

**Tetrahydrofolat-spezifische Enzyme
im Baustoffwechsel von *Methanosarcina barkeri*
sowie die Rolle von Folsäure und *p*-Aminobenzoesäure
als Wachstumsfaktoren in diesem Archaeon**

DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Bärbel Buchenau

aus Bad Hersfeld

Marburg/Lahn 2004

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden in der Zeit von Oktober 2001 bis Oktober 2004 am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg/Lahn unter der Leitung von Professor Dr. R. K. Thauer durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation angenommen
am:

Erstgutachter: Prof. Dr. R. K. Thauer

Zweitgutachter: Prof. Dr. W. Buckel

Tag der mündlichen Prüfung am:

Die in der Dissertation beschriebenen Ergebnisse sind in folgenden Originalpublikationen veröffentlicht:

Buchenau, B. & Thauer, R. K. (2004). Tetrahydrofolate-specific enzymes in *Methanosarcina barkeri* and growth dependence of this methanogenic archaeon on folic acid or *p*-aminobenzoic acid. *Arch Microbiol*, im Druck

Angelaccio, S., Chiaraluce, R., Consalvi, V., Buchenau, B., Giangiacomo, L., Bossa, F., Contestabile, R. (2003). Catalytic and thermodynamic properties of tetrahydromethanopterin-dependent serine hydroxymethyltransferase from *Methanococcus jannaschii*. *J Biol Chem* **278**, 41789-41797

*meinen Eltern
in Liebe und Dankbarkeit
gewidmet*

Inhaltsverzeichnis	Seite
Abkürzungsverzeichnis	1
I Zusammenfassung	2
II Einleitung	4
III Material und Methoden	
1 Verwendete Materialien	11
2 Kultivierung von <i>Methanosarcina barkeri</i>	12
2.1.1 Verwendete Medien und Wachstumsbedingungen	14
2.1.2 Messung der Aufnahme von [¹⁴ C]- <i>p</i> -Aminobenzoesäure	14
2.2 Herstellung von Zellextrakt	15
2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration	15
3 Heterologe Produktion von FOLD, GlyA, MetF und PurN in <i>E. coli</i>	15
3.1 Verwendete Oligonukleotide und Plasmide	16
3.2 Verwendete <i>E. coli</i> -Stämme und Kultivierung	17
3.3 Klonierung der Gene zur heterologen Expression	17
3.3.1 Methoden zur Klonierung	17
3.3.2 Klonierung von <i>glyA</i> , <i>metF</i> und <i>purN</i>	20
3.4 Heterologe Überexpression von <i>fold</i> , <i>glyA</i> , <i>metF</i> und <i>purN</i>	20
3.5 Reinigung von heterolog überproduziertem FOLD, GlyA und MetF	22
3.5.1 Methylen-H ₄ F-Dehydrogenase/Methenyl-H ₄ F-Cyclohydrolase (FOLD)	22
3.5.2 Serin-Hydroxymethyltransferase (GlyA)	23
3.5.3 Methylen-H ₄ F-Reduktase (MetF)	24
4 Proteinanalyse durch denaturierende Gelelektrophorese	26
5 Nachweis von FOLD, GlyA und MetF	27
5.1 Enzymaktivitäten	27
5.2 Western-Blot-Analysen	30
6 Reinigung von FOLD aus <i>M. barkeri</i>	31
7 Bestimmung der intrazellulären H₄F- bzw. H₄SPT-Konzentration	32
7.1 H ₄ F in <i>M. barkeri</i>	32
7.2 H ₄ SPT in <i>M. barkeri</i>	33
8 Analyse von Sequenzen und Sequenzvergleiche	33

IV Ergebnisse

1	H₄F-spezifische Enzyme in <i>M. barkeri</i>	34
1.1.	Methylen-H ₄ F-Dehydrogenase/Methenyl-H ₄ F-Cyclohydrolase (FolD)	36
1.1.1	Eigenschaften des heterolog überproduzierten Enzyms	36
1.1.2	Nachweis von FolD in <i>M. barkeri</i>	41
1.2	Serin: H ₄ F-Hydroxymethyltransferase (GlyA)	43
1.2.1	Eigenschaften des heterolog überproduzierten Enzyms	43
1.2.2	Nachweis von GlyA in <i>M. barkeri</i>	50
1.3	Methylen-H ₄ F-Reduktase (MetF) und Phosphoribosylglycinamid-Formyltransferase (PurN)	51
1.3.1	Heterologe Überproduktion unter Bildung von „Inclusion Bodies“	52
1.3.2	Aktivitäts- und Western-Blot-Analyse	55
2	Wachstum von <i>M. barkeri</i> in Abhängigkeit von Folsäure bzw. <i>p</i>-Aminobenzoesäure	57
2.1	Wachstum in Abhängigkeit von der Vitaminkonzentration	57
2.2	Inhibition des Wachstums durch Sulfanilamid	59
2.3	Aufnahme von <i>p</i> -Aminobenzoesäure während des Wachstums	60
3	Konzentration von H₄F bzw. H₄SPT in <i>M. barkeri</i>	64
3.1	H ₄ F-Konzentration unter der methodischen Nachweisgrenze	64
3.2	H ₄ SPT-Konzentration im millimolarem Bereich	66

V Diskussion

1	Biosynthese von Purinen und anderen C₁-Einheiten-enthaltenden Zellbausteinen in <i>M. barkeri</i>	68
2	H₄F-Biosynthese in <i>M. barkeri</i>	81
3	H₄MPT-/H₄SPT-Biosynthese in methanogenen Archaea	84

VI Literatur 89

VII Anhang 103

Publikation

Lebenslauf 113

Dank 114

Erklärung 115

Abkürzungsverzeichnis

Adh	Alkohol-Dehydrogenase
Bis-Tris	Bis-(2-Hydroxyethyl)imino-Tris(hydroxymethyl)methan
Bq	Becquerel (Anzahl der Zerfälle pro Sekunde)
DTT	Dithiothreitol
ϵ	Extinktionskoeffizient ($\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
F ₄₂₀	8-Hydroxy-7,8-didemethyl-5-deazariboflavin, Faktor 420
Fold	Methylen-H ₄ F-Dehydrogenase/Methenyl-H ₄ F-Cyclohydrolase
GlyA	Serin-Hydroxymethyltransferase
HEPES	(4-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-1-Ethansulfonsäure
H ₄ F	Tetrahydrofolat
H ₄ MPT	Tetrahydromethanopterin
H ₄ SPT	Tetrahydrosarcinapterin
IPTG	Isopropyl-Thio- β -D-Galactopyranosid
MALDI/TOF	Matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight
Mch	Methenyl-H ₄ MPT-Cyclohydrolase
MetF	Methylen-H ₄ F-Reduktase
Mops	(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
Mtd	Methylen-H ₄ MPT-Dehydrogenase
PLP	Pyridoxal-5'-Phosphat
PurH	Phosphoribosylaminoimidazolcarboxamid-Formyltransferase
PurN	Phosphoribosylglycinamid-Formyltransferase
U	Unit (μmol Umsatz pro Minute)

I Zusammenfassung

Tetrahydrofolat (H_4F) spielt als Überträger von C_1 -Einheiten im Baustoffwechsel von allen Bacteria und Eucarya und von einigen Archaea eine wichtige Rolle in der Synthese von C_1 -Einheiten enthaltenden Verbindungen wie Purine, Thymidin und Methionin. Im Baustoffwechsel von methanogenen Archaea, die alle kein H_4F enthalten sollen, wird H_4F durch Tetrahydromethanopterin (H_4MPT) ersetzt, das ein strukturelles Analogon von H_4F ist, und das als C_1 -Überträger essentiell an der Methanbildung aus CO_2 oder Acetat beteiligt ist. Nur im Baustoffwechsel von Archaea der Ordnung *Methanosarcinales* scheint H_4MPT nicht an der Synthese von Purinen, Thymidin und Methionin beteiligt zu sein, was aus ^{13}C -Markierungsexperimenten hervorgeht und die Frage aufwirft, ob diese Organismen neben H_4MPT nicht doch noch zusätzlich H_4F besitzen. Diese Frage zu beantworten, war das Ziel der vorliegenden Arbeit. Die Versuche wurden mit dem Organismus *Methanosarcina barkeri* durchgeführt, der Tetrahydrosarcinapterin (H_4SPT) an Stelle von H_4MPT enthält. H_4SPT wird aus H_4MPT durch Anfügen eines Glutamatrestes synthetisiert, der ohne Einfluss auf die Aktivität von diesem Coenzym ist.

Im Genom von *Methanosarcina barkeri*, *M. acetivorans*, *M. thermophila* und *M. mazei* wurden Gene gefunden, die für folgende H_4F -spezifische Enzyme kodieren könnten: Serin-Hydroxymethyltransferase (GlyA), Methylen- H_4F -Dehydrogenase/Methenyl- H_4F -Cyclohydrolase (FolD), Methylen- H_4F -Reduktase (MetF), Phosphoribosylglycinamid-Formyltransferase (PurN) und Phosphoribosylaminoimidazolcarboxamid-Formyltransferase (PurH). Diese Gene wurden mit Ausnahme von *glyA* in den Genomen von *Methanothermobacter thermoautotrophicus*, *Methanococcus jannaschii*, *Methanococcus maripaludis* und *Methanopyrus kandleri* nicht gefunden. Es gelang, zwei dieser Gene aus *M. barkeri*, *fold* und *glyA*, heterolog in *E. coli* ohne Bildung von „Inclusion Bodies“ zu exprimieren. Die rekombinanten aktiven Enzyme wurden charakterisiert und polyklonale Antikörper zum Nachweis der Proteine in *M. barkeri* produziert.

Das Gen *fold* kodierte für eine bifunktionelle Methylen- H_4F -Dehydrogenase/Methenyl- H_4F -Cyclohydrolase, die sowohl die Oxidation von Methylen- H_4F mit NAD^+ zu Methenyl- H_4F^+ und $NADH$ als auch die Hydrolyse von Methenyl- H_4F^+ zu N^{10} -Formyl- H_4F katalysiert. Beide Aktivitäten waren strikt H_4F -spezifisch. Das Gen *glyA* kodierte für Serin-Hydroxymethyltransferase, die in Gegenwart von H_4F die Spaltung von

L-Serin zu Glycin unter Bildung von Methylen-H₄F katalysierte. H₄F war in der Reaktion durch H₄MPT ersetzbar, wobei die Aktivität allerdings weniger als 1% gegenüber der Aktivität mit H₄F betrug. Die apparenten K_m -Werte für Methylen-H₄F (FolD) und (6S)-H₄F (GlyA) lagen unter 5 μ M. Die Genprodukte von *folD* und *glyA* konnten in Zellextrakten von *M. barkeri* mittels Western-Blot-Analysen und Aktivitätsmessungen nachgewiesen werden.

Ein Hinweis für das Vorkommen von H₄F in *M. barkeri* wurde indirekt durch Wachstumsversuche erhalten: Es wurde gefunden, dass das Wachstum des Archaeons von Folsäure (200 nM) oder *p*-Aminobenzoessäure (20 nM) im Medium abhängig ist und durch Sulfanilamid (2 mM) gehemmt wird. Unter *p*-Aminobenzoessäure-limitierenden Wachstumsbedingungen waren ca. 2 nmol *p*-Aminobenzoessäure für die Bildung von 1 g Zellen (Feuchtmasse) nötig, woraus sich eine intrazelluläre H₄F-Konzentration von 5 μ M abschätzen ließ unter der Annahme, dass *p*-Aminobenzoessäure ausschließlich für die Biosynthese von H₄F verwendet wurde.

Die intrazelluläre H₄SPT-Konzentration von *M. barkeri* wurde zu 3 mM bestimmt und es wurde gefunden, dass sie unabhängig von der *p*-Aminobenzoessäure-Konzentration im Wachstumsmedium war. Die Daten deuten darauf hin, dass *M. barkeri* bei Wachstum unter *p*-Aminobenzoessäure-limitierenden Bedingungen freie *p*-Aminobenzoessäure nicht für die H₄SPT-Synthese verwenden kann, was bestehender Literatur widerspricht. Dies wurde unabhängig durch Versuche bestätigt, bei denen die Aufnahme von [Carboxyl-¹⁴C]-*p*-Aminobenzoessäure in die Zellen verfolgt wurde. Unter den experimentellen Bedingungen wurden maximal 0,4% des H₄SPT aus der vom Medium aufgenommenen *p*-Aminobenzoessäure synthetisiert, was über den Radioaktivitätsverlust durch Decarboxylierung während des Einbaus von *p*-Aminobenzoessäure in H₄SPT ermittelt wurde.

Darüber hinaus wurden Versuche zur Substratspezifität der Serin-Hydroxymethyltransferase von *Methanococcus jannaschii* durchgeführt, die zeigten, dass dieses Enzym H₄MPT-spezifisch ist. Die Publikation zu diesen Ergebnissen befindet sich im Anhang.

II Einleitung

Tetrahydrofolat (H₄F) und Tetrahydromethanopterin (H₄MPT) bzw. Tetrahydrosarcinapterin (H₄SPT) sind analoge Coenzyme, die im Stoffwechsel als Trägermolekül von C₁-Einheiten auf den verschiedenen ineinander umwandelbaren Oxidationsstufen Formiat, Formaldehyd und Methanol dienen (Gorris & van der Drift, 1994; White, 1991; Maden, 2000) (Abb. 1). Sowohl H₄F als auch H₄MPT ist aus einem reduzierten Pterinring aufgebaut, der über eine Methylengruppe an ein Arylamin gebunden ist. An diese Kernstruktur ist eine Seitenkette gekoppelt, die im Falle von H₄F aus einem oder mehreren Glutamatresten gebildet wird und im Falle von H₄MPT aus einem Ribitol, einem Ribose-5-Phosphat und einem Hydroxyglutarat besteht. In H₄SPT ist die Seitenkette zusätzlich mit einem terminalem Glutamatrest verbunden (van Beelen et al., 1984; Li et al., 2003). Wie in Abb. 1 dargestellt bindet die C₁-Einheit an N⁵ (N⁵-Formyl, N⁵-Methyl), an N¹⁰ (N¹⁰-Formyl) oder an N⁵ und N¹⁰ (N⁵,N¹⁰-Methenyl, N⁵,N¹⁰-Methylen) des C₁-Carriers und kann enzymatisch in die unterschiedlichen Oxidationsstufen überführt werden.

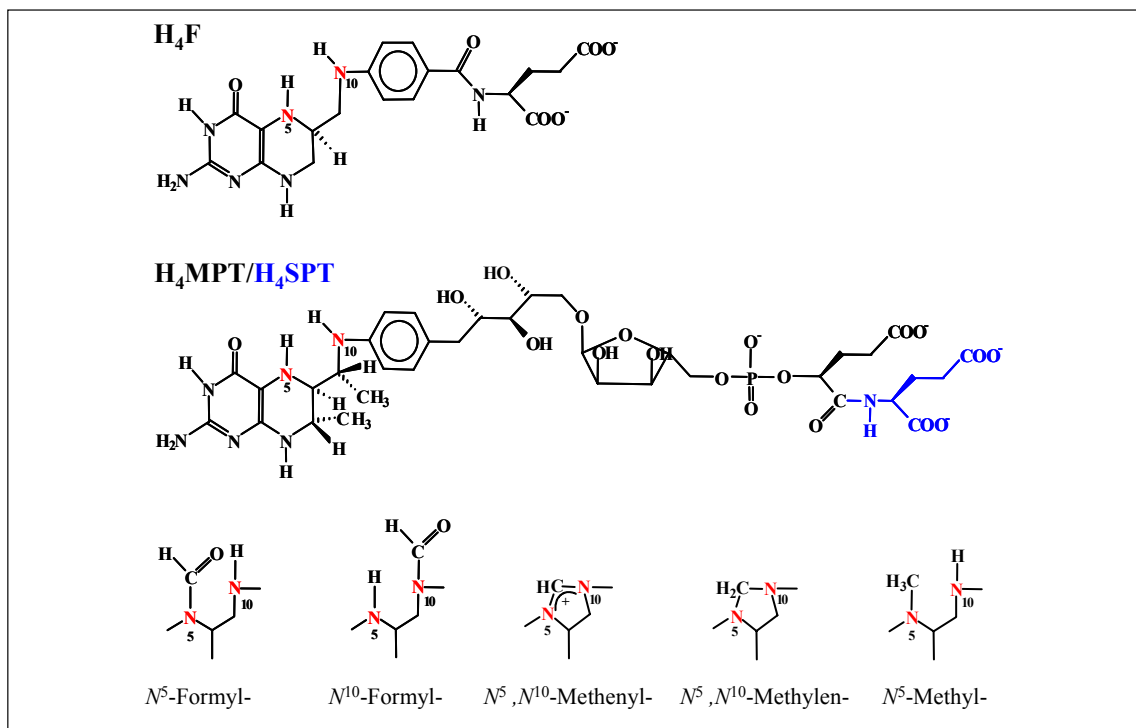


Abbildung 1: Strukturen von Tetrahydrofolat (H₄F) und Tetrahydromethanopterin (H₄MPT)/Tetrahydrosarcinapterin (H₄SPT) sowie ihren C₁-Derivaten. H₄F kann zusätzlich bis zu 8 Glutamatreste tragen (Cossins, 1984), die über die γ -Carboxylgruppe des Glutamatrestes mit dem Coenzym peptidartig verbunden sind. Das in *Methanosarcinales* gefundene H₄SPT unterscheidet sich von H₄MPT durch eine terminale Glutamatgruppe (dargestellt in blau) am α -Hydroxyglutarat. Dargestellt in rot sind die Stickstoffatome, die an der Bindung von C₁-Einheiten beteiligt sind.

Der funktionell wichtigste strukturelle Unterschied zwischen H₄F und H₄MPT/H₄SPT ist, dass H₄F über den aromatischen Ring eine elektronenziehende Carbonylgruppe in Konjugation zu N¹⁰ aufweist, während H₄MPT eine elektronenschiebende Methylengruppe in korrespondierender Position trägt. So wird N¹⁰ von H₄F mit einem pK_a von -1.2 und von H₄MPT/H₄SPT mit einem pK_a von + 2.4 protoniert (Kallen & Jencks, 1966; Thauer et al., 1996). Darüber hinaus üben die beiden Methylgruppen des Pyrazinrings von H₄MPT/H₄SPT einen zusätzlichen entropischen Effekt aus (Maden, 2000). Die strukturellen Unterschiede haben zur Konsequenz, dass sich die Hydrolyse- und Redoxpotentiale der an H₄F- bzw. H₄MPT-gebundenen C₁-Einheiten unterscheiden. So ist N¹⁰-Formyl-H₄F mit einem Hydrolysepotential von -22 kJ/mol „energiereich“, während N¹⁰-Formyl-H₄MPT mit einem Hydrolysepotential von -5 kJ/mol dies nicht ist. Die Hydrolyse von N⁵,N¹⁰-Methenyl-H₄F⁺ zu N¹⁰-Formyl-H₄F ist mit -6 kJ/mol exergon und die von N⁵,N¹⁰-Methenyl-H₄MPT⁺ zu N⁵-Formyl-H₄MPT mit +6 kJ/mol endergon. Darüber hinaus ist das Redoxpotential von N⁵,N¹⁰-Methenyl-H₄F⁺/N⁵,N¹⁰-Methylen-H₄F-Paars mit E^{o'} = -310 mV deutlich positiver als das des korrespondierenden H₄MPT-Paars mit E^{o'} = -390 mV (Thauer et al., 1996; Maden, 2000). Das gilt auch für das Redoxpotential des N⁵,N¹⁰-Methylen-H₄F/N⁵-Methylen-H₄F-Paars (-210 mV), das um 100 mV positiver ist als das des N⁵,N¹⁰-Methylen-H₄MPT/N⁵-Methyl-H₄MPT-Paars (-310 mV). Aufgrund dieser Unterschiede ist ein Teil der unterschiedlichen physiologischen Rollen verständlich, die H₄F und H₄MPT/H₄SPT in verschiedenen Organismen übernehmen.

H₄F wird in allen Eucarya, Bacteria und in Euryarchaeota der Ordnung *Halobacteriales* und in den Crenarchaeota der Gattungen *Pyrodictium* und *Thermoproteus* gefunden (Worrell & Nagle, 1988; White, 1991). In den meisten dieser Organismen wird H₄F ausgehend von Serin mit einer Formaldehydeinheit beladen, wobei neben Glycin N⁵,N¹⁰-Methylen-H₄F entsteht, das direkt zur Synthese von Thymidylat und α-Ketopantoat verwendet wird (Abb. 2, Reaktionen 5, 8 und 9). Die Reduktion von N⁵,N¹⁰-Methylen-H₄F führt über N⁵-Methyl-H₄F zu Methionin (Abb. 2, Reaktionen 4 und 7) und die Oxidation über N¹⁰-Formyl-H₄F zu den Purinen (Abb. 2, Reaktionen 3, 2, 11 und 12) und fMet-tRNA (nur in Bacteria) (Abb. 2, Reaktionen 3, 2 und 10). In diesen Organismen hat H₄F ausschließlich eine anabole Funktion (Matthews, 1996). In einigen Bakterien, zu denen die acetogenen und die autotrophen Bakterien mit Wood-Ljungdahl-Weg gehören, dient CO₂ als Vorläufer der C₁-Einheiten. Nach Reduktion zu Formiat wird dieses in einer ATP-abhängigen Reaktion auf H₄F unter Bildung von N¹⁰-Formyl-H₄F übertragen (Abb. 2, Reaktionen 13 und 1). In diesen Bakterien wird N⁵-Methyl-H₄F nicht nur für die Biosynthese von Methionin, sondern auch für

die Synthese von Acetyl-CoA verwendet (Abb. 2, Reaktion 6), das über Acetyl-Phosphat in Acetat umgewandelt wird und/oder nach reduktiver Carboxylierung zu Pyruvat für Biosynthesen Verwendung findet (Ljungdahl, 1994). Bei Wachstum von acetogenen Bakterien auf Methanol entsteht im ersten Schritt des Stoffwechsels N^5 -Methyl- H_4F (Abb. 2, Reaktion 14), dessen Methylgruppe zum einen in Acetyl-CoA eingebaut wird und zum anderen über N^5, N^{10} -Methylen- H_4F , N^5, N^{10} -Methenyl- H_4F^+ , N^{10} -Formyl- H_4F und Formiat zu CO_2 oxidiert wird (Abb. 2, Reaktionen 4, 3, 2, 1 und 13). Bei Wachstum von methylotrophen Bakterien auf Methan oder Methanol werden diese C_1 -Einheiten zuerst zu Formaldehyd oxidiert, das dann in einer spontanen Reaktion mit H_4F zu N^5, N^{10} -Methylen- H_4F reagiert (Vorholt, 2002). In diesen Bakterien wird Serin aus N^5, N^{10} -Methylen- H_4F und Glycin synthetisiert in Umkehrung der Serin-Hydroxymethyltransferase-Reaktion (Abb. 2, Reaktion 5).

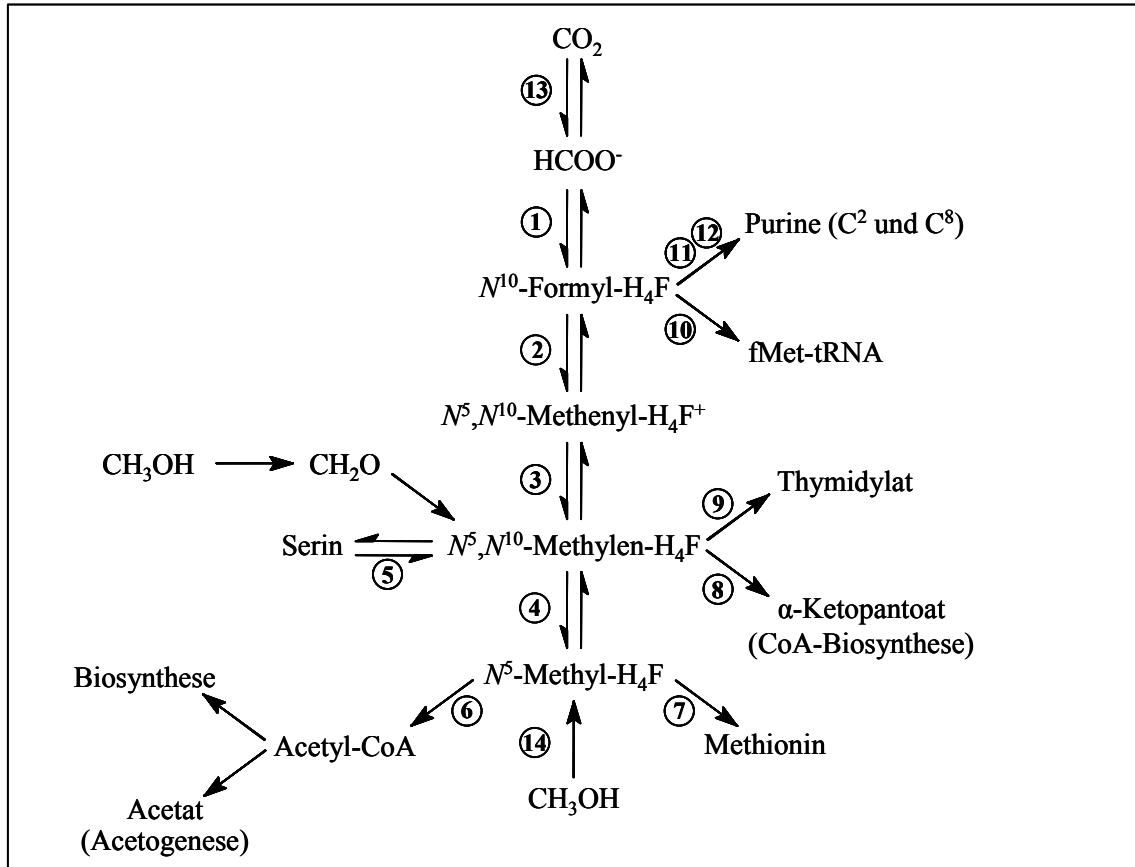


Abbildung 2: H_4F -abhängige Reaktionen im C_1 -Stoffwechsel von Bacteria, Eucarya und einigen Archaea. Reaktionen ⑥, ⑭ und ⑨ kommen nur in einigen Bacteria vor. ① Formyl- H_4F -Synthetase (Fhs); ② Methenyl- H_4F -Cyclohydrolase (Fch oder FolD); ③ Methylen- H_4F -Dehydrogenase (FolD); ④ Methylen- H_4F -Reduktase (MetF); ⑤ Serin-Hydroxymethyltransferase (GlyA); ⑥ Acetyl-CoA-Synthase; ⑦ Methionin-Synthase (MetE oder MetH); ⑧ α -Ketopantoat-Hydroxymethyltransferase (PanB); ⑨ Thymidylat-Synthase (ThyA oder Thy1/ThyX); ⑩ Formylmethionyl-tRNA-Synthase; ⑪ Phosphoribosylglycinamid-Formyltransferase (PurN); ⑫ Phosphoribosylaminoimidazolcarboxamid-Formyltransferase (PurH); ⑬ Formiat-Dehydrogenase (Fdh).

H₄MPT und Modifikationen davon wie z. B. H₄SPT (Abb. 1) werden in allen methanogenen Archaea, in sulfatreduzierenden Archaea, in *Sulfolobus*-, *Pyrococcus*-, und *Thermococcus*-Arten sowie in den meisten methyltrophen Bakterien gefunden (White, 1991; Vorholt, 2002; Gorris & van der Drift, 1994). Aus Genomsequenzen gibt es Hinweise, dass H₄MPT auch in einigen *Planctomycetes*-Arten vorkommt (Chistoserdova et al., 2004). In Abb. 3 sind die H₄MPT-abhängigen Reaktionen im Stoffwechsel von methanogenen Archaea zusammengefasst. Für die Rolle von H₄MPT im C₁-Stoffwechsel von methyltrophen Bakterien wird auf die Übersicht von Vorholt (2002) verwiesen.

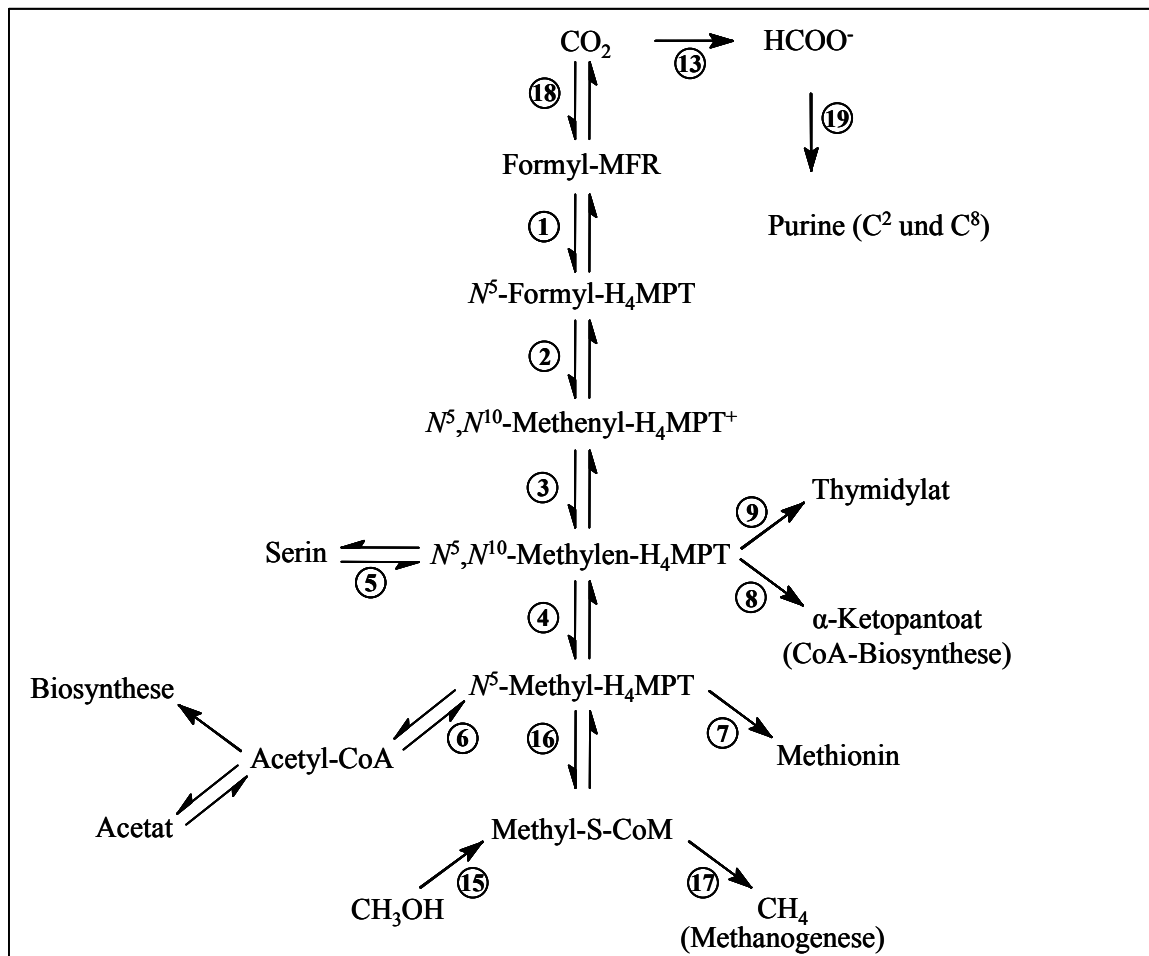


Abbildung 3: H₄MPT/H₄SPT-abhängige Reaktionen im C₁-Stoffwechsel von methanogenen Archaea.

- ① Formyl-Methanofuran:H₄MPT-Formyltransferase (Ftr); ② Methenyl-H₄MPT-Cyclohydrolase (Mch); ③ F₄₂₀-abhängige Methylen-H₄MPT-Dehydrogenase (Mtd), ④ F₄₂₀-abhängige Methylen-H₄MPT-Reduktase (Mer); ⑤ Serin-Hydroxymethyltransferase (GlyA); ⑥ CO-Dehydrogenase/Acetyl-CoA-Synthase; ⑦ Methionin-Synthase (MetH und MetE); ⑧ α-Ketopantoat-Hydroxymethyltransferase (PanB); ⑨ Thymidylat-Synthase (ThyA oder ThyX/Thy1); ⑬ Formiat-Dehydrogenase (Fdh); ⑮ Methanol:Coenzym-M-Methyltransferase (Mta); ⑯ Methyl-H₄MPT:Coenzym-M-Methyltransferase (Mtr); ⑰ Methyl-Coenzym-M-Reduktase (Mcr); ⑱ Formyl-Methanofuran-Dehydrogenase (Fmd); ⑲ Phosphoribosylglycinamid-Formyltransferase T (PurT); MFR, Methanofuran; CoM, Coenzym-M; In *Methanosarcinales* dient H₄SPT als C₁-Überträger (siehe Abb. 1).

Methanogene Archaea enthalten entweder H₄MPT oder H₄SPT. H₄MPT wird in methanogenen Archaea der Ordnungen *Methanobacteriales* und *Methanopyrales* und H₄SPT in methanogenen Archaea der Ordnungen *Methanosarcinales* und *Methanococcales* gefunden. Für *Methanomicrobiales* wurde das Vorkommen von Tatiopterin und Thermopterin beschrieben, die weitere Varianten von H₄MPT darstellen (Gorris & van der Drift, 1994). Im Folgenden wird zwischen H₄MPT und H₄SPT nur unterschieden, wenn es um den Stoffwechsel einzelner Methanbildner geht, da alle bisher bekannten Enzyme von methanogenen Archaea sowohl mit H₄MPT und H₄SPT aktiv sind als auch die beiden Coenzyme sich in ihren Gruppenübertragungs- und Redoxpotentialen der einzelnen C₁-Derivaten nicht unterscheiden.

H₄MPT ist in methanogenen Archaea sowohl am Energiestoffwechsel als auch am Baustoffwechsel beteiligt (Abb. 3). Die Reduktion von CO₂ zu Methan führt über N⁵-Formyl-H₄MPT und N⁵-Methyl-H₄MPT (Abb. 3, Reaktionen 18, 1, 2, 3, 4, 16 und 17) (Thauer, 1998). Dabei ist anzumerken, dass die Methenyl-H₄MPT-Cyclohydrolase die reversible Hydrolyse von N⁵,N¹⁰-Methenyl-H₄MPT⁺ zu N⁵-Formyl-H₄MPT katalysiert und sich deshalb von der Methenyl-H₄F-Cyclohydrolase unterscheidet, die N¹⁰-Formyl-H₄F generiert (Keltjens et al., 1992). Bei der Methanbildung aus Acetat wird die Methylgruppe von Acetyl-CoA auf H₄MPT unter Bildung von N⁵-Methyl-H₄MPT übertragen, deren Methylgruppe dann über Methyl-Coenzym-M zu Methan reduziert wird (Abb. 3, Reaktionen 6, 16 und 17) (Fischer et al., 1992; Fischer & Thauer, 1989).

Während die Rolle von H₄MPT im Energiestoffwechsel von methanogenen Archaea detailliert untersucht ist, ist dessen Rolle im Baustoffwechsel weniger klar. Bisher ist nur eine geringe Anzahl der daran beteiligten Enzyme in wenigen Organismen untersucht. Es wurde eine Methionin-Synthase in *Methanothermobacter marburgensis* beschrieben, die allerdings mit Methyl-Cobalamin als Methylgruppen-Donor getestet wurde. Da *M. marburgensis* definitiv kein H₄F enthält, muss davon ausgegangen werden, dass die Methylgruppe von Methionin letztlich aus dem C₁-H₄MPT-Pool des Organismus stammt (Schröder & Thauer, 1999). Das gilt auch für die Methylgruppe von Thymidin, obwohl die getestete Thymidylat-Synthase (ThyA) mit N⁵,N¹⁰-Methylen-H₄MPT inaktiv war (Krone et al., 1994). In *Methanococcus jannaschii* wurde eine Thymidylat-Synthase gefunden, die nur mit N⁵,N¹⁰-Methylen-H₄F aktiv war, obwohl auch dieser Organismus kein H₄F enthalten dürfte (Xu et al., 1999). Thymidylat-Synthase-Aktivität wurde in zellfreien Extrakten von *M. thermophila* mit Formaldehyd und dUMP als Substrate gefunden und deshalb vermutet, dass das Enzym in diesem Archaeon mit Methylen-H₄SPT aktiv ist (Nyce & White, 1996).

Festzustehen scheint allerdings, dass H₄MPT in methanogenen Archaea nicht an der Purinbiosynthese beteiligt ist. Der Einbau der Formylgruppe von N⁵-Formyl-H₄MPT in die Positionen C² und C⁸ der Purine ist aus thermodynamischen Gründen nicht möglich, da N⁵-Formyl-H₄MPT relativ zu N¹⁰-Formyl-H₄F ein zu geringes Gruppenübertragungspotential besitzt (Thauer et al., 1996; Maden, 2000). Es gibt Hinweise dafür, dass in den meisten methanogenen Archaea die Synthese von C² und C⁸ der Purine von CO₂ ausgeht, das zunächst zu Formiat reduziert wird und anschließend in einem ATP-abhängigen Schritt in die beiden Positionen eingebaut wird (Abb. 3, Reaktionen 13 und 19) (Kappock et al., 2000; Marolewski et al., 1997). Die Gene für die dafür benötigten Enzyme, Formiat-Dehydrogenase (Fdh) und Phosphoribosylglycinamid-Formyltransferase (PurT), wurden in den meisten methanogenen Archaea – mit Ausnahme der *Methanosarcinales* – gefunden (Bult et al., 1996; White, 1997). ¹³C-Markierungsexperimente haben ergeben, dass in *Methanosarcina barkeri* - anders als in den meisten methanogenen Organismen - die Kohlenstoffatome C² und C⁸ der Purine nicht ausgehend von CO₂ und/oder Formiat synthetisiert werden, sondern aus C² von Acetat stammen (Choquet et al., 1994). Da unter den Wachstumsbedingungen Methan ausschließlich aus CO₂ gebildet wurde, schließt dieses Ergebnis die Beteiligung von Intermediaten der Methanbildung an der Synthese von C² und C⁸ der Purine aus (Hippe et al., 1979; Weimer & Zeikus, 1978).

Einen Hinweis, wie in *Methanosarcina* C² und C⁸ der Purine gebildet werden, geben die Genomsequenzen von *Methanosarcina acetivorans*, *M. mazei*, *M. thermophila* und *M. barkeri*. Bei der Annotierung wurden in allen vier Organismen Gene gefunden, die für Serin-Hydroxymethyltransferase (GlyA), Methylen-H₄F-Dehydrogenase/Methenyl-H₄F-Cyclohydrolase (FolD), Phosphoribosylglycinamid-Formyltransferase (PurN) und Phosphoribosylaminoimidazolcarboxamid-Formyltransferase (PurH) kodieren könnten (Galagan et al., 2002; Prof. Dr. J. Ferry, persönliche Mitteilung; http://genome.jgi-psf.org/draft_microbes/metba/metba.home.html). Das spricht dafür, dass in *Methanosarcina* C² und C⁸ der Purine über den Folatweg aus C³ von Serin synthetisiert werden (Abb. 2, Reaktionen 5, 3, 2, 11 und 12), was auch mit den Markierungsdaten übereinstimmen würde. Gene für FolD, PurN und PurH scheinen in den Genomen von *Methanothermobacter thermoautotrophicus*, *Methanococcus jannaschii* und *Methanopyrus kandleri* (Smith et al., 1997; Bult et al., 1996; Slesarev et al., 2002) zu fehlen, was in Einklang mit der Tatsache steht, dass diese Archaea C² und C⁸ der Purine aus CO₂ über freies Formiat synthetisieren (White, 1997).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu klären, ob die als *glyA*, *fold* und *purN* annotierten Gene in *Methanosarcina* wirklich für H₄F-spezifische Enzyme kodieren und exprimiert werden. Für den Fall, dass dies zutrifft, sollte darüber hinaus geprüft werden, ob Zellen dieser Gattung H₄F enthalten, wofür es bisher keine Hinweise gab. Für die folgenden Untersuchungen wurde *M. barkeri* ausgewählt, der auf Methanol als Energie- und Kohlenstoffquelle gezogen wurde. Im Energiestoffwechsel dieses Organismus wird Methanol zum einen über Methyl-Coenzym-M zu Methan reduziert und zum anderen über Methyl-Coenzym-M, N⁵-Methyl-H₄SPT, N⁵,N¹⁰-Methylen-H₄SPT, N⁵,N¹⁰-Methenyl-H₄SPT⁺, N⁵-Formyl-H₄SPT und Formyl-Methanofuran zu CO₂ oxidiert (Abb. 3, Reaktionen 15, 16, 4, 3, 2, 1 und 18) (Keltjens & Vogels, 1993; Thauer, 1998). Im Baustoffwechsel wird Methanol über Methyl-Coenzym-M, N⁵-Methyl-H₄SPT und Acetyl-CoA assimiliert (Abb. 3, Reaktionen 15, 16 und 6) (Simpson & Whitman, 1993).

III Material und Methoden

1. Verwendete Materialien

Chemikalien und Biochemikalien. Tetrahydromethanopterin (H₄MPT) und Coenzym F₄₂₀ wurden aus *Methanothermobacter marburgensis* (DSM 2133) (vormals *Methanobacterium thermoautotrophicum* Stamm Marburg (Wasserfallen et al., 2000)) gereinigt (Shima & Thauer, 2001) und freundlicherweise von R. Böcher und J. Moll zur Verfügung gestellt. Tetrahydrosarcinapterin (H₄SPT) wurde aus *Methanosarcina barkeri* Stamm Fusaro (DSM 804) wie in Grahame (1991) beschrieben gereinigt und mittels MALDI/TOF Massenspektrometrie (siehe 7.1) identifiziert. (6S-) Tetrahydrofolat (H₄F) war ein Geschenk von A. G. Eprova, Schaffhausen, Schweiz. (6R,S-) Methenyl-H₄F⁺ wurde von Schircks Laboratories (Jona, Schweiz) bezogen. Methenyl-H₄MPT⁺ wurde wie bei Donnelly et al. (1985) beschrieben synthetisiert. Die Ausbeute betrug 27%. Anaerobe Stocklösungen von H₄MPT, H₄SPT, H₄F bzw. dessen Derivate wurden in 200 mM K₂HPO₄ mit 50 mM β-Mercaptoethanol hergestellt. Folsäure (98%) wurde von Merck (Darmstadt) bezogen. Sulfanilamid und Anhydrotetracyclin stammten von Sigma (Taufkirchen). Alkohol-Dehydrogenase aus Hefe war von Boehringer (Mannheim). Methylen-H₄MPT-Dehydrogenase (MtdA) aus *Methylobacterium extorquens* AM1 wurde aus einem rekombinanten *Escherichia coli*-Stamm, der freundlicherweise von Dr. C. H. Hagemeyer zur Verfügung gestellt wurde, wie bei Hagemeyer et al. (2000) beschrieben gereinigt. Methylen-H₄F-Reduktase wurde aus einem rekombinanten *Escherichia coli*-Stamm (EET01), der freundlicherweise von Prof. Dr. R. Matthews zur Verfügung gestellt wurde, wie bei Sheppard et al. (1999) beschrieben gereinigt.

Restriktionsendonukleasen, T4-Ligase, T7-DNA-Polymerase und Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid (IPTG) wurden von Amersham Biosciences (Freiburg) bezogen. Synthetische Oligonukleotide wurden von MWG-Biotech (München) synthetisiert. Expand High Fidelity PCR System Kit ist ein Produkt von Roche Diagnostics (Mannheim). Vent-DNA-Polymerase stammte von New England Biolabs GmbH (Frankfurt). Das TOPO-TA-Cloning Kit wurde von Invitrogen (Groningen, Niederlande) sowie der QIAprep Spin Miniprep Kit und der QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen (Hilden) bezogen.

Radioisotope. Die Radioisotope [Ring-¹⁴C]-*p*-Aminobenzoesäure (2,04 MBq/μmol; 3,7 MBq/ml) und [Carboxyl-¹⁴C]-*p*-Aminobenzoesäure (2,15 MBq/μmol; 3,7 MBq/ml)

stammten von Hartman Analytic GmbH, Braunschweig. 5- ^{14}C -Methyl-Tetrahydrofolat (2,11 MBq/ μmol) wurde von Amersham Biosciences (Freiburg) bezogen.

Gas. Die Gase N_2 (Reinheit: 99,993%), H_2 (Reinheit: 99,993%) sowie N_2/H_2 (95%/5%) (Reinheit: 99,996%) wurden von der Firma Messer Griesheim (Siegen) bezogen.

Säulenmaterialien. Alle verwendeten FPLC-Säulenmaterialien stammten von Amersham Biosciences (Freiburg). Ni^{2+} -NTA-Agarose wurde von Qiagen (Hilden) bezogen. Die verwendete HPLC-Säule LiCrospher 100 RP-18 war von Merck (Darmstadt). Zum Ankonzentrieren und Entsalzen von Proteinfractionen wurden Amicon[®] Ultra-Filtriereinheiten (Millipore, Eschborn) verwendet.

Anaerobe Lösungen. Verwendete Puffer und Lösungen wurden durch Membranfilter (0,2 μm ; Pall Gelman Laboratories, Dreieich) filtriert und durch Aufkochen unter einer Stickstoffatmosphäre sowie durch Entgasen bei angelegtem Vakuum anaerobisiert. Anaerobe Arbeiten wurden in einem Anaerobenzelt (Coy, Ann Arbor, MI, USA) unter einer 95% N_2 /5% H_2 -Atmosphäre durchgeführt. Methanol wurde durch wiederholte Beschallung mit Ultraschall unter mehrfachem Austausch der Gasphase mit N_2 anaerobisiert.

Alle nicht aufgeführten Standardchemikalien waren Produkte der Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Biomol (Hamburg).

2 Kultivierung von *Methanosarcina barkeri*

2.1.1 Verwendete Medien und Wachstumsbedingungen

M. barkeri Stamm Fusaro (DSM 804) wurde von der Deutschen Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, Germany) bezogen. Die anaerobe Kultivierung erfolgte bei 37°C mit Methanol (250 mM) als Energiesubstrat. Das verwendete Medium nach Karrasch et al. (1989) wurde modifiziert und ist in Tab. 1 wiedergegeben. Wenn nicht anders angegeben, wurde dem Medium nach dem Autoklavieren standardmäßig *p*-Aminobenzoesäure mit einer Endkonzentration von 0,36 μM sterilfiltriert zugegeben (Folsäure wurde lediglich bei den auf S. 14 beschriebenen Wachstumsversuchen zugegeben). Die Zellen wurden in 100 ml-Serumflaschen, die 50 ml Medium enthielten, oder in 500 ml-Schottflaschen, die 200 ml Medium enthielten, unter einer N_2 -Atmosphäre gezogen. Um größere Zellmengen zu erhalten, erfolgte die Anzucht in 10,5 l-Glasflaschen (Schott, Mainz), die 10 l Medium enthielten. In Zeitintervallen von 12 h wurde der durch die Bildung von Methan und CO_2 bei Wachstum auf Methanol entstandene Gasdruck mittels einer Kanüle

entlassen. Die Zellernte erfolgte in der spätexponentiellen Phase bei 4°C unter strikt anaeroben Bedingungen entweder mittels einer Durchflusszentrifuge (Heraeus, Osterode) bei 15 000 rpm oder in zuvor anaerobisierten 0,5 l-Zentrifugenbechern für 30 min bei 10 000 g (4°C). Die geernteten Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung unter 0,5 bar H₂ bei –20°C aufbewahrt. Das Wachstum wurde photometrisch anhand der optischen Dichte bei 578 nm verfolgt.

Tabelle 1: Zusammensetzung des Standardmediums von *Methanosarcina barkeri* (Mengenangaben pro l). Zusammensetzung (a) des Mediums, (b) der Spurenelemente-Lösung, (c) der Vitamin-Lösung, (d) der Folsäure-Stammlösung und (e) der *p*-Aminobenzoesäure-Stammlösung. Der pH-Wert des Mediums sowie der Spurenelemente-Lösung wurde auf 7,0 eingestellt. Folsäure und/oder *p*-Aminobenzoesäure wurden dem Medium nach dem Autoklavieren sterilfiltriert zugegeben.

