

# **NMR-spektroskopische Untersuchungen zu Protein-Ligand-Wechselwirkungen**

**DISSERTATION**

zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften  
der Johann Wolfgang Goethe – Universität  
in Frankfurt am Main  
vorgelegt von

Stefan Bartoschek  
aus Hamburg

Frankfurt 2001

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von April 1997 bis August 2001 am Max-Planck-Institut für Terrestrische Mikrobiologie in Marburg an der Lahn und im Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der Johann Wolfgang Goethe – Universität in Frankfurt am Main unter der Leitung von Professor Dr. R. Thauer und Professor Dr. C. Griesinger durchgeführt.

Vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der Johann Wolfgang Goethe – Universität in Frankfurt am Main als Dissertation angenommen am:

Tag der mündlichen Prüfung:

Erstgutachter: Professor Dr. C. Griesinger

Zweitgutachter: Professor Dr. R. Thauer

Meinen Eltern gewidmet

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	1
Zusammenfassung .....	2
Einleitung .....	4
A Methanbildung und Methanoxidation (Kapitel 1-4) .....	6
Methanogene Archaea .....	6
Methylotrophe Bakterien .....	9
B Bindung von Ubichinon an den Cytochrom <i>bc<sub>1</sub></i> Komplex (Kapitel 5) .....	12
1 <i>N</i> -Carboxymethanofuran (Carbamat) Bildung aus Methanofuran und CO <sub>2</sub> in methanogenen Archaea: Thermodynamik und Kinetik der spontanen Reaktion .....	17
1.1 Problemstellung .....	17
1.2 Proben- und Meßbedingungen .....	18
1.3 Methode und Auswertung .....	19
1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse .....	22
1.5 Veröffentlichung: <i>N</i> -Carboxymethanofuran (carbamate) formation from methanofuran and CO <sub>2</sub> in methanogenic archaea: thermodynamics and kinetics of the spontaneous reaction .....	25
2 Die <i>Re</i> -Seiten Stereospezifität von <i>N</i> <sup>5</sup> , <i>N</i> <sup>10</sup> -Methylenetetrahydromethanopterin- und <i>N</i> <sup>5</sup> , <i>N</i> <sup>10</sup> -Methylenetetrahydrofolat-abhängigen-Dehydrogenasen ist vorherbestimmt durch intrinsische Eigenschaften des Substrats .....	36
2.1 Problemstellung .....	36
2.2 Proben- und Meßbedingungen .....	37
2.3 Methode und Auswertung .....	39
2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse .....	40
2.5 Veröffentlichung: <i>Re</i> -face stereospecificity of methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenases and methylenetetrahydrofolate dehydrogenases is predetermined by intrinsic properties of the substrate .....	46
3 Bestimmung der <i>Re</i> -Seiten Stereospezifität von NADP-abhängiger <i>N</i> <sup>5</sup> , <i>N</i> <sup>10</sup> -Methylenetetrahydromethanopterin-Dehydrogenase (MtdA) aus <i>Methylobacterium extorquens</i> AM1 mittels NMR-Spektroskopie .....	59
3.1 Problemstellung .....	59
3.2 Proben- und Meßbedingungen .....	60
3.3 Methode und Auswertung .....	61

3.5	Veröffentlichung: <i>Re</i> -face stereospecificity of NADP-dependent methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase from <i>Methylobacterium extorquens</i> AM1 as determined by NMR spectroscopy .....	65
4	Ein Glutathion-abhängiges Formaldehyd-aktivierendes-Enzym (Gfa) aus <i>Paracoccus denitrificans</i> entdeckt und gereinigt mit Hilfe von EXSY .....	70
4.1	Problemstellung.....	70
4.2	Proben- und Meßbedingungen .....	71
4.3	Methode und Auswertung .....	72
4.4	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	75
5	Drei Ubichinonmoleküle sind für die Energiekonservierung im Cytochrom <i>bc<sub>1</sub></i> Komplex der Atmungskette essentiell.....	78
5.1	Problemstellung.....	78
5.2	Proben- und Meßbedingungen .....	78
5.3	Methode und Auswertung .....	80
5.4	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	84
5.5	Veröffentlichung: Three ubiquinone molecules essential for energy conservation by respiratory cytochrome <i>bc<sub>1</sub></i> complex .....	90
	Diskussion .....	109
	Literaturverzeichnis.....	113
	Anhang .....	118

## Abkürzungsverzeichnis

CIDNP	Chemically Induced Dynamic Nuclear Polarisation
COSY	Correlated Spectroscopy
DQF	Double Quantum Filtered
EXSY	Exchange Spectroscopy
F <sub>420</sub>	7,8-Didemethyl-8-Hydroxy-5-Deazaribofalvin-Derivat, Coenzym F <sub>420</sub>
FchA	N <sup>5</sup> ,N <sup>10</sup> -Methenyltetrahydrofolat-Cyclohydrolase
F-DH	Formiat-Dehydrogenase
Fhs	Formyltetrahydrofolat-Synthetase
FID	Free Induction Decay
Fmd	Formylmethanofuran-Dehydrogenase
Gfa	Glutathion-abhängiges Formaldehyd-aktivierendes-Enzym
GD-FALDH	Glutathion-abhängige Formaldehyd-Dehydrogenase
GSH	Glutathion
GSCH <sub>2</sub> OH	S-Hydroxymethylglutathion
H <sub>4</sub> MPT	5,6,7,8-Tetrahydromethanopterin
H <sub>4</sub> F	5,6,7,8-Tetrahydrofolat
Hmd	H <sub>2</sub> -bildende Methylen-H <sub>4</sub> MPT-Dehydrogenase
HR-MAS	High Resolution - Magic Angle Spinning
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
M-DH	Methanol-Dehydrogenase
MFR	Methanofuran
Mtd	F <sub>420</sub> -abhängige Methylen-H <sub>4</sub> MPT-Dehydrogenase
MtdA	NADP-abhängige Methylen-H <sub>4</sub> MPT-Dehydrogenase
MtdB	NAD(P)-abhängige Methylen-H <sub>4</sub> MPT-Dehydrogenase
Orf	Open reading frame
NOE	Nuclear Overhauser Enhancement
<i>pro-R</i>	chemischer Deskriptor
<i>pro-S</i>	chemischer Deskriptor
TROSY	Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy
Xfilter	<sup>1</sup> H-Spektrum, das nach dem Kern X gefiltert wird

## Zusammenfassung

In der vorliegenden Doktorarbeit wurden die folgenden fünf biochemischen Fragestellungen zu Enzymen und deren Wechselwirkungen mit ihren Substraten mit NMR-spektroskopischen Methoden untersucht:

(1) Die spontane Bildungsrate von *N*-Carboxymethanofuran (Carbamat) aus CO<sub>2</sub> und Methanofuran im Gleichgewicht und die Beeinflussung der Geschwindigkeit durch Formylmethanofuran-Dehydrogenase aus *Methanosarcina barkeri* wurden über 2D-Protonenaustausch-Spektroskopie (EXSY) bestimmt. Mit Hilfe der berechneten Geschwindigkeitskonstanten und der bekannten physiologischen Konzentrationen von CO<sub>2</sub> und Methanofuran konnte erstmals gezeigt werden, daß die spontane Carbamatbildungsrate ausreicht, um die *in vivo*-CO<sub>2</sub>-Reduktionsraten in methanogenen Archaea erklären zu können.

(2) Die Konformation von *N*<sup>5</sup>,*N*<sup>10</sup>-Methylen tetrahydromethanopterin (Methylen-H<sub>4</sub>MPT) in Anwesenheit und in Abwesenheit H<sub>2</sub>-bildender Methylen-H<sub>4</sub>MPT-Dehydrogenase aus *Methanothermobacter marburgensis* wurde über Transfer-NOE-Messungen bestimmt. Es wurde nachgewiesen, daß die Bindung zu einer Konformationsänderung des Substrats führt, welche die *Re*-Seiten-Stereospezifität des Enzyms erklären kann.

(3) Die Stereospezifität des Hydridtransfers von Methylen-H<sub>4</sub>MPT auf NADP<sup>+</sup>, katalysiert von NADP-abhängiger Methylen-H<sub>4</sub>MPT-Dehydrogenase aus *Methylobacterium extorquens* AM1, wurde NMR-spektroskopisch untersucht. In Übereinstimmung mit der unter (2) entwickelten Theorie zum Übergangszustand des Hydridtransfers wurde gefunden, daß auch der Transfer auf NADP<sup>+</sup> *Re*-Seiten-spezifisch in Bezug auf Methylen-H<sub>4</sub>MPT verläuft. Zusätzlich wurde gezeigt, daß das Enzym das Hydrid auf die *Re*-Seite von NADPH überträgt.

(4) Die spontane Rate der Kondensationsreaktion von Glutathion und Formaldehyd zu *S*-Hydroxymethylglutathion wurde mit EXSY-Messungen bestimmt. In Zellextrakten des methylotrophen Proteobakteriums *Paracoccus denitrificans* wurde eine Enzymaktivität nachgewiesen, die diese Reaktion beschleunigt. Bislang wurde vermutet, daß es eine solche Enzymaktivität nicht gibt. Mit EXSY-Messungen konnte nicht nur diese Enzymaktivität nachgewiesen werden, sondern es gelang auch das verantwortliche Enzym, das Glutathion-

abhängiges Formaldehyd-aktivierendes-Enzym (Gfa) genannt wurde, erstmals zu reinigen und das kodierende Gen zu identifizieren.

(5) Die Anzahl der Ubichinon-Bindungsstellen des Cytochrom *bc<sub>1</sub>* Komplexes aus *Bos bovis* wurde bestimmt. Dafür wurde eine NMR-Methode entwickelt, die es ermöglicht, Bindungsstudien von wasserunlöslichen Cofaktoren an membranständigen Proteinen durchzuführen. Über die Aufnahme und Integration von <sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C-HSQC-Spektren unter Verwendung von HR-MAS-NMR konnte die Konzentration des Ubichinons, das in der Proteoliposomenmembran frei beweglich ist, quantifiziert werden. Verdrängungsstudien mit spezifischen Inhibitoren ermöglichten es dann, durch den Vergleich der freigesetzten Ubichinonkonzentrationen relativ zu der Cytochrom *bc<sub>1</sub>* Komplexkonzentration nachzuweisen, daß insgesamt drei Ubichinone spezifisch an den Cytochrom *bc<sub>1</sub>* Komplex binden.

Die Ergebnisse werden in 5 Abschnitten beschrieben. Im Anhang zu jedem Abschnitt finden sich die Abdrucke der bereits erschienenen Veröffentlichungen (Abschnitte 1 bis 3) und ein zur Veröffentlichung akzeptiertes Manuskript (Abschnitt 5). In der Einleitung werden die Möglichkeiten aufgezeigt, mit modernen NMR-spektroskopischen Methoden Protein-Ligand-Wechselwirkung zu studieren. In der Diskussion werden anhand der Ergebnisse die Limitierung, aber auch das noch nicht ausgeschöpfte Potential dieser Methoden erläutert.

Während der Doktorarbeit wurden auch Untersuchungen zu den katalytischen Eigenschaften einer energiekonservierenden Hydrogenase aus *M. barkeri* durchgeführt. Die daraus entstandene Publikation ist im Anhang zu finden.



## Einleitung

Die NMR-Spektroskopie ist eine leistungsfähige und vielseitige Methode zur Strukturuntersuchung von Molekülen, deren methodische und apparative Fortschritte immer noch vorangetrieben werden. Vor allem biochemische Fragestellungen speziell zu Protein-Ligand-Wechselwirkungen machen eine Weiterentwicklung der Methode notwendig. Derartige Fragestellungen können zwar auch durch die Kristallographie, die IR-Spektroskopie, die UV/VIS-Spektroskopie, ESR-Messungen, Fluoreszenzmessungen und eine Reihe weiterer Methoden untersucht werden, jedoch zeichnet sich die NMR-Spektroskopie durch ihre besondere Bandbreite aus. Sie liefert Informationen von globalen Parametern bis hin zur atomaren Auflösung, sowohl von dynamischen Prozessen als auch von statischen Zuständen, von Reinsubstanzen und Substanzgemischen. Bereits einfache eindimensionale Protonenspektren (1D-Protonen-NMR-Spektren) ermöglichen oftmals durch Integration von Signalen die Bestimmung von Konzentrationen. Durch Untersuchung der chemischen Verschiebungsdispersion können Aussagen über den globalen Faltungszustand von Proteinen und durch die Auswertung von Kopplungen über die Konformation von Molekülen getroffen werden. Linienbreitenanalyse ermöglicht die Bestimmung von Austauschreaktionen oder intramolekularer Dynamik. Durch die Aufnahme zeitaufgelöster Spektren können Kinetiken verfolgt werden. Die Anwendung der Fourier-Transformation, die insbesondere eine Empfindlichkeitssteigerung von Heterokernmessungen brachte, ermöglichte es beispielsweise Stoffwechselwege durch selektive Markierung von Ausgangssubstanzen aufzuklären und neue Produkte bezüglich ihrer Struktur zu charakterisieren. Durch die Entwicklung der mehrdimensionalen NMR-Spektroskopie gelang es die Überlagerung von Protonenresonanzen durch Korrelation mit der chemischen Verschiebung von Homo- oder auch Heterokernen aufzuheben.

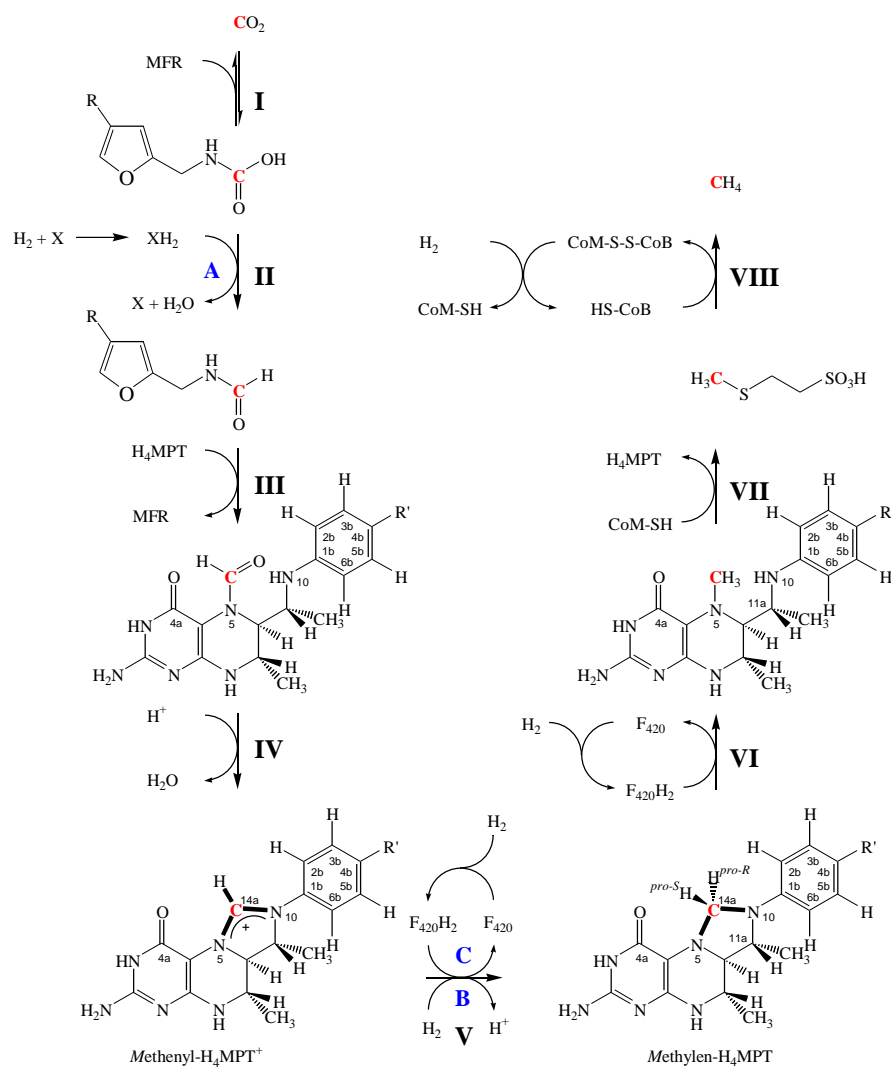
In Kapitel A der vorliegenden Arbeit wird die Methanbildung und Methanoxidation und in Kapitel B die Atmungskette vorgestellt. In Anlehnung an diese Themenkomplexe wurden verschiedene biochemische Fragestellungen zu Protein-Ligand-Wechselwirkungen untersucht. Die Arbeit ist nach den verschiedenen Fragestellungen untergliedert; die Problemstellung wird am Anfang jedes Teils vorgestellt. Im Anschluß daran werden jeweils die NMR-spektroskopisch bedingten Probenbedingungen beschrieben und mit den *in vivo* Bedingungen verglichen. Die dafür durchgeführten NMR-Messungen und erhaltenen Ergebnisse werden jeweils kurz vorgestellt. Am Ende der einzelnen Kapitel sind die

ausführlichen Publikationen und Manuskripte zu den einzelnen Fragestellungen enthalten. In der Diskussion wird aufbauend auf den gewonnenen Erfahrungen auf Stärken und Schwächen der NMR-Spektroskopie hingewiesen.

## A Methanbildung und Methanoxidation (Kapitel 1-4)

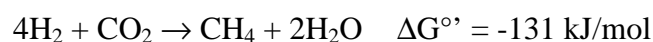
### Methanogene Archaea

Am ubiquitären C<sub>1</sub>-Stoffwechselweg von Bakterien, Eukaryonten und einigen Archaea ist als einziger Cofaktor die Tetrahydrofolsäure (H<sub>4</sub>F) beteiligt. Zusätzlich gibt es einen C<sub>1</sub>-Stoffwechselweg strikt anaerober methanogener Archaea, die ihre Energie ausschließlich durch den Stoffwechsel der Methanogenese gewinnen. Sie sind die einzigen bekannten Organismen, die Methan (CH<sub>4</sub>) als kataboles Endprodukt bilden (siehe Abb. 1).



**Abb. 1:** Schematische Darstellung der Methanogenese aus CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> in *Methanothermobacter marburgensis* (früher *Methanobacterium thermoautotrophicum*) [1]. MFR, Methanofuran (R = 4-[N-(4,5,7-tricarboxyheptanoyl-γ-L-glutamyl-γ-L-glutamyl)-p-(β-aminoethyl)phenoxy)methyl]) [2]; X, unbekannter Elektronenakzeptor; H<sub>4</sub>MPT, 5,6,7,8-Tetrahydromethanopterin; F<sub>420</sub> ist ein Deazariboflavin; CoM-SH, Coenzym M; CoB-SH, Coenzym B; A-C, Enzyme: (A) Formylmethanofuran-Dehydrogenase (Fmd); (C) F<sub>420</sub>-abhängige Methyl-H<sub>4</sub>MPT-Dehydrogenase (Mtd); (B) H<sub>2</sub>-bildende Methyl-H<sub>4</sub>MPT-Dehydrogenase [3].

Die so produzierte Menge an Methan wird weltweit auf ca.  $10^9$  Tonnen pro Jahr geschätzt [4-6]. Ungefähr ein Drittel des  $\text{CH}_4$  stammt aus der Umsetzung von  $\text{H}_2$  und  $\text{CO}_2$ , welches von den meisten bekannten Archaea als einzige Energie- und Kohlenstoffquelle genutzt werden kann [7]. Die Reduktion von  $\text{CO}_2$  mit  $\text{H}_2$  erfolgt dabei sukzessiv über  $\text{C}_1$ -Intermediate, die an die Coenzyme Methanofuran (MFR), Tetrahydromethanopterin ( $\text{H}_4\text{MPT}$ ) und Coenzym M (HS-CoM) gebunden sind [8, 9]. Unter Standardbedingungen ist die Umsetzung von  $\text{CO}_2$  zu  $\text{CH}_4$  mit einem Energiegewinn von  $-131$  kJ/mol verbunden :



Bei physiologischen Konzentrationen verringert sich dieser Wert auf  $-30$  kJ/mol. Der erste Schritt der Reduktion von  $\text{CO}_2$  zu  $\text{CH}_4$  ist die Bildung von *N*-Carboxymethanofuran (Carbamat) aus Methanofuran (MFR) und  $\text{CO}_2$  (siehe **I** in Abb. 1) [10]. Carbamate bilden sich spontan und reversibel als Folge des nukleophilen Angriffs von ungeladenen Aminen an  $\text{CO}_2$ . Mit den in Kapitel 1 beschriebenen EXSY-Messungen wurde bestimmt, ob es sich bei der Carbamatbildung aus  $\text{CO}_2$  und Methanofuran zusätzlich um eine enzymkatalysierte Reaktion handelt. Die in Kapitel 1 anhand der spontanen Carbamatbildung in der Methanogenese etablierte Methode zur Untersuchung von Gleichgewichtsreaktionen wurde ebenfalls dazu genutzt, eine neue Enzymaktivität in *Paracoccus denitrificans* nachzuweisen (siehe Kapitel 4). Der folgende Schritt der Methanogenese, die Reduktion des Carbamats zu Formylmethanofuran (siehe **II** in Abb. 1), wird von Formylmethanofuran-Dehydrogenase (**A** in Abb.1) katalysiert. Nach einer Übertragung der Formylgruppe auf  $\text{H}_4\text{MPT}$  (siehe **III** in Abb. 1) durch eine Transferase erfolgt dann der von  $N^5, N^{10}$ -Methenyltetrahydromethanopterin-Cyclohydrolase katalysierte Ringschluß zu  $N^5, N^{10}$ -Methenyltetrahydromethanopterin (Methenyl- $\text{H}_4\text{MPT}^+$ ) (siehe **IV** in Abb. 1). In Anwesenheit von molekularem Wasserstoff reagiert Methenyl- $\text{H}_4\text{MPT}^+$  reversibel zu  $N^5, N^{10}$ -Methylen tetrahydromethanopterin (Methylen- $\text{H}_4\text{MPT}$ ) und einem Proton (siehe **V** in Abb. 1). Diese Reaktion wird von zwei unterschiedlichen Enzymen katalysiert, von  $\text{F}_{420}$ -abhängiger Methylen- $\text{H}_4\text{MPT}$ -Dehydrogenase (Mtd; **C** in Abb. 1) und von  $\text{H}_2$ -bildender Methylen- $\text{H}_4\text{MPT}$ -Dehydrogenase (Hmd; **B** in Abb. 1). Die  $\text{H}_2$ -bildende Methylen- $\text{H}_4\text{MPT}$ -Dehydrogenase ist die einzige bekannte Hydrogenase, die in der Lage ist, Wasserstoff ohne vorherige Aktivierung durch ein Übergangsmetall zu spalten. Vor diesem Hintergrund wurde dieses Enzym in den letzten Jahren intensiv untersucht [11]. Es gelang eine Vorstellung für den katalytischen Mechanismus dieser Reaktion zu entwickeln, die experimentell überprüft

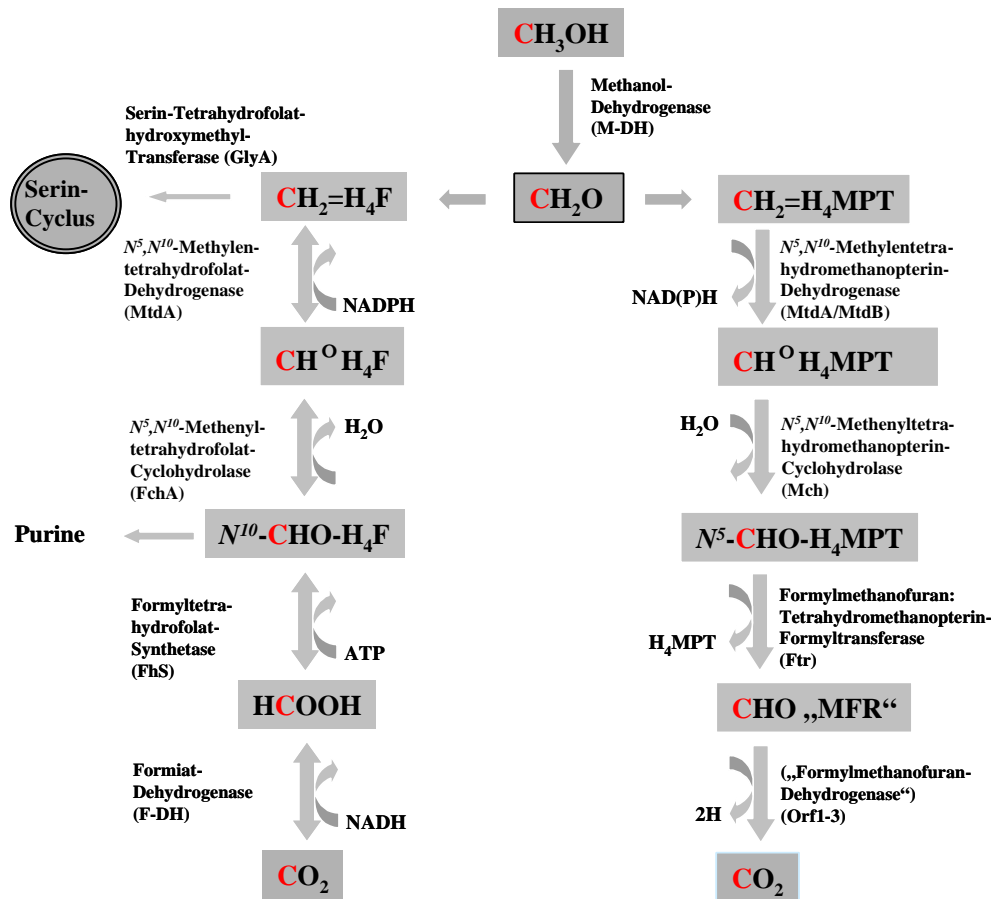
werden sollte. Anhand der in Kapitel 2 beschriebenen Transfer-NOE-Messungen gelang es, einen neuen Mechanismus zur Stereoselektivität dieser Reaktion aufzustellen, der auf intrinsischen Eigenschaften von Methylen- $H_4$ MPT basiert.

In den letzten drei enzymkatalysierten Reaktionsschritten (siehe Abbildung 1) erfolgt die Reduktion von Methylen- $H_4$ MPT zu  $N^5$ -Methyltetrahydromethanopterin (**VI**), der Transfer der Methylgruppe auf Coenzym M (**VII**) und die anschließende Reduktion der Methylgruppe zu Methan (**VIII**). Gleichzeitig wird bei der Reaktion **VIII** das Heterodisulfid CoM-S-S-CoB aus Coenzym M und Coenzym B gebildet.

## Methylotrophe Bakterien

### *Methylobacterium extorquens* AM1

Aerobe methylotrophe Bakterien wie *Methylobacterium extorquens* AM1 besitzen auch einen Energiestoffwechsel, der auf der Umwandlung von C<sub>1</sub>-Einheiten basiert. In *M. extorquens* AM1 findet man neben dem ubiquitären Tetrahydrofolat-abhängigen C<sub>1</sub>-Stoffwechselweg auch einen Tetrahydromethanopterin-abhängigen C<sub>1</sub>-Stoffwechselweg, der zum Teil aus Enzymen besteht, die Sequenzidentität zu Enzymen methanogener Archaea aufweisen [12] (siehe Abb. 2).

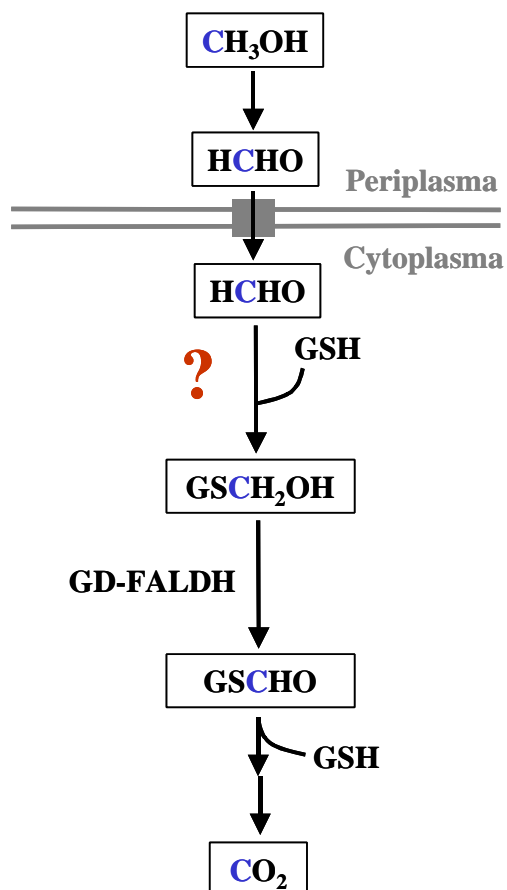


**Abb. 2: Postulierte oxidative C<sub>1</sub>-Stoffwechselwege in *Methylobacterium extorquens* AM1.** Bereits charakterisiert wurden Methanol-Dehydrogenase M-DH [13], NAD(P)-abhängige N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-Methylentetrahydromethanopterin-Dehydrogenasen MtdA und MtdB [14, 15], N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-Methenyltetrahydrofolat-Cyclohydrolase FchA [16], N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-Methenyltetrahydromethanopterin-Cyclohydrolase (Mch) [16], Formyltetrahydrofolat-Synthetase (Fhs) und Formiat-Dehydrogenase (F-DH) (M. Laukel, persönliche Mitteilung) sowie Formylmethanofuran:Tetrahydromethanopterin-Formyltransferase (Ftr) [17]. Anhand der Analyse des Bakteriengenoms gibt es Hinweise auf ein Vorhandensein eines Formylmethanofuran umsetzenden Enzyms (Orf1-3) (B. K. Pomper und J. A. Vorholt, persönliche Mitteilung). Die Cofaktoren Tetrahydromethanopterin (H<sub>4</sub>MPT) und Tetrahydrofolsäure (H<sub>4</sub>F) sind bereits nachgewiesen worden [14].

Dieser Organismus bietet somit ideale Voraussetzungen, um funktionelle Untersuchungen der beteiligten Cofaktoren und Enzyme durchzuführen und Erkenntnisse über die Bedeutung beider Wege zu gewinnen. Insbesondere die Dehydrogenasen, die in beiden C<sub>1</sub>-Stoffwechselwegen eine entscheidende und ähnliche Rolle spielen, bieten sich als Forschungsobjekte - z.B. bezüglich der Stereospezifität - an. Die kürzlich entdeckte NADP-abhängige *N*<sup>5</sup>,*N*<sup>10</sup>-Methylentetrahydromethanopterin-Dehydrogenase (MtdA) aus *M. extorquens* AM1 (siehe Abb. 2) katalysiert den Transfer eines Hydrids von *N*<sup>5</sup>,*N*<sup>10</sup>-Methylentetrahydromethanopterin (Methylen-H<sub>4</sub>MPT) auf NADP<sup>+</sup> [14, 15]. Zusätzlich katalysiert MtdA auch die Reaktion mit *N*<sup>5</sup>,*N*<sup>10</sup>-Methylentetrahydrofolat. Dies macht zusammen mit der Tatsache, daß MtdA phylogenetisch nicht mit den anderen drei bekannten Familien von Methylen-H<sub>4</sub>MPT-Dehydrogenasen und *N*<sup>5</sup>,*N*<sup>10</sup>-Methylentetrahydrofolat-Dehydrogenasen verwandt ist [14], die Besonderheit von MtdA aus. Zu einer dieser Familien gehört auch die untersuchte H<sub>2</sub>-bildende Methylen-H<sub>4</sub>MPT-Dehydrogenase, für die ein Mechanismus der katalysierten Reaktion bezüglich des Cofaktors Methylen-H<sub>4</sub>MPT entwickelt wurde (siehe Kapitel 2). Der Kern des Mechanismus ist die Vorstellung, daß die Stereospezifität eine intrinsische Eigenschaft von Methylen-H<sub>4</sub>MPT ist. Daher wurde die Stereospezifität der Reaktion für MtdA bestimmt und untersucht, ob diese im Einklang mit dem postulierten Mechanismus für die Stereospezifität des Hydridtransfers von Methylen-H<sub>4</sub>MPT auf NADP<sup>+</sup> steht, der von NADP-abhängiger Methylen-H<sub>4</sub>MPT-Dehydrogenase aus *Methylobacterium extorquens* AM1 katalysiert wird. Die Stereospezifität wurde NMR-spektroskopisch durch <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-HSQC-Messungen und <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H-COSY-Messungen bestimmt und ihre Bedeutung wird in einen Zusammenhang mit dem Mechanismus der metallfreien Dehydrogenase (siehe Kapitel 2) gestellt.

*Paracoccus denitrificans*

In *Paracoccus denitrificans* erfolgt die Oxidation von Methanol zu  $\text{CO}_2$  in einem Glutathion-abhängigen  $\text{C}_1$ -Stoffwechsel. Dabei entsteht Formaldehyd, das an Glutathion gebunden wird und als *S*-Hydroxymethylglutathion über eine  $\text{NAD}^+$ - und Glutathion-abhängige Formaldehyd-Dehydrogenase (GD-FALDH) oxidiert wird (siehe Abb. 3).



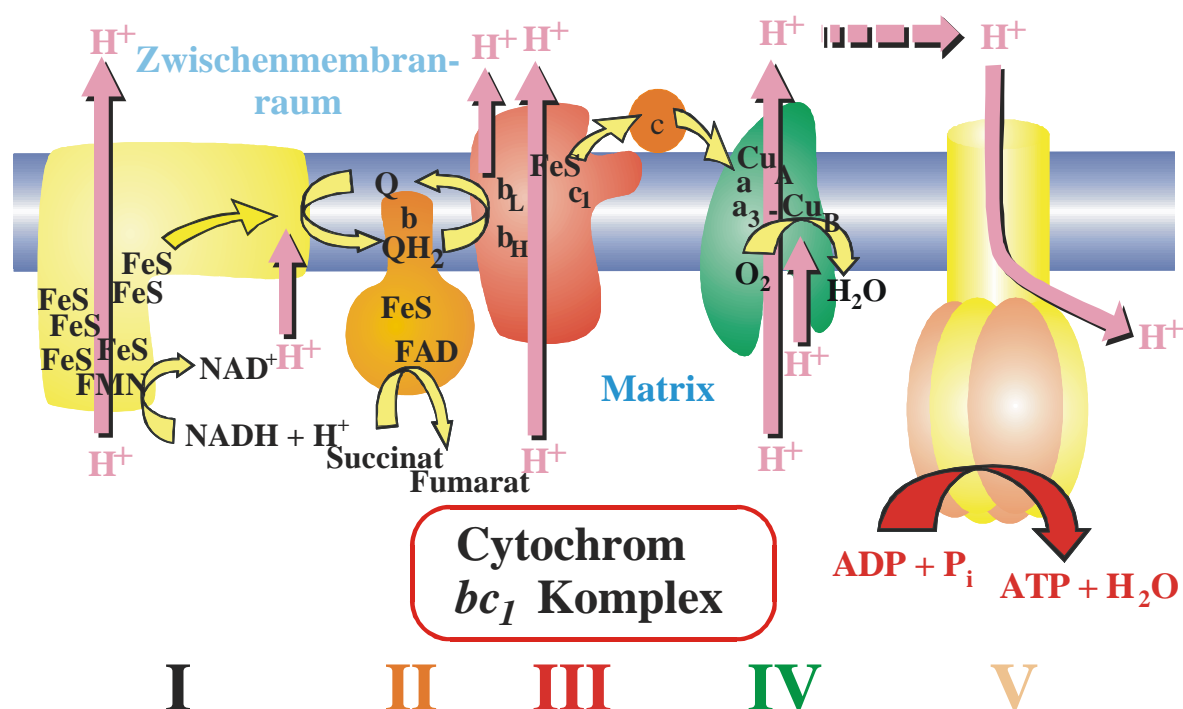
**Abb. 3:** Schematische Darstellung des oxidativen  $\text{C}_1$ -Stoffwechsels von *Paracoccus denitrificans*. (? , Reaktion, die auf eine neue Enzymaktivität hin untersucht wurde; GD-FALDH,  $\text{NAD}^+$ - und Glutathion-abhängige Formaldehyd-Dehydrogenase; GSH, Glutathion)

Die Bildung des Substrates *S*-Hydroxymethylglutathion ( $\text{GSCH}_2\text{OH}$ ) für die Dehydrogenierung erfolgt - ausgehend von Glutathion (GSH) und Formaldehyd ( $\text{H}_2\text{CO}$ ) - spontan und reversibel. Da es sich bei Formaldehyd um ein Zellgift handelt, wurde der Frage nachgegangen, ob es für diese Reaktion zusätzlich eine Enzymaktivität gibt. Unter Gleichgewichtsbedingungen wurde daher über EXSY analog zu Kapitel 1 die Geschwindigkeit dieser Reaktion bestimmt und auf die neue Enzymaktivität hin untersucht.



## B Bindung von Ubichinon an den Cytochrom $bc_1$ Komplex (Kapitel 5)

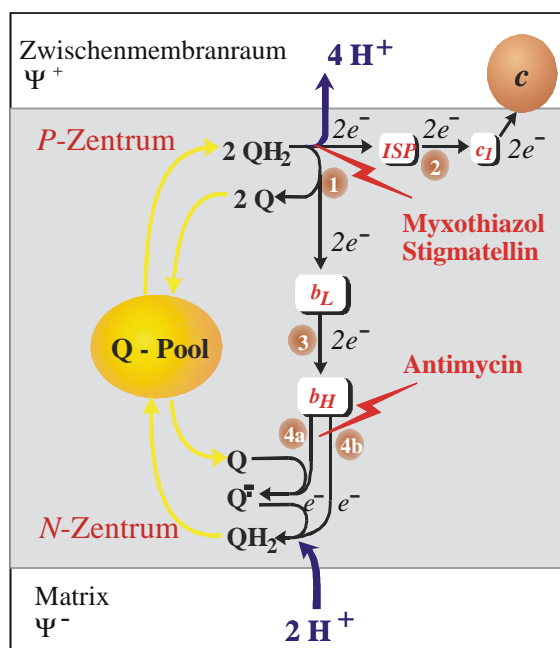
Bei der Glykolyse, der Fettsäureoxidation und im Citratcyclus werden Reduktionsäquivalente in Form von NADH und FADH<sub>2</sub> gespeichert, die jeweils ein Elektronenpaar mit sehr negativem Redoxpotential besitzen. Diese Elektronen werden in der Atmungskette auf molekularen Sauerstoff übertragen. Dabei wird Energie frei, die zur ATP-Synthese genutzt wird. Dieser Prozeß wird als oxidative Phosphorylierung bezeichnet; er liefert ATP in dem Ausmaß, wie Elektronen von NADH oder FADH<sub>2</sub> über eine Reihe von Elektronenüberträgern auf O<sub>2</sub> als terminalen Elektronenakzeptor übertragen werden (siehe Abb. 4).



**Abb. 4: Schema der Anordnung der Komplexe I-V der oxidativen Phosphorylierung.** Die Komplexe I und II katalysieren die Elektronenübertragung auf Ubichinon (Q). Der Elektronendonator des ersten Komplexes ist NADH und der des zweiten Komplexes ist Succinat. Komplex III, der Cytochrom  $bc_1$  Komplex, übernimmt die Elektronen vom Ubichinon und leitet sie an Cytochrom  $c$  weiter. Komplex IV beendet den Elektronentransfer durch die Übertragung der Elektronen von Cytochrom  $c$  auf Sauerstoff. Der durch die Komplexe I, III und IV aufgebaute Protonengradient über die innere Mitochondrienmembran (blau) wird anschließend vom Komplex V zur ATP-Synthese genutzt.

Komplex I, NADH-Dehydrogenase Komplex oder NADH-Coenzym-Q-Reduktase; Komplex II, Succinat-Dehydrogenase Komplex oder Succinat-Coenzym-Q-Reduktase; Komplex III, Cytochrom  $bc_1$  Komplex oder Ubichinon-Cytochrom  $c$ -Oxidoreduktase; Komplex IV, Cytochrom-Oxidase; Komplex V, ATP-Synthase; FeS, Eisen-Schwefel-Cluster; FMN, Flavin-adenin-mononukleotid; NADH, reduziertes Nicotinamadenindinukleotid; NAD<sup>+</sup>, Nicotinamadenindinukleotid; FAD, Flavin-adenin-dinukleotid; Q, Ubichinon, Coenzym Q; QH<sub>2</sub>, Dihydrourbichinon;  $b$ , Cytochrom  $b$ ;  $b_L$ , Cytochrom  $b$  mit einem Häm niedrigen Redoxpotentials;  $b_H$ , Cytochrom  $b$  mit einem Häm hohen Redoxpotentials;  $c$ , Cytochrom  $c$ ;  $a$  und  $a_3$ , Cytochrom  $a$  und  $a_3$ ; Cu, Kupferion; ADP, Adenosindiphosphat; AMP, Adenosinmonophosphat.

Eine dieser Redox-Komponenten ist das Ubichinon (Coenzym Q, Q, Ubichinon-10), das im Überschuß gegenüber den Komplexen I-V der Atmungskette vorkommt. Daraus entwickelte sich die Vorstellung einer Poolfunktion des Ubichinons („Q-Pool“) in der Membran, durch die Elektronen gespeichert und so der Elektronenfluß gepuffert werden kann. Ubichinon ist ein kleines, hydrophobes Molekül, das innerhalb der Lipiddoppelschicht der inneren Mitochondrienmembran frei diffundieren kann. Dadurch ist es in der Lage Wasserstoff zwischen den in der Membran verankerten Komplexen der Atmungskette zu transportieren. Gekoppelt an die Reduktion und Oxidation von Ubichinon ist die Aufnahme und Abgabe von Protonen. Diese Kopplung zwischen Elektronen- und Protonenübertragung wird im Cytochrom  $bc_1$  Komplex für den vektoriellen Protonentransport genutzt. Der Ubichinoncyclus (Q-Cyclus, siehe Abb. 5) beschreibt die Elektronen- und Protonentransportvorgänge innerhalb des Cytochrom  $bc_1$  Komplexes der Atmungskette. Dieser verbindet den membranständigen Ubichinonpool mit dem Cytochrom  $c$  an der äußeren Oberfläche der inneren Mitochondrienmembran.



**Abb. 5: Der protonenübertragende Q-Cyclus – Mechanismus des Elektronen- und Protonentransportes im Cytochrom  $bc_1$  Komplex [18, 19].**  $\Psi^-$  und  $\Psi^+$ , negative und positive Seite der Membran;  $Q^\cdot$ , Ubisemichinonanion-Radikal; ISP, Eisen-Schwefel-Protein, für die anderen Abkürzungen siehe Abb. 4.

Innerhalb des Cytochrom  $bc_1$  Komplexes der inneren Mitochondrienmembran existieren zwei verschiedene Ubichinon-Reaktionszentren, das dem Zwischenmembranraum-zugewandte  $Q_0$ - bzw.  $P$ -Zentrum und das der Matrixseite zugewandte  $Q_i$ - bzw.  $N$ -Zentrum. Während im  $N$ -

Zentrum Ubichinon durch Elektronenaufnahme zu Ubihydrochinon reduziert wird, erfolgt im *P*-Zentrum dessen Oxidation unter Protonenabgabe. Die wesentlichen Schritte des Q-Cyclus sind (s. Abb. 5):

(1) Im *P*-Zentrum werden unter Oxidation des Ubihydrochinons die beiden Elektronen verzweigt auf zwei verschiedene Akzeptoren übertragen, deren Mittelpunktspotentiale sich um etwa 350 mV unterscheiden [20]. Das eine Elektron durchläuft den sogenannten „Hochpotential“-Weg, indem es vom Ubihydrochinon auf das Eisen-Schwefel-Zentrum des Rieske-Proteins (+ 250 mV, ISP in Abb. 5) übertragen wird.

(2) Das Eisen-Schwefel-Protein wird seinerseits durch das Cytochrom  $c_1$  reoxidiert, welches das Elektron schließlich auf das Cytochrom *c* überträgt. Das zweite bei der Oxidation des Ubihydrochinons (siehe 1) anfallende Elektron wird über den „Tiefpotential“-Weg über die innere Mitochondrienmembran hinweg dem *N*-Zentrum zugeführt, wo gebundenes Ubichinon zunächst zum Ubisemichinonanion ( $Q^-$ ) reduziert wird.

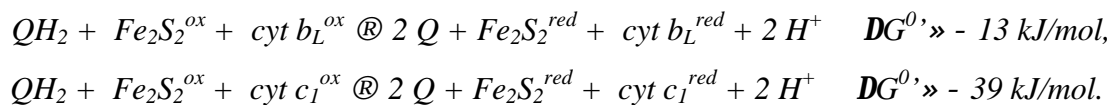
(3) Die Rückführung dieses zweiten Elektrons zum Ubichinon erfolgt durch das Cytochrom *b*, wobei zunächst die Häm-Gruppe niedrigeren Potentials (Häm  $b_L$  bzw.  $b_{566}$ : -90 mV) reduziert wird, die anschließend das Elektron an die zweite Häm-Gruppe höheren Potentials (Häm  $b_H$  bzw.  $b_{562}$ ) weiterreicht.

(4a) Häm  $b_H$  überträgt das Elektron Ubichinon unter Ausbildung des radikalischen Ubisemichinonanions auf Ubichinon, welches tatsächlich innerhalb des *N*-Zentrums mittels ESR-Spektroskopie nachgewiesen werden konnte [21].

(4b) Unter Oxidation eines zweiten Ubihydrochinonmoleküls im *P*-Zentrum gelangt ein weiteres Elektron über das Cytochrom *b* zum Ubisemichinonanion-Radikal im *N*-Zentrum, welches somit endgültig zum Ubihydrochinon ( $QH_2$ ) reduziert wird. Gleichzeitig wird auch das Eisen-Schwefel-Zentrum ein zweites Mal reduziert. In einem vollständigen Cyclus werden demnach zwei Elektronen auf Cytochrom *c* übertragen und zwei Ubihydrochinone unter Elektronenabgabe zu Ubichinonmolekülen umgesetzt; jedoch wird nur ein Ubichinonmolekül auf der entgegengesetzten Seite der Membran durch Aufnahme zweier Elektronen zum Ubihydrochinon reduziert.

Vor allem durch umfassende Untersuchungen zur Wirkungsweise verschiedener Cytochrom  $bc_1$  Komplex-spezifischer Inhibitoren konnte eine genaue Vorstellung von den Elektronen- und Protonen-übertragenden Reaktionen im Cytochrom  $bc_1$  Komplex entwickelt werden. Die Verzweigung des Elektronenflusses am *P*-Zentrum wird deshalb als entscheidender, energiekonservierender Schritt innerhalb des Ubichinoncyclus anerkannt. Bisher konnte in der Natur noch kein zweites Beispiel für eine solche Reaktion gefunden

werden. Es stellt sich nun die Frage, wie eine solche Aufzweigung des Elektronentransports überhaupt gewährleistet werden kann, zumal die Übertragung des zweiten Elektrons auf das Eisen-Schwefel-Zentrum die thermodynamisch günstigere Variante darstellt [19]:



Es muß effektiv verhindert werden, daß beide Elektronen auf das Eisen-Schwefel-Zentrum übertragen werden, da andernfalls das Recycling jedes zweiten Elektrons und der dadurch bedingte Transport von Protonen nicht stattfinden könnte. Durch das sogenannte „Oxidant-Induced-Reduction“-Experiment konnte bestätigt werden, daß die Verzweigung des Elektronenflusses im Cytochrom  $bc_1$  Komplex tatsächlich einer strengen Kontrolle unterliegt: Selbst wenn Häm  $b_L$  durch Blockade des  $N$ -Zentrums infolge der Zugabe des Inhibitors Antimycin im reduzierten Zustand gehalten wird (siehe Abb. 3) und somit eine erneute Reduktion nicht möglich ist, werden die Elektronen nicht auf das Eisen-Schwefel-Zentrum übertragen, sondern Sauerstoff reagiert unter der Bildung von Superoxid [22].

Durch Strukturaufklärung nach Cokristallisation mit spezifischen - der Struktur von Ubichinon ähnlichen - Inhibitoren konnten die Bindungsstellen im Cytochrom  $bc_1$  Komplex für das  $P$ -Zentrum grob lokalisiert werden. Ubichinon wurde in den hochaufgelösten Röntgenstrukturen des Cytochrom  $bc_1$  Komplexes in einigen Kristallstrukturen zwar im  $N$ -Zentrum, nie aber im  $P$ -Zentrum gefunden. Dies liegt vermutlich an den im millimolaren Bereich liegenden Dissoziationskonstanten [23-26]. Es gibt allerdings in der Literatur, aufbauend auf dem nicht kompetitiven Charakter der  $E$ - $\beta$ -Methoxyacrylat-Hemmstoffe wie MOA-Stilben, Hinweise auf mehr als eine Ubichinonbindungsstelle im  $P$ -Zentrum [27]. Charakteristische Veränderungen der ESR-Spektrenform des Eisen-Schwefel-Zentrums, die nach schrittweiser Extraktion des endogenen Ubichinons beobachtet werden können, scheinen diese These zu unterstützen [28]. Die gleichen Untersuchungen bewiesen, daß sich die Affinität von Ubihydrochinon und Ubichinon für das  $P$ - und  $N$ -Zentrum kaum unterscheidet. Allerdings zeigt die eine Bindungsstelle des  $P$ -Zentrums für Ubichinon in beiden Redoxzuständen eine deutlich höhere Affinität als die andere. Es wurde die Theorie aufgestellt, daß das schwächer gebundene Ubichinon das eigentliche Substrat darstellt und deshalb auch während der Katalyse ausgetauscht wird, während das zehnmal stärker gebundene zweite Ubichinon die Rolle einer prosthetischen Gruppe übernimmt und somit nicht ausgewechselt wird. Eine weitere Beobachtung scheint die Hypothese der „Double-

Occupancy“ zu bestätigen: Während die Bindungsaffinität für Stigmatellin nach Entfernung des Eisen-Schwefel-Proteins eindeutig steigt, bleibt diejenige für die E- $\beta$ -Methoxyacrylate von einer reversiblen Abtrennung des Eisen-Schwefel-Proteins unbeeinflusst [29]. Offenbar existieren für beide Hemmstoffgruppen unterschiedliche Bindungsstellen. Die nicht kompetitive Hemmwirkung der E- $\beta$ -Methoxyacrylate läßt sich nach dem „Double-Occupancy“-Modell damit begründen, daß diese Hemmstoffe das prosthetische Ubichinon ersetzen und auf diese Weise den Katalysemechanismus nur indirekt beeinflussen.

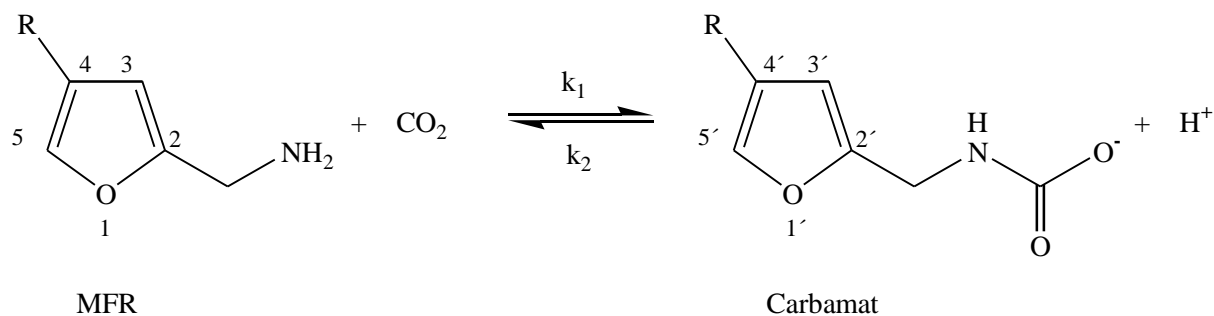
Die Bestimmung der Ubichinonbindungsstellen ist die Grundlage für weitere mechanistische Überlegungen zur Chemie am *P*-Zentrum und Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Sollte sich herausstellen, daß es sich hierbei um zwei Ubihydrochinonmoleküle handelt, könnte dies im Sinne des postulierten „Double-Occupancy“-Modells interpretiert werden [28]. Andererseits könnte die an sich einfachere Vorstellung von nur einem Ubihydrochinon im *P*-Zentrum bestätigt werden [30]. Da diese Frage seit über 15 Jahren Gegenstand einer kontroversen Diskussion ist, wurde eine Methode entwickelt, die es generell erlaubt, Bindungsstudien zu wasserunlöslichen Substraten und membranständigen Enzymen durchzuführen.

# 1 N-Carboxymethanofuran (Carbamat) Bildung aus Methanofuran und CO<sub>2</sub> in methanogenen Archaea: Thermodynamik und Kinetik der spontanen Reaktion

Die Ergebnisse hierzu wurden im European Journal of Biochemistry veröffentlicht. Die Publikation ist am Ende dieses Kapitels abgedruckt. Im folgenden werden die wichtigsten Punkte zusammengefaßt und die durchgeführten Rechnungen detaillierter dargestellt. An einer Stelle werden Daten aufgeführt, für die es in der Publikation keinen Platz mehr gab.

## 1.1 Problemstellung

Die Carbamatbildung aus Methanofuran (MFR) und CO<sub>2</sub> ist der erste Schritt der Methanbildung (siehe Kapitel A) und erfolgt spontan, wobei sich bei der Reaktion ein Gleichgewicht einstellt (siehe Abb. 6). Mittels EXSY wurde bestimmt, ob Zellextrakte methanogener Archaea, welche auf H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> wuchsen, die Carbamatbildung aus CO<sub>2</sub> und Methanofuran katalysieren.



**Abb. 6: Carbamatbildung aus CO<sub>2</sub> und Methanofuran.** Für Methanofuran ist R = 4-[N-(4,5,7-tricarboxyheptanoyl- $\gamma$ -L-glutamyl- $\gamma$ -L-glutamyl)-p-( $\beta$ -aminoethyl)phenoxyethyl] [2] und für Furfurylamin R = H. Die Protonen an C-3, C-4 (im Fall von Furfurylamin) und C-5 wurden für EXSY verwendet.

Zusätzlich wurde analysiert, ob isolierte Formylmethanofuran-Dehydrogenase aus *Methanosarcina barkeri* eine Carbamatbildungsaktivität besitzt, da die  $\alpha$ -Untereinheit dieses Enzyms Sequenzhomologie zu Amidhydrolasen wie der Urease und der Adenosin-Deaminase aufweist [31]. Diese katalysieren wie die Formylmethanofuran-Dehydrogenase die Bildung oder Spaltung von Kohlenstoff-Stickstoff-Bindungen. Es wurde daher auch untersucht, ob die

Formylmethanofuran-Dehydrogenase die Carbamatbildung aus  $\text{CO}_2$  und Methanofuran katalysiert [32].

*M. barkeri* kann ebenfalls auf Methanol unter der Bildung von  $\text{CO}_2$  und  $\text{CH}_4$  wachsen. Der letzte Schritt der  $\text{CO}_2$ -Bildung aus Methanol ist die Dissoziation von *N*-Carboxymethanofuran zu  $\text{CO}_2$  und Methanofuran [33, 34]. Daher wurden auch Zellextrakte von auf Methanol gezogenem *M. barkeri* auf die Beschleunigung der Carbamatbildung und der Carbamatdissoziation getestet.

## 1.2 Proben- und Meßbedingungen

Die Aufnahme von NMR-Spektren dieser Reaktion im Gleichgewicht erfolgte in 0,1 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Puffer mit 0,1 M  $\text{NaHCO}_3$ , im Bereich von 7°C bis 47°C. Diese Bedingungen wurden gewählt, weil die meisten auf  $\text{H}_2$  und  $\text{CO}_2$  wachsenden methanogenen Archaea mesophil sind und optimal bei Temperaturen um 30°C wachsen. Die optimale Salzkonzentration im Medium für Wachstum und Methanogenese liegt bei ungefähr 0,2 M [7], wobei die Anwesenheit von Kalium- und Natriumionen für das Wachstum notwendig ist [35, 36]. Das Optimum des pH-Wertes für das Wachstum liegt im allgemeinen um 7 [7]. Ein Großteil der Messungen wurde aber bei einem pH-Wert von 8,0 anstelle von 7,0 durchgeführt, da bei einem pH-Wert von 8,0 und einer  $\text{NaHCO}_3$ -Konzentration von 0,1 M der Quotient der Gleichgewichtskonzentrationen  $[\text{Carbamat}]/[\text{'MFR'}]$  ungefähr 0,2 war, bei einem pH-Wert von 7,0 hingegen bei 0,03 lag. Die Genauigkeit der Konzentrationsbestimmung des Carbamats und des 'MFR' über 1D-Protonen-NMR-Spektroskopie nimmt drastisch mit der Abnahme des Quotienten  $[\text{Carbamat}]/[\text{'MFR'}]$  ab. Auch bei der physiologischen Methanofurankonzentration von 0,001-0,1 mM [7] konnte aufgrund der Unempfindlichkeit der verwendeten EXSY nicht gemessen werden, so daß 0,01-0,1 M Methanofuran in den Testansätzen verwendet wurden. Da für Formylmethanofuran-Dehydrogenase aus *M. barkeri* gezeigt werden konnte, daß das Enzym auch Substratanaloga wie *N*-Furfurylamin, *N*-Methylformamid, Formamid und Formiat umsetzt [37, 38], wurde anstelle von Methanofuran in den meisten Experimenten Furfurylamin benutzt.

*M. barkeri* wurde aufgrund mehrerer Kriterien ausgewählt: Es ist ein mesophiles methanogenes Archaeon mit einem Wachstumsoptimum bei 37°C und einer Wachstumsrate auf  $\text{CO}_2$  von  $0,036 \text{ h}^{-1}$ , die im Vergleich zu der von anderen mesophilen methanogenen Archaea am höchsten ist [36, 39]. Wenn es eine Enzymaktivität gibt, die die Carbamatbildung

aus CO<sub>2</sub> und Methanofuran katalysiert, sollte diese daher in den Zellextrakten dieses Organismus zu finden sein.

### 1.3 Methode und Auswertung

Um die Geschwindigkeit der Carbamatbildung nach dem Geschwindigkeitsgesetz

$$v_1 = k_1[\text{MFR}][\text{CO}_2] = v_2 = k_2[\text{Carbamat}][\text{H}^+] \text{ (siehe Abb. 6 und Tabelle 1)}$$

berechnen zu können, müssen die Konzentrationen und Geschwindigkeitskonstanten im Gleichgewicht bestimmt und berechnet werden. Die Konzentrationen können aus der Integration von 1D-NMR-Spektren und die Geschwindigkeitskonstanten Pseudo-erster-Ordnung  $k_1^{**}$  der Carbamatbildung und  $k_2^*$  der Carbamatdissoziation mit EXSY bestimmt werden (siehe Tabelle 1):

$$v_1 = k_1^{**}[\text{'MFR'}] = v_2 = k_2^*[\text{Carbamat}]$$

Der Zusammenhang der Geschwindigkeitskonstanten Pseudo-erster-Ordnung  $k_1^{**}$  der Carbamatbildung und  $k_2^*$  der Carbamatdissoziation mit den Geschwindigkeitskonstanten  $k_1$  und  $k_2$  zweiter Ordnung geht aus Tabelle 1 hervor.

**Tab. 1: Definition der Konstanten für die Bestimmung der Carbamatbildung aus Methanofuran und CO<sub>2</sub> im Gleichgewicht.** Abkürzungen: ['MFR'], Summe der Konzentrationen des protonierten und unprotonierten Amins im Gleichgewicht; [MFR], Konzentration des unprotonierten Amins im Gleichgewicht; ['CO<sub>2</sub>'], Summe der Konzentrationen der Spezies CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> + CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> im Gleichgewicht; [CO<sub>2</sub>], Konzentration von CO<sub>2</sub> im Gleichgewicht in Lösung; [Carbamat], Summe der Konzentrationen des Carbamats und der Carbaminsäure im Gleichgewicht.

Konstante	Definition
$k_1^{**}$	$v_1 = k_1^{**} [\text{'MFR'}]$
$k_1^*$	$v_1 = k_1^* [\text{'MFR'}] [\text{'CO}_2\text{'}]$
$k_1$	$v_1 = k_1 [\text{MFR}] [\text{CO}_2]$
$k_2^*$	$v_2 = k_2^* [\text{Carbamat}]$
$k_2$	$v_2 = k_2 [\text{Carbamat}] [\text{H}^+]$



### Bestimmung der Gleichgewichtskonzentrationen von Methanofuran, CO<sub>2</sub> und Carbamat im Gleichgewicht:

Die Konzentration von H<sup>+</sup> wurde durch Messen des pH-Wertes bestimmt. Die Konzentrationen von protoniertem und unprotoniertem Methanofuran 'MFR' ([MFR] = [MFR] + [MFRH<sup>+</sup>]) und von dem Carbamat wurden durch die Integration von 1D-Protonen-NMR-Spektren erhalten. Die Konzentration des unprotonierten Methanofurans (MFR) bei einem gegebenen pH-Wert wurde aus der Konzentration von 'MFR' berechnet, wobei ein pK<sub>a</sub>-Wert von 8,4 [40] benutzt wurde ( $\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{[\text{MFR}]}{[\text{MFRH}^+]}$ ). Die Konzentration des Carbamats in den pH-Bereichen von 7,0-8,0 wurde gleich der totalen Carbamatkonzentration angenommen, da der pK<sub>a</sub>-Wert der Carbamatsäure 4,8 beträgt [41].

Die Konzentration von CO<sub>2</sub> im Gleichgewicht in Lösung bei verschiedenen pH-Werten kann über die Stoffmenge folgendermaßen berechnet werden: Die Messungen wurden in Ansätzen von 0,5 ml durchgeführt, die sich im Gleichgewicht mit einer Gasphase von 2,5 ml befanden. Nach der Einstellung des Gleichgewichtes von CO<sub>2</sub> in der Lösung und in der Gasphase, enthält die Gasphase eine nicht vernachlässigbare Menge an CO<sub>2</sub><sup>gas</sup>. Diese wurde folgendermaßen berechnet: In den Berechnungen der Gesamtkonzentration 'CO<sub>2</sub>' und der CO<sub>2</sub>-Konzentration in Lösung konnte für das CO<sub>2</sub><sup>gas</sup> in der Gasphase angenommen werden:

$$m(\text{HCO}_3^-) + m(\text{Carbamat}) + m(\text{CO}_2) + m(\text{CO}_2^{\text{gas}}) = m(\text{NaHCO}_3^{\text{zugegeben}}),$$

wobei m der Stoffmenge in mol einer jeden zugesetzten Substanz im Gleichgewicht und  $m(\text{NaHCO}_3^{\text{zugegeben}})$  der eingesetzten Menge NaHCO<sub>3</sub> entspricht. In den Berechnungen wurde die Konzentration des H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> vernachlässigt, da das Verhältnis  $[\text{H}_2\text{CO}_3]/[\text{CO}_2]$  im Gleichgewicht sehr klein ist (<0,002) und bei allen pH-Werten unserer Messungen der Quotient  $[\text{H}_2\text{CO}_3]/[\text{HCO}_3^-] = 0,005$  oder weniger betrug [42]. Da der pK<sub>a2</sub>-Wert von H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10,3 ist, konnte auch CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> bei allen pH-Werten unserer Experimente vernachlässigt werden. Umschreiben der obigen Gleichung mit den Volumina der Lösung und Gasphase, V<sub>Lsg.</sub> = 0,5 ml und V<sub>gas</sub> = 2,5 ml, ergibt die Gleichgewichtskonzentration des 'CO<sub>2</sub>' zu:

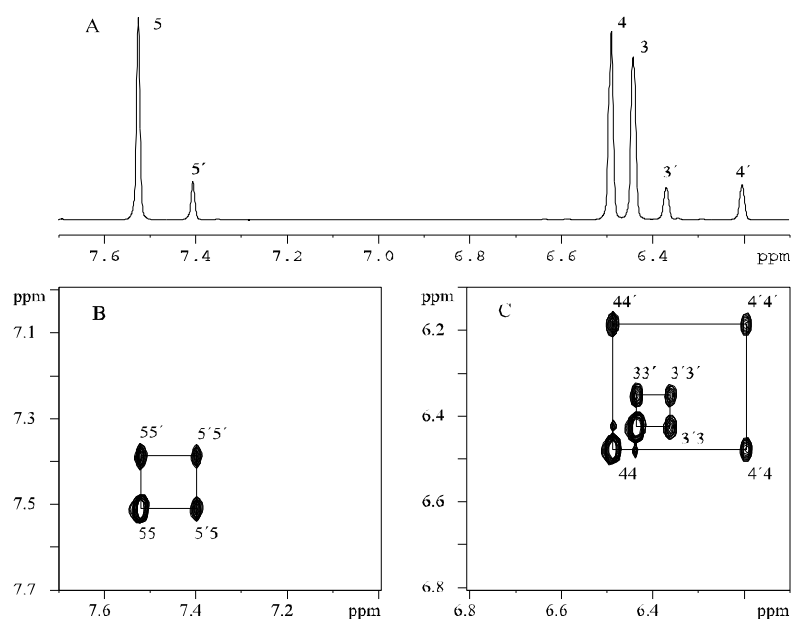
$$[\text{'CO}_2\text{'}] = [\text{HCO}_3^-] + [\text{CO}_2] = [\text{NaHCO}_3^{\text{zugegeben}}] - [\text{Carbamat}] - [\text{CO}_2^{\text{gas}}] V_{\text{gas}}/V_{\text{Lsg.}},$$

wobei  $[\text{NaHCO}_3^{\text{zugegeben}}]$  die eingesetzte Konzentration ist. Die Gleichgewichtskonzentration des CO<sub>2</sub> in Lösung bei einem gegebenen pH-Wert wurde aus ['CO<sub>2</sub>'] berechnet, wobei ein

$pK_a$ -Wert von 6,41 für  $H_2CO_3$  bei  $17^\circ C$ , von 6,34 bei  $27^\circ C$  und von 6,30 bei  $37^\circ C$  benutzt wurde [43] ( $pH = pK_{a1} + \log [HCO_3^-]/[CO_2]$ ). Der verwendete  $pK_a$ -Wert berücksichtigt sowohl die Konzentration an  $H_2CO_3$  als auch an  $CO_2$ ; der  $pK_a$ -Wert bezogen nur auf  $H_2CO_3$  ist um drei Einheiten geringer. Die Menge des  $CO_2^{gas}$  in der 2,5 ml Gasphase wurde aus der  $CO_2$ -Konzentration in der 0,5 ml Lösung berechnet (siehe Veröffentlichung und Zusatztablelle).

### EXSY-Messungen:

Mittels EXSY können Reaktionen im Gleichgewicht verfolgt werden [44-46], wenn die Geschwindigkeitskonstante des Austausches schnell im Vergleich zur Relaxationsrate ( $1/T_1$ ) und klein im Vergleich zum chemischen Verschiebungsunterschied ( $\Delta\Omega$ ) der betrachteten Kerne ist. Dies ist für die Protonen C-3, C-4 und C-5 des substituierten Furanrings des Carbamats (*N*-Carboxymethanofuran) und Methanofurans der Fall (siehe Abb. 7).



**Abb. 7: Furfurylamin, 'CO<sub>2</sub>' (CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> + CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) und *N*-Carboxymethanofuran (Carbamat) im Gleichgewicht bei einem pH-Wert von 8,0 und 27°C.** (A) Aromatische Region eines 1D-Protonen-NMR-Spektrums und (B) und (C) eines homonuklearen EXSY-Spektrums mit 400 ms Mischzeit. Die Signale des Spektrums A 3, 4 und 5 stammen dabei von Protonen des Amins und die Signale 3', 4' und 5' vom Carbamat. Bei den Signalen 55 und 5'5' bzw. 44 und 4'4' sowie 33 und 3'3' handelt es sich um Diagonalsignale von Protonen des Amins bzw. Carbamats (') und bei den Signalen 5'5 und 55' bzw. 4'4 und 44' sowie 3'3 und 33' um Kreuzsignale der sich ineinander umwandelnden Amin- und Carbamatsubstrate. Zur Topologie der Protonenpositionen 3, 4 und 5 siehe Abb.4.

Die Geschwindigkeitskonstanten Pseudo-erster-Ordnung  $k_1^{**}$  und  $k_2^*$  wurden aus den relativen Populationen  $p_{\text{'MFR'}}$  und  $p_{\text{Carbamat}}$  sowie den Peakvolumina  $V_{ij}$  folgendermaßen erhalten (siehe Tabelle 1): Durch Integration der 1D-Protonen-NMR-Spektren wurden die relativen Populationen  $p_{\text{'MFR'}} = [\text{'MFR'}]/([\text{'MFR'}] + [\text{Carbamat}])$  und  $p_{\text{Carbamat}} = [\text{Carbamat}]/([\text{'MFR'}] + [\text{Carbamat}])$  berechnet und die Peakvolumina  $V_{ij}$  durch Integration der EXSY-Spektren erhalten. Die Geschwindigkeitskonstanten  $k_1^{**}$  und  $k_2^*$  sind gegeben durch die relativen Populationen  $p_j$ , die Peakvolumina  $V_{ij}$ , die longitudinalen Relaxationsraten  $R_j$  und die Mischzeit  $\tau_m$ , welche über die Beziehung  $\mathbf{A} = \exp(-\mathbf{R}\tau_m)$  zusammenhängen. Dabei stellt  $\mathbf{A}$  die Datenmatrix dar, deren Elemente durch  $A_{ij} = V_{ij}/p_j$  ( $i = \text{'MFR'}$  oder Carbamat und  $j = \text{Carbamat}$  oder 'MFR') definiert sind und  $\mathbf{R}$  die folgende dynamische Matrix ist:

$$\mathbf{R} = \begin{pmatrix} R_1 + k_1^{**} & -k_2^* \\ -k_1^{**} & R_2 + k_2^* \end{pmatrix}$$

Die Lösung ist durch folgende Gleichung gegeben:

$$\mathbf{R} = -\frac{\ln \mathbf{A}}{t_m} = -\frac{\mathbf{X}(\ln \mathbf{L})\mathbf{X}^{-1}}{t_m}$$

Die Gleichung kann mit MATHEMATICA (Wolfram Research, Champaign, IL, USA) gelöst werden, wobei  $\mathbf{X}$  die quadratische Matrix des Eigenvektors  $\mathbf{A}$  ist, so daß  $\mathbf{X}^{-1}\mathbf{A}\mathbf{X} = \mathbf{L} = \text{diag}(\lambda_k)$  und  $\ln \mathbf{L} = \text{diag}(\ln \lambda_k)$  mit  $\lambda_k$  als dem k-ten Eigenwert von  $\mathbf{A}$  gilt [47-49].

