Der energiekonservierende N^5-Methyltetrahydromethanopterin:Coenzym-M-Methyltransferasekomplex aus methanogenen Archaea:

Struktur und Funktion der Untereinheiten MtrH und MtrE

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Birgit Hippler
aus
Duisburg

Marburg/Lahn 1999

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von September 1996 bis Juli 1999 am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. R. K. Thauer durchgeführt.

Teile der in dieser Dissertation erzielten Ergebnisse sind in folgender Originalpublikation veröffentlicht:

Hippler, B. und Thauer, R. K. (1999) The energy conserving methyltetrahydromethanopterin:coenzyme M methyltransferase complex from methanogenic archaea: function of the subunit MtrH, FEBS Letters **449**, 165-168.

Während der Doktorarbeit zu anderen Themen veröffentlichte Arbeiten:

Hippler, B., Homuth, G., Hoffmann, T., Hungerer, C., Schumann W. und Jahn, D. (1997) Characterization of *Bacillus subtilis hemN*, J. Bacteriol. **179**, 7181-7185.

Lieb, C., Siddiqui, R. A., Hippler, B., Jahn, D. und Friedrich, B. (1998) The *Alcaligenes eutrophus hemN* gene encoding the oxygen-independent coproporphyrinogen III oxidase, is required for heme biosynthesis during anaerobic growth, Arch. Microbiol. **169**, 52-60.

„Je planmäßiger die Menschen vorgehen,
desto wirksamer vermag sie der Zufall zu treffen.“
[Anhang zu „Die Physiker“, Friedrich Dürrenmatt]

Meiner Familie und Klaus gewidmet

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis 1
II. Zusammenfassung 2
III. Einleitung 3
1 Energiemetabolismus methanogener Archaea 3
2 Eigenschaften des N^5-Methyltetrahydromethanopterin:Coenzym-M-Methyltransferasekomplexes 6
3 Vergleich verschiedener natriumionentranslozierender Enzyme 11
IV. Material und Methoden 14
1 Verwendete Materialien 14
2 Verwendete Organismen und mikrobiologische Methoden 17
2.1 Züchtung und Zellernte von *M. thermoautotrophicum*, *A. nidulans* und *E. coli* 17
2.2 Herstellung von Zellextrakten 19
3 Molekularbiologische Methoden 20
3.1 Präparation, Restriktion und Detektion von DNA 20
3.2 Transformation von *Escherichia coli* 20
3.3 Transformation von *Aspergillus nidulans* 21
3.4 Southern-Blot-Hybridisierung 21
3.5 Plaque-Hybridisierung 22
3.6 Sequenzierung doppelsträngiger Plasmid-DNA 22
3.7 Klonierung der *mtr*-Gene aus *M. barkeri* 22
3.8 Klonierung und Expression des *mtrH*- bzw. *mtrE*-Gens aus *M. thermoautotrophicum* in *E. coli* 23
3.9 Klonierung und Expression des *mtrH*-Gens aus *M. thermoautotrophicum* in *A. nidulans* 23
3.10 Coexpression von *mtrH* mit *groEL* und *groES* aus *E. coli* 24
3.11 Klonierung und Expression des *mtrH*-Gens aus *M. barkeri* in *E. coli* 24
4 Biochemische Methoden 25
4.1 Reinigung von Enzymen 25
4.2 Bestimmung spezifischer Enzymaktivitäten 28
5 Analytische Methoden 30
5.1 Bestimmung der Proteinkonzentration 30
5.2 Protein-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen 30
5.3 Bestimmung von *N*-terminalen Aminosäuresequenzen 31

V. Ergebnisse 32
1 MtrH aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* 32
1.1 Abtrennung der 34 kDa-Untereinheit MtrH vom Enzymkomplex 32
1.2 Messung von Enzymaktivitäten 34
1.3 Heterologe Expression von *mtrH* 39
2 MtrH aus *Methanosarcina barkeri* 45
2.1 Klonierung und Sequenzierung des *mtr*-Operons aus *M. barkeri* 45
2.2 Analyse der abgeleiteten Primärstrukturen der Mtr-Untereinheiten aus *M. barkeri* 47
2.3 Heterologe Expression von *mtrH* aus *M. barkeri* in *E. coli* 56
3 Analyse der Primärstruktur als Hinweis auf die Funktion der Untereinheit MtrH 57
4 MtrE aus *M. thermoautotrophicum* 63
4.1 Versuch der Reinigung von MtrE aus *M. thermoautotrophicum* 63
4.2 Versuch der Überexpression von *mtrE* in *E. coli* 65
VI. Diskussion 67
1 Topologische Struktur der acht Untereinheiten MtrA-H des Methyltransferasekomplexes aus *M. thermoautotrophicum* 67
2 Die katalytische Funktion der Untereinheit MtrH 68
3 Die Struktur der Untereinheit MtrE 70
4 Die Funktion der Untereinheit MtrE 71
5 Die Natriumionentranslokation 78
6 Ein neues topologisches Modell für den energiekonservierenden Methyltransferasekomplex aus *M. thermoautotrophicum* 80
VII. Literaturverzeichnis 82

I. Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxodisulfat
CH_3-S-CoM	Methyl-2-mercaptoethansulfonsäure, Methylcoenzym M
CH_3-H_4MPT	N^5-Methyl-5,6,7,8-tetrahydromethanopterin
DC	Dünnschichtchromatographie
DTT	Dithiothreitol
H_4MPT	5,6,7,8-Tetrahydromethanopterin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
kbp	Kilobasenpaare
Mops	4-Morpholinopropansulfonsäure
MT-Aktivität	N^5-Methyltetrahydromethanopterin:Coenzym-M-Methyltransferase-Aktivität
MT1-Aktivität	N^5-Methyltetrahydromethanopterin:Cob(I)alamin-Methyltransferase-Aktivität
MT2-Aktivität	Methylcob(III)alamin:Coenzym-M-Methyltransferase-Aktivität
PCR	Polymerasekettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS/PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Upm	Umdrehungen pro min

Weitere Abkürzungen wurden entsprechend der „Information for Authors (1997)“ des European Journals of Biochemistry verwendet.

II. Zusammenfassung

Methanobacterium thermoautotrophicum ist ein methanogenes Archaeon, das mit CO_2 und H_2 als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle unter Bildung von Methan wachsen kann. Ein wichtiger Schritt der Methanogenese ausgehend von CO_2 und H_2 ist der Transfer der Methylgruppe von N^5-Methyltetrahydromethanopterin auf Coenzym M. Diese Reaktion ist mit einer Energiekonservierung durch Natriumionentranslokation über die Cytoplasmamembran verbunden.

Verantwortlich für den Methylgruppentransfer ist der membrangebundene Methyltransferasekomplex, der aus den acht Untereinheiten MtrABCDEFGH besteht. Die Funktionen der einzelnen Untereinheiten waren bisher weitgehend unbekannt. Es konnte lediglich MtrA als die Untereinheit identifiziert werden, die als prosthetische Gruppe 5'-Hydroxybenzimidazolylcobamid trägt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, daß die Untereinheit MtrH des membrangebundenen Methyltransferasekomplexes aus *M. thermoautotrophicum* durch Ionenaustauschchromatographie vom übrigen Komplex getrennt werden kann und die katalytische Funktion einer Methyltetrahydromethanopterin:Cob(I)alamin-Methyltransferase besitzt. Dieses Ergebnis wird durch eine Reihe von Aminosäuresequenzvergleichen von MtrH-Proteinen verschiedener methanogener Archaea mit unterschiedlichen Enzymen verschiedener Organismen, die ebenfalls den Transfer einer Methylgruppe katalysieren, gestützt.

Darüber hinaus wurden sowohl experimentelle als auch theoretische Hinweise gefunden, daß die Untereinheit MtrE ein integrales Membranprotein ist. Die mögliche Funktion der MtrE-Untereinheit als Methylcob(III)alamin:Coenzym-M-Methyltransferase wird am Ende dieser Arbeit mittels intensiver Vergleiche von MtrE-Untereinheiten mehrerer methanogener Archaea mit Aminosäuresequenzen anderer Enzyme, die eine ähnliche Reaktion katalysieren, diskutiert. Zur Diskussion steht ebenfalls die Beteiligung der MtrE-Untereinheit am Prozeß der Natriumionentranslokation, wobei andere Enzyme mit einer primären Natriumpumpe zum Vergleich herangezogen werden.

III. Einleitung

Methanogene Archaea sind eine heterogene Gruppe strikt anaerob lebender Mikroorganismen, die einen der drei Hauptäste der Domäne der Archaea darstellen (Woese *et al.*, 1990). Archaea bilden neben den Eukarya und Bakteria die dritte Domäne des Lebens.

Die Methanbildung ist ein Prozeß, der in der Natur an anoxischen Standorten wie Sümpfen, Reisfeldern, in Seewassersedimenten, in Faultürmen von Kläranlagen, im Pansen von Wiederkäuern oder in Termitendärmen stattfindet. Ein gut untersuchtes Beispiel für ein methanogenes Archaeon ist *Methanobacterium thermoautotrophicum*, ein thermophiler Organismus mit einer Wachstumstemperatur von 65 °C, der mit H_2 und CO_2 als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle unter Bildung von Methan wachsen kann. Die Methanogenese ausgehend von H_2 und CO_2 ist in Abbildung 1 gezeigt. Es wird deutlich, daß an den zahlreichen Reaktionsschritten der Methanbildung eine Reihe von Enzymen beteiligt sind, deren molekularen und katalytischen Eigenschaften von großem Interesse sind.

1 Energiemetabolismus methanogener Archaea

Die Methanogenese ausgehend von H_2 und CO_2 ist unter Standardbedingungen eine stark exergone Reaktion (Reaktion 1).

(1) $CO_2 + 4H_2 \longrightarrow CH_4 + 2H_2O \quad \Delta G^{\circ\prime} = -130$ kJ/mol

Berücksichtigt man jedoch, daß unter natürlichen Bedingungen nur ein Wasserstoffpartialdruck von 1-10 Pa vorherrscht, beträgt die Änderung der freien Enthalpie nur noch etwa 25 % dieses Werts ($\Delta G' \approx -30$ kJ/mol). Wegen dieses geringen Energiegewinns ist jede Teilreaktion, die einen Beitrag zur Energiegewinnung oder zur Energiekonservierung leisten kann, für den Energiemetabolismus methanogener Archaea von großer Bedeutung.

Noch deutlicher wird die Notwendigkeit von energiekonservierenden Reaktionen, weil die Reduktion von CO_2 zu Beginn der Methanogenese endergon ist (Reaktion 2).

(2) $CO_2 + 2H_2 + MFR \longrightarrow CHO\text{-}MFR \quad \Delta G^{\circ\prime} = +16$ kJ/mol

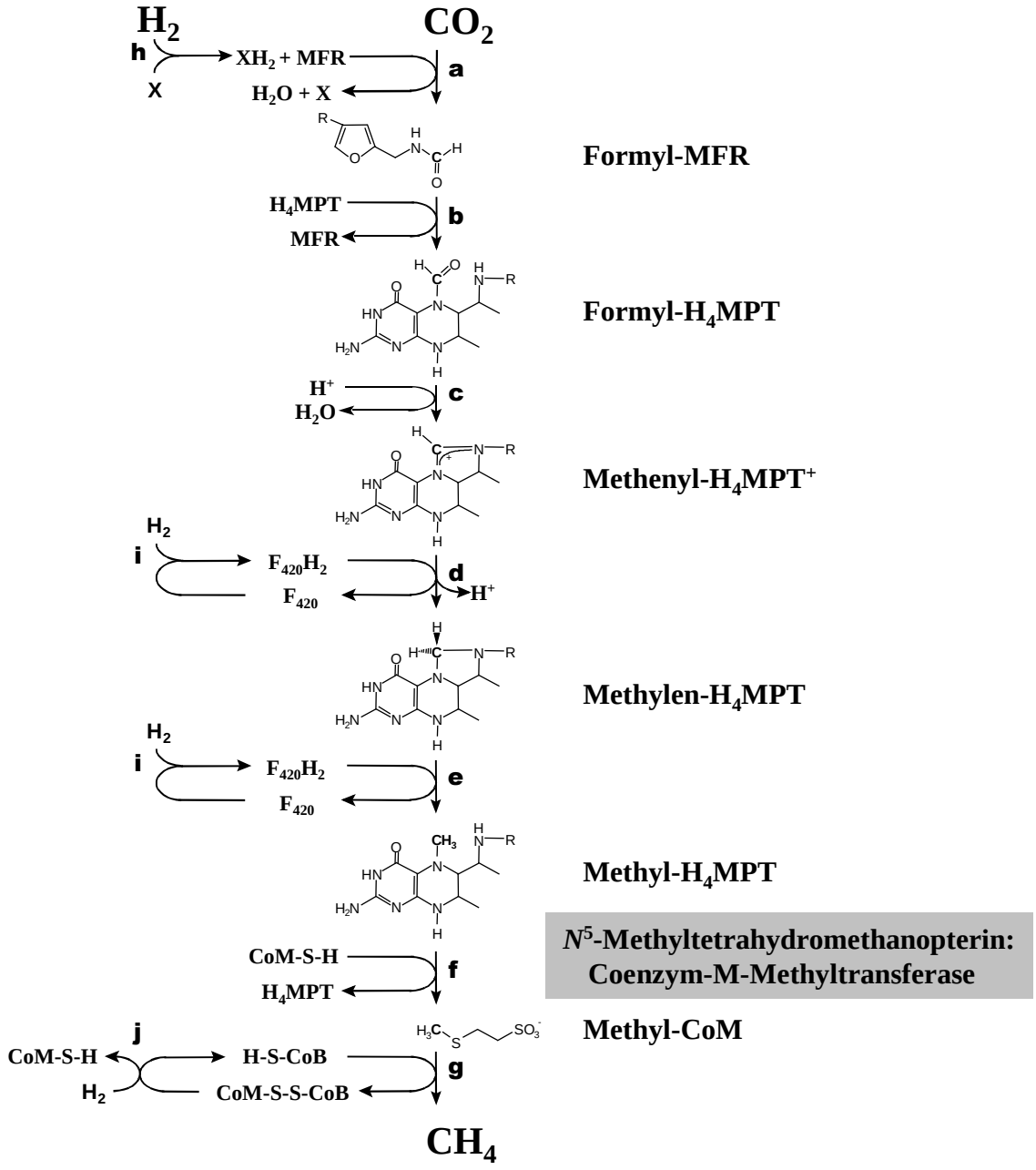


Abb. 1: Stoffwechselweg der Methanogenese aus H_2 und CO_2 in *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Abkürzungen: MFR, Methanofuran; H_4MPT, Tetrahydromethanopterin; $F_{420}H_2$, reduziertes Coenzym F_{420}; H-S-CoM, Coenzym M; H-S-CoB, Coenzym B; CoM-S-S-CoB, Heterodisulfid aus Coenzym M und Coenzym B; X, unbekannter Elektronendonator. Enzyme: a) Formylmethanofuran-Dehydrogenase; b) Formyl-MFR:H_4MPT-Formyl-Transferase; c) N^5,N^{10}-Methenyl-H_4MPT-Cyclohydrolase; d) F_{420}-abhängige N^5,N^{10}-Methylen-H_4MPT-Dehydrogenase; e) N^5,N^{10}-Methylen-H_4MPT-Reduktase; f) N^5-Methyl-H_4MPT:Coenzym-M-Methyltransferase; g) Methylcoenzym-M-Reduktase; h) Coenzym-F_{420}–nicht-reduzierende-Hydrogenase; i) Coenzym-F_{420}-reduzierende-Hydrogenase; j) Heterodisulfid-Reduktase.

Auch bei dieser Reaktion spielt der Wasserstoffpartialdruck eine Rolle, so daß die Reaktion unter natürlichen Bedingungen (siehe oben) mit $\Delta G' = +40$ kJ/mol noch stärker endergon ist (Bertram und Thauer, 1994).

Die zum Energiegewinn der Methanogenese beitragenden Reaktionen können in einen oxidativen Teil, in dem Coenzym M (H-S-CoM) und Coenzym B (H-S-CoB) zum Heterodisulfid (CoM-S-S-CoB) oxidiert werden und einen reduktiven Teil, in dem das Heterodisulfid reduktiv zu Coenzym M und Coenzym B gespalten wird, aufgeteilt werden (Thauer, 1998) (siehe auch Abb.1). Dabei spielt die Methylcoenzym-M-Reduktase im oxidativen Teil eine wichtige Rolle (Reaktion 3).

(3) CH_3-S-CoM + H-S-CoB $\longrightarrow$ CH_4 + CoM-S-S-CoB $\Delta G^{\circ\prime} = -45$ kJ/mol

Die katalysierte Reaktion ist, bedingt durch die Entstehung eines gasförmigen Produkts, nahezu irreversibel und nach bisherigem Wissen nicht mit einer energiekonservierenden Reaktion gekoppelt (Thauer *et. al.*, 1993).

Anders sieht es bei der Reaktion aus, die von der Heterodisulfid-Reduktase katalysiert wird (Reaktion 4).

(4) CoM-S-S-CoB + 2 [H] $\longrightarrow$ H-S-CoM + H-S-CoB $\Delta G^{\circ\prime} = -40$ kJ/mol

Die Reduktion des Heterodisulfids zu Coenzym B und Coenzym M ist nachweislich mit dem Aufbau eines elektrochemischen H^+-Potentials gekoppelt (Peinemann *et al.*, 1990; Deppenmeier *et al.*, 1990a, b, 1991, 1996; Sparling *et al.*, 1993). Dieser elektrochemische H^+-Gradient wird zur Synthese von ATP genutzt. Der genaue Mechanismus der ATP-Synthese ist noch nicht untersucht. Im Genom von *M. thermoautotrophicum* Stamm ΔH sind nur für eine ATP-Synthase kodierende Gene gefunden worden (Smith *et al.*, 1997). Bekannt ist jedoch nicht, ob diese ATP-Synthase H^+- oder Na^+-abhängig ist, weil die Ionengradienten über einen Na^+/H^+-Antiporter ineinander umwandelbar sind. (Kaesler und Schönheit, 1989 a, b).

Trotzdem reichen die bisher erwähnten exergonen Reaktionen nicht aus, um unter natürlichen Bedingungen genügend Energie für die ATP-Bildung zu gewinnen. Somit kommt der N^5-Methyltetrahydromethanopterin:Coenzym-M-Methyltransferase, die die Bildung von Methylcoenzym M (CH_3-S-CoM) aus N^5-Methyltetrahydromethanopterin (CH_3-H_4MPT) und Coenzym M (H-S-CoM) katalysiert (Reaktion 5), eine besondere Bedeutung zu. Die kataly-

sierte Reaktion ist exergon und mit der Energiekonservierung durch die Ausbildung eines elektrochemischen Na^+-Potentials über die Cytoplasmamembran gekoppelt (Deppenmeier *et al.*, 1996).

(5) CH_3-H_4MPT + H-S-CoM ⟶ CH_3-S-CoM + H_4MPT $\Delta G^{\circ\prime} = -30$ kJ/mol

Die Frage, ob die Natriumionen letztendlich für einen Na^+/H^+-Antiporter verwendet werden oder den ersten Schritt der Methanogenese durch reversen Elektronentransport ermöglichen (Kaesler und Schönheit, 1989 a, b), steht noch offen.

2 Eigenschaften des *N*^{5}-Methyltetrahydromethanopterin:Coenzym-M-Methyltransferasekomplexes

Die Methyltransferase ist ein membranassoziierter Enzymkomplex, an den 5'-Hydroxybenzimidazolylcobamid (Abb. 2) als prosthetische Gruppe fest gebunden ist.

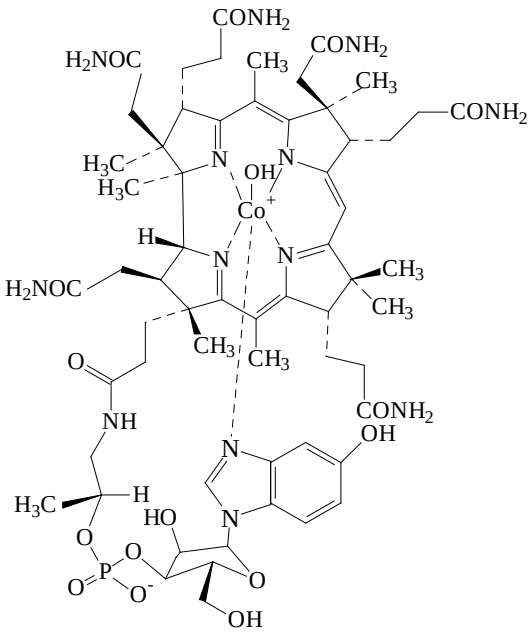


Abb. 2: Strukturformel von 5'-Hydroxybenzimidazolylcobamid. Am zentralen Cobaltatom des Corrinrings sind zwei axiale Liganden gebunden. Ein Hydroxylrest fungiert als oberer axialer (β-) Ligand und eine Base als unterer axialer (α-) Ligand. Im gezeigten Fall ist die Base ein 5'-Hydroxybenzimidazolylrest. Er wird im enzymgebundenen Zustand im Fall des Methyltransferasekomplexes durch einen Histidinrest des Enzyms ersetzt.

Die katalysierte Reaktion läuft in zwei Teilschritten ab. Zunächst wird eine Methylgruppe von N^5-Methyltetrahydromethanopterin auf das Cobamid übertragen. Der zweite Teilschritt der Reaktion beinhaltet die Demethylierung der methylierten prosthetischen Gruppe unter der Bildung von Methylcoenzym M (Abb. 3).

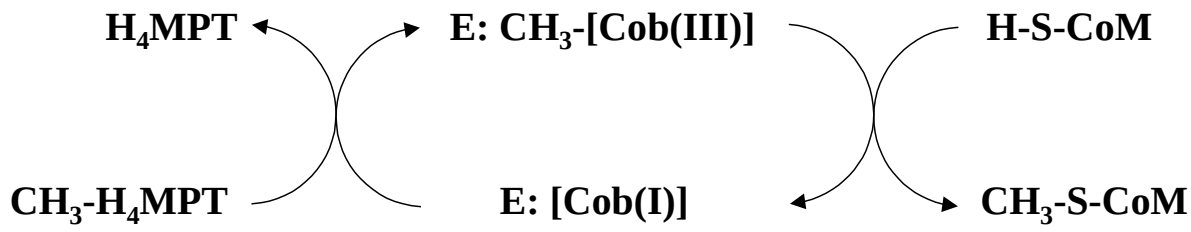


Abb. 3: Mechanismus der Bildung von Methylcoenzym M (CH_3-S-CoM) aus Methyltetrahydromethanopterin (CH_3-H_4MPT) und Coenzym M (H-S-CoM). H_4MPT: Tetrahydromethanopterin; E:CH_3-[Cob(III)]: enzymgebundenes Methylcob(III)alamin; E:[Cob(I)]: enzymgebundenes Cob(I)alamin.

Aus früheren Untersuchungen war bekannt, daß der Methyltransferasekomplex die Transferreaktionen nicht nur mit der enzymgebundenen prosthetischen Gruppe, sondern auch mit extern zugegebenem Cob(I)alamin bzw. Methylcob(III)alamin katalysieren kann (Weiss *et al.*, 1994). Die zwei Teilreaktionen mit freiem Cob(I)alamin und Methylcob(III)alamin sind im folgenden gezeigt (Reaktionen 6 und 7):

(6) CH_3-H_4MPT + Cob(I)alamin ⟶ H_4MPT + CH_3-Cob(III)alamin **(MT1-Aktivität)**

(7) CH_3-Cob(III)alamin + H-S-CoM ⟶ Cob(I)alamin + CH_3-S-CoM **(MT2-Aktivität)**

Der Enzymkomplex der N^5-Methyltetrahydromethanopterin:Coenzym-M-Methyltransferase ist aus acht verschiedenen Untereinheiten aufgebaut. Diese Untereinheiten werden als MtrA-H bezeichnet und haben apparente molekulare Massen von 12 kDa (MtrF), 12,5 kDa (MtrB), 13 kDa (MtrG), 21 kDa (MtrD), 23 kDa (MtrA), 24 kDa (MtrC), 28 kDa (MtrE) und 34 kDa (MtrH) (Harms *et al.*, 1995). Die abgeschätzten Hydrophobizitäten der Aminosäuresequenz jeder Untereinheit (Tab. 1) führten zur Erstellung eines Enzymmodells (Abb. 4).

Tab. 1: Abschätzung der Hydrophobizitäten der acht Untereinheiten des Methyltransferasekomplexes aus *M. thermoautotrophicum* nach Harms *et al.* (1995). Für diese Abschätzung wurden die Aminosäuren Alanin, Isoleucin, Leucin, Tryptophan und Valin als hydrophob eingestuft und ihr relativer Anteil zur Gesamtzahl der Aminosäuren jeder einzelnen Untereinheit berechnet.

Untereinheit	Molekulare Masse (kDa)	Hydrophobe Aminosäuren
MtrA	23	37,8 %
MtrB	12,5	43,6 %
MtrC	24	52,8 %
MtrD	21	47,2 %
MtrE	28	43,1 %
MtrF	12	50,0 %
MtrG	13	42,3 %
MtrH	34	38,1 %

Laut Tabelle 1 haben die Untereinheiten MtrA und MtrH die hydrophilsten Eigenschaften. Deswegen befinden sie sich im topologischen Enzymmodell auf der cytoplasmatischen Seite der Membran. Es wurde außerdem angenommen, daß eine dritte große Untereinheit im Cytoplasma lokalisiert sein muß, um den zweiten Teil der Methyltransferreaktion (Reaktion 7) zu katalysieren. Somit kam die MtrE-Untereinheit mit 43,1 % an hydrophoben Aminosäuren eher in Frage als MtrC mit 52,8 % oder MtrD mit 47,2 %. Die hydrophoben Eigenschaften der fünf Untereinheiten MtrB, MtrC, MtrD, MtrF und MtrG wurden als so stark ausgeprägt angenommen, daß sie im Modell als integrale Membranbestandteile gezeigt werden.

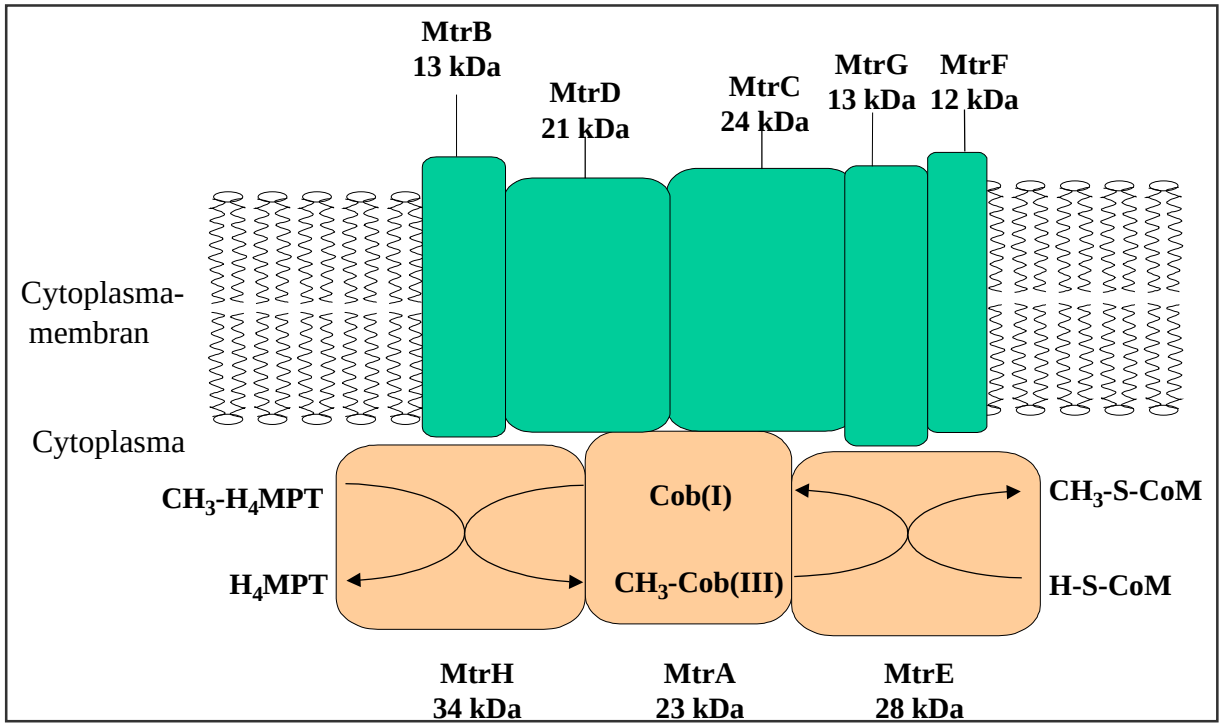


Abb. 4: Schematische Darstellung des MtrA-H-Komplexes in der Cytoplasmamembran von *M. thermo-autotrophicum*. Die Topologie der Untereinheiten wurde anhand einer Abschätzung der Hydrophobizitäten der Proteine abgeleitet (Harms, 1996).

Bisher am besten untersucht wurde die 23 kDa-Untereinheit MtrA. Es konnte gezeigt werden, daß MtrA die Untereinheit ist, die das Corrinoid in einer Form trägt, in der die Base des Nukleotidloops nicht als unterer axialer Ligand gebunden ist (Harms und Thauer, 1996a). Im Cob(II)amid- und Cob(III)amidoxidationszustand fungiert ein Histidinrest der MtrA-Untereinheit als unterer axialer Cobaltligand. Durch seitenspezifische Mutagenese wurde His-84 als das aktive Histidin identifiziert (Harms und Thauer, 1997). Allerdings weist die Aminosäuresequenz von MtrA nicht das charakteristische Corrinoidbindemotiv DxHxxG-X_{41-42}-SxL-x_{24-28}-GG (Sauer und Thauer, 1998a) auf, das in allen anderen Corrinoidproteinen gefunden wurde, die die prosthetische Gruppe in der „Nukleotid-Loop-off/His-on“ Konstitution tragen (Marsh und Holloway, 1992; Ludwig und Matthews, 1997). Dazu gehören die cobalaminabhängige Methionin-Synthase (Drennan *et al.*, 1994), die Methylmalonyl-CoA-Mutase (Mancia *et al.*, 1996), die Glutamat-Mutase (Zelder *et al.*, 1995; Chen und Marsh, 1997), die Methylenglutarat-Mutase (Beatrix *et al.*, 1994), die Methanol:Coenzym-M-Methyltransferase (Sauer *et al.*, 1997) und verschiedene Mono- oder Multimethylamin:Coenzym-M-Methyltransferasen (Paul und Krzycki, 1996; Burke und Krzycki, 1998).

Über die Funktion anderer Untereinheiten des Methyltransferasekomplexes lagen bisher nur Vermutungen vor, die auf der postulierten Topologie und auf Sequenzvergleichen mit anderen Enzymen beruhten. So sind die laut Modell im Cytoplasma liegenden Untereinheiten für an der Enzymreaktion beteiligte Substrate besser erreichbar, was dafür spricht, daß MtrA, MtrE und MtrH die funktionellen katalytischen Untereinheiten sind.

MtrH weist Sequenzähnlichkeiten zu AcsE, einer cytoplasmatisch lokalisierten Methyltransferase aus *Clostridium thermoaceticum*, auf (Roberts *et al.*, 1994). AcsE katalysiert, analog zur MtrH-Untereinheit aus *M. thermoautotrophicum*, den Transfer einer Methylgruppe von N^5-Methyltetrahydrofolat (CH_3-H_4F) auf ein proteingebundenes Corrinoidprotein, das Corrinoid-Eisen-Schwefel-Protein. An dieser Stelle sei erwähnt, daß Tetrahydromethanopterin (H_4MPT) als chemisches Analogon zu Tetrahydrofolat (H_4F) betrachtet werden kann (Thauer *et al.*, 1996). Die wesentlichen Unterschiede dieser Moleküle liegen in den Eigenschaften der verschiedenen Seitenketten, die am Stickstoffatom N^{10} gebunden sind. Das Zentrum der Methylierungsreaktion (N^5) befindet sich jedoch bei beiden Pterinderivaten in nahezu äquivalenter chemischer Umgebung. H_4MPT unterscheidet sich hierbei von H_4F aufgrund von zwei neuen Stereozentren, die durch den Austausch jeweils eines Wasserstoffatoms gegen eine Methylgruppe an zwei C-Atomen in β-Stellung (C^7 und C^9) erzeugt werden (Abb. 5).

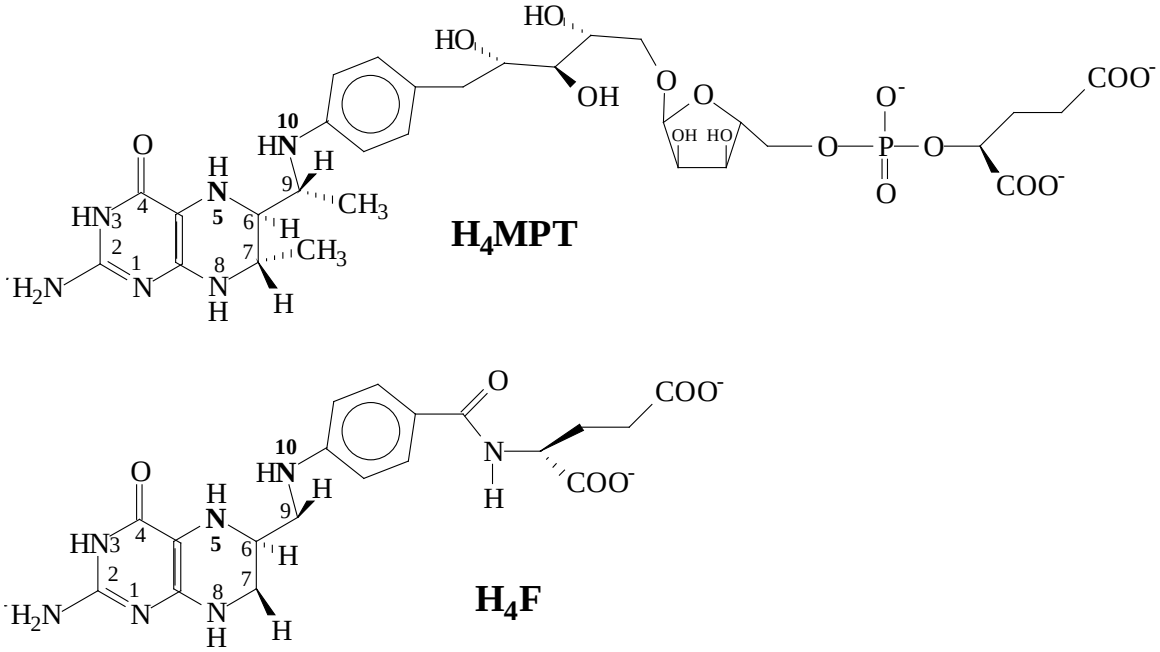


Abb. 5: Strukturformeln von Tetrahydromethanopterin (H_4MPT) und Tetrahydrofolat (H_4F). Bei den methylierten Derivaten befindet sich die Methylgruppe am N^5-Stickstoffatom (siehe Text für weitere Erläuterungen).

