

**Neuartige Glucose-6-Phosphat Isomerasen und
Glucosamin-6-Phosphat Deaminasen
in Archaea**



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

vorgelegt von
Bettina Schlichting

Kiel 2006

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von März 2003 bis Dezember 2006 am Institut für Allgemeine Mikrobiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel im Labor von Herrn Prof. Dr. P. Schönheit durchgeführt.

Referent: Prof. Dr. P. Schönheit

Korreferent: Prof. Dr. R.A. Schmitz-Streit

Tag der mündlichen Prüfung: 06.02.2007

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 07.02.2007

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.

.....
(Bettina Schlichting)

Ein Teil der während der Doktorarbeit erzielten Ergebnisse ist in den folgenden Artikeln veröffentlicht worden bzw. wird zur Veröffentlichung eingereicht:

Hansen T, Schlichting B, Felgendreher M, Schönheit P (2005) Cupin-type phosphoglucose isomerases (Cupin-PGIs) constitute a novel metal-dependent PGI family representing a convergent line of PGI evolution. *J. Bacteriol.* 187(5):1621-1631

Schlichting B, Schönheit P. Characterization of a novel phosphoglucose isomerase in the methanogenic archaea *Methanothermobacter thermoautotrophicus* and *Methanosphaera stadtmanae*.

Schlichting B, Schönheit P. Unusual glucosamine 6-phosphate deaminase in *Pyrococcus furiosus* and *Thermotoga maritima*.

Inhalt

1	Zusammenfassung	3
2	Summary	5
3	Einleitung	7
4	Material und Methoden	15
4.1	Verwendetes Material	15
4.1.1	Chemikalien und Feinchemikalien	15
4.1.2	Organismen und Oligonucleotide	15
4.2	Anzucht von <i>Methanothermobacter thermoautotrophicus</i> Stamm ΔH	17
4.3	Molekularbiologische Methoden	18
4.3.1	Computergestützte Sequenzanalysen	18
4.3.2	Isolierung von genomischer DNA	18
4.3.3	Polymerase Kettenreaktion	18
4.3.4	Konzentrationsbestimmung und Reinheitsanalyse von DNA	21
4.3.5	Klonierung von PCR-Produkten in einen Vektor	22
4.3.6	Sequenzierung	22
4.3.7	Transformation	23
4.3.8	RT-PCR	24
4.3.9	Mutagenese	25
4.3.10	λDE3-Lysogenisierung	27
4.4	Proteinbiochemische Methoden	27
4.4.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	27
4.4.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	27
4.4.3	Bestimmung des apparenten Molekulargewichtes von nativen Proteinen	28
4.4.4	Dialyse	29
4.4.5	Ultrafiltration	29
4.5	Expression und Reinigung von rekombinanten Enzymen	29
4.5.1	Expression	29
4.5.2	Reinigung der rekombinanten Proteine	31
4.5.3	Expression und Reinigung von Mk0918	34
4.6	Charakterisierung der rekombinanten Enzyme und PGI-Aktivität im Zellextrakt von <i>Methanothermobacter thermoautotrophicus</i>	35
4.6.1	Charakterisierung der rekombinanten Glucose-6-Phosphat Isomerasen (HPis)	35
4.6.2	PGI-Aktivität in Zellextrakt von <i>M. thermoautotrophicus</i>	37
4.6.3	Charakterisierung der rekombinanten Glucose-6-Phosphat Isomerase (PGI) aus <i>T. maritima</i>	37
4.6.4	Enzymmessung der rekombinanten Glutamin:Fructose-6-Phosphat Transaminase (GlmS) aus <i>M. thermoautotrophicus</i>	38
4.6.5	Charakterisierung der rekombinanten Glucosamin-6-Phosphat Deaminasen (GPDA) aus <i>P. furiosus</i> und <i>T. maritima</i>	38
4.6.6	Enzymmessung des rekombinanten Proteins Mk0918	40

4.7	Komplementation von <i>pgi</i> -defizienten <i>E. coli</i> MG1655	40
4.8	Metallabhängigkeit der Cupin-Typ PGIs (cPGIs) aus <i>Pyrococcus furiosus</i> , <i>Archaeoglobus fulgidus</i> , <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>typhimurium</i> und <i>Ensifer meliloti</i>	41
5	Ergebnisse	42
5.1	Untersuchungen zur Metallabhängigkeit von Cupin-Typ Glucose-6-Phosphat Isomerasen (cPGIs) aus Archaea und Bacteria	43
5.1.1	Metallreaktivierung von cPGIs in <i>P. furiosus</i> , <i>A. fulgidus</i> , <i>S. enterica</i> serovar <i>typhimurium</i> und <i>E. meliloti</i>	43
5.2	Neuartige Glucose-6-Phosphat Isomerasen (HPIs) in Archaea und Bacteria	46
5.2.1	Nachweis der <i>in vivo</i> -Transkription des ORFs MTH860 aus <i>M. thermoautotrophicus</i> mittels RT-PCR	46
5.2.2	Reinigung der rekombinanten HPIs.....	47
5.2.3	Biochemische Charakterisierung der rekombinanten HPIs	49
5.2.4	Komplementation einer <i>pgi</i> -Deletionsmutante von <i>E. coli</i> durch HPI	54
5.2.5	Ortsspezifische Mutagenese der HPI von <i>M. thermoautotrophicus</i>	56
5.3	ORF MK0918 in <i>Methanopyrus kandleri</i>	58
5.3.1	Nachweis der <i>in vivo</i> -Transkription des ORFs MK0918 mittels RT-PCR.....	58
5.4	Glucose-6-Phosphat Isomerase (PGI) in <i>Thermotoga maritima</i>	59
5.5	Glutamin:Fructose-6-Phosphat Transaminase (GlmS) von <i>Methanothermobacter thermoautotrophicus</i>	63
5.5.1	Reinigung und Aktivität der rekombinanten GlmS	63
5.5.2	Nachweis der <i>in vivo</i> -Transkription des <i>glmS</i> -Gens mittels RT-PCR	64
5.6	Glucosamin-6-Phosphat Deaminase (GPDA) in <i>Pyrococcus furiosus</i> und <i>Thermotoga maritima</i>	65
5.6.1	Reinigung der rekombinanten GPDAs	65
5.6.2	Biochemische Charakterisierung der rekombinanten GPDAs.....	66
5.6.3	Ortsspezifische Mutagenese der GPDA von <i>P. furiosus</i>	70
6	Diskussion	72
6.1	Metallabhängigkeit der Cupin-Typ Glucose-6-Phosphat Isomerasen	72
6.2	Glutamin:Fructose-6-Phosphat Transaminase aus <i>Methanothermobacter thermoautotrophicus</i>	75
6.3	Homologe zur Isomerase-Domäne der Glutamin:Fructose-6-Phosphat Transaminase	79
6.3.1	Glucose-6-Phosphat Isomerasen.....	79
6.3.2	Archaeelle Glucosamin-6-Phosphat Deaminasen (GPDAs).....	85
6.3.3	Funktion der Glucose-6-Phosphat Isomerasen und Glucosamin-6-Phosphat Deaminasen	88
7	Literatur	94
8	Abkürzungen	105
	Danksagung	108
	Lebenslauf	109

1 Zusammenfassung

Die Glucose-6-Phosphat Isomerase (PGI) katalysiert die reversible Isomerisierung zwischen Glucose-6-Phosphat (G6P) und Fructose-6-Phosphat (F6P) ($G6P \rightleftharpoons F6P$). Das Enzym ist sowohl Bestandteil der Glykolyse als auch der Gluconeogenese bei Archaea und Bacteria. Bislang sind drei verschiedene PGI-Typen bekannt: die klassische PGI bei Bacteria und Eukarya, die bifunktionelle Phosphoglucose/Phosphomannose-Isomerase (PGI/PMI), die v.a. bei Crenarchaeota zu finden ist, und die Cupin-Typ PGI (cPGI), die eine konvergente Entwicklungslinie darstellt. cPGIs kommen z.B. in *Pyrococcus furiosus*, *Archaeoglobus fulgidus* und *Methanosarcina mazei* vor. Sequenzvergleiche weisen bei den Cupin-Typ PGIs auf eine Metallbindestelle hin; eine Metallabhängigkeit wurde jedoch bisher noch nicht nachgewiesen. In dieser Arbeit sollte deshalb untersucht werden, ob die Aktivität der cPGIs metallabhängig ist.

In den vollständig sequenzierten Genomen der methanogenen Archaea *Methanothermobacter thermoautotrophicus* ΔH und *Methanosphaera stadtmanae* fanden sich keine Homologe zu den drei bekannten PGI-Typen. Dagegen enthielten diese Organismen ORFs, deren codierte Proteine Homologien zur Isomerase-Domäne der Glutamin:Fructose-6-Phosphat Transaminase (GlmS) aufweisen. Dieses Enzym koppelt die Isomerisierung von F6P zu G6P (Reaktion der Isomerase-Domäne) an die Übertragung einer Aminogruppe von Glutamin auf G6P (Reaktion der Glutaminase-Domäne). Dabei entstehen Glutamat und Glucosamin-6-Phosphat (NG6P). In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob diese ORFs für neuartige funktionelle Glucose-6-Phosphat Isomerasen (im Folgenden als HPIs, Hexosephosphat Isomerasen, bezeichnet) codieren. Weiterhin sollten auf der Basis von Sequenzvergleichen homologe Enzyme in Genomen anderer Organismen identifiziert und charakterisiert werden.

Metallabhängigkeit der Cupin-Typ Phosphoglucose Isomerasen

Behandlung der cPGIs aus *P. furiosus*, *A. fulgidus* und *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* mit dem Chelatbildner EDTA führte zu einem vollständigen Aktivitätsverlust der Proteine. Durch Zugabe verschiedener zweiwertiger Kationen, insbesondere Fe^{2+} und Ni^{2+} , ließ sich die Aktivität wiederherstellen. Diese Daten zeigen, dass cPGIs metallabhängig sind, eine neuartige Eigenschaft, die diese von den klassischen PGIs unterscheidet.

Charakterisierung neuartiger Glucose-6-Phosphat Isomerasen (HPI)

Die ORFs MTH860 aus *M. thermoautotrophicus* und Msp_1054 aus *Ms. stadtmanae*, die zu der Isomerase-Domäne der GlmS homolog sind, wurden exprimiert und als funktionelle HPIs charakterisiert. Die rekombinanten Proteine sind Dimere einer Größe von ca. 80 kDa mit Temperaturoptima von 74°C bzw. 37°C und entsprechenden Thermostabilitäten. Mit F6P als Substrat wiesen die rekombinanten Proteine Aktivitäten von 8.7 (MTH860) bzw. 6.2 U/mg (Msp_1054) auf, die entsprechenden K_m -Werte wurden auf 0.3 bzw. 3 mM bestimmt. Die katalytische Effizienz mit G6P als Substrat war deutlich niedriger, was auf die G6P-Bildung

als bevorzugte Reaktionsrichtung schließen lässt. Mikromolare Konzentrationen von Erythrose-4-Phosphat, 6-Phosphogluconat und Sorbitol-6-Phosphat, Inhibitoren der klassischen PGIs, führten zu einer kompetitiven Inhibition des Enzyms aus *M. thermoautotrophicus*. Austausch eines konservierten Glutamats mittels ortsspezifischer Mutagenese führte zu einem deutlichen Aktivitätsverlust des Enzyms aus *M. thermoautotrophicus*, was auf eine katalytische Funktion dieser Aminosäure hindeutet. Rohextrakt dieses Organismus enthielt PGI-Aktivität, die Transkription des ORFs MTH860 *in vivo* wurde durch RT-PCR Experimente nachgewiesen. Die klonierten HPIs aus *M. thermoautotrophicus* und *Ms. stadtmanae* konnten das Fehlen eines PGI-codierenden Gens einer Mutante von *E. coli* komplementieren. Diese Daten zeigen, dass es sich bei den untersuchten Proteinen aus *M. thermoautotrophicus* und *Ms. stadtmanae* um funktionelle PGIs handelt, die einer neuartigen PGI-Familie angehören. Zur HPI homologe Proteine in *Thermoplasma acidophilum*, *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* und *Thermotoga maritima* zeigten wie auch die Enzyme aus *M. thermoautotrophicus* und *Ms. stadtmanae* PGI-Aktivität, wenn auch z.T. nur sehr geringe. In den Genomen dieser Organismen sind jedoch weitere PGIs annotiert (PGI/PMI bei *Tp. acidophilum*, klassische PGIs bei *T. maritima* und *S. enterica*). Die klassische PGI aus *T. maritima* wurde in dieser Arbeit ebenfalls kloniert und charakterisiert. Das Enzym hat eine deutlich höhere Aktivität als die untersuchten HPIs und stellt damit die funktionelle PGI *in vivo* bei *T. maritima* dar. Außerdem wurde der als GlmS annotierte ORF MTH171 aus *M. thermoautotrophicus* kloniert, exprimiert und gereinigt. Dieses Protein zeigte Aktivität einer Glutamin:Fructose-6-Phosphat Transaminase. Es handelt sich damit um die erste GlmS in Archaea, für die Aktivität gezeigt wurde.

Charakterisierung von Glucosamin-6-Phosphat Deaminasen

Das durch den ORF PF0362 codierte Protein aus *P. furiosus* zeigte keine PGI Aktivität. Für einen homologen ORF (TK1755) aus dem mit *Pyrococcus* verwandten Archaeon *Thermococcus kodakaraensis* wurde gezeigt, dass dieser für eine Glucosamin-6-Phosphat Deaminase codiert (GPDA) (Tanaka et al. 2005). Dieses Enzym katalysiert die Deaminierung von NG6P zu F6P und Ammonium. TK1755 ist Bestandteil eines am Chitinabbau beteiligten Operons, das sich in ähnlicher Form auch bei *P. furiosus* (ORFs PF0358 - PF0363) und bei *T. maritima* (ORFs TM0810 - TM0813) findet. Glucosamin-6-Phosphat Deaminase-Aktivität wurde sowohl für das Protein aus *P. furiosus* als auch für das durch den ORF TM0813 codierte Protein aus *T. maritima* gefunden. Die Proteine sind Homodimere, zeigen hohe Aktivität mit NG6P als Substrat (36 bzw. 50 U/mg), ein hohes Temperaturoptimum (95 bzw. 85°C) und gute Thermostabilität. Austausch eines konservierten Glutamats mittels ortsspezifischer Mutagenese führte zu einem deutlichen Aktivitätsverlust des Enzyms aus *P. furiosus*, was auf eine katalytische Funktion dieser Aminosäure hindeutet. Die Daten zeigen, dass die HPI-homologen ORFs in *P. furiosus* und *T. maritima* für funktionelle Glucosamin-6-Phosphat Deaminasen codieren. Diese Proteine stellen einen neuartigen archaeellen GPDA-Typ dar, der sich von den bisher bekannten GPDA aus Bacteria und Eukarya signifikant unterscheidet.

2 Summary

Phosphoglucose isomerase (PGI) catalyzes the reversible isomerization of glucose 6-phosphate (G6P) to fructose 6-phosphate (F6P) ($G6P \rightleftharpoons F6P$). The enzyme plays a central role in glycolysis as well as gluconeogenesis in archaea and bacteria. To this time, three different types of PGI are known: classical PGI in bacteria and eukarya, bifunctional phosphoglucose/phosphomannose isomerase (PGI/PMI), found mostly in crenarchaeota, and cupin-type PGI (cPGI), being a convergent line of evolution. cPGIs are found i.e. in *Pyrococcus furiosus*, *Archaeoglobus fulgidus* and *Methanosarcina mazei*. Sequence comparison suggested the presence of a metal-binding site in cupin-type PGIs, but metal-dependence of the enzyme has not been proven yet. Thus, in this thesis the metal-dependency of cPGIs was studied.

The complete sequenced genomes of the methanogenic archaea *Methanothermobacter thermoautotrophicus* ΔH and *Methanosphaera stadtmanae* did not contain any homologs to one of the three known types of PGI. On the other hand, the genome of each of these organisms contained ORFs coding for proteins with homologies to the isomerase domain of glutamine:fructose 6-phosphate transaminase (GlmS). This enzyme couples the isomerization of F6P to G6P (reaction catalyzed by the isomerase domain) to the transfer of an amino group of glutamine to G6P (reaction catalyzed by the glutaminase domain). The resulting products are glutamate and glucosamine 6-phosphate (NG6P). Thus, in this thesis the coding function of these ORFs for functional Phosphoglucose Isomerases (HPIs, hexosephosphate isomerases) was to be studied. In addition, homologous enzymes from other organisms were to be identified, using sequence comparisons, and characterized.

Metal dependence of cPGI activity

EDTA treatment of cPGIs from *P. furiosus*, *A. fulgidus* and *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* resulted in a complete loss of catalytic activity. Activity could be restored by addition of different divalent cations, especially Fe^{2+} and Ni^{2+} . These data prove metal dependency of cPGIs, a novel feature of PGIs differentiating them from classical PGIs.

Characterization of novel phosphoglucose isomerases (HPI)

ORFs MTH860 from *M. thermoautotrophicus* and Msp_1054 from *Ms. stadtmanae*, which are homologous to the isomerase domain of GlmS, were expressed in *E. coli* and characterized as coding for functional PGIs. The recombinant proteins are homodimeric with apparent native molecular masses of about 80 kDa, their temperature optima were determined to be 74°C or 37°C respectively, with matching thermostability. Specific activity using F6P as a substrate was determined as 8.7 (MTH860) and 6.2 U/mg (Msp_1054), the respective K_m values were 0.3 and 3 mM. Catalytic efficiency was much lower with G6P as substrate, indicating the isomerization of F6P to G6P as the preferred direction. The enzyme from *M.*

thermoautotrophicus was competitively inhibited by micromolar concentrations of erythrose 4-phosphate, 6-phosphogluconate and sorbitol 6-phosphate, which are known inhibitors of classical PGIs. Substitution of a conserved glutamate by alanine in the HPI from *M. thermoautotrophicus* via site-directed mutagenesis led to a significant loss of activity, suggesting a catalytic function of this amino acid. By using RT-PCR experiments the *in vivo* transcription of ORF MTH860 was demonstrated. Cloned PGIs from *M. thermoautotrophicus* and *Ms. stadtmanae* were able to complement an *E. coli pgi* deficiency mutant. These data show that the studied proteins from *M. thermoautotrophicus* and *Ms. stadtmanae* are functional PGIs in these organisms, which belong to a novel family of PGIs. Like the enzymes from *M. thermoautotrophicus* and *Ms. stadtmanae*, HPI homologous proteins in *Thermoplasma acidophilum*, *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* and *Thermotoga maritima* showed PGI activity, even if only on a very small scale. But all of these organisms do contain genes coding for at least one of the known three types of PGI (PGI/PMI in *Tp. acidophilum*, classical PGIs in *T. maritima* and *S. enterica*, cPGI in *S. enterica*). For comparison, the classical PGI from *T. maritima* was cloned and characterized. Activity of this enzyme was much higher than activity of the studied HPI homolog, which suggested that the classical PGI is the functional enzyme *in vivo* rather than the HPI. ORF MTH171 from *M. thermoautotrophicus*, which was annotated as coding for a GlmS, was cloned, expressed and purified as well. The protein showed no PGI activity, but activity of a glutamine:fructose 6-phosphate transaminase. This is the first reported activity of this enzyme in the domain of archaea.

Characterization of glucosamine 6-phosphate deaminases (GPDA)

ORF PF0362 from *P. furiosus* did not code for a protein with PGI activity. A homolog to this ORF (TK1755) from *Thermococcus kodakaraensis*, a close relative to *P. furiosus*, was shown to code for an archaeal glucosamine 6-phosphate deaminase (GPDA) (Tanaka et al. 2005). This enzyme catalyzes the reversible deamination of NG6P to F6P and Ammonia. TK1755 is part of an operon which participates in chitin degradation. This, in similar fashion, is also found in *P. furiosus* (ORFs PF0358 - PF0363) and *T. maritima* (ORFs TM0810 - TM0813). The protein from *P. furiosus* and the protein from *T. maritima* encoded by ORF TM0813 both exhibited activity of glucosamine 6-phosphate deaminase. Both Proteins are homodimeric and very active with NG6P as substrate (36 and 50 U/mg respectively), and they show high temperature optima (95 and 85°C respectively) as well as good thermostability. Substitution of a conserved glutamate by alanine in the GPDA from *P. furiosus* via site-directed mutagenesis led to a significant loss of activity, suggesting a catalytic function of this amino acid. These data show that HPI homologous ORFs in *P. furiosus* and *T. maritima* code for functional glucosamine 6-phosphat deaminases. These proteins constitute a novel type of GPDA, which exhibits considerable differences to classical GPDAs from bacteria and eukarya.

3 Einleitung

Sequenzvergleiche von 16S-rRNA und 18S-rRNA aus prokaryotischen und eukaryotischen Organismen führten zu einem phylogenetischen Stammbaum des Lebens (Abbildung 1), nach dem sich die Gesamtheit der Organismen in die drei Domänen Eukarya, Bacteria und Archaea gliedert (Woese 1987; Woese et al. 1990).

Die Archaea unterscheiden sich von den Bacteria und Eukarya neben den 16S-rRNA Sequenzmustern durch zahlreiche molekulare und biochemische Merkmale. Die Art des Zellwandaufbaus und der Cytoplasmamembran ist für die Archaea charakteristisch. Die Zellwand enthält weder Muraminsäure noch D-Aminosäuren und kann Proteine, Pseudomurein, Polysaccharide oder Methanochondroitin enthalten (Kandler und König 1998). Die Plasmamembran besteht anstelle von Glycerinestern aus Di- oder Tetraetherlipiden (De Rosa und Gambacorta 1988; Langworthy und Pond 1986). Sie trägt zur Stabilität bei, die für die Besiedlung extremer Standorte nötig ist. Einige Charakteristika der Archaea ähneln denen der Eukarya, z.B. der Transkriptionsmodus (Thomm 1996), das Vorhandensein von Histonproteinen (Sandman und Reeve 2001) und das Vorkommen von Introns in tRNAs (Kaine 1990).

Viele Archaea besiedeln Biotope mit extrem hohen Temperaturen, extremen pH-Werten oder extrem hohen Salzkonzentrationen. Die Lebensräume der hyperthermophilen Archaea, also der an hohen Temperaturen angepassten Organismen mit einem Wachstumsoptimum über 80°C (Stetter 1999), sind oft in vulkanisch aktiven Zonen zu finden: in marinen Hydrothermalquellen, submarin erhitzten Sedimenten und terrestrischen Solfataren. Aus der Domäne der Bacteria sind nur wenige hyperthermophile Spezies bekannt, die den *Aquificales* und *Thermotogales* angehören (Blöchl et al. 1995; Huber und Stetter 1992).

Die Domäne der Archaea wird in die Phyla der Crenarchaeota, Euryarchaeota, Korarchaeota und Nanoarchaeota eingeteilt (Barns et al. 1996; Huber et al. 2002; Woese et al. 1990). Ein Mitglied der Korarchaeota konnte bislang noch nicht in Reinkultur isoliert werden, die Existenz dieses Phylums wurde aus Analysen von Umwelt DNA-Proben geschlussfolgert (Barns et al. 1996). Das Phylum der Nanoarchaeota besteht aus bisher nur einem Organismus, dem hyperthermophilen Symbionten *Nanoarchaeum equitans*. Dieser Organismus lebt fest angeheftet an seinen Wirt, ein Mitglied der crenarchaeellen Gattung *Ignicoccus* (Huber et al. 2002). Die Crenarchaeota sind phylogenetisch relativ homogen und zum großen Teil hyperthermophil. In diese Gruppe gehören schwefelabhängige Ordnungen wie z.B. die *Sulfolobales* oder die *Desulfurococcales* (Woese 1987). Die Euryarchaeota stellen eine phänotypisch heterogene Gruppe dar. Sie weisen in Bezug auf Lebensraum und Physiologie sehr vielfältige Eigenschaften auf. Neben mesophilen Organismen sind thermophile Organismen der Ordnungen *Archaeoglobales*, *Thermoplasmatales* und *Thermococcales*, extrem halophile Organismen und die methanogenen Archaea zu finden.

Die hyperthermophilen Bacteria und Archaea bilden im phylogenetischen Stammbaum die tiefsten Abzweigungen (Abbildung 1). Sie werden deshalb auch als ursprüngliche Organismen angesehen. Somit sind vermutlich auch ihre Stoffwechsellösungen ursprünglich. Es wird angenommen, dass sich das Leben unter thermophilen Bedingungen entwickelt hat und sich in den bis heute noch vorhandenen extremen Biotopen aufgrund relativ konstanter Umweltbedingungen nur sehr langsam weiterentwickelt (Stetter et al. 1990; Wächtershäuser 1988; Wächtershäuser 1992). Damit sind die hyperthermophilen Organismen für die Forschung von großem Interesse. In den vorwiegend anaeroben Biotopen sind vor allem Wasserstoff, Kohlendioxid, Schwefel und Schwefelverbindungen zu finden. Deshalb sind chemolithoautotrophe Stoffwechseltypen weit verbreitet. Zu ihnen gehört die Reduktion von Schwefel zu H₂S (dissimilatorische Schwefelreduktion, z.B. *Pyrodictium*), die Reduktion von Sauerstoff zu Wasser mit entweder H₂ (Knallgasreaktion, z.B. *Aquifex*) oder mit schwefelhaltigen Verbindungen als Elektronendonatoren (aerobe Atmung, z.B. *Aquifex*), die Reduktion von Nitrat zu N₂ oder NH₄⁺ (Denitrifikation, z.B. *Pyrobaculum* und *Pyrolobus*) und die Reduktion von CO₂ zu Methan (Methanogenese, ausschließlich bei methanogenen Archaea) (Blöchl et al. 1997; Danson 1988; Schönheit und Schäfer 1995; Stetter 1996; Wächtershäuser 1992).

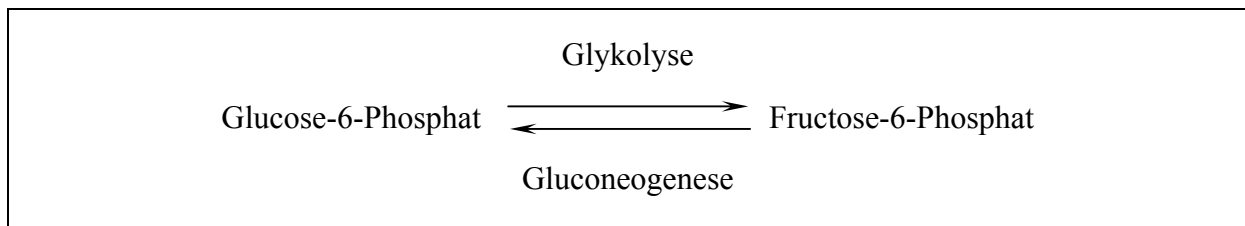
Methanogene Archaea sind hochspezialisierte Organismen, die zur Energiegewinnung C₁-Verbindungen wie CO₂ / H₂, Formiat, Methanol und Methylamine sowie die C₂-Verbindung Acetat verwenden können (Thauer 1998). Die methanogenen Archaea bilden eine phylogenetisch diverse Gruppe strikt anaerober Organismen. Die Diversität dieser Gruppe spiegelt sich wider in der Zusammensetzung ihrer Zellwände, bei denen z.B. Methanochondroitin, Proteinzellwände und Pseudomurein zu finden ist (Kandler und König 1998; König et al. 1994), und in den unterschiedlichen Wachstumsbedingungen der Organismen. Man findet psychrophile (z.B. *Methanogenium frigidum*), mesophile (die meisten Methanogenen, z.B. auch *Methanosphaera stadtmanae*), thermophile (z.B. *Methanothermobacter thermoautotrophicus*) und hyperthermophile Spezies (z.B. *Methanopyrus kandleri* und *Methanocaldococcus jannaschii*) (Burggraf et al. 1991; Franzmann et al. 1997; Jones et al. 1983; Miller und Wolin 1985; Zeikus und Wolfe 1972). Bislang wurden über 140 Arten beschrieben (<http://www.bacterio.cict.fr/>), die in fünf Ordnungen eingeteilt werden: *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanomicrobiales*, *Methanopyrales* und *Methanosarcinales* (Balch und Wolfe 1981a, b, c; Boone et al. 2002; Huber und Stetter 2002). Von diesen Ordnungen sind nur die *Methanosarcinales* in der Lage, neben CO₂ / H₂ auch Acetat, Methanol und andere methylierte C₁-Verbindungen (z.B. Methylamine und methylierte Thiole) als Wachstumssubstrate zu nutzen. Die Mitglieder der anderen vier Ordnungen sind obligat hydrogenotrophe Organismen, die fast ausschließlich Wasserstoff und CO₂ zur Energiegewinnung nutzen können (Deppenmeier 2002; Thauer 1998). Eine Ausnahme bildet der auch in dieser Arbeit untersuchte Organismus *Methanosphaera stadtmanae*, der die H₂-abhängige Reduktion von Methanol zu Methan katalysiert und nicht in der Lage ist, CO₂ zu reduzieren. Biosynthese von Zellbestandteilen

erfolgt bei *M. stadtmanae* ausschließlich aus Acetat (Fricke et al. 2006; Miller und Wolin 1985). An der Methanogenese sind eine Reihe ungewöhnlicher Cofaktoren beteiligt: Methanofuran, Tetrahydromethanopterin, Coenzym M, Coenzym B, Faktor F₄₃₀ und der Faktor F₄₂₀ (methanogener Faktor). Das Vorhandensein des Faktors F₄₂₀ führt zu einer charakteristischen blaugrünen Fluoreszenz. Diese Cofaktoren dienen z.T. als C-Überträger im Zuge der Reduktion von CO₂ (bzw. der anderen Substrate) und z.T. der Übertragung von Elektronen, und ermöglichen die schrittweise Reduktion des Substrates zu Methan. Die Energiegewinnung während der Methanogenese erfolgt durch Bildung eines elektrochemischen Protonengradienten, der von ATPasen zur Bildung von ATP genutzt wird (Deppenmeier 2002; Thauer 1998). Außerdem werden im Zuge der Methanogenese auch Na⁺-Gradienten aufgebaut, die die Energie für den endergonen ersten Schritt der Methanogenese, die Bindung von CO₂ an Methanofuran, bereitstellen (Schönheit 1993). Mittlerweile liegen die vollständigen Genomsequenzen von 11 methanogenen Archaea vor (<http://gib.genes.nig.ac.jp/>), die Sequenzierung von über 15 weiteren Genomen dauert zur Zeit noch an (<http://www.genomesonline.org/gold.cgi?want=Archaeal+Ongoing+Genomes>). Von diesen Genomsequenzen wird eine weitere Aufklärung der Stoffwechselwege in diesen Organismen erwartet.

Neben chemolithoautotrophen Stoffwechseltypen sind viele Archaea befähigt, einen chemoorganoheterotrophen Stoffwechsel durchzuführen, wobei vor allem Proteine und Zucker als Substrate dienen. Die Abbauwege der Zucker wurden in den letzten Jahren intensiv untersucht. Vergleichende Analysen ergaben, dass in allen bisher untersuchten Archaea der Glucoseabbau nicht über die klassischen glykolytischen Abbauwege wie Embden-Meyerhof-Weg und Entner-Doudoroff-Weg erfolgt, sondern über modifizierte Formen dieser Wege (Schönheit und Schäfer 1995; Siebers und Schönheit 2005; Verhees et al. 2003). Die Modifikationen beziehen sich vor allem auf die Schlüsselenzyme der Abbauwege. Die aeroben Archaea *Sulfolobus*, *Thermoplasma* und *Picrophilus* setzen Glucose über einen modifizierten, nicht-phosphorylierten Entner-Doudoroff-Weg um (Budgen und Danson 1986; De Rosa et al. 1984; Reher und Schönheit 2006; Selig et al. 1997; Smith et al. 1989). Dabei wird Glucose über nicht-phosphorylierte Intermediate zu Glycerinaldehyd oxidiert, welches anschließend über eine spezifische Glycerinaldehyd Dehydrogenase und eine spezifische Kinase zu 2-Phosphoglycerat umgesetzt wird. Für die extrem halophilen Archaea wurde gezeigt, dass Glucose über einen modifizierten, partiell-phosphorylierten Entner-Doudoroff-Weg zu Pyruvat verstoffwechselt wird, während Fructose über einen modifizierten Embden-Meyerhof-Weg umgesetzt wird (Johnsen et al. 2001). Die anaeroben Archaea bauen Glucose über modifizierte Embden-Meyerhof-Wege ab. Die Modifikationen beziehen sich auf die Glucokinase (GK), die Phosphofruktokinase (PFK), die Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) oxidierenden Enzyme und die Pyruvat Kinase (PK) (Schönheit und Schäfer 1995; Selig et al. 1997; Siebers und Schönheit 2005). Anstelle der klassischen ATP-abhängigen GKs und PFKs verwenden die Euryarchaeota *Thermococcus* und *Pyrococcus* ADP-abhängige Enzyme (Kengen et al. 2001). Für die Crenarchaeota

Aeropyrum pernix und *Pyrobaculum aerophilum* wurden ATP-abhängige GKs und PFKs beschrieben, die sich jedoch von denen der Bacteria und Eukarya unterscheiden (Hansen et al. 2002a; Hansen und Schönheit 2001). Die Umsetzung von GAP zu 3-Phosphoglycerat erfolgt bei den Archaea je nach Organismus nicht wie bei Bacteria und Eukarya über die zwei Enzyme Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) und Phosphoglycerat Kinase, sondern über neuartige Enzyme, die GAP direkt zu 3-Phosphoglycerat umsetzen. In *A. pernix* und *Thermoproteus tenax* findet sich eine nicht-phosphorylierende GAPDH, wohingegen bei *P. furiosus* und *Pyrobaculum aerophilum* eine GAP:Ferredoxin Oxidoreductase zu finden ist (Siebers und Schönheit 2005). Die Pyruvat Kinasen der Archaea zeigen im Gegensatz zu ihren bakteriellen Homologen eingeschränkte regulatorische Eigenschaften. Klassische heterotrope allosterische Effektoren von PK aus Bacteria und Archaea haben keinen Einfluss auf die Aktivität der archaellen PK (Johnsen et al. 2003).

Auch die Glucose-6-Phosphat Isomerasen (PGI) der Archaea unterscheiden sich von ihren bakteriellen und eukaryotischen Homologen. Glucose-6-Phosphat Isomerase (EC 5.3.1.9) ist ein zentrales Enzym des Zuckerstoffwechsels. Es katalysiert die reversible Isomerisierung von Fructose-6-Phosphat (F6P) aus Glucose-6-Phosphat (G6P) und ist damit von entscheidender Bedeutung für den Embden-Meyerhof-Weg (Glykolyse) in Bacteria und Eukarya, die modifizierten Embden-Meyerhof-Wege in Archaea und die Gluconeogenese.



Fast alle PGIs in Bacteria und Eukarya gehören einer Familie an, zu der in Archaea nur wenige Homologe gefunden wurde. Diese klassischen PGIs wurden aus einer Vielzahl von Organismen isoliert und charakterisiert (Charles und Lee 1980; Froman et al. 1989; Muramatsu und Nosoh 1971; Noltmann 1972), für viele dieser Enzyme, z.B. aus dem Menschen und aus der Maus, liegen Kristallstrukturen vor (Graham Solomons et al. 2004; Read et al. 2001). Die Proteine sind gekennzeichnet durch zwei Signaturmuster in ihrer Aminosäuresequenz, die bei allen PGIs konserviert sind. Homologe zu den klassischen PGIs wurden bei den Archaea in drei Organismen identifiziert: *Haloarcula marismortui*, *Halobacterium* NRC1 und *Methanocaldococcus jannaschii* (Rudolph et al. 2004) (Abbildung 1). In den Archaea *Aeropyrum pernix*, *Thermoplasma acidophilum* und *Pyrobaculum aerophilum* wurden bifunktionelle PGIs charakterisiert, die neben der Isomerisierung von G6P zu F6P auch die reversible Isomerisierung von Mannose-6-Phosphat zu F6P mit gleicher katalytischer Effizienz katalysieren (Hansen et al. 2004b; Hansen et al. 2004c). Dies ist ungewöhnlich; in Bacteria werden diese beiden Reaktionen normalerweise von zwei verschiedenen Enzymen katalysiert: einer PGI und einer Phosphomannose Isomerase (PMI). Mannose-6-Phosphat ist außerdem als Inhibitor von klassischen PGIs beschrieben (Concepcion et al. 1999). Homologe zur bifunktionellen PGI/PMI finden sich auch in den

Archaea *Sulfolobus solfataricus* und *Picrophilus torridus* sowie dem Bacterium *Aquifex aeolicus* (Abbildung 1). Für das bifunktionelle Enzym aus *Pyrobaculum aerophilum* wurde die Kristallstruktur ermittelt (Swan et al. 2004). Dabei zeigte sich, dass die PGI/PMIs eine ähnliche Struktur wie die klassischen PGIs aufweisen. Beide Proteinfamilien haben gemeinsame konservierte Reste, für die essentielle Funktionen bei der Katalyse postuliert wurden, so z.B. ein Histidin (Ringöffnung), ein Lysin (Ringöffnung), ein Arginin (Stabilisierung eines bei der Katalyse entstehenden Intermediats) und ein Glutamat (Protonentransfer im Substrat) (Cordeiro et al. 2003; Hansen et al. 2004c). Damit gehören sowohl die klassischen PGIs als auch die bifunktionellen PGI/PMIs in eine PGI-Superfamilie (Bairoch et al. 1996; Cordeiro et al. 2003; Hansen et al. 2004c). Zur Zeit werden über 1000 Proteinsequenzen dieser PGI-Superfamilie zugeordnet (<http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Pfam/getacc?PF00342>).

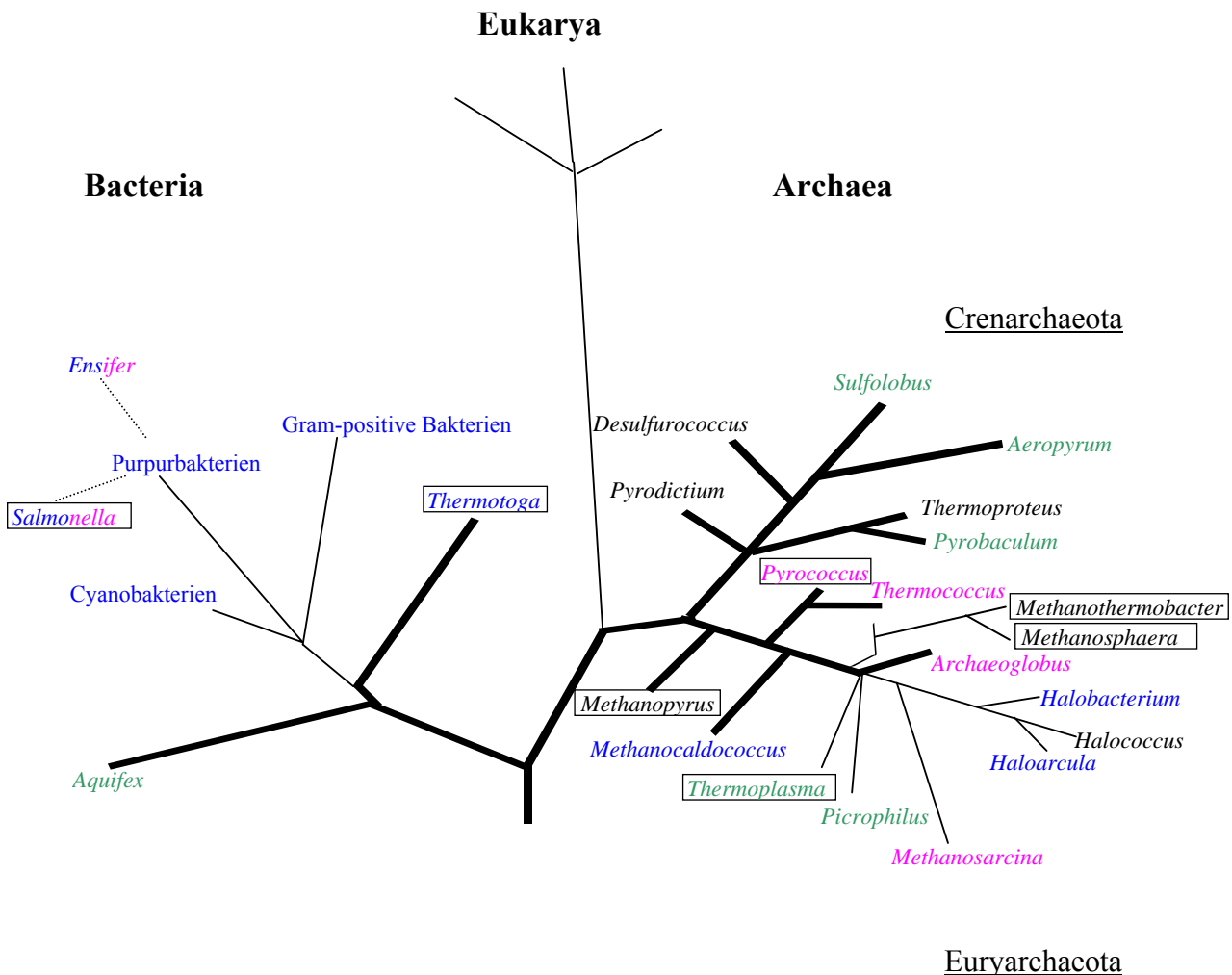
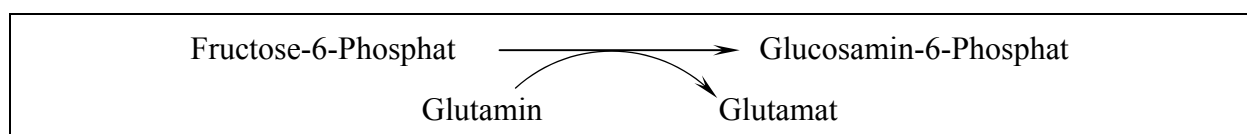


Abbildung 1 Verbreitung von Glucose-6-Phosphat Isomerasen im phylogenetischen Stammbaum. Der Stammbaum basiert auf rRNA-Sequenzvergleichen (schematisch nach Stetter 1993 und Woese et al. 1990), modifiziert). Hyperthermophile Organismen sind durch dicke Linien dargestellt. Die Domänen der Nanoarchaeota und Korarchaeota sind nicht berücksichtigt. Alle Organismen, die eine klassische PGI enthalten, sind blau dargestellt, grün kennzeichnet das Vorhandensein von PGI/PMI und violett das Vorhandensein von cPGI. Die Bacteria *Ensifer* und *Salmonella*, die sowohl cPGIs als auch klassische PGIs enthalten, sind zweifarbig dargestellt. Organismen, die in dieser Arbeit untersucht wurden, sind umrahmt.

In den Euryarchaea *P. furiosus*, *Thermococcus litoralis*, *A. fulgidus* und *Methanosarcina mazei* wurden keine homologen Proteine zur PGI-Superfamilie gefunden, weder PGIs noch PGI/PMIs. Diese Organismen enthalten einen neuartigen PGI-Typ, der zur Cupin-Superfamilie gehört (cPGI) und dessen Struktur sich grundlegend von der der klassischen PGIs unterscheidet. Damit handelt es sich bei den cPGIs um eine konvergente Entwicklung in der Evolution der Glucose-6-Phosphat Isomerasen (Hansen et al. 2005; Swan et al. 2003a). cPGIs sind auch in den Bacteria *Ensifer meliloti* und *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* zu finden, was wahrscheinlich auf lateralen Gentransfer von Archaea zu diesen Organismen zurückzuführen ist. Den Cupin-Typ PGIs sind bislang 17 Sequenzen zugeordnet (<http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Pfam/getacc?PF06560>). Für einige Proteine, die zur Cupin-Superfamilie gehören, ist eine Abhängigkeit der Aktivität von zweiwertigen Kationen beschrieben, so z.B. für Mannose-6-Phosphat Isomerasen (Cleasby et al. 1996; Dunwell et al. 2001; Gracy und Noltmann 1968). Klassische Enzyme der PGI-Superfamilie dagegen sind in ihrer Aktivität nicht abhängig von Cofaktoren (Achari et al. 1981). Die Sequenzen der cPGIs deuten auf das Vorhandensein einer Metallbindestelle hin, eine Abhängigkeit der PGI-Aktivität von Metallen wurde bisher jedoch noch nicht nachgewiesen. Deswegen sollten in einem Teil dieser Arbeit Untersuchungen zur Metallabhängigkeit der cPGIs durchgeführt werden.

In den vollständig sequenzierten Genomen der methanogenen Archaea *Methanothermobacter thermoautotrophicus* ΔH , *Methanosphaera stadtmanae* und *Methanopyrus kandleri* ist kein ORF mit signifikanter Ähnlichkeit zu einem der drei bekannten PGI-Typen zu finden (Fricke et al. 2006; Slesarev et al. 2002; Smith et al. 1997). Dennoch wurde im Rahmen dieser Arbeit in Rohextrakt von *M. thermoautotrophicus* geringe PGI-Aktivität nachgewiesen, was dafür spricht, dass in diesen Organismen eine neuartige PGI vorhanden sein könnte. Die Zellwände von *M. thermoautotrophicus* bestehen aus Pseudomurein, dessen Glykan-Anteil sich aus β -1,3-verknüpftem N-Acetylglucosamin und N-Acetyltalosaminuronsäure zusammensetzt (König et al. 1994). Die Bildung dieser Aminozucker geht von Fructose-6-Phosphat aus; das erste Enzym dieses Weges ist die Glutamin: Fructose-6-Phosphat Transaminase (GlmS; EC 2.6.1.16). Es handelt sich dabei um ein ubiquitäres Enzym, das aus verschiedenen Organismen charakterisiert wurde, wie z.B. dem Menschen, *E. coli*, *Candida albicans* und *Saccharomyces cerevisiae* (Badet et al. 1987; Broschat et al. 2002; Milewski et al. 2006a; Milewski et al. 1999), dessen Aktivität in Archaea bisher jedoch noch nicht nachgewiesen wurde. Glutamin: Fructose-6-Phosphat Transaminase katalysiert die Transaminierung und Isomerisierung von Fructose-6-Phosphat und Glutamin zu Glucosamin-6-Phosphat und Glutamat. Die Reaktion ist irreversibel und ausschließlich von Glutamin als Aminogruppen-Donor abhängig, Ammonium kann Glutamin nicht ersetzen (Pogell und Gryder 1957).