(a) Medium		(b) Spurenelemente-Lösung		(c) Vitamin-Lösung	
Komponente	Menge	Komponente	Menge	Komponente	Menge
Imidazol	2,72 g	Titriplex I	1,5 g	Biotin	2 mg
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	0,069 g	MnSO ₄ x H ₂ O	0,5 g	Pyridoxin-HCl	10 mg
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	0,088 g	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,15 g	Thiamin-HCl	5 mg
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,248 g	CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,1 g	Riboflavin	5 mg
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	0,4 g	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,1 g	Nicotinsäure	5 mg
KCl	0,4 g	CuSO ₄ x 6 H ₂ O	0,01 g	D,L-Ca-Pantothenat	5 mg
NaCl	2 g	AlCl ₃ x H ₂ O	0,01 g	Vitamin B ₁₂	0,1 mg
NH ₄ Cl	0,5 g	H ₃ BO ₃	0,01 g	Liponsäure	5 mg
FeCl ₃	3 mg	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,01 g		
0,2% Resazurin	0,1 ml	NiCl ₂ x 6 H ₂ O	0,03 g	(d) Folsäure-Stammlsg. ^{*1}	
Spurenelemente-Lsg.	10 ml	Na ₂ SeO ₃ x H ₂ O	0,025 g	(e) <i>p</i>-Aminobenzoesäure-Stammlsg. ^{*2}	
Vitamin-Lsg.	10 ml				
L-Cystein-HCl	0,14 g				
Na ₂ S x 9 H ₂ O	0,28 g				
Methanol (100%)	10 ml				
(d) Folsäure-Stammlsg.	—				
(e) <i>p</i>-Aminobenzoesäure-Stammlsg.	10 ml				

^{*1} **Folsäure-Stammlösung:** Die Konzentration der gesättigten Stammlösung (>1,6 mg/l; The Merck Index, 2001) dieser schwer wasserlöslichen Substanz wurde photometrisch bei 280 nm unter Verwendung eines Extinktionskoeffizienten von $\epsilon_{280} = 27,5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Temple & Montgomery, 1984) bestimmt und betrug 6 μM .

^{*2} ***p*-Aminobenzoesäure-Stammlösung:** *p*-Aminobenzoesäure (5 mg/l) wurde anaerob in Aqua dest. angesetzt und bei Bedarf verdünnt.

Wachstum von *M. barkeri* in Abhängigkeit von Folsäure bzw. *p*-Aminobenzoesäure. Um die Abhängigkeit des Wachstums von *M. barkeri* von Folsäure bzw. *p*-Aminobenzoesäure zu untersuchen, wurde zu 50 ml Methanolmedium Folsäure bzw. *p*-Aminobenzoesäure in unterschiedlichen Konzentrationen sterilfiltriert aus anaeroben Stammlösungen zugegeben. Die Inokulation erfolgte 10%ig mit einer an 20 nM *p*-Aminobenzoesäure adaptierten Vorkultur.

Wachstum von *M. barkeri* in Gegenwart von Sulfanilamid. Um die Hemmwirkung von Sulfanilamid auf das Wachstum von *M. barkeri* in Gegenwart von *p*-Aminobenzoesäure zu untersuchen, wurden 50 ml Methanolmedium, die 20 nM *p*-Aminobenzoesäure enthielten, mit unterschiedlichen Konzentrationen von Sulfanilamid supplementiert und 10%ig mit einer an 20 nM *p*-Aminobenzoesäure adaptierten Vorkultur inokuliert. (Sulfanilamid-Stammlösung (120 mM) wurde anaerob in Methanol hergestellt und ggf. verdünnt. Die Zugabe zum Medium erfolgte nach dem Autoklavieren.)

2.1.2 Messung der Aufnahme von [¹⁴C]-*p*-Aminobenzoesäure

Um die Aufnahme von *p*-Aminobenzoesäure in wachsende *M. barkeri*-Zellen zu untersuchen, wurde *M. barkeri* auf Methanolmedium, das mit 80 nM [Carboxyl-¹⁴C]- oder mit 80 nM [Ring-¹⁴C]-*p*-Aminobenzoesäure supplementiert wurde, kultiviert. Die Zugabe von 10 µl [Carboxyl-¹⁴C]-*p*-Aminobenzoesäure (2,15 MBq/µmol; 3,7 MBq/ml) oder 10 µl [Ring-¹⁴C]-*p*-Aminobenzoesäure (2,04 MBq/µmol; 3,7 MBq/ml) zu 200 ml Medium erfolgte mittels einer Unimatrix-Mikroliterspritze (Machery-Nagel, Düren) unmittelbar vor Inokulation mit 20 ml Vorkultur, die in Gegenwart von 20 nM unmarkierter *p*-Aminobenzoesäure gezogen wurde. Während der Inkubation bei 37°C wurde entstehendes Gas kontinuierlich durch Barytwasser (40 g/l) geleitet, um CO₂ in Form von BaCO₃ auszufällen. In Zeitabständen von 8 h wurden Aliquots der Kulturen entnommen, mit 25% HCl angesäuert (~ pH 2), 5 min mit N₂/CO₂ durchgast und die Radioaktivität von 1 ml Kultur sowie die Radioaktivitäten des aus 1 ml Kultur gewonnenen Zellpellets und Überstandes zu bestimmen. Hierzu wurde 1 ml Kultur 5 min bei 13 000 rpm mit einer Tischzentrifuge (Hettich GmbH, Tuttlingen) abzentrifugiert und das erhaltene Pellet durch Resuspendieren in 1 ml 50 mM Mops/KOH pH 7,0 und erneutem Abzentrifugieren gewaschen. Das Pellet wurde anschließend in 1 ml *p*-Aminobenzoesäure-freiem Medium aufgenommen und wie alle anderen Proben mit 9 ml Quicksafe-A-Szintillationscocktail (Zinsser Analytic, Frankfurt) gemischt. Die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte durch 10-minütiges Zählen jeder Proben in einem Beckman LS 6500 Szintillationssystem (Beckman Instruments Inc.,

Fullerton, CA, USA). Nach Ernte der Zellen (siehe 2.1.1) wurden 1,1 g Feuchzellen 1:25 (w/v) in 50 mM Citrat-Puffer pH 6,0 resuspendiert (4°C). 2 ml der Suspension wurden mit 25%iger HCl angesäuert und mittels Ultraschall (Sonopuls HD 200, Bandelin, Berlin) aufgeschlossen, wobei die Zellen in einem durch Eiswasser gekühlten Reagenzglas viermal 5 min mit 200 Watt Ausgangsleistung beschallt wurden. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 13 000 rpm (4°C) wurde sowohl der Überstand als auch das resuspendierte Pellet für 15 min mit N₂/CO₂ durchgast und die Radioaktivität des Lysats, des Überstandes und des Pellets wie oben beschrieben bestimmt.

Der Versuch wurde analog mit 450 nM und mit 1800 nM [¹⁴C]-*p*-Aminobenzoesäure im Medium durchgeführt, wobei die Erhöhung der Endkonzentration von *p*-Aminobenzoesäure durch die Zugabe von unmarkierter *p*-Aminobenzoesäure zum Medium erreicht wurde. Die spezifischen Radioaktivitäten betragen: 80 nM (2,15 MBq/μmol), 450 nM (0,084 MBq/μmol) oder 1800 nM (0,084 MBq/μmol).

2.2 Herstellung von Zellextrakt

Zur Herstellung von Zellextrakt wurden *M. barkeri*-Zellen in einem Anaerobenzelt (Coy, Ann Arbor, Michigan, USA) 1:5 (w/v) in 50 mM Mops/KOH pH 7,0 resuspendiert (4°C). Der Aufschluss erfolgte mittels fünfmaliger Passage durch eine vorgekühlte und zuvor anaerobisierte French-Press-Zelle (American Instrument Company, Maryland, USA) bei einem Druck von $1,2 \times 10^8$ Pa. Anschließend wurden Zelltrümmer und nicht aufgeschlossene Zellen durch Zentrifugation bei 30 000 g für 30 min (4°C) in zuvor anaerobisierten Zentrifugenbechern entfernt. Der resultierende Überstand wird im Folgenden als Zellextrakt bezeichnet.

2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentrationsbestimmung von Protein wurde mit dem Roti[®]-Nanoquant-Mikroassay von Roth (Karlsruhe) durchgeführt. Das Testprinzip beruht auf der Verschiebung des Extinktionsmaximums von Coomassie Brilliantblau R250 in saurer Lösung von 465 nm nach 595 nm durch Bindung des Farbstoffs an Protein (Bradford, 1976; Zor & Selinger, 1996). Dazu wurden 0,8 ml Probe bzw. Rinderserumalbumin als Standard (0-25 μg Protein pro 0,8 ml) mit 0,2 ml Proteinfarbstoffreagenz versetzt und die Extinktion der Lösung bei 590 nm sowie bei 450 nm photometrisch bestimmt.

3 Heterologe Überproduktion von FOLD, GlyA, MetF und PurN in *E. coli*

3.1 Verwendete Oligonukleotide und Plasmide

In Tab. 2 sind alle Oligonukleotide aufgeführt, die zur Konstruktion der in Tab. 3 aufgelisteten Plasmide verwendet wurden. Synthetisiert wurden sie von der Firma MWG-Biotech (München). In Tab. 3 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide aufgeführt.

Tabelle 2: Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz	Verwendung
glyA-NdeI(forward) glyA-XhoI-Stop	5'-GGGAATTCCATATGCTTACATTGAAAAA-3' 5'-CCGCTCGAGTTAACAATAAACAGGGAACCT-3'	Amplifikation von <i>glyA</i> aus <i>M. barkeri</i>
metF-NdeI(forward) metF-XhoI(backward)	5'-GGGAATTCCATATGCTCTTTAATTTTCGT-3' 5'-CCGCTCGAGTTTCCCGGAAATTCCTGCCAT-3'	Amplifikation von <i>metF</i> aus <i>M. barkeri</i>
metF-NdeI(forward) metF-XhoI-Stop	5'-GGGAATTCCATATGCTCTTTAATTTTCGT-3' 5'-CCGCTCGAGTTATTTCCCGGAAATTCCTGC-3'	Amplifikation von <i>metF</i> aus <i>M. barkeri</i>
metF-pMal-(forward) metF-Sall-(backward)	5'-CGGGATCCATGCTCTTTAATTTTCGT-3' 5'-GTCGGTCGACTTATTTCCCGGAAAT-3'	Amplifikation von <i>metF</i> aus <i>M. barkeri</i>
metF-NcoI(forward) metF-XhoI-Stop	5'-CATGCCATGGGAATGCTCTTTAATTTTCGT-3' 5'-CCGCTCGAGTTATTTCCCGGAAATTCCTGC-3'	Amplifikation von <i>metF</i> aus <i>M. barkeri</i>
purN-NdeI_fw purN-XhoI-His_bw	5'-GGGAATTCCATATGACTGTAAAAATTGCA-3' 5'-CCGCTCGAGAATCCCGGTTACTACATTTCT-3'	Amplifikation von <i>purN</i> aus <i>M. barkeri</i>

Tabelle 3: Verwendete Plasmide

Plasmide	Beschreibung	Referenz
pCR [®] 2.1-TOPO [®]	Vektor zur Klonierung von PCR-Produkten mit 5'-polyA-Überhängen; Amp ^r , Kan ^r	Invitrogen (Groningen, Niederlande)
pET24b+	Vektor zur Expression von Proteinen mit C-terminalem His-Tag; Kan ^r	Novagen (Bad Soden)
pET32c+	Vektor zur Expression von Proteinen mit N-terminalem Thioredoxin-Tag; Amp ^r	Novagen (Bad Soden)
pMal-c2x	Vektor zur Expression von Fusionsproteinen mit N-terminalem Maltose-Bindeprotein; Amp ^r	New England Biolabs GmbH (Frankfurt)
pASK-IBA7	Vektor zur Expression von Proteinen mit N-terminalem <i>Strep</i> -Tag II; Amp ^r	IBA GmbH (Göttingen)
pARKJ4	Vektor zur Expression von DnaK und DnaJ aus <i>E. coli</i> ; Spec ^r	Tomoyasu et al., 2001
pSE3	Vektor zur Expression von GrpE aus <i>E. coli</i> ; Cm ^r	Tomoyasu et al., 2001
pGroESL	Vector zur Expression von GroES und GroEL aus <i>E. coli</i> ; Cm ^r	Goloubinoff et al., 1989
pET24b+/fold-His ₆	pET24b-Vektor, in den das <i>fold</i> -Gen aus <i>M. barkeri</i> kloniert wurde	Buchenaus, 2001
pET24b+/glyA	pET24b-Vektor, in den das <i>glyA</i> -Gen aus <i>M. barkeri</i> kloniert wurde	diese Arbeit
pET24b+/purN-His ₆	pET24b-Vektor, in den das <i>purN</i> -Gen aus <i>M. barkeri</i> kloniert wurde	diese Arbeit
pET24b+/metF	pET24b-Vektor, in den das <i>metF</i> -Gen aus <i>M. barkeri</i> kloniert wurde	diese Arbeit
pET32c+/metF-His ₆ -Trx	pET32c-Vektor, in den das <i>metF</i> -Gen aus <i>M. barkeri</i> kloniert wurde	diese Arbeit
pASK-IBA7/metF	pASK-IBA-Vektor, in den das <i>metF</i> -Gen aus <i>M. barkeri</i> kloniert wurde	diese Arbeit
pMal-c2x/metF	pMal-Vektor, in den das <i>metF</i> -Gen aus <i>M. barkeri</i> kloniert wurde	diese Arbeit

3.2 Verwendete *Escherichia coli*-Stämme und Kultivierung

In Tab. 4 sind alle in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Stämme aufgelistet.

Tabelle 4: Verwendete Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
One shot® TOP 10	F ⁻ , <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>)Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rps(St^R) endA1 nupG</i>	Invitrogen (Groningen, Niederlande)
DH5α	<i>endA1 hsdR17 (r_K⁻m_K⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA (Nal^R) relA1 Δ(lacZYA-argF) U169 deoR (Φ80<i>dlac</i>Δ(<i>lacZ</i>)M15)</i>	Hanahan, 1983
BL21-CodonPlus™(DE3)-RIL	F ⁻ , <i>ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) dcm+ Tet^r gal l (DE3) endA Hte [argU ileY leu Cam^r]</i>	Stratagene (Amsterdam, Niederlande)
AD494(DE3)	Δ <i>ara⁻ leu7967 ΔlacX74 ΔphoAPvuII phoR ΔmalF3 F' [lac⁺lacI^q]</i> (DE3)	Novagen (Bad Soden)
Rosetta(DE3)pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm lacY1</i> (DE3) pLysRARE (Cm ^r)	Novagen (Bad Soden)
EET01	-	Sheppard et al., 1999
CH2	-	Hagemeyer et al., 2000

Kultivierung. Wenn nicht anders angegeben, wurde *E. coli* auf Luria-Bertani (LB)-Medium (Sambrook et al., 1989) bei 37°C angezogen. Antibiotika wurden nach Bedarf in den folgenden Konzentrationen zugesetzt: 100 µg Ampicillin/ml; 50 µg Kanamycin/ml; 34 µg Chloramphenicol/ml; 100 µg Spectinomycin/ml. X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galaktopyranosid) zum Blau-Weiss-Test auf Agarplatten wurde in einer Konzentration von 30 µg/ml zugesetzt.

3.3 Klonierung der Gene zur heterologen Expression

3.3.1 Methoden zur Klonierung

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt (White, 1993). Als Matrize diente genomische DNA aus *M. barkeri*, die von Dr. G. Mander zur Verfügung gestellt wurde. Die 20 µl Reaktionsansätze enthielten neben 25 pg genomischer DNA, je 1 µM jedes Oligonukleotidprimers (siehe Tab. 2), je 250 µM jedes Desoxyribonukleotidtriphosphats (Roche Diagnostics, Mannheim) sowie 0,7 U Polymerase und MgCl₂-haltigen Puffer (Expand High Fidelity PCR System, Roche Diagnostics, Mannheim) oder 1 U Vent-DNA-Polymerase (New England Biolabs GmbH, Frankfurt). Das PCR-Programm wurde wie folgt gewählt: Schritt 1: 96°C 5 min, Schritt 2:

96°C 1 min, Schritt 3: 57°C 1 min, Schritt 4: 72°C 1 min, Schritt 5: 96 °C 1 min, Schritt 6: 62°C 1 min, Schritt 7: 72°C 1 min, Schritt 8: 72°C 10 min, Schritt 9: 4°C, wobei die Schritte 2-4 2-mal und die Schritte 5-7 30-mal wiederholt wurden. Für die Amplifikation von *metF* zur Klonierung in die Vektoren pASK-IBA7 bzw. pMal-c2x wurde das PCR-Programm abgeändert, indem die Temperatur von Schritt 3 von 57°C auf 56°C herabgesetzt wurde.

Die PCR-Produkte wurden zur Kontrolle gelelektrophoretisch aufgetrennt und einer Restriktionsanalyse unterzogen. Je nach Verwendung des Produktes erfolgte eine Ligation in den pCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor (Invitrogen, Groningen, Niederlande) oder nach erfolgter Restriktion des PCR-Produktes in einen anderen Vektor.

Präparation, Restriktion und Detektion von DNA

Plasmid-DNA-Präparation. Plasmid-DNA wurde im kleinen Maßstab (2 ml-Kulturen) mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen, Hilden) gereinigt. Die Bestimmung der Plasmid-DNA-Konzentration und deren Reinheit erfolgte photometrisch bei 260 nm und 280 nm. Ein ΔE_{260} -Wert von 1 entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml (Sambrook et al., 1989).

Restriktion und Reinigung von DNA. Analytische DNA-Restriktion wurde standardmäßig in 10 µl Reaktionsansätzen, die 6-8 U Restriktionsendonuklease enthielten, durchgeführt. Die Inkubation erfolgte in den entsprechenden Reaktionspuffern nach Angaben des Herstellers für 1-2 h bei 37°C.

Präparative Restriktionen wurde in 20 µl bzw. 40 µl Reaktionsansätzen, die je 20 U Restriktionsendonuklease enthielten, durchgeführt. Die Inkubation erfolgte nach Angaben der Hersteller für 2-3 h bei 37°C. Restringierte Vektor-DNA wurde mit Shrimp Alkaline Phosphatase (Amersham Biosciences, Freiburg) an den 5'-Enden dephosphoryliert. Die Inkubationsdauer betrug 30 min bei 37°C. Anschließend wurden die Enzyme für 20 min bei 65°C hitzeinaktiviert. Zur Reinigung der restringierten Insert-DNA wurden die DNA-Fragmente über ein 1%iges Agarosegel aufgetrennt, Banden erwarteter Größe ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit aus dem Gel extrahiert. Anschließend wurde die DNA aus dem Eluat mittels Natriumacetatfällung präzipitiert.

Präzipitation von DNA. Zur Fällung von DNA nach Sambrook et al. (1989) wurde der jeweilige Ansatz mit 2,5 Volumenanteilen 100% (v/v) Ethanol und 0,1 Volumenanteil 3 M Natriumacetat-Lösung pH 5,0 versetzt, für 10 min bei -80°C inkubiert und anschließend für 10 min bei 12 000 x g zentrifugiert. Die sedimentierte DNA wurde mit 70% (v/v) Ethanol

gewaschen und durch 10-minütige Zentrifugation bei 12 000 x *g* erneut pelletiert. Das DNA-Pellet wurde getrocknet und in der gewünschten Menge Aqua dest. gelöst.

Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten. Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe von 1%igen Agarosegelen (Sambrook et al., 1989) in 0,5 x TAE-Puffer (20 mM Tris/Acetat pH 8,0, 0,5 mM EDTA) bei einer angelegten Spannung von 100 V. Als Größenstandard diente Smart-Ladder-Marker (Eurogentech, Seraing, Belgien). Die Gele wurden in Ethidiumbromidlösung (2 µg/ml Wasser) gefärbt und nach kurzem Wässern im UV-Durchlicht der Wellenlänge 302 nm photographiert.

Ligation und Transformation von *Escherichia coli*

Ligation. Das zu ligierende DNA-Fragment wurde in einem 10 µl Ansatz mit 2 U T4-Ligase nach Angaben des Herstellers (Amersham Biosciences, Freiburg) über Nacht bei 15°C inkubiert. Die zu inserierende DNA wurde in einem 5 bis 10-fachen Überschuss im Verhältnis zum Vektor eingesetzt. Anschließend wurde der Ligationsansatz für 30 min mittels einer Membran (0,025 µm Porengröße, Millipore, Eschborn) gegen Aqua dest. dialysiert.

Transformation von *Escherichia coli*. Chemisch kompetente One shot TOP[®]10-Zellen (Invitrogen, Groningen, Niederlande) wurden nach dem Standardprotokoll des Herstellers transformiert. Die Elektrotransformation von *E. coli* DH5α, BL21-CodonPlus[™](DE3)-RIL, AD494(DE3) und Rosetta(DE3)pLysS erfolgte mit dem BioRad Gene Pulser II (BioRad, München) in einer vorgekühlten Elektroporationsküvette (1 mm Spaltbreite), in die die Zellen zusammen mit dem dialysierten Ligationsansatz bzw. der Plasmid-DNA gegeben wurden. Nach der Transformation bei 1,8 kV und 25 µF wurde den Ansätzen 250 µl LB-Medium (Sambrook et al., 1989) zugegeben und 1 h bei 37°C unter kräftigem Schütteln inkubiert.

Die Transformationsansätze wurden auf Selektivplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Kontrolle der erhaltenen Transformanden wurde Plasmid-DNA isoliert und eine Restriktionsanalyse durchgeführt.

Herstellung elektrokompetenter Zellen

Elektrokompetente Zellen verschiedener *E. coli*-Stämme (siehe Tab. 4) wurden wie bei Ausubel et al. (1994) beschrieben hergestellt, in 10%iger Glycerinlösung resuspendiert und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

3.3.2 Klonierung von *glyA*, *metF* und *purN*

Klonierung von *glyA*, *metF* und *purN* in verschiedene Vektoren. Wie unter 3.3.1 beschrieben, wurden die Gene *glyA*, *metF* bzw. *purN* aus *M. barkeri* mittels PCR amplifiziert, die PCR-Produkte jeweils in TOPO-TA-Vektor nach Angaben des Herstellers zwischenkloniert, mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen ausgeschnitten, gereinigt und präzipitiert. Im Anschluss daran wurden die jeweiligen DNA-Fragmente in den mit den gleichen Restriktionsendonukleasen geschnittenen Zielvektor (siehe Tab. 3) ligiert. Nach einer halbstündigen Dialyse des Ligationsansatzes gegen Aqua dest. erfolgte eine Elektrotransformation in *E. coli* DH5 α -Zellen bzw. TOP[®]10-Zellen. Plasmid-DNA aus den erhaltenen Transformanden wurde gereinigt, mittels Restriktion analysiert und in elektrokompetente *E. coli* BL21-CodonPlus[™](DE3)-RIL-Zellen oder andere Expressionsstämme (siehe Tab. 4) transformiert. Auf diese Weise erhaltene Transformanden wurden wie unter 3.3.1 beschrieben analysiert. Zusätzlich wurde die Identität des Fragments durch Sequenzierung überprüft.

3.4 Heterologe Überexpression von *fold*, *glyA*, *metF* und *purN*

Heterologe Überexpression von *fold* in *E. coli* BL21-CodonPlus[™](DE3)-RIL. Die Überexpression erfolgte bei 37°C in 2 l M9-Mineralsalzmedium (Sambrook et al., 1989), das mit 0,2% Casaminoäuren, 0,4% Glucose sowie 100 μ g Kanamycin/ml und 34 μ g Chloramphenicol/ml supplementiert wurde. Das Medium wurde mit einer Vorkultur bis zu einer Δ OD₅₇₈ von 0,1 angeimpft und schüttelnd bei 37°C inkubiert. Nach Erreichen einer Δ OD₅₇₈ von 0,7-0,8 wurden die Zellen mit 1 mM IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid) für 3 h induziert. Die Zellernte erfolgte anschließend durch Zentrifugation für 10 min bei 5 000 x g (4°C). Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen bei -20°C gelagert. Ein Kontrollstamm, der das Vektorplasmid ohne Insert trug, wurde analog behandelt.

Heterologe Überexpression von *glyA* in *E. coli* BL21-CodonPlus[™](DE3)-RIL. Die Überexpression erfolgte wie für *fold* beschrieben mit dem Unterschied, dass dem Medium 30 min vor Induktion 1 mM Pyridoxal-5'-Phosphat zugesetzt wurde.

Heterologe Überexpression von *metF* bzw. *purN* in *E. coli* sowie Modifikationen der Expressionsbedingungen. Für die Expression von *metF* bzw. *purN* aus *M. barkeri* wurden die Expressionsstämme standardmäßig auf LB-Medium (Sambrook et al., 1989) aerob bei 37°C kultiviert (siehe oben). Bei einer optischen Dichte der Kultur von $\Delta OD_{578} = 0,7$ wurde die Expression des Gens durch Zugabe von 1 mM IPTG für 3 h induziert und die Zellen anschließend durch Zentrifugation für 30 min bei 10 000 x g (4°C) geerntet.

Folgende Modifikationen der Expressionsbedingungen von *metF* wurden getestet, wobei die Medien in Abhängigkeit der verwendeten Expressionsvektoren und –stämme mit entsprechenden Antibiotika supplementiert wurden:

Medien: Das Wachstum und die Induktion der *E. coli*-Überexpressionsstämme erfolgte entweder auf LB-Medium oder M9-Mineralsalzmedium, das mit 0,2% Casaminsäuren und 0,4% Glucose supplementiert wurde. Wahlweise wurde den Medien 10 μ M Riboflavin (Sheppard et al., 1999) oder Vitamin- und Spurenelemente-Lösung des *M. barkeri*-Mediums zugesetzt (siehe Tab. 1).

Wachstumstemperatur: Wachstum und Überexpression erfolgte bei 37°C oder 18°C, wobei die Induktionsdauer bei 18°C auf 16 h erhöht wurde.

Induktion mit IPTG: Zur Modulation der Induktionsstärke wurden IPTG-Konzentrationen von 0 mM bis 1 mM eingesetzt.

Anaerobes Wachstum: Anaerobes Wachstum von BL21-CodonPlus™(DE3)-RIL mit pET24b+/*metF* erfolgte entweder auf 50 mM Glucose mit 50 mM Nitrat als Elektronenakzeptor oder mit 50 mM Glycerol und 50 mM Fumarat als Elektronenakzeptor der anaeroben Atmung. Die Induktion der langsam wachsenden Kulturen erfolgte bei einer ΔOD_{578} von 0,4 für 23 h mit 1 mM IPTG.

Koproduktion mit Chaperon-Systemen: Koproduktionsversuche wurden sowohl mit dem DnaK-Chaperon-System als auch mit dem GroESL-Chaperon-System unter Standardbedingungen durchgeführt. Die Induktion des DnaK-Chaperon-Systems erfolgte mit 0,1 mM IPTG.

Fusionierung mit verschiedenen „Tags“: Die Überproduktion von MetF in Form eines Fusionsproteins mit dem Maltose-Bindeprotein oder His-Tag in BL21-CodonPlus™(DE3)-RIL erfolgte unter Standardbedingungen sowohl in LB- als auch in M9-Mineralsalzmedium. Die Überproduktion von MetF mit N-terminalem Thioredoxin-Tag in *E. coli* AD494(DE3) erfolgte in M9-Mineralsalzmedium, das mit 40 μ g Leucin/ml, 0,2% Casaminsäuren und 0,4% Glucose supplementiert wurde. Strep-Tag II-fusioniertes MetF wurde in BL21-CodonPlus™(DE3)-RIL in M9-Mineralsalzmedium, das mit 0,2%

Casamino-säuren und 0,4% Glucose supplementiert wurde, kultiviert und mit 0,2 µg Anhydrotetracyclin/ml induziert.

3.5 Reinigung von heterolog überproduziertem FOLD, GlyA und MetF

3.5.1 Methylen-H₄F-Dehydrogenase/Methenyl-H₄F-Cyclohydrolase (FOLD)

Pelletierte *E. coli*-Zellen wurden 1:5 (w/v) in kaltem 20 mM Tris/HCl pH 8,0, der 300 mM NaCl, 0,25 mg MgCl₂/ml und 0,05 mg DNaseI/ml (Roche Diagnostics, Mannheim) enthielt, resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte über dreimalige Passage durch eine vorgekühlte French-Press-Zelle bei $1,2 \times 10^8$ Pa unter aeroben Bedingungen. Anschließend wurden durch Zentrifugation für 30 min bei 20 000 g (4°C) die Zelltrümmer und nicht aufgeschlossene Zellen entfernt.

Affinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA-Agarose. Reinigung des an sechs Histidine gekoppelten Enzyms erfolgte über Affinitätsbindung an einer 30 ml Ni²⁺-NTA-Agarose-Säule, die zuvor mit 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 300 mM NaCl äquilibriert wurde. Nach dem Auftragen des Zentrifugationsüberstands wurde die Säule zunächst mit 50 ml 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol bei einer Flussrate von 2 ml/min gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu eluieren. FOLD-His₆ wurde dann mit 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol eluiert. Die reinen Fraktionen wurden vereint und durch mehrfaches Verdünnen mit 20 mM Tris/HCl pH 8,0 und Ankonzentrieren mittels Ultrafiltration (Amicon[®]Ultra, 10 kDa Ausschlussgröße) entsalzt. Aliquots des gereinigten Enzyms wurden bei -20°C gelagert. Alle Reinigungsschritte wurden bei 4°C durchgeführt.

Ausschlussgrößenchromatographie an Superdex 200. Zur Bestimmung der molekularen Masse des nativen Enzyms wurden 500 µg Protein auf eine Superdex 200-Säule (1 cm x 30 cm), die mit 100 mM Kaliumphosphat pH 7,2 äquilibriert worden war, aufgetragen und mit einer Flussrate von 0,5 ml/min eluiert. Die Elution des Proteins erfolgte nach 14,3 ml (V_e). Zur Kalibrierung der Säule wurden jeweils 200 µg Aldoase (158 kDa; V_e = 12,6 ml), Rinderserumalbumin (67 kDa; V_e = 13,9 ml), Eialbumin (43 kDa; V_e = 15 ml) und Chymotrypsin (25 kDa; V_e = 16,3 ml) verwendet.

3.5.2 Serin-Hydroxymethyltransferase (GlyA)

Pelletierte *E. coli*-Zellen wurden aerob 1:5 (w/v) in 20 mM Kaliumphosphat pH 7,2 mit 0,1 mM Pyridoxal-5'-phosphat (PLP) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Zugabe von 1 mg Lysozym pro g Feuchtzellen. Nach Inkubation für 20 min bei Raumtemperatur wurde dem Lysat 0,25 mg MgCl₂/ml und 0,06 mg DNaseI/ml zugegeben und weitere 5 min inkubiert. Die auf diese Weise aufgeschlossenen Zellen wurde 30 min bei 12 000 g (4 °C) zentrifugiert, um Zelltrümmer und nicht aufgeschlossene Zellen zu entfernen.

Ammoniumsulfat-Fällung. Der erhaltene Überstand wurde durch langsame Zugabe von Ammoniumsulfat auf eine Endkonzentration von 40% (250 g/l) eingestellt, 30 min bei 4 °C gerührt und anschließend für 30 min bei 12 000 g (4°C) zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und eine 80%ige Ammoniumsulfat-Fällung (500,9 g/l) wie oben beschrieben durchgeführt. Das resultierende Pellet wurde in 10 ml 20 mM Kaliumphosphat pH 7,2 mit 0,1 mM PLP resuspendiert und bei 4 °C über Nacht gegen 2 l des gleichen Puffers dialysiert.

Chromatographie an Hydroxyapatit. Die dialysierte Probe wurde auf eine mit 20 mM Kaliumphosphat pH 7,2 äquilibrierte Hydroxyapatit-Säule (1,6 cm x 10 cm) geladen. Nach dem Auftragen wurde die Säule zunächst mit 30 ml des gleichen Puffers bei einer Flussrate von 2 ml/min gewaschen, bevor die Elution mittels eines linearen Gradienten über 30 ml von 20 mM bis 1 M Kaliumphosphat pH 7,2 erfolgte. Serin-Hydroxymethyltransferase eluierte bei ca. 300 mM Kaliumphosphat pH 7,2. Fraktionen, die das Enzym enthielten, wurden vereint, mittels Ultrafiltration (Amicon®Ultra; 10 kDa Ausschlussgröße) ankonzentriert und mit 0,1 mM PLP versetzt.

Gelfiltration an Superdex 75. Die Probe wurde auf eine Superdex 75-Säule aufgetragen (26 cm x 60 cm), die mit 100 mM Kaliumphosphat pH 7,2, 150 mM NaCl äquilibriert worden war. Die Elution erfolgte mit 100 mM Kaliumphosphat pH 7,2, 150 mM NaCl bei einer Flussrate von 0,25 ml/min. Das Enzym wurde nach 136 ml in einem Volumen von 15 ml gefunden. Die aktiven Fraktionen wurden vereint, entsalzt und ankonzentriert wie zuvor beschrieben. Zur Stabilisierung wurde dem gereinigten Enzym 0,1 mM PLP zugesetzt und bei -20°C gelagert.

Ausschlussgrößenchromatographie an Superdex 200. Zur Bestimmung der molekularen Masse des nativen Enzyms wurden 30 µg gereinigtes Protein auf eine Superdex 200-Säule (1 cm x 30 cm), die mit 100 mM Kaliumphosphat pH 7,2 äquilibriert worden war, aufgetragen und mit einer Flussrate von 0,5 ml/min eluiert. Die Elution des Proteins erfolgte nach 13,03 ml (V_e). Zur Kalibrierung der Säule wurden jeweils 150 µg β-Amylase (200 kDa;

$V_e = 11,1$ ml), Rinderserumalbumin (67 kDa; $V_e = 13,6$ ml), Eialbumin (43 kDa; $V_e = 14,6$ ml) und Carboanhydrase (29 kDa; $V_e = 15,7$ ml) verwendet.

Bestimmung der aminoterminalen Aminosäuresequenz. Um GlyA aminoterminal zu sequenzieren, wurde die entsprechende Polypeptidbande aus dem ungefärbten SDS-Polyacrylamidgel durch Elektroblothing in einer Semi-Dry-Transferzelle (Modell Trans-Blot SD, BioRad Laboratories, München) auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (ProBlott™, Applied Biosystems, Weiterstadt) übertragen. Als Blotpuffer dienten an der membran zugewandten Seite (Anode) 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,01% SDS und 25% Methanol in Wasser und an der gel zugewandten Seite (Kathode) 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% SDS und 10% Methanol in Wasser. Der Elektrotransfer wurde 2 h bei $0,8 \text{ mA/cm}^2$ Membranfläche durchgeführt. Das auf die Membran transferierte Protein wurde 1 min mit 0,1% Coomassie Brilliantblau R250 in Methanol/Wasser/Essigsäure (40:59:1) gefärbt. Die Entfärbung erfolgte 2 min mit Wasser/Methanol (1:1). Anschließend wurde die Membran zur Entfernung des Glycins 48 h in Aqua dest. gespült. Die Bande des zu sequenzierenden Polypeptids wurde aus der Membran ausgeschnitten. Die aminoterminalen Aminosäuresequenzierung wurde von Dr. D. Linder (Justus-Liebig-Universität, Gießen) nach der Methode des Edman-Abbaus durchgeführt (Hewick et al., 1981).

3.5.3 Methylen-H₄F-Reduktase (MetF)

Die Reinigung von MetF, das mit einem C-terminalem His-Tag überproduziert wurde, erfolgte über Affinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA-Agarose unter denaturierenden Bedingungen nach Angaben des Herstellers (The QIAexpressionist, Fifth edn, Protocols 10 and 17). Auf diese Weise wurde aus 1 g Feuchtzellen 5 mg gereinigtes MetF gewonnen. Durch wiederholtes Verdünnen in 1 x PBS-Puffer (8 mM Na₂HPO₄, 2 mM NaH₂PO₄, 70 mM NaCl) und Ankonzentrieren mittels Ultrafiltration (Amicon® Ultra; 5 kDa Ausschlussgröße) wurde die Proteinprobe entsalzt und für die Herstellung von polyklonalen Antikörpern vorbereitet.

***In vitro* Rückfaltung**

Rückfaltungsversuche mit heterolog überproduziertem MetF wurden in Anlehnung an die Protokolle von (a) Sauer & Thauer (1997) bzw. (b) Vuillard & Freeman (<http://micro.nwtsc.noaa.gov/protocols/inclusion.html>) durchgeführt.

(a) *E. coli*-Zellen (2,1 g) mit überproduziertem MetF wurden 1:10 (w/v) in 50 mM Mops/KOH pH 7,0 resuspendiert (4°C) und mittels Ultraschall (Sonopuls HD 200, Bandelin, Berlin) aufgeschlossen, wobei die Zellen in einem durch Eiswasser gekühlten Rosettengefäß dreimal 5 min mit 200 Watt Ausgangsleistung beschallt wurden. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 7 000 x g (4°C) wurde das resultierende Pellet dreimal mit 15 ml Mops/KOH pH 7,0, 0,1 M NaCl, 1 mM EDTA gewaschen, anschließend in 5 ml 50 mM Mops/KOH pH 7,0, 6,6 M Harnstoff, 2 mM Dithiothreitol (DTT) resuspendiert und für 30 min bei Raumtemperatur rührend inkubiert. Die Harnstoff-Lösung wurde danach entweder unter anaeroben Bedingungen 66-fach in 50 mM Mops/KOH pH 7,0 mit 10 mM DTT verdünnt und über Nacht bei 4°C rührend inkubiert oder in einem Dialyseschlauch (12 kDa Ausschlussgröße, Medicell International Ltd., London, UK) über Nacht gegen 1 l 50 mM Mops/KOH pH 7,0, 10 mM DTT im Anaerobenzelt dialysiert.

(b) *E. coli*-Zellen (2 g) mit überproduziertem MetF wurden in 20 ml 50 mM HEPES-NaOH pH 7,5, 0,5 M NaCl, 1 mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid), 5 mM DTT und 0,35 mg Lysozym/ml resuspendiert. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde dem Lysat 200 µl Triton X-100 zugegeben. Es folgte eine mehrfache Beschallung für 30 s (siehe (a)), bis die Lösung klar wurde. Dem Extrakt wurde anschließend DNaseI (20 µg/ml) zugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert, bevor ein Zentrifugationsschritt bei 30 000 x g für 30 min (4°C) erfolgte. Das erhaltene Pellet, das das unlösliche MetF enthielt, wurde zweimal mit 10 ml PBS-Puffer (8 mM Na₂HPO₄, 2 mM NaH₂PO₄, 70 mM NaCl) mit 1% Triton X-100 gewaschen, anschließend in 2 ml 50 mM HEPES-NaOH pH 7,5, 6 M Guanidin, 25 mM DTT solubilisiert und 1 h bei 4°C inkubiert. Um noch enthaltende Aggregate zu entfernen, wurde die Proteinlösung 10 min bei 100 000 x g (4°C) zentrifugiert. Nach einer Proteinbestimmung des erhaltenen Überstands wurde die Proteinkonzentration mit 50 mM HEPES-NaOH pH 7,5, 6 M Guanidin, 25 mM DTT auf 1 mg/ml eingestellt. Unmittelbar danach erfolgte der Rückfaltungsschritt (4°C): 2 ml der Proteinlösung wurden unter kontinuierlichem Vortexen schnell zu 18 ml 50 mM HEPES-NaOH pH 7,5, 0,2 M NaCl, 1 mM DTT und 1M NSDB 201 zugegeben. (NSDB 201 steht für Non-detergent-

sulfobetaines bestehend aus 3-(1-Pyridino)-propansulfonat, ein mildes Solubilisierungs-Agenz, das erneute Aggregation vermindern soll (Goldberg et al., 1996).)

4 Protein-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen

Zur Bestimmung der apparenten molekularen Masse von Polypeptiden und zur Reinheitskontrolle von Enzympräparationen wurde das Prinzip der denaturierenden Gelelektrophorese eingesetzt (Laemmli, 1970). Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde in einer BioRad-Elektrophorese-Apparatur (Mini Protean II, BioRad Laboratories, München) durchgeführt. Die Zusammensetzung für 11%ige Gele ist in Tabelle 5 aufgeführt. Vor der Elektrophorese wurden die Proteinproben in SDS-Probenpuffer (130 mM Tris/HCl pH 6,8, 130 mM SDS, 10% Glycerin (w/v), 100 mM Dithiothreitol und 0,2% Bromphenolblau) 1:2 verdünnt und 5 min bei 95°C denaturiert. Als Anoden- und Kathodenpuffer diente ein Tris-Glycin-Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% SDS, pH 8,8). Die angelegte Spannung betrug 180 V. Als Molekularmassenstandard diente der Low Molecular Weight Calibration Kit von Amersham Biosciences (Freiburg) bestehend aus Phosphorylase b (94 kDa), Rinderserumalbumin (67 kDa), Eialbumin (43 kDa), Carboanhydrase (30 kDa), Trypsin-Inhibitor (20,1 kDa) und α -Lactalbumin (14,4 kDa).

Zur Detektion der Proteinbanden wurde das Gel in einer Lösung aus 0,05% Coomassie Brilliantblau R250, 0,05% Crocein Scarlet 7B und 0,5% CuSO₄ in Wasser/Isopropanol/Eisessig (65:25:10) 30 min gefärbt. Anschließend wurde nicht-proteingebundener Farbstoff unter leichtem Schütteln in Wasser/Isopropanol/Essigsäure (81:12:7) mit 0,5% CuSO₄ entfernt.

Tabelle 5: Zusammensetzung der 11%igen SDS-Polyacrylamid-Gele (6,5 x 9 x 0,075 cm³)

Komponente	Trenngel (11%ig)	Sammelgel (6%ig)
1 M Tris/HCl pH 8,8 + 0,28% SDS ^a	3,7 ml	-
1 M Tris/HCl pH 6,8 + 1,2% SDS ^a	-	387 μ l
Aqua dest.	2,4 ml	2,4 ml
Acrylamid:Bisacrylamid (37,5:1)	2,3 ml	510 μ l
TEMED ^b (100%ige Lösung)	10 μ l	10 μ l
APS ^c (10%ige Lösung)	42 μ l	12 μ l

^a= Natriumdodecylsulfat; ^b= N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin; ^c= Ammoniumperoxodisulfat

5 Nachweis von FOLD, GlyA und MetF

5.1 Bestimmung von Enzymaktivitäten

Die photometrischen Tests wurden in Quarzküvetten (1 cm Schichtdicke, 1,5 ml Volumen) mit einem Pharmacia Spektralphotometer Ultrospec 2000 (Amersham Biosciences, Freiburg) bei 37°C durchgeführt. Alle verwendeten Puffer wurden filtriert und durch Aufkochen unter einer Stickstoffatmosphäre sowie durch Entgasen bei angelegtem Vakuum anaerobisiert. Die Küvetten wurden mit Silikonstopfen verschlossen und durch mehrfaches Evakuieren und Begasen mit Stickstoff anaerobisiert. Die Testkomponenten wurden als anoxische Lösungen mit Hilfe von zuvor anaerobisierten Hamilton-Mikroliterspritzen (Hamilton Company, Reno, Nevada, USA) zugegeben.

Methenyltetrahydrofolat-Cyclohydrolase

Methenyl-H₄F-Cyclohydrolase katalysiert die reversible Hydrolyse von *N*⁵,*N*¹⁰-Methenyl-H₄F⁺ zu *N*¹⁰-Formyl-H₄F ($\Delta G^\circ = -6,0$ kJ/mol) (Pomper et al., 1999). Die Abnahme von *N*⁵,*N*¹⁰-Methenyl-H₄F⁺ wurde anhand der Extinktionsabnahme bei 356 nm ($\epsilon_{356} = 24,9$ mM⁻¹cm⁻¹) (Pomper et al., 1999) gemessen. Der 0,7 ml Testansatz enthielt standardmäßig 50 mM Tricin/KOH pH 8,0 und 40 μ M *N*⁵,*N*¹⁰-Methenyl-H₄F⁺. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Protein gestartet. Die Rate der bei alkalischem pH auftretenden spontanen Hydrolyse von *N*⁵,*N*¹⁰-Methenyl-H₄F⁺ zu *N*¹⁰-Formyl-H₄F wurde bei der Berechnung der Enzymaktivität berücksichtigt. Um die Substratspezifität zu testen, wurde *N*⁵,*N*¹⁰-Methenyl-H₄F⁺ durch 25 μ M *N*⁵,*N*¹⁰-Methenyl-H₄MPT⁺ ersetzt und dessen Hydrolyse zu *N*⁵-Formyl-H₄MPT bei 335 nm verfolgt ($\epsilon_{335} = 21,6$ mM⁻¹cm⁻¹) (Pomper et al., 1999).

Die Einheit U wurde als die Enzymaktivität definiert, die die Hydrolyse von 1 μ mol *N*⁵,*N*¹⁰-Methenyl-H₄F⁺ bzw. *N*⁵,*N*¹⁰-Methenyl-H₄MPT⁺ pro min katalysierte.

Methylen tetrahydrofolat-Dehydrogenase

Methylen-H₄F-Dehydrogenase katalysiert die reversible Oxidation von *N*⁵,*N*¹⁰-Methylen-H₄F mit NAD(P)⁺ zu *N*⁵,*N*¹⁰-Methenyl-H₄F⁺ und NAD(P)H ($\Delta G^\circ = +3,5$ kJ/mol) (Vorholt et al., 1998). Die Enzymaktivität wurde anhand der Extinktionszunahme bei 340 nm durch die Entstehung von NAD(P)H und *N*⁵,*N*¹⁰-Methenyl-H₄F⁺ ($\epsilon_{340} = 27,9$ mM⁻¹cm⁻¹, zusammengesetzt aus 6,2 mM⁻¹cm⁻¹ für NAD(P)H und

21,7 mM⁻¹cm⁻¹ für N⁵,N¹⁰-Methenyl-H₄F⁺) gemessen (Vorholt et al., 1998). Der 0,7 ml Testansatz enthielt 120 mM Kaliumphosphat pH 6,0, 10 mM Formaldehyd, 30 μM (6S-)H₄F und 2,7 mM NAD⁺ bzw. 1 mM NADP⁺. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Protein gestartet. Um die Substratspezifität zu testen, wurde H₄F durch 40 μM H₄MPT oder 65 μM H₄SPT ersetzt ($\epsilon_{340} = 20,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ für N⁵,N¹⁰-Methenyl-H₄MPT⁺/-H₄SPT⁺).

Die Einheit U wurde als die Enzymaktivität definiert, die die Oxidation von 1 μmol N⁵,N¹⁰-Methylen-H₄F pro min katalysierte.

Serin-Hydroxymethyltransferase

Serin-Hydroxymethyltransferase katalysiert in Gegenwart von (6S-)H₄F die reversible Spaltung von L-Serin in Glycin unter Bildung von N⁵,N¹⁰-Methylen-H₄F. Um die Reaktion photometrisch verfolgen zu können, wurde ein gekoppelter Test mit Methylen-H₄MPT-Dehydrogenase (MtdA) aus *M. extorquens* AM1 durchgeführt, bei dem das gebildete N⁵,N¹⁰-Methylen-H₄F mit NADP⁺ zu N⁵,N¹⁰-Methenyl-H₄F⁺ und NADPH oxidiert wird. Der 0,7 ml Testansatz enthielt standardmäßig 75 mM Kaliumphosphat pH 7,2, 15 μM (6S-)H₄F, 1 mM NADP⁺, 1 U MtdA sowie 10 bis 30 mU GlyA. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,7 mM L-Serin gestartet und die Extinktionszunahme bei 340 nm verfolgt ($\epsilon_{340} = 27,9 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Vorholt et al., 1998). Da MtdA nicht zwischen H₄F, H₄MPT oder H₄SPT diskriminiert, wurde die Reaktivität von GlyA auch in Gegenwart von 600 μM H₄MPT oder 65 μM H₄SPT ($\epsilon_{340} = 27 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Vorholt et al., 1998) getestet. Der Einfluss von PLP und Mg²⁺ wurde durch die Zugabe von 0,25 mM PLP und/oder 20 mM Magnesiumacetat zum Reaktionsansatz geprüft.

Die Einheit U wurde als die Enzymaktivität definiert, die die Bildung von 1 μmol N⁵,N¹⁰-Methenyl-H₄F⁺ pro min katalysierte, was der Bildung von 1 μmol N⁵,N¹⁰-Methylen-H₄F entspricht.

Die durch Serin-Hydroxymethyltransferase katalysierte Retroaldolspaltung von L-*allo*-Threonin sowie L-Threonin in Glycin und Acetaldehyd wurde anhand der Reduktion des entstehenden Acetaldehyds mit NADH durch Alkohol-Dehydrogenase (Adh) aus Hefe gemessen. Der 0,7 ml Testansatz enthielt 20 mM Kaliumphosphat pH 7,2, 0,25 mM NADH, 25 U Adh und 100 μg GlyA. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von L-*allo*-Threonin (0,03 bis 6,5 mM) oder L-Threonin (0,2 bis 26 mM) gestartet und photometrisch bei 340 nm verfolgt ($\epsilon_{340} = 6,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Die Einheit U wurde als die Enzymaktivität definiert, die die Oxidation von 1 μmol NADH pro min katalysierte, was der Bildung von 1 μmol Acetaldehyd entspricht.