Ferner wird für CmuB, einem MtrH-Analogon aus dem Chlormethanstoffwechsel von *Methylobacterium* sp. Stamm CM4, das kürzlich auf Genebene gefunden wurde (Vannelli *et al.*, 1999), eine Methylcob(III)alamin:Tetrahydrofolataktivität postuliert. Sowohl MtrH als auch AcsE und CmuB zeigen Sequenzähnlichkeiten zu einer Domäne (Aminosäurereste 354-649) der cobalaminabhängigen Methionin-Synthase MetH aus *Escherichia coli* (Banerjee *et al.*, 1989). Für diese Domäne von MetH wurde eine Bindestelle für CH_3-H_4F postuliert (Goulding *et al.*, 1997). Somit lag die Vermutung nahe, daß MtrH die erste Teilreaktion, die N^5-Methyltetrahydromethanopterin:Cob(I)alamin-Methyltransferase-Reaktion, katalysiert.

Auf die Funktion der MtrE-Untereinheit gab es jedoch bisher nur wenige Hinweise. Aufgrund der Größe und postulierten Lage von MtrE wurde vermutet, daß MtrE die Demethylierung des Corrinoids katalysieren kann. Hinzu kamen sehr schwache Sequenzhomologien von etwa 13 % zu den Isoenzymen MtaA und MtbA, zwei Methylcobalamin:Coenzym-M-Methyltransferasen aus *M. barkeri*, die zur Unterstützung der Theorie herangezogen wurden (Harms und Thauer, 1996b; Harms, 1996). Inzwischen konnte gezeigt werden, daß diese Isoenzyme zinkabhängig sind und putative Zinkbindemotive besitzen (Sauer und Thauer, 1997). Eine mögliche Zinkbindestelle als zusätzlicher Hinweis auf die Funktion von MtrE konnte allerdings noch nicht gefunden werden.

Es wird angenommen, daß die Untereinheit MtrD ein integraler Bestandteil der Membran und an der Na^+-Translokation beteiligt ist (Lienard und Gottschalk, 1998). Diese Annahme beruht aber ausschließlich auf der Tatsache, daß die Aminosäure-Sequenz von MtrD gegenüber allen anderen Proteinen die prozentual höchste Anzahl an konservierten Aminosäuren aufweist und somit eine entscheidende Rolle spielen könnte.

3 Vergleich verschiedener natriumionentranslozierender Enzyme

Wie bereits erwähnt, gilt der membrangebundenen Methyltransferase aufgrund ihrer energiekonservierenden Funktion besonderes Interesse. So konnte für die Methyltransferase aus *M. thermoautotrophicum* eine eindeutige Stimulierung der zweiten Teilreaktion, d. h. der Demethylierung von Methylcob(III)alamin unter der Bildung von Methylcoenzym M, durch Erhöhung der Natriumionenkonzentration nachgewiesen werden (Gärtner *et al.*, 1994; Weiss

et al., 1994). In *Methanosarcina mazei* Stamm Gö1, einem weiteren methanogenen Archaeon, das ebenfalls den membrangebundenen Methyltransferasekomplex besitzt, gelang es sogar, eine Translokation von Natriumionen durch die Rekonstitution des Methyltransferasekomplexes aus *M. mazei* in Liposomen nachzuweisen (Lienard *et al*., 1996). Diese Befunde lassen vermuten, daß der Na^+-translozierende Schritt mit der Demethylierung des enzymgebundenen Corrinoids unter Bildung von Methylcoenzym M gekoppelt ist.

Da die Natriumionentranslokation bisher noch nicht im Hinblick auf ihren Mechanismus untersucht wurde, ist es interessant, den membrangebundenen Methyltransferasekomplex aus Archaea mit anderen energiekonservierenden Enzymen zu vergleichen, die ebenfalls mit einer primären Na^+-Pumpe ausgestattet sind. Dazu gehört die Familie von membrangebundenen Decarboxylasen aus anaerob lebenden Bakterien, wie z. B. die Oxalacetat-Decarboxylase, die eine Funktion in der Citratfermentation ausübt und bisher sehr intensiv aus dem Organismus *Klebsiella pneumonieae* untersucht wurde (Dimroth, 1997). Die Methylmalonyl-CoA-Decarboxylase ist am Abbau von Lactat zu Acetat, Propionat, CO_2 und H_2 (untersucht aus *Viellonella parvula*) oder von Succinat zu Propionat und CO_2 (untersucht aus *Propionigenium modestum*) beteiligt (Hilpert und Dimroth, 1982). Ein wichtiges Enzym in einigen glutamatverwertenden Bakterien, wie z. B. *Acidaminococcus fermentans* oder *Fusobacterium nucleatum,* ist die Glutaconyl-CoA-Decarboxylase (Buckel und Semmler, 1983). Die Malonat-Decarboxylase, ein Enzym, das die Decarboxylierung von Malonat zu Acetat in *Malonomonas rubra* (Dehning und Schink, 1989; Hilbi *et al.*, 1992) katalysiert, gehört ebenfalls zu dieser Gruppe. Allen Decarboxylasen gemein ist Biotin als prosthetische Gruppe, auf das in einem ersten Reaktionsschritt die Carboxylgruppe übertragen wird. Anschließend wird Carboxybiotin wieder decarboxyliert. Diese Reaktionsfolge kann analog zur Methylierung und Demethylierung des Corrinoids duch die energiekonservierende Methyltransferase betrachtet werden. Die genannten Decarboxylasen katalysieren alle eine exergone chemische Reaktion ($\Delta G^{\circ\prime} \cong$ -20 kJ / mol), die mit einem aktiven Transport von Na^+-Ionen durch die Membran gekoppelt ist.

Außerdem gibt es einige F_1F_0-ATPasen, die Na^+-Ionen statt H^+-Ionen zum Aufbau eines Ionengradienten verwenden und für Vergleiche mit der Na^+-transportierenden Methyltransferase herangezogen werden können (Dimroth, 1997).

Eine dritte Gruppe von Enzymen für vergleichende Studien liefern mit Na^+-Transport gekoppelte NADH:Ubichinon-Oxidoreduktasen. Von diesen ist die Oxidoreduktase aus *Vibrio alginolyticus* ein gut untersuchtes Beispiel. Diese Oxidoreduktase katalysiert, im Gegensatz zur Oxidoreduktase der mitochondrialen Atmungskette, die zunächst einen Protonengradienten aufbaut, der im Anschluß mit einem Na^+ / H^+-Antiporter kombiniert wird, einen direkten Na^+-Transport (Dimroth, 1997).

All diese Enzyme sind Multi-Untereinheiten-Komplexe, die in ein Membran- und ein peripheres Kompartiment unterteilt werden können. Das Membrankompartiment ist notwendig, um den vektoriellen Na^+-Ionentransport zu katalysieren, während das periphere Kompartiment des Komplexes letztendlich an der Katalyse der eigentlichen chemischen Reaktion beteiligt ist. Eine Reihe von experimentellen Untersuchungen zeigen die Wichtigkeit saurer Aminosäurereste an der Translokation der Kationen in mindestens einer der membrandurchspannenden Domänen der Na^+-transportierenden Untereinheit. Saure Aminosäurereste dienen dort als Bindestellen für die Natriumionen. Eine essentielle Funktion für die Natriumpumpe übt z. B. das Aspartat D203 aus, das in einer von 11 putativen transmembranen Domänen der am stärksten hydrophoben β-Untereinheit der Oxalacetat-Decarboxylase aus *K. pneumoniae* liegt (Di Berardino und Dimroth, 1996). Eine weitere Gemeinsamkeit ist, daß mit dem Transport der Ionen durch die Membran und der Katalyse der Reaktion eine Konformationsänderung im Protein einhergeht, die eine Kopplung der Reaktion mit der vektoriellen Ionentranslokation ermöglicht. Dies wurde am Beispiel der Oxalacetat-Decarboxylase in einem Modell, das den mechanistischen Ablauf der Reaktion darstellt, gezeigt (Di Berardino und Dimroth, 1996).

IV. Material und Methoden

1 Verwendete Materialien

Chemikalien und Biochemikalien

Hydroxocob(III)alamin und Methylcob(III)alamin wurden von Sigma (Deisenhofen), Dodecyl-β-D-maltosid von Fluka (Deisenhofen) bezogen. Tetrahydromethanopterin wurde aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* Stamm Marburg isoliert (Breitung *et al.,* 1992) und freundlicherweise von Frau J. Moll zur Verfügung gestellt. Tris und DTT waren von Biomol (Hamburg). Titan(III)citrat wurde aus Titan(III)chlorid nach der Vorschrift von Goubeaud *et al.* (1997) hergestellt. Restriktionsendonukleasen, DNA-modifizierende Enzyme, X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid), IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid), die Nylon-Membran Hybond-N und die verwendeten Antibiotika wurden von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) bezogen. Die *Pfu*-DNA-Polymerase, und der λ-ZAP II-Express-Vektor-Kit stammten von Stratagene (Heidelberg). Der TA-Cloning-Kit war von Invitrogen. Die *Taq*-DNA-Polymerase, der DIG-Luminescent-Detection-Kit und der DIG-Oligonucleotide-Tailing Kit waren von Roche Diagnostics (Mannheim). Das Protein-Assay-Farbkonzentrat wurde von Bio-Rad (München) bezogen. Casaminosäuren, Hefeextrakt, Caseinhydrolysat und Agar stammten von der Firma Gibco (Eggenstein). Die genomische DNA von *M. thermoautotrophicum* Stamm Marburg wurde freundlicherweise von A. Hochheimer (Hochheimer *et al.*, 1998), die λ-ZAP-Express Genbank und die genomische DNA von *M. barkeri* Stamm Fusaro von J. Vorholt (Vorholt *et al.,* 1996) zur Verfügung gestellt. Alle verwendeten Standardchemikalien, sofern sie nicht extra aufgeführt sind, und die Dünnschichtchromatographie-Alufolien (20x20 cm; Kieselgel 60) wurden von Merck (Darmstadt) bezogen.

Gase

Die Gase N_2 (99,996 %), H_2 (99,999 %), H_2/CO_2 (80:20, 99,999 %:99,998 %) und N_2/CO_2 (80:20, 99,990 %:99,995 %) wurden von Messer Griesheim (Düsseldorf) bezogen.

Säulen, Säulenmaterialien und Protein-Konzentratoren

Alle verwendeten FPLC-Säulen stammten von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg). Die HPLC-Säule LiChrosopher 100 RP-18 (4 mm x 125 mm, 5µm) war von Merck (Darmstadt). Die Amicon-Ultrafiltrationskammer, YM 30 Ultrafiltrationsmembranen und Centricon-30 Mikrokonzentratoren sind Produkte der Firma Amicon (Witten).

Radioisotope

[^{14}C]-Formaldehyd (0,37 MBq/µmol; 1,85 MBq) wurden von ICN Biomedicals GmbH (Belgien) bezogen. N^5-[^{14}C]-Methyltetrahydromethanopterin wurde aus [^{14}C]-Formaldehyd (74 Bq/nmol) und Tetrahydromethanopterin durch enzymatische Reduktion synthetisiert (Fischer *et al.*, 1992).

Mikroorganismen

Methanobacterium thermoautotrophicum Stamm Marburg (DSM 2133) wurde von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen (DSM, Braunschweig) bezogen.

Anaerobe Lösungen

Die für Enzymassays und Enzymreinigungen verwendeten Puffer wurden durch Membranfilter (0,2 µm; Gelmansciences, Michigan, USA) filtriert, unter N_2-Begasung aufgekocht und abgefüllt und durch mehrmaliges Be- und Entgasen mit N_2 sowie Rühren über Nacht in einem Anaerobenzelt (Coy, Ann Arbor, Michigan, USA) mit einer N_2/H_2-Atmosphäre (95%/5%) anaerobisiert. Die Zusammensetzung von Puffern wird bei der jeweiligen Methode erwähnt.

Oligonukleotid-Primer

Synthetische Oligonukleotide waren von MWG Biotech (München) oder von Metabion (Martinsried) und sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tab. 2. Verwendete Oligonukleotid-Primer. Zur Klonierung benutzte Schnittstellen sind unterstrichen.

Primer		**Sequenz (5‘ → 3’)**	**Anlagerungs-temperatur**
mtrE-5‘		ATGGACCCTATGATAACAGGTTTAGG	61,6 °C
mtrE-3‘	(*Hind*III)	TAATAATGGAAGCTTTTATTCTTCCTCCTT	59,9 °C
pCal-*mtrH*-5‘		GACGACGACAAGATGTTTAGGTTTGATAAG	64,0 °C
pCal-*mtrH*-3‘		GGAACAAGACCCGTCTAGAGCAGCTTG	68,0 °C
pET-*mtrE*-5‘	(*Nde*I)	GGAAGACATATGGACCCTATGATAACAGG	65,3 °C
pET-*mtrE*-3‘	(*Xho*I)	TAATGGATCCTCGAGTTCTTCCTCC	63,0 °C
pCal-*mtrE*-5‘		GACGACGACAAGATGGACCCTATGATAAC	66,7 °C
pCal-*mtrE*-3‘		GGAACAAGACCCGTTTATTCTTCCTCCTTG	66,8 °C
mtrH-pET-5‘	(*Nde*I)	GGCATATGTTTAGGTTTGATAAGG	57,6 °C
mtrH-pET-Ende	(*Xho*I)	GGCTCGAGCTAGAGCAGCTTGAAGAA	66,4 °C
mtrH-Trx	(*Nco*I)	GCCATGGGAATGTTTAGGTTTGATAAGG	63,7 °C
Start	(*Nde*I)	CCATATGTTCAAGTTTGACAAG	54,7 °C
Schluss	(*Xho*I)	CCTCTCGAGTTATGTCAGCTTGG	62,4 °C
Sonde aus *mtr*D		CY5-AACATAGGAGGTACAATTGAAGGGT-TCCACGACCCGAAATTCAAGA	73,0 °C
mtrA (antisense)		CY5-GGTAATTACCAGTACACAGTTCTTG	59,7 °C
mtrA (sense)		CY5-CAAGAACTGTGTACTGGTAATTACC	59,7 °C
mtrD-anti-CY5		CY5-GCCAGCTGCACTGTACCGGTAC	65,8 °C
mtrE-anti-CY5		CY5-CCCGAGTACAACGGTCATC	58,8 °C
Anfang-CY5		CY5-TTGAATCCACCTTATTAC	46,9 °C
Ende-anti-CY5		CY5-GCAAAGGAAAATTTCCTC	49,1 °C
mtrA-CY5		CY5-CCCTGCTTGGGTTATTAC	53,7 °C
H-anti		CY5-GGACATCAATTTCCTCCTGC	57,3 °C
F/G sense		CY5-GCCCGCATGATGGACATAGG	61,4 °C
Sense-D/E		CY5-GGCTTCAGCATGATTGACGC	59,4 °C
Anti-E		CY5-GGGGAAACATCATTTGGGG	56,7 °C
Sense-E		CY5-CGCATTAATGTGTTCGATAGG	55,9 °C
Anti-C		CY5-GCACAGATCGCTCCAAGACC	61,4 °C
Fertig		CY5-CCCACACCATAGACGTAGAC	59,4 °C
T7 Prom. (Standard für pBK-Vektoren)		CY5-GTAATACGACTCACTATAGGGC	56,0 °C
Rev Pr. (Standard für pBK-Vektoren)		CY5-ACAGGAAACAGCTATGACCTTG	62,0 °C
T7 Pro. (Standard für pET-Vektoren)		CY5-TTAATACGACTCACTATAGGG	53,0 °C
T7 Term. (Standard für pET-Vektoren)		CY5-GCTAGTTATTGCTCAGCG	56,0 °C

2 Verwendete Organismen und mikrobiologische Methoden

2.1 Züchtung und Zellernte von *M. thermoautotrophicum*, *A. nidulans* und *E. coli*

Methanobacterium thermoautotrophicum

M. thermoautotrophicum Stamm Marburg wurde unter anaeroben Bedingungen bei 65 °C auf einem Mineralsalzmedium mit H_2/CO_2 als Energie- und Kohlenstoffquelle gezüchtet. H_2S diente als Schwefelquelle und zum Anaerobisieren des Mediums (Schönheit *et al.*, 1980). Als Kulturgefäß fand ein 15 l Glasfermenter mit 10 l Medium Verwendung. Das Medium wurde mit 1000 Upm gerührt, mit 1200 ml/min $H_2/CO_2/H_2S$ (80 %/20 %/0,2 %) begast und auf 65 °C temperiert. Sobald das Medium anaerob war, was durch Farbänderung des zugefügten Redoxindikators Resazurin (4 ml 0,2 %ige Lösung) von violett nach farblos erkannt werden konnte, wurde mit 0,5 l einer Vorkultur angeimpft. Nach dem Überschreiten einer optischen Dichte (Extinktionsmessung von mit Puffer verdünnten Proben bei 578 nm) von 4 wurde die Kultur unter weiterer Begasung auf etwa 5 °C abgekühlt. Die Zellen wurden anaerob mit einer Durchflußzentrifuge (Heraeus Contifuge 17RS, Heraeus Sepatech GmbH, Osterode) bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 180 ml/min bei 15000 Upm abzentrifugiert. Für Enzymreinigungen schloß sich ein Aufschluß der erhaltenen Zellen direkt an die Zellernte an. Überschüssige Zellen wurden unter einer N_2-Atmosphäre bei –20 oder –80 °C gelagert.

Aspergillus nidulans

Das Medium zur Zucht von *A. nidulans* (Stamm SRF 200; Genotyp: *pyrG89*; *ΔargB*::*trpCΔB*; *pyroA4*; *veA1*; Suelmann *et al.*, 1998) wurde nach Käfer (1977) hergestellt und mit Uracil (9 mM) vor dem Autoklavieren und Arginin (5 mM), Uridin (5 mM) und Pyridoxalphosphat (3,8 µM) nach dem Autoklavieren supplementiert.

Escherichia coli

Alle in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Stämme und Plasmide sind in Tabelle 3 aufgeführt. *E. coli* wurde entweder auf Vollmedium (Luria Bertani) oder Minimalmedium (M9-Mineralsalzmedium) aerob oder anaerob bei 37 °C gezüchtet. Die Medien wurden, analog zu Sambrook *et al*. (1989), hergestellt und je nach Versuchsansatz mit Antibiotika supplementiert. Die Endkonzentrationen betrugen: 100 µg/ml für Ampicillin, 50 µg/ml für Kanamycin und 34 µg/ml für Chloramphenicol.

Tabelle 3. Verwendete *Escherichia coli* Stämme und Plasmide.

***Escherichia coli*-Stamm**	**Beschreibung**	**Referenz**
XL1-Blue MRF‘	*Δ(mcrA) 183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr) 173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA 96 relA1 lac* [F‘ *proAB lacI*^{q}*ZΔM15* Tn*10* (Tet^r)]	Stratagene (Heidelberg)
BL21(DE3)	F$^-$ *ompT hsdS*($r_B^-m_B^-$) *gal dcm (DE3)*	Novagen (Heidelberg); Studier *et al.*, 1990
XLOLR	*Δ(mcrA) 183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr) 173 endA1 thi-1 recA1 gyrA 96 relA1 lac* [F‘ *proAB lacI*^{q}*ZΔM15* Tn*10* (Tet^r)] Su$^-$ λ^r	Stratagene (Heidelberg)
DH5α	supE44 *Δlac U169 (*Φ80 lac*ZΔM15), hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*	Hanahan, 1983; Sambrook *et al.*, 1989
One Shot TOP10	F‘{*lac*I^q, Tn*10*(Tet^r)} *mcr*A *Δ*(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) Φ80 *lacZΔ*M15 *Δlac*X74 *deo*R *rec*A1 *ara*D139 *Δ*(*ara-leu*)7697 *gal*U *gal*K *rps*L(Str^r) *end*A1 *nup*G	Invitrogen (Groningen, Niederlande)
Plasmid		
pBK-CMV	Phagemid- Klonierungs- und Expressionsvektor (4,5 kbp) mit hoher Kopienzahl, Kan^r	Stratagene (Heidelberg)
pBluescript KS+	Phagemid- Klonierungs- und Expressionsvektor (2,96 kbp) mit hoher Kopienzahl, Amp^r	Stratagene (Heidelberg)
pMB6	pBK-CMV, aus der λ-ZAP-Express-Genbank von *Methanosarcina barkeri* mit 8 kbp-*Sau*3A-Fragment (*mtrD* (teilweise)-*mtrH* + Genregion stromabwärts)	diese Arbeit
pMB7	pBK-CMV, aus der λ-ZAP-Express-Genbank von *Methanosarcina barkeri* mit 4,5 kbp-*Sau*3A-Fragment (*mtrA* (teilweise)-*mtrE* + Genregion stromaufwärts)	diese Arbeit
pCal-n-EK	Klonierungs- und Expressionsvektor (5,6 kbp) mit hoher Kopienzahl, Amp^r	Stratagene (Heidelberg)
pCal-*mtrH*	pCal-n-EK-Vektor, in den *mtrH* aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Stamm Marburg) kloniert wurde	diese Arbeit
pCal-*mtrE*	pCal-n-EK-Vektor, in den *mtrE* aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Stamm Marburg) kloniert wurde	diese Arbeit
pET17b	Klonierungs- und Expressionsvektor mit hoher Kopienzahl, Amp^r	Seed (1987)
pET17b-mtrH	pET17b-Vektor, in den *mtrH* aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Stamm Marburg) kloniert wurde	diese Arbeit
pET32c	Klonierungs- und Expressionsvektor, der das Gen *trxA* trägt (5,9 kbp), Amp^r	Novagen (Heidelberg)
pET32c-*mtrH*	pET32c-Vektor, in den *mtrH* aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Stamm Marburg) kloniert wurde	diese Arbeit
pMAL-c2	Expressionsvektor zur Klonierung von Genen als Fusion mit *malE* (6,6 kbp), Amp^r	New England Biolabs (Schwalbach)

Fortsetzung Tab. 3

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pMal-*mtrE*	pMAL-c2-Vektor, in den *mtrE* aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Stamm Marburg) kloniert wurde	diese Arbeit
pET24b	Expressionsvektor zur Klonierung von Genen mit einem C-terminalen His-Tag (5,3 kbp), Kan^r	Novagen (Heidelberg)
pET24b-*mtrE*	pET24b-Vektor, in den *mtrE* aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Stamm Marburg) kloniert wurde	diese Arbeit
pH-MB	pET17b-Vektor, in den *mtrH* aus *Methanosarcina barkeri* kloniert wurde	diese Arbeit
pGroESL	Veränderter pTG10-Vektor mit den Genen *groEL* und *groES* aus *Escherichia coli*	Goloubinoff *et al*. (1989)
pCR®Blunt	Vektor zur Klonierung eines Blunt-End-PCR-Produkts (3,5 kbp), Kan^r	Invitrogen (Groningen, Niederlande)
p*mtrH*-T-Blunt	pCR®Blunt-Vektor in den *mtrH* aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Stamm Marburg) kloniert wurde	diese Arbeit
pSNI11	Abgewandelter pBluescript KS^--Vektor mit induzierbarem *alcA*-Promotor und *argB* (5,2 kbp), Amp^r	Niklas Schier, Arbeitsgruppe Fischer (nicht publiziert)
pSNI-H1	pSNI11-Vektor in den *mtrH* aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Stamm Marburg) kloniert wurde	

2.2 Herstellung von Zellextrakten

Etwa 50 g unmittelbar nach der Zellzucht geerntete ***M. thermoautotrophicum***-Zellen wurden in 80 ml anaerobem Puffer (je nach Methode) suspendiert und mittels Ultraschall (Branson Sonifier B 15) in einem Anaerobenzelt (Coy, Ann Arbor, Michigan, USA) unter einer N_2/H_2-Atmosphäre (95%/5%) aufgeschlossen. Die resuspendierten Zellen wurden dazu in einem eisgekühlten Rosettengefäß dreimal 8 min mit 200 Watt Leistung beschallt (Intervallbeschallung). Zellfreier Extrakt wurde durch anaerobes Überführen des Rohextrakts in Polycarbonat-Zentrifugenröhrchen und 30-minütiger Zentrifugation bei 8000 x *g* und 4 °C in einer L8-70 Ultrazentrifuge mit 70-Ti-Rotor (Beckman Instruments, München) erhalten. Der jeweils erhaltene Überstand wurde für Messungen und Enzymreinigungen verwendet. ***E. coli***-Zellen wurden analog mittels Ultraschall aufgeschlossen. Für ***A. nidulans***-Zellen wurde dieses Verfahren in der Weise abgeändert, daß die Zellsuspension vor der Behandlung mit

Ultraschall unter Verwendung eines Ultra-Turrax (Janke und Kunkel, IKA®Labortechnik) homogenisiert wurde.

3 Molekularbiologische Methoden

3.1 Präparation, Restriktion und Detektion von DNA

Plasmid-DNA wurde in kleinem Maßstab (4-ml-Kulturen) mit Hilfe des Jetprep-Reinigungs-Kits (Genomed, Bad Oeynhausen) oder im größeren Maßstab (100-ml-Kulturen) mit dem Plasmid-Reinigungs-Kit von Qiagen (Hilden) gereinigt. Die Bestimmung der Plasmid-DNA-Konzentration und deren Reinheit erfolgte photometrisch bei 260 und 280 nm. Ein ΔA_{260}-Wert von 1 entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml (Sambrook *et al.*, 1989).

Die Restriktion der DNA erfolgte standardmäßig in 20 µl Gesamtvolumen, das 1 µl Restriktionsenzym (1 - 20 U/µl) enthielt. Die Inkubation erfolgte in den entsprechenden Restriktionspuffern nach Angaben des Herstellers für 2 - 5 Stunden bei 37 °C.

Die Detektion und Trennung von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe von 1%-igen Agarosegelen (Sambrook *et al.*, 1989) in TAE (Tris/Acetat/EDTA-Puffer; 40 mM Tris/Acetat pH 8,0, 1 mM EDTA). Als Größenstandard diente λ-DNA, die mit *Bst*EII geschnitten worden war, oder Smart-Ladder-Marker von Eurogentec (Seraing, Belgien). Die Gele wurden in Ethidiumbromidlösung (2 µg/ml in Wasser) gefärbt und nach kurzem Wässern im UV-Durchlicht bei 302 nm photographiert.

3.2 Transformation von *Escherichia coli*

Elektrokompetente Zellen von *E. coli* wurden wie bei Ausubel *et al.* (1994) beschrieben hergestellt. Die Zellen wurden in einer 10%-igen Glycerinlösung resuspendiert und bis zur Verwendung bei –80 °C eingefroren. Die Elektrotransformation erfolgte mit dem BioRad Gene Pulser II (BioRad, München) bei 1,8 kV. Die Transformation in One-Shot-TOP10-Zellen erfolgte nach den Angaben des Herstellers (Invitrogen, Groningen, Niederlande).

3.3 Transformation von *Aspergillus nidulans*

Die Transformation von *A. nidulans* wurde durchgeführt, indem *A. nidulans*-Hyphen protoplastiert und die DNA mit Hilfe von Polyethylenglykol in die Protoplasten übertragen wurde (Yelton *et al.*, 1984). Es wurden 500 ml Medium (siehe unter 2.1) mit etwa 10^9 Konidien inokuliert. Die Inkubation erfolgte ~12 Stunden bei 30 °C auf einem Schütteltisch (300 Upm). Die so gewachsenen jungen Hyphen wurden durch Filtration geerntet, die Zellwand in einer Novozymlösung (1 mg/ml) verdaut und die freien Protoplasten durch Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Aus einem 500 ml-Kulturansatz wurden mit dieser Methode etwa $1x10^6$ Protoplasten gewonnen. Pro Transformationsansatz wurden etwa 10^5 Protoplasten und 10 µg pSNI11-H1 (Tab. 3) verwendet. Die transformierten Protoplasten wurden auf osmotisch supplementiertem Medium (siehe unter 2.1) plattiert, das kein Arginin enthielt, weil das verwendete Plasmid das Gen *argB* als Selektionsmarker (Aramayo *et al.*, 1989) trug. Der Promotor stand unter der Kontrolle von *alcA* (Alkohol-Dehydrogenase-Gen) aus *A. nidulans* (Waring *et al.*, 1989).

3.4 Southern-Blot-Hybridisierung

Die Methode der Southern-Blot-Hybridisierung wurde mit dem DIG-Luminescent-Detektion-Kit der Firma Roche Diagnostics (Mannheim) durchgeführt. Die Markierung der Sonde erfolgte mit dem DIG-Oligonucleotide-Tailing-Kit nach Angaben des Herstellers.

Mit Restriktionsendonukleasen behandelte DNA wurde durch Gelelektrophorese in Agarosegelen getrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und im UV-Durchlicht photographiert. Anschließend wurde die DNA mit Hilfe der Kapillarmethode (Sambrook *et al*., 1989) aus dem Agarosegel auf eine ungeladene Nylonmembran (Hybond-N, Amersham Pharmacia Biotech) übertragen und durch UV-Quervernetzung auf der Nylonmembran fixiert. Die Bedingungen für den Southern-Transfer wurden nach Angaben des Herstellers gewählt.

Die Southern-Blot-Membran wurde 1,5 Stunden bei 58 °C prähybridisiert (Ausubel *et al.*, 1994). Die mit Digoxigenin-dUTP markierte DNA-Sonde wurde in 15 ml Hybridisierungslösung aufgenommen und über Nacht bei derselben Temperatur hybridisiert. Die Detektion erfolgte mittels Sichtbarmachen der Chemolumineszenzreaktion auf Röntgenfilmen (Fujifilm New RX) nach Angaben des Herstellers (Roche Diagnostics, Mannheim).

3.5 Plaque-Hybridisierung

Es wurden Plattenlysate der entsprechenden genomischen Genbank hergestellt und über Nacht inkubiert. Die Phagen-Plaques wurden auf Nylonmembranen (Hybond-N, Amersham Pharmacia Biotech) übertragen und die Membran nach Anleitung des Herstellers behandelt. Die Phagen-DNA wurde durch UV-Quervernetzung auf der Membran fixiert. Prähybridisierung, Hybridisierung und Detektion erfolgte wie bei der Southern-Blot-Hybridisierung. Positive Plaques wurden vereinzelt und eine erneute Detektion mittels Hybridisierung durchgeführt.

3.6 Sequenzierung doppelsträngiger Plasmid-DNA

Die Sequenzierung nach Sanger *et al.* (1977) erfolgte nach dem Protokoll für den „Thermo-Sequenase-Fluorescent-Labelled-Primer-Sequencing-Kit“ (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) mit 5´-Cy5(ALF-red)-markierten Oligonukleotiden. In der Sequenzreaktion wurde jeweils T7-DNA-Polymerase (Sequenase™ 2.0) und 1-2 µg DNA eingesetzt. Die denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Sequenzreaktionen erfolgte mit Hilfe eines ALF-Express-Sequencers von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) nach Angaben des Herstellers. Zur Sequenzierung des *mtr*-Operons aus *M. barkeri* wurden Primer aus Tabelle 2 verwendet, die am 5‘-Ende mit einer CY5-Modifikation versehen sind.

3.7 Klonierung der *mtr*-Gene aus *M. barkeri*

Eine heterologe Sonde für *mtrD* wurde aus dem *mtrD*-Gen von *Methanosarcina mazei* abgeleitet (Lienard und Gottschalk, 1997). Die Oligonukleotidsequenz ist in Tabelle 2 unter „Sonde aus *mtrD*“ aufgeführt. Die Sonde wurde am 3‘-Ende mit Digoxygenin-dUTP markiert und die Spezifität im Southern-Blot überprüft. Die 46-bp Gensonde wurde verwendet, um die λ-ZAP-Genbank (*Sau*3A) von *M. barkeri* (Vorholt *et al.*, 1996) zu durchsuchen. Positive Klone wurden durch Phagen-Hybridisierung identifiziert. Nach Excision und Rezirkularisierung des pBK-CMV-Vektors wurden zwei positive Klone mit zwei unterschiedlichen Phagemiden erhalten (pMB6, pMB7; Tab. 3), die zur Sequenzierung des *mtr*-Operons aus *M. barkeri* verwendet wurden.

3.8 Klonierung und Expression des *mtrH*- bzw. *mtrE*-Gens aus *M. thermoautotrophicum* in *E. coli*

Die Plasmide in Tabelle 4 wurden produziert, indem zunächst *mtrH* unter Verwendung der angegebenen Primer (vgl. auch Tab. 2) mit genomischer DNA aus *M. thermoautotrophicum* Stamm Marburg als Template amplifiziert wurde. Die DNA wurde freundlicherweise von A. Hochheimer zur Verfügung gestellt. Das jeweilige erhaltene PCR-Produkt wurde unter Nutzung der angegebenen Schnittstelle für Restriktionsenzyme (Tab. 2) in den entsprechenden Vektor kloniert. Die Transformation der Plasmide erfolgte in elektrokompetente oder chemisch kompetente *E. coli*-Zellen nach Vorschrift (Material und Methoden 3.2). Die Expressionbedingungen wurden variabel gehandhabt (Ergebnisse 1.3.1).

Tab. 4: Konstruierte Plasmide und die zur Konstruktion verwendeten Primer.

Plasmid	Verwendete Primer
pCal-*mtrH*	pCal-*mtrH*-5‘; pCal-*mtrH*-3‘
pET32c-*mtrH*	*mtrH*-Trx; *mtrH*-pET-Ende
p*mtrH*-T-Blunt	*mtrH*-Trx; *mtrH*-pET-Ende
pET17b-*mtrH*	*mtrH*-pET-5‘;*mtrH*-pET-Ende
pMal-*mtrE*	*mtrE*-5‘; *mtrE*-3‘
pCal-*mtrE*	pCal-*mtrE*-5‘; pCal-*mtrE*-3‘
pET24b-*mtrE*	pET-*mtrE*-5‘; pET-*mtrE*-3‘

3.9 Klonierung und Expression des *mtrH*-Gens aus *M. thermoautotrophicum* in *A. nidulans*

Zur Konstruktion des Vektors pSNI11-H1 wurde das *mtrH*-Gen aus dem Plasmid p*mtrH*-T-Blunt durch einen Verdau mit dem Restriktionsenzym *Eco*RI ausgeschnitten und in eine äquivalente Schnittstelle in den Vektor pSNI11 (Tab. 3) kloniert. Die Transformation des Plasmids erfolgte wie unter Material und Methoden 3.3 angegeben.

