Enzyme des Zuckerstoffwechsels aus hyperthermophilen und halophilen Archaea:
Charakterisierung von Pyruvat Kinasen, Phosphoglycerat Mutassen 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 -

Referent: Prof. Dr. P. Schönheit
Korreferent: Prof. Dr. J.F. Imhoff

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 *Archaeoglobus fulgidus* ............................................................... 18
     4.1.2 Züchtung von *Thermotoga maritima* ................................................................. 18
     4.1.3 Züchtung von *Haloarcula marismortui* ............................................................... 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-Polyacrylamidelektrophorese ..................................................................... 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
Inhalt

4.5.3 Wachstumsbilanz von *Ha. marismortui* auf Xylose ...................................................... 44

5 Ergebnisse ................................................................................................................................ 45

5.1 Pyruvat Kinasen aus hyperthermophilen Archaea und Bacteria (*Thermotoga*) ............... 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 *T. maritima* ......................................................................................................................... 55
5.1.4 Untersuchungen zur Abhängigkeit der PK aus *T. maritima* von monovalenten Kationen durch ortsspezifische Mutagenese .................................................................................. 61

5.2 Phosphoglycerat Mutasen aus Archaea .............................................................................. 65
5.2.1 Identifizierung und Charakterisierung einer iPGM aus *A. fulgidus* .................................. 65
5.2.2 Identifizierung und Charakterisierung einer dPGM aus *T. acidophilum* ....................... 68

5.3 Xylose Dehydrogenase, das erste Enzym des Xyloseabbaus, aus dem halophilen Archaeon *Ha. marismortui* .............................................................................................................. 72
5.3.1 Wachstum von *Ha. marismortui* 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 *Ha. marismortui* .......................................... 75
5.3.5 Biochemische Charakterisierung der Xylose Dehydrogenase ......................................... 76

6 Diskussion .................................................................................................................................... 79

6.1 Pyruvat Kinasen aus hyperthermophilen Archaea und Bacteria (*Thermotoga*) ............... 79
6.2 Phosphoglycerat Mutasen aus Archaea ............................................................................... 87
6.3 Xylose Dehydrogenase, das erste Enzym des Xyloseabbaus, aus dem halophilen Archaeon *Ha. marismortui* .............................................................................................................. 92

6 Literatur ..................................................................................................................................... 96

Anhang .......................................................................................................................................... 104

Abkürzungen ............................................................................................................................... 105

Danksagung .................................................................................................................................. 107

Lebenslauf ...................................................................................................................................... 108
1 Zusammenfassung


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


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 archaellen PKs, was für eingeschränkte regulatorische Eigenschaften spricht. Die PK aus dem Bakterium *T. maritima* ist ebenfalls ein Homotetramer und zeigte, wie die archaellen PKs, ein hohes Temperaturoptimum, extreme Thermostabilität sowie eine kooperative Bindung von Phosphoenolpyruvat und ADP. Im Gegensatz zu den archaellen PKs war die PK aus *T. maritima* durch die klassischen Effektores AMP und ATP allosterisch reguliert. Phylogenetische Analysen mit PK Sequenzen aus allen drei Domänen, inklusive der hier untersuchten hyperthermophilen PKs, ergaben eine eigenständige archaelle 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...
Sequenzmotifs 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***

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


Einleitung


Einleitung


Für viele Archaea ist ein Glucoseabbau über modifizierte Embden-Meyerhof Wege beschrieben (Abbildung 2). Die Modifikationen beziehen sich auf die Glucokinase, Phosphofructokinase (PFK) und auf die Glyceraldehyd-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 Glyceraldehyd-3-phosphat zu 3-Phosphoglycerat ist eine Glyceraldehyd-3-phosphat: Ferredoxin Oxidoreduktase (GAP: Fd OR), die die klassischen Enzyme Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase und Phosphoglycerat Kinase ersetzt, beschrieben (Schönheit und Schäfer 1995). In *Thermoproteus tenax* ist die PFK Pyrophosphat-abhängig und Glyceraldehyd-3-phosphat wird durch eine nicht-phosphorylierende Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase zu 3-Phosphoglycerat umgesetzt, wobei wie in der klassischen Reaktion NAD(P)H entsteht. Für den archaeellen Sulfatreduzierer *Archaeoglobus fulgidus*
Einleitung


Einleitung

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 = Phosphofructokinase, PGM = Phosphoglycerat Mutase, PK = Pyruvat Kinase, oxid. = oxidierende, Fd = Ferredoxin, ox. = oxidiert, red. = reduziert.