Methyltetrahydrofolat-Reduktase

Methylen- H_4F -Reduktase katalysiert die reversible Reduktion von N^5, N^{10} -Methylen- H_4F zu N^5 -Methyl- H_4F . Abhängig vom Organismus dient dabei NADH, NADPH oder reduziertes Ferredoxin als Elektronendonator ($\Delta G^\circ = -21,6 \text{ kJ/mol}$) (Wohlfarth et al., 1991). Die Reduktion von N^5, N^{10} -Methylen- H_4F wurde durch die gleichzeitige Oxidation von NAD(P)H zu NAD(P)⁺ anhand der Extinktionsabnahme bei 350 nm ($\epsilon_{350} = 5,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) gemessen (Wohlfarth et al., 1991). Der 0,7 ml Testansatz enthielt 120 mM Kaliumphosphat pH 7,5, 50 mM β -Mercaptoethanol, 10 mM Formaldehyd, 0,5 mM H_4F und 0,15 mM NADH oder 0,15 mM NADPH. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Zellextrakt (40-60 μg) gestartet.

Die Einheit U wurde als die Enzymaktivität definiert, die die Oxidation von 1 μmol NAD(P)H pro min katalysierte.

5-[^{14}C]-Methyltetrahydrofolat-Menadion-Oxidoreduktase

In Gegenwart von Menadion katalysiert Methylen- H_4F -Reduktase die Oxidation von 5-[^{14}C]-Methyl- H_4F zu [^{14}C]-Methylen- H_4F . Der radioaktive Kohlenstoff der Methylen-Verbindung wird in Form von ^{14}C -Formaldehyd mit Dimedon komplexiert, mittels Toluol extrahiert und die Formaldehydbildung mit einem Szintillationszähler gemessen (Sheppard et al., 1999).

Der 4,2 ml Reaktionsansatz enthielt 200 mM Kaliumphosphat pH 6,3, 0,38% BSA, 6 mM EDTA, 0,05 mM FAD, 0,5 mM Menadion und 0,47 mM 5-[^{14}C]-Methyl- H_4F (ca. 1000 dpm/nmol = 17 Bq/nmol). Nach Präinkubation für 5 min bei 37°C wurde die Reaktion mit Zellextrakt von *M. barkeri* (500-1400 μg) gestartet. In Abhängigkeit von der Zeit wurden 0,5 ml-Aliquots entnommen, mit 300 μl Dimedon gemischt und 10 min bei 98°C denaturiert. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Proben mit 3 ml Toluol versetzt und 5 min bei 4000 rpm abzentrifugiert. 0,5 ml der Toluolphase wurden zu 4,5 ml Quicksafe-A-Szintillationscocktail (Zinsser Analytic, Frankfurt) gegeben und die Radioaktivität in einem Beckman LS 6500 Szintillationszähler bestimmt.

Die Einheit U wurde als die Enzymaktivität definiert, die die Bildung von 1 μmol Formaldehyd pro min katalysierte. Als interner Standard diente gereinigtes MetF (50 μg) aus *E. coli* (Sheppard et al., 1999).

F₄₂₀-abhängige Methylentetrahydromethanopterin-Dehydrogenase

Methylen-H₄MPT-Dehydrogenase katalysiert die reversible Oxidation von *N*⁵,*N*¹⁰ Methylen-H₄MPT zu *N*⁵,*N*¹⁰-Methenyl-H₄MPT⁺ bei gleichzeitiger Reduktion von Coenzym F₄₂₀ ($\Delta G^\circ = -5,5 \text{ kJ/mol}$) (Vorholt et al., 1998). Die Bildung von *N*⁵,*N*¹⁰-Methenyl-H₄MPT⁺ kann bei 335 nm durch eine Extinktionszunahme ($\epsilon_{335} = 21,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (DiMarco et al., 1990) verfolgt werden. Der 0,7 ml Testansatz enthielt standardmäßig 120 mM Kaliumphosphat pH 6,0, 50 mM β -Mercaptoethanol, 10 mM Formaldehyd und 40 μM H₄MPT. Nach einer Vorinkubationszeit von ca. 1 min wurden 50 μM F₄₂₀ zugegeben und die Reaktion durch Zugabe von Protein gestartet.

Die Einheit U wurde als die Enzymaktivität definiert, die die Bildung von 1 μmol *N*⁵,*N*¹⁰-Methenyl-H₄MPT⁺ pro min katalysierte.

5.2 Western-Blot-Analysen

Herstellung polyklonaler Antikörper. Die Proteine Fold, GlyA und MetF von *M. barkeri* wurden in *E. coli* überproduziert und wie unter 3.5 beschrieben gereinigt. Die Herstellung polyklonaler Antikörper aus Kaninchen erfolgte jeweils nach einem zweimonatigen Protokoll durch Mitarbeiter von Sequence Laboratories (Göttingen).

Western-Blot-Analyse. Proteinproben für Western-Blot-Analysen wurden mit Hilfe 11%iger SDS-PAGE aufgetrennt und aus den ungefärbten Gelen durch Elektroblothing in einer Semi-Dry-Transfer-Zelle (Modell Trans-Blot SD, BioRad, München) auf Nitrocellulose (Schleicher und Schuell, Dassel) wie unter 3.5.2 beschrieben übertragen. Nach dem Transfer wurden die Membranen über Nacht bei 4°C mit 5% Milchpulver in PBS-T-Puffer (8 mM Na₂HPO₄, 2 mM NaH₂PO₄, 70 mM NaCl, 0,05% Tween 20) abgesättigt. Nach dreimaligem Waschen mit 2,5% Milchpulver in PBS-T wurden die Membranen mit dem entsprechenden Erstantikörper (Kaninchen-Anti-Fold-His₆ 1:10 000, Kaninchen-Anti-GlyA 1:10 000; Kaninchen-Anti-MetF-His₆ 1:2 000) 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 2,5% Milchpulver in PBS-T erfolgte eine Inkubation für 2 h bei Raumtemperatur mit dem Zweitantikörper Ziege-Anti-Kaninchen-IgG, der an alkalische

Phosphatase konjugiert war (BioRad Laboratories, München), in einer Verdünnung von 1:5 000 in 2,5% Milchpulver in PBS-T. Die resultierenden Antikörper-Komplexe wurden mittels ECF-Reagenz nach Angaben des Herstellers (Amerham Biosciences, Freiburg) durch Chemilumineszenz unter Verwendung eines PhosphoImagers (Storm 860, Molecular Dynamics, Sunnyvale CA, USA) detektiert. Als Molekularmassenstandard wurde Precision Plus Protein™ Standards (BioRad Laboratories, München) verwendet.

6 Reinigung von FOLD aus *M. barkeri*

M. barkeri-Zellen (46 g) wurden 1:2 (w/v) in 50 mM Tris/HCl pH 7,6, 0,25 mg MgCl₂/ml und 0,06 mg DNaseI/ml resuspendiert (4°C) und wie unter 2.2 beschrieben aufgeschlossen und zentrifugiert. Die Reinigung erfolgte unter aeroben Bedingungen und umfasste fünf sukzessive säulenchromatographische Trennschritte:

Chromatographie an DEAE-Sepharose. Der erhaltene Überstand wurde auf eine mit 50 mM Tris/HCl pH 7,6 (Puffer A) äquilibrierte DEAE-Säule (5 cm x 20 cm) geladen und mit 300 ml Puffer A nachgewaschen. Die Elution erfolgte mittels eines Stufengradienten (je 300 ml) mit 100 mM NaCl, 200 mM NaCl, 300 mM NaCl und 400 mM NaCl (in Puffer A) bei einer Flussrate von 10 ml/min. Durch Western-Blot-Analyse (siehe 5.2) wurden diejenigen Fraktionen identifiziert, die FOLD enthielten (FOLD eluierte bei 200 mM NaCl). Diese wurden vereinigt und mittels Ultrazentrifugation (Amicon®Ultra; 30 kDa Ausschlussgröße) entsalzt und ankonzentriert.

Chromatographie an Q-Sepharose. Die Proteinprobe wurde auf eine mit Puffer A äquilibrierte Q-Sepharose-Säule (2,6 cm x 20 cm) aufgetragen, mit 100 ml Puffer A gewaschen und anschließend mittels eines Stufengradienten (je 100 ml) von 200 mM NaCl, 400 mM NaCl, 500 mM NaCl, 600 mM NaCl (in Puffer A) mit einer Flussrate von 5 ml/min eluiert. Die Elution von FOLD erfolgte bei 500 mM NaCl. Wie oben beschrieben wurden die aktiven Fraktionen vereinigt, entsalzt und ankonzentriert.

Chromatographie an Source 15Q. Die weitere Reinigung des Enzyms wurde durch Chromatographie an einer Source 15Q-Säule (1 cm x 10 cm), die mit Puffer A äquilibriert worden war, durchgeführt. Gebundenes Protein wurde mittels eines linearen Gradienten (135 ml) von 0 bis 2 M NaCl mit einer Flussrate von 1,5 ml/min eluiert. FOLD eluierte mit 480 mM NaCl. Aktive Fraktionen wurden vereint, entsalzt, in 10 mM Kaliumphosphat pH 7,0 umgepuffert und ankonzentriert.

Chromatographie an Hydroxyapatit. Eine anschließende Auftrennung über eine Hydroxyapatit-Säule (1,2 cm x 15 cm) erfolgte mittels eines linearen Gradienten (80 ml) von 10 mM bis 400 mM Kaliumphosphat pH 7,0 mit einer Flussrate von 2 ml/min, wobei FOLD-Aktivitäten in Fraktionen zwischen 120 mM und 220 mM Kaliumphosphat pH 7,0 gefunden wurden. Diese Fraktionen wurden vereint und in 50 mM Bis-Tris-Puffer pH 6,2 umgepuffert.

Chromatographie an Uno-Q. Die Probe wurde auf ein Uno-Q-Säule (1 cm x 4 cm) geladen, die zuvor mit 50 mM Bis-Tris pH 6,2 äquilibriert wurde. Nachdem mit 6 ml des gleichen Puffers nachgewaschen worden war, wurde das Protein mittels eines linearen Gradienten (15 ml) von 0 bis 500 mM NaCl in 50 mM Bis-Tris pH 6,2 mit einer Flussrate von 1 ml/min eluiert. FOLD eluierte bei 200 mM NaCl.

7 Bestimmung der intrazellulären H₄F- bzw. H₄SPT-Konzentration

7.1 H₄F in *M. barkeri*

Falls nicht anders angegeben, erfolgten alle Schritte unter anaeroben Bedingungen unter Rotlicht bei 4°C. Frisch geerntete *M. barkeri*-Zellen (3 g) wurden 1:2 (w/v) in 50 mM Mops/KOH pH 7,0 resuspendiert und Zellextrakt wie unter 2.2 beschrieben hergestellt. 6,8 ml des Zellextrakts wurden mittels Centricon (3 kDa Ausschlussgröße; Millipore, Eschborn) filtriert (18°C). Im Anschluss wurde das Filtrat (3,2 ml), das die niedermolekularen Komponenten enthielt, in eine dunkle Serumflasche überführt, unter 0,5 bar H₂ bei -80°C eingefroren und anschließend über Nacht lyophilisiert (Lyophilisator Christ Alpha 1-4, Osterode). Das Lyophilisat wurde in 1 ml 120 mM Kaliumphosphat pH 6,0 resuspendiert und mit 15 mM Formaldehyd, 2 mM NADP⁺ sowie 2 U gereinigter MtdA supplementiert, um die in der Probe vorhandenen Tetrahydropterine zu ihren entsprechenden Methenyl-Tetrahydropterininen umzusetzen. Nach 15-minütiger Inkubation bei 32°C wurde die Proben einer HPLC (High Pressure Liquid Chromatography)-Analyse unterzogen: 50 µl Probe wurden auf eine LiCrospher 100 RP-18-Säule (124 mm x 4 mm) geladen, die zuvor mit 25 mM Ammoniumformiat pH 4,0 äquilibriert worden war. Gebundene Komponenten wurden mittels eines linearen Gradienten (30 ml) von 0 bis 50% Methanol mit einer Flussrate von 1 ml/min eluiert. Als interne Standards dienen H₄MPT und/oder (6S-)H₄F, die einem Aliquot der Probe vor Inkubation bei 32°C zugegeben wurden. Die gesammelten Fraktionen wurden mittels MALDI/TOF-Massenspektrometrie analysiert.

Massenspektrometrie mittels MALDI/TOF. Die Identifizierung von niedermolekularen Komponenten in Zellextrakten von *M. barkeri* erfolgte durch die

Ermittlung der molekularen Masse mittels MALDI/TOF (Matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight)-Massenspektrometrie. Die Proben wurden in unterschiedlichen Konzentrationen mit gesättigter α -Cyano-4-Hydroxymethylsäure (in 0,1% Trifluoressigsäure, 60% Acetonitril) 1:1 gemischt, auf einen Probenträger aufgetragen und getrocknet. Die Messung der Probe erfolgte an einem Voyager DE RP Spectrometer (Applied Biosystems, Langen) im Positiv-Reflektormodus. Die anschließende Auswertung erfolgte durch die Hersteller-Software.

7.2 H₄SPT in *M. barkeri*

Zellextrakt (4 ml) von *M. barkeri*, der wie unter 2.2 beschrieben hergestellt wurde, wurde unter anaeroben Bedingungen und unter Rotlicht bei 18 °C mittels Amicon[®] Ultra (10 kDa Ausschlussgröße) filtriert. Anschliessend wurde die H₄SPT-Konzentration des Filtrats enzymatisch mit gereinigter MtdA aus *M. extorquens* AM1 bestimmt. MtdA katalysiert die Dehydrogenierung von Methylen-H₄SPT mit NADP⁺ zu Methenyl-H₄SPT⁺ und NADPH. Der Standardtest enthielt 0,7 ml 120 mM Kaliumphosphat pH 6,0; 1 mM NADP⁺; 1 Unit gereinigte MtdA und 25 μ l, 50 μ l oder 100 μ l Filtrat. Die Umsetzung von Methylen-H₄SPT zu Methenyl-H₄SPT⁺ wurde durch die Zugabe von 4 mM Formaldehyd gestartet und die Extinktionszunahme photometrisch bei 340 nm verfolgt ($\epsilon_{340} = 27 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ zusammengesetzt aus $\epsilon_{340} = 20,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Methenyl-H₄SPT⁺) und $\epsilon_{340} = 6,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (NADPH)) (Vorholt et al., 1998). Aus der Extinktionsdifferenz wurde die Molarität der Probe berechnet und auf das Zellprotein bezogen. Der Test diskriminierte nicht zwischen H₄SPT, H₄MPT oder H₄F. HPLC-Analysen der Filtrate (siehe 7.1) ergaben, dass lediglich H₄SPT in detektierbaren Mengen vorhanden war.

8 Analyse von Sequenzen und Sequenzvergleiche

DNA- und Proteinsequenzen wurden mit dem Computerprogramm Lasergene (DNASTar, London) verarbeitet. Hiermit wurden Sequenzvergleiche und die daraus resultierenden Sequenzidentitäten errechnet (MegAlign von Lasergene). Mit Proteinsequenzen, die der SWISS-PROT-Datenbank entnommen wurden, wurden Sequenzvergleiche mittels BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) durchgeführt (http://genome.jgi-psf.org/draft_microbes/metba/metba.home.html oder <http://gl-ergo.migen.bio.uni-goettingen.de/>) (Altschul et al., 1997).

IV Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit werden Untersuchungen zu Tetrahydrofolat (H₄F)-spezifischen Enzymen in *Methanosarcina* ssp. vorgestellt. Als Modellorganismus wurde *M. barkeri* (Stamm Fusaro) ausgewählt, da es bereits Hinweise gab, dass Zellextrakte dieses Organismus Reaktionen mit H₄F als Substrat katalysieren (Buchenau, 2001; Lin & Sparling, 1998).

M. barkeri zählt zur Ordnung der *Methanosarcinales* und gehört neben *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanopyrales* und *Methanomicrobiales* zu den methanogenen Archaea, eine der größten und phylogenetisch vielseitigsten Gruppe dieser Domäne (Boone et al., 1993; Woese et al., 1990). Wie fast alle dieser strikt anaerob lebenden Organismen kann *M. barkeri* auf H₂ und CO₂, das zu Methan reduziert wird, als einzige Energiequellen wachsen. Darüber hinaus haben die Vertreter der *Methanosarcinales*, im Gegensatz zu Organismen der anderen Ordnungen, die Fähigkeit, Acetat, Methanol, Methylamine und Methylthiole als methanogene Substrate zu verwenden (Thauer, 1993; Thauer, 1998), was mit Anwesenheit von signifikanten Mengen an Cytochromen einhergeht (Kühn et al., 1983). Diese metabole Vielseitigkeit spiegelt sich auch in dem Genom von *M. barkeri* wider, das mit 4,8 Mb neben *M. acetivorans* (5,7 Mb; 4524 Offene Leserahmen) und *M. mazei* (4,1 Mb; 3371 Offene Leserahmen) zu den größten archaeellen Genomen gehört und mehr als doppelt so groß ist wie bereits sequenzierte Genome von anderen methanogenen Archaea (Bult et al., 1996; Smith et al., 1997).

Sowohl in den vollständig sequenzierten Genomen von *M. acetivorans* und *M. mazei* als auch in dem teilsequenzierten Genomen von *M. barkeri* und *M. thermophila* wurden Gene identifiziert, die für putative H₄F-spezifische Enzyme kodieren und deren Untersuchung Gegenstand dieser Arbeit sind. Im ersten Teil dieses Kapitels werden daher biochemische Untersuchungen beschrieben, die belegen, dass zwei dieser Gene aus *M. barkeri*, *folD* und *glyA*, für H₄F-spezifische Enzyme kodieren und in dem Archaeon exprimiert werden. Im zweiten Teil werden Ergebnisse vorgestellt, die aufgrund von Wachstumsversuchen auf das Vorkommen von H₄F sowie dessen *de novo*-Synthese in *M. barkeri* schließen lassen. Ein dritter Teil beschäftigt sich mit der Frage, ob freie *p*-Aminobenzoesäure als Vorläufermolekül in der Tetrahydroscarinapterin (H₄SPT)-Synthese fungieren kann.

1 H₄F-spezifische Enzyme in *Methanosarcina barkeri*

Im Genom von *M. barkeri* und anderen *Methanosarcina* ssp. konnten die Gene, *glyA*, *fold*, *purN* und *purH*, identifiziert werden, deren abgeleitete Aminosäuresequenzen hohe Sequenzidentitäten zu H₄F-spezifischen Enzymen aus *Escherichia coli* aufweisen (Abb. 4). In *E. coli* sind diese Enzyme an der Purinbiosynthese beteiligt und katalysieren folgende Reaktionen: GlyA (Serin-Hydroxymethyltransferase) spaltet L-Serin in Gegenwart von H₄F in Glycin unter Bildung von Methylen-H₄F; FolD (Methylen-H₄F-Dehydrogenase/Methenyl-H₄F-Cyclohydrolase) katalysiert die Oxidation von Methylen-H₄F mit NADP⁺ zu Methenyl-H₄F⁺ und NADPH sowie die Hydrolyse von Methenyl-H₄F⁺ zu N¹⁰-Formyl-H₄F; PurN und PurH kodieren für Phosphoribosylglycinamid-Formyltransferasen, die die Inkorporation von Formylgruppen ausgehend von N¹⁰-Formyl-H₄F in die Positionen C⁸ (PurN) und C² (PurH) der Purine katalysieren (siehe Abb. 2, Reaktionen 11 und 12). Wie in Abb. 4 dargestellt, bilden drei dieser annotierten Gene, *purN*, *glyA* und *fold*, im Genom von *Methanosarcina* ein Gencluster zusammen mit zwei weiteren Genen, *folP* und *metF*, deren abgeleiteten Aminosäuresequenzen Sequenzidentitäten zu Dihydropteroat-Synthase (FolP) und Methylen-H₄F-Reduktase (MetF) aufweisen. In *E. coli* ist FolP an der H₄F-Synthese beteiligt und katalysiert die Kondensation von *p*-Aminobenzoesäure mit 6-Hydroxymethyl-7,8-Dihydropterin-Pyrophosphat zu Dihydropteroat. MetF katalysiert die Reduktion von Methylen-H₄F mit NADPH zu Methyl-H₄F und NADP⁺ (Abb. 2, Reaktion 4).

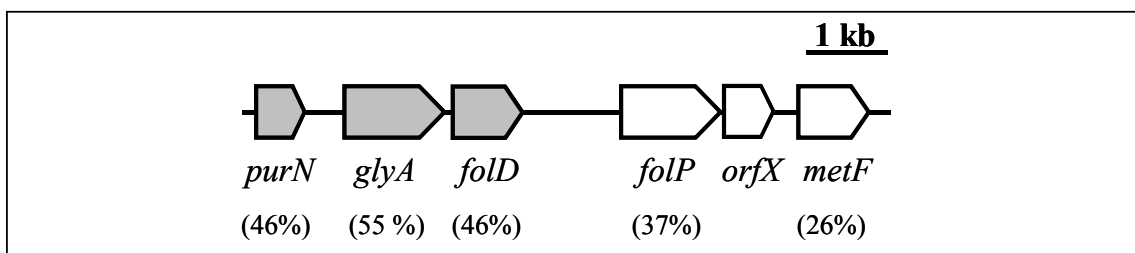


Abbildung 4: Anordnung von Genen, die für putative H₄F-spezifische Enzyme und für ein putatives H₄F-Biosynthese-Enzym kodieren, im Genom von *Methanosarcina barkeri* (Contig. 190; Gene 1055 bis 1060). Die Prozentangaben in Klammern repräsentieren die Sequenzidentitäten der Genprodukte zu den entsprechenden Enzymen in *Escherichia coli*: PurN, Phosphoribosylglycinamid-Formyltransferase; GlyA, Serin-Hydroxymethyltransferase; FOLD, NADP⁺-abhängige Methylen-H₄F-Dehydrogenase/Methenyl-H₄F-Cyclohydrolase; FolP, Dihydropteroat-Synthase; MetF, NADP⁺-abhängige Methylen-H₄F-Reduktase; OrfX, Offener Leserahmen unbekannter Funktion. Grau unterlegt sind die Gene, deren Genprodukte putativ an der Biosynthese von Purinen beteiligt sind. (http://genome.jgi-psf.org/draft_microbes/metba/metba.home.html). Innerhalb der *Methanosarcinales* weisen die von den Genen abgeleiteten Aminosäuresequenzen zwischen 79% und 89% Sequenzidentität auf.

Um zu zeigen, dass die Gene aus *M. barkeri* für Enzyme kodieren, die die erwarteten H₄F-spezifischen Reaktionen katalysieren, wurden *purN*, *glyA*, *fold* und *metF* kloniert und in *Escherichia coli* heterolog überproduziert, um ausreichende Proteinmengen für charakterisierende Studien bereitzustellen. Während sich GlyA und Fold als lösliche Proteine überproduzieren ließen, akkumulierten MetF und PurN bei der heterologen Überproduktion unter Bildung von sogenannten „Inclusion Bodies“. Es wurde sich daher auf die Untersuchung der beiden löslichen Proteine konzentriert.

1.1 Methylen-H₄F-Dehydrogenase/Methenyl-H₄F-Cyclohydrolase (Fold)

1.1.1 Eigenschaften des heterolog überproduzierten Enzyms

Für die heterologe Überproduktion von Fold aus *M. barkeri* wurde das *fold*-Gen in den Expressionsvektor pET24b+ kloniert und in BL21(DE3)TMCodonPlusRIL transformiert. Der gewählte Expressionsvektor ermöglichte die heterologe Überproduktion von Fold mit einem carboxyterminalem His₆-Tag.

E. coli-Zellextrakt mit dem überproduzierten Protein (Abb. 5, Spur 2) katalysierte unter Standardbedingungen die Oxidation von Methylen-H₄F bei gleichzeitiger Reduktion von NAD⁺ mit einer spezifischen Aktivität von 5,1 U/mg sowie die Hydrolyse von Methenyl-H₄F⁺ mit einer spezifischen Aktivität von 23,5 U/mg (Tab. 5). In Zellextrakt, der aus *E. coli*-Zellen gewonnen wurde, die den Expressionsvektor ohne Insert trugen, wurde eine spezifische Cyclohydrolase-Aktivität von 0,03 U/mg und eine spezifische Dehydrogenase-Aktivität mit NADP⁺ von 0,008 U/mg detektiert, was auf das wirtseigenen Fold zurückzuführen ist. Obwohl es sich bei *M. barkeri* um ein anaerob wachsendes Archaeon handelt, hatte die Anwesenheit von Luftsauerstoff keinen Einfluss auf die Aktivitäten von Fold.

Die Reinigung von Fold erfolgte unter aeroben Bedingungen durch Affinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA-Agarose. Ausgehend von 3,3 g Zellen gelang es, Fold 2,8-fach mit einer Ausbeute von 42% anzureichern. Wie in Tab. 5 dargestellt, wurden beide Aktivitäten parallel bis zu einer spezifischen Dehydrogenase-Aktivität von 11,8 U/mg und einer spezifischen Cyclohydrolase-Aktivität von 64,7 U/mg gereinigt, wobei das Verhältnis der Dehydrogenase-Aktivität zur Cyclohydrolase-Aktivität mit 0,2 konstant blieb (Tab. 5) und damit die Bifunktionalität belegt.

Tabelle 5: Reinigung von Methylen-H₄F-Dehydrogenase/Methenyl-H₄F-Cyclohydrolase (FolD) aus *Methanosarcina barkeri* heterolog überproduziert in *Escherichia coli*. DH, Methylen-H₄F-Dehydrogenase; CH, Methenyl-H₄F-Cyclohydrolase

Reinigungs- schritt	Protein (mg)	Aktivität (U)		Spezifische Aktivität (U/mg)		Ratio DH:CH	Reinigung* (x-fach)	Ausbeute* (%)
		DH	CH	DH	CH			
Zellextrakt	336	1700	7900	5,1	23,5	0,2	1	1
Ni ²⁺ -NTA	51	600	3300	11,8	64,7	0,2	2,8	42

* bezogen auf Cyclohydrolase-Aktivität

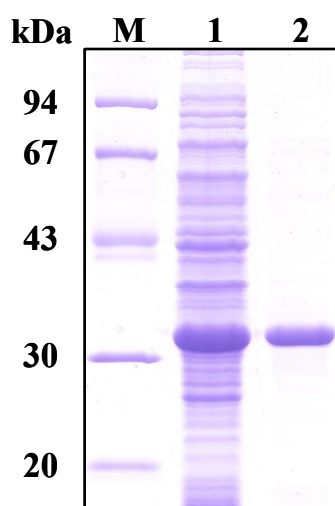


Abbildung 5: SDS-PAGE von Methylen-H₄F-Dehydrogenase/Methenyl-H₄F-Cyclohydrolase (FolD) aus *Methanosarcina barkeri* heterolog überproduziert in *Escherichia coli*. Die Proben wurden in SDS-Probenpuffer für 5 min bei 95°C denaturiert, anschließend in einem Polyacrylamidgel (11%) aufgetrennt und mit Coomassie Brilliantblau R250 gefärbt (Laemmli, 1970). Spur M, Molekularmassenstandard; Spur 1, 5 µg Zellextraktprotein; Spur 2, 5 µg gereinigte Methylen-H₄F-Dehydrogenase/Methenyl-H₄F-Cyclohydrolase.

Molekulare Eigenschaften

Die Analyse des gereinigten FOLD mittels SDS-PAGE zeigte eine Polypeptidbande mit einer apparenten molekularen Masse von ~31 kDa (Abb. 5, Spur 3). Diese unter denaturierenden Bedingungen determinierte apparente molekulare Masse stimmt mit der von der Sequenz abgeleiteten molekularen Masse von 31,87 kDa (31,05 kDa ohne His₆-Tag) überein. Die native Größe des Enzyms wurde mit Hilfe von Gelfiltration untersucht und lag im Bereich von 65 kDa (Daten nicht gezeigt), was auf eine homodimere Form des Proteins hinweist. Dies entspricht bifunktionellen Methylen-H₄F-Dehydrogenase/Methenyl-H₄F-Cyclohydrolasen anderer Prokaryoten, für die ebenfalls homodimere Strukturen beschrieben wurden (D'Ari & Rabinowitz, 1991; MacKenzie, 1984).

Katalytische Eigenschaften

Substratspezifität. Gereinigtes FOLD wurde in Enzymtests auf Substratspezifität getestet, indem (6S-)H₄F im Standardtestansatz durch die für methanogene Organismen charakteristischen H₄F-Analoga H₄MPT und H₄SPT (= H₄MPT-Monoglutamat) ersetzt wurde. H₄MPT wurde aus *Methanothermobacter marburgensis* und H₄SPT aus *Methanosarcina barkeri* gereinigt (siehe Material). Es zeigte sich, dass FOLD weder die Oxidation von Methylen-H₄MPT noch die Oxidation von Methylen-H₄SPT katalysierte, wobei die beiden pterinhaltigen C₁-Überträger in Gegenwart von NAD⁺, NADP⁺ oder F₄₂₀, dem Elektronenüberträger der methanogenen Archaea, getestet wurden. Darüber hinaus konnte Methenyl-H₄MPT⁺ von FOLD nicht hydrolysiert werden.

Im Gegensatz zu NADP⁺-abhängiger Methylen-H₄F-Dehydrogenase/Methenyl-H₄F-Cyclohydrolase aus *E. coli* (D'Ari & Rabinowitz, 1991) wurde für FOLD aus *M. barkeri* eine Präferenz für NAD⁺ als Elektronenakzeptor gefunden. Unter Standardbedingungen zeigte FOLD in Gegenwart von NADP⁺ (1 mM) mit 0,01 U/mg lediglich 0,1% von der Aktivität, die in Gegenwart von NAD⁺ (1 mM) mit 9 U/mg gemessen wurde. Während monofunktionelle Methylen-H₄F-Dehydrogenasen entweder NAD⁺- oder NADP⁺-abhängig sind (Enssle et al., 1991), zeigen bifunktionelle Methylen-H₄F-Dehydrogenase/Methenyl-H₄F-Cyclohydrolasen mit Ausnahme von mitochondrialen Methylen-H₄F-Dehydrogenase/Methenyl-H₄F-Cyclohydrolasen einiger Eucarya (Barlowe & Appling, 1990; MacKenzie, 1997) eine Spezifität für NADP⁺. In dieser Hinsicht unterscheidet sich FOLD aus *M. barkeri* von FOLD

anderer Prokaryoten. Mit Faktor F_{420} , dem Elektronenüberträger der methanogenen Archaea, zeigte das Enzym keine Reaktion.

Apparente K_m - und V_{max} -Werte. Die kinetische Untersuchung zur Bestimmung von K_m - und V_{max} -Werte für Fold erfolgte durch Variation der Substratkonzentrationen im Standardtestansatz. Die Abhängigkeit der Geschwindigkeit (V) von der Substratkonzentration $[S]$ folgte der Michaelis-Menten-Kinetik und wurde in doppelt reziproker Auftragung nach Lineweaver-Burk ($1/V$ gegen $1/[S]$) aufgetragen (Abb. 6). Der daraus abgeleitete apparente K_m -Wert für NAD^+ betrug 0,15 mM und der abgeleitete apparente V_{max} -Wert lag bei 7,3 U/mg. Für Methylen- H_4F konnte lediglich eine Abschätzung des apparenten K_m -Wertes von $< 5 \mu M$ (gemessen in Gegenwart von 3,5 mM NAD^+) vorgenommen werden, da die Anfangsgeschwindigkeit bei dieser niedrigsten noch messbaren Konzentration maximal war. Kinetiken, die in Gegenwart von Methylen- H_4F -Konzentrationen unter $5 \mu M$ aufgenommen wurden, waren aufgrund zu geringer Extinktionsdifferenzen nicht auswertbar.

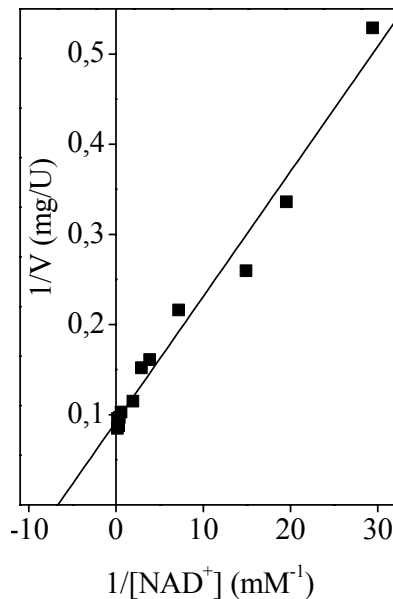


Abbildung 6: Graphische Darstellung zur Bestimmung des apparenten K_m -Wertes von NAD^+ für Fold aus *Methanosarcina barkeri* heterolog überproduziert in *Escherichia coli*. Die spezifische Aktivität wurde in Abhängigkeit von der Substratkonzentration doppelt reziprok nach Lineweaver-Burk aufgetragen. Die Testansätze enthielten 120 mM Kaliumphosphat pH 6,0, 10 mM Formaldehyd, 0 bis 7 mM NAD^+ und 30 μM (6S-) H_4F . Die Reaktionen wurden jeweils mit 3 μg gereinigtem Protein gestartet.

Die gemessenen apparenten K_m -Werte liegen im Größenordnungsbereich der apparenten K_m -Werte von bifunktionellen Methylen- H_4F -Dehydrogenase/Methenyl- H_4F -Cyclohydrolasen und monofunktionellen Methylen- H_4F -Dehydrogenasen anderer Organismen mit 26 bis 66 μM für Methylen- H_4F bzw. 0,09 bis 0,79 mM für $NAD(P)^+$ (D'Ari

& Rabinowitz, 1991; Wohlfahrt et al., 1991; Vorholt et al., 1998; Ljungdahl et al., 1980; Moore et al., 1974) und zwar unabhängig davon, ob das Enzyme eine anabole oder katabole Rolle im jeweiligen Organismus spielt (MacKenzie, 1984). Eine Ausnahme stellt Methylen-H₄F-Dehydrogenase von dem acetogenen Organismus *Acetobacterium woodii* dar: Für dieses Enzym wurden deutlich höhere apparente K_m -Werte von 260 μ M für Methylen-H₄F und von 4 mM für NAD⁺ bestimmt (Ragsdale & Ljungdahl, 1984). In acetogenen Bacteria sind H₄F-spezifische Enzyme am Energiestoffwechsel beteiligt, was sich zum einen darin widerspiegelt, dass die Enzyme eine um ein Vielfaches höhere spezifische Aktivität aufweisen und in bis zu 1000-fach höheren Mengen als in den meisten anderen Organismen vorkommen.

Eine Verwandtschaft von FOLD aus *M. barkeri* zu monofunktionellen Methylen-H₄MPT-Dehydrogenasen und Methenyl-H₄MPT-Cyclohydrolasen aus Archaea oder monofunktionellen Methylen-H₄F-Dehydrogenasen und Methenyl-H₄F-Cyclohydrolasen aus Bacteria besteht nicht.

Einfluss von pH-Wert, Temperatur und Salz

pH: Der optimale pH-Wert für die Dehydrogenase-Aktivität lag bei pH 6,0, gemessen in 120 mM Kaliumphosphat und der optimale pH-Wert für die Cyclohydrolase-Aktivität lag bei pH 8,0, gemessen in 50 mM Tricin/KOH (Buchenau, 2001).

Temperatur: Sowohl für die Dehydrogenase- als auch die Cyclohydrolase-Aktivität konnte ein Temperaturoptimum bei ca. 40°C bestimmt werden, was mit der optimalen Wachstumstemperatur des Archaeons von 37 °C in Einklang steht, jedoch deutlich unter den Temperaturoptima anderer Enzyme aus *M. barkeri* liegt (te Brömmelstroet et al., 1989; Enssle et al., 1991, Ma & Thauer, 1990).

Salz: Der Testansatz, der zur Bestimmung der Cyclohydrolase-Aktivität routinemäßig benutzt wurde, enthielt keinen Zusatz eines Salzes. Während monofunktionelle Methenyl-H₄MPT-Cyclohydrolase aus *Methanopyrus kandleri* (Breitung et al., 1991) und *Methylobacterium extorquens* AM1 (Pomper, 1998) in ihrer katalytischen Effizienz in unterschiedlichem Ausmaß durch die Gegenwart von Salz positiv beeinflusst werden, wurde für die Cyclohydrolase-Aktivität von FOLD aus *E. coli* (D'Ari & Rabinowitz, 1991) und die monofunktionelle Methenyl-H₄F-Cyclohydrolase aus *M. extorquens* (Pomper, 1998) ein negativer Einfluss beschrieben. Aus diesem Grund wurde der Effekt von Salzen auf die Cyclohydrolase-Aktivität von FOLD aus *M. barkeri* durch Zugabe von (NH₄)₂SO₄, KCl und

NaCl zum Testansatz überprüft. Es zeigte sich, dass schon geringe Salzkonzentrationen von 0,2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,4 M KCl und 0,2 M NaCl zu einer Abnahme der Cyclohydrolase-Aktivität um ca. 40% führten. Weitere Erhöhung der Salzkonzentrationen resultierte in einer Aktivitätsabnahme um bis zu 90%.

1.1.2 Nachweis von FOLD in *M. barkeri*

Immunologischer Nachweis

Um das Genprodukt von *fold* in *M. barkeri* nachzuweisen, wurden zunächst Western-Blot-Analysen mit Zellextrakten des Organismus durchgeführt. Der hierfür verwendete polyklonale Antikörper wurde zuvor durch die Immunisierung eines Kaninchens mit gereinigtem FOLD aus *M. barkeri*, das heterolog in *E. coli* überproduziert wurde, hergestellt. Western-Blot-Analysen mit dem erhaltenen Antiserum zeigten eine deutliche Bande mit einer apparenten molekularen Masse von ca. 30 kDa in Zellextrakten von *M. barkeri*. Kreuzreaktion mit anderen Proteinen aus *M. barkeri* oder mit FOLD aus *E. coli* wurden nicht beobachtet. Über den Vergleich der Signalstärke der Bande im Zellextrakt mit der Signalstärke von Banden verschiedener Konzentrationen des gereinigten Proteins wurde abgeschätzt, dass FOLD ca. 0,05% des gesamten Zellproteins ausmacht. Dieser Wert korreliert mit den spezifischen Aktivitäten (siehe Tab. 6), die im Zellextrakt detektiert wurden.

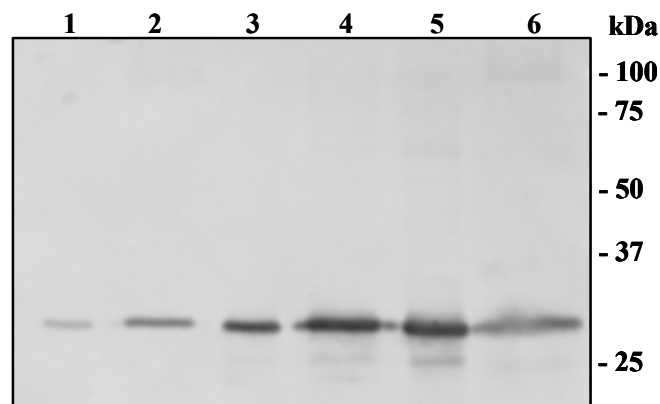


Abbildung 7: Western-Blot-Analyse von Zellextrakt von *Methanosarcina barkeri* und von gereinigtem FOLD heterolog überproduziert in *Escherichia coli*. Die Proben wurden in SDS-Probenpuffer für 5 min bei 95°C denaturiert, anschließend in einem Polyacrylamidgel (11%) aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Zur Detektion wurde Kaninchen-Antiserum, das spezifisch gegen FOLD aus *M. barkeri* gerichtet war, verwendet. Spuren 1-5, gereinigtes FOLD (0,01 µg; 0,05 µg; 0,1 µg; 0,5 µg; 1 µg); Spur 6, 130 µg Zellextrakt. Als Molekularmassenstandard diente Precision Plus Protein™ Standards.

Partielle Reinigung von FOLD aus *M. barkeri*

Zellextrakte von *M. barkeri*, die in Gegenwart von Methanol gezogen wurden, katalysierten unter Standardbedingungen die Oxidation von Methylen-H₄F mit NAD⁺ mit einer spezifischen Aktivität von 0,01 U/mg sowie die Hydrolyse von Methenyl-H₄F⁺ mit einer spezifischen Aktivität von 0,1 U/mg (Tab. 6). Die gemessenen Aktivitäten lagen aufgrund der Ergebnisse der Western-Blot-Analyse (Abb. 7) im Erwartungsbereich.

Um ausschließen zu können, dass es sich bei den gefundenen Aktivitäten um unspezifische Nebenreaktionen der monofunktionellen Methanogenese-Enzyme Methylen-H₄MPT-Dehydrogenase (Mtd) bzw. Methenyl-H₄MPT-Cyclohydrolase (Mch) handelte, die im Zellextrakt mit spezifischen Aktivitäten von 13,5 U/mg bzw. 1,8 U/mg vorhanden waren (Tab. 6), wurde FOLD aus *M. barkeri* durch Chromatographie partiell gereinigt.

Tabelle 6: Reinigung von Methylen-H₄F-Dehydrogenase/Methenyl-H₄F-Cyclohydrolase (FOLD) aus *Methanosarcina barkeri*. Die genaue Vorgehensweise ist in Material und Methoden beschrieben. DH, Methylen-H₄F-Dehydrogenase; CH Methenyl-H₄F-Cyclohydrolase; Mtd, Methylen-H₄MPT-Dehydrogenase; Mch, Methenyl-H₄MPT-Cyclohydrolase.

Reinigungsschritt	Spezifische Aktivität (U/mg)			Reinigung* (x-fach)	Ausbeute* (%)	
	FOLD		Mtd			
	DH	CH				
Zellextrakt	0,01	0,1	13,5	1,8	1	100
DEAE-Sepharose	0,05	0,6	2,1	<0,001	6	106
Q-Sepharose	0,11	1,3	0,6	<0,001	13	74
Source 15Q	0,2	2,2	-	<0,001	22	62
Hydroxyapatit	0,33	3,4	0,2	<0,001	34	49
Uno-Q	0,35	5,2	0,02	<0,001	52	28

*bezogen auf Cyclohydrolase-Aktivität

Bei früheren Reinigungsversuchen konnten nach dem ersten Chromatographie-Schritt keine FOLD-Aktivitäten detektiert werden, was vermutlich daran lag, dass das in nur sehr geringen Mengen vorkommende Enzym während des ersten Reinigungsschritts stark

ausverdünnt wurde und infolgedessen die Enzymtests nicht ausreichend sensitiv waren. Darüber hinaus könnten die bei den chromatographischen Auftrennungen verwendeten Salzpuffer zu Inhibition der Enzymaktivitäten geführt haben (siehe Seite 40). Mit Hilfe des Antikörpers war es nun möglich, auch geringe Mengen FoLD zu detektieren und so eine Reinigung zu erreichen. Ähnlich wie schon für die Reinigung des heterolog überproduzierten FoLD, wurde die Dehydrogenase- als auch Cyclohydrolase-Aktivität parallel angereichert. Nach 52-facher Anreicherung war FoLD vollständig von Mtd und Mch separiert (Tab. 6), wodurch eine unspezifische Umsetzung von Methylen-H₄F bzw. Methenyl-H₄F⁺ durch die beiden letztgenannten Proteine ausgeschlossen wurde.

1.2 Serin: H₄F-Hydroxymethyltransferase (GlyA)

1.2.1 Eigenschaften des heterolog überproduzierten Enzyms

Um zu zeigen, dass das *glyA*-Gen aus *M. barkeri* für eine H₄F-spezifische Serin-Hydroxymethyltransferase kodiert, wurde *glyA* mit Hilfe des Expressionsvektors pET24b+ in *E. coli* BL21(DE3)TMCodonPlus-RIL überexprimiert. Der Expressionsstamm enthielt das Plasmid pCodonPlus-RIL, das zur Erhöhung des Gehaltes an in *E. coli* seltenen Transfer-RNAs für die Aminosäuren Arginin, Isoleucin und Leucin dient, da sich insbesondere für diese Aminosäuren Unterschiede zwischen *E. coli* und *M. barkeri* in der Benutzung der Codons ergeben. Ohne dieses zusätzliche Plasmid konnte keine heterologe Überproduktion von GlyA detektiert werden.

Kulturen zur Überexpression von GlyA wurden aerob in Gegenwart von 0,1 mM Pyridoxal-5'-Phosphat (PLP) bei 37°C gezogen und nach Erreichen einer ΔOD₅₇₈ von 0,7 durch Zugabe von IPTG mit einer Endkonzentration von 1 mM für 3 h induziert. PLP ist eine prosthetische Gruppe von Serin-Hydroxymethyltransferasen und sollte zur Stabilisierung des Enzyms beitragen (Dr. R. Contestabile, persönliche Mitteilung).

Nach Zentrifugation des *E. coli*-Lysats wurde das rekombinant produzierte Enzym in der löslichen Fraktion detektiert und zeigte in SDS-PAGE eine apparente molekulare Masse von 43 kDa (Abb. 8, Spur 1). Unter Standardbedingungen katalysierten *E. coli*-Zellextrakte mit überproduziertem GlyA in Gegenwart von (6S-)H₄F die Spaltung von L-Serin unter Bildung von Methylen-H₄F und Glycin mit einer spezifischen Aktivität von 0,55 U/mg (Tab. 7). Die spezifische Aktivität in *E. coli*-Zellextrakten, die den Expressionsvektor ohne

Insert trugen, betrug lediglich 0,01 U/mg, was auf die Aktivität der wirtseigenen Serin-Hydroxymethyltransferase zurückzuführen ist.

Für die Reinigung von Serin-Hydroxymethyltransferase wurden Ammoniumsulfat-Fällungen, Chromatographie an Hydroxyapatit und Gelfiltration an einer Superdex 75 angewendet. Allen Reinigungspuffern wurde 0,1 mM PLP zugesetzt. Die Reinigung wurde unter aeroben Bedingungen durchgeführt, da das Enzym keine Sensitivität gegenüber Sauerstoff zeigte. Ausgehend von 6,5 g Zellen gelang es, Serin-Hydroxymethyltransferase 7,5-fach mit einer Ausbeute von 109 % bis zu einer spezifischen Aktivität von 4,1 U/mg anzureichern (Tab. 7). Vermutlich wurde die spezifische Aktivität von GlyA im Zellextrakt aufgrund von inhibierenden Einflüssen anderer Proteine oder Zellkomponenten unterbestimmt. Nach SDS-PAGE-Analyse (Abb. 8, Spur 4) ist neben dem gereinigten Enzym eine weitere Bande bei ca. 38 kDa zu erkennen. Diese „Kontamination“ ließ sich weder durch Gelfiltration noch durch Chromatographie an einer UnoQ-Säule abtrennen. Um ausschließen zu können, dass es sich bei dem gereinigten Protein um Serin-Hydroxymethyltransferase aus *E. coli* handelte, wurde die aminoternale Aminosäuresequenz des gereinigten Polypeptids, das bei 43 kDa im SDS-PAGE migrierte, über Edman-Abbau bestimmt. Die erhaltene Sequenz M-YIEKTDPELFE stimmte erwartungsgemäß mit der abgeleiteten Sequenz von *glyA* aus *M. barkeri* (MSYIEKTDPELFE), nicht aber mit der abgeleiteten Sequenz von *glyA* aus *E. coli* (MLKREMNIADYDA) überein.

Tabelle 7: Reinigung von Serin-Hydroxymethyltransferase (GlyA) aus *Methanosarcina barkeri* heterolog überproduziert in *Escherichia coli*.

Reinigungs-schritt	Protein (mg)	Aktivität (U)	Spezifische Aktivität (U/mg)	Reinigung (x-fach)	Ausbeute (%)
Zellextrakt	508	278	0,55	1	100
40 - 70% (NH ₄) ₂ SO ₄	192	467	2,4	4,4	168
Hydroxyapatit	110	544	4,9	9	196
Superdex 75	74	302	4,1	7,5	109

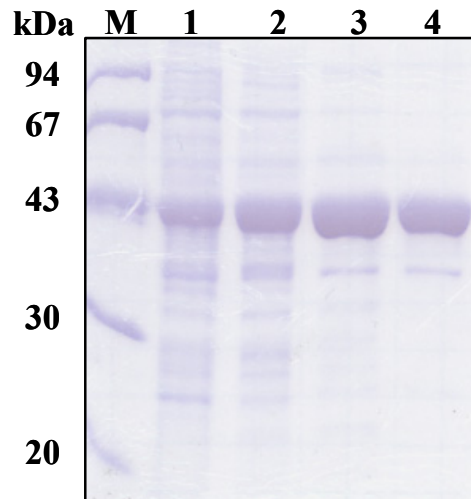


Abbildung 8: SDS-PAGE von Serin-Hydroxymethyltransferase (GlyA) aus *Methanosarcina barkeri* heterolog überproduziert in *Escherichia coli*. Die Proben wurden für 5 min bei 95°C in SDS-Probenpuffer denaturiert, anschließend in einem Polyacrylamidgel (11%) aufgetrennt und mit Coomassie Brilliantblau R250 gefärbt (Laemmli, 1970). Spur M, Molekularmassenstandard; Spur 1, Zellextraktprotein; Spur 2, Ammoniumsulfat-Fraktion; Spur 3, Hydroxyapatit-Fraktion; Spur 4, Superdex 75-Fraktion. Es wurde jeweils 10 µg Protein der jeweiligen Fraktion aufgetragen.

