

Neuartige Enzyme des Glucoseabbaus in Archaea:

Nachweis des nicht-phosphorylierten Entner-Doudoroff-Weges in
Picrophilus torridus
und des modifizierten Embden-Meyerhof-Weges in
Pyrobaculum aerophilum



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

vorgelegt von
Matthias Reher

- Kiel 2008 -

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von März 2004 bis Dezember 2007 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:

Tag der mündlichen Prüfung: 14.7.2008

Zum Druck genehmigt: Kiel, den

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.

.....
(Matthias Reher)

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

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 Letters* 580, 1198-1204.

Reher M, Bott M, Schönheit P (2006) Characterization of glycerate kinase (2-phosphoglycerate forming), a key enzyme of the nonphosphorylative Entner-Doudoroff pathway, from the thermoacidophilic euryarchaeon *Picrophilus torridus*. *FEMS Microbiol Lett.* 259, 113-119.

Reher M, Gebhard S, Schönheit P (2007) Glyceraldehyde-3-phosphate ferredoxin oxidoreductase (GAPOR) and nonphosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPN), key enzymes of the respective modified Embden-Meyerhof pathways in the hyperthermophilic crenarchaeota *Pyrobaculum aerophilum* and *Aeropyrum pernix*. *FEMS Microbiol.Lett.* 273, 196-205.

Reher M, Fuhrer T, Schönheit P (2008) The nonphosphorylative Entner-Doudoroff pathway in the thermoacidophilic euryarchaeon *Picrophilus torridus* involves a novel 2-keto-3deoxy gluconate (KDG) specific aldolase.

Inhalt

1	Zusammenfassung	4
2	Summary.....	7
3	Einleitung.....	9
4	Material und Methoden.....	19
4.1	Chemikalien und Enzyme.....	19
4.2	Züchtung von <i>Picrophilus torridus</i>	19
4.3	Wachstumsversuche mit <i>Picrophilus torridus</i>	20
4.4	¹³ C-NMR Studie	20
4.5	Analytische Methoden	21
4.5.1	Enzymatische Bestimmung von Glucose.....	21
4.5.2	Colorimetrische Bestimmung von KDG und KDPG.....	21
4.5.3	Enzymatische Bestimmung von KDG	21
4.6	Molekularbiologische Methoden	22
4.6.1	Computergestützte Sequenzanalysen.....	22
4.6.2	Isolierung genomischer DNA	22
4.6.3	Polymerase Kettenreaktion	22
4.6.4	Konzentration und Reinheitsanalyse von DNA	24
4.6.5	Klonierung von PCR-Produkten in einen Vektor	25
4.6.6	Sequenzierung.....	26
4.6.7	Expression	27
4.7	Nachweis von Enzymaktivitäten in Rohextrakten	27
4.7.1	Zellaufschluss	27
4.7.2	Allgemeine Handhabung von Enzymtests	28
4.7.3	Enzymaktivitäten von Embden-Meyerhof-Wegen	29
4.7.4	Enzymaktivitäten von Entner-Doudoroff-Wegen.....	32
4.8	Proteinbiochemische Methoden.....	34
4.8.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	34
4.8.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	34
4.8.3	Identifizierung der hypothetischen offenen Leserahmen.....	35
4.8.4	Blotten und N-terminale Aminosäuresequenzierung	35
4.8.5	Apparentes Molekulargewicht von nativen Proteinen	35
4.8.6	Ultrafiltration	35
4.9	Reinigung von nativen Proteinen.....	36
4.10	Reinigung von rekombinanten Proteinen.....	39
4.11	Charakterisierung von gereinigten Enzymen.....	40
4.11.1	Gluconat Dehydratase (GAD)	41
4.11.2	2-Keto-3-Deoxygluconat Aldolase (KDGA).....	41
4.11.3	Glycerinaldehyd Dehydrogenase (GADH).....	42
4.11.4	Glycerat kinase (GCK)	42
4.11.5	Glycerinaldehyd-3-Phosphat: Ferredoxin Oxidoreduktase (GAPOR).....	43

5	Ergebnisse.....	45
5.1	Der nicht-phosphorylierte Entner-Doudoroff-Weg (npED) in <i>Picrophilus torridus</i>	46
5.1.1	Wachstum von <i>P. torridus</i> mit Glucose.....	46
5.1.2	¹³ C-Markierungsexperimente in <i>P. torridus</i>	47
5.1.3	Enzymaktivitäten in Zellextrakten von <i>P. torridus</i>	48
5.1.4	Enzyme des Embden-Meyerhof (EM)-Weges.....	50
5.1.5	Reinigung und Charakterisierung der Schlüsselenzyme des nicht-phosphorylierten Entner-Doudoroff- Weges in <i>Picrophilus torridus</i>	51
	Gluconat Dehydratase.....	51
	KDG-Aldolase	56
	Glycerinaldehyd Dehydrogenase (GADH).....	62
	Charakterisierung eines GADH-Homolog aus <i>Thermoplasma acidophilum</i>	64
	Glycerat Kinase	67
5.1.6	KDG/KDPG-Aldolase Aktivität in Zellextrakten von <i>Thermoplasma acidophilum</i> und <i>Sulfolobus</i> <i>acidocaldarius</i>	71
5.2	Der modifizierte Embden-Meyerhof-Weg (EM) in <i>Pyrobaculum aerophilum</i>	72
5.2.1	Enzymaktivitäten eines modifizierten EM-Weges.....	72
5.2.2	Reinigung und Charakterisierung der Glycerinaldehyd-3-Phosphat: Ferredoxin Oxidoreduktase (GAPOR) aus <i>P. aerophilum</i>	74
6	Diskussion	76
6.1	Der nicht-phosphorylierte ED-Wege in <i>Picrophilus torridus</i>	76
6.2	Der modifizierte Embden-Meyerhof-Weg in <i>Pyrobaculum aerophilum</i>	93
7	Literatur	99
8	Abkürzungen.....	109
9	Danksagungen.....	111
10	Lebenslauf	112

1 Zusammenfassung

Vergleichende Untersuchungen der Zuckerabbauwege von Archaea haben ergeben, dass Glucose und Glucosepolymere über modifizierte Varianten des klassischen Embden-Meyerhof-Weges (EM-Weg) und Entner-Doudoroff-Weges (ED-Weg) von Bacteria und Eukarya abgebaut werden. Modifizierte ED-Wege wurden vor allem für aerobe Archaea postuliert. Für das aerobe thermoacidophile Crenarchaeon *Sulfolobus* wurde ein verzweigter ED-Weg vorgeschlagen, der einen nicht-phosphorylierten Zweig (npED), mit 2-Keto-3-Deoxygluconat (KDG) als Intermediat, und einen semi-phosphorylierten Zweig (spED), mit 2-Keto-3-Deoxyphosphogluconat (KDPG) als Intermediat, enthält. Das Schlüsselenzym dieses Weges ist eine bifunktionelle Aldolase, die sowohl KDG als auch KDPG mit hohen Raten umsetzt. Der glycolytische Abbauweg in aeroben thermoacidophilen Euryarchaeota, wie *Picrophilus torridus* und *Thermoplasma acidophilum*, wurde bisher nicht detailliert untersucht. Das Vorkommen einer Glucose Dehydrogenase in beiden Organismen deutet auf die Beteiligung eines ED-Weges hin. Detaillierte enzymatische Untersuchungen sowie ein Nachweis des ED-Weges *in vivo* lagen nicht vor. Für anaerobe hyperthermophile Archaea wurden modifizierte EM-Wege beschrieben. In dem aeroben hyperthermophilen *Pyrobaculum aerophilum* deuten Genomanalysen auf das Vorkommen eines EM-Weges hin. Ein enzymatischer Nachweis dieses Weges lag nicht vor.

In der vorliegenden Arbeit wurde die glycolytischen Abbauwege in dem thermoacidophilen Euryarchaeon *Picrophilus torridus* und dem aeroben hyperthermophilen Crenarchaeon *Pyrobaculum aerophilum* analysiert und als neuartiger ED-Weg in *P. torridus* bzw. EM-Weg in *P. aerophilum* beschrieben.

Der nicht-phosphorylierte Entner-Doudoroff-Weg (npED) in *Picrophilus torridus*

Die Beteiligung eines ED-Weges *in vivo* wurde durch Wachstum von *P. torridus* mit spezifisch markierter ^{13}C -Glucose und anschließender NMR-spektroskopischer Analyse des Alanins, einer von Pyruvat abgeleiteten Aminosäure im Zellprotein, nachgewiesen. Die Verteilung der Markierung im Alanin zeigte ausschließlich das für den ED-Weg typische Muster; C_1 und C_3 positionsmarkierte Glucose führte ausschließlich zu einer C_1 bzw. C_3 Markierung des Alanins.

In Extrakten Glucose gewachsener Zellen konnten alle Enzyme eines npED-Weges nachgewiesen werden: Glucose Dehydrogenase, Gluconate Dehydratase (GAD), KDG-Aldolase, Glycerinaldehyd Dehydrogenase (GADH), Glycerat Kinase (GCK), Enolase und Pyruvat Kinase. Eine signifikante KDPG-Aldolase und KDG-Kinase Aktivität, wie sie für einen spED-Weg postuliert ist, konnte nicht nachgewiesen werden. Die Schlüsselenzyme des npED-Weges, GAD, KDG-Aldolase, GADH und GCK wurden gereinigt, charakterisiert sowie die kodierenden Gene identifiziert und phylogenetisch analysiert.

Die **Gluconat Dehydratase** ist ein 330 kDa Oktamer. Das Enzym, welches durch Pto0485 kodiert wird, katalysiert die Umwandlung von Gluconat zu KDG. Das Enzym zeigte biochemische und phylogenetische Ähnlichkeit zu der Gluconat Dehydratase von *S. solfataricus*.

Die **KDG-Aldolase** ist ein 120 kDa Homotetramer. Das Enzym, welches durch Pto1279a kodiert wird, katalysiert die reversible Umsetzung von KDG zu Glycerinaldehyd und Pyruvat. Die

Aldolase zeigte eine hohe Spezifität für KDG; KDPG wurde nur mit äußerst niedriger katalytischer Effizienz umgesetzt. Dies unterscheidet die KDG-Aldolase von *P. torridus* von der bifunktionellen KD(P)G-Aldolase von *Sulfolobus*, die sowohl KDPG als auch KDG mit hohen Raten umsetzt. Die ungewöhnliche Substratspezifität für KDG sowie phylogenetischen Analysen charakterisieren das Enzym aus *P. torridus* als neuartige KDG spezifische Aldolase.

Die **Glycerinaldehyd Dehydrogenase** (GADH) ist ein 120 kDa Homodimer. Das Enzym, welches durch Pto0332 kodiert wird, katalysiert die Oxidation von Glycerinaldehyd zu Glycerat mit NADP⁺ als Cofaktor. Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Glycolaldehyd wurden mit signifikant geringeren Effizienzen umgesetzt. Das GADH Homolog aus *T. acidophilum*, Ta0809, wurde identifiziert und nach heterologer Expression des Proteins als GADH charakterisiert. Phylogenetische Analysen deuten darauf hin, dass diese euryarchaeellen GADHs eine eigenständige Familie innerhalb der Aldehyd Dehydrogenase (ALDH)-Superfamilie repräsentieren.

Die **Glycerat Kinase** ist ein 95 kDa Homodimer. Das Enzym, welches durch Pto1442 kodiert wird, katalysiert die ATP-abhängige Phosphorylierung von Glycerat spezifisch zu 2-Phosphoglycerat. Homologe dieser ersten archaeellen GCK mit glycolytischer Funktion fanden sich auch in den Genomen von *Thermoplasma* und *Sulfolobus*.

Die Daten zeigen, dass *P. torridus* Glucose über einen npED-Weg mit einer neuartigen KDG spezifischen Aldolase und Glycerinaldehyd Dehydrogenase als Schlüsselenzyme abbaut. Dies ist die erste detaillierte Beschreibung eines funktionellen npED-Weges, der sich von dem postulierten verzweigten ED-Weg der Crenarchaeota, wie *Sulfolobus* Spezies, deutlich unterscheidet.

Der modifizierte Embden-Meyerhof-Weg (EM) in *Pyrobaculum aerophilum*

In Extrakten Maltose-gewachsener Zellen des aeroben Crenarchaeons *P. aerophilum* konnten alle Enzyme eines modifizierten EM-Weges nachgewiesen werden: ATP-abhängige Glucokinase, Glucose-6-Phosphat-Isomerase, ATP-abhängige Phosphofruktokinase, Fructose-1,6-Bisphosphat-Aldolase, Triosephosphat-Isomerase, Glycerinaldehyd-3-Phosphat: Ferredoxin-Oxidoreduktase (GAPOR), 3-Phosphoglycerat-Mutase, Enolase und Pyruvat-Kinase. Schlüsselenzyme von ED-Wegen (KD(P)G-Aldolase, Gluconat Dehydratase) waren in *P. aerophilum* nicht nachweisbar.

Das Schlüsselenzym des modifizierten EM-Weges, eine durch Maltose induzierbare GAPOR, wurde gereinigt, charakterisiert, das kodierende Gen identifiziert und phylogenetisch untersucht. Diese GAPOR aus einem aeroben Organismus zeigte biochemische und phylogenetische Ähnlichkeiten zu den homologen Enzymen aus strikt anaeroben hyperthermophilen Archaea.

Dies ist der erste Nachweis eines modifizierten EM-Weges in einem aeroben Archaeon mit einer funktionellen GAPOR als Schlüsselenzym.

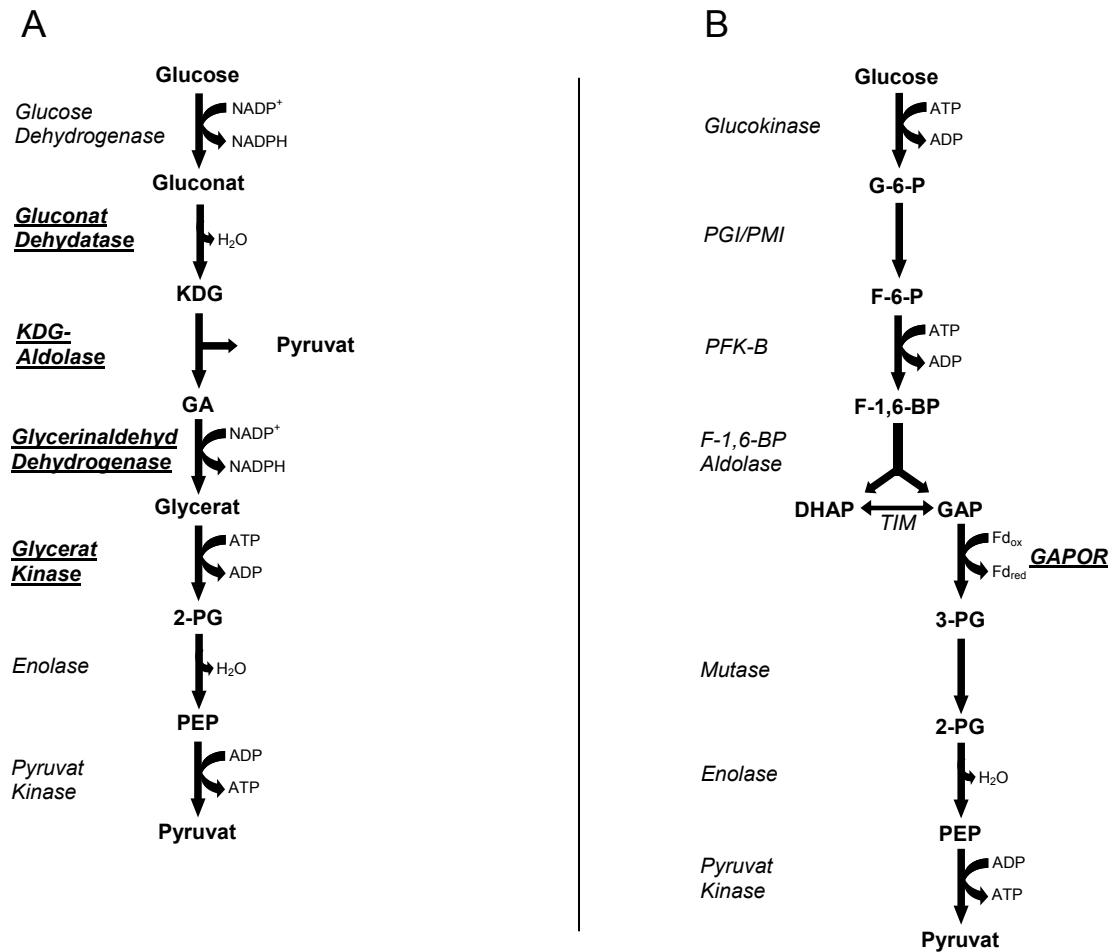


Abbildung 1: A Der postulierte nicht-phosphorylierte Entner-Doudoroff-Weg in *Picrophilus torridus*. **B:** Der modifizierte Embden-Meyerhof-Weg mit einer GAPOR als Schlüsselenzym in *Pyrobaculum aerophilum*. Abkürzungen: KDG; 2-Keto-3-Deoxygluconat; KDPG; 2-Keto-3-Deoxyphosphogluconat; GA: Glycerinaldehyd; GAP: Glycerinaldehyd-3-Phosphat, G-6-P: Glucose-6-Phosphat, F-6-P: Fructose-6-Phosphat; F-1,6-BP: Fructose-1,6-Bisphosphat, DHAP: Dihydroxyacetonphosphat, 3-PG: 3-Phosphogluconat; 2-PG: 2-Phosphogluconat; PEP: Phosphoenolpyruvat, GAPOR: GAP: Ferredoxin Oxidoreduktase, Enzyme siehe Text. Die in dieser Studie näher Untersuchten Enzyme sind unterstrichen.

2 Summary

Comparative studies on central carbohydrate metabolism revealed that Archaea utilize glucose and glucose polymers via modifications of the classical Embden-Meyerhof (EM) and Entner-Doudoroff (ED) pathways of Bacteria and Eucarya. Modified ED pathways have been postulated primarily for aerobic Archaea. In the aerobic thermoacidophilic crenarchaeon *Sulfolobus* glucose is metabolized via a branched ED pathway, involving both a non-phosphorylative branch (npED) with 2-keto-3-deoxygluconate (KDG), and a semi-phosphorylative branch (spED) with 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate (KDPG) as intermediates. The key enzyme of this pathway, a bifunctional aldolase, catalyzes the cleavage of both KDG and KDPG at high rate. The glycolytic pathways in thermoacidophilic euryarchaeota, e.g. *Picrophilus torridus* and *Thermoplasma acidophilum*, have not been studied in detail. The presence of glucose dehydrogenase in both organisms indicates that glucose could be metabolized via the ED pathway. So far, detailed enzymological studies as well as demonstration of the ED pathway *in vivo* have not been described. In anaerobic hyperthermophilic Archaea the operation of modified EM pathways have been described. Genomics-based analysis indicates the operation of a modified EM pathway in the aerobic hyperthermophilic *Pyrobaculum aerophilum*. However, this pathway has not been analyzed by enzymological studies. In this study the pathway of glucose degradation in the thermoacidophilic euryarchaeon *Picrophilus torridus* and in the aerobic hyperthermophilic crenarchaeon *Pyrobaculum aerophilum* is analyzed. A novel modified ED pathway and modified EM pathway are described in *P. torridus* and in *P. aerophilum*, respectively.

Non-phosphorylative Entner-Doudoroff pathway (npED) in *Picrophilus torridus*

The operation of an ED pathway *in vivo* is demonstrated by growth of *P. torridus* with specific labelled ^{13}C -glucose following analysis of the distribution of labelled alanine formed from pyruvate in cell protein by NMR spectroscopy. Addition of 1- ^{13}C -glucose or 3- ^{13}C -glucose to the growth media resulted only in the formation of C₁ and C₃ alanine, respectively. These labelling patterns showed that glucose is utilized exclusively by the ED pathway. Cell extracts of *P. torridus* grown on glucose contain all enzyme activities of an npED pathway: glucose dehydrogenase, gluconate dehydratase (GAD), KDG-aldolase, glyceraldehyde dehydrogenase (GADH), glycerate kinase (GCK), enolase and pyruvate kinase. No significant activity of KDPG aldolase and KDG kinase involved in spED pathway could be detected. Key enzymes of npED pathway (GAD, KDG aldolase, GADH and GCK) were purified, characterized and the respective encoding genes were identified and studied by phylogenetic analysis.

Gluconate dehydratase, a 330-kDa octameric enzyme, catalyzes the conversion of gluconate to KDG. ORF Pto0485 was identified as encoding gene. Gluconate dehydratase from *P. torridus* showed biochemical and phylogenetic similarity to that from *S. solfataricus*.

KDG aldolase, a 120-kDa homotetrameric enzyme, catalyzes the reversible cleavage of KDG to glyceraldehyde and pyruvate. ORF Pto1279a was identified as encoding gene. This enzyme showed a high specificity for KDG, KDPG being cleaved at extremely low catalytic efficiency. In contrast to KDG aldolase from *P. torridus*, the bifunctional KDPG/KDG aldolase from *Sulfolobus* has been proposed to be operative in both KDG and KDPG cleavage at high rate. Based on the unusual substrate specificity for KDG and phylogenetic analysis, the KDG specific aldolase is proposed to be a novel type of aldolase.

Glyceraldehyde dehydrogenase (GADH), a 120-kDa homodimeric protein, catalyzes the oxidation of glyceraldehyde to glycerate, using NADP^+ as a cofactor. ORF Pto0332 was identified as encoding gene. Glyceraldehyde-3-phosphate and glycolaldehyde were accepted as substrates at significant low catalytic efficiency. A GADH homolog from *T. acidophilum* was identified, the gene was expressed and the recombinant protein was characterized as GADH. The phylogenetic analysis defined these euryarchaeal GADHs as members of a novel enzyme family within the aldehyde dehydrogenase (ALDH) superfamily.

Glycerate kinase, a 95-kDa homodimeric protein, catalyzes the ATP dependent phosphorylation of glycerate specifically to 2- phosphoglycerate (2-PG). ORF Pto1442 was identified as encoding gene. The first archaeal glycerate kinase homologs showing glycolytical function were identified in the genomes of the archaea *Thermoplasma* and *Sulfolobus*.

The data presented indicate that in *P. torridus* glucose is degraded via an npED pathway involving a novel type of a KDG specific aldolase and Glyceraldehyde dehydrogenase as key enzymes. This is the first detailed description of the npED pathway, which is clearly distinguishes from the branched ED pathway proposed for the crenarchaeon *Sulfolobus*.

Modified Embden-Meyerhof pathway (EM) in *Pyrobaculum aerophilum*

Cell extracts of the aerobic crenarchaeon *Pyrobaculum aerophilum*, grown on maltose, contained all enzyme activities of a modified EM pathway, including ATP dependent glucokinase, glucose-6-phosphate isomerase, ATP dependent 6-phosphofructokinase, fructose-1,6-phosphate aldolase, triosephosphate isomerase, glyceraldehyde-3-phosphate: ferredoxin oxidoreductase (GAPOR), 3-phosphoglycerate mutase, enolase and pyruvate kinase. Key enzymes of ED pathway, KD(P)G aldolase, gluconate dehydrogenase could not be detected. A key enzyme of modified EM pathway, GAPOR induced by maltose, was purified and characterized. The encoding gene was identified and studied by phylogenetic analysis. *P. aerophilum* GAPOR showed biochemical and phylogenetic similarity to enzymes from strictly anaerobic hyperthermophilic Archaea.

This is the first evidence of a modified EM pathway in aerobic Archaea with a functional GAPOR as key enzyme.

3 Einleitung

Archaea bilden aufgrund ihrer Stellung im phylogenetischen Stammbaum, der auf Sequenzvergleiche der 16S-rRNA bzw. 18S-rRNA basiert, eine eigenständige Domäne des Lebens (Woese 1987; Woese *et al.* 1990). Gestützt wird diese separate Klassifizierung gegenüber den Bacteria und Eukarya durch eine Reihe von biochemischen und strukturellen Merkmalen. Morphologisch sind Archaea und Bacteria ähnlich, indem sie einen prokaryotischen Zellaufbau ohne Zellkern und Organellen haben. Die Archaea unterscheiden sich von den Bacteria in der Art des Zellwandaufbaus und der Cytoplasmamembran. Die archaeelle Zellwand enthält weder Muraminsäure noch D-Aminosäuren und kann Proteine, Pseudomurein, Polysaccharide oder auch Methanochondroitin enthalten (Kandler und König 1998). Die Plasmamembran besteht anstelle von Glycerinestern aus Di- oder Tetraetherlipiden (Langworthy und Pond 1986; De Rosa und Gambacorta 1988). Einige Charakteristika der Archaea ähneln denen der Eukarya, wie z.B. der Transkriptionsmodus (Thomm 1996) sowie das Vorhandensein von Histonproteinen (Sandman und Reeve 2001) und das Vorkommen von Introns in tRNAs (Kaine *et al.* 1983).

Die Domäne der Archaea gliedert sich in vier Phyla: Crenarchaeota, Euryarchaeota, das kürzlich etablierte Phylum Nanoarchaeota und Korarchaeota (Barns *et al.* 1996; Huber *et al.* 2002; Woese *et al.* 1990). Die Kenntnisse über das Phylum der Korarchaeota beschränken sich auf 16S-rDNA-Sequenzen, die aus Umweltproben heißer Quellen erhalten wurden (Barns *et al.* 1996). *Nanoarchaeum equitans* ist der erste Vertreter der Nanoarchaeota und wurde aus heißen Gesteinsproben bei Island isoliert (Huber *et al.* 2002). Innerhalb der Crenarchaeota sind bisher die drei Ordnungen *Desulfurococcales*, *Sulfolobales* und *Thermoproteales* beschrieben, die zum großen Teil hyperthermophile Spezies umfassen (Burggraf *et al.* 1997). Die Euryarchaeota sind hingegen in Bezug auf Wachstumstemperatur, Lebensraum und Physiologie sehr vielfältig. Neben mesophilen Organismen, zu denen Methanogene und extrem halophile Organismen gehören, sind thermophile und hyperthermophile Organismen der Ordnungen *Thermoplasmatales*, *Archaeoglobales* und *Thermococcales* zu finden (Woese und Olsen 1986; Woese 1987).

Der Nachweis archaeeller 16S-rRNA Gene in Umweltproben deutet auf ein ubiquitäres Vorkommen der Archaea in der Biosphäre hin (Valentine 2007). Jedoch sind viele der bisher kultivierbaren Archaea vor allem aus extremen Standorten mit hohen Salzkonzentrationen,

hohen Temperaturen oder extremen pH-Werten isoliert worden. Hypersaline Biotope sind natürliche Salzlaken und Seen wie das Tote Meer, aber auch anthropogene Standorte wie Salzgewinnungsanlagen oder stark gesalzene Lebensmittel. Die Lebensräume der an hohe Temperaturen angepassten Archaea sind meist in vulkanisch aktiven Zonen zu finden, vor allem in marinen Hydrothermalquellen, submarin erhitzten Sedimenten und terrestrischen Solfataren. Hyperthermophile Organismen zeichnen sich durch ein Wachstumsoptimum von über 80°C und einem Maximum von bis zu 113°C aus (Stetter 1999; Stetter 2006). Aus der Domäne der Bacteria sind nur wenige Hyperthermophile bekannt, die den *Aquificales* und *Thermotogales* angehören (Huber et al. 1992; Blöchl et al. 1995). Die bisher kultivierten hyperthermophilen Spezies sind überwiegend Anearobier, da die Biotope der Hyperthermophilen meist anoxisch oder sauerstoffarm sind. Jedoch sind die geothermal erhitzten Biotope reich an Wasserstoff, Kohlendioxid, Schwefel und Schwefelverbindungen. Deshalb sind chemolithoautotrophe Stoffwechselformen weit verbreitet. Zu ihnen gehören die Reduktion von Schwefel zu H₂S (dissimilatorische Schwefelreduktion, z.B. *Pyrodictium*), die Reduktion von CO₂ zu CH₄ (Methanogenese, z.B. *Methanococcus*) und die Reduktion von Nitrat zu N₂ (Denitrifikation, *Pyrobaculum*) (Danson 1988; Wächtershäuser 1992; Schönheit und Schäfer 1995; Stetter 1996). Neben der Nitratreduktion ist *P. aerophilum* auch zu einer aeroben Atmung mit Sauerstoff befähigt. *P. aerophilum* ist mikroaerophil (optimal 1%, maximal 5% Sauerstoff) und heterotroph und kann komplexe organische Substanzen, unter anderem Hefeextrakt, Pepton, Propionat, Acetat und Maltose, verwerten (Gebhard 2002). Das stäbchenförmige Crenarchaeon wurde 1993 aus einer marinen heißen Quelle in Ischia, Italien isoliert und hat ein Wachstumsoptimum von 100°C (Völkl et al. 1993).

Saure Standorte, wie etwa terrestrische Solfataren sind u.a. in vulkanisch aktiven Zonen zu finden oder sind, wie Kohlehalden anthropogenen Ursprungs (Johnson 1998). Solfataren sind postvulkanische Dampfaustrittsstellen (Exhalationen), die reich an Schwefelverbindungen wie Schwefelwasserstoff sind. Durch Oxidation des Schwefelwasserstoffs – entweder spontan oder durch Schwefel-oxidierende Bacteria – entsteht Schwefelsäure, welche die Umgebung der Solfataren ansäuert (bis pH 0) (Schleper et al. 1995a). Aus solchen Habitaten isolierte Organismen sind meist extrem acidophil, d.h. ihr Wachstum ist optimal bei einem pH-Wert von < 3 (Johnson 1998). Viele extrem acidophile Archaea sind obligate Aerobier und heterotroph (Johnson 1998; Norris und Johnson 1998). Ein fermentativer Stoffwechsel unter Bildung von Acetat oder Laktat kommt bei extrem Acidophilen nicht vor, was u.a. vermutlich auf die Hemmung der ATP-Synthese durch hohe Konzentration organischer Säuren zurückzuführen ist (Baker-Austin und Dopson 2007; Ciaramella et al. 2005). Innerhalb der

Archaea sind acidophile Spezies sowohl bei den Euryarchaeota der Ordnung *Thermoplasmatales* als auch bei den Crenarchaeota der Ordnung *Sulfolobales* zu finden. Die Organismen der Gattung *Sulfolobus* sind aerob, chemoorgano- und chemolithotroph und zeigen ein Temperaturoptimum von 75°C bis 85°C und pH-Optima von 2-3 (Brock *et al.* 1972; Zillig *et al.* 1980; Segerer und Stetter 1992b). Die thermophilen Vertreter der euryarchaeellen *Thermoplasmatales* haben ein Temperaturoptimum von etwa 60°C und werden zwei Familien zugeordnet: den zellwandlosen *Thermoplasmataceae* und den *Picrophiliaceae*. *Thermoplasma acidophilum* vermag bei pH-Werten zwischen 0,8 und 4 mit einem Optimum von 1-2 zu wachsen (Darland *et al.* 1970). Das pH-Optimum von *T. volcanium* liegt bei pH 2 (Segerer *et al.* 1988). Das niedrigste pH-Optimum aller Organismen haben die beiden moderat thermophilen Euryarchaeota der Gattung *Picrophilus*: *P. oshimae* und *P. torridus*. *Picrophilus* hat ein pH-Optimum von pH 0,7 und ist in der Lage bei pH -0,06 zu wachsen (Schleper *et al.* 1995b; Schleper *et al.* 1995a). Eine Besonderheit von *Picrophilus* ist der ungewöhnlich geringe intrazelluläre pH-Wert von 4,6 (van, Vossenberg *et al.* 1998). Bei anderen obligaten Acidophilen wie *Sulfolobus* und *Thermoplasma*, die ein pH-Optimum von etwa 2 haben, ist der intrazelluläre pH-Wert nahezu neutral (Schäfer 1996; Searcy 1976). Für einige acidophile Archaea wie *Sulfolobus solfataricus*, *S. acidocaldarius*, *Thermoplasma acidophilum* und *Picrophilus torridus* konnte Wachstum auf Peptiden und Kohlenhydraten gezeigt werden (Grogan 1989; Schleper *et al.* 1995a; Schleper *et al.* 1996; Segerer und Stetter 1992a). Im Gegensatz zu *Sulfolobus* ist das Wachstum von *P. torridus* und *T. acidophilum* abhängig von Komplexbestandteilen wie Hefeextrakt oder Trypton. Glucose stimuliert das Wachstum von *P. torridus* und *T. acidophilum*, wobei die Stimulierbarkeit durch Glucose bei *T. acidophilum* nur bei sehr geringen Hefeextraktkonzentrationen beobachtet wurde (Brock 1978; Segerer und Stetter 1992a). Hingegen zeigt *S. acidocaldarius* Wachstum in Minimalmedium mit Glucose als einziger Energie- und Kohlenstoffquelle (Kardinahl *et al.* 1999).

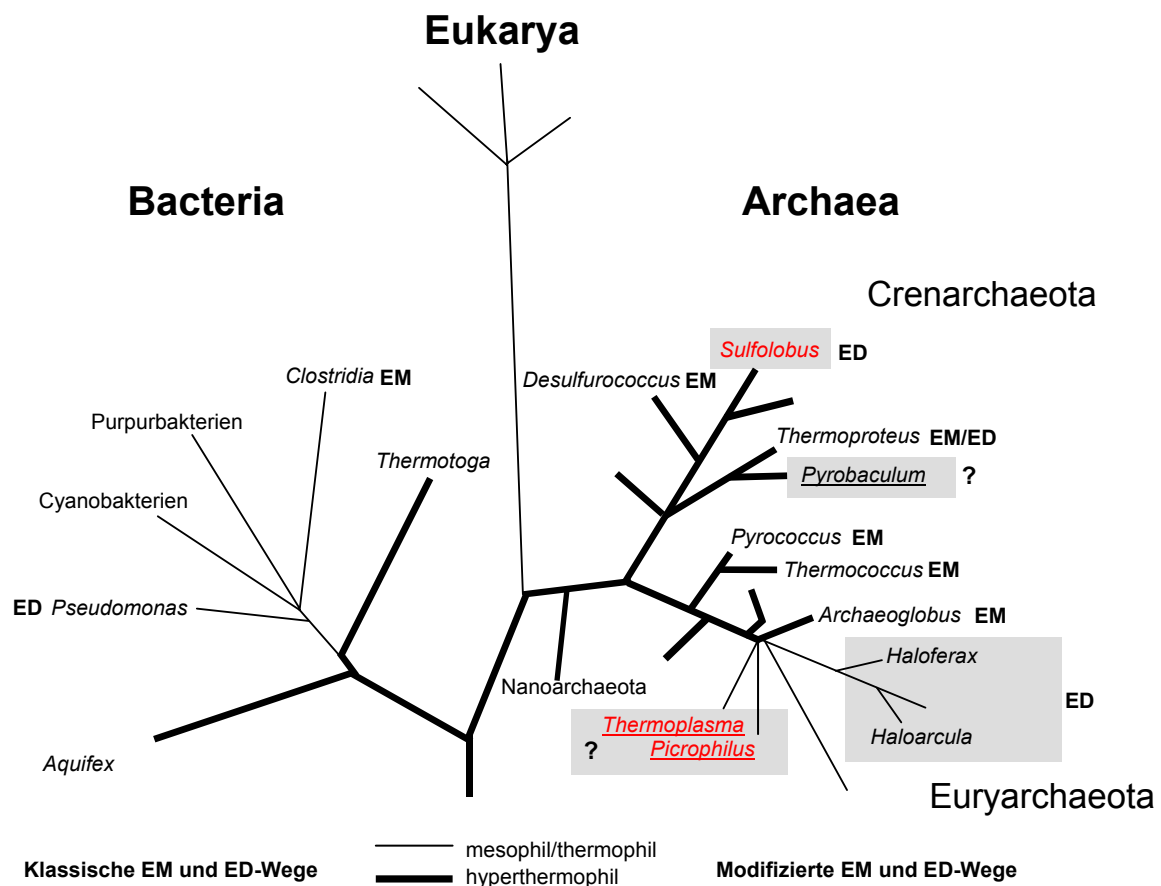


Abbildung 2: Einordnung von saccharolytischen thermoacidophilen und halophilen Archaea sowie von hyperthermophilen Mikroorganismen in den phylogenetischen Stammbaum. Verzweigungsgrad und Verzweigungslängen basieren auf rRNA-Sequenzvergleichen (schematisch nach (Stetter 1993; Woese *et al.* 1990; Barns *et al.* 1996; Huber *et al.* 2002) modifiziert). Thermoacidophile Archaea sind rot gedruckt. Aerobe Archaea sind grau hinterlegt. Hyperthermophile Organismen der Domänen Bacteria und Archaea sind durch dicke Linien dargestellt. Abkürzungen: ED, Entner-Doudoroff; EM, Embden-Meyerhof.

Neben den acidophilen Spezies sind eine Vielzahl von Archaea in der Lage Zucker und Zuckerpolymere umzusetzen. Vergleichende Analysen des Zuckerstoffwechsels zeigen, dass Archaea Glucose nicht über die klassischen glycolytischen Abbauwege wie Embden-Meyerhof (EM) und Entner-Doudoroff (ED)-Wege abbauen, sondern modifizierte Wege nutzen (Siebers und Schönheit 2005). Im klassischen EM-Weg wird die Umsetzung von Glucose zu Fructose-1,6-Bisphosphat (FBP), dem zentralen Intermediat dieses Weges, durch eine ATP-abhängige Glucokinase oder Hexokinase, Phosphoglucose Isomerase und eine allosterische ATP-abhängige Phosphofruktokinase katalysiert. Die Spaltung von FBP zu Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) durch eine FBP-Aldolase und die anschließende Isomerisierung des DHAP führt zur Bildung von zwei Molekülen GAP, die zu 3-Phosphoglycerat oxidiert werden. Hierbei wird GAP durch eine

phosphorylierende GAPDH zunächst zu 1,3-Bisphosphoglycerat umgesetzt und anschließend dephosphoryliert, wobei ATP durch Substratstufenphosphorylierung gebildet wird. Diese Reaktion wird durch eine Phosphoglycerat-Kinase katalysiert. Das gebildete 3-Phosphoglycerat wird unter Beteiligung einer Phosphoglycerat Mutase und Enolase zu Phosphoenolpyruvat (PEP) umgesetzt. Die Bildung von Pyruvat aus PEP wird durch eine allosterisch regulierte Pyruvat Kinase katalysiert, wobei ein ATP durch Substratstufenphosphorylierung entsteht. Die Netto-ATP Ausbeute dieses Weges beträgt 2 mol ATP je mol Glucose. Für viele anaerobe hyperthermophile Archaea ist ein Glucoseabbau über modifizierte Embden-Meyerhof Wege beschrieben. Die Modifikationen beziehen sich z.B. auf das Vorkommen ungewöhnlicher Glucokinasen (GLK), Phosphofruktokinasen (PFK) und neuartiger Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP) oxidierender Enzyme sowie nicht allosterischer Pyruvat Kinasen (Abbildung 3) (Siebers und Schönheit 2005). Anstelle der klassischen ATP-abhängigen GLK und Hexokinasen der Bacteria und Eukarya verwenden die Euryarchaeota *Pyrococcus*, *Thermococcus* und *Archaeoglobus* ADP-abhängige Enzyme, die neuartigen Enzymfamilien zugeordnet werden (Kengen *et al.* 2001; Siebers und Schönheit 2005). In den Crenarchaeota *Desulfurococcus amylolyticus* und *Thermoproteus tenax* sind ATP-abhängige Kinasen beschrieben, die in die ROK-Familie eingeordnet wurden, die Repressorproteine, offene Leserahmen mit unbekannter Funktion und Zuckerkinasen einschließt (Siebers und Schönheit 2005). Die Phosphorylierung von Fructose-6-Phosphat zu Fructose-1,6-bisphosphat wird in Archaea von verschiedenen PFKs katalysiert, die sich in ihrem Phosphorylgruppendonator unterscheiden. Während in *Pyrococcus*, *Thermococcus* und *Archaeoglobus* ADP-abhängige PFKs vorkommen, ist die PFK von *T. tenax* Pyrophosphat abhängig. ATP-abhängige PFK sind für die Crenarchaeota *Desulfurococcus* und *Aeropyrum pernix* beschrieben. Im Gegensatz zu den ATP-abhängigen PFKs aus Bacteria und Eukarya, die der PFK-A-Familie zugeordnet sind, gehören die ATP-abhängigen PFKs der Archaea in die PFK-B-Familie und zeigen keine allosterische Regulation (Siebers und Schönheit 2005).

