm, W., Pothier, B., Qiu, D., Spadafora, R., Vicaire, R., Wang, Y., Wierzbowski, J., Gibson, R., Jiwani, N., Caruso, A., Bush, D., Reeve, J. und et al. (1997). Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* deltaH: functional analysis and comparative genomics. *J Bacteriol* 179(22), 7135–55.
- [50] Thauer, R. K., Klein, A. R. und Hartmann, G. C. (1996). Reactions with molecular hydrogen in microorganisms: Evidence for a purely organic hydrogenation catalyst. *Chem. Rev.* 96(7), 3031 – 3042.
- [51] Berkessel, A. (2001). Activation of dihydrogen without transition metals. *Curr. Opin. Chem. Biol* 5(5), 486 – 490.
- [52] Keltjens, J. T., Raemakers-Franken, P. C. und Vogels, G. D. (1993). Microbial Growth on C1 compounds, Intercept Ltd., Andover. S. 135.
- [53] Keltjens, J. T. und Vogels, G. D. (1988). Methanopterin and methanogenic bacteria. *Biofactors* 1, 95–103.
- [54] Buurman, G. (2000). Zum Katalysemechanismus der H₂-bildenden N⁵,N¹⁰-Methylentetrahydromethanopterin-Dehydrogenase (Hmd) aus methanogenen Archaea: Untersuchungen zur Stereospezifität und Nachweis einer prosthetischen Gruppe. Dissertation, Phillips-Universität Marburg.
- [55] Zirngibl, C. (1991). Eine neuartige Hydrogenase ohne Eisen-Schwefel-Zentren in methanogenen Bakterien. Dissertation, Phillips-Universität Marburg.
- [56] Walling, C. und Bollyky, L. (1964). Homogeneous hydrogenation in absence of transition-metal catalysts. *J. Am. Chem. Soc.* 86(18), 3750.

- [57] Buurman, G., Shima, S. und Thauer, R. (2000). The metal-free hydrogenase from methanogenic archaea: evidence for a bound cofactor. *FEBS Lett* 485(2-3), 200–4.
- [58] Ma, K., Linder, D., Stetter, K. und Thauer, R. (1991). Purification and properties of N^5, N^{10} -metylenetetrahydromethanopterin reductase (coenzyme F_{420} -dependent) from the extreme thermophile *Methanopyrus kandleri*. *Arch Microbiol* 155(6), 593–600.
- [59] Schwörer, B., Fernandez, V., Zirngibl, C. und Thauer, R. (1993). H_2 -forming N^5, N^{10} -metylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Studies of the catalytic mechanism of H_2 formation using hydrogen isotopes. *Eur J Biochem* 212(1), 255–61.
- [60] Klein, A., Fernandez, V. und Thauer, R. (1995). H_2 -forming N^5, N^{10} -metylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase: mechanism of H_2 formation analyzed using hydrogen isotopes. *FEBS Lett* 368(2), 203–6.
- [61] Hartmann, G. C., Santamaria, E., Fernandez, V. M. und Thauer, R. K. (1996). Studies on the catalytic mechanism of H_2 -forming methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase: para-ortho H_2 conversion rates in H_2O and D_2O . *J. Biol. Inorg. Chem.* 1(5), 446 – 450.
- [62] Schleucher, J., Griesinger, C., Schwörer, B. und Thauer, R. (1994). H_2 -forming N^5, N^{10} -metylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* catalyzes a stereoselective hydride transfer as determined by two-dimensional NMR spectroscopy. *Biochemistry* 33(13), 3986–93.
- [63] Geierstanger, B. H., Prash, T., Griesinger, C., Hartmann, G., Buurman, G. und Thauer, R. K. (1998). Catalytic mechanism of the metal-free hydrogenase from methanogenic archaea: Reversed stereospecificity of the catalytic and noncatalytic reaction. *Angew. Chem. Int. Ed.* 37(23), 3300 – 3303.
- [64] Schleucher, J., Schwörer, B., Thauer, R. K. und Griesinger, C. (1995). Elucidation of the stereochemical course of chemical reactions by magnetic labeling. *J. Am. Chem. Soc.* 117(10), 2941 – 2942.
- [65] Walling, C. und Bollyky, L. (1961). Base catalyzed homogeneous hydrogenation. *J. Am. Chem. Soc.* 83(13), 2968.
- [66] Siskin, M. (1974). Strong acid chemistry .2. Catalytic hydrogenation of aromatics in hydrogen fluoride-tantalum pentafluoride and related strong acid systems. *J. Am. Chem. Soc.* 96(11), 3641 – 3641.
- [67] Olah, G. A. (1993). Superelectrophiles. *Angew. Chem.-Int. Edit.* 32(6), 767 – 788.

- [68] Olah, G. A. (1995). My search for carbocations and their role in chemistry (Nobel lecture). *Angew. Chem.-Int. Edit.* 34(13-14), 1393 – 1405.
- [69] Berkessel, A. und Thauer, R. K. (1995). On the mechanism of catalysis by a metal-free hydrogenase from methanogenic archaea - enzymatic transformation of H₂ without a metal and its analogy to the chemistry of alkanes in superacidic solution. *Angew. Chem.-Int. Edit.* 34(20), 2247 – 2250.
- [70] Bartoschek, S., Buurman, G., Thauer, R. K., Geierstanger, B. H., Weyrauch, J. P., Griesinger, C., Nilges, M., Hutter, M. C. und Helms, V. (2001). Re-face stereospecificity of methylenetetrahydromethanopterin and methylenetetrahydrofolate dehydrogenases is predetermined by intrinsic properties of the substrate. *ChemBioChem* 2(7-8), 530 – 541.
- [71] Cioslowski, J. und Boche, G. (1997). Geometry-tunable Lewis acidity of amidinium cations and its relevance to redox reactions of the Thauer metal-free hydrogenase: A theoretical study. *Angew. Chem. Int. Ed.* 36(1-2), 107 – 109.
- [72] Scott, A. P., Golding, B. T. und Radom, L. (1998). Remarkable cleavage of molecular hydrogen without the use of metallic catalysts: a theoretical investigation. *New J. Chem.* 22(11), 1171 – 1173.
- [73] Teles, J. H., Brode, S. und Berkessel, A. (1998). Hydrogenation without a metal catalyst: An ab initio study on the mechanism of the metal-free hydrogenase from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *J. Am. Chem. Soc.* 120(6), 1345 – 1346.
- [74] Sano, T., Hagiwara, H., Okabe, K., Okado, H., Saito, K. und Takaya, H. (1986). *Sekiyu Gakkaishi* 29, 89–92.
- [75] Senger, S. und Radom, L. (2000). Zeolites as transition-metal-free hydrogenation catalysts: A theoretical mechanistic study. *J. Am. Chem. Soc.* 122(11), 2613 – 2620.
- [76] Reeve, J., Nolling, J., Morgan, R. und Smith, D. (1997). Methanogenesis: genes, genomes, and who's on first? *J. Bacteriol* 179(19), 5975–86.
- [77] Afting, C., Hochheimer, A. und Thauer, R. (1998). Function of H₂-forming methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* in coenzyme F₄₂₀ reduction with H₂. *Arch Microbiol* 169(3), 206–10.
- [78] Afting, C., Kremmer, E., Brucker, C., Hochheimer, A. und Thauer, R. (2000). Regulation of the synthesis of H₂-forming methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase (Hmd) and of HmdII and HmdIII in *Methanothermobacter marburgensis*. *Arch Microbiol* 174(4), 225–32.

- [79] Bader, R. R., Baumeister, P. und Blaser, H. U. (1996). Catalysis at Ciba-Geigy. *Chimia* 50(3), 99 – 105.
- [80] Schönheit, P., Moll, J. und Thauer, R. (1979). Nickel, cobalt, and molybdenum requirement for growth of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Arch Microbiol* 123(1), 105–7.
- [81] Hartmann, G. (1997). Untersuchungen zur Struktur und zum Katalysemechanismus der H₂-bildenden N⁵,N¹⁰-Methylentetrahydromethanopterin Dehydrogenase aus methanogenen Archaea. Dissertation, Phillips-Universität Marburg.
- [82] Boggon, T. und Shapiro, L. (2000). Screening for phasing atoms in protein crystallography. *Structure Fold Des* 8(7), R143–9.
- [83] Cohen, S., Padovan, J. und Chait, B. (2000). Mass spectrometric analysis of mercury incorporation into proteins for X-ray diffraction phase determination. *Anal Chem* 72(3), 574–9.
- [84] Knablein, J., Neufeind, T., Schneider, F., Bergner, A., Messerschmidt, A., Lowe, J., Steipe, B. und Huber, R. (1997). Ta6Br(2+)12, a tool for phase determination of large biological assemblies by X-ray crystallography. *J Mol Biol* 270(1), 1–7.
- [85] Evans, G. und Pettifer, R. F. (2001). CHOOCH: a program for deriving anomalous-scattering factors from X-ray fluorescence spectra. *J. Appl. Crystallogr.* 34, 82 – 86.
- [86] Kissinger, C., Gehlhaar, D., Smith, B. und Bouzida, D. (2001). Molecular replacement by evolutionary search. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57(Pt 10), 1474–9.
- [87] Brunger, A., Adams, P., Clore, G., DeLano, W., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R., Jiang, J., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N., Read, R., Rice, L., Simonson, T. und Warren, G. (1998). Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 54 (Pt 5), 905–21.
- [88] Sheldrick, G. M. und Schneider, T. (1997). SHELXL: high-resolution refinement. *Methods Enzymol.* 277, 319–343.
- [89] Petsko, G. A. (2001). Structural basis of thermostability in hyperthermophilic proteins, or „there’s more than one way to skin a cat“. *Methods Enzymol.* 334, 469 – 478.
- [90] Rees, D. C. (2001). Crystallographic analyses of hyperthermophilic proteins. *Methods Enzymol.* 334, 423 – 437.

- [91] Shima, S., Tziatzios, C., Schubert, D., Fukada, H., Takahashi, K., Ermler, U. und Thauer, R. (1998). Lyotropic-salt-induced changes in monomer/dimer/tetramer association equilibrium of formyltransferase from the hyperthermophilic *Methanopyrus kandleri* in relation to the activity and thermostability of the enzyme. *Eur J Biochem* 258(1), 85–92.
- [92] Shima, S., Thauer, R., Ermler, U., Durchschlag, H., Tziatzios, C. und Schubert, D. (2000). A mutation affecting the association equilibrium of formyltransferase from the hyperthermophilic *Methanopyrus kandleri* and its influence on the enzyme's activity and thermostability. *Eur J Biochem* 267(22), 6619–23.
- [93] Moore, J., Uppal, A., Maley, F. und Maley, G. (1993). Overcoming inclusion body formation in a high-level expression system. *Protein Expr Purif* 4(2), 160–3.
- [94] Doherty, A., Ashford, S., Brannigan, J. und Wigley, D. (1995). A superior host strain for the over-expression of cloned genes using the T7 promoter based vectors. *Nucleic Acids Res* 23(11), 2074–5.
- [95] LeMaster, D. und Richards, F. (1985). ^1H - ^{15}N heteronuclear NMR studies of *Escherichia coli* thioredoxin in samples isotopically labeled by residue type. *Biochemistry* 24(25), 7263–8.
- [96] Cowtan, K. und Main, P. (1998). Miscellaneous algorithms for density modification. *Acta Cryst. D* 54, 487 – 493.
- [97] Abrahams, J. P. und Leslie, A. G. W. (1996). Methods used in the structure determination of bovine mitochondrial F-1 ATPase. *Acta Cryst. D* 52, 30 – 42.
- [98] Terwilliger, T. (2000). Maximum-likelihood density modification. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56 (Pt 8), 965–72.
- [99] Bailey, S. (1994). The CCP4 suite - programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr.* 50, 760 – 763.
- [100] Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. W. und Kjeldgaard, M. (1991). Improved methods for building protein models in electron-density maps and the location of errors in these models. *Acta Cryst. A* 47, 110 – 119.
- [101] Jones, T. A. und Kjeldgaard, M. (1997). Electron-density map interpretation. *Methods Enzymol.* 277, 173 – 208.
- [102] Holm, L. und Sander, C. (1993). Protein Structure Comparison by Alignment of Distance Matrices. *J. Mol. Biol.* 233, 123–138.
- [103] Holm, L. und Sander, C. (1995). Dali: a network tool for protein structure comparison. *TIBS* 20, 478–480.