3.10 Coexpression von *mtrH* mit *groEL* und *groES* aus *E. coli*

Das Plasmid, das die Gene *groEL* und *groES* trug, wurde von Prof. Dr. Lorimer freundlicherweise zur Verfügung gestellt (Goloubinoff *et al*., 1989; Lorimer und Todd, 1996). Zur Coexpression von *mtrH* mit *groEL* und *groES* wurden kompetente BL21 (DE3) *E. coli*-Zellen verwendet, die das Plasmid mit den Genen *groEL* und *groES* (Tab. 3) enthielten (freundlicherweise von S. Heim zur Verfügung gestellt). In diese Zellen wurde das Plasmid pET17b-*mtrH* nach Vorschrift transformiert. Der resultierende *E. coli*-Stamm, der beide Plasmide trug, wurde auf LB-Medium, das mit Ampicillin und Chloramphenicol supplementiert war, bei 37 °C gezüchtet. Bei einer optischen Dichte von 0,68 wurde mit 0,3 mM IPTG induziert. Die anschließende Wachstumszeit betrug noch etwa 3 Stunden.

3.11 Klonierung und Expression des *mtrH*-Gens aus *M. barkeri* in *E. coli*

Das Plasmid pH-MB wurde produziert, indem zunächst *mtrH* unter Verwendung der Primer Start und Schluß (vgl. Tab. 2) mit genomischer DNA aus *M. barkeri* (Material und Methoden 3.7) als Template amplifiziert wurde. Das erhaltene PCR-Produkt wurde unter Nutzung der angegebenen Schnittstelle für Restriktionsenzyme (Tab. 2) in den Vektor pET17b kloniert. Die Transformation der Plasmide erfolgte in chemisch kompetente BL21 (DE3) *E. coli*-Zellen nach Vorschrift (Material und Methoden 3.2). Die Zellen wurden auf LB-Medium, das mit Ampicillin supplementiert war, gezüchtet. Bei einer optischen Dichte von 0,68 wurde mit 0,1 mM bzw. 0,3 mM IPTG induziert. Etwa 3 Stunden später wurden die Zellen geerntet.

4 Biochemische Methoden

4.1 Reinigung von Enzymen

Alle beschriebenen Arbeitsschritte erfolgten anaerob unter einer N_2/H_2-Atmosphäre (95 %/5 %) bei 20 °C in einem Anaerobenzelt (Coy, Ann Arbor, Michigan, USA), aus dem Sauerstoff kontinuierlich durch Reduktion mit H_2 an einem Palladium-Katalysator (BASF, Ludwigshafen) entfernt wurde. Die verwendeten Säulen wurden an einer FPLC-Anlage (Pharmacia, Freiburg) betrieben. Die Detektion von Protein erfolgte durch Messung der Absorption bei 280 nm.

4.1.1 Reinigung der Untereinheit MtrH aus *M. thermoautotrophicum*

M. thermoautotrophicum-Zellextrakt wurde wie unter 2.2 beschrieben hergestellt. Zur Isolierung der Membranfraktion wurde der Zellextrakt bei 200000 x *g* und 4 °C für 90 min zentrifugiert. Das erhaltene Zentrifugationssediment wurde einmal mit Tris-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7,6, 2 mM DTT) gewaschen und im Anschluß in 20 ml Tris-Puffer, der zusätzlich 1,1 % Dodecyl-*β*-D-maltosid enthielt, homogenisiert. Die Suspension wurde über Nacht bei 0 °C leicht gerührt. Die nicht solubilisierten Membranfragmente wurden durch 60-minütige Zentrifugation bei 200000 x *g* und 4 °C sedimentiert. Die solubilisierten Proteine wurden auf eine Q-Sepharose-Säule (HiLoad 16/10) geladen, die zuvor mit Tris-Puffer, der mit 4 mM Dodecyl-*β*-D-maltosid supplementiert wurde (Puffer A), äquilibriert worden war. Die Proteine wurden mit einer Flußrate von 3 ml/min mit folgenden NaCl-Konzentrationen in Puffer A eluiert: 60 ml 0,20 M; 60 ml 0,26 M; 60 ml 0,30 M; 60 ml 0,34 M; 60 ml 0,38 M; 60 ml 0,44 M und 60 ml 2 M. Es wurden 5 ml-Fraktionen gesammelt. Der Enzymkomplex MtrA-G wurde mit 0,30 M (Fraktionen 29-33) eluiert. Der Komplex MtrA-H und die Untereinheit MtrH wurde in unterschiedlichen Fraktionen mit 0,38 M NaCl eluiert (MtrA-H: Fraktionen 53 und 54; MtrH: Fraktionen 55-58).

4.1.2 Versuch der Reinigung der Untereinheit MtrE aus *M. thermoautotrophicum*

Beim Versuch der Reinigung der MtrE-Untereinheit aus *M. thermoautotrophicum* wurden unterschiedliche Reinigungsstrategien verfolgt (Ergebnisse 4.1). Die miteinander kombinierten Schritte werden hier getrennt aufgeführt. Der häufig verwendete Puffer mit der

Zusammensetzung 50 mM Mops/KOH pH 7,0 wird in den folgenden Abschnitten als Mops-Puffer bezeichnet.

Ammoniumsulfatfällung

M. thermoautotrophicum-Zellextrakt aus etwa 70 g Zellen (siehe unter 2.2) wurde zunächst bei 180000 x *g* und 4 °C 25 min zentrifugiert. Zu dem resultierenden Zentrifugationsüberstand wurde unter Rühren bei 0 °C innerhalb von 30 min eine gesättigte $(NH_4)_2SO_4$-Lösung zugetropft, bis eine 70 %ige (bzw. als Variationen eine 60 %ige oder 30 %ige) Sättigung erreicht war. Die ausgefällten Proteine wurden durch Ultrazentrifugation bei 180000 x *g* (25 min, 4 °C) abgetrennt. Das erhaltene Zentrifugationssediment wurde in 50 ml Mops-Puffer resuspendiert. Diese Suspension wurde in weiteren Reinigungsschritten verwendet.

Phenylsepharose (HiLoad 26/10)

Diese Säule wurde stets nach einer $(NH_4)_2SO_4$-Fällung verwendet. Vor dem Auftrag auf die Säule wurde $(NH_4)_2SO_4$ zur Proteinsuspension gegeben (1 M) und kurz gerührt. Die Säule wurde mit 1,4 M $(NH_4)_2SO_4$ in Mops-Puffer (Puffer A) äquilibriert. Die Proteine wurden nach Waschen der Säule mit 60 ml Puffer A mittels eines linearen Gradienten mit 1,4-0 M $(NH_4)_2SO_4$ in Mops-Puffer in 300 ml (Fraktionsgröße: 5 ml, Flußrate: 3 ml/min) eluiert. Für weitere Reinigungsschritte wurden die Proteinproben mittels Ultrafiltration ankonzentriert und mit dem entsprechenden Puffer für den nachfolgenden chromatographischen Schritt verdünnt. Eine Variation erfolgte unter Verwendung eines Stufengradienten mit Stufen à 40 ml mit den folgenden $(NH_4)_2SO_4$-Konzentrationen in Mops-Puffer: 1,3 M; 1,2 M, 1,1 M; 1,0 M, 0,9 M, 0,8 M; 0,7 M; 0,6 M; 0,5 M; 0,4 M; 0,3 M.

Mono Q (HR 10/10)

Die stark verdünnte Proteinprobe wurde auf die mit Mops-Puffer äquilibrierte Säule aufgetragen, mit diesem Puffer gewaschen und mit einem linearen Gradienten von 0 bis 1 M NaCl in Mops-Puffer in 400 ml eluiert (Fraktionsgröße: 5 ml, Flußrate: 3 ml/min).

Q-Sepharose (HiLoad 16/10)

Diese Säule wurde im Anschluß an eine Phenylsepharose-Säule verwendet. Die Säule wurde mit Mops-Puffer äqilibriert und nach Auftrag der Proteinprobe mit 60 ml Mops-Puffer

gewaschen. Die Proteine wurden mit einem linearen Gradienten von 0-2 M NaCl in Mops-Puffer eluiert (Fraktionsgröße: 5 ml, Flußrate: 4 ml/min).

Hydroxylapatit (1,6 cm x 12 cm)

Die verdünnte Probe wurde nach Chromatographie an Q-Sepharose auf die mit 10 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7) äquilibrierte Säule aufgetragen. Eluiert wurden die Proteine mit 10-500 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7) in 340 ml (Fraktionsgröße: 3 ml, Flußrate: 3 ml/min).

DEAE-Sepharose Fast-Flow (2,6 cm x 14 cm)

Auf diese Säule wurde der Ultrazentrifugationsüberstand ohne vorangegangene $(NH_4)_2SO_4$-Fällung aufgetragen. Die Säule wurde dafür mit Mops-Puffer äquilibriert. Nach dem Auftrag wurde mit 100 ml Mops-Puffer gewaschen und mittels eines linearen Gradienten mit 0-1 M NaCl in Mops-Puffer in 300 ml (Fraktionsgröße: 5 ml, Flußrate: 3 ml/min) eluiert. Eine Variation erfolgte unter Verwendung eines Stufengradienten mit Stufen à 60 ml mit den folgenden NaCl-Konzentrationen in Mops-Puffer: 0,1 M; 0,2 M, 0,3 M; 0,4 M, 0,6 M, 0,8 M und 2 M.

Superose 6 (3 cm x 48 cm)

Nach Chromatographie an Mono Q wurde die Proteinprobe auf 350 µl durch Ultrafiltration ankonzentriert. Davon wurden 300 µl auf die Gelfiltrationssäule, die mit Mops-Puffer mit 100 mM $(NH_4)_2SO_4$ äquilibriert worden war, aufgetragen. Die Elution der Proteine erfolgte mit 60 ml des gleichen Puffers (Fraktionsgröße: 2 ml, Flußrate: 0,2 ml/min).

4.1.3 Reinigung von Fusionsproteinen durch Affinitätschromatographie

Die Reinigung der MtrE–Maltosebindeprotein-Fusion erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers (New England Biolabs, Schwalbach/Taunus), die Reinigung der MtrH-Calmodulinbindeprotein-Fusion nach dem Protokoll von Stratagene (Heidelberg).

4.2 Bestimmung spezifischer Enzymaktivitäten

Die Bestimmungsmethoden unter Verwendung von radioaktiven Substanzen fanden unter einer N_2/H_2-Atmosphäre (95 %/5 %) bei 20 °C in einem Anaerobenzelt (siehe oben) in 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen statt. Alle Reaktionen mit Cob(I)alamin bzw. Methyl-cob(III)alamin und deren anschließende dünnschichtchromatographische Trennung wurden im Dunkeln bzw. unter Rotlicht durchgeführt.

4.2.1 N^5-Methyltetrahydromethanopterin:Coenzym-M-Methyltransferaseaktivität (MT-Aktivität)

Ein 30 µl-Reaktionsansatz enthielt 50 mM Tris/HCl pH 7,6, 2 mM DTT, 10 mM $MgCl_2$, 2,5 mM ATP, 0,5 mM Titan(III)citrat, 0,3 mM $^{14}CH_3$-H_4MPT (70 Bq/nmol) und 0,5 mM H-S-CoM. Die Komponenten wurden bei Raumtemperatur zusammengegeben und anschließend auf 60 °C erwärmt. Nach einer kurzen Inkubationszeit (etwa 20 s) wurde die Reaktion durch Zugabe von Protein (0,5 µg-10 µg) gestartet. In einem Zeitintervall zwischen 30 s und 60 s wurden je 2 µl des Reaktionsansatzes entnommen und auf Dünnschichtplatten (DC-Alufolie; Kieselgel 60; Merck, Darmstadt) aufgetragen. Als Laufmittel zur Auftrennung der radioaktiv markierten Substanzen $^{14}CH_3$-H_4MPT und $^{14}CH_3$-S-CoM wurde n-Butanol:Essigsäure:Wasser (2:1:2 v/v) verwendet (Gärtner *et al.*, 1994). Die Laufzeit betrug 60-90 min. Nach der chromatographischen Trennung wurden die DC-Folien getrocknet und anschließend außerhalb des Anaerobenzeltes ein Storage Phosphor Screen (Molecular Dynamics, Sunnyvale CA, USA) über Nacht aufgelegt. Die Detektion erfolgte mit Hilfe eines PhosphorImagers™ (Storm 860, Molecular Dynamics, Sunnyvale CA, USA). Der verwendete Screen besteht aus feinen Kristallen von BaFBr:Eu^{2+} in einer organischen Matrix. Durch Strahlung der radioaktiven Substanzen wird Eu^{2+} zu Eu^{3+} oxidiert, während BaFBr zu $BaFBr^-$ reduziert wird. Diese Effekte der ionisierenden Strahlen werden auf dem Screen gespeichert. Zur Detektion wird der Screen mit Licht der Wellenlänge 635 nm belichtet. Dieses wird absorbiert, wobei die zuvor geschilderten chemischen Prozesse umgekehrt werden. Dabei wird Strahlung mit einer Wellenlänge von 390 nm emittiert, deren Intensität proportional zu der zu detektierenden radioaktiven Strahlung ist. Die Auswertung erfolgte mit dem dazu gehörenden Computerprogramm ImageQuant™ Der R_f-Wert wurde für $^{14}CH_3$-H_4MPT mit 0,2, der für $^{14}CH_3$-S-CoM mit 0,7 bestimmt (vgl. auch 1.2.1).

4.2.2 N^5-Methyltetrahydromethanopterin:Cob(I)alamin-Methyltransferaseaktivität (MT1-Aktivität)

Ein 30 µl-Reaktionsansatz enthielt 50 mM Tris/HCl pH 7,6, 2 mM DTT, 10 mM $MgCl_2$, 2,5 mM ATP, 0,5 mM Titan(III)citrat, 0,3 mM $^{14}CH_3$-H_4MPT (70 Bq/nmol) und 0,5 mM Cob(I)alamin. Die Komponenten wurden bei Raumtemperatur zusammengegeben und anschließend auf 60 °C erwärmt. Nach einer kurzen Inkubationszeit (etwa 20 s) wurde die Reaktion durch Zugabe von Protein (0,5 µg-10 µg) gestartet. In einem Zeitintervall zwischen 30 s und 60 s wurden je 2 µl des Reaktionsansatzes entnommen und auf eine Dünnschichtplatte (DC-Alufolie; Kieselgel 60; Merck, Darmstadt) aufgetragen. Die Trennung der radioaktiv markierten Substanzen erfolgte wie unter 4.2.1 beschrieben. Der R_f-Wert wurde für $^{14}CH_3$-H_4MPT mit 0,2, der für $^{14}CH_3$-Cob(I)alamin mit 0,6 bestimmt (vgl. auch 1.2.1).

4.2.3 Methylcob(III)alamin:Coenzym-M-Methyltransferaseaktivität (MT2-Aktivität)

Die photometrischen Tests wurden in mit Butylgummistopfen verschließbaren Quarzküvetten (Schichtdicke: 1 cm; Volumen: 1,5 ml) in einem Anaerobenzelt (siehe oben) angesetzt. Coenzym M wurde als anoxische Lösung mit Hilfe zuvor anaerobisierten Unimetrix-Mikroliter-Spritzen (Macherey-Nagel, Düren) zugegeben. Ein 0,8 ml-Reaktionsansatz enthielt 50 mM Tris/HCl pH 7,6, 0,25 mM Methylcob(III)alamin und 2 mM Coenzym M. Nach Inkubation bei 60 °C wurde Enzym (1-100 µg) zugegeben und die Demethylierung von Methylcob(III)alamin photometrisch mit Hilfe eines Dioden Array Photometers (Hewlett Packard, Düren) über die Abnahme der Extinktion bei 520 nm verfolgt ($\Delta\varepsilon = 6{,}2\ mM^{-1}\ cm^{-1}$) (vgl. auch 1.2.2).

5 Analytische Methoden

5.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung von Protein wurde mit dem BioRad-Mikroassay durchgeführt (Bio-Rad Laboratories, 1990). Das Testprinzip beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie®-Brillantblau R250 in saurer Lösung von 465 nm nach 595 nm durch die Bindung des Farbstoffs an Protein (Bradford, 1976). Der Testansatz enthielt 0,8 ml Probe bzw. Rinderserumalbumin als Standard (0 - 5 µg Protein/0,8 ml) und 0,2 ml BioRad Proteinfarbstoffreagenz. Die Absorption der Lösung wurde nach 20 min bei 595 nm am Spektralphotometer bestimmt.

5.2 Protein-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen

Zur Größenbestimmung von Untereinheiten und zur Reinheitskontrolle von Enzympräparationen wurden Polyacrylamid-Gelelektrophoresen unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt (Laemmli, 1970). Dazu wurden 15 %ige SDS-Polyacrylamid-Gele verwendet. Die Elektrophorese wurde in einer BioRad Elektrophorese-Apparatur (Mini Protean® II; Bio-Rad, München) durchgeführt. Die Zusammensetzung der Gele (90 mm x 65 mm x 0,75 mm) ist in Tabelle 5 beschrieben.

Vor der Elektrophorese wurden die Proteinproben mit SDS-Probenpuffer (50 mM Tris/HCl, pH 6,8, 2 % (w/v) SDS, 10 % (w/v) Glycerin, 100 mM DTT, 0,025 % (w/v) Bromphenolblau) 1:2 verdünnt und 3 min bei 100 °C denaturiert oder für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Von dieser Probelösung wurden 15-25 µl (5 bis 15 µg Protein) pro Geltasche aufgetragen und eine Spannung von 150-220 V angelegt, bis der Bromphenolblaumarker das untere Ende des Gels erreicht hatte. Der Tris/Glycin-Elektrodenpuffer pH 8,8 bestand aus 25 mM Tris, 250 mM Glycin und 0,1% (w/v) SDS. Als Molekularmassenstandard diente der Low Molecular Weight Calibration Kit von Pharmacia (Freiburg) bestehend aus Phosphorylase b (94 kDa), Rinderserumalbumin (67 kDa), Eialbumin (43 kDa), Carboanhydrase (30 kDa), Trypsin Inhibitor (Sojabohne; 20,1 kDa) und Lactalbumin (14,4 kDa).

Zum Sichtbarmachen der Proteinbanden wurden die Gele 15 min in einer Lösung, die aus 0,25 % (w/v) Coomassie®-Brillantblau R 250 in Wasser/Ethanol/Eisessig (40:50:10)

bestand, bei 80 °C inkubiert. Das Entfernen von nicht proteingebundenem Farbstoff erfolgte anschließend bei 80 °C mit einer Mischung aus Wasser/Ethanol/Essigsäure (80:10:10).

Tab. 5: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamid-Gele.

Lösung	Trenngel (15 %ig)	Sammelgel (4 %ig)
1 M Tris/HCl	3,6 ml (pH 8,8)	0,4 ml (pH 6,8)
destilliertes Wasser	1,6 ml	3,3 ml
40% Acrylamid / 1,1% Bisacrylamid	3,2 ml	0,42 ml
TEMED	5 µl	5 µl
APS, 10 %ig (w/v)	50 µl	30 µl

5.3 Bestimmung von *N*-terminalen Aminosäuresequenzen

Proteinproben wurden aus ungefärbten SDS-Polyacrylamidgelen durch Elektroblotting in einer Semi Dry Transfer Zelle (Modell Trans-Blot SD, BioRad Laboratories, München) auf Polyvinylidendifluorid-Membranen (ProBlott PVDF-Membran, Applied Biosystems, Weiterstadt) übertragen. Der Tris/Glycin-Transferpuffer bestand aus 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,02 % SDS und 20 % Methanol. Der Elektrotransfer wurde bei einem konstanten Strom von 0,8 mA/cm^2 über eine Dauer von 2 Stunden nach Vorschrift des Herstellers der PVDF-Membranen durchgeführt. Auf die Membran transferierte Proteine wurden 1 min mit 0,1 % Coomassie®-Brillantblau R 250, gelöst in Wasser/Methanol/Essigsäure (59:40:1), gefärbt. Das Entfernen von nicht proteingebundenem Farbstoff erfolgte durch Waschen mit Wasser/Methanol (1:1). Anschließend wurden die Membranen zur Entfernung des Glycins aus dem Transferpuffer gewässert (48 Stunden; 5 L destilliertes Wasser, dreimal gewechselt). Die Proteinbanden wurden ausgeschnitten und von Herrn Dr. D. Linder am Biochemischen Institut des Fachbereichs Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen mit Hilfe eines automatischen Gasphasensequenators nach der Edman-Methode (Hewick *et al.*, 1981) *N*-terminal ansequenziert.

V. Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten die Untereinheiten MtrH und MtrE des energiekonservierenden N^5-Methyltetrahydromethanopterin:Coenzym-M-Methyltransferase-komplexes (MtrA-H) aus *Methanobacterium thermoautotrophicum* näher auf ihre katalytische Funktion hin untersucht werden. Im ersten Teil dieses Kapitels sind die Ergebnisse proteinchemischer Untersuchungen beschrieben, die mit dem Enzymkomplex aus *M. thermoautotrophicum* durchgeführt wurden. Gegenstand des zweiten Teils sind Ergebnisse zur Klonierung und Sequenzierung des *mtr*-Operons und der Expression des *mtrH*-Gens aus *M. barkeri*. Im dritten Abschnitt wurde eine Reihe von Aminosäuresequenzvergleichen von Mtr-Untereinheiten aus mehreren Archaea mit anderen Enzymen verschiedener Organismen erarbeitet. Der vierte Teil beschreibt Ergebnisse aus Versuchen zur Reinigung und Überproduktion der MtrE-Untereinheit aus *M. thermoautotrophicum*.

1 MtrH aus *Methanobacterium thermoautotrophicum*

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, besteht die energiekonservierende N^5-Methyltetrahydromethanopterin:Coenzym-M-Methyltransferase aus *M. thermoautotrophicum* aus acht verschiedenen Untereinheiten. In der Einleitung wurde ein Enzymmodell vorgestellt, das für die Untereinheit MtrH die katalytische Funktion der N^5-Methyltetrahydromethanopterin:Cob(I)alamin-Methyltransferase postuliert. Die Untersuchungen zu dieser Annahme werden im folgenden beschrieben.

1.1 Abtrennung der 34 kDa-Untereinheit MtrH vom Enzymkomplex

Die N^5-Methyltetrahydromethanopterin:Coenzym-M-Methyltransferase wurde als Komplex, bestehend aus acht Untereinheiten, aus der Membranfraktion isoliert. Bei diesem Verfahren wurden Zellen von *M. thermoautotrophicum* aufgeschlossen und einer Ultrazentrifugation unterzogen. Aus dem Membransediment konnte die Methyltransferase mit Dodecyl-ß-D-maltosid solubilisiert und anschließend säulenchromatographisch gereinigt werden (Gärtner *et al.*, 1993).

Mehrere Proteinfraktionen enthielten nach Anionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose (siehe Material und Methoden) nicht den gesamten Methyltransferasekomplex, sondern nur die Untereinheiten MtrA-G. Die fehlende 34 kDa-Untereinheit MtrH konnte vom Komplex separiert und in später eluierten Fraktionen gesammelt werden. Die gewonnenen Fraktionen wurden durch SDS/PAGE analysiert (Abb. 6).

Zur Überprüfung, ob es sich bei der 34 kDa-Untereinheit tatsächlich um MtrH handelte, wurde das Protein aminoterminal ansequenziert. Das Ergebnis lieferte eine 100 %ige Übereinstimmung mit der bekannten Sequenz von MtrH aus *M. thermoautotrophicum* (Harms *et al.*, 1995). Diese Beobachtung zeigte, daß MtrH offensichtlich nicht fest mit den anderen Untereinheiten des Enzymkomplexes verbunden ist, sondern von diesem getrennt und gereinigt werden kann.

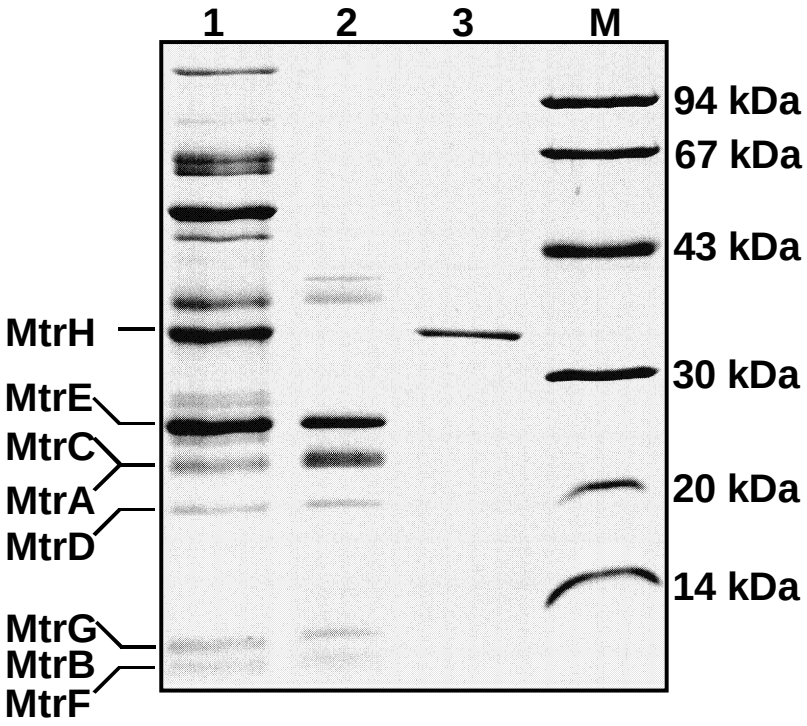


Abb. 6: SDS/PAGE-Analyse des MtrA-H-Komplexes, des MtrA-G-Komplexes und des separierten MtrH-Proteins nach Chromatographie an Q-Sepharose. Zur Analyse wurde ein 15 %iges Polyacrylamidgel verwendet, das nach der Elektrophorese mit Coomassie®-Brillantblau R250 gefärbt wurde (Material und Methoden 5.1). Spur 1, MtrA-H-Komplex (7 µg Protein), mit 0,38 M NaCl eluiert; Spur 2, MtrA-G-Komplex (4 µg Protein), mit 0,30 M NaCl eluiert; Spur 3, MtrH (1 µg Protein), mit 0,38 M NaCl eluiert; Spur M, Molekularmassenstandards.

1.2 Messung von Enzymaktivitäten

Um feststellen zu können, welche Funktion MtrH im Komplex übernimmt, wurden folgende Methyltransferaseaktivitäten gemessen (siehe auch Einleitung).

CH_3-H_4MPT	+	H-S-CoM	→	H_4MPT+CH_3-CoM	**(MT-Aktivität)**
CH_3-H_4MPT	+	Cob(I)	→	H_4MPT+CH_3-Cob(III)	**(MT1-Aktivität)**
CH_3-Cob(III)	+	H-S-CoM	→	Cob(I)+CH_3-CoM	**(MT2-Aktivität)**

Die genaue Durchführung der Messung der Enzymaktivitäten wurde bereits in 4.2 (Material und Methoden) beschrieben. Im folgenden soll exemplarisch jeweils ein Ergebnis der Messungen gezeigt werden.

1.2.1 MT- und MT1-Aktivitätsmessungen

Die MT- und MT1-Aktivität (Ergebnisse 1.2) wurde unter Verwendung von [^{14}C]-Methyltetrahydromethanopterin ($^{14}CH_3$-H_4MPT) und anschließender Trennung der Reaktionsedukte und der Reaktionsprodukte mittels Dünnschichtchromatographie (DC) bestimmt. Nach dem Trocknen der DC-Platten wurde ein Molecular Dynamics Storage Phosphor Screen aufgelegt und über Nacht in einer Kassette bei Raumtemperatur inkubiert. Es war möglich, die ^{14}C-markierten Substanzen unter Verwendung eines PhosphorImagers™ (Molecular Dynamics GmbH, Krefeld) sichtbar zu machen. Anhand des Dünnschichtchromatogramms kann die zeitabhängige Methyltransferreaktion über die Abnahme der [^{14}C]-Methyltetrahydromethanopterinkonzentration und parallel über die Zunahme der [^{14}C]-Methylcob(III)alamin ($^{14}CH_3$-Cob(III))-Konzentration verfolgt werden. Abbildung 7 zeigt das Ergebnis eines solchen Detektionsverfahrens. Die Bildung von [^{14}C]-Methylcoenzym M ($^{14}CH_3$-S-CoM) wurde auf gleiche Weise detektiert. Trennbar sind die beiden für diese Reaktion möglichen radioaktiv markierten Produkte anhand ihrer R_f-Werte ($^{14}CH_3$-H_4MPT: 0,2; $^{14}CH_3$-Cob(III): 0,6; $^{14}CH_3$-S-CoM: 0,7). Die quantitative Auswertung der Meßergebnisse erfolgte mit dem Programm ImageQuaNT™ (Molecular Dynamics GmbH, Krefeld).

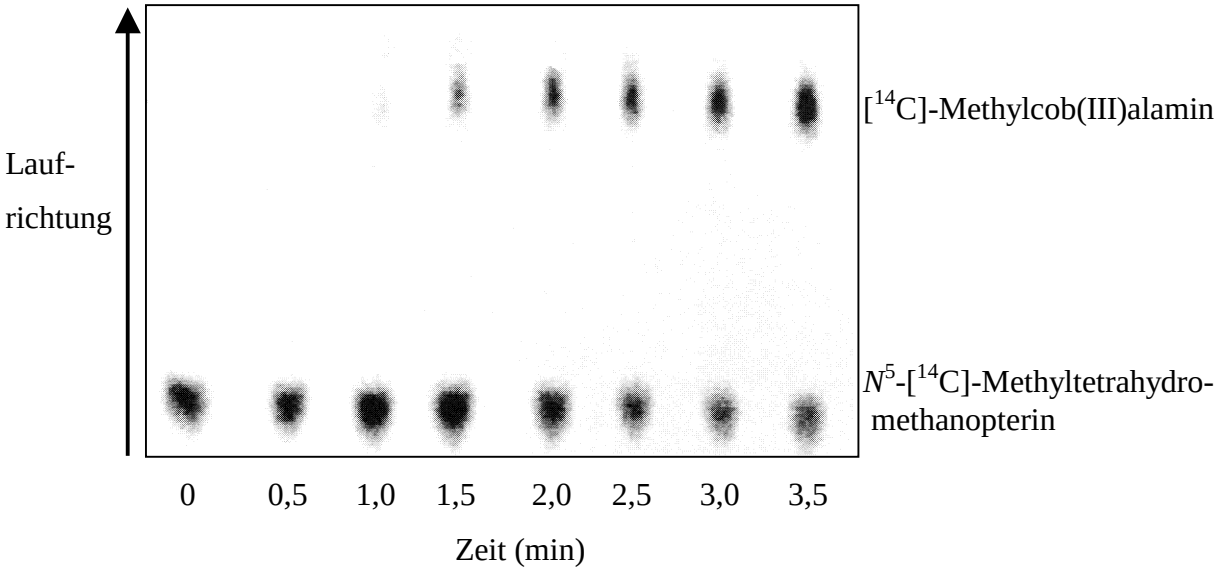


Abb. 7: Bildung von [^{14}C]-Methylcob(III)alamin aus *N*^{5}-[^{14}C]-Methyltetrahydromethanopterin ($^{14}CH_3$-H_4MPT) und Cob(I)alamin. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und die Reaktionsbedingungen wurden unter 4.2 beschrieben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von MtrH (0,9 µg) gestartet. Zu den angegebenen Zeiten wurden jeweils 2 µl des Reaktionsansatzes auf die Dünnschichtplatte aufgetragen. Die Detektion der radioaktiv markierten Substanzen nach Dünnschichtchromatographie erfolgte unter Verwendung eines PhosphorImagers™.

1.2.2 MT2-Aktivitätsmessungen

Zur Bestimmung der MT2-Aktivität (Ergebnisse 1.2) wurden Methylcob(III)alamin als Methylgruppendonor und Coenzym M als Methylgruppenakzeptor in die Reaktion eingesetzt. Methylcob(III)alamin besitzt ein charakteristisches UV/VIS-Spektrum mit einem Absorptionsmaximum bei 520 nm ($\Delta\varepsilon_{520}$= 6,2 $mM^{-1}cm^{-1}$). Gemessen wurde die zeitabhängige Abnahme der Extinktion bei 520 nm, die sich proportional zur Demethylierung von Methylcob(III)alamin bzw. zur Methylierung von Coenzym M verhielt. Ein Spektrum, das während des Ablaufs einer solchen Reaktion erhalten wurde, ist in Abbildung 8 gezeigt.

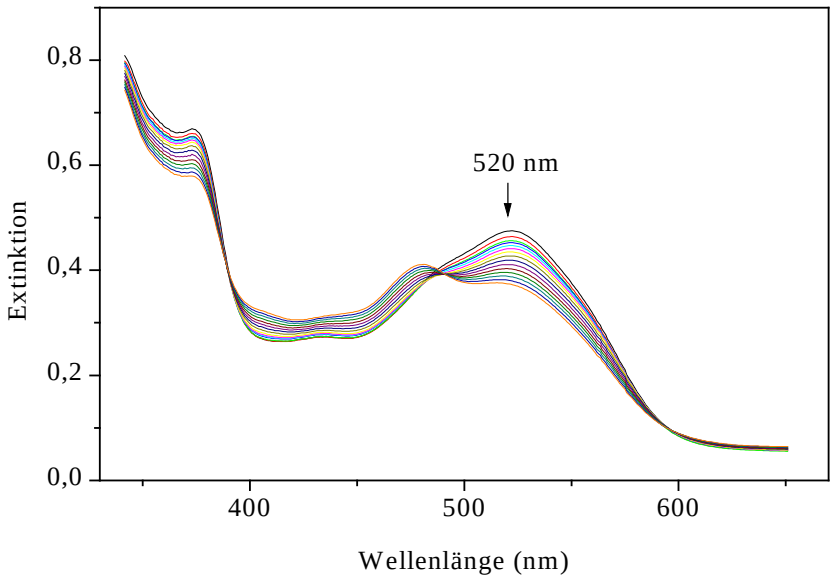


Abb. 8: Verfolgung der Demethylierung von Methylcob(III)alamin in einem UV/VIS-Spektrum. Gezeigt ist die Veränderung des Spektrums mit der Zeit bei Ablauf der MT2-Reaktion. Der Pfeil deutet die Veränderung der Extinktion bei 520 nm an. Die Messung wurde in Zeitintervallen von 30 s über einen Zeitraum von 8 min vorgenommen.

1.2.3 Katalyse der MT1-Reaktion durch MtrH

Zum Nachweis der katalytischen Fähigkeiten der vom Komplex abgetrennten Untereinheit MtrH wurden Aktivitätsmessungen mit dem etwa zu 50 % gereinigten Enzymkomplex, mit den MtrA-G-Fraktionen und der MtrH-Fraktion durchgeführt (siehe dazu Kapitel 1.1). In Tabelle 6 ist das Ergebnis der Aktivitätsmessungen zusammengefaßt.

