

Enzyme des Zuckerstoffwechsels aus hyperthermophilen und halophilen Archaea:

**Charakterisierung von Pyruvat Kinasen, Phosphoglycerat Mutasen
und einer Xylose Dehydrogenase**



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Ulrike Johnsen

- Kiel 2003 -

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Januar 2000 bis Januar 2003 am Institut für Allgemeine Mikrobiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel im Labor von Herrn Prof. Dr. P. Schönheit durchgeführt.

Referent: Prof. Dr. P. Schönheit

Korreferent: Prof. Dr. J.F. Imhoff

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Juni 2003

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 11. Juni 2003

Der Dekan

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst und nur die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Diese Arbeit war bisher noch nicht Bestandteil eines Prüfungsverfahrens, andere Promotionsversuche wurden nicht unternommen.

.....

(Ulrike Johnsen)

Ein Teil der während der Doktorarbeit erzielten Ergebnisse ist in dem folgenden Artikel veröffentlicht worden:

Comparative Analysis of Pyruvate Kinases from the Hyperthermophilic Archaea *Archaeoglobus fulgidus*, *Aeropyrum pernix*, and *Pyrobaculum aerophilum* and the Hyperthermophilic Bacterium *Thermotoga maritima*: Unusual regulatory properties in hyperthermophilic Archaea

Im Druck; J. Biol. Chem. 2003, Vol. 278

elektronische Veröffentlichung <http://www.jbc.org/cgi/reprint/M210288200v1.pdf>

Inhalt

1	Zusammenfassung.....	6
2	Summary.....	8
3	Einleitung.....	10
4	Material und Methoden.....	18
4.1	Wachstum von Organismen.....	18
4.1.1	Züchtung von <i>Archaeoglobus fulgidus</i>	18
4.1.2	Züchtung von <i>Thermotoga maritima</i>	18
4.1.3	Züchtung von <i>Haloarcula marismortui</i>	18
4.2	Molekularbiologische Methoden.....	19
4.2.1	Computergestützte Sequenzanalysen.....	19
4.2.2	Isolierung von genomischer DNA.....	19
4.2.3	Polymerase Kettenreaktion.....	20
4.2.4	Konzentrationsbestimmung und Reinheitsanalyse von DNA.....	23
4.2.5	Klonierung von PCR-Produkten in einen Vektor.....	24
4.2.6	Transformation.....	25
4.2.7	Sequenzierung.....	26
4.2.8	Expression.....	26
4.2.9	Ortsspezifische Mutagenese.....	27
4.2.10	RT-PCR mit RNA.....	28
4.3	Proteinbiochemische Methoden.....	30
4.3.1	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	30
4.3.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	30
4.3.3	Blotten und N-terminale Aminosäuresequenzierung.....	31
4.3.4	Apparentes Molekulargewicht von nativen Proteinen.....	32
4.3.5	Ultrafiltration.....	32
4.3.6	Reinigung von nativen Proteinen.....	32
4.3.7	Reinigung von rekombinanten Proteinen.....	35
4.4	Charakterisierung von gereinigten Enzymen.....	37
4.4.1	Charakterisierung der Pyruvat Kinasen (PK).....	37
4.4.2	Charakterisierung der Phosphoglycerat Mutasen (PGM).....	39
4.4.3	Charakterisierung der Xylose Dehydrogenase.....	41
4.5	Wachstumsbilanz auf Xylose und Enzymaktivitäten im Rohextrakt.....	41
4.5.1	Enzymmessung in Rohextrakten.....	41
4.5.2	Bestimmung von Substraten.....	42

4.5.3	Wachstumsbilanz von <i>Ha. marismortui</i> auf Xylose	44
5	Ergebnisse	45
5.1	Pyruvat Kinasen aus hyperthermophilen Archaea und Bacteria (<i>Thermotoga</i>).....	45
5.1.1	Reinigung der archaeellen PKs	46
5.1.2	Biochemische Charakterisierung der archaeellen PKs.....	48
5.1.3	Reinigung und Charakterisierung der PK aus dem hyperthermophilen Bakterium <i>T. maritima</i>	55
5.1.4	Untersuchungen zur Abhängigkeit der PK aus <i>T. maritima</i> von monovalenten Kationen durch ortsspezifische Mutagenese	61
5.2	Phosphoglycerat Mutasen aus Archaea.....	65
5.2.1	Identifizierung und Charakterisierung einer iPGM aus <i>A. fulgidus</i>	65
5.2.2	Identifizierung und Charakterisierung einer dPGM aus <i>T. acidophilum</i>	68
5.3	Xylose Dehydrogenase, das erste Enzym des Xyloseabbaus, aus dem halophilen Archaeon <i>Ha. marismortui</i>	72
5.3.1	Wachstum von <i>Ha. marismortui</i> auf Xylose.....	72
5.3.2	Enzyme des Xyloseabbaus	73
5.3.3	Induktion der Xylose Dehydrogenase beim Wachstum auf Xylose.....	74
5.3.4	Reinigung der Xylose Dehydrogenase aus <i>Ha. marismortui</i>	75
5.3.5	Biochemische Charakterisierung der Xylose Dehydrogenase	76
6	Diskussion	79
6.1	Pyruvat Kinasen aus hyperthermophilen Archaea und Bacteria (<i>Thermotoga</i>).....	79
6.2	Phosphoglycerat Mutasen aus Archaea.....	87
6.3	Xylose Dehydrogenase, das erste Enzym des Xyloseabbaus, aus dem halophilen Archaeon <i>Ha. marismortui</i>	92
6	Literatur	96
Anhang	104	
Abkürzungen	105	
Danksagung	107	
Lebenslauf	108	

1 Zusammenfassung

Untersuchungen zum Zuckerstoffwechsel der Archaea haben ergeben, dass Glucose und Hexosepolymere über modifizierte glykolytische Abbauwege, häufig über modifizierte Embden-Meyerhof Wege, umgesetzt werden. Über die Regulation dieser modifizierten glykolytischen Abbauwege in Archaea ist wenig bekannt, z.B. sind Pyruvat Kinasen als potentiell allosterische Enzyme kaum untersucht. Ebenso sind Phosphoglycerat Mutasen wenig untersucht. Schließlich liegen auch zum Abbau von Pentosen in Archaea keine Ergebnisse vor. Daher wurden in dieser Arbeit Untersuchungen zu den folgenden drei Enzymen des archaeellen Zuckerstoffwechsels durchgeführt: Pyruvat Kinasen und Phosphoglycerat Mutasen aus hyperthermophilen Archaea und eine Xylose Dehydrogenase, das erste Enzym des Xyloseabbaus, aus dem halophilen Archaeon *Haloarcula marismortui*.

Pyruvat Kinasen aus Archaea und aus dem Bakterium *Thermotoga maritima*

Pyruvat Kinasen (PK) aus Bacteria und Eukarya sind allosterisch regulierte Enzyme, wobei AMP und Fructose-1,6-bisphosphat als positiv allosterische Effektoren und ATP als negativ allosterischer Effektor fungieren. In dieser Arbeit wurden drei archaeelle hyperthermophile PKs aus *Archaeoglobus fulgidus* Stamm 7324, *Pyrobaculum aerophilum* und aus *Aeropyrum pernix* gereinigt und charakterisiert. Insbesondere wurden ihre regulatorischen Eigenschaften untersucht. Zum Vergleich wurde die PK aus dem hyperthermophilen Bakterium *Thermotoga maritima* charakterisiert.

Die PKs der drei Archaea sind 200 kDa Homotetramere mit hohen Temperaturoptima und extremen Thermostabilitäten bis 100°C. Die Enzyme zeigten mit den Substraten Phosphoenolpyruvat und ADP sigmoidale Sättigungskinetiken, was auf eine positiv homotrope kooperative Bindung der Substrate hindeutet. Klassische heterotrope allosterische Regulatoren von PKs aus Bacteria und Eukarya hatten keinen Einfluss auf die Aktivität der archaeellen PKs, was für eingeschränkte regulatorische Eigenschaften spricht. Die PK aus dem Bakterium *T. maritima* ist ebenfalls ein Homotetramer und zeigte, wie die archaeellen PKs, ein hohes Temperaturoptimum, extreme Thermostabilität sowie eine kooperative Bindung von Phosphoenolpyruvat und ADP. Im Gegensatz zu den archaeellen PKs war die PK aus *T. maritima* durch die klassischen Effektoren AMP und ATP allosterisch reguliert. Phylogenetische Analysen mit PK Sequenzen aus allen drei Domänen, inklusive der hier untersuchten hyperthermophilen PKs, ergaben eine eigenständige archaeelle Gruppe, zu der auch die PK aus *T. maritima* gehörte.

Im Gegensatz zu den meisten PKs aus Eukarya und Bacteria war die Aktivität der hyperthermophilen PKs unabhängig von monovalenten Kationen wie Kalium und Ammonium. Kalium-abhängige PKs enthalten innerhalb eines konservierten

Sequenzmotivs ein Glutamat, das vermutlich für die Bindung von Kalium essentiell ist. Um die Rolle des Glutamats zu prüfen wurde in der Kalium-unabhängigen PK aus *T. maritima*, die an der entsprechenden Position ein Lysin enthält, dieses gegen Glutamat ausgetauscht und der Effekt des Austausches auf das mutierte Enzym getestet. Das mutierte Enzym zeigte eine Abhängigkeit von monovalenten Kationen, was die postulierte Rolle dieses Glutamats für die Kaliumbindung unterstreicht.

Phosphoglycerat Mutasen aus Archaea

In Bacteria und Eukarya sind zwei Typen von Phosphoglycerat Mutasen beschrieben, eine 2,3-Bisphosphoglycerat-unabhängige Phosphoglycerat Mutase (iPGM) und eine 2,3-Bisphosphoglycerat-abhängige Phosphoglycerat Mutase (dPGM). Die dPGMs zeigen eine reversible Hemmung mit Vanadat. PGMs in Archaea sind kaum untersucht. In dieser Arbeit wurden eine archaeelle iPGM und die erste archaeelle dPGM charakterisiert.

Im Genom von *Archaeoglobus fulgidus* VC16 wurde ein Gen für eine hypothetische iPGM identifiziert und exprimiert. Das rekombinante Protein wurde als Monomer (46 kDa) charakterisiert und zeigte iPGM Aktivität. Durch RT-PCR Experimente wurde die *in vivo* Transkription der iPGM gezeigt. Phylogenetische Analysen mit Sequenzen von iPGMs aus allen drei Domänen ergaben eine eigenständige Gruppe der archaeellen Enzyme. Im Genom von *Thermoplasma acidophilum* wurde ein Gen für eine hypothetische dPGM identifiziert und exprimiert. Das rekombinante Protein wurde als homodimere dPGM mit 24 kDa Untereinheiten charakterisiert. Die Aktivität war strikt abhängig von 2,3-Bisphosphoglycerat und wurde durch Vanadat reversibel gehemmt.

Xylose Dehydrogenase aus dem halophilen Archaeon *Haloarcula marismortui*

Die Enzyme des Xyloseabbaus in Archaea sind nicht bekannt. In Bacteria werden die ersten Schritte des Xyloseabbaus von einer Xylose Isomerase und einer Xylulose Kinase katalysiert. Diese Enzyme konnten in Xylose-gewachsenen Zellen von *Ha. marismortui* nicht nachgewiesen werden. Stattdessen wurde beim Wachstum auf Xylose eine Xylose Dehydrogenase induziert. Die Xylose Dehydrogenase wurde gereinigt und charakterisiert. Das Enzym ist ein 180 kDa Homotetramer und katalysierte die Oxidation von Xylose zu Xylonat mit NADP^+ als physiologischen Elektronenakzeptor. Das Enzym setzte neben Xylose auch Glucose um, jedoch mit einer 70fach niedrigeren Effizienz. Mit Hilfe der N-terminalen Aminosäuresequenz der Xylose Dehydrogenase wurde im partiell sequenzierten Genom von *Ha. marismortui* das kodierende Gen *xyl dh* identifiziert. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der erste Schritt des Xyloseabbaus in *Ha. marismortui* eine Oxidation von Xylose zu Xylonat ist und nicht eine Isomerisierung von Xylose zu Xylulose, der initiale Schritt des bakteriellen Xyloseabbaus.

2 Summary

Comparative analyses of sugar catabolism revealed that degradation of glucose and hexose polymers in archaea proceeds via modified glycolytic pathways, mainly via modified Embden-Meyerhof pathways. So far regulation of the modified pathways by allosteric enzymes has not been analyzed, e.g. pyruvate kinases as potential allosteric enzymes have not been characterized. Also, little is known about phosphoglycerate mutases being involved in both glycolysis and gluconeogenesis in archaea. Finally, in contrast to the catabolism of hexoses the pathways of pentose catabolism and the enzymes involved have not been analyzed in archaea. Thus, in this thesis the following three enzymes of archaeal sugar metabolism were studied: Pyruvate kinases and phosphoglycerate mutases from hyperthermophilic archaea and xylose dehydrogenase, the first enzyme of xylose degradation, from the halophilic archaeon *Haloarcula marismortui*.

Pyruvate kinases from archaea und from the bacterium *Thermotoga maritima*

Pyruvate kinases (PK) in bacteria and eukarya are well studied enzymes being allosterically regulated by AMP and fructose-1,6-bisphosphate as positive allosteric effectors and by ATP as negative allosteric effector. Most PKs are dependent on potassium. Here, three hyperthermophilic archaeal PKs from *Archaeoglobus fulgidus* strain 7324, *Pyrobaculum aerophilum* and from *Aeropyrum pernix* were purified and characterized. In particular their potential regulatoric properties were analyzed. For comparison the PK from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* was characterized.

Archaeal PKs were 200 kDa homotetrameric enzymes. They showed high temperature optima and were extremely thermostable up to 100°C. All archaeal PKs exhibited sigmoidal saturation kinetics with phosphoenolpyruvate and ADP indicating positive homotropic cooperative response to both substrates. Classical heterotropic allosteric regulators of PKs from eukarya and bacteria, e.g. fructose-1,6-bisphosphate or AMP, did not affect PK activity of hyperthermophilic archaea, suggesting the absence of heterotropic allosteric regulation. The PK from *Thermotoga maritima* was also a homotetramer. The enzyme showed a high temperature optimum and high thermostability, and exhibited cooperative response to phosphoenolpyruvate and ADP. In contrast to its archaeal counterparts, the PK from *Thermotoga maritima* exhibited the classical allosteric response to the activator AMP and the inhibitor ATP. Phylogenetic analysis of PK sequences of all three domains, including the characterized hyperthermophilic PKs, indicate a distinct archaeal cluster which includes the PK from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*.

In contrast to most of the bacterial and eukaryal PKs the activity of the hyperthermophilic PKs was independent on monovalent cations such as potassium and ammonium. Potassium dependent PKs contain a characteristic sequence motif which includes a conserved glutamate which is considered to be essential for the binding of potassium. This glutamate is absent in

potassium independent PKs, e.g. PK of *T. maritima*, which contains a lysine at the equivalent position. This lysine of *T. maritima* PK was substituted by glutamate via site directed mutagenesis. The activity of the mutated enzyme showed dependency on monovalent cations, supporting the postulated role of glutamate for the binding of monovalent cations.

Phosphoglycerate mutases from archaea

Two types of PGMs are known in bacteria and eukarya, one type is independent on the cofactor 2,3-bisphosphoglycerate (dPGM) and the other type is dependent on 2,3-bisphosphoglycerate (dPGM). dPGMs show reversible inhibition of activity by vanadate. Little is known about phosphoglycerate mutases in archaea. In this thesis an iPGM and the first archaeal dPGM were characterized.

In the genome of *Archaeoglobus fulgidus* VC16 a hypothetical iPGM gene was identified and expressed in *E. coli*. The recombinant protein was characterized as a monomer (46 kDa) and showed iPGM activity. Using RT-PCR experiments the *in vivo* transcription of the gene was demonstrated. Phylogenetic analysis of iPGM sequences from all three domains indicate a distinct archaeal cluster. In the genome of *Thermoplasma acidophilum* a hypothetical dPGM gene was identified and expressed in *E. coli*. The recombinant protein was characterized as a homodimer composed of 24 kDa subunits. The dPGM activity required 2,3-bisphosphoglycerate and could be reversibly inhibited by vanadate.

Xylose dehydrogenase from the halophilic archaeon *Haloarcula marismortui*

In archaea nothing is known about the catabolism of pentoses and the enzymes involved. In bacteria the first steps of xylose degradation are catalyzed by xylose isomerase and xylulose kinase. Both enzymes could not be detected in xylose grown cells of *Ha. marismortui*. Instead, during growth on xylose a xylose dehydrogenase was induced. The xylose dehydrogenase was purified and characterized. The enzyme was characterized as a homotetramer (180 kDa) and catalyzes the oxidation of xylose to xylonate with NADP⁺ as physiological electron acceptor. The xylose dehydrogenase also catalyzed the oxidation of glucose but in contrast to xylose the catalytic efficiency was 70fold lower. Thus the dehydrogenase differs from glucose dehydrogenases. Using the N-terminal amino acid sequence of xylose dehydrogenase, the coding gene *xyldh* was identified in the partially sequenced genome of *Ha. marismortui*. The data indicate that the initial reaction of xylose degradation in the halophilic archaeon *Ha. marismortui* involves the oxidation of xylose rather than an isomerization which is the mechanism in bacteria.

3 Einleitung

Sequenzvergleiche von 16 S-rRNA und 18 S-rRNA aus prokaryotischen und eukaryotischen Organismen führten zu einem phylogenetischen Stammbaum des Lebens (Abbildung 1), nach dem sich die Gesamtheit der Organismen in die drei Domänen Eukarya, Bacteria und Archaea gliedern (Woese 1987; Woese et al. 1990). Die meisten Archaea besiedeln Biotope mit extrem hohen Temperaturen, extremen pH-Werten oder extrem hohen Salzkonzentrationen. Die Lebensräume der an hohe Temperaturen angepassten Archaea sind meist in vulkanisch aktiven Zonen zu finden, vor allem in marinen Hydrothermalquellen, submarin erhitzten Sedimenten und terrestrischen Solfataren. Hyperthermophile Organismen, die meisten gehören der Domäne der Archaea an, zeichnen sich durch ein Wachstumsoptimum von über 80°C aus (Stetter 1999). Aus der Domäne der Bacteria sind nur wenige Hyperthermophile bekannt (Abbildung 1), die den *Aquificales* und *Thermotogales* angehören (Huber et al. 1992; Blöchl et al. 1995).

Die Archaea unterscheiden sich von den Bacteria und Eukarya neben den 16 S-rRNA Sequenzmustern durch zahlreiche molekulare und biochemische Merkmale. Die Art des Zellwandaufbaus und der Cytoplasmamembran ist für die Archaea charakteristisch. Die Zellwand enthält weder Muraminsäure noch D-Aminosäuren und kann Proteine, Pseudomurein, Polysaccharide oder auch Methanochondroitin enthalten (Kandler und König 1998). Die Plasmamembran besteht anstelle von Glycerinestern aus Di- oder Tetraetherlipiden (Langworthy und Pond 1986; De Rosa und Gambacorta 1988). Sie trägt zur Stabilität bei, die für die Besiedlung extremer Standorte nötig ist. Einige Charakteristika der Archaea ähneln denen der Eukarya, wie z.B. der Transkriptionsmodus (Thomm 1996) sowie das Vorhandensein von Histonproteinen (Stein und Searcy 1978) und das Vorkommen von Introns in tRNAs (Kaine et al. 1983).

Die Domäne der Archaea wird in Crenarchaeota und Euryarchaeota eingeteilt (Woese et al. 1990). Die Crenarchaeota sind phänotypisch relativ homogen und zum großen Teil hyperthermophil. In diese Gruppe gehören schwefelabhängige Ordnungen wie z.B. die *Sulfolobales* oder die *Desulfurococcales* (Woese 1987). Die Euryarchaeota stellen eine phänotypisch heterogene Gruppe dar. Sie weisen in Bezug auf Lebensraum und Physiologie sehr vielfältige Eigenschaften auf. Neben mesophilen Organismen, wobei die Methanogenen dominieren (Burggraf et al. 1991), sind thermophile Organismen der Ordnungen *Archaeoglobales*, *Thermoplasmatales* und *Thermococcales* und die extrem halophilen Organismen zu finden (Woese und Olsen 1986; Woese 1987). Letztere kommen in der Regel in aeroben Biotopen mit hohen Salzkonzentrationen (Salzseen, Salzseen, Salzseen) vor (Kamekura 1998; Oren 1994). Charakteristisch für halophile Archaea ist ein optimales Wachstum mit Natriumchlorid-Konzentrationen von 15% bis 30%; das Temperaturoptimum liegt zwischen 35°C und 45°C (Kushner und Kamekura 1988; Kamekura 1998).

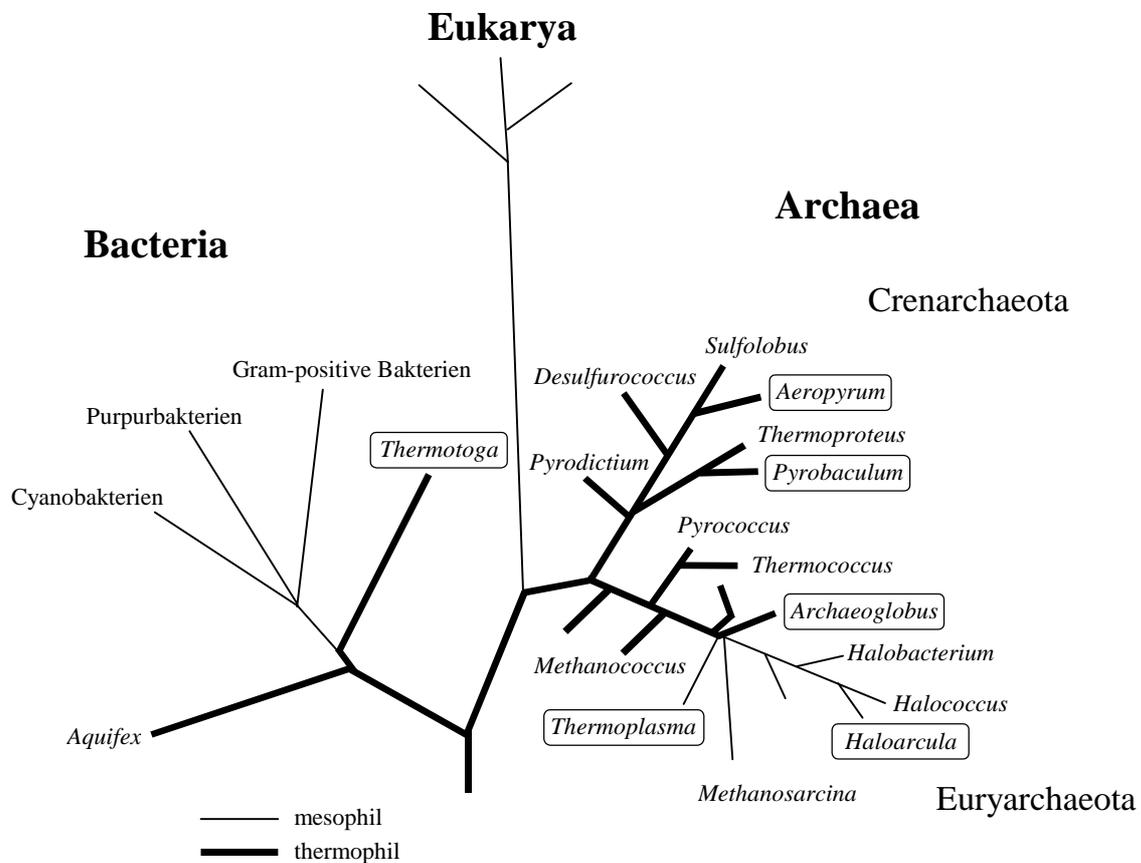


Abbildung 1 Einordnung von hyperthermophilen und halophilen Mikroorganismen in den phylogenetischen Stammbaum. Verzweigungsgrad und Verzweigungslängen basieren auf rRNA-Sequenzvergleichen (schematisch nach (Woese et al. 1990; Stetter 1993), modifiziert). Hyperthermophile Organismen der Domänen Bacteria und Archaea sind durch dicke Linien dargestellt. Organismen, mit denen in dieser Arbeit gearbeitet wurde, sind mit einem Rahmen gekennzeichnet.

Die hyperthermophilen Bacteria und Archaea bilden im phylogenetischen Stammbaum die tiefsten Abzweigungen (Abbildung 1). Sie werden deshalb auch als ursprüngliche Organismen angesehen, womit vermutlich auch ihre Stoffwechsellösungen ursprünglich sind. Es wird angenommen, dass sich das Leben unter thermophilen Bedingungen entwickelt hat und sich in den bis heute noch vorhandenen extremen Biotopen aufgrund relativ konstanter Umweltbedingungen nur sehr langsam weiterentwickelt (Wächtershäuser 1988; Wächtershäuser 1992; Stetter et al. 1990). Damit sind die hyperthermophilen Organismen für die Forschung von großem Interesse. In den vorwiegend anaeroben Biotopen sind vor allem Wasserstoff, Kohlendioxid, Schwefel und Schwefelverbindungen zu finden. Deshalb sind chemolithoautotrophe Stoffwechsellösungen weit verbreitet. Zu ihnen gehören die Reduktion von Schwefel zu H_2S (dissimilatorische

Schwefelreduktion, z.B. *Pyrodictium*), die Reduktion von CO₂ zu CH₄ (Methanogenese, z.B. *Methanococcus*), die Reduktion von Sulfat zu H₂S (dissimilatorische Sulfatreduktion, z.B. *Archaeoglobus*), die Reduktion von Sauerstoff zu Wasser mit entweder H₂ (Knallgasreaktion, z.B. *Aquifex*) oder mit schwefelhaltigen Verbindungen als Elektronendonatoren (aerobe Atmung, z.B. *Aquifex*) und die Reduktion von Nitrat zu N₂ (Denitrifikation, *Pyrobaculum*) (Danson 1988; Wächtershäuser 1992; Schönheit und Schäfer 1995; Stetter 1996). Neben chemolithoautotrophen Stoffwechselformen sind viele Archaea befähigt chemoorganoheterotrophen Stoffwechsel durchzuführen. Die Verwertung von Zuckern, z.B. Maltose und Stärke, ist häufig. Genauere Untersuchungen über Zuckerabbauwege und der daran beteiligten Enzyme wurden hauptsächlich mit den als ursprünglich geltenden hyperthermophilen Archaea durchgeführt. Alle bisher untersuchten zuckerverwertenden Archaea bauen ihre Substrate nicht über die klassischen glykolytischen Abbauwege wie Embden-Meyerhof Weg und Entner-Doudoroff Weg ab, sondern zeigen Modifikationen dieser Wege (Abbildung 2). Die Modifikationen beziehen sich vor allem auf die Schlüsselenzyme der Abbauwege.

Für das Archaeon *Sulfolobus solfataricus* sowie für *Thermoplasma acidophilum* wurde ein modifizierter, nicht-phosphorylierter Entner-Doudoroff Weg für den Abbau von Glucose zu Pyruvat beschrieben (De Rosa et al. 1984; Smith et al. 1989; Selig et al. 1997). Dabei wird Glucose über nicht-phosphorylierte Intermediate zu Glycerinaldehyd oxidiert. Die Umsetzung von Glycerinaldehyd zu 2-Phosphoglycerat erfolgt über eine spezifische Glycerinaldehyd Dehydrogenase und eine spezifische Kinase, die Glycerat zu 2-Phosphoglycerat umsetzt. Die weitere Umsetzung zu Pyruvat erfolgt über die aus dem klassischen Weg bekannten Enzyme Enolase und Pyruvat Kinase. Für halophile Archaea wurde dagegen ein modifizierter, partiell-phosphorylierter Entner-Doudoroff Weg für den Abbau von Glucose beschrieben (Johnsen et al. 2001). Dabei wird auf der Stufe von 2-Keto-3-desoxygluconat phosphoryliert. Das Produkt 2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat wird dann wie im klassischen Entner-Doudoroff Weg zu Pyruvat umgesetzt.

Für viele Archaea ist ein Glucoseabbau über modifizierte Embden-Meyerhof Wege beschrieben (Abbildung 2). Die Modifikationen beziehen sich auf die Glucokinase, Phosphofruktokinase (PFK) und auf die Glycerinaldehyd-3-phosphat oxidierenden Enzyme. So nutzen die Euryarchaeota *Thermococcus celer* und *Pyrococcus furiosus* zur Fermentation von Glucose einen modifizierten Embden-Meyerhof Weg mit ADP-abhängiger Hexokinase und ADP-abhängiger PFK. Für die Umsetzung von Glycerinaldehyd-3-phosphat zu 3-Phosphoglycerat ist eine Glycerinaldehyd-3-phosphat: Ferredoxin Oxidoreduktase (GAP: Fd OR), die die klassischen Enzyme Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase und Phosphoglycerat Kinase ersetzt, beschrieben (Schönheit und Schäfer 1995). In *Thermoproteus tenax* ist die PFK Pyrophosphat-abhängig und Glycerinaldehyd-3-phosphat wird durch eine nicht-phosphorylierende Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase zu 3-Phosphoglycerat umgesetzt, wobei wie in der klassischen Reaktion NAD(P)H entsteht. Für den archaeellen Sulfatreduzierer *Archaeoglobus fulgidus*

Stamm 7324 wurde Wachstum auf Stärke nachgewiesen (Labes und Schönheit 2001). Ähnlich wie *Pyrococcus furiosus* setzt dieser Organismus Glucose über einen modifizierten Embden-Meyerhof Weg mit ADP-abhängigen Kinasen und der GAP: Fd OR zu Pyruvat um. Für das Crenarchaeon *Aeropyrum pernix* wurde vorgeschlagen, dass die Umsetzung von Glucose zu Pyruvat eine ATP-abhängige Glucokinase und eine ATP-abhängige PFK umfasst. Diese Kinasen unterscheiden sich von den ATP-Kinasen aus Bacteria und Eukarya. Die Glucokinase gehört zur ROK-Familie, die Repressorproteine, offene Leserahmen mit unbekannter Funktion und Zuckerkinasen einschließt (Hansen et al. 2002b). Die ATP-abhängige PFK gehört zur PFK-B Familie, im Gegensatz dazu gehören die ATP-abhängigen PFKs aus Bacteria und Eukarya der PFK-A Familie an (Hansen und Schönheit 2001). Glycerinaldehyd-3-phosphat wird in *A. pernix* durch eine nicht-phosphorylierende Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase zu 3-Phosphoglycerat umgesetzt (Reichstein 2001; Wendorff 2002). Für *Pyrobaculum aerophilum* wurden ATP-abhängige Kinasen beschrieben, die denen aus *A. pernix* entsprechen. Die Umsetzung von Glycerinaldehyd-3-phosphat zu 3-Phosphoglycerat wird von einer GAP: Fd OR katalysiert (Gebhard 2002).

Im Gegensatz zu den Archaea wird im hyperthermophilen Bakterium *Thermotoga maritima* Glucose über den klassischen Embden-Meyerhof Weg abgebaut (De Vos et al. 1998; Selig et al. 1997). Dieser enthält eine klassische Glucokinase und eine ATP-abhängige PFK. Glycerinaldehyd-3-phosphat wird durch die klassischen Enzyme Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase und Phosphoglycerat Kinase zu 3-Phosphoglycerat umgesetzt (Abbildung 2).

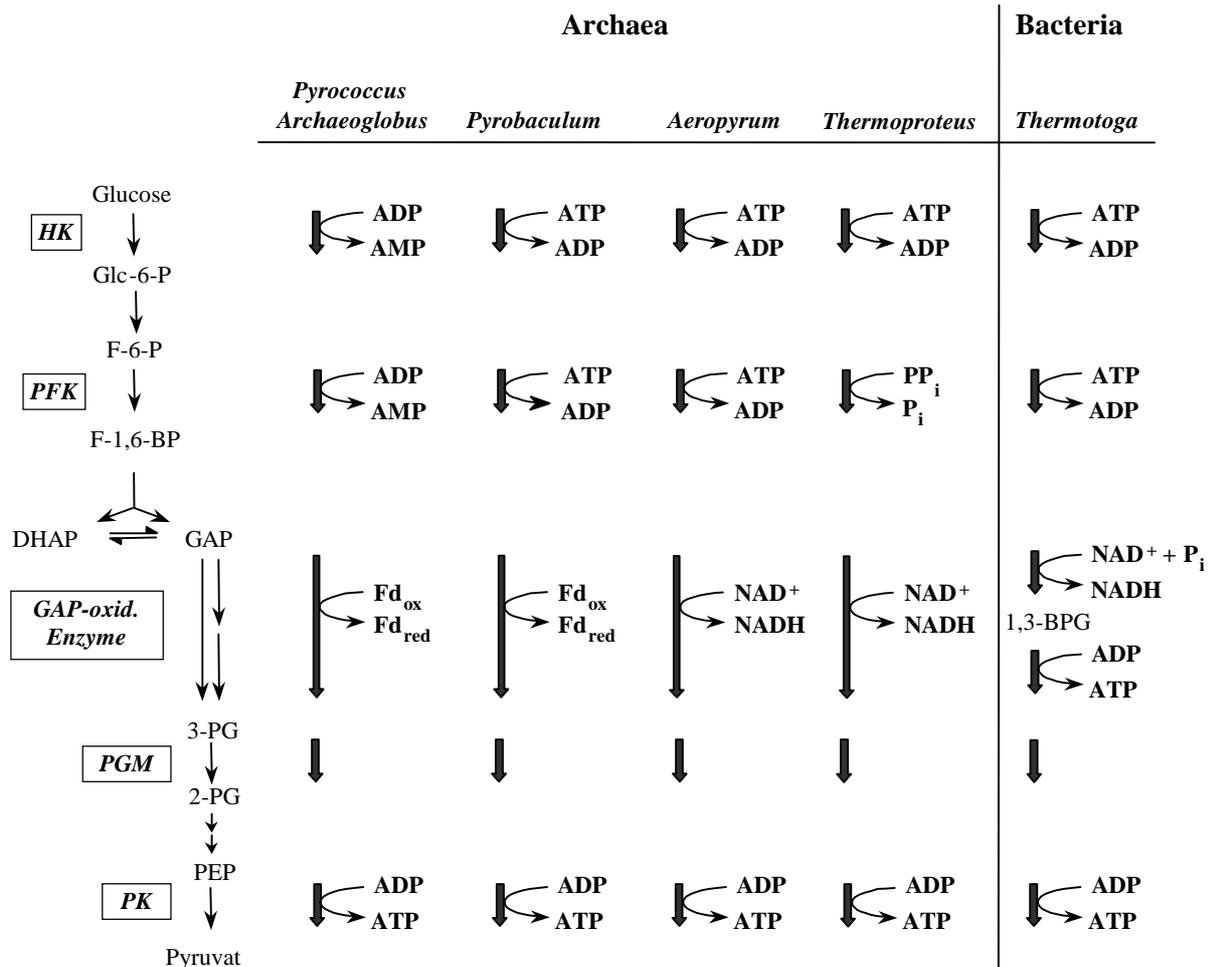


Abbildung 2 Vergleichende Darstellung der Enzyme des Glucoseabbaus der modifizierten Embden-Meyerhof Wege in verschiedenen hyperthermophilen Archaea und des klassischen Embden-Meyerhof Weges in dem hyperthermophilen Bakterium *Thermotoga maritima*. Abkürzungen: Glc-6-P = Glucose-6-phosphat, F-6-P = Fructose-6-phosphat, F-1,6-BP = Fructose-1,6-bisphosphat, DHAP = Dihydroxyacetonphosphat, GAP = Glycerinaldehyd-3-phosphat, 3-PG = 3-Phosphoglycerat, 2-PG = 2-Phosphoglycerat, 1,3-BPG = 1,3-Bisphosphoglycerat, PEP = Phosphoenolpyruvat, HK = Hexokinase, PFK = Phosphofruktokinase, PGM = Phosphoglycerat Mutase, PK = Pyruvat Kinase, oxid. = oxidierende, Fd = Ferredoxin, ox. = oxidiert, red. = reduziert.

Ein wichtiges Merkmal des klassischen Embden-Meyerhof Weges aus Bacteria und Eukarya ist die allosterische Regulation der zwei Schlüsselenzyme Phosphofruktokinase (PFK) und Pyruvat Kinase. Beide Enzyme katalysieren *in vivo* irreversible Reaktionen und sind durch Intermediate des Stoffwechsels oder über die Energieladung der Zelle durch Adenosinnukleotide reguliert. Die PFK aus *T. maritima* ist z.B. durch die Effektoren Phosphoenolpyruvat und ADP allosterisch reguliert (Hansen et al. 2002a). Untersuchungen zur Regulation der archaeellen PFKs, sowohl der ATP-, ADP- als auch der Pyrophosphat-abhängigen PKFs (Abbildung 2), haben ergeben, dass diese im Gegensatz zu den bakteriellen PFKs nicht allosterisch reguliert werden (Kengen et al.

2001; Ronimus et al. 1999; Hansen und Schönheit 2001; Hansen und Schönheit 2000; Siebers et al. 1998). Archaeelle PFKs spielen also keine Rolle bei der allosterischen Kontrolle der modifizierten Embden-Meyerhof Wege.

Das zweite allosterisch regulierte Enzym im klassischen Embden-Meyerhof Weg ist die Pyruvat Kinase. Das Enzym katalysiert den letzten Schritt von klassischen und modifizierten Embden-Meyerhof Wegen und ist in Bacteria und Eukarya vielfach charakterisiert (Kayne 1973; Muirhead 1990; Mattevi et al. 1996). In hyperthermophilen Archaea ist bisher nur die Pyruvat Kinase aus *Thermoproteus tenax* untersucht (Schramm et al. 2000). In Bacteria und Eukarya sind Pyruvat Kinasen homotetramere Enzyme von etwa 200 kDa, die aus Untereinheiten von etwa 50 kDa zusammengesetzt sind. Die Aktivität ist abhängig von divalenten Kationen wie Mangan und Magnesium. Die meisten Pyruvat Kinasen benötigen zusätzlich Kalium. Bis auf wenige Ausnahmen sind alle Pyruvat Kinasen von Bacteria und Eukarya allosterisch reguliert. Eukaryotische Pyruvat Kinasen werden meist durch Fructose-1,6-bisphosphat allosterisch aktiviert, nur die aus den Protozoa *Leishmania mexicana* und *Trypanosoma brucei* sind durch Fructose-2,6-bisphosphat reguliert (Rigden et al. 1999a; Ernest et al. 1998). Bakterielle Pyruvat Kinasen werden durch Fructose-1,6-bisphosphat oder AMP und Zuckermonophosphate wie z.B. Ribose-5-phosphat allosterisch aktiviert. Einige Bacteria, z.B. *E. coli* und *Salmonella typhimurium*, besitzen zwei Pyruvat Kinase Isoenzyme, die entweder durch Fructose-1,6-bisphosphat oder durch AMP aktiviert werden (Waygood et al. 1975; Garcia-Olalla und Garrido-Pertierra 1987; Waygood et al. 1976). Da in Archaea wenig über Pyruvat Kinasen bekannt ist, war es Hauptaufgabe dieser Arbeit Pyruvat Kinasen aus den hyperthermophilen Crenarchaeota *A. pernix* und *P. aerophilum* und aus dem Euryarchaeon *A. fulgidus* Stamm 7324 zu untersuchen. Die Enzyme wurden gereinigt und bezüglich ihrer molekularen, thermophilen und kinetischen Eigenschaften sowie ihrer phylogenetischen Verwandtschaft charakterisiert. Insbesondere wurde der Einfluss von klassischen allosterischen Effektoren der Pyruvat Kinasen aus Bacteria und Eukarya auf die Aktivität der hyperthermophilen Pyruvat Kinasen untersucht. Zum Vergleich wurde die Pyruvat Kinase aus dem Bakterium *T. maritima* gereinigt und charakterisiert. Außerdem wurden mit Hilfe von ortsspezifischer Mutagenese Untersuchungen zum Mechanismus der Kaliumabhängigkeit der Pyruvat Kinasen am Beispiel der Pyruvat Kinase aus *T. maritima* durchgeführt.

Ebenso wie Pyruvat Kinasen sind auch Phosphoglycerat Mutasen aus Archaea bisher kaum charakterisiert und wurden deshalb in dieser Arbeit untersucht. Phosphoglycerat Mutasen katalysieren die reversible Umwandlung von 3-Phosphoglycerat zu 2-Phosphoglycerat und sind in Bacteria und Eukarya gut untersucht. Die Phosphoglycerat Mutasen aus *Saccharomyces cerevisiae*, *E. coli* und *Bacillus stearotherophilus* sind

bereits kristallisiert und die Strukturen beschrieben worden (Rigden et al. 1999b; Bond et al. 2001; Jedrzejewski et al. 2000; Crowhurst et al. 1999). Auf Sequenzebene wie auch auf biochemischer Ebene werden zwei Gruppen von Phosphoglycerat Mutasen unterschieden, die sich in ihrem katalytischen Mechanismus und in ihrer Abhängigkeit von dem Kofaktor 2,3-Bisphosphoglycerat unterscheiden (Jedrzejewski 2000b). Die Kofaktor-abhängigen Phosphoglycerat Mutasen (dPGM) sind als Homodi- bzw. -tetramere mit einem Molekulargewicht der Untereinheiten von etwa 25 kDa beschrieben und kommen vorwiegend bei Vertebraten, Hefen und einer Vielzahl von Eubakterien vor (Fothergill-Gilmore und Watson 1989). Sie bilden mit sauren Phosphatasen und Fructose-2,6-bisphosphatasen eine Proteinfamilie, die vor allem durch ein katalytisch essentielles Histidin charakterisiert ist (Jedrzejewski et al. 2000). Die Kofaktor-unabhängigen Phosphoglycerat Mutasen (iPGM) sind als Monomere mit einem Molekulargewicht von etwa 60 kDa beschrieben und kommen bei Nematoden, höheren Pflanzen und Eubakterien vor (Jedrzejewski 2000b; Galperin und Jedrzejewski 2001; Fraser et al. 1999). Sie gehören zur Superfamilie der alkalischen Phosphatasen, in die auch Metalloenzyme wie z.B. die Phosphopentomutase gehören (Galperin et al. 1998). In archaeellen Genomen sind kaum Gene, die für iPGMs kodieren, annotiert. Erst in jüngster Zeit wurden bei *Pyrococcus furiosus* und *Methanococcus jannaschii* iPGM Gene identifiziert und die rekombinanten Proteine charakterisiert (Van der Oost et al. 2002). Im Gegensatz zu den bakteriellen und eukaryotischen Enzymen liegen diese als Homotetramere vor. Die Gene von dPGMs sind zwar in einigen archaeellen Genomen, z.B. *Sulfolobus solfataricus* und *Thermoplasma acidophilum*, annotiert. Bisher wurde jedoch noch keine dPGM aus der Domäne der Archaea charakterisiert. Deshalb sollten in dieser Arbeit Untersuchungen zu archaeellen Phosphoglycerat Mutasen durchgeführt werden. Im Genom von *A. fulgidus* VC16 und *T. acidophilum* wurden Phosphoglycerat Mutase Gene identifiziert und exprimiert. Die rekombinanten Proteine wurden biochemisch charakterisiert und die *in vivo* Transkription der iPGM aus *A. fulgidus* VC16 überprüft.

