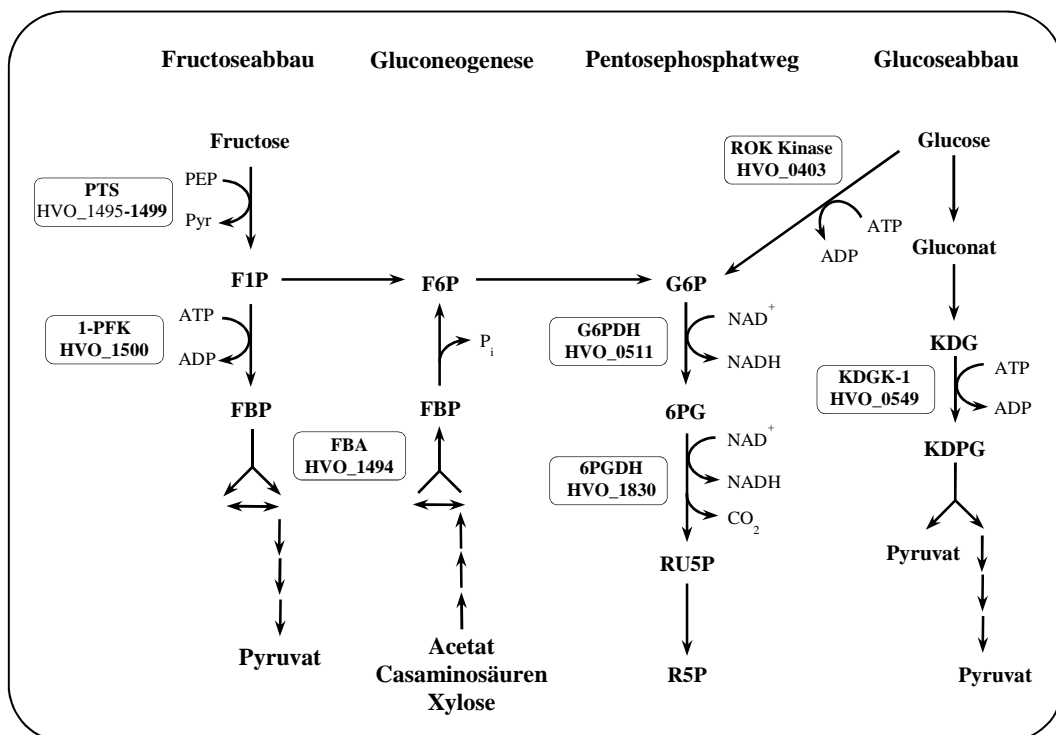


Zuckerstoffwechsel in dem halophilen Archaeon

Haloferax volcanii

Identifizierung und Charakterisierung von
Enzymen des Fructose- und Glucosestoffwechsels
und des Pentosephosphatwegs



Dissertation

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

Andreas Pickl
Kiel, 2013

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Dezember 2010 bis November 2013 am Institut für allgemeine Mikrobiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel im Labor von Herrn Prof. Dr. Peter Schönheit durchgeführt.

Erster Gutachter: Prof. Dr. Peter Schönheit

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Knut J. Heller

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2013

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 17.12.2013

Prof. Dr. Wolfgang J. Duschl, Dekan

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe nach den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die Arbeit war bislang noch nicht Bestandteil eines Prüfungsverfahrens. Andere Promotionsversuche wurden nicht unternommen.

.....
Andreas Pickl

Teile der während dieser Doktorarbeit erzielten Ergebnisse wurden bzw. werden in den folgenden Artikeln veröffentlicht bzw. zur Veröffentlichung eingereicht:

Andreas Pickl, Ulrike Johnsen, and Peter Schönheit (2012)

Fructose degradation in the haloarchaeon *Haloferax volcanii* involves a bacterial type phosphoenolpyruvate dependent phosphotransferase system, fructose-1-phosphate kinase, and class II fructose-1,6-bisphosphate aldolase. *Journal of Bacteriology* 194, 3088 - 3097

Andreas Pickl, Ulrike Johnsen, Robert M. Archer and Peter Schönheit

Identification and characterization of KDG and KDGal kinases in the haloarchaeon *Haloferax volcanii*.

Andreas Pickl and Peter Schönheit

Enzymes of the pentosephosphate pathway in *Haloferax volcanii*: Identification of a novel type of glucose-6-phosphate dehydrogenase.

Inhalt

1	Zusammenfassung	6
2	Summary	9
3	Einleitung.....	12
4	Material und Methoden	21
4.1	Chemikalien, Plasmide und Oligonukleotide.....	21
4.1.1	Spezielle Chemikalien und Enzyme	21
4.1.2	Verwendete Plasmide	22
4.1.3	Verwendete Oligonukleotide.....	24
4.2	Wachstum von <i>E. coli</i>.....	25
4.3	Wachstum von <i>H. volcanii</i> und Substratbestimmung.....	26
4.3.1	Wachstum von <i>H. volcanii</i>	26
4.3.2	Bestimmung von Glucose und Fructose.....	29
4.4	Molekularbiologische Methoden.....	29
4.4.1	Polymerase Kettenreaktion.....	29
4.4.2	Reinigung, Konzentrations- und Größenbestimmung von DNA	32
4.4.3	Restriktionshydrolyse von DNA	33
4.4.4	Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	33
4.4.5	Ligation	33
4.4.6	Transformation in <i>H. volcanii</i>	34
4.4.7	Herstellung von <i>H. volcanii</i> Deletionsmutanten und Komplementation.....	35
4.4.8	Reinigung genomischer DNA und Southern blotting.....	36
4.4.9	RNA Präparation, RT-PCR, qRT-PCR und Northern blotting	37
4.5	Proteinbiochemische Methoden	39
4.5.1	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	39
4.5.2	Größenbestimmung und Reinheitsanalyse von Proteinen	40
4.5.3	Bestimmung des apparenten Molekulargewichts unter nativen Bedingungen.....	41
4.5.4	Homologe und heterologe Expression von Proteinen	42
4.6	Reinigung und Charakterisierung von Enzymen.....	42
4.6.1	Aktivitätsmessungen von Kinasen	43
4.6.2	Aktivitätsmessungen der Fructose-1,6-bisphosphat Aldolase.....	46
4.6.3	Aktivitätsmessungen der 6-Phosphogluconat Dehydrogenase.....	48
4.7	Native Reinigung der G6P Dehydrogenase aus <i>H. volcanii</i>	48
4.8	Bestimmung von Aktivitäten in Zellextrakten von <i>H. volcanii</i>	49

5	Ergebnisse.....	50
5.1	Enzyme des Fructose Transports und Abbaus in <i>H. volcanii</i>.....	51
5.1.1	Wachstum von <i>H. volcanii</i> auf Fructose	52
5.1.2	Transkriptionsanalyse und Deletion der PTS Transmembrankomponente EIIC	52
5.1.3	Transkriptionsanalyse, Deletion und Charakterisierung von 1-PFK.....	55
5.1.4	Transkriptionsanalyse, Deletion und Charakterisierung der FBA.....	60
5.1.5	Funktion der FBA aus <i>H. volcanii</i> in der Gluconeogenese	65
5.2	KDG Kinasen in <i>H. volcanii</i>	67
5.2.1	Transkriptionsanalysen von <i>kdgK1</i> und <i>kdgK2</i>	67
5.2.2	Expression, Reinigung und Charakterisierung von KDGK-1 und KDGK-2	68
5.2.3	Herstellung von Deletionsmutanten und Wachstumsversuche	72
5.3	Enzyme des oxidativen Teils des Pentosephosphatwegs in <i>H. volcanii</i>.....	76
5.3.1	Charakterisierung der ROK Kinasen aus <i>H. volcanii</i> und <i>D. kamchatkensis</i>	76
5.3.2	Identifikation der Glucose-6-phosphat Dehydrogenase aus <i>H. volcanii</i>	82
5.3.3	Charakterisierung der 6-Phosphogluconat Dehydrogenase aus <i>H. volcanii</i>	85
6	Diskussion	88
6.1	Enzyme des Fructosetransports und Abbaus in <i>H. volcanii</i>.....	89
6.1.1	Bakterielles PTS aus <i>H. volcanii</i>	90
6.1.2	Fructose-1-phosphat Kinase (1-PFK) aus <i>H. volcanii</i>	92
6.1.3	Fructose-1,6-bisphosphat Aldolase (FBA) aus <i>H. volcanii</i>	93
6.1.4	Sequenzvergleich und phylogenetische Einordnung der FBA	94
6.1.5	Gluconeogenetische Funktion der Class II H FBA in <i>H. volcanii</i>	98
6.2	KDG Kinasen aus <i>H. volcanii</i>.....	98
6.3	Oxidativer Teil des Pentosephosphatwegs in <i>H. volcanii</i>.....	100
6.3.1	ROK Kinase aus <i>H. volcanii</i>	101
6.3.2	Glucose-6-phosphat Dehydrogenase	105
6.3.3	6-Phosphogluconat Dehydrogenase	108
6.4	Überblick des Fructose- und Glucoseabbaus, der Gluconeogenese und des Pentosephosphatwegs in <i>H. volcanii</i>	110
7	Literaturverzeichnis	113

1 Zusammenfassung

Bisherige Untersuchungen zum Zuckerstoffwechsel in Archaea deuten darauf hin, dass in halophilen Archaea Fructose über einen modifizierten Embden-Meyerhof- (EM) Weg und Glucose über einen semiphosphorylierten Entner-Doudoroff- (ED) Weg abgebaut wird. Die Enzyme und die codierenden Gene für den Transport und den Abbau von Fructose wurden jedoch bisher nicht identifiziert und charakterisiert. Auch das Schlüsselenzym des ED-Wegs, die 2-Keto-3-desoxygluconat (KDG) Kinase, wurde bisher nicht identifiziert. Weiterhin lagen keine Daten zu den Enzymen vor, die in halophilen Archaea an der Bildung von Pentosephosphaten aus Hexosen beteiligt sind.

In der vorliegenden Arbeit wurden Enzyme des Fructoseabbaus aus dem halophilen Modellorganismus *Haloferax volcanii* sowie der funktionell an der Fructoseaufnahme beteiligte Transporter identifiziert. Weiterhin wurde die funktionell am Glucoseabbau beteiligte KDG Kinase (KDGK) aus *H. volcanii* identifiziert und Enzyme des oxidativen Teils des Pentosephosphatwegs charakterisiert.

Transport und Abbau von Fructose in *H. volcanii*

Im Genom von *H. volcanii* wurde ein Cluster identifiziert, der für alle fünf Komponenten eines fructosespezifischen Phosphotransferase Systems (PTS) codiert. In Nachbarschaft dieses Bereichs wurden zwei Gene annotiert, die für die putativen Enzyme 1-Phosphofruktokinase (1-PFK) und Fructose-1,6-bisphosphat (FBP) Aldolase (FBA) codieren (*pfkB* bzw. *fba*). Die Beteiligung der PTS Komponenten und der beiden Enzyme am Fructosestoffwechsel wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht.

Northern-Blot Experimente ergaben, dass alle PTS Komponenten als Cotranskript bei Wachstum auf Fructose transkribiert wurden. Eine Deletionsmutante, bei der die PTS Transmembrankomponente EIIC (codiert von *ptfC*, wobei *ptf* für Phosphotransferase System für Fructose steht) chromosomal deletiert war, wurde generiert. Diese wuchs nicht mehr auf Fructose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle, aber unverändert auf Glucose, was für die funktionelle Beteiligung des PTS im Fructosestoffwechsel von *H. volcanii* spricht. Das PTS in *H. volcanii* ist der erste Nachweis eines funktionellen PTS in der Domäne der Archaea. Auf Grund von Sequenzhomologien und dem Vergleich der Genomorganisation zeigten die halophilen PTS Komponenten die größte Ähnlichkeit zu bakteriellen Homologen aus grampositiven Bakterien. Dies spricht für eine Aufnahme des PTS über einen lateralen Gentransfer von grampositiven Bakterien. Neben den PTS Komponenten war auch die Transkription von *pfkB* und *fba* bei Wachstum auf Fructose stark induziert. Mutanten, bei

denen *pfkB* bzw. *fba* deletiert waren, konnten nicht mehr auf Fructose, jedoch auf Glucose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen, was für eine funktionelle Beteiligung der Enzyme am Abbau von Fructose spricht. 1-PFK und FBA wurden homolog in *H. volcanii* exprimiert und die gereinigten, rekombinanten Enzyme wurden charakterisiert. 1-PFK katalysierte die ATP abhängige Phosphorylierung von Fructose-1-phosphat (F1P) und Fructose-6-phosphat (F6P) zu Fructose-1,6-bisphosphat (FBP). Die katalytische Effizienz für die Umsetzung von F1P war etwa 36-fach höher als für F6P, was zeigt, dass F1P das physiologische Substrat der 1-PFK darstellt. Die rekombinante FBA wurde als eine metallabhängige Class II Aldolase beschrieben, die sowohl die Spaltung von FBP zu Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP) und Dihydroxyacetonphosphat (DHAP), als auch die umgekehrte Reaktion, das heißt die Aldolkondensation, katalysierte. Weiterführende Experimente mit der *fba* Deletionsmutante zeigten, dass *fba* in *H. volcanii* auch essentiell an der Gluconeogenese beteiligt ist. Phylogenetische Analysen ergaben, dass die FBA mit anderen putativen halophilen FBAs einen Cluster bildet, der separat von den bisher charakterisierten Class II Aldolasen liegt.

KDG Kinasen aus *H. volcanii*

Das Schlüsselenzym des semiphosphorylierten ED-Wegs des Glucoseabbaus, die KDG Kinase, wurde identifiziert und charakterisiert. Das Genom von *H. volcanii* enthält mit *kdgK1* und *kdgK2* zwei homologe Gene, die für die putativen KDG Kinasen KDGK-1 und KDGK-2 codieren. *kdgK2* liegt in genomischer Nähe zu putativen galactosespezifischen Genen, was auf eine mögliche Funktion von KDGK-2 als 2-Keto-3-desoxygalactonat (KDGal) Kinase hinweisen könnte. Um zu prüfen, welche der beiden möglichen KDG Kinasen funktionell am Glucoseabbau beteiligt ist, wurde die Transkription beider Enzyme untersucht, die rekombinanten Enzyme exprimiert, gereinigt und charakterisiert, sowie das Wachstum von *kdgK* Deletionsmutanten auf Glucose und Galactose analysiert.

Die Expression von *kdgK1* auf Glucose und Galactose war konstitutiv. KDGK-1 katalysierte die ATP-abhängige Phosphorylierung von KDG mit einer etwa dreifach höheren katalytischen Effizienz als die Umsetzung von KDGal. Die *kdgK1* Deletionsmutante wuchs nicht mehr in Medium mit Glucose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle, wogegen das Wachstum auf Galactose unverändert war. Dies spricht dafür, dass *kdgK1* für die funktionelle KDG Kinase beim Abbau von Glucose im semiphosphorylierten ED-Weg von *H. volcanii* codiert. Die Expression von *kdgK2* auf Galactose war stark induziert und die rekombinante KDGK-2 katalysierte die Phosphorylierung von KDGal mit einer 50-fach höheren katalytischen Effizienz als die Umsetzung von KDG. Die hohe Expression von

kdgK2 auf Galactose sowie die hohe Spezifität für KDGal deuten darauf hin, dass es sich bei der KDGK-2 *in vivo* um eine funktionelle KDGal Kinase handelt.

Oxidativer Teil des Pentosephosphatwegs in *H. volcanii*

Die Enzyme des oxidativen Teils des Pentosephosphatwegs, die in *H. volcanii* die Umwandlung von Glucose zu Ribulose-5-phosphat katalysieren, wurden analysiert. In *H. volcanii* wurden Gene für eine putative ROK Kinase (ROK steht für Repressoren, ORFs unbekannter Funktion und Kinasen) und eine putative 6-Phosphogluconat Dehydrogenase annotiert. Ein Gen für eine bekannte Glucose-6-phosphat (G6P) Dehydrogenase war nicht annotiert. In der vorliegenden Arbeit wurden die ROK Kinase und die 6-Phosphogluconat Dehydrogenase als rekombinante Proteine nach homologer Expression gereinigt und charakterisiert, sowie eine G6P Dehydrogenaseaktivität aus *H. volcanii* Zellextrakt gereinigt und identifiziert. Die ROK Kinase katalysierte die ATP-abhängige Phosphorylierung von Glucose zu G6P mit apparenten K_m - und V_{max} -Werten von 0,16 mM und 182 U/mg. Andere Zucker wurden nicht oder nur mit geringer katalytischer Effizienz umgesetzt. Zum Vergleich mit anderen archaeellen Enzymen wurde eine zweite ROK Kinase aus dem Crenarchaeon *Desulfurococcus kamchatkensis* charakterisiert. Im Gegensatz zur halophilen ROK Kinase aus *H. volcanii* katalysierte diese nicht nur die Phosphorylierung von Glucose, sondern auch die Umsetzung von Fructose und Mannose mit vergleichbaren katalytischen Effizienzen. In Übereinstimmung mit der unterschiedlichen Substratspezifität konnten die beiden charakterisierten Kinasen auch verschiedenen phylogenetischen Clustern zugeordnet werden. Aus Zellextrakten von *H. volcanii* wurde eine G6P Dehydrogenase bis zur apparenten Homogenität gereinigt und mittels MALDI-TOF Massenspektroskopie das codierende Gen identifiziert. Das Enzym katalysierte die NAD^+ abhängige Oxidation von G6P mit einer Rate von 39 U/mg und apparenten K_m -Werten von 5,4 mM und 0,18 mM für G6P und NAD^+ . $NADP^+$ wurde nicht als Elektronenakzeptor verwendet. Phylogenetische Untersuchungen ergaben, dass die G6P Dehydrogenase aus *Haloferax* eine neuartige G6P Dehydrogenase ist, die der extended short-chain dehydrogenase/reductase (SDRe) Familie zugeordnet werden kann. Dies ist die erste Beschreibung einer Glucose-6-phosphat Dehydrogenase in der Domäne der Archaea.

Die rekombinante 6-Phosphogluconat Dehydrogenase katalysierte die NAD^+ abhängige Oxidation von 6-Phosphogluconat mit apparenten K_m - und V_{max} -Werten von 0,021 mM und 10,6 U/mg. $NADP^+$ diente nicht als physiologischer Elektronenakzeptor. Die Ergebnisse zeigen, dass *H. volcanii* Enzyme enthält, die Glucose über G6P zu Ribulose-5-phosphat umsetzen.

2 Summary

Comparative analyses on sugar catabolism revealed that degradation of fructose in halophilic archaea is carried out by a modified Embden-Meyerhof (EM) pathway whereas glucose is degraded via a semiphosphorylative Entner-Doudoroff (ED) pathway. However, enzymes and coding genes for the transport and degradation of fructose have not been identified and characterized yet. Furthermore, 2-keto-3-deoxygluconate (KDG) Kinase, the key enzyme of the semiphosphorylative ED pathway, has not been identified. Moreover, no enzymes for the generation of pentose phosphates from hexoses have been described in halophilic archaea.

In this study, enzymes of the fructose catabolism from the halophilic model organism *H. volcanii* have been identified and characterized. Furthermore, the functionally involved fructose transport system was identified. Also the KDG Kinase (KDGK), which is functionally involved in glucose catabolism in *H. volcanii*, has been identified, and enzymes of the oxidative pentose phosphate pathway have been characterized.

Transport and Degradation of Fructose in *H. volcanii*

Analyses of the *H. volcanii* genome indicate the presence of a cluster, encoding homologs of all five bacterial phosphotransferase system (PTS) components. Directly upstream and downstream of this cluster, respectively, genes coding for putative fructose-1-phosphate kinase (1-PFK) and fructose-1,6-bisphosphate aldolase (FBA) were annotated (*pfkB* respectively *fba*). In this study, the functional involvement of the PTS components and the two enzymes 1-PFK and FBA in fructose catabolism has been investigated.

Northern blot analysis revealed that all PTS components were expressed as a cotranscript that was specifically upregulated by fructose. A mutant with chromosomally deleted PTS transmembrane component EIIC (encoded by *ptfC*, *ptf* stands for *phosphotransferase system for fructose*) was generated. The *ptfC* mutant did not grow on fructose as sole carbon and energy source, whereas growth on glucose was unaffected. These results indicate that *ptfC* and the entire PTS operon in *H. volcanii* is functionally involved in fructose uptake as a part of fructose catabolism. This is the first report of the functional involvement of a bacterial PTS in the domain of the archaea. Based on comparisons of sequences and genome organizations from the halophilic PTS to bacterial counterparts, a high degree of similarity to gram positive bacteria could be detected, indicating that the halophilic PTS might have been acquired via horizontal gene transfer from the domain of the bacteria.

In analogy to the PTS components, fructose specific induction of *pfkB* and *fba* could be detected by Northern blot analyses. Mutants with chromosomally deleted *pfkB* or *fba* did not grow on fructose as sole carbon and energy source, but growth on glucose was not affected. These data indicate that *pfkB* and *fba* are essential for growth on fructose. 1-PFK and FBA were homologously expressed, purified and characterized. 1-PFK catalyzed the ATP dependent phosphorylation of fructose-1-phosphate (F1P) and fructose-6-phosphate (F6P) to fructose-1,6-bisphosphate (FBP). The catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) of the enzyme for F1P was about 36-fold higher than for F6P, indicating that F1P is the physiological substrate defining the enzyme as F1P-specific kinase (1-PFK).

FBA was described as metal dependent Class II aldolase, catalyzing the cleavage of FBP to glyceraldehyde-3-phosphate (GAP) and dihydroxyacetone phosphate (DHAP). Moreover, it was shown that the enzyme catalyzed the reverse reaction. Further experiments with the *fba* deletion mutant showed that *fba* is essentially involved in gluconeogenesis of *H. volcanii*. Phylogenetic analyses revealed that halophilic FBAs formed a distinct cluster apart from other characterized aldolases, suggesting that haloarchaeal class II FBAs form a separate class II FBA subfamily.

KDG Kinases of *H. volcanii*

In this thesis, the key enzyme of the semiphosphorylative ED pathway, the KDG kinase, has been identified and characterized. *H. volcanii* codes for two putative KDG kinases with high sequence similarity (KDGK-1 and KDGK-2, encoded by *kdgK1* and *kdgK2*). In close vicinity to *kdgK2*, putative galactose specific genes are annotated, indicating a possible role of KDGK-2 as 2-keto-3-deoxygalactonate (KDGal) Kinase. To check, which one of the kinases is functionally involved in glucose catabolism, transcription analyses were performed. Furthermore, the recombinant enzymes were expressed, purified and characterized and the growth of *kdgK* deletion mutants was analyzed.

The expression of *kdgK1* on glucose and galactose as sole carbon and energy source was constitutive. KDGK-1 catalyzed the ATP dependent phosphorylation of KDG and KDGal with an approximately threefold higher catalytic efficiency for KDG. The *kdgK1* deletion mutant did not grow on glucose as sole carbon and energy source, whereas growth on galactose was not affected. These data indicate that *kdgK1* is the functional KDG Kinase for the degradation of glucose via the semiphosphorylative ED pathway in *H. volcanii*. The expression of *kdgK2* on galactose was highly induced and the recombinant KDGK-2 catalyzed the phosphorylation of KDGal with a 50-fold higher catalytic efficiency than the

phosphorylation of KDG. The high expression of *kdgK2* on galactose and the specificity of KDGK-2 for KDGal indicates that KDGK-2 is the functional KDGal Kinase *in vivo*.

Oxidative Pentosephosphate Pathway in *H. volcanii*

The enzymes of the oxidative pentosephosphate pathway that catalyze the transformation of glucose to ribulose-5-phosphate in *H. volcanii* have been analyzed. Genes encoding for the putative enzymes ROK kinase (ROK stands for repressors, open reading frames of unknown function and kinases) and 6-phosphogluconate dehydrogenase were found to be annotated in *H. volcanii*. However, the gene for a classical glucose-6-phosphate (G6P) dehydrogenase was not annotated.

In this work, ROK kinase and 6-phosphogluconate dehydrogenase were homologously expressed, and the recombinant enzymes were purified and characterized. Furthermore, a novel G6P dehydrogenase from cell extract was purified and identified. The ROK kinase catalyzed the phosphorylation of glucose to G6P with apparent K_m - and V_{max} - values of 0.16 mM and 182 U/mg. Other sugars than glucose were not phosphorylated with high catalytic efficiency. For comparison to other archaeal enzymes, a second ROK kinase from the crenarchaeon *Desulfurococcus kamchatkensis* was characterized. Unlike the halophilic enzyme from *H. volcanii*, this kinase not only phosphorylated glucose but also other sugars like fructose or mannose with comparable catalytic efficiencies. In accordance to the difference in substrate specificity, the kinases formed distinct clusters in the phylogenetic tree. G6P dehydrogenase from *H. volcanii* cell extract was purified to homogeneity and the encoding gene was identified by MALDI-TOF mass spectrometry. The enzyme catalyzed the NAD^+ dependent oxidation of G6P with a specific activity of 39 U/mg and apparent K_m - values of 5.4 mM and 0.18 mM for G6P and NAD^+ , respectively. $NADP^+$ was not used as electron acceptor. Phylogenetic analyses revealed that G6P dehydrogenase from *Haloferax* constitutes a novel G6P dehydrogenase that belongs to the extended short-chain dehydrogenase/reductase (SDRe) family. This is the first report of an archaeal G6P dehydrogenase.

The recombinant 6-phosphogluconate Dehydrogenase catalyzed the NAD^+ dependent oxidation of 6-phosphogluconate with apparent K_m - and V_{max} - values of 0.021 mM and 10.6 U/mg. The enzyme could not use $NADP^+$ as physiological electron acceptor. The results show that *H. volcanii* codes for all genes that catalyze the conversion of glucose to ribulose-5-phosphate via glucose-6-phosphate.

3 Einleitung

Der phylogenetische Stammbaum des Lebens gliedert sich, basierend auf 16 und 18 S-rRNA Analysen, in die drei Domänen Eukarya, Bacteria und Archaea (Woese et al., 1990). Viele Mitglieder der Archaea besiedeln Habitate, die extreme Bedingungen aufweisen, wie niedrige pH-Werte, hohe Salzkonzentrationen und hohe Temperaturen. Hyperthermophile Organismen, die bei Temperaturen über 80 °C optimal wachsen (Stetter, 1999), finden sich vorwiegend in der Domäne der Archaea, es gibt aber auch einige Vertreter aus der Domäne der Bacteria, wie z.B. *Thermotoga maritima* und *Aquifex pyrophilus* (Huber et al., 1992; Huber et al., 1986). Diese hyperthermophilen Bacteria und Archaea bilden im phylogenetischen Stammbaum die tiefsten Abzweigungen (Abbildung 1), weshalb sie auch als ursprüngliche Organismen angesehen werden.

Die Domäne der Archaea wird in die Phyla Euryarchaeota und Crenarchaeota unterteilt (Woese et al., 1990). Erst kürzlich wurden Korarchaeota, Nanoarchaeota und Thaumarchaeota als neue Phyla beschrieben (Huber et al., 2002; Barns et al., 1996; Brochier-Armanet et al., 2008). Zu den Crenarchaeota gehören unter anderem die Ordnungen der *Desulfurococcales*, *Thermoproteales* und *Sulfolobales* (Huber und Prangishvili, 2006). Bei den Euryarchaeota findet man neben Methanogenen, Hyperthermophilen und Thermoacidophilen die halophilen Organismen aus der Ordnung der *Halobacteriales*. Die Mitglieder dieser Ordnung werden auch als „Haloarchaea“ bezeichnet und repräsentieren die wichtigsten Vertreter der extrem halophilen Archaea, die bei Salzkonzentrationen von 3,5 - 4,5 M optimal wachsen. Extrem halophile Bacteria, wie etwa *Salinibacter ruber* (Oren, 2013), bilden die Ausnahme. Innerhalb der Domäne der Bacteria sind eher moderat halophile und halotolerante Organismen bekannt. So findet man diese Organismen unter anderem in den Klassen der γ -Proteobakterien und Clostridien sowie im Phylum der Cyanobakterien (Ventosa et al., 1998).

Um ein Überleben und Wachstum in salzreichen Umgebungen zu ermöglichen, haben halophile Organismen verschiedene Anpassungsmechanismen entwickelt. Moderat halophile bzw. halotolerante Bacteria verwenden zur Verhinderung des drohenden Wasserverlusts durch Osmose meist sogenannte *compatible solutes*. Dies sind lösliche Substanzen, die hoch angereichert in der Zelle vorliegen können, ohne dabei die Physiologie der Zelle und die Proteinfaltung zu stören (Brown, 1976). Extrem halophile Archaea dagegen verwenden die „salt-in“ Strategie, bei der große Mengen Ionen aufgenommen werden, um isoosmotische Verhältnisse herzustellen (Madigan und Oren, 1999; Galinski und Trüper, 1994). Größere

intrazelluläre Salzmengen können jedoch zum Verlust der Hydrathülle und zur Denaturierung von Proteinen führen (Aussalz-Effekt). Um diesem Effekt entgegenzuwirken, besitzen halophile Proteine überdurchschnittlich viele Aminosäuren mit sauren Resten, die sich oft auf der Proteinoberfläche befinden (Lanyi, 1974; Dennis und Shimmin, 1997). Die unter physiologischen Bedingungen negativ geladenen Seitenketten dieser Aminosäuren sorgen für die Ausbildung einer stabilen Hydrathülle, die auch bei hohen Salzkonzentrationen erhalten bleibt (Lanyi, 1974; Frolow et al., 1996). Proteine aus extrem halophilen Archaea denaturieren bei niedrigen Salzkonzentrationen leichter und werden deshalb zur Charakterisierung eher im homologen Expressionssystem gemacht.

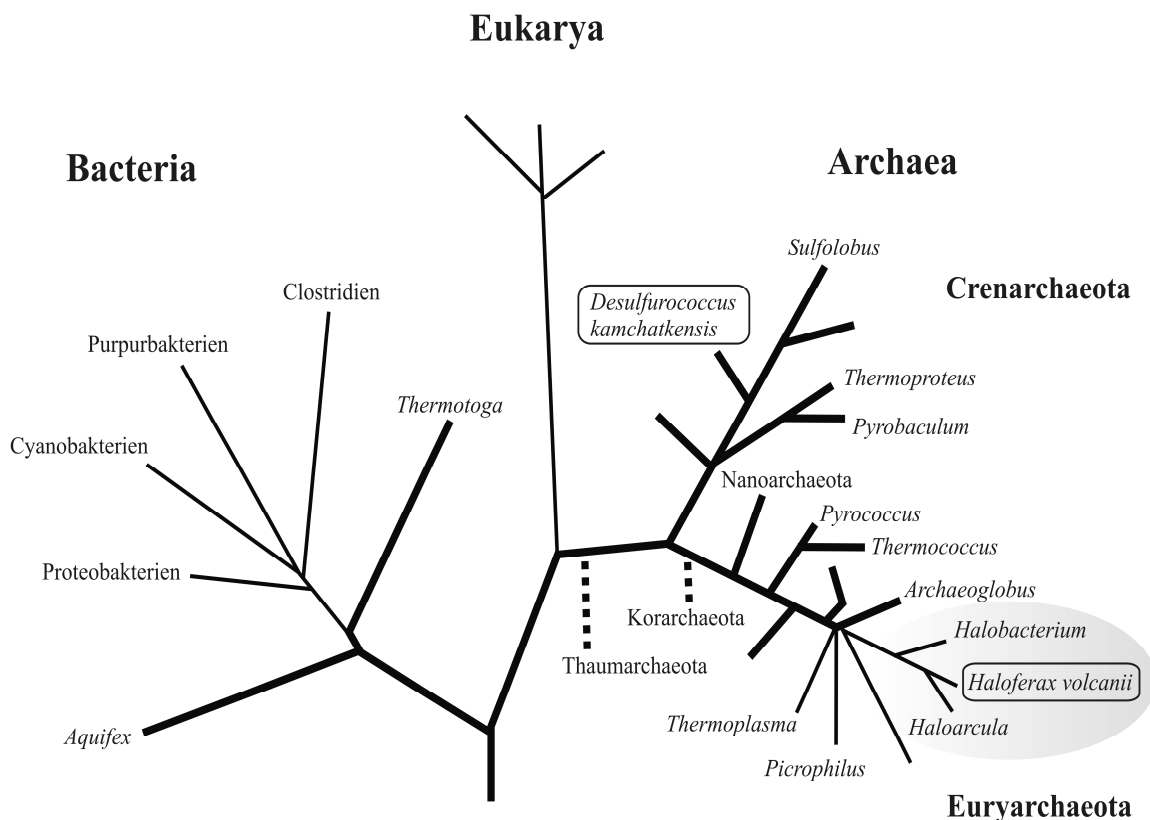


Abbildung 1 Einordnung von halophilen und hyperthermophilen Mikroorganismen in den phylogenetischen Stammbaum. Der Verzweigungsgrad und die Verzweigungslängen wurden verändert (schematisch nach Woese et al., 1990; Stetter, 1993; Spang et al., 2010). Die Organismen, mit denen in der vorliegenden Arbeit gearbeitet wurde, sind mit einem Rahmen gekennzeichnet. Hyperthermophile Vertreter aus den Domänen der Archaea und Bacteria mit einem Temperaturoptimum über 80 °C sind durch dicke Linien gekennzeichnet. Die gestrichelten Linien deuten auf die ungefähre phylogenetische Position der jeweiligen Organismen hin.

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zum Zuckerstoffwechsel und zum oxidativen Teil des Pentosephosphatwegs in halophilen Archaea durchgeführt. Viele Haloarchaea besitzen einen organoheterotrophen Stoffwechsel, in dem z.B. Kohlenhydrate oder Proteine als Kohlenstoff- und Energiequelle verwendet werden (Sato und Atomi, 2011; Siebers und Schönheit, 2005). *Haloferax volcanii* ist ein geeigneter Modellorganismus zur Studie des halophilen Stoffwechsels, da er auf definierten Medien mit unterschiedlichen Kohlenhydraten als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen kann. Außerdem ist das Genom von *H. volcanii* vollständig sequenziert und es ist möglich, gezielt Bereiche daraus zu deletieren (Hartman et al., 2010; Bitan-Banin et al., 2003; Allers et al., 2004). Darüber hinaus es gibt ein System zur homologen Überexpression von Proteinen (Allers et al., 2010).

Zentraler Kohlenhydratstoffwechsel in Archaea

Vergleichende Untersuchungen des zentralen Kohlenhydratstoffwechsels haben ergeben, dass Archaea nicht die klassischen Embden-Meyerhof (EM) und Entner-Doudoroff (ED) Wege zum Abbau von Glucose benutzen, sondern unterschiedliche Modifikationen dieser Abbauwege verwenden (Siebers und Schönheit, 2005).

Im klassischen EM-Weg von Bacteria wird, für die Umsetzung von Glucose zu Triosephosphaten, Glucose unter Beteiligung von ATP-abhängigen Hexokinasen/Glucokinasen zu Glucose-6-phosphat phosphoryliert, welches von der Phosphoglucose Isomerase zu Fructose-6-phosphat umgesetzt wird. ATP-abhängige, allosterisch regulierte Phosphofruktokinase katalysieren dann die Phosphorylierung von Fructose-6-phosphat zu Fructose-1,6-bisphosphat (FBP). Die Spaltung von FBP zu Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP) wird von der FBP Aldolase katalysiert.

Verschiedene Modifikationen dieses klassischen EM-Wegs findet man in den Euryarchaeota *Pyrococcus furiosus* und *Thermococcus litoralis* und den Crenarchaeota *Desulfurococcus amylolyticus* und *Pyrobaculum aerophilum* (Kengen et al., 1994; Selig et al., 1997; Reher et al., 2007). Dabei werden Enzyme verwendet, die sich in ihrer Spezifität bzw. ihrem Phosphoryldonor von den klassischen Enzymen unterscheiden. So besitzen Euryarchaeota, wie zum Beispiel *P. furiosus* oder *T. litoralis*, neuartige ADP-abhängige Glucokinasen (Kengen et al., 1994; Kengen et al., 1995; Koga et al., 2000). In Crenarchaeota wurden ATP-abhängige ROK Glucokinasen charakterisiert, die, anders als die klassischen bakteriellen Enzyme, ein hexokinaseähnliches breites Substratspektrum aufwiesen, wobei

neben Glucose auch andere Zucker wie Fructose oder Mannose phosphoryliert werden können (Hansen et al., 2002a; Dörr et al., 2003). Diese crenarchaeellen Kinasen sind Mitglieder aus der ROK-Familie, zu der Repressoren, offene Leserahmen (ORFs) mit unbekannter Funktion und Kinasen gehören (Titgemeyer et al., 1994). Die weitere Umsetzung von Glucose-6-phosphat zu Fructose-6-phosphat wird in vielen Archaea von neuartigen Phosphoglucose Isomerasen katalysiert (Siebers und Schönheit, 2005).

Die Phosphorylierung von Fructose-6-phosphat zu FBP wird von archaeellen Phosphofruktokinase (PFKs), unter Verwendung verschiedener Phosphoryldonoren, katalysiert. Es sind PP_i -, ATP-, und ADP-abhängige PFKs beschrieben (Siebers und Schönheit, 2005). PFKs findet man in der Proteinfamilie der PFK-A und der Ribokinase Superfamilie. Archaeelle ADP- und ATP-PFKs gehören zur Ribokinase Superfamilie, deren Mitglieder im Gegensatz zu den bakteriellen Enzymen keine allosterische Regulation durch klassische Effektoren aufweisen.

FBP wird im weiteren Verlauf mittels FBP Aldolasen in GAP und DHAP gespalten, wobei zwei Klassen von Aldolasen beschrieben sind. Bei Class I Aldolasen wird mit einem essentiellen Lysin im aktiven Zentrum ein Imin ausgebildet, das bei der Enzymreaktion von Bedeutung ist; Class II Aldolasen hingegen benötigen zur Katalyse zweiwertige Kationen (Alefounder et al., 1989; Fothergill-Gilmore und Michels, 1993). Aus diesem Grund lassen sich Class II Aldolasen, im Gegensatz zu Class I Aldolasen, spezifisch mit EDTA inhibieren. In einigen Archaea wurde ein neuer Typus beschrieben, der eine geringe Sequenzähnlichkeit zu den klassischen bakteriellen Class I Aldolasen aufweist und der als archaeeller Typ Class I FBP Aldolase (FBP Aldolase Class I A) bezeichnet wird (Siebers et al., 2001).

Im klassischen phosphorylierten ED-Weg der Bacteria wird, für die Umsetzung von Glucose zu Triosephosphaten, zunächst die Glucose mittels einer ATP-abhängigen Glucokinase zu Glucose-6-phosphat (G6P) phosphoryliert, welche im nächsten Schritt durch die G6P Dehydrogenase zu 6-Phosphogluconat oxidiert wird. Die 6-Phosphogluconat Dehydratase katalysiert nun die Dehydratisierung von 6-Phosphogluconat zu 2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat (KDPG). Dieses wird von der KDPG Aldolase zu Pyruvat und GAP gespalten.

In Archaea sind verschiedene Modifikationen dieses Wegs bekannt. Eine Variante des klassischen ED-Wegs ist der nichtphosphorylierte ED-Weg, bei dem Glucose unphosphoryliert von der Glucose Dehydrogenase und der Gluconat Dehydratase über

Gluconat zu 2-Keto-3-desoxygluconat (KDG) umgewandelt wird. KDG wird dann von der KDG Aldolase zu Pyruvat und Glycerinaldehyd gespalten. Gut untersucht ist dieser Weg in den thermoacidophilen Euryarchaeota *Picrophilus torridus* und *Thermoplasma acidophilum* (Reher et al., 2010; Budgen und Danson, 1986).

Eine weitere Modifizierung des klassischen Wegs ist der semiphosphorylierte ED-Weg. Dort wird KDG, wie im nichtphosphorylierten ED-Weg, mittels Glucose Dehydrogenase und Gluconat Dehydratase gebildet. Dieses wird dann von der KDG Kinase zu 2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat (KDPG) umgesetzt. Die ATP-abhängige KDG Kinase ist das Schlüsselenzym dieses semiphosphorylierten ED-Wegs. KDPG wird weiter von einer KDPG-Aldolase in Pyruvat und GAP gespalten. Der semiphosphorylierte ED-Weg wurde für den Abbau von Glucose in halophilen Archaea postuliert (Tomlinson et al., 1974; Johnsen et al., 2001) (Abbildung 2 A). Aus *Haloferax mediterranei* wurde die Glucose Dehydrogenase gereinigt und charakterisiert, deren Kristallstruktur mittlerweile aufgeklärt wurde (Bonete et al., 1996; Baker et al., 2009). Weitere Enzyme aus halophilen Archaea wurden bisher jedoch nicht charakterisiert. *H. volcanii* enthält Gene, die für die zwei putativen KDG-Kinasen KDGK-1 und KDGK-2 (*kdgK1* und *kdgK2*) codieren. Die Identifizierung der funktionellen KDG Kinase am Glucoseabbau halophiler Archaea wurde bisher noch nicht gezeigt.

Eine weitere Variante des klassischen ED-Wegs ist der „branched“ ED-Weg, der einen nichtphosphorylierten und einen semiphosphorylierten Teilweg enthält und der für *Sulfolobus solfataricus* und *Thermoproteus tenax* beschrieben wurde (Ahmed et al., 2005). In diesem Weg wird Glucose über die Glucose Dehydrogenase und die Gluconat Dehydratase zu KDG umgewandelt, welches entweder zu Glycerinaldehyd und Pyruvat gespalten wird, oder mittels KDG Kinase zu KDPG phosphoryliert wird. Das Schlüsselenzym dieses Weges ist eine bifunktionelle Aldolase, die sowohl KDG als auch KDPG spalten kann (Lamble et al., 2005). Erst kürzlich wurde gezeigt, dass in *S. solfataricus* über diesen Weg neben Glucose auch das C-4 Epimer Galactose abgebaut werden kann (Lamble et al., 2005).

Im Gegensatz zum Glucoseabbau ist der Fructoseabbau in Archaea weniger untersucht. In halophilen Archaea wurde für den Fructoseabbau ein modifizierter EM-Weg vorgeschlagen (Johnsen et al., 2001). In dem postulierten Weg wird Fructose von einer Ketohexokinase und einer 1-Phosphofruktokinase (1-PFK) über Fructose-1-phosphat zu FBP umgesetzt, welches von der FBP Aldolase in GAP und DHAP gespalten wird (Abbildung 2 B).

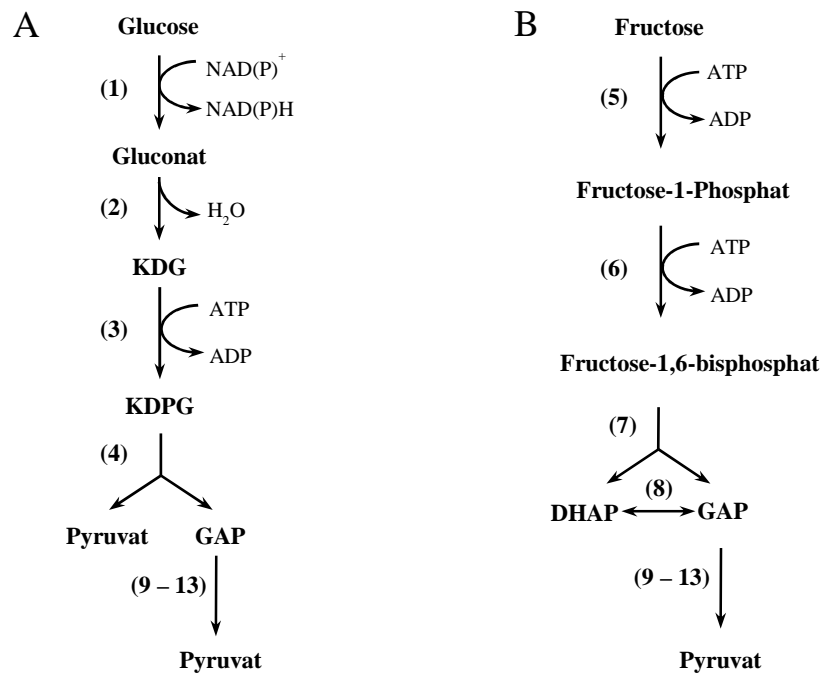


Abbildung 2 Abbau von Glucose (A) und Fructose (B) zu Pyruvat in halophilen Archaea (Schema modifiziert nach Johnsen et al., 2001). Der Glucose- und Fructoseabbau mit den Enzymen (1): Glucose Dehydrogenase, (2): Gluconat Dehydratase, (3): 2-Keto-3desoxygluconat (KDG) Kinase, (4): 2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat (KDPG) Aldolase, (5): Ketohekinase, (6): 1-Phosphofruktokinase, (7): Fructose-1,6-bisphosphat Aldolase, (8): Triosephosphat Isomerase, (9): Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP) Dehydrogenase, (10): 3-Phosphoglycerat Kinase, (11): Phosphoglycerat Mutase, (12): Enolase und (13): Pyruvat Kinase ist schematisch dargestellt. Abkürzungen: **KDG**: 2-Keto-3-desoxygluconat, **KDPG**: 2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat, **GAP**: Glycerinaldehyd-3-phosphat, **DHAP**: Dihydroxyacetonphosphat.