Die GlnS ist ein gut untersuchtes Enzym (Milewski 2002; Teplyakov et al. 2002). Es besteht aus zwei Domänen, einer N-terminalen Glutaminase-Domäne und einer C-terminalen Isomerase-Domäne (Denisot et al. 1991). Die Glutaminase-Domäne katalysiert die Hydrolyse von Glutamin zu Glutamat und an das Enzym gebundenes Ammonium. Das Ammonium wird durch einen intramolekularen Tunnel zur Isomerase-Domäne transferiert (Mouilleron et al. 2006; Teplyakov et al. 2001). Gebundenes Fructose-6-Phosphat wird nun aminiert, was zur Bildung des Zwischenproduktes Fructosimin-6-Phosphat führt. Als letzter Schritt folgt die Isomerisierung des Fructosimin-6-Phosphats zu Glucosamin-6-Phosphat (Milewski 2002; Teplyakov et al. 2002).

Homologe zur GlnS wurden auch in den Genomen von *Methanothermobacter thermoautotrophicus* ΔH (ORF MTH171), *Methanopyrus kandleri* und *Methanosphaera stadtmanae* gefunden (Fricke et al. 2006; Slesarev et al. 2002; Smith et al. 1997). Interessanterweise enthielten diese Organismen auch jeweils einen ORF (ORF MTH860 in *M. thermoautotrophicus*, Msp_1054 in *Ms. stadtmanae* und MK0918 in *Mp. kandleri*), der Ähnlichkeit zur Isomerase-Domäne der GlnS dieser Organismen aufwies, jedoch keine einer Glutaminase-Domäne homologen Sequenzen enthielt (Abbildung 2).

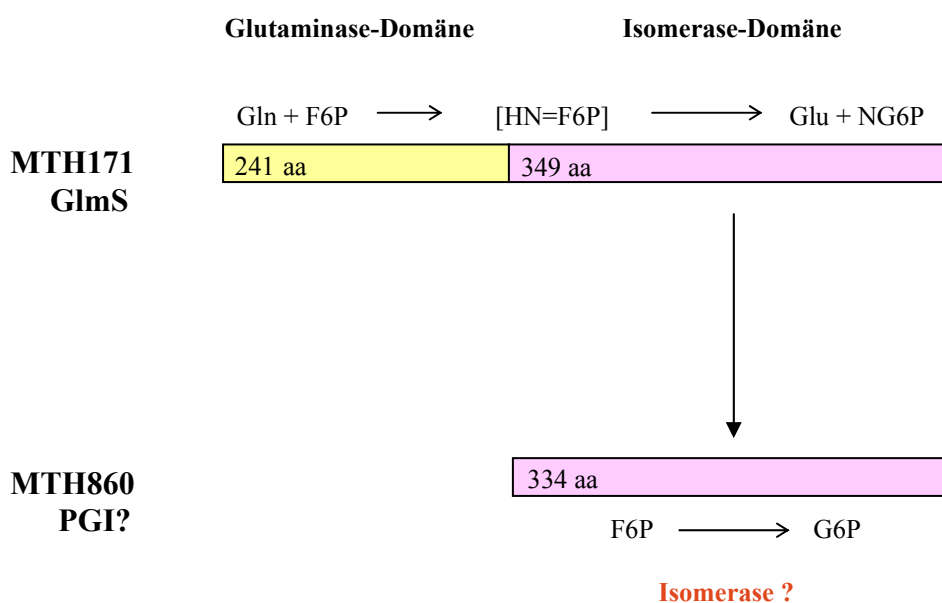


Abbildung 2 Schematische Darstellung der durch die ORFs MTH171 und MTH860 codierten Proteine. Die putative Glutaminase-Domäne, in der die Hydrolyse von Glutamin stattfindet, ist gelb dargestellt. In Violett dargestellt sind die putative Isomerase-Domäne der GlnS und der einzeln vorliegende ORF, der für eine PGI codieren könnte. GlnS: Glutamin:Fructose-6-Phosphat Transaminase; Gln: Glutamin; F6P: Fructose-6-Phosphat; HN=F6P: Fructosimin-6-Phosphat; Glu: Glutamat; NG6P: Glucosamin-6-Phosphat; aa: Aminosäuren; G6P: Glucose-6-Phosphat.

Da diese Organismen sonst keine für PGI codierenden ORFs enthalten, besteht die Möglichkeit, dass die zur Isomerase-Domäne homologen ORFs für funktionelle PGIs codieren. Diese Annahme basiert auf einem Befund für die Isomerase-Domäne der GlnS aus

E. coli. Für diese wurde eine geringe PGI-Aktivität nachgewiesen, nachdem durch Proteolyse die beiden Domänen des Proteins getrennt vorlagen (Todorova 2001). Um zu überprüfen, ob diese ORFs aus den methanogenen Archaea für funktionelle PGIs codieren, sollten die Proteine (im Weiteren als HPI, Hexosephosphat Isoomerase, bezeichnet) heterolog überexprimiert und biochemisch charakterisiert werden. Für das Enzym aus *M. thermoautotrophicus* wurde außerdem die *in vivo* Transkription analysiert. Weiterhin sollte durch Komplementation einer PGI-defizienten *E. coli*-Mutante untersucht werden, ob HPI-homologe Proteine funktionelle PGIs *in vivo* darstellen. Zusätzlich sollte Proteinaktivität der ersten archaeellen GImS, die durch den ORF MTH171 aus *M. thermoautotrophicus* codiert wird, nachgewiesen werden.

Die Organismen *Tp. acidophilum*, *S. enterica* serovar *typhimurium*, *T. maritima* und *P. furiosus* weisen jeweils Genomsequenzen auf, die für einen der drei bekannten PGI-Typen codieren und z.T. bereits charakterisiert sind (Hansen et al. 2001; Hansen et al. 2004c; Hansen et al. 2005). Dennoch wurden auch in diesen Organismen Homologe zur Isomerase-Domäne der GImS identifiziert, die ebenfalls biochemisch charakterisiert werden sollten (Maeder et al. 1999; McClelland et al. 2001; Nelson et al. 1999; Ruepp et al. 2000). Zum Vergleich sollte die klassische Glucose-6-Phosphat Isomerase aus *T. maritima* kloniert und das rekombinante Protein charakterisiert werden.

4 Material und Methoden

4.1 Verwendetes Material

4.1.1 Chemikalien und Feinchemikalien

Alle Chemikalien stammten, falls nicht anders vermerkt, von den Firmen Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Roth (Karlsruhe), Difco (Stuttgart), Sigma-Aldrich (Deisenhofen), Biomol (Hamburg) oder Gibco BRL (Karlsruhe). Die Enzyme und Coenzyme stammten von den Firmen Roche Diagnostics (Mannheim), MBI Fermentas (Vilnius, Litauen), New England Biolabs (Frankfurt), PeqLab (Erlangen) oder Biotherm (Hamburg).

4.1.2 Organismen und Oligonucleotide

Im Folgenden wird eine tabellarische Zusammenstellung aller in dieser Arbeit verwendeten Organismen und Oligonucleotide gegeben:

Tabelle 1 Typstämme, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Stamm	DSMZ	Referenz
<i>Methanothermobacter thermoautotrophicus</i> ΔH	DSM 1053	(Zeikus und Wolfe 1972)
<i>Methanopyrus kandleri</i>	DSM 6324	(Kurr et al. 1991)
<i>Thermotoga maritima</i>	DSM 3109	(Huber et al. 1986)

Tabelle 2 *Escherichia coli*- Derivate, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Stamm	Genotyp/Phänotyp	Referenz
JM109	<i>endA1 recA1 gyrA96 thi hsdR17(r_K⁻ m_K⁺) relA1 supE44 Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB lacI^qZΔM15]</i>	(Yanisch-Perron et al. 1985)
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3)	(Studier und Moffatt 1986)
BL21(DE3).star	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm rne131</i> (DE3)	(Lopez et al. 1999)
BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm⁺ Tet^r</i> (DE3) <i>endA Hte [argU ileY leuW Cam^r]</i>	(Carstens et al. 1999)
Rosetta(DE3)pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3) pLysSRARE2 (Cam ^r)	(Novy et al. 2001)
MG1655	F ⁻ λ <i>ilvG- rfb-50 rph-1</i>	(Blattner et al. 1997)
MG1655 Δ <i>pgi</i> Δ <i>udhA</i>	F ⁻ λ <i>ilvG- rfb-50 rph-1 pgi⁻ udhA⁻</i>	(Sauer et al. 2004)
MG1655(DE3)	F ⁻ λ <i>ilvG- rfb-50 rph-1</i> (DE3)	diese Arbeit
MG1655(DE3) Δ <i>pgi</i> Δ <i>udhA</i>	F ⁻ λ <i>ilvG- rfb-50 rph-1 pgi⁻ udhA⁻</i> (DE3)	diese Arbeit
XL-1 Blue	<i>endA1 recA1 gyrA96 thi hsdR17(r_K⁻ m_K⁺) supE44 relA1 lac [F' proAB+ lacI^qZΔM15 Tn10(Tet^r)]</i>	(Bullock et al. 1987)

Tabelle 3 Oligonucleotide, die in dieser Arbeit zur Amplifizierung, Sequenzierung von DNA, Mutagenese sowie zur RT-PCR verwendet wurden. Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen, die Vorwärtsprimer sind mit -s und die Rückwärtsprimer mit -as bezeichnet. Für die RT-PCR (4.3.8) verwendete Primer sind mit RT- gekennzeichnet, zur Sequenzierung (4.3.6) verwendete Primer mit S-. RE: verwendete Restriktionsendonuclease.

Name	Basensequenz (5' → 3')	RE
MK0918-s	TGCTTGAGCGAGCATATGAGGGATGACGTGG	<i>NdeI</i>
PshAI-MK0918-s	GGTAACCTGGGGTGTACTGCGACAAGAGTCCGATGAGGGATGACGTGG	<i>PshAI</i>
MK0918-as	CAACGTTTCGACCTCCCCGGATCCGCTACAC	<i>BamHI</i>
RT-MK0918-s	ATGAGGGATGACGTGGAGAGAAC	
RT-MK0918-as	CTACACGTGGTTCCACCAGCTTC	
MTH171-s	GCTTCTTAGGGTGCTAGCATGTGTGGC	<i>NheI</i>
MTH171-as	GCTTTCAGGATCCCCTTCACTCAAC	<i>BamHI</i>
RT-MTH171-s	TGTGTGGCATTGTGGCTTGTATAC	
RT-MTH171-as	TCACTCAACGGTCACACACTTTG	
MTH860-s	AGGGGATACCATATGAAGTATGGG	<i>NdeI</i>
MTH860-as	CTGGCTCGAGCTAGTATCTCACC	<i>XhoI</i>
RT-MTH860-s	GTATGGGATGTTCAATGAACTCATGG	
RT-MTH860-as	TCTCACCTTACCTATGTGCCTGGTAC	
MTH860-I143K-s	GGACGTGAGGAGGCAAACTTGGCACCAAG	
MTH860-I143K-as	CTTGGTGCCAAGTTTTGCCTCCTCACGTCC	
MTH860-E229A-s	CAATGACGATGCTCATGGCGGGTGCCTGAAG	
MTH860-E229A-as	CTTCAGGGCACCCGCCATGAGCATCGTCATTG	
MSP_1054-s	CAAAAAAATAAATTGCTAGCATGGAATCATGTTTTTC	<i>NheI</i>
MSP_1054-as	TAAAATTTATTGGAGAATTCCTTAATATCTTATTTTCCC	<i>EcoRI</i>
S-MSP_1054-s	CGATACGTGATGCAATAAAATCCC	
STM0572-s	CGCTAAGGAGATACATATGTCTG	<i>NdeI</i>
STM0572-as	CATCCGGGATCCCTATTAATATTC	<i>BamHI</i>
Ta0479-s	AATAATACATATGGCAGATATGACCG	<i>NdeI</i>
Ta0479-as	CAATAAACGGGATCCCTACGG	<i>BamHI</i>
TM0813-s	GGAGGGAGGCATATGAGCAAAAC	<i>NdeI</i>
TM0813-as	CATAGAAGGATCCTCACAGAACAACG	<i>BamHI</i>
TM1385-s	CTGAGGGGTGCTAGCATGAG	<i>NheI</i>
TM1385-as	CACTTCCTCGAGAATTCTCATTC	<i>EcoRI</i>
S-TM1385-s	AACCTGGCCCTTCACTAC	
S-TM1385-as	CGGAGAGCTTCTTCCTTG	
PF0362-V134K-s	CTATAGAAGAGAGCGTCAAGATGACGCATTCATTTACAGCC	
PF0362-V134K-as	GGCTGTAAATGAATGCGTCATCTTGACGCTCTCTTCTATAG	
PF0362-E211A-s	GGCCAGTCTAAAAATGAAGGCAATGGCGATATTCTGG	
PF0362-E211A-as	CCAGAATATCGCCATTGCCTTCATTTTTAGACTGGCC	
T7-Promotor Primer	TTAATACGACTCACTATAGGG	
T7-Terminator Primer	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	

4.2 Anzucht von *Methanothermobacter thermoautotrophicus* Stamm ΔH

M. thermoautotrophicus Stamm ΔH (DSM 1053) wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig) bezogen und in 100 ml Serumflaschen mit je 20 ml Medium unter Schütteln bei 60°C gezüchtet. Die Gasphase bestand aus H₂/CO₂ (80%/20%, 2 bar). In größerem Maßstab wurde *M. thermoautotrophicus* in einem 100 Liter Biostat-Fermenter (Braun, Melsungen) gezüchtet. Die Wachstumstemperatur betrug 60°C, es wurde mit 450 Upm gerührt und mit 1 bar H₂/CO₂ (80%/20%) begast. Zusammensetzung des für das Wachstum verwendeten Mediums siehe Tabelle 4.

Tabelle 4 Medium zur Züchtung von *Methanothermobacter thermoautotrophicus* Stamm ΔH.

<i>Methanothermobacter thermoautotrophicus</i> Medium			
KH ₂ PO ₄	0.3 g		
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.5 g		
NaCl	0.6 g		
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0.12 g		
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0.08 g		
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0.004 g		
K ₂ HPO ₄	0.15 g		
Na ₂ CO ₃	4 g		
Vitaminlösung	1 ml		
Spurenelementlösung	1 ml		
A. bidest.	ad 1000 ml		
pH auf 7.5 einstellen			
Das Medium wurde unter anaeroben Bedingungen abgefüllt, mit einer 80:20 H ₂ /CO ₂ - Atmosphäre begast und sterilisiert. Anschließend wurde anaerobes, steriles Na ₂ S und Cystein-HCl zu einer Endkonzentration von je 0.5 g/l hinzugegeben.			
Vitaminlösung		Spurenelementlösung	
Biotin	20 mg	Na ₂ -EDTA (TitriplexIII)	6.4 g
Folsäure	20 mg	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	62 g
Pyridoxin-HCl	100 mg	MnSO ₄ x 4 H ₂ O	5.5 g
Thiamin-HCl x 2 H ₂ O	50 mg	NaCl	10 g
Riboflavin	50 mg	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	1 g
Nicotinsäure	50 mg	CoCl ₂ x 6 H ₂ O	1.7 g
Ca-Pantothenat	50 mg	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1.3 g
p-Aminobenzoesäure	10 mg	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	1.8 g
Vitamin B ₁₂	0.1 mg	CuSO ₄	0.5 g
A. bidest.	ad 1000 ml	KAl(SO ₄) ₂ x 12 H ₂ O	0.18 g
		H ₃ BO ₃	0.1 g
		Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0.11 g
		NiCl ₂ x 6 H ₂ O	0.25 g
		Na-EDTA wurde in 500 ml A. bidest. gelöst und nach Zugabe der Salze auf 1000 ml aufgefüllt.	

4.3 Molekularbiologische Methoden

4.3.1 Computergestützte Sequenzanalysen

Mit den Aminosäuresequenzen von Glutamin:Fructose-6-Phosphat Transaminasen und Glucose-6-Phosphat Isomerasen aus Eukarya, Bacteria und Archaea wurden Stammbäume erstellt. Alle Sequenzalignments und die phylogenetischen Stammbäume wurden mit ClustalX und der Neighbor-joining Methode unter Verwendung der Standardeinstellungen und der GONNET Matrix erstellt (Thompson et al. 1997).

4.3.2 Isolierung von genomischer DNA

Genomische DNA von *Thermoplasma acidophilum* (DSM 1728) und *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* (DSM 10506) wurde von der DSMZ (Braunschweig) bezogen. Genomische DNA von *Methanosphaera stadtmanae* (DSM 3091) wurde von G. Gottschalk (Göttingen) zur Verfügung gestellt.

Zur Extraktion genomischer DNA (Sambrook et al. 1989) aus *Methanothermobacter thermoautotrophicus* Stamm Δ H und *Methanopyrus kandleri* (DSM 6324) wurden jeweils 300 mg Feuchtzellen in 5 ml TES-Puffer (TE-Puffer mit 0.25 M Saccharose; TE-Puffer: 10 mM Tris/HCl pH 8 mit 0.1 mM EDTA) vorsichtig suspendiert. Nach Zugabe von 550 μ l 10% SDS und 15 μ l Proteinase K (20 mg/ml) wurde die Suspension für 30 min bei 60°C und anschließend nach Zugabe von 600 μ l 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 μ l TE-Puffer resuspendiert, die Suspension abschließend mit 5 μ l RNase A (100 mg/ml) für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend bei -20°C gelagert.

Die Extraktion genomischer DNA aus *Thermotoga maritima* (DSM 3109) erfolgte aus 300 mg Feuchtzellen mit dem DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers.

Konzentration und Reinheit der genomischen DNA wurden jeweils sowohl photometrisch als auch über ein 1%-iges Agarosegel bestimmt (4.3.4).

4.3.3 Polymerase Kettenreaktion

Mit der Polymerase Kettenreaktion (PCR, Mullis et al. 1986) können DNA-Fragmente spezifisch amplifiziert werden. Sie diente in dieser Arbeit der Amplifizierung von offenen Leserahmen (ORF) aus genomischer DNA und der Überprüfung auf ein vorhandenes Insert von Transformanten. Die PCRs wurden in 50 μ l 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

Oligonucleotid-Primer (MWG Biotech, Ebersberg) variiert wurden (Tabelle 3). Die PCRs werden im Folgenden spezifiziert:

Amplifizierung der zu klonierenden Gene. Zur Amplifizierung der Gene wurden verschiedene Inkubationsprotokolle verwendet:

Methanothermobacter thermoautotrophicus, ORF MTH860: Der Reaktionsansatz enthielt 150 ng Template, je 300 nM sense (-s) und antisense (-as) Primer, 5 µl 10x Reaktionspuffer (GeneCraft, Lüdinghausen), 2 mM MgCl₂ und 200 µM dNTP-Mix. 1 U *Taq*-DNA-Polymerase (GeneCraft, Lüdinghausen) wurde nach dem initialen Denaturierungsschritt hinzu gegeben. Das Inkubationsprotokoll bestand aus initialer Denaturierung für 120 s bei 94°C, 10 Zyklen aus Denaturierung bei 94°C für 20 s, Annealing bei 50°C für 30 s und Polymerisierung bei 72°C für 50 s, 10 Zyklen aus Denaturierung bei 94°C für 20 s, Annealing bei 54°C für 30 s und Polymerisierung bei 72°C für 50 s, 25 Zyklen aus Denaturierung bei 94°C für 20 s, Annealing bei 58°C für 30 s und Polymerisierung bei 72°C für 50 s (wobei bei jedem Zyklus die Synthesezeit um 20 s verlängert wurde) und einer abschließenden Polymerisierung bei 72°C für 7 min.

M. thermoautotrophicus, ORF MTH171: Der Reaktionsansatz enthielt 100 ng Template, je 200 nM sense (-s) und antisense (-as) Primer, 5 µl 10x Reaktionspuffer, 1.5 mM MgCl₂ und 200 µM dNTP-Mix. 1 U *Taq*-DNA-Polymerase wurde nach dem initialen Denaturierungsschritt hinzu gegeben. Das Inkubationsprotokoll bestand aus initialer Denaturierung für 120 s bei 94°C, 10 Zyklen aus Denaturierung bei 94°C für 20 s, Annealing bei 54°C für 30 s und Polymerisierung bei 72°C für 120 s, 25 Zyklen aus Denaturierung bei 94°C für 20 s, Annealing bei 61°C für 30 s und Polymerisierung bei 72°C für 120 s (wobei bei jedem Zyklus die Synthesezeit um 20 s verlängert wurde) und einer abschließenden Polymerisierung bei 72°C für 7 min.

Methanopyrus kandleri, ORF MK0918: Der Reaktionsansatz enthielt 80 bzw. 60 ng Template, je 300 nM MK0918-s und MK0918-as Primer bzw. PshAI-MK0918-s und MK0918-as Primer, 5 µl 10x Reaktionspuffer (PeqLab, Erlangen), 2 mM MgSO₄, 200 µM dNTP-Mix und 1 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 20 s, Annealing bei 65°C für 30 s und Polymerisierung bei 72°C für 60 s, 30 Zyklen aus Denaturierung bei 94°C für 20 s, Annealing bei 70°C für 30 s und Polymerisierung bei 72°C für 60 s (wobei bei jedem Zyklus die Synthesezeit um 20 s verlängert wurde) und einer abschließenden Polymerisierung bei 72°C für 7 min.

Methanosphaera stadtmanae, ORF MSP_1054: Der Reaktionsansatz enthielt 100 ng Template, je 300 nM sense (-s) und antisense (-as) Primer, 5 µl 10x Reaktionspuffer, 3 mM MgSO₄, 200 µM dNTP-Mix und 1 U *Pwo*-DNA-Polymerase. Das Inkubationsprotokoll bestand aus initialer Denaturierung für 120 s bei 94°C, 10 Zyklen aus Denaturierung bei 94°C für 20 s, Annealing bei 50°C für 30 s und Polymerisierung bei 72°C für 60 s, 30 Zyklen aus Denaturierung bei 94°C für 20 s, Annealing bei 55°C für 30 s und Polymerisierung bei 72°C

für 60 s (wobei bei jedem Zyklus die Synthesezeit um 20 s verlängert wurde) und einer abschließenden Polymerisierung bei 72°C für 7 min.

Salmonella enterica serovar *typhimurium*, ORF STM0572: Der Reaktionsansatz enthielt 10 ng Template, je 200 nM sense (-s) und antisense (-as) Primer, 5 µl 10x Reaktionspuffer, 3 mM MgCl₂, 200 µM dNTP-Mix und 1 U *Taq*-DNA-Polymerase. Das Inkubationsprotokoll bestand aus initialer Denaturierung für 120 s bei 94°C, 10 Zyklen aus Denaturierung bei 94°C für 20 s, Annealing bei 50°C für 30 s und Polymerisierung bei 72°C für 60 s, 30 Zyklen aus Denaturierung bei 94°C für 20 s, Annealing bei 55°C für 30 s und Polymerisierung bei 72°C für 60 s (wobei bei jedem Zyklus die Synthesezeit um 20 s verlängert wurde) und einer abschließenden Polymerisierung bei 72°C für 7 min.

Thermoplasma acidophilum, ORF Ta0479: Der Reaktionsansatz enthielt 10 ng Template, je 300 nM sense (-s) und antisense (-as) Primer, 5 µl 10x Reaktionspuffer, 2 mM MgSO₄, 200 µM dNTP-Mix und 1 U *Pwo*-DNA-Polymerase. Das Inkubationsprotokoll bestand aus initialer Denaturierung für 120 s bei 94°C, 10 Zyklen aus Denaturierung bei 94°C für 20 s, Annealing bei 52°C für 30 s und Polymerisierung bei 72°C für 60 s, 30 Zyklen aus Denaturierung bei 94°C für 20 s, Annealing bei 55°C für 30 s und Polymerisierung bei 72°C für 60 s (wobei bei jedem Zyklus die Synthesezeit um 20 s verlängert wurde) und einer abschließenden Polymerisierung bei 72°C für 7 min.

Thermotoga maritima, ORF TM0813: Der Reaktionsansatz enthielt 50 ng Template, je 600 nM sense (-s) und antisense (-as) Primer, 5 µl 10x Reaktionspuffer, 2 mM MgSO₄, 200 µM dNTP-Mix und 1 U *Pwo*-DNA-Polymerase. Das Inkubationsprotokoll bestand aus initialer Denaturierung für 120 s bei 94°C, 10 Zyklen aus Denaturierung bei 94°C für 20 s, Annealing bei 50°C für 30 s und Polymerisierung bei 72°C für 60 s, 20 Zyklen aus Denaturierung bei 94°C für 20 s, Annealing bei 55°C für 30 s und Polymerisierung bei 72°C für 60 s (wobei bei jedem Zyklus die Synthesezeit um 20 s verlängert wurde) und einer abschließenden Polymerisierung bei 72°C für 7 min.

T. maritima, ORF TM1385: Der Reaktionsansatz enthielt 200 ng Template, je 300 nM sense (-s) und antisense (-as) Primer, 5 µl 10x Reaktionspuffer, 2 mM MgSO₄, 200 µM dNTP-Mix und 1 U *Pwo*-DNA-Polymerase. Das Inkubationsprotokoll bestand aus initialer Denaturierung für 120 s bei 96°C, 10 Zyklen aus Denaturierung bei 96°C für 20 s, Annealing bei 45°C für 30 s und Polymerisierung bei 72°C für 90 s, 30 Zyklen aus Denaturierung bei 96°C für 20 s, Annealing bei 50°C für 30 s und Polymerisierung bei 72°C für 90 s (wobei bei jedem Zyklus die Synthesezeit um 20 s verlängert wurde) und einer abschließenden Polymerisierung bei 72°C für 7 min.

Amplifizierung zur Kontrolle einer Klonierung („Kolonie-Screening“). Transformanten wurden auf vorhandenes Insert in erwarteter Länge geprüft. Der Reaktionsansatz enthielt als Template einen Transformanten, der mit sterilem Zahnstocher von der Agarplatte aufgenommen wurde, je 200 nM Primer (T7-Promotor- und T7-Terminatorprimer), 5 µl 10x Reaktionspuffer, 200 µM dNTPs und 3 mM MgCl₂. Die *Taq*-DNA-Polymerase (1 U, GeneCraft, Lüdinghausen) wurde nach dem initialen Denaturierungsschritt zugegeben. Das Inkubationsprotokoll bestand aus initialer Denaturierung für 300 s bei 94°C, 30 Zyklen aus Denaturierung bei 94°C für 20 s, Annealing bei 48°C für 30 s und Polymerisierung bei 72°C für 120 s und einer abschließenden Polymerisierung bei 72°C für 7 min.

4.3.4 Konzentrationsbestimmung und Reinheitsanalyse von DNA

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

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

Daneben wurden Agarosegele dazu genutzt, DNA-Fragmente, Plasmide und genomische DNA der Größe nach analytisch oder präparativ zu trennen. Die Trennung erfolgte für hochmolekulare DNA in 1%-igen und für niedermolekulare DNA in 2%-igen Agarosegelen.

Dazu wurde Agarose in 30 ml TAE-Puffer (40 mM Tris/HCl pH 8.0 mit 20 mM Essigsäure und 1 mM EDTA) durch Aufkochen gelöst, nach Abkühlung auf etwa 60°C 30 µg Ethidiumbromid zugegeben und in eine Gießvorrichtung (7 cm x 10 cm) gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 6x Auftragspuffer (Fermentas, Vilnius, Litauen) versetzt und neben einen Standard (*Hind*III verdaute λ-DNA oder GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder plus, Fermentas, Vilnius, Litauen) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei konstant 100 V in TAE-Puffer. Anschließend wurden die Gele auf einem UV-Schirm (366 nm) analysiert.

4.3.5 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 in *E. coli* Stamm JM109 (Yanisch-Perron et al. 1985) in LB-Medium mit 100 µg/ml Carbenicillin vermehrt und anschließend daraus mit dem QIAquick Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) bzw. mit dem E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I (PeqLab, Erlangen) isoliert. Das LB-Medium setzte sich wie folgt zusammen: 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) bzw. dem E.Z.N.A. Cycle-Pure Kit (PeqLab, Erlangen) von DNA-Polymerase, Oligonucleotiden, Salzen und Puffer gereinigt. Vektoren und geschnittene DNA-Fragmente 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) bzw. dem E.Z.N.A. Gel Extraction Kit (PeqLab, Erlangen) aus dem Gel extrahiert.

Restriktionshydrolyse von Vektoren und PCR-Produkten. Die Restriktionshydrolyse wurde jeweils als Doppel-Verdau angesetzt, d.h. beide Restriktionsendonucleasen (New England Biolabs GmbH, Schwalbach/Taunus) wurden in einen Ansatz gegeben und in einem vom Hersteller mitgelieferten, optimalen Puffer mit der DNA inkubiert. Die Ansätze folgender Zusammensetzung wurden bei 37°C für 2 bis 12 h inkubiert: 50 µl Plasmid-DNA bzw. PCR-Fragment (1 bis 10 µg DNA), jeweils 10 bis 20 U Restriktionsendonuclease, 7 µl 10x Reaktionspuffer auf 70 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 5- bis 15-fachen molaren Überschuss zu den Plasmiden eingesetzt. Die Ansätze wurden bei 16°C für 12 h inkubiert und anschließend in *E. coli* JM109 transformiert.

4.3.6 Sequenzierung

Alle im Rahmen dieser Arbeit konstruierten Plasmide 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 Didesoxynucleotiden 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 Ansätze für die Sequenz-PCR waren wie folgt zusammengesetzt: 0.05 bis 0.2 µg Plasmid-DNA, 1.6 pmol Primer (T7-Promotor- bzw. Terminator-Primer oder, im Falle langer Inserts, die mit S- als Präfix gekennzeichneten Primer in Tabelle 3), 1 µl Big Dye Terminator Cycle Sequencing Premix (ABI PRISM, Applied Biosystems, Warrington, England), 2 µl Big Dye Terminator Cycle Sequencing Puffer auf 10 µl A. bidest.. Das Sequenzprotokoll bestand aus folgenden Zyklen: initialer Denaturierungsschritt bei 96°C für 60 s, 25 Zyklen mit Denaturierung bei 96°C für 10 s, Annealing bei 45°C für 5 s und Synthese bei 60°C für 240 s.

Anschließend wurden die Ansätze für die nachfolgende Sequenzierung gefällt. Dazu wurde zu den Ansätzen 3 µl 125 mM EDTA und 30 µl 100% Ethanol gegeben, gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch 30-minütige Zentrifugation wurde die DNA pelletiert, dann das Pellet einmal mit 30 µl kaltem 70% Ethanol gewaschen und anschließend für 15 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Das getrocknete Pellet konnte nach Lösen in 12 µl A. bidest. zur Sequenzierung eingesetzt werden.

4.3.7 Transformation

Herstellung CaCl₂-kompetenter Zellen. Die Herstellung CaCl₂-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 (4.3.5) wurden 10%-ig mit einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C unter aeroben Bedingungen bis zu einer OD bei 578 nm von 0.6 inkubiert. Dann wurden die Kulturen 20 min auf Eis inkubiert, 15 min zentrifugiert (8000 x g, 4°C) und der Kulturüberstand dekantiert. Das Zellpellet wurde in 200 ml eiskaltem TBS-Puffer (5 mM Tris/HCl pH 7 mit 100 mM NaCl und 5 mM MgCl₂) suspendiert und weitere 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 ml eiskalter CaCl₂-Lösung (5 mM Tris/HCl pH 7 mit 100 mM CaCl₂ und 5 mM MgCl₂) resuspendiert, 20 min auf Eis inkubiert und nochmals 10 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 20 ml eiskalter CaCl₂-Lösung resuspendiert, 1 h auf Eis inkubiert und dann mit sterilem Glycerin versetzt (Endkonzentration 20%). 200 µl Aliquots wurden mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bei -70°C.

Herstellung kompetenter Zellen mit Roti[®]-Transform Kit. Die Herstellung kompetenter Zellen der *E. coli*-Stämme JM109, Rosetta B(DE3)-pLysS, MG1655(DE3) und MG1655(DE3) Δ *pgi* Δ *udhA* erfolgte mit dem Roti[®]-Transform Kit der Firma Roth (Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers.

Transformation eines Vektors 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 1 bzw. 9 µl Ligationsansatz bzw. 50 - 100 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 (4.3.5) mit 18 g/l Agar) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.3.8 RT-PCR

Die Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) dient der Untersuchung der Expression spezifischer Gene auf mRNA Ebene. Dazu wird die Synthese von cDNA aus mRNA mittels der reversen Transkriptase (RT) mit anschließender PCR kombiniert. Bei allen in dieser Arbeit aufgeführten Methoden mit RNA wurden Kontaminationen mit RNasen vermieden. Lösungen wurden mit 0.1% DEPC, einem RNase-Inhibitor, versetzt, für 12 h bei 37°C inkubiert und anschließend autoklaviert, um das DEPC zu entfernen. Alle Glasgefäße und Arbeitsflächen wurden mit RNase-freiem 0.1 M NaOH und 1 mM EDTA vorbehandelt, und die Gefäße wurden anschließend noch für 4 h bei 240°C inkubiert.

Isolierung von RNA aus Zellen. Die Isolierung von RNA aus Zellen von *Methanothermobacter thermoautotrophicus* und *Methanopyrus kandleri* erfolgte mit dem RNeasy Mini-Kit (Qiagen, Hilden), das eine schnelle RNA-Isolierung ermöglicht. Dabei wird selektiv mRNA angereichert, da die 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 je etwa 1×10^9 Zellen. Dazu wurden 100 ml einer sich in der exponentiellen Wachstumsphase befindlichen Kultur von *M. thermoautotrophicus* zentrifugiert (9000 x g, 30 min bei 8°C) und das Pellet in einem Mörser unter flüssigem Stickstoff pulverisiert. Zur Isolierung der RNA aus *Mp. kandleri* wurden 15 mg gefrorene Feuchtzellen in 100 µl RNase-freiem 50 mM Tris/HCl pH 6.9 suspendiert und mit dem in flüssigem Stickstoff gekühlten Mikro-Dismembrator U (Sartorius, Göttingen) aufgeschlossen.

Die aufgeschlossenen Zellen wurden in je 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 nach den Angaben des Herstellers, wobei die DNA durch Hydrolyse mit RNase-freier DNase (Qiagen, Hilden) in 90-minütiger 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 FA-Agarosegele (s.u.) genutzt.

Agarosegelelektrophorese. Die Auftrennung von RNA erfolgte in 1.2%-igen FA-Agarosegelen. Dazu wurden 0.36 g Agarose mit 3 ml 10x FA-Puffer (200 mM MOPS/NaOH pH 7.0 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 0.5 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 FA-Puffer (100 ml 10x FA-Puffer, 20 ml 37% Formaldehyd, 880 ml A. bidest.) equilibriert. Aliquots der isolierten RNA wurden mit 2x RNA-Auftragspuffer (2 x RNA Loading Dye Solution, Fermentas, Vilnius, Litauen) versetzt, 5 min bei 65°C inkubiert und neben einen RNA-Standard (RiboRuler™ RNA Ladder High Range, Fermentas, Vilnius, Litauen) auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 70 V in FA-Puffer. Anschließend wurden die Gele auf einem UV-Schirm (366 nm) analysiert.

Reverse Transkriptase (RT)- PCR mit spezifischen Primern. Die RT-PCRs wurden mit dem QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Die 25 µl Reaktionsansätze enthielten je 5 µl 5x oneStep RT-PCR Puffer, 400 µM dNTP-Mix, 2.7 U RNase-Inhibitor (Humane Plazenta, Sigma, Deisenhofen), 0.6 µM RT-MTH860-s und RT-MTH860-as, RT-MTH171-s und RT-MTH171-as bzw. RT-MK0918-s und RT-MK0918-as (Tabelle 3), 1 µl OneStep RT-PCR Enzym-Mix, 200 ng (*M. thermoautotrophicus*) bzw. 5 ng RNA (*Mp. kandleri*) und RNase-freies A. bidest.. Die RT-PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Einem 30-minütigen RT-Schritt bei 50°C folgte eine 25-minütige Denaturierung der Reversen Transkriptase mit gleichzeitiger Aktivierung der im Enzymmix enthaltenen *Taq*-Polymerase bei 95°C. Anschließend folgten 35 Zyklen PCR zur spezifischen Amplifizierung der Gene mit der entstandenen cDNA als Template. Mit Denaturierung (94°C, 30 s), Primerhybridisierung (30s bei 55°C für MTH860 und MTH171 bzw. 57°C für MK0918), Kettenverlängerung (72°C, 120 s für MTH171 bzw. 60 s für MTH860 und MK0918) und anschließender Beendigung des Reaktionszyklus mit einer 10-minütigen Polymerisierung bei 72°C entspricht sie einer normalen PCR.

Zur Kontrolle der RNA auf DNA-Kontamination während der RNA-Präparation wurde je ein identischer Ansatz inkubiert, bei dem die Template-RNA erst nach der Inaktivierung der Reversen Transkriptase zugegeben wurde (Negativkontrolle). Zur Kontrolle der Primerspezifität wurde je eine RT-PCR mit genomischer DNA von *M. thermoautotrophicus* bzw. *Mp. kandleri* durchgeführt (Positivkontrolle).

Aliquots der RT-PCR-Ansätze wurden anschließend auf 2%-igen Agarosegelen (4.3.4) analysiert, wobei in den Negativkontrollen kein Signal zu sehen sein sollte.

4.3.9 Mutagenese

Die ortsspezifische Mutagenese an der Glucose-6-Phosphat Isomerase (HPI) von *M. thermoautotrophicus* und der Glucosamin-6-Phosphat Deaminase (GPDA) aus *P. furiosus* wurde mit dem QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene (Amsterdam, Niederlande) durchgeführt. Als Ausgangsmaterialien dienten die Plasmide MTH860/pET19b und PF0362/pET14b (Tabelle 5).

HPI-Mt. Für den Austausch von Isoleucin an Position 143 gegen Lysin wurden die beiden komplementären Primer MTH860-I143K-s und MTH860-I143K-as (Tabelle 3) eingesetzt. Sie enthalten im zentralen Bereich die Mutation des Codons ATA, das für Isoleucin143 codiert, gegen das Codon AAA, das für Lysin codiert. Als Primer für den Austausch des Glutamats an Position 229 gegen Alanin dienten die komplementären Oligonucleotide MTH860-E229A-s und MTH860-E229A-as (Tabelle 3). Diese enthalten die Mutation des für Glutamat codierenden Codons GAG gegen das für Alanin codierende Triplet GCG. Die Reaktionsansätze enthielten je 2.5 µl 10x Reaktionspuffer, 30 ng Plasmid MTH860/pET19b, je 0.25 µM MTH860-I143K-s und MTH860-I143K-as bzw. MTH860-E229A-s und MTH860-E229A-as, 0.5 µl dNTP-Mix und 1.25 U *PfuTurbo*-DNA-Polymerase auf 25 µl *A. bidest.*

GPDA-Pf. Für den Austausch von Valin an Position 134 gegen Lysin wurden die beiden komplementären Primer PF0362-V134K-s und PF0362-V134K-as (Tabelle 3) eingesetzt. Sie enthalten im zentralen Bereich die Mutation des Codons GTG, das für Valin134 codiert, gegen das Codon AAG, das für Lysin codiert. Als Primer für den Austausch des Glutamats an Position 211 gegen Alanin dienten die komplementären Oligonucleotide PF0362-E211A-s und PF0362-E211A-as (Tabelle 3). Diese enthalten die Mutation des für Glutamat codierenden Codons GAA gegen das für Alanin codierende Triplet GCA. Die Reaktionsansätze enthielten je 2.5 µl 10x Reaktionspuffer, 27 ng Plasmid PF0362/pET14b, je 0.25 µM PF0362-V134K-s und PF0362-V134K-as bzw. PF0362-E211A-s und PF0362-E211A-as, 0.5 µl dNTP-Mix und 1.25 U *PfuTurbo*-DNA-Polymerase auf 25 µl *A. bidest.*

Das Inkubationsprotokoll für die ortsspezifischen Mutagenesen bestand aus einer Denaturierung für 30 s bei 95°C und 16 Zyklen aus Denaturierung bei 95°C für 30 s, Annealing bei 55°C für 60 s und Polymerisierung bei 68°C für 7 min. Auf die PCR folgte eine Restriktionshydrolyse mit je 5 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 (4.3.5) 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 je 1 µl der Mutageneseansätze. Die transformierten Zellen wurden auf LB-Agarplatten (4.3.7) mit Carbenicillin (100 µg/ml) plattiert und bei 37°C für 12 h inkubiert. Je ein Klon wurde in LB-Medium mit Antibiotikum überimpft und nach Inkubation bei 37°C eine Plasmidpräparation (4.3.5) durchgeführt. Durch Sequenzierung (4.3.6) wurden die Plasmide MTH860-I143K/pET19b, MTH860-E229A/pET19b, PF0362-V134K/pET14b und PF0362-E211A/pET14b auf die mutierten Inserts überprüft. Sie wurden zur Expression in *E. coli* BL21(DE3)-CodonPlus-RIL (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) transformiert (4.3.7) und die Genprodukte analog zu den entsprechenden Proteinen HPI-Mt und GPDA-PF (4.5.1) exprimiert.

4.3.10 λ DE3-Lysogenisierung

Die in pET-Vektoren klonierten Gene stehen unter Kontrolle des T7 Promotors, der von der *E. coli* RNA-Polymerase nicht erkannt wird. Um eine Expression dieser Gene zu erreichen, muss im Genom des Expressionsstammes das Gen für die T7 RNA-Polymerase vorhanden sein. Dies wird durch ortsspezifische Integration des λ DE3-Prophagen in das Chromosom des entsprechenden *E. coli*-Stammes erreicht. λ DE3 ist ein rekombinanter Phage, der das klonierte Gen für T7 RNA-Polymerase unter Kontrolle des *lacUV5*-Promotors trägt. Zugabe von IPTG führt zur Derepression des *lacUV5*-Promotors und damit zur Expression der T7 RNA-Polymerase. Eine Transkription der klonierten Gene ist nun möglich.

Der *E. coli*-Stamm MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA$ (zur Verfügung gestellt von U. Sauer, Zürich; Tabelle 2) sollte mit den verschiedenen in pET-Vektoren klonierten PGIs (Tabelle 5) komplementiert werden. Dazu wurden dieser und der Wildtyp-Stamm MG1655 mit Hilfe des λ DE3 Lysogenization Kits (Novagen, Darmstadt) nach Angaben des Herstellers lysogenisiert. Die so erzeugten Expressionsstämme wurden als *E. coli* MG1655(DE3) und *E. coli* MG1655(DE3) $\Delta pgi \Delta udhA$ bezeichnet und für die Komplementationsversuche (4.7) verwendet.

4.4 Proteinbiochemische Methoden

4.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentrationen wurden mit einer modifizierten Methode nach Bradford bestimmt (Bradford 1976). Es wurden 100 μ l Probe und 900 μ l Bradford-Reagenz (35 mg Serva blue G, 25 ml 96% Ethanol und 50 ml ortho-Phosphorsäure auf 500 ml A. bidest.) eingesetzt, gut gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktion wurde bei 595 nm gemessen. Eine Proportionalität der Messwerte war bis zu einer Proteinmenge von 5 μ g im Test gegeben. Die Eichung erfolgte mit einem Standard aus Rinderserum-Albumin Fraktion V (Merck, Darmstadt).

4.4.2 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 (Laemmli 1970) in 12%-igen, diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen (7 cm x 8 cm x 0.1 cm) in einer Mini Protean II Elektrophorese Zelle (Biorad, München).

Trenn- und Sammelgel hatten folgende Zusammensetzung:

	Trenngel (12%)	Sammelgel (3.75%)
30% Acrylamid, 0.8% Bisacrylamid	2 ml	250 µl
1.5 M Tris/HCl pH 8.8, 0.4% SDS	1.25 ml	-
0.5 M Tris/HCl pH 6.8, 0.4% SDS	-	500 µl
A. bidest.	1.75 ml	1.175 ml
10% Ammoniumpersulfat	17.5 µl	12.5 µl
TEMED	3.4 µl	2 µl

Die Proben wurden mit 5x Auftragspuffer (63 mM Tris/HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% Glycerin, 0.05% Bromphenolblau) versetzt, 10 min bei 95°C inkubiert und in die Geltaschen pipettiert. Der Elektrophoresepuffer bestand aus 25 mM Tris mit 192 mM Glycin und 0.1% 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).

Färbung mit Coomassie. 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 die Entfernung von nicht-proteingebundenem Farbstoff mit 10% Essigsäure.

Silberfärbung. Nach der Elektrophorese wurde das Polyacrylamidgel in Fixierlösung (50% (v/v) Methanol, 12% (v/v) Essigsäure, 0.1% Formaldehyd (v/v) in A. bidest.) für mindestens eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde das Gel dreimal je eine Minute in 50% (v/v) Ethanol gewaschen und für eine Minute in Dinatriumthiosulfat (63 mg in 200 ml A. bidest.) inkubiert. Es folgten dreimaliges Waschen mit A. bidest. für je 20 s und 20 min Imprägnation (0.4 g Silbernitrat, 150 µl 37% (v/v) Formaldehyd in 200 ml A. bidest.). An zwei erneute Waschschrte mit A. bidest. schloss sich die Entwicklung (24 g Na₂CO₃, 1.6 mg Na₂S₂O₃ und 200 µl Formaldehyd in 400 ml A. bidest.) an. Sobald die Proteinbanden die gewünschte Intensität hatten, wurde die Färbereaktion gestoppt, indem EDTA (3.72 g in 200 ml A. bidest.) zugegeben wurde.