Molekulare Eigenschaften

Die apparente molekulare Masse von Serin-Hydroxymethyltransferase wurde unter denaturierenden Bedingungen bestimmt und eine apparente molekulare Masse von 43 kDa determiniert (Abb. 8, Spur 4). Diese Masse ist kleiner als die von der Aminosäuresequenz abgeleiteten Masse von 45,05 kDa. Eine MALDI/TOF-Analyse des gereinigten Proteins ergab eine molekulare Masse von 44,88 kDa. Die native Größe wurde mittels Gelfiltration untersucht und lag bei 100 kDa, was auf eine homodimere Struktur des Enzyms hindeutet. Dies entspricht anderen Serin-Hydroxymethyltransferasen, für die ebenfalls eine homodimere Struktur beschrieben wurde (Hoyt et al., 1986; Schirch et al., 1985).

Biophysikalische Eigenschaften

UV/Visible-Spektroskopie. Präparationen von Serin-Hydroxymethyltransferase wiesen eine leicht gelbe Färbung auf, was auf eine chromophore Gruppe hinweist. Da Serin-Hydroxymethyltransferase zu der Familie der B₆-abhängigen Enzyme gehört (Contestabile et al., 2001; Hayashi, 1995), die als prosthetische Gruppe ein Pyridoxal-5'-Phosphat (PLP) besitzen, wurde dessen Anwesenheit durch ein UV/Visible-Spektrum bestätigt. In Abwesenheit von Substrat zeigt GlyA ein typisches Spektrum mit einem Absorptionsmaximum bei 425 nm, das durch die Bildung einer Schiff'schen Base (Aldimin) zwischen der Aldehydgruppe von PLP und der ε-Aminogruppe eines Lysylrestes des Proteins hervorgerufen wird (Abb. 9). Nach Zugabe von Glycin und (6S-)H₄F zum gereinigten Enzym wurde ein Absorptionsspektrum mit einem Maximum bei 495 nm induziert, was für die Bildung der Quinoidstruktur zwischen Glycin und PLP unter diesen Bedingungen charakteristisch ist (Schirch & Jenkins, 1964).

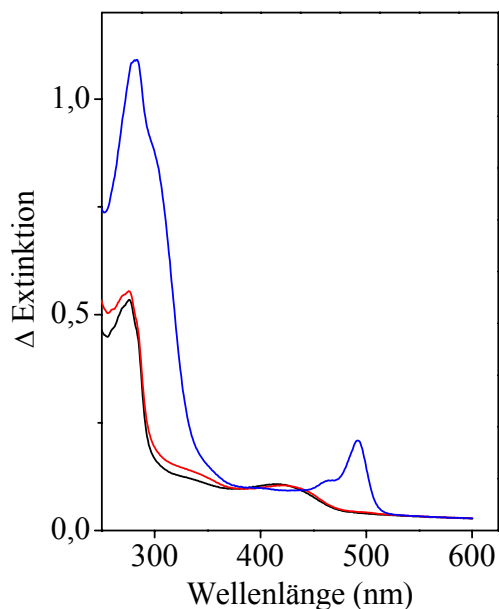


Abbildung 9: UV/Visible-Spektrum von gereinigter Serin-Hydroxymethyltransferase in Gegenwart von Glycin und (6S-)H₄F. Darstellung der Spektren des gereinigten Enzyms (0,8 mg/ml) in 20 mM Kaliumphosphat pH 7,2 (schwarze Linie) sowie nach sukzessiver Zugabe von 0,1 mM Glycin (rote Linie) und 10 μ M (6S-)H₄F (blaue Linie).

Katalytische Eigenschaften

Substratspezifität. Bisher wurden zwei Serin-Hydroxymethyltransferasen aus methanogenen Archaea charakterisiert. Sowohl für GlyA aus *Methanothermobacter thermoautotrophicus* als auch für GlyA aus *Methanococcus jannaschii* konnte H₄MPT als Substrat identifiziert werden. Während GlyA aus *M. thermoautotrophicus*, zu dem GlyA aus *M. barkeri* 37% Sequenzidentität zeigt, strikt H₄MPT-abhängig ist (Hoyt et al., 1986), wurde für GlyA aus *M. jannaschii*, zu dem GlyA aus *M. barkeri* 35% Sequenzidentität zeigt, gefunden, dass neben H₄MPT auch H₄F als Substrat dienen kann, wobei mit H₄F eine 450-fache geringere Effizienz gemessen wurde (Angelaccio et al., 2003). Um die Spezifität von GlyA aus *M. barkeri* zu untersuchen, wurde die Enzymaktivität mit H₄F, H₄MPT und H₄SPT getestet. Es zeigte sich, dass GlyA L-Serin nicht nur in Gegenwart von H₄F, sondern auch in Gegenwart von H₄MPT spaltete, wobei die katalytische Effizienz mit H₄MPT weniger als 1% betrug (siehe app. K_m -Werte). Mit H₄SPT konnte keine Bildung von Methylen-H₄SPT detektiert werden. Diese Daten bestätigen Aktivitätsmessungen von Lin & Sparling (1998), die in Zellextrakten von *M. barkeri* die Spaltung von [3-¹⁴C]-L-Serin in Gegenwart von H₄F mit einer spezifischen Aktivität von 1,8 mU/mg detektieren konnten. H₄F konnte in dieser Reaktion weder durch H₄MPT noch durch H₄SPT ersetzt werden.

Substratinhibition. Für die Serin-Hydroxymethyltransferase-Aktivität wurde beobachtet, dass Konzentrationen von (6S-)H₄F über 15 µM im Reaktionsansatz zu einer Abnahme der spezifischen Aktivität um bis zu 40% führten (Abb. 10). Diese Substratinhibition wurde ebenfalls für Serin-Hydroxymethyltransferase aus *E. coli* beschrieben, wobei der inhibitorische Effekt vermutlich durch die Bindung von H₄F an den binären Enzym-Glycin-Komplex unter Bildung eines inaktiven Proteins zustande kam (unkompetitive Substratinhibition) (Contestabile et al., 2001). Eine Aktivitätsabnahme wurde hier ab einer H₄F-Konzentration > 70 µM festgestellt.

Anders als für Serin-Hydroxymethyltransferasen anderer Organismen gezeigt (Hoyt et al., 1986; Schirch & Mason, 1963; Schirch et al., 1985), konnte eine Erhöhung der spezifischen Aktivität von GlyA aus *M. barkeri* in Gegenwart von Mg²⁺ und/oder PLP nicht festgestellt werden. Eine Begründung hierfür könnte darin liegen, dass sowohl die Überproduktion als auch die Reinigung von GlyA in Gegenwart von 0,1 mM PLP durchgeführt wurde und somit PLP in ausreichender Menge in den Enzympräparationen vorlag.

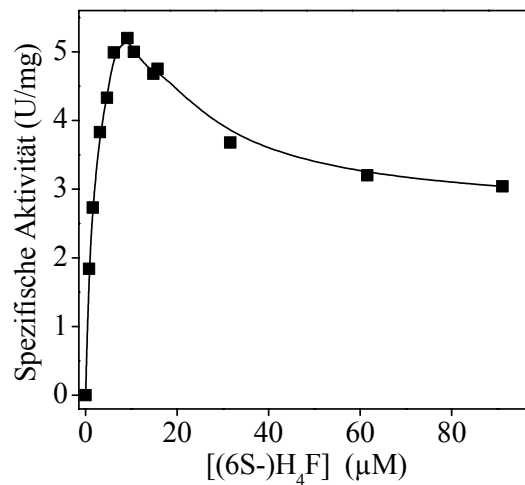


Abbildung 10: Abhängigkeit der Serin-Hydroxymethyltransferase-Aktivität von der (6S)-H₄F-Konzentration. Die Aktivitätsbestimmungen erfolgten mit 1 µg gereinigtem Protein unter Standardbedingungen wie in Material und Methoden beschrieben.

Apparente K_m - und V_{max} -Werte. Die Bestimmung von apparenten K_m -Werten für GlyA erfolgte durch Variation der Substratkonzentrationen im Standardtestansatz. Aufgrund der beobachteten Substratinhibition wurden bei der Bestimmung des apparenten K_m -Werts von (6S)-H₄F nur Messungen bis 15 µM (in Gegenwart von 7 mM L-Serin) bei der doppelt reziproken Auftragung nach Lineweaver-Burk ($1/V$ gegen $1/[S]$) berücksichtigt (Abb. 11, A) und die Bestimmung des apparenten K_m -Werts für L-Serin in Gegenwart von 15 µM (6S)-H₄F durchgeführt (Abb. 11, B). Die aus den Graphen abgeleiteten apparenten K_m -Werte für (6S)-H₄F bzw. für L-Serin betragen 2 µM bzw. 0,2 mM. Der apparente V_{max} -Wert lag bei ca. 6 U/mg. Der apparente K_m -Wert für H₄MPT konnte lediglich auf > 0,3 mM mit einem apparenten V_{max} -Wert von < 1 U/mg abgeschätzt werden, da H₄MPT-Konzentrationen oberhalb von 0,6 mM nicht messbar waren.

Insgesamt zeigt ein Vergleich der apparenten K_m -Werte von GlyA aus *M. barkeri* mit den apparenten K_m -Werten von GlyA aus *E. coli* (app. K_m (L-Serin) = 0,3 mM und app. K_m (H₄F) = 25 µM (Schirch et al., 1985)) und GlyA aus *M. thermoautotrophicus* (app. K_m (L-Serin) = 2,8 mM und app. K_m (H₄MPT) = 1,8 mM (Hoyt et al., 1986)) oder *M. jannaschii* (app. K_m (L-Serin) = 0,8 mM und app. K_m (H₄MPT) = 0,1 mM (Angelaccio et al., 2003)), dass das Enzym aus *M. barkeri* stärker der bakteriellen als der archaeellen Serin-Hydroxymethyltransferase ähnelt.

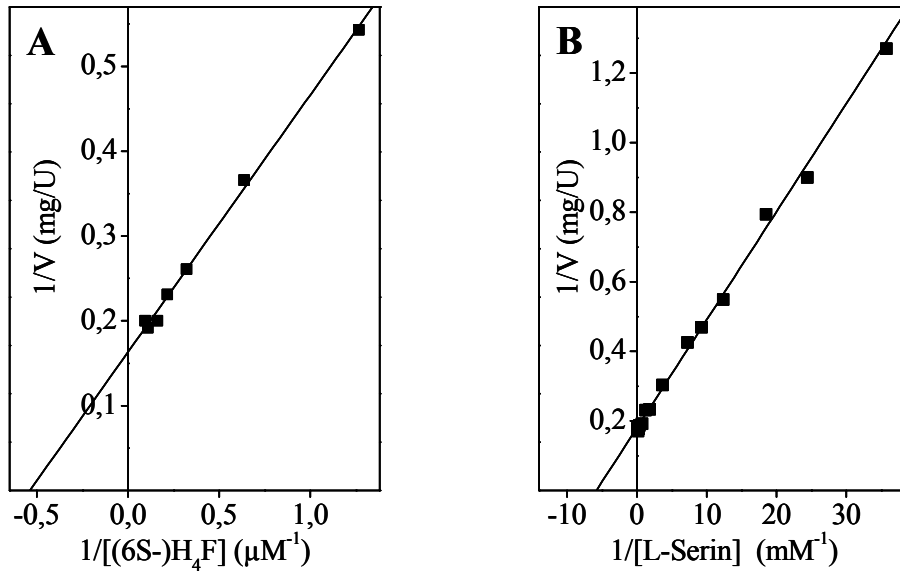


Abbildung 11: Graphische Darstellung zur Bestimmung des apparenten K_m -Wertes von (A) (6S-)H₄F und von (B) L-Serin für GlyA aus *Methanosarcina barkeri* heterolog überproduziert in *Escherichia coli*. Die spezifische Aktivität wurde in Abhängigkeit von der Substratkonzentration doppelt reziprok nach Lineweaver-Burk aufgetragen.

Retroaldolspaltung anderer α -Hydroxy-Aminosäuren. Studien bezüglich der Substratspezifität von Serin-Hydroxymethyltransferasen aus Pro- und Eucaryoten haben gezeigt, dass GlyA neben der Spaltung von L-Serin unter anderem auch die H₄F-unabhängige Retroaldolspaltung verschiedener β -Hydroxy-Aminosäuren in Glycin und ein korrespondierendes Aldehyd katalysiert (Schirch, 1982). Für GlyA aus *M. barkeri* wurde gefunden, dass das Enzym sowohl L-Threonin als auch L-*allo*-Threonin in Glycin und Acetaldehyd spalten kann. Der apparente K_m -Wert für L-Threonin lag bei 2 mM mit einem apparenten V_{max} von 0,4 U/mg (Abb. 12, A) bzw. für L-*allo*-Threonin bei 0,3 mM mit einem apparenten V_{max} von 1,6 U/mg (Abb. 12, B).

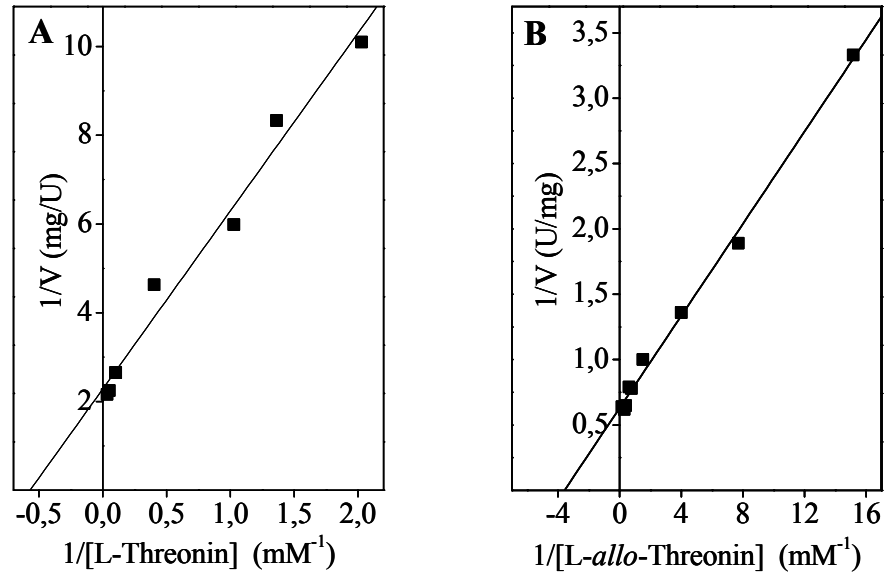


Abbildung 12: Graphische Darstellung zur Bestimmung des apparenten K_m -Wertes von (A) L-Threonin und (B) L-allo-Threonin für GlyA aus *Methanosarcina barkeri* heterolog überproduziert in *Escherichia coli*. Die spezifische Aktivität wurde in Abhängigkeit von der Substratkonzentration doppelt reziprok nach Lineweaver-Burk aufgetragen. Die Testansätze enthielten 20 mM Kaliumphosphat pH 7,2, 0,25 mM NADH, 25 U Alkohol-Dehydrogenase (aus Hefe) und 100 μ g gereinigtes GlyA. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,03 bis 6,5 mM L-Threonin bzw. 0,2 bis 26 mM L-allo-Threonin gestartet.

1.2.2 Nachweis von GlyA in *M. barkeri*

Eine Western-Blot-Analyse mit Zellextrakten von *M. barkeri* sollte zeigen, ob das Genprodukt von *glyA* in *M. barkeri* nachweisbar ist. Der hierfür verwendete polyklonale Antikörper wurde zuvor durch die Immunisierung eines Kaninchens mit gereinigtem GlyA aus *M. barkeri*, das heterolog in *E. coli* überproduziert wurde, hergestellt.

Nach Western-Blot-Analysen mit dem erhaltenen Antiserum konnte im Zellextrakt von *M. barkeri* eine deutliche Bande auf gleicher Höhe mit der Bande von gereinigtem GlyA (ca. 43 kDa) detektiert werden (Abb. 13). Über den Vergleich der Signalintensität der Bande im Zellextrakt mit den Signalintensitäten von Banden verschiedener Konzentrationen von gereinigtem Protein wurde abgeschätzt, dass der Anteil von GlyA bezogen auf das Gesamtzellprotein ca. 0,1% betrug. Diese Konzentration korreliert mit der spezifischen Aktivität von Serin-Hydroxymethyltransferase von 1,8 mU/mg in Zellextrakten von *M. barkeri*, die durch Lin & Sparling (1998) bestimmt wurden.

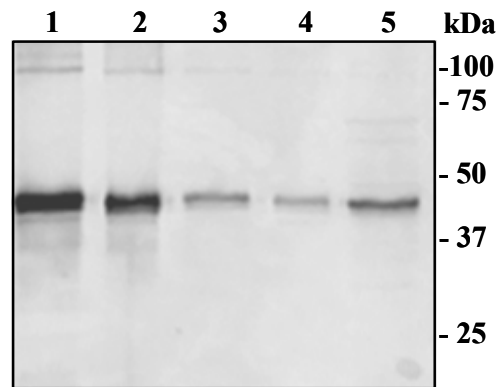


Abbildung 13: Western-Blot-Analyse von Zellextrakt von *Methanosarcina barkeri* und von gereinigtem GlyA heterolog überproduziert in *Escherichia coli*. Die Proben wurden in SDS-Probenpuffer für 5 min bei 95°C denaturiert, anschließend in einem Polyacrylamidgel (11%) aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Zur Detektion wurde Kaninchen-Antiserum, das spezifisch gegen GlyA aus *M. barkeri* gerichtet war, verwendet. Spuren 1-4, gereinigtes GlyA (0,1 µg; 0,05 µg; 0,01 µg; 0,005 µg); Spur 5, 10 µg Zellextraktprotein. Als Molekularmassenstandard diente Precision Plus Protein™ Standards.

1.3 Methylen-H₄F-Reduktase (MetF) und Phosphoribosylglycinamid-Formyltransferase (PurN)

Wie bereits zu Anfang erwähnt, bilden die Gene *glyA* und *fold* zusammen mit den Genen *metF* und *purN* ein Cluster im Genom von *M. barkeri* (Abb. 4). Da bereits für zwei dieser Enzyme gezeigt werden konnte, dass sie die erwarteten Reaktionen mit H₄F katalysieren, sollten auch *metF* und *purN* diesbezüglich untersucht und gezeigt werden, dass *metF* für Methylen-H₄F-Reduktase und *purN* für Phosphoribosylglycinamid-Formyltransferase kodiert. Sowohl das *metF*- als auch *purN*-Gen wurde mittels des Expressionsvektors pET24b+ in BL21-CodonPlus™(DE3)-RIL überexprimiert. Wie zu Beginn erwähnt, kam es zu vermehrter Akkumulation der Proteine in Form von „Inclusion Bodies“. Im Folgenden werden Versuche, die unternommen wurden um die Löslichkeit von MetF zu fördern, vorgestellt.

1.3.1 Heterologe Überproduktion unter Bildung von „Inclusion Bodies“

E. coli-Zellen, die mit dem Expressionsplasmid pET24b+/*metF* transformiert worden waren, wurden aerob bei 37 °C auf LB-Medium gezogen. Bei einer optischen Dichte von 0,7 erfolgte die Induktion mit 1 mM IPTG für 3 h bei 37°C. SDS-PAGE-Analysen der Zellen vor und nach der Induktion ergaben, dass sich das *metF*-Genprodukt aus *M. barkeri* in *E. coli* überproduzieren ließ. Abb. 14 zeigt eine deutliche Bande bei ca. 31 kDa in aufgetrennten Zellextraktproteinen von *E. coli* (Abb. 14, Spuren 1 und 2). Die apparente Masse stimmt mit der von der Aminosäuresequenz abgeleiteten Masse von 31,77 kDa überein.

Zentrifugation des Zellaufschlusses bei 10 000 x *g* und anschließende SDS-PAGE-Analyse des Überstands und des resuspendierten Pellets ergaben, dass MetF quantitativ mit den Zelltrümmern pelletierte und somit unlöslich in Form sogenannter „Inclusion Bodies“ produziert wurde (Abb. 14, Spuren 3-6). Zellextrakte induzierter Expressionszellen wiesen keine Methylen-H₄F-Reduktase-Aktivität auf.

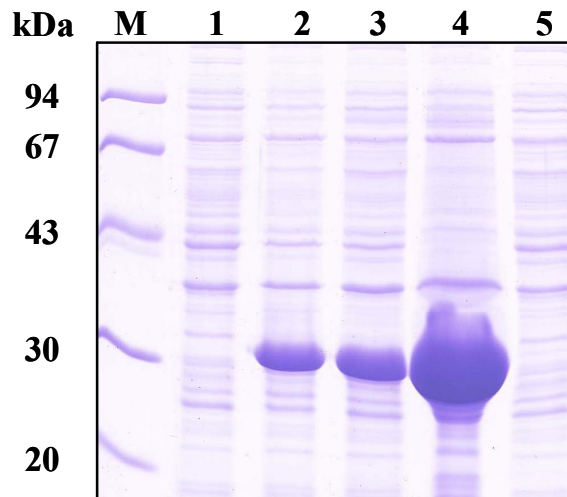


Abbildung 14: SDS-PAGE von heterolog in *E. coli* überproduziertem MetF aus *Methanosarcina barkeri*. Für die Proteinanalyse der Expressionszellen wurden die Proben in SDS-Probenpuffer für 5 min bei 95°C denaturiert, über ein Polyacrylamidgel (11%) aufgetrennt und anschließend mit Coomassie Brilliantblau R250 gefärbt (Laemmli, 1970). Spur M, Molekularmassenstandard; Spur 1, *E. coli*-Zellen vor Induktion mit IPTG; Spur 2, *E. coli*-Zellen 3 h nach Induktion mit IPTG; Spur 3, *E. coli*-Lysat; Spur 4; unlösliche Fraktion des *E. coli*-Lysats; Spur 5 lösliche Fraktion des *E. coli*-Lysats. Es wurden ca. 20 bis 50 µg Protein aufgetragen.

Modifikationen der Überexpressionsbedingungen

Durch Anhäufung von neu synthetisierten Polypeptiden während der Überproduktion eines Proteins kann es zur Bildung von „Inclusion Bodies“ kommen. Die erhöhten Konzentrationen solcher Faltungsintermediate begünstigen die Aggregation und Fehlfaltungen der Polypeptidketten gegenüber dem eigentlichen Faltungsprozeß zum nativen Protein (Kohno et al., 1990). Im Folgenden werden die Modifikationen der Expressionsbedingungen, die zur Förderung der Löslichkeit von MetF angewendet wurden, beschrieben.

Änderung der Expressionsstärke von *metF*. Zunächst wurde die Induktorkonzentration reduziert (1 mM bis 0,05 mM) bzw. vollständig auf eine Induktion der T7-RNA-Polymerase-Expression durch IPTG verzichtet. Obwohl diese Strategie bei der homologen Überproduktion von MetF aus *E. coli* in *E. coli* zu löslichem Protein führte (Sheppard et al., 1999), hatte die Herabsetzung der T7-Polymerase-Verfügbarkeit und die damit reduzierte *metF*-Expression keinen Einfluss auf die Löslichkeit von MetF aus *M. barkeri*.

Änderung der Wachstumsbedingungen von *E. coli*. Die Kultivierung des Expressionsstamms auf M9-Minimalmedium zeigte im Vergleich zu Zellen, die auf LB-Medium gezogen wurden, keine Erhöhung der Löslichkeit des Proteins. Auch die Herabsetzung der Wachstumstemperatur auf 18°C beeinflusste die „Inclusion Body“-Bildung nicht.

Da MetF als prosthetische Gruppe ein FAD besitzt, wurde vermutet, dass FAD während des Faltungsprozesses eine wichtige Rolle spielen könnte. Sämtlichen Überexpressionsansätzen wurden daher wahlweise 10 µM Riboflavin (Vorläufer von FAD) (Sheppard et al., 1999) oder Vitamin- und Spurenelemente-Lösung des *M. barkeri*-Mediums (siehe Material und Methoden) zugesetzt. Eine Erhöhung der Löslichkeit von MetF durch Supplementierung des Mediums mit diesen Zusätzen konnte nicht festgestellt werden.

Um zu prüfen, ob die Redoxbedingungen Einfluss auf die heterologe Produktion der Methylen-H₄F-Reduktase aus dem strikt anaerob wachsenden Archaeons haben, wurde *E. coli* anaerob auf Glucose/Nitrat bzw. Glycerol/Fumarat gezogen und induziert. Die anaerobe Überproduktion hatte keinen positiven Effekt auf die Löslichkeit der heterolog produzierten Methylen-H₄F-Reduktase.

Produktion von MetF als Fusionsprotein. Die Faltung und/oder Löslichkeit eines Proteins kann unter Umständen durch die Überproduktion des Proteins als Fusionsprotein

verbessert werden. Die Fusionierung von MetF an einen His₆-Tag und anschließender Überproduktion in BL21-CodonPlus™(DE3)-RIL resultierte in unlöslichem Protein. Das gleiche Ergebnis wurde für die Überproduktion von MetF mit einem aminoterminalen Thioredoxin-Tag in *E. coli* AD494 (unterstützt die Bildung von Disulfidbrückenbindungen von Proteinen) gefunden. Eine Überproduktion in BL21-CodonPlus™(DE3)-RIL für MetF fusioniert mit einem Strep-Tag II konnte nicht detektiert werden.

Demgegenüber führte die Fusion von *metF* an *malE* zur Überproduktion eines Fusionsproteins mit dem Maltose-Binde-Protein in BL21-CodonPlus™(DE3)-RIL in einer löslichen, aber inaktiven Form. Es wurde angenommen, dass MalE aufgrund seiner molekularen Masse von 43 kDa die Aktivität von MetF (~32 kDa) negativ beeinflusst bzw. inhibiert. Ein Abspalten des MalE-Proteins gelang nur unter sehr stringenten Bedingungen (Inkubation mit Faktor Xa für > 48 h bei 25°C in Gegenwart von 0,02% SDS), was zur gleichzeitigen Proteolyse von MetF führte.

Koexpressionsversuche mit Chaperonen. Ob die gleichzeitige Produktion von MetF mit Chaperonen einen Einfluss auf den Faltungsprozess von MetF hat, wurde durch Koexpression der jeweiligen Gene untersucht. Für die Expression von *metF* bei gleichzeitiger Produktion der Chaperon-Systeme GroESL oder DnaK wurden *E. coli* BL21-CodonPlus™(DE3)-RIL zunächst mit dem *groESL*-tragenden Plasmid (Goloubinoff et al., 1989) oder aber mit den beiden DnaK-System-tragenden Plasmiden (DnaK benötigt Helferchaperone, deren Gene auf dem *grpE*-Plasmid kodiert waren) transformiert (Tomoyasu et al., 2001). Anschließend wurden diese Zellen mit dem Expressionsvektor pET24b+/*metF* transformiert. Für beide Systeme gelang eine Überproduktion von MetF, jedoch in unlöslicher Form.

***In vitro* Rückfaltung**

Andere Proteine wie z. B. MtaB aus *M. barkeri*, die heterolog in *E. coli* als "Inclusion Bodies" überproduziert wurden, konnten erfolgreich renaturiert werden (Sauer & Thauer, 1997). *In vitro* Rückfaltungsversuche mit MetF in Anlehnung an das für MtaB beschriebene Rückfaltungsprotokoll, indem das Protein zunächst durch 6,6 M Harnstoff denaturiert und im Anschluss durch 66-fache Verdünnung renaturiert werden konnte, waren nicht erfolgreich, da während des kritischen Schrittes der Rückfaltung durch Verdünnung das Protein präzipitierte. Den Prozess der Rückfaltung zu verlangsamen, indem MetF über Nacht dialysiert wurde, führte ebenfalls nicht zu löslichem Protein. Eine zweite Methode nach Vuillard und Freeman,

(Goldberg et al., 1996; <http://www-cryst.bioc.cam.ac.uk/hosts/ndsb/protocol2.html>) bei der das Protein zunächst durch 6 M Guanidin denaturiert und im Anschluss durch 10-faches Verdünnen in 1 M NDSB-Puffer (siehe Material und Methoden 3.5.3) renaturiert wird, führte ebenfalls nicht zum gewünschten Erfolg.

1.3.2 Aktivitäts- und Western-Blot-Analyse

Enzymatischer Nachweis

MetF konnte in Zellextrakten von *M. barkeri* nicht durch Aktivitätsbestimmungen nachgewiesen werden (siehe auch Buchenau, 2001). Auch mit einem Testansatz, bei dem [¹⁴C-Methyl]-H₄F in Gegenwart des Elektronenakzeptors Menadion durch MetF zu [¹⁴C-Methylen]-H₄F oxidiert wird (siehe Material und Methoden), war keine Aktivität detektierbar. Als interner Standard wurde gereinigte Methylen-H₄F-Reduktase aus *E. coli*, die homolog in *E. coli* überproduziert wurde, verwendet.

Immunologischer Nachweis

Um ein mögliches Genprodukt von *metF* in *M. barkeri* nachzuweisen, wurden Western-Blot-Analysen mit Zellextrakten des Organismus durchgeführt. Für die Herstellung von polyklonalen Antikörpern wurde MetF-His₆, das als unlösliches Protein in *E. coli* heterolog überproduziert wurde, unter denaturierenden Bedingungen (siehe Material und Methoden 3.5.3) gereinigt und Antikörper durch Immunisierung eines Kaninchens hergestellt. Der in Abb. 15 dargestellte Western-Blot zeigt, dass mit Hilfe des Antiserums zwei Banden von ca. 30 kDa und 60 kDa im Zellextrakt von *M. barkeri* detektierbar waren. Verglichen mit der Bande des gereinigten Enzyms zeigte sich jedoch, dass diese Banden nicht der erwarteten Größe von MetF (~32 kDa) entsprachen. Unklar ist, ob es sich bei diesen Banden um eine modifizierte Form von MetF handelt oder die Antikörper unspezifisch mit anderen Zellproteinen reagieren. Versuche, MetF durch Ammoniumsulfat-Fällungen oder Chromatographie an Q-Sepharose von anderen Zellproteinen zu separieren, um eine Bande zu erhalten, die eindeutig MetF zuzuordnen ist, waren nicht erfolgreich.

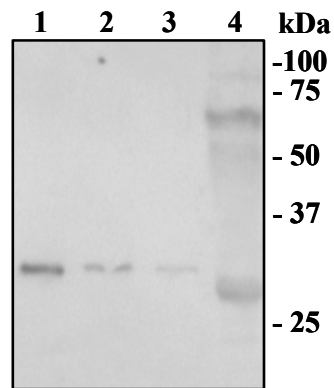


Abbildung 15: Western-Blot-Analyse von Zellextrakt von *Methanosarcina barkeri* und von gereinigtem MetF heterolog überproduziert in *Escherichia coli*. Die Proben wurden in SDS-Probenpuffer für 5 min bei 95°C denaturiert, anschließend in einem Polyacrylamidgel (11%) aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Zur Detektion wurde Kaninchen-Antiserum, das gegen denaturiertes MetF aus *M. barkeri* gerichtet war, verwendet. Spuren 1-3, gereinigtes MetF (0,5 µg; 0,1 µg und 0,05 µg); Spur 4, 50 µg Zellextraktprotein. Als Molekularmassenstandard diente Precision Plus Protein™ Standards.

2 Wachstum von *M. barkeri* in Abhängigkeit von Folsäure bzw. *p*-Aminobenzoesäure

Nachdem in *M. barkeri* H₄F-spezifische Enzyme nachgewiesen werden konnten, galt es zu klären, ob das Archaeon H₄F enthält bzw. zur Biosynthese von H₄F fähig ist. Die niedrigen K_m -Werte für (6S-)H₄F (FolD) und Methylen-H₄F (GlyA) von < 5 µM lassen vermuten, dass die intrazelluläre H₄F-Konzentration in *M. barkeri* im mikromolaren Bereich und somit um mehr als den Faktor 100 unter der intrazellulären H₄SPT-Konzentration von 3 mM (siehe Ergebnisse 3.2) liegt.

2.1 Wachstum in Abhängigkeit von der Vitaminkonzentration

Da bei der standardmäßigen Kultivierung nach Karrasch et al. (1989) sowohl Folsäure als auch *p*-Aminobenzoesäure, ein Intermediat der H₄F- und H₄MPT-/H₄ST-Synthese, im Medium enthalten ist (Material und Methoden, Tab. 1), wurde zunächst untersucht, ob diese beiden Komponenten für das Wachstum von *M. barkeri* notwendig sind. Aus diesem Grund wurden Wachstumsversuche durchgeführt, bei denen *M. barkeri* in Abwesenheit bzw. in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen von Folsäure und/oder *p*-Aminobenzoesäure im Medium kultiviert wurde (Abb. 16). Es wurde festgestellt, dass *M. barkeri* kaum mehr in der Lage war zu wachsen, wenn beide Vitamine aus dem Medium weggelassen wurden. Um die Eintragung von Folsäure bzw. *p*-Aminobenzoesäure in die Versuchsansätze durch das Inokulum gering zu halten, war es notwendig, die Zellen zunächst an geringere Konzentrationen von Folsäure oder *p*-Aminobenzoesäure im Medium zu adaptieren. (Im jeweiligen Ansatz ohne Vitaminzugabe ist noch leichtes Wachstum zu beobachten, was durch das Einbringen von *p*-Aminobenzoesäure oder Folsäure durch das Inokulum zu begründen ist.) Wachstum konnte erst durch die Zugabe von Folsäure oder *p*-Aminobenzoesäure zum Medium rekonstituiert werden (Abb. 16). Um optimales Wachstum zu erreichen, musste das Medium mit ca. 200 nM Folsäure oder ca. 20 nM *p*-Aminobenzoesäure supplementiert werden. Diese Werte sind um die durch das Inokulieren maximal eingebrachte Vitaminkonzentration korrigiert. Höhere Konzentrationen hatten keinen signifikanten Effekt bezüglich der Wachstumsrate oder der erreichten Zellmasse von ca. 5 g Feuchtzellen pro Liter. Bei einer *p*-Aminobenzoesäure-Konzentration von ca. 5 nM, d. h. unter *p*-Aminobenzoesäure-limitierende Bedingungen, wurden ca. 3 g Feuchtzellen pro Liter

erhalten, woraus sich eine intrazelluläre Konzentration von ca. 5 μM *p*-Aminobenzoesäure bzw. daraus synthetisierten Komponenten ergibt. Für diese Abschätzung wurde angenommen, dass das intrazelluläre Volumen 3,3 μl pro mg Zellprotein beträgt (Blaut & Gottschalk, 1984), dass Protein zu Feuchtzellmasse im Verhältnis von 1:10 steht und dass *p*-Aminobenzoesäure bei Wachstumsende vollständig in die Zellen aufgenommen wurde.

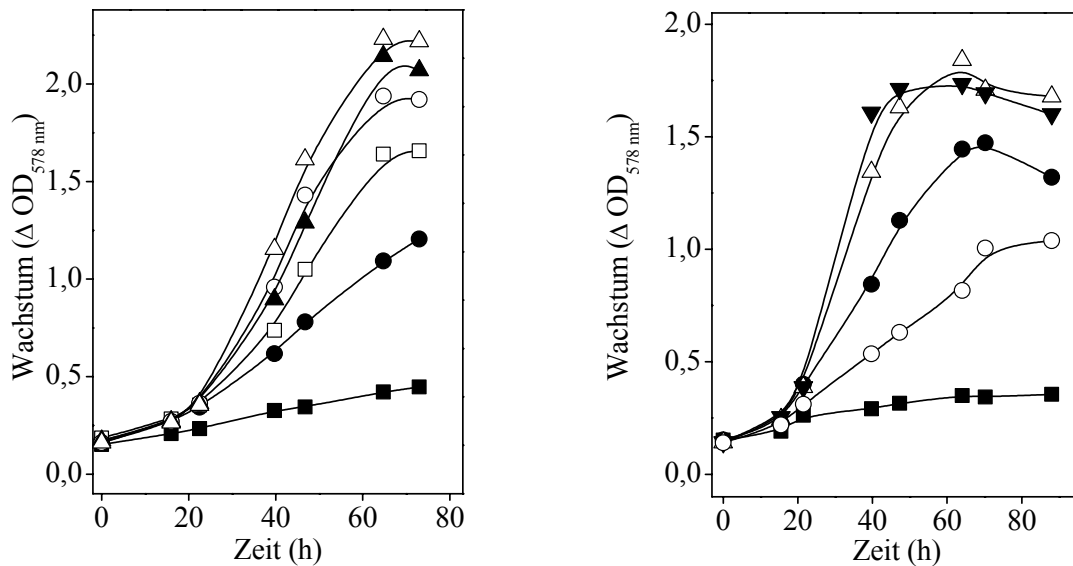


Abbildung 16: Abhängigkeit des Wachstums von *Methanosarcina barkeri* von (A) Folsäure oder (B) *p*-Aminobenzoesäure. Die Kultivierung erfolgte in Gegenwart von (A) Folsäure-Konzentrationen von 0 μM (■), 0,06 μM (●), 0,1 μM (□), 0,16 μM (○), 0,27 μM (▲) oder 0,41 μM (Δ) und (B) *p*-Aminobenzoesäure-Konzentrationen von 0 nM (■), 5 nM (○), 10 nM (●), 18 nM (▼) oder 35 nM (Δ). Die angegebenen Werte wurden um die maximal eingebrachte Vitaminkonzentration durch das Inokulum korrigiert.

Dieses Ergebnis zeigt, dass Folsäure bzw. *p*-Aminobenzoesäure ein Vitamin für *M. barkeri* darstellt, wobei das eine Vitamin durch das andere ersetzt werden kann. Daraus lässt sich ableiten, dass das Archaeon seinen H_4F -Bedarf sowohl über die Aufnahme von Folsäure als auch über die Aufnahme von *p*-Aminobenzoesäure decken kann. Da es sich bei Folsäure um die oxidierte Form des Pterins handelt, scheint *M. barkeri* in der Lage zu sein, das Molekül in seine reduzierte und damit biologisch aktive Form zu überführen. Es wurde jedoch bisher in den Methanogenen kein Homolog zur Dihydrofolat-Reduktase, die die Reduktion von Dihydrofolat zu Tetrahydrofolat katalysiert, gefunden (Caccamo et al., 2004). Desweiteren lässt sich schlussfolgern, dass in Abwesenheit von Folsäure *M. barkeri* H_4F ausgehend von *p*-Aminobenzoesäure *de novo* synthetisieren kann.

2.2 Inhibition des Wachstums durch Sulfanilamid

Um die Hypothese, dass *M. barkeri* zur H₄F-Synthese in der Lage ist, zu überprüfen, wurden Wachstumsstudien mit Sulfanilamid durchgeführt. Der bakteriostatische Wirkmechanismus der Sulfonamide (*p*-Aminobenzolsulfonamid) beruht auf einer kompetitiven Hemmung der Dihydropteroat-Synthase durch Substratkonkurrenz zu *p*-Aminobenzoesäure, wodurch es im wachsenden Organismus zu einer Hemmung der Synthese von H₄F kommt und infolgedessen wichtige Bausteine für DNA, RNA und Proteine nicht mehr synthetisiert werden können.

Für den Fall, dass in *M. barkeri* die Synthese über einen ähnlichen Weg wie in Bacteria und Eucarya erfolgt, sollte das Wachstum von *M. barkeri* durch Sulfanilamid gehemmt werden. Dazu wurde das Archaeon in Methanolmedium kultiviert, das mit 20 nM *p*-Aminobenzoesäure und verschiedenen Konzentrationen von Sulfanilamid (0 bis 2 mM) supplementiert wurde.

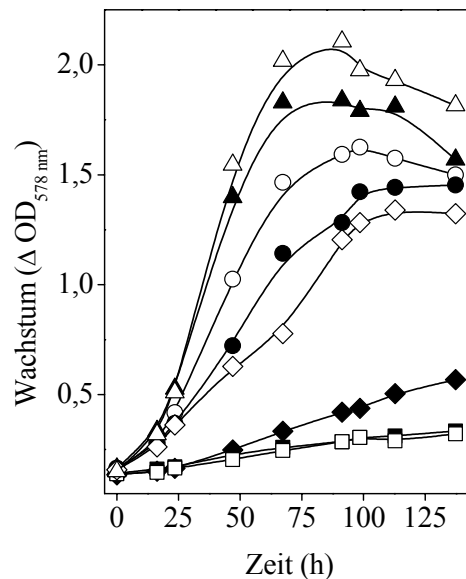


Abbildung 17: Inhibition des Wachstums von *Methanosarcina barkeri* in Abhängigkeit von der Sulfanilamid-Konzentration im Medium. *M. barkeri* wurde auf Methanolmedium kultiviert, das mit 20 nM *p*-Aminobenzoesäure und Sulfanilamid in Konzentrationen von 2 mM (□), 1 mM (◆), 0,64 mM (◇), 0,32 mM (○), 0,16 mM (●), 0,015 mM (▲), 0 mM (Δ) supplementiert wurde. Als Negativkontrolle diente eine Kultur, der weder *p*-Aminobenzoesäure noch Sulfanilamid zugesetzt wurde (■).

Wie in Abb. 17 dargestellt zeigte sich mit steigender Sulfanilamid-Konzentration eine zunehmende Inhibition des Wachstums im Vergleich mit einer Kultur, der kein Sulfanilamid zugesetzt wurde. Eine vollständige Inhibition des Wachstums konnte für eine Sulfanilamid-Konzentration von 2 mM (350 µg/ml) beobachtet werden. Die Inhibition des Wachstums konnte durch die Zugabe von 400 nM *p*-Aminobenzoesäure (in Gegenwart von 2 mM Sulfanilamid) aufgehoben werden (Daten nicht gezeigt). Im Vergleich zu der erforderlichen Konzentration, die zur Bakteriostase vieler grampositiver und gramnegativer Bakterienarten im Bereich von 0,017 mM bis 0,58 mM (3 bis 100 µg/ml) (Aktories et al., 1996) nötig sind, liegt die für *M. barkeri* gefundene Sulfanilamidkonzentration von 2 mM um den Faktor 4 bis 100 höher. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte darin liegen, dass Sulfanilamid nicht für alle Zellen gleichermaßen zugänglich ist, da *Methanosarcina* unter diesen Wachstumsbedingungen multizelluläre Aggregate bildet. Ob *p*-Aminobenzoesäure oder das strukturell eng verwandte Sulfanilamid über Diffusion oder Carrier-vermittelten Transport in die Organismen aufgenommen wird, ist nicht bekannt. Studien mit Pflanzenzellen deuten jedoch darauf hin, dass *p*-Aminobenzoesäure durch Diffusion in die Zelle gelangt und sich aufgrund von pH-Gefälle innerhalb subzellulärer Kompartimente verteilt (Quinlivan et al., 2003). Für den Fall, dass Sulfanilamid in *M. barkeri* ebenfalls durch Diffusion aufgenommen wird, könnte die unterschiedliche chemische Komposition der Cytoplasmamembran von Bacteria und Archaea (die archaelle Cytoplasmamembran besteht aus Isoprenoidalkylketten, die über Etherbindung an Glycerol gebunden sind) möglicherweise einen Einfluss auf die Permeabilität für das Antibiotikum haben und so den Einsatz von höheren Konzentrationen notwendig machen.

2.3 Aufnahme von *p*-Aminobenzoesäure während des Wachstums

Die vorangegangenen Versuche haben die Vermutung untermauert, dass *M. barkeri* neben H₄SPT auch H₄F enthält. Sowohl die beobachtete Wachstumsabhängigkeit von *p*-Aminobenzoesäure als auch die Wachstumsinhibition durch Sulfanilamid weisen darüber hinaus auf eine mögliche *de novo*-Synthese von H₄F durch das Archaeon hin. Um zu bestätigen, dass das Vitamin tatsächlich aufgenommen, jedoch nicht in der H₄SPT-Synthese, für die *p*-Aminobenzoesäure ebenfalls als Vorläufer beschrieben wurde, (Rasche & White, 1998; White, 1985), verwendet wird, wurden Wachstumsversuche in Gegenwart von [¹⁴C]-markierter *p*-Aminobenzoesäure durchgeführt, die es zum einen ermöglichten, die

Aufnahme des Vitamins in die Zellen quantitativ zu verfolgen und zum anderen zwischen den Synthesewegen für H₄F und H₄SPT *in vivo* zu diskriminieren.

Obwohl sich die Strukturen von H₄F und H₄MPT/H₄SPT ähneln und auch die Synthesewege der beiden Coenzyme Gemeinsamkeiten aufweisen, unterscheiden sich die beiden Wege bei der Inkorporation von *p*-Aminobenzoesäure in das Molekül: Während in der H₄SPT-Synthese die Carboxylgruppe von *p*-Aminobenzoesäure in Form von CO₂ abgespalten wird, bleibt sie in H₄F erhalten. Aus diesem Grund kann bei Wachstum in Gegenwart von [Carboxyl-¹⁴C]-*p*-Aminobenzoesäure nicht nur die Aufnahme des Vitamins verfolgt, sondern aus dem Vergleich mit einer Kultur, die in Gegenwart von [Ring-¹⁴C]-*p*-Aminobenzoesäure gezogen wurde, auch abgeschätzt werden, wieviel der aufgenommenen *p*-Aminobenzoesäure decarboxyliert wurde und somit in die H₄SPT-Synthese geflossen ist.

Auf diesem Hintergrundwissen basierend wurde *M. barkeri* in 200 ml Methanolmedium in Gegenwart von 80 nM [Carboxyl-¹⁴C]-*p*-Aminobenzoesäure kultiviert und in Abhängigkeit von der Zeit durch die Bestimmung der Radioaktivität der Kultur bzw. der Radioaktivitäten der Zellen und des Überstandes der Kultur nach Zentrifugation die Aufnahme von *p*-Aminobenzoesäure in den wachsenden Organismus verfolgt (Abb 18, B). Ein Parallelansatz, bei dem *M. barkeri* in Gegenwart von 80 nM [Ring-¹⁴C]-*p*-Aminobenzoesäure kultiviert wurde, diente als Referenz und wurde in gleicher Weise behandelt (Abb. 18, A). Die genaue Vorgehensweise ist in Material und Methoden beschrieben.

Wie in Abb. 18 dargestellt, wurde *p*-Aminobenzoesäure hauptsächlich während der Lag-Phase des Wachstums aufgenommen. Unter der Annahme, dass das aus dem Medium aufgenommene Vitamin für die H₄F-Synthese verwendet wird, ergibt dies Sinn, da der Organismus zunächst für die Zellteilung wichtige Zellbausteine synthetisieren muss. Weiterhin war zu beobachten, dass bei Versuchsende *p*-Aminobenzoesäure nicht vollständig aufgenommen worden war: in beiden Ansätzen wurde ca. 35% (~7 nmol) der anfänglichen *p*-Aminobenzoesäure-Konzentration im Überstand detektiert. Während in der Referenzkultur die Gesamtradioaktivität über die Versuchsdauer ohne Verluste konstant blieb (Abb. 18), wurde im Versuchsansatz mit [Carboxyl-¹⁴C]-*p*-Aminobenzoesäure kontinuierlich Radioaktivität verloren. Diese Differenz spiegelt sich auch in der Menge an aufgenommenen *p*-Aminobenzoesäure in die Zellen wider: Vergleicht man die in die Zellen aufgenommene Menge an *p*-Aminobenzoesäure beider Kulturen, so findet man bei Versuchsende eine dem Radioaktivitätsverlust entsprechend verringerte Aufnahme in die Zellen der Kultur, die in Gegenwart von [Carboxyl-¹⁴C]-*p*-Aminobenzoesäure gezogen wurde. Da es sich bei den

Versuchsansätzen um kein geschlossenes System handelte, wurde die Radioaktivität mit großer Wahrscheinlichkeit über die Gasphase in Form von $^{14}\text{CO}_2$ abgegeben. Aufgrund der Tatsache, dass H_4F bzw. $\text{H}_4\text{MPT}/\text{H}_4\text{SPT}$ die einzigen bekannten Moleküle sind, für deren Synthese *p*-Aminobenzoesäure als Vorläufermolekül benötigt wird und eine Decarboxylierung nur für die $\text{H}_4\text{MPT}/\text{H}_4\text{SPT}$ -Synthese beschrieben ist, ist der Radioaktivitätsverlust auf die Synthese von H_4SPT zurückzuführen.