Der Fructoseabbau in halophilen Archaea wurde bisher hauptsächlich in den *Haloarcula* Species *H. vallismortis* und *H. marismortui* untersucht (Altekar und Rangaswamy, 1992; Altekar und Rangaswamy, 1990; Johnsen et al., 2001). Bisher wurden einige Enzyme dieses Wegs, wie die Ketohekinase, 1-PFK, sowie Class I und Class II Fructose-1,6-bisphosphat Aldolasen beschrieben (Rangaswamy und Altekar, 1994a; Rangaswamy und Altekar, 1994b; D'Souza und Altekar, 1998; Altekar und Dhar, 1988; Krishnan und Altekar, 1991). Die codierenden Gene sind jedoch bisher nicht identifiziert worden. Im Genom von *H. volcanii* ist jedoch mit *pfkB* eine putative 1-PFK aus der Familie der PFK-B und mit *fba* eine putative klassische Class II FBA annotiert.

Transport von Kohlenhydraten in Archaea

Während über die verschiedenen archaeellen glycolytischen Wege schon vieles bekannt ist, liegen über den Transport von Zuckern in der Domäne der Archaea vergleichsweise wenige Informationen vor. Bisher wurde der Zuckertransport in der Domäne der Archaea hauptsächlich in den hyperthermophilen *Sulfolobus* Species und in den *Thermococcales* untersucht. Es hat sich gezeigt, dass diese Organismen Zucker hauptsächlich über ATP-binding cassette (ABC) Transporter aufnehmen (Albers et al., 2004; Lee et al., 2007). Gut untersucht ist, dass *S. solfataricus* Glucose mit Hilfe eines ABC Transporters aufnimmt, der ein hochspezifisches, membranverankertes Bindeprotein enthält (Albers et al., 1999). Für *Pyrococcus furiosus* wurde gezeigt, dass für die Aufnahme von Maltose ein Trehalose/Maltose ABC Transporter verwendet wird (Koning et al., 2002).

In halophilen Archaea ist der Zuckertransport kaum untersucht. Kürzlich durchgeführte vergleichende Untersuchungen mit zehn halophilen Genomen haben ergeben, dass annotierte Gene eventuell für zuckerspezifische ABC-Transporter oder Symporter codieren könnten (Anderson et al., 2011). Diese wurden bisher jedoch nicht charakterisiert. Daneben wurden zum Beispiel in *Haloarcula marismortui*, *Haloterrigena turkmenica* und *H. volcanii* auch Gene identifiziert, die für ein putatives Phosphoenolpyruvat (PEP) abhängiges Phosphotransferase System codieren (PTS), was außergewöhnlich ist, da dieser Transportmechanismus bisher nur in der Domäne der Bacteria beschrieben wurde.

Das PTS wurde erstmals in *Escherichia coli* als Zucker phosphorylierendes System beschrieben (Kundig et al., 1964). Ein zuckerspezifisches PTS katalysiert den Transport und die gleichzeitige Phosphorylierung des transportierten Substrats und besteht typischerweise aus den cytoplasmatischen Proteinen Enzym I (EI) und HPr sowie dem membrangebundenen und zuckerspezifischen Enzym II (EII) Komponenten EIIA, EIIB und EIIC (Barabote und Saier, Jr., 2005). Dabei ist EIIC ein Transmembranprotein, welches den Transportkanal durch die Membran ausbildet. Beim Transport wird eine Phosphatgruppe von PEP über EI, HPr, EIIA und EIIB auf den Zucker übertragen. Neben dem Transport und der Phosphorylierung von Substraten sind Phosphotransferase Systeme in Bacteria in vielen weiteren zellulären Prozessen, wie zum Beispiel der CCR (Carbon Catabolite Repression), involviert (Deutscher et al., 2006). Gut untersuchte Phosphotransferase Systeme findet man vor allem in *E. coli*, in dem Fructose hauptsächlich durch einen PTS vermittelten Transport aufgenommen wird (Kornberg, 2001).

Pentosephosphatweg in Archaea

Der Pentosephosphatweg ist ein zentraler Stoffwechselweg, der in Eukarya und Bacteria gut untersucht ist. Er dient unter anderem der Synthese von NADPH, das für Biosynthesen benötigt wird; zudem ermöglicht er eine Umformung von Zwischenprodukten der Glykolyse oder der Gluconeogenese in Pentosephosphate, die zur Herstellung von Nukleotiden benötigt werden.

Der Pentosephosphatweg lässt sich in einen oxidativen und einen nichtoxidativen Teil gliedern. Im oxidativen Teil des Pentosephosphatwegs wird Glucose-6-phosphat (G6P) von der G6P Dehydrogenase und einer Lactonase über 6-Phosphoglucono- δ -lacton zu 6-Phosphogluconat umgesetzt, welches von der 6-Phosphogluconat Dehydrogenase zu Ribulose-5-phosphat und CO₂ oxidiert wird. Im vollständig reversiblen nichtoxidativen Teil des Pentosephosphatwegs können die aus Ribulose-5-phosphat gebildeten Produkte Ribose-5-phosphat und Xylulose-5-phosphat mittels Transketolasen und Transaldolasen zum Beispiel zu Fructose-6-phosphat, GAP und Erythrose-4-phosphat umgewandelt werden (Berg et al., 2003). Der Pentosephosphatweg wurde in der Domäne der Archaea bisher nur wenig untersucht. Eine Analyse von 13 archaellen Genomen, die unter anderem *Halobacterium*, *Sulfolobus solfataricus*, *Methanococcus janaschii*, *Thermoplasma acidophilum*, *Pyrobaculum aerophilum* und *Aeropyrum pernix* enthielt, ergab, dass in den Genomen dieser Organismen keine Gene eines vollständigen Pentosephosphatwegs codiert waren (Soderberg, 2005). Insbesondere wurden, mit Ausnahme von *Halobacterium*, keine Gene identifiziert, die für Enzyme des oxidativen Teils des Pentosephosphatwegs codieren. Es wurde vorgeschlagen, dass die Bildung von Ribulose-5-phosphat in Organismen ohne oxidativen Teil des Pentosephosphatwegs entweder vom nichtoxidativen Teil des Pentosephosphatwegs oder der Umkehrung des Ribulosemonophosphatwegs stammt (Soderberg, 2005; Grochowski et al., 2005; Orita et al., 2006).

Haloarchaea verfügen weder über einen Ribulosemonophosphatweg, noch über Transketolasen oder Transaldolasen (Anderson et al., 2011). Eine Ausnahme bildet *Halorhabdus utahensis*, der Gene enthält, die für putative Transketolasen und eine putative Transaldolase codieren. Dagegen enthalten die meisten halophilen Archaea ein Gen, das für eine putative 6-Phosphogluconat Dehydrogenase, als Bestandteil des oxidativen Teils des Pentosephosphatwegs, codiert. Das Vorhandensein einer putativen 6-Phosphogluconat Dehydrogenase und das Fehlen des Ribulosemonophosphatwegs und des nichtoxidativen Teils des Pentosephosphatwegs deuten darauf hin, dass halophile Archaea über den oxidativen Teil des Pentosephosphatwegs verfügen. Bisher wurde in archaellen Genomen

jedoch kein Gen gefunden, das für eine bekannte G6P Dehydrogenase codiert, die den einleitenden Schritt des Pentosephosphatwegs katalysiert. Außerdem ist in halophilen Archaea nicht geklärt, wie G6P gebildet wird.

Ausgehend von den beschriebenen Sachverhalten sollten in der vorliegenden Arbeit folgende Themen bearbeitet werden:

1. Die Beteiligung von Genen und Enzymen am Abbau von Fructose zu Triosephosphaten über einen modifizierten EM-Weg sollte in *H. volcanii* untersucht werden. Zudem sollte die Beteiligung eines bakteriellen PTS am Transport und am Abbau von Fructose gezeigt werden.
2. Das Schlüsselenzym des semiphosphorylierten ED-Wegs beim Abbau von Glucose, die KDG Kinase, sollte in *H. volcanii* identifiziert und charakterisiert werden. Dazu sollten zwei annotierte, putative KDG Kinasen charakterisiert und die für den Glucoseabbau funktionelle KDG Kinase identifiziert werden.
3. Es sollte überprüft werden, ob *H. volcanii* über die Enzyme des oxidativen Teils des Pentosephosphatwegs verfügt, welche an der Umsetzung von Glucose zu Ribulose-5-phosphat beteiligt sind. Dabei sollte eine annotierte ROK Kinase, sowie die putative 6-Phosphogluconat Dehydrogenase rekombinant charakterisiert werden. In Zellextrakten von *H. volcanii* sollte zudem auf die Aktivität einer G6P Dehydrogenase untersucht werden.

4 Material und Methoden

4.1 Chemikalien, Plasmide und Oligonukleotide

4.1.1 Spezielle Chemikalien und Enzyme

Carbenicillin	Roth, Karlsruhe
Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue R250	Roth, Karlsruhe
CSPD	Roche Diagnostics, Mannheim
2-Deoxyglucose	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth, Karlsruhe
DNA Molecular weight marker III, DIG labeled	Roche Diagnostics, Mannheim
DNase I, RNase frei	Fermentas, St. Leon-Rot
5-Fluororotsäure (5-FOA)	Biomol, Hamburg
Fructose-1-Phosphat (F1P)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Fructose-6-Phosphat (F6P)	Biomol, Hamburg
Fructose-1,6-Bisphosphat (FBP)	Roche Diagnostics, Mannheim
6-Phosphogluconat	Roche Diagnostics, Mannheim
Glucose-6-Phosphat (G6P)	Roche Diagnostics, Mannheim
Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase	Roche Diagnostics, Mannheim
Glycerin-3-Phosphat Dehydrogenase	Roche Diagnostics, Mannheim
GoScript™ Reverse Transcription System	Promega, Mannheim
Hexokinase	Roche Diagnostics, Mannheim
Isopropyl-β-D-thiogalaktosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe
Lactat Dehydrogenase (LDH)	Roche Diagnostics, Mannheim
PCR DIG Probe Synthesis Mix	Roche Diagnostics, Mannheim
Phosphoglucose-Isomerase (PGI)	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>Pwo</i> -Polymerase	PeqLab, Erlangen
Pyruvatkinase (PK)	Roche Diagnostics, Mannheim
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QuantiTect SYBR® Green PCR Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Random Hexamer Primer	Fermentas, St. Leon-Rot

Restriktionsenzyme	NEB, Schwalbach/Taunus
T4 DNA Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Taq</i> -Polymerase	PeqLab, Erlangen
Triosephosphat-Isomerase (TIM)	Roche Diagnostics, Mannheim
Wizard [®] Genomic DNA-Purification Kit	Promega, Mannheim

2-Keto-3-Desoxygluconat (KDG) wurde mit der gereinigten Xylonat Dehydratase aus *Haloferax volcanii* (Johnsen et al., 2009) aus D-Gluconat gewonnen und wurde mir freundlicherweise von Jan-Moritz Sutter zur Verfügung gestellt. 2-Keto-3-Desoxygalactonat (KDGal) wurde freundlicherweise von Prof. Michael Danson (Bath, UK) zur Verfügung gestellt. Alle weiteren nicht genannten Chemikalien und Feinchemikalien stammten von den Firmen Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Schnelldorf) und Merck (Darmstadt).

4.1.2 Verwendete Plasmide

Die verwendeten Plasmide zur Expression von Proteinen in *H. volcanii* und *E. coli* sowie zur Gendeletion in *H. volcanii* sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1 Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide für die Überexpression, Komplementation und Deletion. RE = Restriktionsenzyme

Bezeichnung Plasmid	Beschreibung	verwendete RE	Primer
pTA131	suicide Vektor basierend auf pBluescript mit <i>pyrE2</i> (Allers et al., 2004)		
pTA963	episomaler haloarchaeeller Expressionsvektor mit 6x His-Tag, <i>pyrE2</i> und <i>hdrB</i> (Allers et al., 2010)		
pET-19b	Überexpressionsvektor für <i>E. coli</i> mit His-Tag (Novagen, Schwalbach)		
pTA963-HVO1499	pTA963 mit <i>HVO_1499</i>	<i>NcoI</i> <i>BamHI</i>	HVO_1499_OE_s HVO_1499_OE_as
pTA963-HVO1500	pTA963 mit <i>HVO_1500</i>	<i>BspHI</i> <i>BamHI</i>	HVO_1500_OE_s HVO_1500_OE_as

Tabelle 1 Fortsetzung Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide für die Überexpression, Komplementation und Deletion.

Bezeichnung Plasmid	Beschreibung	verwendete RE	Primer
pTA963-HVO_1494	pTA963 mit <i>HVO_1494</i>	<i>NdeI</i> <i>BamHI</i>	HVO_1494_OE_s HVO_1494_OE_as
pTA963-HVO_0549	pTA963 mit <i>HVO_0549</i>	<i>BspHI</i> <i>BamHI</i>	HVO_0549_BspHIs HVO_0549BamHIas
pTA963-HVO_A0328	pTA963 mit <i>HVO_A0328</i>	<i>BspHI</i> <i>BamHI</i>	HVO_A0328BspHIs HVO_A0328BamHIas
pTA963-HVO_0403	pTA963 mit <i>HVO_0403</i>	<i>PciI</i> <i>BamHI</i>	HVO_0403_nes_s HVO_0403_nes_as HVO_0403_OE_s-His HVO_0403_OE_as2
pTA963-HVO1830	pTA963 mit <i>HVO_1830</i>	<i>PciI</i> <i>BamHI</i>	HVO_1830_OE_s-His HVO_1830_OE_as
pET-19b-Dkam_0546	pET-19b mit <i>Dkam_0546</i>	<i>NcoI</i> <i>XhoI</i>	Dkam0546_ <i>NcoI</i> Dkam0546_ <i>XhoI</i>
pTA131-ΔHVO_1499	pTA131 mit Insert <i>ΔHVO_1499</i>	<i>SnaBI</i>	HVO_1499frgt1_s HVO_1499frgt1_as HVO_1499frgt2_s HVO_1499frgt2_as
pTA131-ΔHVO_1500	pTA131 mit Insert <i>ΔHVO_1500</i>	<i>EcoRV</i>	HVO_1500frgt1_s HVO_1500frgt1_as HVO_1500frgt2_s HVO_1500frgt2_as
pTA131-ΔHVO_1494	pTA131 mit Insert <i>ΔHVO_1494</i>	<i>SnaBI</i>	HVO_1494frgt1_s HVO_1494frgt1_as HVO_1494frgt2_s HVO_1494frgt2_as
pTA131-ΔHVO_0549	pTA131 mit Insert <i>ΔHVO_0549</i>	<i>EcoRV</i>	HVO_0549frgt1_s HVO_0549frgt1_as HVO_0549frgt2_s HVO_0549frgt2_as2
pTA131- ΔHVO_A0328	pTA131 mit Insert <i>ΔHVO_A0328</i>	<i>SnaBI</i>	HVO_A0328frgt1_s HVO_A0328frgt1_as HVO_A0328frgt2_s HVO_A0328frgt2_as

4.1.3 Verwendete Oligonukleotide

Tabelle 2 Oligonukleotide, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Schnittstellen für Restriktionsenzyme (RE) sind unterstrichen. Die Oligonukleotidprimer stammen von Eurofins MWG Operon (Ebersberg).

Name	Basensequenz (5' → 3')	RE
RibL10-RT_F	ACAGCACAATATGGGCGACCTGC	
RibL10-RT_R	GTCCTCGACGTCGCAGTAGATGG	
HpyA-F	GCGTCCATCGCGACGCGGTAG	
HpyA-R	CGCAAGACGTTGATGGCCGAGG	
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG	
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	
pTA131_T7_-72bp	AGGCGATTAAGTTGGGTAACGCC	
pTA131_T3_-15bp	TTACGCCAAGCGCGCAATTAACC	
T7Term	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	
pTA963_p.tnaA_s	TGGCGAGAACGGAACAGC	
HVO_1499Nth_s	CAAACGACGCAGAAGACGCAGTTC	
HVO_1499Nth_as	CCCTCGGAGATGAGGCCGAC	
HVO_1499RT_s	CAAACGACGCAGAAGACGCAGTTC	
HVO_1499RT_as	CCCTCGGAGATGAGGCCGAC	
HVO_1499_OE_s	GTGGCAACACCATGGCAAACGAC	<i>NcoI</i>
HVO_1499_OE_as	GCCGGCGGATCCTCGAGCG	<i>BamHI</i>
HVO_1499frgt1_s	GGATGTGCTTTCCGACGTGGAC	
HVO_1499frgt1_as	GCGATGACGGCCCCGGTCATCAGGTCCTCCTTC	
HVO_1499frgt2_s	GATGACCGGGCCGTCATCGCGACGGCCATC	
HVO_1499frgt2_as	GAGCTGTACGTCGGCGTCGAAC	
HVO_1499_Sonde_as	GTTCGTCAGCACGTCTTCGAGGTC	
HVO_1500 Nth_s2	GACCGCCTCGGGCTTTCTCG	
HVO_1500Nth_as2	CGTCTTCGAGGTCCGGGACG	
HVO_1500_OE_s	CGGAGTCGCATCATGATTCTCAC	<i>BspHI</i>
HVO_1500_OE_as	GTGCTCAGGATCCCTTTCGAATATG	<i>BamHI</i>
HVO_1500frgt1_s	GTGGGCTCATCGAGCGGTTCG	
HVO_1500frgt1_as	CACGTCTTCCGGTTCGTCGAAGTGAATCGTGTG	
HVO_1500frgt2_s	CTTCGACGAACCGGAAGACGTGCTGACGAACGAAACG	
HVO_1500frgt2_as	GCGACCGGGATGAGGAGCAC	
HVO_1500_Sonde_s	GGCAACACTATGGCAAACGACGC	
HVO_1494Nth_s	GGACCACCAGACGGACCTCG	
HVO_1494Nth_as	CTTGAACAGCGACTGGCCGGC	
HVO_1494_OE_s	TTGCGCATATGCACCACCACCACCACATG CCGTTCTACGGCGGGGAG	<i>NdeI</i>
HVO_1494_OE_as	CGCGATGCGGATCCGACGAGC	<i>BamHI</i>
HVO_1494frgt1_s	CACTAGACCAATGAAACTCGTCGCAG	

Tabelle 2 Fortsetzung Oligonukleotide, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Name	Basensequenz (5' → 3')	RE
HVO_1494frgt1_as	CACGTCGGCGAGCGCCTCGTCGTACACTGTG	
HVO_1494frgt2_s	CGAGGCGCTCGCCGACGTGCACGCCGACC	
HVO_1494frgt2_as	CGGCGGCAAGAAAGGTGAACAGG	
HVO_1494_Sonde_s	CCCACGTCGTTTAAGGCGTCACG	
HVO_0549RT-PCRs2	CCGACGAGGCGGCCGAAGTC	
HVO_0549RT-PCRas	CCGCGCCGTCGGACACCG	
HVO_0549_BspHIs	GCCGTT <u>CATGAC</u> AGCACTCGTG	<i>BspHI</i>
HVO_0549BamHIs	CTGAC <u>GATCC</u> GCGTGCGACTG	<i>BamHI</i>
HVO_0549frgt1_s	CCGCGACGAAATCGCCTCGC	
HVO_0549frgt1_as	CGACGTCCTCCGGCGACAGCCGAAGCATCG	
HVO_0549frgt2_s	CTGTCGCCGGAGGACGTGCGAGCGCGTCG	
HVO_0549frgt2_as2	GGTCATCGCGTCGGGCATCC	
HVO_0549_Sonde_as	GAACCCAGTCGCTCTCGCGG	
HVO_A0328RT-PCRs	CGGAGTTGGCCGCGATTTTCG	
HVO_A0328RT-PCRas	CGCCCGCGATGAGCCGCG	
HVO_A0328BspHIs	GGGGCGTT <u>CATGAC</u> GGCTGAAC	<i>BspHI</i>
HVO_A0328BamHIs	CGCGCGGG <u>GATCC</u> GAAACGTTC	<i>BamHI</i>
HVO_A0328frgt1_s	GCGTTCCGCTCTCGGAACGGTAG	
HVO_A0328frgt1_as	GACTTCGTCAGGGCTCAGCCGAATCATCGTCTCGC	
HVO_A0328frgt2_s	CGGCTGAGCCCTGACGAAGTCGAACGCGTCC	
HVO_A0328frgt2_as	GGACGGCGTCTCTCGGCATGC	
HVO_A0328Sonde_s	GACGAAGTCGAACGCGTCCTCC	
HVO_A0328Sonde_as	GTCAACGCCTACGAGGCCGG	
HVO_0403_nes_s	CCCGGGAGTTACATCGCCGC	
HVO_0403_nes_as	CGATTGTGGTGACAGGAAGTGCC	
HVO_0403_OE_s-His	TCCCTA <u>AACATGTCC</u> ATGGCGTACTACGTGGGCGTC	<i>PciI</i>
HVO_0403_OE_as2	CCGCGTC <u>GATCC</u> CCCGAGCG	<i>BamHI</i>
HVO_1830_OE_s-His	GACGATA <u>CATGTCC</u> ATGCAACTAGGCGTCATCGGC	<i>PciI</i>
HVO_1830_OE_as	GCGAGAACGG <u>GATCC</u> GTCCTCGG	<i>BamHI</i>
Dkam0546_NcoI	GATGGTAG <u>CCATGG</u> CCAGGTATC	<i>NcoI</i>
Dkam0546_XhoI	CACCTCTAG <u>ACTCGAG</u> CGTCAAC	<i>XhoI</i>

4.2 Wachstum von *E. coli*

Plasmide wurden im Stamm *E. coli* XL1 Blue MRF' (Agilent Technologies, Waldbronn) vermehrt; zur Überexpression von Dkam_0546 wurde *E. coli* Rosetta™(DE3) pLysS (Merck, Darmstadt) verwendet. Die Zellen wurden unter aeroben Bedingungen bei 37 °C in LB-Medium (Roth, Karlsruhe) vermehrt. Die Inkubation von Flüssigkulturen und LB-

Agarplatten (LB - Medium mit 1,8 % Agar) erfolgte für 12 - 16 h, die Flüssigkulturen wurden dabei mit 120 - 150 U/min geschüttelt. Zur Selektion auf Transformanten mit Ampicillin-Resistenz wurden 100 µg/ml Carbenicillin zugegeben, zur Selektion auf den Chloramphenicol-resistenten Expressionsstamm wurde zusätzlich 34 µg/ml Chloramphenicol ins Medium gegeben.

4.3 Wachstum von *H. volcanii* und Substratbestimmung

4.3.1 Wachstum von *H. volcanii*

In dieser Arbeit wurden die Stämme *H. volcanii* H26 (Bitan-Banin et al., 2003) und *H. volcanii* H1209 (Allers et al., 2010) verwendet. Die Anzucht von *H. volcanii* in Flüssigkulturen fand unter aeroben Bedingungen bei 42 °C im Heißluftschüttler mit 150 U/min statt. Dabei wurden 100 ml Erlenmeyerkolben verwendet, die mit maximal 20 % Medium gefüllt waren.

Zur Herstellung von Deletionsmutanten in *H. volcanii* H26 (4.4.7) wurden die Stämme in Deletionsmedium (modifiziert nach Dambeck und Soppa, 2008) inkubiert (Tabelle 3). Bei der Deletion von HVO_1494 wurde hingegen Synthetikmedium (modifiziert nach Dambeck und Soppa, 2008) mit 25 mM Glucose als Kohlenstoff- und Energiequelle verwendet (Tabelle 3). Wachstumsversuche mit Deletionsmutanten und Komplementationsexperimente wurden in Minimalmedium (modifiziert nach Zaigler et al., 2003) und Synthetikmedium durchgeführt (Tabelle 3 und Tabelle 4). Als Kohlenstoff- und Energiequellen dienten dabei D-Glucose, D-Fructose, D-Galactose, D-Xylose (alle 25 mM), 40 mM Acetat bzw. 1 % Casaminsäuren. Während des Wachstums wurde die Änderung der optischen Dichte bei 600 nm (ΔOD_{600}) über die Zeit im Einstrahl Photometer Ultrospec 2000 (GE Healthcare, Freiburg) gemessen. Für die Expression von Proteinen aus *H. volcanii* (4.5.4) im Stamm *H. volcanii* H1209 wurden die Vorkulturen in Deletionsmedium mit 0,5 % tryptophanfreien Casaminsäuren inkubiert, die Expressionsansätze wuchsen in DM-YPC (Allers et al., 2010) (Tabelle 3). Zur Herstellung von Agarplatten für *H. volcanii* wurde die jeweilige Salzlösung vor dem Autoklavieren mit 1,8 % Agar versetzt. Die Stämme H26 und H1209 mit deletierter, für die Uracil-Biosynthese benötigter Orotat-Phosphoribosyltransferase ($\Delta pyrE2$) wuchsen in Medien mit 50 µg/ml Uracil. Der Stamm *H. volcanii* H1209 mit zusätzlich deletierter Dihydrofolat-Reduktase ($\Delta pyrE2$, $\Delta hdrB$) wuchs in Medium mit 40 µg/ml Thymidin.

Tabelle 3 Deletions-, Synthetik- und DM-YPC-Medium für *H. volcanii*.

Salzlösung		Zusammensetzung Deletionsmedium	
NaCl	125 g	Salzlösung	900 ml
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	45 g	Spurenelementlösung	1 ml
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	10 g	FeSO ₄ Stammlösung	1 ml
KCl	10 g	10 % Casamino-säuren	100 ml
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1,34 g		
1 M Tris-HCl pH 7,2	50 ml		
in 0,9 l H ₂ O _{dest} angesetzt, pH auf 7,5 eingestellt und autoklaviert			
Spurenelementlösung		Zusammensetzung Synthetikmedium	
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,1 g	Salzlösung	900 ml
MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0,03 g	Spurenelementlösung	1 ml
H ₃ BO ₃	0,31 g	FeSO ₄ Stammlösung	1 ml
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,2 g	2 M MOPS/KOH-Puffer, pH 7,2	50 ml
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	0,01 g	1 M NH ₄ Cl	10 ml
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	0,02 g	10 % Hefeextrakt	1 ml
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,03 g		
mit H ₂ O _{dest} ad 100 ml, pH 3,5, sterilfiltriert		Zusammensetzung DM-YPC Medium	
FeSO₄ Stammlösung		Salzlösung	900 ml
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,23 g	10 % Hefeextrakt	50 ml
mit H ₂ O _{dest} ad 100 ml, pH 7,5, sterilfiltriert		10 % Bactopepton	10 ml
		10 % Casamino-säuren (Trp-frei)	10 ml
		Spurenelementlösung	1 ml
		FeSO ₄ Stammlösung	1 ml

Tabelle 4 Minimalmedium für *H. volcanii*.

Salzlösung		Minimalsalzlösung	
NaCl	240 g	1 M K ₂ HPO ₄	30 ml
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	30 g	0,5 M CaCl ₂	36 ml
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	37 g	Spurenelementlösung	6 ml
KCl	7,5 g		
1 M CaCl ₂	5 ml	Vitaminlösung	
Die Lösung wurde in 1 l H ₂ O _{dest} angesetzt, durch Zugabe von 1 M Tris-HCl pH 7,5 auf pH 7,5 eingestellt und autoklaviert.		1 mg/ml Thiamin	9,6 ml
		1 mg/ml Biotin (gelöst in 0,1 N NaOH)	11,2 ml
		Die Minimalsalzlösung und Vitaminlösung wurden sterilfiltriert.	
Spurenelementlösung		Zusammensetzung Minimalmedium	
MnCl ₂ x 2 H ₂ O	0,030 g	Salzlösung	200 ml
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,044 g	H ₂ O _{dest}	100 ml
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,230 g	1 M Tris-HCl pH 7,5	20 ml
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,005 g	autoklaviert, Zugabe von 4 ml Minimalsalzlösung, 0,65 ml 1 M Phosphatpuffer, pH 7,5 und 0,3 ml Vitaminlösung	
Die Lösung wurde mit H ₂ O _{dest} auf 100 ml aufgefüllt und sterilfiltriert.			

Tabelle 5 Verwendete *H. volcanii* Stämme. [] = episomales Plasmid mit Insert.

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>H. volcanii</i> H26	$\Delta pyrE2$	(Bitan-Banin et al., 2003)
H26- Δ HVO_1499	$\Delta pyrE2 \Delta$ HVO_1499	diese Arbeit
H26- Δ HVO_1499+HVO_1499	$\Delta pyrE2 \Delta$ HVO_1499 [pTA963-HVO_1499]	diese Arbeit
H26- Δ HVO_1500	$\Delta pyrE2 \Delta$ HVO_1500	diese Arbeit
H26- Δ HVO_1500+HVO_1500	$\Delta pyrE2 \Delta$ HVO_1500 [pTA963-HVO_1500]	diese Arbeit
H26- Δ HVO_1494	$\Delta pyrE2 \Delta$ HVO_1494	diese Arbeit
H26- Δ HVO_1494+HVO_1494	$\Delta pyrE2 \Delta$ HVO_1494 [pTA963-HVO_1494]	diese Arbeit
H26- Δ HVO_0549	$\Delta pyrE2 \Delta$ HVO_0549	diese Arbeit
H26- Δ HVO_0549+HVO_0549	$\Delta pyrE2 \Delta$ HVO_A0549 [pTA963-HVO_0549]	diese Arbeit
H26- Δ HVO_0549+HVO_A0328	$\Delta pyrE2 \Delta$ HVO_A0549 [pTA963-HVO_A0328]	diese Arbeit
H26- Δ HVO_A0328	$\Delta pyrE2 \Delta$ HVO_A0328	diese Arbeit
H26- Δ HVO_A0549/ Δ HVO_A0328	$\Delta pyrE2 \Delta$ HVO_0549/ Δ HVO_A0328	diese Arbeit
H26- Δ HVO_A0549/ Δ HVO_A0328+HVO_0549	$\Delta pyrE2 \Delta$ HVO_0549 / Δ HVO_A0328 [pTA963-HVO_0549]	diese Arbeit
H26- Δ HVO_A0549/ Δ HVO_A0328+HVO_A0328	$\Delta pyrE2 \Delta$ HVO_0549 / Δ HVO_A0328 [pTA963HVO_A0328]	diese Arbeit
<i>H. volcanii</i> H1209	$\Delta pyrE2 \Delta$ hdrB pitA _{Nph} Δ mrr	(Allers et al., 2010)
H1209-HVO_1500	$\Delta pyrE2 \Delta$ hdrB pitA _{Nph} Δ mrr [pTA963-HVO_1500]	diese Arbeit
H1209-HVO_1494	$\Delta pyrE2 \Delta$ hdrB pitA _{Nph} Δ mrr [pTA963-HVO_1494]	diese Arbeit
H1209-HVO_0549	$\Delta pyrE2 \Delta$ hdrB pitA _{Nph} Δ mrr [pTA963-HVO_0549]	diese Arbeit
H1209-HVO_A0328	$\Delta pyrE2 \Delta$ hdrB pitA _{Nph} Δ mrr [pTA963-HVO_A0328]	diese Arbeit
H1209-HVO_A0403	$\Delta pyrE2 \Delta$ hdrB pitA _{Nph} Δ mrr [pTA963-HVO_0403]	diese Arbeit
H1209-HVO_1830	$\Delta pyrE2 \Delta$ hdrB pitA _{Nph} Δ mrr [pTA963-HVO_1830]	diese Arbeit

4.3.2 Bestimmung von Glucose und Fructose

Zur Bestimmung von Glucose wurden die Enzyme Hexokinase (HK) und Glucose-6-phosphat (G6P) Dehydrogenase verwendet. Dabei wurde pro mol umgesetzter Glucose 1 mol NADP^+ reduziert, was bei 365 nm als Extinktionszunahme detektiert werden konnte (Kunst et al., 1986). Zur Bestimmung der Fructose in denselben Proben wurde nach Messung der Glucosekonzentration die PGI zugegeben, wobei pro mol Fructose 1 mol NADP^+ gebildet wurde, was bei 365 nm detektiert wurde. Ein Testansatz ($V = 1000 \mu\text{l}$) enthielt 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM ATP, 1 mM NADP^+ , 10 mM MgCl_2 , 0,75 U HK und Probe. Nach Bestimmung der Extinktion (E_0) wurden 0,35 U G6P Dehydrogenase zugegeben, der Ansatz für 10 min bei 37 °C inkubiert und erneut die Extinktion gemessen (E_1). Aus der Extinktionsdifferenz wurde die Glucosekonzentration mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten ($\epsilon_{365\text{nmNADPH}} = 3,4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) berechnet. Der Wert E_2 wurde nach Zugabe von 5,25 U PGI und Inkubation bei 37 °C für 20 min gemessen. Aus der Extinktionsdifferenz ($E_2 - E_1$) wurde die Fructosekonzentration bestimmt.

4.4 Molekularbiologische Methoden

4.4.1 Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) wurde in dieser Arbeit für die Amplifikation von offenen Leserahmen (ORFs) aus genomischer DNA, zur Überprüfung eines Inserts in Transformanten, zur Herstellung von *H. volcanii* Deletionsmutanten und zur Quantifizierung von Transkripten verwendet. Ein Standard PCR Ansatz enthielt 50 μl , die Reaktion wurde in einem Thermocycler (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Die Programme variierten abhängig von den Schmelzpunkten der Oligonukleotid-Primer (Tabelle 2) und der Länge der zu amplifizierenden Produkte. Die bei den Ansätzen verwendeten Enzyme und Chemikalien stammten von PeqLab und Fermentas.

Amplifikation von Genen für die Überexpression, Komplementation und Herstellung von Sonden

Die Reaktionsansätze zur Amplifikation von ORFs zur Überexpression und Komplementation bestanden aus genomischer DNA der entsprechenden Organismen als Template, je 400 nM forward und reverse Primer, 400 μM dNTP Mix, 2 mM MgSO_4 , 5 μl 10 x Reaktionspuffer und 1,25 U *Pwo*-DNA-Polymerase. Mit Hilfe von mismatch-Primern

wurden Schnittstellen eingefügt, die zur späteren Klonierung verwendet wurden. Für die einzelnen PCRs wurden folgende Bedingungen gewählt:

H. volcanii, ORFs HVO_1499, HVO_1494, HVO_A0328, HVO_1830 und *Desulfurococcus kamchatkensis* Dkam_0546: Zur Amplifikation der Gene wurden nahezu gleiche Protokolle verwendet, dabei enthielten die Reaktionsansätze 30 ng DNA (HVO_A0328: 260 ng). Das Inkubationsprotokoll bestand aus einer initialen Denaturierung bei 94 °C für 120 s (HVO_1830 99 °C), darauf folgten 35 Zyklen, bestehend aus 30 s Denaturierung bei 94 °C, 30 s Annealing bei 58 °C - 66 °C und 60 s Synthese bei 68 °C. Eine abschließende Polymerisation wurde bei 68 °C für 7 min durchgeführt.

H. volcanii, ORF HVO_1500: Im Reaktionsansatz wurden 60 ng genomische DNA als Template verwendet. Im Inkubationsprotokoll wurde eine initiale Denaturierung bei 94 °C für 120 s gewählt, darauf folgten 20 Zyklen, bestehend aus 30 s Denaturierung bei 94 °C, 30 s Annealing bei 59 °C und 60 s Synthese bei 68 °C. Nach weiteren 25 Zyklen, bestehend aus 30 s Denaturierung bei 94 °C, 30 s Annealing bei 63 °C und 60 s Synthese bei 68 °C folgte die abschließende Polymerisation bei 68 °C für 7 min.

H. volcanii, ORF HVO_0549: Der Reaktionsansatz enthielt 260 ng genomische DNA als Template und 2,5 mM MgSO₄. Für die Amplifikation wurde eine initiale Denaturierung bei 98 °C für 120 s durchgeführt, gefolgt von 40 Zyklen, bestehend aus 30 s Denaturierung bei 96 °C, 30 s Annealing bei 52 °C und 60 s Synthese bei 68 °C. Die Synthesezeit wurde in jedem Zyklus um 15 s erhöht. Danach folgte eine abschließende Polymerisation bei 68 °C für 7 min.

H. volcanii, ORF HVO_0403: Die Amplifikation des Gens erfolgte in zwei Schritten. Der erste Reaktionsansatz enthielt 30 ng DNA. Das Primerpaar HVO_0403_nes_s/as fügte keine Restriktionsschnittstellen ein und diente zur Amplifikation des ORFs mit flankierenden Genbereichen. In einem zweiten Ansatz wurde das aus einem präparativen Gel eluierte Produkt des ersten Ansatzes als Template für eine zweite PCR verwendet, bei der Restriktionsschnittstellen für die Klonierung eingefügt wurden. Der Reaktionsansatz hierfür enthielt 15 pg Template und je 300 nM forward und reverse Primer. Das Inkubationsprotokoll bestand aus einer initialen Denaturierung bei 99 °C für 10 min, darauf folgten 35 Zyklen, bestehend aus 30 s Denaturierung bei 94 °C, 30 s Annealing bei 67 °C und 60 s Synthese bei 68 °C. Die abschließende Polymerisation wurde bei 68 °C für 7 min durchgeführt.

Amplifikation von Sonden für Northern- und Southern Blot (**4.4.8** und **4.4.9**): Die Reaktionsansätze enthielten als Template 20 ng genomische DNA oder 100 pg Plasmid, das

die jeweils zu amplifizierende Sequenz enthielt, je 500 nM forward und reverse primer, 5 µl 10 x PCR DIG Probe Synthesis Mix, 10 µl 5 x Enhancer, 5 µl 10 x Reaktionspuffer Y und 1 U *Taq*-DNA-Polymerase. Alle Komponenten mit Ausnahme der Polymerase wurden bei 94 °C für 4,5 min initial denaturiert. Nach Zugabe der Polymerase folgten 35 Zyklen, bestehend aus 30 s Denaturierung bei 95 °C, 30 s Annealing bei 63 °C und 60 s Synthese bei 72 °C, dann folgte eine abschließende Polymerisation bei 72 °C für 7 min.

Herstellung von Konstrukten zur Gendeletion in *H. volcanii* (4.4.7) und pop-out PCR

Synthese von Deletionskonstrukten

Zur Synthese von Konstrukten für die Gendeletion in *H. volcanii* wurden zwei etwa 500 bp lange Fragmente hergestellt. Dabei enthielt Fragment 1 den 5'- und Fragment 2 den 3'-flankierenden Bereich des zu deletierenden Gens. Die Primer zur Amplifikation der beiden Fragmente wurden so gewählt, dass jeweils etwa 10 Basenpaare im 3' Bereich von Fragment 1 und im 5' Bereich von Fragment 2 identisch waren, womit die beiden Fragmente in einer Fusions-PCR miteinander verknüpft werden konnten. Die Reaktionsansätze zur Generierung der Fragmente 1 und 2 enthielten 30 ng genomische DNA von *H. volcanii* H26, je 400 nM forward und reverse Primer, 400 µM dNTP Mix, 2 mM MgSO₄, 5 µl 10 x Reaktionspuffer und 1,25 U *Pwo*-DNA-Polymerase. Das Inkubationsprotokoll bestand aus einer initialen Denaturierung bei 94 °C für 120 s, darauf folgten 35 Zyklen, bestehend aus 30 s Denaturierung bei 94 °C, 30 s Annealing bei 63 °C und 60 s Synthese bei 68 °C. Die abschließende Polymerisation fand bei 68 °C für 7 min statt. Die PCRs zur Fusion der beiden mittels Gelelektion (4.4.2) gereinigten Fragmente wurden in derselben Weise mit je 100 ng Fragment 1 und 2 durchgeführt. Die Synthesezeit wurde auf 2 min erhöht. Die Amplifikation von Fragment 2 zur Deletion von HVO_1499 wurde mit dem HotStar HiFidelity Polymerase Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Ein Reaktionsansatz enthielt 30 ng genomische DNA, 10 µl 5 x HotStar PCR Buffer, 10 µl Q-Solution, je 1 µM forward und reverse Primer und 1 U HotStar HiFidelity DNA Polymerase.

pop-out PCR. Um zwischen Wildtyp und erfolgreicher Deletion zu unterscheiden, wurden pop-out PCRs durchgeführt. Von jedem zu untersuchenden Klon wurde ein Aliquot von 100 µl in einer miniSpin plus Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg) bei maximaler Umdrehung für 2 min zentrifugiert. Die Zellen wurden nach Abnahme des Überstands in 100 µl H₂O_{bidest.} lysiert und 1:100 verdünnt (10 µl Lysat + 990 µl H₂O_{bidest.}). Jeder Reaktionsansatz enthielt 4 µl dieser Verdünnung als Template, 400 nM forward und reverse

Primer (frgt1_s und frgt2_as Primer, Tabelle 2), 5 µl 10 x Reaktionspuffer Y, 10 µl 5 x Enhancer, 200 µM dNTP Mix und 1 U *Taq*-DNA-Polymerase. Das Programm enthielt einen initialen Denaturierungsschritt bei 95 °C für 4,5 min, 40 Zyklen aus 30 s Denaturierung bei 95 °C, 30 s Annealing bei 62 °C und 3 min Synthese bei 72 °C, dann folgte eine abschließende Polymerisation bei 72 °C für 7 min.

PCR zur Kontrolle einer Klonierung („Kolonie-PCR“)

Transformierte *E. coli* Stämme wurden darauf untersucht, ob nach Ligation das jeweils aufgenommene Plasmid ein Insert von erwarteter Länge enthielt. Zur Amplifikation des über die multiple cloning site inserierten Gens wurden unterschiedliche Primerpaare für die Plasmide pTA963 (pTA963_p.tnaA_s und T3), pTA131 (pTA131_T7_-72bp und pTA131_T3_-15bp) und pET-19b (T7Prom und T7Term) verwendet (Tabelle 2). Der Reaktionsansatz jeder PCR enthielt als Template einen mit einer sterilen Pipettenspitze gepickten Klon, je 200 nM forward und reverse Primer, 5 µl 10 x Reaktionspuffer Y, 10 µl 5 x Enhancer, 200 µM dNTP Mix und 0,5 U *Taq*-DNA-Polymerase. Das Programm bestand aus einem initialen Denaturierungsschritt bei 95 °C für 4,5 min, 35 Zyklen aus 30 s Denaturierung bei 95 °C, 30 s Annealing bei 48 °C und 2,5 min Synthese bei 72 °C und einer abschließenden Polymerisation bei 72 °C für 7 min.

4.4.2 Reinigung, Konzentrations- und Größenbestimmung von DNA

Reinigung von DNA. Amplifizierte PCR-Produkte und restriktionsverdaute DNA wurden mit dem QIAquick PCR Purification Kit, bzw. nach präparativer Gelelektrophorese mit dem QIAquick Gel Extraction Kit nach den Angaben des Herstellers gereinigt.

Absorptionsmessung bei 260 nm und 280 nm. Die Konzentration von DNA und RNA in Lösungen wurde photometrisch über die Absorption bei 260 nm im NanoDrop ND-1000 Spektralphotometer (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, USA) bestimmt. Zudem wurde die Absorption bei 280 nm bestimmt, und aus dem Quotienten 260 nm / 280 nm die Reinheit der Probe ermittelt. Für reine DNA erwartet man ein Verhältnis von etwa 1,8, für RNA liegt der Wert bei etwa 2,0 (Sambrook et al., 1989).

Agarosegelelektrophorese. Mit der Agarosegelelektrophorese wurden PCR-Produkte, Plasmide, genomische DNA und RNA nach ihrer Größe aufgetrennt. Abhängig von der Größe erfolgte die Trennung von DNA entweder in einem Gel mit 1 % oder 2 % Agarose. Dafür wurde Agarose in 30 ml (analytisches Gel) oder 50 ml (präparatives Gel) TAE-Laufpuffer (40 mM Tris-HCl pH 8,0, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA) durch Aufkochen

gelöst. Nach dem Abkühlen auf etwa 60 °C und Zugabe von 30 bzw. 50 µg Ethidiumbromid wurde die Lösung zum Aushärten in eine Gießvorrichtung (7 cm x 10 cm) mit einem Kamm für die Probenaschen gegossen. Das Agarosegel wurde nun in eine mit TAE-Laufpuffer gefüllte Elektrophorese-Apparatur (Biometra, Göttingen) gelegt. Die mit 6 x Auftragspuffer (Fermentas, St. Leon-Roth) versetzten Proben wurden neben einen Standard (Gene Ruler 100 bp DNA Ladder plus, oder Gene Ruler 1 kb DNA Ladder, Fermentas, St. Leon-Roth) in die Probenaschen pipettiert und bei 60 – 120 V für 15 – 90 min aufgetrennt. Nach erfolgreichem Lauf wurde das Gel auf einem UV-Schirm (312 nm) ausgewertet. Nach einer präparativen Agarosegelelektrophorese wurden die Banden auf dem UV-Schirm mit Hilfe eines Skalpell aus dem Gel geschnitten.

4.4.3 Restriktionshydrolyse von DNA

Ansätze zum spezifischen Verdau von DNA wurden mit Restriktionsenzymen (NEB, Schwalbach/Taunus) als Doppel- oder Einzelverdau angesetzt. Die Bedingungen wurden dabei nach Herstellerangaben gewählt. Der Verdau wurde für 1 h (genomische DNA: über Nacht) inkubiert.