#### 1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Raten der spontanen Carbamatbildung wurden zu Werten zwischen  $0,005 \text{ mM s}^{-1}$  ( $0,1 \text{ mM}$  Methanofuran und  $10 \text{ mM}$  'CO<sub>2</sub>') und  $0,5 \text{ mM s}^{-1}$  ( $1 \text{ mM}$  Methanofuran und  $100 \text{ mM}$  'CO<sub>2</sub>') bei  $27^\circ\text{C}$  und zwischen  $0,020 \text{ mM s}^{-1}$  und  $2,0 \text{ mM s}^{-1}$  bei  $37^\circ\text{C}$  berechnet (für eine genaue Berechnung der Daten siehe Zusatztabelle nach der Veröffentlichung). Ähnliche Werte wurden in Anwesenheit von Zellextrakten gefunden. Die Raten der spontanen Carbamatbildung müssen mit denen der Methanbildung aus H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> in methanogenen Archaea verglichen werden.

*Methanosarcina barkeri*-Zellen katalysieren die Bildung von Methan aus CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> mit einer spezifischen Rate von  $0,2 \text{ } \mu\text{mol pro min und mg Zellen}$  (Trockenmasse) bei  $37^\circ\text{C}$ , wenn die CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Gasphase 20% und die H<sub>2</sub>-Konzentration 80% beträgt

(jeweils bei  $2 \times 10^5$  Pa) [36]. Unter diesen Bedingungen und einem intrazellulären pH-Wert von 7,0 wurde die intrazelluläre 'CO<sub>2</sub>'-Konzentration zu ungefähr 60 mM berechnet (bei 37°C und einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 100 % in der Gasphase bei  $10^5$  Pa ist die CO<sub>2</sub>-Konzentration in Wasser 24,8 mM; der pK<sub>1</sub>-Wert von H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ist 6,3). Eine spezifische Rate von 0,2 µmol pro min und mg Zellen entspricht einer Rate von 120 µmol pro min und ml intrazellulärem Volumen oder einer Rate von 2,0 mM s<sup>-1</sup>. Für die Berechnung wurde ein intrazelluläres Volumen von  $3,3 \mu\text{l (mg Protein)}^{-1} = 1,65 \mu\text{l (mg Zellen (Trockenmasse))}^{-1}$  verwendet [50].

Die maximale Rate der Methanbildung aus CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub> bei 37°C (2,0 mM s<sup>-1</sup>) ist daher ungefähr dieselbe wie die berechnete maximale Rate der spontanen Carbamatbildung bei 37°C (2,0 mM s<sup>-1</sup>) in dem methanogenen Archaeon *M. barkeri*.

In der natürlichen Umgebung von Methanogenen beträgt die H<sub>2</sub>-Konzentration in der Gasphase allerdings nur < 0,1% [7]. Bei dieser Konzentration sinkt die spezifische Rate der Methanbildung auf weniger als 1% von der Rate, die bei einer H<sub>2</sub>-Konzentration von 80% gefunden wird. Bei 0,1 % H<sub>2</sub> beträgt die spezifische Rate der Methanbildung nur 2 nmol pro min und mg Zellen, was einer Rate von 20 µM s<sup>-1</sup> entspricht. Diese Rate ist 100mal kleiner als die spontane Rate der Carbamatbildung unter diesen Bedingungen. D.h. die spontane Rate der Carbamatbildung und Carbamatdissoziation ist in allen methanogenen Archaea unter den physiologischen Konzentrationen und Wachstumsbedingungen ausreichend schnell, so daß eine Enzymaktivität für diese Reaktion nicht zwingend vorhanden sein muß. Dies gilt sowohl für das Wachstum auf MeOH als auch auf CO<sub>2</sub>.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Zellextrakte von *M. barkeri* oder isolierte Formylmethanofuran-Dehydrogenase aus *M. barkeri* (siehe Kapitel 1.1) eine Enzymaktivität aufweisen, welche die Bildung von Carbamat aus CO<sub>2</sub> und Methanofuran katalysiert. Eine solche Aktivität konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden. Die Zellextrakte besaßen ebenfalls keine Carboanhydraseaktivität, obwohl dieser Organismus unter bestimmten Bedingungen Carboanhydrase synthetisieren kann [51]. Entsprechend bilden die Zellen ein Enzym zur Beschleunigung der Carbamatbildung möglicherweise nur unter bestimmten Bedingungen, die jedoch bisher noch nicht gefunden wurden.

EXSY ermöglichte es, die Rate der *N*-Carboxymethanofuranbildung aus CO<sub>2</sub> und Methanofuran zu bestimmen. Dies wäre auch mit anderen Methoden, wie beispielsweise „stopped-flow“-Untersuchungen möglich gewesen. Die NMR-Spektroskopie bietet aber zusätzlich die Möglichkeit, Reaktionsgeschwindigkeiten im Gleichgewicht zu messen.

Dadurch konnte die spontane Rate der Reaktion mit der Rate in Anwesenheit von Zellextrakt aus *Methanosarcina barkeri* verglichen und auf eine Enzymaktivität hin untersucht werden.

## 1.5 Veröffentlichung:

***N*-Carboxymethanofuran (carbamate) formation  
from methanofuran and CO<sub>2</sub> in methanogenic archaea:  
thermodynamics and kinetics of the spontaneous reaction**

# *N*-Carboxymethanofuran (carbamate) formation from methanofuran and CO<sub>2</sub> in methanogenic archaea

## Thermodynamics and kinetics of the spontaneous reaction

Stefan Bartoschek<sup>1,2</sup>, Julia A. Vorholt<sup>1</sup>, Rudolf K. Thauer<sup>1</sup>, Bernhard H. Geierstanger<sup>2,3,\*</sup> and Christian Griesinger<sup>2,3</sup>

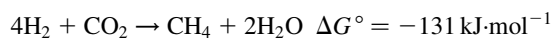
<sup>1</sup>Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie and Laboratorium für Mikrobiologie, Fachbereich Biologie, Philipps-Universität, Marburg, Germany; <sup>2</sup>Institut für Organische Chemie der Universität, Frankfurt am Main, Germany; <sup>3</sup>Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen, Germany

*N*-Carboxymethanofuran (carbamate) formation from unprotonated methanofuran (MFR) and CO<sub>2</sub> is the first reaction in the reduction of CO<sub>2</sub> to methane in methanogenic archaea. The reaction proceeds spontaneously. We address here the question whether the rate of spontaneous carbamate formation is high enough to account for the observed rate of methanogenesis from CO<sub>2</sub>. The rates of carbamate formation ( $v_1$ ) and cleavage ( $v_2$ ) were determined under equilibrium conditions via 2D proton exchange NMR spectroscopy (EXSY). At pH 7.0 and 300 K the second order rate constant  $k_1^*$  of carbamate formation from 'MFR'(MFR + MFRH<sup>+</sup>) and 'CO<sub>2</sub>' (CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> + CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) was found to be 7 M<sup>-1</sup>·s<sup>-1</sup> ( $v_1 = k_1^* [\text{'MFR'}] [\text{'CO}_2\text{'}]$ ) while the pseudo first order rate constant  $k_2^*$  of carbamate cleavage was 12 s<sup>-1</sup> ( $v_2 = k_2^* [\text{carbamate}]$ ). The equilibrium constant  $K^* = k_1^*/k_2^* = [\text{carbamate}]/[\text{'MFR'}][\text{'CO}_2\text{'}]$  was 0.6 M<sup>-1</sup> at pH 7.0 corresponding to a free energy change  $\Delta G^{\circ'}$  of +1.3 kJ·mol<sup>-1</sup>. The pH and temperature dependence of  $k_1^*$ , of  $k_2^*$  and of  $K^*$  were determined. From the second order rate constant  $k_1^*$  it was calculated that under physiological conditions the rate of spontaneous carbamate formation is of the same order as the maximal rate of methane formation and as the rate of spontaneous CO<sub>2</sub> formation from HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> in methanogenic archaea, the latter being important as CO<sub>2</sub> is mainly present as HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> which has to be converted to CO<sub>2</sub> before it can react with MFR. An enzyme catalyzed carbamate formation thus appears not to be required for methanogenesis from CO<sub>2</sub>. Consistent with this conclusion is our finding that the rate of carbamate formation was not enhanced by cell extracts of *Methanosarcina barkeri* and *Methanobacterium thermoautotrophicum* or by purified formylmethanofuran dehydrogenase which catalyzes the reduction of *N*-carboxymethanofuran to *N*-formylmethanofuran.

From the concentrations of 'CO<sub>2</sub>' and of 'MFR' determined by 1D-NMR spectroscopy and the pK<sub>a</sub> of H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and of MFRH<sup>+</sup> the concentrations of CO<sub>2</sub> and of MFR were obtained, allowing to calculate  $k_1$  ( $v_1 = k_1 [\text{MFR}] [\text{CO}_2]$ ). The second order rate constant  $k_1$  was found to be approximately 1000 M<sup>-1</sup>·s<sup>-1</sup> at 300 K and pH values between 7.0 and 8.0 which is in the order of  $k_1$  values determined for other carbamate forming reactions by stopped flow.

**Keywords:** carbamate formation; *N*-carboxymethanofuran; methane formation from CO<sub>2</sub>; rate determination via NMR spectroscopy; *Methanosarcina barkeri*.

Per annum, approximately 10<sup>9</sup> tons of methane are formed in anaerobic environments via the action of methanogenic archaea [1,2]. Approximately one third of the methane is generated from CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>.



Correspondence to R. K. Thauer, Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Karl-von-Frisch-Straße, D-35043 Marburg, Germany.

Fax: + 49 6421178209, Tel.: + 49 6421178200

E-mail: thauer@mail.uni-marburg.de

**Abbreviations:** 'CO<sub>2</sub>', CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> + CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>; CO<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> in solution; CO<sub>2</sub><sup>gas</sup>, CO<sub>2</sub> in the gas phase; MFR, methanofuran in the unprotonated form; MFRH<sup>+</sup>, methanofuran in the protonated form; 'MFR', MFR + MFRH<sup>+</sup>; Q<sub>10</sub>, factor by which the rate increases when the temperature is increased by 10 °C; EXSY, exchange spectroscopy

\*Present address: Novartis Institute for Functional Genomics, 3115 Merryfield Row, Suite 200, San Diego, CA 92121-1125, USA

Note: web page available at <http://www.uni-marburg.de/mpi>

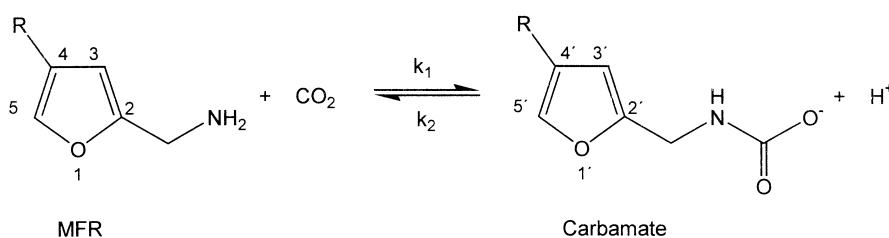
(Received 16 February 2000, accepted 21 March 2000)

The first step in CO<sub>2</sub> reduction to CH<sub>4</sub> has been shown to be the formation of *N*-carboxymethanofuran (carbamate) from methanofuran and CO<sub>2</sub> [3] (Fig. 1).

Carbamates form spontaneously and reversibly as a result of the nucleophilic attack of uncharged amines upon CO<sub>2</sub>. The prototropic steps associated with carbamate formation, which proceed through a zwitter ionic species, are fast relative to C–N bond formation and cleavage [4]; the reverse reaction is subject to general acid catalysis [5].

Carbamate formation from CO<sub>2</sub> and the uncharged amine is exergonic, the chemical free energy includes a substantial contribution from the dissociation of the carbamic acid (pK<sub>a</sub> ≈ 4.8) [4]. Despite this fact the equilibrium associated with carbamate formation is typically unfavourable under physiological conditions as at pH 7 most amines are present predominantly in the protonated form (pK<sub>a</sub> > 8) and CO<sub>2</sub> is present in the hydrated form HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; pK<sub>a1</sub> = 6.3). The pK<sub>a</sub> values of protonated amines can, however, be lowered by their environment thereby favouring carbamate formation [6]. Also the carbamate formed can be stabilized by noncovalent

**Fig. 1.** Carbamate formation from CO<sub>2</sub> and MFR (R = 4-[N-(4,5,7-tricarboxyheptanoyl- $\gamma$ -L-glutamyl- $\gamma$ -L-glutamyl)-p-( $\beta$ -aminoethyl)phenoxyethyl]) [47] or furfurylamine (R = H). Protons at C-3, C-4 (only in the case of furfurylamine) and C-5 were used for the analysis of proton exchange NMR spectroscopy data (EXSY) as described in Fig. 2.



intermolecular interactions [6]. These are the reasons why individual amino functions in some proteins are quantitatively carboxylated. Examples are the N-terminal amino group of valine in the  $\alpha$ - and  $\beta$ -chain of deoxyhemoglobin [4] and the  $\epsilon$ -amino group of the lysine residue in the active site of ribulose biphosphate carboxylase [4,6], of urease [7,8] and of phosphotriesterase [9,10]. In the biosynthesis of biotin the carbonylation of 7,8-diaminononanoic acid to dethiobiotin proceeds via the N<sup>7</sup> carbamate, whose formation from CO<sub>2</sub> and the diamine is energetically favoured by the neighbouring positive charge at N<sup>8</sup> [11]. Other important intermediates are the carbamate of CO<sub>2</sub> and NH<sub>3</sub> in carbamoylphosphate synthesis [12] and the carbamate of CO<sub>2</sub> and N<sup>5</sup>-aminoimidazole ribonucleotide in purine biosynthesis [13]. These two carbamates are, however, generated *in vivo* involving carboxyphosphate rather than CO<sub>2</sub>.

The rate of reversible carbamate formation from CO<sub>2</sub> and an amine is considered to be much higher than the rate of CO<sub>2</sub> hydration to H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> although experimental evidence for this under physiological conditions is not available. In biological systems the interconversion of CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O to H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> is catalyzed by carbonic anhydrase. Whether there is also an enzyme activity catalyzing carbamate formation has not been shown. In the case of dethiobiotin synthesis it was estimated that under the conditions of the assay the spontaneous formation of the carbamate was much faster than the  $k_{cat}$  for

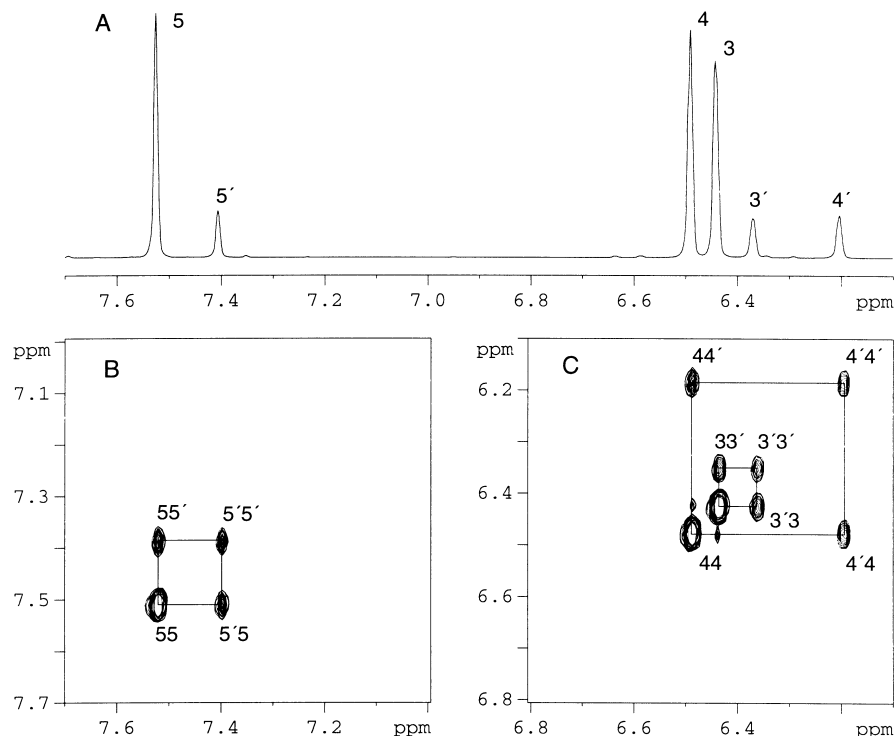
enzyme turnover which is only about 2 min<sup>-1</sup> [11]. The question is, whether the spontaneous rate of carbamate formation is also sufficient when the  $k_{cat}$  of a carbamate utilizing enzyme is more than 1000-fold higher as it is in the case for formylmethanofuran dehydrogenase which catalyzes the second step in methanogenesis from CO<sub>2</sub> [2]. The purified molybdenum or tungsten iron-sulfur protein mediates the reduction of N-carboxymethanofuran to formylmethanofuran with a  $k_{cat}$  of up to about 100 s<sup>-1</sup> [3,14].

In order to determine whether carbamate formation from methanofuran and CO<sub>2</sub> in methanogenic archaea is an enzyme catalyzed reaction we have used proton exchange NMR spectroscopy to measure the rate of N-carboxymethanofuran formation from methanofuran and CO<sub>2</sub> under physiological equilibrium conditions. The method is based on the finding that the protons at C3 and C5 of the furan ring in methanofuran and carboxymethanofuran (Fig. 1) exhibit different chemical shifts (Fig. 2) and that the saturation transfer kinetics of these protons can be followed by proton transfer exchange NMR spectroscopy (EXSY) [15–17]. Via this method the pseudo first order rate constants  $k_1^{**}$  of carbamate formation and the pseudo first order rate constant  $k_2^{**}$  of carbamate cleavage were obtained.

$$v_1 = k_1^{**} [\text{'MFR'}] = v_2 = k_2^{**} [\text{carbamate}]$$

['MFR'] equals the equilibrium concentration of the protonated

**Fig. 2.** Furfurylamine, 'CO<sub>2</sub>' (CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> + CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) and N-carboxyfurfurylamine (carbamate) at equilibrium in aqueous solution at pH 8.0 and 300 K (27 °C). (A) Aromatic region of a 1D proton NMR spectrum and (B) and (C) of a 2D <sup>1</sup>H homonuclear EXSY NMR spectrum (400 ms mixing time). For proton assignments see Fig. 1. Diagonal peaks of the furfurylamine protons and of the carbamate protons in chemical exchange are labelled with 55 and 5'5' or 44 and 4'4' or 33 and 3'3', respectively. Off-diagonal cross peaks arising from chemical exchange (exchange cross peaks) are labelled with 55' and 5'5 or 44' and 4'4 or 33' and 3'3, respectively. The NMR spectra were acquired at a <sup>1</sup>H frequency of 600.13 MHz on a DRX600 spectrometer (Bruker, Analytische Meßtechnik GmbH, Rheinstetten) and processed as described in Materials and methods. The NMR tube (5 mm × 15 cm), closed with a rubber stopper, contained 0.5 mL of a reaction mixture made up of 50  $\mu$ L 1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4.6  $\mu$ L furfurylamine (50  $\mu$ mol), 100  $\mu$ L 0.5 M NaHCO<sub>3</sub>, 50  $\mu$ L D<sub>2</sub>O and 295  $\mu$ L H<sub>2</sub>O. The equilibrium 'CO<sub>2</sub>' concentration was 0.074 M.





**Table 1. Definition of constants for the reversible formation of carbamate from methanofuran or furfurylamine and CO<sub>2</sub> under equilibrium conditions.** [MFR], equilibrium concentration of methanofuran or furfurylamine in the unprotonated form; [MFRH<sup>+</sup>], equilibrium concentration of methanofuran or furfurylamine in the protonated form; ['MFR'] = [MFR] + [MFRH<sup>+</sup>]; [CO<sub>2</sub>], equilibrium concentration of CO<sub>2</sub> in solution; ['CO<sub>2</sub>'] = [CO<sub>2</sub>] + [H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>] + [HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>] + [CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>]. v<sub>1</sub> = v<sub>2</sub> = exchange rates.

Constant	Definition
k <sub>1</sub> **	v <sub>1</sub> = k <sub>1</sub> ** ['MFR']
k <sub>1</sub> *	v <sub>1</sub> = k <sub>1</sub> * ['MFR'] ['CO <sub>2</sub> ']
k <sub>1</sub>	v <sub>1</sub> = k <sub>1</sub> [MFR] [CO <sub>2</sub> ]
k <sub>2</sub> *	v <sub>2</sub> = k <sub>2</sub> * [carbamate]
k <sub>2</sub>	v <sub>2</sub> = k <sub>2</sub> [carbamate] [H <sup>+</sup> ]
K**	K** = k <sub>1</sub> * [H <sup>+</sup> ]/k <sub>2</sub> * = [carbamate] [H <sup>+</sup> ]/['MFR'] ['CO <sub>2</sub> ']
K*	K* = k <sub>1</sub> */k <sub>2</sub> * = [carbamate]/['MFR'] ['CO <sub>2</sub> ']
K	K = [carbamate] [H <sup>+</sup> ]/[MFR] [CO <sub>2</sub> ]

and unprotonated amines (pK<sub>a</sub> = 8.4) [18] and [carbamate] that of carbamate and carbamic acid (pK<sub>a</sub> = 4.8) [4].

From k<sub>1</sub>\*\* and k<sub>2</sub>\* and the equilibrium concentration of 'CO<sub>2</sub>', CO<sub>2</sub> and H<sup>+</sup> the second order rate constants k<sub>1</sub>\*, k<sub>1</sub> and k<sub>2</sub> defined as in Table 1 were calculated. ['CO<sub>2</sub>'] is the sum of the equilibrium concentrations [CO<sub>2</sub>] + [H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>] + [HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>] + [CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>] and [CO<sub>2</sub>] that of CO<sub>2</sub> in solution.

With the 2D proton NMR method described above we determined whether cell extracts from methanogenic archaea, which were grown on H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub>, catalyze carbamate formation from CO<sub>2</sub> and methanofuran. As methanogen we chose *Methanosarcina barkeri* as this is one of the mesophilic methanogens which grows and reduces CO<sub>2</sub> to methane most rapidly (growth temperature optimum 37 °C; growth rate 0.036 h<sup>-1</sup>) [19,20]. Therefore, if there is an enzyme activity catalyzing carbamate formation from CO<sub>2</sub> and methanofuran, it should be found in cell extracts from this organism. *M. barkeri* can also grow on methanol with the formation of CO<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub>. The final step in CO<sub>2</sub> formation from methanol is the dissociation of *N*-carboxymethanofuran to CO<sub>2</sub> and methanofuran [2,3]. We therefore also tested cell extracts of methanol grown *M. barkeri*. Finally, we analyzed whether purified formylmethanofuran dehydrogenase from *M. barkeri* exhibits carbamate forming activity. The α-subunit of this enzyme shows sequence similarity to amidohydrolases such as urease and adenosine deaminase [21] and has therefore been suggested to catalyze carbamate formation from CO<sub>2</sub> and methanofuran [22].

## MATERIALS AND METHODS

Furfurylamine was from Fluka, Deisenhofen, and D<sub>2</sub>O from Aldrich, Deisenhofen, Germany. Methanofuran was isolated from *Methanobacterium thermoautotrophicum* (strain Marburg) (DSMZ 2133) [23]. *Methanobacterium thermoautotrophicum* and *M. barkeri* (strain Fusaro) DSMZ 804 were obtained from the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany.

### Growth of organisms

*M. barkeri* was grown on either methanol or 80% H<sub>2</sub>/20% CO<sub>2</sub> at 37 °C [24]. *M. thermoautotrophicum* was grown on 80%

H<sub>2</sub>/20% CO<sub>2</sub> at 65 °C [25]. The cells were harvested in the exponential growth phase and suspended in 0.09 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/0.01 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.8) to a final cell concentration of 30–40 mg (dry mass) per ml.

### Preparation of cell extracts

The cell suspensions obtained as described above were passed three times through a French pressure cell at 140 MPa. The lysate was subsequently centrifuged for 40 min at 27 000 g at 4 °C. The supernatant, which is referred to as cell extract, was stored under H<sub>2</sub> as gas phase at 4 °C and assayed for carbamate forming activity within the next 24 h.

The cell extracts were also assayed for formylmethanofuran dehydrogenase activity. Extracts of methanol grown *M. barkeri* exhibited a specific activity of 1.3 U·mg<sup>-1</sup> protein and those of H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> grown cells a specific activity of 1.2 U·mg<sup>-1</sup> at 37 °C. Extracts of *M. thermoautotrophicum* exhibited a specific activity of 1.1 U mg<sup>-1</sup> at 65 °C.

Protein was determined by the BioRad method [26] with bovine serum albumin as standard.

As enzymes from methanoarchaea are generally inactivated in the presence of O<sub>2</sub> the preparation of cell extract, enzyme purification and assays of enzyme activity were performed under strictly anaerobic conditions.

### Enzyme purification

Formylmethanofuran dehydrogenase was purified from methanol grown *M. barkeri* [3]. The purified enzyme exhibited a specific activity of 60 U·mg<sup>-1</sup> protein at 37 °C and of 27 U·mg<sup>-1</sup> at 27 °C.

### Assay of formylmethanofuran dehydrogenase activity

Formylmethanofuran dehydrogenase activity was determined by measuring the rate of benzylviologen reduction with formylmethanofuran at pH 7.5 [3]. One unit represents 1 μmol formylmethanofuran oxidized per min.

### Assay of carbamate formation rates

Carbamate formation rates were determined by measuring the rate of *N*-carboxymethanofuran from 'MFR' and 'CO<sub>2</sub>' under equilibrium conditions via 2D proton exchange NMR spectroscopy (EXSY). The assays were performed in NMR tubes (5 mm × 15 cm) closed with a rubber stopper and contained 0.5 mL reaction mixture. The 2.5-mL gas phase consisted initially of 95% N<sub>2</sub> and 5% H<sub>2</sub> at 10<sup>5</sup> Pa; it was subsequently equilibrated with the liquid phase. The pH values given are those of the equilibrated solutions.

The rate of carbamate formation from 'CO<sub>2</sub>' and methanofuran could have in principle also been determined by <sup>13</sup>C NMR spectroscopy [4,27,28]. However, the sensitivity limits of <sup>13</sup>C NMR and the costs of working with isotopically enriched CO<sub>2</sub> prohibited us from using this approach. A potential complication could have resulted from carbonic anhydrase activity: High rates of exchange between dissolved CO<sub>2</sub> and bicarbonate would result in marked line broadening due to intermediate exchange [28] rendering the rate determination difficult if not impossible.

### NMR measurements

NMR spectra were acquired at a <sup>1</sup>H frequency of 600.13 MHz on a DRX600 spectrometer (Bruker, Analytische Meßtechnik

GmbH, Rheinstetten, Germany) and processed with the program xWINNMR (Bruker). One-dimensional spectra were recorded with 16 384 complex points over a spectral width of 6009.6 Hz. After 16 dummy scans to allow for pre-equilibration, 128 scans were signal averaged. The recycle delay was 2 s and a low-power presaturation pulse was applied during the recycle delay. An exponential window function with 0.5-Hz line broadening was applied and the spectra were referenced to the H<sub>2</sub>O signal at 4.73 p.p.m. at 300 K.

2D EXSY spectra in the ratio 9 : 1 H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O were collected using standard NOESY pulse sequences with 1024 or 2048 complex points in  $t_2$  over a spectral width of 6024.1 Hz. The mixing time  $\tau_m$  was varied between 100 and 400 ms to obtain sufficiently intense exchange cross peaks. Between 200 and 500  $t_1$  experiments with 32 scans were acquired with a recycle delay of 5 s. Water suppression was either achieved by a WATERGATE pulse scheme [29] or a low power presaturation pulse during recycling delay and mixing time [16]. Spectra were zero-filled to 4096 points in  $\omega_1$  and 2048 points in  $\omega_2$ . A 90°-shifted squared sinebell window function was applied for apodization prior to Fourier transformation in both dimensions. Automated baseline correction was applied in both dimensions. Cross peak volumes  $V_{ij}$  were extracted with FELIX98 (MSI, San Diego, CA, USA).

### Calculation of exchange rates

Exchange rates  $v_1 = k_1^* [\text{'MFR'}] [\text{'CO}_2'] = v_2 = k_2^* [\text{carbamate}]$  were calculated from the concentrations of 'MFR', 'CO<sub>2</sub>' and carbamate at equilibrium (see below) and from the rate constants  $k_1^{**} = k_1^* [\text{'CO}_2']$  and  $k_2^*$  (Table 1). The equilibrium concentrations were obtained as described below. The rate constants  $k_1^{**}$  and  $k_2^*$  were obtained from the relative populations  $p_{\text{'MFR'}} = [\text{'MFR'}]/([\text{'MFR'}] + [\text{carbamate}])$  and  $p_{\text{Carbamate}} = [\text{carbamate}]/([\text{'MFR'}] + [\text{carbamate}])$  determined by integration of 1D-NMR spectra and from the peak volumes  $V_{ij}$  determined by integration of the 2D EXSY spectra. The rate constants  $k_1^{**}$  and  $k_2^*$  are related to the relative populations  $p_j$ , the peak volumes  $V_{ij}$ , the longitudinal relaxation rate  $R_j$  and the mixing time  $\tau_m$  by the expression  $\mathbf{A} = \exp(-\mathbf{R}\tau_m)$ , where  $\mathbf{A}$  is the data matrix whose elements are defined by  $A_{ij} = V_{ij}/p_j$  ( $i = \text{'MFR'}$  or carbamate and  $j = \text{carbamate}$  or 'MFR') and  $\mathbf{R}$  is the dynamic matrix:

$$\mathbf{R} = \begin{pmatrix} R_1 + k_1^{**} & -k_2^* \\ -k_1^{**} & R_2 + k_2^* \end{pmatrix}$$

The solution is given by the equation

$$\mathbf{R} = -\frac{\ln \mathbf{A}}{\tau_m} = -\frac{\mathbf{X}(\ln \mathbf{A})\mathbf{X}^{-1}}{\tau_m}$$

and solved by using MATHEMATICA (Wolfram Research, Champaign, IL, USA), where  $\mathbf{X}$  is the square matrix of eigenvectors of  $\mathbf{A}$ , such that  $\mathbf{X}^{-1}\mathbf{A}\mathbf{X} = \lambda = \text{diag}(\lambda_k)$  and  $\ln \mathbf{A} = \text{diag}(\ln \lambda_k)$ , with  $\lambda_k$  the  $k$ th eigenvalue of  $\mathbf{A}$  [30–32].

### Determination of equilibrium concentrations and calculation of the amount of CO<sub>2</sub> in the gas phase

The concentrations of 'MFR' and of carbamate in the 0.5 mL reaction mixtures were obtained by integration of 1D spectra yielding the  $[\text{'MFR'}]/[\text{carbamate}]$  ratio. From the ratios the relative populations  $p_{\text{'MFR'}} = [\text{'MFR'}]/([\text{'MFR'}] + [\text{carbamate}])$  and  $p_{\text{Carbamate}} = [\text{carbamate}]/([\text{'MFR'}] + [\text{carbamate}])$  were calculated, whereby  $[\text{'MFR'}] + [\text{carbamate}]$  equals the 'MFR' concentration added. The concentration of MFR at a

given pH was calculated from that of 'MFR' using a  $pK_a$  of 8.4 [18] ( $\text{pH} = pK_a + \log [\text{MFR}]/[\text{MFRH}^+]$ ). The temperature dependence of the  $pK_a$  could not be taken into account, as the temperature dependence of  $\text{MFRH}^+$  dissociation has not been determined. The concentration of carbamate at the pH values of 7.0–8.0 in our experiments was considered to be equal to the total carbamate concentration as the  $pK_a$  of carbamic acid is 4.8 [4].

As indicated above, the assays were performed in 0.5 mL reaction mixtures equilibrated with a gas phase of 2.5 mL which, after equilibration, contained a substantial amount of CO<sub>2</sub>. In the calculations of the 'CO<sub>2</sub>' and CO<sub>2</sub> concentration in solution therefore the CO<sub>2</sub> in the gas phase had to be considered:

$$m(\text{HCO}_3^-) + m(\text{carbamate}) + m(\text{CO}_2) + m(\text{CO}_2^{\text{gas}}) = m(\text{NaHCO}_3^{\text{added}})$$

where  $m$  refers to the amount in moles of each species at equilibrium and  $m(\text{NaHCO}_3^{\text{added}})$  is the amount of NaHCO<sub>3</sub> added. Rewriting this equation with  $V_{\text{sol.}} = 0.5$  mL and  $V_{\text{gas}} = 2.5$  mL being the volumes of the solution and gas phase, respectively, we arrive for the equilibrium concentration of 'CO<sub>2</sub>':  $[\text{'CO}_2'] = [\text{HCO}_3^-] + [\text{CO}_2] = [\text{NaHCO}_3^{\text{added}}] - [\text{carbamate}] - [\text{CO}_2^{\text{gas}}] V_{\text{gas}}/V_{\text{sol.}}$ , whereby  $[\text{NaHCO}_3^{\text{added}}]$  is the concentration added. The equilibrium concentration of CO<sub>2</sub> in solution at a given pH was calculated from  $[\text{'CO}_2']$  using a  $pK_{a1}$  of H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> of 6.41 at 290 K, of 6.34 at 300 K and of 6.30 at 310 K [33] ( $\text{pH} = pK_{a1} + \log [\text{HCO}_3^-]/[\text{CO}_2]$ ). The amount of CO<sub>2</sub> in the 2.5 mL gas phase was calculated from the CO<sub>2</sub> concentration in the 0.5 mL solution and the Bunsen coefficient  $\alpha$  of CO<sub>2</sub> in water using an  $\alpha$  of 1.32 at 280 K, of 0.95 at 290 K, of 0.72 at 300 K, of 0.55 at 310 K and of 0.41 at 320 K [34] ( $m(\text{CO}_2)/m(\text{CO}_2^{\text{gas}}) = \alpha/5$ ).

In the calculations the concentration of H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> was neglected as the ratio  $[\text{H}_2\text{CO}_3]/[\text{CO}_2]$  at equilibrium is very small ( $< 0.002$ ) and at all pH-values in our experiments the ratio  $[\text{H}_2\text{CO}_3]/[\text{HCO}_3^-]$  was 0.005 or less [35]. As the  $pK_{a2}$  of H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> is 10.3 also CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> could be neglected at all pH-values in our experiments.

## RESULTS

Most methanogenic archaea thriving on H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> are mesophiles and grow optimally at temperatures around 30 °C. The optimum pH for growth and methanogenesis is generally near 7 and the optimal salt concentrations near 0.2 M [36]. The presence of both potassium and sodium ions are required [19,37]. We therefore tried to estimate the rate of carbamate formation from 'MFR' and 'CO<sub>2</sub>' under similar conditions, i.e. in 0.1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> with 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>. In most of the experiments we employed furfurylamine rather than methanofuran as the rates of carbamate formation from the two amines were found to be almost identical. Most of the assays were run at pH 8.0 rather than at pH 7.0 as at pH 8.0 and at a NaHCO<sub>3</sub> concentration of 0.1 M the equilibrium concentration ratio  $[\text{carbamate}]/[\text{'MFR'}]$  was approximately 0.2 whereas at pH 7.0 it was only 0.03. The accuracy of concentration determination of carbamate and 'MFR' via 1D proton NMR spectroscopy decreases drastically with decreasing  $[\text{carbamate}]/[\text{'MFR'}]$  ratio: it was  $\pm 2.5\%$  at pH 8.0 and  $\pm 10\%$  at pH 7.0 as determined in eight independent experiments.

In Fig. 2, the aromatic region of a 1D proton NMR spectrum and a 2D <sup>1</sup>H homonuclear EXSY NMR spectrum of furfurylamine and *N*-carboxyfurfurylamine at equilibrium, pH 8.0 and 300 K are shown. From the 1D spectrum the relative population  $p_{\text{'MFR'}} = 0.84$  and  $p_{\text{carbamate}} = 0.16$  were

obtained by integration of the signals 5 and 5' (Fig. 2A). Integration of the 4 and 4' signals yield  $p_{\text{MFR}} = 0.84$  and  $p_{\text{carbamate}} = 0.16$  and integration of the 3 and 3' signals  $p_{\text{MFR}} = 0.83$  and  $p_{\text{carbamate}} = 0.17$  (Fig. 2A). From the 2D spectrum the peak volumes for the protons 5, 4 and 3 were obtained which provide the data matrices A5, A4 and A3, respectively:

$$A5 = \begin{pmatrix} 36.483 & 21.037 \\ 4.127 & 18.720 \end{pmatrix} A4 = \begin{pmatrix} 35.526 & 20.610 \\ 4.043 & 17.073 \end{pmatrix} A3 = \begin{pmatrix} 36.723 & 20.793 \\ 4.079 & 14.796 \end{pmatrix}$$

For each data matrix **A** the kinetic matrix **R** is calculated with the mixing time  $\tau_m = 0.4$  s:

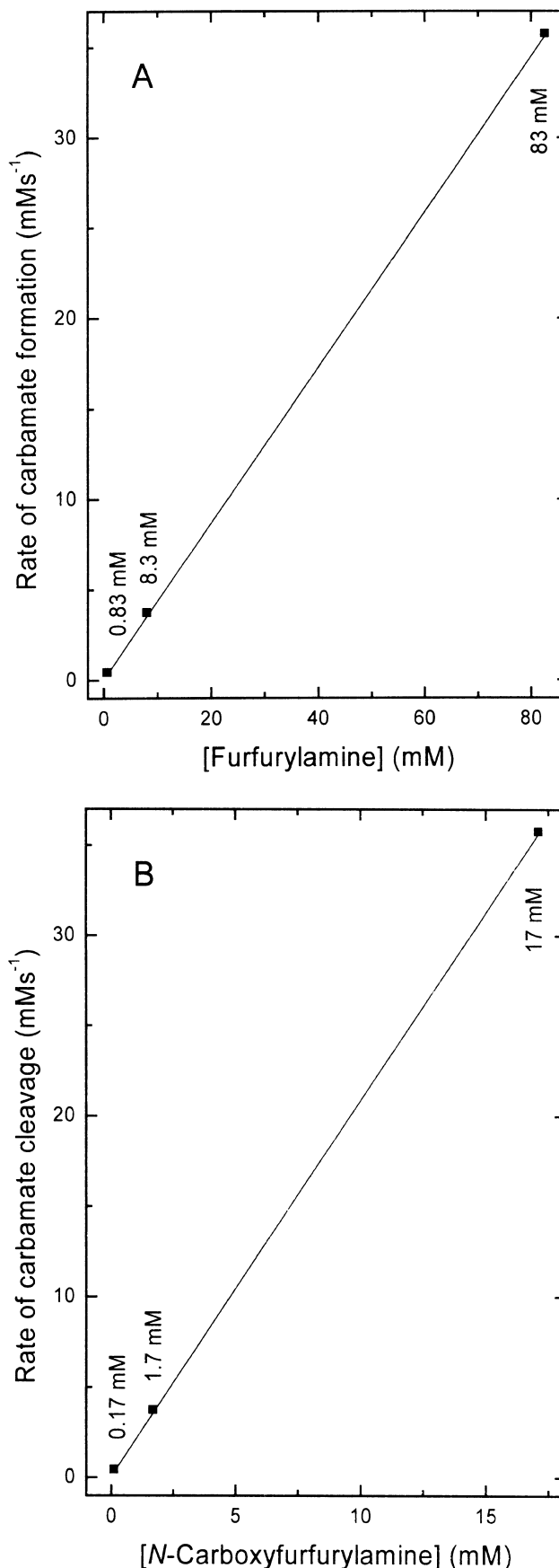
$$R5 = \begin{pmatrix} -8.860 & -2.065 \\ -0.405 & -7.116 \end{pmatrix} R4 = \begin{pmatrix} -8.786 & -2.147 \\ -0.421 & -6.864 \end{pmatrix} R3 = \begin{pmatrix} -8.860 & -2.155 \\ -0.446 & -6.460 \end{pmatrix}$$

The results from the three calculations were averaged and yielded  $k_1^{**} = 0.42 \text{ s}^{-1}$  and  $k_2^* = 2.12 \text{ s}^{-1}$ . From  $k_1^{**}$  and the 'CO<sub>2</sub>' concentration of 0.074 M, a  $k_1^*$  value of  $5.68 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  is calculated ( $k_1^{**} = k_1^* [\text{'CO}_2\text{'}]$ ). From the data an exchange rate  $v_1 = v_2$  at pH 8.0 and 300 K of approximately  $35 \text{ mM}\cdot\text{s}^{-1}$  was obtained for  $[\text{'CO}_2\text{'}] = 0.074 \text{ M}$  and  $[\text{'MFR'}] = 0.083 \text{ M}$  (experiment shown in Fig. 2).

In the experiments shown in Fig. 2, the 0.5-mL assay mixture contained an additional 50  $\mu\text{mol}$  each of furfurylamine and  $\text{HCO}_3^-$ . When the experiment was repeated with 5  $\mu\text{mol}$  furfurylamine and 50  $\mu\text{mol}$   $\text{HCO}_3^-$  or with 0.5  $\mu\text{mol}$  furfurylamine and 50  $\mu\text{mol}$   $\text{HCO}_3^-$  almost the same  $k$ -values were obtained: the exchange rate  $v_1 = v_2$  increased linearly with the equilibrium concentrations of furfurylamine (Fig. 3A) and of *N*-carboxyfurfurylamine (Fig. 3B).

The equilibrium constant  $K^*$  (Table 1) was calculated from  $k_1^*/k_2^*$  and determined from  $[\text{carbamate}]/[\text{'MFR'}][\text{'CO}_2\text{'}]$  to be  $3.0 \text{ M}^{-1}$  at pH 8.0 and 300 K corresponding to a free energy change of carbamate formation of  $-2.7 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  (Table 2).

In Table 2 the rate constants  $k_1^*$  and  $k_2^*$  determined at different pH and temperatures are summarized. The average values for  $n$  independent experiments are given. The results indicate that between pH 7 and 8 the rate constant  $k_1^*$  of carbamate formation did not change much whereas the rate constant  $k_2^*$  decreased with increasing pH. The increase in  $K^*$  with increasing pH (Fig. 4) is thus mainly due to the decrease



**Fig. 3.** Rate of carbamate formation and cleavage in aqueous solution of furfurylamine, 'CO<sub>2</sub>' (CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> + CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) and carboxyfurfurylamine (carbamate) at equilibrium, pH 8.0 and 300 K. (A) Rate of carbamate formation ( $v_1$ ) in dependence of the equilibrium furfurylamine concentration (protonated form plus unprotonated form); (B) rate of carbamate cleavage ( $v_2$ ) in dependence of the equilibrium carbamate concentration. The rates were determined by proton exchange NMR spectroscopy (EXSY). The NMR tube (5 mm × 15 cm), closed with a rubber stopper, contained 0.5 mL of a reaction mixture. For an equilibrium concentration of furfurylamine of 0.83 mM and of carbamate of 0.17 mM the mixture was made up of: 50  $\mu\text{L}$  0.95 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/0.05 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4.6  $\mu\text{L}$  of 1% (v/v) aqueous solution of furfurylamine (0.5  $\mu\text{mol}$ ), 100  $\mu\text{L}$  0.5 M NaHCO<sub>3</sub>, 50  $\mu\text{L}$  D<sub>2</sub>O and 295  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O; for an equilibrium concentration of furfurylamine of 8.3 mM and of carbamate of 1.7 mM the mixture was made up of: 50  $\mu\text{L}$  0.85 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/0.15 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4.6  $\mu\text{L}$  of 1% (v/v) aqueous solution of furfurylamine (5  $\mu\text{mol}$ ), 100  $\mu\text{L}$  0.5 M NaHCO<sub>3</sub>, 50  $\mu\text{L}$  D<sub>2</sub>O and 295  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O; for an equilibrium concentration of furfurylamine of 83 mM and of carbamate of 17 mM the mixture was made up of: 50  $\mu\text{L}$  1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4.6  $\mu\text{L}$  furfurylamine (5  $\mu\text{mol}$ ), 100  $\mu\text{L}$  0.5 M NaHCO<sub>3</sub>, 50  $\mu\text{L}$  D<sub>2</sub>O and 295  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O.

**Table 2. Rate constants for the reverse formation of carbamate from furfurylamine or methanofuran and CO<sub>2</sub> under equilibrium conditions.** For definition of constants see Table 1. The rate constants  $k_1^{**}$  and  $k_2^*$  were determined by proton exchange NMR spectroscopy (EXSY) and  $K^*$  from [carbamate]/[‘MFR’] [‘CO<sub>2</sub>’]. From  $k_1^{**}$ ,  $k_2^*$  and  $K^*$  all the other constants were calculated:  $k_1^* = k_1^{**}/[‘CO_2’]$ ;  $k_1 = k_1^* [‘MFR’] [‘CO_2’]/[MFR] [CO_2]$ ;  $k_2 = k_2^*/[H^+]$  and  $\Delta G^{o*} = -RT \ln K^*$ . In the experiments with furfurylamine the 0.5 mL reaction mixture contained added 50  $\mu$ mol each of furfurylamine and NaHCO<sub>3</sub> and in the experiments with methanofuran 0.5  $\mu$ mol methanofuran and 50  $\mu$ mol NaHCO<sub>3</sub>. The equilibrium concentrations of ‘CO<sub>2</sub>’, CO<sub>2</sub>, ‘MFR’ and MFR were calculated as described in Materials and methods. The values obtained are printed in bold type. The standard deviations  $s$  are given for independent experiments by the expression:

$$s^2 = 1/(n-1) \sum_{i=1}^n (x_i - a)^2$$

where  $x_i$  is the  $i$ th value and  $a$  is the average value. The relative large standard deviations are mainly due to small differences in the concentrations of ‘CO<sub>2</sub>’ and ‘MFR’, and in pH, temperature and ionic strength of the samples rather than to the NMR intrinsic error which was below 10%.

Amine	$n$	$k_1^{**}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_1^*$ (M <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup> )	$10^{-2} k_1$ (M <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup> )	$k_2^*$ (s <sup>-1</sup> )	$10^{-8} k_2$ (M <sup>-1</sup> ·s <sup>-1</sup> )	$K^*$ (M <sup>-1</sup> )	$10^6 K$	$\Delta G^{o*}$ (kJ·mol <sup>-1</sup> )
<b>Furfurylamine</b>									
pH 7.0, 300 K	8	<b>0.30 ± 0.09</b>	7	10	<b>11.5 ± 3.2</b>	1.2	<b>0.6 ± 0.145</b>	8.3	+ 1.3
pH 7.5, 300 K	3	<b>0.42 ± 0.11</b>	6	9	<b>5.5 ± 0.5</b>	1.9	<b>1.1 ± 0.125</b>	4.7	- 0.3
pH 8.0, 300 K	11	<b>0.43 ± 0.03</b>	6	10	<b>2.1 ± 0.2</b>	2.0	<b>3.0 ± 0.087</b>	5.0	- 2.7
pH 8.0, 280 K	3	-	-	-	-	-	<b>3.2 ± 0.312</b>	-	- 2.7
pH 8.0, 290 K	3	<b>0.15 ± 0.03</b>	2	3	<b>0.7 ± 0.2</b>	0.7	<b>3.1 ± 0.288</b>	4.3	- 2.7
pH 8.0, 310 K	4	<b>1.43 ± 0.20</b>	20	36	<b>7.9 ± 2.0</b>	7.0	<b>2.9 ± 0.207</b>	5.1	- 2.7
pH 8.0, 320 K	3	-	-	-	-	-	<b>2.7 ± 0.131</b>	-	- 2.6
<b>Methanofuran</b>									
pH 8.0, 300 K	21	<b>0.31 ± 0.06</b>	4	6	<b>3.5 ± 0.6</b>	4.0	<b>1.2 ± 0.150</b>	1.5	- 0.4

in  $k_2^*$  (Table 2). Both  $k_1^*$  and  $k_2^*$  increased with temperature with a Q<sub>10</sub> of approximately 3;  $K^*$  decreased somewhat with increasing temperature as reported for other carbamates [38]. The results shown in Table 2 also indicate that the rate constant  $k_1^*$  of carbamate formation from methanofuran and ‘CO<sub>2</sub>’ has almost the same value as that of carbamate formation from ‘furfurylamine’ and ‘CO<sub>2</sub>’.

From the concentrations of ‘CO<sub>2</sub>’ and of ‘MFR’ determined by 1D-NMR spectroscopy and the pK<sub>a</sub> of H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and of MFRH<sup>+</sup> the concentrations of CO<sub>2</sub> and of unprotonated

methanofuran were obtained, allowing to calculate  $k_1$  (Table 1). The second order rate constant  $k_1$  was found to be approximately 1000 M<sup>-1</sup>·s<sup>-1</sup> at 300 K and pH values between 7.0–8.0 (Table 2). From  $k_1$  and from  $k_2$  at pH 7 and 300 K a  $\Delta G^{o'}$  of -11 kJ·mol<sup>-1</sup> for carbamate formation from CO<sub>2</sub> and MFR was obtained ( $\Delta G^{o'} = -RT \ln K + RT \ln 10^{-7}$ ) in good agreement with previous findings that carbamate formation from CO<sub>2</sub> and uncharged amines is exergonic at pH 7 [4].

In addition, we investigated whether cell extracts of methanogenic archaea can increase the rate of the carbamate

**Table 3. Effect of cell extracts and of purified formylmethanofuran dehydrogenase from *M. barkeri* on the rate of carbamate formation at pH 7.8 and 300 K (27 °C).** The rates of carbamate formation ( $v_1 = k_1^{**} [‘MFR’]$ ) (Table 1) were determined under equilibrium conditions.  $k_1^{**}$  was determined by proton exchange NMR spectroscopy (EXSY) and the equilibrium concentration of ‘MFR’ by 1D NMR spectroscopy. The experiments were performed in an NMR tube (5 mm × 15 cm) closed with a rubber stopper. It contained 0.5 mL of a reaction mixture made up of 25  $\mu$ L 0.9 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/0.1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 37.5  $\mu$ L 1.38 mM methanofuran or 37.5  $\mu$ L 13.8 mM methanofuran, 100  $\mu$ L 0.5 M NaHCO<sub>3</sub>, 50  $\mu$ L D<sub>2</sub>O, and either 250  $\mu$ L 0.09 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/0.01 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> or 250  $\mu$ L cell extract (4–5 mg protein) or 250  $\mu$ L purified formylmethanofuran dehydrogenase (7–10 U) in 0.09 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/0.01 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. The standard deviations are from  $n$  independent experiments (see legend to Table 2). The NMR intrinsic error was less than 5%. However, the lack of reproducibility of the sample preparation is the reason for the error being 25% (see legend to Table 2). The measurements with 0.1 mM methanofuran were performed only once. Therefore no error is given there.

Conditions	Rate at 300 K	
	(mM·s <sup>-1</sup> )	( $\mu$ mol·min <sup>-1</sup> ·mL <sup>-1</sup> )
<b>Methanofuran (1 mM), <math>n = 5</math></b>		
- Protein	0.27 ± 0.06	16 ± 4
+ Cell extract of CH <sub>3</sub> OH grown <i>Methanosarcina</i>	0.28 ± 0.06	17 ± 4
+ Formylmethanofuran dehydrogenase	0.38 ± 0.08	23 ± 5
<b>Methanofuran (0.1 mM), <math>n = 1</math></b>		
- Protein	0.03	1.8
+ Cell extract of H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> grown <i>Methanosarcina</i>	0.04	2.4
+ Cell extract of CH <sub>3</sub> OH grown <i>Methanosarcina</i>	0.03	1.8
+ Cell extract of H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub> grown <i>Methanobacterium</i>	0.03	1.8
+ Formylmethanofuran dehydrogenase	0.04	2.4

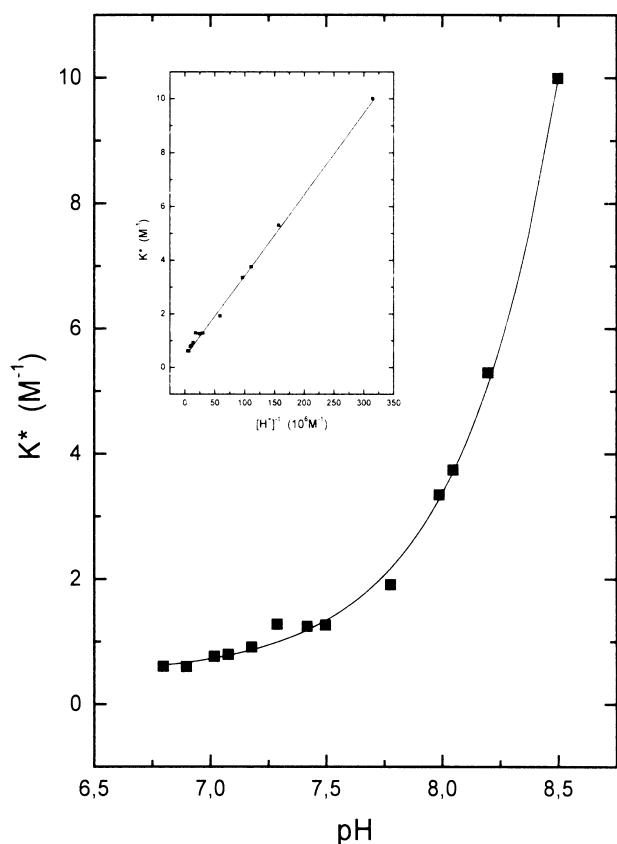


Fig. 4. pH-Dependence of the equilibrium constant  $K^*$  at 300 K (27 °C) for carbamate formation from furfurylamine (protonated form plus unprotonated form) and 'CO<sub>2</sub>' (CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> + CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>). The concentrations of furfurylamine ('MFR') and of the carbamate were determined by 1D NMR spectroscopy.  $K^* = [\text{carbamate}]/[\text{'MFR'}][\text{'CO}_2\text{'}]$ . The inset shows a plot of  $K^*$  vs. the reciprocal proton concentration yielding a straight line as to be expected from  $K^* = K^{**}/[\text{H}^+]$ , where  $K^{**} = [\text{carbamate}][\text{H}^+]/[\text{'MFR'}][\text{'CO}_2\text{'}]$  (Table 1).

formation. We tested cell extracts, obtained as described in the Materials and methods section, from H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> grown and from methanol grown *M. barkeri* and from H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> grown *M. thermoautotrophicum*. A convincing increase in the rate of carbamate formation was not found (Table 3). We also tested the effect of formylmethanofuran dehydrogenase purified from *M. barkeri* with the same result. The small increases observed (Table 3) may be due to small differences in the concentrations of 'CO<sub>2</sub>' and 'MFR' and in pH, temperature and ionic strength of the samples. To be significant the differences in rates would have to be at least twice as high.

In the experiment described in Table 3, the pH was 7.8. Unfortunately, the rates of *N*-carboxymethanofuran formation from methanofuran and 'CO<sub>2</sub>' could not be determined with accuracy at pH 7.0 as at pH 7.0 and physiological methanofuran concentrations (0.1–1 mM) the very low signal to noise ratio only allowed qualitative determination of concentrations. The presence of carbamate forming activity at pH 7.0 can therefore not be excluded completely.

## DISCUSSION

The rate of carbamate cleavage in aqueous solution has been determined for many different carbamates. In an extensive study [5] carbamate cleavage was followed spectrophotometrically. The reaction was found to be subject to general acid

catalysis and the rate to be affected by ionic strength. For carbamates of aliphatic amines  $k_2$  values between  $4.7 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  (*n*-BuNHCOO<sup>-</sup>) and  $1.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  (cyclohexyl-NHCOO<sup>-</sup>) were determined in 0.28 M phosphate buffer pH 10.8 at 25 °C. We found  $k_2$  for *N*-carboxymethanofuran cleavage at 27 °C and pH 8.0 to be  $4.0 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  and for *N*-carboxyfurfurylamine to be  $2.0 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  (Table 2).

Rates of carbamate formation have been determined via stopped flow [39,40] or from the product ratio carbamate/carbonate [41] for the reaction of the uncharged amine with CO<sub>2</sub>. For carbamate formation from diethanol amine and CO<sub>2</sub> a  $k_1$  of  $110 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  at 25 °C and a pH of approximately 10 was reported [40]. The carbamate reaction of glycylglycine proceeds with a  $k_1$  of  $2500 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  at 37 °C and pH 7–8 [39]. We found  $k_1$  for carbamate formation from MFR and CO<sub>2</sub> to be approximately  $1000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  at 300 K and pH values between 7.0 and 8.0.

Also the equilibrium constant  $K^* = k_1^*/k_2^*$  of *N*-carboxymethanofuran formation can be compared with the equilibrium constant of other carbamate forming reactions.  $K^*$  of *N*-carboxyfurfurylamine formation from 'MFR' and 'CO<sub>2</sub>' was determined at 300 K to be  $0.6 \text{ M}^{-1}$  at pH 7.0 and  $3.0 \text{ M}^{-1}$  at pH 8.0 (Table 2). The values are in the order of the  $K^*$  values published for other carbamates [27,38].

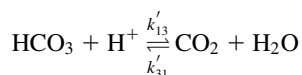
In methanogenic archaea grown on H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> the concentration of methanofuran is in the range of 0.1 mM to 1 mM. The concentration of 'CO<sub>2</sub>' in natural habitats of methanogens is between 10 mM and 100 mM [36]. The 'CO<sub>2</sub>' concentration inside the cells is probably very similar as CO<sub>2</sub> can freely permeate the cytoplasmic membrane and at pH 7 there is no large pH difference between the inside and the outside [42]. We have determined the rate constant  $k_1^*$  of carbamate formation from 'MFR' and 'CO<sub>2</sub>' to be approximately  $6 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  at 300 K (27 °C) and  $20 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$  at 310 K (37 °C) (Table 2). From these data and because  $k_1^*$  was almost pH independent, the rates of spontaneous carbamate formation in methanogens are calculated to be between  $0.005 \text{ mM}\cdot\text{s}^{-1}$  (0.1 mM methanofuran and 10 mM 'CO<sub>2</sub>') and  $0.5 \text{ mM}\cdot\text{s}^{-1}$  (1 mM methanofuran and 100 mM 'CO<sub>2</sub>') at 27 °C and between  $0.020 \text{ mM}\cdot\text{s}^{-1}$  and  $2.0 \text{ mM}\cdot\text{s}^{-1}$  at 37 °C. These rates have to be compared with those of methane formation from H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> in methanogenic archaea.

Cell suspensions of *M. barkeri*, which grows optimally at 37 °C, catalyze the formation of methane from CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> with a specific rate of 0.2 μmol per min and mg cells (dry mass) at 37 °C when the CO<sub>2</sub> concentration in the gas phase is 20% and the H<sub>2</sub> concentration is 80% both at  $2 \times 10^5 \text{ Pa}$  [19]. At a CO<sub>2</sub> concentration of 20% in the gas phase at  $2 \times 10^5 \text{ Pa}$  and an intracellular pH of 7.0 the intracellular 'CO<sub>2</sub>' concentration is calculated to be approximately 60 mM (At 37 °C and a CO<sub>2</sub> concentration in the gas phase of 100% at  $10^5 \text{ Pa}$  the CO<sub>2</sub> concentration in water is 24.8 mM;  $pK_1$  of H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> is 6.3). A specific rate of 0.2 μmol per min and mg cells is equal to a rate of 120 μmol per min and ml intracellular volume or a rate of  $2 \text{ mM}\cdot\text{s}^{-1}$ . For the calculation an intracellular volume of  $3.3 \mu\text{L}\cdot(\text{mg protein})^{-1} = 1.65 \mu\text{L}\cdot(\text{mg cells (dry mass)})^{-1}$  was used [43]. The maximal rate of methane formation from CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> at 37 °C ( $2 \text{ mM}\cdot\text{s}^{-1}$ ) is thus almost the same as the calculated maximal rate of spontaneous carbamate formation at 37 °C ( $2.0 \text{ mM}\cdot\text{s}^{-1}$ ) inside methanogenic archaea (see above).

In the natural habitats of methanogens, the H<sub>2</sub> concentration is <0.1% (in the gas phase) [36]. At this concentration the specific rates of methane formation is only less than 1% of that

at a H<sub>2</sub> concentration of 80%, half maximal rates being observed at a H<sub>2</sub> concentration of 20% [25]. At 0.1% H<sub>2</sub> the specific rate of methane formation is only 2 nmol per min and mg cells equal to a rate of 20 μM·s<sup>-1</sup> which is a rate 100 times smaller than the spontaneous rate of carbamate formation under these conditions.

As already indicated the pH in the natural habitat of methanogens is generally near 7 [36]. At this pH most of the 'CO<sub>2</sub>' is present as HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; pK<sub>a1</sub> = 6.3). As CO<sub>2</sub> rather than HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> is the species of 'CO<sub>2</sub>' reduced to methane [3], the very first step in CO<sub>2</sub> reduction to methane is therefore the formation of CO<sub>2</sub> from HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (see the equation below, rate constants indices as in [38]).



This formula neglects H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> formation from CO<sub>2</sub> and from HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> as the ratio [H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>]/[CO<sub>2</sub>] at equilibrium is very small (< 0.002), and at all pH values in our experiments the ratio [H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>]/[HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>] was 0.005 or less. At 25 °C and an ionic strength of 0.055 the corresponding rate constants are: k'<sub>13</sub> = 5.5 × 10<sup>4</sup> M<sup>-1</sup>·s<sup>-1</sup> and k'<sub>31</sub> = 0.0375 s<sup>-1</sup> [34]. At a 'CO<sub>2</sub>' concentration of 0.1 M and a pH of 7.0 the HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> concentration is 0.082 M. The rate of CO<sub>2</sub> formation from HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> at pH 7.0 is calculated from v = k'<sub>13</sub> [HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>] [H<sup>+</sup>] to be 0.45 mM·s<sup>-1</sup> at 25 °C. This rate has to be compared with a calculated maximal rate of carbamate formation of 0.5 mM·s<sup>-1</sup> at 27 °C (see above). The rates of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> dehydration and of carbamate formation are thus very similar.

Cell extracts of *M. barkeri* grown on 80% H<sub>2</sub>/20% CO<sub>2</sub> do not exhibit carbonic anhydrase activity [24]. The finding indicates that the rate of the spontaneous formation of CO<sub>2</sub> from H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> and thus also that of carbamate formation are apparently sufficiently high not to become rate limiting for methane formation under the growth conditions. However, at lower CO<sub>2</sub> concentrations this may be the case. In the genome of methanogenic archaea [44,45] several open reading frames have been found which encode for carbonic anhydrases and which are probably transcribed only when the methanogens thrive at very low CO<sub>2</sub> concentration [46].

In the present studies we have investigated whether cell extracts of *M. barkeri* contain an enzyme activity that catalyzes the formation of carbamate from CO<sub>2</sub> and methanofuran. Such an activity was not found (Table 3). The cell extracts also did not exhibit carbonic anhydrase activity despite the fact that this organism can synthesize carbonic anhydrase under certain growth conditions [24]. This suggests that an enzyme catalyzing carbamate formation might only be induced under specific growth conditions which have not yet been described.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Max-Planck-Gesellschaft, by the Deutsche Forschungsgemeinschaft and by the Fonds der Chemischen Industrie. All NMR measurements were performed at the Large Scale Facility for Biomolecular NMR (ERBCT95-0034) of the University of Frankfurt. We thank Johanna Moll (MPI Marburg) for the isolation of methanofuran from *Methanobacterium thermoautotrophicum* and Dr W. Bernel and Dr T. Keller (both from Bruker, Karlsruhe) for continuous support. S. B. is a recipient of a 'Kekulé Stipendium' of the Fonds der Chemischen Industrie.

## REFERENCES

1. Wolfe, R.S. (1996) 1776–1996: Alessandro Volta's combustible air.

220 years after Volta's experiments, the microbial formation of methane approaches an understanding. *ASM News* **62**, 529–534.

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

3. Vorholt, J.A. & Thauer, R.K. (1997) The active species of 'CO<sub>2</sub>' utilized by formylmethanofuran dehydrogenase from methanogenic Archaea. *Eur. J. Biochem.* **248**, 919–924.

4. Lorimer, G.H. (1983) Carbon dioxide and carbamate formation: the makings of a biochemical control system. *Trends Biochem. Sci.* **8**, 65–68.

5. Ewing, S.P., Lockshon, D. & Jencks, W.P. (1980) Mechanism of cleavage of carbamate anions. *J. Am. Chem. Soc.* **102**, 3072–3084.

6. Cleland, W.W., Andrews, T.J., Gutteridge, S., Hartman, F.C. & Lorimer, G.H. (1998) Mechanism of rubisco: the carbamate as general base. *Chem. Rev.* **98**, 549–561.

7. Jabri, E., Carr, M.B., Hausinger, R.P. & Karplus, P.A. (1995) The crystal structure of urease from *Klebsiella aerogenes*. *Science* **268**, 998–1004.

8. Park, I.S. & Hausinger, R.P. (1995) Requirement of carbon dioxide for *in vitro* assembly of the urease nickel metalocenter. *Science* **267**, 1156–1158.

9. Benning, M.M., Kuo, J.M., Raushel, F.M. & Holden, H.M. (1995) Three-dimensional structure of the binuclear metal center of phosphotriesterase. *Biochemistry* **34**, 7973–7978.

10. Hong, S.B., Kuo, J.M., Mullins, L.S. & Raushel, F.M. (1995) CO<sub>2</sub> is required for the assembly of the binuclear metal center of phosphotriesterase. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 7580–7581.

11. Gibson, K.J., Lorimer, G.H., Rendina, A.R., Taylor, W.S., Cohen, G., Gatenby, A.A., Payne, W.G., Roe, D.C., Lockett, B.A., Nudelman, A., Marcovici, D., Nachum, A., Wexler, B.A., Marsilii, E.L., Turner, I.M.S., Howe, L.D., Kalbach, C.E. & Chi, H. (1995) Dethiobiotin synthetase: The carbonylation of 7,8-diaminononanoic acid proceeds regiospecifically via the N7-carbamate. *Biochemistry* **34**, 10976–10984.

12. Thoden, J.B., Holden, H.M., Wesenberg, G., Raushel, F.M. & Rayment, I. (1997) Structure of carbamoyl phosphate synthetase – a journey of 96 Å from substrate to product. *Biochemistry* **36**, 6305–6316.

13. Mueller, E.J., Meyer, E., Rudolph, J., Davisson, V.J. & Stubbe, J. (1994) N<sup>5</sup>-Carboxyaminoimidazole ribonucleotide: evidence for a new intermediate and two new enzymatic activities in the *de novo* purine biosynthetic pathway of *Escherichia coli*. *Biochemistry* **33**, 2269–2278.

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

15. Jeener, J., Meier, B.H., Bachmann, P. & Ernst, R.R. (1979) Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy. *J. Chem. Phys.* **71**, 4546–4553.

16. Meier, B.H. & Ernst, R.R. (1979) Elucidation of chemical exchange networks by two-dimensional NMR spectroscopy: The heptamethylbenzenonium ion. *J. Am. Chem. Soc.* **101**, 6441–6442.

17. Schleucher, J., Schwörer, B., Thauer, R.K. & Griesinger, C. (1995) Elucidation of the stereochemical course of chemical reactions by magnetic labeling. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 2941–2942.

18. Arnold, H., Pahls, K. & Potsch, D. (1969) Reaktion von N-(Chloräthyl)-2-oxazolidon mit primären Aminen. *Tetrahedron Lett.* **3**, 137–139.

19. Perski, H.J., Schönheit, P. & Thauer, R.K. (1982) Sodium dependence of methane formation in methanogenic bacteria. *FEBS Lett.* **143**, 323–326.

20. Schwörer, B. & Thauer, R.K. (1991) Activities of formylmethanofuran dehydrogenase, methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase, methylenetetrahydromethanopterin reductase, and heterodisulfide reductase in methanogenic bacteria. *Arch. Microbiol.* **155**, 459–465.

21. Holm, L. & Sander, C. (1997) An evolutionary treasure – unification of a broad set of amidohydrolases related to urease. *Proteins* **28**, 72–82.