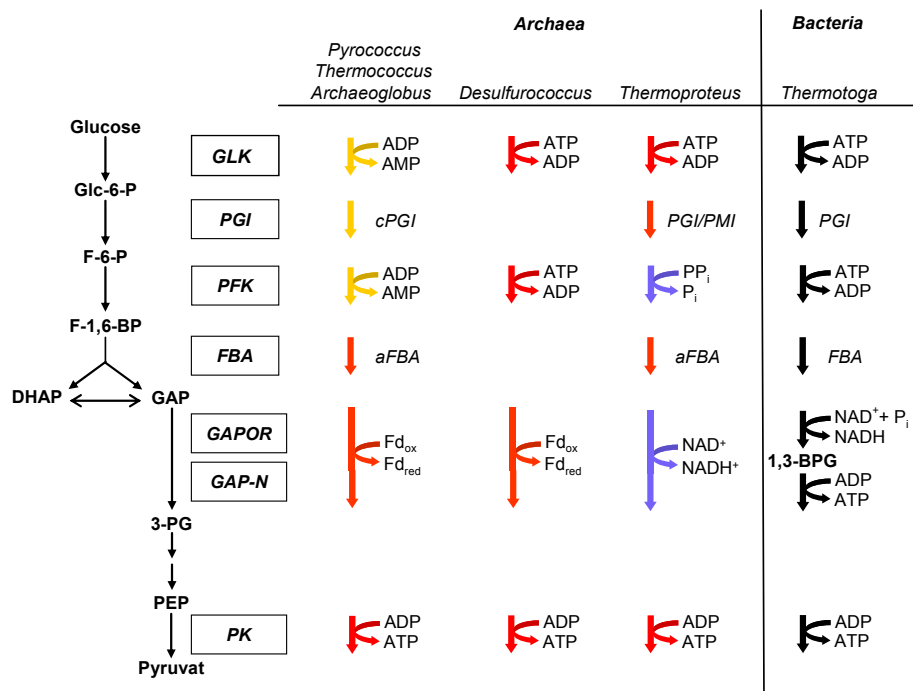


Abbildung 3: Vergleichende Darstellung der Enzyme des Glucoseabbaus der modifizierten Embden-Meyerhof-Wege in verschiedenen hyperthermophilen Archaea und des klassischen Embden-Meyerhof-Weges in dem hyperthermophilen Bakterium *Thermotoga maritima*. Abkürzungen: Glc-6-P = Glucose-6-Phosphat, F-6-P = Fructose-6-Phosphat, F-1,6-BP = Fructose-1,6-Bisphosphat, FBA = F-1,6-BP-Aldolase, aFBA = archaeelle FBA, DHAP = Dihydroxyacetonphosphat, GAP = Glycerinaldehyd-3-Phosphat, 3-PG = 3-Phosphoglycerat, 2-PG = 2-Phosphoglycerat, 1,3-BPG = 1,3-Bisphosphoglycerat, PGI = Phosphoglucose-Isomerase, cPGI = Cupin PGI, PEP = Phosphoenolpyruvat, PMI = Phosphomannose Isomerase, GAPOR = GAP: Ferredoxin Oxidoreduktase, GAP-N = nicht-phosphorylierende GAP Dehydrogenase, GLK = Glucokinase, PFK = 6-Phosphofruktokinase, PK = Pyruvat Kinase, Fd = Ferredoxin, ox = oxidiert, red = reduziert.

Für die Oxidation von Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) zu 3-Phosphoglycerat wurden in Archaea zwei ungewöhnliche Enzyme, eine GAP: Ferredoxin-Oxidoreduktase (GAPOR) und eine nicht-phosphorylierende GAP-DH (GAP-N) beschrieben. Beide Enzyme katalysieren die irreversible, nicht-phosphorylierende Oxidation von GAP zu 3-Phosphoglycerat mit entweder Ferredoxin oder NAD(P)⁺ als Elektronenakzeptor. Diese Enzyme ersetzen die beiden klassischen Enzyme der GAP-Oxidation, die phosphorylierende GAPDH und die Phosphoglycerat Kinase (Siebers und Schönheit 2005). Bisher wurden die GAPOR aus dem anaeroben hyperthermophilen Euryarchaeon *Pyrococcus furiosus* gereinigt und charakterisiert (Mukund und Adams 1995; Mukund und Adams 1996; van der Oost *et al.* 1998; Hagedoorn *et al.* 1999). GAPOR gehört zu einer ungewöhnlichen Familie von Oxidoreduktasen, die durch einen Wolfram-Cofaktor im katalytischen Zentrum und einen [4Fe-4S]-Cluster charakterisiert sind. Die Umsetzung von GAP zu 3-Phosphoglycerat durch die nicht-phosphorylierende GAP-DH (GAP-N) wurde detailliert in *Thermoproteus tenax* untersucht

(Brunner und Hensel 2001). GAP-N wird der Aldehyd Dehydrogenase Superfamilie zugeordnet und unterscheidet sich phylogenetisch signifikant von den klassischen phosphorylierenden GAPDHs. Pyruvat Kinasen aus Archaea zeigen im Gegensatz zu ihren bakteriellen Homologen eingeschränkte regulatorische Eigenschaften. Klassische heterotrope allosterische Effektoren von Pyruvat Kinasen aus Bacteria und Eukarya haben keinen Einfluss auf die Aktivität der archaeellen Pyruvat Kinasen (Johnsen et al. 2003). Die Abwesenheit von allosterischen Phosphofruktokinasen und Pyruvat Kinasen zeigt, dass die archaeellen Wege im Bezug auf die Regulation über keinen allosterischen Kontrollpunkt verfügen. Auch die PGI der Archaea unterscheiden sich von ihren bakteriellen und eukaryotischen Homologen. So wurden neuartige metallabhängige Phosphoglucose Isomerasen (PGI) der Cupinsuperfamilie in *Thermococcales* beschrieben (Siebers und Schönheit 2005). Die PGI aus *A. pernix* und *P. aerophilum* gehören zu der bifunktionellen PGI/Phosphomannose-Isomerase (PMI)-Familie. Diese Familie unterscheidet sich von den klassischen PGIs aus Bacteria durch eine ungewöhnliche Substratspezifität, indem sie sowohl Glucose-6-Phosphat als auch Mannose-6-Phosphat zu Fructose-6-Phosphat isomerisieren (Hansen et al. 2004b). Eine weitere Besonderheit der archaeellen EM-Wege ist das Vorkommen von archaeellen Klasse-I-Aldolasen, die sich phylogenetisch von den klassischen Fructose-1,6-Bisphosphat Aldolasen unterscheiden (Siebers et al. 2001; Lorentzen et al. 2005). Es wurde postuliert, dass die Modifikationen der Glucoseabbauwege in Archaea eine Anpassung an die meist hyperthermophile Lebensweise dieser Organismen ist. Dies konnte ausgeschlossen werden, da im hyperthermophilen Bakterium *Thermotoga maritima* Glucose über den klassischen Embden-Meyerhof Weg abgebaut wird (De Vos et al. 1998; Selig et al. 1997). Dieser enthält eine klassische Glucokinase und eine ATP-abhängige PFK. Glycerinaldehyd-3-phosphat wird durch die klassischen Enzyme Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase und Phosphoglycerat Kinase zu 3-Phosphoglycerat umgesetzt. Das Vorkommen des klassischen Weges in diesem hyperthermophilen Bakterium spricht dafür, dass die Modifikationen in den Zuckerabbauwegen der Archaea nicht auf eine Anpassung an die Hyperthermophilie zurückzuführen sind, sondern wahrscheinlich phylogenetische Gründe haben (Selig et al. 1997; Schönheit 2008).

Im Gegensatz zu anaeroben Archaea, die Glucose über modifizierte EM-Wege abbauen, wurden für aerobe Archaea modifizierte Entner-Doudoroff-Wege postuliert (Siebers und Schönheit 2005). Diese sind bisher wenig untersucht und werden kontrovers diskutiert. Im klassischen ED-Weg der aeroben Bacteria, z.B. *Pseudomonas*, wird die Umsetzung von Glucose zu 2-Keto-3-Deoxy-6-Phosphogluconat (KDPG), dem zentralen Intermediat dieses

Weges, durch eine ATP-abhängige Glucokinase, Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase und 6-Phosphogluconat Dehydratase katalysiert. Anschließend wird KDPG durch eine KDPG-Aldolase in Pyruvat und GAP gespalten. Die weitere Umsetzung von GAP zu Pyruvat erfolgt durch die Enzyme des EM-Weges, wobei ein mol ATP je mol Glucose gebildet wird. Für aerobe halophile Archaea wurde anhand von ^{13}C -Markierungsexperimenten, Enzymanalysen sowie DNA-Mikroarray-Experimenten ein modifizierter semiphosphorylierter ED-Weg (spED) des Glucoseabbaus postuliert (Johnsen *et al.* 2001; Siebers und Schönheit 2005; Zaigler *et al.* 2003). Entsprechend wird Glucose zu Gluconat oxidiert und zu 2-Keto-3-Deoxygluconat (KDG) umgesetzt. Durch eine KDG-Kinase wird KDG zu KDPG phosphoryliert. Die Spaltung des KDPG zu Pyruvat und GAP sowie die weitere Umsetzung des GAP erfolgt analog zum klassischen ED-Weg über eine KDPG-Aldolase, GAPDH, Phosphoglycerat-Kinase, Mutase, Enolase und Pyruvat Kinase. Ähnlich den Schlüsselenzymen des klassischen ED-Weges wird die Expression der KDG-Kinase, KDPG-Aldolase, GAPDH und Phosphoglycerat-Kinase bei Wachstum auf Glucose induziert (Zaigler *et al.* 2003).

Für das aerobe thermoacidophile Crenarchaeon *Sulfolobus* wurde aufgrund von Enzymanalysen, dem Nachweis von Intermediaten und ^{13}C -Markierungsexperimenten zunächst ein nicht-phosphorylierter ED-Weg (npED) postuliert (De Rosa *et al.* 1984; Selig *et al.* 1997; Bartels 1989). Entsprechend wird Glucose durch eine Dehydrogenase zu Gluconat oxidiert und über eine Gluconat Dehydratase zu KDG umgesetzt. Anschließend wird KDG durch eine KDG-Aldolase zu Glycerinaldehyd und Pyruvat gespalten. Glycerinaldehyd wird durch eine Oxidoreduktase zu Glycerat oxidiert und mit einer spezifischen Kinase zu 2-Phosphoglycerat phosphoryliert. Die weitere Umsetzung zu Pyruvat erfolgt über Enolase und Pyruvat Kinase. Einige Schlüsselenzyme dieses Weges, die Glucose Dehydrogenase, Gluconat Dehydratase (GAD), KDG-Aldolase (KDGA), Glycerinaldehyd Oxidoreduktase (GA:OR) wurden gereinigt, charakterisiert und die kodierenden Gene identifiziert (Lamble *et al.* 2004; Buchanan *et al.* 1999; Kardinahl *et al.* 1999; Giardina *et al.* 1986). Kürzlich wurde basierend auf Genomanalysen gefunden, dass einige Enzyme des ED-Weges in einem Gencluster vorkommen (Ahmed *et al.* 2005). Dieser Cluster enthält Gene einer GAD (*gad*), KDG-Aldolase (*kdgA*), KDG-Kinase (*kdgK*) und nicht-phosphorylierende GAPDH (*gapN*), wobei *gad-kdgA-kdgK* in einem Operon vorliegen. Das Vorkommen von Genen einer KDG-Kinase und GAP-N deutet auf die Beteiligung eines semiphosphorylierten Zweigs hin. Außerdem wurde nach wiederholter Analyse der KDG-Aldolase gefunden, dass dieses Enzym nicht, wie zunächst beschrieben, hoch spezifisch für KDG ist, sondern neben KDG auch

KDPG mit hoher Effizienz umsetzt (Lamble *et al.* 2005). Dieses Enzym wurde daraufhin als bifunktionelle KDPG/KDG-Aldolase bezeichnet. Aufgrund des Vorkommens eines ED-Genclusters mit einer bifunktionellen KDPG/KDG-Aldolase und KDG-Kinase wurde für *Sulfolobus* spez. ein verzweigter ED-Weg postuliert, der einen nicht-phosphorylierten Zweig und einen semiphosphorylierten Zweig umfasst (Ahmed *et al.* 2005; Lamble *et al.* 2005). Entsprechend wird KDG durch eine spezifische Kinase phosphoryliert und das entstandene KDPG durch die bifunktionelle KDPG/KDG-Aldolase zu Pyruvat und GAP gespalten. GAP wird anschließend durch eine GAP-N zu 3-Phosphoglycerat oxidiert, das mit einer Phosphoglycerat Mutase zu 2-Phosphoglycerat und weiter über Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat umgesetzt wird. Die beteiligten Enzyme wurden kürzlich charakterisiert (Ahmed *et al.* 2005; Ettema *et al.* 2008). Unklar ist, in welchem Umfang die beiden Wege *in vivo* beteiligt sind. Proteom- und Transkriptionsanalysen deuten darauf hin, dass, anders als bei Bacteria oder halophilen Archaea, die Schlüsselenzyme dieses ED-Weges keiner signifikanten Regulation bei Wachstum auf Glucose unterliegen (Snijders *et al.* 2006; Ettema *et al.* 2008). Das Vorkommen eines verzweigten ED-Weges wurde auch für das hyperthermophile schwefelabhängige Crenarchaeon *Thermoproteus tenax* beschrieben (Ahmed *et al.* 2004). Dieser Organismus setzt Glucose jedoch vorwiegend über einen EM-Weg (> 80%) und nur zu etwa 20% über einen verzweigten ED-Weg um (Ahmed *et al.* 2005; Siebers und Schönheit 2005; Selig *et al.* 1997).

Während die Umsetzung von Glucose über einen ED-Weg *in vivo* sowie die Enzyme des verzweigten ED-Weges bei thermoacidophilen Crenarchaeota intensiv untersucht wurden, lagen über den Abbau von Glucose bei thermoacidophilen Euryarchaeota wie *Thermoplasma acidophilum* und *Picrophilus torridus* keine detaillierten Untersuchungen vor. Der Nachweis von Aktivitäten einer Glucose Dehydrogenase, Gluconat Dehydratase, Glycerinaldehyd Dehydrogenase und Glycerat Kinase in Zellextrakten von *T. acidophilum* deuten auf das Vorkommen eines nicht-phosphorylierten ED-Weges in diesem Organismus hin (Budgen und Danson 1986). Detaillierte Beschreibungen über die am Glucoseabbau beteiligten Enzyme lagen bis auf die Glucose Dehydrogenase nicht vor (Smith *et al.* 1989; Bright *et al.* 1993). Eine homologe Glucose Dehydrogenase wurde für *P. torridus* beschrieben, was ebenfalls einen ED-Weg in diesem Organismus wahrscheinlich macht (Angelov *et al.* 2005). Ein experimenteller Nachweis eines ED-Weges *in vivo* wurde für thermoacidophile Euryarchaeota bisher nicht erbracht. *P. torridus* zeigt im Vergleich zu *T. acidophilum* ein besseres Wachstum mit Glucose und Hefeextrakt, was insbesondere für biochemische Untersuchungen und ¹³C-Markierungsexperimente von Bedeutung ist. Daher sollte in *P. torridus* -

exemplarisch für thermoacidophilen Euryarchaeota - der ED-Weg detailliert untersucht werden. Diese Untersuchungen umfassten im Einzelnen:

1. den Nachweis eines ED-Weges *in vivo* durch ^{13}C -Markierungsexperimente in wachsenden Kulturen.
2. den Nachweis der Enzyme eines nicht-phosphorylierten ED-Weges durch Enzymuntersuchungen in Zellextrakten von *P. torridus*.
3. die Reinigung von vier Schlüsselenzymen des npED-Weges, die Gluconat Dehydratase, KDG-Aldolase, Glycerinaldehyd Dehydrogenase und Glycerat Kinase sowie deren Charakterisierung. Ferner sollten die kodierenden Gene identifiziert und phylogenetisch analysiert werden.

Für alle bisher untersuchten aeroben Archaea wurde aufgrund von Enzym- und Genomanalysen ein Zuckerabbau über modifizierte ED-Wege postuliert. Überraschenderweise wurden im Genom des aeroben hyperthermophilen Crenarchaeons *Pyrobaculum aerophilum* keine Gene für Schlüsselenzyme dieses Weges gefunden (Fitz-Gibbon *et al.* 2002; Verhees *et al.* 2003). Erste in der Arbeitsgruppe durchgeführte Untersuchungen in Zellextrakten deuteten ebenfalls auf das Fehlen von Schlüsselenzymen des Entner-Doudoroff-Weges hin (Gebhard 2002). Dagegen waren einige Enzyme eines modifizierten Embden-Meyerhof (EM)-Weges annotiert und in Zellextrakten nachweisbar, was auf die Verwendung dieses Weges hindeutet. Um dies zu überprüfen, sollte in dieser Arbeit der Zuckerstoffwechsel von *P. aerophilum* untersucht werden, wobei die Enzyme eines modifizierten EM-Weges nachgewiesen werden sollten. Tatsächlich wurde gefunden, dass der Organismus alle Enzyme eines modifizierten EM-Weges mit einer Glycerinaldehyd-3-Phosphat: Ferredoxin Oxidoreduktase (GAPOR) als Schlüsselenzym enthält. Die GAPOR sollte gereinigt, charakterisiert sowie das kodierende Gen identifiziert und phylogenetisch analysiert werden.

4 Material und Methoden

4.1 Chemikalien und Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Feinchemikalien stammen, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen Biolabs (Frankfurt), Biomol (Hamburg), Difco (Stuttgart), Gibco BRL (Karlsruhe), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen). 2-Keto-3-deoxyphosphogluconat (KDPG) stammt von Prof. Eric Toone (Durham/U.S.A.). 2-Keto-3-Deoxygluconat (KDG) wurde enzymatische aus D-Gluconat mittels der gereinigten Gluconat Dehydratase aus *Picrophilus torridus* hergestellt. Die Konzentration an KDG wurde colorimetrisch (4.5.2.) und enzymatische (4.5.3.) mit der gereinigten KDG-Aldolase aus *Picrophilus torridus* quantifiziert. Die Enzyme und Coenzyme stammen von der Firma Roche Diagnostics (Mannheim), MBI Fermentas (Vilnius, Litauen), New England Biolabs (Frankfurt), PeqLab (Erlangen) oder Biotherm (Hamburg). Die thermophile Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase aus *Thermotoga maritima* stammt von PD Dr. Thomas Hansen (Kiel).

4.2 Züchtung von *Picrophilus torridus*

Picrophilus torridus DSM 9790 wurde unter aeroben Bedingungen in 100 ml und 1000 ml Erlenmeyerkolben (EMK) gezüchtet, die 50 bzw. 400 ml Medium (Tabelle 1) enthielten. Die Inkubation erfolgte entweder in einem Schüttelwasserbad oder in einem Heißluftschüttler mit 100 Upm bei 60°C. Wachstum im 8 l Fermenter (fair men tec, Göttingen) erfolgte bei einer Rührergeschwindigkeit von 200 Upm und einer Druckluftdurchgasung von 300 ml/min. Der Fermenter enthielt 5000 ml Medium. Die Ernte der Zellen erfolgte durch Zentrifugation für 15 Minuten bei 8000 x g. Die Pellets wurden bis zu ihrer Verwendung bei -70°C gelagert.

Tabelle 1: Medium für *Picrophilus torridus* (DSMZ 723)

<u>Spurenelementlösung (100-fach)</u>		<u>Picrophilus-Medium (DSMZ 723)</u>	
Ad 1000 ml VE-Wasser		Ad 1000 ml VE-Wasser	
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0,18 g	(NH ₄) ₂ SO ₄	1,30 g
Na ₂ B ₄ O ₇ x 10 H ₂ O	0,45 g	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,25 g
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,02 g	KH ₂ PO ₄	0,28 g
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	5 mg	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,07 g
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	3 mg	FeCl ₃	0,02 g
VOSO ₄ x H ₂ O	3 mg	Mit H ₂ SO ₄ auf pH 0,9 bzw. pH 0,3 einstellen	
CoSO ₄	1 mg		

Als Kohlenstoff- und Energiequellen wurden dem Medium nach dem Autoklavieren Hefeextrakt (0,05 – 0,2%) und ggf. Glucose (bis 25 mM) zugegeben.

4.3 Wachstumsversuche mit *Picrophilus torridus*

Wachstumsversuche wurden bei 60°C in 100 ml EK mit 20 ml oder 50 ml Medium durchgeführt. Das Wachstum wurde durch Bestimmung der optischen Dichte photometrisch bei 600 nm verfolgt. Als Inokulum wurde 5% einer Vorkultur, die über mindestens drei Passagen an Glucose adaptiert war, eingesetzt.

Zur Bestimmung der Enzymaktivitäten in Zellextrakten aus unterschiedlichen Wachstumsphasen von *P. torridus* wurden Proben (400-600 ml) einer Fermenterkultur steril entnommen und die Zellen pelletiert (8000 x g, 10 min, 10°C). Die Zellpellets wurden bis zur Messung der Enzymaktivität bei -20°C gelagert. Zur Substratbestimmung wurden Wachstumsüberstände benötigt, die durch Zentrifugation steril entnommener Proben gewonnen wurden. Die Überstände wurden bis zur späteren Verwendung bei -20°C gelagert.

4.4 ¹³C-NMR Studie

P. torridus wurde in 100 ml EK mit 20 ml Medium und 0,1% Hefeextrakt bei pH 0,3 unter aeroben Bedingungen bei 60°C und 100rpm gezüchtet. Dem Medium wurde in zwei unterschiedlichen Ansätzen D-[1-¹³C]Glucose bzw. D-[3-¹³C]Glucose durch direktes Einwiegen auf eine Endkonzentration von 25 mM zugesetzt. Als Inokulum (2,5%) diente ein durch drei Passagen an Glucose adaptierte, logarithmisch wachsende Vorkultur.

In der exponentiellen Wachstumsphase wurden die Kulturen durch Zentrifugation (8000 x g, 10 min, 10°C) geerntet, die Pellets in einer Vakuumzentrifuge (Christ RVC 2-18) getrocknet und anschließend bei -70°C gelagert. Die massenspektrometrische Untersuchung der

synthetisierten Aminosäuren und Auswertung erfolgte durch die Arbeitsgruppe Prof. Dr. Uwe Sauer (ETH Zürich, Schweiz).

4.5 Analytische Methoden

4.5.1 Enzymatische Bestimmung von Glucose

Glucose wurde unter Verwendung der Hilfsenzyme Hexokinase und Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase bestimmt (Kunst et al., 1986):



Der Testansatz enthielt 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM MgCl₂, 2 mM ATP, 2 mM NADP⁺, 7,5 U Hexokinase und 10 µl Probe (maximal 0,5 mM Glucose im Test). Nach einer Vorinkubation des Ansatzes bei 37°C bis zu einer konstanten Extinktion bei 365 nm (E₁), wurde die Reaktion durch Zugabe von 3,5 U Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase gestartet. Nach 15-20 min war die Glucose vollständig umgesetzt, und es wurde erneut die Extinktion (E₂) bestimmt. Aus der Extinktionsdifferenz wurde mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten (ε₃₆₅ = 3,4 mM⁻¹cm⁻¹) die Glucosekonzentration der Proben ermittelt.

4.5.2 Colorimetrische Bestimmung von KDG und KDPG

KD(P)G wurde colorimetrisch quantifiziert (Weisbach und Hurwitz, 1959). 10-50 µl Probe wurden mit je 125 µl HJO₄-Lösung (0,025 M in 0,125 N H₂SO₄) versetzt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze mit 250 µl Arsenitlösung (2% Na-Arsenit in 0,5 M HCl) versetzt und für weitere 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurden 1000 µl Thiobarbitursäurelösung (0,3 % in VE-Wasser) zugegeben und die Proben für 10 Minuten gekocht. Nach dem Abkühlen der Proben auf Eis und einer Zentrifugation für 5 min bei 13000 x g wurde die Extinktion bei 548 nm gemessen und die Konzentration an KD(P)G mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von 67,8 mM⁻¹cm⁻¹ bestimmt (Gottschalk und Bender 1982).

4.5.3 Enzymatische Bestimmung von KDG

Die Konzentration von KDG wurde enzymatisch mit der gereinigten KDG-Aldolase aus *P. torridus* bestimmt, indem die KDG-abhängige Bildung von Pyruvat bei 55°C gemessen wurde. Die Reaktion wurde mit Hilfe einer Laktat Dehydrogenase an die Oxidation von

NADH gekoppelt. Der Testansatz enthielt 50 mM Na-Phosphat pH 6,2, 0,3 mM NADH, 5,5 U Laktat Dehydrogenase, 0,7 U KDG-Aldolase und Probe. Die Reaktion wurde durch Zugabe der KDG-Aldolase gestartet. Nach etwa 10 min war KDG vollständig umgesetzt, und es wurde erneut die Extinktion bestimmt. Aus der Extinktionsdifferenz wurde mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten ($\epsilon_{365} = 3,4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) die Konzentration von KDG in der Probe ermittelt.

4.6 Molekularbiologische Methoden

4.6.1 Computergestützte Sequenzanalysen

Die Sequenzalignments wurden mit ClustalX und der Neighbor-joining Methode unter Verwendung der Standardeinstellungen erstellt (Thompson et al. 1997). Der phylogenetische Stammbaum wurde nach der Neighbor-joining Methode mittels ClustalX konstruiert. Bootstrapping-Werte wurden anhand von 1000 Wiederholungen bestimmt.

4.6.2 Isolierung genomischer DNA

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

Zur Extraktion genomischer DNA (Sambrook et al. 1989) aus *Picrophilus torridus* (DSM 9790) wurden 250 mg Feuchtzellen in 5 ml TES-Puffer (10 ml TE-Puffer mit 0,86 g Saccharose; TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl pH 8,0 mit 0,1 mM EDTA) suspendiert. Nach Zugabe von 550 μl 10% SDS und 15 μl Proteinase K (20 mg/ml) wurde die Suspension für 30 min bei 60°C und anschließend nach Zugabe von 600 μl 5 M NaCl für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde für 30 min bei 4°C zentrifugiert (48000 x g) und die DNA aus dem Überstand mit einem Volumen eiskaltem Isopropanol gefällt, durch Zentrifugation für 10 min bei 4°C (24000 x g) pelletiert und der Überstand dekantiert. Das Präzipitat wurde in 500 μl TE-Puffer über Nacht bei 4°C resuspendiert, die Suspension abschließend mit 5 μl RNase (100 mg/ml) für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend bei -20°C gelagert.

Konzentration und Reinheit der erhaltenen genomischen DNA wurden jeweils sowohl photometrisch als auch über ein 0,8%iges Agarosegel bestimmt.

4.6.3 Polymerase Kettenreaktion

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

Transformanten. Die PCRs wurden in 50 µl Reaktionsansätzen in einem Thermocycler (T-3000 oder T-personal, Biometra, Göttingen) durchgeführt, wobei die Programme in Abhängigkeit von der Länge des zu erwartenden Produktes und der Schmelzpunkte der Oligonukleotid-Primer (MWG Biotech, Ebersberg) variiert wurden (Tabelle 2).

Amplifikation der zu klonierenden Gene. Zur Genamplifikation wurden verschiedene Inkubationsprotokolle verwendet.

Picrophilus torridus, ORF Pto0332: Der Reaktionsansatz enthielt 35 ng Template, je 300 nM forward und reverse Primer, 5 µl 10 x Reaktionspuffer (PeqLab, Erlangen), 2 mM MgSO₄, 400 µM dNTP-Mix und 2,5 U *Pwo*-DNA-Polymerase (PeqLab, Erlangen). Das Inkubationsprotokoll bestand aus initialer Denaturierung für 300 s bei 95°C, 10 Zyklen aus Denaturierung bei 95°C für 30 s, Annealing bei 56°C für 40 s und Polymerisation bei 72°C für 90 s, 30 Zyklen aus Denaturierung bei 95°C für 30 s, Annealing bei 58°C für 30 s und Polymerisation bei 72°C für 90 s (wobei bei jedem Zyklus die Synthesezeit um 20 s verlängert wurde) und einer abschließenden Polymerisation bei 72°C für 7 min.

Thermoplasma acidophilum, ORF Ta0809: Der Reaktionsansatz enthielt 25 ng Template, je 200 nM forward und reverse Primer, 5 µl 10 x Reaktionspuffer (PeqLab, Erlangen), 2 mM MgSO₄, 400 µM dNTP-Mix und 2,5 U *Pwo*-DNA-Polymerase (PeqLab, Erlangen). Das Inkubationsprotokoll bestand aus initialer Denaturierung für 300 s bei 95°C, 10 Zyklen aus Denaturierung bei 95°C für 30 s, Annealing bei 58°C für 40 s und Polymerisation bei 72°C für 90 s, 30 Zyklen aus Denaturierung bei 95°C für 30 s, Annealing bei 60°C für 30 s und Polymerisation bei 72°C für 90 s (wobei bei jedem Zyklus die Synthesezeit um 20 s verlängert wurde) und einer abschließenden Polymerisation bei 72°C für 7 min.

Picrophilus torridus, ORF Pto1279a: Der Reaktionsansatz enthielt 75 ng Template, je 400 nM forward und reverse Primer, 5 µl 10 x Reaktionspuffer (PeqLab, Erlangen), 2 mM MgSO₄, 400 µM dNTP-Mix und 2,5 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 30 s, Annealing bei 46°C für 30 s und Polymerisation bei 72°C für 90 s, 20 Zyklen aus Denaturierung bei 94°C für 30 s, Annealing bei 50°C für 30 s und Polymerisation bei 72°C für 90 s (wobei bei jedem Zyklus die Synthesezeit um 20 s verlängert wurde) und einer abschließenden Polymerisation bei 72°C für 7 min.

Tabelle 2 Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Restriktionsschnittstellen (RE) sind unterstrichen, die Vorwärtsprimer sind mit F und die Rückwärtsprimer mit R bezeichnet:

Name	Basensequenz (5' → 3')	RE
GadhPto0332F	AATAGATATCCGATGAAAATTTACATAGATG	<i>EcoRV</i>
GadhPto0332R	TTTCTCGAGTTTTAAAGATTTTTGAATAGG	<i>XhoI</i>
GadhTa0809F	GCTAACGTTACATATGGATACGAAGTTATAC	<i>NdeI</i>
GadhTa0809R	ATGGATCCTTAAGATCACTGAAACAGATCGTC	<i>BamHI</i>
KDGAPto1279aF	GAATTCATATGTACAAGGGTATAGTATG	<i>NdeI</i>
KDGAPto1279aR	GATTAGGATCCAAAATATTAATTTATATTTCAA	<i>BamHI</i>
T7-Promotor Primer	TAATACGACTCACTATAGGG	
T7-Terminator Primer	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	

Amplifikation zur Kontrolle einer Klonierung („Kolonie-Screening“). Transformanten wurden auf vorhandenes Insert in erwarteter Länge geprüft. Der Reaktionsansatz enthielt als Template einen Transformanten, der mit sterilem Zahnstocher von der Agarplatte aufgenommen wurde, je 200 nM Primer (T7-Promotor- und T7-Terminatorprimer), 5 µl 10 x Reaktionspuffer, 200 µM dNTPs und 3 mM MgCl₂. Die *Taq*-DNA-Polymerase (1 U, Biotherm, Hamburg) wurde nach dem initialen Denaturierungsschritt zugegeben. Das Inkubationsprotokoll bestand aus initialer Denaturierung für 300 s bei 94°C, 30 Zyklen aus Denaturierung bei 94°C für 20 s, Annealing bei 48°C für 30 s und Polymerisation bei 72°C für 90 s und einer abschließenden Polymerisation bei 72°C für 7 min.

4.6.4 Konzentration und Reinheitsanalyse von DNA

Absorptionsmessung bei 260 nm und 280 nm. Die Konzentration von DNA wurde photometrisch durch Absorptionsmessung bei 260 nm im NanoDrop ND-1000 Spektralphotometer (NanoDrop Technologies, Inc.; Wilmington, USA) bestimmt.

Agarosegelelektrophorese. Agarosegele wurden dazu benutzt, DNA-Fragmente, Plasmide und genomische DNA der Größe nach analytisch oder präparativ zu trennen. Die Trennung erfolgte für hochmolekulare DNA in 0,8%igen und für niedermolekulare DNA in 2%igen Agarosegelen. Dazu wurde Agarose in 30 ml TBE-Puffer (89 mM Tris-HCl pH 8,0 mit 89 mM Borat und 2,5 mM EDTA) durch Aufkochen gelöst, nach Abkühlung auf etwa 60°C 30 µg Ethidiumbromid zugegeben und in eine Gießvorrichtung (7x10 cm) gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 6 x Auftragspuffer (Fermentas, Vilnius, Litauen) versetzt und neben einem Standard (*HindIII* verdaute λ-DNA oder Gene Ruler 100 bp DNA LadderPlus, Fermentas, Vilnius, Litauen) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei konstant 100 V in TBE-Puffer. Anschließend wurden die Gele auf einem UV-Schirm (366 nm) analysiert.

4.6.5 Klonierung von PCR-Produkten in einen Vektor

Vermehrung von Vektoren in *E. coli* und Isolierung von Plasmid-DNA. Vektoren ohne bzw. mit Insert wurden zur Klonierung bzw. zur Sequenzierung und Transformation in *E. coli* Stamm JM109 (Yanisch-Perron et al. 1985) in LB-Medium mit 100 µg/ml Carbenicillin vermehrt und anschließend daraus mit dem Plasmid Miniprep Kit (PeqLab, Erlangen) isoliert. Das LB-Medium hatte folgende Zusammensetzung: 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, pH 7,5.

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

Restriktionshydrolyse von Vektoren und PCR-Produkten. Die Restriktionshydrolyse wurde jeweils als Doppel-Verdau angesetzt, d.h. beide Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs GmbH, Schwalbach/Taunus) wurden in einen Ansatz gegeben und in einem vom Hersteller mitgelieferten, optimalen Puffer mit der DNA inkubiert. Die Ansätze folgender Zusammensetzung wurden bei 37°C für 12-17 h inkubiert: 50 µl Plasmid-DNA (1 bis 10 µg DNA), jeweils 10 U Restriktionsendonuklease, 10 µl 10 x Reaktionspuffer ad. 100 µl A. bidest. bzw. 40 µl PCR-Fragment (1 bis 10 µg DNA), jeweils 10 U Restriktionsendonuklease, 5 µl Reaktionspuffer ad. 50 µl A. bidest.

Behandlung der Vektoransätze mit alkalischer Phosphatase. Um eine Religation des geschnittenen Plasmids zu verhindern, wurden Vektorensätze mit alkalischer Phosphatase (Calf Intestinal Phosphatase, New England Biolabs GmbH) behandelt. Pro µg Vektor-DNA wurden 0,5 U Enzym eingesetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Vektoransätze über eine präparative Agarosegelelektrophorese aufgereinigt.

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

Transformation von einem Vektor in *E. coli*. Sowohl Ligationsansätze als auch gereinigte Plasmid-DNA wurde in *E. coli* transformiert. Je Transformationsansatz wurden 80 µl kompetente Zellen, die mir freundlicherweise von Dr. U. Johnsen, Kiel überlassen wurden, auf Eis aufgetaut, mit 10 µl Ligationsansatz bzw. 1 bis 2 µg Plasmid-DNA vorsichtig gemischt und für 60 min auf Eis inkubiert. Die Ansätze wurden dann für 40 s einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt und für weitere 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 400 µl SOC-Medium (0,5% Hefeextrakt, 2% Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ und 20 mM Glucose, pH 7,0, 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 mit 18 g/l Agar) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.6.6 Sequenzierung

Alle im Rahmen dieser Arbeit konstruierten Vektoren wurden sequenziert. Das Insert und die flankierenden Bereiche des Vektors wurden jeweils durch Abgleich mit den Originalsequenzen auf Fehlerfreiheit überprüft. Die Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte nach Sanger, wobei durch Einbau von unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden Kettenabbrüche erzeugt wurden (Sanger et al. 1977). Die fluoreszenzmarkierten Produkte wurden mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt, mit einem Laser angeregt und die emittierte Fluoreszenz detektiert (ABI PRISM 310, Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA). Die Sequenzansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 0,2 bis 0,6 µg Plasmid-DNA, 0,5 µM Primer (T7-Promotor- bzw. Terminator-Primer oder, im Falle langer Inserts, mit zum Insert komplementär gewählten Primern), 2 µl Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction, 1 µl Big Dye Sequencing Buffer (ABI PRISM, Applied Biosystems, Warrington, England) ad 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 48°C für 5 s und Synthese bei 60°C für 240 s und einem abschließenden Syntheseschritt bei 60°C für 5 min. Die PCR-Ansätze wurden für die nachfolgende Sequenzierung gereinigt. Dazu wurden die Ansätze auf 100 µl mit A. bidest. aufgefüllt und 2 µl Dextranblau (20 ng/µl), 10 µl 3 M Natriumacetat pH 4,8 und 250 µl 99% Ethanol zugegeben. Durch 30minütige Zentrifugation wurde die DNA pelletiert, dann das Pellet zweimal mit 250 µl 70% Ethanol gewaschen und anschließend für 5 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Das getrocknete Pellet konnte nach Lösen in 12 µl A. bidest. zur Sequenzierung eingesetzt werden.

4.6.7 Expression

Als Expressionssystem dienten Ampicillinresistenz-tragende Vektoren pET17b oder pET19b (Novagen, Schwalbach), die jeweils kombiniert wurden mit dem Chloramphenicol-resistenten Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3)-CodonPlus-RIL (Stratagene, Amsterdam, Niederlande). Tabelle 3 gibt eine Übersicht über alle in dieser Arbeit klonierten ORFs:

Tabelle 3: Übersicht über die in dieser Arbeit klonierten ORFs. Die Quelle der DNA, der verwendete Vektor, die zum Klonieren verwendeten Schnittstellen, die Namen der Amplifikations-Primer, die Bezeichnung des konstruierten Vektors und die des Genproduktes sind für jeden ORF angegeben.

DNA-Quelle, ORF	Vektor	Schnittstellen	Primer	Bezeichnung Konstrukt	Bezeichnung Genprodukt
<i>P. torridus</i> Pto0332	pET17b	<i>EcoRV</i> <i>XhoI</i>	GadhPto0332F GadhPto0332R	GadhPto-pET17b	GADHPto
<i>T. acidophilum</i> Ta0809	pET19b	<i>NdeI</i> <i>BamHI</i>	GadhTa0809F GadhTa0809R	GadhTa-pET19b	GADHTa
<i>P. torridus</i> Pto1279a	pET19b	<i>NdeI</i> <i>BamHI</i>	KdgaPto1279aF KdgaPto1279aR	KdgaPto-pET19b	KDGAPto

Expressionen wurden in LB-Medium mit 100 µg/ml Carbenicillin und 34 µg/ml Chloramphenicol bei 20°C bzw. 37°C unter aeroben Bedingungen durchgeführt. Die Induktion erfolgte mit 0,4 mM IPTG (pET17b) bzw. 1 mM IPTG (pET19b). Nach Expression wurden die Zellen bei 4°C für 20 min mit 8000 x g pelletiert. Im Folgenden werden die Bedingungen der Überexpressionen für die entsprechenden Genprodukte dargestellt:

GADHPto wurde in 800 ml Medium bei 20°C exprimiert. Die Induktion erfolgte bei einer OD₅₇₈ von 0,73. Nach 16 h Expression wurden die Zellen bei einer OD₅₇₈ von 2,3 pelletiert.

GADHTa wurde in 800 ml Medium bei 37°C exprimiert. Die Induktion erfolgte bei einer OD₅₇₈ von 0,7. Nach 4 h Expression wurden die Zellen bei einer OD₅₇₈ von 2,9 pelletiert.

KDGAPto wurde in 800 ml Medium bei 37°C exprimiert. Die Induktion erfolgte bei einer OD₅₇₈ von 1,3. Nach 4 h Expression wurden die Zellen bei einer OD₅₇₈ von 4,6 pelletiert.

4.7 Nachweis von Enzymaktivitäten in Rohextrakten

4.7.1 Zellaufschluss

Die bei -70°C gelagerten Zellen wurden aufgetaut und in Aufschlusspuffer (*P. aerophilum*: 50 mM Tris/HCl pH 7,0; *P. torridus*, *T. acidophilum* und *S. acidocaldarius*: 100 mM Tris-HCl pH 8,0) suspendiert. Die Zellen wurden durch Ultraschall (Branson Sonifier 250, Branson, Heinemann, Schwäbisch Gmünd) unter Eiskühlung aufgeschlossen (Probenvolumen 0,5-1 ml, Minitip, 3 x 30 s, 35% duty cycle, output control 3,5) und bei 14.000 Upm für 20 min

zentrifugiert. Für den Nachweis der GAPOR-Aktivität in *P. aerophilum* wurden die Zellen mittels Ultraschall (3 x 2 min) in Tris/HCl pH 7,4, 5 mM DTE aufgeschlossen und für 15 Minuten bei 14000 Upm zentrifugiert und der zellfreie Extrakt anaerobisiert. Dazu wurde der Extrakt in einem mit Gummistopfen verschlossenen Glasgefäß mindestens dreimalig mit N₂ (100%, 0,5 bar) be- und entgast.

4.7.2 Allgemeine Handhabung von Enzymtests

Im Folgenden werden die Testsysteme beschrieben, die zur Bestimmung der Enzyme verwendet wurden. Die Enzymtests wurden an einem beheizbaren Ultrospec2000 Photometer (Pharmacia, Freiburg) in Halbmikro-Einwegküvetten (d = 1 cm) durchgeführt.

Testsysteme, die mit der Reduktion von Benzylviologen gekoppelt waren, wurden unter anaeroben Bedingungen in mit Gummistopfen verschlossenen Glasküvetten mit N₂ (0,2 bar) als Gasphase durchgeführt. Das Benzylviologen wurde durch Zugabe von Natriumdithionit vor dem Start der Reaktion anreduziert.

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. Es war sichergestellt, dass die verwendeten Hilfsenzyme im Test nicht limitierend waren.

Bei diskontinuierlichen Testsystemen wurde in Eppendorfgläsern bei der entsprechenden Temperatur im Thermoblock inkubiert. Nach Inkubation für verschiedene Zeiten wurden die Eppendorfgläser für 10 min auf Eis gestellt oder durch 10% Trichloressigsäure (TCA) gestoppt. Danach wurde ein Aliquot entnommen und in analytische Tests eingesetzt. Die Proteinabhängigkeit der Reaktion und die Startbarkeit wurden in entsprechenden Kontrollansätzen überprüft. Enzymtests mit Pyridinnucleotiden wurden bei 365 nm, mit Benzylviologen bei 578 nm und mit Dichlorphenolindophenol (DCPIP) bei 600 nm durchgeführt. Für die Berechnung der spezifischen Aktivitäten wurden die folgenden molaren Extinktionskoeffizienten, angegeben in mM⁻¹cm⁻¹ pro 2 Elektronen, verwendet: $\epsilon_{365}(\text{NADH}) = 3,4$, $\epsilon_{365}(\text{NADPH}) = 3,4$, $\epsilon_{578}(\text{BV}_{\text{red}}) = 17,2$, $\epsilon_{600}(\text{DCPIP}_{\text{red}}) = 19,1$. Eine Einheit (1 Unit) der Enzymaktivität ist definiert als der Verbrauch von 1 μmol Substrat bzw. die Bildung von 1 μmol Produkt pro Minute. Bei Benzylviologen als Ein-Elektronenakzeptor entspricht 1 U der Reduktion von 2 μmol Elektronenakzeptor pro Minute.