4.4.4 Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Zellen

Zur Herstellung elektrokompetenter Zellen wurden jeweils 200 ml LB-Medium mit einer frischen Kultur 1 % ig angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 – 1,0 inkubiert. Danach wurden die Zellen für 15 min auf Eis inkubiert und für 10 min bei 4 °C und 4500 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde erst mit 200 ml kaltem H₂O_{dest.}, dann mit 2 – 4 ml 4 °C kaltem Glycerin (10 % in H₂O) unter denselben Bedingungen gewaschen und in 2 ml kaltem 10% igen Glycerin aufgenommen. Davon wurden 40 µl Aliquots in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -70 °C.

4.4.5 Ligation

Ligation. Ein 20 µl Ligationsansatz enthielt restriktionsverdautes Plasmid und PCR-Produkt, 1 U T4-DNA-Ligase und 2 µl 10 x T4-DNA-Ligasepuffer. Dabei wurde das zu ligierende PCR-Produkt im 3 bis 10 fachen molaren Überschuss zum Plasmid eingesetzt. Die Ansätze wurden bei 22 °C für 1 h inkubiert, für 15 min gegen H₂O_{bidest.} dialysiert und dann für die Transformation in *E. coli* eingesetzt.

Ein 20 µl Ligationsansatz mit dem *EcoRV* oder *SnaBI* geschnittenem Vektor pTA131 enthielt neben dem verdauten Vektor PCR-Produkt im 5-fachen molaren Überschuss, 5 – 10 U Restriktionsenzym, 2 µl 10 x RE-Puffer, 2 µl 50 % PEG 4000, 1 µl 10 mM ATP und 5 U T4-DNA-Ligase. Der Ansatz wurde für 2 h bei 22 °C inkubiert, für 15 min gegen H₂O_{bidest.} dialysiert und zur Transformation in *E. coli* eingesetzt.

Transformation eines Vektors in *E. coli*. Zur Transformation von Plasmiden in *E. coli* mittels Elektroporation wurden elektrokompente Zellen verwendet (4.4.4). Dabei wurden 40 µl Zellen auf Eis aufgetaut, mit 2 – 10 µl Ligationsansatz oder 20 – 250 ng gereinigtem Plasmid gemischt und in einer eisgekühlten Elektroporations-Küvette (Biozym, Hessisch Oldendorf) bei 2,5 kV, 12,5 kV/cm, 25 µF und 200 Ω (BIO-RAD Pulse Controller und BIO-RAD Gene PulserTM, BioRad, München) elektroporiert. Sofort nach der Elektroporation wurden 700 µl SOC-Medium (0,5 % Hefeextrakt, 2 % Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose, pH 7,0, auf 37 °C vorgewärmt) zugegeben und bei 37 °C für 1 h und 800 U/min (Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Daraus wurden 10 – 250 µl zur Selektion auf eine antibiotikahaltige LB-Agarplatte ausplattiert und bei 37 °C für 16 – 20 h inkubiert.

Reinigung und Sequenzierung von Plasmiden aus *E. coli*. Für die Reinigung von Plasmiden aus *E. coli* wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit nach Herstellerangaben verwendet. Zur Überprüfung auf Fehlerfreiheit des Inserts wurden die Plasmide anschließend bei der Firma MWG (Ebersberg) sequenziert.

4.4.6 Transformation in *H. volcanii*

In dieser Arbeit wurden die Stämme *H. volcanii* H26 und H1209 nach der Methode von Cline *et al.* transformiert (Cline *et al.*, 1989a; Cline *et al.*, 1989b). Dafür wurden 2 ml einer exponentiell wachsenden Kultur (OD₆₀₀ = 0,1 – 1,5) bei 8000 U/min in einer miniSpin plus Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg) pelletiert. Das Zellsediment wurde in einem Gemisch aus 162 µl Sphäroblastenbildungslösung (0,8 M NaCl, 27 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, 15 % Saccharose, pH 8,2) und 18 µl EDTA-Lösung (0,5 M EDTA, pH 8,2) behutsam resuspendiert, um Sphäroblasten zu erzeugen. Nach Zugabe von 20 µl DNA-Lösung (0,5 - 5 µg Plasmid-DNA in 0,8 M NaCl) und Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur wurden 210 µl PEG-Lösung (zusammengesetzt aus 60 % PEG 600 und 40 % Sphäroblastenbildungslösung) in den Deckel des Reaktionsgefäßes gegeben, durch rasches Schwenken miteinander vermischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zu den dabei gebildeten Aggregaten wurden 1800 µl Sphäroblastenverdünnungslösung (3,4 M NaCl,

175 mM MgSO₄ x 7 H₂O, 34 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl₂ x 2 H₂O, 15 % Saccharose) gegeben. Davon wurden 50 – 250 µl auf einer Agarplatte mit dem entsprechenden Medium ausplattiert und für 4 – 7 Tage bei 42 °C inkubiert. Bei jeder Transformation wurde der zu transformierende Stamm sowie die Sphäroblasten- und Aggregatbildung mikroskopisch überprüft.

4.4.7 Herstellung von *H. volcanii* Deletionsmutanten und Komplementation

Deletionsmutanten von *H. volcanii* wurden über die sogenannte pop-in / pop-out Methode mit Hilfe des Vektors pTA131 generiert (Allers et al., 2010; Bitan-Banin et al., 2003). Der Vektor besitzt ein funktionelles *pyrE2*-Gen, welches für die in der Uracilbiosynthese benötigte Orotat-Phosphoribosyltransferase codiert. Der mit pTA131 transformierte Uracil auxotrophe Stamm *H. volcanii* H26 ($\Delta pyrE2$) konnte wieder auf Uracil freiem Deletionsmedium (4.3.1) wachsen, wenn der Vektor durch homologe Rekombination in das Genom integrierte (pop-in). Das Rekombinationsereignis fand jeweils an einer Stelle im Genom statt, die homolog zu einem Teil des in pTA131 klonierten Deletionskonstrukts war. Nach mindestens zehnmaligem Überimpfen in Uracil freiem Medium mit je 0,5 – 1,5 % Inokulum wurden die Zellen auf eine Agarplatte mit Deletionsmedium, 0,03 mg/ml Uracil und 0,05 mg/ml 5-Fluororotsäure (5-FOA) ausplattiert und bei 42 °C inkubiert. Dabei konnten nur die Zellen überleben, die den Vektor mit *pyrE2* über ein zweites homologes Rekombinationsereignis (pop-out) verloren hatten, da FOA von der Orotat-Phosphoribosyltransferase in das für die Zelle toxische 5-Fluoruracil umgewandelt wird. Die Klone enthielten damit entweder das deletierte oder das Wildtypgen. Um zu prüfen, in welchem Klon das jeweilige Gen deletiert war, wurden pop-out PCRs (4.4.1) durchgeführt. Ein Klon mit deletiertem Gen wurde dann in Deletionsmedium mit 0,03 mg/ml Uracil und 0,05 mg/ml FOA 10 – 15 mal mit jeweils 0,5 - 1,5 % Inokulum überimpft. Die entstandene Deletionsmutante ($\Delta pyrE2$) konnte verwendet werden, um auf die gleiche Weise eine Doppelmutante herzustellen. Deletionsmutanten, die nicht mehr oder nur noch vermindert dazu in der Lage waren, auf bestimmten C-Quellen zu wachsen, wurden mit dem jeweiligen funktionellen Gen in pTA963 transformiert. Das komplementierte Wachstum wurde mit bis zu 200 µM Tryptophan im Medium gemessen.

4.4.8 Reinigung genomischer DNA und Southern blotting

Für Southern-Blot Analysen und zur Erzeugung von Template DNA wurde genomische DNA aus *H. volcanii* mit Hilfe des Wizard[®] Genomic DNA-Purification Kits gewonnen. Dafür wurden 2 ml Zellen aus der stationären Phase für 2 min in einer miniSpin plus Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg) mit maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Das Pellet wurde in 600 µl Nuclei Lysis Solution und 3 µl RNase A Lösung aufgenommen und resuspendiert. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurden 200 µl Protein Precipitation Solution zugegeben, die Probe 5 min auf Eis inkubiert und erneut 4 min bei maximaler Umdrehung zentrifugiert. Die Fällung und Rehydratisierung der DNA wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Gendelektionen in *H. volcanii* wurden mittels Southern Blot überprüft. Dafür wurden je 2 µg genomische DNA aus Deletionsmutanten mit Restriktionsenzymen verdaut, wobei Fragmente mit 1500 – 7300 bp entstanden, die den jeweils deletierten Bereich enthielten. Als Kontrolle diente jeweils die DNA aus einem Wildtypstamm. Je 1 µg der verdauten DNA wurde auf die Spur eines 1 % igen Agarosegels aufgetragen und für 100 - 120 min bei 100 V aufgetrennt. Zur Größenbestimmung wurde der Digoxigenin (DIG) markierte DNA Molecular weight marker III (Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet. Die aufgetrennte DNA wurde auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche Diagnostics, Mannheim) mittels Vakuum übertragen. Dafür wurde das Gel 25 min mit Depurinatlösung (250 mM HCl), 20 min mit Denaturierungslösung (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) und 25 min mit Neutralisationslösung (0,5 M Tris-HCl, 1,5 M NaCl, pH 7,5) bei einem Unterdruck von 60 mbar, und 20 min mit 20 x SSC (3 M NaCl und 300 mM Na-Citrat, pH 7,0) bei einem Unterdruck von 80 mbar gebロットet. Die Membran mit der übertragenen DNA wurde dann 90 s mit UV-Licht ($\lambda = 312$ nm) bestrahlt und bei 50 °C für 30 min in DIG Easy Hyb (Roche Diagnostics, Mannheim) inkubiert. Die DIG markierte Sonde (4.4.1) wurde für 5 min bei 100 °C aufgeköcht und in 10 ml DIG Easy Hyb zur Membran gegeben. Nach Inkubation für 14 – 18 h wurde diese 2-mal für 15 min mit Low Stringency Buffer (2 x SSC mit 0,1 % SDS) bei 20 °C und 2-mal für 15 min mit High Stringency Buffer (0,5 x SSC mit 0,1 % SDS) bei 68 °C inkubiert. Die anschließende Detektion wurde mit dem „Luminescent Detection Kit“ (Roche Diagnostics, Mannheim) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

4.4.9 RNA Präparation, RT-PCR, qRT-PCR und Northern blotting

Bei Arbeiten mit RNA wurden alle verwendeten Lösungen mit 0,1% DEPC versetzt, über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert und autoklaviert. Alle Glaswaren wurden bei 240 °C für 4 h gebacken, Spitzen und Reaktionsgefäße wurden zweimal autoklaviert. Vor dem Arbeiten wurden der Tisch und die Pipetten mit 1 mM EDTA und 100 mM NaOH abgewischt.

Reinigung von RNA

Die Reinigung der Gesamtzell-RNA wurde nach einer verbesserten Methode von Chomczynski und Sacchi durchgeführt, bei der an Stelle von Chloroform 1-Brom-3-chlorpropan zur Phasentrennung verwendet wird (Chomczynski und Mackey, 1995; Chomczynski und Sacchi, 1987). Dabei wurden je 2 – 10 ml einer exponentiell wachsenden *H. volcanii*- Kultur ($OD_{600} = 0,3 - 1,5$) bei 10000 x g für 2 min bei 4 °C in einer Tischzentrifuge (Centrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml TRI Reagent® (Sigma-Aldrich, Schnellendorf) resuspendiert und bei 12000 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 0,1 ml 1-Brom-3-chlorpropan versetzt, kräftig gemixt, 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und 15 min bei 12000 x g zentrifugiert. Die RNA enthaltende obere Phase wurde in einem neuen Reaktionsgefäß mit 0,5 ml Isopropanol für 10 min bei Raumtemperatur gefällt. Nach Zentrifugation bei 12000 x g für 5 min bei 4 °C wurde das Pellet mit 1 ml 75 % Ethanol gewaschen, 10 min bei Raumtemperatur getrocknet, in 30 µl Wasser aufgenommen und die Konzentration im NanoDrop Spektralphotometer bestimmt (4.4.2).

Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR) und quantitative reverse Transkriptase PCR (qRT-PCR)

Zur Analyse der RNA mittels RT-PCR oder qRT-PCR wurde diese mit DNase I (Fermentas, St. Leon-Roth) nach dem Protokoll des Herstellers behandelt, um Verunreinigung mit genomischer DNA zu vermeiden. Die RNA wurde mit dem GoScript™ Reverse Transcription System nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. Jeder 20 µl Reaktionsansatz enthielt dabei 400 ng gereinigte RNA als Template, 0,025 µg/µl Random Hexamer Primer (Fermentas, St. Leon-Rot) und 2 mM MgCl₂. Um zu prüfen, ob die RNA DNA-frei war, wurden Kontrollansätze ohne reverse Transkriptase gemacht.

RT-PCR. Die RT-PCR wurde mit der *Taq*-DNA-Polymerase durchgeführt. Der Reaktionsansatz ($V = 25 \mu\text{l}$) enthielt 4 ng cDNA als Template, 200 μM dNTP Mix, 500 μM forward und reverse Primer (HVO_1499Nth_s/as), 2,5 μl 10 x Reaktionspuffer Y, 5 μl 5 x Enhancer und 0,5 U *Taq*-DNA-Polymerase. Das Inkubationsprotokoll bestand aus einer initialen Denaturierung bei 95 °C für 4,5 min, darauf folgten 20 - 30 Zyklen, bestehend aus 30 s Denaturierung bei 95 °C, 30 s Annealing bei 64 °C und 60 s Synthese bei 72 °C, die abschließende Polymerisation wurde bei 72 °C für 7 min durchgeführt. Das konstitutiv exprimierte Gen *ribL* (Primer: RibL10-RT_F/R, Tabelle 2) wurde als Ladekontrolle verwendet (Brenneis et al., 2007). Das Ergebnis wurde auf einem 1 % igen Agarosegel analysiert. Zur Überprüfung der Spezifität wurden die Produkte der RT-PCR aus dem Gel eluiert und sequenziert (4.4.2).

qRT-PCR. Die qRT-PCR wurde mit dem QuantiTect SYBR Green PCR Kit (Qiagen) in einem AB 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Warrington, England) durchgeführt. Dabei enthielt jeder Reaktionsansatz ($V = 12,5 \mu\text{l}$) 6,25 μl 2 x SYBR Green Mastermix, je 75 nM forward und reverse Primer (HVO_0549RT-PCR_s2/as bzw. HVO_A0328RT-PCR_s/as Tabelle 2) und 12,5 ng cDNA bzw. 0,05 – 50 ng genomische DNA als Template. Jede Reaktion wurde bei 95 °C für 15 min denaturiert, darauf folgten 40 Zyklen, bestehend aus 15 s Denaturierung bei 94 °C, 30 s Annealing bei 64 °C und 30 s Synthese bei 72 °C. Danach wurde die Schmelzkurve gemessen, mit deren Hilfe die Reinheit der amplifizierten Produkte und die Spezifität der Primer nachgewiesen werden konnte. Die konstitutiv exprimierten Gene *ribL* und *hpyA* (Primer: RibL10-RT_F/R bzw. HpyA-F/R, Tabelle 2) (Brenneis et al., 2007) wurden als Ladekontrolle verwendet. Primereffizienzen wurden mit Hilfe einer Verdünnungsreihe mit genomischer DNA von *H. volcanii* für jedes Primerpaar bestimmt. Die relative Quantifikation nach der $\Delta\Delta C_T$ Methode wurde mit der REST Software (Relative Expression Software Tool, Qiagen) berechnet. Zur Überprüfung der Spezifität wurden die Produkte der qRT-PCR-Reaktionen auf einem analytischen Agarosegel analysiert und sequenziert.

Northern Blotting

Zur Untersuchung der RNA mittels Northern Blotting wurde ein 1,2 % iges Agarosegel mit Formaldehyd verwendet. Für das Gel wurden 0,6 g Agarose in 50 ml MOPS-Puffer (20 mM MOPS, 5 mM Na-Acetat, 2 mM EDTA, pH 7) aufgekocht. Nach dem Abkühlen auf etwa 60 °C wurden 12,5 μg Ethidiumbromid und 900 μl 37 % Formaldehyd zugegeben und die Lösung zum Aushärten in die Gießvorrichtung mit Probenkamm gegossen. Das Gel wurde

für 30 min in FA Laufpuffer (20 mM MOPS, 5 mM Na-Acetat, 2 mM EDTA, 0,74 % Formaldehyd, pH 7) äquilibriert. Pro Spur wurden 5 – 15 µg RNA mit demselben Volumen 2 x RNA Loading Dye (Fermentas, St. Leon-Roth) versetzt, für 10 min bei 65 °C denaturiert und aufgetragen. Als Größenstandard wurde der RiboRuler™ High Range RNA Ladder (Fermentas, St. Leon-Roth) aufgetragen. Nach elektrophoretischer Auftrennung für 1 h bei 100 V wurde die RNA mittels Vakuum auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche Diagnostics, Mannheim) übertragen. Dafür wurde das Gel 2-mal für 25 min mit Wasser und 2-mal für 30 min mit 20 x SSC (1 x SSC: 0,15 M NaCl und 15 mM Na-Citrat, pH 7,0) bei einem Unterdruck von 60 mbar und für 40 min mit 20 x SSC bei einem Unterdruck von 80 mbar geblottet. Nach kurzer Inkubation der Membran in 2 x SSC wurde diese für 30 min bei 120 °C inkubiert. Danach wurde die Membran in DIG Easy Hyb (Roche Diagnostics, Mannheim) bei 50 °C für 30 min inkubiert. Die mit Digoxigenin markierte Sonde für die spezifische Detektion des Transkripts (**4.4.1**) wurde für 5 min bei 100 °C aufgeköcht und für 14 – 18 h bei 20 °C mit der Membran in 10 ml DIG Easy Hyb inkubiert. Danach wurde die Membran 2-mal für 5 min mit Low Stringency Buffer (2 x SSC mit 0,1 % SDS) bei Raumtemperatur und 2-mal für 5 min mit vorgewärmtem High Stringency Buffer (0,5 x SSC mit 0,1 % SDS) bei 50 °C inkubiert. Die anschließende Detektion wurde mit dem „Luminescent Detection Kit“ (Roche Diagnostics, Mannheim) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

4.5 Proteinbiochemische Methoden

4.5.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Während der Reinigung und Charakterisierung von Enzymen wurden Proteinkonzentrationen nach einer modifizierten Methode von Bradford (Bradford, 1976) gemessen. Dabei wurden 100 µl Probe mit 900 µl Bradford-Reagenz (70 mg Coomassie Brilliant Blue, 50 ml 99 % Ethanol, 100 ml 80 % Ortho-Phosphorsäure ad 1000 ml mit H₂O_{bidest}) miteinander gemischt, 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Extinktion bei 595 nm gemessen. Eine Kalibrierung wurde mit Rinderserum-Albumin Fraktion V (Merck, Darmstadt) durchgeführt. Die Messwerte waren bis zu einer Proteinmenge von 5 µg im Test proportional.

4.5.2 Größenbestimmung und Reinheitsanalyse von Proteinen

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde zur Bestimmung des apparenten Molekulargewichts der Proteinuntereinheiten und zur Reinheitskontrolle von Proteinen verwendet. Die Elektrophorese nach Laemmli (Laemmli, 1970) erfolgte in 12 %igen diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen (7 cm x 8 cm x 0,1 cm) in einer Mini Protean Elektrophorese Zelle (BioRad, München). Die Gele setzten sich aus Trenn- und Sammelgel wie folgt zusammen:

	Trenngel (12 %)	Sammelgel (3,3 %)
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
H ₂ O _{bidest.}	0,818 ml	1,625 ml
10 % Ammoniumpersulfat	50 µl	25 µl
TEMED	5 µl	5 µl

Vor dem Auftrag wurden die Proben mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt. Dazu wurde jede Probe mit 10 % TCA für 10 min auf Eis inkubiert und 10 min bei 4 °C bei maximaler Umdrehung in einer Eppendorf Kühlzentrifuge (Centrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 9 µl H₂O_{bidest.}, 2,5 µl Tris-HCl, pH 9,0, 3 µl 5 x Auftragspuffer (Fermentas, St. Leon Roth) und 0,5 µl 20 x DTT (50 mM in der Probe) gelöst, bei 95 °C für 10 min gekocht und auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte für 10 min bei 70 V und für 50 min bei 210 V in Elektrophoresepuffer (25 mM Tris, 190 mM Glycin und 0,02 % SDS) mit dem Precision Plus ProteinTM Standard (BioRad, München) als Molekulargewichtsmarker. Nach dem Lauf wurde jedes Gel in 1 % Coomassie Brilliant Blue R250 (in 10 % Essigsäure gelöst) für 1 – 5 min inkubiert, danach wurde der nicht-proteingebundene Farbstoff durch Inkubation in 10 % Essigsäure über Nacht entfernt.

Cetyltrimethylammoniumbromid-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (CTAB-PAGE)

Zur Bestimmung der apparenten molekularen Masse der Untereinheit wurden einige gereinigte halophile Proteine zusätzlich mittels CTAB-PAGE nach ihrer Größe aufgetrennt. Die Gele setzten sich aus Trenn- und Sammelgel wie folgt zusammen:

	Trenngel (7,5 %)	Sammelgel (5 %)
30 % Acrylamid 0,8 % Bisacrylamid	1,335 ml	0,333 ml
1,5 M Tricin-NaOH pH 8,0	1,335 ml	-
0,5 M Tricin-NaOH, pH 10,0	-	0,620 ml
H ₂ O _{bidest.}	2,6 ml	0,910 ml
10 % Ammoniumpersulfat	52,5 µl	25 µl
TEMED	5,325 µl	0,6 µl

Die Proben wurden in 10 % TCA gefällt (siehe SDS-PAGE), woraufhin die Proteinpellets in je 15 µl CTAB-Probenpuffer (10 mM Tricin-NaOH, 1 % CTAB, 10 % Glycerin, 10 µl gesättigte Kristallviolettlösung) gelöst, für 10 min bei 100 °C gekocht und auf das Gel aufgetragen wurden. Die Auftrennung erfolgte für 1 h bei 150 V in Tricin-Laufpuffer (25 mM Tricin, 2,7 mM CTAB, 75 mM Arginin, pH 8,2), wobei der Plus- und Minuspol der Elektrophoresekammer miteinander vertauscht wurden. Als Molekulargewichtsmarker dienten 5 µg Albumin (67 kDa), 5 µg Ovalbumin (43 kDa) und 10 µg Chymotrypsinogen (25 kDa) (GE Healthcare, Freiburg) in 15 µl CTAB-Probenpuffer (nach Inkubation für 10 min bei 100 °C). Nach der Färbung (siehe SDS-PAGE) wurde der nicht-proteingebundene Farbstoff bei 37 °C mit 10 % iger Essigsäure über zwei bis fünf Tage entfernt.

4.5.3 Bestimmung des apparenten Molekulargewichts unter nativen Bedingungen

Das apparente Molekulargewicht der gereinigten, rekombinanten Proteine wurde mittels Größen-Ausschlusschromatographie an einer Superdex 200 HiLoad 16/60 Gelfiltrationssäule (GE Healthcare, Freiburg) bestimmt, wobei jeweils ein Probenvolumen von 1 ml aufgetragen wurde. Für halophile Proteine erfolgte die Elution in 50 mM Tris-HCl, 2 M KCl, pH 8, nicht halophile Proteine wurden in 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5 eluiert. Dabei betrug die Flussrate 1 ml/min. Zur Kalibrierung der Säule wurden das HMW und LMW Gel Filtration Kit (GE Healthcare, Freiburg) nach den Angaben des Herstellers verwendet.

4.5.4 Homologe und heterologe Expression von Proteinen

Für die heterologe Überexpression von Dkam_0546 wurde das pET-Vektor System (Novagen, Schwalbach) mit dem Chloramphenicol-resistenten *E. coli* RosettaTM(DE3) pLysS (Merck, Darmstadt) als Expressionsstamm verwendet. Zur Überexpression von halophilen Proteinen aus *H. volcanii* wurde der Stamm *H. volcanii* H1209 (Δ pyrE2, Δ hdrB, Δ pitA_{Nph}, Δ mrr) verwendet (Allers et al., 2010).

Proteinexpression in *E. coli*. Der ORF Dkam_0546 aus *D. kamchatkensis* wurde mit Hilfe der Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *XhoI* so in den Vektor pET-19b kloniert, dass das Protein ohne Tag überexprimiert werden konnte. Das Plasmid wurde in *E. coli* RosettaTM (DE3) transformiert. Zur Expressionen wurden die Zellen in 800 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Carbenicillin und 34 µg/ml Chloramphenicol bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Die Induktion erfolgte bei einer OD₆₀₀ von etwa 0,7 mit 1 mM IPTG. Nach 4 h Expression wurden die Zellen bei 4 °C für 20 min und 9000 x g geerntet und das Pellet bei -20 °C gelagert.

Proteinexpression in *H. volcanii*. Zur Expression von rekombinanten 6 x His-markierten halophilen Proteinen aus *H. volcanii* wurden die ORFs in den Vektor pTA963 kloniert (Allers et al., 2010) und in *H. volcanii* H1209 transformiert und überexprimiert. Die Zellen wurden bei 42 °C und 150 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Die Vorkulturen wuchsen in 120 ml Deletionsmedium (4.3.1) mit 0,5 % Casaminsäuren ohne Tryptophan für 12 – 16 h bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 – 3,3. Zur Expression wurde jede Kultur in 3 x 380 ml DM-YPC Medium (4.3.1) mit einer OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und für etwa 8 h inkubiert. Die Induktion mit 2 mM Tryptophan erfolgte bei einer OD₆₀₀ von 0,25 – 0,6. Nach etwa 15 h Expression wurden die Zellen bei 13400 x g für 10 min bei 10 °C zentrifugiert und das Pellet bei -70 °C gelagert.

4.6 Reinigung und Charakterisierung von Enzymen

Herstellung von zellfreien Rohextrakten und Enzymreinigung. Die gefrorenen Zellpellets (4.5.4) wurden in je 15 ml Puffer aufgetaut. Der Zellaufschluss erfolgte entweder in einer eisgekühlten French-Press Zelle (American Instrument Company, Silver Spring, Maryland, USA) bei 14000 psi Innendruck mit fünf Wiederholungen oder mittels Ultraschall (Sonifier 250 Ultraschall Desintegrator, Branson Heinemann, Schwäbisch Gmünd) im Eisbad bei duty cycle 30 % und output control 3 für 1 min mit fünf Wiederholungen. Das jeweils entstandene Homogenisat wurde mittels Ultrazentrifugation

von Zelltrümmern und nicht löslichen Zellbestandteilen befreit. Dazu wurde die Probe für 90 min in einer präparativen Ultrazentrifuge (Beckmann Optima L, Beckmann Coulter GmbH, Krefeld) bei 4 °C und 90000 x g zentrifugiert. Zur Reinigung rekombinanter Proteine bis zur apparenten Homogenität mittels Säulenchromatographie wurde das ÄKTA FPLC System (GE Healthcare, Freiburg) mit FPLC-Säulen der Firmen GE Healthcare (Freiburg), Qiagen (Hilden) und BioRad (München) verwendet. Eluierte Proteine wurden mittels Absorptionsmessung bei 280 nm detektiert.

Messung von Enzymaktivitäten. Enzymaktivitäten wurden photometrisch im beheizbaren Spektralphotometer Ultrospec 4000 (GE Healthcare, Freiburg) mit der Swift II Software (Vs.2.03) in einem Volumen von 0,2 bis 1 ml ermittelt. Dabei wurden Einmalküvetten aus Kunststoff mit 10 mm Schichtdicke (Roth, Karlsruhe) oder Hellma-Präzisionsküvetten aus Glas (Ochs, Bovenden) verwendet. Jede Küvette wurde vor Substrat- und Enzymzugabe im Photometer inkubiert, bis die gewünschte Temperatur erreicht war. Bei den Messungen wurden die Substratreihenfolge und die Enzymmengen variiert, um die Startbarkeit und Proteinabhängigkeit der Tests zu überprüfen. K_m - und V_{max} - Werte wurden mit Hilfe der doppelt reziproken Auftragung nach Lineweaver-Burk bestimmt. Die Enzymaktivität 1 Unit (U) gibt den Verbrauch von 1 μmol Substrat, bzw. die Bildung von 1 μmol Produkt pro Minute wieder. Kontinuierliche Messungen wurden bis 50 °C durchgeführt, wobei die Rate photometrisch direkt verfolgt werden konnte. Bei diskontinuierlichen Messungen, die über 50 °C durchgeführt wurden, erfolgte eine Entkopplung der Enzymrate und der Detektionsreaktion. Dafür wurden Ansätze mit einem Gesamtvolumen von 0,5 – 1 ml gestartet. In einer definierten Zeitspanne, in der die Reaktion linear ablief, wurden mehrere Aliquots aus dem Ansatz genommen und die Reaktion gestoppt. Die Enzymaktivität konnte dann nachgewiesen werden, indem die Produkt- bzw. Substratkonzentration enzymatisch ermittelt wurde. Zur Bestimmung der pH-Abhängigkeit von Enzymaktivitäten wurden als Puffer Bis-Tris-HCl (pH 5,5 – 7,5), Tris-HCl (pH 7,5 – 9,0) und Glycylglycin-KOH (pH 9,0 – 11,5) verwendet.

4.6.1 Aktivitätsmessungen von Kinasen

Das aus der Kinasereaktion gebildete ADP wurde mit Hilfe von Pyruvat Kinase (PK) und Lactat Dehydrogenase (LDH) an die Oxidation von NADH gekoppelt, womit die Abnahme von NADH bei 340 nm ($\epsilon_{340\text{nm}} = 6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) photometrisch detektiert werden konnte.

Dabei katalysierte die PK die Phosphoenolpyruvat (PEP) abhängige Umsetzung von ADP zu ATP und Pyruvat. Pyruvat wurde mittels LDH und NADH zu Lactat und NAD^+ umgesetzt.

Reinigung und Charakterisierung der 1-Phosphofruktokinase (1-PFK) aus *H. volcanii*

Das Zellpellet mit exprimiertem 6 x His-Tag fusioniertem Protein wurde in Auftragspuffer (0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, 2 M KCl, 5 mM Imidazol) gelöst und mittels French-Press (4.6) aufgeschlossen. Nach Ultrazentrifugation (4.6) wurde der Proteinrohextrakt auf eine mit Auftragspuffer äquilibrierte 1 ml Ni-NTA Säule (Qiagen, Hilden) aufgetragen. Das spezifisch gebundene Protein wurde mit Hilfe eines Stufengradienten (20 mM, 100 mM und 500 mM Imidazol) bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min eluiert, wobei das Enzym bei 100 mM Imidazol von der Säule eluiert werden konnte. Von der Fraktion mit der höchsten spezifischen Aktivität wurde 1 ml auf eine Gelfiltrationssäule (Superdex 200 HiLoad 16/60, GE Healthcare, Freiburg) aufgetragen. Die Säule war in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 2 M KCl äquilibriert, die Elution erfolgte im isokratischen Fluss mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min.

Enzymaktivitäten wurden in 200 µl bei 42 °C gemessen. Die Testansätze zur Bestimmung der enzymkinetischen Parameter der Kinase mit den Substraten Fructose-1-phosphat (F1P) und Fructose-6-phosphat (F6P) enthielten jeweils 100 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,3 mM NADH, 1 mM PEP, 7 mM MgCl₂, 2 mM ATP, 0,5 M KCl, 2 U PK, 1,65 U LDH, gereinigtes Enzym und 0,1 - 20 mM Substrat. Der K_m von ATP wurde unter denselben Bedingungen mit 2 mM F1P und 0,1 – 10 mM ATP bestimmt. Die spezifische Aktivität der Kinase bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen und pH-Werten wurde mit 2 mM F1P gemessen. Bei den Aktivitätsmessungen wurden je 0,05 – 0,6 µg gereinigtes rekombinantes Enzym verwendet.

Reinigung und Charakterisierung der KDG-Kinasen KDGK-1 und 2 aus *H. volcanii*

Beide Kinasen wurden mit einem fusionierten 6 x His-Tag exprimiert. Der Aufschluss und die Reinigung bis zur apparenten Homogenität waren identisch zur Reinigung der 1-PFK aus *H. volcanii*. Dabei eluierte KDGK-1 bei 20 mM und KDGK-2 bei 100 mM Imidazol von der Ni-NTA-Säule.

Die Testansätze zur Bestimmung der enzymkinetischen Parameter wurden in 200 µl bei 42 °C gemessen und enthielten je 100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,3 mM NADH, 1 mM PEP, 10 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 0 - 10 mM 2-Keto-3-desoxygluconat (KDG) bzw. 2-Keto-3-desoxygalactonat (KDGal), gereinigtes Enzym, 3 U PK und 1,2 U LDH. K_m-Werte für ATP wurden mit 1 mM KDGal (KDGK-2) bzw. 2 mM KDG (KDGK-1) mit ATP-Konzentrationen zwischen 0,05 und 5 mM ermittelt. Die Aktivitäten bei verschiedenen Salzkonzentrationen und pH-Werten wurden mit 0,6 mM KDG ermittelt. Für die Messungen wurden jeweils zwischen 0,10 und 1,70 µg gereinigtes Protein eingesetzt.

Bestimmung von KDG und KDGal. Die Konzentrationen von KDG und KDGal wurden colorimetrisch ermittelt (Hurwitz und Weissbach, 1959). Dafür wurden 25 - 50 μl Probe mit je 125 μl Periodatlösung (25 mM HJO_4^- in 125 mM H_2SO_4) gemischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von je 250 μl Arsenit-Lösung (2 % NaAsO_2 in 0,5 M HCl) und einer Inkubation für 2 min bei Raumtemperatur wurden je 1000 μl Thiobarbitursäure-Lösung (0,3 % in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$) auf die Proben gegeben. Nach einer Inkubation für 10 min bei 100 °C im Heizblock wurden die Proben für 15 min auf Eis abgekühlt, bei Raumtemperatur für 5 min mit maximaler Geschwindigkeit in einer miniSpin plus Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert und die Extinktion des Überstands bei 548 nm ermittelt. Mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten von $67,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Gottschalk und Bender, 1982) konnten die Konzentrationen bestimmt werden.

Reinigung und Charakterisierung der ROK Kinase aus *H. volcanii*. Die Kinase wurde als 6 x His-Tag Fusionsprotein exprimiert. Der Aufschluss und die Reinigung bis zur apparenten Homogenität waren identisch zur Reinigung der 1-PFK aus *H. volcanii*. Dabei wurde das Enzym bei 100 mM Imidazol von der Ni-NTA-Säule eluiert.

Die Testansätze zur Bestimmung der enzymkinetischen Parameter wurden in 200 μl bei 42 °C in einem direkten optischen Test gemessen und enthielten je 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, 0,3 mM NADH, 1 mM PEP, 1 M KCl, 7,5 mM MgCl_2 , 2 U PK, 4 U LDH, gereinigtes Enzym und 7,5 mM ATP. Dabei wurden 0,05 - 5 mM Glucose, 0,25 - 5 mM Mannose oder 0,5 - 40 mM Glucosamin als Substrat verwendet. Der K_m -Wert für ATP sowie die spezifischen Aktivitäten bei verschiedenen Salzkonzentrationen und pH-Werten wurden mit 10 mM Glucose ermittelt. Zur Bestimmung der spezifischen Aktivität wurden neben ATP auch ITP und GTP als Phosphoryldonoren verwendet. Die dafür verwendeten Testansätze enthielten 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, 7,5 mM MgCl_2 , 1 mM NADP^+ , 10 mM Glucose, 1,4 U Glucose-6-phosphat Dehydrogenase und 7,5 mM ATP, ITP oder GTP. Bei den Ansätzen wurde jeweils 0,1 - 0,2 μg gereinigtes Enzym verwendet.

Reinigung und Charakterisierung der ROK Kinase von *D. kamchatkensis*. Das Pellet mit exprimierter Kinase wurde mittels Ultraschall in 50 mM Tris-HCl, pH 8,5 aufgeschlossen und ultrazentrifugiert (4.6). Der Überstand wurde für 30 min bei 70 °C inkubiert und erneut für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine im 50 mM, Tris-HCl, pH 8,5 äquilibrierte UNOTM Q1 (BioRad, München) Anionenaustauschchromatographie-Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mittels eines NaCl-Gradienten (0 – 1 M NaCl) bei einer Flussrate von 1,3 ml/min, wobei sich das Protein bei etwa 130 mM NaCl von der Säule löste. Das eluierte Enzym wurde mittels Gelfiltration

(Superdex 200 HiLoad 16/60) in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 2 M KCl bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min bis zur apparenten Homogenität gereinigt.

Zur Charakterisierung bei 50 °C in einem kontinuierlichen Test ($V = 1000 \mu\text{l}$) wurden jeweils 0,1 M Bis-Tris-HCl, pH 7,0, 0,3 mM NADH, 1 mM PEP, 5 mM MgCl_2 , 2 mM ATP, gereinigtes Protein, 2,5 U PK und 5 U LDH verwendet. Als Substrat wurden Glucose (0,1 - 10 mM), Fructose, Mannose und 2-Deoxyglucose (je 0,1 - 20 mM) verwendet. Die Bestimmung des K_m -Werts für ATP erfolgte mit 0,01 - 0,5 mM ATP und 10 mM Glucose. Spezifische Aktivitäten bei unterschiedlichen pH-Werten wurden mit 10 mM Glucose und 2 mM ATP durchgeführt. Bei Temperaturen über 50 °C wurden diskontinuierliche Ansätze ($V = 1000 \mu\text{l}$) durchgeführt. Jeder Ansatz enthielt dabei 0,1 M Bis-Tris-HCl, pH 6,5, 2 mM ATP, 5 mM MgCl_2 , gereinigtes Enzym und Substrat. Als Substrat wurden Glucose (0,1 - 10 mM), Fructose (0,1 - 20 mM), Mannose (0,03 - 20 mM) und 2-Deoxyglucose (0,05 - 10 mM) verwendet. Dabei wurden nach 0 min, 0,5 min, 1 min und 2 min (2-Deoxyglucose: 0 min, 0,5 min, 1 min und 1,5 min) Aliquots von jeweils 180 μl auf Eis inkubiert und mit 20 μl Detektionslösung (0,1 M Bis-Tris-HCl, pH 7,0, 3 mM NADH, 0,5 U PK, 1 U LDH und 10 mM PEP) versetzt und nach 5 min bei Raumtemperatur die Extinktion bei 340 nm gemessen. Aus den erhaltenen Werten konnten die jeweiligen Enzymraten bestimmt werden. Die K_m -Bestimmung von ATP wurde mit 10 mM Glucose und 0,01 - 0,5 mM ATP durchgeführt. Die Aktivierungsenergie wurde mit den spezifischen Aktivitäten des Enzyms zwischen 20 und 90 °C errechnet. Die Bestimmung der Parameter erfolgte bis 50 °C im kontinuierlichen und ab 50 °C im diskontinuierlichen Test, wobei immer 10 mM Glucose als Substrat verwendet wurden. Die Thermostabilität des Enzyms ($c = 0,25 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, in 50 mM Tris-HCl, pH 8,5, 130 mM NaCl, 0,2 M KCl und 0,2 mg/ml BSA) wurde bei 65 °C, 70 °C, 80 °C und 90 °C getestet, indem das Enzym bei den jeweiligen Temperaturen für 2 h inkubiert wurde. Nach 0 min, 10 min, 30 min, 60 min, 90 min und 120 min wurde je ein Aliquot von 5 μl entnommen und auf Eis inkubiert. Die spezifische Aktivität jeder hitzebehandelten Probe wurde bei 50 °C mit 10 mM Glucose wie beschrieben bestimmt. Bei den Messungen wurde jeweils zwischen 0,1 und 1,5 μg Protein verwendet.

4.6.2 Aktivitätsmessungen der Fructose-1,6-bisphosphat Aldolase

Fructose-1,6-bisphosphat (FBP) Aldolasen katalysieren die Spaltung von FBP in Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP) und Dihydroxyacetonphosphat (DHAP). Die aus der Aldolasereaktion gebildeten Produkte GAP und DHAP wurden mit Hilfe von

Triosephosphatisomerase (TIM) und Glycerin-3-Phosphat Dehydrogenase (GDH) an die Oxidation von NADH gekoppelt, wobei die Abnahme von NADH bei 340 nm ($\epsilon_{340\text{nm}} = 6,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) photometrisch detektiert werden konnte. Die TIM katalysierte dabei die Umwandlung von DHAP zu GAP und die GDH katalysierte die NADH abhängige Reduktion von GAP zu Glycerin-3-phosphat und NAD^+ . Alternativ wurde GAP mit Hilfe der GAP Dehydrogenase (GAPDH) an die Reduktion von NAD^+ gekoppelt. Dabei wurde das gebildete GAP mit der GAPDH, NAD^+ und Kaliumarsenat zu 1-Arseno-3-Phosphoglycerat (AsPG) und NADH umgesetzt. Die Zunahme von NADH konnte photometrisch detektiert werden.

Reinigung und Charakterisierung der FBP Aldolase von *H. volcanii*. Die Aldolase wurde mit 6 x His-Tag exprimiert. Der Aufschluss und die Reinigung bis zur apparenten Homogenität waren identisch zur Reinigung der 1-PFK aus *H. volcanii*. Dabei eluierte das Enzym bei 100 mM Imidazol von der Ni-NTA-Säule. Die Aldolase wurde bei 42 °C in 200 μl Ansätzen mit 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5, 0,3 mM NADH, 1 M KCl, 0,75 mM MnCl_2 , 1 mM Cystein, 4,7 μl GDH, 14 U TIM und 0,1 - 20 mM FBP gemessen. Bei der Berechnung der Aktivität wurde berücksichtigt, dass die Spaltung eines Mols FBP zwei Mol NADH oxidierte. Die Aktivitäten bei verschiedenen pH-Werten und Salzkonzentrationen wurden mit 7,5 mM Fructose als Substrat bestimmt. Der Effekt zweiwertiger Kationen (Fe^{2+} , Mn^{2+} und Zn^{2+}) auf die Aldolaseaktivität wurde im diskontinuierlichen Test mit einem Volumen von 260 μl bei 42 °C getestet. Der Ansatz enthielt 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5, 1 M KCl, 1 mM des jeweiligen Kations, 1 mM Cystein, 7,5 mM FBP und gereinigtes Enzym. Während der Inkubation wurden nach 0 s, 20 s, 60 s und 90 s Aliquots mit einem Volumen von 50 μl genommen und die Reaktion mit 80 mM EDTA gestoppt. Die in den Aliquots gebildete Menge an GAP und DHAP wurde mit Hilfe der TIM und GAPDH ermittelt. Der Detektionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 200 μl enthielt jeweils das gesamte Aliquot mit gestopptem Enzymansatz, 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5, 3 mM NAD^+ , 20 mM Kaliumarsenat, 14 U TIM und 8 U GAPDH. Nach Inkubation für 30 min bei 30 °C wurde die Extinktion bei 340 nm gemessen und aus den Werten die Enzymaktivität berechnet. Dabei wurde berücksichtigt, dass die Spaltung eines Mols FBP zur Bildung von 2 Mol NADH beitrug. Die von der FBP-Aldolase katalysierte Bildung von FBP aus GAP und DHAP wurde in einem diskontinuierlichen Ansatz bei 42 °C gemessen. Der Test ($V = 260 \mu\text{l}$) enthielt 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5, 1 M KCl, 0,75 mM MnCl_2 , 1 mM Cystein, 1 mM GAP, 5 mM DHAP und gereinigtes Enzym (0,01 - 0,4 μg). Aus den Tests wurden nach je 0 min, 0,5 min, 1 min und 2 min Aliquots von 50 μl entnommen und durch Zugabe

von 80 mM EDTA gestoppt. Die Menge des restlichen GAPs wurde mittels GAPDH wie beschrieben detektiert. Dabei wurde jedoch keine TIM verwendet.