Im Gegensatz zum Abbau von Hexosen ist über den Stoffwechsel von Pentosen in Archaea nichts bekannt. Der Pentosestoffwechsel in Bacteria ist jedoch gut untersucht. So wird der Abbau der Pentose Xylose in Bacteria, z.B. in *E. coli*, *Lactobacillus brevis* und in *Aerobacter aerogenes*, über die Isomerisierung der Xylose zu Xylulose eingeleitet (David und Wiesemeyer 1970; Bhosale et al. 1996). Anschließend wird die Xylulose zu Xylulose-5-phosphat phosphoryliert und dieses zentrale Intermediat des Stoffwechsels dann über den Pentosephosphat Weg und den klassischen Embden-Meyerhof Weg weiter umgesetzt (Biesterveld et al. 1994). Die von *xylA* Genen kodierten Xylose Isomerasen katalysieren die reversible Isomerisierung von Xylose zu Xylulose. Sie besitzen in der Regel eine sehr breite Substratspezifität und setzen neben Xylose auch andere Pentosen und auch Hexosen, vor allem Glucose, um. Für die Aktivität sind divalente Kationen wie Magnesium, Kobalt und Mangan essentiell (Bhosale et al. 1996). In allen bisher

sequenzierten archaeellen Genomen konnte kein *xylA* Gen, das für eine Xylose Isomerase kodiert, identifiziert werden, was für einen neuartigen Mechanismus des Xyloseabbaus in Archaea spricht. Deshalb wurden in dieser Arbeit Untersuchungen zum Xyloseabbau im halophilen Archaeon *Haloarcula marismortui* durchgeführt. Dabei wurde eine Xylose Dehydrogenase, das erste Enzym des Xyloseabbaus in *Ha. marismortui*, identifiziert. Diese Xylose Dehydrogenase wurde gereinigt und biochemisch charakterisiert. Mit Hilfe der N-terminalen Aminosäuresequenz des Enzyms wurde das kodierende Gen *xyl dh* im partiell sequenzierten Genom von *Ha. marismortui* identifiziert.

4 Material und Methoden

4.1 Wachstum von Organismen

4.1.1 Züchtung von *Archaeoglobus fulgidus*

A. fulgidus Stamm 7324 (DSM 8774) wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig) bezogen und in einem 100-Liter Biostat-Fermenter (Braun, Melsungen) gezüchtet. Die Wachstumstemperatur betrug 76°C, es wurde mit 60 Upm gerührt und mit 1 bar N₂/CO₂ (80%/20%) begast. Das Medium war modifiziert nach Möller-Zinkhan et al. und enthielt 1 g/l Stärke und 0.5 g/l Hefeextrakt als Kohlenstoff- und Energiequelle (Möller-Zinkhan et al. 1989; Labes und Schönheit 2001). Die Ernte der Zellen erfolgte in der stationären Wachstumsphase, die Lagerung der Pellets bei -70°C.

A. fulgidus Typstamm VC16 (DSM 4304) wurde von der DSMZ (Braunschweig) bezogen und in 125 ml Müller-Krempelflaschen mit 50 ml Medium, dass 10 mM Laktat und 0.5 g/l Hefeextrakt als Kohlenstoff- und Energiequelle enthielt, gezüchtet (Möller-Zinkhan et al. 1989; Labes und Schönheit 2001). Die Zellen wurden bei 4°C pelletiert und sofort für die Isolierung von RNA eingesetzt (4.2.10).

4.1.2 Züchtung von *Thermotoga maritima*

T. maritima (DSM 3109) wurde von der DSMZ (Braunschweig) bezogen und in einem 100-Liter Biostat-Fermenter unter anaeroben Bedingungen bei 80°C gezüchtet. Das Medium war modifiziert nach Huber et al. und enthielt 5 g/l Stärke und 5 g/l Hefeextrakt als Kohlenstoff- und Energiequelle (Huber et al. 1986; Schröder et al. 1994).

4.1.3 Züchtung von *Haloarcula marismortui*

Ha. marismortui (DSM 3752) wurde von der DSMZ (Braunschweig) bezogen. Der Organismus wurde aerob bei 37°C in 500 bis 2000 ml Schikanenkolben gezüchtet, die mit 10% Medium gefüllt und 1%ig inokuliert wurden. Nach Autoklavieren des Mediums wurden die als Kohlenstoff- und Energiequelle dienende Xylose sowie Vitamine als sterilfiltrierte 100fach Stammlösung zum Medium gegeben (Johnsen et al. 2001). Die Kolben wurden bei 200 Upm geschüttelt. Zur Stammhaltung wurden Kulturen am Ende der exponentiellen Phase bei 4°C gelagert. Diese konnten bis zu drei Monate als Inokulum verwendet werden.

Wachstum auf Xylose und Glucose. Das Medium enthielt als Kohlenstoff- und Energiequelle neben Hefeextrakt und Casaminsäuren 25 mM Xylose oder Glucose, wobei die Organismen mindestens über drei Passagen an den jeweiligen Zucker adaptiert waren. Das Wachstum wurde durch die Bestimmung der optischen Dichte bei 578 nm (OD_{578}) photometrisch verfolgt (Pharmacia Biotech Ultrospec 2000, Pharmacia, Freiburg). Zur Substrat- und zur Produktbestimmung wurden aus den Kulturen steril entnommene Proben zentrifugiert (12000 x g, 10 min) und die zellfreien Überstände bei -20°C gelagert.

Induktion der Xylose Dehydrogenase im Wachstum. Die Induktionsversuche im Wachstum wurden in mit 20% Medium gefüllten Schikanenkolben durchgeführt. Als Inokulum wurde 1% einer logarithmisch wachsenden, Glucose-adaptierten (25 mM) Kultur verwendet. Zur Messung von Enzymaktivitäten in verschiedenen Wachstumsphasen wurden Proben (60 bis 80 ml) steril entnommen und die Zellen pelletiert (2600 x g, 10 min, 4°C). Die Pellets wurden anschließend in etwa 0.5 ml Waschpuffer (100 mM Tris-HCl pH 7.5 mit 250 g/l NaCl) suspendiert. Diese Suspensionen wurden bis zur Messung der Enzymaktivität (4.4.3) bei -20°C gelagert.

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Computergestützte Sequenzanalysen

Mit den Aminosäuresequenzen von Pyruvat Kinasen aus Eukarya, Bacteria und Archaea wurde ein Stammbaum erstellt. Im Folgenden werden die verwendeten Programme und Einstellungen dargestellt:

Die Sequenzalignments wurden mit ClustalX und der Neighbor-joining Methode unter Verwendung der Standardeinstellungen und der GONNET Matrix erstellt (Thompson et al. 1997). Der phylogenetische Stammbaum wurde nach zwei Methoden konstruiert: 1. Neighbor-joining Methode mittels ClustalX und 2. Maximum Likelihood Methode mit PROML (Phylip, Version 3.6, mit Standardeinstellungen). Konfidenzintervalle wurden anhand von 100 Bootstrapping-Wiederholungen bestimmt.

4.2.2 Isolierung von genomischer DNA

Genomische DNA von *Thermoplasma acidophilum* (DSM 1728) und *Pyrobaculum aerophilum* (DSM 7523) wurde von der DSMZ (Braunschweig) bezogen.

Zur Extraktion genomischer DNA (Sambrook et al. 1989) aus *Archaeoglobus fulgidus* Typstamm VC16 (DSM 4304), *Haloarcula marismortui* (DSM 3752) und *Thermotoga maritima* (DSM 3109) wurden jeweils 250 mg Feuchtzellen in 5 ml TES-Puffer (10 ml

TE-Puffer mit 0.86 g Saccharose; TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl pH 8 mit 0.1 mM EDTA) vorsichtig suspendiert. Nach Zugabe von 550 µl 10% SDS und 15 µl Proteinase K (20 mg/ml) wurde die Suspension für 30 min bei 60°C und anschließend nach Zugabe von 600 µl 5 M NaCl für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde für 30 min bei 4°C zentrifugiert (48000 x g) und die DNA aus dem Überstand mit einem Volumen eiskaltem Isopropanol gefällt. Diese wurde durch Zentrifugation für 10 min bei 4°C (24000 x g) pelletiert und der Überstand dekantiert. Das Präzipitat wurde in 500 µl TE-Puffer über Nacht bei 4°C resuspendiert, die Suspension abschließend mit 5 µl RNase (100 mg/ml) für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend bei -20°C gelagert.

Zur Extraktion genomischer DNA aus *Aeropyrum pernix* (DSM 11879) (Sambrook et al. 1989) wurde dieser aerob bei 90°C in einem 100-Liter Biostat-Fermenter mit einem modifizierten Medium nach Sako gezüchtet (Wendorff 2002; Sako et al. 1996). Die Zellen wurden pelletiert und bei -70°C gelagert. 500 mg Feuchtzellen wurden in 5 ml NET-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8 mit 150 mM NaCl und 100 mM EDTA) suspendiert und anschließend mit 1 ml 10% SDS und 30 µl Proteinase K (20 mg/ml) versetzt. Der Ansatz wurde unter leichtem Schütteln für 30 min bei 65°C inkubiert. Nach vorsichtiger Zugabe des Ansatzes zu 9 ml 99.8%igem, auf 20°C temperierten Ethanol bildeten sich zwei Phasen. Mit einer sterilisierten, zu einem U gebogenen Pasteurpipette wurde die DNA durch die Phasengrenze „gefischt“. Die gebogene Pasteurpipette wurde anschließend in 5 ml 99.8%igen Ethanol getaucht und für 5 bis 15 min inkubiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt und anschließend die gebogene Pasteurpipette mit der DNA für 12 h bei 4°C in 1 ml TE-Puffer inkubiert. Abschließend wurde die DNA vorsichtig mit einer neuen Pasteurpipette von der gebogenen Pasteurpipette gelöst und für 24 bis 48 Stunden bei 4°C unter leichtem Schütteln vollständig suspendiert. 1 µg dieser DNA wurde mit 10 U Restriktionsendonuclease *Cla*I (Roche Diagnostics, Mannheim) hydrolysiert und bei -20°C gelagert.

Konzentration und Reinheit der erhaltenen genomischen DNA wurden jeweils sowohl photometrisch als auch über ein 0.8%iges Agarosegel bestimmt (4.2.4).

4.2.3 Polymerase Kettenreaktion

Mit der Polymerase Kettenreaktion (PCR, (Mullis et al. 1986)) können DNA-Fragmente spezifisch amplifiziert werden. Sie diente in dieser Arbeit der Amplifikation von offenen Leserahmen (ORF) aus genomischer DNA und der Überprüfung auf ein vorhandenes Insert von Transformanten. Die PCRs wurden in 50 µl Reaktionsansätzen in einem Thermocycler (T-3 oder T-personal, Biometra, Göttingen) durchgeführt, wobei die Programme immer in Abhängigkeit von der Länge des zu erwartenden Produktes und der Schmelzpunkte der Oligonukleotid-Primer (MWG Biotech, Ebersberg) variiert wurden (Tabelle 1). Die PCRs werden im Folgenden spezifiziert:

Amplifikation der zu klonierenden Gene. Zur Amplifikation der Gene wurden verschiedene Inkubationsprotokolle verwendet. Diese werden im Folgenden dargestellt:

Thermotoga maritima, ORF TM0208: Der Reaktionsansatz enthielt 50 ng Template, je 600 nM forward und reverse Primer, 5 µl 10x Reaktionspuffer (PeqLab, Erlangen), 1.5 mM MgSO₄, 200 µM dNTP-Mix und 2 U *Pwo*-DNA-Polymerase (PeqLab, Erlangen). Das Inkubationsprotokoll bestand aus initialer Denaturierung für 120 s bei 94°C, 10 Zyklen aus Denaturierung bei 94°C für 15 s, Annealing bei 55°C für 30 s und Polymerisation bei 72°C für 90 s, 25 Zyklen aus Denaturierung bei 94°C für 15 s, Annealing bei 61°C für 30 s und Polymerisation bei 72°C für 90 s (wobei bei jedem Zyklus die Synthesezeit um 20 s verlängert wurde) und einer abschließenden Polymerisation bei 72°C für 7 min.

Aeropyrum pernix, ORF APE0489: Der Reaktionsansatz enthielt 50 ng *Cl*I-geschnittenes Template, je 400 nM forward und reverse Primer, 5 µl 10x Reaktionspuffer, 1.5 mM MgSO₄, 200 µM dNTP-Mix und 2 U *Pwo*-DNA-Polymerase. Das Inkubationsprotokoll bestand aus initialer Denaturierung für 270 s bei 95°C, 5 Zyklen aus Denaturierung bei 95°C für 30 s, Annealing bei 59°C für 20 s und Polymerisation bei 72°C für 30 s, 30 Zyklen aus Denaturierung bei 95°C für 30 s, Annealing bei 65°C für 20 s und Polymerisation bei 72°C für 30 s (wobei bei jedem Zyklus die Synthesezeit um 20 s verlängert wurde) und einer abschließenden Polymerisation bei 72°C für 5 min.

Pyrobaculum aerophilum, ORF PAE0819: Der Reaktionsansatz enthielt 30 ng Template, je 300 nM forward und reverse Primer, 5 µl 10x Reaktionspuffer, 1.5 mM MgSO₄, 300 µM dNTP-Mix und 2.5 U *Pwo*-DNA-Polymerase. Das Inkubationsprotokoll bestand aus initialer Denaturierung für 120 s bei 94°C, 10 Zyklen aus Denaturierung bei 94°C für 30 s, Annealing bei 55°C für 30 s und Polymerisation bei 72°C für 90 s, 25 Zyklen aus Denaturierung bei 94°C für 30 s, Annealing bei 60°C für 30 s und Polymerisation bei 72°C für 90 s (wobei bei jedem Zyklus die Synthesezeit um 20 s verlängert wurde) und einer abschließenden Polymerisation bei 72°C für 7 min.

Archaeoglobus fulgidus, ORF AF1751: Der Reaktionsansatz enthielt 33 ng Template, je 400 nM forward und reverse Primer, 5 µl 10x Reaktionspuffer, 2 mM MgSO₄, 400 µM dNTP-Mix und 2.5 U *Pwo*-DNA-Polymerase. Das Inkubationsprotokoll bestand aus initialer Denaturierung für 120 s bei 94°C, 10 Zyklen aus Denaturierung bei 94°C für 30 s, Annealing bei 52°C für 30 s und Polymerisation bei 72°C für 90 s, 30 Zyklen aus Denaturierung bei 94°C für 30 s, Annealing bei 56°C für 30 s und Polymerisation bei 72°C für 90 s (wobei bei jedem Zyklus die Synthesezeit um 20 s verlängert wurde) und einer abschließenden Polymerisation bei 72°C für 5 min.

Thermoplasma acidophilum, ORF TA1347: Der Reaktionsansatz enthielt 20 bis 80 ng Template, je 400 nM forward und reverse Primer, 5 µl 10x Reaktionspuffer, 2 mM MgSO₄, 400 µM dNTP-Mix und 2.5 U *Pwo*-DNA-Polymerase. Das Inkubationsprotokoll bestand aus initialer Denaturierung für 120 s bei 94°C, 10 Zyklen aus Denaturierung bei

94°C für 30 s, Annealing bei 44°C für 30 s und Polymerisation bei 72°C für 90 s, 30 Zyklen aus Denaturierung bei 94°C für 30 s, Annealing bei 48°C für 30 s und Polymerisation bei 72°C für 90 s (wobei bei jedem Zyklus die Synthesezeit um 20 s verlängert wurde) und einer abschließenden Polymerisation bei 72°C für 7 min.

Amplifikation zur Kontrolle einer Klonierung („Kolonie-Screening“). Transformanten wurden auf vorhandenes Insert in erwarteter Länge geprüft. Der Reaktionsansatz enthielt als Template einen Transformanten, der mit sterilem Zahnstocher von der Agarplatte aufgenommen wurde, je 200 nM Primer (T7-Promotor- und T7-Terminatorprimer), 5 µl 10x Reaktionspuffer, 200 µM dNTPs und 3 mM MgCl₂. Die *Taq*-DNA-Polymerase (1 U, Biotherm, Hamburg) wurde nach dem initialen Denaturierungsschritt zugegeben. Das Inkubationsprotokoll bestand aus initialer Denaturierung für 270 s bei 95°C, 30 Zyklen aus Denaturierung bei 95°C für 30 s, Annealing bei 48°C für 30 s und Polymerisation bei 72°C für 90 s und einer abschließenden Polymerisation bei 72°C für 7 min.

Tabelle 1 Oligonukleotide zur Amplifikation, Sequenzierung, RT-PCR und Mutagenese von DNA, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Restriktionsschnittstellen (RE) sind unterstrichen, die Vorwärtsprimer sind mit F und die Rückwärtsprimer mit R bezeichnet.

Name	Basensequenz (5' → 3')	RE
pkTm0208F	CGGGGTGAAC <u>CATATG</u> CGAAGTACAAAGAT	<i>NdeI</i>
pkTm0208R	ATCTTCATAGGGAT <u>CCCCCT</u> CAATCCA	<i>BamHI</i>
pkTm450F	TGGAAAGATCACACACAGG	
pkTm920R	CTGTTTTCCGCTGTGAGGA	
pkTm0208-K71E-F	CGATCTTGCGGGGCCGAGATCAGAACCGGATACC	
pkTm0208-K71E-R	GGTATCCGGTTCTGATCTCCGGCCCCGCAAGATCG	
pkAp0489F	TTAGAGAGGCTGGCCT <u>CATATG</u> AGGGG	<i>NdeI</i>
pkAp0489R	GATAGGAATTCAGACAGGAGCGGCTAG	<i>EcoRI</i>
pkAp370F	AAGATAATCCTCCAGGTG	
pkAp869R	AAGCACCGCCTGGTATAT	
pkPa0819F	CACTAAAGGGCGCGGAC <u>CATATG</u> AGCGCTC	<i>NdeI</i>
pkPa0819R	GTTGGGTACGCCAGGAT <u>CCTCTTTT</u> TACCG	<i>BamHI</i>
pkPa380F	CGATGTTATTTTAATGCTTGATGG	
ipgmAf1751F	GAAAGGCTGAGGTGAT <u>CATATG</u> CCTGTAC	<i>NdeI</i>
ipgmAf1751R	CAGTCAAGATAAGGAT <u>CCTGTG</u> ATGAGGAAG	<i>BamHI</i>
RTPCRipgmAf1751F	GTGCCTGTACTGCTGATTGTTGTTG	
RTPCRipgmAf1751R	CTTCGCAATGTTTCAGCAGATCAAGG	
dpgmTa1347F	CCGTATACATATGATATATAAAATTTTC	<i>NdeI</i>
dpgmTa1347R	CTGTGAGGAT <u>CCGATCT</u> ATTG	<i>BamHI</i>
T7-Promotor Primer	TAATACGACTCACTATAGGG	
T7-Terminator Primer	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	

4.2.4 Konzentrationsbestimmung und Reinheitsanalyse von DNA

Absorptionsmessung bei 260 nm und 280 nm. Die Konzentration von DNA wurde durch Absorptionsmessung bei 260 nm bestimmt. Es gilt: Eine Absorption von 1 bei 260 nm entspricht bei einer Küvettenschichtdicke von 1 cm einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml Doppelstrang-DNA bzw. 37 µg/ml Einzelstrang-DNA. Darüber hinaus ist der Absorptionskoeffizient 260/280 ein Maß für die Reinheit von Nukleinsäuren. Reine DNA-Lösungen haben einen Quotienten von 1.8 bis 2 (Sambrook et al. 1989).

Agarosegelelektrophorese. Zur Konzentrationsbestimmung von DNA wurden DNA-Standards bekannter Konzentrationen neben einer Probe mit unbekannter DNA-Konzentration aufgetragen. Durch visuellen Vergleich von Banden gleicher Laufstrecke konnte die DNA-Konzentration der Probe unter der Annahme, dass die Intensität proportional zur Masse ist, abgeschätzt werden.

Daneben wurden Agarosegele dazu genutzt, DNA-Fragmente, Plasmide und genomische DNA der Größe nach analytisch oder präparativ zu trennen. Die Trennung erfolgte für hochmolekulare DNA in 0.8%igen und für niedermolekulare DNA in 2%igen Agarosegelen.

Dazu wurde Agarose in 30 ml TBE-Puffer (89 mM Tris-HCl pH 8 mit 89 mM Borat und 2.5 mM EDTA) durch Aufkochen gelöst, nach Abkühlung auf etwa 60°C 30 µg Ethidiumbromid zugegeben und in eine Gießvorrichtung (7x10 cm) gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 6x Auftragspuffer (Fermentas, Vilnius, Litauen) versetzt und neben einen Standard (*Hind*III verdaute λ-DNA oder Gene Ruler 100 bp Ladder, Fermentas, Vilnius, Litauen) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei konstant 100 V in TBE-Puffer. Anschließend wurden die Gele auf einem UV-Schirm (366 nm) analysiert.

4.2.5 Klonierung von PCR-Produkten in einen Vektor

Vermehrung von Vektoren in *E. coli* und Isolierung von Plasmid-DNA. Vektoren ohne bzw. mit Insert wurden zur Klonierung bzw. zur Sequenzierung und Transformation in *E. coli* Stamm JM109 (Yanisch-Perron et al. 1985) in LB-Medium mit 100 µg/ml Carbenicillin vermehrt und anschließend daraus mit dem Plasmid Miniprep Kit (PeqLab, Erlangen) isoliert. Das LB-Medium hatte folgende Zusammensetzung: 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, pH 7.5.

Reinigung von DNA aus Reaktionsansätzen und Agarosegelen. PCR-Ansätze wurden für die Restriktionshydrolyse mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) von DNA-Polymerase, Salzen und Puffer gereinigt. Vektoren und amplifizierte DNA wurden für die Ligation von Restriktionsenzymen, Salzen und Puffer gereinigt, indem sie über präparative Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und die DNA-Banden auf einem UV-Schirm mittels Skalpell ausgeschnitten wurden. Die DNA wurde mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) aus dem Gel extrahiert.

Restriktionshydrolyse von Vektoren und PCR-Produkten. Die Restriktionshydrolyse wurde jeweils als Doppel-Verdau angesetzt, d.h. beide Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs GmbH, Schwalbach/Taunus) wurden in einen Ansatz gegeben und in einem vom Hersteller mitgelieferten, optimalen Puffer mit der DNA inkubiert. Die Ansätze folgender Zusammensetzung wurden bei 37°C für 12 h inkubiert: 50 µl Plasmid-DNA (1 bis 10 µg DNA), jeweils 10 U Restriktionsendonuklease, 10 µl 10x

Reaktionspuffer auf 100 µl A. bidest. bzw. 25 µl PCR-Fragment (1 bis 10 µg DNA), jeweils 10 U Restriktionsendonuklease, 5 µl Reaktionspuffer auf 50 µl A. bidest..

Ligation eines DNA-Fragments in einen Vektor. Die 10 µl Ligationsansätze enthielten PCR-Fragment, Plasmid und 1 U T4-DNA-Ligase (Roche, Diagnostics, Mannheim) mit entsprechendem T4-DNA-Ligasepuffer. Die zu ligierenden PCR-Fragmente wurden dabei im 3- bis 5fachen molaren Überschuss zu den Plasmiden eingesetzt. Die Ansätze wurden bei 16°C für 12 h inkubiert und anschließend direkt für die Transformation in *E. coli* JM109 eingesetzt.

4.2.6 Transformation

Herstellung CaCl₂-kompetenter Zellen. Die Herstellung kompetenter Zellen der *E. coli*-Stämme JM109 und BL21(DE3)-CodonPlus-RIL erfolgte in Anlehnung an das Protokoll im T-Cloning Kit Manual der Firma Fermentas (Vilnius, Litauen). 400 ml LB-Medium (4.2.5) wurden 10%ig mit einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C unter aeroben Bedingungen bis zu einer OD bei 578 nm von 0.6 inkubiert. Dann wurden die Kulturen 20 min auf Eis inkubiert und 15 min zentrifugiert (8000 x g, 4°C). Nach Zentrifugation wurde der Überstand dekantiert und das Zellpellet in 200 ml eiskaltem TBS-Puffer (5 mM Tris-HCl pH 7 mit 100 mM NaCl und 5 mM MgCl₂) suspendiert. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min wurde das Pellet in 200 ml eiskalter CaCl₂-Lösung (5 mM Tris-HCl pH 7 mit 100 mM CaCl₂ und 5 mM MgCl₂) suspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Suspension für 10 min zentrifugiert, in 20 ml eiskalter CaCl₂-Lösung suspendiert und 1 Stunde auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde nun bis zu einer Endkonzentration von 20% mit Glycerin versetzt und in 200 µl Aliquots mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bei -70°C.

Transformation von einem Vektor in *E. coli*. Es wurden sowohl Ligationsansätze als auch gereinigte Plasmid-DNA in *E. coli* transformiert. Je Transformationsansatz wurden 80 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, mit 10 µl Ligationsansatz bzw. 1 bis 2 µg Plasmid-DNA vorsichtig gemischt und für 60 min auf Eis inkubiert. Die Ansätze wurden dann für 40 s einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt und für weitere 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 400 µl SOC-Medium (0.5% Hefeextrakt, 2% Trypton, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ und 20 mM Glucose, auf 37°C vorgewärmt) wurden die Zellen für 30 min bei 37°C unter aeroben Bedingungen inkubiert. Aliquots dieser Ansätze wurden zur Selektion auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten (LB-Medium (4.2.5) mit 18 g/l Agar) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.2.7 Sequenzierung

Alle im Rahmen dieser Arbeit konstruierten Vektoren wurden sequenziert. Das Insert und die flankierenden Bereiche des Vektors wurden jeweils auf Fehlerfreiheit überprüft. Die Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte nach Sanger, wobei durch Einbau von unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden Kettenabbrüche erzeugt wurden (Sanger et al. 1977). Die fluoreszenzmarkierten Produkte wurden mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt, mit einem Laser angeregt und die emittierte Fluoreszenz detektiert (ABI PRISM 310, Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA). Die Sequenzansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 0.2 bis 0.6 µg Plasmid-DNA, 0.5 µM Primer (T7-Promotor- bzw. Terminator-Primer oder, im Falle langer Inserts, mit zum Insert komplementär gewählten Primern), 3 µl Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (ABI PRISM, Applied Biosystems, Warrington, England) und 0.5 µl DMSO auf 10 µl A. bidest.. Das Sequenzprotokoll bestand aus folgenden Zyklen: initialer Denaturierungsschritt bei 96°C für 180 s, 3 Zyklen mit Denaturierung bei 94°C für 30 s, Annealing bei 42°C für 30 s und Synthese bei 60°C für 120 s, 30 Zyklen mit Denaturierung bei 94°C für 30 s, Annealing bei 45°C für 30 s und Synthese bei 60°C für 120 s und einem abschließenden Syntheseschritt bei 60°C für 5 min. Die PCR-Ansätze wurden für die nachfolgende Sequenzierung gereinigt. Dazu wurden die Ansätze auf 100 µl mit A. bidest. aufgefüllt und 2 µl Dextranblau (20 ng/µl), 10 µl 3 M Natriumacetat pH 5.2 und 250 µl 99% Ethanol zugegeben. Durch 30minütige Zentrifugation wurde die DNA pelletiert, dann das Pellet zweimal mit 250 µl 70% Ethanol gewaschen und anschließend für 5 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Das getrocknete Pellet konnte nach Lösen in 12 µl A. bidest. zur Sequenzierung eingesetzt werden.

4.2.8 Expression

Als Expressionssystem wurden die eine Ampicillinresistenz tragenden Vektoren pET17b oder pET19b (Novagen, Schwalbach) gewählt, die jeweils kombiniert wurden mit dem Chloramphenicol-resistenten Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3)-CodonPlus-RIL (Stratagene, Amsterdam, Niederlande). Tabelle 2 gibt eine Übersicht über alle in dieser Arbeit klonierten ORFs:

Tabelle 2 Übersicht über die in dieser Arbeit klonierten ORFs. Die Quelle der DNA, der verwendete Vektor, die zum Klonieren verwendeten Schnittstellen, die Namen der Amplifikations-Primer, die Bezeichnung des konstruierten Vektors und die des Genproduktes sind für jeden ORF angegeben.

DNA-Quelle, ORF	Vektor	Schnittstellen	Primer	Bezeichnung Konstrukt	Bezeichnung Genprodukt
<i>T. maritima</i> TM0208	pET19b	<i>NdeI</i> <i>BamHI</i>	pkTm0208F pkTm0208R	pkTm-pET19b	PKTm
<i>A. pernix</i> APE0489	pET19b	<i>NdeI</i> <i>EcoRI</i>	pkAp0489F pkAp0489R	pkAp-pET19b	PKAp
<i>P. aerophilum</i> PAE0819	pET17b	<i>NdeI</i> <i>BamHI</i>	pkPa0819F pkPa0819R	pkPa-pET17b	PKPa
<i>A. fulgidus</i> VC16 AF1751	pET19b	<i>NdeI</i> <i>BamHI</i>	ipgmAf1751F ipgmAf1751R	ipgmAf-pET19b	iPGMAf
<i>T. acidophilum</i> TA1347	pET17b	<i>NdeI</i> <i>BamHI</i>	dpgmTa1347F dpgmTa1347R	dpgmTa-pET17b	dPGMTa

Die Expressionen wurden in LB-Medium (4.2.5) mit 100 µg/ml Carbenicillin und 34 µg/ml Chloramphenicol bei 37°C unter aeroben Bedingungen durchgeführt. Die Induktion erfolgte mit 0.4 mM (pET17b) bzw. 1 mM IPTG (pET19b). Nach Expression wurden die Zellen bei 4°C für 20 min mit 8000 x g pelletiert. Im Folgenden werden die Bedingungen der Expressionen für die exprimierten Proteine dargestellt:

PKTm wurde in 800 ml Medium exprimiert. Die Induktion erfolgte bei einer OD₅₇₈ von 0.8. Nach 3 h Expression wurden die Zellen bei einer OD₅₇₈ von 2.9 pelletiert.

PKAp wurde in 1600 ml Medium exprimiert. Die Induktion erfolgte bei einer OD₅₇₈ von 1. Nach 2 h Expression wurden die Zellen bei einer OD₅₇₈ von 3 pelletiert.

PKPa wurde in 800 ml Medium exprimiert. Die Induktion erfolgte bei einer OD₅₇₈ von 0.9. Nach 3.5 h Expression wurden die Zellen bei einer OD₅₇₈ von 2.8 pelletiert.

iPGMAf wurde in 800 ml Medium exprimiert. Die Induktion erfolgte bei einer OD₅₇₈ von 1.2. Nach 3 h Expression wurden die Zellen bei einer OD₅₇₈ von 4 pelletiert.

dPGMTa wurde in 800 ml Medium exprimiert. Die Induktion erfolgte bei einer OD₅₇₈ von 0.6. Nach 20 h Expression wurden die Zellen bei einer OD₅₇₈ von 5.8 pelletiert.

4.2.9 Ortsspezifische Mutagenese

Die ortsspezifische Mutagenese an der PK aus *T. maritima* wurde mit dem QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene (Amsterdam, Niederlande) durchgeführt. Als Ausgangsmaterial diente das Expressionsplasmid pkTm-pET19b (Tabelle 2) für die Überproduktion der PK von *T. maritima*, die vom ORF TM0208

kodiert wird. Für den Austausch von Lysin an Position 71 gegen Glutamat wurden die beiden komplementären Primer pkTm0208-K71G-F und pkTm0208-K71G-R (Tabelle 1) eingesetzt. Sie enthalten im zentralen Bereich die Mutation des Kodons für Lysin 71 AAG gegen das Kodon GAG, das für Glutamat kodiert.

Der Reaktionsansatz enthielt 5 µl 10x Reaktionspuffer, 20 ng Plasmid pkTm-pET19b, je 10 µM pkTm0208-K71G-F und pkTm0208-K71G-R, 1 µl dNTP-Kit-Mix und 2.5 U *PfuTurbo*-DNA-Polymerase auf 50 µl A. bidest.. Das Inkubationsprotokoll bestand aus einer Denaturierung für 30 s bei 95°C und 12 Zyklen aus Denaturierung bei 95°C für 30 s, Annealing bei 55°C für 60 s und Polymerisation bei 68°C für 14.5 min. Nach 12 Zyklen waren 12:1 mutierte Stränge zu Template-DNA polymerisiert worden. Auf die PCR folgte eine Restriktionshydrolyse mit 10 U *DpnI* bei 37°C für 1 h. Dabei wird spezifisch die Parental-DNA hydrolysiert, weil diese an der Sequenzfolge 5'-Gm⁶ATC-3' durch Vervielfältigung in *E. coli* JM109 (4.2.5) methyliert ist. Mit diesem Schritt wird die Ausbeute an mutierten Transformanten bei der nachfolgenden Transformation erhöht. Die Transformation erfolgte mit 50 µl superkompetenten *E. coli* XL1-Blue Zellen (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) und 1 µl des Mutageneseansatzes. Die transformierten Zellen wurden auf LB-Agarplatten (4.2.6) mit Carbenicillin (100 µg/ml) plattiert und bei 37°C für 12 h inkubiert. Ein Klon wurde in LB-Medium mit Antibiotikum überimpft und nach Inkubation bei 37°C eine Plasmidpräparation (4.2.5) durchgeführt. Durch Sequenzierung (4.2.7) wurde das Plasmid pkTm-pET19b-K71G auf sein mutiertes Insert überprüft. Das Plasmid pkTm-pET19b-K71E wurde zur Expression in *E. coli* BL21(DE3)-CodonPlus-RIL (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) transformiert (4.2.6) und das Genprodukt PKTm-K71E analog zu dem Genprodukt PKTm (4.2.8) exprimiert.

4.2.10 RT-PCR mit RNA

Die Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion dient der Untersuchung der Expression spezifischer Gene auf mRNA Ebene. Dazu wird die Synthese von cDNA aus mRNA mittels der reversen Transkriptase mit anschließender PCR kombiniert. Bei allen in dieser Arbeit aufgeführten Methoden mit RNA wurden Kontaminationen mit RNasen vermieden. Dazu wurden Glasgefäße und Arbeitsflächen mit 0.1 M NaOH und 1 mM EDTA vorbehandelt. Alle Lösungen wurden frisch angesetzt und sofort autoklaviert.

Isolierung von RNA aus einem Zellpellet. Die RNA-Isolierung aus Zellen von *Archaeoglobus fulgidus* VC16 erfolgte mit dem RNeasy Isolierungs-Kit (Qiagen, Hilden), womit eine schnelle Isolierung von RNA möglich ist. Dabei wird selektiv mRNA angereichert, da die RNA-bindende Membran der RNeasy Säule nur RNA-Fragmente bindet, die größer als 200 Basen sind, d.h. tRNAs und die kleinen rRNAs werden entfernt.

Die Isolierung von RNA erfolgte aus etwa 2×10^8 Zellen. Dazu wurden 100 ml einer sich in der logarithmischen Wachstumsphase befindlichen Kultur zentrifugiert ($9000 \times g$, 20 min bei 4°C) und das Pellet in einem Mörser unter flüssigem Stickstoff pulverisiert. Die aufgeschlossenen Zellen wurden in ein Reaktionsgefäß gegeben und in 100 μl RNase-freiem A. bidest. aufgenommen. Nach Zugabe von 350 μl mit β -Mercaptoethanol versetztem RLT-Puffer (RNeasy Aufschluss Puffer) wurde nach Zentrifugation ($12000 \times g$, 2 min) der Überstand zur Homogenisation auf eine QIAshredder-Säule (Qiagen, Hilden) gegeben. Die Extraktion der RNA aus dem Homogenisat erfolgte mit Hilfe einer RNeasy Säule ohne Modifikation nach den Angaben des Herstellers, wobei die DNA durch Hydrolyse mit RNase-freier DNase (Qiagen, Hilden) in 30minütiger Inkubation entfernt wurde. Die Elution der RNA von der Säule erfolgte mit 50 μl RNase-freiem A. bidest.. Zur Bestimmung von Konzentration und Reinheit der RNA wurden 1.2%ige RNA-Agarosegele genutzt.

Agarosegelelektrophorese. Die Auftrennung von RNA erfolgte in 1.2%igen Agarosegelen. Dazu wurden 0.3 g Agarose mit 3 ml 10x FA-Puffer (200 mM MOPS pH 7 mit 50 mM Natriumacetat und 10 mM EDTA) versetzt, mit RNase-freiem A. bidest. auf 30 ml aufgefüllt und durch Aufkochen gelöst. Nach Abkühlung auf etwa 60°C wurden 0.3 μl Ethidiumbromid (10 mg/ml) und 540 μl 37% Formaldehyd zugegeben und die Lösung in eine Gießvorrichtung (7 x 10 cm) gegeben (Biometra, Göttingen). Nach Erstarren des Gels wurde es für mindestens 30 min in 1x FA-Puffer (100 ml 10x FA-Puffer, 20 ml 37%iges Formaldehyd auf 1000 ml A. bidest.) äquilibriert. Aliquots der isolierten RNA wurden mit 2fach RNA-Auftragspuffer (0.05% (w/v) Bromphenolblau, 80 μl 500 mM EDTA, 720 μl 37% Formaldehyd, 2 ml 100% Glycerin, 3084 μl Formamid, 4 ml 200 mM MOPS, 116 μl A. bidest.) versetzt, 5 min bei 65°C inkubiert und neben einen RNA-Standard (RNA Ladder Low Range, Fermentas, Vilnius, Litauen) auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 80 V in 1x FA-Puffer. Anschließend wurden die Gele auf einem UV-Schirm (366 nm) analysiert.

RT-PCR mit spezifischen Primern. Die RT-PCR wurde mit dem QIAGEN oneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Der 25 μl Reaktionsansatz enthielt 5 μl 5x oneStep RT-PCR Puffer, 400 μM dNTP-Mix, 5 U RNase-Inhibitor (Humane Plazenta, Sigma, Deisenhofen), 0.6 μM RTPCRipgmAf1751F und RTPCRipgmAf1751R (Tabelle 1), 1 μl oneStep RT-PCR Enzym-Mix, 70 ng RNA und RNase-freies A.bidest.. Das Inkubationsprotokoll bestand aus einer Inkubation für 30 min bei 50°C (Reverse Transkriptase Schritt), Inkubation für 15 min bei 95°C (Inaktivierung der Reversen Transkriptase, Aktivierung der DNA-Polymerase), 33 Zyklen mit Denaturierung für 45 s bei 94°C , Annealing für 45 s bei 58°C und Polymerisation bei 72°C für 120 s und einem abschließenden Syntheseschritt bei 72°C für 10 min. Zur Kontrolle der RNA bezüglich unvollständiger Hydrolyse von DNA während der RNA-Präparation wurde ein identischer Ansatz inkubiert, bei dem aber die Template-RNA erst nach der Inaktivierung der Reversen Transkriptase zugegeben wurde. Aliquots der RT-PCR-Ansätze wurden

anschließend auf 2%igen Agarosegelen (4.2.4) analysiert, wobei der Kontrollansatz kein Signal bringen durfte.

4.3 Proteinbiochemische Methoden

4.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Colorimetrische Bestimmung von Protein nach Bradford. Die Proteinkonzentrationen wurden mit einer modifizierten Methode nach Bradford bestimmt (Bradford 1976). Es wurden 100 µl Probe und 900 µl Bradford-Reagenz (35 mg Serva blue G, 25 ml 96% Ethanol und 50 ml ortho-Phosphorsäure auf 500 ml A. bidest.) eingesetzt, gut gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktion wurde bei 595 nm gemessen. Eine Proportionalität der Messwerte war bis zu einer Proteinmenge von 7 µg im Test gegeben. Die Eichung erfolgte mit einem Standard aus Rinderserum-Albumin Fraktion V (Merck, Darmstadt).

Colorimetrische Bestimmung von Protein nach Biuret. Die Bestimmung des Proteingehaltes im Rohextrakt von *Ha. marismortui* (4.5.1) erfolgte nach Biuret (Bode et al. 1968). Die Proben (150 µl) wurden 1:1 mit 1 N NaOH verdünnt. Nach Zugabe von 700 µl Biuret-Reagenz (0.9 g Kaliumnatriumtartrat, 0.3 g $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$, 0.5 g KI in 40 ml 0.2 N NaOH lösen, mit 0.2 N NaOH auf 100 ml auffüllen) wurde der Ansatz für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde sofort die Extinktion bei 546 nm bestimmt. Als Standard diente Rinderserum-Albumin Fraktion V (Merck, Darmstadt). Die Proben und der Standard (maximal 3 mg Protein im Test) wurden in 100 mM Tris-HCl pH 7.5 mit 2 M NaCl angesetzt.

Bestimmung der Proteinkonzentration durch Absorptionsmessung bei 280 nm. Um die Konzentration an Protein einer Lösungen für die CD-Spektroskopie (4.4.1) errechnen zu können wurde die Absorption bei 280 nm bestimmt. Der molare Extinktionskoeffizient der jeweiligen Proteine wurde mit Hilfe von ProtParam (<http://us.expasy.org/>) errechnet. Mit diesen Ergebnissen wurde nun die Konzentration an Protein in der Lösung errechnet. Die Verunreinigung der Lösung mit DNA wurde durch Absorptionsmessung bei 260 nm ermittelt.