Anaerobe Testbedingungen: Für Tests unter anaeroben Bedingungen wurden mit einem Schliff versehene Glasküvetten mit einem Gummistopfen verschlossen und durch dreimaliges Be- und Entgasen mit N₂ (100%, 0,2 bar) anaerobisiert. Unter Vakuum wurde anschließend

mit einer anaerobisierten Spritze anaerober Testpuffer in die Küvetten gegeben und zweimal be- und entgast. Nach Aufheizen auf die gewünschte Messtemperatur im beheizten Küvettenhalter wurde der Überdruck mit einer Kanüle abgelassen. Ansätze mit Benzylviologen als Elektronenakzeptor wurden vor Start der Reaktion mit ca. 2-3 μl einer 100 mM Natriumdithionitlösung soweit reduziert, dass eine leichte konstante Blaufärbung bestand. Die Substrate wurden in Ampullen (5 ml) eingewogen, die mit Gummistopfen verschlossen und durch dreimaliges Be- und Entgasen mit einer N_2 -Atmosphäre versehen wurden. Mit anaerobem Wasser wurden die Substrate gelöst. Der Extrakt bzw. die GAPOR-Lösungen wurden ebenfalls in Ampullen gefüllt und durch dreimaliges Be- und Entgasen mit N_2 anaerobisiert. Substrate und Enzymlösung wurden mit Spritzen (Unimetrics, Macherey & Nagel, Düren) in die Küvetten gegeben. Zur Herstellung des anaeroben Puffers wurde dieser unter N_2 -Begasung zum Kochen gebracht. Nach Überführung des Puffers in eine Infusionsflasche (Müller-Krempel AG, Bulach, Schweiz) wurde dieser unter N_2 -Begasung abgekühlt. Der Puffer enthielt 5 mM DTE.

4.7.3 Enzymaktivitäten von Embden-Meyerhof-Wegen

Hexokinase/Glucokinase: Die Aktivität wurde bei 75°C als ATP-abhängige Bildung von Glucose-6-Phosphat und ADP aus Glucose gemessen. Die Reaktion wurde über eine rekombinant hergestellte Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase aus *Thermotoga maritima* (Hansen *et al.* 2002) mit der Reduktion von NADP^+ gekoppelt. Der Testansatz enthielt 100 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM Glucose, 2 mM ATP (reinst; Sigma, Deisenhofen), 10 mM MgCl_2 , 1 mM NADP^+ , 0,5 U Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase und Extrakt.

Glucosephosphat Isomerase: Die Aktivität der Glucosephosphat Isomerase wurde bei 55°C oder 75°C (*P. aerophilum*) als Bildung von Glucose-6-Phosphat aus Fructose-6-Phosphat gemessen. Die Reaktion wurde über eine Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase mit der Reduktion von NADP^+ gekoppelt (bei 75°C mit dem rekombinanten Enzym aus *Thermotoga maritima*). Der Testansatz enthielt 100 mM BisTris/HCl pH 7,2 oder 100 mM HEPES pH 7,2, 3-5 mM Fructose-6-Phosphat, 1-2 mM NADP^+ , 0,5-2 U Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase und Extrakt.

6-Phosphofruktokinase: Die Aktivität der 6-Phosphofruktokinase wurde bei 55°C als Bildung von Fructose-1,6-Bisphosphat aus Fructose-6-Phosphat und ATP gemessen. Die Reaktion wurde über Aldolase, Triosephosphat Isomerase und Glycerin-3-Phosphat Dehydrogenase an die Oxidation von NADH gekoppelt. Der Testansatz enthielt 100 mM Tris/HCl pH 8,0, 2 mM ATP, 10 mM MgCl_2 und 5 mM Fructose-6-Phosphat, 0,3 mM

NADH, 3 U Aldolase, 4 U Triosephosphate Isomerase und 1 U Glycerin-3-Phosphat Dehydrogenase. Der Umsatz von einem mol Fructose-1,6-Bisphosphat entsprachen der Oxidation von zwei mol NADH.

Fructose-1,6-Bisphosphat Aldolase: Die Aktivität der Fructose-1,6-Bisphosphat Aldolase wurde bei 55°C als Bildung von Dihydroxyacetonphosphat aus Fructose-1,6-Bisphosphat gemessen. Die Reaktion wurde über Triosephosphat Isomerase und Glycerin-3-Phosphat Dehydrogenase an die Oxidation von NADH gekoppelt, wobei ein mol umgesetztes Fructose-1,6-Bisphosphat zwei mol NADH entspricht. Der Testansatz enthielt 100 mM Tris/HCl pH 7,2, 5 mM Fructose-1,6-Bisphosphat, 0,3 mM NADH, 10 U Triosephosphat Isomerase, 1 U Glycerin-3-Phosphat Dehydrogenase und Extrakt.

Triosephosphat Isomerase: Die Aktivität der Triosephosphat Isomerase wurde bei 55°C als Bildung von Dihydroxyacetonphosphat aus Glycerinaldehyd-3-Phosphat bestimmt. Die Reaktion wurde über Glycerin-3-Phosphat Dehydrogenase mit der Oxidation von NADH gekoppelt. Der Testansatz enthielt 100 mM BisTris pH 6,7 (*P. aerophilum*) oder 50 mM HEPES pH 6,8, 0,6 mM Glycerinaldehyd-3-Phosphat, 0,3 mM NADH, 2 U Glycerin-3-Phosphat Dehydrogenase und Extrakt.

Glycerinaldehyd-3-Phosphat: Ferredoxin Oxidoreduktase (GAPOR): Die Aktivität des Enzyms wurde bei 50°C bestimmt, indem die Reduktion des künstlichen Elektronenakzeptors Benzylviologen gemessen wurde (Mukund und Adams 1995). Glycerinaldehyd-3-Phosphat wurde entweder direkt in den Test eingesetzt (500 µM) oder mit Hilfe der Fructose-1,6-Bisphosphat Aldolase und Triosephosphat Isomerase aus Fructose-1,6-Bisphosphat angeliefert. Der Testansatz enthielt jeweils 5 mM Benzylviologen. Es wurde sichergestellt, dass Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) unter den gewählten Testbedingungen stabil war. Für die Anlieferung von GAP enthielt der Ansatz 10 mM Fructose-1,6-Bisphosphat, 0,45 U Fructose-1,6-Bisphosphat Aldolase und 12 U Triosephosphat Isomerase. Während der Reinigung der GAPOR aus *P. aerophilum* wurde der Test in 100 mM Tris/HCl, pH 7,2, 5 mM DTE durchgeführt, zur Charakterisierung des gereinigten Enzyms in 50 mM KPP, pH 8,0.

Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase: In *P. aerophilum* wurde die Aktivität der Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase bei 60°C als Bildung von 1,3-Bisphosphoglycerat aus Glycerinaldehyd-3-Phosphat bestimmt, indem die Reduktion von NADP⁺ oder NAD⁺ gemessen wurde. Der Testansatz enthielt 100 mM Tris/HCl, pH 6,9, 1 mM Glycerinaldehyd-3-Phosphat, 1 mM NADP⁺ oder NAD⁺, 20 mM K₂HPO₄ und Extrakt. In *P. torridus* wurde die Aktivität der Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase bei 55°C als NADPH-abhängige Bildung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat aus 1,3-Bisphosphoglycerat

bestimmt, indem die Oxidation von NADPH gemessen wurde. Der Testansatz enthielt 100 mM Tris/HCl pH 8,2, 20 mM 3-Phosphoglycerat, 0,6 mM NADPH, 8 mM ATP, 6 U 3-Phosphoglycerat Kinase und Extrakt.

3-Phosphoglycerat Kinase: Die Aktivität der 3-Phosphoglycerat Kinase wurde bei 55°C als ATP-abhängige Bildung von 1,3-Bisphosphoglycerat aus 3-Phosphoglycerat gemessen. Die Reaktion wurde über Pyruvat Kinase und Laktat Dehydrogenase an die Oxidation von NADH gekoppelt. Der Testansatz enthielt für *P. aerophilum* 100 mM BisTris, pH 6,7, 1 mM 3-Phosphoglycerat, 2 mM ATP, 1 mM Phosphoenolpyruvat, 10 mM MgCl₂, 0,4 mM NADH, 5 U Pyruvat Kinase, 5,5 U Laktat Dehydrogenase und Extrakt. Der Testansatz enthielt für *P. torridus* 100 mM HEPES, pH 7,8, 2 mM 3-Phosphoglycerat, 4 mM ATP, 2 mM Phosphoenolpyruvat, 10 mM MgCl₂, 0,4 mM NADH, 5 U Pyruvat Kinase, 5,5 U Laktat Dehydrogenase und Extrakt.

Phosphoglycerat Mutase: Die Aktivität der Phosphoglycerat Mutase wurde bei 55°C als Bildung von 2-Phosphoglycerat aus 3-Phosphoglycerat bestimmt. Die Reaktion wurde über Enolase, Pyruvat Kinase und Laktat Dehydrogenase an die Oxidation von NADH gekoppelt. Der Testansatz enthielt für *P. aerophilum* 100 mM Tris/HCl, pH 7,2 bzw. für *P. torridus* 100 mM HEPES, pH 7,2, 1 mM 3-Phosphoglycerat, 2 bzw. 3 mM ADP, 0,3 mM NADH, 5 bzw. 10 mM MgCl₂, 0,07 U Enolase, 1 U Pyruvat Kinase, 1,1 U Laktat Dehydrogenase und Extrakt.

Enolase: Die Aktivität der Enolase wurde bei 55°C als Bildung von Phosphoenolpyruvat aus 2-Phosphoglycerat bestimmt. Die Reaktion wurde über Pyruvat Kinase und Laktat Dehydrogenase an die Oxidation von NADH gekoppelt. Der Testansatz enthielt 50 mM HEPES, pH 6,5, 1 mM 2-Phosphoglycerat, 10 mM MgCl₂, 2 mM ADP, 0,3 mM NADH, 5 U Pyruvatkinase, 5,5 U Laktat Dehydrogenase und Extrakt.

Ferner wurde die Aktivität der Enolase bestimmt, indem 2-Phosphoglycerat aus 3-Phosphoglycerat durch eine Phosphoglucomutase gebildet wurde. Die Reaktion wurde über Pyruvat Kinase und Laktat Dehydrogenase an die Oxidation von NADH gekoppelt. Der Testansatz enthielt 50 mM HEPES pH 7,8, 1 mM 3-Phosphoglycerat, 10 mM MgCl₂, 2 mM ADP, 0,3 mM NADH, 1 U Mutase, 5 U Pyruvat Kinase, 5,5 U Laktat Dehydrogenase und Extrakt.

Pyruvat Kinase: Die Aktivität der Pyruvat Kinase wurde bei 55°C bzw. 65°C (*P. aerophilum*) als ADP-abhängige Bildung von Pyruvat und ATP aus Phosphoenolpyruvat gemessen. Die Reaktion wurde über Laktat Dehydrogenase mit der Oxidation von NADH gekoppelt. Der Testansatz enthielt 50 mM HEPES pH 6,5, 1-5 mM Phosphoenolpyruvat, 5

mM ADP, 10 mM MgCl₂ bzw. MnCl₂, 10 mM KCl, 0,3 mM NADH, 5,5-8,5 U Laktat Dehydrogenase und Extrakt.

4.7.4 Enzymaktivitäten von Entner-Doudoroff-Wegen

Glucose Dehydrogenase: Die Aktivität der Glucose Dehydrogenase wurde bei 55 bzw. 65°C (*S. acidocaldarius*) als Bildung von Gluconat aus Glucose bestimmt, indem die Reduktion von NADP⁺ gemessen wurde. Der Testansatz enthielt 50 mM HEPES pH 7,2, 50 mM Glucose, 2 mM NADP⁺ und Extrakt. Der Testansatz für *S. acidocaldarius* enthielt 50 mM HEPES pH 8,2, 5 mM Glucose, 1 mM NADP⁺ und Extrakt.

Gluconat und 6-Phosphogluconat Dehydratase: Die Aktivität der Gluconat Dehydratase bzw. der 6-Phosphogluconat Dehydratase wurde anhand der Bildung des Produktes 2-Keto-3-Deoxygluconat (KDG) bzw. 2-Keto-3-Deoxy-6-Phosphogluconat (KDPG) gemessen. Die Testansätze (0,3 ml) wurden bei 60°C inkubiert. Über einen Zeitraum von 20 Minuten wurden Proben (100-140 µl) entnommen und die Reaktion durch Zugabe von Trichloressigsäure (TCA) gestoppt. Anschließend wurden die Proben 10 Minuten zentrifugiert. Die quantitative Bestimmung von KDG und KDPG im Überstand erfolgte colorimetrisch. Der Testansatz für die Gluconat Dehydratase enthielt 50 mM Na-Phosphat, pH 6,2, 20 mM MgCl₂, 7,5 mM Gluconat bzw. 6-Phosphogluconat und Extrakt.

2-Keto-3-Deoxygluconat (KDG) und 2-Keto-3-Deoxy-6-Phosphogluconat (KDPG)

Aldolase: (Test 1) Die Aktivität der KDG-Aldolase wurde als Bildung von KDG aus Pyruvat und Glycerinaldehyd im diskontinuierlichen Test bestimmt. Die Aktivität der KDPG-Aldolase wurde entsprechend als Bildung von KDPG aus Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat bestimmt. Die Testansätze (1 ml) wurden bei 60°C inkubiert. Über einen Zeitraum von 20 Minuten wurden Proben (100-140 µl) entnommen und die Reaktion durch Zugabe von TCA gestoppt. Anschließend wurden die Proben 10 Minuten zentrifugiert. Die quantitative Bestimmung von KDG und KDPG im Überstand erfolgte colorimetrisch (XXX). Der Testansatz für die KDG-Aldolase enthielt 50 mM Na-Phosphat, pH 6,2, 20 mM Pyruvat, 20 mM Glycerinaldehyd und Extrakt. Im Testansatz für die KDPG-Aldolase wurde Glycerinaldehyd durch Glycerinaldehyd-3-Phosphat in Konzentration von 1-20 mM ersetzt.

(Test 2) Die Aktivität der KD(P)G-Aldolase wurde bestimmt, indem die KDG- bzw. KDPG-abhängige Bildung von Pyruvat bei 55°C bzw. 65°C (*S. acidocaldarius*) gemessen wurde. Die Reaktion wurde mittels Laktat Dehydrogenase an die Oxidation von NADH gekoppelt. Der Testansatz enthielt 50 mM Na-Phosphat, pH 6,2, 2 mM KDG bzw. 32 mM KDPG, 0,3 mM NADH, 5,5 U Laktat Dehydrogenase und Extrakt. Der Testansatz für *S. acidocaldarius*

enthielt 50 mM Na-Phosphat, pH 6,2, 5 mM KDG bzw. 2 mM KDPG, 0,3 mM NADH, 5,5 U Laktat Dehydrogenase und Extrakt.

KDG-Kinase: Die Aktivität der KDG Kinase wurde bei 55°C als ATP- und KDG abhängige Bildung von KDPG und ADP im diskontinuierlichen Test bestimmt. Die Reaktion wurde über Pyruvat Kinase und Laktat Dehydrogenase an die Oxidation von NADH gekoppelt. Der Testansatz enthielt 100 mM Tris/HCl pH 8,3, 1 mM KDG, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 5 mM EGTA. Über einen Zeitraum von 20 Minuten wurden Proben (100 µl) entnommen und für mindestens 10 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 880 µl Detektionslösung (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 5,5 U Laktat Dehydrogenase, 0,4 mM NADH, 10 mM KCl) und einer zweiminütigen Inkubation bei 25°C wurden 2 mM PEP zugegeben und weiter zwei Minuten inkubiert. Die Oxidation von NADH nach Zugabe von 5 U Pyruvat Kinase wurde bestimmt.

Glycerinaldehyd Dehydrogenase: Die Aktivität der Glycerinaldehyd-Dehydrogenase wurde bei 55°C als Bildung von Glycerat aus Glycerinaldehyd bestimmt, indem die Reduktion von NADP⁺ gemessen wurde. Der Testansatz enthielt 50 mM HEPES, pH 7,2, 1 mM Glycerinaldehyd, 1 mM NADP⁺ und Extrakt.

Glycerinaldehyd Oxidoreduktase: Die Aktivität der Glycerinaldehyd-Oxidoreduktase wurde bei 60°C als Bildung von Glycerat aus Glycerinaldehyd bestimmt, indem die Reduktion von DCPIP⁺ gemessen wurde. Der Testansatz enthielt 50 mM HEPES, pH 6,5, 5 mM Glycerinaldehyd, 0,2 mM DCPIP⁺ und Extrakt.

Glyceratkinase: (Test 1) Die Aktivität der Glycerat Kinase wurde bei 55°C als ATP- und D-Glycerat-abhängige Bildung von 2-Phosphoglycerat und ADP bestimmt. Die Reaktion wurde über Pyruvatkinase und Laktat Dehydrogenase an die Oxidation von NADH gekoppelt. Der Testansatz enthielt 100 mM Tris/HCl pH 8,3, 2,6 mM Glycerat, 10 mM MgCl₂, 2 mM ATP, 0,3 mM NADH, 1 mM PEP, 5 mM EGTA, 5 U Pyruvat Kinase, 5,5 U Laktat Dehydrogenase und Extrakt.

(Test 2) Die Aktivität der Glycerat Kinase wurde bei 55°C als ATP- und D-Glycerat-abhängige Bildung von ADP und 2-Phosphoglycerat bestimmt. Die Reaktion wurde über Enolase, Pyruvat Kinase und Laktat Dehydrogenase an die Oxidation von NADH gekoppelt. Der Testansatz enthielt 100 mM Tris/HCl, pH 8,3, 2,6 mM Glycerat, 10 mM MgCl₂, 2 mM ATP, 0,3 mM NADH, 5 mM EGTA, 5 U Enolase, 5 U Pyruvat Kinase, 5,5 U Laktat Dehydrogenase und Extrakt.

4.8 Proteinbiochemische Methoden

4.8.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentrationen wurden mit einer modifizierten Methode nach Bradford bestimmt (Bradford 1976). Es wurden 100 µl Probe und 900 µl Bradford-Reagenz (35 mg Serva blue G, 25 ml 96% Ethanol und 50 ml ortho-Phosphorsäure auf 500 ml A. bidest.) eingesetzt, 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 µg im Test gegeben. Die Eichung erfolgte Rinderserum-Albumin Fraktion V (Merck, Darmstadt).

4.8.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese diente der Reinheitskontrolle während der Proteinreinigung und der Bestimmung der apparenten molekularen Masse der Untereinheiten gereinigter Proteine. Die Elektrophorese erfolgte nach Laemmli in 12%igen, diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen (7 cm x 8 cm x 0,1 cm) in einer Mini Protean II Elektrophorese Zelle (Biorad, München). Trenn- und Sammelgel hatten folgende Zusammensetzung (Laemmli 1970):

	Trenngel (12%)	Sammelgel (3.75%)
30% Acrylamid 0.8% Bisacrylamid	1 ml	0,25 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	0,625 ml	-
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	-	0,3 ml
10% SDS	0,025 ml	0,05 ml
A. bidest.	0,818 ml	1,625 ml
10% Ammoniumpersulfat	12,5 µl	12,5 µl
TEMED	1,25 µl	2,5 µl

Die Proben wurden mit 5x Auftragspuffer (63 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 10% Glycerin, 0,05% Bromphenolblau, 250 mM Dithiothreitol) versetzt, 10 min bei 95°C inkubiert und in die Geltaschen pipettiert. Der Elektrophoresepuffer bestand aus 25 mM Tris mit 190 mM Glycin und 0,02% SDS (pH-Wert wie eingewogen). Das Einlaufen der Proben in das Sammelgel erfolgte bei 70 V für 10 min. Die Trennung der Proteine über das Trenngel erfolgte bei 210 V für 60 min. Als Molekulargewichtsmarker dienten Standards von Biorad (München) oder PeqLab (Erlangen).

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 in Essigsäure.

4.8.3 Identifizierung der hypothetischen offenen Leserahmen

Das gereinigte Protein wurde aus einem SDS-Polyacrylamidgel ausgeschnitten und der hypothetische offene Leserahmen von Prof. Dr. Bott (Forschungszentrum, Jülich) mittels massenspektrometrischer Methode (MALDI-TOF) identifiziert.

4.8.4 Blotten und N-terminale Aminosäuresequenzierung

Zur Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenzen wurden je 15 bis 20 µg Protein durch Blotten auf eine ImmobilonTM Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membran (Millipore, Eschborn) übertragen. Die Proben wurden zuvor auf ein 12%-iges SDS-Polyacrylamidgel (4.8.2) aufgetragen. Als Laufpuffer diente 100 mM Tris-HCl, pH 8,2 mit 100 mM Tricin und 0,1% SDS. Die Membran wurde vor dem Blotten in Methanol getaucht und ebenso wie die für das Blotten notwendigen Materialien (Membran, Gel, Adapter und Filterpapier) in Transferpuffer (50 mM Natriumborat pH 9,0 mit 20% Methanol und 0,02% SDS) äquilibriert. Es wurde eine Mini Trans-Blot Zelle (Biorad, München), betrieben mit einem PowerPac 1000 (Biorad, München), verwendet. Der Transfer des Proteins aus dem Gel auf die Membran erfolgte über 4 h bei konstant 35 V und 6 W. Anschließend wurde die Membran für 1 bis 2 min in 0,3% Coomassie Brilliant Blue R250 mit 50% Methanol und 10% Essigsäure gefärbt und in 50% Methanol mit 10% Essigsäure entfärbt. Die Sequenzierung erfolgte durch Herrn Dr. R. Schmidt (Universität Osnabrück).

4.8.5 Apparentes Molekulargewicht von nativen Proteinen

Die apparenten molekularen Massen der gereinigten Proteine wurden unter nativen Bedingungen säulenchromatographisch mittels Ausschluss-Chromatographie an einer Superdex 200 HiLoad 16/60 (Pharmacia, Freiburg) bestimmt. Bei jedem Säulenlauf mit 0,1 M Tris-HCl, pH 7,1 mit 150 mM NaCl und einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min betrug das Probenvolumen 1 ml. Als Molekulargewichtsstandards dienten Dextran Blue (2000 kDa), β -Amylase (200 kDa), Alkohol Dehydrogenase (150 kDa), Rinderserum-Albumin (66 kDa), Carboanhydrase (29 kDa) und Cytochrom c (12,4 kDa) (Sigma-Aldrich, Deisenhofen).

4.8.6 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.

4.9 Reinigung von nativen Enzymen

Alle in dieser Arbeit gereinigten Proteine wurden bis zur apparenten Homogenität angereichert. Die säulenchromatographischen Schritte wurden mit einer BioLogic Workstation (Biorad, München) und FPLC-Säulen von Pharmacia (Freiburg) und Biorad (München) bei 7°C bis 20°C durchgeführt. Die Elution der Proteine von den Säulen wurde durch Absorptionsmessung bei 280 nm verfolgt. Zur Berechnung der spezifischen Aktivitäten wurde nach Ermittlung der Aktivität (U/ml) in den Fraktionen die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt.

Reinigung der Gluconate Dehydratase (GAD) aus *P. torridus*. Der zellfreie Extrakt wurde aus 18 g Glucose-gewachsenen Feuchtzellen präpariert. Die Zellen wurden dazu in 30 ml 50 mM Tris-HCl, pH 8,1 mit 10 mM MgCl₂ suspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels zweimaliger Hochdruckhomogenisation in einer gekühlten French Press Zelle (American Instrument Company, Silver Spring, Maryland, USA) bei 86 bar. Diese Suspension wurde bei 50000 x g und 4°C für 90 min zentrifugiert. Der Überstand wurde auf 3 M (NH₄)₂SO₄ eingestellt und 17 h bei 4-8°C inkubiert und erneut zentrifugiert. Dieser Überstand wurde auf pH 8,0, 2 M (NH₄)₂SO₄ eingestellt und auf eine Phenyl Sepharose 26/10 Säule, die mit 100 mM Tris-HCl, pH 8,0 mit 2 M (NH₄)₂SO₄ und 10 mM MgCl₂ äquilibriert war, mit einer Flussrate von 2 ml/min aufgetragen. Die Elution der Proteine erfolgte bei einer Flussrate von 2 ml/min mit einem linearen Gradienten von 2 M bis 0 M (NH₄)₂SO₄. Die Fraktionen mit höchster GAD Aktivität (1,3-0,7 M (NH₄)₂SO₄) wurden vereinigt, gegen 100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM MgCl₂ dialysiert und auf eine Uno Q1 Säule (1 ml) aufgetragen, die in 100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM MgCl₂ äquilibriert war. Die Proteine wurden mit einer Flussrate von 2 ml/min und einem NaCl-Gradienten von 0 bis 1 M eluiert. Die Fraktionen mit höchster GAD Aktivität (0,2-0,4 M NaCl) wurden mittels Ultrafiltration (Ausschlussgröße: 10 kDa) auf ein Volumen von 1 ml konzentriert. Diese Proteinlösung wurde auf eine Superdex 200 HiLoad 16/60 Gelfiltrationssäule aufgetragen, die in 50 mM Tris-HCl, pH 7,1 mit 150 mM NaCl äquilibriert war. Die Proteine wurden mit einer Flussrate von 1 ml/min eluiert. Das Enzym war anschließend apparent homogen und konnte über Wochen ohne signifikanten Aktivitätsverlust bei -20°C gelagert werden.

Reinigung der 2-Keto-3-Deoxygluconat Aldolase (KDGA) aus *P. torridus*. Der zellfreie Extrakt wurde aus 15 g Glucose-gewachsenen Feuchtzellen präpariert. Die Zellen wurden dazu in 35 ml 50 mM Tris/HCl, pH 8,1 suspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels dreimaliger Hochdruckhomogenisation in einer gekühlten French Press Zelle (American Instrument Company, Silver Spring, Maryland, USA) bei 86 bar. Diese Suspension wurde bei 50000 x g und 4°C für 90 min zentrifugiert. Der Überstand wurde auf pH 8,0, 1 M (NH₄)₂SO₄ eingestellt und auf eine Phenyl Sepharose 26/10 Säule, die mit 100 mM Tris/HCl, pH 8,0 mit 1 M (NH₄)₂SO₄ äquilibriert war, mit einer Flussrate von 2 ml/min aufgetragen. Die Elution der Proteine erfolgte bei einer Flussrate von 2 ml/min mit einem linearen Gradienten von 1 M bis 0 M (NH₄)₂SO₄. Die Fraktionen mit höchster KDGA Aktivität (0,3-0,1 M (NH₄)₂SO₄) wurden vereinigt, 30fach mit 50 mM Tris-HCl, pH 7,6 verdünnt und auf eine Uno Q5 Säule (5 ml) aufgetragen, die in 50 mM Tris-HCl, pH 7,6 äquilibriert war. Die Proteine wurden mit einer Flussrate von 2 ml/min und einem NaCl-Gradienten von 0 bis 1 M eluiert. Die Fraktionen mit höchster KDGA Aktivität (0,05-0,15 M NaCl) wurden mittels Ultrafiltration (Ausschlussgröße: 10 kDa) auf ein Volumen von 1 ml konzentriert. Diese Proteinlösung wurde auf eine Superdex 200 HiLoad 16/60 Gelfiltrationssäule aufgetragen, die in 50 mM Tris/HCl, pH 7,1 mit 150 mM NaCl äquilibriert war. Die Proteine wurden mit einer Flussrate von 1 ml/min eluiert. Fraktionen mit höchster KDGA Aktivität wurden auf eine Uno Q1 Säule (1 ml) aufgetragen, die in 100 mM Tris/HCl, pH 8,0 äquilibriert war. Die Proteine wurden mit einer Flussrate von 1 ml/min und einem NaCl-Gradienten von 0 bis 0,5 M eluiert. Apparent homogenes Protein mit KDGA Aktivität eluierte bei 0,15 M NaCl. Das Enzym war anschließend apparent homogen. Dieses Protein konnte ohne signifikanten Aktivitätsverlust über mehrere Wochen bei -20°C gelagert werden.

Reinigung der Glycerinaldehyd Dehydrogenase (GADH) aus *P. torridus*. Der zellfreie Extrakt wurde aus 20 g Glucose-gewachsenen Feuchtzellen präpariert. Die Zellen wurden dazu in 30 ml 50 mM Na-Acetat, pH 6,0 suspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels dreimaliger Hochdruckhomogenisation in einer gekühlten French Press Zelle bei 86 bar. Der 100000 x g Überstand wurde auf pH 4,9 eingestellt und auf eine SP-Sepharose Säule (75 ml) aufgetragen, die in 50 mM Na-Acetat, pH 4,9 äquilibriert war. Die Proteine wurden mit einer Flussrate von 2 ml/min und einem pH Gradienten von 4,9 bis 5,4 gefolgt von einem NaCl Gradienten von 0 bis 2 M NaCl eluiert. Die Fraktionen mit höchster GADH Aktivität (0,1-0,3 M NaCl) wurden auf pH 6,0 eingestellt und auf eine Uno Q1 Säule (1 ml) aufgetragen, die in 100 mM BisTris, pH 6,0 äquilibriert war. Die Proteine wurden mit einer Flussrate von 1 ml/min und einem NaCl-Gradienten von 0 bis 2 M eluiert. Die Fraktion mit höchster GADH

Aktivität (0,1 M NaCl) wurde auf eine Superdex 200 HiLoad 16/60 Gelfiltrationssäule aufgetragen, die in 50 mM Tris/HCl, pH 7,1 mit 150 mM NaCl äquilibriert war. Die Proteine wurden mit einer Flussrate von 1 ml/min eluiert. Das Enzym war anschließend apparent homogen. Dieses Protein zeigte nach wenigen Tagen signifikanten Aktivitätsverlust.

Reinigung der Glycerate Kinase (GCK) aus *P. torridus*. Der zellfreie Extrakt wurde aus 30 g Glucose-gewachsenen Feuchtzellen präpariert. Die Zellen wurden dazu in 35 ml 50 mM Tris/HCl, pH 8,0 suspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels dreimaliger Hochdruckhomogenisation in einer gekühlten French Press Zelle bei 86 bar. Diese Suspension wurde bei 100000 x g und 4°C für 90 min zentrifugiert. Der Überstand wurde auf pH 8,0 und 1,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eingestellt und auf eine Phenyl Sepharose 26/10 Säule, die mit 100 mM Tris-HCl pH 8,0 mit 1,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ äquilibriert war, mit einer Flussrate von 2 ml/min aufgetragen. Die Elution der Proteine erfolgte bei einer Flussrate von 2 ml/min mit einem linearen Gradienten von 1,5 M bis 0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Die Fraktionen mit höchster GCK Aktivität (0,7-0,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) wurden vereinigt, auf 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eingestellt und auf eine Resource Phenyl (1 ml) Säule, die mit 100 mM Tris/HCl, pH 8,0 mit 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ äquilibriert war, mit einer Flussrate von 2 ml/min aufgetragen. Die Fraktionen mit höchster GCK Aktivität (0,8-0,7 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) wurden mittels Ultrafiltration (Ausschlussgröße: 10 kDa) auf ein Volumen von 1 ml konzentriert. Diese Proteinlösung wurde auf eine Superdex 200 HiLoad 16/60 Gelfiltrationssäule aufgetragen, die in 50 mM Tris/HCl, pH 7,1 mit 150 mM NaCl äquilibriert war. Die Proteine wurden mit einer Flussrate von 1 ml/min eluiert. Fraktionen mit höchster GCK Aktivität wurden vereinigt, auf pH 8,0 eingestellt und auf eine Uno Q1 Säule (1 ml) aufgetragen, die in 100 mM Tris-HCl pH 8,0 äquilibriert war. Die Proteine wurden mit einer Flussrate von 1 ml/min und einem NaCl-Gradienten von 0 bis 0,7 M eluiert. Apparent homogenes Protein mit GCK Aktivität eluierte bei 0,06 M NaCl. Dieses Protein konnte ohne signifikanten Aktivitätsverlust über mehrere Wochen bei -20°C gelagert werden.

Reinigung der Glycerinaldehyd-3-Phosphat: Ferredoxin Oxidoreduktase (GAPOR) aus *P. aerophilum*. Der zellfreie Extrakt wurde aus 38 g Glucose-gewachsenen Feuchtzellen präpariert. Die Zellen wurden dazu in 100 mM Tris/HCl, pH 7,5 mit 5 mM Dithioerythritol und 5 mM EGTA suspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte unter aeroben Bedingungen mittels dreimaliger Hochdruckhomogenisation in einer gekühlten French Press Zelle bei 86 bar. Diese Suspension wurde bei 100000 x g und 4°C für 90 min zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine Q-Sepharose HiLoad Säule (22 x 5 cm) aufgetragen, die in 50 mM Tris/HCl, pH 9,0 mit 5 mM DTE äquilibriert war. Die Proteine wurden mit einer Flussrate von 1,5

ml/min und einem pH-Gradienten von pH 9,0 bis pH 7,0 eluiert. Die Fraktionen mit höchster GAPOR Aktivität wurden mittels Ultrafiltration (Ausschlussgröße: 10 kDa) auf ein Volumen von 1 ml konzentriert. Diese Proteinlösung wurde auf eine Superdex 200 HiLoad 16/60 Gelfiltrationssäule aufgetragen, die in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0 mit 150 mM NaCl äquilibriert war. Die Proteine wurden mit einer Flussrate von 1 ml/min eluiert. Fraktionen mit höchster GAPOR Aktivität wurden vereinigt, auf pH 8,0, 1,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eingestellt und auf eine Phenyl Sepharose 26/10 Säule, die mit 100 mM Tris-HCl, pH 8,0 mit 1,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ äquilibriert war, mit einer Flussrate von 1 ml/min aufgetragen. Die Elution der Proteine erfolgte bei einer Flussrate von 1 ml/min mit einem linearen Gradienten von 1,5 M bis 0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Die Fraktionen mit höchster GAPOR Aktivität wurden vereinigt, mit 50 mM Tris/HCl, pH 9,0 verdünnt und auf eine Uno Q1 Säule (1 ml) aufgetragen, die in 50 mM Tris-HCl pH 9,0 äquilibriert war. Die Proteine wurden mit einer Flussrate von 0,5 ml/min und einem NaCl-Gradienten von 0 bis 2 M eluiert. Apparent homogenes Protein mit GAPOR Aktivität eluierte bei 0,5 M NaCl. Dieses Protein konnte ohne signifikanten Aktivitätsverlust unter anaeroben Bedingungen über mehrere Wochen bei -20°C gelagert werden.

4.10 Reinigung von rekombinanten Enzymen

Die allgemeinen Bedingungen für die Reinigung von rekombinanten Proteinen entsprachen denen der nativ gereinigten Proteine (4.9.).

Reinigung der rekombinanten GADH aus *P. torridus*. Das Pellet wurde nach Ernte der Zellen in 50 mM Na-Acetat, pH 6 suspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels dreimaliger Hochdruckhomogenisation in einer gekühlten French Press Zelle bei 86 bar. Diese Suspension wurde bei $48000 \times g$ und 4°C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde für 30 min bei 60°C inkubiert und die hitzepräzipitierten Proteine pelletiert ($100000 \times g$, 4°C , 60 min). Der Überstand wurde auf pH 4,9 eingestellt und auf eine Uno-S5 Säule (5 ml) aufgetragen, die in 50 mM Na-Acetat, pH 4,9 äquilibriert war. Die Proteine wurden mit einer Flussrate von 2 ml/min und einem pH Gradienten von 4,9 bis 5,4 und einem NaCl Gradienten von 0 bis 2 M NaCl eluiert. Die Fraktionen mit höchster GADH Aktivität (0,1-0,4 M NaCl) wurden auf pH 6,0 eingestellt und auf eine Uno Q1 Säule (1 ml) aufgetragen, die in 100 mM BisTris, pH 6,0 äquilibriert war. Die Proteine wurden mit einer Flussrate von 1 ml/min und einem NaCl-Gradienten von 0 bis 2 M eluiert Die Fraktion mit höchster GADH Aktivität (0,1 M NaCl) wurde auf eine Superdex 200 HiLoad 16/60 Gelfiltrationssäule aufgetragen, die in 50 mM Tris/HCl, pH 7,0 mit 150 mM NaCl äquilibriert war. Die Proteine wurden mit einer

Flussrate von 1 ml/min eluiert. Anschließend war das Enzym apparent homogen und für einige Wochen bei 4°C ohne signifikanten Aktivitätsverlust stabil.

Reinigung der rekombinanten GADH aus *T. acidophilum*. Das Pellet wurde nach Ernte der Zellen in 100 mM Tris-HCl pH 7,4 mit 0,3 M NaCl und 4 mM Imidazol suspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels dreimaliger Hochdruckhomogenisation in einer gekühlten French Press Zelle bei 86 bar. Diese Suspension wurde bei 100000 x g, 4°C für 60 min zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine Nickel-NTA Säule (7 ml) aufgetragen, die in 100 mM Tris/HCl, pH 7,4 mit 0,3 M NaCl und 4 mM Imidazol äquilibriert war. Die Proteine wurden bei einer Flussrate von 1 ml/min mit drei steigenden Imidazolgradienten (4 bis 20 mM, 20 bis 100 mM und 100 bis 400 mM) eluiert. Die Fraktion mit höchster GADH Aktivität wurde für 60 min bei 58°C inkubiert und die hitzepräzipitierten Proteine pelletiert (100000 x g, 4°C, 60 min). Anschließend war das Protein apparent homogen und wurde bei 4°C für einige Wochen ohne signifikanten Aktivitätsverlust gelagert.

Reinigung der rekombinanten KDG-Aldolase aus *P. torridus*: Das Pellet wurde nach Ernte der Zellen in 50 mM Tris-HCl pH 8,2 mit 0,3 M NaCl und 5 mM Imidazol suspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels dreimaliger Hochdruckhomogenisation in einer gekühlten French Press Zelle bei 86 bar. Diese Suspension wurde bei 100000 x g, 4°C für 60 min zentrifugiert. Der Überstand wurde für 45 min bei 58°C inkubiert und die hitzepräzipitierten Proteine pelletiert (100000 x g, 4°C, 60 min). Der Überstand wurde auf eine Nickel-NTA Säule (15 ml) aufgetragen, die in 50 mM Tris/HCl, pH 8,2 mit 0,3 M NaCl und 5 mM Imidazol äquilibriert war. Die Proteine wurden bei einer Flussrate von 1 ml/min mit drei steigenden Imidazolgradienten (5 bis 20 mM, 20 bis 100 mM und 100 bis 500 mM) eluiert. Anschließend war das Protein apparent homogen und wurde bei 4°C für einige Wochen ohne signifikanten Aktivitätsverlust gelagert.

4.11 Charakterisierung von gereinigten Enzymen

Zur Charakterisierung der Enzyme gehörten die Bestimmung der kinetischen Parameter, des Temperaturoptimums, der Thermostabilität und des pH-Optimums. Die kinetischen Parameter wurden jeweils aus der Darstellung der Daten nach Lineweaver-Burk ermittelt. Die Bestimmung der Temperaturstabilität erfolgte durch Inkubation in geschlossenen Gefäßen für 120 min. Nach der Inkubation wurden die Inkubationsgefäße jeweils für 10 min auf Eis gekühlt und anschließend die Restaktivität unter Standardbedingungen bestimmt.

4.11.1 Gluconat Dehydratase (GAD)

Gluconat Dehydratase katalysiert die irreversible Umwandlung von Gluconat in 2-Keto-3-Deoxygluconate unter Abspaltung von H₂O. Die Aktivität der Gluconat Dehydratase wurde anhand der Bildung des Produktes 2-Keto-3-Deoxygluconat (KDG) im diskontinuierlichen Test gemessen. Die quantitative Bestimmung von KDG erfolgte colorimetrisch (4.5.2). Der Testansatz für die Gluconat Dehydratase enthielt 50 mM Na-Phosphat, pH 6,2, 20 mM MgCl₂, 10 mM Gluconat und Extrakt. Der Einfluss der Temperatur auf die Enzymaktivität der Gluconat Dehydratase wurde zwischen 49°C und 83°C getestet. Zur Bestimmung der Temperaturstabilität des gereinigten Enzyms wurde jeweils gereinigtes Protein in geschlossenen Inkubationsgefäßen bei Temperaturen zwischen 60°C und 90°C inkubiert. Die Testansätze enthielten: 6 µg Protein in 100 µl Na-Phosphat, pH 6,2 und 50 mM MgCl₂. Die Abhängigkeit der spezifischen Aktivität des gereinigten Enzyms vom pH-Wert wurde zwischen 4,0 und 7,5 bei 60°C mit entweder Na-Acetat (pH 4,0 bis pH 6,0) oder Na-Phosphat (pH 6,2 bis pH 7,5) getestet. Der Testansatz für den K_m -Wert von Gluconat enthielt 20 mM MgCl₂ und 0 bis 10 mM Gluconat. Der Testansatz für die Abhängigkeit der Aktivität von der MgCl₂ Konzentration enthielt 50 mM Na-Phosphat pH 6,2, 10 mM Gluconat und 0-50 mM MgCl₂.

4.11.2 2-Keto-3-Deoxygluconat Aldolase (KDGA)

KDGA katalysiert die reversible Spaltung von KDG in Glycerinaldehyd und Pyruvat. Die Aktivität der KDG-Aldolase wurde als Bildung von KDG bestimmt (Test 1) oder indem die KDG bzw. KDPG abhängige Bildung von Pyruvat bei 55°C-65°C gemessen wurde (Test 2) (xxx). Der Einfluss der Temperatur auf die Enzymaktivität der Aldolase wurde zwischen 49°C und 83°C getestet (Test 1). Zur Bestimmung der Temperaturstabilität des gereinigten Enzyms wurde jeweils gereinigtes Protein in geschlossenen Inkubationsgefäßen bei Temperaturen zwischen 60°C und 90°C inkubiert. Die Testansätze enthielten: 3 µg Protein in 100 µl Na-Phosphat pH 6,2. Die Abhängigkeit der spezifischen Aktivität des gereinigten Enzyms vom pH-Wert wurde zwischen 4,0 und 7,5 bei 60°C im kontinuierlichen Testsystem mit entweder 50 mM Na-Acetat (pH 4,0 bis pH 6,0) oder 50 mM Na-Phosphat (pH 6,2 bis pH 7,5) getestet. Der Testansatz für den K_m -Wert von Pyruvat enthielt 1 bis 25 mM Pyruvat und 10 mM Glycerinaldehyd (Test 1). Der Testansatz enthielt für den K_m -Wert von Glycerinaldehyd (2-20 mM) und für den K_m -Wert Glycerinaldehyd-3-Phosphat (0,5-10mM) und je 25 mM Pyruvat. Der Testansatz für den K_m -Wert von KDG enthielt 0,06 bis 0,84 mM KDG und für den K_m -Wert von KDPG 2 mM bis 32 mM KDPG (Test 2). Der Testansatz

(Test 1) für die Bestimmung der Substratspezifität in Richtung der Bildung von 2-Keto-3-Deoxy-Verbindungen enthielt: Glycolaldehyd (1-20 mM), D-Ribose (25 mM), D-Xylose (50 mM), L-Arabinose (25 mM), D-Arabinose (25 mM), Acetaldehyd (25 mM), Crotonaldehyd (25 mM) mit je 25 mM Pyruvat.