4.6.3 Aktivitätsmessungen der 6-Phosphogluconat Dehydrogenase

Dehydrogenaseaktivitäten wurde bei 42 °C in Ansätzen mit einem Volumen von 200 µl gemessen. Dabei konnte das gebildete NAD(P)H photometrisch bei 340 nm direkt gemessen und die Aktivität berechnet werden ($\epsilon_{340\text{nmNADH}} = 6,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $\epsilon_{340\text{nmNADPH}} = 6,3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

Reinigung und Charakterisierung der 6-Phosphogluconat Dehydrogenase aus *H. volcanii*. Die mit einem 6 x His-Tag fusionierte Dehydrogenase wurde exprimiert. Der Aufschluss und die Reinigung bis zur apparenten Homogenität waren identisch zur Reinigung der 1-PFK aus *H. volcanii*. Dabei eluierte das Enzym bei 100 mM Imidazol von der Ni-NTA-Säule. Der Testansatz zur Aktivitätsbestimmung der 6-Phosphogluconat Dehydrogenase enthielt 0,1 M Tris-HCl, pH 9,0, 1 M KCl, 1 mM NAD(P)⁺, 6-Phosphogluconat und 1,18 - 60 µg gereinigtes Enzym. Die enzymkinetischen Parameter für 6-Phosphogluconat wurden unter Verwendung von 1 mM NADP⁺ bzw. NAD⁺ mit 0,0125 - 10 mM 6-Phosphogluconat als Substrat bestimmt. Zur K_m-Messung von NADP⁺ wurden 5 mM 6-Phosphogluconat und 0,2 - 5 mM NADP⁺ eingesetzt, die Bestimmung des K_m-Werts für NAD⁺ wurde mit 7,5 mM 6-Phosphogluconat und 0,01 - 3 mM NAD⁺ durchgeführt. Zur Messung der spezifischen Aktivität bei verschiedenen Salzkonzentrationen und pH-Werten wurden in jedem Ansatz 1 mM NAD⁺ und 5 mM 6-Phosphogluconat verwendet. Die Inhibition durch NADH wurde in einer analogen Weise mit 1,5 mM 6-Phosphogluconat unter Anwesenheit verschiedener Konzentrationen NADH (0 - 0,5 mM) gemessen. Dabei wurde die Absorption bei 365 nm gemessen ($\epsilon_{365\text{nmNADH}} = 3,4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

4.7 Native Reinigung der G6P Dehydrogenase aus *H. volcanii*

Zur Reinigung der Glucose-6-phosphat (G6P) Dehydrogenase aus Rohextrakt wurde *H. volcanii* H26 in 9,6 l Synthetikmedium (4.3.1) mit 40 mM Acetat als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle gezogen und in der logarithmischen Phase geerntet. Die Zellen wurden mir freundlicherweise von Tom Kuprat zur Verfügung gestellt. Das Zellpellet wurden in 15 ml Auftragspuffer (0,1 M Tris-HCl, 2 M (NH₄)₂SO₄, pH 8,0) resuspendiert und in mittels French-Press (4.6) aufgeschlossen. Nach Ultrazentrifugation (4.6) wurde der Proteinrohextrakt auf eine mit Auftragspuffer äquilibrierte HiLoadTM 26/10 Phenyl Sepharosesäule (GE Healthcare, Freiburg) aufgetragen. Die Säule wurde dann mit 50 ml

Auftragspuffer gewaschen, um nicht gebundenes Protein zu entfernen. Die Elution erfolgte mit Hilfe einer abnehmenden $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Konzentration bei einer Flussgeschwindigkeit von 2,5 ml/min. Das Enzym eluierte bei einer $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Konzentration von 800 mM. Die Fraktion mit der höchsten spezifischen Aktivität wurde mittels Ultrafiltration auf 800 μl eingengt. Dafür wurde eine 10 ml Ultrafiltrationszelle (Amicon, Beverly, USA) und ein Filter mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa (Sartorius, Göttingen) verwendet. Nach der Ultrafiltration wurde der Überstand für 10 min bei 4 °C und maximaler Umdrehungszahl in einer Eppendorf Kühlzentrifuge (Centrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels Gelfiltration identisch zur 1-PFK aufgetrennt. Die drei Fraktionen mit der höchsten spezifischen Aktivität wurden vereint und mit Auftragspuffer (0,1 M Tris-HCl, 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 8,0) auf 20 ml aufgefüllt und auf eine mit Auftragspuffer äquilibrierte HiTrap™ Butyl HP Butyl Sepharose Säule (GE Healthcare, Freiburg) aufgetragen. Die Säule wurde dann mit 10 ml Auftragspuffer gewaschen, um nicht gebundenes Protein von der Säule zu entfernen. Die Elution erfolgte bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min für 20 ml mit abnehmender $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Konzentration. Das Protein eluierte bei einer $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Konzentration von 550 mM. Zur Kontrolle wurde das Enzym mittels SDS-PAGE (4.5.2) analysiert. Der Testansatz ($V = 200 \mu\text{l}$) zur Aktivitätsbestimmung der Glucose-6-phosphat Dehydrogenase aus *H. volcanii* enthielt 100 mM Tris-HCl, pH 7,0, 2,3 M KCl, 1 mM NAD^+ , 1,25 – 40 mM Glucose-6-phosphat und 0,07 – 0,30 μg Enzym. Zu Bestimmung des K_m -Werts für NAD^+ wurden 30 mM Glucose-6-phosphat und 0,1 – 3,0 mM NAD^+ verwendet.

4.8 Bestimmung von Aktivitäten in Zellextrakten von *H. volcanii*

Zur Bestimmung der 1-PFK und FBA aus dem Zellextrakt wurde *H. volcanii* in Minimalmedium (4.3.1) mit 25 mM Glucose bzw. Fructose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle bis zu einer OD_{600} von etwa 1,2 gezogen. Die Zellen wurden bei 10000 x g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert, das Pellet wurde in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 2 M KCl resuspendiert und durch Ultraschall (4.6) aufgeschlossen. Nach Zentrifugation bei 10000 x g für 30 min bei 4 °C wurde der Überstand abgenommen und die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt (4.5.1). Die Messung der Kinaseaktivität im Rohextrakt wurde identisch zur Aktivitätsbestimmung von 1-PFK (4.6.1) mit 5 mM Fructose-1-phosphat durchgeführt. Die Aldolaseaktivität wurde mit 12,5 mM Fructose-1,6-bisphosphat identisch zur Messung der FBA mit dem GDH/TIM-Test bestimmt (4.6.2).

5 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden Untersuchungen zum Fructose- und Glucoseabbau und zur Biosynthese von Pentosephosphaten in halophilen Archaea durchgeführt. Insbesondere wurden der Transport und Abbau von Fructose, sowie ein Schlüsselenzym des semiphosphorylierten Entner-Doudoroff (ED) Wegs und Enzyme des oxidativen Teils des Pentosephosphatwegs im halophilen Euryarchaeon *Haloferax volcanii* untersucht.

1. Zur Untersuchung der Fructoseaufnahme in *H. volcanii* wurde die Regulation von Genen analysiert, die für ein putatives bakterielles Phosphotransferase Systems (PTS) codieren. Das für die Membrankomponente EIIC codierende Gen *ptfC* wurde chromosomal deletiert und das Wachstum der Deletionsmutante auf Fructose wurde untersucht. Zur Studie des weiteren Abbaus zu Triosephosphaten wurde die Regulation der Gene *pfkB* und *fba*, die für die putative 1-Phosphofruktokinase (1-PFK) bzw. Fructose-1,6-bisphosphat Aldolase (FBA) codieren, untersucht. Zudem wurden mit *pfkB* bzw. *fba* Deletionsmutanten Wachstumsversuche durchgeführt und die rekombinanten Enzyme 1-PFK und FBA homolog exprimiert, gereinigt und charakterisiert. Außerdem wurde die Rolle von *fba* in der Gluconeogenese analysiert.
2. Ein Schlüsselenzym des putativen semiphosphorylierten ED-Wegs zum Glucoseabbau, die 2-Keto-3-desoxygluconat (KDG) Kinase (KDGK), wurde identifiziert und charakterisiert. Im Genom von *H. volcanii* sind zwei putative KDGKs annotiert, KDGK-1 (codiert von HVO_0549, *kdgK1*) und KDGK-2 (codiert von HVO_A0328, *kdgK2*). Zur Identifizierung der physiologisch relevanten KDGK beim Abbau von Glucose wurden Transkriptionsanalysen, Charakterisierungen der rekombinanten Enzyme und Wachstumsanalysen von Deletionsmutanten durchgeführt.
3. Die Enzyme des oxidativen Teils des Pentosephosphatwegs wurden untersucht: Eine annotierte ROK Kinase (codiert von HVO_0403, *glcK*) wurde homolog in *H. volcanii* exprimiert, gereinigt und charakterisiert. Zum Vergleich wurde eine weitere rekombinante archaeelle ROK Kinase aus dem hyperthermophilen Crenarchaeon *Desulfurococcus kamchatkensis* charakterisiert. Eine neuartige Glucose-6-phosphat Dehydrogenase konnte gereinigt und identifiziert werden. Zudem wurde die annotierte 6-Phosphogluconat Dehydrogenase (codiert von HVO_1830, *gndA*) homolog exprimiert und charakterisiert.

5.1 Enzyme des Fructose Transports und Abbaus in *H. volcanii*

Im Genom von *H. volcanii* ist ein putatives fructosespezifisches Phosphoenolpyruvat (PEP) abhängiges Phosphotransferase System (PTS) annotiert (Anderson et al., 2011). Die Gene *ptfB*, *ptsI*, *ptsHI*, *ptfA* und *ptfC* (*ptf* steht für Phosphotransferase System für Fructose) mit den Gennummern HVO_1495 – HVO_1499 codieren für die Homologen der fünf bakteriellen PTS Komponenten EIIB, EI, HPr, EIIA und EIIC. In direkter Nachbarschaft befinden sich Gene, die für eine putative Fructose-1-phosphat Kinase (1-PFK, codiert von HVO_1500, *pfkB*) und eine putative Fructose-1,6-bisphosphat Aldolase (FBA, codiert von HVO_1494, *fba*) codieren (Abbildung 3).

Um zu prüfen, ob die Komponenten des Phosphotransferase Systems sowie die putativen 1-PFK und FBA funktionell am Fructosetransport und -abbau beteiligt sind, wurden Transkriptionsanalysen, Wachstumsversuche mit Deletionsmutanten sowie biochemische Charakterisierungen durchgeführt. Dazu wurde die spezifische Transkription von *ptfC*, *pfkB* und *fba* auf Fructose untersucht und es wurden Deletionsmutanten generiert ($\Delta ptfC$, $\Delta pfkB$ und Δfba), deren Wachstum in Minimalmedium mit Fructose als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle getestet wurde. *pfkB* und *fba* wurden homolog in *H. volcanii* exprimiert, gereinigt und charakterisiert.

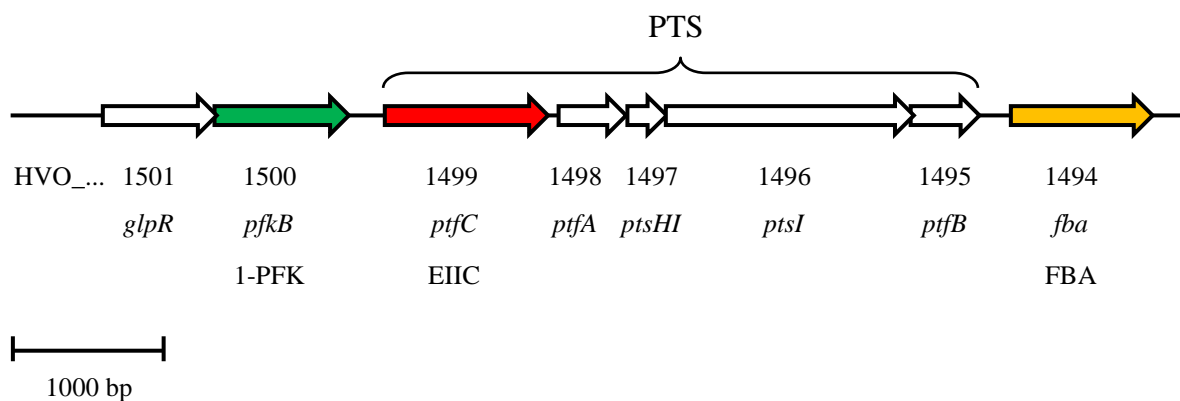


Abbildung 3 Schematische Darstellung der genomischen Region mit putativen Genen für ein fructosespezifisches PTS, 1-PFK und FBA aus *H. volcanii*. Offene Leserahmen sind als Pfeile dargestellt. Das putative PTS besteht aus den fünf Komponenten *ptfC* (roter Pfeil), *ptfA*, *ptsHI*, *ptsI* und *ptfB* (HVO_1499 – HVO_1495), welche für die Proteine EIIC, EIIA, HPr, EI und EIIB codieren. Dieser Bereich ist flankiert von den Genen *pfkB* (HVO_1500, grüner Pfeil) und *fba* (HVO_1494, gelber Pfeil), welche für die putativen Enzyme 1-Phosphofruktokinase (1-PFK) und Fructose-1,6-bisphosphat Aldolase (FBA) codieren. *glpR* (HVO_1501) codiert für einen Transkriptionsregulator (Rawls et al., 2010).

5.1.1 Wachstum von *H. volcanii* auf Fructose

Das Wachstum von *H. volcanii* H26 wurde in Minimalmedium mit 15 mM Fructose bzw. Glucose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle bestimmt. Die Zellen wuchsen auf Fructose mit einer Verdopplungszeit von etwa 4 h bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm von ca. 1,5. Dabei wurde die Fructose vollständig verbraucht (Abbildung 4 A). Mit Glucose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle wuchsen die Zellen mit einer Verdopplungszeit von etwa 7 h bis zu einer optischen Dichte von 2,0, wobei auch hier das Substrat vollständig verbraucht wurde (Abbildung 4 B).

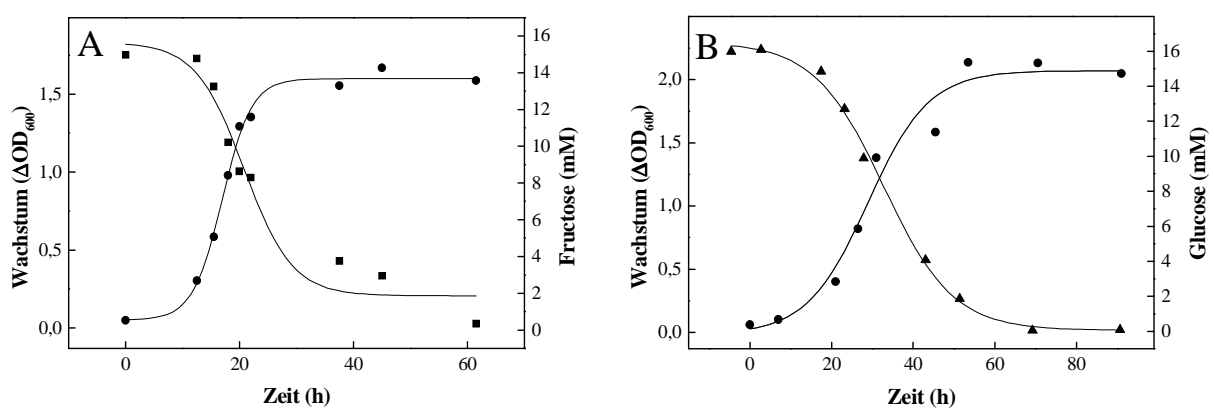


Abbildung 4 Wachstum von *H. volcanii* auf Fructose und Glucose. Die Zellen wuchsen in Minimalmedium mit 15 mM Fructose (A) bzw. Glucose (B) als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle. Das Wachstum (●) und der Verbrauch von Fructose (■) bzw. Glucose (▲) über die Zeit wurden gemessen. Die Vorkulturen wuchsen in Minimalmedium mit 15 mM Fructose (A) bzw. Glucose (B). Das Wachstum wurde über die Messung der optischen Dichte bei 600 nm (ΔOD_{600}) bestimmt.

5.1.2 Transkriptionsanalyse und Deletion der PTS Transmembrankomponente EIIC

Um eine Beteiligung des Phosphotransferase Systems am Transport von Fructose zu untersuchen, wurde die Transkription des Transmembranproteins EIIC (codiert von *ptfC*, Abbildung 3) mittels RT-PCR und Northern-Blot untersucht. Dafür wurde RNA aus exponentiell Glucose bzw. Fructose gewachsenen Zellen isoliert. Über RT-PCR Experimente konnte ein *ptfC* spezifisches Amplifikat in RNA aus Fructose gewachsenen Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 5). Dagegen konnte in RNA aus Glucose gewachsenen Zellen kein Produkt amplifiziert werden, was für eine fructosespezifische Induktion von *ptfC* spricht.

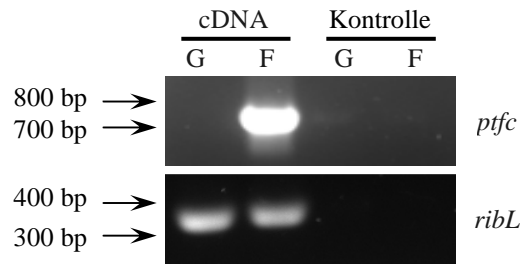


Abbildung 5 Transkriptionsanalyse von *ptfC* aus *H. volcanii* nach Wachstum auf Glucose bzw. Fructose mittels RT-PCR. RNA aus Zellen, die auf Glucose (G) oder Fructose (F) gewachsen waren, wurden mit DNase verdaut und mit reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die cDNA Proben wurden für PCRs mit spezifischen Primern für *ptfC* verwendet. Zur Normierung wurde das konstitutiv exprimierte ribosomale Protein *ribL* (Brenneis et al., 2007) verwendet. Um Verunreinigung mit genomischer DNA auszuschließen, wurde DNase verdaute RNA ohne RT-Schritt verwendet. Die Pfeile stehen für ausgewählte Banden des DNA-Größenstandards.

Die Anordnung der fünf PTS Komponenten (Abbildung 3) könnte darauf hindeuten, dass diese als Operon cotranskribiert werden. Um dies zu prüfen wurde RNA, aus Zellen die auf Glucose bzw. Fructose gewachsen waren, im Northern Blot mit Hilfe einer spezifischen Sonde gegen *ptfC* untersucht (Abbildung 6). Auch hier konnte in RNA aus Zellen, die auf Glucose gewachsen waren, kein Transkript nachgewiesen werden.

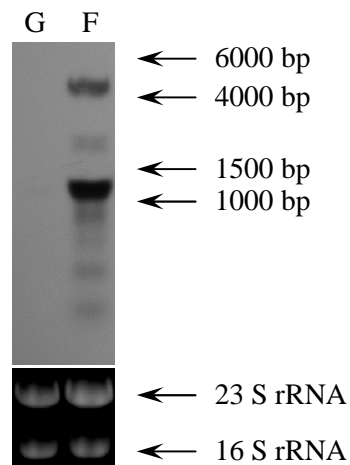


Abbildung 6 Transkriptionsanalyse von *ptfC* aus *H. volcanii* nach Wachstum auf Glucose bzw. Fructose mittels Northern-Blot. Dargestellt ist ein Northern-Blot mit RNA aus Zellen, die auf Glucose (G) oder Fructose (F) als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle gewachsen waren. Die Transkripte wurden mit einer spezifischen Sonde für *ptfC* nachgewiesen. Die Pfeile stehen für ausgewählte Banden des verwendeten Größenstandards. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung des Gels wurde die 16S und 23S rRNA mittels Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht.

Die Bande bei etwa 4100 bp zeigt, dass das gesamte PTS als Operon - bestehend aus HVO_1495 bis HVO_1499 - mit einer erwarteten Größe von 4079 bp cotranskribiert wird. Eine weitere Bande bei etwa 1100 bp zeigt, dass *ptfC* auch als Einzeltranskript vorliegt. Die Daten aus den RT-PCR Messungen und dem Northern-Blot deuten auf eine Beteiligung von EIIC (*ptfC*) im Fructoseabbau von *H. volcanii* hin.

Um eine funktionelle Beteiligung zu prüfen, wurde mit Hilfe der sogenannten pop-in/pop-out-Strategie (Allers et al., 2004; Bitan-Banin et al., 2003) *ptfC* chromosomal deletiert ($\Delta ptfC$). Die erfolgreiche Deletion von etwa 1000 bp konnte mittels Southern-Blot bestätigt werden (Abbildung 7).

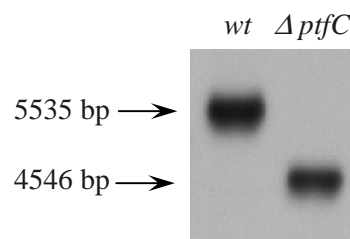


Abbildung 7 Southern-Blot zur Überprüfung der Gendeletion von *ptfC* aus *H. volcanii*. DNA aus dem Wildtyp (*wt*) und aus der Deletionsmutante ($\Delta ptfC$) wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRV* und *PciI* verdaut und mittels Southern Blot analysiert. Dabei wurde eine Sonde, die spezifisch für den unmittelbaren 5'-upstream Bereich von *ptfC* war, eingesetzt. Die Zahlen neben den Pfeilen geben die Größen der detektierten Banden an, wobei der Unterschied in der Bandenhöhe die Größe des deletierten Bereichs wiedergibt.

Das Wachstum der Deletionsmutante wurde auf Fructose und Glucose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle getestet. Dabei konnte kein Wachstum auf Fructose gezeigt werden (Abbildung 8), wogegen das Wachstum auf Glucose im Vergleich zum Wildtyp nicht beeinflusst war (nicht gezeigt). Eine *in-trans* Komplementation der Deletionsmutante mit *ptfC* führte zu einer Wiederherstellung des Wachstums (Abbildung 8).

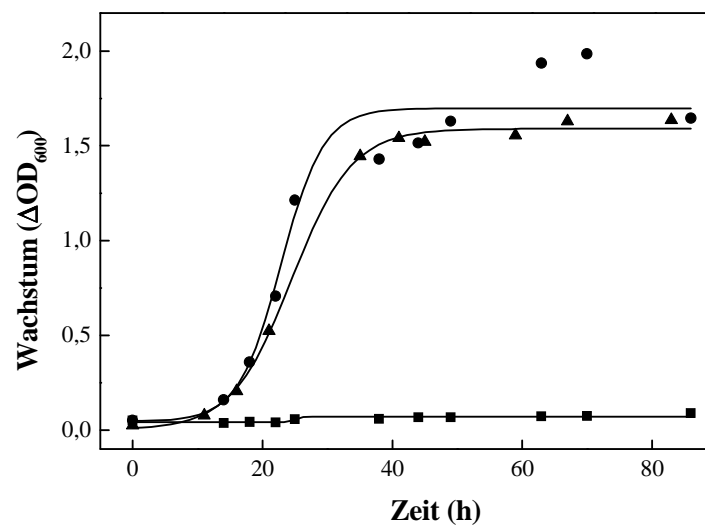


Abbildung 8 Wachstum von *H. volcanii* $\Delta ptfC$ auf 25 mM Fructose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle. Dargestellt ist das Wachstum der *ptfC* Deletionsmutante (■) im Vergleich zum Wildtyp (●) und des mit *ptfC* komplementierten $\Delta ptfC$ -Stamms (▲). Die Vorkulturen wurden in Deletionsmedium mit 1 % Casamminosäuren gezogen. Die Messung des Wachstums erfolgte durch die Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm (ΔOD_{600}).

Die Ergebnisse aus den Transkriptionsanalysen und Wachstumsmessungen mit der *ptfC* Deletionsmutante weisen darauf hin, dass EIIC als Cotranskript mit den anderen PTS-Komponenten fructosespezifisch transkribiert wird und dass *ptfC* funktionell am Fructosetransport in *H. volcanii* beteiligt ist. Damit konnte erstmals in der Domäne der Archaea die funktionelle Beteiligung eines PTS am Zuckertransport gezeigt werden.

5.1.3 Transkriptionsanalyse, Deletion und Charakterisierung von 1-PFK

Das *pfkB* Gen codiert für eine putative 1-Phosphofruktokinase (1-PFK, HVO_1500) und liegt stromaufwärts neben dem PTS (Abbildung 3). Dessen Beteiligung am Abbau von Fructose wurde mit Transkriptionsanalysen und Wachstumsversuchen mit der *pfkB* Deletionsmutante untersucht. Zur biochemischen Charakterisierung wurde das Enzym homolog exprimiert und gereinigt.

Transkriptionsanalysen von *pfkB* und Charakterisierung der *pfkB* Deletionsmutante.

In der Northern-Blot Analyse konnte in RNA aus Fructose gewachsenen Zellen ein *pfkB*-spezifisches Transkript von etwa 1800 bp nachgewiesen werden. Dieses Signal konnte bei Glucose gewachsenen Zellen nur sehr schwach detektiert werden, was für eine fructosespezifische Induktion der 1-PFK spricht (Abbildung 9). Die Transkriptlänge spricht für eine Cotranskription mit *glpR*, einem putativen Transkriptionsregulator. Die gemeinsame Expression von *glpR* und *pfkB* wurde bereits in einer anderen Arbeit mittels RT-PCR Analysen gezeigt (Rawls et al., 2010).

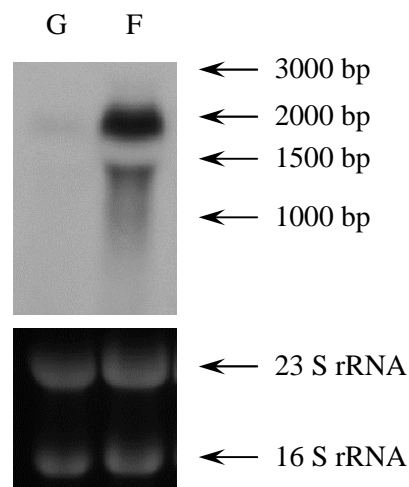


Abbildung 9 Transkriptionsanalyse von *pfkB* aus *H. volcanii* nach Wachstum auf Glucose bzw. Fructose mittels Northern-Blot. Dargestellt ist ein Northern-Blot mit RNA aus Zellen, die auf Glucose (G) oder Fructose (F) als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle gewachsen waren. Die Transkripte wurden mit einer spezifischen Sonde für *pfkB* nachgewiesen. Die Pfeile stehen für ausgewählte Banden des verwendeten Größenstandards. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung des Gels wurde die 16S und 23S rRNA mittels Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht.

Zur Bestätigung der fructosespezifischen Induktion wurde in Zellextrakten von Fructose bzw. Glucose gewachsenen Zellen 1-PFK Aktivität gemessen. Im Extrakt von Fructose gewachsenen Zellen konnte mit 0,1 U/mg eine dreifach höhere 1-PFK Aktivität festgestellt werden als im Extrakt von Glucose gewachsenen Zellen, in dem 0,031 U/mg gemessen wurden. Diese Ergebnisse sprechen für eine Beteiligung von *pfkB* beim Fructoseabbau von *H. volcanii*. Um eine funktionelle Beteiligung zu überprüfen, wurde eine *pfkB* Deletionsmutante generiert. Dabei wurden etwa 800 bp deletiert, was mittels Southern-Blot bestätigt werden konnte (Abbildung 10).

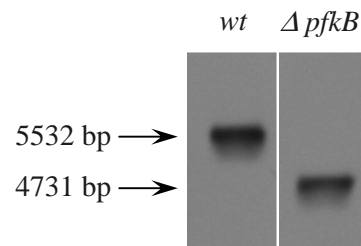


Abbildung 10 Southern-Blot zur Überprüfung der Gendeletion von *pfkB* aus *H. volcanii*. DNA aus dem Wildtyp (*wt*) und aus der Deletionsmutante ($\Delta pfkB$) wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRV* und *PciI* verdaut und mittels Southern Blot analysiert. Dabei wurde eine Sonde, die spezifisch für den unmittelbaren 3'-downstream Bereich von *pfkB* war, eingesetzt. Die Zahlen neben den Pfeilen geben die Größen der detektierten Banden an, wobei der Unterschied in der Bandenhöhe die Größe des deletierten Bereichs wiedergibt.

Die *pfkB* Deletionsmutante zeigte in Medium mit Fructose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle kein signifikantes Wachstum (Abbildung 11), wogegen das Wachstum mit Glucose im Vergleich zum Wildtyp nicht eingeschränkt war (nicht gezeigt). Die mit *pfkB* *in-trans* komplementierte Deletionsmutante konnte auf Fructose wieder wie der Wildtyp wachsen (Abbildung 11).

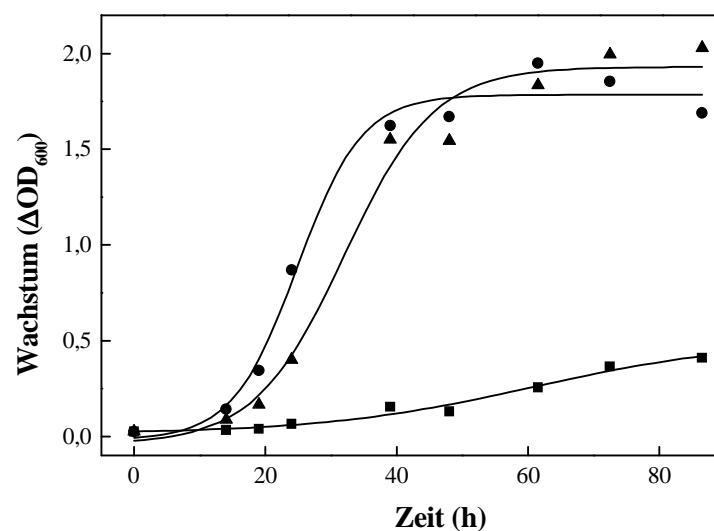


Abbildung 11 Wachstumsversuche der *H. volcanii* *pfkB* Mutante auf 25 mM Fructose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle. Dargestellt ist das Wachstum der *pfkB* Deletionsmutante (■) im Vergleich zum Wildtyp (●) und des mit *pfkB* komplementierten $\Delta pfkB$ -Stamms (▲). Die Vorkulturen wurden in Medium mit 1 % Casaminosäuren gezogen. Die Messung des Wachstums über die Zeit erfolgte durch die Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm (ΔOD_{600}).

Die Ergebnisse sprechen dafür, dass *pfkB* für ein funktionelles Gen im Fructosestoffwechsel von *H. volcanii* codiert. Die enzymatische Aktivität der 1-PFK wurde bislang jedoch nicht nachgewiesen. Dafür wurde das rekombinante Enzym gereinigt und charakterisiert.

Expression, Reinigung und biochemische Charakterisierung der rekombinanten 1-PFK. Das Gen *pfkB* (HVO_1500), das für die putative 1-PFK codiert, wurde so in den Vektor pTA963 kloniert, dass es als 6 x His Fusionsprotein exprimiert wurde. Die mit Tryptophan induzierte Expression erfolgte in *H. volcanii* H1209 (Allers et al., 2010). Das exprimierte Protein wurde über Affinitätschromatographie und Gelfiltration bis zur apparenten Homogenität gereinigt (Abbildung 12).

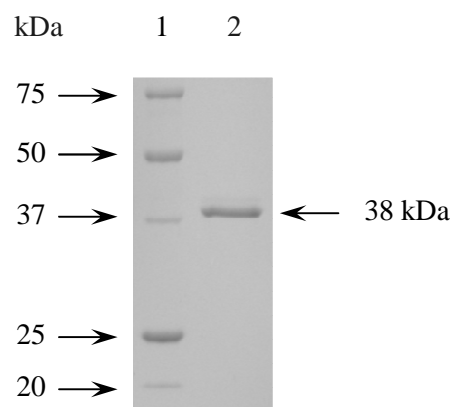


Abbildung 12 Gereinigte rekombinante 1-PFK aus *H. volcanii*. Coomassie Brilliantblau gefärbtes SDS-PAGE Gel mit gereinigter 1-PFK. Die Pfeile auf der linken Seite deuten auf die Banden der Markerproteine, der Pfeil rechts auf die gereinigte Bande der 1-PFK. Spur 1: Molekulargewichtstandard; Spur 2: nach Superdex Gelfiltration.

Das apparente Molekulargewicht der 1-PFK Untereinheit in der SDS-PAGE wurde mit 38 kDa bestimmt (Abbildung 12). Für das native Protein wurde durch Gelfiltration ein Molekulargewicht von 70 kDa ermittelt, was auf eine homodimere Struktur (α_2) hinweist.

Das Enzym katalysierte die ATP-abhängige Phosphorylierung von Fructose-1-phosphat (F1P) zu Fructose-1,6-bisphosphat (FBP) und ADP mit einem apparenten V_{\max} -Wert von 308 U/mg und mit apparenten K_m -Werten von 0,31 mM für F1P (Abbildung 13 A) und 0,08 mM für ATP. Das Enzym setzte Fructose-6-phosphat (F6P) mit apparenten K_m - und V_{\max} -Werten von 1,12 mM und 31 U/mg um (Abbildung 13 B). Die katalytische Effizienz (k_{cat}/K_m) war damit für F1P mit $604 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ etwa 36-fach höher als für F6P ($17 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass F1P das physiologische Substrat der 1-PFK ist. Die

Aktivität war bei einem pH-Wert von 8,0 am höchsten und konnte durch die Zugabe von KCl bis zu einer Konzentration von 1 M gesteigert werden. Höhere Salzkonzentrationen inhibierten die Enzymaktivität.

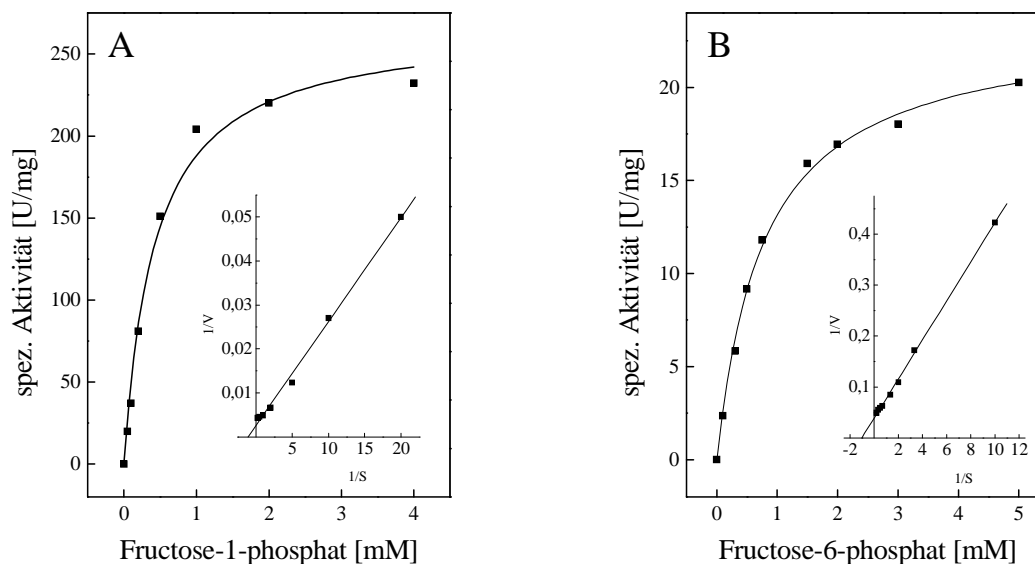


Abbildung 13 Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der 1-PFK aus *H. volcanii* von unterschiedlichen Substratkonzentrationen bei 42 °C. Dargestellt ist die Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Fructose-1-phosphat- (A) und Fructose-6-phosphat- (B) Konzentration. Die doppelt reziproken Aufträge nach Lineweaver-Burk sind in den Einschüben dargestellt.

Tabelle 6 Molekulare und kinetische Eigenschaften der rekombinanten 1-Phosphofruktokinase aus *H. volcanii*. Die Bestimmung der kinetischen Konstanten erfolgte bei 42 °C.

Apparentes Molekulargewicht des Enzyms (kDa)		70
Apparentes Molekulargewicht der Untereinheit (kDa)		38
Kalkuliertes Molekulargewicht der Untereinheit (kDa)		33
Oligomere Struktur		α_2
optimale KCl-Konzentration (M)		1
pH Optimum		8
Apparenter V_{\max} (U/mg)	F1P	308
	F6P	31
Apparenter K_m (mM)	F1P	0,31
	F6P	1,12
	ATP (mit F1P)	0,08
k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1}\text{mM}^{-1}$)	F1P	604
	F6P	17

Die Transkriptionsanalysen, Wachstumsversuche mit der Deletionsmutante und biochemische Charakterisierung weisen darauf hin, dass *pfkB* für die funktionelle 1-PFK im Fructosestoffwechsel von *H. volcanii* codiert, die Fructose-1-phosphat ATP-abhängig zu Fructose-1,6-bisphosphat (FBP) phosphoryliert.

5.1.4 Transkriptionsanalyse, Deletion und Charakterisierung der FBA

Das *fba* Gen (HVO_1494) codiert für eine putative FBP Aldolase (FBA) und liegt direkt stromaufwärts neben dem PTS (Abbildung 3). Es besteht aus 993 Basenpaaren und codiert für ein Protein von 330 Aminosäuren mit einem errechneten Molekulargewicht von 36 kDa. Zur Aufklärung der Funktion wurden Transkriptions- und Wachstumsversuche durchgeführt. Zudem wurde das FBA in *H. volcanii* homolog exprimiert und das gereinigte rekombinante Enzym charakterisiert.

Transkriptionsanalysen von *fba* und Charakterisierung der *fba* Mutante. In RNA aus Fructose gewachsenen Zellen konnte in der Northern-Blot Analyse ein spezifisches Transkript nachgewiesen werden, das in etwa der erwarteten Größe des *fba* Transkripts von 1000 bp entsprach. Dieses Signal war in Glucose gewachsenen Zellen nur schwach nachweisbar, was für eine spezifische Induktion des Gens auf Fructose spricht (Abbildung 14).

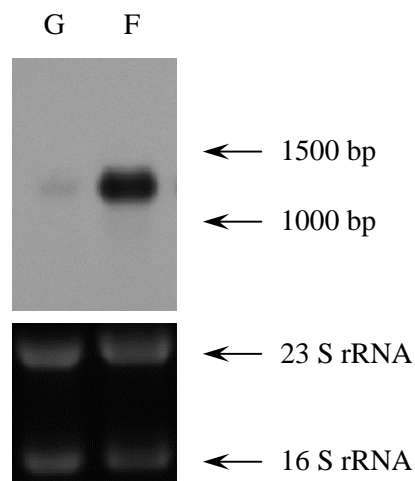


Abbildung 14 Transkriptionsanalyse von *fba* aus *H. volcanii* nach Wachstum auf Glucose bzw. Fructose mittels Northern-Blot. Dargestellt ist ein Northern-Blot mit RNA aus Zellen, die auf Glucose (G) oder Fructose (F) als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle gewachsen waren. Die Transkripte wurden mit einer spezifischen Sonde für *fba* nachgewiesen. Die Pfeile stehen für ausgewählte Banden des verwendeten Größenstandards. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung des Gels wurde die 16S und 23S rRNA mittels Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht.

Die fructosespezifische Induktion von *fba* konnte bestätigt werden, indem Zellextrakte von Fructose bzw. Glucose gewachsenen Zellen auf FBA Enzymaktivität untersucht wurden. Dabei war die FBA Aktivität im Rohextrakt aus Fructose gewachsenen Zellen im Vergleich zu Glucose gewachsenen Zellen induziert. Es wurden 0,39 U/mg im Extrakt aus Fructose- und 0,052 U/mg im Extrakt aus Glucose-gewachsenen Zellen gemessen, was einer achtfachen Induktion der Enzymaktivität entspricht.

Die Ergebnisse deuten auf eine Beteiligung von *fba* am Fructosestoffwechsel von *H. volcanii* hin. Um dies zu prüfen, wurde *fba* chromosomal deletiert und das Wachstum der Deletionsmutante auf Fructose untersucht. Bei der Mutante waren etwa 900 bp deletiert, was mittels Southern-Blot überprüft werden konnte (Abbildung 15).

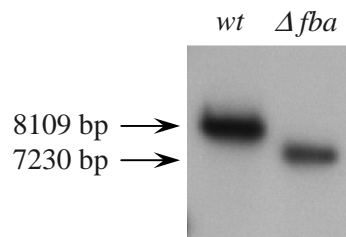


Abbildung 15 Southern-Blot zur Überprüfung der Gendeletion von *fba* aus *H. volcanii*. DNA aus dem Wildtyp (*wt*) und aus der Deletionsmutante (Δfba) wurde mit den Restriktionsenzymen *Pst*I und *Sma*I verdaut und mittels Southern Blot analysiert. Dabei wurde eine Sonde, die spezifisch für den unmittelbaren 3'-downstream Bereich von *fba* war, eingesetzt. Die Zahlen neben den Pfeilen geben die Größen der detektierten Banden an, wobei der Unterschied in der Bandenhöhe die Größe des deletierten Bereichs wiedergibt.

Die *fba* Deletionsmutante konnte im Medium mit Fructose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle nicht mehr wachsen (Abbildung 16), wogegen das Wachstum auf Glucose mit dem Wildtyp vergleichbar war (nicht gezeigt). Eine Komplementation der Deletionsmutante mit *fba* *in-trans* führte zur Wiederherstellung des Wachstums (Abbildung 16).

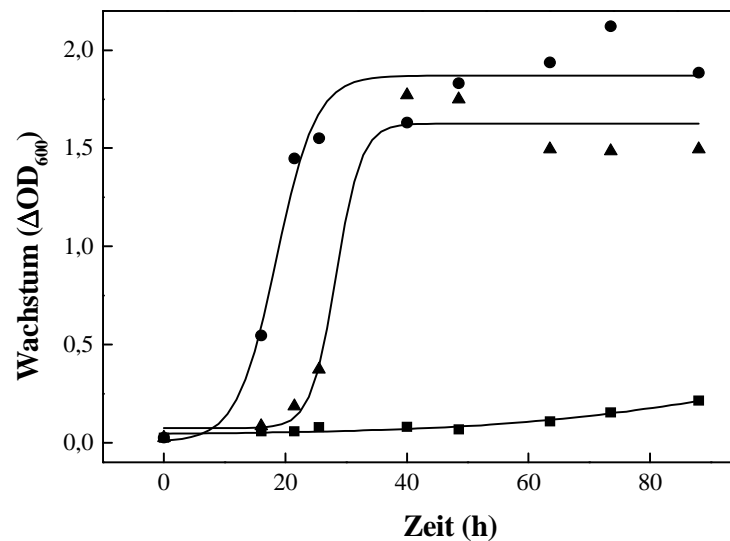


Abbildung 16 Wachstumsversuche von *H. volcanii* Δfba auf 25 mM Fructose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle. Dargestellt ist das Wachstum der *fba* Deletionsmutante (■) im Vergleich zum Wildtyp (●) und des mit *fba* komplementierten Δfba -Stamms (▲). Die Vorkulturen wuchsen auf Medium mit 25 mM Glucose. Die Messung des Wachstums über die Zeit erfolgte durch die Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm (ΔOD_{600}).

Die Ergebnisse zeigen, dass *fba* für ein funktionelles Gen im Fructosestoffwechsel von *H. volcanii* codiert. Zum Nachweis der enzymatischen Aktivität der FBA wurde das rekombinante Enzym gereinigt und charakterisiert.

Expression, Reinigung und biochemische Charakterisierung der rekombinanten FBA
fba, das für die putative FBA codiert, wurde homolog exprimiert. Die Reinigung des Enzyms bis zur apparenten Homogenität wurde mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie und Größenausschlusschromatographie durchgeführt. Dabei wurde ein apparentes natives Molekulargewicht von 80 kDa ermittelt. Mittels SDS-PAGE wurde das Molekulargewicht der Untereinheit auf etwa 42 kDa bestimmt (Abbildung 17), was auf eine homodimere Struktur (α_2) schließen lässt.

Die Aldolase katalysierte bei 42 °C die Spaltung von FBP zu Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP) und Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) mit apparenten V_{max} - und K_m -Werten von 82 U/mg und 0,18 mM (Abbildung 18). Das pH-Optimum des Enzyms lag bei einem pH-Wert von 7,5 und die Aktivität ließ sich durch Zugabe von KCl bis zu einer Konzentration von 1 M steigern. Eine weitere Erhöhung der Salzkonzentration führte wieder zu einer Verringerung der Enzymaktivität. Die Aktivität war von zweiwertigen Kationen abhängig,

wobei die höchste Aktivität mit MnCl_2 gemessen wurde (100 %), gefolgt von FeSO_4 (40 %) und ZnCl_2 (<3 %). Eine Zugabe von 2 mM EDTA konnte die Enzymrate vollständig inhibieren, eine darauf folgende Zugabe von 3 mM MnCl_2 stellte die Rate wieder her. Die Rückreaktion, das heißt die Bildung von FBP aus GAP und DHAP, wurde mit einer Rate von 20 U/mg bestimmt.

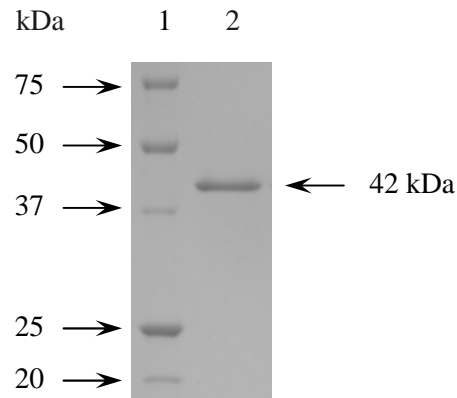


Abbildung 17 Gereinigte rekombinante FBA aus *H. volcanii*. Coomassie Brilliantblau gefärbtes SDS-PAGE Gel mit gereinigter FBA. Die Pfeile auf der linken Seite deuten auf die Banden der Markerproteine, der Pfeil rechts auf die gereinigte Bande der FBA. Spur 1: Molekulargewichtstandard; Spur 2: nach Superdex Gelfiltration.

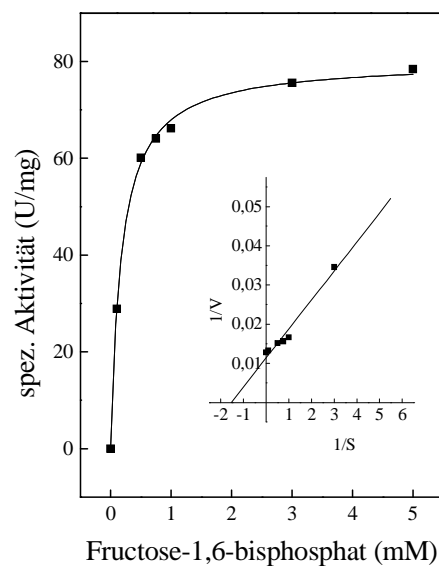


Abbildung 18 Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der FBA aus *H. volcanii* von FBP. Dargestellt ist die spezifische Aktivität der FBA in Abhängigkeit von der Fructose-1,6-bisphosphat-Konzentration. Zur Bestimmung der kinetischen Parameter wurde die doppelt reziproke Auftragung nach Lineweaver-Burk verwendet, die im Einschub dargestellt ist.