4.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese diente, neben der Reinheitskontrolle während der Proteinreinigung, der Bestimmung der apparenten molekularen Masse der Untereinheiten gereinigter Proteine. Die Elektrophorese erfolgte nach Laemmli in 12%igen, diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen (7 cm x 8 cm x 0.1 cm) in einer

Mini Protean Elektrophorese Zelle (Biorad, München). Trenn- und Sammelgel hatten folgende Zusammensetzung (Laemmli 1970):

	Trenngel (12%)	Sammelgel (3.75%)
30% Acrylamid 0.8% Bisacrylamid	1 ml	0.25 ml
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	0.625 ml	-
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	-	0.3 ml
10% SDS	0.025 ml	0.05 ml
A. bidest.	0.818 ml	1.625 ml
10% Ammoniumpersulfat	12.5 µl	12.5 µl
TEMED	1.25 µl	2.5 µl

Die Proben wurden mit 5x Auftragspuffer (63 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% Glycerin, 0.5% Bromphenolblau) versetzt, 10 min bei 95°C inkubiert und in die Geltaschen pipettiert. Der Elektrophoresepuffer bestand aus 25 mM Tris mit 190 mM Glycin und 0.02% SDS (pH-Wert wie eingewogen). Das Einlaufen der Proben in das Sammelgel erfolgte bei 70 V für 10 min. Die Trennung der Proteine über das Trenngel erfolgte bei 210 V für 60 min. Als Molekulargewichtsmarker dienten Standards von Biorad (München) oder PeqLab (Erlangen). Nach der Elektrophorese wurden die Proteine für mindestens 10 min in 25% Isopropanol und 10% Essigsäure im Gel fixiert und anschließend mit 0.03% Coomassie Brilliant Blue R250 in 10% Essigsäure gefärbt. Abschließend erfolgte mit 10% Essigsäure die Entfernung von nicht-proteingebundenem Farbstoff.

4.3.3 Blotten und N-terminale Aminosäuresequenzierung

Um die nativ gereinigten Enzyme Xylose Dehydrogenase aus *Ha. marismortui* und die Pyruvat Kinasen aus *T. maritima* und *A. fulgidus* mit anderen, potentiell homologen Proteinen vergleichen zu können, wurden die Aminosäuresequenzen am N-Terminus bestimmt. Dazu wurden je 15 bis 20 µg Protein durch Blotten auf eine Immobilon™ Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membran (Millipore, Eschborn) übertragen. Die Proben wurden zuvor auf ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel (4.3.2) aufgetragen. Als Laufpuffer diente 100 mM Tris-HCl pH 8.2 mit 100 mM Tricin und 0.1% SDS. Die Membran wurde vor dem Blotten in Methanol getaucht und die für das Blotten notwendigen Materialien (Membran, Gel, Adapter und Filterpapier) in Transferpuffer (50 mM Natriumborat pH 9 mit 20% Methanol und 0.02% SDS) äquilibriert. Es wurde eine Mini Trans-Blot Zelle (Biorad, München), betrieben mit einem PowerPac 1000 (Biorad, München), verwendet. Der Transfer des Proteins aus dem Gel auf die Membran erfolgte über 4 h bei konstant 35

V und 6 W. Anschließend wurde die Membran für 1 bis 2 min in 0.3% Coomassie Brilliant Blue R250 mit 50% Methanol und 10% Essigsäure gefärbt und in 50% Methanol mit 10% Essigsäure entfärbt. Die Proteinbanden wurden jeweils aus der Membran geschnitten und zur Sequenzierung an Herrn Dr. R. Schmid (Universität Osnabrück) geschickt.

4.3.4 Apparentes Molekulargewicht von nativen Proteinen

Die apparenten molekularen Massen der gereinigten Proteine wurden unter nativen Bedingungen säulenchromatographisch mittels Ausschluss-Chromatographie an einer Superdex 200 HiLoad 16/60 (120 ml) (Pharmacia, Freiburg) bestimmt. Bei jedem Säulenlauf mit 0.1 M Tris-HCl pH 7.4 mit 150 mM NaCl und einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min betrug das Probenvolumen 1 ml. Als Molekulargewichtsstandards dienten Dextran Blue (2000 kDa), β -Amylase (200 kDa), Alkohol Dehydrogenase (150 kDa), Rinderserum-Albumin (66 kDa), Carboanhydrase (29 kDa) und Cytochrom c (12.4 kDa) (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) oder der Molekulargewichtsstandard von Biorad (München) bestehend aus: Thyroglobulin (670 kDa), IgG (158 kDa), Ovalbumin (44 kDa), Myoglobin (17 kDa) und B₁₂ (1.35 kDa).

4.3.5 Ultrafiltration

Ultrafiltrationen wurden mit Hilfe einer 100 ml oder 10 ml Ultrafiltrationszelle (Amicon, Beverly, USA) durchgeführt. Diese Methode diente dem Ankonzentrieren oder dem Umpuffern von Proteinlösungen während der Proteinreinigung. Zur Ultrafiltration konnten Filter (Sartorius, Göttingen) verschiedener Ausschlussgrößen eingesetzt werden. Die gewählte Ausschlussgröße lag jeweils unter der apparenten Größe der Untereinheiten der Proteine.

4.3.6 Reinigung von nativen Proteinen

Alle in dieser Arbeit gereinigten Proteine (siehe auch 4.3.7) wurden bis zur apparenten Homogenität angereichert. Die säulenchromatographischen Schritte wurden mit einer BioLogic Workstation (Biorad, München) und FPLC-Säulen von Pharmacia (Feiburg) und Biorad (München) bei 7°C bis 15°C durchgeführt. Die Elution der Proteine von den Säulen wurde durch Absorptionsmessung bei 280 nm verfolgt. Zur Berechnung der spezifischen Aktivitäten wurde nach Ermittlung der Aktivität (U/ml) in den Fraktionen die Proteinkonzentration nach Bradford (4.3.1) bestimmt.

Reinigung der Pyruvat Kinase (PK) aus *A. fulgidus* Stamm 7324. Der zellfreie Rohextrakt wurde aus 80 g Stärke-gewachsenen Feuchtzellen präpariert. Die Zellen wurden dazu in 150 ml 50 mM Tris-HCl pH 7 mit 10 mM NaCl, 2 mM EDTA und 1 mM DTE suspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte unter aeroben Bedingungen mittels 3maliger Hochdruckhomogenisation in einer gekühlten French Press Zelle (American Instrument Company, Silver Spring, Maryland, USA) bei 86 bar. Diese Suspension wurde bei 100000 x g und 4°C für 90 min ultrazentrifugiert.

Der 100000 x g Überstand wurde auf eine Q-Sepharose HiLoad Säule (22 x 5 cm) aufgetragen, die in 50 mM Tris-HCl pH 9 mit 1 mM DTE (Puffer A) äquilibriert war. Die Proteine wurden mit einer Flussrate von 5 ml/min und einem pH-Gradienten von pH 9 bis pH 7 in Puffer A und von pH 7 bis pH 6.5 in 50 mM bisTris-Propan pH 6.5 mit 1 mM DTE eluiert. Die Fraktionen mit höchster PK Aktivität wurden nach Umpuffern auf pH 9 mittels Ultrafiltration (4.3.5, Ausschlussgröße: 20 kDa) in Puffer A auf eine Uno Q5 Säule (5 ml) aufgetragen, die mit Puffer A äquilibriert war. Die Proteine wurden mit einer Flussrate von 2 ml/min und einem NaCl-Gradienten von 0 bis 0.5 M in Puffer A eluiert. Die Fraktionen mit höchster PK Aktivität wurden mittels Ultrafiltration auf ein Volumen von 1 ml konzentriert. Diese Proteinlösung wurde auf eine Superdex 200 HiLoad 16/60 (120 ml) Gelfiltrationssäule aufgetragen, die in 50 mM MES pH 6.5 mit 50 mM NaCl und 1 mM DTE äquilibriert war. Die Proteine wurden mit einer Flussrate von 1 ml/min eluiert. Fraktionen mit höchster PK Aktivität wurden auf eine Uno S1 Säule (1 ml) aufgetragen, die mit 50 mM Natriumacetat pH 5.3 mit 1 mM DTE äquilibriert war. Die Elution der Proteine erfolgte bei einer Flussrate von 2 ml/min mit einem linearen NaCl-Gradienten bis 1 M. Apparent homogenes Protein mit PK Aktivität eluierte bei 0.25 M NaCl. Dieses Protein konnte ohne signifikanten Aktivitätsverlust über mehrere Wochen bei -20°C gelagert werden.

Reinigung der PK aus *T. maritima*. Der zellfreie Rohextrakt wurde aus 59 g Stärke-gewachsenen Feuchtzellen präpariert. Die Zellen wurden dazu in 90 ml 50 mM Tris-HCl pH 7 mit 2 mM DTE suspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte unter aeroben Bedingungen mittels 3maliger Hochdruckhomogenisation in einer gekühlten French Press Zelle bei 86 bar. Diese Suspension wurde bei 100000 x g und 4°C für 90 min ultrazentrifugiert.

Der 100000 x g Überstand wurde auf eine Q-Sepharose HiLoad Säule (430 ml) aufgetragen, die mit 50 mM Tris-HCl pH 7 mit 2 mM DTE äquilibriert war. Nach einem Waschschrift mit 50 mM Piperazin pH 6.4 mit 2 mM DTE (Puffer B) wurde das Protein mit einer Flussrate von 3 ml/min und einem steigenden NaCl-Gradienten bis 2 M in Puffer B (1300 ml) eluiert. Fraktionen mit höchster PK Aktivität (70 ml, 0.15 bis 0.3 M NaCl) wurden auf eine SP-Sepharose Säule (75 ml) aufgetragen, die in 50 mM MES pH 5.5 mit 2 mM DTE äquilibriert war. Die Proteine wurden mit einer Flussrate von 3 ml/min und einem pH Gradienten von 5.5 bis 7.5 in 50 mM MES (300 ml) eluiert. Die Fraktionen mit

höchster PK Aktivität wurden auf ein Volumen von 1 ml mittels Ultrafiltration (4.3.5, Ausschlussgröße: 20 kDa) eingeeengt und auf eine Superdex 200 HiLoad 16/60 Gelfiltrationssäule aufgetragen, die mit 50 mM Tris-HCl pH 7 mit 50 mM NaCl und 2 mM DTE äquilibriert war. Die Proteine wurden mit einer Flussrate von 1 ml/min eluiert. Die Fraktionen mit PK Aktivität wurden auf eine Uno S1 Säule (1 ml), die mit 50 mM MES pH 5.5 mit 2 mM DTE äquilibriert war, aufgetragen. Die Proteine wurden mit einer Flussrate von 2 ml/min mit einem linearen NaCl-Gradienten von 0 bis 1 M (5 ml) eluiert. Die Fraktionen mit höchster PK Aktivität wurden auf eine Uno Q1 Säule (1 ml) aufgetragen, die in 50 mM Tris-HCl pH 8 mit 1 mM DTE äquilibriert war. Die Proteine wurden mit einer Flussrate von 2 ml/min und einem pH-Gradienten von pH 8 bis pH 5.3 in 50 mM Piperazin mit 2 mM DTE eluiert. Die Fraktion mit der höchsten PK Aktivität eluierte bei pH 5.5. Das Enzym war in diesem Stadium apparent homogen und konnte über Wochen ohne signifikanten Aktivitätsverlust bei -20°C gelagert werden.

Reinigung der Xylose Dehydrogenase aus *Ha. marismortui*. Der zellfreie Rohextrakt wurde aus 4 g Xylose-gewachsenen Feuchtzellen präpariert. Die Zellen wurden dazu in 100 mM Tris-HCl pH 8.8 mit 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und 20 mM MgCl_2 (Puffer C) suspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels 3maliger Hochdruckhomogenisation in einer gekühlten French Press Zelle bei 86 bar. Diese Suspension wurde bei $100000 \times g$ und 4°C für 90 min ultrazentrifugiert.

Der $100000 \times g$ Überstand wurde auf eine Sepharose CL 4B Säule 16/60 aufgetragen, die mit Puffer C äquilibriert war. Die Proteine wurden mit einer Flussrate von 0.4 ml/min und einem linearen Gradienten von 2 bis 0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in Puffer C eluiert (300 ml). Die Fraktionen mit der höchsten Xylose Dehydrogenase Aktivität (1.6 bis 1.4 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) wurden auf 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eingestellt und auf eine Phenyl Sepharose 26/10 Säule, die mit 50 mM Tris-HCl pH 8.5 mit 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und 20 mM MgCl_2 (Puffer D) äquilibriert war, mit einer Flussrate von 2 ml/min aufgetragen. Die Proteine wurden mit einem linearen Gradienten von Puffer D zu 50 mM Tris-HCl pH 8.5 mit 20 mM MgCl_2 und 10% Glycerol (Puffer E) (300 ml) eluiert. Die Fraktionen mit der höchsten Xylose Dehydrogenase Aktivität (7 ml, 1.04-0.95 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) wurden mittels Ultrafiltration (4.3.5) auf ein Volumen von 600 μl (Ausschlussgröße: 20 kDa) eingeeengt und auf eine Superdex 200 HiLoad 16/60 Säule aufgetragen, die mit Puffer E mit 100 mM NaCl äquilibriert war. Die Proteine wurden mit einer Flussrate von 1 ml/min eluiert. In diesem Stadium war das Enzym apparent homogen, war über Monate ohne Aktivitätsverlust stabil und wurde bei -20°C gelagert.

4.3.7 Reinigung von rekombinanten Proteinen

Die allgemeinen Bedingungen für die Reinigung von rekombinanten Proteinen entsprachen denen der nativ gereinigten Proteine (4.3.6).

Reinigung der rekombinanten PK aus *T. maritima*. Das Pellet nach Ernte der Zellen (4.2.8) wurde in 20 mM Tris-HCl pH 8.2 mit 0.3 M NaCl und 4 mM Imidazol suspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels 3maliger Hochdruckhomogenisation in einer gekühlten French Press Zelle bei 86 bar. Diese Suspension wurde bei 48000 x g und 4°C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde für 30 min bei 70°C inkubiert und die hitzepräzipitierten Proteine pelletiert (100000 x g, 4°C, 60 min). Der Überstand wurde auf eine Ni-NTA Säule (7 ml) aufgetragen, die in 20 mM Tris-HCl pH 8.2 mit 0.3 M NaCl und 4 mM Imidazol äquilibriert war. Die Proteine wurden mit einem steigenden Imidazol-Gradienten von 4 bis 500 mM bei einer Flussrate von 1 ml/min eluiert. Die Fraktionen mit der höchsten PK Aktivität wurden mittels Ultrafiltration (4.3.5) auf ein Volumen von 1 ml (Ausschlussgröße: 30 kDa) eingengt. Die Proteinlösung wurde auf eine Superdex 200 HiLoad 16/60 Gelfiltrationssäule aufgetragen, die in 50 mM Tris-HCl pH 7.5 mit 150 mM NaCl und 1 mM DTE äquilibriert war. Die Proteine wurden mit einer Flussrate von 1 ml/min eluiert. Die Fraktionen mit der höchsten PK Aktivität wurden auf eine Uno S1 Säule (1 ml) aufgetragen, die in 50 mM MES pH 5.5 mit 1 mM DTE äquilibriert war. Die Proteine wurden mit einem NaCl-Gradienten bis 1 M NaCl bei einer Flussrate von 1 ml/min eluiert. Die Fraktion mit PK Aktivität eluierte bei 0.8 M NaCl. In diesem Stadium war das Enzym apparent homogen und konnte bei -20°C ohne Aktivitätsverlust über Monate gelagert werden.

Reinigung der rekombinanten PK aus *A. pernix*. Das Pellet nach Ernte der Zellen (4.2.8) wurde in 20 mM Tris-HCl pH 8.2 mit 0.3 M NaCl und 4 mM Imidazol suspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels 3maliger Hochdruckhomogenisation in einer gekühlten French Press Zelle bei 86 bar. Diese Suspension wurde bei 48000 x g und 4°C für 30 min zentrifugiert. Der zellfreie Überstand wurde für 30 min bei 77°C inkubiert, anschließend zentrifugiert (100000 x g, 4°C für 60 min) und auf eine in 20 mM Tris-HCl pH 8.2 mit 0.3 M NaCl und 4 mM Imidazol äquilibrierte Ni-NTA Säule (7 ml) aufgetragen. Die Proteine wurden mit einem steigenden Imidazol-Gradienten von 4 bis 500 mM bei einer Flussrate von 1 ml/min eluiert. Die Fraktionen mit der höchsten PK Aktivität wurden für 15 min bei 100°C inkubiert und anschließend zentrifugiert. In diesem Stadium war das Enzym apparent homogen und für einige Wochen bei 4°C ohne signifikanten Aktivitätsverlust stabil.

Reinigung der rekombinanten PK aus *P. aerophilum*. Das Pellet nach Ernte der Zellen (4.2.8) wurde in 50 mM Tris-HCl pH 8.5 suspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels 3maliger Hochdruckhomogenisation in einer gekühlten French Press Zelle bei 86 bar. Diese Suspension wurde bei 48000 x g und 4°C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde für 30 min bei 75°C inkubiert und anschließend zentrifugiert (100000 x g, 4°C für 60 min). Nach Austausch des Puffers gegen 50 mM Piperazin pH 5.3 mittels Ultrafiltration (4.3.5, Ausschlussgröße: 30 kDa) wurde die Proteinlösung auf eine Uno S5 Säule (5 ml) aufgetragen, die in 50 mM Piperazin pH 5.3 äquilibriert war. Die Proteine wurden bei einer Flussrate von 1.5 ml/min mit einem steigenden NaCl-Gradienten bis 1 M eluiert. Die Fraktionen mit der höchsten PK Aktivität (0.3 bis 0.4 M NaCl) wurden mittels Ultrafiltration auf ein Volumen von 1 ml eingeeengt und die Proteinlösung auf eine Superdex 200 HiLoad 16/60 Gelfiltrationssäule aufgetragen, die in 50 mM Tris-HCl pH 7.5 mit 150 mM NaCl äquilibriert war. Die Proteine wurden mit einer Flussrate von 1 ml/min eluiert. Das Enzym war anschließend apparent homogen und konnte über Monate bei -20°C ohne Aktivitätsverlust gelagert werden.

Reinigung der rekombinanten Phosphoglycerat Mutase (PGM) aus *A. fulgidus* VC16. Das Pellet nach Ernte der Zellen (4.2.8) wurde in 20 mM Tris-HCl pH 8.2 mit 0.3 M NaCl und 4 mM Imidazol suspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels 3maliger Hochdruckhomogenisation in einer gekühlten French Press Zelle bei 86 bar. Diese Suspension wurde bei 48000 x g und 4°C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde für 30 min bei 75°C inkubiert, anschließend zentrifugiert (100000 x g, 4°C für 60 min) und auf eine Nickel-NTA Säule (7 ml) aufgetragen, die in 20 mM Tris-HCl pH 8.2 mit 0.3 M NaCl und 4 mM Imidazol äquilibriert war. Die Proteine wurden bei einer Flussrate von 1 ml/min mit drei steigenden Imidazolgradienten (4 bis 20 mM, 20 bis 50 mM und 50 bis 500 mM) eluiert. 1 ml der Fraktion mit der höchsten PGM Aktivität wurde auf eine Superdex 200 16/60 Gelfiltrationssäule aufgetragen, die in 50 mM Tris-HCl pH 7.3 mit 150 mM NaCl äquilibriert war. Die Proteine wurden mit einer Flussrate von 1 ml/min eluiert. In diesem Stadium war das Protein apparent homogen und wurde bei 4°C für einige Wochen ohne signifikanten Aktivitätsverlust gelagert.

Reinigung der rekombinanten PGM aus *T. acidophilum*. Das Pellet nach Ernte der Zellen (4.2.8) wurde in 0.1 M Tris-HCl pH 8 mit 2 mM EDTA suspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels 3maliger Hochdruckhomogenisation in einer gekühlten French Press Zelle bei 86 bar. Diese Suspension wurde bei 48000 x g und 4°C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde für 30 min bei 55°C inkubiert und anschließend zentrifugiert (100000 x g, 4°C für 60 min). 1 ml des Überstandes (18 mg/ml) diente als Auftrag auf eine mit 50 mM Tris-HCl pH 7.4 mit 150 mM NaCl äquilibrierte Superdex 200 Gelfiltrationssäule. Die Proteine wurden bei einer Flussrate von 1 ml/min eluiert.

Proteinfraktionen mit höchster PGM Aktivität wurden vereint. Diese Proteinlösung diente nach Verdünnung in 10 Volumen 50 mM Tris-HCl pH 8.5 als Auftrag auf eine Uno Q1 Säule, die mit 50 mM Tris-HCl pH 8.5 äquilibriert war. Mit einer Flussrate von 2 ml/min wurde an die Säule gebundenes Protein durch einen steigenden NaCl-Gradienten von 0 bis 2 M eluiert. Protein mit PGM Aktivität eluierte zwischen 0.4 und 0.6 M NaCl. In diesem Stadium war das Protein apparent homogen und wurde bei 4°C für einige Wochen ohne signifikanten Aktivitätsverlust gelagert.

4.4 Charakterisierung von gereinigten Enzymen

Im Folgenden werden die Testsysteme, die zur Charakterisierung der gereinigten Enzyme eingesetzt wurden, beschrieben. Die Enzymtests wurden an einem beheizbaren Ultrospec2000 Photometer (Pharmacia, Freiburg) in Halbmikro-Einwegküvetten ($d = 1$) durchgeführt. Die Testlösungen wurden in den Küvetten bei der jeweiligen Temperatur vorinkubiert, die Startbarkeit sowie die Proteinabhängigkeit der Reaktion durch die verschiedenen Substrate bzw. durch Extrakt wurden überprüft. Die Enzymreaktionen wurden mit der Reduktion von NAD(P)^+ oder der Oxidation von NADH gekoppelt und die Extinktionszunahme bzw. -abnahme bei 365 nm verfolgt. Die spezifische Aktivität wurde mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von $3.4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ pro zwei Elektronen berechnet. Dabei gilt für alle Testsysteme: 1 Unit (U) ist definiert als 1 μmol verbrauchtes Substrat oder gebildetes Produkt pro Minute. Es war sichergestellt, dass die verwendeten Hilfsenzyme im Test nicht limitierend waren.

Zur Charakterisierung der Enzyme gehörten die Bestimmung der kinetischen Parameter, des Temperaturoptimums, der Thermostabilität und des pH-Optimums. Außerdem wurde der Einfluss verschiedener Kationen auf die Aktivität der Pyruvat Kinasen und der Einfluss von allosterischen Effektoren getestet. CD-Spektren und Schmelzkurven wurden aufgenommen.

4.4.1 Charakterisierung der Pyruvat Kinasen (PK)

PKs katalysieren die Reaktion: Phosphoenolpyruvat (PEP) + ADP \rightarrow Pyruvat + ATP. Die Aktivität wurde bis 65°C in einem kontinuierlichen Testsystem in Richtung der Pyruvatbildung gemessen. Der Testansatz enthielt für *A. fulgidus* und *T. maritima*: 0.1 M Triethanolamin pH 7 mit 1 mM PEP, 2 mM ADP, 5 mM MgCl_2 , 0.3 mM NADH und 1 U Laktat Dehydrogenase und für *A. pernix* und *P. aerophilum*: 0.1 M bisTris pH 6.2 mit 1 mM PEP, 2 mM ADP, 5 mM MgCl_2 , 0.3 mM NADH und 1 U Laktat Dehydrogenase. Die Bildung von Pyruvat zwischen 65°C und 98°C wurde über einen diskontinuierlichen Test bestimmt. Der Testansatz enthielt: in einem Volumen von 250 μl 0.1 M Triethanolamin,

Tris-HCl oder bisTris, 1 mM PEP, 2 mM ADP, 5 mM MgCl₂. Die Reaktion wurde mit Protein gestartet. Die Inkubationszeit betrug 15 bis 120 s und die Reaktion wurde durch die Zugabe von 750 µl eisgekühltem Puffer (0.1 M Tris-HCl pH 7 mit 0.6 mM NADH und 0.5 U Laktat Dehydrogenase) gestoppt. Die Menge an gebildetem Pyruvat wurde durch die Oxidation von NADH bei 365 nm quantifiziert. Die katalytischen Parameter wurden bei 65°C im kontinuierlichen Testsystem bestimmt. Die S_{0.5}-Werte wurden jeweils aus den sigmoidal gefitteten Substratsättigungskurven ermittelt, nach Darstellung dieser Daten nach Hill wurden die Hill-Koeffizienten errechnet.

Der Einfluss der Temperatur auf die Enzymaktivität der PKs aus *A. fulgidus*, *A. pernix*, *P. aerophilum* und *T. maritima* wurde im kontinuierlichen und diskontinuierlichen Testsystem zwischen 20°C und 98°C getestet. Die Testansätze enthielten: 0.1 M Triethanolamin pH 7 (*A. fulgidus*) bzw. 0.1 M bisTris pH 6.2 (*A. pernix*, *P. aerophilum* und *T. maritima*) jeweils mit 1 mM PEP, 2 mM ADP und 5 mM MgCl₂. Zur Bestimmung der Temperaturstabilität der gereinigten Enzyme wurde jeweils gereinigtes Protein in geschlossenen Inkubationsgefäßen bei Temperaturen zwischen 70°C und 110°C bis zu 120 min inkubiert. Die Testansätze enthielten: 0.5 µg Protein in 30 µl 0.1 M Triethanolamin pH 7 (*A. fulgidus*), 1.5 µg Protein in 30 µl 0.1 M bisTris pH 6.2 (*A. pernix*), 1.4 µg Protein in 30 µl 0.1 M Natriumphosphat pH 7 (*P. aerophilum*) und 1 µg Protein in 30 µl 0.1 M Triethanolamin pH 7 (*T. maritima*) (der pH-Wert wurde jeweils auf die entsprechende Temperatur eingestellt). Nach der Inkubation wurden die Inkubationsgefäße jeweils für 10 min auf Eis gekühlt und anschließend die Restaktivität bei 65°C im kontinuierlichen Testsystem unter Standardbedingungen bestimmt.

Die Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der gereinigten Enzyme vom pH-Wert wurde zwischen 5.5 und 8.2 bei 50°C im kontinuierlichen Testsystem mit entweder bisTris (pH 5.5 bis pH 6.5), bisTris-Propan (pH 6 bis pH 7.5) oder Tris-HCl (pH 7 bis pH 8.2) (*A. fulgidus*) und bei 65°C mit entweder Piperazin (pH 5.5 bis pH 6.1), bisTris (pH 6.1 bis pH 6.5) oder Triethanolamin (pH 6.5 bis pH 7.5) (*A. pernix*, *P. aerophilum* und *T. maritima*) (jeweils 0.1 M) getestet. Verschiedene zweiwertige Kationen wurden unter Standardbedingungen im kontinuierlichen Testsystem bei 50°C (*A. fulgidus*) oder 65°C (*A. pernix*, *P. aerophilum* und *T. maritima*) getestet, indem Mg²⁺ durch jeweils die gleiche Konzentration (1 mM) an Mn²⁺, Co²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺ oder Ni²⁺ ersetzt wurde. Die Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von den monovalenten Kationen K⁺, NH₄⁺, Na⁺, Li⁺, Rb⁺ und Cs⁺ wurde bis zu Konzentrationen von 0.1 M getestet, die Kationen wurden jeweils als Chloride zugegeben.

Die folgenden klassischen Effektoren von PKs wurden bei 65°C im kontinuierlichen Testsystem im Konzentrationsbereich zwischen 10 µM und 5 mM getestet: Fructose-1,6-bisphosphat, Fructose-2,6-bisphosphat, AMP, ATP, L-Alanin, Ribose-5-phosphat, Glucose-6-phosphat, Fructose-6-phosphat, Citrat und Erythrose-4-phosphat. Der Testansatz enthielt 0.3 mM NADH und 1 U Laktat Dehydrogenase für alle getesteten PKs

sowie für *A. fulgidus* 0.4 mM MgCl₂, 0.4 mM ADP und 0.2 mM PEP in 0.1 M Triethanolamin pH 7 (65°C), für *P. aerophilum* 7.5 mM MgCl₂, 1.5 mM ADP und 0.5 mM PEP in 0.1 M bisTris pH 6.2 (65°C) und für *A. pernix* 1 mM MgCl₂ oder MnCl₂ und 0.3 mM PEP in 0.1 M bisTris pH 6.2 oder 0.1 M Tris-HCl pH 7.5 (65°C). Im Fall von *A. pernix* wurden die Effektoren mit Protein bei entsprechender Temperatur vorinkubiert. Der Testansatz für *T. maritima* enthielt: 2.5 mM ADP, 2.5 mM MgCl₂ und 0.3 mM PEP in 0.1 M MES pH 6.5 (65°C). Die Effektoren wurden in jedem Fall mit Substraten ADP und PEP höchster Reinheit (Roche Diagnostics, Mannheim) getestet.

CD-Spektren und Schmelzkurven wurden in einem JASCO J-715 CD-Spektrometer mit 0.1 mm Küvetten aufgenommen. Die Kurven wurden jeweils mit den Signalen des Puffers (20 mM Natriumphosphat pH 7) korrigiert. Die Proteinproben wurden vor der Messung gegen 20 mM Natriumphosphat pH 7 dialysiert und auf eine Konzentration von 100 µg/ml (Bestimmung durch Absorptionsmessung bei 280 nm, 4.3.1) eingestellt. Die Analysen der Sekundärstrukturen und der Vergleich zu anderen Sekundärstrukturtypen wurde durch Korrelation mit Varselec-Bedingungen von Dicroprot (Deleage und Geourjon 1993) erstellt. Schmelzkurven der Pyruvat Kinasen wurden über Temperaturgradienten gemessen. Die Temperatur wurde zwischen 50°C und 98°C mit 1°C pro min erhöht. Das Entfalten der Proteine wurde durch die Veränderung der α -helikalen Elliptizität bei 221 nm verfolgt.

4.4.2 Charakterisierung der Phosphoglycerat Mutasen (PGM)

Die iPGM (2,3-Bisphosphoglycerat-unabhängig) katalysiert die reversible Umwandlung von 3-Phosphoglycerat in 2-Phosphoglycerat. Die Aktivität der iPGM aus *A. fulgidus* VC16 wurde in beide Reaktionsrichtungen bei 50°C bestimmt. Die Bildung von 2-Phosphoglycerat aus 3-Phosphoglycerat wurde als Oxidation von NADH bei 365 nm bestimmt. Der Testansatz enthielt: 0.1 M Tris-HCl pH 7, 3 mM 3-Phosphoglycerat, 5 mM MgSO₄, 50 µM MnCl₂, 1 mM ADP, 0.3 mM NADH, 0.08 U Enolase, 0.4 U Pyruvat Kinase, 0.5 U Laktat Dehydrogenase und rekombinantes Protein. Die Bildung von 3-Phosphoglycerat aus 2-Phosphoglycerat wurde als Oxidation von NADH bei 365 nm bestimmt. Der Testansatz enthielt: 0.1 M Tris-HCl pH 7, 2 mM 2-Phosphoglycerat, 5 mM MgSO₄, 50 µM MnCl₂, 1 mM ATP, 1 mM Phosphoenolpyruvat, 0.3 mM NADH, Glycerat Kinase, 0.4 U Pyruvat Kinase, 0.5 U Laktat Dehydrogenase und rekombinantes Protein. Die kinetischen Parameter wurden jeweils aus der Darstellung der Daten nach Lineweaver-Burk ermittelt. Die Abhängigkeit der spezifischen Aktivität des gereinigten Enzyms vom pH-Wert wurde zwischen pH 6 und pH 7.7 bei 50°C getestet, wobei entweder 0.1 M bisTris (pH 6 bis pH 6.7) oder 0.1 M Tris-HCl (pH 7 bis pH 7.7) eingesetzt wurde. Die Temperaturstabilität des gereinigten Enzyms wurde bei Temperaturen zwischen 60°C und 85°C getestet. Der Testansatz enthielt: 8 µg Protein in

20 μ l 100 mM Triethanolamin pH 7 (bei der entsprechenden Temperatur) jeweils mit und ohne 50 μ M MnCl_2 und 5 mM MgCl_2 . Die Ansätze wurden anschließend für 10 min auf Eis inkubiert und die Restaktivität bei 50°C bestimmt.

Die dPGM (2,3-Bisphosphoglycerat-abhängig) katalysiert die reversible Umwandlung von 3-Phosphoglycerat in 2-Phosphoglycerat. Die Aktivität der dPGM aus *T. acidophilum* wurde in beide Reaktionsrichtungen bei 50°C bestimmt. Die Bildung von 2-Phosphoglycerat aus 3-Phosphoglycerat wurde als Oxidation von NADH bei 365 nm bestimmt. Der Testansatz enthielt: 0.1 M HEPES-KOH pH 7.5, 2 mM 3-Phosphoglycerat, 100 μ M 2,3-Bisphosphoglycerat, 5 mM MgCl_2 , 1 mM ADP, 0.3 mM NADH, 0.08 U Enolase, 0.4 U Pyruvat Kinase, 0.5 U Laktat Dehydrogenase und rekombinantes Protein. Die Bildung von 3-Phosphoglycerat aus 2-Phosphoglycerat wurde als Oxidation von NADH bei 365 nm bestimmt. Der Testansatz enthielt: 0.1 M HEPES-KOH pH 7.5, 2 mM 2-Phosphoglycerat, 100 μ M 2,3-Bisphosphoglycerat, 5 mM MgCl_2 , 2 mM ATP, 2 mM Phosphoenolpyruvat, 0.3 mM NADH, Glycerat Kinase, 0.4 U Pyruvat Kinase, 0.5 U Laktat Dehydrogenase und rekombinantes Protein. Die kinetischen Parameter wurden jeweils aus der Darstellung der Daten nach Lineweaver-Burk ermittelt. Die Hemmung der Aktivität des gereinigten Enzyms durch Vanadat wurde bei 50°C getestet. Der Testansatz enthielt: 0.1 M HEPES-KOH pH 7.5, 2 mM 2-Phosphoglycerat, 100 μ M 2,3-Bisphosphoglycerat, 5 mM MgCl_2 , 2 mM ATP, 2 mM Phosphoenolpyruvat, 0 bis 100 μ M Natriumvanadat, 2.5 mM EDTA, 0.3 mM NADH, Glycerat Kinase, 0.4 U Pyruvat Kinase, 0.5 U Laktat Dehydrogenase und rekombinantes Protein. Durch die Zugabe von 2.5 mM EDTA wurde getestet, ob die Hemmung aufhebbar war. Die Stimulierbarkeit des gereinigten Enzyms durch den Kofaktor 2,3-Bisphosphoglycerat und der K_m -Wert für 2,3-Bisphosphoglycerat konnten nur mit 2,3-Bisphosphoglycerat-freiem Substrat 3-Phosphoglycerat bestimmt werden. Das Kofaktor-freie Substrat wurde nach Towne et al. (Towne et al. 1957) hergestellt. Dazu wurden 5 g Bariumsalz von 3-Phosphoglycerat in 7 ml A. bidest. und 3 ml 10 N H_2SO_4 gelöst. Nach Zentrifugation (5000 x g, 10 min) wurde das Pellet zweimal in 9 ml A. bidest. gewaschen. Die drei Überstände wurden vereint, auf 730 ml (20 mM 3-Phosphoglycerat, pH 1.85) mit A. bidest. verdünnt und auf eine Dowex 1-X8 (400 mesh) Säule (5 ml) aufgetragen. 3-Phosphoglycerat wurde mit 40 ml A. bidest. von der Säule eluiert und 10fach in einer Vakuumzentrifuge bei 50°C ankonzentriert. Diese Lösung wurde mit KOH auf pH 4 eingestellt und anschließend mit einem Überschuss an $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ versehen. Nach langsamer Zugabe von zwei Volumen 95% Ethanol kristallisierte das Bariumsalz von 3-Phosphoglycerat bei -20°C für einige Stunden aus und wurde dann auf einem 0.2 μ m Filter gesammelt. Das Salz wurde abschließend mit 100 ml 65% Ethanol und 50 ml 95% Ethanol gewaschen und unter Vakuum getrocknet. Das Salz konnte zur Verwendung in 1 M HCl gelöst werden. Da die Bariumionen die Aktivität der Hilfsenzyme hemmten, wurde vor Einsatz in den Test das Barium als BaSO_4 mit gesättigter Na_2SO_4 -Lösung ausgefällt. Die Konzentration an 3-Phosphoglycerat wurde anschließend bei 37°C als Oxidation von NADH bei 365 nm

bestimmt. Der Testansatz enthielt 0.1 M Tris-HCl pH 8, 2 mM ADP, 5 mM MgCl₂, 0.3 mM NADH, 0.05 U Phosphoglycerat Mutase, 0.08 U Enolase, 0.4 U Pyruvat Kinase, 0.5 U Laktat Dehydrogenase und verschiedene Konzentrationen an 3-Phosphoglycerat. Der Testansatz für die Stimulierbarkeit des gereinigten Enzyms wurde mit 100 µM 2,3-Bisphosphoglycerat und 1.5 mM Kofaktor-freiem 3-Phosphoglycerat unter Standardbedingungen durchgeführt. Der Testansatz für den K_m -Wert von 2,3-Bisphosphoglycerat enthielt 0.75 mM Kofaktor-freies 3-Phosphoglycerat und 0 bis 50 µM 2,3-Bisphosphoglycerat.

4.4.3 Charakterisierung der Xylose Dehydrogenase

Xylose Dehydrogenase aus *Ha. marismortui* katalysiert die Reaktion: Xylose + NADP⁺ → Xylonat + NADPH+H⁺. Während der Reinigung der Xylose Dehydrogenase wurde die Aktivität unter aeroben Bedingungen bei 37°C über die Xylose-abhängige Reduktion von NADP⁺ bei 365 nm bestimmt. Der Testansatz enthielt: 0.1 M Tris-HCl pH 8.8, 1.5 M KCl, 1 mM NADP⁺, 10 mM Xylose und Protein. Die Abhängigkeit der spezifischen Aktivität des gereinigten Enzyms vom pH-Wert wurde zwischen pH 4.4 und pH 10.3 getestet. Die Ansätze enthielten entweder jeweils 20 mM Piperazin (pH 4.4 bis pH 5.5), bisTris (pH 5.6 und pH 7.2), Tris-HCl (pH 7.5 bis pH 9.3) oder Piperazin (pH 9.3 bis pH 10.3) mit 1.5 M KCl, 1 mM NADP⁺, 10 mM Xylose und Protein bei 37°C. Die Temperaturabhängigkeit der Xylose Dehydrogenase wurde zwischen 20°C und 60°C in 50 mM Tris-HCl, pH 8.3 mit 1.5 M KCl getestet. Der Einfluss verschiedener Salze auf die Aktivität der Xylose Dehydrogenase (bis 0.2 M MgCl₂, bis 3.5 M KCl und bis 3.5 M NaCl) wurde bei 37°C in 20 mM Tris-HCl pH 8.3 getestet. Die Substrate Xylose, Ribose, Glucose, Galactose, Fructose, Arabinose (bis 100 mM) wurden in Anwesenheit von 1 mM NADP⁺ oder NAD⁺ mit 20 mM Tris-HCl pH 8.3 mit 1.5 M KCl bei 37°C getestet. Die kinetischen Parameter wurden jeweils aus der Darstellung der Daten nach Lineweaver-Burk ermittelt.

4.5 Wachstumsbilanz auf Xylose und Enzymaktivitäten im Rohextrakt

4.5.1 Enzymmessung in Rohextrakten

In zellfreien Rohextrakten von *Ha. marismortui* wurden verschiedene Enzymaktivitäten gemessen. Zur Herstellung von Zellextrakten wurden Kulturen (200 ml, 4.1.3) am Ende der exponentiellen Phase durch Zentrifugation (4°C, 20 min, 8000 x g) geerntet, das Pellet in etwa 2 ml 0.1 M Tris-HCl pH 7.5 mit 250 g/l NaCl resuspendiert und die Suspension durch Ultraschall aufgeschlossen. Nach 3 min Ultraschallbehandlung (Branson Sonifer II Ultraschall Desintegrator, Branson, Heinemann, Schäbisch Gmünd) mit einem Minitip

und einem duty cycle von 30% wurde der Extrakt zentrifugiert (13000 x g, 15 min, 4°C) und der Überstand als zellfreier Extrakt in die Tests eingesetzt. Die Proteinbestimmung erfolgte nach Biuret (4.3.1). Die allgemeinen Handhabungen dieser Enzymtests entsprachen denen, die während der Charakterisierung von gereinigten Enzymen (4.4) verwendet wurden.

Xylose Isomerase. Die Xylose Isomerase katalysiert die reversible Umwandlung von Xylose zu Xylulose. Die Aktivität wurde durch colorimetrische Quantifizierung des Reaktionsproduktes Xylulose gemessen. Dazu wurden die Testansätze bei 37°C über einen Zeitraum von 20 min inkubiert. In den zu unterschiedlichen Zeiten aus den Testansätzen entnommenen Proben wurde die Reaktion mit Hilfe von 10% TCA im Test gestoppt. Nach Zentrifugation (13000 x g, 10 min) wurde die Xylulose-Konzentration in den Probenüberständen bestimmt (4.5.2). Der Testansatz enthielt: 0.1 M Tris-HCl pH 8.5 mit 1 M KCl, 1 mM CoCl₂, 5 mM MnSO₄, 5 mM MgCl₂, 10 bis 100 mM Xylose und 13 bis 27 mg Protein. Als Positivkontrolle wurde zellfreier Rohextrakt von Xylosegewachsenen *E. coli* K12-Zellen (DSM 498) inkubiert (100 ml Medium mit 20 mM Xylose: 0.5 mg FeSO₄·7H₂O (gelöst in 50 mM H₂SO₄), 1.39 g K₂HPO₄, 0.52 g KH₂PO₄, 0.2 g (NH₄)₂SO₄, 0.02 g MgSO₄·7H₂O, 0.05 g NaCl, 0.2 mg Thiamin, pH 7). Zur Herstellung von Zellextrakt wurden 200 ml Kultur mit einer OD bei 578 nm von 3 zentrifugiert (4°C, 20 min, 8000 x g) und das Pellet in 3 ml 4 mM Tris-HCl pH 7.4 suspendiert. Der Zellaufschluss und die Proteinbestimmung erfolgten analog zu *Ha. marismortui*. Um identische Testbedingungen zu verwenden wurde der *E. coli* Extrakt unter Hochsalzbedingungen (siehe Testansatz für *Ha. marismortui*) inkubiert.

