

# **Galactose- und Glucose-Stoffwechsel in *Haloferax volcanii***

Abbauwege, Enzyme und transkriptionelle Regulation

Dissertation

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

vorgelegt von

Julia-Beate Tästensen

Kiel 2015

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Februar 2011 bis Juni 2015 am Institut für Allgemeine Mikrobiologie der Christian-Albrechts Universität zu Kiel im Labor von Herrn Prof. Dr. Peter Schönheit durchgeführt.

Erster Gutachter: Prof. Dr. P. Schönheit

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. K. Heller

Tag der mündlichen Prüfung: 23.07.2015

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 23.07.2015

Der 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 Promotionsvorhaben wurden nicht unternommen.

.....

Julia-Beate Tästensen

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

Jan-Moritz Sutter, **Julia-Beate Tästensen**, Ulrike Johnsen and Peter Schönheit

Identification and characterization of glucose dehydrogenase, gluconate dehydratase and kdpg aldolase, key enzymes of the semiphosphorylative Entner-Doudoroff pathway in the haloarchaeon *Haloferax volcanii*.

**Julia-Beate Tästensen**, Ulrike Johnsen and Peter Schönheit

Galactose degradation via the DeLey-Doudoroff pathway in the haloarchaeon *Haloferax volcanii*.

**Julia-Beate Tästensen** and Peter Schönheit

Characterization and function of two glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases and a phosphoglycerate kinase in sugar metabolism of the haloarchaeon *Haloferax volcanii*.

**Inhalt**

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>Summary.....</b>	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>12</b>
<b>4</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>24</b>
<b>4.1</b>	<b>Wachstum von <i>Haloferax volcanii</i>.....</b>	<b>24</b>
<b>4.2</b>	<b>Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>28</b>
4.2.1	Plasmide und Primer.....	28
4.2.2	DNA-Isolierung .....	31
4.2.3	Polymerase-Kettenreaktion.....	32
4.2.4	Reinigung, Konzentrations- und Größenbestimmung von DNA .....	36
4.2.5	Restriktionshydrolyse und Ligation.....	37
4.2.6	Herstellung elektrokompetenter Zellen und Transformation von <i>E. coli</i> .....	37
4.2.7	Sequenzierung.....	38
4.2.8	Transformation von <i>Haloferax volcanii</i> .....	38
4.2.9	Konstruktion von Deletionsmutanten und deren Komplementationen .....	39
4.2.10	Herstellung von konditional letalen Mutanten .....	41
4.2.11	Transkriptnachweis mittels Northern Blot und RT-PCR.....	42
<b>4.3</b>	<b>Analytische Methoden .....</b>	<b>44</b>
4.3.1	Bestimmung von Galactosekonzentrationen in Wachstumsüberständen .....	44
4.3.2	Bestimmung von 2-Keto-3-Desoxyzuckersäuren.....	44
4.3.3	Proteinkonzentrationsbestimmung .....	46
4.3.4	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) .....	46
4.3.5	Bestimmung des nativen Molekulargewichts von Proteinen.....	48
<b>4.4</b>	<b>Überexpression, Reinigung und Charakterisierung von Proteinen.....</b>	<b>49</b>
4.4.1	Galactose-Dehydrogenase .....	50
4.4.2	Galactonat-Dehydratase.....	51
4.4.3	KDPGal-Aldolase und KDPG-Aldolase.....	52
4.4.4	Transkriptionsregulator.....	54
4.4.5	Katabole GAP-DH und anabole GAP-DH .....	54
4.4.6	Phosphoglyceratkinase .....	55
4.4.7	Galactokinase aus <i>Halorhabdus utahensis</i> .....	57
4.4.8	Bestimmung von Enzymaktivitäten in Rohextrakten .....	57
<b>4.5</b>	<b>Promotoranalyse der Galactonat-Dehydratase aus <i>H. volcanii</i> .....</b>	<b>58</b>

---

<b>5</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>61</b>
<b>5.1</b>	<b>D-Galactose-Abbau in <i>Haloferax volcanii</i> .....</b>	<b>62</b>
5.1.1	Galactose-Dehydrogenase .....	64
5.1.2	Galactonat-Dehydratase.....	70
5.1.3	KDPGal-Aldolase .....	74
5.1.4	Galactose-Bindeprotein .....	78
5.1.5	Transkriptionsaktivator DdcR .....	80
<b>5.2</b>	<b>D-Galactose-Abbau in <i>Halorhabdus utahensis</i>.....</b>	<b>85</b>
5.2.1	Galactokinase.....	85
<b>5.3</b>	<b>Glucose-Abbau in <i>Haloferax volcanii</i>.....</b>	<b>87</b>
5.3.1	KDPG-Aldolase .....	87
<b>5.4</b>	<b>GAP-Oxidation in <i>Haloferax volcanii</i> .....</b>	<b>94</b>
5.4.1	Transkriptionsanalysen .....	95
5.4.2	Katabole GAP-DH.....	96
5.4.3	Anabole GAP-DH.....	100
5.4.4	Phosphoglyceratkinase .....	104
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>106</b>
<b>6.1</b>	<b>D-Galactose-Abbau in <i>Haloferax volcanii</i> .....</b>	<b>107</b>
6.1.1	Galactose-Transport.....	109
6.1.2	Galactose-Dehydrogenase .....	111
6.1.3	Galactonat-Dehydratase.....	114
6.1.4	KDPGal-Aldolase und KDPG-Aldolase.....	116
6.1.5	Transkriptionsregulator.....	121
<b>6.2</b>	<b>Galactose-Abbau in <i>Halorhabdus utahensis</i> .....</b>	<b>123</b>
6.2.1	Galactokinase.....	123
<b>6.3</b>	<b>Genominformationen zu Galactose-Abbauwegen .....</b>	<b>124</b>
<b>6.4</b>	<b>Umsetzung von GAP zu 3-Phosphoglycerat in <i>Haloferax volcanii</i> .....</b>	<b>126</b>
6.4.1	GAP-Dehydrogenasen .....	126
6.4.2	Phosphoglyceratkinase .....	130
<b>6.5</b>	<b>Genominformationen zur GAP-Oxidation.....</b>	<b>133</b>
<b>6.6</b>	<b>Überblick über den Galactose- und Glucose-Abbau, sowie die GAP- Umsetzung in <i>Haloferax volcanii</i> .....</b>	<b>135</b>
<b>7</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>137</b>

## 1 Zusammenfassung

Genomanalysen deuten darauf hin, dass in dem Haloarchaeon *Haloferax volcanii* Galactose über einen DeLey-Doudoroff- (DD) Weg abgebaut wird. Der Transport von Galactose und die beteiligten Enzyme des Galactose-Abbaus wurden bisher nicht untersucht. Genomanalysen des Haloarchaeons *Halorhabdus utahensis* deuten darauf hin, dass Galactose, anders als für *H. volcanii* postuliert, über einen Leloir-Weg abgebaut wird. Untersuchungen zum Galactose-Abbau in *H. utahensis* wurden bisher nicht durchgeführt. Weiterhin deuten Untersuchungen darauf hin, dass Glucose in *H. volcanii* über einen semiphosphorylierten Entner-Doudoroff- (spED) Weg abgebaut wird. Das Schlüsselenzym dieses Wegs, die KDPG-Aldolase, wurde bisher nicht detailliert charakterisiert. Die Enzyme der Oxidation von Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP), einem Intermediat des Galactose- und Glucose-Abbaus in *H. volcanii* wurden nicht untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurden der Transport und der Abbau von Galactose, sowie die transkriptionelle Regulation der Gene des Galactose-Abbaus in *H. volcanii* untersucht. In *H. utahensis* wurde das Schlüsselenzym des Leloir-Wegs charakterisiert. Außerdem wurde die KDPG-Aldolase, sowie die Enzyme der GAP-Oxidation zu 3-Phosphoglycerat in *H. volcanii* detailliert untersucht. Im Folgenden werden die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse zusammengefasst.

### **Abbau von Galactose in *Haloferax volcanii***

Im Genom von *H. volcanii* wurde ein Gencluster identifiziert, der die Gene eines ABC-Transporters und der Enzyme des DD-Wegs enthält.

**Transport.** Eine Deletionsmutante des Substratbindepoteins des ABC-Transporters zeigte im Vergleich zum Wildtyp ein deutlich verlangsamtes Wachstum auf Galactose. Dies deutet darauf hin, dass das Substratbindepotein und der entsprechende ABC-Transporter am Transport von Galactose beteiligt sind.

**Enzyme.** Der Gencluster enthält Gene, die für die Enzyme des DD-Wegs, Galactose-Dehydrogenase, Galactonat-Dehydratase und 2-Keto-3-Desoxy-6-Phosphogalactonat- (KDPGal) Aldolase kodieren. In Zellextrakten wurden die entsprechenden Enzymaktivitäten nachgewiesen, die nach Wachstum auf Galactose im Vergleich zu Glucose 20- bis 40-fach erhöht waren. Die Transkriptmengen der kodierenden Gene der Galactose-Dehydrogenase, Galactonat-Dehydratase und KDPGal-Aldolase waren in Galactose-gewachsenen Zellen im Vergleich zu Glucose-gewachsenen Zellen deutlich erhöht, was dafür spricht, dass sie spezifisch durch Galactose induziert werden. Die Gene wurden homolog exprimiert, die

Enzyme gereinigt und charakterisiert. Die Galactose-Dehydrogenase katalysierte die NADP<sup>+</sup>-abhängige Oxidation von Galactose, nicht jedoch die Umsetzung von Glucose. Die Galactonat-Dehydratase setzte spezifisch Galactonat um, Gluconat wurde nicht umgesetzt. Die KDPGal-Aldolase katalysierte sowohl die Spaltung von KDPGal als auch des C<sub>4</sub>-Epimers KDPG mit vergleichbaren Effizienzen. Um die funktionelle Beteiligung der Enzyme am Galactose-Abbau in *H. volcanii* zu zeigen, wurden chromosomale Deletionsmutanten hergestellt. Diese wuchsen nicht mehr auf Galactose, auf Glucose wuchsen sie hingegen unverändert. Dies zeigt, dass D-Galactose in *H. volcanii* über die beschriebenen Enzyme des DD-Wegs zu Pyruvat und GAP abgebaut wird. Dies ist der erste Nachweis von Enzymen des DD-Wegs in Archaea.

**Regulation.** Im Galactose-Gencluster von *H. volcanii* liegt zudem ein Gen, das für einen putativen Transkriptionsregulator kodiert. Eine chromosomale Deletionsmutante dieses Regulators wuchs nicht mehr auf Galactose, jedoch unverändert auf Glucose. Dieses Ergebnis zeigt, dass der Transkriptionsregulator essentiell am Abbau von Galactose beteiligt ist. Um die mögliche Funktion als Transkriptionsregulator des Galactose-Abbaus zu untersuchen, wurde die Transkription der Galactonat-Dehydratase im Wildtyp und in der Deletionsmutante des Transkriptionsregulators analysiert. Dabei zeigte sich, dass nach Induktion mit Galactose das Transkript der Galactonat-Dehydratase nur im Wildtyp nachgewiesen werden konnte, nicht jedoch in der Deletionsmutante. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass der Transkriptionsregulator als transkriptioneller Aktivator des Gens der Galactonat-Dehydratase fungiert.

### **Galactose Abbau in *Halorhabdus utahensis***

Genomanalysen in *H. utahensis* deuten darauf hin, dass, anders als in *H. volcanii*, die Gene des DD-Wegs fehlen. Stattdessen sind im Genom von *H. utahensis* alle Gene vorhanden, die für die Enzyme eines Leloir-Wegs kodieren. Das Schlüsselenzym des Leloir-Wegs, die Galactokinase, wurde überexprimiert, gereinigt und charakterisiert. Das rekombinante Enzym katalysierte die ATP-abhängige Phosphorylierung von Galactose.

### **Abbau von Glucose in *Haloferax volcanii***

Das Schlüsselenzym des spED-Wegs, die KDPG-Aldolase, wurde charakterisiert. Das kodierende Gen wurde konstitutiv nach Wachstum auf Glucose und Galactose exprimiert. Das rekombinante Enzym katalysierte die Spaltung von KDPG. KDPGal wurde nicht umgesetzt. Eine Deletionsmutante wuchs zunächst nicht mehr auf Glucose, auf Galactose war das

Wachstum unverändert im Vergleich zum Wildtyp. Nach einer längeren Inkubationsphase konnte die Deletionsmutante jedoch wieder auf Glucose wachsen. Es wurde gezeigt, dass dieses Wachstum darauf zurückzuführen war, dass die KDPGal-Aldolase die KDPG-Aldolase in der Deletionsmutante ersetzen kann. Diese Ersetzbarkeit war ungewöhnlich, da das Gen der KDPGal-Aldolase im Wildtyp bei Wachstum auf Galactose transkriptionell induziert wird. In der Deletionsmutante zeigte sich eine erhöhte Transkriptmenge des Gens der KDPGal-Aldolase bei Wachstum auf Glucose, was auf eine Deregulation der Transkription unter diesen Bedingungen hindeutet.

### **Glycerinaldehyd-3-Phosphat Oxidation zu 3-Phosphoglycerat in *Haloferax volcanii***

Die Enzyme der Oxidation von Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP), einem Intermediat des Glucose- und Galactose-Abbaus, wurden untersucht. Das Genom von *H. volcanii* enthält ein Gencluster, dessen Gene für zwei putative GAP-Dehydrogenasen (*gapI* und *gapII*) und eine Phosphoglyceratkinase (*pgk*) kodieren.

*gapI* wurde als katabole GAP-DH charakterisiert: Die Transkription des Gens wurde nach Wachstum auf Glucose im Vergleich zu Wachstum auf Casaminsäuren induziert. Das rekombinante Enzym katalysierte die Oxidation von GAP mit hoher Spezifität für NAD<sup>+</sup> als Elektronenakzeptor. Eine Deletionsmutante wuchs nicht mehr auf den Zuckern Glucose, Galactose und Fructose, zeigte jedoch unverändertes Wachstum auf Acetat und Casaminsäuren, was eine essentielle Beteiligung am Zuckerkatabolismus zeigt. Dies ist der erste funktionelle Nachweis einer katabolen GAP-DH in der Domäne der Archaea.

*gapII* wurde als anabole GAP-DH charakterisiert: Das Gen wurde bei Wachstum auf Casaminsäuren, nicht jedoch auf Glucose, transkriptionell induziert. Das rekombinante Enzym katalysierte die Reduktion von 1,3-Bisphosphoglycerat mit NADPH als Elektronendonator. Eine konditional letale Mutante zeigte ein stark verschlechtertes Wachstum auf den Substraten Acetat und Casaminsäuren, das Wachstum auf Glucose war nicht verändert. Diese Daten zeigen eine Beteiligung des Enzyms am Anabolismus.

*pgk* kodiert für eine Phosphoglyceratkinase, deren Transkript konstitutiv bei Wachstum auf Glucose und Casaminsäuren vorhanden war. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass die PGK eine amphibole Funktion im Stoffwechsel von *H. volcanii* erfüllt. Das gereinigte, rekombinante Enzym katalysierte die ATP-abhängige Phosphorylierung von 3-Phosphoglycerat zu 1,3-Bisphosphoglycerat.



## 2 Summary

Genome analyses suggest that in the halophilic archaeon *Haloferax volcanii* galactose is degraded via a DeLey-Doudoroff pathway (DD). The transport of galactose and the enzymes involved in galactose degradation in *H. volcanii* have not been characterized so far. Genome analyses of the halophilic archaeon *Halorhabdus utahensis* suggest, that galactose, in contrast to *H. volcanii*, is degraded via the classical Leloir-pathway. Enzymes involved in galactose degradation in *H. utahensis* have not been analyzed so far. Furthermore, recent studies indicate that glucose is degraded via a semiphosphorylative Entner-Doudoroff pathway (spED). The key enzyme of this pathway, KDPG aldolase, has not been characterized in detail. Also, the enzymes involved in oxidation of glyceraldehyde-3-phosphate (GAP), an intermediate of galactose and glucose catabolism in *H. volcanii*, have not been analyzed so far.

In this thesis the transport and degradation of galactose as well as transcriptional regulation of the genes involved in galactose degradation in *H. volcanii* were investigated. In *H. utahensis* the key enzyme of Leloir pathway was characterized. Moreover, KDPG aldolase, the key enzyme of glucose degradation as well as enzymes catalyzing GAP oxidation to 3-phosphoglycerate were investigated in detail in *H. volcanii*. The following results were obtained in this thesis.

### **Degradation of galactose in *Haloferax volcanii***

In the genome of *H. volcanii* a gene cluster was identified, which contains the genes of a putative ABC transporter and enzymes of a DD pathway.

**Transport.** A chromosomal deletion mutant of the substrate binding protein of the ABC transporter caused a restricted growth phenotype on D-galactose. These data indicate that the substrate binding protein and the corresponding ABC transporter are involved in galactose transport.

**Enzymes.** The gene cluster contains genes of a putative galactose dehydrogenase, galactonate dehydratase and 2-keto-3-deoxy-6-phosphogalactonate (KDPGal) aldolase of the DD pathway. The corresponding enzyme activities were demonstrated in cell extracts, and showed a 20- to 40-fold increase after growth on galactose as compared to glucose. Transcript levels of genes encoding galactose dehydrogenase, galactonate dehydratase and KDPGal aldolase were significantly increased in galactose grown cells as compared to glucose grown cells, indicating a transcriptional upregulation of these genes by galactose. The genes were

homologously expressed, the enzymes were purified and characterized. Galactose dehydrogenase catalyzed the NADP<sup>+</sup> dependent oxidation of galactose, but did not convert glucose. Galactonate dehydratase catalyzed the specific dehydration of galactonate, rather than of gluconate. The KDPGal aldolase catalyzed the cleavage of both KDPGal and the C<sub>4</sub> epimer KDPG with comparable efficiencies. To prove the functional involvement of these enzymes in galactose degradation in *H. volcanii*, chromosomal deletion mutants were constructed. These mutants did not grow on galactose, whereas growth on glucose was not affected. These results show that D-galactose is degraded via the enzymes of the DD pathway forming pyruvate and GAP. This is the first evidence of a DD pathway in the domain of archaea.

**Regulation.** The galactose gene cluster of *H. volcanii* contains a gene encoding a transcriptional regulator DdcR. A chromosomal deletion mutant of this regulator did not grow on galactose, whereas growth on glucose was not affected. This result demonstrates that DdcR is essentially involved in growth on galactose. To analyze whether DdcR is a transcriptional regulator of genes involved in galactose degradation, transcript levels of galactonate dehydratase were compared in wildtype and in *ddcR* deletion mutant. The transcript of galactonate dehydratase was detected after induction with galactose only in wildtype and not in the *ddcR* deletion mutant. This indicates that DdcR is a transcriptional activator of galactonate dehydratase.

### **Galactose degradation in *Halorhabdus utahensis***

Genome analyses indicate, that *H. utahensis*, in contrast to *H. volcanii*, did not contain the genes of the DD pathway. Instead, the *H. utahensis* genome contains genes encoding putative enzymes of the Leloir pathway. The key enzyme of this pathway, galactokinase, was expressed, purified and characterized. The recombinant enzyme catalyzed the ATP-dependent phosphorylation of galactose.

### **Glucose degradation in *Haloferax volcanii***

The key enzyme of spED pathway, KDPG aldolase, was characterized. The coding gene was expressed constitutively after growth on glucose and galactose. The recombinant enzyme catalyzed the conversion of KDPG, rather than of KDPGal. Initially, a chromosomal deletion mutant did not grow on glucose, whereas growth on galactose was not affected. After prolonged incubation time growth on glucose was restored. It could be shown that this growth phenotype was caused by a functional substitution of KDPG aldolase by KDPGal aldolase.

Under these conditions increased transcript levels of KDPGal aldolase were observed in the glucose grown KDPGal aldolase deletion mutant as compared to wildtype. This indicates a deregulation of KDPGal aldolase transcription, since KDPGal aldolase transcription in wildtype is induced by galactose, rather than glucose.

### **Glyceraldehyde-3-phosphate oxidation to 3-phosphoglycerate in *Haloferax volcanii***

The enzymes of glyceraldehyde-3-phosphate (GAP) oxidation, an intermediate of glucose and galactose degradation, were investigated. The genome of *H. volcanii* comprises a gene cluster containing genes encoding two GAP dehydrogenases (*gapI* and *gapII*) and a phosphoglycerate kinase (*pgk*).

*gapI* was characterized as catabolic GAP-DH: The transcription of *gapI* was induced after growth on glucose as compared to growth on casamino acids. The recombinant enzyme catalyzed the oxidation of GAP with high specificity for NAD<sup>+</sup> as an electron acceptor. A *gapI* deletion mutant did not grow on sugars such as glucose, galactose and fructose. However, growth on acetate and casamino acids was not affected. This demonstrates an involvement of *gapI* in sugar catabolism. This is the first functional evidence for a catabolic GAP-DH in the domain of archaea.

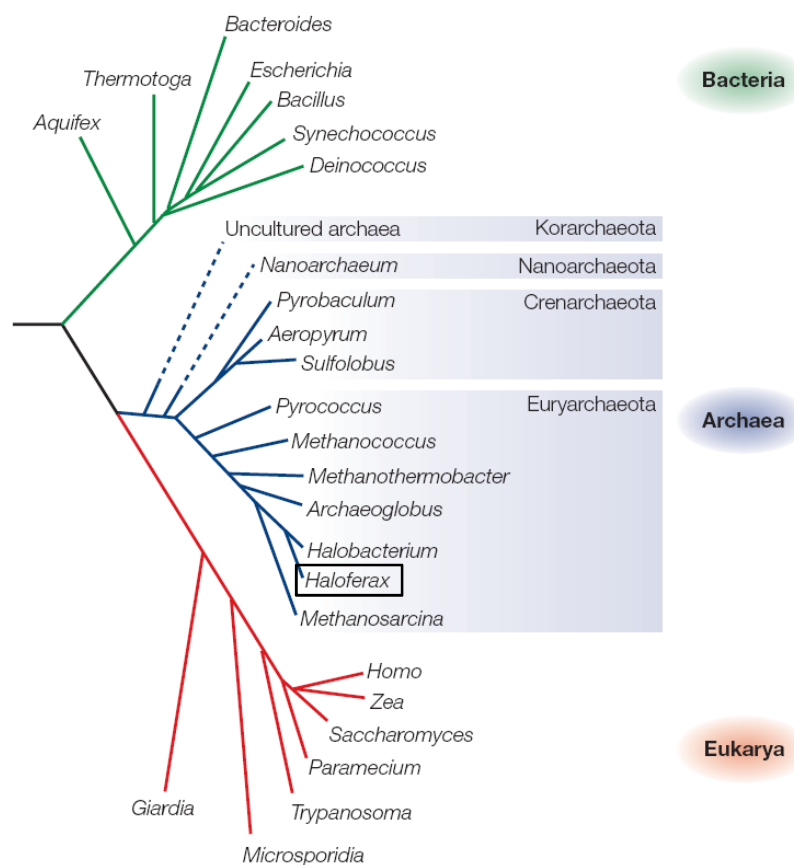
*gapII* was characterized as anabolic GAP-DH: The transcription of *gapII* was induced in cells grown on casamino acids as compared to glucose. The recombinant enzyme catalyzed the reduction of 1,3-bisphosphoglycerate with NADPH as an electron donor. A conditional depletion mutant caused a restricted growth phenotype during growth on acetate and casamino acids, whereas growth on glucose was not affected. These data indicate an involvement of this enzyme in gluconeogenesis.

*pgk* encodes a phosphoglycerate kinase. Transcript of *pgk* was constitutively expressed by growth on glucose and casamino acids. This result indicates that *pgk* has a function in catabolism as well as in anabolism of *H. volcanii*. The purified, recombinant enzyme catalyzed the ATP dependent phosphorylation of 3-phosphoglycerate forming 1,3-bisphosphoglycerate.

### 3 Einleitung

Der Stammbaum des Lebens wurde aufgrund von 16S- und 18S-rRNA Analysen erstellt und gliedert sich in die Domänen der Eukarya, Bacteria und Archaea (Woese 1987; Woese et al. 1990) (Abbildung 1). Die Archaea wurden zunächst in die Abteilungen der Euryarchaeota und Crenarchaeota unterteilt (Woese et al. 1990). Kürzlich wurden außerdem Organismen entdeckt, die in die neuen Abteilungen der Kor-, Nano-, Thaum- und Aigarchaeota eingeordnet wurden (Elkins et al. 2008; Huber et al. 2002; Brochier-Armanet et al. 2008; Spang et al. 2010; Nunoura et al. 2011).

Zu den bisher am besten untersuchten Phyla der Archaea gehören die Euryarchaeota, zu denen auch *Haloferax volcanii* und *Picrophilus torridus* zählen, sowie die Crenarchaeota, in deren Gruppe unter anderem *Sulfolobus solfataricus* und *Thermoproteus tenax* eingeordnet werden.



**Abbildung 1 Phylogenetischer Stammbaum des Lebens basierend auf 16S- und 18S-rRNA Analysen (Allers and Mevarech 2005).** Dargestellt sind Vertreter der Domänen der Bacteria, Archaea und Eukarya. Die Organismen der Archaea sind untergliedert in die Abteilungen der Kor-, Nano-, Cren- und Euryarchaeota. Umrahmt ist die Gattung *Haloferax*. Ein Organismus dieser Gattung, *Haloferax volcanii*, wurde in der vorliegenden Arbeit genauer untersucht.

Die Archaea unterscheiden sich in vielen biochemischen und molekularen Eigenschaften von den Bacteria und Eukarya. Der Aufbau der Zellmembran aus Di- oder Tetraetherlipiden in Archaea unterscheidet sich deutlich von der Zellmembran aus Bacteria und Eukarya, die aus Glycerin-Fettsäure-Esterlipiden besteht (Langworthy und Pond 1986; De Rosa and Gambacorta 1988). Außerdem besteht die Zellwand der Archaea nicht wie die der Bacteria aus Peptidoglykan, sondern ist im Wesentlichen aus Proteinen, Glykoproteinen und Polysacchariden aufgebaut (Albers und Meyer 2011). Während der Aufbau des basalen Transkriptionsapparats der Archaea dem der Eukarya ähnelt, sind die meisten Transkriptionsregulatoren aus Archaea mit denen der Bacteria vergleichbar (Werner und Grohmann 2011). So weisen einige archaeelle Transkriptionsregulatoren ein helix-turn-helix-Motiv für die DNA-Bindung auf, wie es in Bacteria beschrieben ist (Thomm 2007).

Die bisher bekannten Archaea besiedeln zumeist extreme Standorte, die z. B. sehr hohe Temperaturen, niedrige pH-Werte oder einen hohen Gehalt an Salz aufweisen. Zu den Crenarchaeota gehören vor allem hyperthermophile Organismen, die meist anaerobe Standorte besiedeln. Zu den *Thermoproteales* zählt unter anderem *T. tenax*, der anaerob bei einem Temperaturoptimum von 88 °C und einem pH-Optimum von 5,5 lebt (Huber et al. 2006). Zu der Ordnung der *Desulfurococcales* gehören z. B. Mitglieder der anaeroben *Desulfurococcus* Familie, die ein Temperatur-Optimum von 85-92 °C aufweisen (Zillig et al. 1982; Huber und Stetter 2006). Ein weiterer Vertreter der Crenarchaeota ist *S. solfataricus*, der zur Ordnung der *Sulfolobales* zählt (Burggraf et al. 1997). Dieser Organismus ist thermoacidophil und wächst aerob optimal bei einem pH-Wert von 4,5 und einer Temperatur von 87 °C (Brock et al. 1972; Segerer und Stetter 1992; Huber und Prangishvili 2006).

Zu den Euryarchaeota, deren Mitglieder sehr unterschiedliche Habitate besiedeln, zählen unter anderem thermoacidophile Vertreter wie z. B. *Picrophilus torridus*, der aerob bei einem Temperaturoptimum von 60 °C und einem pH-Optimum von 0,7 wächst (Schleper et al. 1995b; Schleper et al. 1995a). Außerdem gehören zu den Euryarchaeota auch mesophile und thermophile methanogene Organismen wie *Methanosarcina* und *Methanocaldococcus*, hyperthermophile anaerobe Organismen wie *Pyrococcus* und *Thermococcus* und halophile Organismen aus der Ordnung der *Halobacteriales*.

## Halophile Organismen

Halophile Mikroorganismen wurden bisher vor allem in der Domäne der Archaea identifiziert. Einige an hohe Salzkonzentrationen angepasste Mikroorganismen wurden allerdings auch in den anderen beiden Domänen des Lebens, den Eukarya und Bacteria entdeckt. Es sind zwei unterschiedliche Mechanismen bekannt mit denen sich halophile oder halotolerante Organismen an die osmotischen Bedingungen ihrer natürlichen Lebensräume angepasst haben. Diese Strategien verhindern einen Wasserverlust der Zellen durch die hohen extrazellulären Salzkonzentrationen.

Eine Strategie der Salz-Adaptation, die von halophilen Bacteria und Eukarya genutzt wird, ist die zelluläre Anreicherung von gelösten osmotisch wirksamen Substanzen. Diese kompatiblen gelösten Solute können zum Beispiel Ektoin, Glycinbetain oder Zucker wie Saccharose und Trehalose sein und sind unter anderem in  $\gamma$ -*Proteobacteria* und phototrophen Eubacteria nachgewiesen worden (Galinski 1993; Oren 1999). Halotolerante Algen der Gattung *Dunaliella*, die im Toten Meer vorkommen, akkumulieren innerhalb der Zelle Glycerin als kompatible gelöste Substanz (Avron 1986).

Bacteria aus der Ordnung *Haloanaerobiales* und *Salinibacter*-Arten, sowie halophile Archaea der Ordnung *Halobacteriales* wenden hingegen eine andere Strategie der Salzadaptation an. Diese Organismen akkumulieren intrazellulär hohe Konzentrationen von Kaliumchlorid (Oren 1999; Oren 2013). An die hohe intrazelluläre Salzkonzentration müssen hierbei auch alle Enzyme und strukturellen Zellkomponenten angepasst sein. Proteine dieser Organismen haben daher oftmals einen hohen Anteil an sauren Aminosäuren, wie Glutamat und Aspartat und nur einen geringen Anteil an hydrophoben Aminosäuren (Dennis und Shimmin 1997; Danson und Hough 1998). Durch die negative Ladung der sauren Aminosäuren, die sich hauptsächlich an der Proteinoberfläche befinden, wird eine stabile Hydrathülle gewährleistet, die das Ausfällen von Proteinen verhindert (Danson und Hough 1998; Mevarech et al. 2000).

*Haloferax volcanii* (früher *Halobacterium*) wird innerhalb der Euryarchaeota zu den *Halobacteriaceae* gezählt und lebt in hypersalinen Biotopen mit hohen Salzkonzentrationen, wie z. B. natürlichen Salzlaken, Meersalzgewinnungsanlagen und Seen wie dem Toten Meer (Oren 2007). *H. volcanii* ist moderat halophil, wächst optimal bei NaCl-Konzentrationen von 10-12 % (Mullakhanbhai und Larsen 1975; Torreblanca et al. 1986) und kann aerob, aber auch anaerob mit Hilfe der Nitratatmung wachsen (Mevarech und Werczberger 1985). Mittlerweile hat sich *H. volcanii* zu einem beliebten Modellorganismus unter anderem für die Untersuchung des Stoffwechsels halophiler Archaeen entwickelt. Das Genom wurde sequenziert und der Organismus wächst in Minimal-Medium mit verschiedenen

Kohlenstoffquellen, unter anderem verschiedenen Zuckern (Hartman et al. 2010). Außerdem kann *H. volcanii* genetisch modifiziert werden. So ist es zum Beispiel möglich, *H. volcanii* mit Plasmiden zu transformieren (Cline et al. 1989; Leigh et al. 2011). Weiterhin können über die pop-in/pop-out Methode markerlose Deletionsmutanten mit Hilfe einer Uracil-auxotrophen Mutante, in der das für eine Orotat-Phosphoribosyl-Transferase kodierende Gen *pyrE2* deletiert ist, generiert werden (Allers et al. 2004; Bitan-Banin et al. 2003). Durch eine markerlose Deletion ist auch die Herstellung von Doppel- oder Dreifachmutanten in *H. volcanii* möglich. Mittlerweile gibt es weitere auxotrophe *Haloferax*-Stämme, die für eine Selektion genutzt werden können. Durch ein System zur homologen Überexpression halophiler Proteine in *H. volcanii* können die mit heterologen Expressionssystemen verbundenen Probleme umgangen werden (Allers 2010). Eine heterologe Überexpression halophiler Proteine in *E. coli* ist durch das fehlende intrazelluläre Salz oftmals mit einer Fehlfaltung und Aggregation der Proteine verbunden (Allers 2010). Es wurden außerdem verschiedene Reportergensysteme entwickelt, mit denen die Untersuchung von Promotoraktivitäten in *H. volcanii* mit Hilfe einer halophilen  $\beta$ -Galactosidase oder Dihydrofolat-Reductase möglich ist (Brenneis et al. 2007; Holmes und Dyll-Smith 2000; Maier et al. 2015). Durch diese Vielfalt an vorhandenen Methoden ist *H. volcanii* ein guter Modellorganismus für die Untersuchung von Zucker-Stoffwechselwegen in halophilen Archaea.

*Halorhabdus utahensis* wurde aus dem Sediment des Great Salt Lake in Utah (USA) isoliert (Waino et al. 2000). Der Organismus ist an extreme Salzkonzentrationen angepasst und zeigt optimales Wachstum bei 27 % NaCl. Außerdem wurde gezeigt, dass *H. utahensis* aerob auf verschiedenen Zuckern wachsen kann. Wachstum auf Acetat, Lactat oder Casamino-säuren konnte hingegen nicht nachgewiesen werden (Waino et al. 2000).

In den letzten Jahren wurde in der Domäne der Archaea, insbesondere in den thermoacidophilen, hyperthermophilen und halophilen Archaea, der Zuckerstoffwechsel detailliert analysiert. Dabei wurden Untersuchungen zum Zuckertransport, sowie zu Hexose- und Pentose-Abbauwegen durchgeführt.

### **Zucker-Transport in Archaea**

In der Domäne der Archaea sind Zucker-Aufnahme-Systeme in *S. solfataricus*, *Pyrococcus furiosus* und *Thermococcus litoralis* gut untersucht (Albers et al. 2004). Es sind bisher hauptsächlich sogenannte ATP-Binding-Cassette (ABC-) Transporter für die Aufnahme von Zuckern in Archaea nachgewiesen worden (Albers et al. 2004; Lee et al. 2007). ABC-

Transporter bestehen aus zwei membranintegralen Permeasen, zwei cytoplasmatischen ATPasen und einem Substratbindeprotein. Die Aufnahme von Zuckern über ABC-Transporter ist gekoppelt an einen Verbrauch von ATP. Das Substratbindeprotein ist als extrazelluläres Protein für die Erkennung und Bindung des Substrats zuständig (Berntsson et al. 2010; Wilkens 2015). In *S. solfataricus* wurden zwei ABC-Transporter identifiziert, die für die Aufnahme von Glucose und Galactose bzw. von Arabinose spezifisch sind (Albers et al. 1999; Elferink et al. 2001; Lubelska et al. 2006). Darüber hinaus wurden in *S. solfataricus* für den Import von Di- bzw. Oligosacchariden weitere ABC-Transporter nachgewiesen (Elferink et al. 2001). In *P. furiosus* und *T. litoralis* wurden außerdem Maltose-ABC-Transporter identifiziert (Koning et al. 2001; Xavier et al. 1996).

Andere aus Bacteria bekannte Zucker-Transport-Systeme wie das Phosphotransferase-System und Symporter sind in Archaea eher ungewöhnlich. Kürzlich wurde aber das erste Phosphotransferase-System in Archaea nachgewiesen, dass essentiell an der Aufnahme von Fructose beteiligt ist. Das Phosphotransferase-System wurde vermutlich durch lateralen Gentransfer aus der Domäne der Bacteria aufgenommen (Pickl et al. 2012).

### **Glucose-Abbauwege in Bacteria und Archaea**

In Bacteria wird Glucose entweder über den Emden-Meyerhof-Weg (EM) oder über den Entner-Doudoroff-Weg (ED) zu Pyruvat abgebaut. Im klassischen EM-Weg (Glykolyse) wird die Umsetzung von einem Molekül Glucose zu dem zentralen Intermediat Fructose-1,6-Bisphosphat über eine Kinase, Isomerase und eine Phosphofruktokinase katalysiert. Fructose-1,6-Bisphosphat wird anschließend von einer Aldolase zu Dihydroxyacetonphosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) gespalten. Die folgende Isomerisierung von Dihydroxyacetonphosphat führt zur Entstehung von einem weiteren Molekül GAP. Die beiden Moleküle GAP werden von einer GAP-Dehydrogenase zu 1,3-Bisphosphoglycerat umgesetzt. Unter ATP-Gewinnung werden diese von einer Phosphoglyceratkinase zu 3-Phosphoglycerat umgesetzt. Die weitere Umsetzung zu zwei Pyruvat wird von einer Phosphoglycerat-Mutase, einer Enolase und einer Pyruvat-Kinase katalysiert.

Im klassischen ED-Weg der Bacteria wird Glucose zunächst durch eine Glucokinase zu Glucose-6-Phosphat phosphoryliert, welches dann von einer Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase zu 6-Phosphogluconat oxidiert wird. Eine 6-Phosphogluconat-Dehydratase setzt 6-Phosphogluconat zu 2-Keto-3-Desoxy-6-Phosphogluconat (KDPG) um, dem zentralen Intermediat dieses Weges. KDPG wird dann durch die KDPG-Aldolase zu GAP und Pyruvat gespalten (Abbildung 2 A). Die weitere Umsetzung von GAP zu einem zweiten Molekül

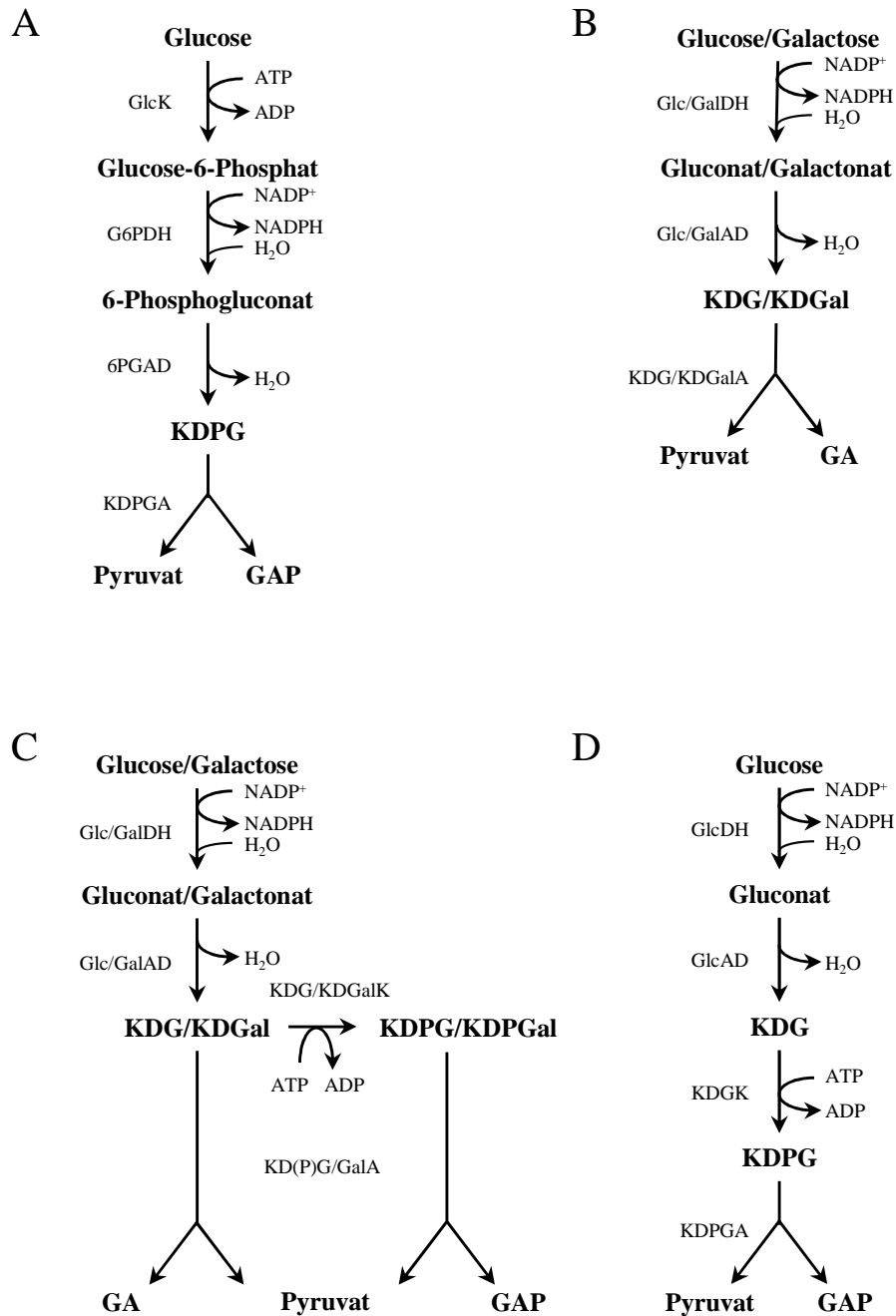


Pyruvat wird durch die aus dem EM-Weg bekannten Enzyme durchgeführt. Die klassischen aus Bacteria bekannten Wege des Glucose-Abbaus wurden bisher in Archaea nicht nachgewiesen. Stattdessen haben vergleichende Analysen ergeben, dass der Glucose-Abbau in anaeroben Archaea vorwiegend über modifizierte Formen des EM-Wegs und in aeroben Archaea hauptsächlich über modifizierte Versionen des ED-Wegs durchgeführt wird (Bräsen et al. 2014; Siebers und Schönheit 2005).

Die modifizierten ED-Wege in Archaea umfassen eine nicht phosphorylierte Variante (npED), die vor allem in thermoacidophilen Euryarchaeota wie *Thermoplasma acidophilum* und *Picrophilus torridus* vorkommt (Reher et al. 2010). In *S. solfataricus* und *Thermoproteus tenax* wurde ein verzweigter ED-Weg beschrieben (Ahmed et al. 2005). Außerdem wurde eine semiphosphorylierte Variante (spED) in halophilen Archaea postuliert, die Schlüsselenzyme wurden bisher nicht vollständig untersucht (Pickl et al. 2014; Siebers und Schönheit 2005). Die verschiedenen ED-Wege wurden in Abbildung 2 dargestellt.

Im npED-Weg (Abbildung 2 B) wird Glucose zunächst über eine Glucose-Dehydrogenase zu Gluconat oxidiert, welches dann mit einer Gluconat-Dehydratase unter Wasser-Abspaltung zu 2-Keto-3-Desoxygluconat (KDG) umgesetzt wird. Eine KDG-spezifische Aldolase spaltet KDG in Glycerinaldehyd und Pyruvat (Reher et al. 2010). Für die Enzyme des npED-Wegs in *P. torridus* wurde außerdem gezeigt, dass sie auch Galactose, das C<sub>4</sub>-Epimer von Glucose, und die folgenden Derivate Galactonat und KDGal umsetzen können.

Im verzweigten ED-Weg (Abbildung 2 C), der in *S. solfataricus* und *T. tenax* nachgewiesen wurde, wird Glucose, wie im npED beschrieben, zu KDG umgesetzt, welches dann entweder durch eine bifunktionelle KD(P)G-Aldolase zu Glycerinaldehyd und Pyruvat gespalten wird oder von einer KDG-Kinase zu KDPG phosphoryliert wird. KDPG wird ebenfalls durch die KD(P)G-Aldolase zu GAP und Pyruvat gespalten (Ahmed et al. 2005). Außerdem wurde für die Glucose-abbauenden Enzyme aus *S. solfataricus* gezeigt, dass sie in der Lage sind jeweils auch Galactose und die während der Umsetzung entstehenden Galactose-Derivate umzusetzen. Dieser verzweigte ED-Weg in *S. solfataricus* könnte damit nicht nur für die Umsetzung von Glucose, sondern auch für die Umsetzung von Galactose verwendet werden (Lamble et al. 2004; Lamble et al. 2003; Lamble et al. 2005).



**Abbildung 2** Vergleichende Darstellung des klassischen Entner-Doudoroff-Wegs aus Bacteria mit den drei modifizierten ED-Varianten aus Archaea. **A:** klassischer Entner-Doudoroff-Abbau, z. B. in *Pelomonas saccharophila* (Entner und Doudoroff 1952); **B:** nicht-phosphorylierter ED-Weg, z. B. in *Picrophilus torridus* (Reher et al. 2010); **C:** Verzweigter ED-Weg, z. B. in *Sulfolobus solfataricus* (Ahmed et al. 2005); **D:** postulierter semiphosphorylierter ED-Weg in halophilen Archaea (Johnsen et al. 2001). Verwendete Abkürzungen: GA, Glycerinaldehyd; GAP, Glycerinaldehyd-3-Phosphat; KDG, 2-Keto-3-Desoxygluconat; KDGal, 2-Keto-3-Desoxygalactonat; KDPG, 2-Keto-3-Desoxy-6-Phosphogluconat; KDPGal, 2-Keto-3-Desoxy-6-Phosphogalactonat; 6PGAD, 6-Phosphogluconat-Dehydratase; GlcAD, Gluconat-Dehydratase; Glc/GalAD, Gluconat/Galactonat-Dehydratase; G6PDH, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase; GlcDH, Glucose-Dehydrogenase; Glc/GalDH, Glucose/Galactose-Dehydrogenase; GlcK, Glucokinase; KDGK, KDG-Kinase; KDG/KDGalK, KDG/KDGal-Kinase; KDPGA, KDPG-Aldolase; KDG/KDGalA; KDG/KDGal-Aldolase; KD(P)G/GalA, KDG/KDGal/KDPG/KDPGal-Aldolase.

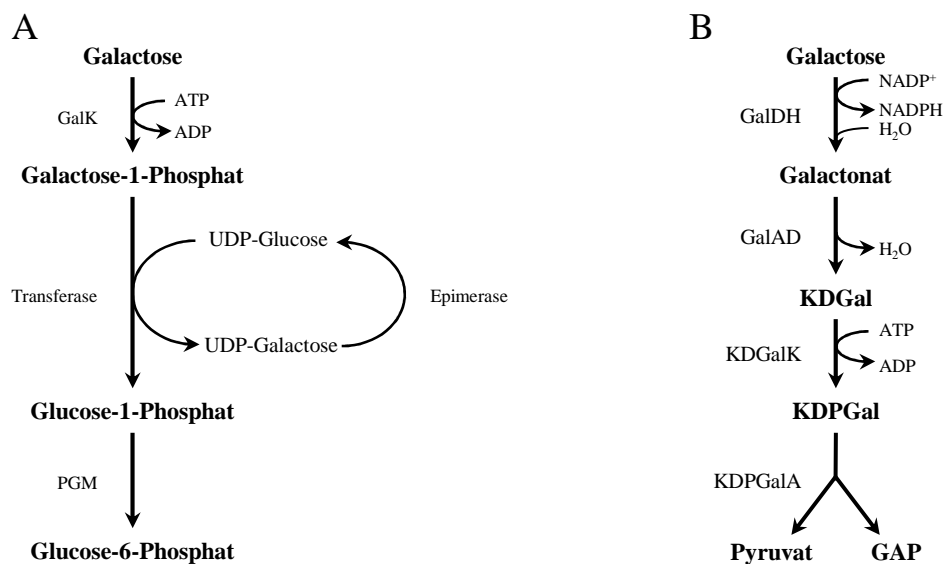
Im Vergleich zum npED- und zum verzweigten ED-Weg der thermoacidophilen Archaea ist der semiphosphorylierte ED-Weg wenig untersucht. Für die halophilen Archaea wurde ein semiphosphorylierter ED-Weg (Abbildung 2 D) postuliert, in dem Glucose zunächst wie im npED-Weg zu KDG umgesetzt wird, welches durch eine KDG-Kinase zu KDPG phosphoryliert wird. Das entstandene KDPG wird durch eine KDPG-Aldolase zu GAP und Pyruvat gespalten. Bisher wurden nur eine Glucose Dehydrogenase aus *Haloferax mediterranei* und eine KDG-Kinase aus *H. volcanii* gereinigt und charakterisiert (Baker et al. 2009; Bonete et al. 1996; Pickl et al. 2014). Bisher gibt es keine detaillierten experimentellen Daten über die KDPG-Aldolase aus *H. volcanii*. Zudem wurde in halophilen Archaea nicht umfassend untersucht, ob die Umsetzung von Glucose und Galactose und der entsprechenden Intermediate wie in anderen Archaea über die gleichen Enzyme erfolgt.

### **Galactose-Abbau in Bacteria und Eukarya**

Galactose, das C<sub>4</sub>-Epimer von Glucose, wird in den meisten Bacteria und Eukarya über den Leloir-Weg über die Enzyme Galactokinase, Galactose-1-Phosphat-Uridyltransferase, UDP-Galactose-4-Epimerase und Phosphoglucomutase zu Glucose-6-Phosphat umgewandelt (Abbildung 3 A). Glucose-6-Phosphat wird dann über die Reaktionen des EM- bzw. ED-Wegs abgebaut. Der Leloir-Weg wurde zunächst von Leloir und Mitarbeitern in *Saccharomyces fragilis* entdeckt (Caputto et al. 1949; Leloir 1951). Dieser Stoffwechselweg wurde außerdem in weiteren Eukarya, wie den Einzellern *Tetrahymena thermophila* und *Aspergillus niger*, der Ackerbohne *Vicia faba* und auch in Säugetieren wie *Homo sapiens* nachgewiesen (Gruben et al. 2012; Vorgias et al. 1991). Außerdem wurde der Weg in verschiedenen Bacteria wie *Escherichia coli*, *Clostridium pasteurianum* und *Streptomyces coelicolor* ebenfalls dokumentiert und kann damit als die klassische Variante der Galactose-Umsetzung in Eukarya und Bacteria beschrieben werden (Vorgias et al. 1991).

In einigen Bakterien wurde ein alternativer Galactose-Abbau-Weg, der DeLey-Doudoroff-Weg (DD) nachgewiesen. Dieser Stoffwechselweg wurde erstmals 1957 in *Pelomonas saccharophila* entdeckt (De Ley und Doudoroff 1957; Xie und Yokota 2005). In diesem Abbauweg wird Galactose zunächst mit Hilfe einer Galactose-Dehydrogenase zu Galactonat oxidiert, welches dann unter Wasserabspaltung von einer Galactonat-Dehydratase zu 2-Keto-3-Desoxygalactonat (KDGal) umgewandelt wird. KDGal wird anschließend von einer KDGal-Kinase zu 2-Keto-3-Desoxy-6-Phosphogalactonat (KDPGal) phosphoryliert. Eine KDPGal-Aldolase spaltet KDPGal in GAP und Pyruvat (Abbildung 3 B) (De Ley und Doudoroff 1957; Shuster und Doudoroff 1967).

Der DD-Weg wurde neben *P. saccharophila* in wenigen weiteren Bacteria wie *Caulobacter crescentus*, *Gluconacetobacter liquefaciens*, *Sinorhizobium meliloti* und *Azotobacter vinelandii* beschrieben (Arias und Cervenansky 1986; De Ley und Doudoroff 1957; Kurn et al. 1978; Stouthamer 1961; Wong und Yao 1994). Bei Wachstum auf Galactonat verwenden *E. coli* und Mycobakterien ebenfalls den DD-Weg, wohingegen sie den Abbau von Galactose über den klassischen Leloir-Weg katalysieren (Deacon and Cooper 1977; Szumilo 1981a). In dem filamentösen Pilz *Aspergillus niger* wurde neben dem Leloir-Weg auch eine nicht-phosphorylierte Variante des DD-Weges beschrieben. In diesem nicht-phosphorylierten Galactose-Abbau wird Galactose wie im DD-Weg zu KDGal abgebaut, welches dann in Pyruvat und Glycerinaldehyd gespalten wird (Elshafei and Abdel-Fatah 2001; Gruben et al. 2012).



**Abbildung 3 Vergleichende schematische Darstellung der Abbauwege von Galactose in Bacteria und Eukarya.** A: klassischer Leloir-Weg z. B. in *Escherichia coli*; B: DeLey-Doudoroff-Weg z. B. in *Pelomonas saccharophila*. Verwendete Abkürzungen und Enzymnamen: GAP, Glycerinaldehyd-3-Phosphat; KDGal, 2-Keto-3-Desoxygalactonat; KDPGal, 2-Keto-3-Desoxy-6-Phosphogalactonat; UDP, Uridindiphosphat; Epimerase: UDP-Galactose-4-Epimerase; GalAD, Galactonat-Dehydratase; GalDH, Galactose-Dehydrogenase; GalK, Galactokinase; KDGalK, KDGal-Kinase; KDPGalA, KDPGal-Aldolase; PGM, Phosphoglucomutase; Transferase, Galactose-1-Phosphat-Uridyltransferase.

Der Galactose-Abbau in der Domäne der Archaea wurde bis jetzt nicht untersucht. Es wurde postuliert, dass die Enzyme der modifizierten ED-Wege der thermoacidophilen Archaea *P. torridus* und *S. solfataricus* nicht nur an der Umsetzung von Glucose, sondern auch an der Umsetzung von Galactose beteiligt sind. Diese Annahme beruht auf dem Befund, dass die Enzyme dieser modifizierten ED-Wege Glucose und Galactose, bzw. die entsprechenden Intermediate mit vergleichbaren katalytischen Effizienzen umsetzen können (Danson und Hough 2005; Reher et al. 2010). Der Galactose-Abbau in halophilen Archaea wurde bisher nicht untersucht. Genomanalysen zeigten allerdings, dass im Genom von *H. volcanii* alle für einen DeLey-Doudoroff-Weg benötigten Enzyme kodiert sind, was darauf hindeuten könnte, dass Galactose in diesem Organismus über diesen Weg abgebaut wird (Anderson et al. 2011). Außerdem wurde in diesen Studien ein Galactose-Abbau in dem ebenfalls halophilen Archaeon *Halorhabdus utahensis* über einen Leloir-Weg postuliert (Anderson et al. 2011). Weitere Untersuchungen zum Galactose-Abbau in halophilen Archaea liegen bisher nicht vor.

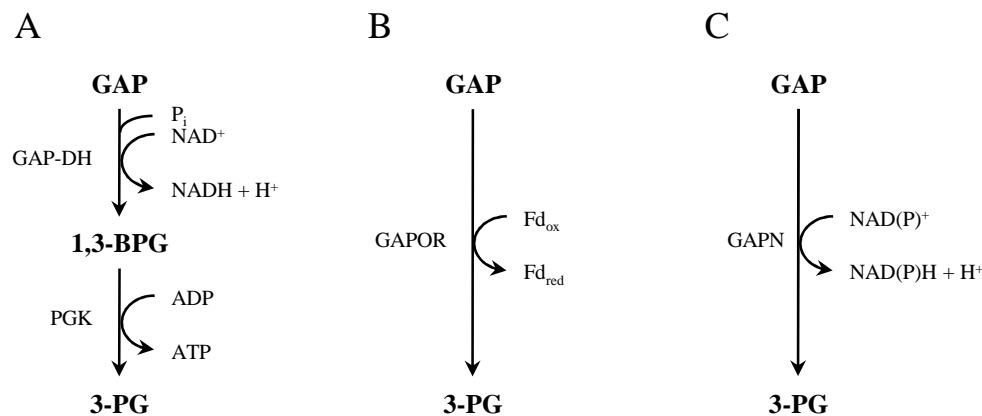
### **GAP-Oxidation zu 3-Phosphoglycerat in Bacteria und Archaea**

In den klassischen EM- und ED-Wegen der Bacteria wird Glucose zunächst zu dem Schlüsselintermediat GAP umgesetzt. Dieses wird anschließend durch die Phosphat-abhängige Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAP-DH) zu 1,3-Bisphosphoglycerat umgesetzt, welches durch eine Phosphoglyceratkinase (PGK) unter ATP-Gewinnung zu 3-Phosphoglycerat umgesetzt wird (Abbildung 4).

Für die Oxidation von GAP zu 3-Phosphoglycerat in Archaea wurde gezeigt, dass diese nicht über die Enzyme GAP-DH und PGK katalysiert werden. Stattdessen wurden neuartige Enzyme und Reaktionen für die GAP-Oxidation in den modifizierten EM- und ED-Wegen nachgewiesen (Abbildung 4). Dabei wird GAP entweder über eine GAP:Ferredoxin-Oxidoreductase (GAPOR) oder eine nicht-phosphorylierende GAP-DH (GAPN) abgebaut, die beide die einstufige Umsetzung von GAP zu 3-Phosphoglycerat ohne ATP-Gewinnung katalysieren. GAPOR verwendet als Elektronen-Akzeptor Ferredoxin und wurde aus dem Euryarchaeoten *Pyrococcus furiosus* und dem Crenarchaeoten *Pyrobaculum aerophilum* gereinigt und charakterisiert (Mukund und Adams 1995; Reher et al. 2007; Siebers und Schönheit 2005). GAPN nutzt  $\text{NADP}^+$  als Elektronenakzeptor und wurde in den Crenarchaeota *Thermoproteus tenax* und *Sulfolobus solfataricus* gut untersucht (Bräsen et al. 2014; Brunner et al. 1998; Ettema et al. 2008). In allen Archaea wurden auch Gene nachgewiesen, die jeweils für GAP-DH und PGK kodieren. Für diese Enzyme wurden in

Archaea bisher ausschließlich Funktionen in der Gluconeogenese nachgewiesen (Matsubara et al. 2011; Schäfer und Schönheit 1993; Siebers und Schönheit 2005).

