

Zuckerstoffwechsel in Archaea

Untersuchungen zur allosterischen Regulation von Pyruvat Kinasen sowie zum
Abbau des Desoxy-Zuckers L-Rhamnose

Dissertation

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

vorgelegt von
Andreas Reinhardt

- Kiel 2019 -

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von August 2015 bis Dezember 2018 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. A.J. Scheidig

Tag der mündlichen Prüfung: 09.04.2019

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 09.04.2019

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. Mir wurde kein akademischer Grad entzogen.

.....

Andreas Reinhardt

Die während dieser Doktorarbeit erzielten Ergebnisse werden oder wurden in den folgenden Artikeln veröffentlicht:

Reinhardt, A., Johnsen, U. and Schönheit, P. (2019) L-Rhamnose catabolism in archaea. *Molecular Microbiology*, Im Druck.

Johnsen, U., **Reinhardt, A.,** Landan, G., Tria, F.D.K., Turner, J.M., Davies, C. and Schönheit, P. (2019) New views on an old enzyme: allosteric regulation and evolution of archaeal pyruvate kinases. In Revision, FEBS Journal.

Inhalt

1	Zusammenfassung	7
2	Summary	11
3	Einleitung	14
3.1	Zuckerabbauwege in Eukarya, Bacteria und Archaea	17
3.1.1	Der Abbau von D-Glucose und die Rolle der Pyruvat Kinase als allosterischer Kontrollpunkt.....	17
3.1.2	Abbau von L-Rhamnose	26
4	Material und Methoden	29
4.1	Wachstum von Organismen.....	29
4.1.1	Wachstum von <i>Haloferax volcanii</i>	29
4.1.2	Wachstum von <i>Sulfolobus solfataricus</i>	31
4.1.3	Wachstum von <i>Escherichia coli</i>	32
4.2	Molekularbiologische Methoden	33
4.2.1	Isolation, Reinigung, Konzentrations- und Größenbestimmung von DNA und RNA .	33
4.2.2	Polymerase-Kettenreaktion.....	34
4.2.3	Klonierung von DNA-Fragmenten in einen Vektor	38
4.2.4	Ortsspezifische Mutagenese.....	39
4.2.5	Transformation von <i>E. coli</i>	40
4.2.6	Transformation von <i>H. volcanii</i>	42
4.2.7	Konstruktion von Deletionsmutanten von <i>H. volcanii</i>	42
4.2.8	Transkriptanalysen mittels Northern-Blot und RT-PCR	44
4.3	Homologe und heterologe Expression von Proteinen.....	45
4.4	Analytische Methoden	47
4.4.1	Bestimmung von Rhamnose in Wachstumsüberständen	47
4.4.2	Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	47
4.4.3	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	47
4.4.4	Bestimmung des apparenten Molekulargewichts von Proteinen	48

4.4.5	Ultrafiltration	48
4.4.6	Colorimetrische Bestimmung von 2-Keto-3-Desoxy-Zuckersäuren	48
4.4.7	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	49
4.4.8	Thermal Shift Assays.....	49
4.5	Reinigung von rekombinanten Proteinen.....	50
4.6	Charakterisierung von gereinigten Enzymen.....	52
4.6.1	Charakterisierung von Pyruvat Kinasen	52
4.6.2	Charakterisierung von Enzymen des Rhamnose-Abbaus	55
4.7	Bioinformatische Sequenzanalysen von Proteinen.....	58
5	Ergebnisse	59
5.1	Pyruvat Kinasen aus Archaea	59
5.1.1	3-Phosphoglycerat-Bindung im allosterischen Zentrum der PK aus <i>Pyrobaculum aerophilum</i>	60
5.1.2	Die PKs aus Thermoproteales enthalten ein konserviertes 3PG-Bindemotiv.....	61
5.1.3	Reinigung der archaellen PKs.....	63
5.1.4	Die PKs aus Thermoproteales werden mit 3PG allosterisch aktiviert.....	63
5.1.5	Die PKs aus Aigarchaeota, Korarchaeota und Thermococcales werden nicht allosterisch aktiviert.....	68
5.1.6	Die PKs aus hyperthermophilen Methanococcales werden mit AMP allosterisch aktiviert.....	70
5.2	Untersuchungen zum Abbau von L-Rhamnose in Archaea.....	74
5.2.1	Abbau von L-Rhamnose in <i>H. volcanii</i>	74
5.2.1.1	Rhamnose wird über einen ABC-Transporter aufgenommen.....	76
5.2.1.2	Rhamnose wird über die Enzyme eines Diketo-Hydrolase Weges abgebaut	78
5.2.1.3	RhcR ist ein Transkriptionsaktivator der Gene des Rhamnose-Katabolismus	86
5.2.1.4	<i>Lactate utilization proteins</i> sind am Rhamnose-Abbau beteiligt.....	91
5.2.2	Abbau von Rhamnose in hyperthermophilen Crenarchaeota	93
5.2.2.1	Der Diketo-Hydrolase Weg in <i>Sulfolobus solfataricus</i> und <i>Vulcanisaeta distributa</i> ...	94
6	Diskussion	99
6.1	Pyruvat Kinasen aus Archaea	99

6.1.1	Allosterische Regulation.....	99
6.1.2	Sequenzanalysen von 3PG-, FBP- und AMP-aktivierten PKs	100
6.1.3	Regulation der archaeellen Glykolyse	106
6.2	L-Rhamnose-Katabolismus in Archaea	108
6.2.1	Transport und Abbau von Rhamnose in <i>H. volcanii</i>	108
6.2.1.1	Der ABC-Transporter der Rhamnose-Aufnahme	108
6.2.1.2	Phylogenetische Einordnung der Enzyme des Diketo-Hydrolase Weges	110
6.2.1.3	Die transkriptionelle Regulation des Rhamnose-Abbaus	117
6.2.1.4	<i>Lactate utilization proteins</i>	120
6.2.2	Der Diketo-Hydrolase Weg in Haloarchaea und hyperthermophilen Crenarchaeota.	122
7	Literatur	127
	Danksagung	137

1 Zusammenfassung

Archaea bauen D-Glucose nicht über die klassischen Embden-Meyerhof (EM)- und Entner-Doudoroff (ED)-Wege aus Bacteria und Eukarya ab, sondern verwenden modifizierte Varianten dieser Wege. Pyruvat Kinasen (PKs) katalysieren die letzte Reaktion sowohl in den klassischen als auch in den modifizierten glykolytischen Abbauwegen ($\text{PEP} + \text{ADP} \rightarrow \text{Pyruvat} + \text{ATP}$). Die PKs aus Bacteria und Eukarya werden in der Regel durch die Zuckerphosphate Fructose-1,6-Bisphosphat (FBP) oder AMP allosterisch aktiviert und bilden damit einen wichtigen Kontrollpunkt in der Regulation der klassischen glykolytischen Abbauwege. Die bisher charakterisierten PKs aus Archaea zeigen hingegen keine allosterische Regulierbarkeit mit den klassischen Zuckerphosphaten. Kürzlich wurde die Struktur der PK des hyperthermophilen Archaeons *Pyrobaculum aerophilum* aus der Ordnung der Thermoproteales gelöst und gezeigt, dass die PK mit dem neuartigen Effektor 3-Phosphoglycerat (3PG) allosterisch aktiviert wird (Solomons *et al.*, 2013). Außerdem wurden fünf Aminosäuren für die Bindung von 3PG im allosterischen Zentrum der PK identifiziert (Solomons *et al.*, 2013). Um zu prüfen, ob die allosterische Aktivierung mit 3PG eine Besonderheit der PK aus *P. aerophilum* oder eine generelle Eigenschaft archaeeller PKs ist, wurden im ersten Teil dieser Arbeit die PKs aus verschiedenen archaeellen Gruppen charakterisiert und insbesondere auf ihre allosterische Regulierbarkeit geprüft.

Im Gegensatz zum Abbau von Glucose ist der Abbau des in der Natur weit verbreiteten Desoxy-Zuckers L-Rhamnose in Archaea bisher kaum untersucht. In den meisten Bacteria wird Rhamnose über einen phosphorylierten Abbauweg abgebaut. Für zwei Bacteria ist ein alternativer, nicht-phosphorylierter Abbauweg für Rhamnose beschrieben und in diesem Diketo-Hydrolase Weg wird Rhamnose zu Pyruvat und L-Lactat umgesetzt (Bae *et al.*, 2015, Watanabe & Makino, 2009). Genomanalysen dieser Arbeit deuteten darauf hin, dass auch einige halophile und hyperthermophile Archaea Gene eines Diketo-Hydrolase Weges aufweisen. Deshalb war es die Aufgabe im zweiten Teil dieser Arbeit zu untersuchen, ob Archaea einen Diketo-Hydrolase-Weg für den Abbau von Rhamnose verwenden.

Untersuchungen zur allosterischen Regulation von archaeellen Pyruvat Kinasen

3PG ist ein allosterischer Aktivator der PKs aus Thermoproteales. Vergleiche der Aminosäuresequenzen von ausgewählten PKs ergaben, dass die fünf an der 3PG-Bindung beteiligten Aminosäuren der PK aus *P. aerophilum* auch in den PKs weiterer Vertreter der

Ordnung Thermoproteales, in *Pyrobaculum islandicum*, *Thermoproteus uzoniensis* und *Caldivirga maquilungensis* konserviert sind. Die PKs dieser Organismen wurden als rekombinante Enzyme gereinigt und eine allosterische Aktivierung der PKs mit 3PG gezeigt. Außerdem wurde mittels ortsspezifischer Mutageneseexperimente nachgewiesen, dass die konservierten Reste der 3PG-Bindung der PK aus *P. aerophilum* auch in diesen PKs essentiell für die 3PG-Bindung sind. Damit wurde gezeigt, dass für eine allosterische Aktivierung von PKs mit 3PG ein vollständiges Motiv aus fünf Aminosäuren vorhanden sein muss. Weitere Untersuchungen mit den archaeellen PKs aus *Vulcanisaeta moutnovskia*, ein weiterer Organismus der Thermoproteales, sowie aus dem Aigarchaeon *Candidatus Caldiarchaeum subterraneum*, dem Korarchaeon *Candidatus Korarchaeum cryptofilum* und aus den hyperthermophilen Euryarchaeota *Pyrococcus furiosus* und *Thermococcus kodakarensis* ergaben, dass diese nicht mit 3PG allosterisch aktiviert werden, was in Übereinstimmung mit dem unvollständigen 3PG-Bindemotiv dieser PKs ist. Auch zeigten diese PKs keine Aktivierung mit Zuckerphosphaten.

AMP ist ein allosterischer Aktivator der PKs aus Methanocaldococcales. Außerdem wurden die PKs aus verschiedenen Gruppen methanogener Archaea auf ihre allosterische Aktivierung untersucht. Dabei hat sich gezeigt, dass die PKs aus den hyperthermophilen Methanocaldococcales *M. jannaschii* und *M. villosus* mit AMP allosterisch aktiviert werden, dem klassischen Effektor der PKs aus Bacteria. Phylogenetische Analysen deuten darauf hin, dass diese archaeellen AMP-aktivierten PKs die Vorläufer der AMP-aktivierten PKs aus Bacteria darstellen.

Untersuchungen zum Rhamnose-Abbau in Archaea

Im Genom des halophilen Euryarchaeons *Haloferax volcanii* wurde ein *L-rhamnose-catabolism* Gencluster (*rhc*-Gencluster) identifiziert, der für alle Enzyme des Diketo-Hydrolase Weges, d.h. für Rhamnose Mutarotase, Rhamnose Dehydrogenase, Rhamnonolactonase, Rhammonat Dehydratase, 2-Keto-3-Desoxyrhammonat Dehydrogenase und 2,4-Diketo-3-Desoxyrhammonat Hydrolase, für den Abbau von L-Rhamnose zu Pyruvat und L-Lactat kodiert. Außerdem enthält dieser Gencluster die kodierenden Gene eines ABC-Transporters für die Aufnahme von Rhamnose sowie das kodierende Gen des Transkriptionsregulators RhcR. Transkriptionsanalysen ergaben, dass bei Wachstum von *H. volcanii* auf Rhamnose alle *rhc*-Gene der Rhamnose-Aufnahme und des -Abbaus transkriptionell induziert werden. RhcR fungiert dabei als Transkriptionsaktivator der *rhc*-Gene, wobei dessen Funktion abhängig ist von dem Signalmolekül 2-Keto-3-Desoxyrhammonat, ein Intermediat des Rhamnose-Abbaus. Der

Nachweis der funktionellen Beteiligung der *rhc*-Gene am Rhamnose-Transport und -Abbau wurde mit Hilfe der entsprechenden Deletionsmutanten erbracht, die nicht mehr in der Lage waren, auf Rhamnose zu wachsen. Weiterhin wurden die Enzyme des Diketo-Hydrolase Weges homolog in *H. volcanii* überexprimiert, gereinigt und die rekombinanten Enzyme detailliert biochemisch charakterisiert. Außerdem wurde erstmals der Nachweis erbracht, dass *lactate utilization proteins* an der Oxidation von L-Lactat, welches über den Diketo-Hydrolase Weg gebildet wird, beteiligt sind. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass *H. volcanii* Rhamnose über einen ABC-Transporter aufnimmt und oxidativ über den Diketo-Hydrolase Weg abbaut. Die erzielten Ergebnisse sind in Abbildung 1 schematisch zusammengefasst.

Putative *rhc*-Gene des Rhamnose-Transports und -Abbaus konnten auch in den Genomen weiterer Haloarchaea nachgewiesen werden, was dafürspricht, dass der Rhamnose-Abbau in diesen Organismen ähnlich wie in *H. volcanii* verläuft. Weiterhin wurden die Gene eines Diketo-Hydrolase Weges in den hyperthermophilen Crenarchaeota *Vulcanisaeta distributa* und *Sulfolobus solfataricus* identifiziert. Mit Hilfe von Wachstumsexperimenten, Transkriptionsanalysen und biochemischen Untersuchungen ausgewählter Enzyme wurde gezeigt, dass vermutlich auch diese Organismen den Diketo-Hydrolase Weg für den Abbau von Rhamnose verwenden. Somit scheint der Diketo-Hydrolase Weg ein genereller Abbauweg für Rhamnose in der archaeellen Domäne zu sein.

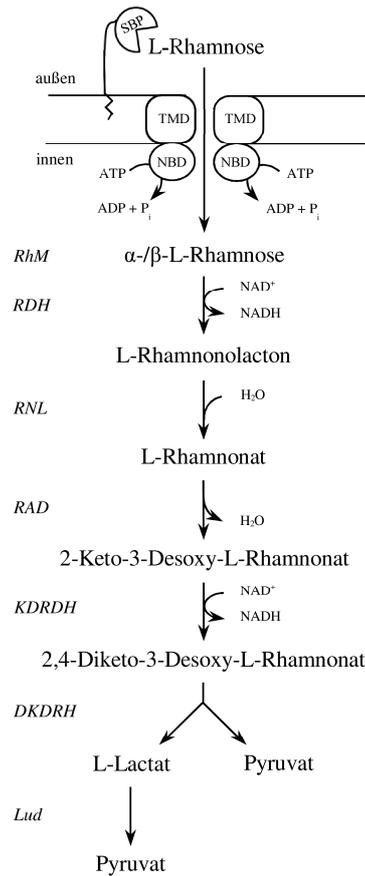


Abbildung 1 Schematische Darstellung des L-Rhamnose-Katabolismus in *H. volcanii*. L-Rhamnose wird über einen ABC-Transporter in die Zelle transportiert, der aus einem Substratbindeprotein (SBP), zwei Transmembrandomänen (TMDs) und zwei Nukleotidbindedomänen (NBDs) besteht. Der oxidative Abbau von Rhamnose zu Pyruvat und L-Lactat erfolgt über die Enzyme L-Rhamnose Mutarotase (RhM), L-Rhamnose Dehydrogenase (RDH), L-Rhamnonolactonase (RNL), L-Rhamnonat Dehydratase (RAD), 2-Keto-3-Desoxy-L-Rhamnonat Dehydrogenase (KDRDH) und 2,4-Diketo-3-Desoxy-L-Rhamnonat Hydrolase (DKDRH). Die anschließende Oxidation von L-Lactat zu Pyruvat wird von Lud-Proteinen (Lud) katalysiert.

2 Summary

Comparative analyses of sugar catabolism revealed that archaea degrade D-glucose via modified variants of classical pathways of bacteria and eukarya such as the Embden-Meyerhof (EM) and the Entner-Doudoroff (ED) pathway. Pyruvate kinases (PKs) catalyse the final step of glycolysis, found in the classical as well as the modified archaeal glycolytic pathways ($\text{PEP} + \text{ADP} \rightarrow \text{pyruvate} + \text{ATP}$). PKs from most bacteria and eukarya are allosteric enzymes activated by sugar phosphates e.g. fructose-1,6-bisphosphate (FBP) or AMP and thus enable regulation of glycolysis. So far, only few PKs from archaea have been studied and these enzymes do not show an allosteric response towards the classical sugar phosphates activators. Recently, the crystal structure of PK from *Pyrobaculum aerophilum*, a member of the hyperthermophilic Thermoproteales, has been solved and 3-phosphoglycerate (3PG) was identified as a novel allosteric activator of this PK (Solomons *et al.*, 2013). Further, a binding site for 3PG formed by five amino acids was identified. A key question posed by 3PG activation of PK from *P. aerophilum* is whether this is an oddity of *P. aerophilum* or whether this type of regulation is more widespread among archaeal PKs. Therefore, biochemical analyses of the allosteric properties of several PKs from Archaea have been performed in the first part of this work.

In contrast to the catabolism of glucose, the degradation of the deoxy sugar L-rhamnose in the archaeal domain has not been studied in detail. In most bacteria rhamnose is degraded via a phosphorylated pathway. In two bacteria an oxidative non-phosphorylated pathway of rhamnose metabolism – designated “diketo hydrolase pathway”- has been described in which rhamnose is converted into pyruvate and L-lactate (Bae *et al.*, 2015, Watanabe & Makino, 2009). Genomic analyses revealed that putative genes encoding for the diketo-hydrolase pathway are also present in haloarchaea and few hyperthermophilic crenarchaeota. Thus, in the second part of this thesis, the degradation of rhamnose in selected archaea has been studied.

Analyses of allosteric regulation of archaeal pyruvate kinases

PKs from Thermoproteales are activated by 3PG. A sequence comparison of PKs from several families of archaea shows that the five amino acids postulated to form the 3PG-binding pocket of PK from *P. aerophilum* are highly conserved in PKs of other Thermoproteales, e.g. *Pyrobaculum islandicum*, *Thermoproteus uzoniensis* and *Caldivirga maquilingensis*, suggesting these enzymes are also activated by 3PG. To test these hypothesis, PKs from these Thermoproteales were purified as recombinant enzymes and characterized kinetically. In accordance with the prediction, the PKs were activated by 3PG and the functional involvement of the predicted residues in 3PG-binding

could be confirmed by site-directed mutagenesis. Thus, activation by 3PG is a common feature of PKs from Thermoproteales and a five amino acid signature is essential for 3PG-binding. Further, PKs from *Vulcanisaeta moutnovskia*, also a member of Thermoproteales, *Candidatus Caldiarchaeum subterraneum*, *Candidatus Korarchaeum cryptofilum*, and from the hyperthermophilic euryarchaeota *Pyrococcus furiosus* and *Thermococcus kodakarensis* were analysed as recombinant enzymes and neither 3PG or sugar phosphates allosterically activated these enzymes. The absence of 3PG activation is in accordance with an incomplete 3PG-binding motif in these enzymes.

PKs from Methanocaldococcus species respond to AMP. The PKs from selected methanogenic archaea were characterized biochemically with a focus on their allosteric properties. It was shown, that PKs from the hyperthermophilic Methanocaldococcales *M. jannaschii* and *M. villosus* are activated allosterically by AMP, the classical sugar phosphate activator from bacteria. Phylogenetic analyses indicate that these AMP-activated archaeal PKs later gave rise to sugar phosphate-activated PKs in bacteria.

Analyses of L-rhamnose catabolism in archaea

In the genome of *H. volcanii* a *L-rhamnose-catabolism* (*rhc*) gene cluster was identified, which encodes the complete set of enzymes of the diketo-hydrolase pathway including rhamnose mutarotase, rhamnose dehydrogenase, rhamnonolactonase, rhamnonate dehydratase, 2-keto-3-deoxyrhamnonate dehydrogenase and 2,4-diketo-3-deoxyrhamnonate hydrolase. The *rhc* cluster also contains genes of components of an ABC transporter and of the transcriptional regulator RhcR. Transcriptional analyses revealed, that all *rhc* genes of rhamnose transport and degradation were specifically upregulated during growth of *H. volcanii* on rhamnose, suggesting a common transcriptional regulator. RhcR was characterized as the activator of all *rhc* genes and 2-keto-3-deoxyrhamnonate, an intermediate of rhamnose degradation, was identified as inducer molecule of RhcR. The essential function of *rhc* genes for uptake and degradation of rhamnose was proven by the respective knockout mutants, which lost their ability to grow on rhamnose. Further, enzymes of the diketo-hydrolase pathway were homologously expressed, purified and characterized. Finally, it was shown that *lactate utilization proteins* are involved in the oxidation of L-lactate formed by the diketo-hydrolase pathway. Together, these results demonstrate that in *H. volcanii* rhamnose is taken up by an ABC transporter and is oxidatively degraded to pyruvate and L-lactate via the diketo-hydrolase pathway, as summarized in figure 2.

Beside *H. volcanii*, putative *rhc* genes of rhamnose transport and degradation are present in most families of haloarchaea suggesting that these organisms also degrade rhamnose via a diketo-hydrolase pathway. Genes encoding enzymes of a diketo-hydrolase pathway could also be identified in the hyperthermophilic crenarchaeota *Vulcanisaeta distributa* and *Sulfolobus solfataricus*. Rhamnose degradation in these crenarchaeota was analyzed by growth experiments, transcriptional analyses and characterisation of selected enzymes, indicating the presence of the diketo-hydrolase pathway in these organisms. Thus, the diketo-hydrolase pathway might be a general degradation pathway for rhamnose in the archaeal domain.

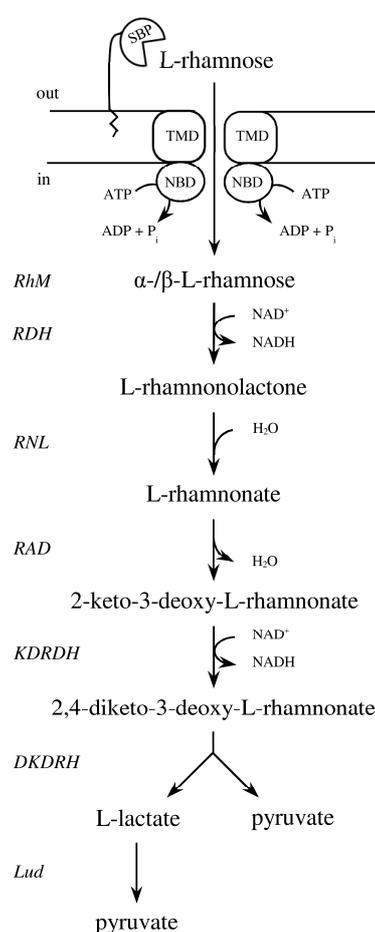


Figure 2 L-rhamnose catabolism in *H. volcanii*. L-rhamnose is taken up by an ABC transporter, which consists of a substrate binding protein (SBP), two transmembrane domains (TMDs) and two nucleotide binding domains (NBD). L-rhamnose is converted to pyruvate and L-lactate via the diketo-hydrolase pathway involving L-rhamnose mutarotase (RhM), L-rhamnose dehydrogenase (RDH), L-rhamnonolactonase (RNL), L-rhamnonate dehydratase (RAD), 2-keto-3-deoxy-L-rhamnonate dehydrogenase (KDRDH) and 2,4-diketo-3-deoxy-L-rhamnonate hydrolase (DKDRH). *Lactate utilization proteins* (Lud proteins) are involved in the oxidation of L-lactate to pyruvate.

3 Einleitung

Der Stammbaum des Lebens wurde basierend auf 16S- und 18S-rRNA Sequenzen von prokaryotischen und eukaryotischen Organismen erstellt (Abbildung 3) (Huber *et al.*, 2002, Spang *et al.*, 2010b, Woese *et al.*, 1990). Archaea bilden im phylogenetischen Stammbaum neben den Domänen der Bacteria und Eukarya die dritte Domäne des Lebens. Diese phylogenetische Klassifizierung spiegelt sich auch in einigen molekularen und strukturellen Unterschieden zwischen den Domänen wider. So ist die Zellwand der Archaea im Wesentlichen aus Proteinen, Glykoproteinen und Polysacchariden aufgebaut und nicht aus dem für Bacteria charakteristischen Peptidoglykan (Albers & Meyer, 2011, Kandler & König, 1998). Die Cytoplasmamembran der Archaea weist einen Aufbau aus Di- oder Tetraetherlipiden auf, wohingegen jene der Bacteria und Eukarya aus Glycerin-Fettsäure-Ester-Lipiden besteht (De Rosa & Gambacorta, 1988). Archaea unterscheiden sich auch in physiologischen Merkmalen von Bacteria und Eukarya. So verwenden Archaea modifizierte Varianten der klassischen bakteriellen und eukaryotischen Zuckerabbauwege (Bräsen *et al.*, 2014, Schönheit, 2008). Archaea besitzen jedoch auch einige Gemeinsamkeiten mit Bacteria und Eukarya. Während Archaea den Eukarya im Vorkommen von Histonproteinen und in ihrem basalen Transkriptionsapparat ähneln, weisen die meisten archaeellen Transkriptionsregulatoren Homologien zu denen aus Bacteria auf (Londei, 2007, Sandman & Reeve, 2001, Thomm, 2007).

Im phylogenetischen Stammbaum bildet LUCA (*last universal common ancestor*) als letzter gemeinsamer Vorfahre von Organismen aller drei Domänen die Wurzel des Lebens (Abbildung 3) (Weiss *et al.*, 2016). Basierend auf vergleichenden Analysen von universellen konservierten Proteinen in Eukarya, Bacteria und Archaea wird für LUCA eine anaerobe Lebensweise in hyperthermophilen Habitaten und ein chemolithoautotropher Stoffwechsel mit H₂ und CO₂ postuliert (Weiss *et al.*, 2018b). Die tiefsten Abzweigungen im phylogenetischen Stammbaum bilden hyperthermophile Archaea und Bacteria, d.h. Organismen mit einem Wachstumsoptimum bei Temperaturen über 80 °C (Abbildung 3). Aus der Domäne der Bacteria sind nur wenige hyperthermophile Spezies bekannt, die den *Aquificales* und *Thermotogales* angehören, wohingegen aus der Domäne der Archaea viele hyperthermophile Organismen beschrieben sind (Stetter, 2006).

Die Archaea werden phylogenetisch unterteilt in die gut untersuchten Phyla der Crenarchaeota und Euryarchaeota sowie in die Phyla der Korarchaeota, Nanoarchaeota, Thaumarchaeota und Aigarchaeota, von denen nur einzelne Vertreter als Reinkultur kultiviert und die vorwiegend in angereicherten Kulturen oder mittels *single cell sequencing* analysiert wurden (Abbildung 3).

Letztere zweigen im phylogenetischen Baum nahe der Wurzel ab und repräsentieren somit eine Gruppe sehr ursprünglicher Organismen. *Candidatus Korarchaeum cryptofilum* ist der bisher einzige untersuchte Vertreter der Korarchaeota und für das hyperthermophile und anaerobe Archaeon wird eine chemoorganoheterotrophe Lebensweise mit Peptiden als Energie- und Kohlenstoffquelle postuliert (Elkins *et al.*, 2008). Die Thaumarchaeota sind eine diverse Gruppe von mesophilen und thermophilen Organismen, die aerob und in der Regel chemolithoautotroph wachsen und zur Energiegewinnung Ammonium zu Nitrit oxidieren (Schleper & Nicol, 2010, Spang *et al.*, 2010a). Nahe verwandt mit den Thaumarchaeota ist *Candidatus Caldiarchaeum subterraneum*, der bisher einzige Vertreter der Aigarchaeota. Dieses Archaeon wurde in Metagenomanalysen identifiziert und mittels *single cell sequencing* analysiert und für den Organismus wird eine aerobe und heterotrophe Lebensweise mit Peptiden und Zuckern als Energie- und Kohlenstoffquelle postuliert (Nunoura *et al.*, 2011, Takami *et al.*, 2015).

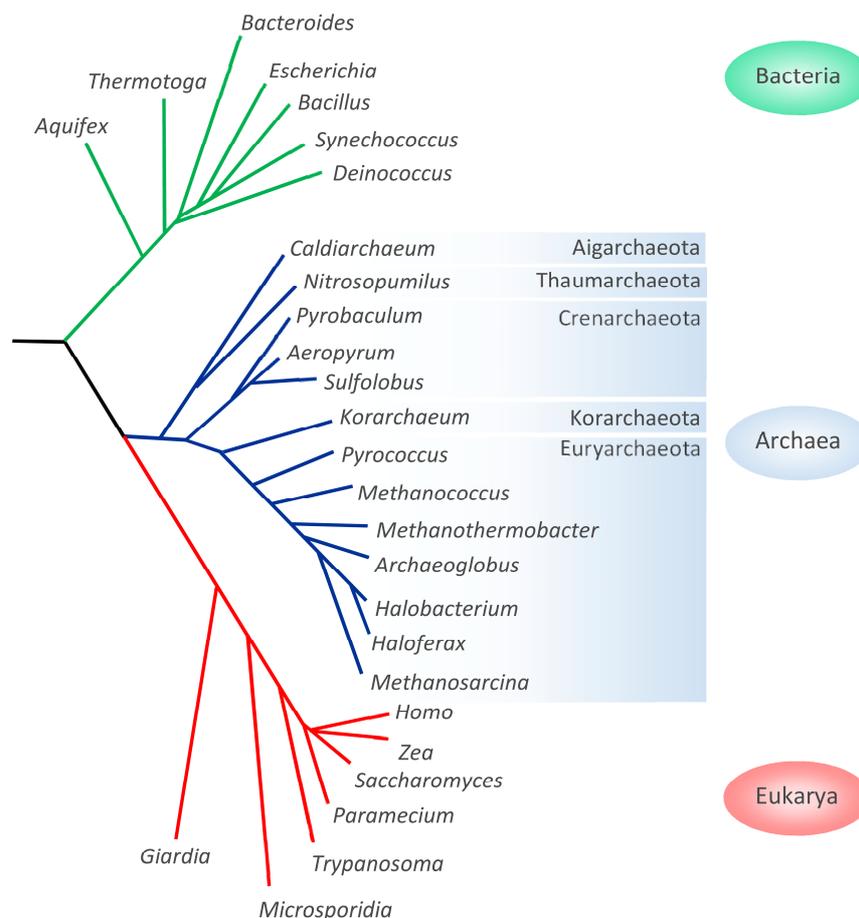


Abbildung 3 Schematischer Stammbaum des Lebens mit den Domänen Bacteria, Eukarya und Archaea (modifiziert nach Allers und Mevarech 2005). Der Stammbaum basiert auf 16S- bzw. 18S-rRNA Sequenzvergleichen. Verzweigungsgrad und -längen sind modifiziert und spiegeln nicht die exakte Phylogenie wider.

Die Crenarchaeota umfassen eine Vielzahl anaerober und hyperthermophiler Organismen wie zum Beispiel *Pyrolobus fumarii* aus der Ordnung der Desulfurococcales, der in der Lage ist bei Temperaturen bis 113°C chemolithoautotroph zu wachsen (Abbildung 3)(Blöchl *et al.*, 1997). Eine weitere Gruppe hyperthermophiler Crenarchaeota sind die Thermoproteales, zu der Gattungen wie *Pyrobaculum*, *Thermoproteus* und *Vulcanisaeta* gehören (Huber & Stetter, 1992). Vertreter dieser Ordnung wachsen chemolithoautotroph oder chemoorganoheterotroph mittels Schwefelatmung, wobei sie Zucker oder Peptide als Energie- und Kohlenstoffquelle nutzen. Ebenfalls zu den Crenarchaeota gehören thermoacidophile Organismen der Ordnung Sulfolobales, zum Beispiel *S. solfataricus*, die saure Standorte wie terrestrische Solfataren besiedeln (pH-Wert 2-4) (Brock *et al.*, 1972, Segerer & Stetter, 1992b). Sulfolobales sind Aerobier und können sowohl chemolithoautotroph mittels Oxidation von Schwefelwasserstoff oder Schwefel als auch chemoorganoheterotroph wachsen und Peptide und Zucker zur Energiegewinnung abbauen.

Die Phyla der Thaumarchaeota, Aigarchaeota, Crenarchaeota und Korarchaeota werden aufgrund ihrer phylogenetischen Nähe zueinander zur monophyletischen Gruppe des TACK Superphylums zusammengefasst (Guy & Ettema, 2011). Phylogenetische Analysen haben ergeben, dass der Vorläufer der Eukarya aus dem TACK Superphylum stammte. So weisen viele Organismen des TACK Superphylums Proteine auf, die charakteristisch für Eukarya sind (Guy & Ettema, 2011). Zu diesen sogenannten eukaryotischen Signaturproteinen (ESP) gehören zum Beispiel Bestandteile der eukaryotischen RNA-Polymerase III oder Homologe des Aktins. Kürzlich wurde eine Gruppe ursprünglicher Archaea identifiziert, deren Genome für eine Vielzahl von ESPs kodieren, weshalb für diese sogenannten Lokiarchaeota eine Rolle als Bindeglied zwischen Eukarya und Archaea diskutiert wird (Spang *et al.*, 2015).

Die Euryarchaeota stellen eine große und phänotypisch sowie physiologisch sehr heterogene Organismengruppe dar (Abbildung 3). So gehören dem Phylum neben hyperthermophilen Vertretern der Thermococcales wie *Pyrococcus furiosus* und *Thermococcus kodakarensis*, die ausschließlich chemoorganoheterotroph mit Peptiden und Zuckern als Energiequelle wachsen, auch thermoacidophile Organismen wie *Thermoplasma acidophilum* und *Picrophilus torridus* aus der Ordnung der Thermoplasmatales an (Schleper *et al.*, 1995, Segerer & Stetter, 1992a). Letztere sind in der Lage, fakultativ aerob mit Zuckern als einziger Energiequelle zu wachsen. Ebenfalls zu den Euryarchaeota gehören methanogene Archaea, die strikt anaerob und lithoautotroph sind und CO₂ und H₂ zu Methan als zentrales Endprodukt ihres Energiestoffwechsels umsetzen (Thauer *et al.*, 2008). Die Gruppe der methanogenen Archaea ist divers und umfasst hyperthermophile Vertreter wie *Methanocaldococcus jannaschii* und mesophile Vertreter wie *Methanococcus maripaludis* und *Methanosarcina acetivorans*. Sie besiedeln anoxische Standorte

wie hydrothermale Quellen und Moore und sind ebenfalls in Faultürmen von Kläranlagen nachgewiesen worden. Eine weitere große Gruppe innerhalb der Euryarchaeota bilden halophile Archaea mit Vertretern wie zum Beispiel *Haloarcula marismortui* und *Haloferax volcanii*. Haloarchaea besiedeln Biotop mit hohen Salzkonzentrationen von 1 bis 5 M NaCl wie natürliche Salzlaken, Salinen oder Gewässer wie das Tote Meer (Oren, 2007). Um der osmotischen Wirkung der hohen Salzkonzentrationen der Umgebung entgegen zu wirken, akkumulieren halophile Archaea intrazellulär hohe Konzentrationen an Kaliumchlorid (bis zu 4 M). Die Proteine dieser Organismen weisen deshalb überdurchschnittlich viele saure Aminosäuren an der Proteinoberfläche auf, um eine stabile Hydrathülle unter den hohen intrazellulären Salzkonzentrationen auszubilden und ein Ausfällen zu verhindern (Dennis & Shimmin, 1997). Halophile Archaea sind in der Regel aerob und wachsen chemoorganotroph mit Zuckern und Peptiden als Energie- und Kohlenstoffquelle (Oren, 1994).

3.1 Zuckerabbauwege in Eukarya, Bacteria und Archaea

Eine Vielzahl von Eukarya, Bacteria und Archaea wachsen chemoorganotroph mit Zuckerpolymeren, Disacchariden und Monosacchariden als Energie- und Kohlenstoffquelle. Die Abbauwege dieser Zuckerpolymeren und deren Bausteine, insbesondere der Hexosen D-Glucose und D-Fructose, der Pentosen D-Xylose und L-Arabinose und der Desoxy-Zucker L-Fucose und L-Rhamnose, wurden intensiv untersucht. Vergleichende Analysen haben ergeben, dass die für Bacteria und Eukarya beschriebenen klassischen Zuckerabbauwege in der Domäne der Archaea nicht vorkommen. Stattdessen verwenden Archaea modifizierte Varianten dieser Wege an denen ungewöhnliche Enzyme mit neuartigen Eigenschaften beteiligt sind (Bräsen *et al.*, 2014, Schönheit, 2008). Im Folgenden werden zunächst die klassischen Zuckerabbauwege für die Hexose D-Glucose aus Bacteria und Eukarya vorgestellt und mit den modifizierten Varianten der Archaea verglichen, wobei insbesondere auf ein Enzym, die Pyruvat Kinase, eingegangen wird. Anschließend wird der Abbau des Desoxy-Zuckers L-Rhamnose in Eukarya, Bacteria und Archaea vorgestellt.

3.1.1 Der Abbau von D-Glucose und die Rolle der Pyruvat Kinase als allosterischer Kontrollpunkt

D-Glucose, ein Baustein der Stärke und der Cellulose, kann von Organismen aus allen drei Domänen abgebaut werden. In Eukarya und anaeroben sowie fakultativen Bacteria erfolgt der Katabolismus von D-Glucose über den klassischen Embden-Meyerhof (EM) Weg (Abbildung 4). Glucose wird dabei in einem ersten Schritt zu Glucose-6-Phosphat (G6P) phosphoryliert. In

Bacteria erfolgt diese Reaktion über das Phosphoenolpyruvat (PEP) abhängige Phosphotransferase System oder wird von einer ATP-abhängigen Glucokinase katalysiert, wohingegen in Eukarya die Umsetzung über eine ATP-abhängige und allosterisch regulierte Hexokinase erfolgt. G6P wird im Anschluss von einer Phosphoglucose Isomerase (PGI) zu Fructose-6-Phosphat isomerisiert, welches von einer ATP-abhängigen und allosterisch regulierten Phosphofruktokinase (PFK) zu Fructose-1,6-Bisphosphat (FBP) phosphoryliert wird. Die anschließende Spaltung von FBP wird von einer FBP-Aldolase katalysiert, wobei Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) und Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) entstehen. DHAP wird von einer Triosephosphatisomerase zu einem zweiten Molekül GAP umgesetzt und GAP wird in zwei reversiblen Schritten von einer GAP-Dehydrogenase (GAP-DH) und einer Phosphoglycerat Kinase (PGK) über 1,3-Bisphosphoglycerat zu 3-Phosphoglycerat (3PG) oxidiert. Anschließend wird 3PG über 2-Phosphoglycerat (2PG) zu Pyruvat umgesetzt. Der letzte Schritt, die Umsetzung von PEP zu Pyruvat, wird von einer Pyruvat Kinase (PK) katalysiert, die allosterisch reguliert wird.

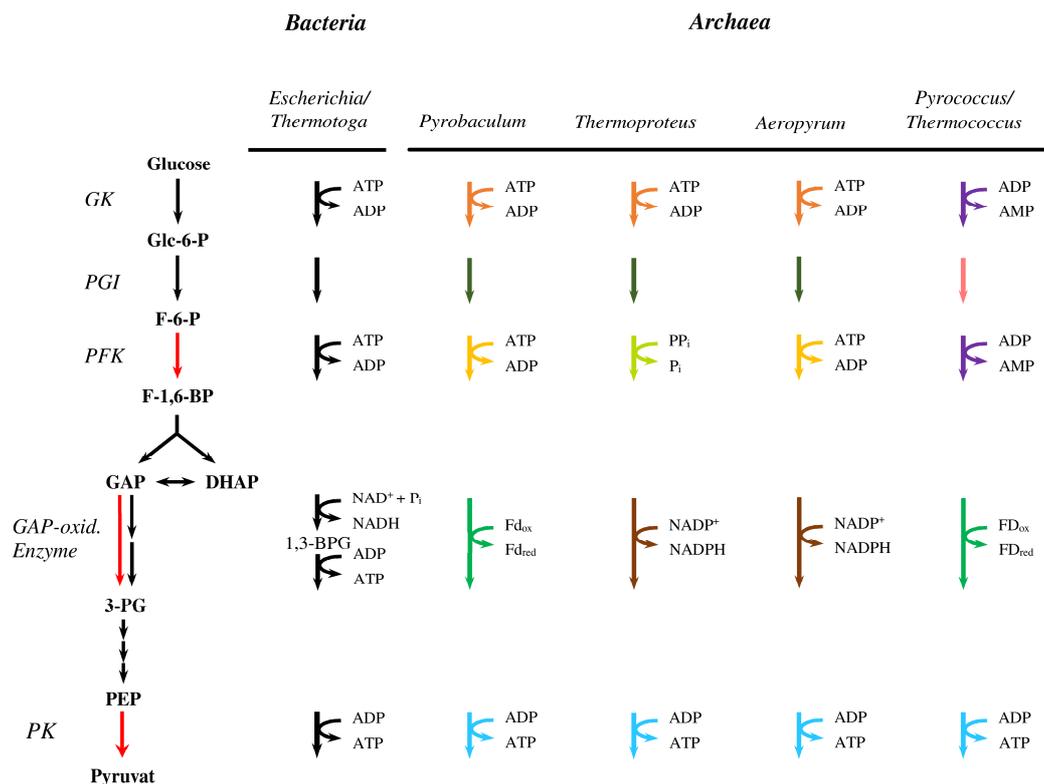


Abbildung 4 Die modifizierten Embden-Meyerhoff Wege aus hyperthermophilen Archaea. Dargestellt sind die modifizierten EM-Wege aus Archaea (farbige Pfeile) im Vergleich zum klassischen EM-Weg aus *T. maritima* und *E. coli* (schwarze Pfeile). Irreversible Reaktionen sind im Schema durch rote Pfeile dargestellt. Abkürzungen: GK, Glucokinase; PGI, Phosphoglucose Isomerase; PFK, 6-Phosphofruktokinase; oxid., oxidierende; PK, Pyruvat Kinase; Glc-6-P, Glucose-6-Phosphat; F-6-P, Fructose-6-Phosphat; F-1,6-BP, Fructose-1,6-Bisphosphat; GAP, Glycerinaldehyd-3-Phosphat; DHAP, Dihydroxyacetonphosphat; 1,3-BPG, 1,3-Bisphosphoglycerat; 3-PG, 3-Phosphoglycerat; PEP, Phosphoenolpyruvat.

Der klassische EM-Weg aus Bacteria und Eukarya kommt in Archaea nicht vor. Stattdessen existieren modifizierte Varianten des EM-Weges in einigen hyperthermophilen, anaeroben Archaea (Bräsen *et al.*, 2014, Schönheit, 2008). Dabei werden Enzyme verwendet, die neuartige Reaktionen katalysieren und die sich in ihrem Phosphorylgruppendonator und ihrem Substratspektrum von den klassischen Enzymen unterscheiden. Auch werden Enzyme verwendet, die, obwohl sie vergleichbare Reaktionen katalysieren, in andere Proteinfamilien gehören als die klassischen Enzyme aus Bacteria und Eukarya. Für einige methanogene Archaea der Methanococcales und Methanosarcinales ist ebenfalls das Vorkommen eines modifizierten EM-Weges beschrieben, obwohl diese Organismen eigentlich strikt lithoautotroph sind (Verhees *et al.*, 2001, Yu *et al.*, 1994). Diese Archaea bilden jedoch bei Wachstum auf CO₂ und H₂ Glykogen, welches sie anschließend über den modifizierten EM-Weg abbauen. Im Folgenden werden einige der Modifikationen der archaeellen Varianten des EM-Weges vorgestellt.

Eine Modifikation betrifft die Glucokinasen (Abbildung 4). So besitzen die Euryarchaeota *P. furiosus* und *Thermococcus* sp. neuartige Glucokinasen, die ADP als Phosphorylgruppendonator verwenden (Kengen *et al.*, 1995, Koga *et al.*, 2000). Die Crenarchaeota *Pyrobaculum aerophilum*, *Thermoproteus tenax* und *Aeropyrum. pernix* phosphorylieren Glucose über ATP-abhängige Glucokinasen, die, anders als die ATP-abhängigen Glucokinasen der Bacteria, ein breites Substratspektrum für Hexosen aufweisen (Dörr *et al.*, 2003, Hansen *et al.*, 2002)(Hansen und Schönheit, unveröffentlicht). Für keine der bisher charakterisierten Glucokinasen aus Archaea konnte eine allosterische Regulierbarkeit nachgewiesen werden.

Die anschließende Isomerisierung von G6P zu F6P wird in Archaea von ungewöhnlichen Phosphoglucose Isomerasen katalysiert (Abbildung 4). So sind für *P. aerophilum* und *A. pernix* neuartige und bifunktionelle Glucose-6-Phosphat/Mannose-6-Phosphat Isomerasen (PGI/PMI) beschrieben (Hansen *et al.*, 2004a, Hansen *et al.*, 2004b). In *P. furiosus* und *Thermococcus* sp. erfolgt die Isomerisierung von G6P zu F6P über eine metallabhängige PGI der Cupin-Superfamilie, die keine Ähnlichkeit zu den archaeellen PGI/PMIs sowie zu den klassischen PGIs aus Bacteria aufweist und die damit eine konvergente Entwicklungslinie darstellen (Hansen *et al.*, 2005, Jeong *et al.*, 2003).

Eine weitere Modifikation archaeeller EM-Wege betrifft die PFK (Abbildung 4). Während die PFKs der PFK-A Familie aus Bacteria und Eukarya ATP-abhängig sind, sind für Archaea unter anderem ADP-abhängige PFKs, zum Beispiel in *Thermococcus* sp. und *P. furiosus*, als auch eine Pyrophosphat-abhängige PFK in *Thermoproteus tenax* beschrieben (Ronimus *et al.*, 1999, Siebers *et al.*, 1998, Tuininga *et al.*, 1999). Die PFKs aus *P. aerophilum* und *A. pernix* sind ATP-abhängig, gehören jedoch, anders als die ATP-abhängigen PFKs aus Bacteria und Eukarya, zur PFK-B

Familie (Hansen & Schönheit, 2001)(Arbeitsgruppe Schönheit). Für das hyperthermophile und methanogene Archaeon *M. jannaschii* ist eine ADP-abhängige und bifunktionelle Glucokinase/Phosphofruktokinase beschrieben (Sakuraba *et al.*, 2002). Bisher konnte für keine dieser untersuchten, archaeellen Kinasen eine allosterische Regulation gezeigt werden.

Auch bei der Umsetzung von GAP zu 3PG zeigen sich Modifikationen zur zweistufigen und reversiblen Reaktion in Bacteria und Eukarya über GAP-DH und PGK (Abbildung 4). So setzen *P. aerophilum*, *P. furiosus* und *M. jannaschii* GAP in einer Reaktion und irreversibel über eine GAP:Ferredoxin-Oxidoreduktase (GAPOR) zu 3PG um, wobei Ferredoxin reduziert wird (Mukund & Adams, 1995, Reher *et al.*, 2007). *T. tenax* und *S. solfataricus* verwenden eine nicht-phosphorylierende GAP-DH (GAPN), wobei NAD(P)⁺ als Elektronenakzeptor fungiert (Brunner *et al.*, 1998, Ettema *et al.*, 2008).

Die meisten aeroben Bacteria bauen D-Glucose über den klassischen Entner-Doudoroff (ED) Weg ab. Glucose wird dabei von einer ATP-abhängigen Glucokinase zu Glucose-6-Phosphat phosphoryliert, welches von einer Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase zu 6-Phosphogluconat oxidiert wird. Eine 6-Phosphogluconat Dehydratase katalysiert die Dehydratisierung von 6-Phosphogluconat zu 2-Keto-3-Desoxy-6-Phosphogluconat (KDPG) und KDPG wird von einer KDPG Aldolase zu Pyruvat und GAP gespalten. Die anschließende Umsetzung von GAP zu einem weiteren Molekül Pyruvat erfolgt über die Enzyme des EM-Weges, wobei die letzte Reaktion von einer PK katalysiert wird.

In aeroben Archaea sind verschiedene Modifikationen des ED-Weges bekannt (Abbildung 5) (Bräsen *et al.*, 2014, Siebers & Schönheit, 2005). So ist für die thermoacidophilen Euryarchaeota *Picrophilus torridus* und *Thermoplasma acidophilum* ein nicht-phosphorylierter ED-Weg beschrieben, bei dem Glucose ohne die Bildung eines phosphorylierten Intermediates zu 2-Keto-3-Desoxygluconat (KDG) umgesetzt wird (Abbildung 5) (Reher *et al.*, 2010, Smith *et al.*, 1989). KDG wird anschließend von einer KDG Aldolase zu Pyruvat und Glycerinaldehyd gespalten und Letzteres zu einem zweiten Molekül Pyruvat umgesetzt. Für Haloarchaea, wie *H. volcanii*, wurde gezeigt, dass diese einen semi-phosphorylierten ED-Weg für den Abbau von Glucose verwenden (Abbildung 5) (Pickl *et al.*, 2014, Sutter *et al.*, 2016). Dabei wird Glucose zu KDG umgesetzt und erst auf dieser Stufe erfolgt die Phosphorylierung zum phosphorylierten Intermediat KDPG durch eine KDG Kinase. KDPG wird anschließend von einer KDPG Aldolase in Pyruvat und GAP gespalten und GAP weiter zu Pyruvat abgebaut. In dem thermoacidophilen Crenarchaeon *S. solfataricus* erfolgt der Abbau von Glucose über einen verzweigten („Branched“) ED-Weg, der einen semi-phosphorylierten und einen nicht-phosphorylierten Ast umfasst (Abbildung 5)

(Ahmed *et al.*, 2005). Das Intermediat KDG wird dabei entweder zu Glycerinaldehyd und Pyruvat gespalten, oder zunächst von einer KDG Kinase zu KDPG phosphoryliert und anschließend zu GAP und Pyruvat gespalten. Das gebildete Glycerinaldehyd bzw. GAP wird im Anschluss zu Pyruvat umgesetzt. Allen modifizierten Varianten der archaellen ED-Wege ist gemeinsam, dass im letzten Schritt eine PK die Umsetzung von PEP zu Pyruvat katalysiert.

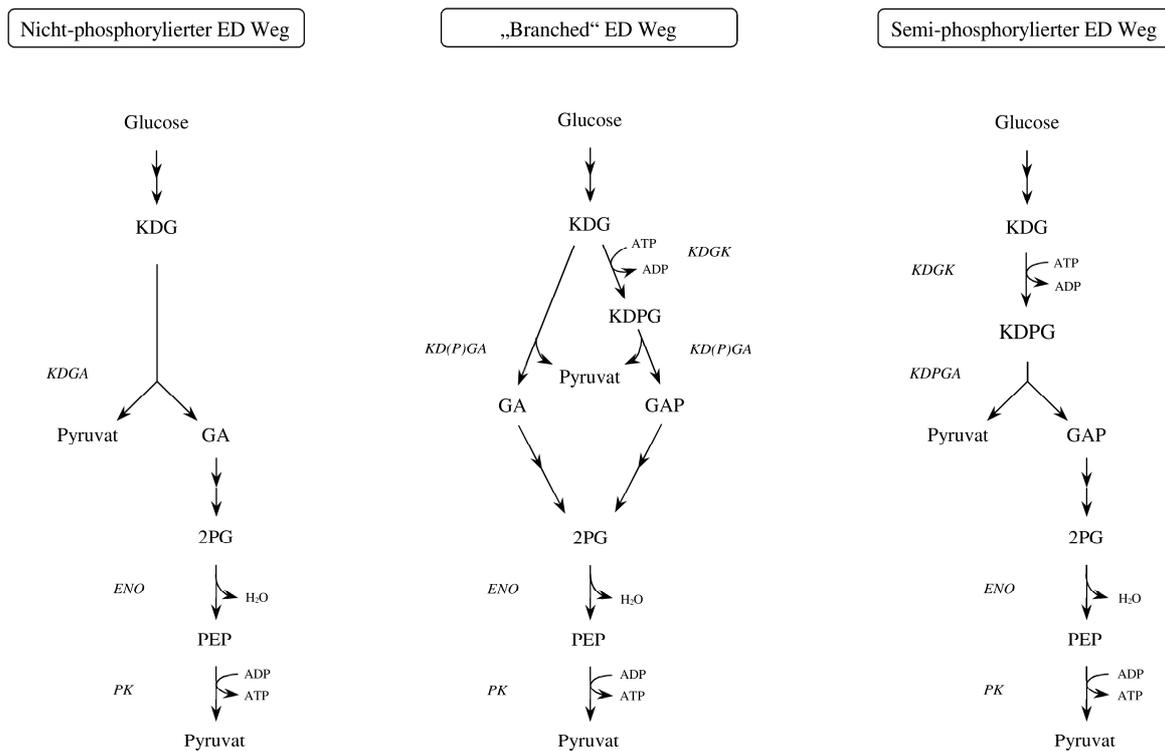


Abbildung 5 Die modifizierten Entner-Doudoroff Wege aus Archaea. Dargestellt sind der nicht-phosphorylierte ED-Weg aus dem thermoacidophilen Euryarchaeon *P. torridus*, der verzweigte „Branched“ ED-Weg aus dem thermoacidophilen Crenarchaeon *S. solfataricus* und der semi-phosphorylierte ED-Weg aus dem halophilen Archaeon *H. volcanii*. Die Enzyme der Umsetzung von Glucose zu KDG sowie der Umsetzung von GA zu 2PG und GAP zu 2PG sind nicht abgebildet. Abkürzungen: KDG, 2-Keto-3-Desoxygluconat; KDPG, 2-Keto-3-Desoxy-6-Phosphogluconat; GA, Glycerinaldehyd; GAP, Glycerinaldehyd-3-Phosphat; 2PG, 2-Phosphoglycerat; PEP, Phosphoenolpyruvat; KDGA, 2-Keto-3-Desoxygluconat Aldolase; KDGK, 2-Keto-3-Desoxygluconat Kinase; KDPGA, 2-Keto-3-Desoxy-6-Phosphogluconat Aldolase; ENO, Enolase; PK, Pyruvat Kinase.

Die klassischen glykolytischen Abbauwege der Bacteria und Eukarya werden in der Regel streng reguliert, um auf energetische Veränderungen in der Zelle schnell zu reagieren. Die Regulation des klassischen EM-Weges erfolgt dabei durch die allosterische Regulation von Enzymen, die irreversible und energiekonservierende Reaktionen katalysieren. So werden PFK und PK durch Intermediate des Stoffwechsels oder über Adenosinnukleotide, welche die Energieladung der

Zelle widerspiegeln, allosterisch reguliert. In Eukarya ermöglicht darüber hinaus die Hexokinase eine allosterische Regulation innerhalb des EM-Weges. Im Folgenden soll näher auf die PK eingegangen werden, da dieses Enzym sowohl in den klassischen EM- und ED-Wegen der Eukarya und Bacteria, als auch in den modifizierten glykolytischen Wegen der Archaea eine irreversible Reaktion katalysiert und somit einen potentiellen allosterischen Kontrollpunkt darstellt.