4.4.3 Bestimmung des apparenten Molekulargewichtes 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 50 mM Tris/HCl pH 7.5 mit 150 mM NaCl und einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min betrug das Probenvolumen 1.5 ml. Kalibriert wurde die Säule mit dem HMW- bzw. LMW Gel Filtration Calibration Kit von Amersham Biosciences (England) bestehend aus: Thyroglobulin (669 kDa), Ferritin (440 kDa), Catalase (232 kDa), Aldolase (158 kDa), Albumin (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Chymotrypsinogen A (25 kDa) und Ribonuclease A (13.7 kDa).

4.4.4 Dialyse

Um Proteinlösungen von Salzen zu befreien, wurden diese gegen Niedrigsalzpuffer dialysiert. Die Dialyse wurde unter aeroben Bedingungen mit mehrmaligem Puffertausch für mehrere Stunden bzw. über Nacht bei 4°C durchgeführt. Das Puffervolumen betrug jeweils das hundertfache des Probenvolumens. Die verwendete Dialysemembran hatte eine molekulare Ausschlussgröße von 12 kDa.

4.4.5 Ultrafiltration

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

4.5 Expression und Reinigung von rekombinanten Enzymen

4.5.1 Expression

Als Expressionssystem wurden die eine Ampicillin- oder Kanamycinresistenz tragenden Vektoren pET14b, pET17b, pET19b, pET28a oder pET44b (Novagen, Schwalbach) gewählt, die jeweils kombiniert wurden mit den Expressionsstämmen *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* BL21(DE3).star, *E. coli* BL21(DE3)-CodonPlus-RIL oder *E. coli* Rosetta B (DE3)-pLysS (Stratagene, Amsterdam, Niederlande und EMD Biosciences (Novagen), Darmstadt, Deutschland). Tabelle 5 gibt eine Übersicht über alle in dieser Arbeit klonierten und exprimierten ORFs. Die Expressionen wurden in LB-Medium (4.3.5) mit 100 µg/ml Carbenicillin (pET14b, pET17b, pET19b und pET44b) bzw. mit 30 µg/ml Kanamycin (pET28a) und ggf. 34 µg/ml Chloramphenicol (s. Tabelle 5) bei 30 bzw. 37°C unter aeroben Bedingungen durchgeführt. Die Induktion erfolgte mit 0.4 mM (pET14b und pET17b) bzw. 1 mM IPTG (pET19b, pET28a und pET44b). Nach Expression wurden die Zellen bei 8°C für 20 min mit 10500 x g pelletiert (Beckmann Avanti J-25 Centrifuge, Rotor JLA 10.5).

Tabelle 5 Übersicht über die in dieser Arbeit exprimierten ORFs. Die Quelle der DNA, der verwendete Vektor, die zum Klonieren verwendeten Schnittstellen, die Bezeichnung der konstruierten Plasmide, die Bezeichnung des Genproduktes und der verwendete Expressionsstamm sind für jeden ORF angegeben.

DNA-Quelle, ORF	Vektor	Schnittstellen	Bezeichnung Konstrukt	Bezeichnung Genprodukt	Expressionsstamm (Resistenz)
<i>M. thermoautotrophicus</i> MTH860	pET19b	<i>NdeI</i> <i>XhoI</i>	MTH860/pET19b	HPI-Mt	BL21-CodonPlus (Chloramphenicol)
<i>M. thermoautotrophicus</i> MTH860-E229A	pET19b	<i>NdeI</i> <i>XhoI</i>	MTH860-E229A/pET19b	HPI-Mt/E229A	BL21-CodonPlus (Chloramphenicol)
<i>M. thermoautotrophicus</i> MTH860-I143K	pET19b	<i>NdeI</i> <i>XhoI</i>	MTH860-I143K/pET19b	HPI-Mt/I143K	BL21-CodonPlus (Chloramphenicol)
<i>Ms. stadtmanae</i> MSP_1054	pET28a	<i>NheI</i> <i>EcoRI</i>	MSP_1054/pET28a	HPI-Ms	Rosetta B-pLysS (Chloramphenicol)
<i>Tp. acidophilum</i> Ta0479	pET19b	<i>NdeI</i> <i>BamHI</i>	Ta0479/pET19b	HPI-Ta	BL21
<i>S. enterica</i> STM0572	pET19b	<i>NdeI</i> <i>BamHI</i>	STM0572/pET19b	HPI-St	BL21-CodonPlus (Chloramphenicol)
<i>T. maritima</i> TM0813	pET19b	<i>NdeI</i> <i>BamHI</i>	TM0813/pET19b	GPDA-Tm	BL21-CodonPlus (Chloramphenicol)
<i>P. furiosus</i> PF0362	pET14b	<i>NdeI</i> <i>XhoI</i>	PF0362/pET14b	GPDA-Pf	BL21-CodonPlus (Chloramphenicol)
<i>P. furiosus</i> PF0362-E211A	pET14b	<i>NdeI</i> <i>XhoI</i>	PF0362-E211A/pET14b	GPDA-Pf/E211A	BL21-CodonPlus (Chloramphenicol)
<i>P. furiosus</i> PF0362-V134K	pET14b	<i>NdeI</i> <i>XhoI</i>	PF0362-V134K/pET14b	GPDDA-Pf/V134K	BL21-CodonPlus (Chloramphenicol)
<i>M. thermoautotrophicus</i> MTH171	pET17b	<i>NheI</i> <i>BamHI</i>	MTH171/pET17b	GlmS-Mt	BL21-CodonPlus (Chloramphenicol)
<i>T. maritima</i> TM1385	pET28a	<i>NheI</i> <i>EcoRI</i>	TM1385/pET28a	PGI-Tm	BL21-CodonPlus (Chloramphenicol)
<i>Mp. kandleri</i> MK0918	pET19b	<i>NdeI</i> <i>BamHI</i>	MK0918/pET19b	Mk0918	BL21-CodonPlus (Chloramphenicol)
<i>Mp. kandleri</i> MK0918	pET19b	<i>NdeI</i> <i>BamHI</i>	MK0918/pET19b	Mk0918	BL21.star
<i>Mp. kandleri</i> MK0918	pET17b	<i>NdeI</i> <i>BamHI</i>	MK0918/pET17b	Mk0918	BL21.star
<i>Mp. kandleri</i> MK0918	pET44b	<i>PshAI</i> <i>BamHI</i>	MK0918/pET44b	Mk0918	BL21.star

Im Folgenden werden die Bedingungen der Expressionen für die exprimierten Proteine dargestellt:

HPI-Mt, HPI-Mt/E229A und HPI-Mt/I143K wurden in je 1 l Medium exprimiert. Die Induktion erfolgte jeweils bei einer OD_{600} von 0.6. Nach 20 h Expression bei 30°C wurden die Zellen bei einer OD_{600} von 6 bis 7 pelletiert.

HPI-Ms wurde in 4 l Medium exprimiert. Die Induktion erfolgte bei einer OD_{600} von 0.6. Nach 19 h Expression bei 30°C wurden die Zellen bei einer OD_{600} von 4.3 pelletiert.

HPI-Ta wurde in 1.5 l Medium exprimiert. Die Induktion erfolgte bei einer OD_{600} von 0.6. Nach 20 h Expression bei 37°C wurden die Zellen bei einer OD_{600} von 7.6 pelletiert.

HPI-St wurde in 800 ml Medium exprimiert. Die Induktion erfolgte bei einer OD₆₀₀ von 0.65. Nach 6 h Expression bei 37°C wurden die Zellen bei einer OD₆₀₀ von 2.6 pelletiert.

GPDA-Tm wurde in 2.4 l Medium exprimiert. Die Induktion erfolgte bei einer OD₆₀₀ von 0.6. Nach 20 h Expression bei 30°C wurden die Zellen bei einer OD₆₀₀ von 5.3 pelletiert.

GPDA-Pf, GPDA-Pf/E211A und GPDA-Pf/V134K wurden in je 1 l Medium exprimiert. Die Induktion erfolgte jeweils bei einer OD₆₀₀ von 0.5. Nach 3 h Expression bei 37°C wurden die Zellen bei einer OD₆₀₀ von 4.0 pelletiert.

GlmS-Mt wurde in 4 l Medium exprimiert. Die Induktion erfolgte bei einer OD₆₀₀ von 0.8. Nach 18 h Expression bei 30°C wurden die Zellen bei einer OD₆₀₀ von 2.2 pelletiert.

PGI-Tm wurde in 1.5 l Medium exprimiert. Die Induktion erfolgte bei einer OD₆₀₀ von 0.7. Nach 20 h Expression bei 30°C wurden die Zellen bei einer OD₆₀₀ von 5.6 pelletiert.

Die Zellen wurden bis zum Zellaufschluss bei -20°C gelagert.

4.5.2 Reinigung der rekombinanten Proteine

Alle rekombinanten Proteine wurden aus *E. coli*-Extrakten bis zur apparenten Homogenität angereichert. Die säulenchromatographischen Schritte wurden mit einer BioLogic Workstation (Biorad, München) und FPLC-Säulen von GE Healthcare (Freiburg) und Biorad (München) bei 7-15°C durchgeführt. Das Ni-NTA Agarose Säulenmaterial wurde von der Firma Qiagen (Hilden) bezogen. Die Elution der Proteine von den Säulen wurde durch Absorptionmessung bei 280 nm verfolgt. Zur Berechnung der spezifischen Aktivitäten wurde nach Ermittlung der Aktivität (U/ml) in den Fraktionen die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt (4.4.1). Während der Reinigung wurde die Reinheit des Enzyms auf 12%-igen SDS-Polyacrylamidgelen (4.4.2) überprüft.

Reinigung der rekombinanten HPI aus *M. thermoautotrophicus* (HPI-Mt) sowie der Mutanten HPI-Mt/E229A und HPI-Mt/I143K. Die Pellets nach Ernte der Zellen wurden in je 20 ml Puffer A (50 mM Tris/HCl pH 8.2, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol) suspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall für 10 x 1 min mit einem Minitip (Branson Sonifier 250 Ultraschall desintegrator, Branson, Heinemann, Schwäbisch Gmünd) bei 30% duty cycle und output control 3 im Eisbad. Die Suspensionen wurden bei 48000 x g und 8°C für 30 min zentrifugiert. Die zellfreien Extrakte wurden jeweils auf eine mit Puffer A equilibrierte Ni-NTA-Säule (7 ml) aufgetragen. Die Proteine wurden mit einem steigenden Imidazolgradienten von 10 bis 500 mM bei einer Flussrate von 2 ml/min eluiert. Die Fraktionen mit der höchsten PGI-Aktivität wurden auf eine Superdex 200 HiLoad 16/60 Gelfiltrationssäule aufgetragen, die mit Puffer B (50 mM Tris/HCl pH 7.5, 150 mM NaCl) equilibriert war. Die Proteine wurden mit einer Flussrate von 1 ml/min eluiert. In diesem Stadium waren die Enzyme apparent homogen und konnten bei 4°C ohne größeren Aktivitätsverlust über Wochen gelagert werden.

Reinigung der rekombinanten HPI aus *Ms. stadtmanae* (HPI-Ms). Das Pellet nach Ernte der Zellen wurde in 15 ml Puffer A suspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels 2-maliger Hochdruckhomogenisation in einer gekühlten French Press Zelle bei 86 bar. Diese Suspension wurde bei 48000 x g und 4°C für 1 h zentrifugiert. Der zellfreie Extrakt wurde auf eine mit Puffer A equilibrierte Ni-NTA-Säule (7 ml) aufgetragen. Die Proteine wurden mit einem steigenden Imidazolgradienten von 10 bis 500 mM bei einer Flussrate von 3 ml/min eluiert. Die Fraktionen mit der höchsten PGI-Aktivität wurden vereinigt, auf 1000 ml mit Puffer C (50 mM Tris/HCl pH 7.5) aufgefüllt und auf eine mit Puffer C equilibrierte Q-Sepharose High Performance HiLoad 16/10 Anionenaustauschersäule (20 ml) aufgetragen. Die Elution der Proteine erfolgte mit einem linearen Gradienten von pH 7.5 nach pH 6.5 (Puffer D: 50 mM BisTris/HCl pH 6.5) gefolgt von einem Gradienten von 0 M nach 2 M NaCl in Puffer D. Die Proteine wurden mit einer Flussrate von 5 ml/min eluiert. Die Fraktionen mit der höchsten PGI-Aktivität wurden mittels Ultrafiltration (4.4.5, Ausschlussgröße: 10 kDa) auf ein Volumen von 1.5 ml eingengt und auf eine Superdex 200 HiLoad 16/60 Gelfiltrationssäule aufgetragen, die mit Puffer B equilibriert war. Die Proteine wurden mit einer Flussrate von 1 ml/min eluiert. In diesem Stadium war das Enzym apparent homogen und konnte bei 4°C ohne größeren Aktivitätsverlust über Wochen gelagert werden.

Reinigung der rekombinanten HPI aus *Tp. acidophilum* (HPI-Ta). Das Pellet nach Ernte der Zellen wurde in 50 ml Puffer A suspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels 2-maliger Hochdruckhomogenisation in einer gekühlten French Press Zelle bei 86 bar. Diese Suspension wurde bei 48000 x g und 8°C für 1 h zentrifugiert. Der Extrakt wurde auf eine mit Puffer A equilibrierte Ni-NTA-Säule (7 ml) aufgetragen. Die Proteine wurden mit einem steigenden Imidazolgradienten von 10 bis 500 mM bei einer Flussrate von 2 ml/min eluiert. Die Fraktionen mit der höchsten PGI-Aktivität wurden mittels Ultrafiltration (4.4.5, Ausschlussgröße: 10 kDa) auf ein Volumen von 3 ml eingengt und in 1.5 ml Aliquots auf eine Superdex 200 HiLoad 16/60 Gelfiltrationssäule aufgetragen, die mit Puffer B equilibriert war. Die Proteine wurden mit einer Flussrate von 1 ml/min eluiert. In diesem Stadium war das Enzym apparent homogen und konnte bei 4°C ohne größeren Aktivitätsverlust über Wochen gelagert werden.

Reinigung der rekombinanten HPI aus *S. enterica* serovar *typhimurium* (HPI-St). Das Pellet nach Ernte der Zellen wurde in 5 ml Puffer A suspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels 2-maliger 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 Extrakt wurde auf eine mit Puffer A equilibrierte Ni-NTA-Säule (7 ml) aufgetragen. Die Proteine wurden mit einem steigenden Imidazolgradienten von 10 bis 500 mM bei einer Flussrate von 1 ml/min eluiert. In diesem Stadium war das Enzym apparent homogen, es konnte bei 4°C ohne größeren Aktivitätsverlust über Wochen gelagert werden.

Reinigung der rekombinanten Glucosamin-6-Phosphat Deaminase (GPDA) aus *T. maritima* (GPDA-Tm). Das Pellet nach Ernte der Zellen wurde in 20 ml Puffer A suspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels 3-maliger Hochdruckhomogenisation in einer gekühlten French Press Zelle bei 86 bar. Diese Suspension wurde bei 48000 x g und 8°C für 30 min zentrifugiert. Der Extrakt wurde für 30 min bei 70°C inkubiert und die hitzepräzipitierten Proteine pelletiert (48000 x g, 8°C, 45 min). Der Überstand wurde auf eine mit Puffer A equilibrierte Ni-NTA-Säule (7 ml) aufgetragen. Die Proteine wurden mit einem steigenden Imidazolgradienten von 10 bis 500 mM bei einer Flussrate von 1 ml/min eluiert. In diesem Stadium war das Enzym apparent homogen, es konnte bei 4°C ohne größeren Aktivitätsverlust über Wochen gelagert werden.

Reinigung der rekombinanten Glucosamin-6-Phosphat Deaminase (GPDA) aus *P. furiosus* (GPDA-Pf) sowie der Mutanten GPDA-Pf/E211A und GPDA-Pf/V134K. Die Pellets nach Ernte der Zellen wurden in je 20 ml Puffer A suspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall für 10 x 1 min mit einem Minitip (Branson Sonifier 250 Ultraschall desintegrator, Branson, Heinemann, Schwäbisch Gmünd) bei 30% duty cycle und output control 3 im Eisbad. Die Suspensionen wurden bei 48000 x g und 8°C für 30 min zentrifugiert. Die zellfreien Extrakte wurden jeweils auf eine mit Puffer A equilibrierte Ni-NTA-Säule (7 ml) aufgetragen. Die Proteine wurden mit einem steigenden Imidazolgradienten von 10 bis 500 mM bei einer Flussrate von 2 ml/min eluiert. Die Fraktionen mit der höchsten GPDA-Aktivität wurden auf eine Superdex 200 HiLoad 16/60 Gelfiltrationssäule aufgetragen, die mit Puffer B equilibriert war. Die Proteine wurden mit einer Flussrate von 1 ml/min eluiert. In diesem Stadium waren die Enzyme apparent homogen und konnten bei 4°C ohne größeren Aktivitätsverlust über Wochen gelagert werden.

Reinigung der rekombinanten Glutamin:Fructose-6-Phosphat Transaminase aus *M. thermoautotrophicus* (GlmS-Mt). Das Pellet nach Ernte der Zellen wurde in 35 ml Puffer E (100 mM Tris/HCl pH 8, 2 M Ammoniumsulfat) suspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels 2-maliger Hochdruckhomogenisation in einer gekühlten French Press Zelle bei 86 bar. Diese Suspension wurde bei 48000 x g und 8°C für 1 h zentrifugiert. Der zellfreie Extrakt wurde auf eine Phenyl-Sepharose Säule (16 ml) aufgetragen, die mit Puffer E equilibriert war. Die Elution der Proteine erfolgte bei einer Flussrate von 1 ml/min mit einem linearen Gradienten von 2 M bis 0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Die Fraktionen mit höchster GlmS-Aktivität (0.25 - 0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) wurden nach Ankonzentrieren mittels Ultrafiltration (4.4.5, Ausschlussgröße: 30 kDa) auf eine Superdex 200 HiLoad 16/60 Gelfiltrationssäule aufgetragen, die mit Puffer B equilibriert war. Die Proteine wurden mit einer Flussrate von 1 ml/min eluiert. In diesem Stadium war das Enzym apparent homogen, es war aber bereits nach 24 h Lagerung keine Aktivität mehr nachweisbar.

Reinigung der rekombinanten PGI aus *T. maritima* (PGI-Tm). Das Pellet nach Ernte der Zellen wurde in 15 ml Puffer A suspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels 2-maliger Hochdruckhomogenisation in einer gekühlten French Press Zelle bei 86 bar. Diese Suspension wurde bei 48000 x g und 8°C für 30 min zentrifugiert. Der Extrakt wurde für 30 min bei 70°C inkubiert und die hitzepräzipitierten Proteine pelletiert (48000 x g, 8°C, 45 min). Der Überstand wurde auf eine mit Puffer A equilibrierte Ni-NTA-Säule (7 ml) aufgetragen. Die Proteine wurden mit einem steigenden Imidazolgradienten von 10 bis 500 mM bei einer Flussrate von 1 ml/min eluiert. Die Fraktionen mit der höchsten PGI-Aktivität wurden mittels Ultrafiltration (4.4.5, Ausschlussgröße: 50 kDa) auf ein Volumen von 1.5 ml eingengt und auf eine Superdex 200 HiLoad 16/60 Gelfiltrationssäule aufgetragen, die mit Puffer B equilibriert war. Die Proteine wurden mit einer Flussrate von 1 ml/min eluiert. In diesem Stadium war das Enzym apparent homogen und konnte bei 4°C ohne Aktivitätsverlust über Wochen gelagert werden.

4.5.3 Expression und Reinigung von Mk0918

Mk0918 aus *Methanopyrus kandleri* wurde fast ausschließlich in Form von unlöslichen Einschlusskörpern exprimiert. Deswegen wurden zur Expression dieses ORFs unterschiedliche Vektoren, Expressionsstämme und Expressionsbedingungen getestet, mit dem Ziel, lösliches Protein zu exprimieren.

Der ORF MK0918 wurde in die Vektoren pET17b, pET19b und pET44b kloniert. Sowohl *E. coli* BL21(DE3)-CodonPlus-RIL als auch *E. coli* BL21(DE3).star wurden als Expressionsstämme getestet, es wurden Expressionsversuche bei 4°C, 20°C, 30°C und 37°C durchgeführt. Die Zellpellets nach Expression und Zentrifugation wurden in verschiedenen Puffern aufgenommen, so z.B. Puffer A, 50 mM Tris/HCl pH 8.2 mit 0.5 M oder 1 M KCl, 0.75 M Kaliumphosphatpuffer (KPP) oder 1.5 M KPP. Nach Zellaufschluss entweder mittels Ultraschall oder mittels Hochdruckhomogenisation wurden die Überstände nach Zentrifugation (48000 x g, 8°C, 30 min) auf eine Ni-NTA-Säule aufgetragen. Mit den Fraktionen, die das Protein Mk0918 in löslicher Form enthielten, wurden Aktivitätstests durchgeführt. Mit den Pellets nach Zentrifugation, die größtenteils aus unlöslichen Einschlusskörpern des rekombinanten Proteins bestanden, wurden verschiedene Rückfaltungsexperimente durchgeführt. Nach Denaturierung der Einschlusskörper in Entfaltungspuffer (8 M Harnstoff, 50 mM Tris/HCl pH 8) wurde die Rückfaltung entweder durch Verdünnung in Rückfaltungspuffer (20 mM Tris/HCl pH 8, 1 M KCl, 1 mM Fructose-6-Phosphat, 3 mM Glutathion_{red.}, 0.3 mM Glutathion_{ox.} und zusätzlich entweder 10% Glycerin, 2 mM EDTA oder 10% Glycerin und 2 mM EDTA; finale Proteinkonzentration 20 µg/ml) und siebentägiger Inkubation bei 4°C oder durch Dialyse gegen 20 mM Tris/HCl pH 8 mit 1 M KCl durchgeführt. Eine weitere Rückfaltungsmethode, die in dieser Arbeit getestet wurde, bestand darin, die denaturierten Einschlusskörper auf eine Ni-NTA-Säule aufzutragen und das an das Säulenmaterial gebundene Protein über einen fallenden linearen

Harnstoffgradienten zu renaturieren. Mit den aus diesen Versuchen resultierenden Proteinlösungen wurden Tests auf PGI-Aktivität durchgeführt (4.6.6).

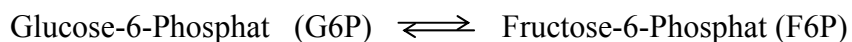
4.6 Charakterisierung der rekombinanten Enzyme und PGI-Aktivität im Zellextrakt von *Methanothermobacter thermoautotrophicus*

Im Folgenden werden die Testsysteme, die zur Charakterisierung der gereinigten Enzyme und zur Enzymmessung im Zellextrakt von *M. thermoautotrophicus* eingesetzt wurden, beschrieben. Die Enzymtests wurden in einem beheizbaren Ultrospec4000 Photometer (Pharmacia, Freiburg) oder einem beheizbaren Cary 50 UV-Vis Spectrophotometer (Varian, Darmstadt) in Halbmikro-Einwegküvetten ($d = 1 \text{ cm}$) durchgeführt. Die Testlösungen wurden in den Küvetten bei der jeweiligen Temperatur vorinkubiert, die Startbarkeit sowie die Proteinabhängigkeit der Reaktion durch die verschiedenen Substrate bzw. durch Extrakt wurden überprüft. Die Reaktionen der HPIs und PGIs sowie die Deaminierung von Glucosamin-6-Phosphat wurden mit der Reduktion von NADP oder der Oxidation von NADH gekoppelt und über die Extinktionszu- bzw. -abnahme bei 365 nm verfolgt. Die spezifische Aktivität wurde mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von $3.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ pro zwei Elektronen berechnet. Dabei gilt für alle Testsysteme: Die Einheit (1 U) der Enzymaktivität ist definiert als der Verbrauch von $1 \text{ }\mu\text{mol}$ Substrat bzw. die Bildung von $1 \text{ }\mu\text{mol}$ Produkt pro Minute. Es war sichergestellt, dass die verwendeten Hilfsenzyme im Test nicht limitierend waren.

Zur Charakterisierung der Enzyme gehörten die Bestimmung der kinetischen Parameter, des Temperaturoptimums und des pH-Optimums. Für die HPIs aus *M. thermoautotrophicus* und *Ms. stadtmanae*, die PGI aus *T. maritima* und die GPDA aus *P. furiosus* wurde zusätzlich auch die Thermostabilität ermittelt. Außerdem wurde der Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die Aktivität der Glucose-6-Phosphat Isomerase aus *M. thermoautotrophicus* und die Glucosamin-6-Phosphat Deaminase aus *P. furiosus* untersucht.

4.6.1 Charakterisierung der rekombinanten Glucose-6-Phosphat Isomerasen (HPIs)

Glucose-6-Phosphat Isomerasen katalysieren die folgende reversible Reaktion:



In Richtung der G6P Bildung wurde die Reaktion an die Reduktion von NADP durch die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase (G6PDH) gekoppelt, die Rückrichtung wurde durch Kopplung der Reaktion an die Oxidation von NADH durch die Mannitol-1-Phosphat Dehydrogenase gemessen. Die kinetischen Parameter wurden in Richtung der G6P Bildung in 100 mM Tris/HCl mit $0 - 25 \text{ mM F6P}$, 0.5 mM NADP und 1 U G6PDH bestimmt (unter 50°C wurde das kommerzielle Hilfsenzym aus *Saccharomyces cerevisiae* verwendet, über 50°C die rekombinante G6PDH aus *T. maritima* (Hansen et al. 2002b)). Die Aktivität der HPI aus

M. thermoautotrophicus und ihrer Mutanten wurden bei pH 7 und 50°C, die der HPI-Ms bei 38°C und pH 7.7, die der HPI-Ta bei 45°C und pH 7, die Aktivität der HPI-St bei 45°C und pH 7.4 und die Isomerase-Aktivität der GPDA aus *T. maritima* bei 70°C und pH 7.5 bestimmt. Die Reaktion wurde mit Protein gestartet. In Richtung der Fructose-6-Phosphat Bildung wurden die kinetischen Parameter in 100 mM Tris/HCl mit 0 - 25 mM G6P, 0.3 mM NADH und 0.2 U rekombinanter Mannitol-1-Phosphat Dehydrogenase aus *Klebsiella pneumoniae* bestimmt. Die Aktivität der HPI-Mt, ihrer Mutanten, der HPI-Ta und der HPI-St wurden bei 45°C, die der HPI-Ms bei 38°C bestimmt, die pH-Werte wurden wie in der umgekehrten Reaktionsrichtung gewählt. Die kinetischen Parameter wurden jeweils aus der Darstellung der Daten nach Lineweaver-Burk ermittelt.

Die Temperaturabhängigkeit der HPIs wurde zwischen 13 und 93°C im kontinuierlichen Testsystem in Richtung der G6P Bildung gemessen. Die Ansätze enthielten 100 mM KPP, 5 mM F6P, 0.5 mM NADP und 1 U G6PDH (unter 50°C) bzw. 0.3 U rekombinante G6PDH aus *T. maritima* (über 50°C). Die pH-Werte wurden wie bei der Bestimmung der kinetischen Parameter eingestellt. Zur Bestimmung der Thermostabilität der HPIs aus *M. thermoautotrophicus* und *Ms. stadmanae* wurden je 5 bzw. 32 µg Protein in 100 mM KPP pH 7 bzw. 7.7 über 120 min in geschlossenen Inkubationsgefäßen bei Temperaturen zwischen 50°C und 70°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Inkubationsgefäße 10 min auf Eis gekühlt und anschließend die Restaktivität bestimmt.

Die Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der gereinigten Enzyme vom pH-Wert wurde zwischen pH 5.5 und 9 bei 50°C (HPI-Mt, HPI-Ms, HPI-Ta, HPI-St) bzw. 70°C (Isomerase Aktivität der GPDA-Tm) im kontinuierlichen Testsystem bestimmt. Die Ansätze enthielten entweder BisTris/HCl (pH 5.5 bis 6.8), Tris/HCl (pH 6.8 bis 8.3), CHES/NaOH (pH 8.3 bis 9) sowie 5 mM F6P, 0.5 mM NADP und 1 U G6PDH (unter 50°C) bzw. 0.3 U rekombinante G6PDH aus *T. maritima* (über 50°C).

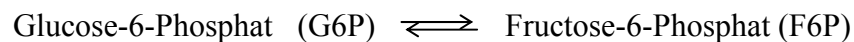
Die halbmaximalen Hemmkonzentrationen K_i für Erythrose-4-Phosphat (E4P), 6-Phosphogluconat (6PG) und Sorbitol-6-Phosphat (S6P) der HPI aus *M. thermoautotrophicus* wurden im kontinuierlichen Testverfahren bei 50°C in 100 mM Tris/HCl pH 7 mit 0.5 mM NADP, 5 mM F6P, 1 U G6PDH und 0 - 0.5 mM Inhibitor (E4P, 6PG oder S6P) ermittelt. Es wurde mit gereinigter HPI gestartet. Die spezifischen Aktivitäten wurden in prozentuale Restaktivitäten umgerechnet, wobei die spezifische Aktivität ohne Hemmstoff 100% entsprach. Der K_i -Wert entspricht 50% Hemmung. Der Einfluss der Inhibitoren auf die kinetischen Parameter der HPI aus *M. thermoautotrophicus* wurde bei 50°C in 100 mM Tris/HCl pH 7 mit 0.5 mM NADP, 0 - 20 mM F6P und 1 U G6PDH im kontinuierlichen Test überprüft. Die Testansätze enthielten zusätzlich 50 µM E4P, 20 µM 6PG oder 8 µM S6P.

4.6.2 PGI-Aktivität in Zellextrakt von *M. thermoautotrophicus*

Zur Herstellung des Zellextraktes wurden 6 g Feuchtzellen (4.2) in 5 ml 50 mM Tris/HCl pH 7.2 mit 150 mM NaCl resuspendiert und mittels 3-maliger Hochdruckhomogenisation in einer gekühlten French Press Zelle bei 72 bar aufgeschlossen. Diese Suspension wurde bei 48000 x g und 4°C für 60 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in 1.5 ml Aliquots auf eine Superdex 200 HiLoad 16/60 Gelfiltrationssäule aufgetragen, die mit 50 mM Tris/HCl pH 7.2 mit 150 mM NaCl equilibriert war. Die Proteine wurden mit einer Flussrate von 1 ml/min eluiert. Die Fraktionen wurden nach Proteinbestimmung (4.4.1) in die Tests auf PGI-Aktivität eingesetzt. Der Test erfolgte wie in 4.6.1 beschrieben in Richtung der Glucose-6-Phosphat Bildung mit 5 mM Fructose-6-Phosphat als Substrat in 100 mM Tris/HCl pH 7 mit 0.5 mM NADP und 1.1 U G6PDH.

4.6.3 Charakterisierung der rekombinanten Glucose-6-Phosphat Isomerase (PGI) aus *T. maritima*

Die PGI katalysiert folgende reversible Reaktion:



In Richtung der G6P Bildung wurde die Reaktion an die Reduktion von NADP durch die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase gekoppelt, die Rückrichtung wurde durch Kopplung der Reaktion an die Oxidation von NADH durch die Mannitol-1-Phosphat Dehydrogenase gemessen. Die kinetischen Parameter der PGI-Tm wurden in Richtung der Glucose-6-Phosphat Bildung in 100 mM Tris/HCl pH 7.4 mit 0 - 10 mM F6P, 0.5 mM NADP und 1 U G6PDH (rekombinantes Enzym aus *T. maritima*) bei 70°C bestimmt. Die Reaktion wurde mit Protein gestartet. In Richtung der Fructose-6-Phosphat Bildung wurden die kinetischen Parameter bei 45°C in 100 mM Tris/HCl pH 7.4 mit 0 - 10 mM G6P, 0.3 mM NADH und 0.5 U rekombinanter Mannitol-1-Phosphat Dehydrogenase aus *Klebsiella pneumoniae* bestimmt. Die kinetischen Parameter wurden jeweils aus der Darstellung der Daten nach Lineweaver-Burk ermittelt.

Die Temperaturabhängigkeit der PGI wurde zwischen 32 und 93°C im kontinuierlichen Testsystem in Richtung der G6P Bildung gemessen. Die Ansätze enthielten 100 mM KPP pH 7.4, 5 mM F6P, 0.5 mM NADP und 1 U G6PDH aus *S. cerevisiae* (unter 50°C) bzw. 1 U rekombinante G6PDH aus *T. maritima* (über 50°C). Zur Bestimmung der Thermostabilität wurde je 0.1 µg Protein in 100 mM KPP pH 7.4 über 120 min in geschlossenen Inkubationsgefäßen bei Temperaturen von 80°C und 90°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Inkubationsgefäße 10 min auf Eis gekühlt und anschließend die Restaktivität bestimmt.

Die Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der PGI vom pH-Wert wurde zwischen pH 5.5 und 9 bei 50°C im kontinuierlichen Testsystem bestimmt. Die Ansätze enthielten entweder BisTris/HCl (pH 5.5 bis 6.8), Tris/HCl (pH 6.8 bis 8.3), CHES/NaOH (pH 8.3 bis 9) sowie 5 mM F6P, 0.5 mM NADP und 1 U G6PDH.

4.6.4 Enzymmessung der rekombinanten Glutamin:Fructose-6-Phosphat Transaminase (GlmS) aus *M. thermoautotrophicus*

Die GlmS katalysiert folgende irreversible Reaktion:

Fructose-6-Phosphat (F6P) + Glutamin \rightarrow Glucosamin-6-Phosphat (NG6P) + Glutamat.

Die Aktivität der rekombinanten GlmS aus *M. thermoautotrophicus* wurde im diskontinuierlichen Testsystem bestimmt. Aliquots der proteinhaltigen Fraktionen wurden in 100 mM Tris/HCl pH 7 mit 10 mM F6P und 10 mM Glutamin bei 60°C im Thermoblock inkubiert. Nach Inkubation für 0, 5, 10 oder 15 min wurde die Reaktion durch Zugabe von TCA (Endkonzentration 10%) gestoppt. Die Proben wurden anschließend für 10 min bei 12000 x g in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Überstände wurden durch Zugabe von 10 M KOH neutralisiert, was mittels pH-Stäbchen überprüft wurde. Entstandenes Glucosamin-6-Phosphat wurde nach einer modifizierten Methode nach Morgan-Elson (Elson und Morgan 1933; Reissig et al. 1955) bestimmt. Dazu wurden 120 µl Probe mit maximal 0.4 mM Glucosamin-6-Phosphat mit 15 µl gesättigter NaHCO₃-Lösung und 15 µl frisch angesetztem 5%-igen Essigsäureanhydrid gemischt, 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 3 min gekocht. Nach Abkühlen der Proben auf Eis wurden 30 µl 0.8 M Borsäure/KOH pH 9.1 zugegeben und für weitere 3 min gekocht und abgekühlt. Zu den Ansätzen wurden nun je 900 µl Ehrlichs Reagenz zugegeben (1 g p-Dimethylaminobenzaldehyd, 1.25 ml 10 N HCl, ad 100 ml 100% Essigsäure) und für 20 min bei 37°C inkubiert. Die Extinktion wurde bei 585 nm gemessen. Eine Proportionalität der Messwerte war bis zu einer Glucosamin-6-Phosphat Konzentration von 0.4 mM in der Probe gegeben. Für jede Testreihe wurde eine Eichgerade mit Glucosamin-6-Phosphat bestimmt, da das Alter des Ehrlichs Reagenz den gemessenen Extinktionskoeffizienten beeinflusste. Als Kontrollen dienten Ansätze ohne Substrat und Ansätze ohne Protein, um unspezifische Raten ausschließen zu können.

4.6.5 Charakterisierung der rekombinanten Glucosamin-6-Phosphat Deaminasen (GPDA) aus *P. furiosus* und *T. maritima*

Die GPDA katalysiert folgende reversible Reaktion:

Glucosamin-6-Phosphat (NG6P) \rightleftharpoons Fructose-6-Phosphat (F6P) + Ammonium.

In Richtung der F6P Bildung wurde die Reaktion an die Reduktion von NADP durch die PGI und die G6PDH gekoppelt, die Rückrichtung wurde durch Bestimmung des entstanden Produktes Glucosamin-6-Phosphat gemessen. Die kinetischen Parameter der GPDAs wurden in Richtung der Fructose-6-Phosphat Bildung im kontinuierlichen Testsystem bei 50°C in 100 mM Tris/HCl pH 7.6 (GPDA-Pf und GPDA-Pf/V134K) bzw. pH 7 (GPDA-Tm) mit 0 - 15 mM NG6P, 0.5 mM NADP, 10 U PGI und 10 U G6PDH bestimmt. Die Reaktion wurde mit Protein gestartet.

Die Aktivität des Enzyms mit F6P und Ammonium wurde im diskontinuierlichen Testsystem durch Bestimmung des gebildeten Glucosamin-6-Phosphats gemessen. Zur Bestimmung der kinetischen Parameter in Richtung der NG6P Bildung wurden die GPDAs in 100 mM

Tris/HCl pH 7.6 (GPDA-Pf) bzw. pH 7 (GPDA-Tm) mit 0 - 20 mM F6P und 150 mM Ammonium oder mit 10 mM F6P und 0 - 200 mM Ammonium bei 60°C im Thermoblock inkubiert. Nach Inkubation für 0, 5, 10 oder 15 min wurde die Reaktion durch Zugabe von TCA (Endkonzentration 10%) gestoppt. Die Proben wurden anschließend für 10 min bei 12000 x g in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Überstände wurden durch Zugabe von 10 M KOH neutralisiert, was mittels pH-Stäbchen überprüft wurde. Als Kontrollen dienen Ansätze ohne Substrat und Ansätze ohne Protein, um unspezifische Raten ausschließen zu können. Entstandenes Glucosamin-6-Phosphat wurde nach der modifizierten Morgan-Elson Methode (4.6.4) bestimmt. Weiterhin wurde mit dieser Methode getestet, ob die GPDA aus *P. furiosus* neben Ammonium auch Glutamin als Aminogruppen-Donor verwenden kann. Dazu wurde das Protein in 100 mM Tris/HCl pH 7.6 mit 10 mM F6P und 10 bzw. 100 mM Glutamin bei 60°C im Thermoblock für 0, 5, 10 oder 15 min inkubiert und wie oben das entstandene Glucosamin-6-Phosphat bestimmt.

Die Temperaturabhängigkeit der GPDA-Pf wurde zwischen 30 und 91°C im kontinuierlichen Testsystem in Richtung der F6P Bildung gemessen. Die Ansätze enthielten 100 mM Tris/HCl pH 7.6 (berechnet für die jeweilige Temperatur), 5 mM NG6P, 0.5 mM NADP, 5 U PGI und 10 U G6PDH aus *S. cerevisiae* (unter 50°C) bzw. 0.2 U rekombinante PGI und 3 U rekombinante G6PDH aus *T. maritima* (über 50°C). Zur Bestimmung der Thermostabilität wurde je 30 µg Protein in 100 mM Tris/HCl pH 7.6 (berechnet für die jeweilige Temperatur) über 120 min in geschlossenen Inkubationsgefäßen bei Temperaturen von 90°C und 95°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Inkubationsgefäße 10 min auf Eis gekühlt und anschließend die Restaktivität bestimmt.

Die Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der GPDA vom pH-Wert wurde zwischen pH 5.5 und 9 bei 50°C im kontinuierlichen Testsystem bestimmt. Die Ansätze enthielten entweder BisTris/HCl (pH 5.5 bis 6.8), Tris/HCl (pH 6.8 bis 8.3) oder CHES/NaOH (pH 8.3 bis 9) sowie 2.5 mM NG6P, 0.5 mM NADP, 10 U PGI und 10 U G6PDH.

Der Einfluss von Erythrose-4-Phosphat und 6-Phosphogluconat auf die Aktivität der GPDA aus *P. furiosus* wurde im diskontinuierlichen Testsystem in Richtung der F6P-Bildung gemessen, da diese Substanzen die Aktivität der als Hilfsenzym verwendeten PGI hemmen. Gereinigtes Protein wurde in 100 mM Tris/HCl pH 7.6 mit 10 mM F6P, 150 mM Ammonium und 0.1 mM, 1 mM bzw. 10 mM Erythrose-4-Phosphat oder 6-Phosphogluconat bei 60°C im Thermoblock für 0, 5, 10 oder 15 min inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von TCA gestoppt und entstandenes Glucosamin-6-Phosphat nach der modifizierten Morgan-Elson Methode (4.6.4) bestimmt.

4.6.6 Enzymmessung des rekombinanten Proteins Mk0918

Mit löslichem Protein nach Expression und Reinigung von Mk0918 wurden Tests auf Aktivität einer PGI und auch auf Aktivität einer GPDA durchgeführt. Dazu wurde sowohl nach Zellaufschluss im Überstand vorliegendes lösliches Protein verwendet als auch renaturiertes Protein aus den Rückfaltungsexperimenten. Es wurden unterschiedliche Puffer mit verschiedenen pH-Werten und Konzentrationen für die Testlösungen verwendet, um einen Einfluss der Puffersubstanz auf die Aktivität auszuschließen: 100 mM BisTris/HCl pH 6, 100 mM KPP pH 6.8, 100 mM HEPES pH 6.8, 20 und 100 mM Tricin/KOH pH 7.8, 100 mM - 1.5 M KPP pH 8. Es wurde sowohl bei 50°C als auch bei 80°C mit den entsprechenden Hilfsenzymen gemessen (siehe 4.6.1 und 4.6.5). Da *Mp. kandleri* eine hohe intrazelluläre KCl-Konzentration von über 3 M hat (Huber et al. 1989; Kurr et al. 1991) und für einige Enzyme aus diesem Organismus eine Salzabhängigkeit beschrieben ist (Breitung et al. 1992), wurden in die Tests zusätzlich 0.1 - 1.5 M KCl oder 0.1 - 1.5 KH₂PO₄ eingesetzt. Fructose-6-Phosphat (bei Tests auf PGI-Aktivität) bzw. Glucosamin-6-Phosphat (bei Tests auf GPDA-Aktivität) wurden in Konzentrationen von 0.1 bis 20 mM verwendet. Es wurden zwischen 1 und 1200 µg Protein Mk0918 in einen 1 ml-Testansatz eingesetzt.

4.7 Komplementation von *pgi*-defizienten *E. coli* MG1655

Eine *pgi*-defiziente Mutante des *E. coli*-Stamms MG1655 zeigt nur ein langsames Wachstum auf Glucose und verstoffwechselt diesen Zucker über den Pentosephosphatweg (Hua et al. 2003). Da in diesem Stoffwechselweg nur NADPH gebildet wird, für den Energiestoffwechsel aber NADH benötigt wird, ist die cytoplasmatische Transhydrogenase UdhA essentiell. Diese reoxidiert im Pentosephosphatweg gebildetes NADPH mit NAD, so dass NADH und NADP entstehen. Eine Doppeldeletion von *pgi* und *udhA* führt zu einer Mutante, die nicht mehr in der Lage ist, auf Glucose zu wachsen, da dieser Zucker nun weder über den Embden-Meyerhof-Weg noch über den Pentosephosphatweg abgebaut werden kann (Sauer et al. 2004). Komplementation dieser Mutante mit *pgi*-tragenden Plasmiden sollte diese zum Wachstum mit Glucose als einziger C-Quelle befähigen.

Die in dieser Arbeit konstruierten Plasmide MTH860/pET19b, Msp_1054/pET28a, MK0918/pET19b, Ta0479/pET19b, STM0572/pET19b, TM0813/pET19b, PF0362/pET14b und TM1385/pET28a wurden in die λDE3-lysogenisierten Stämme (4.3.10) *E. coli* MG1655(DE3) und *E. coli* MG1655(DE3) Δ*pgi* Δ*udhA* transformiert (4.3.7). Einzelkolonien von den Platten wurden in 100 ml-Erlenmeyerkolben mit LB-Medium (4.3.5) sowie den entsprechenden Antibiotika inokuliert und über Nacht bei 37°C unter Schütteln bebrütet. Mit den Kulturen wurden anschließend Wachstumsexperimente in 250 ml-Erlenmeyerkolben mit 70 ml M9-Minimalmedium durchgeführt. Ein Liter M9-Minimalmedium war folgendermaßen zusammengesetzt: 200 ml Salzlösung (187.5 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 75 g KH₂PO₄, 25 g NH₄Cl, 12.5 g NaCl, ad 1000 ml H₂O), 1 ml MgSO₄ (1M), ad 1 l A. bidest.. Dem Medium wurden nach

dem Autoklavieren noch 20 mM Glucose, 0.1 mM CaCl₂, 28 µM FeSO₄ und 5 mg Thiaminhydrochlorid steril hinzugefügt. Entsprechend der verwendeten Plasmide (siehe 4.5.1) enthielten die Kulturen zusätzlich IPTG und Carbenicillin oder Kanamycin. Das Medium wurde jeweils 0.5%-ig inokuliert, das Wachstum wurde durch Bestimmung der OD₆₀₀ verfolgt. Vor Messung der Wachstumskurven wurden die Kulturen 3-mal auf M9-Minimalmedium überimpft. Alle Wachstumskurven wurden jeweils 2-mal reproduziert.

Zum Nachweis der PGI-Aktivität in den komplementierten Zellen wurden Rohextrakte präpariert. Die Zellen wurden in der späten exponentiellen Phase durch Zentrifugation bei 4°C für 30 min bei 10500 x g geerntet und in 100 mM Tris/HCl pH 7.5 resuspendiert und bei -20°C gelagert. Der Zellaufschluss erfolgte jeweils mittels Ultraschall für 6 x 1 min mit einem Minitip (Branson Sonifier 250 Ultraschall desintegrator, Branson, Heinemann, Schwäbisch Gmünd) bei 30% duty cycle und output control 3 im Eisbad. Die Suspensionen wurden bei 48000 x g und 8°C für 1 h zentrifugiert. Der Proteingehalt im löslichen Überstand wurde mit der Methode nach Bradford bestimmt (4.4.1). Die PGI-Aktivität in den Rohextrakten wurde in Richtung der Glucose-6-Phosphat Bildung in 100 mM Tris/HCl pH 7.5 mit 10 mM F6P, 0.5 mM NADP und 1 U G6PDH bei 50°C bestimmt.