Xylulose Kinase. Die Xylulose Kinase katalysiert die ATP-abhängige Phosphorylierung von Xylulose zu Xylulose-5-phosphat. Die Aktivität wurde bei 37°C durch colorimetrische Quantifizierung des Substrates Xylulose gemessen. Der Testansatz enthielt: 0.1 M Tris-HCl pH 8.5 mit 1 M KCl, 10 mM MgCl₂, 4 mM Cystein-HCl, 10 mM ATP und 6 mM Xylulose. Die Reaktion wurde gestartet mit 1.1 bis 2.1 mg Protein und anschließend für 30 min inkubiert. In den zu unterschiedlichen Zeiten aus den Testansätzen entnommenen Proben wurde die Reaktion mit Hilfe von 10% TCA im Test gestoppt. Nach Zentrifugation (13000 x g, 10 min) wurde die Xylulose-Konzentration in den Probenüberständen bestimmt (4.5.2). Als Positivkontrolle diente zellfreier Rohextrakt von *E. coli* (siehe Xylose Isomerase). Der *E. coli* Extrakt wurde unter identischen Bedingungen zu *Ha. marismortui* Extrakt inkubiert.

4.5.2 Bestimmung von Substraten

Xylose. Die Xylose-Konzentration wurde in den Probenüberständen colorimetrisch bestimmt (Brückner 1955). In Gegenwart starker Säuren werden in diesem Testsystem Pentosen zu Furfuralen. Diese bilden mit Phenolen farbige Kondensationsprodukte, die

zur quantitativen photometrischen Bestimmung von Pentosen verwendet werden können. Es handelt sich um einen Pentose-spezifischen Test.

Der Testansatz enthielt 100 μl Probe (maximal 1.5 mM Xylose im Test), 200 μl A. bidest. und 900 μl Testreagenz (41.5 ml konz. HCl, 2.5 ml Stammreagenz auf 50 ml mit A. bidest.; Stammreagenz: 1.35 g Ammoniumeisen-(III)sulfat, 2 g Orcin in 50 ml A. bidest.). Nach Durchmischung des Testansatzes wurde dieser für 20 min im Wasserbad gekocht, anschließend 5 min abgekühlt. Abschließend wurde die Extinktion bei 546 nm gemessen. Die Xylose-Konzentration in der Probe konnte mit Hilfe einer Eichgeraden errechnet werden, aus der der molare Extinktionskoeffizient mit $\epsilon = 5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ermittelt wurde.

Xylonat. Die Quantifizierung von Xylonat erfolgte mittels HPLC (LaChrom, Merck, Darmstadt) mit einer AminexHPX87H Säule der Firma Biorad (München) und einem UV-Detektor bei 210 nm. Als Laufmittel wurde H_2SO_4 (5 mM) mit einer Flussgeschwindigkeit von 0.6 ml/min eingesetzt. Zur Eichung dienten Xylonat-Standards mit 0 bis 10 mM Xylonat. Mit Hilfe der Retentionszeit konnte Xylonat in den Proben identifiziert werden. Über das Integral der Peaks konnte die Xylonatkonzentration der Proben bestimmt werden. Zur Probenvorbereitung wurden die zellfreien Überstände aus den Wachstumsversuchen im Verhältnis 1:5 mit 5 mM H_2SO_4 versetzt und für 30 min gekocht. Nach Zentrifugation (13000 $\times g$, 10 min) wurden die Überstände filtriert (Minisart RC4, 0.2 μm Porenweite, Sartorius GmbH, Göttingen) und das Filtrat zur Analyse eingesetzt.

Xylulose. Die Xylulose-Konzentration wurde in Probenüberständen colorimetrisch bestimmt (Horecker 1988). Dazu wurden 10 μl Probe mit 900 μl H_2SO_4 -Lösung (13 M H_2SO_4), 30 μl Carbazol-Lösung (0.12% Carbazol in 96% Ethanol) und 30 μl Cysteinhydrochlorid-Lösung (1.5% Cysteinhydrochlorid in A. bidest.) versetzt und 60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 546 nm gemessen. Die Eichung und Kontrolle des Testsystems wurde mit Ribulose-o-nitrophenylhydrazon (maximal 20 μM im Test, 5.7 mg in 10 ml Ethanol 96%) durchgeführt.

Gaschromatographische Bestimmung von CO_2 . Die Bestimmung erfolgte mit einem HP 5890 II Gaschromatographen von Hewlett Packard (Hamburg) mit einer Porapak Q 80/100 (180 cm \times 0.3 cm) Säule und N_2 als Trägergas. Die Detektion erfolgte mit einem Flammenionisationsdetektor. Die Eichung mit CO_2 erfolgte mit Gasgemischen in einem Konzentrationsbereich bis 5% CO_2 in N_2 . In diesem Bereich war das Integral der Peakflächen proportional zur Konzentration. Den Versuchsansätzen wurden Gasproben (30 μl) mit gasdichten Spritzen entnommen. Mit Hilfe der Retentionszeit wurde CO_2 identifiziert. Über das Integral der Peaks konnte die Konzentration an CO_2 in den Proben bestimmt werden. Der Gaschromatograph hatte folgende Einstellungen: N_2 -Flussrate: 29 ml/min, Brenngasfluss H_2 : 32 ml/min, Brenngasfluss Luft: 420 ml/min, Injektor: 100°C, Säulenofen: 100°C, Detektor: 400°C und Methanizer: 375°C.

4.5.3 Wachstumsbilanz von *Ha. marismortui* auf Xylose

Zur Bilanzierung von Substrat und Produkten im Wachstum wurde *Ha. marismortui* in mit einem Gummistopfen verschlossenen 1 Liter Müller-Krempel Flaschen gezüchtet. Die Flaschen waren mit 20 ml Medium (4.1.3), das 25 mM Xylose und 1 g/l Hefeextrakt als Kohlenstoff- und Energiequelle enthielt, gefüllt. Als Gasphase diente Raumluft. Das Medium wurde mit 10% Xylose-gewachsener Kultur angeimpft. Die Ansätze wurden bei 37°C unter Schütteln im Wasserbad inkubiert. Ein Kontrollansatz, der keine Xylose enthielt, wurde unter identischen Bedingungen inkubiert. Zur Bestimmung der optischen Dichte bei 578 nm und zur Bestimmung von Substrat bzw. Produkten wurden zu verschiedenen Zeiten 0.5 ml Probe entnommen. Die Proben wurden nach Bestimmung der optischen Dichte zentrifugiert (13000 x g, 10 min) und bis zur Bestimmung von Substrat im Überstand bei -20°C gelagert. Zur Bestimmung von CO₂ aus der Gasphase wurden Proben aus der Gasphase entnommen und sofort zur Konzentrationsbestimmung eingesetzt (4.5.2). Um die Bildung von CO₂ aus Xylose zu ermitteln, wurden die CO₂-Konzentrationen des Ansatzes mit Xylose um die Konzentrationen aus der CO₂-Bestimmung des Kontrollansatzes korrigiert.

5 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden Enzyme des Zuckerstoffwechsels von Archaea untersucht: Pyruvat Kinasen und Phosphoglycerat Mutasen aus hyperthermophilen Archaea und eine Xylose Dehydrogenase, das erste Enzym des Xyloseabbaus, aus dem halophilen Archaeon *Haloarcula marismortui*.

1. Pyruvat Kinasen (PK) aus drei hyperthermophilen Archaea wurden als natives Enzym (*Archaeoglobus fulgidus* Stamm 7324) und als rekombinante Enzyme (*Aeropyrum pernix*, *Pyrobaculum aerophilum*) gereinigt und biochemisch charakterisiert. Die molekularen und kinetischen Parameter sowie die Temperaturoptima und Temperaturstabilitäten wurden bestimmt. Insbesondere sollten die Effekte von allosterischen Regulatoren auf die Aktivität der archaeellen PKs getestet werden. Zum Vergleich wurde die PK aus dem hyperthermophilen Bakterium *Thermotoga maritima* biochemisch charakterisiert. Zusätzlich wurden Untersuchungen zur Abhängigkeit der PK aus *T. maritima* von monovalenten Kationen mit Hilfe von ortsspezifischer Mutagenese durchgeführt.
2. Die Gene für eine 2,3-Bisphosphoglycerat-unabhängige Phosphoglycerat Mutase (iPGM) aus *Archaeoglobus fulgidus* VC16 und für eine 2,3-Bisphosphoglycerat-abhängige Phosphoglycerat Mutase (dPGM) aus *Thermoplasma acidophilum* wurden identifiziert. Die rekombinanten Enzyme wurden biochemisch charakterisiert. Mit Hilfe von RT-PCR Experimenten wurde der Nachweis der *in vivo* Transkription einer iPGM aus *A. fulgidus* VC16 erbracht.
3. Das erste Enzym des Xyloseabbaus aus dem halophilen Archaeon *Haloarcula marismortui* wurde als eine induzierbare Xylose Dehydrogenase identifiziert. Das Enzym wurde gereinigt und biochemisch charakterisiert. Im partiell sequenzierten Genom von *Ha. marismortui* wurde das kodierende Gen identifiziert.

5.1 Pyruvat Kinasen aus hyperthermophilen Archaea und Bacteria (*Thermotoga*)

In den Genomen der hyperthermophilen Crenarchaeota *A. pernix* und *P. aerophilum* sind *pyk* Gene, ORF APE0489 und ORF PAE0819, die für hypothetische PKs kodieren, annotiert. Um ihre kodierende Funktion zu überprüfen wurden die Gene kloniert, in *E. coli* exprimiert und anschließend die rekombinanten PKs charakterisiert. In dem Genom von *A. fulgidus* Stamm VC16 ist kein *pyk* homologes Gen identifiziert. Der nahe verwandte *A. fulgidus* Stamm 7324 weist aber nach Wachstum auf Stärke hohe PK Aktivität auf (Labes

und Schönheit 2001), deshalb wurde die PK aus diesem Stamm gereinigt und charakterisiert.

5.1.1 Reinigung der archaeellen PKs

PK aus *A. fulgidus* Stamm 7324. Rohextrakt von *A. fulgidus* Stamm 7324 weist nach Wachstum auf Stärke 5fach höhere PK Aktivität (0.13 U/mg, 50°C) auf als nach Wachstum auf Laktat (0.02 bis 0.04 U/mg) (Labes und Schönheit 2001). Die PK wurde aus Stärke-gewachsenen Zellen bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Die Reinigung erfolgte an einer Q Sepharose Säule, einer Uno Q5 Säule, einer Gelfiltrationssäule und an einer Uno S1 Säule. Dabei wurde die PK mit einer Gesamtausbeute von 7% und einer spezifischen Aktivität von 1000 U/mg (80°C) 1200fach angereichert, was einem Anteil von 0.08% von nativer PK an löslichem Protein entspricht (Tabelle 3).

Tabelle 3 Reinigung der PK aus *A. fulgidus* Stamm 7324. Die Enzymaktivität wurde bei 80°C im diskontinuierlichen Testsystem als Bildung von Pyruvat aus Phosphoenolpyruvat in 0.1 M Tris-HCl pH 8 mit 1 mM PEP, 2 mM ADP und 5 mM MgCl₂ gemessen.

Reinigungsschritt	Protein (mg)	Aktivität (U)	Spez. Aktivität (U/mg)	Ausbeute (%)	Anreicherung (-fach)
Zellfreier Extrakt	2000	1850	0.92	100	1
Q Sepharose	115	1150	10	62	11
Uno Q5	9	890	100	48	109
Superdex 200	0.32	200	625	11	680
Uno S1	0.11	120	1090	7	1190

Der Reinheitsgrad der PK wurde nach jedem Reinigungsschritt gelelektrophoretisch analysiert (4.3.2). Nach dem letzten Reinigungsschritt zeigte sich auf dem SDS-Gel nur eine Bande (Abbildung 3).

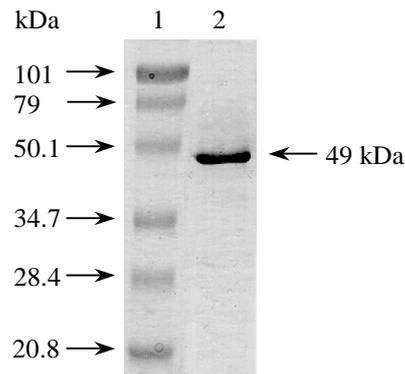


Abbildung 3 Reinigung der PK aus *A. fulgidus* Stamm 7324. SDS-PAGE und anschließende Färbung mit Coomassie Brilliantblau von gereinigter PK. Die Pfeile auf der linken Seite zeigen auf die Markerproteine, der Pfeil rechts auf die Bande der PK. **Spur 1:** Molekulargewichtsstandard; **Spur 2:** nach Uno S1.

Das apparente native Molekulargewicht der PK von *A. fulgidus* wurde mit 195 kDa, das der Untereinheit mit 49 kDa bestimmt. Die Ergebnisse sprechen für eine homotetramere Struktur des Proteins (Tabelle 4). Die N-terminale Aminosäuresequenz (20 Aminosäuren) der Untereinheit der PK wurde bestimmt mit: MQLPSHKTKIATIGPASRQ. Ein Alignment der N-terminalen Aminosäuresequenz der PK von *A. fulgidus* mit hypothetischen PKs von hyperthermophilen Archaea (Abbildung 4) zeigte den höchsten Grad an Übereinstimmung mit den hypothetischen PKs aus *Thermococcus litoralis* (18 Aminosäuren identisch) und aus *Pyrococcus furiosus* (15 Aminosäuren identisch). Mit der N-terminalen Aminosäuresequenz der PK von *A. fulgidus* Stamm 7324 konnte kein ORF im Genom des nahe verwandten Typstamms *A. fulgidus* VC16 identifiziert werden, was darauf hindeutet, dass es in *A. fulgidus* VC16 kein *pyk* homologes Gen gibt.

```

Archaeoglobus fulgidus 7324  ---MQLPSHKTKIATIGPASRQ  20
Thermococcus litoralis    ---MELPSHKTKIATIGPASKQ  20
Pyrococcus furiosus      MRRVKLPSHKTKIVATIGPATNS  23
                          : :*****:*****:..

```

Abbildung 4 Alignment der N-terminalen Aminosäuresequenzen der PKs aus *A. fulgidus* Stamm 7324, *Thermococcus litoralis* und *Pyrococcus furiosus*. Das Alignment wurde mit Hilfe von ClustalX (Thompson et al. 1997) mit Standardeinstellungen erstellt. Die Zahlen am Sequenzende zeigen jeweils die Anzahl der Aminosäuren an. Sterne zeigen identische Reste, Punkte konservierte Substitutionen an. NCBI Accession-Nummern: *P. furiosus* AAL81312, *T. litoralis* CAA58793.

PK aus *A. pernix*. Das *pyk* Gen aus *A. pernix*, ORF APE0489, das als hypothetisches PK Gen annotiert ist, besteht aus 1374 Basenpaaren und kodiert für ein Polypeptid mit 458 Aminosäuren, was einer kalkulierten molekularen Masse von 50.5 kDa entspricht. Das Gen wurde in den Vektor pET19b kloniert und zur Expression in *E. coli* BL21(DE3)-CodonPlus-RIL transformiert. Nach Überexpression eines 51 kDa Proteins wurde dieses

über einen Hitzeschritt bei 77°C, an einer Ni-NTA Säule und über einen zweiten Hitzeschritt bei 100°C bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Die gereinigte PK wies eine spezifische Aktivität von 53 U/mg (65°C) auf. Das native Molekulargewicht betrug 200 kDa. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass es sich um ein Protein mit homotetramerer Struktur handelt (Tabelle 4).

PK aus *P. aerophilum*. Das *pyk* Gen aus *P. aerophilum*, ORF PAE0819, das als hypothetisches PK Gen annotiert ist, besteht aus 1386 Basenpaaren und kodiert für ein Polypeptid mit 461 Aminosäuren, was einer kalkulierten molekularen Masse von 50.3 kDa entspricht. Das Gen wurde in den Vektor pET17b kloniert und zur Expression in *E. coli* BL21(DE3)-CodonPlus-RIL transformiert. Nach Überexpression eines 48 kDa Proteins wurde dieses über einen Hitzeschritt bei 75°C, an einer Uno S5 Säule und an einer Gelfiltrationssäule bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Die gereinigte PK wies eine spezifische Aktivität von 46 U/mg (65°C) auf. Das native Molekulargewicht betrug 200 kDa. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass es sich um ein Protein mit homotetramerer Struktur handelt (Tabelle 4).

5.1.2 Biochemische Charakterisierung der archaeellen PKs

Die gereinigten archaeellen PKs wurden in Bezug auf die katalytischen Eigenschaften, Temperaturoptima, Thermostabilität, hitzeinduzierte Entfaltung und auf den Einfluss von allosterischen Effektoren biochemisch charakterisiert (Tabelle 4). Für die PK aus *P. aerophilum* wurde ein CD-Spektrum aufgenommen, das zusammen mit dem CD-Spektrum der PK aus *T. maritima* dargestellt wird (Abbildung 14).

Katalytische Eigenschaften

PK aus *A. fulgidus*. Das gereinigte Enzym hatte eine spezifische Aktivität von 1000 U/mg (65°C). Die Abhängigkeit der Raten von ADP und PEP zeigten sigmoidale Sättigungskinetiken, was auf eine positiv kooperative Bindung beider Substrate hindeutet. Die apparenten $S_{0.5}$ -Werte für ADP bzw. PEP betragen 0.4 bzw. 0.25 mM, die entsprechenden Hill-Koeffizienten lagen bei 2.1 bzw. 1.8. Die PK benötigte divalente Kationen, wobei Mg^{2+} (100%) teilweise durch Co^{2+} (86%) und Mn^{2+} (63%) ersetzt werden konnte. Dagegen waren Ni^{2+} (21%), Ca^{2+} (7%) und Zn^{2+} (6.5%) weniger effektiv (Abbildung 5 A). Für Mg^{2+} zeigte sich eine sigmoidale Sättigungskinetik, was auf eine kooperative Bindung des Kations hinweist. Der apparente $S_{0.5}$ -Wert betrug 0.6 mM, der entsprechende Hill-Koeffizient lag bei 1.3. Die Aktivität der PK zeigte keine Abhängigkeit von Kalium. Das pH Optimum des Enzyms lag bei pH 6.6, es konnten bei pH 5.5 und 7.5 noch 50% der Aktivität gemessen werden (Abbildung 5 B).

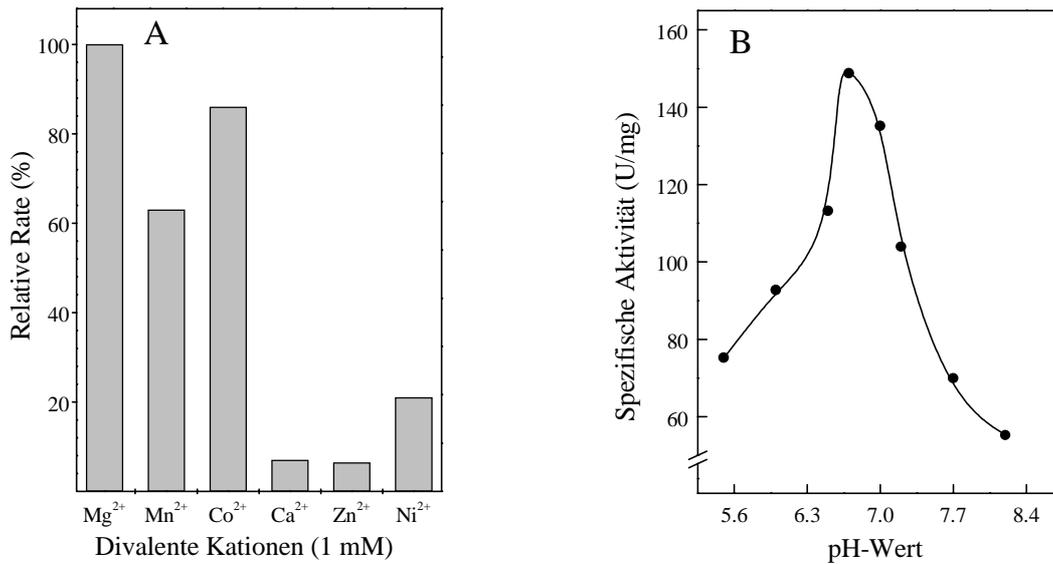


Abbildung 5 Spezifität für divalente Kationen und pH Optimum der PK aus *A. fulgidus* Stamm 7324 bei 50°C. **A** Relative Rate der Aktivität (%) in Abhängigkeit von divalenten Kationen (jeweils 1 mM). **B** Spezifische Aktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert.

PK aus *P. aerophilum*. Das rekombinante Enzym hatte eine spezifische Aktivität von 46 U/mg (65°C). Die Abhängigkeit der Raten von ADP und PEP zeigten sigmoidale Sättigungskinetiken, was auf eine positiv kooperative Bindung beider Substrate hindeutet. Die apparenten $S_{0.5}$ -Werte für ADP bzw. PEP betragen 1.3 und 0.4 mM, die entsprechenden Hill-Koeffizienten lagen bei 2.4 und 3.0 (Abbildung 6). Die PK benötigte divalente Kationen, wobei Mn²⁺ (100%) teilweise durch Co²⁺ (80%) ersetzt werden konnte. Überraschenderweise war die Aktivität mit Mg²⁺ (<3%) sehr gering. Die Aktivität der PK zeigte keine Abhängigkeit von Kalium. Das pH Optimum lag bei pH 6.

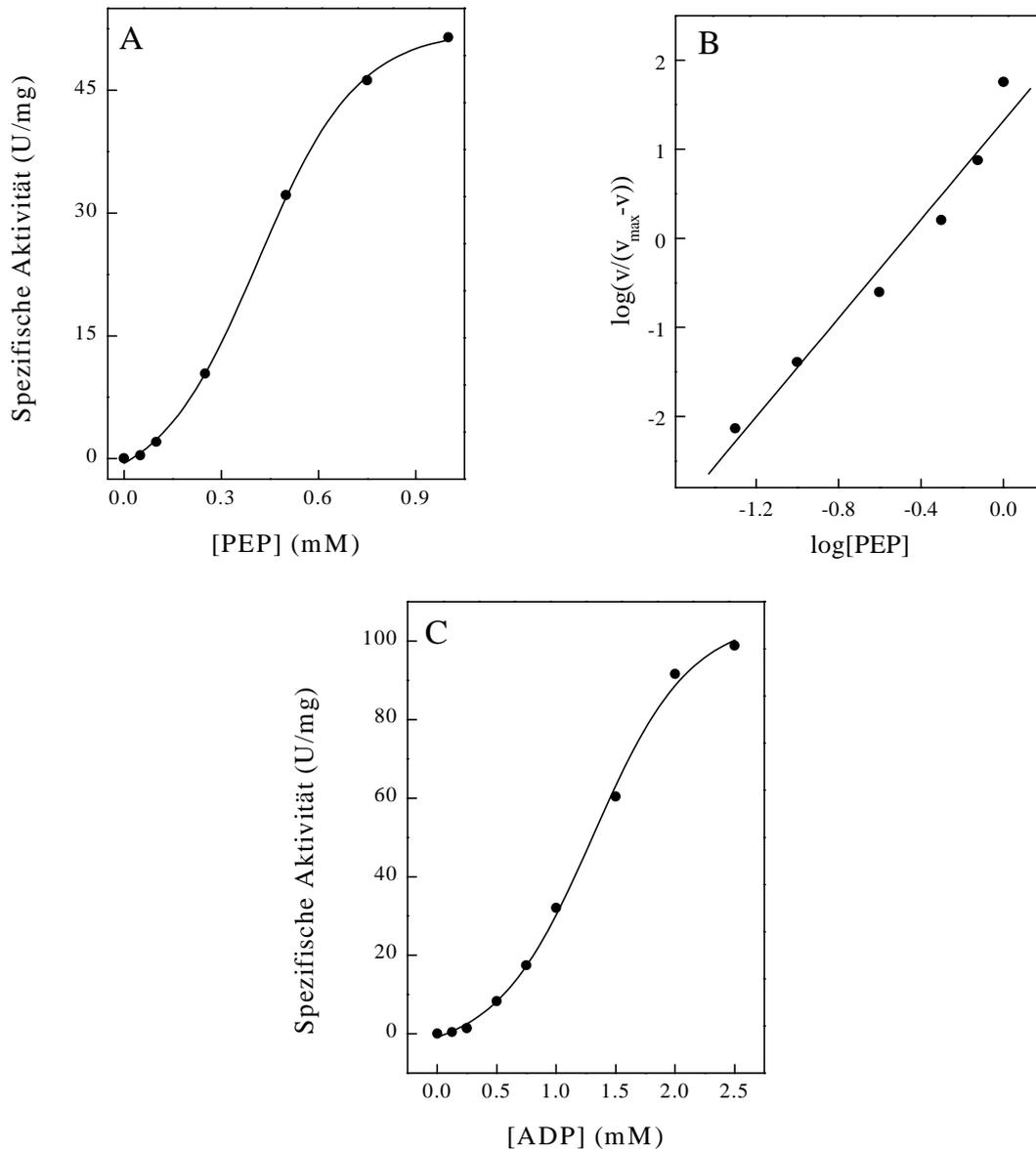


Abbildung 6 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der rekombinanten PK aus *P. aerophilum* von der Konzentration an PEP und ADP bei 65°C. **A** Sättigungskurve mit PEP. **B** Darstellung nach Hill der gleichen Daten. **C** Sättigungskurve mit ADP. Die Testansätze enthielten 18 µg Protein.

PK aus *A. pernix*. Das rekombinante Enzym hatte eine spezifische Aktivität von 53 U/mg (65°C). Die Abhängigkeit der Raten von ADP und PEP zeigten sigmoidale Sättigungskinetiken, was auf eine positiv kooperative Bindung beider Substrate hindeutet. Die apparenten $S_{0.5}$ -Werte für ADP bzw. PEP betragen 0.26 und 0.1 mM, die entsprechenden Hill-Koeffizienten für ADP und PEP lagen bei 2.1 und 1.5. Die PK benötigte divalente Kationen, wobei Mg^{2+} (100%) sehr effizient durch Co^{2+} (170%) und Mn^{2+} (160%) ersetzt werden konnte. Dagegen waren Ni^{2+} (14%), Ca^{2+} (14%) und Zn^{2+} (11%) weniger effektiv. Für Mg^{2+} wurde eine sigmoidale Sättigungskinetik gezeigt, was

auf eine kooperative Bindung des Kations hinweist. Der apparente $S_{0.5}$ -Wert betrug 0.7 mM, der entsprechende Hill-Koeffizient lag bei 1.4. Die Aktivität der PK zeigte keine Abhängigkeit von Kalium. Das pH Optimum lag bei pH 6.1.

Einfluss von allosterischen Effektoren auf die Aktivität der archaeellen PKs

PKs aus Bacteria und Eukarya werden durch z.B. Fructose-1,6-bisphosphat, Zuckermonophosphate und AMP positiv allosterisch reguliert. Die Effekte dieser Regulatoren auf die Aktivität archaeeller PKs wurden bei 65°C und mit unterschiedlichen Konzentrationen an ADP und PEP (siehe 4.4.1) untersucht. Unter keinen Bedingungen konnte ein signifikanter Effekt der getesteten positiven Effektoren auf die Aktivität der archaeellen PKs gezeigt werden, d.h. die sigmoidalen Sättigungskinetiken mit ADP und PEP konnten nicht in eine hyperbole Kurve umgewandelt werden.

ATP ist für viele PKs aus Bacteria und Eukarya als ein allosterischer Inhibitor beschrieben, dabei kann der inhibitorische Effekt von ATP durch positive Effektoren, wie Fructose-1,6-bisphosphat oder AMP, wieder aufgehoben werden. Die Aktivität der archaeellen PKs wurde ebenfalls durch ATP gehemmt, z.B. wurde für die PK aus *A. fulgidus* eine Inhibition mit ATP (1 mM) von 55% bestimmt. Durch die Zugabe von Fructose-1,6-bisphosphat oder AMP war der inhibitorische Effekt von ATP auf die Aktivität der archaeellen PKs nicht aufhebbar, was gegen eine allosterische Regulation der PKs durch ATP spricht. Die Inhibition der Aktivität durch ATP konnte dagegen bis zu 90% durch die Erhöhung der PEP-Konzentration (von 0.3 auf 1 mM) oder durch die Zugabe von 1 mM ADP aufgehoben werden, was auf eine kompetitive Inhibition der Aktivität durch ATP hinweist.

Temperaturoptima und Thermostabilität

PK aus *A. fulgidus*. Das Temperaturoptimum lag bei 85°C (Tabelle 4). Die Darstellung der Daten nach Arrhenius ergab einen linearen Bereich zwischen 20°C und 80°C, daraus wurde eine Aktivierungsenergie von 56 kJ/mol ermittelt (Abbildung 7). Die Thermostabilität der PK wurde über einen Zeitraum von 120 Minuten getestet. Bis 70°C wurde kein signifikanter Aktivitätsverlust beobachtet. Bei 90°C betrug die Halbwertszeit des Enzyms 20 Minuten. Die Inkubation bei 100°C führte zu einer fast vollständigen Hitzeinaktivierung des Enzyms nach 7 Minuten. Die Zugabe von 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ konnte die PK gegen die Hitzeinaktivierung bei 100°C stabilisieren, d.h. nach 120 Minuten wurden noch 50% der Aktivität gemessen. NaCl oder KCl (jeweils 1 M) zeigten keinen Effekt.

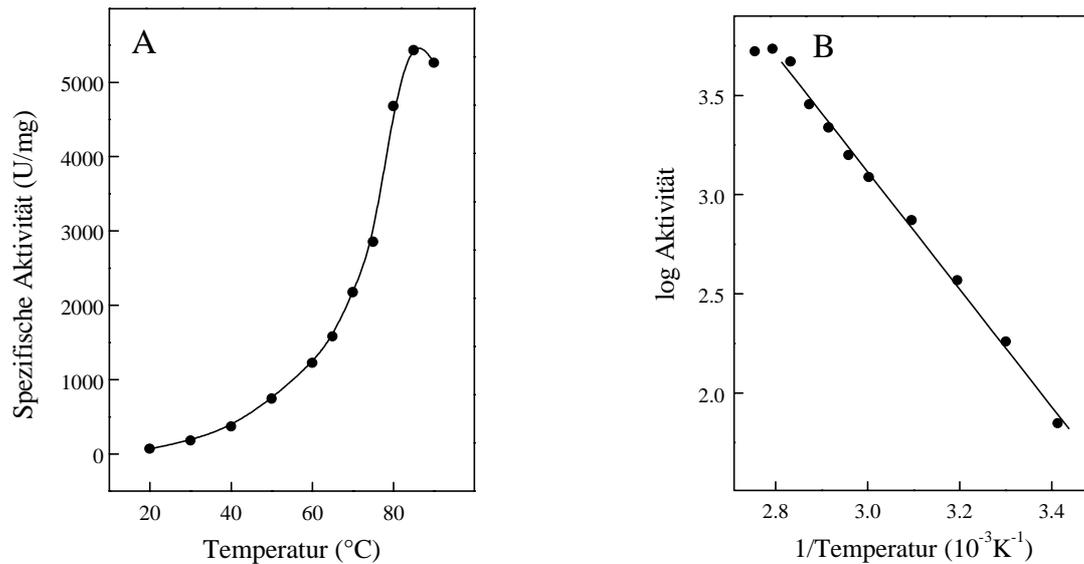


Abbildung 7 Temperaturabhängigkeit der PK Aktivität aus *A. fulgidus*. **A** Spezifische Aktivität in Abhängigkeit von der Temperatur. **B** Darstellung derselben Daten nach Arrhenius.

PK aus *P. aerophilum*. Bis zur höchsten getesteten Temperatur von 98°C stieg die Aktivität exponentiell an, damit lag das Temperaturoptimum über 98°C. Die Darstellung der Daten nach Arrhenius ergab einen linearen Bereich zwischen 25°C und 98°C, daraus wurde eine Aktivierungsenergie von 55 kJ/mol ermittelt. Die Thermostabilität wurde über einen Zeitraum von 120 Minuten getestet. Bei 100°C betrug die Halbwertszeit 220 Minuten.

PK aus *A. pernix*. Bis zur höchsten getesteten Temperatur von 95°C stieg die Aktivität exponentiell an, damit lag das Temperaturoptimum über 95°C (Abbildung 8 A). Die Darstellung der Daten nach Arrhenius ergab einen linearen Bereich zwischen 35°C und 95°C, daraus wurde eine Aktivierungsenergie von 65 kJ/mol ermittelt. Die Thermostabilität wurde über einen Zeitraum von 120 Minuten getestet. Bis 100°C konnte kein signifikanter Aktivitätsverlust beobachtet werden, bei 110°C betrug die Halbwertszeit 30 Minuten (Abbildung 8 B). NaCl, KCl oder (NH₄)₂SO₄ (jeweils 1 M) konnten die PK bei 110°C nicht stabilisieren.

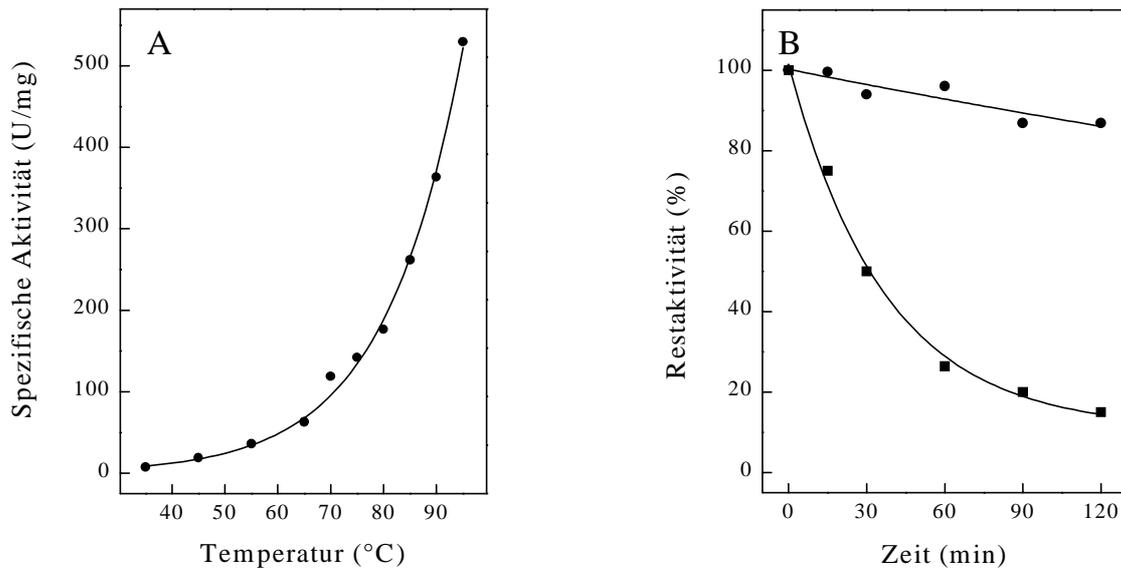


Abbildung 8 Temperaturabhängigkeit der Aktivität und Thermostabilität der PK aus *A. pernix*. **A** Spezifische Aktivität in Abhängigkeit von der Temperatur. **B** Thermostabilität nach Inkubation bei 100°C (●) und 110°C (■). 100% Aktivität entsprechen etwa 50 U/mg.

Analyse der hitzeinduzierten Entfaltung der archaeellen PKs durch CD-Spektroskopie

Die hitzeinduzierte Entfaltung der Enzyme wurde von 50°C bis 98°C als Zunahme der α -helikalen Elliptizität bei 221 nm verfolgt. Mit dieser Methode kann der Anteil an entfaltetem Protein bestimmt und so der Schmelzpunkt eines Proteins ermittelt werden. Die Messungen wurden in Zusammenarbeit mit PD Dr. J. Grötzinger (Biochemisches Institut, CAU Kiel) durchgeführt.

Wie in Abbildung 9 dargestellt, wurde für die PK aus *A. fulgidus* ein Schmelzpunkt bei 93°C ermittelt. Für die PKs aus *P. aerophilum* und *A. pernix* konnte bis 98°C keine hitzeinduzierte Entfaltung beobachtet werden. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit den Temperaturoptima und den Temperaturstabilitäten der archaeellen PKs. Die hitzeinduzierte Entfaltung wurde auch für die PK aus *T. maritima* (5.1.3) bestimmt, die Schmelzkurve ist ebenfalls in Abbildung 9 dargestellt.

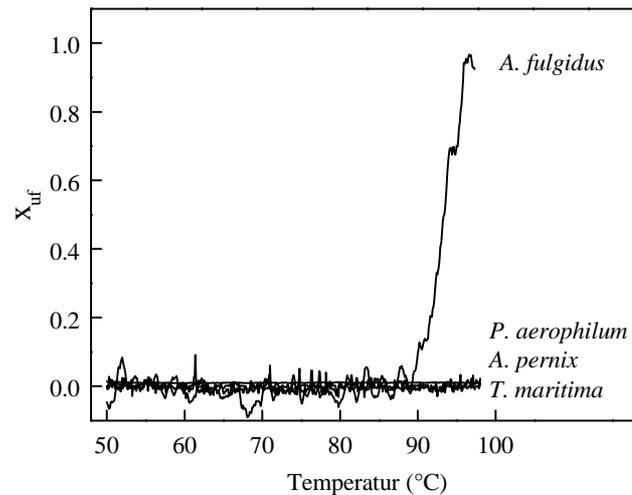


Abbildung 9 Hitzeinduzierte Entfaltung der archaeellen PKs aus *A. fulgidus*, *P. aerophilum* und *A. pernix* und der PK aus *T. maritima*. Die hitzeinduzierte Entfaltung wurde mittels CD-Spektroskopie bei 221 nm analysiert. Der Anteil an entfaltetem Protein (uf = unfolded) wurde gegen die Temperatur aufgetragen. Die Proteinkonzentration war auf 100 µg/ml gesetzt und der Temperaturanstieg wurde mit einer Rate von 1°C pro Minute durchgeführt.

Die molekularen, katalytischen und thermophilen Eigenschaften der archaeellen PKs aus *A. fulgidus*, *A. pernix* und *P. aerophilum* sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4 Molekulare und kinetische Eigenschaften der archaeellen PKs von *A. pernix*, *P. aerophilum* und *A. fulgidus*. Linearer Bereich in der Darstellung nach Arrhenius: ^a 35 - 95°C, ^b 25 - 98°C, ^c 20 - 80°C. Die kinetischen Konstanten wurden bei 65°C bestimmt.

	<i>A. pernix</i>	<i>P. aerophilum</i>	<i>A. fulgidus</i>
Apparente molekulare Masse des Enzyms (kDa)	200	200	195
Apparente molekulare Masse der Untereinheit (kDa)	51	48	49
Oligomere Struktur	α ₄	α ₄	α ₄
pH Optimum	6.1	6.0	6.6
Schmelztemperatur (°C)	>98	>98	93
Temperaturoptimum (°C)	>95	>98	85
Arrhenius Aktivierungsenergie (kJ/mol)	65 ^a	55 ^b	56 ^c
Apparenter V _{max} (U/mg)	53	46	1000
Apparenter S _{0,5} für ADP (mM)	0.26	1.3	0.4
Hill-Koeffizient (h)	2.10	2.4	2.1
Apparenter S _{0,5} für PEP (mM)	0.1	0.4	0.25
Hill-Koeffizient (h)	1.5	3.0	1.80

Die Ergebnisse zeigen, dass die archaeellen PKs extrem hohe Temperaturoptima und Thermostabilitäten aufweisen, was in Übereinstimmung mit der optimalen Wachstumstemperatur der Organismen steht. Die Abhängigkeit der Raten von ADP und PEP der drei PKs zeigen sigmoidale Sättigungskinetiken, was auf eine kooperative Bindung der Substrate hinweist. Ein wesentlicher Unterschied zu bisher bekannten PKs aus Bacteria und Eukarya ist das apparente Fehlen der allosterischen Regulation durch Effektoren. Um den Einfluss der Temperatur auf die allosterischen Eigenschaften auszuschließen, wurde zum Vergleich die PK aus dem hyperthermophilen Bakterium *T. maritima* charakterisiert.

5.1.3 Reinigung und Charakterisierung der PK aus dem hyperthermophilen Bakterium *T. maritima*

Reinigung der nativen PK. Rohextrakt von *T. maritima* nach Wachstum auf Stärke wies 8fach höhere PK Aktivität auf (0.16 U/mg, 50°C) als nach Wachstum auf Hefeextrakt (0.02 U/mg), was zeigt, dass die PK bei Wachstum auf Stärke induziert wird. Die PK wurde aus Stärke-gewachsenen Zellen bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Die Reinigung erfolgte an einer Q Sepharose Säule, einer SP Sepharose Säule, einer Gelfiltrationssäule, einer Uno S1 Säule und an einer Uno Q1 Säule. Dabei wurde die PK 2000fach mit einer Gesamtausbeute von 5% und einer spezifischen Aktivität von 320 U/mg (70°C) angereichert, was einem Anteil von 0.05% nativer PK an löslichem Protein entspricht (Tabelle 5).

Tabelle 5 Reinigung der PK aus *T. maritima*. Die Enzymaktivität wurde bei 70°C im diskontinuierlichen Testsystem als Bildung von Pyruvat aus Phosphoenolpyruvat in 0.1 M Tris-HCl pH 7 mit 5 mM PEP, 2 mM ADP und 10 mM MgCl₂ gemessen.

Reinigungsschritt	Protein (mg)	Aktivität (U)	Spez. Aktivität (U/mg)	Ausbeute (%)	Anreicherung (-fach)
Zellfreier Extrakt	2100	350	0.16	100	1
Q Sepharose	340	315	0.92	91	6
SP Sepharose	8	180	23	51	142
Superdex 200	0.84	65	77	19	480
Uno S1	0.4	53	135	15	840
Uno Q1	0.05	16	320	5	2000

Der Reinheitsgrad der PK wurde nach jedem Reinigungsschritt gelelektrophoretisch analysiert (4.3.2). Nach dem letzten Reinigungsschritt zeigte sich auf dem SDS-Gel nur eine Bande (Abbildung 10).