22. Hochheimer, A., Hedderich, R. & Thauer, R. (1998) The formylmethanofuran dehydrogenase isoenzymes in *Methanobacterium wolfei* and *M. thermoautotrophicum*: induction of the molybdenum

- isoenzyme by molybdate and constitutive synthesis of the tungsten isoenzyme. *Arch. Microbiol.* **170**, 389–393.
23. Shima, S. & Thauer, R.K. (2000) Tetrahydromethanopterin specific enzymes from *Methanopyrus kandleri*. *Methods Enzymol.* in press.
  24. Karrasch, M., Bott, M. & Thauer, R.K. (1989) Carbonic anhydrase activity in acetate grown *Methanosarcina barkeri*. *Arch. Microbiol.* **151**, 137–142.
  25. Schönheit, P., Moll, J. & Thauer, R.K. (1980) Growth parameters ( $K_S$ ,  $\mu_{max}$ ,  $Y_S$ ) of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Arch. Microbiol.* **127**, 59–65.
  26. 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.
  27. Barth, D., Rubini, P. & Delpuech, J.J. (1983) Étude de la formation du carbamate de diéthanolamine par résonance magnétique nucléaire du carbone-13. *Nouv. J. Chim.* **7**, 563–567.
  28. Morrow, J.S., Matthew, J.B. & Gurd, F.R.N. (1981) Measurement of CO<sub>2</sub> binding: The <sup>13</sup>C NMR method. *Methods Enzymol.* **76**, 496–511.
  29. Piotto, M., Saudek, V. & Sklenát, V. (1992) Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *J. Biomol. NMR* **2**, 661–665.
  30. McConnell, H.M. (1958) Reaction rates by nuclear magnetic resonance. *J. Chem. Phys.* **28**, 430–431.
  31. Shao, W.P., Liu, G.H. & Tang, W.X. (1995) Binding of 1-methylimidazole to cytochrome C – kinetic analysis and resonance assignments by two-dimensional NMR. *Biochim. Biophys. Acta* **1248**, 177–185.
  32. Chen, Y., Liu, G. & Tang, W. (1996) H-1 NMR studies of pyridine binding to metmyoglobin. *Inorg. Chem. Acta* **249**, 239–243.
  33. Dean, J.A. (1992). *Lange's Handbook of Chemistry*, 14th edn. McGraw-Hill, Inc., New York, USA.
  34. (1976) *L'air Liquide. Gas Encyclopaedia*. Elsevier, Amsterdam, the Netherlands.
  35. Gibbons, B.H. & Edsall, J.T. (1963) Rate of hydration of carbon dioxide and dehydration of carbonic acid at 25 °C. *J. Biol. Chem.* **238**, 3502–3507.
  36. Zinder, S.H. (1993) Physiological ecology of methanogens. In *Methanogenesis. Ecology, Physiology, Biochemistry and Genetics* (Ferry, J.G., ed.), pp. 128–206. Chapman & Hall, London, UK.
  37. Perski, H.-J., Moll, J. & Thauer, R.K. (1981) Sodium dependence of growth and methane formation in *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Arch. Microbiol.* **130**, 319–321.
  38. Aroua, M.K., Amor, A.B. & Haji-Sulaiman, M.Z. (1997) Temperature dependency of the equilibrium constant for the formation of carbamate from diethanolamine. *J. Chem. Eng. Data.* **42**, 692–696.
  39. Gros, G., Forster, R.E. & Lin, L. (1976) The carbamate reaction of glycylglycine, plasma, and tissue extracts evaluated by a pH stopped flow apparatus. *J. Biol. Chem.* **251**, 4398–4407.
  40. Barth, D., Tondre, C. & Delpuech, J.-J. (1983) Stopped-flow determination of carbon dioxide-diethanolamine reaction mechanism: kinetics of carbamate formation. *Intern. J. Chem. Kinetics* **15**, 1147–1160.
  41. Caplow, M. (1968) Kinetics of carbamate formation and breakdown. *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 6795–6803.
  42. Deppenmeier, U., Müller, V. & Gottschalk, G. (1996) Pathways of energy conservation in methanogenic archaea. *Arch. Microbiol.* **165**, 149–163.
  43. 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.
  44. 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.M. & Venter, J.C. (1996) Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* **273**, 1058–1073.
  45. 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* ΔH: functional analysis and comparative genomics. *J. Bacteriol.* **179**, 7135–7155.
  46. Smith, K.S. & Ferry, J.G. (1999) A plant-type (β-class) carbonic anhydrase in the thermophilic methanoarchaeon *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *J. Bacteriol.* **181**, 6247–6253.
  47. Leigh, J.A., Rinehart, K.L.J. & Wolfe, R.S. (1984) Structure of methanofuran, the carbon dioxide reduction factor of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *J. Am. Chem. Soc.* **106**, 3636–3640.

### Zusatztable zu Tabelle 2 der Carbamatpublikation:

Amin	[Carbamat]	['CO <sub>2</sub> '] <sub>Rest</sub>	['MFR']	[CO <sub>2</sub> ]	[CO <sub>2</sub> <sup>gas</sup> ]	[MFR]	[HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ]	['CO <sub>2</sub> ']	K* aus []	10 <sup>6</sup> K	k <sub>1</sub> **	k <sub>1</sub> *	10 <sup>-2</sup> k <sub>1</sub>	ΔG <sup>0*</sup>
	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(mM)	(M <sup>-1</sup> )		(s <sup>-1</sup> )	(M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	(M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	(kJ/mol)
1. Furfurylamin														
pH 7.0, 300 K	2.25	97.75	97.75	7.810	54.239	3.743	35.701	43.511	0.529	7.696	0.30	6.895	10.032	1.588
pH 7.5, 300 K	6.75	93.25	93.25	4.163	28.911	10.427	60.176	64.339	1.125	4.917	0.42	6.528	9.023	-0.294
pH 8.0, 300 K	17.60	82.40	82.40	1.536	10.665	23.463	70.199	71.735	2.978	4.884	0.43	5.994	9.832	-2.721
pH 8.0, 280 K	18.90	81.10	81.10	2.227	8.437	23.093	70.436	72.663	3.207	3.674	--	--	--	-2.713
pH 8.0, 290 K	18.30	81.70	81.70	1.809	9.520	23.264	70.371	72.180	3.103	4.349	0.15	2.078	2.912	-2.730
pH 8.0, 310 K	16.80	83.20	83.20	1.382	12.562	23.691	69.256	70.638	2.859	5.132	1.43	20.244	36.339	-2.708
pH 8.0, 320 K	15.60	84.40	84.40	1.309	15.962	24.033	67.129	68.438	2.70	4.959	--	--	--	-2.644
2. Methanofuran														
pH 8.0, 300 K	0.01	99.99	0.09	1.864	12.942	28.472	85.185	87.049	1.148	1.885	0.31	3.561	5.841	16.882
Textbeispiel:														
	16.32	83.68	83.68	1.560	10.831	23.828	71.290	72.850	2.677	4.391	0.41	5.628	9.230	-2.456
	16.32	83.68	83.68	1.560	10.831	23.828	71.290	72.895	2.677	4.391	0.42	5.765	9.455	-2.257
	16.56	83.44	83.44	1.556	10.800	23.759	71.085	72.641	2.732	4.482	0.45	6.195	10.157	-2.507

$K = [\text{Carbamat}] [\text{H}^+] / [\text{MFR}] [\text{CO}_2]; v_1 = k_1^* [\text{'MFR'}] [\text{'CO}_2']; v_1 = k_1 [\text{MFR}] [\text{CO}_2]; \text{pK}_a\text{-Wert von Furfurylamin} = 8.4$

(K)	$a_{\text{CO}_2(T)}$	$\text{pK}_{\text{S}_{\text{H}_2\text{CO}_3(T)}}$	$R \times T$ (kJ/mol)	$5 / a_{\text{CO}_2(T)}$	$10^{\text{pH}-\text{pK}_s}$ (pH = 8)	$10^{\text{pH}-\text{pK}_s}$ (pH = 7.5)	$10^{\text{pH}-\text{pK}_s}$ (pH = 7)
280	1.3234	6.50	2.328	3.79	31.62		
290	0.95055	6.41	2.411	5.26	38.91		
300	0.72235	6.34	2.494	6.94	45.71	14.45	4.57
310	0.55174	6.30	2.578	9.09	50.12		
320	0.41093	6.29	2.661	12.20	51.29		

$$[\text{CO}_2^{\text{gas}}] = \frac{5}{a(T)} [\text{CO}_2]$$

$$[\text{HCO}_3^-] = 10^{\text{pH}-\text{pK}_a(T)} [\text{CO}_2]$$

$$[\text{CO}_2] = \frac{[\text{CO}_2]_{\text{Rest}}}{\left(\frac{5}{a(T)} + 1 + 10^{\text{pH}-\text{pK}_a(T)}\right)}$$

$$[\text{MFR}] = \frac{[\text{'MFR'}] 10^{\text{pH}-\text{pK}_a}}{(1 + 10^{\text{pH}-\text{pK}_s})}$$

$$[\text{CO}_2]_{\text{Rest}} = [\text{CO}_2] + [\text{CO}_2^{\text{gas}}] + [\text{HCO}_3^-]$$

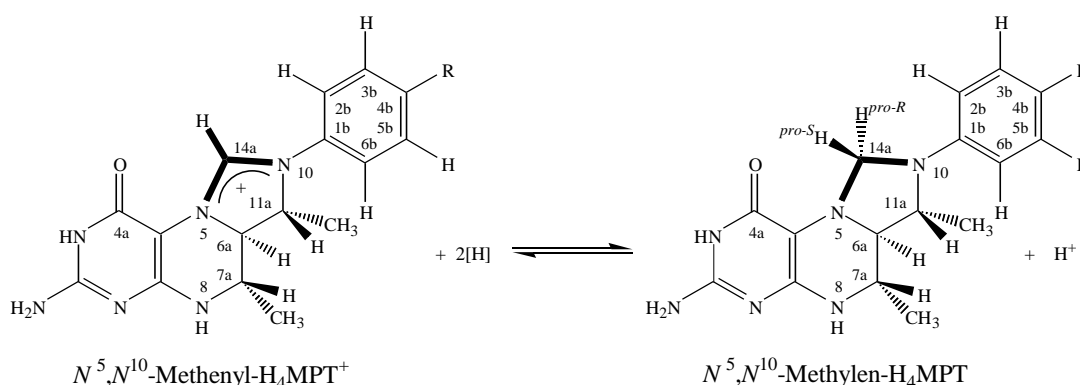


## 2 Die *Re*-Seiten Stereospezifität von $N^5,N^{10}$ -Methylen tetrahydromethanopterin- und $N^5,N^{10}$ -Methylen tetrahydrofolat-abhängigen-Dehydrogenasen ist vorherbestimmt durch intrinsische Eigenschaften des Substrats

Die Ergebnisse hierzu wurden in ChemBioChem veröffentlicht. Die Publikation ist am Ende dieses Kapitels abgedruckt. Im folgenden werden die wichtigsten Punkte zusammengefaßt. Der Ergebnisteil enthält zusätzlich als Vergleich für die Konformationen des Imidazolidinrings die Kristallstrukturen von  $N^5,N^{10}$ -Methylen tetrahydrofolat, einen Reaktionsweg der gesamten Reaktion von  $N^5,N^{10}$ -Methenyl tetrahydromethanopterin zu  $N^5,N^{10}$ -Methylen tetrahydromethanopterin sowie die Ergebnisse von Gerrit Buurman am MPI für Terrestrische Mikrobiologie in Marburg, die darauf hinweisen, daß es einen zusätzlichen Cofaktor gibt.

### 2.1 Problemstellung

Innerhalb der Methanbildung findet eine Reihe von Dehydrogenasereaktionen statt (siehe Kapitel A). Die  $H_2$ -bildende  $N^5,N^{10}$ -Methylen tetrahydromethanopterin-Dehydrogenase (Hmd) aus *Methanothermobacter marburgensis* katalysiert die reversible Reaktion von  $N^5,N^{10}$ -Methenyl tetrahydromethanopterin (Methenyl- $H_4MPT^+$ ) mit molekularem Wasserstoff zu  $N^5,N^{10}$ -Methylen tetrahydromethanopterin (Methylen- $H_4MPT$ ) und einem Proton (siehe Abb. 8).



**Abb. 8: Reversible Reaktion von Methenyl- $H_4MPT^+$  und Wasserstoff zu Methylen- $H_4MPT$  und einem Proton, katalysiert von  $H_2$ -bildender Methylen- $H_4MPT$ -Dehydrogenase aus methanogenen Archaea.** Bei der Reaktion wird ein Hydridion stereoselektiv direkt in die *pro-R*-Position von Methylen- $H_4MPT$  übertragen [52]. Für die vollständige Struktur von Tetrahydromethanopterin und des funktionellen Analogons Tetrahydrofolat siehe [53] und [54].

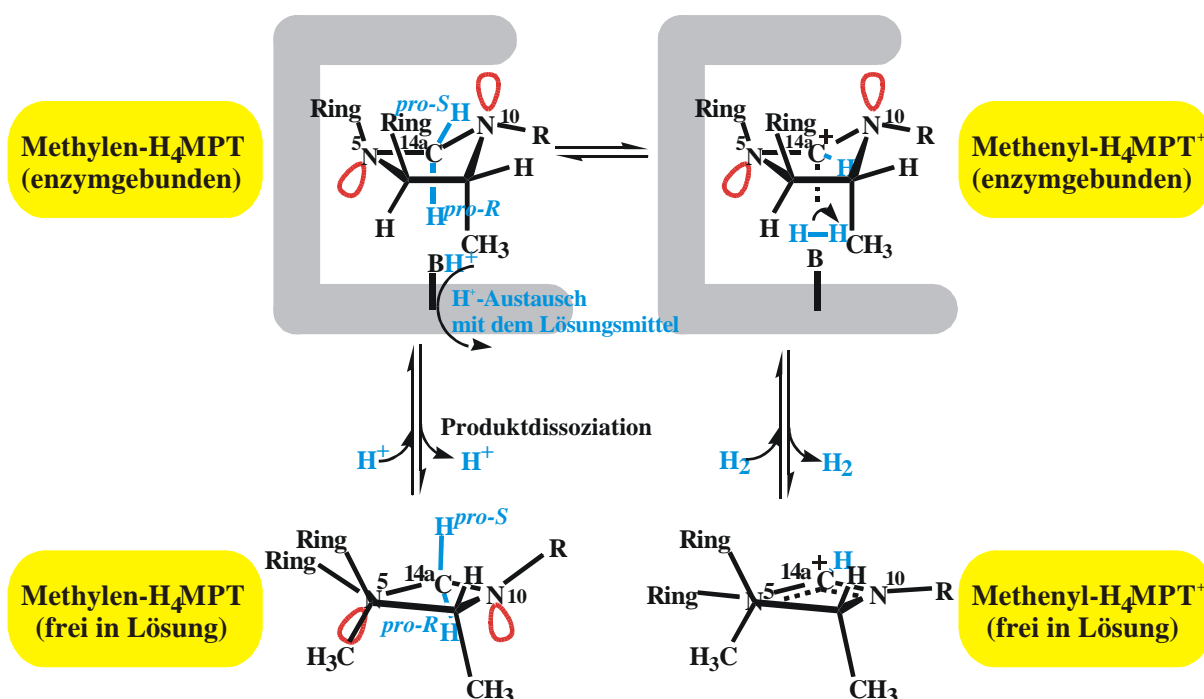
Hmd ist die einzige bekannte metallfreie Hydrogenase und katalysiert wie die metallhaltigen Hydrogenasen auch den Austausch zwischen dem transferierten Hydridion und den Protonen des Lösungsmittels. Allerdings katalysiert Hmd im Vergleich zu den metallhaltigen Hydrogenasen den  $H^+/H_2$ -Austausch nur in Gegenwart des Elektronendonors Methylen- $H_4MPT$  oder des Elektronenakzeptors Methenyl- $H_4MPT^+$  [55, 56]. Die Reaktion von Methylen- $H_4MPT$  zu Methenyl- $H_4MPT^+$  und Wasserstoff läuft in wäßriger Lösung spontan auch in Gegenwart von Mineralsäuren (1-3 M HCl) und bei Temperaturen bis 50°C nicht ab [57]. Da die bisher vier bekannten Familien von Methylen- $H_4MPT$ - und  $N^5,N^{10}$ -Methylentetrahydrofolat-abhängigen-Dehydrogenasen anhand ihrer Aminosäuresequenzen phylogenetisch keinerlei Verwandtschaft zeigen [14], scheint der Protein-Cofaktor-Wechselwirkung innerhalb dieser Reaktion deshalb die entscheidende Bedeutung zuzukommen. Diese Wechselwirkung wurde durch Transfer-NOE-Messungen untersucht.

Interessanterweise erfolgt die Dehydrogenierung von Methylen- $H_4MPT$  und Methylentetrahydrofolat immer in der *pro-R*-Position. Das heißt, alle vier Typen von Dehydrogenasen sind *Re*-Seiten-spezifische Katalysatoren. Diese einheitliche Stereospezifität könnte Zufall sein, aber es könnte auch bedeuten, daß die intrinsischen Eigenschaften von Methylen- $H_4MPT$  bzw.  $N^5,N^{10}$ -Methylentetrahydrofolat die Stereospezifität in der Evolution der Enzyme kontrolliert haben. Dieser Befund läßt sich aufgrund des auf den Transfer-NOE-Messungen aufbauendem Mechanismus erklären.

## 2.2 Proben- und Meßbedingungen

Das Redoxpotential des  $N^5,N^{10}$ -Methenyltetrahydromethanopterin /  $N^5,N^{10}$ -Methylentetrahydromethanopterin-Paares (Methenyl- $H_4MPT^+/Methylen-H_4MPT$ ) (siehe Abb. 8) liegt bei -390 mV und ist somit nahe dem Redoxpotential der Wasserstoffelektrode von -414 mV bei einem pH-Wert von 7,0 [58]. Dies bedingt, daß die Reaktion, katalysiert von  $H_2$ -bildender Methylentetrahydromethanopterin-Dehydrogenase (Hmd) aus *Methanothermobacter marburgensis*, unter Standardbedingungen reversibel ist, was sich in dem niedrigen  $\Delta G^{0'}$ -Wert von -5,5 kJ/mol ausdrückt. Die Gleichgewichtskonzentrationen von Methenyl- $H_4MPT^+$  und Methylen- $H_4MPT$  sind sowohl von der Wasserstoffkonzentration als auch stark vom pH-Wert abhängig. Ein leicht saurer pH-Wert begünstigt die Dehydrogenierung von Methylen- $H_4MPT$  und ein leicht basischer pH-Wert die Reduktion von Methenyl- $H_4MPT^+$  [59]. Durch NMR-spektroskopische Untersuchungen sollten die Konformationen von Methylen- $H_4MPT$  frei in Lösung und gebunden an Hmd aufgeklärt und miteinander verglichen werden. Die

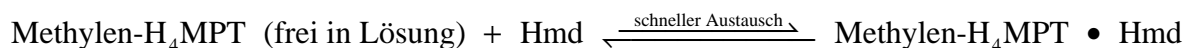
Spektren wurden bei 0°C, pH-Wert 7,8 in einer 100%igen H<sub>2</sub>-Atmosphäre unter strikt anaeroben Bedingungen gemessen. Nur unter diesen Bedingungen ist sowohl Hmd als auch Methylen-H<sub>4</sub>MPT relativ stabil und das Gleichgewicht der enzymkatalysierten Reaktion liegt ganz auf der Seite von Methylen-H<sub>4</sub>MPT. Unter den gleichen Bedingungen, aber in Abwesenheit von Hmd, wurde die Konformation von Methylen-H<sub>4</sub>MPT frei in Lösung bestimmt.



**Abb. 9:** Katalysecyclus für die von H<sub>2</sub>-bildender Methylen-H<sub>4</sub>MPT-Dehydrogenase katalysierte reversible Reaktion von Methylen-H<sub>4</sub>MPT und einem Proton zu Methenyl-H<sub>4</sub>MPT<sup>+</sup> und Wasserstoff. NMR-spektroskopisch wurden die Konformationen von Methylen-H<sub>4</sub>MPT frei in Lösung und in enzymgebundener Form (linker Teil der Abbildung) bestimmt. Für die Strukturen siehe Abb. 8.

## 2.3 Methode und Auswertung

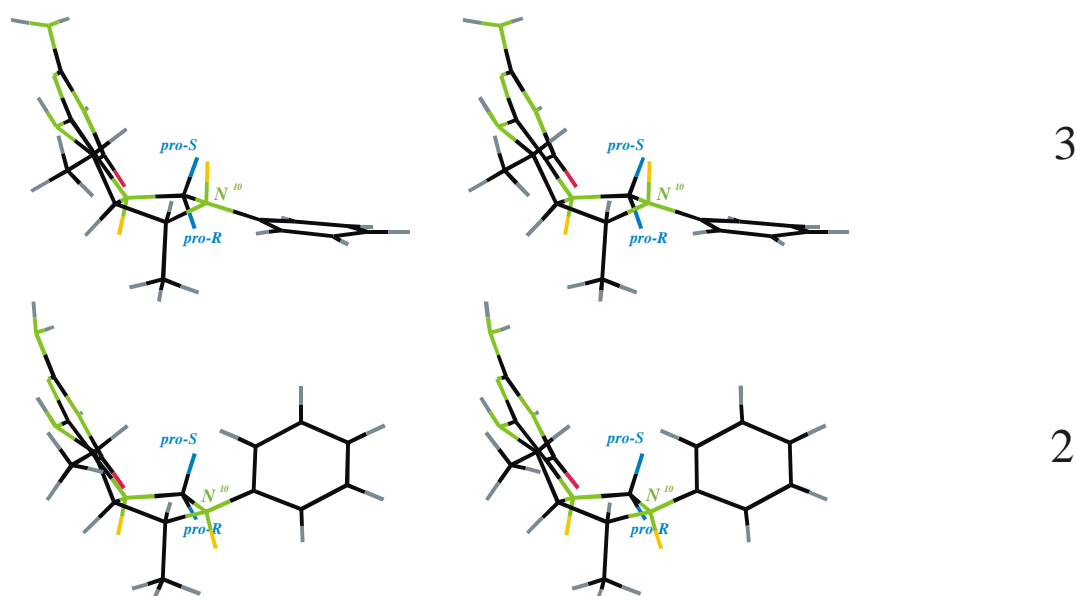
Protonen-Dipol-Dipol-Relaxationsraten von  $N^5, N^{10}$ -Methylen tetrahydromethanopterin (Methylen- $H_4$ MPT) frei in Lösung wurden durch Integration von homonuklearen Transfer-NOE-Spektren bei verschiedenen Mischzeiten bestimmt. Aus diesen lassen sich direkt die Protonen-Protonen-Abstände in Methylen- $H_4$ MPT frei in Lösung berechnen. Zusätzlich wurden die Relaxationsraten in Gegenwart von  $H_2$ -bildender Methylen- $H_4$ MPT-Dehydrogenase (Hmd) aus *Methanothermobacter marburgensis* durch Transfer-NOE-Messungen bestimmt. Methylen- $H_4$ MPT frei in Lösung und enzymgebunden befinden sich dabei im schnellen Austausch:



Durch den Vergleich der Aufbauraten des unveränderten Referenzabstandes der ortho-Protonenpaare des Aromaten in Methylen- $H_4$ MPT (siehe Abb. 8) frei in Lösung und in Gegenwart von Hmd konnten die Konzentrationen von Methylen- $H_4$ MPT frei in Lösung und enzymgebunden berechnet werden. Daraus ließen sich der  $K_D$ -Wert der Reaktion sowie die Protonen-Protonen-Abstände von enzymgebundenem Methylen- $H_4$ MPT berechnen. Mittels der berechneten Protonen-Protonen-Abstände für Methylen- $H_4$ MPT frei in Lösung und enzymgebunden wurden mit dem Programm Xplor Strukturrechnungen durchgeführt aus denen die Konformationen des Substrats erhalten wurden (zur detaillierten Auswertung siehe [60]).

## 2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Mit den Konformationen von Methylentetrahydromethanopterin (Methylen- $H_4$ MPT) frei in Lösung und gebunden an  $H_2$ -bildende Methylentetrahydromethanopterin-Dehydrogenase (Hmd) aus *Methanothermobacter marburgensis*, die aus Transfer-NOE-Daten berechnet wurden, konnte eine Konformationsänderung von Methylentetrahydromethanopterin durch Bindung an das Enzym nachgewiesen werden (siehe Abb. 10).

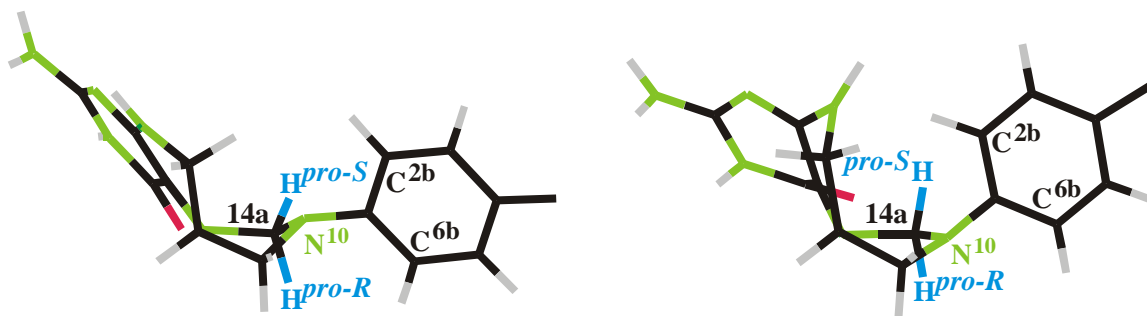


**Abb. 10: Stereoabbildung der Konformationen von Methylentetrahydromethanopterin (2) in wässriger Lösung und (3) gebunden an  $H_2$ -bildende Methylentetrahydromethanopterin-Dehydrogenase.** (Freie Elektronenpaare in gelb, Stickstoff in grün, Wasserstoff in grau, Kohlenstoff in schwarz, Sauerstoff in rot, *pro-R*- und *pro-S*-Wasserstoff in hellblau). Für weitere Details siehe [60].

Anhand dieser Strukturen wurde ein Mechanismus für die von Hmd katalysierte Reaktion vorgeschlagen, der eine Aktivierung des *pro-R*-Wasserstoffatoms durch die metallfreie Hydrogenase aufbauend auf den Arbeiten von Berkessel und Thauer sowie Geierstanger *et al.* [61, 62] postuliert.

Sowohl die freie Form (Konformation 2 in Abb. 10) als auch die enzymgebundene Form (Konformation 3 in Abb. 10) von Methylentetrahydromethanopterin liegen in einer Briefumschlagkonformation mit dem Stickstoffatom  $N^{10}$  unterhalb bzw. oberhalb der Ebene, die aus den anderen Ringatomen gebildet wird, vor. In Konformation 2 in Abb. 10 steht das freie Elektronenpaar von  $N^{10}$  *antichloral* zur *pro-R*-C-H-Bindung und *synchloral* zur *pro-S*-C-H-Bindung; in Konformation 3 in Abb. 10 ist dies gerade der umgekehrte Fall. Die Tatsache dieser Konformationsänderung findet sich auch in Konformationen des Strukturanalogons von

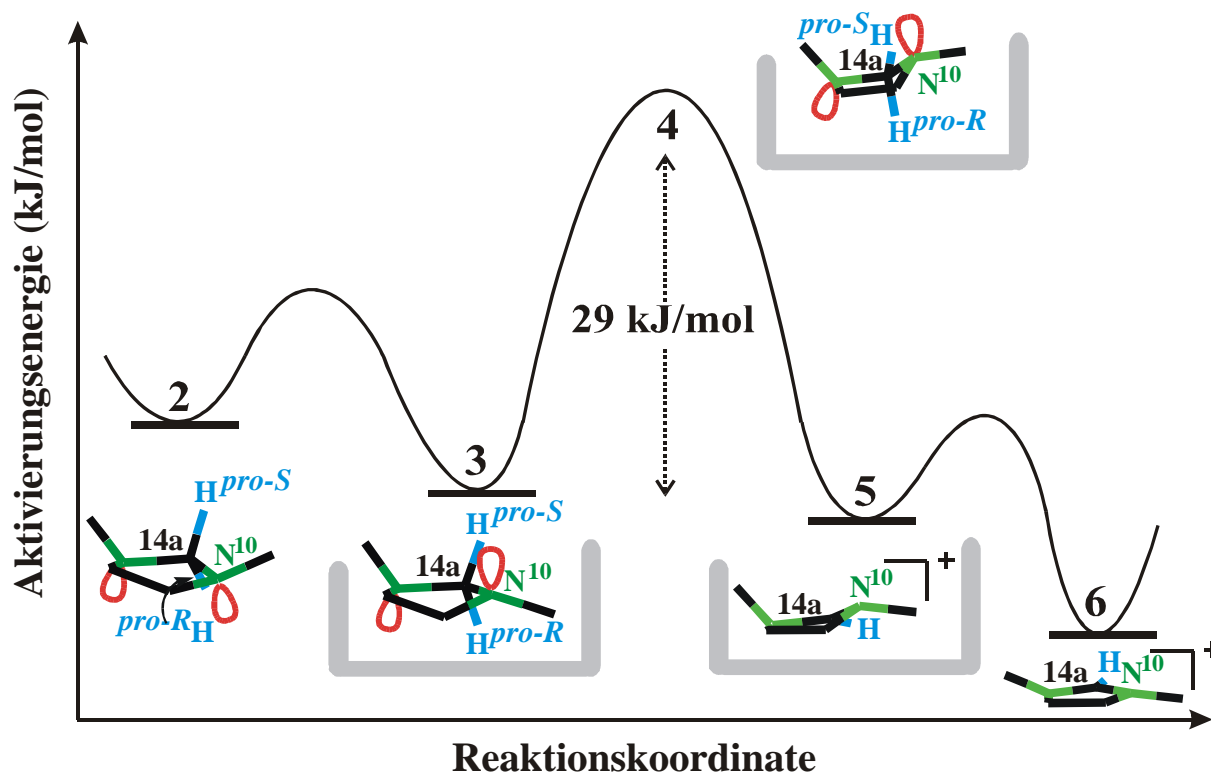
Methylen- $H_4$ MPT,  $N^5,N^{10}$ -Methylen tetrahydrofolat. In  $N^5,N^{10}$ -Methylen tetrahydrofolat gebundenen Kristallstrukturen von Thymidylatsynthase liegt der Imidazolidinring ebenfalls in Briefumschlagkonformationen vor, in denen sich  $N^{10}$  oberhalb oder unterhalb der Ringebene befindet (siehe Abb. 11) [63, 64].



**Abb. 11:** Zwei Konformationen von  $N^5,N^{10}$ -Methylen tetrahydrofolat, wie sie in den Kristallstrukturen von Thymidylatsynthase aus *Bacillus subtilis* gefunden wurden [64]. (Stickstoff in grün, Wasserstoff in grau, Kohlenstoff in schwarz, Sauerstoff in rot, *pro-R*- und *pro-S*-Wasserstoff in hellblau).

Im Gegensatz zu den Konformationen von Methylen- $H_4$ MPT frei in Lösung und gebunden an Hmd ist im postulierten Übergangszustand das freie Elektronenpaar an dem Stickstoffatom  $N^{10}$  *antiperiplanar* zur *pro-R*-C-H-Bindung (Konformation **4** Abb. 12). In dieser Konformation sollte die Wechselwirkung des freien Elektronenpaares mit dem  $s^*$ -Orbital des *pro-R*-C-H-Fragments maximal sein, so daß eine Schwächung der *pro-R*-C-H-Bindung und damit eine erleichterte Hydrid-Bildung bewirkt wird. Das auf diese Weise aktivierte Substrat wird in der enzymkatalysierten Reaktion protoniert. Es entsteht  $H_2$  und die positive Ladung am  $C^{14a}$  wird im planaren Imidazolidinring optimal stabilisiert.

Um den Übergangszustand (Konformation **4** in Abb. 12) zu erreichen, muß in der enzymgebundenen Form **3** in Abb. 12 der dihedrale Winkel zwischen dem freien Elektronenpaar an  $N^{10}$  und der *pro-R*-C-H-Bindung von  $151^\circ$  auf  $180^\circ$  erhöht werden. In quantenmechanischen Berechnungen wurde für diesen Übergang **3**  $\longrightarrow$  **4** eine Energie von nur +29 kJ/mol ermittelt [60]. Dieser Energieunterschied liegt in der Größenordnung der experimentell bestimmten Aktivierungsenergie von etwa +50 kJ/mol, die aus der Temperaturabhängigkeit der Enzymaktivität von Hmd aus *M. marburgensis* [65] und *Methanosarcina kandleri* [66] berechnet wurde.

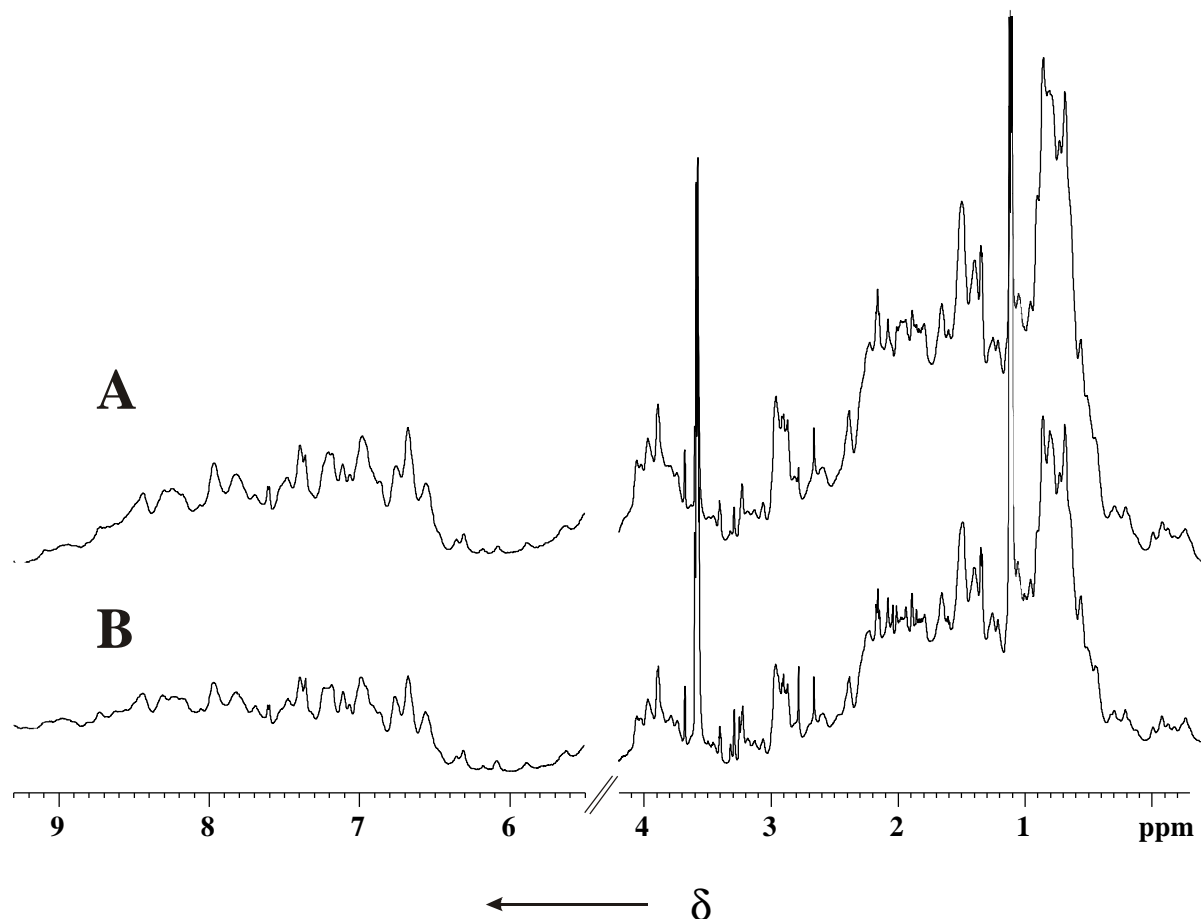


**Abb. 12: Reaktionskoordinate der Dehydrogenierungsreaktion von Methylen- $H_4MPT$  zu Methenyl- $H_4MPT^+$  katalysiert von Hmd (siehe Abb. 9). 2 und 3 sind Konformationen von Methylen- $H_4MPT$  frei in Lösung (2) und gebunden an Hmd (3), die durch NMR-Messungen bestimmt wurden. Die Konformationen 4, 5 und 6 sind die Ergebnisse von quantenmechanischen Rechnungen. Konformation 4 ist der Übergangszustand von Methylen- $H_4MPT$ . 5 und 6 sind Konformationen von Methenyl- $H_4MPT^+$  gebunden an Hmd (5) und frei in Lösung (6). (Numerierung der Konformationen analog [53].) Stickstoff in grün, Kohlenstoff in schwarz, freie Elektronenpaare in rot, *pro-R*- und *pro-S*-Wasserstoff in hellblau sowie Hmd in grau.**

Bisher ist es weder gelungen Kristallstrukturen von  $N^5, N^{10}$ -Methylentetrahydro-methanopterin- (Methylen- $H_4MPT$ -) und  $N^5, N^{10}$ -Methylentetrahydrofolat-abhängigen-Dehydrogenasen mit gebundenem Methylen- $H_4MPT$  oder  $N^5, N^{10}$ -Methylentetrahydrofolat zu erhalten noch Hmd in aktiver Form heterolog überzuproduzieren, was Voraussetzung für Isotopenmarkierungen ist. Über  $^{15}N$ ,  $^{13}C$  oder  $^2H$ -Markierung von Hmd könnten durch weitere NMR-spektroskopische Untersuchungen neue Erkenntnisse zu den Wechselwirkungen von Hmd mit Methylen- $H_4MPT$  in Bezug auf Hmd erhalten werden.

Neue Untersuchungen von Gerrit Buurman am MPI für Terrestrische Mikrobiologie in Marburg haben Hinweise auf einen zweiten zusätzlichen Cofaktor [67] und dessen potentielle Rolle [57] innerhalb des vorgestellten Mechanismus [60] geliefert. Die Kernresultate der aufgenommenen NMR-Spektren, neben den photometrischen Untersuchungen, sind Ergebnisse zur globalen Faltung von H<sub>2</sub>-bildender Methylen-H<sub>4</sub>MPT-Dehydrogenase und zur Bindung des Cofaktors Methenyl-H<sub>4</sub>MPT<sup>+</sup>:

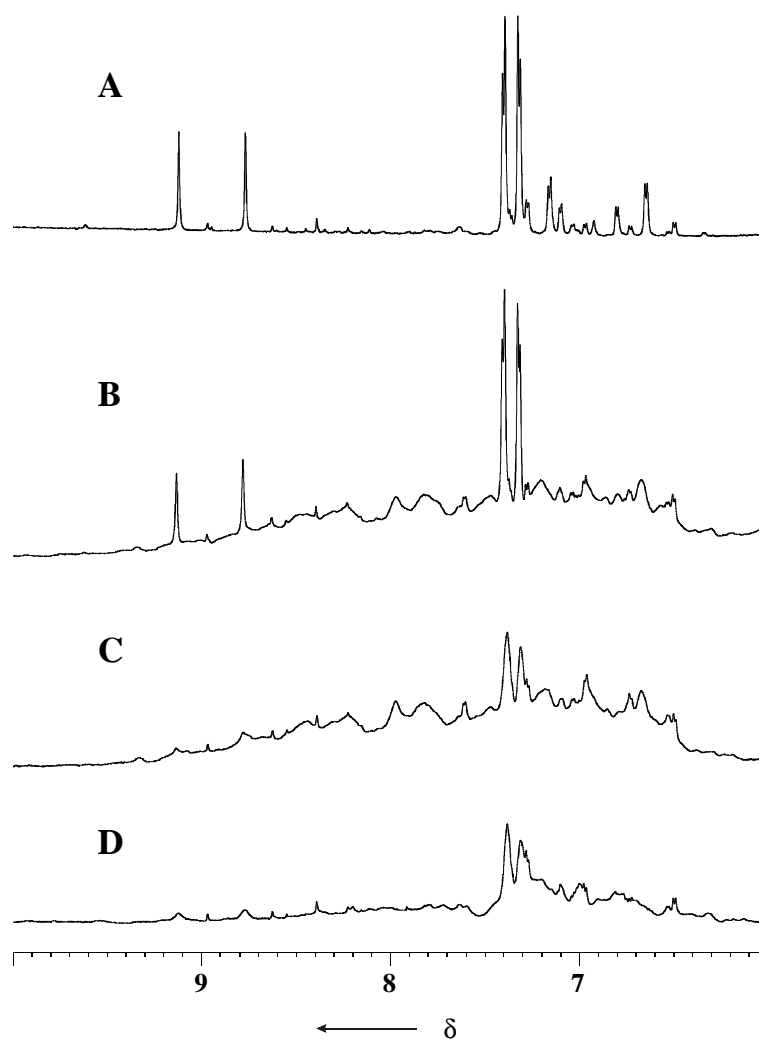
In Abb. 13 sind die 1D-Protonen-NMR-Spektren von nativer und heterolog überproduzierter Hmd aus *M. kandleri* dargestellt. Lediglich im Detail sind die NMR-Spektren verschieden. Dies deutet darauf hin, daß die Inaktivierung von Hmd nicht von einer ausgeprägten Konformationsänderung, wie sie bei Protein-Assoziationen oder Protein-Dissoziationen auftritt, begleitet wird und daß die globale Faltung von nativer und heterolog produzierter Hmd sehr ähnlich ist.



**Abb. 13:** 1D-Protonen-NMR-Spektren (A) von nativer Hmd aus *M. kandleri* und (B) von heterolog überproduzierter Hmd aus *M. kandleri* (inaktiv).



Methenyl- $\text{H}_4\text{MPT}^+$  zeigt im 1D-Protonen-NMR-Spektrum charakteristische Signale des Methenylprotons bei  $\delta = 8,9$  ppm und die  $\text{H}^{3b/5b}$ - und  $\text{H}^{2b/6b}$ -Protonen des Aromaten bei  $\delta = 7,4$  ppm bzw.  $\delta = 7,3$  ppm [52]. In Anwesenheit von Hmd bindet Methenyl- $\text{H}_4\text{MPT}^+$  unter geeigneten Bedingungen reversibel an das Enzym (siehe Abb. 9). Fehlt molekularer Wasserstoff, kann eine enzymkatalysierte Reduktion zu Methylen- $\text{H}_4\text{MPT}$  nicht stattfinden. In Gegenwart von Hmd stellen daher die Resonanzen von Methenyl- $\text{H}_4\text{MPT}^+$  im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum die Summe von freier und enzymgebundener Form dar. Die Spektren von Methenyl- $\text{H}_4\text{MPT}^+$  in Anwesenheit von aktiver Hmd aus *M. kandleri* oder *M. marburgensis* zeigen eine deutliche Linienverbreiterung der Protonenresonanzen (Abb. 14 C und D). Die Resonanzlinien des Methenylprotons sind fast verschwunden und auch die Signale der aromatischen Protonen haben sich stark verbreitert. Die Linienverbreiterungen können mit einer höheren Korrelationszeit von Methenyl- $\text{H}_4\text{MPT}^+$  im enzymgebundenen Zustand erklärt und somit auf die Bindung von Methenyl- $\text{H}_4\text{MPT}^+$  an Hmd zurückgeführt werden.



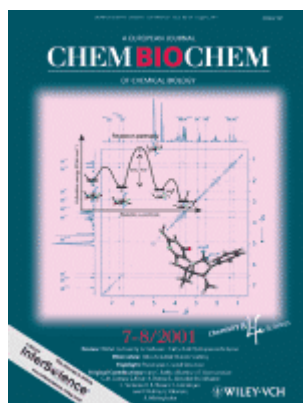
**Abb. 14:** Ausschnitte der 1D-Protonen-NMR-Spektren von Methenyl- $\text{H}_4\text{MPT}^+$ ; (A) in Abwesenheit und (B-D) in Gegenwart von gereinigter Hmd. (B) In Anwesenheit von heterolog überproduzierter Hmd aus *M. kandleri* (inaktiv), (C) in Anwesenheit von nativer Hmd aus *M. kandleri* und (D) in Anwesenheit von nativer Hmd aus *M. marburgensis*.

Im Gegensatz dazu konnte in Anwesenheit von inaktiver heterolog überproduzierter Hmd aus *M. kandleri* (Abb. 14B) keine Linienverbreiterung festgestellt werden. Die Befunde zeigen, daß Methenyl- $\text{H}_4\text{MPT}^+$  nur an native Hmd mit einer hohen spezifischen Aktivität bindet. Die Linienverbreiterung im NMR-Spektrum gibt keinen Hinweis auf die Art der Bindung. Da die Linienverbreiterung allerdings nur in Anwesenheit von aktiver Hmd auftrat und die Inaktivierung von Hmd zu keiner dramatischen Konformationsänderung von Hmd geführt hat, ist es wahrscheinlich, daß die Bindung spezifisch im aktiven Zentrum stattfindet. Obwohl die spektroskopischen Untersuchungen belegen, daß heterolog überproduzierte Hmd sehr ähnliche Faltungseigenschaften besitzt wie das homolog produzierte Enzym, wurde eine Substratbindung in diesen Untersuchungen nicht beobachtet. Eine mögliche Erklärung für diesen Befund ist die Notwendigkeit des zweiten Cofaktors für eine kooperative Bindung von Methylen- $\text{H}_4\text{MPT}$  oder Methenyl- $\text{H}_4\text{MPT}^+$  an Hmd. Zu einer möglichen Rolle des zweiten Cofaktors innerhalb des vorgestellten Katalysemechanismus, über dessen Struktur es bisher keine Informationen gibt, siehe [57].

$\text{H}_2$ -bildende Methylen- $\text{H}_4\text{MPT}$ -Dehydrogenase (Hmd) aus *Methanothermobacter marburgensis* ist eine Hydrogenase, die im Gegensatz zu anderen Hydrogenasen kein Metall enthält. Durch Transfer-NOE-Messungen war die Konformationsbestimmung von Methylen- $\text{H}_4\text{MPT}$  in Abwesenheit und in Anwesenheit von Hmd möglich. Die experimentell bestimmte enzymgebundene Konformation lieferte einen wichtigen Beitrag zum Verständnis des Mechanismus der Reaktion. Bei der Konformation handelt es sich nämlich um eine Konformation, die sich zwischen der Konformation in Lösung und dem postulierten Übergangszustand befindet. Das ist im Einklang mit der momentanen Diskussion darüber, daß es eine der Funktionen von Enzymen ist, Cofaktoren in Richtung des jeweiligen Übergangszustandes der katalysierten Reaktion zu lenken.

## 2.5 Veröffentlichung:

***Re*-face stereospecificity of  
methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenases and  
methylenetetrahydrofolate dehydrogenases is predetermined by  
intrinsic properties of the substrate**



# Re-Face Stereospecificity of Methylene-tetrahydromethanopterin and Methylene-tetrahydrofolate Dehydrogenases is Predetermined by Intrinsic Properties of the Substrate

Stefan Bartoschek,<sup>[a, b]†</sup> Gerrit Buurman,<sup>[a]†</sup> Rudolf K. Thauer,<sup>\*[a]</sup>  
Bernhard H. Geierstanger,<sup>[b]</sup> Jan P. Weyrauch,<sup>[b]</sup> Christian Griesinger,<sup>\*[b]</sup>  
Michael Nilges,<sup>[d]</sup> Michael C. Hutter,<sup>[c]†</sup> and Volkhard Helms<sup>\*[c]</sup>

Dedicated to Prof. Dr. Ernst-G. Jäger on the occasion of his 65th birthday

Four different dehydrogenases are known that catalyse the reversible dehydrogenation of N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-methylene-tetrahydromethanopterin (methylene-H<sub>4</sub>MPT) or N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-methylene-tetrahydrofolate (methylene-H<sub>4</sub>F) to the respective N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-methenyl compounds. Sequence comparison indicates that the four enzymes are phylogenetically unrelated. They all catalyse the Re-face-stereospecific removal of the pro-R hydrogen atom of the coenzyme's methylene group. The Re-face stereospecificity is in contrast to the finding that in solution the pro-S hydrogen atom of methylene-H<sub>4</sub>MPT and of methylene-H<sub>4</sub>F is more reactive to heterolytic cleavage. For a better understanding we determined the conformations of methylene-H<sub>4</sub>MPT in solution and when enzyme-bound by using NMR spectroscopy and semiempirical quantum mechanical calculations. For the conformation free in solution we find an envelope conformation for the imidazolidine ring, with the flap at N<sup>10</sup>. The methylene pro-S C–H bond is anticlinal and the methylene pro-R C–H bond is synclinal to the lone electron pair of N<sup>10</sup>. Semiempirical quantum mechanical calculations of heats of

formation of methylene-H<sub>4</sub>MPT and methylene-H<sub>4</sub>F indicate that changing this conformation into an activated one in which the pro-S C–H bond is antiperiplanar, resulting in the preformation of the leaving hydride, would require a  $\Delta\Delta H_f^\ddagger$  of +53 kJ mol<sup>-1</sup> for methylene-H<sub>4</sub>MPT and of +51 kJ mol<sup>-1</sup> for methylene-H<sub>4</sub>F. This is almost twice the energy required to force the imidazolidine ring in the enzyme-bound conformation of methylene-H<sub>4</sub>MPT (+29 kJ mol<sup>-1</sup>) or of methylene-H<sub>4</sub>F (+35 kJ mol<sup>-1</sup>) into an activated conformation in which the pro-R hydrogen atom is antiperiplanar to the lone electron pair of N<sup>10</sup>. The much lower energy for pro-R hydrogen activation thus probably predetermines the Re-face stereospecificity of the four dehydrogenases. Results are also presented explaining why the chemical reduction of methenyl-H<sub>4</sub>MPT<sup>+</sup> and methenyl-H<sub>4</sub>F<sup>+</sup> with NaBD<sub>4</sub> proceeds Si-face-specific, in contrast to the enzyme-catalysed reaction.

## KEYWORDS:

conformation analysis · dehydrogenases · enzyme catalysis · oxidoreductases · stereospecificity

## Introduction

Tetrahydromethanopterin (H<sub>4</sub>MPT)<sup>[\*\*]</sup> and tetrahydrofolate (H<sub>4</sub>F) are coenzymes of analogous structure (Figure 1). Both coenzymes are involved in the interconversion of C<sub>1</sub> units at the

oxidation levels of formate (N<sup>5</sup>-formyl; N<sup>10</sup>-formyl; N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-methenyl), formaldehyde (N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-methylene) and methanol (N<sup>5</sup>-methyl).<sup>[1, 2]</sup> H<sub>4</sub>MPT is the C<sub>1</sub> carrier in methanogenic archaea and

[a] Prof. Dr. R. K. Thauer, S. Bartoschek, Dr. G. Buurman  
Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie  
and  
Laboratorium für Mikrobiologie des Fachbereichs Biologie der Philipps-Universität  
Karl-von-Frisch-Strasse, 35043 Marburg (Germany)  
Fax: (+49) 6421-178209  
E-mail: thauer@mail.uni-marburg.de

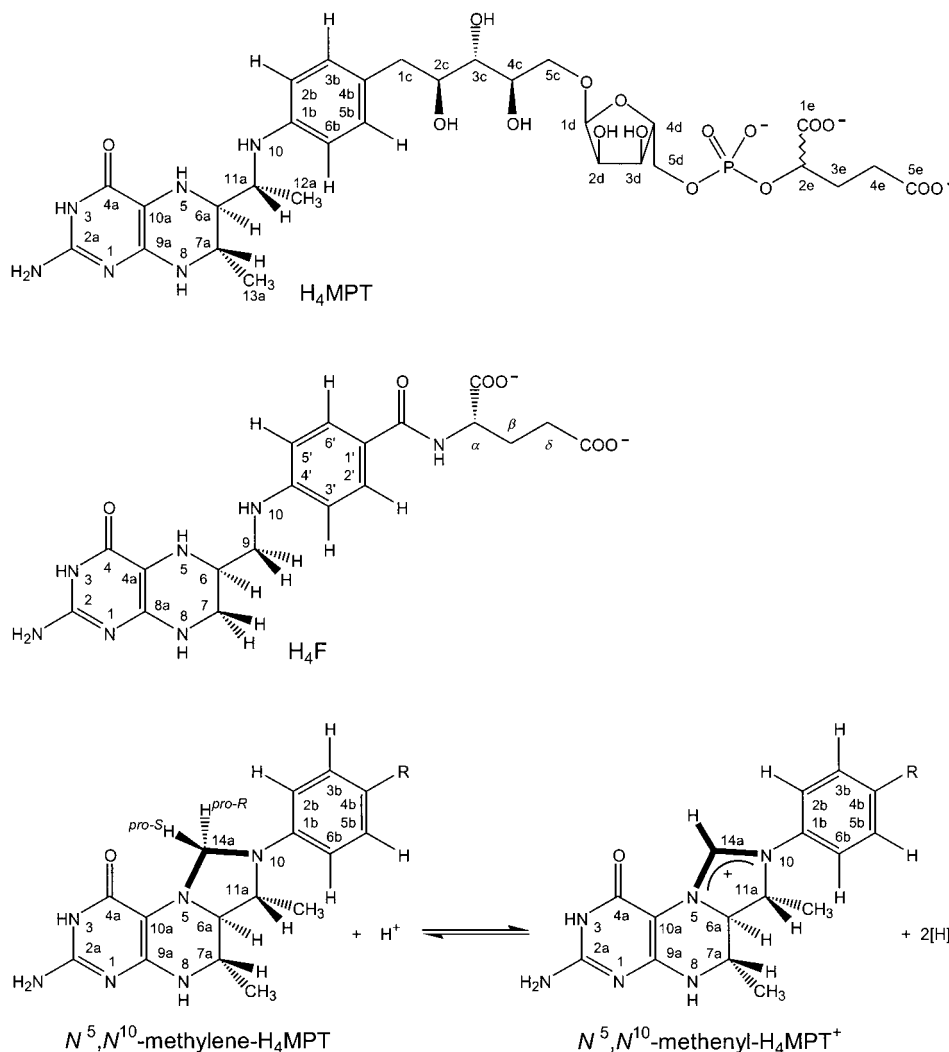
[b] Prof. Dr. C. Griesinger, S. Bartoschek, Dr. B. H. Geierstanger, J. P. Weyrauch  
Institut für Organische Chemie der Universität Frankfurt  
Marie-Curie-Strasse 11, 60439 Frankfurt a. M. (Germany)  
and  
Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie  
Am Fassberg 11, 37077 Göttingen (Germany)  
Fax: (+49) 69-79829128  
E-mail: cigr@org.chemie.uni-frankfurt.de

[c] Dr. V. Helms, Dr. M. C. Hutter  
Max-Planck-Institut für Biophysik  
Kennedyallee 70, 60596 Frankfurt a. M. (Germany)  
Fax: (+49) 69-6303251  
E-mail: Volkhard.Helms@mpibp-frankfurt.mpg.de

[d] Dr. M. Nilges  
Structural and Computational Biology Programme  
EMBL Heidelberg  
Meyerhofstrasse 1, 69117 Heidelberg (Germany)

[†] These authors contributed equally to this work.

[\*\*] For abbreviations see ref. [64].

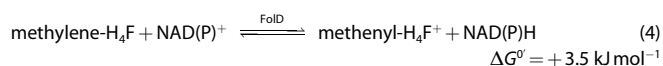
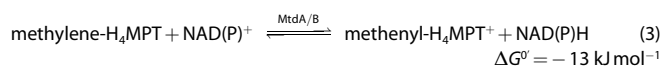
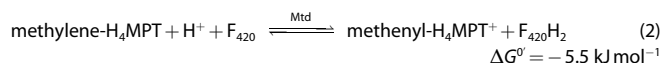
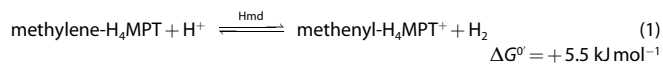


**Figure 1.** Structures of tetrahydromethanopterin ( $H_4MPT$ ), tetrahydrofolate ( $H_4F$ ),  $N^5,N^{10}$ -methylene- $H_4MPT$  and of  $N^5,N^{10}$ -methenyl- $H_4MPT^+$ . The reversible dehydrogenation of the  $N^5,N^{10}$ -methylene compounds to the  $N^5,N^{10}$ -methenyl compounds is shown for methenyl- $H_4MPT$  (bottom). The numbering scheme for  $H_4MPT$  was adopted from van Beelen et al.<sup>[61]</sup> and that for  $H_4F$  from Poe and Benkovic.<sup>[62]</sup> Functionally, the most important difference between  $H_4MPT$  and  $H_4F$  is the electron donating methylene group of  $H_4MPT$  in position 1c, which is conjugated to N<sup>10</sup> through the aromatic ring, whereas  $H_4F$  has an electron-withdrawing carbonyl group in this position. One consequence is that the redox potential of the  $N^5,N^{10}$ -methenyl- $H_4MPT^+/N^5,N^{10}$ -methylene- $H_4MPT$  couple ( $-390$  mV) is almost 100 mV more negative than that of the  $N^5,N^{10}$ -methenyl- $H_4F^+/N^5,N^{10}$ -methylene- $H_4F$  couple ( $-300$  mV).<sup>[6]</sup>

sulfate-reducing archaea, whereas  $H_4F$  serves this function in all other organisms. In methylophilic bacteria both  $H_4MPT$  and  $H_4F$  are present.<sup>[3, 4]</sup> The interconversion of C<sub>1</sub> units is catalysed by specific cyclohydrolases ( $N$ -formyl  $\rightleftharpoons$   $N^5,N^{10}$ -methenyl), dehydrogenases ( $N^5,N^{10}$ -methylene  $\rightleftharpoons$   $N^5,N^{10}$ -methenyl + 2[H]) and reductases ( $N^5,N^{10}$ -methylene + 2[H]  $\rightleftharpoons$   $N^5$ -methyl). Of these enzymes, the dehydrogenases catalyse the dehydrogenation of a prochiral center as shown for methylene- $H_4MPT$  in Figure 1.

Four different families of methylenetetrahydromethanopterin and methylenetetrahydrofolate dehydrogenases are known:<sup>[5]</sup> 1)  $H_2$ -forming methylene- $H_4MPT$  dehydrogenases (Hmd) found in many methanogenic archaea,<sup>[6, 7]</sup> 2)  $F_{420}$ -dependent methylene- $H_4MPT$  dehydrogenases (Mtd) found in methanogenic archaea and sulfate-reducing archaea,<sup>[1]</sup> 3) NAD(P)-dependent methylene- $H_4MPT$  dehydrogenases (MtdA and MtdB) found in methylophilic bacteria,<sup>[5, 8]</sup> and 4) NAD(P)-dependent methylene- $H_4F$  dehydrogenases (e.g. FolD) found in all other organisms.<sup>[2, 9]</sup>

These dehydrogenases catalyse the following reactions [Eqs. (1) – (4)]



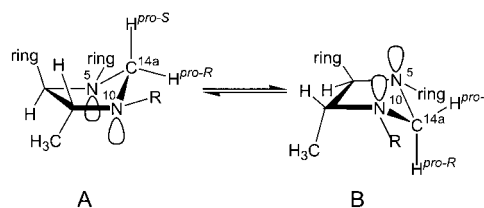
As deduced from comparisons of the amino acid sequences, the four enzyme families are phylogenetically unrelated. However, within each of the four families all enzymes show sequence similarity even when they belong to organisms that are

phylogenetically very distantly related only. It thus appears that the four methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase families have evolved independently.<sup>[5]</sup> It is, therefore, surprising that the enzymatic dehydrogenation of methylene- $H_4$ MPT and methylene- $H_4$ F always leads to the removal of the *pro-R* hydrogen atom of the methylene group, that is, all four types of dehydrogenases are *Re-face*-specific catalysts.<sup>[10–13]</sup>

Recently, for the  $H_2$ -forming methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase (Hmd) [Eq. (1)]<sup>[14, 15]</sup> a mechanism of substrate activation was proposed that may be also valid for other methylenetetrahydromethanopterin and methylenetetrahydrofolate dehydrogenases. This mechanism is supported by ab initio molecular orbital calculations<sup>[16–18]</sup> and assumes that the methylene C–H bond of methylene- $H_4$ MPT can only be cleaved heterolytically if it is activated in an antiperiplanar position to both lone electron pairs of the neighbouring  $N^5$  and  $N^{10}$  atoms. In this position, the conjugation of the neighbouring n orbitals with the  $\sigma^*$  orbital of the C–H fragment is maximal and thus the C–H bond is weakened, making it easier for the hydride ion to leave.<sup>[19–21]</sup>

In aqueous solution methylene- $H_4$ MPT and methylene- $H_4$ F are in a conformation in which the *pro-S* C–H bond is more reactive towards  $H^-$  formation than the *pro-R* C–H bond.<sup>[15]</sup> This was inferred from  $^1J_{C,H}$  coupling constants and chemical shifts of the *pro-R* and *pro-S* protons and from the finding that the chemical

reduction of methenyl- $H_4$ MPT<sup>+</sup> and of methenyl- $H_4$ F<sup>+</sup> in aqueous solution with  $NaBD_4$  leads to the incorporation of the hydrogen into the *pro-S* position of the methylene group.<sup>[15]</sup> In aqueous solution the imidazolidine ring of methylene- $H_4$ MPT was therefore assumed to be in an envelope conformation with  $C^{14a}$  above the ring and the *pro-S* proton at  $C^{14a}$  in antiperiplanar position to the lone electron pairs of  $N^5$  and  $N^{10}$  (Figure 2A).<sup>[15]</sup> The *pro-R* hydrogen atom at  $C^{14a}$  would be in a position synclinal to the lone electron pairs of the two neighbouring nitrogen atoms and thus should not be activated.



**Figure 2.** Previously proposed conformations of the imidazolidine ring of methylene- $H_4$ MPT: A) free in solution and B) bound to  $H_2$ -forming methylene- $H_4$ MPT dehydrogenase (Hmd). In both cases, the imidazolidine ring is in an envelope conformation with the flap  $C^{14a}$  A) above or B) below the ring.<sup>[15]</sup> From the heats of formation ( $\Delta H_f^\circ$ ), the energy change  $\Delta E_{AB}$  associated with a conformational change between the two conformers was calculated to be larger than  $+200 \text{ kJ mol}^{-1}$  (see Results section).

Since the *pro-R* C–H bond rather than the *pro-S* C–H bond is cleaved in the enzyme-catalysed dehydrogenation of methylene- $H_4$ MPT, it was proposed that upon binding to the enzyme methylene- $H_4$ MPT must be forced into a conformation in which the *pro-R* hydrogen atom is reactive or easily activated.<sup>[14, 15]</sup> Figure 2B shows the proposed conformation for the enzyme-bound methylene- $H_4$ MPT in the transition state. With  $C^{14a}$  below the ring, the *pro-S* hydrogen atom is in a synclinal position to the lone electron pairs, and the *pro-R* proton is in an antiperiplanar position to the lone electron pairs of  $N^5$  and  $N^{10}$ . The *pro-R* C–H bond in conformation B should therefore be maximally reactive.

Whether binding to dehydrogenases induces such a conformational change in the coenzyme remains speculative since currently no structures of methylene- $H_4$ MPT or of methylene- $H_4$ F alone or in complex with any dehydrogenase are available. The structure of methenyl- $H_4$ F<sup>+</sup> has been solved by X-ray crystallography.<sup>[22]</sup> This structure agrees well with NMR spectroscopic studies on the conformations of the tetrahydropyrazine and imidazolidine rings of methylene- $H_4$ F.<sup>[23, 24]</sup> However, the exact conformation of the imidazolidine ring at  $N^{10}$  in methylene- $H_4$ F was not clearly defined and was suggested to be  $sp^3$ -hybridised in the structure reported by Poe and Benkovic<sup>[23]</sup> and to be  $sp^2$ -hybridised in that reported by Kalbermatten et al.<sup>[24]</sup>

Here we use two-dimensional nuclear Overhauser effect spectroscopy (NOESY) to study the conformation of methylene- $H_4$ MPT in solution and when bound to  $H_2$ -forming methylene- $H_4$ MPT dehydrogenase (Hmd) from methanogenic archaea. Because the enzyme-bound and the free forms of methylene- $H_4$ MPT are exchanging rapidly on the NMR time scale, we were able to utilise the concept of transferred NOE spectroscopy

Editorial Advisory Board Member:<sup>[\*]</sup>

**Rudolf K. Thauer,**

born in Frankfurt (Germany) in 1939, studied biochemistry at the universities of Frankfurt, Tübingen and Freiburg, where he obtained his PhD degree in the laboratory of Karl Decker in 1968. After his habilitation in Freiburg and a three-months stay in Harland Wood's laboratory in Cleveland (Ohio) he was appointed Associate Professor of Biochemistry at the University of Bochum in 1972. Since 1976 he is Professor of Microbiology at the Philipps University Marburg, and since 1991 he is also Director at the Max Planck Institute for Terrestrial Microbiology in Marburg. His studies are focused on the  $C_1$  metabolism of methanogenic archaea. His group was involved in unravelling the structure and function of many of the novel enzymes and coenzymes involved in  $CO_2$  reduction to methane, a recent example being the crystal structure of nickel-containing methyl-coenzyme M reductase which catalyses the methane-forming reaction proper. Another interesting discovery was that methanogens contain an enzyme that catalyses a reaction with  $H_2$  as substrate without the apparent involvement of a redox-active transition metal. This "metal-free" hydrogenase (Hmd) is also subject of the investigation reported here.



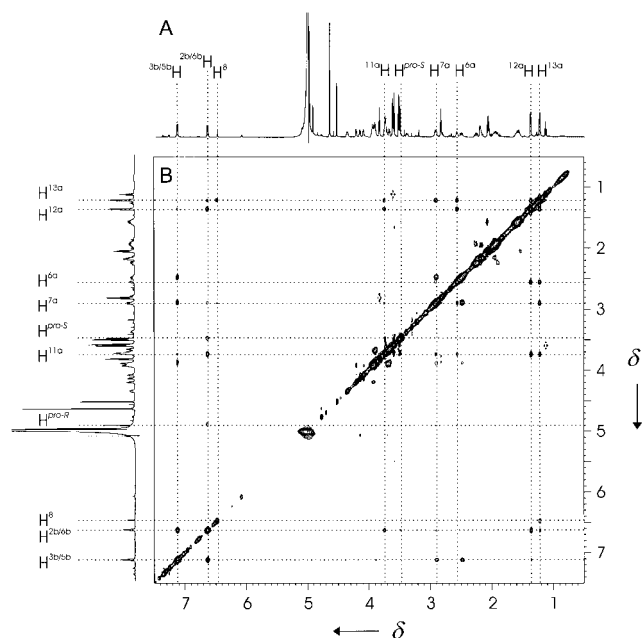
[\*] Members of the Editorial Advisory Board will be introduced to the readers with their first manuscript.

(Tr-NOESY)<sup>[25–27]</sup> to characterise the conformation of methylene- $H_4$ MPT when bound to the enzyme. We show that both conformations are in an envelope conformation with the flap  $N^{10}$  below (free in solution) or above (bound to enzyme) the imidazolidine ring. The conformational change between the free and the enzyme-bound forms is smaller than proposed previously (Figure 2).<sup>[15]</sup> For the transition state of the methylene- $H_4$ MPT oxidation, a conformation with a reactive *pro-R* C–H bond is proposed which, according to semiempirical quantum mechanical calculations, is significantly lower in energy than that of the conformation with a reactive *pro-S* C–H bond. In contrast to the previously proposed reactive conformation, the *pro-R* C–H bond is antiperiplanar to the lone electron pair of only one nitrogen atom. In addition, we describe results from theoretical calculations that explain the reversed stereospecificity of the enzyme-catalysed relative to the uncatalysed chemical reduction of methenyl- $H_4$ MPT<sup>+</sup> and methenyl- $H_4$ F<sup>+</sup>.

## Results

### Conformation of methylene- $H_4$ MPT in aqueous solution and when bound to Hmd as determined by NMR spectroscopy

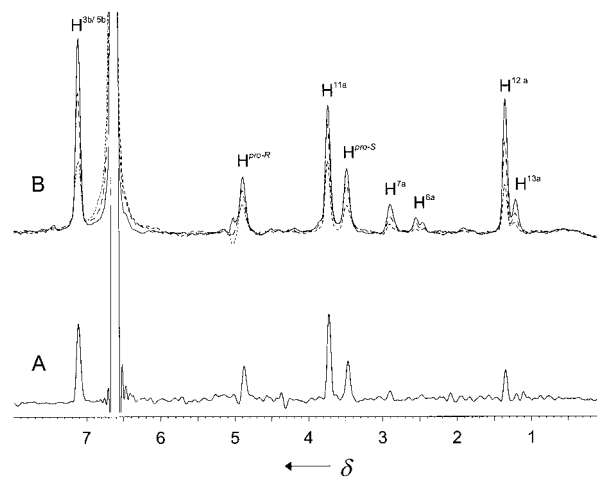
Two-dimensional NOESY was used to study the conformation of methylene- $H_4$ MPT in aqueous solution (Figure 3) and when bound to  $H_2$ -forming methylene- $H_4$ MPT dehydrogenase (Hmd) from *Methanothermobacter marburgensis* (formerly *Methanobacterium thermoautotrophicum*).<sup>[28]</sup> The spectra of methylene- $H_4$ MPT were acquired under strictly anaerobic conditions at 0 °C and pH 7.8. Under these conditions methylene- $H_4$ MPT and the enzyme Hmd are relatively stable and the equilibrium of the



**Figure 3.** A) One-dimensional  $^1H$  NMR spectrum of 1 mM methylene- $H_4$ MPT in  $H_2O/D_2O$  (9:1) containing 50 mM  $K_2HPO_4/KH_2PO_4$  (pH 7.8) at 0 °C. B) Two-dimensional NOESY spectrum of the same sample obtained with a mixing time of 50 ms. The NMR spectra were acquired at a  $^1H$  frequency of 600.13 MHz on a DRX 600 spectrometer (Bruker Instruments, Rheinstetten) and processed as described in the Experimental Section.

reaction of methylene- $H_4$ MPT to methenyl- $H_4$ MPT<sup>+</sup> [Eq. (1)] is far to the side of methylene- $H_4$ MPT.