- [104] Kraulis, P. J. (1991). MOLSCRIPT - a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Cryst.* 24, 946 – 950.
- [105] Kabsch, W. und Sander, C. (1983). Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* 22, 2577–2637.
- [106] Kutzenko, A. S., Lamzin, V. S. und Popov, V. O. (1998). Conserved supersecondary structural motif in NAD-dependent dehydrogenases. *FEBS Lett.* 423, 105–109.
- [107] Carugo, O. und Argos, P. (1997). NADP-dependent Enzymes. II: Evolution of the Mono- and Dinucleotide Binding Domains. *Proteins* 28, 29–40.
- [108] Carugo, O. und Argos, P. (1997). NADP-dependent Enzymes. I: Conserved Stereochemistry of Cofactor Binding. *Proteins* 28, 10–28.
- [109] Bucher, P. und Bairoch, A. (1994). A generalized profile syntax for biomolecular sequence motifs and its function in automatic sequence interpretation. *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* 2, 53–61.
- [110] Westhead, D., Slidel, T., Flores, T. und Thornton, J. (1999). Protein structural topology: Automated analysis and diagrammatic representation. *Protein Sci* 8(4), 897–904.
- [111] Barycki, J. J., O'Brien, L. K., Bratt, J. M., Zhang, R., Sanishvili, R., Strauss, A. W. und Banaszak, L. J. (1999). Biochemical Characterization and Crystal Structure Determination of Human Heart Short Chain L-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase Provide Insights into Catalytic Mechanism. *Biochemistry* 38, 5786–5798.
- [112] Adams, M. J., Ellis, G. H., Gover, S., Naylor, C. E. und Phillips, C. (1994). Crystallographic study of coenzyme, coenzyme analogue and substrate binding in 6-phosphogluconate dehydrogenase: implications for NADP specificity and the enzyme mechanism. *Structure* 2, 651–668.
- [113] Biou, V., Dumas, R., Cohen-Addad, C., Douce, R., Job, D. und Pebay-Peyroula, E. (1997). The crystal structure of plant acetohydroxy acid isomeroreductase complexed with NADPH, two magnesium ions and a herbicidal transition state analog determined at 1.65 Å resolution. *EMBO J.* 16, 3405–3415.
- [114] Warkentin, E., Mamat, B., Sordel-Klippert, M., Wicke, M., Thauer, R. K., Iwata, M., Iwata, S., Ermler, U. und Shima, S. (2001). Structures of F₄₂₀H₂:NADP⁺ oxidoreductase with and without its substrates bound. *EMBO J.* 20, 6561–6569.
- [115] Hendrickson, W., Horton, J. und LeMaster, D. (1990). Selenomethionyl proteins produced for analysis by multiwavelength anomalous diffraction (MAD): a vehicle for direct determination of three-dimensional structure. *EMBO J* 9(5), 1665–72.

- [116] Bushnell, D. A., Cramer, P. und Kornberg, R. D. (2001). Selenomethionine Incorporation in *Saccharomyces cerevisiae* RNA Polymerase II. *Structure* 9, R11–R14.
- [117] Larsson, A. M., Ståhlberg, J. und Jones, T. A. (2002). Preparation and crystallization of selenomethionyl dextranase from *Penicillium minioluteum* expressed in *Pichia pastoris*. *Acta Cryst D* 58, 346–348.
- [118] Bellizi, J. J., Widom, J., Kemp, C. W. und Clardy, J. (1999). Producing selenomethionine-labeled proteins with a baculovirus expression vector system. *Structure* 7, R263–R267.
- [119] Fisher, R. G. und Sweet, R. M. (1980). Treatment of diffraction data from protein crystals twinned by merohedry. *Acta Cryst. A* 36, 755–760.
- [120] Yeates, T. O. (1997). Detecting and overcoming crystal twinning. *Methods Enzymol.* 276, 344 – 358.
- [121] Yeates, T. O. und Fam, B. C. (1999). Protein crystals and their evil twins. *Structure* 7(2), R25–R29.
- [122] Yang, F., Dauter, Z. und Wlodawer, A. (2000). Effects of crystal twinning on the ability to solve a macromolecular structure using multiwavelength anomalous diffraction. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56 (Pt 8), 959–64.
- [123] Terwisscha Van Scheltinga, A., Valegard, K., Ramaswamy, S., Hajdu, J. und Andersson, I. (2001). Multiple isomorphous replacement on merohedral twins: structure determination of deacetoxycephalosporin C synthase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57(Pt 12), 1776–85.
- [124] Schneider, T. R., Karcher, J., Pohl, E., Lubini, P. und Sheldrick, G. M. (2000). *Ab initio* structure determination of the lantibiotic mersacidin. *Acta Cryst. D* 56, 705–713.
- [125] Redinbo, M. R. und Yeates, T. O. (1993). Structure determination of plastocyanin from a specimen with a hemihedral twinning fraction of one-half. *Acta Cryst. D* 49, 375–380.
- [126] Breyer, W., Kingston, R., Anderson, B. und Baker, E. (1999). On the molecular-replacement problem in the presence of merohedral twinning: structure of the N-terminal half-molecule of human lactoferrin. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 55 (Pt 1), 129–38.
- [127] Contreras-Martel, C., Martinez-Oyanedel, J., Bunster, M., Legrand, P., Piras, C., Vernede, X. und Fontecilla-Camps, J. (2001). Crystallization and 2.2 Å resolution structure of R-phycoerythrin from *Gracilaria chilensis*: a case of perfect hemihedral twinning. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57(Pt 1), 52–60.

- [128] Luecke, H., Richter, H.-T. und Lanyi, J. K. (1998). Proton Transfer Pathways in Bacteriorhodopsin at 2.3 Angstrom Resolution. *Science* 280, 1934–1937.
- [129] Pebay-Peyroula, E., Rummel, G., Rosenbusch, J. P. und Landau, E. M. (1997). X-ray structure of bacteriorhodopsin at 2.5 Å from microcrystals grown in lipidic cubic phases. *Science* 277, 1676–1681.
- [130] Yeates, T. O. und Rees, D. C. (1987). An isomorphous replacement method for phasing twinned structures. *Acta Cryst. A* 43, 30–36.
- [131] Rees, D. C. (1982). A general theory of X-ray intensity statistics for twins by merohedry. *Acta Cryst. A* 38, 201–207.
- [132] Stanley, E. (1972). The identification of twins from intensity statistics. *J. Appl. Cryst.* 5, 191–194.
- [133] Yeates, T. O. (1988). Simple statistics for intensity data from twinned specimens. *Acta Cryst. A* 44, 142–144.
- [134] Smith, J. und Thompson, A. (1998). Reactivity of selenomethionine–dents in the magic bullet? *Structure* 6(7), 815–9.
- [135] Daniels, D. L., Cohen, A. R., Anderson, J. M. und Brünger, A. T. (1998). Crystal structure of the hCASK PDZ domain reveals the structural basis of class II PDZ domain target recognition. *Nat. Struct. Biol.* 5, 317–325.
- [136] Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B. und Koronakis, V. (2000). Oxidation of selenomethionine: some MADness in the method! *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56 (Pt 6), 785–8.
- [137] Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B. und Hughes, C. (2000). Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature* 405, 914–919.
- [138] Thomazeau, K., Curien, G., Thompson, A., Dumas, R. und Biou, V. (2001). MAD on threonine synthase: the phasing power of oxidized selenomethionine. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57(Pt 9), 1337–40.
- [139] Dauter, Z., Dauter, M. und Dodson, E. (2002). Jolly SAD. *Acta Cryst. D* 58, 494–506.
- [140] Chang, G., Spencer, R. H., Lee, A. T., Barclay, M. T. und Rees, D. C. (1998). Structure of the MscL Homolog from *Mycobacterium tuberculosis*: A Gated Mechanosensitive Ion Channel. *Science* 282, 2220–2226.

- [141] Rees, D. C., Chang, G. und Spencer, R. H. (2000). Crystallographic Analyses of Ion Channels: Lessons and Challenges. *J. Biol. Chem.* 275(2), 713–716.
- [142] Doyle, D. C. and Cabral, J. M., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T. und MacKinnon, R. (1998). The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K⁺ Conduction and Selectivity. *Science* 280, 69–77.
- [143] Gros, P., van Gunsteren, W. F. und Hol, W. G. (1990). Inclusion of Thermal Motion in Crystallographic Structures by Restrained Molecular Dynamics. *Science* 249, 1149–1152.
- [144] Kuriyan, J., Osapay, K., Burley, S. K., Brunger, A. T., Hendrickson, W. A. und Karplus, M. (1991). Exploration of Disorder in Protein Structures by X-ray Restrained Molecular Dynamics. *Proteins* 10, 340–358.
- [145] Pellegrini, M., Grønbaek-Jensen, N., Kelly, J. A., Pfluegl, M. U. und Yeates, T. O. (1997). Highly Constrained Multiple-Copy Refinement of Protein Crystal Structures. *Proteins* 29, 426–432.
- [146] Escalante-Semerena, J., Rinehart KL, J. und Wolfe, R. (1984). Tetrahydromethanopterin, a carbon carrier in methanogenesis. *J Biol Chem* 259(15), 9447–55.
- [147] Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 74, 5463–5467.
- [148] Sambrook, T., Frisch, E. F. und Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbour Press, 2. Aufl.
- [149] Bradford, 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, 248–54.
- [150] Mach, H., Middaugh, C. R. und Lewis, R. V. (1992). Statistical determination of the average values of the extinction coefficient of tryptophane and tyrosine in native proteins. *Anal. Biochem.* 200, 74–80.
- [151] Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature* 227(5259), 680–685.
- [152] Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. und Struhl, K., Herausgeber (1995). Short Protocols in Molecular Biology. John Wiley, 3. Aufl.
- [153] Davies, D. R. und Segal, D. M. (1971). Protein crystallization: micro techniques involving vapor diffusion. *Methods. Enzymol.* 22.

- [154] Jancarik, J. und Kim, S. H. (1991). Sparse Matrix Sampling - a screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Crystallogr.* 24, 409 – 411.
- [155] Carter, C. W. und Carter, C. W. (1979). Protein crystallization using incomplete factorial experiments. *J. Biol. Chem.* 254(23), 2219 – 2223.
- [156] Segelke, B. W. (2001). Efficiency analysis of sampling protocols used in protein crystallization screening. *J. Cryst. Growth* 232(1-4), 553 – 562.
- [157] Stura, E. A., Nemerow, G. R. und Wilson, I. A. (1992). Strategies in the crystallization of glycoproteins and protein complexes. *J. Cryst. Growth* 122(1-4), 273 – 285.
- [158] Ravelli, R. B. G., Sweet, R. M., Skinner, J. M., Duisenberg, A. J. M. und Kroon, J. (1997). STRATEGY: a program to optimize the starting spindle angle and scan range for X-ray data collection. *J. Appl. Crystallogr.* 30(1), 551 – 554.
- [159] Dauter, Z. (1999). Data-collection strategies. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 55 (Pt 10), 1703–17.
- [160] Otwinowski, Z. und Minor, W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* 276, 307 – 326.
- [161] Harker, D. (1956). The determination of the phases of the structure factors of non-centrosymmetric crystals by the method of double isomorphous replacement. *Acta Cryst.* 9(1), 1 – 9.
- [162] Coster, D., Knol, K. S. und Prins, J. A. (1933). Unterschiede in der Intensität der Röntgenstrahlenreflexion zu den beiden 111-Flächen der Zinkblende. *Z. Phys.* 63.
- [163] Cromer, D. T. und Liberman, D. (1970). Relativistic calculation of anomalous scattering factors for X-rays. *J. Chem. Phys.* 53(5), 1891.
- [164] Hendrickson, W. A., Smith, J. L., Phizackerley, R. P. und Merritt, E. A. (1988). Crystallographic structure analysis of lamprey hemoglobin from anomalous dispersion of synchrotron radiation. *Proteins* 4(2), 77 – 88.
- [165] Hendrickson, W. A. (1999). Maturation of MAD phasing for the determination of macromolecular structures. *J. Synchrot. Radiat.* 6, 845 – 851.
- [166] Hendrickson, W. A. (2000). Synchrotron crystallography. *Trends Biochem. Sci.* 25(12), 637 – 643.
- [167] Walsh, M. A., Dementieva, I., Evans, G., Sanishvili, R. und Joachimiak, A. (1999). Taking MAD to the extreme: ultrafast protein structure determination. *Acta Cryst. D* 55, 1168 – 1173.