Tabelle 7 Molekulare und kinetische Eigenschaften der rekombinanten Fructose-1,6-bisphosphat Aldolase aus *H. volcanii*. Die Bestimmung der kinetischen Konstanten erfolgte bei 42 °C.

Apparentes Molekulargewicht des Enzyms (kDa)		80
Apparentes Molekulargewicht der Untereinheit (kDa)		42
Kalkuliertes Molekulargewicht der Untereinheit (kDa)		37
Oligomere Struktur		α_2
optimale KCl-Konzentration (M)		1
pH Optimum		7,5
Apparenter V_{\max} (U/mg)	FBP \rightarrow GAP + DHAP	82
	GAP + DHAP \rightarrow FBP	20
Apparenter K_m (mM)	FBP \rightarrow GAP + DHAP	0,18
Aktivität (%)	Mn^{2+}	100
	Fe^{2+}	40
	Zn^{2+}	<3

Die Daten aus den Transkriptionsmessungen, Wachstumsversuchen und der biochemischen Charakterisierung deuten darauf hin, dass *fba* für die funktionelle Class II FBA im Fructosestoffwechsel von *H. volcanii* codiert.

5.1.5 Funktion der FBA aus *H. volcanii* in der Gluconeogenese

Um zu untersuchen, ob die reversible FBA auch eine funktionelle Rolle bei der Gluconeogenese von *H. volcanii* spielt, wurde das Wachstum der *fba* Deletionsmutante auf Acetat, D-Xylose oder Casaminosäuren als jeweils einziger Kohlenstoff- und Energiequelle untersucht. Im Gegensatz zum Wildtyp wuchs diese auf keinem der drei Substrate (Abbildung 19). Durch *in-trans* Komplementation der Mutante mit *fba* konnte das Wachstum jeweils wieder hergestellt werden (Abbildung 19).

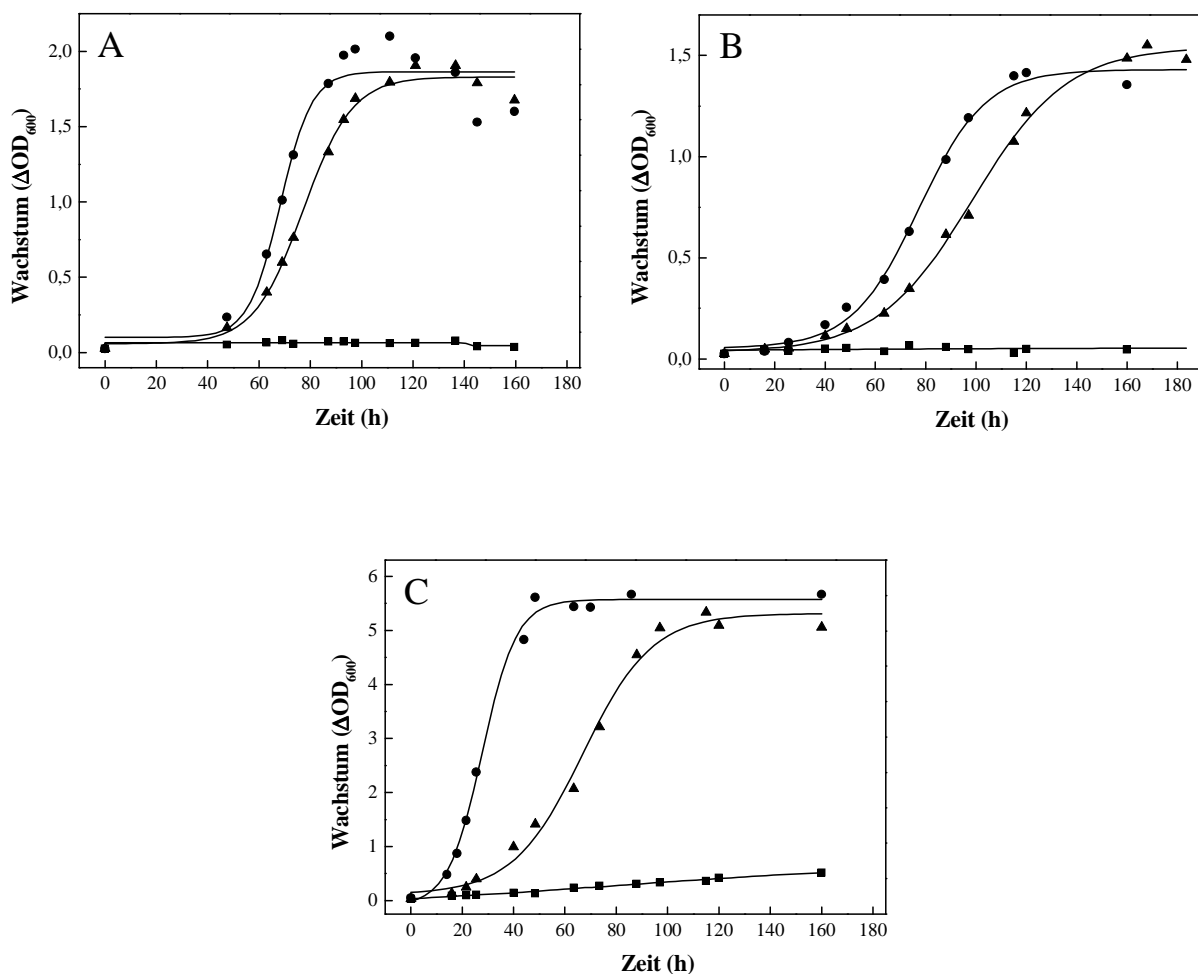


Abbildung 19 Wachstumsversuche von *H. volcanii* *Afba* auf Xylose, Acetat und Casaminosäuren. Die Zellen wuchsen in Minimalmedium mit (A) Xylose, (B) Acetat (je 25 mM) oder (C) 1 % Casaminosäuren. Mit jedem Substrat wurde das Wachstum des Wildtyps (●), der *fba* Mutante (■) und der *fba* Mutante mit *fba* *in-trans* (▲) untersucht. Die Vorkulturen wurden mit 25 mM Glucose gezüchtet, das Wachstum wurde durch Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm (ΔOD_{600}) über die Zeit gemessen.

Da beim Abbau von Acetat, Xylose und Casaminosäuren keine katabole Aldolaseaktivität beteiligt ist (Johnsen et al., 2009), deutet der negative Wachstumsphänotyp der *fba* Mutante auf diesen Substraten darauf hin, dass FBA unter diesen Bedingungen an der Gluconeogenese beteiligt ist.

Die Transkriptionsmessungen von *ptfC*, *pfkB* und *fba*, die Wachstumsversuche mit den Δ *ptfC*, Δ *pfkB* und Δ *fba* Stämmen sowie die biochemischen Charakterisierungen von 1-PFK und FBA lassen folgende Schlüsse zu:

1. Fructose wird in *H. volcanii* durch ein induzierbares bakterielles PEP abhängiges PTS in die Zelle aufgenommen und zu Fructose-1-phosphat phosphoryliert.
2. Die mit Fructose induzierten Enzyme 1-PFK und FBA katalysieren die Phosphorylierung von Fructose-1-phosphat zu Fructose-1,6-bisphosphat und dessen Spaltung zu Triosephosphaten.
3. FBA ist eine reversible Aldolase, der im Katabolismus von Fructose und in der Gluconeogenese bei Wachstum auf Acetat, Xylose und Casaminosäuren eine essentielle Bedeutung zukommt.

5.2 KDG Kinasen in *H. volcanii*

In Haloarchaea wird ein semiphosphorylierter ED-Weg für den Glucoseabbau zu Pyruvat postuliert (Johnsen et al., 2001; Tomlinson et al., 1974). Das Schlüsselenzym dieses Abbauweges ist die 2-Keto-3-desoxygluconat- (KDG) Kinase (KDGK), welche die ATP abhängige Umsetzung von KDG zu 2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat (KDPG) katalysiert. Im Genom von *H. volcanii* sind zwei putative KDG Kinasen annotiert, *kdgK1* (HVO_0549, codiert für KDGK-1) und *kdgK2* (HVO_A0328 codiert für KDGK-2), wobei *kdgK2* in genomischer Nähe zu putativen Enzymen des Galactosestoffwechsels liegt (Anderson et al., 2011). Die Rolle der beiden putativen KDG Kinasen im Glucose- und Galactosestoffwechsel wurde in dieser Arbeit genauer untersucht. Dazu wurden Transkriptionsanalysen durchgeführt und die beiden rekombinanten Kinasen wurden nach homologer Expression und Reinigung charakterisiert. Außerdem wurde das Wachstum verschiedener *kdgK* Deletionsmutanten auf Glucose und Galactose untersucht.

5.2.1 Transkriptionsanalysen von *kdgK1* und *kdgK2*

Die transkriptionelle Regulation der Kinasen wurde in RT-PCR- und qRT-PCR-Messungen mit Hilfe von Primern, die spezifisch für *kdgK1* bzw. *kdgK2* waren, analysiert. Dabei wurde RNA aus Glucose oder Galactose gewachsenen Zellen verwendet.

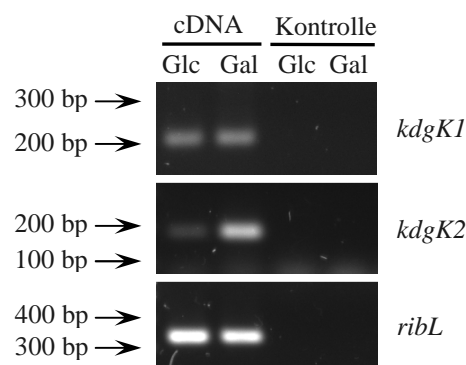


Abbildung 20 Transkriptionsanalyse von *kdgK1* und *kdgK2* aus *H. volcanii* nach Wachstum auf Glucose bzw. Galactose mittels RT-PCR. RNA aus Zellen, die auf Glucose (Glc) oder Galactose (Gal) gewachsen waren, wurden mit DNase verdaut und mit reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die cDNA Proben wurden für PCRs mit spezifischen Primern für *kdgK1* bzw. *kdgK2* verwendet. Zur Normierung wurde das konstitutiv exprimierte ribosomale Transkript *ribL* (Brenneis et al., 2007) verwendet. Um Verunreinigung mit genomischer DNA auszuschließen, wurde DNase verdaute RNA ohne RT-Schritt als Kontrolle verwendet. Die Pfeile stehen für ausgewählte Banden des DNA-Größenstandards.

RT-PCR Analysen ergaben, dass *kdgK1* auf beiden Zuckern konstitutiv exprimiert wird, wogegen die Expression von *kdgK2* auf Galactose im Vergleich zu Glucose stark induziert war (Abbildung 20). qRT-PCR Experimente zeigten, dass die Expression von *kdgK2* in Galactose gewachsenen Zellen im Vergleich zu Glucose gewachsenen Zellen etwa 35-fach induziert war. Somit lag in Zellen, die auf Glucose gewachsen waren nur ca. 3 % des *kdgK2* Transkripts von Galactose gewachsenen Zellen vor.

5.2.2 Expression, Reinigung und Charakterisierung von KDGK-1 und KDGK-2

Zur biochemischen Charakterisierung der putativen KDG Kinasen wurden *kdgK1* und *kdgK2* homolog exprimiert. Die Reinigung der rekombinanten Enzyme erfolgte über Ni-NTA-Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie.

KDGK-1. Die SDS-PAGE ergab eine Bande bei 48 kDa (Abbildung 21 A), was etwa 40 % über dem errechneten Molekulargewicht der Untereinheit (35 kDa) lag. Auch für andere halophile Proteine wurde dieser Effekt schon beobachtet (Bonete et al., 1996). Dabei spielt wahrscheinlich der erhöhte Anteil saurer Aminosäuren in halophilen Proteinen eine Rolle. Dieser erschwert die Anlagerung von SDS, was zu einer vergleichsweise niedrigeren Gesamtladung des Proteins führt. Das Protein wurde daher zusätzlich in der Cetyltrimethylammoniumbromid- (CTAB) PAGE untersucht, in der an Stelle des anionischen SDS das kationische CTAB eingesetzt wird. Diese Methode eignet sich zur Ermittlung des Molekulargewichts saurer Proteine wesentlich besser (Williams und Gratzner, 1971). Unter Verwendung der CTAB-PAGE konnte eine Bande bei etwa 35 kDa detektiert werden, was dem errechneten Molekulargewicht entspricht (Abbildung 21 B).

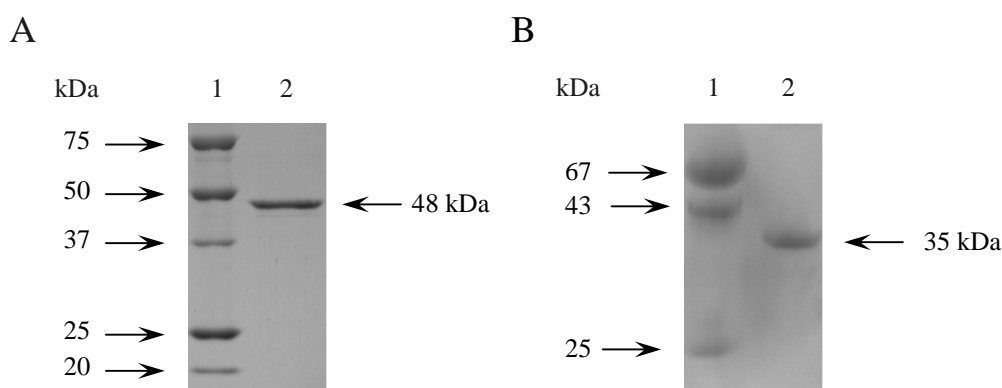


Abbildung 21 Reinigung der rekombinanten KDGK-1 aus *H. volcanii*. Dargestellt ist die gereinigte KDGK-1 nach Auftrennung in der SDS- (A) und CTAB-PAGE (B) und Färbung mit Coomassie Brilliantblau. Spur 1: Molekulargewichtstandard; Spur 2: KDGK-1 nach Gelfiltration.

Das apparente Molekulargewicht des nativen Enzyms wurde mittels Gelfiltration auf 196 ± 12 kDa bestimmt, was für eine homoheexamere Form (α_6) des Enzyms unter nativen Bedingungen spricht. Das Enzym katalysierte die ATP-abhängige Umsetzung von KDG zu KDPG, wobei die Abhängigkeit der Enzymrate von der Substratkonzentration einer Michaelis-Menten Kinetik folgte. Für KDG wurden apparente K_m - und V_{max} -Werte von 0,54 mM und 78 U/mg ermittelt (Abbildung 22 A), für ATP wurde ein apparenter K_m -Wert von 0,36 mM bestimmt. Das Enzym konnte neben KDG auch 2-Keto-3-desoxygalactonat (KDGal) phosphorylieren, wobei ein apparenter K_m -Wert von 0,73 mM und ein V_{max} -Wert von 33 U/mg gemessen wurden (Abbildung 22 B). Aus diesen Werten ließ sich die katalytische Effizienz der KDGK-1 für KDG und KDGal als Substrate berechnen (Tabelle 8). Die katalytische Effizienz für KDG ($84 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$) war im Vergleich zu KDGal ($26 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$) etwa dreimal so hoch. Für das Enzym wurde ein pH-Optimum zwischen 7,5 und 8,5 bestimmt, bei einem pH von 5,5 konnten 50 % Restaktivität gemessen werden. Alle Messungen wurden mit 10 mM MgCl_2 und 100 mM KCl durchgeführt und die Enzymrate konnte durch Zugabe von KCl nicht weiter gesteigert werden. Eine Salzkonzentration von 2,5 M KCl führte zu einer Hemmung des Enzyms von etwa 20 %.

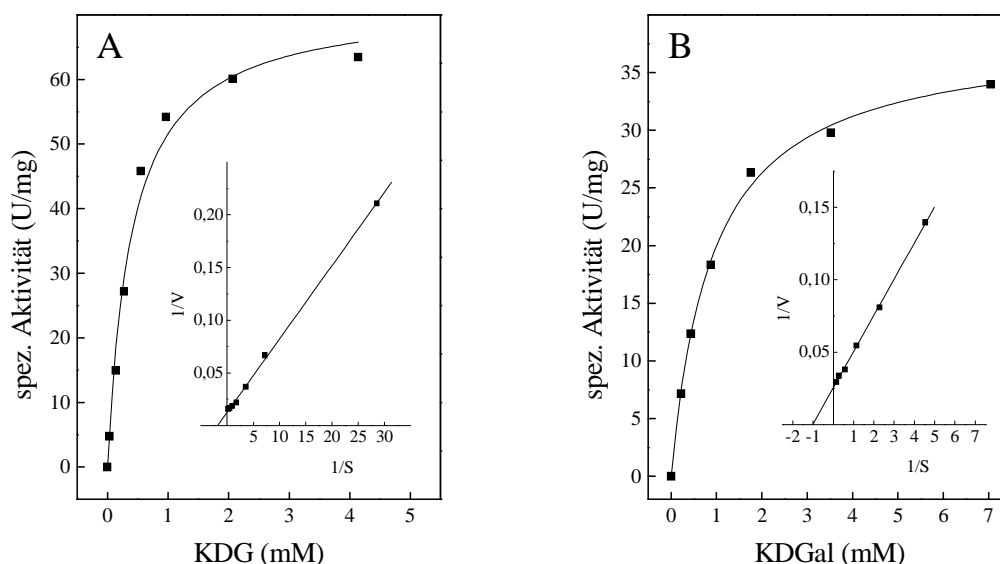


Abbildung 22 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der rekombinanten KDGK-1 aus *H. volcanii* von der Substratkonzentration bei 42 °C. Dargestellt ist die Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der KDGK-1 von der Konzentration an KDG (A) und KDGal (B). Die apparenten K_m - und V_{max} -Werte wurden mit Hilfe der doppelt reziproken Auftragungen nach Lineweaver-Burk ermittelt, die in den Einschüben dargestellt sind.

Tabelle 8 Molekulare und kinetische Eigenschaften der rekombinanten KDGGK-1 aus *H. volcanii*. Die Bestimmung der kinetischen Konstanten erfolgte bei 42 °C.

Apparentes Molekulargewicht des Enzyms (kDa)		196 ± 12
Apparentes Molekulargewicht der Untereinheit (kDa)		35
Kalkuliertes Molekulargewicht der Untereinheit (kDa)		35
Oligomere Struktur		α_6
pH Optimum		7,5 – 8,5
Apparenter V_{\max} (U/mg)	KDG	78
	KDGal	33
Apparenter K_m (mM)	KDG	0,54
	KDGal	0,73
	ATP	0,36
k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1}\text{mM}^{-1}$)	KDG	84
	KDGal	26

KDGGK-2. Das apparente Molekulargewicht der KDGGK-2 Untereinheit in der SDS- und CTAB-PAGE wurde mit 38 kDa bzw. 35 kDa bestimmt (Abbildung 23). Für das native Protein wurde durch Gelfiltration eine Größe von 194 ± 4 kDa bestimmt, woraus sich für das native Protein ein Homohexamer (α_6) schließen lässt.

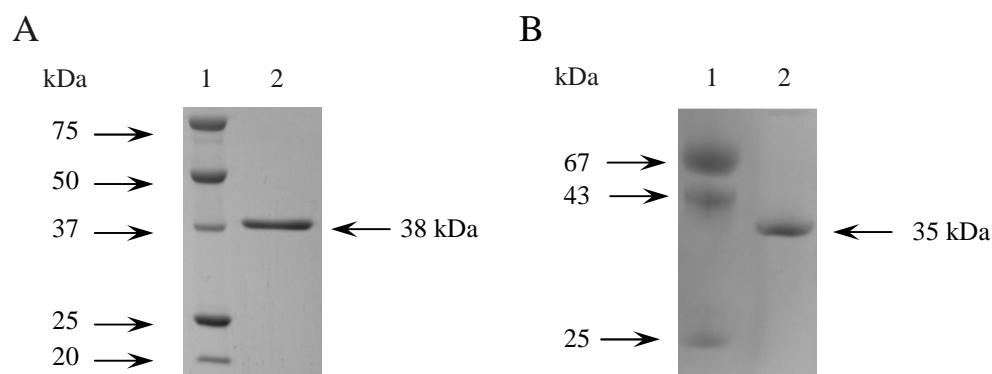


Abbildung 23 Reinigung der rekombinanten KDGGK-2 aus *H. volcanii*. Dargestellt ist die gereinigte rekombinante KDGGK-2 nach Auftrennung in der SDS- (A) und CTAB-PAGE (B) und Färbung mit Coomassie Brilliantblau. Spur 1: Molekulargewichtstandard; Spur 2: KDGGK-2 nach Gelfiltration.

Das Enzym katalysierte die ATP-abhängige Phosphorylierung von KDGal zu KDPGal. Die apparenten K_m - und V_{max} -Werte für KDGal betragen 0,20 mM und 148 U/mg (Abbildung 24 B), für ATP wurde ein apparter K_m -Wert von 0,30 mM bestimmt. Das Enzym setzte unter denselben Bedingungen KDG mit einem apparenten K_m -Wert von 8,8 mM und einem apparenten V_{max} -Wert von 125 U/mg um (Abbildung 24 A). Für KDGal wurde aus diesen Werten eine katalytische Effizienz von $432 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ berechnet, die über 50-fach höher war als die errechnete katalytische Effizienz für KDG ($8 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$). Das pH-Optimum lag zwischen pH 7,5 und 9,0 mit einer Restaktivität von 70 % bei pH 5,5. Die Enzymmessungen wurden bei 10 mM MgCl_2 und 100 mM KCl durchgeführt und die Enzymrate konnte durch Zugabe von KCl nicht weiter gesteigert werden.

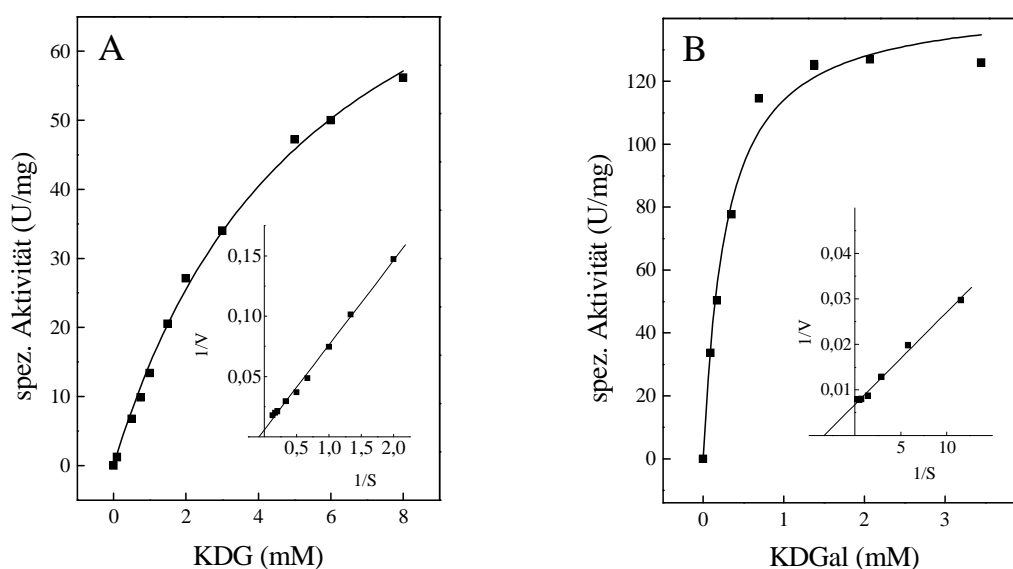


Abbildung 24 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der rekombinanten KDGK-2 aus *H. volcanii* von der Substratkonzentration bei 42 °C. Dargestellt ist die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Konzentration an KDG (A) und KDGal (B). Die apparenten K_m - und V_{max} -Werte wurden mit Hilfe der doppelt reziproken Auftragungen nach Lineweaver-Burk ermittelt, die in den Einschüben dargestellt sind.

Die kinetischen Konstanten der beiden Kinasen und die Transkriptionsanalysen zeigen, dass KDGK-1 konstitutiv exprimiert wird und dass diese KDG und KDGal mit vergleichbaren katalytischen Effizienzen phosphorylieren kann. Dagegen wird KDGK-2, die eine signifikant geringere katalytische Effizienz für KDG besitzt, durch Galactose induziert. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass KDGK-1 die funktionelle KDG Kinase im semiphosphorylierten ED-Weg von *H. volcanii* und KDGK-2 eine funktionelle KDGal

Kinase im Galactosestoffwechsel ist. Um diese Vermutung zu überprüfen wurden Deletionsmutanten generiert und deren Wachstum auf Glucose und Galactose untersucht.

Tabelle 9 Molekulare und kinetische Eigenschaften der rekombinanten KDGK-2 aus *H. volcanii*. Die Bestimmung der kinetischen Konstanten erfolgte bei 42 °C.

Apparentes Molekulargewicht des Enzyms (kDa)		194 ± 4 kDa
Apparentes Molekulargewicht der Untereinheit (kDa)		35
Kalkuliertes Molekulargewicht der Untereinheit (kDa)		35
Oligomere Struktur		α_6
pH Optimum		7,5 - 9
Apparenter V_{\max} (U/mg)	KDG	125
	KDGal	148
Apparenter K_m (mM)	KDG	8,8
	KDGal	0,20
	ATP	0,30
k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1}\text{mM}^{-1}$)	KDG	8,8
	KDGal	432

5.2.3 Herstellung von Deletionsmutanten und Wachstumsversuche

Mittels pop-in/pop-out Methode wurden Einzelmutanten mit chromosomal deletierter *kdgK1* bzw. *kdgK2* generiert. Dabei wurde jeweils ein Bereich von etwa 850 bp deletiert, was mittels Southern Blot überprüft wurde (Abbildung 25 A und B).

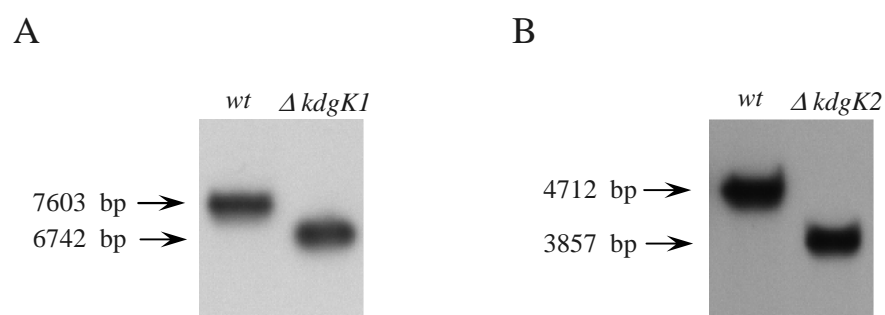


Abbildung 25 Southern-Blots zur Überprüfung von Deletionen der Gene *kdgK1* und *kdgK2* in *H. volcanii*. DNA aus dem Wildtyp (*wt*) und aus den *kdgK* Mutanten ($\Delta kdgK1$ bzw. $\Delta kdgK2$) wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRV* und *PciI* verdaut und mittels Southern Blot analysiert. Dabei wurden Sonden verwendet, die spezifisch für den unmittelbaren 5'-upstream Bereich von *kdgK1* (A), bzw. den direkten 3'-downstream Bereich von *kdgK2* (B) waren. Die Pfeile zeigen die Größe der detektierten Banden an.

Wachstumsversuche mit *kdgk1* und *kdgk2* Deletionsmutanten. Das Wachstum der *kdgK* Einzelmutanten auf Glucose und Galactose wurde im Vergleich zum Wildtyp untersucht.

***ΔkdgK1*.** Es konnte festgestellt werden, dass das Wachstum der *kdgK1* Mutante auf Glucose stark eingeschränkt war. Der Wildtyp erreichte innerhalb von 80 h eine OD_{600} von etwa 2,5, die *kdgK1* Mutante hingegen erreichte nur noch ein Wachstum bis zu einer optische Dichte von etwa 0,5 (Abbildung 26). Nach Inkubation für weitere 80 Stunden erreichte die Mutante eine OD_{600} von etwa 0,8. Nach dem Wachstum von *ΔkdgK1* auf Glucose wurde aus den Zellen genomische DNA isoliert und im Southern-Blot analysiert (nicht gezeigt). Auf diese Weise konnte ausgeschlossen werden, dass der Stamm wieder für das *kdgK1* Wildtypgen codiert. Durch Komplementation der Mutante mit *kdgK1* konnte das Wachstum wieder hergestellt werden (Abbildung 26). Auf Galactose zeigte *ΔkdgK1* im Vergleich zum Wildtyp eine unveränderte Wachstumsrate (nicht gezeigt). Die Daten deuten darauf hin, dass *kdgK1* für die funktionelle KDG Kinase im semiphosphorylierten ED-Weg von *H. volcanii* codiert.

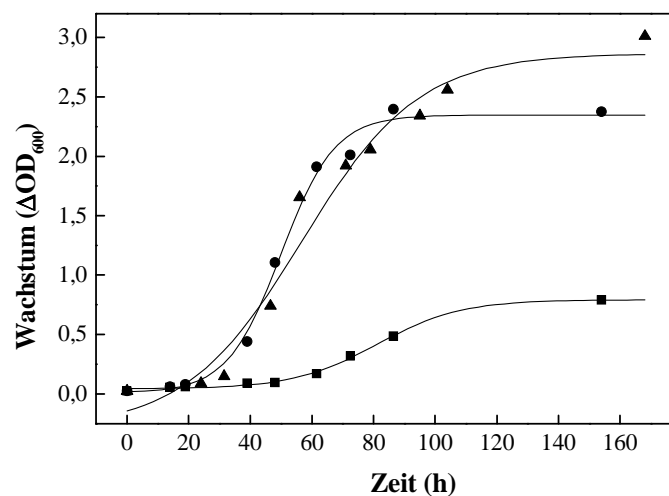


Abbildung 26 Wachstumsversuche mit *H. volcanii* *ΔkdgK1* auf 25 mM Glucose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle. Gezeigt ist das Wachstum der *kdgK1* Deletionsmutante (■) im Vergleich zum Wildtyp (●) und des mit *kdgK1* komplementierten *ΔkdgK1*-Stamms (▲). Die Vorkulturen wurden in Deletionsmedium mit 1 % Casaminsäuren gezogen. Die Messung des Wachstums über die Zeit erfolgte durch die Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm (ΔOD_{600}).

ΔkdgK2. Eine *kdgK2* Deletionsmutante wuchs auf Glucose wie der Wildtyp (nicht gezeigt). Entgegen der Erwartung war das Wachstum der *kdgK2* Mutante auf Galactose im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert (Abbildung 27).

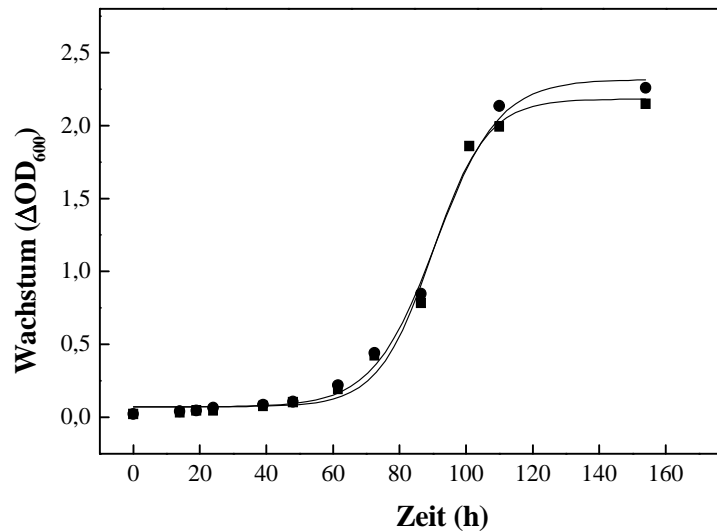


Abbildung 27 Wachstumsversuche mit *H. volcanii ΔkdgK2*. Gezeigt ist das Wachstum des Wildtyps (●) und der *kdgK2* Deletionsmutante (■) in Minimalmedium mit 25 mM Galactose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle. Die Vorkulturen wurden in Deletionsmedium mit 1 % Casaminosäuren gezogen. Die Messung des Wachstums über die Zeit erfolgte durch die Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm (ΔOD_{600}).

Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis ist, dass die konstitutiv exprimierte KDGGK-1, die auch KDGal mit hoher katalytischer Effizienz umsetzt, die in der *kdgk2* Mutante fehlende KDGal Kinaseaktivität funktionell ersetzt. Um dies zu prüfen wurde eine Doppelmutante generiert, in der neben *kdgK2* auch *kdgK1* deletiert war. Die erfolgreiche Deletion wurde mittels Southern-Blot überprüft (nicht gezeigt).

Wachstum der *kdgK1/kdgK2* Doppelmutante. Die Doppelmutante konnte nicht mehr auf Minimalmedium mit Galactose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen, was zeigt dass in der *kdgK2* Deletionsmutante tatsächlich die KDGGK-1 die KDGal Kinaseaktivität übernehmen kann (Abbildung 28). Das Wachstum ließ sich mit *kdgK2* *in-trans* wieder herstellen (Abbildung 28). Das Wachstum konnte auch durch Komplementation mit *kdgK1* wieder hergestellt werden (nicht gezeigt).

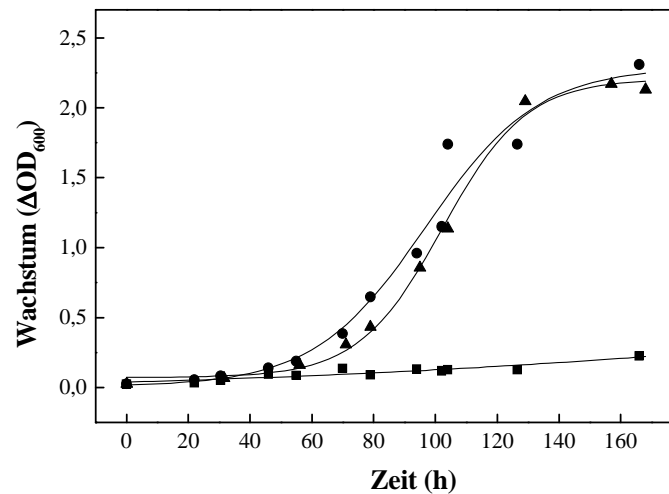


Abbildung 28 Wachstumsversuche mit *H. volcanii* *AkdgK1/AkdgK2* auf Galactose. Gezeigt ist das Wachstum der *kdgK1/kdgK2* Doppeldeletionsmutante (■) im Vergleich zum Wildtyp (●) und der mit *kdgK2* komplementierten Doppelmutante (▲) auf 25 mM Galactose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle. Die Vorkulturen wuchsen in Deletionsmedium mit 1 % Casaminsäuren. Die Messung des Wachstums über die Zeit erfolgte durch die Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm (ΔOD_{600}).

Die Transkriptionsmessungen, biochemischen Charakterisierungen und Analysen der Deletionsmutanten lassen folgende Schlussfolgerungen zu:

1. Die konstitutiv exprimierte KDGK-1 aus *H. volcanii*, die KDG und KDGal mit ähnlicher katalytischer Effizienz phosphoryliert, ist die physiologisch relevante KDG Kinase beim Wachstum auf Glucose.
2. KDGK-2 aus *H. volcanii* ist eine auf Galactose stark induzierte KDGal Kinase, die vermutlich am Abbau von Galactose beteiligt ist. KDGK-1 kann KDGK-2 bei Wachstum auf Galactose funktionell ersetzen, wenn das für KDGK-2 codierende Gen *kdgK2* deletiert wurde.

5.3 Enzyme des oxidativen Teils des Pentosephosphatwegs in *H. volcanii*

Die Enzyme des oxidativen Teils des Pentosephosphatwegs katalysieren die Oxidation von Hexosen über Glucose-6-phosphat zu Pentosephosphaten (z.B. Ribulose-5-phosphat), die unter anderem zur Bildung von Nukleotiden benötigt werden. Dieser Weg wurde in Archaea bisher kaum untersucht. In der vorliegenden Arbeit sind Enzyme aus *H. volcanii* beschrieben, die die Phosphorylierung von Glucose zu Glucose-6-phosphat, dessen Oxidation zu 6-Phosphogluconat und dessen weitere Oxidation zu Ribulose-5-phosphat katalysieren.

H. volcanii enthält ein Gen, das für eine putative Glucose phosphorylierende ROK Kinase codiert (HVO_0403, *glcK*), die rekombinant in *H. volcanii* exprimiert, gereinigt und charakterisiert wurde. Zum Vergleich wurde das homologe Enzym aus dem hyperthermophilen Crenarchaeon *Desulfurococcus kamchatkensis* in *E. coli* exprimiert, gereinigt und charakterisiert. Für die Umsetzung von Glucose-6-phosphat zu 6-Phosphogluconat ist kein Gen annotiert. Aus Rohextrakt konnte jedoch die Aktivität einer Glucose-6-phosphat Dehydrogenase gereinigt und identifiziert werden. *H. volcanii* enthält ein Gen, das für eine putative 6-Phosphogluconat Dehydrogenase codiert (HVO_1830, *gndA*). Diese wurde rekombinant in *H. volcanii* exprimiert, gereinigt und charakterisiert.

5.3.1 Charakterisierung der ROK Kinasen aus *H. volcanii* und *D. kamchatkensis*

Das Gen *glcK* (HVO_0403) aus *H. volcanii*, welches aus 969 Basenpaaren besteht, codiert für eine putative Glucose phosphorylierende ROK Kinase (ROK steht für Regulatoren, QRFs unbekannter Funktion und Kinasen) mit einer Länge von 322 Aminosäuren und einem kalkulierten Molekulargewicht von 33,5 kDa. Das homologe Enzym aus *D. kamchatkensis* (codiert von Dkam_0546) besteht aus 329 Aminosäuren mit einem berechneten Molekulargewicht von 35,5 kDa.

ROK Kinase aus *H. volcanii*. Nach homologer Expression wurde die rekombinante ROK Kinase (codiert von *glcK*) mit Hilfe von Ni-NTA Affinitätschromatographie und Gelfiltration gereinigt. Das apparente Molekulargewicht der Kinase wurde dabei mit 61 kDa bestimmt, für die Untereinheit wurden mittels SDS-PAGE 36 kDa ermittelt (Abbildung 29). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die ROK Kinase unter nativen Bedingungen ein Homodimer (α_2) bildet.

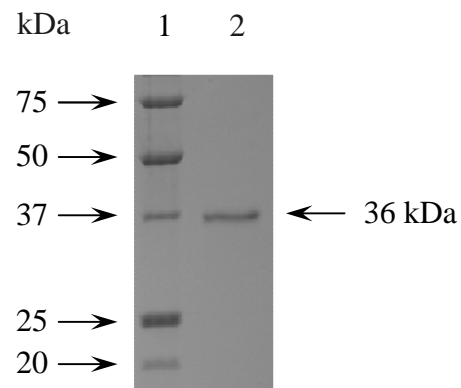


Abbildung 29 Gereinigte rekombinante ROK Kinase aus *H. volcanii*. Coomassie Brilliantblau gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel mit gereinigter ROK Kinase. Die Pfeile auf der linken Seite zeigen auf die Banden der Markerproteine, der Pfeil rechts auf die gereinigte Bande der Kinase. Spur 1: Molekulargewichtstandard; Spur 2: nach Superdex Gelfiltration.

Das Enzym katalysierte die ATP-abhängige Phosphorylierung von Glucose mit apparenten K_m - und V_{max} -Werten von 0,16 mM und 182 U/mg für Glucose (Abbildung 30) und mit einem apparenten K_m -Wert von 0,61 mM für ATP. Neben Glucose wurden auch Mannose und Glucosamin mit apparenten K_m - und V_{max} -Werten von 1,78 mM bzw. 8 mM und 44,6 U/mg bzw. 62 U/mg (Tabelle 10) umgesetzt. Die katalytische Effizienz (k_{cat}/K_m) war damit für Glucose mit $664 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ etwa 44- bzw. 148-fach höher als für Mannose bzw. Glucosamin ($15 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ bzw. $4,5 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$). Mit KDG, Xylose, Gluconat, Galactose, Fructose und 2-Deoxyglucose konnte keine Enzymaktivität gemessen werden. Anstelle von ATP konnte das Enzym die Phosphorylierung von Glucose auch unter Verwendung von Inosintri-phosphat (ITP) und Guanosintri-phosphat (GTP) mit Aktivitäten von 12 % bzw. 6 % katalysieren. Die Enzymaktivität war bei einem pH-Wert von 8,0 am höchsten. Diese konnte durch die Zugabe bis 1 M KCl gesteigert werden, wobei höhere Salzkonzentrationen die Enzymrate inhibierten.

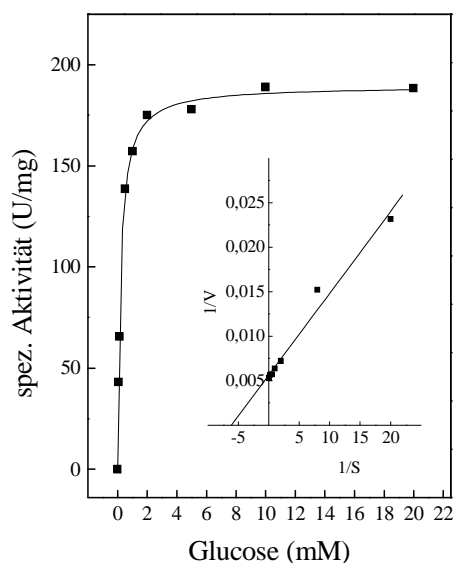


Abbildung 30 Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der ROK Kinase aus *H. volcanii* von Glucose. Dargestellt ist die spezifische Aktivität der ROK Kinase in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration. Der doppelt reziproke Auftrag nach Lineweaver-Burk ist im Einschub dargestellt.

Tabelle 10 Molekulare und kinetische Eigenschaften der ROK Kinase aus *H. volcanii*. Die Bestimmung der kinetischen Konstanten erfolgte bei 42 °C.

Apparentes Molekulargewicht des Enzyms (kDa)		61
Apparentes Molekulargewicht der Untereinheit (kDa)		36
Kalkuliertes Molekulargewicht der Untereinheit (kDa)		34,5
Oligomere Struktur		α_2
optimale KCl-Konzentration (M)		1
pH-Optimum		8,0
Apparenter V_{\max} (U/mg)	Glucose	182
	Mannose	44,6
	Glucosamin	62
Apparenter K_m (mM)	Glucose	0,16
	Mannose	1,78
	Glucosamin	8
	ATP	0,61
k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1}\text{mM}^{-1}$)	Glucose	664
	Mannose	15
	Glucosamin	4,5
Aktivität (%)	ATP	100
	ITP	12
	GTP	6

Die Messungen deuten darauf hin, dass *glcK* in *H. volcanii* für eine funktionelle ATP abhängige ROK Kinase mit hoher Spezifität für Glucose und ATP codiert. Damit unterscheidet sich diese Kinase von den anderen bisher charakterisierten archaeellen ROK Kinasen aus den hyperthermophilen Crenarchaeota *Aeropyrum pernix* und *Thermoproteus tenax* (Hansen et al., 2002a; Dörr et al., 2003), die neben Glucose auch Substrate, wie Fructose und Mannose mit vergleichbaren katalytischen Effizienzen phosphorylieren können. Um zu testen, ob das breite Substratspektrum für weitere ROK Kinasen aus hyperthermophilen Archaea gilt, wurde das Homologe aus *D. kamchatkensis* untersucht.

ROK Kinase aus *D. kamchatkensis*. Der für die ROK Kinase annotierte ORF Dkam_0546 wurde heterolog in *E. coli* exprimiert. Nach Aufschluss und Hitzefällung bei 70 °C wurde das Enzym mittels Anionenaustausch- und Größenausschlusschromatographie bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Dabei wurde das apparente Molekulargewicht des rekombinanten Enzyms unter nativen Bedingungen auf 61 kDa bestimmt. Die Analyse mittels SDS-PAGE ergab ein Molekulargewicht von 31 kDa für die Untereinheiten (Abbildung 31), was für ein Homodimer (α_2) des nativen Enzyms spricht.

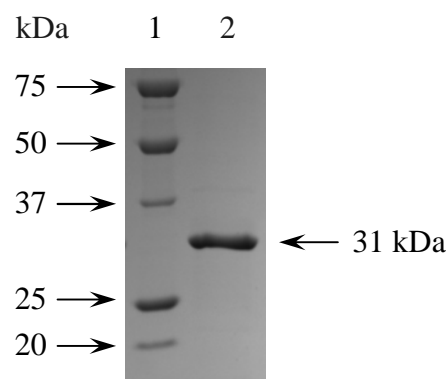


Abbildung 31 Gereinigte rekombinante ROK Kinase aus *D. kamchatkensis*. Coomassie Brilliantblau gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel mit gereinigter rekombinanter ROK Kinase. Die Pfeile auf der linken Seite zeigen auf die Banden der Markerproteine, der Pfeil rechts auf die gereinigte Bande der Kinase. Spur 1: Molekulargewichtstandard; Spur 2: nach Superdex Gelfiltration.