4.11.3 Glycerinaldehyd Dehydrogenase (GADH)

Die GADH katalysiert die irreversible NADP^+ -abhängige Oxidation von Glycerinaldehyd zu Glycerat. Die Aktivität der GADH wurde bei 58°C als Glycerinaldehyd- und NADP^+ -abhängige Bildung von Glycerat und NADPH bestimmt. Der Testansatz enthielt für die GADH aus *P. torridus* 100 mM HEPES pH 6,9 und für die GADH aus *T. acidophilum* 100 mM HEPES pH 7,9 mit jeweils 1 mM NADP^+ und Glycerinaldehyd. Der Einfluss der Temperatur auf die Enzymaktivität wurde zwischen 40°C und 77°C getestet. Zur Bestimmung der Temperaturstabilität des gereinigten Enzyms wurde jeweils Protein in geschlossenen Inkubationsgefäßen bei Temperaturen von 50°C, 60°C und 70°C inkubiert. Die Testansätze enthielten: 6 µg Protein in 60 µl 100 mM HEPES pH 7,0. Die Abhängigkeit der spezifischen Aktivität des gereinigten Enzyms vom pH-Wert wurde zwischen 4,0 und 8,8 bei 58°C mit entweder 100 mM Na-Acetat (pH 4,0 bis pH 6,0), 100 mM HEPES (pH 6,0 bis pH 8,2) oder 200 mM CHES (pH 8,3 bis pH 8,8) getestet. Der Testansatz für die Bestimmung der K_m und V_{max} -Werte enthielt: Glycerinaldehyd (0-2 mM) mit 1 mM NADP^+ , Glycerinaldehyd-3-Phosphat (0-10 mM) mit 1 mM NADP^+ und Glycolaldehyd (0-30 mM) mit 1 mM NADP^+ . Der Testansatz für die Bestimmung der Substratspezifität enthielt: Formaldehyd (0-7 mM), Benzaldehyd (0-12 mM), Acetaldehyd (0-12 mM), Crotonaldehyd (0-10 mM) und Dihydroxyaceton (0-12 mM) mit je 1 mM NADP^+ . NADP^+ wurde durch NAD^+ (0-5 mM) mit Glycerinaldehyd 1 mM ersetzt.

4.11.4 Glycerat Kinase (GCK)

Die GCK katalysiert die irreversible ATP-abhängige Phosphorylierung von Glycerat zu 2-Phosphoglycerat. Die Aktivität der Glyceratkinase wurde bei 50°C als ATP- und D-Glycerat-abhängige Bildung von 2-Phosphoglycerat (Test 2) oder ADP (Test 1) bestimmt. Der Einfluss der Temperatur auf die Enzymaktivität wurde zwischen 42°C und 62°C getestet (Test 1). Zur Bestimmung der Temperaturstabilität des gereinigten Enzyms wurde jeweils gereinigtes Protein in geschlossenen Inkubationsgefäßen bei Temperaturen von 60°C, 70°C und 80°C inkubiert. Die Testansätze enthielten: 0,024 µg Protein in 20 µl Tris/HCL, pH 8,0. Die Abhängigkeit der spezifischen Aktivität (Test 1) des gereinigten Enzym vom pH-Wert wurde zwischen 5,5 und 8,1 bei 50°C mit entweder 100 mM Na-Acetat (pH 5,5 bis pH 6,0), 100 mM

BisTris (pH 5,7 bis pH 7,3), 100 mM HEPES (pH 6,1 bis pH 7,7) oder 100 mM Tris/HCL (pH 7,3 bis pH 8,1) getestet. Verschiedene zweiwertige Kationen wurden unter Standardbedingungen im Testsystem (Test 1) bei 50°C getestet, indem Mg^{2+} durch jeweils die gleiche Konzentration (10 mM) an Mn^{2+} , Co^{2+} oder Ni^{2+} ersetzt wurde. Die Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von K^+ wurde bis zu einer Konzentration von 50 mM getestet, das Kation wurde als Chlorid zugegeben. Die Nukleotidspezifität wurde im Testsystem (Test 2) bei 50°C getestet, indem ATP durch jeweils die gleiche Konzentration (4 mM) an UTP, CTP, GTP oder Acetyl-Phosphat ersetzt wurde. Das Testsystem enthielt 50 μM Mg^{2+} um sicherzustellen, dass die Aktivität des Hilfsenzym Pyruvat Kinase nicht limitierend war. Der Testansatz (Test 2) für die Bestimmung der K_m und V_{max} -Werte enthielt: DL-Glycerat (0-2,6 mM), ATP (0-4 mM) und Mg^{2+} (0-20 mM). Der Testansatz (Test 1) für die Bestimmung der Substratspezifität enthielt: D-Glycerat (2,6 mM), L-Glycerat (2,6 mM), Gluconat (0-12 mM), Glucuronat (0-12 mM), Glycerinaldehyd (0-5 mM), Dihydroxyaceton (0-12 mM), Glycerinaldehyd-3-Phosphat (0-3 mM) und Glucose (0-12 mM). Die Bildung von 3-Phosphoglycerat als Reaktionsprodukt wurde in einem diskontinuierlichen Test bei 50°C überprüft. Der Reaktionsansatz enthielt (1 ml): 100 mM Tris/HCl, pH 7,3, 2,6 mM D,L-Glycerat, 10 mM $MgCl_2$, 2 mM ATP, 5 mM EGTA und Protein. Nach Inkubation von 30 Minuten wurden die Reaktionsgefäße für 10 Minuten auf Eis gestellt. 3-Phosphoglycerat wurde anhand der Bildung von GAP bestimmt, indem an die Oxidation von NADH über 3-Phosphoglycerat Kinase und GAPDH gemessen wurde. Der Testansatz (1 ml) enthielt: 50 mM Na-Phosphat, pH 8,0, 1 mM ATP, 0,2 mM NADH und 100 μl Reaktionsansatz. Die Oxidation von NADH wurde nach Zugabe von 8 U GAPDH und 9 U 3-Phosphoglycerat Kinase verfolgt.

4.11.5 Glycerinaldehyd-3-Phosphat: Ferredoxin Oxidoreduktase (GAPOR)

Die GAPOR katalysiert die irreversible Ferredoxin-abhängige Oxidation von Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) zu 3-Phosphoglycerat. Die Aktivität des Enzyms wurde bei 50°C bestimmt, indem die Reduktion des künstlichen Elektronenakzeptors Benzylviologen unter anaeroben Bedingungen in 50 mM KPP pH 8,0, 5 mM DTE und 500 μM GAP gemessen wurde (Mukund und Adams 1995). Zur Bestimmung der Temperaturstabilität des gereinigten Enzyms wurde gereinigtes Protein in geschlossenen Inkubationsgefäßen bei einer Temperatur von 100°C bis zu 120 min anaerob inkubiert. Die Testansätze enthielten: 7,5 μg Protein in 30 μl 100 mM K-Phosphat pH 7,5. Nach der Inkubation wurden die Inkubationsgefäße jeweils für 4 min auf Eis gekühlt und anschließend

die Restaktivität bei 50°C unter Standardbedingungen bestimmt. Die Abhängigkeit der spezifischen Aktivität des gereinigten Enzyms vom pH-Wert wurde zwischen 5,5 und 8,5 bei 50°C mit 25 mM Na-Acetat getestet. Der Testansatz für die Bestimmung der k_m und V_{max} -Werte enthielt: Glycerinaldehyd-3-Phosphat (0-0,3 mM) mit 5 mM Benzylviologen und Benzylviologen (0-10 mM) mit 0,14 mM GAP. Der Testansatz für die Bestimmung der Substratspezifität enthielt statt GAP, Formaldehyd (10 mM), Glycerinaldehyd (10 mM) und Acetaldehyd (10 mM) mit je 5 mM Benzylviologen.

5 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden die glycolytischen Abbauwege in dem thermoacidophilen Euryarchaeon *Picrophilus torridus* und dem aeroben hyperthermophilen Crenarchaeon *Pyrobaculum aerophilum* analysiert und als neuartiger, nicht phosphorylierter, Entner-Doudoroff (ED)-Weg in *P. torridus* bzw. modifizierter Embden-Meyerhof (EM)-Weg in *P. aerophilum* beschrieben.

1. Die Beteiligung eines ED-Weges *in vivo* wurde durch Wachstum von *P. torridus* auf spezifisch markierter ^{13}C -Glucose und anschließender NMR-spektroskopischer Analyse des Alanins im Zellprotein nachgewiesen.
2. Zellextrakte Glucose-gewachsener Zellen von *P. torridus* wurden auf das Vorkommen von Enzymen verschiedener ED-Wege, der semiphosphorylierten (spED) und nicht-phosphorylierten (npED) Variante untersucht. Es wurden alle Enzyme eines npED-Weges nachgewiesen.
3. Die Schlüsselenzyme des npED-Weges, Gluconat Dehydratase (GAD), KDG-Aldolase, Glycerinaldehyd Dehydrogenase (GADH) und Glycerat Kinase (GCK) wurden gereinigt, charakterisiert sowie die kodierenden Gene identifiziert und Sequenzanalysen durchgeführt. Dabei wurde eine neuartige KDG-spezifische Aldolase identifiziert und charakterisiert.
4. Die Aktivitäten der KDG bzw. KDPG Umsetzung wurden in Extrakten von *Thermoplasma acidophilum* und *Sulfolobus acidocaldarius* gemessen.
5. Zellextrakte Maltose-gewachsener Zellen von *Pyroboculum aerophilum* wurden auf das Vorkommen von Enzymen des EM-Weges untersucht. Es konnten alle Enzyme eines modifizierten EM-Weges, darunter eine Glycerinaldehyd-3-Phosphat: Ferredoxin Oxidoreduktase (GAPOR), nachgewiesen werden. Dieses Schlüsselenzym des modifizierten EM-Weges wurde gereinigt, charakterisiert und das kodierende Gen identifiziert.

5.1 Der nicht-phosphorylierte Entner-Doudoroff-Weg (npED) in *Picrophilus torridus*

5.1.1 Wachstum von *P. torridus* mit Glucose

P. torridus wurde unter aeroben Bedingungen bei 59°C und einem pH Wert von 0,9 in Anwesenheit von 25 mM Glucose und 0,2% Hefeextrakt in 100 ml Erlenmeyerkolben mit 20 ml Medium gezüchtet. Unter diesen Bedingungen wuchs *P. torridus* mit einer Verdopplungszeit von ca. 8-10 Stunden auf eine maximale optische Dichte bei 600 nm von 1,6. In Abwesenheit von Glucose wuchs der Organismus auf Hefeextrakt mit einer vergleichbaren Verdopplungszeit auf eine maximale optische Dichte bei 600 nm von 1,1. Dies zeigt, dass die Zugabe von Glucose zu einer 40%igen Steigerung des Wachstums führt. Eine vergleichbare Stimulation des Wachstums durch Glucose wurde auch bei geringeren Hefeextraktkonzentrationen gefunden. Eine Reduktion der Hefeextraktkonzentration auf 0,1% bzw. 0,05% in Gegenwart von Glucose (25 mM) führte zu maximalen optischen Dichten bei 600 nm von 0,95 bzw. 0,55.

Zur Gewinnung von Zellmasse für enzymatische Untersuchungen und zur Enzymreinigung wurde *P. torridus* in einem 8 l Fermenter (Fairmen Tec) gezüchtet, dessen Kulturgefäß aus säurebeständigen Borosilikatglas besteht und dessen produktberührende Teile metallfrei sind. Die Kultivierung erfolgte unter aeroben Bedingungen mit einer Druckluftdurchgasung von 300 ml/min und einer Rührergeschwindigkeit von 200 Upm bei 59°C und einem pH Wert von 0,9 in Anwesenheit von 22 mM Glucose und 0,2% Hefeextrakt. Die Erhöhung des Kulturvolumens von 20 ml auf 5 l hatte keinen Einfluss auf die erreichten Zelldichten, jedoch war die Verdoppelungszeit verlangsamt (13-20 Stunden). Eine typische Wachstumskinetik in Anwesenheit von 22 mM Glucose und 0,2% Hefeextrakt im 8 l Fermenter ist in Abbildung 4 gezeigt.

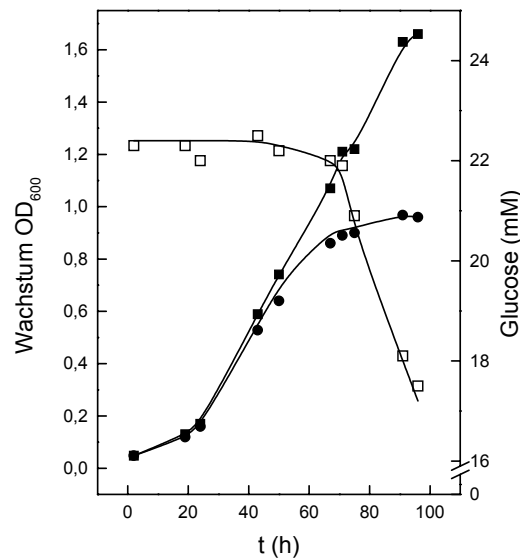


Abbildung 4: Wachstum von *P. torridus* in einem 8 l Fermenter mit 5000 ml Medium, pH 0,9, 0,2 % Hefeextrakt und 22 mM Glucose. Dargestellt sind die Zunahme der optischen Dichte bei 600 nm und die Substratabnahme (Glucose (□)) in Abhängigkeit der Zeit. (■) OD in Medium mit Hefeextrakt und Glucose, (●) OD in Medium mit Hefeextrakt.

Anhand des Glucoseverbrauchs konnte das Wachstum in zwei Phasen untergliedert werden. Bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm von etwa 1,0 wuchs der Organismus auf Hefeextrakt, wobei kein signifikanter Glucoseverbrauch zu beobachten war. In der zweiten Phase wuchs der Organismus auf Glucose, wobei bis zum Erreichen der stationären Phase (OD 600 von 1,6) 5 mM Glucose umgesetzt wurde.

Die Daten zeigen, dass bei Wachstum von *P. torridus* mit Hefeextrakt und Glucose diese Substrate sequenziell umgesetzt werden, wobei Hefeextrakt das bevorzugte Substrat ist.

5.1.2 ¹³C-Markierungsexperimente in *P. torridus*

Um zu überprüfen, welcher glycolytische Abbauweg *in vivo* an der Umsetzung von Glucose zu Pyruvat beteiligt ist, wurden Wachstumsexperimente mit positionsmarkierter ¹³C-Glucose durchgeführt. Hierbei ermöglicht das Markierungsmuster der von Pyruvat abgeleiteten Aminosäure Alanin im Zellprotein Rückschlüsse auf den beteiligten Abbauweg. Damit ein möglichst hoher Anteil des Alanins aus Glucose gebildet wird, wurden Wachstumsbedingungen ermittelt, die zu einer Erhöhung der aus Glucose gebildeten Zellmasse führten. Es zeigte sich, dass bei pH 0,3 und 0,1% Hefeextrakt die Stimulation des Wachstums durch Glucose auf bis zu 200% gesteigert werden konnte. Unter diesen Bedingungen wurde *P. torridus* mit [1-¹³C] Glucose bzw. [3-¹³C] Glucose gezüchtet und die Verteilung der Markierung im Alanin, nach Extraktion der Aminosäure aus dem Zellprotein,

massenspektroskopisch analysiert. Nach Wachstum von *P. torridus* mit [1-¹³C] Glucose war ausschließlich die C₁-Position im Alanin markiert. Bei Wachstum mit [3-¹³C] Glucose wurde eine Markierung ausschließlich der C₃-Position im Alanin beobachtet. Die Markierungsexperimente zeigten, dass Glucose *in vivo* ausschließlich über einen ED-Weg zu Pyruvat abgebaut wird. Ein für den EM-Weg typisches Markierungsmuster mit einer Markierung der C₁-Position im Alanin nach Wachstum mit [3-¹³C] Glucose bzw. der C₃-Position im Alanin nach Wachstum mit [1-¹³C] Glucose wurde nicht beobachtet. Somit konnte die Beteiligung eines EM-Weges ausgeschlossen werden.

Die massenspektroskopischen Analysen erfolgten durch Tobias Fuhrer (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Uwe Sauer, ETH; Zürich, Schweiz).

5.1.3 Enzymaktivitäten in Zellextrakten von *P. torridus*

Die ¹³C-NMR Analysen haben gezeigt, dass *P. torridus* Glucose *in vivo* über einen ED-Weg zu Pyruvat umsetzt. Um zu prüfen, welche Variante des ED-Weges, die klassische, semiphosphorylierte oder nicht-phosphorylierte Variante, vorliegt, wurden Enzymuntersuchungen in Zellextrakten durchgeführt.

In Extrakten Glucose gewachsener Zellen von *P. torridus* konnten alle Enzyme eines nicht-phosphorylierten-ED-Weges (npED) nachgewiesen werden: Glucose Dehydrogenase, Gluconat Dehydratase, KDG-Aldolase, Glycerinaldehyd Dehydrogenase, Glycerat Kinase, Enolase und Pyruvat Kinase. Die spezifischen Aktivitäten und apparenten K_m -Werte der Enzyme des npED-Weges sowie die Reaktionsrichtungen sind in Tabelle 4 dargestellt.

Neben den Enzymen eines npED-Weges enthielten Zellextrakte auch sehr geringe Aktivitäten einer KDPG-Aldolase. Die spezifische Aktivität der KDPG-Spaltung betrug 0,003 Umg⁻¹. Im Vergleich zu der Aktivität der KDG Umsetzung (0,07 Umg⁻¹) betrug die Aktivität der KDPG Umsetzung jedoch weniger als 5 %. Aktivitäten von Schlüsselenzymen anderer Varianten von ED-Wegen, wie einer bifunktionellen KDPG/KDG-Aldolase mit einer hohen Rate mit KDPG, einer KDG-Kinase oder 6-Phosphogluconat Dehydratase, konnten nicht gefunden werden.

Eine mögliche Regulation der Enzyme des npED-Weges wurde anhand vergleichender Untersuchungen von Extrakten Glucose/Hefeextrakt- und Hefeextrakt-gewachsener Zellen untersucht. Die spezifischen Aktivitäten der Enzyme des npED-Weges in Extrakten Hefeextrakt-gewachsener Zellen sind in Tabelle 4 dargestellt. Die Aktivitäten der Enzyme in Zellextrakten ohne Glucose entsprachen den Aktivitäten in Extrakten Glucose-gewachsener Zellen, was zeigt, dass die Enzyme des npED-Weges durch Glucose nicht signifikant reguliert werden.

Tabelle 4: Aktivitäten der Enzyme eines nicht-phosphorylierten Entner-Doudoroff-Weges in Zellextrakten von *P. torridus* nach Wachstum mit Hefeextrakt/Glucose- und Hefeextrakt. Abkürzungen, GA: Glycerinaldehyd, KDG: 2-Keto-3-Deoxygluconat; PEP: Phosphoenolpyruvat, 2-PG: 2-Phosphoglycerat, Pyr: Pyruvat.

Enzymaktivität	Hefeextrakt/Glucose	Hefeextrakt	Apparenter K_m (mM)
	Spezifische Aktivität (Umg^{-1})	Spezifische Aktivität (Umg^{-1})	
Glucose Dehydrogenase [Glucose + NADP^+ → Gluconat + NADPH]	0,49	0,42	6,5 (Glucose) 0,07 (NADP^+)
Gluconat Dehydratase [Gluconat → KDG]	0,03	0,04	-
KDG-Aldolase [GA + Pyr → KDG] [KDG → GA + Pyr]	0,12 0,07	0,11 0,07	2,7 (GA) 0,4 (KDG)
Glycerinaldehyd Dehydrogenase [GA + NADP^+ → Glycerat + NADPH]	0,14	0,1	0,05 (GA) 0,4 (NADP^+)
Glycerat Kinase [Glycerat + ATP → 2-PG + ADP]	0,10	0,09	-
Enolase [2-PG → PEP]	0,04	0,04	-
Pyruvat Kinase [PEP + ADP → Pyr + ATP]	0,03	0,03	-

5.1.4 Enzyme des Embden-Meyerhof (EM)-Weges

Im Genom von *P. torridus* waren mehrere reversible Enzyme des EM-Weges, wie Phosphoglycerat Mutase, Phosphoglycerat Kinase, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, Triosephosphat Isomerase und Phosphoglucose Isomerase annotiert. In Extrakten Glucose-gewachsener Zellen konnten diese Enzyme nachgewiesen werden. Die spezifischen Aktivitäten und apparenten K_m -Werte der Enzyme sowie die Reaktionsrichtungen sind in Tabelle 5 dargestellt. Da die ^{13}C -NMR Analyse zeigt, dass Glucose *in vivo* über einen ED-Weg abgebaut wird, können die Enzyme des EM-Weges nur eine gluconeogenetische Funktion haben. Um zu prüfen, ob die Enzyme unter gluconeogenetischen Bedingungen, d.h. in Abwesenheit von Glucose, induziert werden, wurden Untersuchungen in Extrakten Hefeextrakt-gewachsener Zellen durchgeführt. Die spezifischen Aktivitäten sind in Tabelle 5 angegeben. Es zeigte sich, dass unter diesen Bedingungen die Aktivitäten der Enzyme den Aktivitäten in Extrakten Glucose-gewachsener Zellen entsprachen, was dafür spricht, dass die Enzyme der Gluconeogenese konstitutiv sind.

Tabelle 5: Spezifische Aktivitäten von Enzymen der Gluconeogenese in Extrakten von *P. torridus* nach Wachstum mit Hefeextrakt/Glucose und Hefeextrakt. Die Reaktionsrichtung steht in Klammern. Abkürzungen, 1,3-BPG: 1,3-Bisphosphoglycerat, DHAP: Dihydroxyacetonphosphat, F-6-P: Fructose-6-Phosphat, GAP: Glycerinaldehyd-3-Phosphat, 2-PG: 2-Phosphoglycerat; 3-PG: 3-Phosphoglycerat.

Enzymaktivität	Hefeextrakt/Glucose	Hefeextrakt	
	Spezifische Aktivität (Umg^{-1})	Spezifische Aktivität (Umg^{-1})	Apparenter K_m (mM)
Phosphoglycerat Mutase [3-PG \rightarrow 2-PG]	0,07	0,05	-
Phosphoglycerat Kinase [3-PG \rightarrow 1,3-BPG]	0,03	0,03	1,7 (3-PG), 0,48 (ATP)
Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase [1,3-BPG + NADPH \rightarrow GAP + NADP $^+$]	0,03	0,03	-
Triosephosphat Isomerase [GAP \rightarrow DHAP]	0,64	0,88	0,6 (GAP)
Phosphoglucose Isomerase [F-6-P \rightarrow Glucose-6-Phosphat]	0,03	0,03	-

5.1.5 Reinigung und Charakterisierung der Schlüsselenzyme des nicht-phosphorylierten Entner-Doudoroff-Weges in *Picrophilus torridus*

Die ^{13}C -NMR Analysen und enzymatischen Untersuchungen haben gezeigt, dass *P. torridus* Glucose über einen npED-Weg zu Pyruvat umsetzt. Als einziges Enzym des npED-Weges wurde bisher die Glucose Dehydrogenase charakterisiert (Angelov *et al.* 2005). Im Folgenden werden die Reinigung und Charakterisierung von vier Enzymen des Weges, der Gluconat Dehydratase, KDG-Aldolase, Glycerinaldehyd Dehydrogenase und Glycerat Kinase, beschrieben. Die Enzyme wurden aus Glucose-gewachsenen Zellen von *P. torridus* gereinigt und in Bezug auf die molekularen und katalytischen Eigenschaften sowie das pH- und Temperaturoptimum charakterisiert. Die kodierenden Gene wurden identifiziert und Sequenzanalysen durchgeführt.

Gluconat Dehydratase

Die Gluconat Dehydratase katalysiert die Umsetzung von Gluconat zu 2-Keto-3-Desoxygluconat (KDG). Die Aktivität des Enzyms wurde anhand der Bildung des Produktes KDG im diskontinuierlichen Test gemessen. Die Reinigung der Gluconat Dehydratase erfolgte bis zur apparenten Homogenität über eine Ammoniumsulfat-Präzipitation und drei säulenchromatographische Schritte. Dabei wurde die Gluconat Dehydratase mit einer Gesamtausbeute von 1,4% und einer spezifischen Aktivität von 5 U mg^{-1} (55°C) 189-fach angereichert (Tabelle 6). Nach dem letzten Schritt zeigte sich auf dem SDS-Gel nur eine Bande (Abbildung 5).

Tabelle 6: Reinigung der Gluconat Dehydratase aus *P. torridus*. Die Enzymaktivität wurde bei 55°C im diskontinuierlichen Testsystem als Gluconat-abhängige Bildung von KDG in 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,2 mit 20 mM MgCl_2 und 10 mM Gluconat bestimmt.

Reinigungsschritt	Protein (mg)	Aktivität (U)	Spez. Aktivität (U mg^{-1})	Ausbeute (%)	Anreicherung (-fach)
Zellfreier Extrakt	2464	67,6	0,027	100	1
Ammoniumsulfat-Fällung	816	90,3	0,11	130	4,1
Phenyl Sepharose	24,5	47,5	1,9	70	70,3
Anionenaustauscher	0,46	1,7	3,6	2,5	133
Gelfiltration	0,182	0,93	5,1	1,4	189

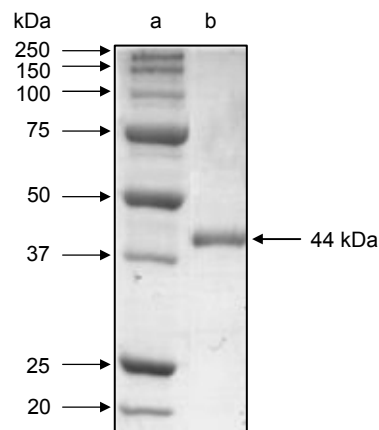


Abbildung 5: Reinigung der Gluconat Dehydratase aus *P. torridus*. SDS-PAGE und anschließende Färbung mit Coomassie Brilliantblau von gereinigter Gluconat Dehydratase. Die Pfeile auf der linken Seite deuten auf die Markerproteine, der Pfeil rechts auf die Bande der Gluconat Dehydratase. Spur a: Molekulargewichtsstandard; Spur b: nach Gelfiltration.

Biochemische Charakterisierung: Das apparente native Molekulargewicht der Gluconat Dehydratase aus *P. torridus* wurde mit 340 kDa, das der Untereinheit mit 44 kDa bestimmt. Die Ergebnisse sprechen für eine homooctamere Struktur des Proteins (Tabelle 7). Das pH Optimum der Gluconat Dehydratase wurde mit pH 6 bestimmt. Bei pH 4,5 bzw. pH 9 konnte noch 50% der Aktivität nachgewiesen werden. Das Enzym zeigte ein Temperaturoptimum von 70°C. Bei dieser Temperatur zeigte das Enzym eine geringe Thermostabilität mit einer Halbwertszeit von ca. 15 min. Bei 60°C war über einen Zeitraum von 120 Minuten kein Aktivitätsverlust der Gluconat Dehydratase messbar.

Kinetischen Eigenschaften: Die Abhängigkeit der Raten des Enzyms von Gluconat zeigte eine Michaelis-Menten-Kinetik mit einem apparenten K_m -Wert von 2,5 mM und einem apparenten V_{max} -Wert von 19,2 Umg^{-1} (Abbildung 6). Die katalytische Aktivität der Gluconat Dehydratase war abhängig von Mg^{2+} mit einem apparenten K_m -Wert von 4,2 mM (Tabelle 7).

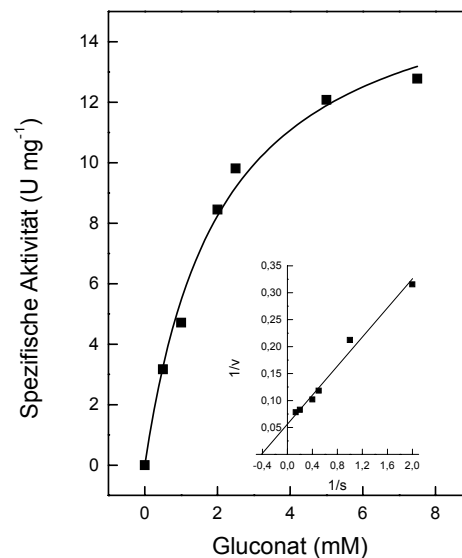


Abbildung 6: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der Gluconat Dehydratase aus *P. torridus* von der Konzentration an Gluconat. Der Einschub zeigt die doppelt-reziproken Auftragungen nach Lineweaver-Burk.

Tabelle 7: Molekulare und kinetische Eigenschaften der Gluconat Dehydratase aus *P. torridus*. Die kinetischen Konstanten wurden bei 60°C bestimmt.

Parameter	GAD
Apparente molekulare Masse des Enzyms (kDa)	340
Apparente molekulare Masse der Untereinheit (kDa)	44
Oligomere Struktur	α_8
pH Optimum	5,5-6,5
Temperaturoptimum (°C)	70
Apparenter V_{\max} (Umg ⁻¹)	
Gluconat	19,2
Apparenter K_m (mM)	
Gluconat	2,5
Mg ²⁺	4,2

Identifizierung des kodierenden Gens: Durch die massenspektroskopische Analyse (MALDI-TOF) des gereinigten Enzyms wurde im Genom von *P. torridus* eindeutig ein offener Leserahmen (Pto0485) mit 34%iger Übereinstimmung der detektierten Peptide identifiziert. Pto0485, der als *gluconate/galactonate dehydratase* annotierte war, stellt das Gluconat Dehydratase kodierende Gen, *gad*, dar. Das Gen kodiert für ein Protein mit 391 Aminosäuren, was einer kalkulierten Masse von 44,2 kDa entspricht und mit der experimentell bestimmten molekularen Masse der Untereinheit der gereinigten Gluconat Dehydratase übereinstimmt.

Sequenzanalyse: Basierend auf der Aminosäuresequenz von Pto0485 wurde eine BlastP-Suche gegen die NCBI-Datenbank durchgeführt. Pto0485 zeigte hohe Sequenzidentitäten zu der Gluconat Dehydratase von *Sulfolobus solfataricus* (44%) (SSO3198) und zu weiteren Proteinen der Mandelat-Racemase (MR)-like Subfamilie (cd03316) der Enolase Superfamilie. Das in Abbildung 7 dargestellten Sequenzalignment von Gluconat Dehydratasen aus *P. torridus* (Pto0485) und *S. solfataricus* (SSO3198) sowie von weiteren putativen archaellen Homologen zeigte eine Reihe von konservierten Aminosäuren. Dazu gehören drei Glutamate, die als Liganden für Mg^{2+} dienen sowie konservierte Histidin und Aspartat Reste, die als allgemeine Säure-Base-Katalysatoren an der Katalyse beteiligt sind (Lamble *et al.* 2004).

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Pto0485 homolog zu der Gluconat Dehydratase von *Sulfolobus solfataricus* ist und der Mandelat-Racemase(MR)-like Subfamilie der Enolase Superfamilie zugeordnet werden kann.

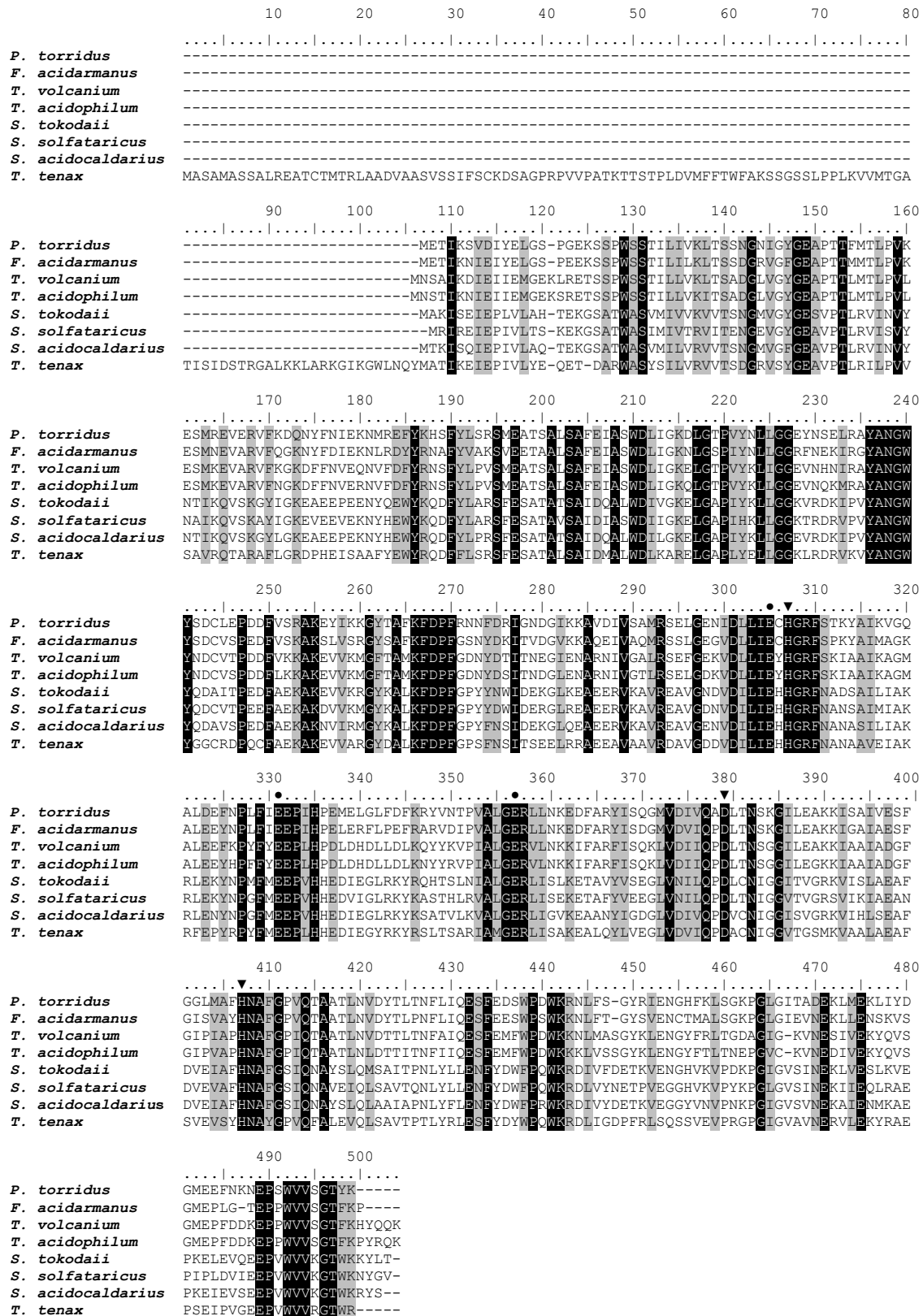


Abbildung 7: Alignment der Sequenzen der Gluconat Dehydratase von *P. torridus* (Pto0485) und *S. solfataricus* (Sso3198) sowie von putativen archaeellen Homologen. (●) Glutamat-Liganden für Mg²⁺, (▼) konservierte Arg und Asp als Säure-Base-Katalysatoren. NCBI gi-Nummern: *Picrophilus torridus* (gi: 48477557); *Ferroplasma acidarmanus* (gi:126008286); *Thermoplasma volcanium* (gi: 13540999); *Thermoplasma acidophilum* (gi: 16082480); *Sulfolobus tokodaii* (gi: 15922698); *Sulfolobus solfataricus* (gi: 15899900); *Sulfolobus acidocaldarius* (gi: 70606673); *Thermoproteus tenax* (gi: 41033591).

KDG-Aldolase

Die Reinigung der KDG-Aldolase bis zur apparenten Homogenität erfolgte über vier säulenchromatographische Schritte. Dabei wurde die KDG-Aldolase mit einer Gesamtausbeute von 3,6% und einer spezifischen Aktivität von 48 Umg^{-1} (60°C) 343-fach angereichert (Tabelle 8). Nach dem letzten Schritt zeigte sich auf dem SDS-Gel nur eine Bande (Abbildung 8).

Tabelle 8: Reinigung der KDG-Aldolase aus *P. torridus*. Die Enzymaktivität wurde bei 55°C im diskontinuierlichen Testsystem als Pyruvat- und Glycerinaldehyd-abhängige Bildung von KDG in 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 6,2 mit 20 mM Glycerinaldehyd und 50 mM Pyruvat bestimmt.

Reinigungsschritt	Protein (mg)	Aktivität (U)	Spez. Aktivität (Umg^{-1})	Ausbeute (%)	Anreicherung (-fach)
Zellfreier Extrakt	1179	164	0,14	100	1
Phenyl Sepharose	42	47	1,1	29	7,8
Anionenaustauscher	9,1	37	4,1	23	29
Gelfiltration	0,2	6,2	31	3,8	221
Anionenaustauscher	0,125	6	48	3,6	343

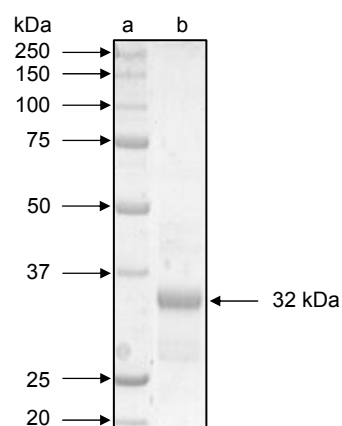


Abbildung 8: Reinigung der KDG-Aldolase aus *P. torridus*. SDS-PAGE und anschließende Färbung mit Coomassie Brilliantblau von gereinigter KDG-Aldolase. Die Pfeile auf der linken Seite deuten auf die Markerproteine, der Pfeil rechts auf die Bande der KDG-Aldolase. Spur a: Molekulargewichtsstandard; Spur b: nach Anionenaustauscher.

Biochemische Charakterisierung: Das apparente native Molekulargewicht der KDG-Aldolase aus *P. torridus* wurde mit 120 kDa, das der Untereinheit mit 32 kDa bestimmt. Die Ergebnisse sprechen für eine homotetramere Struktur des Proteins. Das pH Optimum der KDG-Aldolase wurde mit pH 5,5 bestimmt. Bei pH 4,5 bzw. 7,5 konnten noch 50% der Aktivität nachgewiesen werden. Das Enzym hat ein Temperaturoptimum von 65°C und zeigte eine hohe Thermostabilität. Bis 70°C konnte kein signifikanter Aktivitätsverlust beobachtet werden. Bei 80°C bzw. 90°C betrug die Halbwertszeit 120 Minuten bzw. 15 Minuten.

Kinetischen Eigenschaften: Das Enzym katalysiert die reversible Umsetzung von KDG zu Pyruvat und Glycerinaldehyd. Die Abhängigkeit der Raten des Enzyms von den Substraten KDG, Glycerinaldehyd und Pyruvat zeigte eine Michaelis-Menten-Kinetik mit den in Tabelle 9 dargestellten apparenten K_m - und V_{max} -Werten. Außer mit Glycerinaldehyd wurden Aktivitäten auch mit anderen Aldehyden in Richtung der Bildung von 2-Keto-3-Deoxy-Verbindungen beobachtet. Im Vergleich zu den mit Glycerinaldehyd und Pyruvat gemessenen Aktivitäten (100%) betragen die Aktivitäten mit Glycolaldehyd (13%) sowie mit D-Ribose (5%), D-Xylose (4%), L-Arabinose (2%), D-Arabinose (2%), Acetaldehyd (0,2%) und mit Crotonaldehyd (0,8%). Das Enzym katalysierte auch die Bildung von KDPG aus Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Pyruvat. Diese Reaktion ist durch eine Inhibition bei GAP-Konzentrationen größer 4 mM gekennzeichnet. Die spezifische Aktivität bei 4 mM betrug 7 Umg^{-1} , bei 15 mM war keine Aktivität zu beobachten. Das Enzym setzte neben KDG auch KDPG um, jedoch mit einer etwa 2000fach niedrigeren katalytischen Effizienz (Tabelle 9), was zeigt, dass KDPG kein physiologisches Substrat ist. Die ausgeprägte Substratspezifität für KDG deutet darauf hin, dass das Enzym aus *P. torridus* eine neuartige Aldolase darstellt. Dieses Enzym unterscheidet sich von der bifunktionellen KDPG/KDG-Aldolase von *Sulfolobus* durch die Begünstigung von KDG über KDPG und in der Umkehrreaktion von Glycerinaldehyd über GAP.