Einleitung


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 stearothermophilus sind

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 Hefextrakt 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 Hefextrakt 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 Hefextrakt 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 Casaminosäuren 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 Kinase aus Eukarya, Bacteria und Archaea wurde ein Stammbaum erstellt. Im Folgenden werden die verwendeten Programme und Einstellungen dargestellt:


**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 µg/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 µg/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 „gefishcht“. 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 Restrikionsendonuclease *ClaI* (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:
Material und Methoden

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 *ClaI*-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 and 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 and 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 and 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 sterlem 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.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Name</th>
<th>Basensequenz (5' → 3')</th>
<th>RE</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>pkTm0208F</td>
<td>CCGGGTGAAGCATATGCGAATACACAAAGAT</td>
<td>NdeI</td>
</tr>
<tr>
<td>pkTm0208R</td>
<td>ATCTTCATAGGGATCCCCCCCTCAATCCA</td>
<td>BamHI</td>
</tr>
<tr>
<td>pkTm450F</td>
<td>TGGAAAGATACACACACAGG</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>pkTm920R</td>
<td>CTGTTTCCCTGTGAGGA</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>pkTm0208-K71E-F</td>
<td>CGATCTTGCGGGGCGAGATCAGAACCAGGTACCC</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>pkTm0208-K71E-R</td>
<td>GGTATCCCGTTCGTATCCGGGCGGCAAGATCCG</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>pkAp0489F</td>
<td>TTAGAAGAGGTGGCTCTCATATGAGGGG</td>
<td>NdeI</td>
</tr>
<tr>
<td>pkAp0489R</td>
<td>GATAGGAATTCAGACAGGGGCGGTAG</td>
<td>EcoRI</td>
</tr>
<tr>
<td>pkAp370F</td>
<td>AAGATAATCTCCACAGGTG</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>pkAp869R</td>
<td>AAGCACCAGCTGGTATAT</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>pkPa0819F</td>
<td>CACTAAAGGAGCCGGAGCATATGAGGCTC</td>
<td>NdeI</td>
</tr>
<tr>
<td>pkPa0819R</td>
<td>GTGTGGTACCGCGCATGCGCTTTTTACGG</td>
<td>BamHI</td>
</tr>
<tr>
<td>pkPa380F</td>
<td>CGATGTGTTATTTATATGCTTGAGGG</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>ipgmAf1751F</td>
<td>GAAAGGCTGAGGTGATCATATGCGCTGTAC</td>
<td>NdeI</td>
</tr>
<tr>
<td>ipgmAf1751R</td>
<td>CAGTCAAGATTTGGCTACGCTGAGGAGGAAG</td>
<td>BamHI</td>
</tr>
<tr>
<td>RTPCRipgmAf1751F</td>
<td>GTGCTCTGTACTGCTGATTGTTG</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>RTPCRipgmAf1751R</td>
<td>CTTCGCAATGTTACGCAGATCAAGG</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>dpgmTa1347F</td>
<td>CCGTATACATATGATATATATATATATATATATATATAT</td>
<td>NdeI</td>
</tr>
<tr>
<td>dpgmTa1347R</td>
<td>CTGTGAGTAGTCCTACGTATG</td>
<td>BamHI</td>
</tr>
<tr>
<td>T7-Promotor Primer</td>
<td>TAAATCCGACTCAGTATAGGG</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>T7-Terminator Primer</td>
<td>GCTAGTTTATGTCAGGCGG</td>
<td></td>
</tr>
</tbody>
</table>

4.2.4 Konzentrationsbestimmung und Reinheitsanalyse von DNA

**Material und Methoden**

**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 einem Standard (HindIII 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 inkubierte. Die Ansätze folgender Zusammensetzung wurden bei 37°C für 12 h inkubierte: 50 µl Plasmid-DNA (1 bis 10 µg DNA), jeweils 10 U Restriktionsendonuklease, 10 µl 10x
Material und Methoden

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 Übernachtkultur 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:
Material und Methoden

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-Primere, die Bezeichnung des konstruierten Vektors und die des Genproduktes sind für jeden ORF angegeben.

<table>
<thead>
<tr>
<th>DNA-Quelle, ORF</th>
<th>Vektor</th>
<th>Schnittstellen</th>
<th>Primer</th>
<th>Bezeichnung Konstrukt</th>
<th>Bezeichnung Genprodukt</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td><em>T. maritima</em> TM0208</td>
<td>pET19b</td>
<td>NdeI, BamHI</td>
<td>pkTm0208F, pkTm0208R</td>
<td>pkTm-pET19b</td>
<td>PKTm</td>
</tr>
<tr>
<td><em>P. aerophilum</em> PAE0819</td>
<td>pET17b</td>
<td>NdeI, BamHI</td>
<td>pkPa0819F, pkPa0819R</td>
<td>pkPa-pET17b</td>
<td>PKPa</td>
</tr>
<tr>
<td><em>A. fulgidus</em> VC16 AF1751</td>
<td>pET19b</td>
<td>NdeI, BamHI</td>
<td>ipgmAf1751F, ipgmAf1751R</td>
<td>ipgmAf-pET19b</td>
<td>iPGMAf</td>
</tr>
<tr>
<td><em>T. acidophilum</em> TA1347</td>
<td>pET17b</td>
<td>NdeI, BamHI</td>
<td>dpgmTa1347F, dpgmTa1347R</td>
<td>dpgmTa-pET17b</td>
<td>dPGMTa</td>
</tr>
</tbody>
</table>

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 pellettiert. 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 pellettet.