- [168] Brodersen, D. E. (1999). Understanding the Structure and Regulation of the S100-Proteins – Recent Advances in Heavy Atom Phasing Methodology. Dissertation, Institute of Molecular and Structural Biology, University of Aarhus, Denmark.
- [169] Brodersen, D., de La Fortelle E, Vornrhein, C., Bricogne, G., Nyborg, J. und Kjeldgaard, M. (2000). Applications of single-wavelength anomalous dispersion at high and atomic resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56 (Pt 4), 431–41.
- [170] Rice, L., Earnest, T. und Brunger, A. (2000). Single-wavelength anomalous diffraction phasing revisited. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56 (Pt 11), 1413–20.
- [171] Dauter, Z. und Dauter, M. (1999). Anomalous signal of solvent bromides used for phasing of lysozyme. *J Mol Biol* 289(1), 93–101.
- [172] Dauter, Z., Dauter, M. und Rajashankar, K. (2000). Novel approach to phasing proteins: derivatization by short cryo- soaking with halides. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56 (Pt 2), 232–7.
- [173] Dauter, Z. und Dauter, M. (2001). Entering a new phase: using solvent halide ions in protein structure determination. *Structure (Camb)* 9(2), R21–6.
- [174] Dauter, Z., Li, M. und Wlodawer, A. (2001). Practical experience with the use of halides for phasing macromolecular structures: a powerful tool for structural genomics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57(Pt 2), 239–49.
- [175] Nagem, R., Dauter, Z. und Polikarpov, I. (2001). Protein crystal structure solution by fast incorporation of negatively and positively charged anomalous scatterers. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57(Pt 7), 996–1002.
- [176] Dauter, Z., Dauter, M., de La Fortelle E, Bricogne, G. und Sheldrick, G. (1999). Can anomalous signal of sulfur become a tool for solving protein crystal structures? *J Mol Biol* 289(1), 83–92.
- [177] Christendat, D., Yee, A., Dharamsi, A., Kluger, Y., Savchenko, A., Cort, J., Booth, V., Mackereth, C., Saridakis, V., Ekiel, I., Kozlov, G., Maxwell, K., Wu, N., McIntosh, L., Gehring, K., Kennedy, M., Davidson, A., Pai, E., Gerstein, M., Edwards, A. und Arrowsmith, C. (2000). Structural proteomics of an archaeon. *Nat Struct Biol* 7(10), 903–9.
- [178] Sheldrick, G. M. (1998). Direct Methods for Solving Macromolecular Structures, Kluwer Academic Publishers, Kap. Location of Heavy Atoms by Automated Patterson Interpretation. S. 131–141.
- [179] Terwilliger, T. und Berendzen, J. (1999). Automated MAD and MIR structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 55 (Pt 4), 849–61.

- [180] Karle, J. und Hauptman, H. (1956). A theory of phase determination for the 4 types of non-centrosymmetric space groups 1P222, 2P22, 3P12, 3P22. *Acta Cryst.* 9(7), 635 – 651.
- [181] Debaerdemaeker, T. und Woolfson, M. M. (1983). On the application of phase-relationships to complex structures. 22. Techniques for random phase refinement. *Acta Crystallogr. Sect. A* 39(MAR), 193 – 196.
- [182] Hauptman, H. (1997). Phasing methods for protein crystallography. *Curr Opin Struct Biol* 7(5), 672–80.
- [183] Uson, I. und Sheldrick, G. (1999). Advances in direct methods for protein crystallography. *Curr Opin Struct Biol* 9(5), 643–8.
- [184] DeTitta, G. T., Weeks, C. M., Thuman, P., Miller, R. und Hauptman, H. A. (1994). Structure solution by minimal-function phase refinement and fourier filtering. 1. Theoretical basis. *Acta Crystallogr. Sect. A* 50, 203 – 210.
- [185] Weeks, C. M., DeTitta, G. T., Hauptman, H. A., Thuman, P. und Miller, R. (1994). Structure solution by minimal-function phase refinement and fourier filtering. 2. Implementation and applications. *Acta Cryst. A* 50, 210 – 220.
- [186] Miller, R., DeTitta, G., Jones, R., Langs, D., Weeks, C. und Hauptman, H. (1993). On the application of the minimal principle to solve unknown structures. *Science* 259(5100), 1430–3.
- [187] Miller, R. und Weeks, C. M. (1998). Direct Methods for Solving Macromolecular Structures, Kluwer Academic Publishers, Kap. Shake-and-Bake: Applications and Advances. S. 389–400.
- [188] Weeks, C. M. und Miller, R. (1999). The design and implementation of SnB version 2.0. *J. Appl. Cryst.* 32, 120 – 124.
- [189] Sheldrick, G. M. (1995). Structure solution by iterative peaklist optimization and tangent expansion in space group P1. *Acta Crystallogr. Sect. B* 51, 423 – 431.
- [190] Sheldrick, G. M. (1998). Direct Methods for Solving Macromolecular Structures, Kluwer Academic Publishers, Kap. SHELX Applications to Macromolecules. S. 401–412.
- [191] (2000). SHELX Workshop.
- [192] Ealick, S. E. (1997). Now we're cooking: New successes for shake-and-bake. *Structure* 5(4), 469 – 472.

- [193] Deacon, A., Weeks, C., Miller, R. und Ealick, S. (1998). The Shake-and-Bake structure determination of triclinic lysozyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(16), 9284–9.
- [194] Weeks, C. M. und Miller, R. (1999). Optimizing Shake-and-Bake for proteins. *Acta Cryst. D* 55, 492 – 500.
- [195] Schafer, M., Schneider, T. R. und Sheldrick, G. M. (1996). Crystal structure of vancomycin. *Structure* 4(12), 1509 – 1515.
- [196] Guddat, L. W., Martin, J. A., Shan, L., Edmundson, A. B. und Gray, W. R. (1996). Three-dimensional structure of the alpha-conotoxin GI at 1.2 angstrom resolution. *Biochemistry* 35(35), 11329 – 11335.
- [197] Hu, S. H., Gehrmann, J., Guddat, L. W., Alewood, P. F., Craik, D. J. und Martin, J. L. (1996). The 1.1 angstrom crystal structure of the neuronal acetylcholine receptor antagonist, alpha-conotoxin PnIA from *Conus pennaceus*. *Structure* 4(4), 417 – 423.
- [198] Dauter, Z., Lamzin, V. und Wilson, K. (1997). The benefits of atomic resolution. *Curr Opin Struct Biol* 7(5), 681–8.
- [199] Smith, G., Nagar, B., Rini, J., Hauptman, H. und Blessing, R. (1998). The use of SnB to determine an anomalous scattering substructure. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 54 (Pt 5), 799–804.
- [200] Howell, P., Blessing, R., Smith, G. und Weeks, C. (2000). Optimizing DREAR and SnB parameters for determining Se-atom substructures. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56 (Pt 5), 604–17.
- [201] Xu, H. L., Hauptman, H. A. und Weeks, C. M. (2002). Sine-enhanced Shake-and-Bake: the theoretical basis and applications to Se-atom substructures. *Acta Cryst. D* 58, 90 – 96.
- [202] Blessing, R. H., Guo, D. Y. und Langs, D. A. (1996). Statistical expectation value of the Debye-Waller factor and E(hkl) values for macromolecular crystals. *Acta Cryst. D* 52, 257 – 266.
- [203] Blessing, R. H. (1997). Outlier treatment in data merging .
- [204] Blessing, R. H. (1997). LOCSC: A program to statistically optimize local scaling of single-isomorphous-replacement and single-wavelength-anomalous-scattering data. *J. Appl. Cryst.* 30, 176 – 177.

- [205] Blessing, R. H. und Smith, G. D. (1999). Difference structure-factor normalization for heavy-atom or anomalous-scattering substructure determinations. *J. Appl. Cryst.* 32, 664 – 670.
- [206] delaFortelle, E. und Bricogne, G. (1997). Maximum-likelihood heavy-atom parameter refinement for multiple isomorphous replacement and multiwavelength anomalous diffraction methods. *Methods Enzymol.* 276, 472 – 494.
- [207] Lu, G. G. (1999). FINDNCS: a program to detect non-crystallographic symmetries in protein crystals from heavy-atom sites. *J. Appl. Cryst.* 32, 365 – 368.
- [208] Navaza, J. (1994). AMORE - an automated package for molecular replacement. *Acta Cryst. A* 50, 157 – 163.
- [209] Navaza, J. und Saludjian, P. (1997). AMoRe: An automated molecular replacement program package. *Methods Enzymol.* 276, 581 – 594.
- [210] Navaza, J. (2001). Implementation of molecular replacement in AMoRe. *Acta Cryst. D* 57, 1367 – 1372.
- [211] Levitt, D. G. (2001). A new software routine that automates the fitting of protein X-ray crystallographic electron-density maps. *Acta Cryst. D* 57, 1013 – 1019.
- [212] Perrakis, A., Morris, R. und Lamzin, V. (1999). Automated protein model building combined with iterative structure refinement. *Nat Struct Biol* 6(5), 458–63.
- [213] Adams, P., Pannu, N., Read, R. und Brunger, A. (1997). Cross-validated maximum likelihood enhances crystallographic simulated annealing refinement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(10), 5018–23.
- [214] Brunger, A., Adams, P. und Rice, L. (1998). Recent developments for the efficient crystallographic refinement of macromolecular structures. *Curr Opin Struct Biol* 8(5), 606–11.
- [215] Brunger, A., Krukowski, A. und Erickson, J. (1990). Slow-cooling protocols for crystallographic refinement by simulated annealing. *Acta Crystallogr A* 46 (Pt 7), 585–93.
- [216] Engh, R. A. und Huber, R. (1991). Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure refinement. *Acta Cryst. A* 47, 392 – 400.
- [217] Brunger, A. T. (1992). Free R-value - a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature* 355(6359), 472 – 475.
- [218] Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S. und Thornton, J. M. (1993). PROCHECK - A program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* 26, 283 – 291.

-
- [219] Merritt, E. A. und Murphy, M. E. P. (1994). RASTER3D Version-2.0 - a program for photorealistic molecular graphics. *Acta Cryst. D* 50, 869 – 873.
- [220] Esnouf, R. M. (1997). An extensively modified version of MolScript that includes greatly enhanced colouring capabilities. *J. Mol. Graph.* 15, 132–134.

Anhang

Crystal structures and enzymatic properties of three formyltransferases from archaea: Environmental adaptation and evolutionary relationship

Björn Mamat^{1,3}, Annette Roth¹, Clemens Grimm¹, Ulrich Ermler¹, Christos Tziatzios², Dieter Schubert², Rudolf K. Thauer³, and Seigo Shima³

¹Max-Planck-Institut für Biophysik, Heinrich-Hoffmann-Straße 7, D-60528 Frankfurt am Main, Germany

²Institut für Biophysik der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Theodor-Stern-Kai 7, Haus 74, D-60590 Frankfurt am Main, Germany

³Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie and Laboratorium für Mikrobiologie, Fachbereich Biologie, Philipps-Universität, Karl-von-Frisch-Straße, D-35043 Marburg, Germany

Reprint request to Seigo Shima, shima@mail.uni-marburg.de.

Keywords: formyltransferase, crystal structure, monomer/dimer/tetramer association equilibrium, *Methanosarcina barkeri*, *Methanopyrus kandleri*, *Archaeoglobus fulgidus*, methanogenic archaea, sulfate reducing archaea, mesophiles, hyperthermophiles

submitted to *Protein Science*, March 2002

Abstract

Formyltransferase catalyzes the reversible formation of formylmethanofuran from N^5 -formyltetrahydromethanopterin and methanofuran, a reaction involved in the C1 metabolism of methanogenic and sulfate reducing archaea. The enzyme has been extensively characterized from *Methanopyrus kandleri* which is a hyperthermophilic methanogen with a growth temperature optimum at 98° C. Formyltransferase from *M. kandleri* is composed of four identical subunits in monomer/dimer/tetramer equilibrium, monomers prevailing at low salt concentration and tetramers at high salt concentration. Only the dimers and tetramers are active and only the tetramers are highly thermostable. We report here the crystal structure of the formyltransferase from *Methanosarcina barkeri*, which is a mesophilic methanogen with a growth temperature optimum of 37°C, and from *Archaeoglobus fulgidus*, a sulfate reducing hyperthermophilic archaeon with a growth temperature optimum of 83° C, at 1.85 Å and 2.0 Å resolution and compare the structures and properties of these two enzymes with those of the *M. kandleri* enzyme. The *M. barkeri* enzyme is present as tetramer even at low salt concentrations as revealed by equilibrium sedimentation centrifugation. The enzyme was active and relatively thermostable at low salt concentrations. Its crystal structure exhibits a very similar fold compared to that of the *M. kandleri* enzyme but differs from that mainly by showing a lower negative surface charge. The difference in crystal structure can explain the difference in the effects of salts on solubility, on the monomer/dimer/tetramer equilibrium, on the thermostability and on the activity. Interestingly, they are more similar to those of the mesophilic *M. barkeri* enzyme than to those of the hyperthermophilic *M. kandleri* enzyme reflecting the closer phylogenetic relationship of *M. barkeri* to *A. fulgidus* than to *M. kandleri*.