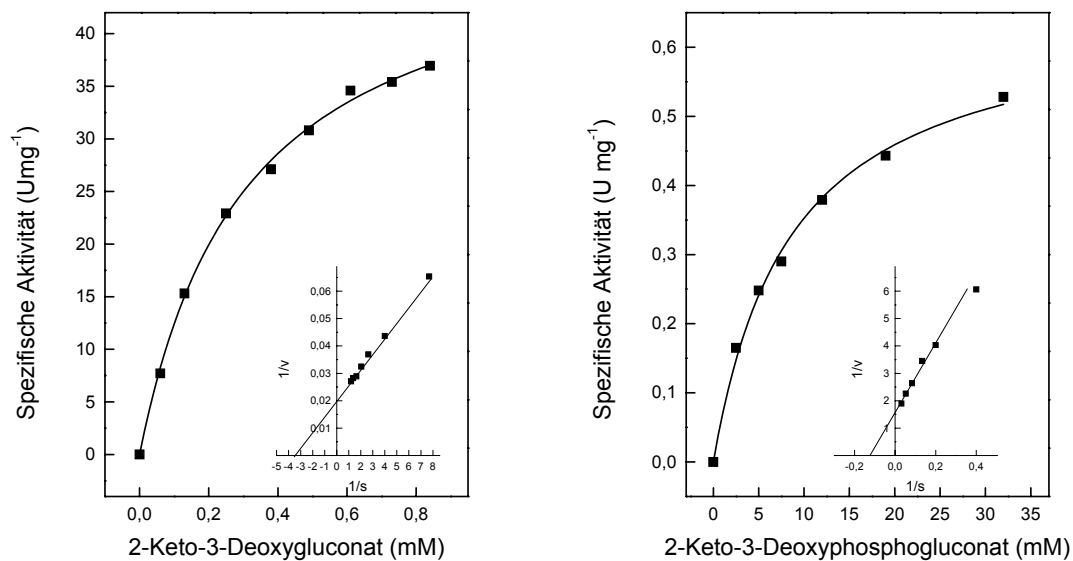


Abbildung 9: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der nativen KDG-Aldolase aus *P. torridus* von der Konzentration an 2-Keto-3-deoxygluconat und 2-Keto-3-deoxyphosphogluconat. Die Einschübe zeigen die doppelt-reziproken Auftragungen nach Lineweaver-Burk.

Identifizierung des kodierenden Gens: Durch die massenspektroskopische Analyse (MALDI-TOF) des gereinigten Enzyms wurde im Genom von *P. torridus* ein offener Leserahmen (Pto1279) mit 51%iger Abdeckung der nachgewiesenen Peptide eindeutig identifiziert. Dieser als *dihydrodipicolinate synthase* annotierter ORF kodiert für ein Protein mit 266 Aminosäuren, was einer kalkulierten Masse von 30,2 kDa entspricht. Ein Vergleich der N-Terminalen Sequenzen von Pto1279 und putativen Homologen aus *Thermoplasma* spez. (TVN1228, Ta1157) zeigt, dass die Proteinsequenz von Pto1279 um 8 Aminosäuren kürzer war als die der putativen Homologen (Abbildung 10). Diese fehlenden 8 Aminosäuren mit einem Methionin als möglichen Start der Proteinsequenz waren im Genom kodiert, was auf eine Fehlannotation hindeutet.

TVN1228	MYNGIVTPMLTPFNAG
Ta1157	MYKGIVTPMITPMGQNG
Pto1279	MITPLDAHG
Pto1279a	MYKGIVCPMITPLDAHG

Abbildung 10: Alignment der N-terminalen Aminosäuresequenzen der KDG-Aldolase aus *P. torridus* und putativen Homologen aus *Thermoplasma* spez.. NCBI gi-Nummern: *Thermoplasma volcanium* (gi:13542059), *Thermoplasma acidophilum* (gi:13542059), *Picrophilus torridus* (gi: 48478351), (PTO1279a).

Um dies zu überprüfen, wurde die N-terminale Aminosäuresequenz der Untereinheit des gereinigten Enzyms bestimmt. Die ermittelte Aminosäuresequenz (MYKGIVCPMITPLDAHGNIDYNATN) stimmte nicht mit der annotierten Sequenz des N-Terminus überein. Jedoch ist die ermittelte Sequenz identisch mit dem um 8 Reste verlängerten N-Terminus von Pto1279. Dieser offene Leserahmen wird als Pto1279a bezeichnet und kodiert für ein Protein mit 274 Aminosäuren, was einer kalkulierten Masse von 31,3 kDa entspricht und mit der experimentell bestimmten molekularen Masse der Untereinheit der gereinigten KDG-Aldolase übereinstimmt.

Klonierung und Expression von Pto1279a und Reinigung des Genproduktes. Das *kdga* Gen aus *P. torridus*, ORF Pto1279a, das für eine hypothetische KDG-Aldolase kodiert, besteht aus 822 Basenpaaren. Das Gen wurde in den Vektor pET19b kloniert und zur Expression in *E. coli* BL21(DE3)-CodonPlus-RIL transformiert. Nach Überexpression eines 33 kDa Proteins wurde dieses über einen Hitzeschritt bei 60°C und an einer Ni-NTA Säule bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Die KDG-Aldolase ergab eine 33 kDa Bande auf einem SDS-Polyacrylamidgel und wies eine spezifische Aktivität von 25,3 Umg^{-1} (65°C) auf. Die molekularen und katalytischen Eigenschaften der rekombinanten KDG-Aldolase waren mit denen des nativen Enzyms vergleichbar (Tabelle 9). Dies betrifft insbesondere auch die ausgeprägte Bevorzugung von KDG über KDPG (400fach).

Tabelle 9: Molekulare und kinetische Eigenschaften der KDG-Aldolase aus *P. torridus*. Die kinetischen Konstanten wurden bei 60°C bestimmt. (-), nicht bestimmt

	natives Enzym	rekombinantes Enzym
Apparente molekulare Masse des Enzyms (kDa)	120	120
Apparente molekulare Masse der Untereinheit (kDa)	32	33
Oligomere Struktur	α_4	α_4
pH-Optimum	5,5	-
Temperaturoptimum (°C)	65	-
Apparenter V_{\max} (Umg ⁻¹)		
KDG	50,0	44,0
KDPG	0,63	0,66
Glycerinaldehyd	67,1	31,3
Pyruvat	58,8	15,0
Wechselzahl k_{cat} (s ⁻¹)		
KDG	26,7	24,2
KDPG	0,34	0,36
Glycerinaldehyd	35,8	17,2
Pyruvat	31,4	8,3
Apparenter K_m (mM)		
KDG	0,3	0,47
KDPG	8,3	2,5
Glycerinaldehyd	4,6	3,3
Pyruvat	2,7	5,2
Katalytische Effizienz (k_{cat}/K_m)		
KDG	89	51,5
KDPG	0,04	0,14
Glycerinaldehyd	7,8	5,2
Pyruvat	11,6	1,6

Sequenzanalyse: Pto1279a zeigte signifikante Sequenzidentitäten zu Proteinen von „Dihydrodipicolinat-Synthase-like“ Proteinen (NCBI, CDD, cd00408). Die Dihydrodipicolinat-Synthase (DHDPS-like) Familie wird den Klasse-I-Aldolasen zugeordnet, welche sich durch die Bildung einer Schiff-Base auszeichnen. Proteine der „DHDPS-like“ Familie katalysieren eine Reihe unterschiedlicher Pyruvat-abhängiger Reaktionen. Beispiele sind: N-Acetylneuraminat Lyase (NAL), Dihydrodipicolinat Synthase (DHDPS), 5-keto-4-Deoxy-Glucarat Dehydratase (KDGDH), *trans*-o-Hydroxybenzylidenpyruvat hydratase-aldolase (HBPHA), *trans*-2'-Carboxybenzalpyruvat hydratase-aldolase (CBPHA) und 2-Keto-3-Deoxy-Gluconat Aldolase (KDGA). Das in Abbildung 11 dargestellte Sequenzalignment von Pto1279a und Vertretern der Dihydrodipicolinat-Synthase (DHDPS-like) Familie zeigt wenige konservierte Aminosäuren. In allen Enzymen ist jedoch der Lysin-Rest konserviert, der für die Bildung einer Schiff-Base erforderlich ist, sowie weitere Reste, die an der Bindung

von Pyruvat beteiligt sind (Barbosa *et al.* 2000; Lawrence *et al.* 1997). Diese Reste sind auch in der KDGA-Aldolase konserviert, was die Zugehörigkeit der KDGA-Aldolase zu der DHDPS-like Familie unterstreicht.

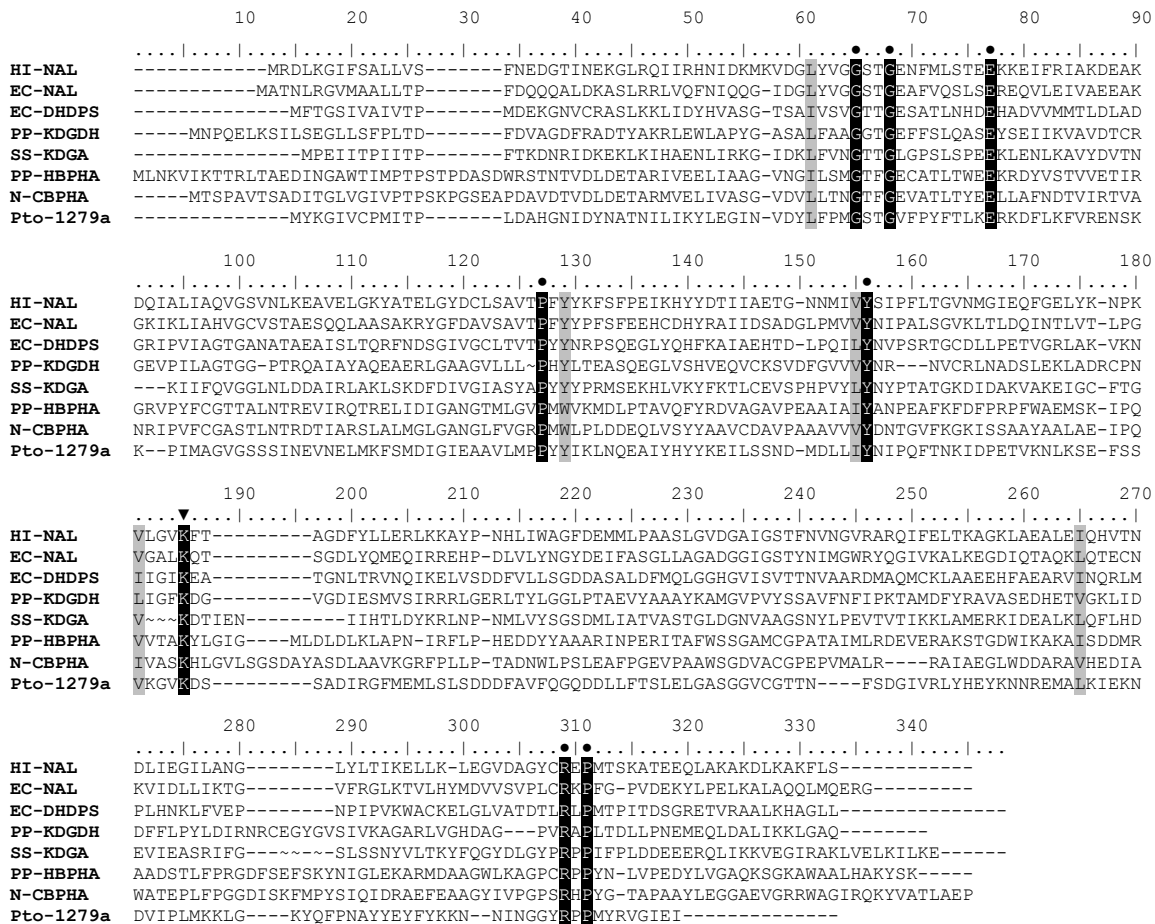


Abbildung 11: Alignment der Sequenzen der KDGA-Aldolase von *P. torridus* (PTO1279a) und ausgewählten Vertretern der Dihydrodipicolinat-Synthase (DHDPS-like) Familie: (▼) konserviertes Lysin, (●) konservierte Aminosäuren der DHDPS Familie. NCBI gi-Nummern: HI-NAL: *Haemophilus influenzae* NAL (gi: 1171757); EC-NAL *Escherichia coli* NAL (gi: 1171756); EC-DHDPS *Escherichia coli* DHDPS (gi: 145708); PP-KDGDH *Pseudomonas putida* KDGDH (gi: 1170630); SS-KDGA *Sulfolobus solfataricus* KDGA (gi: 2879782); PP-HBPHA *Pseudomonas putida* HBPHA (gi: 6225747), N-CBPHA *Nocardioideis sp.* CBPHA (gi: 2588984).

Glycerinaldehyd Dehydrogenase (GADH)

Die Reinigung der GADH erfolgte bis zur apparenten Homogenität über drei säulenchromatographische Schritte. Dabei wurde die GADH mit einer Gesamtausbeute von 1,1% und einer spezifischen Aktivität von $6,9 \text{ Umg}^{-1}$ (55°C) 223fach angereichert (Tabelle 10). Nach dem letzten Reinigungsschritt zeigte sich auf dem SDS-Gel nur eine Bande (Abbildung 12).

Tabelle 10: Reinigung der GADH aus *P. torridus*. Die Enzymaktivität wurde bei 55°C im kontinuierlichen Testsystem als NADP^+ - und Glycerinaldehyd-abhängige Bildung von Glycerat in 100 mM HEPES pH 6,9 mit 1 mM Glycerinaldehyd und 1 mM NADP^+ bestimmt.

Reinigungsschritt	Protein (mg)	Aktivität (U)	Spez. Aktivität (Umg^{-1})	Ausbeute (%)	Anreicherung (-fach)
Zellfreier Extrakt	2853	90	0,031	100	1
Kationentauscher	6	18	3	20	96
Anionentauscher	1,9	12,3	6,5	7,2	209
Gelfiltration	0,145	1	6,9	1,1	223

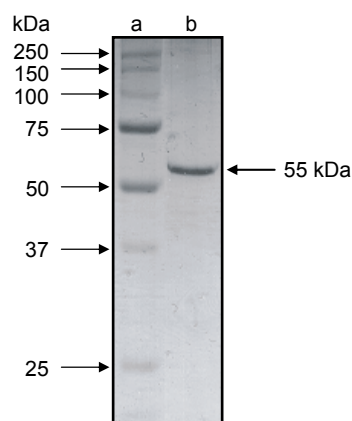


Abbildung 12: Reinigung der GADH aus *P. torridus*. SDS-PAGE und anschließende Färbung mit Coomassie Brilliantblau von gereinigter GADH. Die Pfeile auf der linken Seite deuten auf die Markerproteine, der Pfeil rechts auf die Bande der GADH. Spur a: Molekulargewichtsstandard; Spur b: nach Gelfiltration.

Das apparente native Molekulargewicht der GADH aus *P. torridus* wurde mit 115 kDa, das der Untereinheit mit 55 kDa bestimmt. Die Ergebnisse sprechen für eine homodimere Struktur des Proteins. Weitere Analysen der GADH wurden mit dem rekombinanten Enzym durchgeführt (siehe Tabelle 11).

Identifizierung des kodierenden Gens: Durch die massenspektroskopische Analyse (MALDI-TOF) des gereinigten Enzyms wurde eindeutig im Genom von *P. torridus* ein offener Leserahmen (Pto0332) mit 23%iger Abdeckung durch die nachgewiesenen Peptide identifiziert. Pto0332, der als *succinate-semialdehyde dehydrogenase* annotiert war, stellt das GADH kodierende Gen, *gadh*, dar. Das Gen kodiert für ein Protein mit 494 Aminosäuren, was einer kalkulierten Masse von 55,2 kDa entspricht und mit der experimentell bestimmten molekularen Masse der Untereinheit der gereinigten GADH übereinstimmt.

Klonierung und Expression von Pto0332 und Reinigung des Genproduktes: Das *gadh* Gen aus *P. torridus*, ORF Pto0332, das für eine hypothetische GADH kodiert besteht aus 1482 Basenpaaren. Das Gen wurde in den Vektor pET17b kloniert und zur Expression in *E. coli* BL21(DE3)-CodonPlus-RIL transformiert. Nach Überexpression eines 56 kDa Proteins wurde dieses über einen Hitzeschritt bei 60°C sowie an einer S-Sepharose-, einer Q-Sepharose-Säule und einer Gelfiltration bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Die GADH ergab eine 56 kDa Bande auf einem SDS-Polyacrylamidgel und wies eine spezifische Aktivität von 7,8 Umg^{-1} (60°C) auf.

Biochemische Charakterisierung: Das native apparente Molekulargewicht wurde mit 120 kDa bestimmt. Die Ergebnisse sprechen für eine homodimere Struktur des Proteins. Das pH-Optimum wurde mit pH 6,6 bestimmt. Bei pH 4,3 bzw. pH 8,1 konnten noch 50% der Aktivität nachgewiesen werden. Das Enzym hat ein Temperaturoptimum von 63°C. Die Thermostabilität wurde über einen Zeitraum von 120 Minuten getestet. Bis 60°C konnte kein signifikanter Aktivitätsverlust beobachtet werden, bei 70°C betrug die Halbwertszeit 15 Minuten (**Tabelle 11**).

Kinetischen Eigenschaften der rekombinanten GADH: Die GADH setzte mit hoher Spezifität Glycerinaldehyd um, mit einem apparenten K_m -Wert von 0,06 mM und einem V_{max} -Wert von 10 Umg^{-1} (Tabelle 11). Bei Substratkonzentrationen von 2 mM Glycerinaldehyd wurde eine 25%ige Inhibition der Aktivität beobachtet. Neben Glycerinaldehyd wurden von dem Enzym auch Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Glycolaldehyd als Substrat akzeptiert, jedoch mit deutlich geringeren katalytischen Effizienzen (k_{cat}/K_m) von 1,5% bzw. 1% des Wertes von Glycerinaldehyd (Tabelle 11). Andere Aldehyde wie Acetaldehyd, Crotonaldehyd, Benzaldehyd und Succinatsemialdehyd sowie Dihydroxyacetonphosphat wurden nicht umgesetzt. Die GADH war spezifisch für NADP^+ als Elektronenakzeptor. Mit NAD^+ konnte keine Aktivität dargestellt werden.

Charakterisierung eines GADH-Homologs aus *Thermoplasma acidophilum*

Aufgrund einer hohen Sequenzidentität (>70%) zu der *gadh* von *P. torridus* wurde im Genom von *T. acidophilum* ORF Ta0809 als hypothetische GADH identifiziert.

ORF Ta0809 besteht aus 1479 Basenpaaren und kodiert für ein Polypeptid mit 493 Aminosäuren, was einer kalkulierten molekularen Masse von 54,7 kDa entspricht. Das Gen wurde in den Vektor pET19b kloniert und zur Expression in *E. coli* BL21(DE3)-CodonPlus-RIL transformiert. Nach Überexpression eines 56 kDa Proteins wurde dieses an einer Ni-NTA Säule und über einen Hitzeschritt bei 60°C bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Die GADH ergab eine 56 kDa Bande auf einem SDS-Polyacrylamidgel und wies eine spezifische Aktivität von 16,1 Umg⁻¹ (60°C) auf. Das native apparente Molekulargewicht wurde mit 120 kDa bestimmt. Die Ergebnisse sprechen für eine homodimere Struktur des Proteins.

Die molekularen und kinetischen Eigenschaften der rekombinanten GADH aus *T. acidophilum* sind in Tabelle 11 dargestellt und waren mit den entsprechenden Eigenschaften der GADH von *P. torridus* vergleichbar. Das pH-Optimum der GADH aus *T. acidophilum* wurde mit pH 7,6 bestimmt. Bei pH 5,8 bzw. pH 8,7 konnten noch 50% der Aktivität nachgewiesen werden. Das Enzym hat ein Temperaturoptimum von 63°C. Die Thermostabilität wurde über einen Zeitraum von 120 Minuten getestet. Bis 60°C konnte kein signifikanter Aktivitätsverlust beobachtet werden, bei 70°C betrug die Halbwertszeit 40 Minuten.

Tabelle 11: Molekulare und kinetische Eigenschaften der rekombinanten GADH aus *P. torridus* und *T. acidophilum*. Die kinetischen Konstanten wurden bei 58°C bestimmt.

	<i>P. torridus</i>	<i>T. acidophilum</i>
Apparente molekulare Masse des Enzyms (kDa)	120	120
Apparente molekulare Masse der Untereinheit (kDa)	55	56
Oligomere Struktur	α_2	α_2
pH Optimum	6,6	7,6
Temperaturoptimum (°C)	63	63
Apparenter V_{\max} (Umg ⁻¹)		
Glycerinaldehyd	10	26
Glycerinaldehyd-3-Phosphat	12	20
Glycolaldehyd	20	37
NADP ⁺	10	25
Wechselzahl k_{cat} (s ⁻¹)		
Glycerinaldehyd	10	26
Glycerinaldehyd-3-Phosphat	12	20
Glycolaldehyd	20	37
NADP ⁺	10	25
Apparenter K_m (mM)		
Glycerinaldehyd	0,06	0,2
Glycerinaldehyd-3-Phosphat	5,1	18,3
Glycolaldehyd	11,1	12,3
NADP ⁺	0,42	0,36
Katalytische Effizienz (k_{cat}/K_m)		
Glycerinaldehyd	167	130
Glycerinaldehyd-3-Phosphat	2,4	1,1
Glycolaldehyd	1,8	3
NADP ⁺	24	70

Sequenzanalyse: GADHs von *P. torridus* und *T. acidophilum* zeigen signifikante Sequenzidentitäten (25-30%) zu Vertretern unterschiedlicher Aldehyd Dehydrogenase Familien. Diese Familien werden einer Aldehyd Dehydrogenase (ALDH) Superfamilie zugeordnet. Das in Abbildung 13 dargestellte Sequenzalignment von Pto0332, Ta0809 und putativen Homologen sowie zwei charakterisierten Vertretern der ALDH Superfamilie zeigt eine Reihe von konservierten Aminosäuren. Insbesondere waren Reste des sogenannte modifizierten „Rossmann-fold“-Motifs (GxTxxG) sowie zwei Consensus Sequenzen, PS00687 und PS00070 (Expasy, PROSITE), konserviert, die indikativ für Sequenzen der ALDH Superfamilie sind. Die Ergebnisse deuten auf eine Zugehörigkeit der GADHs aus *P. torridus* und *T. acidophilum* zu der ALDH Superfamilie hin.

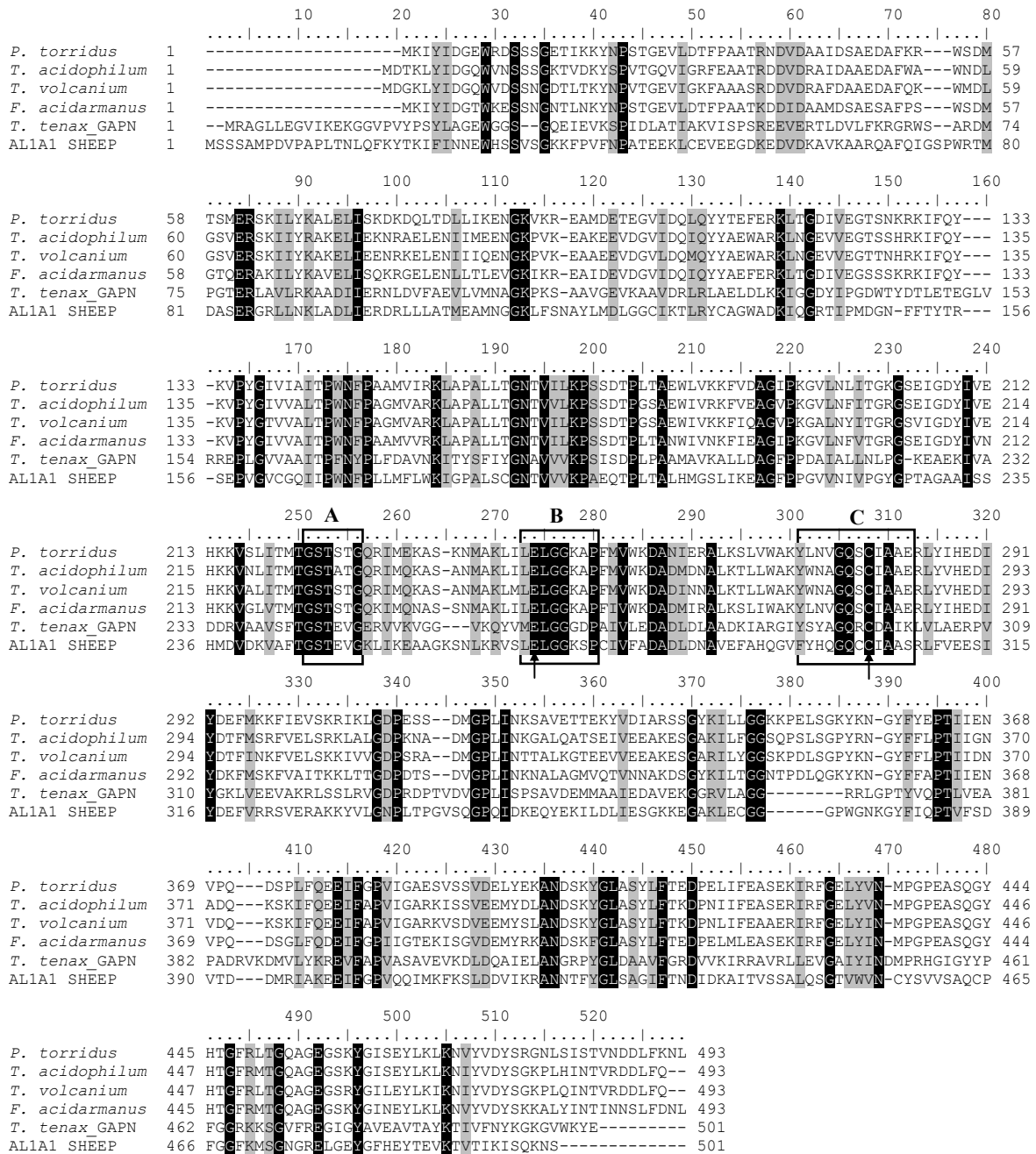


Abbildung 13: Alignment der Aminosäuresequenzen der GADH und der nicht-phosphorylierenden GAPDH (GAP-N) von Archaea und von ALDH1A1 (Schaf). Box A: Modifizierter „Rossmann-fold“ (GxTxxG); Box B: ALDH Glutamat „active site“ (PROSITE Pattern PS00687); Box C: ALDH Cystein „active site“ (PROSITE Pattern PS00070). *Picrophilus torridus* DSM 9790 AAT42917.1; *Thermoplasma acidophilum* CAC11938.1; *Thermoplasma volcanium* GSS1 NP_111540.1; *Ferroplasma acidarmanus* Fer1 EAM94231.1; *Thermoproteus tenax* CAA71651.1; AL1A1 SHEEP P51977

Glycerat Kinase

Die Reinigung der Glycerat Kinase erfolgte bis zur apparenten Homogenität über vier säulenchromatographische Schritte. Dabei wurde das Enzym mit einer Gesamtausbeute von 2% und einer spezifischen Aktivität von 358 Umg^{-1} (50°C) 5114fach angereichert (Tabelle 12). Nach dem letzten Reinigungsschritt zeigte sich auf dem SDS-Gel nur eine Bande (Abbildung 14).

Tabelle 12: Reinigung der Glycerat Kinase aus *P. torridus*. Die Enzymaktivität wurde bei 50°C im kontinuierlichen Testsystem als ATP- und Glycerat-abhängige Bildung von 2-Phosphoglycerat in 100 mM Tris/HCl, pH 7,3 mit 10 mM MgCl_2 , 2,6 mM Glycerat, 0,3 mM NADH, 2 mM ATP, 5 mM EGTA, 5 U Enolase, 6,9 U Pyruvat Kinase und 7,9 U Laktat Dehydrogenase gemessen.

Reinigungsschritt	Protein (mg)	Aktivität (U)	Spez. Aktivität (Umg^{-1})	Ausbeute (%)	Anreicherung (-fach)
Zellfreier Extrakt	2930	205	0,07	100	1
Phenyl Sepharose	70	81	1,2	40	70
Resource PHE	7	63	9	31	129
Gelfiltration	0,94	36	38,3	17	547
Anionenaustauscher	0,012	4,3	358	2	5114

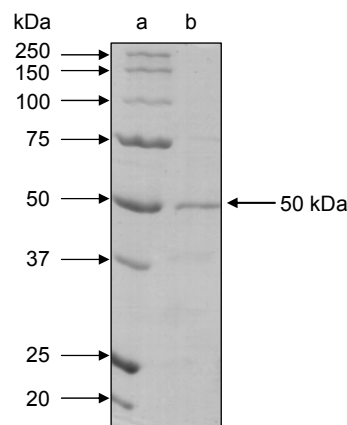


Abbildung 14: Reinigung der Glycerat Kinase aus *P. torridus*. SDS-PAGE und anschließende Färbung mit Coomassie Brilliantblau von gereinigter Glycerat Kinase. Die Pfeile auf der linken Seite deuten auf die Markerproteine, der Pfeil rechts auf die Bande der Glycerat Kinase. Spur a: Molekulargewichtsstandard; Spur b: nach Anionenaustauscher.

Biochemische Charakterisierung: Das apparente native Molekulargewicht der Glycerat Kinase aus *P. torridus* wurde mit 95 kDa, das der Untereinheit mit 50 kDa bestimmt. Die Ergebnisse sprechen für eine homodimere Struktur des Proteins (Tabelle 13). Das pH-

Optimum wurde mit pH 7,3 bestimmt. Bei pH 5,6 bzw. pH 8,6 konnten noch 50% der Aktivität nachgewiesen werden. Die Glycerat Kinase hat ein Temperaturoptimum von 60°C. Bei dieser Temperatur war das Enzym thermostabil. Bei 70°C betrug die Halbwertszeit 5 Minuten.

Kinetischen Eigenschaften: Die Glycerat Kinase katalysiert die Phosphorylierung von Glycerat spezifisch zu 2-Phosphoglycerat. Die spezifische Bildung von 2-Phosphoglycerat wurde anhand eines gekoppelten enzymatischen Tests mit Enolase, Pyruvat Kinase und Laktat Dehydrogenase nachgewiesen. Die Bildung von 3-Phosphoglycerat konnte ausgeschlossen werden (4.11.4). Die Abhängigkeit der Raten des Enzyms von Glycerat und ATP zeigte eine Michaelis-Menten Kinetik mit apparenten K_m - und V_{max} -Werten für Glycerat von 0,34 mM und 435 U mg^{-1} und für ATP von 0,51 mM und 432 U mg^{-1} (Abbildung 15). Das Enzym ist spezifisch für Glycerat, wobei mit D-Glycerat (100%) höhere Aktivitäten als mit L-Glycerat (34%) gemessen wurden.

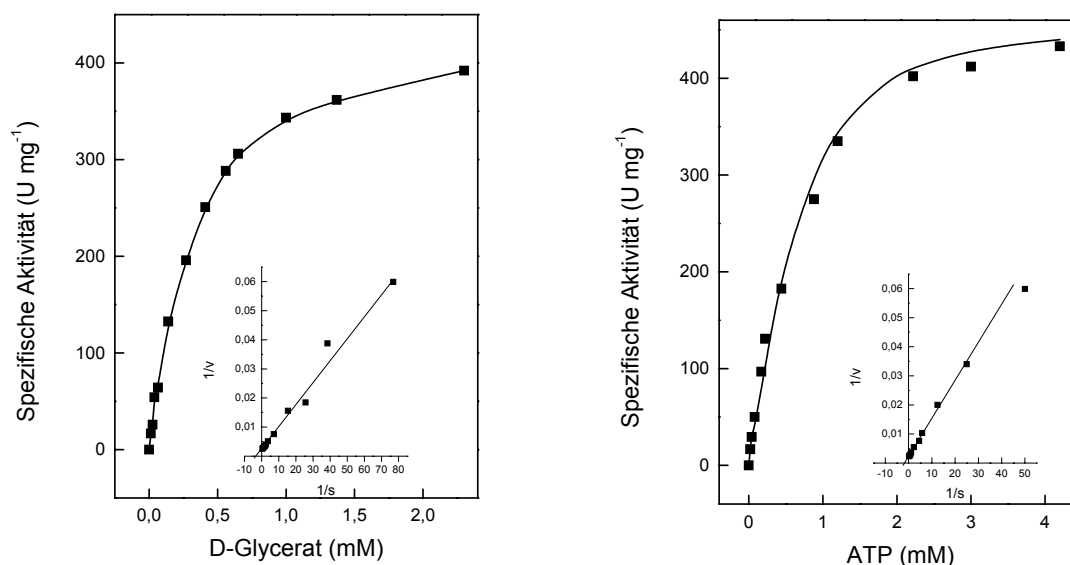


Abbildung 15: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der Glycerat Kinase aus *P. torridus* von der Konzentration an D-Glycerat und ATP. Die Einschübe zeigen die doppelt-reziproken Auftragungen nach Lineweaver-Burk.

Keine Aktivität wurde mit Gluconat, Glucuronat, Glycerinaldehyd, Dihydroxyacetonphosphat, Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Glucose gefunden. Als Phosphoryl-Donator konnte ATP (100%) teilweise durch GTP (37%), CTP (24%) und UDP (39%) ersetzt werden. Mit Acetylphosphat war keine Aktivität nachweisbar. Die Glycerat Kinase benötigte divalente Kationen, wobei Mg^{2+} (100%) teilweise durch Ni^{2+} (25%), Mn^{2+} (11%) und Co^{2+} (11%) ersetzt werden konnte.

ersetzt werden konnte. Kalium (50 mM), für das eine aktivierende Wirkung auf die Glycerat Kinase von *Hyphomicrobium* beschrieben wurde, zeigte keinen Effekt.

Tabelle 13: Molekulare und kinetische Eigenschaften der Glycerat Kinase (GCK) aus *P. torridus*. Die kinetischen Konstanten wurden bei 50°C bestimmt.

Parameter	GCK
Apparente molekulare Masse des Enzyms (kDa)	95
Apparente molekulare Masse der Untereinheit (kDa)	50
Oligomere Struktur	α_2
pH-Optimum	7,3
Temperaturoptimum (°C)	60
Apparenter V_{\max} (Umg ⁻¹)	
D-Glycerat	435
ATP	432
Apparenter K_m (mM)	
D-Glycerat	0,34
ATP	0,51
Mg ²⁺	2,1
Phosphoryldonor-Spezifität (%)	
ATP	100
GTP	37
CTP	24
UTP	39

Identifizierung des kodierenden Gens: Durch die massenspektroskopische Analyse (MALDI-TOF) des gereinigten Enzyms wurde eindeutig im Genom von *P. torridus* ein offener Leserahmen (Pto1442) mit 46%iger Abdeckung der nachgewiesenen Peptide identifiziert. Pto1442, der als *glycerate kinase* annotierte war, stellt das Glycerat Kinase kodierende Gen, *gck* dar. Das Gen kodiert für ein Protein mit 415 Aminosäuren, was einer kalkulierten Masse von 46,6 kDa entspricht und mit der experimentell bestimmten molekularen Masse der Untereinheit der gereinigten GCK übereinstimmt.

Sequenzanalyse: Pto1442 zeigte signifikante Sequenzidentitäten (25-30%) zu putativen archaeellen GCK Homologen aus *Thermoplasma* und *Sulfolobus* sowie zu der GCK aus dem hyperthermophilen Bacterium *Thermotoga maritima* (30%). Das in Abbildung 16 dargestellte Sequenzalignment zeigte eine Reihe konservierter Aminosäuren. Insbesondere sind Reste des Aktiven-Zentrums und der ATP-Bindung, welche für die GCK aus *T. maritima* beschrieben sind, konserviert (Cheek *et al.* 2005; Schwarzenbacher *et al.* 2006).

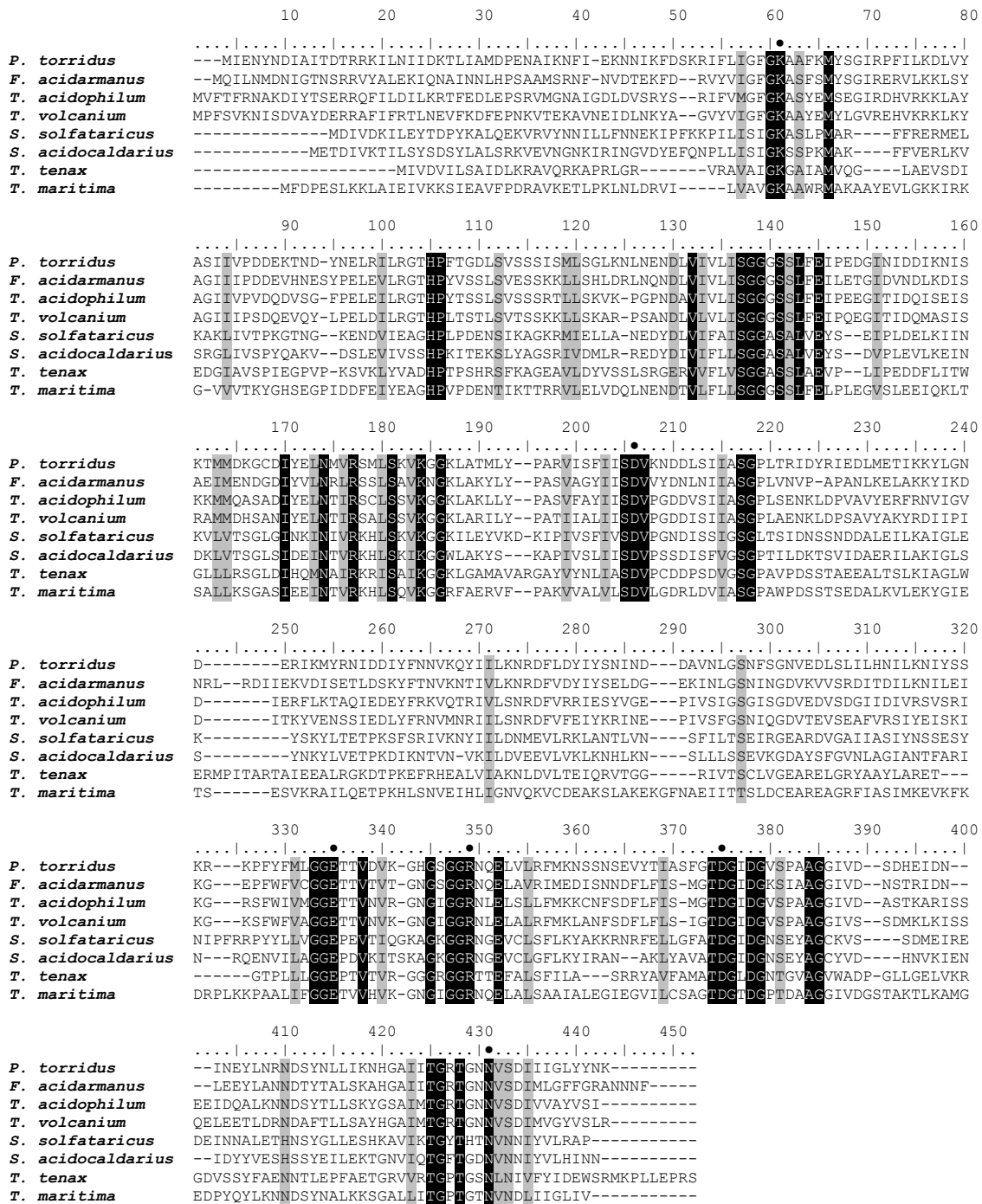


Abbildung 16: Alignment der Sequenzen der GCK von *P. torridus* (Pto1442) und putativen archaeellen Homologen und der Glycerat Kinase von *Thermotoga maritima*. (●) konservierte Aminosäurereste mit putativer katalytischer Funktion. *P. torridus* (gi: 48431162); *F. acidarmanus* (gi: 68140349); *T. acidophilum* (gi: 16082522); *T. volcanium* (gi:14325013); *S. solfataricus* (gi:6015809); *S. acidocaldarius* (gi: 68566609); *T. tenax* (gi: 41033737), *T. maritima* (Q9X1S1).

5.1.6 KDG/KDPG-Aldolase Aktivität in Zellextrakten von *Thermoplasma acidophilum* und *Sulfolobus acidocaldarius*

In Extrakten Glucose-gewachsener Zellen von *P. torridus* wurden hohe Aktivitäten einer KDG-Aldolase, jedoch nur sehr geringe Aktivitäten einer KDPG-Aldolase nachgewiesen (5.1.3.). Dieses Aktivitätsmuster in Extrakten entspricht der Substratspezifität der gereinigten KDG-Aldolase mit einer Bevorzugung von KDG über KDPG (5.1.5.). Aus diesem Befund wurde geschlossen, dass eine funktionelle KDG-Aldolase *in vivo* am Glucoseabbau beteiligt ist. Um einen Hinweis zu bekommen, ob in *T. acidophilum* ebenfalls *in vivo* eine KDG-spezifische Aldolase am Glucoseabbau beteiligt ist, wurden die Aktivitäten der KDG bzw. KDPG Umsetzung in Extrakten gemessen. Zum Vergleich wurden die Aktivitäten der KDG und KDPG Umsetzung in Extrakten Glucose-gewachsener Zellen von *S. acidocaldarius* bestimmt. Für diesen Organismus wurde eine bifunktionelle KDPG/KDG-Aldolase als Schlüsselenzym eines verzweigten ED-Wegs vorgeschlagen (Lamble *et al.* 2005).

In Tabelle 14 sind die spezifische Aktivitäten und K_m -Werte der KDG bzw. KDPG Umsetzung in Extrakten Glucose-gewachsener Zellen von *P. torridus*, *T. acidophilum* und *S. acidocaldarius* vergleichend dargestellt.

Tabelle 14: Spezifische Aktivitäten und K_m -Werte der KDG bzw. KDPG Umsetzung in Zellextrakten von Glucose-gewachsenen Zellen von *P. torridus*, *T. acidophilum* und *S. acidocaldarius*. Die Aktivität wurde bei 55°C (*P. torridus* und *T. acidophilum*) bzw. 65°C (*S. acidocaldarius*) gemessen. Abkürzungen, KDG: 2-Keto-3-Deoxygluconat; KDPG: 2-Keto-3-Deoxyphosphogluconat; GA: Glycerinaldehyd; GAP: Glycerinaldehyd-3-Phosphat; Pyr: Pyruvat, (-) nicht bestimmt.