Die GAP-Oxidation in Haloarchaea wurde hingegen bisher nur wenig untersucht. Eine GAPOR oder GAPN wurde im Genom dieser Archaea bisher nicht nachgewiesen. In Zellextrakten von *Haloarcula marismortui* wurde eine  $\text{NAD}^+$ -abhängige GAP-DH nachgewiesen und aus *Haloarcula vallismortis* wurde eine  $\text{NAD}^+$ -spezifische GAP-DH gereinigt (Johnsen et al. 2001; Krishnan and Altekari 1990; Prüß et al. 1993). Die  $\text{NAD}^+$ -Spezifität dieser Enzyme deutet eine Funktion im Katabolismus und damit eine bakterielle Variante der GAP-Oxidation über GAP-DH und PGK in halophilen Archaea an. Bisher gibt es keine detaillierten Untersuchungen zu GAP-DHs und PGKs in halophilen Archaea, die eine funktionelle Beteiligung der Enzyme im Stoffwechsel nachweisen.



**Abbildung 4 Vergleichende schematische Darstellung der GAP-Oxidation in Bacteria und Archaea. A:** Oxidation in zwei Schritten über GAP-DH und PGK, wie z. B. in *E. coli*; **B:** Oxidation mittels GAPOR wie z. B. in *P. furiosus*; **C:** Oxidation mittels GAPN wie z. B. in *S. solfataricus*. Verwendete Abkürzungen, GAP, Glycerinaldehyd-3-Phosphat; 1,3-BPG, 1,3-Bisphosphoglycerat; 3-PG, 3-Phosphoglycerat; Fd, Ferredoxin; <sub>red</sub>, reduziert; <sub>ox</sub>, oxidiert; GAP-DH, GAP-Dehydrogenase; PGK, Phosphoglyceratkinase; GAPOR, GAP:Ferredoxin-Oxidoreductase; GAPN, nicht-phosphorylierende GAP-DH.

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zum Abbau von Glucose und Galactose, sowie zur Oxidation von GAP zu 3-Phosphoglycerat in *Haloferax volcanii* und *Halorhabdus utahensis* durchgeführt:

1. Die Beteiligung von Genen und Enzymen am Abbau von Galactose über einen DeLey-Doudoroff-Weg zu GAP und Pyruvat sollte in dem halophilen Archaeon *H. volcanii* untersucht werden. Dazu sollten die Enzyme Galactose-Dehydrogenase, Galactonat-Dehydratase und KDPGal-Aldolase biochemisch charakterisiert werden und entsprechende Deletionsmutanten hergestellt und analysiert werden. Außerdem sollte die Beteiligung eines ABC-Transporters am Transport von Galactose nachgewiesen werden.
2. Die transkriptionelle Regulation der Gene des Galactose-Abbaus in *H. volcanii* sollte untersucht und exemplarisch überprüft werden, ob ein putativer Transkriptionsregulator an der Regulation dieser Gene beteiligt ist.
3. Es sollte eine Galactokinase aus *Halorhabdus utahensis* überexprimiert, gereinigt und charakterisiert werden, um einen ersten Hinweis auf einen Leloir-Weg für den Galactose-Abbau in halophilen Archaea zu erhalten.
4. Eine KDPG-Aldolase aus dem spED-Weg für den Glucose-Abbau sollte näher charakterisiert und mit der KDPGal-Aldolase verglichen werden.
5. Die Oxidation von GAP zu 3-Phosphoglycerat über eine katabole GAP-DH und eine Phosphoglyceratkinase sollte in *H. volcanii* aufgeklärt werden. Zusätzlich sollte eine zweite GAP-DH untersucht werden, die für die anabole Reaktion verantwortlich ist.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Wachstum von *Haloferax volcanii*

**Anzucht von *H. volcanii*.** In dieser Arbeit wurden die *H. volcanii* Stämme H26, H1209 und H555 verwendet. Diese Stämme und alle hergestellten oder verwendeten Varianten (Tabelle 1) wurden aerob bei 42 °C und 150 rpm in 100 ml Erlenmeyerkolben mit 20 ml Medium (Tabelle 2) gezüchtet. Dem Medium wurde Uracil in einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugesetzt, da das Gen der Orotat-Phosphoribosyl-Transferase ( $\Delta pyrE2$ ), die an der Uracil-Synthese beteiligt ist, in diesen Stämmen deletiert ist. Dem Stamm H1209 wurde zusätzlich Thymidin in einer Endkonzentration von 40 µg/ml zugegeben, da das Gen der Dihydrofolatreductase ( $\Delta hdrB$ ), die an der Thymidin-Synthese beteiligt ist, in diesem Stamm deletiert ist. Die Anzucht von *H. volcanii* H26, der für die Herstellung von Deletionsmutanten und Komplementationsexperimente genutzt wurde, sowie die Anzucht von *H. volcanii* H555, der für Promotoranalysen eingesetzt wurde, erfolgte entweder in Synthetik- oder Deletionsmedium (Tabelle 2). Der Stamm *H. volcanii* H1209 wurde für die Überexpression von halophilen Proteinen verwendet (4.4) und in Deletionsmedium angezogen.

**Wachstumsexperimente mit *H. volcanii*.** Wachstumsversuche mit *H. volcanii* H26, H555 und deren Varianten wurden in 20 ml Synthetikmedium (Tabelle 2) in 100 ml Erlenmeyerkolben bei 42 °C und 150 rpm durchgeführt. Die Messung des Wachstums erfolgte über die Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm im Einstrahl Photometer Pharmacia Biotech Ultrospec 2000 (GE Healthcare). Die optische Dichte wurde jeweils um die Extinktion unbeimpften Mediums korrigiert und die Proben wurden entsprechend dem Proportionalitätsbereich der Zellzahl/Zellstreuungs-Relation des Photometers unter eine  $OD_{600}$  von 0,5 in Synthetikmedium verdünnt. Als Kohlenstoff- und Energiequellen wurden dem Medium D-Glucose, D-Galactose, D-Fructose (je 25 mM), Acetat (40 mM) oder Casaminsäuren (1 %) zugegeben. Inokuliert wurde jeweils auf eine  $OD_{600}$  von ca. 0,05 mit einer logarithmisch wachsenden Vorkultur, die auf unterschiedlichen C-Quellen adaptiert worden war.



**Tabelle 1 Dargestellt sind die in dieser Arbeit verwendeten *H. volcanii* Stämme.** Es sind Stammnummer, Genotyp und der Literaturnachweis der Stämme angegeben. *pyrE2*, Orotat-Phosphoribosyl-Transferase; *p.tnaA*, Promotor der Tryptophanase; *hdrB*, Dihydrofolatreductase; *pitA<sub>Nph</sub>*, Chlorite dismutase family protein aus *Natronomonas pharaonis*; *mrr*, Endonuklease aus der Mrr Familie; eckige Klammern stehen für ein episomal eingefügtes Plasmid.

Stamm	Genotyp	Referenz
H26	$\Delta pyrE2$	(Bitan-Banin et al. 2003)
H26 $\Delta HVO\_A0329$	$\Delta pyrE2 \Delta HVO\_A0329$	Diese Arbeit
H26 $\Delta HVO\_A0329 + HVO\_A0329$	$\Delta pyrE2 \Delta HVO\_A0329$ [pTA963HVO_A0329]	Diese Arbeit
H26 $\Delta HVO\_A0330$	$\Delta pyrE2 \Delta HVO\_A0330$	Diese Arbeit
H26 $\Delta HVO\_A0330 + HVO\_A0330$	$\Delta pyrE2 \Delta HVO\_A0330$ [pTA963HVO_A0330]	Diese Arbeit
H26 $\Delta HVO\_A0331$	$\Delta pyrE2 \Delta HVO\_A0331$	Diese Arbeit
H26 $\Delta HVO\_A0331 + HVO\_A0331$	$\Delta pyrE2 \Delta HVO\_A0331$ [pTA963HVO_A0331]	Diese Arbeit
H26 $\Delta HVO\_A0332$	$\Delta pyrE2 \Delta HVO\_A0332$	Diese Arbeit
H26 $\Delta HVO\_A0332 + HVO\_A0332$	$\Delta pyrE2 \Delta HVO\_A0332$ [pTA963HVO_A0332]	Diese Arbeit
H26 $\Delta HVO\_A0339$	$\Delta pyrE2 \Delta HVO\_A0339$	Diese Arbeit
H26 $\Delta HVO\_0950$	$\Delta pyrE2 \Delta HVO\_0950$	Tästensen,2010
H26 $\Delta HVO\_0950 + HVO\_0950$	$\Delta pyrE2 \Delta HVO\_0950$ [pTA963HVO_0950]	Diese Arbeit
H26 $\Delta HVO\_A0329 \Delta HVO\_0950$	$\Delta pyrE2 \Delta HVO\_A0329 \Delta HVO\_0950$	Diese Arbeit
H26 $\Delta HVO\_0481$	$\Delta pyrE2 \Delta HVO\_0481$	Diese Arbeit
H26 $\Delta HVO\_0481 + HVO\_0481$	$\Delta pyrE2 \Delta HVO\_0481$ [pTA963HVO_0481]	Diese Arbeit
H26 <i>p.tnaA</i> $\Delta HVO\_0478$	$\Delta pyrE2 p.tnaA \Delta HVO\_0478$	Diese Arbeit
H1209	$\Delta pyrE2 \Delta hdrB pitA_{Nph} \Delta mrr$	(Allers et al. 2010)
H1209 pTA963HVO_A0329	$\Delta pyrE2 \Delta hdrB pitA_{Nph} \Delta mrr$ [pTA963HVO_A0329]	Diese Arbeit
H1209 pTA963HVO_A0330	$\Delta pyrE2 \Delta hdrB pitA_{Nph} \Delta mrr$ [pTA963HVO_A0330]	Diese Arbeit
H1209 pTA963HVO_A0331	$\Delta pyrE2 \Delta hdrB pitA_{Nph} \Delta mrr$ [pTA963HVO_A0331]	Diese Arbeit
H1209 pTA963HVO_A0332	$\Delta pyrE2 \Delta hdrB pitA_{Nph} \Delta mrr$ [pTA963HVO_A0332]	Diese Arbeit
H1209 pTA963HVO_0478	$\Delta pyrE2 \Delta hdrB pitA_{Nph} \Delta mrr$ [pTA963HVO_0478]	Diese Arbeit
H1209 pTA963HVO_0480	$\Delta pyrE2 \Delta hdrB pitA_{Nph} \Delta mrr$ [pTA963HVO_0480]	Diese Arbeit

---

<b>Stamm</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Referenz</b>
H1209 pTA963HVO_0481	$\Delta pyrE2 \Delta hdrB pitA_{Nph} \Delta mrr$ [pTA963HVO_0481]	Diese Arbeit
H555	$\Delta pyrE2 \Delta bgaH$	(Johnsen et al. 2015)
H555 pTA919 p.HVO_A0331	$\Delta pyrE2 \Delta bgaH$ [pTA919 p.HVO_A0331]	AG Schönheit
H555 $\Delta HVO\_A0332$	$\Delta pyrE2 \Delta bgaH \Delta HVO\_A0332$	Diese Arbeit
H555 $\Delta HVO\_A0332$ pTA919 p.HVO_A0331	$\Delta pyrE2 \Delta bgaH \Delta HVO\_A0332$ [pTA919p.HVO_A0331]	Diese Arbeit

---

**Tabelle 2** Deletions-, Synthetik- und DM-YPC- Medium für *H. volcanii*

<b>Salzlösung</b>		<b>Zusammensetzung Deletionsmedium</b>	
NaCl	125 g	Salzlösung	900 ml
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	45 g	10 % Casamino-säuren, autoklaviert	100 ml
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	10 g	Spurenelementlösung	1 ml
KCl	10 g	FeSO <sub>4</sub> -Stammlösung	1 ml
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	1,34 g		
1 M Tris-HCl pH 7,5	50 ml		
Auf 900 ml aufgefüllt, pH auf 7,5 eingestellt, autoklaviert *.			
<b>FeSO<sub>4</sub>-Stammlösung</b>		<b>Zusammensetzung Agarplatten</b>	
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,23 g	Salzlösung	200 ml
ad H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> 100 ml, pH auf 3-4 eingestellt, sterilfiltriert.		Agar-Agar	3 g
		Autoklavieren, vor dem Gießen hinzugeben:	
		Spurenelementlösung	200 µl
		FeSO <sub>4</sub> -Stammlösung	200 µl
		20 % Casamino-säuren, autoklaviert	10 ml
<b>Spurenelementlösung</b>		<b>Zusammensetzung Synthetikmedium</b>	
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,1 g	Salzlösung	900 ml
MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	0,03 g	Spurenelementlösung	1 ml
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,3 g	FeSO <sub>4</sub>	1 ml
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,2 g	2 M MOPS/KOH, pH 7,2, autoklaviert	50 ml
CuCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,01 g	1 M NH <sub>4</sub> Cl, autoklaviert	10 ml
NiCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,02 g	10 % Hefeextrakt, autoklaviert	1 ml
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,03 g		
pH mit HCl auf 3,5 eingestellt, ad H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> 100 ml, sterilfiltriert.			
		<b>Zusammensetzung DM-YPC</b>	
		Salzlösung	900 ml
		10 % Hefeextrakt	50 ml
		10 % Bactopepton	10 ml
		10 % Casamino-säuren (Trp-frei) **	10 ml
		Spurenelementlösung	1 ml
		FeSO <sub>4</sub> Stammlösung	1 ml

\* = für Synthetikmedium pH 7,2

\*\* = Caseinhydrolysat, Tryptophan-frei, bezogen von Carl Roth, Bestellnummer A157

## 4.2 Molekularbiologische Methoden

### 4.2.1 Plasmide und Primer

**Plasmide.** In Tabelle 3 sind die verwendeten und konstruierten Plasmide zur Expression von Proteinen, zur Gendeletion, Komplementation und zur Promotoranalyse in *H. volcanii* dargestellt. Die Plasmide pTA963, pTA131 und pTA919 wurden freundlicherweise von Thorsten Allers (Nottingham, UK) zur Verfügung gestellt.

**Tabelle 3 Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten bzw. erstellten Plasmide für die Überexpression, Deletion, Komplementation und Promotoranalyse.** RE = verwendete Restriktionsenzyme, ÜE = Überexpression, Komp = Komplementation, p. = Promotor.

Name	Beschreibung, Verwendung	RE	Referenz
pTA131	Suicide vector basierend auf pBluescript mit <i>pyrE2</i>		
pTA131 ΔHVO_A0329	Deletion von <i>kdpGAL</i> in H26 und H26 ΔHVO_0950	<i>EcoRV</i>	Diese Arbeit
pTA131 ΔHVO_A0330	Deletion von <i>galDH</i> in H26	<i>EcoRV</i>	Diese Arbeit
pTA131 ΔHVO_A0331	Deletion von <i>galAD</i> in H26	<i>EcoRV</i>	Diese Arbeit
pTA131 ΔHVO_A0332	Deletion von <i>ddcR</i> in H26 und H555	<i>EcoRV</i>	Diese Arbeit
pTA131 ΔHVO_A0339	Deletion von <i>galBP</i> in H26	<i>EcoRV</i>	Diese Arbeit
pTA131 ΔHVO_0478	Deletion von <i>gapII</i> in H26	<i>EcoRV</i>	Diese Arbeit
pTA131 ΔHVO_0480	Deletion von <i>pgk</i> in H26	<i>EcoRV</i>	Diese Arbeit
pTA131 ΔHVO_0481	Deletion von <i>gapI</i> in H26	<i>EcoRV</i>	Diese Arbeit
pTA131 ΔHVO_0950	Deletion von <i>kdpG</i> in H26	<i>EcoRV</i>	Tästensen, 2010
pTA131 p.tnaAΔHVO_0478	p.tnaA::6x His tag::HVO_0478+1/+320, konditional letale Mutante von <i>gapII</i> in H26	<i>EcoRV</i>	Diese Arbeit
pTA963	Episomaler Expressionsvektor mit 6 x His-tag, <i>pyrE2</i> und <i>hdrB</i>		(Allers et al. 2010)
pTA963HVO_A0329	ÜE von <i>kdpGAL</i> in H1209, Komp in H26 ΔHVO_A0329 und ΔHVO_0950	<i>BspHI</i> <i>BamHI</i>	Diese Arbeit
pTA963HVO_A0330	ÜE von <i>galDH</i> in H1209, Komp in H26 ΔHVO_A0330	<i>PciI</i> <i>BamHI</i>	Diese Arbeit
pTA963HVO_A0331	ÜE von <i>galAD</i> in H1209, Komp in H26 ΔHVO_A0331	<i>BspHI</i> <i>BamHI</i>	Diese Arbeit
pTA963HVO_A0332	ÜE von <i>ddcR</i> in H1209, Komp in H26 ΔHVO_A0332	<i>BspHI</i> <i>BamHI</i>	Diese Arbeit

Name	Beschreibung, Verwendung	RE	Referenz
pTA963Huta_3018	ÜE von <i>galK</i> aus <i>Halorhabdus utahensis</i> in H26	<i>NcoI</i> <i>BamHI</i>	Diese Arbeit
pTA963HVO_0478	ÜE von <i>gapII</i> in H1209	<i>BspHI</i> <i>BamHI</i>	Diese Arbeit
pTA963HVO_0480	ÜE von <i>pgk</i> in H1209	<i>PciI</i> <i>BamHI</i>	Diese Arbeit
pTA963HVO_0481	ÜE von <i>gapI</i> in H1209, Komp in H26 $\Delta$ HVO_0481	<i>BspHI</i> <i>BamHI</i>	Diese Arbeit
pTA963HVO_0950	ÜE von <i>kdpG</i> A in H1209, Komp in H26 $\Delta$ HVO_A0329 und $\Delta$ HVO_0950	<i>NcoI</i> <i>BamHI</i>	Tästensen, 2010
pTA919	Episomaler Vektor für Promotoranalysen, <i>pyrE2</i> und <i>bgaH</i>		(Johnsen et al. 2015)
pTA919 p.HVO_A0331	pTA919 mit Insertion des Fragments -132/+24 von HVO_A0331 für Promotoranalysen in H555 und H555 $\Delta$ HVO_A0332	<i>ApaI</i> <i>NdeI</i>	AG Schönheit

**Primer.** Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden bei Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert und sind in Tabelle 4 dargestellt.

**Tabelle 4 Oligonucleotide, die in dieser Arbeit verwendet wurden.** Schnittstellen für Restriktionsenzyme wurden unterstrichen, mutierte Basen fett dargestellt. K-PCR = Kolonie-PCR, Komp = Komplementation, NB = Northern Blot, RE = Restriktionsenzym, SB = Southern Blot, ÜE = Überexpression.

Bezeichnung	Basensequenz(5'→3')	Verwendung	RE
M13 uni (-21)	TGTAACACGACGGCCAGT	K-PCR	
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG		
pTA963p.tnaAs	TGGCGAGAACGGAACAGC		
Huta3018NcoI	CAAACAGAGAGGT <u>CCATGGTC</u>	ÜE	<i>NcoI</i>
Huta3018BamHI	GGACCG <u>GGATCC</u> ACCGGTAT		<i>BamHI</i>
HVO_A0329BspHI	GGAGCTAT <u>TCATG</u> AGCCACCAC	ÜE, Komp	<i>BspHI</i>
HVO_A0329BamHI	GAACTT <u>CGATCC</u> GTGGGTGT		<i>BamHI</i>
HVO_A0330PciI	TCATGTGCAACTC <u>ACATGTCG</u>	ÜE, Komp	<i>PciI</i>
HVO_A0330BamHIneu	ACGGTT <u>GGATCCC</u> GGTGGTGC		<i>BamHI</i>
HVO_A0331BspHI	GTATCGAACCT <u>TCATG</u> AGTAAG	ÜE, Komp	<i>BspHI</i>
HVO_A0331BamHI	TTAGTGAAG <u>GATCCC</u> GCGGTGG		<i>BamHI</i>
HVO_A0332BspHIneu	AGAGAGAT <u>TCATG</u> AGCGAGGGTATGCCACCAGAC	Komp	<i>BspHI</i>
HVO_A0332BamHIas	CCGTATCT <u>GGATCCC</u> TGCGAC		<i>BamHI</i>
HVO_0478BspHI	TGTCTC <u>TCATG</u> ATACGAGTGG	ÜE	<i>BspHI</i>
HVO_0478BamHIas	GTGAAAAACCG <u>GATCCC</u> GAACC		<i>BamHI</i>
HVO_0480PciI	TTCTCCACC <u>ACATGTT</u> CAAGACC	ÜE, Komp	<i>PciI</i>
HVO_0480BamHIas	AACTGGCGTGG <u>GATCCC</u> TGCT		<i>BamHI</i>

Bezeichnung	Basensequenz(5'→3')	Verwendung	RE
HVO_0481BspHIsN	TACTCGATCATGAGTGAAAAATCC	ÜE, Komp	<i>BspHI</i>
HVO_0481BamasNeu	CGTAGAGGGATCCCTTAGTGG		<i>BamHI</i>
HVO_A0329frgm1s	TGCCGGTTCCTGCTCGATTCC	ΔHVO_A0329	
HVO_A0329frgm1as	GAAGGAACGAATGCGGGCTGCTGGGTGGTG		
HVO_A0329frgm2s	GCACGCCGATTCGTTCTTCGTCGAAGCGGTC		
HVO_A0329frgm2as	GAGCTTCTGCAAACGGCGACC		
HVO_A0330frgm1s	GATAGACACGCATTCGGTCTC	ΔHVO_A0330	
HVO_A0330frgm1as	TGCTTCGTAGACCCAGTTACGGCGCTCGAAATC		
HVO_A0330frgm2s	CGTAACTGGGTCTACGAAGCAGGCGAGTCC		
HVO_A0330frgm2as	GAAGAACTCGTCGACGGTATC		
HVO_A0331frgm1s	GTTCCGGTATGCATGCGGTAGC	ΔHVO_A0331	
HVO_A0331frgm1as	GTTGTGCCAGTTAAACAGCCATCGCGGTGGCAC		
HVO_A0331frgm2s	TGGCTGTTTAACTGGCACAACCCCGTGTGG		
HVO_A0331frgm2as	GCGTGCAATGGTTCGTATCTCC		
HVO_A0332frgm1s	TCGACCTGATTCAGCCAGACC	ΔHVO_A0332	
HVO_A0332frgm1as	GGTGTCTCTTCCGTCATCGTCGCCTTGATTCC		
HVO_A0332frgm2s	ACGATGACGGAAGAGGACACCGTCGGATTG		
HVO_A0332frgm2as	GAGAAACACGACCTCCCAACC		
HVO_A0339frgm1s	ATGTCGCTGCGGAGTCGCTGC	ΔHVO_A0339	
HVO_A0339frgm1as	CTGGAGCGTCGAGCGGTGCAAACGACTGCGACG		
HVO_A0339frgm2s	TTCGACCGCTCGACGCTCCAGTTCGGAGAC		
HVO_A0339frgm2as	GATGAACACCAGCCCCACAG		
HVO_0478frgm1s	GTCGTAGATGGCGTCGTAGTC	ΔHVO_0478	
HVO_0478frgm1as	AGAAGGGTCCACGCCGATGAGTTCCATGTC		
HVO_0478frgm2s	CTCATCGGCGTGGACCTTCTGGGTTCTCTGAG		
HVO_0478frgm2as	GAACCGACGCGCATGAAACTC		
HVO_0481frgm1s	GAGGTCGATGGCGTCTTTGTC	ΔHVO_0481	
HVO_0481frgm1as	CTCGTTGTCCACCACGTCCGATTCATCCAC		
HVO_0481frgm2s	TCGGACGTGGTGGACAACGAGTACGGCTTCTCC		
HVO_0481frgm2as	CTCGTACTCGGTCTGCATCAC		
HVO_A0329Sou_as <sup>1</sup>	AATGCGGCGTGCTGGGTGGTG	SB Sonde	
HVO_A0330Souas <sup>1</sup>	CCAGTTACGGCGCTCGAAATC		
HVO_A0331Souas <sup>1</sup>	AAACAGCCATCGCGGTGGCAC		
HVO_A0332Souas <sup>1</sup>	CGTCATCGTCGCCTTGATTCC		
HVO_A0339Sou_as <sup>1</sup>	GCGGTGCAAACGACTGCGACG		
HVO_0478Sou_s	GTCGTAGATGGCGTCGTAGTC		
HVO_0478Sou_as	AGAAGGGTCCACGCCGATGAG		

Bezeichnung	Basensequenz(5'→3')	Verwendung	RE
HVO_0481Sou_s	GACAACGAGTACGGCTTCTCC		
HVO_0481Sou_as	GAACCGACGCGCATGAAACTC		
HVO_0950Sou_s	GTTGACCGTCAGGGAGTGAGG		
HVO_0950Sou_as	GTCCTCGTGTACGTTCGAGTGC		
HVO_A0330Nors	CCACTCAACACCTGCCGGTTC	NB Sonde	
HVO_A0330Noras	GGACTCGCCTGCTTCGTAGAC		
HVO_A0331Nors	ATTGCGACGGGCGAGCGAATG		
HVO_A0331Noras	CACGGGGTTGTGCCAGTTGAC		
HVO_A0332Norsneu	GAGTTTCTCGACCACGACTCG		
HVO_A0332Noras	CAATCCGACGGTGTCTCTTC		
HVO_A0339Norsneu	GACGACTACACCTTCGAAGTC		
HVO_A0339Norasneu	CTCGCTCTTGACGATGGTGTC		
HVO_0478Nors	TCAACGGCTACGGCACAATCG		
HVO_0478Norasneu	AAGATGGCGGGCGTGTGGTGC		
HVO_0480Nors	GTGCTCCTCCTCGAAAACACG		
HVO_0480Noras	CACTGGTTCGTCGAAGAAGTCC		
HVO_0481Norsneu	CCTCGGTGAGCCTCTACAACG		
HVO_0481Noras	CTCGTTGTCGTACCACGTCAG		
RibL10-RT_F	ACAGCACAATATGGGCGACCTGC	RT-PCR	
RibL10-RT_R	GTCCTCGACGTCGAGTAGATGG		
HVO_A0329RTs	CACCCAGCACGCCGATTCG		
HVO_A0329RTas	CCAGTGCGGAGACGAACTCG		
HVO_0950RTs	TCGCACTCGACGTACACGAGG		
HVO_0950RTas	CCTTCATGCTCTTGAGGTGACC		

<sup>1</sup> Als sense Primer wurde der jeweils zugehörige frgm1s Primer (Deletionsmutante) verwendet

#### 4.2.2 DNA-Isolierung

**Isolierung von genomischer DNA.** Genomische DNA aus *H. volcanii* wurde mit Hilfe des „Wizard Genomic DNA Purification“ Kits (Promega) nach Herstellerangaben isoliert. Die genomische DNA aus *H. utahensis* wurde freundlicherweise von der AG Schönheit bereitgestellt.

**Isolierung von Plasmidvektoren.** Die Vermehrung von Plasmidvektoren erfolgte in *E. coli* XL1-Blue MRF<sup>+</sup> Zellen (Agilent Technologies, Waldbronn) in 100 ml Erlenmeyerkolben mit 20 ml LB-Fertig-Medium und 100 µg/ml Carbenicillin zur Selektion auf Plasmid-tragenden *E. coli*. Das Wachstum erfolgte bei 37 °C unter aeroben Bedingungen über Nacht. Die

Plasmide wurden anschließend mit Hilfe des „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert.

### 4.2.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde verwendet, um offene Leserahmen (open reading frames, ORFs) aus genomischer DNA zu amplifizieren, Sonden herzustellen, Transkripte nachzuweisen, eine relative Transkript-Menge abzuschätzen und um mittels Kolonie-PCR das Vorhandensein von Inserts in Transformanten zu überprüfen. Ein Standard-PCR Ansatz hatte ein Volumen von 25 oder 50  $\mu$ l und wurde für die Amplifikation in einem Thermocycler der Firma Biometra inkubiert. Abhängig von den Schmelztemperaturen der verwendeten Oligonucleotide (Tabelle 4) und der Länge der Amplifikate wurden die jeweiligen Annealing- und Synthesezeiten angepasst. Alle in dieser Arbeit amplifizierten PCR-Produkte wurden mit Enzymen und Lösungen der Firmen PeqLab oder Fermentas hergestellt.

**Amplifikation von Genen für die Überexpression und Komplementation.** Die PCRs wurden in 50  $\mu$ l Ansätzen durchgeführt. Die Ansätze enthielten jeweils 230-300 ng genomische DNA, je 200-400 nM forward und reverse Primer, 200-400  $\mu$ M dNTP Mix, 2 mM  $MgSO_4$ , 1 x Reaktionspuffer (ohne  $MgSO_4$ ) und 1-2 U *Pwo*-DNA-Polymerase. Durch die hier verwendeten mismatch-Primer (Tabelle 4) wurden Schnittstellen in die DNA-Fragmente eingefügt, die für die Ligation in den Vektor benötigt wurden.

Die ORFs HVO\_0478, HVO\_0481, HVO\_A0332 und HVO\_0480 wurden unter folgenden Bedingungen synthetisiert: Auf eine initiale Denaturierung von 2 min bei 94 °C (96 °C für HVO\_A0332), folgten zunächst 10 Zyklen mit 30 s Denaturierung bei 94 °C (96 °C für HVO\_A0332), Annealing für 1 min bei 51-54 °C und einer Synthesezeit von 60-90 s bei 68 °C. Darauf folgten weitere 25 Zyklen, bei denen die Annealingtemperatur um 5 °C erhöht wurde. Für HVO\_0480 wurde die Polymerisationszeit auf 120 s verlängert. Abschließend folgte eine Polymerisation für 7 min bei 68 °C.

Die ORFs HVO\_A0331 und Huta\_3018 wurden folgendermaßen amplifiziert: Die initiale Denaturierung wurde bei 94 °C für 2 min durchgeführt. Darauf folgten 10 Zyklen mit 30 s Denaturierung bei 94 °C, einer Annealing-Phase von 30 s bei 50-52 °C und einer Polymerisation für 90 s (105 s für Huta\_3018) bei 68 °C. Anschließend folgten 25 Zyklen, in denen die Annealingtemperatur um 5 °C erhöht wurde. Eine abschließende Polymerisation wurde bei 68 °C für 7 min durchgeführt.



Die Amplifikation des ORFs HVO\_A0329 erfolgte mit einer initialen Denaturierungszeit von 10 min bei 98 °C. Darauf folgten 10 Zyklen mit 45 s Denaturierung bei 98 °C, einer Annealingzeit von 45 s bei 40 °C und einer Polymerisationsphase von 90 s bei 68 °C. Weitere 30 Zyklen mit auf 45 °C erhöhter Annealingtemperatur wurden durchgeführt gefolgt von einer Polymerisationszeit von 7 min bei 68 °C.

Zur Amplifikation des ORFs HVO\_A0330 wurde eine *nested* PCR durchgeführt, bei der zunächst ein DNA-Fragment mit den Primern HVO\_A0330frgm1s und frgm2as (Tabelle 4) synthetisiert wurde. Dieses DNA-Fragment enthielt den ORF mit je 500 flankierenden Basen. Dafür wurde eine initiale Denaturierung für 2 min bei 94 °C durchgeführt. Anschließend folgten 40 Zyklen mit 30 s Denaturierung bei 94 °C, Annealing für 30 s bei 58 °C und einer Synthesezeit von 2 min bei 68 °C. Abschließend wurde eine Polymerisation für 7 min bei 98 °C durchgeführt. Dieses amplifizierte DNA-Fragment wurde der Größe nach im Agarosegel getrennt, aus dem Gel gereinigt (4.2.4) und diente als Template (5 ng) für eine weitere PCR. Dabei wurden die in Tabelle 4 genannten mismatch-Primer für die Überexpression verwendet. Es wurde zunächst ein initialer Denaturierungsschritt für 2 min bei 94 °C durchgeführt. Anschließend folgten 10 Zyklen mit 30 s Denaturierung bei 94 °C, 30 s Annealing bei 50 °C und 60 s Synthese bei 68 °C. Darauf folgten 25 Zyklen bei denen die Annealing Temperatur auf 55 °C erhöht wurde. Abschließend wurde eine Polymerisation für 7 min bei 68 °C durchgeführt.

**Herstellung von Deletionskonstrukten.** Die Erstellung von Vektoren mit deren Hilfe es möglich war, Gene in *H. volcanii* H26 bzw. H555 zu deletieren, erfolgte zunächst über die Synthese zweier das Gen flankierender DNA-Fragmente, die jeweils 500-650 bp lang waren. Fragment 1 enthielt dabei zusätzlich etwa 50 bp des 5'-Bereichs des zu deletierenden Gens und Fragment 2 50 bp des 3'-Bereichs. Da diese beiden Fragmente in einer anschließenden PCR miteinander fusioniert werden sollten, wurde bei der Herstellung der Primer darauf geachtet, dass an den 3'-Primer von Fragment 1 ca. 10 Basen angehängt waren, die komplementär waren zu den ersten 10 Basen im 5'-Bereich von Fragment 2. Der 5'-Primer von Fragment 2 wurde so synthetisiert, dass er ca. 10 Basen enthielt, die zu der 3'-Sequenz des Fragments 1 komplementär waren. Die Ansätze für die Fragment-PCRs enthielten jeweils 300 ng genomische DNA, 400 nM der jeweiligen Primer (Tabelle 4), 400 µM dNTPs, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 x Reaktionspuffer (ohne MgSO<sub>4</sub>) und 1-2 U *Pwo*-DNA-Polymerase. Die PCRs wurden mit folgendem Programm ausgeführt: 2 min initiale Denaturierung bei 94 °C, 30 Zyklen mit 30 s Denaturierung bei 94 °C, 30 s Annealing bei 58-60 °C, 60 s Synthese bei

68 °C mit 10 s Verlängerung je Zyklus (90 s Synthese für  $\Delta$ HVO\_A0339 ohne Verlängerung) und abschließende Polymerisation für 7 min bei 68 °C. Die entstandenen Fragmente wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, aus dem Gel gereinigt (4.2.4) und anschließend als Template für eine Fusions-PCR verwendet. Diese enthielt jeweils equimolare Mengen (~150 ng) der Fragmente, je 400 nM der jeweiligen frgm1s und frgm2as Primer (Tabelle 4), 400  $\mu$ M dNTPs, 2 mM MgSO<sub>4</sub> und 1-2 U *Pwo*-DNA-Polymerase. Die Amplifikation erfolgte mit einer initialen Denaturierung von 120 s bei 94 °C, darauf folgten 30 Zyklen mit 30 s Denaturierung bei 94 °C, Annealing für 30 s bei 58-60 °C und einer Synthesezeit von 90 s, die je Zyklus um 10 s verlängert wurde. Abschließend folgte eine Polymerisation von 7 min bei 68 °C.

**Herstellung eines Konstrukts für eine konditional letale Mutante.** Es wurde ein DNA-Fragment amplifiziert, welches aus dem kompletten Tryptophanase Promotor, dem 6 x His-tag und dem 5'-Bereich (213 oder 320bp) des Zielgens bestand. Als Template diente der Überexpressionsvektor pTA963HVO\_0478 (Tabelle 3). Ein 50  $\mu$ l PCR-Ansatz enthielt dabei 40 ng Plasmid-DNA als Template, je 400 nM des forward (963\_511p.tnaA\_s: 5'-CGGTACCGGGCCCGTTCTC-3') und des reverse Primers HVO\_0478Norasneu (Tabelle 4), 400  $\mu$ M dNTP-Mix, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 x Puffer inkomplett und 1 U *Pwo*-DNA-Polymerase. Die Amplifikation des Fragments wurde mit einer initialen Denaturierungszeit von 2 min bei 94 °C gestartet. Anschließend folgten 10 Zyklen mit einer Denaturierung von 30 s bei 94 °C, Annealing bei 50 °C für 30 s und einer Polymerisation für 90 s bei 68 °C. Danach wurden 25 weitere Zyklen, in denen nur die Annealing-Temperatur auf 55 °C erhöht wurde, durchgeführt. Es folgte eine abschließende Polymerisation für 7 min bei 68 °C.

**Pop-out PCR.** Die pop-out PCR diente der Identifikation der Deletionsmutante nach erfolgtem pop-out (Herausloopen des Vektors aus der chromosomalen DNA, 4.2.9). Um zwischen dem Wildtyp und einer erfolgreichen Deletion zu unterscheiden, wurden mehrere Klone mittels Pop-out PCR untersucht. Jeder Klon wurde in 20 ml Medium angeimpft und mehrere Tage bei 42 °C inkubiert. Aus diesen Kulturen wurde jeweils ein Aliquot von 100  $\mu$ l in einer MiniSpin plus Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg) bei 8000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde entfernt, die Zellen in 100  $\mu$ l H<sub>2</sub>O lysiert und 2  $\mu$ l als Template in die pop-out PCR eingesetzt. Zudem enthielten die 25  $\mu$ l Ansätze je 200 nM der jeweiligen frgm1s und frgm2as Primer (Tabelle 4), 200  $\mu$ M dNTP-Mix, 1 x Puffer Y, 1 x Enhancer und 0,5 U *Taq*-DNA-Polymerase. Für die Deletionskonstrukte,  $\Delta$ HVO\_A0329,  $\Delta$ HVO\_A0330,

$\Delta$ HVO\_A0331,  $\Delta$ HVO\_A0332 und  $\Delta$ HVO\_A0339 wurde das PCR-Programm mit einer initialen Denaturierung bei 98 °C für 4 min 30 s begonnen. Anschließend folgten 40 Zyklen 30 s Denaturierung bei 98 °C, Annealing bei 55 °C für 30 s (60 °C für  $\Delta$ HVO\_A0329) und einer Synthese bei 72 °C für 150 s (120 s für  $\Delta$ HVO\_A0329, 90 s für  $\Delta$ HVO\_A0332). Darauf folgte eine abschließende Polymerisationszeit von 7 min bei 72 °C. Die pop-out PCR für  $\Delta$ HVO\_0478 und  $\Delta$ HVO\_0481 erfolgte wie oben angegeben, allerdings betrug die Synthesezeit 90 s, mit jeweils 20 s Zugabe pro Zyklus. Die Annealing- Temperatur für  $\Delta$ HVO\_0481 lag bei 60 °C.

**Herstellung von DNA Sonden für Southern Blot und Northern Blot.** Die Herstellung der Digoxigenin-markierten Sonden für den Nachweis erfolgreicher Deletionen im Southern Blot erfolgte mit Hilfe des „PCR DIG Probe Synthesis Kit“ (Roche). Ein 25  $\mu$ l Reaktionsansatz enthielt 25-200 pg Plasmid-DNA, welche die zu synthetisierende DNA-Sequenz enthielt (Tabelle 3). Der Ansatz enthielt außerdem je 500 nM forward und reverse Primer (Tabelle 4), 1 x PCR-Puffer mit 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 x „PCR DIG Probe Synthesis Mix“, 0,5 x „dNTP stock solution“ und 1,75 U Enzym Mix. Alternativ wurden die Sonden mit Hilfe einer *Taq*-DNA-Polymerase hergestellt. Dazu wurden in 25  $\mu$ l Ansätzen je 100 pg Plasmid-DNA, je 500 nM forward und reverse Primer (Tabelle 4), 1 x „PCR DIG Probe Synthesis Mix“, 1 x Puffer Y, 1 x Enhancer und 0,5 U *Taq*-DNA-Polymerase eingesetzt. Die Amplifikation der Sonden wurde mit einer initialen Denaturierung bei 95 °C für 120 s (für *Taq*-Polymerase 4 min 30 s) gestartet. Darauf folgten 40 Zyklen mit 30 s Denaturierung bei 95 °C, Annealing für 30 s bei 60 °C und einer Polymerisationszeit von 90 s bei 72 °C. Abschließend wurde eine Polymerisation für 7 min bei 72 °C durchgeführt.

Die Herstellung der Digoxigenin-markierten Northern Blot Sonden wurde, wie für die Southern Blot Sonden beschrieben, mit Hilfe der *Taq*-DNA-Polymerase in 50  $\mu$ l Ansätzen durchgeführt. Als Template wurden entweder genomische DNA (20-25 ng) oder Plasmid-DNA (20-25 ng) des jeweils entsprechenden Überexpressionsvektors (Tabelle 3) verwendet. Die Amplifikation erfolgte wie oben beschrieben, mit 55 °C Annealing-Temperatur und 60 s Synthesezeit.

**Kolonie-PCR.** Nach erfolgter Ligation (4.2.5) eines Inserts in einen Plasmidvektor und anschließender Transformation in *E. coli* XL1-Blue MRF<sup>+</sup> (4.2.6) wurden die *E. coli* Einzelkolonien mittels Kolonie-PCR darauf untersucht, ob das jeweils aufgenommene Plasmid ein Insert von erwarteter Länge enthielt. Die hierfür verwendeten Primerpaare waren

komplementär zu den die Multiple Cloning Site flankierenden Sequenzen des verwendeten Vektors. Für pTA963 wurden die Primer pTA963p.tnaA\_s und T3 verwendet und für pTA131 M13 uni (-21) und T3 (Tabelle 4). Die Kolonie-PCR wurde in 25 µl Ansätzen durchgeführt. Darin enthalten waren jeweils 1 x Puffer Y, 1 x Enhancer, 200 µM dNTP-Mix, je 200 nM der entsprechenden Primer und 0,5 U *Taq*-DNA-Polymerase. Als Template wurde von jeder zu untersuchenden Kolonie mit einem sterilen Zahnstocher etwas Zellmaterial abgenommen und in den Reaktionsansatz gegeben. Die Amplifikation erfolgte mit einem initialen Denaturierungsschritt von 95 °C für 4 min 30 s. Darauf folgten 30 Zyklen mit 30 s Denaturierung bei 95 °C, 30 s Annealing bei 48 °C und einer Synthesezeit von 30-120 s bei 72 °C, die abhängig von der Länge des zu amplifizierenden Fragments gewählt wurde. Abschließend wurde eine Synthese von 7 min bei 72 °C durchgeführt.

#### 4.2.4 Reinigung, Konzentrations- und Größenbestimmung von DNA

**Reinigung von DNA.** Die Reinigung von amplifizierten PCR-Produkten und restriktionshydrolysiertes DNA erfolgte entweder mit dem „PCR-Purification“ Kit (Qiagen) oder, nach Auftrennung im Agarose Gel, mit dem „Gel Extraction“ Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers.

**DNA-Konzentrationsbestimmung.** Die Konzentration von DNA wurde mittels Absorptionsmessung bei 260 und 280 nm am NanoDrop ND-1000 Spektralphotometer (NanoDrop Technologies, Inc.; Wilmington, USA) bestimmt. Die Konzentration wurde durch die Software ND-1000 ermittelt und zusätzlich wurde mit dem Absorptionsquotienten 260/280 nm die Reinheit der DNA analysiert. Reine DNA weist einen Absorptionsquotienten von 1,8 auf (Sambrook et al. 1989).

**Agarosegelelektrophorese.** PCR-Produkte, Plasmide oder genomische DNA wurden mittels Agarosegelelektrophorese analytisch oder präparativ getrennt. Die Trennung erfolgte dabei in 1%igen Agarosegelen. Die Agarose wurde für analytische Gele (30 ml) oder präparative Gele (50 ml) in entsprechender Menge 1 x TBE-Puffer (89 mM Tris-HCl, pH 8 mit 89 mM Borsäure und 2 mM EDTA) durch Aufkochen gelöst. Nach Abkühlen auf ca. 60 °C wurde der Lösung 1,5 µl bzw. 2,5 µl 1%ige Ethidiumbromidlösung zugegeben und die Agaroselösung in eine Gießvorrichtung (Biometra, 7 x 10 cm) gegossen. Nach dem Aushärten wurde das Gel in die mit 1 x TBE gefüllte Laufkammer eingesetzt und mit den Proben beladen, die vorher mit

6 x Auftragspuffer (Fermentas) versetzt wurden. Zusätzlich wurde noch ein Größenstandard (GeneRuler 100 bp plus DNA Ladder oder GeneRuler 1 kb DNA Ladder) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V für 60 min in TBE-Puffer. Die DNA wurde im Anschluss an die Elektrophorese durch Anregung mit UV-Licht bei einer Wellenlänge von 312 nm sichtbar gemacht.

#### 4.2.5 Restriktionshydrolyse und Ligation

**Restriktionshydrolyse.** PCR-Produkte, Plasmide und genomische DNA wurden mit Restriktionsenzymen (NEB, Schwalbach/Taunus) als Doppel- oder Einzelverdau angesetzt. Für die Auswahl der Temperatur und Puffer wurden die Herstellerangaben befolgt. Ein Verdau erfolgte über Nacht in einem Volumen von 50  $\mu$ l.

**Ligation.** Ein Ligationsansatz (20  $\mu$ l) enthielt für eine sticky-end-Ligation restriktionsverdautes Plasmid und PCR-Produkt, wobei das PCR-Produkt in 3-10-fachem molaren Überschuss eingesetzt wurde. Des Weiteren enthielt jeder Ansatz 1 U T4-DNA-Ligase (Fermentas) und 1 x T4-DNA-Ligasepuffer. Die Ansätze wurden bei 22 °C für 2 h inkubiert, für 20 min gegen  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  mikrodialysiert und anschließend für die Transformation in *E. coli* eingesetzt (4.2.6). Für eine blunt-end-Ligation mit dem *EcoRV* verdauten Vektor pTA131, waren in dem Ligationsansatz (20  $\mu$ l) folgende Komponenten enthalten: PCR-Produkt im 3-fachen molaren Überschuss zum Vektor, restriktionshydrolysierter Vektor, 20 U *EcoRV*, 2  $\mu$ l des zum Restriktionsenzym gehörigen Puffers (NEB, Schwalbach/Taunus), 5 % PEG 4000, 0,5 mM ATP und 5 U T4-DNA-Ligase. Die Ansätze wurden 2 h bei 22 °C inkubiert und für 20 min bei 65 °C inaktiviert. Anschließend wurden sie für 20 min gegen  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  mikrodialysiert und dann für die Transformation in *E. coli* eingesetzt (4.2.6).

#### 4.2.6 Herstellung elektrokompenter Zellen und Transformation von *E. coli*

**Elektrokompente Zellen.** Zur Herstellung elektrokompenter *E. coli* XL1-Blue MRF<sup>c</sup> Zellen wurden 200 ml LB-Medium mit einer über Nacht gewachsenen Vorkultur 1,5%ig angeimpft und bei 37 °C inkubiert. Bei einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,7-1,0 wurden die Zellen für 15 min auf Eis inkubiert und anschließend für 10 min bei 4 °C und 4500 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 100 ml kaltem, sterilem  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  resuspendiert und nochmal zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand entfernt und das Pellet in 4 ml 10 % Glycerin aufgenommen.

Von dieser Zellsuspension wurden 40 µl Aliquots in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und mit flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70 °C.

#### **Transformation von *E. coli*.**

Zur Transformation von *E. coli* wurden zunächst 40 µl der elektrokompenten Zellen auf Eis aufgetaut und 1 µl Plasmid oder 2-5 µl Ligationsansatz zugegeben und gemischt. Die Elektroporation erfolgte in einer eisgekühlten Elektroporations-Küvette (Biozym, Hessisch Oldendorf) bei 2,5 kV, 12,5 kV/cm, 25 µF und 200 Ω (Biorad Pulse Controller und Biorad Gene Pulser<sup>TM</sup>, Biorad, München). Nach der Elektroporation wurden die Zellen sofort in 700 µl SOC-Medium (0,5 % Hefeextrakt, 2 % Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM Glucose, pH 7; auf 37 °C vorgewärmt) aufgenommen und bei 37 °C für 1 h bei 750 rpm (Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg) inkubiert. 10-200 µl dieser Zellsuspension wurden anschließend auf Carbenicillin-haltige (100 µg/ml) LB-Platten ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die anschließende Isolation der Plasmide erfolgte wie in 4.2.2 beschrieben.

#### **4.2.7 Sequenzierung**

Alle Plasmide (Tabelle 3) wurden sequenziert, um das Insert und die flankierenden Bereiche auf Fehler zu überprüfen. Die Sequenzierung fand bei der Firma MWG (MWG, Ebersberg) statt. Anschließend wurden die Chromatogramme, bzw. die erhaltenen Sequenzen mittels ClustalW2 ([www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/)) mit den Originalsequenzen ([www.halolex.mpg.de/public/](http://www.halolex.mpg.de/public/)) verglichen. Bei Fehlerfreiheit wurden die Plasmide weiterverwendet.

#### **4.2.8 Transformation von *Haloferax volcanii***

Für die Transformation von *H. volcanii* H26, H555 und H1209 wurden zunächst 2 ml der entsprechenden exponentiell wachsenden Kultur für 2 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand komplett abgenommen und das Zellpellet in einem Gemisch aus 162 µl Sphäroblastenbildungslösung (50 mM Tris-HCl pH 8,2, 800 mM NaCl, 27 mM KCl, 15 % Saccharose) und 18 µl 0,5 M EDTA-Lösung pH 8,2 vorsichtig resuspendiert. Nach einer mikroskopischen Kontrolle der Sphäroblastenbildung wurden 20 µl DNA-Lösung (2-5 µg Plasmid in 0,8 M NaCl) zugegeben und die Reaktionsgefäße vorsichtig 20-mal invertiert und für 5 min bei 20 °C inkubiert. In die Deckel der Reaktionsgefäße

wurden dann 210 µl einer PEG-Lösung (60 % PEG 600 und 40 % Sphäroblastenbildungslösung) gegeben, die durch rasches Schwenken mit der Zell-DNA-Lösung vermischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Anschließend wurden die Zellen mikroskopisch auf eine typische Aggregatbildung kontrolliert. Die Zellsuspension wurde dann mit 1800 µl Sphäroblastenverdünnungslösung (50 mM Tris-HCl, pH 7,2, 3,4 M NaCl, 175 mM MgSO<sub>4</sub>, 34 mM KCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 15 % Saccharose) verdünnt. Jeweils 200 µl der Ansätze wurden auf einer Deletionsmedium-Agarplatte ausplattiert und für ca. 7 Tage bei 42 °C inkubiert bis einzelne Kolonien unter dem Binokular sichtbar waren.

#### 4.2.9 Konstruktion von Deletionsmutanten und deren Komplementationen

**Deletionsmutanten.** Die Herstellung von Deletionsmutanten erfolgte in dieser Arbeit mit Hilfe der pop-in/pop-out Methode (Allers and Ngo 2003; Bitan-Banin et al. 2003). Der für diese Methode verwendete Vektor pTA131 verfügt über ein funktionelles *pyrE2*-Gen, welches für eine Orotat-Phosphoribosyl-Transferase kodiert, die in der Uracil-Biosynthese essentiell ist und unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors steht. In den Vektor wurde ein DNA-Fragment eingefügt, welches jeweils zu den 5'- und 3'- flankierenden Bereichen des zu deletierenden Gens komplementär war (4.2.3). *H. volcanii* H26 oder H555 wurden mit dem hergestellten Deletionsvektor transformiert. Da pTA131 keinen haloarchaeellen Replikationsursprung für die Replikation in *H. volcanii* besitzt, konnte in Uracil-freiem Medium auf Transformanten selektiert werden, die durch homologe Rekombination das Plasmid integriert haben. Die Orotat-Phosphoribosyl-Transferase (*pyrE2*) diente dabei als Selektionsmarker, um die Uracil-Auxotrophie des verwendeten *H. volcanii* Stammes zu komplementieren. Die homologe Rekombination fand an einer der beiden Gen-flankierenden Bereiche des Zielgens statt (pop-in). Nach zehnmalem Überimpfen mit jeweils 1-1,5%igem Inokulum der vorangegangenen Kultur in Uracil-freiem Medium wurden 1 ml Kultur entnommen und bei 8000 rpm für 120 s zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 100 µl Deletionsmedium mit 50 µg/ml 5-Fluoro-Orotsäure (FOA) und 30 µg/ml Uracil resuspendiert und auf eine Deletionsmedium-Agarplatte mit den gleichen Konzentrationen FOA und Uracil ausgestrichen. Das dem Medium zugegebene FOA wurde von den Zellen, die den Vektor noch im Genom integriert haben, durch die auf dem Vektor kodierte Orotat-Phosphoribosyl-Transferase in 5-Fluorouracil umgesetzt. 5-Fluorouracil ist für die Zellen toxisch und kann deshalb für die Selektion auf ein zweites homologes Rekombinationsereignis verwendet werden, bei dem das Plasmid wieder aus dem Genom entfernt wird (pop-out). Dabei kann

entweder das Wildtyp-Gen oder die Deletion im Genom der Klone bleiben. Deshalb wurden von der Pop-out-Platte mehrere Klone gepickt und mittels Pop-out PCR (4.2.3) auf eine Deletion überprüft. Klone, die das deletierte Gen enthielten, wurden dann 10-mal mit jeweils 1-1,5 % Inokulum überimpft. Die entstandene Deletionsmutante war nun eine Uracil-auxotrophe Mutante, die für die Herstellung von Doppelmutanten mit Hilfe derselben Methode verwendet werden konnte.

**Southern Blot Analysen.** Die Deletionen wurden mittels Southern Blot Analysen kontrolliert. Dazu wurde die genomische DNA aus Wildtyp- und Pop-out-Kulturen isoliert (4.2.2) und mit Restriktionsendonukleasen hydrolysiert (4.2.5). Die Auswahl der Restriktionsenzyme wurde je nach Deletionskonstrukt so gewählt, dass die entstehenden Fragmente nicht größer als 7 kb waren. Die DNA-Fragmente wurden in einem 1%igen Agarosegel für ca. 90 min bei 100 V aufgetrennt (4.2.4). Neben einem Standard (GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Fermentas) und jeweils 1-2  $\mu$ g der DNA-Fragmente wurde zusätzlich ein DIG-markierter Größenstandard (DNA Molecular Weight Marker III, Digoxigenin-labeled, Roche) aufgetragen. Anschließend wurde die DNA mittels Vakuum (Vacu-Blot, Biometra) aus dem Gel auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert. Das Gel wurde zunächst bei -60 mbar für 25 min in Depurinatlösung (250 mM HCl), für 20 min in Denaturierungslösung (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl), und für weitere 25 min in Neutralisierungslösung (0,5 M Tris-HCl, 1,5 M NaCl, pH 7,5) inkubiert. Der Unterdruck wurde dann auf -80 mbar erhöht und für weitere 40 min in 20 x SSC (3 M NaCl, 300 mM Na-Citrat, pH7) gebロットet. Die Membran wurde danach für 90 s unter UVA-Licht ( $\lambda = 312$  nm) inkubiert, sodass eine DNA-Fixierung stattfand (Cross-linking), und anschließend in 50 ml Reaktionsgefäßen in 10 ml vorgewärmter DIG Easy Hyb Lösung (Roche) bei 50 °C für mindestens 30 min prähybridisiert. Die hergestellten Sonden (jeweils ca. 200 ng) wurden für 7 min bei 99 °C denaturiert, auf Eis abgekühlt und in 10 ml DIG Easy Hyb (auf 50 °C vorgewärmt) verdünnt (4.2.3). Diese Hybridisierungslösung wurde gegen die Prähybridisierungslösung ausgetauscht und die Membran über Nacht bei 50 °C und 6 rpm inkubiert. Die verwendete Hybridisierungslösung (Zur mehrfachen Verwendung wurden Sonden bei -20 °C gelagert und vor erneuter Verwendung für 10 min bei 68 °C inkubiert) wurde abgossen, die Membran zweimal mit 25 ml Low Stringency Buffer (2 x SSC, 0,1 % SDS) bei Raumtemperatur und zweimal mit 25 ml High Stringency Buffer (0,5 x SSC, 0,1 % SDS) bei 68 °C inkubiert. Bei allen Schritten wurde darauf geachtet, dass die Membran nicht trocknet. Die anschließende Detektion spezifischer Signale wurde mit dem



„Luminescent Detection Kit“ (Roche) nach Herstellerangaben durchgeführt. Durch das entstandene spezifische Bandenmuster konnte eine erfolgreiche Deletion nachgewiesen werden.

**Komplementation.** Deletionsmutanten, die im Gegensatz zum Wildtyp nicht mehr in der Lage waren auf bestimmten C-Quellen zu wachsen oder ein verlangsamtes Wachstum zeigten, wurden mit dem Überexpressionsvektor pTA963 transformiert, der jeweils das funktionelle Gen unter der Kontrolle eines durch Tryptophan induzierbaren Promotors trug (4.2.8). Die Transkription des entsprechenden Gens wurde mit 80  $\mu$ M Tryptophan induziert und das Wachstum gemessen. Mit dieser *in-trans* Komplementation sollte jeweils gezeigt werden, dass der Wachstumsphänotyp der Mutante ausschließlich auf die Deletion des Zielgens zurückzuführen war.

#### 4.2.10 Herstellung von konditional letalen Mutanten

Das Gen HVO\_0478, das für die anabole GAP-DH kodiert, konnte nicht mittels pop-in/pop-out Methode deletiert werden. Deshalb wurde das Gen chromosomal unter die Kontrolle eines künstlich induzierbaren Promotors gestellt, so dass ein gezieltes An- und Abschalten des Gens möglich war (Gäbel et al. 2013). Dazu wurde zunächst mittels PCR (4.2.3) ein DNA-Fragment amplifiziert, das den kompletten mit Tryptophan induzierbaren Promotor (*p.tnaA*) am 5'-Ende und neben einem 6 x His-tag eine kurze Sequenz des 5'-Bereichs des Zielgens (20-30 % des Zielgens) umfasste. Als Template diente der Überexpressionsvektor, mit dessen Hilfe eine Tryptophan induzierte homologe Überexpression eines Gens und eine anschließende Reinigung mittels Nickel-NTA möglich waren. Das synthetisierte DNA-Fragment wurde anschließend mittels *blunt-end* Ligation in pTA131 ligiert (4.2.5) und *H. volcanii* H26 wurde mit dem konstruierten Plasmid transformiert (4.2.8). Eine episomale Vermehrung des Plasmids pTA131 ist aufgrund des fehlenden haloarchaeellen Replikationsursprungs nicht möglich. Die Selektion auf Zellen, die durch homologe Rekombination das Plasmid ins Genom integriert haben, erfolgte durch Wachstum auf Medium ohne Zugabe von Uracil, da durch die Aufnahme des Vektors die Uracil-Auxotrophie ( $\Delta$ *pyrE2*) des Stamms komplementiert wurde.