4.8 Metallabhängigkeit der Cupin-Typ PGIs (cPGIs) aus *Pyrococcus furiosus*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* und *Escherichia coli*

Gereinigte cPGIs aus *P. furiosus*, *A. fulgidus*, *S. enterica* serovar *typhimurium* und *E. coli* wurden für 30 min mit 0.5 M EDTA in 10 mM Tris/HCl inkubiert, um gebundene Metallionen zu entfernen. Dabei wurden folgende Bedingungen verwendet: cPGI aus *P. furiosus* (PfcPGI) bei 80°C und pH 7, cPGI aus *A. fulgidus* (AfcPGI) bei 70°C und pH 7.4, cPGI aus *S. enterica* serovar *typhimurium* (StcPGI) bei 37°C und pH 7.2 und die cPGI aus *E. coli* (EmcPGI) bei 50°C und pH 7.4. Anschließend wurden die Proteinlösungen 5-mal gegen einen 100-fachen Überschuss A. bidest. dialysiert (4.4.4), um das EDTA zu entfernen. Für die Dialyse wurde destilliertes Wasser verwendet, um einen unkontrollierten Eintrag von Ionen durch verwendete Puffersubstanzen auszuschließen. Nach der Dialyse wurde die Aktivität der Enzyme bestimmt. Aktivitätstests wurden in Richtung der Glucose-6-Phosphat Bildung in 10 mM Tris/HCl mit 5 mM F6P, 0.5 mM NADP und 1 U G6PDH (unter 50°C aus *S. cerevisiae*, über 50°C die rekombinante G6PDH aus *T. maritima*) durchgeführt. Es wurden folgende Testbedingungen verwendet (die pH-Werte der Puffer wurden für die jeweilige Temperatur berechnet): PfcPGI bei 80°C und pH 7.4, AfcPGI bei 70°C und pH 7.4, StcPGI bei 37°C und pH 7.1 und die EmcPGI bei 50°C und pH 7.4. Die Ansätze enthielten zusätzlich 0 - 500 µM MnCl₂, NiCl₂, FeCl₂ bzw. ZnCl₂ oder 100 µM CuCl₂, CoCl₂, CdCl₂, CaCl₂ bzw. MgCl₂.

5 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden Glucose-6-Phosphat Isomerasen (PGIs) und archaeelle Glucosamin-6-Phosphat Deaminasen (GPDAs) untersucht sowie erstmalig die Aktivität einer archaeellen Glutamin:Fructose-6-Phosphat Transaminase (GlmS) nachgewiesen.

1. Cupin-Typ PGIs (cPGIs) aus *Pyrococcus furiosus*, *Archaeoglobus fulgidus* und *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* wurden auf ihre Metallabhängigkeit hin untersucht.
2. Neuartige Glucose-6-Phosphat Isomerasen (HPI) aus den Archaea *Methanothermobacter thermoautotrophicus*, *Methanosphaera stadtmanae* und *Thermoplasma acidophilum* sowie den Bacteria *S. enterica* serovar *typhimurium* und *Thermotoga maritima* wurden als rekombinante Proteine gereinigt und biochemisch charakterisiert. Der Nachweis der *in vivo*-Aktivität der rekombinanten Proteine wurde durch Komplementationsexperimente erbracht. *In vivo*-Transkription der HPI aus *M. thermoautotrophicus* wurde durch RT-PCR-Experimente nachgewiesen. Mittels ortsspezifischer Mutagenese wurde für zwei konservierte Aminosäurereste eine Bedeutung für die Aktivität der HPI aus *M. thermoautotrophicus* gezeigt. Des Weiteren wurde im Zellextrakt von *M. thermoautotrophicus* nach Gelfiltration PGI-Aktivität nachgewiesen.
3. ORF MK0918 aus *Methanopyrus kandleri* wurde kloniert, exprimiert und gereinigt. Rückfaltungsexperimente aus Einschlusskörpern wurden durchgeführt. Für das rekombinante Protein konnte weder Aktivität einer PGI noch einer GPDA nachgewiesen werden.
4. Eine klassische PGI aus *T. maritima* wurde als rekombinantes Protein gereinigt und biochemisch charakterisiert.
5. Die erste archaeelle Glutamin:Fructose-6-Phosphat Transaminase aus *M. thermoautotrophicus* wurde als rekombinantes Protein gereinigt und die Enzymaktivität bestimmt.
6. Neuartige Glucosamin-6-Phosphat Deaminasen (GPDA) wurden aus den hyperthermophilen Organismen *P. furiosus* und *T. maritima* als rekombinante Proteine gereinigt und biochemisch charakterisiert. Mittels ortsspezifischer Mutagenese wurde für zwei konservierte Aminosäurereste eine Bedeutung für die Aktivität der GPDA aus *P. furiosus* gezeigt.

5.1 Untersuchungen zur Metallabhängigkeit von Cupin-Typ Glucose-6-Phosphat Isomerasen (cPGIs) aus Archaea und Bacteria

Alle bisher bekannten PGIs benötigen für ihre Aktivität keine Metalle. Sequenzvergleiche sowie Strukturanalysen deuten aber bei den cPGIs auf das Vorhandensein einer Metallbindestelle hin. Daher sollte untersucht werden, ob Metalle die Aktivität der cPGIs aus *Pyrococcus furiosus*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* und *Ensifer meliloti* beeinflussen.

5.1.1 Metallreaktivierung von cPGIs in *P. furiosus*, *A. fulgidus*, *S. enterica* serovar *typhimurium* und *E. meliloti*

Eine 30-minütige Inkubation von cPGIs mit EDTA bei Temperaturen, die 10 bis 20°C unter dem entsprechenden Temperaturoptimum des Enzyms lagen, führte zu einem vollständigen Aktivitätsverlust der cPGIs aus *P. furiosus*, *A. fulgidus* und *S. enterica* serovar *typhimurium*. Die cPGI von *E. meliloti* hatte auch nach EDTA-Behandlung noch PGI-Aktivität, was vermutlich auf besonders feste Metallbindung zurückzuführen ist. Durch wiederholte Dialyse gegen A._{bidest.} wurden die Enzyme von EDTA befreit und anschließend der Effekt von Metallen auf die Enzymaktivität mit Fructose-6-Phosphat als Substrat getestet. Die katalytische Aktivität der cPGIs aus *P. furiosus*, *A. fulgidus* und *S. enterica* serovar *typhimurium* ließ sich durch Zugabe verschiedener zweiwertiger Kationen wiederherstellen. Für die cPGIs aus *A. fulgidus* und *S. enterica* serovar *typhimurium* wurde mit Ni²⁺ die höchste katalytische Aktivität gemessen, die cPGI aus *P. furiosus* ließ sich am besten durch Fe²⁺ reaktivieren (Abbildung 3). In höheren Konzentrationen wirkten einige Metalle inhibierend auf die Enzymaktivität. Dies traf insbesondere auf Zn²⁺ zu, das in geringen Konzentrationen reaktivierend wirkt, in Konzentrationen ab 50 µM jedoch hemmend (Abbildung 3). Co²⁺ in einer Konzentration von 100 µM konnte alle drei cPGIs reaktivieren, dagegen wirkten 100 µM Cu²⁺ auf die untersuchten Proteine inhibierend (Tabelle 6).

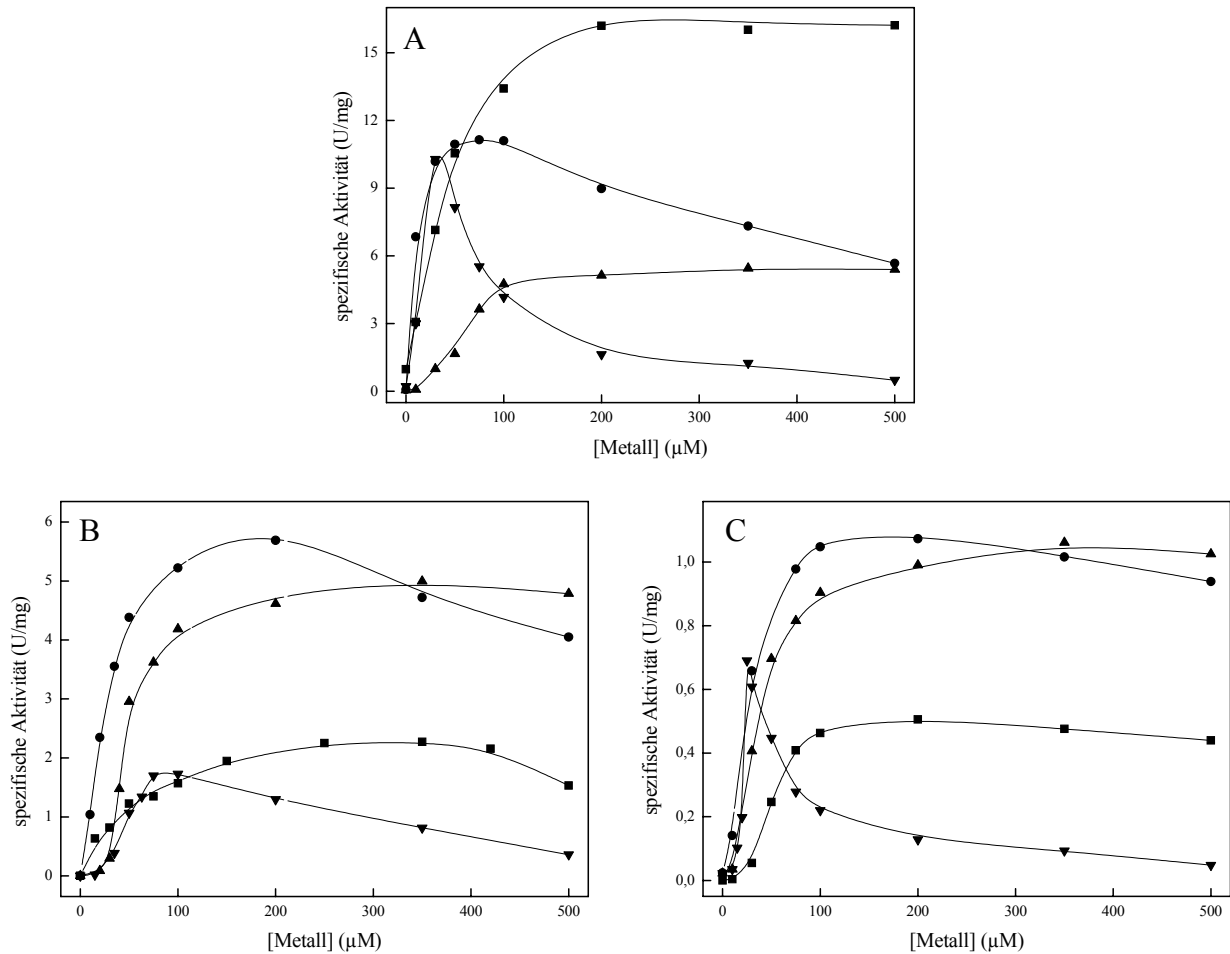


Abbildung 3 Reaktivierung der cPGIs aus *P. furiosus*, *A. fulgidus* und *S. enterica* serovar *typhimurium* durch Metalle nach EDTA-Behandlung. A cPGI aus *P. furiosus*. B cPGI aus *A. fulgidus*. C cPGI aus *S. enterica* serovar *typhimurium*. Reaktivierung mit (■) Fe²⁺, (●) Ni²⁺, (▲) Mn²⁺ und (▼) Zn²⁺.

Diese Daten weisen darauf hin, dass die Aktivität der cPGIs von zweiwertigen Metallionen abhängig ist. Die stärkste Stimulation der Aktivität wurde dabei mit Eisen und Nickel erreicht. Dies ist der erste Nachweis einer metallabhängigen Phosphoglucose Isomerase.

Tabelle 6 Aktivität der cPGIs von *P. furiosus*, *A. fulgidus* und *S. enterica* serovar *typhimurium* mit divalenten Kationen. Die angegebenen Werte stellen die Aktivitäten nach EDTA-Behandlung und Dialyse dar (siehe 4.8). n.m.: nicht messbar.

	<i>P. furiosus</i>	<i>A. fulgidus</i>	<i>S. enterica</i>
Messtemperatur (°C)	80	70	37
maximale Reaktionsgeschwindigkeit * (U/mg)			
nach EDTA-Behandlung	0	0	0
Ni ²⁺	11.1	5.7	1.1
Fe ²⁺	16.2	2.1	0.5
Mn ²⁺	5.4	4.9	1.1
Zn ²⁺	10.2	1.7	0.7
Reaktionsgeschwindigkeit mit 100 µM Metall (U/mg)			
Co ²⁺	8.6	2.2	1.2
Cd ²⁺	4.6	2.1	0.4
Ca ²⁺	6.7	0.1	0.03
Cu ²⁺	0.1	n.m.	0.02
Mg ²⁺	5.5	0.01	0.02

*die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten wurden je nach Organismus bei unterschiedlichen Metallkonzentrationen erreicht.

5.2 Neuartige Glucose-6-Phosphat Isomerasen (HPIs) in Archaea und Bacteria

In den vollständig sequenzierten Genomen der methanogenen Archaea *Methanothermobacter thermoautotrophicus* und *Methanosphaera stadtmanae* fanden sich keine homologen ORFs zu einem der drei bekannten PGI-Typen (klassische PGI, bifunktionelle PGI/PMI und cPGI). Jedoch enthalten beide Genome ORFs, die für Proteine mit Ähnlichkeit zur Isomerase-Domäne der Glutamin:Fructose-6-Phosphat Transaminase (GlmS) codieren. Diese Proteine werden im Folgenden als HPIs bezeichnet (Hexosephosphat Isomerase). Weitere ähnliche ORFs wurden in den vollständig sequenzierten Genomen von *Methanopyrus kandleri*, *Thermoplasma acidophilum*, *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* und *Thermotoga maritima* gefunden. Um die codierende Funktion dieser ORFs zu überprüfen, wurden die entsprechenden Gene kloniert, in *E. coli* exprimiert und anschließend die rekombinanten Proteine charakterisiert.

5.2.1 Nachweis der *in vivo*-Transkription des ORFs MTH860 aus *M. thermoautotrophicus* mittels RT-PCR

Um zu überprüfen, ob ORF MTH860 aus *M. thermoautotrophicus* *in vivo* transkribiert wird, wurden RT-PCR Experimente durchgeführt. Dazu wurde RNA aus einer wachsenden Kultur von *M. thermoautotrophicus* isoliert und im RT-Schritt in cDNA umgeschrieben. Durch eine anschließende PCR mit cDNA und spezifischen Primern für den ORF MTH860 wurde das Gen spezifisch amplifiziert. Das erhaltene PCR-Produkt hatte die erwartete Länge von 1004 Basenpaaren (Abbildung 4). Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne Reverse Transkriptase, wodurch die vollständige Hydrolyse der DNA in der isolierten RNA überprüft wurde.

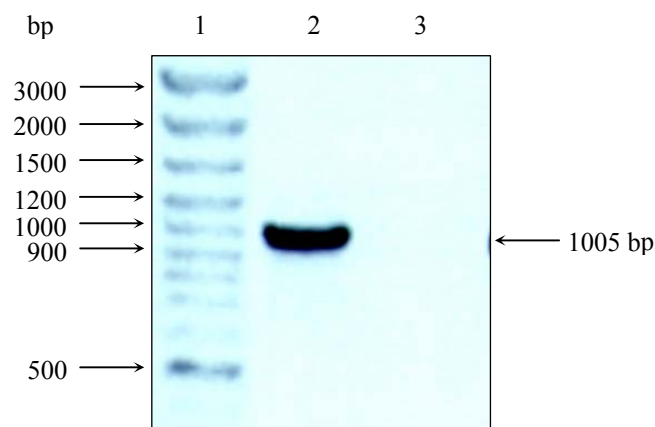


Abbildung 4 Nachweis der mRNA des ORFs MTH860 von *M. thermoautotrophicus* mittels RT-PCR. Zum Nachweis wurde cDNA mit spezifischen Primern amplifiziert. Agarosegelelektrophorese des PCR-Produktes. **Spur 1:** Molekulargewichtsstandard; **Spur 2:** Produkt der erwarteten Länge der RT-PCR; **Spur 3:** Kontrollansatz: RT-PCR ohne Inkubation mit Reverser Transkriptase.

Die Daten zeigen, dass ORF MTH860 bei chemolithoautotrophen Wachstum von *M. thermoautotrophicus* transkribiert wird, was auf eine funktionelle Bedeutung dieses ORFs *in vivo* schließen lässt.

5.2.2 Reinigung der rekombinanten HPIs

HPI aus *M. thermoautotrophicus*. Das *hpi*-Gen aus *M. thermoautotrophicus*, ORF MTH860, besteht aus 1005 Basenpaaren und codiert für ein Polypeptid mit 334 Aminosäuren, was einer kalkulierten Masse von 37.9 kDa entspricht. Das Gen wurde in den Vektor pET19b kloniert und zur Expression in *E. coli* BL21(DE3)-CodonPlus-RIL transformiert. Nach Überexpression eines 39 kDa-Proteins wurde dieses über zwei säulenchromatographische Schritte (Ni-NTA Agarose und Gelfiltration mit Superdex) bis zur apparenten Homogenität gereinigt (Abbildung 5). Die gereinigte HPI wies eine spezifische Aktivität von 8 U/mg (50°C) in Richtung der Glucose-6-Phosphat Bildung auf. Das native Molekulargewicht betrug 75 kDa (Tabelle 7).

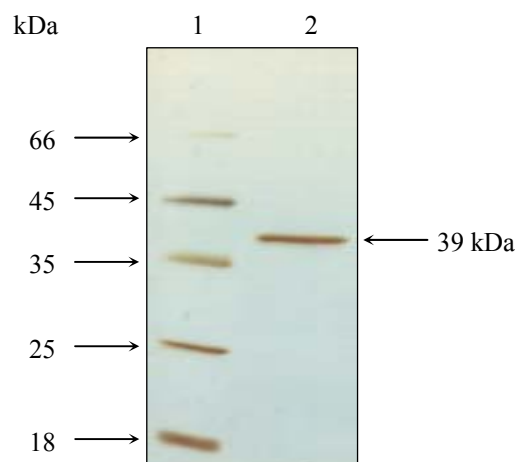


Abbildung 5 Reinigung der HPI aus *M. thermoautotrophicus*. SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung von gereinigter HPI. Die Pfeile auf der linken Seite zeigen auf die Markerproteine, der Pfeil rechts auf die Bande der HPI. **Spur 1:** Molekulargewichtsstandard; **Spur 2:** HPI nach Gelfiltration an Superdex.

Um zu überprüfen, ob die rekombinante HPI auch die Glucose-6-Phosphat Isomerase *in vivo* darstellt, wurde PGI-Aktivität im Zellextrakt von *M. thermoautotrophicus* bestimmt. Nach Zellaufschluss von *M. thermoautotrophicus* und Gelfiltration des Zellextraktes wurde PGI-Aktivität in nur einem Peak nachgewiesen. Die höchste spezifische Aktivität von 23 mU/mg fand sich bei einem Elutionsvolumen von 78 ml, was einem nativen Molekulargewicht von ca. 80 kDa entsprach. Dies stimmt in etwa mit dem für die rekombinante HPI aus *M. thermoautotrophicus* ermittelten Molekulargewicht überein. Die Daten sprechen dafür, dass es sich bei der HPI um die einzige *in vivo* funktionelle Glucose-6-Phosphat Isomerase von *M. thermoautotrophicus* handelt.

HPI aus *Ms. stadtmanae*. Das *hpi*-Gen aus *Ms. stadtmanae*, ORF Msp_1054, besteht aus 1050 Basenpaaren und codiert für ein Polypeptid mit 349 Aminosäuren, was einer kalkulierten Masse von 39.7 kDa entspricht. Das Gen wurde in den Vektor pET28a kloniert und zur Expression in *E. coli* RosettaB-pLysS transformiert. Nach Überexpression eines 40 kDa-Proteins wurde dieses über drei säulenchromatographische Schritte (Ni-NTA Agarose, Q-Sepharose und Gelfiltration mit Superdex) bis zur apparenten Homogenität

gereinigt (Abbildung 6). Die gereinigte HPI wies eine spezifische Aktivität von 6 U/mg (38°C) in Richtung der Glucose-6-Phosphat Bildung auf. Das native Molekulargewicht betrug 76 kDa (Tabelle 7).

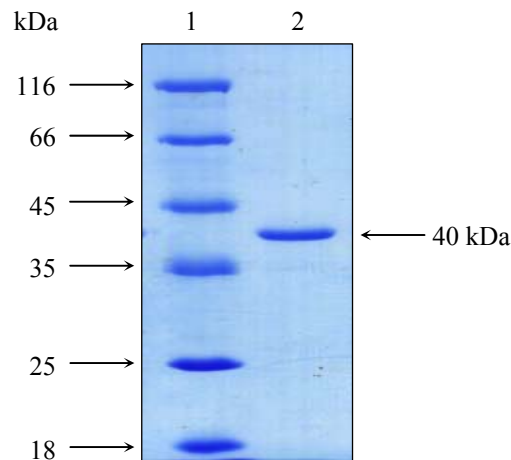


Abbildung 6 Reinigung der HPI aus *Ms. stadtmanae*. SDS-PAGE und anschließende Färbung mit Coomassie Brilliantblau von gereinigter HPI. Die Pfeile auf der linken Seite zeigen auf die Markerproteine, der Pfeil rechts auf die Bande der HPI. **Spur 1:** Molekulargewichtsstandard; **Spur 2:** HPI nach Gelfiltration an Superdex.

HPI aus *Tp. acidophilum*. Das *hpi*-Gen aus *Tp. acidophilum*, ORF Ta0479, besteht aus 1041 Basenpaaren und codiert für ein Polypeptid mit 346 Aminosäuren, was einer kalkulierten Masse von 38.8 kDa entspricht. Das Gen wurde in den Vektor pET19b kloniert und zur Expression in *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Nach Überexpression eines Proteins mit einem apparenten Molekulargewicht von 45 kDa wurde dieses über zwei säulenchromatographische Schritte (Ni-NTA Agarose und Gelfiltration mit Superdex) bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Die gereinigte HPI wies eine spezifische Aktivität von 8 U/mg (45°C) in Richtung der Glucose-6-Phosphat Bildung auf. Das native Molekulargewicht betrug 76 kDa (Tabelle 7).

HPI aus *S. enterica* serovar *typhimurium*. Das *hpi*-Gen aus *S. enterica* serovar *typhimurium*, ORF STM0572, besteht aus 987 Basenpaaren und codiert für ein Polypeptid mit 328 Aminosäuren, was einer kalkulierten Masse von 36.7 kDa entspricht. Das Gen wurde in den Vektor pET19b kloniert und zur Expression in *E. coli* BL21(DE3)-CodonPlus-RIL transformiert. Nach Überexpression eines 39 kDa-Proteins wurde dieses über einen säulenchromatographischen Schritt (Ni-NTA Agarose) bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Die gereinigte HPI wies eine spezifische Aktivität von 0.2 U/mg (45°C) in Richtung der Glucose-6-Phosphat Bildung auf. Das native Molekulargewicht betrug 82 kDa (Tabelle 7).

HPI aus *T. maritima*. Der ORF TM0813 aus *T. maritima* besteht aus 993 Basenpaaren und codiert für ein Polypeptid mit 330 Aminosäuren, was einer kalkulierten Masse von 37.4 kDa entspricht. Das Gen wurde in den Vektor pET19b kloniert und zur Expression in *E. coli* BL21(DE3)-CodonPlus-RIL transformiert. Nach Überexpression eines 39 kDa-Proteins wurde dieses über einen Hitzeschritt bei 70°C und einen säulenchromatographischen Schritt

(Ni-NTA Agarose) bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Die gereinigte HPI wies eine spezifische Aktivität von 0.2 U/mg (70°C) in Richtung der Glucose-6-Phosphat Bildung auf. Das native Molekulargewicht betrug 90 kDa (Tabelle 7).

Tabelle 7 Molekulare Eigenschaften der in dieser Arbeit untersuchten HPIs von *M. thermoautotrophicus*, *Ms. stadmanae*, *Tp. acidophilum*, *S. enterica* serovar *typhimurium* und *T. maritima*.

	<i>M. thermoautotrophicus</i>	<i>Ms. stadmanae</i>	<i>Tp. acidophilum</i>	<i>S. enterica</i>	<i>T. maritima</i>
apparente molekulare Masse des Enzyms (kDa)	75	76	76	82	90
apparente molekulare Masse der Untereinheit (kDa)	39	40	45	39	39
oligomere Struktur	α_2	α_2	α_2	α_2	α_2

Die Ergebnisse der molekularen Untersuchungen für die rekombinanten Proteine deuten daraufhin, dass alle in dieser Arbeit untersuchten HPIs als Homodimere vorliegen.

5.2.3 Biochemische Charakterisierung der rekombinanten HPIs

Die gereinigten rekombinanten HPIs wurden in Bezug auf die katalytischen Eigenschaften, pH- und Temperaturoptima, sowie im Falle der HPIs aus *M. thermoautotrophicus* und *Ms. stadmanae* auf die Temperaturstabilität biochemisch charakterisiert (Tabelle 8). Der Einfluss verschiedener Inhibitoren auf die Aktivität des Enzyms aus *M. thermoautotrophicus* wurde überprüft.

Katalytische Eigenschaften der HPI aus *M. thermoautotrophicus*. Die HPI aus *M. thermoautotrophicus* katalysiert die reversible Isomerisierung von Fructose-6-Phosphat zu Glucose-6-Phosphat. Die Abhängigkeit der Rate folgt in beiden Reaktionsrichtungen einer Michaelis-Menten-Kinetik. Aus den linearen Auftragungen nach Lineweaver-Burk wurde der K_m -Wert für Fructose-6-Phosphat mit 0.3 mM und der V_{max} -Wert mit 8.7 U/mg bestimmt. Der K_m -Wert für Glucose-6-Phosphat wurde mit 1.2 mM und der entsprechende V_{max} -Wert mit 7.3 U/mg (Abbildung 7) bestimmt. Damit war die katalytische Effizienz (V_{max}/K_m) der HPI mit Fructose-6-Phosphat ungefähr 5-mal so hoch wie mit Glucose-6-Phosphat. Diese Werte lassen auf die Richtung der Glucose-6-Phosphat Bildung als bevorzugte Reaktionsrichtung schließen, was in Übereinstimmung mit der gluconeogenetischen Funktion des Enzyms ist.

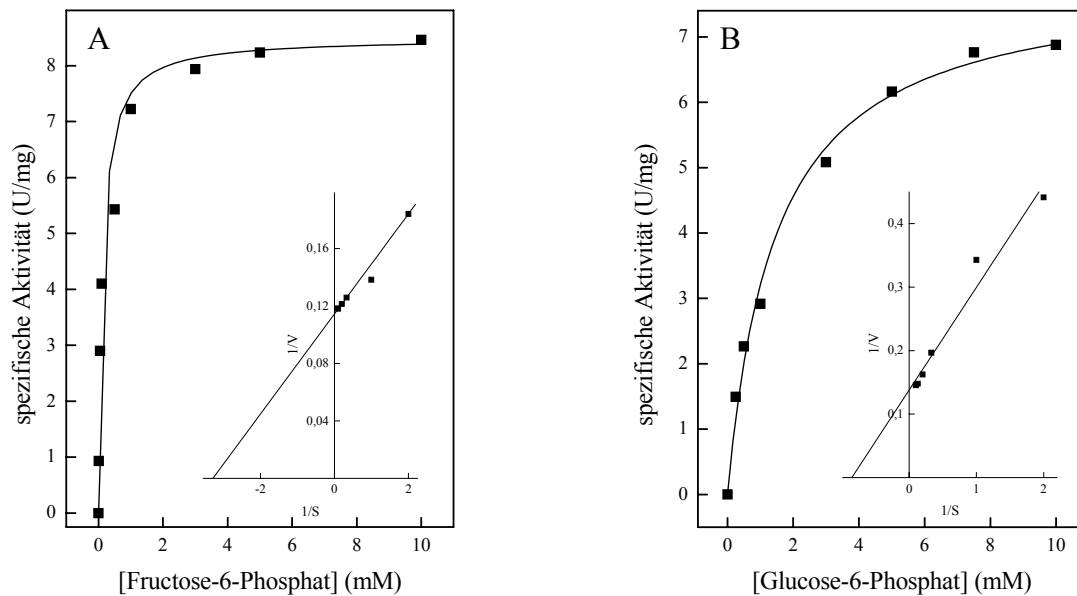


Abbildung 7 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der HPI von *M. thermoautotrophicus* von der Konzentration an Substrat. **A** Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von der Konzentration an Fructose-6-Phosphat. **B** Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von der Konzentration an Glucose-6-Phosphat. Die Einschübe zeigen die doppelt reziproke Auftragung nach Lineweaver-Burk. Die Testansätze enthielten 0.8 µg Protein.

Temperaturoptimum und Thermostabilität der HPI aus *M. thermoautotrophicus*. Das Temperaturoptimum lag bei 73°C (Abbildung 8A). Die Darstellung der Daten nach Arrhenius ergab einen linearen Bereich zwischen 30 und 70°C, daraus wurde eine Aktivierungsenergie von 42.3 kJ/mol ermittelt. Die Thermostabilität der HPI wurde über einen Zeitraum von 120 min getestet. Bis 60°C konnte kein signifikanter Aktivitätsverlust festgestellt werden, bei 70°C betrug die Halbwertszeit 10 min (Abbildung 8B).

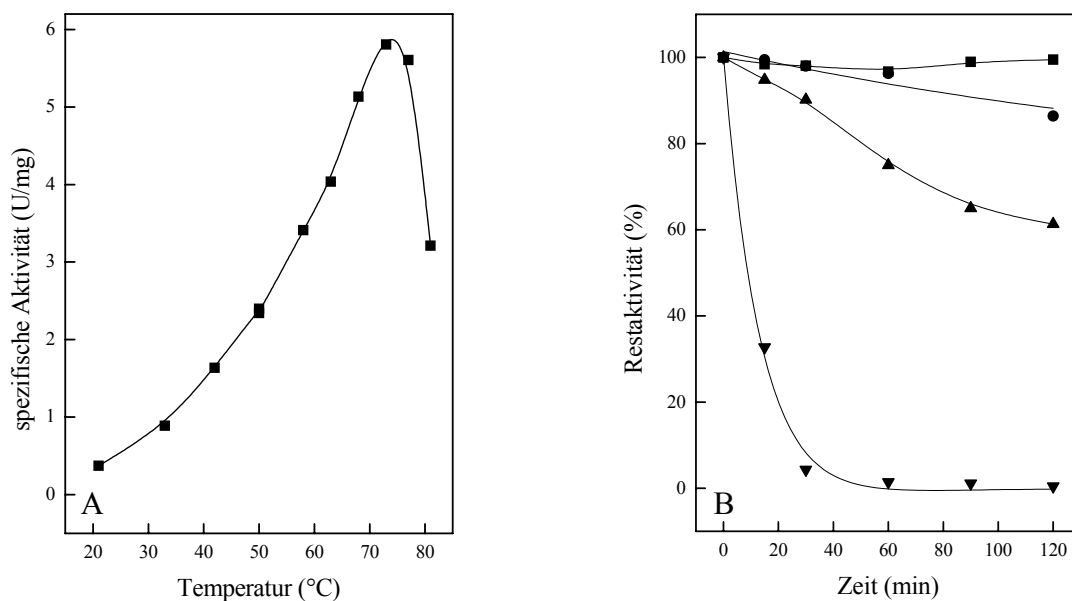


Abbildung 8 Temperaturabhängigkeit der Aktivität und Thermostabilität der HPI von *M. thermoautotrophicus*. **A** Spezifische Aktivität in Abhängigkeit von der Temperatur. **B** Restaktivität nach Inkubation bei (■) 50°C, (●) 60°C, (▲) 65°C und (▼) 70°C.

Inhibitoren der HPI aus *M. thermoautotrophicus*. Erythrose-4-Phosphat (E4P), 6-Phosphogluconat (6PG) und Sorbitol-6-Phosphat (S6P) sind als kompetitive Inhibitoren von PGIs beschrieben worden. Daher wurde getestet, ob diese Substanzen auch auf die HPI hemmend wirken. Dabei wurde festgestellt, dass Zugabe von steigenden Konzentrationen aller drei Inhibitoren zu einer Hemmung der HPI aus *M. thermoautotrophicus* führte. Halbmaximale Hemmung des Enzyms (K_i) wurde erreicht mit 70 μM E4P, 80 μM 6PG bzw. 30 μM S6P. Um zu zeigen, dass die Inhibition des Proteins kompetitiv ist, wurden die kinetischen Parameter für das Enzym in Anwesenheit von 50 μM E4P, 20 μM 6PG bzw. 8 μM S6P bestimmt. Die Inhibierung nahm proportional zur Erhöhung der F6P Konzentration ab. Aus der doppelt reziproken Auftragung nach Lineweaver-Burk ergaben sich auch in Anwesenheit der Inhibitoren dieselben apparenten V_{max} -Werte wie ohne diese (Abbildung 9). Die in Gegenwart der Inhibitoren ermittelten K_m -Werte lagen dagegen um den Faktor 2.9 (E4P) bzw. 3.7 (6PG und S6P) höher als die ohne Inhibitoren bestimmten Werte. Damit wurde nachgewiesen, dass es sich bei Erythrose-4-Phosphat, 6-Phosphogluconat und Sorbitol-6-Phosphat um kompetitive Inhibitoren der HPI aus *M. thermoautotrophicus* handelt.

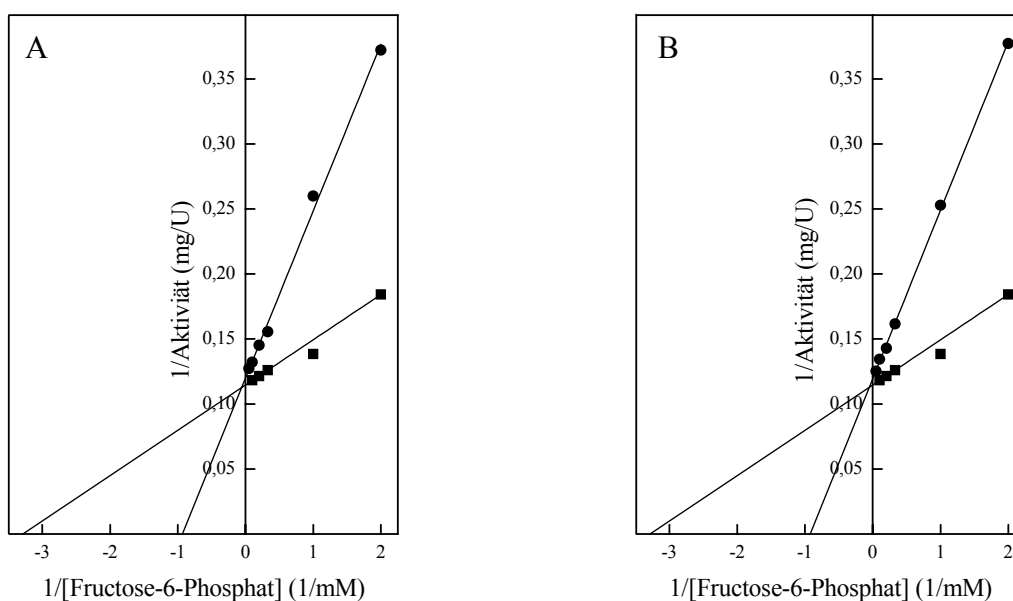


Abbildung 9 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der HPI von *M. thermoautotrophicus* von der Konzentration an Fructose-6-Phosphat in An- und Abwesenheit von Inhibitoren. Darstellung nach Lineweaver-Burk. **A** Die Testansätze enthielten je 20 μM 6-Phosphogluconat. **B** Die Testansätze enthielten je 8 μM Sorbitol-6-Phosphat. In die Tests wurden 0,8 μg (ohne Inhibitor) bzw. 3,8 μg Protein (ohne Inhibitor) eingesetzt.

Katalytische Eigenschaften der HPI aus *Ms. stadtmannae*. Die HPI aus *Ms. stadtmannae* katalysiert die reversible Isomerisierung von Fructose-6-Phosphat zu Glucose-6-Phosphat. Die Abhängigkeit der Rate folgt in beiden Reaktionsrichtungen einer Michaelis-Menten-Kinetik. Aus den linearen Auftragungen nach Lineweaver-Burk wurde der K_m -Wert für Fructose-6-Phosphat mit 3.1 mM und der V_{max} -Wert mit 6.2 U/mg bestimmt. Der K_m -Wert für Glucose-6-Phosphat wurde mit 5.8 mM und der entsprechende V_{max} -Wert mit 3.4 U/mg (Abbildung 10). Damit war die katalytische Effizienz (V_{max}/K_m) der HPI mit Fructose-6-Phosphat ungefähr 3-mal so hoch wie mit Glucose-6-Phosphat. Diese Werte lassen auf die Richtung der Glucose-6-Phosphat Bildung als bevorzugte Reaktionsrichtung schließen, was in Übereinstimmung mit der gluconeogenetischen Funktion des Enzyms ist.

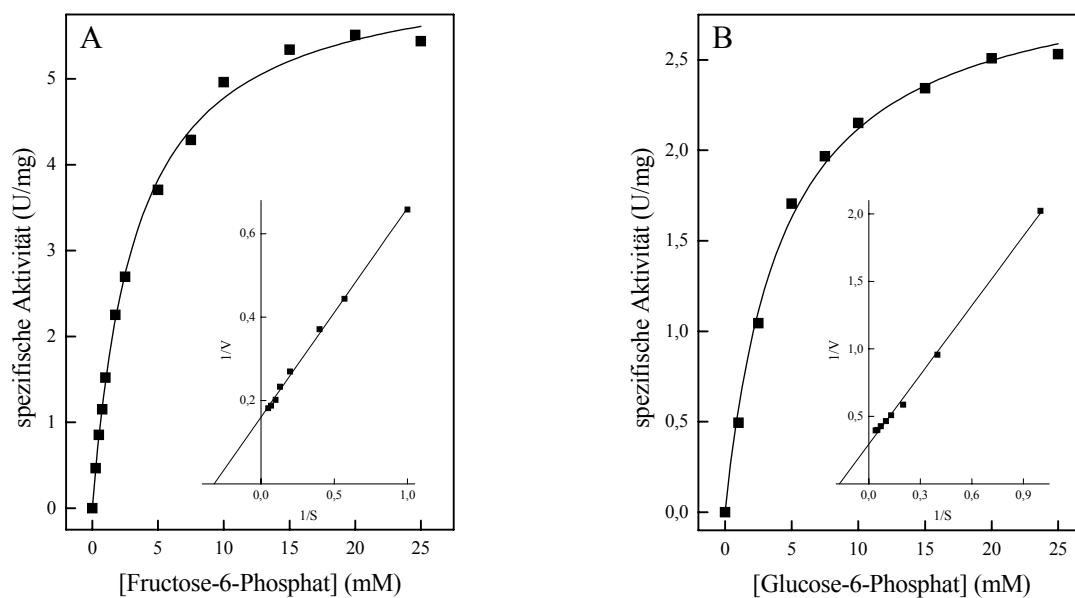


Abbildung 10 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der HPI von *Ms. stadtmannae* von der Konzentration an Substrat. **A** Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von der Konzentration an Fructose-6-Phosphat. **B** Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von der Konzentration an Glucose-6-Phosphat. Die Einschübe zeigen die doppelt reziproke Auftragung nach Lineweaver-Burk. Die Testansätze enthielten 0.1 (A) bzw. 0.5 μ g Protein (B).

Temperaturoptimum und Thermostabilität der HPI aus *Ms. stadtmannae*. Das Temperaturoptimum lag bei 37°C (Abbildung 11A). Die Darstellung der Daten nach Arrhenius ergab einen linearen Bereich zwischen 14 und 35°C, daraus wurde eine Aktivierungsenergie von 55.7 kJ/mol ermittelt. Die Thermostabilität der HPI wurde über einen Zeitraum von 120 min getestet. Bis 55°C konnte kein signifikanter Aktivitätsverlust festgestellt werden, bei 60°C betrug die Halbwertszeit 10 min (Abbildung 11B).

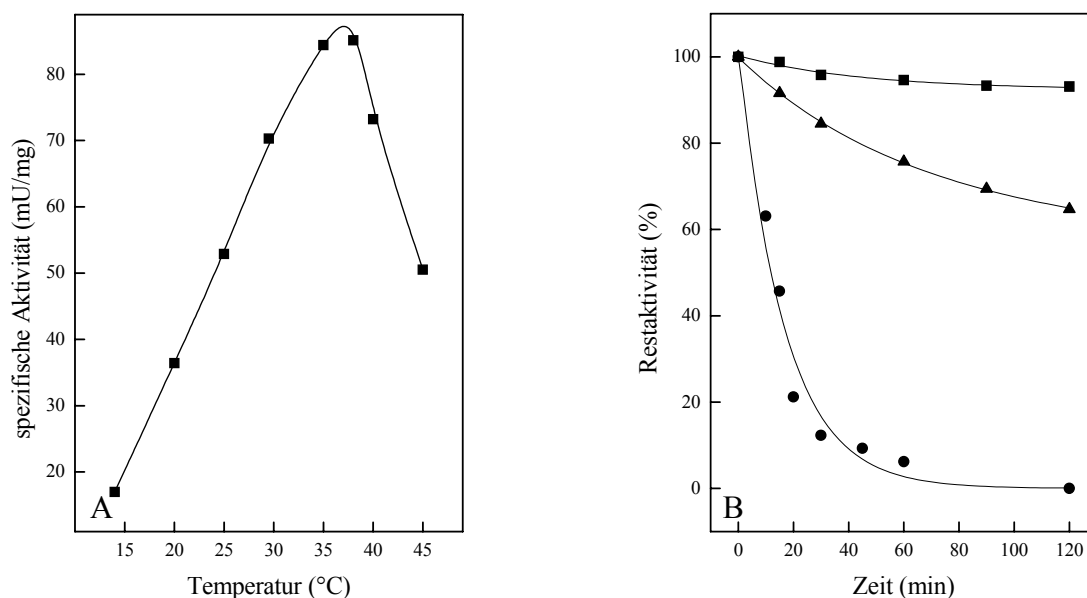


Abbildung 11 Temperaturabhängigkeit der Aktivität und Thermostabilität der HPI von *Ms. stadmanae*. **A** Spezifische Aktivität in Abhängigkeit von der Temperatur. **B** Restaktivität nach Inkubation bei (■) 50°C, (▲) 55°C und (●) 60°C.

Die katalytischen und thermophilen Eigenschaften der HPIs aus *Tp. acidophilum*, *S. enterica* serovar *typhimurium* und *T. maritima* sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8 Kinetische Eigenschaften der in dieser Arbeit untersuchten HPIs von *M. thermoautotrophicus*, *Ms. stadmanae*, *Tp. acidophilum*, *S. enterica* serovar *typhimurium* und *T. maritima*. Die kinetischen Konstanten wurden bestimmt bei ^a 50°C, ^b 38°C, ^c 45°C, ^d 70°C. n.m.: nicht messbar; F6P: Fructose-6-Phosphat; G6P: Glucose-6-Phosphat.

	<i>M. thermoautotrophicus</i>	<i>Ms. stadmanae</i>	<i>Tp. acidophilum</i>	<i>S. enterica</i>	<i>T. maritima</i>
pH-Optimum	6.8	7.7	7.0	7.4	7.5
Temperaturoptimum (°C)	73	37	45	48	83
F6P V_{\max} (U/mg)	8.7 ^a	6.2 ^b	8.6 ^c	0.15 ^c	0.17 ^d
K_m (mM)	0.3 ^a	3.1 ^b	0.3 ^c	1.9 ^c	26 ^d
V_{\max}/K_m (U/mg x mM)	29	2	29	0.08	0.007
G6P V_{\max} (U/mg)	7.3 ^c	3.4 ^b	4.4 ^c	0.04 ^c	n.m.
K_m (mM)	1.2 ^c	5.8 ^b	1.1 ^c	>10 ^c	n.m.
V_{\max}/K_m (U/mg x mM)	6.1	0.6	4	<0.004	n.m.

Die Untersuchungen der katalytischen Eigenschaften der HPIs zeigten, dass bei allen in dieser Arbeit untersuchten Glucose-6-Phosphat Isomerasen die Bildung von Glucose-6-Phosphat die bevorzugte Reaktionsrichtung ist, wie aus dem Vergleich der katalytischen Effizienzen (V_{\max}/K_m) der Proteine mit den beiden Substraten hervorgeht.

5.2.4 Komplementation einer *pgi*-Deletionsmutante von *E. coli* durch HPI

Die untersuchten HPIs aus *M. thermoautotrophicus*, *Ms. stadtmanae*, *Tp. acidophilum*, *S. enterica* serovar *typhimurium* und *T. maritima* zeigen alle PGI-Aktivität. Um nachzuweisen, ob die HPIs auch *in vivo* funktionelle PGIs darstellen, wurden Komplementationsversuche mit einer Deletionsmutante von *E. coli* MG1655 durchgeführt. Dieser *E. coli*-Stamm ist aufgrund zweier Deletionen im Gegensatz zum Wildtyp nicht mehr in der Lage, auf Minimalmedium mit Glucose als einziger C-Quelle zu wachsen, da ihm die Gene für PGI und die lösliche cytoplasmatische Transhydrogenase UdhA fehlen (Sauer et al. 2004).