The signals of all individual protons and of magnetically equivalent proton pairs of methylene- $H_4$ MPT were assigned according to published spectra.<sup>[11]</sup> To determine the conformation at  $N^{10}$ , through-space NOE contacts of the proton pair  $H^{2b/6b}$  of the aromatic ring with the protons  $H^{6a}$ ,  $H^{7a}$ ,  $H^{12a}$ ,  $H^{11a}$ ,  $H^{pro-R}$ ,  $H^{pro-S}$  and  $H^{13a}$  (see Figure 1) are most important. Figure 4 shows the traces through the NOESY spectrum along the signal of the



**Figure 4.** Traces through a two-dimensional NOESY spectrum of methylene- $H_4$ MPT along the signal of the  $H^{2b/6b}$  protons of the aromatic ring (see Figure 3B). A) Methylene- $H_4$ MPT in the absence and B) methylene- $H_4$ MPT in the presence of  $H_2$ -forming methylene- $H_4$ MPT dehydrogenase (Hmd) both in anaerobic solution at 0 °C. The concentration of methylene- $H_4$ MPT was 1.0 mM and that of Hmd 0.3 mM (ca. 6 mg protein in 0.5 mL). After the acquisition of four NOESY spectra over a period of 48 h the Hmd activity had decreased by 50%. In the presence of enzyme the peak volumes increased by a factor of four. A) —, 50 ms mixing time; B) —, 50 ms mixing time; ---, 30 ms mixing time; ----, 15 ms mixing time.

aromatic  $H^{2b/6b}$  protons of methylene- $H_4$ MPT in the absence (Figure 4A) and in the presence of Hmd (Figure 4B). Distances between protons (Table 1) were obtained from NOE build-up curves (Figures 5A and B) and used in a restrained simulated annealing and energy minimisation protocol as described in detail in the Experimental Section. For the free form as well as for the enzyme-bound form the rotation of the two methyl groups and of the aromatic ring had to be taken into account, because of 40 model structures derived from two starting geometries, none fully satisfied the NMR distance restraints. Ensembles of structures were therefore generated by stepwise rotating the aromatic ring and the methyl groups and by calculating the effects of NOE averaging [Eqs. (7)–(9) in the Experimental Section].

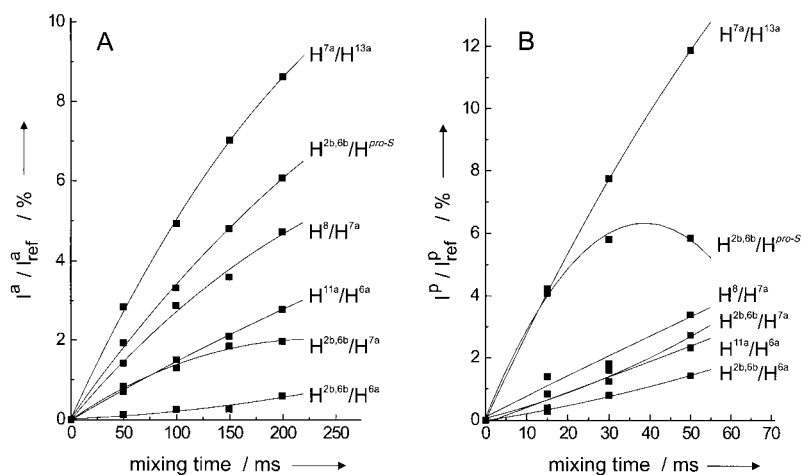
In the resulting conformation of methylene- $H_4$ MPT free in solution (Figure 6, conformation 1a) the imidazolidine ring is in an envelope conformation with the flap at  $N^{10}$ , and the methylene *pro-S* C–H bond is anticlinal and the methylene *pro-R* C–H bond is synclinal to the lone electron pair of  $N^{10}$ .

The conformation of methylene- $H_4$ MPT when bound to Hmd could be determined in a similar manner. The trace through the

**Table 1.** Intramolecular distances between protons of methylene- $H_4$ MPT free in solution and when bound to  $H_2$ -forming methylene- $H_4$ MPT dehydrogenase (Hmd).<sup>[a]</sup>

Proton pair		$\frac{\sigma_{A-B}^a}{\sigma_{ref}^a}$	Methylene- $H_4$ MPT free in solution		Methylene- $H_4$ MPT in the presence of Hmd		Methylene- $H_4$ MPT bound to Hmd	
A	B		$r_{A-B(\text{free})}$ [Å] <sup>[c]</sup>	$\bar{r}_{A-B(\text{free})}$ [Å] <sup>[d]</sup>	$\frac{\sigma_{A-B}^p}{\sigma_{ref}^p}$	$r_{A-B(\text{bound})}$ [Å] <sup>[c]</sup>	$\bar{r}_{A-B(\text{bound})}$ [Å] <sup>[d]</sup>	
H <sup>2b/6b</sup>	H <sup>3b/5b</sup>	1.0000	2.46	2.46	1.0000	2.46	2.46	
H <sup>2b/6b</sup>	H <sup>12a</sup>	0.1074	3.57	4.36	0.3369	2.91	2.61	
H <sup>2b/6b</sup>	H <sup>7a</sup>	0.1633	3.33	3.25	0.0279	5.27	5.28	
H <sup>2b/6b</sup>	H <sup>pro-S</sup>	0.4150	2.85	2.62	0.4269	2.83	2.81	
H <sup>2b/6b</sup>	H <sup>11a</sup>	0.8598	2.52	2.42	0.5296	2.77	3.20	
H <sup>2b/6b</sup>	H <sup>pro-R</sup>	0.2665	3.07	3.25	0.3239	2.96	2.62	
H <sup>6a</sup>	H <sup>2b/6b</sup>	0.0097	5.33	5.12	0.0273	4.42	4.62	
H <sup>2b/6b</sup>	H <sup>13a</sup>	0.0394	4.22	5.57	0.0077	6.29	6.51	
H <sup>11a</sup>	H <sup>13a</sup>	0.4881	2.77	2.65	0.3272	3.00	2.72	
H <sup>7a</sup>	H <sup>13a</sup>	0.4070	2.86	2.60	0.5074	2.74	2.42	
H <sup>6a</sup>	H <sup>13a</sup>	0.2912	3.02	2.75	0.2667	3.07	3.09	
H <sup>11a</sup>	H <sup>12a</sup>	0.4249	2.84	2.60	0.3880	2.89	2.59	
H <sup>7a</sup>	H <sup>12a</sup>	0.0140	5.01	4.59	0.0472	4.03	4.06	
H <sup>6a</sup>	H <sup>12a</sup>	0.5134	2.75	2.51	0.3213	3.01	2.51	
H <sup>11a</sup>	H <sup>6a</sup>	0.4197	2.84	2.91	0.2368	3.18	3.09	
H <sup>11a</sup>	H <sup>7a</sup>	0.7297	2.59	2.45	1.1851	2.37	2.20	
H <sup>6a</sup>	H <sup>7a</sup>	0.2683	3.06	3.13	0.6266	2.63	3.11	
H <sup>7a</sup>	H <sup>pro-S</sup>	0.2647	3.07	3.21	0.2568	3.09	4.01	
H <sup>12a</sup>	H <sup>pro-S</sup>	0.0181	4.80	4.11	0.0303	4.37	4.49	
H <sup>pro-S</sup>	H <sup>pro-R</sup>	2.7750	2.08	1.84	0.6560	2.89	1.83	
H <sup>12a</sup>	H <sup>pro-R</sup>	0.0404	4.20	3.82	0.0420	4.17	4.20	
H <sup>8</sup>	H <sup>13a</sup>	0.3763	2.90	2.79	0.1465	3.52	3.62	
H <sup>8</sup>	H <sup>7a</sup>	0.6530	2.64	2.54	0.2252	3.31	2.54	
H <sup>11a</sup>	H <sup>pro-S</sup>	0.1156	3.52	3.73	0.0407	4.39	3.57	

[a] Distances  $r$  were calculated from NOE cross-relaxation rates that were determined from the initial slopes of the NOE build-up curves acquired at 0 °C (Figure 5) as described in the Experimental Section. The proton pairs containing the aromatic protons H<sup>2b/6b</sup> are listed first. [b]  $\sigma_{A-B}$  is the cross-relaxation rate between protons A and B;  $\sigma_{H^{2b/6b}, H^{3b/5b}}$  the cross-relaxation rate of the proton pairs H<sup>2b/6b</sup> and H<sup>3b/5b</sup>, which have a fixed distance of 2.46 Å, served as reference rate  $\sigma_{ref}$ . The reference cross-relaxation rate in the absence of enzyme is referred to as  $\sigma_{ref}^a$  and in the presence of enzyme as  $\sigma_{ref}^p$ . [c] The distance between protons A and B,  $r_{A-B}$ , is determined according to: ( $r_{A-B} = r_{H^{2b/6b}, H^{3b/5b}}(\sigma_{ref}/\sigma_{A-B})^{1/6}$ ). For methylene- $H_4$ MPT bound to Hmd, the contributions of the free conformation to the observed NOE cross-relaxation rates were subtracted as described in the Experimental Section. [d]  $\bar{r}_{A-B(\text{free})}$  are the average distances in conformation Ia and  $\bar{r}_{A-B(\text{bound})}$  are the average distances in conformation IIa (Figure 6) taking the rotation of the two methyl groups and of the aromatic ring into account (see Experimental Section).



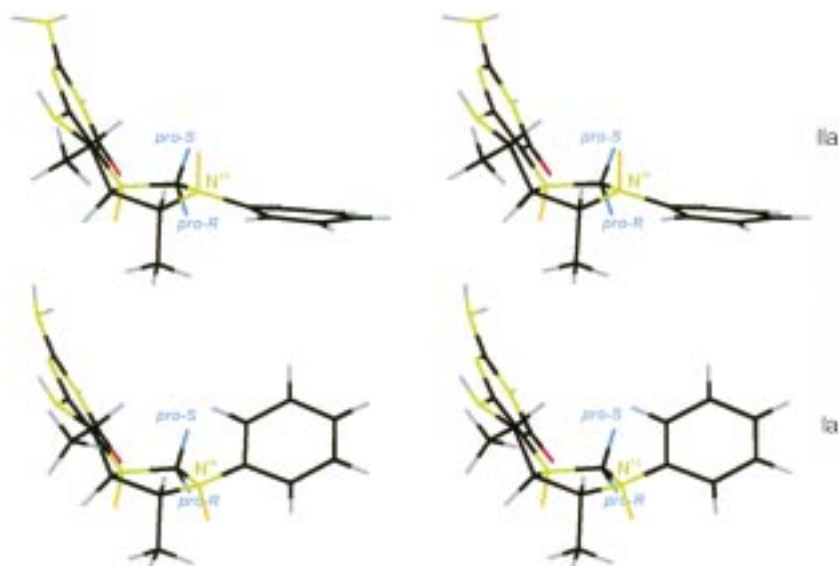
**Figure 5.** NOE build-up curves for several proton pairs in methylene- $H_4$ MPT at 0 °C A) in the absence (index a) and B) in the presence (index p) of  $H_2$ -forming methylene- $H_4$ MPT dehydrogenase (Hmd) in arbitrary units as determined from cross-peak integrals at different mixing times (see Figure 4).

two-dimensional NOESY spectrum along the signal of the aromatic H<sup>2b/6b</sup> protons of methylene- $H_4$ MPT in the presence of Hmd shows only one set of coenzyme resonances (Figure 4B).

This indicates that the enzyme-bound and the free forms of methylene- $H_4$ MPT are in a fast exchange on the NMR time scale. The observed NOE cross-peaks are therefore the sum of contributions from NOE interactions in free and enzyme-bound methylene- $H_4$ MPT. For the same NOESY mixing time (50 ms) the NOE integral of the H<sup>2b,6b</sup>/H<sup>3b,5b</sup> protons, which have a fixed distance of 2.46 Å (calibration NOE), is fourfold larger in the presence of enzyme (Figure 4B) than for free methylene- $H_4$ MPT (Figure 4A). Because the NOE increases with molecular mass, an intensity increase of intramolecular NOE (as shown in Figure 4) is a clear indication of methylene- $H_4$ MPT binding to Hmd under the conditions of the experiment. The increase in the calibration NOE by a factor of 4 in the presence of enzyme indicates that all NOE intensities in the presence of enzyme will be dominated by contributions from the bound form of methylene- $H_4$ MPT, a prerequisite for transferred

NOE studies.<sup>[26, 27]</sup> In addition, some proton–proton distances in the bound form change relative to those in the free form, as can be judged from the slope of the build-up curves (Figure 5).





**Figure 6.** Conformations (stereoview) of the imidazolidine ring of methylene-H<sub>4</sub>MPT free in solution (**Ia**) and bound to H<sub>2</sub>-forming methylene-H<sub>4</sub>MPT dehydrogenase (Hmd) (**IIa**) as determined by NMR spectroscopy. The conformations were calculated using a restrained simulated annealing and energy minimisation protocol (see Experimental Section). Lone electron pairs are shown in yellow, hydrogens in blue, nitrogens in green, carbons in black and oxygens in red. The conformation of the aromatic ring was assumed to populate all dihedral angles between N<sup>10</sup> and C<sup>16</sup>.

As in the case of the free form of methylene-H<sub>4</sub>MPT, we used NOE build-up rates, simulated annealing and restrained energy minimisation to obtain the conformation of methylene-H<sub>4</sub>MPT when bound to Hmd (Figure 6, conformation **IIa**). The imidazolidine ring is again in an envelope conformation with the flap at N<sup>10</sup>, but in contrast to the free form the lone electron pair of N<sup>10</sup> is anticlinal to the *pro-R* C–H bond and synclinal to the *pro-S* C–H bond. This conformational change is mainly represented by the change of interproton distances between H<sup>2b/6b</sup> and H<sup>6a</sup>, between H<sup>2b/6b</sup> and H<sup>7a</sup>, and between H<sup>2b/6b</sup> and H<sup>12a</sup> (see Figures 1 and 6): From methylene-H<sub>4</sub>MPT free in solution to methylene-H<sub>4</sub>MPT bound to the enzyme the distance  $r_{A-B}$  between H<sup>2b/6b</sup> and H<sup>6a</sup> changes by 21%, between H<sup>2b/6b</sup> and H<sup>7a</sup> by 37% and between H<sup>2b/6b</sup> and H<sup>12a</sup> by 23%, respectively (see Table 1).

From the NOE cross-correlation rate of the proton pair H<sup>2b/6b</sup>/H<sup>3b/5b</sup> of methylene-H<sub>4</sub>MPT free in solution ( $\sigma_{ref}^a = 0.2$  Hz) and in the presence of enzyme ( $\sigma_{ref}^b = 1.5$  Hz) and from the molecular masses of methylene-H<sub>4</sub>MPT and Hmd, the percentage of methylene-H<sub>4</sub>MPT bound to the enzyme was calculated to be 14% as described in the Experimental Section [Eq. (5)]. It has to be considered, however, that the protein preparation contained an unknown amount of inactive protein formed by denaturation under the analysis conditions. Therefore, we refrain from calculating  $K_d$  from the measurements.

#### Energy-minimised conformations of the imidazolidine ring of methylene-H<sub>4</sub>MPT and activation barriers calculated from heats of formation

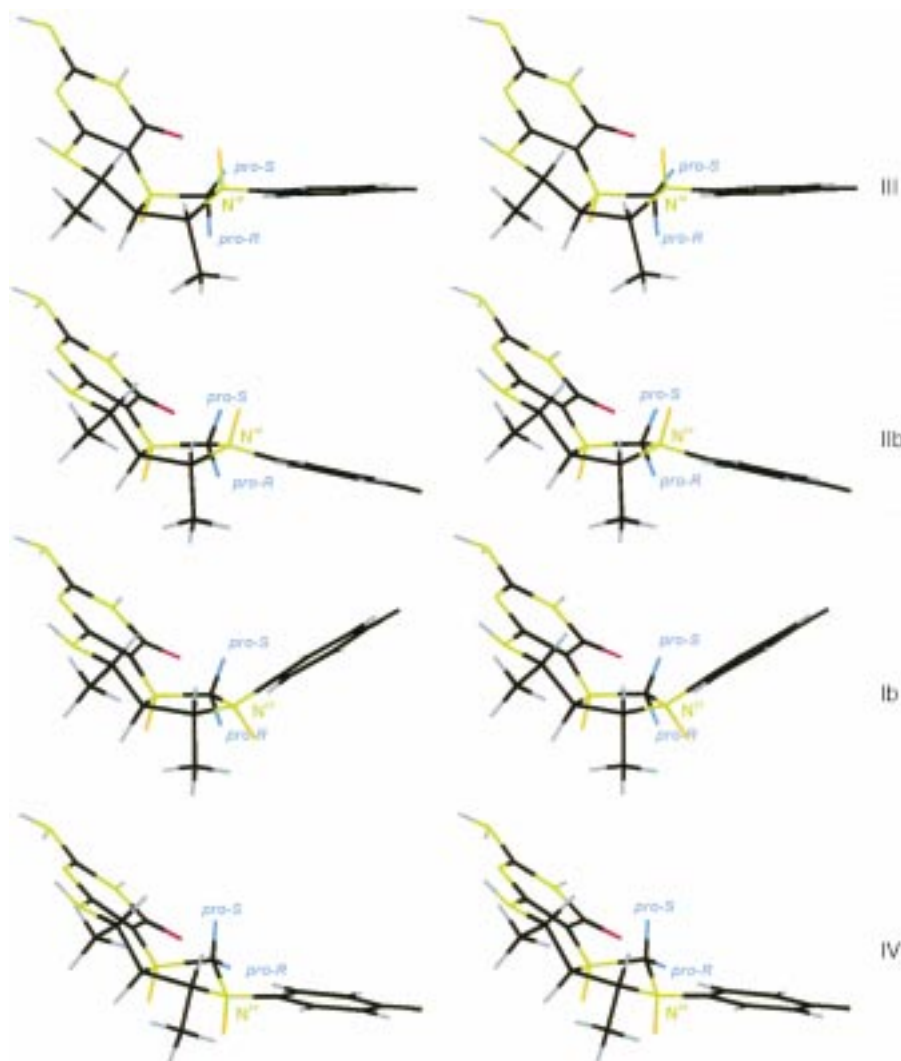
Semiempirical AM1 calculations<sup>[29]</sup> were used to compute local energy minima for the conformations of methylene-H<sub>4</sub>MPT. In

the following, relative energies of two different conformations **A** and **B** will be labelled as  $\Delta E_{AB}$  denoting the difference of the corresponding heats of formation  $\Delta H_f^\ddagger$  that were computed by AM1 for the conformations **A** and **B**. Two low-energy conformations were found (conformations **Ib** and **IIb** in Figure 7), differing only by 2 kJ mol<sup>-1</sup>, which may be within the precision of the method. Particularly the conformation of the imidazolidine ring is in excellent agreement with the results of an ab initio optimisation (restricted Hartree–Fock/3-21G) of methylene-H<sub>4</sub>MPT truncated after the phenyl ring.<sup>[65]</sup> Ignoring the relative orientations of the freely rotating aromatic ring, the two conformations are very similar to the conformations of methylene-H<sub>4</sub>MPT determined by NMR spectroscopy (Figure 6). Conformation **Ib** in Figure 7 corresponds to conformation **Ia** in Figure 6 (methylene-H<sub>4</sub>MPT free in solution), and conformation **IIb** in Figure 7 corresponds to conformation **IIa** in Figure 6 (methylene-H<sub>4</sub>MPT bound to Hmd). The root-mean

square (rms) deviations between calculated and experimental structures are 0.23 Å and 0.21 Å (superimposing all heavy atoms in the three fused rings and C<sup>1b</sup> of the freely rotating phenyl ring), respectively. The good agreement with more accurate ab initio quantum mechanical methods and with experimental NMR data lends confidence in applying semiempirical quantum mechanical methods to these systems.

Using semiempirical quantum mechanical calculations we calculated heats of formation for the different conformations of methylene-H<sub>4</sub>MPT shown in Figure 7 and also for the initially proposed transition state (Figure 2B). The heats of formation for the putative enzyme-bound conformation **IIb** (Figure 7) and the initially proposed transition state (Figure 2B) differ by more than +200 kJ mol<sup>-1</sup>. Such a high activation energy barrier between enzyme-bound substrate in the ground state and in the transition state and an experimentally determined activation barrier of approximately 50 kJ mol<sup>-1</sup> for the enzymes from *M. marburgensis*<sup>[66]</sup> and from *Methanopyrus kandleri*<sup>[30]</sup> make it very unlikely that the reactive *pro-R* C–H bond is antiperiplanar to both lone electron pairs of N<sup>5</sup> and N<sup>10</sup>.

For the different methylene-H<sub>4</sub>MPT conformations shown in Figure 7 the heats of formation are displayed in Figure 8 as a function of the dihedral angle between the lone electron pair of N<sup>10</sup> and the C<sup>14a</sup>–H<sup>pro-S</sup> bond (Figure 8A) or the C<sup>14a</sup>–H<sup>pro-R</sup> bond (Figure 8B). In the enzyme-bound conformation **IIb** (Figure 7) the methylene *pro-R* C–H bond has a dihedral angle of 143° with the lone electron pair of N<sup>10</sup> (Table 2). For maximum reactivity of the *pro-R* C–H bond, the dihedral angle would have to be 180° as in conformation **III** (Figure 7), which is proposed to be the conformation in the transition state. Figure 8B shows that a  $\Delta E_{23}$  of +29 kJ mol<sup>-1</sup> is required for the conversion of conformation **IIb** into conformation **III**.



**Figure 7.** Conformations (stereoview) of methylene- $H_4$ MPT obtained by semiempirical AM1 calculations in vacuo. **Ib** is the conformation with the lowest energy and similar to the conformation free in solution as derived by NMR spectroscopy (Figure 6, conformation **Ia**). The imidazolidine ring is in an envelope conformation with the flap  $N^{10}$  below the ring and the pro-S hydrogen atom anticlinal to the lone electron pair at  $N^{10}$ . Conformation **IIb** is an alternative minimum with a heat of formation only  $+2 \text{ kJ mol}^{-1}$  higher than that of conformation **Ib**. Conformation **IIb** is similar to the NMR-derived enzyme-bound conformation (Figure 6, conformation **IIa**). The imidazolidine ring is in an envelope conformation with the flap  $N^{10}$  above the ring and the pro-R hydrogen atom anticlinal to the lone electron pair of  $N^{10}$ . **III** and **IV** are proposed conformations for the transition states: In **III** the pro-R hydrogen atom of  $C^{14a}$  is antiperiplanar to the lone electron pair of  $N^{10}$  (**IIb**  $\rightarrow$  **III**;  $\Delta E_{23} = +29 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) and therefore reactive; in **IV** the reactive pro-S hydrogen atom of  $C^{14a}$  is antiperiplanar to the lone electron pair of  $N^{10}$  (**Ib**  $\rightarrow$  **IV**;  $\Delta E_{14} = +53 \text{ kJ mol}^{-1}$ ). For relative orientations of the lone electron pairs of  $N^5$  and  $N^{10}$  to the bond of the pro-S and pro-R hydrogen atoms see Table 2. Lone electron pairs are shown in yellow, hydrogens in blue, nitrogens in green, carbons in black and oxygens in red.

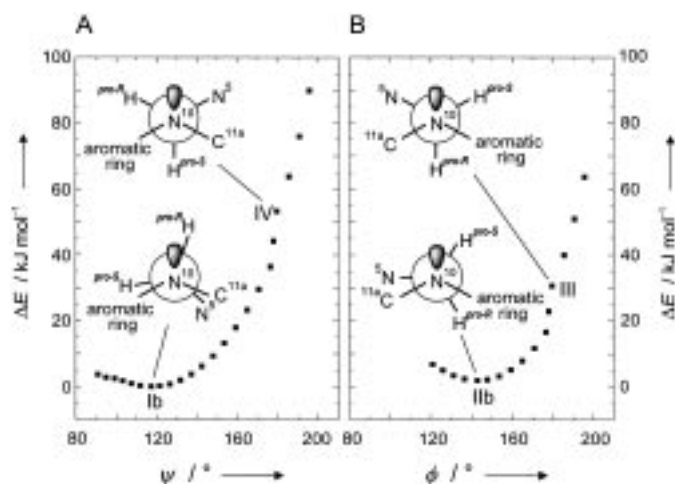
In conformation **Ib** (Figure 7) that corresponds to methylene- $H_4$ MPT free in solution, the methylene pro-S C–H bond has an absolute dihedral angle of  $117^\circ$  with the lone electron pair of  $N^{10}$  (Figure 8A and Table 2). In order to activate the pro-S C–H bond this angle can be increased to  $180^\circ$  by forcing conformation **Ib** into conformation **IV**. This deformation requires a  $\Delta E_{14}$  of  $+53 \text{ kJ mol}^{-1}$  (Figure 8A). Between conformation **Ib** and **IIb** there is an inversion barrier of  $16 \text{ kJ mol}^{-1}$  (see Experimental Section). Conformation **III** can only be reached from conformation **Ib** via conformation **IIb**.

We also performed geometry optimisations for methylene- $H_4$ F and found the conformations to be almost identical to those calculated for methylene- $H_4$ MPT. In addition, the energy profiles for the conversion of conformation **Ib** of methylene- $H_4$ F to the corresponding conformations **IIb**, **III** and **IV** are almost identical to those shown in Figure 8 for methylene- $H_4$ MPT:  $\Delta E_{23}$  was calculated to be  $+35 \text{ kJ mol}^{-1}$  and  $\Delta E_{14}$  to be  $+51 \text{ kJ mol}^{-1}$ .

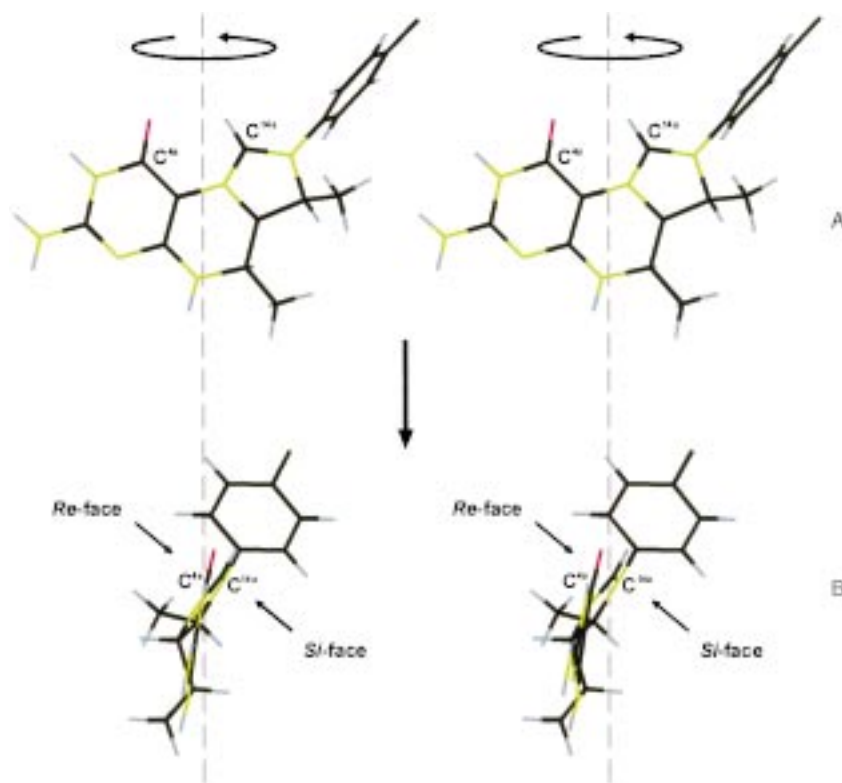
#### Reversed stereospecificity of methenyl- $H_4$ MPT<sup>+</sup> reduction with $NaBD_4$ to methylene- $H_4$ MPT

The quantum mechanical results indicate that almost twice as much energy is required to convert conformation **Ib** into **IV** for maximal activation of the methylene pro-S C–H bond than to convert conformation **IIb** into **III** for maximal activation of the methylene pro-R C–H bond of methylene- $H_4$ MPT and methylene- $H_4$ F. This may explain why the enzymatic dehydrogenation of methylene- $H_4$ MPT and of methylene- $H_4$ F always proceeds *Re*-face-specific.<sup>[11]</sup> Based on the principle of microscopic reversibility the back reaction should have the same stereospecificity as the forward reaction, and indeed it was shown that the enzymatic reduction of methenyl- $H_4$ MPT<sup>+</sup> to methylene- $H_4$ MPT with  $H_2$  also proceeds *Re*-face-specific.<sup>[11]</sup> These results cannot explain, however, why the reduction of methenyl- $H_4$ MPT<sup>+</sup> or methenyl- $H_4$ F<sup>+</sup> with  $NaBD_4$  to the respective methylene compounds is *Si*-face specific, leading to the incorporation of the hydride in the pro-S position.<sup>[15]</sup> An alternative mechanism must therefore be considered for the chemical reduction.

In the chemical reduction methenyl- $H_4$ MPT<sup>+</sup> and methenyl- $H_4$ F<sup>+</sup> react irreversibly with the negatively charged  $BD_4^-$  ion, whereas in the enzyme-catalysed reaction they react reversibly with neutral  $H_2$ ,  $F_{420}H_2$  or NAD(P)H. The energy-minimised conformations of methenyl- $H_4$ MPT<sup>+</sup> indicate that the *Re*-face is sterically and electrostatically shielded by the oxygen atom at  $C^{4a}$  (Figure 9). Therefore, the approach of  $BD_4^-$  to the *Re*-face of the imidazoline ring can be expected to require more activation energy than the approach to the *Si*-face. Indeed, calculation of the minimum energy paths of  $AlH_4^-$  to methenyl- $H_4$ MPT<sup>+</sup> reveals that the *Si*-face approach has a lower energy barrier than the *Re*-face



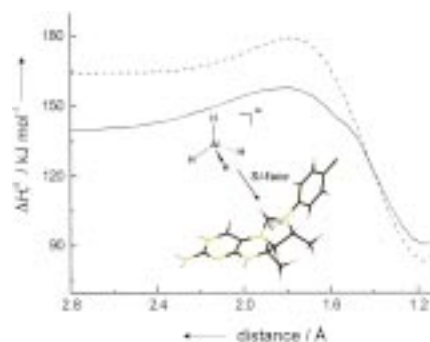
**Figure 8.** Energy profile for the interconversion A) of conformation **1b** of methylene- $H_4$ MPT to conformation **IV** and B) of conformation **IIb** to conformation **III** in Figure 7. The difference of the heats of formation  $\Delta E$  is plotted versus the absolute values of the dihedral angle ( $\psi$  or  $\phi$ ) between the lone electron pair of  $N^{10}$  and A) the  $C^{14a}$ - $H^{pro-S}$  bond and B) the  $C^{14a}$ - $H^{pro-R}$  bond. All energies are given relative to the energy of conformation **1b**. The profiles are obtained from semiempirical quantum mechanical calculations by constraining the dihedral angle between the lone electron pair of  $N^{10}$  and the  $C^{14a}$ - $H^{pro-R}$  bond or the  $C^{14a}$ - $H^{pro-S}$  bond at specific values and by energy-minimising the remaining degrees of freedom using the molecular modeling package INSIGHT.<sup>[67]</sup> Conversion of conformation **1b** into **IIb** involves the inversion at  $N^{10}$  with an estimated activation barrier of about  $+16 \text{ kJ mol}^{-1}$  (see Experimental Section). Newman projections to illustrate the dihedral angle in conformations **I–IV** are shown for clarity.



**Figure 9.** Stereoview A) of the Si-face of methenyl- $H_4$ MPT<sup>+</sup> and B) after rotation by  $90^\circ$  highlighting the shielding effect of the oxygen atom at  $C^{4a}$  on the accessibility of the positively charged  $C^{14a}$  to  $BD_4^-$ . Hydrogens are shown in blue, nitrogens in green, carbons in black and oxygen in red.

**Table 2.** Dihedral angles between the lone electron pair of  $N^5$  or  $N^{10}$  and the  $C^{14a}$ - $H^{pro-S}$  or  $C^{14a}$ - $H^{pro-R}$  bond for the conformations of methylene- $H_4$ MPT shown in Figures 6 and 7.

Conformation	Dihedral angle [ $^\circ$ ]			
	$N^5/H^{pro-S}$	$N^5/H^{pro-R}$	$N^{10}/H^{pro-S}$	$N^{10}/H^{pro-R}$
<b>Ia</b>	144	24	-137	-18
<b>IIa</b>	130	9	30	151
<b>Ib</b>	125	7	-117	2
<b>IIb</b>	121	2	23	143
<b>III</b>	95	-27	50	180
<b>IV</b>	172	48	-180	-48



**Figure 10.** Energy profiles for the reduction of methenyl- $H_4$ MPT<sup>+</sup> with  $AlH_4^-$  approaching from either the Si-face (—) or the Re-face (---) of the imidazolidine ring. The profiles show the lowest heat of formation of the two reactants for each distance as computed by using a semiempirical AM1

Hamiltonian. Distances are given in Å between the closest hydrogen atom of  $AlH_4^-$  and  $C^{14a}$ . Computation of the backward reaction (data not shown) reveals essentially an identical energy profile. Since corresponding semiempirical AM1 parameters for boron are not available,  $BD_4^-$  was modelled by  $AlH_4^-$ , which can also be regarded as a suitable hydride donor within this computational model system. The Si-face attack has the lower activation energy.

approach (ca.  $25 \text{ kJ mol}^{-1}$ ; (Figure 10). The same difference is obtained when calculating minimum energy paths for the reduction of methenyl- $H_4F^+$  with  $AlH_4^-$  (data not shown).  $AlH_4^-$  instead of  $BD_4^-$  was used in the calculations since parametrisation of the  $AlH_4^-$  anion was available and because  $AlH_4^-$  has been shown to react similarly to  $BD_4^-$ .<sup>[31]</sup>

The calculation of the minimum energy paths for the approach of  $AlH_4^-$  is not valid in a quantitative sense because the computation was performed in vacuo and because  $AlH_4^-$  is already in contact with the hydrophobic rings of methenyl- $H_4$ MPT<sup>+</sup> while being pulled towards  $C^{14a}$ . Unfortunately, the errors of current solvation models are too high (ca.  $14.6 \text{ kJ mol}^{-1}$  for AMSOL)<sup>[32]</sup> to use them for extending the minimum energy paths to longer distances. Nevertheless, at van der Waals contact distances to  $C^{14a}$ , the calculations become more and more quantitatively correct and the results of the calculations with

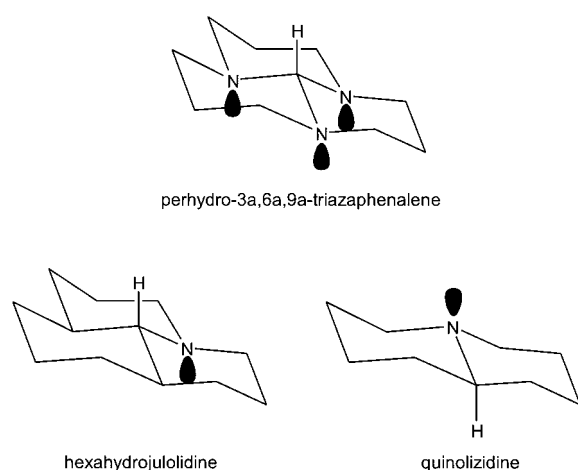
$\text{AlH}_4^-$  agree with the experimental finding that the reduction of methenyl- $\text{H}_4\text{MPT}^+$  and of methenyl- $\text{H}_4\text{F}^+$  with  $\text{NaBD}_4$  proceeds with *Si*-face stereospecificity.<sup>[15]</sup>

## Discussion

The enzyme-catalysed dehydrogenation of methylene- $\text{H}_4\text{MPT}$  requires an activation energy of approximately  $+50 \text{ kJ mol}^{-1}$  as determined for Hmd from *Methanothermobacter marburgensis* and from *Methanopyrus kandleri* from the temperature dependence of the activity.<sup>[30, 66]</sup> This indicates that the conformational change of methylene- $\text{H}_4\text{MPT}$  upon enzyme binding associated with the generation of the transition state should not require more than  $+50 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Semiempirical quantum mechanical calculations of the heats of formation ( $\Delta H_f^\circ$ ) for the conformations **A** and **B** (Figure 2) revealed, however, that the required energy  $\Delta E_{\text{AB}}$  associated with the conformational change **A**  $\rightarrow$  **B** exceeds  $+200 \text{ kJ mol}^{-1}$  both for methylene- $\text{H}_4\text{MPT}$  and methylene- $\text{H}_4\text{F}$  (see Results). The calculations indicate that conformational changes at  $\text{N}^5$  are thermodynamically very unfavourable and that only conformational changes at  $\text{N}^{10}$  are possible. The calculations suggest a thermodynamically more favourable conformation for the transition state in which the *pro-R* C–H bond is in an antiperiplanar position only to the lone electron pair of  $\text{N}^{10}$ . In order to reach this transition state (conformation **III**, Figure 7) from the ground state (conformation **IIb**, Figure 7), only  $+29 \text{ kJ mol}^{-1}$  are required in case of methylene- $\text{H}_4\text{MPT}$  and  $+35 \text{ kJ mol}^{-1}$  in case of methylene- $\text{H}_4\text{F}$ .

The newly proposed transition state raises the question whether one lone electron pair antiperiplanar to the *pro-R* C–H bond is sufficient to allow for the heterolytic cleavage of this C–H bond. It has previously been noted that the reactivity of a C–H bond correlates with the wave number of the C–H stretching band in the IR spectrum. C–H bonds with a very high reactivity have a relatively low wavenumber and vice versa. C–H bonds antiperiplanar to lone electron pairs of neighbouring nitrogen atoms generally show bands with wavenumbers below  $2800 \text{ cm}^{-1}$  that are referred to as Bohlmann bands.<sup>[33–35]</sup> These bands are found for compounds such as perhydro-3a,6a,9a-triazaphenalene with a methine C–H bond in antiperiplanar position to three lone electron pairs of three neighbouring nitrogen atoms,<sup>[19–21]</sup> but also for compounds such as hexahydrojulolidine<sup>[36]</sup> and quinolizidine<sup>[37–40]</sup> with a methine C–H bond in an antiperiplanar position to only one lone electron pair (Figure 11). The presence of a Bohlmann band in hexahydrojulolidine and quinolizidine suggests that one perfectly antiperiplanar oriented lone electron pair should sufficiently activate the *pro-R* C–H bond.

The mechanism proposed for methylene- $\text{H}_4\text{MPT}$  and methylene- $\text{H}_4\text{F}$  dehydrogenation assumes that the four enzyme-catalysed reactions [Eqs. (1)–(4)] can in principle proceed only via two putative transition states, in which either the *pro-R* or the *pro-S* C–H bond of the substrate methylene group is maximally activated. The conformations of the two transition states, one of which is by  $+24 \text{ kJ mol}^{-1}$  (methylene- $\text{H}_4\text{MPT}$ ) or  $+16 \text{ kJ mol}^{-1}$  (methylene- $\text{H}_4\text{F}$ ) (difference of calculated heats of formation) more favoured than the other, differ significantly from the



**Figure 11.** Structures of perhydro-3a,6a,9a-triazaphenalene, of hexahydrojulolidine and of quinolizidine. The three compounds show Bohlmann bands<sup>[33–35]</sup> in their infrared spectra at  $2450 \text{ cm}^{-1}$ ,<sup>[19, 20]</sup> approximately  $2750 \text{ cm}^{-1}$ <sup>[36]</sup> and approximately  $2750 \text{ cm}^{-1}$ ,<sup>[38–40]</sup> respectively. Such wavenumbers are indicative of a reactive C–H bond.<sup>[15]</sup> For the crystal structure of perhydro-3a,6a,9a-triazaphenalene see ref. [63].

substrate conformation in solution. Although with an estimated upper error of  $10 \text{ kJ mol}^{-1}$  for the activation barrier, semiempirical quantum mechanical calculations are not very accurate, the energy differences of  $+24 \text{ kJ mol}^{-1}$  and  $+16 \text{ kJ mol}^{-1}$  seem nevertheless significant enough to explain the *Re*-face specificity of the dehydrogenation of methylene- $\text{H}_4\text{MPT}$  and methylene- $\text{H}_4\text{F}$ .

The NMR spectroscopical data revealed that upon binding of methylene- $\text{H}_4\text{MPT}$  to Hmd the conformation of methylene- $\text{H}_4\text{MPT}$  changes from **Ia**, with the *pro-R* hydrogen atom synclinal, to **IIa**, with the *pro-R* hydrogen atom anticlinal to the lone electron pair of  $\text{N}^{10}$  (Figure 6). Typically, binding of a ligand to its enzyme provides up to  $10–15 \text{ kJ mol}^{-1}$  of energy,<sup>[41, 42]</sup> which is close in magnitude to the inversion barrier of  $16 \text{ kJ mol}^{-1}$  between conformations **Ib** and **IIb** (see Experimental Section). A further increase in the dihedral angle between the lone electron pair of  $\text{N}^{10}$  and the  $\text{C}^{14a}\text{–H}^{pro-R}$  bond by  $29^\circ$ , in order to reach the proposed transition state (conformation **III**, Figure 7), requires an energy  $\Delta E_{23}$  of  $+29 \text{ kJ mol}^{-1}$ . It is the function of enzymes to funnel, by entropic guidance,<sup>[43]</sup> the populations of conformers to the transition state.<sup>[43, 44]</sup> Consistently, the observed conformational change upon enzyme binding is the first step towards a low-energy transition state.

The mechanism proposed for enzymatic methylene- $\text{H}_4\text{MPT}$  and methylene- $\text{H}_4\text{F}$  dehydrogenation is similar in some respects to that proposed by Benner et al. for the enzymatic dehydrogenation of  $\text{NAD(P)H}$ .<sup>[45–47]</sup> In the active site,  $\text{NAD(P)H}$  was proposed to exist in either an *anti*-antiperiplanar conformation, with the *pro-R* C–H bond at  $\text{C}^4$  activated, or in a *syn*-antiperiplanar conformation, with the *pro-S* C–H bond at  $\text{C}^4$  activated.<sup>[43, 48, 49]</sup> The difference in potential energy between the two conformations was calculated to be approximately  $+8 \text{ kJ mol}^{-1}$ ,<sup>[48]</sup> a difference much smaller than the difference of  $+24 \text{ kJ mol}^{-1}$  or  $+16 \text{ kJ mol}^{-1}$  we calculated for the two conformations of methylene- $\text{H}_4\text{MPT}$  and methylene- $\text{H}_4\text{F}$ , with either the *pro-R*



C–H bond or the *pro-S* C–H bond at C<sup>14a</sup> maximally activated. The much smaller energy difference may be the reason why both *Re*-face stereospecific and *Si*-face stereospecific NAD(P)-dependent dehydrogenases are found.

## Conclusions

By combining structural data from NMR spectroscopic measurements and theoretical predictions of activation energies from quantum chemical computations, a mechanism is proposed to explain the *Re*-face stereospecificity of the enzyme-catalysed dehydrogenation of methylene-H<sub>4</sub>MPT and of methylene-H<sub>4</sub>F. This mechanism is based on the theoretical prediction that only half the energy is required to force the *pro-R* hydrogen atom into an activated antiperiplanar conformation relative to the lone electron pair of N<sup>10</sup> than to force the *pro-S* hydrogen atom into the antiperiplanar conformation. Confidence in the theoretical calculations is provided by the fact that a) the two computed minimum energy conformations are in good agreement with the NMR-based structures of methylene-H<sub>4</sub>MPT in solution and when enzyme-bound and the fact that b) the computed energy profiles for the reduction of methenyl-H<sub>4</sub>MPT<sup>+</sup> with AlH<sub>4</sub><sup>−</sup> correctly predict the observed *Si*-face-specific hydrogenation of methenyl-H<sub>4</sub>MPT<sup>+</sup> and methenyl-H<sub>4</sub>F<sup>+</sup> in solution by NaBD<sub>4</sub>.

## Experimental Section

**Enzyme and coenzyme preparation:** Hmd was purified from *Methanothermobacter marburgensis*<sup>[50]</sup> (formerly *Methanobacterium thermoautotrophicum*).<sup>[28]</sup> The purified enzyme with a molecular mass of 37831 Da exhibited a specific activity of 1200 U mg<sup>−1</sup> at 65 °C and of approximately 10 U mg<sup>−1</sup> at 0 °C as determined photometrically by following the dehydrogenation of methylene-H<sub>4</sub>MPT at pH 6.0 and 336 nm.<sup>[50]</sup> Methylene-H<sub>4</sub>MPT and methenyl-H<sub>4</sub>MPT<sup>+</sup> were prepared as described by Breitung et al.<sup>[51]</sup> Since Hmd is inactivated in the presence of O<sub>2</sub> and methylene-H<sub>4</sub>MPT is susceptible to autoxidation, all experiments were performed under strictly anaerobic conditions (where possible) in an anaerobic glove box (Coy Laboratory Products Inc.) filled with 95% N<sub>2</sub>/5% H<sub>2</sub> and containing palladium catalyst for the continuous removal of O<sub>2</sub>.

**NMR spectroscopy:** NMR spectra were recorded at 0 °C on a Bruker DRX 600 MHz NMR spectrometer. The NMR tubes contained 0.5 mL of a solution of 50 mM potassium phosphate (pH 7.8) in H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (9:1), 1 mM methylene-H<sub>4</sub>MPT and, when indicated, 0.3 mM Hmd (6.0 mg/0.5 mL). The gas phase above the solution consisted of 100% H<sub>2</sub>.

2D NOESY spectra in H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (9:1) were collected by using standard NOESY pulse sequences with 1024 or 2048 complex points in *t*<sub>2</sub> over a spectral width of 6024.1 Hz. The mixing time *τ*<sub>m</sub> was varied between 15 and 200 ms. For each spectrum 512 *t*<sub>1</sub> experiments with 32 scans were acquired with a recycle delay of 3 s. Water suppression was either achieved by a WATERGATE pulse scheme<sup>[52]</sup> or a low-power presaturation pulse during recycling delay and mixing time.<sup>[53]</sup> Spectra were zero-filled to 2048 points in *ω*<sub>1</sub> and 1024 points in *ω*<sub>2</sub>. A 90°-shifted squared sinebell window function was applied for apodisation prior to Fourier transformation in both dimensions. Automated baseline correction was applied in both dimensions. For 1D spectra an exponential window function with 0.5 Hz line

broadening was applied and all spectra were referenced to the H<sub>2</sub>O signal at *δ* = 5.01 at 0 °C.

NMR data were processed using the software programs FELIX 98 (MSI, Inc., San Diego, CA) and XWINNMR 2.6 (Bruker Instruments, Rheinstetten). Resonance peaks were assigned based on published spectra.<sup>[11]</sup> Nuclear Overhauser effect (NOE) cross-peak integrals were integrated using the program FELIX. Cross-relaxation rates were determined from the initial slope of a polynomial fit of the cross-peak integrals as a function of the mixing time. We took the H<sup>2b/6b</sup>/H<sup>3b/5b</sup> cross-relaxation rate as reference since this distance does not change upon binding to the enzyme (*r*<sub>ref</sub> = 2.46 Å). Also the cross relaxation rate of this peak is not affected by a rotational mobility of the aromatic ring. For methylene-H<sub>4</sub>MPT free in solution, NOE distance restraints were derived directly from the cross-relaxation rates.

In the presence of Hmd the measured NOE cross-peaks are the sum of contributions from the enzyme-bound and the free conformations of methylene-H<sub>4</sub>MPT. To obtain distance restraints for the enzyme-bound conformation we subtracted the contributions of the free conformation according to the following procedure: The H<sup>2b/6b</sup>/H<sup>3b/5b</sup> cross-relaxation rates in the absence of enzyme (*σ*<sub>ref</sub><sup>a</sup>) and in the presence of enzyme (*σ*<sub>ref</sub><sup>p</sup>) were determined from the initial slope of a polynomial fit of the H<sup>2b/6b</sup>/H<sup>3b/5b</sup> cross-peak integral as a function of the mixing time, divided by the sum over the well-dispersed diagonal peak of H<sup>2b/6b</sup> and the integrals I<sub>ref</sub><sup>a</sup> and I<sub>ref</sub><sup>p</sup>, respectively, over all cross-peaks with the resonance of H<sup>2b/6b</sup> in *ω*<sub>2</sub>. These absolute rates *σ*<sub>ref</sub><sup>a</sup> = 0.2 Hz and *σ*<sub>ref</sub><sup>p</sup> = 1.5 Hz and the molecular masses *M* of Hmd (37831 Da) and methylene-H<sub>4</sub>MPT (775 Da) were used to determine the population *p*<sup>b</sup> of the bound form of methylene-H<sub>4</sub>MPT according to Equation (5);

$$\frac{\sigma_{\text{ref}}^{\text{p}}}{\sigma_{\text{ref}}^{\text{a}}} = \frac{p^{\text{b}} M_{\text{Hmd}} + (1 - p^{\text{b}}) M_{\text{methylene-H}_4\text{MPT}}}{M_{\text{methylene-H}_4\text{MPT}}} \quad (5)$$

taking into account that the correlation time is linear with the molecular mass. The percentage of methylene-H<sub>4</sub>MPT bound to the enzyme is *p*<sup>b</sup> × 100. The correlation time for the free form is 840 ps as determined from *σ*<sub>ref</sub><sup>a</sup> and the distance between H<sup>2b/6b</sup> and H<sup>3b/5b</sup>. At 600 MHz, *J*(2*ω*<sub>h</sub>) is already negligible since it contributes less than 10% to the spectral density.

The integrals I<sub>ref</sub><sup>a</sup> and I<sub>ref</sub><sup>p</sup> for all spectra served to calibrate all cross-peak integrals to unity. The integrals I<sup>b</sup> without or I<sup>p</sup> with enzyme, respectively, of the A,B cross-peak reporting the A,B distance were scaled for each mixing time with the integrals I<sub>ref</sub><sup>a</sup> and I<sub>ref</sub><sup>p</sup>, respectively. *σ*<sub>A-B</sub><sup>a</sup> and *σ*<sub>A-B</sub><sup>p</sup> were obtained from the initial slope to the polynomial fit of I<sup>b</sup>/I<sub>ref</sub><sup>a</sup> and I<sup>p</sup>/I<sub>ref</sub><sup>p</sup>, respectively (Table 1). The distances of the bound form were determined according to Equation (6):

$$\frac{r_{\text{A-B(bound)}}}{r_{\text{ref}}} = \sqrt[6]{\frac{\sigma_{\text{ref}}^{\text{p}} - (1 - p^{\text{b}}) \sigma_{\text{ref}}^{\text{a}}}{\sigma_{\text{A-B}}^{\text{p}} - (1 - p^{\text{b}}) \sigma_{\text{A-B}}^{\text{a}}}} \quad (6)$$

### Calculation of the conformation of methylene-H<sub>4</sub>MPT from NMR data:

To obtain an energetically favourable structure that was consistent with the NMR data, we generated a computer model of methylene-H<sub>4</sub>MPT. A simulated annealing and energy minimisation protocol was then carried out using the program X-PLOR<sup>[54]</sup> with a force field derived from the two three-dimensional structures of methylene-H<sub>4</sub>F bound to crystallised thymidylate synthase<sup>[55]</sup> by using the LEARN command in X-PLOR.<sup>[56]</sup> This command derives ideal values for covalent interactions from averages over a set of coordinates, and force constants from their variance, analogous to the procedure used to derive the energy parameters commonly used in X-ray crystallographic refinement.<sup>[57]</sup> The calculations were carried out in vacuo without electrostatic terms. Nonbonded parameters were taken from the CHARMM PARAM19 force field.<sup>[58]</sup> The

simulated annealing protocol consisted of 120 000 steps with a time step of 0.2 fs of molecular dynamics starting at a temperature of 2000 K and slowly cooling to 100 K. This was followed by 200 steps of conjugate gradient minimisation. Other minimised parameters were set as described by Nilges and O'Donoghue.<sup>[54]</sup> The interproton distances determined from the transferred NOE experiments were used as restraints allowing a 10% uncertainty in distances without energy penalty. The energy-minimised model was then carefully checked to ensure that it obeyed the NMR distance restraints. In the conformational search procedure, N<sup>10</sup> was allowed to be flexible, whereas all the other carbon and nitrogen atoms in the pterin moiety including N<sup>5</sup> were restrained during the calculation to the amount of planarity found in the crystal structure of methylene-H<sub>4</sub>F bound to thymidylate synthase.<sup>[55]</sup> The search was repeated with two different starting geometries derived from this crystal structure. All the individual conformations found were then evaluated by comparison of internuclear distances with the experimentally determined distance restraints to find the conformation which best agreed with the NMR data. When none of the structures fully satisfied the NMR distance restraints, ensembles of structures were generated by stepwise rotating the aromatic ring and the methyl groups. NOE cross-relaxation rates were calculated for these structures and combined into an effective cross-relaxation rate of the ensemble according to the following procedure:

Rotations about the dihedral angles about the N<sup>10</sup>-C<sup>1b</sup> bond for the aromatic ring and about the C<sup>7a</sup>-C<sup>13a</sup> and C<sup>11a</sup>-C<sup>12a</sup> bonds for the methyl groups were performed with the program Insight II (MSI, Inc.) in steps of 5°. Distances of fixed protons H<sup>f</sup> to the aromatic protons H<sup>a</sup> were treated with the  $r^{-6}$  sum assuming dynamics that are slow compared to the correlation time [Eq. (7)],<sup>[59]</sup>

$$\sigma_{af} = \frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} \frac{d\varphi}{|\mathbf{H}^a - \mathbf{H}^f|^6} \quad (7)$$

with  $\varphi$  being the dihedral angle of the aromatic ring and  $\mathbf{H}^a$  and  $\mathbf{H}^f$  being the vectors to the nuclei of H<sup>a</sup> and H<sup>f</sup>, respectively. As mentioned before, the integration [0, 2 $\pi$ ] was replaced by the sum [0°, 5°, ..., 360°] and was evaluated by a FORTRAN program.

Distances between fixed protons H<sup>f</sup> to the methyl protons H<sup>m</sup> were calculated by using Equation (8) (where  $\varphi_1$  and  $\varphi_2$  are both dihedral angles about the Me-C bonds) assuming dynamics that are fast compared to the correlation time.

$$\sigma_{mf} = \frac{1}{(2\pi)^2} \int_0^{2\pi} \int_0^{2\pi} \frac{0.5 \left( 3 \frac{((\mathbf{H}^m - \mathbf{H}^f)(\varphi_1) (\mathbf{H}^m - \mathbf{H}^f)(\varphi_2))^2}{|(\mathbf{H}^m - \mathbf{H}^f)(\varphi_1)|^2 |(\mathbf{H}^m - \mathbf{H}^f)(\varphi_2)|^2} - 1 \right)}{|(\mathbf{H}^m - \mathbf{H}^f)(\varphi_1)|^3 |(\mathbf{H}^m - \mathbf{H}^f)(\varphi_2)|^3} d\varphi_1 d\varphi_2 \quad (8)$$

Distances between protons of the aromatic ring to protons of the methyl groups were calculated by rotating each in steps of 5° using Equation (9) assuming a fast rotation of the methyl groups relative to the aromatic ring:<sup>[54]</sup>  $\varphi_1$  and  $\varphi_3$  are independently varied angles about the Me-C bond and  $\varphi_2$  and  $\varphi_4$  about the C-phenyl bond.

$$\sigma_{am} = \frac{1}{(2\pi)^4} \int_0^{2\pi} \int_0^{2\pi} \int_0^{2\pi} \int_0^{2\pi} \frac{0.5 \left( 3 \frac{((\mathbf{H}^a - \mathbf{H}^m)(\varphi_1, \varphi_2) (\mathbf{H}^a - \mathbf{H}^m)(\varphi_3, \varphi_4))^2}{|(\mathbf{H}^a - \mathbf{H}^m)(\varphi_1, \varphi_2)|^2 |(\mathbf{H}^a - \mathbf{H}^m)(\varphi_3, \varphi_4)|^2} - 1 \right)}{|(\mathbf{H}^a - \mathbf{H}^m)(\varphi_1, \varphi_2)|^3 |(\mathbf{H}^a - \mathbf{H}^m)(\varphi_3, \varphi_4)|^3} d\varphi_1 d\varphi_2 d\varphi_3 d\varphi_4 \quad (9)$$

From the averaged rates the theoretical distances were calculated by referencing to the reference rate and the reference distance according to Equation (10).

$$\bar{r}_{A-B} = r_{ref} \sqrt[6]{\frac{\sigma_{ref}}{\sigma}} \quad (10)$$

The internuclear distances of the ensemble of structures fulfil the experimental NOE cross-relaxation rates to within 10%. The structures shown in Figure 6 represent the ensemble best fitting minimum.

**Semiempirical quantum mechanical calculations of the conformations of methylene-H<sub>4</sub>MPT, methylene-H<sub>4</sub>F, methenyl-H<sub>4</sub>MPT<sup>+</sup> and methenyl-H<sub>4</sub>F<sup>+</sup>:** The quantum chemical calculations were carried out using the program package VAMP (G. Rauhut, A. Alex, J. Chandrasekhar, T. Steinke, W. Sauer, B. Beck, M. Hutter, P. Gedeck, T. Clark, VAMP Version 6.5, Oxford Molecular, Erlangen, 1997). The AM1 Hamiltonian<sup>[29]</sup> was applied to obtain all results and the Eigenvector Following<sup>[60]</sup> algorithm was used throughout all calculations to optimise each molecular system to a gradient norm below +1.7 kJ mol<sup>-1</sup> Å<sup>-1</sup>. The molecular systems considered were derived from the structures of N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-methylene-H<sub>4</sub>MPT or N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-methylene-H<sub>4</sub>F (Figure 1). R was CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH in the case of methylene-H<sub>4</sub>MPT and CONH-CH<sub>3</sub> in the case of methylene-H<sub>4</sub>F. The computation of the energy profile given in Figure 8 was carried out by individual energy minimisations of the structure of methylene-H<sub>4</sub>MPT with the dihedral angle between the lone electron pair orbital of N<sup>10</sup> and the C<sup>14a</sup>-H<sup>pro-R</sup> bond constrained to defined values. For the reaction profiles given in Figure 10 steps of 0.05 Å were chosen. Since corresponding semiempirical AM1 parameters for boron are not available, BD<sub>4</sub><sup>-</sup> was modelled by AlH<sub>4</sub><sup>-</sup>, which can also be regarded as a suitable hydride donor within this computational model system.

To computationally estimate an upper limit of the inversion barrier at N<sup>10</sup>, the dihedral angle C<sup>1b</sup>-N<sup>10</sup>-C<sup>11a</sup>-C<sup>6a</sup> (Figure 1) was altered from +126° to +249° in steps of 5°. The highest point on this reaction path had a dihedral angle of 166° and is 16 kJ mol<sup>-1</sup> higher in energy than conformer **1b** (Figure 7).

All NMR measurements were conducted at the European Large Scale Facility for Biomolecular NMR (ERBCT95-0034) at the University of Frankfurt. This work was supported by the Max-Planck-Gesellschaft, by the Deutsche Forschungsgemeinschaft and by the Fonds der Chemischen Industrie. S.B. is supported by a Kekulé stipend of the Fonds der Chemischen Industrie and is a member of the Graduiertenkolleg "Chemische und biologische Synthese von Wirkstoffen" at the University of Frankfurt.

- [1] R. K. Thauer, *Microbiology* **1998**, *144*, 2377–2406.
- [2] B. E. H. Maden, *Biochem. J.* **2000**, *350*, 609–629.
- [3] L. Chistoserdova, J. A. Vorholt, R. K. Thauer, M. E. Lidstrom, *Science* **1998**, *281*, 99–102.
- [4] J. A. Vorholt, L. Chistoserdova, S. M. Stolyar, R. K. Thauer, M. E. Lidstrom, *J. Bacteriol.* **1999**, *181*, 5750–5757.
- [5] J. A. Vorholt, L. Chistoserdova, M. E. Lidstrom, R. K. Thauer, *J. Bacteriol.* **1998**, *180*, 5351–5356.
- [6] R. K. Thauer, A. R. Klein, G. C. Hartmann, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 3031–3042.
- [7] G. Buurman, S. Shima, R. K. Thauer, *FEBS Lett.* **2000**, *485*, 200–204.
- [8] C. H. Hagemeyer, L. Chistoserdova, M. E. Lidstrom, R. K. Thauer, J. A. Vorholt, *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 3762–3769.
- [9] M. Allaire, Y. G. Li, R. E. MacKenzie, M. Cygler, *Structure* **1998**, *6*, 173–182.
- [10] L. J. Sliker, S. J. Benkovic, *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 1833–1838.
- [11] J. Schleucher, C. Griesinger, B. Schwörer, R. K. Thauer, *Biochemistry* **1994**, *33*, 3986–3993.
- [12] A. R. Klein, R. K. Thauer, *Eur. J. Biochem.* **1995**, *227*, 169–174.
- [13] C. H. Hagemeyer, S. Bartoschek, C. Griesinger, R. K. Thauer, J. A. Vorholt, *FEBS Lett.* **2001**, *494*, 95–98.
- [14] A. Berkesell, R. K. Thauer, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 2418–2421; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, *34*, 2247–2250.

- [15] B. H. Geierstanger, T. Prasch, C. Griesinger, G. Hartmann, G. Buurman, R. K. Thauer, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 3491–3494; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 3300–3303.
- [16] J. Cioslowski, G. Boche, *Angew. Chem.* **1997**, *109*, 165–167; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 107–109.
- [17] A. P. Scott, B. T. Golding, L. Radom, *New J. Chem.* **1998**, *22*, 1171–1173.
- [18] J. H. Teles, S. Brode, A. Berkessel, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 1345–1346.
- [19] J. M. Erhardt, J. D. Wuest, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 6363–6364.
- [20] J. M. Erhardt, E. R. Grover, J. D. Wuest, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 6365–6369.
- [21] T. J. Atkins, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 6364–6365.
- [22] J. C. Fontecilla-Camps, C. E. Bugg, C. Temple, Jr., J. D. Rose, J. A. Montgomery, R. L. Kisluk, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 6114–6115.
- [23] M. Poe, L. M. Jackman, S. J. Benkovic, *Biochemistry* **1979**, *18*, 5527–5530.
- [24] R. Kalbermatten, W. Städeli, J. H. Bieri, M. Viscontini, *Helv. Chim. Acta* **1981**, *64*, 2627–2635.
- [25] J. P. Albrand, B. Birdsall, J. Feeney, G. C. K. Roberts, A. S. V. Burgen, *Int. J. Biol. Macromol.* **1979**, *1*, 37–41.
- [26] G. M. Clore, A. M. Gronenborn, *J. Magn. Reson.* **1982**, *53*, 423–442.
- [27] B. D. Sykes, *Curr. Opin. Biotechnol.* **1993**, *4*, 392–396.
- [28] A. Wasserfallen, J. Nolling, P. Pfister, J. Reeve, E. C. de Macario, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **2000**, *50*, 43–53.
- [29] M. J. S. Dewar, E. G. Zoebisch, E. F. Healy, J. J. P. Stewart, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 3902–3909.
- [30] K. Ma, C. Zirngibl, D. Linder, K. O. Stetter, R. K. Thauer, *Arch. Microbiol.* **1991**, *156*, 43–48.
- [31] J. March, *Advanced Organic Chemistry*, 4th ed., Wiley, New York, **1992**.
- [32] G. D. Hawkins, C. J. Cramer, D. G. Truhlar, *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 3257–3271.
- [33] F. Bohlmann, *Angew. Chem.* **1957**, *20*, 641–642.
- [34] P. J. Krueger, J. Jan, *Can. J. Chem.* **1970**, *48*, 3236–3248.
- [35] R. Jeyaraman, T. Ravindran, M. Sujatha, M. Venkatraj, *Indian J. Chem. Sect. B* **1999**, *38*, 52–55.
- [36] F. Bohlmann, C. Arndt, *Chem. Ber.* **1958**, *91*, 2167–2175.
- [37] F. Bohlmann, *Chem. Ber.* **1958**, *91*, 2157–2167.
- [38] C. D. Johnson, R. A. Y. Jones, A. R. Katritzky, C. R. Palmer, K. Schofield, R. J. Wells, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1965**, 6797–6806.
- [39] G. W. Gribble, R. B. Nelson, *J. Org. Chem.* **1973**, *38*, 2831–2834.
- [40] F. W. Vierhapper, E. L. Eliel, *J. Org. Chem.* **1979**, *44*, 1081–1087.
- [41] J. Boström, P.-O. Norrby, T. Liljefors, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **1998**, *12*, 383–396.
- [42] M. C. Nicklaus, S. Wang, J. S. Driscoll, G. W. Milne, *Bioorg. Med. Chem.* **1995**, *3*, 411–428.
- [43] L. Young, C. B. Post, *Biochemistry* **1996**, *35*, 15129–15133.
- [44] R. Castillo, J. Andrés, V. Moliner, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 12140–12147.
- [45] S. A. Benner, *Experientia* **1982**, *38*, 633–637.
- [46] K. P. Nambiar, D. M. Stauffer, P. A. Kolodziej, S. A. Benner, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 5886–5890.
- [47] S. A. Benner, K. P. Nambiar, G. K. Chambers, *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 5513–5517.
- [48] Ö. Almarsson, T. C. Bruice, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 2125–2138.
- [49] D. J. Creighton, N. S. R. K. Murthy in *The Enzymes*, Vol. XIX (Eds.: D. S. Sigman, P. D. Boyer), 3rd ed., Academic Press, San Diego, **1990**, pp. 323–421.
- [50] C. Zirngibl, R. Hedderich, R. K. Thauer, *FEBS Lett.* **1990**, *261*, 112–116.
- [51] J. Breitung, G. Börner, S. Scholz, D. Linder, K. O. Stetter, R. K. Thauer, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *210*, 971–981.
- [52] M. Piotto, V. Saudek, V. Sklenát, *J. Biomol. NMR* **1992**, *2*, 661–665.
- [53] B. H. Meier, R. R. Ernst, *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 6441–6442.
- [54] M. Nilges, S. I. O'Donoghue, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1998**, *32*, 107–139.
- [55] C. R. Sage, M. D. Michelitsch, T. J. Stout, D. Biermann, R. Nissen, J. Finer-Moore, R. M. Stroud, *Biochemistry* **1998**, *37*, 13893–13901.
- [56] A. Hodel, T. Simonson, R. O. Fox, A. T. Brünger, *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 3409–3417.
- [57] R. Engh, R. Huber, *Acta Crystallogr. Sect. A* **1991**, *47*, 392–400.
- [58] B. R. Brooks, R. E. Brucoleri, B. D. Olafson, D. J. States, S. Swaminathan, M. Karplus, *J. Comput. Chem.* **1983**, *4*, 187–217.
- [59] C. M. Fletcher, D. N. M. Jones, R. Diamond, D. Neuhaus, *J. Biomol. NMR* **1996**, *8*, 292–310.
- [60] J. Baker, *J. Comput. Chem.* **1986**, *7*, 385–395.
- [61] P. van Beelen, A. P. M. Stassen, J. W. G. Bosch, G. D. Vogels, W. Guijt, C. A. G. Haasnoot, *Eur. J. Biochem.* **1984**, *138*, 563–571.
- [62] M. Poe, S. J. Benkovic, *Biochemistry* **1980**, *19*, 4576–4582.
- [63] R. L. Beddoes, W. D. Edwards, J. A. Joule, O. S. Mills, J. D. Street, *Tetrahedron Lett.* **1987**, *43*, 1903–1920.
- [64] Abbreviations: H<sub>4</sub>MPT = tetrahydromethanopterin, H<sub>4</sub>F = tetrahydrofolate, methylene-H<sub>4</sub>MPT = N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-methylene-H<sub>4</sub>MPT, methylene-H<sub>4</sub>F = N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-methylene-H<sub>4</sub>F, methenyl-H<sub>4</sub>MPT<sup>+</sup> = N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-methenyl-H<sub>4</sub>MPT<sup>+</sup>, methenyl-H<sub>4</sub>F<sup>+</sup> = N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-methenyl-H<sub>4</sub>F<sup>+</sup>.
- [65] M. C. Hutter, V. Helms, unpublished results.
- [66] G. Buurman, R. K. Thauer, unpublished results.
- [67] INSIGHT, version II, MSI, Inc., San Diego, CA.

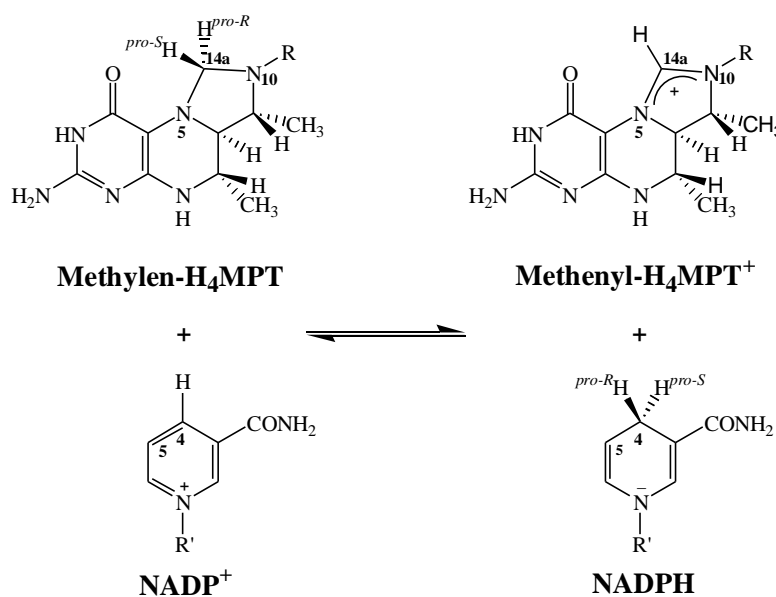
Received: November 15, 2000 [F 157]

### 3 Bestimmung der *Re*-Seiten Stereospezifität von NADP-abhängiger $N^5, N^{10}$ -Methylen tetrahydromethanopterin-Dehydrogenase (MtdA) aus *Methylobacterium extorquens* AM1 mittels NMR-Spektroskopie

Die Ergebnisse hierzu wurden in FEBS Letters veröffentlicht. Die Publikation ist am Ende dieses Kapitels abgedruckt. Im folgenden werden die wichtigsten Punkte zusammengefaßt und insbesondere auf die Bedeutung des Ergebnisses für die Interpretation der Kristallstruktur von NADP-abhängiger  $N^5, N^{10}$ -Methylen tetrahydromethanopterin-Dehydrogenase eingegangen. Die Stereochemie bezüglich Methylen- $H_4$ MPT war aufgrund detaillierter Untersuchungen zum Mechanismus von  $H_2$ -bildender Methylen- $H_4$ MPT-Dehydrogenase vorausgesagt worden (s. Kapitel 2). Der Zusammenhang mit diesen Untersuchungen wird ausführlich diskutiert.