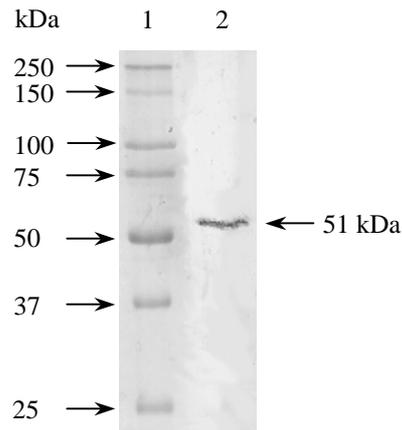


Abbildung 10 Reinigung der PK aus *T. maritima*. SDS-PAGE und anschließende Färbung mit Coomassie Brilliantblau von gereinigter PK. Die Pfeile auf der linken Seite deuten auf die Markerproteine, der Pfeil rechts auf die Bande der PK. **Spur 1:** Molekulargewichtsstandard; **Spur 2:** nach Uno Q1.

Die apparente native molekulare Masse der PK von *T. maritima* wurde mit 200 kDa, die der Untereinheit mit 51 kDa bestimmt. Die Ergebnisse sprechen für eine homotetramere Struktur des Proteins (Tabelle 6). Die N-terminale Aminosäuresequenz (15 Aminosäuren) der Untereinheit der gereinigten PK wurde bestimmt mit: MRSTKIVCTVGPRTD und war identisch zur abgeleiteten N-terminalen Aminosäuresequenz des ORFs TM0208 aus dem Genom von *T. maritima*. Der ORF TM0208 war im Genom von *T. maritima* als hypothetisches *pyk* Gen annotiert.

Klonierung, Expression und Reinigung der rekombinanten PK. Das *pyk* Gen aus *T. maritima*, ORF TM0208, das für eine hypothetische PK kodiert und mit Hilfe des N-Terminus der nativ gereinigten PK aus *T. maritima* identifiziert wurde, besteht aus 1398 Basenpaaren und kodiert für ein Polypeptid mit 466 Aminosäuren, was einer kalkulierten molekularen Masse von 51.9 kDa entspricht. Das Gen wurde in den Vektor pET19b kloniert und zur Expression in *E. coli* BL21(DE3)-CodonPlus-RIL transformiert. Nach Überexpression eines 50 kDa Proteins wurde dieses über einen Hitzeschritt bei 70°C, an einer Ni-NTA Säule, an einer Gelfiltrationssäule und an einer Uno S1 Säule bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Die PK ergab eine 56 kDa Bande auf einem SDS-Polyacrylamidgel und wies eine spezifische Aktivität von 578 U/mg (65°C) auf. Das native apparente Molekulargewicht wurde mit 210 kDa bestimmt. Die Ergebnisse sprechen für eine homotetramere Struktur des Proteins (Tabelle 6).

Biochemische Charakterisierung der PK aus *T. maritima*. Die nativ und die rekombinant gereinigte PK aus *T. maritima* wurden in Bezug auf katalytische Eigenschaften, Temperaturoptimum, Thermostabilität, hitzeinduzierte Entfaltung und auf

den Einfluss von allosterischen Effektoren biochemisch charakterisiert (Tabelle 6). Außerdem wurde von der PK ein CD-Spektrum aufgenommen, das mit dem CD-Spektrum der PK aus *P. aerophilum* dargestellt ist (Abbildung 14).

Katalytische Eigenschaften. Das nativ bzw. rekombinant gereinigte Enzym hatte eine spezifische Aktivität von 320 bzw. 580 U/mg. Die Abhängigkeit der Raten von ADP und PEP zeigten eine sigmoidale Sättigungskinetik, was auf eine positiv kooperative Bindung beider Substrate hindeutet. Die apparenten $S_{0.5}$ -Werte und die entsprechenden Hill-Koeffizienten waren für natives und rekombinantes Enzym fast identisch (Tabelle 6). Für ADP (Abbildung 11) bzw. PEP betragen die $S_{0.5}$ -Werte 1.3 und 0.3 mM, die entsprechenden Hill-Koeffizienten lagen bei 2.9 und 2.0. Die PK benötigte divalente Kationen, wobei Mg^{2+} (100%) sehr effizient durch Co^{2+} (120%) und teilweise durch Mn^{2+} (35%) ersetzt werden konnte. Dagegen waren Ni^{2+} (3%), Ca^{2+} (3%) und Zn^{2+} (2.5%) weniger effektiv. Für Mg^{2+} wurde eine sigmoidale Sättigungskinetik gezeigt, was auf eine kooperative Bindung des Kations hinweist. Der apparente $S_{0.5}$ -Wert betrug 1 mM, der entsprechende Hill-Koeffizient lag bei 2.3. Die Aktivität der PK zeigte keine Abhängigkeit von den monovalenten Kationen Kalium und Ammonium. Das pH Optimum der PK von *T. maritima* lag bei pH 6, bei pH 5.5 und 7 konnten noch 30% der Aktivität gemessen werden.

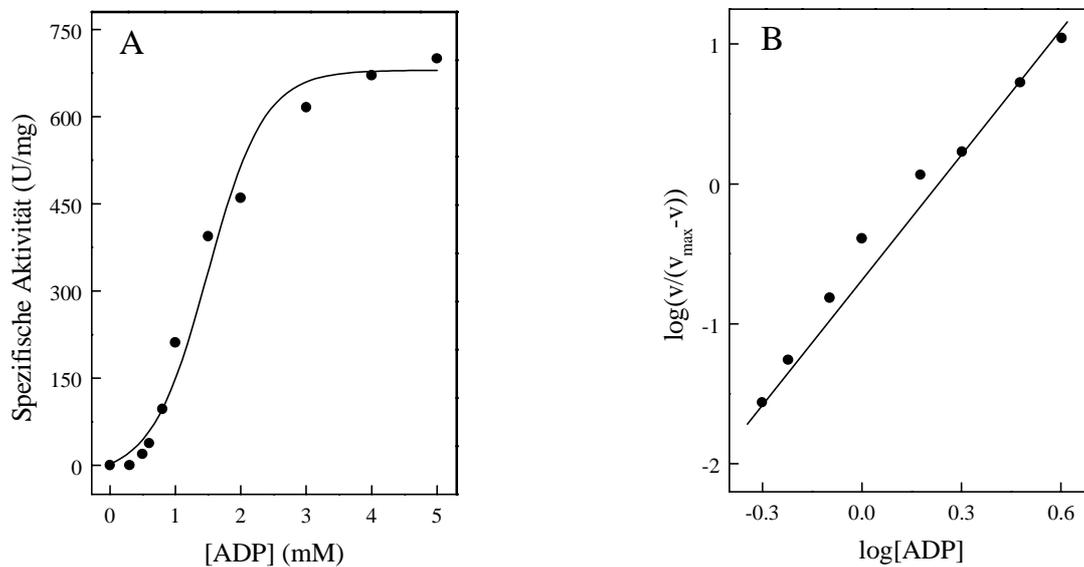


Abbildung 11 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der rekombinanten PK aus *T. maritima* von der Konzentration an ADP bei 65°C. A Sättigungskurve mit ADP. B Darstellung nach Hill der gleichen Daten. Die Testansätze enthielten 1 µg Protein.

Allosterische Effektoren. Der Einfluss von positiv allosterischen Effektoren aus eukaryotischen und bakteriellen PKs wie z.B. Fructose-1,6-bisphosphat und AMP und des

negativ allosterischen Effektors ATP auf die Aktivität der PK aus *T. maritima* wurde bei 65°C getestet. Bis auf AMP und ATP hatte keiner der getesteten Effektoren (4.4.1) einen Einfluss auf die sigmoidale Sättigungskinetik. Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Konzentration an Phosphoenolpyruvat ohne Effektor und mit AMP bzw. ATP ist in Abbildung 12 dargestellt. Ohne allosterischen Effektor zeigte die Reaktionsrate eine sigmoidale Kinetik mit einem $S_{0.5}$ -Wert für PEP von 0.23 mM, der entsprechende Hill-Koeffizient betrug 2.2. Durch die Zugabe von AMP wurde das Enzym allosterisch aktiviert. Die sigmoidale Kinetik änderte sich zu einer hyperbolen Michaelis-Menten Kinetik, was zu einer Änderung des $S_{0.5}$ -Wertes für PEP von 0.23 zu 0.08 mM führte. Damit war auch eine Verringerung des Hill-Koeffizienten zu 1.0 verbunden, der V_{max} -Wert blieb dabei konstant. Damit konnte bei einer PEP-Konzentration von 0.1 mM mit AMP eine 10fache Steigerung der PK Aktivität erreicht werden.

Die Zugabe von ATP führte zu einer allosterischen Inhibition der PK Aktivität. Der $S_{0.5}$ -Wert für PEP erhöhte sich von 0.23 auf 0.5 mM, der entsprechende Hill-Koeffizient auf 2.9. Dabei konnte nur ein V_{max} -Wert von 70% im Vergleich zum V_{max} -Wert ohne Effektor bestimmt werden. Die allosterische Inhibition der PK Aktivität aus *T. maritima* durch ATP konnte durch die Zugabe des positiven Effektors AMP (1 mM) komplett aufgehoben werden, ein Phänomen, das auch für einige bakterielle PKs beschrieben wurde (Waygood und Sanwal 1974).

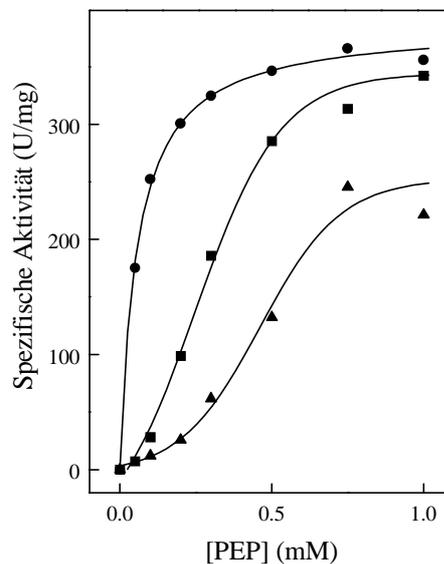


Abbildung 12 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der PK aus *T. maritima* von der Konzentration an Phosphoenolpyruvat in Anwesenheit von AMP und ATP bei 65°C. Rate ohne Effektor (■), mit 1 mM AMP (●) und mit 1 mM ATP (▲). Die Testansätze enthielt 1 µg Protein.

Die Ergebnisse zeigen, dass die hyperthermophile PK aus dem Bakterium *T. maritima* durch AMP positiv und durch ATP negativ allosterisch reguliert wird.

Temperaturoptimum und Thermostabilität. Das Temperaturoptimum lag bei 80°C (Abbildung 13 A). Die Darstellung der Daten nach Arrhenius ergab einen linearen Bereich zwischen 30°C und 70°C, daraus wurde eine Aktivierungsenergie von 55.6 kJ/mol ermittelt (Tabelle 6). Die Thermostabilität der PK wurde über einen Zeitraum von 120 Minuten getestet. Bis 85°C konnte kein signifikanter Aktivitätsverlust festgestellt werden, bei 100°C betrug die Halbwertszeit 20 Minuten (Abbildung 13 B). Die Zugabe von 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ stabilisierte das Enzym gegen die Hitzeinaktivierung bei 100°C, d.h. nach 120 Minuten wurden noch 40% der Aktivität gemessen, NaCl oder KCl (jeweils 1 M) zeigten keinen Effekt.

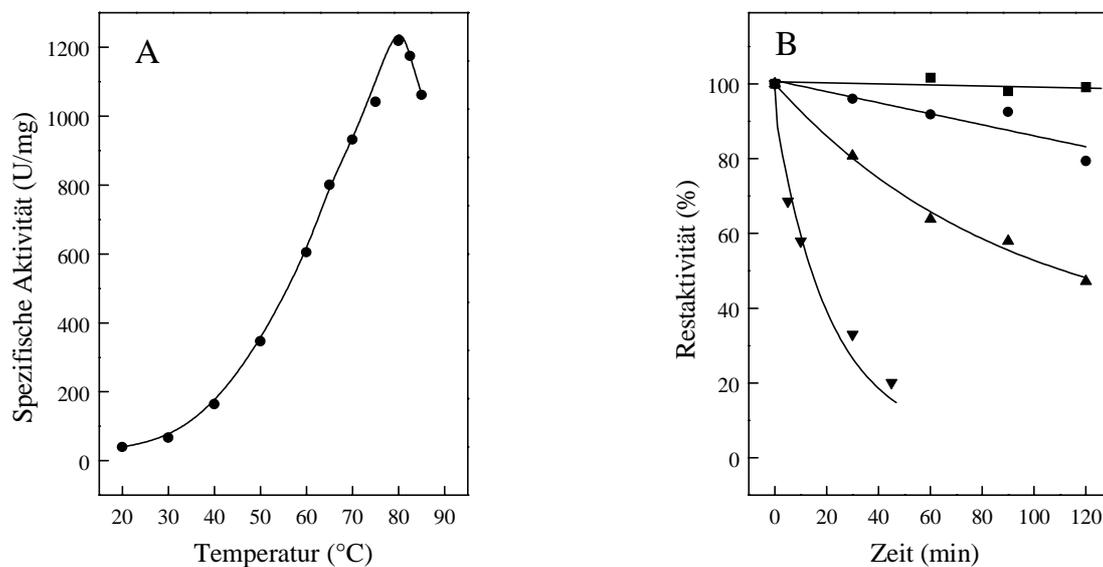


Abbildung 13 Temperaturabhängigkeit der Aktivität und Thermostabilität der PK aus *T. maritima*. **A** Spezifische Aktivität des rekombinanten Enzyms in Abhängigkeit von der Temperatur. **B** Restaktivität des nativen Enzyms nach Inkubation bei 70°C (■), 85°C (●), 95°C (▲) und 100°C (▼).

Analyse der hitzeinduzierten Entfaltung der PK mittels CD-Spektroskopie. Die hitzeinduzierte Entfaltung des Enzyms, die von 50°C bis 98°C analysiert werden sollte, wurde durch die Zunahme der α -helikalen Elliptizität bei 221 nm untersucht. Mit dieser Methode wird der Anteil an entfaltetem Protein bestimmt, um den Schmelzpunkt zu ermitteln. Die Messung wurde in Zusammenarbeit mit PD Dr. J. Grötzinger (Biochemisches Institut, CAU Kiel) durchgeführt. Für die PK von *T. maritima* konnte bis 98°C keine hitzeinduzierte Entfaltung beobachtet werden (Abbildung 9). Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen zum Temperaturoptimum und zu der Temperaturstabilität der PK aus *T. maritima*.

Die molekularen, katalytischen und thermophilen Eigenschaften der bakteriellen PK aus *T. maritima* sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6 Molekulare und kinetische Eigenschaften der nativen und rekombinanten PK aus *T. maritima*. n.b. = nicht bestimmt, ^aKonzentration der Effektoren: 1 mM, die kinetischen Konstanten wurden bei 65°C bestimmt.

	natives Enzym	rekombinantes Enzym	
Apparente molekulare Masse des Enzyms (kDa)	200	210	
Apparente molekulare Masse der Untereinheit (kDa)	51	56	
Oligomere Struktur	α_4	α_4	
pH Optimum	6.0	5.9	
Schmelztemperatur (°C)	n.b.	>98	
Temperaturoptimum (°C)	n.b.	80	
Arrhenius Aktivierungsenergie (kJ/mol, 30-70°C)	n.b.	55.6	
Apparenter V_{max} (U/mg)	320	578	
ADP-Saturierungskurve			
Apparenter $S_{0.5}$ (mM)	1.3	1.2	
Hill-Koeffizient (h)	2.9	2.8	
PEP-Saturierungskurve			
- Effektor	Apparenter $S_{0.5}$ (mM)	0.3	0.23
	Hill-Koeffizient (h)	2.0	2.2
+ AMP ^a	Apparenter $S_{0.5}$ (mM)	0.09	0.08
	Hill-Koeffizient (h)	1.3	1.0
+ ATP ^a	Apparenter $S_{0.5}$ (mM)	n.b.	0.5
	Hill-Koeffizient (h)	n.b.	2.9

Die Ergebnisse zeigen, dass die PK aus dem hyperthermophilen Bakterium *T. maritima* ein hohes Temperaturoptimum aufweist, was in Übereinstimmung mit der Wachstumstemperatur steht. Die PK weist eine kooperative Bindung für ADP und PEP auf. Im Gegensatz zu den archaeellen hyperthermophilen PKs ist die PK aus *T. maritima* durch AMP positiv allosterisch und durch ATP negativ allosterisch reguliert. Der Einfluss der Temperatur auf die allosterischen Eigenschaften der archaeellen PKs kann damit ausgeschlossen werden.

CD-Spektren der hyperthermophilen PKs aus *P. aerophilum* und aus *T. maritima*.

Um Informationen über die Sekundärstruktur der hyperthermophilen Enzyme zu bekommen, wurden CD-Spektren von den PKs aus *P. aerophilum* und *T. maritima* aufgenommen (Abbildung 14). Beide Spektren waren fast identisch. Für die PK von *P. aerophilum* konnte ein α -helikaler Anteil von 36% und ein β -Faltblattanteil von 25% berechnet werden. Dieses Ergebnis stimmte mit den Sekundärstrukturen überein, die aus den Aminosäuresequenzen von *P. aerophilum* und *T. maritima* ermittelt wurden. Hier ergab sich ein theoretischer α -helikaler Anteil von 36% und ein β -Faltblattanteil von 26%

für beide Enzyme. Diese Vorhersage über die Sekundärstruktur der beiden hyperthermophilen PKs passt im Vergleich sehr gut zu den aus Kristallstrukturen errechneten Ergebnissen von *Saccharomyces* (38% α -helikal, 12% β -Faltblatt) und *E. coli* (38% α -helikal, 21% β -Faltblatt) (Jurica et al. 1998; Mattevi et al. 1995). Die Ergebnisse zeigen, dass die hyperthermophilen Eigenschaften der PKs von *P. aerophilum* und *T. maritima* keinen Einfluss auf die Sekundärstruktur haben.

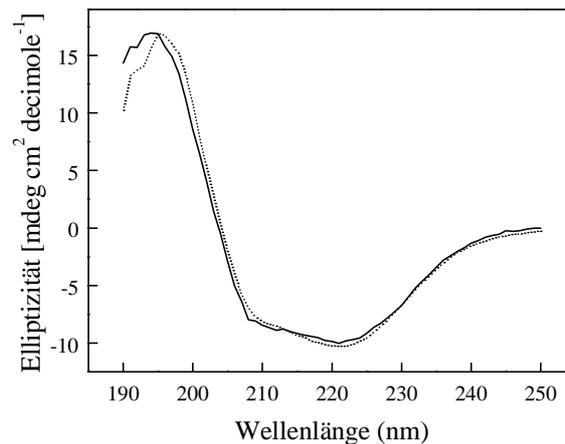


Abbildung 14 CD-Spektren der PKs von *T. maritima* (—) und *P. aerophilum* (---). Die Spektren wurden in 20 mM Natriumphosphat pH 7 und mit einer auf 100 μ g/ml gesetzten Proteinkonzentration aufgenommen. Jedes Spektrum wurde um das Signal des Lösungsmittels korrigiert.

5.1.4 Untersuchungen zur Abhängigkeit der PK aus *T. maritima* von monovalenten Kationen durch ortsspezifische Mutagenese

Aufgrund von Sequenzvergleichen beschriebener Kalium-abhängiger und -unabhängiger PKs und Literaturangaben (Jurica et al. 1998) konnte in der Aminosäuresequenz der PK aus *T. maritima* ein Bereich als Kaliumbindestelle identifiziert werden (Abbildung 15). Alle Sequenzen von Kalium-abhängigen PKs verfügen über ein Glutamat (Position 71 bei *T. maritima*), während die Kalium-unabhängigen PKs an entsprechender Position ein Lysin, Arginin oder Serin enthalten. Das Vorhandensein von Glutamat scheint eine Voraussetzung für die Abhängigkeit von monovalenten Kationen zu sein. Es wird vermutet, dass die negative Ladung von Glutamat für die Bindung eines monovalenten Kations (z.B. Kalium, Ammonium oder Rubidium) benötigt wird. Dieses gebundene Kation ist für die Katalyse essentiell (Jurica et al. 1998).

Es sollte geprüft werden, ob ein Austausch des Lysins (K) an Position 71 in der Kalium-unabhängigen PK aus *T. maritima* gegen ein Glutamat (E) zu einem mutierten Enzym führt, dessen Aktivität von monovalenten Kationen abhängig ist.

Yeast1	52	FSHGSYEHKSVIDNARKSEELYPG-----RPLAIALD	LD	TKGPEIRT	GTTTN	97
Human M2	74	FSHGTHEYHAETIKNVRTATESFASDPILYRPVAVALD	LD	TKGPEIRT	GLIKG	125
E.coli 1	34	FSHGDYAEHGQRIQNLRN-VMSKTG-----KTAAILL	LD	TKGPEIRT	MKLEG	79
T.maritima	34	TSHGDWNEQEQLKIKDLREKKK-----PVAILL	LD	LAGPKIRT	GYLEK	79
T.acidophilum	33	SAHADIKDVSKITQMVR-----INRDVGIM	LD	KGPELRT	GEFAG	74
T.tenax	32	MSHASPSEVEARVNAVRKYEETS-----YIAIIL	LD	LRGPSVRT	GLMRP	77
P.aerophilum	48	LAHASPNEVKFRIEAVRSYEKAKNR-----PLAVIL	LD	KGPSIRV	GSTSP	93
A.pernix	35	ASHGGVEQWNSMLES LRRAEEAVGK-----RVGVAV	LD	LEGPRVRT	GNSEP	80
		:* .	:	:	* ** :*	

Abbildung 15 Ausschnitt der kaliumbindenden Region aus dem multiplen Aminosäuresequenz Alignment mit ausgewählten PKs aus Bacteria, Archaea und Eukarya. Das Alignment wurde mit ClustalX mit Standardeinstellungen erstellt (Thompson et al. 1997). Die Zahlen am Anfang und Ende der Sequenzen geben die Position im jeweiligen Protein an. Das Lysin an Position 71 der PK aus *T. maritima* und die entsprechenden Aminosäuren der anderen PKs sind durch den Pfeil gekennzeichnet. Der Rahmen markiert die Kaliumbindestelle (Jurica et al. 1998). Sterne zeigen identische Reste, Punkte konservierte Substitutionen an. NCBI Accession-Nummern oder die SwissProt Nummern der Sequenzen: *Aeropyrum pernix* BAA79454; *E. coli* 1 KPY1_ECOLI; Human M2 KPY2_HUMAN; *Pyrobaculum aerophilum* AAL63053; Yeast 1 KPY1_YEAST; *Thermoplasma acidophilum* KPYK_THEAC; *Thermoproteus tenax* AAF06820; *Thermotoga maritima* AAD35300.

Ortsspezifische Mutagenese von Lysin⁷¹ gegen Glutamat. Das Plasmid pkTm-pET19b enthält den ORF TM0208, der für die PK aus *T. maritima* kodiert (Tabelle 2). Die zielgerichtete Mutagenese an diesem Plasmid erfolgte mittels zweier komplementärer Oligonukleotide, die die Mutation des Lysinkodons an der Position 71 AAG gegen GAG für Glutamat enthielten. Die Sequenz des mutierten Expressionsplasmids pkTm-pET19b-K71E (Name: Pyruvat Kinase aus Thermotoga maritima in pET19b mit Austausch von Lysin (K) an Position 71 durch Glutamat (E)) enthielt das neue Glutamatkodon an der Position 71 der Aminosäuresequenz. Die Sequenz des restlichen Gens war fehlerfrei. Das mutierte Plasmid wurde in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3)-CodonPlus-RIL transformiert und exprimiert. Das mutierte Enzym wurde gereinigt und charakterisiert.

Expression und Reinigung der mutierten PK aus *T. maritima*. Die Expression wurde unter gleichen Bedingungen durchgeführt wie die des Wildtyps (4.2.8). Die Reinigung bis zur apparenten Homogenität erfolgte über einen Hitzeschritt bei 70°C, an einer Ni-NTA Säule und an einer Gelfiltrationssäule. Das gereinigte mutierte Enzym ergab eine 55 kDa Bande auf einem SDS-Polyacrylamidgel (Abbildung 16) und wies eine spezifische Aktivität von 3.4 U/mg (65°C) auf. Die native apparente molekulare Masse wurde mit 200 kDa bestimmt. Die Ergebnisse sprechen für eine homotetramere Struktur des Proteins.

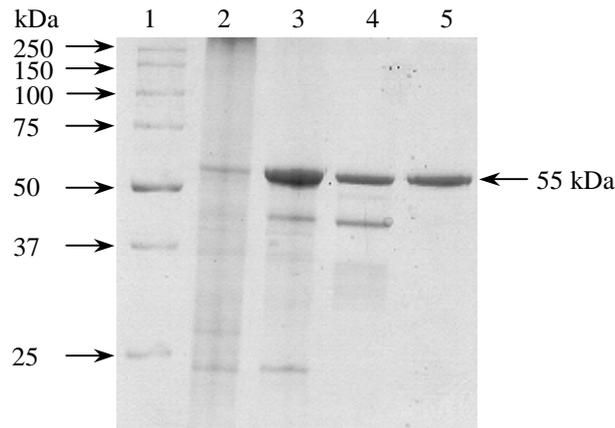


Abbildung 16 Reinigung der mutierten PK aus *T. maritima*. SDS-PAGE und anschließende Färbung mit Coomassie Brilliantblau von aufeinanderfolgenden Reinigungsschritten. Die Pfeile auf der linken Seite deuten auf die Markerproteine, der Pfeil rechts auf die Bande der PK. **Spur 1:** Molekulargewichtsstandard; **Spur 2:** zellfreier Rohextrakt; **Spur 3:** nach 70°C Inkubation; **Spur 4:** nach Ni-NTA Säule; **Spur 5:** nach Gelfiltrationssäule.

Biochemische Charakterisierung der mutierten PK. Das mutierte Enzym wies eine spezifische Aktivität von 4.2 U/mg (mit 0.1 M NH_4Cl) auf und zeigte damit nur etwa 1% der Aktivität des Wildtyps. Die Mutation hat somit zu einem starken Verlust der Aktivität geführt. Dieser Verlust der Aktivität war nicht auf die Sekundär- oder Tertiärstruktur des Enzyms zurückzuführen, das in Bezug auf die allosterische Regulation durch AMP und die Thermostabilität bei 85°C zum Wildtyp identische Eigenschaften aufwies. Die hitzeinduzierte Entfaltung des Enzyms wurde im Bereich von 50°C bis 98°C durch die Zunahme der α -helikalen Elliptizität bei 221 nm durch CD-Spektroskopie untersucht. Der Schmelzpunkt des mutierten Enzyms lag wie auch der des Wildtyps über 98°C.

Effekt von monovalenten Kationen. Das mutierte Enzym unterschied sich jedoch vom Wildtyp durch die Stimulierbarkeit der Aktivität durch monovalente Kationen. In Abwesenheit von monovalenten Kationen betrug die Aktivität 0.38 U/mg. Für Ammonium, Rubidium, Kalium, Lithium und Cäsium ließ sich eine Stimulierung der Aktivität der mutierten PK zeigen (Tabelle 7). Für Natrium (40 mM) wurde dagegen eine Hemmung von 13% gemessen.

Tabelle 7 Steigerung der Aktivität der mutierten PK aus *T. maritima* in Abhängigkeit von monovalenten Kationen. Die Kationen wurden jeweils als Chloridsalze eingesetzt.

Kation	Aktivitätssteigerung in (%)	
	bei 20 mM	bei 60 mM
Ammonium	280	850
Rubidium	27	36
Kalium	11	20
Lithium	7	11
Cäsium	5	7

Durch Ammonium ließ sich die mutierte PK am effektivsten stimulieren. Für dieses monovalente Kation wurde eine Sättigungskurve aufgenommen (Abbildung 17), anhand derer eine maximale spezifische Aktivität mit 100 mM Ammonium ermittelt wurde. Mit Rubidium und Kalium kam es zu einer geringeren Stimulierung. Mit Kalium zeigte sich bei einer Konzentration von 20 bzw. 60 mM eine Aktivitätssteigerung von 11% bzw. 20%. Der Einfluss der monovalenten Kationen auf die Aktivität des Wildtyps wurde ebenfalls analysiert, hier zeigte sich ein hemmender Effekt der getesteten Kationen.

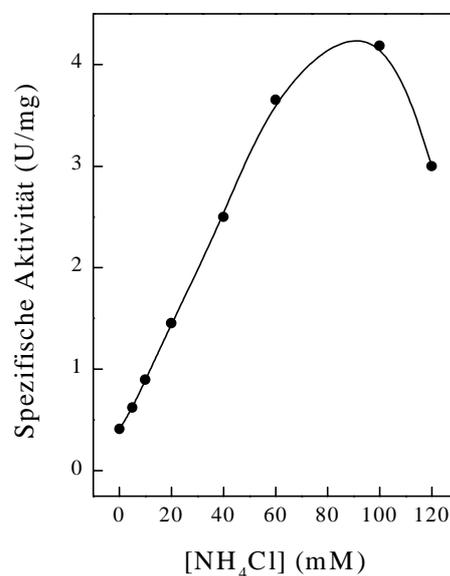


Abbildung 17 Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der mutierten PK aus *T. maritima* von der Konzentration an Ammonium bei 65°C. Die Testansätze enthielten 16 µg Protein.

Die Ergebnisse zeigen, dass der Austausch von Lysin an Position 71 der PK von *T. maritima* gegen Glutamat zu einer Abhängigkeit der Aktivität der mutierten PK von

monovalenten Kationen führte. Die höchste Stimulierung der Aktivität wurde mit Ammonium gezeigt. Eine Veränderung der regulatorischen und thermophilen Eigenschaften durch die Mutation wurde nicht beobachtet.

5.2 Phosphoglycerat Mutasen aus Archaea

Phosphoglycerat Mutasen aus Bacteria und Eukarya sind gut untersucht und werden in zwei Familien eingeordnet: 2,3-Bisphosphoglycerat-unabhängige Phosphoglycerat Mutasen (iPGM) und 2,3-Bisphosphoglycerat-abhängige Phosphoglycerat Mutasen (dPGM), die gleichermaßen aus beiden Domänen bekannt sind. PGMs in Archaea sind bisher wenig untersucht. Kürzlich wurden zwei iPGM kodierende ORFs in den Genomen der Archaea *Pyrococcus furiosus* und *Methanococcus jannaschii* identifiziert (Van der Oost et al. 2002).

Im Genom des Archaeons *A. fulgidus* VC16 wurde ein ORF, der für eine hypothetische iPGM kodiert, identifiziert. Im Folgenden werden die Klonierung, Expression und biochemische Charakterisierung der iPGM aus *A. fulgidus* beschrieben. Außerdem wurde das im Genom von *T. acidophilum* annotierte dPGM Gen kloniert und exprimiert. Das überexprimierte Protein wurde gereinigt und biochemisch charakterisiert, damit ist die erste dPGM aus Archaea charakterisiert.

5.2.1 Identifizierung und Charakterisierung einer iPGM aus *A. fulgidus*

Identifizierung einer iPGM in *A. fulgidus*. Im Genom von *A. fulgidus* VC16 konnte mit BLAST-P Suche (Altschul et al. 1990) der ORF AF1751 als hypothetisches iPGM Gen identifiziert werden. ORF AF1751 zeigte 27% Ähnlichkeit zur iPGM Sequenz aus *E. coli* und 30% Ähnlichkeit zur iPGM Sequenz aus *Bacillus stearothermophilus*. Sequenzvergleiche und die Kristallstruktur der iPGM aus *B. stearothermophilus* ergaben außerdem, dass die für die katalytische Aktivität essentiellen Aminosäuren aus *B. stearothermophilus* auch in ORF AF1751 fast vollständig vorhanden sind (Jedrzejewski et al. 2000). Um zu prüfen ob der ORF AF1751 für eine funktionelle iPGM kodiert, wurde er kloniert, exprimiert und charakterisiert.

Der ORF AF1751 besteht aus 1224 Basenpaaren und kodiert für ein Polypeptid mit 408 Aminosäuren, was einer kalkulierten molekularen Masse von 44.1 kDa entspricht. Das Gen wurde in den Vektor pET19b kloniert und zur Expression in *E. coli* BL21(DE3)-CodonPlus-RIL transformiert. Nach Überexpression eines 45 kDa Proteins wurde dieses über einen Hitzeschritt bei 75°C, an einer Ni-NTA Säule und an einer Gelfiltrationssäule bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Das Protein ergab eine 48 kDa Bande auf

einem SDS-Polyacrylamidgel und wies eine spezifische iPGM Aktivität von etwa 3 U/mg (50°C) auf. Die native apparente molekulare Masse wurde mit 46 kDa bestimmt. Die Ergebnisse sprechen für eine monomere Struktur des Proteins (Tabelle 8). Im Folgenden werden die Ergebnisse der biochemischen Charakterisierung der iPGM aus *A. fulgidus* VC16 dargestellt.

Biochemische Charakterisierung. Die kinetischen und thermophilen Eigenschaften der iPGM wurden analysiert (Tabelle 8). Apparente K_m - und V_{max} -Werte wurden in beide Reaktionsrichtungen bestimmt und folgten jeweils einer Michaelis-Menten Kinetik. Aus den linearen Auftragungen nach Lineweaver-Burk wurde der K_m -Wert für 3-Phosphoglycerat mit 0.8 mM und der V_{max} -Wert mit 3.3 U/mg bestimmt. Der K_m -Wert für 2-Phosphoglycerat wurde mit 0.2 mM und der V_{max} -Wert mit 0.8 U/mg bestimmt (Abbildung 18). Von beschriebenen iPGMs ist bekannt, dass die katalytische Aktivität von Mangan abhängig ist (Jedrzejewski 2000a). Für die iPGM aus *A. fulgidus* zeigte sich, dass durch die Zugabe von Mangan die Aktivität etwa 3fach stimuliert wurde. Maximale Aktivität wurde bereits durch die Zugabe von 10 bis 50 μ M Mangan erreicht, Konzentrationen bis 3 mM wirkten auf die Aktivität nicht hemmend. Das pH Optimum der iPGM aus *A. fulgidus* wurde mit pH 7.1 bestimmt.

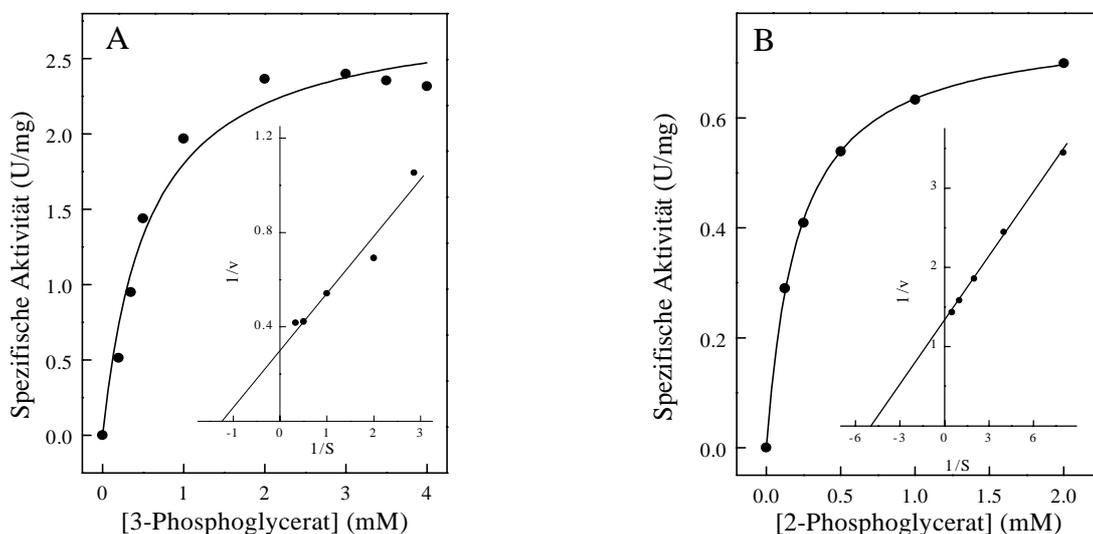


Abbildung 18 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der iPGM aus *A. fulgidus* von der Konzentration an Substrat. **A** Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von der Konzentration an 3-Phosphoglycerat. **B** Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von der Konzentration an 2-Phosphoglycerat. Die Einschübe zeigen die doppelt reziproke Auftragung nach Lineweaver-Burk. Die Testansätze enthielten jeweils 8 μ g Protein.

Die Thermostabilität der iPGM wurde in Gegenwart von MgSO_4 (10 mM) und MnCl_2 (100 μM) getestet. Bis 60°C wurde über 120 Minuten kein signifikanter Aktivitätsverlust beobachtet, bei 70°C bzw. 85°C betrug die Halbwertszeit 160 bzw. 17 Minuten (Abbildung 19). Die Halbwertszeit bei 70°C ohne Kationen fiel auf 35 Minuten. Das zeigt, dass beide Kationen das Enzym gegen Hitzeinaktivierung stabilisieren.

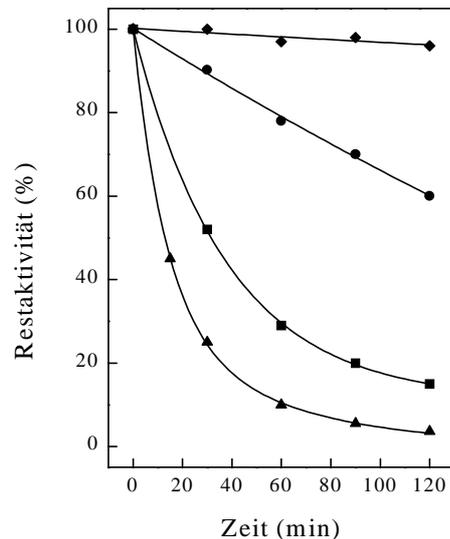


Abbildung 19 Thermostabilität der iPGM aus *A. fulgidus* VC16. Inkubation der Enzymlösung (10.7 μg in 30 μl) in 0.1 M Triethanolamin pH 7 mit 100 μM MnCl_2 und 10 mM MgSO_4 bei 60°C (◆), 70°C (●), 85°C (▲) und bei 70°C ohne MnCl_2 und MgCl_2 (■). Über einen Zeitraum von 120 Minuten wurden zu den angegebenen Zeiten Proben zur Bestimmung der Restaktivität genommen. 100% entsprechen 2.7 U/mg.

Die molekularen und kinetischen Eigenschaften der archaeellen iPGM aus *A. fulgidus* VC16 sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8 Molekulare und kinetische Eigenschaften der iPGM aus *A. fulgidus* VC16. Die kinetischen Konstanten wurden bei 50°C bestimmt.

	Wert
Apparente molekulare Masse des Enzyms (kDa)	46
Apparente molekulare Masse der Untereinheit (kDa)	48
Kalkuliertes Molekulargewicht (kDa)	44.1
Oligomere Struktur	α
pH Optimum	7.1
Apparenter V_{\max} (2-Phosphoglycerat-Bildung, U/mg)	3.3
Apparenter K_m (3-Phosphoglycerat, mM)	0.8
Apparenter V_{\max} (3-Phosphoglycerat-Bildung, U/mg)	0.8
Apparenter K_m (2-Phosphoglycerat, mM)	0.2

Nachweis der *in vivo* Transkription des ORFs AF1751 mittels RT-PCR. Die Ergebnisse der biochemischen Charakterisierung zeigen, dass ORF AF1751 aus *A. fulgidus* VC16 für eine iPGM kodiert. Um zu zeigen dass dieser ORF auch *in vivo* transkribiert wird, wurden RT-PCR Experimente durchgeführt. Dazu wurde RNA aus wachsenden Kulturen von *A. fulgidus* VC16, gewachsen auf Laktat und Sulfat, isoliert und zusammen mit Reverser Transkriptase inkubiert (4.2.10). Die mRNA des ORFs AF1751, die während des Wachstums transkribiert wurde, ist im RT-Schritt in cDNA umgeschrieben worden. Durch eine anschließende PCR mit der cDNA und spezifischen Primern für den ORF AF1751 wurde der ORF spezifisch amplifiziert. Das erhaltene PCR-Produkt hatte die erwartete Länge von 1224 Basenpaaren (Abbildung 20). Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne Reverse Transkriptase, dadurch wurde die vollständige Hydrolyse der DNA in der isolierten RNA überprüft.

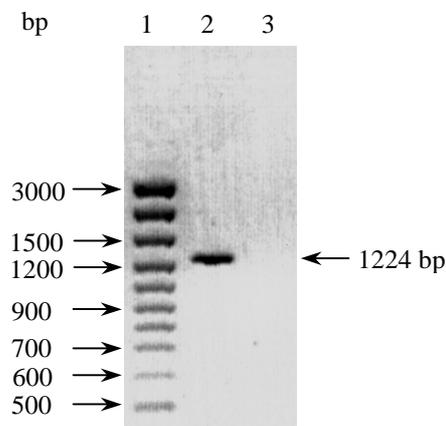


Abbildung 20 Nachweis der mRNA des Gens AF1751 von *A. fulgidus* VC16 mittels RT-PCR. Zum Nachweis wurde cDNA mit spezifischen Primern amplifiziert. Agarosegelelektrophorese des PCR-Produktes. **Spur 1:** Molekulargewichtsstandard; **Spur 2:** Produkt der erwarteten Länge der RT-PCR; **Spur 3:** Kontrollansatz, RT-PCR ohne Inkubation mit Reverser Transkriptase.

Die Daten zeigen, dass der ORF AF1751 aus *A. fulgidus* VC16 bei Wachstum auf Laktat *in vivo* transkribiert wird, was auf eine gluconeogenetische Funktion der iPGM hindeutet.