Pyruvat Kinasen und ihre Rolle als allosterischer Kontrollpunkt

PKs katalysieren die letzte energiekonservierende Reaktion innerhalb glykolytischer Abbauege, in der die Phosphorylgruppe von Phosphoenolpyruvat (PEP) auf ADP übertragen wird, wobei ATP und Pyruvat entstehen. Die PKs aus Bacteria und Eukarya sind gut untersucht. Es handelt sich vorwiegend um homotetramere Enzyme mit einem Molekulargewicht von etwa 200 kDa. Die Kristallstrukturen einer Vielzahl von PKs, zum Beispiel aus *E. coli* und *Saccharomyces cerevisiae*, sind gelöst und Analysen der Kristallstrukturen haben ergeben, dass jede PK-Untereinheit aus einer A-, B- und C-Domäne besteht (Jurica *et al.*, 1998, Mattevi *et al.*, 1995). Eukaryotische PKs weisen zusätzlich noch eine N-terminale N-Domäne auf. PKs zeigen in der Regel mit ihren Substraten PEP und/oder ADP eine sigmoidale Sättigungskinetik, was auf eine positive Kooperativität des Enzyms hindeutet (Jurica *et al.*, 1998, Waygood *et al.*, 1976, Waygood *et al.*, 1975). Kooperativität bedeutet, dass die Bindung eines Substratmoleküls an einer Untereinheit des Enzyms die Substrataffinität der anderen Untereinheiten des Enzyms erhöht. PEP und ADP binden dabei als sogenannte homotrope Effektoren in der katalytischen Domäne der PK, welche von der A- und B-Domäne gebildet wird.

PKs sind allosterische Enzyme, die in der Regel durch die Zuckerphosphate FBP, R5P oder AMP allosterisch aktiviert werden. AMP kann dabei als Zuckerphosphat betrachtet werden, da es einen phosphorylierten Ribosylrest aufweist. Die allosterischen Effektoren, die auch als homotrope Effektoren bezeichnet werden, binden dazu im allosterischen Zentrum der PK, das sich in der C-Domäne befindet. Dabei bewirkt die Bindung des homotropen Effektors eine Konformationsänderung des Enzyms, die sich auf das aktive Zentrum auswirkt, wodurch die Affinität des Enzyms zu seinem Substrat verändert wird.

Die PKs aus Eukarya und aus einigen Bacteria werden mit FBP allosterisch aktiviert. FBP ist das Produkt der irreversiblen PFK und wird im oberen Teil des EM- Weges gebildet. Diese sogenannte *feedforward* Regulation, bei der das Intermediat FBP die Enzymaktivität der nachfolgenden PK-

Reaktion erhöht, ermöglicht die Koordination der Reaktionsgeschwindigkeiten zwischen dem oberen und dem unteren Teil des EM-Weges. Die PKs der Protozoa *Leishmania mexicana* und *Trypanosoma brucei* werden dagegen mit Fructose-2,6-Bisphosphat (F-2,6-BP) allosterisch reguliert, wobei diese ungewöhnliche Regulation als Folge einer parasitären Lebensweise diskutiert wird (Morgan *et al.*, 2010, van Schaftingen *et al.*, 1985). Inzwischen existieren eine Reihe von Kristallstrukturen von FBP- und F-2,6-BP- aktivierten PKs. So ist für die FBP-aktivierte PK aus *S. cerevisiae* die Kristallstruktur mit gebundenem FBP in der C-Domäne gelöst und es wurden wichtige Aminosäuren für die FBP-Bindung im allosterischen Zentrum identifiziert (Jurica *et al.*, 1998). Insbesondere wurde dabei für einen Cluster von Serin- und Threoninresten eine Beteiligung an der Bindung des 6'-Phosphates von FBP gezeigt.

Die PKs aus Bacteria werden neben FBP vor allem durch AMP oder R5P allosterisch aktiviert. So ist zum Beispiel für die PK aus *Thermotoga maritima* eine allosterische Regulierbarkeit mit AMP und für die PK aus *Geobacillus stearothermophilus* mit AMP und R5P beschrieben (Johnsen *et al.*, 2003, Sakai *et al.*, 1986). Für einige Bacteria, zum Beispiel *E. coli*, wurde gezeigt, dass diese Organismen zwei PK Isoenzyme aufweisen, wobei eine PK spezifisch mit FBP und die andere PK mit AMP und R5P allosterisch reguliert wird (Waygood *et al.*, 1976, Waygood *et al.*, 1975). Die PKs aus Milchsäurebakterien sind hinsichtlich ihrer allosterischen Regulation divers. So sind sowohl FBP-, als auch G6P- und AMP-aktivierte PKs beschrieben (Crow & Pritchard, 1976, Veith *et al.*, 2013). Kürzlich wurde für die PK aus dem Bakterium *Mycobacterium tuberculosis* eine allosterische Aktivierung mit G6P und AMP gezeigt (Zhong *et al.*, 2017). Die Kristallstruktur mit gebundenem G6P und AMP in der C-Domäne wurde gelöst und zwei distinkte Bindetaschen, eine für G6P und eine für AMP, nachgewiesen (Zhong *et al.*, 2017).

In der Domäne der Archaea sind bisher wenige PKs aus hyperthermophilen und thermoacidophilen Organismen auf ihre allosterische Regulation hin untersucht worden (De la Vega-Ruiz *et al.*, 2015, Johnsen *et al.*, 2003, Schramm *et al.*, 2000). Diese homotetrameren Enzyme mit einem nativen Molekulargewicht von 200 kDa zeigen alle eine positive Kooperativität mit PEP und/oder ADP. Für die PKs der hyperthermophilen Crenarchaeota *A. pernix*, *Desulfurococcus kamchatkensis*, *T. tenax*, *Thermofilum pendens* und *P. aerophilum* konnte jedoch keine allosterische Regulation durch die klassischen allosterischen Effektoren FBP, AMP und R5P nachgewiesen werden (Johnsen *et al.*, 2003, Schramm *et al.*, 2000) (Arbeitsgruppe Schönheit). Auch die PKs aus den thermoacidophilen Archaea *T. acidophilum*, *P. torridus* und *S. solfataricus* werden nicht durch Zuckerphosphate allosterisch aktiviert (Arbeitsgruppe Schönheit).

Kürzlich wurde die Struktur der PK aus *P. aerophilum*, einem Vertreter der Ordnung Thermoproteales, gelöst und insbesondere die C-Domäne analysiert, um die fehlende allosterische Regulation durch klassische Aktivatoren zu verstehen (Solomons *et al.*, 2013). Überraschenderweise wurde dabei innerhalb der C-Domäne eine Phosphatbindestelle identifiziert, die in Vergleichen mit der Kristallstruktur der PK aus *S. cerevisiae* der Phosphatbindestelle für das 6'-Phosphat von FBP entsprach. Die Möglichkeit einer Phosphatbindung deutete auf eine potentielle allosterische Regulierbarkeit der PK aus *P. aerophilum* durch einen bisher nicht bekannten phosphorylierten Effektor hin. Mit Hilfe der Kristallstruktur konnte eine potentielle Bindetasche für eine phosphoryliert C3- oder C4-Verbindung in der C-Domäne der PK aus *P. aerophilum* vorhergesagt werden (Abbildung 6) und über biochemische Analysen wurde schließlich 3PG als neuartiger allosterischer Aktivator der PK identifiziert (Solomons *et al.*, 2013). 3PG stellt dabei einen völlig neuen Typus eines allosterischen Aktivators von PKs dar. So ist 3PG eine kleine phosphorylierte Säure und kein Zuckerphosphat wie FBP, R5P oder AMP.

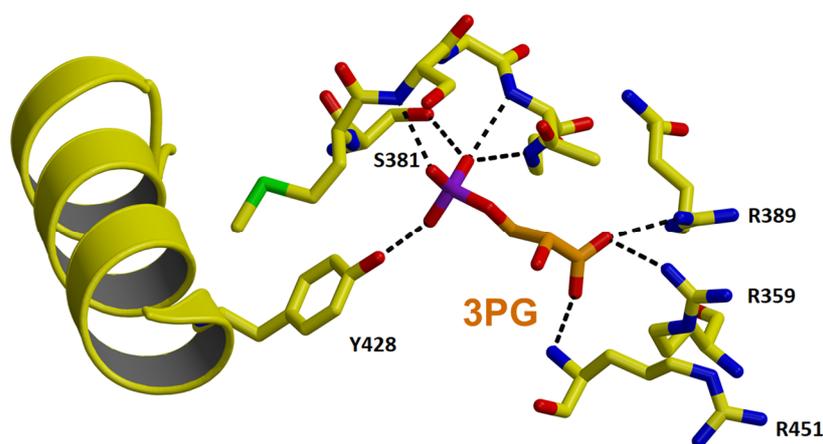


Abbildung 6 Das allosterische Zentrum der PK von *P. aerophilum* mit gemodeltem 3PG. Die Aminosäuren Tyrosin-428 und Serin-381 binden vermutlich die Phosphatgruppe von 3PG und die Arginine R359, R389 und R451 sind voraussichtlich an der Bindung der Carboxylgruppe von 3PG beteiligt.

Für die PK aus *P. aerophilum* konnten außerdem über Strukturmodelle und ortsspezifische Mutageneseexperimente fünf Aminosäuren für die Bindung von 3PG im allosterischen Zentrum identifiziert werden (Abbildung 6)(Solomons *et al.*, 2013). So wird vermutlich die Phosphatgruppe von 3PG von einem Serin an Position 381 und einem Tyrosin an Position 428 gebunden. Die Bindung der Carboxylgruppe von 3PG erfolgt vermutlich über drei Argininreste an den Positionen 359, 389 und 451. Eine weiterführende Analyse zur Beteiligung der einzelnen Reste an der Phosphat- bzw. Carboxylgruppenbindung von 3PG steht jedoch noch aus. Auch

wurde bisher noch nicht untersucht, ob die allosterische Aktivierung mit 3PG eine Besonderheit der PK aus *P. aerophilum* oder eine generelle Eigenschaft archaeeller PKs ist. Darum sollten im ersten Teil dieser Arbeit die PKs aus verschiedenen archaeellen Gruppen charakterisiert und auf ihre allosterische Regulation untersucht werden. Insbesondere sollten dabei folgende Fragestellungen behandelt werden:

1. Mit Hilfe von Sequenzvergleichen sollte geprüft werden, ob homologe Reste der 3PG-Bindung der PK aus *P. aerophilum* auch in den PKs weiterer Archaea der Ordnung Thermoproteales sowie in den PKs anderer archaeeller Ordnungen vorhanden sind.
2. Die PKs von weiteren Vertretern der Ordnung Thermoproteales, von *Pyrobaculum islandicum*, *Thermoproteus uzoniensis*, *Caldivirga maquilingensis* und *Vulcanisaeta moutnovskia*, sollten kloniert, exprimiert und nach Reinigung die rekombinanten Enzyme biochemisch charakterisiert und insbesondere auf ihre allosterische Regulierbarkeit mit 3PG getestet werden.
3. Weiterhin sollten die PKs aus ausgewählten hyperthermophilen Organismen der Aigarchaeota, Korarchaeota und Thermococcales sowie aus hyperthermophilen und mesophilen methanogenen Archaea überexprimiert, gereinigt und die rekombinanten Enzyme auf ihre allosterische Regulierbarkeit mit 3PG sowie mit Zuckerphosphaten untersucht werden.

3.1.2 Abbau von L-Rhamnose

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte der Abbau des in der Natur weit verbreiteten Desoxy-Zuckers L-Rhamnose (6-Desoxy-Mannose) in der Domäne der Archaea untersucht werden. Rhamnose ist zum Beispiel Bestandteil des pflanzlichen Pektins oder der Lipopolysaccharidschicht Gram negativer Bacteria und kann von vielen Mikroorganismen als Wachstumssubstrat abgebaut werden. Der Abbau von Rhamnose ist in Bacteria gut untersucht. Die meisten Bacteria, zum Beispiel *E. coli* und *Bacillus subtilis*, bauen Rhamnose über einen phosphorylierten Abbauweg ab (Abbildung 7) (Egan & Schleif, 1993, Hirooka *et al.*, 2015, Moralejo *et al.*, 1993). Dabei wird Rhamnose von einer Isomerase zu L-Rhamnulose umgesetzt, welches von einer Kinase zu L-Rhamnulose-1-Phosphat (R1P) phosphoryliert wird. Eine Aldolase spaltet R1P zu L-Lactaldehyd und DHAP.

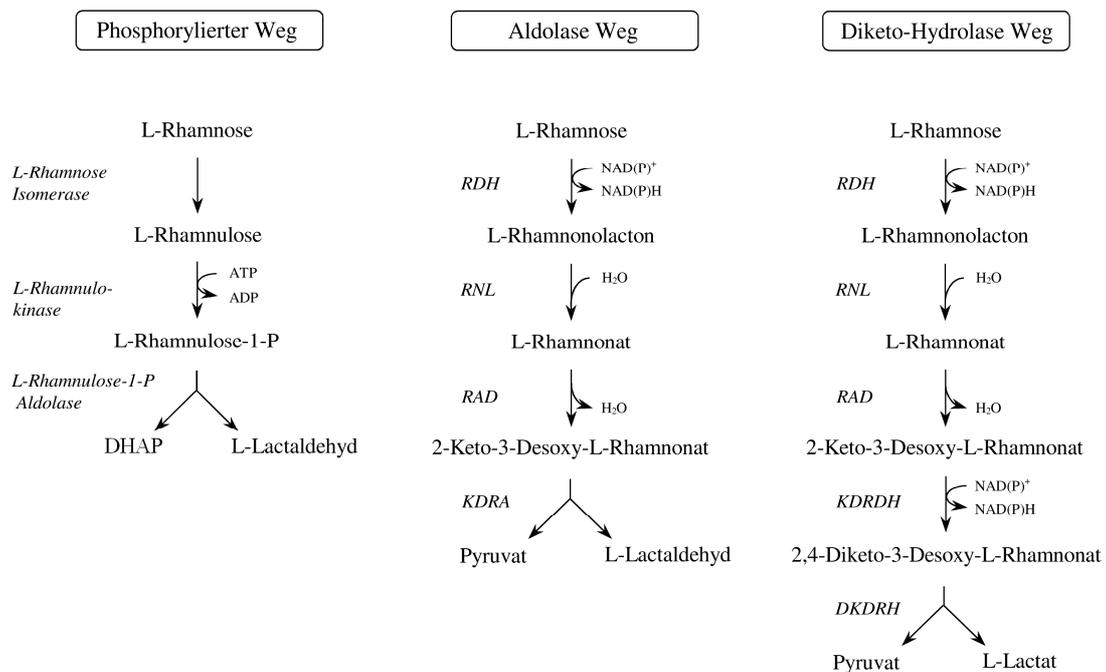


Abbildung 7 L-Rhamnose-Abbauwege in Bacteria und Eukarya. Dargestellt sind der klassische phosphorylierte Rhamnose-Abbauweg der meisten Bacteria, zum Beispiel *E. coli*, der nicht-phosphorylierte Aldolase Weg von einigen Pilzen und Bacteria, zum Beispiel *Debaryomyces hansenii* und *Azotobacter vinelandii*, und der nicht-phosphorylierte Diketo-Hydrolase Weg von *Sphingomonas* sp. und *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*. Abkürzungen: RDH, L-Rhamnose Dehydrogenase; RNL, L-Rhamnonolactonase; RAD, L-Rhamnonat Dehydratase; KDRA, 2-Keto-3-Desoxyrhamnonat Aldolase; KDRDH, 2-Keto-3-Desoxyrhamnonat Dehydrogenase; DKDRH, 2,4-Diketo-3-Desoxyrhamnonat Hydrolase; L-Rhamnulose-1-P, L-Rhamnulose-1-Phosphat.

Das Bacterium *Rhizobium leguminosarum* baut Rhamnose ebenfalls über einen phosphorylierten Weg ab, wobei jedoch zuerst die Phosphorylierung von Rhamnose zu L-Rhamnose-1-Phosphat und anschließend die Isomerisierung zu R1P erfolgt (Richardson *et al.*, 2004). Für die Bacteria *E. coli* und *R. leguminosarum* ist darüber hinaus gezeigt, dass eine L-Rhamnose Mutarotase die initiale Umsetzung von α - zu β -L-Rhamnose katalysiert (Richardson *et al.*, 2008, Ryu *et al.*, 2005). Neben dem Abbau ist für Bacteria auch der Transport von Rhamnose gut untersucht und es sind sowohl Protonen-Symporter, zum Beispiel in *E. coli*, als auch ABC-Transporter, zum Beispiel in *R. leguminosarum*, beschrieben (Muiry *et al.*, 1993, Richardson *et al.*, 2004). Auch ist die transkriptionelle Regulation des Rhamnose-Abbaus für einige Bacteria aufgeklärt. So fungieren in *E. coli* die Regulatoren RhaR und RhaS der AraC/XylS-Familie simultan als Aktivatoren (Via *et al.* 1996). In *R. leguminosarum* und *B. subtilis* wurden Repressoren der DeoR-Familie identifiziert (Hirooka *et al.*, 2015, Richardson *et al.*, 2004).

Für einige Pilze und Bacteria sind zwei alternative Abbauewege für L-Rhamnose beschrieben: der Aldolase Weg und der Diketo-Hydrolase Weg. Der Aldolase Weg kommt in dem Bakterium *Azotobacter vinelandii* und einigen eukaryotischen Pilzen, zum Beispiel in *Scheffersomyces stipitis*, *Aspergillus niger* und *Pullularia pullulans* vor (Abbildung 7) (Khosravi *et al.*, 2017, Koivistoinen *et al.*, 2012, Koivistoinen *et al.*, 2008, Rigo *et al.*, 1976, Watanabe *et al.*, 2008). In diesem Abbaueweg wird Rhamnose oxidativ und ohne die Bildung eines phosphorylierten Intermediates zu Pyruvat und L-Lactaldehyd abgebaut. Rhamnose wird dabei in einem ersten Schritt von einer Rhamnose Dehydrogenase (RDH) zu L-Rhamnonolacton oxidiert, das von einer Rhamnonolactonase (RNL) zu L-Rhamnonat hydrolysiert wird. Eine Rhamnonat Dehydratase (RAD) setzt Rhamnonat zu 2-Keto-3-Desoxy-L-Rhamnonat (KDR) um, welches anschließend von einer 2-Keto-3-Desoxyrhamnonat Aldolase (KDRA) zu Pyruvat und L-Lactaldehyd gespalten wird. Der alternative Diketo-Hydrolase Weg zum Abbau von Rhamnose wurde für die Bacteria *Sphingomonas* sp. und *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* identifiziert (Abbildung 7) (Bae *et al.*, 2015, Watanabe & Makino, 2009). Rhamnose wird in diesem nicht-phosphorylierten Weg zu Pyruvat und L-Lactat abgebaut. Die ersten Schritte dieses Weges, die Umsetzung von Rhamnose zu KDR, sind dabei identisch mit dem Aldolase Weg und werden von homologen Enzymen katalysiert, von RDH, RNL und RAD. KDR wird jedoch, anders als im Aldolase Weg, von einer KDR Dehydrogenase (KDRDH) zu 2,4-Diketo-3-Desoxy-L-Rhamnonat (DKDR) oxidiert, welches von einer DKDR Hydrolase (DKDRH) zu L-Lactat und Pyruvat hydrolysiert wird. Über den Transport von Rhamnose und die transkriptionelle Regulation dieser alternativen Rhamnose-Abbauewege ist bisher wenig bekannt.

Im Gegensatz zu Bacteria und Eukarya ist der Rhamnose-Abbau in Archaea wenig untersucht. Im Genom des thermoacidophilen Euryarchaeons *T. acidophilum* wurden Gene identifiziert, die für Enzyme eines Diketo-Hydrolase Weges kodieren (Kim et al., 2012). Das erste Enzym, die RDH, wurde außerdem charakterisiert. Für das thermoacidophile Crenarchaeon *S. solfataricus* wurde kürzlich der Abbau eines anderen Desoxy-Zuckers, der von L-Fucose, aufgeklärt (Wolf et al., 2016). Es wurde gezeigt, dass *S. solfataricus* Fucose über einen oxidativen und nicht-phosphorylierten Weg abbaut, der promisk ist für den Abbau der Pentose D-Arabinose (Brouns et al., 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurden Genomanalysen durchgeführt, wobei in dem Genom des halophilen Euryarchaeons *H. volcanii* ein putativer Gencluster identifiziert wurde, der für einen ABC-Transporter und die Enzyme eines Diketo-Hydrolase Weges für die Aufnahme und den Abbau von Rhamnose sowie für den Transkriptionsaktivators RhcR kodiert. Außerdem wurden putative Gene eines Diketo-Hydrolase Weges in den Genomen einiger hyperthermophiler Crenarchaeota nachgewiesen. Daraus ergaben sich für die vorliegende Arbeit folgende Aufgaben:

1. Für *H. volcanii* sollte die Beteiligung der putativen Gene des ABC-Transporters und des Diketo-Hydrolase Weges an der Aufnahme und dem Abbau von Rhamnose mit Hilfe von Transkriptionsanalysen und Wachstumsexperimenten mit Deletionsmutanten untersucht werden. Außerdem sollte analysiert werden, ob Lud-Proteine an der Oxidation von L-Lactat, das über den Diketo-Hydrolase Weg gebildet wird, beteiligt sind.
2. Weiterhin sollten die kodierenden Gene des Diketo-Hydrolase Weges in einen Überexpressionsvektor kloniert, homolog überexprimiert und die rekombinanten Enzyme nach Reinigung detailliert biochemisch analysiert werden.
3. Die transkriptionelle Regulation des Rhamnose-Katabolismus in *H. volcanii* sollte aufgeklärt werden. Dabei sollte insbesondere die Funktion von RhcR als Transkriptionsregulator der Gene des Rhamnose-Abbaus untersucht werden. Außerdem sollten Experimente durchgeführt werden, um ein potentiell Signal-molekül von RhcR zu identifizieren.
4. Für die Crenarchaeota *Vulcanisaeta distributa* und *S. solfataricus* sollte die Beteiligung der putativen Gene des Diketo-Hydrolase Weges am Rhamnose-Abbau mit Hilfe von Transkriptionsanalysen und biochemischen Untersuchungen ausgewählter Enzyme geprüft werden.

4 Material und Methoden

4.1 Wachstum von Organismen

Die Züchtung von Mikroorganismen erfolgte, wenn nicht anders beschrieben, unter aeroben Bedingungen in 100 ml Erlenmeyerkolben mit 20 ml Medium. Das Wachstum über die Zeit wurde mittels Zunahme der Streuung bei 600 nm im Einstrahlphotometer (Ultrospec 2000, GE Healthcare) gemessen. Die Messwerte wurden um die Extinktion des Mediums korrigiert und Proben mit einer optischen Dichte über 0,5 mit Medium verdünnt.

4.1.1 Wachstum von *Haloferax volcanii*

In dieser Arbeit wurden die *H. volcanii* Stämme H26, H555 und H1209 verwendet (Tabelle 1). Die Anzucht von *H. volcanii* in Flüssigkulturen erfolgte in Synthetikmedium (Tabelle 2) mit 1 % Casaminsäuren bei 42 °C und einer Schüttelgeschwindigkeit von 150 rpm. In den verwendeten Stämmen ist das Gen *pyrE2*, welches für das für die Pyrimidin-Synthese essentielle Enzym Orotat-Phosphoribosyl-Transferase kodiert, deletiert, weshalb dem Medium 50 µg/ml Uracil zugegeben wurde. Für die Anzucht des Stammes H1209 wurde das Medium zusätzlich mit 40 µg/ml Thymidin versetzt, da in diesem Stamm das Gen der Dihydrofolatreductase (*hdrB*), ein Enzym der Thymidin-Synthese, deletiert ist. Die Stämme *H. volcanii* H26 und H555 wurden in der vorliegenden Arbeit für die Herstellung von Deletionsmutanten (4.2.7) und für Wachstumsexperimente verwendet. Der Stamm *H. volcanii* H1209 diente der homologen Überexpression halophiler Proteine (4.3).

Wachstumsversuche mit *H. volcanii*. Das Wachstum von *H. volcanii* H26, H555 sowie von Deletionsmutanten erfolgte in Synthetikmedium mit 20 mM L-Rhamnose, 20 mM D-Glucose oder 1 % Casaminsäuren als Kohlenstoff- und Energiequelle. Für Komplementations-Experimente wurden die Deletionsmutanten mit auf pTA963 basierenden Plasmiden transformiert (Tabelle 5). Auf diesem Plasmid ist *pyrE2* kodiert, weshalb in Medium ohne Uracil auf plasmidtragende Zellen selektioniert wurde. Die Plasmide enthielten außerdem die jeweils zu komplementierenden *rhc*-Gene unter der Kontrolle eines durch Tryptophan induzierbaren Promotors, weshalb dem Medium 80 µM L-Tryptophan zugesetzt wurde. Die $\Delta lutB\Delta lutC$ Mutante wurde mit pTA963 komplementiert, auf dem das *lut*-Operon unter der Kontrolle des nativen Promotors stand. Die Ansätze der Wachstumsversuche wurden mit exponentiell wachsenden Vorkulturen auf eine OD₆₀₀ von ca. 0,05 inokuliert. Für Enzymmessungen in Rohextrakten wurden Extrakte aus spät

exponentiell gewachsenen Zellen hergestellt. Dazu wurden 5-10 ml der Kulturen für 20 min bei 6000 rpm zentrifugiert (Avanti J-25, Beckmann), die Pellets in 100 mM Tris-HCl, pH 8,5 mit 1,5 M KCl resuspendiert und die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen (Sonifer 250, Bransons). Nach erneuter Zentrifugation für 20 min bei 20000 rpm wurden die zellfreien Extrakte für Aktivitätsmessungen eingesetzt (4.6.2).

Tabelle 1 **Verwendete *H. volcanii* Stämme dieser Arbeit.** Dargestellt sind die Stämme und die jeweiligen Genotypen. Abkürzungen: *pyrE2*, Orotat-Phosphoribosyl-Transferase; *p.tnaA*, Promotor der Tryptophanase; *hdrB*, Dihydrofolatreductase; *pitA_{Nph}*, Chlorite dismutase family protein aus *Natronomonas pharaonis*; *mrr*, Endonuklease aus der MRR Familie; *bgaH*, β -Galaktosidase aus *Haloferax lucentense*. Eckige Klammern stehen für Eigenschaften, die auf einem episomal eingefügten Plasmid kodiert werden. ¹(Allers *et al.* 2004); ²(Allers *et al.* unveröffentlicht); ³(Allers *et al.* 2010).

Stamm	Genotyp
H26 ¹	$\Delta pyrE2$
H26 $\Delta rhcA$	$\Delta pyrE2 \Delta rhcA$
H26 $\Delta rhcB$	$\Delta pyrE2 \Delta rhcB$
H26 $\Delta rhcB$ pTA963- <i>rhcB</i>	$\Delta pyrE2 \Delta rhcB$ [<i>p.tnaA::6xHis tag::rhcB pyrE2 hdrB</i>]
H26 $\Delta rhcC$	$\Delta pyrE2 \Delta rhcC$
H26 $\Delta rhcC$ pTA963- <i>rhcC</i>	$\Delta pyrE2 \Delta rhcC$ [<i>p.tnaA::6xHis tag::rhcC pyrE2 hdrB</i>]
H26 $\Delta rhcD$	$\Delta pyrE2 \Delta rhcD$
H26 $\Delta rhcD$ pTA963- <i>rhcD</i>	$\Delta pyrE2 \Delta rhcD$ [<i>p.tnaA::6xHis tag::rhcD pyrE2 hdrB</i>]
H26 $\Delta rhcE$	$\Delta pyrE2 \Delta rhcE$
H26 $\Delta rhcE$ pTA963- <i>rhcE</i>	$\Delta pyrE2 \Delta rhcE$ [<i>p.tnaA::6xHis tag::rhcE pyrE2 hdrB</i>]
H26 $\Delta rhcF$	$\Delta pyrE2 \Delta rhcF$
H26 $\Delta rhcF$ pTA963- <i>rhcF</i>	$\Delta pyrE2 \Delta rhcF$ [<i>p.tnaA::6xHis tag::rhcF pyrE2 hdrB</i>]
H26 $\Delta rhcG$	$\Delta pyrE2 \Delta rhcG$
H26 $\Delta rhcG$ pTA963- <i>rhcG</i>	$\Delta pyrE2 \Delta rhcG$ [<i>p.tnaA::rhcG pyrE2 hdrB</i>]
H26 ΔHVO_B0113	$\Delta pyrE2 \Delta HVO_B0113$
H26 $\Delta lutB\Delta lutC$	$\Delta pyrE2 \Delta lutB\Delta lutC$
H26 $\Delta lutB\Delta lutC$ pTA963p. <i>lutC::lutClutB</i>	$\Delta pyrE2 \Delta lutB\Delta lutC$ [<i>p.lutC::lutClutB pyrE2 hdrB</i>]
H555 ²	$\Delta pyrE2 \Delta bgaH$
H555 $\Delta rhcR$	$\Delta pyrE2 \Delta bgaH \Delta rhcR$
H555 $\Delta rhcR$ pTA963- <i>rhcR</i>	$\Delta pyrE2 \Delta bgaH \Delta rhcR$ [<i>p.tnaA::rhcR pyrE2 hdrB</i>]
H1209 ³	$\Delta pyrE2 \Delta hdrB pitA_{Nph} \Delta mrr$
H1209 pTA963- <i>rhcB</i>	$\Delta pyrE2 \Delta hdrB pitA_{Nph} \Delta mrr$ [<i>p.tnaA::6xHis tag::rhcB pyrE2 hdrB</i>]
H1209 pTA963- <i>rhcC</i>	$\Delta pyrE2 \Delta hdrB pitA_{Nph} \Delta mrr$ [<i>p.tnaA::6xHis tag::rhcC pyrE2 hdrB</i>]
H1209 pTA963- <i>rhcD</i>	$\Delta pyrE2 \Delta hdrB pitA_{Nph} \Delta mrr$ [<i>p.tnaA::6xHis tag::rhcD pyrE2 hdrB</i>]
H1209 pTA963- <i>rhcE</i>	$\Delta pyrE2 \Delta hdrB pitA_{Nph} \Delta mrr$ [<i>p.tnaA::6xHis tag::rhcE pyrE2 hdrB</i>]
H1209 pTA963- <i>rhcF</i>	$\Delta pyrE2 \Delta hdrB pitA_{Nph} \Delta mrr$ [<i>p.tnaA::6xHis tag::rhcF pyrE2 hdrB</i>]
H1209 pTA963- <i>rhcR</i>	$\Delta pyrE2 \Delta hdrB pitA_{Nph} \Delta mrr$ [<i>p.tnaA::6xHis tag::rhcR pyrE2 hdrB</i>]

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

Zusammensetzung Synthetikmedium ¹		Salzlösung	
Salzlösung ²	900 ml	NaCl	125 g
Spurenelementlösung ³	1 ml	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	45 g
FeSO ₄ -Lösung ³	1 ml	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	10 g
2 M MOPS/KOH, pH 7,2 ³	50 ml	KCl	10 g
1 M K ₂ HPO ₄ ²	1 ml	CaCl ₂	1,34 g
1M NH ₄ Cl ²	10 ml	1 M Tris-HCl, pH 7,2	50 ml
10 % Hefeextrakt ²	1 ml	Ad H ₂ O _{dest} 900 ml, pH 7,2 eingestellt, autoklaviert	
Zusammensetzung Agarplatten		FeSO ₄ -Stammlösung	
Salzlösung	200 ml	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,23 g
Agar-Agar	3 g	Ad H ₂ O _{dest} 100 ml, pH 3-4 eingestellt, sterilfiltriert	
Autoklavieren, vor dem Gießen hinzugeben:		Spurenelementlösung	
Spurenelementlösung ³	200 µl	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,1 g
FeSO ₄ -Lösung ³	200 µl	MnCl ₂ x 4 H ₂ O	0,03 g
Zusammensetzung DM-YPC-Medium		H ₃ BO ₃	0,3 g
Salzlösung	900 ml	CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,2 g
10 % Hefeextrakt ²	50 ml	CuCl ₂ x 2 H ₂ O	0,01 g
10 % Bactopecton ²	10 ml	NiCl ₂ x 6 H ₂ O	0,02 g
10 % Casamino-säuren ³	10 ml	Na ₂ MoO ₄ x H ₂ O	0,03
Spurenelementlösung ³	1 ml	pH mit HCl auf 3,5 eingestellt, ad H ₂ O _{dest} 100 ml, sterilfiltriert	
FeSO ₄ -Lösung	1 ml		

¹ Als Kohlenstoffquelle wurden entweder L-Rhamnose (20 mM), D-Glucose (20 mM) oder Casamino-säuren (1 %) steril zugegeben; ² autoklaviert; ³ sterilfiltriert.

4.1.2 Wachstum von *Sulfolobus solfataricus*

S. solfataricus wurde in Basal-Medium nach Brock bei 72 °C und 150 rpm gezüchtet (Brock *et al.*, 1972). Das Medium enthielt 0,75 g/l Hefeextrakt sowie 10 mM D-Glucose oder 10 mM L-Rhamnose als Kohlenstoff- und Energiequelle. Wachstumsversuche wurden auf eine OD₆₀₀ von 0,05 inokuliert. Zellextrakte für Enzymmessungen wurden aus spät exponentiell gewachsenen Zellen hergestellt. Die Zellen wurden dazu durch Zentrifugation für 20 min bei 6000 rpm pelletiert (Avanti J-25, Beckmann) und mittels Ultraschall in 100 mM HEPES-KOH pH 7,5 aufgeschlossen (Sonifer 250, Bransons). Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 20000 rpm standen die zellfreien Extrakte zur Verfügung (4.6.2).

Tabelle 3 Basal-Medium für *S. solfataricus*.

Zusammensetzung Basal-Medium		Spurenelementlösung	
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,3 g	MnCl ₂ x 4 H ₂ O	180 mg
KH ₂ PO ₄	0,28 g	Na ₂ B ₄ O ₇ x 10 H ₂ O	450 mg
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,25 g	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	22 mg
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,07 g	CuCl ₂ x 2 H ₂ O	5 mg
FeCl ₃ x 6 H ₂ O	0,02 g	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	3 mg
Spurenelementlösung	10 ml	VOSO ₄ x 2 H ₂ O	3 mg
Ad 1000 ml mit H ₂ O _{dest} , pH auf 2,0 eingestellt und autoklaviert		CoSO ₄	1 mg
		Ad 1000 ml mit H ₂ O _{dest} , pH auf 2,0 eingestellt	

4.1.3 Wachstum von *Escherichia coli*

In dem Stamm *E. coli* XL1 Blue MRF⁺ (Agilent Technologies) wurden Vektoren mit bzw. ohne Insert vermehrt (Tabelle 5). Der Stamm *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS (Novagen) diente in dieser Arbeit der Überexpression von Proteinen, die in Vektoren der pET-Serie kloniert vorlagen (Tabelle 5). Die Kultivierung beider Stämme erfolgte in LB-Medium (Luria-Bertani-Medium: 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, pH 7,0) bei 37 °C und einer Schüttelgeschwindigkeit von 130 rpm für 8-14 h. Zur Selektion auf plasmidtragende Zellen wurde das LB-Medium mit Antibiotika versetzt, entsprechend der Antibiotikaresistenz der transformierten Plasmide. Transformanten der Vektoren pET19b, pTA963 und pTA131 wurden in Medium mit 100 µg/ml Carbenicillin und Transformanten mit pET28a in Medium mit 30 µg/ml Kanamycin kultiviert. Zur Selektion von *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS wurde das Medium zusätzlich mit 34 µg/ml Chloramphenicol versetzt, da der Expressionsstamm eine plasmidkodierte Chloramphenicolresistenz trägt.

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Isolation, Reinigung, Konzentrations- und Größenbestimmung von DNA und RNA

Isolierung von genomischer DNA. Genomische DNA aus *H. volcanii* und *S. solfataricus* wurde mit Hilfe des Wizard Genomic DNA Purification Kits (Promega) nach Herstellerangaben isoliert. Die DNA aus *M. acetivorans* wurde mir freundlicher Weise von der AG Schmitz-Streit und die DNA aus *V. moutnovskia* und *T. kodakarensis* von der AG Schönheit zur Verfügung gestellt. Die DNA aus *M. maripaludis* wurde von der DSMZ (Braunschweig) bezogen.

Isolation und Reinigung von Gesamt-RNA. Die Isolation von RNA erfolgte aus exponentiell wachsenden Kulturen von *H. volcanii* bzw. *S. solfataricus*. Für jede Isolation wurden 5×10^9 Zellen eingesetzt (OD₆₀₀/Zellzahl-Relation von OD₆₀₀ = 1 entspricht 1×10^9 Zellen/ml). Die Zellen wurden für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert, das Pellet in 1 ml TRI-Reagenz (Sigma-Aldrich) resuspendiert und die RNA anschließend nach Herstellerangaben isoliert.

Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren. Die Konzentrationsanalyse von DNA und RNA erfolgte photometrisch am NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer bei 260 nm computerunterstützt mit der Software NanoDrop1000 (PEQLAB Biotechnologie GmbH).

Reinigung von amplifizierten DNA-Fragmenten. Die Reinigung von PCR-Amplifikaten erfolgte entweder durch die Anwendung des PCR Purification Kits oder nach präparativer Agarosegelelektrophorese mit dem Gel Extraction Kit (jeweils Qiagen). Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

Agarosegelelektrophorese. Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese wurden PCR-Produkte, Plasmide sowie genomische DNA nach ihrer Größe aufgetrennt. Sie ermöglichte sowohl die Größenbestimmung von PCR-Produkten in analytischen Gelen (40 ml), als auch die Reinigung restriktionshydrolysierter DNA-Fragmente und Plasmide in präparativen Gelen (80 ml). Der DNA-interkalierende Farbstoff Ethidiumbromid diente der anschließenden Visualisierung der getrennten DNA-Fragmente auf einem UV-Schirm (312 nm). Zur Herstellung der Gele wurde Agarose 0,8-2 %ig in 40 oder 80 ml TAE-Puffer (40 mM Tris-HCl pH 8,3, 20 mM Acetat, 1 mM EDTA) durch Erhitzen gelöst, mit 2 bzw. 4 µl einer 1 %igen Ethidiumbromid-Lösung versetzt und die Agaroselösung in eine Gießvorrichtung (9,5 cm x 10 cm; Biometra) gegossen. Die DNA-Proben wurden mit einem 6 x Auftragspuffer (Thermo Scientific) versetzt und neben einem DNA-Größenstandard (Gene Ruler 1 kb DNA Ladder, Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder oder GenRuler 50 bp DNA Ladder, Fermentas) auf das Gel aufgetragen. Anschließend erfolgte die Elektrophorese in einer mit TAE-Puffer gefüllten Kammer bei 100-120 V für 20-80 min.

4.2.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) diente der Amplifikation von DNA-Fragmenten aus genomischer DNA oder von Plasmiden. Sie wurde in Ansätzen von 12,5-50 µl in einem Thermocycler (T3000 Thermocycler, Biometra) mit Enzymen und Lösungen der Firmen PeqLab oder Thermo Scientific durchgeführt. Die verwendeten Oligonukleotid-Primer wurden von Eurofines Genomics bezogen (Tabelle 4). Die PCR-Programme wurden nach Herstellerangaben der jeweiligen Polymerase erstellt, wobei die Schmelztemperatur der verwendeten Oligonukleotid-Primer und die Länge der zu amplifizierenden Sequenzabschnitte berücksichtigt wurde.

Amplifikation von Genen. Die Amplifikation von offenen Leserahmen aus genomischer DNA erfolgte mit Hilfe der *Pwo*-Polymerase (PeqLab) oder der Phusion-Polymerase (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben. Es wurden 5-100 ng genomische DNA als Template eingesetzt. Durch die verwendeten mismatch-Primer wurden in die Amplifikate Restriktionsschnittstellen eingefügt, die eine anschließende Klonierung in die Vektoren pTA963 bzw. pET19b oder pET28a ermöglichten (Tabelle 4; 4.2.3).

Amplifikation von Fragmenten zur Herstellung von Deletionskonstrukten. Für jedes Deletionskonstrukt wurde zunächst in zwei voneinander getrennten Fragment-PCRs ein je ca. 500 bp langes DNA-Fragment amplifiziert, welches dem 5'- bzw. dem 3'-flankierenden Bereich des zu deletierenden Gens entsprach (Fragment 1 und 2). Um diese beiden Fragmente in einer anschließenden PCR miteinander zu fusionieren, wurden an den 3'-Primer des Fragments 1 8-12 Basen angefügt, die komplementär zu den ersten Basen des 5'-Bereiches von Fragment 2 sind (Tabelle 4). An den 5'-Primer des Fragments 2 wurden 9-12 Basen angefügt, die zu der 3'-Sequenz von Fragment 1 komplementär sind. Die Fragment-PCRs erfolgten mit der *Pwo*-Polymerase nach Herstellerangaben. Die amplifizierten Sequenzabschnitte wurden nach Reinigung mittels Agarosegelelektrophorese (4.2.1.) im äquimolaren Verhältnis als DNA-Template für die anschließende Fusions-PCR eingesetzt. Diese wurde mit der *Pwo*-Polymerase in Ansätzen wie vom Hersteller empfohlen durchgeführt und enthielt jeweils 80-150 ng Fragment 1 und Fragment 2 als DNA-Template sowie je 400 nM 5'-Primer von Fragment 1 und 3'-Primer von Fragment 2. Fragment 1 und Fragment 2 wiesen komplementäre Bereiche am 3'- bzw. am 5'-Ende auf, wodurch beide Fragmente in der PCR in diesem Bereich hybridisierten. Die eingesetzten Primer hybridisierten am 5'-Ende von Fragment 1 bzw. am 3'-Ende von Fragment 2. Dadurch entstanden Amplifikate, in denen Fragment 1 und Fragment 2 fusioniert vorlagen. Die Amplifikate wurden anschließend mittels Agarosegelelektrophorese (4.2.1.) gereinigt und standen zur Ligation in den Vektor pTA131 zur Verfügung (4.2.3).

Pop-out PCR. Im Zuge der Generierung von Deletionsmutanten wurde die pop-out PCR verwendet um pop-out Klone auf ein erfolgreiches Herausloopen des Vektors pTA131 (pop out) zu überprüfen (4.2.7). Dazu wurden 100 µl einer pop-out Kultur für 1 min bei 13200 rpm pelletiert, das Zellpellet in 100 µl H₂O lysiert und 1 µl Lysat als Template für eine PCR mit der *Taq*-Polymerase (PeqLab) nach Herstellerangaben eingesetzt.

Kolonie-PCR zur Auswertung von *E. coli* Transformanten. Die Kolonie-PCR wurde verwendet, um transformierte *E. coli* Stämme darauf zu untersuchen, ob nach Ligation das jeweils aufgenommene Plasmid ein Insert von erwarteter Länge enthielt. Dazu wurde jeweils der Vektorabschnitt der multiple cloning site mit flankierend bindenden Primern amplifiziert (Tabelle 4). Die PCR erfolgte mit der *Taq*-Polymerase (PeqLab) in Ansätzen wie vom Hersteller beschrieben. Mit einer sterilen Pipettenspitze aufgenommene Einzelkolonien wurden als Template in die PCR-Ansätze überführt. Die anschließende Visualisierung und Größenbestimmung der PCR-Produkte erfolgte mittels analytischer Agarosegelelektrophorese (4.2.1.).

Herstellung von DIG-dUTP markierten DNA-Sonden. Die Herstellung von Digoxigenin (DIG)-markierten Sonden für Southern-Blot und Northern-Blot Analysen erfolgte mit dem PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche) in 25 µl Ansätzen nach Herstellerangaben. Als Template wurden 5 ng genomische DNA oder 10 pg Plasmid-DNA eingesetzt. Anschließend wurden die PCR-Produkte mittels Agarosegelelektrophorese gereinigt, in 50 µl RNase freiem Wasser aufgenommen, für 7 min bei 99°C denaturiert und mit 10 ml DIG Easy Hyb (Roche) versetzt. Diese Sonden wurden entweder direkt für Transkriptnachweise eingesetzt oder bei -20°C gelagert und vor Verwendung für 10 min bei 68°C erhitzt.

Tabelle 4 Oligonukleotide die in dieser Arbeit verwendet wurden. Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme sind unterstrichen und mutierte Basen fettgedruckt. Sonden für Southern-Blot Analysen wurden mit den Primern HVO_...frg1s und HVO_...frg1as generiert. Kompl. = Komplementation, NB-Sonde = Northern-Blot-Sonde, ÜE = Überexpression, OSM= Ortsspezifische Mutagenese.

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Verwendung
T7	TAATACGACTCACTATAG GG	Kolonie-PCR pET-Vektoren
T7 term	CTA GTTATTGCTCAGCGG T	“
M13 uni(-21)	TGTAAAACGACGGCCAGT	Kolonie-PCR pTA-Vektoren
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG	“
pTA963p.tnaAs	TGGCGAGAACGGAACAGC	Kolonie-PCR pTA963
RibLs	ACAGACAATATGGGGCAGCTGC	RT-PCR
RibLas	GTCCTCGACGTCGCAGTAGATGG	“
HVO_B0104frg1s	CAGAACGCGGTCTCCTCGACG	ΔHVO_B0104
HVO_B0104frg1as	CTCCTTCGAGCGACGGCCTCCGATTGGCGG	“
HVO_B0104frg2s	GAGGCCGTCGCTCGAAGGAGACAGTTGTCCG	“
HVO_B0104frg2as	CGGACAATCATCCGGCATGGCC	“
HVO_B0104Nth_s	CGCGTTCACCTGGAGATTAAAG	RT-PCR/ NB-Sonde
HVO_B0104Nth_as	TCATCCGGTAGACTTCGTCCATC	“
HVO_B0105frg1s	CTCCGGGGTAAATTCGATTTTGGG	ΔHVO_B0105
HVO_B0105frg1as	CGGTCAGCCACGCGTGGGTGTGGGTATCTATC	“
HVO_B0105frg2s	ACCCACGCGTGGCTGACCGAGAAGTCGTTC	“
HVO_B0105frg2as	CACGTCCGGGAGGTTGTTGTTC	“
HVO_B0105Nth_s	GGACAGCTTCGACGTACACA	RT-PCR/ NB-Sonde
HVO_B0105Nth_as	CGAGTCGGACATGTGGACAA	“
HVO_B0105ÜEs	CGTCGATTGTCATGATAGATACCC	ÜE, Kompl.
HVO_B0105ÜEas	GACGACCGGATCCGCTCAG	“
HVO_B0106frg1s	CTCCGGGGTAAATTCGATTTTGGG	ΔHVO_B0106
HVO_B0106frg1as	TCGATGACTTCC CCTACTGAGCCGGTCTCTGTG	“
HVO_B0106frg2s	CTCAGTAGGGGAAGTCATCGACGAGGAGC	“
HVO_B0106frg2as	ATGAACTGCCAGATGGACGC	“
HVO_B0106Nth_s	GGCTACTTCATCGGCTTCGT	NB-Sonde
HVO_B0106Nth_as	GAACAGGTCGTCGTTCTCGT	“
HVO_B0106ÜEs	GTAATAGCACCATATGACTGATAG	Kompl.
HVO_B0106ÜEas	CGAGTCGGATCCTCAGGCC	“
HVO_B0109Nth_s	ACTCGACGGCGTGAGCTTCGAAC	RT-PCR/ NB-Sonde
HVO_B0109Nth_as	GTCTCGGCCTCGAACAGGTAGAC	“
HVO_B0110frg1s	TTCCGGCCGACGACTTCTAC	ΔHVO_B0110
HVO_B0110frg1as	GAAGTGAAGACGCGGCCGGTCTGAATGATG	“
HVO_B0110frg2s	CGGGCCGCGTCTTCCAGTTCGACGGCTGAAC	“
HVO_B0110frg2as	TTCCCGGCGATGTCCCACAG	“
HVO_B0110Nth_s	TGCTCATCAAGGTCCACACC	NB-Sonde
HVO_B0110Nth_as	CCGCCTTCTTCTCGAGGTT	“
HVO_B0110ÜEs	ATTCGCAATCATGAAAGCCATC	ÜE, Kompl.
HVO_B0110ÜEas	CACATCGGATCCGCACGGGTA	“

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Verwendung
HVO_B0111frg1s	CTCGGCATCGACACGGTGAAC	ΔHVO_B0111
HVO_B0111frg1as	GCGTTTCTCCTGGATGAACTCGCCCCACGACTC	ΔHVO_B0111
HVO_B0111frg2s	GAGTTCATCCAGGAGAAACGCGAGTCGACCTAC	“
HVO_B0111frg2as	CGGCCACATGCGCTTCATGAG	“
HVO_B0111Nth_s	GCGACGAAAATCAGCAACGA	NB-Sonde
HVO_B0111Nth_as	GAGTTTCATCGCGTCGAAGC	“
HVO_B0111ÜEs	CCAAACAAA <u>CCATGG</u> AGATTACAGAC	ÜE, Kompl.
HVO_B0111ÜEas	CTGATGTCCG <u>GGATCC</u> TTACTCGATGG	“
HVO_B0113frg1s	GCGGCGAACACGAGTTCACC	ΔHVO_B0113
HVO_B0113frg1as	TTCGTCCGCGAAAGCCGAGTTCTCCGCCTTC	“
HVO_B0113frg2s	AACTCGGCTTTCGCGGACGAAGTCATCCC	“
HVO_B0113frg2as	TCACCTGCGCGAGTTCGTTTATC	“
HVO_B0114frg1s	TGACGCCATCCAGTTCGAAG	ΔHVO_B0114
HVO_B0114frg1as	ATGACGTTTCGCGTCGACGAGTTCGAGCGAGAT	“
HVO_B0114frg2s	CTCGTCGACGCGAACGTCATCGAGGTGAAC	“
HVO_B0114frg2as	GAGTTCGACCTCGTAGTCTACC	“
HVO_B0114ÜEs	ATAACCAAC <u>CCATGG</u> CGAAGGACG	ÜE, Kompl.
HVO_B0114ÜEas	CTCTACGCAGGA <u>TCCCG</u> ACGAC	“
HVO_B0114RTs	GGCGACACCTACTACGTCAG	RT-PCR
HVO_B0114RTas	TCCGTGGCGGTCCAAGATGC	
HVO_B0115frg1s	CACGGTATCGGCGTCTTTCTG	ΔHVO_B0115
HVO_B0115frg1as	GCGCTCGGAGCGAGTTGCATCGTTACTCTG	“
HVO_B0115frg2s	TGCAACTCGCTCCGAGCGGACGAGTAAC	“
HVO_B0115frg2as	CGACGAGATGTTGACGATGCTG	“
HVO_B0115Nth_s	GAGGACGTAAAGCTCCTCGC	RT-PCR/ NB-Sonde
HVO_B0115Nth_as	GATGCCGCTGATGTACTCGA	“
HVO_B0115ÜEs	TTGCGC <u>CATATG</u> CACCACCACCACCACATGCAA CTCGTTCGATACAC	ÜE, Kompl.
HVO_B0115ÜEas	GTGCGTGCTC <u>GAAATTC</u> GGTAG	“
HVO_B0116frg1s	ACGGCCAAGAACGTCGACGCC	ΔHVO_B0116
HVO_B0116frg1as	CGTACAGTATGACTGACGTAAGT	“
HVO_B0116frg2s	TCGCGACGAACAAGTCGGTAGTACCGGGATATCC	“
HVO_B0116frg2as	CTACCGACTTGTTGTCGCGACGACTTCGAAAG	“
HVO_B0116Nth_s	GGTGTACGAGGTCGACGTG	NB-Sonde
HVO_B0116Nth_as	GATTCGGTCGAGGATGTGCA	“
HVO_B0116ÜEs	GTACTACCGA <u>TCATGA</u> GCACGCAC	ÜE, Kompl.
HVO_B0116ÜEas	GGCGGAT <u>CCCG</u> AAGTCGTCGCG	“
HVO_1692/93fgt1s	TTTAGCTCGCCGTTTCGAGGG	ΔHVO_1692ΔHVO_1693
HVO_1692/93fgt1as	GACCAGTTGAATCAACCGTGCCGGTTGACATAC	“
HVO_1692/93fgt2s	GGCACGGTTGATTCAACTGGTCGCACCGCG	“
HVO_1692/93fgt2as	GCGGAAACGGGAGTTAGAACG	“
HVO_1692/93ÜEs	GTCGCGGG <u>CCCG</u> GACGAGG	Kompl.
HVO_1692/93ÜEas	GTCCGGAT <u>CCCG</u> GGGTCGAG	“
HVO_1692Nth_s	CCATCAAGGAAGACGCCATCG	NB-Sonde

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Verwendung
HVO_1692Nth_as	CCCGTTGTCGATGAGAACGAG	“
Vdis_1457ÜEs	CATTTTAAATTTT GCTAGC ATGAAGGCGCTG	ÜE
Vdis_1457ÜEas	CAGCCTC AGGATCC ATATTACTCAC	“
Vdis_1458ÜEs	GAATAATGAGGCT GCTAGC ATGAAGATCA	ÜE
Vdis_1458ÜEas	GAAACACCTAATA AGGATCC ATGGATTATTTTA	“
Vdis_1460ÜEs	CATTAAGT CATAT GAAAGGTGAAAGC	ÜE
Vdis_1460ÜEas	CCCATGT GGATCCC CTACGG	“
SSO1300ÜEs	CCTTTTATTCAGCC CATAT GAAAAATGTAAA	ÜE
SSO1300ÜEas	GCCTCCT GGATCCC ATCAAG	“
SSO1300Nths	CCGGGCAAACAACAAATGGTG	NB-Sonde
SSO1300Nthas	TCCACACCGCAGTATCAAAGG	“
SSO1303Nths	CGCCATTCAATCAGCGTTC	NB-Sonde
SSO1303Nthas	GCCACAGCAGAACCTCATC	“
Pisl_1106s	GAGGATAAG GCTAGC GTGAGTTTAAAC	ÜE
Pisl_1106as	GAGAGGAG CTCGAGG GATATGCAAG	“
Vmut_1565s	AGTAATAT CATAT GTTGTGGG	ÜE
Vmut_1565as	ATCACGCGT AGGATCC ATTGCC	“
TK_0511s	TAGGTGGT CATAT GCGGCTCCCAG	ÜE
TK_0511as	CTCCTCGAAT GGATCCC GAGACTG	“
J422_06229s	GTAAAGTTGA GCTAGC ATGAGAAAGACA	ÜE
J422_06229as	GATATTATTGTT GCGGATCC AAAAAGATT	“
MMP1605s	GGAGGGGT CATAT GTTGAAAAATC	ÜE
MMP1605as	GGGTGCATTTA AGGATCC TTTTTCAAG	“
MA3890s	GTTCTAAAAACG CATAT GAAATATAAACGT	ÜE
MA3890as	CGATTTGAAT CTCGAG TCAGTCCAGA	“
Tuzn_1601Y412As	GGCCAGACCG CCGAGGAGGGG	OSM
Tuzn_1601Y412Aas	GGCAACAACAACGGCTCG	“
Tuzn_1601S365As	AGCGGTCTACGCCATGACCGG	OSM
Tuzn_1601S365Aas	ATGTCTGCGCCGAGATCG	“
Tuzn_1601R373As	GCTTGCAAAAG CCGTGGCTAAGTTCAGAC	OSM
Tuzn_1601R373Aas	GTGCCGGTCATGGAGTAG	“
Cmaq0580R372As	AACAGCGGTT GCGCTTCCAGATATAG	OSM
Cmaq0580R372Aas	AAGCCGCTTTTAGTGAAG	“
Cmaq0580R342As	TTTTGATGAGGCAATGAGGTTTGCC	OSM
Cmaq0580R342Aas	ACAGATGAATCAGCCCTAAAG	“

4.2.3 Klonierung von DNA-Fragmenten in einen Vektor

Für die gezielte Deletion von Genen im Genom von *H. volcanii* wurden die PCR-Produkte der Fusions-PCR (4.2.2) in den Vektor pTA131 kloniert. Für die homologe Überexpression halophiler Proteine in *H. volcanii* wurde eine Klonierung der kodierenden Gene in den Vektor pTA963

durchgeführt. Eine heterologe Überexpression von archaeellen Enzymen in *E. coli* wurde durch eine Klonierung der jeweiligen Gene in die Vektoren pET19b oder pET28a ermöglicht. Die kodierenden Gene wurden dabei aus genomischer DNA amplifiziert (4.2.2) oder im Fall der PKs aus *Caldivirga maquilensis* und *Candidatus Caldiarchaeum subterraneum* als synthetisierte DNA-Fragmente von der Firma Eurofines MWG Operon bezogen. Die synthetisierten Gene lagen dabei in den Vektoren pUC57 oder pEX-A2 vor und wiesen am 5'- und 3'- Ende flankierende Restriktionsschnittstellen auf, die eine Klonierung in Überexpressionsvektoren der pET-Serie ermöglichten.