Mit dem teilweise gereinigten Enzymkomplex können beide Teilreaktionen und die gesamte Methyltransferasereaktion gemessen und quantifiziert werden. Während die spezifischen Aktivitäten für die MT- und die MT1-Reaktion mit 1 U/mg bestimmt wurden, betrug die spezifische MT2-Aktivität nur 0,1 U/mg. Das Verhältnis der spezifischen Aktivitäten von MT- und MT1 zu MT2 steht im Einklang mit früheren Befunden, bei denen 3,1 U/mg für die MT- und 3,8 U/mg für die MT1-Reaktion, jedoch nur 0,3 U/mg für die MT2-Reaktion bestimmt wurden (Weiss *et al.*, 1994).

Im Gegensatz dazu katalysiert der MtrA-G-Komplex jedoch weder die Methylierung von Cob(I)alamin noch, ausgehend von N^5-Methyltetrahydromethanopterin, die Bildung von Methylcoenzym M. Die einzige unter den Standardmeßbedingungen nachweisbare Aktivität des MtrA-G-Komplexes ist die Demethylierung von Methylcob(III)alamin unter Bildung von Methylcoenzym M (Tab. 6). Die für den MtrA-G-Komplex im Vergleich zum MtrA-H-Komplex ermittelte höhere spezifische MT2-Aktivität ist darauf zurückzuführen, daß der MtrA-H-Komplex stärker mit anderen Proteinen verunreinigt ist als der MtrA-G-Komplex (Abb. 6).

Für MtrH konnte weder eine MT- noch eine MT2-Aktivität gemessen werden. Die Bildung von Methylcob(III)alamin wurde jedoch mit MtrH eindeutig und reproduzierbar nachgewiesen. Die im Vergleich zu der für den angereinigten MtrA-H-Komplex bestimmten spezifischen Aktivität von 1 U/mg verhältnismäßig geringe spezifische Aktivität von 0,07 U/mg für MtrH ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß eine hohe katalytische Effizienz der Methyltransferase den Kontakt der einzelnen Untereinheiten zueinander erfordert. Auf diese Zusammenhänge wird in der Diskussion noch genauer eingegangen.

Tab. 6: Spezifische Methyltransferaseaktivitäten von MtrA-H, MtrA-G und MtrH. Die folgenden Methyltransferaseaktivitäten wurden getestet: Methyltetrahydromethanopterin:Coenzym-M-Methyltransferase (MtrA-H); Methyltetrahydromethanopterin:Cob(I)alamin-Methyltransferase (MT1); und Methylcob(III)alamin:Coenzym-M-Methyltransferase (MT2). Die chromatographische Trennung wurde wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt. Die gemessenen Fraktionen wurden, wie in Abbildung 6 gezeigt, mittels SDS/PAGE analysiert. Daraus geht hervor, daß der MtrA-H-Komplex nur zu etwa 50 % gereinigt war.

	Spezifische Aktivität (U/mg)		
Untereinheiten	MT	MT1	MT2
MtrA-H	1	1	0,1
MtrA-G	<0,001	<0,001	0,2
MtrH	<0,001	0,07	<0,001

Für die durch MtrH katalysierte MT1-Reaktion konnte gezeigt werden, daß die Stoffmenge an gebildetem Methylcob(III)alamin von der in der Reaktion eingesetzten Menge an Enzym direkt abhängig ist (Abb. 9A). Abbildung 9B zeigt die lineare Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Proteinmenge.

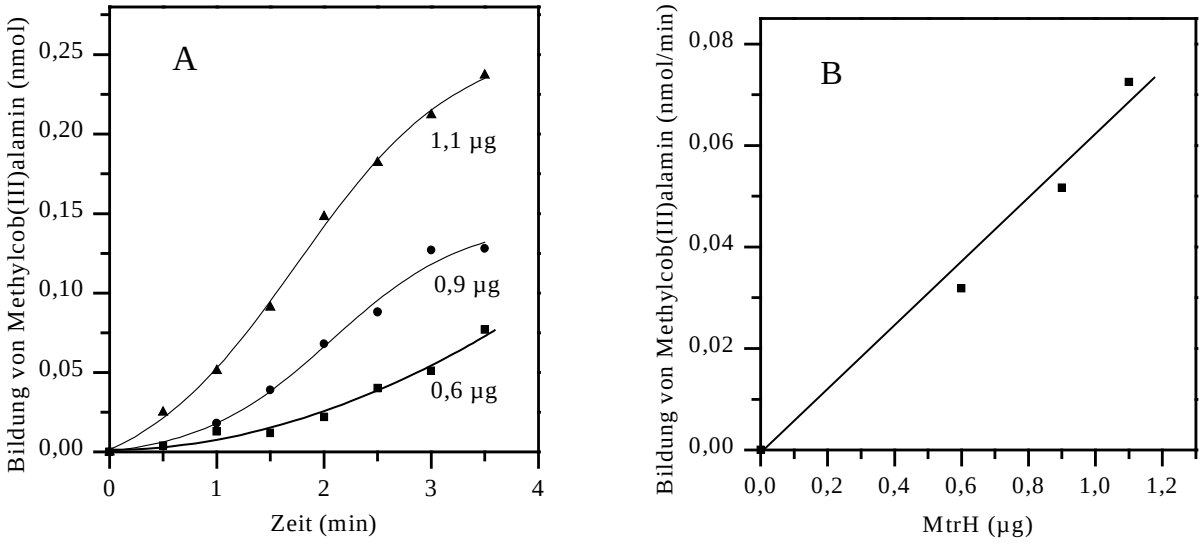


Abb. 9: MtrH katalysierte Methyltransferreaktion von N^5-Methyltetrahydromethanopterin auf Cob(I)alamin. (A) Zeitabhängige Bildung von Methylcob(III)alamin aus N^5-Methyltetrahydromethanopterin und Cob(I)alamin. Es wurden die zuvor beschriebenen Aktivitätsmessungen durchgeführt. Die jeweiligen Reaktionsansätze enthielten MtrH in den angegebenen Konzentrationen. Die Quantifizierung der Meßergebnisse erfolgte mit dem Computerprogramm ImageQuant™. **(B)** Abhängigkeit der Methylcob(III)alaminbildung (nmol/min) von der zugegeben Menge an MtrH (µg).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß diese Meßergebnisse ganz deutlich zeigen, daß MtrH unter Einsatz von freiem Cob(I)alamin die Demethylierung von N^5-Methyltetrahydromethanopterin unter Bildung von Methylcob(III)alamin und Tetrahydromethanopterin katalysiert. Eine weitere Folgerung ist, daß die Untereinheit MtrH eine Bindestelle für das Pterinderivat besitzen muß, um diesen Transfer zu katalysieren.

1.2.4 Rekonstituierbarkeit von MtrA-G mit MtrH

Die bisher beschriebenen Ergebnisse haben gezeigt, daß weder der MtrA-G-Komplex noch die abgetrennte MtrH-Untereinheit beide Schritte der Methylierungsreaktion von Coenzym M, ausgehend von N^5-Methyltetrahydromethanopterin, katalysieren kann. Folglich war es interessant zu testen, ob es möglich ist, durch Vereinigung der getrennten Enzymfraktionen MtrA-G und MtrH die vollständige MT-Reaktion, die normalerweise durch den MtrA-H-Komplex katalysiert wird, zu messen. Dazu wurden die beiden Fraktionen im gleichen Mengenverhältnis zusammengegeben und bei Raumtemperatur etwa 15 Minuten stehend inkubiert. Anschließend wurde die MT-Reaktion getestet. Während mit den beiden Einzelkomponenten der Methyltransfer nicht meßbar war, konnte mit dem rekonstituierten Enzymkomplex die Bildung von Methylcoenzym M eindeutig verfolgt werden. Die spezifische Aktivität für die gemessene MT-Reaktion wurde mit 10-20 mU/mg bestimmt. Das ist etwa 1 % der spezifischen Aktivität, die für den gesamten Enzymkomplex ermittelt wurde.

1.3 Heterologe Expression von *mtrH*

Die Ergebnisse zur Funktionsanalyse der MtrH-Untereinheit, die in den bisherigen Kapiteln beschrieben sind, wurden ausschließlich in Versuchen mit dem Enzym aus *M. thermoautotrophicum* erzielt. Die experimentellen Daten belegen, daß MtrH alleine die Methylierung von Cob(I)alamin, ausgehend von N^5-Methyltetrahydromethanopterin, katalysiert. Es war allerdings nicht völlig ausgeschlossen, daß die mittels Säulenchromatographie abgetrennte Untereinheit MtrH mit äußerst geringen Mengen des MtrA-H- oder MtrA-G-Komplexes verunreinigt war. Sollte das der Fall sein, waren diese Verunreinigungen weder bei der durchgeführten SDS/PAGE-Analyse sichtbar noch konnten sie nachweislich zur Katalyse der MT-, MT1- oder MT2-Reaktion beitragen. Derart kleine Restmengen an Enzymkomplex könnten allerdings notwendig sein, die katalytische Funktion von MtrH zu aktivieren. Das würde bedeuten, daß MtrH zwar die MT1-Reaktion katalysiert, aber eventuell zur Katalyse den Kontakt zu den anderen Untereinheiten benötigt. Ähnliche Effekte wurden bereits für die Methanol:Coenzym-M-Methyltransferase aus *Methanosarcina barkeri* beschrieben (Sauer und Thauer, 1999). Folglich mußte ein Weg gefunden werden, um tatsächlich zu beweisen, daß MtrH, ohne in Verbindung mit den anderen Untereinheiten zu stehen, die MT1-Reaktion katalysiert. Eine solche Möglichkeit bot die heterologe Expression des *mtrH*-Gens

aus *M. thermoautotrophicum* in *Escherichia coli*. *E. coli* besitzt kein Enzym, das die MT1-Reaktion katalysieren kann. Sollte also nach der Expression von *mtrH* in *E. coli* eine N^5-Methyltetrahydromethanopterin:Cob(I)alamin-Methyltransferaseaktivität im Zellextrakt nachgewiesen werden können, wäre das der Beweis, daß einzig MtrH und keine der anderen Untereinheiten zur Katalyse der MT1-Reaktion benötigt wird. In den ersten Versuchen dazu wurde MtrH als Fusionsprotein mit dem Maltosebindeprotein bzw. mit einem 6 x His-Tag überproduziert. Diese führten jedoch zu keinem Ergebnis (Harms, mündliche Mitteilung).

1.3.1 Heterologe Expression von *mtrH* in *Escherichia coli*

Zur Expression von *mtrH* in *E. coli* wurde das *mtrH*-Gen aus *M. thermoautotrophicum* in verschiedene Expressionsvektoren kloniert (Material und Methoden 3.8).

Zunächst sollte das MtrH-Protein als Fusionsprotein mit Calmodulin überproduziert werden. Das Fusionsprotein mit einer erwarteten molekularen Masse von 38 kDa war nach SDS-Gelelektrophorese klar zu erkennen. Nach Aufschluß der Zellen und anschließender Zentrifugation wurden die in den Zentrifugationsüberständen und in den suspendierten Zentrifugationssedimenten enthaltenen Proteine durch SDS/PAGE aufgetrennt. Es war klar erkennbar, daß das gesamte MtrH-Protein nicht in der löslichen Fraktion, sondern im Zentrifugationssediment zu finden war (Abb. 10). Diese Tatsache ließ vermuten, daß das überproduzierte Protein nicht in der nativ gefalteten Form vorlag. Es hatten sich wahrscheinlich unspezifisch gefaltete Aggregate (Inclusion Bodies) gebildet, die den hydrophoben Charakter des Proteins so weit verstärkten, daß MtrH in einem wäßrigen Medium nicht in löslicher Form vorliegt. Weder im Zentrifugationsüberstand noch im Zentrifugationssediment konnte eine MT1-Aktivität gemessen werden, was die Annahme, daß sich Inclusion Bodies gebildet haben, unterstützt.

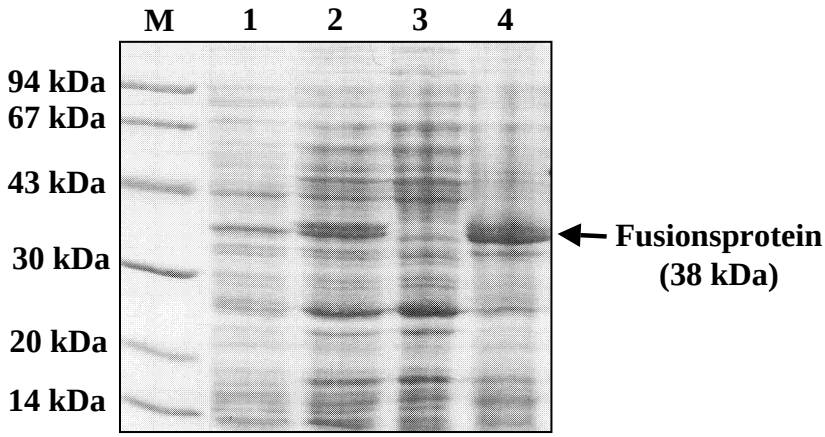


Abb. 10: SDS/PAGE-Analyse der Überproduktion von MtrH als Fusion mit Calmodulin in *Escherichia coli*. Zur Analyse wurde ein 15 %iges Polyacrylamidgel verwendet, das nach der Elektrophorese mit Coomassie®-Brillantblau R250 gefärbt wurde (siehe Material und Methoden 5.1). Spur M, Molekularmassenstandards; Spur 1, *E. coli* Zellextrakt (ZE) vor der Induktion mit IPTG; Spur 2, ZE nach Induktion mit IPTG; Spur 3, Zentrifugationsüberstand; Spur 4, Zentrifugationssediment.

Die Solubilisierung der Inclusion Bodies wurde zunächst getestet, indem das Protein mit verschiedenen Konzentrationen an Harnstoff denaturiert wurde. Mit steigender Harnstoffkonzentration erhöhte sich eindeutig der lösliche Anteil des Proteins (Abb. 11). Die Unterschiede bei Konzentrationen zwischen 4 M und 8 M Harnstoff waren allerdings gering. Für das folgende Experiment wurde das Protein mit 6 M Harnstoff denaturiert und anschließend die Lösung schlagartig auf eine Harnstoffkonzentration von 0,2 M verdünnt. Nach anschließender Zentrifugation zeigte sich, daß die größte Menge an Fusionsprotein wieder in den unlöslichen Zustand übergegangen war. Doch ein Teil blieb löslich und wurde über eine Calmodulin-Affinitätssäule gereinigt. Anschließende SDS-Gelelektrophorese zeigte, daß der erzielte Reinigungseffekt nur sehr gering war. Es hatte zwar auch ein Protein mit der erwarteten molekularen Masse (38 kDa) am Säulenmaterial gebunden, doch MT1-Aktivität (Ergebnisse 1.2) konnte mit dieser Fraktion nicht gemessen werden.

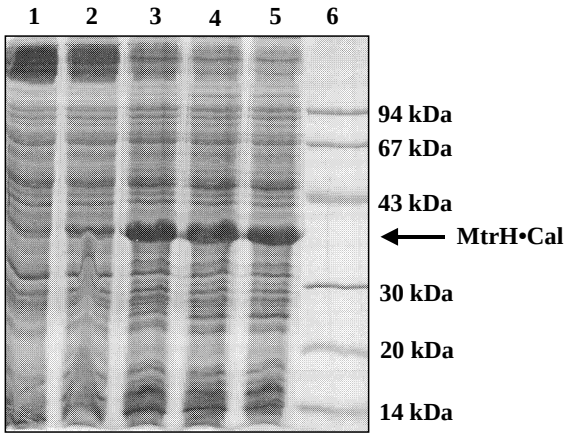


Abb. 11: Solubilisierung des unlöslichen in *E. coli* überproduzierten MtrH-Calmodulinfusionsproteins (MtrH•Cal). Zur Analyse wurde ein 15 %iges Polyacrylamidgel verwendet, das nach der Elektrophorese mit Coomassie®-Brillantblau R250 gefärbt wurde (siehe Material und Methoden 5.1). Spur 1, Zentrifugationsüberstand des zellfreies Extraktes; Spur 2-5: Zentrifugationsüberstände nach Behandlung mit Harnstoff, Spur 2: 2 M, Spur 3: 4 M, Spur 4: 6 M, Spur 5: 8 M; Spur M: Molekularmassenstandards.

Diese Methode wurde zunächst variiert, indem die Rückfaltung durch langsame Dialyse mit Puffer oder mit Puffer unter Zugabe katalytischer Mengen an *M. thermoautotrophicum* Zellextrakt erfolgte. Tatsächlich blieb die Hauptmenge des überproduzierten Proteins in beiden Fällen in der löslichen Phase (Abb.12). Die Messung der erwarteten MT1-Aktivität schlug jedoch fehl.

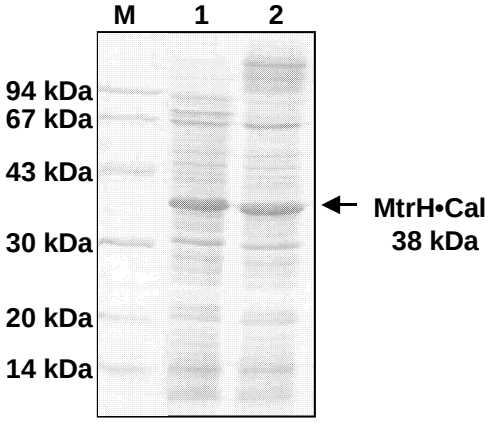


Abb. 12: SDS/PAGE des Rückfaltungsversuches mit dem MtrH-Calmodulinfusionsprotein (MtrH•Cal). Zur Analyse wurde ein 15 %iges Polyacrylamidgel verwendet, das nach der Elektrophorese mit Coomassie®-Brillantblau R250 gefärbt wurde (siehe Material und Methoden 5.1). Spur 1, Zentrifugationsüberstand nach Denaturierung; Spur 2: Zentrifugationsüberstand nach Dialyse der Denaturierungslösung ohne Zugabe von *M. thermoautotrophicum* Zellextrakt (siehe Text).

In der zweiten Variationsmethode wurden die Inclusion Bodies mit 1 mM DTT und 2 M Guanidiniumhydrochlorid teilweise entfaltet. Die anschließende Rückfaltung erfolgte unter Zugabe von L-Arginin, welches einen positiven Effekt auf die Faltung von einigen Proteinen ausübt. Durch diese Behandlung wurde zumindest ein Teil des Proteins solubilisiert und blieb nach Rückfaltung löslich (Ergebnis nicht gezeigt). Wie im ersten Versuch führte diese Methode zu inaktivem MtrH-Protein, das die Bildung von CH_3-Cob(III) aus CH_3-H_4MPT nicht katalysieren konnte.

Zur Verhinderung der Bildung von Inclusion Bodies wurden die Versuchsbedingungen wie folgt geändert: erniedrigte IPTG-Konzentration zur Induktion der Zellen, langsameres Zellwachstum bei 30 °C und 18 °C, Verwendung von Minimalmedium anstelle von Vollmedium (LB), Zucht der *E. coli*-Zellkultur unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C und 10 °C. Das Ergebnis war jedoch in allen Fällen das gleiche: Die aufgeführten Änderungen der experimentellen Bedingungen verhinderten nicht die Bildung von Inclusion Bodies.

Abbildung 13 zeigt ein SDS-Gel von *E. coli* Zellextrakten, die deutlich überproduziertes MtrH-Protein enthalten. Im ersten Fall wurde ein Fusion von MtrH mit dem Trx•Tag™ Thioredoxinprotein unter Verwendung des Vektors pET32c erzeugt. In der Literatur wurde beschrieben, daß eine Fusion mit Thioredoxin die Löslichkeit eines Proteins steigert (LaVallie *et al.*, 1993; Novy *et al.*, 1995). Das Genprodukt hatte die erwartete molekulare Masse von 46 kDa (MtrH= 34 kDa, Thioredoxin= 12 kDa).

Im zweiten Fall wurde das *mtrH*-Gen in den Vektor pET17b kloniert. Dieser Vektor enthält kein für ein Fusionsprotein kodierendes Gen. Dieser Versuch war notwendig um auszuschließen, daß die Fusionsproteine in irgendeiner Weise die native Faltung von MtrH negativ beeinflussen. Die erwartete Größe des Genprodukts betrug 34 kDa.

Auch in diesen Versuchen zeigt die SDS-Gelanalyse, daß die überproduzierten Proteine nicht in der löslichen Fraktion zu finden waren, also wieder nicht in nativ gefalteter und aktiver Form isoliert werden konnten (Abb. 13).

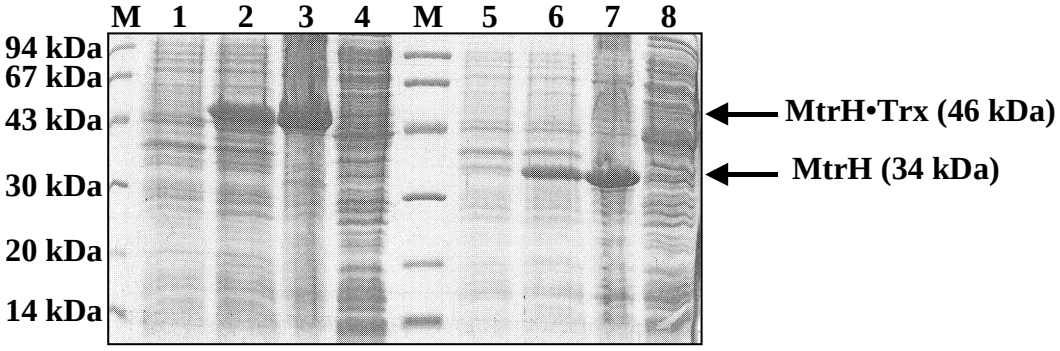


Abb. 13: SDS/PAGE-Analyse von in *E. coli* überproduziertem MtrH-Protein als Fusion mit Thioredoxin und MtrH-Protein ohne Fusion. Zur Analyse wurde ein 15 %iges Polyacrylamidgel verwendet, das nach der Elektrophorese mit Coomassie®-Brillantblau R250 gefärbt wurde (siehe Material und Methoden 5.1). Die Überproduktion von MtrH als Fusionsprotein mit Thioredoxin (*mtrH*-pET32c) ist in den Spuren 1 bis 4 gezeigt. Die Überproduktion von MtrH ohne Fusion (*mtrH*-pET17b) zeigen die Spuren 5-8. Spur M, Molekularmassenstandards; Spur 1und 5, *E. coli* Zellextrakt (ZE) vor der Induktion mit IPTG; Spur 2 und 6, ZE 3 h nach der Induktion mit 0,3 mM IPTG; Spur 3 und 7, Zentrifugationssediment; Spur 4 und 8, Zentrifugationsüberstand.

Es ist bekannt, daß Chaperone, wie die Hitzeschockproteine GroEL und GroES aus *E. coli*, die Faltungen von Proteinen positiv beeinflussen können. Deshalb wurden die Gene *groEL* und *groES* in *E coli* mit dem *mtrH*-Gen coexprimiert (siehe Material und Methoden 3.10). Aber auch die Anwesenheit der Chaperone konnte die Bildung von Inclusion Bodies nicht verhindern (SDS/PAGE-Analyse nicht gezeigt).

1.3.2 Heterologe Expression von *mtrH* in *Aspergillus nidulans*

Neben der Expression von *mtrH* in einem prokaryontischen System wurde auch ein eukaryontisches System gewählt. Dafür wurde das *mtrH*-Gen aus *M. thermoautotrophicum* in eine speziell für die Expression in *A. nidulans* vorgesehenes Plasmid kloniert und das Konstrukt in *A. nidulans* transformiert (siehe Material und Methoden 3.3). Es resultierten sechs Pilzkolonien, die das Plasmid mit *mtrH* aus *M. thermoautotrophicum* tragen sollten. Zur Sicherheit wurden alle auf Flüssigmedium überimpft, die Zellen mit 100 mM Threonin induziert und schließlich Zellextrakte hergestellt. Nach SDS-Gelelektrophorese der Zellextrakte war kein überproduziertes Protein zu erkennen (Gel nicht gezeigt). Dies bedeutete allerdings nicht zwangsläufig, daß das Protein eventuell nicht doch in geringen Mengen produziert worden war. Deshalb wurden alle Extrakte auf N^5-Methyltetrahydromethanopterin:Cob(I)alamin-Methyltransferaseaktivität getestet. Jedoch konnte in keinem eine MT1-Aktivität nachgewiesen werden.

2 MtrH aus *Methanosarcina barkeri*

In der Membranfraktion von *Methanosarcina barkeri* konnte bereits früher N^5-Methyltetrahydromethanopterin:Coenzym-M-Methyltransferaseaktivität nachgewiesen werden (Fischer *et al.*, 1992). Sequenziert und biochemisch näher charakterisiert wurden bisher allerdings nur die löslichen Methanol:Coenzym M und Mono-, Di-, Tri- und Tetramethylamin:Coenzym-M-Methyltransferasen aus *M. barkeri* (Sauer und Thauer 1998b). Gute Erfolge bei der heterologen Expression von Genen aus *M. barkeri* in *E. coli* wurden z. B. für die Methanol:Coenzym-M-Methyltransferase erzielt (Harms und Thauer, 1996b; LeClerc und Grahame, 1996). Außerdem ist ein genetisches System für Archaea der Gattung *Methanosarcina* entwickelt worden, das die Durchführung genetischer Analysen ermöglicht (Metcalf *et al.*, 1997). Unter diesen Voraussetzungen war es naheliegend, das Gen der membrangebundenen N^5-Methyltetrahydromethanopterin:Coenzym-M-Methyltransferase aus *M. barkeri* zu klonieren und zu sequenzieren.

2.1 Klonierung und Sequenzierung des *mtr*-Operons aus *M. barkeri*

Zur Klonierung des *mtr*-Gens aus *M. barkeri* wurde sich zunutze gemacht, daß die Sequenz des *mtr*-Operons aus einem weiteren Archaeon der Familie der *Methanosarcinaceae*, *Methanosarcina mazei*, bereits vollständig sequenziert vorlag (Lienard *et al.*, 1997). Von der *mtrD*-Sequenz aus *M. mazei* wurde ein im Vergleich mit den *mtrD*-Sequenzen aus *Methanopyrus kandleri*, *Methanococcus jannaschii* und *Methanobacterium thermoautotrophicum* hoch konservierter Bereich gewählt, um die heterologe Sonde 5‘-AACATAGGAGGTACAATTGAAGGGTTCCACGACCCGAAATTCAAGA-3‘ abzuleiten. Die Sonde wurde mit Digoxigenin-dUTP markiert und in einer Southern-Blot-Hybridisierung mit chromosomaler *M. barkeri*-DNA eingesetzt. Spezifische Signale wurden erhalten, wenn die Hybridisierung und die nachfolgenden Waschschritte bei 58 °C (Material und Methoden 3.4) erfolgten. Mit dieser Sonde wurde unter den ermittelten Hybridisierungsbedingungen eine λ-ZAP-Express-Genbank (*Sau*3AI) von *M. barkeri* durchsucht. Das Ergebnis waren sechs positive Klone, wovon zwei überlappend das gesamte *mtr*-Operon enthielten (Abb. 14). Die resultierenden Plasmide pMB6 und pMB7 wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, über den ganzen *mtr*-Genbereich sequenziert. Die Sequenz des *mtr*-Gens aus *M. barkeri* ist unter der Nummer AJ132817 bei der EMBL-Sequenzdatenbank verfügbar.

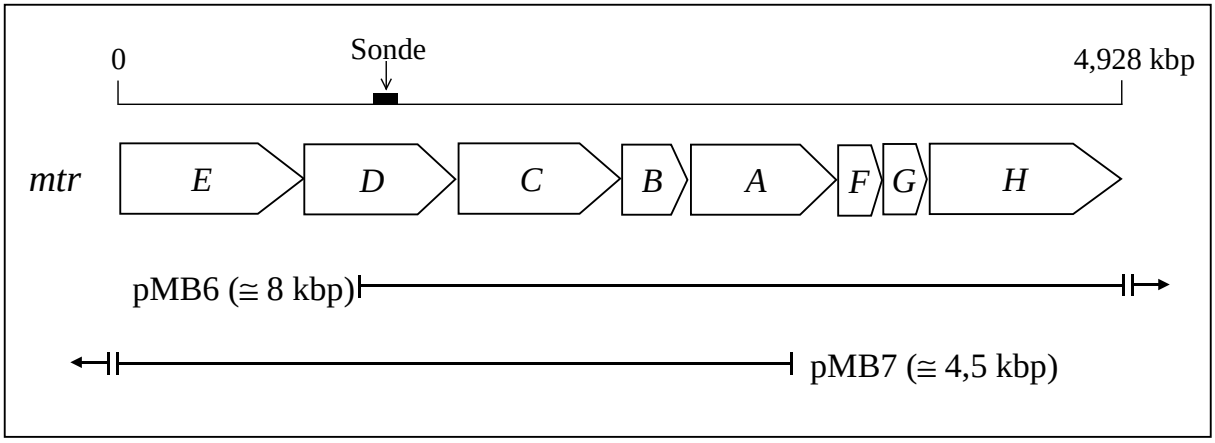


Abb. 14: Übersicht über die Anordnung der acht Gene des *mtr*-Operons in *M. barkeri*. Die Gene wurden kloniert und sequenziert. Die Sequenz ist unter der Nummer AJ132817 bei der EMBL-Sequenzdatenbank abgelegt. Oberhalb der Gene ist der sequenzierte Bereich angegeben, in dem sich auch die Sequenz der abgeleiteten Sonde befindet. Unterhalb der Gene sind die überlappenden Klone, die zur Sequenzierung des gesamten Operons verwendet wurden, schematisch gezeigt.

Die Ähnlichkeiten der DNA-Sequenz der *mtr*-Gene aus *M. barkeri* und aus *M. mazei*, die als Vorlage für die Sequenzierung gedient hatte, betrugen 83-91 % für *mtrA* und *mtrC-H* und 71 % für *mtrB*. Die Anordnung der *mtr*-Gene in *M. barkeri* war die gleiche, die in *M. barkeri* und anderen methanogenen Archaea gefunden wurde. Einzige Ausnahme stellt momentan das *mtr*-Operon aus *M. kandleri* dar, in dem das *mtrF*-Gen fehlt (Harms und Thauer, 1997).

2.2 Analyse der abgeleiteten Primärstrukturen der Mtr-Untereinheiten aus *M. barkeri*

Aus der DNA-Sequenz der N^5-Methyltetrahydromethanopterin:Coenzym-M-Methyltransferase aus *M. barkeri* wurde die Primärstruktur der Aminosäuren für jede der acht Untereinheiten abgeleitet. Mit dieser Grundlage wurden einige Eigenschaften der resultierenden Proteine in Tabelle 7 zusammengefaßt. Unter anderem sind die Hydrophobizitäten der Polypeptide angegeben. Je negativer der errechnete Wert ist, desto höher ist die Hydrophobizität des Proteins einzustufen.

Ganz deutlich hervorgehoben ist hierbei die Untereinheit MtrH, die sowohl die größte als auch, mit einem Wert von +12,98, die hydrophilste Untereinheit ist. Diese Eigenschaft paßt gut zu den bisher beschriebenen Ergebnissen. MtrH läßt sich einerseit leichter als die anderen Untereinheiten vom Komplex abtrennen. Andererseits ist es zur Ausübung der katalytischen Funktion von Vorteil, wenn die Untereinheit nicht in der Membran integriert ist. Dies ermöglicht eine erleichterte Substratbindung und den Kontakt zur Untereinheit MtrA, die den Methylgruppenakzeptor für die Reaktion als prosthetische Gruppe trägt. Auch in Hinsicht auf die energiekonservierende Funktion und das Postulat einer Natriumionentranlokation über die Cytoplasmamembran ist die Lokalisation der MtrH-Untereinheit im Cytoplasma möglich. Die Natriumionenabhängigkeit konnte nur für die MT2-Reaktion nachgewiesen werden (Gärtner *et al*., 1994; Weiss *et al*., 1994).

Die MtrA-Untereinheit, die als Träger der prosthetische Gruppe an der katalytischen Reaktion beteiligt sein muß, ist nur vergleichsweise schwach hydrophob. Diese schwache hydrophobe Ausprägung gilt ebenfalls für die kleinsten Untereinheiten MtrB, MtrF und MtrG, während die größeren Untereinheiten MtrC, MtrD und MtrE einen stark hydrophoben Charakter aufweisen. Der Vergleich mit Mtr-Untereinheiten anderer methanogener Archaea (Tab. 8) in Hinblick auf die isoelektrischen Punkte und die berechneten Hydrophobizitäten bestätigen dieses Ergebnis. Auf die betrachteten Eigenschaften wird in der Diskussion im Zusammenhang mit der Erstellung eines Enzymmodells intensiver eingegangen werden.

Tab. 7. Eigenschaften der acht Mtr-Untereinheiten aus *M. barkeri*. Zur Erstellung der Tabelle wurde das Lasergene-Computerprogramm DNA Star (London, England) verwendet. Die Hydrophobizitäten der Proteinmoleküle entsprechen der Summe der Aminosäurehydropathien nach Kyte und Doolittle (1982) mit einem „span setting“ von 9.

Untereinheit	Molek. Masse (kDa)	Aminosäuren	Saure Aminosäuren	Basische Aminosäuren	Isoelektrischer Punkt	Ladung bei pH7	Hydrophobizität
MtrA	25,41	240	34	22	4,91	-11,14	-15,3
MtrB	11,92	108	12	7	4.27	-5,08	-18,7
MtrC	26,82	267	14	11	5,63	-2,64	-259,1
MtrD	25,15	250	10	8	6,32	-1,45	-243,8
MtrE	32,51	302	21	16	5,61	-4,39	-148,6
MtrF	7,98	73	6	6	6,49	-0,09	-45,3
MtrG	8,01	72	10	9	5,19	-1,08	-20,2
MtrH	34,26	316	43	27	4,55	-15,45	+13,0

Tab. 8: Isoelektrische Punkte (IP) und Hydrophobizitäten (HP) der acht Mtr-Untereinheiten aus verschiedenen methanogenen Archaea. *M. therm.* (MR): *Methanobacterium thermoautotrophicum* Stamm Marburg; *M. therm.* (ΔH): *Methanobacterium thermoautotrophicum* Stamm ΔH; *M. kandleri*: *Methanopyrus kandleri*; *M. jannaschii*: *Methanococcus jannaschii; M. mazei*: *Methanosarcina mazei* Stamm Gö; *M. barkeri*: *Methanosarcina barkei* Stamm Fusaro. Zur Erstellung der Tabelle wurde das Lasergene-Computerprogramm DNA Star (London, England) verwendet. Die Hydrophobizitäten der Proteinmoleküle entsprechen der Summe der Aminosäurehydropathien nach Kyte und Doolittle (1982) mit einem „span setting" von 9.