**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 pellettet.

**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 pellettet.

**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 pellettet.

**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 pellettet.

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
Material und Methoden

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


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 2x10^8 Zellen. Dazu wurden 100 ml einer sich in der logarithmischen Wachstumsphase befindlichen Kultur zentrifugiert (9000 x 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 x 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
Material und Methoden

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 Biuret.** Die Bestimmung des Proteingehaltes im Rohextrakt von *Habronema 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 CuSO₄•5 H₂O, 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
Material und Methoden


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

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 Elektrophorespuffer 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 Laupuffer 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


4.3.6 Reinigung von nativen Proteinen

Reinigung der Pyruvat Kinase (PK) aus *A. fulgidus* Stamm 7324. Der zellfreie Rohextrakt wurde aus 80 g Stärke-gewachsenen Feuchtwürmern 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) äquilibrriert 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 äquilibrriert 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 Feuchtwürmern 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 äquilibrriert war. Nach einem Waschschritt mit 50 mM Piperezin 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
Material und Methoden

Die höchsten PK Aktivitäten wurden auf ein Volumen von 1 ml mittels Ultrafiltration (4.3.5, Ausschlussgröße: 20 kDa) eingegengt 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 (NH₄)₂SO₄ und 20 mM MgCl₂ (Puffer C) suspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte 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 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 (NH₄)₂SO₄ in Puffer C eluiert (300 ml). Die Fraktionen mit der höchsten Xylose Dehydrogenase Aktivität (1.6 bis 1.4 M (NH₄)₂SO₄) wurden auf 2 M (NH₄)₂SO₄ eingestellt und auf eine Phenyl Sepharose 26/10 Säule, die mit 50 mM Tris-HCl pH 8.5 mit 2 M (NH₄)₂SO₄ und 20 mM MgCl₂ (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 MgCl₂ und 10% Glycerol (Puffer E) (300 ml) eluiert. Die Fraktionen mit der höchsten Xylose Dehydrogenase Aktivität (7 ml, 1.04-0.95 M (NH₄)₂SO₄) wurden mittels Ultrafiltration (4.3.5) auf ein Volumen von 600 µl (Ausschlussgröße: 20 kDa) eingegengt 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 entsprach 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) eingeengt. 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 eingeengt 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 HiLoad 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 Extrait 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 mM⁻¹cm⁻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.


#### 4.4.1 Charakterisierung der Pyruvat Kinasen (PK)

PKs katalysieren die Reaktion: Phosphoenolpyruvat (PEP) + ADP → 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 MgCl₂, 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 MgCl₂, 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 inkubierte. 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 bisTris 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 Kuvetten 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 Enyzms 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 Enyzms wurde bei Temperaturen zwischen 60°C und 85°C getestet. Der Testansatz enthielt: 8 µg Protein in
Material und Methoden

20 µl 100 mM Triethanolamin pH 7 (bei der entsprechenden Temperatur) jeweils mit und ohne 50 µM MnCl₂ und 5 mM MgCl₂. 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 µM 2,3-Bisphosphoglycerat, 5 mM MgCl₂, 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 µM 2,3-Bisphosphoglycerat, 5 mM MgCl₂, 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 µM 2,3-Bisphosphoglycerat, 5 mM MgCl₂, 2 mM ATP, 2 mM Phosphoenolpyruvat, 0 bis 100 µM 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 *Kₘ*-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 H₂SO₄ 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 BaCl₂·2H₂O 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 µm Filter gesammelt. Das Salz wurde anschließend 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 BaSO₄ mit gesättigter Na₂SO₄-Lösung ausgefällt. Die Konzentration an 3-Phosphoglycerat wurde anschließend bei 37°C als Oxidation von NADH bei 365 nm
Material und Methoden

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) gereinigt, 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 Xylose-gewachsenen *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* Extrak 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 colorimetrisehe 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* Extrak 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 $\varepsilon = 5 \text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 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$_2$SO$_4$ (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$_2$SO$_4$ versetzt und für 30 min gekocht. Nach Zentrifugation (13000 x 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$_2$SO$_4$-Lösung (13 M H$_2$SO$_4$), 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 x 0.3 cm) Säule und N$_2$ als Träergas. 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

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*.


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.


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.

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

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

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.


<table>
<thead>
<tr>
<th>Archaeoglobus fulgidus 7324</th>
<th>---MQLPSHKTKIATIGPASRQ 20</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Thermococcus litoralis</td>
<td>---MELPSHKTKIATIGPASKQ 20</td>
</tr>
<tr>
<td>Pyrococcus furiosus</td>
<td>MRRVKLPSHKTKIVATIGPATS 23</td>
</tr>
</tbody>
</table>


**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 S₀.₅-Werte für ADP bzw. PEP betrugen 0.4 bzw. 0.25 mM, die entsprechenden Hill-Koeffizienten lagen bei 2.1 bzw. 1.8. Die PK benötigte divalente Kationen, wobei Mg²⁺ (100%) teilweise durch Co²⁺ (86%) und Mn²⁺ (63%) ersetzt werden konnte. Dagegen waren Ni²⁺ (21%), Ca²⁺ (7%) und Zn²⁺ (6.5%) weniger effektiv (Abbildung 5 A). Für Mg²⁺ zeigte sich eine sigmoidale Sättigungskinetik, was auf eine kooperative Bindung des Kations hinweist. Der apparente S₀.₅-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 Enzmys 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 S0,5-Werte für ADP bzw. PEP betrugen 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 \textit{P. aerophilum} von der Konzentration an PEP und ADP bei 65°C. A Saturierungskurve mit PEP. B Darstellung nach Hill der gleichen Daten. C Saturierungskurve mit ADP. Die Testansätze enthielten 18 µg Protein.

