

1. Einleitung

Die Sequenzaufklärung kompletter Genome, die durch Fortschritte in der molekularbiologischen Methodik während der letzten Jahre ermöglicht wurde, bedeutete einen enormen Wissenszuwachs bezüglich der genetischen Information und ihrer Strukturierung in den untersuchten Organismen. Das Ziel biochemischer und physiologischer Forschung, nämlich die Stoffwechselprozesse einer Zelle, ihre Regulation und Interaktion in einem Organismus zu verstehen, konnte durch diese Projekte jedoch bei weitem nicht erreicht werden.

Dies liegt unter anderem darin begründet, daß die Funktion eines großen Teils der aus den Gensequenzen abgeleiteten Proteine noch unbekannt ist. Dieser Anteil beträgt bei *E. coli*, dem am besten charakterisierten Mikroorganismus, ca. 40% (Blattner et al., 1997). Auch hat sich die Vorstellung nicht bewahrheitet, aus der genetischen Information die Stoffwechsellleistungen eines Organismus ableiten zu können. Diese Feststellung trifft insbesondere dann zu, wenn das Untersuchungsobjekt von physiologisch und biochemisch gut charakterisierten Modellorganismen phylogenetisch weit entfernt ist. In diesen Fällen ist die Vorhersage der physiologischen Kapazität schon deswegen eingeschränkt, da häufig neue bzw. unbekannte Stoffwechselwege beschritten werden, die bisher nicht identifizierte Enzymfunktionen bedingen.

Eine weitere Komplikation kann darin liegen, daß homologe Gene nicht erkannt werden, da sie aufgrund der großen phylogenetischen Distanz nicht in den genomischen Datenbanken identifiziert werden können. Beispiele für diese Problematik bieten die vier bislang publizierten Genome hyperthermophiler Archaea (Bult et al., 1996; Klenk et al., 1997; Smith et al., 1997; Kawarabayasi et al., 1998): Nur ca. 40% der ermittelten Protein-kodierenden Gene konnte eine bestimmte Funktion zugeordnet werden. Selbst hierbei ergeben sich in einigen Fällen noch Zweifel an der vorhergesagten Identität der putativen Genprodukte.

Diese Schwierigkeiten bei der Annotierung eines Großteils der genetischen Information belegen einmal mehr die besondere Stellung der Archaea als Deszendenten der dritten Entwicklungslinie des Lebens (Woese et al., 1990). Ferner weisen sie darauf hin, daß bei der Analyse der physiologischen Kapazität dieser Organismen traditionelle biochemische Methoden wie z.B. der Nachweis von Enzymaktivitäten zur Aufklärung von Stoffwechselwegen angewendet werden müssen.

Um einen Einblick in die basalen Stoffwechsellleistungen der Archaea zu erhalten, beschäftigt sich unsere Arbeitsgruppe seit einiger Zeit mit dem Kohlenhydrat-Stoffwechsel dieser Organismengruppe. Wie verschiedene Untersuchungen zeigen, weicht der Kohlenhydrat-Metabolismus deutlich von dem gewohnten Bild der Bacteria und Eucarya ab (vgl. Danson, 1993; Selig et al., 1997; de Vos et al., 1998). Zwar wird auch in Archaea der Embden-Meyerhof-Parnas-Weg (EMP-Weg) neben dem Entner-Doudoroff-Weg (ED-Weg) als Abbauroute für Glucose benutzt, allerdings gibt es insbesondere beim EMP-Weg -im Gegensatz zu den Bacteria und Eucarya- eine Vielzahl von Variationen: Die klassische Version wird nur bei *Methanococcus maripaludis* (Yu et al., 1994) angetroffen, wohingegen z.B. bei *Pyrococcus furiosus* ungewöhnliche ADP-abhängige Kinasen (eine ADP-abhängige Phosphofruktokinase sowie eine ADP-abhängige Glucokinase, [Kengen et al., 1994; Kengen et al., 1995]) gefunden wurden. Weiterhin ist dieser Organismus durch eine Ferredoxin-abhängige Glycerinaldehyd-3-phosphat Oxidoreduktase in der Lage in einem Schritt Glycerinaldehyd-3-phosphat zu 3-Phosphoglycerat umzusetzen (Mukund & Adams, 1995; van der Oost et al., 1998).

Insofern ist es nicht überraschend, daß nur ein Teil der EMP-Enzyme aus Bacteria und Eucarya Homologe in den archaealen Genomen besitzen. So konnten bislang keine Homologen der kodierenden Gene für Hexokinase, Aldolase und Phosphoglyceratmutase identifiziert werden (Tab. 1). Möglicherweise spiegelt diese auffallende Heterogenität des Kohlenhydrat-Stoffwechsels bei Archaea die Situation der frühen Evolution wider, in der geeignete Enzymkombinationen für einen Stoffwechselweg erst gefunden werden mußten.