#### 3.1 Problemstellung

Kürzlich wurde die NADP-abhängige  $N^5, N^{10}$ -Methylen tetrahydromethanopterin-Dehydrogenase (MtdA) aus *M. extorquens* AM1 (siehe Kapitel A, Abb. 2) entdeckt, die den Transfer eines Hydrids von  $N^5, N^{10}$ -Methylen tetrahydromethanopterin (Methylen- $H_4$ MPT) auf  $NADP^+$  unter der Beteiligung zweier Chiralitätszentren, C14a von Methylen- $H_4$ MPT und C4 von  $NADP^+$  [14, 15] (siehe Abb. 15), katalysiert.



**Abb. 15: Hydridtransferreaktion, die von NADP-abhängiger MtdA katalysiert wird.** Für die vollständige Struktur von Tetrahydromethanopterin und des funktionellen Analogons Tetrahydrofolat siehe [14] und [68].



Zusätzlich katalysiert MtdA auch die Reaktion mit  $N^5,N^{10}$ -Methylen tetrahydrofolat.  $N^5,N^{10}$ -Methylen tetrahydrofolat ist ein Cofaktor mit analoger Struktur zu Methylen- $H_4$ MPT [54]. Da MtdA phylogenetisch nicht mit den anderen drei bekannten Familien von Methylen- $H_4$ MPT- und  $N^5,N^{10}$ -Methylen tetrahydrofolat-Dehydrogenasen, von denen die  $H_2$ -bildende Methylen- $H_4$ MPT-Dehydrogenase in Kapitel 2 untersucht wurde, verwandt ist [14], wurde die Stereospezifität der Reaktion bestimmt. Für Methylen- $H_4$ MPT wurde die in Kapitel 2.4 anhand des Reaktionsmechanismus vorausgesagte *Re*-Seiten-Spezifität überprüft.

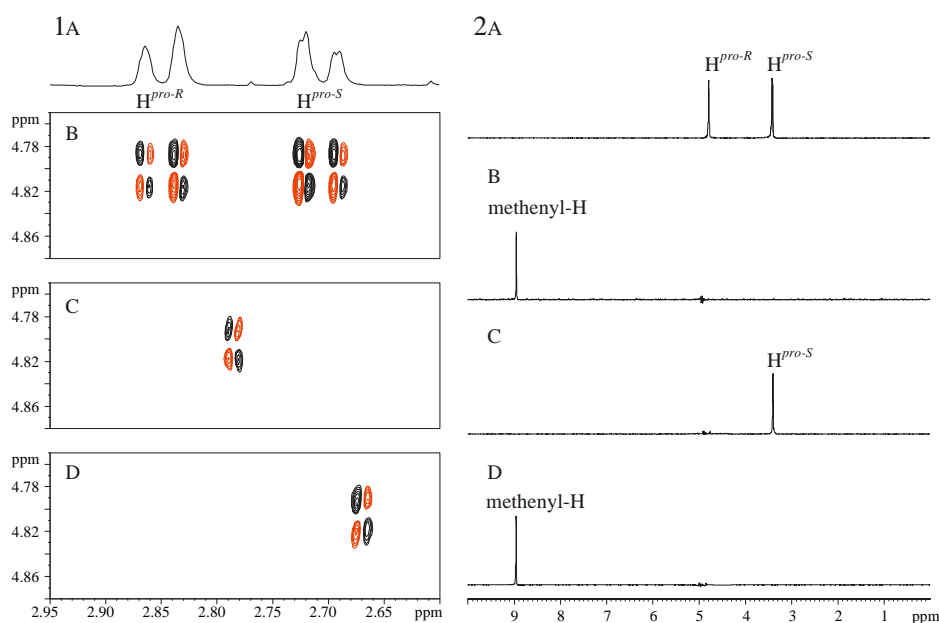
### 3.2 Proben- und Meßbedingungen

Der  $\Delta G^0$ -Wert der zu untersuchenden Reaktion liegt bei  $-13$  kJ/mol. Die Lage des Gleichgewichts der Reaktion ist somit fast vollständig auf Seiten der Produkte NADPH und Methenyl tetrahydrodromethanopterin (Methenyl- $H_4$ MPT<sup>+</sup>). Die Proben wurden in  $^2H_2O$  mit 100 mM Kaliumphosphatpuffer ( $p^2H$ -Wert = 7,5) gemessen, um dem optimalen pH-Wert und der optimalen Salzkonzentration von NADP-abhängiger  $N^5,N^{10}$ -Methylen tetrahydrodromethanopterin-Dehydrogenase (MtdA) aus *Methylobacterium extorquens* AM1 möglichst nahe zu sein [15]. Um die Stereospezifität der Reaktion in Bezug auf beide Cofaktoren bestimmen zu können, wurde  $N^5,N^{10}$ -Methylen tetrahydrodromethanopterin (Methylen- $H_4$ MPT) stereoselektiv entweder in der *pro-R*-Position oder in der *pro-S*-Position deuteriert und NADP<sup>+</sup> in der Position C4 entweder deuteriert oder unmarkiert für die Reaktion eingesetzt [69]. Mit diesen Substanzen wurde der Testansatz 5 min. in Gegenwart von MtdA bei Raumtemperatur inkubiert. Unkatalysiert läuft die Reaktion im Gegensatz zur enzymkatalysierten Reaktion auch über mehrere Tage nicht ab. Durch Abkühlen auf  $6^\circ C$  wurde die Reaktion gestoppt, und die Produkte wurden NMR-spektroskopisch bezüglich des erfolgten Hydrid- bzw. Deuteridtransfers analysiert. Ein Austausch des sauren Protons von Methenyl- $H_4$ MPT<sup>+</sup> oder der Methylengruppe an C4 von NADPH mit dem Lösungsmittel brauchte für die Interpretation der Ergebnisse nicht berücksichtigt werden, da dieser bei  $6^\circ C$  nicht und bei Raumtemperatur langsam erfolgt [57]. Die Experimente dazu werden im folgenden Abschnitt beschrieben.

### 3.3 Methode und Auswertung

Die Stereospezifität der von NADP-abhängiger  $N^5,N^{10}$ -Methylenetrahydro-methanopterin-Dehydrogenase (MtdA) aus *Methylobacterium extorquens* AM1 katalysierten Reaktion bezüglich der beiden Cofaktoren  $N^5,N^{10}$ -Methylenetrahydro-methanopterin (Methylen- $H_4$ MPT) und  $NADP^+$  wurde mit  $^1H,^{13}C$ -HSQC- und  $^1H,^1H$ -COSY-Spektren der Produkte bestimmt. (Für die genauen Probenbedingungen siehe Veröffentlichung).

Mit  $^1H,^{13}C$ -HSQC-Messungen wurde Methenyl- $H_4$ MPT $^+$  daraufhin untersucht, ob der Wasserstoff oder Deuterium in der Position C14a verblieben ist; mit  $^1H,^1H$ -COSY-Spektren wurde gleichzeitig NADPH analysiert, um zu klären, ob sich in der Position C4 ein Wasserstoff und ein Deuterium oder zwei Wasserstoffatome befinden (siehe Abb. 16).

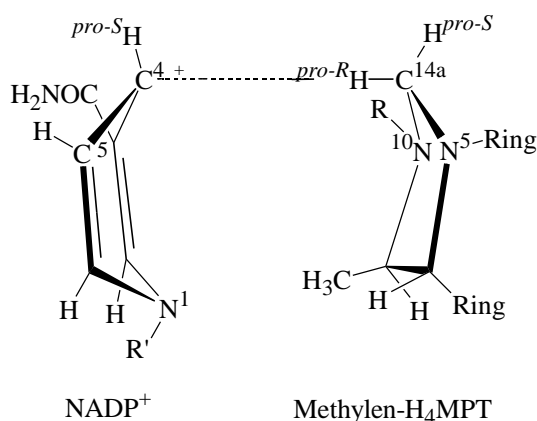


**Abb. 16:** (1) 1D-Protonen-NMR-Spektren der Protonen an C4 von NADPH und (2) Spuren aus  $^1H,^{13}C$ -HSQC-Spektren entlang der  $^{13}C$ -Resonanz von C14a von [14a- $^{13}C$ ]-Methylen- $H_4$ MPT und [14a- $^{13}C$ ]-Methenyl- $H_4$ MPT $^+$  in  $^2H_2O$  bei einem pH-Wert von 7,5 und 6°C. (1A) 1D-Protonen-NMR-Spektrum der Protonen an C4 und (1B) Kreuzsignale zwischen C4-H und C5-H in einem  $^1H,^1H$ -DQF-COSY-NMR-Spektrum von NADPH. (1C) Kreuzsignale zwischen C4-H und C5-H in einem 2D- $^1H,^1H$ -DQF-COSY-NMR-Spektrum von  $(4S)$ -[4- $^2H_1$ ]NADPH. Die chemische Verschiebung des C4- $H^{pro-R}$  ändert sich wegen des Deuteriumisotopeneffekts durch C4- $^2H^{pro-S}$ . (1D) Kreuzsignale zwischen C4-H und C5-H eines  $^1H,^1H$ -DQF-COSY-Spektrums von NADPH erzeugt durch die Reduktion von  $NADP^+$  mit (14aR)-[14a- $^2H_1$ ]-[14a- $^{13}C$ ]-Methylen- $H_4$ MPT katalysiert von MtdA aus *M. extorquens* AM1. Die chemische Verschiebung des C4- $H^{pro-S}$  ändert sich wegen des Deuteriumisotopeneffekts durch C4- $^2H^{pro-R}$ . Negative Konturen sind in roten Linien gezeichnet. (2A) Spektrum von Methylen- $H_4$ MPT mit den *pro-R*- und *pro-S*-Protonen an C14a. (2B) Methenyl- $H_4$ MPT $^+$  mit einem  $^1H$  an C14a. (1C) (14aR)- [14a- $^2H_1$ ]-[14a- $^{13}C$ ]-Methylen- $H_4$ MPT mit dem *pro-S*-Proton an C14a. Die chemische Verschiebung des *pro-S*-Protons ändert sich leicht durch den geminalen Isotopeneffekt von C14a- $^2H^{pro-R}$ . (2D) C14- $^1H$ -Methenyl- $H_4$ MPT $^+$  erhalten durch die Oxidation von (14aR)-[14a- $^2H_1$ ]-[14a- $^{13}C$ ]-Methylen- $H_4$ MPT mit  $NADP^+$  katalysiert von MtdA aus *M. extorquens*. Das Signal des C14- $^1H$  Protons in Methenyl- $H_4$ MPT $^+$  beweist die *pro-R*-Spezifität der Reaktion.

### 3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Mit Hilfe von  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC-Messungen und  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -COSY-Spektren konnte gezeigt werden, daß katalysiert von NADP-abhängiger  $N^5, N^{10}$ -Methylenetrahydromethanopterin-Dehydrogenase (MtdA) aus *Methylobacterium extorquens* AM1 der *pro-R*-Wasserstoff von  $N^5, N^{10}$ -Methylenetrahydromethanopterin (Methylen- $\text{H}_4\text{MPT}$ ) in die *pro-R*-Position von  $\text{NADP}^+$  transferiert wird.

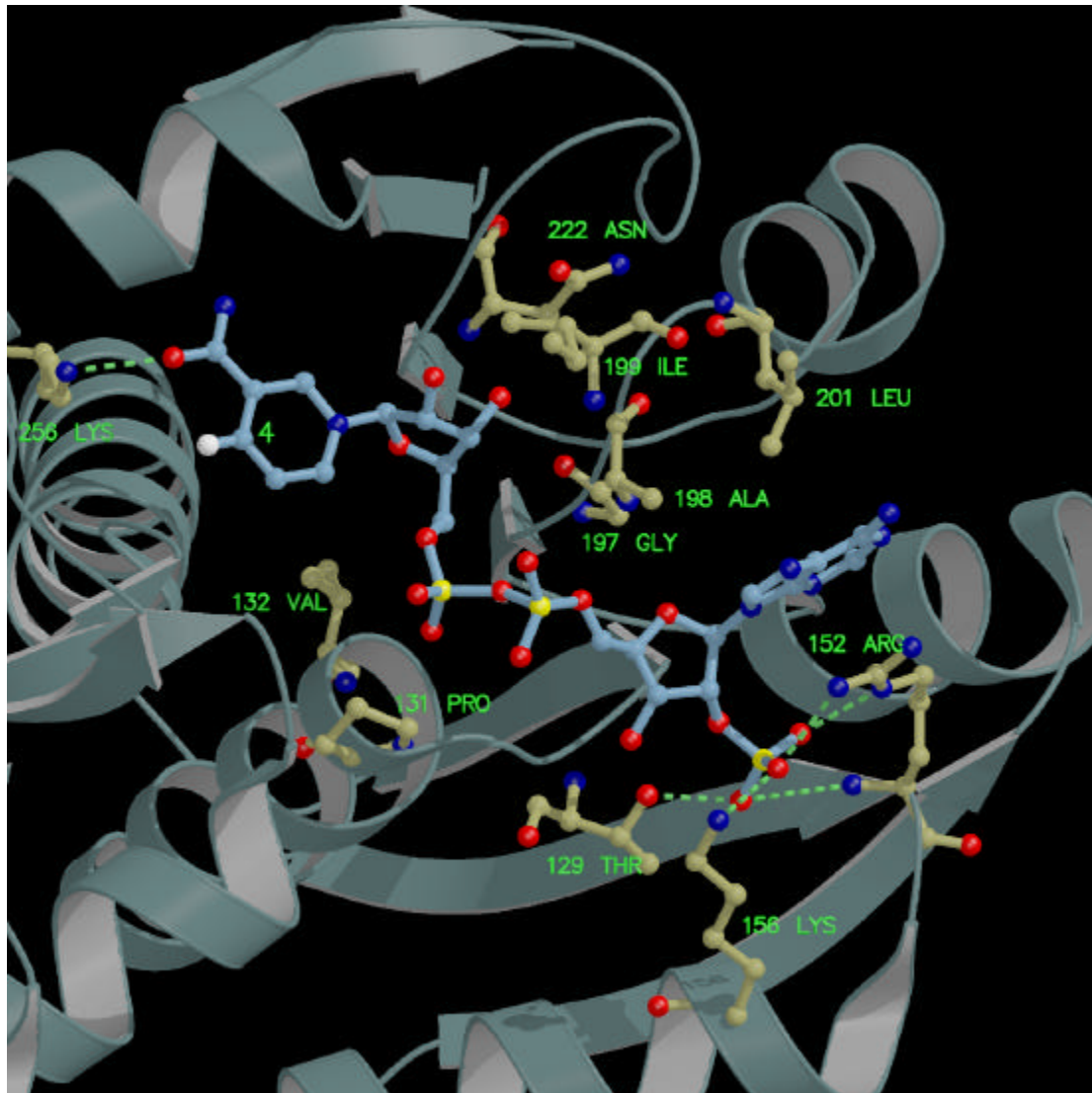
Als Schlüsselexperiment zur Bestimmung der Stereospezifität von NADPH und Methylen- $\text{H}_4\text{MPT}$  stellte sich die Markierung von Methylen- $\text{H}_4\text{MPT}$  in der *pro-R*-Position und die Verwendung von unmarkiertem  $\text{NADP}^+$  heraus. In dieser Reaktion findet man in den Endprodukten  $\text{C14-}^1\text{H}$ -Methenyl- $\text{H}_4\text{MPT}^+$  und  $(4S)$ - $[4\text{-}^2\text{H}_1]\text{NADPH}$ . Dies ist im Einklang mit der in Kapitel 2.4 entwickelten Theorie, daß es eine intrinsische Eigenschaft von Methylen- $\text{H}_4\text{MPT}$  ist, den *pro-R*-Wasserstoff zu übertragen. In der Reaktion wird dann das Deuterium auf den wasserstofftragenden Kohlenstoff C4 übertragen (siehe Abb. 15) und ein Chiralitätszentrum gebildet. In der natürlichen Reaktion mit unmarkierten Substraten wird der *pro-R*-Wasserstoff von Methylen- $\text{H}_4\text{MPT}$  - wie in Abb. 17 gezeigt - in die *pro-R*-Position von  $\text{NADP}^+$  transferiert. Die Reaktion verläuft also *Re*-Seiten-spezifisch sowohl für Methylen- $\text{H}_4\text{MPT}$  als auch für NADPH.



**Abb. 17: Reduktion von  $\text{NADP}^+$  mit Methylen- $\text{H}_4\text{MPT}$  katalysiert von *Re*-Seiten-spezifischer MtdA (siehe auch Abb. 15).** Der Hydridtransfer verläuft stereospezifisch von der *pro-R*-Position von Methylen- $\text{H}_4\text{MPT}$  in die *pro-R*-Position von  $\text{NADP}^+$ . Die Konformationen von  $\text{NADP}^+$  und Methylen- $\text{H}_4\text{MPT}$  sind für den Übergangszustand gezeigt, wie dies in [70] und [60] vorgeschlagen wurde.

Die Stereochemie bezüglich Methylen- $\text{H}_4\text{MPT}$  war aufgrund detaillierter Untersuchungen zum Mechanismus von  $\text{H}_2$ -bildender Methylen- $\text{H}_4\text{MPT}$ -Dehydrogenase vorausgesagt worden [60]. Der postulierte Übergangszustand für diese Reaktion ist in Abb. 17 dargestellt. In Übereinstimmung mit dem postulierten Übergangszustand ist die  $1,9 \text{ \AA}$

Kristallstruktur von MtdA mit gebundenem  $\text{NADP}^+$  [71]. Das Pyridinnukleotid ist darin mit der *Si*-Seite an eine Höhle des Proteins gebunden, so daß die *Re*-Seite vom Protein wegzeigt (siehe Abb. 18). Wenn Methylen- $\text{H}_4\text{MPT}$  nach der Bindung des  $\text{NADP}^+$  mit der *Re*-Seite an das Pyridinnukleotid bindet, kann die gefundene Stereospezifität der Reaktion erklärt werden. Geplant ist es anhand des postulierten Übergangszustandes auch Methylen- $\text{H}_4\text{MPT}$  in die Kristallstruktur zu modellieren (Hagemeier *et al.*, in Vorbereitung), welches bisher nicht kokristallisiert werden konnte.



**Abb. 18:** Kristallstruktur von an MtdA gebundenem  $\text{NADP}^+$  [71]. Gezeigt ist der Blick von oben auf die *Re*-Seite von  $\text{NADP}^+$ , das hydrophob an die Oberfläche von MtdA gebunden ist. Dargestellt sind alle Aminosäurereste, die in einer Entfernung näher als 4 Å zum gebundenen  $\text{NADP}^+$  sind. Besonders hervorgehoben sind die Wechselwirkungen zwischen dem 2'-Phosphat der Nicotinamid-Ribose und den Seitenketten der Aminosäuren Threonin 129, Lysin 156 und Arginin 152 sowie die Wechselwirkung zwischen Lysin 256 und dem Sauerstoff der Carboxamid-Gruppe des Nicotinamid-Ringes.

In Kapitel 2 wurde ein Mechanismus für den Hydridtransfer von Methylen- $H_4MPT$  entwickelt. Dieser Mechanismus postulierte auch die Stereospezifität der Reaktion von Methylen- $H_4MPT$  mit  $NADP^+$ . Die  $NADP$ -abhängige Methylen- $H_4MPT$ -Dehydrogenase aus *Methylobacterium extorquens* AM1 katalysiert diese Reaktion. Die NMR-Spektroskopie stellte dabei eine elegante Methode dar auch die diastereotopen Protonen, die in der Reaktion entstehen, per se zu unterscheiden. Die Ergebnisse bestätigten nicht nur die vorausgesagte Stereospezifität für Methylen- $H_4MPT$  sondern helfen jetzt auch bei der Interpretation der Kristallstruktur von  $NADP^+$ -gebundener MtdA in Abwesenheit von Methylen- $H_4MPT$ .

### 3.5 Veröffentlichung:

***Re*-face stereospecificity of  
NADP-dependent methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase from  
*Methylobacterium extorquens* AM1 as  
determined by NMR spectroscopy**

# *Re*-face stereospecificity of NADP dependent methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens* AM1 as determined by NMR spectroscopy

Christoph H. Hagemeyer<sup>a,1</sup>, Stefan Bartoschek<sup>a,b,c,1</sup>, Christian Griesinger<sup>b,c</sup>,  
Rudolf K. Thauer<sup>a,\*</sup>, Julia A. Vorholt<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie and Laboratorium für Mikrobiologie des Fachbereichs Biologie der Philipps-Universität, Karl-von-Frisch-Strasse, D-35043 Marburg, Germany

<sup>b</sup>Institut für Organische Chemie der Universität Frankfurt, Marie-Curie-Str. 11, D-60439 Frankfurt/Main, Germany

<sup>c</sup>Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Am Fassberg 11, D-37077 Göttingen, Germany

Received 26 January 2001; accepted 28 February 2001

First published online 20 March 2001

Edited by Thomas L. James

**Abstract** MtdA catalyzes the dehydrogenation of  $N^5,N^{10}$ -methylene-tetrahydromethanopterin (methylene- $H_4$ MPT) with  $NADP^+$  as electron acceptor. In the reaction two prochiral centers are involved, C14a of methylene- $H_4$ MPT and C4 of  $NADP^+$ , between which a hydride is transferred. The two diastereotopic protons at C14a of methylene- $H_4$ MPT and at C4 of  $NADPH$  can be seen separately in  $^1H$ -NMR spectra. This fact was used to determine the stereospecificity of the enzyme. With (14a*R*)-[14a- $^2H_1$ ]-[14a- $^{13}C$ ]methylene- $H_4$ MPT as the substrate, it was found that the *pro-R* hydrogen of methylene- $H_4$ MPT is transferred by MtdA into the *pro-R* position of  $NADPH$ . © 2001 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier Science B.V. All rights reserved.

**Key words:** Methylene-tetrahydromethanopterin;  $NADPH$ ; Stereospecificity;  $^1H$ -Nuclear magnetic resonance; *Methylobacterium extorquens* AM1

## 1. Introduction

Recently in *Methylobacterium extorquens* AM1 a novel enzyme was found that catalyzes the dehydrogenation of  $N^5,N^{10}$ -methylene-tetrahydromethanopterin (methylene- $H_4$ MPT) to  $N^5,N^{10}$ -methenyltetrahydromethanopterin (methenyl- $H_4$ MPT<sup>+</sup>) with  $NADP^+$  as electron acceptor ( $\Delta G^\circ = -13$  kJ/mol) [1,2] (Fig. 1). The enzyme designated NADP dependent methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase (MtdA) also catalyzes the dehydrogenation of  $N^5,N^{10}$ -methylene-tetrahydrofolate to  $N^5,N^{10}$ -methenyltetrahydrofolate albeit with a 20-fold lower catalytic efficiency. It is, however, strictly specific for NADP. The homotrimeric enzyme, which is devoid of a prosthetic group, exhibits a ternary complex catalytic mechanism [1].

\*Corresponding author. Fax: (49)-6421-178209.  
E-mail: thauer@mail.uni-marburg.de

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

**Abbreviations:** DQF-COSY, double-quantum filter correlated spectroscopy; HSQC, heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy; MtdA,  $NADP^+$  dependent methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase; Hmd, hydrogen forming methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase;  $H_4$ MPT, tetrahydromethanopterin

In the MtdA catalyzed reaction, a hydride is transferred from C14a of methylene- $H_4$ MPT to C4 of  $NADP^+$ , which are both prochiral centers (Fig. 1). The C14a containing imidazolidine ring and the C4 containing pyridine ring thus have a *Si*-face and a *Re*-face with which they can bind to an enzyme and interact with one another. For hydrogen transfer to occur, either the *pro-S* or the *pro-R* hydrogen of methylene- $H_4$ MPT must be in van der Waals contact with C4 of the pyridine ring, either from the *Si*-face or from the *Re*-face. From the stereochemistry of the hydride transfer the relative position of the two substrates within the active site of MtdA can therefore be deduced.

## 2. Materials and methods

$^2H_2$  was from Messer Griesheim.  $^2H_2O$ , [ $^{13}C$ ]formaldehyde,  $NaB^2H_4$  and [ $^{1-2}H$ ]glucose were from Aldrich, and  $NADP^+$  and  $NADPH$  were from Biomol. Tetrahydromethanopterin ( $H_4$ MPT) was isolated from *Methanothermobacter marburgensis* (DSMZ 2133, formerly *Methanobacterium thermoautotrophicum* strain Marburg [3]) [4]. Glucose-6-phosphate dehydrogenase from yeast was from Boehringer.

[14a- $^{13}C$ ]Methylene- $H_4$ MPT was prepared by spontaneous reaction of  $H_4$ MPT with [ $^{13}C$ ]formaldehyde [5]. Methenyl- $H_4$ MPT<sup>+</sup> was generated from methylene- $H_4$ MPT at pH 6.0 by dehydrogenation. The reaction was catalyzed by hydrogen forming methylene- $H_4$ MPT dehydrogenase (Hmd) [6]. Hmd was purified from *M. marburgensis* [7].  $NADP^+$  dependent methylene- $H_4$ MPT dehydrogenase from *M. extorquens* AM1 (DSMZ 1338) was heterologously overproduced in *Escherichia coli* and purified as described in [2].

### 2.1. Preparation of $^2H$ stereospecifically labelled methylene- $H_4$ MPT and $NADPH$

(14a*R*)-[14a- $^2H_1$ ]-[14a- $^{13}C$ ]Methylene- $H_4$ MPT was generated by reduction of methenyl- $H_4$ MPT<sup>+</sup> with  $^2H_2$  in  $^2H_2O$  containing 100 mM potassium phosphate p<sup>2</sup>H 7.5 at room temperature as catalyzed by *Re*-face specific Hmd [8,9]. After completion of the reaction the enzyme was removed by ultrafiltration using a 30 kDa microconcentrator (Millipore). Since Hmd and methylene- $H_4$ MPT are oxygen sensitive, all steps were performed under strictly anaerobic conditions. (4*S*)-[4- $^2H_1$ ]NADPH was synthesized by reduction of  $NADP^+$  with [ $^{1-2}H$ ]glucose-6-phosphate as catalyzed by *Si*-face specific glucose-6-phosphate dehydrogenase from yeast [10]. After completion of the reaction the enzyme was removed by ultrafiltration. (14a*S*)-[14a- $^2H_1$ ]-[14a- $^{13}C$ ]Methylene- $H_4$ MPT was generated by reduction of methenyl- $H_4$ MPT<sup>+</sup> with  $NaB^2H_4$  [9,11].

### 2.2. Assay for the determination of the stereospecificity of MtdA

The 1 ml assay mixture in  $^2H_2O$  contained 100 mM potassium

phosphate  $p^2H$  7.5, 2 mM NADP<sup>+</sup>, 4 mM (14aR)-[14a-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]-[14a-<sup>13</sup>C]methylene-H<sub>4</sub>MPT or 4 mM (14aS)-[14a-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]-[14a-<sup>13</sup>C]methylene-H<sub>4</sub>MPT. The reaction was started with 5 U MtdA at room temperature and completed after 5 min. Before and after the reaction the assay was analyzed by <sup>1</sup>H-nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy.

### 2.3. Substrate and product analysis via <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy

NMR spectra of the assays were recorded at 279 K (6°C) and at a <sup>1</sup>H frequency of 600.13 MHz on a DRX600 spectrometer (Bruker) and processed with the program XWINNMR 2.6.

One-dimensional <sup>1</sup>H spectra were recorded with 16384 complex points over a spectral width of 6009.6 Hz. After 16 dummy scans to allow for preequilibration, 128 scans were signal averaged. The recycle delay was 2 s and a low power presaturation pulse was applied during the recycle delay. An exponential window function with 0.5 Hz line broadening was applied and the spectra were referenced to the H<sub>2</sub>O signal at 4.95 ppm and 279 K.

Two-dimensional <sup>13</sup>C,<sup>1</sup>H-heteronuclear single-quantum correlation (HSQC) spectra were collected using the standard HSQC pulse sequence [8,12–14] with 2048 complex points in  $t_2$  over a spectral width of 7788.2 Hz. For each spectrum 512  $t_1$  experiments with 32 scans were acquired with a recycle delay of 2 s (measurement time 22 h). Spectra were zero filled to 4096 points in  $\omega_1$  and 2048 points in  $\omega_2$  to obtain a resolution of 1.5 Hz in  $\omega_1$  and 1.0 Hz in  $\omega_2$ . A 90° shifted squared sinebell window function was applied for apodization prior to Fourier transformation in both dimensions. Automated baseline correction was applied in both dimensions.

Two-dimensional double-quantum filter correlated spectroscopy (DQF-COSY) spectra in <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O were collected using the standard pulse sequences [15–17] with 2048 complex points in  $t_2$  over a spectral width of 6009.6 Hz. A total of 512  $t_1$  experiments with 32 scans were acquired with a recycle delay of 2 s (measurement time 22 h). Spectra were zero filled to 4096 points in  $\omega_1$  and 2048 points in  $\omega_2$  resulting in a resolution of 2.9 Hz in  $\omega_1$  and 1.5 Hz in  $\omega_2$ . A 90° shifted squared sinebell window function was applied for apodization prior to Fourier transformation in both dimensions. Automated baseline correction was applied in both dimensions.

## 3. Results

### 3.1. Stereospecificity of MtdA at C14a of methylene-H<sub>4</sub>MPT

The diastereotopic protons at C14a of methylene-H<sub>4</sub>MPT exhibit different <sup>1</sup>H-NMR resonances, the chemical shift of the *pro-S* proton being 3.4 ppm and of the *pro-R* proton being 4.8 ppm [8] (Fig. 2, trace A). The resonance of the C14a proton of methenyl-H<sub>4</sub>MPT<sup>+</sup> is at 9.0 ppm (Fig. 2, trace B). In <sup>13</sup>C,<sup>1</sup>H-HSQC spectra of [14a-<sup>13</sup>C]methylene-H<sub>4</sub>MPT only the resonances at 3.4 and 4.8 ppm are observed and of

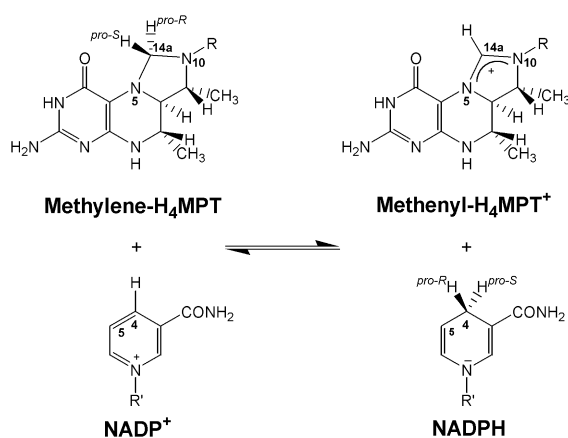


Fig. 1. Reaction catalyzed by NADP dependent MtdA. For the complete structure of tetrahydromethanopterin see [1]. H<sub>4</sub>MPT is structurally and functionally analogous to tetrahydrofolate [25].

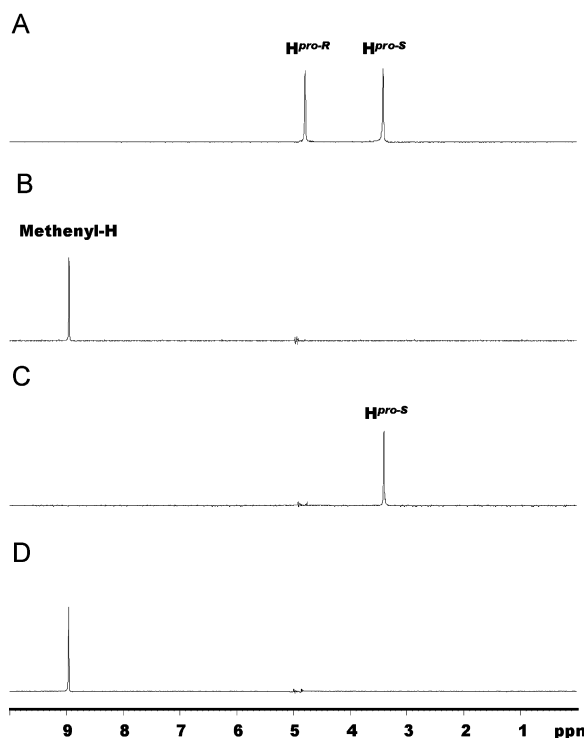


Fig. 2. Traces through <sup>13</sup>C,<sup>1</sup>H-HSQC spectra along the <sup>13</sup>C resonance of C14a of [14a-<sup>13</sup>C]methylene-H<sub>4</sub>MPT and [14a-<sup>13</sup>C]methenyl-H<sub>4</sub>MPT<sup>+</sup> in <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O at pH 7.5 and 279 K. A: Methylene-H<sub>4</sub>MPT (2 mM) showing the *pro-R* and *pro-S* protons at C14a. B: Methenyl-H<sub>4</sub>MPT<sup>+</sup> (2 mM) showing the <sup>1</sup>H at C14a. C: (14aR)-[14a-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]-[14a-<sup>13</sup>C]Methylene-H<sub>4</sub>MPT (4 mM) showing the *pro-S* proton at C14a. The chemical shift of the *pro-S* proton changed slightly due to the geminal isotope effect of the C14a-<sup>2</sup>H<sup>*pro-R*</sup>. D: [C14-<sup>1</sup>H]Methenyl-H<sub>4</sub>MPT<sup>+</sup> obtained by oxidation of (14aR)-[14a-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]-[14a-<sup>13</sup>C]methylene-H<sub>4</sub>MPT with NADP<sup>+</sup> at pH 7.5 as catalyzed by MtdA from *M. extorquens*. The observation of the C14-<sup>1</sup>H proton in the methenyl-H<sub>4</sub>MPT<sup>+</sup> spectrum proves the *pro-R* specificity of the reaction.

[14a-<sup>13</sup>C]methenyl-H<sub>4</sub>MPT<sup>+</sup> only at 9.0 ppm. These differences in chemical shifts were exploited to determine the stereospecificity of MtdA at C14a of methylene-H<sub>4</sub>MPT.

In Fig. 2, trace C, the <sup>13</sup>C,<sup>1</sup>H-HSQC spectrum of (14aR)-[14a-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]-[14a-<sup>13</sup>C]methylene-H<sub>4</sub>MPT shows the resonance of the *pro-S* proton of C14a at 3.4 ppm, and Fig. 2, trace D, depicts the spectrum of the compound after oxidation to methenyl-H<sub>4</sub>MPT<sup>+</sup> with NADP<sup>+</sup> in the presence of MtdA. The spectrum of the product (trace D) is identical to that of methenyl-H<sub>4</sub>MPT<sup>+</sup> with a <sup>1</sup>H at C14a (trace B). The *pro-S* <sup>1</sup>H of (14aR)-[14a-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]-[14a-<sup>13</sup>C]methylene-H<sub>4</sub>MPT was thus retained in the product indicating that the <sup>2</sup>H<sup>-</sup> in the *pro-R* position rather than the <sup>1</sup>H<sup>-</sup> in the *pro-S* position of the labelled substrate was transferred to NADP<sup>+</sup>. When (14aS)-[14a-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]-[14a-<sup>13</sup>C]methylene-H<sub>4</sub>MPT rather than (14aR)-[14a-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]-[14a-<sup>13</sup>C]methylene-H<sub>4</sub>MPT was used to reduce NADP<sup>+</sup>, methenyl-H<sub>4</sub>MPT<sup>+</sup> with <sup>2</sup>H<sub>1</sub> at C14a was formed (not shown). The results indicate that MtdA is *Re-face* specific with respect to C14a of methylene-H<sub>4</sub>MPT.

### 3.2. Stereospecificity of MtdA at C4 of NADP

The one-dimensional <sup>1</sup>H-NMR spectrum of the protons at C4 of NADPH shows two resonances which are both split by the geminal coupling between the two C4 protons (Fig. 3, trace A) [18]. These resonances were overlapped in the one-



dimensional spectrum by the resonances of other protons when, in addition to NADPH, methylene-H<sub>4</sub>MPT and the enzyme MtdA were also present in the solution. In the two-dimensional <sup>1</sup>H DQF-COSY NMR spectrum (Fig. 3), however, the C4, C5 proton cross peak was well resolved.

In Fig. 3C the <sup>1</sup>H DQF-COSY NMR spectrum of (4*S*)-[4-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]NADPH is shown. The resonances of the *pro-R* hydrogen are shifted to lower ppm values due to the <sup>2</sup>H isotope effect exerted by the <sup>2</sup>H<sup>*pro-S*</sup>. The geminal proton deuterium coupling is too small to be observed. In Fig. 3D the spectrum of NADP<sup>+</sup> after reduction to NADPH with (14*aR*)-[14*a*-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]-[14*a*-<sup>13</sup>C]methylene-H<sub>4</sub>MPT in the presence of MtdA indicates that (4*R*)-[4-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]-[NADPH] was formed. The negative deuterium isotope effect and the removal of the splitting of the H<sup>*pro-S*</sup> resonance is consistent with the presence of <sup>2</sup>H in the *pro-R* position. When (14*aS*)-[14*a*-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]-[14*a*-<sup>13</sup>C]methylene-H<sub>4</sub>MPT rather than (14*aR*)-[14*a*-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]-[14*a*-<sup>13</sup>C]methylene-H<sub>4</sub>MPT was used to reduce NADP<sup>+</sup>, NADPH containing two protons at C4 was formed (not shown). The results

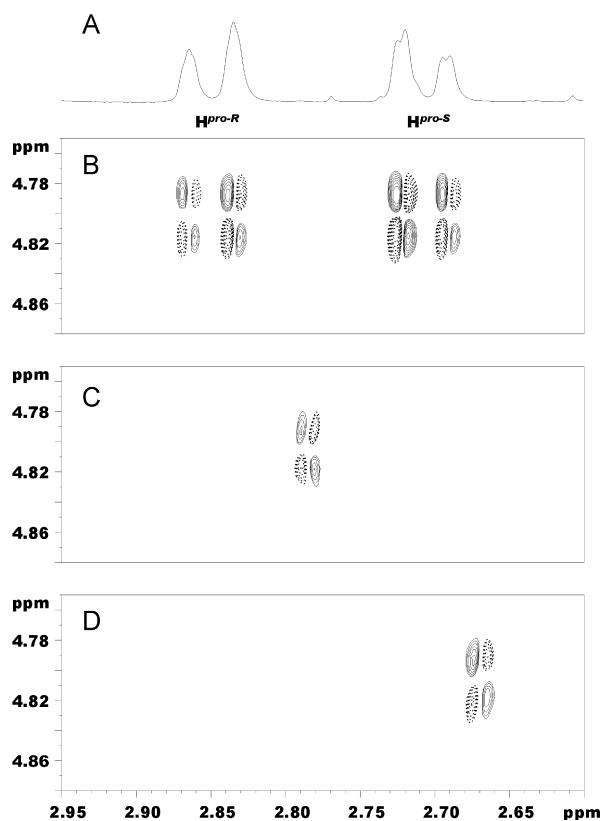


Fig. 3. <sup>1</sup>H-NMR spectra of the protons at C4 of NADPH in <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O at pH 7.5 and 279 K. One-dimensional <sup>1</sup>H-NMR spectrum of the protons at C4 (A) and cross peaks between the C4 and the C5 proton resonances in a <sup>1</sup>H DQF-COSY NMR spectrum of a sample containing 4 mM NADPH (B). C: Cross peak between the C4 and the C5 protons in a two-dimensional <sup>1</sup>H DQF-COSY NMR spectrum of 2 mM (4*S*)-[4-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]NADPH. The chemical shift of the C4 H<sup>*pro-R*</sup> changed due to the deuterium isotope effect by C4 <sup>2</sup>H<sup>*pro-S*</sup>. D: Cross peak between the C4 and the C5 protons of a DQF-COSY spectrum of 2 mM NADPH generated by reduction of 2 mM NADP<sup>+</sup> with 4 mM (14*aR*)-[14*a*-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>]-[14*a*-<sup>13</sup>C]methylene-H<sub>4</sub>MPT as catalyzed by MtdA from *M. extorquens* which was shown to be *Re*-face specific with respect to C14*a* of methenyl-H<sub>4</sub>MPT<sup>+</sup> (see Fig. 2). The chemical shift of C4 <sup>1</sup>H<sup>*pro-S*</sup> proton changed due to the deuterium isotope effect by the C4 <sup>2</sup>H<sup>*pro-R*</sup>. Negative contours are plotted in dashed lines.

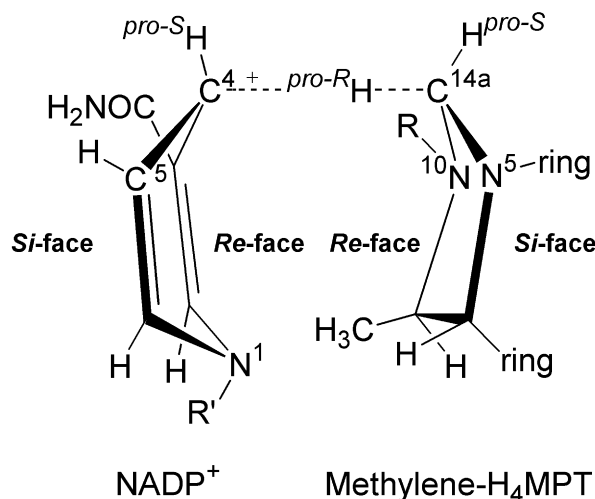


Fig. 4. Reduction of NADP<sup>+</sup> with methylene-H<sub>4</sub>MPT as catalyzed by *Re*-face stereospecific MtdA (see also Fig. 1). The hydride transfer proceeds stereoselectively from the *pro-R* position of methylene-H<sub>4</sub>MPT into the *pro-R* position of NADP<sup>+</sup>. The conformations of NADP<sup>+</sup> and methylene-H<sub>4</sub>MPT are shown for the transition state as proposed by [24,26].

thus indicate that the <sup>2</sup>H in the *pro-R* position of methylene-H<sub>4</sub>MPT was transferred into the *pro-R* position of NADPH. MtdA is thus *Re*-face specific with respect to C4 of NADP.

#### 4. Discussion

In Section 3 it was shown that MtdA is *Re*-face specific with respect to both C14*a* of methylene-H<sub>4</sub>MPT and C4 of NADP<sup>+</sup>. The *pro-R* hydrogen of methylene-H<sub>4</sub>MPT is thus transferred into the *pro-R* position of NADP<sup>+</sup> as shown in Fig. 4.

The crystal structure of MtdA with NADP<sup>+</sup> bound has recently been determined to 1.9 Å resolution [19]. The pyridine nucleotide was located in a wide cleft with its *Si*-face bound to the protein. From the stereochemistry of hydride transfer we can now predict that methylene-H<sub>4</sub>MPT has to bind on top of NADP<sup>+</sup> with its *Re*-face facing the *Re*-face of NADP<sup>+</sup>, and that consecutive binding of the two substrates to the enzyme occurs with NADP<sup>+</sup> binding first.

MtdA from *M. extorquens* AM1 has the same stereospecificity as NAD(P) dependent methylenetetrahydrofolate dehydrogenase from Eucarya [11,20–23]. This was not per se predictable since MtdA and methylenetetrahydrofolate dehydrogenases do not show sequence similarities and are therefore considered to have evolved independently [1,24].

**Acknowledgements:** This work was supported by the Max-Planck-Gesellschaft, by the Peter und Traudl Engelhorn-Stiftung, by the Deutsche Forschungsgemeinschaft and by the Fonds der Chemischen Industrie. We would like to thank Reinhard Böcher and Gerrit Buurman, MPI Marburg, for the preparation of H<sub>4</sub>MPT and Hmd.

#### References

- [1] Vorholt, J.A., Chistoserdova, L., Lidstrom, M.E. and Thauer, R.K. (1998) *J. Bacteriol.* 180, 5351–5356.
- [2] Hagemeyer, C.H., Chistoserdova, L., Lidstrom, M.E., Thauer, R.K. and Vorholt, J.A. (2000) *Eur. J. Biochem.* 267, 3762–3769.

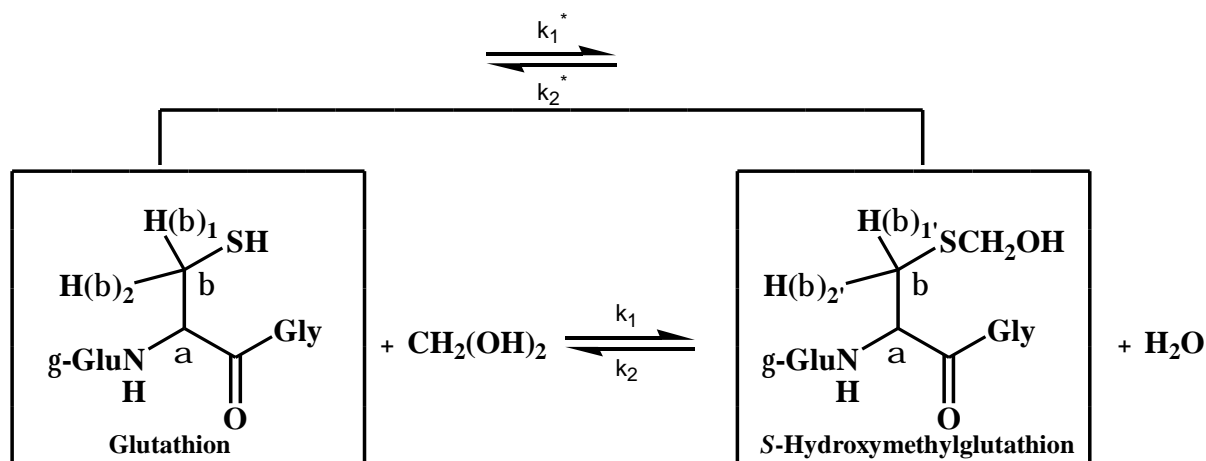
- [3] Wasserfallen, A., Nölling, J., Pfister, P., Reeve, J. and de Macario, E.C. (2000) *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 43–53.
- [4] Breitung, J., Börner, G., Scholz, S., Linder, D., Stetter, K.O. and Thauer, R.K. (1992) *Eur. J. Biochem.* 210, 971–981.
- [5] Escalante-Semerena, J.C., Rinehart Jr., K.L. and Wolfe, R.S. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 9447–9455.
- [6] Zirngibl, C., Hedderich, R. and Thauer, R.K. (1990) *FEBS Lett.* 261, 112–116.
- [7] Zirngibl, C., van Dongen, W., Schwörer, B., von Büнау, R., Richter, M., Klein, A. and Thauer, R.K. (1992) *Eur. J. Biochem.* 208, 511–520.
- [8] Schleucher, J., Griesinger, C., Schwörer, B. and Thauer, R.K. (1994) *Biochemistry* 33, 3986–3993.
- [9] Geierstanger, B.H., Prash, T., Griesinger, C., Hartmann, G., Buurman, G. and Thauer, R.K. (1998) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 37, 3300–3303.
- [10] You, K.-S. (1982) in: (Purich, D.L., Ed.), Vol. 87, pp. 101–126, Academic Press, New York.
- [11] Sliker, L.J. and Benkovic, S.J. (1984) *J. Am. Chem. Soc.* 106, 1833–1838.
- [12] Bodenhausen, G. and Ruben, D.J. (1980) *Chem. Phys. Lett.* 69, 185–189.
- [13] Palmer, A.G., Cavanagh, J., Wright, P.E. and Rance, M. (1991) *J. Magn. Reson.* 93, 151–170.
- [14] Kay, L.E., Keifer, P. and Saarinen, T. (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114, 10663–10665.
- [15] Aue, W.P., Bartholdi, E. and Ernst, R.R. (1976) *J. Chem. Phys.* 64, 2229–2246.
- [16] Piantini, U., Sorensen, O.W. and Ernst, R.R. (1982) *J. Am. Chem. Soc.* 104, 6800–6801.
- [17] Rance, M., Sorensen, O.W., Bodenhausen, G., Wagner, G., Ernst, R.R. and Wüthrich, K. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 117, 479–485.
- [18] Mostad, S.B., Helming, H.L., Groom, C. and Glasfeld, A. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 233, 681–686.
- [19] Hagemeyer, C.H., Ermler, U., Warkentin, E. and Vorholt, J.A. (2001) *Biospectrum* (in press).
- [20] Ramasastri, B.V. and Blakely, R.L. (1964) *J. Biol. Chem.* 239, 112–114.
- [21] Green, J.M., MacKenzie, R.E. and Matthews, R.G. (1988) *Biochemistry* 27, 8014–8022.
- [22] Allaire, M., Li, Y.G., MacKenzie, R.E. and Cygler, M. (1998) *Structure* 6, 173–182.
- [23] Shen, B.W., Dyer, D.H., Huang, J.Y., D’Ari, L., Rabinowitz, J. and Stoddard, B.L. (1999) *Protein Sci.* 8, 1342–1349.
- [24] Bartoschek, S., Buurman, G., Thauer, R.K., Geierstanger, B.H., Weyrauch, J.P., Griesinger, C., Nilges, M., Hutter, M. and Helms, V. (2001) *ChemBioChem* (in press).
- [25] Maden, B.E.H. (2000) *Biochem. J.* 350, 609–629.
- [26] Almarsson, Ö. and Bruice, T.C. (1993) *J. Am. Chem. Soc.* 115, 2125–2138.

## 4 Ein Glutathion-abhängiges Formaldehyd-aktivierendes-Enzym (Gfa) aus *Paracoccus denitrificans* entdeckt und gereinigt mit Hilfe von EXSY

Die Ergebnisse hierzu wurden bisher nicht veröffentlicht. Daher enthält dieses Kapitel die Daten für eine Kurzveröffentlichung, wobei auf die Methode nicht ausführlich eingegangen wird, da dies bereits in Kapitel 1 gründlich geschehen ist.

### 4.1 Problemstellung

Die Bildung des Substrates *S*-Hydroxymethylglutathion (GSCH<sub>2</sub>OH) erfolgt innerhalb des oxidativen C<sub>1</sub>-Stoffwechselwegs von *Paracoccus denitrificans* ausgehend von Glutathion (GSH) und Formaldehyd (H<sub>2</sub>CO) spontan und reversibel (siehe Kapitel A, Abb. 3).



**Abb. 19: *S*-Hydroxymethylglutathion-Bildung aus Formaldehyd und Glutathion (2-amino-*N*-[1-(carboxymethyl-carbomoyl)-2-mercapto-ethyl]-succinat).** Für die Analyse der EXSY-Daten, wie in Abb. 20 gezeigt, wurden die Protonen am C<sub>β</sub>-Atom beobachtet. Eine stereospezifische Zuordnung der Protonen H(β)<sub>1</sub> und H(β)<sub>2</sub> des Glutathions sowie H(β)<sub>1</sub>' und H(β)<sub>2</sub>' des *S*-Hydroxymethylglutathions ist bisher nicht literaturbekannt und für die Auswertung der Experimente nicht nötig. Die komplette Reaktion zeigt die relevanten Komponenten für die Berechnung der Raten zweiter Ordnung  $k_1$  und  $k_2$ ; die markierten Komponenten, die für die Berechnung der Raten pseudo-erster Ordnung aus  $k_1^*$  und  $k_2^*$ .

Unter Gleichgewichtsbedingungen wurde über EXSY analog zu Kapitel 1 die Geschwindigkeit der Reaktion aus Abbildung 19 bestimmt. In Zusammenarbeit mit Meike Goenrich und Julia Vorholt-Zambelli, MPI für Terrestrische Mikrobiologie in Marburg, wurde nach einer möglichen enzymatischen Aktivität in *P. denitrificans* gesucht, die diese Reaktion beschleunigt. Zur Detektion des Enzyms wurde zunächst ein gekoppelter Ansatz zusammen mit zuvor gereinigter NAD<sup>+</sup>- und Glutathion-abhängiger Formaldehyd-Dehydrogenase (GD-FALDH) aus *P. denitrificans* untersucht (siehe Abb. 3). Die

Enzymaktivität hätte so direkt aus den Differenzen in der GD-FALDH-Aktivität berechnet werden können. Der Versuch scheiterte jedoch an der zu geringen spezifischen Aktivität der gereinigten GD-FALDH, so daß eine Zunahme der Aktivität von GD-FALDH nicht gemessen werden konnte. Da es so nicht möglich war, einen Enzymtest aufzubauen, wurde zum Nachweis der im Zellextrakt vorhandenen Enzymaktivität und Reinigung von Glutathion-abhängigem Formaldehyd-aktivierenden-Enzym (Gfa) die Aktivität deshalb über NMR-Messungen bestimmt.

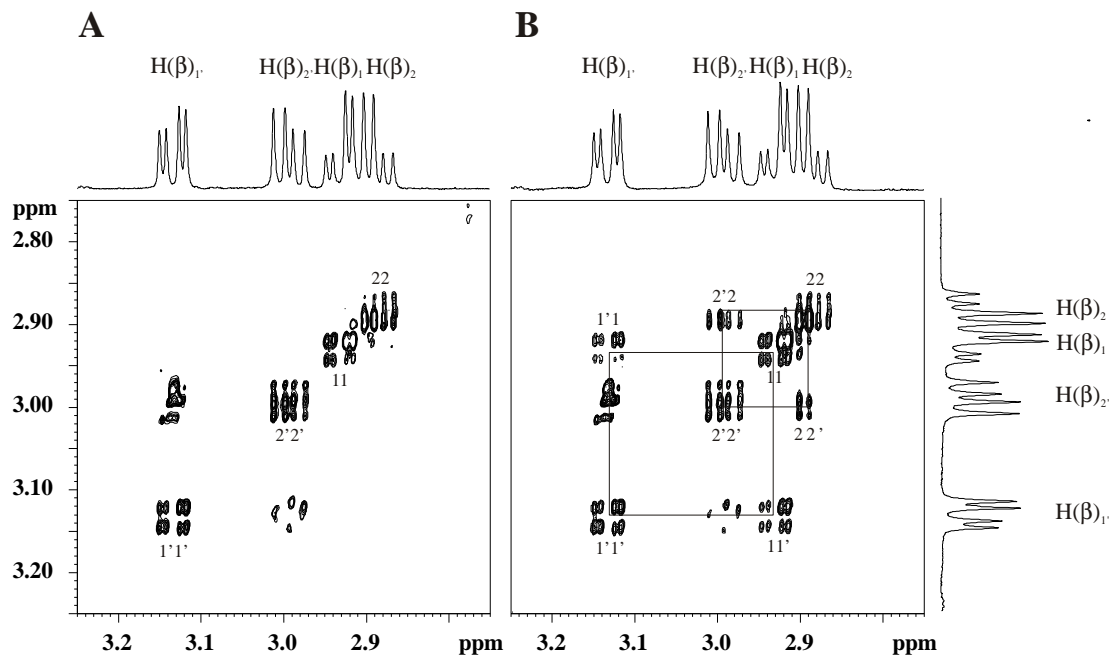
#### 4.2 Proben- und Meßbedingungen

Die Aufnahme der NMR-Spektren der Reaktion von Glutathion (GSH) mit Formaldehyd zu *S*-Hydroxymethylglutathion (GSCH<sub>2</sub>OH) im Gleichgewicht erfolgte aerob in einem Temperaturbereich von 20-60°C (siehe Abb. 19). Diese Bedingungen wurden gewählt, da es sich bei *Paracoccus denitrificans* um ein aerobes, mesophiles Bakterium handelt, dessen optimale Wachstumstemperatur bei 30°C liegt. Der optimale pH-Wert für das Wachstum liegt bei etwa 7,0. Der Großteil der Messungen wurde jedoch bei einem pH-Wert von 6,0 in 120 mM Kaliumphosphatpuffer anstelle von 7,0 durchgeführt, da oberhalb eines pH-Wertes von 7,0 die Probe nicht mehr stabil ist [72]. Durch Einsetzen variierender Mengen von Formaldehyd und Glutathion in die Reaktion wurde ein Verhältnis von GSH zu GSCH<sub>2</sub>OH von 1,1:1 bei 30°C eingestellt, was die Genauigkeit sowohl der Konzentrationsbestimmungen im Gleichgewicht über 1D-Protonen-NMR-Spektroskopie als auch der Geschwindigkeitskonstanten mittels EXSY erhöht. Das Verhältnis wurde über ein 2:1-Verhältnis an Glutathion gegenüber Formaldehyd (10,8 mM GSH; 5 mM H<sub>2</sub>CO) erreicht und in allen Messungen verwendet. Zellextrakte von *Paracoccus denitrificans* wurden dann auf eine Beschleunigung der spontanen *S*-Hydroxymethylglutathionbildung hin untersucht.

Die Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Meike Goenrich und Julia Vorholt-Zambelli, MPI für Terrestrische Mikrobiologie in Marburg, durchgeführt.

### 4.3 Methode und Auswertung

Zunächst wurde die Gleichgewichtsreaktion von Glutathion mit Formaldehyd zu *S*-Hydroxymethylglutathion (siehe Abb. 19) bezüglich der Temperaturabhängigkeit und der pH-Wert-Abhängigkeit untersucht (siehe [73]). Anschließend wurde Zellextrakt von *Paracoccus denitrificans* auf eine Beschleunigung der *S*-Hydroxymethylglutathionbildung hin überprüft. *P. denitrificans* wurde unter methylo-trophen Bedingungen kultiviert und der Zellextrakt dann in die NMR-Probenansätze mit einer Proteinmenge von 1,04 mg je Ansatz eingesetzt. Zellextrakt von methanolgezogenem *P. denitrificans* zeigt bei einem pH-Wert von 6,0 und 30°C eine drastische Beschleunigung der Glutathion-Formaldehyd-Kondensationsrate gegenüber der spontanen Rate (siehe Abb. 20).



**Abb. 20:** Ausschnitte der aliphatischen Region aus 1D-Protonen-NMR-Spektren und EXSY-Spektren der Gleichgewichtsreaktion von Formaldehyd mit Glutathion zu *S*-Hydroxymethylglutathion (A) in Abwesenheit und (B) in Anwesenheit von Zellextrakt aus *Paracoccus denitrificans*. Die Temperatur betrug 30°C und der pH-Wert lag bei 6,0. Oberhalb und seitlich der 2D-Spektren sind die 1D-Protonen-NMR-Spektren abgebildet. Die Signale der 1D-Protonen-NMR-Spektren H(β)<sub>1</sub> und H(β)<sub>2</sub> stammen von Protonen des GSH und die Signale H(β)<sub>1</sub>' und H(β)<sub>2</sub>' von GSCH<sub>2</sub>OH (siehe Abb. 19). Bei den Signalen der EXSY-Spektren 11 und 1'1' sowie 22 und 2'2' handelt es sich um Diagonalsignale von Protonen des GSH bzw. GSCH<sub>2</sub>OH (') und bei den Signalen im Spektrum (B) 1'1 und 11' sowie 2'2 und 22' um Kreuzsignale der sich ineinander umwandelnden GSH- und GSCH<sub>2</sub>OH-Substrate. Die Kreuzsignale sind nur in Anwesenheit von Zellextrakt aus *Paracoccus denitrificans* eindeutig meßbar, so daß die spontane Rate aus dem Signal zu Rausch Verhältnis abgeschätzt wurde.

Abb. 20 zeigt 1D-Protonen-NMR-Spektren und EXSY-Spektren der aliphatischen Region von Glutathion (GSH) und S-Hydroxymethylglutathion (GSCH<sub>2</sub>OH) im Gleichgewicht in Abwesenheit (A in Abb. 20) und in Anwesenheit (B in Abb. 20) von Zellextrakt aus *P. denitrificans*. Aus den 1D-Protonen-NMR-Spektren wurden die relativen Populationen von Glutathion und S-Hydroxymethylglutathion durch Integration der Signale H(β)<sub>1</sub> und H(β)<sub>2</sub> von Protonen des Glutathions und der Signale H(β)<sub>1</sub>' und H(β)<sub>2</sub>' von Protonen des S-Hydroxymethylglutathions bestimmt. Aus den 2D-Spektren wurden die Peakvolumina der Kreuz- und Diagonalsignale erhalten und analog zu Kapitel 1.3 zur Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten k<sub>1</sub>\* und k<sub>2</sub>\* verwendet (siehe Tab. 2).

**Tab. 2: Glutathion-Formaldehyd-Kondensationsrate in Zellextrakten von *P. denitrificans* aus unterschiedlichen Wachstumsbedingungen.**

Organismus	Wachstum auf <sup>a</sup>	10 <sup>-2</sup> k <sub>1</sub> * (s <sup>-1</sup> )	Aktivität im Ansatz (U)	Spezifische Aktivität (U/mg)	Spezifische GD-FALDH- Aktivität (U/mg)
Spontane Rate		2	5	-	-
<i>P. denitrificans</i>	Methanol <sup>b</sup>	20	41	35	1,1
	Methanol, ½ x Protein	11	23	35	1,1
	Methanol, denaturiert	3	6	-	-
	Succinat	8	16	11	<0,04

a = LB, Luria-Bertani-Medium; NB, Nutrient Broth

b = Zur Kontrolle wurde gereinigte GD-FALDH aus *P. denitrificans* gemessen, der auf Methanol gezogen wurde. Diese lieferte keine Beschleunigung der Kondensationsreaktion gegenüber der spontanen Rate.

Mit der eingesetzten Proteinmenge wurde eine knapp 10-fache Aktivitätszunahme im Ansatz bestimmt. Daraus errechnet sich nach Abzug der spontanen Kondensationsrate eine spezifische Aktivität von 35 U/mg; diese Aktivität kann von einem potentiellen Enzym stammen. Zur Kontrolle wurde eine Probe mit der Hälfte an Zellextrakt gemessen sowie mit Zellextrakt, der 5 min. bei 95°C denaturiert wurde. Der denaturierte Zellextrakt zeigte keine Beschleunigung. Die Probe mit der Hälfte an Zellextrakt zeigte die Hälfte der Beschleunigung gegenüber der Spontanrate (siehe Tab. 2).

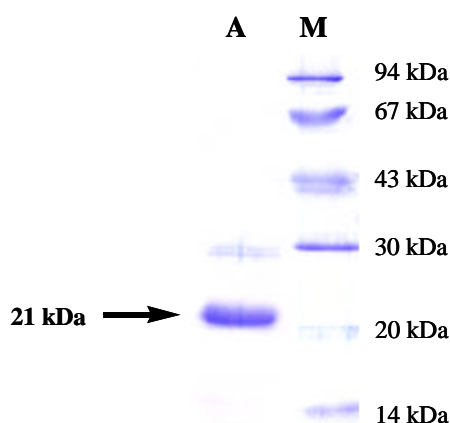
Für die Reinigung des Enzyms aus methanolgewachsenen *P. denitrificans*-Zellen wurden drei säulenchromatographische Schritte verwendet und die Aktivität von Gfa der einzelnen Fraktionen über EXSY bestimmt. Ausgehend von 20 g Feuchtzellen gelang es, das Enzym 8-fach mit einer Ausbeute von 23 % bis zu einer spezifischen Aktivität von 135 U/mg anzureichern (siehe Tab. 3).

**Tab. 3: Reinigung von Glutathion-abhängigem Formaldehyd-aktivierendem-Enzym (Gfa) aus Methanol-gewachsenen *P. denitrificans*-Zellen.** Die genaue Vorgehensweise der Reinigung ist in [73] beschrieben.

Reinigungsschritt	Protein (mg)	Gesamt-Aktivität (U)	Spezifische Aktivität (U/mg)	Reinigung (x-fach)	Ausbeute (%)
Zellextrakt	469	7 586	16	1	100
DEAE-Sephacel	106	6 279	59	4	83
Hydroxyapatit	53	2 608	49	3	34
Q-Sepharose <sup>a</sup>	13	1 753	135	8	23

<sup>a</sup> = Hier wurden 5 repräsentative der insgesamt 11 aktiven Fraktionen gemessen. Die fehlenden Werte wurden in Anlehnung an die gemessenen Fraktionen und des Elutionsprofils der Proteine abgeschätzt und daraus die in der Tabelle angegebenen Werte berechnet.

Die Analyse mittels SDS-PAGE (siehe Abb. 21) zeigte in der aktivsten Q-Sepharose-Fraktion eine deutliche Bande bei 21 kDa, die rechts und links dieser Fraktion mit Abnahme der Aktivität dünner wurde.



**Abb. 21: SDS-PAGE-Analyse des Reinigungsendproduktes von Glutathion-abhängigem Formaldehyd-aktivierendem-Enzym (Gfa) aus *P. denitrificans*.** Die Proben wurden nach Aufkochen in 0,1 % SDS in einem 12 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend mit Coomassie Brilliant Blue R250 angefärbt. Bahn A: Q-Sepharose-Fraktion (3 µg). Bahn M: Molekularmassenstandard. Eine Reinigung bis zur Homogenität des Enzyms wurde bis zum derzeitigen Zeitpunkt nicht erreicht. Die Reinheit reichte allerdings zur Bestimmung der N-terminalen Sequenz aus.

#### 4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Mittels EXSY gelang es, aus Zellextrakten von *Paracoccus denitrificans* ein Enzym zu reinigen, das die Reaktion von Glutathion (GSH) mit Formaldehyd zu S-Hydroxymethylglutathion (GSCH<sub>2</sub>OH) im Gleichgewicht beschleunigt. Dieses Enzym wurde Glutathion-abhängiges Formaldehyd-aktivierendes-Enzym (Gfa) genannt. Die N-terminale Sequenz des gereinigten 21 kDa-Proteins konnte über Edman-Abbau ermittelt werden:

#### MVDTSGVKIHPAVDNG

Die Sequenz ermöglichte eine eindeutige Identifizierung von „open reading frame 2“ (*orf2*, im weiteren Verlauf *gfa* für **G**lutathion-abhängige **F**ormaldehyd-**A**ktivierung) als kodierendem Gen. Gfa aus *P. denitrificans* zeigt auf Ebene der Aminosäuresequenz 61 % Sequenzidentität zu einem hypothetischen Protein Mlr0874 aus *Mesorhizobium loti* (siehe Abb. 22).

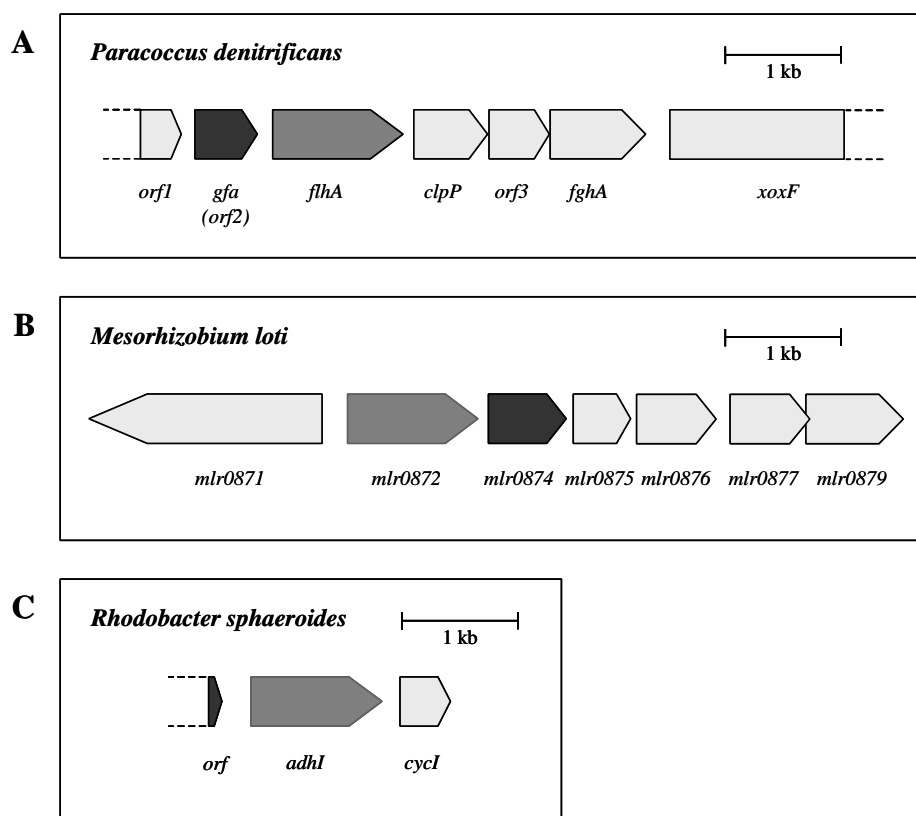
Gfa <i>P. denitr.</i>	M	V	D	T	S	G	V	K	I	H	P	A	V	D	N	G	I	K	P	A	Q	P	G	F	A	G	G	T	L	H	30
Mlr0874 <i>M. loti</i>	M	A	E	-	-	-	-	K	L	H	P	R	I	D	N	G	L	P	K	E	S	A	S	F	A	G	G	T	L	V	26
Gfa <i>P. denitr.</i>	C	K	C	S	T	N	P	V	R	V	A	V	R	A	Q	T	A	H	N	H	V	C	G	C	T	K	C	W	K	P	60
Mlr0874 <i>M. loti</i>	C	A	C	T	S	K	P	V	K	V	K	V	K	G	Q	I	A	H	N	H	A	C	G	C	T	K	C	W	K	P	56
Gfa <i>P. denitr.</i>	E	G	A	I	F	S	Q	V	A	V	V	G	R	D	A	L	E	V	L	E	G	A	E	K	L	E	I	V	N	A	90
Mlr0874 <i>M. loti</i>	E	G	A	I	F	S	V	V	A	V	A	G	T	G	D	V	T	V	T	E	N	G	D	K	L	K	V	V	D	A	86
Gfa <i>P. denitr.</i>	E	A	P	I	Q	R	H	R	C	R	D	C	G	V	H	M	Y	G	R	I	E	N	R	D	H	P	F	Y	G	L	120
Mlr0874 <i>M. loti</i>	S	A	L	I	Q	R	H	A	C	T	G	C	G	V	H	M	H	G	P	V	E	-	R	D	H	A	F	K	G	L	116
Gfa <i>P. denitr.</i>	D	F	V	H	T	E	L	S	D	E	D	G	W	S	A	P	E	F	A	A	F	V	S	S	I	I	E	S	G	V	150
Mlr0874 <i>M. loti</i>	T	F	I	H	P	E	R	F	V	E	D	G	W	S	P	P	G	F	T	A	F	V	S	S	I	I	E	S	G	V	146
Gfa <i>P. denitr.</i>	D	P	S	R	M	E	A	I	R	A	R	L	R	E	L	G	L	E	P	Y	D	A	L	S	P	P	L	M	D	A	180
Mlr0874 <i>M. loti</i>	D	P	K	R	M	D	G	I	R	A	Q	L	R	T	I	G	L	E	P	Y	D	C	L	N	P	G	L	M	D	Y	176
Gfa <i>P. denitr.</i>	I	A	T	H	I	A	K	R	S	G	A	L	A	A	194																
Mlr0874 <i>M. loti</i>	I	A	T	W	T	A	K	K	S	G	A	L	P	A	190																

Abb. 22: Gruppierung der Aminosäuresequenz von Gfa aus *P. denitrificans* und des hypothetischen Proteins Mlr0874 aus *Mesorhizobium loti*. Identische Aminosäuren wurden grau unterlegt.