Enzymaktivität		<i>P. torridus</i>	<i>T. acidophilum</i>	<i>S. acidocaldarius</i>
KDG-Aldolase				
[KDG → GA + Pyr]	Spez. Aktivität (Umg ⁻¹)	0,07	0,26	0,18
	K_m (KDG) (mM)	0,4	0,28	2,6
KDPG-Aldolase				
[KDPG → GAP + Pyr]	Spez. Aktivität (Umg ⁻¹)	0,003	0,002	0,20
	K_m (KDPG) (mM)	-	-	0,19

Es zeigte sich, dass die spezifische Aktivität der KDG Umsetzung in Zellextrakten von *T. acidophilum* etwa 140fach höher war als die von KDPG. Diese deutliche Bevorzugung von KDG deutet darauf hin, dass *T. acidophilum*, wie für *P. torridus* gezeigt, eine KDG-spezifische Aldolase enthält, die *in vivo* am Glucoseabbau beteiligt ist. Dagegen setzen Zellextrakte von *S. acidocaldarius* KDG und KDPG mit vergleichbaren Aktivitäten um, was in Übereinstimmung mit der Substratspezifität einer bifunktionellen KDPG/KDG-Aldolase ist.

5.2 Der modifizierte Embden-Meyerhof-Weg (EM) in *Pyrobaculum aerophilum*

In bisherigen Untersuchungen der Arbeitsgruppe wurde gefunden, dass *P. aerophilum* mit Maltose in Gegenwart von Hefeextrakt wachsen kann (Gebhard 2002). Im Genom von *P. aerophilum* waren mehrere Enzyme eines modifizierten EM-Weges, nicht aber von ED-Wegen annotiert. In ersten Enzymuntersuchungen in Zellextrakten wurden keine Schlüsselenzyme von ED-Wegen gefunden. Dies spricht in Übereinstimmung mit den genomischen Daten gegen die Beteiligung eines Entner-Doudoroff-Weges am Zuckerabbau von *P. aerophilum*. Daher wurden Extrakte Maltose-gewachsener Zellen auf das Vorkommen von Schlüsselenzymen von modifizierten EM-Wegen untersucht.

5.2.1 Enzymaktivitäten eines modifizierten EM-Weges

In Extrakten Maltose-gewachsener Zellen von *P. aerophilum* konnten alle Enzyme eines modifizierten EM-Weges nachgewiesen werden: ATP-abhängige Glucokinase, Phosphoglucose-Isomerase, ATP-abhängige 6-Phosphofruktokinase, Fructose-1,6-Bisphosphat-Aldolase, Triosephosphat Aldolase, Glycerinaldehyd-3-Phosphat: Ferredoxin Oxidoreduktase (GAPOR), Phosphoglycerat Mutase, Enolase und Pyruvat Kinase. Die spezifischen Aktivitäten der Enzyme sowie die Reaktionsrichtungen sind in Tabelle 15 dargestellt. Die Aktivitäten der Enzyme wurden 25-50°C unterhalb der optimalen Wachstumstemperatur von *P. aerophilum* (100°C) gemessen, da für die Messung Hilfsenzyme mesophilen Ursprungs verwendet wurden. In der Annahme eines Q_{10} -Wertes der Enzymaktivitäten von 2, ergeben sich 5-30fach höhere Aktivitäten bei 100°C, was die z.T. geringen gemessenen Aktivitäten erklärt.

Um zu prüfen, ob die Enzyme des modifizierten EM-Weges in Gegenwart von Maltose reguliert werden, wurden die Enzymaktivitäten in Extrakten von *P. aerophilum* nach Wachstum auf Maltose/Hefeextrakt und auf Hefeextrakt gemessen (Tabelle 15). Eine geringe Stimulierung wurde für die ATP-Glucokinase und ATP-Phosphofruktokinase beobachtet. Hingegen wurde für die GAPOR-Aktivität eine deutliche Stimulierung (vierfach) nach Wachstum auf Maltose gefunden, was eine funktionelle Beteiligung des Enzyms am Maltoseabbau unterstreicht. Extrakte Maltose-gewachsener Zellen enthielten auch geringe Aktivitäten einer Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH), gemessen als NADP^+ abhängige Umsetzung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat, und einer 3-Phosphoglycerat Kinase, gemessen als ATP-abhängige Phosphorylierung von 3-Phosphoglycerat zu 1,3-Bisphosphoglycerat. Die spezifischen Aktivitäten beider Enzyme

betragen $0,002 \text{ Umg}^{-1}$ (50°C), was etwa 0,5% der GAPOR Aktivität entspricht. Die etwa 200fach höhere Aktivität der GAPOR deutet darauf hin, dass die GAPOR die klassischen Enzymen der GAP-Oxidation – GAPDH und 3-Phosphoglycerat-Kinase – ersetzt.

Tabelle 15: Spezifische Aktivitäten der Enzyme eines modifizierten Embden Meyerhoff-Weges in Zellextrakten von *P. aerophilum* nach Wachstum mit Hefeextrakt/Maltose- und Hefeextrakt. Abkürzungen, BV: Benzylviologen, DHAP: Dihydroxyacetonphosphat, F-6-P: Fructose-6-Phosphat, F-1,6-BP: Fructose-1,6-Bisphosphat, GAP: Glycerinaldehyd-3-Phosphat, GAPOR: Glycerinaldehyd-3-Phosphat: Ferredoxin Oxidoreduktase, G-6-P: Glucose-6-Phosphat, PEP: Phosphoenolpyruvat, 2-PG: 2-Phosphoglycerat, 3-PG: 3-Phosphoglycerat, (-) nicht bestimmt.

Enzymaktivität	Gene	Temperatur °C	Hefeextrakt/Maltose (Umg^{-1})	Hefeextrakt (Umg^{-1})
ATP-Glucokinase [Glucose + ATP → G-6-P + ADP]	Pae3437	75	0,02	0,01
Phosphoglucose Isomerase [F-6-P → G-6-P]	Pae1610	75	0,12	0,09
ATP-Phosphofruktokinase [F-6-P + ATP → F-1,6-BP + ADP]	Pae0853	55	0,005	0,002
Fructose-1,6,-Bisphosphat Aldolase [F-1,6-BP → GAP + DHAP]	-	50	0,001	0,001
Triosephosphat Isomerase [GAP → DHAP]	Pae1501	55	2,3	-
GAPOR [GAP + BV _{red} → 3-PG + BV _{ox}]	-	50	0,38	0,11
Phosphoglycerat Mutase [3-PG → 2-PG]	Pae2326	55	0,007	-
Enolase [2-PG → PEP]	Pae0812	55	0,08	0,16
Pyruvat Kinase [PEP + ADP → Pyruvat + ATP]	Pae0819	65	0,04	0,05

Die Enzymdaten zeigen, dass *P. aerophilum* alle Enzyme eines modifizierten EM-Weges mit einer durch Maltose induzierbaren GAPOR enthält. Die GAPOR katalysiert die Oxidation von GAP zu 3-Phosphoglycerat. Die genomischen Daten zeigten, dass für die Mehrzahl der nachgewiesenen Enzyme, wie Glucokinase und Phosphofruktokinase, entsprechende Gene annotiert waren (Tabelle 15). Eine GAPOR, das Schlüsselenzym dieses Weges, war im Genom von *P. aerophilum* nicht als solche annotiert. Deshalb wurde die GAPOR gereinigt und das kodierende Gen identifiziert. Im Folgenden wird die Reinigung und Charakterisierung des Enzyms sowie die Identifizierung des kodierenden Gens beschrieben.

5.2.2 Reinigung und Charakterisierung der Glycerinaldehyd-3-Phosphat: Ferredoxin Oxidoreduktase (GAPOR) aus *P. aerophilum*

Die GAPOR katalysiert die Oxidation von Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu 3-Phosphoglycerat mit Ferredoxin als Elektronenakzeptor. Die Aktivität der GAPOR wurde anhand der Reduktion des artifiziellen Elektronenakzeptors Benzylviologen photometrisch bestimmt. Die Reinigung der GAPOR erfolgte aus Maltose-gewachsenen Zellen von *P. aerophilum* bis zur apparenten Homogenität über vier säulenchromatographische Schritte. Dabei wurde die GAPOR mit einer Gesamtausbeute von 0,2% und einer spezifischen Aktivität von 17 Umg⁻¹ (50°C) 113fach angereichert (Tabelle 16). Nach dem letzten Reinigungsschritt zeigte sich auf dem SDS-Gel nur eine Bande (Abbildung 17).

Tabelle 16: Reinigung der GAPOR aus *P. aerophilum*. Die Enzymaktivität wurde bei 50°C im kontinuierlichen Testsystem als GAP- und Benzylviologen-abhängige Bildung von 3-Phosphoglycerat in 50 mM Tris/HCl pH 8,0 mit 5 mM Benzylviologen, 1 mM Dithioerythritol und Natriumdithionit bestimmt. GAP wurde aus Fructose-1,6-Bisphosphat (10 mM) durch eine Fructose-1,6-Bisphosphat Aldolase (0,45 U) und Triosephosphat Isomerase (12 U) angeliefert.

Reinigungsschritt	Protein (mg)	Aktivität (U)	Spez. Aktivität (Umg ⁻¹)	Ausbeute (%)	Anreicherung (-fach)
Zellfreier Extrakt	865	131	0,15	100	1
Anionenaustauscher	12,6	22,2	1,76	17	12
Gelfiltration	3,4	7,5	2,3	5,7	17
Resource PHE	0,34	1,9	5,5	1,4	33
Anionenaustauscher	0,02	0,26	17	0,2	113

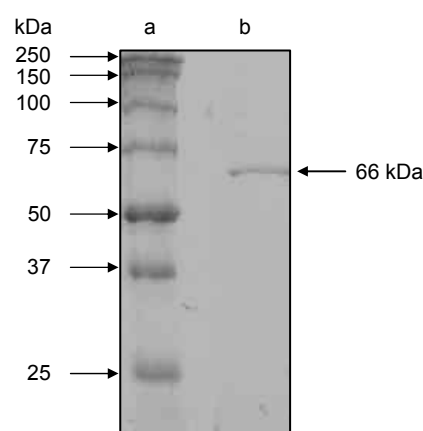


Abbildung 17: Reinigung der GAPOR aus *P. aerophilum*. SDS-PAGE und anschließende Färbung mit Coomassie Brilliantblau von gereinigter GAPOR. Die Pfeile auf der linken Seite deuten auf die Markerproteine, der Pfeil rechts auf die Bande der GAPOR. Spur a: Molekulargewichtsstandard; Spur b: nach Anionenaustauscher.

Biochemische Charakterisierung: Das apparente native Molekulargewicht der GAPOR aus *P. aerophilum* wurde mit 60 kDa, das der Untereinheit mit 66 kDa bestimmt, was für eine monomere Struktur des Proteins spricht. Das pH-Optimum wurde mit pH 8,1 bestimmt. Das Enzym zeigte eine hohe Temperaturstabilität mit einer Halbwertszeit bei 100°C von etwa 8 Stunden. Die Abhängigkeit der Raten der GAPOR von GAP und Benzylviologen zeigten eine Michaelis-Menten-Kinetik mit apparenten K_m -Werten von 0,043 mM (GAP) und 1 mM (Benzylviologen). Die apparenten V_{max} -Werte betragen für GAP und Benzylviologen 23 Umg^{-1} . Das Enzym ist hoch spezifisch für GAP; nicht-phosphorylierte Aldehyde wie Glycerinaldehyd, Formaldehyd oder Acetaldehyd wurden nicht umgesetzt.

Identifizierung des kodierenden Gens: Durch die massenspektroskopische Analyse (MALDI-TOF) des gereinigten Enzyms wurde eindeutig im Genom von *P. aerophilum* ein offener Leserahmen (Pae1029) mit 40%iger Abdeckung der nachgewiesenen Peptide identifiziert. Pae1029, der als *aldehyde oxidoreductase* annotierte war, stellt das GAPOR kodierende Gen, *gapor* dar. Das Gen kodiert für ein Protein mit 622 Aminosäuren, was einer kalkulierten Masse von 70 kDa entspricht und mit der experimentell bestimmten molekularen Masse der Untereinheit der gereinigten GAPOR übereinstimmt.

6 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die glycolytischen Abbauwege in dem thermoacidophilen Euryarchaeon *Picrophilus torridus* und dem aeroben hyperthermophilen Crenarchaeon *Pyrobaculum aerophilum* untersucht. Dabei wurde ein nicht-phosphorylierter Entner-Doudoroff (ED)-Weg mit neuartigen Schlüsselenzymen in *P. torridus*, und ein modifizierten Embden-Meyerhof (EM)-Weg in *P. aerophilum* nachgewiesen. Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse der Untersuchung des Glucoseabbaus in *P. torridus* diskutiert. Im zweiten Teil werden die Untersuchungen zum modifizierten Embden-Meyerhof-Weg in *P. aerophilum* vorgestellt und diskutiert.

6.1 Der nicht-phosphorylierte ED-Wege in *Picrophilus torridus*

Der Glucoseabbauweg in *P. torridus* wurde durch Markierungsexperimente, enzymatische Untersuchungen und Charakterisierung der Schlüsselenzyme untersucht. Zunächst wurden geeignete Wachstumsbedingungen etabliert, um Wachstumsexperimente mit ^{13}C -Glucose durchzuführen und Zellmasse für enzymatische Untersuchungen zu gewinnen.

Das Wachstum von *P. torridus* mit Glucose war abhängig von Hefeextrakt. Bei Wachstum mit beiden Substraten wurden diese sequenziell umgesetzt, wobei Hefeextrakt das bevorzugte Substrat ist. Markierungsexperimente mit ^{13}C -Glucose wurden durchgeführt um festzustellen, über welchen Abbauweg Glucose zu Pyruvat umgesetzt wird. Für die Markierungseffizienz erwiesen sich vergleichsweise saure Wachstumsbedingungen (pH 0,3) als effektiv. Das Markierungsmuster von Alanin im Zellprotein, einer direkt aus Pyruvat abgeleiteten Aminosäure, wurde nach Wachstum mit $[1-^{13}\text{C}]$ - bzw. $[3-^{13}\text{C}]$ Glucose analysiert. Bei Wachstum mit $[1-^{13}\text{C}]$ Glucose wurde eine Markierung ausschließlich in der C_1 -Position erhalten, während bei Wachstum mit $[3-^{13}\text{C}]$ Glucose eine Markierung in der C_3 -Position des Alanins beobachtet wurde. Ein Positionstausch von C_1 -Glucose zu C_3 -Alanin, der indikativ für einen EM-Weg ist, wurde nicht festgestellt. Diese Daten zeigen, dass *P. torridus* Glucose über einen ED-Weg zu Pyruvat abbaut. Dies ist der erste *in vivo* Nachweis eines ED-Weges in thermoacidophilen Euryarchaeota. Zur näheren Charakterisierung des ED-Weges wurden Enzymaktivitäten in Zellextrakten untersucht.

In Zellextrakten von *P. torridus* wurden alle Enzymaktivitäten eines nicht-phosphorylierten (np)ED-Weges nachgewiesen: Glucose Dehydrogenase, Gluconat Dehydratase, KDG-Aldolase, Glycerinaldehyd Dehydrogenase, 2-Phosphoglycerat-bildende Glycerat Kinase, Enolase und Pyruvat Kinase. Zellextrakte setzten neben KDG auch KDPG um, jedoch mit sehr geringen Raten, was dafür spricht, dass KDG und nicht KDPG das physiologische Substrat der Aldolase ist. Dies ist in Übereinstimmung mit dem Fehlen einer KDG-Kinase Aktivität und deutet darauf hin, dass der npED-Weg der einzige Abbauweg der Glucose in *P. torridus* ist. Auch in Zellextrakten von *T. acidophilum* wurde eine deutliche Bevorzugung von KDG über KDPG gefunden, was ebenfalls auf einen npED-Weg mit einer KDG-spezifischen Aldolase als Schlüsselenzym hindeutet. Im Gegensatz zu *P. torridus* und *T. acidophilum* wurden in Zellextrakten von *Sulfolobus acidocaldarius* hohe Aktivitäten mit KDPG und KDG gemessen. Dies ist in Übereinstimmung mit dem Vorkommen eines verzweigten ED-Weges mit einer bifunktionellen KDG/KDPG-Aldolase als Schlüsselenzym (Ahmed *et al.* 2005). Das Vorkommen des npED-Weges in *P. torridus* wird durch die Charakterisierung der Schlüsselenzyme gestützt. Insbesondere wurde eine neuartige KDG-spezifischen Aldolase identifiziert und charakterisiert, deren Substratspezifität das Aktivitätsmuster der KDG- und KDPG- Umsetzung in Zelletrakten widerspiegelt. Ferner wurden die Glycerinaldehyd Dehydrogenase und 2-Phosphoglycerat-bildende Glycerat Kinase als neuartige Enzyme bzw. Enzymfamilien charakterisiert.

Im Folgenden werden die molekularen und biochemischen Eigenschaften der Enzyme des npED-Weges in *P. torridus* diskutiert sowie die Ergebnisse der phylogenetischen Analyse dargestellt.

Gluconat Dehydratase aus *P. torridus*

Die Gluconat Dehydratase (GAD) aus *P. torridus* katalysiert die Umsetzung von Gluconat zu KDG und zeigte vergleichbare molekulare und biochemische Eigenschaften zu dem Ortholog aus *S. solfataricus* (Lamble *et al.* 2004; Kim und Lee 2005). In beiden Organismen ist die GAD am Glucoseabbau über modifizierte ED-Wege beteiligt. In einigen Bacteria, wie Clostridien, katalysiert die GAD den ersten Schritt des Gluconatabbaus, der in Teilreaktionen Ähnlichkeiten zu modifizierten ED-Wegen aufweist. Die GAD von *Clostridium pasteurianum* wurde ausschließlich biochemisch charakterisiert (Bender und Gottschalk 1973; Bender *et al.* 1971; Gottschalk und Bender 1982). Informationen über das kodierende Gen liegen nicht vor. In Tabelle 17 sind die molekularen und katalytischen Eigenschaften der GADs aus diesen drei Organismen dargestellt.

Tabelle 17: Molekulare und katalytische Eigenschaften der GAD aus *P. torridus*, *S. solfataricus* (Lamble et al. 2004, [Lee et al. 2005]) und *C. pasteurianum* (Bender 1973). Die katalytischen Eigenschaften wurden bei 60°C (*P. torridus*), 70°C (*S. solfataricus*) bzw. 25°C (*C. pasteurianum*) gemessen. Die Werte in [...] stammen von Lee et al. 2005.

	<i>P. torridus</i>	<i>S. solfataricus</i>	<i>C. pasteurianum</i>
Wachstumsoptimum (°C)	60	80	37
Molekulare Masse			
Natives Enzym (kDa)	340	48 [350]	131
Untereinheit (kDa)	44	45 [44]	64
Oligomere Struktur	α_8	α [α_8]	α_2
Apparenter V_{\max} (Umg⁻¹)			
Gluconat	19,2	13,4	150
Apparenter K_m (mM)			
Gluconat	2,5	1,6 [0,45]	5,5
Mg ²⁺	4,2	-	-

Die molekularen Massen der Untereinheiten der archaeellen GAD zeigen eine vergleichbare Größe von etwa 44 kDa, während die bakterielle GAD mit 64 kDa deutlich größer ist. Die GAD aus *P. torridus* zeigte eine molekulare Masse von 340 kDa, was auf eine octamere Struktur des Enzyms hindeutete. Für die oligomere Struktur der *S. solfataricus* GAD gibt es unterschiedliche Angaben. Während Lee et al. (2005) eine octamere Struktur ermittelten, fanden Lamble et al. (2004) eine monomere Struktur des nativen Proteins aus *S. solfataricus*. Die GAD aus *C. pasteurianum* wurde als Dimer bestimmt. Die V_{\max} und K_m -Werte der GAD aus *P. torridus* lagen in derselben Größenordnung wie die der GAD aus *S. solfataricus*. Die Aktivität der GAD aus *P. torridus* war abhängig von Magnesium mit einer maximalen Aktivität bei 10 mM. Die GAD aus *S. solfataricus* bevorzugt ebenfalls Mg²⁺, während die bakterielle GAD aus *C. pasteurianum* maximale Aktivität mit Fe²⁺ zeigte (Kim und Lee 2005; Lamble et al. 2004; Bender und Gottschalk 1973). In Übereinstimmung mit den vergleichbaren katalytischen Eigenschaften zeigte die GAD von *P. torridus* eine hohe Sequenzidentität (44%) zu der GAD von *S. solfataricus*. Aufgrund von Sequenzanalysen werden GADs der Mandel-Racemase (MR)-like Subfamilie der Enolase Superfamilie zugeordnet (Lamble et al. 2004; Kim und Lee 2005; Ahmed et al. 2005). Charakterisierte Vertreter der MR-like Superfamilie sind neben den archaeellen Gluconat Dehydratasen vor allem Glucarat Dehydratasen aus *Pseudomonas putida*, *Bacillus subtilis* und *E. coli* sowie die Galactonat Dehydratase aus *E. coli* (Babbitt et al. 1996; Hubbard et al. 1998). Sequenzinformationen bakterieller GAD sind bisher nicht beschrieben. Bezüglich der molekularen Masse der Untereinheit sowie der katalytischen Eigenschaften, insbesondere der Bevorzugung von Fe²⁺, unterscheidet sich die GAD aus *C. pasteurianum* von den archaeellen GADs.

2-Keto-3-Deoxygluconat-Aldolase (KDGA) aus *P. torridus*

Der molekulare Aufbau der KDG-Aldolase aus *P. torridus* ähnelt dem der bifunktionelle KDPG/KDG-Aldolase aus *Sulfolobus* spez. (Buchanan *et al.* 1999). Beide Enzyme sind Homotertramere mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 120 kDa. Dagegen waren die Substratspezifitäten der Enzyme bezüglich der aldolytischen Spaltung von KDG und KDPG signifikant unterschiedlich. Die KDGA aus *P. torridus* ist hoch spezifisch für KDG, was sich in einer etwa 2000fach höheren katalytischen Effizienz für KDG gegenüber KDPG zeigte. Daraus folgt, dass KDG, nicht KDPG, das physiologische Substrat der KDGA ist. Hingegen setzt die bifunktionelle KDPG/KDG-Aldolase aus *S. solfataricus* KDG und KDPG mit vergleichbaren Raten um, jedoch mit einer signifikant höheren katalytischen Effizienzen für KDPG (Lamble *et al.* 2005) (Tabelle 18). Für die bifunktionelle Aldolase aus *S. acidocaldarius* und *Thermoproteus tenax* wurde nur die Umkehrreaktion, d.h. die Bildung von KDPG aus GAP und Pyruvat bzw. von KDG aus Glycerinaldehyd und Pyruvat untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Bildung von KDPG gegenüber KDG bevorzugt war (Wolterink-van *et al.* 2007; Ahmed *et al.* 2005).

Tabelle 18: Vergleich der katalytischen Eigenschaften der KDG-Aldolase aus *P. torridus* und der bifunktionellen KDPG/KDG-Aldolase aus *S. solfataricus* (Lamble 2005) gemessen bei 60°C.

	<i>P. torridus</i>	<i>S. solfataricus</i>
Apparenter k_{cat} (s^{-1})		
KDG	26,7	28,3
KDPG	0,34	64,3
Apparenter K_m (mM)		
KDG	0,3	25,7
KDPG	8,3	0,1
Katalytische Effizienz (k_{cat}/K_m)		
KDG	89	1,1
KDPG	0,04	643

Die Ergebnisse zeigen, dass die Aldolase aus *P. torridus* eine neuartige KDG-spezifische Aldolase ist, die sich signifikant von der bifunktionellen KD(P)G-Aldolase aus *Sulfolobus* und *T. tenax* unterscheidet.

Die unterschiedlichen katalytischen Eigenschaften der Aldolasen spiegeln sich auch in der phylogenetischen Position der Enzyme wider. Aufgrund von Sequenzanalysen können beide Aldolasen der DHDPS-like Familie zugeordnet werden. In Abbildung 18 ist die phylogenetische Analyse von KDG-Aldolase, bifunktionellen KDPG/KDG-Aldolase und weiteren Subfamilien der DHDPS-like Familie dargestellt.

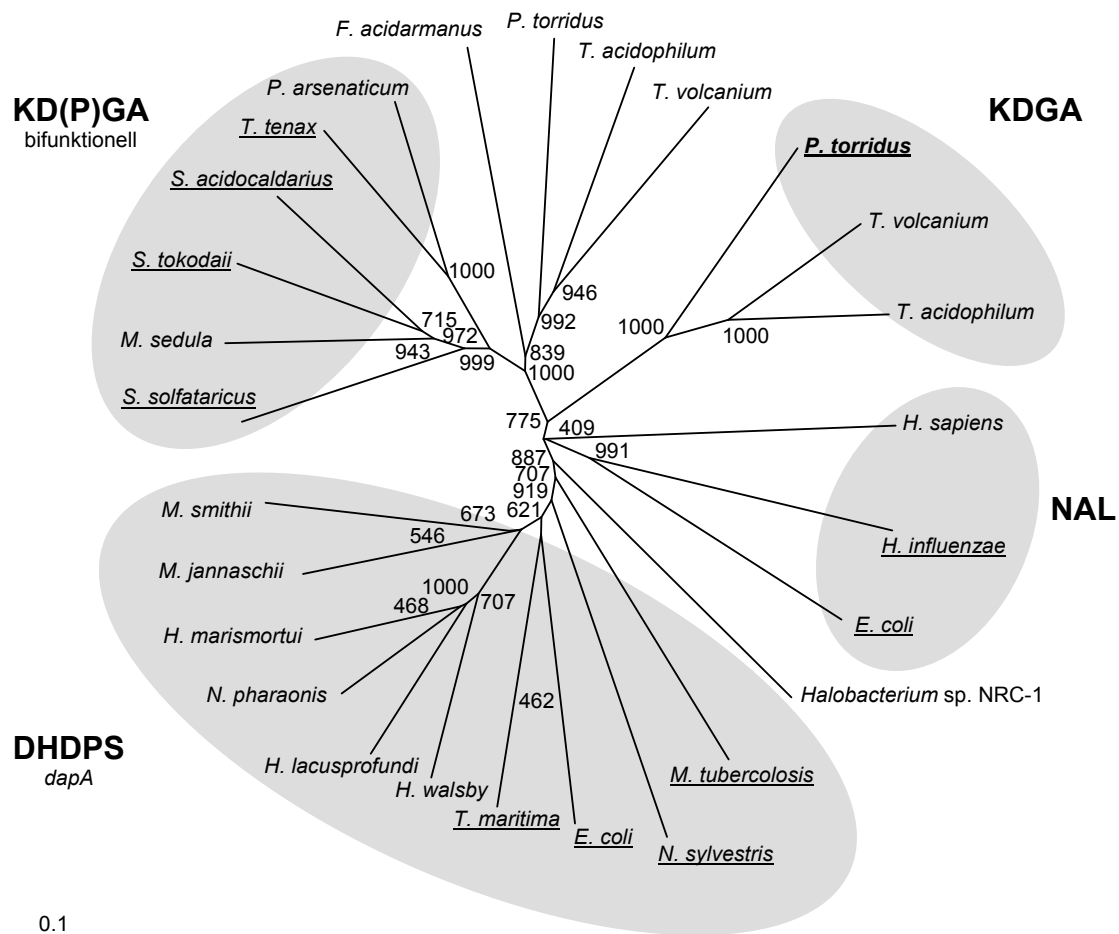


Abbildung 18: Phylogenetische Verwandtschaft von KDGA und weiteren Subfamilien der DHDPS-like Proteinfamilie. Die Zahlen an den Knotenpunkten sind die Bootstrap-Werte nach Neighbor-Joining. NCBI Accession-Nummern der Sequenzen: KDGA: *Picrophilus torridus* (Pto1279a), *Thermoplasma volcanium* GSS1 (gi:13542059), *Thermoplasma acidophilum* DSM 1728 (gi:16082170); NAL: *Homo sapiens* (gi:13540533), *Haemophilus influenzae* (P44539), *Escherichia coli* (P06995); KD(P)GA: *Sulfolobus solfataricus* (gi:2879782), *Sulfolobus tokodaii* str. 7 (gi:15922811), *Sulfolobus acidocaldarius* DSM 639 (gi:70606067), *Thermoproteus tenax* (gi:41033593), *Pyrobaculum arsenaticum* DSM 13514 (gi:145591599), *Metallosphaera sedula* DSM 5348 (gi:146304062); DHDPS: *Methanocaldococcus jannaschii* DSM 2661 (gi:15668419), *Methanobrevibacter smithii* ATCC 35061 (gi:148642891), *Haloarcula marismortui* ATCC 43049 (gi:55377124) *Natronomonas pharaonis* DSM 2160 (gi:76801395), *Haloquadratum walsbyi* DSM 16790 (gi:110667468), *Thermotoga maritima* (gi:7531088), *Escherichia coli* (gi:145708), *Nicotiana sylvestris* (gi:14575543), *Mycobacterium tuberculosis* AF2122/97 (gi:31793927); *Halobacterium* sp. NRC-1 (gi:15789685), *Picrophilus torridus* DSM 9790 (gi:48478098), *Thermoplasma acidophilum* DSM 1728 (gi:16081713), *Thermoplasma volcanium* GSS1 (gi:14324884), *Ferroplasma acidarmanus* Fer1 (gi:69268899).

Die Subfamilien der DHDPS-like Familie bilden eigenständige phylogenetische Gruppen, die sich auch entsprechend ihrer katalytischen Funktionen und Eigenschaften unterscheiden. N-Acetylneuraminat Lyasen (NAL) katalysieren die Spaltung von N-Acetylneuraminsäure in Pyruvat und N-Acylmannosamin in höheren Tieren und einigen Mikroorganismen (Schauer *et al.* 1999). Das Enzym aus *E. coli* wurde charakterisiert und die Kristallstruktur dieses Enzyms

und der NAL aus *Haemophilus influenzae* gelöst (Aisaka *et al.* 1991; Barbosa *et al.* 2000). Dihydrodipicolinate Synthasen (DHDPS, *dapA*) katalysieren die Aldol-Kondensation von Pyruvat und L-Aspartat- β -Semialdehyd zu L-2,3 Dihydrodipicolinat und sind an der Biosynthese von Lysin beteiligt. Die Enzyme aus *Mycobacterium tuberculosis*, *Nicotiana sylvestris* sowie *E. coli* und *T. maritima* wurden charakterisiert und die Kristallstrukturen der beiden letztgenannten Enzyme gelöst (Kefala *et al.* 2008; Ghislain *et al.* 1995; Pearce *et al.* 2006). Archaeelle Vertreter der DHDPS sind bisher nicht beschrieben, jedoch waren putative archaeelle *dapA* Sequenzen annotiert. Ferner waren bei halophilen Archaea und *Methanobrevibacter* in der Genumgebung von *dapA* weitere Enzyme der Lysin Biosynthese annotiert, was auf eine Funktion der archaeellen *dapA* als DHDPS hindeutete. Für die bifunktionellen KDPG/KDG-Aldolasen der Crenarchaeota wurde eine Beteiligung am Glucoseabbau über einen verzweigten ED-Weg postuliert (Ahmed *et al.* 2005; Lambie *et al.* 2005). In der Genumgebung der bifunktionellen Aldolase sind Schlüsselenzyme des verzweigten ED-Weges lokalisiert, darunter eine KDG-Kinase und GAP-N, was die Funktion der KDPG/KDG-Aldolase als Schlüsselenzym dieses Weges unterstreicht (Ettema *et al.* 2008). Die Enzyme aus *S. solfataricus*, *S. tokodaii*, *S. acidocaldarius* und *T. tenax* wurden charakterisiert und die Kristallstrukturen der Aldolasen aus *S. solfataricus* und *S. acidocaldarius* gelöst (Wolterink-van *et al.* 2007; Ahmed *et al.* 2005; Theodossis *et al.* 2004). Putative Homologe der bifunktionellen KDPG/KDG-Aldolasen fanden sich in den Genomen von *Pyrobaculum arsenaticum* und *Metallosphaera sedula*. Für ORF VNG0444G aus *Halobacterium* sp. NRC-1 wurde eine Funktion als KDPG/KDG-Aldolase aufgrund der Genumgebung vorgeschlagen (Ahmed *et al.* 2005). Jedoch sprechen die geringe Sequenzidentität von 17-23% zu den bifunktionellen Aldolasen sowie ein großer phylogenetischer Abstand gegen eine Funktion als KDPG/KDG-Aldolase. Signifikante Sequenzidentitäten der KDPG/KDG-Aldolase von 28-35% zeigten sich zu offenen Leserahmen aus thermoacidophilen Euryarchaeota, wie *P. torridus*, *Thermoplasma* spez. und *Ferroplasma acidarmanus*. Aufgrund von Sequenzvergleichen mit KDPG/KDG-Aldolase aus *Sulfolobus* wurde postuliert, dass diese Proteine, anders als die KDPG/KDG-Aldolase, keine phosphorylierten Substrate umsetzen (Wolterink-van *et al.* 2007). Die Funktion dieser Proteine ist daher unklar. Die neuartige KDG-Aldolase aus *P. torridus* zeigt hohe Sequenzidentitäten (50%) zu putativen Homologen aus *Thermoplasma* spez., jedoch nur etwa 20-25% Sequenzidentität zu bifunktionellen KDPG/KDG-Aldolasen. Entsprechend bilden KDG-Aldolasen eine eigenständige Gruppe, die phylogenetisch deutlich von der bifunktionellen KDPG/KDG-Aldolase abgetrennt ist.

Glycerinaldehyd Dehydrogenase (GADH) aus *P. torridus*

Die GADH aus *P. torridus* wurde als dimeres Enzym charakterisiert und zeigte eine hohe Spezifität für NADP^+ und Glycerinaldehyd. Glycerinaldehyd-3-Phosphat oder nicht-phosphorylierte aliphatische und aromatische Aldehyde waren keine Substrate für die GADH. Insbesondere wird Succinat-Semialdehyd durch das Enzym nicht umgesetzt, was zeigt, dass die Annotierung von ORF Pto0332 als Succinat-Semialdehyd Dehydrogenase nicht zutreffend ist. In *Thermoplasma acidophilum* wurde ORF Ta0809 als GADH-Homolog identifiziert und das rekombinante Enzym als funktionelle GADH mit vergleichbaren molekularen Eigenschaften (Dimer) und identischer Substratspezifität charakterisiert. Das pH-Optimum des Enzyms war mit pH 7,6 signifikant höher als das der GADH von *P. torridus*, was die Unterschiede der intrazellulären pH-Werte beider Organismen widerspiegelt, der bei *P. torridus* mit pH 4,6 geringer ist als bei *T. acidophilum* mit pH 6,0 (Searcy 1976). Kürzlich wurde die GADH aus *T. acidophilum* gereinigt und charakterisiert (Jung und Lee 2006). ORF Ta0809 wurde ebenfalls als kodierendes Gen identifiziert und eine vergleichbare Substratspezifität des Enzyms beschrieben. Jedoch wurde für diese GADH eine tetramere Struktur vorgeschlagen sowie einige abweichende katalytische Parameter beschrieben.

Sequenzanalysen zeigen, dass die GADHs von *P. torridus* und *T. acidophilum* Vertreter der Aldehyd Dehydrogenase (ALDH) Superfamilie sind. In der ALDH Superfamilie werden eine Vielzahl von verschiedenen ALDH Familien zusammengefasst. Den Enzymen gemeinsam ist, dass sie Aldehyde zu den korrespondierenden Säuren oxidieren, wobei die ALDH an unterschiedlichen physiologischen Funktionen beteiligt sind (Perozich *et al.* 1999; Sophos und Vasiliou 2003). Entsprechend dieser spezifischen Funktionen bilden die Enzyme phylogenetisch eigenständige Gruppen. In Abbildung 19 ist die phylogenetische Analyse ausgewählter ALDH Familien sowie der GADH dargestellt. Die Proteine der humanen ALDH1-Familie sind primär an der Oxidation von Retinal zu Retinalat beteiligt, welches eine Rolle bei der Genexpression und Zell-Differenzierung spielt. Die Enzyme der ALDH3-Familie sind am Abbau von 4-Aminobutyrat oder Fucose beteiligt und katalysieren vor allem die Oxidation von aromatischen Aldehyden und aus Fettsäuren abgeleitete Aldehyde (Lütke-Eversloh und Steinbüchel 1999; Bartsch *et al.* 1990; Chambliss *et al.* 1995). Die Sequenzen der nicht-phosphorylierenden Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenasen (GAP-N) zeigen phylogenetisch getrennte Gruppen. Eine Gruppe beinhaltet eukaryotische und bakterielle Sequenzen, während die andere GAP-N-Gruppe archaeele Sequenzen enthält. Die GAPN aller drei Domänen katalysieren die NAD(P)^+ -abhängige Oxidation von Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu 3-Phosphoglycerat (Habenicht 1997; Ahmed *et al.* 2005; Brunner *et al.* 1998;

Ettema *et al.* 2008). Eukaryotische und bakterielle GAP-Ns sind an der Bildung von NADPH bei anabolen Prozessen beteiligt (Iddar *et al.* 2002; Iddar *et al.* 2003; Habenicht 1997), während für archaeele GAP-Ns aus *T. tenax* und *Sulfolobus* Spezies eine katabole Funktion im modifizierten Embden Meyerhof-Weg bzw. semiphosphorylierten Entner-Doudoroff-Weg postuliert wird (Siebers und Schönheit 2005; Ettema *et al.* 2008).

Die GADHs von *P. torridus* und *T. acidophilum* zeigen eine hohe Spezifität für die Substrate Glycerinaldehyd und NADP⁺. Diese einzigartige Substratspezifität unterscheidet sie von allen anderen Familien der ALDH-Superfamilie. Damit stellt die GADH aus Thermoplasmales die erste charakterisierte GADH dar. Die hohe Spezifität des Enzyms für Glycerinaldehyd ist in Übereinstimmung mit der Funktion als Schlüsselenzym der Glycerinaldehyd Oxidation im Rahmen des Glucoseabbaus über einen nicht-phosphorylierten ED-Weg. Die ungewöhnlichen Substratspezifität und eigenständige phylogenetische Position charakterisiert die GADH als neuartige Familie der ALDH-Superfamilie.

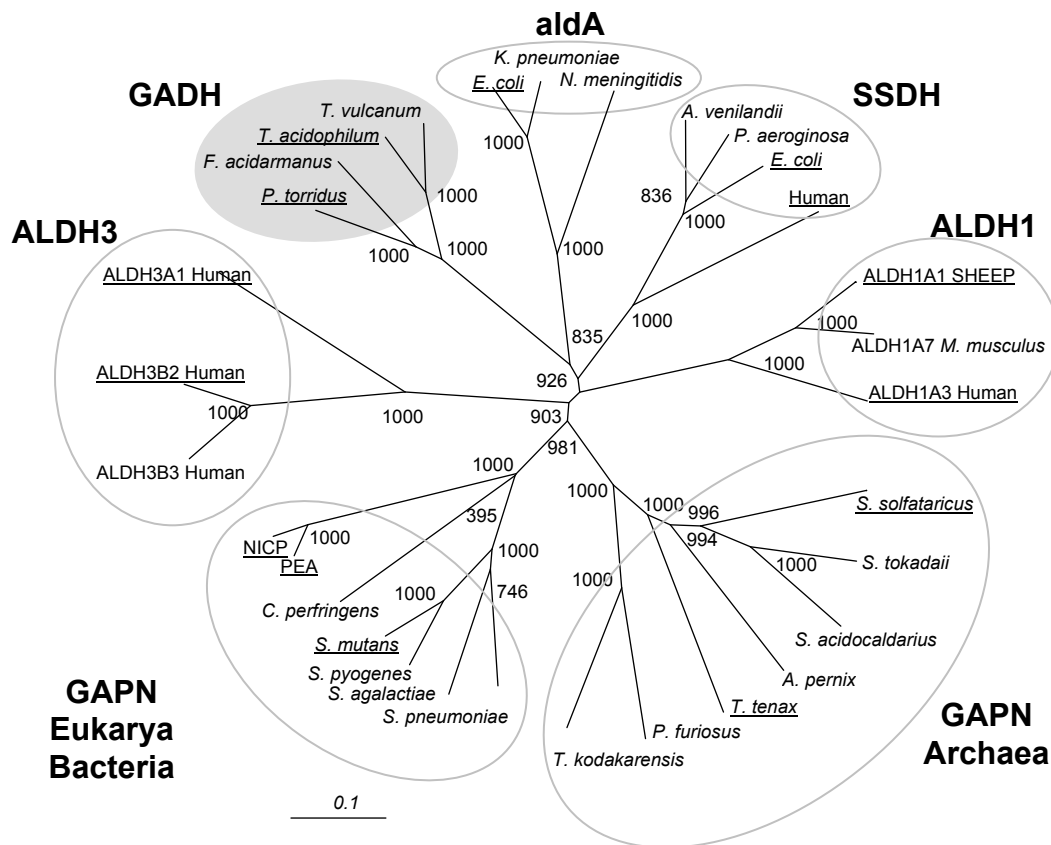


Abbildung 19: Phylogenetische Verwandtschaft der GADH und ausgewählten Vertretern der ALDH-Superfamilie aus Archaea, Bacteria und Eukarya. Charakterisierte Enzyme sind unterstrichen. Die Zahlen an den Knotenpunkten sind die Bootstrap-Werte nach Neighbor-Joining. NCBI Accession-Nummern der Sequenzen: **GADH:** *Picrophilus torridus* DSM 9790 AAT42917.1; *Ferroplasma acidarmanus* Fer1 EAM94231.1; *Thermoplasma acidophilum* CAC11938.1; *Thermoplasma volcanium* GSS1 NP_111540.1; **aldA:** *Escherichia coli* K12 AAC74497.1; *Klebsiella pneumoniae* ABA00458.1; *Neisseria meningitidis* MC58 AAF42297.1; **SSDH:** *Escherichia coli* K12 AAC75708.1; *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 NP_248956.1; *Azotobacter vinelandii* AvOP ZP_00417203.1; *Homo sapiens* CAD20883.2; **ALDH1:** *Homo sapiens* AAH69274.1; SHEEP P51977; *Mus musculus* AAH46315.1; **GAPN:** *Streptococcus pneumoniae* R6 AAK99832.1; *Streptococcus pyogenes* MGAS5005 AAZ51737.1; *Streptococcus agalactiae* A909 YP_329569.1; *Streptococcus mutans* Q59931; PEA, *Pisum sativum* P81406; NICPL *Nicotiana plumbaginifolia* P93338; *Clostridium perfringens* str. 13 BAB82144.1; *Sulfolobus solfataricus* P2 NP_344502.1; *Pyrococcus furiosus* DSM 3638 NP_578484.1; *Thermococcus kodakarensis* KOD1 YP_183118.1; *Aeropyrum pernix* K1 NP_148165.1; *Sulfolobus tokodaii* str. 7 NP_378478.1; *Thermoproteus tenax* CAA71651.1; **ALDH3:** ALDH3A1 *Homo sapiens* NP_000682.3; ALDH3B1 *Homo sapiens* P43353; ALDH3B2 *Homo sapiens* P48448.