Der λ DE3-Prophage wurde in die Doppeldeletionsmutante *E. coli* MG1655 Δ *pgi* Δ *udhA* integriert, so dass dieser Stamm als Expressionsstamm verwendet werden konnte. Die in dieser Arbeit konstruierten *hpi*-Plasmide mit den Genen aus *M. thermoautotrophicus*, *Ms. stadtmanae*, *Tp. acidophilum*, *S. enterica* serovar *typhimurium* und *T. maritima* wurden in *E. coli* MG1655(DE3) Δ *pgi* Δ *udhA* transformiert. Die resultierenden Stämme wurden auf M9-Minimalmedium mit 20 mM Glucose als einziger C-Quelle gezüchtet. Durch die Zugabe von IPTG wurden die entsprechenden *hpi*-Gene induziert. Als Maß für die erfolgreiche Komplementation diente das Wachstum, das über die Zunahme der optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) verfolgt wurde. Der Wildtyp wuchs mit einer Verdoppelungszeit von 1.09 Stunden bis zu einer OD₆₀₀ von 4. Die Doppeldeletionsmutante war nicht in der Lage, auf dem Minimalmedium mit Glucose zu wachsen. Alle klonierten HPIs konnten das Fehlen eines *pgi*-Gens der Deletionsmutante komplementieren. Das Wachstum war jedoch mit den heterologen Plasmiden im Vergleich zum Wildtyp *E. coli* MG1655 deutlich langsamer, die Verdoppelungszeit war 3- bis 12-mal so lang. Abbildung 12 zeigt exemplarisch das Wachstum der mit der HPI aus *M. thermoautotrophicus* komplementierten Deletionsmutante und das Wachstum des Wildtyps. Die Wachstumsparameter sind in Tabelle 9 zusammengestellt.

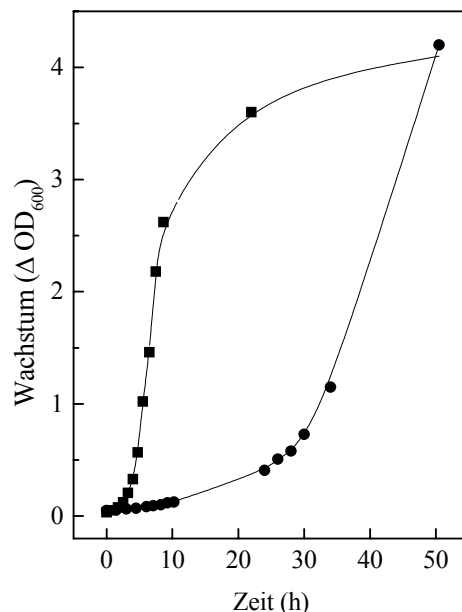


Abbildung 12 Wachstum des Wildtyps *E. coli* MG1655 und der mit dem *hpi*-Gen aus *M. thermoautotrophicus* komplementierten Deletionsmutante *E. coli* MG1655(DE3) Δ *pgi* Δ *udhA*. Wachstumsversuch in 250 ml Erlenmeyerkolben mit 30% Medium (M9-Minimalmedium mit 20 mM Glucose und 1 mM IPTG). Dargestellt ist die Zunahme der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) wachsender Kulturen von (■) *E. coli* MG1655 und (●) *E. coli* MG1655(DE3) Δ *pgi* Δ *udhA*-MTH860.

Tabelle 9 Wachstum des Wildtyps *E. coli* MG1655 und *E. coli* MG1655(DE3) Δ *pgi* Δ *udhA* komplementiert mit den *hpi*-Gen tragenden Plasmiden auf M9-Minimalmedium mit Glucose als einziger C- und Energiequelle.

Stamm	Wachstumsrate μ	Verdoppelungszeit t_D (h)	relative Wachstumsrate (%)	PGI-Aktivität im Zellextrakt (U/mg)
MG1655	0.64	1.09	100	
MG1655(DE3) Δ <i>pgi</i> Δ <i>udhA</i> - MTH860	0.10	7.33	16	0.024
MG1655(DE3) Δ <i>pgi</i> Δ <i>udhA</i> - Msp_1054	0.24	3.10	38	0.011
MG1655(DE3) Δ <i>pgi</i> Δ <i>udhA</i> - Ta0479	0.16	6.37	25	0.029
MG1655(DE3) Δ <i>pgi</i> Δ <i>udhA</i> - STM0572	0.08	12.37	13	0.008
MG1655(DE3) Δ <i>pgi</i> Δ <i>udhA</i> - TM0813	0.11	6.14	17	0.011

Diese Daten zeigen, dass die PGI des Wildtyps *E. coli* MG1655 von den in dieser Arbeit untersuchten HPIs ersetzt werden kann. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die HPIs *in vivo* aktive Proteine mit PGI-Aktivität sind.

5.2.5 Ortsspezifische Mutagenese der HPI von *M. thermoautotrophicus*

Aufgrund von Sequenzvergleichen der Isomerase-Domäne der Glutamin:Fructose-6-Phosphat Transaminase aus *E. coli* mit den in dieser Arbeit charakterisierten HPIs wurden einige konservierte Aminosäuren dieser Enzyme bestimmt.

Der Reaktionsmechanismus der GlmS von *E. coli* ist gut untersucht und zeigt große Ähnlichkeit zu dem der Glucose-6-Phosphat Isomerasen (Milewski 2002). Auf die Bindung des Substrates an das aktive Zentrum folgt Ringöffnung, ein Protonentransfer über ein cis-endiol-Intermediat und anschließender Ringschluss. Der Protonentransfer wird sowohl bei der GlmS aus *E. coli* als auch bei PGIs über ein konserviertes Glutamat vermittelt, das auch in den in dieser Arbeit charakterisierten HPIs konserviert ist (Abbildung 13B). Eine weitere Aminosäure im aktiven Zentrum der GlmS aus *E. coli* ist Valin, für das eine Funktion bei der Stabilisierung des cis-endiol-Intermediats postuliert wurde (Milewski et al. 2006b). Dieses liegt bei der HPI-Mt als funktionell konserviertes Isoleucin (Abbildung 13A) vor.

A

```

M.thermoautotr. 97 TADTLAALRRANELG-LRTVTITNEPGSTMASESMETIVTRCGREEAILGTKTYMTQLLA 155
M.stadtmanae    112 TSDTLSALRKAKEYN-LKTVAITNVSDSSMAKEADDAIITLCGEEVAILGTKTYVTQLFA 170
E.coli          112 TADTLALGLRLSKELGYLGSLAICNVPGSSLVRESDLALMTNAGTEIGVASTKAFTTQLTV 171
T.acidophilum  102 TKSTVDAVIKARKTA--KTAGITHYADSPLYNSVDYPIAIADE-DKSLCNTKAFFNNAFA 158
* .*: . . :.: : : .:.: : : :

```

B

```

M.thermoautotr. 211 GSGPNYGLAYKLAMTLMEGALKHSCPLYSGEFRHGLIERVEEGVPVIFLESGLPGDELT 270
M.stadtmanae    226 GSGLNFGLAYKLAMTFMEGALKHACPVYSGEFRHGLIERVEKGVTVVFLKAGNNFDDVT 285
E.coli          231 GRGDQYPIALEGAL-KLKEISYIHAEAAYAAGELKHGPLALIDADMPVIVVAPNNELLEKL 289
T.acidophilum  208 GSGFNFPVAREAAQ-KIKEATHIHAEGIEFEEFNHGCTAVMDENTLVILIE-GEKDRARG 265
* * .: * : : : * : : * ** : . .: : .

```

Abbildung 13 Ausschnitte aus dem Sequenzvergleich der HPIs aus *M. thermoautotrophicus*, *Ms. stadtmanae* und *Tp. acidophilum* mit der Isomerase-Domäne der GlmS aus *E. coli*. Das Alignment wurde mit ClustalX mit Standardeinstellungen erstellt (Thompson et al. 1997). Die Zahlen am Anfang und Ende der Sequenzen geben die Position der jeweiligen Aminosäure im Protein an. Konservierte Reste sind fett hervorgehoben und in der untersten Zeile mit * markiert, Punkte in der untersten Zeile zeigen konservierte Substitutionen an. NCBI-Accession-Nummern der Sequenzen: *M. thermoautotrophicus* AAB85358; *Ms. stadtmanae* ABC57438; *Tp. acidophilum* CAC11621; *E. coli* CAA23894. **A** Isoleucin an Position 143 der HPI aus *M. thermoautotrophicus* und die entsprechenden Aminosäuren der anderen Proteine sind rot hervorgehoben. **B** Glutamat an Position 229 der HPI aus *M. thermoautotrophicus* und die entsprechenden Aminosäuren der anderen Proteine sind rot hervorgehoben.

Es sollte nun untersucht werden, ob ein Austausch des Isoleucins gegen das basische Lysin und ein Austausch des für die Ringöffnung wichtigen Glutamats gegen Alanin jeweils zu einer Veränderung der Enzymaktivität führt.

Ortsspezifische Mutagenese. Das Plasmid MTH860/pET19b enthält den ORF MTH860, der für die HPI aus *M. thermoautotrophicus* codiert (Tabelle 5). Die zielgerichteten Mutagenesen an diesem Plasmid erfolgten mittels je zweier komplementärer Oligonucleotide, die die Mutation des Isoleucin143-Codons ATA gegen AAA für Lysin bzw. die Mutation des Glutamat229-Codons GAG gegen das Codon GCG für Alanin enthielten. Die Sequenzen der erhaltenen Expressionsplasmide MTH860-I143K/pET19b (ORF MTH860 aus *M. thermoautotrophicus*, in dem das Isoleucin (I) an Position 143 gegen Lysin (K) ausgetauscht wurde in pET19b) und MTH860-E229A/pET19b (ORF MTH860 aus *M. thermoautotrophicus*, in dem das Glutamat (E) an Position 229 gegen Alanin (A) ausgetauscht wurde in pET19b) enthielten die neuen Codons. Die Sequenz des restlichen Gens war jeweils fehlerfrei. Die mutierten Plasmide wurden in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3)-CodonPlus-RIL transformiert und exprimiert.

Expression, Reinigung und Charakterisierung der mutierten HPIs aus *M. thermoautotrophicus*. Die Expression und Reinigung wurde jeweils unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wie die des Wildtyps (4.5.1, 4.5.2). Beide Proteine ergaben auf einem SDS-Polyacrylamidgel 39 kDa-Banden, die apparente native molekulare Masse der Proteine wurde mit jeweils 73 kDa bestimmt, was auf eine homodimere Struktur der mutierten Proteine hindeutet. Damit entsprechen die molekularen Eigenschaften der Mutanten denen des Wildtyps. Die katalytischen Parameter für die gereinigten mutierten HPIs wurden mit einem V_{\max} -Wert von 1.1 U/mg bei einem K_m -Wert von 0.65 mM (MTH860-I143K) bzw. einem V_{\max} -Wert von 0.4 U/mg bei einem K_m -Wert von 0.54 mM (MTH860-E229A) bei 50°C in Richtung der Glucose-6-Phosphat Bildung bestimmt (Tabelle 10).

Tabelle 10 Katalytische Eigenschaften der rekombinanten HPI aus *M. thermoautotrophicus* (HPI-Mt): Vergleich des Wildtyps mit den Mutanten. Die Parameter wurden bei 50°C mit Fructose-6-Phosphat als Substrat bestimmt. Auftragungen nach Lineweaver-Burk dienten der Ermittlung der kinetischen Parameter.

	HPI-Mt Wildtyp	HPI-Mt/ I143K	HPI-Mt/ E229A
V_{\max} mit F6P als Substrat (U/mg)	8.7	1.1	0.37
K_m mit F6P als Substrat (mM)	0.3	0.65	0.54
V_{\max}/K_m (U/mg x mM)	29	1.7	0.7

Aus den Daten geht hervor, dass beide Mutationen zu einem nahezu vollständigen Aktivitätsverlust des Enzyms geführt haben und die Aminosäuren Isoleucin143 und Glutamat229 damit offenbar von großer Bedeutung für die Katalyse des Enzyms sind.

5.3 ORF MK0918 in *Methanopyrus kandleri*

Der ORF MK0918 im vollständig sequenzierten Genom des methanogenen Archaeons *Mp. kandleri* ist als hypothetische Phosphozucker Isomerase annotiert. Dieser ORF besteht aus 906 Basenpaaren und codiert für ein Polypeptid mit 301 Aminosäuren, was einer kalkulierten Masse von 33.2 kDa entspricht. Das Protein wurde in allen untersuchten Expressionsstämmen fast ausschließlich in Form von Einschlusskörpern exprimiert. Diese wurden in Harnstoff entfaltet und anschließend mit verschiedenen Methoden rückgefaltet. Das Protein wurde bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Unter keiner der verwendeten Testbedingungen (pH-Werte 6 - 8, Temperaturen 50 - 80°C, Salzkonzentrationen 0 - 1 M KCl und 0 - 1.5 M KH₂PO₄, Substratkonzentrationen 0.25 - 25 mM Fructose-6-Phosphat und Glucosamin-6-Phosphat, gereinigtes Protein Mk0918 1 - 1200 µg) konnte Aktivität einer PGI oder GPDA nachgewiesen werden. Expression des in den Vektor pET44b klonierten ORFs MK0918 führte zwar zu löslichem Protein, jedoch zeigte auch dieses unter keiner der verwendeten Testbedingungen PGI- oder GPDA-Aktivität. Komplementation des fehlenden *pgi*-Gens in *E. coli* MG1655 Δ *pgi* Δ *dudhA* (4.7) konnte durch den ORF MK0918 nicht erreicht werden.

5.3.1 Nachweis der *in vivo*-Transkription des ORFs MK0918 mittels RT-PCR

Um herauszufinden, ob dieser ORF MK0918 *in vivo* transkribiert wird, wurden RT-PCR Experimente durchgeführt. Dazu wurde RNA aus einer wachsenden Kultur von *Mp. kandleri* isoliert und im RT-Schritt in cDNA umgeschrieben. Durch eine anschließende PCR mit cDNA und spezifischen Primern für den ORF MK0918 wurde das Gen spezifisch amplifiziert. Das erhaltene PCR-Produkt hatte die erwartete Länge von 906 Basenpaaren (Abbildung 14).

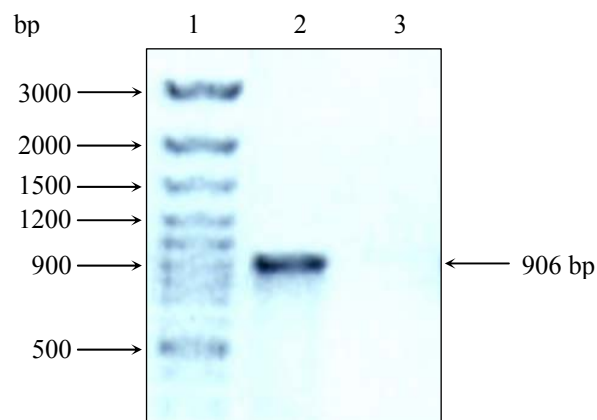


Abbildung 14 Nachweis der mRNA des ORFs MK0918 von *Mp. kandleri* mittels RT-PCR. Zum Nachweis wurde cDNA mit spezifischen Primern amplifiziert. Agarosegelelektrophorese des PCR-Produktes. **Spur 1:** Molekulargewichtsstandard; **Spur 2:** Produkt der erwarteten Länge der RT-PCR; **Spur 3:** Kontrollansatz: RT-PCR ohne Inkubation mit Reverser Transkriptase.

Die Daten zeigen, dass ORF MK0918 bei Wachstum von *Mp. kandleri* transkribiert wird, was darauf schließen lässt, dass das codierte Protein *in vivo* von Bedeutung für den Organismus ist. Welche Funktion dieses Protein hat, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

5.4 Glucose-6-Phosphat Isomerase (PGI) in *Thermotoga maritima*

Die Untersuchungen des ORFs TM0813 aus *T. maritima* ergaben, dass dieser für ein Protein mit extrem geringer PGI-Aktivität codiert. Dies spricht gegen eine physiologische Relevanz dieses ORFs. Im vollständig sequenzierten Genom des hyperthermophilen Bakteriums *T. maritima* war dagegen ein ORF als Glucose-6-Phosphat Isomerase annotiert, der große Ähnlichkeit zu den Sequenzen der klassischen PGIs zeigt. Dieser ORF wurde kloniert, exprimiert und charakterisiert.

PGI aus *T. maritima*. Das *pgi*-Gen aus *T. maritima*, ORF TM1385, besteht aus 1347 Basenpaaren und codiert für ein Polypeptid mit 448 Aminosäuren, was einer kalkulierten Masse von 50.5 kDa entspricht. Das Gen wurde in den Vektor pET28a 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 und zwei säulenchromatographische Schritte (Ni-NTA Agarose und Gelfiltration mit Superdex) bis zur apparenten Homogenität gereinigt (Abbildung 15). Die gereinigte PGI wies eine spezifische Aktivität von 650 U/mg (70°C) in Richtung der Glucose-6-Phosphat Bildung auf. Das native Molekulargewicht betrug 130 kDa. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es sich um ein Protein mit dimerer Struktur handelt (Tabelle 11).

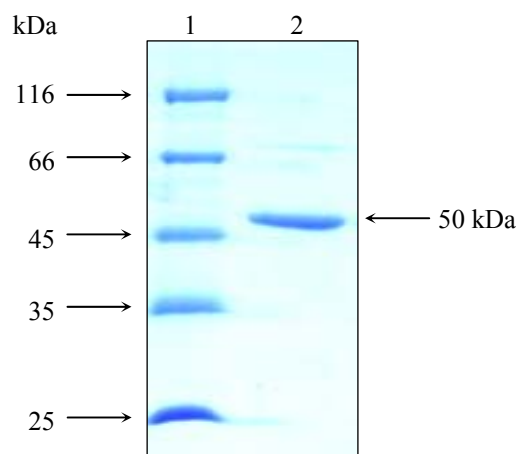


Abbildung 15 Reinigung der PGI aus *T. maritima*. SDS-PAGE und anschließende Färbung mit Coomassie Brilliantblau von gereinigter PGI. Die Pfeile auf der linken Seite zeigen auf die Markerproteine, der Pfeil rechts auf die Bande der PGI. **Spur 1:** Molekulargewichtsstandard; **Spur 2:** PGI nach Gelfiltration an Superdex.

Katalytische Eigenschaften der PGI aus *T. maritima*. Die PGI aus *T. maritima* katalysiert die reversible Isomerisierung von Fructose-6-Phosphat zu Glucose-6-Phosphat. Die Abhängigkeit der Rate folgt in beiden Reaktionsrichtungen einer Michaelis-Menten-Kinetik. Aus den linearen Auftragungen nach Lineweaver-Burk wurde der K_m -Wert für Fructose-6-Phosphat mit 3.9 mM und der V_{max} -Wert mit 650 U/mg bestimmt. Der K_m -Wert für Glucose-6-Phosphat wurde mit 0.4 mM und der entsprechende V_{max} -Wert mit 132 U/mg bestimmt (Abbildung 16). Damit war die katalytische Effizienz (V_{max}/K_m) der PGI mit Glucose-6-Phosphat ungefähr doppelt so hoch wie mit Fructose-6-Phosphat. Diese Werte lassen auf die Richtung der Fructose-6-Phosphat Bildung als bevorzugte Reaktionsrichtung schließen, was auf eine bevorzugt glykolytische Funktion des Enzyms hindeutet.

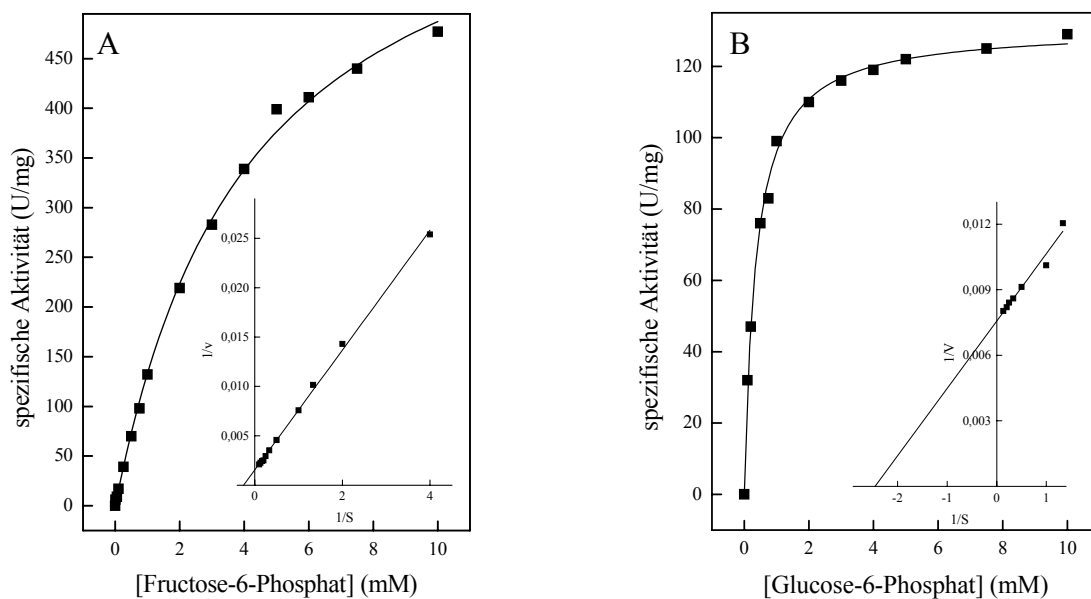


Abbildung 16 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der PGI von *T. maritima* von der Konzentration an Substrat. **A** Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von der Konzentration an Fructose-6-Phosphat. **B** Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von der Konzentration an Glucose-6-Phosphat. Die Einschübe zeigen die doppelt reziproke Auftragung nach Lineweaver-Burk. Die Testansätze enthielten 0.1 - 0.5 (A) bzw. 3 μ g Protein (B).

Temperaturoptimum und Thermostabilität der PGI aus *T. maritima*. Das Temperaturoptimum lag bei 87°C (Abbildung 17A). Die Darstellung der Daten nach Arrhenius ergab einen linearen Bereich zwischen 40 und 80°C, daraus wurde eine Aktivierungsenergie von 37.0 kJ/mol ermittelt. Die Thermostabilität der PGI wurde über einen Zeitraum von 120 min getestet. Bis 80°C wurde kein signifikanter Aktivitätsverlust festgestellt, bei 90°C betrug die Halbwertszeit 135 min (Abbildung 17B).

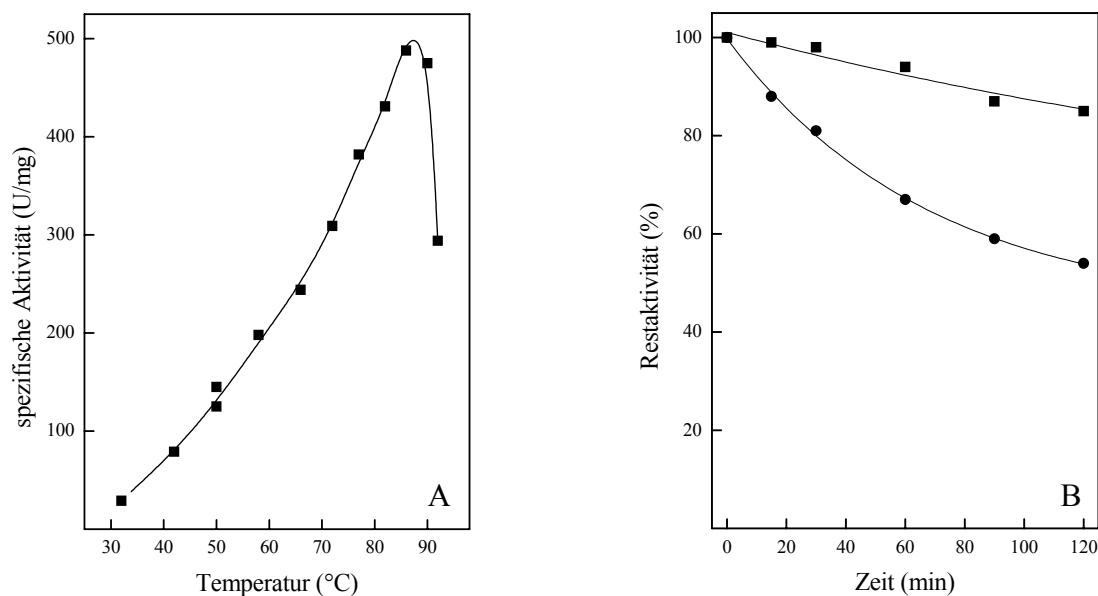


Abbildung 17 Temperaturabhängigkeit der Aktivität und Thermostabilität der PGI von *T. maritima*. **A** Spezifische Aktivität in Abhängigkeit von der Temperatur. **B** Restaktivität nach Inkubation bei (■) 80°C und (●) 90°C.

Die molekularen und kinetischen Eigenschaften der klassischen PGI aus *T. maritima* sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11 Molekulare und kinetische Eigenschaften der klassischen PGI von *T. maritima*. Linearer Bereich in der Darstellung nach Arrhenius 40 - 86°C. Die kinetischen Konstanten wurden bestimmt bei ^a 70°C, ^b 45°C. F6P: Fructose-6-Phosphat; G6P: Glucose-6-Phosphat.

		PGI aus <i>T. maritima</i>
apparente molekulare Masse des Enzyms (kDa)		130
apparente molekulare Masse der Untereinheit (kDa)		50
oligomere Struktur		α_2
pH-Optimum		7.5
Temperaturoptimum (°C)		87
F6P	V_{\max} (U/mg)	650 ^a
	K_m (mM)	3.9 ^a
	V_{\max}/K_m (U/mg x mM)	167
G6P	V_{\max} (U/mg)	132 ^b
	K_m (mM)	0.4 ^b
	V_{\max}/K_m (U/mg x mM)	330

Komplementation einer *pgi*-Deletionsmutante von *E. coli* MG1655 durch die klassische PGI aus *T. maritima*. Die klassische PGI aus *T. maritima* war in der Lage, das Fehlen eines *pgi*-Gens in *E. coli* MG1655 $\Delta pgi \Delta udhA$ zu komplementieren (4.7). Es wurde fast die gleiche Wachstumsrate wie die des Wildtyps erreicht (Verdoppelungszeit des Wildtyps *E. coli* MG1655: 1.1 Stunden, Verdoppelungszeit der komplementierten Deletionsmutante *E. coli* MG1655(DE3) $\Delta pgi \Delta udhA$ -TM1385: 1.4 Stunden). Auch im Rohextrakt der komplementierten Deletionsmutante war eine hohe PGI-Aktivität von 8 U/mg messbar. Damit ist die klassische PGI aus *T. maritima* von allen bislang getesteten PGIs am besten in der Lage, das Fehlen einer Glucose-6-Phosphat Isomerase in *E. coli* zu komplementieren.

Die Daten zeigen, dass die PGI aus *T. maritima*, die durch den ORF TM1385 codiert wird, eine hohe Aktivität und gute thermophile Eigenschaften zeigt. Dies Protein stellt damit die physiologisch relevante Glucose-6-Phosphat Isomerase in *T. maritima* dar und ist die erste hyperthermophile PGI, die aus der Domäne der Bacteria charakterisiert wurde.

5.5 Glutamin:Fructose-6-Phosphat Transaminase (GlmS) von *Methanothermobacter thermoautotrophicus*

Im vollständig sequenzierten Genom des methanogenen Archaeons *M. thermoautotrophicus* ist ORF MTH171 als Glutamin:Fructose-6-Phosphat Transaminase (GlmS) annotiert. GlmS ist ein ubiquitär vorhandenes Protein, welches bisher noch nicht aus einem Archaeon untersucht worden ist.

5.5.1 Reinigung und Aktivität der rekombinanten GlmS

Reinigung der GlmS aus *M. thermoautotrophicus*. Das *glmS*-Gen aus *M. thermoautotrophicus*, ORF MTH171, besteht aus 1773 Basenpaaren und codiert für ein Polypeptid mit 590 Aminosäuren, was einer kalkulierten Masse von 64.0 kDa entspricht. Das Gen wurde in den Vektor pET17b kloniert und zur Expression in *E. coli* BL21(DE3)-CodonPlus-RIL transformiert. Nach Überexpression eines 66 kDa-Proteins wurde dieses über zwei säulenchromatographische Schritte (Phenyl-Sepharose und Gelfiltration mit Superdex) bis zur apparenten Homogenität gereinigt (Abbildung 18). Die GlmS wies eine spezifische Aktivität von 30 mU/mg (60°C) in Richtung der Glucosamin-6-Phosphat Bildung auf. Das native Molekulargewicht betrug 150 kDa. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass es sich um ein Protein mit dimerer Struktur handelt.

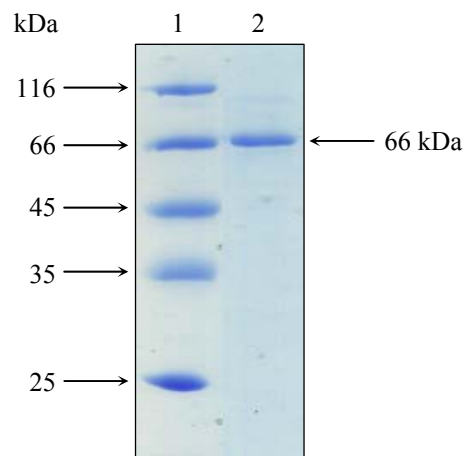


Abbildung 18 Reinigung der GlmS aus *M. thermoautotrophicus*. SDS-PAGE und anschließende Färbung mit Coomassie Brilliantblau von gereinigter GlmS. Die Pfeile auf der linken Seite zeigen auf die Markerproteine, der Pfeil rechts auf die Bande der GlmS. **Spur 1:** Molekulargewichtsstandard; **Spur 2:** GlmS nach Gelfiltration an Superdex.

5.5.2 Nachweis der *in vivo*-Transkription des *glmS*-Gens mittels RT-PCR

Durch Reinigung des rekombinanten Proteins und anschließende Messung der Aktivität des Enzyms wurde nachgewiesen, dass ORF MTH171 aus *M. thermoautotrophicus* für eine Glutamin:Fructose-6-Phosphat Transaminase codiert. Um zu zeigen, dass dieser ORF auch *in vivo* transkribiert wird, wurden RT-PCR Experimente durchgeführt. Dazu wurde RNA aus einer wachsenden Kultur von *M. thermoautotrophicus* isoliert und im RT-Schritt in cDNA umgeschrieben. Durch eine anschließende PCR mit cDNA und spezifischen Primern für den ORF MTH171 wurde das Gen spezifisch amplifiziert. Das erhaltene PCR-Produkt hatte die erwartete Länge von 1773 Basenpaaren (Abbildung 19). Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne Reverse Transkriptase, wodurch die vollständige Hydrolyse der DNA in der isolierten RNA überprüft wurde.

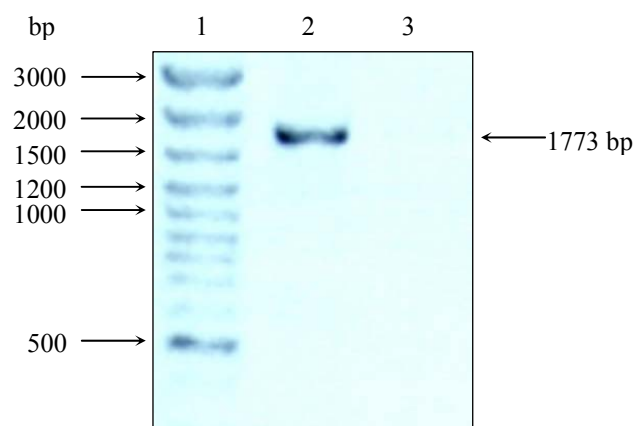


Abbildung 19 Nachweis der mRNA des ORFs MTH171 von *M. thermoautotrophicus* mittels RT-PCR. Zum Nachweis wurde cDNA mit spezifischen Primern amplifiziert. Agarosegelelektrophorese des PCR-Produktes. **Spur 1:** Molekulargewichtsstandard; **Spur 2:** Produkt der erwarteten Länge der RT-PCR; **Spur 3:** Kontrollansatz: RT-PCR ohne Inkubation mit Reverser Transkriptase.

Die Daten zeigen, dass ORF MTH171, der für eine GlnS codiert, bei Wachstum von *M. thermoautotrophicus* transkribiert wird, was auf eine Bedeutung des entsprechenden Proteins *in vivo* schließen lässt.

5.6 Glucosamin-6-Phosphat Deaminase (GPDA) in *Pyrococcus furiosus* und *Thermotoga maritima*

Im Genom des hyperthermophilen Archaeons *P. furiosus* wurde wie auch im Genom von *M. thermoautotrophicus* ein ORF gefunden, der homolog zur Isomerase Domäne der GlmS ist. Dieser ORF ist bei *P. furiosus* Bestandteil eines Operons, das große Ähnlichkeit zu einem am Chitinabbau beteiligten Operon in *Thermococcus kodakaraensis* hat. Ein Protein dieses Operons in *Tc. kodakaraensis* ist zu 61% identisch mit dem als GlmS annotierten ORF aus *P. furiosus* und codiert für eine Glucosamin-6-Phosphat Deaminase (Tanaka et al. 2005). Es sollte nun untersucht werden, ob das entsprechende Protein in *P. furiosus* GPDA-Aktivität hat. In *T. maritima* fand sich eine ähnliche Genumgebung um den ORF TM0813, dessen codiertes Protein sehr geringe PGI-Aktivität zeigte (Tabelle 8). Auch bei diesem sollte nun untersucht werden, ob das Protein die physiologische Bedeutung einer GPDA hat.

5.6.1 Reinigung der rekombinanten GPDAs

GPDA aus *P. furiosus*. Das *gpda*-Gen aus *P. furiosus*, ORF PF0362, der als Glutamin:Fructose-6-Phosphat Transaminase annotiert ist, besteht aus 978 Basenpaaren und codiert für ein Polypeptid mit 325 Aminosäuren, was einer kalkulierten Masse von 36.7 kDa entspricht. Das Gen wurde in den Vektor pET14b kloniert und zur Expression in *E. coli* BL21(DE3)-CodonPlus-RIL transformiert. Nach Überexpression eines 39 kDa-Proteins wurde dieses über zwei säulenchromatographische Schritte (Ni-NTA Agarose und Gelfiltration mit Superdex) bis zur apparenten Homogenität gereinigt (Abbildung 20). Die gereinigte GPDA wies eine spezifische Aktivität von 36 U/mg (50°C) mit Glucosamin-6-Phosphat als Substrat auf. Das native Molekulargewicht betrug 70 kDa (Tabelle 12). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass es sich um ein Protein mit dimerer Struktur handelt.

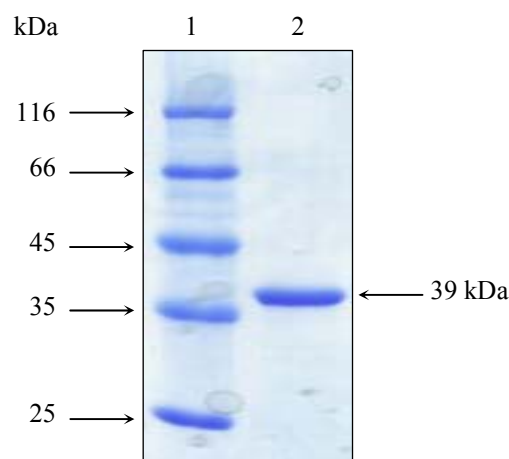


Abbildung 20 Reinigung der GPDA aus *P. furiosus*. SDS-PAGE und anschließende Färbung mit Coomassie Brilliantblau von gereinigter GPDA. Die Pfeile auf der linken Seite zeigen auf die Markerproteine, der Pfeil rechts auf die Bande der GPDA. **Spur 1:** Molekulargewichtsstandard; **Spur 2:** GPDA nach Gelfiltration an Superdex.

GPDA aus *T. maritima*. Die Reinigung der GPDA (ORF TM0813) aus *T. maritima* erfolgte wie in 5.2.2 beschrieben. Das gereinigte Protein hat eine spezifische Aktivität von 50 U/mg mit Glucosamin-6-Phosphat als Substrat. Diese extrem hohe spezifische Aktivität im Vergleich zu der geringen PGI-Aktivität von nur 0.2 U/mg zeigt, dass es sich bei dabei um die Hauptaktivität des Enzyms handelt.

5.6.2 Biochemische Charakterisierung der rekombinanten GPDAs

Die gereinigten rekombinanten GPDAs wurden in Bezug auf die katalytischen Eigenschaften, pH- und Temperaturoptima, sowie im Falle der GPDA aus *P. furiosus* auf die Temperaturstabilität biochemisch charakterisiert (Tabelle 12). Der Einfluss von 6-Phosphogluconat und Erythrose-4-Phosphat auf die Aktivität des Enzyms aus *P. furiosus* wurde überprüft.

Katalytische Eigenschaften der GPDA aus *P. furiosus*. Die Glucosamin-6-Phosphat Deaminase aus *P. furiosus* katalysiert die reversible Deaminierung/Aminierung von Glucosamin-6-Phosphat zu Fructose-6-Phosphat und Ammonium. Die Abhängigkeit der Rate folgt in beiden Reaktionsrichtungen einer Michaelis-Menten-Kinetik. Aus den linearen Auftragungen nach Lineweaver-Burk wurde der K_m -Wert für Glucosamin-6-Phosphat mit 1.8 mM und der V_{max} -Wert mit 36 U/mg bestimmt. Die apparenten K_m -Werte für Fructose-6-Phosphat und NH_4^+ wurden mit 4.2 mM bzw. 34 mM und die entsprechenden V_{max} -Werte mit 14.5 bzw. 16 U/mg bestimmt (Abbildung 21). Damit war die katalytische Effizienz (V_{max}/K_m) der GPDA mit Glucosamin-6-Phosphat mindestens 5-mal so hoch wie mit Fructose-6-Phosphat und Ammonium. Diese Werte lassen auf die Richtung der Fructose-6-Phosphat Bildung als bevorzugte Reaktionsrichtung schließen, was in Übereinstimmung mit der physiologischen Funktion des Enzyms als Bestandteil eines Aminozucker-Abbauweges ist.

Um zu überprüfen, ob die GPDA neben NH_4^+ auch Glutamin als Aminogruppen-Donor verwenden kann, wurde die Aktivität des Enzyms mit Glutamin in Konzentrationen bis zu 100 mM getestet. Es wurde keinerlei Aktivität mit diesem Substrat festgestellt. Das lässt darauf schließen, dass es sich bei der GPDA aus *P. furiosus* um eine ausschließlich von Ammonium als Aminogruppen-Donor abhängige Deaminase handelt.

Erythrose-4-Phosphat (E4P) und 6-Phosphogluconat (6PG) wirken als kompetitive Inhibitoren auf die HPI von *M. thermoautotrophicus* (5.2.2). Diese weist 19% Identität zur GPDA aus *P. furiosus* auf. Deswegen wurde getestet, ob diese Substanzen auch auf die GPDA hemmend wirken. Dabei wurde festgestellt, dass bis zu 10 mM 6-Phosphogluconat keinen signifikanten Effekt auf die GPDA aus *P. furiosus* haben. 10 mM Erythrose-4-Phosphat hemmten die Aktivität um ca. 50%, bei Zugabe von 1 mM E4P war keine Hemmung der Enzymaktivität festzustellen. Beide Inhibitoren wirken damit nicht auf die Glucosamin-6-Phosphat Deaminase.

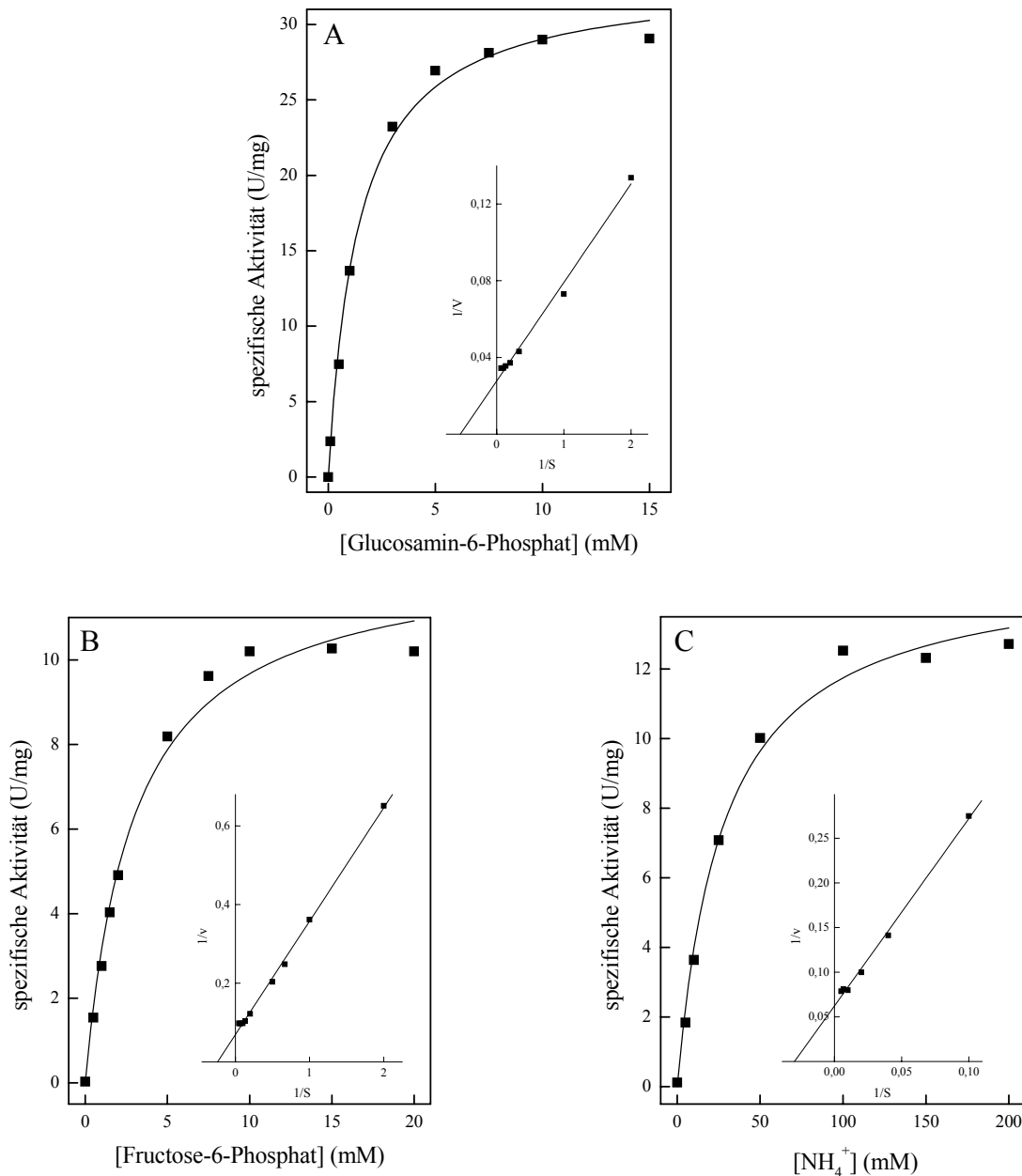


Abbildung 21 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der GPDA von *P. furiosus* von der Konzentration an Substrat. **A** Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von der Konzentration an Glucosamin-6-Phosphat. **B** Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von der Konzentration an Fructose-6-Phosphat. **C** Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von der Konzentration an Ammonium. Die Einschübe zeigen die doppelt reziproke Auftragung nach Lineweaver-Burk. Die Testansätze enthielten 1.5 (A) bzw. 0.7 μg Protein (B und C).

Temperaturoptimum und Thermostabilität der GPDA aus *P. furiosus*. Das Temperaturoptimum der GPDA aus *P. furiosus* wurde getestet. Bis zur höchsten gemessenen Temperatur von 91°C stieg die Aktivität an, damit lag das Temperaturoptimum über 91°C (Abbildung 22A). Die Darstellung der Daten nach Arrhenius ergab einen linearen Bereich zwischen 30 und 81°C, daraus wurde eine Aktivierungsenergie von 62.1 kJ/mol ermittelt. Die Thermostabilität der GPDA wurde über einen Zeitraum von 120 min getestet. Bis 90°C wurde kein signifikanter Aktivitätsverlust festgestellt. Bei 95°C betrug die Halbwertszeit 147 min (Abbildung 22B).

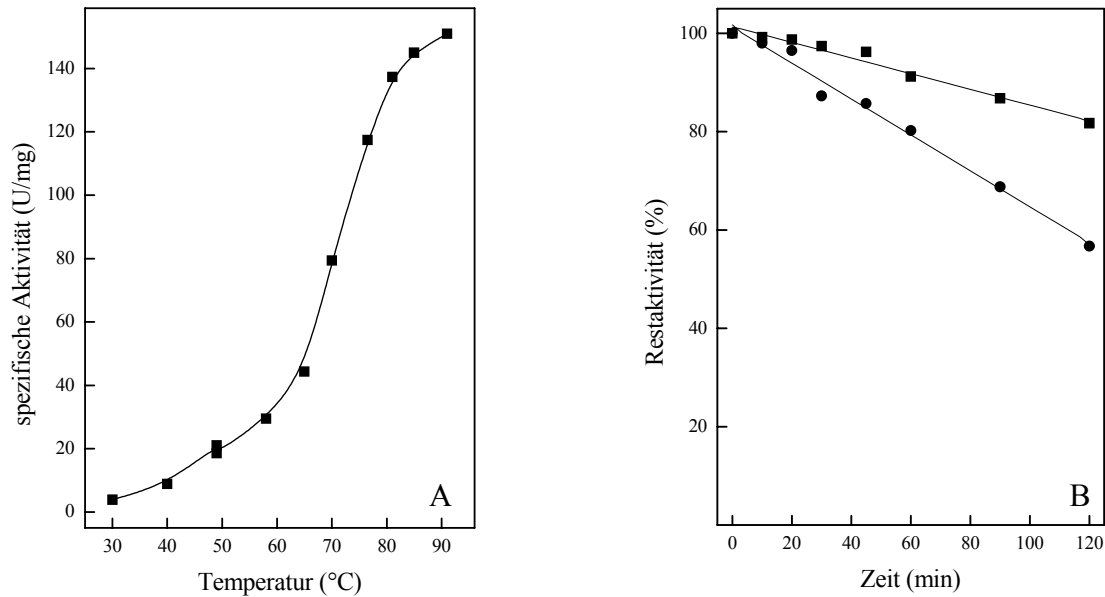


Abbildung 22 Temperaturabhängigkeit der Aktivität und Thermostabilität der GPDA von *P. furiosus*. A Spezifische Aktivität in Abhängigkeit von der Temperatur. B Restaktivität nach Inkubation bei (■) 90°C und (●) 95°C.