Tab. 1: Identifizierung der für Glycolyseenzyme kodierenden Gene in bisher publizierten archaealen Genomen.

Reaktion	Enzym	PYRHO	ARCFU	METJA	METTH	PYRAE
Glu \longrightarrow Glu-6-P	Hexokinase	---	---	---	---	---
Glu-6-P \rightleftharpoons Fru-6-P	Glucose-6-P-Isomerase	---	---	MJ 1605	---	---
Fru-6-P \longrightarrow FBP	Phosphofruktokinase	---	---	---	---	---
FBP \rightleftharpoons DHAP+GAP	Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase	---	---	---	---	+
DHAP \rightleftharpoons GAP	Triosephosphat-isomerase	PH 1884	AF 1304	MJ 1528	MTH 1041	+
GAP \rightleftharpoons 1,3-BPG	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase	PH 1830	AF 1732	MJ 1411, MJ 1146	MTH 0978, MTH 1009	+
1,3-bPG \rightleftharpoons 3-PG	3-Phosphoglycerat-kinase	PH 1218	AF 1146	MJ 0641	MTH 1042	+
3-PG \rightleftharpoons 2-PG	Phosphoglycerat-mutase	---	---	---	---	---
2-PG \rightleftharpoons PEP	Enolase	PH 1942	AF 1132	MJ 0232	MTH 0043	+
PEP \longrightarrow Pyruvat	Pyruvat-Kinase	PH 0570	---	MJ 0108	---	+

Abkürzungen: PYRHO: *Pyrococcus horikoshii* (Kawarabayasi et al., 1998), ARCFU: *Archaeoglobus fulgidus* (Klenk et al., 1997), METJA: *Methanococcus jannaschii* (Bult et al., 1996), METTH: *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Smith et al., 1997), PYRAE: *Pyrobaculum aerophilum* (Fitz-Gibbon et al., 1997). Die Zahlen beziehen sich auf die Annotationen in den jeweiligen Genomprojekten. "---" bedeutet, daß kein homologes Gen in dem jeweiligen Organismus identifiziert werden konnte. "+" bedeutet, daß zwar das homologe Gen annotiert wurde, jedoch die Gensequenz nicht publiziert ist. Glu: Glucose; Glu-6-P: Glucose-6-phosphat; Fru-6-P: Fructose-6-phosphat; FBP: Fructose-1,6-bisphosphat; DHAP: Dihydroxyacetonphosphat; GAP: Glycerinaldehyd-3-phosphat; 1,3-BPG: 1,3-Bisphosphoglycerat; 3-PG: 3-Phosphoglycerat; 2-PG: 2-Phosphoglycerat; PEP: Phosphoenolpyruvat.

Hauptobjekt bei den Untersuchungen des archaealen Kohlenhydratmetabolismus ist in unserer Arbeitsgruppe seit einiger Zeit das hyperthermophile Archaeum *Thermoproteus tenax*. Der Organismus wächst sowohl autotroph mit CO₂ als einziger Kohlenstoffquelle in Gegenwart von H₂ und elementarem Schwefel (S⁰) als auch heterotroph auf organischen Substraten wie Glucose, Stärke oder Amylose in Gegenwart von S⁰ (Zillig et al., 1981; Fischer et al., 1983). Systematisch wird dieser Organismus dem Reich der Crenarchaeota zugeordnet. *T. tenax* besitzt ein Wachstumsoptimum von über 80°C (T. opt.= 86°C) und wird daher als hyperthermophil bezeichnet.

Wie Untersuchungen von Siebers (1995) zeigen, besitzt *T. tenax* zwei Abbauwege für Glucose: Eine Variante des reversiblen EMP-Weges und einen sogenannten nicht-phosphorylativen ED-Weg, bei dem die Phosphorylierung erst auf der Stufe des Glycerats erfolgt. Die Variante des EMP-Weges ist zum einen ausgezeichnet durch eine reversible, nicht allosterisch regulierbare, PPi-abhängige Phosphofruktokinase, welche die Interkonversion von Fructose-6-phosphat und Fructose-1,6-bisphosphat bidirektional katalysiert. Zum anderen wurden zwei GAPDHs mit unterschiedlichen Kosubstratspezifitäten sowie katalytischen und regulatorischen Eigenschaften identifiziert. Wie durch Untersuchungen von Brunner (1998) gezeigt, üben die beiden GAPDHs eine wichtige Kontrollfunktion innerhalb des EMP-Wegs aus und ersetzen damit die fehlende Regulationsstelle einer ATP-abhängigen PFK, die im konventionellen EMP-Weg die Hauptkontrolle über den Kohlenstoffflux ausübt.