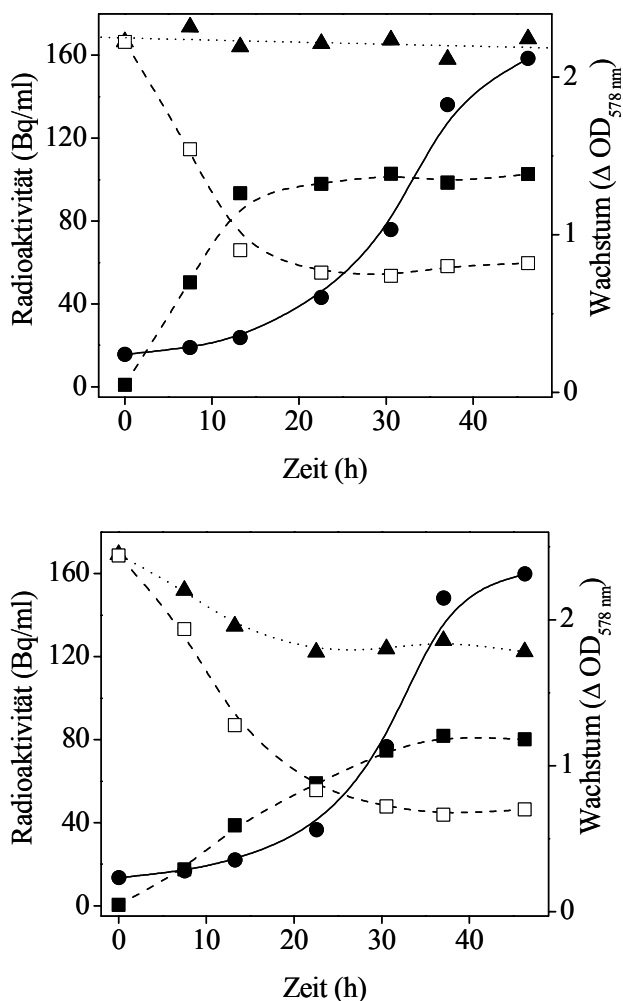


Abbildung 18: Aufnahme von $[^{14}\text{C}]-p$ -Aminobenzoesäure in *Methanosarcina barkeri* während des Wachstums in Gegenwart von (A) 80 nM [Ring- $^{14}\text{C}]-p$ -Aminobenzoesäure (2,1 MBq/ μmol) oder (B) 80 nM [Carboxyl- $^{14}\text{C}]-p$ -Aminobenzoesäure (2,1 MBq/ μmol). Radioaktivität in 1 ml Kultur (▲) sowie in den Zellen (■) und dem Überstand (□) von 1 ml Kultur nach Zentrifugation. Das Wachstum (●) wurde anhand der optischen Dichte bei 578 nm verfolgt.

Aus der Bilanzierung des Versuches ergibt sich, dass *M. barkeri* ca. 65% (13 nmol) der im Medium vorhandenen $[^{14}\text{C}]-p$ -Aminobenzoesäure aufgenommen hat, wovon 33% (4 nmol) für die H_4SPT -Synthese verwendet wurden und somit 67% (9 nmol) für die H_4F -Synthese zur Verfügung standen. Um ausschließen zu können, dass die in den Zellen

verbliebene Radioaktivität in Form von gelöstem $^{14}\text{CO}_2$ vorliegt oder aber [^{14}C]-*p*-Aminobenzoesäure unspezifisch an die Zellen adsorbierte, wurden die Zellen aufgeschlossen, das erhaltene Lysat angesäuert und mit N_2/CO_2 für 15 min durchsprudelt, um gelöstes $^{14}\text{CO}_2$ auszutreiben. Die Bestimmung der Radioaktivität des Lysats vor und nach der Behandlung mit N_2/CO_2 (siehe Material und Methoden) sowie die Analyse des Überstandes und des Pellets nach Zentrifugation des Lysats ergaben, dass sich 95% der Radioaktivität im Überstand befanden und daher angenommen werden kann, dass die gemessene Radioaktivität in den Zellen auf [Carboxyl- ^{14}C]-*p*-Aminobenzoesäure zurückzuführen ist.

Da aus 200 ml Kultur ca. ~1 g Feuchtzellen geerntet werden konnten, wurde unter der Annahme, dass das Verhältnis von Feuchtzellen zu Zellprotein 10 zu 1 und das intrazelluläre Volumen 3,3 μl pro mg Zellprotein beträgt, eine intrazelluläre H_4F -Konzentration von 27 μM und eine intrazelluläre H_4SPT -Konzentration von 12 μM berechnet. Unter diesen Wachstumsbedingungen (Faktor 4 bis 5 über der für optimales Wachstum von *M. barkeri* notwendigen *p*-Aminobenzoesäure-Konzentration; siehe Abb. 16, B) liegt die Konzentration von H_4F somit im Erwartungsbereich dessen, was sich durch die Ergebnisse der Wachstumsversuche ableiten ließ. Es zeigte sich außerdem, dass das aus freier *p*-Aminobenzoesäure synthetisierte H_4SPT weniger als 0,4% der in *M. barkeri* gemessenen H_4SPT -Konzentration von 3 mM (siehe Ergebnisse 3.2) betrug und daher *p*-Aminobenzoesäure als Intermediat der H_4SPT in *M. barkeri* unter diesen Versuchsbedingungen ausgeschlossen werden kann.

Nach Wiederholung des Versuchs in Gegenwart von 450 nM bzw. 1800 nM [^{14}C]-*p*-Aminobenzoesäure zeigte sich, dass die Aufnahme der im Medium befindlichen *p*-Aminobenzoesäure in die Zellen mit 65-70 % konstant blieb, und somit die absolute Menge an aufgenommenem Vitamin deutlich anstieg. Darüber hinaus hatte sich in beiden Versuchsansätzen der Anteil an Radioaktivitätsverlust, der auf die Decarboxylierung während der H_4SPT -Synthese zurückzuführen ist, von 35% auf 58% (in Gegenwart von 450 nM *p*-Aminobenzoesäure) bzw. 56% (in Gegenwart von 1800 nM *p*-Aminobenzoesäure) bezüglich der aufgenommenen *p*-Aminobenzoesäure-Menge nahezu verdoppelt. Basierend auf diesen Daten ließ sich abschätzen, dass der H_4SPT -Anteil, der aus freier *p*-Aminobenzoesäure synthetisiert wurde, von 0,4% (in Gegenwart von 80 nM *p*-Aminobenzoesäure) auf ca. 13% (in Gegenwart von 1800 nM *p*-Aminobenzoesäure) anstieg. Dies deutet darauf hin, dass in *M. barkeri* mit steigender Konzentration von freier

p-Aminobenzoessäure in den Zellen diese in zunehmendem Maße auch für die H₄SPT-Synthese verwendet wird.

3 Konzentration von H₄F bzw. H₄SPT in *M. barkeri*

3.1 H₄F-Konzentration unter der methodischen Nachweisgrenze

Innerhalb der Euryarchaeota, zu denen *M. barkeri* zählt, konnte bislang nur in Organismen der Ordnung *Halobacteriales* signifikante Konzentrationen von H₄F gefunden werden. In der Vergangenheit angewendete Methoden zum direkten Nachweis von H₄F in *M. barkeri* und anderen methanogenen Archaea waren bislang nicht erfolgreich. Weder die Anwendung eines Bioindikator-Tests (Leigh, 1983; Worrell & Nagle, 1988) noch die Anwendung einer radioimmunologischen Methode (Lin & Sparling, 1998) waren ausreichend spezifisch, um geringe Konzentrationen von H₄F in Gegenwart von hohen Konzentrationen von H₄MPT/H₄SPT zweifelsfrei zu detektieren. Das Vorkommen von H₄F in *M. barkeri* konnte daher weder belegt noch ausgeschlossen werden.

Eine alternative Methode, H₄F und H₄SPT/H₄MPT direkt in Zellextrakten nachzuweisen, beruht auf der enzymatischen Umsetzung der Pterine zu ihren stabileren und aufgrund ihrer verschiedenen UV/Visible-Spektren leicht zu unterscheidenden Methenyl-Derivaten mit anschließender Analyse über HPLC (Vorholt et al., 1998). Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass das für die Umwandlung verwendete Enzym Methylen-H₄MPT-Dehydrogenase (MtdA) aus *M. extorquens* AM1 nicht zwischen H₄F, H₄MPT oder H₄SPT diskriminiert und so gleichzeitige Analyse verschiedener Tetrahydropterine ermöglicht. Zellextrakte von *M. barkeri* wurden zunächst filtriert, um die niedermolekularen Zellkomponenten (< 5 kDa) von den Proteinen zu trennen. Nach der Überführung der im Filtrat enthaltenen Pterine in ihre Methenyl-Derivate wurden die Verbindungen mittels Umkehrphase an einer LiCrospher RP18-Säule aufgetrennt und kontinuierlich Spektren der eluierten Verbindungen durch einen Dioden-Array-Detektor aufgenommen. Zur Kalibrierung der Säule wurde H₄MPT und/oder H₄F verwendet, die einem Aliquot des Filtrats vor der enzymatischen Umwandlung zugesetzt wurden. Die Retentionszeit betrug für Methenyl-H₄F⁺ 17,2 min und für Methenyl-H₄MPT⁺ 20,4 min. Beide Verbindungen konnten aufgrund ihrer UV/Visible-Spektren eindeutig identifiziert werden, da Methenyl-H₄MPT⁺ bzw. Methenyl-

H_4SPT^+ ein Absorptionsmaximum bei 336 nm und Methenyl- H_4F^+ ein Absorptionsmaximum bei 357 nm besitzt (siehe Abb. 19, a und b).

Bei der Auftrennung von *M. barkeri*-Filtrat eluierte nach 22 min eine Verbindung, die ein UV/Visible-Spektrum mit einem Absorptionsmaximum bei 336 nm zeigte (Abb. 19 (a)). Eine massenspektrometrische Untersuchung der entsprechenden Fraktion mittels MALDI/TOF ergab eine Masse von 916,27 Da, die mit der berechneten Masse von 916,18 Da für Methenyl- H_4SPT^+ übereinstimmte. Durch einen Vergleich des Methenyl- H_4SPT^+ -Peaks (Abb. 19) mit Methenyl- H_4MPT^+ -Peaks bekannter Konzentrationen, die zur Standardisierung verwendet wurden (Daten nicht gezeigt), konnte eine intrazelluläre H_4SPT -Konzentration von ungefähr 4 mM abgeschätzt werden. Wie das Elutionsprofil in Abb. 19 (schwarzes Chromatogramm) zeigt, wurden keine weiteren Peaks detektiert. Zur Kontrolle wurde die Analyse mit Filtrat wiederholt, dem als interner Standard (6S-) H_4F mit einer Endkonzentration von 170 μM vor Inkubation mit MtdA zugesetzt wurde (Abb. 19, rotes Chromatogramm). Wie in Abb. 19 zu sehen ist, zeigt das Elutionsprofil neben dem Methenyl- H_4SPT^+ -Peak bei 22 min einen zweiten Peak bei 17,2 min. Dieser Peak konnte aufgrund der Retentionszeit, des UV/Visible-Spektrums und einer Massenbestimmung von 456,015 Da mittels MALDI/TOF erwartungsgemäß als Methenyl- H_4F^+ (456,16 Da) identifiziert werden.

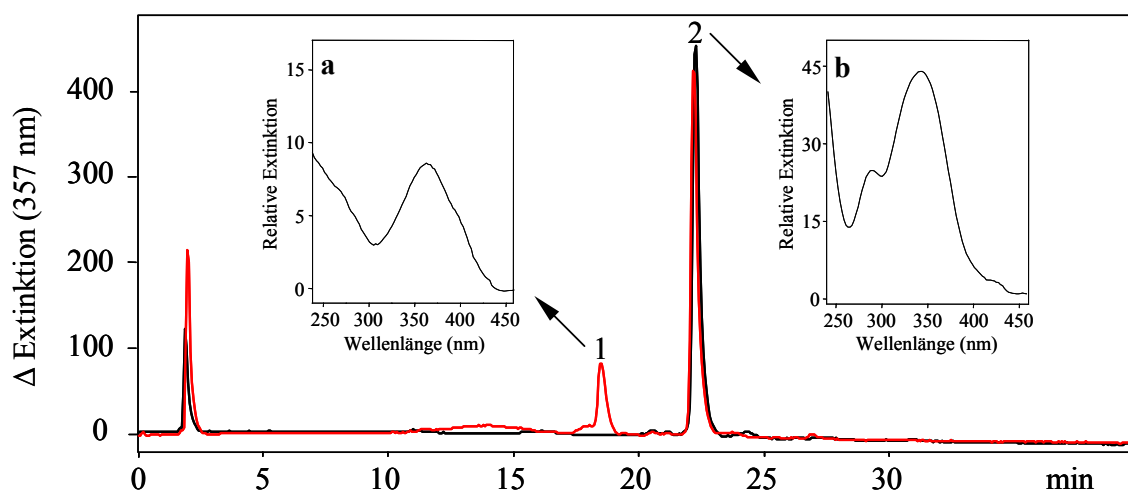


Abbildung 19: HPLC-Analyse der Methenyl-Tetrahydropterine in Zellextrakt-Filtrat von *Methanosarcina barkeri* sowie UV/Visible-Spektren von (a) Methenyl- H_4F^+ und (b) Methenyl- H_4SPT^+ . 50 μl Probe wurden über Umkehrphase an einer LiCrospher RP18-Säule, die mit 25 mM Ammoniumformiat pH 4,0 äquilibriert wurde, aufgetrennt und spektroskopisch detektiert. Die Elution adsorbierter Verbindungen erfolgte über einen Methanolgradienten (0 bis 30 ml) mit einer Flussrate von 1 ml/min. Dargestellt sind die Elutionsprofile bei 357 nm von *M. barkeri*-Filtrat (schwarzes Chromatogramm) und *M. barkeri*-Filtrat mit Methenyl- H_4F^+ zur internen Standardisierung (rotes Chromatogramm). Die Retentionszeit für Methenyl- H_4F^+ (Peak 1) betrug 17,2 min und für Methenyl- H_4SPT^+ (Peak 2) 22 min.

Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass in Zellextrakten von *M. barkeri* die H₄F-Konzentration unter der mit dieser Methode detektierbaren Konzentration liegt. Die untere Nachweisgrenze für Methenyl-H₄F⁺ lag unter der Annahme der vollständigen Umsetzung durch MtdA bei ca. 50 µM. Es kann darüber hinaus nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem in *M. barkeri* vorkommenden H₄F um ein polyglutamyliertes Derivat oder eine andersartig modifizierte Form handelt, welche möglicherweise nicht durch MtdA umgesetzt wird und daher durch die angewendete Analyseverfahren nicht erfasst wurde.

3.2 H₄SPT-Konzentration im millimolaren Bereich

Wie durch die unter 2 beschriebenen Versuche gezeigt wurde, benötigt *M. barkeri* eine Konzentration von ca. 20 nM *p*-Aminobenzoesäure im Medium für optimales Wachstum. Da *p*-Aminobenzoesäure nicht nur als Vorläufermolekül in der H₄F-Synthese, sondern auch in der H₄MPT/H₄SPT-Synthese gilt (Rasche & White, 1998; White, 1985), könnten daher unter Vitaminmangel beide Synthesewege betroffen und somit für das Erliegen des Wachstums verantwortlich sein. Dieser Annahme widersprechen sowohl die Ergebnisse des Hemmversuchs mit Sulfanilamid (Ergebnisse, 2), welches spezifisch die H₄F-Synthese inhibiert, als auch die Resultate der Aufnahmeversuche mit radioaktiver *p*-Aminobenzoesäure, die gezeigt haben, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen freie *p*-Aminobenzoesäure in nur quantitativ geringen Mengen decarboxyliert wurde. Als Konsequenz ergibt sich daraus sowohl ein Widerspruch zu oben genannter Literatur als auch zur abgeschätzten intrazellulären H₄SPT-Konzentration von ca. 4 mM (Ergebnisse, 3.1).

Um die Hypothese, dass der intrazelluläre H₄SPT-Gehalt nicht von der *p*-Aminobenzoesäure-Konzentration abhängig ist, zu überprüfen, wurde *M. barkeri* in Gegenwart von 20 nM, 200 nM und 2000 nM *p*-Aminobenzoesäure im Medium kultiviert und in der spätexponentiellen Phase geerntet. Anschließend wurde in den verschiedenen Zellextrakten enzymatisch die H₄SPT-Konzentration bestimmt (siehe Material und Methoden 7.2) und auf das Zellprotein bezogen. Zur Kontrolle wurde als Maß für die Methanogenese-Rate die Aktivität von Methylen-H₄MPT-Dehydrogenase (Mtd) der Zellextrakte bestimmt.

Tabelle 8: Tetrahydrosarcinapterin (H₄SPT)-Gehalt und F₄₂₀-abhängige Methylen-H₄SPT-Dehydrogenase-Aktivität (Mtd) in Zellextrakten von *Methanosarcina barkeri* nach Kultivierung in Gegenwart von verschiedenen *p*-Aminobenzoesäure-Konzentrationen. Der theoretische intrazelluläre *p*-Aminobenzoesäure-Gehalt wurde unter der Annahme berechnet, dass *p*-Aminobenzoesäure vollständig in die Zellen aufgenommen wurde und dass das Verhältnis von Feuchtzellen zu Zellprotein 10:1 beträgt. Mtd, Methylen-H₄MPT-Dehydrogenase.

<i>p</i> -Aminobenzoesäure im Medium (nM)	Theor. intrazellulärer <i>p</i> -Aminobenzoesäure- Gehalt (nmol/mg Zellprotein)	Intrazellulärer H ₄ SPT- Gehalt (nmol/mg Zellprotein)	Spezifische Aktivität (Mtd) (U/mg)
20	0,04	9,9	9,4
200	0,4	10,5	11,6
2000	4	10,2	12,8

M. barkeri zeigte erwartungsgemäß keinen Unterschied in der Wachstumsrate oder Zelldichte bei der Kultivierung in Gegenwart der verschiedenen *p*-Aminobenzoesäure-Konzentrationen. Die Erhöhung der Vitaminkonzentration stimulierte weder die H₄SPT-Synthese noch die Aktivität von H₄SPT-spezifischen Enzymen (Tab. 8): in allen Zellextrakten wurde eine nahezu gleiche spezifische Mtd-Aktivität von 9 bis 13 U/mg gemessen. Pro mg Zellprotein wurden 10 nmol H₄SPT gefunden, wobei es keinen Unterschied machte, ob die Zellen in Gegenwart von 20 nM, 200 nM oder 2000 nM *p*-Aminobenzoesäure gezogen wurden. Unter der Annahme, dass das intrazelluläre Volumen 3,3 µl pro mg Zellprotein beträgt (Blaut & Gottschalk, 1984), ergibt sich daraus eine intrazelluläre H₄SPT-Konzentration von 3 mM.

Aus dem Vergleich der berechneten Werte der intrazellulär zur Verfügung stehenden *p*-Aminobenzoesäure mit den enzymatisch bestimmten Werten für H₄SPT ergibt sich eine Diskrepanz, die sich - in Einklang mit den Ergebnissen der vorangegangenen Experimente - nur dadurch erklären lässt, dass *M. barkeri* möglicherweise über einen alternativen H₄SPT-Syntheseweg verfügt, bei dem freie *p*-Aminobenzoesäure nicht als Intermediat vorkommt.

V Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden Ergebnisse dargestellt, die eine erstmalige Charakterisierung von zwei H₄F-spezifischen Enzymen, Methylen-H₄F-Dehydrogenase/Methenyl-H₄F-Cyclohydrolase (FolD) und Serin-Hydroxymethyltransferase (GlyA), aus einem methanogenen Archaeon beschreiben. Die durchgeführten Untersuchungen an FolD und GlyA aus *Methanosarcina barkeri* ergaben ähnliche katalytische Eigenschaften, wie sie für entsprechende Enzyme aus *E. coli* gezeigt wurden (D'Ari & Rabinowitz, 1991; Schirch et al., 1985). Wachstumsphysiologische Studien lieferten indirekte Beweise für eine mögliche *de novo*-Synthese von H₄F durch den Organismus. Gleichzeitig stellt die gefundene Wachstumsabhängigkeit des Archaeons von *p*-Aminobenzoesäure in Frage, ob freie *p*-Aminobenzoesäure unter limitierenden Bedingungen als Intermediat in der H₄SPT-Synthese vorkommen kann.

Vor diesem Hintergrund soll im Folgenden die physiologische Relevanz der H₄F-spezifischen Enzyme für den anabolen C₁-Stoffwechsel in *M. barkeri* diskutiert werden. Da bisher das Vorkommen von H₄F in methanogenen Archaea als unwahrscheinlich galt, wird die Möglichkeit der H₄F-Biosynthese in *M. barkeri* erörtert. Anschließend wird die Existenz eines alternativen H₄SPT-Biosyntheseweges in diesem Archaeon hinterfragt.

1 Biosynthese von Purinen und von anderen C₁-Einheiten-enthaltenden Zellbausteinen in *M. barkeri*

In der Einleitung wurden Markierungsexperimente beschrieben, in denen *M. barkeri* auf H₂ und ¹²CO₂ in Gegenwart von [2-¹³C]-Acetat gezogen wurde. Unter den experimentellen Bedingungen wurde Methan aus CO₂ gebildet, dagegen die Positionen C² und C⁸ von Purinen fast ausschließlich von C² aus Acetat (Choquet et al., 1994). Aus diesen Resultaten lässt sich ableiten, dass in *M. barkeri* die Zwischenprodukte der Methanbildung - N⁵-Formyl-H₄SPT, Methenyl-H₄SPT⁺ und Methylen-H₄SPT - nicht an der Synthese von Purinen beteiligt sein können, da bei Wachstum auf H₂ und CO₂ in Gegenwart von Acetat mehr als 100 Mol Methan pro Mol Purine synthetisiert werden und die Markierung von C² aus Acetat daher vollständig durch CO₂ ausverdünnung worden wäre. Diese Abschätzung beruht auf einem Wachstumsertrag von 6 g pro Mol Methan (Schönheit et al., 1980; Wennerhold, 2004; Weimer & Zeikus 1978) und der Annahme, dass der Nukleinsäuregehalt der

Trockenzellen etwa 10% beträgt. Darüber hinaus kann N^5 -Formyl- H_4 SPT als Formylgruppen-Donor in der Purinbiosynthese aus thermodynamischen Gründen ausgeschlossen werden (siehe Einleitung) (Maden, 2000; Thauer et al., 1996). Basierend auf diesen Befunden wurde postuliert, dass in *Methanosarcina* ssp. ein von H_4 SPT verschiedener C_1 -Überträger an der Purinbiosynthese beteiligt sein muss. Durch die in der vorliegenden Arbeit gemachte Entdeckung von H_4 F-spezifischen Enzymen in *M. barkeri* - von Serin-Hydroxymethyltransferase (GlyA) und Methylen- H_4 F-Dehydrogenase/Methenyl- H_4 F-Cyclohydrolase (FolD) - ist die Formulierung des in Abb. 20 wiedergegebenen Stoffwechselweges möglich, der den spezifische Einbau des C^2 von Acetat in die Positionen C^2 und C^8 von Purinen erklären kann.

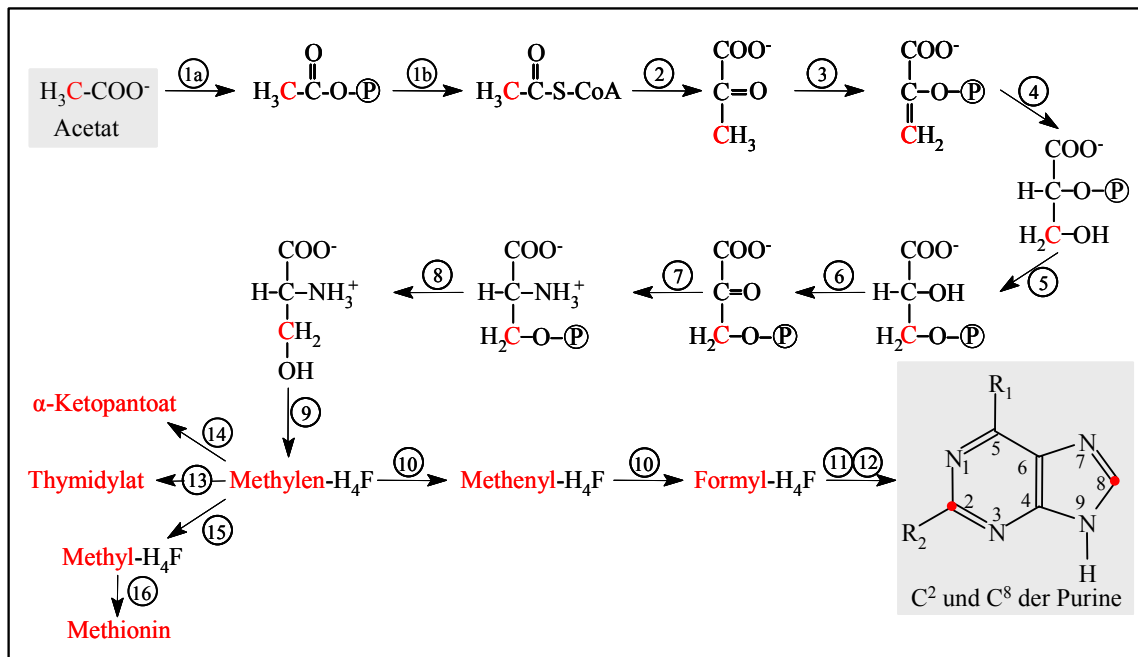
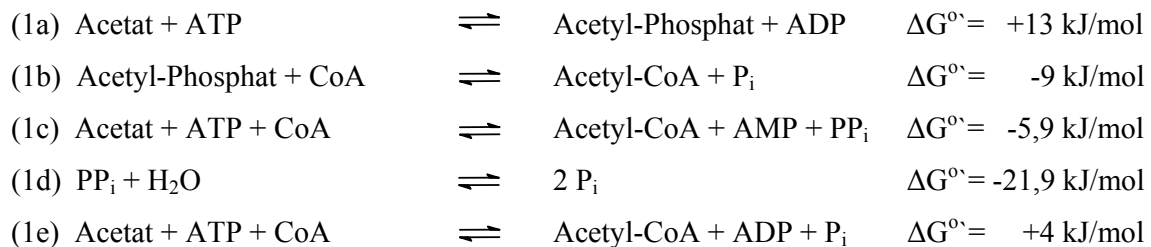


Abbildung 20: Vereinfachte schematische Darstellung der Synthese von C^2 und C^8 von Adenin sowie anderen C_1 -Einheiten enthaltenden-Zellbausteinen ausgehend von $[2-^{13}C]$ -Acetat in *M. barkeri*. (1a) Acetat-Kinase (Ack); (1b) Phosphotransacetylase (Pta); (2) Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase (Por); (3) Phosphoenolpyruvat-Synthetase (PpsA); (4) Enolase (Eno); (5) Phosphoglycerat-Mutase (Pgm); (6) Phosphoglycerat-Dehydrogenase (SerA); (7) Phosphoserin-Transaminase (SerC); (8) Phosphoserin-Phosphatase (SerB); (9) Serin-Hydroxymethyltransferase (GlyA); (10) Methylen- H_4 F-Dehydrogenase/Methenyl- H_4 F-Cyclohydrolase (FolD); (11) Phosphoribosylglycinamid-Formyltransferase (PurN); (12) Phosphoribosylaminoimidazolcarboxamid-Formyltransferase (PurH); (13) Thymidylat-Synthase (ThyA oder ThyX); (14) α -Ketopantoat-Hydroxymethyltransferase (PanB); (15) Methylen- H_4 F-Reduktase (MetF) oder F_{420} -abhängige Methylen- H_4 MPT-Reduktase (Mer); (16) Methionin-Synthase (MetE oder MetH). Die ^{13}C -Markierung ist in rot dargestellt. Adenin, $R_1 = -NH_2$, $R_2 = -H$ und Guanin: $R_1 = =O$, $R_2 = -NH_2$.

Der Weg führt von Acetat über Acetyl-CoA, Pyruvat, Phosphoenolpyruvat (PEP), 3-Phosphoglycerat (3-PGA) zunächst zu Serin, dessen Hydroxymethylgruppe auf H₄F übertragen wird. Ausgehend von Methylen-H₄F wird über Methenyl-H₄F⁺ N¹⁰-Formyl-H₄F synthetisiert, dessen aktivierte Formylgruppe dann direkt in die Positionen C² und C⁸ von Purinen eingebaut wird. Die einzelnen Schritte und die sie belegenden Befunde werden im Folgenden diskutiert, wobei die Diskussion auch die Synthese von Thymidylat, α -Ketopantoat und Methionin ausgehend von Methylen-H₄F einschließt. Prinzipiell können die letztgenannten Zellbausteine auch ausgehend von Methylen-H₄SPT bzw. Methylen-H₄MPT wie in anderen methanogenen Archaea gebildet werden (Maden, 2000).

Für die Enzyme und die sie kodierenden Gene wurden, wo möglich, die gleichen Abkürzungen wie in *E. coli* verwendet. Sequenzidentitätsangaben in Prozent beziehen sich auf die entsprechenden *E. coli*-Enzyme, wenn nicht anders vermerkt.

Von Acetat zu Acetyl-CoA: Es gibt folgende drei Möglichkeiten Acetyl-CoA aus Acetat zu synthetisieren (Abb. 20, Reaktion 1)



Reaktion (1a) wird durch Acetat-Kinase (Ack), Reaktion (1b) durch Phosphotransacetylase (Pta), Reaktion (1c) durch AMP-bildende Acetyl-CoA-Synthetase (Acs), Reaktion (1d) durch anorganische Pyrophosphatase (Ppa) und Reaktion (1e) durch ADP-bildende Acetyl-CoA-Synthetase (Acd) katalysiert. Im Genom von *Methanosarcina* ssp. werden die Gene für Acetat-Kinase (45%), Phosphotransacetylase (47%), Pyrophosphatase (39%) sowie für AMP-bildende Acetyl-CoA-Synthetase (30%, *E. coli*) und für ADP-bildende Acetyl-CoA-Synthetase (52%, *Pyrococcus furiosus*) gefunden.

Innerhalb der methanogenen Archaea sind lediglich zwei Genera, *Methanosarcina* und *Methanosaeta* (vormals *Methanothrix* (Kamagata et al., 1992)), ein phylogenetisch naher Verwandter von *Methanosarcina* und ebenfalls zu den *Methanosarcinales* zählend, in der Lage, Acetat als Substrat für die Methanogenese zu nutzen (Krzycki et al., 1985; Grahame & Stadtman, 1987; Zinder, 1993; Jetten et al., 1992). Zellextrakte von Acetat-gewachsenen *Methanosarcina* ssp. weisen hohe Acetat-Kinase- und Phosphotransacetylase-Aktivitäten auf,

jedoch keine AMP-bildende oder ADP-bildende Acetyl-CoA-Synthetase-Aktivität (Weimer & Zeikus, 1978; Kenealy & Zeikus, 1982; Ferry, 1997). Sowohl Acetat-Kinase als auch Phosphotransacetylase wurden aus *Methanosarcina thermophila* gereinigt und charakterisiert (Aceti & Ferry, 1988; Lundie & Ferry, 1989).

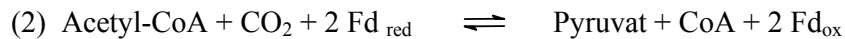
Während *Methanosarcina* für die Umsetzung von Acetat zu Acetyl-CoA zwei Enzyme benötigt, erfolgt die Acetataktivierung in *Methanosaeta* über ein einziges Enzym, AMP-bildende Acetyl-CoA-Synthetase (Eggen et al., 1991; Jetten et al., 1992). In Zellextrakten von *Methanosaeta soehngenii* wurden neben hohen Aktivitäten von AMP-bildender Acetyl-CoA-Synthetase auch hohe Aktivitäten von Adenylat-Kinase und Pyrophosphatase detektiert (Jetten & Zehnder, 1989; Köhler & Zehnder 1984). Da AMP durch Adenylat-Kinase zu ADP umgesetzt und Pyrophosphat vollständig durch Pyrophosphatase hydrolysiert wird, werden bei der Aktivierung von Acetat durch Acetyl-CoA-Synthetase in *Methanosaeta* zwei ATP verbraucht, während *Methanosarcina* für die Bildung von Acetyl-CoA lediglich ein ATP benötigt (Jetten et al., 1992). Die Reinigung und Charakterisierung von AMP-bildender Acetyl-CoA-Synthetase aus *M. soehngenii* ergab, dass die Affinität dieses Enzyms für Acetat ca. 20-fach höher liegt als für Acetat-Kinase, was sich – neben dem höheren ATP-Verbrauch bei der Acetataktivierung – in der Beobachtung widerspiegelt, dass *Methanosaeta* bei vergleichsweise geringen Acetatkonzentrationen von weniger als 0,01 mM wachsen kann, während *Methanosarcina* eine Acetatkonzentration von 0,4 mM bis 1,2 mM benötigt (Jetten et al., 1992; Daniels, 1993). In diesem Zusammenhang sind auch Untersuchungen an *E. coli* interessant, die gezeigt haben, dass dieser Organismus bei hohen Acetatkonzentrationen das Acetat-Kinase/Phosphotransacetylase-System und bei niedrigen Acetat-Konzentrationen AMP-bildende Acetyl-CoA-Synthetase aktiviert (Brown et al., 1977).

Bei einem Vergleich der bisher sequenzierten Genome ist auffällig, dass die meisten Archaea ein Gen für AMP-bildende Acetyl-CoA-Synthetase besitzen, während Gene für Acetat-Kinase und Phosphotransacetylase auf *Methanosarcina* ssp. beschränkt zu sein scheinen. AMP-bildende Acetyl-CoA-Synthetase wurde darüber hinaus in einer Vielzahl von hydrogenotrophen Methanogenen einschließlich *Methanothermobacter thermoautotrophicus*, *Methanospirillum hungatei*, *Methanococcus maripaludis* und *Methanobrevibacter arboriphilus* gefunden, die bei Wachstum auf H₂ und CO₂ Acetat assimilieren (Oberlies et al., 1980; Jetten et al., 1990; Shieh & Whitman, 1987).

ADP-bildende Acetyl-CoA-Synthetase gilt als typisches archaeelles Enzym, obwohl das Protein zuerst in den beiden eukaryotischen Organismen *Entamoeba histolytica* und *Giardia lamblia* entdeckt wurde, wo es an der Acetatbildung während fermentativer Prozesse

beteiligt ist (Reeves et al., 1977; Sanchez & Müller, 1996). Gene für ADP-bildende Acetyl-CoA-Synthetase finden sich in fast allen Archaea, wobei das Enzym im Wesentlichen an der Bildung von Acetat und ATP aus Acetyl-CoA und ADP und nicht an der Assimilation von Acetat beteiligt ist (Schäfer et al., 1993). ADP-bildende Acetyl-CoA-Synthetase-Aktivität wurde in allen getesteten Acetat-bildenden Archaea einschließlich anaeroben hyperthermophilen Euryarchaeota und Crenarchaeota sowie mesophilen aeroben Halophilen gefunden (Schäfer et al., 1993; Schönheit & Schäfer, 1995; Bräsen et al., 1993).

Von Acetyl-CoA zu Pyruvat: Diese Reaktion wird durch Pyruvat: Ferredoxin-Oxidoreduktase (= Pyruvat-Synthase) (Por) katalysiert (Abb. 20, Reaktion 2).

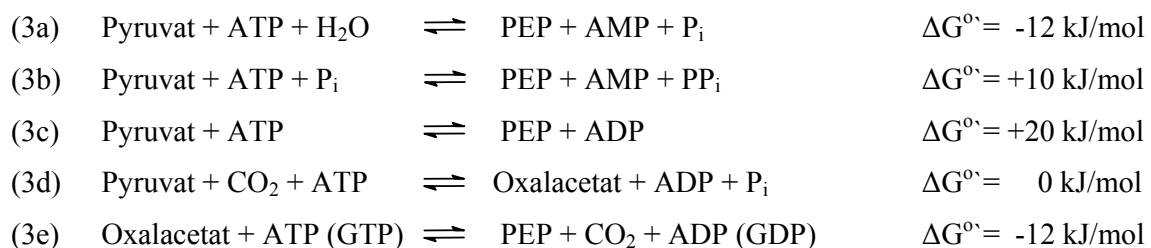


Dieses Enzym ist in anaeroben Bacteria und Archaea weit verbreitet (Kerscher & Oesterhelt, 1982; Blamey und Adams, 1994; Ragsdale, 2003), findet sich aber auch in aeroben Mikroorganismen wie z. B. *Aquifex*- und *Hydrogenobacter*-Arten, die CO₂ über den reduktiven Tricarbonsäure-Zyklus assimilieren (Yoon et al., 1997; Yamamoto et al., 2003), oder in aeroben Archaea wie *Halobacterium halobium* und *H. salinarum*, die Pyruvat mit Ferredoxin als Elektronenakzeptor zu Acetyl-CoA oxidieren (Kerscher et al., 1982; Ghosh & Sonawat, 1998). Zellextrakte von *Methanosarcina* enthalten hohe spezifische Aktivitäten des Enzyms. Gereinigte Pyruvat: Ferredoxin-Oxidoreduktase aus *M. barkeri* ist ähnlich wie in *P. furiosus*, *M. maripaludis* und *Thermotoga maritima* aus vier verschiedenen Untereinheiten aufgebaut, die von den Genen *porA*, *porB*, *porC* und *porD* kodiert werden (Bock et al., 1996; Ragsdale, 2003). Wie in anderen Organismen gezeigt, kann das Enzym auch als Homo- oder als Heterodimer vorliegen (Wahl & Omre-Johnsen, 1987; Kerscher & Oesterhelt, 1982), wobei angenommen wird, dass alle Pyruvat: Ferredoxin-Oxidoreduktasen durch Umorganisation und Fusion von vier ancestralen Genen evolvierten (Kletzin & Adams, 1996; Zhang et al., 1996). Bei Wachstum von *M. barkeri* auf H₂ und CO₂ besteht das Problem, dass das Redoxpotential E° des Acetyl-CoA + CO₂/Pyruvat-Paares -500 mV beträgt (Bock et al., 1996), während das des 2H⁺ + 2e⁻/H₂-Paares nur -414 mV beträgt. Um die Synthese von Pyruvat aus Acetyl-CoA und CO₂ mit H₂ als Elektronendonator möglich zu machen, müssen daher die Elektronen auf ein negativeres Potential angehoben werden, was in *M. barkeri* durch die Energie-konvertierende Hydrogenase (Ech) geschieht (Meuer et al., 2002), die die Reduktion von Ferredoxin mit H₂ unter Verbrauch von Energie (Elektrochemisches

Protonenpotential $\Delta\mu_{H^+}$) katalysiert. Auf diese Weise wird die Assimilation von Kohlenstoff unter autotrophen Wachstumsbedingungen gewährleistet.

Bisher wurde Pyruvat: Ferredoxin-Oxidoreduktase aus zwei methanogenen Archaea, *M. barkeri* und *M. thermoautotrophicus*, isoliert und ihre Rolle im anabolen Stoffwechsel nachgewiesen (Bock et al., 1996; Tersteegen et al., 1997). Die Sequenzen der methanogenen Enzyme zeigen nahe Sequenzverwandtschaft zu den Aminosäuresequenzen von Pyruvat: Ferredoxin-Oxidoreduktase aus *P. furiosus* und *T. maritima*, in denen das Enzym jedoch eine katabole Rolle spielt (Blamey & Adams, 1993; Blamey & Adams, 1994).

Von Pyruvat zu PEP: In der Natur gibt es vier Möglichkeiten von Pyruvat zu PEP zu gelangen (Abb. 20; Reaktion 3) (ΔG° -Werte wurden aus Thauer et al. (1977) entnommen bzw. berechnet):



Reaktion (3a) wird durch PEP-Synthetase (PpsA), Reaktion (3b) durch Pyruvat, Orthophosphat Dikinase (PpdK), Reaktion (3c) durch Pyruvat-Kinase (Pyk), Reaktion (3d) durch Pyruvat-Carboxylase (Pyc) und Reaktion (3e) durch PEP-Carboxykinase (Pck) katalysiert. Im Genom von *M. barkeri* wurden Gene für PEP-Synthetase (50%), Pyruvat, Orthophosphat Dikinase (59%, *Clostridium symbiosum*), Pyruvat-Kinase (43%) und für Pyruvat-Carboxylase (64%, *M. thermoautotrophicus*) nicht aber für PEP-Carboxykinase gefunden. Untersuchungen zur Expression der Gene in *Methanosarcina* ssp. liegen mit Ausnahme von Pyruvat-Carboxylase nicht vor. Sowohl für *M. barkeri* als auch für *M. jannaschii* und *M. thermoautotrophicus* konnte gezeigt werden, dass diese Organismen Pyruvat-Carboxylase für die Synthese von Oxalacetat, welches ein wichtiger Vorläufer für die Synthese von Aminosäuren und Tetrapyrrolen (über α -Ketoglutarat) darstellt, nutzen (Mukhopadhyay et al., 1998; Mukhopadhyay et al., 2001; Shieh & Whitman, 1987; Simpson & Whitman, 1993). Eine mögliche PEP-Synthese in *Methanosarcina* ssp. durch einen zweistufigen Prozess aus einer Kombination von Pyruvat-Carboxylase mit anschließender Decarboxylierung von Oxalacetat zu PEP ist aufgrund des offensichtlichen Fehlens von PEP-

Carboxykinase unwahrscheinlich. Thermodynamische Untersuchungen mit partiell gereinigter PEP-Synthetase aus *M. marburgensis* ergaben, dass das Enzym *in vivo* die energetisch bevorzugte Synthese von PEP aus Pyruvat und ATP katalysierte (Eyzaguirre et al., 1982). Da die Synthese von PEP aus Pyruvat - katalysiert durch Pyruvat-Kinase oder Pyruvat, Orthophosphat Dikinase - stark endergone Reaktionen sind, muss angenommen werden, dass auch in *M. barkeri* PEP aus Pyruvat über die PEP-Synthetase synthetisiert wird. Das Vorkommen von Pyruvat-Kinase kann durch den Befund erklärt werden, dass *Methanosarcina* ssp. bei Wachstum auf Acetat oder Methanol unter Stickstoff-limitierenden Bedingungen Glykogen bildet, das in der stationären Phase bzw. unter Substratmangel wieder abgebaut wird, wobei PEP und Pyruvat als Zwischenprodukte bei der Bildung von CO₂ und Methan durchlaufen werden (Murray & Zinder, 1987; Yu et al., 1994).

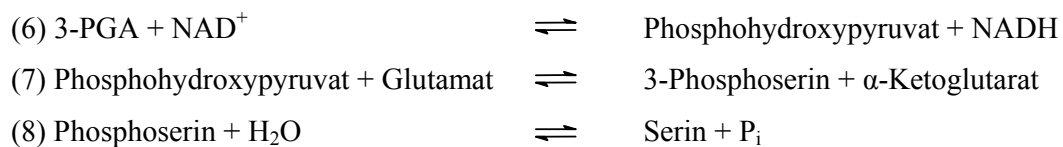
Von Phosphoenolpyruvat zu 3-Phosphoglycerat: Die Umwandlung von Phosphoenolpyruvat (PEP) zu 3-Phosphoglycerat (3-PGA) erfolgt über 2-Phosphoglycerat (2-PGA) in zwei Reaktionen (Abb. 20, Reaktionen 4 und 5):



Reaktion (4) wird durch Enolase (Eno) und Reaktion (5) durch 3-Phosphoglycerat-Mutase (Pgm) katalysiert. Ein Gen für Enolase findet sich in nahezu allen Archaea einschließlich *Methanosarcina* ssp. (52%) (Oslancova & Janecek, 2004). In Zellextrakten von *M. maripaludis*, *M. thermoautotrophicus* und *P. furiosus* wurden sowohl Enolase- als auch 3-Phosphoglycerat-Mutase-Aktivität detektiert (Yu et al., 1994; Jansen et al., 1982; Schäfer & Schönheit 1993). Enolase aus *P. furiosus* wurde gereinigt, charakterisiert und ist nachweislich an der Glukoneogenese aus Pyruvat über den Emden-Meyerhof-Weg bzw. der Glykolyse über einen modifizierten Entner-Doudoroff-Weg beteiligt (Peak et al., 1994; Schäfer & Schönheit, 1993). In Bacteria und Eucarya unterscheidet man zwischen zwei Typen von Phosphoglycerat-Mutasen (Pgm), die sich in ihrer Abhängigkeit von 2,3-Bisphosphoglycerat als Phosphatdonor unterscheiden und strukturell nicht miteinander verwandt sind (Jedrzejewski, 2000). Mit Ausnahme einiger weniger Organismen, wie z. B. *E. coli*, der sowohl Kofaktor-abhängige Pgm (dPgm) als auch Kofaktor-unabhängige Pgm (iPgm) besitzt (Fraser et al., 1999), findet man in den meisten Bacteria iPgm. *M. barkeri* und andere *Methanosarcina* ssp. scheinen sowohl ein Gen für dPgm (45%) als auch zwei Gene für iPgm (53% und 52%) zu besitzen, wobei eines der iPgm-Gene in der Nähe von den Genen für PEP-Synthase und

3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase liegt. Obwohl biochemische Untersuchungen zu Enolase oder 3-Phosphoglycerat-Mutase fehlen, legt dieser Befund nahe, dass *M. barkeri* in der Lage ist, 3-PGA aus PEP zu synthetisieren. Interessanterweise scheint das Vorhandensein von Bacteria-ähnlichen Pgm innerhalb der Archaea auf *Methanosarcinales* beschränkt zu sein, da in allen anderen archaeellen Genomen entsprechende Gene nicht gefunden wurden (van der Oost et al., 2002). Stattdessen konnte in diesen Organismen Gene einer neuen Familie von Proteinen, die nur weitläufig mit iPgm aus Bacteria verwandt sind, identifiziert werden, von denen angenommen wurde, dass sie für iPgm kodieren (van der Oost et al., 2002). Dass es sich bei diesen Genen tatsächlich um archaeelle iPgm handelt, wurde durch die Reinigung und Charakterisierung von heterolog in *E. coli* überproduzierter Pgm aus *M. jannaschii*, *P. furiosus* und *Sulfolobus solfataricus* bestätigt (Graham et al., 2002; Potters et al., 2003; van der Oost et al., 2002). Auch *Methanosarcina* ssp. verfügen über einen offenen Leserahmen, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz 40% Sequenzidentität zu iPgm aus *M. jannaschii* zeigt. Darüber hinaus scheinen Orthologe dieser neuartigen iPgm in fast allen archaeellen Genomen verbreitet zu sein (van der Oost et al., 2002), was in Einklang damit steht, dass nicht nur in Zellextrakten von *P. furiosus*, sondern auch in Zellextrakten von *M. maripaludis* und *A. fulgidus* Kofaktor-unabhängige Phosphoglycerat-Mutase-Aktivität detektiert wurde (Labes & Schönheit, 2001; Schönheit & Schäfer, 1995; Yu et al., 1994).

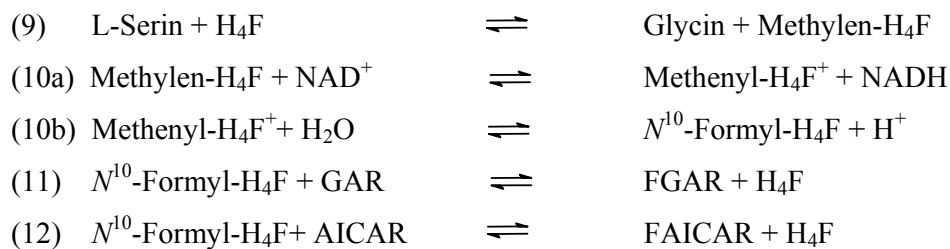
Von 3-PGA zu Serin: Der Weg führt über Phosphohydroxypyruvat und Phosphoserin zu Serin:



Reaktion (6) wird durch 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase (SerA), Reaktion (7) durch Phosphoserin-Transaminase (SerC) und Reaktion (8) durch Phosphoserin-Phosphatase (SerB) katalysiert. Die Gene für SerA (38%), SerC (25%) und SerB (30%) wurden im Genom von *Methanosarcina* ssp. und den sequenzierten Genomen anderer methanogener Archaea gefunden. Markierungsstudien mit *Methanospirillum hungatei* und *M. barkeri* haben gezeigt, dass in den Methanogenen Serin mit großer Wahrscheinlichkeit ausgehend von Acetat über den herkömmlichen Weg synthetisiert wird (Stauffer, 1996; Ekiel et al., 1983; Ekiel et al., 1985). Unterstützt wurde diese Annahme durch die Beobachtung, dass ein Plasmid, das *serC* aus *M. barkeri* trug, in der Lage war, eine *E. coli-serC*-Mutante zu komplementieren und nur

derartig komplementierte Zellen Phosphoserin-Aminotransferase-Aktivität aufwiesen (Metcalf et al., 1996).