Das Enzym katalysierte die ATP abhängige Umsetzung von Glucose bei 80 °C mit apparenten K_m - und V_{max} -Werten von 0,44 mM und 313 U/mg für Glucose und einem apparenten K_m -Wert von 0,032 mM für ATP. Das Enzym konnte neben Glucose auch

Fructose, Mannose und 2-Deoxyglucose mit apparenten K_m - und V_{max} -Werten von 1,22 mM, 0,57 mM bzw. 1,29 mM und 323 U/mg, 94 U/mg bzw. 714 U/mg phosphorylieren. Die katalytische Effizienz für Glucose war mit $368 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ (100 %) am höchsten, gefolgt von 2-Deoxyglucose ($286 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$, 78 %), Fructose ($137 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$, 37 %) und Mannose ($85 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$, 23 %) (Tabelle 11). Dies zeigt, dass *D. kamchatkensis*, im Gegensatz zu *H. volcanii*, eine ROK Kinase mit breitem Substratspektrum für Hexosen besitzt.

Tabelle 11 Molekulare und kinetische Eigenschaften der rekombinanten ROK Kinase aus *D. kamchatkensis*. Die Bestimmung der kinetischen Konstanten erfolgte bei 80 °C.

Apparentes Molekulargewicht des Enzyms (kDa)		61
Apparentes Molekulargewicht der Untereinheit (kDa)		31
Kalkuliertes Molekulargewicht der Untereinheit (kDa)		35,5
Oligomere Struktur		α_2
pH Optimum		6,5 – 7,5
Temperaturoptimum (°C)		80
Arrhenius Aktivierungsenergie (kJ/mol)		25,6
Apparenter V_{max} (U/mg)	Glucose	313
	Fructose	323
	Mannose	94
	2-Deoxyglucose	714
Apparenter K_m (mM)	Glucose	0,44
	Fructose	1,22
	Mannose	0,57
	2-Deoxyglucose	1,29
	ATP	0,032
k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1}\text{mM}^{-1}$)	Glucose	368
	Fructose	137
	Mannose	85
	2-Deoxyglucose	286

Die Enzymaktivität war bei pH-Werten zwischen 6,5 und 7,5 am höchsten. Das apparente Temperaturoptimum wurde bei 80 °C bestimmt (Abbildung 32 A). Die Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von der Temperatur wurde nach Arrhenius dargestellt, wobei ein linearer Bereich zwischen 30 °C und 70 °C zur Bestimmung der Aktivierungsenergie verwendet wurde (Abbildung 32 B). Die Berechnungen ergaben dabei einen Wert von 25,6 kJ/mol.

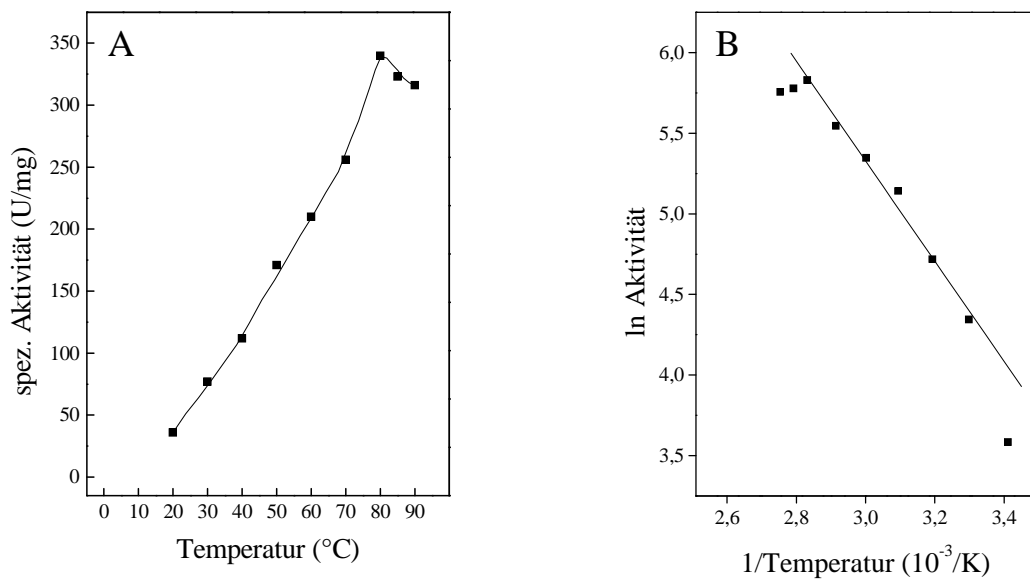


Abbildung 32 Temperaturabhängigkeit der Aktivität der ROK Kinase aus *D. kamchatkensis*. (A) Dargestellt ist die spezifische Aktivität in Abhängigkeit von der Temperatur. (B) Auftrag der Daten nach Arrhenius.

Die Stabilität der Kinase wurde bei verschiedenen Temperaturen über einen Zeitraum von zwei Stunden gemessen. Bei 65 °C blieb die Enzymaktivität über den gesamten Zeitraum erhalten (Abbildung 33). Nach zwei Stunden Inkubation des Enzyms bei 70 °C, 80 °C und 90 °C wurden noch 91 %, 80 % und 4 % Aktivität gemessen.

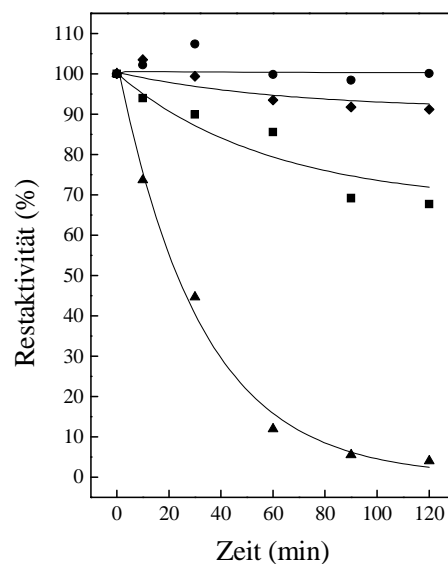


Abbildung 33 Thermostabilität der ROK Kinase aus *D. kamchatkensis*. Nach Inkubation des rekombinanten Enzyms bei 65 °C (●), 70 °C (◆), 80 °C (■) und 90 °C (▲) für 0 – 120 min wurde die spezifische Aktivität bestimmt und daraus die Restaktivität berechnet.

5.3.2 Identifikation der Glucose-6-phosphat Dehydrogenase aus *H. volcanii*

Zellextrakt von *H. volcanii* Kulturen, die auf Glucose bzw. Acetat gewachsen waren, katalysierten die Oxidation von Glucose-6-phosphat (G6P) mit NAD^+ als Elektronenakzeptor mit einer spezifischen Aktivität von etwa 0,035 U/mg. Aus Acetat gewachsenen Zellen wurde die G6P Dehydrogenase bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Dabei erfolgte die Reinigung in drei Schritten an einer Phenyl Sepharose Säule, einer Gelfiltrationssäule und einer Butyl Sepharose Säule. Das gereinigte native Enzym wies eine spezifische Aktivität von 42 U/mg auf und war 1200-fach angereichert worden. Der Anteil nativer Xylose Dehydrogenase am löslichen Protein in *H. volcanii* lag somit bei 0,083 % (Tabelle 12).

Tabelle 12 Reinigung der Glucose-6-phosphat Dehydrogenase aus *H. volcanii*. Die NAD^+ - und Glucose-6-phosphat Dehydrogenase abhängige Enzymaktivität wurde bei 42 °C gemessen.

Reinigungsschritt	Protein (mg)	Aktivität (U)	spez. Aktivität (U/mg)	Ausbeute (%)	Anreicherung (-fach)
Zellfreier Extrakt	638	22,8	0,035	100	1
Phenyl Sepharose	11,3	6,65	0,59	29	17
Superdex 200	0,1639	2,06	12	9	343
Butyl Sepharose	0,0146	0,617	42	2,7	1200

Auf dem SDS-Gel konnte eine distinkte Banden mit einem apparenten Molekulargewicht von 32 kDa identifiziert werden (Abbildung 34).

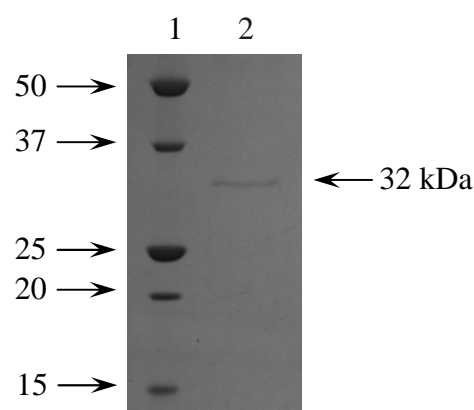


Abbildung 34 Gereinigte Glucose-6-phosphat Dehydrogenase aus *H. volcanii*. Coomassie Brilliantblau gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel mit gereinigter G6P Dehydrogenase. Die Pfeile auf der linken Seite zeigen auf die Banden der Markerproteine, der Pfeile rechts auf die gereinigte Glucose-6-phosphat Dehydrogenase. Spur 1: Molekulargewichtstandard; Spur 2: nach Butyl Sepharose.

Das apparente Molekulargewicht der nativen G6P Dehydrogenase wurde mit 55 kDa bestimmt, was für eine homodimere Form des Proteins spricht.

Die G6P Dehydrogenase wurde aus dem Gel eluiert und mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie analysiert (Prof. Michael Bott, Forschungszentrum Jülich). Dabei konnte der ORF HVO_0511 identifiziert werden, der für ein Protein mit 262 Aminosäuren und einem kalkulierten Molekulargewicht von 29 kDa codiert. Phylogenetische Analysen zeigten, dass HVO_0511 für ein Enzym aus der Familie der extended short-chain dehydrogenase/reductase (SDRe) codiert (Marchler-Bauer et al., 2011). Kürzlich wurde mit der homologen L-Arabinose Dehydrogenase aus *H. volcanii* die erste archaelle Zuckerdehydrogenase dieser Familie charakterisiert (Johnsen et al., 2013). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass HVO_0511 aus *H. volcanii* für eine bisher nicht beschriebene, neuartige G6P Dehydrogenase codiert, die sich von den weit verbreiteten bekannten Enzymen der Bacteria und Eukarya unterscheidet.

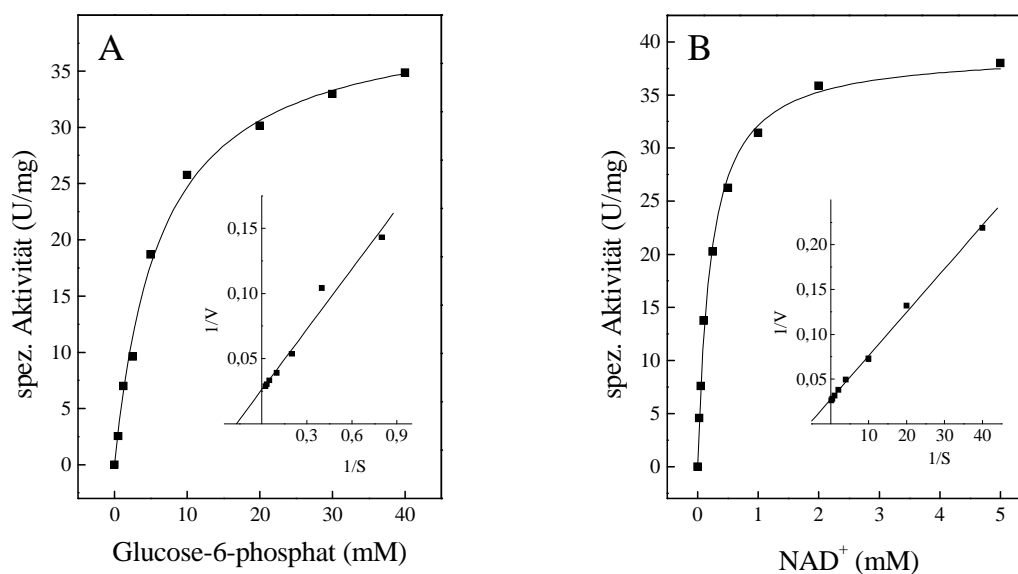


Abbildung 35 Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der Glucose-6-phosphat (G6P) Dehydrogenase aus *H. volcanii* von der Konzentration an G6P und NAD⁺. Dargestellt ist die spezifische Aktivität des Enzyms in Abhängigkeit von der Glucose-6-phosphat (A) bzw. NAD⁺ (B) -Konzentration. Zur Bestimmung der kinetischen Parameter wurden die doppelt reziproken Auftragungen nach Lineweaver-Burk verwendet, die in den Einschüben gezeigt sind.

Die gereinigte G6P Dehydrogenase katalysierte die Umsetzung von G6P mit NAD^+ . Die apparenten K_m - und V_{\max} - Werte betragen 5,4 mM und 39 U/mg (Abbildung 35 A). Für NAD^+ wurde ein apparter K_m -Wert von 0,18 mM ermittelt (Abbildung 35 B). NADP^+ diente nicht als Elektronenakzeptor und Glucose wurde nicht als Substrat verwendet. Die hier identifizierte neuartige G6P Dehydrogenase ist die erste beschriebene G6P Dehydrogenase in der Domäne der Archaea.

Tabelle 13 Molekulare und kinetische Eigenschaften der nativen Glucose-6-phosphat Dehydrogenase aus *H. volcanii*. Die Bestimmung der kinetischen Konstanten erfolgte bei 42 °C.

Apparentes Molekulargewicht des Enzyms (kDa)		55
Apparentes Molekulargewicht der Untereinheit (kDa)		32
Kalkuliertes Molekulargewicht der Untereinheit (kDa)		29
Oligomere Struktur		α_2
Apparenter V_{\max} (U/mg)	Glucose-6-phosphat	39
Apparenter K_m (mM)	Glucose-6-phosphat	5,4
	NAD^+	0,18

5.3.3 Charakterisierung der 6-Phosphogluconat Dehydrogenase aus *H. volcanii*

gndA (HVO_1830) aus *H. volcanii* codiert für eine putative 6-Phosphogluconat Dehydrogenase mit einem berechneten Molekulargewicht von 32 kDa. Das rekombinante Enzym wurde homolog exprimiert und mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie und Gelfiltration gereinigt. Dabei wurde das apparente Molekulargewicht der nativen 6-Phosphogluconat Dehydrogenase auf 143 kDa bestimmt. Das Molekulargewicht der Untereinheiten wurde mit SDS-PAGE auf 37 kDa bestimmt (Abbildung 36) was auf ein Homotetramer (α_4) des nativen Enzyms schließen lässt.

Das rekombinante Enzym katalysierte die Oxidation von 6-Phosphogluconat unter Reduktion von NAD^+ mit einem apparenten V_{\max} -Wert von 10,6 U/mg und apparenten K_m -Werten von 0,021 mM für 6-Phosphogluconat und 0,033 mM für NAD^+ (Abbildung 37 A und B). Das Enzym katalysierte die Oxidation von 6-Phosphogluconat auch mit NADP^+ mit apparenten K_m - und V_{\max} -Werten für NADP^+ von 2,94 mM und 0,42 U/mg (Abbildung 37 C). Damit war die katalytische Effizienz des Enzyms mit NAD^+ ($174 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$) etwa 2000 fach höher als mit NADP^+ ($0,082 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$) (Tabelle 14). Diese Ergebnisse zeigen, dass *gndA* für eine 6-Phosphogluconat Dehydrogenase codiert, die hochspezifisch für NAD^+ ist. Die Rate des Enzyms konnte durch Zugabe bis 1 M KCl gesteigert werden, wobei die Zugabe höherer Salzkonzentrationen die Aktivität des Enzyms verminderte.

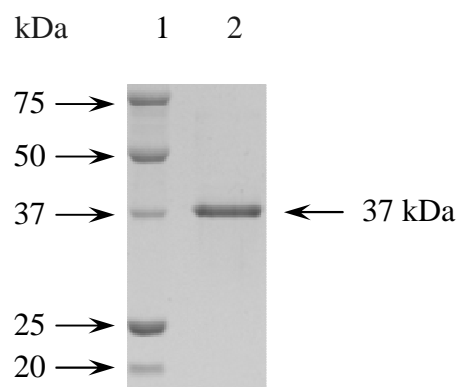


Abbildung 36 Gereinigte rekombinante 6-Phosphogluconat Dehydrogenase aus *H. volcanii*. Coomassie Brilliantblau gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel mit gereinigter 6-Phosphogluconat Dehydrogenase. Die Pfeile auf der linken Seite zeigen auf die Banden der Markerproteine, der Pfeil rechts auf die gereinigte Bande der FBA. Spur 1: Molekulargewichtstandard; Spur 2: nach Superdex Gelfiltration.

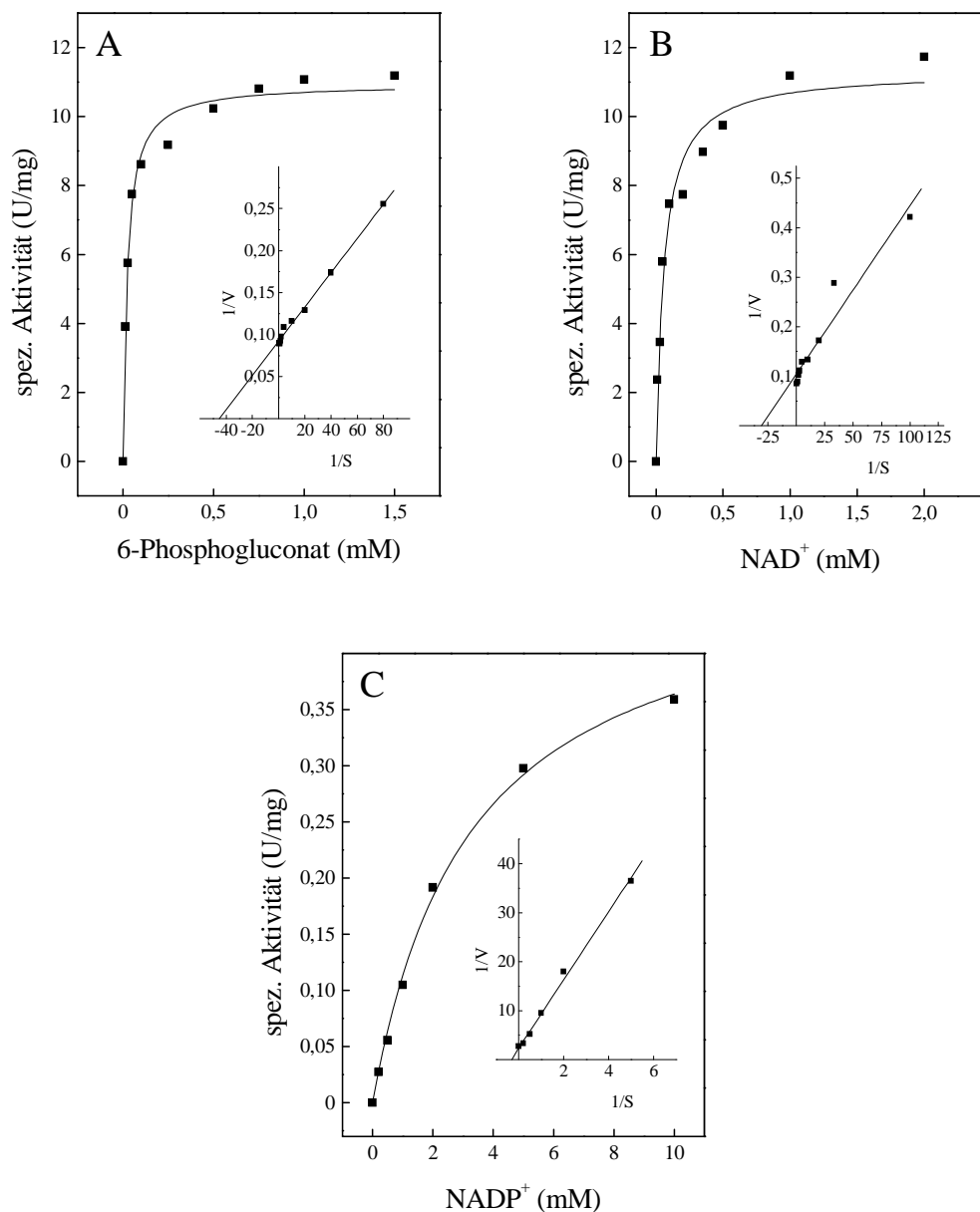


Abbildung 37 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der rekombinanten 6-Phosphogluconat Dehydrogenase aus *H. volcanii* von der Konzentration an 6-Phosphogluconat, NAD⁺ und NADP⁺ bei 42 °C. Dargestellt sind die Kurven für (A) 6-Phosphogluconat, (B) NAD⁺ und (C) NADP⁺. Die Einschübe zeigen jeweils die doppelt reziproken Auftragungen nach Lineweaver-Burk.

Tabelle 14 Molekulare und kinetische Eigenschaften der rekombinanten 6-Phosphogluconat Dehydrogenase aus *H. volcanii*. Die Bestimmung der kinetischen Konstanten erfolgte bei 42 °C.

Apparentes Molekulargewicht des Enzyms (kDa)		143
Apparentes Molekulargewicht der Untereinheit (kDa)		37
Kalkuliertes Molekulargewicht der Untereinheit (kDa)		33
Oligomere Struktur		α_4
optimale KCl-Konzentration (M)		1,0
Apparenter V_{\max} (U/mg)	6-Phosphogluconat mit NAD^+	10,6
	NAD^+	10
	NADP^+	0,42
Apparenter K_m (mM)	6-Phosphogluconat mit NAD^+	0,021
	NAD^+	0,033
	NADP^+	2,94
k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1}\text{mM}^{-1}$)	NAD^+	174
	NADP^+	0,082

Die Enzymmessungen zeigen, dass *H. volcanii* alle Enzyme des oxidativen Teils des Pentosephosphatwegs besitzt, die zur Bildung von Ribulose-5-phosphat aus Glucose nötig sind. Dabei lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

1. *H. volcanii* enthält ein Gen, das für eine ROK Kinase codiert, die mit hoher Spezifität Glucose zu Glucose-6-phosphat umwandelt. Dieses Enzym besitzt eine hohe Substratspezifität und unterscheidet sich damit von der dieser Arbeit charakterisierten ROK Kinasen aus *D. kamchatkensis* und weiteren beschriebenen archaellen ROK Kinasen, die alle ein breites Substratspektrum für Hexosen aufweisen.
2. *H. volcanii* enthält eine neuartige Glucose-6-phosphat Dehydrogenase, die Glucose-6-phosphat NAD^+ abhängig zu 6-Phosphogluconat oxidiert.
3. Die Oxidation von 6-Phosphogluconat zu Ribulose-5-phosphat wird in *H. volcanii* von der NAD^+ abhängigen 6-Phosphogluconat Dehydrogenase katalysiert.

6 Diskussion

Bisherige Studien weisen darauf hin, dass halophile Archaea Fructose über einen modifizierten Embden-Meyerhof- (EM) Weg und Glucose über einen semiphosphorylierten Entner-Doudoroff- (ED) Weg abbauen. Die Enzyme und codierende Gene für den Transport und Abbau von Fructose wurden bisher aber nicht identifiziert. Es wurde bisher auch keine funktionelle halophile 2-Keto-3-desoxygluconat (KDG) Kinase, das Schlüsselenzym des semiphosphorylierten ED-Wegs, charakterisiert. Auch Enzyme des oxidativen Teils des Pentosephosphatwegs, die Glucose-6-phosphat zu Pentosephosphaten (z.B. Ribulose-5-phosphat) umwandeln, wurden bisher in Archaea kaum untersucht.

Zum besseren Verständnis des Fructosetransports, des Abbaus von Fructose und Glucose sowie des oxidativen Teils des Pentosephosphatwegs in halophilen Archaea wurden in der vorliegenden Arbeit folgende Untersuchungen mit dem halophilen Modellorganismus *H. volcanii* durchgeführt, deren Ergebnisse in diesem Kapitel diskutiert werden:

1. Die Beteiligung eines fructosespezifischen PEP abhängigen Phosphotransferase Systems (PTS) beim Transport von Fructose wurde gezeigt. Weiterhin wurde die Beteiligung der Enzyme 1-Phosphofruktokinase (1-PFK) und Fructose-1,6-bisphosphat Aldolase (FBA) am Abbau von Fructose nachgewiesen und die Bedeutung der FBA in der Gluconeogenese gezeigt.
2. Die zwei annotierten KDG Kinasen, KDGK-1 und KDGK-2 wurden charakterisiert und deren Rolle im Glucose- bzw. Galactosestoffwechsel wurde analysiert.
3. Enzyme des oxidativen Teils des Pentosephosphatwegs wurden untersucht. Dafür wurden die ROK Kinase und die 6-Phosphogluconat Dehydrogenase charakterisiert. Zur besseren Einordnung der halophilen ROK Kinase wurde auch das homologe Enzym aus dem Crenarchaeon *Desulfurococcus kamchatkensis* charakterisiert. Ferner konnte eine neuartige Glucose-6-phosphat (G6P) Dehydrogenase aus *H. volcanii* identifiziert werden.

6.1 Enzyme des Fructosetransports und Abbaus in *H. volcanii*

Ausgehend von Genominformationen wurden Gene und Enzyme aus *H. volcanii*, denen beim Transport und beim Abbau von Fructose zu Triosephosphaten eine essentielle Bedeutung zukommt, identifiziert. Dazu wurden Studien mit dem vollständig sequenzierten Genom von *H. volcanii* (Hartman et al., 2010), Transkriptionsanalysen, Wachstumsversuche mit Deletionsmutanten und Enzymcharakterisierungen durchgeführt. Die Daten deuten darauf hin, dass Fructose über ein bakterielles fructosespezifisches PEP abhängiges Phosphotransferase System (PTS) in die Zelle aufgenommen und dabei zu Fructose-1-phosphat (F1P) umgewandelt wird, welches anschließend von der 1-Phosphofruktokinase (1-PFK) zu Fructose-1,6-bisphosphat (FBP) umgesetzt wird. Die Spaltung von FBP zu Triosephosphaten wird von einer bakteriellen Class II FBP Aldolase (FBA) katalysiert (Abbildung 38).

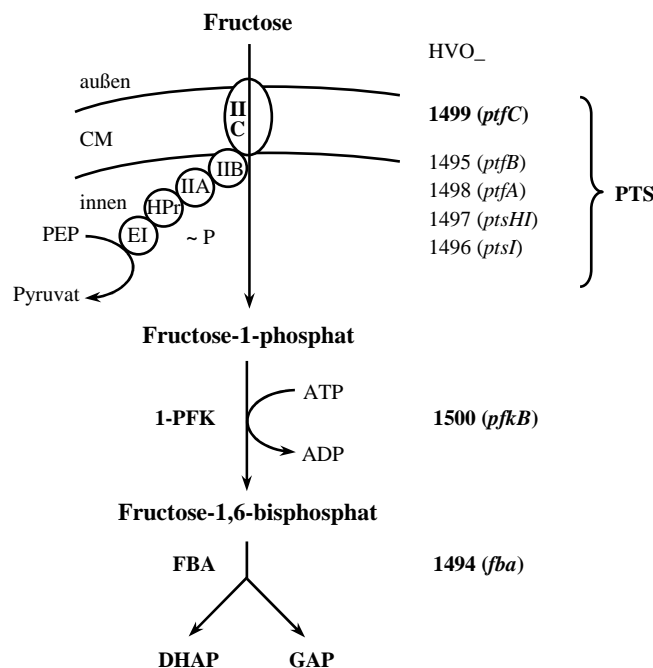


Abbildung 38 Vorgeschlagener Weg des Fructosetransports und Abbaus zu Triosephosphaten in *H. volcanii*. Der Transport von Fructose und die Phosphorylierung zu Fructose-1-phosphat durch ein PTS mit den Komponenten EI, HPr, EIIA, EIIB und EIIC (annotiert als *ptsI*, *ptsHI*, *ptfA*, *ptfB* und *ptfC*; *ptf* steht für Phosphotransferase System für Fructose) ist schematisch dargestellt. ~P zeigt die Phosphorylgruppe, die von PEP auf Fructose übertragen wird, die transiente Phosphorylierung von PTS-Komponenten ist nicht gezeigt. Fructose-1-phosphat wird von der 1-Phosphofruktokinase (1-PFK, codiert von HVO_1500, *pfkB*) zu Fructose-1,6-bisphosphat phosphoryliert, welches von der Fructose-1,6-bisphosphat Aldolase (FBA, codiert von HVO_1494, *fba*) zu Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP) und Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) gespalten wird. Proteine und Gene, deren funktionelle Beteiligung beim Transport und Abbau von Fructose gezeigt wurden, sind dick gedruckt. CM steht für Cytoplasmamembran.

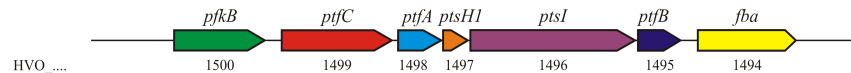
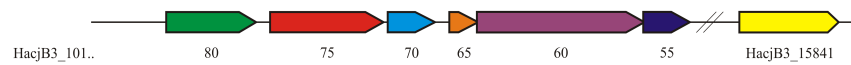
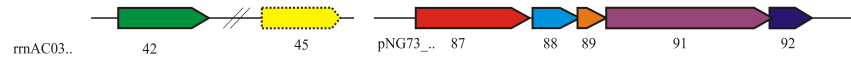
6.1.1 Bakteriellles PTS aus *H. volcanii*

Im Genom von *H. volcanii* findet sich ein Gencluster, der für alle fünf Komponenten (EIIC, EIIA, HPr, EI und EIIB) eines putativen bakteriellen fructosespezifischen PTS codiert (HVO_1499 – HVO_1495; *ptfC*, *ptfA*, *ptsHI*, *ptsI* und *ptfB*) (Hartman et al., 2010).

Transkriptionsanalysen haben ergeben, dass die Komponenten fructosespezifisch als Cotranskript abgelesen werden. Zusätzlich wurde die Membrankomponente EIIC (codiert von *ptfC*) als Einzeltranskript nachgewiesen. Die Ergebnisse aus den Transkriptionsanalysen deuten auf eine funktionelle Rolle des putativen PTS Operons im Fructosekatabolismus hin. Um dies genauer zu untersuchen, wurde das für die putative Transmembrankomponente EIIC codierende Gen *ptfC* deletiert. Die Deletionsmutante konnte nicht mehr auf Fructose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen, was die essentielle Bedeutung von *ptfC* für die Aufnahme von Fructose in *H. volcanii* zeigt. In einer früheren Arbeit wurde vorgeschlagen, dass Fructose in *H. volcanii* über einen Na⁺-gekoppelten Symport in die Zelle aufgenommen wird (Takano et al., 1995). Eine funktionelle Beteiligung dieses postulierten Symportsystems unter den in dieser Arbeit getesteten Bedingungen kann jedoch anhand des Fructose negativen Phänotyps der *ptfC* Mutante ausgeschlossen werden.

Die hier beschriebenen Ergebnisse zeigen erstmals die Beteiligung eines funktionellen PTS im Zuckermetabolismus in der Domäne der Archaea. In kürzlich sequenzierten halophilen Organismen, wie *Haloarcula marismortui*, *Haloarcula hispanica*, *Halalkalicoccus jeotgali* und *Haloterrigena turkmenica* finden sich ebenfalls Homologe zum gesamten PTS Clusters aus *H. volcanii*. Die fünf PTS-Komponenten dieser Haloarchaea zeigen jeweils zueinander einen hohen Grad an Sequenzidentität, die für *ptfC* bei etwa 70 % liegt. Zudem ist die Anordnung der Gene, die für die einzelnen Komponenten codieren, in diesen Organismen identisch zu *H. volcanii*, wie für *H. jeotgali* und *H. marismortui* dargestellt ist (Abbildung 39). Diese Ergebnisse weisen auf die mögliche funktionelle Beteiligung eines PTS bei der Aufnahme von Fructose auch in diesen halophilen Archaea hin.

Archaea

Haloferax volcanii*Halalkalicoccus jeotgali**Haloarcula marismortui*

Bacteria

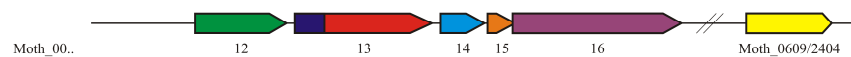
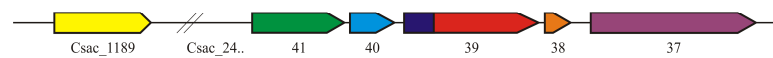
Moorella thermoacetica*Caldicellulosiruptor saccharolyticus**Escherichia coli*

Abbildung 39 Genomische Anordnung von fructosespezifischen PTS Komponenten, 1-PFK und FBA in *H. volcanii* im Vergleich zu anderen Haloarchaea und Bacteria. Jedes Gen ist als farbiger Pfeil dargestellt: 1-Phosphofruktokinase (1-PFK, HVO_1500, *pfkB*) in grün, EIIC (HVO_1499, *ptfC*) in rot, EIIA (HVO_1498, *ptfA*) in blau, HPr (HVO_1497, *ptsHI*) in orange, EI (HVO_1496, *ptsI*) in violett, EIIB (HVO_1495, *ptfB*) in dunkelblau und Fructose-1,6-bisphosphat Aldolase (FBA, HVO_1494, *fba*) in gelb. Die EIIC und EIIB Homologen in *M. thermoacetica* (Moth0013) und *C. saccharolyticus* (Csac2439) sind fusioniert. *fruB* und *fruA* aus *E. coli* sind Fusionsproteine, bestehend aus EIIA-HPr bzw. EIIB-EIIC. Die weißen Bereiche dieser Gene zeigen Regionen, die wahrscheinlich für nichtfunktionelle Bereiche codieren. rrnAC0345 aus *H. volcanii* codiert für eine Class I FBA (gelb mit unterbrochener Linie).

Bisher wurden putative Phosphotransferase Systeme nur in sequenzierten Genomen von Haloarchaea, jedoch in keinen weiteren archaeellen Genomen und in keinen eukaryotischen Organismen gefunden (Anderson et al., 2011; Barabote und Saier, Jr., 2005). Basierend auf Sequenzvergleichen der Transmembrankomponente EIIC können bakterielle Phosphotransferase Systeme in sieben Subfamilien unterteilt werden. Ein Vertreter daraus ist die Fructosefamilie, deren Mitglieder für den Transport von Fructose und Mannitol spezifisch sind (Barabote und Saier, Jr., 2005). Die EIIC Komponente aus *H. volcanii* beinhaltet eine PTS EIIC Typ 2 Domäne (PS51104), welche das haloarchaeelle PTS der Fructose/Mannitol PTS Familie zuordnet. Zusätzlich ergab eine detailliertere Analyse bei TIGRFAMs (<http://www.jcvi.org/cgi-bin/tigrfams/index.cgi>) ergibt, dass EIIC zur fructosespezifischen EIIC Typ 2 Subfamilie gehört (TIGR01427), dessen Mitglieder Fructose spezifisch am C-1 Kohlenstoffatom phosphorylieren und somit Fructose-1-

phosphat (F1P) bilden. Die höchsten Aminosäuresequenzähnlichkeiten zeigt EIIC aus *H. volcanii* zu Bakterien aus der Gruppe der Clostridia, wie zum Beispiel *Moorella thermoacetica* und *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* (44 – 48 %).

Das haloarchaeelle PTS besteht aus separaten Komponenten, wogegen die Phosphotransferase Systeme der meisten Bakterien Fusionsproteine enthalten. Im Genom von *E. coli* sind zum Beispiel mit *fruA* und *fruB* Fusionsproteine codiert, die EIIB und EIIC bzw. EIIA und HPr beinhalten (Abbildung 39). In der Organisation der Gene zeigte das haloarchaeelle PTS die größte Ähnlichkeit zu *M. thermoacetica* und *C. saccharolyticus* (Abbildung 39). Mit Ausnahme der fusionierten EIIB/EIIC Komponenten liegen in diesen Organismen separate PTS-Gene vor, die für getrennte Proteine codieren.

Aufgrund der hohen Sequenzidentität der EIIC Komponenten und der vergleichbaren Genomorganisation lässt sich schließen, dass das haloarchaeelle PTS von einem horizontalen Gentransfer von Mitgliedern aus der Klasse der Clostridia stammen könnte. Kürzlich durchgeführte phylogenetische Studien ergaben, dass auch die putativen EI und HPr Komponenten aus *H. marismortui* bakteriellen Ursprungs sind (Comas et al., 2008). Zusammenfassend weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass *H. volcanii* über ein bakterielles fructosespezifisches PTS verfügt, das Fructose während des Transports zu F1P phosphoryliert.

6.1.2 Fructose-1-phosphat Kinase (1-PFK) aus *H. volcanii*

Die weiteren Untersuchungen dieser Arbeit deuten darauf hin, dass F1P von einer 1-Phosphofruktokinase (1-PFK) zu Fructose-1,6-bisphosphat (FBP) umgesetzt wird. Das für eine 1-PFK codierende Gen *pfkB* (HVO_1500), welches sich stromaufwärts in direkter Nachbarschaft zum beschriebenen PTS Clusters befindet, wurde genauer untersucht. Transkriptionsanalysen deuteten auf eine fructosespezifische Induktion hin. Zusammen mit der Analyse einer *pfkB* Deletionsmutante konnte eindeutig gezeigt werden, dass die 1-PFK funktionell am Fructosestoffwechsel von *H. volcanii* beteiligt ist.

Mit dem gereinigten Enzym konnte für F1P eine etwa 35-fach höhere katalytische Effizienz gemessen werden als für Fructose-6-phosphat (F6P). Dieses Ergebnis spricht dafür, dass F1P und nicht F6P das physiologische Substrat der 1-PFK ist. Dies ist in Übereinstimmung mit der Annahme, dass F1P das Produkt des fructosespezifischen Phosphotransferase Systems in *H. volcanii* ist. Homologe Proteine mit hohen Sequenzidentitäten von über 50 % konnten in anderen halophilen Archaea, wie *H. marismortui*, *Halorhabdus utahensis*,

H. hispanica, *H. jeotgali* und *H. turkmenica* identifiziert werden, was für eine ähnliche katalytische Funktion der 1-PFK in diesen Organismen spricht. Analog zu *H. volcanii* liegen die *pfkB* Gene in *H. jeotgali* (Abbildung 39) und *H. turkmenica* neben dem jeweiligen homologen PTS Cluster. Die 1-PFK aus *H. volcanii* wurde in dieser Arbeit als 70 kDa Homodimer beschrieben, wogegen die 1-PFK aus *Haloarcula vallismortis* als 70 kDa Monomer beschrieben wurde (Rangaswamy und Altekar, 1994a). Das Gen, welches für die aus *H. vallismortis* charakterisierte 1-PFK codiert, wurde jedoch bisher nicht identifiziert. Die 1-PFK aus *H. volcanii* lässt sich in die PFK-B Familie der Zuckerkinasen einordnen und zeigt eine hohe Sequenzidentität zu bakteriellen 1-PFKs, wie zum Beispiel zur 1-PFK aus *E. coli* (31 %), welche vom *fruK* Gen codiert wird (Abbildung 39). Aus den Bakterien *Clostridium pasteurianum* und *Enterobacter aerogenes* wurden 1-PFKs charakterisiert (Sapico und Anderson, 1969; van Hugo und Gottschalk, 1974). Das Molekulargewicht des Enzyms aus *E. aerogenes* wurde dabei zu 75 kDa bestimmt. Das Enzym aus *C. pasteurianum*, welches als 63 kDa Heterodimer beschrieben wurde, wies für F1P und ATP ähnliche kinetische Konstanten auf wie die 1-PFK aus *H. volcanii*.

6.1.3 Fructose-1,6-bisphosphat Aldolase (FBA) aus *H. volcanii*

Fructose-1,6-bisphosphat (FBP), das Produkt der 1-PFK, wird im EM-Weg von einer FBP-Aldolase (FBA) zu Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP) und Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) gespalten. Das direkt stromabwärts zum bakteriellen fructosespezifischen PTS liegende Gen *fba* (HVO_1494), das in *H. volcanii* für eine FBA codiert, wurde in dieser Arbeit untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass *fba* in *H. volcanii* funktionell am Abbau von Fructose beteiligt ist. Transkriptionsanalysen ergaben eine fructosespezifische Induktion des Gens, eine *fba* Deletionsmutante konnte nicht mehr auf Fructose wachsen. Das Wachstum der Mutante auf Glucose war hingegen nicht gehemmt, was darauf zurückzuführen ist, dass Glucose in halophilen Archaea über einen semiphosphorylierten Entner-Doudoroff-Weg abgebaut wird, in dem keine katabole FBA Aktivität benötigt wird (Johnsen et al., 2001; Siebers und Schönheit, 2005).

Die rekombinante FBA, ein 80 kDa α_2 -Dimer, zeigte eine strikte Abhängigkeit von divalenten Kationen und konnte durch Zugabe von EDTA inhibiert werden. Dies charakterisierte das Enzym als metallabhängige Class II Aldolase. Die höchsten Aktivitäten wurden mit Mn^{2+} und Fe^{2+} gemessen. Dagegen konnte mit Zn^{2+} nur eine geringe Aktivität gemessen werden. Aus dem verwandten *Haloferax mediterranei* wurde bereits eine Fe^{2+}

abhängige Class II Aldolase beschrieben, die ebenfalls als 80 kDa Homodimer charakterisiert wurde und bei der Zn^{2+} keinen stimulierenden Einfluss auf die Enzymrate hatte (D'Souza und Altekar, 1998). Im Gegensatz dazu bevorzugen viele bisher beschriebene bakterielle Class II Aldolasen Zn^{2+} Ionen (Berry und Marshall, 1993).

6.1.4 Sequenzvergleich und phylogenetische Einordnung der FBA

Die FBA aus *H. volcanii* ist die erste beschriebene Class II Aldolase, für die eine funktionelle Beteiligung am Zuckerstoffwechsel von Archaea gezeigt wurde. Homologe Enzyme mit bis zu 90 % Sequenzidentität wurden in anderen Gattungen der Haloarchaea, wie *Halorhabdus*, *Halogeometricum*, *Haloquadratum* und *Halalkalicoccus* gefunden. BLAST Analysen (Altschul et al., 1990) zeigten, dass andere archaeelle Genome für keine Class II Aldolase Homologen mit signifikanter Sequenzidentität (> 15 %) codierten. In der Domäne der Bacteria wurden viele Homologe mit maximal 30 % Sequenzidentität gefunden. Class II Aldolasen aus Bakterien und niederen Eukaryoten, wie zum Beispiel *Giardia*, *Saccharomyces* und *Euglena* werden auf Grund von Sequenzvergleichen und physiologischer Funktion in die Subgruppen A und B geteilt (Henze et al., 1998; Plaumann et al., 1997). Mitglieder der Class II A Familie sind in der Regel spezifisch für die Spaltung bzw. Bildung von FBP im EM-Weg bzw. in der Gluconeogenese. Viele Enzyme aus der Familie der Class II B weisen ein breiteres Substratspektrum auf und sind beim Abbau von verschiedenen Zuckern, Zuckeralkoholen und Aminosackern beteiligt (Henze et al., 1998; Plaumann et al., 1997). Mit den haloarchaeellen Class II Aldolasen aus *H. volcanii* und *H. borinquense*, sowie Vertretern der bakteriellen Class II A und B Familien wurde ein multiples Sequenzalignment durchgeführt (Abbildung 40). In der Aminosäuresequenz der FBA aus *H. volcanii* wurde, mit wenigen Abweichungen, die Konsensussequenzen 1 und 2 der bakteriellen Class II Aldolasen gefunden. Bei einer Analyse der Kristallstruktur der Class II Aldolase aus *E. coli* wurden drei konservierte Histidine (H93, H191 und H225, Abbildung 40) beschrieben, die in der Metallbindung eine Rolle spielen (Hall et al., 1999). Diese Reste sind auch in der haloarchaeellen FBA konserviert. Außerdem wurden in der FBA aus *H. volcanii* drei konservierte Aminosäurereste gefunden, deren katalytische Funktion im Enzym aus *E. coli* (D92, E155 und E155, Abbildung 40) vorgeschlagen wurde (Hall et al., 1999).