Formyltransferase is an enzyme found in all methanogenic archaea, in sulfate-reducing archaea and in most methylophilic bacteria (Chistoserdova et al. 1998; Thauer 1998). The enzyme catalyzes the reversible formation of N^5 -formyltetrahydromethanopterin from N-formylmethanofuran and tetrahydromethanopterin ($\Delta G^{0'} = -5.5$ kJ/mol). In methanogenic archaea this reaction is involved in CO₂ reduction to methane, in methanol disproportionation to methane and CO₂ and in autotrophic CO₂ fixation (Thauer 1998), in sulfate-reducing archaea in lactate oxidation to 3 CO₂ and in autotrophic CO₂ fixation (Thauer and Kunow 1995; Vorholt et al. 1997) and in methylophilic bacteria in methanol oxidation to CO₂ (Vorholt et al. 1998).

The formyltransferase from all methanogenic and sulfate reducing archaea investigated to date is composed of only one type of subunit with a molecular mass of approximately 35 kDa and lacks a prosthetic group. The enzyme exhibits a ternary complex catalytic mechanism (Breitung et al. 1992; Schwörer et al. 1993). The gene encoding for the formyltransferase has been cloned and sequenced from several organisms and an active enzyme could be heterologously overproduced in *Escherichia coli* (Donnelly

and Wolfe 1986; Shima et al. 1995; Kunow et al. 1996). Sequence comparison revealed that the formyltransferase from all organisms show a high degree of sequence similarity indicating a common phylogenetic origin.

Studies of the properties and structure of formyltransferase have mainly concentrated on the enzyme from *Methanopyrus kandleri* which is a hyperthermophilic methanogen with a growth temperature optimum at 98° C (Kurr et al. 1991). The enzyme is thermostable and active only at relatively high concentrations of lyotropic salts (> 1 M) (Breitung et al. 1992). This unique property is reflected in the internal milieu of this microorganism which contains a cytoplasmic concentration of cyclic 2,3-diphosphoglycerate and of K⁺ of 1 M and 3 M, respectively (Shima et al. 1998a). At low salt concentration the enzyme is inactive and thermolabile. Via equilibrium sedimentation analysis it was shown that the enzyme from *M. kandleri* is in a salt dependent monomer/dimer/tetramer equilibrium, high salt concentrations being required for oligomerization (Shima et al. 1998b). It was found that for activity dimerization is required and for thermostability additionally tetramerization (Shima et al. 2000).

The crystal structure of the enzyme from *M. kandleri* was solved to 1.7 Å resolution (Shima et al. 1996; Ermler et al. 1997). It revealed a homotetramer composed essentially of two dimers, the monomer contact being much more extended than the dimer/dimer contact. The structure of the monomer can be subdivided in two tightly connected lobes which are separated by a small cleft. The proximal lobe (the location of the N- and C-terminal end) consists of a six-stranded mixed β -sheet embedded between two helices and the so-called insertion region. The distal lobe is composed of a central four-stranded β -sheet and a peripheral three-stranded antiparallel β -sheet (β -meander fold) both flanked from the backside by three helices and from the frontside by the proximal lobe. The structure also indicated that the active site is located at the monomer/monomer interface explaining the requirement of dimerization for activity.

We have now investigated the formyltransferase from *Methanosarcina barkeri* which is a methanogen with a growth temperature optimum at 37° C (Boone et al. 1993) and from *Archaeoglobus fulgidus* which is a hyperthermophilic sulfate reducing archaeon with a temperature optimum at 83° C (Stetter 1988). The two enzymes differ from the *M. kandleri* enzyme in not requiring high concentrations of lyotropic salts for activity and thermostability (Breitung and Thauer 1990; Schwörer et al. 1993) reflecting that the intracellular concentration of salts in the two archaea are much lower than in *M. kandleri* (Tolman et al. 1986; Gorris et al. 1991; Kurr et al. 1991). Interesting in this respect is that *Methanosarcina* and *Archaeoglobus* are phylogenetically much closer related to each other than to *Methanopyrus* (Woese et al. 1991) (Fig. 1).

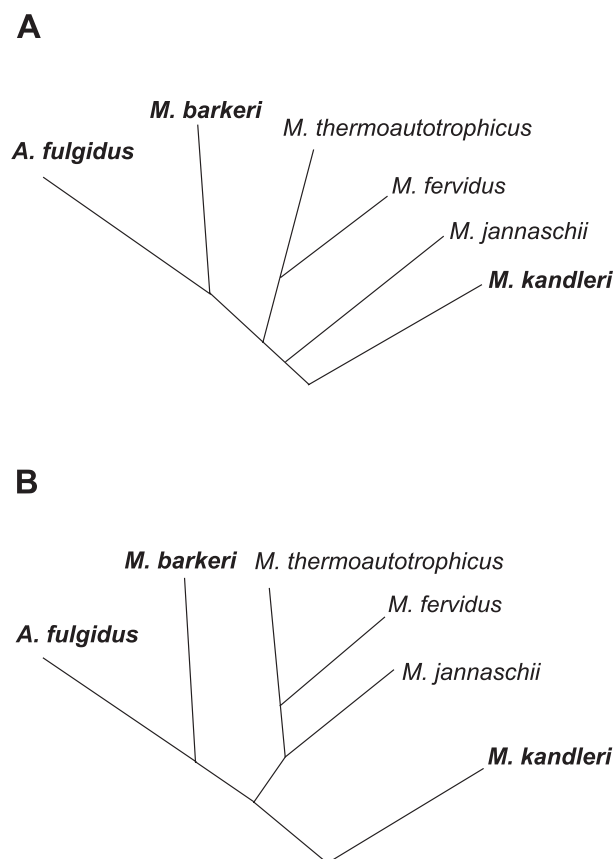


Figure 1: Phylogenetic relationship (A) of 16S-rRNA sequence from *Methanosarcina barkeri*, *Methanopyrus kandleri*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Methanothermobacter thermoautotrophicus*, *Methanothermobacter fervidus* and *Methanococcus jannaschii*, and (B) of the formyltransferase amino acid sequence from these euryarchaeota. Tree A was constructed from the data given in (Boone et al. 1993); Tree B was calculated from formyltransferase sequences using the Clustal method of the Megalign program (DNA Star, London, UK).

Results

Formyltransferase from *M. barkeri* were found to differ from the enzyme from *M. kandleri* in solubility and in salt-dependent oligomerisation, activity and stability which is reflected in the crystal structure. The *A. fulgidus* enzyme is structurally more related to that of *M. barkeri* but its physical properties are somewhere between those of the methanogenic enzymes.

Solubility

The solubility of the formyltransferases from *M. barkeri* and *M. kandleri* in lyotropic salt solutions was investigated by performing a hanging drop vapour diffusion experiment at

a temperature of 18° C. The drop contained equal volumes of protein solution (5 mg/ml protein, 10 mM potassium phosphate pH 7.0) and of reservoir solution consisting of different concentrations of potassium phosphate pH 7.0. Precipitation could be observed at a salt concentration of about 1.1 M for the *M. barkeri* enzyme, of 1.6 M for the *A. fulgidus* enzyme and of 2.2 M for the *M. kandleri* enzyme after an incubation time of one week.

Oligomerisation

The oligomeric state of formyltransferase from *M. barkeri* was studied at potassium phosphate concentrations between 20 mM and 100 mM, pH 7.2 using the sedimentation equilibrium analysis in the analytical ultracentrifuge. A typical absorbance versus radius distribution $A(r)$ at 280 nm is shown in Fig. 2. The data could be fitted with high precision according to eq. (1) of Shima et al. (1998b; 2000) under the assumption that the enzyme is present as monomer, dimer and tetramer. The dependence of the oligomeric state of formyltransferase on the potassium phosphate concentration at pH 7.2 is shown in Fig. 3. Under most of the conditions studied, the calculated contribution of monomer was virtually zero. The relative amounts of the other two species, dimer and tetramer, were approximately 20% and 80%, respectively; in 20-100 mM potassium phosphate pH 7.2 they were independent of buffer concentration. Oligomers larger than tetramer could not be detected. According to polyacrylamide gradient gel electrophoresis data the *A. fulgidus* enzyme revealed a tetrameric state already at salt concentrations below 0.1 M (Schwörer et al 1993). Therefore, additional ultracentrifugation experiments did not appear to be profitable. The oligomerisation behaviour of the *M. barkeri* and *A. fulgidus* enzymes are clearly in contrast to that of the enzyme from *M. kandleri*, which is mostly in a monomeric state at a phosphate concentration of 100 mM and which tetramerizes only at potassium phosphate concentrations above 400 mM (Shima et al. 1998b).

Activity

The activity of the three formyltransferases was dependent on the presence of lyotropic salts (Table 1). In 5 mM Mops/KOH pH 7.2 the activity was essentially zero. Upon addition of potassium phosphate pH 7.2 the activity increased. Half maximal activity was observed at a concentration of 0.01 M for the enzyme from *M. barkeri*, 0.1 M for the enzyme from *A. fulgidus*, and 1.0 M for the enzyme from *M. kandleri*.

The activity of formyltransferase from *M. barkeri* in dependence of the concentration of potassium phosphate pH 7.2 was determined at 4° C, the temperature at which the sedimentation equilibrium data were collected, and at 37° C, the growth temperature optimum of *M. barkeri* (Fig. 4). At both temperatures maximal activity was reached at a phosphate concentration of 50 mM, the specific activity at 37°C being 7 times higher than at 4° C. The results indicate that formyltransferase from *M. barkeri* is already

active at very low salt concentrations which corresponds to the finding that the enzyme is already in a dimeric and tetrameric state under these conditions (Fig. 3).

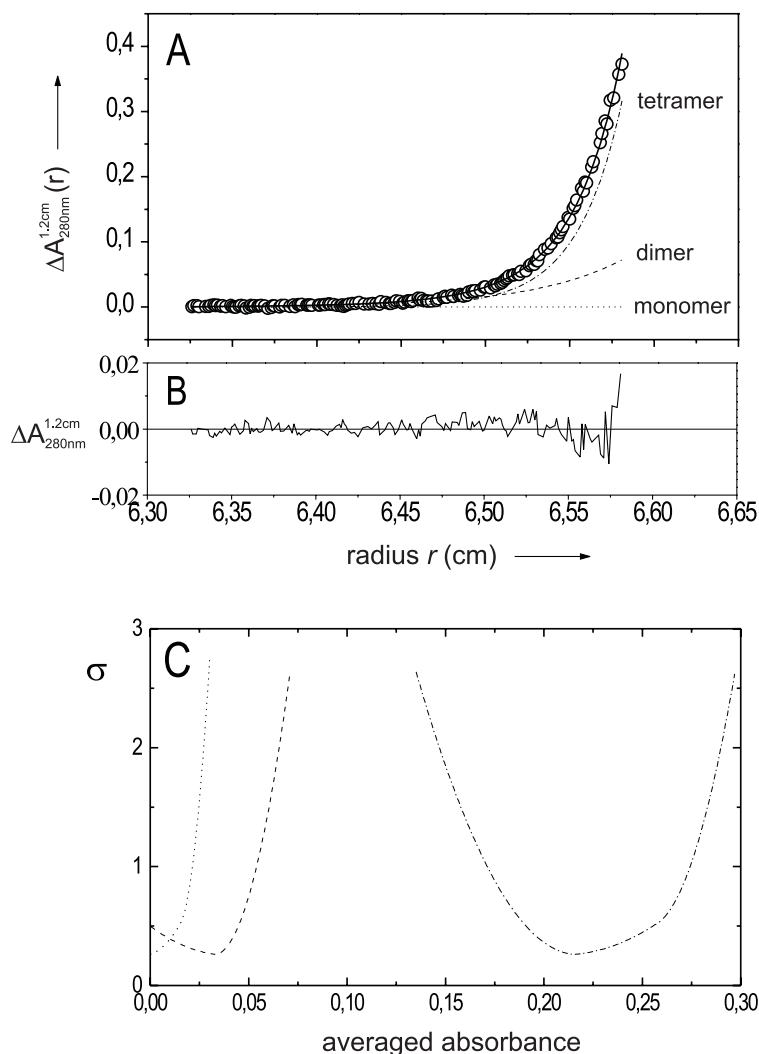


Figure 2: Sedimentation equilibrium analysis of formyltransferase from *Methanosarcina barkeri* (A) Experimental absorbance data $A^{1.2\text{cm}}(r)$ at 280 nm, best fit to the data assuming a monomer/dimer/tetramer model of self-association (-), and calculated local contributions of monomers (\cdots), dimers (- - -) and tetramers (- · - · -). (B) Local difference $\Delta A^{1.2\text{cm}}$ at 280 nm between fitted and experimental data. (C) Statistical accuracy of the calculated absorbance contributions of the different oligomers (obtained by integration over the sample volume): changes in the sum of the squared residuals, σ , of fits to the data of (A) resulting from one non-optimal absorbance parameter (Schuck 1994). The meaning of the symbols is the same as in (A). Initial protein concentration, 0.56 mg ml^{-1} ; solvent, 0.1 M potassium phosphate pH 7.2, 0.3 mM DTT; rotor speed, 19,000 rpm.; rotor temperature, 4°C .

