

**Titre de l'expérience :**Etudes cristallographiques de l'hydrogénase de  
*Desulfomicroium baculatum***Numéro de  
l'expérience :**  
**LS-499****Beamline:**  
BM2/D2AM**Date de l'expérience:**

du : 26/10/96 au : 28/10/96

**Date du  
rapport:**  
09/10/97**Shifts:**

3

**Local contact(s):**

J.L. Ferrer

Reçu par le CRG D2AM:

**Nom et adresse du responsable de projet :**

Juan Fontecilla-Camps

Laboratoire de Cristallogénèse et Cristallographie des Protéines

Institut de Biologie Structurale

41, avenue des Martyrs 38027 Grenoble Cédex 1 France

tél.: 04 76 88 59 20 e-mail : juan@lccp.ibs.fr

**Noms et adresses des utilisateurs :**

Elsa GARCIN

elsa@lccp.ibs.fr

Anne Volbeda

volbeda@lccp.ibs.fr

Michel Frey

frey@lccp.ibs.fr

Xavier Vemede

xavier@lccp.ibs.fr

Yael MONTET

yael@lccp.ibs.fr

**Rapport :**

Deux grands types d'hydrogénases peuvent être distingués selon leur contenu métallique (1): les hydrogénases à fer seulement et les hydrogénases à [NiFe], possédant un sous-groupe: les hydrogénases à [NiFeSe]. Des études de spectroscopie d'absorption des rayons X aux seuils du nickel et du sélénium ainsi que des études de RPE sur l'hydrogénase à [NiFeSe] de *Desulfomicrobium baculatum* enrichie en <sup>77</sup>Se ont montré qu'une des cysteines ligands du nickel chez les hydrogénases à [NiFe] est remplacée par une sélénocysteine (2). Une expérience de dispersion anormale au seuil du selenium a également permis de confirmer sa présence au site actif et comme étant un des ligands du nickel.

Une des différences principales entre les 2 classes est la réaction d'échange H<sub>2</sub>/HD; le rapport H<sub>2</sub>/HD qui a en général une valeur inférieure à 0.5 chez les protéines à [NiFe], pourrait prendre une valeur supérieure à 1 pour les hydrogénases à [NiFeSe]. Il semblerait donc que la présence de sélénium au site actif ait un effet important sur l'activité catalytique de l'enzyme

Un enregistrement a été effectué à 100K sur un cristal réduit ayant poussé en anaérobiose. Un très bon jeu de données à 2.135 Å de résolution a été obtenu: avec R=9.1% et Complétude=96.6%. La maille est orthorhombique avec les paramètres suivants: a=110.4Å b=63.7Å c=99.6Å, et  $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$  et le groupe d'espace est P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub> avec une molécule par unité asymétrique et un pourcentage de solvant de 37.5%. Le modèle de *D. gigas* à 2.54Å (3) a servi de modèle de départ pour le remplacement moléculaire. L'affinement avec XPLOR ainsi que plusieurs étapes de construction manuelle à l'écran avec le programme O ont permis l'obtention d'un modèle final de très bonne qualité. La dernière phase d'affinement a été réalisée avec REFMAC et a conduit à un facteur R de 18.9% et un facteur Rfree de 24.9%. Environ 300 molécules d'eau ont pu être ajoutées au modèle.

(1) G. Fauque, H.D. Peck Jr, J.J.G. Moura, B.H. Huynh, Y. Berlier, D.V. DerVartanian, M. Teixeira, A.E. Przybyla, P.A. Lespinat, I. Moura and J. LeGall, *FEMS Micr. Rev.* **54**, 299-344 (1988).

(2) S. H. He, M. Teixeira, J. LeGall, D.S. Patil, I. Moura, J.J.G. Moura, D.V. DerVartanian, B.H. Huynh and H.D. Peck Jr., *J. Biol. Chem.* **264**, 2678-2682 (1989)

(3) A. Volbeda, E. Garcin, C. Piras, A. L. de Lacey, V. M. Fernandez, E. C. Hatchikian, M. Frey, J. C. Fontecilla-Camps, *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 12989-12996 (1996).