5.2.2 Identifizierung und Charakterisierung einer dPGM aus *T. acidophilum*

Identifizierung einer dPGM in *T. acidophilum*. Der ORF TA1347 aus dem Genom von *T. acidophilum* ist aufgrund seiner Ähnlichkeit zu dPGMs aus Bacteria und Eukarya als hypothetisches dPGM Gen annotiert. Das Gen besteht aus 642 Basenpaaren und kodiert für ein Polypeptid mit 214 Aminosäuren, was einer kalkulierten molekularen Masse von 23.8 kDa entspricht. Um zu prüfen ob der ORF TA1347 für eine funktionelle dPGM kodiert, wurde das Gen in den Vektor pET17b kloniert und zur Expression in *E. coli* BL21(DE3)-CodonPlus-RIL transformiert. Nach Überexpression eines 24 kDa Proteins

wurde dieses über einen Hitzeschritt bei 55°C und an einer Gelfiltrationssäule bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Die dPGM wies eine spezifische Aktivität von etwa 35 U/mg (50°C) auf. Die native apparente molekulare Masse wurde mit 46 kDa bestimmt. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass es sich um ein Protein mit homodimerer Struktur handelt (Tabelle 9). Im Folgenden werden die Ergebnisse der biochemischen Charakterisierung der dPGM aus *T. acidophilum* dargestellt.

Biochemische Charakterisierung. Die kinetischen Eigenschaften der dPGM wurden analysiert (Tabelle 9). Apparente K_m - und V_{max} -Werte wurden in beide Reaktionsrichtungen bestimmt und folgten jeweils einer Michaelis-Menten Kinetik. Aus den linearen Auftragungen nach Lineweaver-Burk wurde der K_m -Wert für 3-Phosphoglycerat mit 3.3 mM und der V_{max} -Wert mit 36 U/mg bestimmt. Der K_m -Wert für 2-Phosphoglycerat wurde mit 1.1 mM und der V_{max} -Wert mit 12 U/mg bestimmt (Abbildung 21).

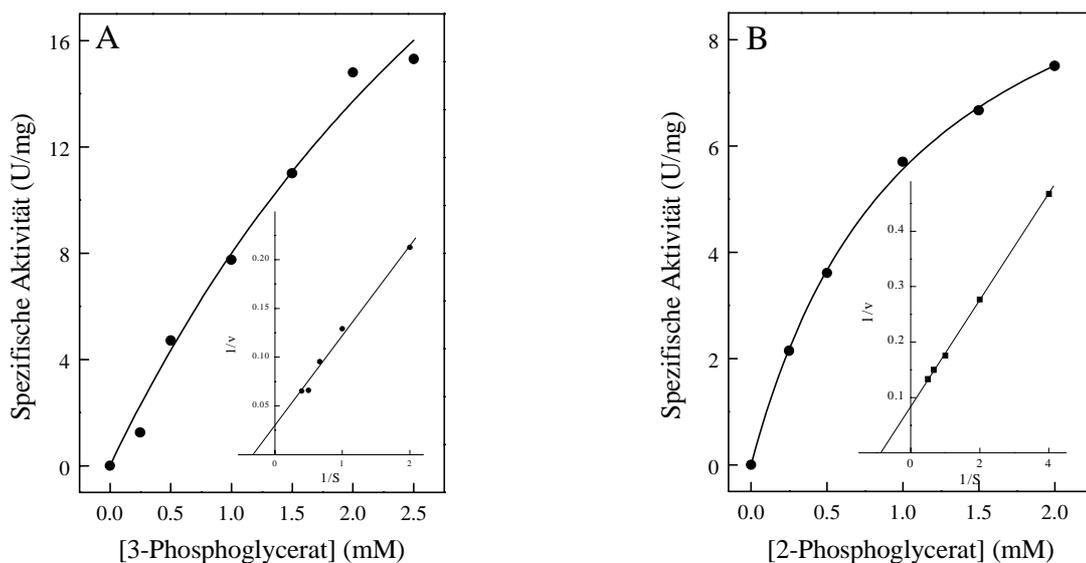


Abbildung 21 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der dPGM aus *T. acidophilum* von der Konzentration an Substrat. **A** Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von der Konzentration an 3-Phosphoglycerat. **B** Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von der Konzentration an 2-Phosphoglycerat. Die Einschübe zeigen die doppelt reziproke Auftragung nach Lineweaver-Burk. Die Testansätze enthielten 2.6 µg Protein.

Die spezifische Aktivität der dPGM aus *T. acidophilum* war abhängig vom Kofaktor 2,3-Bisphosphoglycerat. Die Abhängigkeit der Rate folgte einer Michaelis-Menten Kinetik mit einem K_m -Wert von 17 μM (Abbildung 22).

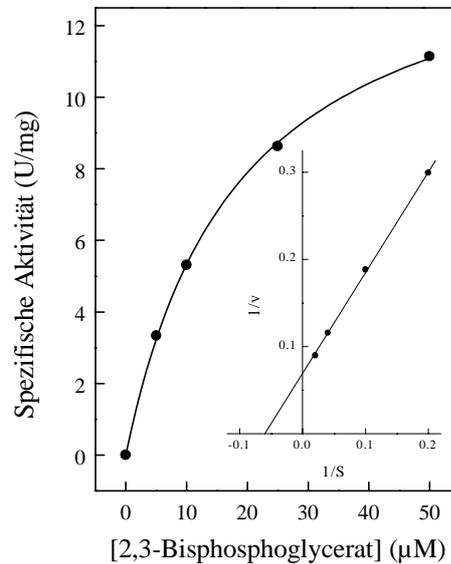


Abbildung 22 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der dPGM aus *T. acidophilum* von der Konzentration an 2,3-Bisphosphoglycerat. Der Einschub zeigt die doppelt reziproke Auftragung nach Lineweaver-Burk. Die Testansätze enthielten 0,75 mM 3-Phosphoglycerat und 2,6 μg Protein.

Für dPGMs aus Bacteria und Eukarya ist bekannt, dass Vanadat als Phosphatanalogon die Enzymaktivität hemmt. Diese Hemmung ist reversibel und kann durch Entfernen von Vanadat mit EDTA teilweise aufgehoben werden. Auch die Aktivität der dPGM aus *T. acidophilum* ließ sich mit Vanadat hemmen. Die Zugabe von 5 μM Vanadat führte zu einer Hemmung von 36%, mit 100 μM Vanadat lag die Hemmung bei 91%. Die Hemmung ließ sich teilweise durch Zugabe von EDTA aufheben (Abbildung 23).

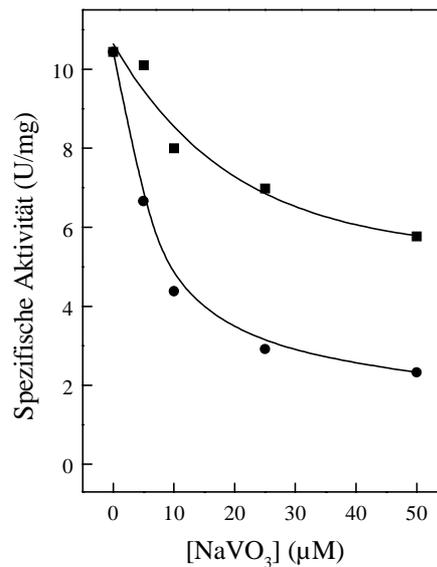


Abbildung 23 Einfluss von Vanadat und EDTA auf die Aktivität der dPGM aus *T. acidophilum*. Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von der Konzentration an Vanadat (●) und Aufhebung der Vanadat-Hemmung mit EDTA (■). Die Testansätze enthielten 2.6 µg Protein.

Die molekularen und kinetischen Eigenschaften der archaeellen dPGM aus *T. acidophilum* sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9 Molekulare und kinetische Eigenschaften der dPGM aus *T. acidophilum*. Die kinetischen Konstanten wurden bei 50°C bestimmt.

	Wert
Apparente molekulare Masse des Enzyms (kDa)	46
Apparente molekulare Masse der Untereinheit (kDa)	24
Kalkuliertes Molekulargewicht (kDa)	23.8
Oligomere Struktur	α_2
Apparenter V_{\max} (2-Phosphoglycerat-Bildung, U/mg)	36
Apparenter K_m (3-Phosphoglycerat, mM)	3.3
Apparenter V_{\max} (3-Phosphoglycerat-Bildung, U/mg)	12
Apparenter K_m (2-Phosphoglycerat, mM)	1.1
Apparenter K_m (2,3-Bisphosphoglycerat, µM)	17

Die Ergebnisse zeigen, dass der ORF TA1347 aus *T. acidophilum* für eine dPGM kodiert. Das ist der erste Nachweis einer dPGM aus Archaea. Die Aktivität war abhängig von 2,3-Bisphosphoglycerat und zeigte Vanadathemmung, wie für bakterielle dPGMs beschrieben.

5.3 Xylose Dehydrogenase, das erste Enzym des Xyloseabbaus, aus dem halophilen Archaeon *Ha. marismortui*

Der Stoffwechsel von Pentosen und die daran beteiligten Enzyme sind bisher in Archaea nicht untersucht. Es wurden erste Untersuchungen zum Abbau von Xylose in *Ha. marismortui* durchgeführt. Zunächst wird das Wachstum von *Ha. marismortui* auf Xylose beschrieben. Anschließend wird das erste Enzym des Xyloseabbaus, eine Xylose Dehydrogenase, charakterisiert.

5.3.1 Wachstum von *Ha. marismortui* auf Xylose

Ha. marismortui wurde bei 37°C auf einem Medium mit 0.5 g/l Hefeextrakt und 25 mM Xylose gezüchtet. Die Zellen wuchsen mit einer Verdopplungszeit von 20 Stunden bis zu einer optischen Dichte bei 578 nm von 1 (Abbildung 24). Bis zum Erreichen der stationären Phase wurden 5 mM Xylose verbraucht. Ohne Xylose wuchs *Ha. marismortui* bis zu einer optischen Dichte von 0.5.

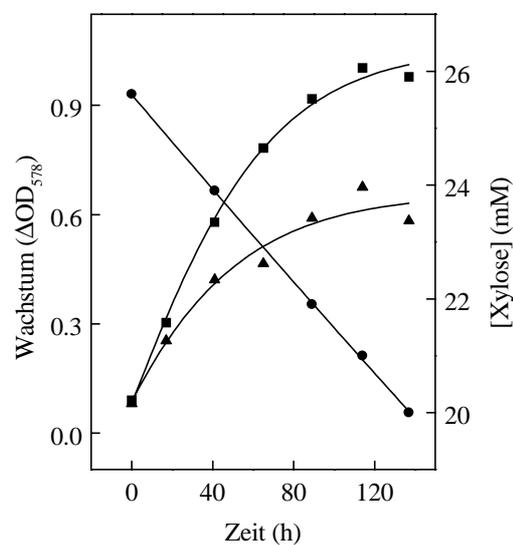


Abbildung 24 Wachstum von *Ha. marismortui* auf Xylose (25 mM) und Verbrauch von Xylose in Gegenwart von 0.5 g/l Hefeextrakt. Wachstumsversuch in 500 ml Schikanenkolben mit 10% Medium und 1% Inokulum, Wachstumstemperatur 37°C, Schüttelgeschwindigkeit 200 Upm, Verdopplungszeit etwa 20 Stunden. Dargestellt sind die Zunahme der optischen Dichte (ΔOD_{578}) bei 578 nm und die Xyloseabnahme (mM) in Abhängigkeit von der Zeit. Substrat (●), Wachstum mit Xylose (■), Wachstum ohne Xylose (▲).

Die Produktbildung in der exponentiellen Wachstumsphase beim Wachstum von *Ha. marismortui* auf Xylose wurde untersucht. In der exponentiellen Phase wurden 65% der verbrauchten Xylose (5 mM) zu CO₂ oxidiert. Außerdem wurden etwa 2 mM (21%) an Xylonat gebildet, damit betrug die Kohlenstoffbilanz 86% (Abbildung 25).

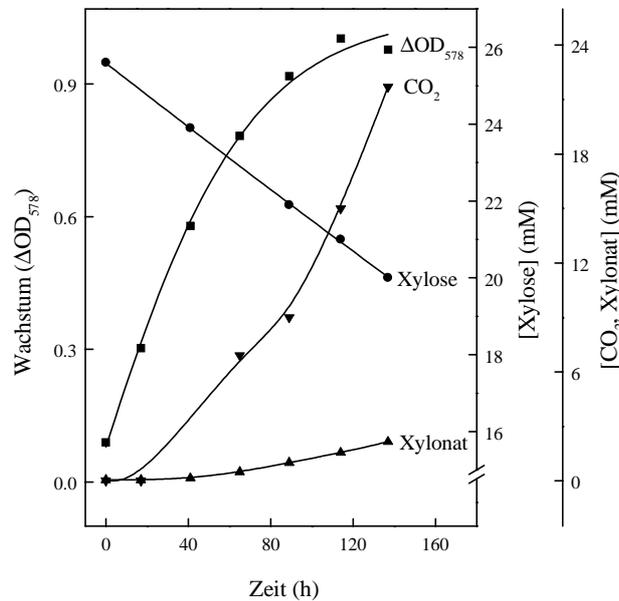


Abbildung 25 Xyloseabbau zu CO₂ und Xylonat in wachsenden Kulturen von *Ha. marismortui*. Wachstumsversuch in 500 ml Schikanenkolben mit 10% Medium (25 mM Xylose, 1 g/l Hefeextrakt) und 1% Inokulum, Wachstumstemperatur 37°C, Schüttelgeschwindigkeit 200 Upm, Verdopplungszeit etwa 20 Stunden. Dargestellt sind die Zunahme der optischen Dichte (ΔOD_{578}) bei 578 nm (■), die Xyloseabnahme in mM (●) und die Xylonat- (▲) und CO₂-Zunahme (▼) in Abhängigkeit von der Zeit.

5.3.2 Enzyme des Xyloseabbaus

In der Domäne der Bacteria so z.B. in *E. coli* werden die ersten Schritte des Xyloseabbaus von einer Xylose Isomerase und einer Xylulose Kinase katalysiert. Beide Enzymaktivitäten wurden in Zellextrakten von Xylose-gewachsenen *Ha. marismortui* Zellen nicht nachgewiesen. Als Kontrolle diente Extrakt von Xylose-gewachsenen *E. coli* Zellen, hier waren unter identischen Versuchsbedingungen Aktivitäten von Xylose Isomerase (0,04 U/mg) und Xylulose Kinase (0,42 U/mg) messbar. Da beim Wachstum von *Ha. marismortui* auf Xylose geringe Mengen an Xylonat nachweisbar waren (Abbildung 25), wurde der Rohextrakt auf Xylose Dehydrogenase Aktivität untersucht. Zellextrakt von *Ha. marismortui* katalysierte eine NADP⁺- und auch NAD⁺-abhängige Oxidation von Xylose zu Xylonat. Der apparente K_m -Wert für Xylose von 0,95 mM war 16fach kleiner als der K_m -Wert für Glucose, was dafür spricht, dass die Xylose

Dehydrogenase eine hohe Spezifität für Xylose aufweist. In weiteren Wachstumsversuchen konnte gezeigt werden, dass die Xylose Dehydrogenase beim Wachstum auf Xylose induziert wurde. Dies weist auf die spezifische Rolle der Xylose Dehydrogenase beim Abbau von Xylose hin.

5.3.3 Induktion der Xylose Dehydrogenase beim Wachstum auf Xylose

Die Induktion der Xylose Dehydrogenase ist in Abbildung 26 gezeigt. *Ha. marismortui* wurde auf Medium mit 25 mM Xylose (2.5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l Casaminosäuren) gezüchtet. Als Inokulum dienten Zellen, die in Abwesenheit von Xylose gewachsen waren. Die Zellen wuchsen mit einer Verdopplungszeit von etwa 15 Stunden bis zu einer optischen Dichte von 4.5, wobei bis zum Übergang in die stationäre Phase etwa 10 mM Xylose verbraucht wurden. Die spezifische Aktivität der Xylose Dehydrogenase stieg parallel zum Xyloseverbrauch auf das 5fache an.

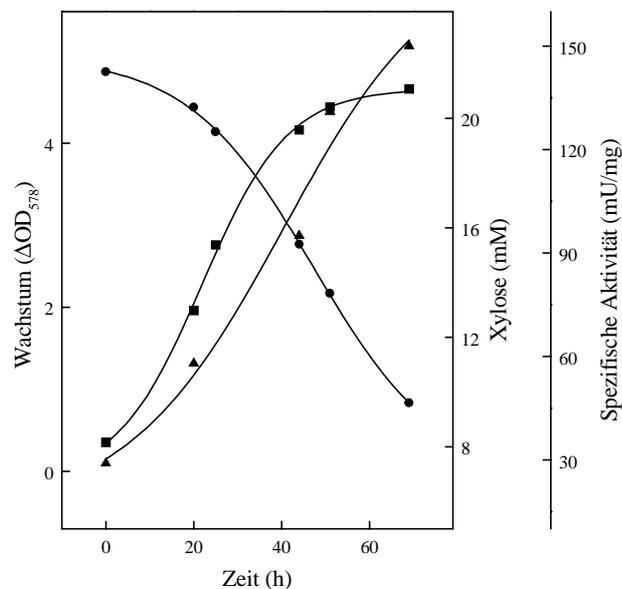


Abbildung 26 Induktion der Xylose Dehydrogenase beim Wachstum von *Ha. marismortui* auf 25 mM Xylose. Inokuliert wurde mit Glucose-gewachsener Vorkultur. Wachstum in 2000 ml Schikanenkolben mit 10% Medium und 1% Inokulum, Wachstumstemperatur 37°C, Schüttelgeschwindigkeit 200 Upm. Messung der spezifischen Aktivität der Xylose Dehydrogenase bei 37°C mit 0.1 M Tris-HCl pH 8.8, 1.5 M KCl, 1 mM NADP⁺, 10 mM Xylose und 0.05 bis 1.3 mg Protein. Wachstum (ΔOD_{578}) (■), Substrat (●), spezifische Aktivität der Xylose Dehydrogenase (▲).

Die Abwesenheit von Xylose Isomerase Aktivität und Xylulose Kinase Aktivität in Rohextrakten von *Ha. marismortui* sowie die Oxidation von Xylose zu Xylonat sprechen dafür, dass der erste Schritt des Xyloseabbaus in *Ha. marismortui* von einer induzierbaren Xylose Dehydrogenase katalysiert wird.

5.3.4 Reinigung der Xylose Dehydrogenase aus *Ha. marismortui*

Über Xylose Dehydrogenasen in Bacteria und Archaea ist bisher wenig bekannt. Deshalb wurde die Xylose Dehydrogenase aus Rohextrakt von *Ha. marismortui* gereinigt und anschließend biochemisch charakterisiert. Rohextrakt von *Ha. marismortui* weist nach Wachstum auf Xylose hohe Xylose Dehydrogenase Aktivität auf (0.15 U/mg). Die Xylose Dehydrogenase wurde aus Xylose-gewachsenen Zellen bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Die Reinigung erfolgte in drei Schritten an einer Sepharose CL 4b Säule, einer Phenyl Sepharose Säule und an einer Gelfiltrationssäule. Das gereinigte Protein wies eine spezifische Aktivität von 100 U/mg auf und war 211fach angereichert worden. Damit ergab sich ein Anteil von 0.5% nativer Xylose Dehydrogenase an löslichem Protein von *Ha. marismortui* (Tabelle 10).

Tabelle 10 Reinigung der Xylose Dehydrogenase aus *Ha. marismortui*. Die Enzymaktivität wurde bei 37°C als NADP⁺- und Xylose-abhängige Bildung von Xylonat in 0.1 M Tris-HCl pH 8.8 mit 1.5 M KCl, 1 mM NADP⁺ und 10 mM Xylose gemessen.

Reinigungsschritt	Protein (mg)	Aktivität (U)	Spez. Aktivität (U/mg)	Ausbeute (%)	Anreicherung (-fach)
Zellfreier Extrakt	260	125	0.48	100	1
Sepharose CL 4b	24	102	4.4	82	9
Phenyl Sepharose	0.57	37	66	30	137
Superdex 200	0.12	12	100	10	211

Der Reinheitsgrad der Xylose Dehydrogenase wurde nach jedem Reinigungsschritt gelelektrophoretisch analysiert (4.3.2). Nach dem letzten Reinigungsschritt zeigte sich auf einem SDS-Gel nur eine Bande (Abbildung 27).

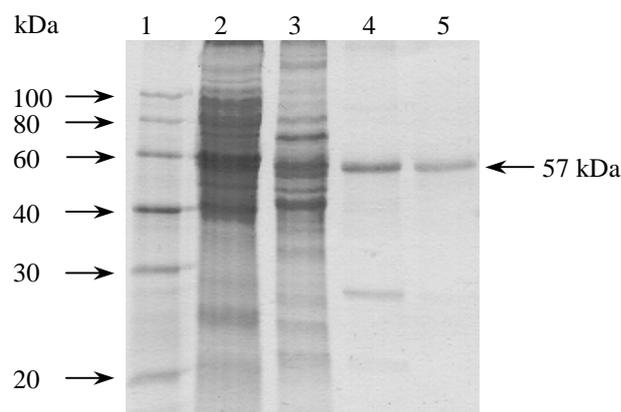


Abbildung 27 Reinigung der Xylose Dehydrogenase aus *Ha. marismortui*. SDS-PAGE und anschließende Färbung mit Coomassie Brilliantblau von aufeinanderfolgenden Reinigungsschritten. Die Pfeile auf der linken Seite deuten auf die Markerproteine, der Pfeil rechts auf die Bande des gereinigten Enzyms. **Spur 1:** Molekulargewichtsstandard; **Spur 2:** zellfreier Rohextrakt; **Spur 3:** nach Sepharose CL 4b; **Spur 4:** nach Phenyl Sepharose; **Spur 5:** nach Superdex.

Das apparente native Molekulargewicht der Xylose Dehydrogenase aus *Ha. marismortui* wurde mit 180 kDa, das der Untereinheit mit 57 kDa bestimmt. Die Ergebnisse sprechen für eine homotetramere Struktur des Proteins (Tabelle 12). Die N-terminale Aminosäuresequenz (29 Aminosäuren) der Untereinheit des gereinigten Enzyms wurde bestimmt mit: MNVDALTGGFDRRDWQEQTATDNPVRF_{AA} und war identisch zur N-terminalen Sequenz eines ORFs aus dem Contig97 im partiell sequenzierten Genom von *Ha. marismortui* (Zhang et al. 2003). Der ORF, im Folgenden als *xyldh* bezeichnet, besteht aus 1083 Basenpaaren und kodiert für ein Polypeptid mit 360 Aminosäuren, was einer kalkulierten molekularen Masse von 39.9 kDa entspricht. Die kodierende Sequenz startet mit ATG und endet mit TGA (siehe Anhang).

5.3.5 Biochemische Charakterisierung der Xylose Dehydrogenase

Das gereinigte Enzym katalysierte die Oxidation von Xylose zu Xylonat sowohl mit NADP⁺ als auch mit NAD⁺ als Elektronenakzeptor. Die Abhängigkeit der Rate von Xylose, NADP⁺ und NAD⁺ folgte einer Michaelis-Menten Kinetik mit apparenten K_m -Werten von 1.2 mM für Xylose und 0.15 bzw. 0.9 mM für NADP⁺ und NAD⁺ (Abbildung 28). Der 9fach höhere K_m -Wert für NAD⁺ gegenüber NADP⁺ spricht dafür, dass NADP⁺ der physiologische Elektronenakzeptor der Xylose Dehydrogenase ist.

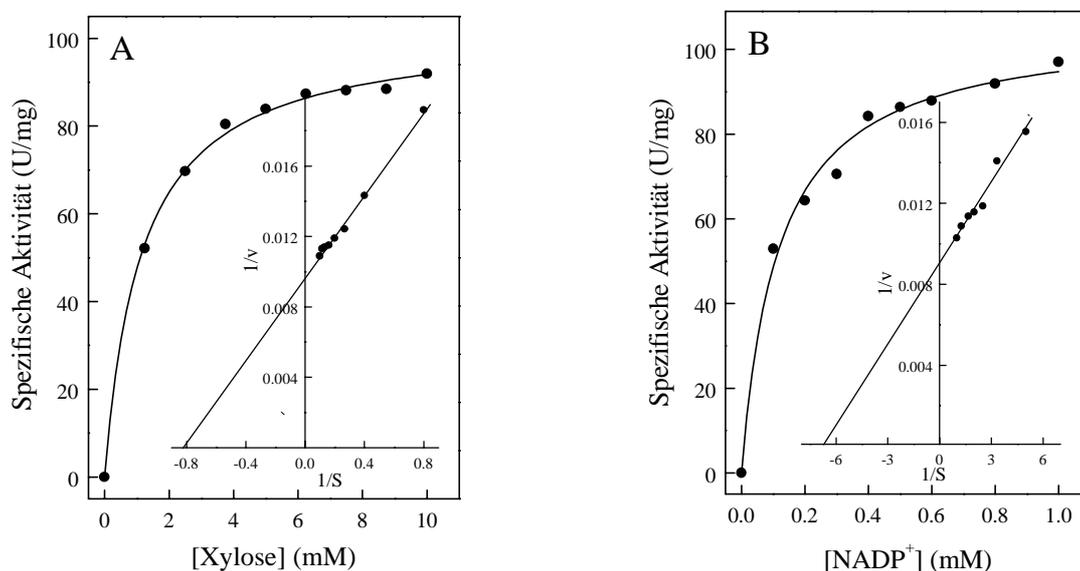


Abbildung 28 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der Xylose Dehydrogenase aus *Ha. marismortui* von den Konzentrationen an Xylose und NADP⁺. **A** Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von der Konzentration an Xylose. **B** Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von der Konzentration an NADP⁺. Die Einschübe zeigen die doppelt reziproken Auftragungen nach Lineweaver-Burk. Die Testansätze enthielten 32 µg/ml Protein.

Neben Xylose wurden Ribose, Glucose, Galactose, Fructose und Arabinose als Substrate getestet. Die V_{max} -Werte, K_m -Werte und die katalytische Effizienz (k_{cat}/K_m) sind in Tabelle 11 dargestellt. Die höchste katalytische Effizienz wurde mit Xylose gemessen. Ribose wurde ebenfalls mit hoher Rate und Affinität umgesetzt, dagegen wurden Fructose und Arabinose nicht in signifikanten Raten vom Enzym oxidiert. Im Vergleich mit Glucose wurde Xylose mit einer 70fach höheren Effizienz umgesetzt, was dafür spricht, dass es sich bei der Dehydrogenase um eine spezifische Xylose Dehydrogenase handelt.

Tabelle 11 Substratspezifität der Xylose Dehydrogenase aus *Ha. marismortui*. Die Substratspezifitäten wurden bei 37°C in 20 mM Tris-HCl pH 8.3 mit 1.5 M KCl gemessen. Für die V_{max} -Werte wurden folgende Konzentrationen an Substraten eingesetzt: Xylose, Ribose (jeweils 10 mM) mit NADP⁺ (1 mM), Glucose, Galactose, Fructose, Arabinose (jeweils 0.1 M) mit NADP⁺ (1 bzw. 2 mM), Xylose, Ribose (jeweils 20 mM) mit NAD⁺, n.b. = nicht bestimmt.

Substratpaar		V_{max} (U/mg)	K_m (Zucker)	K_m (Kofaktor)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ x10 ²)
Xylose	NADP ⁺	107	1.2	0.15	356	2.97
Ribose	NADP ⁺	108	2.3	0.1	360	1.57
Glucose	NADP ⁺	81.6	64	0.18	273	0.043
Galactose	NADP ⁺	38.5	n.b.	n.b.	-	-
Fructose	NADP ⁺	1.9	n.b.	n.b.	-	-
Arabinose	NADP ⁺	1.0	n.b.	n.b.	-	-
Xylose	NAD ⁺	83	n.b.	0.9	-	-
Ribose	NAD ⁺	87	n.b.	1.2	-	-

Die Aktivität der Xylose Dehydrogenase wurde durch die Zugabe von hohen Konzentrationen an KCl oder NaCl sowie von moderaten Konzentrationen an MgCl₂ stark stimuliert. Maximale Aktivität konnte mit 1.5 M KCl oder NaCl und mit 100 mM MgCl₂ gemessen werden. Die Daten zeigen, dass KCl in einer Konzentration von 1.5 M durch niedrige Konzentrationen an MgCl₂ ersetzt werden kann. Das pH Optimum lag bei pH 8.3, bei pH 6.1 und 9 wurden noch 50% der Aktivität gemessen. Das Temperaturoptimum lag bei 50°C (Abbildung 29). Die Darstellung der Daten nach Arrhenius ergab einen linearen Bereich zwischen 20°C und 50°C, daraus wurde eine Aktivierungsenergie von 64 kJ/mol ermittelt.

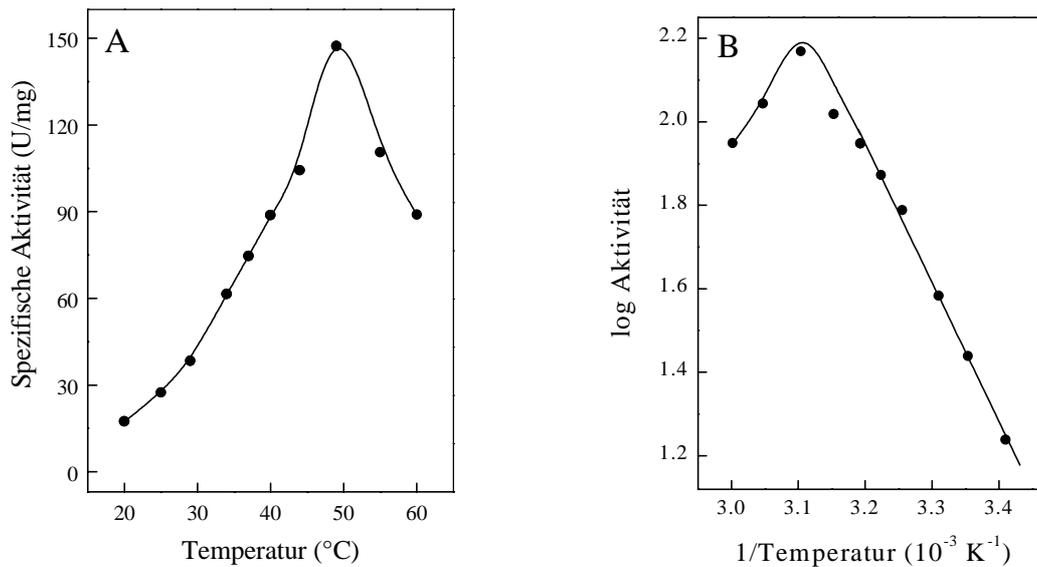


Abbildung 29 Temperaturabhängigkeit der Aktivität der Xylose Dehydrogenase aus *Ha. marismortui*. A Spezifische Aktivität des Enzyms in Abhängigkeit von der Temperatur. B Darstellung derselben Daten nach Arrhenius. Die Testansätze enthielten 0.3 µg Protein.

Die molekularen und katalytischen Eigenschaften der archaeellen Xylose Dehydrogenase aus *Ha. marismortui* sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

Tabelle 12 Molekulare und katalytische Eigenschaften der Xylose Dehydrogenase aus *Ha. marismortui*.

	Wert
Apparente molekulare Masse des Enzyms (kDa)	180
Apparente molekulare Masse der Untereinheit (kDa)	57
Oligomere Struktur	α ₄
pH Optimum	8.3
Temperaturoptimum (°C)	50
Aktivierungsenergie (kJ/mol, 20-60°C)	64

Die Daten deuten darauf hin, dass die in dieser Arbeit identifizierte und charakterisierte induzierbare Xylose Dehydrogenase das erste Enzym des Xyloseabbaus in *Ha. marismortui* darstellt. Damit unterscheidet sich vermutlich der archaeelle Abbauweg für Xylose von dem aus Bacteria bekannten Abbauweg, dessen ersten Schritte von Xylose Isomerase und Xylulose Kinase katalysiert werden.

6 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden drei Enzyme des Zuckerstoffwechsels charakterisiert: Pyruvat Kinasen und Phosphoglycerat Mutasen aus hyperthermophilen Archaea und eine Xylose Dehydrogenase, das erste Enzym des Xyloseabbaus, aus dem halophilen Archaeon *Haloarcula marismortui*.

6.1 Pyruvat Kinasen aus hyperthermophilen Archaea und Bacteria (*Thermotoga*)

Pyruvat Kinasen (PK) aus drei hyperthermophilen Archaea, aus *Aeropyrum pernix*, *Pyrobaculum aerophilum* sowie aus *Archaeoglobus fulgidus* Stamm 7324, und aus dem Bakterium *Thermotoga maritima* wurden biochemisch charakterisiert und bezüglich ihrer phylogenetischen Verwandtschaft analysiert. Insbesondere wurden die Effekte von allosterischen Regulatoren auf die Aktivität der PKs überprüft. Zusätzlich wurde die PK aus *T. maritima* mit Hilfe von ortsspezifischer Mutagenese auf ihre Abhängigkeit von monovalenten Kationen untersucht.

Molekulare und thermophile Eigenschaften und Kationenspezifität. Die apparenten Molekulargewichte der hyperthermophilen PKs wurden mit etwa 200 kDa bestimmt, die der Untereinheiten mit etwa 50 kDa, was für eine homotetramere Struktur der PKs spricht. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit dem Molekulargewicht von PKs aus Bacteria und Eukarya. Auch die archaeellen PKs aus *Thermoproteus tenax* und *Thermoplasma acidophilum* wurden als Homotetramere charakterisiert (Potter und Fothergill-Gilmore 1992; Schramm et al. 2000).

Die Aktivität eukaryotischer und bakterieller PKs ist abhängig von divalenten Kationen. Dieses trifft auch für die hyperthermophilen PKs zu, wobei Magnesium durch Mangan oder Kobalt ersetzbar war. Die PK aus *P. aerophilum* zeigte eine starke Bevorzugung von Mangan gegenüber Magnesium. Die Aktivität der untersuchten archaeellen PKs und auch die der PK aus *T. maritima* war nicht abhängig von monovalenten Kationen wie z.B. Kalium oder Ammonium. Eine Abhängigkeit der Aktivität von monovalenten Kationen ist für viele PKs beschrieben. Auch Kalium-unabhängige PKs sind aus Bacteria und Eukarya bekannt so von *E. coli*, *Corynebacterium glutamicum* und *Zymomonas mobilis* (Waygood et al. 1975; Pawluk et al. 1986; Jetten et al. 1994). Die Aktivität der archaeellen PK aus *Thermoproteus tenax* ist im Gegensatz zu der PK aus *Thermoplasma acidophilum* ebenfalls unabhängig von Kalium (Schramm et al. 2000; Potter und Fothergill-Gilmore 1992).

In Übereinstimmung mit der Wachstumstemperatur von Hyperthermophilen zeigten die untersuchten PKs extrem hohe Temperaturoptima und Thermostabilitäten. *P. aerophilum*

hat z.B. eine optimale Wachstumstemperatur von 100°C (Völkl et al. 1993), entsprechend lag das Temperaturoptimum der PK über 98°C. Die PK war über zwei Stunden bei 100°C ohne Aktivitätsverlust stabil. Bisher sind keine so extrem thermostabilen PKs beschrieben. So zeigt die thermophile bakterielle PK aus *Thermus thermophilus*, dessen Wachstumsoptimum bei etwa 70°C liegt, nach 10minütiger Inkubation bei 100°C eine komplette Inaktivierung (Yoshizaki und Imahori 1979). Die hyperthermophilen PKs wurden auf ihre hitzeinduzierte Entfaltung hin untersucht. Für die PK aus *A. fulgidus* wurde eine Schmelztemperatur von 93°C bestimmt, die PKs aus *A. pernix*, *P. aerophilum* und aus *T. maritima* zeigten Schmelztemperaturen über 98°C.

Kinetische Eigenschaften und Regulation. Die untersuchten hyperthermophilen PKs zeigten sigmoidale Saturierungskinetiken für die beiden Substrate Phosphoenolpyruvat und ADP. Dieses Ergebnis weist auf eine positiv homotrope kooperative Bindung der Substrate hin. Eine kooperative Bindung von Substrat, vor allem von Phosphoenolpyruvat, wurde bereits für viele PKs aus Bacteria und Eukarya beschrieben. Für einige PKs zeigte sich mit ADP als Substrat nur eine hyperbole Kinetik, so auch für die PK aus *Thermoproteus tenax* (Schramm et al. 2000).

Im Gegensatz zu den meisten eukaryotischen und bakteriellen PKs konnte für die archaeellen hyperthermophilen PKs keine allosterische Aktivierung durch heterotrope Effektoren gezeigt werden. Eine Vielzahl von Effektoren, die als allosterische Regulatoren von bakteriellen und eukaryotischen PKs beschrieben sind, wurde getestet. Eukaryotische PKs werden durch Fructose-1,6-bisphosphat (FBP) allosterisch aktiviert. Innerhalb der Eukaryoten bilden die Protisten *Leishmania* und *Trypanosoma* eine Ausnahme, sie werden durch Fructose-2,6-bisphosphat aktiviert (Ernest et al. 1998; Rigden et al. 1999a). Die meisten bakteriellen PKs werden durch AMP und Zuckermonophosphate wie z.B. Ribose-5-phosphat allosterisch aktiviert, einige aber auch durch FBP (Waygood und Sanwal 1974; Waygood et al. 1975; Tuominen und Bernlohr 1971; Garcia-Olalla und Garrido-Pertierra 1987). Das apparente Fehlen einer allosterischen Regulation durch heterotrope Effektoren bei den hyperthermophilen archaeellen PKs weist auf eine ungewöhnliche Regulation der PKs hin, d.h. Regulation nur durch die kooperative Substratbindung.

ATP ist für einige eukaryotische und bakterielle PKs als allosterischer Inhibitor beschrieben. Die Inhibition ist durch den jeweiligen allosterischen Aktivator, FBP oder AMP, aufhebbar (Waygood und Sanwal 1974). Die Aktivität der PKs aus den hyperthermophilen Archaea wird ebenfalls durch ATP inhibiert. Diese Inhibition kann jedoch durch FBP oder AMP nicht aufgehoben werden, was gegen eine allosterische Inhibition spricht. Die Inhibition ist ein kompetitiver Effekt gegenüber den Substraten Phosphoenolpyruvat und ADP. Das apparente Fehlen der allosterischen Regulation durch heterotrope Effektoren ist auch für die hyperthermophile PK aus *Thermoproteus tenax* beschrieben (Schramm et al. 2000). Die archaeelle PK aus *Thermoplasma acidophilum* ist dagegen durch AMP allosterisch aktivierbar (Potter und Fothergill-Gilmore 1992). Daher

scheinen die reduzierten allosterischen Eigenschaften der hyperthermophilen PKs kein generelles Vorkommen bei den archaellen PKs zu sein.

Das apparente Fehlen der allosterischen Regulation der archaellen hyperthermophilen PKs kann zu diesem Zeitpunkt nicht endgültig erklärt werden. Ein spezifischer Effekt der hohen Temperatur auf die allosterischen Eigenschaften kann ausgeschlossen werden, da, wie in dieser Arbeit gezeigt, die bakterielle PK aus *T. maritima* allosterisch reguliert ist und hyperthermophile Eigenschaften aufweist. Die PK aus *T. maritima* wird durch AMP allosterisch aktiviert und durch ATP inhibiert. Die Inhibition der Aktivität der PK aus *T. maritima* durch ATP kann durch den allosterischen Aktivator AMP aufgehoben werden. Die unterschiedlichen Eigenschaften bezüglich der allosterischen Regulation der hyperthermophilen PKs könnten durch die verschiedenen Abbauwege von Glucose, d.h. die modifizierten Embden-Meyerhof Wege der Archaea und den klassischen Embden-Meyerhof Weg in *T. maritima*, induziert sein. Neben der PK hat die Phosphofruktokinase (PFK) im klassischen Embden-Meyerhof Weg der Bacteria regulierende Funktion. ADP-, ATP- und Pyrophosphat-abhängige PFKs der archaellen modifizierten Embden-Meyerhof Wege sind dagegen nicht allosterisch reguliert (Siebers et al. 1998; Hansen und Schönheit 2001; Tuininga et al. 1999). Dieses deutet darauf hin, dass in Archaea weder die PFKs noch die PKs eine Funktion bezüglich der allosterischen Regulation in den modifizierten Abbauwegen von Glucose übernehmen. Jedoch wurde für PFKs und für PKs gezeigt, dass sie beim Wachstum auf Zuckern stark induziert werden (Labes und Schönheit 2001). Für einige Enzyme wurde die Regulation auf Transkriptionsebene direkt gezeigt (Siebers et al. 1998; Van der Oost et al. 1998; De Vos et al. 1998). Außerdem könnten die kooperativen Bindungen der Substrate PEP und ADP für die Regulation der modifizierten Embden-Meyerhof Wege in Archaea von hinreichend physiologischer Relevanz sein.

Bisher ist nur ein allosterisch reguliertes Enzym aus einem modifizierten Embden-Meyerhof Weg bekannt: die nicht-phosphorylierende Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase aus *Thermoproteus tenax* (Abbildung 2), die die irreversible Oxidation von Glycerinaldehyd-3-phosphat zu 3-Phosphoglycerat katalysiert (Brunner et al. 1998). Die Glycerinaldehyd-3-phosphat: Ferredoxin Oxidoreduktase, die die entsprechende Funktion in anderen Archaea übernimmt, ist bisher auf allosterische Regulation wenig untersucht.

Aminosäuresequenzvergleiche von PKs. Ein Sequenzvergleich der PKs der hyperthermophilen Organismen *T. maritima*, *A. pernix* und *P. aerophilum* zeigte signifikante Ähnlichkeiten (37 bis 65% Ähnlichkeit) zu bekannten PK Sequenzen aus Bacteria und Eukarya. Dies deutet darauf hin, dass alle PKs eine homologe Familie eines Ursprunges bilden. Alle Sequenzen der hyperthermophilen PKs enthalten die PK-Konsensussequenz: [LIVAC]-x-[LIVM](2)-[SAPCV]-K-[LIV]-E-[NKRST]-x-[DEQHS]-

[GSTA]-[LIVM] (Falquet et al. 2002). Ein Alignment der hyperthermophilen PKs mit ausgewählten Homologen aus allen drei Domänen ist in Abbildung 30 dargestellt.