\textbf{PK aus \textit{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 betrugen 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
Ergebnisse

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 hyperbolische 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. 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.
Ergebnisse

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.


<table>
<thead>
<tr>
<th></th>
<th><em>A. pernix</em></th>
<th><em>P. aerophilum</em></th>
<th><em>A. fulgidus</em></th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Apparente molekulare Masse des Enzyms (kDa)</td>
<td>200</td>
<td>200</td>
<td>195</td>
</tr>
<tr>
<td>Apparente molekulare Masse der Untereinheit (kDa)</td>
<td>51</td>
<td>48</td>
<td>49</td>
</tr>
<tr>
<td>Oligomere Struktur</td>
<td>α₄</td>
<td>α₄</td>
<td>α₄</td>
</tr>
<tr>
<td>pH Optimum</td>
<td>6.1</td>
<td>6.0</td>
<td>6.6</td>
</tr>
<tr>
<td>Schmelztemperatur (°C)</td>
<td>&gt;98</td>
<td>&gt;98</td>
<td>93</td>
</tr>
<tr>
<td>Temperaturoptimum (°C)</td>
<td>&gt;95</td>
<td>&gt;98</td>
<td>85</td>
</tr>
<tr>
<td>Arrhenius Aktivierungsgenergie (kJ/mol)</td>
<td>65ᵃ</td>
<td>55ᵇ</td>
<td>56ᶜ</td>
</tr>
<tr>
<td>Apparenter Vₘₚₙ (U/mg)</td>
<td>53</td>
<td>46</td>
<td>1000</td>
</tr>
<tr>
<td>Apparenter S₀,₅ für ADP (mM)</td>
<td>0.26</td>
<td>1.3</td>
<td>0.4</td>
</tr>
<tr>
<td>Hill-Koeffizient (h)</td>
<td>2.10</td>
<td>2.4</td>
<td>2.1</td>
</tr>
<tr>
<td>Apparenter S₀,₅ für PEP (mM)</td>
<td>0.1</td>
<td>0.4</td>
<td>0.25</td>
</tr>
<tr>
<td>Hill-Koeffizient (h)</td>
<td>1.5</td>
<td>3.0</td>
<td>1.80</td>
</tr>
</tbody>
</table>
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 Sättigungs kinetiken, 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 Effekto ren. 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.

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

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

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.


**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

*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 betrugen 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 Saturierungskurve mit ADP. B Darstellung nach Hill der gleichen Daten. Die Testansätze enthielten 1 µg Protein.

*Allosterische Effekto ren.* Der Einfluss von positiv allosterischen Effekto ren 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 hyperbolischen 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).

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 Aktivierungsgenergie 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 (NH₄)₂SO₄ 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 (▼).](image-url)

**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.
### Ergebnisse

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

<table>
<thead>
<tr>
<th></th>
<th>natives Enzym</th>
<th>rekombinantes Enzym</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Apparente molekulare Masse des Enzyms (kDa)</td>
<td>200</td>
<td>210</td>
</tr>
<tr>
<td>Apparente molekulare Masse der Untereinheit (kDa)</td>
<td>51</td>
<td>56</td>
</tr>
<tr>
<td>Oligomere Struktur</td>
<td>α₄</td>
<td>α₄</td>
</tr>
<tr>
<td>pH Optimum</td>
<td>6.0</td>
<td>5.9</td>
</tr>
<tr>
<td>Schmelztemperatur (°C)</td>
<td>n.b.</td>
<td>&gt;98</td>
</tr>
<tr>
<td>Temperaturoptimum (°C)</td>
<td>n.b.</td>
<td>80</td>
</tr>
<tr>
<td>Arrhenius Aktivierungsenergie (kJ/mol, 30-70°C)</td>
<td>n.b.</td>
<td>55.6</td>
</tr>
<tr>
<td>Apparenter $V_{max}$ (U/mg)</td>
<td>320</td>
<td>578</td>
</tr>
<tr>
<td>ADP-Saturierungskurve</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>Apparenter $S_{0.5}$ (mM)</td>
<td>1.3</td>
<td>1.2</td>
</tr>
<tr>
<td>Hill-Koeffizient (h)</td>
<td>2.9</td>
<td>2.8</td>
</tr>
<tr>
<td>PEP-Saturierungskurve</td>
<td></td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>- Effektor (Apparenter $S_{0.5}$ (mM), Hill-Koeffizient (h))</td>
<td>0.3, 2.0</td>
<td>0.23, 2.2</td>
</tr>
<tr>
<td>+ AMP&lt;sup&gt;a&lt;/sup&gt; (Apparenter $S_{0.5}$ (mM), Hill-Koeffizient (h))</td>
<td>0.09, 1.3</td>
<td>0.08, 1.0</td>
</tr>
<tr>
<td>+ ATP&lt;sup&gt;a&lt;/sup&gt; (Apparenter $S_{0.5}$ (mM), Hill-Koeffizient (h))</td>
<td>n.b., n.b.</td>
<td>0.5, 2.9</td>
</tr>
</tbody>
</table>

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 µg/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