	MtrA IP/HP	**MtrB IP/HP**	**MtrC IP/HP**	**MtrD IP/HP**	**MtrE IP/HP**	**MtrF IP/HP**	**MtrG IP/HP**	**MtrH IP/HP**
***M. therm.* (MR)**	4,4/+13	3,8/-54	8,5/-287	6,6/-241	6,2/-172	11,0/-53	4,7/-21	4,3/+26
***M. therm.* (ΔH)**	4,4/+11	3,7/-46	8,5/-270	6,6/-241	6,2/-170	11,5/-52	4,6/-21	4,3/+26
M. kandleri	4,0/-23	4,2/-47	5,8/-272	7,2/-189	6,1/-143	--------	5,0/-8	4,2/+47
M. jannaschii	4,6/-22	4,6/-45	8,1/-259	6,6/-228	6,9/-185	6,6/-26	5,3/-21	4,7/+20
M. mazei	5,5/14	4,4/-13	4,8/-288	7,2/-259	5,6/-147	5,0/-51	4,8/-19	5,1/+24
M. barkeri	4,9/-15	4,3/-19	5,6/-259	6,3/-244	5,6/-149	6,5/-45	5,2/-20	4,55/+13

In einem Katalog (Abbildung 15) im Anschluß an diese Seite befinden sich Aminosäuresequenzvergleiche jeder der acht Untereinheiten aus *M. barkeri* mit den MtrA-H-Aminosäuresequenzen von *Methanosarcina mazei (*Lienard und Gottschalk, 1998*), Methanobacterium thermoautotrophicum* (Stamm Marburg und ΔH) (Harms *et al*., 1995; Smith *et al*., 1997), *Methanococcus jannaschii* (Bult *et al*., 1996) und *Methanopyrus kandleri* (Harms und Thauer, 1997). Die Sequenzidentitäten der Untereinheiten aus den verschiedenen Organismen sind insgesamt sehr hoch. Im Vergleich zu den einzelnen *M. barkeri*-Untereinheiten liegen die Ähnlichkeiten für *M. mazei* bei 73 bis 91 %, für beide *M. thermoautotrophicum*-Stämme bei 33 bis 56 % und für *M. jannaschii* und *M. kandleri* zwischen 27 und 54 %. Die Ähnlichkeiten sind bei den Untereinheiten MtrC, MtrD und MtrE etwas stärker ausgeprägt, was wahrscheinlich auf der großen Anzahl von hydrophoben Aminosäureresten beruht.

MtrA

```
M.barkeri      - - M A D K K E P A P G W P I L K G E Y E V G D V K N C V L V I T C G S H L P G  38
M.mazei        - - M A D K R E P A P G W P I L K R E Y E V G D V K N S V L V I T C G S H L P G  38
M.therm.(MR)   M - - V E K K S P A E G W P V V N G D Y I V G D P E S P V A A T T L A S H - I E  37
M.therm.(ΔH)   V - - V E K K S P A E G W P V V N G D Y I V G D P E S P V A A T T L A S H - I E  37
M.jann.        M S M A N K R E P A P G W P I V S G E Y V V G N P E S C V G V V T L G S H G L E  40
M.kandleri     M - - P E K A E P A E G W P V V E G D Y V V G D P E A P V H V V T L G S H - I E  37

M.barkeri      Q P I L D A G A - - - - A V T G S C K T E N L G I E K V V A H I I S N P N I R Y  74
M.mazei        K P I L D A G A - - - - A C T G S C K T E N L G I E K V V A H I I S N P D I R Y  74
M.therm.(MR)   D I P V E A G A - - - - A I A G P C K T E N L G I E K M I A N L I S N P N I R F  73
M.therm.(ΔH)   D V P V E A G A - - - - A I A G P C K T E N L G I E K M I A N L I S N P N I R F  73
M.jann.        Q A C I D A G A - - - - A I A G P C H T E N L G I E K V V A N Y I S N P N I R F  76
M.kandleri     E D I L K A A G E D K V A I A G P C K T E N I G I E K V I A N V I A N P N I R F  77

M.barkeri      L L V T G S E V K G H I T G Q S V M S L H A N G V K D N R - - I S G A L G A I P  112
M.mazei        L L V T G S E V K G H I T G Q S M M S L H A N G V K E N R - - I A G A L G A I P  112
M.therm.(MR)   L I L C G S E V Q G H I T G Q S I E A L H Q N G V D P D K R N I I G A T G A I P  113
M.therm.(ΔH)   L I L C G S E V Q G H I T G Q S I E A L H Q N G V D P D K R N I I G A T G A I P  113
M.jann.        M I L C G S E V Q G H I T G Q C F K A L W E N G I G - D D G G I I G A K G A I P  115
M.kandleri     G V L C G A E V T G H L T G Q C F K A M Y E N G V D P D S G E I I G A E G A I P  117

M.barkeri      Y V E N L N E D A I A R F Q E Q - V D V V N L L D T E D M G A I T S K V K E L A  151
M.mazei        Y V E N L N A A A V A R F Q G Q - V Q V V N L L D T E D M G A I T S K V R E L A  151
M.therm.(MR)   Y I E N I P D E G I E R F Q K Q L - E I V N L I D V E D A D A I K A K V K E C I  152
M.therm.(ΔH)   Y I E N I P D E G I E R F Q K Q L - E I V N L I D V E D A D A I K A K V K E C I  152
M.jann.        F L E N V N K E A V E R F R R Q I V E V V D L I D C E D I G K I T Q A I K E C L  155
M.kandleri     Y L E N I P E E A V E R Y R D Q I V E L V D L I D V E D V D E I V K A I E E C V  157

M.barkeri      S K D P G A F D A E P M I V E I S E E - G E E E E E G G A V R P V S G E I A V I  190
M.mazei        S K D P G A F D A E P L V V E I S E E - G E E E E E G G V V R P V S G E I A V L  190
M.therm.(MR)   E K D P G A F E E E A M I I K V E E G - G E E E E E G E - E V K P V A P E T A L I  190
M.therm.(ΔH)   E K D P G A F E E E A M V I K V E E G - G E E E E E G E - E V K P V A P E T A L I  190
M.jann.        S K D P G A I D E D P F I I E L E G G K G G G E E E E G V I K P I T P E M A I I  195
M.kandleri     E K D P G A Y E E G P M T I S L E E E - E E E E L A E V A G M P V S A E T V T V  196

M.barkeri      R S R L K A I E A R M M D I G N L N K F H S G V H A G K I E G A M I G L T V T I  230
M.mazei        R S R L K A I E A R M M D I G N L N K F H S G V H A G K V E G A M I G L T I T I  230
M.therm.(MR)   E A R M R N I Q T Q V K M I G S T N R M F A G M Y S G K V Q G I M I G L A - - -  227
M.therm.(ΔH)   E A R M R N I Q T Q V K M I G S T N R M F A G M Y S G K V Q G I M I G L A - - -  227
M.jann.        E S R M R L I G N E M C Y N G L L A K W Q A G Y Y N G K I Q G I - - - - A T G L  231
M.kandleri     E Y R I N D V R V G V K S I G A M Q R Y M A G Y L S G R T M G L L I G I I S G M  236

M.barkeri      S L L G L - - - L L L G R                                                      241
M.mazei        S L L G L - - - L L L G - R                                                    240
M.therm.(MR)   - - F T L T L G I L L L V                                                      239
M.therm.(ΔH)   - - F T L T L G I L L L V Y                                                    239
M.jann.        F L M L L I M G I L M F                                                        244
M.kandleri     I F L F L P M V V L G G V                                                      250
```

MtrB

```
M.barkeri      M S M - - - I R I A P E L N L V M D P E T G T I T Q E R - K D S I Q Y S M E P V  36
M.mazei        M S I - - - V R I A P E I N L V M D T E S G N V T Q E R - K D S I Q Y S M E P V  36
M.therm.(MR)   M E M L P L V K I A P E Y N L T L D P S T G M I G A A L G R E V I I L S M D E I  40
M.therm.(ΔH)   M E M L P L V K I A P E Y N L T L D P S T G M I G A A L G R E V I I L S M D E I  40
M.jann.        M A T Y V F I D - - Q N I P L V Y T V E T G V I T K G F G - D L L F V D V S P I  37
M.kandleri     M A I - - - V L I D P E S Q I A M D A V T G A V A - E W S E D V V T L D V M P L  36

M.barkeri      F E R V D K L D A I A D D L V N S L S P S N P L L N S W P G R E N T S Y M A G F  76
M.mazei        F E R V D K L D A I A D D L V N S L S P S K P L L N T W P G R E N T S Y I A G I  76
M.therm.(MR)   N E Q I A A L E A T A D D L I N S L D P T T I P E G S Y P G R E G V Y L T A G K  80
M.therm.(ΔH)   N E Q I A E L E A T A D D L I N S L D P T T T P L D S Y P G R E G V Y L T A G K  80
M.jann.        E E Q I K K L E T L V D A Y E H S L D P R Y P P L N S F P N R D G V Y A I S G Y  77
M.kandleri     Y E K V E E L E Q Y V N D M M R A M D P S T T T W G T L P G R E G V H E T A G F  76

M.barkeri      Y G N T F Y G V I I G L A F S G L L A L V I Y I A S L M R G V - - - - V        109
M.mazei        Y S N S F Y G I I V G L A F S G L L A L I I Y I T R - - - - - - - - - - L      103
M.therm.(MR)   L T N I V Y G F I L G L I I - - L F A L L L                                  101
M.therm.(ΔH)   L T N M V Y G F I L G L I I - - L F A L L L Y                                101
M.jann.        F K S A F F G F W I G L G I M A L L A I I L G V K - - - - - - - - - - F      104
M.kandleri     L T N F A H G F V I G T M I V A L V A F T L A A V Y K L H A L R L L G L      113
```

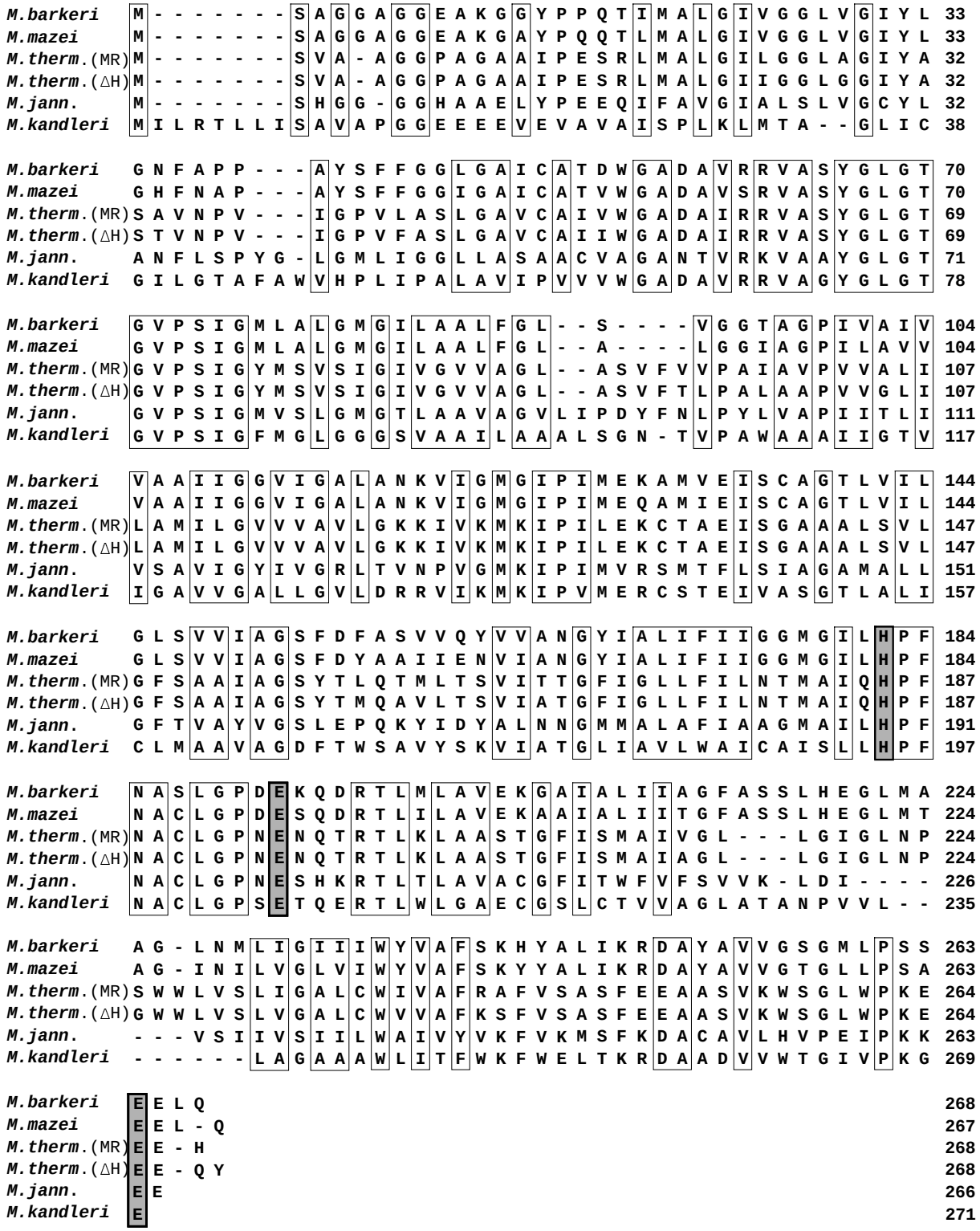
MtrF

```
M.barkeri      M K V A E E Y D K G V P M M L A P Q M G A I D A T V E S I R Y R A Q L I A R N Q  40
M.mazei        M - - A E E H E K G V P M V L A P - M G A I D A T V E S I R Y R A Q L I A R N Q  37
M.therm.(MR)   M - - - - - - - - - - I I L S N K P N I R G I K N V V E D I K Y R N Q L I G R D G  31
M.therm.(ΔH)   M - - - - - - - - - - I I L S N K P N I R G I K R V V E D I K Y R N Q L I G R D G  31
M.jann.        M - - - - - - - - - G V E V S N K P N V S S I Q S Y V E D L E Y K V G L I T R N R  32

M.barkeri      K L D S G V A A T G M I G F A A G F L F S L L M V I V L P L L - - - - F W        74
M.mazei        K L D F G V A A P D - I G F A A G L L F S L L M V I V L P V A - - - - V G L      70
M.therm.(MR)   R L F A G L I A T R I S G I A I G F L L A V L L V G V P A M M S I L G V I        69
M.therm.(ΔH)   R L F A G L I A T R I S G I A I G F L L A V L L V G V P A M M S I L G V I Z      69
M.jann.        G L E S G T E S A G T K G L I I G V V S A I V L M G I P L A L Y F L - M K      69
```

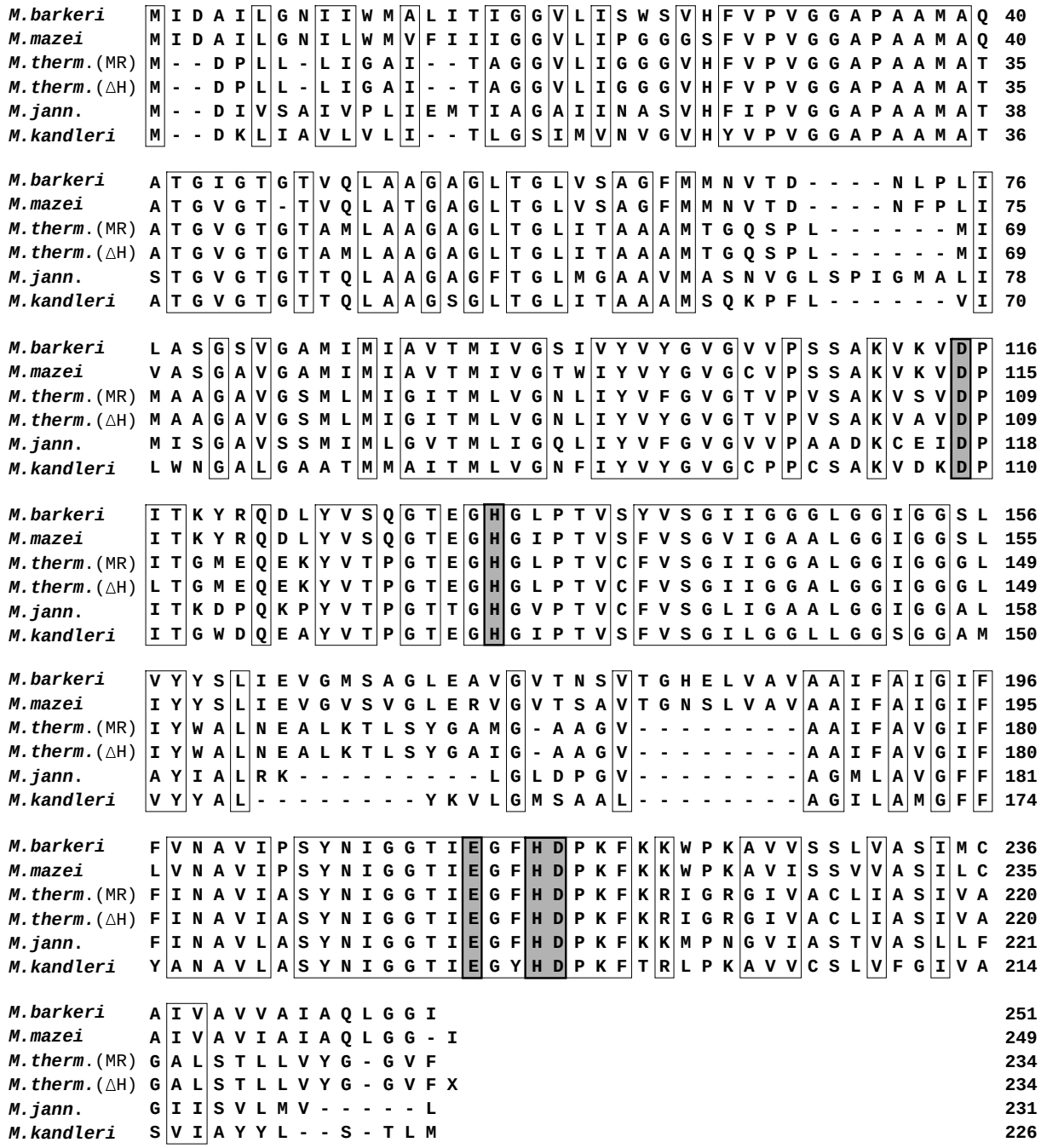
MtrG

```
M.barkeri      M - - D G K A - - P A A F V E P G E F N E V M K R L D K I D E K I E F V N S E V  36
M.mazei        M - - D G K A - - P A A F V E P G E F N E V M K R L D Q I D E K V E F V N S E V  36
M.therm.(MR)   M S E E E K T T I P R V L V S A D E F N K A N E K L D E I E E K V E F T V G E Y  40
M.therm.(ΔH)   M S E E D K T T I P R V L V S A D E F N K A N E R L D D I E E K V E F T V G E Y  40
M.jann.        M S E D E K L - - P Q V I M D P A D Y E A L K K R L D E L E K K V E N T N A E L  38
M.kandleri     M A E E E - - S V P K M V A P E D D I R E I H S R L D E I E R R L D F V W G E V  38

M.barkeri      A Q K I G K K V G R D I G I L Y G G F I G L L L F L I Y T V V S S M F M        73
M.mazei        A Q R I G K K V G R D I G I L Y G G V I G L L L F L I Y V Q I S S M F - - - - -  71
M.therm.(MR)   S Q R I G Q Q I G R D I G I L Y G I V I G L I I L A V T N I L F A G L L K G L L  80
M.therm.(ΔH)   S Q R I G Q Q I G R D I G I L Y G I V I G L I I L A V T N I L F A G L L K G L L  80
M.jann.        F Q L A G K K V G R D I G I L Y G L V I G I I L S Y I L P A L I K I I Q I L S L  78
M.kandleri     Y Q R F G K R I G R D I G I L Y G L V I G L Y L C M L Y I L L G V A F R        75

M.barkeri                                                                                  73
M.mazei        - - - - - - M                                                               72
M.therm.(MR)   K S L F G - L                                                               86
M.therm.(ΔH)   K S L F G L                                                                 87
M.jann.        K V L V Q Q                                                                 85
M.kandleri                                                                                 75
```

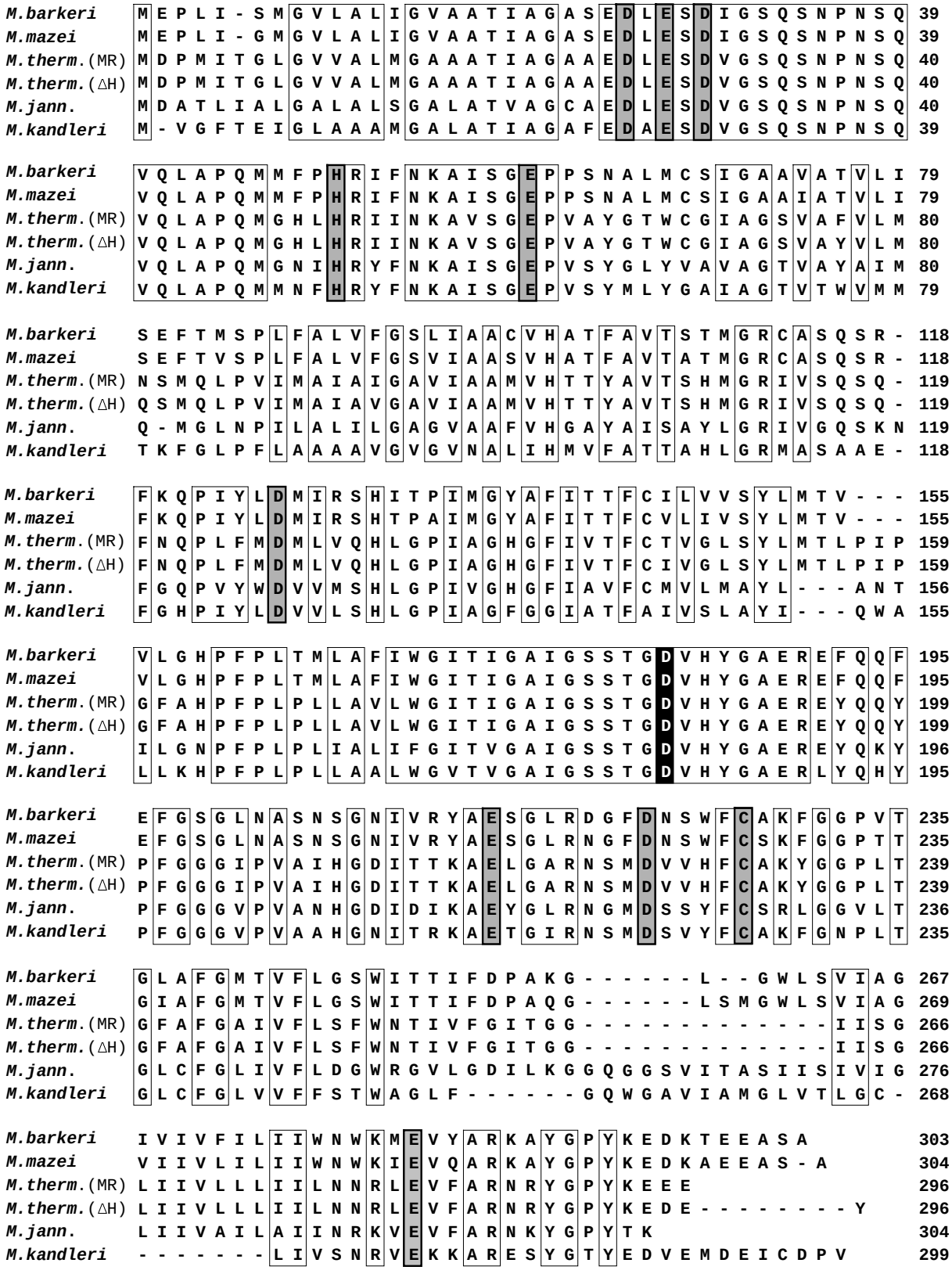
MtrC


M.barkeri M - - - - - - - S A G G A G G E A K G G Y P P Q T I M A L G I V G G L V G I Y L 33
M.mazei M - - - - - - - S A G G A G G E A K G A Y P Q Q T L M A L G I V G G L V G I Y L 33
M.therm.(MR) M - - - - - - - S V A - A G G P A G A A I P E S R L M A L G I L G G L A G I Y A 32
M.therm.(ΔH) M - - - - - - - S V A - A G G P A G A A I P E S R L M A L G I I G G L G G I Y A 32
M.jann. M - - - - - - - S H G G - G G H A A E L Y P E E Q I F A V G I A L S L V G C Y L 32
M.kandleri M I L R T L L I S A V A P G G E E E E V E V A V A I S P L K L M T A - - G L I C 38
M.barkeri G N F A P P - - - A Y S F F G G L G A I C A T D W G A D A V R R V A S Y G L G T 70
M.mazei G H F N A P - - - A Y S F F G G I G A I C A T V W G A D A V S R V A S Y G L G T 70
M.therm.(MR) S A V N P V - - - I G P V L A S L G A V C A I V W G A D A I R R V A S Y G L G T 69
M.therm.(ΔH) S T V N P V - - - I G P V F A S L G A V C A I I W G A D A I R R V A S Y G L G T 69
M.jann. A N F L S P Y G - L G M L I G G L L A S A A C V A G A N T V R K V A A Y G L G T 71
M.kandleri G I L G T A F A W V H P L I P A L A V I P V V V W G A D A V R R V A G Y G L G T 78
M.barkeri G V P S I G M L A L G M G I L A A L F G L - - S - - - - V G G T A G P I V A I V 104
M.mazei G V P S I G M L A L G M G I L A A L F G L - - A - - - - L G G I A G P I L A V V 104
M.therm.(MR) G V P S I G Y M S V S I G I V G V V A G L - - A S V F V V P A I A V P V V A L I 107
M.therm.(ΔH) G V P S I G Y M S V S I G I V G V V A G L - - A S V F T L P A L A A P V V G L I 107
M.jann. G V P S I G M V S L G M G T L A A V A G V L I P D Y F N L P Y L V A P I I T L I 111
M.kandleri G V P S I G F M G L G G G S V A A I L A A A L S G N - T V P A W A A A I I G T V 117
M.barkeri V A A I I G G V I G A L A N K V I G M G I P I M E K A M V E I S C A G T L V I L 144
M.mazei V A A I I G G V I G A L A N K V I G M G I P I M E Q A M I E I S C A G T L V I L 144
M.therm.(MR) L A M I L G V V V A V L G K K I V K M K I P I L E K C T A E I S G A A A L S V L 147
M.therm.(ΔH) L A M I L G V V V A V L G K K I V K M K I P I L E K C T A E I S G A A A L S V L 147
M.jann. V S A V I G Y I V G R L T V N P V G M K I P I M V R S M T F L S I A G A M A L L 151
M.kandleri I G A V V G A L L G V L D R R V I K M K I P V M E R C S T E I V A S G T L A L I 157
M.barkeri G L S V V I A G S F D F A S V V Q Y V V A N G Y I A L I F I I G G M G I L H P F 184
M.mazei G L S V V I A G S F D Y A A I I E N V I A N G Y I A L I F I I G G M G I L H P F 184
M.therm.(MR) G F S A A I A G S Y T L Q T M L T S V I T T G F I G L L F I L N T M A I Q H P F 187
M.therm.(ΔH) G F S A A I A G S Y T M Q A V L T S V I A T G F I G L L F I L N T M A I Q H P F 187
M.jann. G F T V A Y V G S L E P Q K Y I D Y A L N N G M M A L A F I A A G M A I L H P F 191
M.kandleri C L M A A V A G D F T W S A V Y S K V I A T G L I A V L W A I C A I S L L H P F 197
M.barkeri N A S L G P D E K Q D R T L M L A V E K G A I A L I I A G F A S S L H E G L M A 224
M.mazei N A C L G P D E S Q D R T L I L A V E K A A I A L I I T G F A S S L H E G L M T 224
M.therm.(MR) N A C L G P N E N Q T R T L K L A A S T G F I S M A I V G L - - - L G I G L N P 224
M.therm.(ΔH) N A C L G P N E N Q T R T L K L A A S T G F I S M A I A G L - - - L G I G L N P 224
M.jann. N A C L G P N E S H K R T L T L A V A C G F I T W F V F S V V K - L D I - - - - 226
M.kandleri N A C L G P S E T Q E R T L W L G A E C G S L C T V V A G L A T A N P V V L - - 235
M.barkeri A G - L N M L I G I I I W Y V A F S K H Y A L I K R D A Y A V V G S G M L P S S 263
M.mazei A G - I N I L V G L V I W Y V A F S K Y Y A L I K R D A Y A V V G T G L L P S A 263
M.therm.(MR) S W W L V S L I G A L C W I V A F R A F V S A S F E E A A S V K W S G L W P K E 264
M.therm.(ΔH) G W W L V S L V G A L C W V V A F K S F V S A S F E E A A S V K W S G L W P K E 264
M.jann. - - - V S I I V S I I L W A I V Y V K F V K M S F K D A C A V L H V P E I P K K 263
M.kandleri - - - - - - - L A G A A A W L I T F W K F W E L T K R D A A D V V W T G I V P K G 269
M.barkeri E E L Q 268
M.mazei E E L - Q 267
M.therm.(MR) E E - H 268
M.therm.(ΔH) E E - Q Y 268
M.jann. E E 266
M.kandleri E 271

MtrD


M.barkeri M I D A I L G N I I W M A L I T I G G V L I S W S V H F V P V G G A P A A M A Q 40
M.mazei M I D A I L G N I L W M V F I I I G G V L I P G G G S F V P V G G A P A A M A Q 40
M.therm.(MR) M - - D P L L - L I G A I - - T A G G V L I G G G V H F V P V G G A P A A M A T 35
M.therm.(ΔH) M - - D P L L - L I G A I - - T A G G V L I G G G V H F V P V G G A P A A M A T 35
M.jann. M - - D I V S A I V P L I E M T I A G A I I N A S V H F I P V G G A P A A M A T 38
M.kandleri M - - D K L I A V L V L I - - T L G S I M V N V G V H Y V P V G G A P A A M A T 36
M.barkeri A T G I G T G T V Q L A A G A G L T G L V S A G F M M N V T D - - - - N L P L I 76
M.mazei A T G V G T - T V Q L A T G A G L T G L V S A G F M M N V T D - - - - N F P L I 75
M.therm.(MR) A T G V G T G T A M L A A G A G L T G L I T A A A M T G Q S P L - - - - - - M I 69
M.therm.(ΔH) A T G V G T G T A M L A A G A G L T G L I T A A A M T G Q S P L - - - - - - M I 69
M.jann. S T G V G T G T T Q L A A G A G F T G L M G A A V M A S N V G L S P I G M A L I 78
M.kandleri A T G V G T G T T Q L A A G S G L T G L I T A A A M S Q K P F L - - - - - - V I 70
M.barkeri L A S G S V G A M I M I A V T M I V G S I V Y V Y G V G V V P S S A K V K V D P 116
M.mazei V A S G A V G A M I M I A V T M I V G T W I Y V Y G V G C V P S S A K V K V D P 115
M.therm.(MR) M A A G A V G S M L M I G I T M L V G N L I Y V F G V G T V P V S A K V S V D P 109
M.therm.(ΔH) M A A G A V G S M L M I G I T M L V G N L I Y V Y G V G T V P V S A K V A V D P 109
M.jann. M I S G A V S S M I M L G V T M L I G Q L I Y V F G V G V V P A A D K C E I D P 118
M.kandleri L W N G A L G A A T M M A I T M L V G N F I Y V Y G V G C P P C S A K V D K D P 110
M.barkeri I T K Y R Q D L Y V S Q G T E G H G L P T V S Y V S G I I G G G L G G I G G S L 156
M.mazei I T K Y R Q D L Y V S Q G T E G H G I P T V S F V S G V I G A A L G G I G G S L 155
M.therm.(MR) I T G M E Q E K Y V T P G T E G H G L P T V C F V S G I I G G A L G G I G G G L 149
M.therm.(ΔH) L T G M E Q E K Y V T P G T E G H G L P T V C F V S G I I G G A L G G I G G G L 149
M.jann. I T K D P Q K P Y V T P G T T G H G V P T V C F V S G L I G A A L G G I G G A L 158
M.kandleri I T G W D Q E A Y V T P G T E G H G I P T V S F V S G I L G G L L G G S G G A M 150
M.barkeri V Y Y S L I E V G M S A G L E A V G V T N S V T G H E L V A V A A I F A I G I F 196
M.mazei I Y Y S L I E V G V S V G L E R V G V T S A V T G N S L V A V A A I F A I G I F 195
M.therm.(MR) I Y W A L N E A L K T L S Y G A M G - A A G V - - - - - - - - - A A I F A V G I F 180
M.therm.(ΔH) I Y W A L N E A L K T L S Y G A I G - A A G V - - - - - - - - - A A I F A V G I F 180
M.jann. A Y I A L R K - - - - - - - - - - L G L D P G V - - - - - - - - - A G M L A V G F F 181
M.kandleri V Y Y A L - - - - - - - - - Y K V L G M S A A L - - - - - - - - - A G I L A M G F F 174
M.barkeri F V N A V I P S Y N I G G T I E G F H D P K F K K W P K A V V S S L V A S I M C 236
M.mazei L V N A V I P S Y N I G G T I E G F H D P K F K K W P K A V I S S V V A S I L C 235
M.therm.(MR) F I N A V I A S Y N I G G T I E G F H D P K F K R I G R G I V A C L I A S I V A 220
M.therm.(ΔH) F I N A V I A S Y N I G G T I E G F H D P K F K R I G R G I V A C L I A S I V A 220
M.jann. F I N A V L A S Y N I G G T I E G F H D P K F K K M P N G V I A S T V A S L L F 221
M.kandleri Y A N A V L A S Y N I G G T I E G Y H D P K F T R L P K A V V C S L V F G I V A 214
M.barkeri A I V A V V A I A Q L G G I 251
M.mazei A I V A V I A I A Q L G G - I 249
M.therm.(MR) G A L S T L L V Y G - G V F 234
M.therm.(ΔH) G A L S T L L V Y G - G V F X 234
M.jann. G I I S V L M V - - - - - L 231
M.kandleri S V I A Y Y L - - S - T L M 226