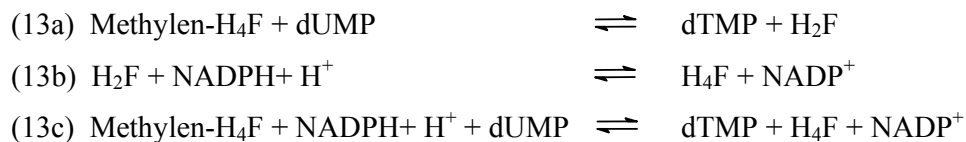
Von Serin zu Purinen: Ausgehend von Serin wird die Hydroxymethylgruppe zunächst auf H_4F unter Bildung von Methylen- H_4F übertragen und nach Oxidation zu N^{10} -Formyl- H_4F in die Positionen C^2 und C^8 von Adenin und Guanin inkorporiert (Abb. 20, Reaktionen 9 bis 12), wobei Glycinamidribonucleotid (GAR), Formyl-Glycinamidribonucleotid (FGAR), 5-Aminoimidazol-4-Carboxamidribonucleotid (AICAR) und N-Formyl-Aminoimidazol-4-Carboxamidribonucleotid (FAICAR) als Zwischenprodukte durchlaufen werden:



Reaktion (9) wird durch Serin-Hydroxymethyltransferase (GlyA), Reaktionen (10a) und (10b) durch Methylen- H_4F -Dehydrogenase/Methenyl- H_4F -Cyclohydrolase (FolD), Reaktion (11) durch Phosphoribosylglycinamid-Formyltransferase (PurN) und Reaktion (12) durch Phosphoribosylimidazolcarboxamid-Formyltransferase (PurH) katalysiert. Wie in der Einleitung beschrieben konnten Gene, die putativ für diese Proteine kodieren, im Genom von *Methanosarcina* ssp. gefunden werden (siehe Abb. 4). Durch die Charakterisierung von Serin-Hydroxymethyltransferase (GlyA) und Methylen- H_4F -Dehydrogenase/Methenyl- H_4F -Cyclohydrolase (FolD) aus *M. barkeri* konnte bestätigt werden, dass diese H_4F -spezifischen Enzyme tatsächlich in dem Archaeon exprimiert werden. Die durch GlyA und FolD katalysierten Reaktionen gewährleisten, dass dem Organismus energiereiche Formyl-Gruppen für die Biosynthese von Purinen bereitgestellt werden. Unter den experimentellen Bedingungen wuchs *M. barkeri* auf Methanol mit einer Verdopplungszeit von ca. 8 h, woraus sich - unter der Annahme, dass die Trockenzellen etwa 10% Nukleinsäuren und 50% Protein enthalten - eine spezifische Syntheserate für die Purine von $\sim 0,2$ mU/mg Protein ergibt. Wie Aktivitätsmessungen mit Zellextrakten von *M. barkeri* gezeigt haben, liegen die spezifischen Aktivitäten von FolD mit 10 mU/mg und GlyA mit 1,8 mU/mg (Lin & Sparling, 1998) um mehr als den Faktor fünf höher als für die Synthese der Purine benötigt wird. Eine Rolle im anabolen C_1 -Metabolismus ist daher anzunehmen, da im umgekehrten Sinne die Aktivitäten weniger als 0,1% der spezifischen Bildungsrate von Methan mit 0,5 U/mg Protein (Perski et

al., 1982) betragen, wodurch erwartungsgemäß eine Funktion im Energiemetabolismus ausgeschlossen werden kann. Der Einbau von N^{10} -Formyl- H_4F in die Positionen C^2 und C^8 der Purine erfolgt dann wie folgt: Katalysiert durch PurN wird aus Glycinamidribonucleotid (GAR) und N^{10} -Formyl- H_4F Formyl-Glycinamidribonucleotid (FGAR) synthetisiert, das durch eine Serie von Reaktionen zunächst zu 5-Aminoimidazol-4-Carboxamidribonucleotid umgesetzt wird (AICAR). Die Inkorporation einer zweiten Formyl-Gruppe in dieses Molekül wird durch PurH katalysiert und führt zu der Bildung von N-Formyl-Aminoimidazol-4-Carboxamidribonucleotid (FAICAR). Im Anschluss daran erfolgt eine Hydrolyse zu Inosinat, von dem ausgehend AMP und GMP synthetisiert werden (Kappock et al., 2000). Jeweils ein Gen für PurN (46%) und für PurH (48%) konnte in den Genomen von *Methanosarcina* ssp. gefunden werden, was den Biosyntheseweg von Purinen ausgehend von Acetat vervollständigt. Ein alternativer Mechanismus der Purinsynthese, wie er beispielsweise für *M. thermoautotrophicus* beschrieben wurde und den direkten Einbau von Formiat in die Positionen C^2 und C^8 unter ATP-Verbrauch einschließt, scheint in *M. barkeri* aufgrund der Ergebnisse von Markierungsstudien (siehe Einleitung) nicht operativ zu sein und kann auf das Fehlen von *purT* im Genom von *Methanosarcina* ssp. zurückgeführt werden (Choquet et al., 1994; White, 1997; Tanner et al., 1989).

Von Methylen- H_4F zu Thymidylat: Bislang sind zwei Thymidylat-Biosynthesewege ausgehend von Methylen- H_4F bzw. Methylen- H_4SPT/H_4MPT bekannt:



Reaktion (13a) wird durch Thymidylat-Synthase (ThyA) und Reaktion (13b) durch Dihydrofolat-Reduktase (FolA) katalysiert. Reaktion (13c) wird durch Flavin-abhängige Thymidylat-Synthase (ThyX) katalysiert. Im Genom von *Methanosarcina* ssp. wurden sowohl ein Gen für ThyA (37%) als auch zwei Gene für ThyX (39% und 24%; *M. jannaschii* MJ0757), nicht aber für FolA gefunden. Für *M. thermophila* und *S. solfataricus* wurde gezeigt, dass Zellextrakte nach Zugabe von dUMP und deuteriertem Formaldehyd dTMP generierten (Nyce & White, 1996). Es wurde angenommen, dass dabei das im Zellextrakt von *M. thermophila* vorhandene H_4SPT spontan mit Formaldehyd zu Methylen- H_4SPT reagierte und als Substrat für die Thymidylat-Synthase diente. Versuche, in dem Organismus ein entsprechendes Gen, das für Thymidylat-Synthase kodiert, mit degenerierten Primern von

hochkonservierten Regionen der bakteriellen und eukaryotische ThyA zu identifizieren, waren nicht erfolgreich (Nyce & White, 1996). Aus *Methanothermobacter marburgensis* konnte ein Protein gereinigt und teilweise charakterisiert werden, das den Tritium-Austausch von [5-³H]-dUMP mit Protonen und die Dehalogenierung von 5-Bromo-Desoxyuridin-Monophosphat katalysierte, welches Kofaktor-unabhängige Nebenreaktionen von Thymidylat-Synthase darstellen. Die Bildung von dTMP aus Methylen-H₄MPT oder Methylen-H₄F und dUMP konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Krone et al., 1994), was später zu der Annahme führte, dass es sich bei diesem Enzym möglicherweise um Deoxyuridylat-Hydroxymethyltransferase und nicht um Thymidylat-Synthase handelte (Vaupel et al., 1996). Aus *M. jannaschii* wurden die beiden Gene, die für putative ThyA (MJ0511) und ThyX (MJ0757) kodieren, heterolog in *E. coli* überproduziert und gefunden, dass lediglich das Genprodukt von *thyX* Thymidylat-Synthase-Aktivität aufwies (Xu et al., 1999). Es zeigte sich, dass diese Aktivität überraschenderweise spezifisch für Methylen-H₄F zu sein schien, was zunächst nicht verständlich ist, da es keine Hinweise für das Vorkommen von H₄F in *Methanococcus* gibt (White, 1990). Um die Verwendung von Methylen-H₄F durch Thymidylat-Synthase aus *M. jannaschii* zu erklären, postulierte White, dass das Enzym möglicherweise einen noch nicht an C⁷ und C⁹ methylierten Biosynthesevorläufer von H₄SPT verwendet, der in seiner Struktur stärker H₄F gleicht (Abb. 1). Die beiden Methylgruppen werden ausgehend von S-Adenosylmethionin erst in den letzten Schritten der Biosynthese von H₄SPT in das Molekül eingebaut (White, 1998). Eine spezifische Regulation der Methylase-Aktivität könnte demnach bewirken, dass in dem entstehenden Tetrahyrobioplerin-Pool geringe Anteile des Coenzym in einem nicht- oder semi-methylierten Zustand vorliegen und dann als Substrat im anabolen C₁-Metabolismus dienen.

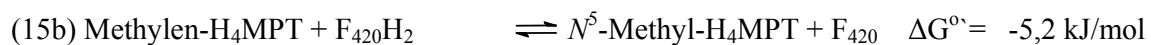
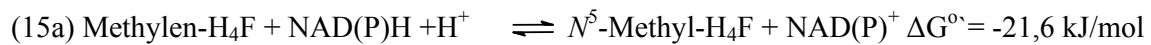
Von Methylen-H₄F zu α -Ketopantoat: Der erste Schritt in der Biosynthese von Pantothenat, das als Vorläufer für die Synthese von Coenzym-A verwendet wird, stellt die Methylierung von α -Ketoisovalerat durch α -Ketopantoat-Hydroxymethyltransferase (PanB) dar:



Ausser PanB (Reaktion (14)) sind an der Pantothenat-Synthese noch drei weitere Enzyme - PanC, PanD und PanE - beteiligt (Jackowski, 1996; Begley et al., 2001). Sorgfältige Genomanalysen durch Genschel ergaben, dass in den bisher sequenzierten Genomen von verschiedenen Archaea die Gene von PanB und PanE in vereinzelt nicht-methanogenen Archaea konserviert zu sein scheinen und vermutlich durch horizontalen

Gentransfer von thermophilen Bacteria aquiriert wurden (Genschel, 2004). Im Gegensatz dazu wurde in den Genomen von methanogenen Archaea einschließlich *Methanosarcina* ssp. keines dieser Gene gefunden. Da aufgrund von biochemischen Untersuchungen ausser Zweifel steht, dass Pantothenat in methanogenen Archaea vorkommt (Noll & Barber, 1988; Leigh, 1983) und Coenzym-A als ein zentraler Cofaktor in einer Vielzahl von anabolen und katabolen Reaktionen beteiligt ist (Ruhlemann et al., 1985), muss angenommen werden, dass Pantothenat bzw. Coenzym-A in methanogenen Archaea vollkommen anders synthetisiert wird oder der Biosyntheseweg durch konvergente Evolution entstanden ist.

Von Methylen-H₄F zu Methionin: An der Biosynthese von Methionin ausgehend von Methylen-H₄F bzw. Methylen-H₄MPT/-H₄SPT sind zwei Reaktionen beteiligt:



Reaktion (15a) wird durch NAD(P)⁺-abhängige Methylen-H₄F-Reduktase (MetF), Reaktion (15b) durch F₄₂₀-abhängige Methylen-H₄MPT-Reduktase (Mer) und Reaktion (16a/b) entweder durch Cobalamin-abhängige Methioninsynthase (MetH) oder durch Cobalamin-unabhängige Methionin-Synthase (MetE) katalysiert. Methylen-H₄MPT-Reduktase ist ein gut untersuchtes Enzym der Methanogenese und katalysiert in *Methanosarcina* ssp. die Reduktion von Methylen-H₄SPT zu Methyl-H₄SPT, wobei reduziertes F₄₂₀ als Elektronenüberträger dient (Ma & Thauer, 1998). Obwohl im Genom der *Methanosarcinales* ein Gen identifiziert werden konnte, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz 26% Sequenzidentität zu MetF aus *E. coli* aufweist (Abb. 4), gelang es nicht, MetF in Zellextrakten von *M. barkeri* durch Aktivitätstests oder Immunodetektion nachzuweisen. Darüber hinaus verhinderte die Akkumulation des heterolog überproduzierten MetF aus *M. barkeri* in Form von „Inclusion Bodies“ eine biochemische Charakterisierung des Genproduktes von *metF*. Da *metF* stromabwärts von Genen liegt, die für H₄F-spezifische Enzyme kodieren (Abb. 4), kann spekuliert werden, dass es sich bei MetF ebenfalls um ein H₄F-spezifisches Enzym handeln könnte. Aufgrund fehlender Nachweise bleibt jedoch unklar, ob MetF in *M. barkeri* exprimiert wird und eine mögliche Rolle im anabolen Stoffwechsel erfüllt.

Die Biosynthese von Methionin findet im Allgemeinen ausgehend von N^5 -Methyl- H_4F statt (Matthews & Drummond, 1990). Es konnten in den Genomen von *Methanosarcina* ssp. jedoch keine offenen Leserahmen für Proteine mit Sequenzverwandtschaft zu Cobalamin-abhängiger Methionin-Synthase (MetH) oder Cobalamin-unabhängiger Methionin-Synthase (MetE) aus *E. coli* gefunden werden. Markierungsstudien mit *M. barkeri* und *M. concilii* ergaben jedoch, dass in *M. concilii* während des Wachstums auf H_2 und CO_2 in Gegenwart von $[2-^{13}C]$ -Acetat die Methylgruppe von Methionin von C^2 aus Acetat stammte und nicht ausgehend von CO_2 inkorporiert wurde, wie es beispielsweise für *M. thermoautotrophicus* oder *M. hungatei* gezeigt wurde (Ekiel et al., 1985; Ekiel et al., 1983). Obwohl eine entsprechende Markierung des ϵ -Kohlenstoffs von Methionin ausgehend von C^2 aus Acetat in *M. barkeri* nicht nachgewiesen werden konnte, deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass Methionin aus Homocystein und N^5 -Methyl- H_4F und nicht von N^5 -Methyl- H_4SPT synthetisiert wird (Ekiel et al., 1985). Da es nicht gelang, die Aktivität von Methyl- H_4F -Reduktase in Zellextrakten von *M. barkeri* zu detektieren, ist eine Aussage über den Methyl-Donor für die Biosynthese von Methionin in diesem Organismus nicht möglich. Anders als bei der Synthese von C^2 und C^8 der Purine ist die Verwendung von N^5 -Methyl- H_4F jedoch nicht zwingend, da angenommen wird, dass die Gruppentransferpotentiale von N^5 -Methyl- H_4F und N^5 -Methyl- H_4MPT/H_4SPT sehr ähnlich sind (Maden, 2000). In den meisten Methanogenen wird die Methylgruppe von Methionin höchstwahrscheinlich ausgehend von CO_2 über N^5 -Methyl- H_4MPT/H_4SPT synthetisiert (Choquet et al., 1994), jedoch ist es bislang noch nicht gelungen, den Nachweis von H_4MPT/H_4SPT -spezifischer Methionin-Synthase in methanogenen Archaea zu erbringen (Schröder & Thauer, 1999) (siehe Einleitung).

Im Hinblick auf die thermodynamischen Eigenschaften von N^5 -Methyl- H_4MPT/H_4SPT und N^5 -Methyl- H_4F ist es in diesem Zusammenhang interessant, dass die membrangebundene Methyl- H_4SPT :Coenzym-M-Methyltransferase von *M. mazei* Gö1 auch signifikante Aktivität mit N^5 -Methyl- H_4F zeigte (Lienard et al., 1996), was deutlich macht, dass auch für die biosynthetischen Reaktionen ausgehend von der Oxidationsstufe des Methanols prinzipiell beide C_1 -Überträger genutzt werden können. Dieses Argument ist ebenfalls zutreffend für Reaktionen ausgehend von Methyl- H_4F/H_4MPT (PanB, ThyA/ThyX und GlyA), was durch die Existenz von sowohl H_4F -abhängiger als auch H_4MPT -abhängiger Serin-Hydroxymethyltransferase innerhalb der methanogenen Archaea gestützt wird und zeigt, dass eine Voraussage bezüglich der Substratspezifität insbesondere für diese Enzyme nicht möglich ist (Hoyt et al., 1986; Lin & Sparling, 1998).

2 H₄F-Biosynthese in *M. barkeri*

Da *M. barkeri* nachweislich H₄F-spezifische Enzyme exprimiert, sollte der Organismus auch H₄F enthalten. Ein wichtiger Hinweis, dass dies tatsächlich der Fall ist, liefert die Beobachtung, dass *M. barkeri* nicht in Abwesenheit von Folsäure oder *p*-Aminobenzoesäure im Medium wächst und offensichtlich nicht in der Lage ist, H₄F völlig *de novo* zu synthetisieren. Abb. 21 zeigt eine schematische Darstellung des Biosyntheseweges von H₄F wie er in *E. coli* verwirklicht ist (Green et al., 1996).

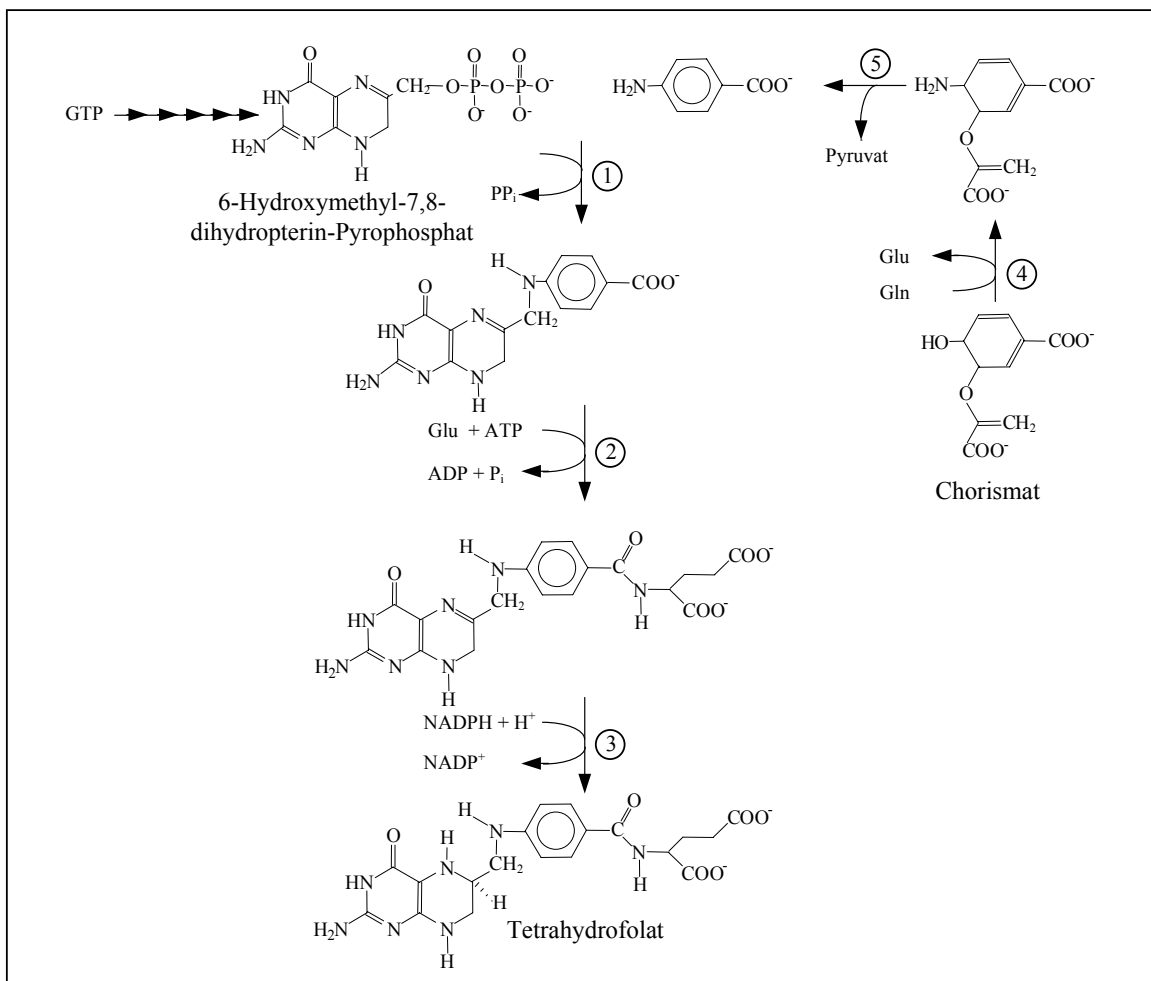


Abbildung 21: Schematische Darstellung der Biosynthese von Tetrahydrofolat (H₄F) ausgehend von 6-Hydroxymethyl-7,8-Dihydropterin-Pyrophosphat und *p*-Aminobenzoesäure in *E. coli* (modifiziert nach Green, 1996). ① Dihydropteroat-Synthase (FolP); ② Dihydrofolat-Synthase (FolC); ③ Dihydrofolat-Reduktase (FolA), ④ ADC-Synthase (PabA/PabB) bestehend aus PabA und PabB; ⑤ ADC-Lyase (PabC); ADC, 4-Amino-4-Deoxychorismat.

Ausgehend von GTP wird zunächst 6-Hydroxymethyl-7,8-Dihydropterin-Pyrophosphat gebildet, das - katalysiert durch Dihydropteroat-Synthase (FolP) - mit *p*-Aminobenzoesäure zu Dihydropteroat kondensiert (Abb. 21, Reaktion 1). In zwei weiteren Schritten wird unter Beteiligung von Dihydrofolat-Synthase (FolC) ein Glutamatrest ankondensiert, bevor das entstandene Dihydrofolat zu Tetrahydrofolat durch Dihydrofolat-Reduktase (FolA) reduziert wird (Abb. 21, Reaktionen 2 und 3).

Die Abhängigkeit des Wachstums von *M. barkeri* von *p*-Aminobenzoesäure deutet darauf hin, dass in diesem Organismus *p*-Aminobenzoesäure nicht aus Chorismat synthetisiert werden kann. In *E. coli* sind daran die Enzyme 4-Amino-4-Desoxychorismat-Synthase (PabA/PabB) und 4-Amino-4-Desoxychorismat-Lyase (PabC) beteiligt (Abb. 21, Reaktionen 4 und 5). Im Genom von *M. barkeri* wurden Gene für PabA (42%), PabB (33%) und PabC (27%) gefunden. Da biochemische Untersuchungen bezüglich der *p*-Aminobenzoesäure-Synthese jedoch fehlen, bleibt unklar, warum *M. barkeri* auf *p*-Aminobenzoesäure für das Wachstum angewiesen ist. Festzustehen scheint allerdings, dass die sehr niedrige Konzentration von 20 nM *p*-Aminobenzoesäure im Medium für die Biosynthese von H₄F in *M. barkeri* ausreichen dürfte (siehe Ergebnisse).

Von den drei Enzymen, die an der Synthese von H₄F aus 6-Hydroxymethyl-7,8-Dihydropterin-Pyrophosphat und *p*-Aminobenzoesäure beteiligt sind, wurden im Genom von *Methanosarcina* ssp. zwei Gene entdeckt, die für putative Dihydropteroat-Synthase (FolP) kodieren. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen zeigen mit 36% für FolP1 und mit 29% für FolP2 relativ hohe Sequenzidentität zu FolP aus *E. coli*. Das Gen für FolP1 liegt stromabwärts von *purN*, *glyA* und *folD* (siehe Abb. 4), was zusammen mit der höheren Sequenzidentität zu dem entsprechenden *E. coli*-Enzym nahe legt, dass FolP1 an der H₄F-Synthese beteiligt ist. Das Vorkommen eines Enzyms in *M. barkeri*, das die Synthese von Dihydropteroat katalysiert, geht auch aus dem in dieser Arbeit beschriebenen Befund hervor, dass das Wachstum dieses Archaeons durch Sulfanilamid, einem klassischen Hemmstoff der Dihydropteroat-Synthase und somit der H₄F-Biosynthese, inhibiert wird und durch die erhöhte Zugabe von *p*-Aminobenzoesäure wieder aufgehoben werden kann.

Im Genom von *Methanosarcina* ssp. fehlen Gene für Dihydrofolat-Synthase (FolC) und Dihydrofolat-Reduktase (FolA). Im Falle von FolC lässt sich argumentieren, dass in *M. barkeri* Tetrahydropteroat und nicht H₄F der eigentliche C₁-Überträger ist, was ein *folC*-Gen überflüssig machen würde. Wie in der Einleitung beschrieben, werden die für den C₁-Gruppen-Transfer essentiellen Stickstoffe N⁵ und N¹⁰ der Pterine in ihren chemischen Eigenschaften nicht durch die Glutamatreste von H₄F oder durch den Phosphatrest von

H₄MPT/H₄SPT beeinflusst, sodass eine stark verkürzte Variante des C₁-Überträgers physiologisch relevant sein könnte. Wie für methylo trope Bakterien gezeigt wurde, synthetisieren diese neben H₄F eine modifizierte Form von Tetrahydromethanopterin, dem der endständige Phosphatidyl-Hydroxyglutaratrest fehlt. Dieses sogenannte Dephospho-H₄MPT wird als C₁-Überträger bei der Oxidation von Formaldehyd zu CO₂ verwendet (Vorholt et al., 1998) und spezifisch zur Trennung des anabolen und katabolen C₁-Stoffwechsels genutzt (Chistoserdova et al., 1998). Es könnte aber auch sein, dass es in *Methanosarcina* ssp. eine Dihydrofolat-Synthase gibt, die nicht mit FolC von *E. coli* verwandt ist. Dieses Argument lässt sich auch für das Fehlen des Gens für Dihydrofolat-Reduktase (FolA) anbringen. Hinweise dafür, dass die Biosynthese-Enzyme der Pterin-Cofaktoren in Archaea und Bacteria nicht zwingend strukturell miteinander verwandt sind, liefert das umgekehrte Beispiel der Dihydromethanopterin-Reduktase (Caccamo et al., 2004): In dem aeroben α -Proteobakterium *Methylobacterium extorquens* AM1, das sowohl H₄F als auch H₄MPT enthält, wurde erstmalig eine Dihydromethanopterin-Reduktase (DmrA), die in Analogie zu FolA den letzten Schritt der H₄MPT-Synthese durch Reduktion von H₂MPT zu H₄MPT katalysiert, identifiziert und charakterisiert. Überraschenderweise konnten keine DmrA-Homologe in den Genomen der methanogenen Archaea gefunden werden, was zu der Annahme führt, dass in Bacteria und Archaea zwei evolutionär verschiedene Formen von Dihydromethanopterin-Reduktase operativ sind (Caccamo et al., 2004). Für eine *E. coli*-Mutante mit inaktivem FolA konnte gezeigt werden, dass die Zellen immer noch in der Lage waren zu wachsen (Herrington & Chirwa, 1999) und darüber hinaus 60% bis 80% der Menge an reduzierten Folaten im Vergleich zum Wildtyp enthielten (Hamm-Alvarez et al., 1990). Dies deutet darauf hin, dass auch alternative Wege existieren, um H₄F zu synthetisieren. In *Thermus thermophilus* wurde beispielsweise Dihydropteridin-Reduktase gefunden, die neben der Regeneration von quinoidem Dihydrofolat (qH₂F) (entsteht bei nicht-enzymatischer Oxidation von H₄F) zusätzlich die Reduktion von Dihydrofolat (H₂F) mit NADPH zu Tetrahydrofolat katalysiert. Obwohl die spezifische Aktivität mit H₂F nur 20% von der mit qH₂F betrug, könnte dies ein alternativer Mechanismus für die Synthese von H₄F darstellen. Außer Frage steht jedoch, dass es in *Methanosarcina* ein Dihydrofolat- und/oder Dihydromethanopterin-reduzierendes Enzym geben muss, und zwar nicht nur für die Biosynthese der beiden C₁-Überträger, sondern wahrscheinlich auch für die Re-Reduktion von H₂F bzw. H₂MPT/H₂SPT, das bei der Biosynthese von Thymidylat (siehe Reaktion (13a), S. 71) entsteht.

Von der Biosynthese von 6-Hydroxymethyl-7,8-Dihydropterin-Pyrophosphat in methanogenen Archaea ist bekannt, dass sie wie in *E. coli* von GTP ausgeht (Green et al., 1996; White, 2001; White & Zhou, 1993). Wie in Zellextrakten von *M. thermophila* jedoch nachgewiesen werden konnte, werden zum Teil andere Zwischenprodukte durchlaufen, (Howell & White, 1997), was die Beteiligung von Enzymen, die mit denen von *E. coli* nicht verwandt sind, unumgänglich macht (White, 2001). Da, wie im nächsten Abschnitt erläutert, 6-Hydroxymethyl-7,8-Dihydropterin-Pyrophosphat nicht nur eine Zwischenstufe bei der Biosynthese von H₄F, sondern auch von H₄MPT/H₄SPT ist, kann angenommen werden, dass die Synthese dieses Intermediates gesichert ist.

3 H₄MPT-/H₄SPT-Synthese in methanogenen Archaea

Die strukturelle Ähnlichkeit zwischen H₄MPT/H₄SPT und H₄F (siehe Abb. 1) lässt vermuten, dass die Biosynthesewege beider Coenzyme Gemeinsamkeiten aufweisen. Durch Markierungsstudien wurde gezeigt, dass in beiden Molekülen der Pterinring von GTP und der Benzolring von *p*-Aminobenzoesäure abstammen (White & Zhou, 1993). Ein wichtiger Unterschied stellt jedoch die Inkorporation von *p*-Aminobenzoesäure in das jeweilige Molekül dar: Während in der H₄F-Synthese Dihydropteroat-Synthase (FolP) *p*-Aminobenzoesäure mit 6-Hydroxymethyl-7,8-Dihydropterin-Pyrophosphat zu Dihydropteroat kondensiert (Abb. 21, Reaktion 1), wird während der H₄MPT-/H₄SPT-Synthese *p*-Aminobenzoesäure zunächst mit Phosphoribosylaminobenzol-Pyrophosphat zu β -Ribofuranosylaminobenzol-5'-Phosphat (β -RFAP) umgesetzt, was durch β -RFAP-Synthase katalysiert wird (White, 2001) (Abb. 22, Reaktion 3). Im Anschluss daran wird β -RFAP mit 6-Hydroxymethyl-7,8-Dihydropterin-Pyrophosphat zu 7,8-Dihydropterin-6-ylmethyl-4-(β -D)-Ribofuranosylaminobenzol-5'-Phosphat verknüpft, eine Reaktion, die von einem Enzym katalysiert wird, das mit FolP Sequenzverwandtschaft zeigt (Abb. 22, Reaktion 1). In *M. jannaschii* konnte ein entsprechendes Gen (MJ0301) identifiziert werden, dessen in *E. coli* heterolog überproduziertes Genprodukt die Kondensation von 6-Hydroxymethyl-7,8-Dihydropterin-Pyrophosphat mit β -RFAP, jedoch nicht mit *p*-Aminobenzoesäure, katalysierte (Xu et al., 1999). Wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, gibt es im Genom von *M. barkeri* zwei Gene für FolP, wobei die abgeleitete Aminosäuresequenz von *folP1* höhere Sequenzidentität zu *E. coli* zeigt als die von *folP2*. Umgekehrt ähnelt die abgeleitete Aminosäuresequenz von *folP2* stärker der von MJ0301, was eine mögliche Beteiligung an der H₄SPT-Synthese vermuten lässt. Diese Befunde decken sich mit der Annahme, dass in

Methanosarcina ssp. sowohl H₄F als auch H₄SPT vorkommt und beide Pterine synthetisiert werden können.

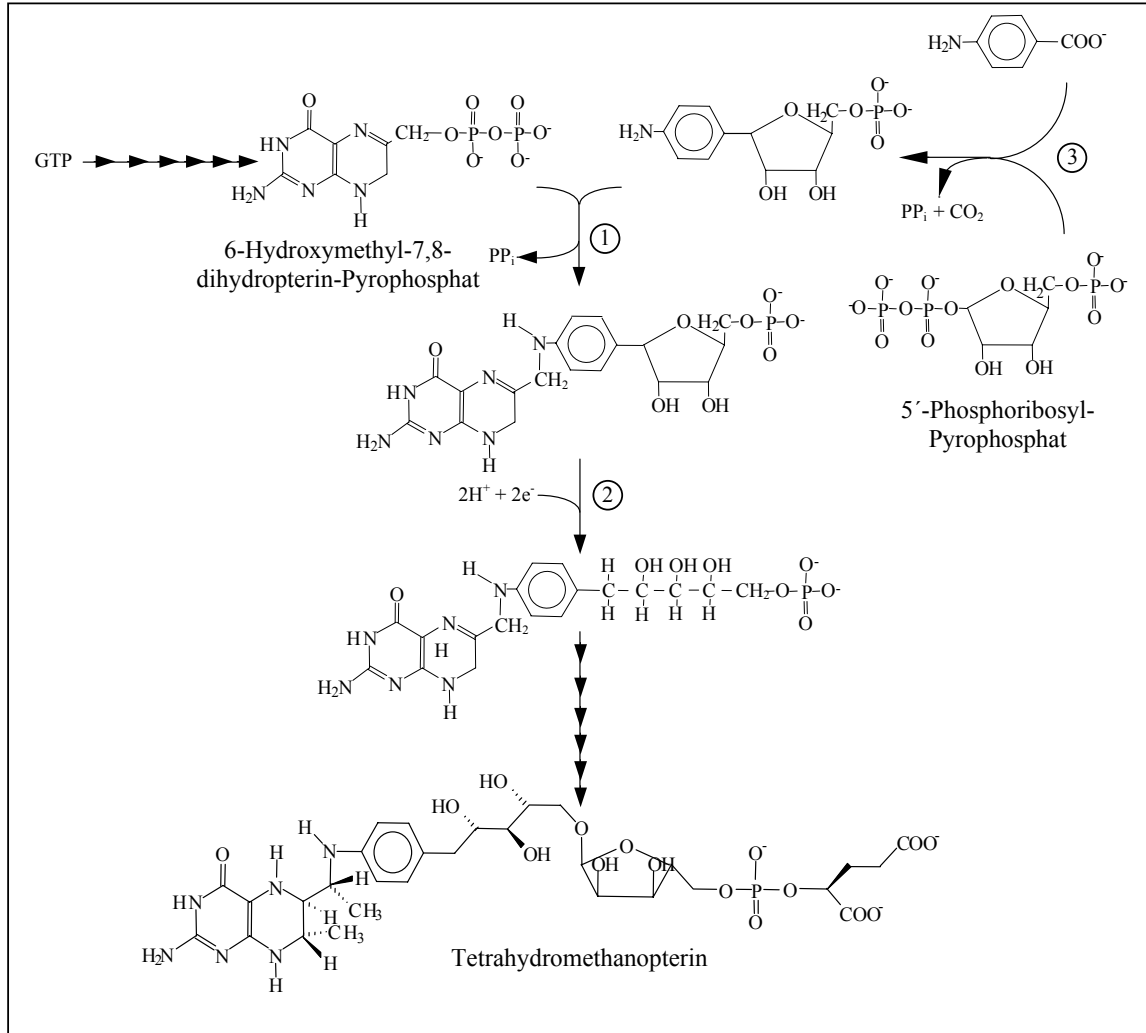


Abbildung 22: Schematische Darstellung der Biosynthese von Tetrahydromethanopterin (H₄MPT) ausgehend von 6-Hydroxymethyl-7,8-Dihydropterin-Pyrophosphat und *p*-Aminobenzoesäure in methanogenen Archaea nach White (White, 2001). ① Dihydropteroat-Synthase-ähnliches Enzym (MJ0301; Xu et al., 1999); ② Zellextrakt-Aktivität (White, 1996); ③ β-Ribofuranosylaminobenzol-5'-Phosphat-Synthase.

Wie in der schematischen Darstellung in Abb. 22 angedeutet, umfasst der Biosyntheseweg von H₄MPT/H₄SPT mindestens 17 Reaktionen, die mit Ausnahme des letzten Reduktionsschrittes von H₂MPT zu H₄MPT in Zellextrakten von *M. thermophila* nachgewiesen wurden (White, 1996; White, 2001). Darüber hinaus konnte White zeigen, dass die Biosynthese von H₄MPT in *Methanothermobacter* grundlegend gleich verläuft, was eine Universalität dieses Weges innerhalb der Methanogenen nahe legt (White, 1998).

Bisher konnten nur wenige Gene, die an der H₄MPT-Synthese ausgehend von *p*-Aminobenzoesäure und 6-Hydroxymethyl-7,8-Dihydropterin-Pyrophosphat beteiligt sind, in methanogenen Archaea identifiziert und charakterisiert werden: In *M. jannaschii* wurde neben dem bereits erwähnten Gen MJ0301 ein weiteres Gen (MJ1425) gefunden, dessen Genprodukt die Umwandlung von α -Ketoglutarat zu Hydroxyglutarat, einer Seitenkettenkomponente von H₄MPT, katalysiert (Graupner et al., 2000). Das am besten untersuchte Enzym stellt jedoch die oben bereits erwähnte β -RFAP-Synthase dar, die den ersten Schritt in der H₄MPT-Synthese katalysiert (Abb. 22, Reaktion 3). Die Charakterisierung des gereinigten Enzyms aus *M. thermophila* ergab, dass das Enzym spezifisch für *p*-Aminobenzoesäure ($K_m = 58 \pm 7 \mu\text{M}$) ist und lediglich *p*-Hydroxybenzoesäure und 4-Aminothiobenzoesäure als alternatives Substrat mit einer deutlich niedrigeren katalytischen Effizienz akzeptiert (Rasche & White, 1998). Als Hemmstoffe wurden zahlreiche N-substituierte *p*-Aminobenzoesäure-Analoga wie z. B. 4-Methylaminobenzoesäure ($K_i = 350 \mu\text{M}$) oder 4-Propylaminobenzoesäure ($K_i = 20 \mu\text{M}$) identifiziert (Rasche & White, 1998, Dumitru et al., 2003). Im Gegensatz dazu war Sulfanilamid, ein C¹-substituiertes *p*-Aminobenzoesäure-Analogon, bei einer Konzentration von 5 mM ohne Effekt auf die β -RFAP-Synthase-Aktivität (Rasche & White, 1998). Aufgrund dieser Resultate ist unwahrscheinlich, dass die beobachtete Wachstumsinhibition von *M. barkeri* durch Sulfanilamid auf die Hemmung der β -RFAP-Synthase und damit der H₄SPT-Synthese zurückzuführen ist, sondern auf der Hemmung von der an der H₄F-Synthese beteiligten Dihydropteroat-Synthase (FolP) beruht.

Nicht in Übereinstimmung mit dem in Abb. 22 dargestellten Biosyntheseweg für H₄MPT ist der in dieser Arbeit gemachte Befund, dass das Wachstum von *M. barkeri* von *p*-Aminobenzoesäure - und zwar in sehr geringen Konzentrationen - abhängig ist: Die Konzentration von 20 nM *p*-Aminobenzoesäure im Medium, die zur Rekonstitution des Wachstums erforderlich ist, reicht bei weitem nicht aus, um die Biosynthese von H₄SPT in *M. barkeri* erklären zu können (siehe Ergebnisse). Unter *p*-Aminobenzoesäure-limitierenden Bedingungen wurden weniger als 0,4% des H₄SPT aus der in die Zelle aufgenommenen *p*-Aminobenzoesäure synthetisiert, was darauf hindeutet, dass freie *p*-Aminobenzoesäure unter diesen Bedingungen kein Intermediat in der H₄SPT-Synthese darstellt und somit im Widerspruch zu dem bisher angenommenen Syntheseweg steht (White, 2001). Die in Zellextrakten von *M. thermophila* gefundenen sehr geringen spezifischen Aktivitäten von β -RFAP-Synthase von 0,03 mU/mg unterstützen diese Hypothese, nicht jedoch der niedrige

K_m für *p*-Aminobenzoessäure von $\sim 60 \mu\text{M}$, der für dieses Enzym gemessen wurde (Rasche & White, 1998; Scott & Rasche, 2002). Es wurde beobachtet, dass der prozentuale Anteil an H_4SPT , der auf die Verwendung von aus dem Medium aufgenommener *p*-Aminobenzoessäure zurückzuführen ist, auf ca. 13% anstieg, wenn die *p*-Aminobenzoessäure-Konzentration im Medium erhöht wurde. Diese Beobachtung deckt sich mit Markierungsversuchen von White, die gezeigt haben, dass in *Methanobacterium formicicum* deuterierte *p*-Aminobenzoessäure in den Arylamin-Teil von H_4MPT eingebaut wurde, wenn der Organismus in Gegenwart von 2 mM [$^2\text{H}_2$ -Ring]-*p*-Aminobenzoessäure im Medium gezogen wurde (White, 1985). Entsprechende Experimente wurden für *Methanosarcina* ssp. nicht durchgeführt. Insgesamt lassen diese Befunde vermuten, dass in *M. barkeri* möglicherweise zwei alternative Synthesewege operativ sind, von denen nur einer freie *p*-Aminobenzoessäure verwendet. Als „gebundene *p*-Aminobenzoessäure“ könnte z. B. 4-Amino-4-Desoxychorismat (ACD) in Betracht gezogen werden (Abb. 21), das als Intermediat in der Biosynthese von *p*-Aminobenzoessäure aus Chorismat vorkommt (Green et al., 1996). Alternativ wäre vorstellbar, dass ACD das natürliche Substrat von β -RFAP-Synthase in der H_4MPT -/ H_4SPT -Synthese ist und bei einem Überangebot an freier *p*-Aminobenzoessäure diese ebenfalls als Substrat verwendet wird.

Nachtrag: H₄F-Synthese in *M. barkeri*

Nach Fertigstellung der Arbeit erhielten wir folgende Information von Prof. Mevarech (Universität Tel Aviv), die die Annahme stützen, dass *Methanosarcina* ssp. in der Lage ist, H₄F zu synthetisieren (siehe auch S. 82):

In *Halobacterium salinarum* wurde kürzlich ein Gen identifiziert, dessen Genprodukt eine Fusion aus FolC und FolP (FolC~P) darstellt (siehe Abb. 21) und über ein 100 Aminosäuren langes Polypeptid miteinander verknüpft ist. Eine Mutante von *Haloferax volcanii*, die keine Dihydrofolat-Reduktase (FolA) besitzt, konnte erfolgreich mit *folP~C* aus *H. salinarum* komplementiert werden. Homologe Sequenzen zu dem Linker-Polypeptid wurden in *Haloarcula marismortui*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter jejuni*, *Thermoanaerobacter tengcongensis* und *Methanosarcina* ssp. identifiziert, wo sie N- oder C-terminal an FolP fusioniert vorliegen. Komplementationsstudien mit den Fusionsgenen von *H. pylori* und *H. salinarum* ergaben, dass die Proteine neben Dihydropteroat-Synthase-Aktivität auch eine Reduktase-Aktivität aufweisen, wobei letztere durch das Linker-Polypeptid katalysiert wird und daher als „Putative Reducing Domain“ (PRD) bezeichnet wird. Aufgrund dieser Befunde wird angenommen, dass „PRD-FolP“ die Bildung von Tetrahydropteroat katalysiert. In *Halobacteria* konnte zusätzlich gezeigt werden, dass FolC-PRD-FolP Tetrahydropteroat unter Zugabe von Glutamat zu H₄F umsetzen kann (Levin, I., Giladi, M., Altman-Price, N., Ortenberg, R., & Mevarech, M. (2004). An alternative pathway for reduced folate biosynthesis in bacteria and halophilic archaea. *Mol Microbiol*, im Druck).

In *M. barkeri* ist die „Putative Reducing Domain“ C-terminal an FolP1 (siehe Abb. 4) fusioniert. Erste Untersuchungen ergaben, dass *folP1* aus *M. barkeri* in der Lage ist, eine *folP*-Deletionsmutante von *E. coli* zu komplementieren. Ob eine *folA*-Deletionsmutante von *E. coli* durch *prd-folP1* aus *M. barkeri* komplementiert werden kann, wird zur Zeit untersucht (Prof. Mevarech, persönliche Mitteilung).

VI Literatur

Aceti, D. J. & Ferry, J. G. (1988). Purification and characterization of acetate kinase from acetate-grown *Methanosarcina*. Evidence for regulation of synthesis. *J Biol Chem* **263**, 15444-15448.

Angelaccio, S., Chiaraluce, R., Consalvi, V., Buchenau, B., Giangiacomo, L., Bossa, F. & Contestabile, R. (2003). Catalytic and thermodynamic properties of tetrahydromethanopterin-dependent serine hydroxymethyltransferase from *Methanococcus jannaschii*. *J Biol Chem* **278**, 41789-41797.

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

Aktories, K., Bönisch, H., Büch, U., Coper, H., Eckert, K.-G., Feuerstein, T. J., Fichtl, B., Flohé, L., Forth, W., Förstermann, U., Fülgraff, G. M., Giertz, H., Glusa, E., Göthert, M., Gresser, U., Gröbner, W., Habermann, E., Haen, E., Hasselblatt, A., Helmchen, H., Henschler, D., Illes, I., Jurna, I., Kaefer, V., Keller, C., Kilbinger, H., Kimbel, H., Neumann, F., Neumann H.-G., Palm, D., Peskar, B. A., Resch, K., Rummel, W., Schenck, B., Schleusener, H., Schlicker, E., Schweikert, H.-U., Schütz, W., Seeger, R., Seifen, E., Starke, K., Turnheim, K., Wenzel, E., Wolfram, S., Wolfram, G., Wollenberg, P. & Zöllner, N. (1996). Sulfonamide, Sulfonamid-Kombinationen mit Diaminopyrimidinen. In *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, pp. 683-689. Edited by W. Forth, D. Henschler, W. Rummel & K. Starke. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag GmbH.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**, 3389-3402.

Barlowe, C. K. & Appling, D. R. (1990). Isolation and characterization of a novel eukaryotic monofunctional NAD⁺-dependent 5,10-methylenetetrahydrofolate dehydrogenase. *Biochemistry* **29**, 7089-7094.

Begley, T. P., Kinsland, C. & Strauss, E. (2001). The biosynthesis of coenzyme A in bacteria. *Vitam Horm* **61**, 157-171.

Blamey, J. M. & Adams, M. W. (1993). Purification and characterization of pyruvate ferredoxin oxidoreductase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Biochim Biophys Acta* **1161**, 19-27.

Blamey, J. M. & Adams, M. W. (1994). Characterization of an ancestral type of pyruvate ferredoxin oxidoreductase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Biochemistry* **33**, 1000-1007.

Blaut, M. & Gottschalk, G. (1984). Coupling of ATP synthesis and methane formation from methanol and molecular hydrogen in *Methanosarcina barkeri*. *Eur J Biochem* **141**, 217-222.

Bock, A. K., Kunow, J., Glasemacher, J. & Schönheit, P. (1996). Catalytic properties, molecular composition and sequence alignments of pyruvate: ferredoxin oxidoreductase from

the methanogenic archaeon *Methanosarcina barkeri* (strain Fusaro). *Eur J Biochem* **237**, 35-44.

Boone, D. R., Whitman, W. B. & Rouvière, P. (1993). Diversity and taxonomy of methanogens. In *Methanogenesis*, pp. 35-80. Edited by J. G. Ferry. New York: Chapman & Hall.

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.

Bräsen, C. & Schönheit, P. (1991). Mechanism of acetate formation and acetate activation in halophilic archaea. *Arch Microbiol* **175**, 360-368.

Breitung, J., Schmitz, R. A., Stetter, K. O. & Thauer, R. K. (1991). N^5,N^{10} -methenyltetrahydromethanopterin cyclohydrolase from the extreme thermophile *Methanopyrus kandleri*: increase of catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) and thermostability in the presence of salts. *Arch Microbiol* **156**, 517-524

Brown, T. D., Jones-Mortimer, M. C. & Kornberg, H. L. (1977). The enzymic interconversion of acetate and acetyl-coenzyme A in *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* **102**, 327-336.

Buchenau, B. (2001). Gibt es Tetrahydrofolat-spezifische Enzyme in methanogenen Archaea und Tetrahydromethanopterin-spezifische Enzyme in acetogenen Bacteria? In *Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg*. Diplomarbeit. Marburg.

Bult, C. J., White, O., Olsen, G. J., Zhou, L., Fleischmann, R. D., Sutton, G. G., Blake, J. A., FitzGerald, L. M., Clayton, R. A., Gocayne, J. D., Kerlavage, A. R., Dougherty, B. A., Tomb, J. F., Adams, M. D., Reich, C. I., Overbeek, R., Kirkness, E. F., Weinstock, K. G., Merrick, J. M., Glodek, A., Scott, J. L., Geoghagen, N. S. & Venter, J. C. (1996). Complete genome sequence of the methanogenic archaeon *Methanococcus jannaschii*. *Science* **273**, 1058-1073.

Caccamo, M. A., Malone, C. S. & Rasche, M. E. (2004). Biochemical characterization of a dihydromethanopterin reductase involved in tetrahydromethanopterin biosynthesis in *Methylobacterium extorquens* AM1. *J Bacteriol* **186**, 2068-2073.

Chistoserdova, L., Jenkins, C., Kalyuzhnaya, M., Marx, C. J., Lapidus, A., Vorholt, J. A., Staley, J. T. & Lidstrom, M. E. (2004). The enigmatic *Planctomycetes* may hold a key to the origins of methanogenesis and methylotrophy. *Mol Biol Evol* **21**, 1234-1241.

Chistoserdova, L., Vorholt, J. A., Thauer, R. K. & Lidstrom, M. E. (1998). C_1 transfer enzymes and coenzymes linking methylotrophic bacteria and methanogenic archaea. *Science* **281**, 99-102.

Choquet, C. G., Richards, J. C., Patel, G. B. & Sprott, G. D. (1994). Purine and pyrimidine biosynthesis in methanogenic bacteria. *Arch Microbiol* **161**, 471-480.

Contestabile, R., Paiardini, A., Pascarella, S., di Salvo, M. L., D'Aguanno, S. & Bossa, F. (2001). L-Threonine aldolase, serine hydroxymethyltransferase and fungal alanine racemase.

A subgroup of strictly related enzymes specialized for different functions. *Eur J Biochem* **268**, 6508-6525.

Cossins, E. A. (1984). Folates in biological materials. In *Folates and Pterins*, pp. 1-60. Edited by R. L. Blakley & S. J. Benkovic. New York: John Wiley & Sons, Inc.