Komplementation einer *pgi*-Deletionsmutante von *E. coli* MG1655 durch die GPDA aus *P. furiosus*. Die GPDA aus *P. furiosus* war nicht dazu in der Lage, das Fehlen eines *pgi*-Gens in *E. coli* MG1655(DE3) $\Delta pgi \Delta udhA$ zu komplementieren (4.7). Dies steht in Übereinstimmung mit der Funktion des Enzyms als GPDA.

Katalytische Eigenschaften der GPDA aus *T. maritima*. Die Glucosamin-6-Phosphat Deaminase aus *T. maritima* katalysiert die reversible Deaminierung/Aminierung von Glucosamin-6-Phosphat zu Fructose-6-Phosphat und Ammonium. Die Abhängigkeit der Rate folgt in beiden Reaktionsrichtungen einer Michaelis-Menten-Kinetik. Aus den linearen Auftragungen nach Lineweaver-Burk wurde der K_m -Wert für Glucosamin-6-Phosphat mit 1.2 mM und der V_{max} -Wert mit 50 U/mg bestimmt. Die apparenten K_m -Werte für Fructose-6-Phosphat und NH_4^+ wurden mit 8.8 mM bzw. 40 mM und die entsprechenden V_{max} -Werte mit 64 bzw. 52 U/mg bestimmt (Tabelle 12). Damit war die katalytische Effizienz (V_{max}/K_m) der GPDA mit Glucosamin-6-Phosphat mindestens 6-mal so hoch wie mit Fructose-6-Phosphat und Ammonium. Damit wurde gezeigt, dass der ORF TM0813 für eine GPDA codiert, die sehr geringe Nebenaktivität einer PGI zeigt.

Tabelle 12 Molekulare und kinetische Eigenschaften der GPDAs von *P. furiosus* und *T. maritima*. Die kinetischen Konstanten wurden bestimmt bei ^a 50°C, ^b 60°C. ¹ bestimmt für die PGI-Aktivität des Enzyms, siehe Tabelle 2. NG6P: Glucosamin-6-Phosphat; F6P: Fructose-6-Phosphat.

		<i>P. furiosus</i>	<i>T. maritima</i>
apparente molekulare Masse des Enzyms (kDa)		70	90
apparente molekulare Masse der Untereinheit (kDa)		39	39
oligomere Struktur		α_2	α_2
pH-Optimum		7.6	7.5 ¹
Temperaturoptimum (°C)		>91°C	83 ¹
NG6P	V_{\max} (U/mg)	36 ^a	50 ^a
	K_m (mM)	1.8 ^a	1.2 ^a
F6P	V_{\max} (U/mg)	14.5 ^b	64 ^b
	K_m (mM)	4.2 ^b	8.8 ^b
NH ₄ ⁺	V_{\max} (U/mg)	16 ^b	52 ^b
	K_m (mM)	34 ^b	40 ^b

Die Ergebnisse der biochemischen Charakterisierung zeigen, dass die in dieser Arbeit untersuchten ORFs aus *P. furiosus* und *T. maritima* (TM0813) für funktionelle Glucosamin-6-Phosphat Deaminasen codieren.

5.6.3 Ortsspezifische Mutagenese der GPDA von *P. furiosus*

Aufgrund von Sequenzvergleichen der Isomerase-Domäne der Glutamin:Fructose-6-Phosphat Transaminase aus *E. coli* mit den in dieser Arbeit charakterisierten GPDAs und der GPDA aus *Tc. kodakaraensis* wurden einige konservierte Aminosäuren dieser Enzyme bestimmt.

Der Reaktionsmechanismus der Isomerase-Domäne der GlnS von *E. coli* zeigt Ähnlichkeit zu dem von bakteriellen Glucosamin-6-Phosphat Deaminasen (Milewski 2002; Oliva et al. 1995). Auf die Bindung von Glucosamin-6-Phosphat an das aktive Zentrum folgt Ringöffnung, ein Protonentransfer über ein cis-enolamin-Intermediat, Deaminierung und anschließender Ringschluss. Der Protonentransfer wird bei der GlnS aus *E. coli* über ein konserviertes Glutamat vermittelt, während bei der klassischen Deaminase von *E. coli* ein konserviertes Aspartat dazu dient. Bei den in dieser Arbeit untersuchten GPDAs aus *Pyrococcus* und *Thermotoga* ist wie bei der Isomerase-Domäne der GlnS aus *E. coli* ein Glutamat konserviert, das wahrscheinlich für den Protonentransfer verantwortlich ist (Abbildung 23B). Eine weitere Aminosäure im aktiven Zentrum der GlnS aus *E. coli* ist Valin (Abbildung 23A), für das eine Funktion bei der Stabilisierung des cis-enolamin-Intermediats postuliert wurde (Milewski et al. 2006b). In den hier untersuchten GPDAs ist das Valin konserviert oder liegt als funktionell konserviertes Isoleucin vor.

A

```

P.furiosus      98  ---LEKINTP-KLGISAYESS-LTRACDYSLVVPTIEES-VVMTHSFTAFYFAYLQLLRH 152
T.kodakaraensis 101 ---LESLDVP-KFALTAYEST-LSRKADYALIVPTHEES-VVMTHSFTAFYFAFLQLLNA 155
T.maritima     108 NDVLKKNRHR-TIGITIEEESRLAKESDLPLVFPVREEA-IVMTKSFMSILLSLMFLADK 165
E.coli        119 LRLSKELGYLGLSLAICNVPGSSLVRESDLALMTNAGTEIGVASTKAFTTQLTVLLMLVAK 178
      :. . . .: : * : .* .*: . * :. *::: : *

```

B

```

P.furiosus      202 ALEASLKMKEMAIFWSEAYPTFEVRHGFKAIDENT-LVVLLMAQELFEWHKK-LVNEFKG 259
T.kodakaraensis 205 ALEAMLKMKEMALFWSEAYQTFEVRHGFKSVADGTLVVLLVNEPFDWHEK-LTKEFQG 262
T.maritima     215 SLESALKCIEMSLTFSEAYSTLEYRHGPKALVKKGT-LVFMQKVSQMDQEKRLRKELES 273
E.coli        239 ALEGALKLKEISYIHAEAYAAGELKHGPLALIDADMPVIVVAPNELLEKLSNIEEVRA 298
      **: * * *:: :*** : * ** : : . . :::: . : : * :*...

```

Abbildung 23 Ausschnitte aus dem Sequenzvergleich der GPDAs aus *P. furiosus*, *Tc. kodakaraensis* und *T. maritima* mit der Isomerase-Domäne der GlnS aus *E. coli*. Das Alignment wurde mit ClustalX mit Standardeinstellungen erstellt (Thompson et al. 1997). Die Zahlen am Anfang und Ende der Sequenzen geben die Position der jeweiligen Aminosäure im Protein an. Konservierte Reste sind fett hervorgehoben und in der untersten Zeile mit * markiert, Punkte in der untersten Zeile zeigen konservierte Substitutionen an. NCBI-Accession-Nummern der Sequenzen: *P. furiosus* AAL80486; *T. kodakaraensis* BAD85944; *T. maritima* AAD35895; *E. coli* CAA23894. **A** Valin an Position 134 der GPDA aus *P. furiosus* und die entsprechenden Aminosäuren der anderen Proteine sind rot hervorgehoben. **B** Glutamat an Position 211 der GPDA aus *P. furiosus* und die entsprechenden Aminosäuren der anderen Proteine sind rot hervorgehoben.

Es sollte nun untersucht werden, ob ein Austausch des Valins gegen das basische Lysin und ein Austausch des für die Ringöffnung wichtigen Glutamats gegen Alanin zu einer Veränderung der Enzymaktivität führt.

Ortsspezifische Mutagenese. Das Plasmid PF0362/pET14b enthält den ORF PF0362, der für die GPDA aus *P. furiosus* codiert (Tabelle 5). Die zielgerichteten Mutagenesen an diesem Plasmid erfolgten mittels je zweier komplementärer Oligonucleotide, die die Mutation des Valin134-Codons GTG gegen AAG für Lysin bzw. die Mutation des Glutamat211-Codons GAA gegen das Codon GCA für Alanin enthielten. Die Sequenzen der erhaltenen Expressionsplasmide PF0362-V134K/pET14b (ORF PF0362 aus *P. furiosus*, in dem das Valin (V) an Position 134 gegen Lysin (K) ausgetauscht wurde in pET14b) und PF0362-E211A/pET14b (ORF PF0362 aus *P. furiosus*, in dem das Glutamat (E) an Position 211 gegen Alanin (A) ausgetauscht wurde in pET14b) enthielten die neuen Codons, die Sequenz des restlichen Gens war jeweils fehlerfrei. Die mutierten Plasmide wurden in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3)-CodonPlus-RIL transformiert und exprimiert.

Expression und Reinigung der mutierten GPDAs aus *P. furiosus*. Die Expression und Reinigung wurde jeweils unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wie die des Wildtyps (4.5.1 und 4.5.2). Beide Proteine ergaben auf einem SDS-Polyacrylamidgel 39 kDa-Banden, die apparente native molekulare Masse der Proteine wurde mit jeweils 70 kDa bestimmt, was auf eine homodimere Struktur der mutierten Proteine hindeutet. Damit entsprechen die molekularen Eigenschaften der Mutanten denen des Wildtyps. Für die Mutante PF0362-V134K wurde ein V_{\max} -Wert von 3 U/mg und ein K_m -Wert von 4.3 mM bei 50°C in Richtung der Glucosamin-6-Phosphat Deaminierung bestimmt. Für die Mutante PF0362-E211A konnte keinerlei Aktivität einer Glucosamin-6-Phosphat Deminase mehr nachgewiesen werden (Tabelle 13).

Tabelle 13 Katalytische Eigenschaften der rekombinanten GPDA aus *P. furiosus* (GPDA-Pf): Vergleich des Wildtyps mit den Mutanten. Die Parameter wurden bei 50°C mit Glucosamin-6-Phosphat als Substrat bestimmt. Auftragungen nach Lineweaver-Burk dienten der Ermittlung der kinetischen Parameter. n.m.: nicht messbar.

	GPDA-Pf Wildtyp	GPDA-Pf/ V134K	GPDA-Pf/ E211A
V_{\max} mit Glucosamin-6-P als Substrat (U/mg)	36	3	n.m.
K_m mit Glucosamin-6-P als Substrat (mM)	1.8	4.3	n.m.
V_{\max}/K_m (U/mg x mM)	20	0.7	n.m.

Die Daten zeigen, dass der Austausch von Glutamat211 gegen Alanin zu einem vollständigen und der Austausch von Valin134 gegen ein Lysin zu einem 96%-igen Aktivitätsverlust geführt haben. Das lässt darauf schließen, dass beide Aminosäuren von entscheidender Bedeutung für die Aktivität des Enzyms sind.

6 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

1. Die Metallabhängigkeit der Cupin-Typ Glucose-6-Phosphat Isomerasen wurde mittels Reaktivierung der nach EDTA-Behandlung inaktiven Enzyme durch Metalle nachgewiesen.
2. In *Methanothermobacter thermoautotrophicus* wurde die Aktivität der ersten archaeellen Glutamin:Fructose-6-Phosphat Transaminase gezeigt.
3. Für Homologe zur Isomerase-Domäne der Glutamin:Fructose-6-Phosphat Transaminase wurde gezeigt, dass diese je nach Organismus entweder Aktivität einer Glucose-6-Phosphat Isomerase oder Glucosamin-6-Phosphat Deaminase zeigen. Diese Enzyme gehören einer neuartigen Proteinfamilie an.

6.1 Metallabhängigkeit der Cupin-Typ Glucose-6-Phosphat Isomerasen

Cupin-Typ Glucose-6-Phosphat Isomerasen (cPGIs) aus *Pyrococcus furiosus*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Ensifer meliloti* und *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* wurden auf ihre Metallabhängigkeit hin untersucht. Die Aktivität aller Enzyme mit Ausnahme der cPGI aus *E. meliloti* war nach EDTA-Behandlung nicht mehr vorhanden und konnte durch Zugabe verschiedener zweiwertiger Kationen wiederhergestellt werden. Um eine vollständige Entfernung des gebundenen Metalls zu erreichen, waren relativ hohe Konzentrationen an EDTA und höhere Inkubationstemperaturen nötig. Zugabe von 10 mM EDTA führte nicht zur Inaktivierung der cPGI aus *P. furiosus*, weshalb zunächst angenommen wurde, dass dieses Enzym nicht metallabhängig ist (Verhees et al. 2001). Inkubation des gereinigten Enzyms mit 500 mM EDTA führte dagegen zu einem vollständigen Aktivitätsverlust der cPGI aus *P. furiosus*. Auch die cPGIs aus *A. fulgidus* und *S. enterica* serovar *typhimurium* konnten unter diesen Bedingungen vollständig inaktiviert werden, dagegen behielt das Enzym aus *E. meliloti* auch nach EDTA-Behandlung PGI-Aktivität. Das ist wahrscheinlich auf besonders feste Bindung des Metalls an das Enzym zurückzuführen. Reaktivierung der cPGIs aus *P. furiosus* (PfcPGI), *A. fulgidus* (AfcPGI) und *S. enterica* serovar *typhimurium* (StcPGI) war durch verschiedene zweiwertige Kationen möglich. Mit Ni^{2+} und Mn^{2+} zeigten die AfcPGI und die StcPGI die höchste Aktivität, die höchste Aktivität der PfcPGI wurde mit Fe^{2+} gemessen. Höhere Konzentrationen der meisten Metalle wirkten allerdings inhibierend auf die Aktivität der cPGIs. So war z.B. mit Zink bereits ab einer Konzentration von 50 μM eine Hemmung der Enzymaktivität zu sehen. Dies erklärt, warum in früheren Untersuchungen keine Metallabhängigkeit nachgewiesen werden konnte, da in diesen sehr hohe Metallkonzentrationen verwendet worden waren.

In Metallanalysen verschiedener cPGIs wurde Eisen und Nickel direkt nachgewiesen (Hansen et al. 2005), die Kristallstruktur der cPGI aus *P. furiosus* zeigte das Vorhandensein von einem Eisenatom pro Untereinheit (Abbildung 24) (Swan et al. 2003b). Dies spricht dafür, dass Eisen das in der Natur relevante Metall für die cPGIs ist.

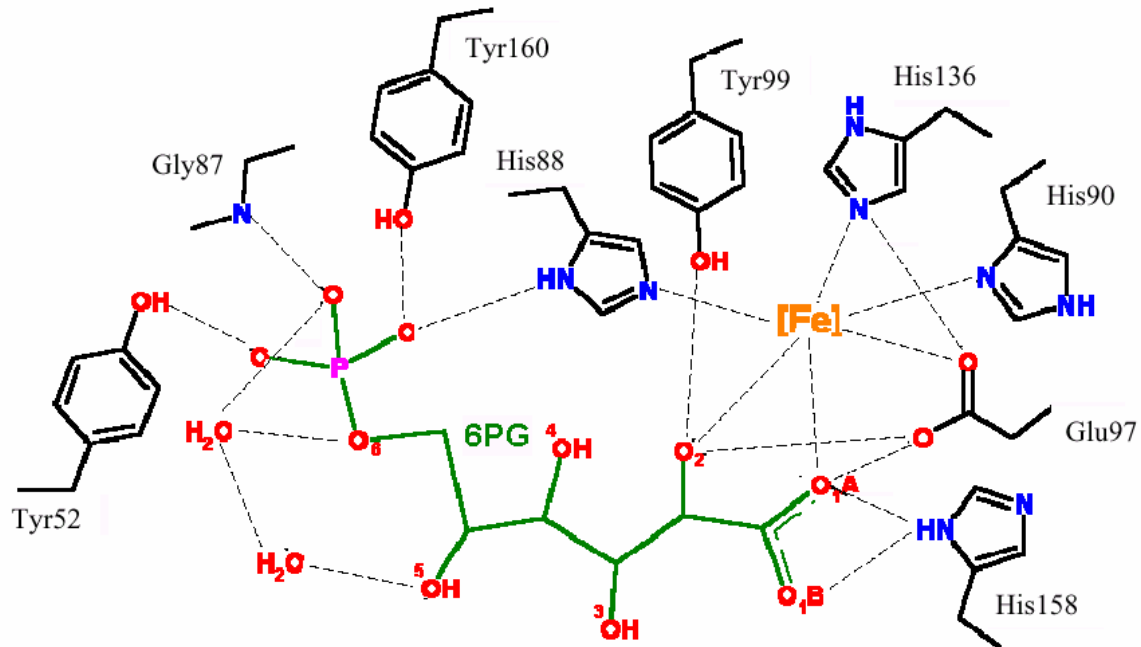


Abbildung 24 Kristallstruktur der cPGI aus *P. furiosus* mit gebundenem Inhibitor 6-Phosphogluconat (Swan et al. 2003b, modifiziert). Das Schema zeigt die Wechselwirkungen zwischen 6-Phosphogluconat (6PG), Eisen (Fe) und ausgewählten Aminosäureresten des Enzyms.

Das Eisen ist über vier Aminosäurereste an das Enzym gebunden. Diese Aminosäuren, Histidin88, Histidin90, Histidin136 und Glutamat97 (Abbildung 24), sind Bestandteil der Signaturmuster der cPGI-Familie, TX₃PX₃GXEX₃TXGHXHX₆₋₁₁EXY und PPX₃HX₃N, sie sind bei allen untersuchten cPGIs konserviert (Abbildung 25) (Hansen et al. 2005). Auch bei anderen metallabhängigen Proteinen der Cupin-Superfamilie wird das Metall durch drei Histidine und ein Glutamat koordiniert (Dunwell et al. 2004). Die Bedeutung des gebundenen Metalls für die Aktivität des Enzyms wird unterstrichen durch Mutagenese-Experimente, die mit der cPGI aus *A. fulgidus* durchgeführt wurden. Ein Austausch der Histidine an Position 80 und 82 der AfcPGI sowie von Glutamat93 (entspricht His88, His90 und Glu97 in der PfcPGI) gegen Alanin bzw. Aspartat führte zu einem deutlichen Verlust an Aktivität und der Fähigkeit zur Metallbindung (Hansen et al. 2004a).

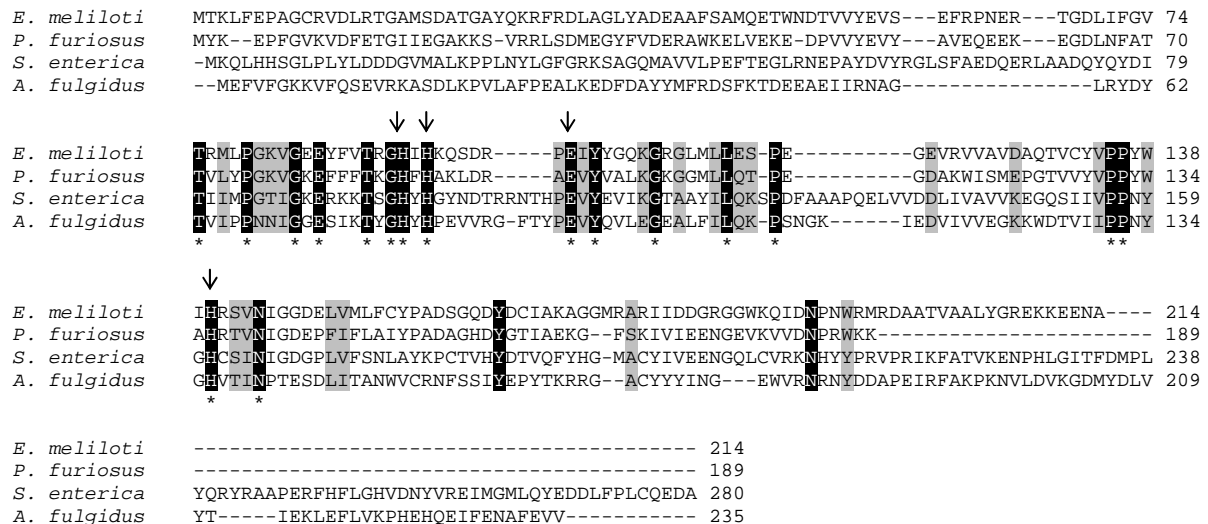


Abbildung 25 Multiples Sequenzalignment mit Aminosäuresequenzen der untersuchten cPGIs aus *E. meliloti*, *P. furiosus*, *A. fulgidus* und *S. enterica* serovar *typhimurium*. Das Alignment wurde mit ClustalX mit Standardeinstellungen (Thompson et al. 1997) erstellt. Konservierte Aminosäuren wurden schwarz, funktionell konservierte Aminosäuren grau hinterlegt. Aminosäuren, die Bestandteil der Signaturmuster der cPGIs sind (Hansen et al. 2005), wurden durch * in der untersten Zeile markiert. Aminosäuren, die das gebundene Metall koordinieren, sind durch Pfeile markiert. Die Zahlen am Ende der Sequenzen geben die Position der jeweiligen Aminosäure im Protein an. NCBI-Accession-Nummern der Sequenzen: *E. meliloti* Q92MQ8; *A. fulgidus* NP_070323; *S. enterica* serovar *typhimurium* NP_461684; *P. furiosus* NP_577925.

Zu klären bleibt jedoch die genaue Funktion des gebundenen Metalls. Eine strukturelle Funktion scheint unwahrscheinlich, da die Mutation der metallbindenden Aminosäuren nicht zu einer Veränderung der thermostabilen Eigenschaften der AfcPGI führte (Hansen et al. 2004a). Für Mannose-6-Phosphat Isomerase (PMI), ein zinkabhängiges Mitglied der Cupin-Superfamilie, wurde postuliert, dass das gebundene Metall der Polarisierung der C-O Bindungen im Molekül und so der leichteren De- und Reprotonierung dienen könnte. Das entstandene cis-endiol-Intermediat wird dann durch den Metall-Kofaktor stabilisiert (Roux et al. 2004). Da der Reaktionsmechanismus der cPGIs wahrscheinlich ebenso wie der der klassischen PGIs und der der PMIs über ein cis-endiol-Intermediat verläuft (Berrisford et al. 2006), ist auch hier eine entsprechende Rolle des essentiellen Metalls zu vermuten.

6.2 Glutamin:Fructose-6-Phosphat Transaminase aus *Methanothermobacter thermoautotrophicus*

Die Glutamin:Fructose-6-Phosphat Transaminase (GlmS) aus *Methanothermobacter thermoautotrophicus*, die durch den ORF MTH171 codiert wird, wurde rekombinant in *E. coli* hergestellt. Nach Reinigung über Phenyl-Sepharose und Gelfiltration zeigte das rekombinante Protein im Test bei 60°C eine GlmS-Aktivität von ca. 30 mU/mg. Das Enzym war außerdem sehr instabil, nach einer Lagerung des gereinigten Enzyms für 24 h bei 4°C war keine Aktivität mehr messbar. Geringe Aktivitäten und Labilität des Enzyms wurden bereits für GlmS aus verschiedenen anderen Organismen beschrieben, so z.B. für die Enzyme aus *Rattus norvegicus* und *Neurospora crassa* (Ghosh et al. 1960; Huynh et al. 2000). Es wurde weiterhin gezeigt, dass der ORF MTH171 *in vivo* transkribiert wird und somit von Bedeutung für das lithoautotrophe Wachstum dieses Organismus ist. Das apparente Molekulargewicht der GlmS wurde mit etwa 150 kDa bestimmt, das der Untereinheiten mit etwa 66 kDa, was für eine homodimere Struktur des Enzyms spricht. Auch die bisher charakterisierten bakteriellen GlmS liegen als Dimere vor. Dagegen sind die untersuchten eukaryotischen Glutamin:Fructose-6-Phosphat Transaminasen als Tetramere aktiv. Die Untereinheiten der Proteine bestehen aus 590 bis 720 Aminosäuren, wobei die eukaryotischen Proteine generell zwischen 70 und 90 Aminosäuren länger sind als die prokaryotischen (Abbildung 26) (Milewski 2002).

Ein Vergleich der GlmS aus *M. thermoautotrophicus* mit den GlmS-Sequenzen sowohl bakterieller als auch eukaryotischer Organismen zeigte signifikante Ähnlichkeiten (47 - 69%) zwischen diesen Proteinen. Insbesondere der C-Terminus der GlmS ist sehr gut konserviert, alle Sequenzen enthalten dort das Signaturmuster DXPXXLAK[SC]VT (Abbildung 26) (Teplyakov et al. 1998). Glutamin:Fructose-6-Phosphat Transaminasen gehören zur Familie der Glutamin Amidotransferasen. Diese sind Enzyme, die den Transfer der Amidogruppe von L-Glutamin auf ein Akzeptormolekül katalysieren. In dieser Familie nimmt die GlmS eine einzigartige Position ein, da sie nicht in der Lage ist, Ammonium anstelle von Glutamin zu verwenden und neben der Transferase-Reaktion auch eine Aldose/Ketose Isomerase-Funktion besitzt (Milewski 2002; Teplyakov et al. 1998). Alle GlmS bestehen aus zwei Domänen, einer N-terminalen Glutaminase-Domäne und einer C-terminalen Isomerase-Domäne, die durch ein „linker“-Fragment miteinander verknüpft sind (Abbildung 26). Dieses ist bei den eukaryotischen GlmS etwas länger als bei den prokaryotischen. Die Glutaminase-Domäne (Aminosäuren 1 - 241 der GlmS aus *E. coli*) zeigt große Ähnlichkeiten zu den Glutaminase-Domänen anderer Amidotransferasen. Die Isomerase-Domäne (Aminosäuren 249 - 609 der GlmS aus *E. coli*) dagegen ähnelt strukturell anderen Aldose/Ketose Isomerasen, wie z.B. klassischen PGIs und Glucosamin-6-Phosphat Deaminasen (GPDA) (Isupov et al. 1996; Teplyakov et al. 1998). Diese setzen wie GlmS Fructose-6-Phosphat über ein cis-endiol- bzw. cis-enolamin-Intermediat um.

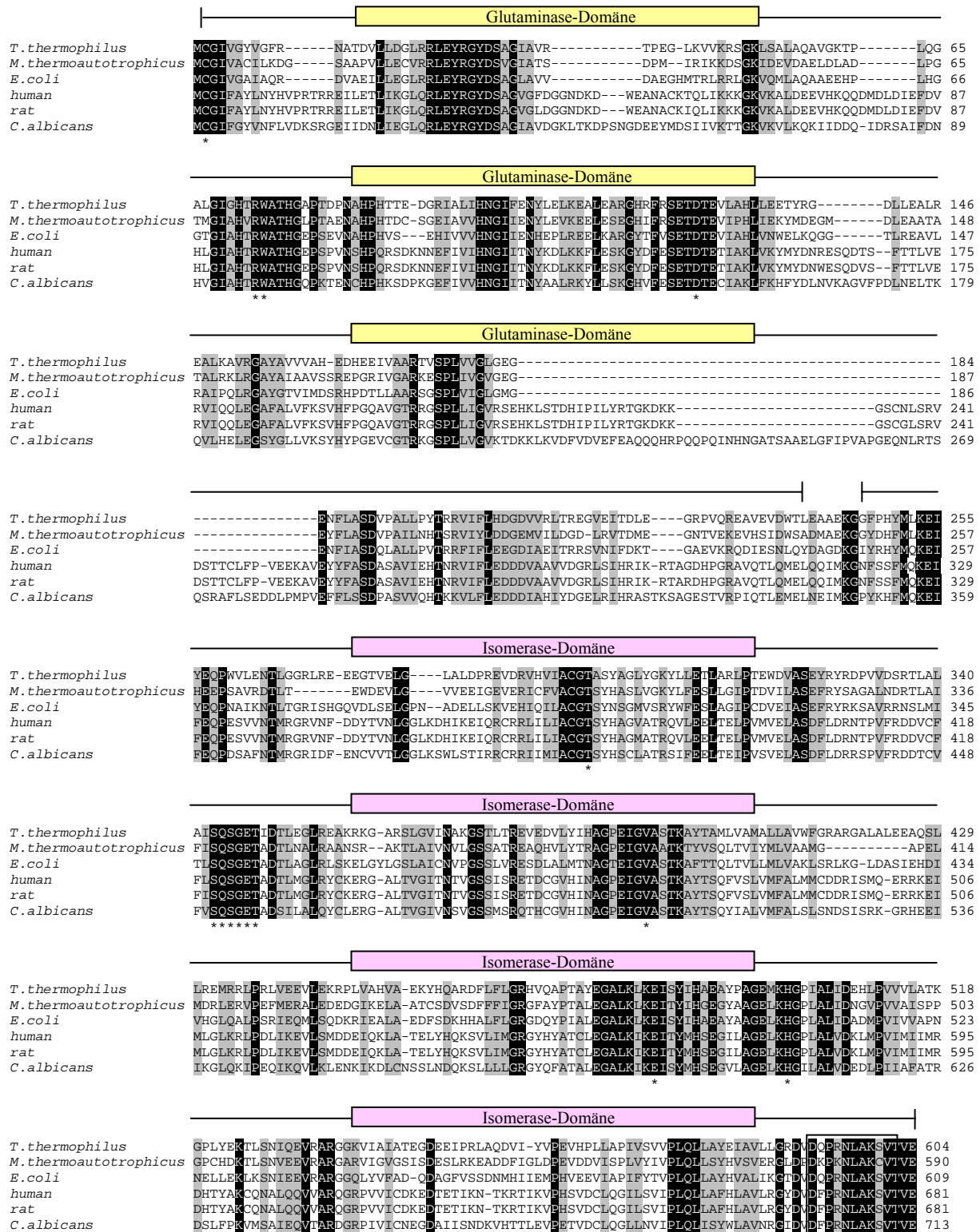


Abbildung 26 Multiples Sequenzalignment der GlmS aus *M. thermoautotrophicus* mit Aminosäuresequenzen von GlmS aus den Domänen der Eukarya und Bacteria. Das Alignment wurde mit ClustalX mit Standardeinstellungen (Thompson et al. 1997) erstellt. Konservierte Aminosäuren wurden schwarz, funktionell konservierte Aminosäuren grau hinterlegt. Aminosäuren, die an der Substratbindung und Katalyse beteiligt sind, sind durch * in der untersten Zeile markiert. Das konservierte GlmS-Signaturmuster am C-Terminus ist durch einen Kasten gekennzeichnet, die beiden Domänen durch waagerechte Striche. Die Zahlen am Ende der Sequenzen geben die Position der jeweiligen Aminosäure im Protein an. NCBI-Accession-Nummern der Sequenzen: *Thermus thermophilus* YP_0058502; *M. thermoautotrophicus* NP_275314; *E. coli* CAA23894; human NP_002047; rat AAH83889; *C. albicans* XP_721697.

Kontrollierte Proteolyse durch Chymotrypsinogen führt zu einer Trennung der beiden Domänen der GlmS. Die Glutaminase-Domäne behält dabei die Fähigkeit zur Hydrolyse von Glutamin zu Glutamat und freiem Ammonium (Deniset et al. 1991). Für die Isomerase-Domäne wurde dagegen gezeigt, dass diese die reversible Isomerisierung von Fructose-6-Phosphat (F6P) zu Glucose-6-Phosphat (G6P) katalysiert und damit die Reaktion einer PGI zeigt (Todorova 2001). Untersuchungen mit der GlmS aus *E. coli* ergaben, dass das Holoenzym bei Inkubation mit F6P ohne Glutamin in geringem Maße auch die Isomerisierung zu G6P katalysierte (Leriche et al. 1996). Eine solche PGI-ähnliche Aktivität konnte für die GlmS aus *M. thermoautotrophicus* nicht festgestellt werden.

Phylogenetische Verwandtschaften der GlmS. Die GlmS aus *M. thermoautotrophicus* wurden mit GlmS aus allen drei Domänen des Lebens bezüglich ihrer evolutionären Verwandtschaft untersucht (Abbildung 27).

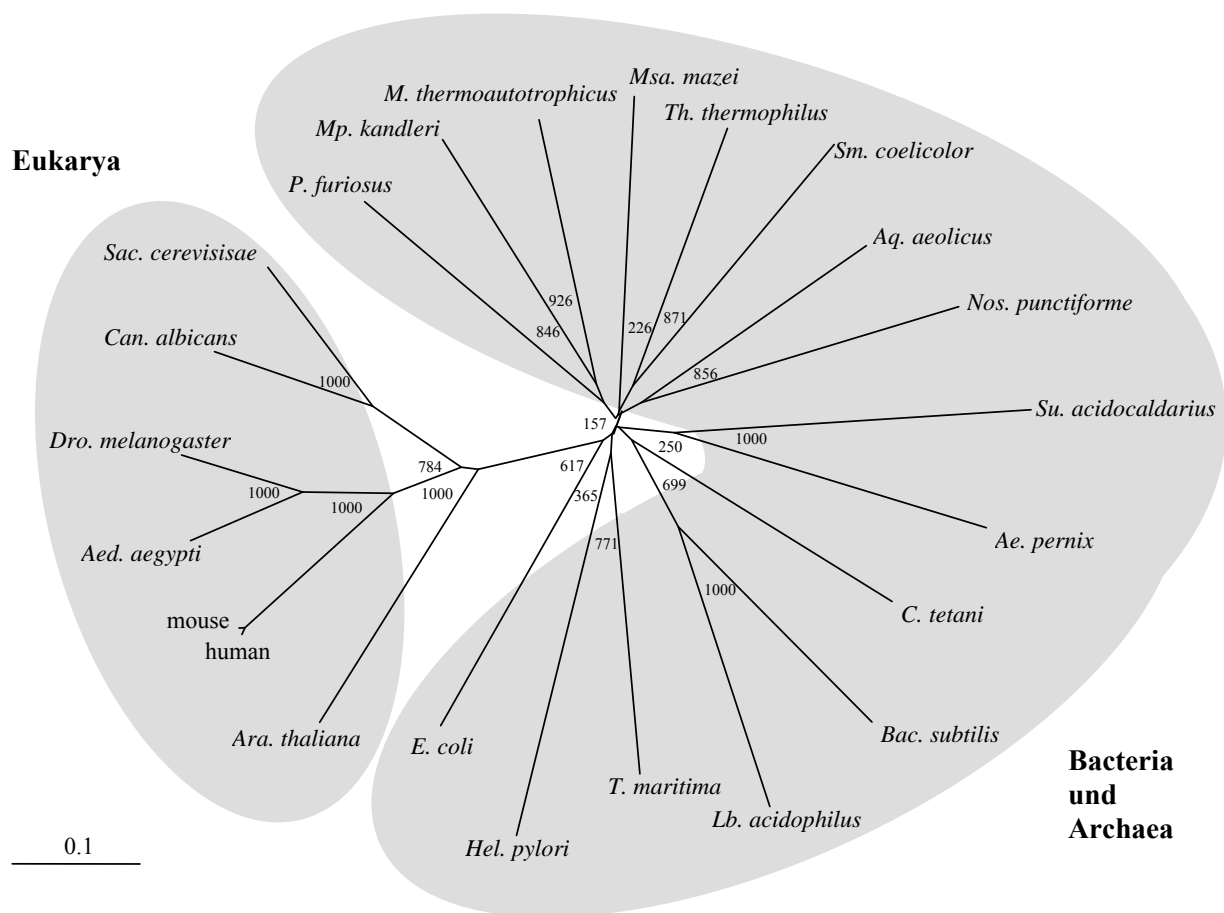


Abbildung 27 Phylogenetische Verwandtschaft von GlmS aus Eukarya, Bacteria und Archaea. Die Zahlen an den Knotenpunkten sind die Bootstrap-Werte nach Neighbor-Joining. NCBI-Accession-Nummern: *P. furiosus* NP_577886; *Mp. kandleri* Q8TZ14; *M. thermoautotrophicus* NP_275314; *Methanosarcina mazei* NP_632324; *Thermus thermophilus* YP_0058502; *Streptomyces coelicolor* NP_628898; *Aquifex aeolicus* NP_213208; *Nostoc punctiforme* ZP_00112054; *Sulfolobus acidocaldarius* YP_256936; *Aeropyrum pernix* NP_147783; *Clostridium tetani* NP_783066; *Bacillus subtilis* NP_388059; *Lactobacillus acidophilus* YP_193380; *T. maritima* NP_227963; *Helicobacter pylori* NP_208322; *E. coli* CAA23894; *Arabidopsis thaliana* BAB03027; human, *Homo sapiens* NP_002047; mouse, *Mus musculus* NP_038556; *Aedes aegyptii* AAK85407; *Drosophila melanogaster* CAB46365; *Candida albicans* XP_721697; *Saccharomyces cerevisiae* NP_012818.

Wie der phylogenetische Stammbaum in Abbildung 27 zeigt, bilden die ausgewählten GlnS zwei Gruppen, eine eukaryotische Gruppe und eine prokaryotische Gruppe. Die prokaryotische Gruppe setzt sich zusammen aus Sequenzen der Archaea und Bacteria, die jedoch keine separaten Gruppen bilden. Diese Aufteilung des phylogenetischen Stammbaums in Prokaryota und Eukaryota entspricht dem unterschiedlichen strukturellen Aufbau der GlnS aus diesen beiden Gruppen. Die GlnS der Eukarya sind größer als die der Prokaryota und liegen als Tetramere vor, wohingegen die bakteriellen und auch die in dieser Arbeit untersuchte archaeelle GlnS Dimere sind.

In dieser Arbeit wurde damit zum ersten Mal die Aktivität einer GlnS in der Domäne der Archaea nachgewiesen. Eine weitergehende biochemische Charakterisierung des Enzyms aus *M. thermoautotrophicus* war bislang durch die Instabilität des Proteins und seine geringe Aktivität noch nicht möglich.

6.3 Homologe zur Isomerase-Domäne der Glutamin:Fructose-6-Phosphat Transaminase

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ORFs aus den Genomen von *Methanosphaera stadtmanae*, *Methanothermobacter thermoautotrophicus*, *Methanopyrus kandleri*, *Thermoplasma acidophilum*, *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*, *Thermotoga maritima* und *Pyrococcus furiosus* untersucht, die für Homologe zur Isomerase-Domäne der Glutamin:Fructose-6-Phosphat Transaminase codieren. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Enzyme je nach Organismus entweder Aktivitäten einer Glucose-6-Phosphat Isomerase (HPI) oder einer Glucosamin-6-Phosphat Deaminase (GPDA) aufwiesen. Für das Protein aus *Mp. kandleri*, das durch den ORF MK0918 codiert wird, konnte im Rahmen dieser Arbeit keine Funktion nachgewiesen werden. Mittels RT-PCR wurde gezeigt, dass dieser ORF zwar *in vivo* transkribiert wird, welche Bedeutung das entsprechende Protein aber für das Wachstum des Organismus hat, konnte nicht geklärt werden.

6.3.1 Glucose-6-Phosphat Isomerasen

Die HPIs aus *M. thermoautotrophicus*, *Ms. stadtmanae*, *Tp. acidophilum* und *S. enterica* serovar *typhimurium* sowie in geringerem Maße auch aus *T. maritima* zeigten PGI-Aktivität. Sie wurden in dieser Arbeit biochemisch charakterisiert. Im Genom von *T. maritima* ist außerdem eine klassische PGI annotiert, diese wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls charakterisiert. Weiterhin wurde die Bedeutung zweier konservierter Aminosäuren für die Funktion der HPI aus *M. thermoautotrophicus* mittels ortsspezifischer Mutagenese nachgewiesen.

Biochemische Charakterisierung. Alle Proteine wurden rekombinant in *E. coli* hergestellt und über einen His-tag gereinigt. Die apparenten Molekulargewichte für die Untereinheiten der HPIs wurden mit ungefähr 40 kDa bestimmt, die der nativen Proteine mit 75 - 90 kDa, was für homodimere Strukturen der Proteine spricht. Die durch Proteolyse abgespaltene Isomerase-Domäne der GlnS aus *E. coli* lag ebenfalls als Homodimer vor. Dieses bestand aus zwei Untereinheiten mit einer Größe von jeweils ca. 40 kDa (Deniset et al. 1991; Todorova 2001). Auch die meisten klassischen PGIs sind Dimere, allerdings mit etwas größeren Untereinheiten von 50 bis 67 kDa. Eine Ausnahme bilden die beiden thermophilen PGIs aus *Bacillus stearothermophilus* und *B. caldotenax* mit Untereinheiten von ca. 50 kDa, die als Tetramere vorliegen und ein natives Molekulargewicht von 172 bzw. 202 kDa haben (Muramatsu und Nosoh 1971; Takama und Nosoh 1980). Dieses scheint aber keine thermophile Eigenschaft zu sein, da die in dieser Arbeit untersuchte klassische PGI aus dem hyperthermophilen Organismus *T. maritima* als Dimer vorliegt. Für dieses Enzym wurde ein natives Molekulargewicht von 130 kDa mit Untereinheiten einer Größe von ca. 50 kDa bestimmt, was den für klassische PGIs ermittelten Werten gut entspricht.

Für die hyperthermophilen Proteine aus *T. maritima* wurden Temperaturoptima von 83°C (für das Homolog zur Isomerase-Domäne der GlmS) und 87°C (für die klassische PGI) bestimmt. Damit entsprachen sie gut dem Wachstumsoptimum dieses Organismus, das bei etwa 80°C liegt (Huber et al. 1986). Auch die Thermostabilität der PGI war extrem, nach über 120 min Inkubation bei 90°C war noch mehr als 50% der Anfangsaktivität messbar. Die Temperaturoptima und Thermostabilitäten der mesophilen bzw. thermophilen HPIs aus *Ms. stadtmanae* (HPI-Ms) und *M. thermoautotrophicus* (HPI-Mt) sind in Übereinstimmung mit den Wachstumstemperaturen der Organismen geringer: das Protein aus *Ms. stadtmanae* hatte bei 60°C eine Halbwertszeit von 10 min; für das Enzym aus *M. thermoautotrophicus* wurde bei 70°C eine Halbwertszeit von 15 min bestimmt. Die Temperaturoptima der untersuchten HPIs entsprachen im Allgemeinen den meso- bzw. thermophilen Wachstumsbedingungen der Organismen. Die HPI-Mt zeigte ein Temperaturoptimum von 73°C (bei einer optimalen Wachstumstemperatur von 65 bis 70°C), allerdings war das Protein bei dieser Temperatur nur für sehr kurze Zeit stabil.

Die höchsten HPI-Aktivitäten wurden für die Proteine aus *M. thermoautotrophicus*, *Ms. stadtmanae* und *Tp. acidophilum* gemessen, diese Proteine hatten mit Fructose-6-Phosphat (F6P) als Substrat maximale Aktivitäten von 6 - 9 U/mg. Im Falle von *Tp. acidophilum* ist diese Aktivität deutlich geringer als die der bifunktionellen PGI/PMI, für die mit F6P eine maximale Aktivität von ca. 60 U/mg gemessen wurde (Hansen et al. 2004c). Dies spricht dafür, dass die PGI/PMI und nicht die hier untersuchte HPI die physiologisch relevante PGI in *Tp. acidophilum* ist. Auch die Aktivität der HPI aus *S. enterica* serovar *typhimurium* ist mit ca. 0.2 U/mg für F6P sehr gering; für diesen Organismus sind jedoch sowohl Aktivität einer cPGI (6.1) als auch das Vorhandensein einer klassischen PGI nachgewiesen worden (Hansen, unveröffentlicht). Die klassische PGI aus *T. maritima* zeigte eine 1000-fach höhere Aktivität mit Fructose-6-Phosphat als das HPI-homologe Protein aus diesem Organismus. Dies zeigt eindeutig, dass die klassische PGI die physiologisch relevante Glucose-6-Phosphat Isomerase ist. Damit sind die HPIs vor allem in Organismen wichtig, die sonst keine anderen PGIs besitzen, wie die hier untersuchten methanogenen Archaea *M. thermoautotrophicus* und *Ms. stadtmanae*. Für die HPI aus *M. thermoautotrophicus* wurde durch RT-PCR nachgewiesen, dass der für dieses Protein codierende ORF in wachsenden Zellen transkribiert wird. Auch aus den Messungen im Zellextrakt von *M. thermoautotrophicus* nach Gelfiltration ergab sich, dass dieser Organismus ein Protein mit PGI-Aktivität besitzt, dessen natives Molekulargewicht dem der rekombinanten HPI entspricht. Dies spricht dafür, dass die HPI in *M. thermoautotrophicus* auch *in vivo* von Bedeutung für den Organismus ist und die einzige funktionelle Glucose-6-Phosphat Isomerase in diesem methanogenen Archaeon darstellt. Die kinetischen Eigenschaften der untersuchten HPIs deuten darauf hin, dass die Isomerisierung von Fructose-6-Phosphat zu Glucose-6-Phosphat die bevorzugte Reaktionsrichtung ist. In allen Fällen war die katalytische Effizienz (V_{\max}/K_m) der Proteine mit Fructose-6-Phosphat als Substrat deutlich höher als mit

Glucose-6-Phosphat. Diese Präferenz für F6P lässt darauf schließen, dass die HPIs vor allem für die Gluconeogenese von Bedeutung sind.