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.
Ergebnisse

<table>
<thead>
<tr>
<th>Protein</th>
<th>Sequence</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Yeast1</td>
<td>52 FSHGSYEHKSVIDNARKSEELYP-----RPLAIALDTKGPEIRTGLTGN 97</td>
</tr>
<tr>
<td>Human M2</td>
<td>74 FSHGTTEHAEITKVRATATGFSASPAILYRTPVAVLDTKGPEIRTGLIGK 125</td>
</tr>
<tr>
<td>E.coli 1</td>
<td>34 FSHGDYAEHGQRQNLRS---VMSKTTG-------KTAAILLDTKGPEIRMKLE 79</td>
</tr>
<tr>
<td>T.maritima</td>
<td>34 TSHGDWNEEQKILKIKDLREKK-----PVA1LDLAGKRTGYLEK 79</td>
</tr>
<tr>
<td>T.acidophilum</td>
<td>34 SAHADEKDVSKITQMVR--------INRVDGIMDLKPELRTGEFAG 74</td>
</tr>
<tr>
<td>T.tenax</td>
<td>32 MSHASPSEVARVNAVRGK------YIAIIADLRGPSVTRGLMP 77</td>
</tr>
<tr>
<td>P.aerophilum</td>
<td>48 LAHASPNEVKFREAVRYSXAKR--------PLAVIIDLKPISRVGSTEP 93</td>
</tr>
<tr>
<td>A.pernix</td>
<td>35 ASHGGVEQWNSMEQRLRAEAVK-------RVGVADVLEGPRVTRGENSEP 80</td>
</tr>
</tbody>
</table>

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.


**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.
Biochemische Charakterisierung der mutierten PK. Das mutierte Enzym wies eine spezifische Aktivität von 4.2 U/mg (mit 0.1 M NH₄Cl) 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.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Kation</th>
<th>Aktivitätssteigerung in (%) bei 20 mM</th>
<th>Aktivitätssteigerung in (%) bei 60 mM</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Ammonium</td>
<td>280</td>
<td>850</td>
</tr>
<tr>
<td>Rubidium</td>
<td>27</td>
<td>36</td>
</tr>
<tr>
<td>Kalium</td>
<td>11</td>
<td>20</td>
</tr>
<tr>
<td>Lithium</td>
<td>7</td>
<td>11</td>
</tr>
<tr>
<td>Cásiurn</td>
<td>5</td>
<td>7</td>
</tr>
</tbody>
</table>

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
monovalent 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 (Jedrzejas 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 Hitzeschrift 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 (Jedrzejas 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 µM 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.

Die Thermostabilität der iPGM wurde in Gegenwart von MgSO₄ (10 mM) und MnCl₂ (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 MnCl₂ und 10 mM MgSO₄ bei 60°C (●), 70°C (●), 85°C (▲) und bei 70°C ohne MnCl₂ und MgCl₂ (■). 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.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Eigenschaft</th>
<th>Wert</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Apparente molekulare Masse des Enzyms (kDa)</td>
<td>46</td>
</tr>
<tr>
<td>Apparente molekulare Masse der Untereinheit (kDa)</td>
<td>48</td>
</tr>
<tr>
<td>Kalkuliertes Molekulargewicht (kDa)</td>
<td>44.1</td>
</tr>
<tr>
<td>Oligomere Struktur</td>
<td>α</td>
</tr>
<tr>
<td>pH Optimum</td>
<td>7.1</td>
</tr>
<tr>
<td>Apparenter ( V_{\text{max}} ) (2-Phosphoglycerat-Bildung, U/mg)</td>
<td>3.3</td>
</tr>
<tr>
<td>Apparenter ( K_{m} ) (3-Phosphoglycerat, mM)</td>
<td>0.8</td>
</tr>
<tr>
<td>Apparenter ( V_{\text{max}} ) (3-Phosphoglycerat-Bildung, U/mg)</td>
<td>0.8</td>
</tr>
<tr>
<td>Apparenter ( K_{m} ) (2-Phosphoglycerat, mM)</td>
<td>0.2</td>
</tr>
</tbody>
</table>


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).

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.

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 Vanadathemmung 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.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Eigenschaft</th>
<th>Wert</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Apparente molekulare Masse des Enzyms (kDa)</td>
<td>46</td>
</tr>
<tr>
<td>Apparente molekulare Masse der Untereinheit (kDa)</td>
<td>24</td>
</tr>
<tr>
<td>Kalkuliertes Molekulargewicht (kDa)</td>
<td>23.8</td>
</tr>
<tr>
<td>Oligomere Struktur</td>
<td>α₂</td>
</tr>
<tr>
<td>Apparenter $V_{\text{max}}$ (2-Phosphoglycerat-Bildung, U/mg)</td>
<td>36</td>
</tr>
<tr>
<td>Apparenter $K_m$ (3-Phosphoglycerat, mM)</td>
<td>3.3</td>
</tr>
<tr>
<td>Apparenter $V_{\text{max}}$ (3-Phosphoglycerat-Bildung, U/mg)</td>
<td>12</td>
</tr>
<tr>
<td>Apparenter $K_m$ (2-Phosphoglycerat, mM)</td>
<td>1.1</td>
</tr>
<tr>
<td>Apparenter $K_m$ (2,3-Bisphosphoglycerat, µM)</td>
<td>17</td>
</tr>
</tbody>
</table>

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*


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 von 0.5. 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 (ΔOD₅₇₈) 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 *Kₘ* Wert für Xylose von 0.95 mM war 16fach kleiner als der *Kₘ* 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 Casaminoäuren) 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 (\(\Delta\)OD₅₇₈) (■), 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.