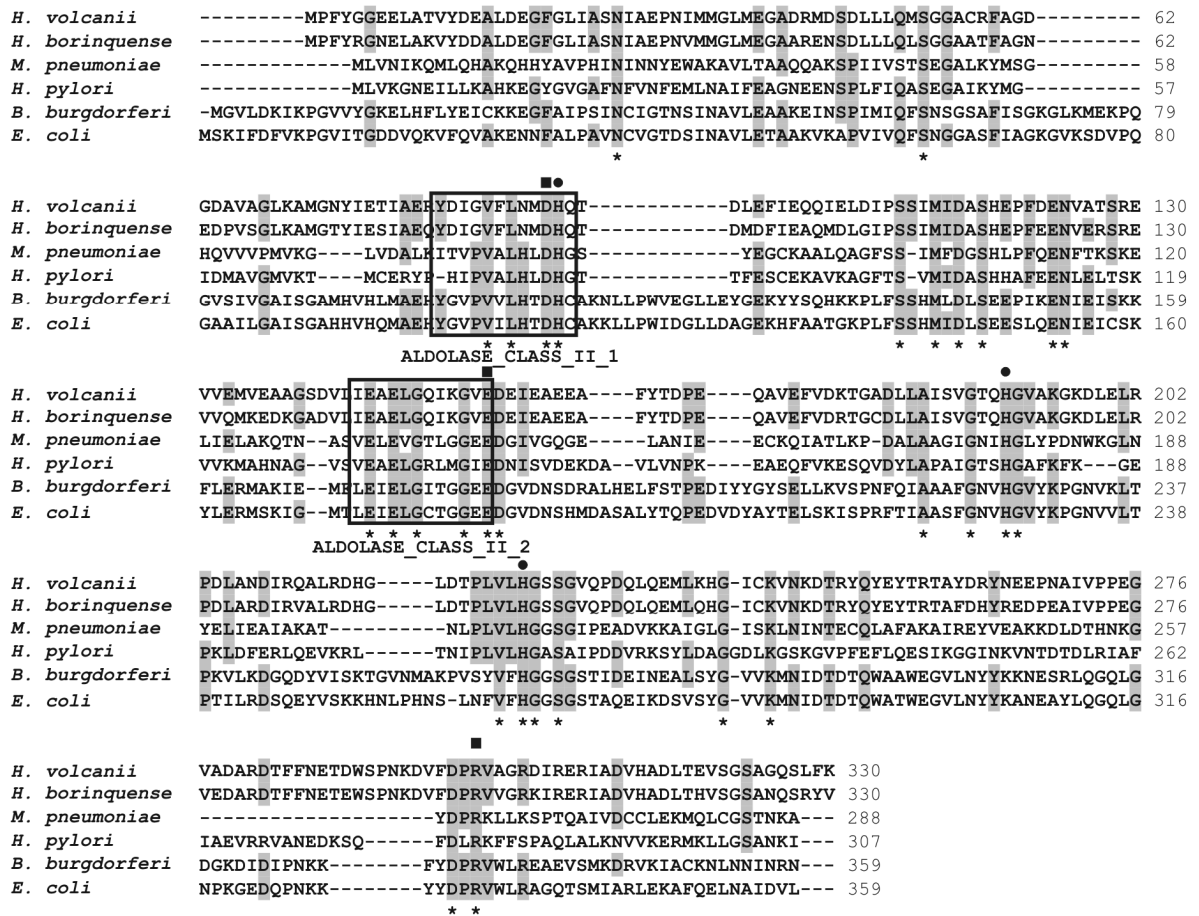


Abbildung 40 Multiples Aminosäure Sequenzierung von Class II Fructose-1,6-bisphosphat Aldolasen aus Haloarchaea und Bacteria. Das Alignment wurde unter Verwendung der Gonnet Matrix mit ClustalX erstellt (Larkin et al., 2007). Die Konsensussequenzen (ALDOLASE_CLASS_II_1 und 2) sind durch Boxen markiert. Das ALDOLASE_CLASS_II_1 Konsensusmotiv ist [FYVMT]-x(1,3)-[LIVMH]-[APNT]-[LIVM]-x(1,2)-[LIVM]-H-x-D-H-[GACH] (PS00602), das ALDOLASE_CLASSII_2 Konsensusmotiv ist [LIVM]-E-x-E-[LIVM]-G-x(2)-[GM]-[GSTA]-x-E (PS00806). Konservierte Aminosäuren sind durch einen Stern markiert. Außerdem wurden die wichtigen katalytischen Reste R300, E155 und D92 (■) und die für die Kationenbindung benötigten Histidine H93, H191 und H225 (●) dargestellt (Hall et al., 1999). Folgende Sequenzen, mit Accession Nummern in Klammern, wurden verwendet: *Borrelia burgdorferi* (AAB91507), *Escherichia coli* (BAE76989), *Haloferax volcanii* (YP_003535543), *Halogeometricum borinquense* (ADQ67306), *Helicobacter pylori* (CBI66947) und *Mycoplasma pneumoniae* (BAL21593).

Die phylogenetische Einordnung haloarchaeeller FBAs wurde mit homologen Aldolasen aus Bakterien und niederen Eukaryoten durchgeführt (Abbildung 41). Dabei bilden die halophilen Aldolasen neben den Class II A und Class II B Familien eine distinkte Gruppe. Für diese Gruppe der Aldolasen wird der Name FBA Class II H (FBA Class II Haloarchaea) vorgeschlagen. Es ist denkbar, dass die Aldolasen aus der Class II H Familie aus einem lateralen Gentransfer von Bakterien stammen. Die Bildung eines separaten Clusters könnte durch die Anpassung der Enzyme an hohe intrazelluläre Salzkonzentrationen erklärt werden. Die FBA aus *H. volcanii* ist die erste beschriebene funktionelle Class II Aldolase im Zuckerstoffwechsel in der Domäne der Archaea. Bisher wurden in den meisten Archaea nur Class I Aldolasen beschrieben, deren Katalysemechanismus über die Bildung einer Schiff'schen Base als Intermediat abläuft und die damit zu den Class II Aldolasen phylogenetisch nicht verwandt sind. Archaeelle Class I Aldolasen wurden zum Beispiel in den hyperthermophilen Archaea *Pyrococcus furiosus* und *Thermoproteus tenax* beschrieben. Neben den hier beschriebenen Class II H Aldolasen gibt es in Haloarchaea, wie *H. marismortui* oder *H. volcanii* ebenfalls archaeelle Class I Aldolasen. So wurden schon in früheren Arbeiten, in Zellextrakten aus halophilen Archaea, Aktivitäten von Class I und II Aldolasen detektiert, wobei die verschiedenen Aldolasen durch die Verwendung von Borhydrid und EDTA als selektive Inhibitoren der Class I bzw. Class II Aldolasen voneinander unterschieden werden konnten (Altekar und Dhar, 1988). Die codierenden Gene wurden dabei jedoch nicht identifiziert.

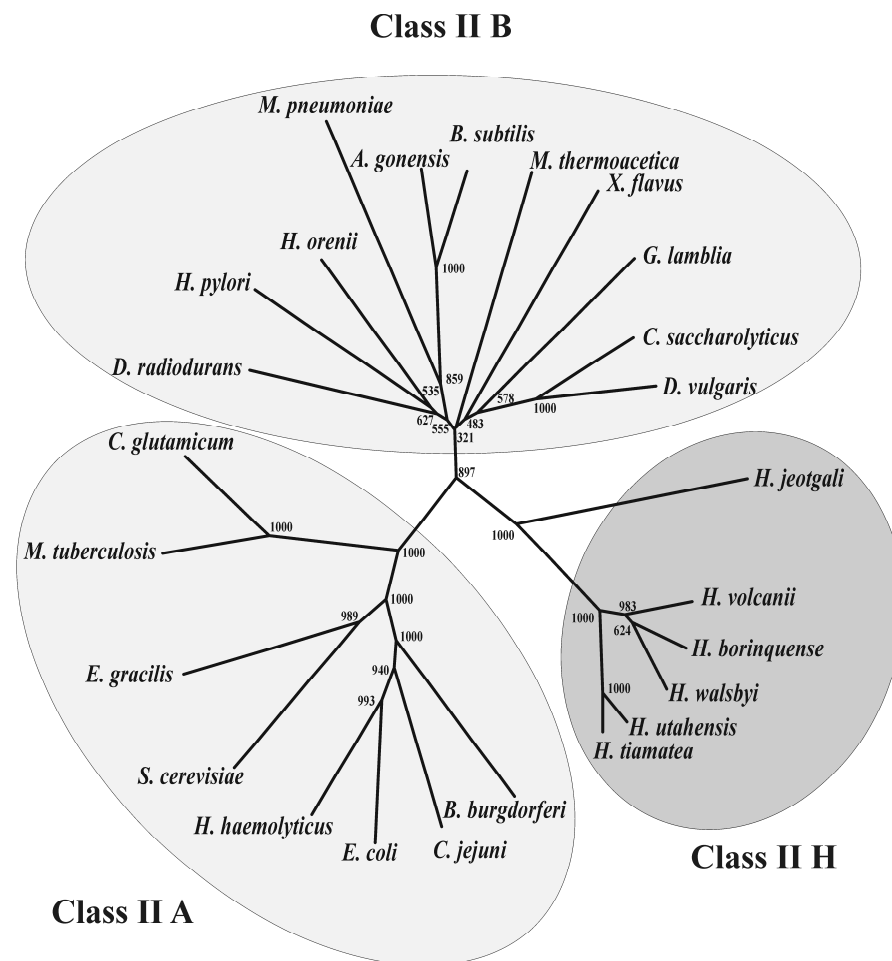


Abbildung 41 Phylogenetische Einordnung von Class II Fructose-1,6-bisphosphat Aldolasen aus Haloarchaea, Bacteria und niederen Eukaryoten. Der Stammbaum wurde mit dem Neighbor-Joining Algorithmus aus ClustalX erstellt (Larkin et al., 2007), wobei das Bootstrapping-Verfahren 1000 Wiederholungen umfasste. Die Bootstrap-Werte befinden sich an den Knotenpunkten. Der Baum basiert auf einem multiplen Aminosäure Sequenzalignment, das mit ClustalX unter Verwendung der Gonnet Matrix erstellt wurde. Folgende Sequenzen, mit Accession-Nummern in Klammern, wurden verwendet: Class II B, *Anoxybacillus gonensis* (ABL75360), *Bacillus subtilis* (AEP88659), *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* (YP_001179983), *Deinococcus radiodurans* R1 (NP_295312), *Desulfovibrio vulgaris* (YP_002434443), *Giardia lamblia* (3GB6_A), *Halothermothrix orenii* (YP_002509546), *Helicobacter pylori* (CBI66947), *Moorella thermoacetica* (YP_429482), *Mycoplasma pneumoniae* (BAL21593) und *Xanthobacter flavus* (AAA96742); Class II A, *Borrelia burgdorferi* (AAB91507), *Campylobacter jejuni* (ZP_06371648), *Corynebacterium glutamicum* (EHE82675), *Escherichia coli* (BAE76989), *Euglena gracilis* (CAA61912), *Haemophilus haemolyticus* (EGT83318), *Mycobacterium tuberculosis* (P67475) und *Saccharomyces cerevisiae* (GAA24665); Class II H, *Halalkalicoccus jeotgali* (YP_003738319), *Haloferax volcanii* (YP_003535543), *Halogeticum borinquense* (ADQ67306), *Halorhabdus tiamatea* (ZP_08561145), *Halorhabdus utahensis* (YP_003129569) und *Haloquadratum walsbyi* (YP_658423). Der Balken stellt 0,1 Substitutionen pro Aminosäure dar.

6.1.5 Gluconeogenetische Funktion der Class II H FBA in *H. volcanii*

Die meisten Archaea besitzen die kürzlich beschriebene neuartige, bifunktionelle Class I Fructose-1,6-bisphosphat Aldolase/Phosphatase, die eine unidirektionale Bildung von Fructose-6-phosphat aus GAP und DHAP in der Gluconeogenese katalysiert (Say und Fuchs, 2010). Eine solche Aldolase wurde in *H. volcanii* jedoch nicht gefunden. Daher wurde geprüft, ob die in dieser Arbeit charakterisierte Class II H Aldolase neben ihrer Funktion im Katabolismus auch eine Rolle bei der Gluconeogenese spielt. Für die FBA aus *H. volcanii* konnte gezeigt werden, dass diese neben der Spaltung von FBP zu Triosephosphaten auch die reverse Reaktion, also die Bildung von FBP aus GAP und DHAP, katalysieren kann. Die *fbA* Deletionsmutante konnte nicht mehr auf Substraten wie Acetat, Xylose oder Casaminsäuren wachsen, obwohl bei deren Abbau keine katabole FBA-Aktivität benötigt wird (Johnsen et al., 2009). Diese Befunde sprechen dafür, dass die FBA eine auch essentielle Rolle in der Gluconeogenese von *H. volcanii* hat.

6.2 KDG Kinasen aus *H. volcanii*

Für den Glucoseabbau in halophilen Archaea wurde ein semiphosphorylierter Entner-Doudoroff- (ED) Weg postuliert (Siebers und Schönheit, 2005; Johnsen et al., 2001). Das Schlüsselenzym dieses Wegs ist die KDG Kinase (KDGK), die die ATP abhängige Umsetzung von 2-Keto-3-desoxygluconat (KDG) zu 2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat (KDPG) katalysiert. Die funktionelle KDGK und das dafür codierende Gen aus halophilen Archaea wurden bisher jedoch nicht identifiziert. *H. volcanii* enthält Gene, die für die zwei putativen KDG Kinasen KDGK-1 und KDGK-2 codieren (*kdgK1*, HVO_0549 und *kdgK2*, HVO_A0328), die zueinander sehr homolog sind (63 % Sequenzidentität). Dabei ist *kdgK2* in der Nähe von putativen Galactose spezifischen Genen codiert (Anderson et al., 2011). Die Funktion der Kinasen im Glucosestoffwechsel von *H. volcanii* wurde in dieser Arbeit untersucht. Dafür wurde die Transkription der Gene auf verschiedenen Zuckern untersucht, sowie die homolog exprimierten Enzyme charakterisiert, Deletionsmutanten konstruiert und deren Wachstum untersucht.

Transkriptionsstudien mit RNA aus Zellen, die auf Glucose bzw. Galactose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle gewachsen waren, zeigten eine konstitutive Expression des *kdgK1* Gens. Das Wachstum der *kdgK1* Deletionsmutante auf Glucose war im Vergleich zum Wildtyp stark eingeschränkt. Die *kdgK2* Mutante hingegen wuchs wie der Wildtyp.

Die gereinigte KDGK-1 phosphorylierte neben KDG auch 2-Keto-3-desoxygalactonat (KDGal), wobei die katalytische Effizienz für KDG etwa 3-fach höher als für KDGal war. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass *kdgK1* für die funktionelle KDGK im Glucosestoffwechsel von *H. volcanii* codiert. In einer kürzlich durchgeführten Studie wurde eine Repression von *kdgK1* bei Wachstum auf Glycerin im Vergleich zum Wachstum auf Glucose und Fructose gezeigt (Rawls et al., 2010). Daraus wurde geschlossen, dass *kdgK1* eine essentielle Bedeutung bei Wachstum auf Glucose haben könnte.

Das für KDGK-2 codierende Gen *kdgK2* war transkriptionell auf Galactose, im Vergleich zu Glucose, stark induziert. Das rekombinante Enzym setzte KDGal mit einer etwa 50-fach höheren katalytischen Effizienz im Vergleich zu KDG um. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass *kdgK2* für eine KDGal Kinase codiert, die am Abbau von Galactose in *H. volcanii* beteiligt sein könnte. Die *kdgK2* Mutante zeigte bei Wachstum auf Galactose jedoch keinen Phänotyp, da sie von der KDGK-1 komplementiert wurde. Diese Annahme wurde dadurch bestätigt, dass die *kdgK1/kdgK2* Doppelmutante nicht mehr auf Galactose wachsen konnte.

Bisher wurden KDG Kinasen in Archaea nur aus hyperthermophilen Crenarchaeota charakterisiert (Lamble et al., 2005; Kim und Lee, 2006; Ohshima et al., 2007; Ahmed et al., 2005). Die KDG Kinase aus *Sulfolobus solfataricus* setzte, wie die KDGK-1 aus *H. volcanii*, Glucose und Galactose mit vergleichbaren katalytischen Effizienzen um (Lamble et al., 2005). Im Gegensatz zu den Haloarchaea, die Gene für jeweils zwei KDG Kinasen enthalten, gibt es in *S. solfataricus* nur eine KDG Kinase (Kouril et al., 2013). Ein weiterer Unterschied zu den halophilen Archaea ist, dass *S. solfataricus* für den Abbau von Glucose einen „branched“ ED-Weg benutzt, der aus einem semiphosphorylierten und einem nichtphosphorylierten Teilweg besteht und der eine bifunktionelle KDG/KDPG-Aldolase enthält (Lamble et al., 2005; Ahmed et al., 2005). In einer vor kurzem veröffentlichten Studie konnte gezeigt werden, dass der semiphosphorylierte Teilweg in *S. solfataricus* P2 vom nichtphosphorylierte ED-Weg vollständig ersetzt werden kann, da eine KDG Kinase Deletionsmutante auf Glucose wie der Wildtyp wuchs (Kouril et al., 2013). Die *H. volcanii* KDGK-2 Mutante konnte hingegen nicht mehr auf Glucose wachsen, da Glucose dort ausschließlich über den semiphosphorylierten ED-Weg abgebaut wird.

Die halophilen KDG Kinasen sind phylogenetisch nahe mit der bakteriellen KDG Kinase aus *Thermotoga maritima* verwandt (Rawls et al., 2010). Wie die halophilen Enzyme wurden das Enzym aus *Thermotoga* sowie die homologe bakterielle KDG Kinase aus *Thermus thermophilus* als Homohexamere (α_6) beschrieben (Mathews et al., 2008; Ohshima

et al., 2004). Archaeelle KDG Kinasen aus *Sulfolobus solfataricus* und *Sulfolobus tokodaii* wurden als Dimere (α_2), Tetramere (α_4) oder Hexamere (α_6) beschrieben (Kim und Lee, 2006; Ohshima et al., 2007; Potter et al., 2008). Aus vergleichenden Untersuchungen mit Kristallstrukturen der KDG Kinasen aus *S. solfataricus* und *T. thermophilus* wurde gefolgert, dass die Bifunktionalität der KDG Kinase aus *S. solfataricus* für KDG und KDGal auf minimale Änderungen in der Positionierung der Aminosäuren des aktiven Zentrums zurückzuführen ist (Potter et al., 2008).

6.3 Oxidativer Teil des Pentosephosphatwegs in *H. volcanii*

Der Pentosephosphatweg, ein in den Domänen der Bacteria und Eukarya gut untersuchter Stoffwechselweg, besteht aus einem oxidativen und einem nichtoxidativen Teil. Im oxidativen Teil des Pentosephosphatwegs werden Hexosen zu Ribulose-5-phosphat umgesetzt. Der nichtoxidative Teil des Pentosephosphatwegs dient unter anderem der Bildung von Ausgangsprodukten für die Synthese von aromatischen Aminosäuren und Nukleotiden. Im Gegensatz zu den Bacteria und Eukarya wurde bisher kein vollständiger Pentosephosphatweg in der Domäne der Archaea nachgewiesen. Einige Vertreter enthalten jedoch Enzyme des nichtoxidativen Teils des Pentosephosphatwegs (Soderberg, 2005). Ein alternativer Weg der Umwandlung von Hexosen zu Pentosephosphaten wurde zum Beispiel in *Thermococcus kodakaraensis* beschrieben, bei dem ein umgekehrt laufender Ribulosemonophosphatweg beschrieben wurde, der den Pentosephosphatweg ersetzen kann (Orita et al., 2006). Im diesem Weg wird Fructose-6-phosphat von der 3-Hexulose-6-phosphat Isomerase und der 3-Hexulose-6-phosphat Synthase über 3-Hexulose-6-phosphat zu Ribulose-5-phosphat und Formaldehyd umgewandelt. Im oxidativen Teil des Pentosephosphatwegs in Bacteria und Eukarya wird Glucose-6-phosphat (G6P) von einer G6P Dehydrogenase und einer Lactonase zu 6-Phosphogluconat oxidiert. Eine 6-Phosphogluconat Dehydrogenase katalysiert die weitere Oxidation und Decarboxylierung von 6-Phosphogluconat zu Ribulose-5-phosphat. Viele haloarchaeelle Genome codieren für eine putative 6-Phosphogluconat Dehydrogenase (Soderberg, 2005; Anderson et al., 2011), was auf die Anwesenheit eines funktionellen oxidativen Teils des Pentosephosphatwegs in diesen Organismen hinweisen könnte. Ein Gen, das für eine bekannte bakterielle oder eukaryotische homologe G6P Dehydrogenase codiert, konnte bisher in keinem der sequenzierten archaeellen Genome gefunden werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden Enzyme aus *H. volcanii* charakterisiert, die eine Umwandlung von Glucose zu Ribulose-5-phosphat katalysieren. Die Daten deuten darauf hin, dass *H. volcanii* Glucose mit Hilfe einer ROK Kinase zu G6P umsetzt, welches dann mit einer neuartigen G6P Dehydrogenase zu 6-Phosphogluconat oxidiert und mit einer bereits im Genom annotierten 6-Phosphogluconat Dehydrogenase weiter zu Ribulose-5-phosphat umgesetzt wird.

6.3.1 ROK Kinase aus *H. volcanii*

Die katalytische Funktion der ROK Kinase aus *H. volcanii* (codiert von HVO_0403, *glcK*) wurde in dieser Arbeit untersucht. Die Familie der ROK Kinasen beinhaltet Repressoren, QRFs unbekannter Funktion und Kinasen, die sich anhand von Aminosäuresequenzhomologien zuordnen lassen (Titgemeyer et al., 1994). Die für ROK Kinasen spezifischen ROK Konsensussequenzen 1 und 2 (Concha und Leon, 2000; Hofmann et al., 1999) sowie eine konservierte ATP-Bindestelle konnten im Enzym aus *H. volcanii* nachgewiesen werden (Arora et al., 1990; Flaherty et al., 1994) (Abbildung 42). Das Enzym aus *H. volcanii* wurde rekombinant exprimiert, gereinigt und als 61 kDa Homodimer (α_2) beschrieben. Es katalysierte die ATP abhängige Phosphorylierung von Glucose zu Glucose-6-phosphat mit einer katalytischen Effizienz von $664 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$. Das Enzym war spezifisch für Glucose. Andere Hexosen, wie Fructose, Mannose oder Glucosamin wurden gar nicht, bzw. nur mit geringer katalytischer Effizienz umgesetzt (Tabelle 15). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass *H. volcanii* mit *glcK* für eine spezifische ROK Glucokinase codiert. Dieser Befund war überraschend, da die bisher charakterisierten ROK Kinasen aus den hyperthermophilen Crenarchaeota *Aeropyrum pernix* und *Thermoproteus tenax* ein breites, hexokinaseähnliches Substratspektrum für Hexosen aufweisen (Hansen et al., 2002a; Dörr et al., 2003) (Tabelle 15). In diesen Organismen katalysiert die ROK Kinase den ersten Schritt des Glucosekatabolismus im modifizierten Embden-Meyerhof Weg (Selig et al., 1997; Siebers und Hensel, 1993; Siebers und Schönheit, 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde zum Vergleich eine weitere archaelle ROK Kinase aus dem hyperthermophilen Crenarchaeon *Desulfurococcus kamchatkenis* exprimiert und das gereinigte rekombinante Enzym charakterisiert. Das Enzym katalysierte die Umsetzung von Glucose, Fructose und Mannose in einer vergleichbaren Weise wie die beiden anderen charakterisierten crenarchaeellen ROK Kinasen (Tabelle 15). Anders als die crenarchaeellen Enzyme, weisen die ROK

Kinasen aus Bakterien eine hohe Substratspezifität für Glucose auf (Concha und Leon, 2000; Skarlatos und Dahl, 1998; Hansen und Schönheit, 2003) (Tabelle 15). Anders als die meisten bakteriellen Enzyme katalysieren aber die ROK Kinasen aus *Thermus thermophilus* und *Bacillus sphaericus* neben der Phosphorylierung von Glucose auch die Phosphorylierung andere Zucker, jedoch mit vergleichsweise geringer katalytischer Effizienz (Nakamura et al., 2012; Han et al., 2007) (Tabelle 15).

<i>H. volcanii</i>	--MAYYVQVDLGGTNRVRSVVGDDDGTVLGEARDNTPRGPTGIAVTEAVLGVVREACAEEAGIDPSDAVAAGIGAIGPLDLA	78
<i>D. kamchatkensis</i>	--MARYLAVDLGATKTRIALCQDRILDKIVFPTPKTG---DNTTIAESIVAKAREKWSILDSVEAVGVASIGPLDLR	74
<i>A. pernix</i>	--MAEVVAVDVGATWVRMAIV-RGGVIEAIKREKNPPT---EEG--LERVQLGLAELGIDRGRVKEVGAASIGPLDLR	71
<i>T. tenax</i>	---MILADVGGTNRVRLVSRDGRVE--RREKFRD---ESP--VEKAAR-LVEGW----EFEAIGVSGSIGPMDLR	62
<i>T. thermophilus</i>	---MKVVGLDLGGTKIAAGVFDGKRLLSKVVVPTPKEG---GER-VAEALAAEAERAEREAGVGEAIGLGTGPGPLDFR	72
<i>T. maritima</i>	MPKLIKQVDLGGTFFSVGLVSEDGKILKKTTRDTLVEN---GKEDVIRRIAETILEVS--DGEEAPYVGISSPGSIDRE	75
	* * *	
	ATP-Bindestelle	
<i>H. volcanii</i>	EGAVENPANLDDTIDRIPLTGPLSVLLETDEVYHLNDTNAAGVIGERFHSDRN-PDDMYYLTISSGIGAGVCDVGHVLAGW	157
<i>D. kamchatkensis</i>	RGVIVKPPNLLF--NEVKLLEPLERMLGKR-VYVVNDAAVAAGWGEKHFSGSRSFENLLYVTLSTGVGGGVIVNNHLLGK	151
<i>A. pernix</i>	RGYIVGSEPNKS--HIVRLSTILKRLFPKSKVAIANDAVAAWGEYLLGRLAGTDLGYITMSTGVGGGFVVGRRLLGS	149
<i>T. tenax</i>	RGWVTASNSPFS--KSPFLVEPLKLF--KRPVYVANDCVAAGWGEYVGGWG-VDNLAYLTLSTGLGVGAVVNGHLILGK	137
<i>T. thermophilus</i>	RGVIRFAPNIPG--VQDFPIRRILEEATGRPVFLENDANAALAEHHLGAAQGEESLYLTVSTGIGGGVVLGGRVLRGE	150
<i>T. maritima</i>	NGIVRFSENFDP-WHNVPLTDELAKR-TGKKVFLENDANAFLVGEKWFAGRGRHDHIVALTLGTGIGGGVVTHGYLLTGR	153
	* * * * *	
	Konsensussequenz 1	
<i>H. volcanii</i>	DGNAGEVGHLLTLDPHGF-MTCGCGHNGHWEGYCSGNNIPKYARELHEEDPVDTALPIS-----DPDFSAVDVFEHAGD-	229
<i>D. kamchatkensis</i>	QGNAHEIGHLVVDYNSE-LKCGCGGYGHWEAYVGGRNLPVARWLLERNPGLASGSLAKRISIGEQTVSIDIFTLYRSN	230
<i>A. pernix</i>	RGNAHEVGHVVDMGWEGGRCCGCGTGHWEAIAAGRWIPRTSSVLAR--GWRGPETSLYRAALEGRVGSAREVEFAAAVG	227
<i>T. tenax</i>	EGNAHELGHAVLDVRGD-VKCGCGGLGHWEAMAGGANIPSYFRVFAARLGLRAP-----EVRTAEDVFKLYREG	205
<i>T. thermophilus</i>	RGQGGELGHLTLPPGGP--KCGCGLEGCLEALAAGRALERDATYAFQR-----PVDTRLEFRFLFREK	210
<i>T. maritima</i>	DGIGAEELGHVVVEPNGP--MNCNCGTRGCLAEVAVSATAIRRFLEREGYKKYHSSLVYKLAGS----PEKADAKHLFDAARQG	227
	* * * * *	
	Konsensussequenz 2	
<i>H. volcanii</i>	DEFADHIIISQLGHWNAMGVANIVHAYAPLIIVYGGAVALNNPDLVLEPIREQMSEMVMNSNI---PEIQLTTLGDEVVVEG	306
<i>D. kamchatkensis</i>	DPLALEVVKQFIKATGAGLASAINSYPDEVVVIIGGGVFINNIDILLEPIRREAERNIVTTP---PLIQPTTLGDDVGLYG	307
<i>A. pernix</i>	DDFALHVIDYIARASAAGIASVKAAYDVDAVVIIGGSVYLNRRMLRPLIERHLAAYAPFSSR--IEVVDASFQDNEGVMG	305
<i>T. tenax</i>	DRVAQMFVDHWVDVNAAGIATITAAAYDPEVLVGGSIALNHWDLVEAAVDR-LKKYTPLTPT---PALEKAKFGDDEVAMG	281
<i>T. thermophilus</i>	DPKÄERLVLAARYVIGLASLVKAFDPGVVVLGGVALNAPEGYWEALLAAYRHYLQGWEA--PPLRKARLGAEGLLG	288
<i>T. maritima</i>	DRFALMIRDRVVDALARAVAGYIHFNEIIVIIIGGGISRAG-EILFGPLREKVVVDYIMPSFVGTGYEVVAVPLVEDAGILG	306
	* * * * *	
<i>H. volcanii</i>	ALASAMTGGTGDRSRL-----	322
<i>D. kamchatkensis</i>	ALALVIEPPEELLKLQSSITQ	329
<i>A. pernix</i>	AYALAYRNPEDLPIF-----	320
<i>T. tenax</i>	AAALAIRPPDTLKKFGYPRF--	301
<i>T. thermophilus</i>	AALTAYLEVKDGGG-----	302
<i>T. maritima</i>	AASIIKERIGG-----	317
	*	

Abbildung 42 Multiples Aminosäure Sequenzalignment charakterisierter archaeller und bakterieller ROK Kinasen. Das Alignment wurde unter Verwendung der Gonnet Matrix mit ClustalX erstellt (Larkin et al., 2007). Die ATP-Bindestelle (Flaherty et al., 1994; Arora et al., 1990) und die ROK-Konsensussequenzen 1 und 2 sind durch Boxen markiert. Die Konsensussequenz 1 ist [LIVM]X₂G[LIVMFCT]GX [GA][LIVMF]X₈GX₃₋₅[GATP]X₂G [RKH] (Hofmann et al., 1999), die Konsensussequenz 2 ist CXCGX₂GX[WILV]EX[YFIN]X[STAG] (Concha und Leon, 2000). Konservierte Aminosäuren sind durch einen Stern markiert. Folgende Sequenzen, mit Accession Nummern in Klammern, wurden verwendet: *Haloferax volcanii* (YP_003534477), *Desulfurococcus kamchatkensis* (YP_002428239), *Aeropyrum pernix* (NP_148378) *Thermoproteus tenax* (WP_014125995), *Thermus thermophilus* (WP_014628873), *Thermotoga maritima* (NP_229269).

Tabelle 15 Substratspezifität von bakteriellen und archaeellen ROK Kinasen. ND: nicht detektierbar; -: nicht bestimmt

Organismus	Substrate				
	kat. Effizienz (in %)				
	Glucose	Fructose	Mannose	Galactose	2-Dglc ^a
breites Substratspektrum					
<i>Aeropyrum pernix</i> ¹	100	13	23	-	17
<i>Thermoproteus tenax</i> ²	100	17	52	-	54
<i>Desulfurococcus kamchatkensis</i>	100	37	23	-	74
hohe Substratspezifität					
<i>Haloferax volcanii</i>	100	ND	2	ND	ND
<i>Thermus thermophilus</i> ³	100	0,005	20	0,073	-
<i>Bacillus subtilis</i> ⁴	100	ND	ND	ND	-
<i>Thermotoga maritima</i> ⁵	100	ND	ND	ND	24
<i>Renibacterium salminarum</i> ⁶	100	ND	ND	ND	-

^a2-Dglc: 2-Deoxyglucose ¹(Hansen et al., 2002a) ²(Dörr et al., 2003) ³(Nakamura et al., 2012) ⁴(Skarlatos und Dahl, 1998) ⁵(Hansen und Schönheit, 2003) ⁶(Concha und Leon, 2000)

Zur phylogenetischen Einordnung wurde ein Stammbaum mit charakterisierten ROK Kinasen und mit weiteren homologen Proteinen der ROK-Familie (Fructokinasen und Repressoren) berechnet (Abbildung 43). Dabei lassen sich die ROK Kinasen in zwei Hauptgruppen einordnen. Die Gruppe I enthält bakterielle Enzyme mit hoher Substratspezifität für Glucose, in der Gruppe II finden sich hauptsächlich archaeelle Enzyme. Die Gruppe II lässt sich in zwei distinkte Untergruppen (A und B) aufteilen (Abbildung 43): Die Gruppe mit ROK Kinasen aus den hyperthermophilen Crenarchaeota, die ein breites Substratspektrum aufweisen (B) und die Gruppe der glucosespezifischen ROK Kinasen aus halophilen Archaea und thermophilen Bacteria (A). Die ROK Kinasen aus den *Thermoplasmatales* ließen sich in keine der beiden ROK Kinase Hauptgruppen einordnen. Die phylogenetische Nähe zu bakteriellen und halophilen Enzymen könnte jedoch darauf hinweisen, dass diese archaeellen Enzyme eine hohe Spezifität für Glucose besitzen, was in weiteren Arbeiten gezeigt werden muss.

Die Ergebnisse zeigen, dass *H. volcanii* eine ROK Kinase besitzt, die eine zu den bakteriellen Enzymen ähnliche, hohe Substratspezifität für Glucose aufweist. Da die ROK Kinase aus *H. volcanii* beim Abbau von Glucose nicht benötigt wird, könnte diese im Baustoffwechsel eine Rolle spielen.

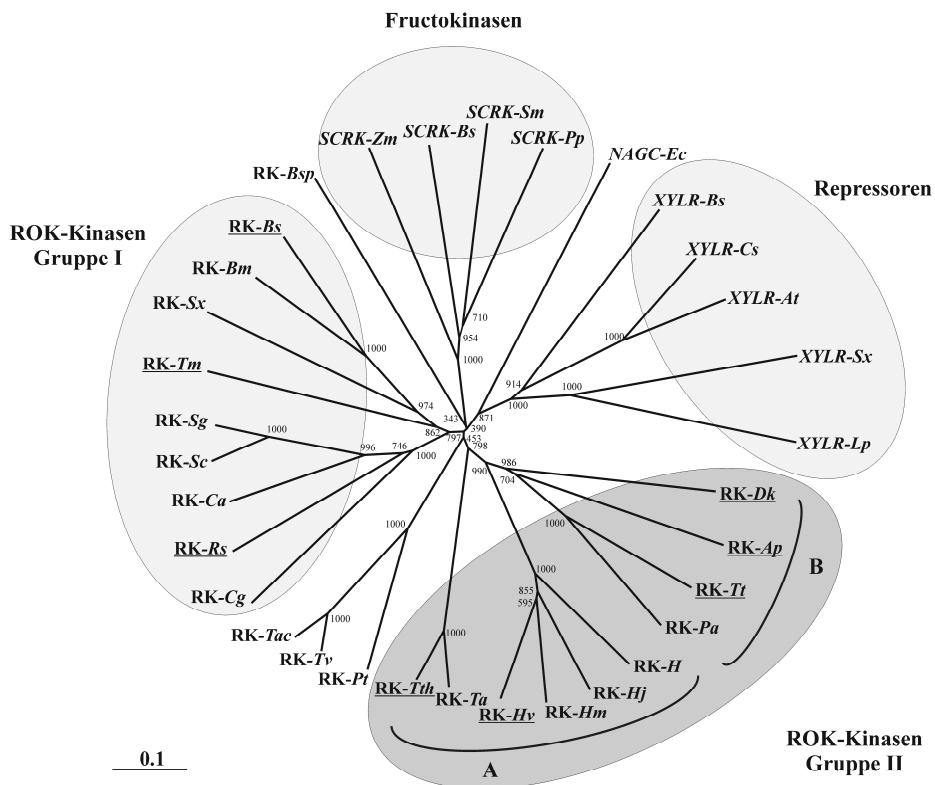


Abbildung 43 Stammbaum bakterieller und archaeeller Proteine mit ROK-Motiv (modifiziert nach Hansen et al., 2002a). Der Stammbaum wurde mit dem Neighbor-Joining Algorithmus aus ClustalX erstellt (Larkin et al., 2007), wobei das Bootstrapping-Verfahren 1000 Wiederholungen umfasste. Die Bootstrap-Werte befinden sich an den Knotenpunkten. Der Baum basiert auf einem multiplen Aminosäure Sequenzalignment, das mit ClustalX unter Verwendung der Gonnet Matrix erstellt wurde. Folgende Sequenzen, mit Accession-Nummern in Klammern, wurden verwendet: ROK Kinasen (RK), *Bsp*, *Bacillus sphaericus* (EAZ87567), *Bs*, *Bacillus subtilis* (P54495); *Bm*, *Bacillus megaterium* (O31392); *Sx*, *Staphylococcus xylosus* (Q56198); *Tm*, *Thermotoga maritima* (Q9X1I0); *Sg*, *Streptomyces griseus* (Q9F1W1); *Sc*, *Streptomyces coelicolor* (P40184); *Ca*, *Catenulispora acidiphila* (YP_003116761); *Rs*, *Renibacterium salmoniarum* (Q53165); *Cg*, *Corynebacterium glutamicum* (Q9KKE7); *Tac*, *Thermoplasma acidophilum* (Q9HJY6); *Tv*, *Thermoplasma volcanium* (Q97AS0); *Pt*, *Picrophilus torridus* (YP_023994); *Tth*, *Thermus thermophilus* (WP_014628873); *Ta*, *Thermus aquaticus* (WP_003046468); *Hv*, *Haloferax volcanii* (YP_003534477); *Hm*, *Haloarcula marismortui* (YP_135271); *Hj*, *Halalkalicoccus jeotgali* (YP_003738194); *H*, *Halobacterium* sp. Stamm NRC1 (Q9HMA7); *Pa*, *Pyrobaculum aerophilum* (PAE3437); *Tt*, *Thermoproteus tenax* (WP_014125995); *Ap*, *Aeropyrum pernix* (NP_148378); *Dk*, *Desulfurococcus kamchatkensis* (YP_002428239); Xylose Repressoren (XYLR), *Lp*, *Lactobacillus pentosus* (P21940); *Sx*, *Staphylococcus xylosus* (P27159); *At*, *Anaerocellum thermophilum* (Q44406); *Cs*, *Caldicellulosiruptor* sp. (P40981); *Bs*, *Bacillus subtilis* (P16557); NAGC-*Ec*, N-Acetylglucosamin Repressor *E. coli* (P15301); Fructokinasen (SCRK), *Pp*, *Pedicoccus pentosaceus* (P43468); *Sm*, *Streptococcus mutans* (Q07211); *Bs*, *Bacillus subtilis* (WP_003234095); *Zm*, *Zymomonas mobilis* (Q03417). Charakterisierte Enzyme sind unterstrichen. Der Balken stellt 0,1 Substitutionen pro Aminosäure dar.

6.3.2 Glucose-6-phosphat Dehydrogenase

Im oxidativen Teil des Pentosephosphatwegs katalysiert die Glucose-6-phosphat (G6P) Dehydrogenase die Oxidation von G6P. Klassische G6P Dehydrogenasen (COG0364), die meist aus etwa 500 Aminosäuren bestehen und ein Molekulargewicht von 50 bis 60 kDa aufweisen, sind in Bacteria und Eukarya weit verbreitet. Es wurden Enzyme beschrieben, die spezifisch für NAD^+ oder/und NADP^+ als Elektronenakzeptor sind (Lee et al., 1991; Nogae und Johnston, 1990; Rowley und Wolf, Jr., 1991; Persico et al., 1986; Hansen et al., 2002b). Für die G6P Dehydrogenase aus *Leuconostoc mesenteroides*, die sowohl NAD^+ als auch NADP^+ als Cofaktor verwenden kann (Naylor et al., 2001), wurde eine hochaufgelöste dreidimensionale Struktur beschrieben (Rowland et al., 1994). Neben der Funktion im Pentosephosphatweg hat die G6P Dehydrogenase auch eine katabole Funktion im phosphorylierten Entner-Doudoroff (ED) Weg. So wurde zum Beispiel eine hochaktive G6P Dehydrogenase aus *Zymomonas mobilis* als Teil des phosphorylierten ED-Wegs beschrieben (Scopes et al., 1985). Auch aus *E. coli* und *Pseudomonas aeruginosa*, bei denen der phosphorylierte ED-Weg gut beschrieben ist, wurde die G6P Dehydrogenase gereinigt und charakterisiert (Conway, 1992; Banerjee und Fraenkel, 1972; Lessie und Neidhardt, 1967). Neben den $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ abhängigen Enzymen sind G6P Dehydrogenasen bekannt, die das Deazaflavin F_{420} als Cofaktor benötigen (COG0451). Diese Enzyme wurden unter anderem in *Mycobacterium smegmatis* (Purwantini und Daniels, 1996) und in *Nocardia* Species (Purwantini et al., 1997) beschrieben. Sie haben ein Molekulargewicht von etwa 40 kDa und weisen keine signifikante Homologie zu den klassischen $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ abhängigen Enzymen auf.

Bei keinem der bisher untersuchten Archaea konnte eine bekannte $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$ oder F_{420} abhängige G6P Dehydrogenase gefunden werden. In dieser Arbeit wurde eine native G6P Dehydrogenase aus *H. volcanii* Zellen bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Das Enzym katalysierte die Oxidation von G6P mit NAD^+ als Elektronenakzeptor mit apparenten V_{\max} - und K_m -Werten von 39 U/mg und 5,4 mM für G6P. Das codierende Gen, HVO_0511, wurde mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie identifiziert. Eine Analyse der Aminosäuresequenz ergab, dass HVO_0511 für ein Protein codiert, das Mitglied der extended short-chain dehydrogenase/reductase (SDRe) Familie ist (Marchler-Bauer et al., 2011). Insbesondere wurde das für die SDRe Familie indikative Cofaktor bindende Sequenzmotiv T-G-X-X-G-X-X-G in HVO_0511 nachgewiesen (Persson et al., 2003). Kürzlich konnte ein homologes Enzym aus *H. volcanii* als neuartige L-Arabinose

Dehydrogenase identifiziert werden, die ebenfalls der SDR_e Familie angehört (Johnsen et al., 2013). Diese bildete im phylogenetischen Stammbaum neben weiteren charakterisierten Mitgliedern der SDR_e Familie, wie den Enzymen aus den Gruppen der SDR_e-GalE und SDR_e-L-ThrDH, einen separaten Cluster (SDR_e-L-AraDH) (Johnsen et al., 2013). Das Enzym katalysierte die spezifische Umsetzung von L-Arabinose zu L-Arabinat unter Verwendung von NAD⁺ bzw. NADP⁺ mit vergleichbaren katalytischen Effizienzen und ist die erste beschriebene Zuckerdehydrogenase aus der SDR_e Familie. Die von HVO_0511 codierte G6P Dehydrogenase und weitere Homologe aus halophilen Archaea ergaben im phylogenetischen Stammbaum einen von der L-Ara DH distinkten Cluster (SDR_e-G6PDH) (Abbildung 44). Dies ist in Übereinstimmung mit der Spezifität der G6P Dehydrogenase für phosphorylierte Zucker und der strikten Abhängigkeit von NAD⁺ als Cofaktor.

Die in Haloarchaea gefundene neuartige G6P Dehydrogenase konnte weder in anderen archaeellen, noch in bakteriellen oder eukaryotischen Genomen gefunden werden. Dieses exklusive Vorkommen der Dehydrogenase weist auf eine konvergente Entwicklung des Enzyms innerhalb der Haloarchaea hin.