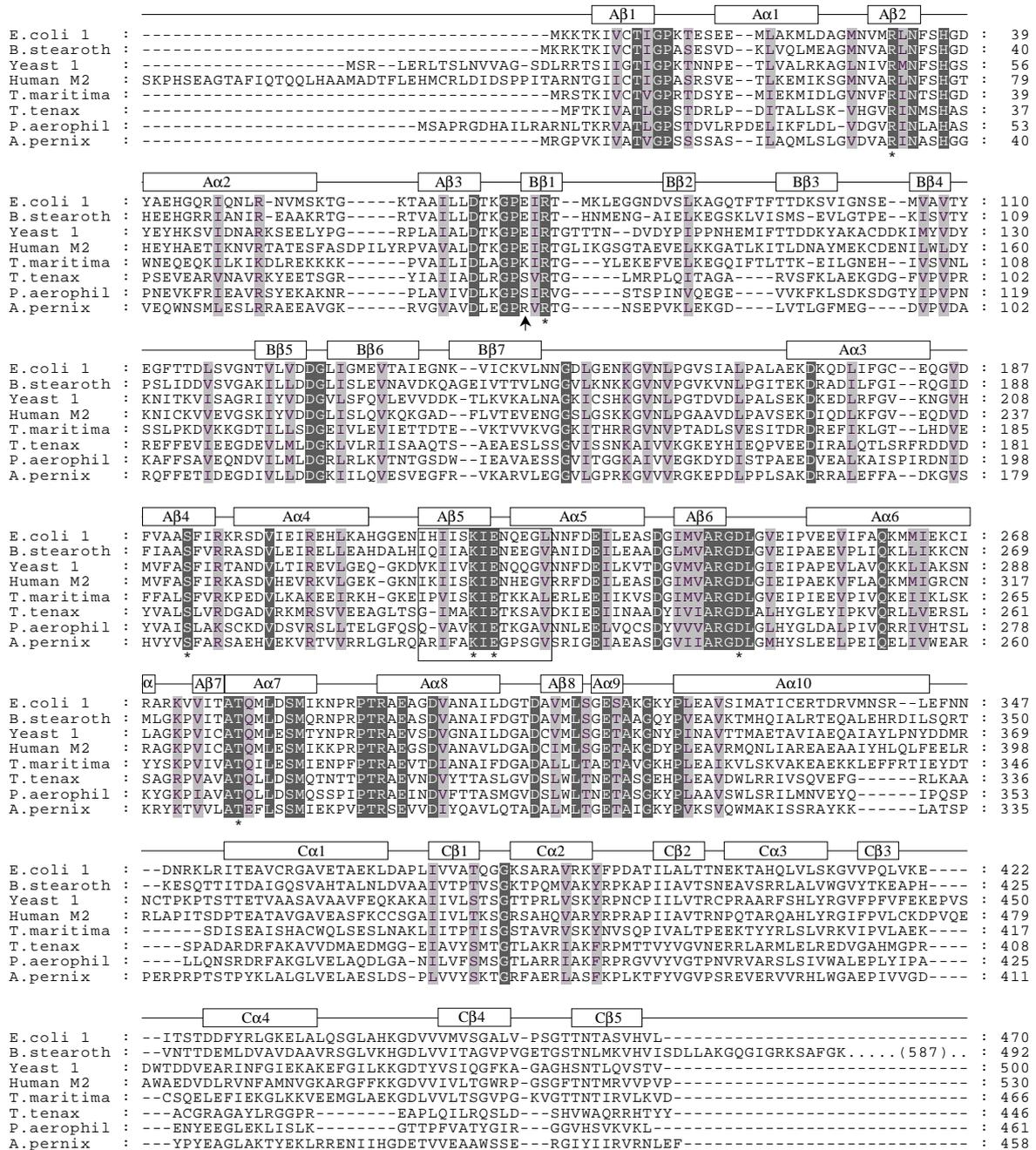


Abbildung 30 Multiples Sequenzalignment mit Aminosäuresequenzen von PKs aus den Domänen der Eukarya, Bacteria und Archaea. Das Alignment wurde mit ClustalX mit Standard Einstellungen (Thompson et al. 1997) erstellt. Konservierte Aminosäurereste, die essentiell für die katalytische Aktivität sind (Jurica et al. 1998), wurden durch Sterne markiert. Der Pfeil markiert den konservierten Glutamat-Rest, der essentiell für Kalium-abhängige PKs ist. Die PK-Konsensussequenz ist durch einen Rahmen markiert. Die durch Berechnung vorhergesagte Sekundärstruktur der PK aus *P. aerophilum* ist oberhalb der Sequenzen gezeigt. A = Domäne A; B = Domäne B; C = Domäne C. NCBI Accession-Nummern oder die SwissProt-Nummern der Sequenzen: *Aeropyrum pernix* BAA79454; *Bacillus stearotherophilus* S29783; *E. coli* 1 KPY1_ECOLI; *Human M2* KPY2_HUMAN; *Pyrobaculum aerophilum* AAL63053; *Yeast* 1 KPY1_YEAST; *Thermoproteus tenax* AAF06820; *Thermotoga maritima* AAD35300.

Kristallstrukturen von PKs aus Bacteria (*E. coli*) und Eukarya (*Leishmania mexicana*, Katze, Kaninchen und *Saccharomyces cerevisiae*) haben ergeben, dass jede Untereinheit des Enzyms bei Eukarya aus vier Domänen (N, A, B, C) und bei Bacteria aus drei Domänen (A, B, C) besteht (Abbildung 30). Die N-terminale Domäne N (mindestens 18 Aminosäuren) fehlt in bakteriellen und archaeellen PKs. Die Domäne A, die die katalytische Bindestelle enthält (Reste 14 bis 83 und 176 bis 348 für die PK aus *P. aerophilum*), besteht aus einer klassischen $(\alpha\beta)_8$ -Fass-Struktur. Die Domäne B (Reste 84 bis 175) besteht aus β -Faltblättern und liegt über der katalytischen Domäne. Die Domäne C (Reste 349 bis 461) bildet in der PK aus Hefe die Bindestelle für den allosterischen Regulator FBP und ist eine offen gedrehte $\alpha\beta$ -Struktur. Der höchste Grad an Homologie bei PKs befindet sich in der katalytischen Domäne A. In dieser Domäne konnten anhand der PK aus Hefe eine Reihe Aminosäurereste identifiziert werden, die für die Katalyse essentiell sind (Jurica et al. 1998). Die Reste sind in allen PKs konserviert, so auch in den hyperthermophilen PKs. Die Domäne B und insbesondere die Domäne C zeigen dagegen untereinander weniger Sequenzhomologien. Anhand der Kristallstruktur der PK aus Hefe sind mindestens acht Aminosäurereste innerhalb der Domäne C identifiziert worden (S402, T403, S404, T407, W452, R459, G475 und H491), die für die Bindung des allosterischen Effektors FBP essentiell sind. Erstaunlicherweise sind diese Reste nicht in allen FBP-regulierten PKs konserviert. Das Vorhandensein eines Glutamatrestes (Position 432, PK M1 Mensch) wird für das Fehlen von allosterischen Eigenschaften der Säuger M1 PK verantwortlich gemacht (Jurica et al. 1998). Die Sequenzen der hyperthermophilen archaeellen PKs weisen an der entsprechenden Position kein Glutamat auf, was darauf hinweist, dass das Glutamat nicht zwingend die Voraussetzung für eine fehlende allosterische Regulation sein muss. Auf Sequenzebene kann das Fehlen der allosterischen Regulation der hyperthermophilen archaeellen PKs zur Zeit nicht erklärt werden. Durch den Zugang zu den rekombinanten Pyruvat Kinasen sind die Voraussetzungen für eine Kristallisation geschaffen. Anhand von Kristallstrukturen könnte die Bindestelle von AMP in der Pyruvat Kinase aus *T. maritima* identifiziert werden und so die Strukturunterschiede zu den nicht-allosterisch regulierten PKs der hyperthermophilen Archaea untersucht werden.

Phylogenetische Verwandtschaften der PKs. Die PKs aus *T. maritima*, *A. pernix* und *P. aerophilum* wurden mit PKs aus allen drei Domänen des Lebens bezüglich ihrer evolutionären Verwandtschaft untersucht. Wie der phylogenetische Stammbaum in Abbildung 31 darstellt, bilden die ausgewählten PKs vier Gruppen: PK Bacteria I, PK Archaea, PK Eukarya und PK Bacteria II. Der Stammbaum wurde mit Hilfe zweier unabhängiger Methoden, der Neighbor-Joining-Methode und der Maximum-Likelihood-Methode, erstellt, die hohe Übereinstimmungen zeigten sowie zu hohen Bootstrap-Werten führten. Die meisten bakteriellen PKs fallen in die Gruppe PK Bacteria I. Einige von diesen Enzymen sind bereits charakterisiert und AMP wurde bei ihnen als positiver allosterischer Effektor identifiziert. Fast alle archaeellen PK Sequenzen bilden eine

separate Gruppe, was für eine Monophylie der archaeellen PKs spricht. Die PK aus dem Bakterium *T. maritima* befindet sich im Stammbaum in der archaeellen Gruppe. Dieses könnte ein Hinweis auf lateralen Gentransfer des *pyk* Gens aus einem hyperthermophilen Archaeon zu *T. maritima* sein. Lateraler Gentransfer wird bereits für andere Enzyme im Zusammenhang mit *T. maritima* diskutiert (Nelson et al. 1999). Die PKs der archaeellen Gruppe sind entweder nicht allosterisch reguliert oder, im Falle von *T. maritima* und *Thermoplasma acidophilum*, durch AMP aktivierbar.

Die Sequenz der PK aus dem Archaeon *A. fulgidus* Stamm 7324 ist bisher nicht bekannt. Die N-terminale Aminosäuresequenz dieser PK, die in dieser Arbeit identifiziert werden konnte, weist einen hohen Grad an Identität zu den PKs aus den Archaea *Pyrococcus furiosus* und *Thermococcus litoralis* auf (Abbildung 4). Das Fehlen des *pyk* Homologs im Genom von *A. fulgidus* Stamm VC16 und das Vorhandensein der PK in Stamm 7324 kann entweder durch den Verlust des Gens im Stamm VC16 erklärt werden oder durch lateralen Gentransfer des *pyk* Gens von einem Organismus aus der Ordnung der *Thermococcales* in den Stamm 7324.

Eukaryotische PKs, die meist durch FBP oder auch Fructose-2,6-bisphosphat allosterisch aktiviert sind, bilden eine eigenständige Gruppe. Die zweite bakterielle Gruppe setzt sich aus PKs von Bakterien mit niedrigem GC-Gehalt und Organismen aus der Gruppe der γ -Proteobakterien zusammen. Diese PKs zeigen allosterische Regulation entweder durch FBP oder durch AMP. Das Vorhandensein von zwei separaten bakteriellen Gruppen könnte durch Genduplikation während der Evolution entstanden sein oder auch durch lateralen Gentransfer von Eukaryoten zu einigen gram-positiven Bakterien und Proteobakterien. Für einen lateralen Gentransfer spricht die enge Stellung der PK Bacteria II-Gruppe zu der eukaryotischen Gruppe im phylogenetischen Stammbaum. Außerdem wurde in *E. coli* und *S. typhimurium* eine allosterische Regulation durch FBP, dem allosterischen Aktivator der eukaryotischen PKs, im Isoenzym 1 gefunden (Garcia-Olalla und Garrido-Pertierra 1987; Waygood und Sanwal 1974).

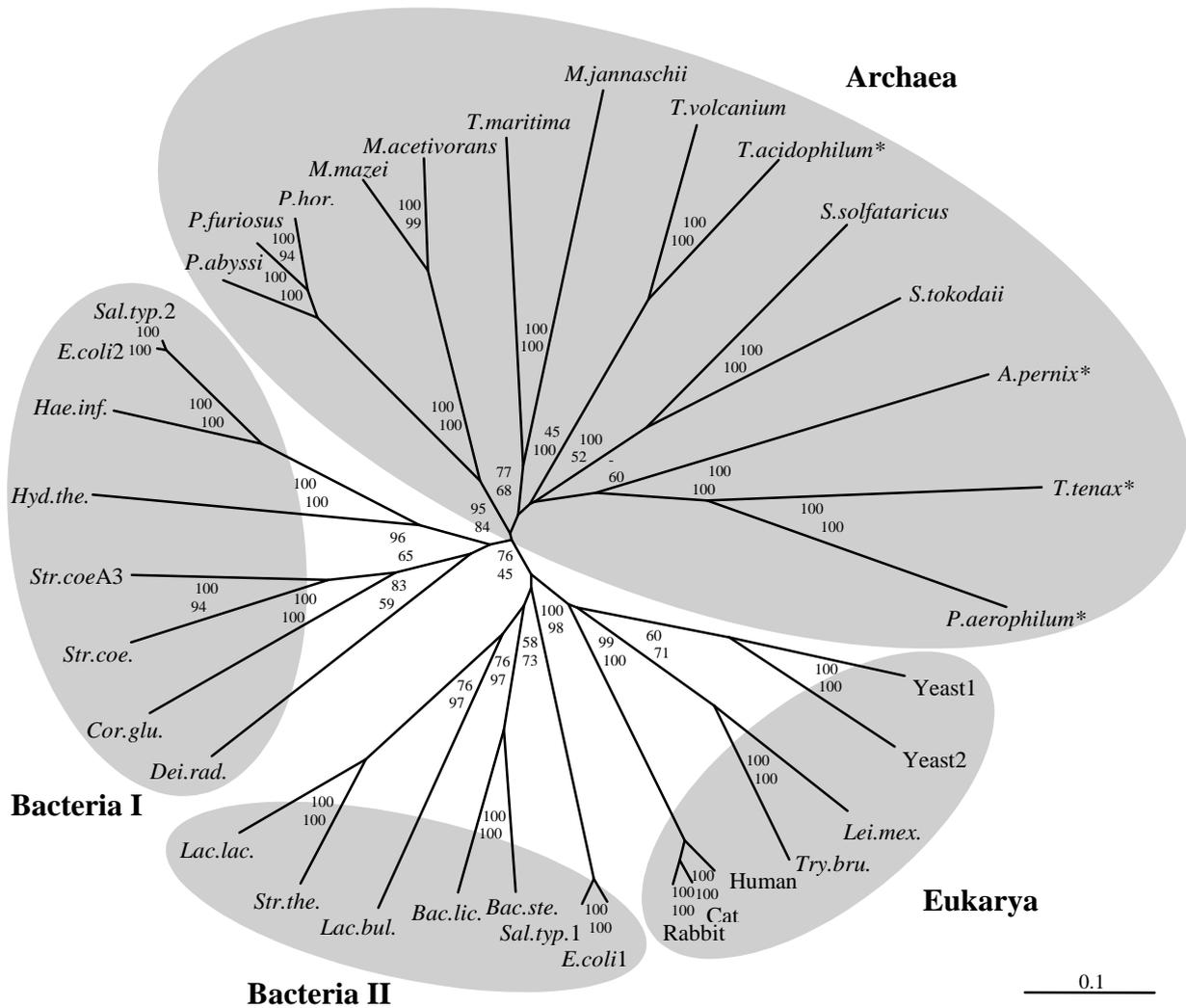


Abbildung 31 Phylogenetische Verwandtschaft von PKs aus Eukarya, Bacteria und Archaea. Die Zahlen an den Knotenpunkten sind die Bootstrap-Werte nach Neighbor-Joining (obere Werte) und Maximum-Likelihood (untere Werte). NCBI Accession-Nummern oder die SwissProt-Nummern der Sequenzen: *Aeropyrum pernix* BAA79454; *Bac.lic.*, *Bacillus licheniformis* KPYK_BACLI; *Bac.ste.*, *Bacillus stearothermophilus* S29783; *Cor.glu.*, *Corynebacterium glutamicum* KPYK_CORGL; *Dei.rad.*, *Deinococcus radiodurans* AAF12171; *E. coli1* KPY1_ECOLI; *E. coli2* KPY2_ECOLI; cat KPY1_FELCA; *Hae.inf.*, *Haemophilus influenzae* KPYK_HAEIN; Human M2 KPY2_HUMAN; *Hyd.the.*, *Hydrogenophilus thermoluteolus* BAA95686; *Lac.del.*, *Lactobacillus delbrueckii* KPYK_LACDE; *Lac.lac.*, *Lactococcus lactis* B40620; *Lei.mex.*, *Leishmania mexicana* KPYK_LEIME; *Methanococcus jannaschii* D64313; *Methanosarcina acetivorans* str. C2A AAM07241; *Methanosarcina mazei* Goel AAM30411; rabbit KPY1_RABIT; *Pyrobaculum aerophilum* AAL63053; *Pyrococcus abyssi* CAB50316; *Pyrococcus furiosus* AAL81312; *P.hor.*, *Pyrococcus horikoshii* F71171; *Sal.typ.1*, *Salmonella typhimurium* LT2 AAL20302; *Sal.typ.2*, *Salmonella typhimurium* LT2 AAL20804; *Str.the.*, *Streptococcus thermophilus* AAF25804; *Str.coe.*, *Streptomyces coelicolor* T35759; *Str.coe. A3* CAB70653; *Sulfolobus solfataricus* AAK41255; *Sulfolobus tokodaii* BAB66695; *Thermoplasma acidophilum* KPYK_THEAC; *Thermoplasma volcanium* BAB60191; *Thermoproteus tenax* AAF06820; *Thermotoga maritima* AAD35300; *Try.bru.*, *Trypanosoma brucei brucei* KPY2_TRYBB; Yeast 1 KPY1_YEAST; Yeast 2 KPY2_YEAST.

Ortsspezifische Mutagenese an der PK aus *T. maritima*. Aus Sequenzvergleichen und Kristallstrukturen von PKs sind konservierte Bereiche für die Kaliumbindung bekannt, diese liegen in der PK Sequenz von Hefe bei den Aminosäuren 51 bis 55 und 83 bis 92 (Abbildung 15, Abbildung 30) (Jurica et al. 1998). Bei allen Kalium-abhängigen PKs, inklusive der PK aus dem Archaeon *T. acidophilum*, findet sich ein konserviertes Glutamat, so an Position 89 für die PK aus Hefe. Dieses Glutamat ist in Kalium-unabhängigen PKs durch z.B. Arginin oder Lysin ersetzt. Mutagenese-Experimente an der Kalium-abhängigen PK aus Kaninchen, bei der entsprechendes Glutamat gegen Lysin ausgetauscht wurde, führten zu einem Verlust der Kaliumabhängigkeit (Laughlin und Reed 1997). Es wird vermutet, dass die negative Ladung des Glutamats ein monovalentes Kation bindet, was für den Phosphoryltransfer nötig ist (Jurica et al. 1998). Die Funktion des gebundenen monovalenten Kations wird bei Kalium-unabhängigen PKs von der Seitenkettenladung der Aminosäuren Lysin und Arginin an entsprechender Position übernommen. In den Sequenzen der in dieser Arbeit charakterisierten Kalium-unabhängigen PKs finden sich an entsprechender Position die Aminosäuren Arginin, Lysin oder Serin (Abbildung 30).

Die Charakterisierung der PK aus *T. maritima* zeigte, dass die Aktivität nicht von monovalenten Kationen abhängig ist. Durch eine ortsspezifische Mutagenese sollte eine Abhängigkeit der Aktivität von monovalenten Kationen geschaffen werden. Das Lysin (K) an Position 71 in der Aminosäuresequenz der Kalium-unabhängigen PK aus *T. maritima* wurde durch Glutamat (E) ausgetauscht mit dem Ziel eine Kalium-abhängige PK zu generieren. Das mutierte Enzym wies eine erheblich geringere spezifische Aktivität auf als der Wildtyp, zeigte aber sonst zum Wildtyp vergleichbare molekulare, katalytische, allosterische und thermophile Eigenschaften. Nach dem Austausch konnte eine Stimulierung der Aktivität durch monovalente Kationen gezeigt werden. Die höchste Stimulierung der PK Aktivität mit monovalenten Kationen zeigte sich mit Ammonium, eine wesentlich geringere Stimulierung wurde mit Rubidium und Kalium (etwa 5%) beobachtet. Mit Natrium, Lithium und Cäsium konnten keine signifikanten PK Aktivitäten bestimmt werden. Für Kalium-abhängige PKs ist bereits beschrieben, dass Kalium durch andere monovalente Kationen, z.B. Rubidium, Ammonium und Thallium, substituiert werden kann (Kayne 1971). Dabei scheinen Kationen von ähnlichem Radius wie Kalium, d.h. Rubidium, Ammonium und Thallium, effektiver zu sein als Kationen mit extrem kleinem Radius wie Natrium oder extrem großem Radius wie Cäsium. In der Regel ergibt Kalium als aktivierendes Kation in physiologisch relevanter Konzentration, z.B. etwa 200 mM bei *E. coli*, die höchste spezifische Aktivität (Kayne 1971).

Mit der ortsspezifischen Mutagenese an der PK aus *T. maritima* wurde eine Bindestelle für monovalente Kationen geschaffen, was zu einer Abhängigkeit der Aktivität von diesen Kationen führte. Damit wird die postulierte Rolle des Glutamats im konservierten Sequenzbereich für die Kaliumbindung bei Kalium-abhängigen PKs unterstützt.

6.2 Phosphoglycerat Mutasen aus Archaea

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Typen von Phosphoglycerat Mutasen analysiert. Eine 2,3-Bisphosphoglycerat-unabhängige Phosphoglycerat Mutase (iPGM) aus *A. fulgidus* VC16 wurde charakterisiert und die *in vivo* Transkription des Gens überprüft. Außerdem wurde eine 2,3-Bisphosphoglycerat-abhängige Phosphoglycerat Mutase (dPGM) aus *T. acidophilum* charakterisiert. Die dPGM stellt die erste charakterisierte Kofaktor-abhängige Phosphoglycerat Mutase aus Archaea dar.

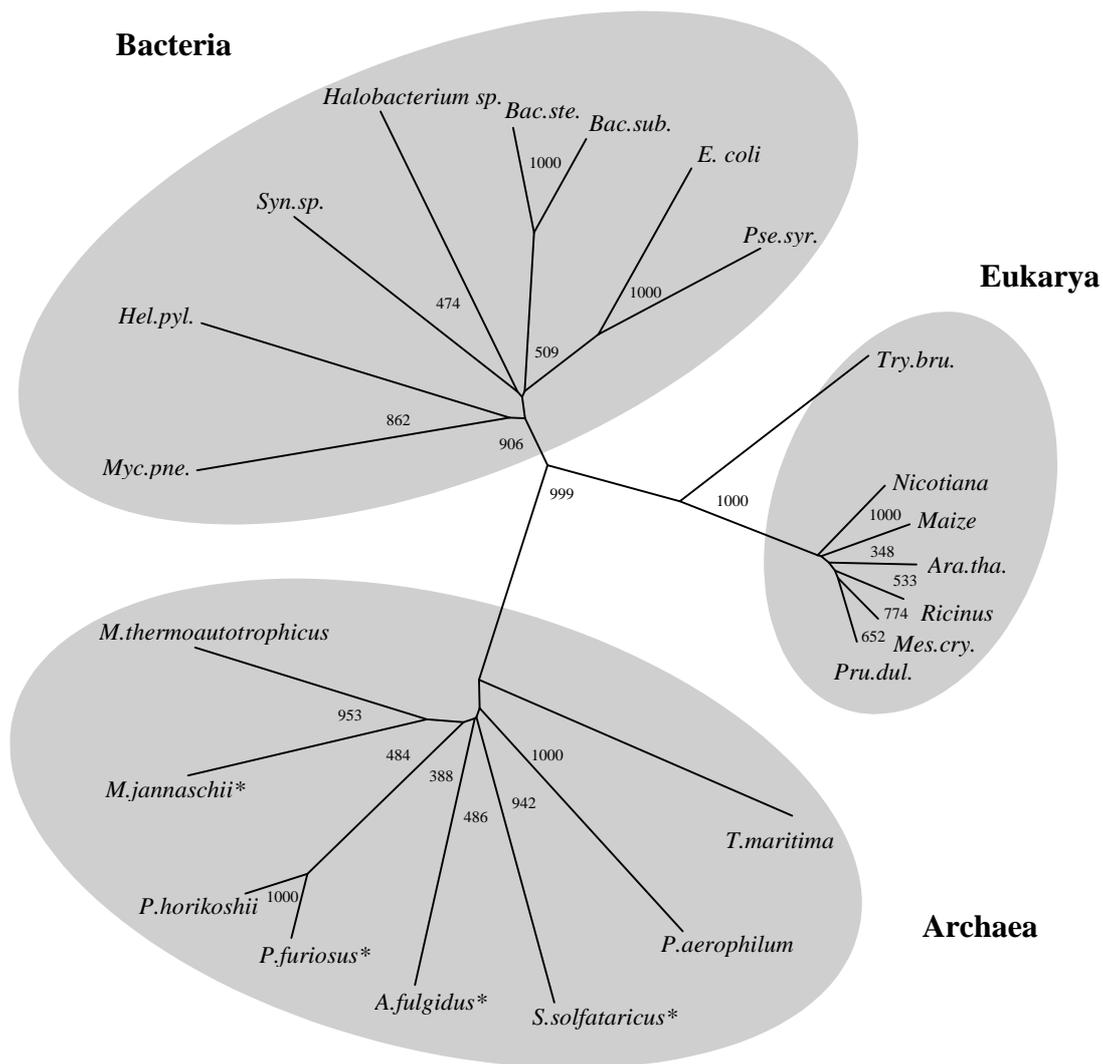
Identifizierung einer hypothetischen iPGM aus *A. fulgidus* VC16. iPGMs werden aufgrund von Homologien innerhalb der konservierten Metallbindestelle in die Superfamilie der alkalischen Phosphatasen eingeordnet (Grana et al. 1992). In diese Superfamilie gehören Metalloenzyme sowie die Phosphopentomutasen und Sulfatasen (Galperin und Jedrzejas 2001; Galperin et al. 1998). iPGMs sind überwiegend in Pflanzen und Nematoden zu finden und kommen auch in Bacteria vor (Jedrzejas 2000b; Fraser et al. 1999). In archaeellen Genomen war bisher, bis auf eine im Genom von *Halobacterium* sp. NRC-1 annotierte iPGM, nichts über iPGMs bekannt (Ng et al. 2000). Kürzlich wurden in den archaeellen Genomen von *Methanococcus jannaschii*, *Pyrococcus furiosus* und *Sulfolobus solfataricus* ORFs als iPGM Gene identifiziert und Genprodukte als iPGMs charakterisiert (Potters et al. 2003; Graham et al. 2002; Van der Oost et al. 2002). Im Genom von *A. fulgidus* VC16 wurde weder ein ORF, der für eine iPGM, noch ein ORF, der für eine dPGM kodiert, annotiert (Klenk et al. 1997). Im Rahmen dieser Arbeit, in der Zwischenzeit auch durch andere Autoren, wurde ORF AF1751 aus *A. fulgidus* als hypothetisches iPGM Gen identifiziert, eine biochemische Charakterisierung lag bisher noch nicht vor (Dandekar et al. 1999; Galperin et al. 1998; Van der Oost et al. 2002). In dieser Arbeit wurde ORF AF1751 kloniert und exprimiert. Die biochemische Charakterisierung ergab den Nachweis, dass ORF AF1751 für eine iPGM kodiert.

Biochemische Charakterisierung der iPGM aus *A. fulgidus* VC16. Das apparente Molekulargewicht der iPGM wurde mit 46 kDa bestimmt, das der Untereinheit mit 48 kDa, was dafür spricht, dass es sich um ein Protein mit monomerer Struktur handelt. Bei den bisher beschriebenen iPGMs aus Bacteria und Eukarya handelt es sich ebenfalls um Monomere mit ähnlichen Molekulargewichten (Jedrzejas 2000b; Fraser et al. 1999). Im Unterschied dazu wurden die archaeellen iPGMs aus *Methanococcus jannaschii* und *Pyrococcus furiosus* als Homotetramere mit etwa 45 kDa Untereinheiten identifiziert (Van der Oost et al. 2002). In Übereinstimmung mit der optimalen Wachstumstemperatur von 83°C für *A. fulgidus* VC16 (Stetter 1988) zeigte die iPGM eine hohe Thermostabilität. Das Enzym hatte bei 70°C in Gegenwart von Magnesium und Mangan eine Halbwertszeit von 160 Minuten. iPGMs der Superfamilie weisen eine Abhängigkeit der Aktivität von Mangan auf. Die Kristallstruktur der iPGM von *Bacillus stearothermophilus* zeigt, dass

Mangan als Bestandteil der Struktur vorliegt (Jedrzejak et al. 2000). Im Gegensatz zu den archaeellen iPGMs aus *M. jannaschii* und *P. furiosus* wurde für die iPGM aus *A. fulgidus* VC16 eine etwa 3fache Stimulierung der Aktivität mit Mangan gemessen, was darauf hindeutet, dass die iPGM aus *A. fulgidus* ebenfalls von Mangan abhängig ist.

Außerdem wurde gezeigt, dass der ORF AF1751 aus *A. fulgidus* VC16 bei Wachstum auf Laktat *in vivo* transkribiert wird, was für eine gluconeogenetische Bedeutung des ORFs spricht. Das ist der erste *in vivo* Nachweis eines iPGM Gens in Archaea. Für die iPGM Gene aus *M. jannaschii* und *P. furiosus* wurde dieser Nachweis noch nicht erbracht.

Phylogenetische Verwandtschaften der iPGMs. Die iPGM aus *A. fulgidus* wurde mit iPGMs aus allen drei Domänen bezüglich ihrer evolutionären Verwandtschaft untersucht. Wie der phylogenetische Stammbaum in Abbildung 32 zeigt, bilden die iPGMs drei Gruppen: Bacteria, Archaea und Eukarya, die den drei Domänen des Lebens, die aufgrund von 16 S-rRNA Analysen definiert sind, entsprechen. Der Stammbaum wurde mit Hilfe der Neighbor-Joining-Methode erstellt und ist durch hohe Bootstrap-Werte gekennzeichnet. Die iPGMs aus *Halobacterium sp.* und aus *T. maritima* verhalten sich untypisch. Die iPGM aus *T. maritima* fällt im Stammbaum zu der archaeellen Gruppe. Lateraler Gentransfer von thermophilen Archaea zu *T. maritima* wurde bereits beschrieben (Nelson et al. 1999). Dagegen fällt die iPGM aus *Halobacterium* in die bakterielle Gruppe, hier kann ebenfalls lateraler Gentransfer von einem Organismus aus der Gruppe der Bacteria hin zu *Halobacterium* vermutet werden. Die Tatsache, dass die iPGMs in allen drei Domänen vorkommen, spricht für eine monophyletische Abstammung der iPGMs. Mit diesem phylogenetischen Stammbaum wurde zum ersten Mal dargestellt, dass die archaeellen iPGMs, von denen inzwischen einige charakterisiert sind (im Stammbaum mit Sternchen markiert), eine eigenständige Gruppe bilden.



0.1

Abbildung 32 Phylogenetische Verwandtschaft von iPGMs aus Eukarya, Bacteria und Archaea. Die Zahlen an den Knotenpunkten sind die Bootstrap-Werte nach Neighbor-Joining. NCBI Accession-Nummern: *Arabidopsis thaliana* O04499; *A. fulgidus* AAB89499; *B. stearothermophilus* 1099A; *Bacillus subtilis* P39773; *E. coli* Q8XDE9; *Halobacterium sp.* NRC-1 Q9HNY7; *Helicobacter pylori* P56196; Maize A42807; *Mesembryanthemum crystallinum* Q42908; *M. jannaschii* Q59007; *Methanothermobacter thermoautotrophicus* O27628; *Mycoplasma pneumoniae* P75167; *Nicotiana tabacum* (common tobacco) P35494; *Prunus dulcis* (almond) O24246; *Pseudomonas syringae* pv. tomato str. DC3000 AAO58753; *Pyrobaculum aerophilum* Q8ZVE4; *P. furiosus* P58814; *Pyrococcus horikoshii* O57742; *Ricinus communis* (castor bean) P35493; *S. solfataricus* Q980A0; *Synechocystis sp.* S76482; *Thermotoga maritima* Q9X295; *Trypanosoma brucei brucei* CAB85498

Identifizierung einer dPGM aus *T. acidophilum*. Im Genom von *T. acidophilum* sind drei ORFs als hypothetische dPGM Gene annotiert (Ruepp et al. 2000). Im Rahmen dieser Arbeit konnte über Sequenzvergleiche der drei ORFs mit bekannten bakteriellen und eukaryotischen dPGMs der ORF TA1347 aus *T. acidophilum* als wahrscheinlichstes dPGM Gen identifiziert werden (Abbildung 33). Dieser ORF wurde kloniert und exprimiert. Die biochemische Charakterisierung ergab den Nachweis, dass ORF TA1347 für eine dPGM kodiert. dPGMs bilden mit sauren Phosphatasen, Fructose-2,6-bisphosphatasen und Phytasen eine Proteinfamilie. Sequenzen dieser Familie, so auch ORF TA1347 aus *T. acidophilum* (Abbildung 33), sind gekennzeichnet durch ein katalytisch essentielles Histidin, das während der Isomerisierung von 3-Phosphoglycerat zu 2-Phosphoglycerat durch den Kofaktor 2,3-Bisphosphoglycerat phosphoryliert wird. Die Phosphatgruppe am Histidin wird nun auf das Substrat 3-Phosphoglycerat bzw. 2-Phosphoglycerat übertragen, womit das Intermediat 2,3-Bisphosphoglycerat entsteht (Jedrzejewski 2000b; Fothergill-Gilmore und Watson 1989). dPGMs kommen, wie iPGMs, in der Domäne der Bacteria vor (Fraser et al. 1999). Sie sind auch für Hefen beschrieben, dagegen sind in Vertebraten bisher nur dPGMs beschrieben (Carreras et al. 1982). In archaeellen Genomen, z.B. in *Sulfolobus solfataricus* und *Thermoplasma acidophilum*, sind dPGM Gene annotiert. Bisher ist keines der annotierten Gene auf seine Funktionalität überprüft worden.

```

Ratte      : -----AAYKLVLTIRHGESAWNLENRFSGWYDA-DLSPAGHEEMKRGGAARDAGYEFDFVFTSVQKRAIRLIL : 66
E. coli    : -----AVTKLVLRHGESQWNEKNRFTGWYDV-DLSEKGVSEAKAAGKLLKEEGVSDFDFAYTSVLKRAIHTL : 66
Yeast     : -----PKLVLRHGCSEWNEKNLFTGWVVD-KLSAKGQOEAAARAGELKKEKVVYDPVLYTSKLSRAIQTLA : 64
S. pombe   : -----MTTEAAPNLLVLRHGESSEWNEKNLFTGWKDP-ALSETCIKEAKLGGERKSRGYKFDIAFTSALQRAQKTC : 71
B. stearo  : -----TRHGETHKWNVERRMQGQDS-PLTEKGRQDAMRLGKRELA--VELAAIYTSSTSGRALBTA : 57
TA1347    : VIYKFLIGIGDGGIMKIAILIRHGESDINWKGILSDTIDNNMLTEKGMROAEHAAAEKLG--IDIKNFYSSPIKRAFDTA : 78
          :                               *
          :                               |
Ratte      : WTVLDAIDQMWPVVVRTWRINGRHYGGLTCLNKAETAAKHGAEQVKIWRRSYDVPVPPMPEPDHPPFYSNISKDRRYADLTE : 146
E. coli    : WNVLDELQAWLPVEKSNKLNDRHYGALQCLNKAETAEKYGDEQVKWRRGFVAVTPELTKDDERYP--GHDPKYAKLSE : 144
Yeast     : NIALEKADRLWIPVNRSWRLNDRHYGDLOCKDKAETLKKFGEEKFNTYRRSFDVPPPIDASSPFSQ--KGDERYKYVDP : 142
S. pombe   : QIILEEVGEPNLETIKSEKLNDRHYGDLOCLNKDDARKKWGAEQVQIWRRSYDIAPP----- : 128
B. stearo  : EIVRGGR---LIPIYQDERLRRIHLCGDWEGKTHDEIRQMDPIAFDHFVWNAHPHYAPQ----- : 111
TA1347    : QIIADSFN--KDVVTDQRLLIIGLCKARKRKANEFNGLYSGHITGKIR----- : 125

Ratte      : DQLPSCESLKDITARALPFWNEETVPQIKEGKGV-LIPAHGNSYGGIVKHLEGLSEEAIMELNLPQTGIPVYELDKNLKP : 225
E. coli    : KELPLTESLALITDRVIPYWNETILPRMKSGERV-LIAAHGNSLRALVKYLDNMSEEEILELNIPQVPLVYEFDENFKP : 223
Yeast     : NVLPETESLALVIDRLLPYWQDVTAKDLLSGKTV-MIAAHGNSLRGLVKHLEGISDADIKLNIPQVPLVYEFDENFKP : 221
S. pombe   : ----NGESLKDIAERVLPPYKSTIVPHILKGEKV-LIAAHGNSLRALIMDLEGLTGDQIVKRELATGVPIVYHLDKDGK- : 202
B. stearo  : ----RGERFCQVQRALEAVQSIIVDR--HEGETV-LIVTGGVVLKTLMAAFKDTPLDHLWSPPYMYGTSVTIIEVDGGT- : 183
TA1347    : -----EDLEMEKWDSLQKRVVEAIIASREGINIVYVTHSDPIRAAHSYFLEMGEETEYGLSIKNASMTVIDVEIGRIL : 196

Ratte      : IKPMQSLGDEETVRKAMEAVAAQGVK : 253
E. coli    : LKRY-LGNADIAAKAAAVANQGKAK- : 249
Yeast     : SKPSY-YLDPEAAAAGAAVANQGK-- : 246
S. pombe   : -----YVSKELIDN----- : 211
B. stearo  : -----FHVAVEGDVSHI----- : 195
TA1347    : T-----LGAISMTDSVRKYLNIQ----- : 214

```

Abbildung 33 Multiples Sequenzalignment mit ORF TA1347 aus *T. acidophilum* und Aminosäuresequenzen von dPGMs aus Bacteria und Eukarya. Das Alignment wurde mit ClustalX mit Standardeinstellungen (Thompson et al. 1997) erstellt. Die dPGM-Konsensussequenz [LIVM]-x-R-H-G-[EQ]-x(3)-N ist durch einen Rahmen markiert (Falquet et al. 2002). Das katalytisch essentielle Histidin ist mit einem Stern markiert. NCBI Accession-Nummern der Sequenzen: *Bacillus stearothersophilus* AAK07665; *E. coli* P31217; Ratte P25113; *Schizosaccharomyces pombe* P36623; *Thermoplasma acidophilum* CAC12468; Yeast P00950.

Biochemische Charakterisierung der dPGM aus *T. acidophilum*. Das apparente Molekulargewicht der dPGM wurde mit 46 kDa bestimmt, das der Untereinheit mit 24 kDa, was dafür spricht, dass es sich um ein Protein mit homodimerer Struktur handelt. Die bisher beschriebenen dPGMs aus Bacteria und Eukarya liegen, bis auf wenige Ausnahmen, ebenfalls als Homodimere vor (Jedrzejewski 2000b; Fraser et al. 1999). Die Aktivität der dPGM aus *T. acidophilum* war abhängig von 2,3-Bisphosphoglycerat, ohne die Zugabe von 2,3-Bisphosphoglycerat konnte keine Aktivität gemessen werden. Der K_m -Wert für 2,3-Bisphosphoglycerat lag bei 17 μM . Dieser kleine K_m -Wert war vermutlich der Grund, warum mit dem Substrat 3-Phosphoglycerat, das mit 2,3-Bisphosphoglycerat verunreinigt ist, keine Stimulierung der dPGM Aktivität nachweisbar war. Erst nach Abtrennung von 2,3-Bisphosphoglycerat über Anionenaustauschchromatographie konnte gezeigt werden, dass das Enzym nur nach Zugabe des Kofaktors aktiv ist. Für dPGMs ist eine reversible Hemmung der Aktivität durch Vanadat beschrieben, dabei wirkt Vanadat als Strukturanalogon zu Phosphat, die Hemmung ist vermutlich kompetitiv (Carreras et al. 1980). Der Effekt von Vanadat wurde auch für die dPGM aus *T. acidophilum* gezeigt. Die Zugabe von 100 μM Vanadat hatte eine fast vollständige Hemmung der Aktivität zur Folge. Die Hemmung konnte durch Komplexierung des Vanadats mit EDTA teilweise aufgehoben werden, was darauf hindeutet, dass das Enzym durch Vanadat nur reversibel inaktiviert wird.

Diese Ergebnisse der biochemischen Charakterisierung zeigen, dass die archaelle Phosphoglycerat Mutase aus *T. acidophilum* durch 2,3-Bisphosphoglycerat stimuliert wird. Damit wurde im Rahmen dieser Arbeit die erste 2,3-Bisphosphoglycerat-abhängige Phosphoglycerat Mutase aus der Domäne der Archaea charakterisiert.

6.3 Xylose Dehydrogenase, das erste Enzym des Xyloseabbaus, aus dem halophilen Archaeon *Ha. marismortui*

Das erste Enzym des Xyloseabbaus, eine Xylose Dehydrogenase, wurde in dem halophilen Archaeon *Haloarcula marismortui* identifiziert und charakterisiert.

Identifizierung einer Xylose Dehydrogenase aus *Ha. marismortui*. Die ersten Enzyme des Xyloseabbaus in *Ha. marismortui* wurden untersucht. In der Domäne der Bacteria werden die einleitenden Schritte des Xyloseabbaus durch eine Xylose Isomerase und eine Xylulose Kinase katalysiert. In Bacteria so z.B. in *E. coli* wird die Xylose nach Aufnahme in die Zelle über eine Permease, die vom *xylE* Gen kodiert wird, zunächst zu Xylulose isomerisiert (Schellenberg et al. 1984; David und Wiesemeyer 1970). Xylulose wird anschließend zu Xylulose-5-phosphat phosphoryliert, welches dann als zentrales Intermediat über den Pentose-Phosphat Weg weiter umgesetzt wird (Abbildung 34). Insbesondere die Xylose Isomerase ist ein gut untersuchtes Enzym, das von großer biotechnologischer Bedeutung ist, da das Enzym als Nebenreaktion auch die Isomerisierung von Glucose zu Fructose katalysiert. Diese Isomerisierung ist der letzte Schritt in dem wichtigen industriellen Prozess der Zuckerherstellung aus Stärke (Bhosale et al. 1996; Zeikus et al. 1998; Antranikian 1990). Sowohl die Xylose Isomerasen, kodiert von *xylA* Genen, als auch die Xylulose Kinasen, kodiert von *xylB* Genen, sind in Bacteria durch Xylose induzierbar (David und Wiesemeyer 1970).