Daniels, L. (1993). Biochemistry of methanogenesis. In *The biochemistry of archaea (archaeobacteria)*, pp. 41-112. Edited by M. Kates, D. J. Kushner & A. T. Matheson. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B. V.

D'Ari, L. & Rabinowitz, J. C. (1991). Purification, characterization, cloning, and amino acid sequence of the bifunctional enzyme 5,10-methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/5,10-methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **266**, 23953-23958.

DiMarco, A. A., Bobik, T. A. & Wolfe, R. S. (1990). Unusual coenzymes of methanogenesis. *Ann Rev Biochem* **59**, 355-394.

Donnelly, M. I., Escalante-Semerena, J. C., Rinehart, K. L., Jr. & Wolfe, R. S. (1985). Methenyl-tetrahydromethanopterin cyclohydrolase in cell extracts of *Methanobacterium*. *Arch Biochem Biophys* **242**, 430-439.

Dumitru, R., Palencia, H., Schroeder, S. D., DeMontigny, B. A., Takacs, J. M., Rasche, M. E., Miner, J. L. & Ragsdale, S. W. (2003). Targeting methanopterin biosynthesis to inhibit methanogenesis. *Appl Environ Microbiol* **69**, 7236-7241.

Eggen, R. I. I., Geerling, A. C. M., Boshoven, A. B. P. & de Vos, W. M. (1991). Cloning, sequence analysis, and functional expression of the acetyl coenzyme A synthetase gene from *Methanotheroxiphilum* in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **173**, 6383-6389.

Ekiel, I., Smith, I. C. P. & Sprott, G. D. (1983). Biosynthetic pathway in *Methanospirillum hungatei* as determined by ¹³C nuclear magnetic resonance. *J Bacteriol* **156**, 316-326.

Ekiel, I., Sprott, G. D. & Patel, G. B. (1985). Acetate and CO₂ assimilation by *Methanotheroxiphilum concilii*. *J Bacteriol* **162**, 905-908.

Enssle, M., Zirngibl, C., Linder, D. & Thauer, R. K. (1991). Coenzyme F₄₂₀ dependent N⁵,N¹⁰-methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase in methanol grown *Methanosarcina barkeri*. *Arch Microbiol* **155**, 483-490.

Eyzaguirre, J., Jansen, K. & Fuchs, G. (1982). Phosphoenolpyruvate synthetase in *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Arch Microbiol* **132**, 67-74.

Ferry, J. G. (1997). Enzymology of the fermentation of acetate to methane by *Methanosarcina thermophila*. *Biofactors* **6**, 25-35.

Fischer, R., Gärtner, P., Yeliseev, A. & Thauer, R. K. (1992). N⁵-methyltetrahydromethanopterin: coenzyme M methyltransferase in methanogenic archaeobacteria is a membrane protein. *Arch of Microbiol* **158**, 208-217.

Fraser, H. I., Kvaratskhelia, M. & White, M. F. (1999). The two analogous phosphoglycerate mutases of *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **445**, 344-348.

Fischer, R. & Thauer, R. (1989). Methyltetrahydromethanopterin as an intermediate in methanogenesis from acetate in *Methanosarcina barkeri*. *Arch Microbiol* **151**, 459-465.

Galagan, J. E., Nusbaum, C., Roy, A., Endrizzi, M. G., Macdonald, P., FitzHugh, W., Calvo, S., Engels, R., Smirnov, S., Atnoor, D., Brown, A., Allen, N., Naylor, J., Stange-Thomann, N., DeArellano, K., Johnson, R., Linton, L., McEwan, P., McKernan, K., Talamas, J., Tirrell, A., Ye, W. J., Zimmer, A., Barber, R. D., Cann, I. & Birren, B. (2002). The genome of *M. acetivorans* reveals extensive metabolic and physiological diversity. *Genome Res* **12**, 532-542.

Genschel, U. (2004). Coenzyme A biosynthesis: reconstruction of the pathway in archaea and an evolutionary scenario based on comparative genomics. *Mol Biol Evol* **21**, 1242-1251.

Ghosh, M. & Sonawat, H. M. (1998). Kreb's TCA cycle in *Halobacterium salinarum* investigated by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Extremophiles* **2**, 427-433.

Goldberg, M. E., Expert-Bezancon, N., Vuillard, L. & Rabilloud, T. (1996). Non-detergent sulphobetaines: a new class of molecules that facilitate *in vitro* protein renaturation. *Fold Des* **1**, 21-27.

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

Gorris, L. G. & van der Drift, C. (1994). Cofactor contents of methanogenic bacteria reviewed. *Biofactors* **4**, 139-145.

Graham, D. E., Xu, H. & White, R. H. (2002). A divergent archaeal member of the alkaline phosphatase binuclear metalloenzyme superfamily has phosphoglycerate mutase activity. *FEBS Lett* **517**, 190-194.

Grahame, D. A. (1991). Catalysis of acetyl-CoA cleavage and tetrahydrosarcinapterin methylation by a carbon monoxide dehydrogenase-corrinoid enzyme complex. *J Biol Chem* **266**, 22227-22233.

Grahame, D. A. & Stadtman, T. C. (1987). *In vitro* methane and methyl coenzyme M formation from acetate: evidence that acetyl-CoA is the required intermediate activated form of acetate. *Biochem Biophys Res Commun* **147**, 254-258.

Graupner, M., Xu, H. & White, R. H. (2000). Identification of an archaeal 2-hydroxy acid dehydrogenase catalyzing reactions involved in coenzyme biosynthesis in methanoarchaea. *J Bacteriol* **182**, 3688-3692.

Green, J. M., Nichol, B. P. & Matthews, R. G. (1996). Folate biosynthesis, reduction, and polyglutamylation. In *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and molecular biology, pp. 665-673. Edited by F. C. Neidhardt. Washington: ASM Press.

- Hagemeier, C. H., Chistoserdova, L., Lidstrom, M. E., Thauer, R. K. & Vorholt, J. A. (2000).** Characterization of a second methylene tetrahydromethanopterin dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens* AM1. *Eur J Biochem* **267**, 3762-3769.
- Hamm-Alvarez, S. F., Sancar, A. & Rajagopalan, K. V. (1990).** The presence and distribution of reduced folates in *Escherichia coli* dihydrofolate reductase mutants. *J Biol Chem* **265**, 9850-9856.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.
- Hayashi, H. (1995).** Pyridoxal enzymes: mechanistic diversity and uniformity. *J Biochem* **118**, 463-473.
- Herrington, M. B. & Chirwa, N. T. (1999).** Growth properties of a *folA* null mutant of *Escherichia coli* K12. *Can J Microbiol* **45**, 191-200.
- Hewick, R. M., Hunkapiller, M. W., Hood, L. E. & Dreyer, W. J. (1981).** A gas-liquid solid phase peptide and protein sequenator. *J Biol Chem* **256**, 7990-7997.
- Hippe, H., Caspari, D., Fiebig, K. & Gottschalk, G. (1979).** Utilization of trimethylamine and other N-methyl compounds for growth and methane formation by *Methanosarcina barkeri*. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**, 494-498.
- Howell, D. M. & White, R. H. (1997).** D-erythro-Neopterin biosynthesis in the methanogenic archaea *Methanococcus thermophila* and *Methanobacterium thermoautotrophicum* Δ H. *J Bacteriol* **179**, 5165-5170.
- Hoyt, J. C., Oren, A., Escalante-Semerena, J. C. & Wolfe, R. S. (1986).** Tetrahydromethanopterin-dependent serine transhydroxymethylase from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Arch Microbiol* **145**, 153-158.
- Jackowski, S. (1996).** Biosynthesis of pantothenic acid and coenzyme-A. In *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and molecular biology, pp. 687-694. Edited by F. C. Neidhardt. Washington: ASM Press.
- Jansen, K., Stupperich, E. & Fuchs, G. (1982).** Carbohydrate synthesis from acetyl-CoA in the autotroph *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Arch Microbiol* **132**, 355-364.
- Jedrzejak, M. J. (2000).** Structure, function, and evolution of phosphoglycerate mutases: comparison with fructose-2,6-bisphosphatase, acid phosphatase, and alkaline phosphatase. *Prog Biophys Mol Biol* **73**, 263-287.
- Jedrzejak, M. J., Chander, M., Setlow, P. & Krishnasamy, G. (2000).** Structure and mechanism of action of a novel phosphoglycerate mutase from *Bacillus stearothermophilus*. *EMBO J* **19**, 1419-1431.
- Jetten, M. S., Fluit, T. J., Stams, A. J. & Zehnder, A. J. (1992).** A fluoride-insensitive inorganic pyrophosphatase isolated from *Methanotherix soehngeni*. *Arch Microbiol* **157**, 284-289.

- Jetten, M. S., Stams, A. J. & Zehnder, A. J. (1989).** Isolation and characterization of acetyl-coenzyme A synthetase from *Methanotherix soehngeni*. *J Bacteriol* **171**, 5430-5435.
- Jetten, M. S., Stams, A. J. & Zehnder, A. J. (1990).** Acetate threshold values and acetate activating enzymes in methanogenic bacteria. *FEMS Microbiol Ecol* **73**, 339-344.
- Jetten, M. S., Stams, A. J. & Zehnder, A. J. (1992).** Methanogenesis from acetate - a comparison of the acetate metabolism of *Methanotherix soehngeni* and *Methanosarcina* ssp. *FEMS Microbiol Rev* **88**, 181-197.
- Kallen, R. G. & Jencks, W. P. (1966).** The dissociation constants of tetrahydrofolic acid. *J Biol Chem* **241**, 5845-5850.
- Kamagata, Y., Kawasaki, H., Oyaizu, H., Nakamura, K., Mikami, E., Endo, G., Koga, Y. & Yamasato, K. (1992).** Characterization of three thermophilic strains of *Methanotherix* ("*Methanosaeta*") *thermophila* sp. nov. and rejection of *Methanotherix* ("*Methanosaeta*") *thermoacetophila*. *Int J Syst Bacteriol* **42**, 463-468.
- Kappock, T. J., Ealick, S. E. & Stubbe, J. (2000).** Modular evolution of the purine biosynthetic pathway. *Curr Opin Chem Biol* **4**, 567-572.
- Karrasch, M., Bott, M. & Thauer, R. K. (1989).** Carbonic anhydrase activity in acetate grown *Methanosarcina barkeri*. *Arch Microbiol* **151**, 137-142.
- Keltjens, J. T., Brugman, A. J., Kesseleer, J. M., te Brommelstroet, B. W., van der Drift, C. & Vogels, G. D. (1992).** 5-Formyl-5,6,7,8-tetrahydromethanopterin is the intermediate in the process of methanogenesis in *Methanosarcina barkeri*. *Biofactors* **3**, 249-255.
- Keltjens, J. T., Brugman, A. J., Kesseleer, J. M., te Brommelstroet, B. W., van der Drift, C. & Vogels, G. D. (1992).** Conversion of methanol and methylamines to methane and carbon dioxide. In *Methanogenesis*, pp. 253-303. Edited by J. G. Ferry. New York London: Chapman & Hall.
- Kenealy, W. R. & Zeikus, J.G. (1982).** One-carbon metabolism in methanogens: evidence for synthesis of a two-carbon cellular intermediate and unification of catabolism and anabolism in *Methanosarcina barkeri*. *J Bacteriol* **151**, 932-941.
- Kerscher, L. & Oesterhelt, D. (1982).** Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase - new findings on an ancient enzyme. *Trends Biochem Sci* **7**, 371-374.
- Kerscher, L., Nowitzki, S. & Oesterhelt, D. (1982).** Thermoacidophilic archaeobacteria contain bacterial-type ferredoxins acting as electron acceptors of 2-oxoacid:ferredoxin oxidoreductases. *Eur J Biochem* **128**, 223-230.
- Kletzin, A. & Adams, M. W. (1996).** Molecular and phylogenetic characterization of pyruvate and 2-ketoisovalerate ferredoxin oxidoreductases from *Pyrococcus furiosus* and pyruvate ferredoxin oxidoreductase from *Thermotoga maritima*. *J Bacteriol* **178**, 248-257.
- Kohler, H.-P. E. & Zehnder, G. D. (1984).** Carbon monoxide dehydrogenase and acetate thiokinase in *Methanotherix soehngeni*. *FEMS Microbiol Lett* **21**, 287-292

- Kohno, T., Carmichael, D. F., Sommer, A. & Thompson, R. C. (1990).** Refolding of recombinant proteins. *Methods Enzymol* **185**, 187-195.
- Krone, U. E., McFarlan, S. C. & Hogenkamp, H. P. (1994).** Purification and partial characterization of a putative thymidylate synthase from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Eur J Biochem* **220**, 789-794.
- Krzycki, J. A., Lehman, L. J. & Zeikus, J. G. (1985).** Acetate catabolism by *Methanosarcina barkeri*: evidence for involvement of carbon monoxide dehydrogenase, methyl coenzyme M, and methylreductase. *J Bacteriol* **163**, 1000-1006.
- Kühn, W., Fiebig, K., Hippe, H., Mah, R. A., Huser, B. A. & Gottschalk, G. (1983).** Distribution of cytochromes in methanogenic bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **20**, 407-410.
- Labes, A. & Schönheit, P. (2001).** Sugar utilization in the hyperthermophilic, sulfate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus* strain 7324: starch degradation to acetate and CO₂ via a modified Embden-Meyerhof pathway and acetyl-CoA synthetase (ADP-forming). *Arch Microbiol* **176**, 329-338.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Leigh, J. A. (1983).** Levels of water-soluble vitamins in methanogenic and non-methanogenic bacteria. *Appl Environ Microbiol* **45**, 800-803.
- Lienard, T., Becher, B., Marschall, M., Bowien, S. & Gottschalk, G. (1996).** Sodium ion translocation by N⁵-methyltetrahydromethanopterin: coenzyme M methyltransferase from *Methanosarcina mazei* Gö1 reconstituted in ether lipid liposomes. *Eur J Biochem* **239**, 857-864.
- Li, H., Xu, H. M. & Graham, D. E (2003).** Glutathione synthetase homologs encode α -L-glutamate ligases for methanogenic coenzyme F₄₂₀ and tetrahydrosarcinapterin biosyntheses. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 9785-9790.
- Lin, Z. & Sparling, R. (1998).** Investigation of serine hydroxymethyltransferase in methanogens. *Can J Microbiol* **44**, 652-656.
- Ljungdahl, L. G. (1994).** The acetyl-CoA pathway and the chemiosmotic generation of ATP during acetogenesis. In *Acetogenesis*. Edited by H. L. Drake. New York and London: Chapman & Hall.
- Ljungdahl, L.G., O'Brien, W. E., Moore, M. R. & Liu, M. T. (1980).** Methylene tetrahydrofolate dehydrogenase from *Clostridium formicoaceticum* and methylene tetrahydrofolate dehydrogenase, methenyl tetrahydrofolate cyclohydrolase (combined) from *Clostridium thermoaceticum*. *Methods Enzymol* **66**, 599-609.
- Lundie, L. L. & Ferry, J. G. (1989).** Activation of acetate by *Methanosarcina thermophila*. *J Biol Chem* **264**, 18392-18396.
- Ma, K. & Thauer, R. K. (1990).** N⁵, N¹⁰-Methylene tetrahydromethanopterin reductase from *Methanosarcina barkeri*. *FEMS Microbiol Lett* **70**, 119-124.

MacKenzie, R. E. (1984). Biogenesis and interconversion of substituted tetrahydrofolates. In *Folates and Pterins*, pp. 255-306. Edited by R. L. Blakley & S. J. Benkovic. New York: John Wiley & Sons, Inc.

MacKenzie, R. E. (1997). Mitochondrial NAD-dependent methylenetetrahydrofolate dehydrogenase-methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase. *Methods Enzymol* **281**, 171-177.

Maden, B. E. H. (2000). Tetrahydrofolate and tetrahydromethanopterin compared: functionally distinct carriers in C₁ metabolism. *Biochem J* **350**, 609-629.

Marolewski, A. E., Mattia, K. M., Warren, M. S. & Benkovic, S. J. (1997). Formyl phosphate: a proposed intermediate in the reaction catalyzed by *Escherichia coli* PurT GAR transformylase. *Biochemistry* **36**, 6709-6716.

Matthews, R. G. (1996). One-carbon metabolism. In *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and molecular biology, pp. 600-611. Edited by F. C. Neidhardt. Washington: ASM Press.

Matthews, R. G. & Drummond, J. T. (1990). Providing one-carbon units for biological methylations: Mechanistic studies on serine hydroxymethyltransferase, methylenetetrahydrofolate reductase, and methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase. *Chem Rev* **90**, 1275-1290.

Metcalf, W. W., Zhang, J. K., Shi, X. & Wolfe, R. S. (1996). Molecular, genetic, and biochemical characterization of the *serC* gene of *Methanosarcina barkeri* Fusaro. *J Bacteriol* **178**, 5797-5802.

Meuer, J., Kuettner, H. C., Zhang, J. K., Hedderich, R. & Metcalf, W.W. (2002). Genetic analysis of the archaeon *Methanosarcina barkeri* Fusaro reveals a central role for Ech hydrogenase and ferredoxin in methanogenesis and carbon fixation. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 5632-5637.

Moore, M. R., O'Brien, W. E. & Ljungdahl, L. G. (1974). Purification and characterization of nicotinamide adenine dinucleotide-dependent methylenetetrahydrofolate dehydrogenase from *Clostridium formicoaceticum*. *J Biol Chem* **249**, 5250-5253.

Mukhopadhyay, B., Stoddard, S.F. & Wolfe R.S. (1998). Purification, regulation, and molecular and biochemical characterization of pyruvate carboxylase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* strain ΔH. *J Biol Chem* **273**, 5155-5166.

Mukhopadhyay, B., Purwantini, E., Kreder, C. L. & Wolfe, R. S. (2001). Oxaloacetate synthesis in the methanarchaeon *Methanosarcina barkeri*: pyruvate carboxylase genes and a putative *Escherichia coli*-type bifunctional biotin protein ligase gene (*bpl/birA*) exhibit a unique organization. *J Bacteriol* **183**, 3804-3810.

Murray, P. A. & Zinder, S. H. (1987). Polysaccharide reserve material in the acetotrophic methanogen *Methanosarcina thermophila* strain TM-1: accumulation and mobilization. *Arch Microbiol* **147**, 109-116.

Noll, K. M. & Barber, T. S. (1988). Vitamin contents of archaeobacteria. *J Bacteriol* **170**, 4315-4321.

- Nyce, G. W. & White, R. H. (1996). dTMP biosynthesis in Archaea. *J Bacteriol* **178**, 914-916.
- Oberlies, G., Fuchs, G. & Thauer, R. K. (1980). Acetate thiokinase and the assimilation of acetate in *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Arch Microbiol* **128**, 248-252.
- Oslancova, A., & Janecek, S. (2004). Evolutionary relatedness between glycolytic enzymes most frequently occurring in genomes. *Folia Microbiol* **49**, 247-258.
- Peak, M. J., Peak, J. G., Stevens, F. J., Blamey, J., Mai, X., Zhou, Z. H. & Adams, M. W. (1994). The hyperthermophilic glycolytic enzyme enolase in the archaeon *Pyrococcus furiosus*: comparison with mesophilic enolases. *Arch Biochem Biophys* **313**, 280-286.
- Perski, H. J., Schönheit, P. & Thauer, R. K. (1982). Sodium dependence of methane formation in methanogenic bacteria. *FEBS Lett* **143**, 323-326.
- Pomper, B. K. (1998). Reinigung und Charakterisierung der Methenyltetrahydromethanopterin-Cyclohydrolase (Mch) und der Methenyltetrahydrofolat-Cyclohydrolase (Fch) aus *Methylobacterium extorquens* AM1. In *Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg*. Diplomarbeit. Marburg.
- Pomper, B. K., Vorholt, J. A., Chistoserdova, L., Lidstrom, M. E. & Thauer, R. K. (1999). A methenyl tetrahydromethanopterin cyclohydrolase and a methenyl tetrahydrofolate cyclohydrolase in *Methylobacterium extorquens* AM1. *Eur J Biochem* **261**, 475-480.
- Potters, M. B., Solow, B. T., Bischoff, K. M., Graham, D. E., Lower, B. H., Helm, R. & Kennelly, P. J. (2003). Phosphoprotein with phosphoglycerate mutase activity from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J Bacteriol* **185**, 2112-2121.
- Quinlivan, E. P., Roje, S., Basset, G., Shachar-Hill, Y., Gregory, J. F. & Hanson, A. D. (2003). The folate precursor *p*-aminobenzoate is reversibly converted to its glucose ester in the plant cytosol. *J Biol Chem* **278**, 20731-20737.
- Ragsdale, S. W. (2003). Pyruvate ferredoxin oxidoreductase and its radical intermediate. *Chem Rev* **103**, 2333-2346.
- Ragsdale, S. W. & Ljungdahl, L.G. (1984). Purification and properties of NAD-dependent 5,10-methylenetetrahydrofolate dehydrogenase from *Acetobacterium woodii*. *J Biol Chem* **259**, 3499-503.
- Rasche, M. E. & White, R. H. (1998). Mechanism for the enzymatic formation of 4-(beta-D-ribofuranosyl)aminobenzene 5'-phosphate during the biosynthesis of methanopterin. *Biochemistry* **37**, 11343-11351.
- Reeves, R. E., Warren, L. G., Susskind, B. & Lo, H. S. (1977). An energy-conserving pyruvate-to-acetate pathway in *Entamoeba histolytica*. Pyruvate synthase and a new acetate thiokinase. *J Biol Chem* **252**, 726-731.
- Ruhlemann, M., Ziegler, K., Stupperich, E. & Fuchs, G. (1985). Detection of acetyl coenzyme-A as an early CO₂ assimilation intermediate in *Methanobacterium*. *Arch Microbiol* **141**, 399-406.

- Sanchez, L. B. & Müller, M. (1996).** Purification and characterization of the acetate forming enzyme, acetyl-CoA synthetase (ADP-forming) from the amitochondriate protist, *Giardia lamblia*. *FEBS Lett* **378**, 240-244.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989).** *Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd edn.* Cold Spring Harbor New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sauer K. & 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.
- Schäfer, T. & Schönheit, P. (1993).** Gluconeogenesis from pyruvate in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: involvement of reactions of the embden-meyerhof pathway. *Arch Microbiol* **159**, 354-363.
- Schäfer, T., Selig, M. & Schönheit, P. (1993).** Acetyl-CoA synthetase (ADP-forming) in archaea, a novel enzyme involved in acetate formation and ATP synthesis. *Arch Microbiol* **159**, 72-83
- Schieh, J. & Whitman, W. B. (1987).** Pathways of acetate assimilation in autotrophic and heterotrophic *Methanococci*. *J Bacteriol* **169**, 5327-5329.
- Schirch, L. & Jenkins, W. T. (1964).** Serine transhydroxymethylase. Properties of the enzyme-substrate complexes of D-alanine and glycine. *J Biol Chem* **239**, 3801-3807.
- Schirch, L. G. & Mason, M. (1963).** Serine transhydroxymethylase. A study of the properties of a homogeneous enzyme preparation and of the nature of its interaction with substrates and pyridoxal 5-phosphate. *J Biol Chem* **238**, 1032-1037.
- Schirch, V., Hopkins, S., Villar, E. & Angelaccio, S. (1985).** Serine hydroxymethyltransferase from *Escherichia coli*: purification and properties. *J Bacteriol* **163**, 1-7.
- Schönheit, P., Moll, J. & Thauer, R. K. (1980).** Growth parameters (K_S , μ_{max} , Y_S) of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Arch Microbiol* **127**, 59-65.
- Schönheit, P. & Schäfer, T. (1995).** Metabolism of hyperthermophiles. *World J Microbiol Biotechnol* **11**, 26-57.
- Schröder, I. & Thauer, R. K. (1999).** Methylcobalamin:homocysteine methyltransferase from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Identification as the *metE* gene product. *Eur J Biochem* **263**, 789-796.
- Scott, J. W. & Rasche, M. E. (2002).** Purification, overproduction, and partial characterization of beta-RFAP synthase, a key enzyme in the methanopterin biosynthesis pathway. *J Bacteriol* **184**, 4442-4448.
- Sheppard, C. A., Trimmer, E. E. & Matthews, R. G. (1999).** Purification and properties of NADH-dependent 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase (MetF) from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**, 718-725.

Shima, S. & Thauer, R. K. (2001). Tetrahydromethanopterin-specific enzymes from *Methanopyrus kandleri*. *Methods Enzymol* **331**, 317-353.

Simpson, P. G. & Whitman, W. B. (1993). Anabolic pathways in methanogens. In *Methanogenesis*, pp. 445-472. Edited by J. G. Ferry. New York: Chapman & Hall.

Slesarev, A. I., Mezhevaya, K. V., Makarova, K. S., Polushin, N. N., Shcherbinina, O. V., Shakhova, V. V., Belova, G. I., Aravind, L., Natale, D. A., Rogozin, I. B., Tatusov, R. L., Wolf, Y. I., Stetter, K. O., Malykh, A. G., Koonin, E. V. & Kozyavkin, S. A. (2002). The complete genome of hyperthermophile *Methanopyrus kandleri* AV19 and monophyly of archaeal methanogens. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 4644-4649.

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. & Reeve, J. N. (1997). Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* Δ H: functional analysis and comparative genomics. *J Bacteriol* **179**, 7135-7155.

Stauffer, G. V. (1996). Biosynthesis of serine, glycine, and one-carbon units. In *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and molecular biology, pp. 509-513. Edited by F. C. Neidhardt. Washington: ASM Press.

Tanner, R. S., McInerney, M. J. & Nagle, D. P., Jr. (1989). Formate auxotroph of *Methanobacterium thermoautotrophicum* Marburg. *J Bacteriol* **171**, 6534-6538.

te Brömmelstroet, B. W., Hensgens, C. M. H., Geerts, W. J., Keltjens, J. T., van der Drift, C. & Vogels, G. D. (1990). Purification and properties of 5,10-Methenyltetrahydromethanopterin cyclohydrolase from *Methanosarcina barkeri*. *J Bacteriol* **172**, 564-571.

Temple, C., Jr. & Montgomery, J. A. (1984). Chemical and physical properties of folic acid and reduced derivatives. In *Folates and Pterins*, pp. 61-120. Edited by R. L. Blakley & S. J. Benkovic. New York: Wiley & Sons, Inc.

Tersteegen, A., Linder, D., Thauer, R. K. & Hedderich, R. (1997). Structures and functions of four anabolic 2-oxoacid oxidoreductases in *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Eur J Biochem* **244**, 862-868.

Thauer, R. K. (1993). Reactions and enzymes involved in methanogenesis from CO₂ and H₂. In *Methanogenesis*, pp. 209-252. Edited by J. G. Ferry. New York London: Chapman & Hall.

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

Thauer, R. K., Jungermann, K. & Decker, K. (1977). Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bact Rev* **41**, 100-180.

Thauer, R. K., Klein, A. R. & Hartmann, G. C. (1996). Reactions with molecular hydrogen in microorganisms. Evidence for a purely organic hydrogenation catalyst. *Chem Rev* **96**, 3031-3042.

The Merck Index - an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals (2001). Thirteenth edn. New Jersey: Merck & Co.; Inc.

The QIAexpressionist™ (2001). A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins. Fifth edn. Hilden: QIAGEN GmbH.

Tomoyasu, T., Mogk, A., Langen, H., Goloubinoff, P. & Bukau, B. (2001). Genetic dissection of the roles of chaperones and proteases in protein folding and degradation in the *Escherichia coli* cytosol. *Mol Microbiol* **40**, 397-413.

van Beelen, P., Stassen, A. P. M., Bosch, J. W. G., Vogels, G. D., Guijt, W. & Haasnoot, C. A. G. (1984). Elucidation of the structure of methanopterin, a coenzyme from *Methanobacterium thermoautotrophicum*, using two-dimensional nuclear-magnetic resonance techniques. *Eur J Biochem* **138**, 563-571.

van der Oost, J., Huynen, M. A. & Verhees, C. H. (2002). Molecular characterization of phosphoglycerate mutase in archaea. *FEMS Microbiol Lett* **212**, 111-120.

Vaupel, M., Dietz, H., Linder, D. & Thauer, R. K. (1996). Primary structure of cyclohydrolase (Mch) from *Methanobacterium thermoautotrophicum* (strain Marburg) and functional expression of the *mch* gene in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **236**, 294-300.

Vorholt, J. A., Chistoserdova, L., Lidstrom, M. E. & Thauer, R. K. (1998). The NADP-dependent methylene tetrahydromethanopterin dehydrogenase in *Methylobacterium extorquens* AM1. *J Bacteriol* **180**, 5351-5356.

Vorholt, J. A. (2002). Cofactor-dependent pathways of formaldehyde oxidation in methylophilic bacteria. *Arch Microbiol* **178**, 239-249.

Vorholt, J. A., Chistoserdova, L., Lidstrom, M. E. & Thauer, R. K. (1998). The NADP-dependent methylene tetrahydromethanopterin dehydrogenase in *Methylobacterium extorquens* AM1. *J Bacteriol* **180**, 5351-5356.

Vuillard L. & Freeman A. <http://www-cryst.bioc.cam.ac.uk/hosts/ndsb/protocol2.html>

Wahl, R. C. & Orme-Johnsen, W. H. (1987). Clostridial pyruvate oxidoreductase and the pyruvate-oxidizing enzyme specific to nitrogen fixation in *Klebsiella pneumonia* are similar enzymes. *J Biol Chem* **262**, 10489-10496.

Wasserfallen, A., Nolling, J., Pfister, P., Reeve, J. & de Macario, E. C. (2000). Phylogenetic analysis of 18 thermophilic *Methanobacterium* isolates supports the proposals to create a new genus, *Methanothermobacter* gen. nov., and to reclassify several isolates in three species, *Methanothermobacter thermoautotrophicus* comb. nov., *Methanothermobacter wolfeii* comb. nov., and *Methanothermobacter marburgensis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**, 43-53.

Weimer, P. J. & Zeikus, J. G. (1978). One carbon metabolism in methanogenic bacteria. Cellular characterization and growth of *Methanosarcina barkeri*. *Arch Microbiol* **119**, 49-57.

Wennerhold, J. (2004). Heterodisulfid-Reduktasen des *Methanothermobacter*-Typs in *Methanosarcina barkeri* und Untersuchungen zur Rolle des H₂:Heterodisulfid-Oxidoreduktase-

Komplexes bei der Energiekonservierung in *Methanothermobacter marburgensis*. In *Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg*. Diplomarbeit. Marburg.

White, B. A. (1993). *PCR protocols*. Totowa, NJ: Humana Press.

White, R. H. (1985). Biosynthesis of 5-(*p*-aminophenyl)-1,2,3,4-tetrahydroxypentane by methanogenic bacteria. *Arch Microbiol* **143**, 1-5.

White, R. H. (1991). Distribution of folates and modified folates in extremely thermophilic bacteria. *J Bacteriol* **173**, 1987-1991.

White, R. H. & Zhou, D. (1993). Biosynthesis of the coenzymes in methanogens. In *Methanogenesis*, pp. 409-444. Edited by J. G. Ferry. New York London: Chapman & Hall.

White, R. H. (1996). Biosynthesis of methanopterin. *Biochemistry* **35**, 3447-3456.

White, R. H. (1997). Purine biosynthesis in the domain Archaea without folates or modified folates. *J Bacteriol* **179**, 3374-3377.

White, R. H. (1998). Methanopterin biosynthesis: methylation of the biosynthetic intermediates. *Biochim Biophys Acta* **1380**, 257-267.

White, R. H. (1998). Methanopterin biosynthesis: methylation of the biosynthetic intermediates. *Biochim Biophys Acta* **1380**, 257-267.

White, R. H. (2001). Biosynthesis of the methanogenic cofactors. *Vitam Horm* **61**, 299-337.

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

Wohlfarth, G., Geerligs, G. & Diekert, G. (1991). Purification and characterization of NADP⁺-dependent 5,10-methylenetetrahydrofolate dehydrogenase from *Peptostreptococcus productus* Marburg. *J Bacteriol* **173**, 1414-1419.

Worrell, V. E. & Nagle, D. P., Jr. (1988). Folic acid and pteroylpolyglutamate contents of archaeobacteria. *J Bacteriol* **170**, 4420-4423.

Xu, H. M., Aurora, R., Rose, G. D. & White, R. H. (1999). Identifying two ancient enzymes in Archaea using predicted secondary structure alignment. *Nature Struct Biol* **6**, 750-754.

Yamamoto, M., Arai, H., Ishii, M. & Igarashi, Y. (2003). Characterization of two different 2-oxoglutarate:ferredoxin oxidoreductases from *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. *Biochem Biophys Res Commun* **312**, 1297-1302.

Yoon, K. S., Ishii, M., Kodama, T. & Igarashi, Y. (1997). Purification and characterization of pyruvate:ferredoxin oxidoreductase from *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. *Arch Microbiol* **167**, 275-279.

Yu, J. P., Ladapo, J. & Whitman, W. B. (1994). Pathway of glycogen metabolism in *Methanococcus maripaludis*. *J Bacteriol* **176**, 325-332.

Zhang, Q., Iwasaki, T., Wakagi, T. & Oshima, T. (1996). 2-oxoacid:ferredoxin oxidoreductase from the thermoacidophilic archaeon, *Sulfolobus* sp. strain 7. *J Biochem* **120**, 587-599.

Zinder, S. H. (1993). Physiological ecology of methanogens. In *Methanogenesis*, pp. 128-206. Edited by J. G. Ferry. New York London: Chapman & Hall.

Zor, T. & Selinger, Z. (1996). Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Anal Biochem* **236**, 302-308.

VII Anhang

Ergebnisse, die in dieser Dissertation nicht aufgegriffen wurden, sind in folgender Publikation veröffentlicht worden:

Angelaccio, S., Chiaraluce, R., Consalvi, V., Buchenau, B., Giangiacomo, L., Bossa, F., Contestabile, R. (2003). Catalytic and thermodynamic properties of tetrahydromethanopterin-dependent serine hydroxymethyltransferase from *Methanococcus jannaschii*. *J Biol Chem* **278**, 41789-41797

Catalytic and Thermodynamic Properties of Tetrahydromethanopterin-dependent Serine Hydroxymethyltransferase from *Methanococcus jannaschii**

Received for publication, June 25, 2003, and in revised form, August 1, 2003
Published, JBC Papers in Press, August 5, 2003, DOI 10.1074/jbc.M306747200

Sebastiana Angelaccio, Roberta Chiaraluce, Valerio Consalvi, Bärbel Buchenau‡, Laura Giangiacomo, Francesco Bossa§, and Roberto Contestabile¶

From the Dipartimento di Scienze Biochimiche "A. Rossi Fanelli" and §Centro di Eccellenza di Biologia e Medicina Molecolare, Università degli Studi di Roma "La Sapienza," Piazzale Aldo Moro 5, Roma 00185, Italy and the ‡Max-Planck-Institut für Terrestrische Mikrobiologie and Laboratorium für Mikrobiologie des Fachbereichs Biologie der Philipps-Universität, Karl-von-Frisch-Strasse, Marburg D-35043, Germany

The reaction catalyzed by serine hydroxymethyltransferase (SHMT), the transfer of C β of serine to tetrahydropteroylglutamate, represents in Eucarya and Eubacteria a major source of one-carbon (C₁) units for several essential biosynthetic processes. In many Archaea, C₁ units are carried by modified pterin-containing compounds, which, although structurally related to tetrahydropteroylglutamate, play a distinct functional role. Tetrahydromethanopterin, and a few variants of this compound, are the modified folates of methanogenic and sulfate-reducing Archaea. Little information on SHMT from Archaea is available, and the metabolic role of the enzyme in these organisms is not clear. This contribution reports on the purification and characterization of recombinant SHMT from the hyperthermophilic methanogen *Methanococcus jannaschii*. The enzyme was characterized with respect to its catalytic, spectroscopic, and thermodynamic properties. Tetrahydromethanopterin was found to be the preferential pteridine substrate. Tetrahydropteroylglutamate could also take part in the hydroxymethyltransferase reaction, although with a much lower efficiency. The catalytic features of the enzyme with substrate analogues and in the absence of a pteridine substrate were also very similar to those of SHMT isolated from Eucarya or Eubacteria. On the other hand, the *M. jannaschii* enzyme showed increased thermoactivity and resistance to denaturing agents with respect to the enzyme purified from mesophilic sources. The results reported suggest that the active site structure and the mechanism of SHMT are conserved in the enzyme from *M. jannaschii*, which appear to differ only in its ability to bind and use a modified folate as substrate and increased thermal stability.

Serine hydroxymethyltransferase (SHMT,¹ EC 2.1.2.1) catalyzes the reversible transfer of C β of serine to tetrahydro-

teroylglutamate (H₄PteGlu) to form glycine and 5,10-methylene-H₄PteGlu. In Eukarya and Eubacteria, H₄PteGlu functions as a carrier of C₁ units in several oxidation states, which are used in the biosynthesis of important cellular components, such as purines and thymidylate, in the regeneration of methionine from homocysteine or, in acetogenic bacteria, in the synthesis of acetyl-CoA. The reaction catalyzed by SHMT represents in these organisms one of the major loading routes of C₁ units onto the folate carrier (1). In methanogens and several other Archaea, C₁ fragments from formyl to methyl oxidation levels are carried by tetrahydromethanopterin (H₄MPT), a pterin-containing compound involved in methanogenesis. Although H₄PteGlu and H₄MPT are structurally similar in their pterin-like portion (Fig. 1) and in the role as C₁ units carriers, they are functionally distinct. H₄MPT does not appear to be suited to most of the biosynthetic functions of H₄PteGlu. Moreover, the biosynthetic pathways of the two carriers have few, if any, homologies, suggesting the possibility of separate evolutionary origins (2). In the metabolism of folates, SHMT represents a unique link between Archaea and the rest of living beings, in the sense that, whereas all SHMTs clearly share a common evolutionary origin (3), other enzymes that use H₄MPT as cofactor do not show any significant homology to their eukaryotic and eubacterial counterparts (2).

Although a gene encoding SHMT is present in all archaeal genomes so far sequenced, little information is available on the catalytic properties and metabolic role of the enzyme in these organisms. Modified folates are not commercially available, and this has clearly hindered a satisfactory characterization of archaeal SHMTs. Moreover, the purification of the enzyme from Archaea that thrive in extreme environments is complicated by the difficulty of growing these organisms in a laboratory. Two reports of purified SHMT activity, from *Methanobacterium thermoautotrophicum* (4), recently renamed *Methanothermobacter marburgensis* (5), and from *Sulfolobus solfataricus* (6), with limited structural and functional characterization, have been made. In the first report, the enzyme was proposed to function *in vivo* in the direction of serine biosynthesis. Importantly, both works provided evidence that SHMT was selective toward the modified folate used by the source organisms: H₄MPT for *M. marburgensis* and sulfolpterin for *S. solfataricus* (2, 7).

This study reports on the purification of recombinant SHMT from *Methanococcus jannaschii* (*mj*SHMT) and the characterization of its catalytic and thermodynamic properties. The aim of the research was to assess the extent to which *mj*SHMT is structurally and mechanistically similar to its prokaryotic and eukaryotic counterparts.

* This work was supported by the Italian Ministero dell'Istruzione, dell'Università, and della Ricerca. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¶ To whom correspondence should be addressed: Dipartimento di Scienze Biochimiche, Università degli Studi di Roma "La Sapienza," Piazzale Aldo Moro 5, Roma 00185, Italy. Tel.: 39-06-49917569; Fax: 39-06-49917566; E-mail: roberto.contestabile@uniroma1.it.

¹ The abbreviations used are: SHMT, serine hydroxymethyltransferase; *mj*SHMT, *M. jannaschii* SHMT; eSHMT, *E. coli* SHMT; H₄MPT, tetrahydromethanopterin; H₄PteGlu, tetrahydropteroylglutamate or tetrahydrofolate; DTT, dithiothreitol; PLP, pyridoxal phosphate; SVD, singular value decomposition algorithm.

41790

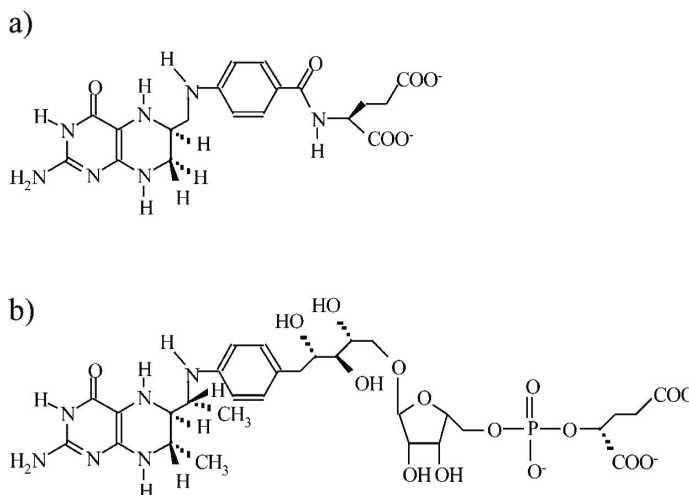
Serine Hydroxymethyltransferase from *Methanococcus jannaschii*

FIG. 1. Structures of tetrahydropteroylglutamate (a) and tetrahydromethanopterin (b).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials—Ingredients for bacterial growth were from Difco. Chemicals used in the purification procedure were from BDH, and DEAE-Sepharose and phenyl-Sepharose were from Amersham Biosciences. Enzymes used for the cloning procedures were purchased from Roche Diagnostics. SHMT from *Escherichia coli* (eSHMT) was expressed and purified as described previously (8). The oligonucleotides used in the PCR reaction were from MWG Biotech. (6S)-H₄PteGlu was a gift from A. G. Eprova, Schaffhausen, Switzerland. All other reagents were from Sigma-Aldrich. The bifunctional enzyme methylene-H₄PteGlu dehydrogenase/methylene-H₄PteGlu cyclohydrolase from *E. coli* was purified from a recombinant *E. coli* bacterial strain kindly provided by Dr. Martino di Salvo (Università "La Sapienza," Rome, Italy) following the procedure described previously (9). NADP-dependent methylene-H₄MPT dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens* AM1 and H₄MPT purified from *M. marburgensis* were kindly provided by Rolf Thauer (Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg, Germany). The thermostable alcohol dehydrogenase from *Thermoanaerobium brockii* employed in the threonine aldolase assay was from Sigma-Aldrich.

Cloning of the *glyA* Gene from *M. jannaschii*—A pUC18 plasmid with a 1686-bp insert containing the gene encoding *mj*SHMT was purchased from the American Type Culture Collection. This plasmid (AMJK15) was used as template in a PCR amplification that used 5'-GGGATACATATGGAAATATTCGG-3' (upstream) and 5'-GCGAATCTTAATGAATCTTAG-3' (downstream) oligonucleotides as primers. *Nde*I and *Eco*RI restriction sites were introduced in the primers to insert the amplified 1287-bp DNA fragment into a pET22b expression plasmid (Novagen), which was used to transform *E. coli* HMS174 (DE3) cells (Novagen). The nucleotide sequence of the insert was determined to confirm that no mismatching had occurred during the PCR amplification.

Expression and Purification—A 100-ml overnight culture of *E. coli* HMS174 (DE3) cells, transformed with the *mj*SHMT overexpressing plasmid, was inoculated into 3 liters of Luria-Bertani broth containing ampicillin (100 mg/liter) and grown aerobically at 37 °C to exponential phase ($A_{600} = 0.3-0.4$). Expression of *mj*SHMT was then induced with 0.2 mM isopropyl thio- β -D-galactopyranoside. After 20 h, cells were harvested and suspended in 100 ml of 50 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 7.6. Cell lysis was obtained by the addition of 1 mg of lysozyme per g of packed bacterial cells. After incubation at 25 °C for 30 min, the cells were frozen overnight at -20 °C. After thawing, streptomycin sulfate (10 g/liter) was added to precipitate DNA. The cell extract was then centrifuged at 15,000 $\times g$ for 30 min, and the pellet was discarded. Solid ammonium sulfate was added to the yellow supernatant to 60% saturation. The solution was centrifuged at 15,000 $\times g$ for 20 min, and the pellet was discarded. The supernatant was directly loaded onto a phenyl-Sepharose column (5 \times 15 cm) pre-equilibrated with 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.2, containing ammonium sulfate to 30% saturation. The column was washed with 100 ml of the same buffer, and the protein was eluted using a 600-ml linear gradient from the equilibrating buffer to 20 mM potassium phosphate, pH 7.2. Fractions con-

taining SHMT, detected spectrophotometrically, pooled, and concentrated using centrifuge concentrators (30 kDa cut-off; Vivaspin, Sartorius) to a volume of about 20 ml, were heat-treated for 15 min at 75 °C to precipitate most of the host cell proteins. After centrifugation at 15,000 $\times g$ for 30 min, the supernatant containing *mj*SHMT and a few other proteins was loaded onto a DEAE-Sepharose column (3 \times 10 cm) that had been equilibrated with 20 mM potassium phosphate, pH 7.2. The column was washed with 100 ml of the same buffer, and the protein was then eluted with a 500-ml linear gradient of 0-0.4 M NaCl in 20 mM phosphate buffer, pH 7.2. Fractions were pooled and concentrated as in the previous step. The purity of the *mj*SHMT sample was checked by SDS-PAGE and judged to be $\geq 98\%$. The protein concentration was determined measuring the absorbance at 280 nm and using a $\epsilon_{280} = 34990 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, calculated according to Ref. 10.

Molecular Mass Estimation by Size-exclusion Chromatography—The molecular mass of the native enzyme was estimated by size-exclusion chromatography at 20 °C on a Superose 12 column (Amersham Biosciences), eluted at a flow rate of 0.4 ml/min with 20 mM sodium phosphate, pH 7.2, containing 0.15 M NaCl, controlled by a Dionex pump. Elution was monitored at 280 and 226 nm. The Superose column was calibrated with horse spleen apoferritin (440 kDa, elution volume $V_e = 8.0$ ml), catalase (232 kDa, $V_e = 9.1$ ml), rabbit muscle aldolase (158 kDa, $V_e = 9.3$ ml), BSA (67 kDa, $V_e = 9.8$ ml), egg albumin (43 kDa, $V_e = 10.4$ ml), chymotrypsin (25 kDa, $V_e = 12$ ml), and ribonuclease (13.7 kDa, $V_e = 12.5$ ml). V_e of the purified SHMT was 9.6 ml.

Molecular Mass Estimation by Analytical Ultracentrifugation—All experiments were conducted at 20 °C on a Beckman Optima XL-A analytical ultracentrifuge equipped with absorbance optics. The protein concentration was in the range of 0.2 to 1.0 mg/ml. Sedimentation velocity experiments were done at 40,000 rpm. Data were collected at 280 nm at a spacing of 0.005 cm with three averages in a continuous scan mode and were analyzed with the program Sedfit (11). Sedimentation coefficients were corrected to $s_{20,w}$ using standard procedures. Sedimentation equilibrium experiments were performed at 16,000, 19,000 and 22,000 rpm. Data were collected at 280 nm at a spacing of 0.001 cm with 10 averages in a step scan mode. Establishment of equilibrium was checked by comparing scans up to 24 h. Data sets were edited with REEDIT (J. Lary, National Analytical Ultracentrifugation Center, Storrs, CT) and fit with NONLIN (PC version provided by E. Braswell, National Analytical Ultracentrifugation Center, Storrs, CT) (12). Data from different speeds were combined for global fitting. Fits to a single species give a Z-average molecular weight. For fits to a monomer-dimer association scheme, the monomer molecular weight was fixed at the value determined from the amino acid sequence. The experiments were performed in 20 mM phosphate buffer, pH 7.2, and in 20 mM sodium formate, pH 3.0, containing 200 μM DTT and 100 μM EDTA.

Kinetic Studies—With serine and H₄MPT as substrates, the rate of 5,10-methylene-H₄MPT production was determined by oxidizing this compound to 5,10-methenyl-H₄MPT, using NADP⁺ and methylene-H₄MPT dehydrogenase from *M. extorquens* AM1. The initial rate of the reaction, carried out in 75 mM potassium phosphate, pH 7.4, at 37 °C,

Serine Hydroxymethyltransferase from *Methanococcus jannaschii*

41791

was calculated from the absorbance change at 340 nm because of NADPH and methenyl- H_4 MPT formation, using a value of $\epsilon_{340} = 27\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ (13). The same procedure was employed when H_4 PteGlu was the pteridine substrate, except that the coupled enzyme employed in the assay was the bifunctional methylene- H_4 PteGlu dehydrogenase/methenyl- H_4 PteGlu cyclohydrolase from *E. coli*, and the ϵ_{340} used in the calculation was $7200\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ (8). The reaction mixture included *mj*SHMT at either $0.1\ \mu\text{M}$, when H_4 MPT was the pteridine substrate, or $14\ \mu\text{M}$, when H_4 PteGlu was used. Kinetic parameters were determined either under anaerobic conditions (N_2 pressure equal to 0.3 bar) or in the presence of air, varying the concentration of one substrate while the second was kept constant. The dependence of the initial velocity of the reaction on H_4 MPT concentration was determined maintaining L-serine at 30 mM and varying H_4 PteGlu concentration between 0.162 and 0.45 mM. H_4 MPT was 0.162 mM when serine was varied between 0.09 and 30 mM. The formaldehyde was measured mixing aliquots of the reaction mixture, taken at time intervals, with an equal volume of 0.2% (w/v) 2,4-dinitrophenyl hydrazine in 1 M HCl. The resulting colored solution was diluted in 1 M HCl and used to measure the increase in absorbance at 380 nm because of the formation of a dinitrophenyl hydrazone derivative. For this derivative, a calibration curve, obtained previously using commercial formaldehyde, gave a $\epsilon_{380} = 57120\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$.