Restriktionshydrolyse von Nukleinsäuren. Die Restriktionshydrolyse der gereinigten PCR-Produkte (4.2.2) sowie der Vektoren erfolgte als Einzel- oder Doppelverdau für 15 min bis 2 h. Es wurden Enzyme und Puffer von NEB (New England Biolabs GmbH) in 50 µl Ansätzen nach Herstellerangaben verwendet. Die DNA-Fragmente wurden im weiteren Verlauf mittels Agarosegelelektrophorese gereinigt und die DNA-Konzentration am NanoDrop bestimmt (4.2.1).

Ligation. Die Ligation der restriktionshydrolysierten Amplifikate in die geschnittenen Vektoren erfolgte in 10 µl Reaktionsansätzen. Das jeweilige Amplifikat wurde im 3- bis 5-fachen molaren Überschuss zum gereinigten Vektor (50-200 ng) eingesetzt. Ein Ansatz für eine sticky-end-Ligation in den Vektor pTA963, pET19b bzw. pET28a enthielt neben Vektor und PCR-Produkt 1 x T4-DNA-Ligase-Puffer und 1 U T4-Ligase (Fermentas). Ein Ansatz für eine blunt-end-Ligation in pTA131 enthielt neben Vektor und PCR-Produkt 1 x CutSmart Puffer, 5 % PEG4000, 0,5 mM ATP und 5 U T4-DNA-Ligase. Um eine Religation der blunt-end geschnittenen Vektoren zu verhindern, wurden die Ansätze zusätzlich mit der Restriktionsendonuklease versetzt, die in der vorangegangenen Restriktionshydrolyse des Vektors verwendet wurde (20 U *SmaI*, *EcoRV* oder *PmeI*, jeweils NEB). Die Ligationsansätze wurden für 1-10 h bei 22 °C inkubiert und anschließend bei 65 °C für 10 min hitzeinaktiviert. Danach wurde *E. coli* XL1-Blue MRF' mit diesen Ligationsprodukten transformiert (4.2.5).

4.2.4 Ortsspezifische Mutagenese

Die ortsspezifische Mutagenese diente in dieser Arbeit dem Austausch einzelner Basen in den kodierenden Genen der PKs aus *T. uzoniensis* und *C. maquilensis* und erfolgte mit dem Q5 Site Directed Mutagenesis Kit (New England Biolabs GmbH). Die verwendeten Primerpaare wurden mit Hilfe der Online-Software NEBaseChanger v1.2.5 (<http://nebasechanger.neb.com/>) konstruiert und die Mutagenesen mit den kalkulierten Annealing-Temperaturen durchgeführt

(Tabelle 4). Es wurden 12,5 µl Ansätze nach Herstellerangaben verwendet. Als Template dienten die entsprechenden Überexpressionsvektoren (Tabelle 5).

4.2.5 Transformation von *E. coli*

Die Vermehrung von Plasmiden nach erfolgter Mutagenese oder aus Ligationsansätzen erfolgte in dem Stamm *E. coli* XL-1Blue MRF'. Für die Überexpression von nicht-halophilen Proteinen wurde der Stamm *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS mit den entsprechenden Plasmiden (Tabelle 5) transformiert.

Transformation mittels Elektroporation. Für die Transformation mittels Elektroporation wurden 1-4 µl Ligationsansatz bzw. 1 µl Plasmid DNA (50- 150 ng) mit 50 µl kompetenter Zellen gemischt, in eisgekühlte Elektroporationsküvetten (Biozym) überführt und bei 2,5 kV, 200 Ω und 25 µF elektroporiert (Pulse Controller und Gene Pulser, Bio-Rad). Nach Zugabe von 700 µl SOC-Medium (0,5 % Hefeextrakt, 2 % Tryptophan, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose und 2,5 mM KCl, pH 7,0) wurden die Transformationsansätze für 1 h bei 37 °C und 750 rpm inkubiert. Anschließend wurden Aliquotes auf LB-Agarplatten mit Antibiotika (4.1.3) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Transformation mittels Hitzeschock. Für die Hitzeschock-Transformation wurden 2-5 µl Ligations- oder Mutagenese-Ansatz bzw. 1 µl Plasmid (50- 150 ng) mit 20 bis 40 µl chemisch-kompetenter Zellen gemischt und die Ansätze für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 30 s und eine Inkubation für 5 min auf Eis. Anschließend wurden die Zellen in 700 µl SOC-Medium aufgenommen und für eine Stunde bei 37 °C und 750 rpm inkubiert. Aliquotes der Ansätze wurden auf LB-Platten mit Antibiotika (4.1.3) ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* und Sequenzierung. In *E. coli* XL-1Blue MRF' vermehrte Plasmide wurden aus 4 ml Flüssigkultur mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) oder dem NucleoSpin Plasmid EasyPure-Kit (Macherey-Nagel) nach Angaben der Hersteller isoliert und die Konzentration der Plasmide am NanoDrop (4.2.1) bestimmt. Um auszuschließen, dass die im Rahmen dieser Arbeit konstruierten Plasmide Mutationen innerhalb des Inserts oder in den flankierenden Vektorbereichen aufweisen, wurden diese von der Firma MWG sequenziert. Die Sequenziererergebnisse wurden computerunterstützt mit der Software BioEdit analysiert (www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit). Durch einen Abgleich der Sequenziererergebnisse mit den Sequenzen der NCBI-Datenbank erfolgte eine Prüfung auf Fehlerfreiheit. In Tabelle 5 sind die in dieser Arbeit konstruierten Plasmide dargestellt.

Tabelle 5 Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten bzw. erstellten Plasmide. Angegeben ist die Bezeichnung sowie die Verwendung und die für diese Arbeit relevanten Eigenschaften. Abkürzungen: ÜE, Überexpression; Kompl., Komplementation; *pyrE2*, Orotat-Phosphoribosyl-Transferase; *hdrB*, Dihydrofolatreductase, ¹(Allers *et al.* 2004), ²(Allers *et al.* 2010), ³(Novagen), ⁴(AG Schönheit).

Bezeichnung	Verwendung und relevante Eigenschaften
pTA131¹	Plasmid für die Deletion eines Zielgens in <i>H. volcanii</i> , Suicide Vektor mit <i>pyrE2</i> unter Kontrolle des konstitutiven <i>p.fdx</i> -Promotors
- <i>ΔrhcA</i>	Deletion von <i>rhcA</i>
- <i>ΔrhcB</i>	Deletion von <i>rhcB</i>
- <i>ΔrhcC</i>	Deletion von <i>rhcC</i>
- <i>ΔrhcD</i>	Deletion von <i>rhcD</i>
- <i>ΔrhcE</i>	Deletion von <i>rhcE</i>
- <i>ΔrhcF</i>	Deletion von <i>rhcF</i>
- <i>ΔrhcG</i>	Deletion von <i>rhcG</i>
- <i>ΔrhcR</i>	Deletion von <i>rhcR</i>
- <i>ΔHVO_B0113</i>	Deletion von HVO_B0113
- <i>ΔlutBΔlutC</i>	Deletion von <i>lutBlutC</i>
pTA963²	Episomaler Vektor für die Expression halophiler Proteine in <i>H. volcanii</i> H1209 und die Komplementation von <i>H. volcanii</i> Deletionsmutanten; 6 x His-tag, <i>pyrE2</i> und <i>hdrB</i>
- <i>rhcB</i>	ÜE der RDH aus <i>H. volcanii</i> , Kompl. von H26 <i>ΔrhcB</i>
- <i>rhcC</i>	ÜE der RNL aus <i>H. volcanii</i> , Kompl. von H26 <i>ΔrhcC</i>
- <i>rhcD</i>	ÜE der RAD aus <i>H. volcanii</i> , Kompl. von H26 <i>ΔrhcD</i>
- <i>rhcE</i>	ÜE der KDRDH aus <i>H. volcanii</i> , Kompl. von H26 <i>ΔrhcE</i>
- <i>rhcF</i>	ÜE der DKDRH aus <i>H. volcanii</i> , Kompl. von H26 <i>ΔrhcF</i>
- <i>rhcG</i>	Kompl. von H26 <i>ΔrhcG</i>
- <i>rhcR</i>	ÜE von RhcR aus <i>H. volcanii</i> , Kompl. von H555 <i>ΔrhcR</i>
- <i>p.lutC::lutClutB</i>	Kompl von H26 <i>ΔlutBΔlutC</i>
pET19b³	Episomaler Vektor für die Expression rekombinanter Fusionsproteine mit einem 10 x His-tag in <i>E. coli</i> Rosetta (DE3)pLysS
-SSO1300	ÜE der RDH aus <i>S. solfataricus</i>
-Vdis_1460	ÜE der RDH aus <i>V. distributa</i>
-Tuzn_1601 ⁴	ÜE der PK aus <i>T. uzoniensis</i>
-Tuzn_1601Y412A	ÜE der PK-Y412A aus <i>T. uzoniensis</i>
-Tuzn_1601S365A	ÜE der PK-S365A aus <i>T. uzoniensis</i>
-Tuzn_1601Y412A-S365A	ÜE der PK-Y412A-S365A aus <i>T. uzoniensis</i>
-Tuzn_1601R373A	ÜE der PK-R373A aus <i>T. uzoniensis</i>
-Cmaq_0580	ÜE der PK aus <i>C. maquilingsis</i>
-Cmaq_0580R372A	ÜE der PK-R372A aus <i>C. maquilingsis</i>
-Cmaq_0580R342A-R372A	ÜE der PK-R342A-R372A aus <i>C. maquilingsis</i>
-Vmut_1565	ÜE der PK aus <i>V. moutnovskia</i>
-CSUB_C0804	ÜE der PK aus <i>Cand. C. subterraneum</i>
-TK0511	ÜE der PK aus <i>T. kodakarensis</i>
-MMP1605	ÜE der PK aus <i>M. maripaludis</i>
-MA3890	ÜE der PK aus <i>M. acetivorans</i>
pET28a³	Episomaler Vektor für die Expression rekombinanter Fusionsproteine mit einem 6 x His-tag in <i>E. coli</i> Rosetta (DE3)pLysS
-Vdis_1457	ÜE der KDRDH aus <i>V. distributa</i>
-Vdis_1458	ÜE der RAD aus <i>V. distributa</i>
-Pisl_1106 ⁴	ÜE der PK aus <i>P. islandicum</i>
-Kcr0150 ⁴	ÜE der PK aus <i>Cand. K. cryptofilum</i>
-J422_06229	ÜE der PK aus <i>M. villosus</i>

4.2.6 Transformation von *H. volcanii*

Zur Transformation von *H. volcanii*-Stämmen (Tabelle 1) wurden 2-4 ml einer exponentiell wachsenden Kultur für 2 min mit 8000 rpm zentrifugiert und die Zellpellets in einem Gemisch aus 162 µl Sphäroblastenbildungslösung (SBL; 0,8 M NaCl, 27 mM KCl, 15 % Saccharose, 50 mM Tris-HCl, pH 8,2) und 18 µl 0,5 M EDTA-Lösung pH 8,2 resuspendiert. Nach einer mikroskopischen Prüfung der Sphäroblastenbildung wurden zu jedem Ansatz 20 µl DNA-Lösung (1-3 µg Plasmid in 0,8 M NaCl) zugegeben und durch vorsichtiges, zwanzigfaches Invertieren der Reaktionsgefäße gemischt. Die Ansätze wurden 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 210 µl 60 %ige PEG-Lösung (in SBL) zugegeben und durch rasches Schwenken mit den Ansätzen vermischt. Nach einer Inkubation von 20 min bei Raumtemperatur wurde die Bildung von Zellaggregaten mikroskopisch kontrolliert. Im Anschluss wurden die Zellsuspensionen mit je 1,8 ml Sphäroblastenverdünnungslösung (SVL; 3,4 M NaCl, 175 mM MgSO₄, 34 mM KCl, 3 mM CaCl₂, 15 % Saccharose, 50 mM Tris-HCl, pH 7,2) versetzt und Aliquotes dieser Ansätze (80 bis 300 µl) auf Agarplatten mit Casaminosäuren als Kohlenstoffquelle ausplattiert (Tabelle 2). Die Agarplatten wurden bei 42 °C inkubiert und gewachsene Klone für die Kultivierung in Flüssigmedium verwendet (4.1.1).

4.2.7 Konstruktion von Deletionsmutanten von *H. volcanii*

Deletionsmutanten. Die Herstellung der Deletionsmutanten von *rhc*- und *lut*-Genen erfolgte über die sogenannte pop-in/pop-out Strategie mit Hilfe des Suicide-Vektors pTA131 (Allers & Mevarech, 2005, Bitan-Banin *et al.*, 2003). Der Vektor verfügt über ein funktionelles *pyrE2*-Gen, welches für eine Orotat-Phosphoribosyl-Transferase kodiert und unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors steht. In den Vektor wurden zwei fusionierte DNA-Fragmente eingefügt, welche zu dem 3'- und dem 5'-Bereich des zu deletierenden Genes komplementär waren (4.2.2.). Die Uracil-auxotrophen Stämme *H. volcanii* H26 und H555 ($\Delta pyrE2$) wurden mit den konstruierten Deletionsvektoren transformiert und in Uracil-freiem Medium auf Transformanten selektiert. Da pTA131 keinen haloarchaeellen Replikationsursprung aufweist, konnten nur die Transformanten in Medium ohne Uracil wachsen, die den Vektor durch homologe Rekombination in das Genom integriert hatten (pop-in). Die homologe Rekombination fand dabei an einem der beiden Gen-flankierenden Bereiche des Zielgens statt, wodurch Stämme entstanden, die neben dem Wildtyp-Gen auch die Deletionsvariante des Gens enthielten. Nach zehnmalem Passagieren in Uracil-freiem Medium, wurden die Zellen auf Agarplatten mit 30 µg/ml Uracil und 50 µg/ml 5-Fluoro-Orotat (5-FOA) ausplattiert, um auf ein zweites homologes Rekombinationsereignis zu selektieren. Zellen, bei denen der Vektor noch in das Genom integriert

war, setzten 5-FOA durch die auf dem Vektor kodierte Orotat-Phosphoribosyl Transferase zu dem für die Zellen toxischen 5-Fluorouracil um. Demgegenüber konnten Zellen, die den Vektor durch ein zweites homologes Rekombinationsereignis wieder verloren hatten (pop-out), wachsen, wobei Klone entstanden, die entweder das Wildtyp-Gen oder die Deletion aufwiesen. Pop-out-Klone mit erfolgreicher Deletion des Zielgens wurden mittels pop-out PCR (4.2.2) identifiziert und zehnmal in Medium mit 30 µg/ml Uracil und 50 µg/ml 5-FOA passagiert. Die erfolgreiche Deletion wurde anschließend mittels Southern-Blot Analysen verifiziert.

Southern-Blot Analysen. Für Southern-Blot Analysen wurde genomische DNA aus der Deletionsmutante und dem Wildtyp isoliert (4.2.1) und mit Restriktionsenzymen hydrolysiert. Dazu wurden Restriktionshydrolasen der Firma NEB (New England Biolabs GmbH) nach Herstellerangaben verwendet. Anschließend wurden 0,3 bis 1 µg der hydrolysierten DNA neben einem DIG-markierten Größenstandard (DNA Molecular Weight Marker III, Roche) in einem 0,8 %igen Agarosegel bei 120 V für 60 bis 90 min elektrophoretisch aufgetrennt (4.2.1). Im Anschluss wurden die DNA-Fragmente mit Hilfe eines Vakuum-Blot-Systems (Vacu-Blot, Biometra) auf eine Nylonmembran (Roche) transferiert. Dazu wurde zunächst bei einem konstanten Unterdruck von -60 mbar das Gel für 25 min mit Depurinatlösung (250 mM HCl), für 20 min mit Denaturierungslösung (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl), und für 25 min mit Neutralisierungslösung (0,5 M Tris-HCl, 1,5 M NaCl, pH 7,5) überschichtet. Der anschließende Transfer erfolgte bei -80 mbar für 40 min mit 20 x SSC (3 M NaCl, 300 mM Na-Citrat, pH 7,0). Die Fixierung der transferierten DNA auf der Nylonmembran erfolgte durch Bestrahlung mit UV-Licht (312 nm) für 90 s. Die Nylonmembran wurde im Anschluss in ein Hybridisierungsgefäß mit 5 ml vorgewärmter DIG Easy Hyb Lösung (Roche) aufgenommen und für 30 min bei 50 °C und 6 rpm inkubiert (Hybridisierungssofen OV 2, Biometra), bevor die Lösung entfernt und die DIG markierte Sonde (4.2.2) zur Membran gegeben wurde. Die Hybridisierung erfolgte bei 50 °C und 6 rpm über Nacht. Nach Entfernen der Hybridisierungslösung wurde die Membran zweimal mit 25 ml Low stringency buffer (2 x SSC, 0,1 % SDS) bei Raumtemperatur und 10 rpm und zweimal mit High stringency buffer (0,5 x SSC, 0,1 % SDS) bei 68 °C und 10 rpm inkubiert. Anschließend erfolgte die Detektion mit dem DIG Luminescent Detection Kit (Roche) nach Herstellerangaben. Über einen Vergleich der Fragmentgrößen der detektierten Banden von Wildtyp und Deletionsmutante konnte die erfolgreiche Deletion des Zielgens verifiziert werden.

4.2.8 Transkriptanalysen mittels Northern-Blot und RT-PCR

Der Nachweis von Transkripten und die Bestimmung von Transkriptlängen erfolgte mittels Northern-Blot Analysen. Für die semiquantitative Bestimmung von Transkriptmengen wurden Reverse Transkriptase (RT-PCR)-Experimente durchgeführt. Um einen Verdau der RNA durch Ribonukleasen zu vermeiden, wurden Glas- und Metallwaren vor Gebrauch für mindestens 4 h bei 240 °C gebacken und Plastikware zweimal autoklaviert. Alle verwendeten Lösungen wurden mit 0,1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt, über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert und anschließend autoklaviert.

Northern-Blot. Es wurden 4 bis 14 µg isolierte RNA mit 2 x RNA-Loading Dye (Fermentas) versetzt und die RNA durch Erhitzen der Ansätze für 10 min auf 65 °C denaturiert. Anschließend wurden die Proben neben dem Molekulargewichtsmarker RiboRuler High Range RNA Ladder (Fermentas) in einem 1,2 %igen Formaldehyd-Agarosegel (50ml; 1 x MOPS, 0,6 g Agarose, 2,5 µl 0,01 % Ethidiumbromidlösung, 900 µl Formaldehyd) bei 100 V für 60 min elektrophoretisch aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgte in 20 mM MOPS-Puffer pH 7,0 mit 0,74 % Formaldehyd. Der anschließende Transfer der RNA auf eine Nylonmembran (Roche) wurde mit einem Vakuum-Blot System (Vacu-Blot, Biometra) durchgeführt. Um störendes Formaldehyd zu entfernen, wurde das Gel zunächst zweimal mit RNase freiem Wasser bei -60 mbar Unterdruck für 25 min gespült und Membran und Gel anschließend zweimal mit 20 x SSC bei -60 mbar für je 30 min equilibriert. Der Transfer der RNA auf die Membran erfolgte bei -60 mbar Unterdruck für 40 min mit 20 x SSC. Nach dem Blotten wurde die Membran mit 2 x SSC gespült und die RNA durch Backen der Nylonmembran bei 120 °C für 30 min fixiert (Ofen WTB Binder). Im Anschluss wurde der Blot in ein Inkubationsgefäß überführt und 60 min mit 5 ml vorgewärmter DIG Easy Hyb Lösung (Roche) bei 50 °C und 6 rpm inkubiert. Darauf folgte die Hybridisierung mit der hitzedenaturierten Sonde (4.2.2) bei 50 °C und 6 rpm über Nacht. Im Anschluss wurde der Blot zweimal mit Low stringency buffer (2 x SSC, 0,1 % SDS) für 5 min und 6 rpm bei Raumtemperatur und zweimal mit High stringency buffer (0,5 x SSC, 0,1 % SDS) für 5 min und 6 rpm bei 50 °C gewaschen. Die anschließende Detektion der spezifisch markierten Transkripte erfolgte mit dem Luminescent Detection Kit (Roche) nach Herstellerangaben.

Nach der Detektion konnte die Sonde von der Membran gewaschen werden (stripping), um die Membran für die Hybridisierung mit einer weiteren Sonde einzusetzen. Dazu wurde die Membran mit H₂O gespült und anschließend zweimal für 60 min in je 10 ml Stripping-Lösung (50 % Formamid, 5 % SDS in 50 mM Tris, pH 7,5) bei 80 °C und 6 rpm inkubiert. Nach einem Waschschrift von 10 min in 2x SSC konnte die Membran für eine erneute Hybridisierung eingesetzt werden.

RT-PCR. RT-PCR-Experimente wurden mit DNaseI verdauter RNA (Thermo Scientific; nach Herstellerangaben) und dem GoSript Reverse Transcription System (Promega) durchgeführt. Dabei wurde die RNA in einem ersten Schritt mit *random* Hexamer-Primern in cDNA umgeschrieben. Ein 10 µl Reaktionsansatz enthielt 80-100 ng DNA-freie Gesamt-RNA, 0,25 µg *random* Hexamer-Primer (Promega), 500 µM dNTPs, 2 mM MgCl₂, und 0,5 µl GoScript Reverse Transkriptase. In Kontrollansätzen ohne Reverse Transkriptase wurden die Proben auf DNA-Kontaminationen geprüft. Die anschließenden PCR-Reaktionen mit Gen-spezifischen Primern wurden mit der GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase (Promega) durchgeführt. Der einfache Ansatz (25 µl) bestand aus 4-6 µg cDNA, 500 µM dNTPs, jeweils 200 nM forward und reverse Primer, 1 x GoTaq Green Flexi Reaktionspuffer, 2 mM MgCl₂ und 1,25 U GoTaq Flexi Polymerase. Das PCR-Programm bestand aus einer initialen Denaturierung bei 95 °C für 2 min, 22-28 Zyklen bestehend aus 30 s Denaturierung bei 95 °C, 30 s Annealing bei 58-62 °C und 45 s bis 1 min Synthese bei 72 °C. Das kodierende Gen des ribosomalen Proteins L10 wurde als konstitutiv exprimierte Kontrolle verwendet (Brenneis *et al.*, 2007). Das Ergebnis der PCR wurde mittels einer Agarosegelelektrophorese in einem 1 %igen Agarosegel analysiert (4.2.1).

4.3 Homologe und heterologe Expression von Proteinen

Für die homologe Überexpression von halophilen Proteinen aus *H. volcanii* wurde der Expressionsstamm *H. volcanii* H1209 und das Plasmid pTA963 verwendet (Allers *et al.*, 2010). Gene, die in Vektoren der pET-Serie kloniert vorlagen, wurden mit dem Chloramphenicol-resistenten Expressionsstamm *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS nach Angabe des *pET System Manuals* (Novagen) heterolog überexprimiert.

Überexpression in *H. volcanii*. Zur Überexpression rekombinanter, halophiler Proteine wurde *H. volcanii* H1209 mit den entsprechenden pTA963 Vektoren transformiert (Tabelle 5) und in Medium ohne Uracil und Thymidin kultiviert (4.1.1). Die Überexpression der halophilen Proteine erfolgte in 2 l Erlenmeyerkolben mit je 400 ml DM-YPC-Medium (Tabelle 2) (Allers *et al.*, 2010). Dazu wurden die Kulturen auf eine OD₆₀₀ von ca. 0,1-0,3 angeimpft und schüttelnd bei 42 °C inkubiert. Beim Erreichen einer OD₆₀₀ von etwa 0,6 wurde die Überexpression durch Zugabe von 2 mM L-Tryptophan induziert. Nach 10 bis 15 h weiteren Wachstums bei 42 °C wurden die Zellen bei 8000 rpm für 20 min zentrifugiert (Zentrifuge Avanti J-25, Rotor JLA 10,500, Beckmann) und die Pellets bis zur Reinigung bei -20 °C gelagert.

Proteinexpression in *E. coli*. *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS wurde mit pET-Vektoren transformiert (Tabelle 5) und Transformanten in LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika kultiviert (4.1.3). Die Überexpression erfolgte in 2 l Erlenmeyerkolben mit 400 ml Medium schüttelnd bei 37 °C, oder im Fall der PKs aus *Cand. K. cryptofilum*, *T. kodakarensis* und *M. villosus* bei 15 °C. Dazu wurden die Expressionsansätze auf eine OD₆₀₀ von ca. 0,1-0,3 angeimpft und nach Wachstum bis zu einer OD₆₀₀ von 0,55 bis 0,98 die Überexpression induziert. Die Überexpression bei 37 °C wurde durch Zugabe von 1 mM Isopropyl β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Die Induktion der Überexpression bei 15 °C erfolgte durch Zugabe von 100 μM IPTG. Nach 4-16 h Expression wurden die Kulturen mit 6000 rpm für 10 min zentrifugiert (Zentrifuge Avanti J-25 Beckman, Rotor JLA 10.500 Beckmann), die Überstände dekantiert und die Pellets für die Proteinreinigung verwendet.

4.4 Analytische Methoden

4.4.1 Bestimmung von Rhamnose in Wachstumsüberständen

Die Rhamnose-Konzentration in Wachstumsüberständen wurde colorimetrisch mit Hilfe des Orcintests bestimmt (Brückner, 1955). Der Testansatz bestand aus 100 µl Probe, 200 µl H₂O und 900 µl Testreagenz (41,5 ml konz. HCl, 2,5 ml Stammreagenz ad 50 ml H₂O; Stammreagenz: 1,35 g Ammonium-(III)-Sulfat, 2 g Orcin ad 50 ml H₂O). Der Testansatz wurde gemischt und für 20 min bei 100 °C im Thermoblock (TB2, Biometra) erhitzt. Nach Abkühlen der Ansätze auf Eis für 5 min wurde die Extinktion der Proben bei 546 nm bestimmt. Ein molarer Extinktionskoeffizient für L-Rhamnose von $\epsilon = 4,03 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ wurde mit Hilfe einer Eichgeraden ermittelt, wodurch die Bestimmung der Rhamnose-Konzentration in den Proben ermöglicht wurde.

4.4.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe einer modifizierten Methode nach Bradford bestimmt (Bradford, 1976). Ein Ansatz bestand aus 100 µl proteinhaltiger Probe (maximal 5 µg im Test) und 900 µl Bradford-Reagenz (70 mg Brilliant Blue G 250 , 50 ml 99 %iger Ethanol, 100 ml 85 %ige Ortho-Phosphorsäure ad 1 l H₂O, filtriert). Die Ansätze wurden gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion der Proben bei 595 nm bestimmt, wobei die Messwerte gegen die Extinktion einer Probe ohne Protein korrigiert wurden. Das Erstellen einer Eichgeraden mit einem Proteinstandard aus Rinderserum-Albumin Fraktion V (Merck, Darmstadt) ermöglichte die Ermittlung des molaren Extinktionskoeffizienten.

4.4.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE diente der Kontrolle der Überexpressionen und der Reinheit von Proteinen sowie der Größenbestimmung von Proteinuntereinheiten. Die Elektrophorese erfolgte in 12 %igen, diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen (7 cm x 8 cm x 0,075 cm) nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970). Abhängig vom Reinheitsgrad der Proben wurden zwischen 1 µg und 15 µg Protein pro Spur eingesetzt. Probenvolumen zur Überprüfung der Überexpressionen wurden dabei mit Hilfe einer OD₆₀₀-Proteinrelation abgeschätzt (OD₆₀₀ = 1 \approx 0,25 mg Protein/ml). Bei zu großen Probenvolumina sowie bei Proben mit halophilen Proteinen wurde zusätzlich eine Fällung der Proteine mit 10 % Trichloressigsäure (TCA) durchgeführt. Alle Ansätze wurden mit 2,5 µl 1 M Tris-HCl pH 9,0, 0,5 µl 400 mM Dithiothreitol (DDT) und 2,5 µl Auftragspuffer (250 mM Tris/HCl pH 6,8, 0,5 % SDS, 50 % Glycerin, 0,5 % Bromphenolblau)

versetzt, mit Wasser auf ein Volumen von 20 μl aufgefüllt und für fünf Minuten bei 99 °C erhitzt. Anschließend wurden die Proben neben einem Precision Plus Protein Unstained Standard (Bio-Rad) auf das Gel aufgetragen und die Proteine elektrophoretisch in einer Mini Protean 3 Elektrophorese Zelle (Bio-Rad, München) getrennt. Nach Elektrophorese erfolgte die Färbung des Polyacrylamidgels mit dem Färber InstanBlue (Expedon).

4.4.4 Bestimmung des apparenten Molekulargewichts von Proteinen

Das apparente Molekulargewicht der gereinigten, rekombinanten Proteine wurde mittels Größen-Ausschlusschromatographie mit einer HiLoad 16/60 Superdex 200 Gelfiltrationssäule (GE Healthcare) bestimmt. Dazu wurde ein Probenvolumen von 0,5 bis 2 ml mit einer Flussrate von 1 ml/min auf die Säule aufgetragen. 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.

4.4.5 Ultrafiltration

Die Ultrafiltration diente dem Ankonzentrieren von Proteinlösungen während der Reinigung und erfolgte mit einer 10 ml Ultrafiltrationszelle (Amico) sowie Filtern mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa bzw. 30 kDa (Sartorius). Die gewählte Ausschlussgröße lag dabei unter den apparenten Größen der Untereinheiten der Proteine.

4.4.6 Colorimetrische Bestimmung von 2-Keto-3-Desoxy-Zuckersäuren

Die Konzentration von KDR wurde colorimetrisch mit Hilfe des Thiobarbitursäure-Tests ermittelt (Buchanan *et al.*, 1999). Dazu wurden 50 μl Probe mit je 125 μl Periodatlösung (25 mM HJO_4^-) versetzt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 250 μl Arsenit-Lösung (2 % NaAsO_2 in 0,5 M HCl) zugegeben, nach 2 min Inkubation die Reaktionsgefäße mit 1 ml 30 %iger Thiobarbitursäure aufgefüllt und für 10 min bei 100 °C inkubiert. Die Proben wurden auf Eis abgekühlt, für 10 min bei 13200 rpm zentrifugiert und im Anschluss die Extinktion der Proben bei 548 nm gemessen. Mit Hilfe eines molaren Extinktionskoeffizienten von $9,35 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ konnte dabei die KDR-Konzentration bestimmt werden.

4.4.7 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Identifizierung und Quantifizierung von L-Lactat und KDR (4.6.1) erfolgte mittels HPLC an einer Merck Hitachi LaChrom Anlage mit einem Brechungsindex-Detektor L-7492 (Merck). Die Proben wurden 10 min bei 13200 rpm zentrifugiert, der Überstand mit einem Spartan 13/30 Filter (Porengröße 0,2 µm; Schleicher und Schuell) filtriert und anschließend mittels HPLC analysiert. Dazu wurden jeweils 20 µl Probe über eine EC 250/4 Nucleodur C18 Pyramid Säule (5 µm Partikel, Macherey-Nagel) mit 0,05 % H₃PO₄ als Laufmittel und einer Flussgeschwindigkeit von 0,25 ml/min bei 30 °C getrennt. Die Identifizierung von L-Lactat und KDR erfolgte durch einen Vergleich mit den Retentionszeiten von Standards. Dazu wurden unterschiedliche Konzentrationen an L-Lactat und KDR in Messpuffer gelöst und mittels HPLC aufgetrennt. Die Berechnung der Flächen unter den Peaks des L-Lactat-Standards ermöglichte außerdem das Erstellen einer Eichgeraden und die Bestimmung der L-Lactat-Konzentration in den Proben.

4.4.8 Thermal Shift Assays

Die Analysen der Schmelzkurven des Transkriptionsregulators RhcR erfolgte mittels Thermal Shift Assays nach Martin *et al.* (Martin *et al.*, 2018). Ein Testansatz von 40 µl bestand aus 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 mit 1,5 M KCl, 1 µM rekombinanten Protein und 5 x SYPRO Orange (Sigma-Aldrich). Um den Effekt von potentiellen Liganden von RhcR auf die Schmelztemperatur zu testen, wurden einzelne Ansätze mit 1 mM L-Rhamnose, L-Rhamnono-δ-Lacton, L-Rhamnonat, KDR, 2-Keto-3-Desoxygluconat, D-Glucose oder D-Fructose versetzt. Die Aufnahme der Schmelzkurven erfolgte in einem AB 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) über einen Temperaturgradienten von 22 bis 95 °C. Die Temperatur wurde dabei um 1 °C pro Minute erhöht. Die Schmelztemperatur wurde anschließend mit der Software Origin 2018 unter Verwendung der Boltzmann Gleichung bestimmt. Die Messungen erfolgten in drei unabhängigen Experimenten.

4.5 Reinigung von rekombinanten Proteinen

Die in dieser Arbeit untersuchten Proteine wurden mit einem Äkta FPLC-System (GE Healthcare) und entsprechenden Chromatographie-Säulen bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Alle Proteine wurden als rekombinante Fusionsproteine mit einem His-Tag exprimiert, wodurch eine erste säulenchromatographische Reinigung mittels Nickel-NTA-Affinitätschromatographie ermöglicht wurde. Die zellfreien Extrakte nach Zellaufschluss wurden dazu mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min auf eine 1 ml Ni-NTA Superflow Säule (Quiagen) aufgetragen und gebundene Proteine in einem Stufengradienten mit 20 mM, 150 mM und 500 mM Imidazol eluiert. Für die anschließende Größen-Ausschlusschromatographie wurde eine geeichte HiLoad 16/60 Superdex 200 Gelfiltrationssäule (GE Healthcare) verwendet, welche auch die Bestimmung des nativen Molekulargewichts der Proteine ermöglichte (4.4.4). Die Elution der Proteine erfolgte dabei mit einem isokratischen Fluss bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min.

Reinigung halophiler Proteine. Die Zellpellets der homologen Überexpression in *H. volcanii* H1209 (4.3) wurden in Puffer A (50 mM Tris-HCl, 1,5 M KCl, 5 mM Imidazol, pH 8,2) resuspendiert und mittels Hochdruckhomogenisation in einer French Press Zelle (French Pressure Cell Press) bei 16000 psi Innendruck aufgeschlossen. Die Suspensionen wurden bei 4 °C für 1,5 h bei 40000 rpm zentrifugiert (Optima L Preparative Ultrazentrifuge, Rotor Typ 70 Ti, Beckman) und die Überstände auf eine mit Puffer A equilibrierte Nickel-NTA-Säule aufgetragen. Die Elution der Proteine erfolgte mit Puffer B (50 mM Tris-HCl, 1,5 M KCl, 500 mM Imidazol, pH 8,2), wobei die rekombinanten Proteine spezifisch bei 150 mM Imidazol eluiert wurden. Proben dieser Protein-Lösungen wurden anschließend auf eine equilibrierte Gelfiltrationssäule aufgetragen und mit 50 mM Tris-HCl, 1,5 M KCl, pH 7,5 eluiert.

Reinigung der RDH, RAD und KDRDH aus *V. distributa* und der RDH aus *S. solfataricus*. Die Zellpellets der Überexpressionen in *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS (4.3.) wurden in Puffer C (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 5 mM Imidazol, pH 8,2) gelöst und mittels Hochdruckhomogenisation aufgeschlossen. Nach Zentrifugation bei 20000 rpm für 30 min (Avanti J-25; Rotor JA 25,50, Beckman) wurden die Überstände für einen ersten Reinigungsschritt mittels Hitzefällung für 30 min bei 75 °C eingesetzt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Überstände auf eine mit Puffer C equilibrierte Nickel-NTA-Säule aufgetragen und die Zielproteine mit 150 mM Imidazol eluiert. Die Proteine aus *V. distributa* standen im Anschluss für biochemische Untersuchungen zur Verfügung. Die RDH aus

S. solfatarcticus wurde zusätzlich mittels Größen-Ausschlusschromatographie gereinigt, wobei Puffer D (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5) als Laufpuffer verwendet wurde.

Reinigung von PKs. Die Zellpellets von *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS wurden in Puffer C resuspendiert, die Zellen mittels Hochdruckhomogenisation aufgeschlossen und die Extrakte für 30 min bei 20000 rpm zentrifugiert (Avanti J-25; Rotor JA 25,50, Beckmann). Die hyperthermophilen PKs wurden anschließend in einem ersten Schritt über eine Hitzefällung gereinigt. Die 30 minütige Hitzefällung für die PKs aus *P. islandicum*, *T. uzoniensis*, *C. maquilingensis*, *V. moutnovskia* und *M. villosus* erfolgte bei 75 °C und für die PK aus *T. kodakarensis* bei 80 °C. Nach Zentrifugation wurden die Proteinlösungen der hyperthmophilen PKs, wie auch der mesophilen PKs aus *M. maripaludis* und *M. acetivorans*, für eine Nickel-Affinitätschromatographie mit Puffer C als Laufpuffer verwendet. Die Elution der PKs erfolgte dabei mit einer Imidazol-Konzentration von 150 mM. Mit Ausnahme der PK aus *T. kodakarensis* wurden die PKs anschließend für eine Größenausschlusschromatographie mit Puffer D verwendet.

4.6 Charakterisierung von gereinigten Enzymen

Die Enzymaktivitätsmessungen erfolgten entweder in einem kontinuierlichen und optischen Testsystem an einem beheizbaren Einstrahlphotometer (Ultrospec 4000, GE Healthcare) oder in einem Stoptest, wobei die Enzymreaktion im Thermoblock (TB2, Biometra) von der anschließenden Detektion entkoppelt wurde. Jeder Testansatz wurde vor Substrat und Enzymzugabe auf die gewünschte Messtemperatur erwärmt, wobei der pH-Wert der verwendeten Puffer auf die jeweilige Messtemperatur eingestellt war. Sowohl die Substratreihenfolge als auch die Enzymmengen wurden variiert, um die Startbarkeit und Proteinabhängigkeit der Tests zu überprüfen. Die K_m - und V_{max} -Werte wurden mit der Software Origin 2018 (OriginLab Corporation) bestimmt. Hyperbole Kinetiken wurden dabei nach Michaelis-Menten und sigmoidale Kinetiken nach der Funktion von Boltzmann ausgewertet. Die Enzymaktivität 1 Unit (U) wurde als die Bildung von 1 μmol Produkt pro Minute definiert.

4.6.1 Charakterisierung von Pyruvat Kinasen

Die Enzymaktivitätsmessungen zur Charakterisierung der PKs erfolgten photometrisch in einem optisch gekoppelten Test. PKs katalysieren die ADP-abhängige Umsetzung von PEP zu Pyruvat und ATP. Diese Reaktion wurde mittels einer Laktat-Dehydrogenase (L-LDH 107069 from pig heart oder L-LDH 10127884001 from rabbit muscle, Roche), die Pyruvat zu L-Lactat reduziert, an die Oxidation von NADH gekoppelt und die NADH-Abnahme bei 340 nm gemessen. Mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten für NADH ($\epsilon_{340} = 6,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) konnte im Anschluss die spezifische Aktivität berechnet werden. Dabei wurde gewährleistet, dass die verwendete LDH in den Messansätzen nicht limitierend vorlag.

Die Messungen erfolgten bei 65 °C, oder im Fall der PKs aus *M. maripaludis* und *M. acetivorans* bei 37 °C, in einem kontinuierlichen Testsystem. Lediglich zur Bestimmung des Temperaturoptimums wurde für Messungen über 60 °C ein diskontinuierlicher Test verwendet. Ein Standard-Messansatz bestand aus 0,3 mM NADH, 5 U LDH sowie PEP, ADP und MgCl_2 . In einzelnen Ansätzen wurde die ADP- und PEP-Konzentration zur Aufnahme von substratabhängigen Sättigungskinetiken variiert. Außerdem wurde der Einfluss der allosterischen Effektoren 3PG, AMP, FBP und R5P auf die Enzymaktivität der PKs in Testansätzen mit limitierenden PEP und/oder ADP-Konzentrationen untersucht. Dazu wurden die PK-Reaktion gestartet und nachdem eine ausreichend lange Rate für die Bestimmung der Enzymaktivität ohne Effektor abgelaufen war, die Ansätze mit den einzelnen potentiellen Effektoren versetzt. Die Konzentration der Effektoren wurde in einzelnen Küvetten variiert, um die Abhängigkeit der

Stimulierung von der Effektor-Konzentration zu untersuchen. Im Folgenden sind die Konzentrationen an ADP, PEP und $MgCl_2$ der Testansätze für die einzelnen PKs beschrieben.

PK aus *P. islandicum*. Die Aufnahme der kinetischen Parameter erfolgte in Testansätzen bestehend aus 50 mM Bis-Tris pH 6,2, 5 mM $MgCl_2$, 2 mM ADP und 1 mM PEP. Der Einfluss von Phosphat auf die Enzymaktivität wurde mit 1 mM Na_2HPO_4 getestet.

PK aus *T. uzoniensis*. Die Ansätze zur Untersuchung der kinetischen Parameter setzten sich aus 100 mM Bis-Tris pH 6,2, 15 mM $MgCl_2$, 10 mM ADP und 10 mM PEP zusammen. Die Ansätze zur Untersuchung der allosterischen Regulierbarkeit enthielt 15 mM $MgCl_2$, 10 mM ADP und 1 mM PEP, wobei die potentiellen allosterischen Effektoren mit einer Konzentration von 2 mM getestet wurden.

PK aus *C. maquilingsis*. Die Charakterisierung der PK erfolgte in Ansätzen mit 50 mM Triethanolamin pH 7,0, 10 mM $MgCl_2$, 5 mM ADP und 6 mM PEP. Um die Abhängigkeit der PK von monovalenten Kationen zu prüfen, wurden einzelne Ansätze zusätzlich mit 10-50 mM Kalium versetzt. Der Effekt der potentiellen allosterischen Effektoren (je 2 mM) wurde in Ansätzen mit 10 mM $MgCl_2$, 6 mM ADP und 0,5 mM PEP analysiert.

PK aus *V. moutnovskia*. Die PK wurde in Testansätzen mit 50 mM Triethanolamin pH 7,0, 15 mM $MgCl_2$, 5 mM ADP und 10 mM PEP auf ihre kinetischen Eigenschaften untersucht. Allosterische Effektoren wurden mit einer Konzentration von 2 mM bei 25 mM $MgCl_2$, 3,75 mM ADP und 0,25 mM PEP geprüft.

PK aus *Cand. C. subterraneum*. Die kinetischen Parameter der PK wurden in Testansätzen bestehend aus 50 mM Triethanolamin pH 8,0 mit 10 mM $MgCl_2$, 2,5 mM ADP und 7 mM PEP bestimmt. Die allosterische Regulierbarkeit der PK wurde in Ansätzen mit 10 mM $MgCl_2$, 0,4 mM ADP und 0,4 mM PEP untersucht, wobei die Effektoren in einer Konzentration von 2 mM eingesetzt wurden. Außerdem wurde die Thermostabilität der PK über 2 h bei 70, 75 und 80 °C untersucht. Die 50 µl Messansätze enthielten 0,8 µg Protein in 50 mM Bis-Tris pH 6,2 und wurden im Thermocycler (T3000 Thermocycler, Biometra) entsprechend der zu untersuchenden Temperaturen inkubiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden Proben entnommen, 2 min auf Eis inkubiert, anzentrifugiert und die Enzymaktivität im kontinuierlichen Testsystem bei 65 °C wie beschrieben bestimmt.

PK aus *P. aerophilum*. Die rekombinante PK aus *P. aerophilum* sowie die entsprechenden PK-Mutanten wurden mir freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Schönheit zur Verfügung gestellt.

Die Charakterisierung der PK erfolgte in Ansätzen mit 50 mM Bis-Tris pH 6,0, 5 mM MgCl₂, 2 mM ADP und 3 mM PEP. Der Effekt

PK aus *Cand. K. cryptofilum*. Die Ansätze zur Untersuchung der kinetischen Parameter bestanden aus 50 mM Bis-Tris pH 6,2, 10 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 3 mM ADP und 3 mM PEP. Die Ansätze zur Untersuchung der allosterischen Regulierbarkeit enthielt 10 mM MgCl₂, 3 mM ADP und 0,4 mM PEP, wobei die potentiellen allosterischen Effektoren mit einer Konzentration von 2 mM getestet wurden.

PK aus *P. furiosus*. Die rekombinante und gereinigte PK aus *P. furiosus* wurde mir freundlicher Weise von der AG Schönheit zur Verfügung gestellt. Die Ansätze zur Bestimmung der kinetischen Konstanten setzten sich aus 50 mM Bis-Tris pH 6,0, 5 mM ADP, 10 mM PEP und 4 mM MgCl₂ zusammen. Die allosterischen Effektoren (2 mM) wurden mit 0,5 mM ADP, 1 mM PEP und 4 mM MgCl₂ geprüft.

PK aus *T. kodakarensis*. Die PK wurde in Testansätzen mit 50 mM Bis-Tris pH 6,0 und 5 mM ADP, 2,5 mM PEP sowie 5 mM MgCl₂ untersucht. Der Einfluss der potentiellen allosterischen Effektoren (je 2 mM) auf die Enzymaktivität wurde in Ansätzen mit 5 mM MgCl₂, 2,5 mM ADP und 0,2 mM PEP analysiert.

PK aus *M. jannaschii*. Das rekombinante Enzym wurde mir von der AG Schönheit zur Verfügung gestellt. Die Bestimmung der kinetischen Parameter erfolgte in Testansätzen bestehend aus 20 mM Bis-Tris pH 6,0, 2 mM ADP, 2 mM PEP und 6 mM MgCl₂. Die allosterische Regulierbarkeit der PK wurde mit 1 mM der jeweiligen potentiellen Effektoren in Ansätzen mit 2 mM ADP, 0,25 mM PEP und 6 mM MgCl₂ überprüft. Darüber hinaus wurde das Temperaturoptimum der PK zwischen 25 °C und 95 °C untersucht. Die Messungen von 25 °C bis 60 °C erfolgten im kontinuierlichen Testsystem wie eingehend beschrieben. Die Messungen von 65 °C bis 95 °C wurden in einem diskontinuierlichen Testsystem durchgeführt. Dazu wurden für die PK-Reaktion 1,25 ml Ansätze bestehend aus 2 mM PEP, 6 mM MgCl₂ und 2 mM ADP in 20 mM Bis-Tris pH 6,2 bei der jeweiligen Messtemperatur im Thermoblock (Thermomixer comfort, Eppendorf) inkubiert und beim Erreichen der Messtemperatur die Reaktion durch Zugabe von Protein gestartet. Zu definierten Zeiten (45 – 180 s) wurden je 250 µl aus jedem Testansatz entnommen und die Reaktion durch Zugabe von 750 µl eisgekühlter Detektionslösung, bestehend aus 50 mM Triethanolamin pH 7,5 (25 °C), 0,4 mM NADH und 5 U LDH, gestoppt. Nach einer Inkubation der Ansätze für 5 min bei Raumtemperatur konnte die PK-Aktivität durch Messung der Pyruvat-abhängigen Oxidation von NADH bei 340 nm im Photometer bestimmt werden. Außerdem wurde die Thermostabilität der PK (1,15 µg je 50 µl Ansatz) für 2 h bei 70 °C,

80 °C und 95 °C bestimmt. Die Messansätze wurden im Thermocycler (T3000 Thermocycler, Biometra) bei den zu untersuchenden Temperaturen inkubiert und zu definierten Zeiten Proben entnommen und 2 min auf Eis inkubiert. Nach Anzentrifugation wurde die Enzymaktivität im kontinuierlichen Testsystem wie beschrieben bestimmt.

PK aus *M. villosus*. Die PK wurde bei pH 7,0 in 50 mM Triethanolamin untersucht. Die Ansätze zur Aufnahme der kinetischen Parameter enthielten 5 mM ADP, 5 mM PEP und 10 mM MgCl₂. Die Ansätze zur Analyse der allosterischen Regulation enthielten 5 mM ADP, 0,25 mM PEP und 10 mM MgCl₂. Die allosterischen Effektoren wurden in einer Konzentration von 1 mM geprüft.

PK aus *M. maripaludis*. Die Charakterisierung der PK erfolgte in Ansätzen mit 50 mM Bis-Tris pH 6,0, 5 mM MgCl₂, 2 mM ADP und 3 mM PEP. Der Effekt der potentiellen allosterischen Effektoren (je 2 mM) wurde in Ansätzen mit 5 mM MgCl₂, 2 mM ADP und 0,1 mM PEP analysiert.

PK aus *M. acetivorans*. Die PK wurde in Testansätzen mit Triethanolamin pH 7,0 und 5 mM ADP, 3 mM PEP und 5 mM MgCl₂ untersucht. Der Einfluss der potentiellen allosterischen Effektoren (je 2 mM) auf die Enzymaktivität wurde in Ansätzen mit 5 mM MgCl₂, 5 mM ADP und 0,25 mM PEP analysiert.

4.6.2 Charakterisierung von Enzymen des Rhamnose-Abbaus

Die Enzyme aus *H. volcanii* wurden bei 42 °C und die Enzyme aus *S. solfataricus* und *V. distributa* bei 72 °C charakterisiert.

Rhamnose-Dehydrogenasen. Die Aktivitäten der RDHs, welche die NAD⁺ bzw. NADP⁺-abhängige Oxidation von Rhamnose katalysierten, wurden in einem kontinuierlichen Test über die Zunahme der Extinktion bei 340 nm ($\epsilon_{340} = 6,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) gemessen. Die Charakterisierung der RDH aus *H. volcanii* erfolgte in Ansätzen mit 100 mM Tris-HCl, pH 8,4, 1,5 M KCl, 15 mM L-Rhamnose und 1,5 mM NAD⁺. Um die Aktivität der RDH mit NADP⁺ zu testen, wurde NAD⁺ durch 0,5-20 mM NADP⁺ ersetzt. Die Substratspezifität der RDH wurde mit 5 und 15 mM der Zucker L-Mannose, D-Glucose, D-Fructose, D-Galactose, L-Fucose, D-Ribose, D-Xylose sowie L- und D-Arabinose getestet.

Die RDH aus *V. distributa* wurde in Ansätzen bestehend aus 100 mM Bis-Tris pH 7,0 mit 5 mM L-Rhamnose und 8 mM NAD⁺ untersucht. Um die Aktivität der RDH mit weiteren Zuckern zu prüfen, wurde den Ansätzen anstelle von L-Rhamnose die Zucker D-Glucose, D-Fructose, D-Galactose, L-Fucose, D-Xylose, D-Ribose sowie D- und L-Arabinose zugesetzt.

Die Aktivitätsmessungen mit der RDH aus *S. solfataricus* erfolgten in Ansätzen mit 100 mM HEPES-KOH, pH 7,5 sowie 2 mM L-Rhamnose und 0,4 mM NADP⁺.

Rhamnonolactonase. Die Aktivität der RNL aus *H. volcanii* wurde mit Hilfe des p-Nitrophenol-Tests (Hucho & Wallenfels, 1972) ermittelt. Dabei wurden die bei der Hydrolyse von Lactonen freiwerdenden Protonen als pH-Wert-Verschiebung der Reaktionsansätze über den pH-Indikator p-Nitrophenol nachgewiesen. Der Nachweis erfolgte photometrisch in einem kontinuierlichen Test bei 405 nm. Die Charakterisierung erfolgte in 1 ml Ansätzen bestehend aus 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 mit 1,5 M KCl, 0,125 mM p-Nitrophenol und 15 mM L-Rhamnono- δ -Lacton. Außerdem wurden L-Rhamnono- γ -Lacton, D-Glucono- δ -Lacton, L-Arabino- γ -Lacton, D-Xylono- γ -Lacton, D-Galactono- γ -Lacton und D-Ribono- γ -Lacton als alternative Substrate der RNL mit Konzentrationen von 5-15 mM geprüft. In Ansätzen ohne Enzym wurde die spontane Hydrolyse der Lactone bestimmt und die RNL-Aktivität um diese Rate korrigiert. Über eine Eichgerade mit definierten HCl-Konzentrationen wurde für p-Nitrophenol unter den gewählten Bedingungen ein ϵ_{405} von 0,806 mM⁻¹cm⁻¹ bestimmt.

Rhamnonat Dehydratase. Die RAD-Aktivität wurde als L-Rhamnonat abhängige Bildung von 2-Keto-3-Desoxy-Rhamnonat (KDR) in einem diskontinuierlichen Test bestimmt. Dazu wurden Reaktionsansätze mit einem Volumen von 0,25-1 ml für 0 bis 180 min in einem Thermoblock (TB2, Biometra) bei 42 °C (*H. volcanii*) bzw. 72 °C (*V. distributa*) inkubiert, zu definierten Zeiten Proben von 100 μ l entnommen und die Proteine durch Zugabe von final 6 % Trichloressigsäure (TCA) gefällt, um die Reaktion zu stoppen. Diese Aliquotes wurden anschließend bei 13200 rpm zentrifugiert und die Überstände für die Bestimmung der KDR-Konzentration mittels Thiobarbitursäuretest eingesetzt (4.4.6).

Die Aktivität der RAD aus *H. volcanii* wurde in 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0 mit 1,5 M KCl, 10 mM MgCl₂ und 15 mM L-Rhamnonat bestimmt. Zur Charakterisierung des Substratspektrums wurde L-Rhamnonat durch D-Xylonat, D-Ribonat, L-Arabinonat, D-Gluconat, D-Galactonat und D-Galacturonsäure ersetzt. Die Bestimmung der kinetischen Parameter von MgCl₂ erfolgte mit 0-20 mM MgCl₂ und 15 mM L-Rhamnonat im Test.

Die RAD aus *V. distributa* wurde in Versuchsansätzen bestehend aus 0,1 M Bis-Tris, pH 7,0 mit 10 mM MgCl₂ und 10 mM L-Rhamnonat untersucht. Neben L-Rhamnonat wurden die Zuckersäuren D-Xylonat D-Ribonat, L-Arabinonat, D-Gluconat und D-Galactonat als Substrat der RAD getestet.