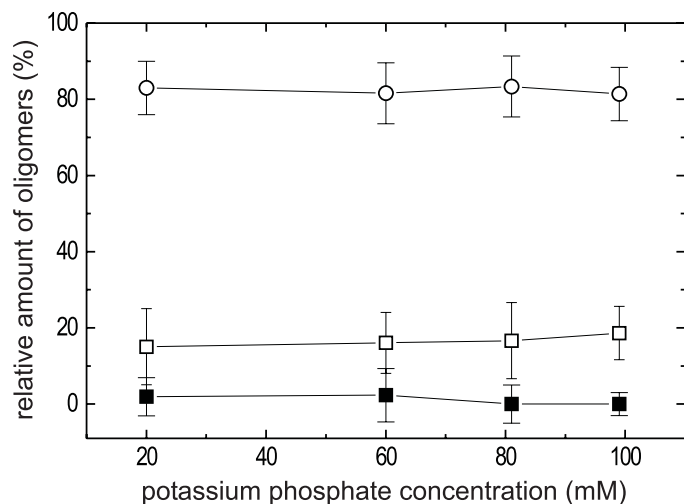


Figure 3: Dependence of the relative amounts of formyltransferase monomers (■), dimers (□) and tetramers (○) from *M. barkeri* on the potassium phosphate concentration. Initial protein concentration, 0.35 mg ml^{-1} ; solvent, potassium phosphate pH 7.2 at the concentrations indicated, 0.3 mM DTT; rotor speed, $19,000 \text{ rpm}$; rotor temperature, 4° C .

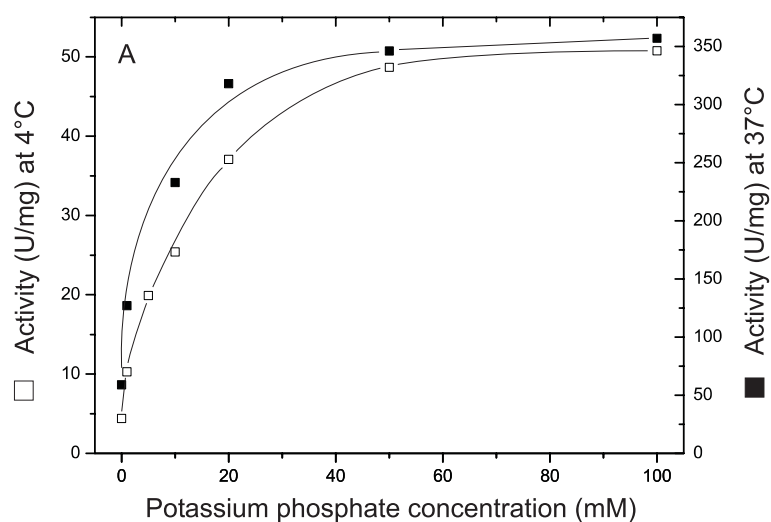


Figure 4: Activity of formyltransferase from *M. barkeri* at 4° C (□) and 37° C (■) in potassium phosphate pH 7.2 at the concentrations indicated. The phosphate buffer contained 0.3 mM dithiothreitol. Before starting the reaction, the enzyme (0.4 mg ml^{-1}) was incubated for 25 h at 4° C in the same phosphate buffer as used in the respective assay. From assays at 37° C the enzyme solution was diluted 1:20 after incubation. Samples of $2.5 \mu\text{l}$ were assayed.

Table 1: Dependence of the activity and thermostability of formyltransferase from a mesophilic and two thermophilic archaea on the presence of lyotropic salts (potassium phosphate pH 7.2).

Property	Formyltransferase from		
	<i>M. barkeri</i> (37° C) ^a	<i>A. fulgidus</i> (83° C) ^a	<i>M. kandleri</i> (98° C) ^a
Salt concentration (M) required for 50% activity ^b	0.01	0.1	1.0
Salt concentration (M) required for 100% activity ^b	0.1	1.0	1.5
Salt concentration (M) required to retain 50% activity after 20 min incubation at 80° C ^c	0.05	0.005	1.2
Salt concentration (M) required to retain 100% activity after 20 min incubation at 80° C ^c	0.5	0.05	1.5

Thermostability

The temperature dependent activity of formyltransferases was also correlated with the presence of lyotropic salts (Table 1). In 5 mM Mops/KOH pH 7.2 the three enzymes were completely inactivated at 90° C within a few minutes. Upon addition of potassium phosphate pH 7.2 the stability increased, much lower salt concentrations being required to stabilize the enzyme from *M. barkeri* and *A. fulgidus* than the enzyme from *M. kandleri*. Fifty percent inactivation at 80° C after 20 min was observed at a salt concentration of 0.005 M for the *A. fulgidus* enzyme, of 0.05 M for the *M. barkeri* enzyme and of 1.2 M (at 90° C) for the *M. kandleri* enzyme. The surprisingly high thermostability of the *M. barkeri* enzyme at low salt concentrations is in agreement with results from differential scanning calorimetry which indicate that the enzyme in the presence of 0.5 M lyotropic salt has a melting temperature of 95° C (data not shown).

Crystal Structures of formyltransferase from *M. barkeri* and *A. fulgidus*

The sequence identity between the formyltransferase of *M. barkeri* and *M. kandleri*, *A. fulgidus* and *M. kandleri*, *M. barkeri* and *A. fulgidus* is 59%, 61% and 68% suggesting a

^aGrowth temperature optimum.

^bThe activity of the *M. barkeri* enzyme was determined at 37° C and that of the *A. fulgidus* and *M. kandleri* enzyme at 65° C.

^c90° C in the case of the *M. kandleri* enzyme.

high similarity of their three-dimensional structures (Fig. 5). Indeed, the corresponding average deviation of the monomers is 0.9 Å, 0.8 Å and 0.7 Å after superimposing 291 (from 296), 290 (from 296) and 297 (from 297) equivalent C $_{\alpha}$ -positions. Despite the small overall deviations of the structures there is a significant conformational change of the lobes relative to each other. The *M. barkeri* enzyme is present in a more closed form, the *M. kandleri* in a more open form (Fig. 5). Substantial structural differences were only found in the insertion region, in the β -meander region and in the loop region between strands 6 and 7 (Fig. 5). The latter two adjacent regions are shifted in a concerted manner of around 1.5 Å in the *M. kandleri* compared the *M. barkeri* and *A. fulgidus* enzymes. The two latter enzymes deviate only around 0.6 Å from each other. The temperature factor of the mentioned regions is in the three enzymes significantly higher than that of the core region. Thus, the regions with the largest conformational changes are also the most flexible ones. Not surprisingly, the mentioned regions with a higher temperature factor are also involved in substrate binding (Ermler et al. 1997) which requires a certain flexibility for the participating residues. However, a reliable interpretation of the temperature factors is problematic because of the interference between the internal protein flexibility and crystal lattice effects.

The superposition of the tetramers of the three investigated formyltransferases leads to an average deviation of the C $_{\alpha}$ atoms of 1.1 Å, 0.9 Å and 0.8 Å which indicates a nearly identical arrangement of the subunits. The interfaces between the subunits are basically conserved, although several significant differences are detectable. The character of the interface between subunits 1 and 2 is maintained concerning the hydrophobicity of around 70% and the conservation of about twothird of the hydrogen bonds. It differs, however, with respect to the size of the contact area and the number of the hydrogen bonds. The interface area of the *A. fulgidus* enzyme is 15% and 6% larger than that of the *M. barkeri* and *M. kandleri* enzymes, respectively. 56, 42 and 38 hydrogen bonds between subunits 1 and 2 were found in the corresponding formyltransferases. The contact area between subunits 1 and 3 varies between 2% and 5% of the monomer surface and is less conserved between the three formyltransferases. The bidentate hydrogen bond between Gln181 of subunit 1 and Gln176 of subunit 3 (and vice versa) found in the *M. kandleri* is not maintained in the *M. barkeri* and *A. fulgidus* enzymes. Instead, two new hydrogen bonds between Ser172 (subunit 1) and Thr175 (subunit 3) as well as between Ser172 (subunit 1) and Ser172 (subunit 3) are formed in the *M. barkeri* enzyme. In the *A. fulgidus* enzyme Ser172 is exchanged for threonine and Thr175 for serine but the hydrogen bond pattern is maintained. The contact region between subunits 1 and 4 is also substantially changed. Although the contact area in all three enzymes is comparable in size, the *M. barkeri* enzyme only contains two, the *A. fulgidus* and *M. kandleri* enzymes six hydrogen bonds. In the latter enzyme, this contact region is characterized by a strong salt bridge between Glu64 and Arg261.

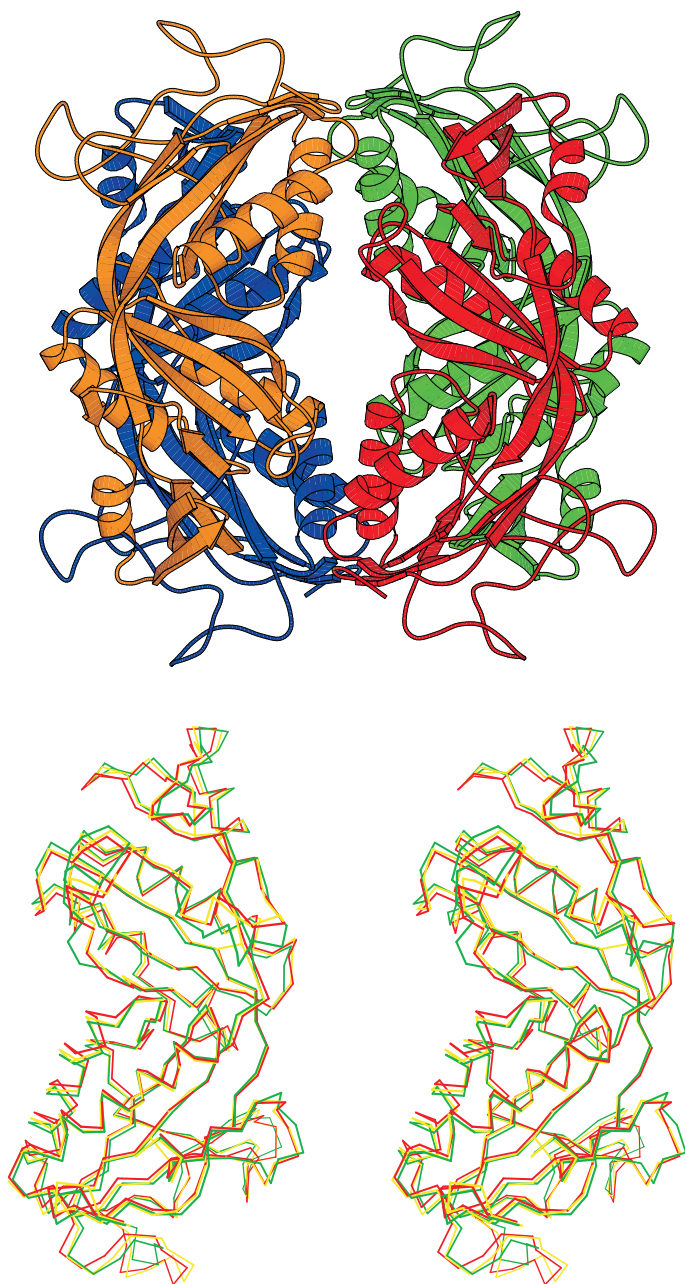


Figure 5: Structure of the formyltransferase from *M. barkeri* as Ribbon diagram of the tetrameric state (top) and a stereo C_{α} -plot of the superimposed monomers of the enzymes from *M. barkeri* (red), *A. fulgidus* (yellow) and *M. kandleri* (green) (bottom). Top: In the tetramers a particularly extended contact occurs between subunits 1 and 2 and the equivalent subunits 3 and 4. In both tetramers the contacts between subunits 1 and 4 and 2 and 3 are much less extended. Bottom: The fold of the three formyltransferases is very similar, in particular in the core regions of the two lobes. (Figure generated using the program MOLSCRIPT (Kraulis 1991).)