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

Der Reinheitsgrad der Xylose Dehydrogenase wurde nach jedem Reinigungsschritt gelektrophoretisch 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 Brillantblau von aufeinanderfolgenden Reinigungsschritten. Die Pfeile auf der linken Seite deuten auf die Markerproteine, der Pfeil rechts auf die Bande des gereinigten Enzmys. **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 Aminosäuressequenz (29 Aminosäuren) der Untereinheit des gereinigten Enzyms wurde bestimmt mit: MNVDALTGGFDRRDWQEQTATDNPVRFAA 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.

Neben Xylose wurden Ribose, Glucose, Galactose, Fructose und Arabinose als Substrate getestet. Die $V_{\text{max}}$-Werte, $K_m$-Werte und die katalytische Effizienz ($k_{\text{cat}}/K_m$) 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 $V_{\text{max}}$-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.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Substratpaar</th>
<th>$V_{\text{max}}$ (U/mg)</th>
<th>$K_m$ (Zucker)</th>
<th>$K_m$ (Kofaktor)</th>
<th>$k_{\text{cat}}$ (s⁻¹)</th>
<th>$k_{\text{cat}}/K_m$ (s⁻¹x10²)</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Xylose NADP⁺</td>
<td>107</td>
<td>1.2</td>
<td>0.15</td>
<td>356</td>
<td>2.97</td>
</tr>
<tr>
<td>Ribose NADP⁺</td>
<td>108</td>
<td>2.3</td>
<td>0.1</td>
<td>360</td>
<td>1.57</td>
</tr>
<tr>
<td>Glucose NADP⁺</td>
<td>81.6</td>
<td>64</td>
<td>0.18</td>
<td>273</td>
<td>0.043</td>
</tr>
<tr>
<td>Galactose NADP⁺</td>
<td>38.5</td>
<td>n.b.</td>
<td>n.b.</td>
<td>-</td>
<td>-</td>
</tr>
<tr>
<td>Fructose NADP⁺</td>
<td>1.9</td>
<td>n.b.</td>
<td>n.b.</td>
<td>-</td>
<td>-</td>
</tr>
<tr>
<td>Arabinose NADP⁺</td>
<td>1.0</td>
<td>n.b.</td>
<td>n.b.</td>
<td>-</td>
<td>-</td>
</tr>
<tr>
<td>Xylose NAD⁺</td>
<td>83</td>
<td>n.b.</td>
<td>0.9</td>
<td>-</td>
<td>-</td>
</tr>
<tr>
<td>Ribose NAD⁺</td>
<td>87</td>
<td>n.b.</td>
<td>1.2</td>
<td>-</td>
<td>-</td>
</tr>
</tbody>
</table>

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 Aktivierungsentnergie von 64 kJ/mol ermittelt.
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*.

<table>
<thead>
<tr>
<th>Eigenschaft</th>
<th>Wert</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>Apparente molekulare Masse des Enzyms (kDa)</td>
<td>180</td>
</tr>
<tr>
<td>Apparente molekulare Masse der Untereinheit (kDa)</td>
<td>57</td>
</tr>
<tr>
<td>Oligomere Struktur</td>
<td>4α</td>
</tr>
<tr>
<td>pH Optimum</td>
<td>8.3</td>
</tr>
<tr>
<td>Temperaturoptimum (°C)</td>
<td>50</td>
</tr>
<tr>
<td>Aktivierungsenergie (kJ/mol, 20-60°C)</td>
<td>64</td>
</tr>
</tbody>
</table>

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*)


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).


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.

**Kinetiche 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 hyperbolische 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.

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


**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 Ursprungs bilden. Alle Sequenzen der hyperthermophilen PKs enthalten die PK-Konsensussequenz: [LIVAC]-x-[LIVM](2)-[SAPCV]-K-[LIV]-E-[NKRST]-x-[DEQHS]-
Abbildung 30: Multiples Sequenzalignment mit Aminosäuresequenzen von PKs aus den Domänen der Eukaryota, Bacteria und Archaea. Das Alignment wurde mit ClustalX mit Standardabstellungen (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 BA79454; Bacillus stearothermophilus S29783; E. coli 1 KPY1_ECOLI; Human M2 KPY2_HUMAN; Pyrobaculum aerophilum AAL63053; Yeast 1 KPY1_YEAST; Thermoproteus tenax AAF06820; Thermodractia maritima AAD35300.