2-Keto-3-Desoxyrhamnonat Dehydrogenase. Die KDRDH-Aktivitäten wurden im kontinuierlichen Testsystem als NAD⁺ abhängige Oxidation von KDR am Photometer bei 340 nm gemessen ($\epsilon_{340} = 6,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Es wurden Testansätze mit einem Volumen von 0,5 ml verwendet.

Der Testansatz für die KDRDH aus *H. volcanii* enthielt 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0 mit 1,5 M KCl, 2,5 mM KDR und 2 mM NAD⁺. Die Aktivität der KDRDH mit NADP⁺ wurden in Ansätzen mit bis zu 5 mM NADP⁺ analysiert.

Für die Untersuchung der Aktivität der KDRDH aus *V. distributa* wurden Ansätze bestehend aus 0,1 M Bis-Tris, pH 7,0 mit 0,5 mM KDR und 5 mM NAD⁺ verwendet.

Da KDR nicht käuflich zu erwerben ist, wurde es enzymatisch aus L-Rhamnonat mit Hilfe der RAD aus *H. volcanii* hergestellt. Dazu wurden Ansätze bestehend aus 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0 mit 150 mM L-Rhamnonat, 5 mM MgCl₂, 1,5 M KCl und 80 mU RAD bei 42 °C für 12 h inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze für eine Ultrafiltration (4.4.5) eingesetzt, um die Proteine aus den Lösungen zu entfernen. Die Bestimmung der KDR-Konzentration in den Ansätzen erfolgte enzymatisch mit Hilfe der KDRDH aus *H. volcanii*. Dabei wurde die vollständige NAD⁺-abhängige Umsetzung von KDR zu DKDR im Photometer bei 340 nm bestimmt. Die Messungen wurden bei 42 °C in 1 ml Ansätzen bestehend aus 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0 mit 1,5 M KCl, 5 mM NAD⁺ und verschiedenen Konzentrationen an KDR durchgeführt. Es wurde dabei gewährleistet, dass NAD⁺ im Überschuss vorlag. Die Extinktion der Proben wurde bei 340 nm bestimmt (E_1) und die Reaktion durch Zugabe von 120 mU KDRDH gestartet. Nach 10 min Inkubation war KDR vollständig oxidiert und die Extinktion wurde erneut bestimmt (E_2). Mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten von NADH ($\epsilon_{340 \text{ nm}} = 6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) konnte die KDR-Konzentration ermittelt werden.

2,4-Diketo-3-Desoxyrhamnonat Hydrolase. Die DKDRH aus *H. volcanii* wurde in einem Stopptest untersucht. Dabei erfolgte die Messung der Enzymaktivität in einem gekoppelten Test, indem DKDR über die NAD⁺-abhängige Oxidation von KDR durch die KDRDH aus *H. volcanii* gebildet und anschließend von der DKDRH in Pyruvat und L-Lactat gespalten wurde. Der Messansatz von 250 μ l bestand aus 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0 mit 1,5 M KCl, 10 mM KDR, 10 mM NAD⁺ und 10 mM MgCl₂. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 144 mU KDRDH aus *H. volcanii* und 30 μ g DKDRH gestartet und die Ansätze für 0-32 h bei 42 °C inkubiert. Zu ausgewählten Zeiten wurden 60 μ l Proben der Reaktionsansätze entnommen, die Proteine durch Zugabe von final 6 % TCA gefällt und die Reaktion dadurch gestoppt. Die Bestimmung von KDR und L-Lactat erfolgte anschließend mittels HPLC (4.4.7.).

4.7 Bioinformatische Sequenzanalysen von Proteinen

Die Sequenzalignments wurden mit ClustlX 2.1 unter Verwendung der Standardeinstellungen erstellt (Larkin *et al.*, 2007) und mit Hilfe von ESPRIPT dargestellt (Robert & Gouet, 2014). Die Vorhersage von Sekundärstrukturelementen von Proteinen erfolgte über die Online-Software PSIPRED (Buchan *et al.*, 2013). Der phylogenetische Stammbaum der RAD aus *H. volcanii* wurde nach der Maximum Likelihood Methode mit der Software Mega V.7 konstruiert, wobei ein mit ClustlX erstelltes Alignment als Basis diente (Kumar *et al.*, 2016). Die Einordnung von Proteinen in Protein-Familien erfolgte mit Hilfe des online-Tools *conserved domain search* (Marchler-Bauer *et al.*, 2015).

5 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei aktuelle Fragestellungen zum Zuckerstoffwechsel in Archaea behandelt. Zum einen wurden die Pyruvat Kinasen aus verschiedenen Gruppen von Archaea charakterisiert und insbesondere auf ihre allosterische Regulierbarkeit untersucht. Zum anderen wurde der Abbau des Desoxy-Zuckers L-Rhamnose in dem Haloarchaeon *H. volcanii* sowie in den Crenarchaeota *V. distributa* und *S. solfataricus* analysiert. Die dabei erzielten Ergebnisse werden im Folgenden dargestellt.

5.1 Pyruvat Kinasen aus Archaea

Pyruvat Kinasen (PKs) aus Eukarya und Bacteria sind gut untersuchte Enzyme, die in der Regel die Substrate PEP und/oder ADP kooperativ binden und durch die Zuckerphosphate FBP oder AMP positiv allosterisch reguliert werden (Jurica *et al.*, 1998, Waygood *et al.*, 1975). In der Domäne der Archaea sind nur wenige PKs aus hyperthermophilen und thermoacidophilen Crenarchaeota charakterisiert und diese werden nicht durch klassische Effektoren aus Eukarya und Bacteria allosterisch aktiviert (De la Vega-Ruiz *et al.*, 2015, Johnsen *et al.*, 2003, Schramm *et al.*, 2000, Solomons *et al.*, 2013). Kürzlich wurde die Struktur der PK aus dem hyperthermophilen Archaeon *P. aerophilum*, einem Vertreter der Thermoproteales, aufgeklärt und gezeigt, dass das Enzym mit 3-Phosphoglycerat (3PG) als neuartigem Typus von Effektor allosterisch reguliert wird (Solomons *et al.*, 2013). Mit Hilfe von *unbiased docking* Analysen von Christopher Davies wurde außerdem ein Modell für die Bindung von 3PG im allosterischen Zentrum der PK aus *P. aerophilum* erstellt, wonach ein Serin-381 und ein Tyrosin-428 an der Phosphatgruppenbindung von 3PG und drei Arginine an den Positionen 359, 389 und 451 an der Bindung der Carboxylgruppe von 3PG beteiligt sein könnten (Abbildung 8) (Solomons *et al.*, 2013). Die generelle Beteiligung dieser Reste an der 3PG-Bindung konnte bereits mit Hilfe von ersten ortsspezifischen Mutageneseexperimenten bestätigt werden (Solomons *et al.*, 2013).

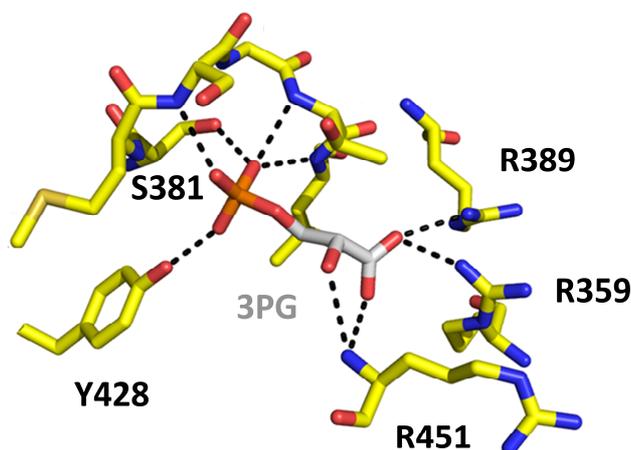


Abbildung 8 Strukturmodell der 3PG-Bindetasche der PK aus *P. aerophilum* mit gebundenem 3PG. Das Modell der Bindung von 3PG im allosterischen Zentrum der PK aus *P. aerophilum* wurde basierend auf der Kristallstruktur der PK mit Hilfe von *unbiased docking* Analysen von Christopher Davies erstellt.

5.1.1 3-Phosphoglycerat-Bindung im allosterischen Zentrum der PK aus *Pyrobaculum aerophilum*

Um das Modell der 3PG-Bindung im allosterischen Zentrum der PK aus *P. aerophilum* zu unterstützen, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die Reste der 3PG-Bindung an der Bindung der Phosphat- oder der Carboxylgruppe von 3PG beteiligt sind. Dazu wurde der Effekt von freiem Phosphat auf die Aktivität der PK aus *P. aerophilum* getestet und mit dem Effekt auf PK-Mutanten verglichen, in denen einzelne Reste der 3PG-Bindung mittels ortsspezifischer Mutagenese ausgetauscht wurden (Tabelle 6). Zusammen mit vorangegangenen Analysen konnten dabei folgende Ergebnisse erbracht werden. Die Aktivität der Wildtyp PK wurde durch 1 mM Phosphat um 70 % inhibiert. Hingegen betrug die Phosphat-Inhibierung einer Y428A-S381A-Doppelmutante nur 19 % und einer Y428A- bzw. S381A-Einzelmutante nur 55 % bzw. 33 %, was darauf hindeutet, dass diese Aminosäuren an der Phosphatbindung und damit an der Phosphat-Inhibierung beteiligt sind. In den Arginin-Mutanten R359A, R389A und R451A entsprach die Phosphat-Inhibierung der des Wildtyps, was bedeutet, dass diese Reste vermutlich nicht an der Phosphatbindung und damit vermutlich an der Carboxylgruppenbindung von 3PG beteiligt sind. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit dem aufgestellten Modell der 3PG-Bindung im allosterischen Zentrum der PK aus *P. aerophilum* (Abbildung 8).

Tabelle 6 Inhibierung der Aktivität der PK aus *P. aerophilum* durch Phosphat im Vergleich zu PK-Mutanten. Die Messungen erfolgten mit 5 mM MgCl₂, 2 mM ADP und 1 mM PEP. Der Effekt von freiem Phosphat wurde mit 1 mM Na₂HPO₄ getestet. *AG Schönheit.

PK	V _{max} (U/mg)		Phosphat- Inhibierung (%)
	- PO ₄ ²⁻	+ PO ₄ ²⁻	
Wildtyp	20,1	4,8	76
Y421A	36,5	16,4	55
S381A	18,4	15,0	33
Y421A-S381A*	38,2	30,9	19
R389A	15,9	4,8	68
R359A	16,6	5,2	70
R451A	16,6	4,1	75

5.1.2 Die PKs aus Thermoproteales enthalten ein konserviertes 3PG-Bindemotiv

Ausgehend von der PK aus *P. aerophilum* wurden in dieser Arbeit Sequenzvergleiche mit den PKs von weiteren Vertretern der Thermoproteales sowie mit PKs aus verschiedenen archaeellen Gruppen durchgeführt (Abbildung 9). Es konnte gezeigt werden, dass die fünf an der Bindung von 3PG beteiligten Aminosäuren der PK aus *P. aerophilum* in den PKs der Thermoproteales *P. islandicum*, *Thermoproteus tenax*, *T. uzoniensis* und *C. maquilingensis* konserviert sind (Abbildung 9). Die PK aus *T. uzoniensis* weist dabei einen konservierten Austausch an Position 435 von Arginin zu Lysin auf. Das Vorhandensein aller fünf Reste in diesen PKs deutet auf eine allosterische Aktivierung der Enzyme mit 3PG hin. Eine Ausnahme innerhalb der Thermoproteales bildet die PK aus *V. moutnovskia*, der alle drei Argininreste für eine 3PG-Bindung fehlen, weshalb das Enzym vermutlich nicht 3PG-aktiviert ist (Abbildung 9). In den PKs weiterer hyperthermophiler Archaea der Aigarchaeota, Korarchaeota und Thermococcales sowie in den PKs aus hyperthermophilen und mesophilen methanogenen Archaea konnte das komplette Bindemotiv der 3PG-Bindung nicht identifiziert werden, was gegen eine allosterische Aktivierung dieser Enzyme mit 3PG spricht (Abbildung 9). Um diese Vorhersagen zu prüfen, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit ausgewählte PKs aus den verschiedenen archaeellen Gruppen charakterisiert und insbesondere auf ihre allosterische Regulation mit 3PG untersucht. Außerdem wurden die PKs auf ihre allosterische Regulierbarkeit durch die Zuckerphosphate FBP, AMP und R5P geprüft.

Thermoproteales		359		381		389		428		451									
Pae	-----	OSPLLQNS	DRFAKGLVELAQDLGANILVF-	SMSGTLARRIAKFRPRGVVYVGT	PNVRVARSLSIVWALEPLYIPAE	-----	NTEEGLEKLSLKG	T-----	TPFVATYGI	IRGG	-----	VHSVKVKL	-----	461					
Pis	-----	KLPSFGDVR	DRFAKGLVEMAHDIGAVILVY-	SMSGTLAKRIAKFRPLNVVHVG	TPDVKTARILSLIHALQPAYIPAN	-----	SYEDGLEKL	TASRGS	-----	APFVATYGI	IRGG	-----	VHLVKVMF	-----	448				
Tte	-----	KAASPADAR	DRFAKAVVDMADMGGEIAVY-	SMTGTLAKRIAKFRPMTTVYV	GVNERLRARMLLELIWGLEP	VVPAH	-----	TTEEGLERLLSR	FSD	-----	KVLIATYGI	IRGG	-----	THTIKRLPE	-----	446			
Tuz	-----	GRPSPANAR	DKFAEAVADMAADLGADIAVY-	SMTGTLAKRVAKFRPPVKI	FAGVKEASVARKLALIWGVE	PLLPQAQ	-----	TTEEGLEKLMAR	FDP	-----	RTLVA	TYGI	IRGG	-----	VHTIKINIKD	-----	447		
Cma	-----	PGFRADSSV	DFEIMRFALGVAELADSIGAKIVVF-	TKSGLTAVRLSRYRPRVQIL	AGTPSEAVFRRLKLLWGVES	RVINDQ	-----	DYDKGMVD	TLENYI	KEGLIKHG	DLVVLTYGI	IRPNVSEYEHV	IKLIRA	-----	456				
Vmo	-----	VERDVMANIT	DRLALGIVQLAEDIGAKIVIY-	SRGGRFVEAISRYRPRVPT	YVGVSDERIMRRLRLYWGVE	PILIGNIR	-----	EYDEGERET	L	IRGGLIAK	GDVLLTH	GI	VIDTYNDYS	-----	IRILRV	-----	455		
Aigarchaeota																			
Csu	-----	PRRALPPSAEV	VDRFALAVVNLAESLAAKIAIF-	TINGNMARRIARFK	EPVSGIIAATPNHDVVPRL	MLLWGVTPLLLEAQ	-----	SAEGLKLEKLEK	LEERLAEP	GDYVLT	TYGI	IRLV	KEP	-----	IHIVKMKFM	-----	453		
Thermococcales																			
Pfu	SFGLSRIREF	MEIKKGTIK	EAITRSIIDAICTIDIKFILTP	RTGRTARLISRFKPKQWILAF	STNERVCNNLMSYGVY	PFCLEEG	-----	FDENDIVRL	TKGLGLVE	---	SDDMVL	TEGKPI	EKT	VTGNSIKIFQIA	-----	477			
Tko	EWKMSELRG-	TRPTKGTIK	DAITRSIIEALNSIDIKYILTP	RMGQTARLISRFKPKQWVLA	FVDEWVKNTLMSYGVY	PFLVEDT	-----	SEE-EILRV	ITGLGLVD	---	EGD	VLLTK	CTPI	GKTAGTNTIRIFNV	-----	478			
Korarchaeota																			
Kcr	-----	LESRLDFPVD	NIPSFIGKAAVEASEILKCPVIFCF	YSQYTRARHVARHRPKARI	IALSSNKRTSQLLTLTW	GVETIDVTGD	-----	LDEALSYAL	SYCMR	DRGILSEEDRIV	TYGI	IRGHPHGEAK	TN	TLRILSVRELQ	RAGTPKSEITGFS	-----	491		
Methanococcales/ Methanosarcinales																			
Mja	-----	RVCLEVESI	DEGLVYAVYELYKLNKLVITP	YSGRTRAKLISKLRINSKI	IAPTNI	RTLKRRLRVWGVESCLMEEFD	-----	DMEKIINT	CREMAKKEIGKG	---	IYLI	TLGHP	IGQKK	TNTIKVESI	-----	447			
Mvi	-----	IRKTDLDV	FNVEEGLAYAVSSLYKKLP	IKLITPYSGRTRAKLISKLRK	--RIAPTNI	NINLTKRDLKLVYGVESCLMEEFN	-----	NIDNII	SACREIAKKEIGSG	---	LYLLV	TLGHP	IGERK	SNTIKVESI	-----	434			
Mmp	-----	EIEFEHSI	YSGIAYAVEALS	SKLNPKIVITP	TSGKTPLEISKFRFNSPI	IALAPENIVFRKRLRVWGVIP	IKIDEIG	-----	DVDEVLE	ISKKI	AKNIIDSG	---	IYVV	TLGHP	KGEK	TNVIKVESI	-----	487	
Mac	---	DTMLKGIT	TAQKMSDEVIALQVHEALQ	KLPVAVVLT	RSRATPRRLSRFK	PEPWILAFTRFPKTCSSL	ALS	YGVYPIIVKEVS	-----	ENWETET	TEKAKELG	FAKSGE	---	LVV	TLGHP	ASGKPGGTNMLKIL	TLD	-----	489

Abbildung 9 Aminosäuresequenzalignment der C-Domänen von ausgewählten PKs der Thermoproteales, Aigarchaeota, Thermococcales, Korarchaeota, Methanococcales und Methanosarcinales. Die an der Bindung von 3PG beteiligten Aminosäuren der PK aus *P. aerophilum* (S381, Y428, R359, R389 und R451) sowie deren homologe Reste in anderen PKs sind im Alignment rot markiert. Das vollständige Motiv für die 3PG-Bindung ist nur in Organismen der Ordnung Thermoproteales vorhanden. NCBI Accession-Nummern: *Pyrobaculum aerophilum* (Pae) AAL63053; *Pyrobaculum islandicum* (Pis) ABL88277; *Caldivirga maquilungensis* (Cma) ABW01421; *Thermoproteus tenax* (Tte) AAF06820; *Thermoproteus uzoniensis* (Tuz) AEA13068; *Vulcanisaeta moutnovskia* (Vmo) ADY01769; *Candidatus Caldiarchaeum subterraneum* (Csu) BAJ50662; *Candidatus Korarchaeum cryptofilum* (Kcr) B1L381; *Pyrococcus furiosus* (Pfu) AAL81312; *Thermococcus kodakarensis* (Tko) BAD02412; *Methanocaldococcus jannaschii* (Mja) AAB98090; *Methanocaldococcus villosus* (Mvi) ENN95729; *Methanococcus maripaludis* (Mmp) CAF31161; *Methanosarcina acetivorans* (Mac) AAM07241.

5.1.3 Reinigung der archaeellen PKs

Die *pyk* Gene aus den zu analysierenden archaeellen PKs weisen alle eine Gengröße von ca. 1500 Nukleotiden auf und kodieren für Proteine mit ca. 500 Aminosäuren, was einer kalkulierten Masse von etwa 50 kDa entspricht. Die *pyk* Gene wurden in Vektoren der pET-Serie kloniert und die PKs in *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS bei 15 °C oder 37 °C überexprimiert. Hyperthermophile PKs wurden in einem ersten Schritt über eine Hitzefällung bei 75-85 °C gereinigt, um Wirtsproteine aus *E. coli* zu denaturieren und anschließend wurden die hyperthermophilen PKs, wie auch die mesophilen PKs, säulenchromatographisch über Nickel-Affinitätschromatographie und Superdex-Größenausschlusschromatographie bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Mittels SDS-PAGE wurde für die PKs ein Molekulargewicht der Untereinheiten von etwa 50 kDa bestimmt (Tabelle 7 und 8). Mit Hilfe der geeichten Superdex-Größenausschlusschromatographie konnte das Molekulargewicht der PKs unter nativen Bedingungen mit etwa 200 kDa ermittelt werden (Tabelle 7 und 8). Daraus ergibt sich für die in dieser Arbeit untersuchten PKs eine homotetramere Struktur. Der homotetramere Aufbau ist eine Voraussetzung für die kooperative Substratbindung und die allosterische Regulierbarkeit von PKs.

5.1.4 Die PKs aus Thermoproteales werden mit 3PG allosterisch aktiviert

Kinetische Eigenschaften. Die Aktivitäten der PKs aus den Thermoproteales *P. islandicum*, *T. uzoniensis*, *C. maquilingensis* und *V. moutnovksia* wurden bei 65 °C gemessen und die kinetischen Parameter bestimmt (Tabelle 7). Die Enzyme katalysierten die ADP-abhängige Umsetzung von PEP zu Pyruvat mit spezifischen Aktivitäten zwischen 170 und 260 U/mg. Die Abhängigkeit der Enzymaktivität der PKs von der ADP-Konzentration folgte einer Michaelis-Menten-Kinetik. Mit PEP zeigten die Enzyme aus *P. islandicum*, *T. uzoniensis* und *C. maquilingensis* sigmoidale Sättigungskinetiken, was auf eine kooperative Bindung des Substrates PEP hindeutet (Abbildung 10). Demgegenüber wies die PK aus *V. moutnovksia* mit PEP eine hyperbole Sättigungskinetik auf, was gegen eine kooperative Bindung von PEP spricht (Abbildung 10).

Allosterische Eigenschaften. Die allosterische Regulierbarkeit der PKs durch bekannte positive Effektoren, durch 3PG, FBP und AMP, wurde bei limitierenden PEP-Konzentrationen (0,25 bis 1 mM) getestet. Dazu wurde zunächst die Aktivität der PKs ohne Effektor gemessen und anschließend die Regulierbarkeit durch Zugabe des Effektors geprüft. Die PKs aus *P. islandicum*, *T. uzoniensis* und *C. maquilingensis* wiesen eine Steigerung der PK-Aktivität um das 6- bis 8-fache mit 2 mM 3PG auf. Die sigmoidalen Sättigungskinetiken mit PEP änderten sich in

Gegenwart von 3PG hin zu einem hyperbolischen Verlauf, wodurch sich der $S_{0,5}$ -Wert für PEP um das 2- bis 4-fache verringerte (Tabelle 7, Abbildung 10). Demgegenüber wurde die PK aus *V. moutnovskia* mit 3PG nicht allosterisch aktiviert. Keine der untersuchten PKs aus Thermoproteales konnte durch die klassischen Effektoren aus Bacteria und Eukarya, FBP, AMP und R5P in ihrer Aktivität gesteigert werden. Nur die PK aus *C. maquilingsis* zeigte eine leichte Aktivierung mit FBP, die jedoch nur 25 % der 3PG-Aktivierung betrug, weshalb dieser Effekt vermutlich nicht physiologisch ist.

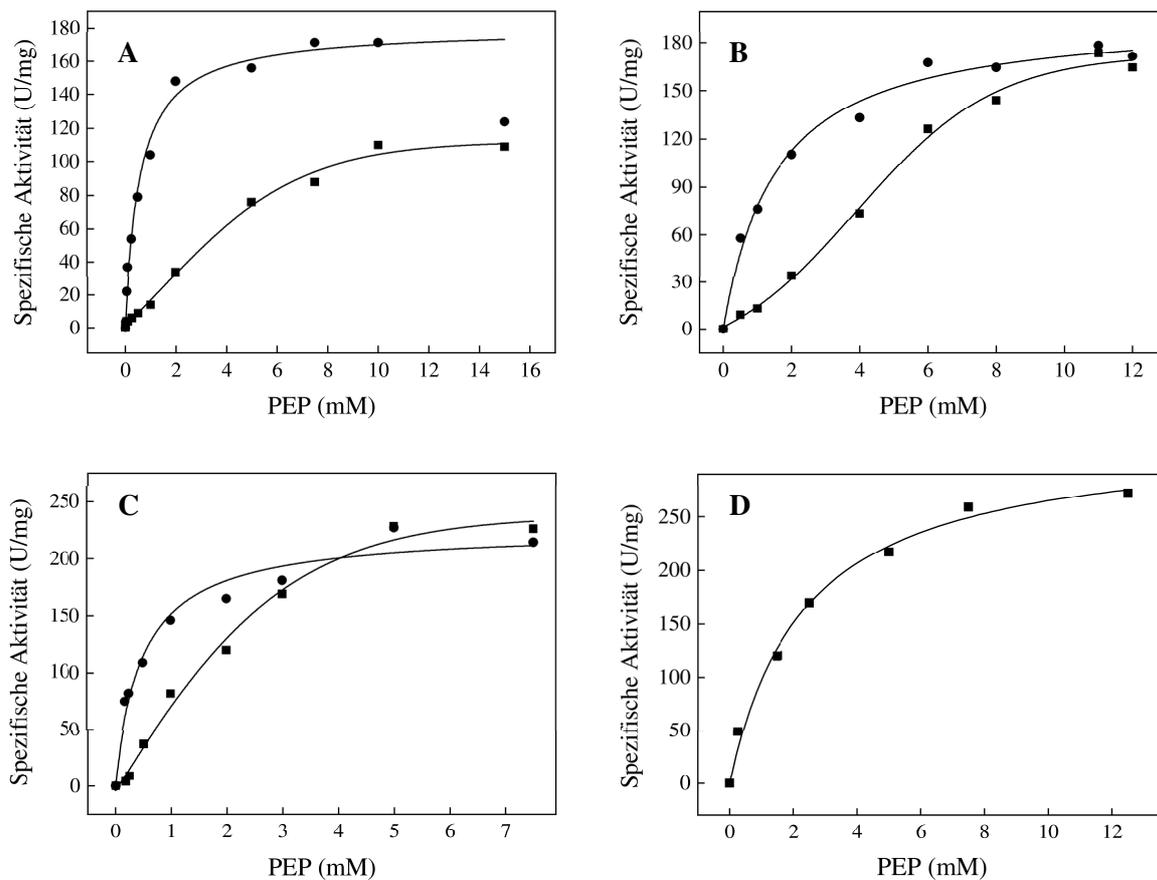


Abbildung 10 Abhängigkeit der Enzymaktivität von der PEP-Konzentration ohne Effektor (■) sowie in Gegenwart von 2 mM 3PG (●) der PKs aus (A) *P. islandicum*, (B) *T. uzoniensis*, (C) *C. maquilingsis* und (D) *V. moutnovskia*.

Tabelle 7 Molekulare und kinetische Eigenschaften der PKs aus *Thermoproteales* im Vergleich zu den PK-Mutanten. Die Messungen erfolgten bei 65 °C und pH 6,2. $S_{0,5}$, Substrat- bzw. Effektorkonzentration bei halbmaximaler Enzymgeschwindigkeit. N.b., nicht bestimmt. Standardabweichungen wurden aus Triplikaten kalkuliert.

PK	V_{\max} (U/mg)		$S_{0,5}$ PEP (mM)		$S_{0,5}$ 3PG (mM)	$S_{0,5}$ ADP (mM)	Untereinheit/ Holoenzym (kDa)
	- 3PG	+ 3PG	- 3PG	+ 3PG			
<i>P. islandicum</i>	103,4 ± 4,6	178,5 ± 4,1	2,1 ± 0,6	0,57 ± 0,06	n. b.	2,53 ± 0,37	48,8 / 225
<i>T. uzoniensis</i>	142,7 ± 14,9	207,7 ± 4,1	3,3 ± 0,64	1,6 ± 0,31	0,2	3,9 ± 1,4	48,3 / 220
Y412A	147,1	179,4	2,2	1,3	0,41	n. b.	50,8 / 201,8
S365A	205,8	256,4	2,8	2,59	2,29	n. b.	52,7 / 205,6
Y412A-S365A	31,5	31,2	3,9	4,7	Nicht aktiviert	n. b.	47,6 / 208,4
R373A	178,8	167,4	4,75	4,93	Nicht aktiviert	n. b.	48,5 / 202
<i>C. maquilingensis</i>	230 ± 17	230 ± 18	2,1 ± 0,17	0,63 ± 0,27	0,3	4,1 ± 0,4	50,5 / 187
R372A	263,5 ± 14,9	296,9	3,21 ± 0,4	1,8	1,3	n. b.	51,2 / 191
R372A-R342A	236,7 ± 7,3	250	3,0 ± 0,18	3,0	Nicht aktiviert	n. b.	49,6 / 205
<i>V. moutnovskia</i>	255 ± 11	263	2,3 ± 0,22	1,9	Nicht aktiviert	0,25 ± 0,01	50,8 / 229

Für die PKs aus *T. uzoniensis* und *C. maquilingensis* wurde außerdem analysiert, bei welcher 3PG-Konzentration die PK-Aktivität maximal stimuliert wird. Dazu wurde in Ansätzen mit 1 mM PEP die Konzentration an 3PG variiert. Für die PK aus *T. uzoniensis* zeigte sich mit 3PG eine maximale Stimulierung um das 4-fache bei einer Konzentration über 1,0 mM und die halbmaximale Stimulierung wurde mit 0,2 mM 3PG erreicht (Abbildung 11A, Tabelle 7). Für die PK aus *C. maquilingensis* wurde nachgewiesen, dass das Enzym bei 3PG-Konzentrationen über 2 mM maximal stimuliert wird (Faktor 3,3) und eine halbmaximale Stimulierung der Aktivität mit 0,3 mM 3PG erfolgt (Abbildung 11B, Tabelle 7).

Fünf konservierte Aminosäuren sind an der Bindung von 3PG beteiligt

Ein von Christopher Davies angefertigtes Strukturmodell für die Bindung von 3PG im allosterischen Zentrum der PKs aus *T. uzoniensis* und *C. maquilingensis* deutet darauf hin, dass die 3PG-Bindung in diesen PKs wie in der PK aus *P. aerophilum* über fünf Aminosäuren erfolgt (Abbildung 11C und D). Um dies zu überprüfen, wurden einzelne dieser Aminosäuren mittels ortsspezifischer Mutagenese ausgetauscht und die mutierten PKs nach Überexpression und Reinigung charakterisiert und auf ihre 3PG-Aktivierung untersucht. Die PK-Mutanten zeigten mit

PEP sigmoidale Sättigungskinetiken wie die unmutierten Enzyme, was darauf hindeutet, dass die Aminosäure-Austausche keinen Effekt auf die kooperative Bindung der PKs hatten (Tabelle 7).

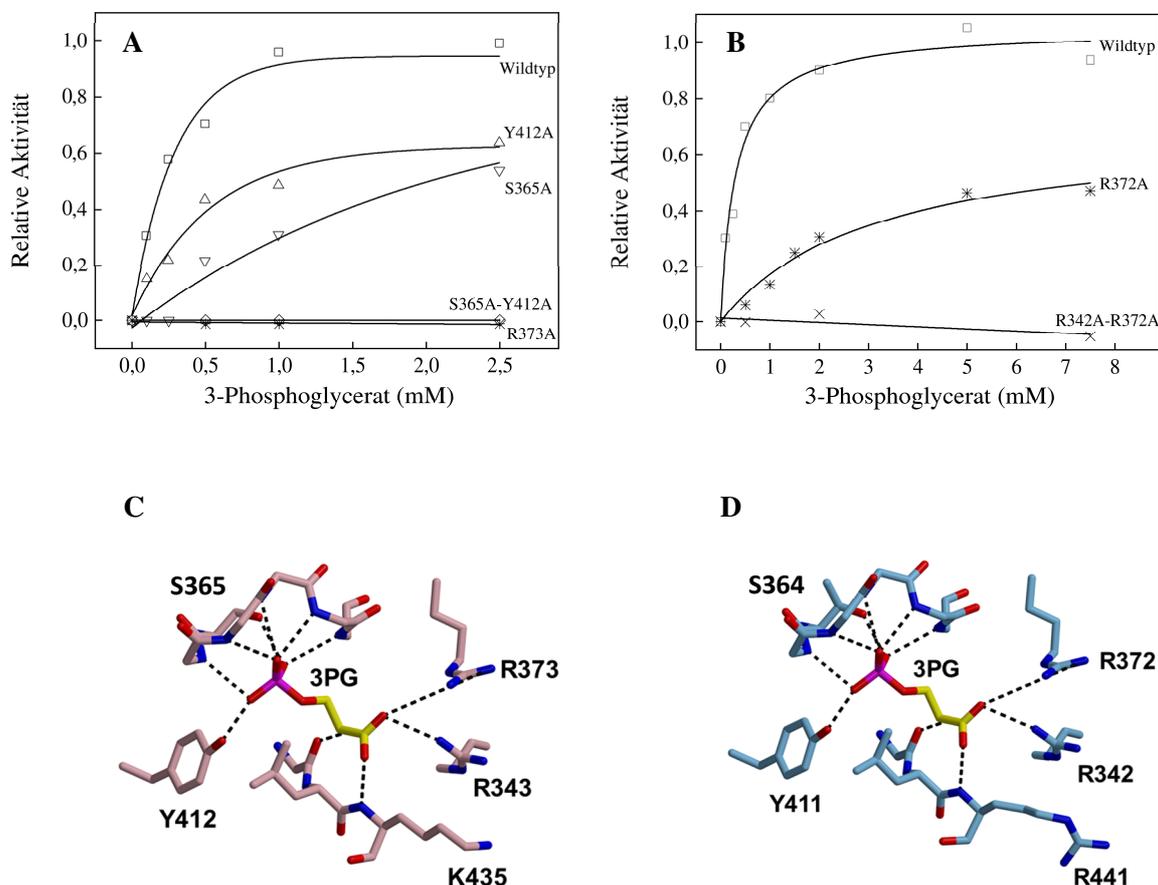


Abbildung 11 Stimulierung der Aktivität der PKs aus (A) *T. uzoniensis* und (B) *C. maquilingsensis* durch 3PG im Vergleich zu PK-Mutanten und Strukturmodell der 3PG-Bindetaschen der PKs aus (C) *T. uzoniensis* und (D) *C. maquilingsensis*. (A, B) Die Abhängigkeit der Stimulierung der PK-Aktivität von der 3PG-Konzentration wurde für die PK aus *T. uzoniensis* mit 1 mM PEP, 10 mM ADP, 15 mM MgCl₂ und für die PK aus *C. maquilingsensis* mit 0,5 mM PEP, 6 mM ADP, 10 mM MgCl₂ bestimmt. (C, D) Die Strukturmodelle wurden auf Basis der Kristallstruktur der PK aus *P. aerophilum* von Christopher Davies erstellt.

Bindung von 3PG in der PK aus *T. uzoniensis*. Ausgehend von dem Strukturmodell ergibt sich für die PK aus *T. uzoniensis* die Beteiligung zweier Arginine (R373 und R343) sowie eines Lysins an Position 435 an der Bindung der Carboxylgruppe von 3PG (Abbildung 11C). Analysen mit einer R373A-Mutante ergaben, dass diese mit 3PG nicht mehr allosterisch aktiviert wird (Tabelle 7, Abbildung 11A). Das Arginin-373 der PK aus *T. uzoniensis* ist somit, wie auch der homologe Rest der PK aus *P. aerophilum*, essentiell für die Effektorbindung (Solomons *et al.*, 2013). An der Bindung der Phosphatgruppe von 3PG sind in der PK aus *T. uzoniensis* vermutlich ein Tyrosin an Position 412 und ein Serin an Position 365 beteiligt (Abbildung 11C). Untersuchungen mit einer

Y412A- sowie einer S365A-Mutante der PK ergaben, dass diese im Vergleich zum unmutierten Enzym deutlich höhere 3PG-Konzentrationen für eine halbmaximale Stimulierung benötigten. So erfolgte eine halbmaximale Stimulierung in der Y412A-Mutante erst mit zweimal und in der S365A-Mutante mit zehnmal höheren 3PG-Konzentrationen (Abbildung 11A, Tabelle 7). Eine Y412A-S365A-Doppelmutante zeigte im Vergleich zum unmutierten Enzym eine deutlich geringere spezifische Aktivität, was für einen Einfluss der Mutation auf die katalytischen Eigenschaften spricht, und wurde durch 3PG nicht allosterisch aktiviert (Tabelle 7, Abbildung 11A). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass das Tyrosin-412 und insbesondere das Serin-365 an der Phosphatgruppenbindung von 3PG beteiligt sind.

Bindung von 3PG in der PK aus *C. maquilingsis*. In der PK aus *C. maquilingsis* erfolgt die Bindung der Carboxylgruppe von 3PG vermutlich über drei Arginine an den Positionen 372, 342 und 441 (Abbildung 11D). Für eine R372A-Mutante wurde gezeigt, dass diese im Vergleich zum unmutierten Enzym erst bei einer ca. 4-fach höheren 3PG-Konzentration halbmaximal stimuliert wird, was auf eine Beteiligung des Arginins-372 an der Effektorbindung hindeutet (Tabelle 7, Abbildung 11B). Anders als in den PKs aus *P. aerophilum* und *T. uzoniensis* führt der Austausch des Arginins in der PK aus *C. maquilingsis* jedoch nicht zu einem vollständigen Verlust der allosterischen Aktivierbarkeit mit 3PG. Um zu untersuchen, ob sich das Arginin-372 und das Arginin-342 in ihrer Funktion für die Carboxylgruppenbindung des 3PGs ersetzen können, wurde eine R372A-R342A-Doppelmutante generiert. Das Enzym wurde mit 3PG nicht mehr allosterisch aktiviert (Tabelle 7, Abbildung 11B). Beide Reste sind somit an der 3PG-Bindung beteiligt.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass die allosterische Aktivierung mit 3PG eine generelle Eigenschaft der PKs aus Thermoproteales ist. Wie auch in der PK aus *P. aerophilum*, sind fünf Aminosäuren an der 3PG-Bindung im allosterischen Zentrum der PKs aus *T. uzoniensis* und *C. maquilingsis* beteiligt (Solomons *et al.*, 2013). Eine Ausnahme innerhalb der Thermoproteales ist die PK aus *V. moutnovskia*, der alle drei Arginine für die 3PG-Bindung fehlen und die in Übereinstimmung keine allosterische Aktivierung mit 3PG zeigt. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass ein vollständiges Motiv aus fünf Aminosäuren, drei Argininen, einem Tyrosin und einem Serin bzw. Threonin, die Voraussetzung für eine 3PG-Bindung im allosterischen Zentrum von PKs ist. In Zukunft wird es möglich sein, mit Hilfe dieses Motivs über Sequenzvergleiche eine Aussage über die allosterische Aktivierbarkeit von PKs mit 3PG zu treffen.

5.1.5 Die PKs aus Aigarchaeota, Korarchaeota und Thermococcales werden nicht allosterisch aktiviert

Untersuchungen zur allosterischen Regulation der PK aus *Candidatus Caldiarchaeum subterraneum*

Cand. C. subterraneum wurde aus heißen, geothermalen Quellen isoliert und mittels *single cell sequencing* untersucht. Dabei wurden die kodierenden Gene von Enzymen glykolytischer Abbauwege identifiziert, unter anderem das Gen einer PK (Takami *et al.*, 2015). Die rekombinante PK aus *Cand. C. subterraneum* wurde zunächst auf ihre thermophilen Eigenschaften untersucht und zeigte, in Übereinstimmung mit der postulierten thermophilen Lebensweise des Organismus, eine signifikante Thermostabilität (Abbildung 12). So wies das Enzym bei 70 °C über 2 h nur einen geringen Aktivitätsverlust auf. Für 75 °C wurde eine Halbwertszeit der Aktivität von 36 min und für 80 °C von 10 min ermittelt.

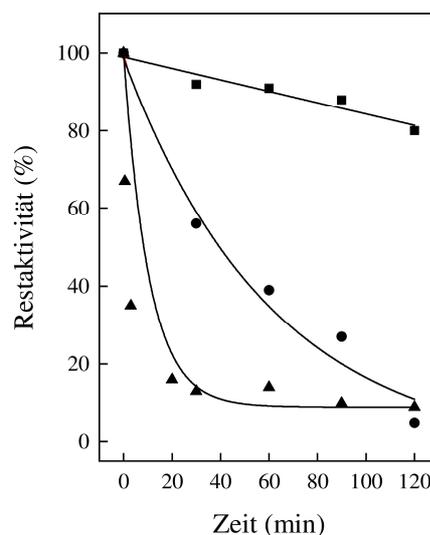


Abbildung 12 Thermostabilität der rekombinanten PK aus *Cand. C. subterraneum*. Es ist die spezifische Aktivität der PK (%) gegen die Inkubationszeit bei 70 °C (■), 75 °C (●) und 80 °C (▲) aufgetragen. 100 % entspricht einer spezifischen Aktivität von 141 U/mg bei 65 °C.

Der Sequenzvergleich in Abbildung 9 zeigt, dass in der PK aus *Cand. C. subterraneum* das aus fünf Aminosäuren bestehende 3PG-Bindemotiv fast vollständig konserviert ist. Allerdings ersetzt in der PK die hydrophobe Aminosäure Valin an Position 341 das an der Carboxylgruppenbindung von 3PG beteiligte Arginin-359 der PK aus *P. aerophilum*. Die PK aus *Cand. C. subterraneum* wurde bei 65 °C charakterisiert und zeigte für die Substrate ADP und PEP jeweils eine hyperbole Sättigungskinetik, was gegen eine kooperative Substratbindung spricht (Tabelle 8). Mit dem

allosterischen Effektor 3PG sowie mit FBP, AMP und R5P konnte keine Stimulierung der Enzymaktivität nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse unterstützen den Befund, dass alle fünf Aminosäuren des 3PG-Bindemotivs für eine 3PG-Bindung vorhanden sein müssen.

Tabelle 8 Molekulare und kinetische Eigenschaften der PKs aus Aigarchaeota, Thermococcales, Methanococcales und Methanosarcinales. Die V_{\max} -Werte entsprechen der maximalen spezifischen Aktivität der ADP- und PEP-Titrationen. N.b., nicht bestimmt. Standardabweichungen wurden von Triplikaten kalkuliert.

PK	V_{\max} (U/mg)	$S_{0,5PEP}$ (mM)	$S_{0,5ADP}$ (mM)	Untereinheit/ Holoenzym (kDa)
Aigarchaeota				
<i>Cand. C. subterraneum</i>	122 ± 18	2,52 ± 0,16	0,18 ± 0,02	49,6 / 230
Korarchaeota				
<i>Cand. K. cryptofilum</i>	157 ± 25	0,95 ± 0,07	1,3	54,3 / 229
Thermococcales				
<i>T. kodakarensis</i>	58	0,63	0,28	53,0 / 218
<i>P. furiosus</i>	210	0,98	1,0	53,2 / n.b.
Methanococcales/Methanosarcinales				
<i>M. jannaschii</i>	173,2 ± 15,3	0,71 ± 0,05	0,17 ± 0,04	50,5 / 233
<i>M. villosus</i>	17,5	3,4	n.b.	49,1 / 200
<i>M. maripaludis</i>	24,6 ± 1,8	0,34 ± 0,08	0,05 ± 0,01	50,1 / 214
<i>M. acetivorans</i>	31,9 ± 3,0	0,41 ± 0,13	0,05	53,9 / 214

Untersuchungen zur allosterischen Regulation der PK aus *Candidatus Korarchaeum cryptofilum*

Cand. K. cryptofilum ist der bisher einzige Vertreter der Korarchaeota dessen Genom sequenziert wurde, wobei das kodierende Gen einer PK nachgewiesen wurde (Elkins *et al.*, 2008). Die rekombinante PK aus *Cand. K. cryptofilum* wurde bei 65 °C untersucht und zeigte eine hyperbole Sättigungskinetik mit ADP (Tabelle 8). Dagegen wies die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der PEP-Konzentration eine sigmoidale Sättigungskinetik auf, was auf eine kooperative Bindung des Substrates PEP hindeutet (Tabelle 8). Die allosterische Regulierbarkeit der PK wurde bei einer PEP-Konzentration von 0,4 mM mit AMP, FBP, R5P und 3PG getestet. Mit allen getesteten Effektoren zeigte die PK eine leichte Stimulierung der Aktivität um das ca. 2-3-fache, weshalb diese Effekte vermutlich nicht physiologisch sind. Das Ausbleiben einer allosterischen Aktivierung der PK mit 3PG ist dabei in Übereinstimmung mit einem unvollständigen 3PG-

Bindemotiv (Abbildung 9). So fehlen der PK alle drei Arginine und das Tyrosin für die 3PG-Bindung.

Untersuchungen zur allosterischen Regulation der PKs aus Thermococcales

Eine gut untersuchte Gruppe hyperthermophiler Archaea sind die Thermococcales, die zum Phylum der Euryarchaeota gehören. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die PKs aus zwei Organismen dieser Gruppe, aus *Thermococcus kodakarensis* und *Pyrococcus furiosus*, biochemisch analysiert. Die gereinigten Enzyme zeigten hyperbole Sättigungskinetiken mit den Substraten PEP und ADP (Tabelle 8). Das deutet darauf hin, dass weder ADP noch PEP kooperativ gebunden werden. Der Einfluss von 3PG sowie der klassischen Effektoren FBP, AMP und R5P auf die spezifische Aktivität wurde in Testansätzen mit limitierenden PEP- und ADP-Konzentrationen geprüft. Mit keinem der Effektoren konnte ein stimulierender Effekt auf die Aktivität der Enzyme gezeigt werden. Das Ausbleiben einer allosterischen Aktivierung mit 3PG ist in Übereinstimmung mit dem Fehlen von essentiellen Resten des 3PG-Bindemotivs (Abbildung 9). So fehlen beiden PKs das Tyrosin der Phosphatgruppenbindung von 3PG und der homologe Rest des für die Carboxylgruppenbindung von 3PG essentielle Arginins-389 der PK aus *P. aerophilum*.

5.1.6 Die PKs aus hyperthermophilen Methanococcales werden mit AMP allosterisch aktiviert

Methanogene Archaea sind in der Regel chemolithoautotrophe Organismen, die mit CO₂ und H₂ als Energie- und Kohlenstoffquelle wachsen und die üblicherweise keine PK besitzen. Für einige methanogene Archaea der Ordnung Methanococcales und Methanosarcinales wurde jedoch gezeigt, dass diese während des Wachstums auf CO₂ und H₂ intrazellulären Glykogen bilden und dieses über einen modifizierten EM-Weg abbauen, an dem eine PK beteiligt ist (Pellerin *et al.*, 1987, Yu *et al.*, 1994). In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die PKs aus methanogenen Archaea eine allosterische Regulation aufweisen.

PKs aus *M. jannaschii* und *M. villosus* sind AMP-aktiviert

Erste Untersuchungen der Arbeitsgruppe Schönheit deuteten darauf hin, dass die PK aus dem hyperthermophilen methanogenen Archaeon *M. jannaschii*, ein Vertreter der Gattung Methanocaldococcus, mit AMP allosterisch stimuliert wird, weshalb dies in dieser Arbeit näher untersucht werden sollte. Das Enzym wurde zunächst auf seine thermophilen Eigenschaften untersucht und zeigte ein Temperaturoptimum von über 90 °C mit einer Aktivierungsenergie nach

Arrhenius von 60,7 kJ/mol (Abbildung 13A). Außerdem wurde für die PK eine ausgeprägte Thermostabilität nachgewiesen (Abbildung 13B). Bei 70 °C wurde kein signifikanter Aktivitätsverlust der PK beobachtet. Für 80 °C wurde eine Halbwertszeit der Aktivität von 261 min und für 95 °C von 27 min bestimmt. Die Ergebnisse zeigen, dass die PK aus *M. jannaschii* an hohe Temperaturen adaptiert ist, was in Übereinstimmung mit der optimalen Wachstumstemperatur des Organismus von etwa 85 °C ist (Jones et al. 1983).

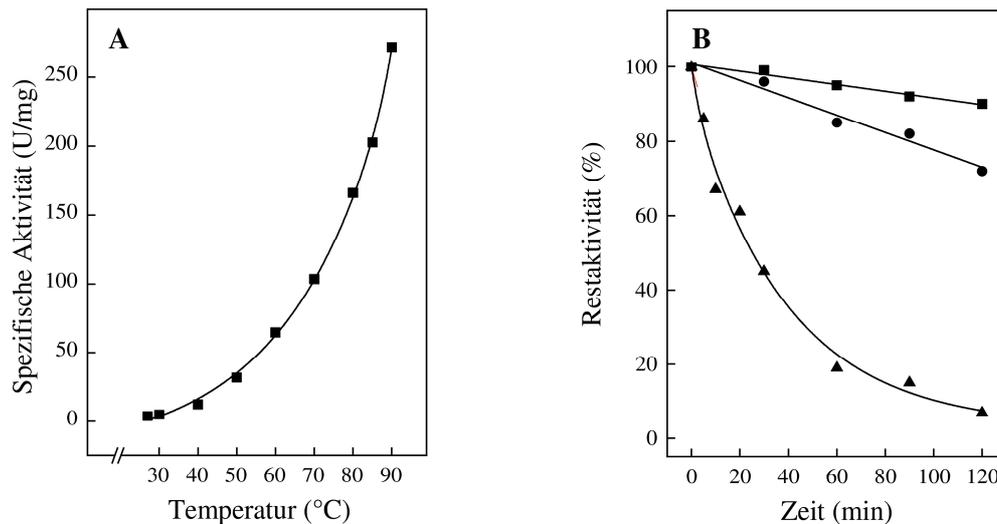


Abbildung 13 Abhängigkeit der Aktivität von der Temperatur und Thermostabilität der rekombinanten PK aus *M. jannaschii*. (A) Einfluss der Temperatur auf die spezifische Aktivität der PK. (B) Auftrag der spezifischen Aktivität (%) gegen die Inkubationszeit bei 70 °C (■), 80 °C (●) und 95 °C (▲). 100 % entspricht einer spezifischen Aktivität von 89,5 U/mg bei 65 °C.

Die kinetischen Parameter der PK wurden bei 65 °C bestimmt (Tabelle 8). Die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der ADP-Konzentration folgte einer Michaelis-Menten-Kinetik. Dagegen wies die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der PEP-Konzentration eine sigmoidale Sättigungskinetik auf, was auf eine kooperative Bindung von PEP hindeutet (Abbildung 14A). Der Effekt der potentiellen allosterischen Effektoren AMP, FBP, R5P und 3PG wurde bei einer PEP-Konzentration von 0,25 mM getestet. Mit FBP, R5P und 3PG konnte keine allosterische Aktivierung gezeigt werden. Demgegenüber zeigte sich mit AMP eine Stimulierung der PK-Aktivität um das 19-fache. Die sigmoidale Kinetik mit PEP änderte sich in Anwesenheit von 1 mM AMP zu einer hyperbolischen Kinetik, was zu einer Verminderung des $S_{0,5}$ -Wertes für PEP um das 4,5-fache führte ($S_{0,5}$ 0,15 mM) (Abbildung 14A, Tabelle 8). Damit ist die PK aus *M. jannaschii* die erste archaeelle PK, die mit dem klassischen Effektor AMP aus Bacteria allosterisch aktiviert wird.

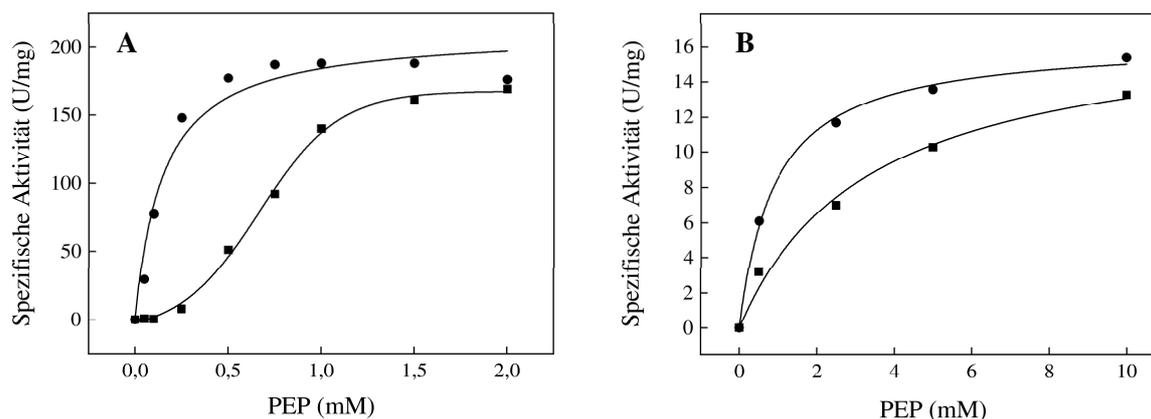


Abbildung 14 Abhängigkeit der Enzymaktivität von der PEP-Konzentration ohne Effektor (■) sowie in Gegenwart von 1 mM AMP (●) der PKs aus *M. jannaschii* (A) und *M. villosus* (B).

Um zu prüfen, ob die PK eines weiteren Vertreters der Gattung *Methanocaldococcus* mit AMP allosterisch aktiviert wird, wurde die PK aus *M. villosus* charakterisiert. Das Enzym wies mit dem Substrat PEP eine Sättigungskinetik mit einem $S_{0,5}$ -Wert von 3,4 mM auf und wurde mit AMP spezifisch allosterisch aktiviert (Abbildung 14B, Tabelle 8). Die Zugabe von 1 mM AMP führte zu einer Steigerung der Aktivität, wodurch sich der $S_{0,5}$ -Wert der PK für das Substrat PEP um das ca. 4-fache verringerte ($S_{0,5}$ 0,91 mM) (Abbildung 14B). Mit den Zuckerphosphaten FBP und R5P sowie mit 3PG wurde die PK nicht allosterisch aktiviert. Damit konnte für die PK eines weiteren Vertreters der Gattung *Methanocaldococcus* eine spezifische allosterische Regulierbarkeit mit AMP gezeigt werden.

Die PKs aus mesophilen methanogenen Archaea werden nicht mit AMP allosterisch aktiviert

Weiterhin wurde die PK aus dem mesophilen methanogenen Archaeon *M. maripaludis* aus der Ordnung *Methanococcus* und die PK aus *M. acetivorans*, ein Vertreter der *Methanosarcinales*, bei 37 °C charakterisiert. Die Abhängigkeit der Enzymaktivität der PKs von der ADP-Konzentration folgte einer Michaelis-Menten-Kinetik (Tabelle 8). Mit PEP zeigte die PK aus *M. maripaludis* eine hyperbole Sättigungskinetik, wohingegen die PK aus *M. acetivorans* eine sigmoidale Sättigungskinetik aufwies (Tabelle 8). Die allosterische Regulierbarkeit der PKs wurde mit den Effektoren AMP, FBP, R5P und 3PG in Ansätzen mit limitierenden PEP- und ADP-Konzentrationen getestet. Keiner der getesteten Effektoren hatte einen allosterischen Effekt auf die PK-Aktivität. Somit scheinen die PKs aus mesophilen methanogenen Archaea der *Methanococcales* und *Methanosarcinales*, anders als die PKs aus den hyperthermophilen Archaea der *Methanococcales*, nicht mit AMP allosterisch aktiviert zu werden.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass neben der PK aus *P. aerophilum* die PKs weiterer Organismen der Ordnung Thermoproteales mit 3PG allosterisch aktiviert werden. Ein vollständiges 3PG-Bindemotiv aus fünf Aminosäuren ist dabei die Voraussetzung für die allosterische Aktivierung mit 3PG. Die PKs aus Eukarya, Korarchaeota, Thermococcales sowie aus hyperthermophilen und mesophilen methanogenen Archaea werden mit 3PG nicht allosterisch aktiviert, was in Übereinstimmung mit einem unvollständigen 3PG-Bindemotiv dieser Enzyme ist. Für die PKs aus hyperthermophilen methanogenen Archaea der Ordnung Methanococcus konnte eine allosterische Aktivierung mit AMP, dem klassischen Effektor der PKs aus Bacteria, gezeigt werden.