Für klassische PGIs wurden mehrere kompetitive Inhibitoren beschrieben, so z.B. Erythrose-4-Phosphat (E4P), 6-Phosphogluconat (6PG) und Sorbitol-6-Phosphat (S6P) (Grazi et al. 1960; Parr 1956; Parr 1957). Auch die bifunktionellen PGI/PMIs werden von E4P und 6PG in mikromolaren Konzentrationen gehemmt, dagegen hat bei den cPGIs, die eine konvergente Entwicklung darstellen, nur S6P einen signifikanten Effekt auf die Enzymaktivität (Hansen et al. 2004c; Hansen et al. 2005). Die in dieser Arbeit untersuchte HPI aus *M. thermoautotrophicus* wurde sowohl von E4P und 6PG als auch von S6P gehemmt. Die K_i -Werte der jeweiligen Inhibitoren wurden mit 20 - 80 μ M bestimmt. Für alle getesteten Inhibitoren wurde die Kompetitivität der Hemmung nachgewiesen, Zugabe der Hemmstoffe führte zu einer 3- bis 4-fachen Erhöhung des gemessenen K_m -Wertes für Fructose-6-Phosphat bei gleichbleibendem V_{max} -Wert. Damit liegen die für die HPIs bestimmten Inhibitor konstanten in derselben Größenordnung, wie sie auch schon für PGIs der Superfamilie bestimmt wurden. Dies legt einen identischen Reaktionsmechanismus für die HPIs und die PGIs der Superfamilie nahe.

Komplementationsexperimente. Durch die Charakterisierung der rekombinanten Proteine wurde nachgewiesen, dass die hier beschriebenen, zur Isomerase-Domäne der GlmS homologen Proteine die Aktivität von Glucose-6-Phosphat Isomerasen haben. Um zu prüfen, ob diese Proteine auch *in vivo* funktionelle PGIs darstellen, wurden Komplementationsexperimente mit einer Deletionsmutante von *E. coli* durchgeführt. Die verwendete Deletionsmutante war durch das Fehlen zweier Gene (*pgi* und *udhA*) nicht mehr in der Lage, auf Minimalmedium mit Glucose als einziger C-Quelle zu wachsen (Canonaco et al. 2001; Sauer et al. 2004). Nach Transformation der konstruierten *hpi*-Plasmide konnte das Wachstum in allen Fällen wiederhergestellt werden. Allerdings war die Wachstumsrate der mit den HPIs komplementierten Deletionsmutante in allen Fällen deutlich langsamer als die des Wildtyps, die Verdoppelungszeit war 3- bis 6-mal so lang. Die klassische PGI aus *T. maritima* war dagegen fast vollständig dazu in der Lage, das Fehlen einer PGI in *E. coli* zu komplementieren. Mit dem konstruierten Plasmid transformierte Zellen der Deletionsmutante zeigten eine Verdoppelungszeit von 1.4 Stunden, die höchste Wachstumsrate, die im Rahmen der Komplementationsversuche gemessen wurde. Die unterschiedliche Komplementationsfähigkeit der HPIs und der PGI könnte auf die katalytischen Eigenschaften der exprimierten Proteine zurückzuführen sein.

Die beschriebenen Experimente zeigen, dass die untersuchten HPIs *in vivo* funktionell aktive Glucose-6-Phosphat Isomerasen sind.

Aminosäuresequenzvergleiche und Reaktionsmechanismus der HPIs. Ein Sequenzvergleich der HPIs mit der Isomerase-Domäne der GlmS aus *E. coli* ergab Ähnlichkeiten von 34 - 44% und zwischen 15 und 24% identische Reste (Abbildung 28). Mittlerweile liegen mehrere Kristallstrukturen für die GlmS aus *E. coli* vor (<http://www.rcsb.org>), sowohl für das gesamte Enzym mit gebundenem Substrat oder verschiedenen Inhibitoren als auch für die Glutaminase- und die Isomerase-Domäne allein (Isupov et al. 1996; Mouilleron et al. 2006; Teplyakov et al. 1998; Teplyakov et al. 1999; Teplyakov et al. 2001). Aus den Kristallstrukturen der Isomerase-Domäne wurde ein Reaktionsmechanismus für die Isomerisierung von F6P zu G6P postuliert (Abbildung 29). Die Phosphatgruppe des Substrats bindet an die Aminosäurereste Ser347, Ser349, Thr352, Ser303 und Gln348, der Zuckeranteil ist über H-Brückenbindungen an Val399, Glu488, Ala602, Thr302 und His504* gebunden.

<i>M. thermo.</i>	-----MKYGMFNELMEQPESLRRTLKSEGDR-----MARISNEILECRRIYLVGCCSS	48
<i>Ms. stadtmansae</i>	MESCFQTLNWEISSMKYAMYQEKDQPISLRRTIESEKRH-----MEYISKEFLNLDKIFLIGCGSS	62
<i>E. coli</i> GlmS	-----DAGDKGIYRHYMQKEIYEQPNAIKNTLTGRISHGQVDLSELGPNADSELLSKVEHIQILACGTS	303
<i>S. enterica</i>	-----MSVAHENARRIISDILGK-----QNIERVWVFGCGGS	32
<i>T. acidophilum</i>	MADMTDQLPEVRKSHPVYMYEMMKDIPNGIDRTLSSMQN-----ADLSFIGDDLIFLGNLTA	57
		*
<i>M. thermo.</i>	LSTCYSARDAIAMNY-EVNMDVMTGYEFYYHR-QIDYSDSAVIFTSSQSGETADTLAALRRANELG-LRTV	115
<i>Ms. stadtmansae</i>	ISTCYTIRDALKSLSDINIDVQTGFDFTDHQYLKVDNSMGVILTSQSGETSDTLSALRKAKEYN-LKTV	130
<i>E. coli</i> GlmS	YNSGMVSRWFESLA-GIPCDVEIASEFRYRKSARR-NSLMIITLSSQSGETADTLAAGLRSLKELGVLGSL	371
<i>S. enterica</i>	LTGFWPGKYFLDCEASKLAVGYITSNFVHATPKALGKNSVVILASQQGNTAETVAARVAREKG-AATI	101
<i>T. acidophilum</i>	YHSAYVGSQILDRVS--KRHAVVQAYEYLYNYM---QSNAATLAISSHTGKTKSTVDAVIKARKTA--KTA	119
		* * *
<i>M. thermo.</i>	TITNEPGSTMASESMETIVTRCGREEAILGKTYMTQLLALYRILFGMYSDE----KSDEIMGELEKLP	180
<i>Ms. stadtmansae</i>	AITNVSDSSMAKEADDAIITLCGEEVAILGKTYVTQLFALYVIFFNMIKTK----ESEEILTQLYTVP	195
<i>E. coli</i> GlmS	AICNVPGSSLVRESDLALMTNAGTEIGVASTKAFTTQLTVLLMLVAKLSRLKGLDASIEHDIVHGLQAL	441
<i>S. enterica</i>	GLVYQPDTPLECYSDYIIEYQWARYPETVDPAQQKAAYSLWLALAILAQTEG---YAQYDELVSFAFRFS	168
<i>T. acidophilum</i>	GITHYADSPLYNSVDYPIAIADEDKSLCNTKAFFNNAFASLYIADY-----YGNLSYDMKNLR	177
		*
<i>M. thermo.</i>	GEVEDLLRRTVEVCRDLAEYEGEDIFYCMCSGPNYGLAYKLAMTLMMEGALKHSCPLYSGEFRHGLIER	250
<i>Ms. stadtmansae</i>	DLIEEAIEETEEKSKEIARINKVDVDFYCMCSGLNFGLAYKLAMTFMMEGALKHACPVYSGEFRHGLIER	265
<i>E. coli</i> GlmS	SRIEQMLSQDK-RIEALAEEDFSDKHHALFLCRGDQYPALLEGAL-KLKEISYIHAEEYAAGEELKHCPLAL	509
<i>S. enterica</i>	DVHGAQRQVQEDAQRFAAEWKDEKVVYMMCSGSPSFGAAHQESICILLEMQWINSASIHSGEYFHFHGFPEI	238
<i>T. acidophilum</i>	SEIAKHVKGDDPEMRSAAEELDQIDDIFVLCSCFNFPVAREAAQ-KIKEATHIHAEGIEFEFEFNHGCETAV	246
		* * *
<i>M. thermo.</i>	VEEGVPVIFLESGLPGDELTERALRFCEKLGAEENLVFR-----MSDYS-DLNLGMSPPVLA	306
<i>Ms. stadtmansae</i>	VEKGVTVVFLKAGNNFDDVTNRAIKFCEDLEVNSILFN-----LNDYA-DIHPLLPFALIV	321
<i>E. coli</i> GlmS	IDADMPVIVVAPNNELEKLSNIEEVRARQGQLYVFADQDAGFVSSDNMHIEMP-HVEEVIAPIFYTV	578
<i>S. enterica</i>	TEPGTPFILLQSSGRTRPLDDRAIRFIERYQKQLQIDADKLG-----IQDLSTDVGEYFCGLLHNC	300
<i>T. acidophilum</i>	MDENTLVILLIE-GEKDRARGDQIARASRYVSGSKTLAINGVG-----DISVYNDPQDDLAAFLNLT	306
<i>M. thermo.</i>	PLEWFVYYLAHFNGEDPGSTRHIGKVRY-----	334
<i>Ms. stadtmansae</i>	PLEWFIYHLSIYNNEDPGSTRHIGKIRY-----	349
<i>E. coli</i> GlmS	PLQLLAYHVALIKGTDVDQPRNLAKSVTVE-----	608
<i>S. enterica</i>	VLDVYNLALATARNHPLTTRRYMVKVEY-----	328
<i>T. acidophilum</i>	DLYYLAYYLAVRRNINPDMLRFEDRRYRDYDSVVFPPGEH	346
		*

Abbildung 28 Multiples Sequenzalignment der in dieser Arbeit untersuchten HPIs mit der Isomerase-Domäne der GlmS aus *E. coli*. Das Alignment wurde mit ClustalX mit Standardeinstellungen (Thompson et al. 1997) erstellt. Konservierte Aminosäuren wurden schwarz, funktionell konservierte Aminosäuren grau hinterlegt. Aminosäuren, die bei der GlmS aus *E. coli* an der Substratbindung und Katalyse beteiligt sind, sind durch * in der untersten Zeile markiert. Die Zahlen am Ende der Sequenzen geben die Position der jeweiligen Aminosäure im Protein an. NCBI-Accession-Nummern der Sequenzen: *M. thermoautotrophicus* AAB85358; *Ms. stadtmansae* ABC57438; *E. coli* CAA23894; *S. enterica* serovar *typhimurium* AAL19523; *T. acidophilum* CAC11621.

Das His504* ist dabei Bestandteil der zweiten Untereinheit des Enzyms, was erklärt, dass prokaryotische GlmS und auch die in dieser Arbeit untersuchten HPIs als Dimere aktiv sind. Isomerisierung des gebundenen Fructose-6-Phosphats verläuft zunächst über Öffnung des Ringes durch His504* gefolgt von einem Protonentransfer von C1 zu C2 des Substrates, der wahrscheinlich durch Glu488 vermittelt wird (Abbildung 29). Dieser Schritt verläuft über ein cis-endiol-Intermediat, das vermutlich durch Lys603 stabilisiert wird (Teplyakov et al. 1998; Teplyakov et al. 1999). Diese für die Substratbindung und Katalyse bedeutenden Reste sind auch in den in dieser Arbeit untersuchten HPIs funktionell konserviert (Abbildung 28). Insbesondere das für die De- und Reprotonierung wichtige Glutamat ist in allen Sequenzen vorhanden, genauso wie das Histidin, für das die Funktion der Ringöffnung postuliert wurde. Ähnliche Aminosäuren mit vergleichbarer Funktion sind auch bei den klassischen PGIs konserviert. Dem His504* der HPI entspricht das His388 der PGI des Menschen, für das die Funktion der Ringöffnung postuliert wurde. Protonentransfer, der bei der HPI durch Glu488 vermittelt wird, findet bei der PGI mittels Glu357 statt. Auch die Bindestelle des Zuckerphosphatrests ist bei beiden Proteinen ähnlich: Ser347-Ser349-Thr352-Ser303 der HPI entspricht Ser209-Thr211-Thr-214-Ser159 bei der PGI (Cordeiro et al. 2003; Milewski et al. 2006b). Trotz der Tatsache, dass es nur geringe Sequenzähnlichkeiten zwischen PGIs und HPIs (bzw. GlmS) gibt, sind der Mechanismus der Isomerisierung und die beteiligten Aminosäuren bei beiden Proteinen sehr ähnlich.

Mutagenese. Aus den Kristallstrukturen der Isomerase-Domäne der GlmS aus *E. coli* wurde eine Funktion für verschiedene konservierte Aminosäuren postuliert (s.o.). Im Rahmen dieser Arbeit wurden bei der HPI aus *M. thermoautotrophicus* zwei dieser Aminosäuren, ein konserviertes Glutamat (Glu229) und ein funktionell konserviertes Isoleucin (I143), das einem konservierten Valin der GlmS aus *E. coli* entspricht, mittels ortsspezifischer Mutagenese gegen Alanin bzw. Lysin ausgetauscht. Die beiden mutierten Proteine zeigten den gleichen molekularen Aufbau (Homodimer mit einem Molekulargewicht von 75 kDa) wie das Wildtyp-Protein. Die Austausche führten jedoch zu einem drastischen Abfall der katalytischen Effizienz (V_{\max}/K_m) der Proteine. Die Substitution des Glutamats gegen Alanin reduzierte die katalytische Effizienz im Vergleich zum Wildtyp auf 2.5%, Austausch des Isoleucins gegen Lysin auf 6%. Das dem mutierten Glutamat entsprechende Glu488 der Isomerase-Domäne der GlmS aus *E. coli* sorgt für De- und Reprotonierung des Substrats und somit für die eigentliche Isomerisierung (Abbildung 29). Diese Funktion wird auch für einen Glutamatrest in den klassischen PGIs postuliert (Graham Solomons et al. 2004). Für das dem mutierten Isoleucin entsprechende Val399 in der Isomerase-Domäne der GlmS aus *E. coli* wurde eine Funktion zur Stabilisierung des cis-enolamin-Intermediats postuliert (Milewski et al. 2006b), auch scheint diese Aminosäure für die Bindung des Substrats von Bedeutung zu sein (Teplyakov et al. 1999).

Die Mutagenese-Versuche zeigen, dass das ausgetauschte Glutamin und das Isoleucin von entscheidender Bedeutung für die Aktivität der HPI aus *M. thermoautotrophicus* sind und sie vermutlich eine ähnliche Funktion wie in der GlmS und der klassischen PGI haben.

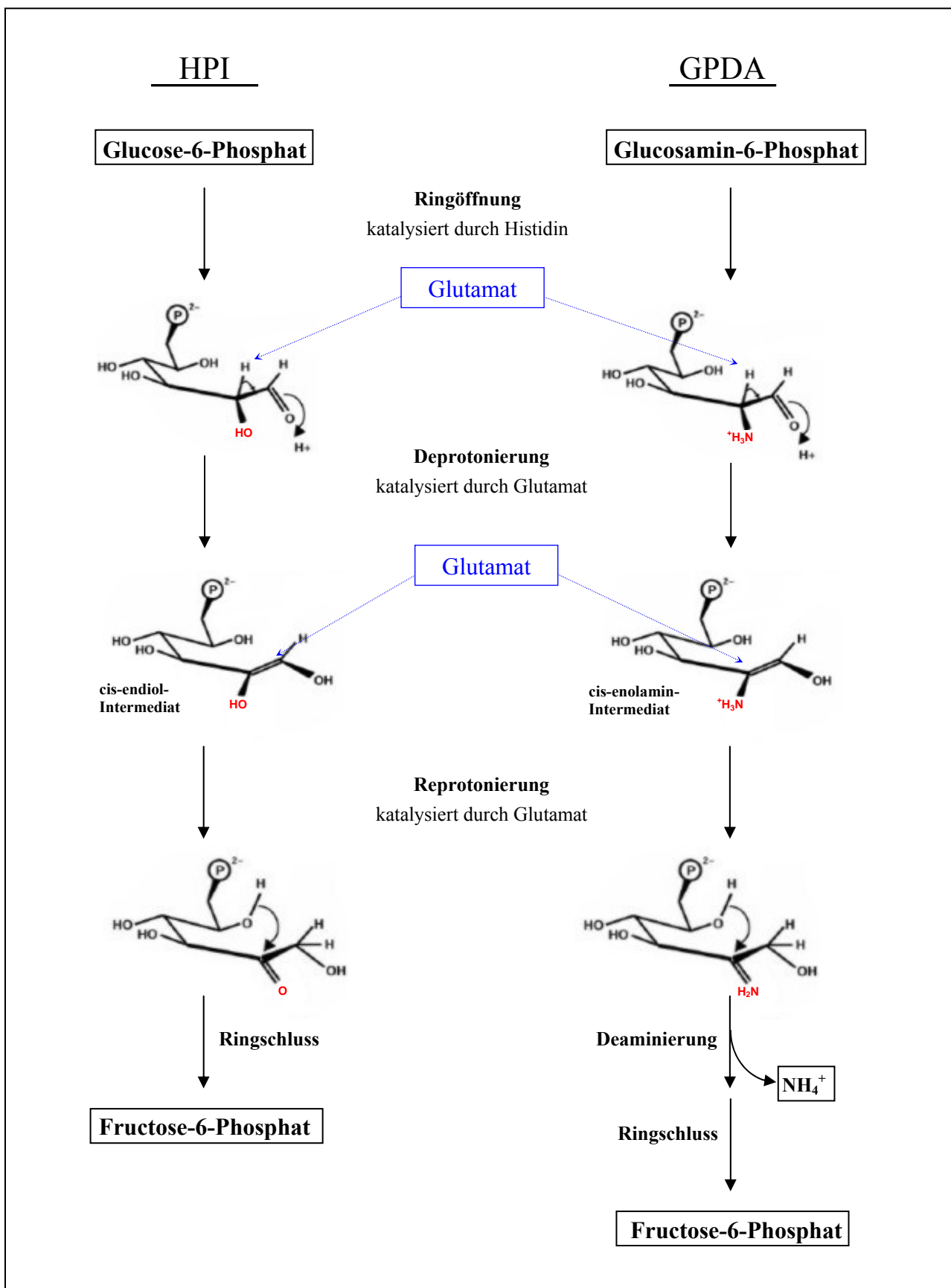


Abbildung 29 Reaktionsmechanismus für HPI und GPDA. Die Darstellung zeigt den postulierten Reaktionsmechanismus der beiden Enzyme sowie die Rolle des konservierten Glutamats bei der De- und Reprotonierung des jeweiligen Substrates (modifiziert nach (Davies und Muirhead 2003) und (Mouilleron et al. 2006)). Dieses Glutamat wurde im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Mutagenese-Experimente in der HPI aus *M. thermoautotrophicus* und in der GPDA aus *P. furiosus* ausgetauscht.

6.3.2 Archaeelle Glucosamin-6-Phosphat Deaminasen (GPDAs)

Die zur Isomerase-Domäne der GlmS homologen ORFs aus *Pyrococcus furiosus* und *Thermotoga maritima* zeigten keine bzw. nur geringe PGI-Aktivität. Stattdessen konnte für diese Proteine Aktivität einer Glucosamin-6-Phosphat Deaminase nachgewiesen werden. Die GPDAs wurden in dieser Arbeit biochemisch charakterisiert. Bei diesen Proteinen handelt es sich um neuartige Deaminasen, die keine Ähnlichkeit zu den bisher bekannten bakteriellen und eukaryotischen GPDAs aufweisen. In beiden Organismen stellen diese Proteine vermutlich die einzigen Glucosamin-6-Phosphat Deaminasen dar, da keine Homologe zu bakteriellen GPDAs in ihren Genomen zu finden sind.

Biochemische Charakterisierung. Die Proteine wurden rekombinant in *E. coli* hergestellt und über einen His-tag gereinigt. Die apparenten Molekulargewichte für die Untereinheiten der GPDAs wurden wie die der HPis mit ungefähr 39 kDa bestimmt, die der nativen Proteine mit 70 (GPDA-Pf) bzw. 90 kDa (GPDA-Tm), was für homodimere Strukturen der Proteine spricht. Damit entsprechen sie in ihrem molekularen Aufbau der bisher einzigen archaeellen GPDA aus *Thermococcus kodakaraensis* (Tanaka et al. 2005). Dagegen sind die bislang charakterisierten bakteriellen und eukaryotischen Glucosamin-6-Phosphat Deaminasen Mono- oder Hexamere mit deutlich kleineren Untereinheiten von 27 - 33 kDa (Tabelle 14) (Arreola et al. 2003; Calcagno et al. 1984; Carabaza et al. 1990; Lara-Lemus und Calcagno 1998; Natarajan und Datta 1993; Vincent et al. 2005).

Tabelle 14 Vergleich der molekularen Eigenschaften der GPDAs von *P. furiosus*, *Tc. kodakaraensis* und *T. maritima* mit den bakteriellen GPDAs aus *E. coli* und *Bacillus subtilis*. Referenzen: ^a diese Arbeit, ^b (Tanaka et al. 2005), ^c (Calcagno et al. 1984), ^d (Montero-Morán et al. 2001), ^e (Vincent et al. 2005). NG6P: Glucosamin-6-Phosphat, F6P: Fructose-6-Phosphat, n.a.: nicht angegeben.

	<i>P. furiosus</i> ^a	<i>T. maritima</i> ^a	<i>Tc. kodakaraensis</i> ^b	<i>E. coli</i> ^{c,d}	<i>B. subtilis</i> ^e
apparente molekulare Masse des Enzyms (kDa)	70	90	71.8	178	n.a.
apparente molekulare Masse der Untereinheit (kDa)	39	39	37.3	30	27
oligomere Struktur	α_2	α_2	α_2	α_6	α

Die bakteriellen Glucosamin-6-Phosphat Deaminasen unterscheiden sich auch von der Sequenz her deutlich von den hier charakterisierten GPDAs und werden in eine andere Proteinfamilie eingeordnet. Alle bisher charakterisierten bakteriellen und eukaryotischen GPDAs gehören zur NagB-Superfamilie, in die neben den Glucosamin-6-Phosphat Deaminasen auch noch 6-Phosphogluconolactonasen eingeordnet werden (Pfam01182; <http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Pfam/getacc?PF01182>) (Vincent et al. 2005). Dagegen gehören die archaeellen GPDAs zur Familie der SIS-domain (sugar isomerase domain) Proteine, sie enthalten jeweils zwei SIS-Domänen (Pfam01380; <http://www.sanger.ac.uk/cgi->

bin/Pfam/getacc?PF01380). SIS-Domänen sind kennzeichnend für Proteine, die an der Isomerisierung oder Bindung von Zuckerphosphaten beteiligt sind (Bateman 1999).

Die bisher untersuchten neuartigen GPDA's stammen aus hyperthermophilen Organismen und haben entsprechende Temperaturoptima. Die Deaminase aus *P. furiosus* zeigte ein Temperaturoptimum von über 91°C, das Protein aus *T. maritima* hatte bei 83°C die höchste Aktivität. Auch die Thermostabilität des Enzyms aus *P. furiosus* war mit einer Halbwertszeit von über 120 min bei 95°C extrem hoch. Die GPDA aus *Tc. kodakaraensis* zeigte vergleichbare thermophile Eigenschaften, jedoch geringere Thermostabilität (bei 90°C wurde eine Halbwertszeit von 10 min bestimmt). Damit ist die Glucosamin-6-Phosphat Deaminase aus *P. furiosus* die thermostabilste bekannte GPDA.

Die untersuchten GPDA's katalysieren sowohl die Deaminierung von Glucosamin-6-Phosphat zu Fructose-6-Phosphat und Ammonium (Abbildung 29) als auch die Umkehrung dieser Reaktion. Jedoch war die katalytische Effizienz der Deaminierungsreaktion deutlich besser als die der Aminierung von F6P, was dafür spricht, dass dies die physiologisch relevante Funktion dieses Enzyms ist (s. Tabelle 12). Diese eindeutige Präferenz der Glucosamin-6-Phosphat Deaminase für die Deaminierungsreaktion, die auch bei den klassischen bakteriellen GPDA's gegeben ist (Calcagno et al. 1984; Montero-Morán et al. 2001; Vincent et al. 2005), spricht für eine Funktion dieses Enzyms im Katabolismus von Aminosuktern. Die Synthese von Glucosamin-6-Phosphat *in vivo* dagegen wird in allen bisher untersuchten Organismen durch die Glutamin:Fructose-6-Phosphat Transaminase durchgeführt (s. 6.2) zu der es auch in *P. furiosus*, *T. maritima* und *Tc. kodakaraensis* Homologe gibt (Fukui et al. 2005; Maeder et al. 1999; Nelson et al. 1999). Im Falle der bakteriellen GlnS und GPDA's sind diese Proteine auf Transkriptionsebene und teilweise auch allosterisch reguliert. Eine koordinierte Regulation der beiden Enzyme ist nötig, da sie entgegengesetzte Reaktionen katalysieren (Oliva et al. 1995; Plumbridge et al. 1993).

Für die GPDA aus *P. furiosus* wurde getestet, ob Erythrose-4-Phosphat und 6-Phosphogluconat, die die HPI aus *M. thermoautotrophicus* bereits in µmolaren Konzentrationen hemmen, inhibierend wirken. Dabei stellte sich heraus, dass diese Substanzen offenbar keinen Effekt auf die Glucosamin-6-Phosphat Deaminasen haben. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Inhibitoren keine Aminogruppe besitzen, und so wahrscheinlich nicht mit den Substraten um Bindungsplätze am katalytischen Zentrum konkurrieren. Weiterhin wurde gezeigt, dass die archaeellen GPDA's ebenso wie die bakteriellen ausschließlich Ammonium als Aminogruppen-Donor verwenden, da mit Glutamin und Fructose-6-Phosphat als Substrat keine Aktivität nachzuweisen ist. Da den Deaminasen eine Glutaminase-Domäne fehlt, wie sie bei den GlnS vorhanden ist, sind sie nicht in der Lage, Glutamin zu hydrolysieren.

Aminosäuresequenzvergleiche. Ein Sequenzvergleich zeigte, dass die untersuchten GPDA's größere Ähnlichkeiten zur Isomerase-Domäne der GlnS aus *E. coli* zeigten als die HPI's (Abbildung 28 und Abbildung 30).

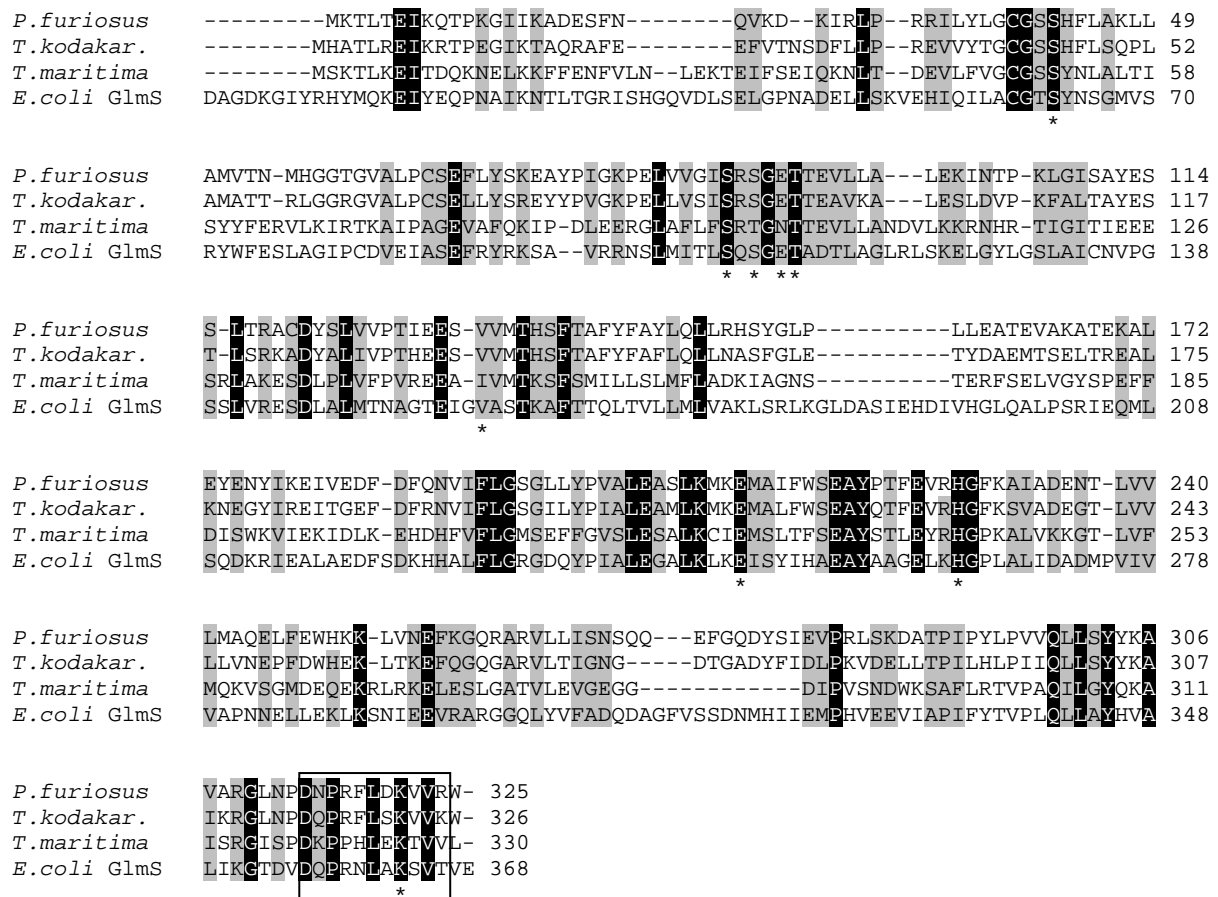


Abbildung 30 Multiples Sequenzalignment der archaeellen GPDA mit der Isomerase-Domäne der GlmS aus *E. coli*. Das Alignment wurde mit ClustalX mit Standardeinstellungen (Thompson et al. 1997) erstellt. Konservierte Aminosäuren wurden schwarz, funktionell konservierte Aminosäuren grau hinterlegt. Aminosäuren, die bei der GlmS aus *E. coli* an der Substratbindung und Katalyse beteiligt sind, sind durch * in der untersten Zeile markiert, das konservierte GlmS-Signaturmuster am C-Terminus ist durch einen Kasten gekennzeichnet. Die Zahlen am Ende der Sequenzen geben die Position der jeweiligen Aminosäure im Protein an. NCBI-Accession-Nummern der Sequenzen: *P. furiosus* AAL80486; *Tc. kodakaraensis* BAD85944; *T. maritima* AAD35895; *E. coli* CAA23894.

Für die GPDA wurden Ähnlichkeiten von 40 - 77% und zwischen 21 und 61% identische Reste ermittelt. Alle für die Substratbindung und Katalyse bedeutenden Reste der Isomerase-Domäne der GlmS aus *E. coli* sind auch bei den archaeellen GPDA funktionell konserviert (Abbildung 30). Insbesondere ist aber bei den GPDA auch der C-Terminus der Proteine stark konserviert. Dieser enthält das Signaturmuster der GlmS DXPXXLAK[SC]VT in leicht veränderter Form DXPXXLXK[STV]VX. Dieser C-Terminus ist bei den Glutamin:Fructose-6-Phosphat Transaminasen ein Bestandteil des intramolekularen Tunnels, durch den das aus Glutamin freigesetzte Ammonium in die Isomerase-Domäne transferiert wird. Da dieser C-Terminus in den archaeellen Glucosamin-6-Phosphat Deaminasen konserviert ist, nicht aber in den homologen HPIs (Abbildung 31), die keine Aminosäuren als Substrate haben, ist eine Beteiligung des C-Terminus an der Katalyse wahrscheinlich. Auch für das Protein aus *Tc. kodakaraensis* wurde eine Bedeutung des C-Terminus für die Reaktion der GPDA postuliert (Tanaka et al. 2005).

Mutagenese. In den GPDAs finden sich die gleichen konservierten Reste wie in den HPIs. Um herauszufinden, ob diese Reste eine katalytische Bedeutung haben, wurden auch in der GPDA aus *P. furiosus* das konservierte Glutamat211 und das konservierte Valin134 gegen Alanin bzw. Lysin ausgetauscht. Auch in diesem Fall hatten die Mutationen keinen Einfluss auf den molekularen Aufbau der mutierten Proteine, die als Homodimere (70 kDa) mit Untereinheiten von 39 kDa charakterisiert wurden. Dagegen führten die Mutationen im Fall des Austauschs von Glutamat gegen Alanin zu einem vollständigen und im Fall des Austauschs von Valin gegen Lysin zu einem 96%-igen Aktivitätsverlust. Dies spricht für eine Beteiligung der beiden Aminosäuren an der Aktivität des Enzyms. Es wird angenommen, dass das Glutamat ähnlich wie bei den HPIs essentiell für De- und Reprotonierung des Substrates ist (Abbildung 29). Interessanterweise ist bei den bakteriellen GPDAs, die nur sehr geringe Sequenzhomologien zu den hier beschriebenen Deaminasen aufweisen, ein Aspartat konserviert, für das ebenfalls eine Funktion bei der De- und Reprotonierung des Substrates postuliert wurde (Oliva et al. 1995). Funktionell entspricht dies dem in den archaellen GPDAs konservierten Glutamat.

6.3.3 Funktion der Glucose-6-Phosphat Isomerasen und Glucosamin-6-Phosphat Deaminasen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für Proteine, die homolog zur Isomerase-Domäne der GlmS sind, zwei verschiedene Funktionen bestimmt. Zwei der untersuchten Proteine zeigten Aktivität einer Glucosamin-6-Phosphat Deaminase, die anderen hatten Aktivität einer Glucose-6-Phosphat Isomerase. Für die GPDA aus *T. maritima* wurde neben der Hauptaktivität als GPDA auch eine sehr geringe PGI-Restaktivität nachgewiesen, das Protein aus *P. furiosus* hatte keine Nebenaktivität als PGI. Der Unterschied in der Funktion der Proteine ist wahrscheinlich auf das Vorliegen eines konservierten C-Terminus bei den GPDAs zurückzuführen, der in den HPIs nicht konserviert ist (Abbildung 31) und vermutlich für die Umsetzung von Aminoazuckern wichtig ist.

<i>Tc. kodakaraensis</i>	QLLSYYKAIK	RGLNPDQPRF	LSKVVKW---	-----	326
<i>P. furiosus</i>	QLLSYYKAVA	RGLNPDNPRF	LDKVVWRW---	-----	325
<i>T. maritima</i>	QLLGYQKAIS	RGLSPDKPPH	LEKIVVVL---	-----	330
<i>Tp. acidophilum</i>	YYLAYYLAVR	RNLNPDMLRF	EDRRYRDYDS	VVFPPGEH	346
<i>M. thermoautotrophicus</i>	EWFYVYLAHF	NGEDPGSTRH	ICKVRY----	-----	334
<i>Ms. stadtmanae</i>	EWFIYHLSIY	NNEDPGSTRH	IGKIRY----	-----	349
<i>S. enterica</i>	DVYNLALATA	RNHPLTTRRY	MWKVEY----	-----	328

Abbildung 31 Partielles Sequenzalignment der C-Termini der archaellen GPDAs mit den C-Termini der HPIs. Das Alignment wurde mit ClustalX mit Standardeinstellungen (Thompson et al. 1997) erstellt. Konservierte Aminosäuren wurden schwarz, funktionell konservierte Aminosäuren grau hinterlegt. Die Zahlen am Ende der Sequenzen geben die Position der jeweiligen Aminosäure im Protein an. NCBI-Accession-Nummern der Sequenzen: *Tc. kodakaraensis* BAD85944; *P. furiosus* AAL80486; *T. maritima* AAD35895; *Tp. acidophilum* CAC11621; *M. thermoautotrophicus* AAB85358; *Ms. stadtmanae* ABC57438; *S. enterica* serovar *typhimurium* AAL19523.

Ein weiterer Hinweis auf die Funktion der entsprechenden Proteine ist auch in der Organisation der codierenden ORFs im Genom der Organismen zu finden (Abbildung 32). Die ORFs aus *P. furiosus* und *T. maritima*, für die in dieser Arbeit eine codierende Funktion für GPDA nachgewiesen wurde, liegen im Genom gruppiert mit anderen ORFs vor, die für Proteine des Aminosäurestoffwechsels codieren. Das sind z.B. ABC-Transporterproteine, exo- β -D-Glucosaminidase (auch als Chitinase bezeichnet) und N-Acetylglucosamin-6-Phosphat Deacetylase (Maeder et al. 1999; Nelson et al. 1999). Daher liegt nahe, dass die GPDAs aus *P. furiosus* und *T. maritima* am Abbau von Aminosäuren beteiligt sind. Eine solche Gruppierung wurde auch für die archaelle Glucosamin-6-Phosphat Deaminase aus *Tc. kodakaraensis* beschrieben und nachgewiesen, dass diese Gene bei Wachstum auf Aminosäuren gemeinsam transkribiert werden (Tanaka et al. 2005). Dagegen unterscheiden sich die HPIs aus *M. thermoautotrophicus* und *Ms. stadtmanae* von den GPDAs dadurch, dass in der näheren Umgebung der codierenden Gene im Genom keine ORFs zu finden sind, die auf eine Funktion im Aminosäurestoffwechsel hindeuten (Abbildung 32). Dies ist in Übereinstimmung mit dem lithoautotrophen Stoffwechsel der beiden methanogenen Archaea. Beide enthalten jedoch Gene für den Aufbau von Aminosäuren, die zur Zellwandsynthese nötig sind, wie z.B. *glmS* (Fricke et al. 2006; Smith et al. 1997). Auch die HPI-codierenden ORFs in *S. enterica* serovar *typhimurium* und *Tp. acidophilum* sind nicht mit anderen ORFs gruppiert, die für Enzyme des Aminosäurestoffwechsels codieren (McClelland et al. 2001; Ruepp et al. 2000), was in Übereinstimmung mit ihrer in dieser Arbeit überprüften Funktion als Glucose-6-Phosphat Isomerase ist.

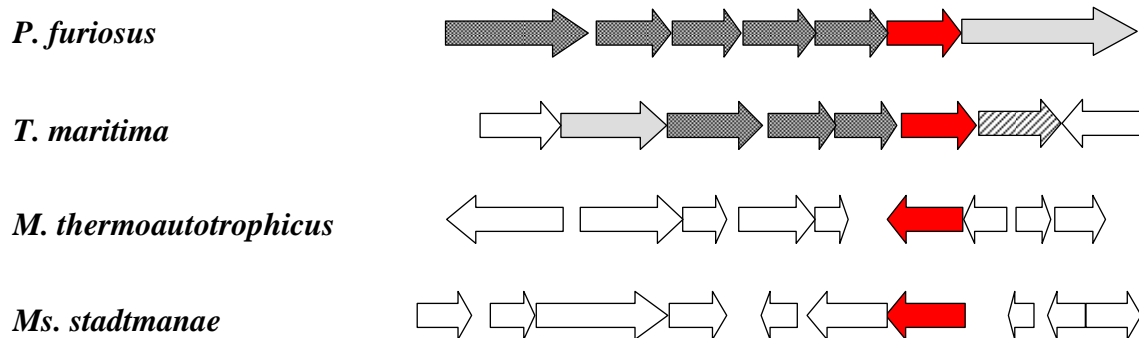


Abbildung 32 Organisation der für HPIs und GPDA codierenden ORFs in den Genomen der Organismen. Die offenen Leserahmen sind durch Pfeile in unterschiedlichen Farbtönen dargestellt. Rot: die in dieser Arbeit untersuchten ORFs; dunkelgrau: Bestandteile von ABC-Transportsystemen; hellgrau: exo- β -D-Glucosaminidase; schraffiert: Glucosamin-6-Phosphat Deacetylase. Es wurden folgende Regionen dargestellt: *P. furiosus*: 370.1 - 379.2 kbp; *T. maritima*: 831.3 - 840.3 kbp; *M. thermoautotrophicus*: 777.2 - 785.7 kbp; *Ms. stadtmanae*: 1193.1 - 1202.4 kbp.

Zu HPI bzw. GPDA homologe ORFs wurden außer in Archaea auch noch in verschiedenen Bacteria gefunden, so z.B. in den Proteobacteria *Shewanella oneidensis*, *Chromobacterium violaceum*, *Brucella suis*, *Brucella melitensis* und *Burkholderia mallei* (Brazilian National Genome Project Consortium 2003; DelVecchio et al. 2002; Heidelberg et al. 2002; Nierman et al. 2004; Paulsen et al. 2002). Auch in diesen Organismen deutete der Genomkontext auf

eine Rolle der Proteine im Aminosuckerstoffwechsel hin. *Br. suis*, *Br. melitensis* und *Bh. mallei* sind pathogene Organismen mit breitem Substratspektrum, für *C. violaceum* wurde die Verwendung von Chitin beschrieben (Creczynski-Pasa und Antonio 2004; DelVecchio et al. 2002; Nierman et al. 2004; Paulsen et al. 2002). In keinem der Genome war dagegen ein Homolog zur klassischen bakteriellen Glucosamin-6-Phosphat Deaminase zu finden. Diese Hinweise sprechen dafür, dass die vorhandenen ORFs mit Homologien zur Isomerase-Domäne der GlmS für funktionelle GPDAs codieren. In Übereinstimmung mit dieser Theorie weisen die C-Termini der Proteine die gleichen konservierten Aminosäuren auf, wie die charakterisierten Proteine aus *Pyrococcus*, *Thermotoga* und *Thermococcus* (Abbildung 33).

<i>P. furiosus</i>	VVQLLSYYKAVA-----RGLNPDNPRFLDKVVRW-	325
<i>Tc. kodakaraensis</i>	IIQLLSYYKAIK-----RGLNPDQPRFLSKVVKW-	326
<i>Br. suis</i>	LVSLINYYRVIEAVTRRKGFDPDKPRNLNKVTVTV	343
<i>Br. melitensis</i>	LVSLINYYRVIEAVTRRKGFDPDKPRNLNKVTVTV	345
<i>Sh. oneidensis</i>	LALLQRFYIDVAVAIARGIDPDQAPGLKKVTQTL	332
<i>Bh. mallei</i>	IAAILTFYVMAAGLAPARGRDPDAPRHLHKITETH	335
<i>C. violaceum</i>	LLAIQSFYLM AARLSEARGLNPDLPRLSKVTRTR	336
<i>E. coli</i> GlmS	PLQLLAYHVALI-----KGTVDQPRNLAKSVTVE	608
<i>T. maritima</i>	PAQILGYQKAIS-----RCISPDKPPHLEKTVVL-	330

Abbildung 33 Partielles Sequenzalignment der C-Termini der archaeellen GPDAs mit der Isomerase-Domäne der GlmS aus *E. coli* und homologen Proteinen aus verschiedenen Bacteria. Das Alignment wurde mit ClustalX mit Standardeinstellungen (Thompson et al. 1997) erstellt. Konservierte Aminosäuren wurden schwarz, funktionell konservierte Aminosäuren grau hinterlegt. Die Zahlen am Ende der Sequenzen geben die Position der jeweiligen Aminosäure im Protein an. NCBI-Accession-Nummern der Sequenzen: *P. furiosus* AAL80486; *Tc. kodakaraensis* BAD85944; *Br. suis* AAN34084; *Br. melitensis* AAL53626; *Sh. oneidensis* AAN56497; *Bh. mallei* AAU48511; *C. violaceum* AAQ58233; *E. coli* CAA23894; *T. maritima* AAD35895.

Zur Überprüfung dieser Hypothese müssten diese Proteine exprimiert und funktionell charakterisiert werden.

Evolution der HPIs und GPDAs. Die in dieser Arbeit untersuchten PGIs und GPDAs sind wahrscheinlich aus einem gemeinsamen Vorläufer entstanden, der in zwei verschiedene Richtungen evolviert ist. Möglicherweise kam es im Genom einer frühen prokaryotischen Vorläuferzelle zu einer Duplikation der Isomerase-Domäne der GlmS. Diese enthält die für die Aldose/Ketose Isomerase-Funktion wichtigen konservierten Reste Glutamat, Histidin und Lysin, sowie den konservierten C-Terminus zur Aminogruppen-Bindung (Abbildung 34). In den Organismen, die über keine klassische Deaminase verfügen, wie z.B. *Pyrococcus* und *Thermococcus*, könnte dieses Protein die Funktion der GPDA übernommen haben, und so deren Wachstum auf Aminosuckern ermöglichen. Für das Protein aus *Thermotoga* ist lateraler Gentransfer von einem Mitglied der *Pyrococcus/Thermococcus*-Gruppe anzunehmen, da nicht nur der für die GPDA codierende ORF, sondern auch die entsprechenden offenen Leserahmen, die ihn umgeben, große Ähnlichkeiten zu den ORFs aus dieser Gruppe aufweisen. Lateraler Gentransfer von *Pyrococcus* zu *Thermotoga* wurde bereits mehrfach beschrieben (Nesbo et al. 2001; Worning et al. 2000). In den methanogenen Organismen *Methanothermobacter* und *Methanosphaera* (bzw. einem gemeinsamen Vorläufer) könnte das

Protein die Funktion der fehlenden Glucose-6-Phosphat Isomerase übernommen haben. Durch mangelnden Selektionsdruck (kein Abbau von Aminosuckern) ist es möglich, dass der C-Terminus nach und nach mutierte und das Protein die Fähigkeit zur Aminierung/Deaminierung verlor (Abbildung 34).