Der daraus resultierende Stamm kodierte nun für das Wildtyp-Gen (HVO\_0478) unter der Kontrolle des mit Tryptophan induzierbaren Promotors, wohingegen der native Promotor vor dem inkompletten und damit funktionslosen Gen lag. Damit das Wildtyp-Zielgen konstitutiv

exprimiert vorlag, enthielt das Medium Tryptophan (80-400  $\mu\text{M}$ ). Es wurde jeweils ein Klon von der Transformationsplatte abgenommen und zehnmal mit jeweils 1-1,5 % Inokulum aus der vorangegangenen Kultur auf Deletionsmedium mit Tryptophan überimpft. Anschließend wurde mittels Southern Blot (4.2.9) die erfolgreiche Insertion des Plasmids in das Chromosom überprüft und Wachstumsversuche (4.1) auf Synthetik-Medium mit und ohne Zugabe von 200  $\mu\text{M}$  Tryptophan durchgeführt, um phänotypische Unterschiede zu zeigen.

#### **4.2.11 Transkriptnachweis mittels Northern Blot und RT-PCR**

Der Nachweis von Transkripten erfolgte mittels Northern Blot oder RT-PCR. Um bei Arbeiten mit RNA eine Kontamination mit RNasen auszuschließen, wurden vor der Benutzung alle verwendeten Glaswaren bei 240 °C für 4 h inkubiert und alle Plastikwaren doppelt autoklaviert. Labortisch und Pipetten wurden vor Beginn der Arbeiten mit 0,1 M NaOH und 1 mM EDTA behandelt. Alle verwendeten Lösungen wurden mit 0,1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt, über Nacht bei 37 °C auf einem Reziproschüttler inkubiert und anschließend autoklaviert.

**Isolierung und Reinigung von RNA.** Die Isolierung von RNA erfolgte aus 2-6 ml exponentiell wachsender Kultur ( $\text{OD}_{600} = 1-1,5$ ). Die Zellen wurden bei 13000 rpm für 2 min zentrifugiert und das Pellet wurde in 1 ml TRI-Reagenz (Sigma-Aldrich) resuspendiert. Die Gesamt-RNA wurde anschließend nach Angaben des Herstellers isoliert. Eine Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte am Nanodrop (4.2.4). Die Konzentration wurde durch die Software ND-1000 ermittelt. Reine RNA weist dabei einen 260/280 nm Quotienten von 2 auf (Sambrook et al. 1989). Um mögliche Kontaminationen mit DNA auszuschließen, wurde die RNA vor Verwendung in Northern Blot und RT-PCR mit DNaseI (Fermentas) nach den Angaben des Herstellers behandelt.

**Northern Blot.** Die RNA wurde zunächst in 1,2%igen Formaldehydgelen getrennt. Dafür wurde die Laufkammer der Agarose-Gelelektrophorese über Nacht in 0,5 % SDS inkubiert. Die Agarose wurde durch Aufkochen in 50 ml MOPS-Puffer (20 mM MOPS, 5 mM Na-Acetat, 2 mM EDTA, pH 7) gelöst und auf ca. 60 °C abgekühlt, bevor 2,5  $\mu\text{l}$  0,01 % Ethidiumbromid und 900  $\mu\text{l}$  37 % Formaldehyd zugegeben wurden. Die Agarose-Lösung wurde anschließend in eine Gießvorrichtung gegossen (Biometra, 7 x 10 cm). Das ausgehärtete Gel wurde dann für 30 min in 1 x FA-Laufpuffer (MOPS-Puffer mit 0,74 %

Formaldehyd) equilibriert und anschließend die Proben aufgetragen, die mit 2 x Auftragspuffer für RNA (Fermentas) versetzt waren. Zusätzlich wurde als RNA-Standard der RiboRuler™ High Range RNA Ladder (Fermentas) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V für 60 min. Die Visualisierung der RNA fand durch eine Anregung mit UV-Licht bei 312 nm statt. Die RNA wurde dann mit Hilfe eines VacuBlot Systems (Vacu-Blot, Biometra) auf eine positiv geladene Nylon-Membran (Roche) übertragen. Der Transfer wurde zunächst bei -60 mbar mit 2 x 25 min H<sub>2</sub>O und 2 x 30 min 20 x SSC (3 M NaCl, 300 mM Na-Citrat, pH7) durchgeführt. Im Anschluss daran wurde ein weiterer Blotting-Schritt bei -80 mbar mit 20 x SSC für 40 min durchgeführt. Die Membran wurde dann für 5 min in 2 x SSC (aus 20 x SSC verdünnt) gewaschen und anschließend zur Fixierung der RNA für 30 min bei 120 °C inkubiert. Danach wurde die Membran für mindestens 30 min in einem Hybridisierungsröhrchen mit 10 ml vorgewärmter DIG Easy Hyb Lösung (Roche) bei 50 °C in einem Hybridisierungssofen bei 6 rpm inkubiert. Die jeweils verwendete Digoxigenin-markierte DNA-Sonde (4.2.3) wurde für 7 min bei 99 °C denaturiert, sofort auf Eis abgekühlt, mit 10 ml frischer, vorgewärmter DIG Easy Hyb Lösung gemischt und zu der Membran gegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 50 °C im Hybridisierungssofen bei 6 rpm. Die Sonde wurde in DIG Easy Hyb gelagert (-20 °C) und konnte mehrfach wiederverwendet werden (4.2.9).

Anschließend wurde die Membran 2 x für 5 min in Low Stringency Buffer (2 x SSC mit 0,1 % SDS) bei Raumtemperatur und dann 2 x für 5 min bei 50 °C im Hybridisierungssofen gespült. Die darauffolgende Detektion wurde mit dem „Luminescent Detection Kit“ (Roche) nach Herstellerangaben durchgeführt.

**Nachweis von Transkripten durch Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR).** Die RT-PCR wurde für eine semiquantitative Analyse von Transkriptmengen eines Gens auf verschiedenen C-Quellen genutzt. Die Transkripte von HVO\_A0329 und HVO\_0950 wurden mittels RT-PCR unter Verwendung des OneStep RT-PCR Kit (Qiagen) nachgewiesen. Ein 12,5 µl Ansatz enthielt 20-30 ng RNA (für ein Transkript jeweils die gleiche Menge), je 600 nM forward und reverse Primer (Tabelle 4), 400 µM dNTP-Mix, 1 x RT-Puffer und 0,5 µl Enzym-Mix. Die verwendeten Primer sind der Tabelle 4 zu entnehmen. Die Proben wurden für die reverse Transkription zunächst 30 min bei 50 °C inkubiert. Anschließend wurde die reverse Transkriptase für 15 min bei 95 °C denaturiert und die DNA-Polymerasen aktiviert. Daran schlossen sich mehrere Zyklen aus Denaturierung für 30 s bei 95 °C, Annealing für 30 s bei 60-62 °C und einer Synthesezeit von 30-60 s bei 72 °C an. Abschließend wurde eine

Polymerisationszeit von 10 min bei 72 °C durchgeführt. Für die semiquantitativen Ansätze variierte die Anzahl der verwendeten Zyklen je nach Transkript (26 Zyklen (*ribL*), 36 Zyklen (HVO\_A0329), 30 Zyklen (HVO\_0950)). Als konstitutive Kontrolle in den semiquantitativen Ansätzen diente *ribL*. Um eine Kontamination der RNA mit DNA auszuschließen wurden Kontrollansätze pipettiert, bei denen die Zugabe der RNA erst nach dem Inaktivierungsschritt der Reversen Transkriptase zugegeben wurde.

### 4.3 Analytische Methoden

#### 4.3.1 Bestimmung von Galactosekonzentrationen in Wachstumsüberständen

Die D-Galactose-Konzentration wurde enzymatisch mit Hilfe der gereinigten Galactose-Dehydrogenase (GalDH) aus *H. volcanii* (4.4.1) bestimmt. Der Nachweis erfolgte dabei über die Reduktion von NADP<sup>+</sup>, die bei 340 nm photometrisch bestimmt werden konnte. Die Tests wurden in 50 mM Tris-HCl, 1,5 M KCl, pH 8 bei 42 °C in 1 ml Ansätzen durchgeführt. Als Kontrolle für die vollständige Umsetzung und die Proportionalität der Messung wurde eine Eichgerade aus verschiedenen bekannten Galactose-Konzentrationen bei jeder Messung durchgeführt. Die Ansätze enthielten jeweils 2 mM NADP<sup>+</sup> und bis zu 150 µM Galactose. Die Ansätze wurden jeweils bei 42 °C bis zu einer konstanten Extinktion bei 340 nm vorinkubiert. Durch die Zugabe von 1 U GalDH wurde die Reaktion gestartet, nach ca. 2 h war die Galactose vollständig umgesetzt und die Extinktion wurde erneut bestimmt. Aus der Extinktionsdifferenz wurde mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon = 6,3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) die Galactosekonzentration der Proben ermittelt.

#### 4.3.2 Bestimmung von 2-Keto-3-Desoxyzuckersäuren

2-Keto-3-Desoxygluconat (KDG) wurde von der Arbeitsgruppe Schönheit und 2-Keto-3-Desoxygalactonat (KDGal) wurde von Michael Danson (Bath, UK) zur Verfügung gestellt. Die Konzentration der Lösungen wurde enzymatisch mit Hilfe einer KDG-Kinase aus *H. volcanii* (Pickl et al. 2014) ermittelt. Für die Substrate 2-Keto-3-Desoxy-6-Phosphogluconat (KDPG) und 2-Keto-3-Desoxy-6-Phosphogalactonat (KDPGal) (Sigma-Aldrich) waren die Herstellerangaben über die Reinheit der Produkte nicht eindeutig, sodass für diese Produkte die Konzentration zunächst enzymatisch unter Verwendung der KDPGal-Aldolase aus *H. volcanii* bestimmt wurde. Die enzymatisch ermittelte Konzentration wurde jeweils für die Ermittlung eines Extinktionskoeffizienten im Thiobarbiturat-Test (s.u.)

verwendet. Der Thiobarbiturat-Test wurde dann für die Ermittlung von Enzymraten der KDPG-Aldolase und der Galactonat-Dehydratase verwendet.

**Enzymatischer Test.** Die Konzentrations-Bestimmung von KDPG- und KDPGal-Lösungen wurde enzymatisch mit Hilfe der gereinigten KDPGal-Aldolase aus *H. volcanii* (4.4.3) durchgeführt. Dabei wurde die vollständige Umsetzung von KDPG oder KDPGal zu Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Pyruvat gemessen. Mit Hilfe einer Lactat-Dehydrogenase wurde das gebildete Pyruvat mit NADH zu Lactat reduziert. Es wurde gewährleistet, dass NADH im Überschuss vorlag. Die Oxidation von NADH wurde im Photometer bei 340 nm gemessen. Die Ansätze wurden bei 42 °C in 1 ml Ansätzen in 50 mM Tris-HCl, 0,5 M KCl, pH 7,5 durchgeführt. Die Ansätze enthielten jeweils 0,3 mM NADH, 3 U Lactat Dehydrogenase, 2,7 µg gereinigte, rekombinante KDPGal-Aldolase und verschiedene Konzentrationen von KDPG bzw. KDPGal. Die Extinktion bei 340 nm wurde vor Zugabe der KDPGal-Aldolase bestimmt ( $E_1$ ). Gestartet wurde die Reaktion durch Zugabe der KDPGal-Aldolase. Nach ca. 10 min war die Zuckersäure vollständig umgesetzt und die Extinktion wurde erneut bestimmt ( $E_2$ ). Durch die errechnete Extinktionsdifferenz wurde mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten von NADH ( $\epsilon = 6,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) die in den Proben enthaltene Menge an KDPG bzw. KDPGal ermittelt. Die Messwerte waren bis zu einer Konzentration von 100 µM KDPG bzw. KDPGal proportional.

**Colorimetrischer Test.** Um mit dem colorimetrischen Thiobarbitursäure Test (Weissbach und Hurwitz 1959) die Enzymaktivität der Galactonat-Dehydratase und der KDPG-Aldolase zu bestimmen, musste zunächst der molare Extinktionskoeffizient von KDGal, KDGal, KDPG und KDPGal im Thiobarbiturat-Test bestimmt werden. Für die Zuckersäure-Lösungen, deren Konzentrationen enzymatisch bestimmt worden waren, wurde der Thiobarbiturat-Test mit Hilfe verschiedener eingesetzter Konzentrationen kalibriert. Dazu wurden 50 µl Probe der jeweiligen Zuckersäure mit je 125 µl Perjodat-Lösung (0,025 M  $\text{HJO}_4^-$  in 0,125 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) versetzt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 250 µl Arsenit-Lösung (2 %  $\text{NaAsO}_2$  in 0,5 M HCl) zugegeben, und nach 2 min bei Raumtemperatur wurden 1000 µl Thiobarbitursäure-Lösung (0,3 % Thiobarbiturat in  $\text{H}_2\text{O}$ ) zugegeben. Es folgte eine Inkubation für 10 min bei 100 °C im Thermoblock. Die Proben wurden kurz auf Eis abgekühlt und anschließend für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die Extinktion des Überstands wurde photometrisch bei 548 nm ermittelt. Dabei ergab sich für KDGal und KDPGal ein molarer Extinktionskoeffizient von  $67,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , der für KDGal schon bekannt

war (Gottschalk und Bender 1982). Für KDGal wurde der molare Extinktionskoeffizient auf  $39,1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$  bestimmt. Für KDPG ergab sich ein molarer Extinktionskoeffizient von  $0,93 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Eine Proportionalität der Konzentrationen im Thiobarbitursäure-Test konnte jeweils nachgewiesen werden.

Die KDPG-Aldolase Aktivität wurde in Richtung der Bildung von KDG oder KDPG aus Glycerinaldehyd bzw. Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Pyruvat mit Hilfe des Thiobarbitursäure-Tests ermittelt. Dazu wurden die oben genannten Extinktionskoeffizienten verwendet. Es wurden jeweils  $50 \mu\text{l}$  oder geeignete Verdünnungen der Überstände aus der diskontinuierlichen Messung eingesetzt (4.4.3).

Die Enzymraten der Galactonat-Dehydratase aus *H. volcanii* wurden ebenfalls mittels Thiobarbitursäure-Test gemessen. Die in den diskontinuierlichen Test (4.4.2) eingesetzten Substrate Galactonat oder Gluconat wurden durch die Galactonat-Dehydratase in die jeweiligen Produkte KDGal bzw. KDG umgesetzt. Mit Hilfe des Thiobarbiturat-Tests und der oben ermittelten Extinktionskoeffizienten wurde dann aus den Überständen die Produktkonzentration bestimmt. Es wurden jeweils  $50 \mu\text{l}$  oder geeignete Verdünnungen der Überstände aus der diskontinuierlichen Messung in den Thiobarbitursäure Test eingesetzt.

### 4.3.3 Proteinkonzentrationsbestimmung

Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe einer modifizierten Methode nach Bradford (Bradford 1976) bestimmt. Dazu wurden je  $100 \mu\text{l}$  proteinhaltige Probe mit  $900 \mu\text{l}$  Bradford-Reagenz (70 mg Coomassie Brilliant Blue, 50 ml 99 % Ethanol, 100 ml 80 % Ortho-Phosphorsäure ad 1000 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ , filtriert) gemischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktion wurde bei 595 nm bestimmt und der Messwert gegen eine Probe ohne Protein korrigiert. Eine Eichgerade wurde mit einem Standard aus Rinder-Serum Albumin Fraktion V (Merck, Darmstadt) erstellt. Die Messwerte waren bis zu einer Proteinmenge von  $5 \mu\text{g}$  im Test proportional.

### 4.3.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

**SDS-PAGE.** Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde für die Reinheitskontrolle während der Proteinreinigung und die Größenbestimmung von Proteinuntereinheiten genutzt. Die Elektrophorese erfolgte dabei in 12%igen, diskontinuierlichen Gelen ( $7 \text{ cm} \times 8 \text{ cm} \times 0,075 \text{ cm}$ ) nach der Methode von Laemmli (Laemmli 1970) in einer Mini Protean 3

Elektrophorese Zelle (Biorad). Die Zusammensetzungen der Trenn- und Sammelgele sind in Tabelle 5 dargestellt.

Alle Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel (Tabelle 5) mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt. Dazu wurden zwei Volumen Probe mit einem Volumen 30%iger TCA-Lösung versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet in 9 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>, 2,5 µl 1 M Tris-HCl pH 9, 0,5 µl 20 x DTT (oder 1,5 µl 10 x DTE) und 3 µl 5 x Auftragspuffer (Fermentas, St. Leon Roth oder 100 mM Tris-HCl, 20 % Glycerin, 4 % SDS, 0,2 % Bromphenolblau pH 6,8) resuspendiert. Die Proben wurden dann für 10 min bei 96 °C denaturiert und auf das Gel aufgetragen. Der Elektrophorese-Puffer bestand aus 25 mM Tris, 192 mM Glycin und 0,1 % SDS. Die Auftrennung der Proteine erfolgte zunächst für 10 min bei 70 V im Sammelgel und bei 200 V für weitere 50 min im Trenngel. Auf jedes verwendete Gel wurde als Molekulargewichtsmarker der Precision Plus Protein<sup>TM</sup> Standard 10-250 kDa von Biorad aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurden die Gele für ca. 5 min in 1 % Commassie Brilliant Blue R250 in 10 % Essigsäure gefärbt. Eine Entfernung von nichtproteingebundenem Farbstoff erfolgte in 10 % Essigsäure.

**Tabelle 5 Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für die SDS-PAGE.**

Substanz	Trenngel (12 %)	Sammelgel (3,33 %)
30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid	2 ml	0,25 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	1,25 ml	---
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	---	0,3 ml
10 % SDS	50 µl	50 µl
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	1,64 ml	1,63 ml
10 % Ammoniumpersulfat	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl

**CTAB-PAGE.** Die Cetyltrimethylammoniumbromid-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (CTAB-PAGE) nach Akins (Akins et al. 1992) wurde in dieser Arbeit verwendet, um die apparente molekulare Masse der Untereinheiten von Proteinen zu bestimmen, die aufgrund des hohen Gehalts an sauren Aminosäuren in der SDS-PAGE nicht der erwarteten Größe entsprachen (Bonete et al. 1996). Die Gele wurden, wie in

Tabelle 6 beschrieben, hergestellt. Die Proben wurden in 10 % TCA gefällt (4.3.4) und die Proteinpellets in 20 µl CTAB-Probenpuffer (1 ml enthielt 10 mM Tricin-NaOH pH 8,8, 1 % CTAB, 10 % Glycerin und 10 µl einer gesättigten Kristallviolettlösung) aufgenommen. Die Proteine wurden dann für 10 min bei 98 °C denaturiert und mit Hilfe einer Hamilton-Spritze auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte zunächst für 15 min bei 100 V und für weitere 60 min bei 150 V in Tricin-Laufpuffer (25 mM Tricin, 0,1 % CTAB, 15 mM Arginin, pH 8,2), wobei der Plus- und Minuspol der Elektrophoresekammer vertauscht wurden. Als Molekulargewichtsmarker dienten Proteine aus dem Gelfiltration Calibration Kit von GE Healthcare (Conalbumin, Albumin, Ovalbumin, Carbonic Anhydrase oder Chymotrypsinogen, in 1 mg/ml H<sub>2</sub>O gelöst, jeweils 5-10 µg), die ebenso gefällt und denaturiert wurden, wie oben beschrieben (4.3.4). Das Gel wurde anschließend für ca. 5 min in Fixierlösung (25 % Isopropanol, 10 % Essigsäure) fixiert, dann für ca. 10 min in 1 % Commassie Brilliant Blue R250 in 10 % Essigsäure gefärbt. Eine Entfernung von nichtproteingebundenem Farbstoff erfolgte in 10 % Essigsäure bei 40 °C über Nacht.

**Tabelle 6 Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für die CTAB-PAGE.**

Substanz	Trenngel (12 %)	Sammelgel (3,33 %)
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	---	0,625 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	2,6 ml	0,91 ml
10 % Ammoniumpersulfat	57,5 µl	25 µl
TEMED	5,325 µl	5 µl

#### 4.3.5 Bestimmung des nativen Molekulargewichts von Proteinen

Für die Bestimmung des apparenten Molekulargewichts der gereinigten, rekombinanten Proteine wurde eine Größen-Ausschlusschromatographie an einer Superdex 200 HiLoad 16/60 Gelfiltrationssäule (GE Healthcare, Freiburg) verwendet. Es wurden 1-2 ml Probe aufgetragen, die Flussgeschwindigkeit betrug 1 ml/min. Die jeweils verwendeten Laufpuffer sind in 4.4 beschrieben. Proteine aus dem HMW und LMW Gel Filtration Calibration Kit (GE Healthcare) dienten als Molekulargewichtsstandards. Die Kalibrierung erfolgte nach Herstellerangaben in 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5. Neben der Superdex Säule



wurde auch eine Superose 12 10/300 Gelfiltrationssäule (GE Healthcare) mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml/min zur Bestimmung des nativen Molekulargewichts verwendet. Zur Kalibrierung des Molekulargewichts wurden ebenfalls Proteine aus dem HMW und LMW Gel Filtration Calibration Kit (GE Healthcare) verwendet.

#### 4.4 Überexpression, Reinigung und Charakterisierung von Proteinen

**Überexpression von Proteinen.** Die Überexpression von Proteinen erfolgte in *H. volcanii* H1209, der mit dem jeweiligen Überexpressionsvektor pTA963 (Allers et al. 2010) transformiert war (Tabelle 3). Die Anzucht der Vorkulturen erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 42 °C in 250 ml Erlenmeyerkolben mit 40 ml DM-YPC-Medium (Tabelle 2). Die Expression selbst erfolgte in 2 l Erlenmeyerkolben mit 400 ml DM-YPC, welches mit den Vorkulturen auf eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,1-0,3 angeimpft wurde. Die Induktion erfolgte bei einer OD<sub>600</sub> von etwa 0,6 mit 2 mM L-Tryptophan (Stammlösung: 400 mM L-Tryptophan in 0,5 M HCl). Nach ca. 16 h weiteren Wachstums wurden die Zellen bei 8000 rpm für 20 min bei 10 °C zentrifugiert (Zentrifuge Avanti<sup>TM</sup>J-25, Rotor JLA 10.500, Beckman) und die Pellets bis zur Reinigung bei -20 °C oder -70 °C gelagert.

**Reinigung von Proteinen.** Die säulenchromatographische Reinigung von Proteinen bis zur apparenten Homogenität wurde an FPLC-Systemen von Bio-Rad (Biologic HR Workstation, Bio-Rad) und GE Healthcare (ÄKTA FPLC) bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Elution von Proteinen wurde durch die Absorptionsmessung bei 280 nm kontrolliert.

Die Zellpellets wurden zunächst in 20 ml Auftragspuffer resuspendiert und mittels viermaliger Hochdruckhomogenisation in einer gekühlten French Press Zelle bei 16000 Psi aufgeschlossen. Die Zellsuspension wurde dann für 90 min bei 4 °C mit 40000 rpm zentrifugiert (Optima L Preparative Ultracentrifuge, Rotor 70 Ti, Beckmann). Die daraus erhaltenen Überstände wurden auf 50-100 ml mit dem jeweiligen Auftragspuffer aufgefüllt und, mit Ausnahme der Galactonat-Dehydratase, auf eine mit dem Auftragspuffer equilibrierte Nickel-NTA Säule (1 ml, QIAGEN oder GE Healthcare) mit einer Flussgeschwindigkeit von 1-2 ml/min aufgetragen. Unspezifisch gebundenes Protein wurde mit 20 mM Imidazol ausgewaschen, spezifisch gebundenes Protein wurde mit 100 mM Imidazol eluiert und fraktioniert gesammelt. Die Fraktionen mit der höchsten Proteinkonzentration aus der spezifischen Elution wurden entweder direkt für den Auftrag auf

die Größen-Ausschlusschromatographie verwendet, oder zunächst vereint, ultrafiltriert und dann für die Größen-Ausschlusschromatographie eingesetzt.

Die Ultrafiltration erfolgte in einer 10 ml Ultrafiltrationszelle (Amicon, Beverly, USA). Dabei wurde ein Filter mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa verwendet. Anschließend wurden die Proteine für 10-20 min bei 13200 rpm und 4 °C in einer Kühlzentrifuge (5415 R, Eppendorf) zentrifugiert und der Überstand für die weitere Verwendung abgenommen.

**Charakterisierung von Proteinen.** Die Messung von Aktivitäten gereinigter Enzyme erfolgte in einem Volumen von 0,2-1 ml. Es wurden dafür Einmalküvetten aus Kunststoff mit einer Schichtdicke von 10 mm verwendet. Die Messungen wurden entweder in einem beheizbaren Ultrospec 2000 Photometer (GE Healthcare) durchgeführt und die Raten mit einem Schreiber L250E (Linseis, Selb) aufgezeichnet, oder es wurde ein beheizbares Photometer Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies) verwendet und die Daten mit Hilfe der Cary Win UV Software (Agilent Technologies) ausgewertet. Jede Küvette wurde vor der Messung inkubiert, bis die gewünschte Temperatur erreicht war. Der pH-Wert der Puffer war jeweils auf die entsprechende Temperatur eingestellt. Sowohl die Substratreihenfolge als auch die Enzymmengen wurden bei den Messungen variiert, um mögliche unspezifische Raten und eine Abhängigkeit der Rate von der Proteinkonzentration zu zeigen.  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werte wurden durch eine doppelt reziproke Auftragung nach Lineweaver-Burk ermittelt. Die Enzymaktivität 1 Unit (U) ist definiert als die Umsetzung von 1  $\mu$ mol Substrat, bzw. die Bildung von 1  $\mu$ mol Produkt pro Minute.

#### 4.4.1 Galactose-Dehydrogenase

Das Zellpellet wurde in 20 mM Tris-HCl, 1,5 M KCl, 5 mM Imidazol, pH 8 resuspendiert, aufgeschlossen, zentrifugiert und der Überstand auf eine Nickelsäule aufgetragen. Das bei 100 mM Imidazol spezifisch eluierte Protein wurde auf eine in 20 mM Tris-HCl, 1,5 M KCl, pH 8 equilibrierte Superdex (4.3.5) aufgetragen und mit einem isokratischen Fluss von 1 ml/min eluiert. Das apparent homogene Protein wurde für die Aktivitätsmessungen verwendet.

Die gereinigte Galactose-Dehydrogenase, welche die  $NADP^+$  abhängige Oxidation von D-Galactose katalysiert, wurde über die Zunahme der Extinktion bei 340 nm ( $\epsilon = 6,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) bei 42 °C gemessen. Die 1 ml Ansätze enthielten 50 mM Tris-HCl, 1,5 M KCl, pH 8, 2 mM  $NADP^+$ , 50 mM D-Galactose und bis zu 0,5  $\mu$ g gereinigtes Protein. Der Testansatz für

den  $K_m$ -Wert von Galactose enthielt 0-100 mM Galactose und 6 mM  $\text{NADP}^+$ . Für den  $K_m$ -Wert von  $\text{NADP}^+$  enthielt der Testansatz 0-6 mM  $\text{NADP}^+$  und 100 mM Galactose. Die Bestimmung des  $K_m$ -Werts von  $\text{NAD}^+$  erfolgte mit 0-12 mM  $\text{NAD}^+$  und 100 mM Galactose. Der Testansatz für die Bestimmung des  $K_m$ -Werts von Arabinose enthielt 0-100 mM Arabinose und 2 mM  $\text{NADP}^+$ . Die Substrat-Spezifität der Galactose-Dehydrogenase wurde mit je 25 mM folgender Zucker gemessen: D-Mannose, D-Galactose, D-Glucose, D-Fructose, D-Xylose, L-Arabinose, D-Ribose und D-Talose. Die pH-Abhängigkeit des Enzyms wurde in Puffer (50 mM) mit jeweils 1,5 M KCl im pH-Bereich von 5-10,5 (Piperazin pH 5-7, Tris-HCl pH 7-9 oder Piperazin pH 9-10,5) gemessen. Das KCl-Optimum wurde in 50 mM Tris-HCl, pH 8 bis 4 M KCl gemessen.

#### 4.4.2 Galactonat-Dehydratase

Vorversuche haben ergeben, dass eine Reinigung der Galactonat-Dehydratase an einer Nickelsäule nicht möglich ist, da das Enzym unter den gewählten Bedingungen inaktiv war. Deshalb wurde das Zellpellet in 50 ml 50 mM Tris-HCl, 2 M Ammoniumsulfat pH 7,5 resuspendiert, in einer French Press Zelle aufgeschlossen und zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine im gleichen Puffer equilibrierte Phenyl-Sepharose-Säule 26/10 aufgetragen und mit einem linearen Gradienten über 8 Säulenvolumen bis 0 M Ammoniumsulfat eluiert. Die Fraktion mit der höchsten Volumenaktivität wurde mittels Ultrafiltration auf 2 ml eingengt und mittels Superdex (4.3.5) gereinigt.

Die gereinigte D-Galactonat-Dehydratase katalysierte die Umwandlung der Zuckersäure D-Galactonat in 2-Keto-3-Desoxy-Galactonat (KDGal) unter Abspaltung von  $\text{H}_2\text{O}$ . Dazu wurden die Reaktionsansätze mit einem Volumen von 0,5-1 ml bei einer Temperatur von 42 °C für 0-160 min im Thermoblock TB1 (Biometra) inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten erfolgte ein Abstoppen der Reaktion durch Entnahme von Aliquots (100  $\mu\text{l}$ ) durch eine Fällung der Proteine mit 25  $\mu\text{l}$  30 %iger Trichloressigsäure. Diese Aliquots wurden anschließend bei 13200 rpm zentrifugiert und die Überstände wurden für die Detektion des entstandenen KDGal mit Hilfe des Thiobarbiturat-Tests eingesetzt (4.3.2). Die Versuche wurden in 0,1 M Tris-HCl, 3,5 M KCl, pH 7,5 durchgeführt. Ein Versuchsansatz enthielt 4 mM D-Galactonat, 10 mM  $\text{MgCl}_2$  und bis zu 3,5  $\mu\text{g}$  gereinigtes Protein. Die Reaktion wurde durch Zugabe des gereinigten Proteins gestartet. Die kinetischen Parameter für Galactonat wurden mit 0-20 mM Galactonat und 10 mM  $\text{MgCl}_2$  bestimmt. Die Bestimmung der kinetischen Parameter von  $\text{MgCl}_2$  erfolgte mit 0-20 mM  $\text{MgCl}_2$  und 4 mM Galactonat im

Test. Das KCl-Optimum der Galactonat-Dehydratase wurde für 0-4 M KCl in 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5 gemessen. Das pH-Optimum wurde in 0,1 M Bis-Tris, 3,5 M KCl pH 5,5-7 und 0,1 M Tris-HCl, 3,5 M KCl, pH 7-9 bestimmt. Zur Ermittlung der  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werte für Galactonat und Gluconat wurden Substratkonzentrationen zwischen 0-20 mM bzw. 0-50 mM verwendet. Um die Abhängigkeit von divalenten Kationen zu testen, wurden den Reaktionsansätzen 4 mM D-Galactonat und je 1 mM  $MgCl_2$ ,  $CaCl_2$ ,  $CuCl_2$ ,  $CoCl_2$ ,  $FeCl_2$ ,  $MnCl_2$ ,  $NiCl_2$  oder  $ZnCl_2$  zugegeben. Zusätzlich wurde in weiteren Reaktionsansätzen getestet, ob die Aktivität durch Zugabe von EDTA inhibiert und durch erneute Zugabe von  $MgCl_2$  wieder aktiviert werden konnte. Dazu wurde das Enzym mit 4 mM Galactonat und 1 mM  $MgCl_2$  von 0-40 min inkubiert, anschließend wurden dem Ansatz 3 mM EDTA zugegeben und dieser für weitere 40 min inkubiert. Abschließend wurden 10 mM  $MgCl_2$  zugefügt und nochmals für weitere 40 min bei 42 °C inkubiert. Über die gesamte Zeitspanne wurden geeignete Aliquots (100  $\mu$ l) abgenommen, um die Aktivität zu detektieren.

#### 4.4.3 KDPGal-Aldolase und KDPG-Aldolase

Die Zellpellets wurden in 20 mM Tris-HCl, 1,5 M KCl, 5 mM Imidazol, pH 8 (KDPGal-Aldolase) bzw. in 100 mM HEPES-KOH, 2 M NaCl, 5 mM Imidazol, pH 8 (KDPG-Aldolase) suspendiert, aufgeschlossen, zentrifugiert und der Überstand auf eine mit dem jeweiligen Puffer equilibrierte Nickelsäule aufgetragen. Das bei 100 mM Imidazol spezifisch eluierte Protein wurde auf eine in 20 mM Bis-Tris-HCl, 1,5 M KCl, pH 7,5 equilibrierte Superdex-Säule (4.3.5) aufgetragen und mit einem isokratischen Fluss von 1 ml/min eluiert. Die Proteine waren nach diesen Reinigungsschritten apparent homogen und wurden für die Aktivitätsmessungen verwendet.

**KDPGal-Aldolase.** Die KDPGal-Aldolase katalysierte die reversible Spaltung von KDPGal in Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) und Pyruvat. Die Messung der KDPGal-Aldolase erfolgte in Richtung der Bildung von GAP und Pyruvat im kontinuierlichen Test. Das gebildete Pyruvat wurde mit Hilfe der Lactat-Dehydrogenase und NADH zu Lactat reduziert. Die Extinktions-Abnahme von NADH ( $\epsilon = 6,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) wurde im Photometer bei 340 nm gemessen. Die Messungen wurden in 20 mM Tris-HCl, 0,5 M KCl, pH 7 mit 0,2 mM NADH, 0,7 U Lactat-Dehydrogenase, bis zu 1,5  $\mu$ g gereinigter KDPGal-Aldolase und 90  $\mu$ M KDPGal durchgeführt.

Für die Bestimmung der kinetischen Parameter wurden bis zu 160  $\mu\text{M}$  KDPGal und 0,2 mM NADH verwendet. Das pH-Optimum wurde in 20 mM Puffer mit 0,5 M KCl, für den pH-Bereich von 5-7 (Bis-Tris), pH 7-8,5 (Tris) und für pH 8,5-10 (Piperazin), gemessen. Das KCl-Optimum wurde in 20 mM Bis-Tris pH 7,5 bis 4 M KCl bestimmt.

**KDPG-Aldolase.** Die KDPG-Aldolase katalysierte die reversible Spaltung von KDPG in GAP und Pyruvat. Die Aktivität der KDPG-Aldolase wurde in beide Reaktionsrichtungen bestimmt.

Die Spaltung von KDPG wurde in einer kontinuierlichen Messung analysiert. Das gebildete Pyruvat wurde mit Hilfe der Lactat-Dehydrogenase und NADH zu Lactat reduziert, sodass eine Abnahme der Extinktion von NADH bei 340 nm ( $\epsilon = 6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) gemessen werden konnte. Die 200-250  $\mu\text{l}$  Ansätze enthielten 20 mM Bis-Tris, 1,5 M KCl, pH 7,5, 0,7 U Lactat-Dehydrogenase, 0,2 mM NADH, 0,1  $\mu\text{g}$  gereinigte KDPG-Aldolase und bis zu 0,56 mM KDPG. Das Substratspektrum wurde mit 1,5 U Lactat-Dehydrogenase, 0,3 mM NADH, 0,35  $\mu\text{g}$  der gereinigten KDPG-Aldolase und 3 mM der Substrate KDPG, KDPGal oder KDG gemessen.

Für die diskontinuierliche Messung der Bildung von KDG oder KDPG wurden die Reaktionsansätze in 0,5-1 ml Volumen bei einer Temperatur von 42 °C für 0-60 min im Thermoblock TB1 (Biometra) inkubiert. Zu definierten Zeitpunkten erfolgte ein Abstoppen der Reaktion durch Entnahme von Aliquots (100  $\mu\text{l}$ ), die durch Zugabe von 25  $\mu\text{l}$  30 %iger TCA gefällt wurden. Diese Aliquots wurden anschließend bei 13200 rpm zentrifugiert und die Überstände für die Detektion des entstandenen KDG oder KDPG mit Hilfe des Thiobarbiturat-Tests eingesetzt (4.3.2). Die Messung wurde in 0,1 M Bis-Tris, 1,5 M KCl, pH 7,5 mit 6 mM Glycerinaldehyd, 10 mM Pyruvat und bis zu 10  $\mu\text{g}$  gereinigter KDPG-Aldolase durchgeführt. Die Reaktionsansätze hatten ein Volumen von 500  $\mu\text{l}$ . Für die Messung der  $V_{\text{max}}$ - und  $K_{\text{m}}$ -Werte von Pyruvat wurden 0-30 mM Pyruvat und 20 mM Glycerinaldehyd eingesetzt. Der Testansatz für den  $K_{\text{m}}$  von Glycerinaldehyd (0-30 mM) enthielt 25 mM Pyruvat. Der  $K_{\text{m}}$  für GAP (0-20 mM) wurde mit 25 mM Pyruvat im Testansatz durchgeführt. Das pH-Optimum wurde jeweils mit 100 mM Puffer und 1,5 M KCl für den pH-Bereich von 5,5-8 in Bis-Tris und für den pH-Bereich von 8-9,5 in Piperazin bestimmt. Das KCl-Optimum wurde in 0,1 M Bis-Tris, pH 7 mit bis zu 3,5 M KCl gemessen.

#### 4.4.4 Transkriptionsregulator

Das Zellpellet wurde in 50 mM Tris-HCl, 1,5 M KCl, 5 mM Imidazol, pH 8 resuspendiert, aufgeschlossen, zentrifugiert und der Überstand auf eine Nickelsäule aufgetragen. Das bei 100 mM Imidazol spezifisch eluierte Protein wurde dann auf eine in 50 mM Tris-HCl, 2 M KCl, pH 7,5 equilibrierte Superdex (4.3.5) aufgetragen und mit einem isokratischen Fluss von 1 ml/min eluiert. Das eluierte Protein wurde auf eine SDS-PAGE aufgetragen.

#### 4.4.5 Katabole GAP-DH und anabole GAP-DH

**Katabole GAP-DH.** Das Zellpellet wurde in 20 ml 100 mM HEPES-KOH, 1,5 M KCl, 5 mM 1,4-Dithioerythrit, 5 mM Imidazol pH 8 resuspendiert, aufgeschlossen, zentrifugiert und der Überstand auf eine Nickel-Säule aufgetragen. Die spezifische Elution erfolgte bei 100 mM Imidazol. Das spezifisch eluierte Protein wurde dann auf eine in 50 mM Tris-HCl, 1,5 M KCl, 5 mM 1,4-Dithioerythrit, pH 7,8 equilibrierte Gelfiltrations-Säule aufgetragen und mit einem isokratischen Fluss von 1 ml/min eluiert. Um Aktivitätsverluste zu vermeiden, wurde sofort nach Elution jeweils 40 mM 1,4-Dithioerythrit (DTE) zu den Fraktionen gegeben.

Die katabole GAP-DH (HVO\_0481) katalysiert die Phosphat-abhängige Umsetzung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) zu 1,3-Bisphosphoglycerat unter Reduktion von  $\text{NAD(P)}^+$  ( $\epsilon_{\text{NADH}} = 6,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ,  $\epsilon_{\text{NADPH}} = 6,3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Die Messung wurde in Richtung der 1,3-Bisphosphoglycerat Bildung in 200  $\mu\text{l}$  Ansätzen in 50 mM Tris-HCl, 2 M KCl, pH 8 gemessen. Die Ansätze enthielten 2 mM  $\text{NAD}^+$ , 2,78 mM GAP, 10 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  und 0,03-0,35  $\mu\text{g}$  gereinigtes Protein. Für die Bestimmung des pH-Optimums wurde in 50 mM Tris-HCl, 1,5 M KCl, pH 7-9 oder in 50 mM Piperazin, 1,5 M KCl, pH 9-10 gemessen. Das Salz-Optimum wurde in 50 mM Tris-HCl, pH 8 mit 0-4 M KCl bestimmt. Für die Bestimmung von  $V_{\text{max}}$ - und  $K_{\text{m}}$ -Werten nach Lineweaver-Burk wurden die einzelnen Substrate mit bis zu 2,78 mM GAP, 30 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  und 2 mM  $\text{NAD}^+$  eingesetzt. Dabei wurde jeweils nur eins der Substrate variiert und die anderen jeweils mit der maximal verwendeten Konzentration eingesetzt. Um die Aktivität der GAP-DH mit  $\text{NADP}^+$  zu testen, wurden 0,5-5 mM  $\text{NADP}^+$ , 2,78 mM GAP und 10 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  in den Testansatz gegeben. Der Testansatz für die Umsetzung von Glycerinaldehyd (5-50 mM) enthielt außerdem 2 mM  $\text{NAD}^+$  und 10 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ .

**Anabole GAP-DH.** Das Zellpellet wurde in 20 ml 20 mM Tris-HCl, 3,5 M KCl, 5 mM 1,4-Dithioerythrit, 5 mM Imidazol pH 8 resuspendiert, aufgeschlossen, zentrifugiert und der Überstand auf eine Nickel-NTA aufgetragen. Bei 100 mM Imidazol erfolgte die spezifische Elution des Proteins, welches dann auf eine in 20 mM Tris-HCl, 3,5 M KCl, 5 mM 1,4-Dithioerythrit, pH 8 equilibrierte Superdex-Säule (4.3.5) aufgetragen und mit einem isokratischen Fluss von 1 ml/min eluiert wurde. In die Elutionsfraktionen nach Nickel-NTA und Superdex wurden direkt nach der Elution jeweils 40 mM DTE gegeben.

Die anabole GAP-DH (HVO\_0478) katalysierte die NAD(P)H-abhängige Bildung von GAP aus 1,3-Bisphosphoglycerat. Für die Messung in Richtung der GAP-Bildung wurde 3-Phosphoglycerat mit Hilfe einer Phosphoglycerat-Kinase zu 1,3-Bisphosphoglycerat phosphoryliert, welches dann von der GAP-DH unter Oxidation von NADPH zu GAP umgewandelt wurde. Die Abnahme der Extinktion von NADPH ( $\epsilon = 6,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) wurde bei 340 nm photometrisch detektiert. Die Aktivität wurde in 50 mM Tris-HCl, 4 M KCl, pH 7,5 gemessen. Im Reaktionsansatz waren 0,3 mM NADPH, 40 mM DTE, 2 mM ATP, 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1,3-2 U der Phosphoglycerat-Kinase aus *H. volcanii* (HVO\_0480, 4.4.6) bis zu 85  $\mu\text{g}$  der gereinigten GAP-DH und 15 mM 3-Phosphoglycerat. Für die Bestimmung der  $K_m$ - und  $V_{\text{max}}$ -Werte wurde nur die Menge an eingesetztem NADPH bzw. NADH von 0,03 mM - 0,6 mM variiert. Das Salz-Optimum wurde in 50 mM Tris, pH 7,5 mit 0-4 M KCl gemessen. Das pH-Optimum wurde in 0,1 M Bis-Tris, 3,5 M KCl pH 6-7 und in 0,1 M Tris-HCl, 3,5 M KCl, pH 7,5-9 bestimmt.

Die Messung der Hinreaktion erfolgte wie für die katabole GAP-DH beschrieben (s.o.). Die Messung wurde in 50 mM Tris-HCl, 4 M KCl, pH 7,5 bei 42 °C mit 2 mM NADPH durchgeführt. Es konnte keine Aktivität nachgewiesen werden.

#### 4.4.6 Phosphoglyceratkinase

Das aus der Überexpression stammende Zellpellet wurde in 20 mM Tris-HCl, 1,5 M KCl, 5 mM Imidazol, pH 8 resuspendiert, aufgeschlossen, zentrifugiert und der Überstand auf eine Nickel-Säule aufgetragen. Die spezifische Elution erfolgte bei 100 mM Imidazol. Die Elutionsfraktion wurde dann auf eine in 20 mM Tris-HCl, 1,5 M KCl, pH 8 equilibrierte Superdex (4.3.5) aufgetragen und mit einem isokratischen Fluss von 1 ml/min eluiert. Das Protein war nach diesen Reinigungsschritten apparent homogen und wurde für die Bestimmung der kinetischen Konstanten verwendet.

Die Phosphoglycerat-Kinase aus *H. volcanii* katalysiert die reversible Phosphorylierung von 3-Phosphoglycerat zu 1,3-Bisphosphoglycerat. Die Phosphoglycerat-Kinase Aktivität wurde gemessen, indem die ATP-abhängige Phosphorylierung von 3-Phosphoglycerat mit Hilfe von Pyruvat-Kinase (PK), die die ADP-abhängige Umsetzung von Phosphoenolpyruvat (PEP) zu Pyruvat katalysiert, und Lactat-Dehydrogenase (LDH) an die Oxidation von NADH gekoppelt werden konnte. Damit konnte die Abnahme von NADH bei 340 nm ( $\epsilon = 6,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) photometrisch aufgezeichnet werden. Gemessen wurde in 1 ml Ansätzen mit 50 mM Tris-HCl, 1,5 M KCl, pH 7,5. Die Ansätze enthielten 0,3 mM NADH, 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM Phosphoenolpyruvat, 2 mM ATP, 20 U Pyruvat Kinase (Roche), 30 U Lactat-Dehydrogenase (Roche), bis zu 0,2  $\mu\text{g}$  gereinigtes Protein und 15 mM 3-Phosphoglycerat (3-PG). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3-PG gestartet. Der Testansatz für die Bestimmung des  $K_m$ -Werts von 3-Phosphoglycerat enthielt 0-30 mM 3-PG und 2 mM ATP. Der Testansatz für den  $K_m$  von ATP enthielt 0,05-4 mM ATP und 15 mM 3-PG. Das pH-Optimum wurde in 50 mM Piperazin, 1,5 M KCl, pH 5-7,5, sowie in 50 mM Tris-HCl, 1,5 M KCl, pH 7,5-9 und 50 mM Piperazin, 1,5 M KCl, pH 9-10,5 gemessen. Das Salz-Optimum wurde in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 bis 4 M KCl gemessen. Die  $V_{\max}$ - und  $K_m$ -Werte wurden mit bis zu 4 mM ATP und bis zu 20 mM 3-PG ermittelt.

Für die Messung der Kationen-Abhängigkeit der Phosphoglyceratkinase war das PK/LDH Test-System nicht geeignet, da das Hilfsenzym Pyruvat-Kinase ebenfalls von zweiwertigen Kationen abhängig ist. Für diese Messung wurde die Phosphoglyceratkinase-Aktivität gemessen, indem das bei der Phosphorylierung von 3-Phosphoglycerat entstandene 1,3-Bisphosphoglycerat mit Hilfe einer GAP-DH an die Oxidation von NADH gekoppelt wurde. So konnte die Abnahme der Extinktion von NADH bei 340 nm photometrisch nachgewiesen werden. Das Kationenspektrum wurde in 50 mM Tris-HCl, 1,5 M KCl, pH 7,5 gemessen. Die 1 ml Ansätze enthielten 0,3 mM NADH, 1 mM ATP, 11 U GAP-DH (Sigma-Aldrich), 0,1  $\mu\text{g}$  gereinigte PGK, 15 mM 3-PG und jeweils 2 mM  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{FeCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$ ,  $\text{NiCl}_2$  oder  $\text{ZnCl}_2$ . Gestartet wurde durch Zugabe von 3-PG. Die Inaktivierung der Enzymaktivität mit EDTA wurde in einem Reaktionsansatz gezeigt, in dem zunächst mit 1 mM  $\text{MgCl}_2$  Phosphoglycerat-Kinase Aktivität gezeigt wurde. Dieser Ansatz wurde dann mit 4 mM EDTA versetzt, sodass eine Inhibierung der Phosphoglycerat-Kinase Aktivität gezeigt werden konnte. Durch Zugabe von weiteren 4 mM  $\text{MgCl}_2$  konnte daraufhin die Reaktivierbarkeit der PGK gezeigt werden.



#### 4.4.7 Galactokinase aus *Halorhabdus utahensis*

Das Zellpellet wurde in 20 ml 20 mM Tris-HCl, 1,5 M KCl, 5 mM Imidazol pH 8 suspendiert, mit Hilfe einer French Press Zelle aufgeschlossen und ultrazentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine Nickel-Säule aufgetragen. Das bei 100 mM Imidazol spezifisch eluierte Protein wurde für die Messung der Galactokinase-Aktivität verwendet. Für die Bestimmung des nativen Molekulargewichts wurden 250 µl des spezifisch eluierten Proteins auf eine in 50 mM Tris-HCl, 3 M KCl, pH 7,5 equilibrierte Superose 12 10/300 Gelfiltrationssäule (GE Healthcare) aufgetragen und mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml/min eluiert.

Die Galactokinase aus *H. utahensis* katalysierte die ATP-abhängige Phosphorylierung von Galactose zu Galactose-1-Phosphat. Die Messung wurde an die Bildung von ADP mit Hilfe der Enzyme Pyruvat-Kinase und Lactat-Dehydrogenase und damit an die Abnahme der Extinktion von NADH bei 340 nm gekoppelt. Die Messung erfolgte in 1 ml Ansätzen in 50 mM Tris-HCl, 3,5 M KCl, pH 8. In den Testansätzen waren 0,3 mM NADH, 1 mM PEP, 2 mM ATP, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 U Pyruvat-Kinase (Roche), 30 U Lactat-Dehydrogenase (Roche), 10 mM Galactose und 10-40 µg Protein. Der Testansatz für die Bestimmung des K<sub>m</sub>-Werts von Galactose (0,25-25 mM) enthielt 2 mM ATP. Für den K<sub>m</sub> von ATP (0,05-2 mM) enthielt der Testansatz außerdem 10 mM Galactose. Für die Bestimmung des Salz-Optimums wurde 50 mM Tris-HCl pH 8 mit bis zu 3,5 M KCl verwendet.

#### 4.4.8 Bestimmung von Enzymaktivitäten in Rohextrakten

**Herstellung von Zellextrakten.** Es wurden 20 ml Kultur für 10 min bei 10000 rpm und 4 °C zentrifugiert (Zentrifuge Avanti<sup>TM</sup> J-25, Rotor JA 25.50, Beckmann). Das Zellpellet wurde anschließend bei -20 °C gelagert und zur Verwendung in 0,5-1 ml des später verwendeten Messpuffers resuspendiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte mittels Ultraschall (Sonifier 250 Ultraschall Desintegrator, Branson Heinemann, Schwäbisch Gmünd) im Eisbad bei duty cycle 30 % und output control 3 für 1 min mit 3 Wiederholungen. Diese Suspensionen wurden dann mit 13000 rpm für 10-20 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand für die Messung der Enzymaktivitäten eingesetzt.

**Galactose-Dehydrogenase.** Die Aktivität wurde in 1 ml Ansätzen mit 50 mM Tris-HCl, 1,5 M KCl, pH 8 gemessen. Die Ansätze enthielten außerdem 5 mM Galactose, 2 mM NADP<sup>+</sup> und 100-1000 µg Protein.

**Galactonat-Dehydratase.** Die Messung erfolgte in 0,1 M Tris-HCl, 3,5 M KCl, pH 7,5 mit 4 mM D-Galactonat und 10 mM MgCl<sub>2</sub>. Es wurden 170-330 µg Protein eingesetzt. Die Messung erfolgte in 500 µl Ansätzen bei 42 °C über einen Zeitraum von 60 min. Zu definierten Zeitpunkten erfolgte ein Abstoppen der Reaktion durch Entnahme von Aliquots (100 µl), die durch Zugabe von 25 µl 30 %iger TCA gefällt wurden. Diese Aliquots wurden anschließend bei 13200 rpm zentrifugiert und die Überstände für die Detektion des entstandenen KDGal mit Hilfe des Thiobarbiturat-Tests eingesetzt (4.3.2).

**KDPG-Aldolase und KDPGal-Aldolase.** Die Messung wurde in 250 µl Ansätzen mit 20 mM Bis-Tris, 1,5 M KCl, pH 7,5 durchgeführt. Dazu wurden dem Test 0,2 mM NADH, 0,7 U LDH (Roche), 50-100 µg der Zellextrakte und 0,56 mM KDPG oder 0,088 mM KDPGal zugegeben.

#### 4.5 Promotoranalyse der Galactonat-Dehydratase aus *H. volcanii*

***bgaH*-Reportergenfusionen.** Der Einfluss verschiedener Kohlenstoffquellen auf die Aktivität des Promotors der Galactonat-Dehydratase und der Einfluss des Regulators auf diese Promotoraktivität wurden mit Hilfe eines Reportergensystems getestet. Als Reportergen diente das β-Galactosidase Gen aus *Haloferax lucentense* (früher *H. alicantei*) (Holmes et al. 1997; Holmes und Dyll-Smith 2000), das in dem Vektor pTA919 vorlag. Das Plasmid trägt zur Vermehrung und Selektion in *E. coli* einen ColE1-Origin und ein Gen, welches eine Ampicillin-Resistenz vermittelt. Zur Vermehrung und Selektion in *H. volcanii* trägt der Vektor außerdem den pHV2-Origin und das Gen *pyrE2*, das für die Uracil-Biosynthese essentiell ist.

Der Vektor pTA919p.HVO\_A0331 wurde von der AG Schönheit zur Verfügung gestellt und enthielt direkt vor dem β-Galactosidase Gen den gesamten intergenischen Bereich zwischen HVO\_A0330 (*galDH*) und HVO\_A0331 (*galAD*), sodass davon ausgegangen wurde, dass alle Promotorelemente von HVO\_A0331 vorhanden waren. Neben diesem Bereich (-132 bp bis -1 bp) enthielt das in den Vektor eingefügte Fragment außerdem die ersten 24 Nukleotide der *galAD* kodierenden Sequenz und ein künstlich eingefügtes Triplett (CAT), das zur Klonierung notwendig war. Das bei Expression daraus resultierende β-Galactosidase-Fusionsprotein weist N-terminal die ersten 8 Aminosäuren (MSKITEYE) der Galactonat-Dehydratase und ein zusätzliches Histidin auf. Der für die Promotoranalysen verwendete Stamm H555, der mit diesem Plasmid transformiert wurde, ist Uracil-auxotroph ( $\Delta pyrE2$ ), sodass eine Selektion auf plasmidtragende Zellen in Uracil-freiem Medium durchgeführt

werden konnte. Außerdem trägt der Stamm kein  $\beta$ -Galactosidase Gen ( $\Delta bgaH$ ), sodass eine homologe Rekombination zwischen dem Plasmidkodierten *bgaH* mit einem chromosomalen *bgaH* unmöglich ist.

Das *bgaH* Reportergen stand in dem hergestellten Plasmid unter der Kontrolle des Promotors von *galAD* und konnte so für die Analyse des Galactose-spezifischen Promotors genutzt werden. Um nachzuweisen, dass die  $\beta$ -Galactosidase Aktivität spezifisch bei Wachstum auf Galactose induziert wird, wurden die Kulturen von plasmidtragenden *H. volcanii* H555 auf Synthetikmedium (Tabelle 2) mit verschiedenen Kohlenstoffquellen (1 % Casaminsäuren oder 25 mM Galactose) angeimpft und über eine Passage auf das jeweilige Substrat adaptiert. Aus diesen Kulturen wurde anschließend Synthetikmedium mit dem entsprechenden Substrat mit einer  $OD_{600}$  von 0,2 angeimpft. Nach ein bis drei Tagen wurde die Aktivität der  $\beta$ -Galactosidase in den Kulturen bestimmt (s.u.).

Um den Einfluss des Transkriptionsregulators HVO\_A0332 auf die Aktivität des Promotors der Galactonat-Dehydratase zu untersuchen, wurde neben dem plasmidtragenden Stamm *H. volcanii* H555 zusätzlich eine Deletionsmutante des putativen Galactose-spezifischen Transkriptionsregulators *H. volcanii* H555  $\Delta HVO\_A0332$  mit dem Plasmid pTA919p.HVO\_A0331 transformiert. Da diese Deletionsmutante nicht mehr auf Galactose wachsen kann, wurden beide Stämme zunächst über eine Passage auf 1 % Casaminsäuren in Synthetikmedium adaptiert. Mit diesen Kulturen wurde Synthetikmedium mit 0,2 % Casaminsäuren mit einer  $OD_{600}$  von 0,2 inokuliert. Nach ca. 25 h Wachstum wurden den Wachstumskulturen je 10 mM Galactose zugegeben und für weitere 120 h das Wachstum verfolgt. Die  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität in den Kulturen wurde mehrfach während des Wachstums gemessen (s.u.).