The most pronounced difference between the *M. barkeri* and *A. fulgidus* formyltransferases on one hand and the *M. kandleri* enzyme on the other is the significantly altered number of negatively charged and hydrophobic residues on the protein surface. The hydrophobic surface fraction is 56% (57%) for the *M. barkeri* (*A. fulgidus*) enzyme which corresponds to the average value for mesophilic proteins (Miller et al. 1987) and only 50% for the *M. kandleri* enzyme. This increased hydrophobicity on the protein surface is predominantly responsible for its increased overall hydrophobicity recognized by Kunow et al. (1996) for the *M. barkeri* enzyme, because the hydrophobic cores of the formyltransferases are highly similar.

The formyltransferases of *M. barkeri* (*A. fulgidus*) possesses a ratio of 37 (37) negatively to 29 (26) positively charged residues on the surface, which is in drastic contrast to the ratio of 52 to 20 found in the *M. kandleri* enzyme (Fig. 6). Interestingly, the *M. barkeri* and the *A. fulgidus* enzymes contain more positively charged residues than the *M. kandleri* enzyme.

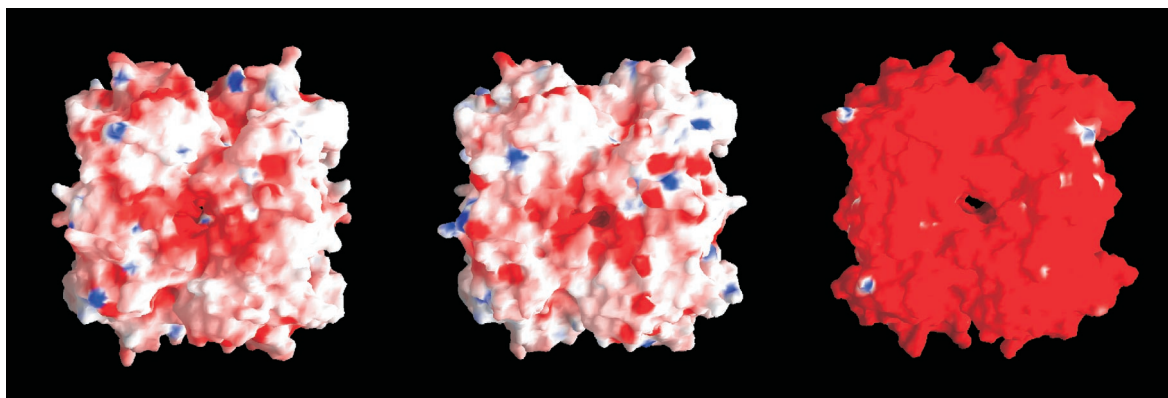


Figure 6: The electrostatic properties of the formyltransferase tetramer from *M. barkeri* (left), *A. fulgidus* (middle) and *M. kandleri* (right). The molecule surface is coated according to the electrostatic potential: The extreme ranges of red and blue represent potentials of $-20 k_B T$ and $20 k_B T$, respectively (where k_B = Boltzmann constant and T = temperature). The electrostatic surface potential of the enzymes from *M. barkeri* and *A. fulgidus* demonstrates that the surface potential of the enzyme is neutral. The electrostatic surface potential of the enzyme from *M. kandleri* show that the surface potential of the enzyme is highly negative, reflecting the dominance of acidic to basic residues. The potentials are calculated under salt-free conditions (Figure generated using the program GRASP (Nicholls et al. 1993).)

The *M. kandleri* enzyme contains three sequence clusters (81-88, 111-119, 132-141) with an accumulation of negatively charged residues (Ermler et al. 1997). The *M. barkeri* and *A. fulgidus* enzymes also show a dominance of acidic to basic residues in these clusters but the excess of 7:4 and 9:6, respectively, is by far not as pronounced as found in the *M. kandleri* enzyme with 16:5. A more careful analysis of the structure indicates

how the negative charges are distributed or partly neutralized to prevent protonation or destabilization. For example, the central residue Lys86 in the segment 81-88 of the *M. kandleri* enzyme which stabilizes five surrounding acidic side chains is replaced for glutamate in the *M. barkeri* and *A. fulgidus* enzymes. Interestingly, the solvent exposed loop in the segment 111-119 is prolonged in the *M. kandleri* enzyme most likely to increase the number of negative charge in this region.

Despite the large difference concerning the charged residues, the number of ion pairs are similar with 0.06, 0.05 and 0.07 per residue for *M. barkeri*, *A. fulgidus* and *M. kandleri* respectively. The ion pairs were normally not conserved as a consequence of the high number of exchanges at the protein surface. Conserved ion pairs are only found at positions where different segments of the structure had to be linked together. Examples include the salt bridge between Lys207 and Glu222 within the insertion region and between Glu152 and Arg137 which connects the core of the distal lobe with the β -meander region.

Discussion

The structural basis of the different physical and catalytic properties of the *M. barkeri*, *A. fulgidus* and *M. kandleri* formyltransferases are discussed and related to the different living conditions of the three organisms.

Solubility

Formyltransferase from *M. barkeri* is significantly less soluble in lyotropic salts than the enzyme from *M. kandleri*; the solubility of the enzyme from *A. fulgidus* is between that of the methanogenic enzymes. This behaviour reflects the low and high intracellular salt concentrations found in the three organisms (Shima et al., 1998a). The structural analysis of the three formyltransferases revealed two features which can be correlated with this difference.

Firstly, the higher fraction of hydrophobic surface area in the *M. barkeri* and *A. fulgidus* enzymes compared to the *M. kandleri* enzyme leads to an increased number of unspecific hydrophobic interactions between the protein molecules in solution which can induce aggregation. Furthermore, this effect is even stronger at high salt concentrations because the hydrophobic interactions are increased as result of the salting out effect.

Secondly, the ratio of acidic to basic residues, in particular in three clusters (see above), on the protein surface is large in the *M. kandleri* enzyme but significantly reduced in the *A. fulgidus* enzyme and even more reduced in the *M. barkeri* enzyme (Fig. 6). A negatively charged surface raises the solubility due to the repulsion of approaching protein molecules preventing aggregation and due to the increased capacity of acidic residues to compete successfully with inorganic ions for water molecules. This interpretation is in agreement with observations in halophilic proteins like malate dehydrogenase (Dym et al. 1995) and ferredoxin (Frolow et al. 1996).

Oligomerisation

In contrast to the strong dependency of the oligomeric state of the formyltransferase from *M. kandleri* on salt concentration with different relative amounts of monomer, dimer and tetramer (Shima et al. 1998b) the structurally highly homologous enzymes from *M. barkeri* and *A. fulgidus* are mostly tetramers independent of the salt concentration (Fig. 3). The different oligomerisation behaviour might be again a consequence of the different number of negatively charged residues at the protein surface which prevent the assembly of the monomers at low salt concentrations in the case of the *M. kandleri* enzyme. In contrast, the few repelling interactions between the negative surface charges of monomers that approach each other can obviously be compensated in the *M. barkeri* and *A. fulgidus* enzymes by forming of hydrogen bonds and hydrophobic interactions between the interfaces of the subunits. Obviously, besides the strength of the attractive intersubunit interactions the position of charged residues adjacent to the subunit interfaces might be of special relevance for the salt dependent oligomerisation behaviour. According to a qualitative analysis, the number of carboxylate groups less than 10 Å apart from the carboxylate groups of the neighbouring subunit is only half as much in the *M. barkeri* and *A. fulgidus* enzymes as in the *M. kandleri* enzyme. The effect of repelling negative charges for tetramerization was recently investigated by exchanging Arg261 for glutamate in the *M. kandleri* enzyme. The dimer/tetramer equilibrium was significantly shifted towards the dimer (Shima et al. 2000).

Activity

The formyltransferases from *M. barkeri*, *A. fulgidus* and *M. kandleri* display a 50% activity at 10 mM, 100 mM and 1 M lyotropic salt concentrations, respectively (Table 1). The main reason for this different behaviour is that dimer formation, which is itself a salt-dependent process, is essential for activity.

The three formyltransferases are enzymatically active at different temperature ranges reflected in a optimum temperature of 65° C for the *M. barkeri* (Breitung and Thauer 1990), 70° C for the *A. fulgidus* (Schwörer et al. 1993) and 90° C for the *M. kandleri* enzyme (Breitung et al. 1992), respectively, for maximal activity. Moreover, at 4° C the enzyme from *M. barkeri* exhibited 10% (Fig. 4) and the *M. kandleri* enzyme 0.2% (Shima et al. 1998b) of the optimum activity. One molecular explanation might be that a few specific regions around the substrate binding site of the enzymes from *M. barkeri* and *A. fulgidus* have an increased flexibility compared to the *M. kandleri* enzyme. The *M. kandleri* enzyme might be too rigid at low temperatures but well adapted to high temperatures. This idea is supported by the Q10 value which was calculated to be 2.0 for the *M. kandleri* enzyme and 1.5 for the *M. barkeri* and *A. fulgidus* enzymes.

Thermostability

A reliable quantitative determination of the protein stability on the basis of structural data is not feasible yet. Structural and thermodynamic data can only be linked by a comparative and qualitative structural analysis of heat labile and heat stable proteins. These studies provided as major stabilization factors for proteins a tight network of ion pairs and hydrogen bonds, optimal internal packing and increased oligomeric interactions (Szilagyi and Zavodszky 2000).

The formyltransferases from *M. barkeri*, *A. fulgidus* and *M. kandleri* are highly thermostable but their stability greatly depends on the salt concentration: 50% activity after incubation at 80° C require salt concentrations of 0.005 M, 0.05 M and 1.2 M, respectively, for the *A. fulgidus*, *M. barkeri* and *M. kandleri* enzymes (Table 1). These values correlate well with the phosphate concentrations necessary for oligomerisation. The *M. kandleri* enzyme requires a higher salt concentration for neutralizing the surplus negative surface charge and for increasing the hydrophobic interactions to allows an assembly of the monomers. Thus, a very important stabilizing factor is the formation of a tetrameric state and probably the hydrophobic forces between the monomers. Surprisingly, the dimer-dimer interactions are important for stability although their number is small and the participating residues are not well conserved between the three enzymes (Shima et al. 1998b; 2000).

Even after tetramer formation the stability of the three enzymes increase by increasing salt concentrations mainly because of the enhancement of the hydrophobic interactions (salting out effect). The formyltransferase of *M. kandleri* is thermostable in 3.0 M potassium phosphate pH 7.2 up to a temperature of 130° C (Shima et al., 1998b). In contrast, the *M. barkeri* enzyme become insoluble at a lyotropic salt concentration between 1.0 and 1.5 M (depending primarily on the protein concentration) and loses its activity at about 80° C after precipitation. The maximal stability of the *A. fulgidus* enzyme was not exactly determined, but it is about 90° C. Notably, the *A. fulgidus* enzyme has a larger interface area and a higher number of intersubunit hydrogen bonds as the methanogenic enzymes.

Environmental Adaptation

M. kandleri is a hyperthermophilic organism which is additionally adapted to high intracellular lyotropic salt concentrations. In comparison, the phylogenetically distant methanogen *M. barkeri* is a mesophilic organism with low intracellular salt concentrations. The sulfate-reducing archaeon *A. fulgidus* is a hyperthermophilic organism but evolutionary closely related to *M. barkeri*.

The three investigated formyltransferases revealed a nearly identical overall fold (Fig. 5) but the structural similarity between the phylogenetically closely related *M. barkeri* and *A. fulgidus* is more pronounced than between *M. kandleri* and *M. barkeri* and

between *M. kandleri* and *A. fulgidus*. The molecular adaptation to the highly different living conditions is primarily restricted to the protein surface where specific side chain exchanges of solvent exposing residues are primarily responsible for the observed physical and kinetic differences. The main structural difference is a significantly different ratio of acidic to basic surface residues (Fig. 6). A similar conclusion was drawn from the structural analysis of three methyl coenzyme M reductases from *M. barkeri*, *Methanothermobacter marburgensis* and *M. kandleri* (Grabarse et al., 2000).

It has to be emphasized that *M. kandleri* proteins have not enlarged their field of activity; they operate at high but not at low salt concentrations and temperatures whereas the *M. barkeri* proteins are functional at low but not at high salt concentrations. The extreme thermostability of the *M. barkeri* enzyme was unexpected as it is not essential in its mesophilic habitat. An explanation for this finding might be that the evolutionary origin of methanogenic archaea is in a high temperature environment. Interestingly, in contrast to other thermostable proteins (e.g. the formyltransferase from *M. kandleri*) the *M. barkeri* enzyme is also significantly active at 4° C. The physical properties of the *A. fulgidus* enzyme lie between the methanogenic enzymes albeit closer to *M. barkeri* formyltransferase. It is enzymatically active in a range of higher salt concentrations and temperatures than the *M. barkeri* enzyme but of lower salt concentration and temperatures than the *M. kandleri* enzyme.