Retroaldol cleavage reactions were carried out in 20 mM potassium phosphate, pH 7.2. The rate of *allo*-threonine cleavage was measured by coupling the reaction with reduction of the product acetaldehyde by NADH and thermostable alcohol dehydrogenase from *T. brockii* (14). The rate of the reaction was calculated from the rate of decrease in absorbance at 340 nm, using a value of $\epsilon_{340} = 6220\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$. Benzaldehyde production from phenylserine cleavage was measured spectrophotometrically at 279 nm, using a molar absorptivity value of $\epsilon_{279} = 1400\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ (15). The rate of transamination with both alanine enantiomers was determined according to Ref. 16. Kinetic data analysis, curve-fitting procedures, and statistical analysis were performed using the data manipulation software of Scientist (Micromath, Salt Lake City, UT).

Spectroscopic Techniques—Fluorescence emission measurements were carried out at 20 °C with a LS50B spectrofluorimeter (PerkinElmer Life Sciences) using a 1-cm path length quartz cuvette. Intrinsic fluorescence emission spectra were recorded from 300–450 nm (1-nm sampling interval) with the excitation wavelength set at 295 nm. PLP emission fluorescence was monitored between 330 and 600 nm exciting at 285, 320, and 418 nm.

CD spectra were recorded at 20 °C in a Jasco J-720 spectropolarimeter. Far-UV-CD spectra (190–250 nm) were measured in a 0.1-cm path length quartz cuvette, and near-UV-CD spectra (250–310 nm) and visible-CD spectra (310–500 nm) were measured in a 1.0-cm path length quartz cuvette. The results are expressed as the mean residue ellipticity ($[\theta]$) assuming a mean residue weight of 110 Da per amino acid residue. In all the spectroscopic measurements, 200 μM DTT and 100 μM EDTA were added unless otherwise stated. UV-visible spectra were recorded with a double-beam Lambda 16 PerkinElmer Life Sciences spectrometer equipped with a Peltier thermocontroller set at 20 °C.

Urea-induced Unfolding Equilibrium—Protein samples, at 0.12 mg/ml final concentration, were incubated at 20 °C with increasing concentrations of urea (0–7.9 M) in 20 mM sodium phosphate, pH 7.2, or in 20 mM sodium formate, pH 3.0, in the presence of 200 μM DTT and 100 μM EDTA. After 24 h, a time that was tested to be sufficient to reach equilibrium, far-UV-CD spectra were recorded at 20 °C. To probe the reversibility of the unfolding process, the protein (1.9 mg/ml) was incubated at 20 °C with 7.9 M urea in 20 mM formate, pH 3.0, in the presence of 3.2 mM DTT and 1.6 mM EDTA. After 24 h, the refolding was started by a 16-fold dilution with the same buffer used for the unfolding, containing decreasing denaturant concentrations. The final protein concentration was 0.12 mg/ml. After 2 h, a time that was established to be sufficient to reach equilibrium, far-UV-CD spectra were recorded at 20 °C.

Data Analysis—Far-UV-CD spectra from urea titration were analyzed by the singular value decomposition algorithm (SVD) (17–19) using the software MATLAB (MathWorks, South Natick, MA). SVD is useful to find the number of independent components in a set of spectra and to remove the high-frequency noise and the low-frequency random error. CD spectra in the 210–250-nm region (0.2-nm sampling interval) were placed in a rectangular matrix **A** of *n* columns, one column for each spectrum collected in the titration. The **A** matrix is decomposed by SVD into the product of three matrices: **A** = **U****S****V**^T, where **U** and **V** are orthogonal matrices, and **S** is a diagonal matrix. The columns of **U** matrix contain the basis spectra, and those of the **V** matrix contain the

denaturant dependence of each basis spectrum. Both **U** and **V** columns are arranged in terms of their decreasing order of the relative weight of information, as indicated by the magnitude of the singular values in **S**. The diagonal **S** matrix contains the singular values that quantify the relative importance of each vector in **U** and **V**. An important feature of SVD analysis is that the signal-to-noise ratio is very high in the earliest columns of **U** and **V**, and the random noise is mainly accumulated in the latest **U** and **V** columns. The wavelength averaged spectral changes induced by increasing denaturant concentrations are represented by the columns of matrix **V**. Therefore, the plot of the columns of **V** versus the denaturant concentration provides information about the observed transition.

Urea-induced equilibrium unfolding was analyzed by fitting baseline and transition region data to a two-state linear extrapolation model (20) according to Equation 1, where $\Delta G_{\text{unfolding}}$ is the free energy change of unfolding for a given denaturant concentration, $\Delta G^{\text{H}_2\text{O}}$ is the free energy change of unfolding in the absence of denaturant, and *m* is a slope term that quantitates the change in $\Delta G_{\text{unfolding}}$ per unit concentration of denaturant, *R* is the gas constant, *T* is the absolute temperature, and $K_{\text{unfolding}}$ is the equilibrium constant for unfolding.

$$\Delta G_{\text{unfolding}} = \Delta G^{\text{H}_2\text{O}} + m[\text{urea}] = -RT \ln K_{\text{unfolding}} \quad (\text{Eq. 1})$$

The model expresses the signal as a function of denaturant concentration, shown in Equation 2, where y_i is the observed signal, y_N and y_D are the native and denatured baseline intercepts, m_N and m_D are the native and denatured baseline slopes, $[X]_i$ is the denaturant concentration after the *i*th addition, $\Delta G^{\text{H}_2\text{O}}$ is the extrapolated free energy of unfolding in the absence of denaturant, *m* is the slope of a *G* unfolding versus $[X]$ plot, *R* is the gas constant, and *T* is the absolute temperature.

$$y_i = \frac{y_N + m_N[X]_i + (y_D + m_D[X]_i) \exp\left(\frac{-\Delta G^{\text{H}_2\text{O}} - m[X]_i}{RT}\right)}{1 + \exp\left(\frac{-\Delta G^{\text{H}_2\text{O}} - m[X]_i}{RT}\right)} \quad (\text{Eq. 2})$$

The $[\text{urea}]_{0.5}$ is the denaturant concentration at the midpoint of the transition and, according to Equation 1, is calculated as shown in Equation 3.

$$[\text{urea}]_{0.5} = \Delta G^{\text{H}_2\text{O}}/m \quad (\text{Eq. 3})$$

RESULTS

Purification of *mj*SHMT and Molecular Mass Estimation—Purification was performed on 15-g portions of wet bacterial cell paste deriving from 2 liters of culture. A 20-fold purification of the enzyme with a yield of 10 mg per liter of culture was obtained. The purified enzyme exhibited a single band on SDS-PAGE when stained with Coomassie blue and, on analytical ultracentrifugation, sedimented as a single, sharp, and symmetrical peak (see below). *mj*SHMT, whose predicted subunit size based on the amino acid sequence is 48.2 kDa, eluted in 20 mM sodium phosphate, pH 7.2, from a calibrated size-exclusion chromatography column (Superose 12) with an elution volume corresponding to a protein of 98 kDa, suggesting that the enzyme is a dimer at neutral pH.

Catalytic Properties of *mj*SHMT—The SHMT activity of the enzyme was assayed at 37 °C, using either H_4 MPT or H_4 PteGlu as pteridine substrate. Such a sub-optimal temperature was required by the use of methylene- H_4 MPT dehydrogenase from *M. extorquens* AM1 as the coupling enzyme in the assay. Activity, which was measured upon mixing 0.1 μM enzyme with 4 mM L-serine and 50 μM of either pteridine substrates, could only be detected when using H_4 MPT. The dependence of the steady-state rate of the reaction on substrates concentration conformed to the Michaelis-Menten equation, with best fit values of kinetic parameters as summarized in Table I. The addition of 20 mM magnesium acetate to the reaction mixture did not increase activity, differently from that reported for the enzyme from *M. marburgensis* (4). The same experiment was repeated under anaerobic conditions, obtaining similar values for the kinetic parameters, and showing that, interestingly, the reaction is not negatively affected by oxygen.

Activity could actually be measured also when using

41792

Serine Hydroxymethyltransferase from *Methanococcus jannaschii*

TABLE I

Kinetic parameters of the reactions catalysed by *mjSHMT*Kinetic constants are the average of at least three determinations. The range of values was always less than $\pm 10\%$.

Reaction	K_m mM	k_{cat} min ⁻¹	k_{cat}/K_m min ⁻¹ mM ⁻¹
SHMT			
L-serine	0.8 ^a	212	265
H ₄ MPT	0.1 ^a	212	2122
H ₄ PteGlu	N.D. ^b	N.D.	5.2 ^c
Retroaldol cleavage ^d			
L- <i>allo</i> -Threonine	1.3	687	528
D,L- <i>threo</i> -3-Phenylserine	95	3576	37.6

^a Apparent K_m values calculated from experiments in which the concentration of one substrate was varied whereas the second substrate was fixed at high concentration.^b N.D., not determined.^c Calculated as reported in the text.^d Reactions were carried out at 60 °C.

H₄PteGlu, but only if the enzyme was present in the assay at a much higher concentration (14 μ M). In this case, the dependence of the steady-state velocity on the pteridine substrate was linear on a range from 0 to 150 μ M. Higher H₄PteGlu concentrations could not be employed without incurring problems with the assay. Activity did not change significantly when measured under anaerobic conditions. The specificity constant with H₄PteGlu could be calculated, because the observed linear relationship between substrate concentration and initial velocity is evidence that under the conditions of the assay $K_m \gg [S]$, and therefore the Michaelis-Menten equation can be reduced to $v_0 = k_{cat}/K_m \cdot [E_0] \cdot [S]$. H₄PteGlu is known to react spontaneously with formaldehyde (21). Therefore, there was a possibility that the SHMT reaction we observed with H₄PteGlu was actually because of the retroaldol cleavage of serine, followed by the spontaneous condensation between the product formaldehyde and the folate to form 5,10-methylene-H₄PteGlu. To check this hypothesis, we repeated the experiment under the same conditions but in the absence of H₄PteGlu. No formaldehyde could be detected, confirming that the SHMT reaction involving H₄PteGlu takes place on the enzyme. The actual binding of H₄PteGlu to the enzyme was also demonstrated by the appearance of a typical 490-nm absorbing band, corresponding to a quinonoid intermediate (22), upon mixing 0.2 mM H₄PteGlu with 230 μ M enzyme and 70 mM glycine at 37 °C in 20 mM potassium phosphate, pH 7.2. Analogously, a quinonoid intermediate was visible after mixing 0.135 mM H₄MPT with 14 μ M enzyme and 70 mM glycine (data not shown).

The enzyme was also capable of catalyzing the retroaldol cleavage of L-*allo*-threonine and *threo*- β -phenylserine to glycine and the corresponding aldehyde (Table I). Addition of 200 mM of either L- or D-alanine to the enzyme resulted in a transamination reaction, as indicated by the decrease of absorbance at 424 nm and the concomitant formation of a new absorption band with a maximum at 324 nm. The 498-nm absorbing band, corresponding to a quinonoid intermediate, which is observed with the *E. coli* enzyme (16), is absent in the reaction catalyzed by *mjSHMT*. The kinetics of both reactions, which were carried out at 60 °C, fitted well to the sum of two first-order processes. With D-alanine, the rapid phase exhibited a $k = 0.42$ min⁻¹ and was responsible for about 3/4 of the total absorbance change, whereas the slow phase had a $k = 0.054$ min⁻¹. With L-alanine, the fast phase corresponded to a $k = 0.092$ min⁻¹ and 1/3 of the total amplitude; the slow phase had a $k = 0.001$ min⁻¹. Although *eSHMT* transaminates both alanine enantiomers with single first order kinetics, the reaction of D-alanine is also faster with this enzyme (k is 0.038 min⁻¹ with D-alanine and 0.014 min⁻¹ with L-alanine).

Temperature Dependence of Enzyme Activity—The tempera-

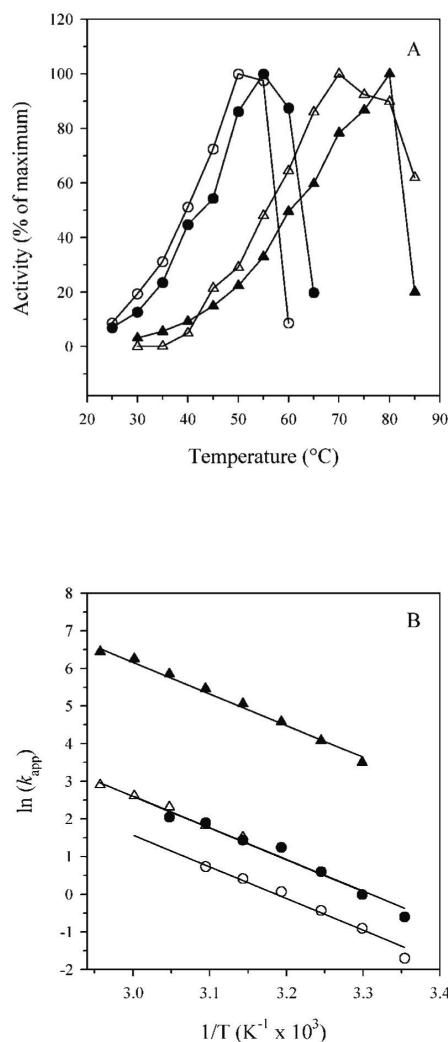


FIG. 2. **Temperature dependence of enzyme activity.** A, the activity of *mjSHMT* (triangles) and *eSHMT* (circles) in the retroaldol cleavage of L-*allo*-threonine was assayed at various temperatures. The steady-state velocity of the reaction was measured either under virtually saturating conditions (25 mM substrate; closed symbols) or at about 4% of saturation (0.055 mM substrate; open symbols). Measurements were carried out over the first minute from the beginning of the reaction, during which linearity was always observed. B, Arrhenius plot for the apparent catalytic constant of the reaction.

ture dependence of the rate of retroaldol cleavage of L-*allo*-threonine was determined, using either *eSHMT* or *mjSHMT* as catalyst, over the range from 25 to 85 °C (Fig. 2A). The steady-state velocity of the reaction was measured both under virtually saturating conditions (25 mM substrate) and at about 4% of saturation (0.055 mM substrate). The reaction catalyzed by *mjSHMT* was found to have an optimal temperature 20–25 °C higher than that catalyzed by the *E. coli* enzyme. Saturation with the substrate had a stabilizing effect on the activity of both enzymes. Data were used in a global fit to the Arrhenius equation in which the activation energy (estimated to be equal to 70.00 ± 2.10 kJ/mol) was a shared parameter (Fig. 2B).

Urea-induced Unfolding Equilibrium—The equilibrium stability of *mjSHMT* was studied by monitoring urea-induced unfolding transitions. At neutral pH, in the presence of 10 M

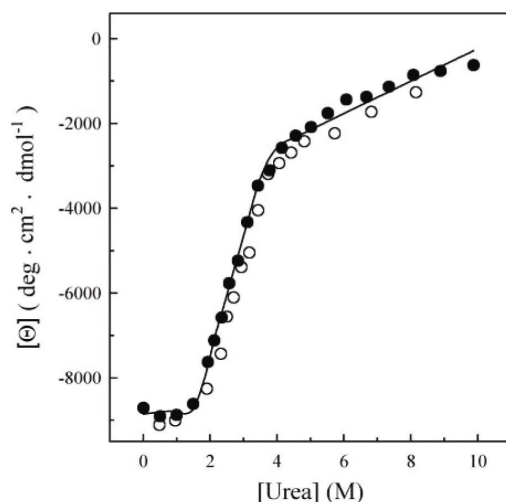


FIG. 3. Urea-induced unfolding/refolding equilibrium of *M. jannaschii* SHMT. Far UV-CD spectra were recorded after 24 h of incubation in 20 mM formate, pH 3.0, at 20 °C at the indicated urea concentrations, at a protein concentration of 0.12 mg/ml. The solid line results from a non-linear regression analysis using Equation 2. Reversibility points (○) were not included in the non-linear regression analysis.

urea, 42% residual ellipticity at 222 nm was still present after 24 h at 20 °C, thus indicating that the enzyme structure was not abolished (data not shown). No further changes were observed after 48 h. These results prompted us to explore the effect of urea at acidic pH, with the aim of finding the conditions required for complete and reversible unfolding transitions. At pH 3.0 a single monomeric species is present, as indicated by analytical ultracentrifugation experiments, with a secondary structure content similar to that of the enzyme at pH 7.2 (see below). These observations encouraged us to analyze the effect of urea on *mj*SHMT at pH 3.0. Increasing urea concentrations (0–10 M) induced structural changes on the enzyme, as revealed by far-UV-CD spectra, and above 6 M the dichroic activity was reduced significantly with a transition midpoint at 2.56 M (Fig. 3). The process was completely reversible, as indicated by the recovery of the dichroic activity after dilution of the denaturant, with ΔG and m values corresponding to 13.43 kJ/mol and 5.23 kJ/mol/M, respectively. The ellipticity changes at 222 nm induced by increasing concentrations of urea were analyzed after removal of the high-frequency noise and the low-frequency random error by SVD. The global changes in the spectral region from 210 to 250 nm were analyzed by SVD, which indicates that only two spectral components contribute to the far-UV-CD spectra. The most significant singular values are 1.7×10^5 , 0.2×10^5 , and 0.03×10^5 . All the other singular values are well below 10% of the largest singular value and progressively decrease approaching to zero. A plot of the first and the second columns of the \mathbf{V} matrix (\mathbf{V}_1 and \mathbf{V}_2) as a function of urea concentration (data not shown) shows transition profiles comparable with those observed by monitoring the 222-nm ellipticity changes.

Spectroscopic and Analytical Ultracentrifugation Analyses—The secondary, tertiary, and quaternary arrangement of the enzyme at pH 7.2 was investigated and compared with that at pH 3.0, with the aim of detecting possible structural changes caused by the low pH necessary to reversibly denature the enzyme. The far-UV-CD spectrum at pH 7.2 is typical of a predominantly α -helix protein (Fig. 4A). At pH 3.0, the far-UV-CD spectrum of the holoenzyme is characterized by a profile similar to that at pH 7.2 with the same zero intercept and

$\Theta_{222}/\Theta_{208}$ ratio and a slight general decrease of ellipticity compared with that at neutral pH (Fig. 4A). In the near-UV region, the dichroic activity of the enzyme at pH 3.0 is notably decreased in comparison with the enzyme at pH 7.2, and the 289-nm Trp band is absent (Fig. 4B). At pH 3.0, the 420- and 325-nm bands, present in the UV-visible CD spectrum of the holoenzyme at neutral pH and attributable to the PLP cofactor, are absent (Fig. 4C). The UV-visible absorption spectrum at pH 3.0 shows a 3-fold decrease of the absorbance at 420 nm, when compared with that of the holoenzyme at pH 7.2 (Fig. 4D).

The intrinsic fluorescence emission spectra of the holoenzyme at pH 7.2 and 3.0, measured upon excitation at 295 nm, are similar and show the same maximum emission wavelength at 347 nm (Fig. 4E). At pH 7.2, as observed with other PLP enzymes in the holo-form (23–25), excitation at either 320 or 418 nm yields fluorescence emission spectra with maxima centered, respectively, at 386 nm and 494 nm (Fig. 5, A and B). A faint energy transfer band at about 510 nm is observed when exciting at 285 nm (Fig. 5A, inset). At pH 3.0, the fluorescence emission spectra of the holoenzyme (Fig. 5, A and B) excited at 320 and 418 nm are centered at the same maximum emission wavelength, although a dramatic decrease of the relative fluorescence is observed upon excitation at 418 nm. At pH 3.0, the 510-nm energy transfer band is absent (Fig. 5A, inset).

The relative content of the secondary structure elements in solution, estimated by SELCON 2 (26) using the software DICROPROT v2.5 on the far-UV-CD spectra, at pH 7.2 and 3.0, was at least 98% and corresponded to 36 and 28% α -helix, 14 and 18% β -sheet, 22 and 24% turns, 8% polyproline II, and 20% of other structures, respectively. The relative amount of α and β structures was also consistent with that determined by K2D program (27) and SELCON 3 (28). These results indicate that at pH 3.0 the SHMT relative secondary structure composition is closely similar to that at pH 7.2. Secondary structure prediction according to Ref. 29 indicates 50% α -helix, 16% extended, and 34% loops.

The spectral properties of the monomer at pH 3.0 indicate that the dissociation of the dimer into monomers is accompanied by remarkable changes of the tertiary contacts, as indicated by the near-UV and visible CD signals, and suggest that the secondary structure content of the monomer is similar to that of the dimeric enzyme.

Sedimentation velocity experiments yielded an $s_{20,w}$ value of 6.2 for the enzyme at pH 7.0 and 3.9–4.3 at pH 3.0. Such values correspond to molecular masses of 100 kDa and 50–55 kDa, respectively, for proteins with a spherical shape (30). Equilibrium sedimentation experiments confirmed such results, yielding molecular mass values of 53 ± 4 kDa at pH 3.0 and 80 ± 10 kDa at pH 7.2, when data were fitted to a single species. A very poor fit was obtained for a monomer-dimer association-dissociation scheme at both pH values. Taken together, the performed analyses strongly indicate that the protein is mainly dimeric at neutral pH and dissociates almost entirely into monomers at pH 3.0.

DISCUSSION

SHMT has been isolated from several sources and extensively characterized, from both the structural and functional points of view (31). Crystal structures of the enzyme from five different eubacterial and eukaryotic sources, either in the unliganded form or in complex with amino substrates and H_4 PteGlu analogues, have been solved (32–36). Therefore, a clear picture of the amino acid residues which form the active site and are involved in cofactor and substrate binding is available. A recent, theoretical analysis on the structural features of archaeal SHMTs proposed that the environment of the PLP cofactor in these enzymes exhibits no significant differences

41794

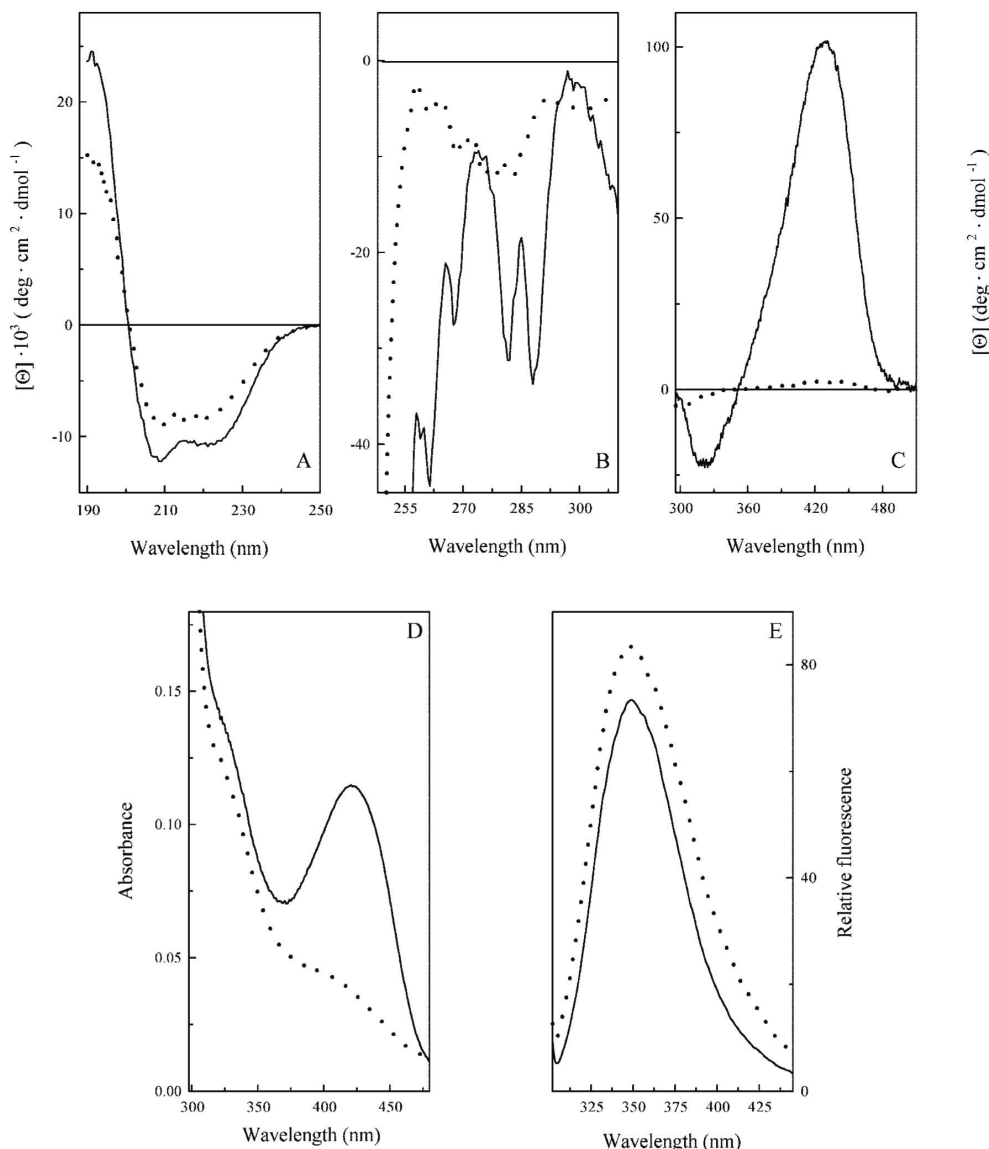
Serine Hydroxymethyltransferase from *Methanococcus jannaschii*

FIG. 4. Spectral properties of *M. jannaschii* SHMT. A, far-UV-CD spectra were recorded in a 0.1-cm quartz cuvette at 0.13 mg/ml protein concentration. B and C, near-UV and visible-CD spectra were recorded in a 1-cm quartz cuvette at 1.2 mg/ml protein concentration. D, UV-visible spectra were recorded at 2.0 mg/ml. E, fluorescence emission spectra were recorded at 0.13 mg/ml protein concentration (295-nm excitation wavelength). *mj*SHMT in 20 mM sodium phosphate, pH 7.2, is represented by solid lines and in 20 mM sodium formate, pH 3.0, is represented by dotted lines. All the spectra were recorded at 20 °C after 24 h incubation of the protein at the indicated pH values in the presence of 200 μ M DTT and 100 μ M EDTA.

with respect to their bacterial and eukaryotic counterparts (3). SHMT is characterized by very broad reaction and substrate specificities. In addition to its physiological hydroxymethyltransferase activity, this enzyme is able to catalyze, in the absence of the pteridine substrate, a number of different reactions such as the retroaldol cleavage of β -hydroxyamino acids and the transamination of both alanine enantiomers (31). Our results show that the catalytic properties of *mj*SHMT match those of the enzyme purified from other sources and therefore confirm that the PLP catalytic apparatus of SHMT is substantially conserved throughout the kingdoms. A multiple sequence alignment of eubacterial and archaeal SHMTs (the numbering system is based on the amino acid sequence of eSHMT) shows

indeed that all residues interacting with PLP are invariant (Fig. 6): His¹²⁶ and Ala²⁰², the residues that stack, respectively, to the *re* face and *si* face of PLP, His¹²⁹ and Asn¹⁰², which appear to stabilize the crucial interaction between Asp²⁰⁰ and the pyridinium nitrogen of PLP, and His²⁰³ and Ser¹⁷⁵, which interact with the phenol oxygen of PLP pyridine ring. The residues involved in the binding of the amino acid substrates are also invariant: Glu⁵⁷, and Tyr⁶⁵, (the apostrophe indicates that the residues are contributed from the other subunit), which appear to interact with the hydroxyl group of the PLP-bound serine substrate, and Arg³⁶³ and Ser³⁵, which bind to the α -carboxylate of the substrates. On the other hand, the selectivity of *mj*SHMT toward H₄MPT reflects the presence of a

Serine Hydroxymethyltransferase from *Methanococcus jannaschii*

41795

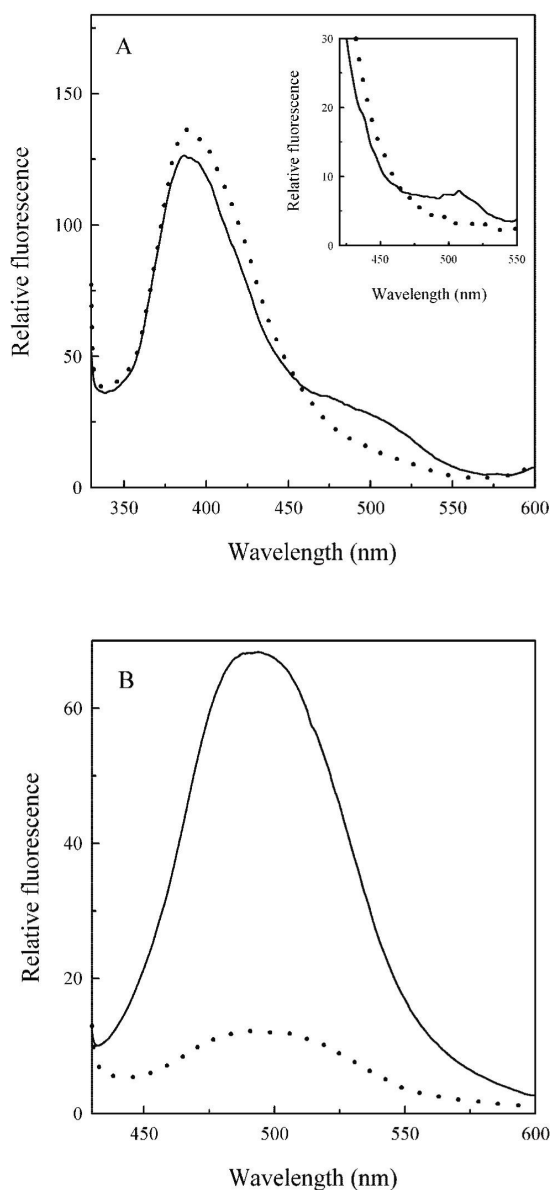


FIG. 5. Fluorescence emission spectra of *M. jannaschii* SHMT. Spectra were recorded at 2.7 mg/ml protein concentration with the excitation wavelength set at 320 nm (A) and 418 nm (B) in 20 mM sodium phosphate, pH 7.2 (solid lines), and in 20 mM formate, pH 3.0 (dotted lines). The inset shows the fluorescence emission spectrum monitored at 0.2 mg/ml upon excitation at 285 nm. All the spectra were recorded at 20 °C.

specific binding site of the pteridine substrate and clearly represents a distinguishing feature. Interestingly, $H_4PteGlu$ can also bind to m_jSHMT and take part to the hydroxymethyltransferase reaction, although 450-fold less efficiently than H_4MPT . This suggests that significant differences between H_4MPT -dependent and $H_4PteGlu$ -dependent SHMTs may be limited to only the pteridine binding site. Crystallographic studies have shown that the pteridine substrate binds to the enzyme from different eubacterial and eukaryotic sources with similar modalities, although the stoichiometry and subunit occupancy for

the binding is different for each of the four structures solved so far (34, 35, 36, 38). Asn^{347} , which binds to N-1 and N-8 of $H_4PteGlu$, is probably the most important structural element in the pteridine ring recognition. Another important interaction is made by Tyr^{64} , which stacks to the *p*-aminobenzoic acid ring of $H_4PteGlu$. Other interactions are made by the backbone carbonyls of residues 121, 125, and 127. The portion of the active site that binds the pteridine ring, *i.e.* the moiety of the molecule that is similar in all different pteridine substrates, is expected to be structurally similar in all SHMTs. Asn^{347} is indeed an invariant residue (Fig. 6). Tyr^{64} is present in all aligned sequences except those corresponding to SHMT from methanogens, which have a Leu residue at this position. However, this difference does not seem to be related to the nature of the pteridine substrate, because *Pyrococcus* SHMTs use a modified folate whose pteridine ring is identical to that of H_4MPT (2). Identification of the residues responsible for the pteridine substrate specificity is actually difficult. Apparent differences in the primary structure of SHMTs from methanogens that use H_4MPT (note that *Methanosarcina* SHMT is an exception in methanogens, because it is $H_4PteGlu$ -dependent (39)) with respect to the eubacterial and eukaryotic enzymes (Fig. 6) may be related to the particular phylogenetic history of these organisms, rather than to a specific function. Moreover, the available structures of SHMT in complex with $H_4PteGlu$ derivatives do not give any clue of how the distinctive portion of the pteridine substrates may bind to the enzyme, and modeling studies did not locate structural elements involved in this specific binding (3).

M. jannaschii is an obligate anaerobe and therefore it is expected that oxygen might affect the hydroxymethyltransferase reaction catalyzed by m_jSHMT . We tested the effect of oxygen by performing kinetic studies under both aerobic and anaerobic conditions and using either H_4MPT or $H_4PteGlu$ as pteridine substrate. Surprisingly, the presence of oxygen does not seem to affect significantly the kinetic parameters of the reaction.

The temperature dependence of the enzyme activity in the *allo*-threonine aldolase reaction shows that with either m_jSHMT or *eSHMT* the saturation with substrate has a stabilizing effect (Fig. 2A). This is in agreement with previously reported studies on the interactions of substrates and substrate analogues with cytosolic rabbit SHMT, which suggested that the binding of β -hydroxyamino acids results in a conformational change of the enzyme (40). The activation energy of the *allo*-threonine aldolase reaction calculated from the Arrhenius plots appears to be the same for both enzymes. Taken together, these results confirm that m_jSHMT is quite similar in several respects to the enzyme from mesophilic sources.

Notably, m_jSHMT is fairly resistant to denaturation. At pH 3.0, the protein shows a global secondary structure content similar to the native dimeric form with a significant perturbation of the tertiary structure, as revealed by the near-UV and visible CD spectra and the PLP fluorescence emission spectrum, accompanied by loss of the dimeric assembly. This finding may indicate that electrostatic interactions play a significant role in the stabilization of the dimer. The ΔG of the monomer secondary structure unfolding is below the lowest limit reported for many globular proteins from mesophiles, whereas the transition midpoint is at 2.56 M denaturant, a value similar to that reported for the dimeric *E. coli* enzyme at neutral pH (41). This fact indicates that the monomeric protein can tolerate high concentrations of denaturant without showing a remarkable conformational stability at 20 °C. Interestingly, the notable resistance of the enzyme against urea-induced denaturation is shown by the persistence of a significant

41796

Serine Hydroxymethyltransferase from *Methanococcus jannaschii*

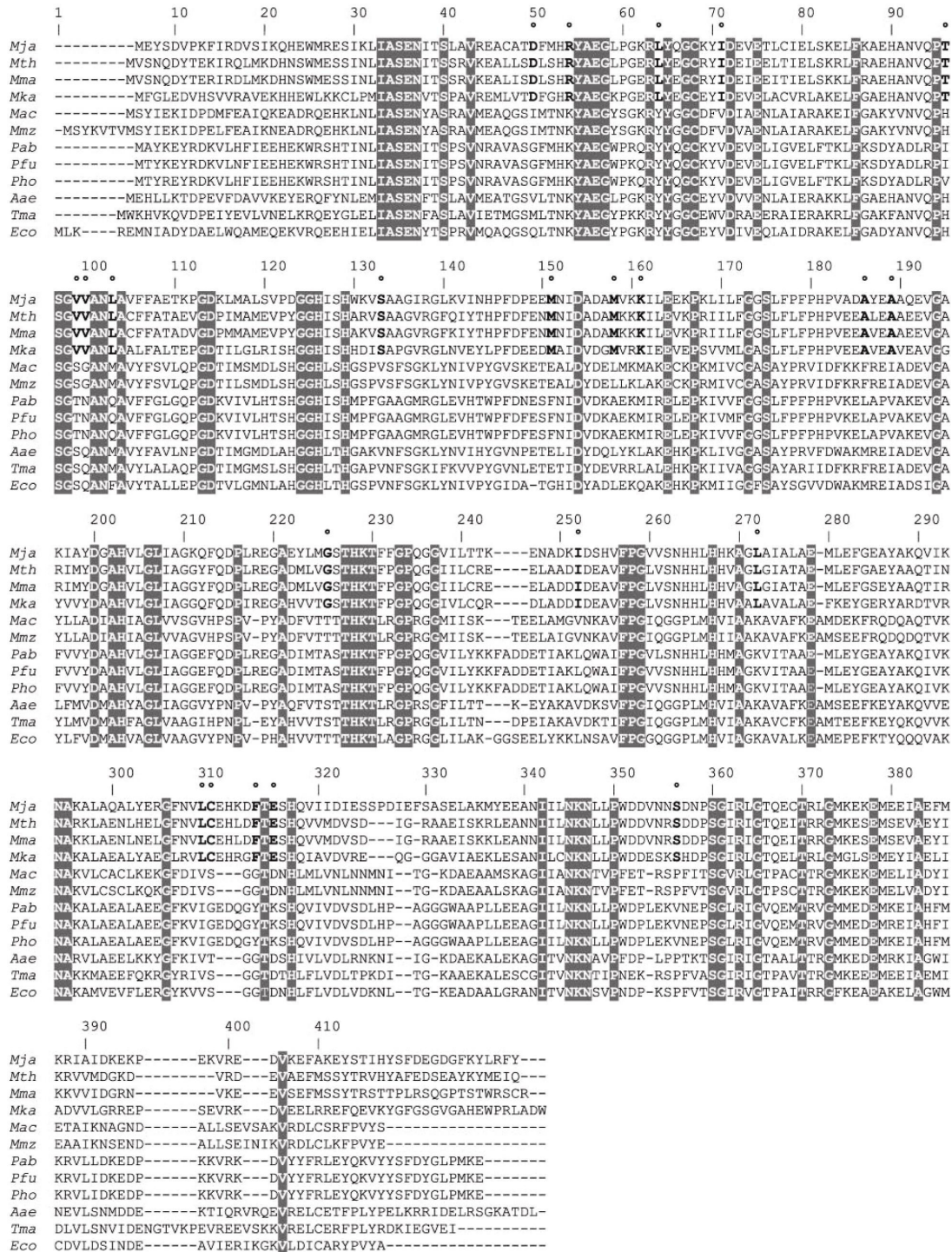


FIG. 6. Multiple-sequence alignment of SHMTs from eubacterial and archaeal organisms. The multiple-sequence alignment was obtained employing the T-Coffee server (37) at www.ch.embnet.org/software/TCoffee.html. Dashes represent insertions or deletions. Numbers above the sequences are relative to the sequence numbering of eSHMT. Amino acid one-letter code is used. The invariant residues are displayed in gray boxes. Residues that appear to be invariant only in methanogens SHMTs that use H₂MPT are in boldface and are indicated by a circle above the sequences (○). The name of the microorganisms selected for the sequence alignment and their SwissProt accession numbers are as follows: *Mja*, *M. jannaschii* Q58992; *Mth*, *M. thermoautotrophicum* O27433; *Mma*, *M. marburgensis* P50436; *Mka*, *Methanopyrus kandleri* Q8TZ19; *Mac*, *Methanosarcina acetivorans* Q8TK94; *Mmz*, *Methanosarcina mazei* Q8PZQ0; *Pab*, *Pyrococcus abyssi* Q9V1B2; *Pfu*, *Pyrococcus furiosus* Q8U039; *Pho*, *Pyrococcus horikoshii* O59347; *Aae*, *Aquifex aeolicus* O66776; *Tma*, *Thermotoga maritima* Q9WZH9; *Eco*, *Escherichia coli* P00477.

Serine Hydroxymethyltransferase from *Methanococcus jannaschii*

41797

amount of secondary structure in the presence of 10 M urea at pH 7.2. Therefore, the monomeric state of *mj*SHMT at pH 3.0 should be considered a protein resistant against urea-induced denaturation rather than a stable protein (42).

A recent structural comparison between SHMT from mesophilic and thermophilic sources, carried out through the application of homology modeling, indicated that the thermal stability in SHMT may be the result of the combination of an increased number of charged residues at the protein surface and an increased hydrophobicity at the protein core (3). The experimental results obtained with *mj*SHMT agree with these hypotheses.

Acknowledgments—We thank Professors Verne Schirch and Rolf Thauer for help during the writing of the manuscript and for helpful discussions. We are grateful to Eprova AG, Schaffhausen, Switzerland, for kindly providing pure (6S) H₄PteGlu.

REFERENCES

- Schirch, L. (1984) in *Folates and Pterins* (Blakley, R. L., and Benkovic, S. J., eds) Vol I, pp. 399–431, John Wiley & Sons, Inc., New York
- Maden, B. E. (2000) *Biochem. J.* **350**, 509–529
- Paiardini, A., Gianese, G., Bossa, F., and Pascarella, S. (2003) *Proteins* **50**, 122–134
- Hoyt, J. C., Oren, A., Escalante-Semerena, J. C., and Wolfe, R. S. (1986) *Arch. Microbiol.* **145**, 153–158
- Wasserfallen, A., Nolling, J., Pfister, P., Reeve, J., and Conway de Macario, E. (2000) *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**, 43–53
- Delle Fratte, S., White, R. H., Maras, B., Bossa, F., and Schisch, V. (1997) *J. Bacteriol.* **179**, 7456–7461
- White, R. H. (1991) *J. Bacteriol.* **173**, 1987–1991
- Schirch, V., Hopkins, S., Villar, E., and Angelaccio, S. (1985) *J. Bacteriol.* **163**, 1–7
- Fu, T. F., di Salvo, M., and Schirch, V. (2001) *Anal. Biochem.* **290**, 359–365
- Gill, S. C., and von Hippel, P. H. (1989) *Anal. Biochem.* **182**, 319–326
- Schuck, P., and Rossmanith, P., (2000) *Biopolymers* **54**, 328–341
- Johnson, M. L., Correia, J. J., Yphantis, D. A., and Halvorson, H. R. (1981) *Biophys. J.* **36**, 575–588
- Vorholt, J. A., Chistoserdova, L., Lidstrom, M. E., and Thauer, R. K. (1998) *J. Bacteriol.* **180**, 5351–5356
- Schirch, V., and Peterson, D. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 7801–7806
- Ulevitch, R. J., and Kallen, R. G. (1977) *Biochemistry* **16**, 5342–5350
- Shostak, K., and Schirch, V. (1988) *Biochemistry* **27**, 8007–8014
- Henry, E. R., and Hofrichter, J. (1992) *Methods Enzymol.* **210**, 129–192
- Ionescu, R. M., Smith, V. F., O'Neill, J. C., Jr., and Matthews, C. R. (2000) *Biochemistry* **39**, 9540–9550
- Johnson, W. C., Jr. (1992) *Methods Enzymol.* **210**, 426–447
- Santoro, M. M., and Bolen, D. W. (1988) *Biochemistry* **27**, 8063–8068
- Chen, M. S., and Schirch, L. (1973) *J. Biol. Chem.* **248**, 7979–7984
- Schirch, L. V., and Jenkins, T. (1964) *J. Biol. Chem.* **239**, 3801–3806
- Arrio-Dupont, M. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **44**, 653–659
- Bertoldi, M., Cellini, B., Clausen, T., and Borri Voltattorni, C. (2002) *Biochemistry* **41**, 9153–9164
- Shaltiel, S., and Cortijo, M. (1970) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **41**, 594–600
- Deléage, G., and Geourjon, C. (1993) *Comp. Appl. Biosci.* **9**, 197–199
- Andrade, M. A., Chacon, P., Merelo, J. J., and Moran, F. (1993) *Protein Eng.* **6**, 383–390
- Sreerama, N., and Woody, R. W. (1994) *J. Mol. Biol.* **242**, 497–507
- Rost, B. (1996) *Methods Enzymol.* **266**, 525–539
- Wyman, J., Jr., and Ingalls, E. N. (1943) *J. Biol. Chem.* **147**, 297–318
- Schirch, V. (1998) in *Comprehensive Biological Catalysis* (Sinnott, M., ed) Vol. 1, pp. 211–252, Academic Press, San Diego, CA
- Renwick, S. B., Snell, K., and Baumann, U. (1998) *Structure* **6**, 1105–1116
- Scarsdale, J. N., Kazanina, G., Radaev, S., Schirch, V., and Wright, H. T. (1999) *Biochemistry* **38**, 8347–8358
- Scarsdale, J. N., Radaev, S., Kazanina, G., Schirch, V., and Wright, H. T. (2000) *J. Mol. Biol.* **296**, 155–168
- Szebenyi, D. M. E., Xiaowen, L., Kriksunov, I. A., Stover, P., and Thiel, D. J. (2000) *Biochemistry* **39**, 13313–13323
- Trivedi, V., Gupta, A., Jala, V. R., Saravanan, P., Jagannatha Rao, G. S., Appaji Rao, N., Savithri, H. S., and Subramanya, H. S. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 17161–17169
- Notredame, C., Higgins, D., and Heringa, J. (2000) *J. Mol. Biol.* **302**, 205–217
- Fu, T. F., Scarsdale, J. N., Kazanina, G., Schirch, V., and Wright, H. T. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 2645–2653
- Lin, Z., and Sparling, R. (1998) *Can. J. Microbiol.* **44**, 652–656
- Schirch, V., Shostak, K., Zamora, M., and Gautam-Basak, M. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 759–764
- Cai, K., Schirch, D., and Schirch, V. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 19294–19299
- Myers J. K., Pace, N. C., and Scholtz, M. J. (1995) *Protein Sci.* **4**, 2138–2148

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Bärbel Anni Buchenau
Geburtsdatum:	21. Dezember 1976
Geburtsort:	Bad Hersfeld
Familienstand:	ledig

Schulbildung

August 1983 bis Juni 1987	Grundschule in Wildeck-Obersuhl
August 1987 bis Juni 1993	Blumensteinschule in Wildeck-Obersuhl
August 1993 bis Juni 1996	Gymnasiale Oberstufe an der Jakob-Grimm-Schule in Rotenburg a. d. Fulda
Juni 1996	Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

seit Oktober 1996	Studium der Biologie an der Philipps-Universität in Marburg
Oktober 1998	Vordiplom
September 2000	Diplomprüfung in den Fächern Mikrobiologie, Genetik, Virologie/Biochemie
September bis Dezember 2000	Auslandsstudium an der University of Oxford in England (Sokrates/Erasmus-Stipendium)
Januar bis September 2001	Anfertigung der Diplomarbeit am Max-Planck- Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. R. K. Thauer mit dem Thema „Gibt es Tetrahydrofolat-spezifische Enzyme in methanogenen Archaea und Tetrahydromethanopterin-spezifische Enzyme in acetogenen Bacteria?“
Oktober 2001 bis Oktober 2004	Anfertigung der Dissertation im Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. R. K. Thauer

Dank

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Rudolf K. Thauer für die Anregung zu dieser Arbeit, die hilfreichen Diskussionen und die Unterstützung während meiner Diplom- und Doktorarbeit.

Dr. Markus Krüer und Dr. Gerd Mander möchte ich für die hilfreichen Tipps, die Einarbeitung in molekularbiologische Methoden und die wertvollen Ratschläge in „HPLC-technischen“ Fragen danken.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Thauer, Shima und Hedderich danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft und angenehme Zusammenarbeit. Für die freundliche Unterstützung und technische Hilfe während der Laborarbeit bin ich Frau Manuela Kauß, Frau Steffi Lindow, Frau Melanie Sordel-Klippert, Frau Johanna Moll und Herrn Jürgen Koch sowie den Mitarbeitern der Haustechnik, insbesondere Herrn Horst Henseling, sehr dankbar. Gleichmaßen danke ich Herrn Jörg Kahnt für die Einführung in die MALDI/TOF-Massenspektrometrie und den Herren Dr. Manfred Irmeler und Reinhard Böcher für die Hilfe in computertechnischen Fragen.

Ein großes Dankeschön gilt Frau Monika Schmidt für das Korrekturlesen von Abstracts, Postern und verschiedenen Manuskripten. Für mich sind Sie die gute Seele unserer Arbeitsgruppe, sorgen stets für die notwendige moralische Unterstützung und sind in ihrem Engagement unübertroffen.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die mich in jeder Hinsicht unterstützt haben und ohne deren Rückhalt ich vieles nicht erreicht hätte.

Der Max-Planck-Gesellschaft und der Deutschen Forschungsgemeinschaft, durch deren Mittel diese Arbeit gefördert wurde, möchte ich ebenfalls danken.

Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich meine Dissertation mit dem Titel

**Tetrahydrofolat-spezifische Enzyme
im Baustoffwechsel von *Methanosarcina barkeri*
sowie die Rolle von Folsäure und *p*-Aminobenzoesäure
als Wachstumsfaktoren in diesem Archaeon**

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Ort, Datum

Unterschrift