**Messung der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität.** Die  $\beta$ -Galactosidase katalysiert die Hydrolyse von Ortho-Nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (ONPG) zu D-Galactose und dem gelben Farbstoff o-Nitrophenol (ONP). Der Farbstoff konnte mit Hilfe eines beheizbaren Photometers Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies) in einer kontinuierlichen Messung bei einer Wellenlänge von 405 nm detektiert und die Daten mit Hilfe der Cary Win UV Software (Agilent Technologies) ausgewertet werden. Für die Messung wurden 50 oder 100  $\mu$ l Zellen in 779 bzw. 729  $\mu$ l BgaH-Puffer (50 mM Tris-HCl, 2,75 M NaCl, 10  $\mu$ M MnCl<sub>2</sub>, pH 7,2 (bei 30 °C)) mit 20  $\mu$ l 0,1 % SDS und 1  $\mu$ l 99%  $\beta$ -Mercaptoethanol durch Auf-und Abpipettieren gemischt. Dabei lysierten die Zellen und die Suspension wurde anschließend im Photometer in Plastikküvetten mit 10 mm Schichtdicke für 15 min auf 30 °C aufgewärmt. Durch die Zugabe von 150  $\mu$ l

ONPG (6 mg/ml in BgaH-Puffer, vorgewärmt) wurde die Reaktion der  $\beta$ -Galactosidase gestartet und am Photometer verfolgt. Die spezifische Aktivität konnte mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon_{405} = 3,3 \text{ mM}^{-1}\text{cm}$ ) und einer  $\text{OD}_{600}$  – Proteinrelation (eine  $\text{OD}_{600}$  von 1 entspricht einer Proteinkonzentration von 0,28 mg/ml) errechnet werden (Holmes et al. 1997); Masterarbeit Anne-Christine Schultz, 2014). Die Messung von Promotoraktivitäten erfolgte in Triplikaten.

## 5 Ergebnisse

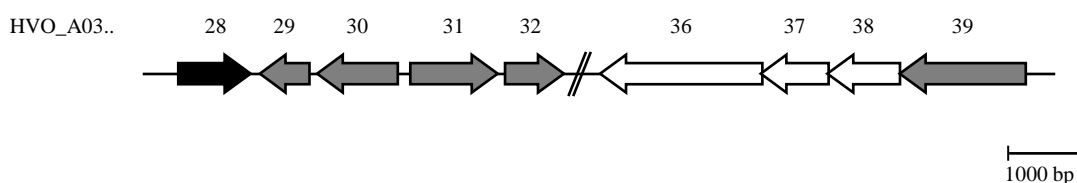
Bioinformatische Untersuchungen deuten darauf hin, dass Galactose in *H. volcanii* über den DeLey-Doudoroff- (DD) Weg abgebaut wird. Glucose wird hingegen über den semiphosphorylierten Entner-Doudoroff- (spED) Weg abgebaut. Detaillierte Untersuchungen zum Galactose-Abbau in *H. volcanii* liegen bisher nicht vor. Außerdem wurde die KDPG-Aldolase, das Schlüsselenzym des Glucose-Abbaus in *H. volcanii*, nicht charakterisiert. Sowohl im Glucose- als auch im Galactose-Stoffwechsel entsteht Glycerinaldehyd-3-Phosphat als Intermediat. Die Oxidation von Glycerinaldehyd-3-Phosphat in *H. volcanii* wurde bisher nicht untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurden die folgenden Untersuchungen zum Galactose- und Glucose-Abbau in *Haloferax volcanii* durchgeführt.

- 1) Der Abbauweg von Galactose über den postulierten DD-Weg in *H. volcanii* wurde nachgewiesen. Die Gene des DD-Wegs liegen in einem Gencluster, der auch für einen putativen ABC-Transporter und einen hypothetischen Transkriptionsregulator kodiert. Es wurde eine Galactose-spezifische transkriptionelle Induktion der Gene, die für die Enzyme der Galactose-Umsetzung kodieren, gezeigt. Weiterhin wurden die Galactose-Dehydrogenase, Galactonat-Dehydratase und KDPGal-Aldolase überexprimiert, gereinigt und charakterisiert. Um die funktionelle Beteiligung der Gene am Galactose-Abbau und Transport zu untersuchen, wurde das Wachstum von Deletionsmutanten untersucht.
- 2) Über Northern Blot- und Promotoranalysen wurde untersucht, ob der Transkriptionsregulator DdcR als Transkriptionsaktivator der Gene des Galactose-Abbaus fungiert.
- 3) Im Genom des Haloarchaeons *Halorhabdus utahensis* liegen, im Gegensatz zu dem Genom von *H. volcanii*, Gene, die für Enzyme des klassischen Galactose-Abbaus über den Leloir-Weg kodieren. Eines der Gene wurde als katalytisch aktive Galactokinase charakterisiert.
- 4) Die KDPG-Aldolase, das Schlüsselenzym des semiphosphorylierten Entner-Doudoroff-Wegs wurde kinetisch und über Wachstumsanalysen mit Deletionsmutanten charakterisiert.
- 5) *H. volcanii* kodiert für zwei putative GAP-Dehydrogenasen und eine putative Phosphoglyceratkinase. Durch Transkriptanalysen und Wachstumsanalysen von Deletionsmutanten wurde jeweils eine Beteiligung am Katabolismus oder Anabolismus untersucht. Nach homologer Expression der kodierenden Gene wurden die Enzyme charakterisiert.

## 5.1 D-Galactose-Abbau in *Haloferax volcanii*

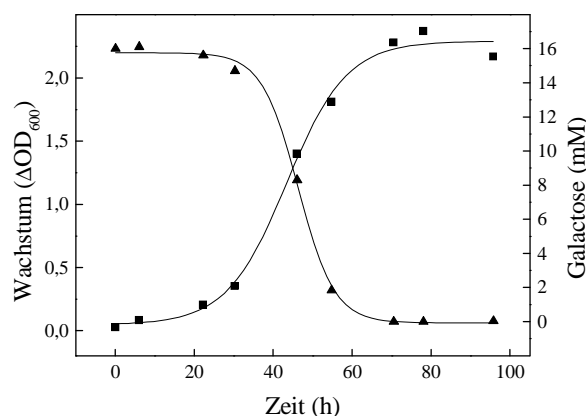
Das Genom von *H. volcanii* enthält ein Gencluster, der für die putativen Enzyme eines DD-Wegs kodiert (Abbildung 5) (Anderson et al. 2011). Innerhalb dieses Genclusters liegen die Gene einer Galactose-Dehydrogenase (HVO\_A0330), Galactonat-Dehydratase (HVO\_A0331), KDGal-Kinase (HVO\_A0328) und einer KDPGal-Aldolase (HVO\_A0329). Bis auf die KDGal-Kinase (Pickl et al. 2014) sind diese Gene noch nicht untersucht worden. In direkter genomischer Nähe zu den Genen des Galactose-Abbaus befinden sich Gene eines hypothetischen Transkriptionsregulators (HVO\_A0332) und eines putativen ABC-Transporters (HVO\_A0336-HVO\_A0339).

Zunächst wurde das Wachstum von *H. volcanii* auf Galactose untersucht und Enzymaktivitäten des DD-Wegs in Zellextrakten analysiert. Im Anschluss wurden die Schlüsselenzyme des DD-Wegs, Galactose-Dehydrogenase, Galactonat-Dehydratase und KDPGal-Aldolase charakterisiert. Ein Gen des ABC-Transporters, das für ein Substratbindeprotein kodiert, wurde untersucht.



**Abbildung 5 Genomumgebung der Gene des D-Galactose-Abbaus in *H. volcanii*.** Die offenen Leserahmen (ORFs) sind als Pfeile dargestellt. Die Gene kodieren für die hypothetischen Proteine 2-Keto-3-Desoxy-6-Phosphogalactonat-Aldolase (HVO\_A0329), Galactose-Dehydrogenase (HVO\_A0330), Galactonat-Dehydratase (HVO\_A0331) und einen putativen Transkriptionsregulator (HVO\_A0332), sowie die Gene eines ABC-Transporters: ein ATP-Bindeprotein (HVO\_A0336), zwei Permeasen (HVO\_A0337 und HVO\_A0338) und das Substrat-Bindeprotein (HVO\_A0339). Die Gene, die in dieser Arbeit untersucht wurden, sind grau markiert. Die 2-Keto-3-Desoxy-Galactonat-Kinase (HVO\_A0328) ist bereits charakterisiert und wurde schwarz unterlegt (Pickl et al. 2014). Der Maßstab entspricht einer Länge von 1000 bp.

**Wachstum auf Galactose.** *H. volcanii* H26 wuchs in Synthetik-Medium mit 15 mM Galactose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle mit einer Verdopplungszeit von 10,4 h bis zu einer optischen Dichte von ca. 2,2 (Abbildung 6). Dabei wurde die Galactose vollständig verbraucht.



**Abbildung 6 Wachstum von *H. volcanii* auf Galactose.** Die Zellen wuchsen in Synthetik-Medium mit 15 mM Galactose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle. Gemessen wurde das Wachstum (■) und der Verbrauch von Galactose (▲) über die Zeit. Die Vorkultur wuchs in Synthetik-Medium mit 25 mM Galactose. Die Messung des Wachstums erfolgte über die Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm ( $OD_{600}$ ).

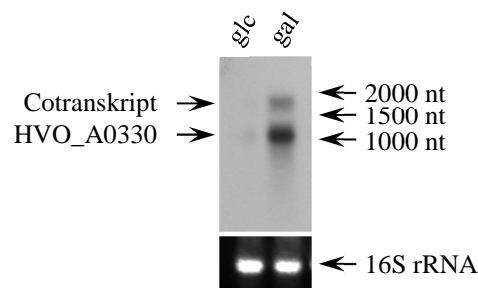
In Extrakten aus Zellen, die auf Galactose oder Glucose gewachsen waren, wurden die Aktivitäten der Enzyme des DD-Wegs gemessen. Dabei wurde in Galactose-gewachsenen Zellen eine 21- bis 47-fach höhere Aktivität der Enzyme Galactose-Dehydrogenase (Gal-DH), Galactonat-Dehydratase (GalAD) und KDPGal-Aldolase (KDPGalA) nachgewiesen, als in Glucose-gewachsenen Zellen (Tabelle 7). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass diese Enzyme am Abbau von Galactose über den postulierten DD-Weg beteiligt sind.

**Tabelle 7 Aktivitäten der Enzyme des Galactose-Abbaus in Zellextrakten aus *H. volcanii*.** Die Zellen wuchsen in Medium mit Glucose bzw. Galactose als einziger Kohlenstoffquelle gewachsen waren.

	Glucose-gewachsen (U/mg)	Galactose-gewachsen (U/mg)	Induktion (-fach)
<b>GalDH</b>	3	124	41
<b>GalAD</b>	1,3	27	21
<b>KDPGalA</b>	1,5	70	47

### 5.1.1 Galactose-Dehydrogenase

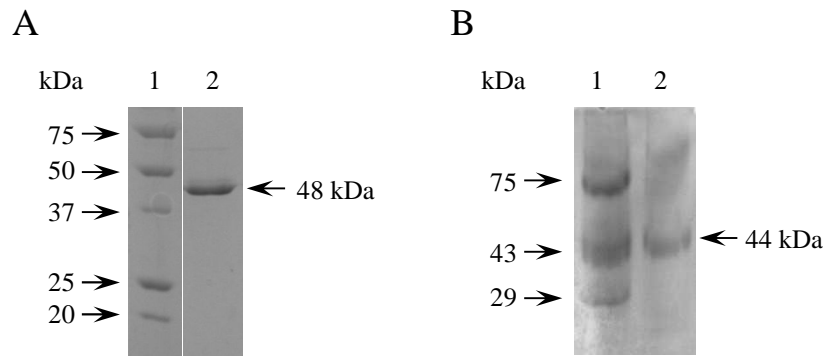
**Transkriptionsanalyse.** Das Gen HVO\_A0330 kodiert für eine hypothetische Galactose-Dehydrogenase. Mit Hilfe von Northern Blot Analysen wurde untersucht, ob das Transkript Galactose-spezifisch induziert wird (Abbildung 7). Dafür wurde RNA aus Zellen isoliert, die auf Glucose oder Galactose gewachsen waren. Es wurden zwei spezifische Transkripte in RNA aus Galactose-gewachsenen Zellen, nicht jedoch in RNA aus Glucose-gewachsenen Zellen nachgewiesen. Das Transkript bei 1100 nt entspricht der Länge des Gens HVO\_A0330 (1074 bp). Außerdem wurde mit geringerer Intensität ein weiteres Galactose-spezifisches Transkript bei 1800 nt nachgewiesen, was der Länge eines Cotranskripts aus HVO\_A0330 und HVO\_A0329 (648 bp) entspricht (Abbildung 5). Durch den relativ großen intergenischen Bereich dieser Gene von 81 bp könnte die gemeinsame Transkription allerdings auch durch eine schlechte Transkriptionstermination bedingt sein.



**Abbildung 7 Transkriptionsanalyse von HVO\_A0330 aus *H. volcanii*.** Abgebildet ist ein Northern Blot mit RNA aus Zellen, die auf Glucose (glc) oder Galactose (gal) gewachsen waren. Die Transkripte wurden mit Hilfe einer für HVO\_A0330 spezifischen Sonde nachgewiesen. Die Pfeile bilden ausgewählte Banden des verwendeten Größenstandards ab. Zur Beladungskontrolle wurde die 16S rRNA mittels Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

**Expression, Reinigung und Charakterisierung der rekombinanten Galactose-Dehydrogenase.** Das Gen HVO\_A0330, das für die putative Galactose-Dehydrogenase (GalDH) kodiert, wurde so in den Vektor pTA963 kloniert, dass es als 6 x Histidin Fusionsprotein exprimiert wurde. Die Expression erfolgte durch Induktion mit Tryptophan in *H. volcanii* H1209. Das exprimierte Protein wurde über Nickel-Affinitätschromatographie und Größenausschlusschromatographie bis zur apparenten Homogenität gereinigt (Abbildung 8).





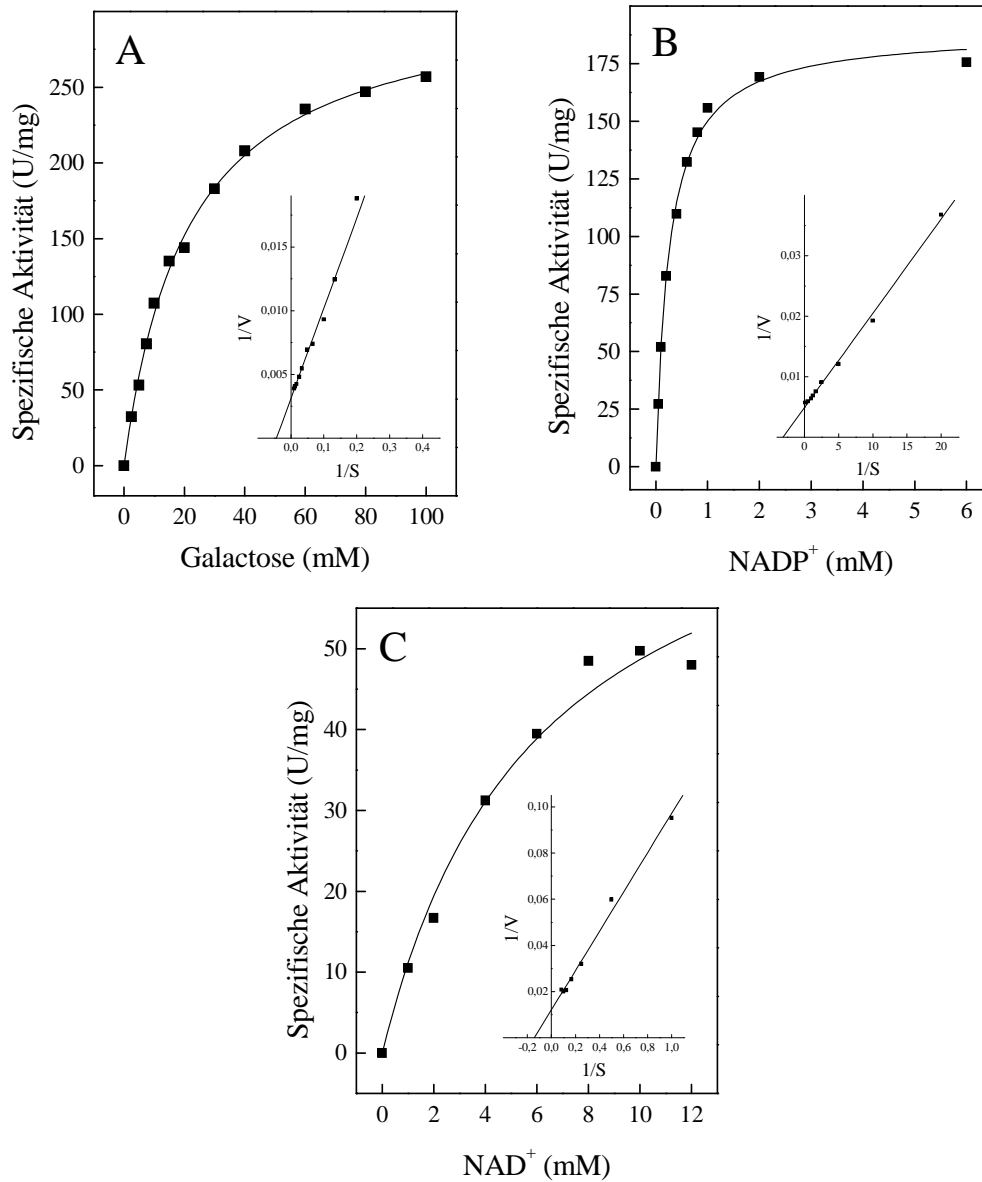
**Abbildung 8 Rekombinante Galactose-Dehydrogenase (HVO\_A0330) aus *H. volcanii*.** SDS-PAGE (A) und CTAB-PAGE (B) nach Coomassie Brilliant Blau Färbung mit gereinigter Galactose-Dehydrogenase, die N-terminal einen 6 x His-Tag aufweist. Die Pfeile auf der linken Seite zeigen auf die Banden der Markerproteine, der Pfeil rechts auf das gereinigte Enzym. Spur 1: Molekulargewichtsstandard; Spur 2: Galactose-Dehydrogenase.

Die Analyse des rekombinanten Proteins in der SDS-PAGE zeigte eine Bande bei 48 kDa (Abbildung 8 A), die etwa 20 % über dem errechneten Molekulargewicht der Untereinheit (40 kDa) lag. Für andere halophile Proteine wurde bereits gezeigt, dass das Laufverhalten im SDS-Gel von der tatsächlichen Größe abweichen kann und vermutlich durch den erhöhten Anteil an sauren Aminosäuren in halophilen Proteinen verursacht wird (Bonete et al. 1996). Deshalb wurde zusätzlich eine Cetyltrimethylammoniumbromid-PAGE (CTAB-PAGE) durchgeführt. Bei dieser Methode wird das anionische SDS durch das kationische Detergens CTAB ersetzt, welches sich für die Ermittlung des Molekulargewichts saurer Proteine besser eignet (Williams und Gratzner 1971). Die CTAB-PAGE zeigte eine Bande bei 44 kDa (Abbildung 8 B), was in etwa dem kalkulierten Molekulargewicht entspricht. Mittels Gelfiltration wurde das native Molekulargewicht des Enzyms auf 76 kDa bestimmt, was auf eine homo-dimere Form ( $\alpha_2$ ) des Enzyms unter nativen Bedingungen hinweist.

Die Galactose-Dehydrogenase (GalDH) katalysierte die  $\text{NAD(P)}^+$ -abhängige Oxidation von D-Galactose mit einer spezifischen Aktivität von 323 U/mg. Die Abhängigkeit der Rate von der Substratkonzentration folgte dabei einer Michaelis-Menten Kinetik. Für Galactose wurde ein apparenter  $K_m$ -Wert von 23 mM (Abbildung 9 A) und für  $\text{NADP}^+$  ein apparenter  $K_m$ -Wert von 0,32 mM ermittelt (Abbildung 9 B). Die Galactose-Dehydrogenase konnte neben  $\text{NADP}^+$  auch  $\text{NAD}^+$  als Elektronenakzeptor verwenden, wobei die apparenten  $K_m$ - und  $V_{\max}$ -Werte für  $\text{NAD}^+$  mit 7 mM und 83 U/mg bestimmt wurden (Abbildung 9 C). Die katalytische Effizienz der Galactose-Dehydrogenase für  $\text{NADP}^+$  ( $421 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ ) war im Vergleich zu  $\text{NAD}^+$

( $1,8 \text{ s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ ) etwa 230-mal so hoch, was darauf hindeutet, dass  $\text{NADP}^+$  der physiologische Elektronenakzeptor ist. Das Enzym katalysierte auch die  $\text{NADP}^+$ -abhängige Oxidation von L-Arabinose mit apparenten  $K_m$ - und  $V_{\max}$ -Werten von 54 mM und 599 U/mg. Aus diesen Werten ließen sich vergleichbare katalytische Effizienzen des Enzyms für Galactose und Arabinose errechnen (Tabelle 8). Im Vergleich zu D-Galactose (100 %) setzte das Enzym mit geringerer Effizienz D-Xylose (4,8 %) und D-Glucose (2 %) um. D-Fructose, D-Mannose, D-Glucose-6-Phosphat, D-Glucosamin, 2-Deoxy-D-Glucose und D-Ribose wurden mit weniger als 1 % der Aktivität umgesetzt.

Das pH-Optimum lag zwischen pH 7,5 und pH 8,5. Bei einem pH von 6 wurden noch 35 %, bei einem pH von 10 noch 57 % Aktivität gemessen. Die Galactose-Dehydrogenase wies ein breites KCl-Optimum zwischen 1 und 4 M KCl auf, ohne KCl betrug die Aktivität 2,5 %. Die Ergebnisse wurden zusammenfassend in (Tabelle 8) dargestellt.



**Abbildung 9** Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der rekombinanten GalDH aus *H. volcanii* von der Konzentration von Galactose (A), NADP<sup>+</sup> (B) oder NAD<sup>+</sup> (C) bei 42 °C. In den Einschüben sind die doppelt reziproken Auftragungen nach Lineweaver-Burk dargestellt.

**Tabelle 8 Molekulare und kinetische Eigenschaften der rekombinanten GalDH aus *H. volcanii*.** Die Bestimmung der kinetischen Parameter erfolgte bei 42 °C.

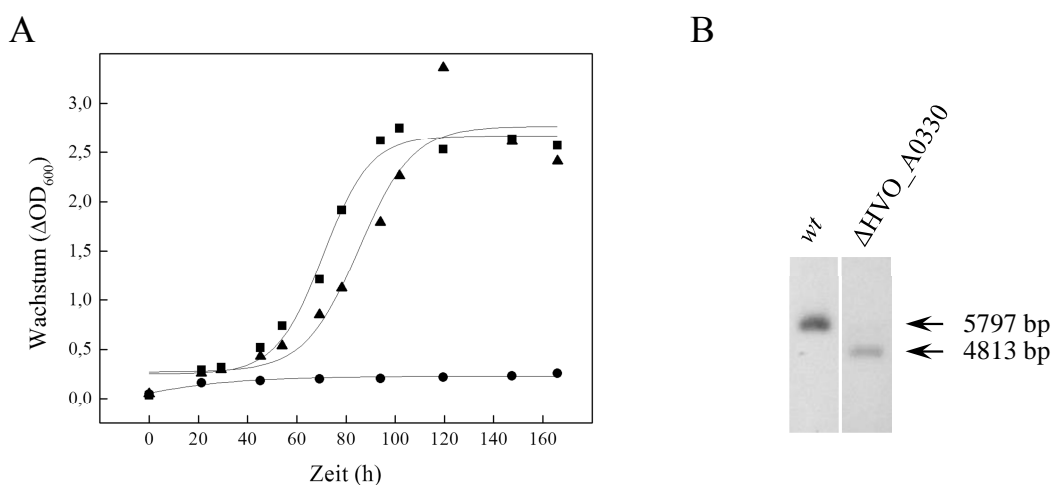
Parameter		GalDH
Apparentes Molekulargewicht des Enzyms (kDa)		76,1
Apparentes Molekulargewicht der Untereinheit (kDa) <sup>1</sup>		44
Kalkuliertes Molekulargewicht der Untereinheit (kDa) <sup>2</sup>		39,6
Oligomere Struktur		$\alpha_2$
Apparenter $V_{\max}$ (U/mg)	Galactose	323
	Arabinose	599
	NADP <sup>+</sup> *	204
	NAD <sup>+</sup>	83
Apparenter $K_m$ (mM)	Galactose	23
	Arabinose	53,8
	NADP <sup>+</sup>	0,32
	NAD <sup>+</sup>	7,03
$k_{\text{cat}}/K_m$ (s <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> )	Galactose	9,3
	Arabinose	7,4
	NADP <sup>+</sup>	421
	NAD <sup>+</sup>	1,8

<sup>1</sup> Bestimmung über CTAB-PAGE

<sup>2</sup> *HVO\_A0330* (www.halolex.mpg.de), inkl. His-tag

\* gemessen mit 100 mM Galactose

**Deletion und Komplementation.** Um eine funktionelle Beteiligung der Galactose-Dehydrogenase am Galactose-Abbau zu untersuchen, wurde eine chromosomale Deletionsmutante von HVO\_A0330 hergestellt. Dabei wurden 92 % (984 bp) des Gens deletiert. Dies wurde mittels Southern Blot nachgewiesen (Abbildung 10). Die Deletionsmutante der Galactose-Dehydrogenase war nicht mehr in der Lage auf Galactose zu wachsen. Nach einer Komplementation mit HVO\_A0330 wurde das Wachstum auf Galactose wieder hergestellt. (Abbildung 10). Bei Wachstum auf Glucose zeigte die Mutante kein verändertes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp (nicht gezeigt).

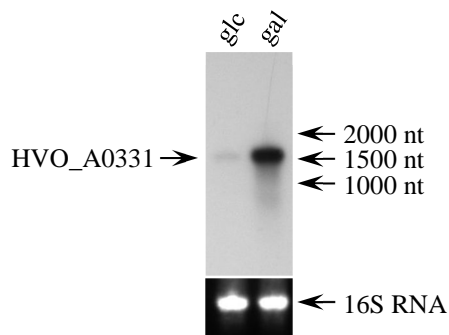


**Abbildung 10 Wachstum der *H. volcanii* GalDH Deletionsmutante auf 25 mM Galactose und Southern Blot zur Überprüfung der Gendeletion von HVO\_A0330.** (A) Dargestellt ist das Wachstum der Deletionsmutante (●) im Vergleich zum Wildtyp (■) und der Deletionsmutante ΔHVO\_A0330, die mit HVO\_A0330 komplementiert war (▲). Die Vorkulturen waren in Medium mit 1 % Casaminsäuren gewachsen. Das Wachstum wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm analysiert. (B) Für den Southern Blot wurde genomische DNA aus dem Wildtyp (*wt*) und der Deletionsmutante (ΔHVO\_A0330) verwendet, die mit *NcoI* und *BamHI* verdaut wurde. Mit Hilfe einer Sonde, die zum 5'- untranslatierten Bereich von HVO\_A0330 komplementär war, wurde die Deletion nachgewiesen. Der Unterschied in der Bandenhöhe entspricht der Größe des deletierten Bereichs von HVO\_A0330.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Transkription von HVO\_A0330 durch Galactose induziert wird. Die NADP<sup>+</sup>-abhängige Galactose-Dehydrogenase setzte Galactose, nicht aber Glucose um. Mit Hilfe einer hergestellten Deletionsmutante wurde außerdem gezeigt, dass die Galactose-Dehydrogenase essentiell am Abbau von Galactose in *H. volcanii* beteiligt ist.

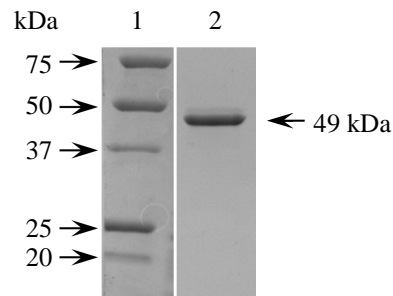
### 5.1.2 Galactonat-Dehydratase

**Transkriptionsanalyse.** Um eine Beteiligung der putativen Galactonat-Dehydratase, kodiert von HVO\_A0331, am Galactose-Abbau in *H. volcanii* zu zeigen, wurde das Transkript mittels Northern Blot nachgewiesen. Dazu wurde RNA aus Galactose- und Glucose-gewachsenen Zellen verwendet. In RNA aus Galactose-gewachsenen Zellen wurde ein spezifisches Transkript identifiziert, das in Glucose-gewachsenen Zellen kaum nachweisbar war (Abbildung 11). Die für HVO\_A0331 spezifische Bande war 1600 nt lang und ist damit ca. 450 nt länger als das Gen (1155 bp). Das längere Transkript könnte durch 5'- bzw. 3'- UTRs (untranslated regions) verursacht werden.



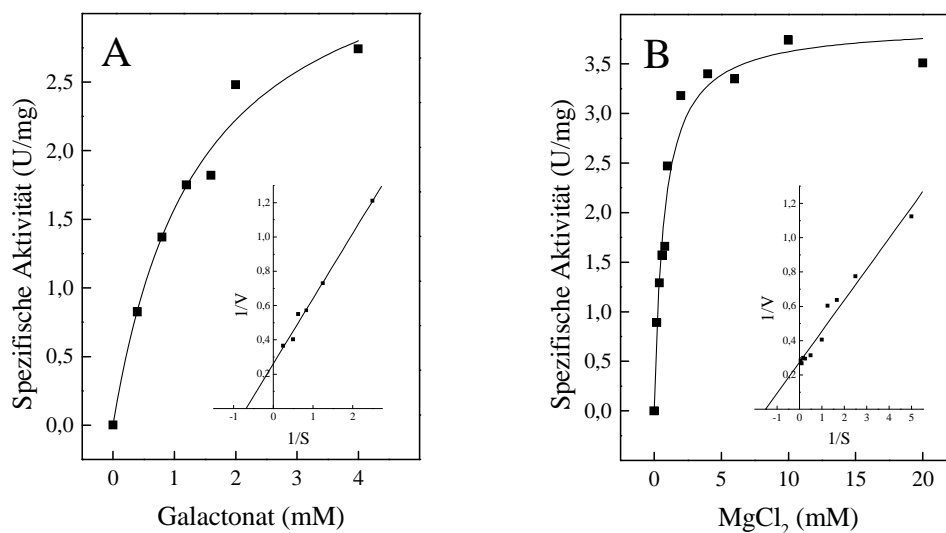
**Abbildung 11 Transkriptionsanalyse von HVO\_A0331 aus *H. volcanii* mittels Northern Blot.** Abgebildet ist ein Northern Blot mit RNA aus Zellen, die auf Glucose (glc) oder Galactose (gal) gewachsen waren. Die Transkripte wurden mit Hilfe einer für HVO\_A0331 spezifischen Sonde nachgewiesen. Die Pfeile bilden ausgewählte Banden des verwendeten Größenstandards ab. Zur Beladungskontrolle wurde die 16S rRNA mittels Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

**Expression, Reinigung und Charakterisierung der rekombinanten Galactonat-Dehydratase.** HVO\_A0331 wurde als 6 x Histidin Fusionsprotein homolog überexprimiert. Die Reinigung des Enzyms wurde über hydrophobe Interaktionschromatographie und Größenausschlusschromatographie bis zur apparenten Homogenität durchgeführt. Dabei konnte ein natives Molekulargewicht von  $300 \pm 20$  kDa bestimmt werden. Mittels SDS-PAGE wurde das Molekulargewicht der Untereinheit auf 49 kDa bestimmt (Abbildung 12). Das errechnete Molekulargewicht lag bei 43,7 kDa, was auf eine homo-octamere Struktur ( $\alpha_8$ ) schließen lässt.



**Abbildung 12 Rekombinante Galactonat-Dehydratase (HVO\_A0331) aus *H. volcanii*.** SDS-PAGE nach Coomassie Brilliant Blau Färbung mit gereinigter Galactonat-Dehydratase, die N-terminal einen 6 x His-Tag aufweist. Die Pfeile auf der linken Seite zeigen auf die Banden der Markerproteine, der Pfeil rechts auf das gereinigte Enzym. Spur 1: Molekulargewichtsstandard; Spur 2: Galactonat-Dehydratase.

Die Galactonat-Dehydratase (GalAD) katalysierte die Dehydratisierung von Galactonat zu 2-Keto-3-Desoxygalactonat mit apparenten  $V_{\max}$ - und  $K_m$ -Werten für Galactonat von 3,8 U/mg und 1,4 mM (Abbildung 13 A). Bei Galactonat-Konzentrationen über 4 mM trat eine Inhibition der Enzymaktivität ein. Bei 5 mM wurden noch 90 % der Aktivität nachgewiesen, bei 20 mM nur noch 20 %. Das Enzym zeigte keine Aktivität mit anderen Zuckersäuren wie D-Gluconat, L-Arabinat oder D-Xylonat (je 4 mM). Außerdem war die Aktivität des Enzyms abhängig von divalenten Kationen. Durch Zugabe von 2 mM EDTA konnte die Enzymaktivität vollständig inhibiert werden, durch Zugabe von 4 mM  $MgCl_2$  wurde die Aktivität wieder hergestellt. Für  $MgCl_2$  wurde ein apparter  $K_m$ -Wert von 0,66 mM bestimmt (Abbildung 13 B) (Tabelle 9). Der Effekt verschiedener Kationen (je 1 mM) auf die Enzymaktivität wurde getestet.  $Mg^{2+}$  (100 %) konnte durch  $Mn^{2+}$  (93 %) ersetzt werden. Für  $Fe^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  und  $Zn^{2+}$  wurden weniger als 10 % der Aktivität nachgewiesen. Die maximale Aktivität des Enzyms wurde bei 4 M KCl erreicht, bei 3 M KCl betrug die Aktivität nur 60 %. Das pH-Optimum wurde bei pH 7,5 bestimmt, bei pH 6,5 bzw. pH 8 betrug die Aktivität noch 31 % bzw. 13 %.



**Abbildung 13** Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der rekombinanten Galactonat-Dehydratase aus *H. volcanii* von der Konzentration von Galactonat (A) und MgCl<sub>2</sub> (B) bei 42 °C. Zur Bestimmung der kinetischen Parameter wurde die doppelt reziproke Auftragung nach Lineweaver-Burk verwendet, die in den Einschüben dargestellt ist.

**Tabelle 9** Molekulare und kinetische Eigenschaften der rekombinanten GalAD aus *H. volcanii*. Die Bestimmung der kinetischen Parameter erfolgte bei 42 °C.

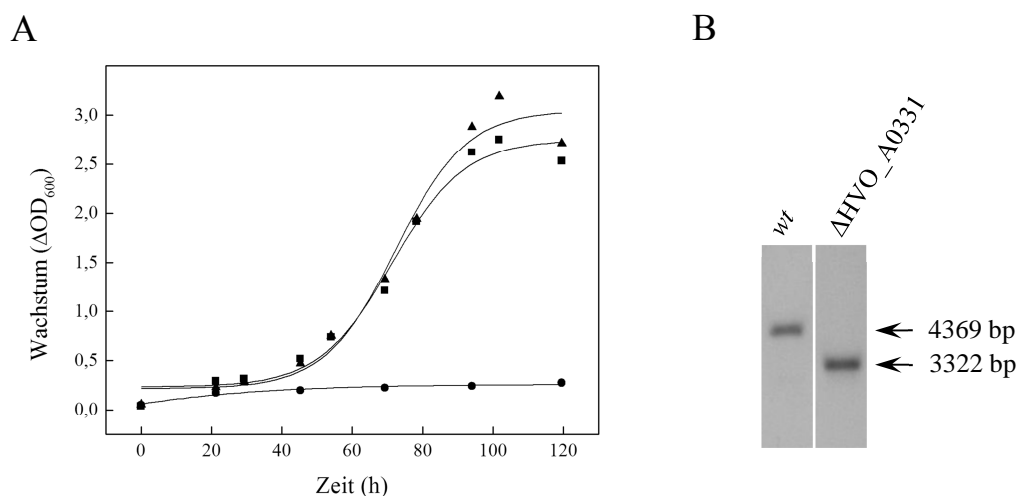
Parameter		GalAD
Apparentes Molekulargewicht des Enzyms (kDa)		300
Apparentes Molekulargewicht der Untereinheit (kDa) <sup>1</sup>		49
Kalkuliertes Molekulargewicht der Untereinheit (kDa) <sup>2</sup>		43,7
Oligomere Struktur		$\alpha_8$
Apparenter V <sub>max</sub> (U/mg)	Galactonat	3,8
Apparenter K <sub>m</sub> (mM)	Galactonat	1,4
	MgCl <sub>2</sub>	0,66

<sup>1</sup> Bestimmung über SDS-PAGE

<sup>2</sup> HVO\_A0331 (www.halolex.mpg.de); mit His-tag



**Deletion und Komplementation.** Die funktionelle Beteiligung der Galactonat-Dehydratase am Galactose-Abbau wurde durch eine chromosomale Deletion des Gens untersucht. Bei der Mutante waren 1047 bp von HVO\_A0331 deletiert, was mittels Southern Blot überprüft wurde (Abbildung 14). Die Deletionsmutante konnte in Medium mit Galactose als einziger Energie- und Kohlenstoffquelle nicht mehr wachsen (Abbildung 14). Das Wachstum auf Galactose wurde durch eine *in-trans* Komplementation mit HVO\_A0331 wiederhergestellt. Das Wachstum auf Glucose war im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert (nicht gezeigt).

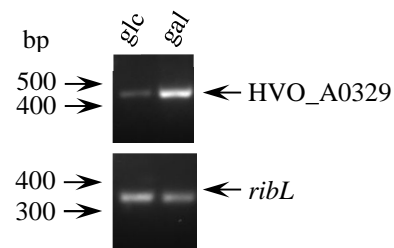


**Abbildung 14 Wachstum der *H. volcanii* GalAD Deletionsmutante auf 25 mM Galactose und Southern Blot zur Überprüfung der Gendeletion.** (A) Dargestellt ist das Wachstum der Deletionsmutante (●) im Vergleich zum Wildtyp (■) und der mit HVO\_A0331 komplementierten Deletionsmutante (▲). Die Vorkulturen waren in Medium mit 1 % Casaminsäuren gewachsen. Das Wachstum wurde durch die Messung der optischen Dichte bei 600 nm analysiert. (B) Für den Southern Blot wurde genomische DNA aus dem Wildtyp (*wt*) und der Deletionsmutante ( $\Delta HVO\_A0331$ ) aufgetragen, die mit *Hind*III und *Pci*I verdaut wurde. Mit Hilfe einer Sonde, die zum 5'-untranslatierten Bereich von HVO\_A0331 komplementär war, wurde die Deletion nachgewiesen. Der Unterschied in der Bandenhöhe entspricht der Größe des deletierten Bereichs von HVO\_A0331.

Die Ergebnisse zeigen, dass HVO\_A0331 für eine funktionelle Galactonat-Dehydratase kodiert, die bei Wachstum auf Galactose induziert wird. Durch die homologe Überexpression, Reinigung und Charakterisierung der Galactonat-Dehydratase wurde außerdem eine Spezifität des Enzyms für Galactonat gezeigt, Gluconat wurde nicht umgesetzt. Deletionsanalysen zeigten eine essentielle Beteiligung der Galactonat-Dehydratase am Galactose-Stoffwechsel.

### 5.1.3 KDPGal-Aldolase

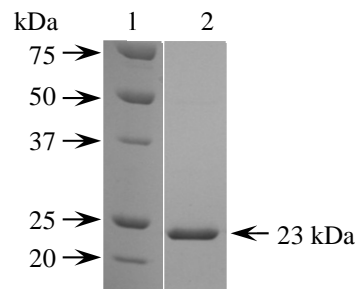
**Transkriptionsanalyse.** Das Transkript von HVO\_A0329, der für eine putative KDPGal-Aldolase kodiert, wurde in RNA aus Galactose- oder Glucose-gewachsenen Zellen untersucht. Die Analyse der Transkriptmenge erfolgte mit Hilfe einer semiquantitativen RT-PCR. Dabei zeigte sich eine Induktion der Transkription von HVO\_A0329 bei Wachstum auf Galactose im Vergleich zu Glucose (Abbildung 15).



**Abbildung 15** Transkriptionsanalyse von HVO\_A0329 aus *H. volcanii* mittels semiquantitativer RT-PCR. Es wurde RNA aus Zellen verwendet, die entweder auf Glucose (glc) oder Galactose (gal) als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle gewachsen waren. Das Transkript wurde mit Hilfe von Primern, die für HVO\_A0329 spezifisch waren, in einer RT-PCR nachgewiesen. Als Kontrolle wurde das konstitutiv exprimierte ribosomale Gen *ribL* (Brenneis et al., 2007) nachgewiesen.

### Expression, Reinigung und Charakterisierung der rekombinanten KDPGal-Aldolase.

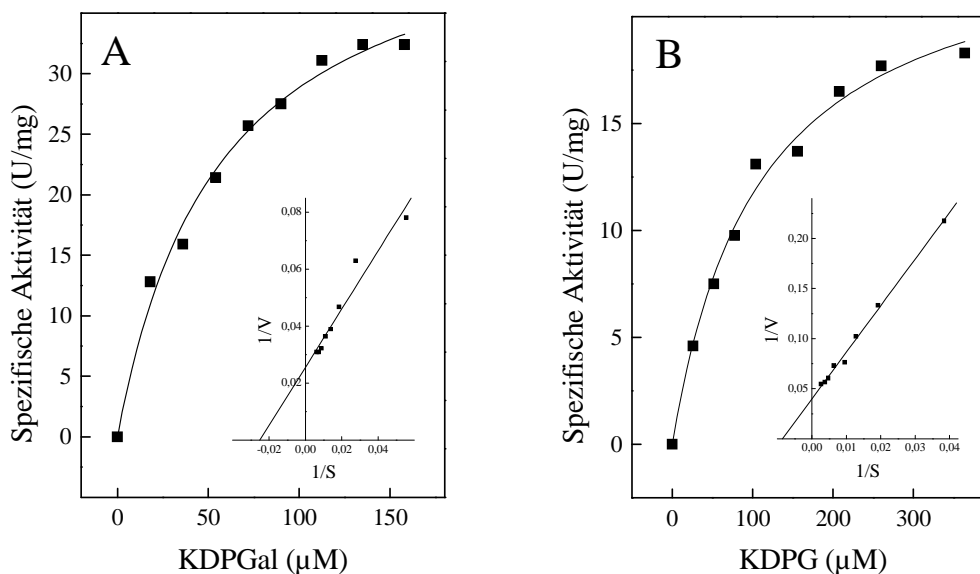
Das Gen HVO\_A0329 wurde in *H. volcanii* homolog überexprimiert und das rekombinante Enzym mittels Nickel-Affinitätschromatographie und Größenausschlusschromatographie gereinigt. Dabei wurde ein apparentes Molekulargewicht des Enzyms von 220 kDa gezeigt. Mit Hilfe einer SDS-PAGE wurde das Molekulargewicht der Untereinheit auf 23 kDa bestimmt (Abbildung 16), was dem kalkulierten Molekulargewicht von 22 kDa (22,9 mit His-Tag) entspricht. Dies deutet auf eine homo-nonamere Struktur ( $\alpha_9$ ) des nativen Enzyms hin.



**Abbildung 16 Rekombinante KDPGal-Aldolase (HVO\_A0329) aus *H. volcanii*.** SDS-PAGE nach Coomassie Brilliant Blau Färbung mit gereinigter KDPGal-Aldolase, die N-terminal einen 6 x His-Tag aufweist. Die Pfeile auf der linken Seite zeigen auf die Banden der Markerproteine, der Pfeil rechts auf die gereinigte Aldolase. Spur 1: Molekulargewichtsstandard; Spur 2: KDPGal-Aldolase.

Die KDPGal-Aldolase (KDPGalA) katalysierte die Spaltung von 2-Keto-3-Desoxy-6-Phosphogalactonat in Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) und Pyruvat mit apparenten  $V_{\max}$ - und  $K_m$ -Werten für von 39 U/mg und 0,04 mM (Abbildung 17 A) (Tabelle 10). Neben KDPGal setzte das Enzym auch KDPG mit einer maximalen Rate von 25 U/mg und einem  $K_m$  von 0,117 mM um (Abbildung 17 B). Damit ist die katalytische Effizienz des Enzyms für KDPGal mit  $376 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$  fünffach höher als die für KDPG (Tabelle 10). Die nicht-phosphorylierten Substrate KDG und KDGal wurden im Vergleich zu KDPGal (100 %) mit weniger als 1 % der Aktivität umgesetzt. Dies zeigte eine Spezifität des Enzyms für die getesteten phosphorylierten 2-Keto-3-Desoxy-Zuckersäuren um.

Das pH-Optimum der Aldolase lag bei pH 7. 50 % der Aktivität wurden bei pH 5 und pH 9 nachgewiesen. Die maximale Aktivität wurde bei 0,5 M KCl erreicht, 70 % Aktivität wurden bei 0 M und 50 % bei 2 M KCl gemessen.



**Abbildung 17** Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der rekombinanten KDPGal-Aldolase aus *H. volcanii* von der Konzentration an KDPGal (A) und KDPG (B). Die Einschübe zeigen die doppelt reziproke Auftragung nach Lineweaver-Burk.

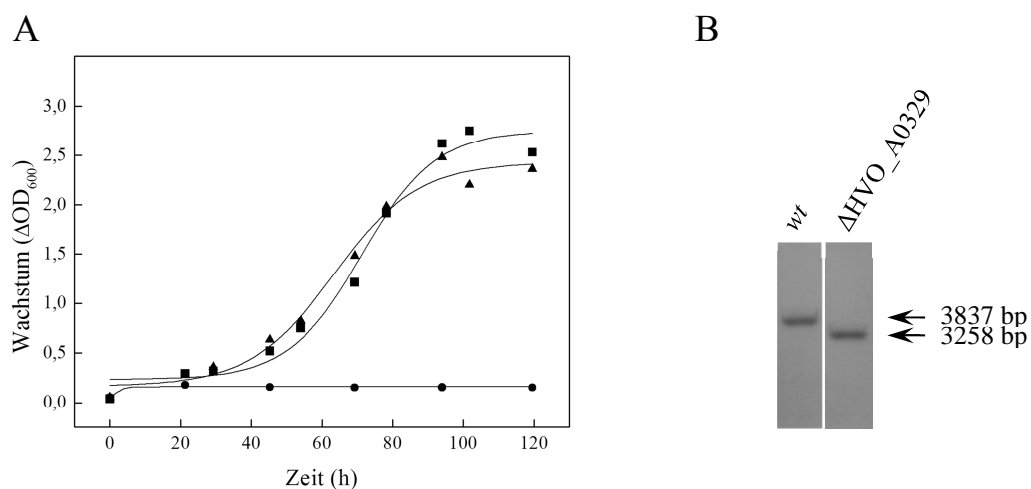
**Tabelle 10** Molekulare und kinetische Eigenschaften der rekombinanten KDPGal-Aldolase aus *H. volcanii*. Die Bestimmung der kinetischen Parameter erfolgte bei 42 °C.

Parameter		KDPGalA
Apparente molekulare Masse des Enzyms (kDa)		220
Apparente molekulare Masse der Untereinheit (kDa) <sup>1</sup>		23
Kalkulierte molekulare Masse der Untereinheit (kDa) <sup>2</sup>		23
oligomere Struktur		$\alpha_9$
Apparenter $V_{\max}$ (U/mg)	KDPGal	39,2
	KDPG	25,1
Apparenter $K_m$ (mM)	KDPGal	0,04
	KDPG	0,116
$K_{\text{cat}}/K_m$ (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	KDPGal	376
	KDPG	83

<sup>1</sup> Bestimmung über SDS-PAGE

<sup>2</sup> *HVO\_A0329* (www.halolex.mpg.de); mit His-tag

**Deletion und Komplementation.** Das Gen HVO\_A0329, das für eine putative KDPGal-Aldolase kodiert, wurde chromosomal deletiert und mit Hilfe eines Southern Blots die Deletion nachgewiesen (Abbildung 18). Es wurden 579 bp (89 %) des Gens deletiert. Das Wachstum der Deletionsmutante in Medium mit Glucose oder Galactose wurde analysiert (Abbildung 18). Die Deletionsmutante wuchs nicht mehr auf Galactose. Wurde in die Deletionsmutante das Gen HVO\_A0329 mit Hilfe eines Vektors *in-trans* eingefügt, ließ sich das Wachstum auf Galactose wieder vollständig herstellen (Abbildung 18). Das Wachstum auf Glucose war im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert (nicht gezeigt).



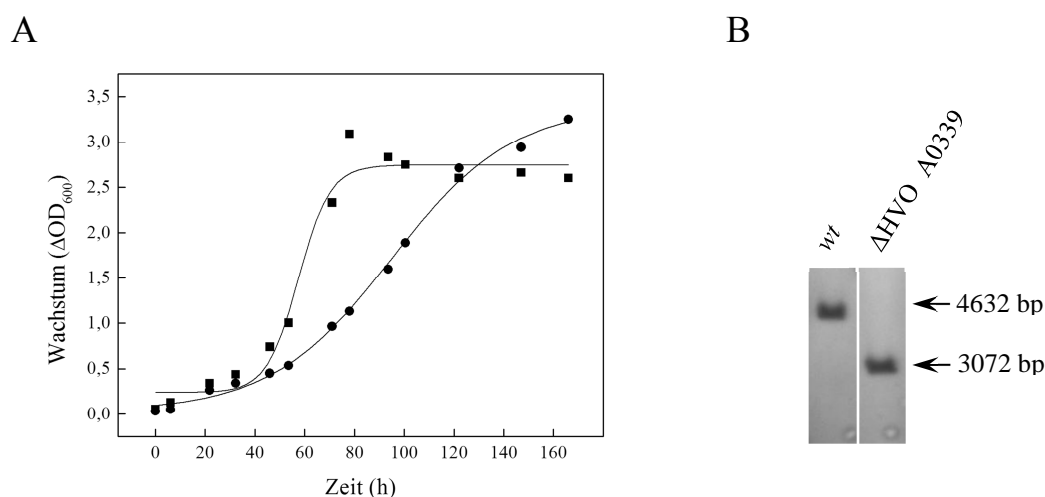
**Abbildung 18 Wachstum der *H. volcanii* KDPGalA Deletionsmutante auf 25 mM Galactose und Southern Blot zur Überprüfung der Gendeletion von HVO\_A0329.** (A) Dargestellt ist das Wachstum der Deletionsmutante (●) im Vergleich zum Wildtyp (■) und der mit HVO\_A0329 komplementierten Deletionsmutante (▲). Die Vorkulturen wurden in Medium mit 1 % Casaminsäuren angezogen. Das Wachstum wurde durch die Messung der optischen Dichte bei 600 nm analysiert. (B) Für den Southern Blot wurde DNA aus dem Wildtyp (*wt*) und der Deletionsmutante ( $\Delta$ HVO\_A0329), die mit *EcoRV* und *NcoI* verdaut wurde, aufgetragen. Anschließend wurde die DNA der Größe nach getrennt, auf eine Membran geblottet und mit Hilfe einer Sonde, die komplementär zum 5'- untranslatierten Bereich von HVO\_A0329 war, die Deletion nachgewiesen. Der Unterschied in der Bandenhöhe entspricht der Größe des deletierten Bereichs.

Diese Ergebnisse zeigen, dass HVO\_A0329 für eine funktionelle KDPGal-Aldolase kodiert, die bei Wachstum auf Galactose induziert wird. Die KDPGal-Aldolase setzte spezifisch die phosphorylierten 2-Keto-3-Desoxyzuckersäuren KDPGal und KDPG um, nicht jedoch die entsprechenden unphosphorylierten 2-Keto-3-Desoxyzuckersäuren. Wachstumsanalysen einer Deletionsmutante zeigten eine essentielle Beteiligung der KDPGal-Aldolase am Galactose-Stoffwechsel in *H. volcanii*.

### 5.1.4 Galactose-Bindeprotein

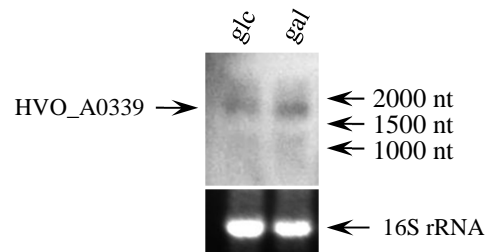
**Deletion.** In genomischer Nähe zu den Genen des Galactose-Abbaus befinden sich Gene für einen ABC-Transporter (Abbildung 5). Um zu klären, ob der ABC-Transporter am Galactose-Transport beteiligt ist, wurde das Gen des Substratbindeproteins deletiert und die Deletion mittels Southern Blot überprüft (Abbildung 19). Es wurden 1560 bp (93 %) des Gens deletiert.

Das Wachstum der Deletionsmutante wurde im Vergleich zum Wildtyp untersucht. Dabei wuchs die Mutante auf Galactose mit einer deutlich verlangsamten Verdopplungszeit von 30,3 h bis zu einer  $OD_{600}$  von 3,2 (Abbildung 19). Im Gegensatz dazu wuchs der Wildtyp mit einer Verdopplungszeit von 14,4 h bis zu einer  $OD_{600}$  von 3,2. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass das Substratbindeprotein, und damit der ABC-Transporter am Galactose-Transport beteiligt ist.



**Abbildung 19** Wachstum der Deletionsmutante  $\Delta$ HVO\_A0339 auf 25 mM Galactose und Southern Blot zur Überprüfung der Gendeletion von HVO\_A0339 in *H. volcanii*. (A) Dargestellt ist das Wachstum der  $\Delta$ HVO\_A0339 Deletionsmutante (●) im Vergleich zum Wildtyp (■). Die Vorkulturen wurden in Medium mit 1 % Casaminsäuren angezogen. Das Wachstum wurde durch die Messung der optischen Dichte bei 600 nm analysiert. (B) Für den Southern Blot wurde genomische DNA aus dem Wildtyp (*wt*) und der Deletionsmutante ( $\Delta$ HVO\_A0339), die mit *NdeI* und *PciI* verdaut wurde, verwendet. Mit Hilfe einer Sonde, die spezifisch an den 5'-untranslatierten Bereich von HVO\_A0339 binden konnte, wurde die Deletion nachgewiesen. Der Unterschied in der Bandenhöhe entspricht der Größe des deletierten Bereichs.

**Transkriptionsregulation.** Weiterhin wurde geprüft, ob das Gen des Substratbindeproteins transkriptionell reguliert ist. Es wurden vergleichbare Transkriptmengen in Galactose- und Glucose-gewachsenen Zellen mittels Northern Blot nachgewiesen. Dies deutet auf eine konstitutive Expression hin (Abbildung 20).



**Abbildung 20** Transkriptionsanalyse von HVO\_A0339 aus *H. volcanii* nach Wachstum auf Glucose bzw. Galactose mittels Northern Blot. Es wurde RNA aus Zellen isoliert, die entweder auf Glucose (glc) oder Galactose (gal) wuchsen. Die Northern Blot Analyse wurde mit einer für HVO\_A0339 spezifischen Sonde durchgeführt. Als Kontrolle diente die 16S rRNA, die mit Hilfe von Ethidiumbromid sichtbar gemacht wurde.

### 5.1.5 Transkriptionsaktivator DdcR

Die bisherigen Analysen haben gezeigt, dass die Gene des Galactose-Abbaus HVO\_A0330 (Galactose-Dehydrogenase), HVO\_A0331 (Galactonat-Dehydratase) und HVO\_A0329 (KDPGal-Aldolase), die im Folgenden als *galDH*, *galAD* und *kdpgalA* bezeichnet werden, in *H. volcanii* bei Wachstum auf Galactose transkriptionell induziert werden, was für einen gemeinsamen transkriptionellen Regulator spricht. In direkter genomischer Nähe zu den Genen des Galactose-Abbaus in *H. volcanii* liegt das Gen eines putativen Transkriptionsregulators (HVO\_A0332). Dieser Regulator ist homolog zur IclR-Familie der Transkriptionsregulatoren aus Bacteria und enthält ein Helix-Turn-Helix-Motiv (IclR-type HTH, PS51077), was ihn als DNA-bindendes Protein ausweist.

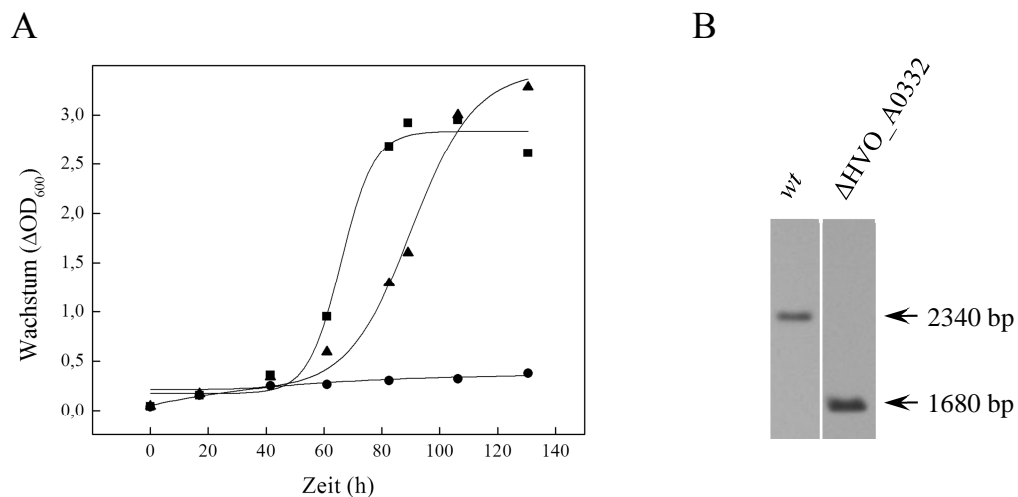
**Deletion und Komplementation.** Um einen Effekt des putativen Regulators am Galactose-Abbau in *H. volcanii* zu zeigen, wurde das Gen HVO\_A0332 chromosomal deletiert. Die Deletionsmutante wurde mit Hilfe eines Southern Blots überprüft, es wurden 660 bp (84 %) des Gens deletiert (Abbildung 21).