MtrE


M.barkeri M E P L I - S M G V L A L I G V A A T I A G A S E D L E S D I G S Q S N P N S Q 39
M.mazei M E P L I - G M G V L A L I G V A A T I A G A S E D L E S D I G S Q S N P N S Q 39
M.therm.(MR) M D P M I T G L G V V A L M G A A A T I A G A A E D L E S D V G S Q S N P N S Q 40
M.therm.(ΔH) M D P M I T G L G V V A L M G A A A T I A G A A E D L E S D V G S Q S N P N S Q 40
M.jann. M D A T L I A L G A L A L S G A L A T V A G C A E D L E S D V G S Q S N P N S Q 40
M.kandleri M - V G F T E I G L A A A M G A L A T I A G A F E D A E S D V G S Q S N P N S Q 39
M.barkeri V Q L A P Q M M F P H R I F N K A I S G E P P S N A L M C S I G A A V A T V L I 79
M.mazei V Q L A P Q M M F P H R I F N K A I S G E P P S N A L M C S I G A A I A T V L I 79
M.therm.(MR) V Q L A P Q M G H L H R I I N K A V S G E P V A Y G T W C G I A G S V A F V L M 80
M.therm.(ΔH) V Q L A P Q M G H L H R I I N K A V S G E P V A Y G T W C G I A G S V A Y V L M 80
M.jann. V Q L A P Q M G N I H R Y F N K A I S G E P V S Y G L Y V A V A G T V A Y A I M 80
M.kandleri V Q L A P Q M M N F H R Y F N K A I S G E P V S Y M L Y G A I A G T V T W V M M 79
M.barkeri S E F T M S P L F A L V F G S L I A A C V H A T F A V T S T M G R C A S Q S R - 118
M.mazei S E F T V S P L F A L V F G S V I A A S V H A T F A V T A T M G R C A S Q S R - 118
M.therm.(MR) N S M Q L P V I M A I A I G A V I A A M V H T T Y A V T S H M G R I V S Q S Q - 119
M.therm.(ΔH) Q S M Q L P V I M A I A V G A V I A A M V H T T Y A V T S H M G R I V S Q S Q - 119
M.jann. Q - M G L N P I L A L I L G A G V A A F V H G A Y A I S A Y L G R I V G Q S K N 119
M.kandleri T K F G L P F L A A A A V G V G V N A L I H M V F A T T A H L G R M A S A A E - 118
M.barkeri F K Q P I Y L D M I R S H I T P I M G Y A F I T T F C I L V V S Y L M T V - - - 155
M.mazei F K Q P I Y L D M I R S H T P A I M G Y A F I T T F C V L I V S Y L M T V - - - 155
M.therm.(MR) F N Q P L F M D M L V Q H L G P I A G H G F I V T F C T V G L S Y L M T L P I P 159
M.therm.(ΔH) F N Q P L F M D M L V Q H L G P I A G H G F I V T F C I V G L S Y L M T L P I P 159
M.jann. F G Q P V Y W D V V M S H L G P I V G H G F I A V F C M V L M A Y L - - - A N T 156
M.kandleri F G H P I Y L D V V L S H L G P I A G F G G I A T F A I V S L A Y I - - - Q W A 155
M.barkeri V L G H P F P L T M L A F I W G I T I G A I G S S T G D V H Y G A E R E F Q Q F 195
M.mazei V L G H P F P L T M L A F I W G I T I G A I G S S T G D V H Y G A E R E F Q Q F 195
M.therm.(MR) G F A H P F P L P L L A V L W G I T I G A I G S S T G D V H Y G A E R E Y Q Q Y 199
M.therm.(ΔH) G F A H P F P L P L L A V L W G I T I G A I G S S T G D V H Y G A E R E Y Q Q Y 199
M.jann. I L G N P F P L P L I A L I F G I T V G A I G S S T G D V H Y G A E R E Y Q K Y 196
M.kandleri L L K H P F P L P L L A A L W G V T V G A I G S S T G D V H Y G A E R L Y Q H Y 195
M.barkeri E F G S G L N A S N S G N I V R Y A E S G L R D G F D N S W F C A K F G G P V T 235
M.mazei E F G S G L N A S N S G N I V R Y A E S G L R N G F D N S W F C S K F G G P T T 235
M.therm.(MR) P F G G G I P V A I H G D I T T K A E L G A R N S M D V V H F C A K Y G G P L T 239
M.therm.(ΔH) P F G G G I P V A I H G D I T T K A E L G A R N S M D V V H F C A K Y G G P L T 239
M.jann. P F G G G V P V A N H G D I D I K A E Y G L R N G M D S S Y F C S R L G G V L T 236
M.kandleri P F G G G V P V A A H G N I T R K A E T G I R N S M D S V Y F C A K F G N P L T 235
M.barkeri G L A F G M T V F L G S W I T T I F D P A K G - - - - - - L - - G W L S V I A G 267
M.mazei G I A F G M T V F L G S W I T T I F D P A Q G - - - - - - L S M G W L S V I A G 269
M.therm.(MR) G F A F G A I V F L S F W N T I V F G I T G G - - - - - - - - - - - - I I S G 266
M.therm.(ΔH) G F A F G A I V F L S F W N T I V F G I T G G - - - - - - - - - - - - I I S G 266
M.jann. G L C F G L I V F L D G W R G V L G D I L K G G Q G G S V I T A S I I S I V I G 276
M.kandleri G L C F G L V V F F S T W A G L F - - - - - - G Q W G A V I A M G L V T L G C - 268
M.barkeri I V I V F I L I I W N W K M E V Y A R K A Y G P Y K E D K T E E A S A 303
M.mazei V I I V L I L I I W N W K I E V Q A R K A Y G P Y K E D K A E E A S - A 304
M.therm.(MR) L I I V L L L I I L N N R L E V F A R N R Y G P Y K E E E 296
M.therm.(ΔH) L I I V L L L I I L N N R L E V F A R N R Y G P Y K E D E - - - - - - - - Y 296
M.jann. L I I V A I L A I I N R K V E V F A R N K Y G P Y T K 304
M.kandleri - - - - - - - L I V S N R V E K K A R E S Y G T Y E D V E M D E I C D P V 299

MtrH

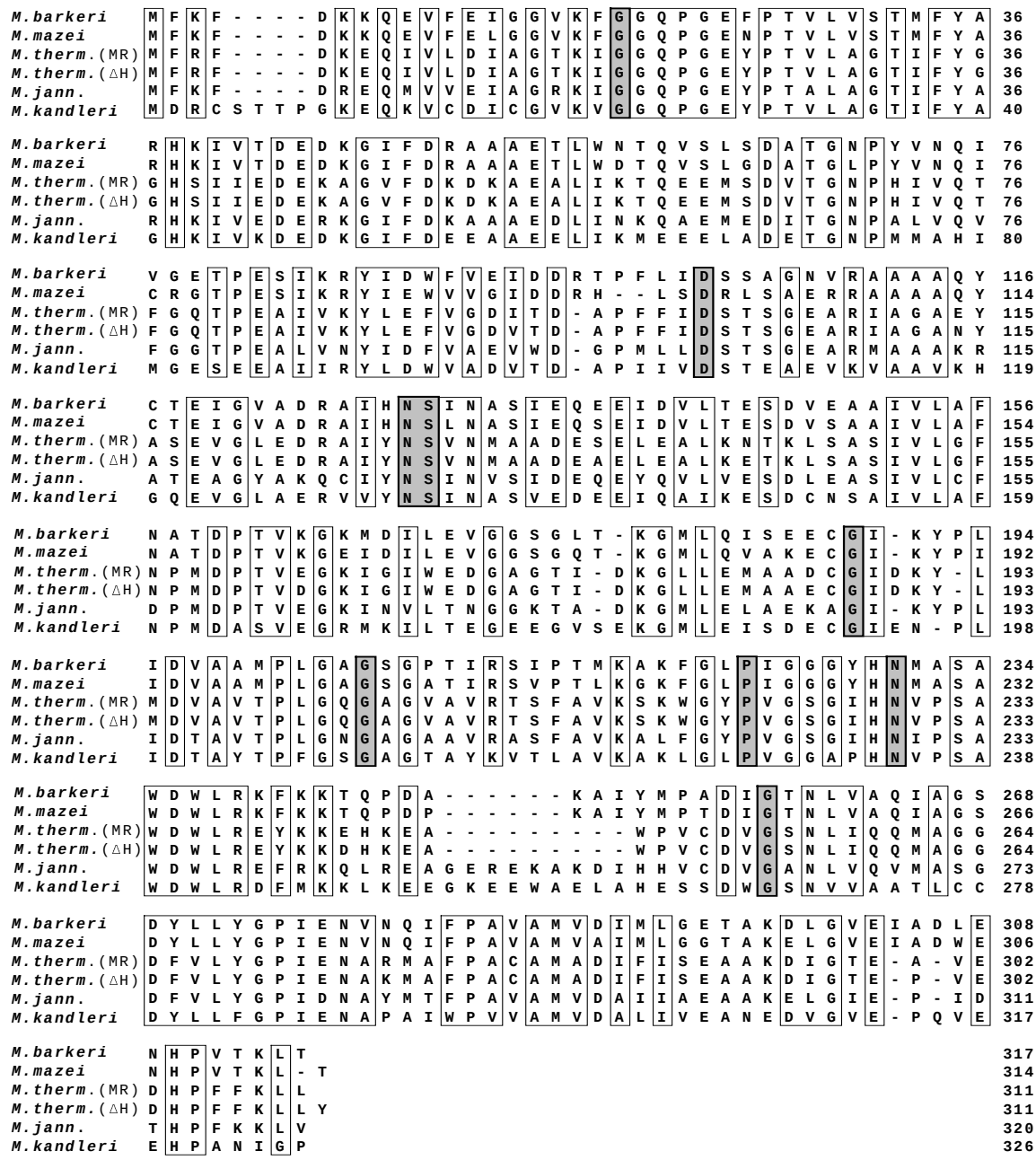


Abb. 15: Vergleich der aus der DNA-Sequenz abgeleiteten Proteinprimärstrukturen verschiedener methanogener Archaea. Identische und chemisch äquivalente Aminosäuren sind schwarz umrandet. Grau unterlegt sind die Aminosäurereste, die in der Diskussion in Zusammenhang mit einem putativen Zinkbindemotiv erwähnt werden. Eine Ausnahme ist der Sequenzvergleich der MtrH-Untereinheiten. Darin sind die Aminosäurereste grau unterlegt, die im Vergleich mit den putativen Methyltetrahydrofolatbindedomänen der MetH-Proteine (Abb. 16), identisch sind. *M. therm.* (MR): *Methanobacterium thermoautotrophicum* Stamm Marburg, . *M. therm.* (ΔH): *Methanobacterium thermoautotrophicum* Stamm ΔH, *M. mazei*: *Methanosarcina mazei* Stamm Gö1, *M. barkeri*: *Methanosarcina barkei* Stamm Fusaro, *M. kandleri*: *Methanopyrus kandleri*, *M. jannaschii*: *Methanococcus jannaschii*. Der Aminosäuresequenzvergleich wurde mit dem Lasergene-Computerprogramm DNA Star (London, England) unter Verwendung der Clustal-Methode durchgeführt.

2.3 Heterologe Expression von *mtrH* aus *M. barkeri* in *E. coli*

Es ist anzunehmen, daß MtrH-Proteine aus verschiedenen Archaea die gleiche katalytische Funktion besitzen, weil sie sehr ähnliche Eigenschaften aufweisen (Tabelle 9, Ergebnisse 3). Mit einer Expression des *M. barkeri mtrH*-Gens, aus der ein aktives Protein resultiert, könnte folglich die Funktion der MtrH-Untereinheit nachgewiesen werden. Sowohl *M. barkeri* als auch *E. coli* sind mesophile Organismen mit einer Wachstumstemperatur von 37 °C. Die Vermutung liegt nahe, daß sich diese Tatsache positiv auf die Faltung eines überproduzierten Proteins auswirken könnte.

Das *mtrH*-Gen aus *M. barkeri* wurde in den Vektor pET17b kloniert (Material und Methoden 3.11) und in *E. coli* exprimiert. Das Resultat war unlösliches MtrH-Protein, das vermutlich nicht in nativer Form gefaltet war (vgl. 1.3.1). Dementsprechend konnten keine katalytischen Methyltransferaseaktivitäten gemessen werden.

3 Analyse der Primärstruktur als Hinweis auf die Funktion der Untereinheit MtrH

Die bisher geschilderten Ergebnisse zeigten, daß die Untereinheit MtrH der energiekonservierenden Methyltransferase aus dem MtrA-H-Komplex die Bindedomäne für CH_3-H_4MPT enthält (Ergebnisse 1.2.3) und die Methylierung von freiem Cob(I)alamin *in vitro* und des proteingebundenen Corrinoids *in vivo* katalysieren muß. Diese Folgerungen wurden, wie in der Einleitung bereits angedeutet, von Ergebnissen aus Aminosäuresequenzvergleichen mit dem AcsE-Protein aus *Clostridium thermoaceticum*, dem CmuB-Protein aus *Methylobacterium* sp. Stamm CM4 und der CH_3-H_4F-Bindestelle des MetH-Proteins aus *E. coli* unterstützt. Die Ergebnisse der Primärstrukturvergleiche werden im folgenden präsentiert.

Vorangehend soll der MtrH-Sequenzvergleich aus Abbildung 15 anhand einiger Zahlenwerte dokumentiert werden. Aus den Daten in Tabelle 9 läßt sich entnehmen, daß die molekularen Massen der Enzyme aus den verschiedenen methanogenen Archaea nahezu identisch sind. Auch die Sequenzidentität auf der Ebene der Aminosäuren ist zwischen den mesophilen Archaea *M. barkeri* und *M. mazei*, den thermophilen Archaea *M. thermoautotrophicum* und *M. jannaschii* und dem hyperthermophilen Archaeon *M. kandleri* sehr hoch. Die Unterschiede bezüglich der Aminosäurezusammensetzung, des isoelektrischen Punkts, der Ladung bei einem pH-Wert von 7 und der Hydrophobizität sind gering. Aufgrund dieser Eigenschaften ist zu vermuten, daß die MtrH-Untereinheiten aus verschiedenen Archaea auch auf katalytischer Ebene miteinander vergleichbar sind.

Tab. 9: Eigenschaften der MtrH-Untereinheiten aus verschiedenen methanogenen Archaea. Die Werte wurden mit Hilfe des Lasergene-Computerprogramms DNA Star, (London, England) verwendet. Die Hydrophobizitäten der Proteinmoleküle entsprechen der Summe der Aminosäurehydropathien nach Kyte und Doolittle (1982) mit einem „span setting“ von 9.

Organismus	Molekulare Masse (kDa)	Aminosäure-identität (%)	Anzahl saurer Aminosäuren	Anzahl basischer Aminosäuren	Isoelektrischer Punkt	Ladung bei pH7	Hydrophobizität
M. thermoautotro-phicum (Marburg)	33,5	100	49	25	4,34	-23,30	+25,5
M. thermoautotro-phicum (ΔH)	33,6	97	49	25	4,33	-23,30	+25,9
M. kandleri	35,0	50	63	24	4,16	-38,21	+46,5
M. jannaschii	34,6	63	47	31	4,70	-15,3	+19,9
M. mazei	33,9	49	39	30	5,08	-8,32	+24,2
M. barkeri	34,3	51	43	27	4,55	-15.45	+13,0

Für eine bessere Übersichtlichkeit in Vergleichen mit anderen Proteinen wurden zunächst die Sequenzen aller MtrH-Proteine (Abb. 15) zu einer gemeinsamen Konsensussequenz zusammengefaßt, die bei schwach konservierten Aminosäuren der Mehrheit der übereinstimmenden Aminosäuren entsprach.

Analog wurde mit den Aminosäuresequenzen der jeweiligen putativen CH_3-H_4F-Bindedomäne der MetH-Proteine von *Escherichia coli* (Banerjee *et al*., 1989), *Pseudomonas putida* (Holtwick *et al*., 1997), *Mycobacterium tuberculosis* (Cole *et al*., 1998), *Mycobacterium leprae* (Smith, 1994), *Synechocystis* species (Kaneko *et al*., 1996), *Caenorhabditis elegans* (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998), *Rattus norvegicus* (Yamada *et al.*, 1998) und *Homo sapiens* (Li *et al*., 1996) verfahren. Die Sequenzen wurden zunächst miteinander verglichen, indem die Festlegung der putativen Bindedomänen unter Verwendung des Blast-Algorithmus (Altschul *et al.*, 1990) erfolgte, indem die putative CH_3-H_4F-Bindedomäne von MetH aus *E. coli* als Vorlage diente. Tabelle 10 zeigt die ausgewählten Aminosäuresequenzbereiche der vollständigen MetH-Sequenzen und Abb. 16 den Aminosäuresequenzvergleich. Die ermittelten Sequenzidentitäten sind mit 32-90 % in Anbetracht der Unterschiedlichkeiten der Organismen relativ hoch.

Tab. 10: Aminosäuresequenzbereiche für die angenommenen Methyltetrahydrofolatbindestellen. Die Sequenzbereiche wurden unter Verwendung des Blast-Algorithmus (Altschul *et al.*, 1990) anhand der bekannten putativen Methyltetrahydrofolatbindestelle von MetH aus *E. coli* ermittelt.

Organismus	Anzahl der Aminosäuren von MetH	Anfang der putativen Bindestelle	Ende der putativen Bindestelle
E. coli	1227	354	649
P. putida	607	357	607
M. tuberculosis	1192	346	625
M. leprae	1183	331	610
Synechocystis sp.	1195	340	626
C. elegans	1249	360	650
R. norvegicus	1253	359	656
H. sapiens	1265	371	651

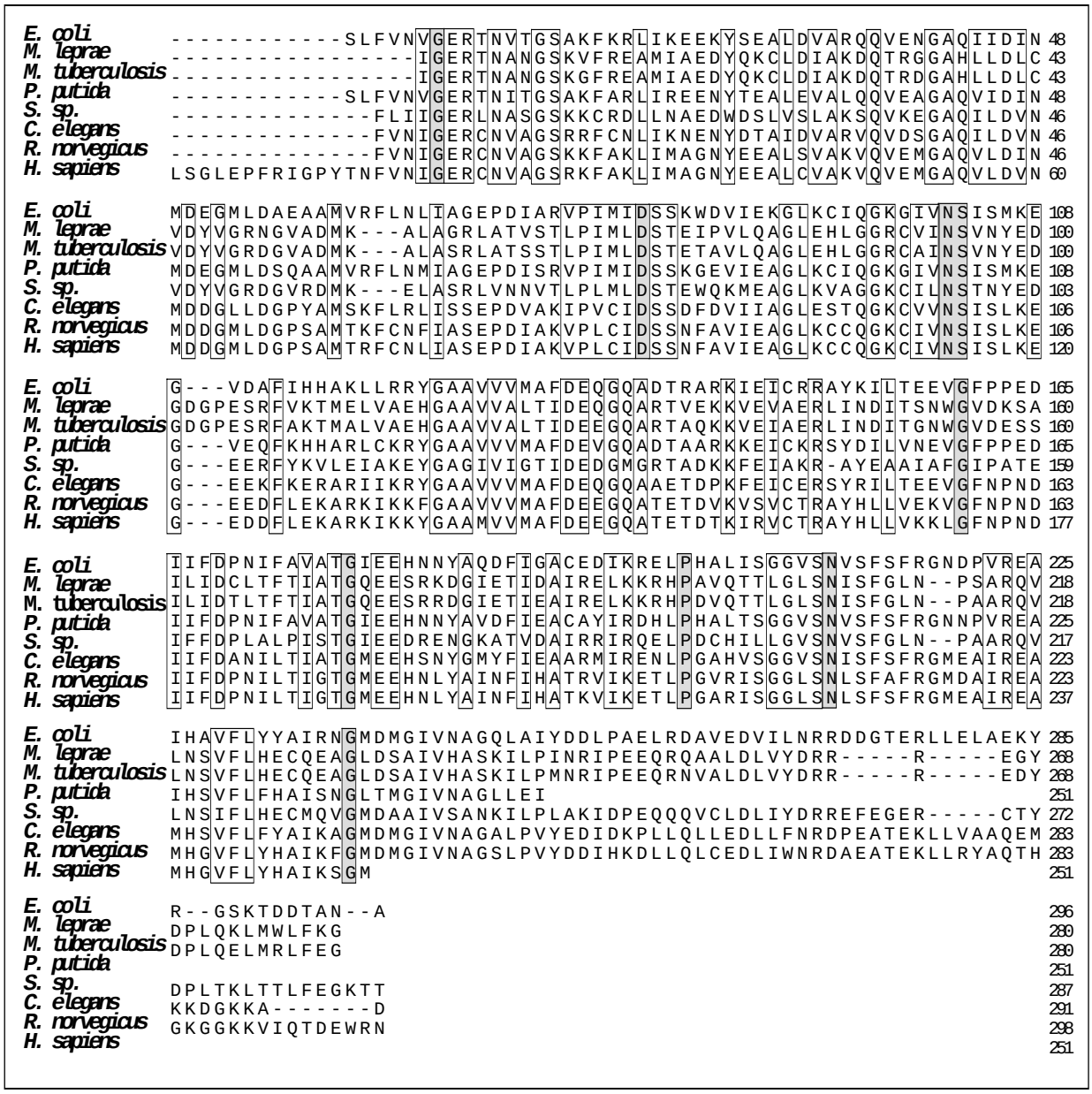


Abb. 16: Sequenzvergleich von putativen Methyltetrahydrofolatbindedomänen der cobalaminabhängigen Methionin-Synthase MetH verschiedener Organismen. Identische und chemisch äquivalente Aminosäuren sind umrandet. Grau unterlegt sind die Aminosäuren, die in allen genannten Organismen auch im Vergleich mit den MtrH-Proteinen (Abb. 15) identisch sind. *E. coli*: *Escherichia coli*, *M. leprae*: *Mycobacterium leprae*, *M. tuberculosis*: *Mycobacterium tuberculosis*, *P. putida*: *Pseudomonas putida*, *S. sp.*: *Synechocystis* species, *C. elegans*: *Caenorhabditis elegans*, *R. norvegicus*: *Rattus norvegicus*, *H. sapiens*: *Homo sapiens*. Der Aminosäuresequenzvergleich wurde mit dem Lasergene-Computerprogramm DNA Star (London, England) unter Verwendung der Clustal-Methode durchgeführt.

Der Vergleich der MtrH-Konsensussequenz mit AcsE, CmuB und der MetH-Konsensussequenz ist in Abbildung 17 gezeigt.

A

```
MtrH  M F K F D K E Q I V L D I A G V K I G G Q P G E Y P T V L A G T I F Y A G H K I  40
AcsE  M L - - - - - - - - - - I I G E R I N G - - - - - - - - - - - - M F G D I K R  17

MtrH  V E D E K G I F D K A A A E A L I K T Q E E L S D A T G N P H V V Q I F G G T P  80
AcsE  A I Q E R - - - D P A P V Q E W A R R Q E E G G A R A L D L N V G P A V Q D K V  54

MtrH  E A I V R Y L D F V G D V T D A P F L I D S T S G E A R A A A A K Y A T E V G L 120
AcsE  S A M E W L V E V T Q E V S N L T L C L D S T N I K A I E A G L K K C K - - - - 90

MtrH  A D R A I Y N S I N A S I D E S E - I D A L K E S D L S A A I V L A F N P M D P 159
AcsE  - N R A M I N S T N A E R E K V E K L F P L A V E H G A A L I G L T M N - - - - 125

MtrH  T V E G K I G I L E V G G G G I D K G M L E I A A E C G I K Y P L I D V A V T P 199
AcsE  - - - - K T G I P K D S D T R L A F A M E L V A A A D E F G L P M E D L Y I D P 161

MtrH  L G A G A G A A V R S S F A V K A K F G L P V G G G I H N V P S A W D W L R E F 239
AcsE  L I - - - - - - - - - - - - - - - - - - L P A N V A Q D H A P E V L K T L Q Q I 183

MtrH  K K T L K E A - K A I H M V C D V G S N L V A Q M A G G D F V L Y G P I E N A N 278
AcsE  K M L A D P A P K T V L G L S N V S Q N C Q N R P L I N R T F L A M A M A C G L 223

MtrH  M I F P A V A M V D I F I G E A A K D - - L G V E A V E D H P F T K L L         312
AcsE  M S A I A D A C D E A L I E T A A T A E I L L N Q T V Y C D S F V K M F K T R   262
```

B

```
MtrH  M F K F D K E Q I V L D I A G V K I G G Q P G E Y P T V L A G T I F Y A G H K I  40
CmuB  M N K Y H E - - - - I N L G K V S I G G P L G A R T G M L V G S I F Y D K H S I  36

MtrH  V E D E - K G I F D K A A A E A L I K T Q E E L S D A T G N P H V V Q I F G G T  79
CmuB  V S D A F A G T F D E E R A A K L I T R V N D T H A K Y G M Q M A F D V I A A S  76

MtrH  P E A I V R Y L D F V G D V T D A P F L I D S T S G E A R A A A A K Y A T E V G 119
CmuB  G E A M D K F L R F V S A R T D L P M M I N A T E G D A R V Q G L E T A A E L G 116

MtrH  L A D R A I Y N S I N A S I D E S E I D A L K E S D L S A A I V L A F N P M D P 159
CmuB  I L D R C I Y A S L N E D T E E F E I E A L K K H K P G A V M I L A Y D V A D P 156

MtrH  T V E G K I G I L E V G G G G I D K G M L E I A A E C G I K Y P L I D V A V T P 199
CmuB  T P E G T V A M I E - - - - N V F R P M L D A I - - - G V E A P I V D C G V M D 189

MtrH  L G A G A G A A V R S S F A V K A K F G L P V G G G I H N V P S A W D W L R E F 239
CmuB  - P P S I G I T N R A I K L V R E T Y G Y P A G G A V A N C F P Q W T G L K D L 228

MtrH  K K T L K E A K A I H M V C D V G S N L V A - Q M A G G D F V L Y G P I E N A N 278
CmuB  G K D F V N L S - - - - - - - L G A S L L S I R F H G G D F L H Y G L V E R T V 261

MtrH  M I F P A V A M V D I F I G E A A K D L G V E A V - - - - - - - - - - - - - - - 303
CmuB  P A A H A V A S G E V F L G F A A Q E L D G H T L P R P H P V L S M F K L A V P 301

MtrH  - E D H P F T K L L                                                         312
CmuB  A T G P A A V A A E                                                         311
```

C

Abb. 17: Aminosäuresequenzvergleich der Konsensussequenz der MtrH-Proteine mit anderen Proteinen. MtrH repräsentiert die Konsensussequenz aus sechs MtrH-Sequenzen (siehe Text). (A) Vergleich mit AcsE aus *Clostridium thermoaceticum*; (B) Vergleich mit CmuB aus *Methylobacterium* species Stamm CM4; (C) Vergleich mit der Konsensussequenz der putativen CH_3-H_4F-Bindestellen der MetH-Proteine aus acht Organismen (siehe Text). Identische und chemisch ähnliche Aminosäuren sind umrandet. Grau unterlegt sind Aminosäuren, die in allen 14 MtrH- bzw. MetH-Sequenzen identisch sind. Der Aminosäuresequenzvergleich wurde mit dem Lasergene-Computerprogramm DNA Star (London, England) unter Verwendung der Clustal-Methode durchgeführt.

Die Konsensussequenzen von MtrH und MetH (Abb. 17C) weisen eine Identität von 21,3 % und eine Ähnlichkeit von 37,3 % zueinander auf. Die 9 hoch konservierten Aminosäuren, die in den 14 verglichenen Sequenzen vorkommen, sind möglicherweise ein Hinweis auf ein ähnliches oder gemeinsames Pterinderivat-Bindemotiv. Der Vergleich von AcsE und

MtrH (Abb. 17A) ergibt eine Identität von 21 % und eine Ähnlichkeit von 36 %, während 30 % Identität und 50 % Ähnlichkeit im Vergleich von CmuB und MtrH (Abb. 17B) ermittelt wurden. In den beiden zuletzt genannten Sequenzvergleichen findet sich nur ein Teil der 9 konservierten Aminosäurereste aus MtrH und MetH wieder. Dazu findet sich eine nähere Erläuterung in der Diskussion. Insgesamt sind aber die Ähnlichkeiten dieser Enzyme so hoch, daß zumindest auf eine vergleichbare katalytische Funktion geschlossen werden kann.

4 MtrE aus *M. thermoautotrophicum*

In der Einleitung wurde bereits erwähnt, daß für die Untereinheit MtrE des energiekonservierenden Methyltransferasekomplexes aufgrund ihrer Größe und weniger stark ausgeprägten hydrophoben Eigenschaften die Funktion als Katalysator der Methylierung von Coenzym M aus Methylcob(I)alamin postuliert wurde.

4.1 Versuch der Reinigung von MtrE aus *M. thermoautotrophicum*

Versuche mit *Methanobacterium bryantii* haben gezeigt, daß es ein Enzym in der löslichen Fraktion des zellfreien Extrakts gibt, das die Methylierung von Coenzym M mit Methylcobalamin als Methylgruppendonor katalysiert (Taylor und Wolfe, 1974). Folglich war es nicht unwahrscheinlich, daß diese Aktivität auch im löslichen Teil zellfreier Extrakte aus *M. thermoautotrophicum* nachweisbar ist. Diese Aktivität könnte von der MtrE-Untereinheit herrühren, falls sie wirklich die Demethylierung des Corrinoids unter Bildung von Methylcoenzym M katalysiert.

Tatsächlich konnte im Überstand nach einer Ultrazentrifugation des zellfreien Extrakts aus *M. thermoautotrophicum* eine Aktivität von etwa 10 mU/mg Protein nachgewiesen werden.

Zur Reinigung des MtrE-Proteins aus dem Zentrifugationsüberstand wurden verschiedene Methoden angewendet (Material und Methoden 4.1.2). Erster Reinigungsschritt in einem Teil der durchgeführten Versuche war eine Proteinfällung mit Ammoniumsulfat. Die MT2-Aktivität konnte nach anschließender Ultrazentrifugation im Zentrifugationssediment

detektiert werden (Spezifische Aktivität: 1-10 mU/mg). Das Sediment wurde in Puffer resuspendiert und verschiedene säulenchromatographische Trennverfahren angeschlossen. Eine Auflistung von angewendeten Reinigungsstrategien befindet sich unter den Punkten 1.-5. In der anschließenden Tabelle 11 sind verwendete Säulenmaterialien und deren Trennprinzipien aufgeführt.

1.) $(NH_4)_2SO_4$-Fällung → Phenylsepharose → MonoQ
2.) $(NH_4)_2SO_4$-Fällung → Phenylsepharose → Hydroxylapatit → MonoQ
3.) $(NH_4)_2SO_4$-Fällung → Phenylsepharose → Q-Sepharose
4.) DEAE-Sepharose → Mono Q→Superose 6→ Phenylsepharose
5.) DEAE-Sepharose→ Q-Sepharose

Tab. 11: Verwendete Säulenmaterialien und deren Trennprinzipien für die FPLC.

Säulenmaterial	Trennprinzip
DEAE-Sepharose	Anionenaustauschchromatographie
Q-Sepharose	Anionenaustauschchromatographie
MonoQ	Anionenaustauschchromatographie
Phenylsepharose	Hydrophobe Interaktionschromatographie
Hydroxylapatit	Affinitätschromatographie
Superose 6	Gelfiltrationschromatographie

Die einzelnen Schritte wurden außerdem durch unterschiedliche Salzgradienten (linear oder stufig) oder durch die Wiederholung eines Schritts mit den enzymatisch aktiven Fraktionen in sich variiert.

Im Laufe der einzelnen Reinigungsschritte konnten spezifische MT2-Aktivitäten von maximal 100 mU/mg gemessen werden. Analysen der jeweiligen Proteinzusammensetzung durch SDS-Gelelektrophorese ergaben allerdings keinen deutlichen Hinweis auf eine Anreicherung des 28 kDa Proteins MtrE oder eines anderen Proteins, das diese katalytische Fähig-

keit besitzt. Am jeweils angegebenen letzten Schritt der Reinigungsstrategien stand der Verlust jeglicher MT2-Aktivität.

4.2 Versuch der Überexpression von *mtrE* in *E. coli*

Einen anderen Ansatz, die katalytische Funktion des MtrE-Proteins aufzuklären, bot die heterologe Überexpression des *mtrE*-Gens in *E. coli*. Das Gen wurde in verschiedene Expressionsvektoren kloniert (Material und Methoden 3.8). Zunächst sollte das MtrE-Protein als eine Fusion mit dem Maltosebindeprotein in *E. coli* überproduziert werden. Aber weder bei Induktion mit verschiedenen IPTG-Konzentrationen (0.1 mM und 0,3 mM) noch bei verschiedenen Wachstumstemperaturen (30 °C und 37 °C) oder verlängerten Induktionszeiten (1 bis 4,5 Stunden) wurde das Protein sichtbar überproduziert (Abb. 18).

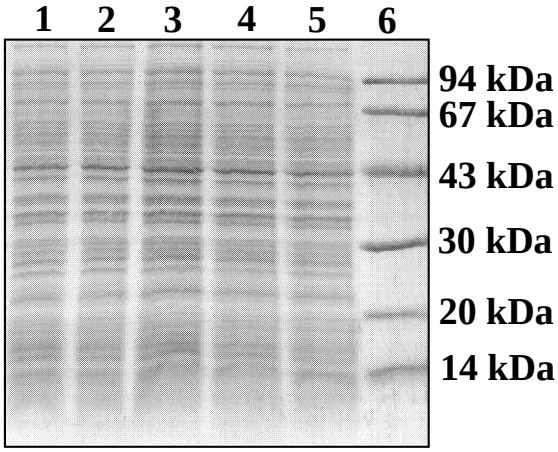


Abb. 18: SDS/PAGE-Analyse der Überproduktion von MtrE als Fusion mit dem Maltosebindeprotein in *E. coli*. Zur Analyse wurde ein 15 %iges Polyacrylamidgel verwendet, das nach der Elektrophorese mit Coomassie®-Brillantblau R250 gefärbt wurde (Material und Methoden 5.1). Spur 1: Proteinextrakt uninduzierter *E. coli*-Zellen; Spur 2: mit 0,1 mM IPTG induzierte Zellen nach 1 h; Spur 3: mit 0,3 M IPTG induzierte Zellen nach 1 h; Spur 4: mit 0,1 mM IPTG induzierte Zellen nach 2 h; Spur 5: mit 0,3 mM IPTG induzierte Zellen nach 2 h.

Da das Protein möglicherweise in nur geringen Mengen produziert worden sein könnte, wurde der gewonnene zellfreie Extrakt über eine Amyloseharz-Säule gereinigt. Es wurde allerdings kein Protein mit der erwarteten molekularen Masse der MtrE-Maltosebindeprotein-Fusion von der Säule eluiert.

Um die Kopplung mit einem Fusionsprotein zu vermeiden, wurde das *mtrE*-Gen mit einem 6 x His-Tag kloniert. Wieder ergab die SDS-Gelanalyse kein sichtbar überproduziertes Protein (Ergebnis nicht gezeigt). Trotzdem wurde versucht, das Protein unter Verwendung einer Nickel-Agarosesäule zu reinigen. Es hatte zwar unter anderem ein Protein mit der molekularen Masse von etwa 28 kDa am Säulenmaterial gebunden, allerdings konnte keine MT2-Aktivität nachgewiesen werden.

Als dritte Variante für ein Expressionssystem wurde die Überproduktion von MtrE als Fusion mit dem Calmodulinbindeprotein gewählt. Doch auch hierbei konnten keine Hinweise darauf gefunden werden, daß MtrE überproduziert werden kann oder die Demethylierung von Methylcobalamin unter der Bildung von Methylcoenzym M katalysiert.