Das *gfa* (*orf2*)-Gen aus *Paracoccus denitrificans* liegt - wie in Abb. 23; A dargestellt - in Leserichtung der Polymerase direkt stromaufwärts des *flh*-Gens, welches für NAD<sup>+</sup>- und



Glutathion-abhängige Formaldehyd-Dehydrogenase (GD-FALDH) kodiert. Auch in *M. loti* liegt das *mlr0874*-Gen, dessen abgeleitetes Protein Sequenzidentität zu Gfa aus *P. denitrificans* besitzt, unmittelbar neben dem *mlr0872*-Gen (*flhA*), dessen Genprodukt als hypothetische NAD<sup>+</sup>- und Glutathion-abhängige Formaldehyd-Dehydrogenase beschrieben wird (Abb. 23; B). In diesem Fall ist die Reihenfolge der Gene jedoch umgekehrt im Vergleich zu *P. denitrificans*. Ein Genomaufbau ähnlich dem von *P. denitrificans* zeigt sich dagegen in *Rhodobacter sphaeroides* (siehe Abb. 23; C).



**Abb. 23: (A), (B) und (C) Physikalische Karten eines chromosomalen DNA-Abschnitts aus (A) *P. denitrificans*, (B) *M. loti* und (C) *R. sphaeroides*.** Die offenen Leserahmen der Gene wurden maßstabsgetreu durch Blockpfeile zur Kennzeichnung ihrer Orientierung dargestellt. Gestrichelte Linien deuten hypothetische, bislang nicht sequenzierte Bereiche von Genen an. Proteine mit Sequenzidentität sind durch gleiche Farbgebung hervorgehoben. **(A) Genetische Organisation des *gfa* (*orf2*)-Bereichs im *P. denitrificans*-Genom.** *gfa* (*orf2*) kodiert für Glutathion-abhängiges Formaldehyd-aktivierendes-Enzym (Gfa); *flhA* für die NAD<sup>+</sup>- und Glutathion-abhängige Formaldehyd-Dehydrogenase (GD-FALDH). **(B) Genetische Organisation des *mlr0874*-Bereichs im *M. loti*-Genom.** *mlr0874* kodiert für ein hypothetisches Protein, welches eine Sequenzhomologie von 61 % zum GD-FAE aus *P. denitrificans* besitzt; *mlr0872* für eine putative NAD<sup>+</sup>- und Glutathion-abhängige Formaldehyd-Dehydrogenase. **(C) Genetische Organisation des *orf*-Bereichs im *R. sphaeroides*-Genom.** *orf* kodiert für ein hypothetisches Protein, dessen bisher bekanntes Aminosäuresequenzfragment eine 97 %ige Identität zum Gfa aus *P. denitrificans* besitzt; *adhI* für NAD<sup>+</sup>- und Glutathion-abhängige Formaldehyd-Dehydrogenase (GSH-FDH).

Das *adhI*-Gen wurde als NAD<sup>+</sup>- und Glutathion-abhängige Formaldehyd-Dehydrogenase (GSH-FDH) identifiziert, welche eine 89 %ige Aminosäuresequenzidentität und eine 95 %ige Aminosäuresequenzähnlichkeit zu *P. denitrificans* GD-FALDH besitzt [74]. Stromaufwärts des Gens *adhI* konnte das 3'-Ende eines offenen Leserahmens „orf“ identifiziert werden. Die abgeleitete Aminosäuresequenz dieses Teilstückes wies 34 von 35 identische Aminosäuren im Vergleich zu Gfa aus *P. denitrificans* auf. Die Anordnung der Gene im Genom dieser Bakterien spricht für eine funktionelle Einheit dieser Enzyme in ihrem Stoffwechsel. Weitere Homologien zu Gfa konnten in den Datenbanken nicht gefunden werden.

EXSY ermöglichte es analog zu Kapitel 1 die Rate der S-Hydroxymethylglutathionbildung aus Glutathion und Formaldehyd im Gleichgewicht zu bestimmen. Dadurch konnte ein neues Enzym, das Glutathion-abhängiges Formaldehyd-aktivierendes-Enzym (Gfa) genannt wurde, erstmals gereinigt und das kodierende Gen identifiziert werden.

## 5 Drei Ubichinonmoleküle sind für die Energiekonservierung im Cytochrom $bc_1$ Komplex der Atmungskette essentiell

Die Ergebnisse hierzu wurden im Journal of Biological Chemistry als „Accelerated Publication“ veröffentlicht. Die Publikation ist am Ende dieses Kapitels abgedruckt. Im folgenden werden die wichtigsten Punkte zusammengefaßt. Insbesondere auf die entwickelte Methode und die Interpretation der Meßergebnisse wird im Text genau eingegangen und die Bedeutung der durchgeführten Kontrollmessungen erklärt. An einer Stelle werden Daten aufgeführt, für die es in der Publikation keinen Platz mehr gab.

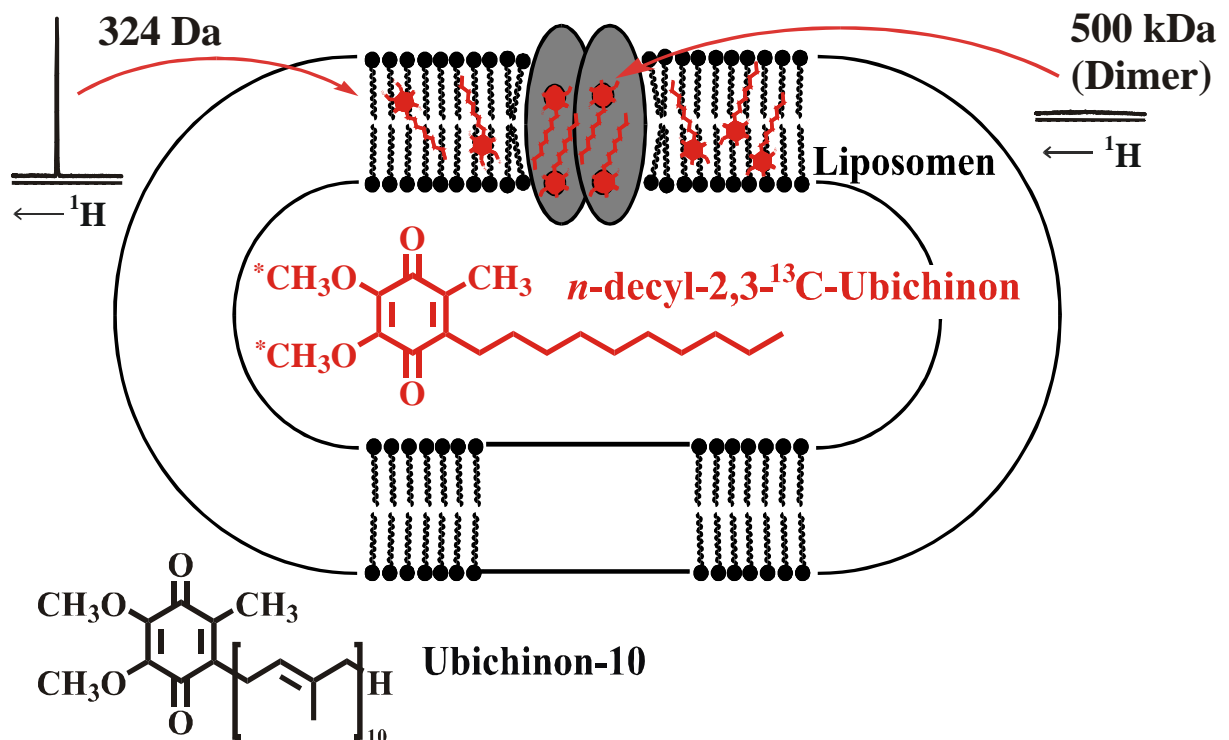
### 5.1 Problemstellung

Das Ubichinon/Ubihydrochinon Redoxpaar spielt eine entscheidende Rolle im Elektronentransfer der mitochondrialen Atmungskette (siehe Abb. 4). Bisher ist es nicht gelungen, die Bindungsstöchiometrie von Ubichinon am membranständigen Cytochrom  $bc_1$  Komplex aus *Bos bovis* zu bestimmen. Daher wurde eine NMR-spektroskopische Methode entwickelt, die es erlaubt durch die Messung und Auswertung von  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektren die Konzentration von beweglichem Ubichinon in einer Membran zu bestimmen und daraus die Bindungsstöchiometrie zu ermitteln.

### 5.2 Proben- und Meßbedingungen

Das Prinzip zur Bestimmung der Ubichinonbindungsstellen am Cytochrom  $bc_1$  Komplex beruht auf der Zugabe von kompetitiven Hemmstoffen, die spezifisch gebundenes Ubichinon quantitativ freisetzen. Die Menge an freigesetztem Ubichinon wurde dann durch die Integration von  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektren ermittelt. Im Rahmen von Festkörpermessungen bei Raumtemperatur ist es bisher nicht gelungen an den Cytochrom  $bc_1$  Komplex gebundenes Ubichinon direkt zu detektieren. In den vorgenommenen Untersuchungen wurde grundsätzlich mit Ubichinon und nicht mit reduziertem Ubihydrochinon gearbeitet. Gemäß des Q-Cyclus bindet zwar Ubichinon an das *N*-Zentrum, aber Ubihydrochinon an das *P*-Zentrum, um dort oxidiert zu werden (siehe Abb. 5). Es konnte allerdings nachgewiesen werden, daß sich die Affinität von Ubihydrochinon und Ubichinon für das *P*-Zentrum kaum unterscheidet [28]. Für die NMR-spektroskopischen Untersuchungen wurde anstelle des natürlichen Ubichinons (Ubichinon-

10) das synthetisch zugängliche Decyl-Ubichinon (*n*-decyl-2,3-<sup>13</sup>C-Ubichinon) verwendet, das an den Methoxygruppen <sup>13</sup>C-markiert war (siehe Abb. 24).



**Abb. 24: Schematischer Aufbau der Proteoliposomen und Strukturen von Ubichinonen.** *n*-decyl-2,3-<sup>13</sup>C-Ubichinon wurde für die NMR-Untersuchungen verwendet und bei Ubichinon-10 handelt es sich um das natürliche Substrat.

Durch die <sup>13</sup>C-Markierung kann man die Ubichinon-Signale aus dem Hintergrund der natürlichen <sup>13</sup>C-Isotopen des in den Proteoliposomen enthaltenen Kohlenstoffs herausfiltern, da nur die Protonen, die direkt an <sup>13</sup>C-Kerne gebunden sind, Signale liefern. Ein funktioneller Unterschied zwischen dem natürlichen Ubichinon-10 und *n*-decyl-2,3-<sup>13</sup>C-Ubichinon konnte nicht nachgewiesen werden. Im weiteren Verlauf der Beschreibung der durchgeführten NMR-Messungen steht die Bezeichnung Ubichinon immer für *n*-decyl-2,3-<sup>13</sup>C-Ubichinon.

Der aus Rinderherz-Mitochondrien isolierte Cytochrom  $bc_1$  Komplex wurde in Liposomen rekonstituiert, die zu 75% aus L- $\alpha$ -Phosphatidylcholin (PC), zu 20% aus L- $\alpha$ -Phosphatidylethanolamin (PE) und zu 5% aus Cardiolipin bestanden. Die Konzentrationen in den 50  $\mu$ l Probenansätzen waren 0,15-0,29 mM für den Cytochrom  $bc_1$  Komplex und 1,6-2,1 mM für das Ubichinon. Das molare Verhältnis des Cytochrom  $bc_1$ -Komplexes zu den Phospholipiden lag bei 1:1000-2500. Als Hemmstoffe für das *N*-Zentrum wurden

dabei Antimycin, für das *P*-Zentrum Myxothiazol bzw. Stigmatellin verwendet (siehe Abb. 25).

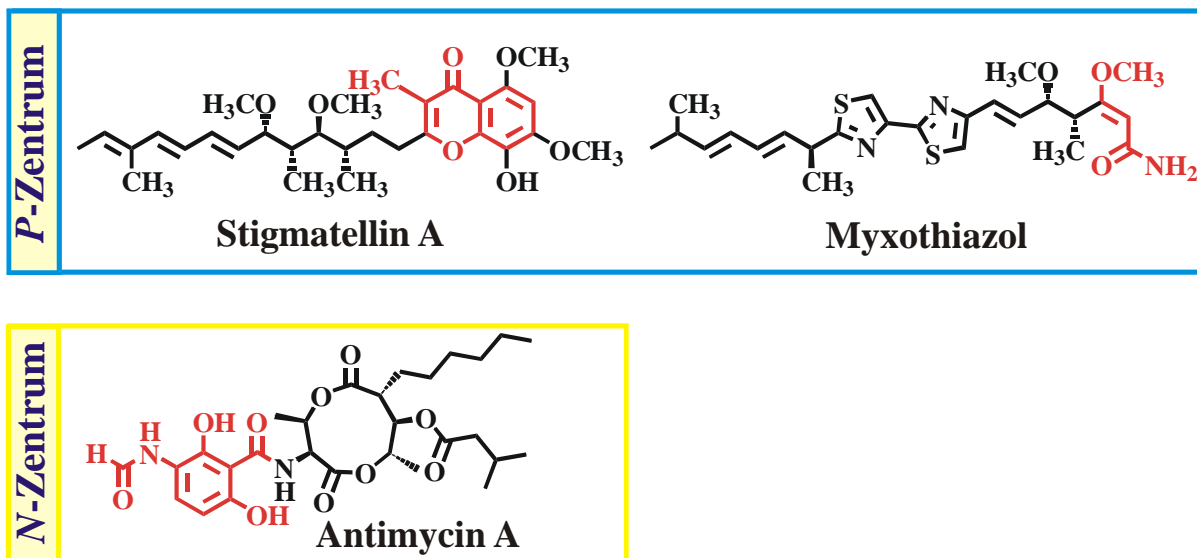


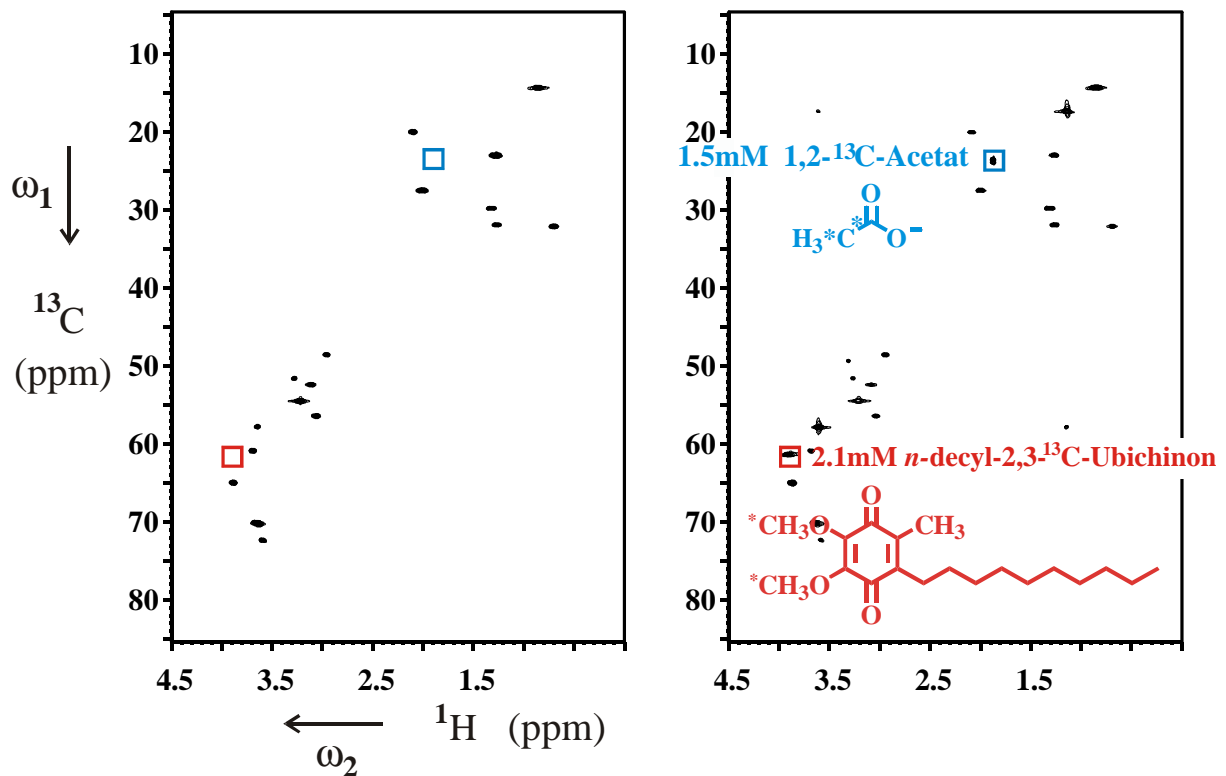
Abb. 25: Chemische Formeln der verwendeten spezifischen, Ubichinon-analogen Inhibitoren.

### 5.3 Methode und Auswertung

Um das in Kapitel 5.2 beschriebene Meßprinzip durchführen zu können, müssen die Signale von in Liposomen diffundierendem Ubichinon gut aufgelöst sein und eine geringe Linienbreite aufweisen. Mit Standard-Flüssig-NMR-Methoden ist dies nicht erreichbar. Dies liegt u.a. an der großen Linienbreite von 60 Hz des zugehörigen Signals der  $^{13}\text{C}$ -markierten Methoxygruppe, wodurch es auch zu einer Überlagerung mit anderen Signalen kommt und die Intensität stark abnimmt. Die große Linienbreite des Signals kommt im wesentlichen aufgrund von Inhomogenitäten der magnetischen Suszeptibilität zustande, die durch die teilweise makroskopische Struktur der Liposomen bedingt ist. Durch den Einsatz von HR-MAS-NMR-Methoden verringert sich die Linienbreite der  $^{13}\text{C}$ -markierten Methoxygruppen des Ubichinons bei 3,9 ppm auf 7 Hz, weil Suszeptibilitätseffekte beim magischen Winkel keine Rolle mehr spielen. Dabei wird die Probe im Zuge der HR-MAS-NMR-Methode mit 5000 Umdrehungen pro Sekunde gedreht. Die Achse des Rotors ist dabei im Winkel von  $54,7^\circ$ , dem „magic angle“, zum Magnetfeld angeordnet. Die Einstellung dieses Winkels und die Rotation bewirken, daß die Linienverbreiterung unterdrückt wird. Somit konnte ein nicht überlagertes Signal dem freien, ungebundenen Ubichinon zugeordnet werden. Unter diesen Bedingungen wurden sowohl 1D-Protonen-NMR-Spektren mit Wasservorsättigung als auch 2D- $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektren aufgenommen, mit dem Programm XWINNMR prozessiert und integriert.  $^{13}\text{C}$ -

markiertes Natriumacetat in einer Konzentration von 1,5 mM wurde den Proben als interner Standard zur Bestimmung der Ubichinonkonzentration zugesetzt, da dieses nur in der wässrigen Phase löslich ist und keine Wechselwirkungen mit den Proteoliposomen eingeht.

Abb. 26 zeigt ein Beispiel für ein solches  $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektrum mit  $^{13}\text{C}$ -markiertem Ubichinon und  $^{13}\text{C}$ -markiertem Natriumacetat.



**Abb. 26:**  $^1\text{H},^{13}\text{C}$ -HSQC-Spektrum einer Probe, die 0,2 mM Cytochrom  $bc_1$  Komplex, 1,5 mM Acetat und 2,1 mM Ubichinon enthält. Links: Proteoliposomenprobe ohne  $^{13}\text{C}$ -markiertes Acetat und Ubichinon; rechts: Proteoliposomenprobe mit  $^{13}\text{C}$ -markiertem Acetat und Ubichinon. Die Spektren wurden bei 5000 Umdrehungen pro Sekunde mit einem HR-MAS-Probenkopf aufgenommen. Rot markiert ist das Signal für frei bewegliches, ungebundenes Ubichinon. Blau markiert ist das Signal für freies Natriumacetat, welches hier als Referenz-Signal und Referenzwert zur Bestimmung der Konzentration des Ubichinons dient. Die restlichen Signale werden durch die natürliche  $^{13}\text{C}$ -Häufigkeit in den Proteoliposomen hervorgerufen.

Eine direkte Gegenüberstellung der für das Ubichinon und für das Acetat gemessenen Signalintensitäten konnte jedoch nicht vorgenommen werden, da die eingesetzte Meßmethodik eine Berücksichtigung der substanzspezifischen Spin-Gitter-Relaxationszeiten ( $T_1$ -Zeiten) des Acetats und des Ubichinons erforderlich machte.

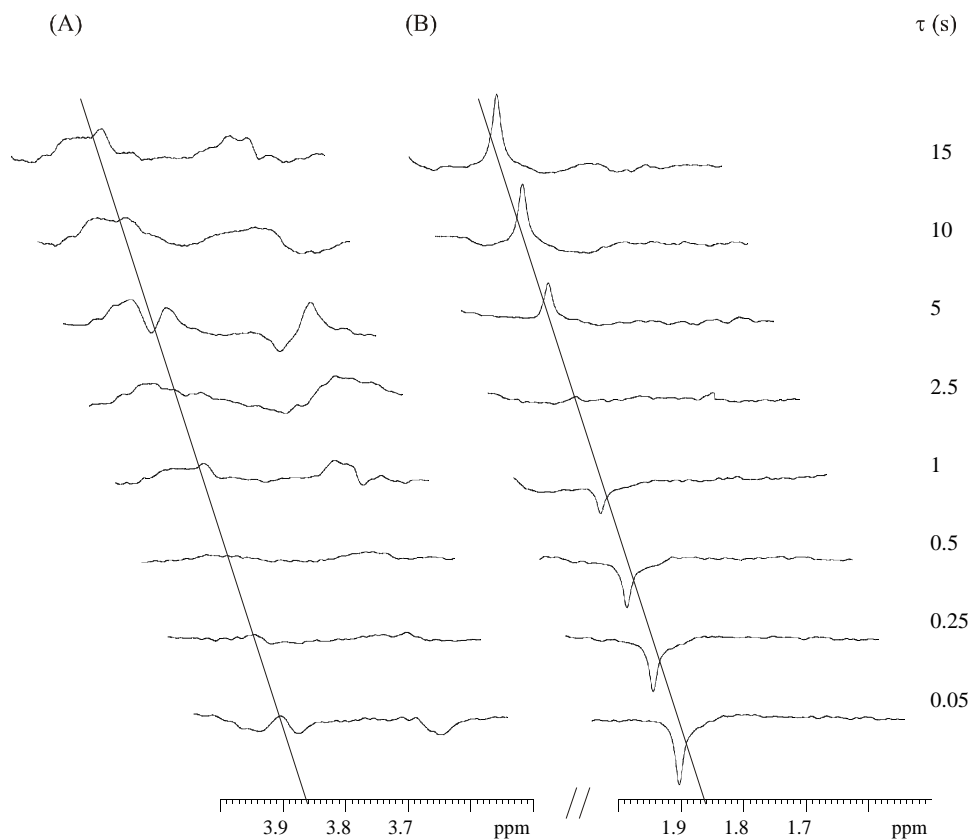
Normalerweise müssen für ein gutes  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum viele FIDs akkumuliert werden. Vor der Wiederholung einer Pulsfolge muß jedoch jedes Mal eine Wartezeit von

mindestens  $5 T_1$  eingelegt werden, wobei der  $T_1$ -Wert des am langsamsten relaxierenden  $^{13}\text{C}$ -Kernes berücksichtigt werden muß. Erst nach dieser Zeit ist das Spinsystem wieder im Gleichgewicht und man mißt absolute, vergleichbare Intensitäten. Mittels einer solchen Vorgehensweise könnten die für  $^{13}\text{C}$ -Acetat und  $^{13}\text{C}$ -Ubichinon gemessenen Signale unmittelbar ins Verhältnis zueinander gesetzt werden. Dies würde jedoch insgesamt sehr lange Meßzeiten von 48 h pro Spektrum erforderlich machen.

Es besteht allerdings die Möglichkeit, aus der bei einer festen Wartezeit  $t_z$  zwischen den einzelnen Pulsen bestimmten Signalintensität  $I_z$  die maximal meßbare Intensität  $I_0$  nach der Bloch'schen Formel zu ermitteln:

$$(1) \quad I_0 = \frac{1}{1 - e^{-\frac{t_z}{T_1}}} \cdot I_z = k \cdot I_z$$

Hierbei kann die Wartezeit  $\tau_z$  auch kürzer als die zugehörige  $T_1$ -Zeit sein, wodurch sich die Meßzeit erheblich verringert.



**Abb. 27:** 600 MHz- $^{13}\text{C}$ -Xfilter-NMR-Spektren von (A) Ubichinon und (B) Acetat aufgenommen nach der Inversion-Recovery-Methode mit  $t = 0,05; 0,25; 0,5; 1; 2,5; 5; 10$  und 15 s.

Für  $^{13}\text{C}$ -Acetat wurde eine  $T_1$ -Zeit von 3,41 s nach der Inversion-Recovery-Methode gefunden (siehe Abb. 27); für das Ubichinon war eine derartige Auswertung nicht möglich, weil das Signal viel schwächer als das Signal des Acetats ist. Daher erfolgte die Bestimmung folgendermaßen:

Die Intensität  $I_1$  bzw.  $I_2$  wurde für zwei verschiedene Wartezeiten  $t_1$  bzw.  $t_2$  bestimmt und dann aus dem Verhältnis der beiden Intensitäten zueinander auf die  $T_1$ -Zeit geschlossen. Durch Einsetzen der entsprechenden Werte in Gleichung (1) erhält man:

$$(2) \frac{1}{1 - e^{-\frac{t_1}{T_1}}} \cdot I_1 = \frac{1}{1 - e^{-\frac{t_2}{T_1}}} \cdot I_2 \quad .$$

Diese Gleichung wurde anschließend wie folgt umgestellt und vereinfacht:

$$\begin{aligned} \left(1 - e^{-\frac{t_2}{T_1}}\right) \cdot I_1 &= \left(1 - e^{-\frac{t_1}{T_1}}\right) \cdot I_2 \quad , \text{ substituieren: } a = e^{-\frac{t_2}{T_1}} \\ (1 - a) \cdot I_1 &= \left(1 - a^{\frac{t_1}{t_2}}\right) \cdot I_2 \quad , \\ (3) \quad a^{\frac{t_1}{t_2}} - \frac{I_1}{I_2} a + \left(\frac{I_1}{I_2} - 1\right) &= 0. \end{aligned}$$

Die Intensitäten  $I_1$  und  $I_2$  wurden sowohl für  $t_1 = 3,170$  s und  $t_2 = 1,585$  s als auch für  $t_1 = 4,755$  s und  $t_2 = 1,585$  s gemessen. Dadurch resultiert in Gleichung (3) entweder eine quadratische oder eine kubische Gleichung, die für  $a$  gelöst werden kann. Resubstitution führt anschließend zu der gesuchten  $T_1$ -Zeit. Für  $t_1 = 3,170$  s ergab sich für die  $T_1$ -Zeit des  $^{13}\text{C}$ -Ubichinons ein Wert von 0,75 s, nach Gleichung (1) folgt für experimentelle Wartezeiten von 1,585 s ein Umrechnungsfaktor  $k$  von 1,14. Die Messungen für  $t_1 = 4,755$  s bestätigten diese Werte. In gleicher Weise durchgeführte Messungen ermöglichten ebenso eine Überprüfung der für  $^{13}\text{C}$ -Acetat im Inversion-Recovery-Experiment gefundenen  $T_1$ -Zeit.

Die mit den entsprechenden Faktoren multiplizierten Signalintensitäten des  $^{13}\text{C}$ -Acetats und des freien  $^{13}\text{C}$ -Ubichinons konnten nun ins Verhältnis gesetzt werden, woraus unter Berücksichtigung der bekannten Konzentration des  $^{13}\text{C}$ -Acetats ( $c = 1,5$  mM) die Konzentration des freien  $^{13}\text{C}$ -Ubichinons ( $[\text{Ubichinon}]_{\text{frei}}$ ) berechnet werden konnte. Die zuvor berechneten Integrale waren umgerechnet in Konzentrationen mit einem absoluten



Fehler von 0,03 mM Acetat behaftet. Dieser resultiert aus der berechneten Standardabweichung des Verhältnisses der Integrale von Acetat zu Ubichinon. Diese betrug weniger als 5 % und wurde auf eine Acetat-Konzentration von 1,5 mM bezogen.

Nach Sättigung der Ubichinon-Bindungsstellen des Cytochrom  $bc_1$  Komplexes wurden zu den Proben Inhibitoren in verschiedener Konzentrationen und Kombination zugegeben. Das spezifisch gebundene Ubichinon wird dann quantitativ freigesetzt. Die Menge des freigesetzten Ubichinons kann anhand der Intensitätszunahme des Signals des ungebundenen Ubichinons quantifiziert werden.

Die Differenz zur zugegebenen Menge  $^{13}\text{C}$ -Ubichinon ( $[\text{Ubichinon}]_{\text{zugegeben}}$ ) gab Aufschluß darüber, wieviel  $^{13}\text{C}$ -Ubichinon (nach Inhibitorzugabe) noch an den Cytochrom  $bc_1$  Komplex gebunden wurde ( $[\text{Ubichinon}]_{\text{gebunden}}$ ). Der Quotient ( $[\text{Ubichinon}]_{\text{gebunden}}/[\text{bc}_1]$ ) aus der Konzentration des gebundenen  $^{13}\text{C}$ -Ubichinons und des Cytochrom  $bc_1$  Komplexes in den Liposomen erleichtert die Diskussion der Messergebnisse, da man durch diese Größe eine Aussage darüber machen kann, wieviel Ubichinonmoleküle an jeweils einen Cytochrom  $bc_1$  Komplex binden. Die Bestimmung der Konzentration des nach Zugabe spezifischer Inhibitoren des  $P$ -Zentrums freigesetzten Ubichinons führte somit durch Differenzbildung letztendlich zur Bestimmung der Anzahl der spezifisch an das  $P$ -Zentrum gebundenen Ubichinone.

In den anschließend vorgenommenen Meßreihen betrug die Wartezeit zwischen den einzelnen Pulsen  $t_1$  jeweils 1,585 s. Einsetzen dieses Wertes  $t_1$  und Berücksichtigung der ermittelten  $T_1$ -Zeit = 3,41 s ergaben aus Gleichung (1), daß die im Experiment für  $^{13}\text{C}$ -Acetat erhaltenen Signalintensitäten  $I_1$  mit dem Faktor 2,7 multipliziert werden mußten, um die maximal meßbare Intensität  $I_0$  zu ermitteln, welche mit dem entsprechenden Wert für  $^{13}\text{C}$ -Ubichinon ins Verhältnis gesetzt werden konnte. Für unterschiedliche Probenzusammensetzungen wiederholte Inversion-Recovery-Experimente bestätigten diese Daten. Ein Unterschied in den  $T_2$ -Zeiten für die Ubichinonsignale in Abhängigkeit der Inhibitoren wurde nicht gefunden.

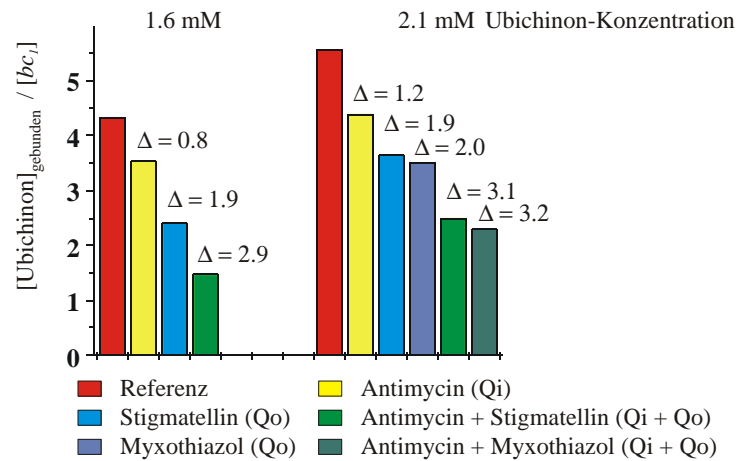
#### 5.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zunächst wurden Proben untersucht, die eine steigende Konzentration an zugegebenen Ubichinon und keine Inhibitoren enthielten. Bei einer Annahme von entweder zwei oder drei spezifischen Bindungsstellen für Ubichinon am Cytochrom  $bc_1$

Komplex (Berücksichtigung von *P*- und *N*-Zentrum!) wäre für die Konzentration an gebundenem Ubichinon eine Sättigung bei erhöhten Mengen an zugegebenen Ubichinon zu erwarten gewesen. Die erhaltenen Meßergebnisse erfüllten diese Erwartung jedoch nicht (siehe Abb. 28).

Es stellte sich heraus, daß mit zunehmender Konzentration  $[\text{Ubichinon}]_{\text{zugegeben}}$ , die Anzahl der pro Cytochrom  $bc_1$  Komplex gebundenen Ubichinonmoleküle steigt: Während bei einer Konzentration an zugegebenen Ubichinon von 1,2 mM die gemessene Anzahl der pro Cytochrom  $bc_1$  Komplex gebundenen Ubichinonmoleküle noch 3,46 beträgt, binden bei einer Konzentration  $[\text{Ubichinon}]_{\text{zugegeben}} = 2,1$  mM bereits 5,55 Ubichinonmoleküle pro Cytochrom  $bc_1$  Komplex. Dies könnte grundsätzlich daher kommen, daß der Cytochrom  $bc_1$  Komplex mehr als drei spezifische Bindungsstellen für Ubichinon aufweist, deren Absättigung bei einer vorgegebenen Ubichinonkonzentration von 2,1 mM noch nicht erreicht wurde. Die für den Q-Cyclus postulierten Mechanismen und die bekannten Strukturen des Komplexes machen eine solche Annahme jedoch unwahrscheinlich. Die durchgeführten Meßreihen zeigen vielmehr, daß der Cytochrom  $bc_1$  Komplex über die spezifischen Bindungsstellen hinaus unspezifische Bindungsstellen für Ubichinon besitzt. Diese Annahme wurde auch dadurch bestätigt, daß die unspezifische Bindung an rekonstituierter Cytochrome-*c*-Oxidase aus *Bos bovis* in der gleichen Größenordnung wie für den Cytochrom  $bc_1$  Komplex lag (nicht gezeigt). Dabei handelt es sich um einen membranständigen Komplex ähnlicher Größe, der jedoch keine spezifischen Ubichinonbindungsstellen aufweist [75]. Dies legt die Vermutung nahe, daß es eine schwache, unspezifische Bindung des Ubichinons an die membranständigen Domänen der Komplexe gibt. Die im Anschluß durchgeführten Messungen unter Inhibitorenzugabe mußten deshalb grundsätzlich für verschiedene Konzentrationen an zugegebenen Ubichinon wiederholt werden, um eine Absättigung der spezifischen Bindungsstellen sicherzustellen.

Die folgenden Untersuchungen zeigten zunächst, daß bei Zugabe verschiedener Inhibitoren (Antimycin, Stigmatellin und Myxothiazol) Ubichinonmoleküle aus dem Cytochrom  $bc_1$  Komplex freigesetzt wurden (siehe Zusatztablette der Veröffentlichung): Die gemessene Anzahl der pro Cytochrom  $bc_1$  Komplex gebundenen Ubichinonmoleküle war grundsätzlich kleiner als bei der jeweiligen Vergleichsprobe ohne Inhibitor (siehe Abb. 28).



**Abb. 28:** Anzahl der durchschnittlich pro Cytochrom  $bc_1$  Komplex gebundenen Ubichinone bei Ubichinonkonzentrationen von 1,6 mM und 2,1 mM in An- und Abwesenheit von Inhibitoren.

Antimycin ist ein Inhibitor aus der Gruppe der Ubichinon-Analoga, welche an das  $Q_i$ - bzw.  $N$ -Zentrum auf der Matrixseite der Mitochondrienmembran binden [76]. Für das  $N$ -Zentrum wurde bereits in der Kristallstruktur gezeigt, daß jeweils ein Ubichinonmolekül an dieses Reaktionszentrum bindet [77]. Es ist ebenfalls bekannt, daß Antimycin dieses Ubichinon spezifisch verdrängt. Die Zugabe von Antimycin in der durchgeführten Untersuchung müßte deshalb die Freisetzung von jeweils einem Ubichinonmolekül pro Cytochrom  $bc_1$  Komplex bewirken. Die Meßergebnisse bestätigten dies: In der Inhibitor-freien Probe mit  $[Ubichinon]_{zugegeben} = 2,1$  mM betrug die gemessene Anzahl der pro Cytochrom  $bc_1$  Komplex gebundenen Ubichinonmoleküle 5,55, in der Antimycin-haltigen Probe mit der gleichen Menge an vorgelegtem Ubichinon waren nur 4,39 Ubichinonmoleküle an jeweils einen Cytochrom  $bc_1$  Komplex gebunden. Die Differenz aus beiden Meßwerten betrug somit  $5,55 - 4,39 = 1,16$ . Unter Berücksichtigung des für diese Methode bestimmten Meßfehlers kann behauptet werden, daß durch Antimycin-Zugabe jeweils ein Ubichinonmolekül pro Cytochrom  $bc_1$  Komplex freigesetzt wurde.

Desweiteren wurde 0,33 mM Stigmatellin als Inhibitor zu wiederum 2,1 mM Ubichinon und 0,225 mM Cytochrom  $bc_1$  Komplex hinzugegeben. Mit dem ebenfalls in der Probe enthaltenen Ascorbat wird in erster Linie das Eisen-Schwefel-Protein und Cytochrom  $c_1$  reduziert. Darüber hinaus wird je nach pH-Wert und Konzentration auch Cytochrom  $b$  teilweise reduziert; Ubichinon wird hingegen nicht reduziert. Eine solche Maßnahme bot sich an, da Stigmatellin um mehrere (4-5) Größenordnungen besser an das reduzierte als an das oxidierte Eisen-Schwefel-Protein bindet [20]. Stigmatellin gehört zu den Chromon-Inhibitoren, welche - im Gegensatz zu Antimycin - an das  $Q_0$ - bzw.  $P$ -

Zentrum des Cytochrom  $bc_1$  Komplexes auf der Zwischenmembranseite der Mitochondrienmembran binden [76]. Hierdurch wird eine Bindung von Ubichinon an das *P*-Zentrum blockiert. Die Anzahl der durch einen solchen Inhibitor pro Cytochrom  $bc_1$  Komplex freigesetzten Ubichinonmoleküle sollte letztendlich die Frage beantworten, wieviel Ubihydrochinone im *P*-Zentrum des Q-Cyclus binden. Das postulierte „Chinhydron“-Modell setzt hierfür zwei Ubihydrochinon-Bindungsstellen voraus [18, 19]. Die ermittelten Meßdaten unterstützten eine solche Hypothese, da in der mit 0,33 mM Stigmatellin versetzten Probe nur noch 3,65 Ubichinonmoleküle an jeweils einen Cytochrom  $bc_1$  Komplex binden, in der Inhibitor-freien Probe mit gleicher Menge an vorgelegtem Ubichinon betrug die Anzahl der pro Cytochrom  $bc_1$  Komplex gebundenen Ubichinonmoleküle noch 5,55. Die Differenz aus beiden Daten  $5,55 - 3,65 = 1,9$  läßt - wiederum unter Berücksichtigung des für diese Methode bestimmten Fehlers - die Schlußfolgerung zu, daß jeweils zwei Ubichinone bzw. Ubihydrochinone an das *P*-Zentrum des Cytochrom  $bc_1$  Komplexes binden, wodurch die Vorstellung von einem „Chinhydron“-Modell bekräftigt werden konnte. Es mußte jedoch auch noch gezeigt werden, daß die Zugabe sowohl von Antimycin als auch von Stigmatellin zu einem additiven Effekt bezüglich der zuvor erhaltenen Meßdaten führt.

Als Ergebnis dieser Untersuchungen wurde die Freisetzung von insgesamt 3 Ubichinonmolekülen aus dem Cytochrom  $bc_1$  Komplex erwartet: Ein Molekül aus dem *N*-Zentrum (hervorgerufen durch Antimycin) und zwei Moleküle aus dem *P*-Zentrum (bewirkt durch Stigmatellin). Die gemessene Anzahl der pro Cytochrom  $bc_1$  Komplex gebundenen Ubichinonmoleküle betrug in dieser Probe 2,49. Die Differenz zu der Zahl der in der entsprechenden Inhibitor-freien Probe an jeweils einen Cytochrom  $bc_1$  Komplex gebundenen Ubichinonmoleküle (5,55) betrug 3,06, so daß die Hypothese von zwei Ubichinon-Bindungsstellen im *P*-Zentrum erneut bestätigt werden konnte.

Weiter oben wurde dargestellt, daß der Cytochrom  $bc_1$  Komplex eine noch nicht bekannte Anzahl unspezifischer Bindungsstellen für Ubichinon aufweist. Bis dahin konnte die Möglichkeit noch nicht ausgeschlossen werden, daß durch die hinzugefügten Inhibitoren unspezifisch gebundene Ubichinonmoleküle freigesetzt wurden. Es wurde deshalb eine Probenmischung mit gleicher Konzentration an Ubichinon, Cytochrom  $bc_1$  Komplex und Ascorbat, aber mit einer erhöhten Menge von Antimycin und Stigmatellin gemessen (0,66 mM im Vergleich zu 0,33 mM). Wurden in den zuvor gemessenen Proben nur spezifisch gebundene Ubichinonmoleküle durch Inhibitor-Zugabe verdrängt, hätte die Analyse dieser Probe zu einer Reproduktion der zuvor erhaltenen Ergebnisse führen

müssen. Werden durch Antimycin und Stigmatellin auch unspezifisch gebundene Ubichinone freigesetzt, hätte sich die Anzahl der in dieser Probe pro Cytochrom  $bc_1$  Komplex gebundenen Ubichinonmoleküle aufgrund der erhöhten Inhibitor-Konzentration weiter verringern müssen. In Anbetracht der doppelten Menge an Inhibitormolekülen hätten unter Annahme unspezifischer Verdrängung sämtliche Ubichinonmoleküle freigesetzt werden müssen. Das erhaltene Ergebnis von 2,63 pro Cytochrom  $bc_1$  Komplex gebundenen Ubichinonmolekülen weist jedoch nur auf die Freisetzung spezifisch gebundener Ubichinonmoleküle hin, da dieser Wert - unter Berücksichtigung des Fehlers der Methode – sehr gut mit dem Ergebnis von 2,49 übereinstimmt.

Mit Proben geringerer Ubichinonkonzentration ( $[\text{Ubichinon}]_{\text{zugegeben}} = 1,6 \text{ mM}$ ) wurden die beschriebenen Untersuchungen wiederholt. Mit Hilfe dieser Messungen sollte sichergestellt werden, daß sich in den Probenmischungen die spezifischen Ubichinon-Bindungsstellen des Cytochrom  $bc_1$  Komplexes bereits im Zustand der Sättigung befanden. Dies ist dann der Fall, wenn in der Probe geringerer Ubichinonkonzentration durch Inhibitor-Zugabe genau die gleiche Anzahl spezifisch gebundener Ubichinonmoleküle freigesetzt wird wie in derjenigen Probe mit der höheren Konzentration an hinzugegebenem Ubichinon. Wenn sich das System bei der vorgegebenen Ubichinonkonzentration noch nicht im Zustand der Sättigung befindet, wird durch die Zugabe von Inhibitoren eine geringere Zahl von Ubichinonmolekülen verdrängt, als normalerweise durch den Cytochrom  $bc_1$  Komplex gebunden wird. Die ermittelten Daten lassen dann keinen Rückschluß auf die Zahl der im Cytochrom  $bc_1$  Komplex vorhandenen spezifischen Bindungsstellen für Ubichinon zu. Durch die Proben konnten jedoch die zuvor erhaltenen Daten reproduziert werden. Die Annahme zweier spezifischer Ubichinon-Bindungsstellen im *P*-Zentrum konnte somit erneut bekräftigt werden.

Eine weitere Kontrolle enthielt neben 0,225 mM Cytochrom  $bc_1$  Komplex und 2,1 mM Ubichinon 0,33 mM Myxothiazol. Myxothiazol gehört zu der Gruppe der E- $\beta$ -Methoxyacrylate (MOA-Inhibitoren), welche wie das Stigmatellin an das *P*-Zentrum des Cytochrom  $bc_1$  Komplexes binden und die dort ablaufenden Elektronenübertragungsprozesse blockieren. Im Gegensatz zum Stigmatellin ist jedoch die Bindungsstelle der MOA-Inhibitoren nicht identisch mit derjenigen des Substratubichinons. Für die Strobilurine - eine Unterklasse kleinerer MOA-Inhibitoren - wurde gezeigt, daß sie in kinetischer Hinsicht nicht kompetitive Hemmstoffe sind [78]. Verschiedene Untersuchungen und die molekularen Strukturen zeigen jedoch, daß die Bindungsstelle für die MOA-Inhibitoren ebenfalls im *P*-Zentrum liegt. Für eine Probe mit

Myxothiazol wurde deshalb erwartet [27], daß auch hier - wie zuvor bei der entsprechenden Stigmatellin-haltigen Probe - die Inhibitor-Zugabe die Freisetzung zweier Ubichinonmoleküle pro Cytochrom  $bc_1$  Komplex bewirkt. Der erhaltene Wert von 3,24 gebundenen Ubichinonmolekülen je Cytochrom  $bc_1$  Komplex entsprach dieser Erwartung. Die Differenz zu dem Vergleichswert aus der Probe ohne Inhibitoren von 5,55 betrug 2,31.

Die entwickelte NMR-Methode ermöglichte es, die seit über 15 Jahren unter Biochemikern kontrovers diskutierte Frage zu beantworten, wieviele Ubichinone spezifisch an den Cytochrom  $bc_1$  Komplex binden. Die Methode bietet darüber hinaus generell die Möglichkeit, auch die Bindungsstöchiometrie für andere membranständige Proteine mit wasserunlöslichen Cofaktoren zu bestimmen.

**5.5 Veröffentlichung:**

**Three ubiquinone molecules essential for  
energy conservation by  
respiratory cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex**

## Three molecules of ubiquinone bind specifically to mitochondrial cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex

Stefan Bartoschek<sup>1</sup>, Malin Johansson<sup>2</sup>, Bernhard H. Geierstanger<sup>1</sup>, Jürgen G. Okun<sup>2</sup>, C. Roy D. Lancaster<sup>3</sup>, Eberhard Humpfer<sup>4</sup>, Linda Yu<sup>5</sup>, Chang-An Yu<sup>5\*</sup>, Christian Griesinger<sup>1\*</sup> and Ulrich Brandt<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt, Institut für Organische Chemie, Marie-Curie-Strasse 11, D-60439 Frankfurt am Main & Max Planck Institute for Biophysical Chemistry, Am Fassberg 11, D-37077 Göttingen, Germany

<sup>2</sup>Universitätsklinikum Frankfurt, Institut für Biochemie I, D-60590 Frankfurt am Main, Germany

<sup>3</sup>Max-Planck-Institut für Biophysik, Abteilung für Molekulare Membranbiologie, Heinrich-Hoffmann-Str. 7, D-60528 Frankfurt am Main, Germany

<sup>4</sup>Bruker Analytik GmbH, Silberstreifen 4, D-76287 Rheinstetten, Germany

<sup>5</sup>Oklahoma State University, Department of Biochemistry And Molecular Biology, 255 Noble Research Center, Stillwater, OK 74078, USA

\*Corresponding authors:

Ulrich Brandt; Tel.: +49 69/63016926; Fax: +49 69/63016970;

E-mail: brandt@zbc.klinik.uni-frankfurt.de

Christian Griesinger; Tel.: +49 69/79829130; Fax: +49 69/79829128

E-mail: cigr@org.chemie.uni-frankfurt.de

Chang-An Yu; Tel.: +1 (405) 744-6612; Fax: +1 (405) 744-7799

E-mail: cayuq@okstate.edu

**Running title:** Ubiquinone Binding Sites in Cytochrome *bc<sub>1</sub>* Complex



## Summary

Bifurcated electron flow to high-potential 'Rieske' iron-sulfur cluster and low-potential heme  $b_L$  is crucial for respiratory energy conservation by the cytochrome  $bc_1$  complex. The chemistry of ubiquinol oxidation has to ensure the thermodynamically unfavourable electron transfer to heme  $b_L$ . To resolve a central controversy about the number of ubiquinol molecules involved in this reaction, we used high-resolution magic-angle-spinning nuclear magnetic resonance experiments to show that two out of three n-decyl-ubiquinones bind at the ubiquinol oxidation center of the complex. This substantiates a proposed mechanism in which a charge-transfer between a ubiquinol/ ubiquinone pair explains the bifurcation of electron flow.

## Introduction

A central question in membrane biochemistry is how cofactors interact with membrane proteins. Here we introduce a general NMR based method to quantify the stoichiometry of binding of hydrophobic cofactors to membrane proteins to resolve a central controversy about the number of ubiquinone binding sites in mitochondrial cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex. The cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex plays a crucial role in oxidative phosphorylation, a universal process that converts most of the energy provided by foodstuffs into the general energy source adenosine 5'-triphosphate (ATP). Within this process, the cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex connects hydrophobic ubiquinol and water soluble cytochrome *c*, transferring electrons between these two freely diffusible intermediates and thereby linking the exergonic reaction to a vectorial proton translocation across the inner mitochondrial membrane. Molecular structures of the cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex from different sources (1-4) are fully consistent with the electron transfer scheme of the proton-motive ubiquinone cycle proposed earlier (5-7). The reaction most critical for energy conservation is an obligatory bifurcation of the electron path linked to the two-electron oxidation of ubiquinol (Fig. 1). Molecular structures indicate that this unique reaction occurs in a rather spacious ( $Q_O$  or  $Q_P$ ) pocket formed mostly by transmembrane cytochrome *b* and the tip of the mobile hydrophilic domain of the 'Rieske' iron-sulfur protein (1-4). As predicted by enzymological studies (8), methoxyacrylate-type inhibitors like myxothiazol and the chromone-type inhibitor stigmatellin were found to bind with very high affinity to different but overlapping sites within this pocket (9). In crystal structures, bound ubiquinone could only be seen in the ubiquinone reduction ( $Q_i$  or  $Q_N$ ) center facing the opposite side of the inner mitochondrial membrane (2;4). Presumably because of very weak binding of the substrate, no corresponding electron density could be identified in the ubiquinol oxidation pocket. It is still a controversial issue whether ubiquinol oxidation in the cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex involves just a single quinone that may have to move to transfer the second electron (6;10) or whether two quinone molecules occupy this binding pocket simultaneously (11) and facilitate bifurcated electron flow (12) (Fig. 1B). Double occupancy of the ubiquinol oxidation pocket was proposed by Ding et al. (11) based on specific line shape changes in the EPR spectrum of the reduced 'Rieske' iron-sulfur cluster of bacterial cytochrome *bc<sub>1</sub>*

complex. However, Crofts and colleagues proposed that the different line shapes may also reflect different states of the complex or different positions of the ubiquinone headgroup (10). Resolving this issue will be a prerequisite to understand the chemistry of this unique reaction.

## **Experimental procedures**

### *Synthesis of $^{13}\text{C}$ -labelled ubiquinone*

$^{13}\text{C}$ -ubiquinone was synthesized anaerobically according to the method described for the synthesis of ethoxy-ubiquinone derivatives (13). The reaction was carried out in a Thunberg tube with a two-arm stopper. 1.5 ml of hexane solution containing 100  $\mu\text{l}$  of  $^{13}\text{C}$ -methanol and 1 mg sodium methoxide was placed in the bottom of the tube. 10 mg of  $\text{Q}_0\text{C}_{10}$  (2,3-dimethoxy-5-methyl-6-n-decyl-1,4-benzoquinone) in 0.5 ml of hexane was placed in one arm of the stopper. 20  $\mu\text{l}$  of 10 N acetic acid was placed in the other arm of the stopper. The assembly was then subjected three times to evacuation and argon flushing. The  $\text{Q}_0\text{C}_{10}$  solution was then carefully tipped into  $^{13}\text{C}$ -methanol/methoxide solution. This mixture was incubated at room temperature for 2 hours in the dark with constant shaking. At the end of incubation the mixture was acidified by tipping in the acidic acid. The acidified mixture was concentrated under vacuum, redissolved in 0.3 ml of hexane and subjected to thin-layer chromatography (TLC) separation. The TLC plate was developed with a mixture of hexane:ether (3.5:1.0). The yield of the synthesis was 75%. The pattern of  $^{13}\text{C}$ -labeling was analyzed by mass spectroscopy. 22.6% of the ubiquinone molecules were found to carry two, 57.9% one, and 19.5% no  $^{13}\text{C}$ -methoxy group, corresponding to an average of 1.0  $^{13}\text{C}$ -atom per molecule.

### *Preparation of cytochrome $bc_1$ complex*

Cytochrome  $bc_1$  complex proteoliposomes were prepared by the cholate dialysis method essentially as described in (15). 1 g of a mixture of 75% phosphatidylcholine (99% Sigma Type III-E), 20% phosphatidylethanolamine (98% Sigma Type IV-S) and 5% cardiolipin (>80% bovine heart) was dissolved in 26 ml of 3% sodium-cholate, 1% octyl-glucoside, 100 mM KCl, 2 mM EDTA, 2 mM  $\text{NaN}_3$ , 20 mM  $\text{K}^+$ /Mops, pH 7.2 by sonication. 40-50 ml of a 20  $\mu\text{M}$  solution of cytochrome  $bc_1$  complex in 10% glycerol was added to the dissolved lipids. After stirring for 15 minutes on ice, the mixture was placed into a

dialysis tube and dialyzed overnight against a 100-fold volume of 100 mM KCl, 2 mM EDTA, 2 mM NaN<sub>3</sub>, 20 mM K<sup>+</sup>/Mops, pH 7.2. The dialysis buffer was changed once after 4 h. The proteoliposomes were sedimented by centrifugation for 5-6 h at 50000 x g<sub>av</sub>; the red pellet was resuspended in 50 ml dialysis buffer made with D<sub>2</sub>O, and the liposomes were sedimented again by overnight centrifugation at 50000 x g<sub>av</sub>. The concentration of cytochrome *bc*<sub>1</sub> complex was determined spectroscopically using  $\epsilon_{562-575} = 28.5 \text{ cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$  for the sum of two heme *b* groups per monomer of cytochrome *bc*<sub>1</sub> complex.

#### *Experimental set-up for HR-MAS-measurements*

As a novel approach to directly measure the binding of an extremely hydrophobic, but weakly bound ligand to a membrane protein complex, we have used high-resolution magic-angle-spinning nuclear magnetic resonance (HR-MAS NMR) spectroscopy of the liquid heterogenous system composed of water, liposomes containing cytochrome *bc*<sub>1</sub> complex and ubiquinone to determine the binding stoichiometry of <sup>13</sup>C-6-n-decyl-ubiquinone to membrane bound cytochrome *bc*<sub>1</sub> complex. We used a mixture of unlabeled and labeled 6-n-decyl-ubiquinone (<sup>13</sup>C-Q<sub>0</sub>C<sub>10</sub>, Fig. 2) carrying one <sup>13</sup>C-methoxy group at C-2 or C-3 or two <sup>13</sup>C-methoxy groups at C-2 and C-3 of the quinone ring (13). Since the ubiquinone diffused freely in the phospholipid bilayer that was not immobilized e.g. by freezing or orientation between glass plates as used in solid state NMR investigations, the labeled methyl groups not only had identical <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C chemical shifts but also gave rise to sharp resonances (proton linewidth of 7 Hz) under HR-MAS conditions (Fig. 2). Solid state MAS on frozen liposomes was not chosen for this investigation since double labelled ubiquinone would have been necessary for the suppression of the protein background and the experiments would have suffered from 10-times lower sensitivity. In the HR-MAS measurements, the enzyme bound ubiquinones did not contribute to the NMR signal, because immobilization by the large integral membrane protein complex caused the signal to broaden beyond detection since cytochrome *bc*<sub>1</sub> bound ubiquinones assume the correlation time of the membrane protein in the liposome which is of the order of  $\mu\text{s}$ . Thus, by displacing the cytochrome *bc*<sub>1</sub> complex bound ubiquinones with specific inhibitors, the number of bound ubiquinones can be inferred from the increase of the NMR signal.

Cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex isolated from bovine heart mitochondria (14) was reconstituted into unilamellar proteoliposomes at a molar ratio of 3000-4000 lipids per cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex dimer (15). Signals were calibrated using <sup>13</sup>C-acetate as an internal standard (cf. Fig. 2) that remains in the water phase and neither interacts with the lipid membrane nor with the cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex. Calculated concentrations took into account corrections for differences in the NMR T<sub>1</sub> relaxation times of the nuclei giving rise to the signals from ubiquinone and acetate (see Fig. 2). Controls using liposomes without protein (not shown) confirmed that it was possible to calculate the concentration of the mobile, unbound species from the integral of the <sup>13</sup>C-Q<sub>0</sub>C<sub>10</sub> signal in a two-dimensional HR-MAS heteronuclear single-quantum correlation (HSQC) experiment (16-22). To assess unspecific binding, we measured immobilization of ubiquinone by reconstituted bovine heart cytochrome *c* oxidase (23), a membrane bound complex of similar size but not containing a ubiquinone binding site. Unspecific binding was significant in the millimolar range and increased with the concentration of ubiquinone added to the sample. However, the extent of unspecific binding was very similar for cytochrome *c* oxidase and cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex (with the specific sites blocked, see below) suggesting that it was largely due to weak association of ubiquinone molecules with the membrane domain of the complexes.

## Results and Discussion

To determine the number of specific ubiquinone binding sites of cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex we used high affinity inhibitors (24) with precisely known binding sites determined by X-ray crystallography (9) as well defined competitors. Counting the number of ubiquinone molecules per cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex displaced by these highly specific inhibitors in the presence of saturating concentrations of ubiquinone, avoided interference by non-specific immobilization of ubiquinone by the cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex. Unspecific binding was always observed at the high concentrations of ubiquinone necessary to saturate the rather weak ubiquinone binding sites of the cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex under conditions of the NMR-experiment and made direct quantitative binding studies impossible (not shown).

For the ubiquinone reduction site, X-ray structures show that a single ubiquinone shares a common binding pocket with the inhibitor antimycin (2;4). Competition was used to validate our the approach: We

added  $^{13}\text{C}\text{-Q}_0\text{C}_{10}$  (1.2 – 3.6 mM) to cytochrome  $bc_1$  complex (0.15 – 0.29 mM) in proteoliposomes; antimycin (0.3 - 1.5 mM) displaced  $1.04 \pm 0.15$  moles of ubiquinone from each mole of cytochrome  $bc_1$  complex as expected from the molecular structure (Fig. 3). It should be stressed that this ratio was calculated using independently determined concentrations in the sample for the cytochrome  $bc_1$  complex via UV/VIS spectroscopy and for ubiquinone via referencing of the NMR integral to the NMR integral of acetate. Stigmatellin, a chromone-type inhibitor of the ubiquinol oxidation site, was found to displace  $1.87 \pm 0.07$  mole ubiquinone per mole cytochrome  $bc_1$  complex. If both, antimycin and stigmatellin were added to the cytochrome  $bc_1$  complex proteoliposomes  $2.94 \pm 0.11$  mol/mol were released. Stigmatellin is known to bind with much higher affinity to the ubiquinol oxidation pocket when the 'Rieske' iron-sulfur protein is reduced (24). However, reducing this redox-center by sodium-ascorbate prior to the competition experiment had no effect on the displacement stoichiometries. In the presence of the E- $\beta$ -methoxyacrylate inhibitor myxothiazol, a somewhat higher displacement ratio of  $2.28 \pm 0.16$  mol/mol was measured, but antimycin plus myxothiazol again displaced only  $3.07 \pm 0.20$  mol/mol. A possible explanation for the slight difference between the stoichiometries with stigmatellin and myxothiazol alone is that in contrast to stigmatellin, myxothiazol may have a weak affinity for the ubiquinone reduction site and could therefore partially displace ubiquinone in competition with antimycin. This seems feasible as other E- $\beta$ -methoxyacrylate inhibitors have shown to be inhibitors of the plastoquinone reduction site of plastidial cytochrome  $b_6f$  complex (25). None of the found stoichiometries was affected upon variation of the ubiquinone concentrations from 1.6 up to 3.6 mM or upon variation of the inhibitor concentrations from 0.33 up to 1.5 mM (see Fig. 3 for details). When less than 1.6 mM of ubiquinone was present, lower stoichiometries were observed for stigmatellin and myxothiazol, but not for antimycin (not shown) indicating incomplete saturation of the ubiquinol oxidation ( $\text{Q}_0$  or  $\text{Q}_p$ ) site and somewhat tighter binding of ubiquinone to its reduction ( $\text{Q}_i$  or  $\text{Q}_N$ ) center. This is in agreement with ubiquinone occupancy in molecular structures (2) and seems characteristic for mitochondrial cytochrome  $bc_1$  complex. It should be noted however that in the bacterial enzyme  $\text{Q}_{ow}$  (cf. Fig. 1) was reported to have the highest affinity (11).

Our results clearly indicate that a total of three ubiquinones binds specifically to mitochondrial cytochrome  $bc_1$  complex: One binds at the ubiquinone reduction center and is displaced by antimycin, two bind at the ubiquinol oxidation center and are displaced by stigmatellin and myxothiazol. To test whether

this finding is in accordance with structural data obtained by X-ray crystallography, we modeled two ubiquinone molecules carrying a long isoprenoid side chain that for technical reasons could not be used in the experiments into the ubiquinol oxidation pocket of the cytochrome  $bc_1$  complex (Fig. 4). Two ubiquinone molecules could be accommodated by changes of the order of 1.5 Å in the atomic positions of a few neighboring amino acid residues. Movements on this scale are only slightly larger than those that have been observed experimentally for the removal of ubiquinone from the reaction center from *Rhodospseudomonas viridis* (26). Figure 4 shows one set of possible conformations of the two quinones in the ubiquinol oxidation site; other conformations are possible.

Our equilibrium binding approach, using high concentrations of ubiquinone and cytochrome  $bc_1$  complex, inherently provides no information on the functional meaning of the binding of two ubiquinone molecules at the ubiquinol oxidation center. However, our finding is in perfect agreement with the “double occupancy  $Q_o$  site model” by Ding et al. suggesting a functional role for two ubiquinones (11;27). In this complementary study, specific line shape changes in the EPR spectrum of the reduced ‘Rieske’ iron-sulfur cluster were interpreted as reflecting the presence of two functionally interacting ubiquinone species in the ubiquinol oxidation pocket of bacterial cytochrome  $bc_1$  complex. However, the indirect way in which ubiquinone binding was monitored in this approach allowed alternative interpretations of the data. Crofts and colleagues (10) proposed that the different line shapes may also reflect different states of the complex or different positions of the ubiquinone headgroup. However, our compelling result that two ubiquinone molecules bind to the ubiquinol oxidation pocket and are specifically displaced by inhibitors of this site corroborates the interpretation of Ding and colleagues. Together, both approaches provide strong support for the functional implications that have been based on the “double occupancy model” (11;28). In particular, charge transfer between ubiquinone and ubiquinol molecules - as implemented in the ‘proton-gated charge-transfer’ mechanism (28) – appears as a chemically attractive paradigm for the role of a ubiquinone pair in bifurcated electron flow at the ubiquinol oxidation center of the cytochrome  $bc_1$  complex.

The HR-MAS approach presented may be widely employed to study binding of hydrophobic cofactors to membrane proteins. It should be useful for the analysis of ubiquinone binding to other respiratory chain complexes such as complex I and ubiquinol oxidase, for which specific inhibitors are

available but the binding stoichiometries are uncertain. The method may develop into a general procedure for analyzing the binding of hydrophobic ligands to membrane bound proteins. If tighter binding reduces the problem of unspecific binding, also quantitative binding studies with no need to use inhibitors will be possible.

### **Acknowledgments**

We thank Franz Streb for skilful technical assistance. Supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft SFB 472 and Graduiertenkolleg 145/12, NIH Grant GM30721, the Max-Planck Society, the Bundesministerium für Bildung und Forschung, and the Fonds der Chemischen Industrie. All measurements were done at the Large Scale Facility for Biomolecular NMR, Frankfurt and Bruker, Karlsruhe, Germany.

### **References**

1. Zhang, Z., Huang, L., Shulmeister, V. M., Chi, Y.-I., Kim, K. K., Hung, L.-W., Crofts, A. R., Berry, E. A., and Kim, S.-H. (1998) *Nature* **392**, 677-684
2. Xia, D., Yu, C.-A., Kim, H., Xia, J. Z., Kachurin, A. M., Zhang, L., Yu, L., and Deisenhofer, J. (1997) *Science* **277**, 60-66
3. Iwata, S., Lee, J. W., Okada, K., Lee, J. K., Iwata, M., Rasmussen, B., Link, T. A., Ramaswamy, S., and Jap, B. K. (1998) *Science* **281**, 64-71
4. Hunte, C., Koepke, J., Lange, C., and Michel, H. (2000) *Structure* **8**, 669-684
5. Mitchell, P. (1975) *FEBS Lett.* **59**, 137-139
6. Berry, E. A., Guergova-Kuras, M., Huang, L. S., and Crofts, A. R. (2000) *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 1005-1075



7. Brandt, U. and Trumpower, B. L. (1994) *CRC Crit.Rev.Biochem.* **29**, 165-197
8. Brandt, U., Haase, U., Schägger, H., and von Jagow, G. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 19958-19964
9. Kim, H., Xia, D., Yu, C. A., Xia, J. Z., Kachurin, A. M., Zhang, L., Yu, L., and Deisenhofer, J. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 8026-8033
10. Crofts, A. R., Guergova-Kuras, M., Kuras, R., Ugulava, N. B., Li, J., and Hong, S. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* **1459**, 456-466
11. Ding, H., Moser, C. C., Robertson, D. E., Tokito, M. K., Daldal, F., and Dutton, P. L. (1995) *Biochem.* **34**, 15979-15996
12. Brandt, U. (1996) *FEBS Lett.* **387**, 1-6
13. He, D.-Y., Gu, L. Q., Yu, L., and Yu, C.-A. (1994) *Biochem.* **33**, 880-884
14. Schägger, H., Link, T. A., Engel, W. D., and von Jagow, G. (1986) *Methods Enzymol.* **126**, 224-237
15. Brandt, U., Schägger, H., and von Jagow, G. (1988) *Eur. J. Biochem.* **173**, 499-506
16. Stöver, H. D. H. and Fréchet, J. M. J. (1989) *Macromolecules* **22**, 1574-1576
17. Vander Hart, D. L., Earl, W. L., and Garroway, A. N. (1981) *J. Magn. Reson.* **44**, 361-401
18. Garroway, A. N. (1982) *J. Magn. Reson.* **49**, 168-171
19. Palmer III, A. G., Cavanagh, J., Wright, P. E., and Rance, M. (1991) *J. Magn. Res.* **93**, 151-170
20. Kay, L. E., Keifer, P., and Saarinen, T. (1992) *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 10663-10665
21. Schleucher, J., Sattler, M., and Griesinger, C. (1993) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **32**, 1489-1491
22. Lindblom, G. (1996) *Curr. Opin. Coll. Interf. Sci.* **1**, 287-295
23. Brandt, U., Schägger, H., and von Jagow, G. (1989) *Eur. J. Biochem.* **182**, 705-711

24. von Jagow, G. and Link, T. A. (1986) *Methods Enzymol.* **126**, 253-271
25. Rich, P. R., Madgwick, S. A., Brown, M. S., von Jagow, G., and Brandt, U. (1992) *Photosynth.Res.* **34**, 465-477
26. Lancaster, C. R. D. and Michel, H. (1997) *Structure* **5**, 1339-1359
27. Ding, H., Robertson, D. E., Daldal, F., and Dutton, P. L. (1992) *Biochem.* **31**, 3144-3158
28. Brandt, U. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* **1275**, 41-46
29. Vold, R. I., Waugh, J. S., Klein, M. P., and Phelps, D. E. (1968) *J. Chem. Phys.* **48**, 3831-3832
30. Kraulis, P. J. (1991) *J. Appl. Cryst.* **24**, 946-950
31. Esnouf, R. M. (1997) *Journal of Molecular Graphics & Modelling* **15**, 132-134
32. Crofts, A. R., Hong, S. J., Ugulava, N., Barquera, B., Gennis, R., Guergova-Kuras, M., and Berry, E. A. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 10021-10026
33. Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T., and Warren, G. L. (1998) *Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr.* **54**, 905-921

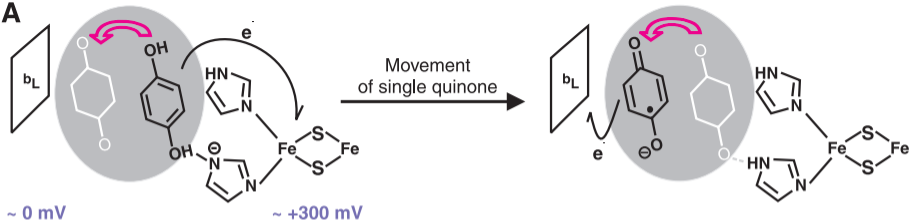
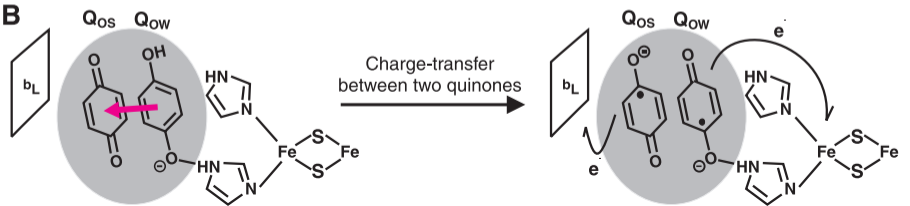
## Figure Legends

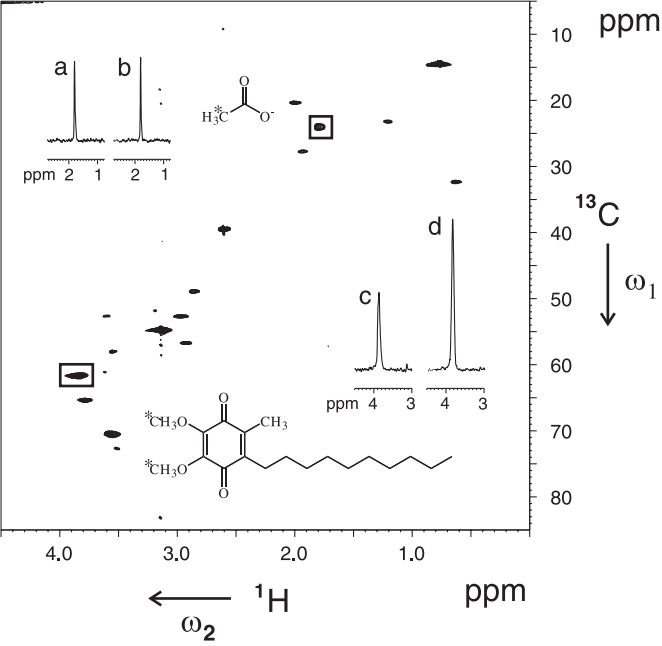
**Fig. 1: Involvement of one or two ubiquinones in bifurcated electron flow at the ubiquinol oxidation site of the cytochrome  $bc_1$  complex.** The mechanism of ubiquinol oxidation has to ensure the divergent reduction of the high potential 'Riske' iron-sulfur cluster ( $Fe_2S_2$ ) and the low potential heme  $b_L$ . Curved black arrows indicate electron transfer. **(A)** Single quinone model, involving one ubiquinol molecule and a mobile semiquinone intermediate (10) with the unoccupied alternate binding site highlighted in white and a curved red arrow indicating the direction of the movement from the Riske cluster towards heme  $b_L$ ; **(B)** Two quinone model involving a tightly bound ubiquinone ( $Q_{os}$ ) and a weakly bound ubiquinol ( $Q_{ow}$ ) that cooperate by charge-transfer (red arrow) during catalysis (11;12).