Das Wachstum wurde in Medium mit Galactose oder Glucose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle untersucht. Die Deletionsmutante wuchs nicht mehr auf Galactose (Abbildung 21), auf Glucose wuchs die Mutante hingegen wie der Wildtyp (nicht gezeigt). Das Wachstum auf Galactose wurde durch eine *in-trans* Komplementation mit HVO\_A0332 wieder hergestellt werden (Abbildung 21). Die Daten zeigen, dass der hypothetische Transkriptionsregulator essentiell am Galactose-Abbau beteiligt ist, möglicherweise als Aktivator.

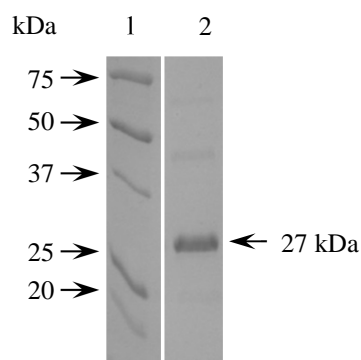
**Expression und Reinigung des rekombinanten Transkriptionsregulators.** HVO\_A0332 wurde in *H. volcanii* homolog überexprimiert und mittels Nickel-Affinitätschromatographie und Größenausschlusschromatographie gereinigt. Dabei wurde ein apparentes Molekulargewicht des Enzyms von 67 kDa gezeigt. Mit Hilfe einer SDS-PAGE wurde das Molekulargewicht der Untereinheit auf 27 kDa bestimmt (Abbildung 22), was dem kalkulierten Molekulargewicht von 28,7 kDa (29,6 mit His-Tag) entspricht. Dies deutet auf eine homo-dimere Konformation des Enzyms hin ( $\alpha_2$ ).

Das Gen des putativen Transkriptionsregulators wird im Folgenden *ddcR* (DeLey-Doudoroff-catabolism regulator) genannt.



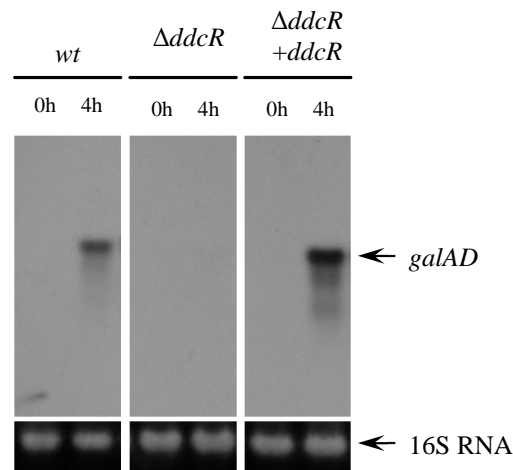


**Abbildung 21** Wachstum der *H. volcanii* HVO\_A0332 Deletionsmutante auf 25 mM Galactose und Southern Analyse zur Überprüfung der Gendeletion von HVO\_A0332. (A) Dargestellt ist das Wachstum der Deletionsmutante (●) im Vergleich zum Wildtyp (■) und der mit *ddcR* komplementierten Deletionsmutante (▲). Die Vorkulturen wurden in Medium mit 1 % Casaminsäuren angezogen. Das Wachstum wurde durch die Messung der optischen Dichte bei 600 nm analysiert. (B) Southern Blot mit genomischer DNA aus dem Wildtyp (*wt*) und der Deletionsmutante ( $\Delta$ HVO\_A0332), die mit *EcoRV* und *NcoI* verdaut wurde. Mit Hilfe einer Sonde, die zum 5'-untranslatierten Bereich von HVO\_A0332 komplementär war, wurde die Deletion nachgewiesen. Der Unterschied in der Bandenhöhe entspricht der Größe des deletierten Bereichs von HVO\_A0332.



**Abbildung 22** Rekombinanter Transkriptionsregulator aus *H. volcanii*. SDS-PAGE nach Coomassie Brilliant Blau Färbung mit gereinigtem Regulator, der N-terminal einen 6 x His-Tag aufweist. Die Pfeile auf der linken Seite zeigen auf die Banden der Markerproteine, der Pfeil rechts auf das gereinigte Protein. Spur 1: Molekulargewichtsstandard; Spur 2: Transkriptionsregulator.

**Transkriptionsregulation von *galAD* durch DdcR.** Um zu überprüfen, ob der Transkriptionsregulator DdcR die Gene des Galactose-Abbaus in *H. volcanii* Galactose-spezifisch induziert, sollten exemplarisch die Transkriptmengen von *galAD* im Wildtyp und in der DdcR Deletionsmutante bestimmt werden. Da die Deletionsmutante nicht mehr auf Galactose wachsen kann, wurden Wildtyp-Zellen von *H. volcanii* H26 und die Deletionsmutante  $\Delta ddcR$  zunächst mit 5 mM Glucose bis zur stationären Phase ( $OD_{600} \approx 1$ ) gezüchtet. Zu diesem Zeitpunkt (0 h) wurde RNA isoliert. Anschließend wurde zur Induktion der Galactose-abbauenden Gene 5 mM Galactose zu den Kulturen gegeben und nach weiteren 4 Stunden erneut RNA isoliert (4 h). Die RNA wurde mit Hilfe von Northern Blot Analysen auf eine Bildung von Transkripten des Galactonat-Dehydratase Gens untersucht (Abbildung 23). Vor der Zugabe von Galactose (0 h) wurde in keiner der untersuchten Kulturen Transkript nachgewiesen. Nach Induktion mit Galactose (4 h) zeigte sich im Wildtyp eine deutliche Induktion der Transkription von *galAD*. Im Gegensatz dazu wurde in der DdcR Deletionsmutante kein spezifisches Transkript nachgewiesen. Um zu prüfen, ob die Abwesenheit des *galAD* Transkripts ausschließlich auf die Deletion des Transkriptionsregulators zurückzuführen war, wurde in einem dritten Ansatz die Deletionsmutante  $\Delta ddcR$  *in-trans* mit *ddcR* komplementiert. Unter diesen Bedingungen war nach Induktion mit Galactose wieder spezifisches Transkript von *galAD* nachweisbar. Dieses Ergebnis zeigt, dass der Transkriptionsregulator DdcR für die Galactose-spezifische Transkription von *galAD* essentiell ist und als Transkriptionsaktivator wirkt.

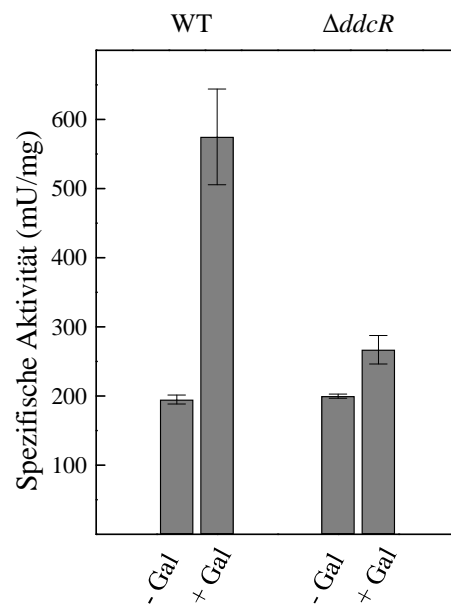


**Abbildung 23 Northern Blot Analyse von *galAD* (HVO\_A0331) in *H. volcanii* (wt), der DdcR Deletionsmutante ( $\Delta ddcR$ ) und der *in-trans* komplementierten Deletionsmutante ( $\Delta ddcR+ddcR$ ).** RNA wurde aus Zellen isoliert, die bis zur stationären Phase in Medium mit 5 mM Glucose gewachsen waren (0h). Anschließend wurde den Zellen 5 mM Galactose zugegeben und nach 4 Stunden Inkubation erneut RNA isoliert (4h). Die komplementierte Deletionsmutante wurde mit 80  $\mu$ M Tryptophan im Medium inkubiert. Die verwendete Sonde war spezifisch für *galAD*. Als Kontrolle wurde die 16S RNA verwendet.

**Regulation der *galAD*-Promotoraktivität durch DdcR.** Der Einfluss des Transkriptionsregulators DdcR auf die Transkription von *galAD* sollte auch anhand von Promotoraktivitäten mit Hilfe eines Reportergensystems nachgewiesen werden. Dabei sollte zunächst gezeigt werden, dass die Reportergenaktivität durch den Promotor von *galAD* spezifisch von Galactose induziert wird. Dazu wurde der Promotor des Gens *galAD* in den Vektor pTA919 *in-frame* vor das *bgaH*-Reporter gen, das für eine  $\beta$ -Galactosidase kodiert, kloniert. Der Stamm *H. volcanii* H555, der kein  $\beta$ -Galactosidase Gen trägt, wurde mit diesem Konstrukt (pTA919p.HVO\_A0331) transformiert (AG Schönheit). Der Stamm wurde auf 25 mM Galactose und 1 % Casaminosäuren gezüchtet und die  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität bestimmt. Die Messung der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität erfolgte jeweils am Anfang der stationären Phase. Dabei war die Promotoraktivität von *galAD* in Galactose-gewachsenen Zellen (436 mU/mg) etwa 5-fach höher als bei Casaminosäure-gewachsenen Zellen (87,7 mU/mg). Dies zeigt, dass der *galAD*-Promotor in Anwesenheit von Galactose induziert wird. Damit ist dieses Reportergensystem geeignet, um den Einfluss von DdcR auf die Promotorstärke von *galAD* zu untersuchen.

Dazu wurde eine Deletionsmutante  $\Delta ddcR$  im Stamm *H. volcanii* H555 erstellt. Die erfolgreiche Deletion wurde mittels Southern Blot nachgewiesen und die Deletionsmutante konnte, wie *H. volcanii* H26  $\Delta ddcR$ , nicht mehr auf Galactose wachsen (nicht gezeigt). Die

Deletionsmutante wurde mit dem Plasmid pTA919p.HVO\_A0331 transformiert. Wildtyp und  $\Delta ddcR$  wurden zunächst auf 0,2 % Casaminosäuren bis zur stationären Phase gezüchtet und die  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität gemessen. Dabei wurden im Wildtyp als auch in der Deletionsmutante basale Promotoraktivitäten von  $195 \pm 6,4$  mU/mg bzw.  $200 \pm 2,9$  mU/mg nachgewiesen (Abbildung 24). Anschließend wurden beiden Kulturen zur Induktion des *galAD*-Promotors jeweils 10 mM Galactose zugegeben. Nach ca. 100 h wurde erneut die Promotor-Aktivität der *galAD* mit Hilfe der  $\beta$ -Galactosidase-Aktivität bestimmt. Im Wildtyp wurde eine dreifach erhöhte Aktivität von  $595 \pm 69$  mU/mg nachgewiesen, die Aktivität in der Deletionsmutante hingegen blieb annähernd konstant bei  $267 \pm 20,7$  mU/mg. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Anwesenheit von DdcR essentiell ist für die Promotoraktivierung von *galAD* und bestätigt damit die Rolle von DdcR als Transkriptionsaktivator.



**Abbildung 24** Promotoraktivität der *galAD* in *H. volcanii* H555 (WT) und *H. volcanii* H555  $\Delta ddcR$  ( $\Delta ddcR$ ). Gezeigt ist die Promotoraktivität nach Wachstum auf 0,2 % Casaminosäuren bis zur stationären Phase (-Gal) und nach Zugabe von 10 mM Galactose nach ca. 100 h (+Gal).

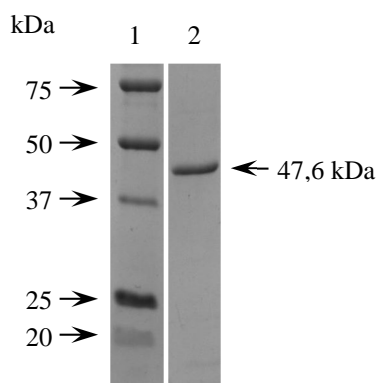
## 5.2 D-Galactose-Abbau in *Halorhabdus utahensis*

### 5.2.1 Galactokinase

Genomanalysen haben ergeben, dass in *H. utahensis* die Gene für den in *H. volcanii* identifizierten DeLey-Doudoroff Weg für den Abbau von Galactose fehlen. Es konnten hingegen alle Gene für einen klassischen bakteriellen Leloir-Weg für den Abbau von Galactose nachgewiesen werden (Anderson et al. 2011). Das Schlüsselenzym, die Galactokinase, wird durch das Gen Huta\_3018 (*galK*) kodiert. In dieser Arbeit sollte dieses Gen überexprimiert und das rekombinante Protein gereinigt und charakterisiert werden.

#### Expression, Reinigung und biochemische Charakterisierung der rekombinanten GalK.

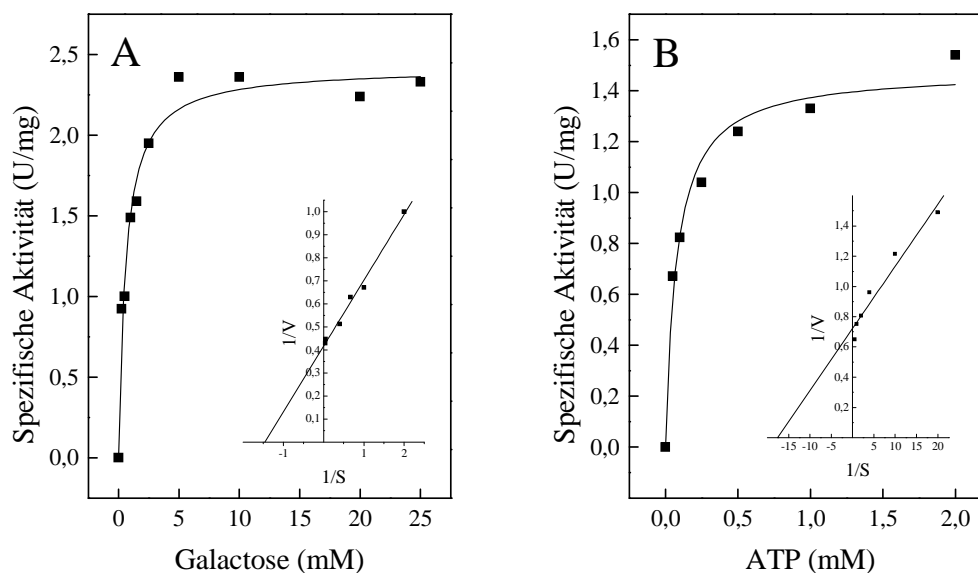
Das Gen *galK* wurde in *H. volcanii* homolog überexprimiert und das rekombinante Protein mit Hilfe von Nickel-Affinitätschromatographie und Größenausschlusschromatographie gereinigt. Mit Hilfe einer denaturierenden SDS-PAGE wurde das Molekulargewicht der Untereinheit auf 47,6 kDa bestimmt (Abbildung 25). Das kalkulierte Molekulargewicht lag bei 40 kDa (mit His-Tag). Das native Molekulargewicht des Enzyms wurde mittels Gelfiltration auf  $31,3 \pm 5,5$  kDa bestimmt. Dies deutet auf eine monomere Struktur des Enzyms hin.



**Abbildung 25** Rekombinante Galactokinase aus *H. utahensis*. SDS-PAGE nach Coomassie Brilliant Blau Färbung mit gereinigter Galactokinase, die N-terminal einen 6 x His-Tag aufweist. Die Pfeile auf der linken Seite zeigen auf die Banden der Markerproteine, der Pfeil rechts auf die Galactokinase. Spur 1: Molekulargewichtsstandard; Spur 2: Galactokinase.

Das rekombinante Enzym katalysierte die ATP-abhängige Phosphorylierung von Galactose mit  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werten von 0,69 mM und 2,4 U/mg für Galactose (Abbildung 26 A) (Tabelle 11). Der apparente  $K_m$ -Wert für ATP lag bei 0,057 mM (Abbildung 26 B). Die

Aktivität konnte bis zu einer Salzkonzentration von 3,5 M KCl gesteigert werden. Bei 2,5 M KCl konnten noch 38 % der Aktivität nachgewiesen werden. Das Enzym war unter den gewählten Bedingungen nicht stabil, nach 24 h wurden nur noch 50 % der Aktivität nachgewiesen.



**Abbildung 26** Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der Galactokinase aus *H. utahensis* von der Konzentration von Galactose (A) oder ATP (B) bei 37 °C. In den Einschüben sind die doppelt reziproken Auftragungen nach Lineweaver-Burk dargestellt.

**Tabelle 11** Molekulare und kinetische Eigenschaften der rekombinanten Galactokinase aus *H. utahensis*. Die Bestimmung der kinetischen Parameter erfolgte bei 37 °C.

Parameter	GalK
Apparente molekulare Masse des Enzyms (kDa)	31,3
Apparente molekulare Masse der Untereinheit (kDa) <sup>1</sup>	47,6
Kalkulierte molekulare Masse der Untereinheit (kDa) <sup>2</sup>	40
oligomere Struktur	$\alpha$
Apparenter $V_{\max}$ (U/mg)	2,4
Apparenter $K_m$ (mM)	Galactose 0,69 ATP 0,057

<sup>1</sup> Bestimmung über SDS-PAGE

<sup>2</sup> Huta\_3018 (www.halolex.mpg.de); mit His-tag

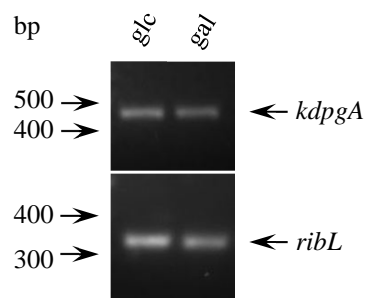
Es wurde gezeigt, dass *H. utahensis* über eine katalytisch aktive Galactokinase verfügt, was darauf hindeuten könnte, dass Galactose in *H. utahensis* über den Leloir-Weg abgebaut wird.

### 5.3 Glucose-Abbau in *Haloferax volcanii*

#### 5.3.1 KDPG-Aldolase

Für den Abbau von Glucose wurde in *H. volcanii* ein semiphosphorylierter Entner-Doudoroff-Weg postuliert. Das Schlüsselenzym dieses Weges, die KDPG-Aldolase wurde bis jetzt nicht detailliert untersucht. In bisherigen Untersuchungen der Arbeitsgruppe wurde mit Hilfe einer Deletionsmutante gezeigt, dass die KDPG-Aldolase, kodiert von HVO\_0950 (*kdpG*), essentiell am Abbau von Glucose beteiligt ist (Tästensen, 2010). Im Folgenden wurden Transkriptanalysen durchgeführt, das Protein wurde homolog überexprimiert und umfassend biochemisch charakterisiert.

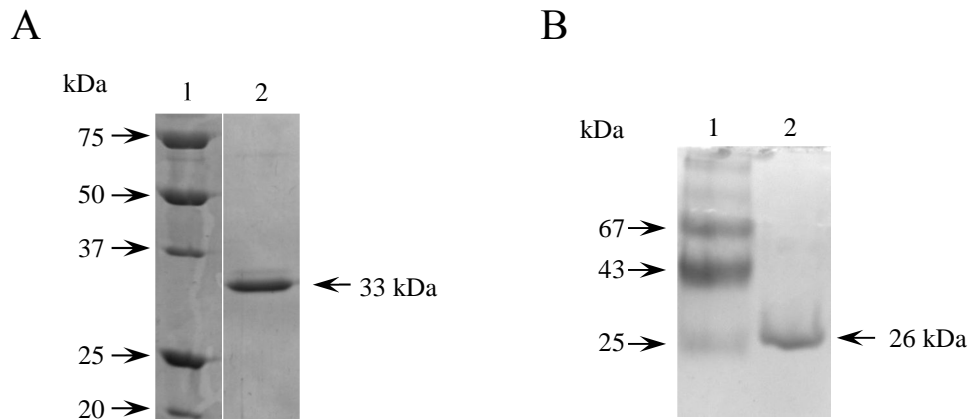
**Transkriptionsanalyse.** In RNA aus Glucose- oder Galactose-gewachsenen Zellen wurde die Transkriptmenge von *kdpG* mittels semiquantitativer RT-PCR abgeschätzt. Dabei zeigte sich, dass *kdpG* konstitutiv bei Wachstum auf Glucose und Galactose transkribiert wird (Abbildung 27).



**Abbildung 27** Transkriptionsanalyse von *kdpG* aus *H. volcanii* nach Wachstum auf Glucose bzw. Galactose mittels semiquantitativer RT-PCR. RNA wurde aus Zellen isoliert, die entweder auf Glucose (glc) oder Galactose (gal) als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle gewachsen waren. Das Transkript wurde mit Hilfe von spezifischen Primern für *kdpG* (453 bp) mittels RT-PCR nachgewiesen. Als Kontrolle wurde das konstitutiv exprimierte ribosomale Gen *ribL* (337 bp) nachgewiesen.

**Expression, Reinigung und Charakterisierung der rekombinanten KDPG-Aldolase.** Die KDPG-Aldolase wurde in *H. volcanii* überexprimiert und bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Mittels SDS-PAGE wurde das Molekulargewicht der Untereinheit auf 33 kDa bestimmt (Abbildung 28 A). Das kalkulierte Molekulargewicht entspricht 23,3 kDa (inklusive His-tag), sodass in der SDS-PAGE eine deutliche Überbestimmung der Untereinheit vorlag,

die für halophile Proteine schon gezeigt wurde (5.1.1). Deshalb wurde zusätzlich das apparente Molekulargewicht mit Hilfe einer CTAB-PAGE auf 26 kDa bestimmt, was in etwa mit dem kalkulierten Molekulargewicht übereinstimmt (Abbildung 28 B). Die apparente molekulare Masse des Enzyms wurde mittels Größenausschlusschromatographie auf 267 kDa bestimmt. Diese Ergebnisse deuten auf eine homo-dodecamere ( $\alpha_{12}$ ) Form des nativen Enzyms hin.

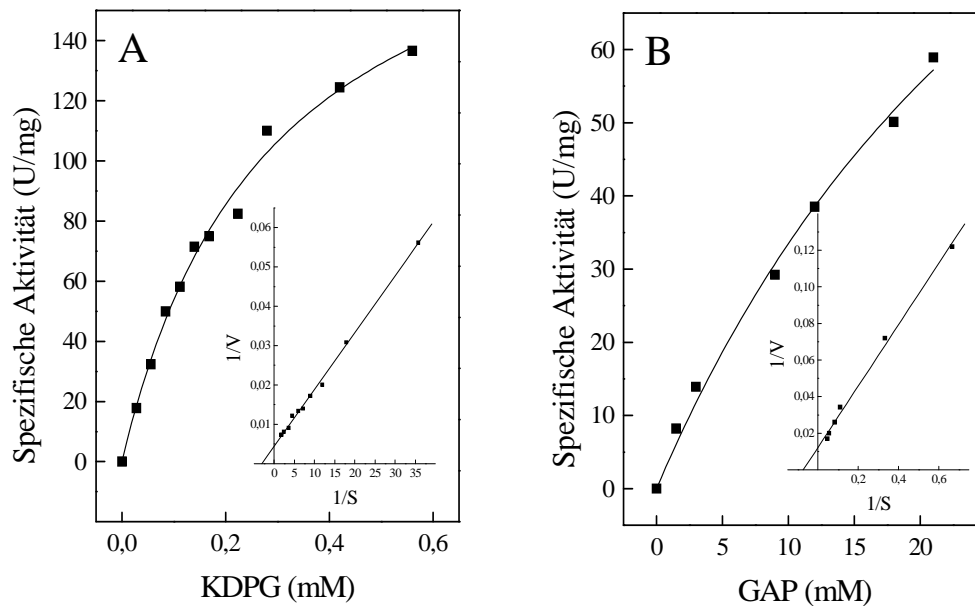


**Abbildung 28 Rekombinante KDPG-Aldolase aus *H. volcanii*.** SDS-PAGE (A) und CTAB-PAGE (B) nach Coomassie Brilliant Blau Färbung mit gereinigter KDPG-Aldolase, die N-terminal einen 6 x His-Tag aufweist. Die Pfeile auf der linken Seite zeigen auf die Banden der Markerproteine, der Pfeil rechts auf die KDPG-Aldolase. Spur 1: Molekulargewichtsstandard; Spur 2: KDPG-Aldolase.

Die KDPG-Aldolase katalysierte die Spaltung von KDPG zu GAP und Pyruvat mit einem  $V_{\max}$ -Wert von 226 U/mg. Der  $K_m$ -Wert für KDPG betrug 0,33 mM (Abbildung 29 A). Das Enzym setzte das entsprechende  $C_4$ -Epimer KDPGal nur mit geringen Raten (< 3 %) um. Außerdem katalysierte das Enzym die Rückreaktion, nämlich die Bildung von KDPG aus Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) und Pyruvat, mit einem apparenten  $V_{\max}$ -Wert von 81,6 U/mg, für GAP wurde ein  $K_m$ -Wert von 13,4 mM ermittelt (Abbildung 29 B). Mit deutlich geringeren spezifischen Aktivitäten wurde die Spaltung von KDG zu Glycerinaldehyd und Pyruvat (< 1 %) und die Bildung von KDG (< 6 %) katalysiert. Bei der KDG-Bildung aus GA und Pyruvat wurden für Glycerinaldehyd und Pyruvat apparente  $K_m$ -Werte von 30 mM bzw. 3,3 mM bestimmt.



Die maximale Aktivität wurde bei pH-Werten zwischen pH 6,5 und pH 7,5 erreicht. Es konnten bei pH 5,5 und pH 9 jeweils 50 % der Aktivität nachgewiesen werden. Das Enzym zeigte optimale Aktivität bei KCl-Konzentrationen von 1-1,5 M. Ohne KCl wurden noch 3,5 % Aktivität nachgewiesen, bei 3,5 M KCl noch 67 %. Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 zusammenfassend dargestellt.



**Abbildung 29** Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der rekombinanten KDPG-Aldolase aus *H. volcanii* von KDPG (A) und GAP (B) bei 42 °C. In den Einschüben sind die doppelt reziproken Auftragungen nach Lineweaver-Burk dargestellt.

**Tabelle 12 Molekulare und kinetische Eigenschaften der rekombinanten KDPG-Aldolase aus *H. volcanii*.**  
Die Bestimmung der kinetischen Parameter erfolgte bei 42 °C

Parameter		KDPGA
Apparente molekulare Masse des Enzyms (kDa)		267
Apparente molekulare Masse der Untereinheit (kDa) <sup>1</sup>		26
Kalkulierte molekulare Masse der Untereinheit (kDa) <sup>2</sup>		23,3
Oligomere Struktur		$\alpha_{12}$
Apparenter $V_{\max}$ (U/mg)	KDPG	226,2
	KDG	n.b.
	GAP *	81,6
	GA *	4,5
	Pyruvat **	2
Apparenter $K_m$ (mM)	KDPG	0,326
	KDG	n.b.
	GAP *	13,4
	GA *	30
	Pyruvat**	3,3

<sup>1</sup> Bestimmung über CTAB-PAGE

<sup>2</sup> *HVO\_0950* (www.halolex.mpg.de); mit His-tag

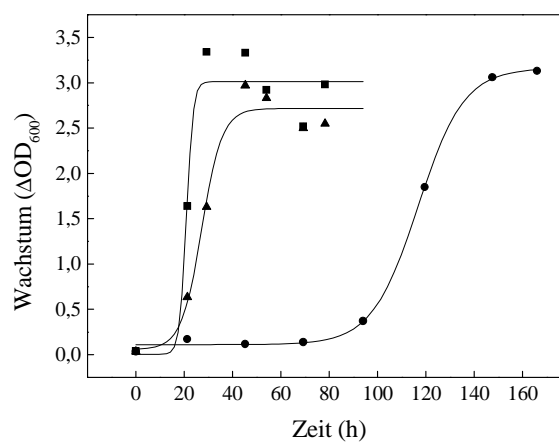
n.b.: nicht bestimmbar

\* Die  $V_{\max}$ - und  $K_m$ -Werte für GAP und GA wurden jeweils mit 25 mM Pyruvat ermittelt

\*\* Die  $V_{\max}$ - und  $K_m$ -Werte für Pyruvat wurden mit 20 mM GA ermittelt

**Deletionsmutante.** Eine chromosomale Deletionsmutante der KDPG-Aldolase in *H. volcanii* war bereits verfügbar. Es zeigte sich, dass diese Deletionsmutante im Gegensatz zum Wildtyp in den ersten 80 Stunden nicht mehr auf Glucose wachsen konnte (Tästensen, 2010). Wurde in die Deletionsmutante das Gen *kdpGA* mit Hilfe eines Vektors *in-trans* eingefügt, ließ sich das Wachstum auf Glucose wieder vollständig herstellen (Abbildung 30). Das Wachstum der Deletionsmutante auf 1 % Casaminsäuren und 25 mM Galactose war nicht verändert (nicht gezeigt). Dieses Ergebnis zeigt, dass die KDPG-Aldolase essentiell am Abbau von Glucose beteiligt ist.

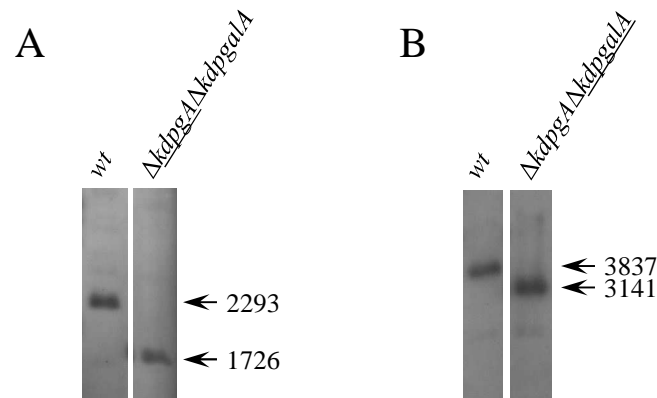
In einer weiterführenden Analyse stellte sich jedoch heraus, dass die  $\Delta kdpGA$  Deletionsmutante in Medium mit Glucose nach 80-100 h wieder in der Lage war Glucose als Energie- und Kohlenstoffquelle zu nutzen (Abbildung 30). Um zu prüfen, ob die Deletionsmutante nach dieser Zeitspanne wieder zum Wildtyp rückmutiert war, wurde zunächst DNA aus  $\Delta kdpGA$  nach Wachstum auf Glucose isoliert und durch einen Southern Blot die Deletion des Gens erneut bestätigt (nicht gezeigt). Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass die KDPG-Aldolase in der Deletionsmutante durch eine andere Aldolase ersetzt werden kann.



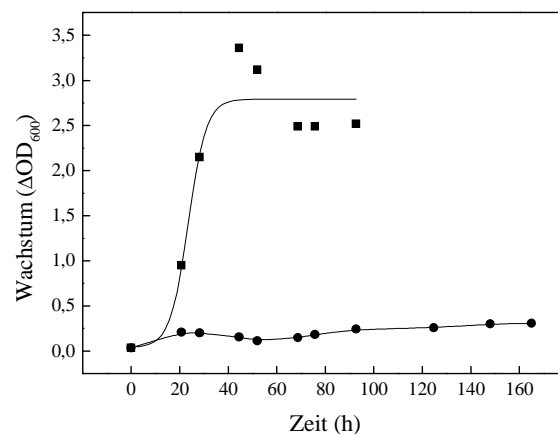
**Abbildung 30** Wachstum der *H. volcanii*  $\Delta kdpGA$  Deletionsmutante auf 25 mM Glucose. Dargestellt ist das Wachstum der  $\Delta kdpGA$  Deletionsmutante (●) im Vergleich zum Wildtyp (■) und des mit *kdpGA* (▲) komplementierten Deletionsstamms. Die Vorkulturen wurden in Medium mit 1 % Casaminosäuren angezogen.

Da die im Rahmen der vorliegenden Arbeit charakterisierte KDPGal-Aldolase (5.1.3) in der Lage ist auch KDPG effizient umzusetzen, wurde vermutet, dass die KDPGal-Aldolase, die Funktion der KDPG-Aldolase in der  $\Delta kdpGA$  Mutante übernehmen kann.

**Doppel-Deletionsmutante.** Um zu überprüfen, ob das Wachstum der  $\Delta kdpGA$  Mutante auf Glucose durch die KDPGal-Aldolase verursacht wird, wurde eine  $\Delta kdpGA \Delta kdpGAL$  Doppel-Deletionsmutante generiert und die Deletionen in einer Southern Blot Analyse überprüft (Abbildung 31). Die Doppelmutante  $\Delta kdpGA \Delta kdpGAL$  zeigte auch nach 150 h kein Wachstum auf Glucose. Dieses Ergebnis bestätigt die Vermutung, dass die KDPGal-Aldolase die KDPG-Aldolase in der  $\Delta kdpGA$ -Mutante funktionell ersetzt (Abbildung 32). Wie erwartet wuchs die Doppelmutante auch nicht mehr auf Galactose (nicht gezeigt).



**Abbildung 31 Southern Analyse zur Überprüfung der Gendeletion von *kdpG* (HVO\_0950) und *kdpGalA* (HVO\_A0329) in *H. volcanii*.** Aufgetragen wurde DNA aus dem Wildtyp (*wt*) und der Doppel-Deletionsmutante ( $\Delta kdpG \Delta kdpGalA$ ), die mit (A) *NotI* und *EcoRV* oder (B) *NcoI* und *EcoRV* verdaut wurde. Anschließend wurde die DNA der Größe nach getrennt, auf eine Membran geblottet und mit Hilfe einer Sonde, die spezifisch an den 5'-untranslatierten Bereich von (A) *kdpG* oder (B) *kdpGalA* binden konnte, die Deletion nachgewiesen. Der Unterschied in der Bandenhöhe entspricht der Größe des deletierten Bereichs von *kdpG* bzw. *kdpGalA*.

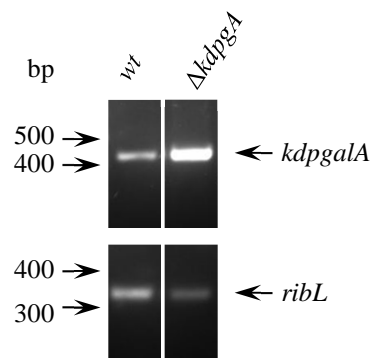


**Abbildung 32 Wachstum der *H. volcanii*  $\Delta kdpG \Delta kdpGalA$  Deletionsmutante auf 25 mM Glucose.** Dargestellt ist das Wachstum der  $\Delta kdpG \Delta kdpGalA$  Deletionsmutante (●) im Vergleich zum Wildtyp (■). Die Vorkulturen wurden in Medium mit 1 % Casaminsäuren angezogen. Das Wachstum wurde durch die Messung der optischen Dichte bei 600 nm analysiert.

Die Ersetzbarkeit der KDPG-Aldolase durch die KDPGal-Aldolase wurde auch durch Transkriptionsanalysen gezeigt. Dazu wurde RNA aus Glucose-gewachsenen Wildtyp-Zellen und aus der  $\Delta kdpG$  Deletionsmutante nach Wachstum auf Glucose isoliert. Mittels semiquantitativer RT-PCR wurde das Transkript von *kdpGalA* nachgewiesen. Dabei zeigte sich im Vergleich zum Wildtyp eine Zunahme der Transkriptmenge von *kdpGalA* in der

Deletionsmutante nach Wachstum auf Glucose (Abbildung 33). Die erhöhte Transkriptmenge in Gegenwart von Glucose ist überraschend, da *kdpgalA* im Wildtyp nur durch Galactose spezifisch induziert wird (5.1.3). Dies deutet darauf hin, dass die Transkription von *kdpgalA* in der Mutante  $\Delta kdpgA$  bei Wachstum auf Glucose dereguliert wird.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der transkriptionellen Regulation wurde eine 17-fach erhöhte KDPGal-Aldolase Aktivität in Zellextrakten der  $\Delta kdpgA$  Deletionsmutante (25,4 mU/mg) nach Wachstum auf Glucose im Vergleich zum Wildtyp (1,5 mU/mg) nachgewiesen.



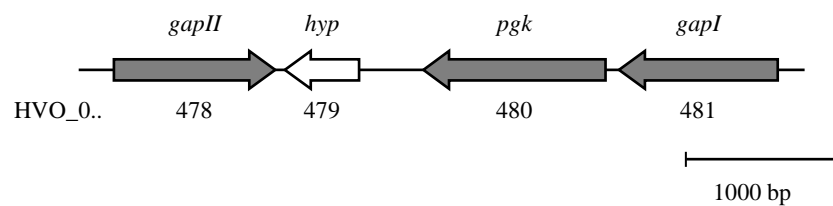
**Abbildung 33** Semiquantitative RT-PCR von *kdpgalA* mit RNA aus *H. volcanii* Wildtyp (*wt*) und  $\Delta kdpgA$  ( $\Delta kdpgA$ ) nach Wachstum auf Glucose. Es wurde RNA aus Zellen verwendet, die auf Glucose (glc) als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle gewachsen waren. Das Transkript wurde mit Hilfe für *kdpgalA* spezifischen Primern mittels RT-PCR nachgewiesen. Als Kontrolle wurde das konstitutiv exprimierte ribosomale Gen *ribL* nachgewiesen.

Die Daten zeigen, dass die KDPG-Aldolase spezifisch die Umsetzung von KDPG katalysiert und KDPGal nicht mit effizienten Raten umsetzt. Die funktionelle Beteiligung der KDPG-Aldolase am Glucose-Abbau wurde nachgewiesen. Außerdem wurde gezeigt, dass die KDPG-Aldolase in der  $\Delta kdpgA$  Mutante funktionell durch die KDPGal-Aldolase ersetzt werden kann.

## 5.4 GAP-Oxidation in *Haloferax volcanii*

Während des Abbaus von Galactose über den DD-Weg und von Glucose über den spED-Weg in *H. volcanii* wird Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) als Intermediat gebildet. Die Enzyme der GAP-Oxidation in *H. volcanii* wurden bisher nicht untersucht. Im Genom von *H. volcanii* wurde ein Gencluster identifiziert, der Gene enthält, die für zwei hypothetische GAP-DHs (*gapI* und *gapII*) und eine PGK (*pgk*) kodieren (Abbildung 34). Microarrayanalysen deuten darauf hin, dass *gapI* am Katabolismus und *gapII* am Anabolismus beteiligt sein könnten (Zaigler et al. 2003).

Um zu überprüfen, ob die hypothetischen Gene für funktionelle katabole bzw. anabole GAP-DHs und eine Phosphoglyceratkinase kodieren, wurden in dieser Arbeit Transkriptanalysen durchgeführt, Deletionsmutanten konstruiert und deren Wachstum analysiert, sowie die Enzyme homolog überexprimiert, gereinigt und charakterisiert.

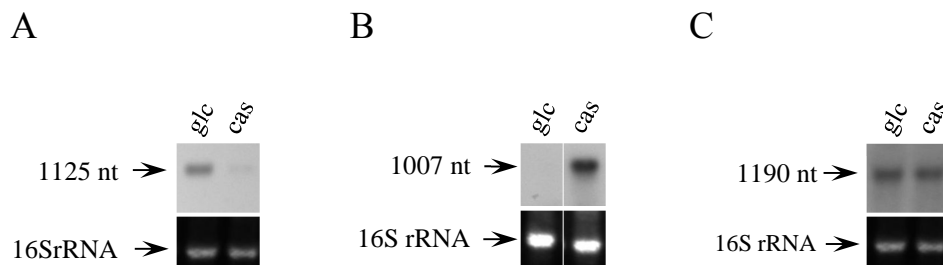


**Abbildung 34 Genomumgebung der Gene HVO\_0478, HVO\_0480 und HVO\_0481.** Die Gene HVO\_0478, HVO\_0479, HVO\_0480 und HVO\_0481 sind als Pfeile dargestellt. Sie kodieren für die putativen Enzyme Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (*gapII* und *gapI*), Phosphoglyceratkinase (*pgk*) und für ein hypothetisches Protein (*hyp*). Die Gene, die in dieser Arbeit untersucht wurden, wurden grau markiert. Der Maßstab entspricht einer Länge von 1000 bp.

### 5.4.1 Transkriptionsanalysen

Zunächst wurde die transkriptionelle Regulation der Gene *gapI*, *gapII* und *pgk* mit Northern Blot Analysen untersucht. Die Northern Blot Analysen zeigten in Übereinstimmung mit den Microarray-Daten, dass die Transkriptmenge von *gapI* in RNA aus Glucose-gewachsenen Zellen im Vergleich zu Casaminosäure-gewachsenen Zellen deutlich erhöht war (Abbildung 35 A). Die Transkriptlänge von etwa 1125 nt entsprach der Genlänge von 1053 bp. Demgegenüber war die Transkriptmenge von *gapII* in RNA aus Casaminosäure-gewachsenen Zellen deutlich erhöht im Vergleich zu Glucose-gewachsenen Zellen (Abbildung 35 B). Das Transkript war 1007 nt lang, was in etwa mit der Länge des Gens von 1068 bp übereinstimmt. Diese Ergebnisse deuten auf eine Beteiligung der durch *gapI* kodierten GAP-DH am Katabolismus und der durch *gapII* kodierten GAP-DH am Anabolismus hin. Im Folgenden werden die Enzyme als katabole (*gapI*) bzw. anabole (*gapII*) GAP-DH bezeichnet.

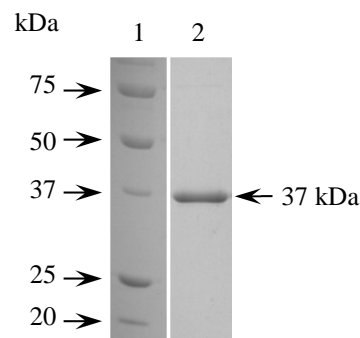
Die Transkriptionsanalyse von *pgk*, der für eine Phosphoglyceratkinase kodiert, zeigte vergleichbare Transkriptmengen in RNA aus Glucose- und Casaminosäure-gewachsenen Zellen, was für eine konstitutive Transkription des Gens und damit für eine Beteiligung im Katabolismus und im Anabolismus spricht (Abbildung 35 C).



**Abbildung 35** Transkriptionsanalyse der Gene *gapI* (A), *gapII* (B) und *pgk* (C) aus *H. volcanii* mittels Northern Blot. Es wurde RNA aus Zellen verwendet, die entweder auf Glucose (glc) oder Casaminosäuren (cas) als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle gewachsen waren. Das Transkript wurde mit Hilfe einer jeweils spezifischen Sonde mittels Northern Blot nachgewiesen. Als Kontrolle wurde die 16S rRNA verwendet.

### 5.4.2 Katabole GAP-DH

**Expression, Reinigung und biochemische Charakterisierung der rekombinanten katabolen GAP-DH.** *gapI* wurde in *H. volcanii* homolog überexprimiert und das Protein bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Das apparente Molekulargewicht der Untereinheit wurde mittels SDS-PAGE auf 37 kDa bestimmt, was mit dem kalkulierten Molekulargewicht von 38,5 kDa (mit His-tag) übereinstimmt. Das native Molekulargewicht des Enzyms wurde mittels Gelfiltration auf 135 kDa bestimmt. Diese Ergebnisse deuten auf eine homo-tetramere Struktur des Enzyms hin ( $\alpha_4$ ).

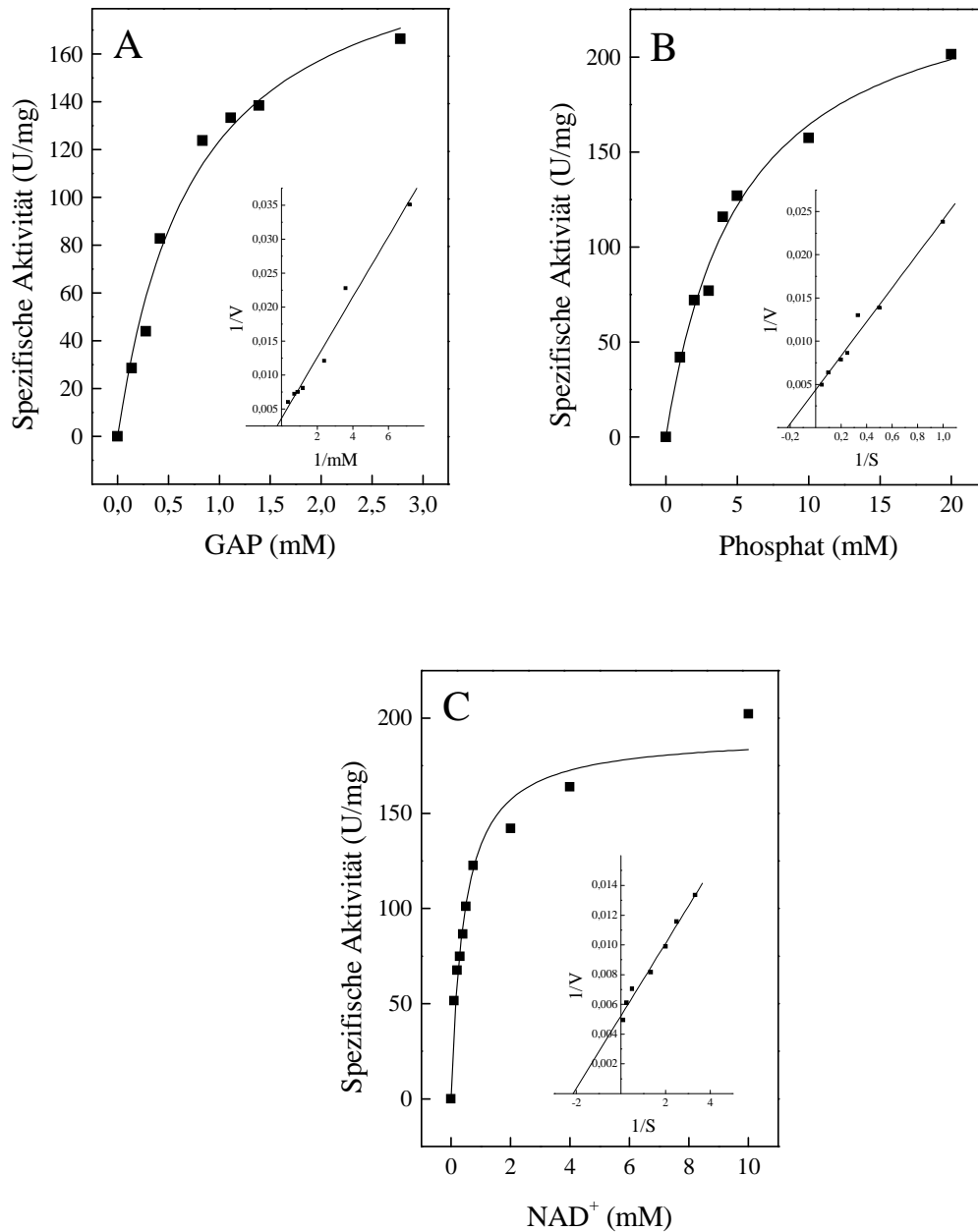


**Abbildung 36** Rekombinante katabole GAP-DH aus *H. volcanii*. SDS-PAGE nach Coomassie Brilliant Blau Färbung mit gereinigter GAP-DH, die N-terminal einen 6 x His-Tag aufweist. Die Pfeile auf der linken Seite zeigen auf die Banden der Markerproteine, der Pfeil rechts auf das gereinigte Enzym. Spur 1: Molekulargewichtsstandard; Spur 2: GAP-DH.

Die katabole GAP-DH katalysierte die Phosphat-abhängige Umsetzung von GAP zu 1,3-Bisphosphoglycerat mit  $\text{NAD}^+$  als Elektronenakzeptor. Die Abhängigkeit der Raten von den Substratkonzentrationen folgte einer Michaelis-Menten Kinetik mit einem  $V_{\text{max}}$ -Wert von etwa 270 U/mg. Für Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) wurde ein  $K_m$ -Wert von 1,22 mM bestimmt (Abbildung 37 A). Bei einer GAP-Konzentration von mehr als 5,5 mM wurde eine 25%ige Inhibition des Enzyms gezeigt, die Inhibition lag mit 8 mM GAP bei 60 %. Der  $K_m$ -Wert für  $\text{NAD}^+$  betrug 0,47 mM (Abbildung 37 C). Der  $K_m$ -Wert für Phosphat lag bei 4,5 mM (Abbildung 37 B). Das Enzym zeigte keine Aktivität mit  $\text{NADP}^+$  (bis 5 mM), was dafür spricht, dass  $\text{NAD}^+$  der physiologische Elektronenakzeptor ist. Glycerinaldehyd (bis 50 mM) wurde von der katabolen GAP-DH nicht umgesetzt.



Das pH-Optimum des Enzyms lag zwischen pH 8 und pH 9. Bei pH 7 bzw. pH 10 wurden noch 13 % bzw. 60 % der Aktivität nachgewiesen. Maximale Enzymaktivitäten wurden bei 2 M KCl gezeigt, bei 0,5 und 4 M KCl betrug die Aktivität noch 50 %.



**Abbildung 37** Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der rekombinanten katabolen GAP-DH (*gapI*) aus *H. volcanii* von den Konzentrationen von GAP (A), Phosphat (B) und NAD<sup>+</sup> (C) bei 42 °C. In den Einschüben sind die doppelt reziproken Auftragungen nach Lineweaver-Burk dargestellt.

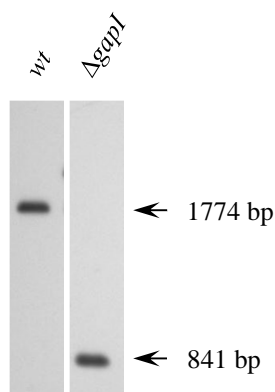
**Tabelle 13 Molekulare und kinetische Eigenschaften der rekombinanten katabolen GAP-DH aus *H. volcanii*.** Die Bestimmung der kinetischen Parameter erfolgte bei 42 °C.

Parameter	katabole GAP-DH	
Apparente molekulare Masse des Enzyms (kDa)		135
Apparente molekulare Masse der Untereinheit (kDa) <sup>1</sup>		40,5
Kalkulierte molekulare Masse der Untereinheit (kDa) <sup>2</sup>		38,5
Oligomere Struktur		$\alpha_4$
Apparenter $V_{\max}$ (U/mg)	GAP	271
Apparenter $K_m$ (mM)	GAP	1,22
	NAD <sup>+</sup>	0,47
	Phosphat	4,5

<sup>1</sup> Bestimmung über SDS-PAGE

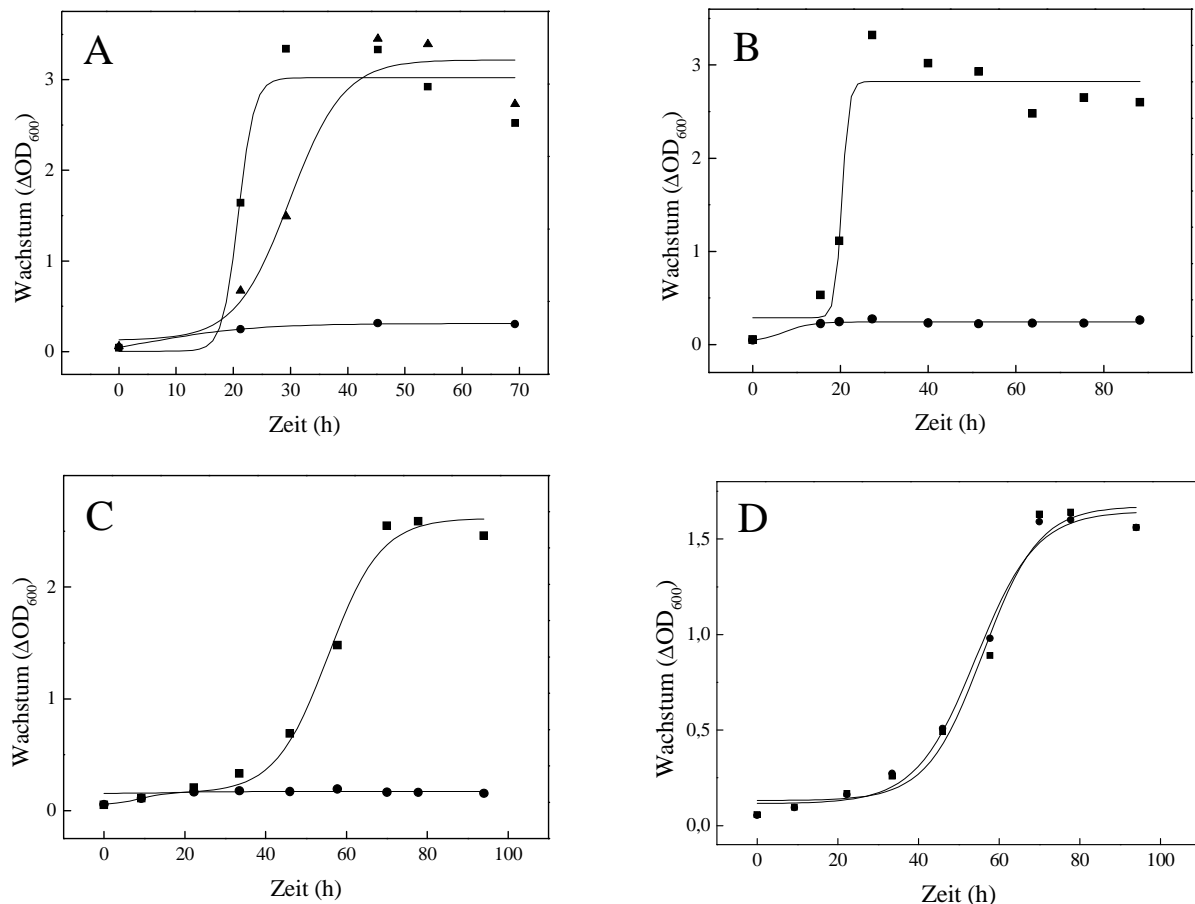
<sup>2</sup> *HVO\_0481* (www.halolex.mpg.de); mit His-tag

**Deletion und Komplementation.** Um die funktionelle Beteiligung der katabolen GAP-DH am Abbau verschiedener Zucker zu überprüfen, wurde das Gen chromosomal deletiert und das Wachstum der Mutante auf verschiedenen Kohlenstoffquellen untersucht. Southern Blot Analysen ergaben, dass 933 bp (89 %) des Gens deletiert waren (Abbildung 38).



**Abbildung 38 Southern Blot zur Überprüfung der Gendeletion von *gapI* in *H. volcanii*.** Aufgetragen wurde DNA aus dem Wildtyp (*wt*) und der Deletionsmutante ( $\Delta gapI$ ), die mit *EcoRV* und *BspHI* verdaut wurde. Anschließend wurde die DNA auf eine Membran geblottet und mit Hilfe einer Sonde, die komplementär zum 3'-untranslatierten Bereich von *gapI* war, die Deletion nachgewiesen. Der Unterschied in der Bandenhöhe entspricht der Größe des deletierten Bereichs.

Das Wachstum der Deletionsmutante wurde mit verschiedenen Kohlenstoffquellen getestet. Die Deletionsmutante wuchs nicht mehr auf Glucose. Eine *in-trans* Komplementation mit HVO\_0481 konnte das Wachstum auf Glucose wiederherstellen (Abbildung 39 A). Ebenso wuchs die Mutante nicht mehr auf Galactose und Fructose (Abbildung 39 B und C). Dagegen war das Wachstum auf Acetat (Abbildung 39 D) und Casaminosäuren (nicht gezeigt) im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert.

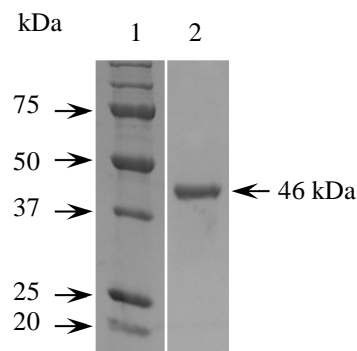


**Abbildung 39** Wachstum der *H. volcanii*  $\Delta$ HVO\_0481 Deletionsmutante auf 25 mM Glucose (A), Fructose (B), Galactose (C) oder 40 mM Acetat (D). Dargestellt ist das Wachstum der Deletionsmutante (●) im Vergleich zum Wildtyp (■) und der mit HVO\_0481 komplementierten Deletionsmutante (▲). Die Vorkulturen wurden in Medium mit 1 % Casaminosäuren angezogen. Das Wachstum wurde durch die Messung der optischen Dichte bei 600 nm analysiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass *gapI* für eine katabole GAP-DH kodiert, die essentiell am Abbau von Glucose, Galactose und Fructose beteiligt ist. Dies ist der erste funktionelle Nachweis einer katabolen GAP-DH im Zuckerstoffwechsel von Archaea.