82
Diskussion


**Eukarya**
- Hae.inf., Haemophilus influenzae KPYK_HAEIN
- Human M2 KPY2_HUMAN
- Hyd.the., Hydrogenophilus thermostoletolus BAA95686
- Lac.del., Lactobacillus delbrueckii KPYK_LACDE
- Lac.lac., Lactococcus lactis B40620
- Lei.mex., Leishmania mexicana KPYK_LEIME
- Methanosarcina acetivorans str. C2A AAM07241
- Methanosarcina mazei Goe1 AAM30411
- Pyrococcus abyssi CAB50316
- Pyrococcus furiosus AAL81312
- Pyrococcus horikoshii F71171
- Salmonella enterica subspecies enterica serovar Typhimurium LT2 AAL20804
- Streptococcus thermophilus AAF25804
- Streptomyces coelicolor T35759
- Str.coe. A3 CAB70653
- Sulfolobus tokodaii BAB66695
- Thermoplasma acidophilum KPYK_THEAC
- Thermoplasma volcanium BAB60191
- Trypanosoma brucei brucei KPY2_TRYBB
- Yeast 1 KPY1YEAST
- Yeast 2 KPY2YEAST

**Bacteria I**
- 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.coli 1 KPY1_ECOLI
- E. coli 2 KPY2_ECOLI
- E.coli 3 cat KPY1_FELCA
- F. coli KPY2_FELCA
- Hae.inf., Haemophilus influenzae KPYK_HAEIN
- Human M2 KPY2_HUMAN
- Hyd.the., Hydrogenophilus thermostoletolus BAA95686
- Lac.del., Lactobacillus delbrueckii KPYK_LACDE
- Lac.lac., Lactococcus lactis B40620
- Lei.mex., Leishmania mexicana KPYK_LEIME
- Methanosarcina acetivorans str. C2A AAM07241
- Methanosarcina mazei Goe1 AAM30411
- Pyrococcus abyssi CAB50316
- Pyrococcus furiosus AAL81312
- Pyrococcus horikoshii F71171
- Salmonella enterica subspecies enterica serovar Typhimurium LT2 AAL20804
- Streptococcus thermophilus AAF25804
- Streptomyces coelicolor T35759
- Str.coe. A3 CAB70653
- Sulfolobus tokodaii BAB66695
- Thermoplasma acidophilum KPYK_THEAC
- Thermoplasma volcanium BAB60191
- Trypanosoma brucei brucei KPY2_TRYBB
- Yeast 1 KPY1YEAST
- Yeast 2 KPY2YEAST

**Bacteria II**
- Archaea
- Dei.rad., Deinococcus radiodurans AAF12171
- E. coli 1 KPY1_ECOLI
- E. coli 2 KPY2_ECOLI
- E. coli 3 cat KPY1_FELCA
- F. coli KPY2_FELCA
- Hae.inf., Haemophilus influenzae KPYK_HAEIN
- Human M2 KPY2_HUMAN
- Hyd.the., Hydrogenophilus thermostoletolus BAA95686
- Lac.del., Lactobacillus delbrueckii KPYK_LACDE
- Lac.lac., Lactococcus lactis B40620
- Lei.mex., Leishmania mexicana KPYK_LEIME
- Methanosarcina acetivorans str. C2A AAM07241
- Methanosarcina mazei Goe1 AAM30411
- Pyrococcus abyssi CAB50316
- Pyrococcus furiosus AAL81312
- Pyrococcus horikoshii F71171
- Salmonella enterica subspecies enterica serovar Typhimurium LT2 AAL20804
- Streptococcus thermophilus AAF25804
- Streptomyces coelicolor T35759
- Str.coe. A3 CAB70653
- Sulfolobus tokodaii BAB66695
- Thermoplasma acidophilum KPYK_THEAC
- Thermoplasma volcanium BAB60191
- Trypanosoma brucei brucei KPY2_TRYBB
- Yeast 1 KPY1YEAST
- Yeast 2 KPY2YEAST


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


**Identifizierung einer hypothetischen iPGM aus \textit{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 archaellen Genomen war bisher, bis auf eine im Genom von \textit{Halobacterium} sp. NRC-1 annotierte iPGM, nichts über iPGMs bekannt (Ng et al. 2000). Kürzlich wurden in den archaellen Genomen von \textit{Methanococcus jannaschii}, \textit{Pyrococcus furiosus} und \textit{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 \textit{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 \textit{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 \textit{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 archaellen iPGMs aus \textit{Methanococcus jannaschii} und \textit{Pyrococcus furiosus} als Homotetramerem mit etwa 45 kDa Untereinheiten identifiziert (Van der Oost et al. 2002). In Übereinstimmung mit der optimalen Wachstumstemperatur von 83°C für \textit{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 \textit{Bacillus stearothermophilus} zeigt, dass
Mangan als Bestandteil der Struktur vorliegt (Jedrzejas 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.
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 thermautotrophicus 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

Die Phosphatgruppe am Histidin wird nun auf das Substrat 3-Phosphoglycerat bzw. 2-Phosphoglycerat übertragen, womit das Intermediat 2,3-Bisphosphoglycerat entsteht (Jedrejas 2000b; Fothergill-Gilmore und Watson 1989). dPGMs kommen, wie iPGMs, in der Domäne der Bakterien 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.

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(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 steaerothermophilus AAK07665; E. coli P31217; Rate 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 (Jedrzejas 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 archaeelle 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.


 Diskussion

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

![Diagramm](insert_diagram)


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 *xyldh* 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.


