

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung.....	1
2. Material und Methoden.	9
2.1 Material.....	9
2.1.1 Herkunft von Enzymen und Chemikalien.....	9
2.1.2 Geräte.....	10
2.1.3 Organismen.....	11
2.1.4 Plasmide.....	11
2.2 Methoden.....	12
2.2.1 Anzucht von Mikroorganismen.....	12
2.2.1.1 Anzucht von <i>Thermoproteus tenax</i>	12
2.2.1.2 Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	12
2.2.2 Molekularbiologisches Arbeiten mit DNS.....	13
2.2.2.1 Isolierung von DNS.....	13
2.2.2.2 Phenol/Chloroform-Extraktion von DNS.....	14
2.2.2.3 DNS-Präzipitation.....	14
2.2.2.4 Quantitative und qualitative Analyse von DNS.....	15
2.2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese von DNS (Sambrook et al., 1989)	15
2.2.2.6 Reinigung von DNS-Fragmenten.....	15
2.2.2.7 <i>In vitro</i> Rekombination von DNS.....	16
2.2.2.8 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	17
2.2.2.9 Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNS (modifiziert nach Hanahan, 1983).....	18
2.2.2.10 Kapillartransfer von DNS auf Nylonmembranen (Southern Blot).....	18
2.2.2.11 Hybridisierung von DNS mit Digoxigenin-markierten Sonden.....	19
2.2.2.12 Sequenzierung von DNS.....	21
2.2.3 Auswertung molekularer Sequenzen.....	22
2.2.4 Molekularbiologisches Arbeiten mit RNS von <i>T. tenax</i>	23
2.2.4.1 Behandlung von Lösungen, Gefäßen und Geräten.....	23
2.2.4.2 Isolation von RNS.....	23
2.2.4.3 Bestimmung von Konzentration und Reinheit.....	23
2.2.4.4 Agarose-Gelelektrophorese von RNS.....	23
2.2.4.5 Transfer von RNS auf Nylonmembranen (Northern Blot)	24
2.2.4.6 Hybridisierung von RNS mit einer Digoxigenin-markierten <i>pyk</i> -spezifischen RNS-Sonde....	24
2.2.4.7 Primer Extension.....	25
2.3 Biochemische Methoden.....	26
2.3.1 Gekoppelter Enzymtest der TIM in glycolytischer Richtung.....	26
(modifiziert nach Plaut & Knowles, 1972)	
2.3.2 Gekoppelter Enzymtest der Pyruvat-Kinase aus <i>T. tenax</i>	27
2.3.3 Bestimmung der kinetischen Parameter.....	27
2.3.4 Präparative Enzymreinigungen.....	27
2.3.5 Bestimmung der Thermostabilität von Proteinen über irreversible Inaktivierung.....	29
2.4 Proteinanalytische Methoden.....	29
2.4.1 Proteinbestimmung.....	29
2.4.2 Konzentrierung von Proteinlösungen.....	30
2.4.3 Bestimmung des Molekulargewichts unter nativen Bedingungen.....	30
2.4.4. Bestimmung des Molekulargewichts unter denaturierenden Bedingungen.....	31
2.4.5 Proteintrennung durch diskontinuierliche SDS-PAGE nach Laemmli.....	31
2.4.6 Diskontinuierliche SDS-PAGE nach Schägger und von Jagow.....	31
2.4.7 Elektro-Proteintransfer.....	32
2.4.8 Proteinnachweis in Polyacrylamidgelen.....	32
2.4.9 Bestimmung der N-terminalen Aminosäure-Sequenz durch automatisierten Edman-Abbau..	33