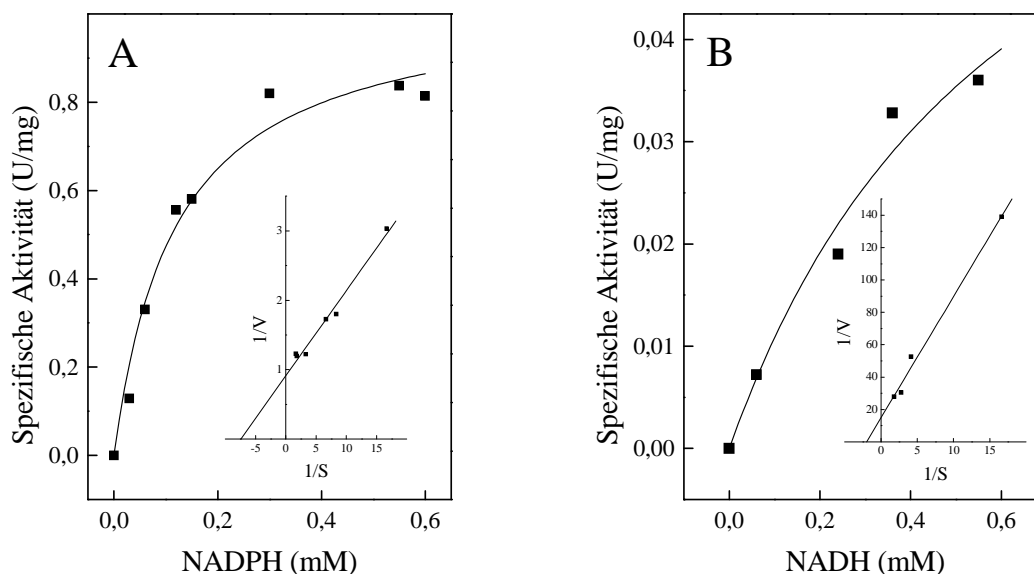
### 5.4.3 Anabole GAP-DH

**Expression, Reinigung und biochemische Charakterisierung der rekombinanten anabolen GAP-DH.** *gapII* wurde in *H. volcanii* überexprimiert und das rekombinante Protein mittels Nickel-Affinitätschromatographie und Gelfiltration bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Das apparente Molekulargewicht der Untereinheit wurde in der SDS-PAGE bestimmt und lag bei 46 kDa. Das kalkulierte Molekulargewicht der anabolen GAP-DH beträgt 39 kDa (mit His-Tag). Das native Molekulargewicht des Enzyms von 81,2 kDa wurde mittels Gelfiltration bestimmt und deutet auf eine homo-dimere Form ( $\alpha_2$ ) des Enzyms hin.



**Abbildung 40** Rekombinante anabole GAP-DH aus *H. volcanii*. SDS-PAGE nach Coomassie Brilliant Blau Färbung mit gereinigter GAP-DH, die N-terminal einen 6 x His-Tag aufweist. Die Pfeile auf der linken Seite zeigen auf die Banden der Markerproteine, der Pfeil rechts auf die gereinigte PGK. Spur 1: Molekulargewichtsstandard; Spur 2: GAP-DH nach Gelfiltration (Superdex).

Das Enzym katalysierte die NADPH- bzw. NADH- abhängige Umsetzung von 1,3-Bisphosphoglycerat zu GAP und Phosphat. Für NADPH betrug der apparente  $K_m$ -Wert 0,13 mM, der  $V_{max}$ -Wert wurde mit 1,1 U/mg bestimmt (Abbildung 41 A). Für NADH wurde ein apparenter  $K_m$ -Wert von 0,5 mM und ein  $V_{max}$ -Wert von 0,067 U/mg gemessen (Abbildung 41 B). Die katalytische Effizienz des Enzyms für NADPH ( $5,38 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ ) war damit 63-fach höher als für NADH, was NADPH als physiologischen Elektronendonator der Reaktion ausweist. Eine Aktivität in Richtung der GAP-Oxidation konnte nicht gezeigt werden. Das pH-Optimum des Enzyms wurde bei pH 8 bestimmt, mit 17 bzw. 58 % Aktivität bei pH 6 bzw. pH 8,5. Die maximale Geschwindigkeit erreichte das Enzym bei KCl-Konzentrationen von 3,5-4 M. Die Ergebnisse wurden in Tabelle 14 dargestellt.



**Abbildung 41** Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der anabolen GAP-DH aus *H. volcanii* von der Konzentration an NADPH (A) oder NADH (B) bei 42 °C. In den Einschüben sind die doppelt reziproken Auftragungen nach Lineweaver-Burk dargestellt.

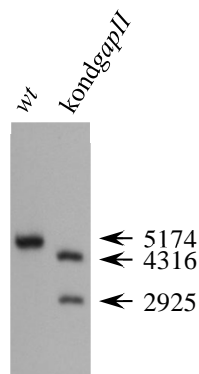
**Tabelle 14** Molekulare und kinetische Eigenschaften der rekombinanten anabolen GAP-DH aus *H. volcanii*. Die Bestimmung der kinetischen Parameter erfolgte bei 42 °C.

Parameter	anabole GAP-DH	
Apparente molekulare Masse des Enzyms (kDa)	81,2	
Apparente molekulare Masse der Untereinheit (kDa) <sup>1</sup>	46	
Kalkulierte molekulare Masse der Untereinheit (kDa) <sup>2</sup>	39	
oligomere Struktur	$\alpha_2$	
Apparenter $V_{max}$ (U/mg)	NADPH	1,1
	NADH	0,067
Apparenter $K_m$ (mM)	NADPH	0,13
	NADH	0,503
$K_{cat}/K_m$ (mM <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )	NADPH	5,38
	NADH	0,0851

<sup>1</sup> Bestimmung über SDS-PAGE

<sup>2</sup> *HVO\_0480* ([www.halolex.mpg.de](http://www.halolex.mpg.de)); mit His-tag

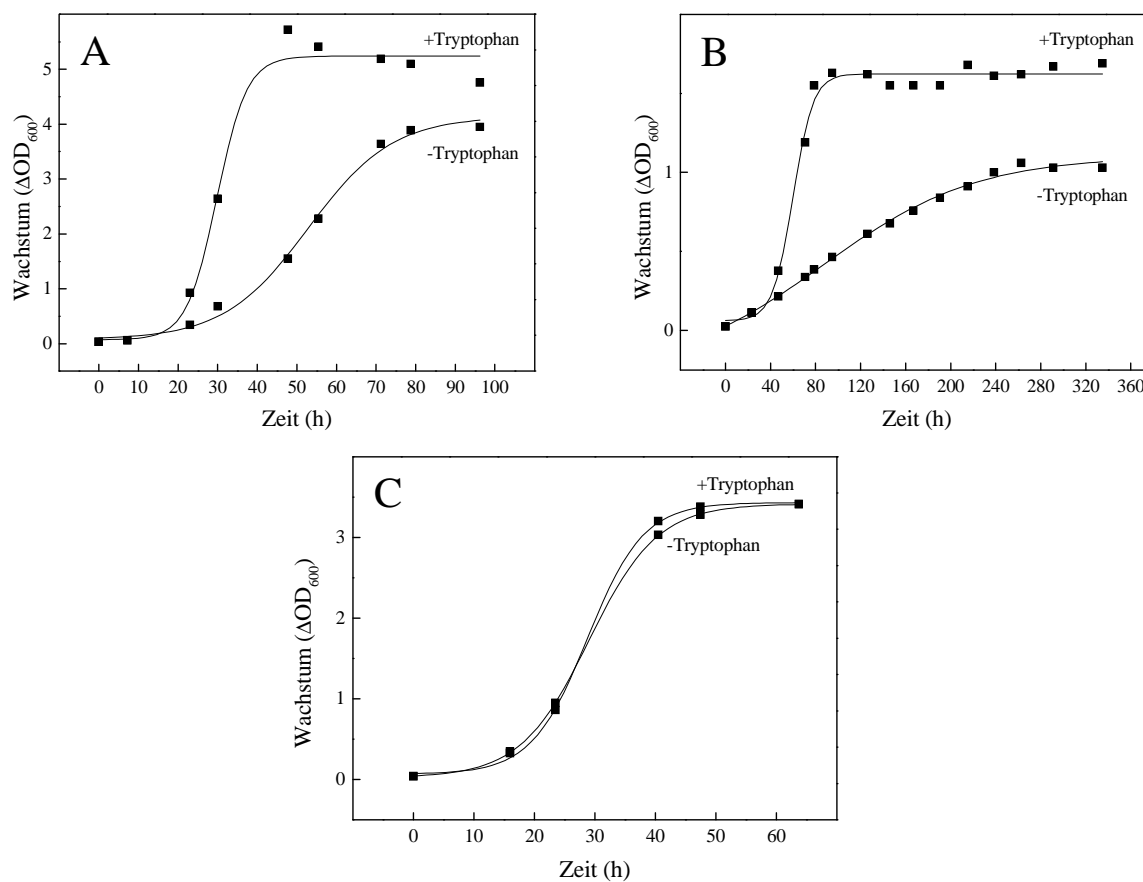
**Konditional letale Mutante.** Um die gluconeogenetische Funktion der anabolen GAP-DH zu untersuchen, wurde eine konditional letale Mutante von *gapII* hergestellt. Bei dieser Methode wurde das Wildtyp-Gen im Chromosom unter die Kontrolle eines künstlich induzierbaren Promotors gestellt. Die so hergestellte Mutante wurde mittels Southern Blot überprüft (Abbildung 42). Der Promotor konnte mit Tryptophan künstlich induziert werden, und es wurden Wachstumsexperimente mit verschiedenen Kohlenstoffquellen in Medium mit und ohne Zugabe von Tryptophan durchgeführt.



**Abbildung 42 Southern Blot zur Überprüfung der konditional letalen Mutante von *gapII* in *H. volcanii*.** Aufgetragen wurde DNA aus dem Wildtyp (*wt*) und der konditional letalen Mutante (*kondgapII*), die mit *NotI* und *BspHI* verdaut wurde. Anschließend wurde die DNA auf eine Membran geblottet und mit Hilfe einer Sonde, die komplementär zum 5'-Bereich von *gapII* war, die konditional letale Mutation nachgewiesen. In der genomischen DNA der konditional letalen Mutante, bei der der Vektor ins Genom integriert war, wurden zwei spezifische Banden nachgewiesen, da eins der Restriktionsenzyme innerhalb der Vektorsequenz schnitt.

Das Wachstum der Mutante war ohne Zugabe von Tryptophan auf Casaminsäuren deutlich verlangsamt im Vergleich zum Wachstum mit Tryptophan (Abbildung 43 A). Mit Tryptophan wuchs der Stamm bis zu einer  $OD_{600}$  von 5, ohne Tryptophan nur bis zu einer  $OD_{600}$  von 4. Die Verdopplungszeit verdreifachte sich von 5,2 h auf 13,9 h. Bei Wachstum auf Acetat, einem Substrat, das wie Casaminsäuren gluconeogenetische Reaktionen voraussetzt, wuchs die Mutante ohne Zugabe von Tryptophan nur bis zu einer  $OD_{600}$  von 1. Mit Tryptophan wuchs der Stamm hingegen bis zu einer  $OD_{600}$  von 1,6. Die Verdopplungszeit bei Wachstum auf Acetat mit Zugabe von Tryptophan betrug 14,5 h, ohne Tryptophan verfünffachte sich die Verdopplungszeit auf 74,9 h. Das Wachstum auf Glucose veränderte

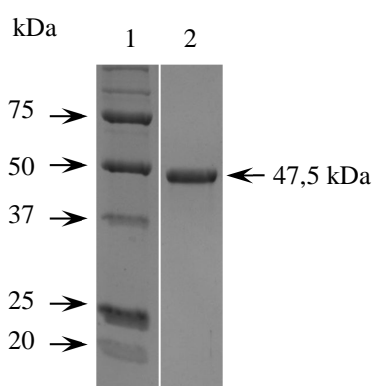
sich durch das Weglassen von Tryptophan nicht. Diese Ergebnisse sprechen für eine Beteiligung der anabolen GAP-DH ausschließlich an der Gluconeogenese.



**Abbildung 43** Wachstum der konditional letalen Mutante von *gapII* in *H. volcanii* auf 1% Casaminosäuren (A), 40 mM Acetat (B) oder 25 mM Glucose (C). Dargestellt ist das Wachstum der konditional letalen Mutante von *gapII* bei Wachstum mit und ohne 200  $\mu$ M Tryptophan im Medium. Die Vorkulturen wurden in Medium mit 1% Casaminosäuren mit Tryptophan angezogen. Das Wachstum wurde durch die Messung der optischen Dichte bei 600 nm analysiert.

#### 5.4.4 Phosphoglyceratkinase

**Expression, Reinigung und Charakterisierung der rekombinanten PGK.** Das Gen *pgk* wurde in *H. volcanii* homolog überexprimiert und das rekombinante Protein mittels Nickel-Affinitätschromatographie und Gelfiltration bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Das apparente Molekulargewicht der Untereinheit wurde über SDS-PAGE bestimmt und lag bei 47,5 kDa, was mit dem kalkulierten Molekulargewicht von 44,5 kDa (mit His-tag) übereinstimmt. Das apparente Molekulargewicht des Enzyms von 42,2 kDa wurde mittels Größenausschluss-chromatographie bestimmt, was dafür spricht, dass das Enzym in einer monomeren Form vorliegt.

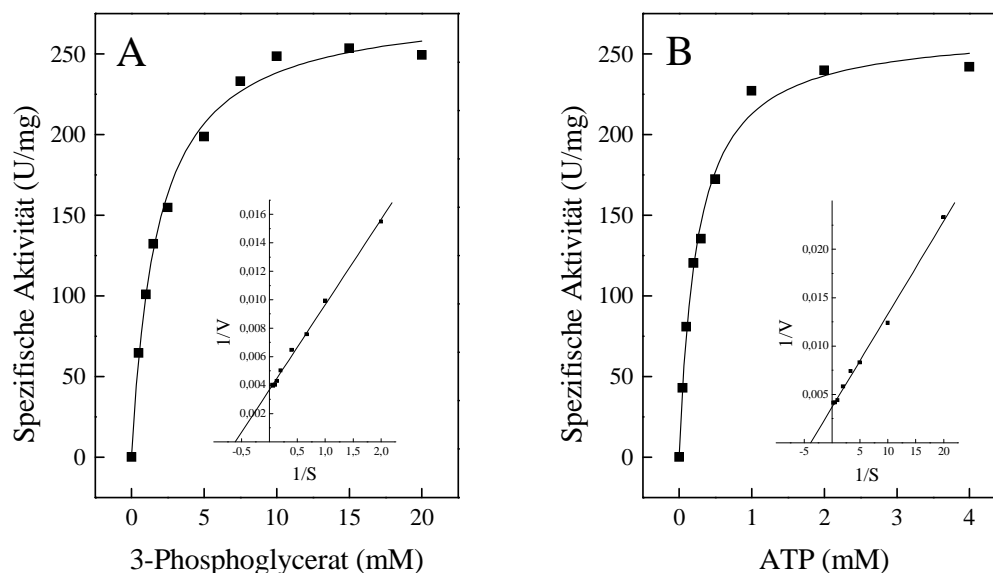


**Abbildung 44 Rekombinante Phosphoglyceratkinase aus *H. volcanii*.** SDS-PAGE nach Coomassie Brilliant Blau Färbung mit gereinigter PGK, die N-terminal einen 6 x His-Tag aufweist. Die Pfeile auf der linken Seite zeigen auf die Banden der Markerproteine, der Pfeil rechts auf die PGK. Spur 1: Molekulargewichtsstandard; Spur 2: PGK.

Die Aktivität der Phosphoglyceratkinase (PGK) wurde als ATP-abhängige Phosphorylierung von 3-Phosphoglycerat (3-PG) zu 1,3-Bisphosphoglycerat und ADP gemessen. Die apparenten  $K_m$ -Werte für 3-Phosphoglycerat und ATP betragen 1,63 mM und 0,26 mM (Abbildung 45). Der apparente  $V_{max}$ -Wert lag bei 272 U/mg (Tabelle 15). Das Enzym war abhängig von zweiwertigen Kationen. Die Zugabe von EDTA (4 mM) führte zur vollständigen Inhibition der Aktivität. Durch Zugabe von  $MgCl_2$  (6 mM) wurde die Enzymaktivität wieder hergestellt. Die höchste Aktivität der Phosphoglyceratkinase wurde mit  $Mg^{2+}$  (100 %) nachgewiesen, das effektiv durch  $Co^{2+}$  (70,5 %),  $Mn^{2+}$  (63,4 %) und  $Ca^{2+}$  (51,8 %) ersetzt werden konnte. Mit  $Ni^{2+}$  wurden 11,5 % und mit  $Zn^{2+}$  1,3 % der Aktivität detektiert, mit  $Cu^{2+}$  wurde keine Aktivität nachgewiesen.



Die Phosphoglyceratkinase Aktivität zeigte ein breites Optimum zwischen 1 und 2,5 M KCl, ohne KCl konnten noch 26 % und bei 4 M noch 50 % der Aktivität nachgewiesen werden. Das Enzym zeigte ein breites pH-Optimum zwischen pH 7 und pH 9, bei pH 6 bzw. pH 10,5 wurden 73 % bzw. 69 % der Aktivität nachgewiesen.



**Abbildung 45** Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der rekombinanten PGK aus *H. volcanii* von der Konzentration von 3-Phosphoglycerat (A) und ATP (B) bei 42 °C. In den Einschüben sind die doppelt reziproken Auftragungen nach Lineweaver-Burk dargestellt.

**Tabelle 15** Molekulare und kinetische Eigenschaften der rekombinanten PGK aus *H. volcanii*. Die Bestimmung der kinetischen Parameter erfolgte bei 42 °C.

Parameter		PGK
Apparente molekulare Masse des Enzyms (kDa)		42,2
Apparente molekulare Masse der Untereinheit (kDa) <sup>1</sup>		47,5
Kalkulierte molekulare Masse der Untereinheit (kDa) <sup>2</sup>		44,5
oligomere Struktur		$\alpha$
Apparenter $V_{\max}$ (U/mg)		271,7
Apparenter $K_m$ (mM)	3-Phosphoglycerat	1,63
	ATP	0,26

<sup>1</sup> Bestimmung über SDS-PAGE

<sup>2</sup> *HVO\_0480* ([www.halolex.mpg.de](http://www.halolex.mpg.de)); mit His-tag

## 6 Diskussion

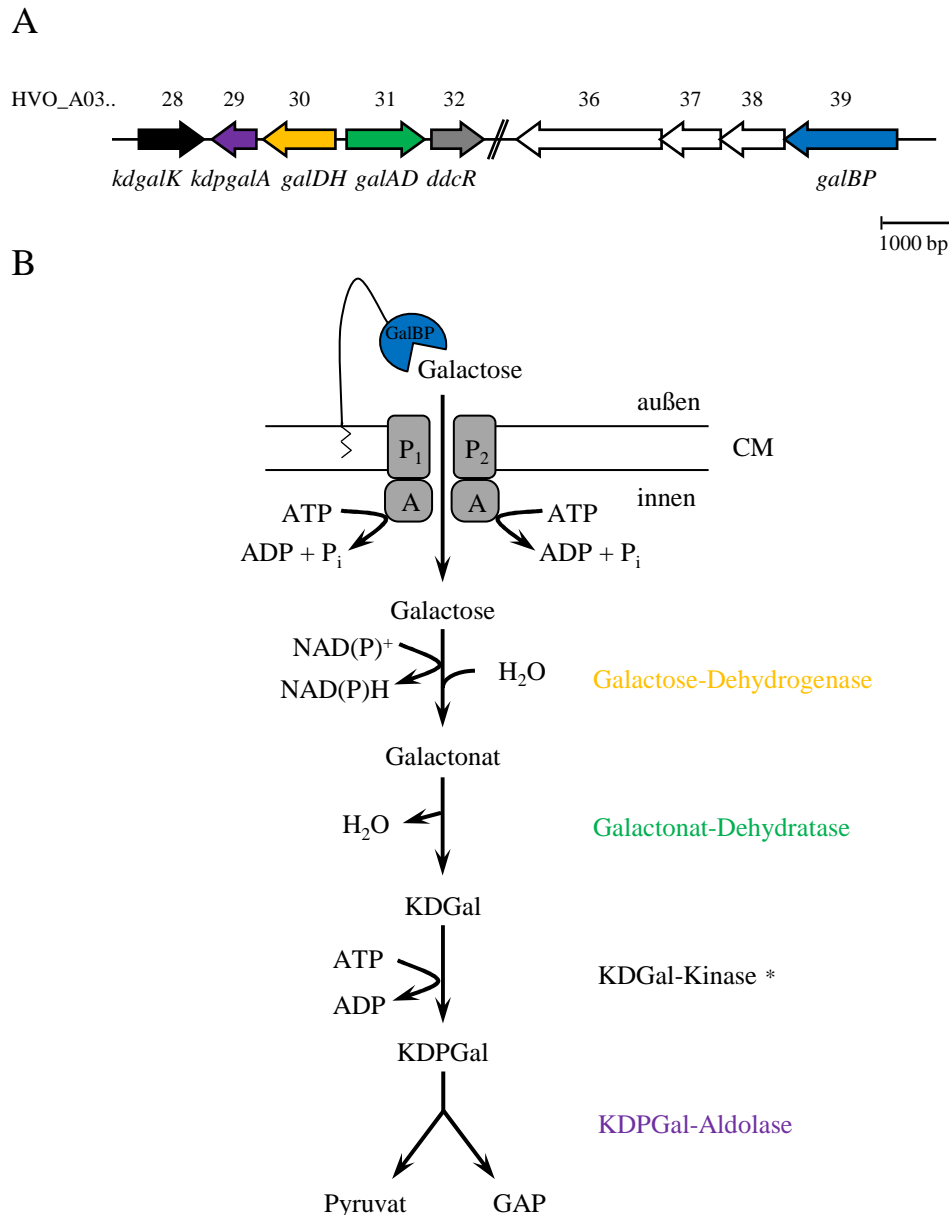
Bisherige Genomanalysen weisen darauf hin, dass *Haloferax volcanii* Galactose über den DeLey-Doudoroff-Weg abbaut. Die Enzyme und kodierenden Gene für den Transport und Abbau von Galactose wurden in *H. volcanii* bisher nicht untersucht. In einem weiteren halophilen Archaeon, *Halorhabdus utahensis*, wurde durch Genomanalysen ein Leloir-Weg für den Galactose-Abbau postuliert, die Gene und Enzyme dieses Abbauwegs wurden bisher ebenfalls nicht untersucht. In *H. volcanii* wurde für den Abbau von Glucose ein semiphosphorylierter Entner-Doudoroff-Weg vorgeschlagen, das Schlüsselenzym, die KDPG-Aldolase, wurde bisher nicht umfassend charakterisiert. Des Weiteren wurde die GAP-Oxidation in halophilen Archaea kaum untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Ergebnisse erzielt.

- 1) Die Beteiligung eines Galactose-spezifischen ABC-Transporters am Transport von Galactose wurde gezeigt. Weiterhin wurde die Beteiligung der Enzyme Galactose-Dehydrogenase (GalDH), Galactonat-Dehydratase (GalAD) und KDPGal-Aldolase (KDPGalA) am Abbau von Galactose über den DeLey-Doudoroff-Weg in *H. volcanii* nachgewiesen und eine Galactose-spezifische transkriptionelle Induktion dieser Gene gezeigt.
- 2) Erste Untersuchungen mit einem putativen Transkriptionsregulator DdcR deuten auf eine transkriptionelle Aktivierung der Gene des Galactose-Abbaus durch DdcR hin.
- 3) Die annotierte Galactokinase aus *H. utahensis* wurde als katalytisch aktive Galactokinase charakterisiert.
- 4) Das Schlüsselenzym des Glucose-Abbaus über den semi-phosphorylierten ED-Weg, die KDPG-Aldolase aus *H. volcanii*, wurde charakterisiert und die Rolle im Glucose-Abbau analysiert.
- 5) Die Enzyme der GAP-Oxidation zu 3-Phosphoglycerat aus *H. volcanii* wurden untersucht und es konnte der erste funktionelle Nachweis einer katabolen GAP-DH in der Domäne der Archaea erbracht werden. Außerdem wurden eine Phosphoglyceratkinase und eine anabole GAP-DH charakterisiert.

## 6.1 D-Galactose-Abbau in *Haloferax volcanii*

Ausgehend von Genominformationen (Anderson et al. 2011) wurden die Gene und Enzyme aus *H. volcanii*, die am Transport und Abbau von Galactose beteiligt sind, charakterisiert und identifiziert. Dazu wurden Aktivitätsmessungen in Zellextrakten, Transkriptionsanalysen und Wachstumsversuche mit Deletionsmutanten durchgeführt und die beteiligten Enzyme charakterisiert (Abbildung 46). Die Daten deuten darauf hin, dass Galactose zunächst über einen ABC-Transporter in die Zelle aufgenommen und anschließend durch die Enzyme des DD-Wegs zu Pyruvat und GAP umgesetzt wird. Dabei wird Galactose zunächst von der Galactose-Dehydrogenase zu Galactonat oxidiert, welches dann unter Wasserabspaltung von der Galactonat-Dehydratase zu KDGal umgewandelt wird. KDGal wird von der KDGal-Kinase zu KDPGal phosphoryliert, welches von der KDPGal-Aldolase in GAP und Pyruvat gespalten wird. Außerdem wurde nachgewiesen, dass ein Transkriptionsregulator als Aktivator auf die Transkription von *galAD*, dem Gen der Galactonat-Dehydratase, wirkt.

Im Folgenden werden die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zu den einzelnen Proteinen des Galactose-Transports und -Abbaus diskutiert. Dabei werden die Proteine des Galactose-Abbaus aus *H. volcanii* mit beschriebenen Enzymen des Galactose-Abbaus aus Bacteria und Eukarya und des Glucose/Galactose-Abbaus aus Archaea verglichen. Durch bioinformatische Analysen werden die Proteine phylogenetisch eingeordnet.



**Abbildung 46 Genomumgebung der Gene des D-Galactose-Abbaus (A) und schematische Darstellung des Galactose Transports und Abbaus über den DeLey-Doudoroff-Weg (B) in *H. volcanii*.** (A) Die offenen Leserähmen (ORFs) sind als Pfeile dargestellt. Die Gene kodieren für die Proteine KDGal-Kinase (*kdgalK*), KDPGal-Aldolase (*kdpgalA*), Galactose-Dehydrogenase (*galDH*), Galactonate-Dehydratase (*galAD*) und einen putativen Transkriptionsregulator (*ddcR*), sowie die Gene eines ABC-Transporters: Ein ATP-Bindeprotein (HVO\_A0336), zwei Permeasen (HVO\_A0337 (P<sub>1</sub>) und HVO\_A0338 (P<sub>2</sub>)) und das Substrat-Bindeprotein (*galBP*). Die Gene, deren Funktionen nachgewiesen wurden, wurden farbig markiert. Der Maßstab entspricht einer Länge von 1000 bp. (B) Schematisch gezeigt wird die Aufnahme von Galactose über einen ABC-Transporter und die Oxidation von Galactose zu Pyruvat und GAP über die Enzyme des DeLey-Doudoroff-Wegs. Die Farben der untersuchten Proteine entsprechen denen der in (A) dargestellten Gene. Verwendete Abkürzungen: GalBP, Galactose-Bindeprotein; CM, Cytoplasmamembran; P, Permease; A, ATPase; KDGal, 2-Keto-3-Desoxygalactonate; KDPGal, 2-Keto-3-Desoxy-6-Phosphogalactonate; GAP, Glycerinaldehyd-3-Phosphat. \* Die KDGal-Kinase wurde bereits charakterisiert (Pickl et al. 2014).

### 6.1.1 Galactose-Transport

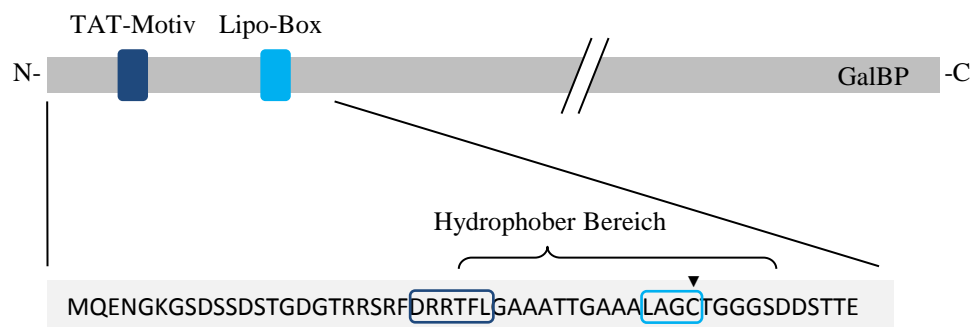
In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das Gen des Substratbindeproteins eines ABC-Transporters bei Wachstum auf Galactose transkribiert wird. Eine Deletionsmutante des Substratbindeproteins zeigte auf Galactose ein deutlich verlangsamtes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp. Das Wachstum auf Glucose war nicht beeinflusst. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Galactose-Bindeprotein und der entsprechende ABC-Transporter am Transport von Galactose beteiligt sind. Die Tatsache, dass das Wachstum der Deletionsmutante nur teilweise eingeschränkt war, deutet darauf hin, dass der Transport von Galactose in der Deletionsmutante auch durch andere Transporter katalysiert werden kann.

ABC-Transporter sind aus zwei membranintegralen Permeasen, zwei cytoplasmatischen ATPasen und einem extrazellulären Substratbindeprotein aufgebaut. Transportproteine werden im Allgemeinen über die Transmembranproteine klassifiziert (Zheng et al. 2013). Über Blast Analysen in der Transporter Classification Database wurden die Permeasen des Galactose-ABC-Transporters der Peptide/Opine/Nickel Uptake Transporter (PepT) Familie (TC 3.A.1.5) zugeordnet, zu der z. B. Oligopeptid-Transporter wie der Glutathion-Transporter aus *E. coli* gehören (Suzuki et al. 2005). Zu der PepT Familie gehören auch archaelle Disaccharid-Transporter aus *P. furiosus* und *S. solfataricus* (Elferink et al. 2001; Koning et al. 2001).

Im Gegensatz zu dem Galactose-Transporter aus *H. volcanii* werden die beiden bisher in Archaea bekannten Monosaccharid-Transporter für Glucose bzw. Arabinose aus dem Crenarchaeoten *S. solfataricus* in die Carbohydrate Uptake Transporter 1 (CUT-1) Familie eingeordnet. Beide Substratbindeproteine aus *S. solfataricus* zeigten ein breites Substratspektrum, wobei das Glucose-Bindeprotein auch Galactose binden konnte (Albers et al. 1999; Elferink et al. 2001). In *S. solfataricus* wurde außerdem gezeigt, dass das Glucose Bindeprotein konstitutiv exprimiert wird (Lubelska et al. 2006). So könnten auch in *H. volcanii* bei Wachstum auf Galactose andere Transporter exprimiert werden, die den Galactose-Transport teilweise übernehmen.

Extrazelluläre Proteine aus halophilen Archaea werden oftmals über das TAT-System aus der Zelle transportiert (Storf et al. 2010). Dabei werden die Proteine, im Gegensatz zum klassischen Sec-vermittelten Transport, der in Bacteria weiter verbreitet ist, im gefalteten Zustand über die Membran transportiert (Robinson und Bolhuis 2004). Eine Nutzung des TAT-Systems hat in einem salzhaltigen Milieu den Vorteil, dass die an hohe Salzkonzentrationen angepassten Proteine durch eine korrekte intrazelluläre Faltung stabilisiert werden und gleichzeitig eine Aggregation der Proteine verhindert wird (Albers et

al. 2004; Rose et al. 2002). Mittels Aminosäure-Sequenzanalysen wurde eine N-terminale Signalsequenz für eine Twin-Arginin-Translokation (TAT) im Galactose-Bindeprotein aus *H. volcanii* nachgewiesen. In der Aminosäuresequenz wurden ein für das TAT-Transportsystem typisches Twin-Arginin-Sequenzmotiv (D-R-R-T-F-L), sowie ein typischer hydrophober Bereich nachgewiesen. In dem hydrophoben Bereich befindet sich außerdem eine Lipobox (L-A-G-C) mit einem konservierten Cystein (Abbildung 47). Dieses konservierte Cystein wird vor dem Abschneiden der Signalsequenz mit einem Lipid-Anker gekoppelt, der vermutlich für die Verankerung des Bindeproteins in der Membran verantwortlich ist (Storf et al. 2010).



**Abbildung 47 Schematische Darstellung des Galactose-Bindeproteins mit N-terminalen Sequenzmotiven.** Dargestellt ist GalBP schematisch als Pfeil mit dem Twin-Arginin-Motiv (TAT-Motiv, dunkelblau) und der Lipobox (hellblau) mit dem konservierten Cystein (▼). Der hydrophobe Bereich (TFLGAAATTGAAALAGCTGGGS) wurde mit einer Klammer gekennzeichnet. Die konservierten Sequenzmotive wurden über <http://signalfind.org/tatlipo.html> und <http://signalfind.org/tatfind.html> identifiziert.

### 6.1.2 Galactose-Dehydrogenase

Enzymmessungen in Zellextrakten und Transkriptanalysen haben ergeben, dass die Galactose-Dehydrogenase (GalDH) aus *H. volcanii* bei Wachstum auf Galactose im Vergleich zu Glucose spezifisch induziert wird. Eine Deletionsmutante der Galactose-Dehydrogenase wuchs nicht mehr auf Galactose, das Wachstum auf Glucose war nicht verändert. Diese Ergebnisse zeigen eine essentielle Beteiligung der GalDH am Abbau von Galactose in *H. volcanii*.

Die gereinigte homo-dimere Galactose-Dehydrogenase (76 kDa) zeigte eine 230-fach höhere katalytische Effizienz für den Cofaktor  $\text{NADP}^+$  als für  $\text{NAD}^+$ , was  $\text{NADP}^+$  als physiologischen Elektronenakzeptor ausweist. Das Enzym setzte mit etwa gleichen katalytischen Effizienzen D-Galactose und L-Arabinose um, D-Glucose wurde kaum umgesetzt (Tabelle 16). Bisher wurden Galactose-Dehydrogenasen des DeLey-Doudoroff-Wegs aus den Bacteria *Pseudomonas fluorescens*, *Pelomonas saccharophila* und *Azotobacter vinelandii* genauer untersucht (Tabelle 16) (Blachnitzky et al. 1974; Wengenmayer et al. 1973; Wong und Yao 1994). Diese Galactose-Dehydrogenasen setzten, wie die GalDH aus *H. volcanii*, Galactose um, nicht jedoch Glucose. Außerdem zeigten sie mehrheitlich ebenfalls eine Bevorzugung für  $\text{NADP}^+$  (Tabelle 16).

Die Galactose-Dehydrogenase aus *H. volcanii* wurde durch eine Conserved Domain Search (Marchler-Bauer et al. 2015) in die GFO/IDH/MocA-Familie eingeordnet, zu der auch die Galactose-Dehydrogenase aus *P. fluorescens* gehört (Blachnitzky et al. 1974; Sperka et al. 1989). In einem multiplen Aminosäure-Sequenzalignment wurde die Galactose-Dehydrogenase mit der charakterisierten D-Galactose-Dehydrogenase aus *P. fluorescens*, sowie der Glucose-Fructose-Oxidoreductase (GFOR) aus *Z. mobilis* verglichen (Abbildung 48). Die GFOR aus *Z. mobilis* gehört ebenfalls zur GFO/IDH/MocA-Familie (Wiegert et al. 1997). Ein für diese Proteinfamilie typisches Konsensusmotiv (AGKHVxCEKP) wurde mit leichten Abweichungen auch in der halophilen GalDH nachgewiesen (Wiegert et al. 1997). Mit Hilfe der Struktur der GFOR aus *Z. mobilis* und einer vorhergesagten Sekundärstruktur der GalDH aus *H. volcanii* wurde außerdem ein  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ -Strukturmotiv in der N-terminalen Region nachgewiesen. Dieses weist auf eine typische Dinucleotid-Bindestelle (Rossmann Fold) hin (Hanukoglu and Gutfinger 1989; Wierenga et al. 1985).

**Tabelle 16 Molekulare und katalytische Eigenschaften archaeller und bakterieller Galactose- und Glucose-Dehydrogenasen im Vergleich.** Galactose-Dehydrogenasen aus *Haloferax volcanii* (*Hvo*, HVO\_A0330), *Pseudomonas fluorescens* (*Pfl*, gi:120937, Blachnitzky et al. 1974); *Pelomonas saccharophila* (*Psa*, gi: ---, Wengenmayer et al. 1973), *Azotobacter vinelandii* (*Avi*, gi: ---, Wong and Yao 1994); Glucose/Galactose-Dehydrogenasen aus *Thermoplasma acidophilum* (*Tac*, gi:11467946 Smith et al. 1989), *Sulfolobus solfataricus* (*Sso*, gi:15899711, Lamble et al. 2003) und *Picrophilus torridus* (*Pto*, gi:48430790, Angelov et al. 2005). n.b. = nicht bestimmt.

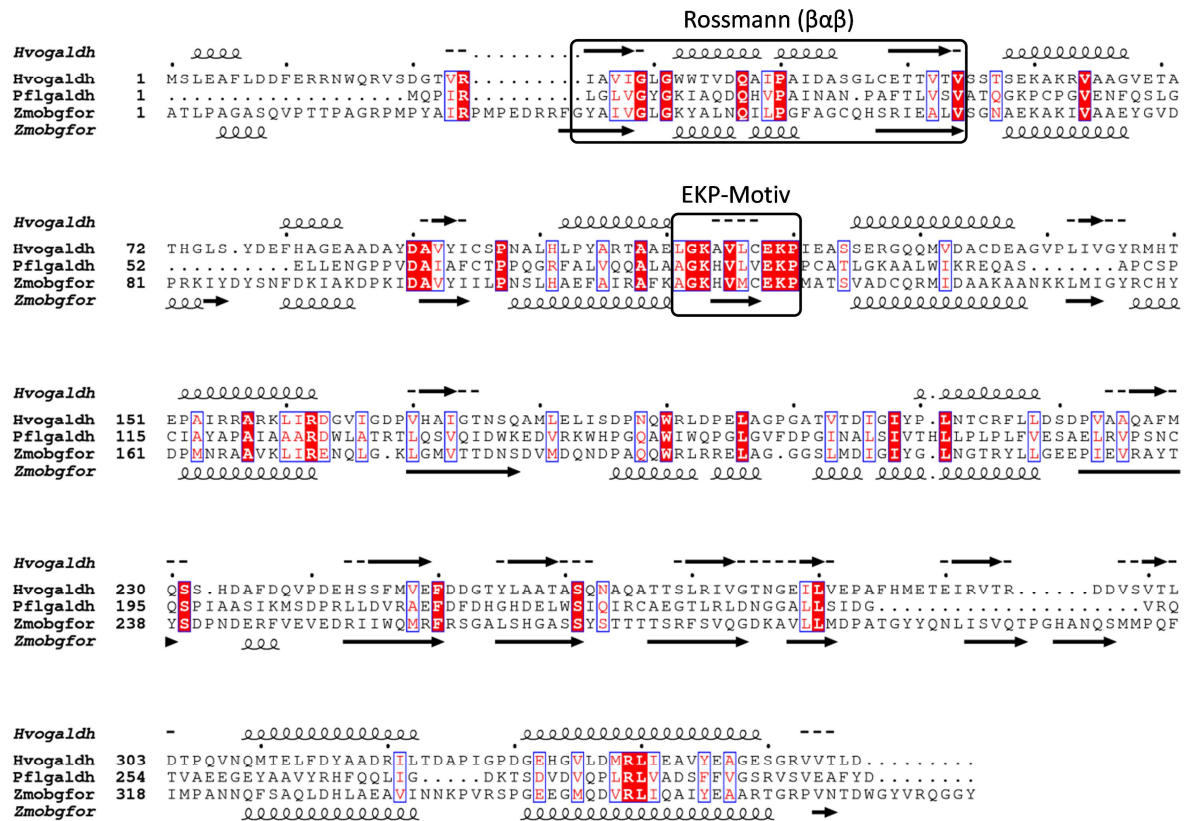
Organismus	GalDH				Glc/GalDH		
	<i>Hvo</i>	<i>Pfl</i>	<i>Psa</i>	<i>Avi</i>	<i>Tac</i>	<i>Sso</i>	<i>Pto</i>
<b>Familie</b>	GFO	GFO	n.b.	n.b.	MDR	MDR	MDR
<b>Natives Enzym</b>	76	64	103	74	155	160	160
<b>Untereinheit</b>	39,6	32	25	n.b.	38	41	41
<b>Oligomere Struktur</b>	$\alpha_2$	$\alpha_2$	$\alpha_4$	n.b.	$\alpha_4$	$\alpha_4$	$\alpha_4$
<b>Cofaktor</b>	NADP <sup>+</sup>	NADP <sup>+</sup> NAD <sup>+</sup>	NADP <sup>+</sup>	NAD <sup>+</sup>	NADP <sup>+</sup>	NADP <sup>+</sup> NAD <sup>+</sup>	NADP <sup>+</sup>
<b>Galactose</b>	+	+	+	+	+	+	+
<b>Glucose</b>	-	-	-	-	+	+	+

Für thermoacidophile Archaea wurde postuliert, dass Galactose, wie Glucose, über die Enzyme des semiphosphorylierten ED-Wegs abgebaut wird. Die bisher charakterisierten Glucose/Galactose-Dehydrogenasen der modifizierten ED-Wege aus Archaea gehören zu der medium chain Dehydrogenase/Reductase (MDR)-Familie (Angelov et al. 2005; Lamble et al. 2003; Smith et al. 1989). Sie setzen neben Glucose auch Galactose um und unterscheiden sich damit von der GalDH aus *H. volcanii* und den bisher aus Bacteria bekannten Galactose-Dehydrogenasen, die Galactose aber nicht Glucose umsetzen (Tabelle 16).

Außerdem wurde mittlerweile die Glucose-Dehydrogenase des spED-Wegs aus *H. volcanii* identifiziert. Sie setzte spezifisch Glucose um, Galactose wurde nicht umgesetzt (AG Schönheit, unveröffentlicht).



Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen, dass die charakterisierte GalDH essentiell am Abbau von D-Galactose über den DD-Weg beteiligt ist. Dies ist der erste funktionelle Nachweis einer Galactose-Dehydrogenase in der Domäne der Archaea.



**Abbildung 48** Aminosäure-Sequenz-Alignment der Galactose-Dehydrogenase aus *H. volcanii* mit charakterisierten Dehydrogenasen der GFO/IDH/MocA-Familie. Das Alignment wurde mit ClustalX durchgeführt (Larkin, 2007), die Darstellung von Alignment und Sekundärstrukturen erfolgte mittels ESPript3.0 (<http://espript.ibcp.fr>; Robert and Gouet 2014). Identische Aminosäuren sind rot hinterlegt. Die Sekundärstruktur der Galactose-Dehydrogenase aus *H. volcanii* wurde mit Pspired vorhergesagt (Buchan et al. 2013; Jones 1999) und über dem Alignment dargestellt. Die Sekundärstruktur der GFOR aus *Z. mobilis* ist unter dem Alignment dargestellt (Nurizzo et al. 2001). Die Dinucleotid-Bindestelle (Rossmann-Motiv) und das konservierte EKP-Motiv wurden mit einer Box umrahmt. Verwendete Sequenzen aus *Haloferax volcanii* (Hvogal dh, HVO\_A0330), *Pseudomonas fluorescens* (Pflgal dh, gi120937) und *Zymomonas mobilis* (Zmobgfor, gi17942853, PDB ID: 1H6D).

### 6.1.3 Galactonat-Dehydratase

Durch Enzymmessungen in Zellextrakten und Transkriptionsanalysen wurde eine Galactose-spezifische Induktion der Galactonat-Dehydratase (GalAD) im Vergleich zu Glucose gezeigt. Eine *galAD* Deletionsmutante wuchs nicht mehr auf Galactose, das Wachstum auf Glucose war nicht verändert. Damit wurde eine essentielle Beteiligung der Galactonat-Dehydratase am Galactose-Abbau in *H. volcanii* nachgewiesen.

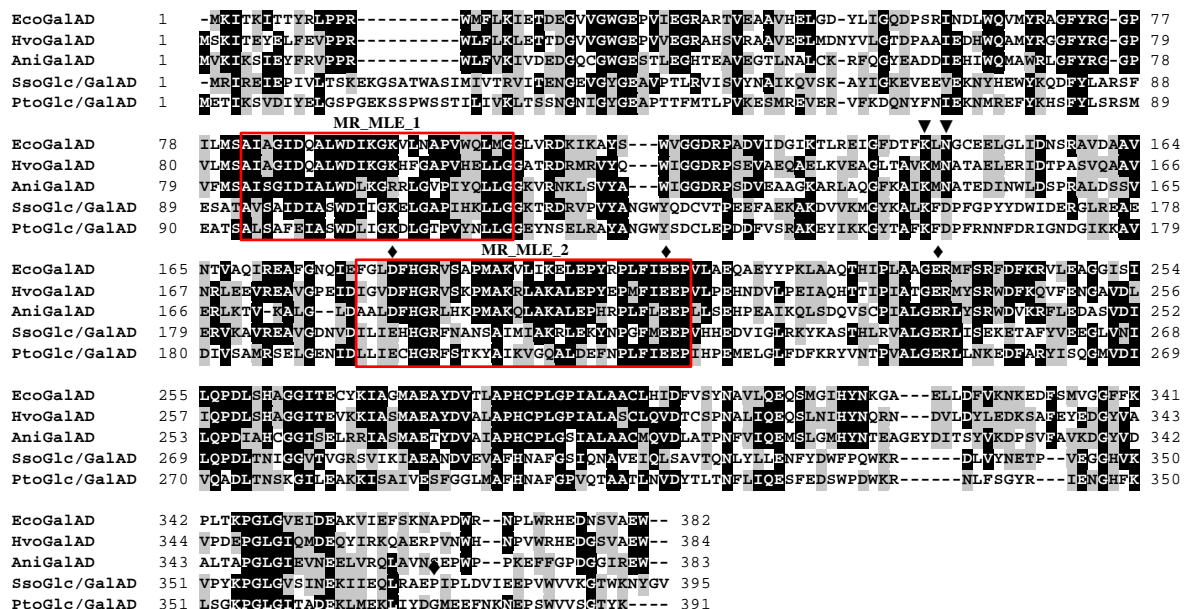
Das gereinigte homo-oktamere Enzym setzte D-Galactonat um und die Aktivität war abhängig von zweiwertigen Kationen. Mit D-Gluconat wurde keine Aktivität nachgewiesen. Damit zeigte die GalAD ähnliche biochemische Eigenschaften wie die schon charakterisierten Galactonat-Dehydratasen aus *E. coli*, *Mycobacterium butyricum* und dem filamentösen Pilz *Aspergillus niger* (Deacon and Cooper 1977; Elshafei et al. 1995; Szumilo 1981b). Alle bisher genannten Galactonat-Dehydratasen zeigten eine hohe Spezifität für D-Galactonat. D-Gluconat wurde nicht umgesetzt (Babbitt et al. 1995; Motter et al. 2014; Szumilo 1981b). Die GalAD aus *H. volcanii* weist eine hohe Aminosäuresequenz-Identität zu den Galactonat-Dehydratasen aus *E. coli* (57 %) und *A. niger* (48 %) auf.

Im Gegensatz zu den Galactonat-Dehydratasen aus *H. volcanii*, Bacteria und Eukarya setzte die aus *H. volcanii* charakterisierte Gluconat-Dehydratase (GlcAD) spezifisch D-Gluconat um (Sutter, 2010). Die aus den thermoacidophilen Archaea *S. solfataricus* und *P. torridus* bekannten Gluconat/Galactonat-Dehydratasen (Glc/GalAD) der modifizierten ED-Wege setzten hingegen sowohl Gluconat als auch Galactonat um (Lamble et al. 2004; Reher et al. 2010). Zu der GlcAD aus *H. volcanii* und zu den Glc/GalADs aus thermoacidophilen Archaea wies die GalAD aus *H. volcanii* nur 25-30 % Sequenzidentität auf.

Aminosäuresequenzanalysen der GalAD aus *H. volcanii* zeigten zwei konservierte Sequenzmotive, MR\_MLE\_1 (PS00908) und MR\_MLE\_2 (PS00909), durch weitere Sequenzvergleiche wurde die GalAD innerhalb der Enolase-Superfamilie der MR-like Subfamilie zugeordnet (<http://prosite.expasy.org>). Die Enolase-Superfamilie besteht neben der MR-like Subfamilie aus drei weiteren Subfamilien, der Enolase-like, MAL-like (3-Methylaspartate ammonia lyase) und MLE-like- (muconate lactonizing enzyme) Subfamilie. Die Mitglieder der Enolase-Superfamilie weisen den gleichen Reaktionsmechanismus der Dehydratisierung auf, dabei wird zunächst die Abspaltung eines  $\alpha$ -Protons von einem Carboxylat-Anion katalysiert, wodurch ein durch ein divalentes Kation stabilisiertes Enol als Intermediat gebildet wird (Gerlt et al. 2005; Wichelecki et al. 2014). Die bisher genannten Zuckersäure-Dehydratasen aus Bacteria, Archaea und Eukarya gehören alle zur MR-like Subfamilie der Enolasen.

In einem Aminosäure-Sequenzalignment wurde die Galactonat-Dehydratase aus *H. volcanii* mit charakterisierten Galactonat- oder Gluconat/Galactonat-Dehydratasen verglichen (Abbildung 49). Die bakteriellen Galactonat-Dehydratasen bilden innerhalb der MR-like Subfamilie eine eigene Untergruppe, die ein Lys-X-Asp Motiv aufweisen, welches auch in der GalAD aus *H. volcanii* vorhanden ist (Babbitt et al. 1996; Gerlt et al. 2005; Wiczorek et al. 1999). In den Glc/GalADs aus thermoacidophilen Archaea ist dieses Lys-X-Asp Motiv hingegen nicht vorhanden.

Mit den erzielten Ergebnissen wurde gezeigt, dass die GalAD aus *H. volcanii*, wie die aus Bacteria und Eukarya bekannten Galactonat-Dehydratasen, spezifisch Galactonat umsetzt. Die Galactonat-Dehydratase aus *H. volcanii* ist essentiell an der Umsetzung von Galactose über einen DeLey-Doudoroff-Weg beteiligt.



**Abbildung 49** Aminosäuresequenz-Alignment der Galactonat-Dehydratase aus *H. volcanii* mit Galactonat-Dehydratasen aus Bacteria und Eukarya, sowie mit Gluconat/Galactonat-Dehydratasen aus Archaea. Das Alignment wurde mit ClustalX erstellt (Larkin et al. 2007). Identische Aminosäuren sind schwarz hinterlegt. Rot umrandet sind die Konsensusmotive MR\_MLE\_1 (PS00908) bzw. MR\_MLE\_2 (bzw. PS00909). Konservierte Reste, die an der Bindung des divalenten Kations beteiligt sind (♦) (Babbitt et al. 1996) und das Lys-X-Asp-Motiv, welches spezifisch in Galactonat-Dehydratasen aus Bacteria und Eukarya gefunden wird (▼) wurden über dem Alignment gekennzeichnet (Babbitt et al. 1996). Verwendete Sequenzen von Galactonat-Dehydratasen: *Escherichia coli* (*EcoGalAD*, gi|49176390), *Haloferax volcanii* (*HvoGalAD*, HVO\_A0331); *Aspergillus niger* (*AniGalAD* gi|350630697); Gluconat/Galactonat-Dehydratasen: *Sulfolobus solfataricus* (*SsoGlc/GalAD*, gi|13816633) und *Picrophilus torridus* (*PtoGlc/GalAD*, gi|74567983).

#### 6.1.4 KDPGal-Aldolase und KDPG-Aldolase

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die KDPGal-Aldolase essentiell am Abbau von Galactose über den DeLey-Doudoroff-Weg beteiligt ist. Die Transkription des Gens der KDPGal-Aldolase war bei Wachstum auf Galactose im Vergleich zu Glucose induziert. Außerdem wurde gezeigt, dass die KDPGal-Aldolase Deletionsmutante nicht mehr auf Galactose wachsen konnte. Bei Wachstum auf Glucose zeigte sich keine Veränderung im Wachstum. Die KDPGal-Aldolase wurde zudem gereinigt und charakterisiert. Das Enzym setzte sowohl KDPGal als auch KDPG mit ähnlicher katalytischer Effizienz um. KDGal und KDGal wurden nicht umgesetzt.

Auch wurde die KDPG-Aldolase, das Schlüsselenzym des semiphosphorylierten ED-Wegs, charakterisiert. Das Enzym setzte spezifisch KDPG um. KDPGal und KDGal wurden nicht mit signifikanten Raten umgesetzt. Eine Deletionsmutante der KDPG-Aldolase ( $\Delta kdpG$ ) wuchs auf Galactose wie der Wildtyp. Auf Glucose wuchs die Deletionsmutante zunächst nicht, was auf eine essentielle Beteiligung der KDPG-Aldolase am spED-Weg schließen lässt. Es wurde jedoch festgestellt, dass  $\Delta kdpG$  nach ca. 100 h wieder auf Glucose wachsen konnte (Abbildung 30). Wachstumsanalysen einer Doppel-Deletionsmutante und Transkriptionsanalysen zeigten, dass die KDPG-Aldolase unter diesen Bedingungen funktionell durch die KDPGal-Aldolase ersetzt werden konnte. Diese Ersetzbarkeit ist möglich, da die KDPGal-Aldolase sowohl KDPG als auch KDPGal umsetzen konnte. Die KDPGal-Aldolase wird im Wildtyp allerdings nur bei Wachstum auf Galactose induziert, das heißt es muss in der Mutante  $\Delta kdpG$  eine Deregulation der Expression der KDPGal-Aldolase stattgefunden haben. Die molekularen Ursachen dieser Deregulation der KDPGal-Aldolase in  $\Delta kdpG$  sind bisher nicht untersucht.

Die Untereinheiten beider in dieser Arbeit charakterisierten Aldolasen des DD-Wegs bzw. des spED-Wegs weisen mit 22,1 (KDPGal-Aldolase) bzw. 22,4 kDa (KDPG-Aldolase) ähnliche Größen auf. Ebenfalls weisen beide eine ungewöhnliche Oligomerisierung als Homo-Nonamer ( $\alpha_9$ , KDPGal-Aldolase) bzw. als Homo-Dodecamer ( $\alpha_{12}$ , KDPG-Aldolase) auf. Sie weisen eine Aminosäuresequenz-Identität von 47 % zueinander auf.

Aktivitäten von KDPGal- bzw. KDPG-Aldolasen des DD- bzw. ED-Wegs wurden in verschiedenen Bacteria, wie z. B. *Pelomonas saccharophila*, *E. coli* und weiteren Organismen nachgewiesen. Ähnlich zu den Ergebnissen aus *H. volcanii* wurde in diesen Organismen gezeigt, dass die KDPGal-Aldolase Aktivität bei Wachstum auf Galactose bzw. Galactonat induzierbar war. Die KDPG-Aldolase Aktivität war hingegen konstitutiv vorhanden (Cotterill et al. 1998; Shuster und Doudoroff 1967).

Die KDPGal- und KDPG-Aldolasen aus *H. volcanii* zeigten hohe Aminosäure-Sequenzidentitäten zu der bisher charakterisierten bakteriellen KDPGal-Aldolase aus *E. coli* und zu den KDPG-Aldolasen aus *T. maritima* und *E. coli* (23-34 %). Die KDPGal-Aldolase aus *E. coli* weist eine homo-trimere Struktur auf und besteht aus 21,4 kDa Untereinheiten, sie setzt spezifisch KDPGal um. (Walters et al. 2008). Die aus mehreren Bacteria wie *E. coli*, *Zymomonas mobilis* und *Thermotoga maritima* bekannten KDPG-Aldolasen weisen ebenfalls eine homo-trimere Quartärstruktur auf und setzen sich aus Untereinheiten von 21,5-24 kDa zusammen. (Bell et al. 2003; Conway et al. 1991; Griffiths et al. 2002; Ryu et al. 2010; Wymer et al. 2001). Für die KDPG-Aldolase aus *E. coli* wurde eine hohe Spezifität für KDPG nachgewiesen (Walters et al. 2008). Im Gegensatz zu den bakteriellen homo-trimeren KDPGal- und KDPG-Aldolasen weisen die beiden haloarchaeellen Aldolasen eine ungewöhnliche Oligomerisierung als Homo-Nonamer oder Homo-Dodecamer auf, was darauf hindeutet, dass sie aus einem Proteinkomplex aus drei oder vier Trimeren bestehen.

In einem Aminosäuresequenz-Alignment wurden die beiden haloarchaeellen Aldolasen mit den bakteriellen Aldolasen verglichen (Abbildung 50). Alle bisher charakterisierten KDPG- und KDPGal-Aldolasen der Bacteria als auch die beiden aus *H. volcanii* charakterisierten Aldolasen gehören zu den Klasse I Aldolasen, die ein katalytisches Lysin im aktiven Zentrum aufweisen (Fullerton et al. 2006). Außerdem weisen die bisher identifizierten bakteriellen KDPGal- und KDPG-Aldolasen Konsensussequenzen (PS00159 und PS00160) auf, die mit leichten Abweichungen auch in den haloarchaeellen Aldolasen nachgewiesen werden konnten. Diese Konsensusmotive sind typisch für Aldolasen der KDPG/KHG-Familie. Aufgrund der Kristallstruktur von *T. maritima* wurden konservierte Aminosäuren identifiziert, die an der Katalyse oder am strukturellen Aufbau der Enzyme beteiligt sind. Diese sind auch in den haloarchaeellen KDPGal- bzw. KDPG-Aldolasen konserviert (Abbildung 50).