Conclusion

The analysis of the formyltransferase from *M. barkeri* and *M. kandleri* revealed the astonishing finding that at low salt concentrations the protein from the hyperthermophilic organism is thermolabile and the equivalent one from the mesophilic organism is extremely thermostable. This apparent contradiction teaches us two things. Firstly, it is highly dangerous to conclude from the optimal growth conditions of an organism to the potential thermostability of an individual protein. Secondly, the stability of proteins cannot be understood independent of parameters like buffer, pH value and salt conditions. Only the *A. fulgidus* enzyme behaves as expected. Taken together, the formyltransferase system provides an instructive example to illustrate these statements and to investigate the adaptation strategy of proteins on a molecular ground.

Materials and Methods

Protein expression and purification

Formyltransferases from *M. barkeri* and *M. kandleri* were heterologously produced in *Escherichia coli* and purified as described by Kunow et al. (1996) and Shima et al. (1995). For heterologous overproduction of the *A. fulgidus* enzyme in *E. coli* the *ptr* gene was amplified by PCR using *Pfu* polymerase with the following primers: CAT ATG AAA GTG AAT GGT GTT GAG GTT GAG G (sense) and ACC AGA CGG ATC CAG GCC AGA GAT TGT

TA (antisense). The primers were constructed using the known *A. fulgidus* genome sequence (Klenk et al. 1997) which contains the two *ptr* genes AF2073 and AF2207 the latter encodes the formyltransferase studied in this work. The PCR product obtained was cloned into the blunt end vector pPCR-Script SK(+) (Stratagene). After transformation of *E. coli* XL1 Blue and isolation of the recombinant plasmid the insert was recloned into the expression vector pET24b(+) (Novagen) via the *Nde*I and *Bam*HI sites. For expression *E. coli* BL21(DE3) pLysS cells (Novagen) were transformed and grown at 30° C in M9 medium without Thiamin, supplemented with trace element solution according to Wolfe and the antibiotics Kanamycin (50 µg/ml) and Chloramphenicol (25 µg/ml). Expression of formyltransferase was induced at an OD₆₀₀ of 0.5-0.6 by adding IPTG to a concentration of 0.5 mM. Cells were harvested 3h after induction, washed with 50 mM Tricin (pH 7.0) and stored at -70° C. For purification the frozen cells were thawed in a small volume of 50 mM Tricin (pH 7.0) with 200 µg of DNase I added. To complete cell lysis and to degrade large fragments of genomic DNA, the suspension was subjected to ultrasonication. The purification protocol was similar to that previously developed for the enzyme from *A. fulgidus* cells (Schwörer et al. 1993). Enzyme activity was determined by following the formation of N⁵-formyltetrahydromethanoperin from formylmethanofuran (100 µM) and tetrahydromethanopterin (65 µM) at 282 nm ($\Delta\epsilon = 5.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) in a potassium phosphate (pH 7.0) solution (at the concentrations indicated) containing 0.3 mM dithiothreitol (Schwörer et al. 1993).

Tetrahydromethanopterin and methanofuran were purified from *Methanothermobacter marburgensis* (formerly *Methanobacterium thermoautotrophicum* strain Marburg) (Wasserfallen et al. 2000) as described (Breitung et al. 1992). Formylmethanofuran was synthesized from methanofuran and 4-nitroformyl formate (Breitung et al. 1992).

Analytical ultracentrifugation

Sedimentation equilibrium experiments were performed as described for the *M. kandleri* enzyme (Shima et al. 1998b; 2000). The sample volume was 140 µl, the rotor speed 19,000 rpm and the rotor temperature 4° C. The experiments were carried out in a buffer containing 0.3 mM dithiothreitol and 0-100 mM potassium phosphate, pH 7.2. The loading protein concentration was 0.56 mg/ml. Absorption profiles were recorded at 280 nm. The experimental A(r) data were analyzed according to eq. (1) in Shima et al. (1998b; 2000). The statistical accuracy of the calculated parameters was assessed as described (Shima et al. 1998b; 2000). The partial specific volume, \bar{v} , of the enzyme was calculated (Durchschlag 1986) to be 0.736 ml/g, applying the data set of Cohn and Edsall, as tabulated in Durchschlag (1986). In the range of low potassium phosphate concentrations employed, of the protein was assumed to be constant, as reported in Durchschlag and Jaenicke (1982a; 1982b; 1983).

Crystallization and data collection

Crystallization experiments were performed with the hanging drop vapor diffusion method using a sparse matrix crystallization kit (Hampton Research) for initial screening (Jancarik and Kim 1991). Crystals for the *M. barkeri* enzyme were obtained at 4° C after mixing of equal volumes of enzyme solution (15 mg/ml protein in 10 mM MOPS, pH 7.0) and reservoir solution consisting of 0.1 M sodium citrate, 0.2 M ammonium acetate, 31% MPD, 0.1 M

HEPES pH 6.7 and 5.0 mM formylmethanofuran. The space group of the crystals was $C2$ and their cell dimensions $a=127.1$ Å, $b=83.8$ Å, $c=126.4$ Å and $\beta=108.4^\circ$ (at 90 K) which corresponds to one tetramer per asymmetric unit. (Matthews 1968). Data were collected at 1.85 Å resolution under cryoconditions at the Max-Planck beamline BW6 at the Deutsches Elektronensynchrotron in Hamburg (DESY) and processed with DENZO and SCALEPACK (Otwinowski and Minor 1996). From 215926 measured reflections were 99960 unique. The R_{sym} value of the data were 3.7% and their completeness 94%.

Rhombohedrally shaped crystals of the *A. fulgidus* enzyme were grown at 4° C from equal volumes of protein solution (12 mg/ml in 10 mM MOPS, pH 7.0) and a reservoir solution (0.1 M Imidazol/Malate, 0.2 M KSCN, and 23% PEG 3350). The space group was $P1$ with cell dimensions of $a=77.1$ Å, $b=81.8$ Å, $c=99.1$ Å, $\alpha=90.1^\circ$, $\beta=110.0^\circ$ and $\gamma=93.7^\circ$ at 100 K, corresponding to two tetramers per unit cell. Data were collected under cryoconditions at the EMBL beamline BW7B at DESY and processed using DENZO (Otwinowski and Minor 1996) and SCALA (CCP4 1994) to a resolution of 2.0 Å. The total number of reflections was 839340 with 150792 being unique. The completeness of the data was 86%, the R_{sym} value 8.0%.

Structure Determination

The structures of the *M. barkeri* and *A. fulgidus* enzymes were determined with the molecular replacement method (AMoRe; Navaza 1994; EPMR; Kissinger et al. 1999) using the structures of the *M. kandleri* and *M. barkeri* enzymes, respectively, as search models. After modelling the *M. barkeri* and *A. fulgidus* sequences (Kunow et al. 1996; Klenk et al. 1997) into the correctly oriented structures the coordinates were refined with the program CNS (Brünger et al. 1998) excluding 5% of the data for validation (R_{free}). An initial molecular dynamics refinement was followed by several rounds of positional refinement, B factor refinement and automated water picking.

Model errors including mainly side chain conformations and water positions were removed during several rounds of manual model building using the graphical display program O (Jones et al. 1991) and subsequent refinement runs with CNS. The R and R_{free} factors converged for the *M. barkeri* formyltransferase to 19.7% and 24.8%. The final model of the *A. fulgidus* enzyme had R and R_{free} factors of 22.8% and 28.2%.

Model errors were detected with the program PROCHECK (Laskowski et al. 1993), which analyzes deviations of geometric parameters from their standard values. Superpositions of structures were performed with the program MULTLGA_FIT (May and Johnson 1994). The accessible surface of the protein surface was calculated with the program NACCESS (Hubbard et al. 1991) and the classification of a surface region in hydrophobic and polar was performed according to Miller et al. (1987).

Acknowledgements

We thank Melanie Sordel-Klippert and Michaela Wicke for excellent technical assistance, Eberhard Warkentin for discussion and Hartmut Michel for generous support. We also thank Harumi Fukada and Katsutada Takahashi for analysis using differential scanning calorimetry. The staff of the Max-Planck beamline BW6 and the EMBL beamline BW7B at DESY, Hamburg are grateful acknowledged for their help during data collection.

References

- Boone, D.R., Whitman, W.B., and Rouvière, P. 1993. Diversity and taxonomy of methanogens. In *Methanogenesis*. (ed. J.G. Ferry), pp. 35-80. Chapman & Hall, New York.
- Breitung, J., Börner, 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.
- Breitung, J., and Thauer, R.K. 1990. Formylmethanofuran:tetrahydromethanopterin formyltransferase from *Methanosarcina barkeri*: Identification of N⁵-formyltetrahydromethanopterin as the product. *FEBS Lett.* 275: 226-230.
- Brünger, A., Adams, P.D., Clore, G.M., Delano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R., Jiang, J.-S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., et al. 1998. Crystallography and NMR system: a new software suite for macromolecular structure determinations. *Acta Crystallog Sect D* 54: 905-921.
- CCP4 (1994). The CCP4 Suite - programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr. D* 50:760-763.
- 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.
- Donnelly, M.I., and Wolfe, R.S. 1986. The role of formylmethanofuran:tetrahydromethanopterin formyltransferase in methanogenesis from carbon dioxide. *J. Biol. Chem.* 261: 16653-16659.
- Durchschlag, H. 1986. Specific volumes of biological macromolecules and some other molecules of biological interest. In *Thermodynamic data for biochemistry and biotechnology*. (ed. H.-J. Hinz), pp. 45-128. Springer-Verlag, Berlin.
- Durchschlag, H., and Jaenicke, R. 1982a. Partial specific volume changes of proteins: densimetric studies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 108: 1074-1079.
- Durchschlag, H., and Jaenicke, R. 1982b. Partial specific volume changes of proteins: ultracentrifugal and viscometric studies. *Int. J. Biol. Macromol.* 5: 143-148.
- Durchschlag, H., and Jaenicke, R. 1983. Partial specific volume changes of proteins: ultracentrifugal and viscometric studies. *Int. J. Biol. Macromol.* 5: 143-148.
- Dym, O., Mevarech, M. and Sussman, J.L. (1995). Structural features that stabilize halophilic malate dehydrogenase from an archaebacterium. *Science* 267: 1344-1346.
- Ermler, U., Merckel, M.C., Thauer, R.K., and Shima, S. 1997. Formylmethanofuran:tetrahydromethanopterin formyltransferase from *Methanopyrus kandleri* - new insights into salt-dependence and thermostability. *Structure* 5: 635-646.
- Frolow, F., Harel, M., Sussman, J.L., Mevarech, M. and Shoham, M. (1996). Insights into protein adaption to a saturated salt environment from the crystal structure of a halophilic 2Fe-2S ferredoxin. *Nat. Struct. Biol.* 3: 452-458.
- Gorris, L.G.M., Voet, A.C.W.A., and Van der Drift, C. 1991. Structural characteristics of methanogenic cofactors in the non-methanogenic archaebacterium *Archaeoglobus fulgidus*. *Biofactors* 3: 29-35.

- Grabarse, W., Mahlert, F., Shima, S., Thauer, R.K. and Ermler, U. 2000. Comparison of three methyl coenzyme M reductases from phylogenetically distant organisms: Unusual amino acid modification, conservation and adaptation. *J. Mol. Biol.* 303: 329-344.
- Hubbard, S.J., Campbell, S.F., and Thornton, J.M. 1991. Molecular recognition. Conformational analysis of limited proteolytic sites and serine proteinase protein inhibitors. *J. Mol. Biol.* 220: 507-530.
- Jancarik, J., and Kim, S.H. 1991. Sparse-matrix sampling - a screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Crystallogr.* 24: 409-411.
- Jones, T.A., Zou, J.Y., Cowan, S.W., and Kjeldgaard, M. 1991. Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Cryst A* 47: 110-119.
- Kissinger, C.R., Gehlhaar, D.K. and Fogel, D.B. 1999. Rapid automated molecular replacement by evolutionary search. *Acta Cryst. D* 55: 484-491.
- Klenk, H.P., Clayton, R.A., Tomb, J.F., White, O., Nelson, K.E., Ketchum, K.A., Dodson, R.J., Gwinn, M., Hickey, E.K., Peterson, J.D., et al. 1997. The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Nature* 390: 364-370.
- Kraulis, P.J. 1991. MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Cryst.* 24: 946-950.
- Kunow, J., Shima, S., Vorholt, J.A., and Thauer, R.K. 1996. Primary structure and properties of the formyltransferase from the mesophilic *Methanosarcina barkeri*: Comparison with the enzymes from thermophilic and hyperthermophilic methanogens. *Arch. Microbiol.* 165: 97-105.
- Kurr, M., Huber, R., König, H., Jannasch, H.W., Fricke, H., Trincone, 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: 239-247.
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., and Thornton, J.M. 1993. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Cryst* 26: 283-291.
- Matthews, B.W. 1968. Solvent content of protein crystals. *J. Mol. Biol.* 33: 491-497.
- May, A.C.W., and Johnson, M.S. 1994. Protein structure comparisons using a combination of a genetic algorithm, dynamic programming and least-squares minimization. *Protein Eng* 7: 475-485.
- Miller, S., Lesk, A.M., Janin, J., and Chothia, C. 1987. The accessible surface area and stability of oligomeric proteins. *Nature* 328: 834-836.
- Navaza, J. 1994. AMoRe: an automated package for molecular replacement. *Acta Cryst A* 50: 157-163.
- Nicholls, A., Bharadwaj, R., and Honig, B. 1993. GRASP: graphical representation and analysis of surface properties. *Biophys J* 64: 166-170.