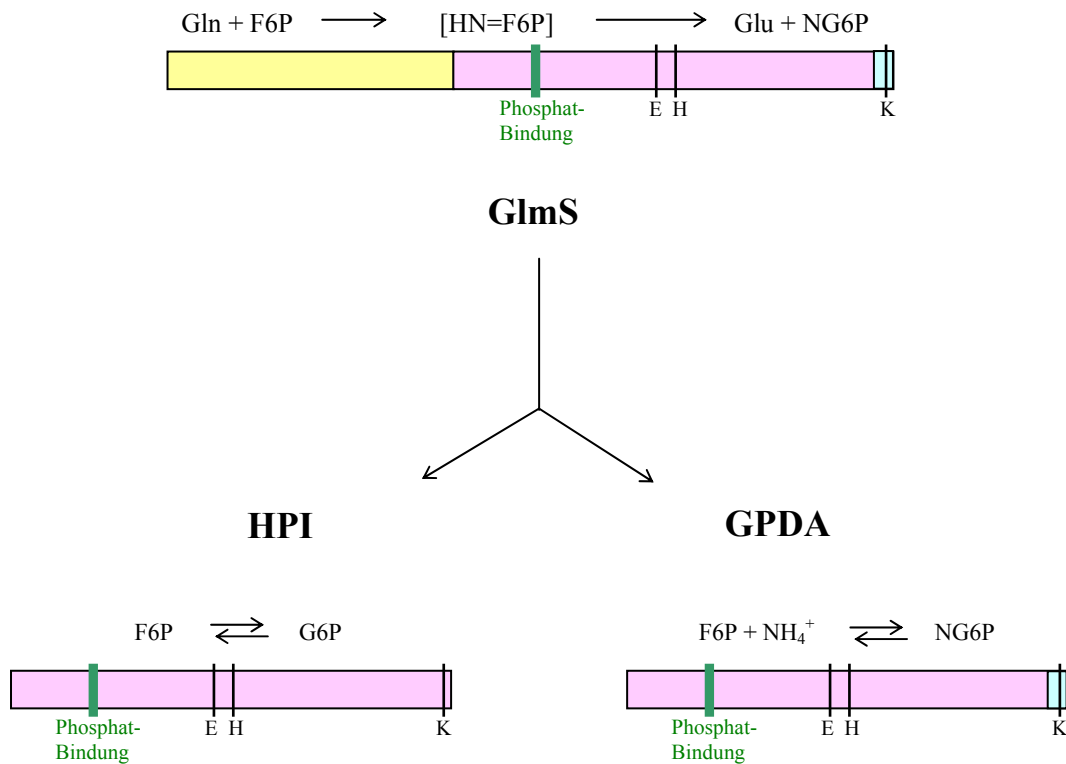


Abbildung 34 Schematische Darstellung von GlnS und den aus ihrer Isomerase-Domäne abgeleiteten HPIs und archaeellen GPDA. Die Glutaminase-Domäne der GlnS ist gelb dargestellt. In Violett dargestellt sind die Isomerase-Domäne der GlnS und die aus ihr evolvierten Proteine. Hellblau markiert ist der in GlnS und GPDA konservierte C-Terminus, katalytisch wichtige Reste und die Phosphatbindestelle sind durch senkrechte Striche markiert. GlnS: Glutamin:Fructose-6-Phosphat Transaminase; HPI: Glucose-6-Phosphat Isomerase; GPDA: Glucosamin-6-Phosphat Deaminase; Gln: Glutamin; F6P: Fructose-6-Phosphat; HN=F6P: Fructosimin-6-Phosphat; Glu: Glutamat; NG6P: Glucosamin-6-Phosphat; G6P: Glucose-6-Phosphat.

In dieser Arbeit wurde eine neuartige Proteinfamilie untersucht, die sich höchstwahrscheinlich aus der Isomerase-Domäne der Glutamin:Fructose-6-Phosphat Aminotransferase entwickelt hat und deren Mitglieder zwei unterschiedliche Funktionen aufweisen: Glucosamin-6-Phosphat Deaminase oder Glucose-6-Phosphat Isomerase. Beide Enzyme weisen eine sehr ähnliche Struktur und gleiche konservierte Reste auf. Wie auch die PGIs und PGI/PMIs der PGI-Superfamilie enthalten die untersuchten HPIs und GPDAs eine SIS-Domäne, eine Phosphatbindestelle und drei konservierte Aminosäuren (Glutamat, Histidin und Lysin), für die Funktionen beim Protonentransfer, Ringöffnung und Stabilisierung eines Intermediats postuliert wurden. Diese Eigenschaften sind essentiell für die Aldose/Ketose Isomerase-Funktion sowohl der HPIs als auch der GPDAs. Während die HPIs die Isomerisierung von Fructose-6-Phosphat und Glucose-6-Phosphat katalysieren, katalysieren die GPDAs die

Isomerisierung und Deaminierung von Glucosamin-6-Phosphat über Fructosamin-6-Phosphat zu Fructose-6-Phosphat und Ammonium. In der den beiden Enzymen gemeinsamen Isomerasefunktion (Abbildung 29) könnte die Identität der konservierten Reste bei HPIs und GPDAs begründet sein. Das Vorkommen der SIS-Domäne und der konservierten Reste kennzeichnet diese Enzyme als Mitglieder der PGI-Superfamilie. Aufgrund der geringen Sequenzähnlichkeiten zu den PGIs und PGI/PMIs bilden sie innerhalb der PGI-Superfamilie eine eigene Gruppe (Abbildung 35).

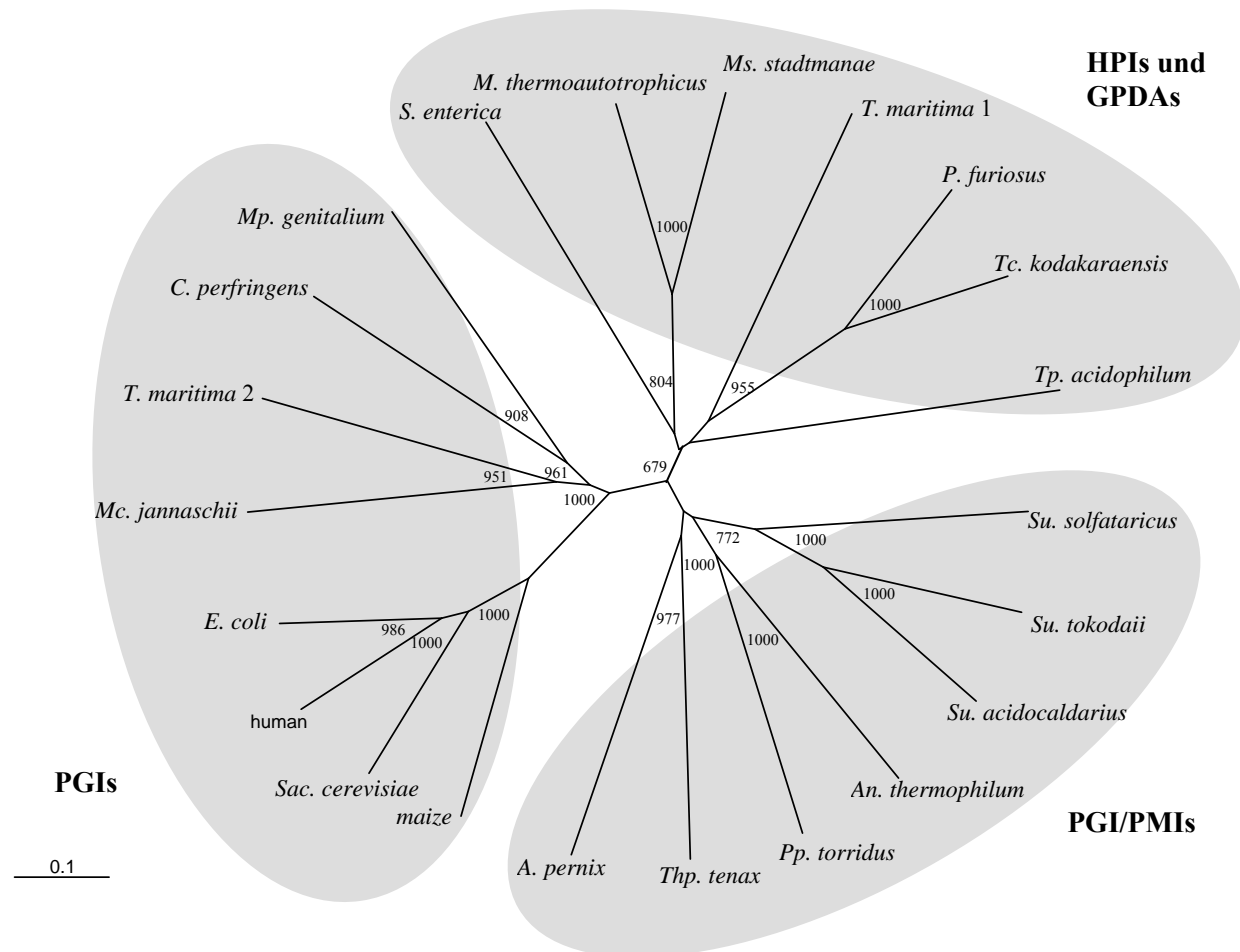


Abbildung 35 Phylogenetische Verwandtschaft von GlmS aus Eukarya, Bacteria und Archaea. Die Zahlen an den Knotenpunkten sind die Bootstrap-Werte nach Neighbor-Joining. NCBI-Accession-Nummern: *S. enterica* AAL19523; *M. thermoautotrophicus* AAB85358; *Ms. stadtmannae* ABC57438; *Tp. acidophilum* CAC11621; *T. maritima 1* AAD35895; *P. furiosus* AAL80468; *Tc. kodakaraensis* BAD85944; *Su. solfataricus* NP_343653; *Su. tokodaii* NP_378246; *Su. acidocaldarius* YP_254865; *An. thermophilum* CAA93628; *Pp. torridus* AAT43811; *Thp. tenax* CAF18453; APE0768, *A. pernix* BAA79746; *maize*, *Zea mays* P49105; *Sac. cerevisiae* P12709; *human*, *Homo sapiens* P06744; *E. coli* P0A6T1; *Mc. jannaschii* NP_248615; *T. maritima 2* NP_229186; *C. perfringens* Q8XI54; *Mp. genitalium* NP_072773.

In dieser Arbeit wurde damit eine dritte Gruppe innerhalb der PGI-Superfamilie charakterisiert, deren Mitglieder je nach Organismus eine unterschiedliche Diversifizierung durchgemacht haben. In den Archaea *M. thermoautotrophicus* und *Ms. stadtmannae*, die

keinen der bisher bekannten drei PGI-Typen aufweisen, erfolgte eine Entwicklung des Vorläufers hin zu einer neuartigen funktionellen Glucose-6-Phosphat Isomerase, die in diesen Organismen vor allem gluconeogenetische Funktion hat. In den heterotrophen Organismen *P. furiosus*, *Tc. kodakaraensis* und *T. maritima*, die jeweils über funktionelle PGIs verfügen, blieb der konservierte C-Terminus des Vorläufers erhalten und das Protein nahm die Funktion einer GPDA an. Für die weitere Analyse dieser neuartigen Proteinfamilie wird es interessant sein, weitere bakterielle und archaeele Homologe zu untersuchen.

7 Literatur

- Achari A, Marshall SE, Muirhead H, Palmieri RH, Noltmann EA (1981) Glucose-6-phosphate isomerase. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 293:145-157
- Elson L, Morgan WTJ (1933) A colorimetric method for the determination of glucosamine and chondrosamine. *Biochem XXVII*:1824-1828
- Arreola R, Valderrama B, Morante ML, Horjales E (2003) Two mammalian glucosamine-6-phosphate deaminases: a structural and genetic study. *FEBS Lett* 551:63-70
- Badet B, Vermoote P, Haumont PY, Lederer F, LeGoffic F (1987) Glucosamine synthetase from *Escherichia coli*: purification, properties, and glutamine-utilizing site location. *Biochemistry* 26:1940-1948
- Bairoch A, Bucher P, Hofmann K (1996) The PROSITE database, its status in 1995. *Nucleic Acids Res* 24:189-196
- Balch WE, Wolfe RS (1981a) *Methanomicrobiales* ord. nov. [In *Validation of the Publication of New Names and New Combinations Previously Effectively Published Outside the IJSB*. List no. 6]. *Int J Syst Bacteriol* 31:215-218
- Balch WE, Wolfe RS (1981b) *Methanococcales* ord. nov. [In *Validation of the Publication of New Names and New Combinations Previously Effectively Published Outside the IJSB*. List no. 6]. *Int J Syst Bacteriol* 31:215-218
- Balch WE, Wolfe RS (1981c) *Methanobacteriales* ord. nov. [In *Validation of the Publication of New Names and New Combinations Previously Effectively Published Outside the IJSB*. List no. 6]. *Int J Syst Bacteriol* 31:215-218
- Barns SM, Delwiche CF, Palmer JD, Pace NR (1996) Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9188-9193
- Bateman A (1999) The SIS domain: a phosphosugar-binding domain. *Trends Biochem Sci* 24:94-95
- Berrisford JM, Hounslow AM, Akerboom J, Hagen WR, Brouns SJ, van der OJ, Murray IA, Michael BG, Waltho JP, Rice DW, Baker PJ (2006) Evidence supporting a cis-enediol-based mechanism for *Pyrococcus furiosus* phosphoglucose isomerase. *J Mol Biol* 358:1353-1366
- Blattner FR, Plunkett G, III, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B, Shao Y (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277:1453-1474
- Blöchl E, Burggraf S, Fiala G, Lauerer G, Huber G, Huber R, Rachel R, Segerer A, Stetter KO, Völkl P (1995) Isolation, taxonomy and phylogeny of hyperthermophilic microorganisms. *World J Microbiol Biotechnol* 11:9-16

- Blöchl E, Rachel R, Burggraf S, Hafenbradl D, Jannasch HW, Stetter KO (1997) *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113 °C. *Extremophiles* 1:14-21
- Boone DR, Whitman WB, Koga Y (2002) *Methanosarcinales* ord. nov. [In *Validation of the Publication of New Names and New Combinations Previously Effectively Published Outside the IJSB*. List no. 85]. *Int J Syst Bacteriol* 52:685-690
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Brazilian National Genome Project Consortium (2003) The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:11660-11665
- Breitung J, Börner G, Scholz S, Linder D, Stetter KO, Thauer RK (1992) Salt dependence, kinetic properties and catalytic mechanism of *N*-formylmethanofuran:tetrahydromethanopterin formyltransferase from the extreme thermophile *Methanopyrus kandleri*. *Eur J Biochem* 210:971-981
- Broschat KO, Gorka C, Page JD, Martin-Berger CL, Davies MS, Huang Hc HC, Gulve EA, Salsgiver WJ, Kasten TP (2002) Kinetic characterization of human glutamine-fructose-6-phosphate amidotransferase I: potent feedback inhibition by glucosamine 6-phosphate. *J Biol Chem* 277:14764-14770
- Budgen N, Danson MJ (1986) Metabolism of glucose via a modified Entner-Doudoroff pathway in the thermoacidophilic archaebacterium *Thermoplasma acidophilum*. *FEBS Lett* 196:207-210
- Bullock WO, Fernandez JM, Short JM (1987) XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA* es. *Biotechniques* 5:376-379
- Burggraf S, Stetter KO, Rouvier P, Woese CR (1991) *Methanopyrus kandleri*: an archael methanogen unrelated to all other known methanogens. *System Appl Microbiol* 14:346-351
- Calcagno M, Campos PJ, Mulliert G, Suastegui J (1984) Purification, molecular and kinetic properties of glucosamine-6-phosphate isomerase (deaminase) from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 787:165-173
- Canonaco F, Hess TA, Heri S, Wang T, Szyperski T, Sauer U (2001) Metabolic flux response to phosphoglucose isomerase knock-out in *Escherichia coli* and impact of overexpression of the soluble transhydrogenase UdhA. *FEMS Microbiol Lett* 204:247-252
- Carabaza A, Arino J, Fox JW, Villar-Palasi C, Guinovart JJ (1990) Purification, characterization and partial amino acid sequence of glycogen synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 268:401-407
- Carstens C-P, Bonnardel J, Allen R, Waesche A (1999) BL21-CodonPlus Cells Correct Expression Problems Caused by Codon Bias. *Stratagies* 14:50-52
- Charles DJ, Lee CY (1980) Biochemical characterization of phosphoglucose isomerase and genetic variants from mouse and *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biochem* 29:11-21

- Cleasby A, Wonacott A, Skarzynski T, Hubbard RE, Davies GJ, Proudfoot AE, Bernard AR, Payton MA, Wells TN (1996) The x-ray crystal structure of phosphomannose isomerase from *Candida albicans* at 1.7 angstrom resolution. *Nat Struct Biol* 3:470-479
- Concepcion JL, Chataing B, Dubourdieu M (1999) Purification and properties of phosphoglucose isomerases of *Trypanosoma cruzi*. *Comp Biochem Physiol [B]* 122:211-222
- Cordeiro AT, Godoi PH, Silva CH, Garratt RC, Oliva G, Thiemann OH (2003) Crystal structure of human phosphoglucose isomerase and analysis of the initial catalytic steps. *Biochim Biophys Acta* 1645:117-122
- Creczynski-Pasa TB, Antonio RV (2004) Energetic metabolism of *Chromobacterium violaceum*. *Genet Mol Res* 3:162-166
- Danson MJ (1988) Archaeobacteria: the comparative enzymology of their central metabolic pathways. *Adv Microb Physiol* 29:165-231
- Davies C, Muirhead H (2003) Structure of native phosphoglucose isomerase from rabbit: conformational changes associated with catalytic function. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 59:453-465
- De Rosa M, Gambacorta A (1988) The lipids of archaeobacteria. *Prog Lipid Res* 27:153-175
- De Rosa M, Gambacorta A, Nicolaus B, Giardina P, Poerio E, Buonocore V (1984) Glucose metabolism in the extreme thermoacidophilic archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus*. *Biochem J* 224:407-414
- DelVecchio VG, Kapatral V, Redkar RJ, Patra G, Mujer C, Los T, Ivanova N, Anderson I, Bhattacharyya A, Lykidis A, Reznik G, Jablonski L, Larsen N, D'Souza M, Bernal A, Mazur M, Goltsman E, Selkov E, Elzer PH, Hagius S, O'Callaghan D, Letesson JJ, Haselkorn R, Kyrpides N, Overbeek R (2002) The genome sequence of the facultative intracellular pathogen *Brucella melitensis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:443-448
- Denisot MA, Le Goffic F, Badet B (1991) Glucosamine-6-phosphate synthase from *Escherichia coli* yields two proteins upon limited proteolysis: identification of the glutamine amidohydrolase and 2R ketose/aldose isomerase-bearing domains based on their biochemical properties. *Arch Biochem Biophys* 288:225-230
- Deppenmeier U (2002) The unique biochemistry of methanogenesis. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 71:223-283
- Dunwell JM, Culham A, Carter CE, Sosa-Aguirre CR, Goodenough PW (2001) Evolution of functional diversity in the cupin superfamily. *Trends Biochem Sci* 26:740-746
- Dunwell JM, Purvis A, Khuri S (2004) Cupins: the most functionally diverse protein superfamily? *Phytochemistry* 65:7-17
- Franzmann PD, Liu Y, Balkwill DL, Aldrich HC, Conway de ME, Boone DR (1997) *Methanogenium frigidum* sp. nov., a psychrophilic, H₂-using methanogen from Ace Lake, Antarctica. *Int J Syst Bacteriol* 47:1068-1072

- Fricke WF, Seedorf H, Henne A, Krüer M, Liesegang H, Hedderich R, Gottschalk G, Thauer RK (2006) The genome sequence of *Methanosphaera stadtmanae* reveals why this human intestinal archaeon is restricted to methanol and H₂ for methane formation and ATP synthesis. *J Bacteriol* 188:642-658
- Froman BE, Tait RC, Gottlieb LD (1989) Isolation and characterization of the phosphoglucose isomerase gene from *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 217:126-131
- Fukui T, Atomi H, Kanai T, Matsumi R, Fujiwara S, Imanaka T (2005) Complete genome sequence of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 and comparison with *Pyrococcus* genomes. *Genome Res* 1-12
- Ghosh S, Blumenthal H, Davidson E, Roseman S (1960) Glucosamine Methabolism. *J Bacteriol Chem* 235:1265-1273
- Gracy RW, Noltmann EA (1968) Studies on phosphomannose isomerase. II. Characterization as a zinc metalloenzyme. *J Biol Chem* 243:4109-4116
- Graham Solomons JT, Zimmerly EM, Burns S, Krishnamurthy N, Swan MK, Krings S, Muirhead H, Chirgwin J, Davies C (2004) The crystal structure of mouse phosphoglucose isomerase at 1.6 Å resolution and its complex with glucose 6-phosphate reveals the catalytic mechanism of sugar ring opening. *J Mol Biol* 342:847-860
- Grazi E, De Flora A, Pontremoli S (1960) The inhibition of phosphoglucose isomerase by D-erythrose-4-phosphate. *Biochem Biophys Res Commun* 2:121-125
- 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
- Hansen T, Oehlmann M, Schönheit P (2001) Novel type of glucose-6-phosphate isomerase in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J Bacteriol* 183:3428-3435
- Hansen T, Reichstein B, Schmid R, Schönheit P (2002a) The first archaeal ATP-dependent glucokinase, from the hyperthermophilic crenarchaeon *Aeropyrum pernix*, represents a monomeric, extremely thermophilic ROK glucokinase with broad hexose specificity. *J Bacteriol* 184:5955-5965
- Hansen T, Schlichting B, Schönheit P (2002b) Glucose-6-phosphate dehydrogenase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: expression of the g6pd gene and characterization of an extremely thermophilic enzyme. *FEMS Microbiol Lett* 216:249-253
- Hansen T, Schlichting B, Grötzinger J, Swan MK, Davies C, Schönheit P (2004a) Mutagenese of catalytically important residues of cupin type phosphoglucose isomerase from *Archaeoglobus fulgidus*. *J Biol Chem*
- Hansen T, Urbanke C, Schönheit P (2004b) Bifunctional phosphoglucose/phosphomannose isomerase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum aerophilum*. *Extremophiles* 8:507-512

- Hansen T, Wendorff D, Schönheit P (2004c) Bifunctional phosphoglucose/phosphomannose isomerases from the Archaea *Aeropyrum pernix* and *Thermoplasma acidophilum* constitute a novel enzyme family within the phosphoglucose isomerase superfamily. *J Biol Chem* 279:2262-2272
- Hansen T, Schlichting B, Felgendreher M, Schönheit P (2005) Cupin type phosphoglucose isomerases constitute a novel metal dependent PGI family-representing a convergent line of PGI evolution. *J Bacteriol* 187:1621-1631
- Heidelberg JF, Paulsen IT, Nelson KE, Gaidos EJ, Nelson WC, Read TD, Eisen JA, Seshadri R, Ward N, Methe B, Clayton RA, Meyer T, Tsapin A, Scott J, Beanan M, Brinkac L, Daugherty S, DeBoy RT, Dodson RJ, Durkin AS, Haft DH, Kolonay JF, Madupu R, Peterson JD, Umayam LA, White O, Wolf AM, Vamathevan J, Weidman J, Impraim M, Lee K, Berry K, Lee C, Mueller J, Khouri H, Gill J, Utterback TR, McDonald LA, Feldblyum TV, Smith HO, Venter JC, Neilson KH, Fraser CM (2002) Genome sequence of the dissimilatory metal ion-reducing bacterium *Shewanella oneidensis*. *Nat Biotechnol* 20:1118-1123
- Hua Q, Yang C, Baba T, Mori H, Shimizu K (2003) Responses of the central metabolism in *Escherichia coli* to phosphoglucose isomerase and glucose-6-phosphate dehydrogenase knockouts. *J Bacteriol* 185:7053-7067
- Huber H, Hohn MJ, Rachel R, Fuchs T, Wimmer VC, Stetter KO (2002) A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* 417:63-67
- Huber R, Kurr M, Stetter KO (1989) A novel group of abyssal methanogenic archaeobacteria (*Methanopyrus*) growing at 110 °C. *Nature* 342:833-834
- Huber R, Langworthy TA, König H, Thomm M, Woese CR, Sleytr UB, Stetter KO (1986) *Thermotoga maritima* sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up to 90 °C. *Arch Microbiol* 144:324-333
- Huber R, Stetter KO (2002) *Methanopyrales* ord. nov. [In *Validation of the Publication of New Names and New Combinations Previously Effectively Published Outside the IJSB*. List no. 85]. *Int J Syst Bacteriol* 52:685-690
- Huber R, Stetter KO (1992) The Order Thermotogales. In: Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., and Schleifer, K. H. (eds) *The Prokaryotes. A Handbook of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*, 2nd edn. Springer-Verlag, New York, pp 3810-3815
- Huynh QK, Gulve EA, Dian T (2000) Purification and characterization of glutamine:fructose 6-phosphate amidotransferase from rat liver. *Arch Biochem Biophys* 379:307-313
- Isupov MN, Obmolova G, Butterworth S, Badet-Denisot MA, Badet B, Polikarpov I, Littlechild JA, Teplyakov A (1996) Substrate binding is required for assembly of the active conformation of the catalytic site in Ntn amidotransferases: evidence from the 1.8 Å crystal structure of the glutaminase domain of glucosamine 6-phosphate synthase. *Structure* 4:801-810

- Johnsen U, Hansen T, Schönheit P (2003) 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. *J Biol Chem* 278:25417-25427
- Johnsen U, Selig M, Xavier KB, Santos H, Schönheit P (2001) Different glycolytic pathways for glucose and fructose in the halophilic archaeon *Halococcus saccharolyticus* [published erratum appears in *Arch.Microbiol.* 2003 180: 503]. *Arch Microbiol* 175:52-61
- Jones WJ, Leigh JA, Mayer F, Woese CR, Wolfe RS (1983) *Methanococcus jannaschii* sp. nov., an extremely thermophilic methanogen from a submarine hydrothermal vent. *Arch Microbiol* 136:254-261
- Kaine BP (1990) Structure of the archaeobacterial 7S RNA molecule. *Mol Gen Genet* 221:315-321
- Kandler O, König H (1998) Cell wall polymers in Archaea (Archaeobacteria). *Cell Mol Life Sci* 54:305-308
- Kengen SW, Tuininga JE, Verhees CH, Van der Oost J, Stams AJ, De Vos WM (2001) ADP-dependent glucokinase and phosphofructokinase from *Pyrococcus furiosus*. *Methods Enzymol* 331:41-53
- König H, Hartmann E, Kärcher U (1994) Pathways and principles of the biosynthesis of methanobacterial cell wall polymers. *Syst Appl Microbiol* 16:510-517
- Kurr M, Huber R, König H, Fricke H, Trincone A, Kristjansson J, Stetter KO (1991) *Methanopyrus kandleri*, gen. and sp. nov. represents a novel group of the thermophilic methanogens, growing at 110 °C. *Arch Microbiol* 156:239-247
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Langworthy TA, Pond JL (1986) Archaeobacterial ether lipids and chemotaxonomy. *System Appl Microbiol* 7:253-257
- Lara-Lemus R, Calcagno ML (1998) Glucosamine-6-phosphate deaminase from beef kidney is an allosteric system of the V-type. *Biochim Biophys Acta* 1388:1-9
- Leriche C, Badet-Denisot MA, Badet B (1996) Characterization of a phosphoglucose isomerase-like activity associated with the carboxy-terminal domain of *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate synthase. *J Am Chem Soc* 118:1797-1798
- Lopez PJ, Marchand I, Joyce SA, Dreyfus M (1999) The C-terminal half of RNase E, which organizes the *Escherichia coli* degradosome, participates in mRNA degradation but not rRNA processing in vivo. *Mol Microbiol* 33:188-199
- Maeder DL, Weiss RB, Dunn DM, Cherry JL, González JM, Diruggiero J, Robb FT (1999) Divergence of the hyperthermophilic archaea *Pyrococcus furiosus* and *P. horikoshii* inferred from complete genomic sequences. *Genetics* 152:1299-1305

- McClelland M, Sanderson KE, Spieth J, Clifton SW, Latreille P, Courtney L, Porwollik S, Ali J, Dante M, Du F, Hou S, Layman D, Leonard S, Nguyen C, Scott K, Holmes A, Grewal N, Mulvaney E, Ryan E, Sun H, Florea L, Miller W, Stoneking T, Nhan M, Waterston R, Wilson RK (2001) Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* LT2. *Nature* 413:852-856
- Milewski S (2002) Glucosamine-6-phosphate synthase--the multi-facets enzyme. *Biochim Biophys Acta* 1597:173-192
- Milewski S, Gabriel I, Olchowoy J (2006a) Enzymes of UDP-GlcNAc biosynthesis in yeast. *Yeast* 23:1-14
- Milewski S, Janiak A, Wojciechowski M (2006b) Structural analogues of reactive intermediates as inhibitors of glucosamine-6-phosphate synthase and phosphoglucose isomerase. *Arch Biochem Biophys* 450:39-49
- Milewski S, Kuszczak D, Jedrzejczak R, Smith RJ, Brown AJ, Gooday GW (1999) Oligomeric structure and regulation of *Candida albicans* glucosamine-6-phosphate synthase. *J Biol Chem* 274:4000-4008
- Miller TL, Wolin MJ (1985) *Methanosphaera stadtmaniae* gen. nov., sp. nov.: a species that forms methane by reducing methanol with hydrogen. *Arch Microbiol* 141:116-122
- Montero-Morán GM, Lara-González S, Álvarez-Añorve LI, Plumbridge JA, Calcagno ML (2001) On the multiple functional roles of the active site histidine in catalysis and allosteric regulation of *Escherichia coli* glucosamine 6-phosphate deaminase. *Biochemistry* 40:10187-10196
- Mouilleron S, Badet-Denisot MA, Golinelli-Pimpaneau B (2006) Glutamine binding opens the ammonia channel and activates glucosamine-6P synthase. *J Biol Chem* 281:4404-4412
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1:263-273
- Muramatsu N, Nosoh Y (1971) Purification and characterization of glucose-6-phosphate isomerase from *Bacillus stearothermophilus*. *Arch Biochem Biophys* 144:245-252
- Natarajan K, Datta A (1993) Molecular cloning and analysis of the *NAG1* cDNA coding for glucosamine-6-phosphate deaminase from *Candida albicans*. *J Biol Chem* 268:9206-9214
- Nelson KE, Clayton RA, Gill SR, Gwinn ML, Dodson RJ, Haft DH, Hickey EK, Peterson JD, Nelson WC, Ketchum KA, McDonald L, Utterback TR, Malek JA, Linher KD, Garrett MM, Stewart AM, Cotton MD, Pratt MS, Phillips CA, Richardson D, Heidelberg J, Sutton GG, Fleischmann RD, Eisen JA, Fraser CM (1999) Evidence for lateral gene transfer between archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature* 399:323-329
- Nesbo CL, L'Haridon S, Stetter KO, Doolittle WF (2001) Phylogenetic analyses of two "archaeal" genes in *Thermotoga maritima* reveal multiple transfers between archaea and bacteria. *Mol Biol Evol* 18:362-375

Nierman WC, DeShazer D, Kim HS, Tettelin H, Nelson KE, Feldblyum T, Ulrich RL, Ronning CM, Brinkac LM, Daugherty SC, Davidsen TD, DeBoy RT, Dimitrov G, Dodson RJ, Durkin AS, Gwinn ML, Haft DH, Khouri H, Kolonay JF, Madupu R, Mohammoud Y, Nelson WC, Radune D, Romero CM, Sarria S, Selengut J, Shamblin C, Sullivan SA, White O, Yu Y, Zafar N, Zhou L, Fraser CM (2004) Structural flexibility in the *Burkholderia mallei* genome. Proc Natl Acad Sci USA 101:14246-14251

Noltmann EA (1972) Aldose-Ketose Isomerases. In: Boyer, P. D. (ed) The enzymes, 3 edn. Academic press, New York, pp 302-314

Novy R, Drott D, Yaeger K, Mierendorf R (2001) Overcoming the codon bias of *E. coli* for enhanced protein expression. in Novations (Newsletter of Novagen)

Oliva G, Fontes MR, Garratt RC, Altamirano MM, Calcagno ML, Horjales E (1995) Structure and catalytic mechanism of glucosamine 6-phosphate deaminase from *Escherichia coli* at 2.1 Å resolution. Structure 3:1323-1332

Parr CW (1956) Inhibition of Phosphoglucose Isomerase. Nature 4547:1401

Parr CW (1957) Competitive inhibitors of phosphoglucose isomerase. Biochem J 65:34p

Paulsen IT, Seshadri R, Nelson KE, Eisen JA, Heidelberg JF, Read TD, Dodson RJ, Umayam L, Brinkac LM, Beanan MJ, Daugherty SC, DeBoy RT, Durkin AS, Kolonay JF, Madupu R, Nelson WC, Ayodeji B, Kraul M, Shetty J, Malek J, Van Aken SE, Riedmuller S, Tettelin H, Gill SR, White O, Salzberg SL, Hoover DL, Lindler LE, Halling SM, Boyle SM, Fraser CM (2002) The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between animal and plant pathogens and symbionts. Proc Natl Acad Sci USA 99:13148-13153

Plumbridge JA, Cochet O, Souza JM, Altamirano MM, Calcagno ML, Badet B (1993) Coordinated regulation of amino sugar-synthesizing and -degrading enzymes in *Escherichia coli* K-12. J Bacteriol 175:4951-4956

Pogell BM, Gryder RM (1957) Enzymatic synthesis of glucosamine 6-phosphate in rat liver. J Biol Chem 228:701-712

Read J, Pearce J, Li X, Muirhead H, Chirgwin J, Davies C (2001) The crystal structure of human phosphoglucose isomerase at 1.6 Å resolution: implications for catalytic mechanism, cytokine activity and haemolytic anaemia. J Mol Biol 309:447-463

Reher M, Schönheit P (2006) Glyceraldehyde dehydrogenases from the thermoacidophilic euryarchaeota *Picrophilus torridus* and *Thermoplasma acidophilum*, key enzymes of the non-phosphorylative Entner-Doudoroff pathway, constitute a novel enzyme family within the aldehyde dehydrogenase superfamily. FEBS Lett 580:1198-1204

Reissig JL, Strominger JL, Leloir LF (1955) A modified colorimetric method for the estimation of N-acetyl amino sugars. J Biol Chem 217:959-966

Roux C, Lee JH, Jeffery CJ, Salmon L (2004) Inhibition of type I and type II phosphomannose isomerases by the reaction intermediate analogue 5-phospho-d-arabinonohydroxamic acid supports a catalytic role for the metal cofactor. Biochemistry 43:2926-2934

- Rudolph B, Hansen T, Schönheit P (2004) Glucose-6-phosphate isomerase from the hyperthermophilic archaeon *Methanococcus jannaschii*: characterization of the first archaeal member of the phosphoglucose isomerase superfamily. *Arch Microbiol* 181:82-87
- Ruepp A, Graml W, Santos-Martinez ML, Koretke KK, Volker C, Mewes HW, Frishman D, Stocker S, Lupas AN, Baumeister W (2000) The genome sequence of the thermoacidophilic scavenger *Thermoplasma acidophilum*. *Nature* 407:508-513
- Sambrook S, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2 edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Sandman K, Reeve JN (2001) Chromosome packaging by archaeal histones. *Adv Appl Microbiol* 50:75-99
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463-5467
- Sauer U, Canonaco F, Heri S, Perrenoud A, Fischer E (2004) The soluble and membrane-bound transhydrogenases UdhA and PntAB have divergent functions in NADPH metabolism of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 279:6613-6619
- Schönheit P (1993) The role of Na⁺ in the first step of CO₂ reduction to methane in methanogenic bacteria. In: Bakker, E. P. (ed) *Alkali cation transport systems in prokaryotes*. CRC Press, Boca Raton, pp 179-202
- Schönheit P, Schäfer T (1995) Metabolism of hyperthermophiles. *World J Microbiol Biotechnol* 11:26-57
- Selig M, Xavier KB, Santos H, Schönheit P (1997) Comparative analysis of Embden-Meyerhof and Entner-Doudoroff glycolytic pathways in hyperthermophilic archaea and the bacterium *Thermotoga*. *Arch Microbiol* 167:217-232
- Siebers B, Schönheit P (2005) Unusual pathways and enzymes of central carbohydrate metabolism in Archaea. *Curr Opin Microbiol* 8:695-705
- Slesarev AI, Mezhevaya KV, Makarova KS, Polushin NN, Shcherbinina OV, Shakhova VV, Belova GI, Aravind L, Natale DA, Rogozin IB, Tatusov RL, Wolf YI, Stetter KO, Malykh AG, Koonin EV, Kozyavkin SA (2002) The complete genome of hyperthermophile *Methanopyrus kandleri* AV19 and monophyly of archaeal methanogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:4644-4649
- Smith DR, Doucette-Stamm LA, Deloughery C, Lee H, Dubois J, Aldredge T, Bashirzadeh R, Blakely D, Cook R, Gilbert K, Harrison D, Hoang L, Keagle P, Lumm W, Pothier B, Qiu D, Spadafora R, Vicaire R, Wang Y, Wierzbowski J, Gibson R, Jiwani N, Caruso A, Bush D, Reeve JN (1997) Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* deltaH: functional analysis and comparative genomics. *J Bacteriol* 179:7135-7155
- Smith LD, Budgen N, Bungard SJ, Danson MJ, Hough DW (1989) Purification and characterization of glucose dehydrogenase from the thermoacidophilic archaeobacterium *Thermoplasma acidophilum*. *Biochem J* 261:973-977
- Stetter KO (1996) Hyperthermophiles in the history of life. *Ciba Found Symp* 202:1-10

Stetter KO (1993) Life at the upper temperature border. In: Tran Thanh Van, J., Tran Thanh Van, K., Mounolon, J. C., Schneider, J., and McKay, C. (eds) *Frontiers of Life*. Editions Frontiers, Gif-sur-Yvette, pp 195-219

Stetter KO (1999) Extremophiles and their adaptation to hot environments. *FEBS Lett* 452:22-25

Stetter KO, Fiala G, Huber R, Seegerer A (1990) Hyperthermophilic microorganisms. *FEMS Microbiol Rev* 75:117-124

Studier FW, Moffatt BA (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189:113-130

Swan MK, Hansen T, Schönheit P, Davies C (2003a) Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of phosphoglucose isomerase from *Pyrococcus furiosus*. *Protein Pept Lett* 10:517-520

Swan MK, Hansen T, Schönheit P, Davies C (2004) A novel phosphoglucose isomerase (PGI)/phosphomannose isomerase from the crenarchaeon *Pyrobaculum aerophilum* is a member of the PGI superfamily: structural evidence at 1.16 Å resolution. *J Biol Chem* 279:39838-39845

Swan MK, Solomons JT, Beeson CC, Hansen T, Schönheit P, Davies C (2003b) Structural evidence for a hydride transfer mechanism of catalysis in phosphoglucose isomerase from *Pyrococcus furiosus*. *J Biol Chem* 278:47261-47268

Takama M, Nosoh Y (1980) Purification and some properties of 6-phosphoglucose isomerase from *Bacillus caldotenax*. *J Biochem (Tokyo)* 87:1821-1827

Tanaka T, Takahashi F, Fukui T, Fujiwara S, Atomi H, Imanaka T (2005) Characterization of a novel glucosamine-6-phosphate deaminase from a hyperthermophilic archaeon. *J Bacteriol* 187:7038-7044

Tepljakov A, Leriche C, Obmolova G, Badet B, Badet-Denisot MA (2002) From Lobry de Bruyn to enzyme-catalyzed ammonia channelling: molecular studies of D-glucosamine-6P synthase. *Nat Prod Rep* 19:60-69

Tepljakov A, Obmolova G, Badet B, Badet-Denisot MA (2001) Channeling of ammonia in glucosamine-6-phosphate synthase. *J Mol Biol* 313:1093-1102

Tepljakov A, Obmolova G, Badet-Denisot MA, Badet B (1999) The mechanism of sugar phosphate isomerization by glucosamine 6-phosphate synthase. *Protein Sci* 8:596-602

Tepljakov A, Obmolova G, Badet-Denisot MA, Badet B, Polikarpov I (1998) Involvement of the C terminus in intramolecular nitrogen channeling in glucosamine 6-phosphate synthase: evidence from a 1.6 Å crystal structure of the isomerase domain. *Structure* 6:1047-1055

Thauer RK (1998) Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. 1998 Marjory Stephenson Prize Lecture. *Microbiology* 144:2377-2406

Thomm M (1996) Archaeal transcription factors and their role in transcription initiation. *FEMS Microbiol Rev* 18:159-171

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25:4876-4882

Todorova R (2001) Isomerase activity of the C-terminal fructose-6-phosphate binding domain of glucosamine-6-phosphate synthase from *Escherichia coli*. *J Enzyme Inhib* 16:373-380

Verhees CH, Huynen MA, Ward DE, Schiltz E, De Vos WM, Van der Oost J (2001) The phosphoglucose isomerase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* is a unique glycolytic enzyme that belongs to the cupin superfamily. *J Biol Chem* 276:40926-40932

Verhees CH, Kengen SW, Tuininga JE, Schut GJ, Adams MW, De Vos WM, Van der Oost J (2003) The unique features of glycolytic pathways in Archaea. *Biochem J* 375:231-246

Vincent F, Davies GJ, Brannigan JA (2005) Structure and kinetics of a monomeric glucosamine 6-phosphate deaminase: missing link of the NagB superfamily? *J Biol Chem* 280:19649-19655

Wächtershäuser G (1988) Pyrite formation, the first energy source for life: a hypothesis. *System Appl Microbiol* 10:207-210

Wächtershäuser G (1992) Groundworks for an evolutionary biochemistry: the iron-sulphur world. *Prog Biophys Mol Biol* 58:85-201

Woese CR (1987) Bacterial evolution. *Bacteriol Rev* 51:221-271

Woese CR, Kandler O, Wheelis ML (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:4576-4579

Worning P, Jensen LJ, Nelson KE, Brunak S, Ussery DW (2000) Structural analysis of DNA sequence: evidence for lateral gene transfer in *Thermotoga maritima*. *Nucleic Acids Res* 28:706-709

Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33:103-119

Zeikus JG, Wolfe RS (1972) *Methanobacterium thermoautotrophicus* sp. n., an anaerobic, autotrophic, extreme thermophile. *J Bacteriol* 109:707-715

8 Abkürzungen

μ	Wachstumsrate
6PG	6-Phosphogluconat
A. bidest.	zweifach deionisiertes Wasser
aa	Aminosäuren
app.	apparent
ATP	Adenosintriphosphat
BisTris	Bis(2-Hydroxyethyl)amino-Tris-(Hydroxymethyl)methan
bp	Basenpaare
cDNA	Copy DNA
CHES	2-[N-Cyclohexylamino]-Ethansulfonat
cPGI	Cupin-Typ PGI
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
DSM(Z)	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
E4P	Erythrose-4-Phosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et alii
F6P	Fructose-6-Phosphat
FA	Formaldehyd
g	relative Zentrifugalbeschleunigung (9.81 m/s^2)
G6P	Glucose-6-Phosphat
G6PDH	Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase
GAP	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
GK	Glucokinase
GlmS	Glutamin:Fructose-6-Phosphat Transaminase
GPDA	Glucosamin-6-Phosphat Deaminase
h	Stunde
H-	Wasserstoff-
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)Piperazin-1-Ethansulfonat
HPI	Hexose-Phosphat Isomerase, homolog zur Isomerase Domäne der GlmS
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kbp	Kilobasenpaare
k_{cat}	Wechselzahl
kDa	Kilodalton
K_i	Michaeliskonstante für einen Inhibitor
K_m	Michaeliskonstante
KPP	Kaliumphosphatpuffer
LB	Luria Bertani
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	Messenger RNA
Ms	<i>Methanosphaera stadtmanae</i>

Mt	<i>Methanothermobacter thermoautotrophicus</i>
n.a.	nicht angegeben
n.m.	nicht messbar
NAD	Nicotinamidadenindinucleotid
NADH	reduziertes Nicotinamidadenindinucleotid
NADP	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NADPH	reduziertes Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NagB	Glucosamin-6-Phosphat Deaminase
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NG6P	Glucosamin-6-Phosphat
Ni-NTA	Nickel-nitrilotriacetic acid
OD	Optische Dichte
ORF	Open reading frame
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase chain reaction
Pf	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PFK	Phosphofruktokinase
PGI	Glucose-6-Phosphat Isomerase
PK	Pyruvat Kinase
PMI	Mannose-6-Phosphat Isomerase
RE	Restriktionsendonuclease
RNA	Ribonucleic acid
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde
S	Substrat
S6P	Sorbitol-6-Phosphat
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIS	Sugar Isomerase
St	<i>Salmonella enterica</i> serovar <i>typhimurium</i>
Ta	<i>Thermoplasma acidophilum</i>
TCA	Trichloroacetic acid
t _b	Verdoppelungszeit
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tm	<i>Thermotoga maritima</i>
Tricin	N-[Tris(Hydroxymethyl)methyl]glycin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer RNA
U	Unit
UdhA	cytoplasmatische Transhydrogenase
UV	ultraviolett
v	Reaktionsgeschwindigkeit
V _{max}	Maximalgeschwindigkeit des Substratumsatzes

Symbole für den Nukleinsäurecode:

A	Desoxyadenosin	G	Desoxguanosin
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 Prof. G. Gottschalk von der Georg-August-Universität Göttingen, Institut für Mikrobiologie und Genetik, danke ich für die Überlassung der genomischen DNA von *Methanosphaera stadtmanae*.

Herrn PD Dr. Reiner Hedderich vom Max Planck Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg danke ich für Zellmaterial von *Methanopyrus kandleri*.

Herrn Preidel danke ich für die Massenkultivierung von *Methanothermobacter thermoautotrophicus*.

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

Abschließend ein herzliches Dankeschön an meine Eltern und Freunde, die mich während des gesamten Studiums unterstützt haben und immer für mich da waren.

Lebenslauf

Bettina Schlichting

geb. am: 21. März 1977

Staatsangehörigkeit: deutsch

Wohnort: Kiel

Schulbildung

1983-1987 Grundschule

1987-1996 Gymnasium

Juni 1996 Allgemeine Hochschulreife

Studium

September 1996 – März 2003 Studium der Biologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

November 2001 Diplomprüfung in den Fächern Mikrobiologie, Botanik und Biochemie

Januar 2002 – Dezember 2002 Experimentelle Diplomarbeit am Institut für Allgemeine Mikrobiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. P. Schönheit mit dem Thema: „Glucose-6-Phosphat Isomerasen in Archaea“

März 2003 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.

Seit März 2003 wissenschaftliche Mitarbeiterin bei Prof. Dr. P. Schönheit am Institut für Allgemeine Mikrobiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.