5.2 Untersuchungen zum Abbau von L-Rhamnose in Archaea

Der Abbau des Desoxy-Zuckers L-Rhamnose ist in Archaea bisher kaum untersucht. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit detaillierte Untersuchungen zur Aufnahme und zum Abbau von Rhamnose in dem halophilen Euryarchaeon *H. volcanii* durchgeführt und die transkriptionelle Regulation der beteiligten Gene analysiert. Außerdem wurden ausgewählte Enzyme des Rhamnose-Abbaus aus den Crenarchaeota *S. solfataricus* und *V. distributa* charakterisiert.

5.2.1 Abbau von L-Rhamnose in *H. volcanii*

H. volcanii H26 wurde bei 42 °C in Medium mit 15 mM L-Rhamnose gezüchtet. Die Zellen wuchsen mit einer Verdopplungszeit von 8,7 h bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm von ca. 2,4 (Abbildung 15). Während des Wachstums wurde die Rhamnose vollständig verbraucht.

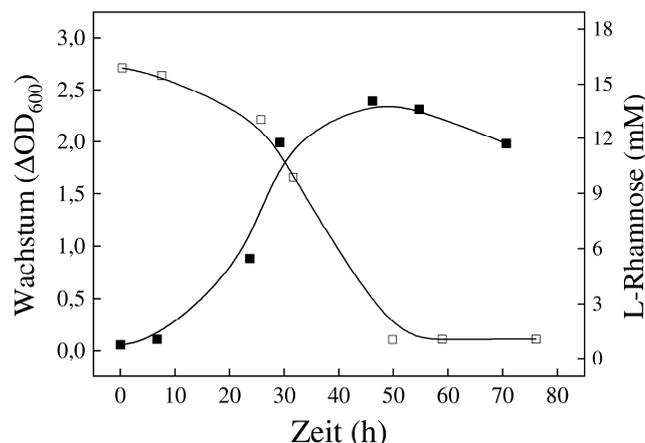


Abbildung 15 Wachstum von *H. volcanii* auf 15 mM Rhamnose. Die Zellen wuchsen in Synthetik-Medium mit Rhamnose als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle. Das Wachstum (■) und der Verbrauch von Rhamnose (□) über die Zeit wurde bestimmt. Die Vorkulturen waren an Rhamnose adaptiert.

Das Genom von *H. volcanii* wurde auf kodierende Gene von Enzymen des Rhamnose-Abbaus untersucht. Gene, die für eine Rhamnose Isomerase, Rhamnulokinase und Rhamnulose-1-Phosphat Aldolase, die Enzyme des klassischen Rhamnose-Abbauweges aus Bacteria, kodieren, konnten nicht identifiziert werden. Hingegen wurde ein Gencluster identifiziert, der für alle Enzyme eines Diketo-Hydrolase Weges sowie einen putativen ABC-Transporter und einen putativen Transkriptionsregulator kodiert. Die Anordnung dieses Genclusters, welcher im Folgenden als *rhamnose catabolism* Gencluster (*rhc*-Gencluster) bezeichnet wird, ist in

Abbildung 16 dargestellt. Der Diketo-Hydrolase Weg umfasst die Gene *rhcABCDEF*, die für eine Rhamnose Mutarotase (RhM), Rhamnose Dehydrogenase (RDH), Rhamnonolactonase (RNL), Rhamnonat Dehydratase (RAD), 2-Keto-3-Desoxyrhamnonat Dehydrogenase (KDRDH) und 2,4-Diketo-3-Desoxyrhamnonat Hydrolase (DKDRH) kodieren. In direkter Nachbarschaft befinden sich die Gene *rhcGHIJ*, die für ein Substratbindeprotein (SBP), zwei Transmembrandomänen (TMD) und eine Nukleotidbindedomäne (NBD) eines putativen ABC-Transporters kodieren. Innerhalb des *rhc*-Clusters ist mit *rhcR* außerdem das kodierende Gen eines putativen Transkriptionsregulators der IclR-Proteinfamilie annotiert.

Um einen ersten Hinweis zu erhalten, ob *H. volcanii* Rhamnose oxidativ über einen Diketo-Hydrolase Weg abbaut, wurden Extrakte von Zellen, die auf Rhamnose oder Glucose gewachsen waren, hergestellt und die Aktivität einer Rhamnose Dehydrogenase (RDH) als erstes Enzym eines oxidativen Abbauweges bestimmt. In Rhamnose gewachsenen Zellen war die RDH-Aktivität 9-fach induziert (71 mU/mg), im Vergleich zu der in Glucose gewachsenen Zellen (8 mU/mg). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass *H. volcanii* für den Abbau von Rhamnose einen oxidativen Weg verwendet.

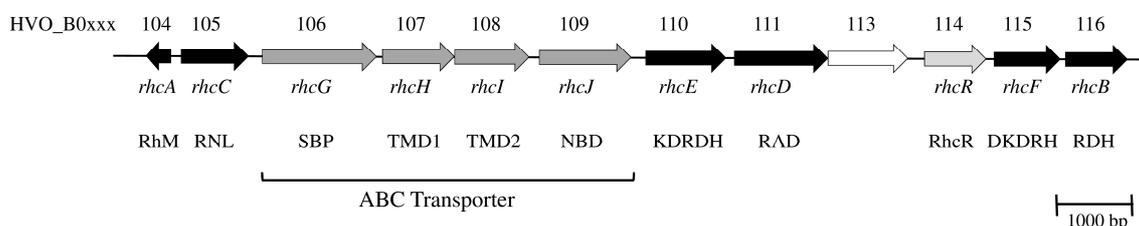


Abbildung 16 Der *rhc*-Gencluster aus *H. volcanii* umfasst die Gene des Rhamnose-Transports und des -Abbaus. Die offenen Leserahmen sind als Pfeile dargestellt: die Gene des L-Rhamnose-Transports in dunkelgrau, die Gene des Rhamnose-Abbaus in schwarz und das kodierende Gen des Transkriptionsregulators RhcR in hellgrau. Der ABC-Transporter besteht aus vier Komponenten: einem Substratbindeprotein (SBP), zwei Transmembrandomänen (TMD) und einer Nukleotidbindedomäne (NBD). Der Diketo-Hydrolase Weg umfasst die Enzyme Rhamnose Mutarotase (RhM), Rhamnose Dehydrogenase (RDH), Rhamnonolactonase (RNL), Rhamnonat Dehydratase (RAD), 2-Keto-3-Desoxyrhamnonat Dehydrogenase (KDRDH), und 2,4-Diketo-3-Desoxyrhamnonat Hydrolase (DKDRH). Der Maßstab entspricht einer Länge von 1000 bp.

Die Beteiligung des ABC-Transporters sowie der putativen Enzyme des Diketo-Hydrolase Weges am Rhamnose-Transport und -Abbau wurde mit Hilfe von Transkriptionsanalysen, Wachstumsversuchen mit Deletionsmutanten sowie biochemischen Analysen der beteiligten Enzyme überprüft. Außerdem wurde die Funktion von RhcR als Transkriptionsregulator der *rhc*-Gene des Rhamnosekatabolismus untersucht. Die erzielten Ergebnisse werden im Folgenden beschrieben.

5.2.1.1 Rhamnose wird über einen ABC-Transporter aufgenommen

Die Transkription der kodierenden Gene *rhcGHIJ* des putativen ABC-Transporters der Rhamnose-Aufnahme wurde mittels Northern-Blot Analysen untersucht. Dafür wurde RNA aus Zellen verwendet, die auf Glucose oder Rhamnose gewachsen waren. Mit einer spezifischen Sonde gegen *rhcG*, dem kodierenden Gen des Substratbindeproteins (SBP), wurde ein starkes Signal von ca. 3400 Nukleotiden in Rhamnose gewachsenen Zellen nachgewiesen (Abbildung 17). Die Transkriptlänge von 3400 nt entspricht der Summe der Nukleotide (3416 Nukleotide) der Gene *rhcG*, *rhcH* und *rhcI*, was darauf hindeutet, dass diese drei Gene cotranskribiert werden. Ein Cotranskript aller Gene des ABC-Transporters, einschließlich *rhcJ*, konnte nicht nachgewiesen werden. Transkriptionsanalysen mit einer spezifischen Sonde gegen *rhcJ* ergaben ein Signal von 1200 nt, welches der Genlänge von *rhcJ* (1182 Nukleotide) entspricht (Abbildung 17). *RhcJ* liegt somit als monocistronisches Transkript vor. Zwischen den Genen *rhcJ* und *rhcI* liegt ein intergenischer Bereich von 95 Nukleotiden, was für einen eigenen Promotor von *rhcJ* spricht und das Ergebnis unterstützt, dass *rhcJ* monocistronisch transkribiert wird. In Glucose gewachsenen Zellen konnten keine Transkripte von *rhcGHIJ* nachgewiesen werden, was auf eine Rhamnose-spezifische transkriptionelle Induktion des ABC-Transporters hindeutet.

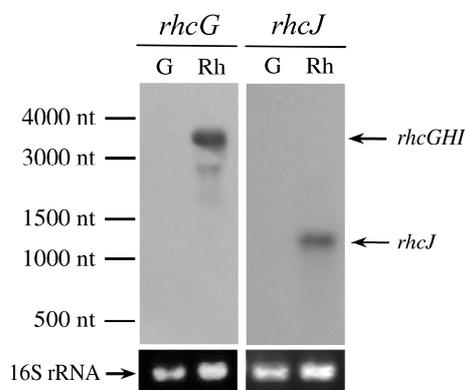


Abbildung 17 Transkription des Rhamnose-spezifischen ABC-Transporters aus *H. volcanii*. Northern-Blot Analysen mit RNA aus Glucose (G)- und Rhamnose (Rh)-gewachsenen Zellen. Die verwendeten Sonden waren spezifisch für *rhcG* (links) oder *rhcJ* (rechts). Die Markierungen an der linken Seite bilden den ausgewählten Größenstandard ab. Als Kontrolle der gleichmäßigen Beladung mit RNA diente die 16S rRNA.

Um die funktionelle Beteiligung des ABC-Transporters am Rhamnose-Transport zu prüfen, wurde mit Hilfe der sogenannten pop-in/pop-out Strategie (Allers *et al.*, 2004, Bitan-Banin *et al.*, 2003) *rhcG*, das kodierende Gen des Substratbindeproteins deletiert. Die erfolgreiche Deletion konnte mittels Southern-Blot Analysen bestätigt werden (Abbildung 18A). Das Wachstum der Deletionsmutante wurde auf 20 mM Rhamnose im Vergleich zu dem des Wildtyps untersucht

(Abbildung 18B). Dabei wuchs der Wildtyp mit einer Verdopplungszeit von 8,7 h bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von 2,8. Im Gegensatz dazu wuchs die Mutante mit einer deutlich verlangsamten Verdopplungszeit von 23,9 h bis zu einer OD_{600} von 2,0. Durch eine *in trans* Komplementation mit *rhcG* konnte das Wachstum der $\Delta rhcG$ Mutante auf Rhamnose vollständig wiederhergestellt werden (Abbildung 18B). Auf Glucose wuchs die $\Delta rhcG$ Mutante vergleichbar dem Wildtyp. Diese Ergebnisse sprechen für eine funktionelle Beteiligung des ABC-Transporters am Transport von Rhamnose in *H. volcanii*. Da das Wachstum der Deletionsmutante jedoch nur teilweise eingeschränkt war, kann ein alternatives System für die Aufnahme von Rhamnose in *H. volcanii* nicht ausgeschlossen werden. Interessanterweise war die $\Delta rhcG$ Mutante in Wachstumsversuchen mit niedrigen Rhamnose-Konzentrationen (1,5 mM) nicht mehr in der Lage zu wachsen, weshalb die Aufnahme von Rhamnose über einen alternativen Transporter unter diesen Bedingungen ausgeschlossen werden kann.

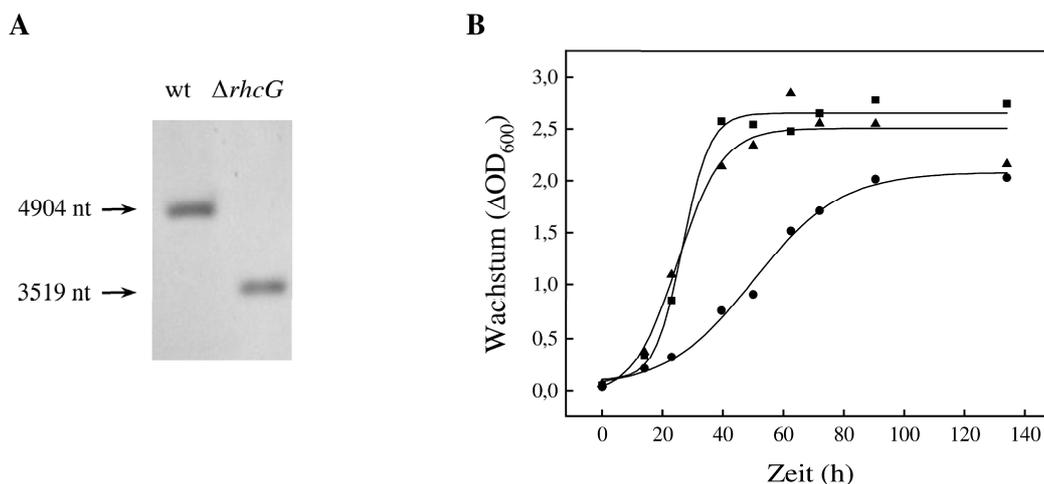


Abbildung 18 Southern-Blot zur Überprüfung der Gendeletion von *rhcG* und Wachstum einer $\Delta rhcG$ Mutante auf 20 mM Rhamnose. (A) Southern-Blot mit restriktionshydrolysiertem DNA aus dem Wildtyp (wt) und aus der Deletionsmutante ($\Delta rhcG$). (B) Wachstum der $\Delta rhcG$ Mutante (●) im Vergleich zum Wildtyp (■) und des mit *rhcG* komplementierten $\Delta rhcG$ -Stammes (▲). Die Vorkulturen wuchsen in Medium mit 1 % Casaminoacidsäuren.

5.2.1.2 Rhamnose wird über die Enzyme eines Diketo-Hydrolase Weges abgebaut

Innerhalb des *rhc*-Genclusters liegen die kodierenden Gene von Enzymen des Diketo-Hydrolase Weges. Zunächst wurde die Transkription dieser Gene untersucht und ihre funktionelle Beteiligung in Wachstumsexperimenten mit Deletionsmutanten geprüft. Anschließend wurden die Enzyme dieses Weges biochemisch charakterisiert.

Die Gene des Rhamnose-Abbaus werden Rhamnose-spezifisch transkribiert

Es wurden Northern-Blot Analysen mit RNA aus Rhamnose-gewachsenen Zellen im Vergleich zu Glucose-gewachsenen Zellen durchgeführt. Für die kodierenden *rhc*-Gene von RhM, RDH, RNL, KDRDH und DKDRH wurde jeweils ein spezifisches Signal in Rhamnose-gewachsenen Zellen nachgewiesen, dessen kalkulierte Größe mit der entsprechenden Genlänge übereinstimmt (Abbildung 19). Das deutet auf eine Rhamnose-spezifische und monocistronische Transkription dieser Gene hin. Für *rhcD*, das kodierende Gen der RAD, wurden zwei Rhamnose-spezifische Signale von 2300 und 1200 Nukleotiden detektiert (Abbildung 19). Das Transkript von 1200 Nukleotiden stimmt mit der Genlänge von *rhcD* überein. Das Signal von 2300 Nukleotiden entspricht der Länge eines Cotranskripts aus *rhcD* und HVO_B0113 (2237 Nukleotide). Zwischen beiden Genen liegt ein intergenischer Bereich von 2 Nukleotiden, was gegen einen eigenen Promotor von HVO_B0113 spricht und somit in Übereinstimmung mit einem Cotranscript von *rhcD* und HVO_B0113 ist. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die Transkription alle *rhc*-Gene des Diketo-Hydrolase Weges Rhamnose-spezifisch induziert wird.

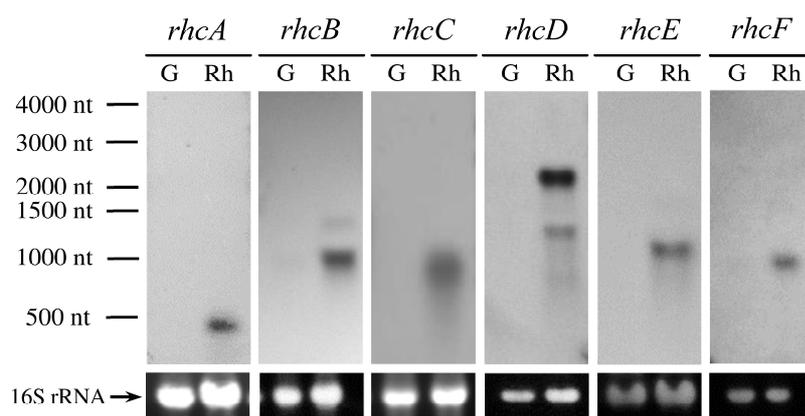


Abbildung 19 Transkription von *rhc*-Genen des Diketo-Hydrolase Weges aus *H. volcanii*. Abgebildet sind Northern-Blots mit RNA aus Glucose (G)- und Rhamnose (Rh)-gewachsenen Zellen. Die Markierungen an der linken Seite entsprechen dem Größenstandard. Gengrößen: *rhcA* (303 nt), *rhcB* (798 nt), *rhcC* (870 nt), *rhcD* (1206 nt), *rhcD* + HVO_B0113 (2237 nt), *rhcE* (1035 nt) und *rhcF* (852 nt). Zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung mit RNA wurde die 16S rRNA verwendet.

Die *rhc*-Gene des Diketo-Hydrolase Weges sind essentiell für das Wachstum auf Rhamnose

Um die funktionelle Beteiligung der *rhc*-Gene des Diketo-Hydrolase Weges am Abbau von Rhamnose zu überprüfen, wurden Deletionsmutanten der entsprechenden Gene generiert und die erfolgreichen Deletionen mittels Southern-Blot Analysen bestätigt (Abbildung 20A). Anschließend wurde das Wachstum der Deletionsmutanten auf Rhamnose und Glucose mit dem des Wildtyps verglichen. Die Deletionsmutante von *rhcA*, dem kodierenden Gen der Rhamnose Mutarotase (RhM), wuchs auf Rhamnose vergleichbar zum Wildtyp, was darauf hindeutet, dass dieses Enzym unter den gewählten Wachstumsbedingungen nicht essentiell für den Rhamnose-Abbau ist (Abbildung 20B).

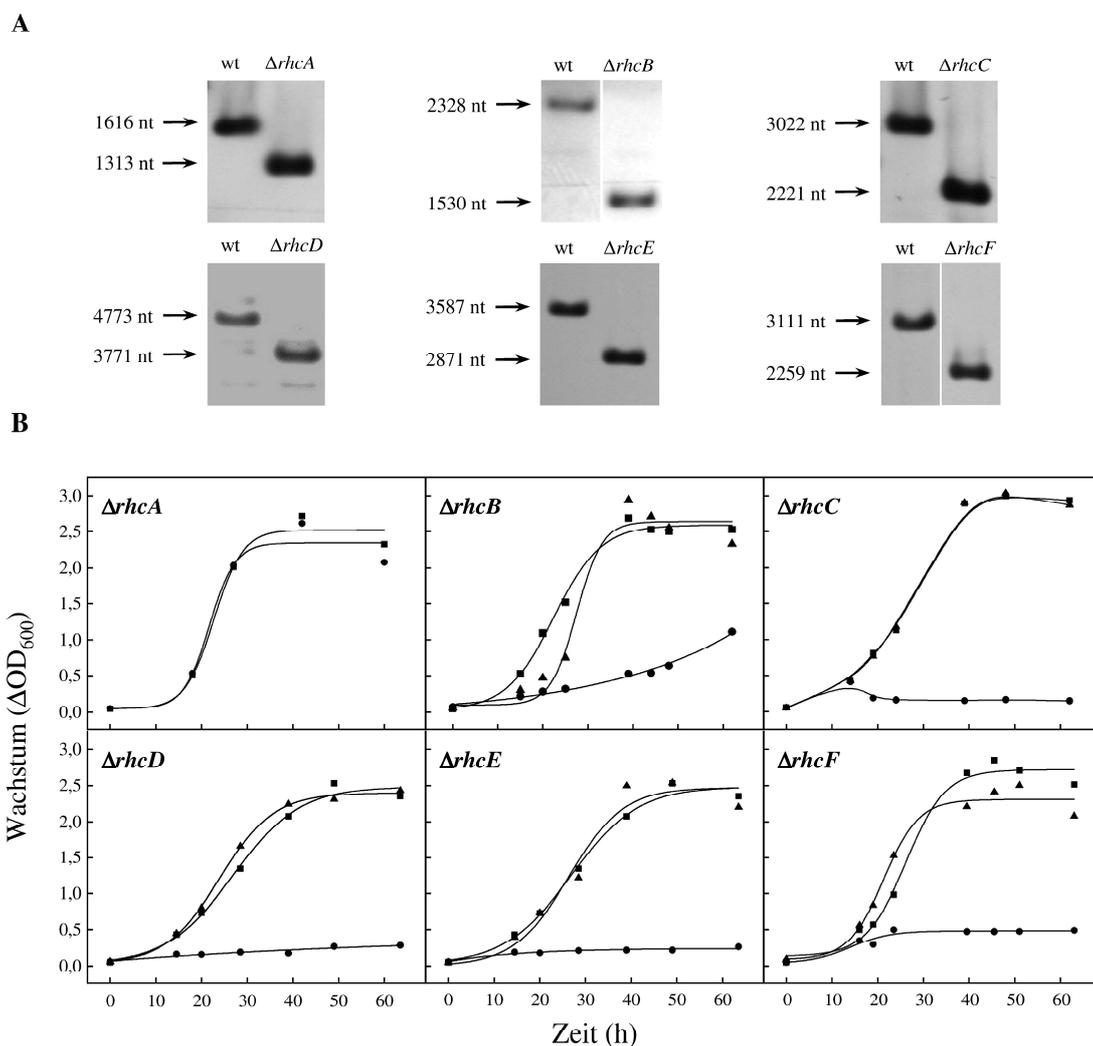


Abbildung 20 Southern-Blot Analysen zur Überprüfung der Gendeletionen von Δrhc Mutanten und Wachstum der Δrhc Mutanten des Diketo-Hydrolase Weges von *H. volcanii* auf 20 mM Rhamnose. (A) Southern-Blots mit restriktionshydrolysiertes DNA aus dem Wildtyp (wt) und aus den Δrhc Mutanten. (B) Wachstum der Δrhc Mutanten (●), des Wildtyps (■) sowie der *in trans* komplementierten Δrhc Mutanten (▲). Die Vorkulturen wuchsen in Medium mit 1 % Casaminsäuren.

Hingegen waren die Deletionsmutanten von *rhcB*, *rhcC*, *rhcD*, *rhcE* und *rhcF* nicht mehr in der Lage, auf Rhamnose zu wachsen (Abbildung 20A). Eine *in trans* Komplementation der Deletionsmutanten mit den entsprechenden Genen führte zu einer Wiederherstellung des Wachstums auf Rhamnose (Abbildung 20B). Auf Glucose wuchsen alle untersuchten Δrhc Mutanten wie der Wildtyp. Die Daten zeigen, dass die kodierenden Gene von RDH, RNL, RAD, KDRDH und DKDRH essentiell für das Wachstum von *H. volcanii* auf Rhamnose sind.

In den Transkriptionsanalysen wurde gezeigt, dass *rhcD*, das kodierende Gen der RAD, als Cotranskript mit HVO_B0113 transkribiert wird. HVO_B0113 ist als kodierendes Gen einer F₄₂₀-abhängigen Monooxygenase annotiert, deren Funktion im Rhamnose-Abbau nicht bekannt ist. Um zu prüfen, ob HVO_B0113 wichtig für das Wachstum von *H. volcanii* auf Rhamnose ist, wurde eine Δ HVO_B0113 Mutante generiert und in Wachstumsanalysen gezeigt, dass diese Deletionsmutante auf Rhamnose wie der Wildtyp wuchs. Das spricht gegen eine essentielle Beteiligung von HVO_B0113 am Rhamnose-Abbau.

Charakterisierung von Enzymen des Diketo-Hydrolase Weges

Mit Ausnahme der RhM wurden die Enzyme des Diketo-Hydrolase Weges aus *H. volcanii*, d.h. RDH, RNL, RAD, KDRDH und DKDRH, als rekombinante Enzyme biochemisch charakterisiert. Dazu wurden die kodierenden Gene in den Vektor pTA963 kloniert und die rekombinanten Proteine in *H. volcanii* H1209 homolog überexprimiert. Die Proteine wurden anschließend über Nickel-Affinitätschromatographie und Größenausschlusschromatographie bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Der Reinheitsgrad wurde dabei mittels SDS-PAGE überprüft. Anschließend standen die rekombinanten Enzyme zur Charakterisierung der molekularen und kinetischen Eigenschaften zur Verfügung (Tabelle 9).

Rhamnose Dehydrogenase. Die RDH wurde als homotetrameres Enzym mit einem nativen Molekulargewicht von 113 kDa gereinigt. Das Enzym katalysierte die NAD^+ -abhängige Oxidation von L-Rhamnose mit einer spezifischen Aktivität von 71,0 U/mg und apparenten K_m -Werten von 2,7 mM für Rhamnose und 0,4 mM für NAD^+ (Abbildung 21). Mit NADP^+ als Elektronenakzeptor konnte keine Aktivität nachgewiesen werden. Das Enzym katalysierte auch die NAD^+ -abhängige Oxidation von L-Lyxose und L-Mannose mit V_{\max} -Werten von 35,2 U/mg bzw. 31,2 U/mg und K_m -Werten von 34,8 mM bzw. 94,4 mM. Daraus ergibt sich, dass die katalytische Effizienz der RDH für L-Rhamnose 26- bzw. 80-fach höher ist als für L-Lyxose bzw. L-Mannose. Andere Zucker wie die Hexosen D-Glucose, D-Fruktose und D-Galactose, der Desoxy-Zucker L-Fucose und die Pentosen D-Ribose, D-Xylose sowie L- und D- Arabinose wurden von der RDH nicht oxidiert.

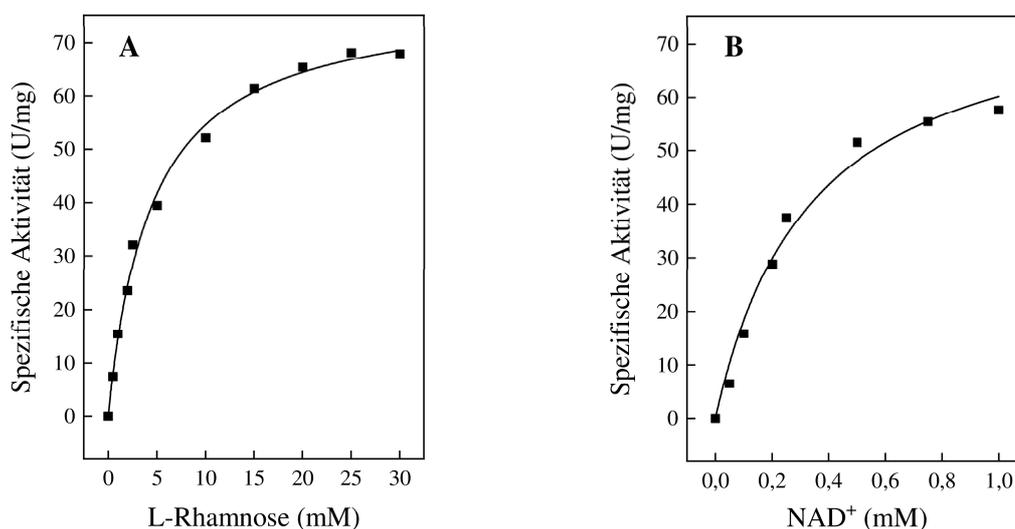


Abbildung 21 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der rekombinanten Rhamnose Dehydrogenase aus *H. volcanii* von der Konzentration an Rhamnose (A) und NAD^+ (B).

Rhamnonolactonase. Das native Molekulargewicht der RNL wurde über die Ausschlusschromatographie mit 134 kDa bestimmt und die SDS-PAGE ergab eine Größe der Untereinheiten von 35,1 kDa, woraus sich ein homotetramerer Aufbau des Enzyms ergibt. Die Aktivität der Lactonase wurde mit Hilfe des p-Nitrophenol Tests analysiert, wobei die bei der Hydrolyse der Lactone freiwerdenden Protonen als Ansäuerung der Ansätze nachgewiesen werden. Die RNL aus *H. volcanii* war hochspezifisch für L-Rhamnono- δ -Lacton mit einem V_{\max} -Wert von 1543 U/mg und einem K_m -Wert von 4,2 mM (Abbildung 22). Mit dem Substrat L-Rhamnono- γ -Lacton konnte keine Aktivität nachgewiesen werden. Auch andere Zucker-Lactone

wie L-Arabino- γ -Lacton, D-Xylono- γ -Lacton, D-Glucono- δ -Lacton, D-Ribono- γ -Lacton und D-Galactono- γ -Lacton wurden von der RNL nicht umgesetzt.

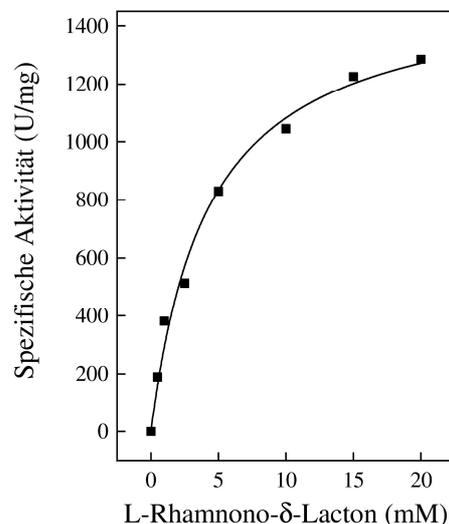


Abbildung 22 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der rekombinanten L-Rhamnonolactonase aus *H. volcanii* von der Konzentration an L-Rhamnono- δ -Lacton.

Rhamnonat Dehydratase. Für die RAD wurde ein natives Molekulargewicht von 349 kDa bestimmt und die Größe einer Untereinheit beträgt 46 kDa, woraus sich ein homooctamerer Aufbau des Enzyms ableiten lässt. Die RAD katalysierte die Dehydratisierung von L-Rhamnonat zu KDR mit apparenten V_{\max} - und K_m -Werten von 5,2 U/mg und 7,1 mM (Abbildung 23A). Die Aktivität des Enzyms war abhängig von divalenten Kationen und für $MgCl_2$ wurde ein apparenter K_m -Wert von 0,24 mM bestimmt (Abbildung 23B). Das Enzym zeigte keine Aktivität mit anderen Zuckersäuren wie D-Xylonat, D-Ribonat, L-Arabinonat, D-Gluconat, D-Galactonat und D-Galacturonsäure.

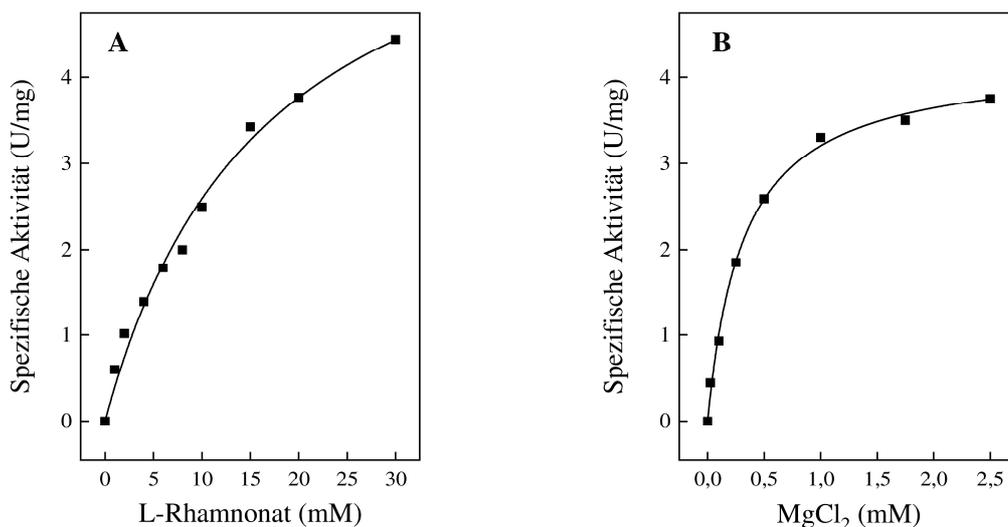


Abbildung 23 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der rekombinanten L-Rhamnonat Dehydratase aus *H. volcanii* von den Konzentrationen an L-Rhamnonat (A) und MgCl₂ (B).

2-Keto-3-Desoxyrhamnonat Dehydrogenase. Die KDRDH wurde als Protein mit einer homooligomeren Struktur aus vier Untereinheiten und einem nativen Molekulargewicht von 139 kDa gereinigt. Das Enzym katalysierte die Oxidation von KDR mit einem V_{\max} -Wert von 5,4 U/mg und einem K_m -Wert von 0,66 mM (Abbildung 24A). Das Enzym war spezifisch für den Elektronenakzeptor NAD⁺ und zeigte keine Aktivität mit NADP⁺. Für NAD⁺ wurde ein K_m -Wert von 0,55 mM bestimmt (Abbildung 24B).

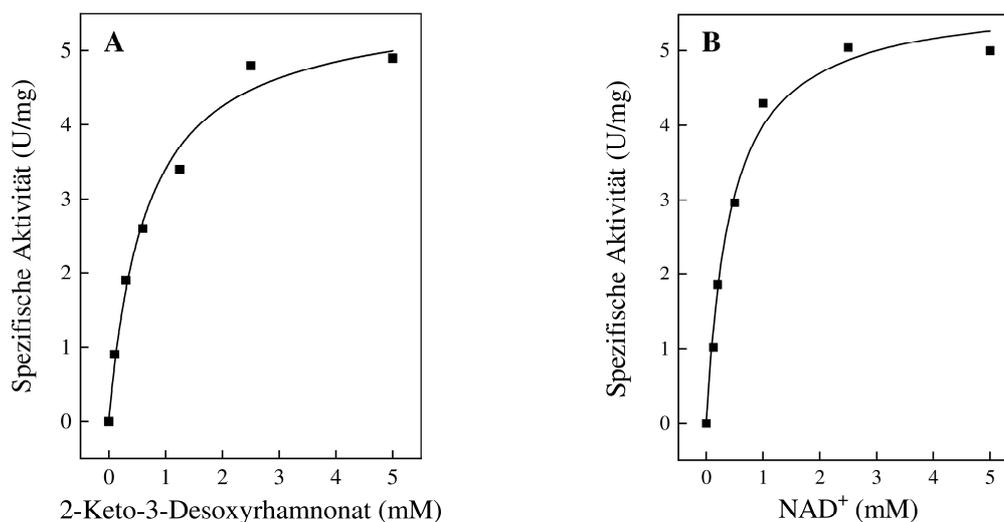


Abbildung 24 Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der rekombinanten KDR Dehydrogenase aus *H. volcanii* von den Substratkonzentrationen an KDR (A) und NAD⁺ (B).

2,4-Diketo-3-Desoxyrhamnonat Hydrolase. Die DKDRH wurde als homohexameres Enzym mit einem nativen Molekulargewicht von 173 kDa charakterisiert. Die Enzymaktivität der DKDRH wurde in einem diskontinuierlichen, gekoppelten Test untersucht, indem DKDR über die NAD⁺-abhängige Oxidation von KDR durch die KDRDH aus *H. volcanii* gebildet und anschließend von der DKDRH in Pyruvat und L-Lactat gespalten wurde. Zu ausgewählten Zeiten wurden Proben der Reaktionsansätze genommen, die Reaktion gestoppt und für HPLC-Analysen eingesetzt. Es zeigte sich, dass die Konzentration an KDR über die Zeit abnahm und das Produkt L-Lactat gebildet wurde (Abbildung 25). Die gebildete Menge an L-Lactat konnte mittels einer Eichung der HPLC-Säule mit unterschiedlichen L-Lactat-Konzentrationen bestimmt und daraus die spezifische Aktivität der DKDRH mit 0,5 U/mg ermittelt werden.

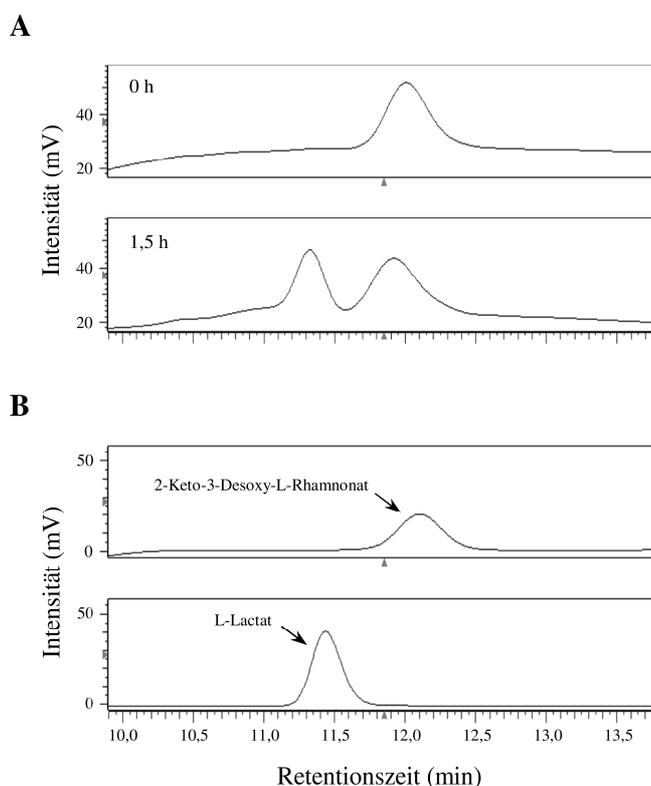


Abbildung 25 Umsetzung von KDR zu L-Lactat durch die KDRDH und DKDRH aus *H. volcanii*. (A) Zeitabhängige Bildung von L-Lactat aus KDR durch die KDRDH und DKDRH. Dargestellt sind die Chromatogramme zu Beginn der Reaktion und nach 1,5 h. (B) Chromatogramme der Standards (je 10 mM) von L-Lactat und KDR. Retentionszeiten der Standards: L-Lactat (~ 11,3 min), KDR (~ 12,0 min). In Kontrollansätzen ohne DKDRH konnte keine Bildung von L-Lactat nachgewiesen werden.

Tabelle 9 Molekulare und kinetische Eigenschaften der rekombinanten Enzyme des Diketo-Hydrolase Weges aus *H. volcanii*. Die kinetischen Eigenschaften wurden bei 42 °C analysiert. Die Überbestimmung des Molekulargewichts der Untereinheiten der RDH, RAD, KDRDH und DKDRH ist vermutlich die Folge des hohen Anteils an sauren Aminosäuren in diesen Enzymen (15-21 %), so wie es bereits für andere halophile Proteine gezeigt wurde (Johnsen *et al.*, 2009). N.b., nicht bestimmt; Standardabweichungen wurden aus Triplikaten kalkuliert.

	RDH	RNL	RAD	KDRDH	DKDRH
Holoenzym (kDa)	111,3 ± 1,8	134	349 ± 27,4	139 ± 8,0	173 ± 17
Apparente molekulare Masse der Untereinheit (kDa)	40,1 ± 6,0	35,1 ± 2,0	54,8 ± 1,4	46,6 ± 0,3	45,5 ± 1,5
Kalkulierte molekulare Masse der Untereinheit (kDa)	28	33	46	37	30
Oligomerisierung	α_4	α_4	α_8	α_4	α_6
Spezifische Aktivität (U/mg)	71,0 ± 2,8	1543	5,2 ± 0,6	5,4 ± 0,7	0,5
Apparenter K_m -Wert (mM)	2,7 ± 0,3 (Rhamnose)	4,2 (Rhamnono- δ -Lacton)	7,1 ± 1,8 (Rhamnonat)	0,66 (KDR)	n.b.
	0,4 ± 0,04 (NAD ⁺)	-	0,24 ± 0,03 (MgCl ₂)	0,55 (NAD ⁺)	-

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die *rhc*-Gene von *H. volcanii* für die funktionellen Enzyme RDH, RNL, RAD, KDRDH und DKDRH eines Diketo-Hydrolase Weges kodieren und bei Wachstum auf Rhamnose transkriptionell induziert werden. Wachstumsanalysen mit Deletionsmutanten ergaben eine essentielle Beteiligung der Enzyme am Rhamnose-Katabolismus in *H. volcanii*.

5.2.1.3 RhcR ist ein Transkriptionsaktivator der Gene des Rhamnose-Katabolismus

Die bisherigen Untersuchungen haben gezeigt, dass alle Gene des *rhc*-Genclusters bei Wachstum auf Rhamnose transkriptionell induziert werden, was auf eine gemeinsame transkriptionelle Regulation hindeutet. Innerhalb des *rhc*-Genclusters liegt das Gen *rhcR*, das für den putativen Transkriptionsregulator RhcR kodiert (Abbildung 16).

Expression und Reinigung von RhcR. RhcR wurde in *H. volcanii* homolog überexprimiert und mittels Nickel-Affinitätschromatographie und Größenausschlusschromatographie als 47 kDa Protein gereinigt. Mittels SDS-PAGE wurde ein Molekulargewicht der Untereinheit von 28 kDa bestimmt. Das spricht für eine homodimere Struktur von RhcR.

Deletion von *rhcR*. Um eine Beteiligung von RhcR am Rhamnose-Abbau zu untersuchen, wurde eine $\Delta rhcR$ Mutante generiert, die Deletion mittels Southern-Blot Analysen überprüft und das Wachstum der Mutante auf Glucose und Rhamnose analysiert (Abbildung 26). Die Deletion von *rhcR* führte zu einem vollständigen Verlust des Wachstums von *H. volcanii* auf Rhamnose, welches durch eine *in trans* Komplementation mit *rhcR* wiederhergestellt werden konnte. Das Wachstum der Deletionsmutante auf Glucose war hingegen nicht beeinflusst. Diese Daten zeigen, dass *rhcR* essentiell für den Rhamnose-Abbau ist und deuten auf eine Funktion von RhcR als Transkriptionsaktivator der *rhc*-Gene hin.

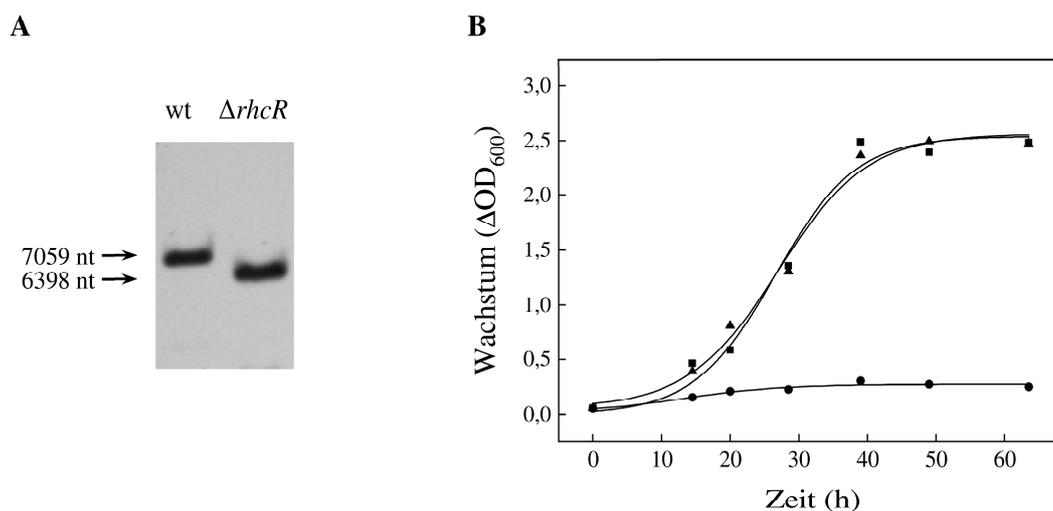


Abbildung 26 Southern-Blot zur Überprüfung der Gendeletion von *rhcR* und Wachstum der $\Delta rhcR$ Mutante von *H. volcanii* auf 20 mM Rhamnose. (A) Southern-Blot mit restriktionshydrolysiertem DNA aus dem Wildtyp (wt) und aus der Deletionsmutante $\Delta rhcR$. (B) Dargestellt ist das Wachstum von $\Delta rhcR$ (●) im Vergleich zum Wildtyp (■) und zur $\Delta rhcR$ Mutante die mit *rhcR* *in trans* komplementiert wurde (▲). Die Vorkulturen wurden mit 1 % Casaminsäuren als Kohlenstoffquelle gezüchtet.

RhcR aktiviert die Transkription der *rhc*-Genen. Um eine Funktion von RhcR als Transkriptionsaktivator der *rhc*-Gene zu prüfen, wurde die Transkription von *rhc*-Genen in der $\Delta rhcR$ Mutante im Vergleich zum Wildtyp untersucht. Zur Gewinnung von Zellmasse für die Transkriptionsanalysen wurde der Wildtyp und der $\Delta rhcR$ Stamm in Medium mit 5 mM Glucose als Energie- und Kohlenstoffquelle bis zur stationären Phase angezogen ($OD_{600} \approx 1$). Beim Erreichen der stationären Phase wurde die Transkription der *rhc*-Gene durch die Zugabe von 5 mM Rhamnose zu den Kulturen induziert. Vor Zugabe von Rhamnose sowie 2 Stunden nach Zugabe wurde die Bildung von Transkripten der *rhc*-Gene mittels RT-PCR oder Northern-Blots analysiert. In Glucose-gewachsenen Zellen des Wildtyps und der $\Delta rhcR$ Mutante wurden keine Transkripte von *rhc*-Genen nachgewiesen. Nach Induktion mit Rhamnose zeigte sich im Wildtyp die Bildung von Transkripten der *rhc*-Gene (Abbildung 27).

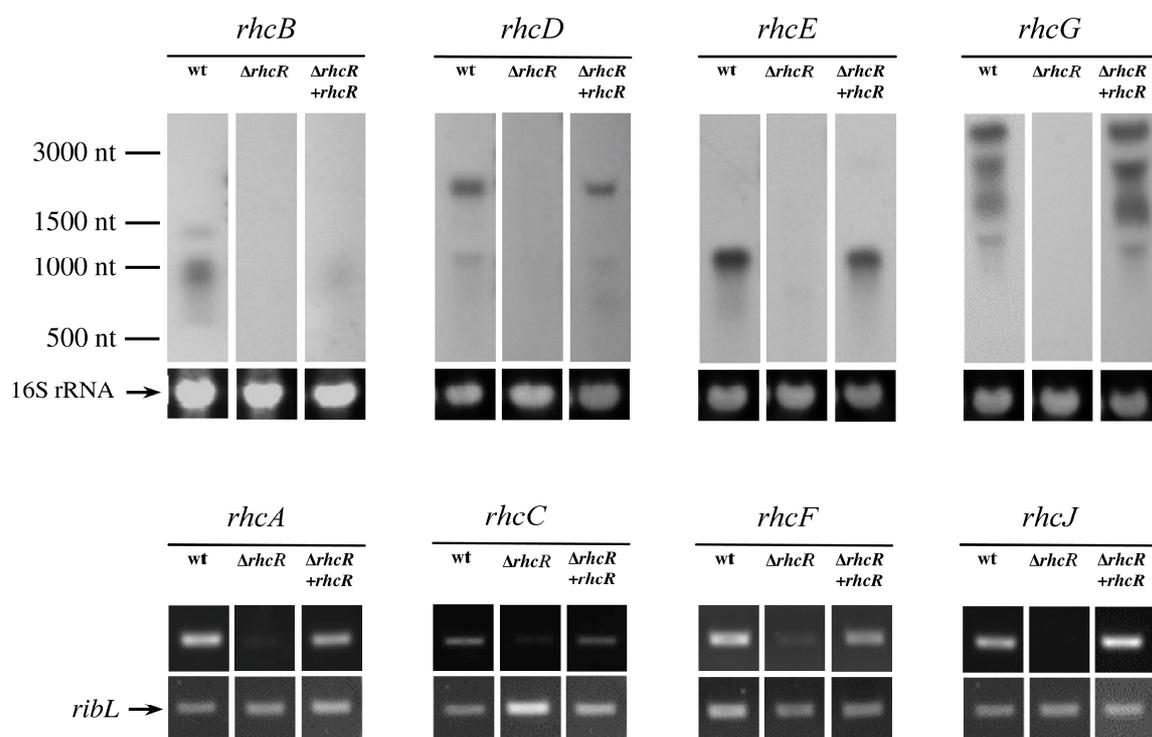


Abbildung 27 Transkriptionsanalysen der *rhc*-Gene in *H. volcanii* (wt), der Deletionsmutante von *rhcR* ($\Delta rhcR$) und der *in trans* komplementierten Deletionsmutante. Die Zellen wurden auf 5 mM Glucose gezüchtet und beim Erreichen der stationären Phase 5 mM Rhamnose zu den Kulturen gegeben. Die Bildung von Transkripten der *rhc*-Gene wurde 2 Stunden nach Rhamnose-Zugabe in Zellen des Wildtyps (wt), der $\Delta rhcR$ Mutante ($\Delta rhcR$) und der komplementierten Deletionsmutante ($\Delta rhcR + rhcR$) analysiert. Die Transkripte von *rhcB*, *rhcD*, *rhcE* und *rhcG* wurden mittels Northern-Blot nachgewiesen, wobei die 16S rRNA zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung des Gels mit RNA diente. Die Transkriptionsanalysen von *rhcA* (287 nt), *rhcC* (574 nt), *rhcF* (389 nt) und *rhcJ* (303 nt) erfolgte mittels RT-PCR und spezifischen Primern. Die Größe der jeweiligen PCR-Produkte sind in den Klammern angegeben. Als Kontrolle wurde das konstitutiv exprimierte ribosomale Protein *ribL* (Fragmentgröße 337 nt) verwendet (Brenneis *et al.*, 2007).

Im Gegensatz dazu wurde in der $\Delta rhcR$ Mutante keine Transkription der *rhc*-Gene nachgewiesen (Abbildung 27). Um zu prüfen, ob die fehlende transkriptionelle Induktion der *rhc*-Gene nur auf die Deletion von *rhcR* zurückzuführen ist, wurde $\Delta rhcR$ mit *rhcR* *in trans* komplementiert und der Nachweis erbracht, dass in dem komplementierten Stamm die *rhc*-Gene nach Zugabe von Rhamnose transkribiert werden (Abbildung 27). Diese Ergebnisse zeigen, dass RhcR als Transkriptionsaktivator aller *rhc*-Gene des Rhamnose-Transports sowie des Diketo-Hydrolase Weges fungiert.

RhcR wird nicht Rhamnose-spezifisch transkribiert. Die Transkription von *rhcR* wurde mittels RT-PCR Experimenten analysiert, wobei vergleichbare Transkriptmengen in Rhamnose-, Glucose- und Casaminsäure-gewachsenen Zellen nachgewiesen wurden (Abbildung 28). Damit scheint *rhcR* konstitutiv exprimiert zu werden, im Gegensatz zu den *rhc*-Genen der Rhamnose-Aufnahme und des Rhamnose-Abbaus, für die eine Rhamnose-spezifische Transkription gezeigt wurde.

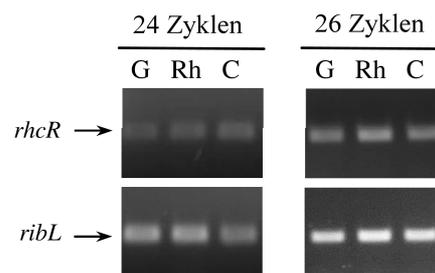


Abbildung 28 Transkriptionsanalysen von *rhcR* aus *H. volcanii*. Die RT-PCR Experimente wurden mit DNase verdauter RNA aus Glucose (G)-, Rhamnose (Rh)- und Casaminsäuren-gewachsenen Zellen durchgeführt. Die Amplifikation von *rhcR* (Fragmentgröße 306 nt) aus cDNA erfolgt mit 24 und 26 PCR-Zyklen. Als Kontrolle wurde das konstitutiv exprimierte ribosomale Protein *ribL* (Fragmentgröße 337 nt) verwendet.

5.2.1.3.2 KDR ist ein Signalmolekül von RhcR

Die bisherigen Ergebnisse sprechen dafür, dass ein Signalmolekül die Funktion von RhcR als Transkriptionsaktivator induziert. Deshalb wurde die Interaktion von RhcR mit möglichen Liganden *in vitro* mittels Temperatur Shift Assays untersucht. Dazu wurde RhcR in Ansätzen mit Rhamnose oder Intermediaten des Diketo-Hydrolase Weges versetzt und die Schmelzkurven von RhcR zwischen 25 °C und 95 °C aufgezeichnet (Tabelle 10). Die Zugabe von KDR führte zu einem Anstieg der Schmelztemperatur von RhcR um ca. 3 °C. Hingegen konnte mit L-Rhamnose, L-Rhamnono- δ -Lacton und L-Rhamnonat kein Anstieg der Schmelztemperatur nachgewiesen werden. 2-Keto-3-Desoxy-D-Gluconat, welches eine ähnliche Struktur wie KDR aufweist,

erhöhte ebenfalls nicht die Schmelztemperatur von RhcR. Diese Daten deuten darauf hin, dass KDR spezifisch mit RhcR interagiert.

Tabelle 10 Schmelztemperatur von RhcR in Abhängigkeit von potentiellen Liganden. Die Temperatur Shift Assays wurden mit 1 μ M RhcR und 1 mM der potenziellen Liganden von RhcR durchgeführt. Die Schmelztemperatur (T_m) von RhcR ohne Ligand wurde mit $37,5 \pm 0,1$ °C bestimmt. ΔT_m gibt die Verschiebung der Schmelztemperatur von RhcR in Anwesenheit der Liganden an.

Ligand	ΔT_m (°C)
L-Rhamnose	+ 0,7 \pm 0,15
L-Rhamnono- δ -Lacton	+ 0,1 \pm 0,06
L-Rhamnonat	0,0 \pm 0,02
2-Keto-3-Desoxy-L-Rhamnonat	+ 3,2 \pm 0,12
2-Keto-3-Desoxy-D-Gluconat	- 1,1 \pm 0,31

Außerdem wurde in *in vivo* Analysen geprüft, ob die Transkription der *rhc*-Gene abhängig von KDR ist. Dazu wurde die Transkriptbildung in der RAD-Deletionsmutante ($\Delta rhcD$) untersucht, in der kein KDR gebildet wird und mit dem Wildtyp verglichen. Der Wildtyp und der $\Delta rhcD$ Stamm wurden zunächst mit 5 mM Glucose gezüchtet, beim Erreichen der stationären Phase die Transkription der *rhc*-Gene durch Zugabe von 5 mM Rhamnose induziert und nach zwei Stunden die Transkription von *rhc*-Genen mittels Northern-Blot Analysen untersucht. Anders als im Wildtyp, konnte dabei in der $\Delta rhcD$ Mutante keine Transkriptbildung von *rhcA*, *rhcB*, *rhcC* und *rhcF*, den kodierenden Genen der Rhamnose Mutarotase, Rhamnose Dehydrogenase, Rhamnonolactonase und 2,4-Diketo-3-Desoxyrhamnonat Hydrolase, sowie von *rhcJ*, dem kodierenden Gen der Nukleotidbindedomäne des ABC-Transporters, nachgewiesen werden (Abbildung 29). In der KDRDH-Deletionsmutante ($\Delta rhcE$), in der KDR akkumuliert und die Bildung von DKDR verhindert wird, wurden die *rhc*-Gene hingegen transkribiert (Abbildung 29). Das lässt darauf schließen, dass KDR das Signalmolekül von RhcR ist.