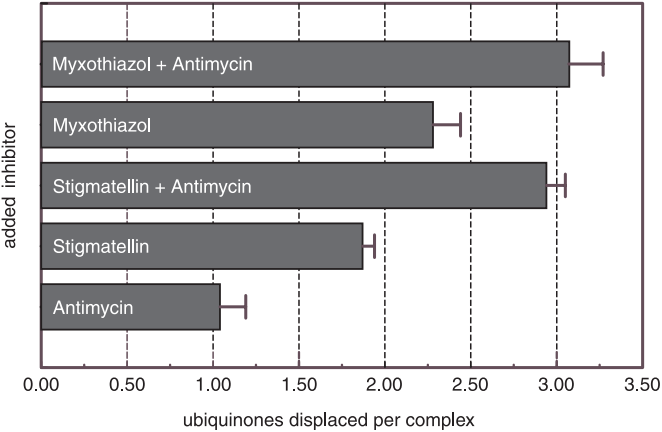
**Fig. 2: HR-MAS-NMR-measurements of free ubiquinone in proteoliposomes.** Two-dimensional  $^1H$ - $^{13}C$  heteronuclear single-quantum correlated (HSQC) NMR-spectrum of a 60  $\mu$ l suspension of membrane bound cytochrome  $bc_1$  complex (0.23 mM) in  $D_2O$  (16-22) The spectrum was acquired at 298 K with a 1.5 s relaxation delay (total experimental time of 4 hours) on a Bruker DRX600 instrument equipped with a  $^1H/^{13}C/^{15}N$ -HR-MAS probe and HR-MAS control unit. The spinning rate was 5 kHz.  $Na$ - $^{13}C$ -acetate was added as standard at a concentration of 1.5 mM. The well resolved signals (boxed) of  $^{13}C$ - $Q_0C_{10}$  (3.9 ppm / 61 ppm) and  $Na$ - $^{13}C$ -acetate (1.8 ppm / 24 ppm) were referenced to the  $Na$ - $^{13}C$ -acetate signal and integrated by means of the XWINNMR software (Bruker). All other signals are due to the natural abundance of 1.1%  $^{13}C$  in the proteoliposomes. Characteristic traces along  $\omega_2$  of the  $^{13}C$  labelled methyl groups of acetate **(a,b)** and ubiquinone **(c,d)** are shown as insets. **(a,c)** without inhibitors; **(b,d)** with added antimycin and stigmatellin. The concentration of  $^{13}C$ - $Q_0C_{10}$  was 2.1 mM, as evaluated by integration to determine the volume under its cross peak relative to that under the cross peak from  $Na$  acetate present at known concentration. Corrected integrals  $I^{corrected}$  were obtained from the measured integrals  $I^{measured}$  according to  $I^{corrected} = I^{measured} / (1 - e^{-\Delta/T_1})$  with  $T_1$  values for ubiquinone of 0.75 s and acetate of 3.43 s (determined by using the inversion recovery method, (29) and the repetition delay of the HSQC pulse sequence including the acquisition time  $\Delta$ ).

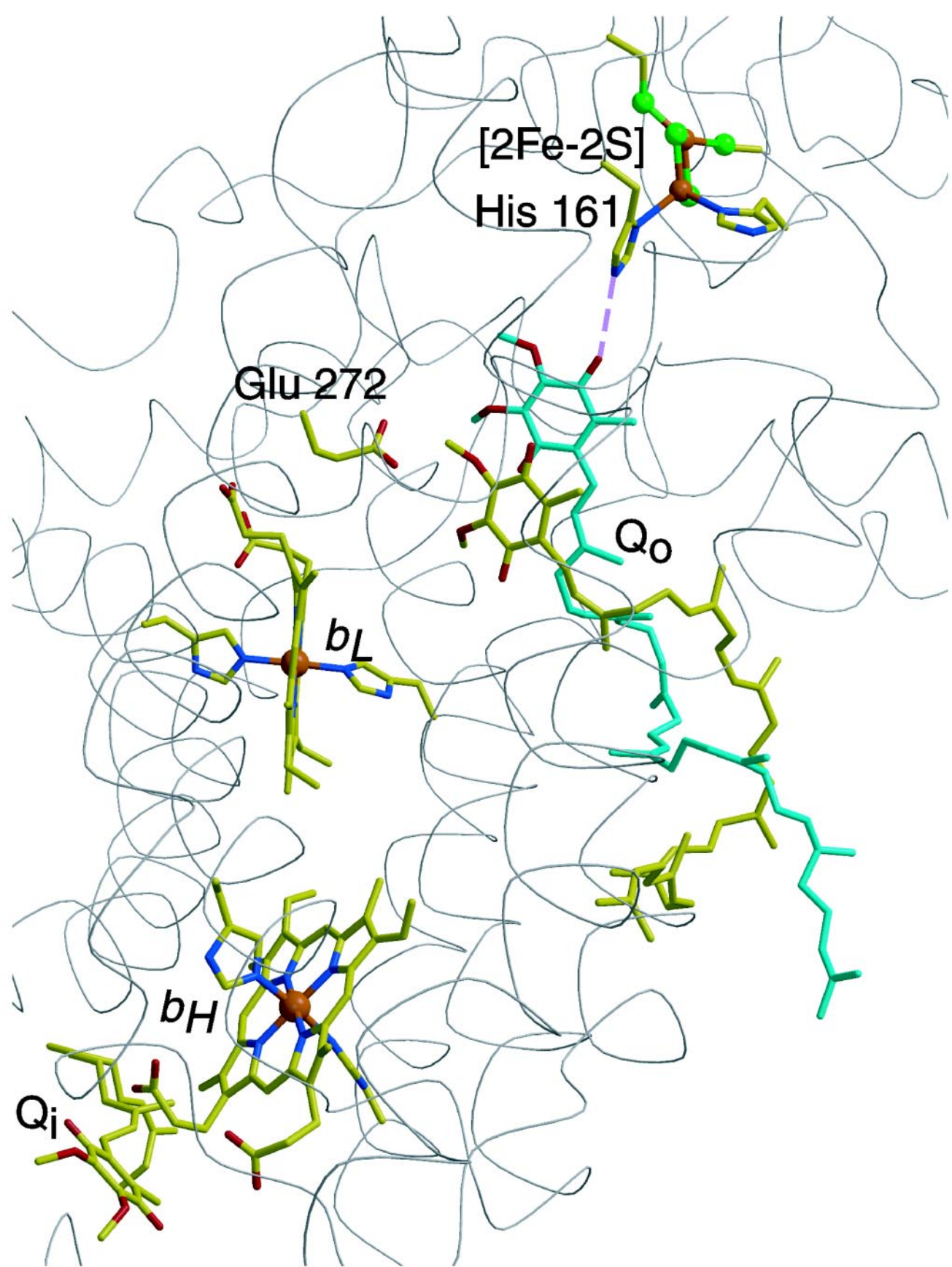
**Fig. 3: Stoichiometry of specific  $^{13}\text{C}$ -6-n-decyl-ubiquinone binding to cytochrome  $bc_1$  complex as determined by inhibitor displacement.** As an internal standard, 1.5 mM  $^{13}\text{C}$  sodium-acetate in  $\text{D}_2\text{O}$  was added to freshly prepared proteoliposomes.  $^{13}\text{C}$ - $\text{Q}_0\text{C}_{10}$  was added from a stock solution in dimethylsulfoxide. This solvent was found not to affect the NMR measurement or binding at the level added. The desired amount of the inhibitor(s) was placed as an ethanolic stock solution into a dry tube. The solvent was evaporated before  $^{13}\text{C}$ -ubiquinone (1.2–3.6 mM) and acetate containing proteoliposomes (0.15–0.29 mM cytochrome  $bc_1$  complex) were added. The final sample volume was adjusted to 85  $\mu\text{l}$  of which 60  $\mu\text{l}$  were used in the HR-MAS-NMR measurements (see Fig. 2). Inhibitors were added at the following final concentrations (the number of measured samples is given in brackets): antimycin, 0.3 mM [2], 0.8 mM [2], 1.5 mM [1]; stigmatellin, 0.3 mM [1], 0.3 mM + 1 mM sodium-ascorbate [2], 0.8 mM; myxothiazol, 0.3 mM [2], 1.5 mM [2]; antimycin + stigmatellin (each), 0.3 mM + 1 mM sodium-ascorbate [2], 0.7 mM + 1 mM sodium-ascorbate [1], 0.8 mM; antimycin + myxothiazol (each), 0.3 mM [2], 1.5 mM [2]. Variation in inhibitor concentrations within these ranges and addition of sodium ascorbate in the case of stigmatellin had no effect on the stoichiometry of ubiquinone release from the cytochrome  $bc_1$  complex. The error bars give the standard deviation of all measurements listed for a given inhibitor or combination of inhibitors.

**Fig. 4: Two ubiquinone molecules fit into the ubiquinol oxidation pocket of the cytochrome  $bc_1$  complex.** Shown are the  $\text{C}\alpha$  traces of the cytochrome  $b$  and the "Rieske" subunits, the [2Fe-2S] cluster, the cytochrome  $b$  heme groups  $b_L$  and  $b_H$  and their ligands as well as the ubiquinone molecule at the reduction ( $\text{Q}_i$ ) center, and the ubiquinone-7 models at the ubiquinol oxidation ( $\text{Q}_o$ ) center. A possible hydrogen bond is indicated by a purple line. According to Crofts et al. (10), cf. Fig. 1), glutamine-272 changes its conformation upon movement of the ubiquinone. The Figure was prepared with a version of MolScript (30) modified to enable color ramping (31). PDB entry 2BCC (32) was used as the starting structure for modeling of the chicken enzyme. At the ubiquinol oxidation pocket, the inhibitor stigmatellin was replaced by a pair of ubiquinone-7 molecules, and the system was subjected to energy minimization and molecular dynamics simulations at 300K using the program CNS (33).

**A****B**









Bartoschek et al.

*Three ubiquinone molecules essential for energy conservation by respiratory cytochrome bc<sub>1</sub> complex*

### Supplementary Data

Individual data used for Fig. 3.:

<sup>13</sup> C-Q <sub>0</sub> C <sub>10</sub> mM	bc <sub>1</sub> complex	Antimycin	Myxothiazol	Stigmatellin	Displaced Q mol / mol
1.6	0.23	0.3	-	-	0.78
2.1	0.23	0.3	-	-	1.16
1.2	0.15	0.8	-	-	1.14
1.2	0.15	0.8	-	-	1.09
3.6	0.29	1.5	-	-	1.02
2.1	0.23	-	0.3	-	2.04
2.1	0.23	-	0.3	-	2.31
3.6	0.29	-	1.5	-	2.36
3.6	0.29	-	1.5	-	2.40
1.6	0.23	-	-	0.3*	1.91
2.1	0.23	-	-	0.3*	1.90
2.1	0.23	-	-	0.3	1.79
2.1	0.23	0.3	0.3	-	3.16
2.1	0.23	0.3	0.3	-	3.25
3.6	0.29	1.5	1.5	-	2.78
3.6	0.29	1.5	1.5	-	3.08
1.6	0.23	0.3	-	0.3*	2.85
2.1	0.23	0.3	-	0.3*	3.06
2.1	0.23	0.7	-	0.7*	2.92

\*in the presence of 1 mM Na-ascorbate.

## Diskussion

Der Schwerpunkt dieser Arbeit ist die Untersuchung von Enzymaktivitäten; hierbei wurden fünf verschiedene Themenkomplexe NMR-spektroskopisch behandelt:

(1) Bestimmung der spontanen Bildungsrate von *N*-Carboxymethanofuran und die Beeinflussung der Geschwindigkeit durch Zellextrakte aus *Methanosarcina barkeri*.

(2) Beiträge zur Aufklärung des Mechanismus der H<sub>2</sub>-bildenden Methylen-H<sub>4</sub>MPT-Dehydrogenase (Hmd) aus *Methanothermobacter marburgensis*.

(3) Bestimmung der Stereospezifität des Hydridtransfers von Methylen-H<sub>4</sub>MPT auf NADP<sup>+</sup>, katalysiert von NADP-abhängiger Methylen-H<sub>4</sub>MPT-Dehydrogenase (MtdA) aus *Methylobacterium extorquens* AM1.

(4) Identifizierung eines Enzyms aus *Paracoccus denitrificans*, das die Bildung von *S*-Hydroxymethylglutathion katalysiert.

(5) Bestimmung der Bindungsstöchiometrie von Ubichinon an den Cytochrom *bc<sub>1</sub>* Komplex aus *Bos bovis*.

(1) In Zellen wird CO<sub>2</sub> durch Carbamatbildung primär an Methanofuran fixiert. Bisher war von dieser Reaktion nicht bekannt, ob es sich um eine enzymkatalysierte Reaktion handelt. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, daß die spontane Rate der Carbamatbildung ausreicht, um die *in vivo*-CO<sub>2</sub>-Reduktionsraten in methanogenen Archaea erklären zu können, da die Zugabe von Zellextrakten aus *Methanosarcina barkeri* keine eindeutige Beeinflussung der Geschwindigkeit im EXSY bewirkte. Dieser negative Befund kann verschiedene Gründe haben: Es ist denkbar, daß die Enzymaktivität unter anderen Wachstumsbedingungen von *M. barkeri* verstärkt induziert wird. Zusätzlich mußten die Messungen bei einem pH-Wert von 8 anstelle des physiologischen pH-Wertes von 7 durchgeführt werden, weil das Gleichgewicht der Reaktion stark pH-Wert abhängig ist und bei einem pH-Wert von 7 ganz auf Seiten der Edukte liegt. Es ist denkbar, daß bei dem physiologischen pH-Wert eine größere Beschleunigung der Reaktion relativ zur spontanen Rate vorliegt. Ferner mußte aufgrund von Empfindlichkeitsproblemen bei Konzentrationen von 100 µM oder höher gemessen werden. Dies ist höher als die natürlichen Konzentrationen von CO<sub>2</sub> und Methanofuran, die im niedrigen µM-Bereich liegen. Derartige Messungen unter physiologischen Bedingungen sind durch die Entwicklung von empfindlicheren Kryoprobeköpfen inzwischen durchführbar. Der in

dieser Arbeit entwickelte Ansatz ist also prinzipiell in der Lage, Enzymaktivität nachzuweisen.

(2) Die Reaktion von Methylen- $\text{H}_4\text{MPT}$  zu Methenyl- $\text{H}_4\text{MPT}^+$  und einem Hydridanion wird von Hmd aus *M. marburgensis* katalysiert. Das einmalige an diesem Enzym ist, daß es sich um eine metallfreie Dehydrogenase handelt, weshalb insbesondere der Mechanismus der Aktivierung von Methylen- $\text{H}_4\text{MPT}$  besonders interessant ist. In dieser Arbeit wurde mittels Transfer-NOE-Messungen nachgewiesen, daß Methylen- $\text{H}_4\text{MPT}$  durch die Bindung an das Enzym seine Konformation ändert. Die beobachtete Konformationsänderung ist im Einklang mit dem hier postulierten Mechanismus der Reaktion, der zusätzlich durch semiempirische, quantenmechanische Berechnungen erhärtet wurde. Um Transfer-NOE-Messungen durchführen zu können, ist es notwendig, daß der betrachtete Cofaktor im mM-Bereich verfügbar ist und sich die Formen frei in Lösung und gebunden an das Enzym im schnellen Austausch befinden.

Solange Hmd nicht im mM-Bereich markiert darstellbar ist, können weitere Experimente, die die Protein-Cofaktor-Wechselwirkungen darüber hinausgehend untersuchen, nicht durchgeführt werden.

(3) Der Hydridtransfer von Methylen- $\text{H}_4\text{MPT}$  auf  $\text{NADP}^+$  wird von MtdA katalysiert. Die Stereospezifität dieser Reaktion war nicht bekannt. In dieser Arbeit wurde gefunden, daß der Transfer auf  $\text{NADP}^+$  *Re*-Seiten-spezifisch in Bezug auf Methylen- $\text{H}_4\text{MPT}$  und  $\text{NADP}^+$  verläuft. Bei den Messungen wurde ausgenutzt, daß es prinzipiell möglich ist, die relative Stereochemie zu bestimmen und diastereotope Protonen NMR-spektroskopisch per se zu unterscheiden. Da  $\text{NADP}^+$  in Kristallstrukturen in  $\text{NADP}^+$ -gebundener MtdA mit der *Si*-Seite an MtdA gebunden ist, kann die gefundene Stereospezifität der Reaktion erklärt werden. Es ist nun möglich, anhand des postulierten Übergangszustandes auch Methylen- $\text{H}_4\text{MPT}$  in die Kristallstruktur zu modellieren, das bisher nicht kokristallisiert werden konnte.

(4) Der erste zelluläre Reaktionschritt der Detoxifikation von Formaldehyd verläuft spontan als Kondensationsreaktion mit Glutathion zu *S*-Hydroxymethylglutathion. Aus Zellextrakten des methylotrophen Proteobakteriums *Paracoccus denitrificans* wurde ein diese Reaktion beschleunigendes Enzym gereinigt, indem die Aktivität in den säulenchromatographisch getrennten Fraktionen mit EXSY bestimmt wurde. Das Enzym

wurde Glutathion-abhängiges Formaldehyd-aktivierendes-Enzym genannt. Mittels NMR-Spektroskopie kann man nun die Protein-Ligand-Wechselwirkungen von Glutathion und Gfa untersuchen, um weitere Erkenntnisse zum Mechanismus der Reaktion zu gewinnen.

(5) Bei der Bindung von Ubichinon an den Cytochrom *bc<sub>1</sub>* Komplex aus *Bos bovis* handelt es sich um die Bindung eines hydrophoben Cofaktors an einen membranständigen Proteinkomplex. Bisher war es nicht bekannt, ob ein oder zwei Ubichinone an das *P*-Zentrum des Cytochrom *bc<sub>1</sub>* Komplexes binden. Für die Messungen wurde eine NMR-Methode entwickelt: Über die Aufnahme und Integration von <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-HSQC-Spektren unter Verwendung von HR-MAS-NMR konnte die Konzentration des Ubichinons, das in der Proteoliposomenmembran frei beweglich ist, quantifiziert werden. Die Konzentrationen des Cofaktors müssen für diese Messungen im mM-Bereich liegen und es müssen Inhibitoren bekannt sein, die Verdrängungsstudien ermöglichen. Diese ermöglichen es, durch den Vergleich der freigesetzten Cofaktorkonzentrationen direkt auf die Anzahl der zuvor gebundenen Cofaktormoleküle zu schließen.

Bindungsstudien ohne die Verwendung von Inhibitoren sind aufgrund der hohen Anzahl unspezifischer Bindungen schwerer zu interpretieren. Es gibt aber prinzipiell zwei NMR-spektroskopische Möglichkeiten, um auch diese Systeme eindeutig zu beschreiben: Es kann versucht werden durch Diffusionsmessungen die spezifisch oder unspezifisch gebundenen Cofaktoren zu unterscheiden. Desweiteren kann man in eingefrorenen Proben direkt die markierten gebundenen Cofaktormoleküle detektieren. Dies ist Gegenstand weiterer Untersuchungen.

In den beschriebenen Beispielen hat sich die NMR-Spektroskopie als eine äußerst nützliche Methode erwiesen, um von globalen Parametern bis hin zur atomaren Struktur Erkenntnisse über dynamische Prozesse zu liefern. Die vorgestellten Beiträge der NMR-Spektroskopie zu biochemischen Fragestellungen setzen aber auch eine Reihe von Bedingungen voraus, die sich aus der Methode ergeben. So ist es erforderlich hohe Konzentrationen wegen der geringen Empfindlichkeit der Methode zu verwenden. Das Problem der Signalüberlagerung bei großen Molekülen führt dazu, daß nicht alle Systeme für NMR-spektroskopische Untersuchungen direkt geeignet sind. So ist beispielsweise die Strukturaufklärung von Proteinen bis 20 kDa durch <sup>13</sup>C- und <sup>15</sup>N- Markierung möglich und

durch Deuterierung bis hin zu einer molekularen Masse von 40 kDa. Allerdings sind derartige Bestimmungen immer noch zeitaufwendig und kompliziert.

Für große Moleküle (mit Molekülmassen ab mehreren kDa), und geringe Konzentrationen von wenigen  $\mu\text{M}$  oder weniger, sind aber eine Reihe von Methoden entwickelt worden, die auch diese für NMR-Messungen zugänglich machen. Grundsätzlich kann die Anzahl der Signale eines großen Moleküls durch spezifische Isotopenmarkierung und durch spezielle Detektionstechniken (e.g.: Photo-CIDNP oder aminosäurespezifische Pulssequenzen) verringert werden. Zusätzlich gibt es aber auch von der NMR-Seite Möglichkeiten sich die Eigenschaften großer Moleküle zunutze zu machen. So filtern beispielsweise TROSY-Spektren das sogenannte TROSY-Signal, welches die geringste Linienbreite und eine starke Intensität besitzt, aus dem Multiplett der gekoppelten Spektren durch Verwendung des entsprechenden Phasencyclus heraus. Auf diese Weise wird die Überlagerung von Signalen verringert und die Methode auch auf für größere Moleküle geeignet. Auch die Messung von dipolaren Kopplungen von Proben, die in Lösung orientiert sind, bietet sich für die Strukturbestimmung und Bestimmung der Dynamik von großen Molekülen an. Die Bestimmung von Projektionswinkeln zwischen heteronuklearen Vektoren mit Hilfe von Relaxationsgeschwindigkeiten von Doppel- und Nullquanten-Kohärenzen ermöglicht es strukturelevante Parameter zu bestimmen. Der Relaxationsmechanismus beruht dabei auf der Kreuzkorrelation zweier individueller dipolarer Kopplungstensoren. Derartige Projektionswinkel können auch durch die Messung von Doppel- und Nullquanten-Kohärenzen erhalten werden, die durch Kreuzkorrelation eines dipolaren Kopplungstensors mit einem chemischen Verschiebungstensor hervorgerufen werden.

Grundsätzlich ist es notwendig den spezifischen Fragestellungen die Präparation der Proben von Fall zu Fall individuell anzupassen und zu entscheiden, ob es möglich und auch sinnvoll ist NMR-spektroskopische Methoden zu verwenden.

## Literaturverzeichnis

1. Wasserfallen, A., Nölling, 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., *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology*. 50, 43-53.
2. Leigh, J. A., Rinehart, K. L. J. & Wolfe, R. S. (1984) Structure of methanofuran, the carbon dioxide reduction factor of *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Journal of the American Chemical Society*. 106, 3636-3640.
3. Thauer, R. (1997) Biodiversity and unity in biochemistry, *Antonie van Leeuwenhoek*. 71, 21-32.
4. Hogan, K. B., Hoffman, J. S. & Thompson, A. M. (1991) Methane on the greenhouse agenda, *Nature*. 354, 181-182.
5. Crutzen, P. J. (1991) Methane's sink and sources, *Nature*. 350, 380-381.
6. Schlesinger, W. H. (1997) *Biogeochemistry: An analysis of global change*, 2. edn, Academic Press, San Diego.
7. Zinder, S. H. (1993) Physiological ecology of methanogens in *Methanogenesis. Ecology, Physiology, Biochemistry & Genetics* (Ferry, J. G., ed) pp. 128-206, Chapman & Hall, New York London.
8. DiMarco, A. A., Bobik, T. A. & Wolfe, R. S. (1990) Unusual coenzymes of methanogenesis, *Annual Review of Biochemistry*. 59, 355-94.
9. Wolfe, R. S. (1991) My kind of biology, *Annual Review of Microbiology*. 45, 1-35.
10. Vorholt, J. A. & Thauer, R. K. (1997) The active species of "CO<sub>2</sub>" utilized by formylmethanofuran dehydrogenase from methanogenic Archaea, *European Journal of Biochemistry*. 248, 919-924.
11. Thauer, R. K., Klein, A. R. & Hartmann, G. C. (1996) Reactions with molecular hydrogen in microorganisms. Evidence for a purely organic hydrogenation catalyst, *Chemical Reviews*. 96, 3031-3042.
12. Chistoserdova, L., Vorholt, J. A., Thauer, R. K. & Lidstrom, M. E. (1998) C<sub>1</sub> transfer enzymes and coenzymes linking methylotrophic bacteria and methanogenic archaea, *Science*. 281, 99-102.
13. Ghosh, M., Anthony, C., Harlos, K., Goodwin, M. G. & Blake, C. (1995) The Refined Structure of the Quinoprotein Methanol Dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens* at 1.94 Angstrom, *Structure*. 3, 177-187.
14. Vorholt, J. A., Chistoserdova, L., Lidstrom, M. E. & Thauer, R. K. (1998) The NADP-dependent methylene tetrahydromethanopterin dehydrogenase in *Methylobacterium extorquens* AM1, *Journal of Bacteriology*. 180, 5351-5356.
15. Hagemeyer, 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, *European Journal of Biochemistry*. 267, 3762-3769.
16. 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, *European Journal of Biochemistry*. 261, 475-480.
17. Pomper, B. K. & Vorholt, J. A. (2001) Characterisation of the Formyltransferase (Ftr) from *Methylobacterium extorquens* AM1, *European Journal of Biochemistry*. in press.

18. Brandt, U. (1996) Bifurcated ubihydroquinone oxidation in the cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex by proton-gated charge transfer [Review], *FEBS Letters*. 387, 1-6.
19. Brandt, U. (1996) Energy conservation by bifurcated electron-transfer in the cytochrome-*bc<sub>1</sub>* complex, *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. 1275, 41-46.
20. Brandt, U. & Trumpower, B. (1994) The protonmotive Q cycle in mitochondria and bacteria, *Critical Reviews in Biochemistry & Molecular Biology*. 29, 165-97.
21. Ohnishi, T. & Trumpower, B. L. (1980) Differential effects of antimycin on ubisemiquinone bound in different environments in isolated succinate - cytochrome c reductase complex, *Journal of Biological Chemistry*. 255, 3278-84.
22. Trumpower, B. L. & Simmons, Z. (1979) Diminished inhibition of mitochondrial electron transfer from succinate to cytochrome c by thenoyltrifluoroacetone induced by antimycin, *Journal of Biological Chemistry*. 254, 4608-16.
23. Xia, D., Yu, C. A., Kim, H., Xian, J. Z., Kachurin, A. M., Zhang, L., Yu, L. & Deisenhofer, J. (1997) Crystal structure of the cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex from bovine heart mitochondria, *Science*. 277, 60-66.
24. Zhang, Z., Huang, L., Shulmeister, V. M., Chi, Y. I., Kim, K. K., Hung, L. W., Crofts, A. R., Berry, E. A. & Kim, S. H. (1998) Electron transfer by domain movement in cytochrome *bc<sub>1</sub>*, *Nature*. 392, 677-684.
25. Crofts, A. R. & Berry, E. A. (1998) Structure and function of the cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex of mitochondria and photosynthetic bacteria, *Current Opinion in Structural Biology*. 8, 501-9.
26. Iwata, S., Lee, J. W., Okada, K., Lee, J. K., Iwata, M., Rasmussen, B., Link, T. A., Ramaswamy, S. & Jap, B. K. (1998) Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex, *Science*. 281, 64-71.
27. Ding, H., Moser, C. C., Robertson, D. E., Tokito, M. K., Daldal, F. & Dutton, P. L. (1995) Ubiquinone pair in the Q<sub>o</sub> site central to the primary energy conversion reactions of cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex, *Biochemistry*. 34, 15979-96.
28. Ding, H., Robertson, D. E., Daldal, F. & Dutton, P. L. (1992) Cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex [2Fe-2S] cluster and its interaction with ubiquinone and ubihydroquinone at the Q<sub>o</sub> site: A double-occupancy Q<sub>o</sub> site model, *Biochemistry*. 31, 3144-58.
29. Brandt, U., Haase, U., Schägger, H. & von Jagow, G. (1991) Significance of the "Rieske" iron-sulfur protein for formation and function of the ubiquinol-oxidation pocket of mitochondrial cytochrome c reductase (*bc<sub>1</sub>* complex), *Journal of Biological Chemistry*. 266, 19958-64.
30. Crofts, A. R., Guergova-Kuras, M., Kuras, R., Ugulava, N., Li, J. & Hong, S. (2000) Proton-coupled electron transfer at the Q<sub>o</sub> site: what type of mechanism can account for the high activation barrier?, *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. 1459, 456-466.
31. Holm, L. & Sander, C. (1997) An evolutionary treasure - unification of a broad set of amidohydrolases related to urease, *Proteins*. 28, 72-82.
32. Hochheimer, A., Hedderich, R. & Thauer, R. (1998) The formylmethanofuran dehydrogenase isoenzymes in *Methanobacterium wolfei* and *M. thermoautotrophicum*: Induction of the molybdenum isoenzyme by molybdate and constitutive synthesis of the tungsten isoenzyme, *Archives of Microbiology*. 170, 389-393.
33. Thauer, R. K. (1998) Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson, *Microbiology*. 144, 2377-2406.
34. Vorholt, J. A., Vaupel, M. & Thauer, R. K. (1996) A polyferredoxin with eight [4Fe-4S] clusters as a subunit of molybdenum formylmethanofuran dehydrogenase from *Methanosarcina barkeri*, *European Journal of Biochemistry*. 236, 309-317.
35. Perski, H.-J., Moll, J. & Thauer, R. K. (1981) Sodium dependence of growth and methane formation in *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Archives of Microbiology*. 130, 319-321.

36. Perski, H. J., Schönheit, P. & Thauer, R. K. (1982) Sodium dependence of methane formation in methanogenic bacteria, *FEBS Letters*. 143, 323-326.
37. Thauer, R. K., Hedderich, R. & Fischer, R. (1993) Reactions and enzymes involved in methanogenesis from CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> in *Methanogenesis* (Ferry, J. G., ed) pp. 209-252, Chapman & Hall, London.
38. Breitung, J., Börner, G., Scholz, S., Linder, D., Stetter, K. O. & Thauer, R. K. (1992) Salt dependence, kinetic properties and catalytic mechanism of *N*-formylmethanofuran:tetrahydromethanopterin formyltransferase from the extreme thermophile *Methanopyrus kandleri*, *European Journal of Biochemistry*. 210, 971-981.
39. Schwörer, B. & Thauer, R. K. (1991) Activities of formylmethanofuran dehydrogenase, methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase, methylenetetrahydromethanopterin reductase, and heterodisulfide reductase in methanogenic bacteria, *Archives of Microbiology*. 155, 459-465.
40. Arnold, H., Pahls, K. & Potsch, D. (1969) Reaktion von N-(Chloräthyl)-2-oxazolidon mit primären Aminen, *Tetrahedron Letters*. 3, 137-139.
41. Lorimer, G. H. (1983) Carbon dioxide and carbamate formation: the makings of a biochemical control system, *Trends in Biochemical Sciences*. 8, 65-68.
42. Gibbons, B. H. & Edsall, J. T. (1963) Rate of hydration of carbon dioxide and dehydration of carbonic acid at 25°C, *Journal of Biological Chemistry*. 238, 3502-3507.
43. Dean, J. A. (1992) *Lange's Handbook of Chemistry*, fourteenth edn, McGraw-Hill, Inc., New York.
44. Jeener, J., Meier, B. H., Bachmann, P. & Ernst, R. R. (1979) Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy, *Journal of Chemical Physics*. 71, 4546-4553.
45. Meier, B. H. & Ernst, R. R. (1979) Elucidation of chemical exchange networks by two-dimensional NMR spectroscopy: The heptamethylbenzenonium ion, *Journal of the American Chemical Society*. 101, 6441-6442.
46. Schleucher, J., Schwörer, B., Thauer, R. K. & Griesinger, C. (1995) Elucidation of the stereochemical course of chemical reactions by magnetic labeling, *Journal of the American Chemical Society*. 117, 2941-2942.
47. McConnell, H. M. (1958) Reaction rates by nuclear magnetic resonance, *The Journal of Chemical Physics*. 28, 430-431.
48. Shao, W. P., Liu, G. H. & Tang, W. X. (1995) Binding of 1-methylimidazole to cytochrome c - kinetic analysis and resonance assignments by two-dimensional NMR, *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure & Molecular Enzymology*. 1248, 177-185.
49. Chen, Y., Liu, G. & Tang, W. (1996) H-1 NMR studies of pyridine binding to metmyoglobin, *Inorganica Chimica Acta*. 249, 239-243.
50. Blaut, M. & Gottschalk, G. (1984) Coupling of ATP synthesis and methane formation from methanol and molecular hydrogen in *Methanosarcina barkeri*, *European Journal of Biochemistry*. 141, 217-22.
51. Karrasch, M., Bott, M. & Thauer, R. K. (1989) Carbonic anhydrase activity in acetate grown *Methanosarcina barkeri*, *Archives of Microbiology*. 151, 137-142.
52. Schleucher, J., Griesinger, C., Schwörer, B. & Thauer, R. K. (1994) H<sub>2</sub>-forming *N*<sup>5</sup>,*N*<sup>10</sup>-methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* catalyzes a stereoselective hydride transfer as determined by two-dimensional NMR spectroscopy, *Biochemistry*. 33, 3986-3993.
53. 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, *European Journal of Biochemistry*. 138, 563-571.



54. Poe, M. & Benkovic, S. J. (1980) 5-Formyl- and 10-formyl-5,6,7,8-tetrahydrofolate. Conformation of the tetrahydropyrazine ring and formyl group in solution, *Biochemistry*. *19*, 4576-4582.
55. Schwörer, B., Breitung, J., Klein, A. R., Stetter, K. O. & Thauer, R. K. (1993) Formylmethanofuran:tetrahydromethanopterin formyltransferase and  $N^5,N^{10}$ -methylene tetrahydromethanopterin dehydrogenase from the sulfate-reducing *Archaeoglobus fulgidus*: similarities with the enzymes from methanogenic Archaea, *Archives of Microbiology*. *159*, 225-232.
56. Klein, A. R. & Thauer, R. K. (1995) *Re*-face specificity at C14a of methylene tetrahydromethanopterin and *Si*-face specificity at C5 of coenzyme F<sub>420</sub> for coenzyme F<sub>420</sub>-dependent methylene tetrahydromethanopterin dehydrogenase from methanogenic Archaea, *European Journal of Biochemistry*. *227*, 169-174.
57. Buurman, G. (2001) *Zum Mechanismus der H<sub>2</sub>-bildenden N<sup>5</sup>,N<sup>10</sup>-Methylen tetrahydromethanopterin-Dehydrogenase (Hmd) aus methanogenen Archaea: Untersuchungen zur Stereospezifität und Nachweis einer prosthetischen Gruppe*, Philipps-Universität, Marburg.
58. Keltjens, J. T. & Vogels, G. D. (1988) Methanopterin and methanogenic bacteria, *Biofactors*. *1*, 95-103.
59. Zirngibl, C., Hedderich, R. & Thauer, R. K. (1990)  $N^5,N^{10}$ -Methylene tetrahydromethanopterin dehydrogenase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* has hydrogenase activity, *FEBS Letters*. *261*, 112-116.
60. Bartoschek, S., Buurman, G., Thauer, R. K., Geierstanger, B. H., Weyrauch, J. P., Griesinger, C., Nilges, M., Hutter, M. & Helms, V. (2001) *Re*-face stereospecificity of methylene tetrahydromethanopterin dehydrogenases and methylene tetrahydrofolate dehydrogenases is predetermined by intrinsic properties of the substrate, *ChemBioChem*. *7-8*, 530-541.
61. Berkessel, A. & Thauer, R. K. (1995) On the mechanism of catalysis by a metal-free hydrogenase from methanogenic Archaea: enzymatic transformation of H<sub>2</sub> without a metal and its analogy to the chemistry of alkanes in superacidic solution, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* *34*, 2247-2250.
62. Geierstanger, B. H., Prash, T., Griesinger, C., Hartmann, G., Buurman, G. & Thauer, R. K. (1998) Catalytic mechanism of the metal-free hydrogenase from methanogenic archaea: Reversed stereospecificity of the catalytic and noncatalytic reaction, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* *37*, 3300-3303.
63. Finer-Moore, J., Fauman, E. B., Foster, P. G., Perry, K. M., Santi, D. V. & Stroud, R. M. (1993) Refined structures of substrate-bound and phosphate-bound thymidylate synthase from *Lactobacillus casei*, *Journal of Molecular Biology*. *232*, 1101-16.
64. Sage, C. R., Michelitsch, M. D., Stout, T. J., Biermann, D., Nissen, R., Finer-Moore, J. & Stroud, R. M. (1998) D221 in thymidylate synthase controls conformation change, and thereby opening of the imidazolidine, *Biochemistry*. *37*, 13893-901.
65. Zirngibl, C., van Dongen, W., Schwörer, B., von Büнау, R., Richter, M., Klein, A. & Thauer, R. K. (1992) H<sub>2</sub>-forming methylene tetrahydromethanopterin dehydrogenase, a novel type of hydrogenase without iron-sulfur clusters in methanogenic archaea, *European Journal of Biochemistry*. *208*, 511-520.
66. Ma, K., Zirngibl, C., Linder, D., Stetter, K. O. & Thauer, R. K. (1991)  $N^5,N^{10}$ -Methylene tetrahydromethanopterin dehydrogenase (H<sub>2</sub>-forming) from the extreme thermophile *Methanopyrus kandleri*, *Archives of Microbiology*. *156*, 43-48.
67. Buurman, G., Shima, S. & Thauer, R. K. (2000) The metal-free hydrogenase from methanogenic archaea: evidence for a bound cofactor, *FEBS Letters*. *485*, 200-204.
68. Maden, B. E. H. (2000) Tetrahydrofolate and tetrahydromethanopterin compared: functionally distinct carriers in C-1 metabolism, *Biochemical Journal*. *350*, 609-629.

69. Hagemeyer, C. H., Bartoschek, S., Griesinger, C., Thauer, R. K. & Vorholt, J. A. (2001) Re-face stereospecificity of NADP dependent methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens* AM1 as determined by NMR spectroscopy, *FEBS Letters*. 494, 95-98.
70. Almarsson, Ö. & Bruice, T. C. (1993) Evaluation of the factors influencing reactivity and stereospecificity in NAD(P)H dependent dehydrogenase enzymes, *Journal of the American Chemical Society*. 115, 2125-2138.
71. Hagemeyer, C. H., Ermler, U., Warkentin, E. & Vorholt, J. A. (2001) Structure of the NADP<sup>+</sup>-dependent methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens* AM1, *Biospectrum*. In press.
72. Mason, R. P., Sanders, J. K., Crawford, A. & Hunter, B. K. (1986) Formaldehyde metabolism by *Escherichia coli*. Detection by in vivo <sup>13</sup>C NMR spectroscopy of S-(hydroxymethyl)glutathione as a transient intracellular intermediate, *Biochemistry*. 25, 4504-7.
73. Goenrich, M. (2001) *Die Formaldehyd-aktivierenden Enzyme Fae und Gfa in methylo-trophen Proteobakterien*, Philipps-Universität, Marburg.
74. Barber, M. J., Van Valkenburgh, H., Trimboli, A. J., Pollock, V. V., Neame, P. J. & Bastian, N. R. (1995) The Amino Acid Sequence of Rhodobacter Sphaeroides Dimethyl Sulfoxide Reductase, *Archives of Biochemistry & Biophysics*. 320, 266-275.
75. Brandt, U., Schagger, H. & von Jagow, G. (1989) Purification of cytochrome-c oxidase retaining its pulsed form, *European Journal of Biochemistry*. 182, 705-11.
76. von Jagow, G. & Link, T. A. (1986) Use of specific inhibitors on the mitochondrial bc<sub>1</sub> complex, *Methods in Enzymology*. 126, 253-71.
77. Hunte, C., Koepke, J., Lange, C., Roßmanith, T. & Michel, H. (2000) Structure at 2.3 angstrom resolution of the cytochrome bc<sub>1</sub> complex from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* co-crystallized with an antibody Fv fragment, *Structure with Folding & Design*. 8, 669-684.
78. Brandt, U., Schagger, H. & von Jagow, G. (1988) Characterisation of binding of the methoxyacrylate inhibitors to mitochondrial cytochrome c reductase, *European Journal of Biochemistry*. 173, 499-506.

## **Anhang**

**Veröffentlichungen, die in der Dissertation nicht aufgegriffen worden sind:**

**Preparation of Silicon- and Germanium-  
Containing  $\alpha$ -Amino Acids**

# Preparation of Silicon- and Germanium-Containing $\alpha$ -Amino Acids

Markus Merget, Stefan Bartoschek, Reiner Willeke, Reinhold Tacke\*

Institut für Anorganische Chemie, Universität Würzburg

Am Hubland, D-97074 Würzburg, Germany

Tel.: Int. code + (931)888 5250 — Fax: Int. code + (931)888 4609

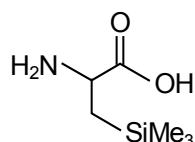
E-mail: r.tacke@mail.uni-wuerzburg.de

**Keywords:**  $\alpha$ -Amino Acids / Enantioselective Syntheses /  $\beta$ -Silylalanine /  $\beta$ -Germylalanine / Crystal Structure

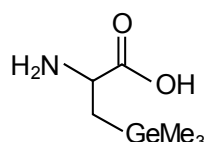
**Summary:** The silicon-containing  $\alpha$ -amino acids (*R*)- and (*S*)- $\beta$ -(trimethylsilyl)alanine [(*R*)-**1a** and (*S*)-**1a**] as well as the germanium-containing  $\alpha$ -amino acids (*R*)- and (*S*)- $\beta$ -(trimethylgermyl)alanine [(*R*)-**1b** and (*S*)-**1b**] were synthesized according to the Schöllkopf approach. In addition, *rac*- $\beta$ -(trimethylsilyl)alanine (*rac*-**1a**) was studied by single-crystal X-ray diffraction.

## Introduction

Synthetic amino acids with unnatural side chains have proven useful for probing the structural requirements for the biological activity of numerous peptides and proteins [1, 2]. In addition, unnatural amino acids are of interest as precursors of drugs and plant-protective agents [3]. In the course of our systematic studies on biologically active organosilicon compounds (for reviews, see [4, 5]), we have started a research program concerning silicon-containing  $\alpha$ -amino acids. In the context of our investigations on C/Si/Ge bioisosterism (for recent examples, see [6, 7]), we also became interested in germanium-containing  $\alpha$ -amino acids. We report here on the syntheses of the (*R*)- and (*S*)-enantiomers of  $\beta$ -(trimethylsilyl)alanine (**1a**) and  $\beta$ -(trimethylgermyl)alanine (**1b**). In addition, the crystal structure of *rac*- $\beta$ -(trimethylsilyl)alanine (*rac*-**1a**) is described.



**1a**

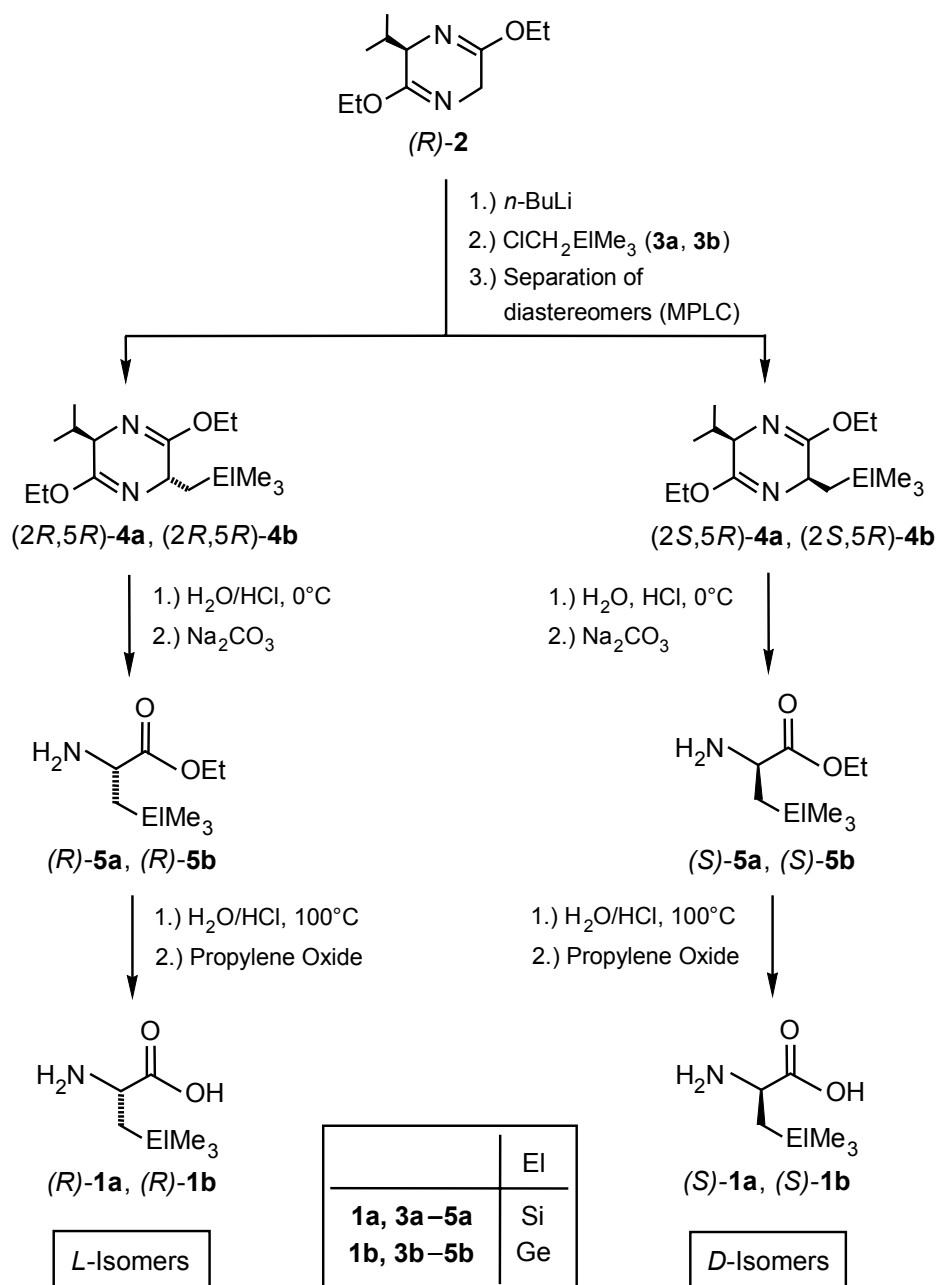


**1b**

Syntheses of *rac*-**1a** [8–10], (*R*)-**1a** [11–13], (*S*)-**1a** [13], (*R*)- $\beta$ -(dimethylphenylsilyl)alanine [12], and (*R*)- $\beta$ -(methyldiphenylsilyl)alanine [12] have already been reported. In addition, the ethyl ester and the *N*-Fmoc and *N*-Boc derivatives of (*R*)-**1a**, as well as renin inhibitory peptides bearing (*R*)-**1a**, have been described in the literature [14]. In contrast, germanium-containing  $\alpha$ -amino acids have not yet been reported.

## Syntheses of the $\alpha$ -Amino Acids (*R*)-1a, (*S*)-1a, (*R*)-1b, and (*S*)-1b

The  $\alpha$ -amino acids (*R*)-1a, (*S*)-1a, (*R*)-1b, and (*S*)-1b were prepared by three-step syntheses, starting from the bislactim ether (*R*)-2 (Scheme 1). The strategy of these syntheses is based on the Schöllkopf approach [14, 15].



**Scheme 1.** Syntheses of the  $\alpha$ -amino acids (*R*)-1a, (*S*)-1a, (*R*)-1b, and (*S*)-1b.

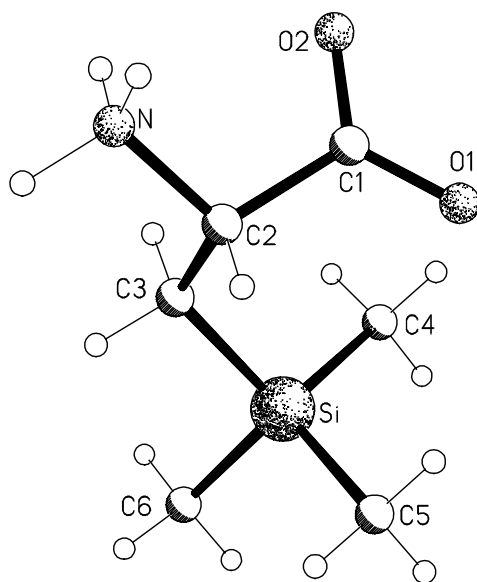
Metalation of the bislactim ether (*R*)-2 with *n*-butyllithium and subsequent reaction with the (chloromethyl)silane **3a** yielded a mixture of the diastereomeric bislactim ethers (*2R,5R*)-4a and (*2S,5R*)-4a (molar ratio 85:15). The analogous reaction with the (chloromethyl)germane **3b** instead of the (chloromethyl)silane **3a** gave a mixture of the corresponding germanium analogues (*2R,5R*)-4b and (*2S,5R*)-4b (molar ratio 86:14). The mixtures of the diastereomers of **4a** and **4b** were separated by column chromatography (MPLC) on silica gel, and the diastereomerically pure

(GC studies) bislactim ethers (2*R*,5*R*)-**4a**, (2*S*,5*R*)-**4a**, (2*R*,5*R*)-**4b**, and (2*S*,5*R*)-**4b** were subsequently hydrolyzed with hydrochloric acid at 0°C to yield the respective  $\beta$ -(trimethylsilyl)alanine esters (*R*)-**5a** and (*S*)-**5a** and the  $\beta$ -(trimethylgermyl)alanine esters (*R*)-**5b** and (*S*)-**5b**. As shown by <sup>1</sup>H-NMR studies using the chiral solvating agent (*R*)-(-)-1-(9-anthryl)-2,2,2-trifluoroethanol, the enantiomeric purities of these esters were  $\geq 98\%$  *ee*. Hydrolysis of the esters (*R*)-**5a**, (*S*)-**5a**, (*R*)-**5b**, and (*S*)-**5b** in boiling hydrochloric acid and subsequent treatment of the resulting  $\alpha$ -amino acid hydrochlorides with propylene oxide yielded the title compounds (*R*)-**1a**, (*S*)-**1a**, (*R*)-**1b**, and (*S*)-**1b** as colorless crystalline solids.

The identity of the  $\alpha$ -amino acids (*R*)-**1a**, (*S*)-**1a**, (*R*)-**1b**, and (*S*)-**1b** and compounds (2*R*,5*R*)-**4a**, (2*S*,5*R*)-**4a**, (2*R*,5*R*)-**4b**, (2*S*,5*R*)-**4b**, (*R*)-**5a**, (*S*)-**5a**, (*R*)-**5b**, and (*S*)-**5b** was established by elemental analyses (C, H, N), solution-state NMR studies (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>29</sup>Si), and mass-spectrometric investigations.

### Crystal Structure Analysis of the $\alpha$ -Amino Acid *rac*-**1a**

*rac*- $\beta$ -(Trimethylsilyl)alanine (*rac*-**1a**) was structurally characterized by single-crystal X-ray diffraction [ $T = -100^\circ\text{C}$ ,  $\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$ ; space group  $P2_1/c$ ,  $a = 13.736(3) \text{ \AA}$ ,  $b = 7.0775(14) \text{ \AA}$ ,  $c = 9.779(2) \text{ \AA}$ ,  $\beta = 102.67(3)^\circ$ ,  $V = 927.5(3) \text{ \AA}^3$ ,  $Z = 4$ ]. Crystals were obtained by crystallization from water (slow evaporation of the solvent at room temperature). Although the quality of the crystal structure analysis is limited ( $R1 = 10.1\%$ ,  $wR2 = 19.6\%$ ), the following conclusion can be drawn: As expected for an  $\alpha$ -amino acid, *rac*-**1a** exhibits a zwitterionic structure in the crystal (Fig. 1), the zwitterions being connected by intermolecular N–H...O hydrogen bonds.



**Fig. 1.** Structure of (*R*)- $\beta$ -(trimethylsilyl)alanine in the crystal of *rac*-**1a**.

**Acknowledgment:** Financial support by *Degussa AG* and the *Fonds der Chemischen Industrie* is gratefully acknowledged. In addition, we would like to thank Prof. Dr. K. Drauz and Dr. C. Weckbecker (*Degussa AG*) for helpful suggestions.

**References:**

- [1] A. Giannis, T. Kolter, *Angew. Chem.* **1993**, *105*, 1303; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1993**, *32*, 1244.
- [2] J. Gante, *Angew. Chem.* **1994**, *106*, 1780; *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1994**, *33*, 1699.
- [3] A. Kleemann, W. Leuchtenberger, B. Hoppe, H. Tanner, "Amino Acids", in: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* (Ed.: W. Gerhartz), 5th edn., Vol. A2, VCH, Weinheim, **1985**, pp. 57–97.
- [4] R. Tacke, H. Linoh, "Bioorganosilicon Chemistry", in: *The Chemistry of Organic Silicon Compounds, Part 2* (Eds.: S. Patai, Z. Rappoport), Wiley, Chichester, **1989**, pp. 1143–1206.
- [5] R. Tacke, S. A. Wagner, "Chirality in Bioorganosilicon Chemistry", in: *The Chemistry of Organic Silicon Compounds, Part 3* (Eds.: Z. Rappoport, Y. Apeloig), Vol. 2, Wiley, Chichester, **1998**, pp. 2363–2400.
- [6] R. Tacke, D. Reichel, P. G. Jones, X. Hou, M. Waelbroeck, J. Gross, E. Mutschler, G. Lambrecht, *J. Organomet. Chem.* **1996**, *521*, 305.
- [7] R. Tacke, U. Kosub, S. A. Wagner, R. Bertermann, S. Schwarz, S. Merget, K. Günther, *Organometallics* **1998**, *17*, 1687.
- [8] L. Birkofer, A. Ritter, *Angew. Chem.* **1956**, *68*, 461.
- [9] L. Birkofer, A. Ritter, *Liebigs Ann. Chem.* **1958**, *612*, 22.
- [10] T. H. Porter, W. Shive, *J. Med. Chem.* **1968**, *11*, 402.
- [11] R. Fitzi, D. Seebach, *Tetrahedron* **1988**, *44*, 5277.
- [12] R. D. Walkup, D. C. Cole, B. R. Whittlesey, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 2630.
- [13] H. Yamanaka, T. Fukui, T. Kawamoto, A. Tanaka, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1996**, *45*, 51.
- [14] B. Weidmann, *Chimia* **1992**, *46*, 312.
- [15] U. Schöllkopf, *Tetrahedron* **1983**, *39*, 2085.

**Purification and catalytic properties of  
Ech hydrogenase from *Methanosarcina barkeri***



## Purification and catalytic properties of Ech hydrogenase from *Methanosarcina barkeri*

Jörn Meuer, Stefan Bartoschek, Jürgen Koch, Andreas Künkel and Reiner Hedderich

Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg, Germany

*Methanosarcina barkeri* has recently been shown to produce a multisubunit membrane-bound [NiFe] hydrogenase designated Ech (*Escherichia coli* hydrogenase 3) hydrogenase. In the present study Ech hydrogenase was purified to apparent homogeneity in a high yield. The enzyme preparation obtained only contained the six polypeptides which had previously been shown to be encoded by the *ech* operon. The purified enzyme was found to contain 0.9 mol of Ni, 11.3 mol of nonheme-iron and 10.8 mol of acid-labile sulfur per mol of enzyme. Using the purified enzyme the kinetic parameters were determined. The enzyme catalyzed the H<sub>2</sub> dependent reduction of a *M. barkeri* 2[4Fe-4S] ferredoxin with a specific activity of 50 U·mg protein<sup>-1</sup> at pH 7.0 and exhibited an apparent *K<sub>m</sub>* for the ferredoxin of 1 μM. The enzyme also catalyzed hydrogen formation with the reduced ferredoxin as electron donor at a rate of 90 U·mg protein<sup>-1</sup> at pH 7.0. The apparent *K<sub>m</sub>* for the reduced ferredoxin was 7.5 μM. Reduction or oxidation of the ferredoxin proceeded at similar rates as the reduction or oxidation of oxidized or reduced methylviologen, respectively. The apparent *K<sub>m</sub>* for H<sub>2</sub> was 5 μM. The kinetic data strongly indicate that the ferredoxin is the physiological electron donor or acceptor of Ech hydrogenase. Ech hydrogenase amounts to about 3% of the total cell protein in acetate-grown, methanol-grown or H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>-grown cells of *M. barkeri*, as calculated from quantitative Western blot experiments. The function of Ech hydrogenase is ascribed to ferredoxin-linked H<sub>2</sub> production coupled to the oxidation of the carbonyl-group of acetyl-CoA to CO<sub>2</sub> during growth on acetate, and to ferredoxin-linked H<sub>2</sub> uptake coupled to the reduction of CO<sub>2</sub> to the redox state of CO during growth on H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> or methanol.

**Keywords:** *Methanosarcina barkeri*; hydrogenase; complex I; energy conservation; iron–sulfur protein; ferredoxin.

*Methanosarcina barkeri* is a methanogenic archaeon that can utilize H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, methanol or methylamines as energy substrates (reviewed in [1–3]). Three different [NiFe] hydrogenases have been characterized from *Methanosarcina* species: F<sub>420</sub>-reducing hydrogenase, F<sub>420</sub>-nonreducing hydrogenase and Ech hydrogenase.

F<sub>420</sub>-reducing hydrogenase has been purified and characterized from *M. barkeri* [4,5]. The enzyme catalyzes the reduction of coenzyme F<sub>420</sub> which plays an important role as redox carrier in methanogenic archaea. The genome of *M. barkeri* contains two gene clusters (*frh* and *fre*) encoding two related F<sub>420</sub>-reducing hydrogenases indicating the presence of two isoenzymes. Both operons were transcribed during growth on H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, methanol or trimethylamine [6]. In acetate-grown cells no transcripts of these operons were detectable although these cells contain small amounts of F<sub>420</sub>-reducing

hydrogenase activity (about 5% of the activity detectable in methanol-grown cells; Meuer and Hedderich, unpublished results).

F<sub>420</sub>-nonreducing hydrogenase has been purified from *M. barkeri* and from *Methanosarcina mazei*. The purified enzyme was found to be composed of two different subunits [7,8]. An analysis of the operon encoding these subunits in *M. mazei* indicated the presence of a third subunit, not present in the purified enzyme. This subunit was shown to be a *b*-type cytochrome, which is assumed to function as a membrane anchor of this hydrogenase *in vivo* [9]. It was also shown that *M. mazei* encodes two closely related F<sub>420</sub>-nonreducing hydrogenases, designated Vho and Vht. The *vho* genes were found to be expressed constitutively, whereas the *vht* genes were only expressed during growth of the organism on H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> or methanol, rather than on acetate [10].

Ech hydrogenase is a multisubunit membrane-bound [NiFe] hydrogenase that has only recently been described [11]. This hydrogenase was identified during the purification of heterodisulfide reductase from acetate-grown cells of *M. barkeri*. Heterodisulfide reductase and Ech hydrogenase were found to coelute on different chromatography columns. The preparations obtained contained eight polypeptides with apparent molecular masses of 55, 46, 39, 24, 23, 20, 16 and 15 kDa. The 46-kDa polypeptide and the 23-kDa polypeptide were shown to be subunits of heterodisulfide reductase [12]. The remaining polypeptides were shown to be encoded by one operon, the *echABCDEF* operon [11]. A sequence analysis of the different polypeptides indicated that the enzyme, which was designated

Correspondence to R. Hedderich, Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Karl-von-Frisch-Straße, D-35043 Marburg, Germany.  
Fax: + 49 6421178299, Tel.: + 49 6421178230,  
E-mail: hedderic@mail.uni-marburg.de

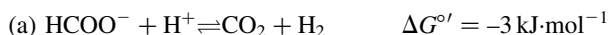
**Abbreviations:** Ech, *E. coli* hydrogenase 3 type hydrogenase of *Methanosarcina barkeri*; coenzyme M, H-S-CoM or 2-mercaptoethane-sulfonate; CoM-S-S-CoB, heterodisulfide of coenzyme M and coenzyme B; DPL, diphenyleiodonium.

**Enzymes:** heterodisulfide reductase (EC 1.99.4.-); F<sub>420</sub>-reducing hydrogenase (EC 1.12.99.1); F<sub>420</sub>-nonreducing hydrogenase (EC 1.12.99.-), NADH:ubiquinone oxidoreductase (EC 1.6.99.3).

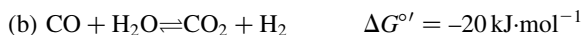
(Received 24 June 1999; accepted 20 July 1999)

as Ech hydrogenase, belongs to a small group of multisubunit membrane-bound [NiFe] hydrogenases. The list of enzymes includes hydrogenase 3 from *Escherichia coli* [13,14], hydrogenase 4 from *E. coli* [15], and carbon monoxide-induced hydrogenase from *Rhodospirillum rubrum* [16,17]. Two integral membrane proteins and three hydrophilic polypeptides of these multisubunit enzymes are highly conserved. A fourth hydrophilic protein present in these enzymes only shows a low sequence similarity. Via sequence analysis two of the hydrophilic polypeptides were identified as the so called 'hydrogenase large subunit' and the 'hydrogenase small subunit' which are found in all [NiFe] hydrogenases. The hydrogenase large subunit contains the four conserved cysteine residues acting as ligands of the binuclear [NiFe] active site. The hydrogenase small subunit of these membrane-bound hydrogenases is considerably smaller than that of other [NiFe] hydrogenases and contains only the cysteine ligands for the proximal [4Fe-4S] cluster. A sequence analysis of both the hydrogenase large and the hydrogenase small subunit indicates that these proteins are more closely related to subunits of the proton-pumping NADH:quinone oxidoreductase (complex I) from various organisms than to subunits of other [NiFe] hydrogenases [11,13,16,18]. The third hydrophilic subunit present in these enzymes contains two binding motifs for [4Fe-4S] clusters. A homologue of this subunit is also found in complex I. The two conserved integral membrane subunits also have closely related homologues in complex I. To differentiate these multisubunit membrane-bound hydrogenases from 'standard' [NiFe] hydrogenases we have designated this group of enzymes as *E. coli* hydrogenase 3-type hydrogenases [11].

*E. coli* hydrogenase 3 and CO-induced hydrogenase from *R. rubrum* catalyze *in vivo* hydrogen formation. *E. coli* hydrogenase 3 is part of the formate–hydrogen lyase complex which catalyzes reaction a.



Andrews *et al.* [15] have proposed that *E. coli* hydrogenase 4 is part of a second formate–hydrogen lyase complex. Under natural conditions, the formate–hydrogen lyase reaction is exergonic, and the authors proposed that the reaction is coupled to energy conservation [15]. The CO-induced hydrogenase from *R. rubrum* catalyzes, together with carbon monoxide dehydrogenase, reaction b.



Since *R. rubrum* can utilize CO as sole energy source, this reaction should be coupled to energy conservation. The hydrogenase has been proposed to be the coupling site [16,17].

Ech hydrogenase from *M. barkeri* has been partially purified from acetate-grown cells. The physiological function of this enzyme has not yet been elucidated. In this communication we describe the purification and the catalytic properties of Ech hydrogenase. The data presented strongly indicate that a ferredoxin is the physiological redox partner of this enzyme.

## MATERIALS AND METHODS

*M. barkeri* strain Fusaro (DSM 804) and *M. thermophila* strain TM-1 (DSM 1825) were from the Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig). *M. barkeri* was grown on methanol, acetate or H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> at 37°C as described in [19]. *M. thermophila* was cultivated on acetate as described in [20]. Dodecyl-β-D-maltoside and diphenyleneiodonium were from Fluka (Neu-Ulm). 2-Hydroxyphenazine was synthesized

as described in [21]. All other chemicals were from Merck (Darmstadt) or Sigma (Deisenhofen).

### Preparation of cell extracts

Cell extracts were routinely prepared from 25 g of cells which were suspended in 150 mL of 50 mM Mops/NaOH pH 7.0, containing 2 mM dithiothreitol (buffer A). Cells were disrupted by sonication at 4°C in intervals of 3 × 5 min using an energy output of 200 W (Bandelin sonicator) under a gas phase of 5% H<sub>2</sub>/95% N<sub>2</sub>. Undisrupted cells and cell debris were removed by centrifugation at 10 000 g for 30 min.

### Purification of Ech hydrogenase

All purification steps were performed under strictly anaerobic conditions under an atmosphere of 5% H<sub>2</sub>/95% N<sub>2</sub>. The crude membrane fraction was isolated from cell extracts by centrifugation at 150 000 g for 2 h. The 150 000 g supernatant was stored for the isolation of ferredoxin, carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase and F<sub>420</sub>-reducing hydrogenase (see below). The crude membrane fraction was used for the isolation of Ech hydrogenase. Crude membranes were homogenized in 20 mL of buffer A using a Teflon potter and then suspended in a total volume of 150 mL of buffer A containing 15 mM dodecyl-β-D-maltoside (1.5 mg of protein/mL). The suspension was incubated for 12 h at 4°C under slight swirling. After centrifugation at 150 000 g for 30 min the solubilized membrane proteins present in the supernatant were loaded on a Q-Sepharose HiLoad column (2.6 × 10 cm) equilibrated with buffer A containing 4 mM dodecyl-β-D-maltoside (= buffer A + detergent). The column was washed with 50 mL of buffer A + detergent and proteins were eluted with NaCl in buffer A + detergent in a linear gradient from 0.1 M to 0.18 M NaCl (200 mL) and in two steps of 0.4 M NaCl (70 mL) and 1 M NaCl (70 mL). Ech hydrogenase was recovered in the fractions eluting with 0.13 M NaCl. Most of the heterodisulfide reductase was recovered in the fractions eluting with 0.11 M NaCl. The F<sub>420</sub>-nonreducing hydrogenase was present in the 1 M NaCl fraction (see below). Ech hydrogenase that still contained some minor protein contaminants was further purified by chromatography on hydroxyapatite. The column (1 × 15 cm) was equilibrated with 30 mM potassium phosphate buffer pH 7.0 containing 4 mM dodecyl-β-D-maltoside. Protein was eluted using a potassium phosphate step gradient: 75 mM (50 mL), 150 mM (50 mL), 265 mM (50 mL), 380 mM (50 mL) and 500 mM (100 mL). Ech hydrogenase was recovered in the fractions eluting with 500 mM potassium phosphate. The protein was concentrated by ultrafiltration (Molecular/Por cellulose ester ultrafiltration membranes, cut-off 100 kDa; Spectrum, Houston, TX, USA). Protein was stored in buffer A + detergent at protein concentrations of 3 mg·mL<sup>-1</sup> and 4°C or -20°C.