- Otwinowski, Z., and Minor, W. 1996. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol* 276: 307-326.
- Schuck, P. 1994. Simultaneous radial and wavelength analysis with the Optima XL-A analytical ultracentrifuge. *Prog. Colloid. Polym. Sci* 86: 1-13.
- 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.
- Shima, S., Héroult, D.A., Berkessel, A., and Thauer, R.K. 1998a. Activation and thermostabilization effects of cyclic 2,3-diphosphoglycerate on enzymes from the hyperthermophilic *Methanopyrus kandleri*. *Arch. Microbiol.* 170: 469-472.
- Shima, S., Thauer, R.K., Ermler, U., Durchschlag, H., Tziatzios, C., and Schubert, D. 2000. A mutation affecting the association equilibrium of formyltransferase from the hyperthermophilic *Methanopyrus kandleri* and its influence on the enzyme's activity and thermostability. *Eur J Biochem* 267: 6619-6623.
- Shima, S., Thauer, R.K., Michel, H., and Ermler, U. 1996. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of formylmethanofuran:tetrahydromethanopterin formyltransferase from *Methanopyrus kandleri*. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 26: 118-120.
- Shima, S., Tziatzios, C., Schubert, D., Fukada, H., Takahashi, K., Ermler, U., and Thauer, R.K. 1998b. Lyotropic-salt-induced changes in monomer/dimer/tetramer association equilibrium of formyltransferase from the hyperthermophilic *Methanopyrus kandleri* in relation to the activity and thermostability of the enzyme. *Eur. J. Biochem.* 258: 85-92.
- Shima, S., Weiss, D.S., and Thauer, R.K. 1995. Formylmethanofuran:tetrahydromethanopterin formyltransferase (Ftr) from the hyperthermophilic *Methanopyrus kandleri*: Cloning, sequencing and functional expression of the *ftr* gene and one step purification of the enzyme overproduced in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 230: 906-913.
- Stetter, K.O. 1988. *Archaeoglobus fulgidus* gen. nov. sp. nov. - a new taxon of extremely thermophilic archaebacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 10: 172-173.
- Szilagyi, A. and Zavodszky, P. 2000. Structural differences between mesophilic, thermophilic and extremely thermophilic protein subunits: results of a comprehensive survey. *Structure* 8: 493-504.
- Thauer, R.K. 1998. Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. *Microbiology* 144: 2377-2406.
- Thauer, R.K., and Kunow, J. 1995. Sulfate reducing Archaea. In *Biotechnology Handbook*. (ed. N. Clark), pp. 33-48. Plenum Publishing Company Ltd, London.
- Tolman, C.J., Kanodia, S., Roberts, M.F., and Daniels, L. 1986. ^{31}P -NMR spectra of methanogens: 2,3-cyclopyrosphoglycerate is detectable only in methanogenic strains. *Biochim. Biophys. Acta* 886: 345-352.

- 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.
- Vorholt, J.A., Hafenbradl, D., Stetter, K.O., and Thauer, R.K. 1997. Pathways of autotrophic CO₂ fixation and of dissimilatory nitrate reduction to N₂O in *Ferroglobus placidus*. *Arch Microbiol.* 167: 19-23.
- Wasserfallen, A., Nölling, 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 thermautotrophicus* comb. nov., *Methanothermobacter wolfeii* comb. nov., and *Methanothermobacter marburgensis* sp. nov. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology* 50: 43-53.
- Woese, C.R., Achenbach, L., Rouvière, P., and Mandelco, L. 1991. Archaeal phylogeny - reexamination of the phylogenetic position of *Archaeoglobus fulgidus* in light of certain composition-induced artifacts. *Syst. Appl. Microbiol.* 14: 364-371.

Publikationsliste

- Lübben, M., Prutsch, A., Mamat, B. & Gerwert, K. (1999). Electron transfer induces side-chain conformational changes of glutamate-286 from cytochrome bo_3 . *Biochemistry* 38(7), 2048–2056.
- Warkentin, E., Mamat, B., Sordel-Klippert, M., Wicke, M., Thauer, R. K., Iwata, M., Iwata, S., Ermler, U. & Shima, S. (2001). Structures of $F_{420}H_2:NADP^+$ oxidoreductase with and without its substrates bound. *EMBO J.* 30(23), 6561–6569.
- Mamat, B., Roth, A., Grimm, C., Ermler, U., Tziatzios, C., Schubert, D., Thauer, R. K. & Shima, S. (2002). Crystal structures and enzymatic properties of three formyltransferases from archaea: Environmental adaptation and evolutionary relationship. Eingereicht bei *Protein Science*.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Björn Mamat
Geburtsdatum	1. 7. 1974
Geburtsort	Essen

Schulausbildung

Grundschule	1980–1984 Hinseler Schule, Essen
Gymnasium	1985–1993 Gymnasium Essen-Überruhr
Schulabschluß	6/1993 Abitur

Studium der Biologie

Grundstudium	10/1993–9/1995 Ruhr-Universität Bochum
Vordiplom	9/1995
Hauptstudium	10/1995–3/1997 Ruhr-Universität Bochum
Diplomprüfung	8/1997 in den Fächern Biochemie und Biophysik, Mikrobiologie, Pharmakologie
Diplomarbeit	11/1997–10/1998 am Lehrstuhl für Biophysik der Ruhr-Universität Bochum unter Anleitung von PD Dr. Mathias Lübben: „Neue Strategien der Infrarot-Spektroskopie an Häm- Kupfer-Oxidase unter Anwendung optischer Trigger“

Promotion (Biochemie)

seit Dezember 1998 am MPI für Biophysik (Frankfurt am Main) und
MPI für terrestrische Mikrobiologie (Marburg);

mit Aufenthalten an der Universität Regensburg,
am Deutschen Elektronen-Synchrotron, Hamburg,
an der European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble, Frankreich
und der National Synchrotron Light Source, Brookhaven National Lab, USA

biotechnologische Studenteninitiative (btS) e. V.

seit 1999 Mitglied, 10/2000–1/2002 bundesweiter AG-Leiter
für die Vermittlung von Praktika;
Projektleitung (WWW-basierte Praktikumsbörse)

Danksagung

Bei der in dieser Arbeit beschriebenen Strukturbestimmung waren außerordentlich große Schwierigkeiten zu überwinden, und der letztendliche Erfolg wäre ohne die Beiträge einer großen Zahl von Personen nicht möglich gewesen. Außerdem hatte ich das ungewöhnliche Glück, Mitglied zweier großer Arbeitsgruppen (in Frankfurt und Marburg) zu sein, was die Arbeits- und Diskussionsmöglichkeiten sehr bereichert hat.

Zuerst bedanke ich mich sehr herzlich bei meinem Doktorvater, Prof. Dr. Rudolf K. Thauer, für die Bereitschaft, mir dieses Projekt zu übertragen, für seine Unterstützung und seine Geduld.

Genau so herzlich bedanke ich mich bei meinem Betreuer vor Ort in Frankfurt, Dr. Ulrich Ermler, für seine ständige Hilfsbereitschaft und die praktische Unterstützung besonders in der schwierigen Phase der Phasierung und Interpretation der ersten Elektronendichte.

Nicht genug würdigen kann ich die ungeheure Arbeit, die Dr. Seigo Shima in die Reinigung und Kristallisation der Hmd aus *M. marburgensis* und die Entwicklung der Se-Markierung gesteckt hat. Außerdem sei ihm für die Überlassung des Plasmids pHmd2 gedankt.

Ohne die Beiträge dieser drei Personen wäre die Strukturbestimmung nicht möglich gewesen.

Bei Prof. Dr. Hartmut Michel bedanke ich mich für die Aufnahme als Gast in seine Frankfurter Abteilung.

Herrn Prof. Dr. Bernd Ludwig danke ich für die Rolle des offiziellen Betreuers an der Frankfurter Universität.

Clemens Vornrhein (Global Phasing Ltd., Cambridge, UK) danke ich für die Unterstützung mit SHARP, schnellen Alpha-Rechnern und seinen Bemühungen zur Bestimmung der NCS.

Ein herzlicher Dank geht an Annette Roth für die Hilfe bei der Großfermentation von *M. marburgensis*, ebenso an Thomas Hader, Dr. Robert Huber, Prof. Dr. K. O. Stetter (alle Universität Regensburg) und Reinhard Böcher (MPI Marburg).

Am MPI in Marburg danke ich außerdem Jörg Kahnt für die Durchführung von MALDI-TOF-Messungen und Jürgen Koch für die Hilfe bei der Durchführung von AAS-Experimenten und den Export der Anaerobentechnik nach Frankfurt sowie Gerrit Burman für die Überlassung des Plasmids pHmd3.

Ralf Krüger (Institut für Analytische und Instrumentelle Chemie, Uni Frankfurt) hat sich mit MALDI-Messungen an den jHmd-Mikrokristallen verdient gemacht, Martina Mertens (Institut für Anorganische Chemie/Analytische Chemie, Uni Frankfurt) mit TXRF-Messungen zum Nachweis der Se-Inkorporation.

Für viele wertvolle Informationen danke ich allen, die an den Kursen PEPCII 2000 (EMBL Hamburg) und RapiData 2001 (NSLS, Brookhaven) beteiligt waren, unter anderem Paul Tucker, Eleni Mumtsidu und Ehmke Pohl (alle EMBL) sowie Bob Sweet

(Brookhaven).

Für ihre Unterstützung bei der MAD-Datensammlung an der Station X12C (Brookhaven) danke ich Jim Pflugrath (MSC/Rigaku), Bram Schierbeek (Bruker/Nonius) und Anand Saxena (NSLS); für wertvolle Tips zur Anwendung von SOLVE und RESOLVE Tom Terwilliger (Los Alamos), für eine Einführung in den korrekten Gebrauch von *SnB* Chuck Weeks (HHMI).

Neben den bisher genannten haben zahlreiche Wissenschaftler an den besuchten Synchrotronmeßplätzen zur Datensammlung beigetragen, darunter Andrew Thompson (BM14, ID29), Gordon Leonard (BM14), Manfred Burghammer und Christian Riekel (ID13), Raimond Ravelli (ID14), Alexander Popov (X31), Olga Mayans und Ehmke Pohl (BW7A), Paul Tucker (X13) und Viktor Lamzin (EMBL-Stationen).

Bei Günter Fritsch und Ilme Schlichting bedanke ich mich für die irreguläre Abtretung von Meßzeit an der Station BW7B, was die Aufnahme des 2.3 Å-Datensatzes ermöglicht hat.

Ein herzliches Dankeschön an Heidi Müller für die Synthese der Oligos und Barbara Schiller für die Aufrechterhaltung unserer IT-Infrastruktur, an Eberhard Warkentin für seine stete und freundliche Hilfsbereitschaft und für manchen Tip und manche Hilfestellung in kristallographischen Problemfällen. Alex Haas sei für die zuverlässige Beschaffung von JACS-Artikeln gedankt.

Danke an die Initiatoren und Promotoren der (mittlerweile fast schon vergessenen) legendären Teatime, I-Peng Chen, Daniel Ungar, und den Teilnehmern und Laborkollegen Yoshitake Maeda, Thomas Ostermann, Wolfgang Grabarse, Anette Klinger, Agnes Szmolenszky, Christoph Reinhart, und der nächsten Generation, Danka Elez, Hildur Palsdottir, Guohong Pengh für schöne Stunden nicht nur am Institut.

Sehr herzlich bedanke ich mich bei Karin A. Jaschkowitz, Jutta Kreilos, Uli Z., Ingrid Albert, Sevil für Freundschaft und guten Rat. Schließlich bedanke ich mich bei meinen Eltern und meinem Bruder, nicht nur für die zum Schreiben hilfreiche Espressomaschine.