Glycerat Kinase aus *P. torridus*

Die GCK aus *P. torridus* ist die erste charakterisierte archaeelle Glycerat Kinase. Das Enzym katalysiert die Phosphorylierung von Glycerat spezifisch zu 2-Phosphoglycerat. Zu Beginn dieser Arbeit war lediglich die GCK von *Hyphomicrobium methylovorum* biochemisch charakterisiert (Yoshida *et al.* 1992). Kürzlich wurde die native GCK von *T. acidophilum* und die rekombinanten Enzyme von *T. tenax* und *Pyrococcus horikoshii* beschrieben (Noh *et al.* 2006; Kehrer *et al.* 2007; Liu *et al.* 2007). In Tabelle 19 sind die molekularen und katalytischen Eigenschaften der Glycerat Kinasen dargestellt.

Tabelle 19: Molekulare und katalytische Eigenschaften der GCK von *P. torridus* gemessen bei 50°C, *T. acidophilum*, 55°C (Noh 2006), *T. tenax*, 70°C (Kehrer 2007), *P. horikoshii*, 45°C (Liu 2007), *T. maritima*, 37°C (Yang 2008) und *H. methylovorum*, 30°C (Yoshida 1992).

	<i>P. torridus</i>	<i>T. acidophilum</i>	<i>T. tenax</i>	<i>P. horikoshii</i>	<i>T. maritima</i>	<i>H. methylovorum</i>
Wachstumsoptimum (°C)	60	59	90	95	80	60
Molekulare Masse (kDa)						
Natives Enzym	95	50	48	100	-	41
Untereinheit	50	45	44	47	-	52
Oligomere Struktur	α_2	α	α	α_2	α	α
Apparenter V_{\max} (Umg⁻¹)						
Glycerat	435	118	5	624	-	181
ATP	432	118	4,4	639	-	-
Apparenter K_m (mM)						
Glycerat	0,34	0,56	0,02	0,044	0,15	0,13
ATP	0,51	0,23	0,03	0,102	0,1	0,13
Mg ²⁺	2,1	-	-	-	-	-

Die molekularen Massen der Untereinheiten der GCKs zeigen eine vergleichbare Größe von 44 – 52 KDa, während die oligomeren Strukturen nicht einheitlich sind. Die GCK aus *P. torridus* und *P. horikoshii* sind als Dimere, während die GCKs aus *T. acidophilum*, *T. tenax*, *H. methylovorum* sowie *T. maritima* als Monomere beschrieben sind. Die GCK aus *P. torridus* war spezifisch für ATP und Glycerat. Die apparenten K_m -Werte für beide Substrate lagen jeweils in derselben Größenordnung wie die K_m -Werte der GCKs aus *T. acidophilum*, *H. methylovorum* sowie *T. maritima*. Für die GCKs aus *P. horikoshii* und *T. tenax* wurden geringere K_m -Werte für Glycerat beschrieben. Außerdem zeigt das Enzym aus *T. tenax* signifikant geringere V_{\max} -Werte. Die GCK aus *P. torridus* war hoch spezifisch für Glycerat, wobei D-Glycerat gegenüber L-Glycerat (34 % Aktivität) bevorzugt wurde. Keine Aktivität konnte mit Gluconat, Glucuronat, Glycerinaldehyd, Dihydroxyacetonphosphat, Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Glucose nachgewiesen werden. Vergleichbare Substratspezifitäten sind auch für die Enzyme aus *T. tenax* und *H. methylovorum* beschrieben.

Lediglich die GCK aus *T. acidophilum* zeigte geringe Aktivität (<5%) mit Gluconat und Glycerol. ATP als Phosphoryldonor konnte bei der GCK aus *P. torridus* durch GTP, CTP, UTP teilweise ersetzt werden, wobei Aktivitäten von etwa 10-25% beobachtet wurden. Die Enzyme *T. tenax* und *H. methylovorum* zeigten eine ähnliche Phosphoryldonor-Spezifität. Die GCK aus *T. acidophilum* hingegen war spezifisch für ATP. Die Rate der GCK aus *P. torridus* war abhängig von den divalenten Kationen, Mg^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} und Co^{2+} , dies ist auch für die GCK aus *T. tenax* und *H. methylovorum* beschrieben. Im Gegensatz dazu ist für das Enzym aus *T. acidophilum* keine signifikante Aktivität mit Ni^{2+} beschrieben (Noh *et al.* 2006).

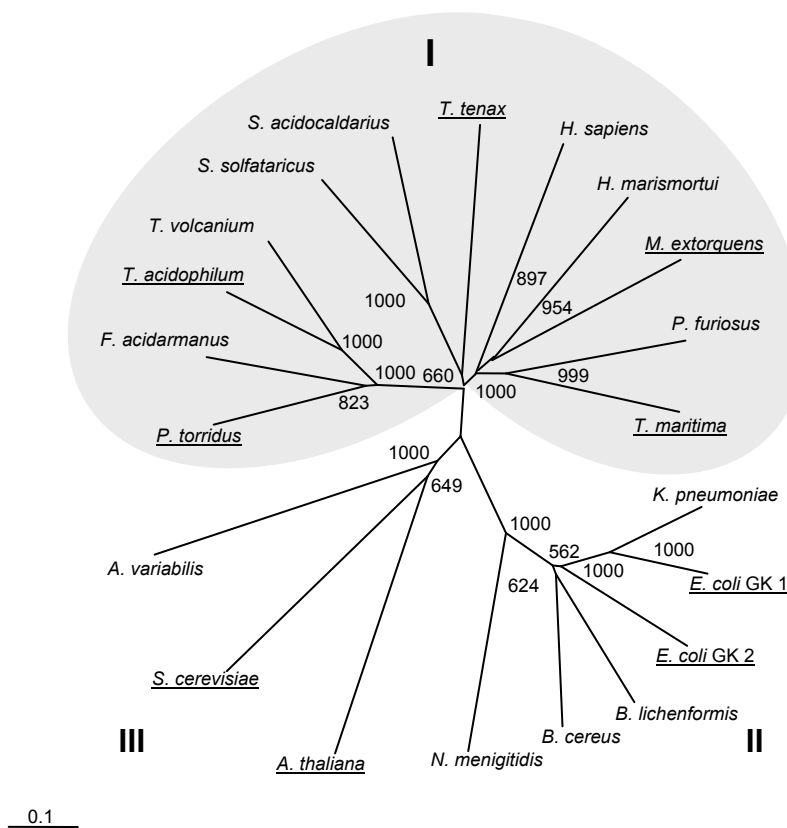


Abbildung 20: Phylogenetische Verwandtschaft der GCK aus *P. torridus* und ausgewählten Vertretern der drei GCK-Familien aus Archaea, Bacteria und Eukarya. Charakterisierte Enzyme sind unterstrichen. Die Zahlen an den Knotenpunkten sind die Bootstrap-Werte nach Neighbor-Joining. NCBI Accession-Nummern der Sequenzen: I: *Picrophilus torridus* DSM 9790 AAT44027.1; *Ferroplasma acidarmanus* Fer1 EAM93653.1; *Thermoplasma acidophilum* NP_393931.1; *Thermoplasma volcanium* GSS1 BAB59939.1; *Sulfolobus solfataricus* CAB57636.1; *Sulfolobus acidocaldarius* AAY79538.1; *Thermoproteus tenax* CAF18535.1; *Homo sapiens* AAP41923.1; *Haloarcula marismortui* ATCC 43049 AAV44739.1; *Methylobacterium extorquens* AAB66496.1; *Pyrococcus furiosus* DSM 3638 AAL80148.1; *Thermotoga maritima* Q9x1s1; II: *Klebsiella pneumoniae* BAD14998; *Escherichia coli* K12 GK1 P77364; *Escherichia coli* K12 GK2 P23524; *Bacillus lichenformis* ATCC 14580 AAU21658.1; *Bacillus cereus* ATCC 10987 AAS39089.1; *Neisseria meningitidis* serogroup A P57098; III: *Arabidopsis thaliana* Q94414; *Saccharomyces cerevisiae* NP_011721.1; *Anabaena variabilis* ATCC 29413 COG4240.

Signifikante Sequenzidentitäten zeigte die GCK aus *P. torridus* zu Sequenzen aus *Methylobacterium* und *T. maritima*. Die GCK aus *Methylobacterium* ist an der Formaldehyd-Assimilation über den Serin-Weg beteiligt (Chistoserdova und Lidstrom 1997). In Mammalia und *Thermotoga maritima* wird eine Funktion der GCK im Serinstoffwechsel vorgeschlagen (Hagopian *et al.* 2005; Yang *et al.* 2008). Homologe mit hoher Sequenzidentität fanden sich in den Genomen von *Thermoplasma acidophilum*, *Sulfolobus solfataricus*, *S. acidocaldarius* und *Thermoproteus tenax*, für die ein Glucoseabbau unter Beteiligung eines npED-Weg bzw. verzweigten ED-Weg postuliert wurde (Siebers und Schönheit 2005). In einigen Bacteria, wie *E. coli*, ist eine 2-Phosphoglycerat-bildende Glycerat Kinase an dem Abbau von Glucarat und Galactarat beteiligt (Hubbard *et al.* 1998). Sequenzanalysen zeigten keine Ähnlichkeiten der *E. coli* GCK zu archaeellen Sequenzen. Auch zu den kürzlich charakterisierten GCK aus *Arabidopsis thaliana* und *Saccharomyces* spez. (Boldt *et al.* 2005) zeigte die GCK aus *P. torridus* keine Sequenzähnlichkeit. Die Phylogenie der drei bisher bekannten GCK-Familien ist in Abbildung 20 dargestellte. Gruppe I umfasst archaeelle Sequenzen und die GCK von *M. extorquenz* und *T. maritima* sowie vom Menschen. In Gruppe II sind ausschließlich bakterielle Sequenzen zusammengefasst, darunter die 2- bzw. 3- Phosphoglycerat bildenden GCKs aus *E. coli* und die putative GCK aus *Neisseria meningitidis*. Die distinkte Gruppierung der GCK Sequenzen der Gruppe I und II ist in Übereinstimmung mit den geringen Sequenzidentitäten dieser Gruppe (<10%). Ferner zeigen Strukturanalysen der GCK aus *T. maritima* (Gruppe I) und *Neisseria* (Gruppe II) eine grundsätzlich unterschiedliche Proteinarchitektur (Cheek *et al.* 2005). Gruppe III umfasst 3-Phosphoglycerat-bildende GCKs aus *Arabidopsis thaliana* und *Saccharomyces* spez. sowie Cyanobakterien. Die Vertreter dieser Gruppe zeigten nur geringer Sequenzidentitäten (<10%) zu Sequenzen aus Gruppe I und II.

Temperaturoptimum, Stabilität und pH-Optimum der Enzyme aus *P. torridus*

Alle gereinigten Enzyme aus *P. torridus* zeigten Temperaturoptima zwischen 60-70°C und waren bei 60°C thermostabil, was in Übereinstimmung mit dem Temperaturoptimum des Wachstums (60°C) von *P. torridus* war. Die pH-Optima der Enzyme waren z.T. deutlich höher als der intrazelluläre pH von 4,6 des Organismus (van, Vossenbergh *et al.* 1998), jedoch zeigten die Enzyme bei pH-Werten zwischen 4,6 und 5 noch Aktivitäten von ~ 50%, was auf ein breites pH-Spektrum hindeutet. Die pH-Optima anderer intrazellulärer Enzyme aus *P. torridus*, wie die Alkohol Dehydrogenase oder Esterase lagen zwischen pH 6,5 und 7,8, was ebenfalls deutlich höher als der intrazelluläre pH-Wert ist (Hess und Antranikian 2008; Hess

et al. 2008). Dagegen zeigen extrazelluläre Enzyme von *P. torridus* in Übereinstimmung mit dem extrazellulären pH-Wert ein saures pH-Optimum. So zeigt die Amylase aus *P. torridus* ein pH-Optimum von 2,0, was auf eine Anpassung des Enzyms an die extremen pH-Werte hindeutet (Serour und Antranikian 2002).

Der nicht-phosphorylierte Entner-Doudoroff-Weg und Modifikationen des ED-Weges in Archaea

Die ¹³C-Markierungsexperimente, enzymatische Untersuchungen in Zellextrakten sowie biochemischen und phylogenetischen Analyse der am Glucoseabbau beteiligten Enzyme zeigen, dass *P. torridus* Glucose über einen nicht-phosphorylierten Entner-Doudoroff-Weg abbaut. Die verfügbaren Daten für *T. acidophilum* sprechen ebenfalls für die Beteiligung eines npED-Weges in diesem Organismus. Homologe der Enzyme des npED-Weges aus *P. torridus* finden sich im Genom von *T. acidophilum* oder wurden als orthologe Gene, wie die Glucose Dehydrogenase (Smith *et al.* 1989), Glycerat Kinase (Noh *et al.* 2006) und Glycerinaldehyd Dehydrogenase (Diese Arbeit,(Jung und Lee 2006)), identifiziert. Kürzlich durchgeführte Proteom Analysen von *T. acidophilum* zeigen die Expression der Gene des npED-Weges mit Ausnahme der GCK (Sun *et al.* 2007). Insbesondere konnte ein Homolog der KDG-Aldolase durch die 2D-Analyse nachgewiesen werden, was in Übereinstimmung mit der Aktivität einer KDG spezifischen Aldolase in Zellextrakten von *T. acidophilum* ist. Die weiteren Aktivitäten der Enzyme eines npED-Weges wurden in Zellextrakten von *T. acidophilum* ebenfalls nachgewiesen (Budgen und Danson 1986). Der Abbauweg der Glucose über einen nicht-phosphorylierten ED-Weg in den thermoacidophilen Euryarchaeota *T. acidophilum* und *P. torridus* sowie die weiteren für Archaea postulierten Modifikationen des ED-Weg sind in Abbildung 21 dargestellt. Alle modifizierten ED-Wege der Archaea beginnen mit der Umsetzung von Glucose zu KDG, katalysiert durch eine Glucose Dehydrogenase und Gluconat Dehydratase. Die Glucose Dehydrogenase von *P. torridus* und *T. acidophilum* ist homolog zu den Enzymen aus *Sulfolobus* und halophilen Archaea (Angelov *et al.* 2005; Smith *et al.* 1989; Giardina *et al.* 1986; Lamble *et al.* 2003; Pire *et al.* 2001). Die Gluconat Dehydratase aus *P. torridus* zeigte biochemische und phylogenetische Ähnlichkeiten zu dem Enzym aus *S. solfataricus*. Eine Gluconat Dehydratase halophilen Ursprungs ist bisher nicht beschrieben, jedoch sind putative Homologe der GAD in halophilen Genomen annotiert (Falb *et al.* 2008).

Während die Bildung von KDG aus Glucose in Archaea einheitlich ist, erfolgt die Umsetzung von KDG zu 2-Phosphoglycerat durch drei verschiedene Varianten, die sich bezüglich der

auftretenden Intermediate und beteiligten Enzyme unterscheiden. (1) Im npED-Weg von *P. torridus* und *T. acidophilum* wird KDG durch eine spezifische Aldolase in Pyruvat und Glycerinaldehyd gespalten. Anschließend wird Glycerinaldehyd durch eine NADP⁺-spezifische Aldehyd Dehydrogenase zu Glycerat oxidiert. Die Phosphorylierung des Glycerats zu 2-Phosphoglycerat wird durch eine Glycerat Kinase katalysiert. (2) Für *Sulfolobus* und *T. tenax* wurde aufgrund von enzymatischen Untersuchungen in Zellextrakten und der Charakterisierung von Schlüsselenzymen ein verzweigter ED-Weg postuliert, der neben einem npED-Zweig auch einen semi-phosphorylierten Zweig beinhaltet. Das Schlüsselenzym des verzweigten ED-Weges ist eine bifunktionellen KDPG/KDG-Aldolase (*kd(p)gA*), die neben KDG auch KDPG mit hohen Raten umsetzt (Ahmed *et al.* 2005; Lambie *et al.* 2005). Entsprechend wird beim Glucoseabbau über den npED-Zweig KDG direkt durch die bifunktionelle Aldolase in Pyruvat und Glycerinaldehyd gespalten. Die anschließende Oxidation des Glycerinaldehyds zu Glycerat wird in *Sulfolobus* und *T. tenax* nicht durch eine GADH, sondern durch Glycerinaldehyd Oxidoreduktasen (GA:OR) katalysiert. Während der Elektronenakzeptor des Enzyms in *Sulfolobus* nicht bekannt ist, wurde für das Enzym in *T. tenax* Ferredoxin als Elektronenakzeptor postuliert (Kardinahl *et al.* 1999; Selig *et al.* 1997). In beiden Organismen wird das gebildete Glycerat, wie bei *P. torridus*, durch eine Glycerat Kinase zu 2-Phosphoglycerat phosphoryliert (Siebers und Schönheit 2005; Kehrer *et al.* 2007). Kennzeichnend für den spED-Zweig des verzweigten ED-Weges ist das Vorkommen des Intermediats KDPG, das durch Phosphorylierung von KDG zu KDPG durch eine KDG-Kinase (*kdgK*) entsteht. Die anschließende Spaltung von KDPG zu Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat erfolgt durch die bifunktionelle KDPG/KDG Aldolase. Das nach Spaltung von KDPG gebildete GAP wird durch eine GAP-N (*gapN*) zu 3-Phosphoglycerat oxidiert. Die Umsetzung von 3-Phosphoglycerat zu 2-Phosphoglycerat wird durch eine Phosphoglycerat Mutase katalysiert (Ahmed *et al.* 2005; Ettema *et al.* 2008). (3) Die Bildung von 2-Phosphoglycerat aus KDG erfolgt in halophilen Archaea über Teilreaktionen des semiphosphorylierten ED-Weges. Entsprechend wird KDG durch eine KDG-Kinase zu KDPG phosphoryliert und anschließend durch eine KDPG-Aldolase in Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Pyruvat gespalten. GAP wird durch eine NAD⁺- und Phosphat-abhängige Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase zu 1,3-Bisphosphoglycerat umgesetzt und durch ein Phosphoglycerat-Kinase dephosphoryliert. Das gebildete 3-Phosphoglycerat wird durch eine Phosphoglycerat Mutase zu 2-Phosphoglycerat umgesetzt (Tomlinson *et al.* 1974; Johnsen *et al.* 2001; Siebers und Schönheit 2005). Während die annotierte KDG-Kinase Ähnlichkeiten zu archaellen Enzymen zeigt, sind die KDPG-Aldolase und NAD⁺-abhängige

GAPDH homolog zu bakteriellen Enzymen. Alle ED-Wege der Archaea unterscheiden sich von dem klassischen ED-Weg der Bacteria durch das Fehlen einer Glucokinase, Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase und 6-Phosphogluconat Dehydratase, die in Bacteria an der Umsetzung von Glucose zu KDPG beteiligt sind (Abbildung 21). Die Bildung von Pyruvat aus 2-Phosphoglycerat wird in allen modifizierten ED-Wegen der Archaea und dem klassischen ED-Weg der Bacteria durch eine Enolase und Pyruvat Kinase katalysiert (Siebers und Schönheit 2005).

Energetik: Die modifizierten ED-Wege in Archaea unterscheiden sich durch die Netto-ATP-Ausbeute. Der npED-Weg in *P. torridus* ist nicht mit einer Netto-ATP-Ausbeute gekoppelt. In der Glycerat Kinase Reaktion wird ein ATP verbraucht, das in der Pyruvat Kinase Reaktion wiedergewonnen wird. Somit ist die Netto-ATP-Ausbeute gleich null. Im verzweigten ED-Weg wird bis zur Bildung von 2-Phosphoglycerat ein ATP, entweder in der KDG-Kinase Reaktion oder bei der Phosphorylierung des Glycerats, verbraucht, welches in der Pyruvat-Kinase Reaktion wiedergewonnen wird, was ebenfalls zu keiner Netto-ATP-Ausbeute führt. Die fehlende Netto-ATP-Synthese bei der Glucoseumsetzung zu Pyruvat bewirkt, dass die Energie zum Wachstum dieser Aerobier ausschließlich durch Elektronen-Transport-Phosphorylierung in der Atmungskette gewonnen werden kann (Schäfer *et al.* 1999). Im spED-Weg der halophilen Archaea wird in der KDG-Kinase Reaktion ein ATP verbraucht. Da in der Phosphoglycerat Kinase- und Pyruvat Kinase Reaktion 2 ATP gewonnen werden, ist die Netto Ausbeute ein ATP. Eine vergleichbare Netto-ATP-Ausbeute findet sich auch bei dem klassischen Weg der Bacteria (Siebers und Schönheit 2005).

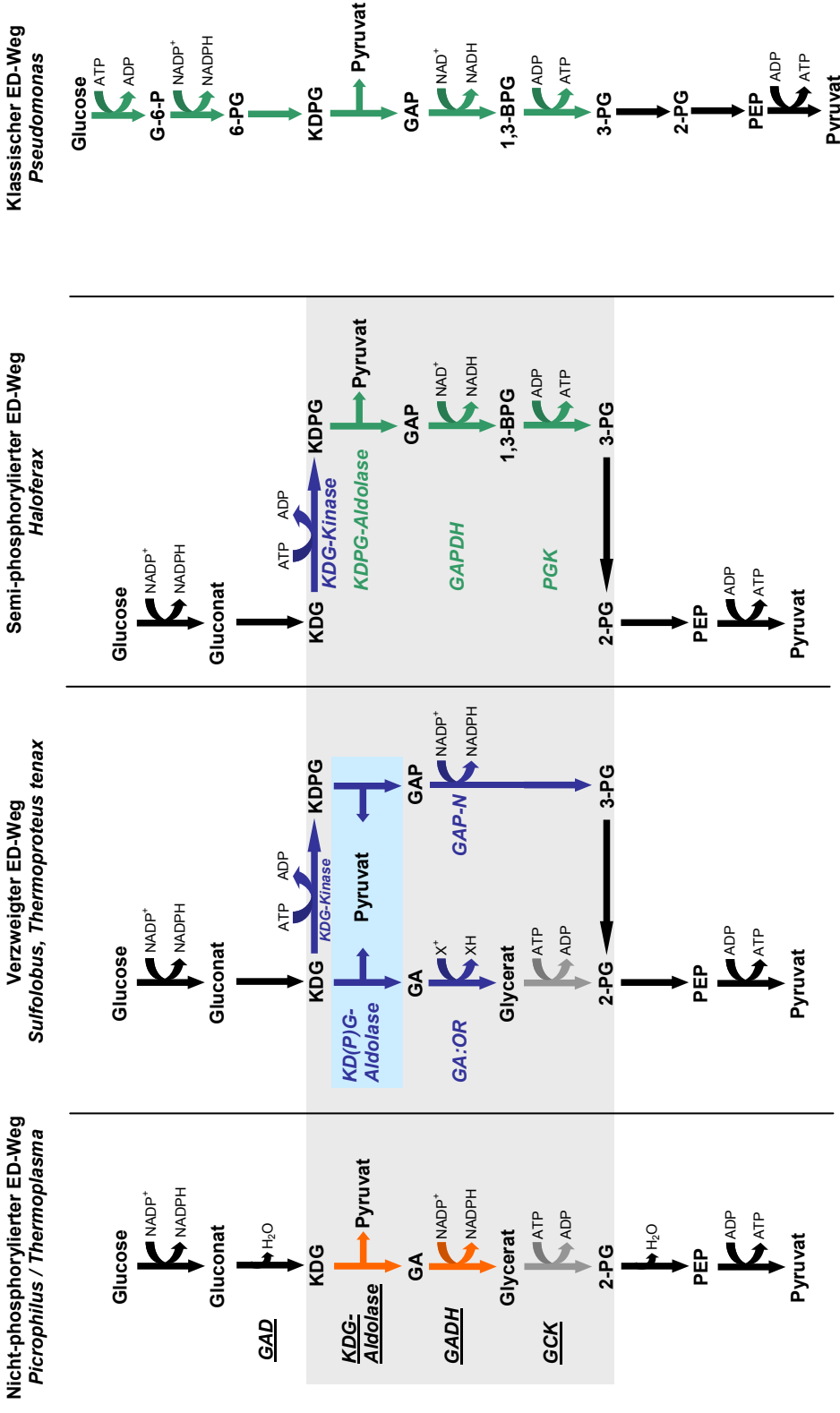


Abbildung 21: Modifikationen des Entner-Dooudoroff-Weges in Archaea und der klassische ED-Weg in Bacteria: Dargestellt sind der nicht-phosphorylierte ED-Weg in den thermoacidophilen Euryarchaeota *P. torridus* und *T. acidophilum*, der verzweigte ED-Weg Crenarchaeota wie *Sulfolobus* und *Thermoproteus tenax*, der semi-phosphorylierte ED-Weg in halophilen Archaea wie *Haloferax* und der klassische ED-Weg in Bacteria wie *Pseudomonas*. Angegeben sind die in dieser Arbeit untersuchten Enzyme sowie wichtige Schlüsselenzyme. Unterschiedliche Enzyme sind farblich hervorgehoben. Abkürzungen: KDG = 2-Keto-3-Deoxygluconat, KDPG = 2-Keto-3-Deoxyphosphogluconat, GA = Glycerinaldehyd-3-Phosphat, 1,3-BPG = 1,3-Bisphosphoglycerat, 2-PG = 2-Phosphoglycerat, 3-PG = 3-Phosphoglycerat, PEP = Phosphoenolpyruvat, GAD = Gluconat Dehydratase, GAPDH = Glycerinaldehyd Dehydrogenase, GAP-N = nicht-phosphorylierende GAPDH, GA:OR = Glycerinaldehyd Oxidoreduktase, GCK = Glycerat Kinase, PGK = Phosphoglycerat Kinase, KD(P)G-Aldolase = bifunktionelle KDG/KDPG Aldolase

Regulation: Der npED-Weg in *P. torridus* und der verzweigte ED-Weg in Crenarchaeota zeigte keine signifikante Regulation durch Glucose (Snijders *et al.* 2006; Ettema *et al.* 2008). Dadurch unterscheiden sich diese Wege von dem spED-Weg der halophilen Archaea wie *Haloferax*, der durch Glucose induziert wird (Zaigler *et al.* 2003). Eine vergleichbare Regulation ist auch für den klassischen ED-Weg der Bacteria, z.B. Pseudomonaden beschrieben (O'Brien 1975). Dies zeigt, dass der spED-Weg der halophilen Archaea im Bezug auf Phylogenie der Enzyme als auch im Bezug auf die Regulation dem klassischen ED-Weg der Bacteria ähnlich ist.

Gluconeogenese: *P. torridus* verfügt neben den Enzymen des npED-Weges auch über reversible Enzyme des EM-Weges, die vermutlich an der Gluconeogenese beteiligt sind. Die Verwendung eines reversiblen EM-Weges bei der Gluconeogenese zur Bildung von Glucose-6-Phosphat aus Pyruvat kommt in allen drei Domänen vor und deutet auf einen hohen Grad der Konservierung dieses Prozesses hin (Siebers und Schönheit 2005).

Die Charakterisierung des Entner-Doudoroff-Weges in *P. torridus* stellt die erste detaillierte Beschreibung eines funktionellen nicht-phosphorylierten ED-Weges dar, und zeigt, dass thermoacidophile Archaea Glucose über zwei unterschiedliche Wege abbauen. Während Euryarchaeota Glucose über einen npED-Weg umsetzen, erfolgt der Glucoseabbau in Crenarchaeota über einen verzweigten ED-Weg. Die unterschiedlichen Abbauewege zeigen sich auch in der Anordnung der für die Enzyme kodierenden Gene im Genom. Einige Gene des verzweigten ED-Weges sind in *Sulfolobus* in einem ED-Gencluster (*gad-kd(p)gA-kdgK, gapN*) organisiert, wobei *gad-kdgA-kdgK* in einem Operon vorliegen (Ahmed *et al.* 2005; Ettema *et al.* 2008). Ein solcher Gencluster fehlt sowohl in *P. torridus* als auch *T. acidophilum*.

6.2 Der modifizierte Embden-Meyerhof-Weg in *Pyrobaculum aerophilum*

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass das mikroaerophilen Crenarchaeon *Pyrobaculum aerophilum* alle Enzyme eines modifizierten EM-Weges enthält. In *P. aerophilum* umfasst dieser Wege eine ATP-abhängige Glucokinase, Phosphoglucose-Isomerase, ATP-abhängige 6-Phosphofruktokinase, Fructose-1,6-Bisphosphat-Aldolase, Triosephosphat Aldolase, Glycerinaldehyd-3-Phosphat: Ferredoxin Oxidoreduktase (GAPOR), Phosphoglycerat Mutase, Enolase und Pyruvat Kinase. Dies ist der erste Nachweis eines modifizierten EM-Weges mit einer funktionellen GAPOR in einem aeroben Archaeon. Das Schlüsselenzym dieses Weges, eine durch Maltose induzierbare GAPOR wurde charakterisiert und phylogenetisch analysiert. Im Folgenden wird der modifizierte EM-Weg in *P. aerophilum* mit anderen modifizierten EM-Wegen in Archaea verglichen und das Schlüsselenzym GAPOR phylogenetisch analysiert.

Bisher wurde ein modifizierter EM-Weg mit einer GAPOR als Schlüsselenzym nur für strikt anaerobe saccharolytische hyperthermophile Archaea, wie *Pyrococcus furiosus*, *Thermococcus* spez., *Archaeoglobus fulgidus* Stamm 7324 und *Desulforococcus amylolyticus* beschrieben (Abbildung 22) (Siebers und Schönheit 2005). Auch in diesen Organismen wird die GAPOR bei Wachstum auf Zucker stimuliert, was die Funktion der GAPOR als Schlüsselenzym des Zuckerabbaus unterstreicht. Der modifizierte EM-Weg von *P. aerophilum* zeigt Ähnlichkeiten zu dem entsprechenden Weg von *D. amylolyticus*, der neben einer GAPOR ebenfalls über eine ATP-abhängige Glucokinase und ein ATP-abhängige 6-Phosphofruktokinase verfügt. Während *D. amylolyticus* Glucose zu Acetat abbaut, wird in *P. aerophilum* Glucose vollständig zu CO₂ oxidiert (Schönheit 2008). Der EM-Weg in *Pyrococcus*, *Thermococcus* und *Archaeoglobus fulgidus* Stamm 7324 unterscheidet sich signifikant durch das Vorkommen von ADP-abhängigen Glucokinasen und 6-Phosphofruktokinasen. *Thermoproteus tenax* verfügt wie *P. aerophilum* über eine ATP-abhängige Glucokinase, jedoch unterscheidet er sich durch das Vorkommen einer PP_i-abhängigen Phosphofruktokinase und einer GAP-N zur Oxidation des Glycerinaldehyd-3-Phosphats zu 3-Phosphoglycerat. Die Netto-ATP-Ausbeute des modifizierten EM-Weges in *P. aerophilum* ist null, da die Oxidation des Glycerinaldehyd-3-Phosphats zu 3-Phosphoglycerat durch eine GAPOR nicht mit einer ATP-Synthese gekoppelt ist. Die Reaktion der Glucokinase und Phosphofruktokinase verbraucht je eine ATP, welches in der Pyruvat Kinase Reaktion bei der Umsetzung von zwei Phosphoenolpyruvat zu zwei Pyruvat wiedergewonnen wird. Die formale Netto-ATP Ausbeute anderer modifizierter EM-Wege, die über eine

GAPOR oder GAP-N verfügbar ist ebenfalls null, was ein generelles Phänomen aller modifizierten EM-Wege in Archaea ist. Die Energiegewinnung findet entweder statt in der Atmungskette (z.B. *P. aerophilum*) oder bei der Acetat Bildung (z.B. *Pyrococcus*). Der klassische EM-Weg, in dem die Oxidation von GAP zu 3-Phosphoglycerat durch eine phosphorylierende GAPDH und Phosphoglyceratkinase katalysiert wird, hat eine ATP-Ausbeute von zwei ATP (Siebers und Schönheit 2005).

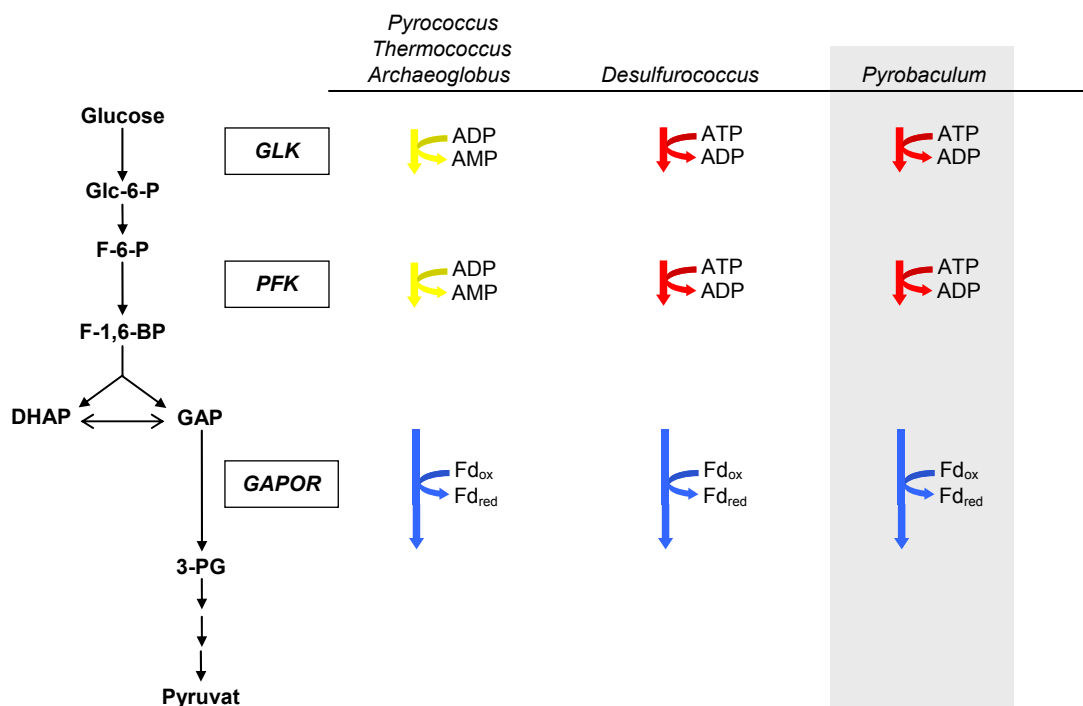


Abbildung 22: Vergleichende Darstellung der Schlüsselenzyme des Glucoseabbaus von modifizierten Embden-Meyerhof-Wegen mit einer GAPOR in verschiedenen hyperthermophilen Archaea. Abkürzungen: DHAP = Dihydroxyacetonphosphat, Glc-6-P = Glucose-6-Phosphat, F-6-P = Fructose-6-Phosphat, F-1,6-BP = Fructose-1,6-Bisphosphat, GAP = Glycerinaldehyd-3-Phosphat, 3-PG = 3-Phosphoglycerat, GLK = Glucokinase, GAPOR = GAP: Ferredoxin Oxidoreduktase, GLK = Glucokinase, PFK = 6-Phosphofruktokinase, Fd = Ferredoxin, ox = oxidiert, red = reduziert.

Das Vorkommen der Enzyme eines modifizierten EM-Weges ist in Übereinstimmung mit der Annotierung bzw. Identifizierung von Genen im Genom von *P. aerophilum* (Fitz-Gibbon *et al.* 2002; Verhees *et al.* 2003). Außer der GAPOR wurden die Gene für die ATP-abhängige Glucokinase, Glucose-6-Phosphat Isomerase und Pyruvat Kinase identifiziert. Die ATP-Glucokinase wird durch PAE3437 kodiert und der ROK-Familie zugeordnet (Hansen und Schönheit, unveröffentlicht). Die Isomerisierung des Glucose-6-Phosphats wird durch eine ungewöhnliche Isomerase (PAE1610) katalysiert, die aufgrund der vergleichbaren katalytischen Effizienz mit Mannose-6-Phosphat als bifunktionelle

Phosphoglucose/Phosphomannose Isomerase (PGI/PMI) bezeichnet wird und eine neuartige Familie innerhalb der PGI-Superfamilie repräsentiert (Hansen *et al.* 2004a; Swan *et al.* 2004). Pyruvat Kinasen, die bei Archaea im Vergleich zu bakteriellen und eukaryotischen Pyruvat Kinasen nur eingeschränkte allosterische Eigenschaften besitzen, wurden in *P. aerophilum* (PAE0819) identifiziert und charakterisiert (Johnsen *et al.* 2003). Im Genom von *P. aerophilum* sind Gene für eine ATP-Phosphofruktokinase der PFK-B Familie, Kofaktor-unabhängige Phosphoglycerat Mutase sowie Triosephosphat Isomerase und Enolase annotiert. Dagegen konnte kein Homolog zu bekannten Fructose-1,6-Bisphosphat-Aldolasen gefunden werden. Da in *P. aerophilum* eine entsprechende Aktivität nachgewiesen wurde, deuten die Befunde auf das Vorkommen einer neuartigen Aldolase in diesem Organismus hin, die sich signifikant von bekannten Aldolasen unterscheidet.

Die GAPOR aus *P. aerophilum*

Das Schlüsselenzym des modifizierten EM-Weges, GAPOR, wurde gereinigt und als monomeres 67 kDa Protein mit hoher Spezifität für Glycerinaldehyd-3-Phosphat charakterisiert. Das Enzym zeigte eine ausgeprägte Thermostabilität. Das kodierende Gen, identifiziert über MALDI-TOF Analysen, zeigte signifikante Sequenzidentitäten zu der GAPOR des strikt anaeroben Euryarchaeons *Pyrococcus furiosus* (Mukund und Adams 1995) sowie zu Formaldehyd: Ferredoxin Oxidoreduktasen (FOR) und Aldehyd: Ferredoxin Oxidoreduktasen (AOR). Diese Enzyme werden der Aldehyd Ferredoxin Oxidoreduktase (AOR) Familie zugeordnet und sind als metall-pterinhaltige Eisen-Schwefel-Proteine charakterisiert. Die an der Bindung des Pterin-Cofaktors und des Eisen-Schwefel-Clusters beteiligten Aminosäuren sind in den Sequenzen der GAPOR von *P. furiosus* und *P. aerophilum* sowie in den Sequenzen von putativen Homologen konserviert, was dafür spricht, dass die GAPOR aus *P. aerophilum* ebenfalls ein metall-pterinhaltiges Enzym ist (Abbildung 23) (Roy *et al.* 2001; Van der Oost *et al.* 1998). Bei charakterisierten hyperthermophilen AORs ist ein Wolfram-Pterin vorhanden, während die kürzlich beschriebene GAPOR aus dem mesophilen methanogenen Euryarchaeota *Methanococcus maripaludis* ein molybdänhaltiges Isoenzyme ist (Park *et al.* 2007). Als Erklärung wird vorgeschlagen, dass in hyperthermophilen Habitaten Wolfram biologisch verfügbar ist, während Molybdän unter diesen Bedingungen überwiegend als unlösliches MoS_2 vorliegt (Kletzin und Adams 1996).

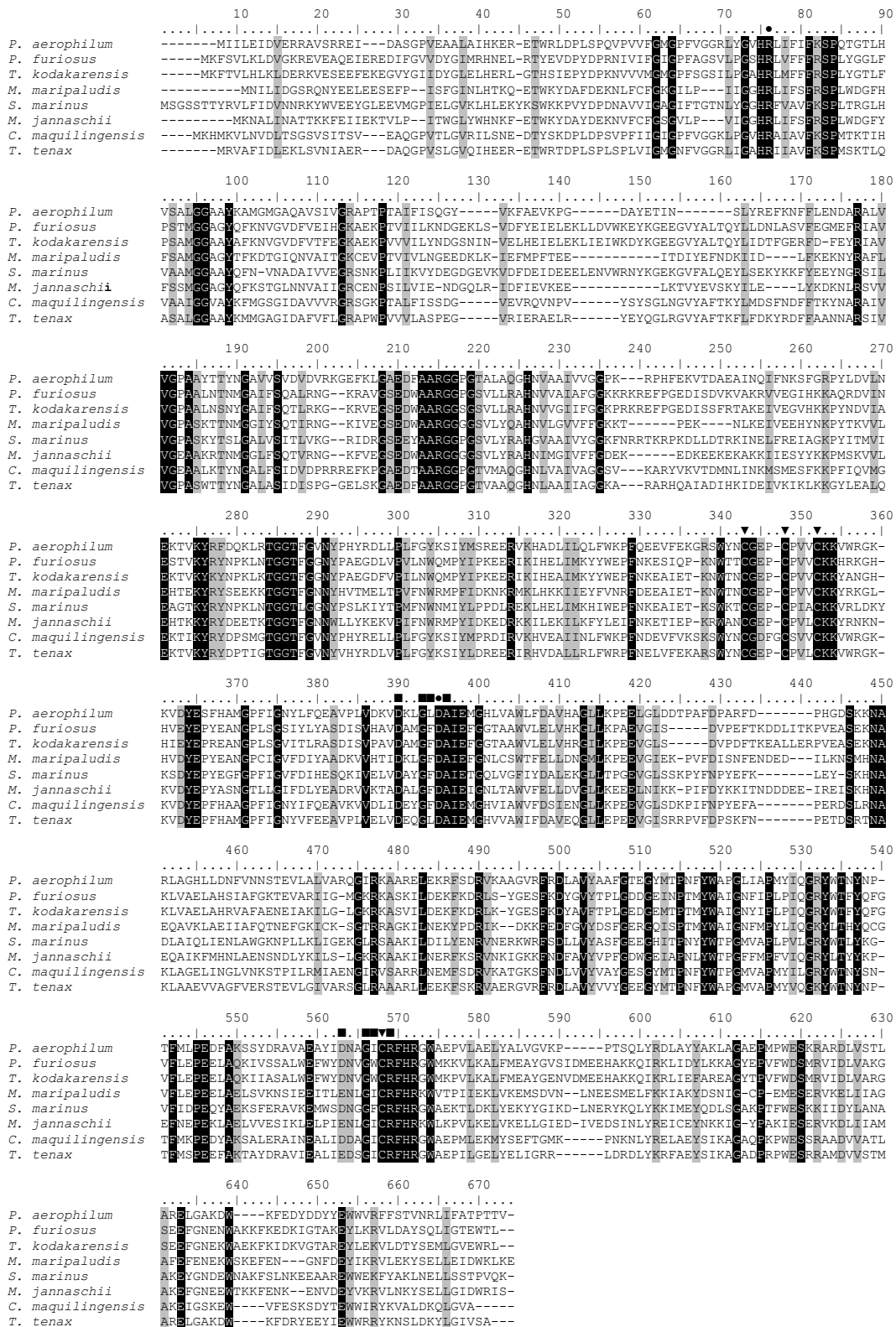


Abbildung 23: Alignment der Sequenzen der GAPOR von *P. aerophilum* (Pae1029) und putativen archaeellen Homologen und der GAPOR von *P. furiosus*. (●) H-Brückenverbindung der Liganden des [4Fe-4S]-Clusters und der Metallbipterin-Gruppe; (▼) Cystein-Liganden des [4Fe-4S]-Clusters; (■) Pterin-bindende H-Brücken-Netzwerke (Van der Oost *et al.* 1998). *P. aerophilum* (gi: 18312361); *P. furiosus* (gi:); *T. kodakarensis* (gi: 57642098); *M. maripaludis* (gi: 45358508); *S. marinus* (gi:126466465); *M. jannaschii* (gi:15669374); *C. maquilingensis* (gi: 126354817); *T. tenax* (gi: 41033689).