### Purification of ferredoxin, carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase, F<sub>420</sub>-reducing hydrogenase and F<sub>420</sub>-nonreducing hydrogenase

The *M. barkeri* ferredoxin was purified under anaerobic conditions from the 150 000 g supernatant by chromatography on DEAE-Sepharose, Q-Sepharose HiLoad and Superose 12 as previously described [22]. The isolated oxidized ferredoxin showed absorption maxima at 280 and 390 nm, and a A<sub>390</sub>/A<sub>280</sub> ratio of 0.8. An ε<sub>390</sub> value of 12.8 mM<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup> was used for the determination of ferredoxin concentrations.

Carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase was partially purified from the 150 000 g supernatant by chromatography on DEAE-Sephacel and Q-Sepharose HiLoad. The preparation obtained contained five major polypeptides corresponding to the subunits of carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase as shown previously [23]. The preparation catalyzed the ferredoxin dependent reduction of metronidazole by CO at a rate of 13 U·mg protein<sup>-1</sup>.

F<sub>420</sub>-nonreducing hydrogenase present in the 1 M NaCl eluate of the Q-Sepharose HiLoad column, obtained during the purification of Ech hydrogenase (see above), was further purified by chromatography on hydroxyapatite using the conditions described for the purification of Ech hydrogenase. The enzyme eluted at a concentration of 75 mM potassium phosphate. An SDS/PAGE of the fractions containing F<sub>420</sub>-nonreducing hydrogenase activity indicated the presence of two major polypeptides corresponding to apparent molecular masses of 57 kDa and 35 kDa. These polypeptides had been previously shown to be subunits of F<sub>420</sub>-nonreducing hydrogenase of *M. barkeri* [7].

F<sub>420</sub>-reducing hydrogenase present in the 150 000 g supernatant of cell extract was partially purified and separated from Ech hydrogenase by chromatography on DEAE-Sephacel and hydroxyapatite. The preparation catalyzed the reduction of coenzyme F<sub>420</sub> at a rate of 3 U·mg protein<sup>-1</sup>.

### Determination of enzyme activities

The assays were routinely performed at 37 °C either in 8-mL serum bottles or in 1.5-mL cuvettes under anaerobic conditions. (1 U of enzyme activity corresponds to 1 μmol of H<sub>2</sub> formed or consumed per min.)

Hydrogen uptake-activity with dyes as electron acceptors was determined by following the reduction of methylviologen, benzylviologen or methylene blue at 578 nm or the reduction of 2-hydroxyphenazine at 425 nm. The 0.8-mL assays contained 50 mM Tris/HCl pH 7.6, 2 mM methylviologen, 2 mM benzylviologen, 0.2 mM methylene blue or 0.2 mM 2-hydroxyphenazine. In standard assays, cuvettes were allowed to equilibrate with a 100% H<sub>2</sub> headspace (1.2 × 10<sup>5</sup> Pa). For kinetic studies, varying amounts of H<sub>2</sub> were injected into a N<sub>2</sub> headspace of the assay buffer and the solution was equilibrated by vigorous shaking for 10 min. The dissolved H<sub>2</sub> was calculated from solubility data [24]. The inhibition of 2-hydroxyphenazine reduction by diphenyleneiodonium (DPI) was tested by adding DPI to the assay at end concentrations of 10 μM to 150 μM.

The H<sub>2</sub> formation activity with reduced methylviologen as electron donor was measured by following the oxidation of reduced methylviologen at 578 nm. The standard assay contained 50 mM Tris/HCl pH 7.6, 2 mM methylviologen, which was reduced with sodium dithionite to a ΔA<sub>578</sub> of 2 and N<sub>2</sub> (1.2 × 10<sup>5</sup> Pa) as the gas phase. The reaction was started by addition of protein. Enzyme inhibition by CO was determined in the H<sub>2</sub> formation assay by adding CO to the headspace of the assay cuvettes before addition of Ech hydrogenase to yield from 0 to 100% CO in the headspace.

The ferredoxin dependent reduction of metronidazole by H<sub>2</sub> was measured by following the decrease in absorbance at 320 nm ( $\epsilon_{\text{metronidazole}} = 9.3 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ , corresponding to a six-electron reduction) [25]. The 0.8-mL assay contained 50 mM Mops/NaOH pH 7.0, 4 mM dodecyl-β-D-maltoside, 0.2 mM metronidazole, 10 μM ferredoxin, protein (purified Ech hydrogenase or fractions obtained during the purification) and 1.2 × 10<sup>5</sup> Pa of 100% H<sub>2</sub> as the gas phase. To ensure

completely anaerobic conditions 0.1 mM sodium dithionite was added.

The ferredoxin dependent H<sub>2</sub> formation with sodium dithionite as electron donor was followed by determining the H<sub>2</sub> concentration in the gas phase by gas chromatography. The 1-mL assay in 8-mL serum bottles contained 50 mM Mops/NaOH pH 7.0, 10 mM sodium dithionite, 20 μM ferredoxin (or as indicated) and 8 μg of purified Ech hydrogenase under N<sub>2</sub> as gas phase (1.2 × 10<sup>5</sup> Pa). The solution was stirred vigorously with a magnetic bar. At time intervals of 1 min samples from the gas phase were withdrawn and H<sub>2</sub> was quantified after separation by gas chromatography.

The ferredoxin dependent H<sub>2</sub> formation from CO was measured by following H<sub>2</sub> formation via gas chromatography as described above. The 1-mL assay mixture in 8-mL serum bottles contained 100 mM potassium phosphate buffer pH 7.0, 240 μg of carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase, 20 μM ferredoxin and 12 or 24 μg of Ech hydrogenase. The gas phase was N<sub>2</sub> with 17% CO at 1.2 × 10<sup>5</sup> Pa.

### Analytical methods

Nonheme iron was quantified colorimetrically with neocuproin (2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline) and ferrozine[3-(2-pyridyl)-5,6-bis(4-phenyl sulfonate)-1,2,4-triazine] as described by Fish [26]. Acid-labile sulfur was analyzed as methylene blue [27].

Nickel was determined by atomic absorption spectroscopy on a 3030 Perkin Elmer atomic absorption spectrometer fitted with a HGA-600 graphite furnace assembly and an AS-60 autosampler.

Protein was determined by the method of Bradford [28] or by the bicinchoninic acid method [29].

### Determination of the intracellular concentration of Ech hydrogenase

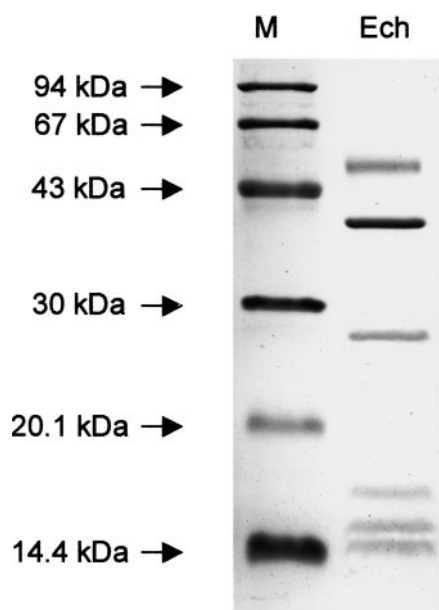
A chemiluminescent Western blotting system (ECF, Amersham Pharmacia, Freiburg), was used to quantify the Ech hydrogenase contents of *M. barkeri* cells grown on H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, methanol or acetate. Protein in cell extracts or purified Ech hydrogenase were denatured by incubation in 62 mM Tris/HCl pH 6.8 that contained 2% SDS and 16 mM dithiothreitol for 30 min at 20°C. Polypeptides were separated by SDS/PAGE and transferred to nitrocellulose membranes by electroblotting. Immunodetection was performed using the protocol for the ECF detection kit provided by Amersham Pharmacia with 1 : 1000 dilutions of a rabbit anti-Ech serum and 1 : 10 000 dilutions of alkaline phosphatase-conjugated anti-(rabbit IgG) antibody. After incubation with the ECF detection reagent, a phosphor storage screen of a Phosphor Imager (Storm 860, Molecular Dynamics, Krefeld) was exposed to the blots. Signals were analyzed using the ImageQuant software (Molecular Dynamics). A calibration curve using known amounts of Ech hydrogenase (60–320 ng of protein) was generated and was used to calculate the Ech content in cell extracts.

The anti-(Ech hydrogenase) serum was generated by Eurogentec (Seraing) from a rabbit immunized with a protein mixture of Ech hydrogenase and heterodisulfide reductase.

## RESULTS

### Purification and molecular properties of Ech hydrogenase

Using the purification procedure described previously [11], enzyme preparations were obtained which contained both



**Fig. 1.** SDS/PAGE analysis of purified Ech hydrogenase from *M. barkeri*. Protein was denatured by SDS for 90 min at room temperature and separated by electrophoresis in a 16% slab gel (8 × 7 cm) which was subsequently stained with Coomassie Brilliant Blue R250. Right lane: 12 µg of purified Ech hydrogenase. Left lane: molecular mass standards. The Coomassie-stained gel was scanned (Scantouch 210, Nikon) and the protein bands were quantified using the ImageQuant software (Molecular Dynamics, Krefeld, Germany). Subunits EchA, EchB, EchC, EchD and EchF were found approximately in a 1 : 1 : 1 : 1 : 1 stoichiometry, while subunit EchE (40-kDa subunit) was present in about twofold higher amounts. This result was obtained for the enzyme from different preparations. It suggests that subunit EchE is either present in higher stoichiometry or that this subunit is more efficiently stained by Coomassie Brilliant Blue. A higher stoichiometry of subunit EchE, the subunit which harbors the [NiFe] active site, should result in a Ni-content of about 2 mol of Ni per mol of enzyme. However, the enzyme was found to contain approximately 1 mol of Ni per mol of enzyme which would argue against a higher stoichiometry of this subunit.

heterodisulfide reductase and Ech hydrogenase. An SDS/PAGE of this preparation indicated the presence of eight polypeptides corresponding to the two subunits of heterodisulfide reductase and to the six polypeptides encoded by the *ech* operon. From 25 g of cells (wet mass) approximately 2–3 mg of this protein mixture was obtained. In addition to Ech hydrogenase, acetate-grown cells of *M. barkeri* contain the  $F_{420}$ -nonreducing hydrogenase which is present in large amounts in these cells and the  $F_{420}$ -reducing hydrogenase which is present in small

amounts in these cells. It was therefore not possible to follow the purification of Ech hydrogenase by enzyme activity measurements using the standard viologen dye assay. Therefore the enzyme preparation containing heterodisulfide reductase and Ech hydrogenase was used to generate anti-Ech/anti-Hdr sera. An immunodetection was then used to follow the purification of Ech hydrogenase. It was found that more than 50% of Ech hydrogenase present in the membrane fraction was not solubilized from the membrane with Chaps, which had been used as detergent. Dodecyl-β-D-maltoside was found to be much more effective, because more than 95% of the enzyme was released from the cytoplasmic membrane fraction using this detergent. The enzyme was further purified by anion-exchange chromatography and hydroxyapatite chromatography in the presence of dodecyl-β-D-maltoside. Using this protocol about 12–16 mg of highly purified Ech hydrogenase was obtained from 25 g of cells (1700 mg of protein). This enzyme preparation only contained the six subunits which had previously been shown to be encoded by the *ech* operon (Fig. 1). Ech hydrogenase and heterodisulfide reductase, which were both present in the solubilized membrane fraction, were separated to more than 90% by anion-exchange chromatography on Q-Sepharose, and were completely separated by hydroxyapatite chromatography. Using this purification procedure also heterodisulfide reductase was obtained in high purity and high yield (20–25 mg of protein). The coelution of both enzymes observed previously [11] may be due to an insufficient solubilization of both enzymes which may result in large lipid-protein aggregates.

Later it was found that a *M. barkeri* 2[4Fe-4S] ferredoxin functions as a substrate of Ech hydrogenase, in contrast to the two other hydrogenases of *M. barkeri*, which do not catalyze the reduction of this ferredoxin (see below). Therefore, the hydrogen dependent reduction of the ferredoxin by Ech hydrogenase was used to follow Ech hydrogenase activity during the purification from the membrane fraction (Table 1). The 150 000 g supernatant of the cell extract was also found to contain substantial amounts of Ech hydrogenase as revealed by an immunoblot and by activity measurements. Up to 40% of the enzyme was found in this fraction. When this fraction was loaded on a DEAE-Sephacel column or other anion-exchange columns, the enzyme was completely found in the void volume of these columns (exclusion volume  $1 \times 10^6$  Da). The fractions were turbid, indicating the presence of small membrane particles. Hence, Ech hydrogenase is considered to be also tightly membrane bound in the 150 000 g supernatant. The enzyme was not purified from this fraction.

The purified Ech hydrogenase was analyzed for its content on Ni, acid-labile sulfur and nonheme iron. Based on a calculated molecular mass of the enzyme of 184 kDa and based on a protein determination using the bicinchoninic acid method,

**Table 1.** Purification of Ech hydrogenase from *M. barkeri* strain Fusaro. The enzyme was purified from 25 g cells (1700 mg of protein). 1 U of activity is defined as the amount of enzyme that catalyzes the ferredoxin dependent reduction of metronidazole with  $1 \mu\text{mol}$  of  $\text{H}_2 \text{min}^{-1}$ . The yield refers to the recovery of activity units.

Purification step	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U·mg <sup>-1</sup> )	Yield (%)
Washed membranes	1386.5	295	4.7	100
Solubilized membrane proteins	1377	281	4.9	99
Q-Sepharose HiLoad	819	17.8	46.0	59
Hydroxyapatite	708	12.2	58.0	51

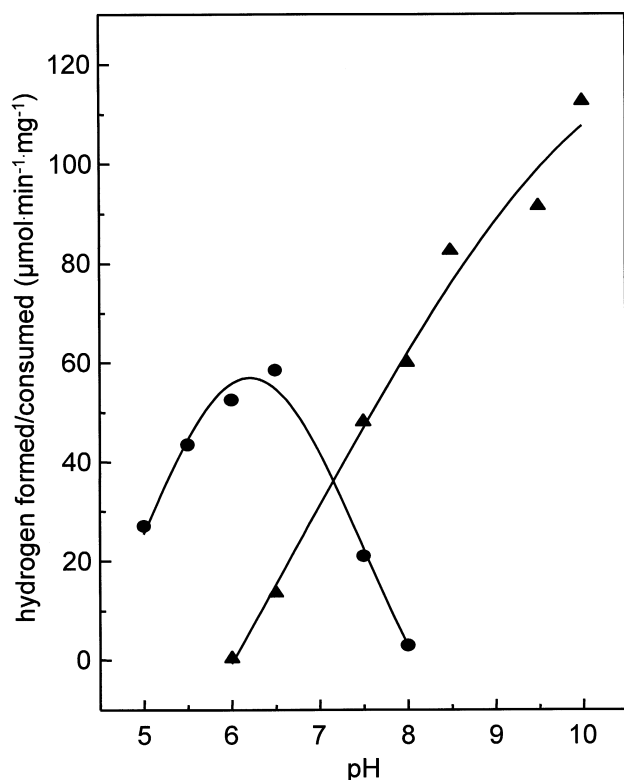


Fig. 2. Effect of pH on  $\text{H}_2$ -dependent reduction of methylviologen ( $\blacktriangle$ ) and hydrogen formation from reduced methylviologen ( $\bullet$ ). Assays were performed at  $37^\circ\text{C}$ . The 0.8-mL assay contained 2 mM methylviologen in 20 mM Mes/Tris/Caps buffer at the pH indicated. Reactions were started with 12  $\mu\text{g}$  of Ech hydrogenase. In hydrogen uptake assays 0.02 mM methyl viologen was reduced with sodium dithionite and the gas phase was 100%  $\text{H}_2$  at  $1.2 \times 10^5$  Pa. In hydrogen formation assays 0.4 mM methyl viologen was reduced with sodium dithionite and the gas phase was 100%  $\text{N}_2$  at  $1.2 \times 10^5$  Pa.

0.9 mol of Ni, 10.8 mol of acid-labile sulfur and 11.3 mol of nonheme iron were found. Per mol of Ni the enzyme thus contains 12.5 mol of Fe and 12 mol of acid-labile sulfur. From the primary structure, the enzyme is predicted to bind three [4Fe-4S] clusters and one binuclear [Ni-Fe] center, corresponding to 13 mol of nonheme iron and 12 mol of acid-labile sulfur.

The activity of the enzyme, purified under an atmosphere of 5%  $\text{H}_2/95\%$   $\text{N}_2$  with 2 mM dithiothreitol in all buffers, could not be further increased by incubation under 100%  $\text{H}_2$  for 60 min. The enzyme was stable at  $4^\circ\text{C}$  under 100%  $\text{H}_2$  for several days.

The enzyme was rapidly inactivated by oxygen. After 30 min exposure to air only 10% enzyme activity was retained. After a short exposure to air ( $< 30$  min) the enzyme could be fully reactivated under reducing conditions using reduced methylviologen and  $\text{H}_2$ .

### Catalytic properties of Ech hydrogenase

Ech hydrogenase catalyzed hydrogen uptake with several artificial electron acceptors. Highest activities were obtained with benzylviologen ( $210 \text{ U}\cdot\text{mg protein}^{-1}$ ), methylene blue ( $123 \text{ U}\cdot\text{mg protein}^{-1}$ ) and methylviologen ( $53 \text{ U}\cdot\text{mg protein}^{-1}$ )

at pH 7.6. The apparent  $K_m$  for  $\text{H}_2$  was determined to be  $5 \mu\text{M}$  using methylviologen as electron acceptor.

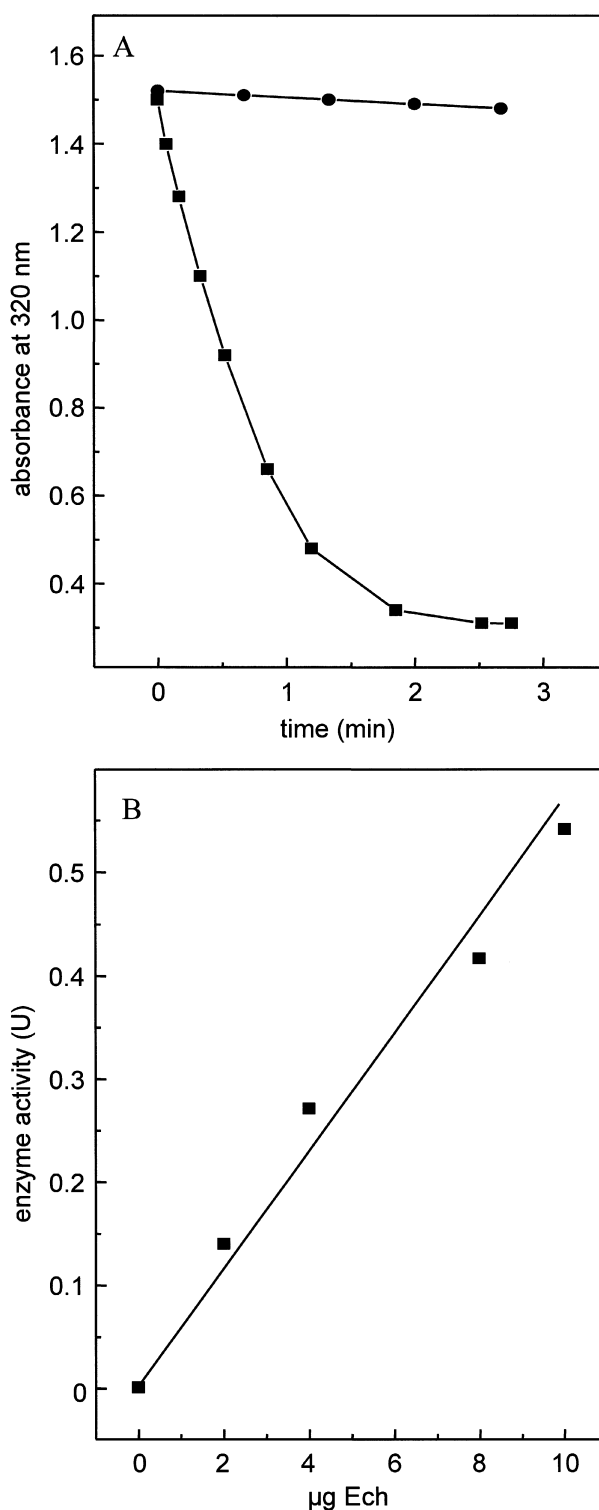


Fig. 3. Ferredoxin requirement for metronidazole reduction catalyzed by Ech hydrogenase. (A) Time course of the hydrogen dependent metronidazole reduction in the presence and absence of ferredoxin ( $\blacksquare$ ,  $8 \mu\text{M}$  ferredoxin;  $\bullet$ , no ferredoxin added). The reaction was started with 15  $\mu\text{g}$  of Ech hydrogenase. (B) Dependence on the concentration of Ech hydrogenase. For assay conditions see the Materials and methods section.

Hydrogen formation was assayed with reduced methylviologen as an electron donor. The pH dependence of the

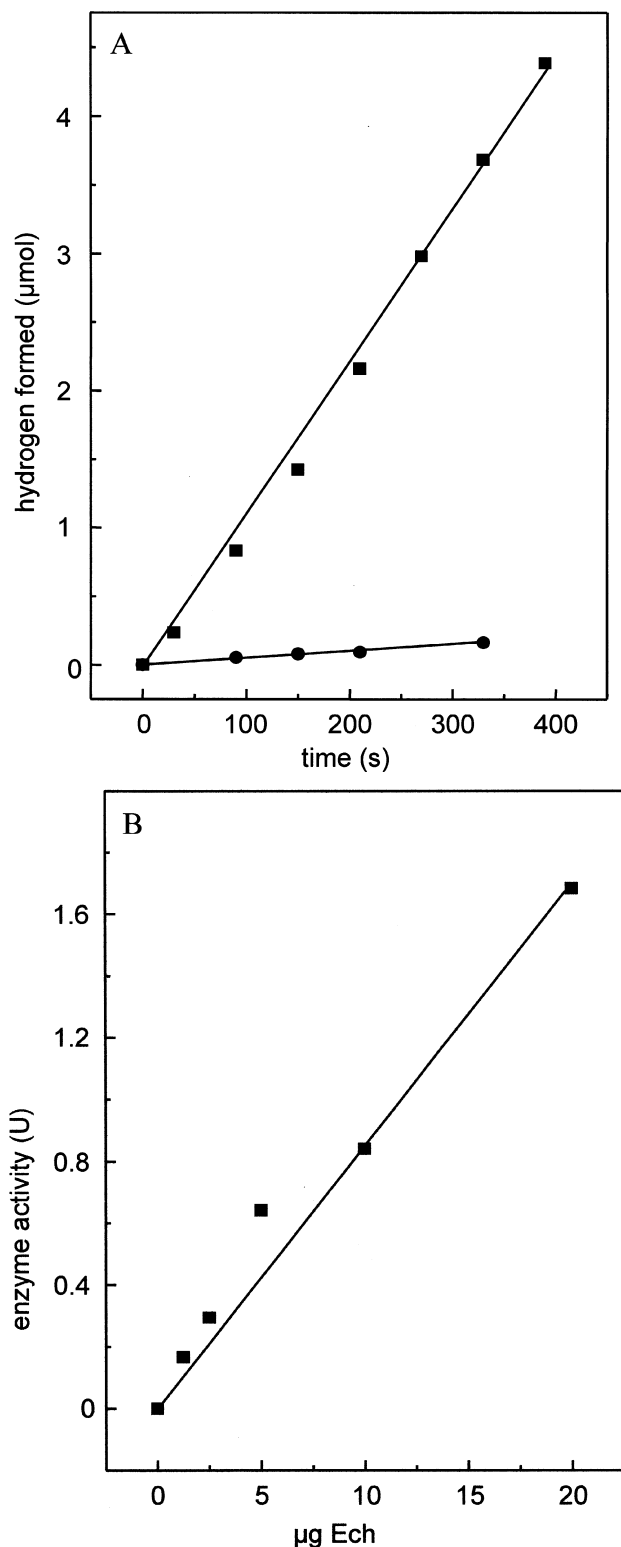


Fig. 4. Ferredoxin requirement for H<sub>2</sub> formation with sodium dithionite as reductant catalyzed by Ech hydrogenase. (A) Time course for H<sub>2</sub> formation with sodium dithionite as reductant in the presence and absence of ferredoxin (■, 20 μM ferredoxin; ●, no ferredoxin added). (B) Dependence on the concentration of Ech hydrogenase. For assay conditions see the Materials and methods section.

hydrogen uptake and hydrogen formation with methylviologen as electron donor or acceptor is shown in Fig. 2. At pH 7 both reactions proceed at a rate of 35–40 U·mg protein<sup>-1</sup>.

The activity of Ech hydrogenase, measured by following H<sub>2</sub> formation from reduced methylviologen, was found to be inhibited by CO. A 50% inhibition was observed with 7.5% CO in the gas phase (≈ 65 μM CO in solution). Hence, Ech hydrogenase is more sensitive to CO than the closely related CO-induced hydrogenase from *R. rubrum*, which is inhibited to 50% at 300 μM CO [17]. The CO sensitivity of Ech hydrogenase seems to be more similar to that of the standard [NiFe] hydrogenase from *Desulfovibrio gigas* [30].

Acetate-grown cells of *M. barkeri* contain a 2[4Fe-4S] ferredoxin which has been shown to be essential for CO-dependent H<sub>2</sub> formation catalyzed by cell extracts of *M. barkeri* [22]. It was therefore tested if Ech hydrogenase is able to catalyze the reduction of this ferredoxin with hydrogen as electron donor or to catalyze H<sub>2</sub> formation with reduced ferredoxin as electron donor. To determine the ferredoxin reduction rate, the metronidazole assay was used [25]. Ech hydrogenase catalyzed the reduction of metronidazole by H<sub>2</sub> only in the presence of the ferredoxin, which indicates that the ferredoxin is a direct electron acceptor of the enzyme (Fig. 3A). Reduced ferredoxin is oxidized in a fast chemical reaction by metronidazole. The metronidazole reduction rate increased linearly with increasing Ech hydrogenase concentrations (Fig. 3B). Ech hydrogenase catalyzed the reduction of metronidazole and thus the reduction of the ferredoxin at a V<sub>max</sub> of 50 U·mg<sup>-1</sup> of enzyme. The enzyme exhibited an apparent K<sub>m</sub> for the ferredoxin of 1 μM. Assuming a molecular mass for Ech hydrogenase of 184 kDa, a catalytic efficiency coefficient (k<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub>) of 1.5 × 10<sup>8</sup> M<sup>-1</sup>·s<sup>-1</sup> was calculated.

Reduction of the ferredoxin was reversible. Ech hydrogenase catalyzed hydrogen formation with sodium dithionite-reduced ferredoxin as electron donor at an apparent V<sub>max</sub> of 90 U·mg protein<sup>-1</sup>. The direct reduction of the enzyme by sodium dithionite proceeded only at very low rates as in the absence of ferredoxin the rate of hydrogen formation was only 2 U·mg<sup>-1</sup> of Ech hydrogenase (Fig. 4A). The rate of hydrogen formation from reduced ferredoxin increased linearly with increasing Ech hydrogenase concentrations (Fig. 4B). Using this assay an apparent K<sub>m</sub> for reduced ferredoxin of 7.5 μM was determined. The catalytic efficiency coefficient was calculated to be 3.7 × 10<sup>7</sup> M<sup>-1</sup>·s<sup>-1</sup>.

In control experiments the two standard [NiFe] hydrogenases of *M. barkeri* were tested for their ability to catalyze the reduction of the *M. barkeri* ferredoxin. F<sub>420</sub>-nonreducing hydrogenase, partially purified from *M. barkeri*, did not catalyze ferredoxin reduction, which is in accord with the results obtained by Kemner and Zeikus [7]. F<sub>420</sub>-reducing hydrogenase, partially purified from *M. barkeri*, also did not catalyze ferredoxin reduction, which is in line with the findings of Grahame & DeMoll [31]. Kemner and Zeikus [32] had reported that F<sub>420</sub>-reducing hydrogenase, present in acetate-grown cells of *M. barkeri*, catalyzes ferredoxin reduction at high rates. These experiments were, however, performed with a crude enzyme preparation which most probably contained Ech hydrogenase and F<sub>420</sub>-reducing hydrogenase.

Ech hydrogenase is related to energy conserving NADH:quinone oxidoreductases. One of the two integral membrane subunits of Ech hydrogenase is a homologue of a subunit which is implicated in the binding of the quinone in complex I [33]. It may therefore be concluded that quinone-like compounds act as a physiological electron acceptor of Ech hydrogenase. Methanogens do not contain quinones but from

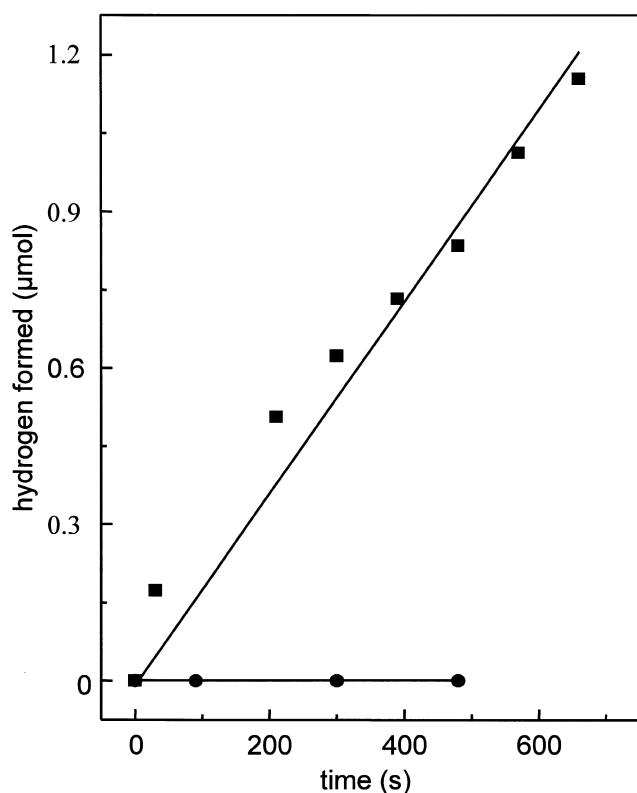


Fig. 5. Reconstitution of a CO-oxidizing:H<sub>2</sub>-evolving system composed of carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase, ferredoxin and Ech hydrogenase. Time course of the CO-dependent H<sub>2</sub> formation catalyzed by *M. barkeri* carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase and *M. barkeri* Ech hydrogenase (■) in the presence of 40 μM *M. barkeri* 2[4Fe-4S] ferredoxin or (●) in the absence of ferredoxin. The reaction was started with 12 μg of Ech hydrogenase. For assay conditions see the Materials and methods section. Note that at the CO concentration of 7.5% used in this assay, Ech hydrogenase is inhibited to about 50%.

*M. mazei* a membrane-bound electron carrier designated methanophenazine was characterized which is a 2-hydroxyphenazine linked to an isoprenoid side chain via an ether linkage [34]. Methanophenazine is thought to have a quinone-like function in the electron transport chain of *Methanosarcina* species. Because methanophenazine is highly hydrophobic the water soluble 2-hydroxyphenazine has been used in enzyme assays [34]. Ech hydrogenase was found to catalyze the reduction of 2-hydroxyphenazine with an apparent  $V_{\max}$  of 9 U·mg protein<sup>-1</sup> and was found to exhibit an apparent  $K_m$  for 2-hydroxyphenazine of 0.2 mM. Do these data indicate that methanophenazine is a physiological electron acceptor of Ech hydrogenase or does the water soluble 2-hydroxyphenazine function as an artificial electron acceptor of Ech hydrogenase? Control experiments were performed with two nonmembrane-bound hydrogenases, the F<sub>420</sub>-reducing hydrogenase and the F<sub>420</sub>-nonreducing hydrogenase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* which were available in a highly purified state. It was found that these enzymes also catalyze the reduction of 2-hydroxyphenazine. The F<sub>420</sub>-reducing hydrogenase catalyzed the reduction of 2-hydroxyphenazine at a rate of 25 U·mg protein<sup>-1</sup> and the reduction of coenzyme F<sub>420</sub> at a rate of 5 U·mg protein<sup>-1</sup>. The F<sub>420</sub>-nonreducing hydrogenase catalyzed the reduction of 2-hydroxyphenazine at a rate of 1.5 U·mg protein<sup>-1</sup> and the reduction of benzylviologen at a rate of 300 U·mg protein<sup>-1</sup>. At least for the F<sub>420</sub>-reducing

hydrogenase, a physiological function as methanophenazine-reducing hydrogenase can be excluded because the role of this enzyme in reduction of coenzyme F<sub>420</sub> is well established [4,35]. It may therefore be concluded that 2-hydroxyphenazine functions as artificial electron acceptor of these hydrogenases. To further address this question, it was tested if the reduction of 2-hydroxyphenazine catalyzed by Ech hydrogenase is inhibited by DPI. DPI has been reported to be an inhibitor of *M. mazei* F<sub>420</sub>H<sub>2</sub> dehydrogenase which catalyzes the F<sub>420</sub>H<sub>2</sub> dependent reduction of 2-hydroxyphenazine. The inhibition is competitive with respect to 2-hydroxyphenazine ( $K_i = 0.45 \mu\text{M}$ ) [36]. DPI was also found to inhibit the reduction of 2-hydroxyphenazine by H<sub>2</sub> catalyzed by the membrane fraction of *M. mazei* [36]. The latter reaction is assumed to be catalyzed by the F<sub>420</sub>-nonreducing hydrogenase (Vho) present in the membrane fraction of *M. mazei*. In this work it was found that 2-hydroxyphenazine reduction catalyzed by Ech hydrogenase was not inhibited by DPI at concentrations up to 100 μM, which indicates that the binding sites of Ech hydrogenase and F<sub>420</sub>H<sub>2</sub> dehydrogenase for 2-hydroxyphenazine are different, and that Ech hydrogenase probably binds 2-hydroxyphenazine at an artificial, low affinity site.

#### Reconstitution of a CO-oxidizing:H<sub>2</sub>-generating system

Cell suspensions of *M. barkeri* have previously been shown to catalyze the conversion of CO (5% CO in the gas phase) to CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> at a rate of 80–120 mU·mg<sup>-1</sup> of cell protein. The rate increased up to 200 mU·mg protein<sup>-1</sup> in the presence of the uncoupler tetrachlorosalicylanilide. These cell suspensions catalyzed methane formation from acetate at a rate of 100–200 mU·mg protein<sup>-1</sup> [37]. These *in vivo* rates were compared with the rates obtained with an *in vitro* system composed of purified *M. barkeri* Ech hydrogenase, *M. barkeri*

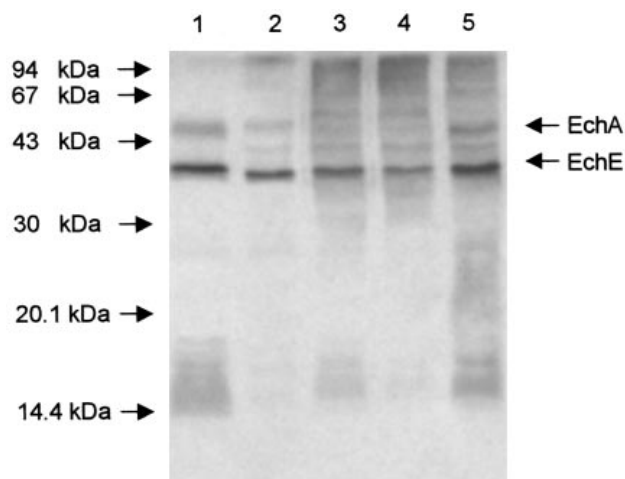


Fig. 6. Western blot detection of Ech hydrogenase in cell extracts of *M. barkeri* and *M. thermophila*. Lane 1, purified Ech hydrogenase from *M. barkeri* (0.35 μg); lane 2, cell-extract prepared from acetate-grown cells of *M. thermophila* (12 μg of protein); lane 3, cell-extract prepared from H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>-grown cells of *M. barkeri* (12 μg of protein); lane 4, cell-extract prepared from methanol-grown cells of *M. barkeri* (12 μg of protein); lane 5, cell-extract prepared from acetate-grown cells of *M. barkeri* (12 μg of protein). The immuno-detection was performed using rabbit anti-Ech sera as described in the Materials and methods section. The arrows on the left side indicate the migration distance of molecular mass standards. The subunit HdrD of heterodisulfide reductase is also detected by the antiserum (apparent molecular mass 41 kDa).

ferredoxin and *M. barkeri* carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase. Ech hydrogenase was present in rate-limiting amounts in the assay mixture. This system catalyzed the conversion of CO to CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> at a rate of 15 U·mg<sup>-1</sup> of Ech hydrogenase, calculated for a concentration of 5% CO in the gas phase (Fig. 5). Electron transfer between carbon monoxide dehydrogenase and Ech hydrogenase was strictly dependent on the presence of the ferredoxin, excluding a direct electron transfer between both enzymes. Based on an Ech hydrogenase content of about 3% of the total cell protein (see below) the *in vivo* activity should be in the order of 0.45 U·mg<sup>-1</sup> of cell protein, provided the oxidation of the ferredoxin by Ech hydrogenase is the rate limiting step *in vivo*. Hence, the *in vivo* and the *in vitro* activities are in the same order which indicates that Ech hydrogenase is responsible for the CO-dependent H<sub>2</sub> formation catalyzed by whole cells.

### Presence of Ech hydrogenase in methanol and H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>-grown cells of *M. barkeri* and in acetate-grown cells of *M. thermophila*

Immunoblotting experiments with anti-Ech sera showed that Ech hydrogenase is not only present in acetate-grown cells of *M. barkeri*, from which the enzyme has been purified, but also in methanol-grown and H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>-grown cells. A quantitative immunoblot analysis showed that the content of Ech hydrogenase in acetate-grown cells is 3 ± 1% of the total cell protein. Similar amounts of Ech hydrogenase were detected in methanol-grown and H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>-grown cells. This correlates with the specific activities of Ech hydrogenase determined in cell extracts. Acetate-grown cells catalyzed ferredoxin dependent H<sub>2</sub> uptake at a rate of 1.6 U·mg protein<sup>-1</sup>, methanol-grown cells at a rate of 2 U·mg protein<sup>-1</sup> and H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>-grown cells at a rate of 0.7 U·mg protein<sup>-1</sup>.

The anti-Ech serum was used to detect Ech hydrogenase in cell extracts of acetate-grown cells of *M. thermophila*, a *Methanosarcina* species that is not able to grow on H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> as energy substrates [20]. *M. thermophila* cell extract was found to cross-react with the anti-(*M. barkeri* Ech) serum (Fig. 6). A 55-kDa polypeptide and a 39-kDa polypeptide corresponding to the molecular masses of the subunits EchA and EchE of *M. barkeri* Ech hydrogenase gave the strongest reaction in the immunoblot with *M. thermophila* cell extract. The subunits EchB, EchC, EchD and EchF of *M. barkeri* Ech hydrogenase only exhibit a very weak reaction with the antiserum. Polypeptides corresponding to the molecular masses of these subunits were also detected in *M. thermophila* cell extract. The presence of Ech hydrogenase in acetate-grown cells of *M. thermophila* cannot be due to the constitutive expression of an enzyme only needed in H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> metabolism. Therefore these results can be taken as proof that the enzyme plays an essential function in the acetate metabolism of *Methanosarcina* species.

## DISCUSSION

Ech hydrogenase was found to be a major membrane protein in acetate-grown, methanol-grown or H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>-grown cells of *M. barkeri*. The data provided show that the enzyme efficiently mediates electron transfer to a 2[4Fe-4S] ferredoxin and catalyzes H<sub>2</sub> formation with reduced ferredoxin as electron donor. In the following the physiological role of these reactions in the different energy metabolic pathways of *M. barkeri* will be discussed.

During growth on acetate, cleavage of the acetate molecule is catalyzed by carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA

synthase (reviewed in [2]). This reaction generates enzyme-bound CO and an enzyme-bound methyl group. The methyl group is transferred to coenzyme M (H-S-CoM or 2-mercaptoethanesulfonate) via tetrahydrosarcinapterin. The methyl group of methyl-coenzyme M is subsequently reduced by coenzyme B (H-S-CoB or *N*-7-mercaptoheptanoylthreonine phosphate) to CH<sub>4</sub>, thereby forming the heterodisulfide (CoM-S-S-CoB). The CO bound to carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase is oxidized to CO<sub>2</sub>, and the reducing equivalents are used for the reduction of CoM-S-S-CoB. In *M. barkeri*, a 2[4Fe-4S] ferredoxin with a midpoint potential (*E*'<sub>0</sub>) of -420 mV has been shown to be the direct electron acceptor of carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase [23,31]. The electron transfer pathway coupling ferredoxin oxidation with CoM-S-S-CoB reduction has not yet been elucidated. Two possible pathways will be discussed.

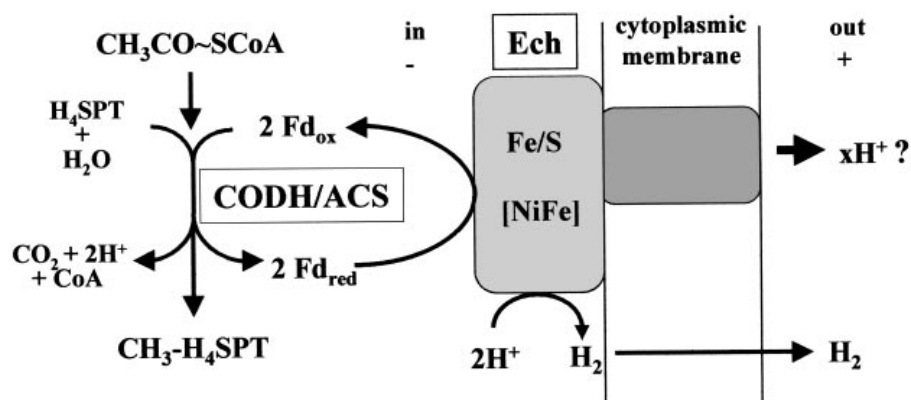
The first pathway assumes that H<sub>2</sub> is an obligatory intermediate of this electron transport chain. This 'intraspecies hydrogen cycling' pathway is based on the finding that cultures of *Methanosarcina* species produce significant levels of H<sub>2</sub> during growth on acetate [38-40]. Furthermore, it was found that cell suspensions and cell extracts of *M. barkeri* catalyze the conversion of CO to CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> [22,37,41]. A CO-oxidizing:H<sub>2</sub>-generating activity was reconstituted with purified carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase, ferredoxin and the membrane fraction from *M. thermophila* [42]. It is assumed that *in vivo* the carbonyl group of acetyl-CoA instead of free CO is converted to CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>. The hydrogen thus formed has to be recaptured by the cell to generate reducing equivalents for the reduction of the heterodisulfide (CoM-S-S-CoB). This model requires the presence of two hydrogenases, a hydrogen-evolving and a hydrogen-uptake hydrogenase.

The data provided in this work support this model. They suggest that Ech hydrogenase catalyzes H<sub>2</sub> formation with reduced ferredoxin as electron donor (Fig. 7). The catalytic efficiency coefficient determined is in agreement with the function of Ech hydrogenase as a physiological redox partner of the ferredoxin. In contrast to Ech hydrogenase, the two other [NiFe] hydrogenases present in *M. barkeri* cannot utilize the ferredoxin as substrate. In addition to Ech hydrogenase, acetate-grown cells of *M. barkeri* and *M. mazei* produce another membrane-bound hydrogenase, the F<sub>420</sub>-nonreducing hydrogenase (Vho) [7-9]. The enzyme contains a *b*-type cytochrome as membrane anchor [9]. The *whoG* gene encodes a 'twin arginine' leader peptide typical for enzymes translocated across the cytoplasmic membrane [9]. It therefore can be assumed that the catalytic subunit of the enzyme is exposed to the extracellular side of the cytoplasmic membrane. The enzyme has been proposed to be part of an electron transport chain with H<sub>2</sub> as electron donor and the heterodisulfide (CoM-S-S-CoB) as electron acceptor [34,36]. Hence, the H<sub>2</sub> generated by Ech hydrogenase may diffuse to the extracellular side of the cytoplasmic membrane where it is recaptured by Vho hydrogenase. The reduction of CoM-S-S-CoB by H<sub>2</sub> in acetate metabolism could involve the same electron transport chain as in H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> metabolism. The growth of *Methanosarcina* in cell aggregates would have enormous benefit for the genus because hydrogen lost by one cell could be regained by an adjacent cell.

An alternative model suggests that *Methanosarcina* species contain an electron transport chain that directly channels electrons from carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase via the ferredoxin to heterodisulfide reductase. Such a CO:heterodisulfide oxidoreductase activity has been



**Fig. 7. Scheme for the proposed function of Ech hydrogenase.** The data presented indicate that an *M. barkeri* 2[4Fe-4S] ferredoxin (Fd) mediates electron transfer between carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase and Ech hydrogenase. During growth on acetate Ech hydrogenase is assumed to produce H<sub>2</sub> with reducing equivalents generated in the oxidation of the carbonyl-group of acetate to CO<sub>2</sub>, as shown in the scheme. During growth on methanol or H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> the enzyme may function as hydrogen uptake hydrogenase and may generate reducing equivalents for the synthesis of acetyl-CoA from methyl-tetrahydroscarinapterin (CH<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>SPT) and CO<sub>2</sub>. CODH/ACS, carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase.



reconstituted with purified carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase, ferredoxin, washed membranes and partially purified heterodisulfide reductase [43]. Because this *in vitro* system still contained the membrane fraction and thus both membrane-bound hydrogenases, Vho and Ech, it cannot be excluded that H<sub>2</sub> is an intermediate in this system. A similar reconstitution experiment was performed later on by Simianu *et al.* [44] with purified carbon monoxide dehydrogenase/acetyl-CoA synthase, ferredoxin and purified heterodisulfide reductase. This system catalyzed reduction of the heterodisulfide by CO but the catalytic efficiency coefficient was calculated to be  $2.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , which led to the conclusion that the ferredoxin is not a physiological electron donor of heterodisulfide reductase [44]. The  $k_{\text{cat}}/K_m$  of Ech hydrogenase for ferredoxin is about 800-fold higher in the H<sub>2</sub> uptake assay and about 175-fold higher in the H<sub>2</sub> formation assay than that of heterodisulfide reductase, which supports our assumption that the ferredoxin is the physiological electron donor or acceptor of Ech hydrogenase.

The 'intraspecies H<sub>2</sub> cycling model' might offer the advantage of having two energy coupling sites in the electron transfer chain between the ferredoxin and the heterodisulfide (CoM-S-S-CoB). The reduction of the heterodisulfide CoM-S-S-CoB with H<sub>2</sub> is a well established energy coupling step in the metabolism of *Methanosarcina* [45]. Based on its similarity to complex I and based on the finding that the conversion of CO to CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>, as catalyzed by cell suspensions of *M. barkeri*, is coupled to the generation of a proton-motive force [37,41], it is tempting to speculate that Ech hydrogenase functions as proton pump and forms a second site of energy conservation in this electron transport chain.

The generation of H<sub>2</sub> from reducing equivalents formed in the oxidation of the carbonyl group of acetate seems to be not the only function of Ech hydrogenase because the enzyme is produced in substantial amounts in methanol and H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>-grown cells. It has been previously shown that H<sub>2</sub> is an efficient electron donor for acetyl-CoA synthesis from methyl-tetrahydroscarinapterin, CoA and CO<sub>2</sub>. For this reaction acetyl-CoA synthase, ferredoxin and a hydrogenase present in a high molecular mass fraction of a gel filtration column were necessary [31]. The data presented here indicate that Ech is the hydrogenase involved in this reaction. At the H<sub>2</sub> partial pressures found in the natural habitats (1–10 Pa) synthesis of acetyl-CoA becomes endergonic with H<sub>2</sub> as electron donor. Reversed electron transport might be used to overcome this thermodynamic barrier. Therefore we propose that during

growth of *M. barkeri* under autotrophic conditions Ech hydrogenase catalyzes the H<sub>2</sub> dependent reduction of the ferredoxin driven by the proton-motive force. This is also supported by the finding of Bott and Thauer that the synthesis of CO from CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>, catalyzed by cell suspensions of *M. barkeri* and other methanogens, is driven by the proton-motive force [46].

We have recently shown, that in *Methanobacterium thermoautotrophicum*, a methanogen that can only utilize H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> as energy substrates, two gene clusters are expressed that encode enzymes similar to Ech hydrogenase from *M. barkeri*. For these enzymes a role in endergonic reductions, such as the synthesis of acetyl-CoA, has been proposed [47].

The members of the *E. coli* hydrogenase 3-type hydrogenases are related to energy conserving NADH:quinone oxidoreductase (complex I). *E. coli* complex I can be cleaved into three distinct fragments, the NADH-dehydrogenase fragment, the connecting fragment and the membrane fragment, which are thought to represent modules with distinct functions [48]. The NADH-dehydrogenase fragment is formed by three subunits and mediates electron transfer from NADH to various artificial electron acceptors. This module is thought to function as the isopotential electron-input device and is thought to reduce the iron-sulfur clusters of the connecting fragment. Subunits with sequence similarity to subunits of this module are not found in Ech hydrogenase and related hydrogenases.

In contrast, the four subunits which form the connecting fragment of *E. coli* complex I have homologues in the membrane-bound hydrogenases. These are the four conserved hydrophilic subunits found in Ech hydrogenase and related hydrogenases. The connecting fragment of complex I harbors iron-sulfur cluster(s) N-2, which have a pH dependent midpoint redox potential and have been suggested to be part of a proton-pumping redox device [49,50].

Two of the seven subunits which form the membrane fragment of *E. coli* complex I are also conserved in the membrane-bound hydrogenases.

The data presented in this work indicate that the ferredoxin functions as the electron input-device of Ech hydrogenase and thus might have a similar function as the NADH-dehydrogenase module of complex I. Electron transfer proceeds most probably via the two [4Fe-4S] clusters of subunit EchF (the homologue of subunit NuoI of the *E. coli* complex I) and via the iron-sulfur cluster of subunit EchC (the homologue of NuoB) to the

[NiFe] active site present on subunit EchE (the homologue of NuoD), where two H<sup>+</sup> are reduced to H<sub>2</sub>. The enzyme can also operate in the reverse direction and can reduce the ferredoxin with H<sub>2</sub> as electron donor.

For Ech hydrogenase a quinone can be excluded as electron acceptor and also the methanogenic coenzyme methanophenazine seems not to function as electron acceptor of this enzyme. This is probably the most pronounced difference to NADH:quinone oxidoreductase (complex I), where quinones function as the physiological electron acceptor. If Ech hydrogenase is a proton pump, as we propose, proton translocation cannot involve a quinone cycle mechanism. A conformational change in the hydrophilic part of the enzyme has to be coupled to vectorial translocation of H<sup>+</sup> across the cytoplasmic membrane.

CO-induced hydrogenase from *R. rubrum*, which has been partially purified, catalyzes hydrogen formation with reducing equivalents generated in the oxidation of CO to CO<sub>2</sub>, catalyzed by carbon monoxide dehydrogenase. The electron carrier(s) mediating electron transfer between both enzymes have not yet been identified; probably also a ferredoxin is involved. Hydrogen formation is the physiological reaction catalyzed by this enzyme. This is also reflected by the kinetic properties of the enzyme because it catalyzes hydrogen formation at 22-fold higher rates than hydrogen uptake [17]. There is no obvious function for a quinone to participate in this reaction or to function as electron acceptor of CO-induced hydrogenase.

*E. coli* hydrogenase 3 (Hyc) under physiological conditions also functions as hydrogen forming hydrogenase with reducing equivalents generated in the oxidation of formate to CO<sub>2</sub>. Cell suspensions of *E. coli* grown under fermenting conditions were also found to catalyze the reverse reaction, the formation of formate from CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> [51]. The *hyc* operon encodes a 4[4Fe-4S] ferredoxin (HycB) which might mediate electron transfer between formate dehydrogenase and hydrogenase [13,14]. There is also no obvious function for a quinone to participate in this reaction or to function as electron acceptor of Hyc.

From the present data it may be concluded that the three hydrogenases, Ech, Hyc and Co, catalyze related reactions. Reducing equivalents generated in the oxidation of a low potential electron donor (formate, carbon monoxide or the carbonyl group of acetate) are passed to the respective hydrogenase where protons are reduced to H<sub>2</sub>. Ech hydrogenase might also be involved in the catalysis of the reverse reaction, reduction of a low potential electron acceptor by H<sub>2</sub>. Ech hydrogenase, the only member of this hydrogenase family that has been purified, will be used in future studies for a characterization of the redox centers of this enzyme which might allow a more detailed comparison to complex I and to standard [NiFe] hydrogenases.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Max-Planck-Gesellschaft, by the Deutsche Forschungsgemeinschaft, and by the Fonds der Chemischen Industrie.

## REFERENCES

- Deppenmeier, U., Müller, V. & Gottschalk, G. (1996) Pathways of energy conservation in methanogenic archaea. *Arch. Microbiol.* **165**, 149–163.
- Ferry, J.G. (1999) Enzymology of one-carbon metabolism in methanogenic pathways. *FEMS Microbiol. Rev.* **23**, 13–38.
- Thauer, R.K. (1998) Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. *Microbiology* **144**, 2377–2406.
- Fiebig, K. & Friedrich, B. (1989) Purification of the F<sub>420</sub>-reducing hydrogenase from *Methanosarcina barkeri* (strain Fusaro). *Eur. J. Biochem.* **184**, 79–88.
- Michel, R., Massanz, C., Kostka, S., Richter, M. & Fiebig, K. (1995) Biochemical characterization of the 8-hydroxy-5-deazaflavin-reactive hydrogenase from *Methanosarcina barkeri* Fusaro. *Eur. J. Biochem.* **233**, 727–735.
- Vaupel, M. & Thauer, R.K. (1998) Two F<sub>420</sub>-reducing hydrogenases in *Methanosarcina barkeri*. *Arch. Microbiol.* **169**, 201–205.
- Kemner, J.M. & Zeikus, J.G. (1994) Purification and characterization of membrane bound hydrogenase from *Methanosarcina barkeri* MS. *Arch. Microbiol.* **161**, 47–54.
- Deppenmeier, U., Blaut, M., Schmidt, B. & Gottschalk, G. (1992) Purification and properties of a F<sub>420</sub>-nonreactive, membrane-bound hydrogenase from *Methanosarcina* strain Gö1. *Arch. Microbiol.* **157**, 505–511.
- Deppenmeier, U., Blaut, M., Lenters, S., Herzberg, C. & Gottschalk, G. (1995) Analysis of the *whoGAC* and *vhtGAC* operons from *Methanosarcina mazei* strain Gö1, both encoding a membrane-bound hydrogenase and a cytochrome *b*. *Eur. J. Biochem.* **227**, 261–269.
- Deppenmeier, U. (1995) Different structure and expression of the operons encoding the membrane-bound hydrogenases from *Methanosarcina mazei* Gö1. *Arch. Microbiol.* **164**, 370–376.
- Künkel, A., Vorholt, J.A., Thauer, R.K. & Hedderich, R. (1998) An *Escherichia coli* hydrogenase-3-type hydrogenase in methanogenic archaea. *Eur. J. Biochem.* **252**, 467–476.
- Künkel, A., Vaupel, M., Heim, S., Thauer, R.K. & Hedderich, R. (1997) Heterodisulfide reductase from methanol-grown cells of *Methanosarcina barkeri* is not a flavoenzyme. *Eur. J. Biochem.* **244**, 226–234.
- Böhm, R., Sauter, M. & Böck, A. (1990) Nucleotide sequence and expression of an operon in *Escherichia coli* coding for formate hydrogenlyase components. *Mol. Microbiol.* **4**, 231–243.
- Sauter, M., Böhm, R. & Böck, A. (1992) Mutational analysis of the operon (*hyc*) determining hydrogenase 3 formation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **6**, 1523–1532.
- Andrews, S.C., Berks, B.C., McClay, J., Ambler, A., Quail, M.A., Golby, P. & Guest, J.R. (1997) A 12-cistron *Escherichia coli* operon (*hyf*) encoding a putative proton-translocating formate hydrogenlyase system. *Microbiology* **143**, 3633–3647.
- Fox, J.D., He, Y., Shelver, D., Roberts, G.P. & Ludden, P.W. (1996) Characterization of the region encoding the CO-induced hydrogenase of *Rhodospirillum rubrum*. *J. Bacteriol.* **178**, 6200–6208.
- Fox, J.D., Kerby, R.L., Roberts, G.P. & Ludden, P.W. (1996) Characterization of the CO-induced, CO-tolerant hydrogenase from *Rhodospirillum rubrum* and the gene encoding the large subunit of the enzyme. *J. Bacteriol.* **178**, 1515–1524.
- Friedrich, T. & Weiss, H. (1997) Modular evolution of the respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase and the origin of its modules. *J. Theor. Biol.* **187**, 529–540.
- Karrasch, M., Bott, M. & Thauer, R.K. (1989) Carbonic anhydrase activity in acetate grown *Methanosarcina barkeri*. *Arch. Microbiol.* **151**, 137–142.
- Zinder, S.H. & Mah, R.A. (1979) Isolation and characterization of a thermophilic strain of *Methanosarcina* unable to use H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub> for methanogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **38**, 996–1008.
- Willstätter, R. & Müller, F. (1911) Zur Kenntnis der o-Chinone. *Chem. Ber.* **44**, 2171–2185.
- Fischer, R. & Thauer, R.K. (1990) Ferredoxin-dependent methane formation from acetate in cell extracts of *Methanosarcina barkeri* (strain MS). *FEBS Lett.* **269**, 368–372.
- Grahame, D.A. (1991) Catalysis of acetyl-CoA cleavage and tetrahydrocarinapterin methylation by a carbon monoxide dehydrogenase–corrinoid enzyme complex. *J. Biol. Chem.* **266**, 22227–22233.
- Wilhelm, E., Battino, R. & Wilcock, R.J. (1977) Low-pressure solubility of gases in liquid water. *Chem. Rev.* **77**, 219–238.

25. Chen, J.-S. & Blanchard, D.K. (1979) A simple hydrogenase-linked assay for ferredoxin and flavodoxin. *Anal. Biochem.* **93**, 216–222.
26. Fish, W.W. (1988) Rapid colorimetric micromethod for the quantitation of complexed iron in biological samples. In *Methods in Enzymology* (Riordan, J.F. & Vallee, B.L., eds), pp. 357–364. Academic Press, New York, USA.
27. Cline, J.D. (1969) Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters. *Limnol. Oceanogr.* **14**, 454–458.
28. 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.
29. Smith, P.K., Krohn, R.L., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. & Klenk, D.C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76–85.
30. Fauque, G., Peck, H.D.J., Moura, J.J.G., Huynh, B.H., Berlier, Y., DerVartanian, D.V., Teixeira, M., Przybyla, A.E., Moura, I. & LeGall, J. (1988) The three classes of hydrogenases from sulfate-reducing bacteria of the genus *Desulfovibrio*. *FEMS Microbiol. Rev.* **54**, 299–344.
31. Grahame, D.A. & DeMoll, E. (1995) Substrate and accessory protein requirements and thermodynamics of acetyl-CoA synthesis and cleavage in *Methanosarcina barkeri*. *Biochemistry* **34**, 4617–4624.
32. Kemner, J.M. & Zeikus, J.G. (1994) Regulation and function of ferredoxin-linked versus cytochrome *b*-linked hydrogenase in electron transfer and energy metabolism of *Methanosarcina barkeri* MS. *Arch. Microbiol.* **162**, 26–32.
33. Friedrich, T., Strohdrecher, M., Hofhaus, G., Preis, D., Sahn, H. & Weiss, H. (1990) The same domain motif for ubiquinone reduction in mitochondrial or chloroplast NADH dehydrogenase and bacterial glucose dehydrogenase. *FEBS Lett.* **265**, 37–40.
34. Abken, H.J., Tietze, M., Brodersen, J., Bäumer, S., Beifuss, U. & Deppenmeier, U. (1998) Isolation and characterization of methanophenazine and function of phenazines in membrane-bound electron transport of *Methanosarcina mazei* Gö1. *J. Bacteriol.* **180**, 2027–2032.
35. Fox, J.A., Livingston, D.J., Orme-Johnson, W.H. & Walsh, C.T. (1987) 8-Hydroxy-5-deazaflavin-reducing hydrogenase from *Methanobacterium thermoautotrophicum*: 1. Purification and characterization. *Biochemistry* **26**, 4219–4227.
36. Brodersen, J., Bäumer, S., Abken, H.J., Gottschalk, G. & Deppenmeier, U. (1999) Inhibition of membrane-bound electron transport of the methanogenic archaeon *Methanosarcina mazei* Gö1 by diphenyleneiodonium. *Eur. J. Biochem.* **259**, 218–224.
37. Bott, M., Eikmanns, B. & Thauer, R.K. (1986) Coupling of carbon monoxide oxidation to CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> with the phosphorylation of ADP in acetate-grown *Methanosarcina barkeri*. *Eur. J. Biochem.* **159**, 393–398.
38. Lovley, D.R. & Ferry, J.G. (1985) Production and consumption of hydrogen during growth of *Methanosarcina*-spp on acetate. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 247–249.
39. Krzycki, J.A., Morgan, J.B., Conrad, R. & Zeikus, J.G. (1987) Hydrogen metabolism during methanogenesis from acetate by *Methanosarcina barkeri*. *FEMS Microbiol. Lett.* **40**, 193–198.
40. Ahring, B.K., Westermann, P. & Mah, R.A. (1991) Hydrogen inhibition of acetate metabolism and kinetics of hydrogen consumption by *Methanosarcina thermophila* TM-1. *Arch. Microbiol.* **157**, 38–42.
41. Bott, M. & Thauer, R.K. (1989) Proton translocation coupled to the oxidation of carbon monoxide to CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> in *Methanosarcina barkeri*. *Eur. J. Biochem.* **179**, 469–472.
42. Terlesky, K.C. & Ferry, J.G. (1988) Ferredoxin requirement for electron transport from the carbon monoxide dehydrogenase complex to a membrane-bound hydrogenase in acetate-grown *Methanosarcina thermophila*. *J. Biol. Chem.* **263**, 4075–4079.
43. Peer, C.W., Painter, M.H., Rasche, M.E. & Ferry, J.G. (1994) Characterization of a CO<sub>2</sub>:heterodisulfide oxidoreductase system from acetate-grown *Methanosarcina thermophila*. *J. Bacteriol.* **176**, 6974–6979.
44. Simianu, M., Murakami, E., Brewer, J.M. & Ragsdale, S.W. (1998) Purification and properties of the heme- and iron-sulfur-containing heterodisulfide reductase from *Methanosarcina thermophila*. *Biochemistry* **37**, 10027–10039.
45. Deppenmeier, U., Blaut, M. & Gottschalk, G. (1991) H<sub>2</sub>:heterodisulfide oxidoreductase a second energy-conserving system in the methanogenic strain Gö1. *Arch. Microbiol.* **155**, 272–277.
46. Bott, M. & Thauer, R.K. (1987) Proton-motive-force-driven formation of CO from CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub> in methanogenic bacteria. *Eur. J. Biochem.* **168**, 407–412.
47. Tersteegen, A. & Hedderich, R. (1999) *Methanobacterium thermoautotrophicum* encodes two multi-subunit membrane-bound [NiFe] hydrogenases. Transcription of the operons and sequence analysis of the deduced proteins. *Eur. J. Biochem.* (in press).
48. Leif, H., Sled, V.D., Ohnishi, T., Weiss, H. & Friedrich, T. (1995) Isolation and characterization of the proton-translocating NADH: ubiquinone oxidoreductase from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **230**, 538–548.
49. Inglede, W.J. & Ohnishi, T. (1980) An analysis of some thermodynamic properties of iron-sulphur centres in site I of mitochondria. *Biochem. J.* **186**, 111–117.
50. van Belzen, R., Kotlyar, A.B., Moon, N., Dunham, W.R. & Albracht, S.P.J. (1997) The iron-sulfur clusters 2 and ubisemiquinone radicals of NADH:ubiquinone oxidoreductase are involved in energy coupling in submitochondrial particles. *Biochemistry* **36**, 886–893.
51. Woods, D.D. (1936) LXXVII. Hydrogenlyases. IV. The synthesis of formic acid by bacteria. *Biochem. J.* **30**, 515–527.

**Hochschullehrer:**

Professor Dr. Dr. h.c. W. Adam, Professor Dr. H. Beier, Professor Dr. U. Brandt, Professor Dr. G. Bringmann, Professor Dr. M. Christel, Professor Dr. E. Egert, Professor Dr. V. Engel, Professor Dr. J.W. Engels, Professor Dr. M. Göbel, Professor Dr. C. Griesinger, Professor Dr. H.J. Gross, Professor Dr. P. Hammann, Professor Dr. R. Hedderich, Professor Dr. Dr. h.c. S. Hünig, Professor Dr. W. Kiefer, Professor Dr. R. Laufs, Professor Dr. H. Malisch, Professor Dr. H. Quast, Professor Dr. G. Quinkert, Professor Dr. D. Rehm, Professor Dr. H. Schenk, Professor Dr. M. Schmittel, Professor Dr. F.W. Schneider, Professor Dr. H. Stalke, Professor Dr. H. Schwalbe, Professor Dr. R. Thauer, Professor Dr. R. Tacke, Professor Dr. H. Werner.

## Lebenslauf

### PERSÖNLICHE DATEN

Name: Stefan Bartoschek  
Geburtstag: 27.04.1971  
Geburtsort: Hamburg  
Familienstand: ledig

### SCHULBILDUNG, WEHRDIENST

1977 – 1981 Katholische Grundschule Eberhofsweg in Hamburg  
1981 – 1990 Katholisches Privat-Gymnasium Sankt-Ansgar-Schule in Hamburg;  
Abschluß 1990 Abitur (sehr gut)  
1990 – 1991 Grundwehrdienst in Munster / Heide

### HOCHSCHULBILDUNG

1991 – 1993 Grundstudium im Fach Chemie (Diplom) an der Universität  
Würzburg; Abschluß 1993 Vordiplom (Note: sehr gut)  
1993 – 1997 Hauptstudium im Fach Chemie (Diplom) an der Universität  
Würzburg; Abschluß 1997 Diplom (Note: sehr gut)  
1996 - 1997 Diplomarbeit bei Professor Tacke am Institut für Anorganische  
Chemie der Universität Würzburg. (Stipendium der Hoechst AG)  
Thema: „Synthese Silicium- und Germanium-haltiger  $\alpha$ -  
Aminosäuren“

### PROMOTION

Seit 1997 Doktorarbeit bei Professor Griesinger am Lehrstuhl für Organische  
Chemie der Universität Frankfurt in Zusammenarbeit mit der  
Arbeitsgruppe von Professor Thauer am MPI in Marburg. (Kekulé-  
Stipendium des Fonds der Chemischen Industrie) Thema: „NMR-  
spektroskopische Untersuchungen zu Protein-Ligand-  
Wechselwirkungen“

## Dank

Mein besonderer Dank gilt Professor Dr. C. Griesinger und Professor Dr. R. K. Thauer für Ihre Anregungen zu dieser Arbeit, die flexible Betreuung, die hilfreichen Diskussionen sowie die Förderung jeder Art. Sie hatten stets ein offenes Ohr für meine Fragen und waren immer mit Ihrer fachlichen Kompetenz bei der kritischen Diskussion meiner Ergebnisse eine wertvolle Hilfe.

Außerdem danke ich:

Meinen Freunden dafür, daß 28 immer noch eine besondere Zahl ist.

Allen Mitarbeitern der Arbeitskreise von Professor Dr. C. Griesinger und Professor Dr. R. Thauer für die freundschaftliche Atmosphäre während meiner Dissertation.

Wolfgang Peti dafür, daß ich das ein oder andere Kabinettstückchen auf dem Platz bewundern durfte und ich immer einen zuverlässigen Freund vor Ort hatte.

Dr. Bernhard Geierstanger für die verlässliche Art bei den Kooperationen zu allen Projekten der Arbeit.

Dr. Julia Vorholt, Christoph Hagemeyer und Meike Goenrich für die vertraute Atmosphäre auf dem Carbamat-, MtdA- und Gfa-Projekt.

Professor Dr. U. Brandt, Malin Johansson, C.R.D. Lancaster und E. Humpfer für die kameradschaftliche Zusammenarbeit bei dem Cytochrom  $bc_1$  Komplex-Projekt.

Jan Weyrauch, Dr. Volkhard Helms, Michael Hutter, Dr. Gerrit Buurman und Professor Michael Nilges für die dynamische Kooperation beim  $H_4MPT$ -Projekt.

Christian von der Heyden, Michael Czech, Julia Vorholt, Christoph Hagemeyer, Karin Sauer, Julia Janzon, Heike Neubauer, Julia Wirmer und Elke Stinal für das sorgfältige Korrekturlesen dieser Arbeit.

Michaela Wicke, Felix Mahler, Dr. Karin Sauer und Dr. Birgit Hippler für die das fröhliche und fürsorgliche Klima im Labor A.1.05.

Johanna Moll und Reinhard Böcher für die Reinigung auch von  $H_4MPT$ .

Dirk Bockelmann, Wolfgang Peti und Christian von der Heyden für das bemerkenswerte Engagement als Superuser.

Professor Dr. Peter Hammann und Professor Dr. H. Schwalbe für Ihre strategische Beratung.

Dem Fonds der Chemischen Industrie und der Max-Planck-Gesellschaft, durch deren Mittel diese Arbeit gefördert wurde.

Bei meiner Familie, die mich im Verlauf des Studiums in jeder Hinsicht unterstützt hat. Und bei meiner Freundin Julia für Ihre liebevolle Art und die Geduld.

**Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Zuhilfenahme der genannten Literatur und der erwähnten Hilfsmittel angefertigt habe.

Frankfurt am Main,

Stefan Bartoschek