In den thermoacidophilen Crenarchaeota *Sulfolobus* sp. und *T. tenax* wurden bifunktionelle KD(P)G-Aldolasen des verzweigten ED-Wegs charakterisiert, die sowohl die Umsetzung der C<sub>4</sub>-Epimere KDPG und KDPGal, als auch die Umsetzung der nicht-phosphorylierten Varianten KDG und KDGal katalysieren (Ahmed et al. 2005; Lamble et al. 2003; Lamble et al. 2005; Pauluhn et al. 2008). Die aus dem Euryarchaeon *P. torridus* gereinigte KDG-Aldolase kann hingegen nur die nicht-phosphorylierten Substrate KDG und KDGal umsetzen (Reher et al. 2010). Neben den ungewöhnlich breiten Substratspektren weisen die Aldolasen der thermoacidophilen Archaea außerdem noch weitere Unterschiede zu den KDPGal- und KDPG-Aldolasen aus *H. volcanii* auf. Die Aldolasen der thermoacidophilen Archaea besitzen eine homo-tetramere Struktur, die Untereinheiten sind ca. 30 kDa groß und sie werden der

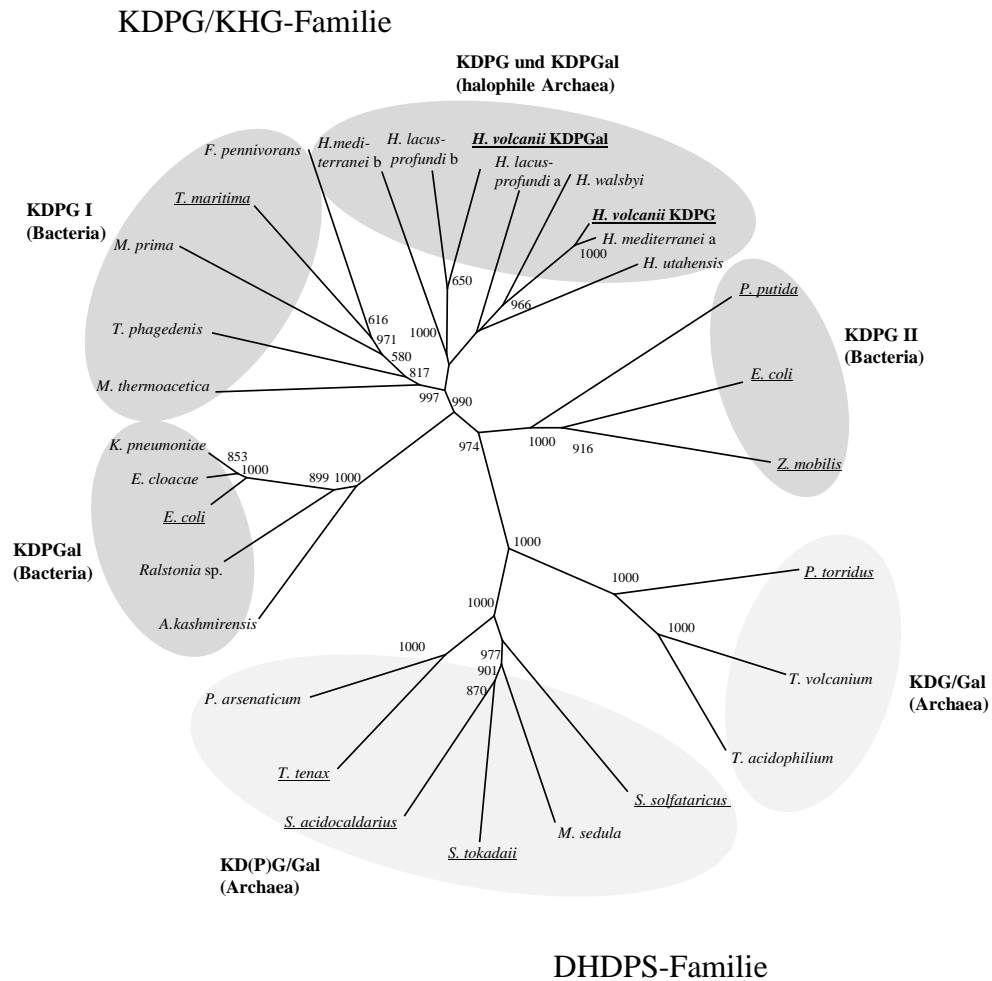
DHDPS-like/NAL-like Superfamilie von Klasse I Aldolasen zugeordnet (Buchanan et al. 1999; Lambie et al. 2003; Lambie et al. 2005; Reher et al. 2010). Die Aminosäuresequenzidentität der haloarchaeellen Aldolasen zu den thermoacidophilen Aldolasen beträgt nur 8-10 %.

		KDPG_KHG_1		
HvoKDPGalA	1	----MSHHPARRIRETGLIATIRGTDADTALETVEALTRCGVSTVEITANTDGVLGMLRDVSASF	TADEVTTGAGTVLDS	76
HvoKDPGA	1	MVALDVHEDMQRLADSGVAVMRGADADTIIDVDALHEGCVTAYEITADNPDMDLIREVSAFSDNEAIV	GAGTALDA	80
EcoKDPGalA	1	-----MQWQTKLPLIATLRGITPDEALAHVGAVIDGFDVAVEIPLNSIQWEQSTPAIVDAYG-DKALI	GAGTVLKP	70
TmaKDPGA	1	-----MKMEELFKKHKIVAVLRANSVBEAKKELAVFEGGVHLHEITFTVDDADTVIKELS-FLKEK	GAGTVLTV	73
EcoKDPGA	1	-MKNWKTSAESILTTGFPVVPVIVVVKLEHAVPMAKALVAGGVRVLEVLTFTECAVDARAIKEVP--	EAVGAGTVLNP	77
ZmoKDPGA	1	-----MDSVMRLAPVMPVVLVIEDIADAKPIAEALVACGLNVLEVLRTPCALEAK-IMKEVP--	GAVVGAGTVLNA	69
▼ KDPG_KHG_2				
HvoKDPGalA	77	ETARAALLAGAAYLVVPTTFDEGVIRTNRYGAPSMVGIATPTAVNAYEFGAEMVQVFPAGTLC-	PEFVSALGGPLG-HI	154
HvoKDPGA	81	PTANAATQAGAEFVVGPNFDEGVVETCNRYGTLVAPGIMTPTAETDAYSAGADLVKVF	PASSLC-PGHLKSMKGPLP-QI	158
EcoKDPGalA	71	EQVDALARMGCOLIVTPTNIHSEVIRRAVGYGMTVCPGCATATEAFTALEFQAQAKIFPSSAFC-	POYTKALKAVLPSDI	149
TmaKDPGA	74	EQCRKAVESGAEFIVSPHLDEEISQFCKEKGVFYMPGVMTPTBLVKAMKLGHTILKLF	PGEVVC-POFVKAMKGFPP-NV	151
EcoKDPGA	78	QQLAEVTEAGAOPAI SPGLTEPLKAATEGTIPLIPGISTVSELMLGMDYGLKEKFFFP	EAANGVVKALQAIAGPFS-QV	156
ZmoKDPGA	70	KMLDQAQAEAGCEFFVSEPLTADLGKHAVAQKAALLPGVANAADVMLGLDILGLDRR	KFFPAENICGLPALKSMASVFR-QV	148
HvoKDPGalA	155	PTVPTGGVALDVTVEFFDAGATAVGVGSALVDNDVSRGDFATITNARSFVEAVERARRD	215	
HvoKDPGA	159	PMMPTGGVGLDNRADYIEACAVVVGAGGALMDDEAIENGDFEAITETAREFSNIIDDARDD	219	
EcoKDPGalA	150	AVFAVGGVTPENLAQWIDACGAGAGLGSALYRAGQSVVERTAQQAFAVFKAYREAVQ----	205	
TmaKDPGA	152	KFVPTGGVNLNDVCEWFKAGVLAAGVGSALVKG-----TPDEVREKAKAFVEKIRGCTE-	205	
EcoKDPGA	157	RFCPTGGIISPANRYDYLALKSVLCIGGSWLVPADALEAGDYDRI TKLAREAVEGAKL----	213	
ZmoKDPGA	149	RFCPTGGITPTSAPKYLENPSILCVGGSWVVPAGKPDVAKITALAKEASAFKRAAVA----	205	

**Abbildung 50** Alignment mit Aminosäuresequenzen von KDPGal- und KDPG-Aldolasen aus *H. volcanii* und ausgewählten Aldolasen aus Bacteria. Das Alignment wurde mit ClustalX durchgeführt (Larkin et al. 2007). Identische Aminosäuren sind schwarz hinterlegt. Die Konsensusmotive ALDOLASE\_KDPG\_KHG\_1, (PS00159) bzw. ALDOLASE\_KDPG\_KHG\_2, (PS00160) wurden rot umrahmt. Konservierte Reste des aktiven Zentrums (♦) und das konservierte Lysin des aktiven Zentrums (▼) wurden über den Sequenzen gekennzeichnet (Fullerton et al. 2006). Verwendete KDPG-Aldolase Sequenzen: *E. coli* (EcoKDPGA, GI:16129803), *H. volcanii* (HvoKDPGA, HVO\_0950), *T. maritima* (TmaKDPGA, gi:60593841); *Z. mobilis* (ZmoKDPGA, gi:3980248). Verwendete KDPGal-Aldolase Sequenzen: *EcoKDPGalA*, gi:49176391) und *H. volcanii* (HvoKDPGalA, HVO\_A0329).

Die unterschiedlichen katalytischen und molekularen Eigenschaften der hier diskutierten Aldolasen spiegeln sich auch in der phylogenetischen Position der Enzyme wider (Abbildung 51). Darin bilden die haloarchaeellen KDPGal- bzw. KDPG-Aldolasen zusammen mit den bakteriellen KDPGal- und KDPG-Aldolasen vier distinkte Cluster innerhalb der Familie der KDPG/KHG-Aldolasen. Die in dieser Arbeit identifizierten KDPGal- und KDPG-Aldolasen aus *Haloflex volcanii* bilden zusammen mit homologen Proteinen aus anderen halophilen Archaea einen eigenen Cluster. Die zweite distinkte Gruppe enthält die charakterisierte KDPGal-Aldolase aus *E. coli* sowie homologe Proteine. Bakterielle KDPG-Aldolasen bilden zwei weitere distinkte Cluster. Alle bisher aus Archaea charakterisierten KD(P)G- und KDG-Aldolasen gehören hingegen zur DHDPS-Familie, innerhalb dieser bilden sowohl die bifunktionellen KD(P)G/Gal-Aldolasen als auch die KDG/Gal-Aldolasen eine eigene Subgruppe.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Aldolasen aus *H. volcanii* identifiziert, die jeweils spezifisch an der Umsetzung von Galactose über den DD-Weg (KDPGal-Aldolase), bzw. an der Umsetzung von Glucose über den spED-Weg (KDPG-Aldolase) beteiligt sind. Sie gehören beide zu der aus Bacteria bekannten KDPG/KHG-Proteinfamilie.



0.1

**Abbildung 51 Phylogenetische Einordnung der KDPGal- und KDPG-Aldolasen aus Haloarchaea und Bacteria sowie der bifunktionellen KD(P)G/Gal- und KDG/Gal- Aldolasen aus thermoacidophilen Archaea (verändert nach (Reher et al. 2010)).** Der Stammbaum wurde mit dem Neighbor-Joining Algorithmus aus ClustalX erstellt (Larkin et al. 2007). Das Bootstrapping-Verfahren umfasste 1000 Wiederholungen, die Bootstrap-Werte befinden sich an den Knotenpunkten. Der Stammbaum basiert auf einem multiplen Sequenz-Alignment, das mit ClustalX unter Verwendung der Gonnet-Matrix erstellt wurde. Charakterisierte Aldolasen wurden unterstrichen. Proteine, die zur KDPG/KHG-Familie gehören wurden dunkelgrau unterlegt, Proteine der DHDPS-Familie hellgrau. Folgende Sequenzen wurden verwendet, die Identifikationsnummern wurden jeweils in Klammern dargestellt: KDG/Gal: *Picrophilus torridus* Pto1279, *Thermoplasma volcanium* GSS1 (gi:13542059), *Thermoplasma acidophilum* DSM 1728 (gi:16082170); KD(P)G/Gal: *Sulfolobus solfataricus* (gi:2879782), *Sulfolobus tokodaii* strain 7 (gi:15922811), *Sulfolobus acidocaldarius* DSM 639 (gi:70606067), *Thermoproteus tenax* (gi:41033593), *Pyrobaculum arsenaticum* DSM 13514 (gi:145591599), *Metallosphaera sedula* DSM 5348 (gi:146304062); KDPGal: *Advenella kashmirensis* (gi|389874024), *Ralstonia* sp. (gi|309783118), *Escherichia coli* (gi|49176391), *Enterobacter cloacae* supsp. *cloacae* (gi|401761571), *Klebsiella pneumoniae* (gi|426296587); KDPG I: *Thermotoga maritima* (gi:60593841), *Mesotoga prima* (gi|389844598), *Treponema phagedenis* (gi|320536150), *Fervidobacterium pennivorans* (gi|383785841), *Moorella thermoacetica* (GI:499711224); KDPG II: *Escherichia coli* (1EUA), *Pseudomonas putida* (1MXS), *Zymomonas mobilis* (GI:3980248); KDPG und KDPGal (halophile Archaea): *Haloferax volcanii* (KDPGal, HVO\_A0329), *Haloferax mediterranei* b (gi|389849058), *Halorubrum lacusprofundi* b (Hlac\_2860), *Haloferax volcanii* (KDPG, HVO\_0950), *Haloquadratum walsbyi* (gi|385802895), *Haloferax mediterranei* a (HFX\_0947), *Halorubrum lacusprofundi* a (Hlac\_0151), *Halorhabdus utahensis* (Huta\_1331).

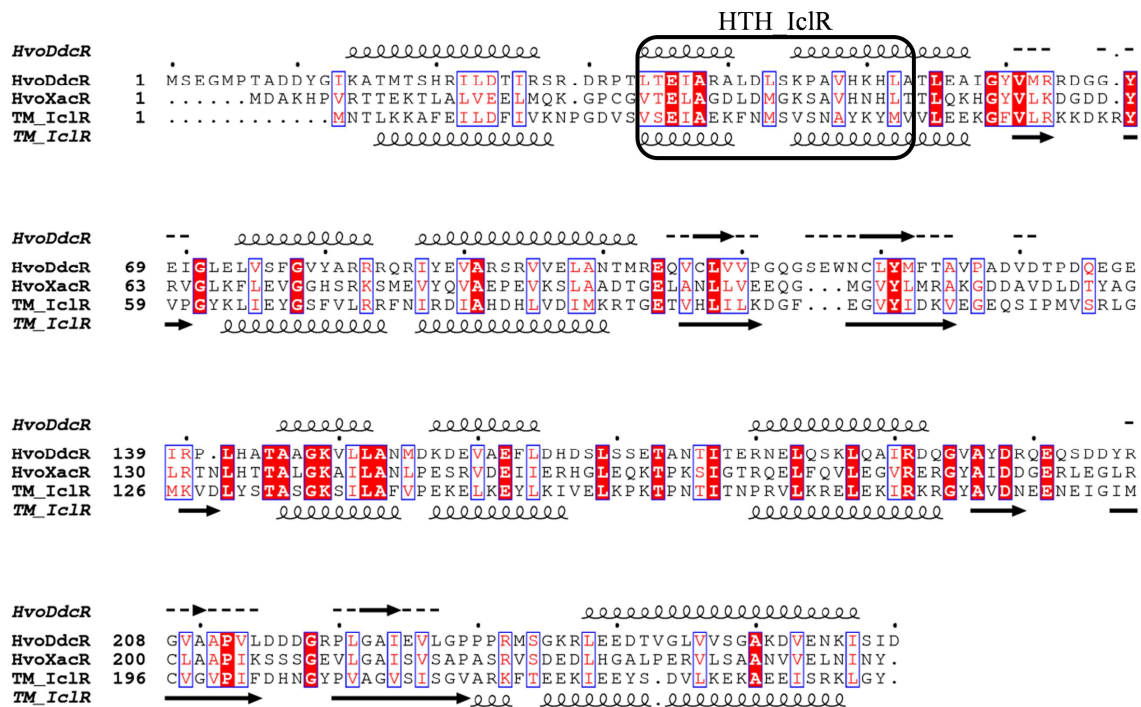


### 6.1.5 Transkriptionsregulator

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die beteiligten Gene des D-Galactose-Abbaus transkriptionell bei Wachstum auf Galactose induziert werden. Dies deutet auf eine gemeinsame transkriptionelle Regulation der am Galactose-Abbau beteiligten Gene hin. Im Gencluster des Galactose-Abbaus ist auch ein Transkriptionsregulator (*ddcR*, DeLey-Doudoroff catabolism Regulator) kodiert. Eine  $\Delta ddcR$  Mutante wuchs nicht mehr auf Galactose. Am Beispiel des Gens der Galactonat-Dehydratase wurde zudem gezeigt, dass in der Deletionsmutante des Transkriptionsregulators auch bei Induktion mit Galactose kein Transkript der Galactonat-Dehydratase gebildet wird. Die Bildung des Transkripts konnte durch eine *in-trans* Komplementation mit *ddcR* wiederhergestellt werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Transkriptionsregulator als Aktivator der Gene des Galactose-Abbaus dient. Der Transkriptionsregulator wies eine dimere Struktur auf, die schon für andere Transkriptionsregulatoren gezeigt wurde (Molina-Henares et al. 2006).

Durch BlastP Analysen mit DdcR wurden signifikante Homologien zu Proteinen der IclR transcription regulator Familie aus Bacteria, wie *Bacillus* sp. und *Clostridium* sp, sowie zu Proteinen aus halophilen Archaea gezeigt. In der Domäne der Eukarya und anderen Archaea konnten hingegen keine homologen Proteine gefunden werden.

DdcR wies N-terminal ein Helix-turn-Helix Motiv (IclR-type HTH, Aminosäuren 34-53, PS51077, prosite.expasy.org) auf, welches für eine DNA-Bindung des Proteins typisch ist. C-terminal wurde eine IclR-Effektor Bindedomäne (PS51078) nachgewiesen, die für die Bindung eines Signalmoleküls verantwortlich sein könnte (Molina-Henares et al. 2006). DdcR lässt sich damit der IclR-Familie (Isocitrat-Lyase Regulator) aus Transkriptionsregulatoren zuordnen, die in *E. coli* gut untersucht sind. Mittlerweile wurden diese Regulatoren nicht nur in Bacteria, sondern auch in dem Haloarchaeon *H. volcanii* beschrieben. In Abbildung 52 ist ein Alignment des Transkriptionsregulators DdcR mit XacR aus *H. volcanii* und einem Transkriptionsregulator der IclR-Familie *Tm-IclR* aus *Thermotoga maritima* gezeigt (Johnsen et al. 2015; Zhang et al. 2002). XacR ist ein Transkriptionsregulator der am Xylose- und Arabinose-Abbau beteiligten Gene aus *H. volcanii* und wurde detailliert untersucht (Johnsen et al. 2015). Die vorhergesagte Sekundärstruktur von DdcR stimmt gut mit der Kristallstruktur von *Tm-IclR* überein und zeigt im N-terminalen Bereich das typische Helix-turn-Helix Motiv.



**Abbildung 52** Alignment der Aminosäuresequenzen von DdcR aus *H. volcanii* mit charakterisierten Ic1R-Transkriptionsregulatoren aus *H. volcanii* (XacR) und *T. maritima* (Tm-Ic1R). Das Alignment wurde mit ClustalX erstellt (Larkin et al. 2007), die Darstellung des Alignments und der Sekundärstrukturen erfolgte mit Hilfe von ESPript3.0 (<http://esprpt.ibcp.fr>; (Robert und Gouet 2014)). Identische Aminosäuren sind rot hinterlegt. Die Sekundärstruktur von DdcR wurde mit Psipred vorhergesagt (Buchan et al. 2013; Jones 1999) und über dem Alignment dargestellt. Die Sekundärstruktur von Tm\_Ic1R ist unter dem Alignment dargestellt, PDB ID: 1MKM (Zhang et al. 2002). Das konservierte Helix-turn-Helix-Motiv wurde umrahmt (HTH Ic1R; PS51077). Folgende Proteine sind in dem Alignment dargestellt: HvoDdcR, *H. volcanii* (HVO\_A0332); HvoXacR, *H. volcanii* (HVO\_B0040); Tm-Ic1R, *T. maritima* (Tm\_0065).

Es wurde gezeigt, dass der Transkriptionsregulator DdcR in *H. volcanii* an der positiven Regulation des Gens der Galactonat-Dehydratase beteiligt ist. Vermutlich werden durch DdcR auch die anderen Gene des Galactose-Abbaus in *H. volcanii* reguliert. Interessanterweise wurden Ic1R-like Transkriptionsregulatoren bisher nur in der Domäne der Bacteria und in der Domäne der Archaea ausschließlich in Haloarchaea nachgewiesen. Dies deutet darauf hin, dass das Gen *ddcR* in *H. volcanii* über horizontalen Gentransfer aus der Domäne der Bacteria aufgenommen worden ist.

## 6.2 Galactose-Abbau in *Halorhabdus utahensis*

### 6.2.1 Galactokinase

Im Gegensatz zu *H. volcanii*, der Galactose über einen DeLey-Doudoroff-Weg abbaut, wurde durch Genomanalysen postuliert, dass in einem anderen halophilen Archaeon, *H. utahensis*, Galactose über den Leloir-Weg abgebaut wird. Die rekombinante Galactokinase aus *H. utahensis* wurde in der vorliegenden Arbeit gereinigt und es wurde gezeigt, dass das monomere Enzym die ATP-abhängige Phosphorylierung von Galactose katalysierte. Im Genom von *H. utahensis* sind außerdem noch die weiteren für diesen Abbauweg benötigten Enzyme Galactose-1-Phosphat Uridyltransferase, UDP-Galactose-4-Epimerase und Phosphoglucomutase kodiert (Abbildung 53).

Über Aminosäuresequenzanalysen wurde im N-terminalen Bereich der Galactokinase aus *H. utahensis* eine Konsensussequenz (PS00627) nachgewiesen, die diese Galactokinase den GHMP-Kinasen zuordnet, zu denen Galactokinasen, Homoserin Kinasen, Mevalonat Kinasen und Phosphomevalonat-Kinasen zählen. Zu dieser Proteinfamilie gehören auch charakterisierte Galactokinasen aus Bacteria und Eukarya, wie z. B. aus *E. coli*, *S. cerevisiae* und *Homo sapiens* (Ai et al. 1995; Schell and Wilson 1977; Schlesinger et al. 1977; Yang et al. 2003).

Der Nachweis einer funktionellen Galactokinase in *H. utahensis* könnte dafür sprechen, dass in diesem Organismus der Leloir-Weg am Abbau von Galactose zu Glucose-6-Phosphat beteiligt ist. Weitere Untersuchungen zum Galactose-Abbau in *H. utahensis* stehen noch aus.

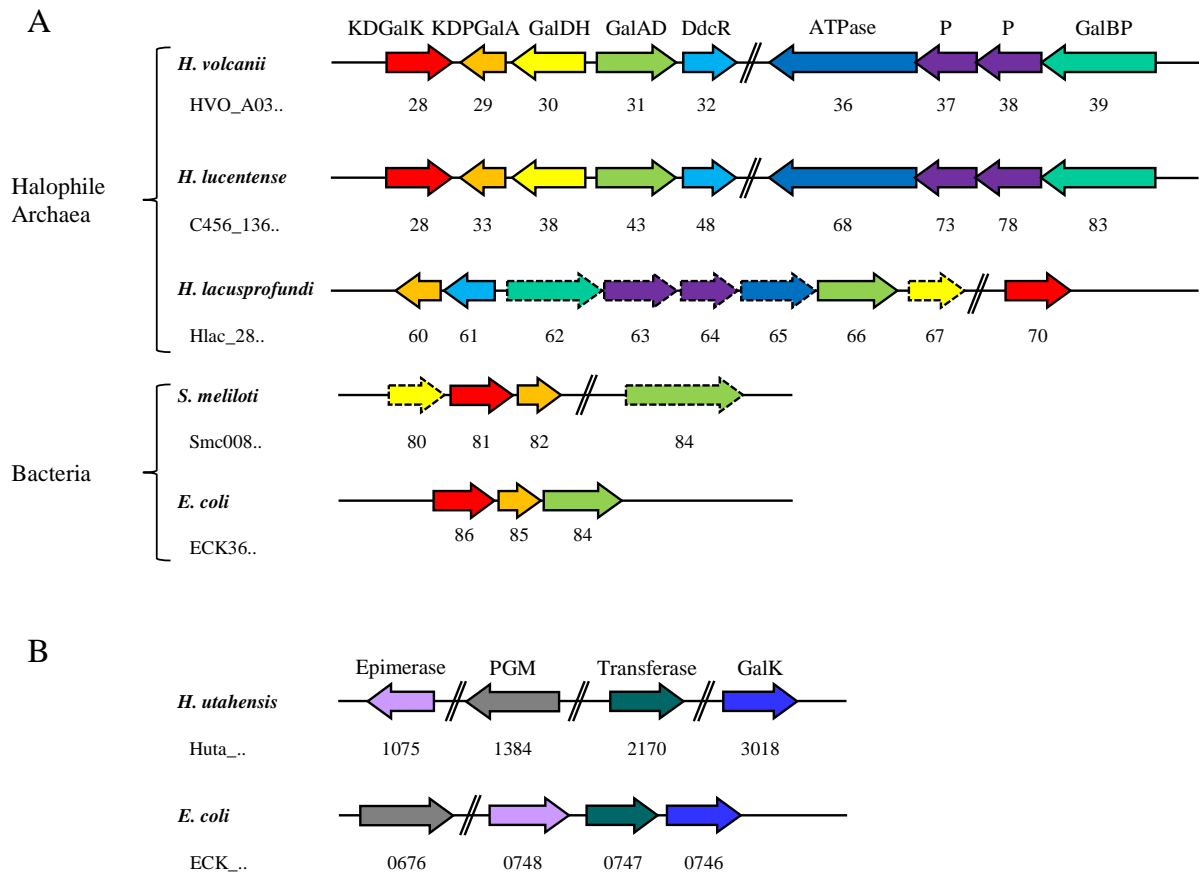
### 6.3 Genominformationen zu Galactose-Abbauwegen

Die Gene des Galactose-Abbaus in *H. volcanii* liegen in einem Gencluster vor, welcher sich aus den Genen des Galactose-Abbaus, einem Transkriptionsregulator, sowie einem ABC-Transporter zusammensetzt. Dieser Gencluster wurde auch in *Haloferax lucentense* nachgewiesen. Die gleiche Anordnung der Gene und die hohe Ähnlichkeit der Proteine zueinander lassen darauf schließen, dass *H. lucentense* Galactose ebenfalls über einen DD-Weg abbaut (Abbildung 53 A).

In *Halorubrum lacusprofundi*, der auf Galactose wachsen kann, wurde ebenfalls ein Gencluster identifiziert, der einige Gene des Galactose-Clusters aus *H. volcanii* enthält (Anderson et al. 2011). Sowohl der in diesem Cluster kodierte ABC-Transporter als auch die putative Galactose-Dehydrogenase gehören nicht zu den gleichen Proteinfamilien, wie die entsprechenden Proteine aus *H. volcanii*. Die genomische Nähe zu einer putativen Galactonat-Dehydratase, KDGal-Kinase, KDPGal-Aldolase sowie einem Homologen des DdcR Transkriptionsregulators sprechen jedoch dafür, dass auch *H. lacusprofundi* Galactose über einen DeLey-Doudoroff-Weg abbaut.

Der DD-Weg für den Abbau von Galactose ist aus wenigen Bacteria bekannt, dazu zählt unter anderem *Sinorhizobium meliloti*, in dem ein Galactose-spezifisches Gencluster identifiziert wurde (Arias und Cervenansky 1986; Geddes und Oresnik 2012). Für *E. coli* wurde gezeigt, dass dieser Galactonat über einen DeLey-Doudoroff-Weg abgebaut. Die beteiligten Gene und Enzyme wurden charakterisiert (Cooper 1978; Deacon und Cooper 1977) (Abbildung 53 A).

Im Gegensatz zu dem in *H. volcanii* nachgewiesenen DD-Weg wurde für *H. utahensis* ein klassischer Leloir-Weg für den Abbau von Galactose postuliert, der in vielen Organismen, wie zum Beispiel in *E. coli* vorkommt (Abbildung 53 B). Durch das Vorhandensein eines Leloir-Wegs im Genom unterscheidet sich *H. utahensis* von allen bisher beschriebenen Haloarchaea. Das Vorkommen eines klassischen Galactose-Abbaus über den Leloir-Weg in *H. utahensis* ist ungewöhnlich. Eine Sonderstellung hinsichtlich des Vorkommens von Stoffwechselwegen nimmt *H. utahensis* allerdings auch beim Abbau von Pentosen ein. Während die meisten Haloarchaea Xylose oxidativ zu  $\alpha$ -Ketoglutarat umsetzen, wurde für *H. utahensis* der typische bakterielle, nicht-oxidative Xylose-Abbau nachgewiesen (Sutter, 2014).



**Abbildung 53** Genomumgebung der am DeLey-Doudoroff-Weg beteiligten Gene in *Haloferax volcanii*, *Haloferax lucentense*, *Halorubrum lacusprofundi*, *Sinorhizobium meliloti* und *Escherichia coli* (A) und der möglicherweise am Leloir-Weg beteiligten Gene aus *Halorhabdus utahensis* und *Escherichia coli* (B). Die Gene wurden als Pfeile dargestellt. Oberhalb der charakterisierten Gene wurden Abkürzungen für die von den Genen kodierte Proteine aufgelistet: KDGalK, 2-Keto-3-Desoxygalactonat-Kinase; KDPGalA, 2-Keto-3-Desoxy-6-Phosphogalactonat-Aldolase; GalDH, Galactose-Dehydrogenase; GalAD, Galactonat-Dehydratase; DdcR, Transkriptionsregulator; P, Permease; GalBP, Galactose-Bindeprotein; Epimerase, UDP-Galactose-4-Epimerase; PGM, Phosphoglucomutase; Transferase, Galactose-1-Phosphat Uridyltransferase; GalK, Galactokinase. Die Gene wurden entsprechend ihrer Funktion farblich markiert, Gene aus *Halorubrum lacusprofundi* und *Sinorhizobium meliloti*, deren Rahmen gestrichelt dargestellt sind, kodieren für Proteine aus Proteinfamilien, die nicht mit denen aus *H. volcanii* übereinstimmen.

## 6.4 Umsetzung von GAP zu 3-Phosphoglycerat in *Haloferax volcanii*

In *H. volcanii* wird Galactose über den DeLey-Doudoroff-Weg und Glucose über den semiphosphorylierten ED-Weg abgebaut. In beiden Stoffwechselwegen wird Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) gebildet, die Enzyme der GAP-Oxidation wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht. In *H. volcanii* wurde ein Gencluster identifiziert, der die Gene für zwei GAP-DHs und eine Phosphoglyceratkinase kodiert. Die Daten zeigen, dass die Oxidation von GAP zu 3-Phosphoglycerat über das Intermediat 1,3-Bisphosphoglycerat durch eine katabole GAP-DH und die Phosphoglyceratkinase katalysiert wird. Die gluconeogenetische Bildung von GAP über 1,3-Bisphosphoglycerat aus 3-Phosphoglycerat wird durch die Phosphoglyceratkinase und eine anabole GAP-DH katalysiert.

### 6.4.1 GAP-Dehydrogenasen

**GAP-Umsetzung in Archaea.** Transkriptionsanalysen der katabolen GAP-DH aus *H. volcanii* haben gezeigt, dass diese bei Wachstum auf Glucose im Vergleich zu Casaminosäuren spezifisch induziert wird. Eine Deletionsmutante des kodierenden Gens der GAP-DH war nicht mehr in der Lage auf Glucose, Galactose und Fructose zu wachsen, das Wachstum auf Casaminosäuren und Acetat war nicht verändert. Dies zeigt eine essentielle Beteiligung dieser GAP-DH an der katabolen Umsetzung verschiedener Zucker, eine gluconeogenetische Funktion wurde ausgeschlossen. Das rekombinante, homo-tetramere Enzym war hochspezifisch für den Cofaktor NAD<sup>+</sup>. Dies ist der erste funktionelle Nachweis einer katabolen GAP-DH in der Domäne der Archaea. Bisher wurde eine GAP-DH aus *Haloarcula vallismortis* gereinigt, die vermutlich an der katabolen Umsetzung von GAP beteiligt sein könnte (Krishnan und Altekari 1990; Prüß et al. 1993).

In allen anderen bisher untersuchten Archaea wird GAP hingegen durch die neuartigen Enzyme GAP:Ferredoxin-Oxidoreductase (GAPOR) oder nicht-phosphorylierende GAP-DH (GAPN) umgesetzt. Beide Enzyme katalysieren die einstufige Umsetzung von GAP zu 3-Phosphoglycerat ohne die Beteiligung einer PGK. Eine GAPOR wurde in den hyperthermophilen Archaea *Pyrococcus furiosus* und *Pyrobaculum aerophilum* charakterisiert, GAPN wurde in *Thermoproteus tenax*, *Sulfolobus solfataricus* und *Thermococcus kodakarensis* charakterisiert (Brunner et al. 1998; Ettema et al. 2008; Hensel et al. 1987; Ito et al. 2012; Mukund und Adams 1995; Reher et al. 2007; Siebers und Schönheit 2005). GAPOR und GAPN katalysieren die irreversible GAP-Oxidation zu 3-Phosphoglycerat, durch Analysen von Deletionsmutanten wurde eine Beteiligung am

katabolen Abbau von Zuckern, nicht aber an der Gluconeogenese nachgewiesen (Matsubara et al. 2011).

**GAP-Bildung aus 1,3-Bisphosphoglycerat in Archaea.** Für die anabole GAP-DH wurde eine deutlich stärkere Transkription des Gens bei Wachstum auf Casaminsäuren im Vergleich zu Glucose nachgewiesen, was auf eine gluconeogenetische Funktion hindeutet. Außerdem zeigten Untersuchungen einer konditional letalen Mutante, dass diese GAP-DH am Abbau von Casaminsäuren und Acetat beteiligt war, was eine Beteiligung an der Gluconeogenese nachweist. Das rekombinante homo-dimere Enzym katalysierte die Reduktion von 1,3-Bisphosphoglycerat zu GAP mit NADPH oder NADH als Cofaktor, wobei NADPH deutlich bevorzugt wurde.

Anabole GAP-DHs, die die gluconeogenetische Umsetzung von 1,3-Bisphosphoglycerat zu GAP katalysieren, wurden in anderen Archaea, wie z. B. *Pyrococcus woesei*, *Methanothermus fervidus*, *Thermoproteus tenax*, sowie *S. solfataricus* und *Thermococcus kodakarensis* bereits charakterisiert (Brunner et al. 2001; Fabry und Hensel 1987; Hensel et al. 1987; Jia et al. 2011; Littlechild und Isupov 2001; Ronimus und Morgan 2003; Schäfer und Schönheit 1993; Zwickl et al. 1990). Kristallstrukturen der GAP-DHs aus *S. solfataricus* und *M. fervidus* sind vorhanden (Charron et al. 2000; Isupov et al. 1999).

**GAP-Umsetzung und Bildung in Bacteria.** Die glykolytische Umsetzung von GAP zu 1,3-Bisphosphoglycerat bzw. die gluconeogenetische Umkehrung dieser Reaktion wird in Bacteria durch eine reversible GAP-DH katalysiert. In den meisten Bacteria und Eukarya ist eine GAP-DH sowohl an der Glykolyse als auch an der Gluconeogenese beteiligt, und zeigt damit eine amphibole Rolle, wie z. B. die GAP-DH aus *E. coli* (Hillman und Fraenkel 1975; Seta et al. 1997). Eine Ausnahme bilden einige gram-positive Bacteria wie *Staphylococcus aureus* und *Bacillus subtilis* sowie das Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Fillinger et al. 2000; Koksharova et al. 1998; Purves et al. 2010). In diesen Organismen wurden zwei funktionell unterschiedliche GAP-DHs identifiziert. Durch Deletionsmutanten wurde eine Beteiligung der GAP-DHs entweder an der Glykolyse (GapA) oder an der Gluconeogenese (GapB) nachgewiesen. In *B. subtilis* und *S. aureus* wurde außerdem nachgewiesen, dass die Genexpression der beiden GAP-DHs, ähnlich wie in *H. volcanii*, bei Wachstum auf glykolytischen und gluconeogenetischen Substraten gegensätzlich reguliert wird (Fillinger et al. 2000; Purves et al. 2010).

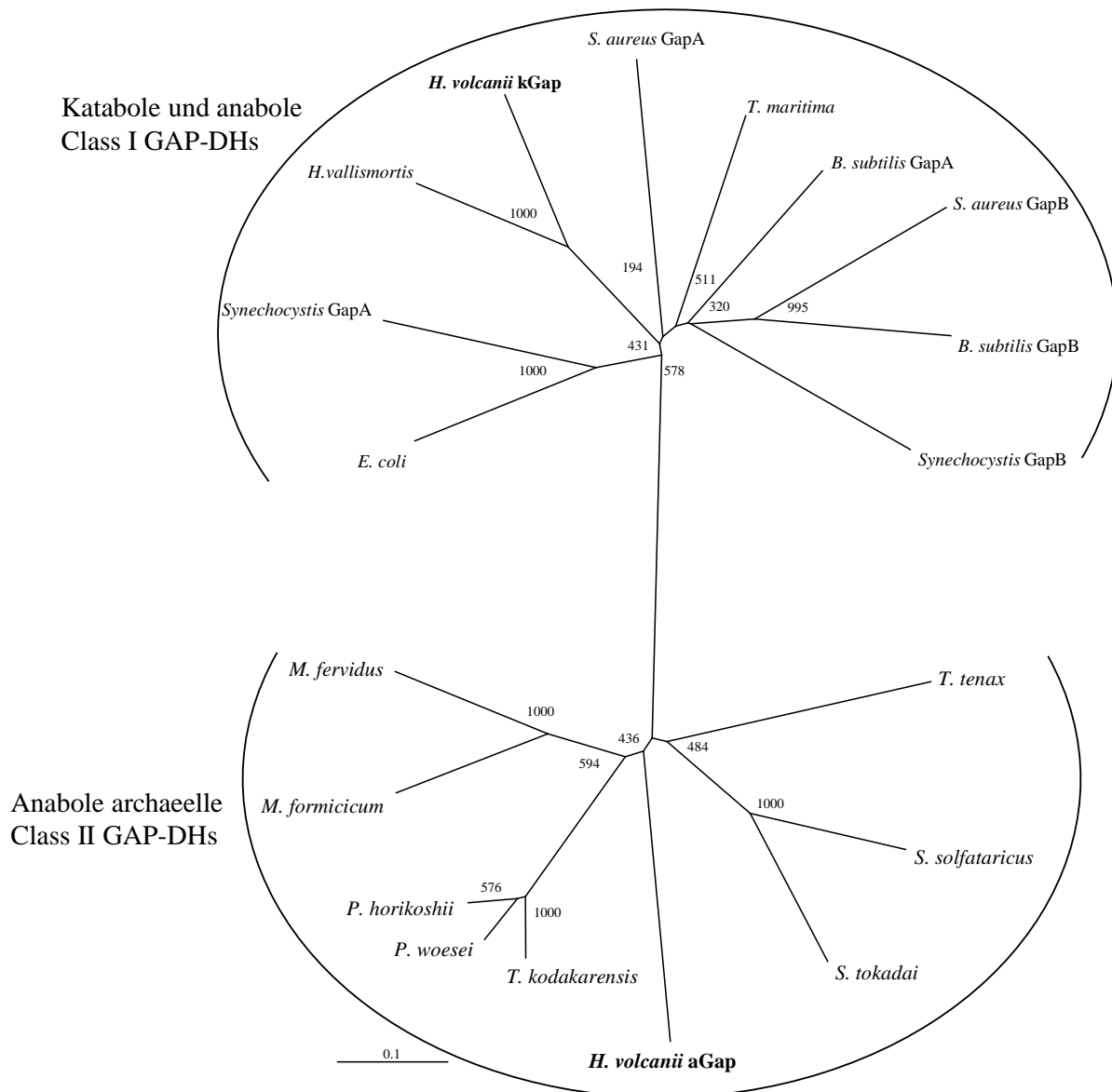
**Molekulare Eigenschaften und phylogenetische Verwandtschaft archaeeller und bakterieller GAP-DHs.** Die amphibole GAP-DH aus *E. coli*, sowie die katabolen GAP-DHs aus *B. subtilis* und *S. aureus* weisen eine hohe Spezifität für den Cofaktor  $\text{NAD}^+$  auf, was auch für die katabole GAP-DH aus *H. volcanii* gezeigt wurde (Eyschen et al. 1999; Fillinger et al. 2000; Harris und Waters 1976; Purves et al. 2010). Anabole bakterielle und archaeelle GAP-DHs hingegen zeigen eine duale Cofaktor-Spezifität und verwenden sowohl  $\text{NAD}^+$  als auch  $\text{NADP}^+$  als Cofaktor, wobei  $\text{NADP}^+$  bevorzugt wird (Fabry und Hensel 1987; Fillinger et al. 2000; Hensel et al. 1987; Littlechild und Isupov 2001; Purves et al. 2010; Zwickl et al. 1990). Die anabole GAP-DH aus *H. volcanii* zeigte ebenfalls eine duale Cofaktor-Spezifität mit einer Bevorzugung für NADPH.

Archaeelle und bakterielle GAP-DHs nutzen den gleichen Reaktionsmechanismus, sie unterscheiden sich aber durch ihre Aminosäuresequenzen voneinander und weisen eine deutliche phylogenetische Distanz zueinander auf (Cerff 1995; Hensel et al. 1989; Ronimus und Morgan 2003). Daher wurde eine Benennung in Class I für bakterielle und Class II für archaeelle GAP-DHs vorgeschlagen (Cerff 1995). Die katabole GAP-DH aus *H. volcanii* wies eine höhere Aminosäuresequenzähnlichkeit zu Class I (57-67 %) als zu Class II GAP-DHs auf (25-31 %). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen zeigt ein phylogenetischer Stammbaum von Class I und Class II GAP-DHs die Zugehörigkeit der katabolen GAP-DH aus *H. volcanii* zu den bakteriellen Class I GAP-DHs (Abbildung 54). Der Stammbaum macht außerdem deutlich, dass sich die bakteriellen Class I GAP-DHs phylogenetisch nicht durch ihre Funktion im Katabolismus oder Anabolismus einordnen lassen.

Die anabole GAP-DH aus *H. volcanii* hingegen wies eine höhere Ähnlichkeit zu Class II (60-67 %) als zu Class I GAP-DHs (23-27 %) auf. Die Ähnlichkeit zu den halophilen katabolen GAP-DHs aus *H. volcanii* und *H. vallismortis* betrug nur 24-26 %. Die anabole GAP-DH aus *H. volcanii* ist damit wie alle bisher untersuchten anabolen GAP-DHs aus Archaea den Class II Enzymen zuzuordnen (Abbildung 54).

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass in dem halophilen Archaeon *H. volcanii* nicht, wie in anderen Archaea üblich, die Oxidation von GAP über einen einstufigen Mechanismus durch GAPOR oder GAPN katalysiert wird. Stattdessen wurde eine Class I GAP-DH, die vermutlich über horizontalen Gentransfer aus Bacteria aufgenommen wurde, identifiziert, die die katabole Umsetzung von GAP zu 1,3-Bisphosphoglycerat katalysiert. Eine zweite GAP-DH ist an der Gluconeogenese beteiligt und zeigte eine große Ähnlichkeit zu anabolen archaeellen Class II GAP-DHs.





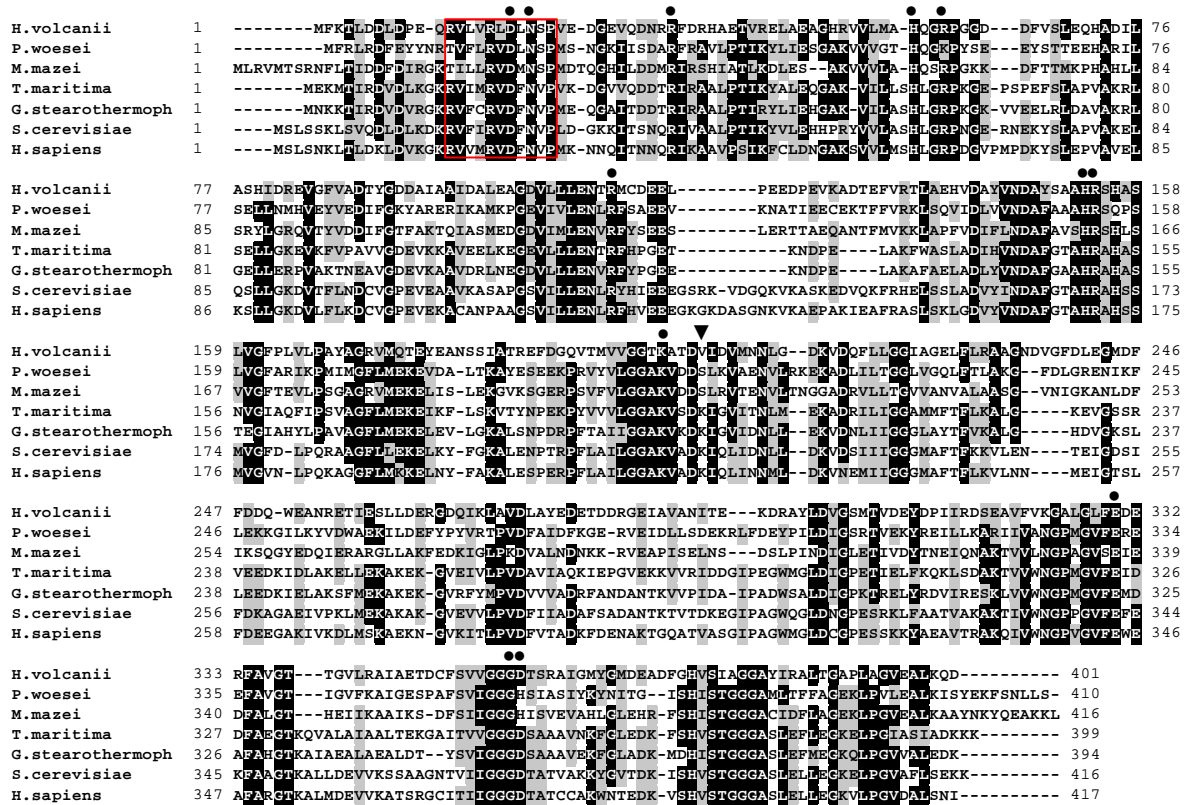
**Abbildung 54 Phylogenetische Einordnung der GAP-DHs aus *H. volcanii* mit charakterisierten bakteriellen (Class I) und archaeellen (Class II) GAP-DHs.** Der Stammbaum wurde mit dem Neighbor-Joining Algorithmus aus ClustalX erstellt (Larkin et al. 2007). Das Bootstrapping-Verfahren umfasste 1000 Wiederholungen, die Bootstrap-Werte befinden sich an den Knotenpunkten. Der Baum basiert auf einem multiplen Aminosäuresequenz-Alignment, das mit ClustalX unter Verwendung der Gonnet Matrix erstellt wurde. Folgende Sequenzen wurden verwendet, die Identifikationsnummern wurden jeweils in Klammern dargestellt: Class I amphibole GAP-DHs: *Escherichia coli* (gi16129733) und *Thermotoga maritima* (gi15643451). Class I katabole GAP-DHs: *Synechocystis* sp. PCC 6803 (GapA: gi1652689); *Haloarcula vallismortis* (gi490650417); *Haloferax volcanii* (kGap: HVO\_0481); *Staphylococcus aureus* (gapA: gi151220953); *Bacillus subtilis* (GapA: gi16080447). Class I anabole GAP-DHs: *Synechocystis* sp. PCC 6803 (GapB: gi499176528); *Staphylococcus aureus* (GapB: gi 151221792); *Bacillus subtilis* (GapB gi16079954). Class II archaeelle anabole GAP-DHs *Methanothermus fervidus* (gi503178696); *Methanobacterium formicicum* (gi120701); *Pyrococcus horikoshii* (gi88192712); *Pyrococcus woesei* (gi48428911); *Thermococcus kodakarensis* (TK0765); *Haloferax volcanii* (aGap: HVO\_0478); *Sulfolobus tokadai* (ST1356); *Sulfolobus solfataricus* (gi6435783); *Thermoproteus tenax* (gi503893420). Der Balken stellt 0,1 Substitutionen pro Aminosäure dar.

### 6.4.2 Phosphoglyceratkinase

Das Genom von *H. volcanii* enthält ein Gen, das für eine putative Phosphoglyceratkinase (PGK) kodiert. Es wurde gezeigt, dass dieses Gen konstitutiv bei Wachstum auf Glucose und Casaminosäuren transkribiert wird. Dieses Ergebnis deutet auf eine Beteiligung der PGK am Katabolismus und an der Gluconeogenese hin. Das rekombinante monomere Enzym katalysierte die ATP-abhängige Umsetzung von 3-Phosphoglycerat zu 1,3-Bisphosphoglycerat.

Phosphoglyceratkinasen sind gut untersucht, so wurden PGKs aus den thermophilen Archaea *Pyrococcus woesei*, *Sulfolobus solfataricus* und *Methanothermus fervidus* charakterisiert, des Weiteren ist die Kristallstruktur einer PGK aus *Pyrococcus horikoshii* bekannt (Crowhurst et al. 2001; Hess et al. 1995; Mizutani und Kunishima, PDB ID: 2CUN). Während für die bisher charakterisierten archaeellen PGKs eine Beteiligung ausschließlich an der Gluconeogenese gezeigt wurde (Jansen et al. 1982; Schäfer und Schönheit 1993), haben die aus Bacteria und Eukarya bekannten PGKs vermutlich eine amphibole Rolle im Stoffwechsel. Charakterisiert wurden z. B. die Enzyme aus *Thermotoga maritima*, *Homo sapiens* und *Saccharomyces cerevisiae*, Kristallstrukturen sind ebenfalls vorhanden (Auerbach et al. 1997; Davies et al. 1994; Krietsch und Bücher 1970; Schurig et al. 1995; Varga et al. 2009).

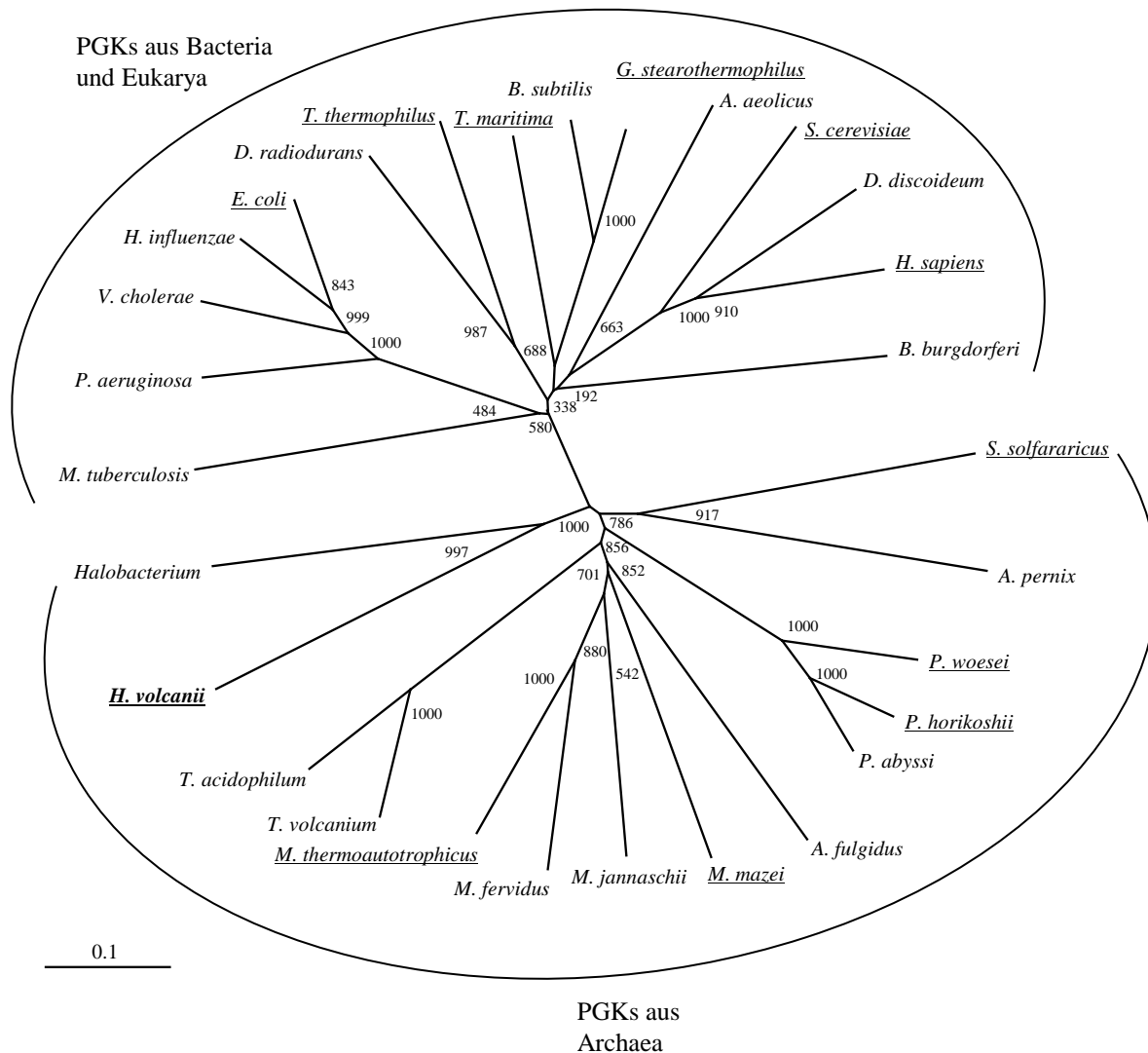
In einem Alignment der PGK aus *H. volcanii* mit archaeellen und bakteriellen PGKs wurde das für Phosphoglyceratkinasen typische konservierte Sequenzmotiv (PS00111), sowie die für das aktive Zentrum essentiellen Aminosäuren gekennzeichnet (Abbildung 55) (Wellner et al. 2013). Die meisten dieser essentiellen Aminosäuren sind in PGKs aus den drei Domänen konserviert. Es wurde allerdings festgestellt, dass das Lysin an der Position 219 (Nummerierung der humanen PGK), welches an der ATP-Bindung und am Phosphat-Transfer beteiligt ist, nur in Eukarya und Bacteria konserviert ist (Szabo et al. 2008; Wellner et al. 2013). Demgegenüber befindet sich an der entsprechenden Position in archaeellen PGKs statt eines Lysins meist ein Serin, Threonin oder Valin (Wellner et al. 2013) (Abbildung 55). An der entsprechenden Position der PGK aus *H. volcanii* befindet sich ein Valin. Die essentielle Beteiligung der jeweiligen Aminosäure an dieser Position wurde in den PGKs aus *H. sapiens*, *E. coli* und *Methanosarcina mazei* nachgewiesen (Wellner et al. 2013).



**Abbildung 55** Aminosäuresequenz-Alignment mit der PGK aus *H. volcanii* und ausgewählten PGKs aus Archaea, Bacteria und Eukarya. Das Alignment wurde mit ClustalX erstellt (Larkin et al. 2007), identische Aminosäuren sind schwarz, ähnliche Aminosäuren grau hinterlegt. Das Konsensusmotiv (PS00111) ist rot umrandet, konservierte Reste des aktiven Zentrums wurden mit ● markiert. Das in Eukarya und Bacteria konservierte Lysin, bzw. die unterschiedlichen in Archaea an dieser Position befindlichen Aminosäuren wurden mit ▼ markiert (Wellner et al. 2013). Folgende Proteine sind in dem Alignment dargestellt: *Haloferax volcanii* (HVO\_0480); *Pyrococcus woesei* (gi:48429039); *Methanosarcina mazei* (MM\_0485); *Thermotoga maritima* (gi:15643452); *Geobacillus stearothermophilus* (GI:696475406); *Saccharomyces cerevisiae* (gi:10383781); *Homo sapiens* (gi:4505763).

Die phylogenetische Entwicklung von Phosphoglyceratkinasen wurde gut untersucht (Brinkmann und Martin 1996; Ronimus und Morgan 2003). In einem phylogenetischen Stammbaum von Phosphoglyceratkinasen aus Archaea, Bacteria und Eukarya wurde gezeigt, dass die Enzyme aus Eukarya und Bacteria eine phylogenetische Gruppe bilden und die PGKs aus Archaea eine zweite distinkte Gruppe. Der Stammbaum zeigt außerdem die Zugehörigkeit der Phosphoglyceratkinase aus *H. volcanii* zu den archaellen Enzymen (Abbildung 56).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Phosphoglyceratkinase aufgrund der konstitutiven Transkription, sowie der Tatsache, dass nur eine PGK im Genom von *H. volcanii* kodiert ist, vermutlich nicht nur am Katabolismus, sondern auch an der Gluconeogenese beteiligt ist. Die PGK aus *H. volcanii* wurde phylogenetisch den archaellen Enzymen zugeordnet.



**Abbildung 56 Einordnung der PGK aus *H. volcanii* in den phylogenetischen Stammbaum von Phosphoglyceratkinasen aus Archaea, Bacteria und Eukarya (verändert nach Ronimus und Morgan, 2001).** Der Stammbaum wurde mit dem Neighbor-Joining Algorithmus aus ClustalX erstellt (Larkin et al. 2007). Das Bootstrapping-Verfahren umfasste 1000 Wiederholungen, die Bootstrap-Werte befinden sich an den Knotenpunkten. Der Baum basiert auf einem multiplen Aminosäuresequenz-Alignment, das mit ClustalX unter Verwendung der Gonnet Matrix erstellt wurde. Charakterisierte PGKs wurden unterstrichen, die PGK aus *H. volcanii* wurde fett dargestellt. Folgende Sequenzen wurden verwendet, die Identifikationsnummern wurden jeweils in Klammern dargestellt: PGKs aus Archaea: *Halobacterium* sp. NRC-1 (gi:15790280); *Haloferax volcanii* (HVO\_0480), *Thermoplasma acidophilum* (gi:16082102), *Thermoplasma volcanium* (gi:13541361), *Methanothermobacter thermoautotrophicus* (gi:15679060), *Methanothermus fervidus* (gi:312136384), *Methanocaldococcus jannaschii* (gi:15668822), *Methanosarzipina mazei* (gi:21226587), *Archaeoglobus fulgidus* (gi:11498746), *Pyrococcus abyssi* (gi:14521240), *Pyrococcus horikoshii* (gi:14591038), *Pyrococcus woesei* (gi:48429039), *Aeropyrum pernix* (gi:118430918), *Sulfolobus solfataricus* (gi:15897452); PGKs aus Bacteria und Eukarya: *Mycobacterium tuberculosis* (gi:15608575), *Pseudomonas aeruginosa* (gi:15595749), *Vibrio cholerae* (gi:15640504), *Haemophilus influenzae* (gi:16272469), *Escherichia coli* (gi:16130827), *Deinococcus radiodurans* (gi:15806359), *Thermus thermophilus* (gi:55980875), *Thermotoga maritima* (gi:15643452), *Bacillus subtilis* (gi:16080446), *Geobacillus stearothermophilus* (PDB ID: 1PHP), *Aquifex aeolicus* (gi:15605702), *Saccharomyces cerevisiae* (gi:10383781), *Dictyostelium discoideum* (gi:22711882), *Homo sapiens* (gi:4505763), *Borrelia burgdorferi* (gi:15594402). Der Balken stellt 0,1 Substitutionen pro Aminosäure dar.