Die phylogenetische Position der GAPOR innerhalb der Aldehyd Oxidorduktasen

Die phylogenetische Analyse der charakterisierten GAPORs sowie von putativen Homologen zeigt eine eigenständige Gruppierung der Enzyme innerhalb des Stammbaums der archeellen AOR Familien (Abbildung 24). Die FORs und AORs zeigen ebenfalls distinkte Gruppierungen und eine deutliche phylogenetische Distanz zu der GAPOR. Dies ist in Übereinstimmung mit ihren unterschiedlichen molekularen und katalytischen Eigenschaften. Die GAPORs aus *P. aerophilum*, *P. furiosus* und *M. maripaludis* sind monomere Proteine und entsprechend ihrer glycolytischen Funktion spezifisch für Glycerinaldehyd-3-Phosphat. AORs von *P. furiosus* und *P. aerophilum* sind homodimere Enzyme, welche die Oxidation von nicht-phosphorylierten Aldehyden, insbesondere Crotonaldehyd und Benzaldehyd, katalysieren (Mukund und Adams 1991; Hagedoorn *et al.* 2005). FORs von *T. litorales* und *P. furiosus* sind homotetramere Proteine, die die Oxidation einer Vielzahl von Aldehyden, vor allem aber Formaldehyd, katalysieren (Roy *et al.* 2001). Kürzlich wurden zwei wolframhaltige Proteine (WOR4 und WOR5) aus *P. furiosus* anhand ihrer spektroskopischen Eigenschaften charakterisiert. Diese Proteine der AOR-Familie zeigen eine phylogenetisch separate Position im Stammbaum. Ihre physiologische Bedeutung ist noch unklar (Bever *et al.* 2005).

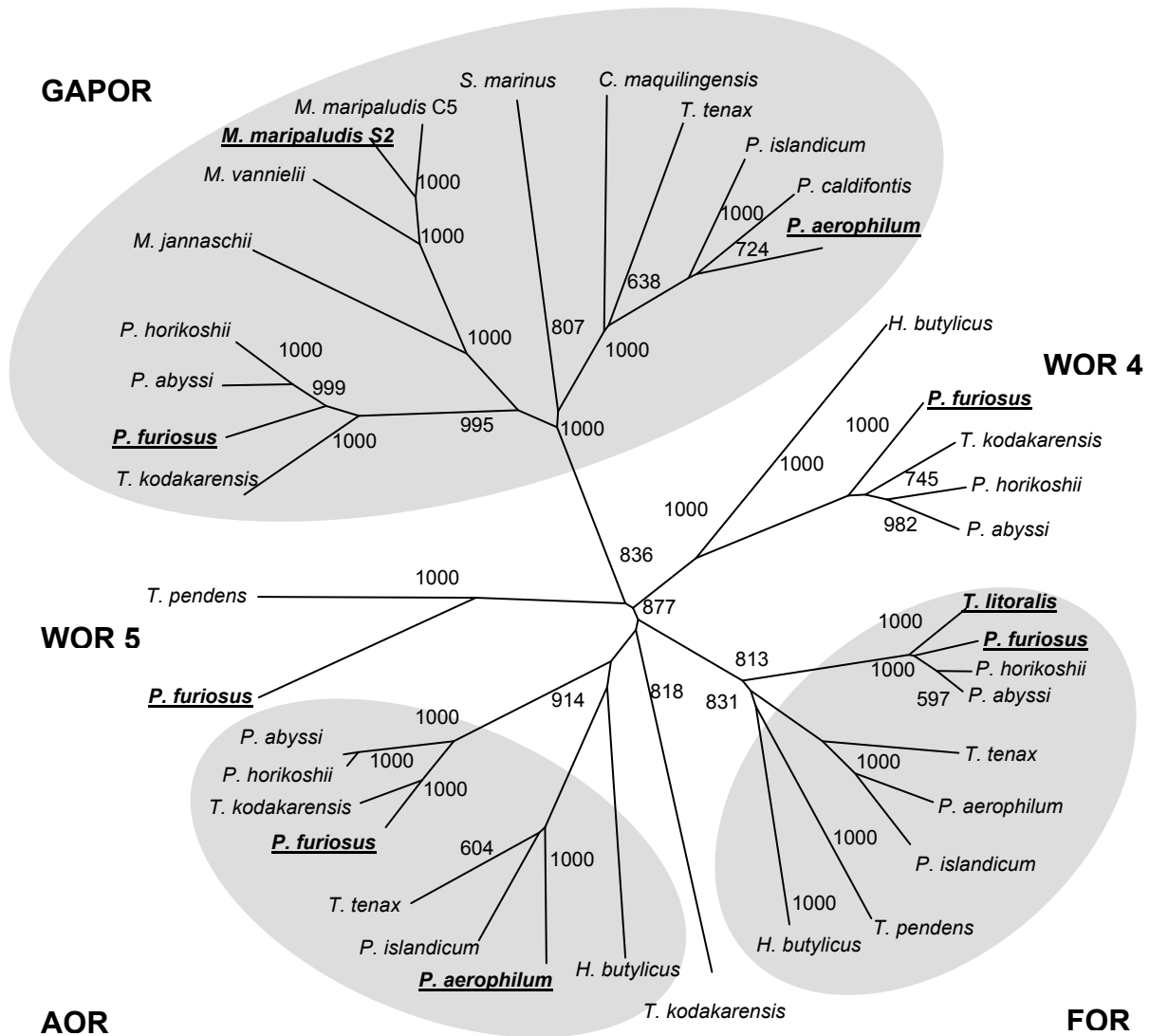


Abbildung 24: Phylogenetische Verwandtschaft der AOR-Familie mit archaealen Sequenzen von GAPOR, AOR, FOR, WOR 4 und WOR 5. Die Zahlen an den Knotenpunkten sind die Bootstrap-Werte. NCBI Accession-Nummern oder die SwissProt-Nummern der Sequenzen: GAPOR: *Thermococcus kodakarensis* KOD1 YP_184576.1, *Pyrococcus furiosus* DSM 3638 NP_578193.1, *Pyrococcus abyssi* GE5 NP_127254.1, *Pyrococcus horikoshii* OT3 NP_142434.1, *Methanocaldococcus jannaschii* DSM 2661 NP_248179.1, *Methanocaldococcus vanniellii* SB ZP_01702330.1, *Methanocaldococcus maripaludis* S2 NP_988065.1, *Staphylothermus marinus* F1 YP_001041574.1, *Caldivirga maquilingensis* IC-167 ZP_01711828.1, *Thermoproteus tenax* CAF18511.1, *Pyrobaculum islandicum* DSM 4184 YP_930734.1, *Pyrobaculum calidifontis* JCM 11548 YP_001055556.1, *Pyrobaculum aerophilum* str. IM2 NP_559028.1 WOR4: *Hyperthermus butylicus* A2BKT0, *Thermococcus kodakarensis* Q5JI10, *Pyrococcus furiosus* O93736, *Pyrococcus horikoshii* O57750, *Pyrococcus abyssi* Q9V2P2, FOR: *Thermococcus litoralis* Q56303, *Pyrococcus furiosus* Q8U1K3, *Pyrococcus horikoshii* O74007, *Pyrococcus abyssi* Q9UZE9, *Thermoproteus tenax* Q704C0, *Pyrobaculum aerophilum* Q8ZT58, *Pyrobaculum islandicum* A1RT64, *Thermofilum pendens* A1RWC4, *Hyperthermus butylicus* DSM 5456 A2BJR2, AOR: *Thermococcus kodakarensis* KOD1 YP_182485.1, *Hyperthermus butylicus* DSM 5456 A2BLI7, *Pyrobaculum aerophilum* str. IM2 Q8ZYU2, *Pyrobaculum islandicum* DSM 4184 A1RSI3, *Thermoproteus tenax* Q703Z6, *Pyrococcus furiosus* Q51739, *Thermococcus kodakarensis* KOD1 Q5JE15, *Pyrococcus horikoshii* OT3 O58778, *Pyrococcus abyssi* GE5 Q9V035, WOR5: *Pyrococcus furiosus* AAL81604.1, *Thermofilum pendens* A1S030

7 Literatur

- Ahmed H, Ettema TJ, Tjaden B, Geerling AC, van der OJ, Siebers B (2005) The semi-phosphorylative Entner-Doudoroff pathway in hyperthermophilic archaea - a re-evaluation. *Biochem. J.* 390, (Pt2) 529-540
- Ahmed H, Tjaden B, Hensel R, Siebers B (2004) Embden-Meyerhof-Parnas and Entner-Doudoroff pathways in *Thermoproteus tenax*: metabolic parallelism or specific adaptation? *Biochem. Soc. Trans.* **32**, 303-304.
- Aisaka K, Igarashi A, Yamaguchi K, Uwajima T (1991) Purification, crystallization and characterization of *N*-acetylneuraminate lyase from *Escherichia coli*. *Biochem J* **276** (Pt 2), 541-546.
- Angelov A, Fütterer O, Valerius O, Braus GH, Liebl W (2005) Properties of the recombinant glucose/galactose dehydrogenase from the extreme thermoacidophile, *Picrophilus torridus*. *FEBS J* **272**, 1054-1062.
- Babbitt PC, Hasson MS, Wedekind JE, Palmer DR, Barrett WC, Reed GH, Rayment I, Ringe D, Kenyon GL, Gerlt JA (1996) The enolase superfamily: a general strategy for enzyme-catalyzed abstraction of the α -protons of carboxylic acids. *Biochemistry* **35**, 16489-16501.
- Baker-Austin C, Dopson M (2007) Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. *Trends Microbiol.* **15**, 165-171.
- Barbosa JA, Smith BJ, DeGori R, Ooi HC, Marcuccio SM, Campi EM, Jackson WR, Brossmer R, Sommer M, Lawrence MC (2000) Active site modulation in the *N*-acetylneuraminate lyase sub-family as revealed by the structure of the inhibitor-complexed *Haemophilus influenzae* enzyme. *J. Mol. Biol.* **303**, 405-421.
- Barns SM, Delwiche CF, Palmer JD, Pace NR (1996) Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences [see comments]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 9188-9193.
- Bartels M (1989) Glukoseabbau über einen modifizierten Entner-Doudoroff Weg bei dem thermoacidophilen Archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. Dissertation, Medizinische Fakultät, Universität Lübeck.
- Bartsch K, von Johnn-Marteville A, Schulz A (1990) Molecular analysis of two genes of the *Escherichia coli* gab cluster: nucleotide sequence of the glutamate:succinic semialdehyde transaminase gene (*gabT*) and characterization of the succinic semialdehyde dehydrogenase gene (*gabD*). *J. Bacteriol.* **172**, 7035-7042.
- Bender R, Andreesen JR, Gottschalk G (1971) 2-keto-3-deoxygluconate, an intermediate in the fermentation of gluconate by clostridia. *J. Bacteriol.* **107**, 570-573.
- Bender R, Gottschalk G (1973) Purification and properties of D-gluconate dehydratase from *Clostridium pasteurianum*. *Eur. J. Biochem.* **40**, 309-321.

- Bevers LE, Bol E, Hagedoorn PL, Hagen WR (2005) WOR5, a novel tungsten-containing aldehyde oxidoreductase from *Pyrococcus furiosus* with a broad substrate specificity. *J Bacteriol.* **187**, 7056-7061.
- 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.
- Boldt R, Edner C, Kolukisaoglu U, Hagemann M, Weckwerth W, Wienkoop S, Morgenthal K, Bauwe H (2005) D-GLYCERATE 3-KINASE, the last unknown enzyme in the photorespiratory cycle in *Arabidopsis*, belongs to a novel kinase family. *Plant Cell* **17**, 2413-2420.
- 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.
- Bright JR, Byrom D, Danson MJ, Hough DW, Towner P (1993) Cloning, sequencing and expression of the gene encoding glucose dehydrogenase from the thermophilic archaeon *Thermoplasma acidophilum*. *Eur. J. Biochem.* **211**, 549-554.
- Brock TD (1978) 'Thermophilic microorganisms and life at high temperatures.' (Springer-Verlag: New York Heidelberg Berlin).
- Brock TD, Brock KM, Belly RT, Weiss RL (1972) *Sulfolobus*: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. *Arch.Microbiol.* **84**, 54-68.
- Brunner NA, Brinkmann H, Siebers B, Hensel R (1998) NAD⁺-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Thermoproteus tenax*. The first identified archaeal member of the aldehyde dehydrogenase superfamily is a glycolytic enzyme with unusual regulatory properties. *J. Biol. Chem.* **273**, 6149-6156.
- Brunner NA, Hensel R (2001) Nonphosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Thermoproteus tenax*. *Methods in Enzymology* **331**, 117-131.
- Buchanan CL, Connaris H, Danson MJ, Reeve CD, Hough DW (1999) An extremely thermostable aldolase from *Sulfolobus solfataricus* with specificity for non-phosphorylated substrates. *Biochem.J.* **343 Pt 3**, 563-570.
- Budgen N, Danson MJ (1986) Metabolism of glucose via a modified Entner-Doudoroff pathway in the thermoacidophilic archaeobacterium *Thermoplasma acidophilum*. *FEBS Lett.* **196**, 207-210.
- Burggraf S, Huber H, Stetter KO (1997) Reclassification of the crenarchael orders and families in accordance with 16S rRNA sequence data. *Int.J.Syst.Bacteriol.* **47**, 657-660.
- Chambliss KL, Caudle DL, Hinson DD, Moomaw CR, Slaughter CA, Jakobs C, Gibson KM (1995) Molecular cloning of the mature NAD⁺-dependent succinic semialdehyde dehydrogenase from rat and human. cDNA isolation, evolutionary homology, and tissue expression. *J. Biol. Chem.* **270**, 461-467.
- Cheek S, Ginalski K, Zhang H, Grishin NV (2005) A comprehensive update of the sequence and structure classification of kinases. *BMC.Struct.Biol.* **5**, 6.

- Chistoserdova L, Lidstrom ME (1997) Identification and mutation of a gene required for glycerate kinase activity from a facultative methylotroph, *Methylobacterium extorquens* AM1. *J. Bacteriol.* **179**, 4946-4948.
- Ciaramella M, Napoli A, Rossi M (2005) Another extreme genome: how to live at pH 0. *Trends Microbiol* **13**, 49-51.
- Danson MJ (1988) Archaeobacteria: the comparative enzymology of their central metabolic pathways. *Adv. Microb. Physiol.* **29**, 165-231.
- Darland G, Brock TD, Samsonoff W, Conti SF (1970) A thermophilic, acidophilic mycoplasma isolated from a coal refuse pile. *Science* **170**, 1416-1418.
- De Rosa M, Gambacorta A (1988) The Lipids of Archaeobacteria. *Prog. Lipid Res.* **27**, 153-175.
- De Rosa M, Gambacorta A, Nicolaus B, Giardina P, Poerio E, Buonocore V (1984) Glucose metabolism in the extreme thermoacidophilic archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus*. *Biochem. J.* **224**, 407-414.
- De Vos WM, Kengen SW, Voorhorst WG, Van der Oost J (1998) Sugar utilization and its control in hyperthermophiles. *Extremophiles* **2**, 201-205.
- Ettema TJ, Ahmed H, Geerling AC, van der Oost J, Siebers B (2008) The non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPN) of *Sulfolobus solfataricus*: a key-enzyme of the semi-phosphorylative branch of the Entner-Doudoroff pathway. *Extremophiles* **12**, 75-88.
- Falb M, Müller K, Königsmaier L, Oberwinkler T, Horn P, von GS, Gonzalez O, Pfeiffer F, Bornberg-Bauer E, Oesterhelt D (2008) Metabolism of halophilic archaea. *Extremophiles* **12**, 177-196.
- Fitz-Gibbon ST, Ladner H, Kim UJ, Stetter KO, Simon MI, Miller JH (2002) Genome sequence of the hyperthermophilic crenarchaeon *Pyrobaculum aerophilum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 984-989.
- Gebhard S (2002) Zuckerstoffwechsel von hyperthermophilen Archaea: Charakterisierung der Glycerinaldehyd-3-Phosphat: Ferredoxin Oxidoreduktase aus *Archaeoglobus fulgidus* und Enzyme des Glucoseabbaus in *Pyrobaculum aerophilum*. Dipl.-Arbeit, Uni-Kiel
- Ghislain M, Frankard V, Jacobs M (1995) A dinucleotide mutation in dihydrodipicolinate synthase of *Nicotiana sylvestris* leads to lysine overproduction. *Plant J* **8**, 733-743.
- Giardina P, De Biasi M-G, De Rosa M, Gambacorta A, Buonocore V (1986) Glucose dehydrogenase from the thermoacidophilic archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus*. *Biochem. J.* **239**, 517-522.
- Gottschalk G, Bender R (1982) D-Gluconate dehydratase from *Clostridium pasteurianum*. *Methods in Enzymology* **90 Pt E**, 283-287.
- Grogan DW (1989) Phenotypic characterization of the archaeobacterial genus *Sulfolobus*: comparison of five wild-type strains. *J. Bacteriol.* **171**, 6710-6719.

- Habenicht A (1997) The non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: biochemistry, structure, occurrence and evolution. *Biol.Chem.* **378**, 1413-1419.
- Hagedoorn PL, Chen T, Schröder I, Piersma SR, de VS, Hagen WR (2005) Purification and characterization of the tungsten enzyme aldehyde:ferredoxin oxidoreductase from the hyperthermophilic denitrifier *Pyrobaculum aerophilum*. *J Biol.Inorg.Chem.* **10**, 259-269.
- Hagedoorn PL, Freije JR, Hagen WR (1999) *Pyrococcus furiosus* glyceraldehyde 3-phosphate oxidoreductase has comparable W(6+/5+) and W(5+/4+) reduction potentials and unusual [4Fe-4S] EPR properties. *FEBS Lett.* **462**, 66-70.
- Hagopian K, Ramsey JJ, Weindruch R (2005) Serine utilization in mouse liver: influence of caloric restriction and aging. *FEBS Lett.* **579**, 2009-2013.
- Hansen T, Musfeldt M, Schönheit P (2002) ATP-dependent 6-phosphofructokinase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: characterization of an extremely thermophilic, allosterically regulated enzyme. *Arch.Microbiol.* **177**, 401-409.
- Hansen T, Urbanke C, Schönheit P (2004a) Bifunctional phosphoglucose/phosphomannose isomerase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum aerophilum*. *Extremophiles.* **8**, 507-512.
- Hansen T, Wendorff D, Schönheit P (2004b) 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.
- Hess M, Antranikian G (2008) Archaeal alcohol dehydrogenase active at increased temperatures and in the presence of organic solvents. *Appl.Microbiol Biotechnol.* **77**, 1003-1013.
- Hess M, Katzer M, Antranikian G (2008) Extremely thermostable esterases from the thermoacidophilic euryarchaeon *Picrophilus torridus*. *Extremophiles* **12**, 351-364.
- Hubbard BK, Koch M, Palmer DR, Babbitt PC, Gerlt JA (1998) Evolution of enzymatic activities in the enolase superfamily: characterization of the (D)-glucarate/galactarate catabolic pathway in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **37**, 14369-14375.
- 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, Wilharm T, Huber D, Trincone A, Burggraf S, König H, Rachel R, Rockinger I, Fricke H, Stetter KO (1992) *Aquifex pyrophilus* gen. nov. sp. nov., represents a novel group of marine hyperthermophilic hydrogen-oxidizing bacteria. *System.Appl.Microbiol.* **15**, 340-351.
- Iddar A, Valverde F, Serrano A, Soukri A (2003) Purification of recombinant non-phosphorylating NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Streptococcus pyogenes* expressed in *E. coli*. *Mol.Cell Biochem.* **247**, 195-203.
- Iddar A, Valverde F, Serrano A, Soukri A (2002) Expression, purification, and characterization of recombinant nonphosphorylating NADP-dependent glyceraldehyde-3-

- phosphate dehydrogenase from *Clostridium acetobutylicum*. *Protein Expression and Purification* **25**, 519-526.
- 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.
- Johnson DB (1998) Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. *FEMS Microbiol.Ecol.* **27**, 307-317.
- Jung JH, Lee SB (2006) Identification and characterization of *Thermoplasma acidophilum* glyceraldehyde dehydrogenase: a new class of NADP⁺-specific aldehyde dehydrogenase. *Biochem J* **397**, 131-138.
- Kaine BP, Gupta R, Woese CR (1983) Putative introns in tRNA genes of prokaryotes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **80**, 3309-3312.
- Kandler O, König H (1998) Cell wall polymers in Archaea (Archaeobacteria). *Cell Mol.Life Sci.* **54**, 305-308.
- Kardinahl S, Schmidt CL, Hansen T, Anemüller S, Petersen A, Schäfer G (1999) The strict molybdate-dependence of glucose-degradation by the thermoacidophile *Sulfolobus acidocaldarius* reveals the first crenarchaeotic molybdenum containing enzyme--an aldehyde oxidoreductase. *Eur. J. Biochem.* **260**, 540-548.
- Kefala G, Evans GL, Griffin MD, Devenish SR, Pearce FG, Perugini MA, Gerrard JA, Weiss MS, Dobson RC (2008) Crystal structure and kinetic study of dihydrodipicolinate synthase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem. J.* **411**, 351-360.
- Kehrer D, Ahmed H, Brinkmann H, Siebers B (2007) Glycerate kinase of the hyperthermophilic archaeon *Thermoproteus tenax*: new insights into the phylogenetic distribution and physiological role of members of the three different glycerate kinase classes. *BMC.Genomics* **8**, 301.
- 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 in Enzymology* **331**, 41-53.
- Kim S, Lee SB (2005) Identification and characterization of *Sulfolobus solfataricus* D-gluconate dehydratase: a key enzyme in the non-phosphorylated Entner-Doudoroff pathway. *Biochem J* **387**, 271-280.
- Kletzin A, Adams MW (1996) Tungsten in biological systems. *FEMS Microbiol.Rev.* **18**, 5-63.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

- Lamble HJ, Heyer NI, Bull SD, Hough DW, Danson MJ (2003) Metabolic pathway promiscuity in the archaeon *Sulfolobus solfataricus* revealed by studies on glucose dehydrogenase and 2-keto-3-deoxygluconate aldolase. *J. Biol. Chem.* **278**, 34066-34072.
- Lamble HJ, Milburn CC, Taylor GL, Hough DW, Danson MJ (2004) Gluconate dehydratase from the promiscuous Entner-Doudoroff pathway in *Sulfolobus solfataricus*. *FEBS Lett.* **576**, 133-136.
- Lamble HJ, Theodossis A, Milburn CC, Taylor GL, Bull SD, Hough DW, Danson MJ (2005) Promiscuity in the part-phosphorylative Entner-Doudoroff pathway of the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *FEBS Letters* **579**, 6865-6869.
- Langworthy TA, Pond JL (1986) Archaeobacterial ether lipids and chemotaxonomy. *System. Appl. Microbiol.* **7**, 253-257.
- Lawrence MC, Barbosa JA, Smith BJ, Hall NE, Pilling PA, Ooi HC, Marcuccio SM (1997) Structure and mechanism of a sub-family of enzymes related to *N*-acetylneuraminase lyase. *J. Mol. Biol.* **266**, 381-399.
- Liu B, Hong Y, Wu L, Li Z, Ni J, Sheng D, Shen Y (2007) A unique highly thermostable 2-phosphoglycerate forming glycerate kinase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii*: gene cloning, expression and characterization. *Extremophiles* **11**, 733-739.
- Lorentzen E, Siebers B, Hensel R, Pohl E (2005) Mechanism of the Schiff base forming fructose-1,6-bisphosphate aldolase: structural analysis of reaction intermediates. *Biochemistry* **44**, 4222-4229.
- Lütke-Eversloh T, Steinbüchel A (1999) Biochemical and molecular characterization of a succinate semialdehyde dehydrogenase involved in the catabolism of 4-hydroxybutyric acid in *Ralstonia eutropha*. *FEMS Microbiol. Lett.* **181**, 63-71.
- Mukund S, Adams MWW (1995) Glyceraldehyde-3-phosphate ferredoxin oxidoreductase, a novel tungsten-containing enzyme with a potential glycolytic role in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J. Biol. Chem.* **270**, 8389-8392.
- Mukund S, Adams MWW (1991) The novel tungsten-iron-sulfur protein of the hyperthermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus furiosus*, is an aldehyde ferredoxin oxidoreductase. Evidence for its participation in a unique glycolytic pathway. *J. Biol. Chem.* **266**, 14208-14216.
- Mukund S, Adams MWW (1996) Molybdenum and vanadium do not replace tungsten in the catalytically active forms of the three tungstoenzymes in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J. Bacteriol.* **178**, 163-167.
- 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.
- Noh M, Jung JH, Lee SB (2006) Purification and characterization of glycerate kinase from the thermoacidophilic archaeon *Thermoplasma acidophilum*: an enzyme belonging to the second glycerate kinase family. *Biotech. Bioprocess Eng.* **11**, 344-350.

- Norris PR, Johnson DB (1998) Acidophilic microorganisms. In 'Extremophiles: Microbial life in extreme environments'. pp. 133-153. (Wiley-Liss, Inc)
- O'Brien RW (1975) Enzymatic analysis of the pathways of glucose catabolism and gluconeogenesis in *Pseudomonas citronellolis*. *Arch. Microbiol.* **103**, 71-76.
- Park MO, Mizutani T, Jones PR (2007) Glyceraldehyde-3-phosphate ferredoxin oxidoreductase from *Methanococcus maripaludis*. *J Bacteriol.* **189**, 7281-7289.
- Pearce FG, Perugini MA, McKerchar HJ, Gerrard JA (2006) Dihydrodipicolinate synthase from *Thermotoga maritima*. *Biochem J* **400**, 359-366.
- Perozich J, Nicholas H, Wang BC, Lindahl R, Hempel J (1999) Relationships within the aldehyde dehydrogenase extended family. *Protein Sci.* **8**, 137-146.
- Pire C, Esclapez J, Ferrer J, Bonete MJ (2001) Heterologous overexpression of glucose dehydrogenase from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*, an enzyme of the medium chain dehydrogenase/reductase family. *FEMS Microbiol.Lett.* **200**, 221-227.
- Reichstein B (2001) Zuckerstoffwechsel von hyperthermophilen Archaea. Enzyme des Glucoseabbaus in *Aeropyrum pernix*. Institut für Allgemeine Mikrobiologie, CAU Kiel.
- Roy R, Menon AL, Adams MW (2001) Aldehyde oxidoreductases from *Pyrococcus furiosus*. *Methods in Enzymology* **331**, 132-144.
- Sambrook S, Fritsch EF, Maniatis T (1989) 'Molecular Cloning. A Laboratory Manual.' (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.U.S.A.* **74**, 5463-5467.
- Schäfer G (1996) Bioenergetics of the archaeobacterium *Sulfolobus*. *Biochim.Biophys.Acta* **1277**, 163-200.
- Schäfer G, Engelhard M, Müller V (1999) Bioenergetics of the archaea. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **63**, 570-620.
- Schauer R, Sommer U, Krüger D, van UH, Traving C (1999) The terminal enzymes of sialic acid metabolism: acylneuraminate pyruvate-lyases. *Biosci.Rep.* **19**, 373-383.
- Schleper C, Puehler G, Holz I, Gambacorta A, Janekovic D, Santarius U, Klenk HP, Zillig W (1995a) *Picrophilus* gen. nov., fam. nov.: a novel aerobic, heterotrophic, thermoacidophilic genus and family comprising archaea capable of growth around pH 0. *J.Bacteriol.* **177**, 7050-7059.
- Schleper C, Pühler G, Klenk HP, Zillig W (1996) *Picrophilus oshimae* and *Picrophilus torridus* fam. nov., gen. nov., sp. nov., two species of hyperacidophilic, thermophilic, heterotrophic, aerobic archaea. *Int.J.Syst.Bacteriol.* **46**, 814-816.

- Schleper C, Pühler G, Kühlmorgen B, Zillig W (1995b) Life at extremely low pH. *Nature* **375**, 741-742.
- Schönheit P (2008) Glycolysis in hyperthermophiles. In 'Thermophiles. Biotechnology and Technology at High Temperatures'. (Eds F Robb, G Antranikian, D Grogan, and A Driessen) pp. 99-112. (CRC Press: Boca Raton)
- Schönheit P, Schäfer T (1995) Metabolism of hyperthermophiles. *World J.Microbiol.Biotechnol.* **11**, 26-57.
- Schwarzenbacher R, McMullan D, Krishna SS, Xu Q, Miller MD, Canaves JM, Elsliger MA, Floyd R, Grzechnik SK, Jaroszewski L, Klock HE, Koesema E, Kovarik JS, Kreuzsch A, Kuhn P, McPhillips TM, Morse AT, Quijano K, Spraggon G, Stevens RC, van den BH, Wolf G, Hodgson KO, Wooley J, Deacon AM, Godzik A, Lesley SA, Wilson IA (2006) Crystal structure of a glycerate kinase (TM1585) from *Thermotoga maritima* at 2.70 Å resolution reveals a new fold. *Proteins* **65**, 243-248.
- Searcy DG (1976) *Thermoplasma acidophilum*: intracellular pH and potassium concentration. *Biochim.Biophys.Acta* **451**, 278-286.
- Seegerer A, Langworthy TA, Stetter KO (1988) *Thermoplasma acidophilum* and *Thermoplasma volcanium* sp. nov. from solfatara fields. *System.Appl.Microbiol.* **10**, 171.
- Seegerer A, Stetter KO (1992a) The Genus *Thermoplasma*. In 'The Prokaryotes'. (Eds A Balows, HG Trüper, M Dworkin, W Harder, and KH Schleifer) pp. 712-718. (Springer-Verlag: New York).
- Seegerer A, Stetter KO (1992b) The order *Sulfolobales*. In 'The Prokaryotes'. (Eds A Balows, HG Trüper, M Dworkin, W Harder, and KH Schleifer) pp. 684-701. (Springer-Verlag: New York).
- 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.
- Serour E, Antranikian G (2002) Novel thermoactive glucoamylases from the thermoacidophilic Archaea *Thermoplasma acidophilum*, *Picrophilus torridus* and *Picrophilus oshimae*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **81**, 73-83.
- Siebers B, Brinkmann H, Dörr C, Tjaden B, Lilie H, Van der Oost J, Verhees CH (2001) Archaeal fructose-1,6-bisphosphate aldolases constitute a new family of archaeal type class I aldolase. *J.Biol. Chem.* **276**, 28710-28718.
- Siebers B, Schönheit P (2005) Unusual pathways and enzymes of central carbohydrate metabolism in Archaea. *Curr.Opin.Microbiol.* **8**, 695-705.
- 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.
- Snijders AP, Walther J, Peter S, Kinnman I, de Vos MG, van de Werken HJ, Brouns SJ, van der OJ, Wright PC (2006) Reconstruction of central carbon metabolism in *Sulfolobus*

- solfataricus* using a two-dimensional gel electrophoresis map, stable isotope labelling and DNA microarray analysis. *Proteomics*. **6**, 1518-1529.
- Sophos NA, Vasiliou V (2003) Aldehyde dehydrogenase gene superfamily: the 2002 update. *Chem.Biol.Interact.* **143-144**, 5-22.
- Stetter KO (1999) Extremophiles and their adaptation to hot environments. *FEBS Lett.* **452**, 22-25.
- Stetter KO (1996) Hyperthermophilic procaryotes. *FEMS Microbiol.Rev.* **18**, 149-158.
- Stetter KO (1993) Life at the upper temperature border. In 'Frontiers of Life'. (Eds J Tran Thanh Van, K Tran Thanh Van, JC Mounolon, J Schneider, and C McKay) pp. 195-219. (Editions Frontiers: Gif-sur-Yvette)
- Stetter KO (2006) History of discovery of the first hyperthermophiles. *Extremophiles* **10**, 357-362.
- Sun N, Beck F, Knispel RW, Siedler F, Scheffer B, Nickell S, Baumeister W, Nagy I (2007) Proteomics analysis of *Thermoplasma acidophilum* with a focus on protein complexes. *Mol.Cell Proteomics*. **6**, 492-502.
- Swan MK, Hansen T, Schönheit P, Davies C (2004) Structural basis for phosphomannose isomerase activity in phosphoglucose isomerase from *Pyrobaculum aerophilum*: a subtle difference between distantly related enzymes. *Biochemistry* **43**, 14088-14095.
- Theodossis A, Walden H, Westwick EJ, Connaris H, Lambie HJ, Hough DW, Danson MJ, Taylor GL (2004) The structural basis for substrate promiscuity in 2-keto-3-deoxygluconate aldolase from the Entner-Doudoroff pathway in *Sulfolobus solfataricus*. *J Biol.Chem* **279**, 43886-43892.
- 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.
- Tomlinson GA, Koch TK, Hochstein LI (1974) The metabolism of carbohydrates by extremely halophilic bacteria: glucose metabolism via a modified Entner-Doudoroff pathway. *Can. J. Microbiol.* **20**, 1085-1091.
- Valentine DL (2007) Adaptations to energy stress dictate the ecology and evolution of the Archaea. *Nat.Rev.Microbiol* **5**, 316-323.
- Van der Oost J, Schut G, Kengen SW, Hagen WR, Thomm M, De Vos WM (1998) The ferredoxin-dependent conversion of glyceraldehyde-3-phosphate in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* represents a novel site of glycolytic regulation. *J.Biol.Chem.* **273**, 28149-28154.
- van der Oost J, Schut G, Kengen SW, Hagen WR, Thomm M, de Vos WM (1998) The ferredoxin-dependent conversion of glyceraldehyde-3-phosphate in the hyperthermophilic

- archaeon *Pyrococcus furiosus* represents a novel site of glycolytic regulation. *J.Biol.Chem.* **273**, 28149-28154.
- van d, Vossenberg, Driessen AJ, Zillig W, Konings WN (1998) Bioenergetics and cytoplasmic membrane stability of the extremely acidophilic, thermophilic archaeon *Picrophilus oshimae*. *Extremophiles.* **2**, 67-74.
- 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.
- Völkl P, Huber R, Drobner E, Rachel R, Burggraf S, Trincone A, Stetter KO (1993) *Pyrobaculum aerophilum* sp. nov., a novel nitrate-reducing hyperthermophilic archaeum. *Appl.Environ.Microbiol.* **59**, 2918-2926.
- Wächtershäuser G (1992) Groundworks for an evolutionary biochemistry: the iron-sulphur world. *Prog.Biophys.Mol.Biol.* **58**, 85-201.
- Wendorff D (2002) Enzyme des Zuckerstoffwechsels von hyperthermophilen Archaea: Reinigung und Charakterisierung der Glucose-6-Phosphat Isomerase aus *Aeropyrum pernix*. Dipl.-Arbeit, Uni-Kiel.
- Woese CR (1987) Bacterial evolution. *Bacteriol.Rev.* **51**, 221-271.
- Woese CR, Kandler O, Wheelis ML (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **87**, 4576-4579.
- Woese CR, Olsen GJ (1986) Archaeobacterial phylogeny: perspectives on the urkingdom. *System.Appl.Microbiol.* **7**, 161-177.
- Wolterink-van LS, van EA, Siemerink MA, Akerboom J, Dijkstra BW, van der OJ (2007) Biochemical and structural exploration of the catalytic capacity of *Sulfolobus* KDG aldolases. *Biochem J* **403**, 421-430.
- Yang C, Rodionov DA, Rodionova IA, Li X, Osterman AL (2008) Glycerate 2-kinase of *Thermotoga maritima* and genomic reconstruction of related metabolic pathways. *J. Bacteriol.* **190**, 1773-1782.
- 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.
- Yoshida T, Fukuta K, Mitsunaga T, Yamada H, Izumi Y (1992) Purification and characterization of glycerate kinase from a serine-producing methylotroph, *Hyphomicrobium methylovorum* GM2. *Eur.J Biochem* **210**, 849-854.
- Zaigler A, Schuster SC, Soppa J (2003) Construction and usage of a onefold-coverage shotgun DNA microarray to characterize the metabolism of the archaeon *Haloferrax volcanii*. *Mol. Microbiol.* **48**, 1089-1105.
- Zillig W, Stetter KO, Wunderl S, Schulz W, Priess H, Scholz I (1980) The *Sulfolobus*-*Caldariella* Group: Taxonomy on the basis of the structure of DNA-dependent RNA polymerase. *Arch.Microbiol.* **125**, 259-269.

8 Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
ADP	Adenosindiphosphat
A. bidest.	Zweifach deionisiertes Wasser
bp	Basenpaare
BV	Benzyliologen
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DTE	Dithioerythritol
EGTA	Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)- tetraacetat
ED	Entner-Doudoroff
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GA	Glycerinaldehyd
GADH	Glycerinaldehyd Dehydrogenase
GAOR	Glycerinaldehyd Oxidoreduktase
GAP	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
GAPOR	Glycerinaldehyd-3-Phosphat: Ferredoxin-Oxidoreduktase
GAP-N	Nicht-phosphorylierende Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GCK	Glycerat Kinase
h	Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethanesulfonsäure
IPTG	Isopropylthiogalactosid
K_{cat}	Wechselzahl
K_m	Michaeliskonstante
KDG	2-Keto-3-Deoxygluconat
KDPG	2-Keto-3-Deoxyphosphogluconat
min	Minute
npED	Nicht-phosphorylierter Entner-Doudoroff
OD	Optische Dichte
ORF	Open reading frame
PCR	Polymerase chain reaction
PEP	Phosphoenolpyruvat
PFK	Phosphofruktokinase
PG	Phosphoglycerat
PGI	Phosphoglucoseisomerase
P_i	Anorganisches Phosphat
PP_i	Pyrophosphat
s	Sekunde
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

spED	Semi-phosphorylierter Entner-Doudoroff
TCA	Trichloroacetic acid
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
V_{max}	Maximalgeschwindigkeit des Substratumsatzes
(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Masse pro Volumen

Symbole für den Nukleinsäurecode

A	Desoxyadenosin	G	Desoxyguanosin
C	Desoxycytidin	T	Desoxythymidin

Symbole für Aminosäuren

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

9 Danksagungen

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

Herrn Prof. Dr. U. Sauer und Herrn T. Fuhrer (Zürich) danke ich für die Durchführung und Auswertung der ^{13}C -NMR Analysen.

Herrn Prof. Dr. M. Bott (Jülich) danke ich für die Durchführung und Auswertung der MALDI-TOF Analysen der gereinigten Proteine.

Herrn Dr. R. Schmidt (Osnabrück) danke ich für die N-terminale Aminosäure-Sequenzierung der gereinigten KDG-Aldolase aus *P. torridus*.

Herrn Prof. Dr. E. Toone (Durham/ USA) danke ich für die Überlassung von KDPG.

Herrn Prof. Dr. G. Schäfer (Lübeck) danke ich für die Überlassung eines Glucose-adaptierten Stammes von *Sulfolobus acidocaldarius* sowie für das Zellmaterial von *Thermoplasma acidophilum*.

Herrn H. Preidel (Kiel) danke ich für die Massenkultivierung von *Pyrobaculum aerophilum* und *Sulfolobus acidocaldarius* sowie für die technische Unterstützung bei der Klonierung der KDG-Aldolase.

Frau Dr. U. Johnsen (Kiel) danke ich für die Überlassung Ca-Kompetenter-Zellen von *Escherichia coli*.

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

10 Lebenslauf

Matthias Reher

Geb. am: 17. März 1972

Staatsangehörigkeit: deutsch

Wohnort: Kiel

Schulbildung

1978-1982	Grundschule
1982-1989	Realschule
1994-1997	Abendgymnasium
Juni 1997	Allgemeine Hochschulreife

Berufsausbildung

1989-1991	Landwirtschaftlich-technischer Assistent (LTA), Bundesanstalt für Milchforschung, Kiel
-----------	--

Studium

1998-2003	Studium der Biologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Nov. 2002	Diplomprüfung in den Fächern Mikrobiologie, Anthropologie und Rechtsmedizin
Jan. - Nov. 2003	Experimentelle Diplomarbeit am Institut für Allgemeine Mikrobiologie (IfAM) der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. P. Schönheit
März 2004	Beginn der experimentellen Arbeit zu der vorliegenden Dissertation am IfAM der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. P. Schönheit

Beruflicher Werdegang

1991-1992	Angestellter am Institut für Milcherzeugung an der Bundesanstalt für Milchforschung, Kiel
1992-1998	Angestellter bei der Kieler Pharma & Veterinärprodukte (KVP) GmbH, Kiel, Qualitätskontrolle / Mikrobiologie
Seit 2004	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am IfAM der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. P. Schönheit