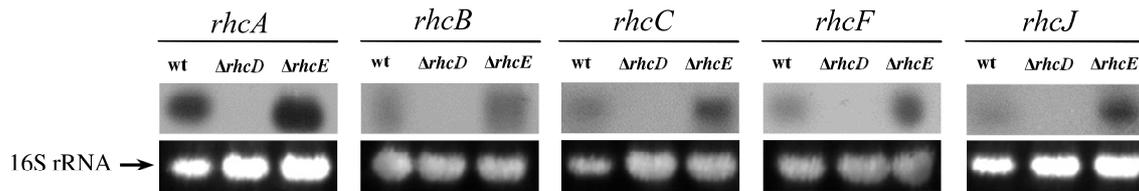


Abbildung 29 Transkriptionsanalysen der *rhc*-Gene in *H. volcanii* (wt) sowie in den Deletionsmutanten von *rhcD* und *rhcE*. Die Zellen des Wildtyps (wt) sowie der $\Delta rhcD$ und $\Delta rhcE$ Mutante wurden auf Glucose angezogen und beim Erreichen der stationären Phase 5 mM Rhamnose zu den Kulturen gegeben. Die Transkription von *rhcA*, *rhcB*, *rhcC*, *rhcF* und *rhcJ* wurde zwei Stunden nach Rhamnose-Zugabe mittels Northern-Blot Analysen untersucht. Die 16S rRNA diente zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung mit RNA.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass RhcR der Transkriptionsaktivator der *rhc*-Gene des Rhamnose-spezifischen ABC-Transporters und der Enzyme des Diketo-Hydrolase Weges ist. Die Funktion von RhcR als Transkriptionsaktivator ist dabei abhängig von KDR als Signalmolekül.

5.2.1.4 Lactate utilization proteins sind am Rhamnose-Abbau beteiligt

Rhamnose wird von *H. volcanii* über den Diketo-Hydrolase Weg zu den Produkten Pyruvat, ein zentrales Intermediat des Stoffwechsels, und L-Lactat abgebaut. Die Umsetzung von L-Lactat als Produkt des Diketo-Hydrolase Weges ist bisher nicht aufgeklärt. Im Genom von *H. volcanii* wurden zwei Gene identifiziert, *lutB* (HVO_1692) und *lutC* (HVO_1693), die für Proteine mit einer hohen Sequenzähnlichkeit zu Untereinheiten der *lactate utilization proteins* (Lud-Proteine) kodieren. Lud-Proteine sind für wenige Bacteria wie *Bacillus subtilis* beschrieben und katalysieren vermutlich die Oxidation von L-Lactat zu Pyruvat (Chai *et al.*, 2009). Um zu prüfen, ob die *lut*-Gene aus *H. volcanii* am Rhamnose-Abbau beteiligt sind, wurden *lutB* und *lutC* chromosomal deletiert, die erfolgreiche Deletion mittels Southern-Blot verifiziert und das Wachstum der Doppelmutante auf Rhamnose mit dem des Wildtyps verglichen (Abbildung 30A). Im Vergleich zum Wildtyp zeigte die Deletionsmutante ein vermindertes Wachstum mit einer deutlich reduzierten Verdopplungszeit und erreichte eine geringere Dichte (Abbildung 30A). Eine *in trans* Komplementation der Doppelmutante mit *lutBC* konnte das Wachstum auf Rhamnose wieder vollständig herstellen.

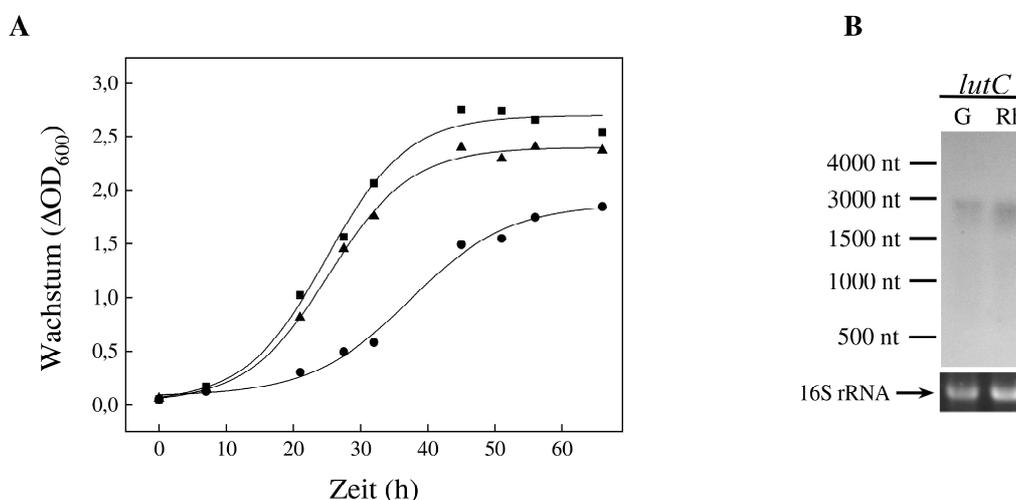


Abbildung 30 Wachstum einer $\Delta lutBC$ Mutante auf 20 mM Rhamnose und Transkription der *lut*-Gene aus *H. volcanii*. (A) Wachstum der $\Delta lutBC$ Mutante (●) im Vergleich zum Wildtyp (■) und des mit *lutBC* komplementierten $\Delta lutBC$ -Stammes (▲). Die Vorkulturen wurden in Medium mit 1 % Casaminsäuren angezogen. Das Wachstum der $\Delta lutBC$ -Mutante auf Glucose war im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert. (B) Northern-Blot Analysen mit RNA aus Glucose (G)- und Rhamnose (Rh)-gewachsenen Zellen. Die verwendete Sonde war spezifisch für *lutC*. Als Kontrolle der gleichmäßigen Beladung mit RNA diente die 16S rRNA.

Diese Daten deuten darauf hin, dass die Lud-Proteine aus *H. volcanii* am Rhamnose-Abbau beteiligt sind, wobei sie vermutlich die Oxidation von L-Lactat zu Pyruvat katalysieren. Weiterhin wurde die Transkription der *lut*-Gene aus *H. volcanii* mittels Northern-Blot Analysen und einer spezifischen Sonde gegen *lutC* untersucht. Es wurden vergleichbare Transkriptmengen in Rhamnose- und Glucose gewachsenen Zellen nachgewiesen, wobei die Transkriptgröße von 2704 Nukleotiden der Länge eines Cotranskripts aus *lutB* und *lutC* entspricht (2706 Nukleotide, Abbildung 30B). Das spricht gegen eine Rhamnose-spezifische Transkription der *lut*-Gene aus *H. volcanii*.

5.2.2 Abbau von Rhamnose in hyperthermophilen Crenarchaeota

Neben *H. volcanii* sind Gene eines Diketo-Hydrolase Weges in der Domäne der Archaea bisher nur für das thermoacidophile Euryarchaeon *Thermoplasma acidophilum* postuliert (Kim *et al.*, 2012). In der vorliegenden Arbeit wurden Genomanalysen durchgeführt, um zu prüfen, ob weitere Archaea Gene eines Diketo-Hydrolase Weges für den Abbau von Rhamnose aufweisen. Dabei wurden die putativen Gene eines Diketo-Hydrolase Weges in den Genomen zweier hyperthermophiler Crenarchaeota der Ordnung Thermoproteales identifiziert, in *Vulcanisaeta distributa* und in *Caldivirga maquilingensis* (Abbildung 31). Neben Organismen der Thermoproteales wurden auch in den Genomen einiger Vertreter der Ordnung Sulfolobales, zum Beispiel in *Sulfolobus solfataricus* und *Sulfolobus islandicus*, homologe Gene eines Diketo-Hydrolase Weges nachgewiesen (Abbildung 31). Das spricht dafür, dass diese Archaea ebenfalls den Diketo-Hydrolase Weg für den Abbau von Rhamnose verwenden. Außerdem konnten in den Genomen der genannten Archaea Gene identifiziert werden, die für Homologe zu Lud-Proteinen kodieren und die an der Oxidation von L-Lactat zu Pyruvat beteiligt sein könnten.

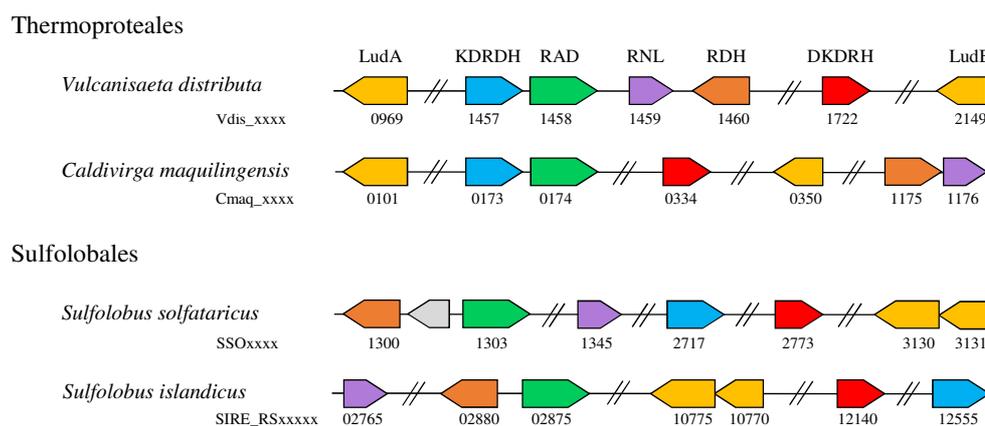


Abbildung 31 Putative Gene des Rhamnose-Abbaus über einen Diketo-Hydrolase Weg in hyperthermophilen Crenarchaeota. Homologe Gene sind in derselben Farbe dargestellt: Rhamnose Dehydrogenase (orange), Rhamnonolactonase (lila), Rhamnonat Dehydratase (grün), 2-Keto-3-Desoxyrhamnonat Dehydrogenase (blau), 2,4-Diketo-3-Desoxyrhamnonat Hydrolase (rot) und Lud-Proteine (gelb).

Im Folgenden werden Untersuchungen in den Crenarchaeota *S. solfataricus* und *V. moutnovskia* beschrieben, deren Ergebnisse auf eine Beteiligung des Diketo-Hydrolase Weges am Rhamnose-Abbau in diesen Organismen hindeuten. Dabei wurden Wachstumsversuche mit *S. solfataricus* auf Rhamnose durchgeführt und einzelne Gene transkriptionell untersucht. Außerdem wurden einzelne Enzyme des Rhamnose-Abbaus aus *S. solfataricus* und *V. moutnovskia* biochemisch analysiert.

5.2.2.1 Der Diketo-Hydrolase Weg in *Sulfolobus solfataricus* und *Vulcanisaeta distributa*

Abbau von L-Rhamnose in *Sulfolobus solfataricus*

S. solfataricus wurde bei 72 °C in Medium mit 0,75 g/l Hefeextrakt und 10 mM Rhamnose als C-Quelle gezüchtet. Die Zellen wuchsen mit einer Verdopplungszeit von 18,5 h bis zu einer maximalen optischen Dichte bei 600 nm von etwa 1,7 (Abbildung 32). Während des Wachstums wurde die Rhamnose vollständig verbraucht. In Abwesenheit von Rhamnose wuchs der Organismus auf dem Hefehintergrund des Mediums nur bis zu einer optischen Dichte von 0,51 (Abbildung 32).

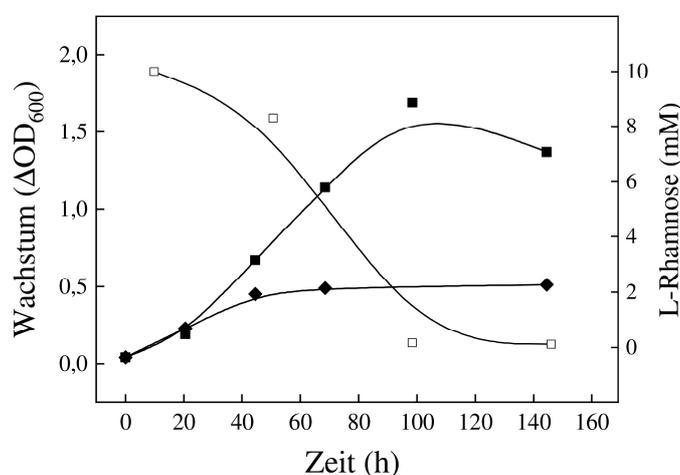


Abbildung 32 Wachstum von *S. solfataricus* in Medium mit 0,75 g/l Hefeextrakt und 10 mM Rhamnose. Dargestellt ist das Wachstum von *S. solfataricus* auf 10 mM Rhamnose (■) und die Rhamnose-Abnahme über die Zeit (□). Als Kontrolle wurden Zellen in Medium ohne Rhamnose kultiviert (◆). Die Vorkulturen wurden in Medium mit 0,75 g/l Hefeextrakt gezogen. Das Passagieren von *S. solfataricus* auf Rhamnose war nicht möglich.

Es wurde untersucht, ob während des Wachstums auf Rhamnose eine Rhamnose Dehydrogenase als erstes Enzym eines oxidativen Rhamnose-Abbauweges induziert ist. Dazu wurde die RDH-Aktivität in Rhamnose-gewachsenen Zellen bestimmt und mit der in Glucose-gewachsenen Zellen verglichen. Die RDH-Aktivität war in Rhamnose-gewachsenen Zellen 15-fach induzierte (87 mU/mg), was dafürspricht, dass *S. solfataricus* einen oxidativen Weg für den Abbau von Rhamnose verwendet.

Um einen ersten Hinweis zu erhalten, ob das kodierende Gen der putativen RDH, SSO1300, am Rhamnose-Abbau beteiligt ist, wurde dessen Transkription in Rhamnose und Glucose gewachsenen Zellen mittels Northern-Blot Analysen untersucht. Es wurde ein spezifisches Signal in Rhamnose gewachsenen Zellen nachgewiesen, dessen Transkriptgröße von 1128 Nukleotiden

mit der Länge des Genes SSO1300 (1050 Nukleotide) übereinstimmt (Abbildung 33). In genomischer Nähe zu SSO1300 ist der ORF SSO1303 als kodierendes Gen einer RAD annotiert (Abbildung 31). Northern-Blot Analysen ergaben, dass SSO1303 bei Wachstum auf Rhamnose ebenfalls transkribiert wird, wobei die Transkriptgröße von 1189 Nukleotiden der Gengröße von SSO1303 (1152 Nukleotide) entspricht (Abbildung 33). In Glucose gewachsenen Zellen konnten hingegen keine Transkripte von SSO1300 und SSO1303 nachgewiesen werden. Die Rhamnose-spezifische Transkription deutet auf eine Beteiligung von SSO1300 und SSO1303 am Rhamnose-Abbau in *S. solfataricus* hin.

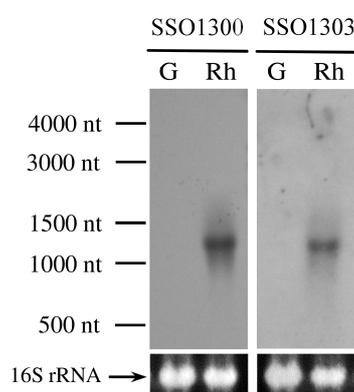


Abbildung 33 Transkription der Gene SSO1300 und SSO1303, die für RDH und RAD aus *S. solfataricus* kodieren. Abgebildet ist ein Northern-Blot mit RNA aus Zellen, die auf Glucose (G)- oder Rhamnose (Rh)-gewachsen waren. Die verwendeten Sonden waren spezifisch für SSO1300 (links) und SSO1303 (rechts). Die Markierungen an der linken Seite entsprechen dem Größenstandard. Die gleichmäßige Beladung mit RNA wurde mit Hilfe der 16S rRNA abgeschätzt.

Die putative RDH aus *S. solfataricus* wurde außerdem als rekombinantes Enzym biochemisch analysiert (Tabelle 10). Dazu wurde das Gen SSO1300 in den Vektor pET19b kloniert und das rekombinante Protein in *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS überexprimiert. Anschließend wurde die RDH mittels Hitzefällung, Nickel-Affinitätschromatographie und Größenausschlusschromatographie als homotetrameres Enzym mit einem apparenten Molekulargewicht von 144,7 kDa gereinigt. Die RDH katalysierte die NADP⁺-abhängige Oxidation von L-Rhamnose mit einer spezifischen Aktivität von 21,1 U/mg und einem K_m-Wert von 0,2 mM für Rhamnose (Abbildung 35). Das Enzym katalysierte auch die NADP⁺-abhängige Oxidation von L-Fucose und D-Arabinose. Mit den Substraten D-Glucose und D-Galactose konnte keine Aktivität nachgewiesen werden.

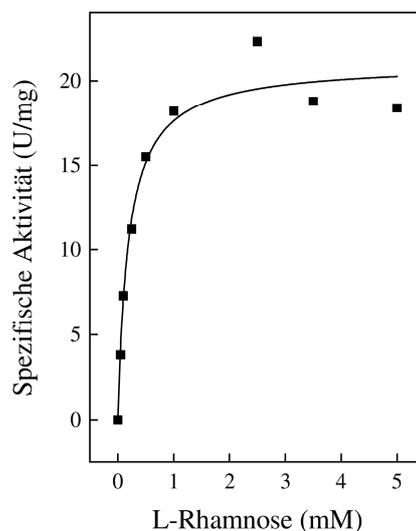


Abbildung 34 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der RDH aus *S. solfataricus* von der Konzentration an Rhamnose.

Tabelle 10 Molekulare und kinetische Eigenschaften der rekombinanten Enzyme des Rhamnose-Abbaus aus *Sulfolobus solfataricus* und *Vulcanisaeta distributa*. Die kinetischen Eigenschaften wurden bei 72 °C bestimmt. N.b., nicht bestimmt; ^a gemessen mit 0,5 mM KDR und 5 mM NAD⁺.

Eigenschaften	<i>S. solfataricus</i>		<i>V. distributa</i>	
	RDH	RDH	RAD	KDRDH
Holoenzym (kDa)	144,7	128,9	N.b.	131,4
Apparente molekulare Masse der Untereinheit (kDa)	40,3	36,1	45,6	37,6
Kalkulierte molekulare Masse der Untereinheit (kDa)	37,9	37,9	43,9	37,2
Oligomerisierung	α_4	α_4	N.b.	α_4
Spezifische Aktivität (U/mg)	21,1	104	0,98	0,22 ^a
Apparenter K_m (mM)	0,2	1,1	1,2	n.b.
	(Rhamnose)	(Rhamnose)	(Rhamnonat)	
	/	3,2 (NAD ⁺)	/	/

Abbau von L-Rhamnose in *Vulcanisaeta distributa*

Die kodierenden Gene der hypothetischen RDH, RAD und KDRDH aus *V. distributa* wurden in Vektoren der pET-Serie kloniert, in *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS überexprimiert und die rekombinanten Enzyme nach säulenchromatographischer Reinigung im Hinblick auf ihre kinetischen Eigenschaften untersucht (Tabelle 10).

Rhamnose Dehydrogenase. Für die RDH wurde ein natives Molekulargewicht von 128,9 kDa bestimmt und die Größe einer Untereinheit beträgt 37,9 kDa, was auf einen homotetrameren Aufbau des Enzyms hindeutet. Das Enzym katalysierte die NAD^+ -abhängige Oxidation von L-Rhamnose mit einem V_{\max} -Wert von 104 U/mg. Für Rhamnose wurde ein apparenter K_m -Wert von 1,1 mM und für NAD^+ von 3,2 mM ermittelt (Abbildung 35). Mit dem Desoxy-Zucker L-Fucose, den Hexosen D-Glucose, D-Fructose und D-Galactose und den Pentosen D-Arabinose, D-Xylose und D-Ribose zeigte das Enzym keine Aktivität.

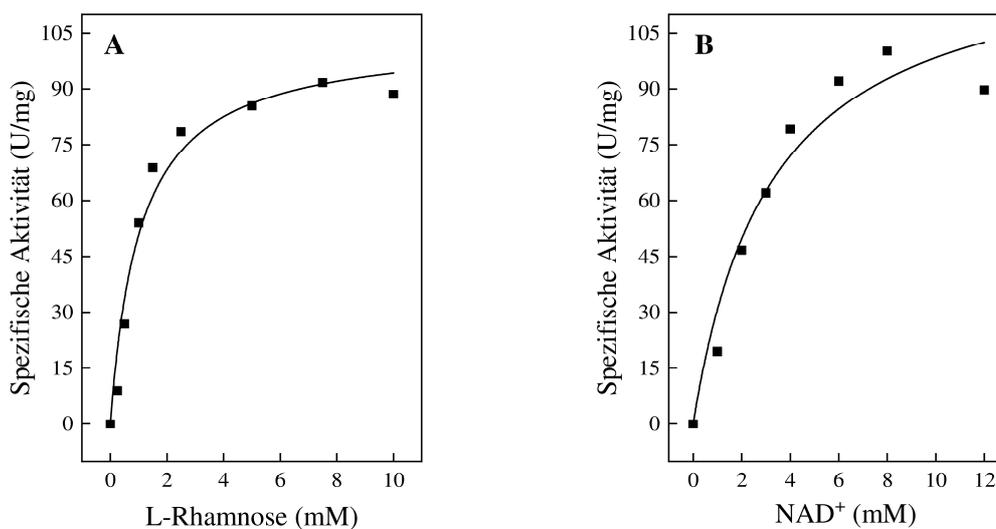


Abbildung 35 Abhängigkeit der Enzymaktivität der RDH aus *V. distributa* von der Konzentration an L-Rhamnose (A) und NAD^+ (B).

Rhamnonat Dehydratase. Die RAD katalysierte die Dehydratisierung von L-Rhamnonat zu KDR mit apparenten V_{\max} - und K_m -Werten für Rhamnonat von 0,98 U/mg und 1,2 mM (Abbildung 36). Das Enzym zeigte keine Aktivität mit den Zuckersäuren D-Gluconat, D-Galactonat, D-Xylonat, D-Arabinonat und D-Ribonat.

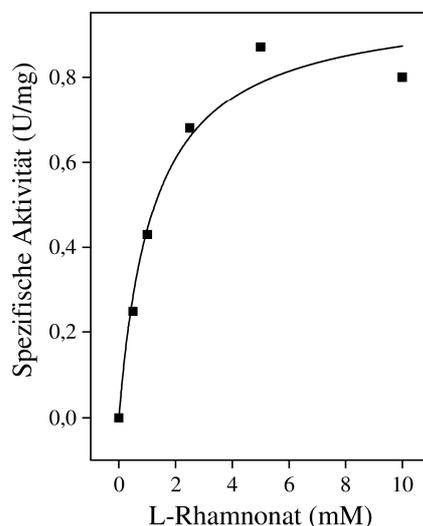


Abbildung 36 Spezifische Aktivität der RAD aus *V. distributa* in Abhängigkeit von der Konzentration an L-Rhamnonat.

KDR Dehydrogenase. Die KDRDH aus *V. distributa* wurde als homotetrameres Enzym mit einem denaturierten Molekulargewicht von 131,4 kDa gereinigt. Die Aktivität des Enzyms wurde in Ansätzen mit 0,5 mM KDR untersucht. Die KDRDH katalysierte die NAD^+ -abhängige Oxidation von KDR mit einer spezifischen Aktivität von 0,22 U/mg.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die hyperthermophilen Crenarchaeota *S. solfataricus* und *V. moutnovskia* Rhamnose vermutlich über einen Diketo-Hydrolase Weg zu Pyruvat und Lactat abbauen. So verfügen beide Organismen über katalytisch aktive Enzyme eines Diketo-Hydrolase Weges. Außerdem wurde für *S. solfataricus* gezeigt, dass der Organismus mit Rhamnose als Energie- und Kohlenstoffquelle wächst und dass dabei einzelne Gene des Rhamnose-Abbaus Rhamnose-spezifisch transkribiert werden.

6 Diskussion

Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse zur allosterischen Regulation von archaeellen Pyruvat Kinasen und im Anschluss die erzielten Daten über den Abbau von Rhamnose in halophilen sowie hyperthermophilen Archaea diskutiert.

6.1 Pyruvat Kinasen aus Archaea

6.1.1 Allosterische Regulation

Ausgangspunkt dieser Arbeit war, dass für die PK aus *P. aerophilum*, einem Vertreter der Thermoproteales, eine allosterische Aktivierung mit dem neuartigen Effektor 3-Phosphoglycerat (3PG) nachgewiesen wurde (Solomons *et al.*, 2013). Außerdem wurde ein Modell für die Bindung von 3PG im allosterischen Zentrum aufgestellt und für fünf Aminosäuren eine Beteiligung an der 3PG-Bindung gezeigt (Solomons *et al.*, 2013).

Sequenzanalysen dieser Arbeit ergaben, dass auch die PKs aus weiteren Vertretern der Ordnung Thermoproteales, aus *P. islandicum*, *T. uzoniensis* und *C. maquilingensis*, alle fünf Reste für eine 3PG-Bindung aufweisen und mit Hilfe biochemischer Analysen wurde die allosterische Aktivierung dieser PKs mit 3PG nachgewiesen. Außerdem wurde für diese Enzyme mittels ortsspezifischer Mutageneseexperimente die Beteiligung der konservierten Reste an der 3PG-Bindung bestätigt. Hingegen wurden die PKs aus *V. moutnovksia*, ein weiterer Organismus der Thermoproteales, und aus dem Aigarchaeon *Cand. C. subterraneum*, ein naher Verwandter der Thermoproteales, nicht mit 3PG allosterisch aktiviert, was in Übereinstimmung mit dem Fehlen einzelner Reste für die 3PG-Bindung ist. Damit ergab sich, dass ein vollständiges Bindemotiv aus fünf konservierten Aminosäuren eine Voraussetzung für die 3PG-Aktivierung von PKs ist.

Weiterhin wurden in dieser Arbeit die PKs aus dem Korarchaeon *Cand. K. cryptofilum* und den hyperthermophilen Euryarchaeota *P. furiosus* und *T. kodakarensis* auf ihre allosterische Regulierbarkeit untersucht und gezeigt, dass diese Enzyme weder mit 3PG noch mit Zuckerphosphaten allosterisch aktiviert werden. Für die PKs aus zwei hyperthermophilen, methanogenen Archaea der Methanococcales, aus *M. jannaschii* und *M. villosus*, konnte überraschenderweise eine allosterische Regulierbarkeit mit AMP, dem klassischen Effektor der PKs aus Bacteria, nachgewiesen werden. Dagegen zeigten die PKs aus den mesophilen methanogenen Archaea *M. maripaludis* und *M. acetivorans* keinen allosterischen Effekt mit AMP. In Untersuchungen der Arbeitsgruppe Schönheit konnte gezeigt werden, dass die PKs aus den mesophilen methanogenen Archaea *Methanosarcina mazei* und *Methanospirillum hungatei* ebenfalls nicht mit AMP allosterisch aktiviert werden. Somit scheint sich das Vorkommen einer

allosterischen Regulierbarkeit mit AMP innerhalb der methanogenen Archaea auf hyperthermophile Organismen der Ordnung Methanococcus zu beschränken. Neuere Untersuchungen ergaben, dass neben den PKs aus hyperthermophilen methanogenen Archaea auch die PKs aus den beiden halophilen Euryarchaeota *H. volcanii* und *Haloarcula marismortui* eine allosterische Aktivierung mit AMP aufweisen (Arbeitsgruppe Schönheit). Neben den genannten archaeellen PKs wurden bisher auch die PKs aus den hyperthermophilen Archaea *A. pernix* und *D. kamchatkensis* aus der Ordnung der Desulfurococcales sowie die PKs aus den thermoacidophilen Archaea *P. torridus*, *S. solfataricus* und *T. acidophilum* untersucht und gezeigt, dass diese weder mit 3PG noch mit FBP oder AMP allosterisch aktiviert werden (Johnsen *et al.*, 2003)(AG Schönheit).

6.1.2 Sequenzanalysen von 3PG-, FBP- und AMP-aktivierten PKs

Phylogenetische Verwandtschaft von allosterisch aktivierten PKs

In Zusammenarbeit mit Giddy Landan und Fernando Tria (Arbeitsgruppe Dagan) wurden die in dieser Arbeit untersuchten PKs mit weiteren PKs auf ihre phylogenetische Verwandtschaft hin untersucht, um die Evolution der allosterischen Regulierbarkeit von PKs näher zu verstehen. Dazu wurde ein phylogenetischer Baum mit den Sequenzen von 3PG-, FBP- und AMP-aktivierten PKs aus Eukarya, Bacteria und Archaea erstellt (Abbildung 37). Der Stammbaum wurde mit Hilfe der *Maximum-Likelihood* Methode konstruiert und zeigt hohe Bootstrap-Werte, was für eine hohe Qualität spricht. Außerdem konnte mit Hilfe der kürzlich entwickelten *minimal ancestor deviation* (MAD) Methode die Wurzel des Baumes bestimmt werden (Tria *et al.*, 2017). Die Auswertung des phylogenetischen Baumes lässt dabei folgende Schlussfolgerungen zu:

1. In direkter Nähe zur Wurzel des Baumes befinden sich ausschließlich PKs aus hyperthermophilen Archaea und keine PKs aus Bacteria, weshalb PKs vermutlich in hyperthermophilen Archaea entstanden sind (Abbildung 37). LUCA, als letzter gemeinsamer Vorfahre von Archaea und Bacteria, hätte folglich keine PK besessen, was in Übereinstimmung mit der postulierten chemolithotrophen Lebensweise von LUCA ist (Weiss *et al.*, 2016). Die PKs aus Bacteria stammen demnach von den PKs aus Archaea ab und wurden über einen lateralen Gentransfer in die Domäne der Bacteria übertragen.
2. Der phylogenetische Baum bildet von der Wurzel ausgehend zwei distinkte Gruppen (Abbildung 37). In der Ausbildung dieser beiden Gruppen spiegeln sich zwei unabhängige Entwicklungslinien der allosterischen Regulation von PKs wider. Eine Gruppe stellt die

Entwicklungslinie von 3PG-aktivierten PKs dar und umfasst die 3PG-aktivierten PKs aus Thermoproteales sowie die nicht-regulierten PKs aus Desulfurococcales und *Cand. C. subterraneum*. Die allosterische Regulation mit 3PG ist demnach in den PKs aus hyperthermophilen Crenarchaeota entstanden. Die zweite Gruppe spiegelt die Entwicklungslinie der allosterischen Regulation von PKs mit Zuckerphosphaten (FBP und AMP) wider. Zu dieser Gruppe gehören neben den nicht-allosterisch regulierten PKs aus thermoacidophilen sowie aus mesophilen methanogenen Archaea auch die AMP-aktivierten PKs aus hyperthermophilen methanogenen Archaea sowie die Zuckerphosphat-aktivierten PKs aus Bacteria und Eukarya.

3. Die in dieser Arbeit charakterisierten AMP-aktivierten PKs aus Methanococcales bilden in der Entwicklungslinie der Zuckerphosphat-aktivierten PKs die tiefste Abzweigung allosterisch regulierter PKs (Abbildung 37). Das deutet auf eine Entstehung der allosterischen Regulation mit AMP in den PKs hyperthermophiler methanogener Archaea hin. Dabei stellen diese archaeellen AMP-aktivierten PKs vermutlich den Vorläufer der AMP-aktivierten PKs aus Bacteria dar und wurden über einen lateralen Gentransfer von Archaea in die Domäne der Bacteria übertragen. Interessanterweise befindet sich im phylogenetischen Baum die AMP-aktivierte PK aus dem hyperthermophilen Bakterium *T. maritima* in enger phylogenetischer Nähe zu den AMP-aktivierten PKs aus Methanococcales, was ein Hinweis für einen lateralen Gentransfer der PK von Methanococcales zu den Thermotogales ist. Ein lateraler Gentransfer von *M. jannaschii* zu *T. maritima* ist bereits für eine Vielzahl an Genen beschrieben (Nelson *et al.*, 1999).
4. Die AMP-regulierten PKs aus den Haloarchaea *H. volcanii* und *H. marismortui* befinden sich im Stammbaum in phylogenetischer Nähe zu den AMP-aktivierten PKs aus Bacteria, was ein Hinweis für einen lateralen Gentransfer dieser PKs aus Bacteria zu Haloarchaea ist (Abbildung 37). Diese Vermutung ist in Übereinstimmung mit bioinformatischen Analysen, die einen massiven horizontalen Gentransfer bakterieller Gene in die Haloarchaea postulieren (Nelson-Sathi *et al.*, 2012).
5. Die FBP-aktivierten PKs sowohl von Bacteria als auch von Eukarya entspringen aus einem gemeinsamen Ast innerhalb der AMP-aktivierten PKs aus Bacteria (Abbildung 37). Demnach haben sich die FBP-aktivierten PKs beider Domänen aus den AMP-aktivierten PKs der Bacteria entwickelt. Die Abstammung der eukaryotischen PKs von Bacteria ist in Übereinstimmung mit der Endosymbiontentheorie, wonach der Ursprung der eukaryotischen PKs auf einen endosymbiontischen Gentransfer aus dem Mitochondrium in den Kern zurückzuführen ist (Martin *et al.*, 2015).

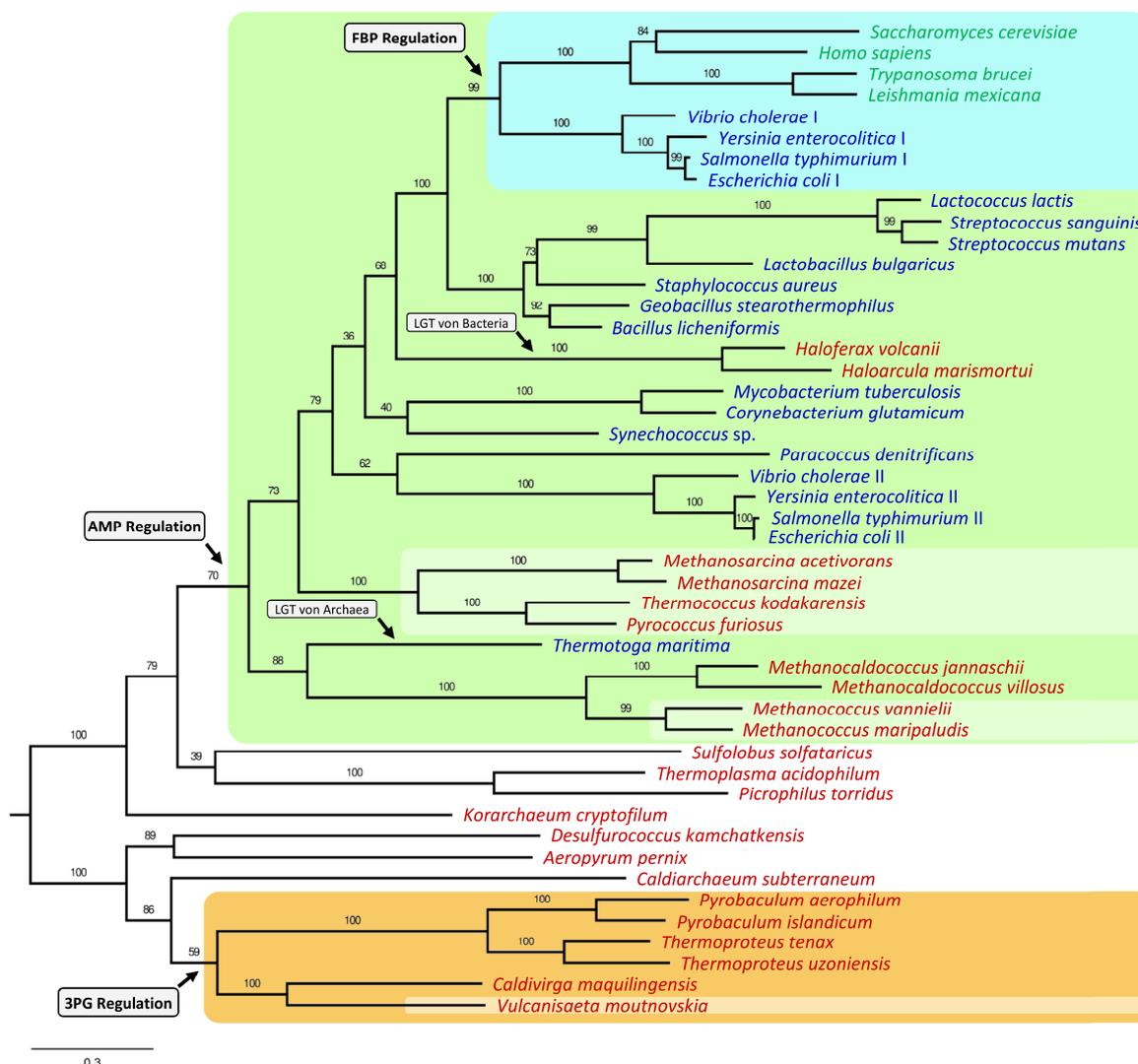


Abbildung 37 Phylogenetische Verwandtschaft von PKs aus Archaea, Bacteria und Eukarya. Der phylogenetische Baum wurde in Zusammenarbeit mit Giddy Landan und Fernando Tria (Arbeitsgruppe Dagan) mit der *Maximum Likelihood* Methode konstruiert und mit der *minimal ancestor deviation* Methode die Wurzel des Baumes bestimmt (Tria *et al.*, 2017). Die Zahlen an den Ästen geben die Bootstrap-Werte an. Farbige Kästen illustrieren die allosterischen Effektoren der analysierten PKs: FBP in cyan, AMP in grün und 3PG in orange. Die Domänen-Zuordnung der Organismen ist durch farbige Artnamen dargestellt: Eukarya in grün, Bacteria in blau und Archaea in rot. LGT: Lateraler Gentransfer. UniProt-Nummern: *Trypanosoma brucei* (P30615), *L. mexicana* (Q27686), *S. cerevisiae* (P00549), *Human M2* (P14618), *Vibrio cholerae* Isoenzym 1 (Q9KUN0), *Vibrio cholerae* Isoenzym 2 (Q9KQJ0), *Yersinia enterocolitica* Isoenzym 1 (A1JPB0), *Yersinia enterocolitica* Isoenzym 2 (A1JRG5), *Salmonella typhimurium* Isoenzym 1 (P77983), *Salmonella typhimurium* Isoenzym 2 (Q8ZNW0), *E. coli* Isoenzym 1 (P0AD61), *E. coli* Isoenzym 2 (P21599), *Lactobacillus bulgaricus* (P34038), *Streptococcus sanguinis* (F2CE05), *Streptococcus mutans* (Q8DTX7), *Lactococcus lactis* (Q07637), *Staphylococcus aureus* (Q6GG09), *Geobacillus stearothermophilus* (Q02499), *Bacillus licheniformis* (P51181), *Synechococcus* PCC 6301 (A0A0H3K2W0), *M. tuberculosis* (P9WKE5), *Paracoccus denitrificans* (A1B4C4), *Corynebacterium glutamicum* (Q46078), *T. maritima* (Q9WY51), *H. volcanii* (D4GUB6), *H. marismortui* (Q5V4I8), *T. kodakarensis* (Q76I93), *P. furiosus* (Q8U1L8), *M. acetivorans* (Q8TJ98), *M. mazei* (Q8PYY4), *Methanococcus vannielii* (A6UQP9), *M. maripaludis* (Q6LWU9), *M. jannaschii* (Q57572), *T. acidophilum* (P32044), *P. torridus* (Q6L281), *S. solfataricus* (Q97ZD7), *K. cryptofilum* (B1L381), *A. pernix* (Q9YEU2), *Desulfurococcus kamchatkensis* (B8D638), *T. uzoniensis* (AG Schönheit, nicht veröffentlicht), *Thermoproteus tenax* (AG Schönheit, nicht veröffentlicht), *P. aerophilum* (Q8ZYE0), *P. islandicum* (A1RTJ5), *C. maquilingsis* (A8MCB5), *V. moutnovskia* (F0QTY3), *C. subterraneum* (E6N6B7).

Aminosäuresequenzvergleich von PKs

Für einen weiteren Vergleich von unterschiedlich allosterisch aktivierten PKs, wurde ein Aminosäuresequenzvergleich mit der 3PG-aktivierten PK aus *P. aerophilum*, der AMP-aktivierten PK aus *M. jannaschii* sowie mit ausgewählten FBP- und AMP-aktivierten PKs aus Bacteria und Eukarya durchgeführt (Abbildung 38).

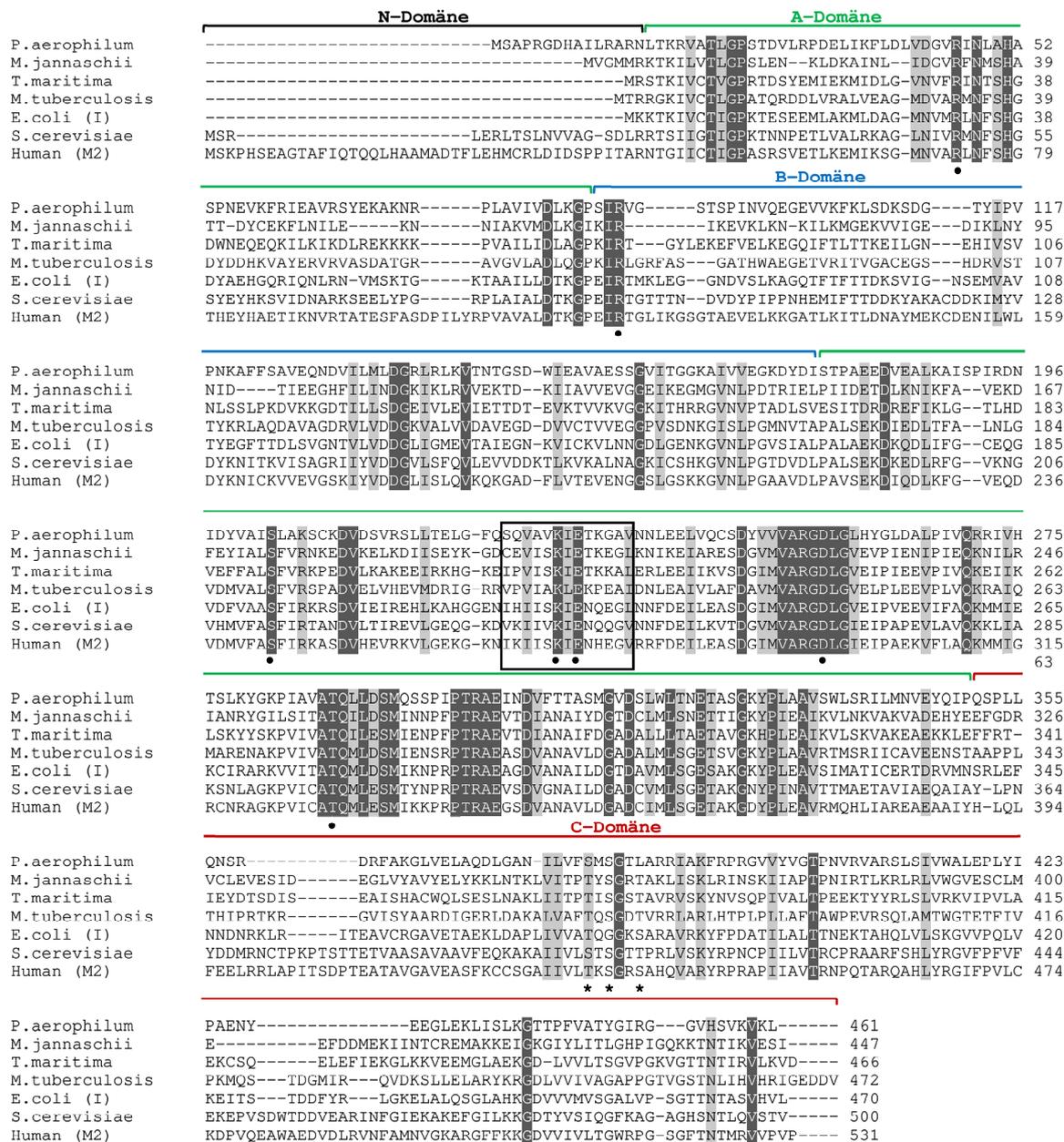


Abbildung 38 Aminosäuresequenzalignment von PKs aus Eukarya, Bacteria und Archaea. Die PK-Konsensussequenz [LIVAC]-x-[LIVM](2)-[SPACV]-K-[LIV]-E-[NKRST]-x-[DEQHS]-[GSTA]-[LIVM] ist in allen PKs konserviert und durch einen Kasten gekennzeichnet. Die an der Katalyse beteiligten Aminosäuren der PK aus *S. cerevisiae* sind durch Kreise markiert (Jurica *et al.*, 1998). Die an der Bindung des 6'-Phosphates von FBP beteiligten Reste in der C-Domäne der PK aus *S. cerevisiae* sind mit Sternen markiert (Jurica *et al.*, 1998). Die Einteilung der Proteindomänen erfolgte auf der Grundlage der Kristallstruktur der PK aus *S. cerevisiae* (Jurica *et al.*, 1998). Die NCBI Accession-Nummern können Abbildung 37 entnommen werden.

Kristallstrukturen von PKs aus Bacteria (*M. tuberculosis*), Eukarya, (*S. cerevisiae*) und Archaea (*P. aerophilum*) haben ergeben, dass jede PK-Untereinheit aus einer A-, B- und C-Domäne besteht und dass die PKs aus Eukarya zusätzlich eine N-terminale N-Domäne aufweisen (Jurica *et al.*, 1998, Solomons *et al.*, 2013, Zhong *et al.*, 2017). Die C-Domäne enthält dabei das allosterische Zentrum, wohingegen die A-Domäne das katalytische Zentrum trägt und die B-Domäne an der Katalyse beteiligt ist. Das Alignment verdeutlicht die hohe Sequenzähnlichkeit der A- und B-Domänen (48-65 % Sequenzähnlichkeit; Abbildung 38). Anhand der Kristallstruktur der PK aus *S. cerevisiae* konnten innerhalb der A-Domäne eine Reihe von Aminosäuren identifiziert werden, die essentiell für die Katalyse sind (Jurica *et al.*, 1998). Das Alignment zeigt, dass diese Reste in allen PKs konserviert sind, so auch in den PKs der Archaea (Abbildung 38). Im Gegensatz zu den A- und B-Domänen weisen die C-Domänen eine geringe Sequenzähnlichkeit auf (32-45 %). Das ist in Übereinstimmung mit der allosterischen Aktivierung der PKs durch unterschiedliche Effektoren. Interessanterweise ist jedoch in der C-Domäne aller PKs ein Cluster von Serin- und Threonin-Resten mit leichten Abweichungen konserviert, für den in den FBP-, AMP- bzw. 3PG-aktivierten PKs aus *S. cerevisiae*, *M. tuberculosis* bzw. *P. aerophilum* eine Beteiligung an der Bindung des 6'-Phosphates von FBP, des 5'-Phosphates von AMP bzw. des 3'-Phosphates von 3PG gezeigt wurde (Jurica *et al.*, 1998, Solomons *et al.*, 2013, Zhong *et al.*, 2017)(Abbildung 38). Ein Vergleich der Kristallstrukturen der PKs aus *S. cerevisiae*, *M. tuberculosis* und *P. aerophilum* ergab, dass sich dieser Serin/Threonin-Cluster in seiner Position in den allosterischen Zentren der drei PKs überlagert (Abbildung 39). Somit scheinen PKs über eine homologe Phosphatbindestelle zu verfügen, die an der Bindung der Phosphatgruppen der unterschiedlichen Effektoren FBP, AMP bzw. 3PG beteiligt ist. Es kann spekuliert werden, dass diese Phosphatbindestelle der gemeinsame Ausgangspunkt für die Entwicklung der allosterischen Regulation von PKs durch die unterschiedlichen Effektoren war. Der Vergleich der allosterischen Zentren zeigt außerdem, dass in der PK aus *P. aerophilum* die Bindetasche für den Glyceratrest von 3PG eine gegenläufige Orientierung zur Bindetasche des Furanoserings der Zuckerphosphate AMP und FBP in den PKs aus *S. cerevisiae* und *M. tuberculosis* aufweist (Abbildung 39). Ein Grund für diese gegenläufige Orientierung könnte sein, dass in der PK aus *P. aerophilum* das für die 3PG-Bindung essentielle Tyrosin-428 den Bereich des allosterischen Zentrums blockiert, der in den PKs aus *S. cerevisiae* und *M. tuberculosis* den Furanosering von FBP bzw. AMP aufnimmt. Somit könnte der Tyrosinrest die Voraussetzung für die Entwicklung der 3PG-Bindetasche gewesen sein, indem dieser die Bindung von Zuckerphosphaten im allosterischen Zentrum verhinderte.

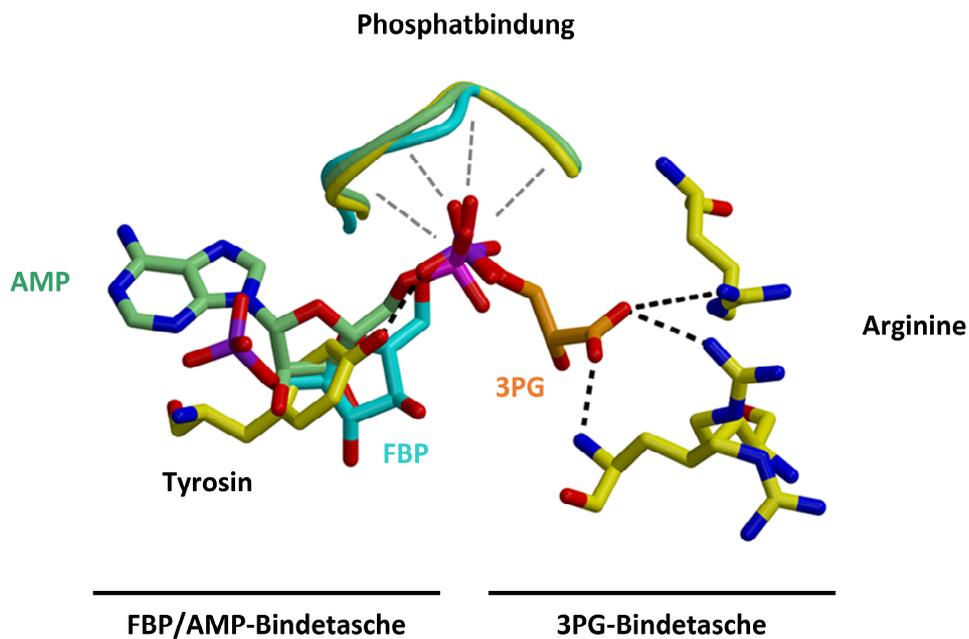


Abbildung 39 Schematische Darstellung der Effektorbindetaschen in den allosterischen Zentren der PKs aus *P. aerophilum*, *M. tuberculosis* und *S. cerevisiae*. Die Abbildung basiert auf einer Überlagerung der C-Domänen der Kristallstrukturen der PKs aus *P. aerophilum* (gelb), *M. tuberculosis* (grün) und *S. cerevisiae* (cyan) und wurde von Christopher Davies angefertigt. Das Schema zeigt, dass sich in den drei PKs die Bindestelle für die Phosphatgruppe von 3PG, AMP bzw. FBP in ihrer Position überlagert. Dagegen weisen die Bindetasche für den Glyceratrest von 3PG und die Bindetasche für den Furanosering von FBP bzw. AMP eine gegenläufige Orientierung auf. Die gebundenen allosterischen Effektoren sind farblich dargestellt: FBP in cyan, AMP in grün und 3PG in orange.

6.1.3 Regulation der archaeellen Glykolyse

In den klassischen EM-Wegen aus Bacteria und Eukarya stellen Enzyme die eine irreversible und energiekonservierende Reaktion katalysieren wichtige allosterische Kontrollpunkte zur Regulation der Geschwindigkeit dar (Abbildung 4). Zu diesen Enzymen gehören neben den Hexokinasen der Eukarya, insbesondere die ATP-abhängigen Phosphofruktokinasen (PFKs) und PKs. Die PFKs der meisten Bacteria gehören zur PFK-A Familie und werden in der Regel mit ADP inhibiert und mit PEP aktiviert. Für PFKs aus Eukarya sind neben ADP und PEP weitere allosterische Effektoren, unter anderem der positive Effektor Fructose-2,6-Bisphosphat, beschrieben. Die allosterische Aktivierung von PKs erfolgt in der Regel über die Zuckerphosphate AMP oder FBP. FBP wird im oberen Teil der Glykolyse von der PFK irreversibel gebildet, wodurch eine Akkumulation und dadurch eine Funktion von FBP als allosterischer Aktivator der PKs über eine sogenannte *feedforward* Regulation ermöglicht wird. Im Gegensatz zu den klassischen glykolytischen Abbauwegen aus Bacteria und Eukarya, weisen die modifizierten EM-Wege aus Archaea eine eingeschränkte allosterische Regulierbarkeit auf. So sind für Archaea ATP- und ADP-abhängige PFKs der PFK-B Familie sowie eine Pyrophosphat-abhängige PFK beschrieben, die, anders als die PFKs aus Bacteria und Eukarya, nicht mit ADP oder PEP allosterisch aktiviert werden (Siebers *et al.*, 1998, Tuininga *et al.*, 1999). Auch ergaben bisherige Untersuchungen mit archaeellen PKs, dass diese in der Regel nicht allosterisch aktiviert werden. Eine Ausnahme bilden die PKs aus Organismen der Ordnung Thermoproteales, die mit 3PG allosterisch aktiviert werden. Dadurch ergibt sich in den modifizierten EM-Wegen dieser Archaea ein allosterischer Kontrollpunkt.

Der Grund, weshalb 3PG als allosterischer Aktivator der PKs aus Thermoproteales fungiert, könnte mit dessen irreversibler Bildung in den modifizierten EM-Wegen der Thermoproteales zusammenhängen (Abbildung 40). Während Eukarya und Bacteria GAP in zwei reversiblen Reaktionen über eine GAP-DH und eine Phosphoglycerat-Kinase zu 3PG umsetzen, erfolgt in den modifizierten EM-Wegen der Thermoproteales die Umsetzung von GAP zu 3PG in einer Reaktion. So bildet *P. aerophilum* 3PG über eine GAP-Ferredoxin-Oxidoreduktase (GAPOR) durch einstufige, irreversible Oxidation von GAP (Reher *et al.*, 2007). *T. tenax* setzt GAP ebenfalls einstufig und irreversibel über eine nicht-phosphorylierende GAP-Dehydrogenase (GAPN) zu 3PG um (Brunner *et al.*, 1998). Die irreversible Bildung ermöglicht dabei eine intrazelluläre Akkumulation von 3PG und damit eine Funktion als allosterischer Regulator. Diese koordinierte Regulation mit 3PG, als irreversibel gebildeter Effektor, ist vergleichbar mit der allosterischen Aktivierung von PKs aus Bacteria und Eukarya mit FBP, dem Produkt der irreversiblen PFK. FBP ermöglicht dabei die koordinierte Regulation zwischen dem oberen und

dem unteren Teil des klassischen EM-Weges (Abbildung 40). Im Gegensatz dazu ermöglicht 3PG in den modifizierten EM-Wegen der Thermoproteales eine koordinierte Regulation des unteren Teiles der Stoffwechselwege auf Höhe von C3-Verbindungen (Abbildung 40). Die Bildung von 3PG in einer irreversiblen Reaktion scheint jedoch nicht zwingend in einer allosterischen Regulation von PKs mit 3PG zu resultieren. So bilden auch die Vertreter der Thermococcales *P. furiosus* und *T. kodakarensis* 3PG irreversibel über eine GAPOR, die Analysen dieser Arbeit haben jedoch ergeben, dass diese Enzyme nicht mit 3PG allosterisch aktiviert werden. Somit scheint sowohl eine irreversible Bildung von 3PG als auch das Vorhandensein eines vollständigen 3PG-Bindemotives die Voraussetzung für die allosterische Regulierbarkeit von PKs mit 3PG zu sein.