3. Ergebnisse	34
3.1 Struktur- und Funktionsuntersuchungen an archaealen Triosephosphat-Isomerasen.....	34
3.1.1 Reinigung und Charakterisierung der TIM aus <i>T. tenax</i>	34
3.1.1.1 Bestimmung der kinetischen Parameter.....	35
3.1.1.2 Strukturuntersuchungen.....	35
3.1.1.3 Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz.....	36
3.1.1.4 Intrinsische Thermostabilität.....	36
3.1.2 Klonierung und Sequenzierung des <i>tpi</i> -Gens aus <i>T. tenax</i>	37
3.1.2.1 Ableitung von Oligonukleotidsonden.....	37
3.1.2.2 Identifizierung eines <i>tpi</i> -spezifischen 417bp-PCR-Fragments.....	38
3.1.2.3 Isolierung und Klonierung eines 3,3kb- <i>Bam</i> HI-Fragments, welches das gesamte <i>tpi</i> -Gen enthält.....	38
3.1.3 Expression der TIM von <i>T. tenax</i> in <i>E. coli</i> und enzymatische Charakterisierung des rekombinanten Enzyms.....	42
3.1.3.1 Klonierung des <i>tpi</i> -Gens aus <i>T. tenax</i> in den Expressionsvektor pJF118EH.....	42
3.1.3.2 Reinigung und enzymatische Charakterisierung der in <i>E. coli</i> exprimierten TIM aus <i>T. tenax</i>	42
3.1.3.3 Bestimmung der kinetischen Parameter.....	43
3.1.3.4 Bestimmung des Molekulargewichts der nativen rekombinanten TIM mittels Gelfiltration und Ultrazentrifugation.....	44
3.2 Heterologe Expression der TIM von <i>M. fervidus</i> in <i>E. coli</i>	45
3.2.1 Klonierung des <i>tpi</i> -Gens in die Expressionsvektoren pJF118EH und pET15b.....	45
3.2.2 Aktivitäts-Vergleich der rekombinanten Enzyme aus <i>E. coli</i> BL21DE3 und DH5 α	46
3.2.3 Enzymatische Untersuchungen.....	47
3.2.4 Strukturuntersuchungen.....	47
3.2.5 Intrinsische Thermostabilität.....	48
3.3 Klonierung und Sequenzierung des <i>tpi</i> -Gens aus dem mesophilen Archaeum <i>Methanobacterium bryantii</i>	48
3.3.1 Genorganisation des <i>tpi</i> -Locus von <i>M. bryantii</i>	49
3.3.2 Amplifikation eines 222 bp <i>tpi</i> -spezifischen PCR-Produkts.....	49
3.3.3 Klonierung eines 4,2 kb <i>Eco</i> RI/ <i>Hind</i> III-Fragment von <i>M. bryantii</i> , welches die gesamte <i>tpi</i> - <i>pgk</i> Genregion enthält.....	49
3.3.4 Expression der TIM von <i>M. bryantii</i> in der <i>tpi</i> -defekten <i>E. coli</i> -Mutante AA200.....	51
3.4 Untersuchungen zur Thermostabilisierung archaealer TIMs durch geladene und ungeladene niedermolekulare Komponenten.....	52
3.5 Strukturelle und enzymatische Untersuchungen an der Pyruvat-Kinase von <i>T. tenax</i>	55
3.5.1 Klonierung und Sequenzierung des kodierenden Gens.....	55
3.5.2 Vergleich der Aminosäuresequenz der PK von <i>T. tenax</i> mit bekannten PK-Sequenzen.....	58
3.5.3 Heterologe Expression der PK von <i>T. tenax</i> in <i>E. coli</i>	65
3.5.3.1 Klonierung des <i>pyk</i> -Leserahmens in pJF118EH.....	65
3.5.3.2 Reinigung der in <i>E. coli</i> exprimierten PK aus <i>T. tenax</i>	65
3.5.4 Funktionelle Charakterisierung der in <i>E. coli</i> exprimierten PK aus <i>T. tenax</i>	66
3.5.4.1 Quartär-Struktur der rekombinanten PK.....	66
3.5.4.2 Bestimmung der enzymatischen Eigenschaften.....	66
3.5.5 Transkriptanalysen.....	70
3.5.5.1 Northern Blot-Analysen.....	70
3.5.5.2 Primer Extension-Analysen.....	71

4. Diskussion.....	72
4.1 Struktur und Eigenschaften archaealer TIMs.....	72
4.1.1 Merkmale archaealer <i>tpi</i> -Gene.....	72
4.1.2 Expression archaealer TIMs in <i>E. coli</i>	74
4.1.3 Vergleichende Primärstrukturanalyse archaealer TIMs mit Enzymen aus den Domänen der Bacteria und Eucarya.....	75
4.1.4 Vergleichende Quartärstrukturanalyse archaealer TIMs.....	79
4.1.5 Enzymatische Aktivität und thermale Stabilität archaealer TIMs.....	81
4.2 Strukturelle und funktionelle Untersuchungen an der Pyruvat-Kinase aus <i>T. tenax</i>	83
4.2.1 Sequenzanalyse des kodierenden <i>pyk</i> -Gens und der PK.....	83
4.2.2 Transkriptanalysen des <i>pyk</i> -Gens.....	85
4.2.3 Biochemische Eigenschaften des Enzyms aus <i>T. tenax</i> und des rekombinanten Proteins.....	86
4.2.4 Phylogenetische Zuordnung der PK von <i>T. tenax</i>	86
4.2.5 Die phylogenetische Dichotomie der PKs geht mit einer differentiellen Regulation einher..	87
5. Zusammenfassung.....	90
6. Literatur.....	91