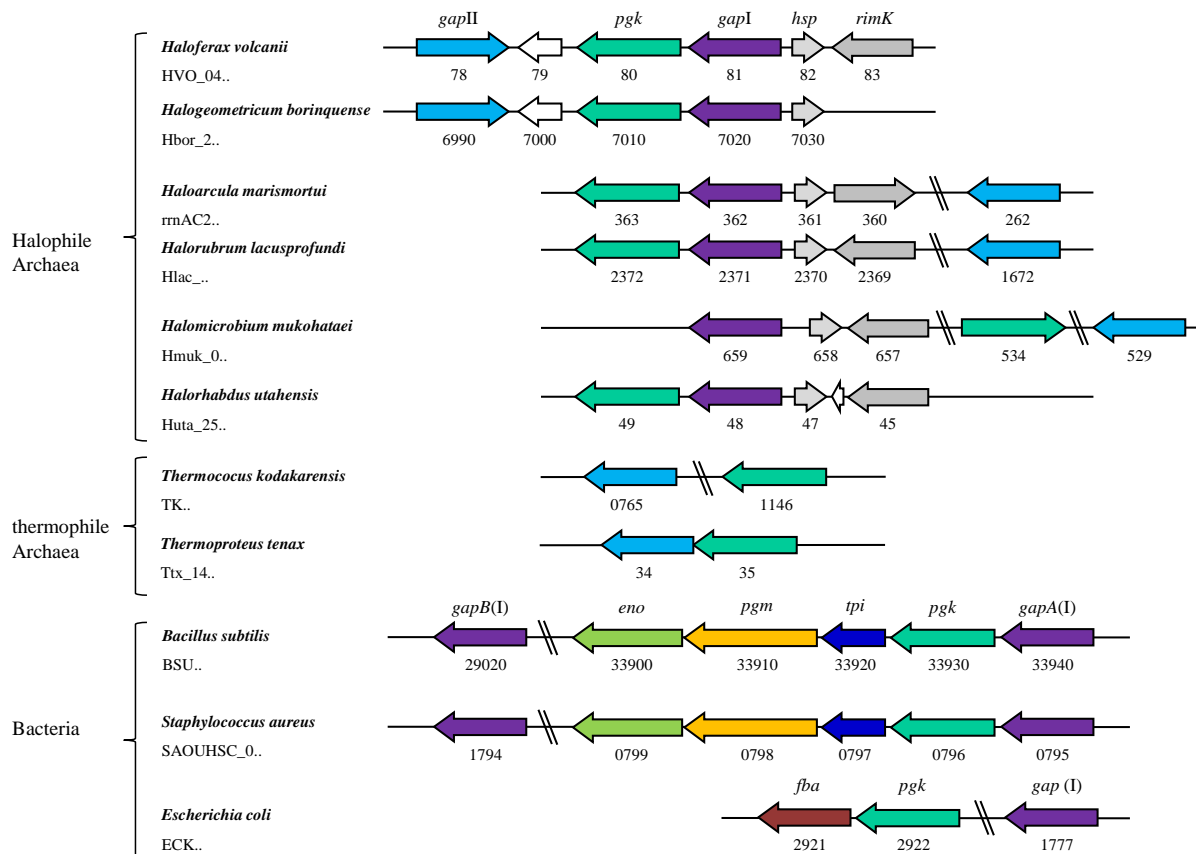
## 6.5 Genominformationen zur GAP-Oxidation

Die Oxidation von GAP zu 3-Phosphoglycerat wird in *H. volcanii* durch die Enzyme GAP-DH und Phosphoglyceratkinase katalysiert. Die im Katabolismus benötigte GAP-DH ist bakteriellen Ursprungs. In der Gluconeogenese wird eine zweite, anabole GAP-DH verwendet, die archaeellen Ursprungs ist. Die im Genom vorhandene Phosphoglyceratkinase wird vermutlich für den glykolytischen und gluconeogenetischen Stoffwechsel benötigt und ist ebenfalls archaeellen Ursprungs.

In anderen halophilen Archaea, wie *Halogeometricum borinquense*, *Haloarcula marismortui*, *Halorubrum lacusprofundi* und *Halomicrobium mukohatei*, wurden über BlastP-Analysen ebenfalls Gene nachgewiesen, die möglicherweise für eine bakterielle GAP-DH (*gapI*), eine archaeelle GAP-DH (*gapII*) und eine Phosphoglyceratkinase (*pgk*) kodieren (Abbildung 57). Auffällig ist, dass die katabole GAP-DH meist in direkter Nachbarschaft der PGK kodiert ist. Die Genominformationen deuten darauf hin, dass die meisten halophilen Archaea, wie *H. volcanii*, eine katabole GAP-DH und eine anabole GAP-DH besitzen. Eine Ausnahme bildet *Halorhabdus utahensis*, in dessen Genom Homologe für die Class I GAP-DH und die PGK, nicht aber für die Class II GAP-DH kodiert sind. Das Fehlen der Class II GAP-DH könnte erklären, warum *H. utahensis* nicht auf Substraten wie Acetat und Aminosäuren wachsen kann (Waino et al. 2000). Genomanalysen zeigten außerdem, dass weitere Enzyme der Gluconeogenese fehlen (Anderson et al. 2011). Eine Sonderstellung von *H. utahensis* bezüglich der Stoffwechselfunktionen wurde bereits für den Xylose-Abbau nachgewiesen (Sutter, 2014) und für den Galactose-Abbau postuliert (6.3; Anderson et al. 2011).

Die Genome der Archaea *Thermococcus kodakarensis* und *Thermoproteus tenax* kodieren, im Gegensatz zu den halophilen Archaea nicht für eine Class I GAP-DH. Für die katabole Umsetzung von GAP wurde stattdessen GAPOR oder GAPN nachgewiesen (Bräsen et al. 2014). Für die Gluconeogenese wurden mit Hilfe von Deletionsmutanten und Microarrayanalysen die Beteiligung von GAP-DH Class II und PGK nachgewiesen (Abbildung 57) (Matsubara et al. 2011; Zaparty et al. 2008).

Die aus den Bacteria *B. subtilis* und *S. aureus* charakterisierten katabolen Class I GAP-DHs (*gapA*) sind im Genom ebenfalls, wie in *H. volcanii*, neben dem Gen der PGK kodiert. Die zweite Class I GAP-DH (*gapB*), die für die Gluconeogenese benötigt wird, ist an einem anderen Locus kodiert (Abbildung 57) (Brinkmann und Martin 1996).



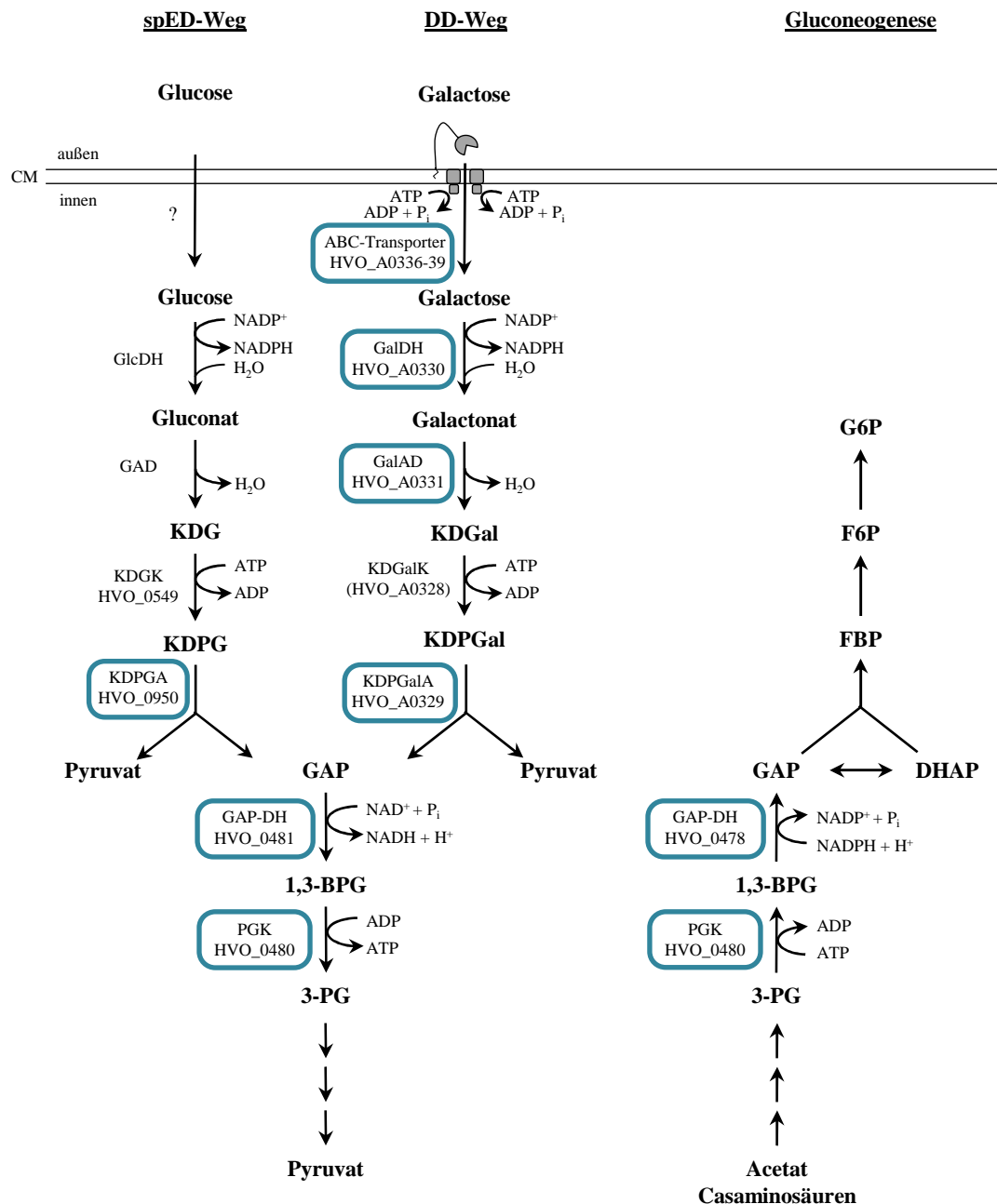
**Abbildung 57** Genomumgebung der am DeLey-Doudoroff-Weg beteiligten Gene in *Haloferax volcanii* und der homologen Gene in verschiedenen Haloarchaea und thermophilen Archaea, sowie der Gene charakterisierter GAP-DHs aus Bacteria. Die Gene wurden als Pfeile dargestellt. Oberhalb der charakterisierten Gene wurden die Gen-Namen notiert, die kodierten Proteine sind: *gapI*, GAP-DH Class I; *gapII*, GAP-DH Class II; *pgk*, Phosphoglyceratkinase; *hsp*, heat shock protein; *rimK*, rimK family protein; *gapB(I)*, anabole GAP-DH Class I; *eno*, Enolase; *pgm*, Phosphoglyceratmutase; *tpi*, Triose-Phosphat-Isomerase; *gapA(I)*, katabole GAP-DH Class I; *fba*, Fructose-1,6-Bisphosphat-Aldolase; *gap(I)*, amphibole GAP-DH. Die Gene wurden entsprechend ihrer Funktion farbig markiert.

## 6.6 Überblick über den Galactose- und Glucose-Abbau, sowie die GAP-Umsetzung in *Haloferax volcanii*

In der vorliegenden Arbeit wurde der vollständige Abbau von Galactose in *H. volcanii* aufgeklärt und gezeigt, dass Galactose über den DeLey-Doudoroff-Weg zu Pyruvat und GAP abgebaut wird (Abbildung 58). Dies ist der erste funktionelle Nachweis eines Abbauwegs für Galactose in der Domäne der Archaea. Die Beteiligung eines ABC-Transporters am Transport von Galactose wurde gezeigt. Außerdem wurde nachgewiesen, dass die Gene des DD-Wegs (nachgewiesen am Beispiel der Galactonat-Dehydratase) durch den Transkriptionsregulator DdcR bei Wachstum auf Galactose transkriptionell aktiviert werden. Weiterhin wurde das Schlüsselenzym der Glucose-Umsetzung über den semiphosphorylierten ED-Weg, die KDPG-Aldolase charakterisiert (Abbildung 58).

Des Weiteren wurden die Enzyme der GAP-Umsetzung nachgewiesen, die katabole Umsetzung von GAP zu 3-Phosphoglycerat wird durch eine Class I GAP-DH sowie eine PGK katalysiert. Dies ist der erste funktionelle Nachweis einer katabolen GAP-DH in der Domäne der Archaea. Die anabole Umsetzung von 3-Phosphoglycerat zu GAP wird hingegen durch eine Class II GAP-DH und die selbe PGK katalysiert (Abbildung 58).

Viele der in dieser Arbeit charakterisierten Enzyme zeigten hohe Ähnlichkeiten zu bakteriellen Proteinen. Dazu gehören die Galactose-Dehydrogenase, Galactonat-Dehydratase, KDPG- und KDPGal-Aldolasen, die katabole GAP-DH und der Transkriptionsregulator DdcR. Die hohe Ähnlichkeit dieser Enzyme zu bakteriellen Proteinen deutet darauf hin, dass die kodierenden Gene durch lateralen Gentransfer aus der Domäne der Bacteria aufgenommen wurden. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit bioinformatischen Analysen, die einen vielfachen horizontalen Gentransfer bakterieller Gene in die Haloarchaea postulieren (Nelson-Sathi et al. 2012).



**Abbildung 58 Überblick über den Galactose- und Glucose-Abbau sowie die Gluconeogenese in *Haloferax volcanii*.** Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Enzyme sind umrandet. Verwendete Abkürzungen: spED-Weg, semiphosphorylierter Entner-Doudoroff-Weg; DD-Weg, DeLey-Doudoroff-Weg; CM, Cytoplasmamembran; KDG, 2-Keto-3-Desoxygluconat; KDGal, 2-Keto-3-Desoxygalactonat; KDPG, 2-Keto-3-Desoxy-6-Phosphogluconat; KDPGal, 2-Keto-3-Desoxy-6-Phosphogalactonat; GAP, Glycerinaldehyd-3-Phosphat; 1,3-BPG, 1,3-Bisphosphoglycerat; 3-PG, 3-Phosphoglycerat; DHAP, Dihydroxyacetonphosphat; FBP, Fructose-1,6-Bisphosphat; F6P, Fructose-6-Phosphat; G6P, Glucose-6-Phosphat; GlcDH, Glucose-Dehydrogenase; GAD, Gluconat-Dehydratase; KDGK, KDG-Kinase; KDPGA, KDPG-Aldolase; GalDH, Galactose-Dehydrogenase; GalAD, Galactonat-Dehydratase; KDGalK, KDGal-Kinase; KDPGalA, KDPGal-Aldolase; GAP-DH, GAP-Dehydrogenase; PGK, Phosphoglyceratkinase.



## 7 Literatur

- Ahmed, H., Ettema, T. J., Tjaden, B., Geerling, A.C., van der Oost, J. and Siebers, B. (2005) The semi-phosphorylative Entner-Doudoroff pathway in hyperthermophilic archaea - a re-evaluation. *Biochem J.*
- Ai, Y., Basu, M., Bergsma, D.J. and Stambolian, D. (1995) Comparison of the enzymatic activities of human galactokinase GALK1 and a related human galactokinase protein GK2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **212**, 687-691.
- Akins, R.E., Levin, P.M. and Tuan, R.S. (1992) Cetyltrimethylammonium bromide discontinuous gel electrophoresis: Mr-based separation of proteins with retention of enzymatic activity. *Anal. Biochem.* **202**, 172-178.
- Albers, S.V., Elferink, M.G., Charlebois, R.L., Sensen, C.W., Driessen, A.J. and Konings, W.N. (1999) Glucose transport in the extremely thermoacidophilic *Sulfolobus solfataricus* involves a high-affinity membrane-integrated binding protein. *J. Bacteriol.* **181**, 4285-4291.
- Albers, S.V., Koning, S.M., Konings, W.N. and Driessen, A.J. (2004) Insights into ABC transport in archaea. *J Bioenerg. Biomembr.* **36**, 5-15.
- Albers, S.V. and Meyer, B.H. (2011) The archaeal cell envelope. *Nat. Rev. Microbiol* **9**, 414-426.
- Allers, T. (2010) Overexpression and purification of halophilic proteins in *Haloferax volcanii*. *Bioeng. Bugs.* **1**, 288-290.
- Allers, T., Barak, S., Liddell, S., Wardell, K. and 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. and Mevarech, M. (2005) Archaeal genetics - the third way. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 58-73.
- Allers, T. and Ngo, H.P. (2003) Genetic analysis of homologous recombination in Archaea: *Haloferax volcanii* as a model organism. *Biochem Soc. Trans.* **31**, 706-710.
- Allers, T., Ngo, H.P., Mevarech, M. and Lloyd, R.G. (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.
- Anderson, I., Scheuner, C., Göker, M., Mavromatis, K., Hooper, S.D., Porat, I., Klenk, H.P., Ivanova, N. and Kyrpides, N. (2011) Novel insights into the diversity of catabolic metabolism from ten haloarchaeal genomes. *PLoS. ONE.* **6**, e20237.
- Angelov, A., Fütterer, O., Valerius, O., Braus, G.H. and Liebl, W. (2005) Properties of the recombinant glucose/galactose dehydrogenase from the extreme thermoacidophile, *Picrophilus torridus*. *FEBS J* **272**, 1054-1062.
- Arias, A. and Cervenansky, C. (1986) Galactose metabolism in *Rhizobium meliloti* L5-30. *J. Bacteriol.* **167**, 1092-1094.

- Auerbach, G., Huber, R., Grättinger, M., Zaiss, K., Schurig, H., Jaenicke, R. and Jacob, U. (1997) Closed structure of phosphoglycerate kinase from *Thermotoga maritima* reveals the catalytic mechanism and determinants of thermal stability. *Structure* **5**, 1475-1483.
- Avron, M. (1986) The osmotic components of halotolerant algae. *Trends in Biochemical Sciences* **11**, 5-6.
- Babbitt, P.C., Hasson, M.S., Wedekind, J.E., Palmer, D.R., Barrett, W.C., Reed, G.H., Rayment, I., Ringe, D., Kenyon, G.L. and Gerlt, J.A. (1996) The enolase superfamily: a general strategy for enzyme-catalyzed abstraction of the  $\alpha$ -protons of carboxylic acids. *Biochemistry* **35**, 16489-16501.
- Babbitt, P.C., Mrachko, G.T., Hasson, M.S., Huisman, G.W., Kolter, R., Ringe, D., Petsko, G.A., Kenyon, G.L. and Gerlt, J.A. (1995) A functionally diverse enzyme superfamily that abstracts the  $\alpha$  protons of carboxylic acids. *Science* **267**, 1159-1161.
- Baker, P.J., Britton, K.L., Fisher, M., Esclapez, J., Pire, C., Bonete, M.J., Ferrer, J. and Rice, D.W. (2009) Active site dynamics in the zinc-dependent medium chain alcohol dehydrogenase superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **106**, 779-784.
- Bell, B.J., Watanabe, L., Rios-Steiner, J.L., Tulinsky, A., Lebioda, L. and Arni, R.K. (2003) Structure of 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate (KDPG) aldolase from *Pseudomonas putida*. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **59**, 1454-1458.
- Berntsson, R.P., Smits, S.H., Schmitt, L., Slotboom, D.J. and Poolman, B. (2010) A structural classification of substrate-binding proteins. *FEBS Lett* **584**, 2606-2617.
- Bitan-Banin, G., Ortenberg, R. and 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.
- Blachnitzky, E.O., Wengenmayer, F. and Kurz, G. (1974) D-Galactose dehydrogenase from *Pseudomonas fluorescens*. Purification, properties and structure. *European Journal of Biochemistry* **47**, 235-250.
- Bonete, M.J., Pire, C., LLorca, F.I. and Camacho, M.L. (1996) Glucose dehydrogenase from the halophilic Archaeon *Haloferax mediterranei*: enzyme purification, characterisation and N-terminal sequence. *FEBS Letters* **383**, 227-229.
- Bradford, M.M. (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.
- Bräsen, C., Esser, D., Rauch, B. and Siebers, B. (2014) Carbohydrate metabolism in Archaea: current insights into unusual enzymes and pathways and their regulation. *Microbiol Mol. Biol. Rev.* **78**, 89-175.
- Brenneis, M., Hering, O., Lange, C. and Soppa, J. (2007) Experimental characterization of *Cis*-acting elements important for translation and transcription in halophilic archaea. *PLoS. Genet.* **3**, e229.

- Brinkmann, H. and Martin, W. (1996) Higher-plant chloroplast and cytosolic 3-phosphoglycerate kinases: a case of endosymbiotic gene replacement. *Plant Mol. Biol.* **30**, 65-75.
- Brochier-Armanet, C., Boussau, B., Gribaldo, S. and Forterre, P. (2008) Mesophilic Crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nat. Rev. Microbiol* **6**, 245-252.
- Brock, T.D., Brock, K.M., Belly, R.T. and Weiss, R.L. (1972) *Sulfolobus*: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. *Arch. Microbiol.* **84**, 54-68.
- Brunner, N.A., Brinkmann, H., Siebers, B. and Hensel, R. (1998) NAD<sup>+</sup>-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Thermoproteus tenax*. The first identified archaeal member of the aldehyde dehydrogenase superfamily is a glycolytic enzyme with unusual regulatory properties. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 6149-6156.
- Brunner, N.A., Siebers, B. and Hensel, R. (2001) Role of two different glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases in controlling the reversible Embden-Meyerhof-Parnas pathway in *Thermoproteus tenax*: regulation on protein and transcript level. *Extremophiles* **5**, 101-109.
- Buchan, D.W., Minneci, F., Nugent, T.C., Bryson, K. and Jones, D.T. (2013) Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench. *Nucleic Acids Res.* **41**, W349-W357.
- Buchanan, C.L., Connaris, H., Danson, M.J., Reeve, C.D. and Hough, D.W. (1999) An extremely thermostable aldolase from *Sulfolobus solfataricus* with specificity for non-phosphorylated substrates. *Biochem. J.* **343 Pt 3**, 563-570.
- Burggraf, S., Huber, H. and Stetter, K.O. (1997) Reclassification of the crenarchaeal orders and families in accordance with 16S rRNA sequence data. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 657-660.
- Caputto, R., Leloir, L.R. (1949) The enzymatic transformation of galactose into glucose derivatives. *Journal of Biological Chemistry* **179**, 497.
- Cerff, R. (1995) The chimeric nature of nuclear genomes and the antiquity of introns as demonstrated by the GAPDH gene system. In *Tracing Biological Evolution and Gene Structures* ed. Go, M. and Schimmel, P.R. pp. 203-223. Elsevier Science.
- Charron, C., Talfournier, F., Isupov, M.N., Littlechild, J.A., Branlant, G., Vitoux, B. and Aubry, A. (2000) The crystal structure of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Methanothermus fervidus* in the presence of NADP<sup>+</sup> at 2.1 Å resolution. *J Mol. Biol.* **297**, 481-500.
- Cline, S.W., Schalkwyk, L.C. and Doolittle, W.F. (1989) Transformation of the archaeobacterium *Halobacterium volcanii* with genomic DNA. *J. Bacteriol.* **171**, 4987-4991.

- Conway, T., Fliege, R., Jones-Kilpatrick, D., Liu, J., Barnell, W.O. and Egan, S.E. (1991) Cloning, characterization and expression of the *Zymomonas mobilis eda* gene that encodes 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase of the Entner-Doudoroff pathway. *Molecular Microbiology* **5**, 2901-2911.
- Cooper, R.A. (1978) The utilisation of D-galactonate and D-2-oxo-3-deoxygalactonate by *Escherichia coli* K-12. Biochemical and genetical studies. *Arch. Microbiol* **118**, 199-206.
- Cotterill, I.C., Henderson, D.P., Shelton, M.C. and Toone, E.J. (1998) The synthetic utility of KDPGal aldolase. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **5**, 103-111.
- Crowhurst, G., McHarg, J. and Littlechild, J. A. (2001) Phosphoglycerate kinases from bacteria and archaea. In *Methods in Enzymology: Hyperthermophilic Enzymes Part B* ed. Adams, M.W.W. and Kelly, R.M. pp. 90-104. Academic Press.
- Danson, M.J. and Hough, D.W. (2005) Promiscuity in the Archaea. The enzymology of metabolic pathways. *The Biochemist* **27**, 17-21.
- Danson, M.J. and Hough, D.W. (1998) Structure, function and stability of enzymes from the Archaea. *Trends. Microbiol.* **6**, 307-314.
- Davies, G.J., Gamblin, S.J., Littlechild, J.A., Dauter, Z., Wilson, K.S. and Watson, H.C. (1994) Structure of the ADP complex of the 3-phosphoglycerate kinase from *Bacillus stearothermophilus* at 1.65 Å. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **50**, 202-209.
- De Ley, J. and Doudoroff, M. (1957) The metabolism of D-galactose in *Pseudomonas saccharophila*. *Journal of Biological Chemistry* **227**, 745-757.
- De Rosa, M. and Gambacorta, A. (1988) The lipids of archaebacteria. *Prog. Lipid Res.* **27**, 153-175.
- Deacon, J. and Cooper, R.A. (1977) D-Galactonate utilisation by enteric bacteria. The catabolic pathway in *Escherichia coli*. *FEBS Letters* **77**, 201-205.
- Dennis, P.P. and Shimmin, L.C. (1997) Evolutionary divergence and salinity-mediated selection in halophilic archaea. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 90-104.
- Elferink, M.G., Albers, S.V., Konings, W.N. and Driessen, A.J. (2001) Sugar transport in *Sulfolobus solfataricus* is mediated by two families of binding protein-dependent ABC transporters. *Mol. Microbiol* **39**, 1494-1503.
- Elkins, J.G., Podar, M., Graham, D.E., Makarova, K.S., Wolf, Y., Randau, L., Hedlund, B.P., Brochier-Armanet, C., Kunin, V., Anderson, I., Lapidus, A., Goltsman, E., Barry, K., Koonin, E.V., Hugenholtz, P., Kyrpides, N., Wanner, G., Richardson, P., Keller, M. and Stetter, K.O. (2008) A korarchaeal genome reveals insights into the evolution of the Archaea. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **105**, 8102-8107.
- Elshafei, A.M. and Abdel-Fatah, O.M. (2001) Evidence for a non-phosphorylated route of galactose breakdown in cell-free extracts of *Aspergillus niger*. *Enzyme Microb. Technol.* **29**, 76-83.

- Elshafei, A.M., Mohawed, S.M., Ammar, M.S. and Abdel-Fatah, O.M. (1995) Properties of enzymes involved in D-galactonate catabolism in fungi. *Antonie Van Leeuwenhoek* **67**, 211-216.
- Entner, N. and Doudoroff, M. (1952) Glucose and gluconic acid oxidation of *Pseudomonas saccharophila*. *J Biol. Chem* **196**, 853-862.
- Ettema, T.J., Ahmed, H., Geerling, A.C., van der Oost, J. and Siebers, B. (2008) The non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPN) of *Sulfolobus solfataricus*: a key-enzyme of the semi-phosphorylative branch of the Entner-Doudoroff pathway. *Extremophiles* **12**, 75-88.
- Eyschen, J., Vitoux, B., Marraud, M., Cung, M.T. and Branlant, G. (1999) Engineered glycolytic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase binds the anti conformation of NAD<sup>+</sup> nicotinamide but does not experience A-specific hydride transfer. *Arch. Biochem. Biophys.* **364**, 219-227.
- Fabry, S. and Hensel, R. (1987) Purification and characterization of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the thermophilic archaebacterium *Methanothermus fervidus*. *European Journal of Biochemistry* **165**, 147-155.
- Fillinger, S., Boschi-Muller, S., Azza, S., Dervyn, E., Branlant, G. and Aymerich, S. (2000) Two glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases with opposite physiological roles in a nonphotosynthetic bacterium. *J Biol. Chem.* **275**, 14031-14037.
- Fullerton, S.W., Griffiths, J.S., Merkel, A.B., Cheriyan, M., Wymer, N.J., Hutchins, M.J., Fierke, C.A., Toone, E.J. and Naismith, J.H. (2006) Mechanism of the Class I KDPG aldolase. *Bioorg. Med. Chem.* **14**, 3002-3010.
- Gäbel, K., Schmitt, J., Schulz, S., Näther, D.J. and Soppa, J. (2013) A comprehensive analysis of the importance of translation initiation factors for *Haloferax volcanii* applying deletion and conditional depletion mutants. *PLoS. ONE.* **8**, e77188.
- Galinski, E.A. (1993) Compatible solutes of halophilic eubacteria: molecular principles, water-solute interaction, stress protection. *Experientia* **49**, 487-496.
- Geddes, B.A. and Oresnik, I.J. (2012) Inability to catabolize galactose leads to increased ability to compete for nodule occupancy in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **194**, 5044-5053.
- Gerlt, J.A., Babbitt, P.C. and Rayment, I. (2005) Divergent evolution in the enolase superfamily: the interplay of mechanism and specificity. *Arch Biochem Biophys.* **433**, 59-70.
- Gottschalk, G. and Bender, R. (1982) D-Gluconate dehydratase from *Clostridium pasteurianum*. *Methods in Enzymology* **90 Pt E**, 283-287.
- Griffiths, J.S., Wymer, N.J., Njolito, E., Niranjanakumari, S., Fierke, C.A. and Toone, E.J. (2002) Cloning, isolation and characterization of the *Thermotoga maritima* KDPG aldolase. *Bioorg. Med. Chem.* **10**, 545-550.

- Gruben, B.S., Zhou, M. and de Vries, R.P. (2012) GalX regulates the D-galactose oxidoreductive pathway in *Aspergillus niger*. *FEBS Letters* **586**, 3980-3985.
- Hanukoglu, I. and Gutfinger, T. (1989) cDNA sequence of adrenodoxin reductase. Identification of NADP-binding sites in oxidoreductases. *European Journal of Biochemistry* **180**, 479-484.
- Harris, J. I. and Waters, M. (1976) Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase. In *The Enzymes* ed. Boyer, P.D. pp. 1-49. Academic Press Inc.
- Hartman, A.L., Norais, C., Badger, J.H., Delmas, S., Haldenby, S., Madupu, R., Robinson, J., Khouri, H., Ren, Q., Lowe, T.M., Maupin-Furlow, J., Pohlschröder, M., Daniels, C., Pfeiffer, F., Allers, T. and Eisen, J.A. (2010) The complete genome sequence of *Haloferax volcanii* DS2, a model archaeon. *PLoS ONE*. **5**, e9605.
- Hensel, R., Laumann, S., Lang, J., Heumann, H. and Lottspeich, F. (1987) Characterization of two D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases from the extremely thermophilic archaeobacterium *Thermoproteus tenax*. *European Journal of Biochemistry* **170**, 325-333.
- Hensel, R., Zwickl, P., Fabry, S., Lang, J. and Palm, P. (1989) Sequence comparison of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases from the three kingdoms: evolutionary implication. *Can. J Microbiol.* **35**, 81-85.
- Hess, D., Krüger, K., Knappik, A., Palm, P. and Hensel, R. (1995) Dimeric 3-phosphoglycerate kinases from hyperthermophilic Archaea - Cloning, sequencing and expression of the 3-phosphoglycerate kinase gene of *Pyrococcus woesei* in *Escherichia coli* and characterization of the protein. Structural and functional comparison with the 3-phosphoglycerate kinase of *Methanothermus fervidus*. *European Journal of Biochemistry* **233**, 227-237.
- Hillman, J.D. and Fraenkel, D.G. (1975) Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **122**, 1175-1179.
- Holmes, M.L. and Dyall-Smith, M.L. (2000) Sequence and expression of a halobacterial  $\beta$ -galactosidase gene. *Molecular Microbiology* **36**, 114-122.
- Holmes, M.L., Scopes, R.K., Moritz, R.L., Simpson, R.J., Englert, C., Pfeifer, F. and Dyall-Smith, M.L. (1997) Purification and analysis of an extremely halophilic  $\beta$ -galactosidase from *Haloferax alicantei*. *Biochim. Biophys. Acta* **1337**, 276-286.
- Huber, H., Huber, R. and Stetter, K. O. (2006) *Thermoproteales*. In *The Prokaryotes* pp. 10-22.
- Huber, H. and Prangishvili, D. (2006) *Sulfolobales*. In *The Prokaryotes* pp. 23-51. Springer New York.
- Huber, H., Hohn, M.J., Rachel, R., Fuchs, T., Wimmer, V.C. and Stetter, K.O. (2002) A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* **417**, 63-67.

- Huber, H. and Stetter, K. O. (2006) *Desulfurococcales*. In *The Prokaryotes* pp. 52-68. Springer New York.
- Isupov, M.N., Fleming, T.M., Dalby, A.R., Crowhurst, G.S., Bourne, P.C. and Littlechild, J.A. (1999) Crystal structure of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J Mol. Biol.* **291**, 651-660.
- Ito, F., Chishiki, H., Fushinobu, S. and Wakagi, T. (2012) Comparative analysis of two glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases from a thermoacidophilic archaeon, *Sulfolobus tokodaii*. *FEBS Lett* **586**, 3097-3103.
- Jansen, K., Stupperich, E. and Fuchs, G. (1982) Carbohydrate synthesis from acetyl CoA in the autotroph *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Arch. Microbiol.* **132**, 355-364.
- Jia, B., Linh, I.T., Lee, S., Pham, B.P., Liu, J., Pan, H., Zhang, S. and Cheong, G.W. (2011) Biochemical characterization of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Thermococcus kodakarensis* KOD1. *Extremophiles.* **15**, 337-346.
- Johnsen, U., Selig, M., Xavier, K.B., Santos, H. and 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, J.M., Schulz, A.C., Tästensen, J.B. and Schönheit, P. (2015) XacR - a novel transcriptional regulator of D-xylose and L-arabinose catabolism in the haloarchaeon *Haloferax volcanii*. *Environ. Microbiol.* **17**, 1663-1676.
- Jones, D.T. (1999) Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J. Mol. Biol.* **292**, 195-202.
- Koksharova, O., Schubert, M., Shestakov, S. and Cerff, R. (1998) Genetic and biochemical evidence for distinct key functions of two highly divergent GAPDH genes in catabolic and anabolic carbon flow of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Mol. Biol.* **36**, 183-194.
- Koning, S.M., Elferink, M.G., Konings, W.N. and Driessen, A.J. (2001) Cellobiose uptake in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* is mediated by an inducible, high-affinity ABC transporter. *J Bacteriol.* **183**, 4979-4984.
- Krietsch, W.K. and Bücher, T. (1970) 3-phosphoglycerate kinase from rabbit skeletal muscle and yeast. *European Journal of Biochemistry* **17**, 568-580.
- Krishnan, G. and Altekari, W. (1990) Characterization of a halophilic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the archaeobacterium *Haloarcula vallismortis*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **36**, 19-32.
- Kurn, N., Contreras, I. and Shapiro, L. (1978) Galactose catabolism in *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* **135**, 517-520.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

- Lamble, H.J., Heyer, N.I., Bull, S.D., Hough, D.W. and Danson, M.J. (2003) Metabolic pathway promiscuity in the archaeon *Sulfolobus solfataricus* revealed by studies on glucose dehydrogenase and 2-keto-3-deoxygluconate aldolase. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 34066-34072.
- Lamble, H.J., Milburn, C.C., Taylor, G.L., Hough, D.W. and Danson, M.J. (2004) Gluconate dehydratase from the promiscuous Entner-Doudoroff pathway in *Sulfolobus solfataricus*. *FEBS Lett* **576**, 133-136.
- Lamble, H.J., Theodossis, A., Milburn, C.C., Taylor, G.L., Bull, S.D., Hough, D.W. and Danson, M.J. (2005) Promiscuity in the part-phosphorylative Entner-Doudoroff pathway of the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *FEBS Letters* **579**, 6865-6869.
- Langworthy, T.A. and Pond, J.L. (1986) Archaeobacterial ether lipids and chemotaxonomy. *System. Appl. Microbiol.* **7**, 253-257.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J. and Higgins, D.G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* **23**, 2947-2948.
- Lee, S.J., Böhm, A., Krug, M. and Boos, W. (2007) The ABC of binding-protein-dependent transport in Archaea. *Trends Microbiol* **15**, 389-397.
- Leigh, J.A., Albers, S.V., Atomi, H. and Allers, T. (2011) Model organisms for genetics in the domain Archaea: methanogens, halophiles, *Thermococcales* and *Sulfolobales*. *FEMS Microbiol. Rev.* **35**, 577-608.
- Leloir, L.F. (1951) The enzymatic transformation of uridine diphosphate glucose into a galactose derivative. *Arch. Biochem. Biophys.* **33**, 186-190.
- Littlechild, J.A. and Isupov, M. (2001) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Sulfolobus solfataricus*. *Methods in Enzymology* **331**, 105-117.
- Lubelska, J.M., Jonuscheit, M., Schleper, C., Albers, S.V. and Driessen, A.J. (2006) Regulation of expression of the arabinose and glucose transporter genes in the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Extremophiles.* **10**, 383-391.
- Maier, L.K., Benz, J., Fischer, S., Alstetter, M., Jaschinski, K., Hilker, R., Becker, A., Allers, T., Soppa, J. and Marchfelder, A. (2015) Deletion of the Sm1 encoding motif in the lsm gene results in distinct changes in the transcriptome and enhanced swarming activity of *Haloferax* cells. *Biochimie.*
- Marchler-Bauer, A., Derbyshire, M.K., Gonzales, N.R., Lu, S., Chitsaz, F., Geer, L.Y., Geer, R.C., He, J., Gwadz, M., Hurwitz, D.I., Lanczycki, C.J., Lu, F., Marchler, G.H., Song, J.S., Thanki, N., Wang, Z., Yamashita, R.A., Zhang, D., Zheng, C. and Bryant, S.H. (2015) CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Res.* **43**, D222-D226.
- Matsubara, K., Yokooji, Y., Atomi, H. and Imanaka, T. (2011) Biochemical and genetic characterization of the three metabolic routes in *Thermococcus kodakarensis* linking glyceraldehyde 3-phosphate and 3-phosphoglycerate. *Mol. Microbiol* **81**, 1300-1312.



- Mevarech, M., Frolow, F. and Gloss, L.M. (2000) Halophilic enzymes: proteins with a grain of salt. *Biophys. Chem.* **86**, 155-164.
- Mevarech, M. and Werczberger, R. (1985) Genetic transfer in *Halobacterium volcanii*. *J. Bacteriol.* **162**, 461-462.
- Molina-Henares, A.J., Krell, T., Eugenia, G.M., Segura, A. and Ramos, J.L. (2006) Members of the IclR family of bacterial transcriptional regulators function as activators and/or repressors. *FEMS Microbiol Rev.* **30**, 157-186.
- Motter, F.A., Kuivanen, J., Keranen, H., Hilditch, S., Penttilä, M. and Richard, P. (2014) Categorisation of sugar acid dehydratases in *Aspergillus niger*. *Fungal. Genet. Biol.* **64**, 67-72.
- Mukund, S. and Adams, M.W.W. (1995) Glyceraldehyde-3-phosphate ferredoxin oxidoreductase, a novel tungsten-containing enzyme with a potential glycolytic role in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 8389-8392.
- Mullakhanbhai, M.F. and Larsen, H. (1975) *Halobacterium volcanii* spec. nov., a Dead Sea halobacterium with a moderate salt requirement. *Arch. Microbiol.* **104**, 207-214.
- Nelson-Sathi, S., Dagan, T., Landan, G., Janssen, A., Steel, M., McInerney, J.O., Deppenmeier, U. and Martin, W.F. (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.
- Nunoura, T., Takaki, Y., Kakuta, J., Nishi, S., Sugahara, J., Kazama, H., Chee, G.J., Hattori, M., Kanai, A., Atomi, H., Takai, K. and Takami, H. (2011) Insights into the evolution of Archaea and eukaryotic protein modifier systems revealed by the genome of a novel archaeal group. *Nucleic Acids Res.* **39**, 3204-3223.
- Nurizzo, D., Halbig, D., Sprenger, G.A. and Baker, E.N. (2001) Crystal structures of the precursor form of glucose-fructose oxidoreductase from *Zymomonas mobilis* and its complexes with bound ligands. *Biochemistry* **40**, 13857-13867.
- Oren, A. (2013) *Salinibacter*: an extremely halophilic bacterium with archaeal properties. *FEMS Microbiol Lett.* **342**, 1-9.
- Oren, A. (2007) Biodiversity in highly saline environments. In *Physiology and biochemistry of extremophiles* ed. Gerday, C. and Glansdorff, N. pp. 223-231. Washington, DC: ASM Press.
- Oren, A. (1999) Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 334-348.
- Pauluhn, A., Ahmed, H., Lorentzen, E., Buchinger, S., Schomburg, D., Siebers, B. and Pohl, E. (2008) Crystal structure and stereochemical studies of KD(P)G aldolase from *Thermoproteus tenax*. *Proteins* **72**, 35-43.
- Pickl, A., Johnsen, U., Archer, R.M. and Schönheit, P. (2014) Identification and characterization of 2-keto-3-deoxygluconate kinase and 2-keto-3-deoxygalactonate kinase in the haloarchaeon *Haloferax volcanii*. *FEMS Microbiol Lett.*

- Pickl, A., Johnsen, U. and Schönheit, P. (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. *J. Bacteriol.* **194**, 3088-3097.
- Prüß, B., Meyer, H.E. and Holldorf, A.W. (1993) Characterization of the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from the extremely halophilic archaebacterium *Haloarcula vallismortis*. *Arch. Microbiol.* **160**, 5-11.
- Purves, J., Cockayne, A., Moody, P.C. and Morrissey, J.A. (2010) Comparison of the regulation, metabolic functions, and roles in virulence of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase homologues gapA and gapB in *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **78**, 5223-5232.
- Reher, M., Fuhrer, T., Bott, M. and 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. and 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.
- Robert, X. and Gouet, P. (2014) Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Res.* **42**, W320-W324.
- Robinson, C. and Bolhuis, A. (2004) Tat-dependent protein targeting in prokaryotes and chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta* **1694**, 135-147.
- Ronimus, R.S. and Morgan, H.W. (2003) Distribution and phylogenies of enzymes of the Embden-Meyerhof-Parnas pathway from archaea and hyperthermophilic bacteria support a gluconeogenic origin of metabolism. *Archaea* **1**, 199-221.
- Rose, R.W., Brüser, T., Kissinger, J.C. and Pohlschröder, M. (2002) Adaptation of protein secretion to extremely high-salt conditions by extensive use of the twin-arginine translocation pathway. *Mol. Microbiol* **45**, 943-950.
- Ryu, H.C., Park, S.Y., Lee, S.H. and Kim, J.S. (2010) Cloning, expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase from *Zymomonas mobilis* ZM4. *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* **66**, 471-473.
- Sambrook, S., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schäfer, T. and Schönheit, P. (1993) Gluconeogenesis from pyruvate in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: involvement of reactions of the Embden-Meyerhof pathway. *Arch. Microbiol.* **159**, 354-363.
- Schell, M.A. and Wilson, D.B. (1977) Purification and properties of galactokinase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **252**, 1162-1166.

- Schleper, C., Puehler, G., Holz, I., Gambacorta, A., Janekovic, D., Santarius, U., Klenk, H.P. and Zillig, W. (1995a) *Picrophilus* gen. nov., fam. nov.: a novel aerobic, heterotrophic, thermoacidophilic genus and family comprising archaea capable of growth around pH 0. *J. Bacteriol.* **177**, 7050-7059.
- Schleper, C., Pühler, G., Kühlmorgen, B. and Zillig, W. (1995b) Life at extremely low pH. *Nature* **375**, 741-742.
- Schlesinger, D.H., Schell, M.A. and Wilson, D.B. (1977) The NH<sub>2</sub>-terminal sequences of galactokinase from *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* **83**, 45-47.
- Schulz, Anne-Christine, Promotoranalysen an Genen des D-Xylose und L-Arabinose-Abbaus in dem halophilen Archaeon *Haloferax volcanii*, Masterarbeit, 2014
- Schurig, H., Beaucamp, N., Ostendorp, R., Jaenicke, R., Adler, E. and Knowles, J.R. (1995) Phosphoglycerate kinase and triosephosphate isomerase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* form a covalent bifunctional enzyme complex. *EMBO Journal* **14**, 442-451.
- Segerer, A. and Stetter, K. O. (1992) The order *Sulfolobales*. In *The Prokaryotes* ed. Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.H. pp. 684-701. New York: Springer-Verlag.
- Seta, F.D., Boschi-Muller, S., Vignais, M.L. and Branlant, G. (1997) Characterization of *Escherichia coli* strains with gapA and gapB genes deleted. *J. Bacteriol.* **179**, 5218-5221.
- Shuster, C.W. and Doudoroff, M. (1967) Purification of 2-keto-3-deoxy-6-phosphohexonate aldolase of *Pseudomonas saccharophila*. *Archiv für Mikrobiologie* **59**, 279-286.
- Siebers, B. and Schönheit, P. (2005) Unusual pathways and enzymes of central carbohydrate metabolism in Archaea. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 695-705.
- Smith, L.D., Budgen, N., Bungard, S.J., Danson, M.J. and Hough, D.W. (1989) Purification and characterization of glucose dehydrogenase from the thermoacidophilic archaeobacterium *Thermoplasma acidophilum*. *Biochem. J.* **261**, 973-977.
- Spang, A., Hatzenpichler, R., Brochier-Armanet, C., Rattai, T., Tischler, P., Spieck, E., Streit, W., Stahl, D.A., Wagner, M. and Schleper, C. (2010) Distinct gene set in two different lineages of ammonia-oxidizing archaea supports the phylum Thaumarchaeota. *Trends Microbiol* **18**, 331-340.
- Sperka, S., Zehelein, E., Fiedler, S., Fischer, S., Sommer, R. and Buckel, P. (1989) Complete nucleotide sequence of *Pseudomonas fluorescens* D-galactose dehydrogenase gene. *Nucleic Acids Res.* **17**, 5402.
- Storf, S., Pfeiffer, F., Dilks, K., Chen, Z.Q., Imam, S. and Pohlschröder, M. (2010) Mutational and bioinformatic analysis of haloarchaeal lipobox-containing proteins. *Archaea.* **2010**.

- Stouthamer, A.H. (1961) Glucose and galactose metabolism in *Gluconobacter liquefaciens*. *Biochim. Biophys. Acta* **48**, 500.
- Sutter, Jan-Moritz, Enzyme des Zuckerstoffwechsels in halophilen Archaea, Diplomarbeit 2010
- Sutter, Jan-Moritz, Pentosestoffwechsel in halophilen Archaea, Doktorarbeit, 2014
- Suzuki, H., Koyanagi, T., Izuka, S., Onishi, A. and Kumagai, H. (2005) The yliA, -B, -C, and -D genes of *Escherichia coli* K-12 encode a novel glutathione importer with an ATP-binding cassette. *J. Bacteriol.* **187**, 5861-5867.
- Szabo, J., Varga, A., Flachner, B., Konarev, P.V., Svergun, D.I., Zavodszky, P. and Vas, M. (2008) Communication between the nucleotide site and the main molecular hinge of 3-phosphoglycerate kinase. *Biochemistry* **47**, 6735-6744.
- Szumilo, T. (1981a) Pathway for D-galactonate catabolism in nonpathogenic mycobacteria. *J. Bacteriol.* **148**, 368-370.
- Szumilo, T. (1981b) Purification and properties of D-galactonate dehydratase from *Mycobacterium butyricum*. *Biochim. Biophys. Acta* **661**, 240-246.
- Tästensen, Julia-Beate, Analyse von Proteinen des Zuckerstoffwechsels in *Haloferax volcanii*, Diplomarbeit 2010
- Thomm, M. (2007) Transcription: Mechanism and regulation. In *Archaea. Molecular and cellular biology* ed. Cavicchioli, R. pp. 139-157. Washington, DC: ASM Press.
- Torreblanca, M., Rodriguez-Valera, F., Juez, G., Ventosa, A., Kamekura, M. and Kates, M. (1986) Classification of non-alkaliphilic halobacteria based on numerical taxonomy and polar lipid composition, and description of *Haloarcula* gen. nov. and *Haloferax* gen. nov. *System. Appl. Microbiol.* **8**, 89-99.
- Varga, A., Lionne, C., Lallemand, P., Szabo, J., Adamek, N., Valentin, C., Vas, M., Barman, T. and Chaloin, L. (2009) Direct kinetic evidence that lysine 215 is involved in the phospho-transfer step of human 3-phosphoglycerate kinase. *Biochemistry* **48**, 6998-7008.
- Vorgias, C.E., Lemaire, H.G. and Wilson, K.S. (1991) Overexpression and purification of the galactose operon enzymes from *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* **2**, 330-338.
- Waino, M., Tindall, B.J. and Ingvorsen, K. (2000) *Halorhabdus utahensis* gen. nov., sp. nov., an aerobic, extremely halophilic member of the Archaea from Great Salt Lake, Utah. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol* **50 Pt 1**, 183-190.
- Walters, M.J., Srikannathasan, V., McEwan, A.R., Naismith, J.H., Fierke, C.A. and Toone, E.J. (2008) Characterization and crystal structure of *Escherichia coli* KDPGal aldolase. *Bioorg. Med. Chem.* **16**, 710-720.

- Weissbach, A. and Hurwitz, J. (1959) The formation of 2-keto-3-deoxyheptonic acid in extracts of *Escherichia coli* B; I. Identification. *Journal of Biological Chemistry* **234**, 705-709.
- Wellner, A., Raitses, G.M. and Tawfik, D.S. (2013) Mechanisms of protein sequence divergence and incompatibility. *PLoS. Genet.* **9**, e1003665.
- Wengenmayer, F., Ueberschar, K.H., Kurz, G. and Sund, H. (1973) D-galactose dehydrogenase from *Pseudomonas saccharophila*. Purification, properties and structure. *European Journal of Biochemistry* **40**, 49-61.
- Werner, F. and Grohmann, D. (2011) Evolution of multisubunit RNA polymerases in the three domains of life. *Nat. Rev. Microbiol* **9**, 85-98.
- Wichelecki, D.J., Balthazor, B.M., Chau, A.C., Vetting, M.W., Fedorov, A.A., Fedorov, E.V., Lukk, T., Patskovsky, Y.V., Stead, M.B., Hillerich, B.S., Seidel, R.D., Almo, S.C. and Gerlt, J.A. (2014) Discovery of function in the enolase superfamily: D-mannonate and d-gluconate dehydratases in the D-mannonate dehydratase subgroup. *Biochemistry* **53**, 2722-2731.
- Wieczorek, S.J., Kalivoda, K.A., Clifton, J.G., Ringe, D., Petsko, G.A. and Gerlt, J.A. (1999) Evolution of enzymatic activities in the enolase superfamily: Identification of a "new" general acid catalyst in the active site of D-galactonate dehydratase from *Escherichia coli*. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 4540-4541.
- Wiegert, T., Sahn, H. and Sprenger, G.A. (1997) The substitution of a single amino acid residue (Ser-116 --> Asp) alters NADP-containing glucose-fructose oxidoreductase of *Zymomonas mobilis* into a glucose dehydrogenase with dual coenzyme specificity. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 13126-13133.
- Wierenga, R.K., De Maeyer, M. and Hol, W.G. (1985) Interaction of Pyrophosphate Moities with  $\alpha$ -Helixes in Dinucleotide Binding Proteins. *Biochemistry* **24**, 1346-1357.
- Wilkins, S. (2015) Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000Prime. Rep.* **7**, 14.
- Williams, J.G. and Gratzer, W.B. (1971) Limitations of the detergent-polyacrylamide gel electrophoresis method for molecular weight determination of proteins. *J. Chromatogr.* **57**, 121-125.
- Woese, C.R. (1987) Bacterial evolution. *Bacteriol. Rev.* **51**, 221-271.
- Woese, C.R., Kandler, O. and Wheelis, M.L. (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.
- Wong, T.Y. and Yao, X.T. (1994) The DeLey-Doudoroff pathway of galactose metabolism in *Azotobacter vinelandii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 2065-2068.
- Wymer, N., Buchanan, L.V., Henderson, D., Mehta, N., Botting, C.H., Pocivavsek, L., Fierke, C.A., Toone, E.J. and Naismith, J.H. (2001) Directed evolution of a new catalytic site in 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase from *Escherichia coli*. *Structure.* **9**, 1-9.

- Xavier, K.B., Martins, L.O., Peist, R., Kossmann, M., Boos, W. and Santos, H. (1996) High-affinity maltose/trehalose transport system in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*. *J. Bacteriol.* **178**, 4773-4777.
- Xie, C.H. and Yokota, A. (2005) Reclassification of *Alcaligenes latus* strains IAM 12599T and IAM 12664 and *Pseudomonas saccharophila* as *Azohydromonas lata* gen. nov., comb. nov., *Azohydromonas australica* sp. nov. and *Pelomonas saccharophila* gen. nov., comb. nov., respectively. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol* **55**, 2419-2425.
- Yang, J., Fu, X., Jia, Q., Shen, J., Biggins, J.B., Jiang, J., Zhao, J., Schmidt, J.J., Wang, P.G. and Thorson, J.S. (2003) Studies on the substrate specificity of *Escherichia coli* galactokinase. *Org. Lett.* **5**, 2223-2226.
- Zaigler, A., Schuster, S.C. and Soppa, J. (2003) Construction and usage of a onefold-coverage shotgun DNA microarray to characterize the metabolism of the archaeon *Haloferax volcanii*. *Molecular Microbiology* **48**, 1089-1105.
- Zaparty, M., Tjaden, B., Hensel, R. and Siebers, B. (2008) The central carbohydrate metabolism of the hyperthermophilic crenarchaeote *Thermoproteus tenax*: pathways and insights into their regulation. *Arch Microbiol* **190**, 231-245.
- Zhang, R.G., Kim, Y., Skarina, T., Beasley, S., Laskowski, R., Arrowsmith, C., Edwards, A., Joachimiak, A. and Savchenko, A. (2002) Crystal structure of *Thermotoga maritima* 0065, a member of the IclR transcriptional factor family. *J Biol. Chem* **277**, 19183-19190.
- Zheng, W.H., Vastermark, A., Shlykov, M.A., Reddy, V., Sun, E.I. and Saier, M.H., Jr. (2013) Evolutionary relationships of ATP-Binding Cassette (ABC) uptake porters. *BMC Microbiol* **13**, 98.
- Zillig, W., Stetter, K.O., Prangishvilli, D., Schäfer, W., Wunderl, S., Janekovic, D., Holz, I. and Palm, P. (1982) *Desulfurococcaceae*, the second family of the extremely thermophilic, anaerobic, sulfur-respiring *Thermoproteales*. *Zentralbl. Bakteriolog. Hyg., I. Abt., Orig. C.* **3**, 304-317.
- Zwickl, P., Fabry, S., Bogedain, C., Haas, A. and Hensel, R. (1990) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the hyperthermophilic archaebacterium *Pyrococcus woesei*: characterization of the enzyme, cloning and sequencing of the gene, and expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**, 4329-4338.

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. P. Schönheit für die Überlassung des Themas, für die Betreuung und Förderung, sowie für viele hilfreiche Diskussionen.

Frau Dr. U. Johnsen möchte ich für die vielen hilfreichen Diskussionen und praktischen Tipps danken.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Allgemeine Mikrobiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel möchte ich für die angenehme und harmonische Zusammenarbeit danken. Mein besonderer Dank gilt hierbei Marcel, Tom, Jan-Moritz, Andreas, Angelika, Holger, Dagmar und Kerstin.

Abschließend möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie bedanken, die mich zu jeder Zeit in meinem Vorhaben bestärkt und mich in jeder Hinsicht unterstützt hat. Ein ganz besonderer Dank gilt hierbei Sven, der mich in jeder Situation wieder zum Lachen bringen konnte.

**Lebenslauf**

Name	Julia-Beate Tästensen
Geboren am	12.07.1986
Geburtsort	Schleswig
Nationalität	deutsch
Wohnort	Kiel

**Schulbildung:**

1992-1996	Grundschule
1996-2005	Gymnasium
2005	Abitur

**Studium**

Okt. 2005 bis Dez. 2010	Studium der Biologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
Jan. 2010 bis Dez. 2010	Experimentelle Diplomarbeit am Institut für Allgemeine Mikriobiologie der CAU zu Kiel in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. P. Schönheit
Feb. 2011	Beginn der experimentellen Arbeiten zu der vorliegenden Dissertation am Institut für Allgemeine Mikrobiologie der CAU zu Kiel in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. P. Schönheit