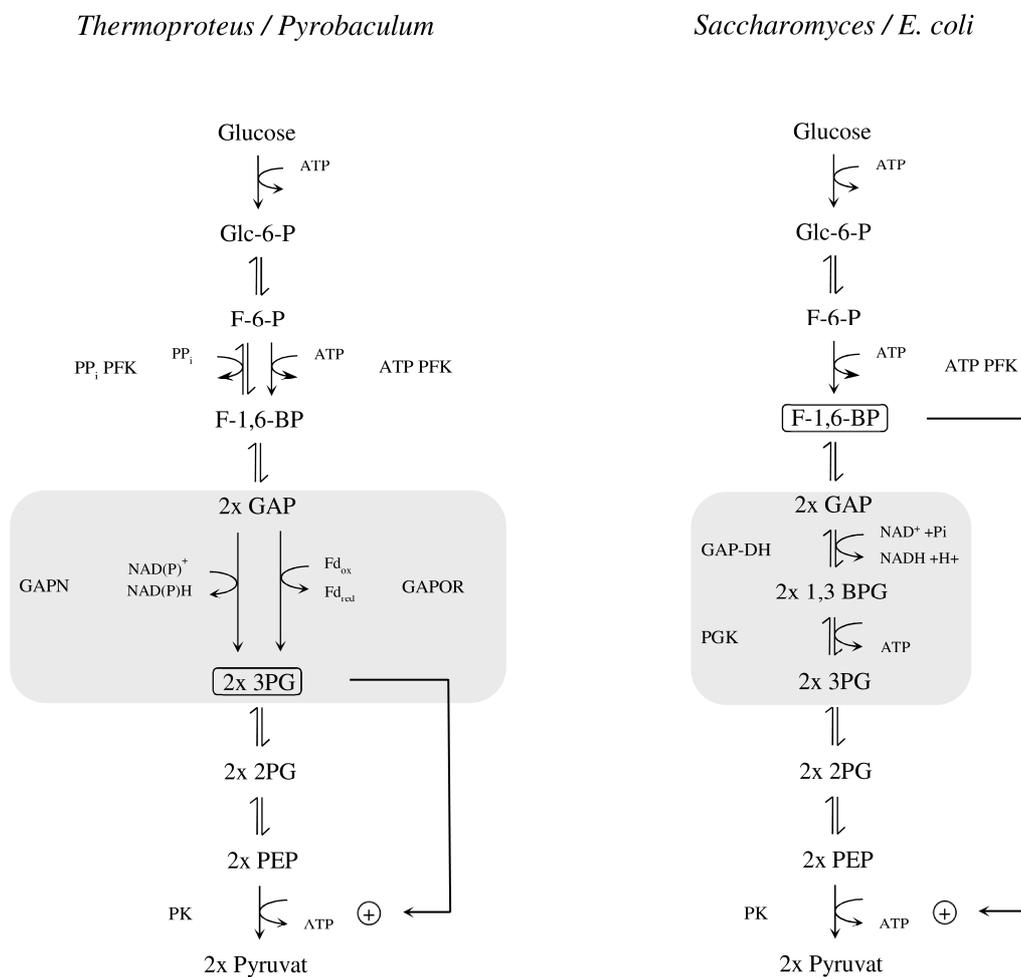


Abbildung 40 Die modifizierten EM-Wege aus *Thermoproteus* und *Pyrobaculum* im Vergleich zum klassischen EM-Weg aus *Saccharomyces* und *E. coli*. Die 3PG-bildenden Reaktionen sind durch Kästen hervorgehoben. Abkürzungen: Glc-6-P, Glucose-6-Phosphat; F-6-P, Fructose-6-Phosphat; F-1,6-BP, Fructose-1,6-Bisphosphat; GAP, Glycerinaldehyd-3-Phosphat; 1,3 BPG, 1,3-Bisphosphoglycerat; 3PG, 3-Phosphoglycerat; 2PG, 2-Phosphoglycerat; PEP, Phosphoenolpyruvat; PFK, Phosphofruktokinase; GAPN, nicht-phosphorylierende GAP-Dehydrogenase; GAPOR, GAP-Ferredoxin-Oxidoreduktase; GAP-DH, GAP-Dehydrogenase; PGK, Phosphoglycerat Kinase; PK, Pyruvat Kinase.

6.2 L-Rhamnose-Katabolismus in Archaea

6.2.1 Transport und Abbau von Rhamnose in *H. volcanii*

In der vorliegenden Arbeit wurde im Genom von *H. volcanii* ein *rhamnose catabolism* Gencluster (*rhc*-Gencluster) identifiziert und gezeigt, dass dieser für einen Rhamnose-spezifischen ABC-Transporter, für alle Enzyme des Abbaus von Rhamnose über einen Diketo-Hydrolase Weg sowie den Transkriptionsregulator RhcR kodiert, der alle *rhc*-Gene transkriptionell aktiviert. Zunächst sollen die Ergebnisse zum Rhamnose-Transport und -Abbau in *H. volcanii* sowie deren transkriptionelle Regulation diskutiert werden. Anschließend wird die Beteiligung von Lud-Proteinen am Rhamnose-Abbau erörtern.

6.2.1.1 Der ABC-Transporter der Rhamnose-Aufnahme

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Aufnahme von Rhamnose in *H. volcanii* über einen *ATP-Binding-Cassette*-Transporter (ABC-Transporter) erfolgt. Die Komponenten des Transporters werden von vier Genen kodiert, die im *rhc*-Gencluster liegen und die Rhamnose-spezifisch transkribiert werden. Mit Hilfe einer Deletionsmutante des Substratbindeproteins wurde die funktionelle Beteiligung des ABC-Transporters an der Rhamnose-Aufnahme nachgewiesen.

ABC-Transporter aus Archaea und Bacteria bestehen in der Regel aus fünf Domänen: einem extrazellulären Substratbindeprotein, zwei Transmembrandomänen (TMD) und zwei cytoplasmatischen Nukleotidbindedomänen (NBD). Innerhalb der Proteinfamilie der ABC-Transporter katalysieren vorwiegend zwei Subfamilien die Aufnahme von Zuckern: die *Carbohydrate Uptake Transporter* (CUT)-1 und die CUT-2 Subfamilie (Schneider, 2001). Diese Subfamilien werden über ihre Domänenorganisation und ihre NBD klassifiziert (Schneider, 2001). Der Rhamnose-spezifische ABC-Transporter aus *H. volcanii* weist die CUT1 typische Domänenorganisation aus einem extrazellulären Substratbindeprotein, einer heterodimeren TMD und einer homodimeren NBD auf. Um zu prüfen, ob auch die NBD des Rhamnose-ABC-Transporters aus *H. volcanii* (RhcJ) die CUT1 typischen Aminosäuresequenzeigenschaften aufweist, wurde RhcJ mit charakterisierten NBD der CUT1 Subfamilie verglichen (Abbildung 41). Dabei wurde in der N-terminalen Domäne von RhcJ ein konserviertes Walker A und Walker B Motiv identifiziert. Diese Motive sind charakteristisch für verschiedene ATP-hydrolysierende Enzyme wie F1-ATPasen, Tyrosin Kinasen und NBD und enthalten Reste, die an der Nukleotidbindung beteiligt sind (Walker *et al.*, 1982). In der C-terminalen Domäne konnte neben der ABC-Signatursequenz die für CUT1-Transporter typische Konsensussequenz (G-[IV]-

R-P-E-[DH]) nachgewiesen werden. Damit kann der Rhamnose ABC-Transporter aus *H. volcanii* der CUT1 Subfamilie zugeordnet werden (Schneider, 2001). Für eine Vielzahl archaeller Zuckertransporter ist ebenfalls eine Zugehörigkeit zur CUT1 Subfamilie gezeigt. So gehören die Disaccharid-Transporter aus *Thermococcus litoralis* und *Pyrococcus furiosus* der CUT1 Subfamilie an (Koning *et al.*, 2002, Xavier *et al.*, 1996). Zur CUT1 Subfamilie gehören auch archaelle Monosaccharid-Transporter wie der Glucose bzw. Arabinose Transporter aus *S. solfataricus* und der Xylose bzw. Arabinose Transporter aus *H. volcanii* (AG Schönheit) (Lubelska *et al.*, 2006). In Bacteria erfolgt der Transport von Monosacchariden hingegen meist über ABC-Transporter der CUT2 Subfamilie (Schneider, 2001). So ist für die Aufnahme von Rhamnose in *R. leguminosarum* ein ABC-Transporter beschrieben, der, anders als der Rhamnose-Transporter aus *H. volcanii*, zur CUT2 Subfamilie gehört (Richardson *et al.*, 2004). Für einige γ -Proteobacteria, zum Beispiel *E. coli*, ist eine Aufnahme von Rhamnose über einen Protonensympporter der Drug/Metabolite Transporter Superfamilie gezeigt (Muiry *et al.*, 1993).

	Walker A	
RhcJ	MTHLTVDGVTKIFGDPDKDGVVAVDDLDIDVEDGEFLVLLGPSGCCGKTTTLRMIGGLETPTSCEIRFDDV	70
TL_MALK	MAGVRLVDVWVVFGEVAVREMSLEVKDEGFMILLGPSGCCGKTTTLRMIAGLEEPSRGQIYIGDK	65
SS_GLCV	MVRIIVKNVSKVFKK---GKVVALDNVNIENGERFGILGPSGAGKTTFMRIIAGLDVVPSTCELYFDDR	67
EC_UGPC	MAGLKLQAVTKSWDG---KTQVIKPLTLDVADGEFIVMVGPSGCCGKSTLLRMVAGLIERVTEGDCICINDQ	66
RhcJ	VVND-----IKARNRDVAMVFDFFALYPHMTVRENLGFGLKREDNGMSTADVNERVEEVAATMLETEOLL	134
TL_MALK	LVADPEKGI FVPPKDRDIAMVFSYALYPHMTVYDNI AFPLKLR--KVPROEIQRVREVAELI GLTELL	133
SS_GLCV	LVASNGK-LIVPPEDRKIGMVFQI TWALYPNLTAFENI AFPLTNM--KMSKEEIRKRVEEVAKILD IHVVL	134
EC_UGPC	RVTE-----MEPKDRGIAMVFNALYPHMSVEENMAWGLKIR--GMGKQQAERVKEAARIL ELDGLL	128
	ABC Signatur	Walker B
RhcJ	NKKPACLSGGQQRVALGRAIIVREPRFLFFDEPLANLDAKLRKTMRT EIDELQSEVGI TSAYVTINQEEA	204
TL_MALK	NRKPRELSGGQQRVALGRAIVRKPQVFLMDEPLSNLDAKLRVRRMRAELKKLQRQLGVTITTYVTHDQVEA	203
SS_GLCV	NHFPRELSGGQQRVALARALVKDPSLLLLDEPF SNLDARMSARALVKEVQSRIGVTL LVVSHDPADI	204
EC_UGPC	KRRPRELSGGQQRVAMGRAIVRDPVAVFLFDEPLSNLDAKLRVQMRLELQQLHRRKTSLSLYVTHDQVEA	198
RhcJ	MTIADKIAVINDGALQQLGRPEEVFNEDANLFWAQVFGSPDMNIYDGVVEEAAA---DGVRVELDGVS-FE	270
TL_MALK	MIMGDRIA MNRGVLQOVGSPDEVDKPEANTFVAGF ICSPPMFLDAIVTEDEG----FVDFGEFRKLLLP	269
SS_GLCV	FAIADRVGLVKKLVQVCKPEDLYDNPVSIQVASLIG-EINELEGKVTNEG-----VVIGS--LR	262
EC_UGPC	MTLAQRVMVMNGEVAEQIETPEVEVYEKASLFWASFI GSPAMNLLTGRVNN----EGTHFELDGG--IA	261
	CUT1-Konsensussequenz	
RhcJ	LPSDAL-DAEVPVGGVNVCFRPQDFYQTGKRADGL-----TFDVDIRVIEPVGTKA---IVHGDGP--M	329
TL_MALK	DQFEVLGELGYVGREVIEGIRPEDLYDAMFAQVRVPGE--NLVRAVVEIVENLGSER---IVHLRVG--G	332
SS_GLCV	FPVSVS-----SDRAIIGIRPEDVVKLSKDVIKDDS-----WILVKGKVKVIGYQG--GLFRITITPLD	319
EC_UGPC	LPLNGG-YRQYACRKMTCIRPEHIALSS--QAEGC-----VPLVMDTLEILCADN---LAHRWC--E	317
RhcJ	GDVTAEIGEFHGLSACDTLSLSIAPEHVYLF EAETEALRKGRRIENRASVQSQSSESSESDGVEI	393
TL_MALK	VTFVGSFRSESRVREGVEVDVVFDMKKIHIFDKTTG-----KAIF-----	372
SS_GLCV	SEEEIFTYSDHP IHSCEEVLVYVRKDKIKVFEKN-----	353
EC_UGPC	QKLVVRLAHQERP TAGSTLWLHLFENQLHLF--DGETG--QRV-----	356
SS_GLCV	SEEEIFTYSDHP IHSCEEVLVYVRKDKIKVFEKN-----	353

Abbildung 41 Alignment der Nukleotidbindedomäne (NBD) des ABC-Transporters der Rhamnose-Aufnahme aus *H. volcanii* (RhcJ) mit ausgewählten NBD der CUT1 Subfamilie von Archaea und Bacteria. Das Walker A Motiv (PDOC00017), das Walker B Motiv (hhhhD, h: hydrophobe Aminosäure) sowie die ABC-Signatursequenz (LSGGQ[QRK]QR) und das für CUT1-Transporter spezifische Sequenzmotiv G-[IV]-R-P-E-[DH] sind durch einen Rahmen markiert (Schneider, 2001). *Haloferax volcanii* RhcJ, D4GPB1; *Thermococcus litoralis* Trehalose/Maltose Transporter (TL_MaK), Q9YGA6; *Sulfolobus solfataricus* D-Glucose Transporter (SS_GlcV), Q97UY8; *Escherichia coli* n-Glycerol-3-Phosphat Transporter (EC_UgpC), P10907.

6.2.1.2 Phylogenetische Einordnung der Enzyme des Diketo-Hydrolase Weges

Alle Enzyme des Diketo-Hydrolase Weges von *H. volcanii*, RhM, RDH, RNL, RAD, KDRDH und DKDRH, werden von dem *rhc*-Gencluster kodiert. Analysen dieser Arbeit ergaben, dass die Transkription dieser Gene bei Wachstum auf Rhamnose induziert ist, was auf eine Beteiligung am Rhamnose Abbau hindeutete. Bis auf die Rhamnose Mutarotase (RhM), konnte für alle Enzyme der Nachweis der funktionellen Beteiligung am Rhamnose-Abbau mit Hilfe der entsprechenden Deletionsmutanten in Wachstumsversuchen auf Rhamnose erbracht werden. Außerdem wurden die Enzyme des Diketo-Hydrolase Weges homolog in *H. volcanii* überexprimiert, gereinigt und charakterisiert. Im Folgenden sollen die Enzyme des Diketo-Hydrolase Weges aus *H. volcanii* mit beschriebenen Enzymen des Rhamnose-Abbaus aus Eukarya und Bacteria verglichen werden.

Rhamnose Mutarotase. Die Rhamnose-spezifische Transkription der RhM aus *H. volcanii* deutet auf eine Beteiligung des Enzyms am Abbau von Rhamnose hin. Dagegen ergaben Wachstumsexperimente mit einer RhM Deletionsmutante auf Rhamnose, dass diese kein verändertes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp zeigte. Eine Erklärung für das uneingeschränkte Wachstum der RhM Deletionsmutante auf Rhamnose könnte sein, dass die spontane Konfigurationsänderung der α - in die β -Konfiguration von Rhamnose schnell genug verläuft, um ein ungehindertes Wachstum der Mutante bei den gewählten Bedingungen zu ermöglichen. Basierend auf Sequenzanalysen wurde die RhM aus *H. volcanii* der Rhamnose-Mutarotase Familie zugeordnet, zu der auch die bisher charakterisierten RhMs aus *E. coli* und *R. leguminosarum* gehören (Richardson *et al.*, 2008, Ryu *et al.*, 2005). In Abbildung 42 ist ein Aminosäure-Sequenzalignment der RhM aus *H. volcanii* mit den charakterisierten RhMs aus *E. coli* und *R. leguminosarum* dargestellt. Die vorhergesagte Sekundärstruktur der RhM aus *H. volcanii* ist in Übereinstimmung mit der Sekundärstruktur der RhM aus *E. coli*, die auf der Kristallstruktur basiert. Außerdem sind die für die RhM aus *E. coli* identifizierten katalytischen Reste auch in der RhM aus *H. volcanii* konserviert. Das unterstützt die Annahme, dass die RhM aus *H. volcanii*, wie auch die RhM aus *E. coli*, die Umsetzung von α - in β -Rhamnose katalysiert.

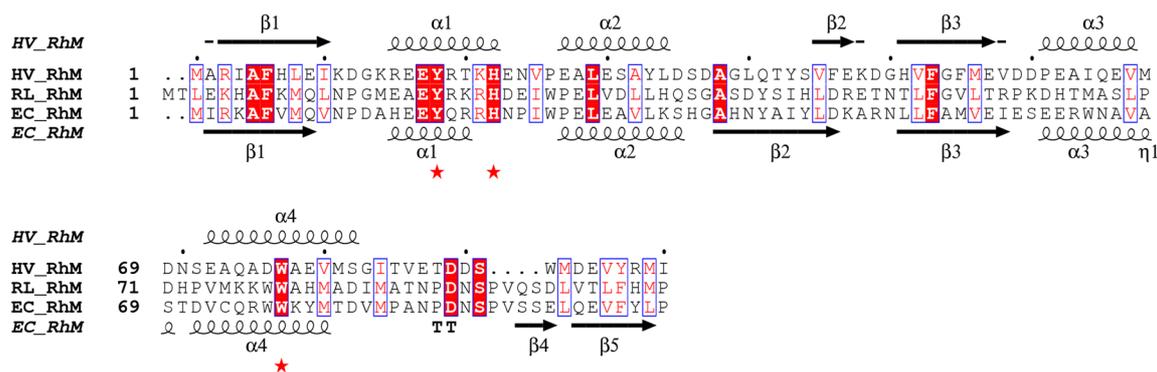


Abbildung 42 Aminosäure-Sequenzalignment der RhM aus *H. volcanii* mit charakterisierten RhMs aus *E. coli* und *R. leguminosarum*. Die an der Katalyse beteiligten Histidin- und Tyrosin-Reste der RhM aus *E. coli* sind durch rote Sterne markiert. Die vorhergesagte Sekundärstruktur der RhM aus *H. volcanii* ist über der Sequenz und die Sekundärstruktur der RhM aus *E. coli* unter dem Alignment abgebildet (Ryu *et al.*, 2005). Rhamnose Mutarotasen: *Haloferax volcanii* (HV_RhM, D4GPA6); *Escherichia coli* (EC_RhM, 1X8D); *Rhizobium leguminosarum* (RL_RhM, PDB: 2QLX).

Rhamnose Dehydrogenase. Die RDH aus *H. volcanii* setzte neben L-Rhamnose mit deutlich geringerer katalytischer Effizienz auch L-Lyxose und L-Mannose um und war spezifisch für den Cofaktor NAD^+ . Bisher wurden die RDHs aus den Bacteria *A. vinelandii*, *S. thermosulfidooxidans* und *Sphingomonas* sp., den Pilzen *S. stipitis* und *D. hansenii* sowie dem Archaeon *T. acidophilum* charakterisiert (Bae *et al.*, 2015, Kim *et al.*, 2012, Watanabe & Makino, 2009, Watanabe *et al.*, 2008). Diese RDHs katalysieren ebenfalls die Oxidation von L-Rhamnose, L-Lyxose und L-Mannose. Anders als die RDH aus *H. volcanii*, weisen die genannten RDHs aus Archaea, Bacteria und Eukarya eine ähnliche katalytische Effizienz für L-Rhamnose und L-Lyxose auf (Bae *et al.*, 2015, Kim *et al.*, 2012, Watanabe & Makino, 2009, Watanabe *et al.*, 2008). Eine Erklärung für die Aktivität von RDHs mit L-Lyxose und L-Mannose könnte sein, dass L-Rhamnose, L-Lyxose und L-Mannose die gleiche Konfiguration am C-2, C-3 und C-4 Atom aufweisen, was auf eine vergleichbare stereospezifische Substratbindung hindeutet. Die bisher charakterisierten RDHs unterscheiden sich in ihrer Spezifität für Pyridinnukleotide. Während die RDHs aus *D. hansenii* und *S. stipitis* spezifisch für NAD^+ sind, bevorzugt die RDH aus *T. acidophilum* NADP^+ und die RDHs aus *Sphingomonas* sp., *A. vinelandii* und *S. thermosulfidooxidans* weisen eine duale Cofaktor Spezifität auf (Bae *et al.*, 2015, Kim *et al.*, 2012, Watanabe & Makino, 2009, Watanabe *et al.*, 2008).

Die RDH aus *H. volcanii* konnte aufgrund von Sequenzanalysen der short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) Superfamilie zugeordnet werden. In die SDR Superfamilie gehören NAD(P)(H) -abhängige Oxidoreduktasen, die eine große funktionale Diversität aufweisen und die in fünf distinkte Subfamilien eingeteilt werden (Kavanagh *et al.*, 2008). Die RDH aus *H.*

volcanii gehört der klassischen SDRc Familie an und weist das für die Subfamilie indikative Cofaktor-bindende Sequenzmotiv (T-G-x-x-x-[AG]-x-G) auf (Kavanagh *et al.*, 2008)(Abbildung 43). Auch alle bisher charakterisierten RDHs aus Bacteria, Archaea und Eukarya gehören zur SDRc Subfamilie (Abbildung 49) (Kim *et al.*, 2012, Watanabe & Makino, 2009, Watanabe *et al.*, 2008).

Cofaktor-Bindestelle	
H. volcanii	MSTHTDTRLRDRHIVVTGGARGIGRGI ⁺ AVRC ⁺ ARAGADVSI ⁺ FDTKP ⁺ ---EVAEATADLVREEGGEAEVYE 66
T. acidophilum	-----MLDFKGNNAVITCGSRGIGRAI ⁺ ALGLAKQGANIL ⁺ LSYASHD ⁺ ---SEADEVLETASKYGVKAHKVK 62
Sphingomonas sp.	-----MKLLEGKTVLVTGASTGIGRAAAIGAA ⁺ OHGADVAINY ⁺ AHSD ⁺ ---GPAQSCVAEIEALGQRAIAVK 62
S. stipitidis	-----MTGLLNKGVVAVITGGVTGIGRAI ⁺ AEMARN ⁺ GAKVVVNHLPSEE ⁺ QAOLAKELKEE ⁺ ISDGENNVLTIP 66
S. thermosulfidooxidans	-----MALTGKVAVVSCASRGIGRAI ⁺ AIRL ⁺ AOE ⁺ GAKVVIDHPGDD ⁺ ---DAALETMSDIQKFGGEAISVK 61
SDR-Konsensussequenz	
H. volcanii	VDVTDA-EGVETA ⁺ VDAAID ⁺ SLGDI ⁺ HGLV ⁺ NNAGV ⁺ QQA ⁺ VPLLET ⁺ EDD ⁺ WDLH ⁺ FEV ⁺ NAKGT ⁺ FLVSKAVASR ⁺ V 135
T. acidophilum	VDQSDPYESIR-FAEKAIE ⁺ TFGK ⁺ VHIL ⁺ VDNAG ⁺ ICPF ⁺ EDFF ⁺ FRIS ⁺ VDLFEK ⁺ VK ⁺ VNVESH ⁺ YFIT ⁺ ORIA ⁺ KNMI 131
Sphingomonas sp.	GDVADP-QTAQDFVAKAV ⁺ ETFC ⁺ KVDV ⁺ MVSNAG ⁺ ICPF ⁺ HAF ⁺ LDMP ⁺ V ⁺ VV ⁺ ERTF ⁺ KV ⁺ NLHG ⁺ AYFM ⁺ VQAA ⁺ QQ ⁺ V 131
S. stipitidis	GDISLP-ETGRRIVELAVE ⁺ KFGE ⁺ IN ⁺ VFV ⁺ SNAG ⁺ VCGF ⁺ REF ⁺ LEI ⁺ TP ⁺ ETL ⁺ FQ ⁺ TVNI ⁺ NLNG ⁺ AFFA ⁺ IQAAA ⁺ QQ ⁺ V 135
S. thermosulfidooxidans	ADVSSS-PEVEFLFRET ⁺ LEYHT ⁺ VDI ⁺ LNNAG ⁺ ICPF ⁺ VDF ⁺ VEV ⁺ TED ⁺ LWDR ⁺ VHAI ⁺ NLKG ⁺ AF ⁺ LC ⁺ SOY ⁺ ASKIM ⁺ R 130
H. volcanii	DGDIEG ⁺ STVNI ⁺ SSV ⁺ GERP ⁺ FSG ⁺ GAY ⁺ GASK ⁺ AAVLA ⁺ FTTV ⁺ LAKEL ⁺ SDH ⁺ GIT ⁺ VNAL ⁺ KPG ⁺ TVE ⁺ TPM ⁺ VEEWLDE 205
T. acidophilum	ENKINGR ⁺ ILLISSIS ⁺ AHV ⁺ GGEF ⁺ Q ⁺ THY ⁺ TTK ⁺ SAL ⁺ NGFM ⁺ HSIA ⁺ IVL ⁺ GKY ⁺ GIL ⁺ VNS ⁺ LEP ⁺ GT ⁺ IL ⁺ EDINK ⁺ ---- 196
Sphingomonas sp.	RQGHGGS ⁺ IVAVSSIS ⁺ ALV ⁺ GGEY ⁺ Q ⁺ THY ⁺ TPT ⁺ KAC ⁺ VHSL ⁺ MQST ⁺ AIAL ⁺ GKH ⁺ GIR ⁺ CNS ⁺ VLP ⁺ GT ⁺ IL ⁺ EDINK ⁺ ---- 196
S. stipitidis	KQKGG ⁺ SLIGISSIS ⁺ ALV ⁺ GGAH ⁺ Q ⁺ THY ⁺ TPT ⁺ KAG ⁺ IL ⁺ SLMQ ⁺ STAC ⁺ AL ⁺ GKY ⁺ GIR ⁺ CAI ⁺ LPG ⁺ TIS ⁺ ALNE ⁺ ---- 200
S. thermosulfidooxidans	DHHHGCR ⁺ ILISSIS ⁺ ALV ⁺ GGGL ⁺ Q ⁺ THY ⁺ TPT ⁺ KAS ⁺ IRSL ⁺ MQSL ⁺ AIVL ⁺ GPY ⁺ GIT ⁺ CNS ⁺ ILP ⁺ G ⁺ SIL ⁺ EDINR ⁺ ---- 195
* * *	
H. volcanii	HAEQSGKSPDEILAETLDVHILDRICQ ⁺ EEVGHVAVL ⁺ LSEEGDWIT ⁺ GESTAV ⁺ DGGY ⁺ LKH ⁺ -- 265
T. acidophilum	----EDLSNQEKRAYMERR ⁺ TVVGR ⁺ LGL ⁺ EDMVAPAL ⁺ FLLSDDNTY ⁺ VTGTELLADGGMLINL ⁺ Q 254
Sphingomonas sp.	----DDLADQEKREYMEART ⁺ PLGR ⁺ LCAP ⁺ EDLAGP ⁺ IVFLASDMAAYVTGAALLV ⁺ DGGMYVNL ⁺ Q 254
S. stipitidis	----EDLKDPEKRYMEGR ⁺ PLGR ⁺ VCD ⁺ EKDI ⁺ TAGPAIF ⁺ LASDMSNYVNCALLV ⁺ DGGFLVNL ⁺ Q 258
S. thermosulfidooxidans	----DHYADKKILERDVNR ⁺ IPLGR ⁺ LGT ⁺ EDD ⁺ TAGVAAF ⁺ LASDDARYIT ⁺ GADILV ⁺ DGGFLVNL ⁺ Q 253

Abbildung 43 Aminosäure-Sequenzalignment der RDH aus *H. volcanii* mit charakterisierten RDHs der SDRc-Familie aus Archaea, Bacteria und Eukarya. Das für SDRc-Enzyme indikative Cofaktor Bindemotiv (T-G-x-x-x-[AG]-x-G) ist durch einen Rahmen markiert. Die für alle SDR-Enzyme charakteristische SDR-Konsensussequenz (Prosite: PDOC00060) ist durch einen schwarzen Rahmen hervorgehoben und die für die Katalyse essentiellen Aminosäuren Serin, Tyrosin und Lysin durch Sterne markiert (Persson *et al.*, 2003). Rhamnose Dehydrogenasen: *Haloferax volcanii* (ADE01345), *Thermoplasma acidophilum* (AEN94562), *Sphingomonas* sp. (EAT09360), *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* (A0A1W1WNU6), *Azotobacter vinelandii* (EAM07804), *Schefferomyces stipitidis* (ABN68405), *Debaryomyces hansenii* (Q6BQZ7).

Rhamnonolactonase. Die RNL aus *H. volcanii* zeigte eine hohe Spezifität für L-Rhamnono- δ -Lacton. L-Rhamnono- γ -Lacton sowie weitere Zuckerlactone wurden nicht umgesetzt. Mit Hilfe von Sequenzanalysen wurde das Enzym der Amidohydrolase Superfamilie (AHS) zugeordnet (Seibert & Raushel, 2005). Proteine der AHS zeichnen sich durch eine einheitliche Proteinfaltung und eine metallabhängige Katalyse aus. Die Aminosäuresequenzähnlichkeit innerhalb der Proteinfamilie ist jedoch gering. Enzyme der AHS katalysieren eine Vielzahl an Reaktionen, wie die Hydrolyse von Amid- und Esterbindungen, die Deaminierung von Nucleinsäuren sowie Isomerisierungen und Hydratisierungen. Die RNL aus *H. volcanii* gehört innerhalb der AHS zu einer Gruppe von Enzymen (cog3618), deren Mitglieder vorwiegend die Hydrolyse von Lactonen katalysieren und zu der auch Zucker-Lactonasen wie die L-Fuconolactonase aus *Burkholderia*

multivorans und die L-Rhamnonolactonase aus *D. hansenii* gehören (Hobbs *et al.*, 2013, Watanabe *et al.*, 2008). Letztere bildet mit der RNL aus *H. volcanii* die einzigen bisher charakterisierten RNLs. Die putativen RNLs aus dem Pilz *S. stipitis* sowie aus den Bacteria *Sphingomonas* sp. und *A. vinelandii* gehören ebenfalls in diese Familie (Watanabe & Makino, 2009, Watanabe *et al.*, 2008). Für das Bakterium *S. thermosulfidooxidans* und das Archaeon *T. acidophilum* sind hingegen Rhamnonolactonasen postuliert, die zu der metallo-hydrolase-like MBL-fold Superfamilie gehören (Abbildung 49)(Bae *et al.*, 2015, Kim *et al.*, 2012).

Neben der RNL aus *H. volcanii* gibt es bisher nur eine weitere charakterisierte Zucker Lactonase aus der Domäne der Archaea. So ist für *H. volcanii* eine Lactonase der SMP-30/gluconolactonase/LRE like Protein Familie beschrieben, die am Abbau der Pentosen D-Xylose und L-Arabinose beteiligt ist (Sutter *et al.*, 2017).

Rhamnonat Dehydratase. Die RAD aus *H. volcanii* katalysierte die Dehydratisierung von L-Rhamnonat zu KDR, wobei die Aktivität abhängig von divalenten Kationen war. Die RAD aus *H. volcanii* zeigt eine hohe Sequenzidentität zu den charakterisierten RADs des Aldolase bzw. des Diketo-Hydrolase Weges der Bacteria *A. vinelandii*, *Sphingomonas* sp. und *S. thermosulfidooxidans* sowie der Pilze *D. hansenii* und *S. stipitis* und dem Archaeon *T. acidophilum* (Kim *et al.*, 2012, Watanabe & Makino, 2009, Watanabe *et al.*, 2008). Die RAD aus *H. volcanii* zeigt auch eine hohe Sequenzidentität zu der charakterisierten RAD aus *E. coli*, deren physiologische Bedeutung bisher nicht bekannt ist (Rakus *et al.*, 2008, Watanabe & Makino, 2009). So baut *E. coli* Rhamnose ausschließlich über einen klassischen phosphorylierten Weg ab, an dem keine RAD beteiligt ist, verfügt jedoch über die Enzyme RAD und KDR Aldolase eines Aldolase Weges (Rea *et al.*, 2008). Mit Hilfe bioinformatischer Analysen konnte die RAD aus *H. volcanii* der Enolase Superfamilie zugeordnet werden, zu der auch alle bisher charakterisierten RADs gehören. In diese Familie gehören auch eine Vielzahl an weiteren Zuckersäure Dehydratasen, wie zum Beispiel die Gluconat Dehydratasen, Xylonat Dehydratasen oder Fuconat Dehydratasen (FAD) sowie Mandelat Racemasen (MR) und die namensgebenden Enolasen. Eine phylogenetische Einordnung von Enzymen der Enolase Superfamilie ist in Abbildung 44 dargestellt. Der phylogenetische Baum zeigt, dass die Enzyme der Enolase Superfamilie nach ihrer katalytischen Funktion clustern. So bildet die in dieser Arbeit identifizierte RAD aus *H. volcanii* zusammen mit charakterisierten RADs aus Archaea, Bacteria und Eukarya einen eigenen Cluster, der von den Clustern der Fuconat Dehydratasen, der Gluconat/Xylonat Dehydratasen sowie der Mandelate Racemasen und Enolasen klar abgegrenzt ist. Diese Clusterung wird es

zukünftig ermöglichen mittels bioinformatischer Sequenzanalysen eine Vorhersage über die katalytische Funktion von nicht-charakterisierten Enzymen der Enolase-Superfamilie zu treffen.

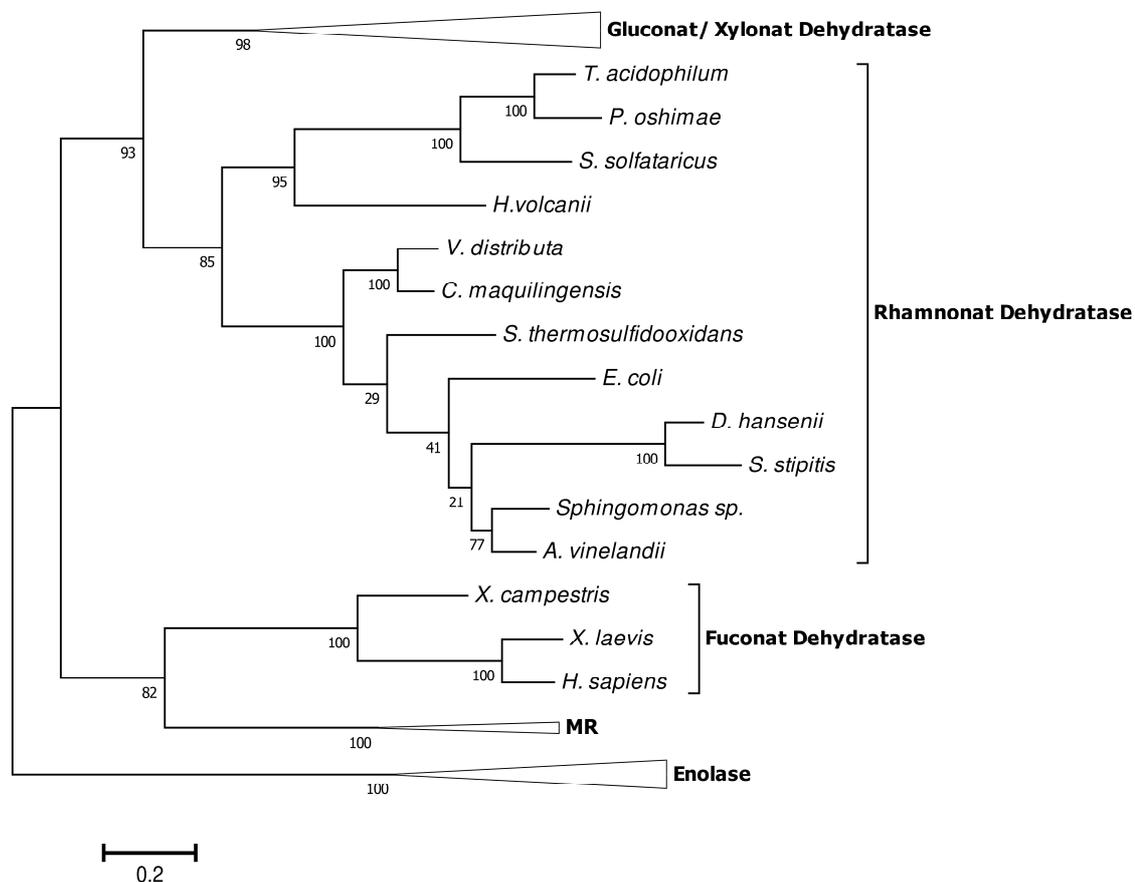


Abbildung 44 Phylogenetische Verwandtschaft der RAD aus *H. volcanii* zu weiteren Zuckersäure Dehydratasen, MRs und Enolasen der Enolase Superfamilie (verändert nach Sutter *et al.*, 2016). Rhamnonat Dehydratasen: *Haloferax volcanii* (D4GPB3), *Thermoplasma acidophilum* (Q9HK53), *Picrophilus oshimae* (A0A1W2G4V4), *Sulfolobus solfataricus* (Q97YL9), *Vulcanisaeta distributa* (E1QSX7), *Caldivirga maquilingensis* (A8MA91), *Escherichia coli* (P77215), *Debaryomyces hansenii* (Q6BQZ6), *Scheffersomyces stipitis* (A3LZU6), *Sphingomonas* sp. (Q1NEI8), *Azotobacter vinelandii* (C1DMY1); Fuconat Dehydratasen: *Xanthomonas campestris* (Q8P3K2), *Xenopus laevis* (Q6INX4), *Homo sapiens* (Q7L5Y1); Mandelat Racemasen (MR): *Pseudomonas putida* (P11444), *Bradyrhizobium diazoefficiens* (Q89D20), *Paraburkholderia xenovorans* (Q13JD6). Die Accession-Nummern der Gluconat/Xylonat Dehydratasen und Enolasen können aus Sutter *et al.*, (2016) entnommen werden.

Eine weitere typische Eigenschaft von RADs ist das Vorhandensein einer erweiterten *loop*-Struktur von ca. 50 Aminosäuren in der N-terminalen Domäne, welche in MRs, FADs sowie weiteren Enzymen der Enolase Superfamilie nicht vorhanden ist (Rakus *et al.*, 2008). Ein Aminosäure-Sequenzalignment von ausgewählten RADs, FADs und MRs ist in Abbildung 45 dargestellt und zeigt, dass diese erweiterte *loop*-Struktur auch in der RAD aus *H. volcanii* konserviert ist.

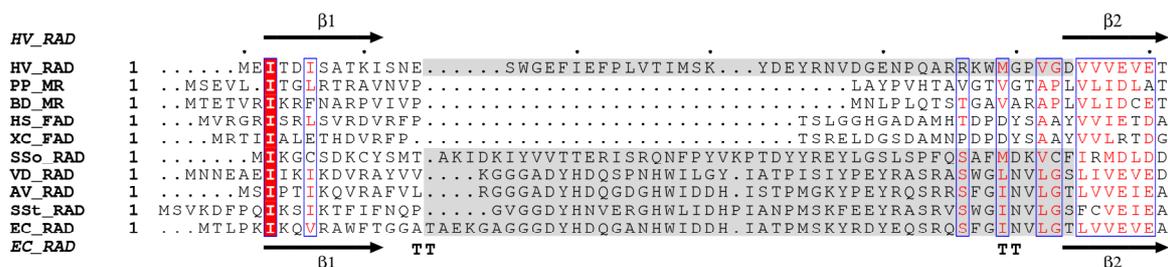


Abbildung 45 Ausschnitt des Alignments der RAD aus *H. volcanii* mit ausgewählten RADs, Fuconat Dehydratase (FADs) und Mandelat Racemasen (MRs) der Enolase Superfamilie aus Archaea, Bacteria und Eukarya. Der RAD spezifische erweiterte loop von ca. 50 Aminosäuren ist im Alignment grau hervorgehoben und ist in den Aminosäuresequenzen der MRs und FADs nicht vorhanden. Rhamnonat Dehydratase: *Haloferax volcanii* (HV_RAD, D4GPB3), *Sulfolobus solfataricus* (SSo_RAD, Q97YL9), *Vulcanisaeta distributa* (VD_RAD, E1QSX7), *Escherichia coli* (EC_RAD, P77215), *Scheffersomyces stipitis* (SSt_RAD, A3LZU6), *Azotobacter vinelandii* (AV_RAD, C1DMY1); Mandelat Racemasen (MR): *Pseudomonas putida* (PP_MR, P11444), *Bradyrhizobium diazoefficiens* (BD_MR, Q89D20); Fuconat Dehydratase: *Xanthomonas campestris* (XC_FAD, Q8P3K2), *Homo sapiens* (HS_FAD, Q7L5Y1).

KDR Dehydrogenase. Die KDRDH aus *H. volcanii* katalysierte die Oxidation von KDR zu DKDR mit NAD^+ als Cofaktor. Analysen der Aminosäuresequenz ergaben, dass die KDRDH der medium-chain dehydrogenase/reductase (MDR) Superfamilie angehört (Persson *et al.*, 2008). So weist die KDRDH das für Enzyme der MDR Superfamilie indikative Motiv (G-H-E-x-(EL)-G-(AP)- $x_{(4)}$ -[GA]- $x_{(2)}$ -[IVSAC]) mit dem konservierten Histidinrest für die Bindung eines katalytischen Zinks auf. Neben der KDRDH aus *H. volcanii* sind bisher nur die KDRDHs aus den Bacteria *Sphingomonas* sp. und *S. thermosulfidooxidans* charakterisiert und beide Enzyme gehören unterschiedlichen Proteinfamilien an (Bae *et al.*, 2015, Watanabe & Makino, 2009). So ist die KDRDH aus *S. thermosulfidooxidans* ein Mitglied der MDR Superfamilie, wohingegen die KDRDH aus *Sphingomonas* sp. der SDR Superfamilie angehört (Abbildung 49).

DKDR Hydrolase. Die DKDRH aus *H. volcanii* wurde als homohexamerer Enzym gereinigt und katalysierte die Spaltung von DKDR in Pyruvat und L-Lactat. Das Enzym zeigt eine hohe Aminosäuresequenzidentität zur charakterisierten DKDRH aus *Sphingomonas* sp. sowie zu den putativen DKDRHs aus *S. thermosulfidooxidans* und *T. acidophilum* (37 %) (Bae *et al.*, 2015, Kim *et al.*, 2012, Watanabe & Makino, 2009). Die DKDRH aus *H. volcanii* zeigt auch eine hohe Aminosäure-Sequenzidentität zur 2,4-Diketo-3-Desoxy-L-Fuconat Hydrolase (DKDFH) aus *Xanthomonas campestris* (36 %). Dieses Enzym katalysiert die Hydrolyse von 2,4-Diketo-3-Desoxy-L-Fuconat zu Pyruvat und L-Lactat in einem oxidativen Fucose-Abbauweg, der dem Diketo-Hydrolase Weg ähnelt (Yew *et al.*, 2006). Mittels Aminosäure-Sequenzanalysen konnte die DKDRH aus *H. volcanii* der Fumarylacetoacetat Hydrolase (FAH) Superfamilie zugeordnet

werden (Weiss *et al.*, 2018a). Die FAH-Superfamilie umfasst Enzyme verschiedener Enzymklassen. So gehören zur FAH Superfamilie unter anderem viele Hydrolasen, wie zum Beispiel die genannten DKDRHs und DKDFHs des Desoxy-Zucker-Abbaus oder die namensgebenden Fumarylacetoacetat Hydrolasen (FAHs), die in Eukarya am Abbau von aromatischen Aminosäuren beteiligt sind (Bateman *et al.*, 2001, Watanabe & Makino, 2009, Yew *et al.*, 2006). In die FAH Superfamilie gehören auch die 2-Keto-3-Desoxy-Pentanoat Dehydratasen des Pentose-Abbaus der Archaea *S. solfataricus* und *H. volcanii* (Brouns *et al.*, 2008, Johnsen *et al.*, 2013). Die meisten Enzyme der FAH Superfamilie weisen eine Oligomerisierung als Dimer oder Tetramer auf. Mit der DKDRH aus *H. volcanii* wurde erstmals für ein Enzym der FAH-Superfamilie ein homooligomerer Aufbau aus sechs Untereinheiten bestimmt.

6.2.1.3 Die transkriptionelle Regulation des Rhamnose-Abbaus

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass RhcR als Transkriptionsaktivator des Rhamnose-Abbaus von *H. volcanii* fungiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Rhamnose-spezifische Induktion der *rhc*-Gene nicht in einer Deletionsmutante von RhcR nachweisbar ist, was für eine Funktion von RhcR als Transkriptionsaktivator spricht.

Bioinformatische Analysen haben ergeben, dass RhcR eine Homologie zu den Transkriptionsregulatoren der IclR Proteinfamilie zeigt (Abbildung 46). So weist RhcR N-terminal ein Helix-turn-Helix Motiv auf, welches typisch für eine DNA-Bindung von Regulatoren der IclR Proteinfamilie ist. C-terminal wurde eine IclR spezifische Effektorbindedomäne nachgewiesen, die für die Bindung eines Signalmoleküls verantwortlich sein könnte (Molina-Henares *et al.*, 2006). RhcR kann daher in die IclR Proteinfamilie eingeordnet werden. In diese Proteinfamilie gehören Transkriptions-aktivatoren und -repressoren aus Bacteria, wie zum Beispiel der putative Transkriptionsregulator des Xylulose-Metabolismus aus *Thermotoga maritima* oder der namensgebende Isocitrat-Lyase Regulator (IclR) aus *E. coli*, der als Transkriptionsrepressor der Gene des Glyoxylatzyklus fungiert (Gui *et al.*, 1996, Zhang *et al.*, 2002). Regulatoren der IclR Proteinfamilie kommen neben Bacteria auch in halophilen Archaea wie *H. volcanii* vor. Im Genom von *H. volcanii* sind neben RhcR weitere Transkriptionsregulatoren der IclR Proteinfamilie annotiert und für zwei dieser Regulatoren wurde ebenfalls eine Beteiligung am Zuckerstoffwechsel gezeigt. So ist XacR der Transkriptionsaktivator der Gene des D-Xylose- und L-Arabinose-Abbaus und DdcR aktiviert die Transkription der Gene des Galactose-Abbaus (Johnsen *et al.*, 2015)(AG Schönheit). Damit scheinen Transkriptionsregulatoren der IclR Proteinfamilie wichtige Aktivatoren des Zuckerstoffwechsels in *H. volcanii* zu sein. Interessanterweise kommen Transkriptionsregulatoren der IclR Proteinfamilie in der Domäne der Archaea ausschließlich in Haloarchaea vor. Deshalb wird diskutiert, dass diese Gene über einen horizontalen Gentransfer aus der Domäne der Bacteria aufgenommen wurden (Johnsen *et al.*, 2015).

Für viele Transkriptionsregulatoren der IclR Proteinfamilie wurde gezeigt, dass diese als Repressor ihrer eigenen Synthese fungieren, wie zum Beispiel für das IclR aus *E. coli* (Gui *et al.*, 1996). Die Transkriptionsanalysen dieser Arbeit deuten darauf hin, dass RhcR aus *H. volcanii* konstitutiv transkribiert wird, was gegen eine Autoregulation des Transkriptionsregulators spricht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde außerdem mittels *in vitro* und *in vivo* Analysen gezeigt, dass KDR, ein Intermediät des Rhamnose-Abbaus, als Signalmolekül von RhcR fungiert. KDR bindet dabei vermutlich in der Effektorbindedomäne von RhcR und moduliert die Bindung des

Transkriptionsregulatoren an die Promotoren der *rhc*-Gene. Auch für andere Transkriptionsregulatoren der IclR Proteinfamilie wurde gezeigt, dass die Bindung von Signalmolekülen die Affinität des Regulators zum Operator moduliert. So ist für das IclR aus *E. coli* gezeigt, dass Pyruvat bzw. Glyoxylat als Signalmoleküle in der Effektorbindedomäne binden und die Affinität des Regulators zum Operator erhöhen bzw. vermindern (Lorca *et al.*, 2007).

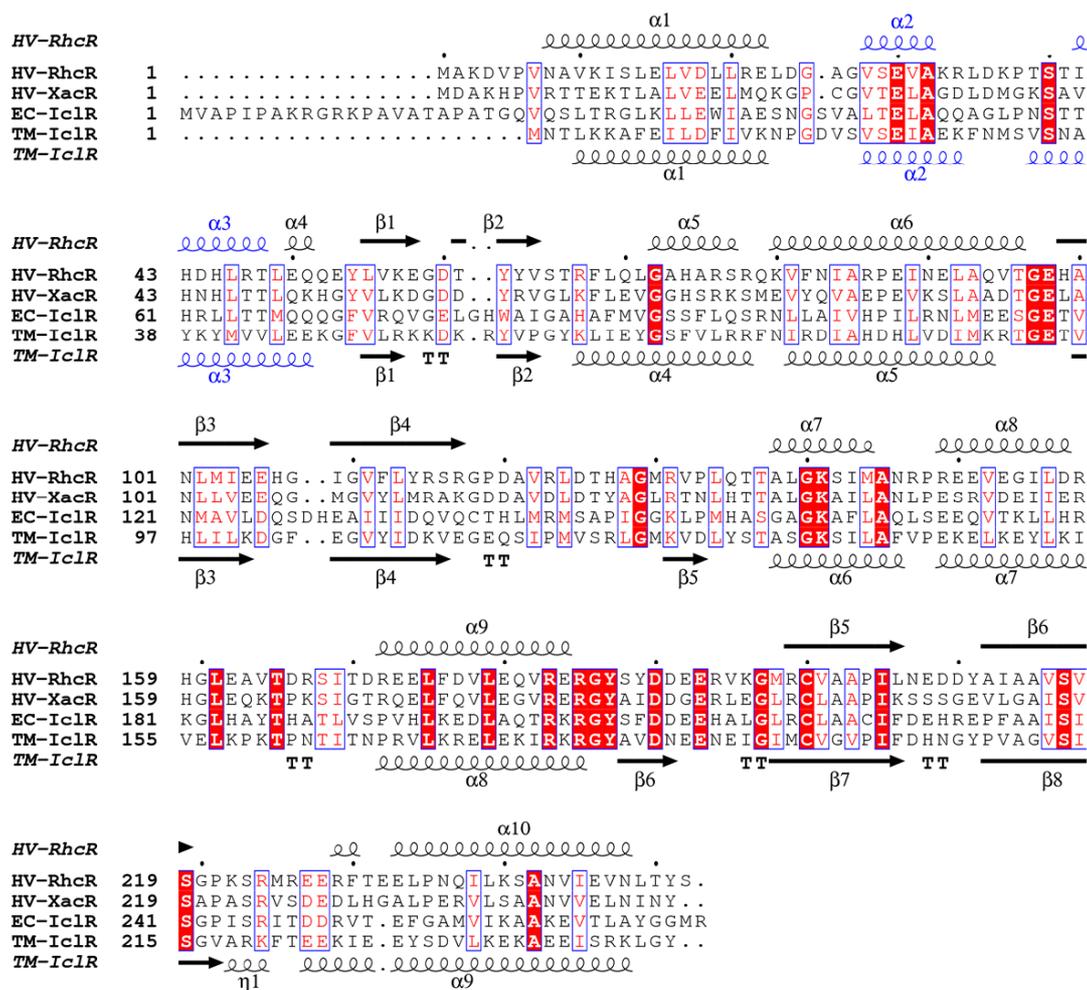


Abbildung 46 Aminosäure-Sequenzalignment von RhcR aus *H. volcanii* mit charakterisierten Transkriptionsregulatoren der IclR Proteinfamilie aus *H. volcanii* (XacR), *E. coli* (EC-IclR) und *T. maritima* (TM-IclR). Die vorhergesagte Sekundärstruktur von RhcR ist über der Sequenz und die Sekundärstruktur von TM-IclR unter dem Alignment abgebildet. Die zwei α -Helices des HTH DNA-Bindemotivs sind blau markiert (IclR-type HTH, Aminosäuren 27-47, PS51077). Die IclR spezifische Effektorbindedomäne umfasst die Aminosäuren 81-280 (PS51078). *Haloferax volcanii* RhcR (HV-RhcR, D4GPB5), *Haloferax volcanii* XacR (HV-XacR, D4GP42), *Escherichia coli* (EC-IclR, P16528), *Thermotoga maritima* IclR (TM-IclR, Q9WXS0).

Bisher gibt es nur wenige Informationen zur transkriptionellen Regulation der Gene des Rhamnose-Abbaus. In den Bacteria *Sphingomonas* sp. und *S. thermosulfidooxidans*, die Rhamnose wie *H. volcanii* über einen Diketo-Hydrolase Weg abbauen, wurden bisher keine Transkriptionsregulatoren des Rhamnose-Katabolismus identifiziert. Für den Pilz *P. pullulans*, der Rhamnose oxidativ über einen Aldolase Weg abbaut, wurde in Wachstumsversuchen gezeigt, dass in Anwesenheit von D-Glucose der Abbau von L-Rhamnose als Folge einer Katabolitrepression reprimiert wird (Twerdochlib *et al.*, 1994, Vieira *et al.*, 1979). Die zugrundeliegende Regulation wurde dabei jedoch nicht aufgeklärt. Der Pilz *A. niger* baut Rhamnose ebenfalls über einen Aldolase Weg ab (Khosravi *et al.*, 2017). RhaR wurde dabei als Transkriptionsaktivator der beteiligten Gene identifiziert und eine mögliche Funktion von KDR als Signalmolekül von RhaR postuliert (Khosravi *et al.*, 2017). Anders als RhcR aus *H. volcanii*, dessen Funktion auch KDR-abhängig ist, gehört RhaR aus *A. niger* nicht der IclR Proteinfamilie an. Für den klassisch phosphorylierten Weg sind Transkriptionsregulatoren verschiedener Proteinfamilien beschrieben. So fungieren in *E. coli* die Regulatoren RhaR und RhaS der AraC/XylS Proteinfamilie simultan als Aktivatoren (Via *et al.* 1996). In *R. leguminosarum* und *B. subtilis* wurden Repressoren der DeoR-Familie identifiziert (Hirooka *et al.*, 2015, Richardson *et al.*, 2004). Für *B. subtilis* wurde darüber hinaus gezeigt, dass L-Rhamnulose-1-Phosphat als Effektormolekül die Bindung des Transkriptionsregulators an den Operator reprimiert (Hirooka *et al.*, 2015).