In archaeellen Genomen, so auch in dem partiell sequenzierten Genom von *Ha. marismortui*, konnte kein homologes Gen zu *xylA* identifiziert werden (Zhang et al. 2003). Außerdem wurde weder die Aktivität einer Xylose Isomerase noch die einer Xylulose Kinase in Rohextrakt von Xylose-gewachsenen Zellen aus *Ha. marismortui* nachgewiesen. Stattdessen wurde gezeigt, dass während des Wachstums auf Xylose eine spezifische Xylose Dehydrogenase induziert wird. Die Daten sprechen dafür, dass in *Ha. marismortui* und möglicherweise generell in Archaea die einleitenden Schritte des Xyloseabbaus von denen der Bacteria verschieden sind (Abbildung 34).

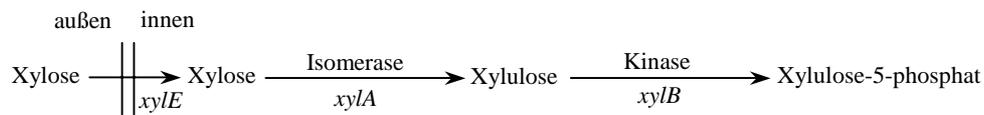
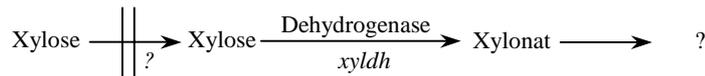
Xyloseabbau in Bacteria (z.B. *E. coli*, *T. maritima*)Xyloseabbau in Archaea (*Ha. marismortui*)

Abbildung 34 Erste Enzyme des Xyloseabbaus in Bacteria und postulierter Mechanismus des Xyloseabbaus in Archaea. In *E. coli* und *T. maritima* wird nach Aufnahme von Xylose in die Zelle diese zu Xylulose isomerisiert und anschließend zu Xylulose-5-phosphat phosphoryliert (Vieille et al. 1995; David und Wiesemeyer 1970). In dem halophilen Archaeon wird aufgrund der Identifizierung der Xylose Dehydrogenase als erster Schritt des Xyloseabbaus eine Oxidation von Xylose zu Xylonat postuliert.

Charakterisierung der Xylose Dehydrogenase aus *Ha. marismortui*. Die Xylose Dehydrogenase, die die Oxidation von Xylose zu Xylonat katalysiert, war mit NADP^+ und auch mit NAD^+ aktiv. Der 9fach kleinere K_m -Wert weist darauf hin, dass NADP^+ der physiologische Elektronenakzeptor ist. Die beste katalytische Effizienz der Xylose Dehydrogenase zeigte sich mit Xylose, für Ribose wurde eine 2fach geringere Effizienz bestimmt. Die katalytische Effizienz mit Glucose war im Vergleich zu Xylose etwa 70fach geringer, was die Xylose Dehydrogenase von einer Glucose Dehydrogenase unterscheidet. Glucose Dehydrogenasen in halophilen Archaea sind bereits charakterisiert. Sie setzen neben Glucose auch Xylose um, jedoch mit geringer Aktivität und Spezifität (Bonete et al. 1996).

Das apparente native Molekulargewicht der Xylose Dehydrogenase wurde mit 180 kDa, das der Untereinheit mit 57 kDa bestimmt. Für halophile Proteine ist bekannt, dass unter denaturierenden Bedingungen das Molekulargewicht bis zu 30% über dem kalkulierten Molekulargewicht liegt (Bonete et al. 1996), deshalb kann aus den Ergebnissen der Molekulargewichtsbestimmung für die Xylose Dehydrogenase aus *Ha. marismortui* auf eine homotetramere Struktur des Enzyms geschlossen werden. Anhand der N-terminalen Aminosäuresequenz des gereinigten Enzyms wurde im partiell sequenzierten Genom von *Ha. marismortui* ein ORF identifiziert, der für die Xylose Dehydrogenase kodiert (Zhang et al. 2003). Der ORF *xyl dh* besteht aus 1083 Basenpaaren und kodiert für ein Polypeptid mit 360 Aminosäuren, was einer kalkulierten molekularen Masse von 39.9 kDa entspricht.

Damit wird bestätigt, dass das Molekulargewicht der Xylose Dehydrogenase unter denaturierenden Bedingungen mit 57 kDa überbestimmt wurde.

Mit der vom *xyldh* Gen abgeleiteten Aminosäuresequenz der Xylose Dehydrogenase aus *Ha. marismortui* wurde eine BLAST-P Analyse (http://www-archbac.u-psud.fr/Projects/Sulfolobus/Blast_Search.html) durchgeführt. Die Analyse ergab hohe Ähnlichkeiten (45 bis 51%) der Xylose Dehydrogenase Sequenz zu hypothetischen Oxidoreduktasen aus dem Bakterium *Deinococcus radiodurans* und den Proteobakterien *Caulobacter crescentus*, *Xanthomonas campestris* und *Ralstonia solanacearum*. Die Xylose Dehydrogenase Sequenz zeigte geringere Ähnlichkeit zu einigen hypothetischen Dehydrogenasen und Oxidoreduktasen aus Archaea. Zur Glucose-Fructose Oxidoreduktase (GFOR) aus *Zymomonas mobilis* wies die Xylose Dehydrogenase 37% Ähnlichkeit auf. Die GFOR aus *Z. mobilis* ist biochemisch gut charakterisiert und kristallisiert (Kingston et al. 1996; Zachariou und Scopes 1986). Das Enzym katalysiert die Oxidation von Glucose zu Gluconolacton gekoppelt mit der Reduktion von Fructose zu Sorbitol. Als Besonderheit enthält das Enzym ein nicht-dissoziierbares NADP⁺. Die GFOR liegt als Homotetramer vor, das sich aus etwa 40 kDa Untereinheiten zusammensetzt. Für Oxidoreduktasen und Dehydrogenasen ist die Dinukleotidbindestelle charakterisiert.

In der vom *xyldh* Gen abgeleiteten Aminosäuresequenz der Xylose Dehydrogenase aus *Ha. marismortui* konnte ein Sequenzmotiv der Dinukleotidbindestelle identifiziert werden (Abbildung 35). Von NADP⁺-bindenden Enzymen ist eine dinukleotidbindende Domäne mit dem Bindemotiv $\beta\alpha\beta$ bekannt (Baker et al. 1992; Wiegert et al. 1997; Rossmann et al. 1975). Die Dinukleotidbindestelle ist eine Glycin-reiche Sequenz mit folgendem Motiv: G-x-G-x-x-G/A, wobei das letzte Glycin eher für NAD⁺-spezifische Bindung und das Alanin für NADP⁺-spezifische Bindung steht, vermutlich ist aber das letzte Glycin bzw. Alanin der Sequenz nicht essentiell. Beide β -Stränge des Dinukleotidbindemotivs bestehen aus vorwiegend hydrophoben Resten. Bei NAD⁺-Bindesequenzen ist ein Säurerest am C-terminalen Ende des zweiten β -Stranges bekannt, der eine Barriere für die NADP⁺-Bindung bildet. Für die NADP⁺-Bindestelle ist eine Konsensussequenz bereits beschrieben (Baker et al. 1992; Hanukoglu und Gutfinger 1989). Abbildung 35 zeigt die Sequenz für die Bindestelle von NADP⁺. Hanukoglu und Gutfinger konnten eine Reihe hydrophober Aminosäuren und einige geladene Aminosäuren identifizieren, ohne die die Sekundärstruktur der Bindedomäne nicht möglich wäre. Der Vergleich mit der Bindestelle für NADP⁺ in der Xylose Dehydrogenase Sequenz aus *Ha. marismortui* zeigte bis auf drei Ausnahmen Übereinstimmung.

Glutathion R (human)	(188)	GRSVIVGAGYI AVEMAGILSALGSKTSLMIR
Glutamat DH (Yeast)	(218)	KRVALSGSGNVAQYAALKLIELGATVVSLSD
Glutamat DH (<i>E. coli</i>)	(233)	MRVSVSGSGNVAQYAI EKAMEFCARVITASD
Glutathion R (<i>E. coli</i>)	(164)	ERVAVVGAGYI AVELAGVINGLCAKTHLFVR
Xylose DH (<i>Ha. marismortui</i>)	(25)	VR FAMIGVGWWTTEQAMP AVDAGDLCETT VL
Konsensussequenz		+hhhhG G hAh hA hh G +h h
Struktur		βββββ αααααααααααααα βββββ

Abbildung 35 Konsensussequenz der NADP⁺-bindenden Region von Glutamat Dehydrogenase bzw. Glutathion Reduktase aus *E. coli*, Glutamat Dehydrogenase aus Hefe, Glutathion Reduktase aus Mensch und Xylose Dehydrogenase aus *Ha. marismortui*. Die Zahlen am Anfang der Sequenzen geben die Position im jeweiligen Protein an. Die unteren Zeilen geben die Konsensussequenz bzw. die Ladung der konservierten Aminosäuren und die Struktur des Bindemotivs nach Hanukoglu und Gutfinger an (Hanukoglu und Gutfinger 1989). Übereinstimmungen mit der Konsensussequenz sind schwarz hinterlegt, Austausche mit gleicher Ladung sind grau hinterlegt. h = hydrophobe Aminosäureseitenkette, + = positiv geladene Aminosäureseitenkette, α = α-Helix, β = β-Faltblatt.

Neben der Dinukleotidbindestelle konnte in der Aminosäuresequenz der Xylose Dehydrogenase aus *Ha. marismortui* ein Sequenzmotiv identifiziert werden (Abbildung 36), das große Übereinstimmung zu einer postulierten Konsensussequenz für eine neue Klasse von Zucker Dehydrogenasen zeigt, die kürzlich beschrieben wurde (Wiegert et al. 1997; Kingston et al. 1996). Diese enthält eine konservierte Sequenz [EKP], die auch in der Aminosäuresequenz der Xylose Dehydrogenase identifiziert worden.

Konsensussequenz	AGKHVXCEKP
Xylose Dehydrogenase	LDKAILCEKP
	: * : ****

Abbildung 36 Konsensussequenz der putativen neuen Klasse von Zucker Dehydrogenasen und die Übereinstimmung mit der Xylose Dehydrogenase aus *Ha. marismortui*. Sterne zeigen identische Reste, Doppelpunkte konservierte Substitutionen an.

Die Untersuchungen zum Xyloseabbau in dem halophilen Archaeon *Haloarcula marismortui* haben ergeben, dass eine Xylose Dehydrogenase den ersten Schritt des Xyloseabbaus katalysiert. Damit unterscheidet sich der Abbauweg von Xylose in *Ha. marismortui* von dem aus Bacteria. Dort katalysieren eine Xylose Isomerase und eine Xylulose Kinase die einleitenden Schritte. Das anhand der N-terminalen Sequenz identifizierte *xyldh* Gen im partiell sequenzierten Genom von *Ha. marismortui* zeigte Ähnlichkeiten zu hypothetischen Oxidoreduktasen. Aufgrund dieser Ähnlichkeiten ist eine weitere biochemische Analyse nötig, um eine genaue Zuordnung vornehmen zu können.

Zukünftigen Untersuchungen könnten der Aufklärung des kompletten Abbauweges der Xylose in *Ha. marismortui* dienen. Weiterhin wäre es interessant zu untersuchen, ob sich der Abbau von Xylose in Archaea von dem bekannten aus Bacteria generell unterscheidet.

6 Literatur

- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool J.Mol.Biol. 215: 403-410
- Antranikian G (1990) Stärke hydrolysierende Enzyme aus thermophilen anaeroben Bakterien - Eigenschaften und biotechnologische Bedeutung - Forum.Microbiol.399-409
- Baker PJ, Britton KL, Rice DW, Rob A, Stillman TJ (1992) Structural consequences of sequence patterns in the fingerprint region of the nucleotide binding fold. Implications for nucleotide specificity J.Mol.Biol. 228: 662-671
- Bhosale SH, Rao MB, Deshpande VV (1996) Molecular and industrial aspects of glucose isomerase Microbiol.Rev. 60: 280-300
- Biesterveld S, Kok MD, Dijkema C, Zehnder AJB, Stams AJM (1994) D-Xylose catabolism in *Bacteriodes xylanolyticus* X5-1 Arch.Microbiol. 161: 521-527
- Blöchl E et al. (1995) Isolation, taxonomy and phylogeny of hyperthermophilic microorganisms World J.Microbiol.Biotechnol. 11: 9-16
- Bode C, Goebell H, Stahler E (1968) [Elimination of errors caused by turbidity in the determination of protein by the biuret method] Zur Eliminierung von Trübungsfehlern bei der Eiweissbestimmung mit der Biuretmethod Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. 6: 418-422
- Bond CS, White MF, Hunter WN (2001) High resolution structure of the phosphohistidine-activated form of *Escherichia coli* cofactor-dependent phosphoglycerate mutase J.Biol.Chem. 276: 3247-3253
- Bonete MJ, Pire C, LLorca FI, Camacho ML (1996) Glucose dehydrogenase from the halophilic Archaeon *Haloferax mediterranei*: enzyme purification, characterisation and N-terminal sequence FEBS Lett. 383: 227-229
- Bradford MM (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
- Brückner J (1955) Estimation of monosaccharides by the orcinol-sulphuric acid reaction Biochem.J. 60: 200-205
- Brunner NA, Brinkmann H, Siebers B, Hensel R (1998) NAD⁺-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Thermoproteus tenax*. The first identified archaeal member of the aldehyde dehydrogenase superfamily is a glycolytic enzyme with unusual regulatory properties J.Biol.Chem. 273: 6149-6156
- Burggraf S, Stetter KO, Rouvier P, Woese CR (1991) *Methanopyrus kandleri*: an archaeal methanogen unrelated to all other known methanogens System.Appl.Microbiol. 14: 346-351
- Carreras J, Bartrons R, Grisolia S (1980) Vanadate inhibits 2,3-bisphosphoglycerate dependent phosphoglycerate mutases but does not affect the 2,3-bisphosphoglycerate independent phosphoglycerate mutases Biochem.Biophys.Res.Commun. 96: 1267-1273

- Carreras J, Mezquita J, Bosch J, Bartrons R, Pons G (1982) Phylogeny and ontogeny of the phosphoglycerate mutases--IV. Distribution of glycerate-2,3-P₂ dependent and independent phosphoglycerate mutases in algae, fungi, plants and animals *Comp.Biochem.Physiol.B.* 71: 591-597
- Crowhurst GS, Dalby AR, Isupov MN, Campbell JW, Littlechild JA (1999) Structure of a phosphoglycerate mutase 3-phosphoglyceric acid complex at 1.7 Å *Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.* 55: 1822-1826
- Dandekar T, Schuster S, Snel B, Huynen M, Bork P (1999) Pathway alignment: application to the comparative analysis of glycolytic enzymes *Biochem.J.* 343 Pt 1: 115-124
- Danson MJ (1988) Archaeobacteria: the comparative enzymology of their central metabolic pathways *Adv.Microb.Physiol.* 29: 165-231
- David JD, Wiesemeyer H (1970) Control of xylose metabolism in *Escherichia coli* *Biochim.Biophys.Acta* 201: 497-499
- De Rosa M, Gambacorta A (1988) The Lipids of Archaeobacteria *Prog.Lipid Res.* 27: 153-175
- De Rosa M, Gambacorta A, Nicolaus B, Giardina P, Poerio E, Buonocore V (1984) Glucose metabolism in the extreme thermoacidophilic archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus* *Biochem.J.* 224: 407-414
- De Vos WM, Kengen SW, Voorhorst WG, Van der Oost J (1998) Sugar utilization and its control in hyperthermophiles *Extremophiles* 2: 201-205
- Deleage G, Geourjon C (1993) An interactive graphic program for calculating the secondary structure content of proteins from circular dichroism spectrum *Comput.Appl.Biosci.* 9: 197-199
- Ernest I et al. (1998) Pyruvate kinase of *Trypanosoma brucei*: overexpression, purification, and functional characterization of wild-type and mutated enzyme *Protein Expr.Purif.* 13: 373-382
- Falquet L et al. (2002) The PROSITE database, its status in 2002 *Nucleic Acids Res.* 30: 235-238
- Fothergill-Gilmore LA, Watson HC (1989) The phosphoglycerate mutases *Adv.Enzymol.Relat.Areas.Mol.Biol.* 62: 227-313
- Fraser HI, Kvaratskhelia M, White MF (1999) The two analogous phosphoglycerate mutases of *Escherichia coli* *FEBS Lett.* 455: 344-348
- Galperin MY, Bairoch A, Koonin EV (1998) A superfamily of metalloenzymes unifies phosphopentomutase and cofactor-independent phosphoglycerate mutase with alkaline phosphatases and sulfatases *Protein Sci.* 7: 1829-1835
- Galperin MY, Jedrzejewski MJ (2001) Conserved core structure and active site residues in alkaline phosphatase superfamily enzymes *Proteins* 45: 318-324
- Garcia-Olalla C, Garrido-Pertierra A (1987) Purification and kinetic properties of pyruvate kinase isoenzymes of *Salmonella typhimurium* *Biochem.J.* 241: 573-581

- Gebhard S (2002) Zuckerstoffwechsel von hyperthermophilen Archaea: Charakterisierung der Glycerinaldehyd-3-Phosphat: Ferredoxin Oxidoreduktase aus *Archaeoglobus fulgidus* und Enzyme des Glucoseabbaus in *Pyrobaculum aerophilum*. Diplomarbeit, Institut für Allgemeine Mikrobiologie, Universität Kiel
- Graham DE, Xu H, White RH (2002) A divergent archaeal member of the alkaline phosphatase binuclear metalloenzyme superfamily has phosphoglycerate mutase activity FEBS Lett. 517: 190-194
- Grana X et al. (1992) Cloning and sequencing of a cDNA encoding 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase from maize. Possible relationship to the alkaline phosphatase family J.Biol.Chem. 267: 12797-12803
- Hansen T, Musfeldt M, Schönheit P (2002a) ATP-dependent 6-phosphofruktokinase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: characterization of an extremely thermophilic, allosterically regulated enzyme Arch.Microbiol. 177: 401-409
- Hansen T, Reichstein B, Schmid R, Schönheit P (2002b) The first archaeal ATP-dependent glucokinase, from the hyperthermophilic crenarchaeon *Aeropyrum pernix*, represents a monomeric, extremely thermophilic ROK glucokinase with broad hexose specificity J Bacteriol. 184: 5955-5965
- Hansen T, Schönheit P (2000) Purification and properties of the first-identified, archaeal, ATP-dependent 6-phosphofruktokinase, an extremely thermophilic non-allosteric enzyme, from the hyperthermophile *Desulfurococcus amylolyticus* Arch.Microbiol. 173: 103-109
- Hansen T, Schönheit P (2001) Sequence, expression, and characterization of the first archaeal ATP-dependent 6-phosphofruktokinase, a non-allosteric enzyme related to the phosphofruktokinase-B sugar kinase family, from the hyperthermophilic crenarchaeote *Aeropyrum pernix* Arch.Microbiol. 177: 62-69
- Hanukoglu I, Gutfinger T (1989) cDNA sequence of adrenodoxin reductase. Identification of NADP-binding sites in oxidoreductases Eur.J.Biochem. 180: 479-484
- Horecker BL (1988) D-Xylulose and D-Xylose. In: Bergmeyer, H.-U. (ed) Methods of Enzymatic Analysis, Third Edition. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, pp 465-473
- Huber R et al. (1986) *Thermotoga maritima* sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up to 90 °C Arch.Microbiol. 144: 324-333
- Huber R et al. (1992) *Aquifex pyrophilus* gen. nov. sp. nov., represents a novel group of marine hyperthermophilic hydrogen-oxidizing bacteria System.Appl.Microbiol. 15: 340-351
- Jedrzejewski MJ (2000a) Structural and functional comparison of polysaccharide-degrading enzymes Crit.Rev.Biochem.Mol.Biol. 35: 221-251
- Jedrzejewski MJ (2000b) Structure, function, and evolution of phosphoglycerate mutases: comparison with fructose-2,6-bisphosphatase, acid phosphatase, and alkaline phosphatase Prog.Biophys.Mol.Biol. 73: 263-287
- Jedrzejewski MJ, Chander M, Setlow P, Krishnasamy G (2000) Structure and mechanism of action of a novel phosphoglycerate mutase from *Bacillus stearothermophilus* EMBO J. 19: 1419-1431

- Jetten MS, Gubler ME, Lee SH, Sinskey AJ (1994) Structural and functional analysis of pyruvate kinase from *Corynebacterium glutamicum* Appl.Environ.Microbiol. 60: 2501-2507
- Johnsen U, Selig M, Xavier KB, Santos H, Schönheit P (2001) Different glycolytic pathways for glucose and fructose in the halophilic archaeon *Halococcus saccharolyticus* Arch.Microbiol. 175: 52-61
- Jurica MS, Mesecar A, Heath PJ, Shi W, Nowak T, Stoddard BL (1998) The allosteric regulation of pyruvate kinase by fructose-1,6-bisphosphate Structure 6: 195-210
- Kaine BP, Gupta R, Woese CR (1983) Putative introns in tRNA genes of prokaryotes Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 80: 3309-3312
- Kamekura M (1998) Diversity of extremely halophilic bacteria Extremophiles 2: 289-295
- Kandler O, König H (1998) Cell wall polymers in Archaea (Archaeobacteria) Cell Mol.Life Sci. 54: 305-308
- Kayne FJ (1971) Thallium (I) activation of pyruvate kinase Arch.Biochem.Biophys. 143: 232-239
- Kayne FJ (1973) Pyruvate Kinase. In: Boyer, P. D. (ed) The Enzymes, Third Edition. Academic Press, pp 353-382
- Kengen SW, Tuininga JE, Verhees CH, van der OJ, Stams AJ, De Vos WM (2001) ADP-dependent glucokinase and phosphofructokinase from *Pyrococcus furiosus* Methods Enzymol. 331: 41-53
- Kingston RL, Scopes RK, Baker EN (1996) The structure of glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis*: an osmoprotective periplasmic enzyme containing non-dissociable NADP Structure 4: 1413-1428
- Klenk HP et al. (1997) The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus* [published erratum appears in Nature 1998 Jul 2;394(6688):101] Nature 390: 364-370
- Kushner DJ, Kamekura M (1988) Physiology of halophilic eubacteria. In: Rodriguez-Valera, F. (ed) Halophilic bacteria. CRC Press, pp 109-140
- Labes A, Schönheit P (2001) Sugar utilization in the hyperthermophilic, sulfate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus* strain 7324: starch degradation to acetate and CO₂ via a modified Embden-Meyerhof pathway and acetyl-CoA synthetase (ADP-forming) [published erratum appears in Arch.Microbiol. 2001 177: 431-432] Arch.Microbiol. 176: 329-338
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 Nature 227: 680-685
- Langworthy TA, Pond JL (1986) Archaeobacterial ether lipids and chemotaxonomy System.Appl.Microbiol. 7: 253-257
- Laughlin LT, Reed GH (1997) The monovalent cation requirement of rabbit muscle pyruvate kinase is eliminated by substitution of lysine for glutamate 117 Arch.Biochem.Biophys. 348: 262-267

- Mattevi A, Bolognesi M, Valentini G (1996) The allosteric regulation of pyruvate kinase FEBS Lett. 389: 15-19
- Mattevi A, Valentini G, Rizzi M, Speranza ML, Bolognesi M, Coda A (1995) Crystal structure of *Escherichia coli* pyruvate kinase type I: molecular basis of the allosteric transition Structure 3: 729-741
- Möller-Zinkhan D, Börner G, Thauer RK (1989) Function of methanofuran, tetrahydromethanopterin, and coenzyme F₄₂₀ in *Archaeoglobus fulgidus* Arch.Microbiol. 152: 362-368
- Muirhead H (1990) Isoenzymes of pyruvate kinase Biochem.Soc.Trans. 18: 193-196
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol. 51 Pt 1: 263-273
- Nelson KE et al. (1999) Evidence for lateral gene transfer between Archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima* Nature 399: 323-329
- Ng WV et al. (2000) Genome sequence of *Halobacterium* species NRC-1 Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 97: 12176-12181
- Oren A (1994) The ecology of the extremely halophilic archaea FEMS Microbiol.Rev. 13: 415-439
- Pawluk A, Scopes RK, Griffiths-Smith K (1986) Isolation and properties of the glycolytic enzymes from *Zymomonas mobilis*. The five enzymes from glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase through to pyruvate kinase Biochem.J. 238: 275-281
- Potter S, Fothergill-Gilmore LA (1992) Purification and properties of pyruvate kinase from *Thermoplasma acidophilum* FEMS Microbiol.Lett. 73: 235-239
- Potters MB et al. (2003) Phosphoprotein with Phosphoglycerate Mutase Activity from the Archaeon *Sulfolobus solfataricus* J.Bacteriol. 185: 2112-2121
- Reichstein B (2001) Zuckerstoffwechsel von hyperthermophilen Archaea. Enzyme des Glucoseabbaus in *Aeropyrum pernix*. Diplomarbeit, Institut für Allgemeine Mikrobiologie, Universität Kiel
- Rigden DJ, Phillips SE, Michels PA, Fothergill-Gilmore LA (1999a) The structure of pyruvate kinase from *Leishmania mexicana* reveals details of the allosteric transition and unusual effector specificity J.Mol.Biol. 291: 615-635
- Rigden DJ, Walter RA, Phillips SE, Fothergill-Gilmore LA (1999b) Sulphate ions observed in the 2.12 Å structure of a new crystal form of *S. cerevisiae* phosphoglycerate mutase provide insights into understanding the catalytic mechanism J.Mol.Biol. 286: 1507-1517
- Ronimus RS, Koning J, Morgan HW (1999) Purification and characterization of an ADP-dependent phosphofructokinase from *Thermococcus zilligii* Extremophiles 3: 121-129

- Rossmann MG, Liljas A, Bränden CI, Banaszak LJ (1975) In: The Enzymes, 3rd. Academic Press, New York, pp 61-102
- Ruepp A et al. (2000) The genome sequence of the thermoacidophilic scavenger *Thermoplasma acidophilum* Nature 407: 508-513
- Sako Y et al. (1996) *Aeropyrum pernix* gen. nov., sp. nov., a novel aerobic hyperthermophilic archaeon growing at temperatures up to 100 degrees C Int.J.Syst.Bacteriol. 46: 1070-1077
- Sambrook S, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2 edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 74: 5463-5467
- Schellenberg GD et al. (1984) Xylose isomerase from *Escherichia coli*. Characterization of the protein and the structural gene J.Biol.Chem. 259: 6826-6832
- Schönheit P, Schäfer T (1995) Metabolism of hyperthermophiles World J.Microbiol.Biotechnol. 11: 26-57
- Schramm A, Siebers B, Tjaden B, Brinkmann H, Hensel R (2000) Pyruvate kinase of the hyperthermophilic crenarchaeote *Thermoproteus tenax*: physiological role and phylogenetic aspects J.Bacteriol. 182: 2001-2009
- Schröder C, Selig M, Schönheit P (1994) Glucose fermentation to acetate, CO₂ and H₂ in the hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga maritima*: involvement of the Embden-Meyerhof pathway Arch.Microbiol. 161: 460-470
- Selig M, Xavier KB, Santos H, Schönheit P (1997) Comparative analysis of Embden-Meyerhof and Entner-Doudoroff glycolytic pathways in hyperthermophilic archaea and the bacterium *Thermotoga* Arch.Microbiol. 167: 217-232
- Siebers B, Klenk HP, Hensel R (1998) PP_i-dependent phosphofructokinase from *Thermoproteus tenax*, an archaeal descendant of an ancient line in phosphofructokinase evolution J.Bacteriol. 180: 2137-2143
- Smith LD, Budgen N, Bungard SJ, Danson MJ, Hough DW (1989) Purification and characterization of glucose dehydrogenase from the thermoacidophilic archaebacterium *Thermoplasma acidophilum* Biochem.J. 261: 973-977
- Stein DB, Searcy DG (1978) Physiologically important stabilization of DNA by a prokaryotic histone-like protein Science 202: 219-221
- Stetter KO (1988) *Archaeoglobus fulgidus* gen. nov., sp. nov.: a new taxon of extremely thermophilic archaebacteria System.Appl.Microbiol. 10: 172-173
- Stetter KO (1993) Life at the upper temperature border. In: Tran Thanh Van, J., Tran Thanh Van, K., Mounolon, J. C., Schneider, J., and McKay, C. (eds) Frontiers of Life. Editions Frontiers, Gif-sur-Yvette, pp 195-219
- Stetter KO (1996) Hyperthermophiles in the history of life Ciba Found.Symp. 202: 1-10

- Stetter KO (1999) Extremophiles and their adaptation to hot environments FEBS Lett. 452: 22-25
- Stetter KO, Fiala G, Huber G, Seegerer A (1990) Hyperthermophilic microorganisms FEMS Microbiol.Rev. 75: 117-124
- Thomm M (1996) Archaeal transcription factors and their role in transcription initiation FEMS Microbiol.Rev. 18: 159-171
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools Nucleic Acids Res. 25: 4876-4882
- Towne JC, Rodwell VW, Grisolia S (1957) The microestimation, distribution, and biosynthesis of 2,3-diphosphoglyceric acid J.Biol.Chem. 226: 777-788
- Tuininga JE, Verhees CH, Van der Oost J, Kengen SW, Stams AJ, De Vos WM (1999) Molecular and biochemical characterization of the ADP-dependent phosphofructokinase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* J.Biol.Chem. 274: 21023-21028
- Tuominen FW, Bernlohr RW (1971) Pyruvate kinase of the spore-forming bacterium *Bacillus licheniformis*. II. Kinetic properties J.Biol.Chem. 246: 1746-1755
- Van der Oost J, Huynen MA, Verhees CH (2002) Molecular characterization of phosphoglycerate mutase in archaea FEMS Microbiol.Lett. 212: 111-120
- Van der Oost J, Schut G, Kengen SW, Hagen WR, Thomm M, De Vos WM (1998) The ferredoxin-dependent conversion of glyceraldehyde-3-phosphate in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* represents a novel site of glycolytic regulation J.Biol.Chem. 273: 28149-28154
- Vieille C, Hess JM, Kelly RM, Zeikus JG (1995) *xylA* cloning and sequencing and biochemical characterization of xylose isomerase from *Thermotoga neapolitana* Appl.Environ.Microbiol. 61: 1867-1875
- Völkl P et al. (1993) *Pyrobaculum aerophilum* sp. nov., a novel nitrate-reducing hyperthermophilic archaeum Appl.Environ.Microbiol. 59: 2918-2926
- Wächtershäuser G (1988) Pyrite formation, the first energy source for life: a hypothesis System.Appl.Microbiol. 10: 207-210
- Wächtershäuser G (1992) Groundworks for an evolutionary biochemistry: the iron-sulphur world Prog.Biophys.Mol.Biol. 58: 85-201
- Waygood EB, Mort JS, Sanwal BD (1976) The control of pyruvate kinase of *Escherichia coli*. Binding of substrate and allosteric effectors to the enzyme activated by fructose 1,6-bisphosphate Biochemistry 15: 277-282
- Waygood EB, Rayman MK, Sanwal BD (1975) The control of pyruvate kinases of *Escherichia coli*. II. Effectors and regulatory properties of the enzyme activated by ribose 5-phosphate Can.J.Biochem. 53: 444-454

- Waygood EB, Sanwal BD (1974) The control of pyruvate kinases of *Escherichia coli*. I. Physicochemical and regulatory properties of the enzyme activated by fructose 1,6-diphosphate J.Biol.Chem. 249: 265-274
- Wendorff D (2002) Enzyme des Zuckerstoffwechsels von hyperthermophilen Archaea: Reinigung und Charakterisierung der Glucose-6-Phosphat Isomerase aus *Aeropyrum pernix*. Diplomarbeit, Institut für Allgemeine Mikrobiologie, Universität Kiel
- Wiegert T, Sahm H, Sprenger GA (1997) The substitution of a single amino acid residue (Ser-116 --> Asp) alters NADP-containing glucose-fructose oxidoreductase of *Zymomonas mobilis* into a glucose dehydrogenase with dual coenzyme specificity J.Biol.Chem. 272: 13126-13133
- Woese CR (1987) Bacterial evolution Bacteriol.Rev. 51: 221-271
- Woese CR, Kandler O, Wheelis ML (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 87: 4576-4579
- Woese CR, Olsen GJ (1986) Archaeobacterial phylogeny: perspectives on the urkingdom System.Appl.Microbiol. 7: 161-177
- Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors Gene 33: 103-119
- Yoshizaki F, Imahori K (1979) Regulatory Properties of Pyruvate Kinase from an Extreme Thermophile, *Thermus thermophilus* HB 8 Agric.Biol.Chem. 43: 527-536
- Zachariou M, Scopes RK (1986) Glucose-fructose oxidoreductase, a new enzyme isolated from *Zymomonas mobilis* that is responsible for sorbitol production J Bacteriol. 167: 863-869
- Zeikus JG, Vieille C, Savchenko A (1998) Thermozyms: biotechnology and structure-function relationships Extremophiles 2: 179-183
- Zhang, P., Ng, W. V., and DasSarma, S. (2003) <http://zdna2.umbi.umd.edu/cgi-bin/blast/blast.pl>

Anhang

Sequenz der *xylDh* von *Haloarcula marismortui* aus Contig97

```

50  ATG AAC GTT GAC GCG CTC ACG GGA GGA TTC GAC CGC CGA GAC TGG CAG GAA CAG 103
17  M  N  V  D  A  L  T  G  G  F  D  R  R  D  W  Q  E  Q  34

104 ACA GCG ACC GAC AAC CCA GTT CGG TTT GCG ATG ATC GGC GTC GGC TGG TGG ACC 154
35  T  A  T  D  N  P  V  R  F  A  M  I  G  V  G  W  W  T  52

155 ACC GAA CAG GCG ATG CCC GCC GTC GAC GCA GGG GAC CTC TGT GAA ACG ACT GTG 211
53  T  E  Q  A  M  P  A  V  D  A  G  D  L  C  E  T  T  V  70

212 CTG GTC AGC AGC GAC CGG GAG AAA GCG GCG GAC GTG GCA GCT GAT TCG GAG ACA 261
71  L  V  S  S  D  R  E  K  A  A  D  V  A  A  D  S  E  T  88

262 GTC GAA CAC GCG ATT ACG TAC GAG GAG TTC CAC GAC GGC GCC GCA AGC GAC GCG 319
89  V  E  H  A  I  T  Y  E  E  F  H  D  G  A  A  S  D  A  105

320 TAC GAC GCC GTC TAC ATC GTC ACC CCG AAC GCG CTC CAC CTC CCG TAC GTC GAG 373
106 Y  D  A  V  Y  I  V  T  P  N  A  L  H  L  P  Y  V  E  124

374 ACG GCG GCA GAA CTG GAC AAG GCG ATC CTC TGT GAG AAG CCG ATG GAG GCC ACT 427
125 T  A  A  E  L  D  K  A  I  L  C  E  K  P  M  E  A  T  142

428 ATC GAG CGC GCC GAG CGA ATG GTC GAG GTC TGT GAC GAG CAC GAC GCG ACG CTG 481
143 I  E  R  A  E  R  M  V  E  V  C  D  E  H  D  A  T  L  160

482 ATG ATC GCC TAC CGA ATG CAC ACC GAG CCA GCC GTC CGG CGA GCG AAG GAC CTC 535
161 M  I  A  Y  R  M  H  T  E  P  A  V  R  R  A  K  D  L  178

536 ATC GAC GAG GGG TAC ATC GGC GAA CCG CTG TTC GTC CAC GGC AAC ATG ACC GAA 589
179 I  D  E  G  Y  I  G  E  P  L  F  V  H  G  N  M  T  E  196

590 CCC ATT CTT GAA CTC GTT CCC GAC CCT GAC CAG TGG CGG CTG GAC GGG GAA CTG 643
197 P  I  L  E  L  V  P  D  P  D  Q  W  R  L  D  G  E  L  214

644 TCC GGA GGG TGT GCC GTC ATG GAT ATC GGT ATC TAT CCG CTG AAC ACG AGC CGA 697
215 S  G  G  C  A  V  M  D  I  G  I  Y  P  L  N  T  S  R  232

698 TTC CTG CTT GAT GCC GAC CCC GTT GCA GTC CGG GGG ACC GTT GCC TCT GTG CAA 751
233 F  L  L  D  A  D  P  V  A  V  R  G  T  V  A  S  V  Q  250

752 GAG GAG TTC GCC GAT GTG CCA GAC GAA CAC GGC GCG TTC CAG CTA GAT TTC CCC 805
251 E  E  F  A  D  V  P  D  E  H  G  A  F  Q  L  D  F  P  268

806 GGC CAC GTG TAC GCG GTG TGT ACC GCC AGC CAG AAC GCA CAT CTT GAC AGC CAC 859
269 G  H  V  Y  A  V  C  T  A  S  Q  N  A  H  L  D  S  H  286

860 ATC TCC GTA CTC GGG ACA GAG GGC AAG GTC CGC GTC GAA CCG GCC TTC TAC CCC 913
287 I  S  V  L  G  T  E  G  K  V  R  V  E  P  A  F  Y  P  304

914 TGG GAC GAC CGC GCG CTC CAG TTG TCT CAC GAG GGG ACG ACG GTC GAG ATC GAC 967
305 W  D  D  R  A  L  Q  L  S  H  E  G  T  T  V  E  I  D  322

968 TTC GAA CAG ATC GAC CAG ATG GAA GAG GAG TTC GAG TAC TTC GCC CAC TGC CTG 1021
323 F  E  Q  I  D  Q  M  E  E  E  F  E  Y  F  A  H  C  L  340

1022 CTG ACC GAC ACT GAG CCC TAC GCC GAC GGC GAA CAC GGC CTC GTC GAT ATC AAC 1075
341 L  T  D  T  E  P  Y  A  D  G  E  H  G  L  V  D  I  N  358

1076 ACG ATC AAG TCC GTC TAC GAA GCA TCC GAG ACG GAG TCG ACA GTC AGA CTC GAT 1128
359 T  I  K  S  V  Y  E  A  S  E  T  E  S  T  V  R  L  D  376

1129 TGA 1132
377  *  378

```

Abkürzungen

A. bidest.	Zweifach deionisiertes Wasser
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
CD	Circulardichroismus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dPGM	Kofaktor-abhängige Phosphoglycerat Mutase
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DTE	Dithioerythritol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
h	Stunde
HPLC	High performance liquid chromatography
iPGM	Kofaktor-unabhängige Phosphoglycerat Mutase
IPTG	Isopropylthiogalactosid
K_m	Michaeliskonstante
MES	2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
Ni-NTA	Nickel-nitrilotriacetic acid
OD	Optische Dichte
ORF	Open reading frame
PCR	Polymerase chain reaction
PEP	Phosphoenolpyruvat
PK	Pyruvat Kinase
RNA	Ribonucleic acid
RT	Reverse Transkriptase
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
TCA	Trichloroacetic acid
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
U	Unit
V_{max}	Maximalgeschwindigkeit des Substratumsatzes

Symbole für den Nukleinsäurecode

A	Desoxyadenosin	G	Desoxyguanosin
C	Desoxycytidin	T	Desoxythymidin

Symbole für Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. P. Schönheit für die Überlassung des Themas, für die Betreuung und Förderung und für hilfreiche Diskussionen.

Herrn Dr. R. Schmidt von der Universität Osnabrück, Fachbereich Mikrobiologie, danke ich für die N-terminale Aminosäuresequenzierung der gereinigten Pyruvat Kinasen aus *Archaeoglobus fulgidus* und *Thermotoga maritima* und der gereinigten Xylose Dehydrogenase aus *Haloarcula marismortui*.

Herrn Dr. J. Grötzinger von der Universität Kiel, Biochemisches Institut, danke ich für das Ermöglichen von CD-spektroskopischen Untersuchungen an Proteinen.

Herrn Preidel danke ich für die Massenkultivierung von *Archaeoglobus fulgidus*, *Thermotoga maritima* und *Haloarcula marismortui*.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern am Institut für Allgemeine Mikrobiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel möchte ich für die angenehme Zusammenarbeit danken.

Lebenslauf

Ulrike Johnsen

geb. am: 26. Februar 1967

Staatsangehörigkeit: deutsch

Wohnort: Kiel

Schulbildung

1973 – 1977 Grundschule

1977 – 1984 Realschule

1984 – 1987 Gymnasium

Juni 1987 Allgemeine Hochschulreife

Ausbildung

1987 – 1990 Krankenpflegeausbildung an der ev.-luth. Diakonissenanstalt in Flensburg

1990 Anerkennung zur staatlich examinierten Krankenschwester

Studium

Oktober 1992 – September 1993 Studium der Agrarwissenschaft an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Oktober 1993 – September 1999 Studium der Biologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Juni 1998 Diplomprüfung in den Fächern Mikrobiologie, Botanik und Biochemie

Juli 1998 – Juli 1999 Experimentelle Diplomarbeit am Institut für Allgemeine Mikrobiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. P. Schönheit mit dem Thema: „Zuckerstoffwechsel von aeroben Archaea: Abbauwege von Glucose, Fructose und Xylose im extrem halophilen Archaeon *Halococcus saccharolyticus*“.

August 1999 Beginn der experimentellen Arbeiten zu der vorliegenden Dissertation am Institut für Allgemeine Mikrobiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. P. Schönheit.

Berufstätigkeit

1990 – Juni 1992 Krankenschwester an der ev.-luth. Diakonissenanstalt in Flensburg

Juli 1992 – September 1992 Krankenschwester am Städtischen Krankenhaus der Stadt Kiel

Seit August 1999 wissenschaftliche Mitarbeiterin bei Prof. Dr. P. Schönheit am Institut für Allgemeine Mikrobiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.