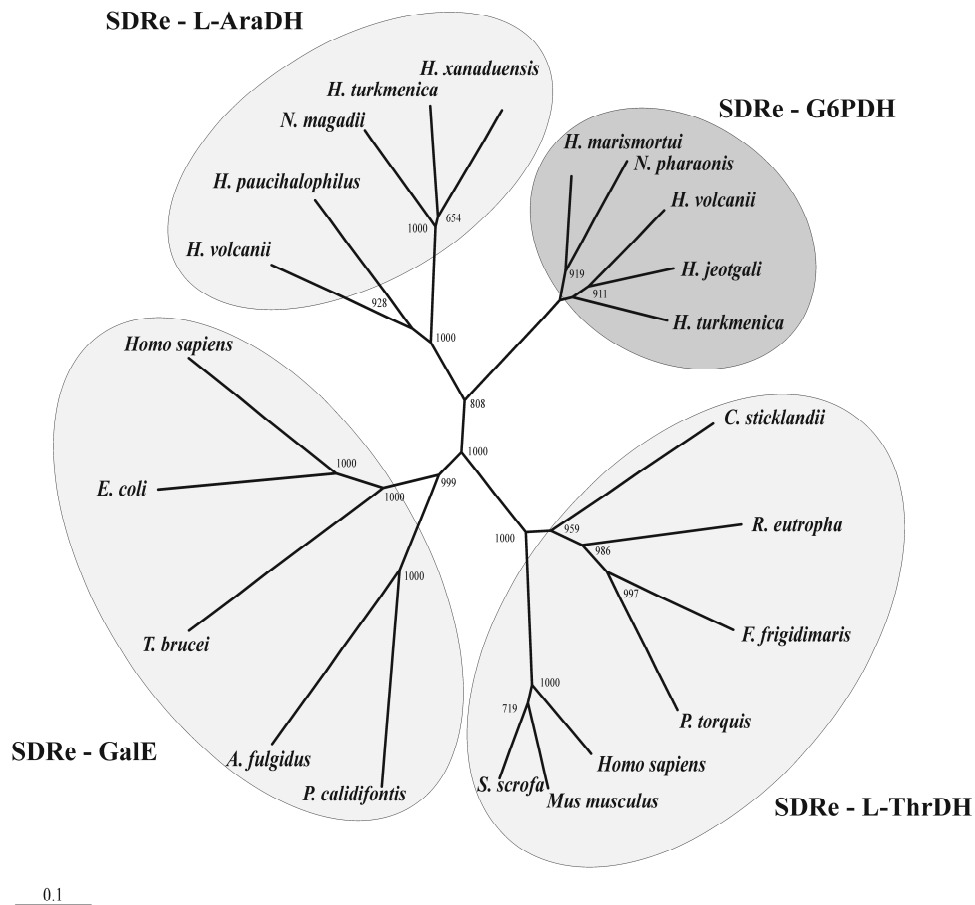


Abbildung 44 Phylogenetische Einordnung der Glucose-6-phosphat Dehydrogenase aus *H. volcanii* mit Enzymen aus der Familie der SDRé (modifiziert nach Johnsen et al., 2013). Der Stammbaum wurde mit dem Neighbor-Joining Algorithmus aus ClustalX erstellt (Larkin et al., 2007), wobei das Bootstrapping-Verfahren 1000 Wiederholungen umfasste. Die Bootstrap-Werte befinden sich an den Knotenpunkten. Der Baum basiert auf einem multiplen Aminosäure Sequenzalignment, das mit ClustalX unter Verwendung der Gonnet Matrix erstellt wurde. Folgende Sequenzen, mit Accession-Nummern in Klammern, wurden verwendet: SDRé-L-AraDH: *Haloferax volcanii* (YP_003533112), *Haladaptatus paucihalophilus* (WP_007982414), *Natrialba magadii* (YP_003479313), *Haloterrigena turkmenica* (YP_003403964), *Halopinger xanaduensis* (AEH38749); SDRé-GalE: *Homo sapiens* (NP_001008217), *Escherichia coli* (1LRJ_A), *Trypanosoma brucei* (1GY8_A), *Archaeoglobus fulgidus* (3EHE_A), *Pyrobaculum calidifontis* (YP_001055777); SDRé-L-ThrDH: *Sus scrofa* (NP_999169), *Mus musculus* (NP_067455), *Homo sapiens* (CAC82738), *Psychroflexus torquis* (YP_006867417), *Flavobacterium frigidimaris* (2YY7_A), *Ralstonia eutropha* (YP_728977), *Clostridium sticklandii* (YP_003936646); SDRé-G6PDH: *Haloterrigena turkmenica* (YP_003402006), *Halalkalicoccus jeotgali* (YP_003738108), *Haloferax volcanii* (YP_003534581), *Natronomonas pharaonis* (YP_325816), *Haloarcula marismortui* (YP_136835). Der Balken stellt 0,1 Substitutionen pro Aminosäure dar.

6.3.3 6-Phosphogluconat Dehydrogenase

Im Genom von *H. volcanii* ist eine 6-Phosphogluconat Dehydrogenase annotiert (HVO_1830, *gndA*). Das homolog exprimierte Protein wurde als 143 kDa Homotetramer (α_4) beschrieben, welches 6-Phosphogluconat unter Verwendung von NAD^+ als Cofaktor mit apparenten K_m - und V_{max} -Werten von 0,021 mM und 10,6 U/mg umsetzte. Die katalytische Effizienz des Enzyms war mit NAD^+ über 2000-fach höher als mit NADP^+ , was zeigt, dass NAD^+ der physiologische Elektronenakzeptor ist. Neben klassischen NADP^+ abhängigen 6-Phosphogluconat Dehydrogenasen aus *Bacillus subtilis* und *Enterococcus faecalis* (Zamboni et al., 2004; Bridges et al., 1975) wurden in Bakterien NAD^+ abhängige Enzyme in *Leuconostoc lactis* und *Leuconostoc mesenteroides* beschrieben (Ohara et al., 1996; Ohara et al., 2004). In Übereinstimmung mit der in dieser Arbeit gereinigten 6-Phosphogluconat Dehydrogenase aus *H. volcanii*, wurde das Enzym aus *L. lactis* als Homotetramer beschrieben (Ohara et al., 2004).

Zur phylogenetischen Einordnung der 6-Phosphogluconat Dehydrogenase aus *H. volcanii* wurde ein Stammbaum mit bakteriellen NAD^+ und NADP^+ abhängigen 6-Phosphogluconat Dehydrogenasen erstellt (Abbildung 45). Der Stammbaum ergab drei separate Cluster, die NADP^+ abhängige bakterielle, NAD^+ abhängige bakterielle bzw. NAD^+ abhängige halophile 6-Phosphogluconat Dehydrogenasen beinhalteten. Dabei zweigten die halophilen Dehydrogenasen phylogenetisch näher bei den NAD^+ abhängigen bakteriellen Enzymen ab. Da in anderen Archaea keine 6-Phosphogluconat Dehydrogenasen gefunden werden konnten, ist es sehr wahrscheinlich, dass das halophile Enzym von bakteriellen NAD^+ abhängigen 6-Phosphogluconat Dehydrogenasen abstammt, die über lateralen Gentransfer aufgenommen wurden. Die Bildung eines separaten Clusters könnte durch die Anpassung der Enzyme an hohe intrazelluläre Salzkonzentrationen erklärt werden.

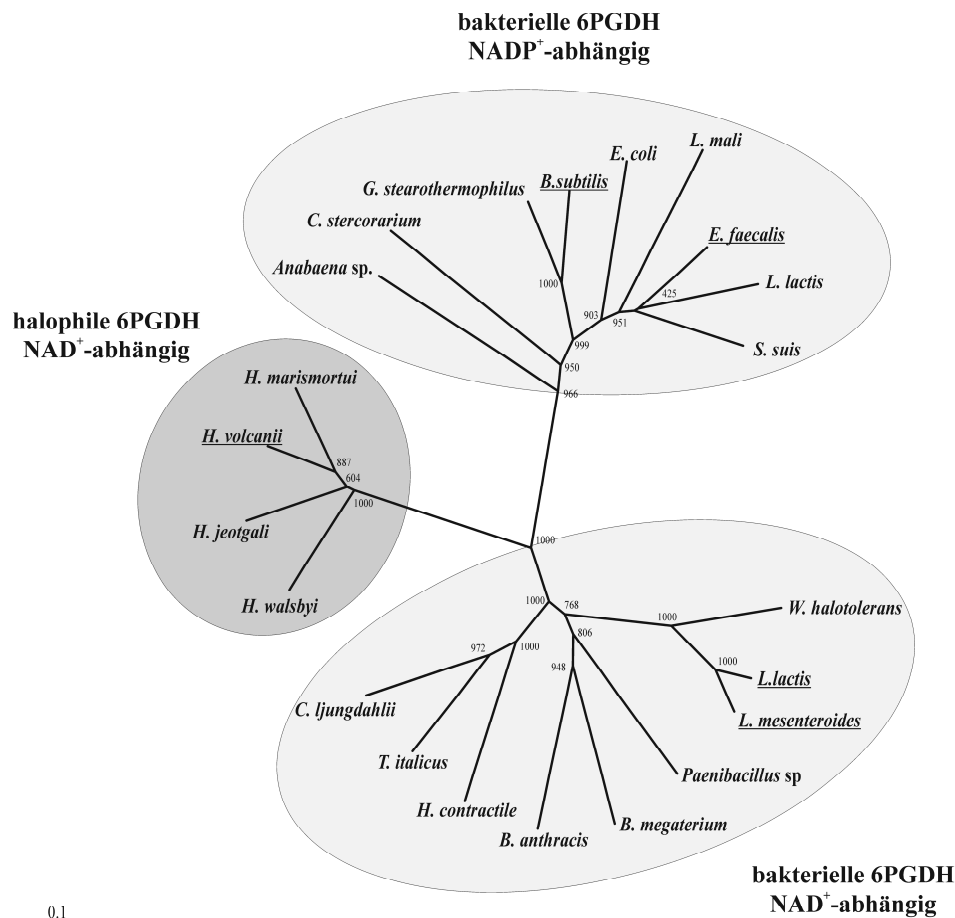


Abbildung 45 Phylogenetische Einordnung von NAD⁺ und NADP⁺ abhängigen 6-Phosphogluconat (6PG) Dehydrogenasen (6PGDH) aus Bakterien und Haloarchaea. Der Stammbaum wurde mit dem Neighbor-Joining Algorithmus aus ClustalX erstellt (Larkin et al., 2007), wobei das Bootstrapping-Verfahren 1000 Wiederholungen umfasste. Die Bootstrap-Werte befinden sich an den Knotenpunkten. Der Baum basiert auf einem multiplen Aminosäure Sequenzalignment, das mit ClustalX unter Verwendung der Gonnet Matrix erstellt wurde. Folgende Sequenzen, mit Accession-Nummern in Klammern, wurden verwendet: bakterielle 6PGDH NAD⁺-abhängig, *Anabaena sp.* (YP_006996441), *Clostridium stercoarium* (YP_007374093), *Geobacillus stearothermophilus* (2W90_A), *Bacillus subtilis* (WP_003226506), *Escherichia coli* (WP_001572820), *Lactobacillus mali* (WP_003689865), *Enterococcus faecalis* (WP_010777506), *Lactococcus lactis* (AGY43835), *Streptococcus suis* (YP_004402178); bakterielle 6PGDH NAD⁺-abhängig, *Chloroflexus aggregans* (YP_002464483), *Weissella halotolerans* (WP_022791838), *Leuconostoc lactis* (WP_010002049), *Leuconostoc mesenteroides* (WP_004164525), *Paenibacillus sp.* (WP_009223340), *Bacillus megaterium* (WP_016763076), *Bacillus anthracis* (NP_845715.1), *Haloplasma contractile* (WP_008824575), *Thermoanaerobacter italicus* (YP_003476797), *Clostridium ljungdahlii* (YP_003779329); halophile 6PGDH NAD⁺-abhängig, *Haloquadratum walsbyi* (YP_005838856), *Halalkalicoccus jeotgali* (YP_003738127), *Haloferax volcanii* (YP_003535867), *Haloarcula marismortui* (YP_136728). Charakterisierte Enzyme sind unterstrichen. Der Balken stellt 0,1 Substitutionen pro Aminosäure dar.

6.4 Überblick des Fructose- und Glucoseabbaus, der Gluconeogenese und des Pentosephosphatwegs in *H. volcanii*

Die in dieser Arbeit untersuchten Gene und Enzyme des Fructose- und Glucoseabbaus, des Fructosetransports, der Gluconeogenese und des oxidativen Pentosephosphatwegs aus *H. volcanii* lassen sich, zusammen mit Genominformationen, in einem Übersichtsschema zusammenfassen:

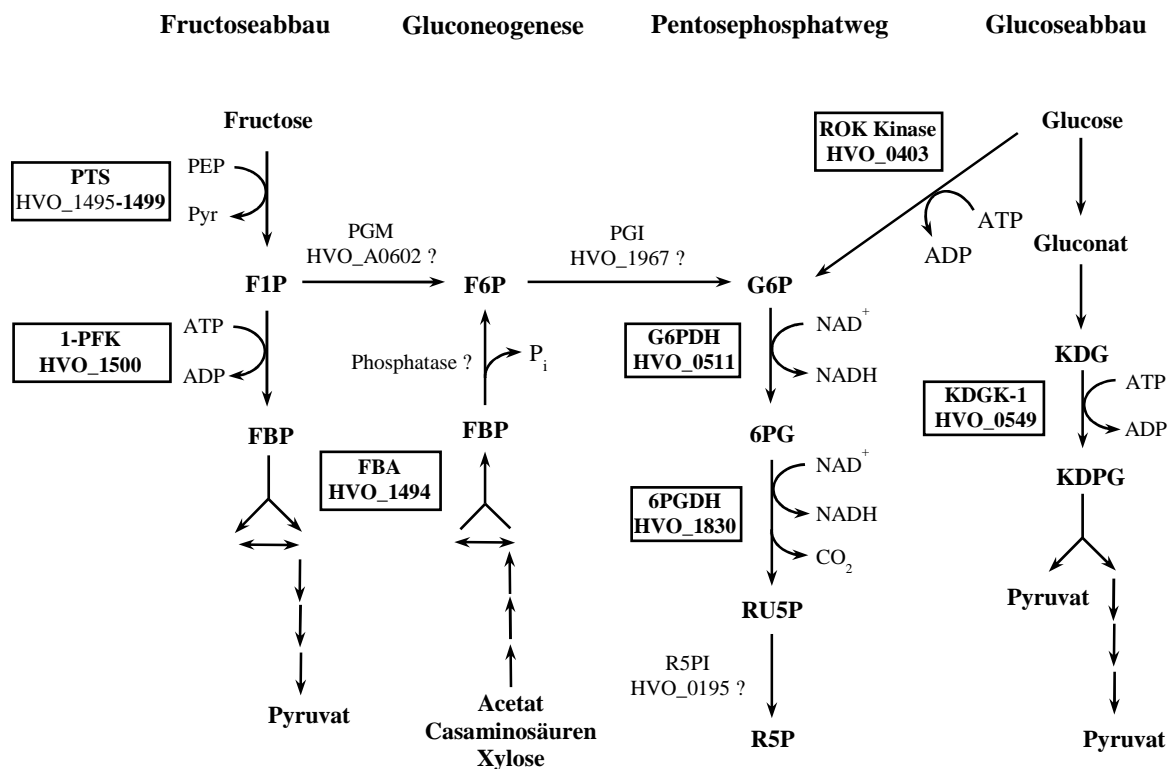


Abbildung 46 Schematischer Überblick über den Fructose- und Glucoseabbau, der Gluconeogenese und den Pentosephosphatweg aus *H. volcanii*. Die in dieser Arbeit untersuchten Enzyme sind fett gedruckt und mit einem Rechteck umrandet. Erläuterungen zum Schema im Text. Abkürzungen: **PEP**, Phosphoenolpyruvat; **Pyr**, Pyruvat; **F1P**, Fructose-1-phosphat; **FBP**, Fructose-1,6-bisphosphat; **PTS**, Phosphotransferase System; **1-PFK**, 1-Phosphofruktokinase; **FBA**, Fructose-1,6-bisphosphat Aldolase; **PGM**, Phosphoglucomutase; **F6P**, Fructose-6-phosphat; **PGI**, Phosphoglucose Isomerase; **G6P**, Glucose-6-phosphat; **6PG**, 6-Phosphogluconat; **RU5P**, Ribulose-5-phosphat; **R5P**, Ribose-5-phosphat; **G6PDH**, Glucose-6-phosphat Dehydrogenase; **6PGDH**, 6-Phosphogluconat Dehydrogenase; **R5PI**, Ribose-5-phosphat Isomerase; **KDG**, 2-Keto-3-desoxygluconat; **KDPG**, 2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat; **KDGK**, KDG Kinase; Die Fragezeichen deuten an, dass die codierende Funktion der entsprechenden ORFs nicht gezeigt wurde.

Ein Fructose-1-phosphat (F1P) bildendes fructosespezifisches Phosphotransferase System (PTS, codiert von HVO_1495 – 1499) ist essentiell am Fructosestoffwechsel von *H. volcanii* beteiligt; der Abbau des gebildeten F1P zu Triosephosphaten über Fructose-1,6-bisphosphat (FBP) wird von den funktionellen Enzymen 1-Phosphofructokinase (1-PFK, codiert von HVO_1500) und Fructose-1,6-bisphosphat (FBP) Aldolase (FBA, codiert von HVO_1494) katalysiert. Es wurde gezeigt, dass die reversible Class II FBA funktionell an der Gluconeogenese bei Wachstum auf Acetat, Casaminosäuren und Xylose beteiligt ist.

Darüber hinaus zeigt das Schema, dass Glucose in *H. volcanii* über einen postulierten semiphosphorylierten ED-Weg abgebaut wird. Dabei wird Glucose über Gluconat und 2-Keto-3-desoxygluconat (KDG) zu 2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat (KDPG) umgewandelt. KDPG wird in weiteren Schritten zu zwei Pyruvat umgesetzt. In der vorliegenden Arbeit wurde das Schlüsselenzym dieses Wegs, die KDG-Kinase (KDGK-1, codiert von HVO_0549) identifiziert und charakterisiert. Die zur KDGK-1 homologe KDGK-2 (codiert von HVO_A0328) ist als 2-Keto-3-desoxy-6-phosphogalactonat (KDGal) Kinase vermutlich am Galactoseabbau beteiligt (nicht gezeigt).

Weiter dargestellt ist, dass *H. volcanii* alle Enzyme des oxidativen Teils des Pentosephosphatwegs besitzt. Diese katalysieren die Umsetzung von Glucose-6-phosphat (G6P) über 6-Phosphogluconat zu Ribulose-5-phosphat (RU5P) mit Hilfe der G6P Dehydrogenase, 6-Phosphogluconat Dehydrogenase und der putativen Ribose-5-phosphat (R5P) Isomerase (R5PI, codiert von HVO_0195). In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass *H. volcanii* eine neuartige NAD⁺-abhängige Glucose-6-phosphat Dehydrogenase (G6PDH, codiert von HVO_0511) besitzt, die an der Oxidation von G6P beteiligt ist. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass *H. volcanii* eine 6-Phosphogluconat Dehydrogenase (6PGDH) enthält (codiert von HVO_1830), die die NAD⁺ abhängige Oxidation von 6-Phosphogluconat katalysiert.

Das Ausgangssubstrat des Pentosephosphatwegs ist Glucose-6-phosphat (G6P). Beim Abbau von Glucose über den semiphosphorylierten ED-Weg wird Glucose jedoch nicht phosphoryliert (Abbildung 46). Darum benötigt *H. volcanii* bei Wachstum auf Glucose eine Kinase, die G6P aus Glucose bildet. Diese enzymatische Aktivität konnte bei einer ROK Kinase (codiert von HVO_0403) gemessen werden. Bei Wachstum auf Substraten wie Acetat, Casaminosäuren oder Xylose wird G6P vermutlich aus FBP gebildet, welches in der Gluconeogenese durch die reversible FBA (codiert von HVO_1494) bereitgestellt wird. Diese Umwandlung könnte von einer der annotierten, putativen Fructose-1,6-

bisphosphatasen (codiert von HVO_1446/2131/2857, HVO_A0274, HVO_B0253/0290) und einer annotierten, putativen Phosphoglucoseisomerase (codiert von HVO_1967) katalysiert werden. Bei Wachstum auf Fructose könnte G6P aus F1P über eine putative Phosphoglucomutase (PGM, codiert von HVO_A0602) und die putative PGI (codiert von HVO_1967) gebildet werden.

Ein großer Teil der in dieser Arbeit charakterisierten Enzyme zeigt hohe Ähnlichkeiten zu bakteriellen Homologen. Dazu gehört das fructosespezifische PTS (codiert von HVO_1495 – 1499), die reversible metallabhängige Class II Aldolase (codiert von HVO_1494), die für Glucose spezifische ROK Kinase (codiert von HVO_0403) sowie die 6-Phosphogluconat Dehydrogenase (codiert von HVO_1830). Die hohe Ähnlichkeit dieser Enzyme zu bakteriellen Homologen lässt darauf schließen, dass deren codierenden Gene über lateralen Gentransfer mit Bacteria aufgenommen wurden. Dies ist in Übereinstimmung mit einer bioinformatischen Arbeit, in der postuliert wurde, dass ein gemeinsamer Vorfahr der Haloarchaea eine Vielzahl bakterieller Gene über lateralen Gentransfer aufgenommen hat (Nelson-Sathi et al., 2012). Demgegenüber ist die G6P Dehydrogenase ein neuartiges Enzym, das sich vermutlich über konvergente Evolution innerhalb der Haloarchaea entwickelt hat.

7 Literaturverzeichnis

- 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*
- Albers SV, Elferink MG, Charlebois RL, Sensen CW, Driessen AJ, Konings WN (1999) Glucose transport in the extremely thermoacidophilic *Sulfolobus solfataricus* involves a high-affinity membrane-integrated binding protein. *J Bacteriol* 181:4285-4291
- Albers SV, Koning SM, Konings WN, Driessen AJ (2004) Insights into ABC transport in archaea. *J Bioenerg Biomembr* 36:5-15
- Alefounder PR, Baldwin SA, Perham RN, Short NJ (1989) Cloning, sequence analysis and over-expression of the gene for the class II fructose 1,6-bisphosphate aldolase of *Escherichia coli*. *Biochem J* 257:529-534
- Allers T, Barak S, Liddell S, Wardell K, Mevarech M (2010) Improved strains and plasmid vectors for conditional overexpression of His-tagged proteins in *Haloferax volcanii*. *Appl Environ Microbiol* 76:1759-1769
- Allers T, Ngo HP, Mevarech M, Lloyd RG (2004) Development of additional selectable markers for the halophilic archaeon *Haloferax volcanii* based on the *leuB* and *trpA* genes. *Appl Environ Microbiol* 70:943-953
- Altekar W, Dhar NM (1988) Archaeobacterial class I and class II aldolases from extreme halophiles. *Orig Life Evol Biosph* 18:59-64
- Altekar W, Rangaswamy V (1990) Indication of a modified EMP pathway for fructose breakdown in a halophilic archaeobacterium. *FEMS Microbiol Lett* 69:139-143
- Altekar W, Rangaswamy V (1992) Degradation of endogenous fructose during catabolism of sucrose and mannitol in halophilic archaeobacteria. *Arch Microbiol* 158:356-363
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403-410
- Anderson I, Scheuner C, Goker M, Mavromatis K, Hooper SD, Porat I, Klenk HP, Ivanova N, Kyrpides N (2011) Novel insights into the diversity of catabolic metabolism from ten haloarchaeal genomes. *PLoS ONE* 6:e20237
- Arora KK, Shenbagamurthi P, Fanciulli M, Pedersen PL (1990) Glucose phosphorylation. Interaction of a 50-amino acid peptide of yeast hexokinase with trinitrophenyl ATP. *J Biol Chem* 265:5324-5328
- Baker PJ, Britton KL, Fisher M, Esclapez J, Pire C, Bonete MJ, Ferrer J, Rice DW (2009) Active site dynamics in the zinc-dependent medium chain alcohol dehydrogenase superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:779-784
- Banerjee S, Fraenkel DG (1972) Glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Escherichia coli* and from a "high-level" mutant. *J Bacteriol* 110:155-160

- Barabote RD, Saier MH, Jr. (2005) Comparative genomic analyses of the bacterial phosphotransferase system. *Microbiol Mol Biol Rev* 69:608-634
- 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
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2003) Der Pentosephosphatweg erzeugt NADPH und C5-Kohlenhydrate. In. pp 616-621
- Berry A, Marshall KE (1993) Identification of zinc-binding ligands in the class II fructose-1,6-bisphosphate aldolase of *Escherichia coli*. *FEBS Lett* 318:11-16
- Bitan-Banin G, Ortenberg R, Mevarech M (2003) Development of a gene knockout system for the halophilic archaeon *Haloferax volcanii* by use of the *pyrE* gene. *J Bacteriol* 185:772-778
- Bonete MJ, Pire C, LLorca FI, Camacho ML (1996) Glucose dehydrogenase from the halophilic Archaeon *Haloferax mediterranei*: enzyme purification, characterisation and N-terminal sequence. *FEBS Lett* 383:227-229
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254
- Brenneis M, Hering O, Lange C, Soppa J (2007) Experimental characterization of *Cis*-acting elements important for translation and transcription in halophilic archaea. *PLoS Genet* 3:e229
- Bridges RB, Palumbo MP, Wittenberger CL (1975) Purification and properties of an NADP-specific 6-phosphogluconate dehydrogenase from *Streptococcus faecalis*. *J Biol Chem* 250:6093-6100
- Brochier-Armanet C, Boussau B, Gribaldo S, Forterre P (2008) Mesophilic Crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nat Rev Microbiol* 6:245-252
- Brown AD (1976) Microbial water stress. *Bacteriol Rev* 40:803-846
- 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
- Chomczynski P, Mackey K (1995) Substitution of chloroform by bromo-chloropropane in the single-step method of RNA isolation. *Anal Biochem* 225:163-164
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159
- Cline SW, Lam WL, Charlebois RL, Schalkwyk LC, Doolittle WF (1989a) Transformation methods for halophilic archaeobacteria. *Can J Microbiol* 35:148-152

- Cline SW, Schalkwyk LC, Doolittle WF (1989b) Transformation of the archaeobacterium *Halobacterium volcanii* with genomic DNA. *J Bacteriol* 171:4987-4991
- Comas I, Gonzalez-Candelas F, Zuniga M (2008) Unraveling the evolutionary history of the phosphoryl-transfer chain of the phosphoenolpyruvate:phosphotransferase system through phylogenetic analyses and genome context. *BMC Evol Biol* 8:147
- Concha MI, Leon G (2000) Cloning, functional expression and partial characterization of the glucose kinase from *Renibacterium salmoninarum*. *FEMS Microbiol Lett* 186:97-101
- Conway T (1992) The Entner-Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biology. *FEMS Microbiol Rev* 9:1-27
- D'Souza SE, Altekar W (1998) A Class II fructose-1,6-bisphosphate aldolase from a halophilic archaeobacterium *Haloferax mediterranei*. *J Gen Appl Microbiol* 44:235-241
- Dambeck M, Soppa J (2008) Characterization of a *Haloferax volcanii* member of the enolase superfamily: deletion mutant construction, expression analysis, and transcriptome comparison. *Arch Microbiol* 190:341-353
- Dennis PP, Shimmin LC (1997) Evolutionary divergence and salinity-mediated selection in halophilic archaea. *Microbiol Mol Biol Rev* 61:90-104
- Deutscher J, Francke C, Postma PW (2006) How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 70:939-1031
- Dörr C, Zaparty M, Tjaden B, Brinkmann H, Siebers B (2003) The hexokinase of the hyperthermophile *Thermoproteus tenax*: ATP-dependent hexokinases and ADP-dependent glucokinases, two alternatives for glucose phosphorylation in Archaea. *J Biol Chem* 278:18744-18753
- Flaherty KM, Wilbanks SM, DeLuca-Flaherty C, McKay DB (1994) Structural basis of the 70-kilodalton heat shock cognate protein ATP hydrolytic activity. II. Structure of the active site with ADP or ATP bound to wild type and mutant ATPase fragment. *J Biol Chem* 269:12899-12907
- Fothergill-Gilmore LA, Michels PA (1993) Evolution of glycolysis. *Prog Biophys Mol Biol* 59:105-235
- Frolow F, Harel M, Sussman JL, Mevarech M, Shoham M (1996) Insights into protein adaptation to a saturated salt environment from the crystal structure of a halophilic 2Fe-2S ferredoxin. *Nat Struct Biol* 3:452-458
- Galinski EA, Trüper HG (1994) Microbial behaviour in salt-stressed ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews* 15:95-108
- Gottschalk G, Bender R (1982) D-Gluconate dehydratase from *Clostridium pasteurianum*. *Methods Enzymol* 90 Pt E:283-287

- Grochowski LL, Xu H, White RH (2005) Ribose-5-phosphate biosynthesis in *Methanocaldococcus jannaschii* occurs in the absence of a pentose-phosphate pathway. *J Bacteriol* 187:7382-7389
- Hall DR, Leonard GA, Reed CD, Watt CI, Berry A, Hunter WN (1999) The crystal structure of *Escherichia coli* class II fructose-1, 6-bisphosphate aldolase in complex with phosphoglycolohydroxamate reveals details of mechanism and specificity. *J Mol Biol* 287:383-394
- Han B, Liu H, Hu X, Cai Y, Zheng D, Yuan Z (2007) Molecular characterization of a glucokinase with broad hexose specificity from *Bacillus sphaericus* strain C3-41. *Appl Environ Microbiol* 73:3581-3586
- Hansen T, Reichstein B, Schmid R, Schönheit P (2002a) The first archaeal ATP-dependent glucokinase, from the hyperthermophilic crenarchaeon *Aeropyrum pernix*, represents a monomeric, extremely thermophilic ROK glucokinase with broad hexose specificity. *J Bacteriol* 184:5955-5965
- Hansen T, Schlichting B, Schönheit P (2002b) Glucose-6-phosphate dehydrogenase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: expression of the *g6pd* gene and characterization of an extremely thermophilic enzyme. *FEMS Microbiol Lett* 216:249-253
- Hansen T, Schönheit P (2003) ATP-dependent glucokinase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* represents an extremely thermophilic ROK glucokinase with high substrate specificity. *FEMS Microbiol Lett* 226:405-411
- Hartman AL, Norais C, Badger JH, Delmas S, Haldenby S, Madupu R, Robinson J, Khouri H, Ren Q, Lowe TM, Maupin-Furlow J, Pohlschroder M, Daniels C, Pfeiffer F, Allers T, Eisen JA (2010) The complete genome sequence of *Haloferax volcanii* DS2, a model archaeon. *PLoS ONE* 5:e9605
- Henze K, Morrison HG, Sogin ML, Muller M (1998) Sequence and phylogenetic position of a class II aldolase gene in the amitochondriate protist, *Giardia lamblia*. *Gene* 222:163-168
- Hofmann K, Bucher P, Falquet L, Bairoch A (1999) The PROSITE database, its status in 1999. *Nucleic Acids Res* 27:215-219
- 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 H, Prangishvili D (2006) Sulfolobales. In: Rosenberg, Eugene, DeLong, Edward F., Lory, Stephen, Stackebrandt, Erko, and Thompson, Fabiano (eds) *The Prokaryotes*. pp 23-51
- Huber R, Langworthy TA, König H, Thomm M, Woese CR, Sleytr UB, Stetter KO (1986) *Thermotoga maritima* sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up to 90 °C. *Arch Microbiol* 144:324-333
- Huber R, 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
- Hurwitz J, Weissbach A (1959) The formation of 2-Keto-3-deoxyheptonic acid in extracts of *Escherichia coli* B; II. Enzymic studies. *J Biol Chem* 234:710-712
- Johnsen U, Dambeck M, Zaiss H, Fuhrer T, Soppa J, Sauer U, Schönheit P (2009) D-xylose degradation pathway in the halophilic archaeon *Haloferax volcanii*. *J Biol Chem* 284:27290-27303
- 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
- Johnsen U, Sutter JM, Zaiss H, Schönheit P (2013) L-Arabinose degradation pathway in the haloarchaeon *Haloferax volcanii* involves a novel type of L-arabinose dehydrogenase. *Extremophiles* 17:897-909
- Kengen SW, de Bok FA, van Loo ND, Dijkema C, Stams AJ, De Vos WM (1994) Evidence for the operation of a novel Embden-Meyerhof pathway that involves ADP-dependent kinases during sugar fermentation by *Pyrococcus furiosus*. *J Biol Chem* 269:17537-17541
- Kengen SW, Tuininga JE, de Bok FA, Stams AJ, De Vos WM (1995) Purification and characterization of a novel ADP-dependent glucokinase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J Biol Chem* 270:30453-30457
- Kim S, Lee SB (2006) Characterization of *Sulfolobus solfataricus* 2-keto-3-deoxy-D-gluconate kinase in the modified Entner-Doudoroff pathway. *Biosci Biotechnol Biochem* 70:1308-1316
- Koga S, Yoshioka I, Sakuraba H, Takahashi M, Sakasegawa S, Shimizu S, Ohshima T (2000) Biochemical characterization, cloning, and sequencing of ADP-dependent (AMP-forming) glucokinase from two hyperthermophilic Archaea, *Pyrococcus furiosus* and *Thermococcus litoralis*. *J Biochem (Tokyo)* 128:1079-1085
- Koning SM, Konings WN, Driessen AJ (2002) Biochemical evidence for the presence of two α -glucoside ABC-transport systems in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Archaea* 1:19-25
- Kornberg HL (2001) Routes for fructose utilization by *Escherichia coli*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 3:355-359
- Kouril T, Wieloch P, Reimann J, Wagner M, Zaparty M, Albers SV, Schomburg D, Ruoff P, Siebers B (2013) Unraveling the function of the two Entner-Doudoroff branches in the thermoacidophilic Crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. *FEBS J* 280:1126-1138
- Krishnan G, Altekar W (1991) An unusual class I (Schiff base) fructose-1,6-bisphosphate aldolase from the halophilic archaebacterium *Haloarcula vallismortis*. *Eur J Biochem* 195:343-350

- Kundig W, Ghosh S, Roseman S (1964) Phosphate bound to histidine in a protein as an intermediate in a novel phosphotransferase system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 52:1067-1074
- Kunst A, Draeger B, Ziegenhorn J (1986) D-Glucose. In: Bergmeyer, H.-U. (ed) *Methods of Enzymatic Analysis*, Third Edition edn. Verlag Chemie, Weinheim, pp 163-172
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- 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 Lett* 579:6865-6869
- Lanyi JK (1974) Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Bacteriol Rev* 38:272-290
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947-2948
- Lee SJ, Böhm A, Krug M, Boos W (2007) The ABC of binding-protein-dependent transport in Archaea. *Trends Microbiol* 15:389-397
- Lee WT, Flynn TG, Lyons C, Levy HR (1991) Cloning of the gene and amino acid sequence for glucose 6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*. *J Biol Chem* 266:13028-13034
- Lessie T, Neidhardt FC (1967) Adenosine triphosphate-linked control of *Pseudomonas aeruginosa* glucose-6-phosphate dehydrogenase. *J Bacteriol* 93:1337-1345
- Madigan MT, Oren A (1999) Thermophilic and halophilic extremophiles. *Curr Opin Microbiol* 2:265-269
- Marchler-Bauer A, Lu S, Anderson JB, Chitsaz F, Derbyshire MK, Weese-Scott C, Fong JH, Geer LY, Geer RC, Gonzales NR, Gwadz M, Hurwitz DI, Jackson JD, Ke Z, Lanczycki CJ, Lu F, Marchler GH, Mullokandov M, Omelchenko MV, Robertson CL, Song JS, Thanki N, Yamashita RA, Zhang D, Zhang N, Zheng C, Bryant SH (2011) CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res* 39:D225-D229
- Mathews II, McMullan D, 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, Rife CL, Schwarzenbacher R, Spraggon G, Stevens RC, van den BH, Weekes D, Wolf G, Hodgson KO, Wooley J, Deacon AM, Godzik A, Lesley SA, Wilson IA (2008) Crystal structure of 2-keto-3-deoxygluconate kinase (TM0067) from *Thermotoga maritima* at 2.05 Å resolution. *Proteins* 70:603-608
- Nakamura T, Kashima Y, Mine S, Oku T, Uegaki K (2012) Characterization and crystal structure of the thermophilic ROK hexokinase from *Thermus thermophilus*. *J Biosci Bioeng* 114:150-154

- Naylor CE, Gover S, Basak AK, Cosgrove MS, Levy HR, Adams MJ (2001) NADP⁺ and NAD⁺ binding to the dual coenzyme specific enzyme *Leuconostoc mesenteroides* glucose 6-phosphate dehydrogenase: different interdomain hinge angles are seen in different binary and ternary complexes. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57:635-648
- Nelson-Sathi S, Dagan T, Landan G, Janssen A, Steel M, McInerney JO, Deppenmeier U, Martin WF (2012) Acquisition of 1,000 eubacterial genes physiologically transformed a methanogen at the origin of Haloarchaea. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:20537-20542
- Nogae I, Johnston M (1990) Isolation and characterization of the ZWF1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*, encoding glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Gene* 96:161-169
- Ohara H, Russell RA, Uchida K, Kondo H (2004) Purification and characterization of NAD-specific 6-phosphogluconate dehydrogenase from *Leuconostoc lactis* SHO-54. *J Biosci Bioeng* 98:126-128
- Ohara H, Uchida K, Yahata M, Kondo H (1996) NAD-specific 6-phosphogluconate dehydrogenase in lactic acid bacteria. *Biosci Biotechnol Biochem* 60:692-693
- Ohshima N, Inagaki E, Yasuike K, Takio K, Tahirov TH (2004) Structure of *Thermus thermophilus* 2-Keto-3-deoxygluconate kinase: evidence for recognition of an open chain substrate. *J Mol Biol* 340:477-489
- Ohshima T, Kawakami R, Kanai Y, Goda S, Sakuraba H (2007) Gene expression and characterization of 2-keto-3-deoxygluconate kinase, a key enzyme in the modified Entner-Doudoroff pathway of the aerobic and acidophilic hyperthermophile *Sulfolobus tokodaii*. *Protein Expr Purif* 54:73-78
- Oren A (2013) *Halobacterium*: an extremely halophilic bacterium with archaeal properties. *FEMS Microbiol Lett* 342:1-9
- Orita I, Sato T, Yurimoto H, Kato N, Atomi H, Imanaka T, Sakai Y (2006) The ribulose monophosphate pathway substitutes for the missing pentose phosphate pathway in the archaeon *Thermococcus kodakaraensis*. *J Bacteriol* 188:4698-4704
- Persico MG, Viglietto G, Martini G, Toniolo D, Paonessa G, Moscatelli C, Dono R, Vulliamy T, Luzzatto L, D'Urso M (1986) Isolation of human glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) cDNA clones: primary structure of the protein and unusual 5' non-coding region. *Nucleic Acids Res* 14:2511-2522
- Persson B, Kallberg Y, Oppermann U, Jornvall H (2003) Coenzyme-based functional assignments of short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *Chem Biol Interact* 143-144:271-278
- Plaumann M, Pelzer-Reith B, Martin WF, Schnarrenberger C (1997) Multiple recruitment of class-I aldolase to chloroplasts and eubacterial origin of eukaryotic class-II aldolases revealed by cDNAs from *Euglena gracilis*. *Curr Genet* 31:430-438
- Potter JA, Kerou M, Lamble HJ, Bull SD, Hough DW, Danson MJ, Taylor GL (2008) The structure of *Sulfolobus solfataricus* 2-keto-3-deoxygluconate kinase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 64:1283-1287

- Purwantini E, Daniels L (1996) Purification of a novel coenzyme F₄₂₀-dependent glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Mycobacterium smegmatis*. J Bacteriol 178:2861-2866
- Purwantini E, Gillis TP, Daniels L (1997) Presence of F₄₂₀-dependent glucose-6-phosphate dehydrogenase in *Mycobacterium* and *Nocardia* species, but absence from *Streptomyces* and *Corynebacterium* species and methanogenic Archaea. FEMS Microbiol Lett 146:129-134
- Rangaswamy V, Altekar W (1994a) Characterization of 1-phosphofructokinase from halophilic archaeobacterium *Haloarcula vallismortis*. Biochim Biophys Acta 1201:106-112
- Rangaswamy V, Altekar W (1994b) Ketohexokinase (ATP:D-fructose 1-phosphotransferase) from a halophilic archaeobacterium, *Haloarcula vallismortis*: purification and properties. J Bacteriol 176:5505-5512
- Rawls KS, Yacovone SK, Maupin-Furlow JA (2010) GlpR represses fructose and glucose metabolic enzymes at the level of transcription in the haloarchaeon *Haloferax volcanii*. J Bacteriol 192:6251-6260
- Reher M, Fuhrer T, Bott M, Schönheit P (2010) The nonphosphorylative Entner-Doudoroff pathway in the thermoacidophilic euryarchaeon *Picrophilus torridus* involves a novel 2-keto-3-deoxygluconate-specific aldolase. J Bacteriol 192:964-974
- 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
- Rowland P, Basak AK, Gover S, Levy HR, Adams MJ (1994) The three-dimensional structure of glucose 6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides* refined at 2.0 Å resolution. Structure 2:1073-1087
- Rowley DL, Wolf RE, Jr. (1991) Molecular characterization of the *Escherichia coli* K-12 zwf gene encoding glucose 6-phosphate dehydrogenase. J Bacteriol 173:968-977
- Sambrook S, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2 edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Sapico V, Anderson RL (1969) D-fructose 1-phosphate kinase and D-fructose 6-phosphate kinase from *Aerobacter aerogenes*. A comparative study of regulatory properties. J Biol Chem 244:6280-6288
- Sato T, Atomi H (2011) Novel metabolic pathways in Archaea. Curr Opin Microbiol 14:307-314
- Say RF, Fuchs G (2010) Fructose 1,6-bisphosphate aldolase/phosphatase may be an ancestral gluconeogenic enzyme. Nature 464:1077-1081

- Scopes RK, Testolin V, Stoter A, Griffiths-Smith K, Algar EM (1985) Simultaneous purification and characterization of glucokinase, fructokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Zymomonas mobilis*. *Biochem J* 228:627-634
- Selig M, Xavier KB, Santos H, Schönheit P (1997) Comparative analysis of Embden-Meyerhof and Entner-Doudoroff glycolytic pathways in hyperthermophilic archaea and the bacterium *Thermotoga*. *Arch Microbiol* 167:217-232
- Siebers B, 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, Hensel R (1993) Glucose metabolism of the hyperthermophilic archaeum *Thermoproteus tenax*. *FEMS Microbiol Lett* 111:1-8
- Siebers B, Schönheit P (2005) Unusual pathways and enzymes of central carbohydrate metabolism in Archaea. *Curr Opin Microbiol* 8:695-705
- Skarlatos P, Dahl MK (1998) The glucose kinase of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 180:3222-3226
- Soderberg T (2005) Biosynthesis of ribose-5-phosphate and erythrose-4-phosphate in archaea: a phylogenetic analysis of archaeal genomes. *Archaea* 1:347-352
- Spang A, Hatzenpichler R, Brochier-Armanet C, Rattei T, Tischler P, Spieck E, Streit W, Stahl DA, Wagner M, Schleper C (2010) Distinct gene set in two different lineages of ammonia-oxidizing archaea supports the phylum Thaumarchaeota. *Trends Microbiol* 18:331-340
- Stetter KO (1993) Life at the upper temperature border. In: Tran Thanh Van, J., Tran Thanh Van, K., Mounolon, J. C., Schneider, J., and McKay, C. (eds) *Frontiers of Life*. Editions Frontiers, Gif-sur-Yvette, pp 195-219
- Stetter KO (1999) Extremophiles and their adaptation to hot environments. *FEBS Lett* 452:22-25
- Takano J-I, Kaidoh K, Kamo N (1995) Fructose transport by *Haloferax volcanii*. *Can J Microbiol* 41:241-246
- Titgemeyer F, Reizer J, Reizer A, Saier MHJ (1994) Evolutionary relationships between sugar kinases and transcriptional repressors in bacteria. *Microbiology* 140:2349-2354
- 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
- van Hugo H, Gottschalk G (1974) Purification and properties of 1-phosphofructokinase from *Clostridium pasteurianum*. *Eur J Biochem* 48:455-463
- Ventosa A, Marquez MC, Garabito MJ, Arahal DR (1998) Moderately halophilic gram-positive bacterial diversity in hypersaline environments. *Extremophiles* 2:297-304

- Williams JG, Gratzer WB (1971) Limitations of the detergent-polyacrylamide gel electrophoresis method for molecular weight determination of proteins. *J Chromatogr* 57:121-125
- 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
- Zaigler A, Schuster SC, Soppa J (2003) Construction and usage of a onefold-coverage shotgun DNA microarray to characterize the metabolism of the archaeon *Haloferax volcanii*. *Mol Microbiol* 48:1089-1105
- Zamboni N, Fischer E, Laudert D, Aymerich S, Hohmann HP, Sauer U (2004) The *Bacillus subtilis* yqjI gene encodes the NADP⁺-dependent 6-P-gluconate dehydrogenase in the pentose phosphate pathway. *J Bacteriol* 186:4528-4534

Danksagung

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

Frau Dr. U. Johnsen (Kiel) danke ich für die hilfreichen Diskussionen und die Hilfe bei vielen praktischen Fragen.

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

Der DFG danke ich für die Finanzierung der Arbeit.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern am Institut für Allgemeine Mikrobiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel möchte ich für die angenehme Zusammenarbeit und die schöne Zeit im Labor danken. Insbesondere gilt mein Dank Marcel, Tom, Jan-Moritz, Julia und Kerstin.

Lebenslauf

Andreas Pickl

Geb. am: 29. Februar 1984 in Ingolstadt

Staatsangehörigkeit: deutsch

Wohnort: Dänischenhagen

Schulbildung

1990 – 1994 Grundschule

1994 – 2003 Gymnasium

Juni 2003 allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

2003 – 2004 Zivildienst in der Caritas Sozialstation Kösching

Studium und Berufstätigkeit

Oktober 2004 – Oktober 2009 Studium der Biochemie an der Universität Regensburg

Januar 2009 – Oktober 2009 Experimentelle Diplomarbeit am Institut für Biochemie, Genetik und Mikrobiologie, Lehrstuhl für Genetik in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Seufert mit dem Thema: „Studien zur Funktion und Regulation der Cdc14 Phosphatase im Zellteilungszyklus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*.“

Oktober 2009 Abschluss des Studiums mit Diplom

November 2009 – Oktober 2010 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Sektion für molekulare Onkologie, UKSH Kiel

Dezember 2010 Beginn der experimentellen Arbeiten zu der vorliegenden Dissertation am Institut für Allgemeine Mikrobiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. P. Schönheit.