VI. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Ergebnisse zur Funktionsermittlung der beiden Untereinheiten MtrH und MtrE des energiekonservierenden N^5-Methyltetrahydromethanopterin:Coenzym-M-Methyltransferasekomplexes aus *M. thermoautotrophicum* und anderer methanogener Archaea vorgestellt. Im folgenden sollen Funktion und Struktur der Untereinheit MtrH als N^5-Methyltetrahydromethanopterin:Cob(I)alamin-Methyltransferase und der Untereinheit MtrE als Methylcob(III)alamin:Coenzym-M-Methyltransferase basierend auf den erzielten Ergebnissen und Analysen der Primärstruktur diskutiert werden. Dazu werden zum einen Vergleiche zur Topologie und Eigenschaften aller anderen Mtr-Untereinheiten und Vergleiche mit der Primärstruktur anderer Enzyme im Hinblick auf ihre mögliche Funktion bzw. als essentieller Bestandteil für die Natriumionentranslokation herangezogen. Abschließend soll diese Diskussion zur Erstellung eines neuen topologischen Enzymmodells führen.

1 Topologische Struktur der acht Untereinheiten MtrA-H des Methyltransferasekomplexes aus *M. thermoautotrophicum*

Wie bereits einleitend erwähnt, spielt die N^5-Methyltetrahydromethanopterin:Coenzym-M-Methyltransferase eine wichtige Rolle im Energiemetabolismus methanogener Archaea. Das Enzym ist mit einer Energiekonservierung durch ein elektrochemisches Na^+-Potential über die Cytoplasmamembran gekoppelt. Deshalb muß der Enzymkomplex notwendigerweise zumindest zum Teil ein integraler Membranbestandteil sein. Basierend auf den bekannten Primärstrukturen der einzelnen Untereinheiten war es möglich, durch Anwendung eines Computerprogramms Voraussagen über die Existenz von transmembranen Helices zu machen (Methode nach Sonnhammer *et al*., 1998). Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 zusammengestellt. Für diese Darstellungsform wurde weder die Größe der Untereinheiten maßstabsgetreu angegeben noch ihre Lage zueinander berücksichtigt. Das Modell soll lediglich aufzeigen, ob und wieviele transmembrane Helices die Untereinheiten besitzen. Es zeigt sich, daß die Untereinheiten MtrA, MtrB, MtrF und MtrG jeweils durch eine transmembrane Helix in der Membran verankert sind. Die Untereinheiten MtrC, MtrD und MtrE sind integrale Membranproteine mit 6 (MtrD und MtrE) bzw. 7 (MtrC) transmembranen Helices.

Allerdings trifft das Computerprogramm keine sicheren Aussagen über die Lage der restlichen Teile der Proteine, so daß deren Zuordnung zum Cytoplasma nicht als Absolutposition gesehen werden darf. Die Zuordnung der Proteintermini und Loops zur cytoplasmatischen Seite hin erfolgte, soweit möglich, anhand der “positive inside rule” nach von Heijne (1992).

Bei diesem Vergleich wird der Unterschied der Untereinheit MtrH zu allen anderen Untereinheiten sehr stark deutlich. Sie besitzt keine transmembrane Helix und kann somit als cytoplasmatisch lokalisiertes Protein betrachtet werden. Dies korreliert gut mit den Proteineigenschaften, die in den Tabellen 7,8 und 9 aufgeführt sind.

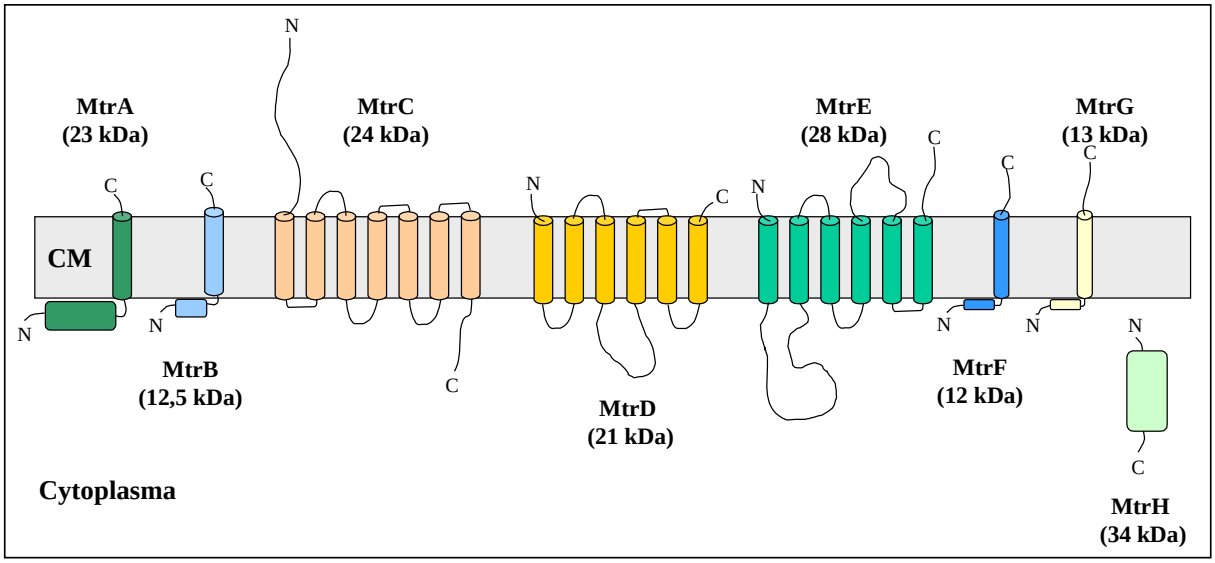


Abb. 19. Topologie der acht Untereinheiten MtrA-H. Zur Erstellung dieses Modells wurde das Programm TMHMM1.0 verwendet (Prediction Server, Center for Biological Sequence analysis (CBS)). Die cytoplasmatischen Helices und Loops entsprechen in dieser Darstellung relativ zu den Membranhelices nicht ihrer tatsächlichen Größe. Abkürzungen: CM, Cytoplasmamembran; C, *C*-terminales Ende; N, *N*-terminales Ende.

2 Die katalytische Funktion der Untereinheit MtrH

In Kapitel 1 des Ergebnisteils dieser Arbeit wurde gezeigt, daß die Untereinheit MtrH vom übrigen Komplex aus *M. thermoautotrophicum* abgetrennt werden konnte, während alle anderen Untereinheiten als MtrA-G-Komplex fest miteinander verbunden blieben. Diese Beobachtung steht im Einklang mit dem Befund des topologischen Modells der MtrA-H-

Proteins (Abb. 19). Dort ist MtrH die einzige Untereinheit, die keine transmembranen Helices besitzt und damit einen stark hydrophilen Charakter aufweist. Dies stützt außerdem die berechnete Hydrophobizität von MtrH im Vergleich zu den anderer Untereinheiten aus *M. barkeri* (Tab. 7). Diese Eigenschaft ist vermutlich auf alle bekannten MtrH-Untereinheiten verschiedener methanogener Archaea übertragbar. Ihre Ähnlichkeit konnte anhand von Aminosäuresequenzvergleichen und tabellarischen Daten gezeigt werden (Abb. 15; Tab. 8, Tab. 9).

Die vom Komplex separierte Untereinheit MtrH zeigte N^5-Methyltetrahydromethanopterin:Cob(I)alamin-Methyltransferaseaktivität, während der Restkomplex die Fähigkeit zur Katalyse dieser Reaktion nach Abtrennung der MtrH-Untereinheit verloren hatte (Ergebnisse 1.2.3). Dies kann nur in sofern interpretiert werden, daß MtrH für die Katalyse dieser Methyltransferreaktion essentiell ist. Allerdings konnte eine Verunreinigung der MtrH-Präparation mit noch geringen Mengen anderer Mtr-Untereinheiten nicht ausgeschlossen werden. Folglich ist eine Aussage darüber, ob MtrH gänzlich ohne Mitwirkung der anderen Untereinheiten zur Katalyse der Reaktion befähigt ist oder den Kontakt zu mindestens einer der anderen Untereinheiten braucht, nicht mit letzter Sicherheit machbar. Ein Beispiel für einen solchen kooperativen Effekt weist ein anderes Corrinoidprotein, die Methanol:Coenzym-M-Methyltransferase aus *Methanosarcina barkeri* auf. Dieses Enzymsystem besteht aus den Untereinheiten MtaA, MtaB und MtaC, wobei die letztgenannte die prosthetische Gruppe trägt (Sauer *et al*., 1997). Das Corrinoid wird durch MtaB ausgehend von Methanol methyliert, während MtaA die Demethylierung der prosthetischen Gruppe katalysiert. Für MtaB konnte gezeigt werden, daß dessen Aktivität durch Zugabe von MtaA um ein Vielfaches gesteigert wird, während die MtaA-Aktivität in Anwesenheit von MtaB und Methanol stimuliert wird (Sauer und Thauer, 1999).

Eine endgültige Aussage über die alleinige katalytische Funktion von MtrH im Methylguppentransfer von CH_3-H_4MPT auf Cob(I)alamin hätte nur durch die Überproduktion von aktivem MtrH-Protein in einem Organismus, der keine Enzyme mit dieser katalytischen Fähigkeit besitzt, erfolgen können. Es gibt zwei Erklärungsansätze, warum dies nicht gelang. Eine Möglichkeit ist, daß MtrH tatsächlich nicht alleine in der Lage ist, diese katalytische Funktion auszuüben. Die andere ist, daß die großen Unterschiede zwischen Proteinen aus Archaea und Bakteria bei den Expressionsversuchen eine Rolle gespielt haben könnten.

Um dennoch die Versuche zur Funktion der Untereinheit MtrH zu unterstützen, wurden alternativ Aminosäuresequenzvergleiche mit der putativen CH_3-H_4F-Bindedomäne der cobalaminabhängigen Methionin-Synthase MetH aus *E. coli* und anderen Organismen durchgeführt, die signifikante Ähnlichkeiten zu MtrH aufweisen (Abb. 17C). Das gleiche gilt für die Sequenzvergleiche mit den Methyltransferasen AcsE aus *C. thermoaceticum* (Roberts *et al.*, 1994) (Abb. 17A) und CmuB, einem MtrH-Analogon, das kürzlich in *Methylobacterium* sp. Stamm CM4 gefunden wurde (Vannelli *et al.*, 1999) (Abb. 17B). Aus all diesen Aminosäuresequenzen konnten letztlich nur zwei konservierte Aminosäurereste herausgearbeitet werden, die in allen Sequenzvergleichen konserviert waren (S-x_n-P). Ein mögliches konserviertes gemeinsames Bindemotiv für Pterinderivate ist damit nicht sehr wahrscheinlich. Da in den Vergleichen Enzyme unterschiedlicher Stoffwechselwege betrachtet wurden, ist dies aber auch nicht zwangsläufig erforderlich.

3 Die Struktur der Untereinheit MtrE

Die Untereinheit MtrE wurde in dem in der Einleitung beschriebenen Enzymmodell (Abb. 4) als ein hydrophiles Protein dargestellt, das vollständig im Cytoplasma lokalisiert ist und den Methylgruppentransfer von Methylcob(III)alamin auf Coenzym M katalysiert (Harms, 1996). Die Lokalisation im Cytoplasma geschah aufgrund von Abschätzungen der relativen Hydrophobizitäten aus dem prozentualen Gehalt an den Aminosäuren Alanin, Isoleucin, Leucin, Tryptophan und Valin. Diese Abschätzung führt jedoch in die Irre, was der Vergleich der Werte in Tabelle 1 mit denen in Tabelle 8 zeigt. Die Berechnung der Hydrophobizitäten aus den Hydropathien der einzelnen Aminosäuren ergibt, daß MtrE ein stark hydrophobes Protein ist (Tab. 8). Die Voraussagen der Quartärstruktur besagen zudem, daß MtrE über sechs transmembrane Helices verfügt (Abb. 19).

Außerdem wurden im Rahmen dieser Arbeit Versuche durchgeführt, deren Ergebnisse zur Unterstützung der Theorie, daß MtrE ein integrales Membranprotein ist, beitragen. Zum einen ist es nicht gelungen, MtrE aus der löslichen Proteinfraktion zellfreier Extrakte aus *M. thermoautotrophicum* zu reinigen. Die anfängliche geringe Aktivität, die in der löslichen Proteinfraktion gemessen wurde, konnte von wenigen Enzymfragmenten herrühren, die während des Zellaufschlusses aus der Membran gerissen wurden. Zum anderen konnte MtrE im Gegensatz zur MtrH-Untereinheit nicht in *E. coli* überproduziert werden. Auch diese Beob-

achtung trägt zu der Annahme bei, daß es sich bei MtrE um eine membranständige Untereinheit handelt, da bei der Überproduktion von Membranenzymen aufgrund ihrer stark hydrophoben Eigenschaften häufiger Probleme auftreten.

4 Die Funktion der Untereinheit MtrE

Experimentelle Befunde zur Funktion der Untereinheit MtrE konnten bisher nicht erbracht werden. Allerdings ist es anhand der Primärstruktur dieses Proteins möglich, dessen Funktion zu diskutieren. Der erste Schritt der Übertragung einer Methylgruppe auf Coenzym M ist zunächst die Aktivierung der Thiolgruppe des Coenzyms zum Thiolat, ohne die die Transferreaktion nicht erfolgen kann (Matthews und Goulding, 1997; Hogenkamp, 1987). Es gibt eine Reihe von Arbeiten, in denen gezeigt wurde, daß Zinkionen an der Aktivierung von Thiolgruppen beteiligt sind. Dazu zählt das Ada-Protein aus *E. coli* (Myers *et al.*, 1993, 1994), die cobalaminunabhängige Methionin-Synthase MetE aus *E. coli* (González *et al*., 1996), die cobalaminabhängige Methionin-Synthase MetH aus *E. coli* (Goulding und Matthews, 1997; Peariso *et al*., 1998) und die Methanol:Coenzym-M-Methyltransferase aus *M. barkeri* (Sauer und Thauer, 1997). In Analogie zu den Reaktionen, die diese Enzyme katalysieren, kann auch ein ähnlicher Mechanismus für die energiekonservierende Methyltransferase aus *M. thermoautotrophicum* angenommen werden.

Im Zusammenhang mit einer katalytischen Funktion von Zinkionen ist eine Reihe von potentiellen Zinkbindemotiven bekannt. Zinkionen werden in Enzymen meist durch vier Liganden gebunden. In vielen Fällen sind dies Aminosäurereste, die Sauerstoff-, Stickstoff- oder Schwefelatome tragen, die über ihre freien Elektronenpaare eine Bindung mit dem Zinkion eingehen können (Vallee und Auld, 1990). Bevorzugte Aminosäuren dafür sind Aspartat, Glutamat, Cystein und Histidin in der Prioritätenfolge: His>>Glu>Asp = Cys. Neben diesen gibt es Enzyme, in denen der vierte Ligand als Wasser identifiziert werden konnte. Für die Identifikation eines Zinkbindemotivs in den Untereinheiten der Methyltransferase war es sinnvoll, den Vergleich mit oben genannten Enzymen vorzunehmen. Tabelle 12 zeigt eine Auflistung der potentiellen Zinkbindemotive vergleichbarer Enzyme.

Tab. 12: Potentielle Zinkbindemotive verschiedener Enzyme. Enzyme: MetH, cobalaminabhängige Methionin-Synthase aus *E. coli*; MetE, cobalaminunabhängige Methionin-Synthase aus *E. coli*; MtaA, MtbA, Methylcob(III)alamin:Coenzym-M-Methyltransferase (Isoenzyme) aus *M. barkeri*; MtaB, Methanol:Cob(I)alamin-Methyltransferase aus *M. barkeri*.

Enzym	**Potentielles Zinkbindemotiv**	**Literatur**
MetH	**C**^{247}-x_n-GG**C**^{310}**C**^{311}G	Goulding *et al.*, 1997; Peariso *et al.*, 1998
MetE	**H**-x-**C**-x_n-**C**	González *et al.*, 1996; Peariso *et al.*, 1998
MtaA, MtbA	**H**^{241}-x-**C**^{243}-x_n-**C**^{320}	LeClerc und Grahame, 1996
MtaB	S-x_3-**E**Vx**H**-x-Q-x_9-**H**x**E**-x_9-**H**	Sauer, 1999

Anhand der gezeigten potentiellen Zinkbindemotive wird deutlich, daß die Variationsbreite der an der Zinkbindung beteiligten Liganden sehr groß ist. Obwohl die Enzyme vergleichbare Reaktionen katalysieren, kann kein einheitliches Motiv gefunden werden. Demnach ist es nicht zu erwarten, daß ein ganz bestimmtes Motiv in einer Mtr-Untereinheit vorliegt, zumal alle genannten Methyltransferasen nicht wie die membrangebundene Methyltransferase mit Energiekonservierung gekoppelt sind. Ein auffälliges Merkmal der Motive ist, daß jeweils zwei beteiligte Aminosäurereste eng benachbart sind, während einer oder mehrere weiter entfernt liegen. Diese Beobachtung konnte auch für verschiedene andere Enzyme gemacht werden, z. B. für die Carboxypeptidasen A und B aus dem Rinderpankreas oder Thermolysine aus verschiedenen Bakterien (Vallee und Auld, 1990). Die kurzen Abstände betragen 1-3 Aminosäurereste, während die langen etwa 20 bis 120 Reste enthalten.

Die folgenden Erwägungen sollen auf ein potentielles Zinkbindemotiv in einer der acht Untereinheiten der membrangebundenen Methyltransferase und damit auf die Untereinheit hinführen, die die Methylierung von Coenzym M katalysiert.

Betrachtet man die Aminosäuresequenzvergleiche der N^5-Methyltetrahydromethanopterin:Coenzym-M-Methyltransferaseuntereinheiten verschiedener methanogener Archaea im Hinblick auf hochkonservierte Aminosäurereste, die für eine Bindung von Zinkionen in Frage

kommen, so können direkt einige Untereinheiten von der Diskussion ausgeschlossen werden (Abb. 15). Darunter fallen **MtrB** und **MtrF**, die jeweils als einzigen Aminosäurerest, der als Zinkligand in Frage kommt, einen konservierten Glutamatrest haben (Abb. 15). Aus den zuvor beschriebenen Zinkbindemotiven geht aber hervor, daß mindestens 3 Liganden zur Verfügung stehen müssen. **MtrH** kann nicht der Katalysator der MT2-Reaktion sein, weil der Enzymkomplex MtrA-G ohne MtrH den Transfer der Methylgruppe auf Coenzym M katalysiert (siehe Ergebnisteil 1.2.3).

In den **MtrG**-Sequenzen sind zwei Aspartatreste und ein Glutamatrest konserviert, die Zink binden könnten (Abb. 15). Allerdings sind die Abstände dazwischen gleich (je 11 Aminosäurereste) und insgesamt viel geringer als bei den oben erwähnten Zinkbindemotiven. Außerdem ist diese Untereinheit so klein, daß schwer vorzustellen ist, daß sie große überlappende Bereiche mit der MtrA-Untereinheit haben könnte, um die Methylgruppe von der prosthetischen Gruppe aufzunehmen und auf Coenzym M zu übertragen.

Es ist nicht auszuschließen, daß **MtrA** als Träger der prosthetischen Gruppe selbst den Methylgruppentransfer auf Coenzym M katalysiert. Z. B. besteht die Dimethylamin:Coenzym-M-Methyltransferase aus *M. barkeri* nur aus einer 50 kDa großen corrinoidtragenden Untereinheit und dem MT2-Isoenzym MtbA, einer Methylcob(III)alamin:Coenzym-M-Methyltransferase (Wassenaar *et al.*, 1998). Ein anderes Beispiel ist die Dimethylsulfid:Coenzym-M-Methyltransferase, die aus den beiden Untereinheiten MtsA (41 kDa) und dem Corrinoidprotein MtsB (30 kDa) besteht. Bei diesem Enzymsystem katalysiert MtsA sowohl die Methylierung als auch die Demethylierung des Corrinoids (Tallant und Krzycki, 1996; Tallant und Krzycki 1997, Paul und Krzycki 1996). Es müssen also nicht unbedingt drei Untereinheiten an einer solchen Zweistufenreaktion beteiligt sein. Für die Zinkbindung an MtrA kommen 8 Glutamat-, 3 Aspartat-, 2 Histidinreste und 1 Cysteinrest in Frage (Abb. 15). His-84 ist nachweislich als unterer axialer Ligand des Cobaltatoms an der Bindung der prosthetischen Gruppe beteiligt und fällt damit aus der Betrachtung heraus (Harms und Thauer, 1997; Sauer und Thauer, 1998a). Es muß außerdem erwogen werden, daß mehrere der konservierten Aminosäurereste an der Bindung des Corrinoids beteiligt sind und deshalb nicht auch noch für die Bindung eines Zinkions zur Verfügung stehen. Außerdem sind die oben erwähnten Untereinheiten, die jeweils zwei Reaktionen katalysieren, mit 41 kDa und 50 kDa wesentlich größer als MtrA (23 kDa), was ebenfalls gegen eine Doppelfunktion von MtrA spricht . Trotzdem kann aufgrund der großen Anzahl an konservierten Aminosäureresten in

der Primärstruktur von MtrA, die potentiell an der Bindung von Zink und somit an der Aktivierung von Coenzym M beteiligt sein können, nicht vollständig ausgeschlossen werden, daß MtrA als Träger der prosthetischen Gruppe auch die Katalyse des Methylgruppentransfers auf Coenzym M übernimmt.

Den Untereinheiten **MtrC**, **MtrD** und **MtrE** kommt bei der Diskussion über ein potentielles Zinkbindemotiv eine besondere Bedeutung zu, weil sie in Relation zu den anderen Untereinheiten eine größere apparente Molekularmasse besitzen und eine Reihe von berechneten transmembranen Helices aufweisen. Diese Helices sind notwendig, wenn im Zusammenhang mit der MT2-Reaktion eine Kopplung mit der Natriumionentranslokation über die Cytoplasmamembran diskutiert werden soll. Dies wird aber im folgenden noch als eigener Diskussionspunkt aufgeführt. Zur Verdeutlichung der Strukturen dieser Untereinheiten wurden toplogische Modelle anhand der Primärstruktur dargestellt (Abb. 20). In diesen Abbildungen markieren Pfeile die konservierten Aminosäurereste (vgl. Abb. 15), die möglicherweise Zinkionen binden können.

Bei der **MtrC**-Untereinheit sind dies His-185, Glu-195 und Glu-266, die auf der cytoplasmatischen Seite der Membran liegen. Der Abstand zwischen His-185 und Glu-195 ist zwar größer als die vorher beschriebenen Abstände, aber nur aufgrund dieser Tatsache sollte dieses Motiv nicht ausgeschlossen werden. Allerdings erscheint das Motiv durch die Lokalisation von Glu-195 am carboxyterminalen Ende des Proteins eher fraglich.

MtrD weist 5 potentielle Aminosäurereste für die Zinkbindung auf (Abb.15 und Abb. 20), die in zwei verschiedenen Loops positioniert sind. Wie in den meisten Fällen zuvor gilt auch hier, daß die Abstände zwischen den Resten nicht dem Muster einiger bekannter Motive entsprechen. Desweiteren sind die Loops mit einer Aminosäurekettenlänge von 34 und 20 Aminosäuren relativ klein, wodurch ein intensiver Kontakt mit der MtrA-Untereinheit möglicherweise erschwert wäre.

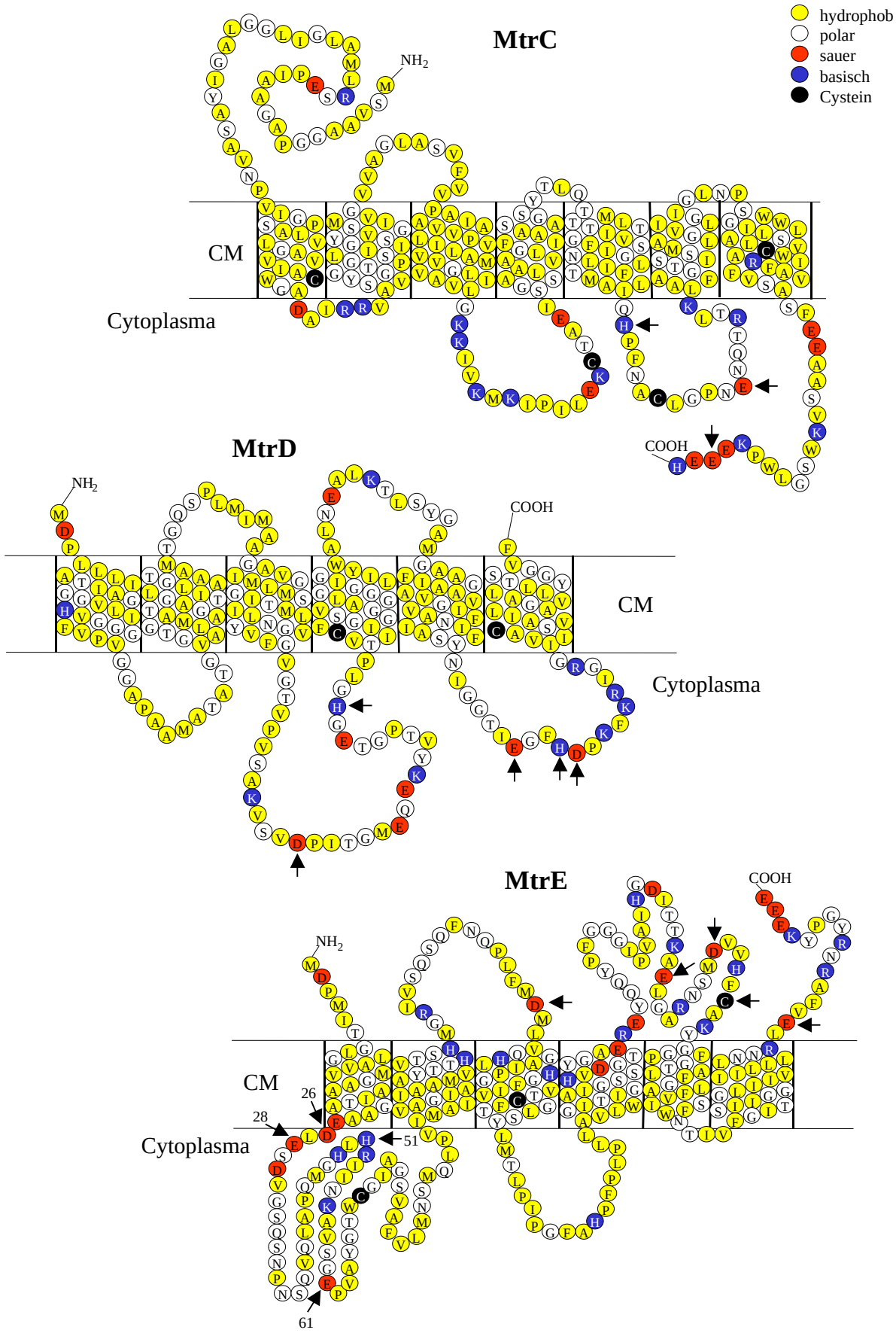


Abb. 20: Topologische Modelle der Untereinheiten MtrC, MtrD und MtrE aus *M. thermoautotrophicum*. Pfeile markieren Aminosäurereste, die im Zusammenhang mit einem Zinkbindemotiv diskutiert werden (siehe Text). CM, Cytoplasmamembran.

Das topologische Modell von **MtrE** bietet unter den bisherigen Gesichtspunkten die beste Möglichkeit, ein potentielles Zinkbindemotiv zu finden: Asp-26, Glu-28, His-51, Glu-61, Asp-127, Glu-218, Asp-226, Cys-231 und Glu-281. Diese Aminosäurereste befinden sich am *N*-terminalen bzw. *C*-terminalen Ende des Proteins in zwei verschiedenen Loops, von denen nur einer auf der cytoplasmatischen Seite der Membran liegen kann (Abb. 20). Da die Zuordnung der Aminosäuren ins Cytoplasma nur auf theoretischen Berechnungen beruht, müssen die konservierten Aminosäuren auf beiden Seiten diskutiert werden.

Unter der Annahme, daß der *C*-Terminus nicht auf der potentiellen cytoplasmatischen Seite der Membran liegt, sind 5 Aminosäurereste konserviert, von denen 3 in einem Loop zusammen vorkommen. Die Abstände dieser 3 Aminosäurereste untereinander sind jedoch relativ gering, so daß sie mit den putativen Motiven aus Tabelle 12 nicht in Einklang gebracht werden können. Es wäre aber z. B. eine Wechselwirkung mit Asp-127 oder Glu-281, die auf der gleichen Seite der Membran liegen, durchaus möglich. Demnach kann die Beteiligung dieser Reste an der Zinkbindung nicht ausgeschlossen werden.

Es stehen aber mehr Argumente zur Verfügung, die für das putative Zinkbindemotiv Asp^{26}-x-Glu^{28}-x_{22}-His^{51}-Glu^{61} im ersten, 62 Aminosäurereste umfassenden Loop, der im Cytoplasma liegt, sprechen. Auf dieser nun folgenden Argumentation basiert letztendlich auch die Darstellung dieses Loops auf der cytoplasmatischen Seite der Membran.

Erstens erfüllt dieses Motiv als Teil der MtrE-Untereinheit die Forderung nach einem kurzen und einem langen Abstand zwischen den einzelnen Resten, wie er durch Vergleiche mit ähnlichen Enzymen festgestellt wurde. Zweitens umfaßt dieser Loop 62 Aminosäurereste, die möglicherweise größere überlappende Bereiche mit dem MtrA-Protein bilden können, was zur Katalyse der Reaktion erforderlich sein sollte. Drittens wurde ein Sequenzvergleich mit zwei weiteren MtrE-Untereinheiten aus *Methanothermus fervidus* (Weil *et al.*, 1997) und *Methanococcus vannielii* (Nölling *et al.*, 1996) vorgenommen. Dieser Vergleich war bei den anderen Untereinheiten nicht möglich, weil sie aus diesen beiden Organismen noch nicht veröffentlicht sind.

Die Sequenz aus *M. vannielii* ist zwar nur zum Teil bekannt (bis Aminosäurerest 85), aber Abbildung 21 zeigt ganz deutlich, daß nur die zuvor erwähnten vier Aminosäurereste konserviert sind. Der konservierte Aspartatrest liegt in einem Loop auf der anderen Seite der Membran und kann deshalb außer acht gelassen werden.

Abb. 21: Vergleich der Aminosäuresequenzen von MtrE aus *M. thermoautotrophicum*, *M. fervidus* und einem Teil der Sequenz aus *M. vannielii*. Abkürzungen: *M. therm.* (MR), *Methanobacterium thermoautotrophicum* Stamm Marburg; *M. fervidus*, *Methanothermus fervidus*; *M. vannielii*, *Methanococcus vannielii*. Die Aminosäurereste, die konserviert sind und für die Beteiligung an der Bindung von Zinkionen in Frage kommen, sind grau unterlegt. Der Aminosäuresequenzvergleich wurde mit dem Lasergene-Computerprogramm DNA Star (London, England) unter Verwendung der Clustal-Methode durchgeführt.

Viertens konnte für eine Aminopeptidase aus *Aeromonas proteolyticus* und eine Carboxypeptidase G2 aus *Pseudomonas* sp. durch Röntgenstrukturanalyse die Beteiligung von Aspartat, Glutamat, Histidin und Wasser an der Zinkbindung nachgewiesen werden (Lipscomb und Sträter, 1996), was beweist, daß nicht zwangsläufig ein Cysteinrest zugegen sein muß, so wie es die potentiellen Motive in Tabelle 12 suggerieren.

Faßt man all diese Hinweise zusammen, so tragen sie zur Festigung der Annahme bei, daß MtrE eine Methylcob(III)alamin:Coenzym-M-Methyltransferase ist.

5 Die Natriumionentranslokation

Die Besonderheit der N^5-Methyltetrahydromethanopterin:Coenzym-M-Methyltransferase liegt in ihrer energiekonservierenden Funktion. Bereits in der Einleitung wurden einige Enzyme erwähnt, deren katalytische Funktionen ebenfalls mit Energiekonservierung durch Natriumionentranslokation gekoppelt sind. Insbesondere wurde auf die Bedeutung des Aspartatrests D-203 in einer transmembranen Helix der β-Untereinheit der Oxalacetat-Decarboxylase aus *K. pneumoniae* eingegangen, der nachweislich essentiell für den Natriumionentransport ist (Di Berardino und Dimroth, 1996). Ebenso wurden in der Glutaconyl-CoA-Decarboxylase aus *Acidaminococcus fermentans* zwei Aspartatreste (Asp-97 und Asp-145) in putativen transmembranen Helices gefunden, die in einem Aminosäuresequenzvergleich mit den jeweils Na^+-translozierenden Untereinheiten der Methylmalonyl-CoA-Decarboxylasen aus *Veillonella parvula* und *Propionigenium modestum*, der Oxalacetat-Decarboxylasen aus *Klebsiella pneumonieae* und *Salmonella typhimurium* und einem offenen Leserahmen aus *Archaeoglobus fulgidus* hoch konserviert sind. Die Mitwirkung eines dieser Aspartatreste an der Natriumionentranslokation wurde vorausgesagt, konnte aber noch nicht wie im Fall des Asp-203 der Oxalacetat-Decarboxylase aus *K. pneumoniae* experimentell durch seitenspezifische Mutagenese gezeigt werden (Braune *et al*., 1999). Ein weiteres Beispiel für die Beteiligung eines Aspartatrests am Transport positiver Ionen ist die C-Kette der ATPase aus *E. coli*. Bei diesem Enzym führte die Mutation von Asp-61 in einen Glycin- oder Asparaginrest zum Verlust der Fähigkeit zur H^+-Translokation (Hoppe und Sebald, 1984). Auch die Position 61 liegt in einer von zwei membrandurchspannenden Domänen des Enzyms.

Die Untereinheit MtrE der in dieser Arbeit untersuchten energiekonservierenden Methyltransferase trägt als einzige Untereinheit des Enzymkomplexes einen Aspartatrest (Asp-187) in einer der sechs kalkulierten transmembranen Helices (Abb. 20). Unter Berücksichtigung der zuvor geschilderten Erkenntnisse könnte eine Beteiligung dieser Aminosäure, und letztendlich von MtrE generell, an der Natriumionentranslokation möglich sein. Ein weiterer Beleg zur Unterstützung dieser Theorie ist die Tatsache, daß dieser Aspartatrest in allen verglichenen MtrE-Proteinsequenzen methanogener Archaea in einem hoch konservierten Sequenzbereich liegt (Abb. 15 und Abb. 21).

Die Betrachtung der Lage dieses wichtigen Aspartatrests innerhalb der membrandurchspannenden Domäne führt ebenfalls zu übereinstimmenden Ergebnissen (Abb. 22).

Der Aspartatrest in der Helix ist immer von 18 bis 22 Aminosäuren umgeben, von denen die Mehrheit auf der *N*-terminalen Seite des Proteins liegt.