6.2.1.4 *Lactate utilization proteins*

Der Abbau von Rhamnose in *H. volcanii* über den Diketo-Hydrolase Weg führt zu den Produkten Pyruvat und L-Lactat. Die Umsetzung von L-Lactat als Produkt des Diketo-Hydrolase Weges war bisher nicht aufgeklärt. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass das gebildete Lactat in *H. volcanii* von den *L-lactate utilization proteins* LudB und LudC zu Pyruvat oxidiert wird. Die kodierenden *lut*-Gene sind jedoch, anders als die übrigen Gene des Rhamnose-Abbaus von *H. volcanii*, nicht Teil des *rhc*-Genclusters und werden vermutlich konstitutiv transkribiert. Das spricht gegen eine transkriptionelle Regulation der *lut*-Gene durch RhcR, dem Transkriptionsaktivator der *rhc*-Gene. Auch konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass in den Bacteria *Sphingomonas* sp. und *S. thermosulfidooxidans*, die Rhamnose wie *H. volcanii* über einen Diketo-Hydrolase Weg abbauen, *lut*-Gene in direkter genomischer Nähe zu den Genen des Rhamnose-Abbaus vorliegen. Das deutet darauf hin, dass Lud-Proteine ebenfalls am Rhamnose-Abbau in diesen Organismen beteiligt sind. Damit scheinen Lud-Proteine in Bacteria und Archaea generell an der Umsetzung von L-Lactat, welches über den Diketo-Hydrolase Weg gebildet wird, beteiligt zu sein.

Bisher sind Lud-Proteine nur für wenige Bacteria, zum Beispiel für *Bacillus subtilis* und *Deinococcus radiodurans*, untersucht (Chai *et al.*, 2009, Hwang *et al.*, 2013). Im Genom von *B. subtilis* kodiert das *lutABC*-Operon für die Proteine LutA, LutB und LutC für die in Wachstumsversuchen mit Deletionsmutanten eine essentielle Beteiligung am L-Lactat-Abbau gezeigt wurde (Chai *et al.*, 2009). Es ist postuliert, dass diese drei Proteine zusammen die Oxidation von L-Lactat zu Pyruvat katalysieren (Chai *et al.*, 2009). Somit sollte in zukünftigen Untersuchungen geprüft werden, ob Lud-Proteine auch am Lactat-Stoffwechsel von *H. volcanii* beteiligt sind.

Zusammenfassung des Rhamnose-Abbaus in *H. volcanii*

Die erzielten Ergebnisse dieser Arbeit zum Rhamnose-Abbau in *H. volcanii* sind in Abbildung 47 zusammengefasst. Es wurde gezeigt, dass *H. volcanii* Rhamnose über einen ABC-Transporter der CUT1 Subfamilie in die Zelle aufnimmt und anschließend durch die Enzyme des Diketo-Hydrolase Weges zu Pyruvat und L-Lactat abbaut. Außerdem wurde der Transkriptionsaktivator RhcR identifiziert, der die *rhc*-Gene der Rhamnose-Aufnahme und des Rhamnose-Abbaus transkriptionell induziert. KDR, ein Intermediat des Rhamnose-Abbaus, fungiert dabei als Signalmolekül von RhcR. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass die *lactate utilization proteins* LudB und LudC an der Umsetzung von L-Lactat, welches über den Diketo-Hydrolase Weg gebildet wird, beteiligt sind.

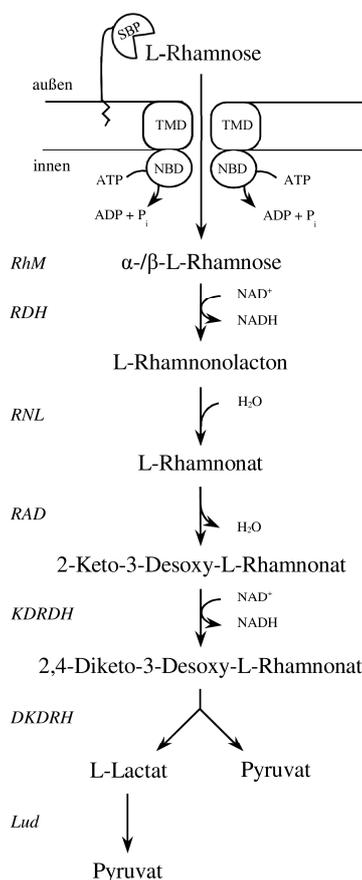


Abbildung 47 Schematische Darstellung des L-Rhamnose-Katabolismus in *H. volcanii*. L-Rhamnose wird über einen ABC-Transporter in die Zelle transportiert, der aus einem Substratbindendeprotein (SBP), zwei Transmembrandomänen (TMDs) und zwei Nukleotidbindedomänen (NBDs) besteht. Der oxidative Abbau von Rhamnose zu Pyruvat und L-Lactat erfolgt über die Enzyme L-Rhamnose Mutarotase (*RhM*), L-Rhamnose Dehydrogenase (*RDH*), L-Rhamnonolactonase (*RNL*), L-Rhamnonat Dehydratase (*RAD*), 2-Keto-3-Desoxy-L-Rhamnonat Dehydrogenase (*KDRDH*) und 2,4-Diketo-3-Desoxy-L-Rhamnonat Hydrolase (*DKDRH*). Die anschließende Oxidation von L-Lactat zu Pyruvat wird von Lud-Proteinen (*Lud*) katalysiert.

6.2.2 Der Diketo-Hydrolase Weg in Haloarchaea und hyperthermophilen Crenarchaeota

Die Gene des Rhamnose-Abbaus in *H. volcanii* liegen in einem Gencluster vor, welcher sich aus den Genen der Rhamnose-Aufnahme und des Rhamnose-Abbaus und dem Gen des Transkriptionsregulators RhcR zusammensetzt (Abbildung 48). Mittels bioinformatischer Sequenzanalysen konnten homologe Gene des Diketo-Hydrolase Weges auch in den Genomen weiterer Haloarchaea identifiziert werden, zum Beispiel in *Halorubrum lipolyticum*, *Haloarcula japonica*, *Haloterrigena turkmenica* und *Natronoarchaeum philippinense* (Abbildung 48).

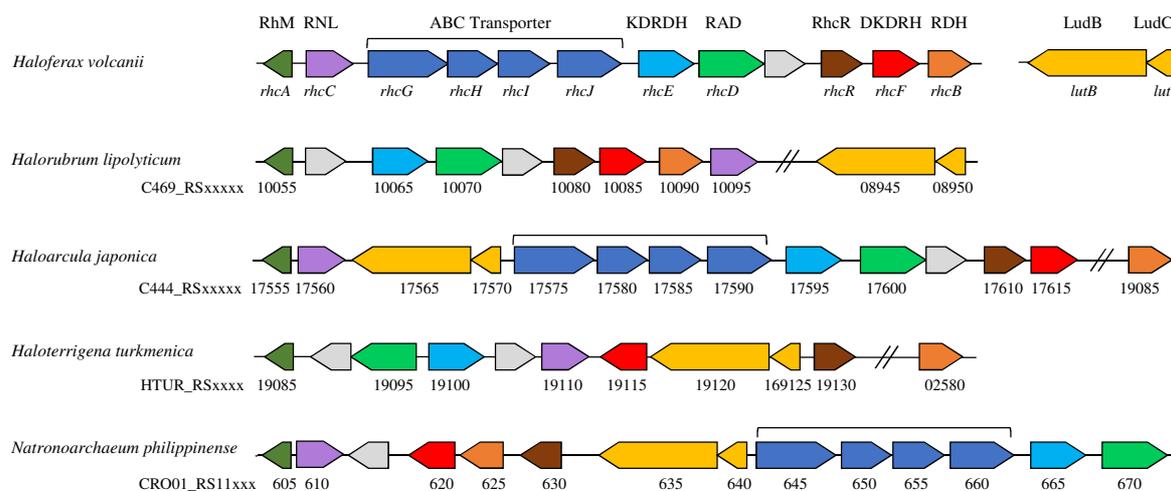


Abbildung 48 Genomische Anordnung von Genen der Rhamnose-Aufnahme und des -Abbaus in *H. volcanii* im Vergleich zu homologen Genen aus Haloarchaea. Homologe Gene sind in derselben Farbe dargestellt: Rhamnose Mutarotase (RhM, olive), Rhamnose Dehydrogenase (RDH, orange), Rhamnonolactonase (RNL, lila), Rhammonat Dehydratase (RAD, grün), 2-Keto-3-Desoxyrhammonat Dehydrogenase (KDRDH, hellblau), 2,4-Diketo-3-Desoxyrhammonat Hydrolase (DKDRH, rot), *lutBC* Gene (gelb), Transkriptionsregulator RhcR (braun) und ABC-Transporter (blau). Gene, denen keine Beteiligung am Rhamnose-Abbau zugeordnet werden konnte, sind in grau dargestellt.

Die putativen *rhc*-Gene weisen dabei eine hohe Sequenzidentität zu denen aus *H. volcanii* auf (42-88 %), was darauf schließen lässt, dass diese Haloarchaea Rhamnose ebenfalls über den Diketo-Hydrolase Weg abbauen. Auch sind homologe Gene zu *rhcR*, dem kodierenden Gen des Rhamnose-spezifischen Transkriptionsaktivators aus *H. volcanii*, in den putativen *rhc*-Genclustern der genannten Haloarchaea vorhanden (Abbildung 48). Das spricht dafür, dass der Rhamnose-Katabolismus in diesen Organismen ähnlich wie in *H. volcanii* transkriptionell reguliert wird. Bis auf *H. lipolyticum* und *H. turkmenica* wurden in den Genomen der Haloarchaea außerdem homologe Gene zum Rhamnose-spezifischen ABC-Transporter aus *H. volcanii* identifiziert, was dafürspricht, dass auch diese Archaea Rhamnose über einen ABC-Transporter aufnehmen (Abbildung 48). Interessanterweise konnten in den Genomen von *H. japonica*, *H.*

turkmenica und *N. philippinense* *lut*-Gene als Teil der *rhc*-Gencluster identifiziert werden (Abbildung 48). Das unterstützt die Annahme, dass *Lud*-Proteine ein genereller Bestandteil des Diketo-Hydrolase Weges sind. Im Genom von *H. lipolyticum* werden, wie in *H. volcanii*, *lut*-Gene mit großem genetischen Abstand zu den *rhc*-Genen kodiert.

Die Sequenzanalysen dieser Arbeit haben außerdem ergeben, dass Gene des Diketo-Hydrolase Weges innerhalb der Euryarchaeota auch in Vertretern der Thermoplasmatales, zum Beispiel in *T. acidophilum* und *Picrophilus oshimae*, vorkommen (Kim *et al.*, 2012)(Abbildung 49). Innerhalb der Crenarchaeota konnten Gene des Diketo-Hydrolase Weges in den Thermoproteales *V. distributa* und *C. maquilingensis* und in den Sulfolobales *S. solfataricus* und *S. islandicus* identifiziert werden (Abbildung 49).

	RhM	RDH	RNL	RAD	KDRDH	DKDRH	KDRA
Archaea							
<i>H. volcanii</i>	HVO_B0104	HVO_B0116*	HVO_B0105*	HVO_B0111*	HVO_B0110*	HVO_B0115*	-
<i>T. acidophilum</i>	Ta0744	Ta0747*	Ta0751	Ta0752	Ta0749	Ta0750	-
<i>P. oshimae</i>	-	B8780_RS06955	B8780_RS06930	B8780_RS06925	B8780_RS06940	B8780_RS06935	-
<i>V. distributa</i>	-	Vdis_1460*	Vdis_1459	Vdis_1458*	Vdis_1457*	Vdis_1722	-
<i>S. solfataricus</i>	-	SSO1300*	SSO1345	SSO1303	SSO2717	SSO2773	-
<i>C. maquilingensis</i>	-	Cmaq_1175	Cmaq_1176	Cmaq_0174	Cmaq_0173	Cmaq_0334	-
Bacteria							
<i>Sphingomonas</i> sp.	EAT09377	EAT09360*	EAT09365	EAT09362*	EAT09364*	EAT09363*	-
<i>S. thermosulfidooxidans</i>	Sulth_3553	Sulth_3559*	Sulth_3556	Sulth_3560	Sulth_3557*	Sulth_3558	-
<i>A. vinelandii</i>	EAM07802	EAM07804*	EAM07805	EAM07808*	-	-	EAM07890*
<i>E. coli</i>	b3901*	-	-	b2247*	-	-	b2245*
Eukarya							
<i>S. stipitis</i>	-	ABN68405*	ABN68602	ABN68404	-	-	ABN68603*
<i>D. hansenii</i>	-	CAG87576*	CAG87575*	CAG87577	-	-	CAG87574

Abbildung 49 Zuordnung von Enzymen der oxidativen Rhamnose-Abbauewege zu den jeweiligen Proteinfamilien. RhM, RDH, RNL und RAD sind sowohl Enzyme des Diketo-Hydrolase Weges als auch des Aldolase Weges. KDRDH und DKDRH sind exklusive Enzyme des Diketo-Hydrolase Weges und die KDRA ist spezifisch für den Aldolase Weg. Die bisher charakterisierten Enzyme sind mit einem Stern versehen und der jeweilige Locus-tag des kodierenden Genes ist in den Spalten angegeben. Enzyme die der selben Proteinfamilie angehören sind in der gleichen Farbe dargestellt: Rhamnose Mutarotase Superfamilie (olive), short chain dehydrogenase/reductase Superfamilie (orange), medium chain dehydrogenase/reductase Superfamilie (hellblau), Amidohydrolase Superfamilie (lila), metallo-hydrolase-like MBL-fold Superfamilie (gelb), Enolase Superfamilie (grün), Fumarylacetoacetat Hydrolase Superfamilie (rot), HpcH Familie (dunkelblau) und DHDPS/NAL Familie (grau).

Einzelne Enzyme aus *V. distributa* und *S. solfataricus* wurden im Rahmen dieser Arbeit heterolog in *E. coli* überexprimiert, auf ihre Aktivität geprüft und ihre Funktion innerhalb des Diketo-

Hydrolase Weges bestätigt. Außerdem wurde für *S. solfataricus* der Nachweis erbracht, dass der Organismus mit L-Rhamnose als Energie- und Kohlenstoffquelle wächst. Für einzelne Gene des Rhamnose-Abbaus wurde dabei eine Rhamnose-spezifische transkriptionelle Induktion gezeigt. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass neben halophilen und thermoacidophilen Euryarchaeota vermutlich auch einige hyperthermophile Crenarchaeota den Diketo-Hydrolase Weg für den Abbau von Rhamnose verwenden. Die kodierenden Gene von Enzymen eines klassischen phosphorylierten Rhamnose-Abbauweges konnten in den Genomen von keinem Vertreter der archaeellen Domäne identifiziert werden. Somit scheint der Diketo-Hydrolase Weg der generelle Abbauweg für Rhamnose in Archaea zu sein.

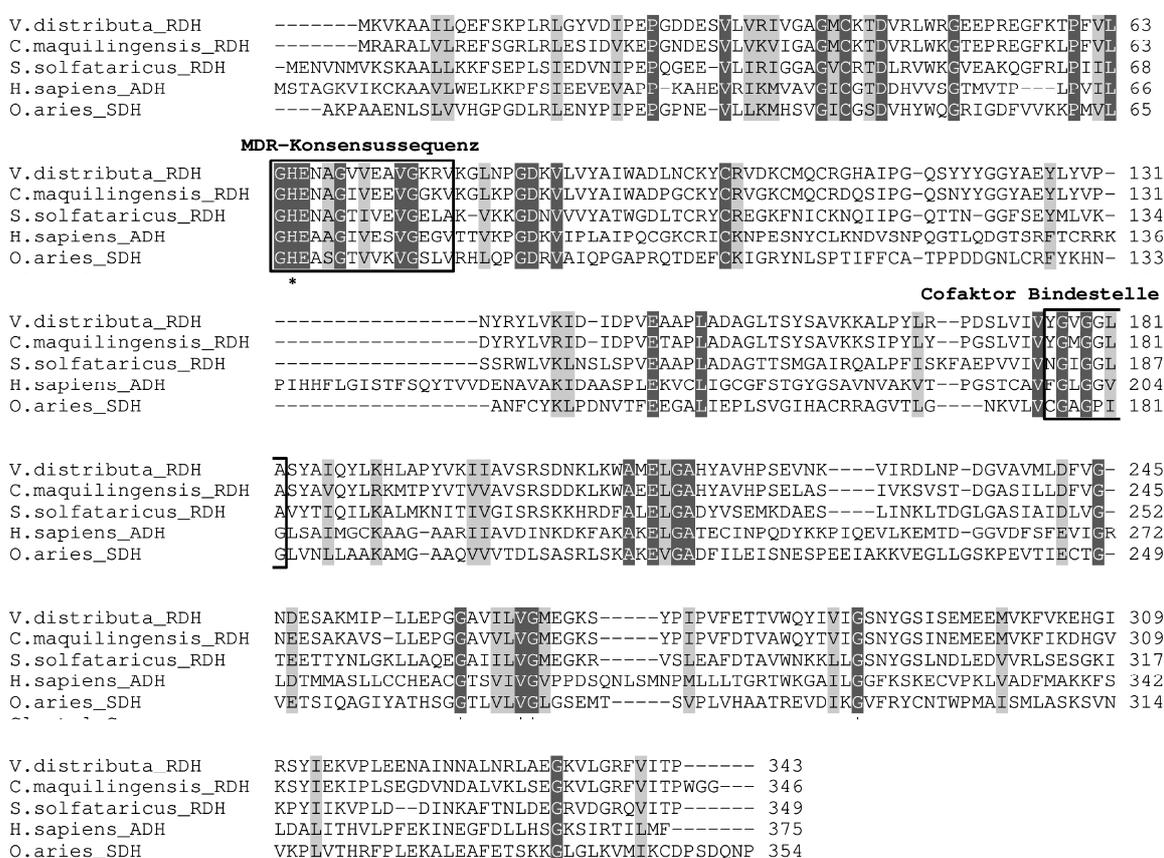


Abbildung 50 Aminosäure-Sequenzalignment der charakterisierten RDHs aus *S. solfataricus* und *V. distributa* mit Homologen aus Archaea und charakterisierten Enzymen der MDR Superfamilie. Die RDHs aus Crenarchaeota zeigen eine Homologie zu charakterisierten Dehydrogenasen der MDR Superfamilie und weisen die für Enzyme der MDR Superfamilie indikative Konsensussequenz G-H-E-x-(EL)-G-(AP)-x₍₄₎-[GA]-x₍₂₎-[IVSAC] (Prosites: PDOC00058) auf. Innerhalb der MDR-Konsensussequenz ist ein Histidin für die Bindung eines katalytischen Zinks konserviert (Stern), weshalb die RDHs den Zink-abhängigen MDRs zugeordnet werden können. Das konservierte Cofaktor-Bindemotiv G-x-G-x-xG einer klassischen Rossmann fold ist umrahmt. Rhamnose Dehydrogenasen: *Vulcanisaeta distributa* (E1QSX9), *Caldivirga maquilingensis* (A8MDZ6), *Sulfolobus solfataricus* (Q97YM2); Alkohol Dehydrogenase: *Homo sapiens* (P07327); Sorbitol Dehydrogenase: *Ovis aries* (P07846) (Jeffery *et al.*, 1984, Niederhut *et al.*, 2001).

Die Enzyme des Diketo-Hydrolase Weges aus *V. distributa* und *S. solfataricus* wurden darüber hinaus phylogenetisch untersucht und mit den Enzymen aus Eukarya, Bacteria und Archaea verglichen (Abbildung 49). Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. Die RADs aus *V. distributa* und *S. solfataricus* gehören, wie auch alle anderen bisher charakterisierten RADs, zur Enolase Superfamilie (Abbildung 49) (Rakus *et al.*, 2008, Watanabe & Makino, 2009, Watanabe *et al.*, 2008). Im phylogenetischen Baum der Enolase Superfamilie (Abbildung 44) bilden die RADs aus den hyperthermophilen Crenarchaeota mit den RADs aus Euryarchaeota, Bacteria und Eukarya einen distinkten RAD-Cluster. Auch ist der für RADs charakteristische erweiterte N-terminale *loop* in den RADs aus *V. distributa* und *S. solfataricus* konserviert (Abbildung 45) (Rakus *et al.*, 2008). Damit konnte gezeigt werden, dass die RADs aus Archaea einen hohen Grad der Konservierung zu den RADs aus Bacteria und Eukarya aufweisen.
2. Die RDHs aus den Crenarchaeota *V. distributa* und *S. solfataricus* konnten über Aminosäuresequenzvergleiche der MDR Superfamilie zugeordnet werden, zu der eine Vielzahl an NAD(P)H-abhängigen Dehydrogenasen mit unterschiedlichen katalytischen Funktionen gehören (Abbildung 50) (Persson *et al.*, 2008). Im Gegensatz dazu gehören alle charakterisierten RDHs aus Bacteria und Eukarya sowie aus den Euryarchaeota *T. acidophilum* und *H. volcanii* zur SDR Superfamilie (Bae *et al.*, 2015, Kim *et al.*, 2012, Watanabe & Makino, 2009, Watanabe *et al.*, 2008)(Abbildung 49). Die Zuordnung von archaeellen RDHs zu verschiedenen Proteinfamilien könnte auf eine konvergente Entwicklung der RDH innerhalb der archaeellen Domäne hindeuten. Alternativ könnten die RDHs der Euryarchaeota auch von den RDHs aus Bacteria abstammen und über einen lateralen Gentransfer aufgenommen worden sein.
3. Die charakterisierte KDRDH aus *V. distributa* und die postulierte KDRDH aus *S. solfataricus* gehören der MDR Superfamilie an, zu der auch die RDHs dieser Organismen gehören (siehe oben; Abbildung 49). Die Tatsache, dass zwei unterschiedliche Dehydrogenasen eines Weges zu derselben Proteinfamilie gehören, könnte darauf schließen lassen, dass diese Enzyme aus einer gemeinsamen Vorläufer-Dehydrogenase entstanden sind, welche durch Genduplikation und anschließender Mutation zu zwei spezifischen Dehydrogenasen evolviert ist. Eine Entstehung aus einer gemeinsamen Vorläufer-Dehydrogenase ist auch für die RDH und KDRDH aus *Sphingomonas* sp. postuliert, die beide der SDR Superfamilie angehören (Watanabe & Makino, 2009).

4. In der vorliegenden Arbeit wurde für die RDH aus *S. solfataricus* der Nachweis einer Aktivität mit Rhamnose erbracht und eine transkriptionelle Induktion durch Rhamnose gezeigt. Interessanterweise ist die in dieser Arbeit identifizierte RDH identisch mit der bifunktionellen L-Fucose/D-Arabinose Dehydrogenase, für die in vorangegangenen Arbeiten eine Beteiligung an einem promisklen Abbau von D-Arabinose und L-Fucose gezeigt wurde (Brouns *et al.*, 2006, Wolf *et al.*, 2016). Damit handelt es sich bei der RDH um eine Dehydrogenase, die in *S. solfataricus* den ersten Schritt in den drei Abbauwegen von Rhamnose, Fucose und Arabinose katalysiert. Im Gegensatz zur RDH, ist die RAD aus *S. solfataricus* nicht am Abbau von Arabinose und Fucose beteiligt. So verfügt *S. solfataricus* über eine bifunktionelle L-Fuconat/D-Arabinat Dehydratase, die von der RAD abgegrenzt werden kann (Sequenzidentität 25 %) (Brouns *et al.*, 2006, Wolf *et al.*, 2016). Die Transkriptionsanalysen dieser Arbeit zeigen zusammen mit vorangegangenen Transkriptionsanalysen, dass die kodierenden Gene von RDH und RAD bei Wachstum von *S. solfataricus* auf allen drei Substraten, Rhamnose, Arabinose und Fucose, transkriptionell induziert werden (Brouns *et al.*, 2006, Wolf *et al.*, 2016). Das deutet darauf hin, dass die Gene des Rhamnose-, Fucose- und Arabinose-Abbaus durch einen gemeinsamen Transkriptionsregulator aktiviert werden, wobei ein solcher Regulator bisher nicht identifiziert werden konnte.

Zusammenfassend zeigt der phylogenetische Vergleich der Enzyme der oxidativen Rhamnose-Abbauwege aus Archaea, Bacteria und Eukarya, dass eine Reihe von funktionell gleichartigen Enzymen unterschiedlichen Proteinfamilien zugeordnet werden können (Abbildung 49). Diese mosaikartige Phylogenie deutet darauf hin, dass funktionell gleichartige Enzyme konvergent entstanden sind und dass sich der Diketo-Hydrolase Weg in der Evolution mehrfach unterschiedlich entwickelt hat.

7 Literatur

- Ahmed, H., Ettema T.J., Tjaden B., Geerling A.C., van der O.J., Siebers B. (2005). The semi-phosphorylative Entner-Doudoroff pathway in hyperthermophilic archaea - a re-evaluation. *Biochemical J*, **390**, 546.
- Albers, S.V., Meyer B.H. (2011). The archaeal cell envelope. *Nat Rev Microbiol*, **9**, 414-426.
- Allers, T., Barak S., Liddell S., Wardell K., Mevarech M. (2010). Improved strains and plasmid vectors for conditional overexpression of His-tagged proteins in *Haloferax volcanii*. *Appl Environ Microbiol*, **76**, 1759-1769.
- Allers, T., Mevarech M. (2005). Archaeal genetics - the third way. *Nat Rev Genet*, **6**, 58-73.
- Allers, T., Ngo H.P., Mevarech M., 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.
- Bae, J., Kim S.M., Lee S.B. (2015). Identification and characterization of 2-keto-3-deoxy-L-rhamnonate dehydrogenase belonging to the MDR superfamily from the thermoacidophilic bacterium *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*: implications to L-rhamnose metabolism in archaea. *Extremophiles*, **19**, 469-478.
- Bateman, R.L., Bhanumoorthy P., Witte J.F., McClard R.W., Grompe M., Timm D.E. (2001). Mechanistic inferences from the crystal structure of fumarylacetoacetate hydrolase with a bound phosphorus-based inhibitor. *J Biol Chem*, **276**, 15284-15291.
- Bitan-Banin, G., Ortenberg R., Mevarech M. (2003). Development of a gene knockout system for the halophilic archaeon *Haloferax volcanii* by use of the *pyrE* gene. *J Bacteriol*, **185**, 772-778.
- Blöchl, E., Rachel R., Burggraf S., Hafenbradl D., Jannasch H.W., Stetter K.O. (1997). *Pyrolobus fumarii*, gen. and sp. nov., represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit for life to 113 °C. *Extremophiles*, **1**, 14-21.
- 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., 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., Soppa J. (2007). Experimental characterization of *Cis*-acting elements important for translation and transcription in halophilic archaea. *PLoS Genet*, **3**, e229.
- Brock, T.D., Brock K.M., Belly R.T., Weiss R.L. (1972). *Sulfolobus*: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. *Arch Microbiol*, **84**, 54-68.
- Brouns, S.J., Barends T.R., Worm P., Akerboom J., Turnbull A.P., Salmon L., van der Oost J. (2008). Structural insight into substrate binding and catalysis of a novel 2-keto-3-deoxy-D-arabinonate dehydratase illustrates common mechanistic features of the FAH superfamily. *J Mol Biol*, **379**, 357-371.
- Brouns, S.J., Walther J., Snijders A.P., van de Werken H.J., Willemsen H.L., Worm P., de Vos M.G., Andersson A., Lundgren M., Mazon H.F., van den Heuvel R.H., Nilsson P., Salmon L., De Vos W.M., Wright P.C., Bernander R., van der Oost J. (2006). Identification of the missing links in prokaryotic pentose oxidation pathways: evidence for enzyme recruitment. *J Biol Chem*, **281**, 27378-27388.

- Brückner, J. (1955). Estimation of monosaccharides by the orcinol-sulphuric acid reaction. *Biochem J*, **60**, 200-205.
- Brunner, N.A., Brinkmann H., Siebers B., Hensel R. (1998). NAD⁺-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Thermoproteus tenax*. The first identified archaeal member of the aldehyde dehydrogenase superfamily is a glycolytic enzyme with unusual regulatory properties. *J Biol Chem*, **273**, 6149-6156.
- Buchan, D.W., Minneci F., Nugent T.C., Bryson K., Jones D.T. (2013). Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench. *Nucleic Acids Res*, **41**, 349-357.
- Buchanan, C.L., Connaris H., Danson M.J., Reeve C.D., Hough D.W. (1999). An extremely thermostable aldolase from *Sulfolobus solfataricus* with specificity for non-phosphorylated substrates. *Biochem J*, **343**, 563-570.
- Chai, Y., Kolter R., Losick R. (2009). A widely conserved gene cluster required for lactate utilization in *Bacillus subtilis* and its involvement in biofilm formation. *J Bacteriol*, **191**, 2423-2430.
- Crow, V.L., Pritchard G.G. (1976). Purification and properties of pyruvate kinase from *Streptococcus lactis*. *Biochim Biophys Acta*, **438**, 90-101.
- De la Vega-Ruiz, G., Dominguez-Ramirez L., Riveros-Rosas H., Guerrero-Mendiola C., Torres-Larios A., Hernandez-Alcantara G., Garcia-Trejo J.J., Ramirez-Silva L. (2015). New insights on the mechanism of the K⁺- independent activity of Crenarchaeota pyruvate kinases. *PloS one*, **10**, e0119233.
- De Rosa, M., Gambacorta A. (1988). The lipids of archaebacteria. *Prog Lipid Res*, **27**, 153-175.
- Dennis, P.P., Shimmin L.C. (1997). Evolutionary divergence and salinity-mediated selection in halophilic archaea. *Microbiol Mol Biol Rev*, **61**, 90-104.
- Dörr, C., Zaparty M., Tjaden B., Brinkmann H., Siebers B. (2003). The hexokinase of the hyperthermophile *Thermoproteus tenax*: ATP-dependent hexokinases and ADP-dependent glucokinases, two alternatives for glucose phosphorylation in Archaea. *J Biol. Chem*, **278**, 18744-18753.
- Egan, S.M., Schleif R.F. (1993). A regulatory cascade in the induction of rhaBAD. *J Mol Biol*, **234**, 87-98.
- 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., 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.
- Ettema, T.J., Ahmed H., Geerling A.C., van der Oost J., Siebers B. (2008). The non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPN) of *Sulfolobus solfataricus*: a key-enzyme of the semi-phosphorylative branch of the Entner-Doudoroff pathway. *Extremophiles*, **12**, 75-88.
- Gui, L., Sunnarborg A., Pan B., LaPorte D.C. (1996). Autoregulation of *iclR*, the gene encoding the repressor of the glyoxylate bypass operon. *J Bacteriol*, **178**, 321-324.
- Guy, L., Ettema T.J. (2011). The archaeal 'TACK' superphylum and the origin of eukaryotes. *Trends Microbiol*, **19**, 580-587.

- Hansen, T., Reichstein B., Schmid R., Schönheit P. (2002). The first archaeal ATP-dependent glucokinase, from the hyperthermophilic crenarchaeon *Aeropyrum pernix*, represents a monomeric, extremely thermophilic ROK glucokinase with broad hexose specificity. *J Bacteriol*, **184**, 5955-5965.
- Hansen, T., Schlichting B., Felgendreher M., Schönheit P. (2005). Cupin type phosphoglucose isomerases constitute a novel metal dependent PGI family-representing a convergent line of PGI evolution. *J Bacteriol*, **187**, 1621-1631.
- Hansen, T., Schönheit P. (2001). Sequence, expression, and characterization of the first archaeal ATP-dependent 6-phosphofructokinase, a non-allosteric enzyme related to the phosphofructokinase-B sugar kinase family, from the hyperthermophilic crenarchaeote *Aeropyrum pernix*. *Arch Microbiol*, **177**, 62-69.
- Hansen, T., Urbanke C., Schönheit P. (2004a). Bifunctional phosphoglucose/phosphomannose isomerase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum aerophilum*. *Extremophiles*, **8**, 507-512.
- Hansen, T., Wendorff D., Schönheit P. (2004b). Bifunctional phosphoglucose/phosphomannose isomerases from the Archaea *Aeropyrum pernix* and *Thermoplasma acidophilum* constitute a novel enzyme family within the phosphoglucose isomerase superfamily. *J. Biol Chem*, **279**, 2262-2272.
- Hirooka, K., Kodoi Y., Satomura T., Fujita Y. (2015). Regulation of the rhaEWRBMA operon involved in L-Rhamnose catabolism through two transcriptional factors, RhaR and CcpA, in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, **198**, 830-845.
- Hobbs, M.E., Vetting M., Williams H.J., Narindoshvili T., Kebodeaux D.M., Hillerich B., Seidel R.D., Almo S.C., Raushel F.M. (2013). Discovery of an L-fucono-1,5-lactonase from cog3618 of the amidohydrolase superfamily. *Biochemistry*, **52**, 239-253.
- Huber, H., Hohn M.J., Rachel R., Fuchs T., Wimmer V.C., Stetter K.O. (2002). A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature*, **417**, 63-67.
- Huber, R., Stetter K.O., (1992) The Order Thermoproteales. In: *The Prokaryotes*, pp. 677-683. Springer-Verlag, New York.
- Hucho, F., Wallenfels K. (1972). Glucono- δ -lactonase from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*, **276**, 176-179.
- Hwang, W.C., Bakolitsa C., Punta M., Coghill P.C., Bateman A., Axelrod H.L., Rawlings N.D., Sedova M., Peterson S.N., Eberhardt R.Y., Aravind L., Pascual J., Godzik A. (2013). LUD, a new protein domain associated with lactate utilization. *BMC bioinformatics*, **14**, 341.
- Jeffery, J., Cederlund E., Jornvall H. (1984). Sorbitol dehydrogenase. The primary structure of the sheep-liver enzyme. *Eur J Biochem*, **140**, 7-16.
- Jeong, J.J., Fushinobu S., Ito S., Jeon B.S., Shoun H., Wakagi T. (2003). Characterization of the cupin-type phosphoglucose isomerase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*. *FEBS lett*, **535**, 200-204.
- Johnsen, U., Dambeck M., Zaiss H., Fuhrer T., Soppa J., Sauer U., Schönheit P. (2009). D-xylose degradation pathway in the halophilic archaeon *Haloferax volcanii*. *J Biol Chem*, **284**, 27290-27303.

- Johnsen, U., Hansen T., Schönheit P. (2003). Comparative analysis of pyruvate kinases from the hyperthermophilic archaea *Archaeoglobus fulgidus*, *Aeropyrum pernix*, and *Pyrobaculum aerophilum* and the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: unusual regulatory properties in hyperthermophilic archaea. *J Biol Chem*, **278**, 25417-25427.
- Johnsen, U., Sutter J.M., Schulz A.C., Tästensen J.B., 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.
- Johnsen, U., Sutter J.M., Zaiss H., Schönheit P. (2013). L-Arabinose degradation pathway in the haloarchaeon *Haloferax volcanii* involves a novel type of L-arabinose dehydrogenase. *Extremophiles*, **17**, 897-909.
- Jurica, M.S., Mesecar A., Heath P.J., Shi W., Nowak T., Stoddard B.L. (1998). The allosteric regulation of pyruvate kinase by fructose-1,6-bisphosphate. *Structure*, **6**, 195-210.
- Kandler, O., König H. (1998). Cell wall polymers in Archaea (Archaeobacteria). *Cell Mol Life Sci*, **54**, 305-308.
- Kavanagh, K.L., Jörnvall H., Persson B., Oppermann U. (2008). Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families : the SDR superfamily: functional and structural diversity within a family of metabolic and regulatory enzymes. *Cell Mol Life Sci*, **65**, 3895-3906.
- Kengen, S.W., Tuininga J.E., de Bok F.A., Stams A.J., De Vos W.M. (1995). Purification and characterization of a novel ADP-dependent glucokinase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J Biol Chem*, **270**, 30453-30457.
- Khosravi, C., Kun R.S., Visser J., Aguilar-Pontes M.V., de Vries R.P., Battaglia E. (2017). In vivo functional analysis of L-rhamnose metabolic pathway in *Aspergillus niger*: a tool to identify the potential inducer of RhaR. *BMC Microbiol*, **17**, 214.
- Kim, S.M., Paek K.H., Lee S.B. (2012). Characterization of NADP⁺-specific L-rhamnose dehydrogenase from the thermoacidophilic Archaeon *Thermoplasma acidophilum*. *Extremophiles*, **16**, 447-454.
- Koga, S., Yoshioka I., Sakuraba H., Takahashi M., Sakasegawa S., Shimizu S., Ohshima T. (2000). Biochemical characterization, cloning, and sequencing of ADP-dependent (AMP-forming) glucokinase from two hyperthermophilic Archaea, *Pyrococcus furiosus* and *Thermococcus litoralis*. *J Biochem*, **128**, 1079-1085.
- Koivistoinen, O.M., Arvas M., Headman J.R., Andberg M., Penttilä M., Jeffries T.W., Richard P. (2012). Characterisation of the gene cluster for L-rhamnose catabolism in the yeast *Scheffersomyces (Pichia) stipitis*. *Gene*, **492**, 177-185.
- Koivistoinen, O.M., Hilditch S., Voutilainen S.P., Boer H., Penttilä M., Richard P. (2008). Identification in the yeast *Pichia stipitis* of the first L-rhamnose-1-dehydrogenase gene. *FEBS J*, **275**, 2482-2488.
- Koning, S.M., Konings W.N., Driessen A.J. (2002). Biochemical evidence for the presence of two α -glucoside ABC-transport systems in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Archaea*, **1**, 19-25.
- Kumar, S., Stecher G., Tamura K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol*, **33**, 1870-1874.

- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- 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., Higgins D.G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, **23**, 2947-2948.
- Londei, P., (2007) Translation. In: *Archaea. Molecular and cellular biology*, pp. 175-197. ASM Press, Washington, DC.
- Lorca, G.L., Ezersky A., Lunin V.V., Walker J.R., Altamentova S., Evdokimova E., Vedadi M., Bochkarev A., Savchenko A. (2007). Glyoxylate and pyruvate are antagonistic effectors of the *Escherichia coli* IclR transcriptional regulator. *J Biol Chem*, **282**, 16476-16491.
- Lubelska, J.M., Jonuscheit M., Schleper C., Albers S.V., Driessen A.J. (2006). Regulation of expression of the arabinose and glucose transporter genes in the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Extremophiles*, **10**, 383-391.
- 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., Bryant S.H. (2015). CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Res*, **43**, D222-D226.
- Martin, J.H., Rawls K.S., Chan J.C., Hwang S., Martinez-Pastor M., McMillan L.J., Prunetti L., Schmid A.K., Maupin-Furlow J.A. (2018). GlpR is a direct transcriptional repressor of fructose metabolic genes in *Haloferax volcanii*. *J Bacteriol*, **200**, 218-244.
- Martin, W.F., Garg S., Zimorski V. (2015). Endosymbiotic theories for eukaryote origin. *Philos. Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **370**, 2014.0330.
- Molina-Henares, A.J., Krell T., Eugenia G.M., Segura A., 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.
- Moralejo, P., Egan S.M., Hidalgo E., Aguilar J. (1993). Sequencing and characterization of a gene cluster encoding the enzymes for L-rhamnose metabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **175**, 5585-5594.
- Morgan, H.P., McNae I.W., Nowicki M.W., Hannaert V., Michels P.A., Fothergill-Gilmore L.A., Walkinshaw M.D. (2010). Allosteric mechanism of pyruvate kinase from *Leishmania mexicana* uses a rock and lock model. *J Biol Chem*, **285**, 12892-12898.
- Muiry, J.A., Gunn T.C., McDonald T.P., Bradley S.A., Tate C.G., Henderson P.J. (1993). Proton-linked L-rhamnose transport, and its comparison with L-fucose transport in Enterobacteriaceae. *Biochem J*, **290**, 833-842.
- Mukund, S., 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*. *J Biol Chem*, **270**, 8389-8392.
- Nelson-Sathi, S., Dagan T., Landan G., Janssen A., Steel M., McInerney J.O., Deppenmeier U., 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.

- Nelson, K.E., Clayton R.A., Gill S.R., Gwinn M.L., Dodson R.J., Haft D.H., Hickey E.K., Peterson J.D., Nelson W.C., Ketchum K.A., McDonald L., Utterback T.R., Malek J.A., Linher K.D., Garrett M.M., Stewart A.M., Cotton M.D., Pratt M.S., Phillips C.A., Richardson D., Heidelberg J., Sutton G.G., Fleischmann R.D., Eisen J.A., Fraser C.M. (1999). Evidence for lateral gene transfer between Archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature*, **399**, 323-329.
- Niederhut, M.S., Gibbons B.J., Perez-Miller S., Hurley T.D. (2001). Three-dimensional structures of the three human class I alcohol dehydrogenases. *Protein Sci*, **10**, 697-706.
- Oren, A. (1994). The ecology of the extremely halophilic archaea. *FEMS Microbiol Rev*, **13**, 415-439.
- Oren, A., (2007) Biodiversity in highly saline environments. In: *Physiology and biochemistry of extremophiles*, pp. 223-231. ASM Press, Washington, DC.
- Pellerin, P., Gruson G., Prensier G., Albanac G., Debeire P. (1987). Glycogen in *Methanothrix*. *Arch Microbiol*, **146**, 377-381.
- Persson, B., Hedlund J., Jörnvall H. (2008). Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families : the MDR superfamily. *Cell Mol Life Sci*, **65**, 3879-3894.
- Persson, B., Kallberg Y., Oppermann U., Jörnvall H. (2003). Coenzyme-based functional assignments of short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *Chem. Biol. Interact*, **143-144**, 271-278.
- Pickl, A., Johnsen U., Archer R.M., 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*, **361**, 76-83.
- Rakus, J.F., Fedorov A.A., Fedorov E.V., Glasner M.E., Hubbard B.K., Delli J.D., Babbitt P.C., Almo S.C., Gerlt J.A. (2008). Evolution of enzymatic activities in the enolase superfamily: L-rhamnonate dehydratase. *Biochemistry*, **47**, 9944-9954.
- Rea, D., Hovington R., Rakus J.F., Gerlt J.A., Fulop V., Bugg T.D., Roper D.I. (2008). Crystal structure and functional assignment of YfaU, a metal ion dependent class II aldolase from *Escherichia coli* K12. *Biochemistry*, **47**, 9955-9965.
- Reher, M., Fuhrer T., Bott M., Schönheit P. (2010). The nonphosphorylative Entner-Doudoroff pathway in the thermoacidophilic euryarchaeon *Picrophilus torridus* involves a novel 2-keto-3-deoxygluconate- specific aldolase. *J Bacteriol*, **192**, 964-974.
- Reher, M., Gebhard S., Schönheit P. (2007). Glyceraldehyde-3-phosphate ferredoxin oxidoreductase (GAPOR) and nonphosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPN), key enzymes of the respective modified Embden-Meyerhof pathways in the hyperthermophilic crenarchaeota *Pyrobaculum aerophilum* and *Aeropyrum pernix*. *FEMS Microbiol Lett*, **273**, 196-205.
- Richardson, J.S., Carpena X., Switala J., Perez-Luque R., Donald L.J., Loewen P.C., Oresnik I.J. (2008). RhaU of *Rhizobium leguminosarum* is a rhamnose mutarotase. *J Bacteriol*, **190**, 2903-2910.
- Richardson, J.S., Hynes M.F., Oresnik I.J. (2004). A genetic locus necessary for rhamnose uptake and catabolism in *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii. *J Bacteriol*, **186**, 8433-8442.

- Rigo, L.U., Nakano M., Veiga L.A., Feingold D.S. (1976). L-Rhamnose dehydrogenase of *Pullularia pullulans*. *Biochim Biophys Acta*, **445**, 286-293.
- Robert, X., Gouet P. (2014). Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Res*, **42**, 320-324.
- Ronimus, R.S., Koning J., Morgan H.W. (1999). Purification and characterization of an ADP-dependent phosphofructokinase from *Thermococcus zilligii*. *Extremophiles*, **3**, 121-129.
- Ryu, K.S., Kim J.I., Cho S.J., Park D., Park C., Cheong H.K., Lee J.O., Choi B.S. (2005). Structural insights into the monosaccharide specificity of *Escherichia coli* rhamnose mutarotase. *J Mol Biol*, **349**, 153-162.
- Sakai, H., Suzuki K., Imahori K. (1986). Purification and properties of pyruvate kinase from *Bacillus stearothermophilus*. *J Biochem*, **99**, 1157-1167.
- Sakuraba, H., Yoshioka I., Koga S., Takahashi M., Kitahama Y., Satomura T., Kawakami R., Ohshima T. (2002). ADP-dependent glucokinase/phosphofructokinase, a novel bifunctional enzyme from the hyperthermophilic Archaeon *Methanococcus jannaschii*. *J Biol Chem*, **277**, 12495-12498.
- Sandman, K., Reeve J.N. (2001). Chromosome packaging by archaeal histones. *Adv Appl Microbiol*, **50**, 75-99.
- Schleper, C., Nicol G.W. (2010). Ammonia-oxidising archaea--physiology, ecology and evolution. *Adv Microb Physiol*, **57**, 1-41.
- Schleper, C., Puehler G., Holz I., Gambacorta A., Janekovic D., Santarius U., Klenk H.P., Zillig W. (1995). *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.
- Schneider, E. (2001). ABC transporters catalyzing carbohydrate uptake. *Res Microbiol*, **152**, 303-310.
- Schönheit, P. (2008) Glycolysis in hyperthermophiles. In: *Thermophiles. Biotechnology and Technology at High Temperatures*, pp. 99-112. CRC Press, Boca Raton.
- Schramm, A., Siebers B., Tjaden B., Brinkmann H., Hensel R. (2000). Pyruvate kinase of the hyperthermophilic crenarchaeote *Thermoproteus tenax*: physiological role and phylogenetic aspects. *J Bacteriol*, **182**, 2001-2009.
- Seegerer, A., Stetter K.O., (1992a) The Genus *Thermoplasma*. In: *The Prokaryotes*, pp. 712-718. Springer-Verlag, New York.
- Seegerer, A., Stetter K.O., (1992b) The order *Sulfolobales*. In: *The Prokaryotes*, pp. 684-701. Springer-Verlag, New York.
- Seibert, C.M., Raushel F.M. (2005). Structural and catalytic diversity within the amidohydrolase superfamily. *Biochemistry*, **44**, 6383-6391.
- Siebers, B., Klenk H.P., Hensel R. (1998). PP_i-dependent phosphofructokinase from *Thermoproteus tenax*, an archaeal descendant of an ancient line in phosphofructokinase evolution. *J Bacteriol*, **180**, 2137-2143.
- Siebers, B., 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., Hough D.W. (1989). Purification and characterization of glucose dehydrogenase from the thermoacidophilic archaeobacterium *Thermoplasma acidophilum*. *Biochem J*, **261**, 973-977.
- Solomons, J.T., Johnsen U., Schönheit P., Davies C. (2013). 3-Phosphoglycerate is an allosteric activator of pyruvate kinase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum aerophilum*. *Biochemistry*, **52**, 5865-5875.
- Spang, A., Hatzenpichler R., Brochier-Armanet C., Rattei T., Tischler P., Spieck E., Streit W., Stahl D.A., Wagner M., Schleper C. (2010a). Distinct gene set in two different lineages of ammonia-oxidizing archaea supports the phylum Thaumarchaeota. *Trends Microbiol*, **18**, 331-340.
- Spang, A., Saw J.H., Jorgensen S.L., Zaremba-Niedzwiedzka K., Martijn J., Lind A.E., van Eijk R., Schleper C., Guy L., Ettema T.J.G. (2015). Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes. *Nature*, **521**, 173-179.
- Stetter, K.O. (2006). History of discovery of the first hyperthermophiles. *Extremophiles*, **10**, 357-362.
- Sutter, J.M., Johnsen U., Schönheit P. (2017). Characterization of a pentonolactonase involved in D-xylose and L-arabinose catabolism in the haloarchaeon *Haloferax volcanii*. *FEMS Microbiol Lett*, **364**, fmx140.
- Sutter, J.M., Tästensen J.B., Johnsen U., Soppa J., Schönheit P. (2016). Key Enzymes of the Semiphosphorylative Entner-Doudoroff Pathway in the Haloarchaeon *Haloferax volcanii*: Characterization of Glucose Dehydrogenase, Gluconate Dehydratase, and 2-Keto-3-Deoxy-6-Phosphogluconate Aldolase. *J Bacteriol*, **198**, 2251-2262.
- Takami, H., Arai W., Takemoto K., Uchiyama I., Taniguchi T. (2015). Functional classification of uncultured "*Candidatus Caldiarchaeum subterraneum*" using the Maple System. *PLoS one*, **10**, e0132994.
- Thauer, R.K., Kaster A.K., Seedorf H., Buckel W., Hedderich R. (2008). Methanogenic archaea: ecologically relevant differences in energy conservation. *Nat Rev Microbiol*, **6**, 579-591.
- Thomm, M., (2007) Transcription: Mechanism and regulation. In: *Archaea. Molecular and cellular biology*, pp. 139-157. ASM Press, Washington, DC.
- Tria, F.D.K., Landan G., Dagan T. (2017). Phylogenetic rooting using minimal ancestor deviation. *Nat Ecol Evol*, **1**, 193.
- Tuininga, J.E., Verhees C.H., van der Oost J., Kengen S.W., Stams A.J., de Vos W.M. (1999). Molecular and biochemical characterization of the ADP-dependent phosphofructokinase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J Biol Chem*, **274**, 21023-21028.
- Twerdochlib, A.L., Pedrosa F.O., Funayama S., Rigo L.U. (1994). L-Rhamnose metabolism in *Pichia stipitis* and *Debaryomyces polymorphus*. *Can J Microbiol*, **40**, 896-902.
- van Schaftingen, E., Opperdoes F.R., Hers H.G. (1985). Stimulation of *Trypanosoma brucei* pyruvate kinase by fructose 2,6-bisphosphate. *Eur J Biochem*, **153**, 403-406.

- Veith, N., Feldman-Salit A., Cojocaru V., Henrich S., Kummer U., Wade R.C. (2013). Organism-adapted specificity of the allosteric regulation of pyruvate kinase in lactic acid bacteria. *PLoS. Comput Biol*, **9**, e1003159.
- Verhees, C.H., Tuininga J.E., Kengen S.W., Stams A.J., van der Oost J., De Vos W.M. (2001). ADP-dependent phosphofructokinases in mesophilic and thermophilic methanogenic archaea. *J Bacteriol*, **183**, 7145-7153.
- Vieira, M.M., Rigo L.U., Marechal L.R., Veiga L.A. (1979). Induction and catabolite repression of L-rhamnose dehydrogenase in *Pullularia pullulans*. *J Bacteriol*, **138**, 55-59.
- Walker, J.E., Saraste M., Runswick M.J., Gay N.J. (1982). Distantly related sequences in the a- and b-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J*, **1**, 945-951.
- Watanabe, S., Makino K. (2009). Novel modified version of nonphosphorylated sugar metabolism-an alternative L-rhamnose pathway of *Sphingomonas* sp. *FEBS J*, **276**, 1554-1567.
- Watanabe, S., Saimura M., Makino K. (2008). Eukaryotic and bacterial gene clusters related to an alternative pathway of nonphosphorylated L-rhamnose metabolism. *J Biol Chem*, **283**, 20372-20382.
- Waygood, E.B., Mort J.S., Sanwal B.D. (1976). The control of pyruvate kinase of *Escherichia coli*. Binding of substrate and allosteric effectors to the enzyme activated by fructose 1,6-bisphosphate. *Biochemistry*, **15**, 277-282.
- Waygood, E.B., Rayman M.K., Sanwal B.D. (1975). The control of pyruvate kinases of *Escherichia coli*. II. Effectors and regulatory properties of the enzyme activated by ribose 5-phosphate. *Can J Biochem*, **53**, 444-454.
- Weiss, A.K.H., Loeffler J.R., Liedl K.R., Gstach H., Jansen-Durr P. (2018a). The fumarylacetoacetate hydrolase (FAH) superfamily of enzymes: multifunctional enzymes from microbes to mitochondria. *Biochem Soc Trans*, **46**, 295-309.
- Weiss, M.C., Preiner M., Xavier J.C., Zimorski V., Martin W.F. (2018b). The last universal common ancestor between ancient Earth chemistry and the onset of genetics. *PLoS Genet*, **14**, e1007518.
- Weiss, M.C., Sousa F.L., Mrnjavac N., Neukirchen S., Roettger M., Nelson-Sathi S., Martin W.F. (2016). The physiology and habitat of the last universal common ancestor. *Nat Microbiol*, **1**, 16116.
- Woese, C.R., Kandler O., 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.
- Wolf, J., Stark H., Fafenrot K., Albersmeier A., Pham T.K., Muller K.B., Meyer B.H., Hoffmann L., Shen L., Albaum S.P., Kouril T., Schmidt-Hohagen K., Neumann-Schaal M., Bräsen C., Kalinowski J., Wright P.C., Albers S.V., Schomburg D., Siebers B. (2016). A systems biology approach reveals major metabolic changes in the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* in response to the carbon source L-fucose versus D-glucose. *Mol Microbiol*, **102**, 882-908.
- Xavier, K.B., Martins L.O., Peist R., Kossmann M., Boos W., Santos H. (1996). High-affinity maltose/trehalose transport system in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*. *J Bacteriol*, **178**, 4773-4777.

-
- Yew, W.S., Fedorov A.A., Fedorov E.V., Rakus J.F., Pierce R.W., Almo S.C., Gerlt J.A. (2006). Evolution of enzymatic activities in the enolase superfamily: L-fuconate dehydratase from *Xanthomonas campestris*. *Biochemistry*, **45**, 14582-14597.
- Yu, J.P., Ladapo J., Whitman W.B. (1994). Pathway of glycogen metabolism in *Methanococcus maripaludis*. *J Bacteriol*, **176**, 325-332.
- Zhang, R.G., Kim Y., Skarina T., Beasley S., Laskowski R., Arrowsmith C., Edwards A., Joachimiak A., Savchenko A. (2002). Crystal structure of *Thermotoga maritima* 0065, a member of the IclR transcriptional factor family. *J Biol Chem*, **277**, 19183-19190.
- Zhong, W., Cui L., Goh B.C., Cai Q., Ho P., Chionh Y.H., Yuan M., Sahili A.E., Fothergill-Gilmore L.A., Walkinshaw M.D., Lescar J., Dedon P.C. (2017). Allosteric pyruvate kinase-based "logic gate" synergistically senses energy and sugar levels in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Commun*, **8**, 1986.

Danksagung

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

Frau Dr. U. Johnsen möchte ich für die vielen hilfreichen Diskussionen und die Hilfe bei vielen praktischen Fragen danken.

Der DFG danke ich für die Finanzierung der Arbeit.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Allgemeine Mikrobiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel möchte ich für die angenehme Zusammenarbeit danken. Insbesondere gilt mein Dank Andreas, Jan-Moritz, Julia, Tom, Marius, Holger, Dagmar und Kerstin.