Diskussion

Glutathion R (human)  (188) GRVIVGAKHAAGLGSALSTKSLMR
Glutamat DH (Yeast)  (218) KREVLSVGSNYGALKLIQGATVSLSD
Glutamat DH (E. coli)  (233) MRSVSLGSAQYAIEKAMEGARVITASD
Glutathion R (E. coli)  (164) ERVAVGAYHAVELAVGINSAL
Xylose DH (Ha. marismortui)  (25) VFRAEMHVMTETEAMPVADGLGETTVL

Konsensussequenz

Struktur


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


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 archaean member of the aldehyde dehydrogenase superfamily is a glycolytic enzyme with unusual regulatory properties J.Biol.Chem. 273: 6149-6156


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-phosphofructokinase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: characterization of an extremely thermophilic, allosterically regulated enzyme Arch.Microbiol. 177: 401-409


Hansen T, Schönheit P (2001) Sequence, expression, and characterization of the first archaeal ATP-dependent 6-phosphofructokinase, a non-allosteric enzyme related to the phosphofructokinase-B sugar kinase family, from the hyperthermophilic crenarchaeote *Aeropyrum pernix* Arch.Microbiol. 177: 62-69


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


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


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


Rigden DJ, Walter RA, Phillips SE, Fothergill-Gilmore LA (1999b) Sulphate ions observed in the 2.12 A structure of a new crystal form of S. cerevisiae phosphoglycerate mutase provide insights into understanding the catalytic mechanism J.Mol.Biol. 286: 1507-1517

References


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


Tuominen FW, Bernlohr RW (1971) Pyruvate kinase of the spore-forming bacterium Bacillus licheniformis. II. Kinetic properties J.Biol.Chem. 246: 1746-1755


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


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


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


Zhang, P., Ng, W. V., and DasSarma, S. (2003) [http://zdna2.umbi.umd.edu/cgi-bin/blast/blast.pl](http://zdna2.umbi.umd.edu/cgi-bin/blast/blast.pl)
Anhang

Sequenz der xyldh von Haloarcula marismortui aus Contig97

| 50 | ATG AAC GTT GAC GCC CTC ACG GGA GGA TTC GAC CGC GAA CAG | 103 |
| 17 | M N V D A L T G G F P D R R D W Q E Q |

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

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

| 212 | CTG GTC AGC AGC GCC GAG AAA GCC GCG GAG GTG GCA GCT GAT TCG GAG ACA |
| 71 | L V S S D R E K A A D V A A D S E T |

| 262 | GTC GAA CAC GCG ATT ACG TAC GAG GAG TCT CAC GAC GCC GCC GCA AGC GAC GCG |
| 89 | V E H A I T Y E E F P H D G A A S D A |

| 320 | ACC GAA CAG GCG ATG CCC GCC GTC GAC GCA GGG GAC CTC TGT GAA ACG ACT GTG |
| 105 | L V S S D R E K A A D V A A D S E T |

| 374 | ACG GCC GCA GAA CTG GAC ATG GCC CTG GCC GTC GAC GCA GGG GAA CTG |
| 125 | T A E L K A I L C E K P M E A T |

| 428 | ATC GAG CGC GCC GAG CGA ATG GCC GTC GAC GCA GGG GAC CTC TGT GAA ACG ACT GTG |
| 143 | I E R A E R M V E V C D E H A T L |

| 482 | ATG ATC GCC GTC TAC ATC GCC ACC CCG GCC GTC CAC CTC CGC TAC GTC GAG |
| 161 | M I A Y R M H T E P A V R R A K D L |

| 536 | ATC GAC GAG GGG TAC ATC GCC GAA CCG CTG TTT GTC GAC GCC AAC ATG ACC GAA |
| 179 | I D E G Y I G E P L F V H G N M T E |

| 590 | CCC ATT CTT GAA CTC GTT CCC GAC CCT GAC TAG TGG CCG CTG GAC GCC GGG GAA CTG |
| 197 | P I L E L V P D P D Q W R L D G E L |

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

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

| 752 | GAG GAG TTC GCC GCT ATG CCA GAC GAA CAC GCC GGC TTC CAG CTA GAT TTT CCC |
| 251 | E E F A D V P D E H G A F Q L D F P |

| 806 | GCC CAC GTG TAC GCC GTG TGT ACC GCC AGC CAG AAC GCA CAT CTG GAC GCC CAC |
| 269 | G H V Y A V C T A S Q N A H L D S H |

| 860 | ATC TCC GTA CTC GGG ACA GAG GCC AAC ATG CTC GCC CAG TAC CTC TCC CAC GAA CCG GCC TGC TAC CCC |
| 287 | I S V L G T E G K V R V E P A F Y P |

| 914 | TGG GAC GAC CGC GCC CTC CAG TGT TCT CAC GAG GGG ACG ACG GTC GAG ATC GAC |
| 305 | W D D R A L Q L S H E G T T V E I D |

| 968 | TTC GAA CAG GCC GAG ATG CAG GAA GAG GTG TAC TTT GCC CAG TGC CTG 1021 |
| 323 | F E Q I D Q M E E E F Y F A H C L |

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

| 1076 | ACG ATC AAC TCC GTC TAC GGA GCA TCC GCC GAG GAC 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 |

| 1129 | TGA 1132 |
| 377 | * 378 |
Abkürzungen

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

**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 1993 – September 1999 Studium der Biologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
  Juni 1998 Diplomprüfung in den Fächern Mikrobiologie, Botanik und Biochemie
  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
  Seit August 1999 wissenschaftliche Mitarbeiterin bei Prof. Dr. P. Schönheit am Institut für Allgemeine Mikrobiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.