MtrE	*N*-...AVLWGITIGAIGSSTG**D**^{187}VHYGAE.....-*C*
GCDB 1	*N*-.....IFPPLIFMGVGAMT**D** ^{97}FGPLIA.....-*C*
GCDB 2	*N*-.........ASAIGIIGGA**D**^{145}GPTSIYLAS..-*C*
OADB	*N*-.........AAAIGIIGGA**D**^{203}GPTAIYLSG..-*C*

Abb. 22: Putative transmembrane Helices mit einem Aspartatrest. Es sind nur die Aminosäurereste gezeigt, die eine putative transmembrane Helix bilden. Abkürzungen: MtrE, Untereinheit MtrE der energiekonservierenden Methyltransferase aus *M. thermoautotrophicum*; GCDB 1, 1. mögliche transmembrane Helix der β-Untereinheit der Glutaconyl-CoA-Decarboxylase *aus A. fermentans*; GCDB 2, 2. mögliche transmembrane Helix der β-Untereinheit der Glutaconyl-CoA-Decarboxylase aus *A. fermentans*; OADB, β-Untereinheit der Oxalacetat-Decarboxylase aus *K. pneumoniae*; *N*-Terminus des Proteins; C, *C*-Terminus des Proteins.

Sowohl alle schon zuvor im Hinblick auf ein mögliches Zinkbindemotiv in einer cytoplasmatischen Aminosäurekette diskutierten Hinweise als auch der Aspartatrest in einer der membrandurchspannenden Domänen der Untereinheit MtrE sprechen dafür, daß MtrE die Bildung von Methylcoenzym M aus Methylcob(III)alamin und Coenzym M katalysiert und in erheblichem Maße an der Translokation von Natriumionen durch die Membran beteiligt ist. Einen Hinweis darauf, daß diese beiden Prozesse unmittelbar miteinander gekoppelt sind, gaben bereits Versuche von Gärtner *et al*. (1994) und Weiss *et al*. (1994), in denen gezeigt wurde, daß die Methylierung von Coenzym M ausgehend von Methylcob(III)alamin (MT2-Reaktion) durch Na^+-Ionen stimulierbar ist.

6 Ein neues topologisches Modell für den energiekonservierenden Methyltransferasekomplex aus *M. thermoautotrophicum*

Die experimentellen Befunde und theoretischen Überlegungen sollen nun abschließend in einem neuen Enzymmodell zusammengefaßt werden (Abb. 23).

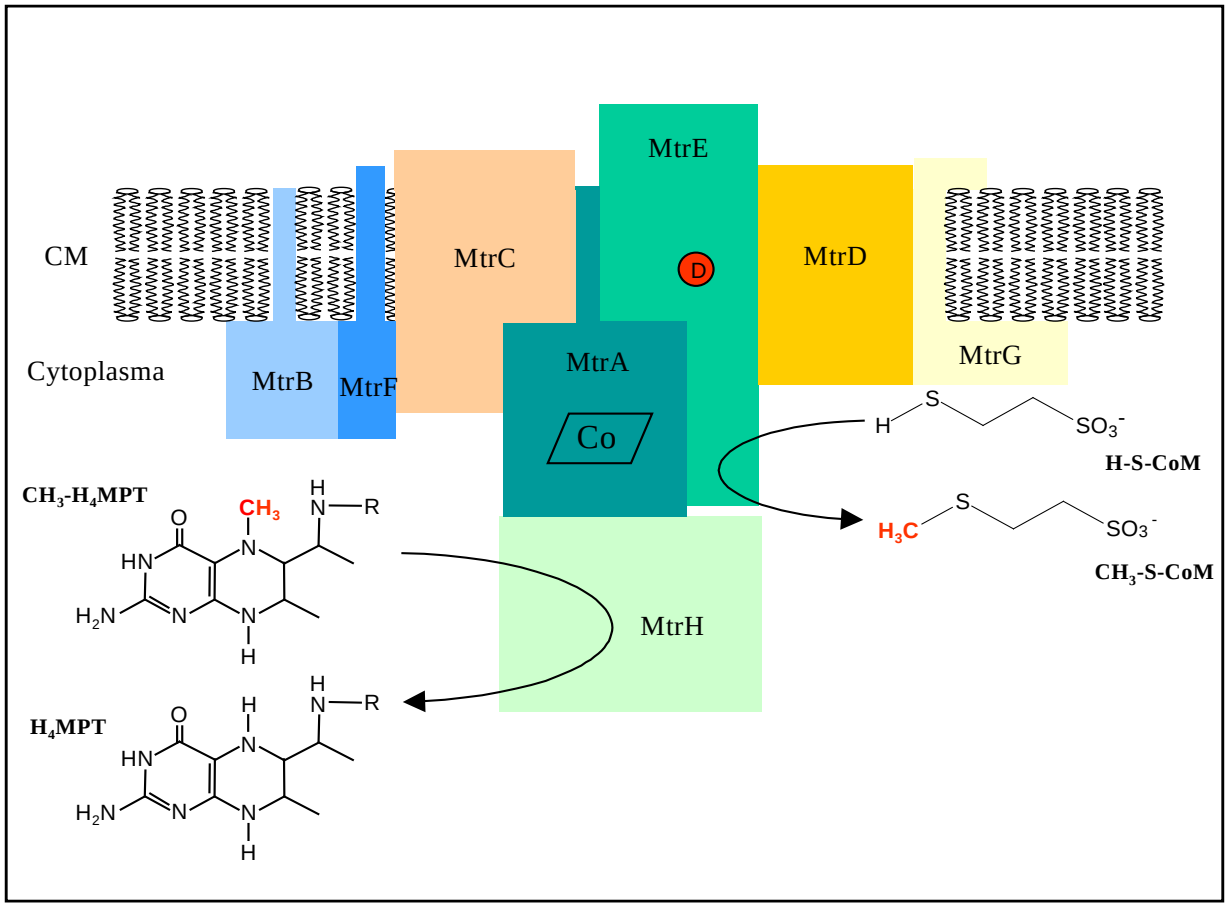


Abb. 23: Modell der N^5-Methyltetrahydromethanopterin:Coenzym-M-Methyltransferase aus *M. thermoautotrophicum*. Die Flächen der einzelnen Untereinheiten wurden anhand der molekularen Massen berechnet und maßstabsgetreu wiedergegeben (MtrA: 25,6 kDa, MtrB: 10,7 kDa, MtrC: 27,1 kDa, MtrD: 22,7 kDa, MtrE: 31,2 kDa, MtrF: 7,4 kDa, MtrG: 10,8 kDa, MtrH: 33,5 kDa). Die Funktionen der Untereinheiten, soweit bekannt, sind angegeben. Abkürzungen: Co: 5'-Hydroxybenzimidazolylcobamid; D: Aspartatrest in einer transmembranen Helix; R: Seitenkette des Tetrahydromethanopteringerüsts (vgl. Abb. 5).

Nach diesem Modell sind die Untereinheiten MtrA, MtrB, MtrF und MtrG mittels einer transmembranen Helix in der Cytoplasmamembran verankert. MtrA trägt die prosthetische Gruppe und steht in Kontakt mit den beiden funktionell wichtigen Untereinheiten MtrH und MtrE. MtrH katalysiert die Methylierung von Cob(I)alamin ausgehend von N^5-Methyltetrahy-

dromethanopterin. Diese Untereinheit hat keine transmembranen Anteile und liegt komplett im Cytoplasma. MtrE ist ein integrales Membranprotein mit mehreren Aminosäureketten, die außerhalb der Cytoplasmamembran liegen. Die vermutete Funktion für diese Untereinheit ist zum einen die Katalyse der Methyltransferreaktion von Methylcob(III)alamin auf Coenzym M und zum anderen die Beteiligung an der gekoppelten Natriumionentranslokation über einen Aspartatrest in einer der transmembranen Helices. Die Untereinheiten MtrC und MtrD sind ebenfalls integrale Membranproteine. Ihre Funktionen konnten bislang allerdings noch nicht geklärt werden.

VII. Literaturverzeichnis

Altschul, S.F. und Lipman, D.J. (1990) Protein database searches for multiple alignments, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**, 5509-5513.

Aramayo, R., Adams, T.H. und Timberlake, W.E. (1989) A large cluster of highly expressed genes is dispensable for growth and development in *Aspergillus nidulans*, Genetics **122**, 65-71.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. und Struhl, K. (1994) Current protocols in molecular biology. New York, Wiley and Sons, Inc.

Banerjee, R.V., Johnston, N.L., Sobeski, J.K., Datta, P. und Matthews, R.G. (1989) Cloning and sequence analysis of the *Escherichia coli metH* gene encoding cobalamin-dependent methionine synthase and isolation of a tryptic fragment containing the cobalamin-binding domain, J. Biol. Chem. **264**,13888-13895.

Beatrix, B., Zelder, O., Linder, D. und Buckel, W. (1994) Cloning, sequencing and expression of the gene encoding the coenzyme B_{12}-dependent 2-methyleneglutarate mutase from *Clostridium barkeri* in *Escherichia coli*, Eur. J. Biochem. **221**, 101-109.

Bertram, P.A. und Thauer, R.K. (1994) Thermodynamics of the formylmethanofuran dehydrogenase reaction in *Methanobacterium thermoautotrophicum*, Eur. J. Biochem. **226**, 811-818.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal. Biochem. **72**, 248-254.

Braune, A., Bendrat, K., Rospert, S. und Buckel, W. (1999) The sodium ion translocating glutaconyl-CoA decarboxylase from *Acidaminococcus fermetans*: cloning and function of the genes forming a second operon, Mol. Microbiol. **31**, 473-487.

Breitung, J., Börner, G., Scholz, S., Linder, D., Stetter, K.O. und 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.

Buckel, W. und Semmler, R. (1983) Purification, characterisation and reconstitution of glutaconyl-CoA decarboxylase, a biotin-dependent sodium pump from anaerobic bacteria, Eur. J. Biochem. **136**, 427-434.

Bult, C.J., White, O., Olsen, G.J., Zhou, L., Fleischmann, R.D., Sutton, G.G., Blake, J.A., FitzGerald, L.M., Clayton, R.A., Gocayne, J.D., Kerlavage, A.R., Dougherty, B.A., Tomb, J.F., Adams, M.D., Reich, C.I., Overbeek, R., Kirkness, E.F., Weinstock, K.G., Merrik, J.M., Glodek, A., Scott, J.L., Geoghagen, N.S. M., Weidman, J.F., Fuhrmann, J.L., Nguyen, D., Utterback, T.R., Kelley, J.M., Peterson, J.D., Sadow, P.W., Hanna, M.C., Cotton, M.D., Roberts, K.M., Hurst, M.A., Kaine, P.P., Borodovsky, M., Klenk, H.P., Fraser, C.M., Smith, H.O., Woese, C.R. und Venter, J.C. (1996) Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*, Science **273**, 1058-1073.

Burke, S.A., Lo, S.L. und Krzycki, J.A. (1998) Clustered genes encoding the methyltransferases of methanogenesis from monomethylamine, J. Bacteriol. **180**, 3432-3440.

Chen, H.P. und Marsh, E.N. (1997) How enzymes control the reactivity of adenosylcobalamin: effect on coenzyme binding and catalysis of mutations in the conserved histidine-aspartate pair of glutamate mutase, Biochemistry **36**, 7884-7889.

Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry III, C.E., Tekaia; F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, D., Feltwell, T., Gentles, S., Hamlin, N., Holroyd, S., Hornsby, T., Jagels, K., Grogh, A., McLean, H., Moule, S., Murphy, L., Oliver, K., Osborne, J., Quail, M.A., Rajandream, M.-A., Rogers, K., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, R., Squares, S., Sulston, J.E., Taylor, K., Whitehead, S. und Barrell, B.G. (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence, Nature **393**, 537-544.

Deppenmeier, U., Blaut, M., Mahlmann, A. und Gottschalk, G. (1990a) Reduced coenzyme F_{420}: heterodisulfide oxidoreductase, a proton-translocating redox system in methanogenic bacteria, Proc. Natl. Sci. USA **87**, 9449-9453.

Deppenmeier, U., Blaut, M., Mahlmann, A. und Gottschalk, G. (1990b) Membrane-bound $F_{420}H_2$-dependent heterodisulfide reductase in methanogenic bacterium strain Gö1 and *Methanolobus tindarius*, FEBS Lett. **261**, 199-203.

Deppenmeier, U., Blaut, M. und Gottschalk, G. (1991) H_2:heterodisulfide oxidoreductase, a second energy-conserving system in methanogenic strain Gö1, Arch. Microbiol. **155**, 272-277.

Deppenmeier, U., Müller, V. und Gottschalk, G. (1996) Pathways of energy conservation in methanogenic archaea, Arch. Microbiol. **165**, 149-163.

Dehning, und Schink, B. (1989) *Malomonas rubra* ge. nov. sp., a microaerotolerant anaerobic bacterium growing by decarboxylation of malonate, Arch. Microbiol. **151**, 427-433.

Di Berardino, M. und Dimroth, P. (1996) Aspartate 203 of the oxaloacetate decarboxylase β-subunit catalyses both the chemical and vectorial reaction of the Na^+ pump, EMBO Journal **15**, 1842-1849.

Dimroth, P. (1997) Primary sodium ion translocating enzymes, Biochim. Biophys. Acta **1318**, 11-51.

Drennan, C.L., Huang, S., Drummond, J.T., Matthews, R.G. und Ludwig, M.L. (1994) How a protein binds B_{12}: a 3.0 Å X-ray structure of B_{12}-binding domains of methionine synthase, Science **266**, 1669-1674.

Fischer, R., Gärtner, P., Yeliseev, A. und Thauer, R.K. (1992) N^5-Methyltetrahydromethanopterin:coenzyme M methyltransferase in methanogenic archaebacteria is a membrane protein, Arch. Microbiol. **158**, 208-217.

Gärtner, P., Ecker, A., Fischer, R., Linder, D., Fuchs, G. und Thauer, R.K. (1993) Purification and properties of N^5-methyltetrahydromethanopterin:coenzyme M methyltransferase from *Methanobacterium thermoautotrophicum*, Eur. J. Biochem. **213**, 537-545.

Gärtner, P., Weiss, D.S., Harms, U. und Thauer, R.K. (1994) N^5-methyltetrahydromethanopterin:coenzyme M methyltransferase from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Catalytic mechanism and sodium ion dependence, Eur. J. Biochem. **226**, 465-472.

Goloubinoff, P., Gatenby, A.A. und Lorimer, G.H. (1989) GroE heat-shock proteins promote assembly of foreign prokaryotic ribulose bisphosphate carboxylase oligomers in *Escherichia coli*, Nature **337**, 44-47.

González, J.C., Peariso, K., Penner-Hahn, J.E. und Matthews, R.G. (1996) Cobalamin-independent methionine synthase from *Escherichia coli* - a zinc metalloenzyme, Biochemistry **35**, 12228-12234.

Goubeaud, M., Schreiner, G. und Thauer, R.K. (1997) Purified methyl-coenzyme M reductase is activated when the enzyme-bound coenzyme F_{430} is reduced to the nickel(I)oxidation state by titanium(III) citrate, Eur. J. Biochem. **243**, 110-114.

Goulding, C.W. und Matthews, R.G. (1997) Cobalamin-dependent methionine synthase from *Escherichia coli* - involvement of zinc in homocysteine activation, Biochemistry **36**, 15749-15757.

Goulding, C.W., Postigo, D. und Matthews, R.G. (1997) Cobalamin-dependent methionine synthase is a modular protein with distinct regions for binding homocysteine, methyltetrahydrofolate, cobalamin, and adenosylmethionine, Biochemistry **36**, 8082-8091.

Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, J. Mol. Biol. **166**, 557-580.

Harms, U., Weiss, D.S., Gärtner, P., Linder, D. und Thauer, R.K. (1995) The energy conserving N^5-methyltetrahydromethanopterin:coenzyme M methyltransferase complex from *Methanobacterium thermoautotrophicum* is composed of eight different subunits, Eur. J. Biochem. **228**, 640-648.

Harms, U. (1996) Der energiekonservierende Methyltransferase-Komplex aus Methanobacterium thermoautotrophicum: Kodierende Gene und Struktur und Funktion der acht den Komplex aufbauenden Untereinheiten, Dissertation, Philipps-Universität Marburg.

Harms, U. und Thauer, R.K. (1996a) The corrinoid-containing 23-kDa subunit MtrA of the energy-conserving N^5- methyltetrahydromethanopterin:coenzyme M methyltransferase complex from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. EPR spectroscopic evidence for a histidine residue as a cobalt ligand of the cobamide, Eur. J. Biochem. **241**, 149-154.

Harms, U. und Thauer, R.K. (1996b) Methylcobalamin:coenzyme M methyltransferase isoenzymes MtaA and MtbA from *Methanosarcina barkeri*. Cloning, sequencing and differential transcription of the encoding genes, and functional overexpression of the *mtaA* gene in *Escherichia coli*, Eur. J. Biochem. **235**, 653-659.

Harms, U. und Thauer, R.K. (1997) Identification of the active site histidine in the corrinoid protein MtrA of the energy-conserving methyltransferase complex from *Methanobacterium thermoautotrophicum*, Eur. J. Biochem. **250**, 783-788.

Hewick, R.M., Hunkapiller, M.W., Hood, L.E. und Dreyer, W.J. (1981) A gas-liquid solid phase peptide and protein sequenator, J. Biol. Chem. **256**, 7990-7997.

Hilbi, H., Dehning, I., Schink, B. und Dimroth, P. (1992) Malonate decarboxylase *of Malonomonas rubra*, a novel type of biotin-containing acetyl enzyme, Eur. J. Biochem. **207**, 117-123.

Hilpert, W. und Dimroth, P. (1982) Conversion of the chemical energy of methylmalonyl-CoA decarboxylation into a Na^+ gradient, Nature **296**, 584-585.

Hochheimer, A., Hedderich, R. und Thauer, R.K (1998) The formylmethanofuran dehydrogenase isoenzymes in *Methanobacterium wolfei* and *M. thermoautotrophicum*: Induction of the molybdenum isoenzyme by molybdate and constitutive synthesis of the tungsten isoenzyme, Arch. Microbiol. **170**, 389-393.

Hogenkamp, H.P.C., Bratt, G.T. und Kotchevar, A.T. (1987) Reaction of alkylcobalamins with thiols, Biochemistry **26**, 4723-4727.

Holtwick, R., Meinhardt, F. und Keweloh, H. (1997) cis-trans Isomerization of unsaturated fatty acids: cloning and sequencing of the *cti* gene from *Pseudomonas putida* P8, Appl. Environ. Microbiol. **63**, 4292-4297.

Hoppe, J. und Sebald, W. (1984) The proton conducting F_0-part of bacterial ATP synthases, Biochim. Biophys. Acta **768**,1-27.

Kaesler, B. und Schönheit, P. (1989a) The role of sodium ions in methanogenesis. Formaldehyde oxidation to CO_2 and $2H_2$ in methanogenic bacteria is coupled with primary electrogenic Na^+ translocation at a stoichiometry of 2-3 Na^+/CO_2, Eur. J. Biochem. **184**, 223-232.

Kaesler, B. und Schönheit, P. (1989b) The sodium cycle in methanogenesis. CO_2 reduction to the formaldehyde level in methanogenic bacteria is driven by a primary electrochemical potential of Na^+ generated by formaldehyde reduction to CH_4, Eur. J. Biochem. **186**, 309-316.

Käfer, E. (1977) Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus nidulans* and its chromosomal aberrations, Adv. Genet. **19**, 33-131.

Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirosawa, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M. und Tabata, S. (1996) Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis sp.* strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions (supplement), DNA Res. **3**, 109-136.

Kyte, J. und Doolittle, R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein, J. Mol. Biol. **157**, 105-132.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature **227**, 680-685.

LaVallie, E.R., DiBlasio, E.A., Kovacic, S., Grant, K.L., Schendel, P.F. und McCoy, J.M. (1993) A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm, Bio/Technology **11**, 187-193.

LeClerc, G.M. und Grahame, D.A. (1996) Methylcobamide:coenzyme M methyltransferase isozymes from *Methanosarcina barkeri*. Physicochemical characterization, cloning, sequence analysis, and heterologous gene expression, J. Biol. Chem. **271**, 18725-18731.

Li, Y.N., Gulati, S., Baker, P.J., Brody, L.C., Banerjee, R. und Kruger, W.D. (1996) Cloning, mapping and RNA analysis of the human methionine synthase gene, Hum. Mol. Genet. **5**, 1851-1858.

Lienard, T., Becher, B., Marschall, M., Bowien, S. und Gottschalk, G. (1996) Sodium ion translocation by N^5-methyltetrahydromethanopterin:coenzyme M methyltransferase from *Methanosarcina mazei* Gö1 reconstituted in ether lipid liposomes, Eur. J. Biochem. **239**, 857-864.

Lienard, T. und Gottschalk, G. (1998) Cloning, sequencing and expression of the genes encoding the sodium translocating N^5-methyltetrahydromethanopterin:coenzyme M methyltransferase of the methylotrophic archaeon *Methanosarcina mazei* Gö1, FEBS Letters **425**, 204-208.

Lipscomb, W.N. und Sträter, N. (1996) Recent Advances in Zink Enzymology, Chem. Rev. **96**, 2375-2433.

Lorimer, G. H. und Todd, M. J. (1996) GroE structures galore, Nature Struct. Biol. 3, 116-121.

Ludwig, M.L. und Matthews, R.G. (1997) Structure-based perspectives on B_{12}-dependent enzymes, Annu. Rev. Biochem. **66**, 269-313.

Mancia, F., Keep, N.H., Nakagawa, A., Leadlay, P.F., McSweeney, S., Rasmussen, B., Bosecke, P., Diat, O. und Evans, P.R. (1996) How coenzyme B_{12} radicals are generated: the crystal structure of methylmalonyl-coenzyme A mutase at 2 Å resolution, Structure **4**, 339-350.

Marsh, E.N.G. und Holloway, D.E. (1992) Cloning and sequencing of glutamate mutase component S from *Clostridium tetanomorphum*. Homologies with other cobalamin-dependent enzymes, FEBS Letters **310**, 167-170.

Matthews, R.G. und Goulding, C.W. (1997) Enzyme-catalyzed methyl transfers to thiols: the role of zinc, Curr. Opin. Chem. Biol. **1**, 332-339.

Metcalf, W.W., Zhang, J.K., Apolinario, E., Sowers, K.R. und Wolfe, R.S. (1997) A genetic system for Archaea of the genus *Methanosarcina*: Liposome-mediated transformation and construction of shuttle vectors, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**, 2626-2631.

Myers, L.C., Terranova, M.P., Ferentz, A.E., Wagner, G. und Verdine, G.L. (1993) Repair of DNA methylphosphotriesters through a metalloactivated cysteine nucleophile, Science **261**, 1164-1167.

Myers, L.C., Cushing, T.D., Wagner, G. und Verdine, G.L. (1994) Metal-coordination sphere in the methylated Ada protein-DNA co-complex, Chem. Biol. **1**, 91-97.

Nölling, J., Elfner, A., Palmer, J.R., Steigerwald, V.J., Pihl, T.D., Lake, J.A. und Reeve, J.N. (1996) Phylogeny of *Methanopyrus kandleri* based on methyl coenzyme M reductase operons, Int. J. of Systematic Bacteriology, **46**, 1170-1173.

Novy, R., Berg, J., Yaeger, K. und Mierendorf, R. (1995) pet TRX Fusion system for Increased solubility of proteins expressed in *E. coli*, inNovations 3, Novagen, Inc., (http://www.novagen.com/html/inno/3inno4.htm).

Paul, L. und Krzycki, J.A. (1996) Sequence and transcript analysis of a novel *Methanosarcina barkeri* methyltransferase II homolog and its associated corrinoid protein homologous to methionine synthase, J. Bact. **178**, 6599-6607.

Peariso, K., Goulding, C.W., Huang, S., Matthews, R.G. und Penner-Hahn, J.E. (1998) Characterization of the zinc binding site in methionine synthase enzymes of *Escherichia coli*: the role of zinc in the methylation of homocysteine, J. Am. Chem. Soc. **120**, 8410-8416.

Peinemann, S., Hedderich, R., Blaut, M., Thauer, R.K. und Gottschalk, G. (1990) ATP synthesis coupled to electron transfer from H_2 to the heterodisulfide of 2-mercaptoethanesulfonate and 7-mercaptoheptanoylthreonine phosphate in vesicle preparations of the methanogenic bacterium strain Gö1, FEBS Letters **263**, 57-60.

Roberts, D.L., Zhao, S., Doukov, T. und Ragsdale, S.W. (1994) The reductive acetyl coenzyme A pathway: sequence and heterologous expression of active methyltetrahydrofolate:corrinoid/iron-sulfur protein methyltransferase from *Clostridium thermoaceticum*, J. Bacteriol. **176**, 6127-6130.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., und Maniatis, T. (1989) Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**, 5463-5467.

Sauer, K., Harms, U. und Thauer, R.K. (1997) Methanol:coenzyme M methyltransferase from *Methanosarcina barkeri*: Purification, properties and encoding genes of the corrinoid protein MT1, Eur. J. Biochem. **243**, 670-677.

Sauer, K. und Thauer, R.K. (1997) Methanol:coenzyme M methyltransferase from *Methanosarcina barkeri*. Zinc dependence and thermodynamics of the methanol:cob(I)alamin methyltransferase reaction, Eur. J. Biochem. **249**, 280-285.

Sauer, K. und Thauer, R.K. (1998a) His^{84} rather than His^{35} is the active site histidine in the corrinoid protein MtrA of the energy conserving methyltransferase complex from *Methanobacterium thermoautotrophicum*, FEBS Lett. **436**, 401-402.

Sauer, K. und Thauer, R.K. (1998b) The role of corrinoids in methnogenesis, Chemistry and Biochemistry of B_{12}, (Banerjee, R. ed.) John Wiley and Sons, Inc., im Druck.

Sauer, K. und Thauer, R.K. (1999) Methanol:coenzyme M methyltransferase from *Methanosarcina barkeri* - substitution of the corrinoid harbouring subunit MtaC by free cob(I)alamin, Eur. J. Biochem. **261**, 674-681.

Sauer, K. (1999) Methanol:Coenzym-M-Methyltransferase aus Methanosarcina barkeri, Struktur und Katalysemechanismus, Dissertation, Philipps-Universität Marburg.

Schönheit, P., Moll, J. und Thauer, R.K. (1980) Growth parameters (K_S, μ_{max}, Y_S) of *Methanobacterium thermoautotrophicum*., Arch. Microbiol., 59-65.

Seed, B. (1987) An LFA-3 cDNA encodes a phospholipid-linked membrane protein homologous to its receptor CD2, Nature **329**, 840-842.

Smith, D.R., Doucette-Stamm, L.A., 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., Safer, H., Patwell, D., Prabhakar, S., McDougall, S., Shimer, G., Goyal, A., Pietrokovski, S., Church, G.M., Daniels, C.J., Mao, J.I., Rice, P., Nölling, J. und Reeve, J.N. (1997) Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* ΔH: functional analysis and comparative genomics, J. Bacteriol. **179**, 7135-7155.

Smith, D.R., (1994) GenBank accession number: U00017.

Sonnhammer, E.L.L., von Heijne, G. und Krogh, A. (1998) A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences (Glasgow, J., Littlejohn, T., Major, F., Lathrop, R., Sankoff, D., Sensen, C. ed) Proc. of Sixth Int. Conf. on Intelligent Systems for Molecular Biology,175-182, AAAI Press, Menlo Park, CA.

Sparling, R., Blaut, M. und Gottschalk, G. (1993) Bioenergetic studies of *Methanosphaera stadtmanae*, an obligate H_2-methanol utilising methanogen, Can. J. Microbiol. **39**, 742-748.

Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. und Dubendorff, J.W. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes, Methods in Enzymology **185**, 60-89.

Suelmann, R., Sievers, N., Galetzka, D., Robertson, L., Timberlake, W.E. und Fischer, R. (1998) Increased nuclear traffic chaos in hyphae of *Aspergillus nidulans*: molecular characterization of *apsB* and *in vivo* observation of nuclear behaviour, Mol. Microbiol. **30**, 831-842.

Tallant, T.C. und Krzycki, J.A. (1996) Coenzyme M methylase activity of the 480-kilodalton corrinoid protein from *Methanosarcina barkeri*, J. Bacteriol. **175**, 1295-1301.

Tallant, T.C. und Krzycki, J.A. (1997) Methylthiol:Coenzyme M methyltransferase from *Methanosarcina barkeri*, an enzyme of methanogenesis from dimethylsulfide and methylmercaptopropionate, J. Bacteriol. **179**, 6902-6911.

Taylor, C.D. und Wolfe, R.S. (1974) A simplified assay for coenzyme M ($HSCH_2CH_2SO_3$). Resolution of methylcobalamin-coenzyme M methyltransferase and use of sodium borohydride, J. Biol. Chem. **249**,4886-4890.

Thauer, R.K., Hedderich, R. und Fischer, R. (1993) Biochemistry. Reactions and enzymes involved in methanogenesis from CO_2 and H_2. Methanogenesis. J.G. Ferry, editor. Chapman & Hall, New York. 209-252.

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**, 3031-3042.

Thauer, R.K. (1998). Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson, Microbiology **144**, 2377-2406.

The *C. elegans* Sequencing Consortium: http://genome.wustl.edu/gsc/C_elegans (1998) Genome Sequence of the Nematode *C. elegans*: A Platform for Investigating Biology, Science **282**, 2012-2018.

Vallee, B.L. und Auld, D.S. (1990) Active-site zinc ligands and activated H_2O of zinc enzymes, Proc. Natl. Acad. Sci.USA **87**, 220-224.

Vannelli, T., Messmer, M., Studer, A., Vuilleumier, S. und Leisinger, T. (1999) A corrinoid-dependent catabolic pathway for growth of a *Methylobacterium* strain with chloromethane, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **96**, 4615-4620.

Vorholt, J.A., Vaupel, M. und Thauer, R.K. (1996) A polyferredoxin with eight [4Fe-4S] clusters as a subunit of molybdenum formylmethanofuran dehydrogenase from *Methanosarcina barkeri*, Eur. J. Biochem. **236**, 309-317.

von Heijne, G. (1992) Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule, J. Mol. Biol. **225**, 487-494.

Waring, R.B., May, G.S. und Morris, N.R. (1989) Characterization of an inducible expression system in *Aspergillus nidulans* using *alcA* and tubulin coding genes, Gene **79**, 119-130.

Wassenaar, R.W., Keltjens, J.T., van der Drift, C. und Vogels, G.D. (1998) Purification and characterization of dimethylamine:5-hydroxybenzimidazolyl-cobamide methyltransferase from *Methanosarcina barkeri* Fusaro, Eur. J. Biochem. **253**, 692-697.

Weil, C.F. Cram, D.S., Sherf, B.A und Reeve, J.N. (1988) Structure and comparative analysis of the genes encoding component C of methyl coenzyme M reductase in the extremly thermophilic archaebacterium *Methanothermus fervidus*, J. Bacteriol. **170**, 4718-4726.

Weiss, D.S., Gärtner, P. und Thauer, R.K. (1994) The energetics and sodium-ion dependence of N^5-methyltetrahydromethanopterin:coenzyme M methyltransferase studied with cob(I)alamin as methyl acceptor and methylcob(III)alamin as methyl donor, Eur. J. Biochem. **226**, 799-809.

Woese, C. R., Kandler, O. und Wheelis, M. L. (1990) Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eurcarya, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **87**, 4576-4579.

Yamada, K., Tobimatsu, T. und Toraya, T. (1998) Cloning, sequencing, and heterologous expression of rat methionine synthase cDNA, Bioscience, Biotechnology and Biochemistry **62**, 2155-2160.

Yelton, M.M., Hamer, J.E. und Timberlake, W.E. (1984) Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a *trpC* plasmid, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**, 1470-1474.

Zelder, O., Beatrix, B., Kroll, F. und Buckel, W. (1995) Coordination of a histidine residue of the protein-component S to the cobalt atom in coenzyme B_{12}-dependent glutamate mutase from *Clostridium cochlearium*, FEBS Letters **369**, 252-254.

Danksagung

Herrn Professor Dr. R. K. Thauer gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas, für die Anregungen und interessanten Diskussionen.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitgruppe Thauer bedanke ich mich für die große Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre. Für den regen Informationsaustausch danke ich den Methyltransferase-Mitstreiterinnen Karin und Ilka. Ein besonders großes Dankeschön geht an Michaela, die mir stets mit helfender Hand zur Seite gestanden und mit ihrer guten Laune den Laboralltag erleichtert hat.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Fischer, Franken, Buckel, Bremer, Völker und Ullrich danke ich für die stetige Bereitschaft, mit Material oder Ideen auszuhelfen.

Herzlich danken möchte ich Thomas, Thomas, Steffi und Uli für die freundschaftliche Begleitung durch alle Studienjahre.

Urs, Jutta und Beate danke ich, daß sie mir in der Ferne so nah waren.

Mein größter und herzlichster Dank gilt meiner Mutter, Fred, meinem Bruder Heinz-Jürgen, dem Rest meiner kleinen Familie und Klaus für die Unterstützungen, Ermunterungen und alle erholsamen Stunden, die wir zusammen verbracht haben.

An dieser Stelle sei ebenfalls der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Fonds der Chemischen Industrie und der Max-Planck-Gesellschaft gedankt, durch deren Mittel diese Arbeit gefördert wurde.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Birgit Hippler
Geburtstag:	20.02.1969
Geburtsort:	Duisburg

Schulische Ausbildung

August 1975-Juni 1979:	Städt. Gemeinschaftsgrundschule Duisburg-Neumühl
August 1979-Juni 1988:	Abtei-Gymnasium Duisburg-Hamborn
Juni 1988:	Abitur

Berufliche Ausbildung

September 1988-Januar 1991:	Ausbildung zur Chemielaborantin am Max-Planck-Institut für Kohlenforschung in Mülheim a. d. Ruhr
Januar 1991-April 1991:	Anstellung als Chemielaborantin am Max-Planck-Institut für Kohlenforschung in Mülheim a. d. Ruhr
April 1991-Juli 1996:	Studium der Chemie (Diplom) an der Philipps-Universität Marburg
Oktober 1995:	Diplomprüfungen
November 1995-August 1996:	Anfertigung der Diplomarbeit ”Die oxidative Decarboxylierung von Coproporphyrinogen-III in *Bacillus subtilis*” in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dieter Jahn am Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg
September 1996-August 1999	Anfertigung der Dissertation ”Der energiekonsevierende N^5-Methyltetrahydromethanopterin:Coenzym-M-Methyltransferasekomplex aus methanogenen Archaea: Struktur und Funktion der Untereinheiten MtrH und MtrE” in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Rudolf K. Thauer am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt, keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet und sämtliche Stellen, die im Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Werken entnommen sind, mit Quellenangaben kenntlich gemacht habe. Die Versicherung schließt Zeichnungen und Skizzen mit ein.