So wird die NADP⁺-abhängige, phosphorylierende GAPDH von *T. tenax* verstärkt unter autotrophen Bedingungen exprimiert und unterstützt damit die anabole Richtung des EMP-Weges, während die NAD⁺-abhängige, nicht-phosphorylierende GAPDH (GAPN) ausschließlich dem Katabolismus dient und durch ihre allosterischen Eigenschaften den Kohlenstofffluss in kataboler Richtung bestimmt (Brunner et al., 1998).

Dieser modifizierte EMP-Weg stellt die Hauptabbauroute für Glucose in *T. tenax* dar. Der nicht-phosphorylative ED-Weg wird in geringerem Maß genutzt, wie durch die Analyse der Verteilung der [¹³C]-Markierung in Alanin, dem direkten Aminierungsprodukt von Pyruvat, bei Anzucht in Gegenwart von [1-¹³C]-Glucose festgestellt werden konnte (Siebers et al., 1997).

Ein wesentliches Anliegen dieser Arbeit besteht darin, durch Untersuchungen an zwei weiteren Enzymen des reversiblen EMP-Weges von *T. tenax* zu einem umfassenderen Verständnis des Mechanismus dieses Stoffwechselweges und seiner Regulation beizutragen. Als Studienobjekte wurden die Triosephosphat-Isomerase (TIM) und die Pyruvat-Kinase (PK) ausgewählt. Beiden Enzymen kommt neben ihrer katalytischen Funktion regulatorische Bedeutung für den Kohlenhydrat-Metabolismus in Bacteria zu (Meijer et al., 1997; Fothergill-Gilmore & Michels, 1993).

Da die Untersuchung von Enzymen aus hyperthermophilen Archaea zwangsläufig Aspekte der Anpassung an hohe Temperaturen einschließt, wurde ihre phänotypische Beschreibung auch im Hinblick auf die Thermoadaptation vorgenommen. Dies veranlaßte mich im Fall der TIM, die Primärstrukturen der Enzymhomologen aus weiteren Archaea mit unterschiedlichen Wachstumstemperaturen zu analysieren. Hierfür konnte auf die vorliegende Beschreibung der TIM des hyperthermophilen Archaeums *Pyrococcus woesei* (Reich: Euryarchaeota) zurückgegriffen werden (Kohlhoff, 1995).

Im Unterschied zur TIM lagen für die archaeale PK keine detaillierten Untersuchungen vor. Die Annotierung der in archaealen Genomprojekten sequenzierten *pyk*-Gene bezieht sich allein auf die Sequenzähnlichkeit zu bacterialen bzw. eucaryalen *pyk*-Genen. Die hier geplanten Untersuchungen sollten zum ersten Mal eine zweifelsfreie Identifizierung eines archaealen *pyk*-Gens durch enzymatische Analyse seines Produktes erlauben. Außerdem war vorgesehen, durch phylogenetische Analysen die strukturelle und funktionelle Diversifikation der PKs im Lauf der organismischen Evolution unter Einbeziehung der archaealen Homologen zu verfolgen.

Funktion und Eigenschaften von Triosephosphat-Isomerasen (TIMs)

Die TIM (E.C. 5.3.1.1) ist ein essentielles glycolytisches Enzym (vgl. Knowles, 1991), welches die Interkonversion von D-Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP) und Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) katalysiert. Die 3D-Struktur einer Enzymuntereinheit ist charakterisiert durch ein (β/α)₈-Fαβ-Motiv, bei dem 8 β-Stränge von 8 α-Helices umgeben sind. Dieses Faltungsmotiv findet sich bei ca. 20 % aller bekannten Enzymproteine (Farber & Petsko, 1990).

Alle bisher untersuchten nicht-archaealen TIMs sind Dimere mit einem Molekulargewicht von 48.000-60.000. Nur die Dimere weisen vollständige Aktivität auf. Monomere TIMs können durch gezielte Mutagenese hergestellt werden, zeigen aber deutlich geringere katalytische Aktivität (Borchert et al., 1994; Schliebs et al., 1996). Die TIM ist ein sehr effizientes Enzym, dessen Umsatzgeschwindigkeit lediglich durch die Diffusion begrenzt wird (Blacklow et al., 1988). Für die Katalyse essentiell sind drei Aminosäuren des aktiven Zentrums, die in allen TIMs konserviert sind, Lys 13, His 95 und Glu 167 (Numerierung entsprechend der Aminosäureposition in der *Trypanosoma brucei*-TIM, vgl. Abb. 1).

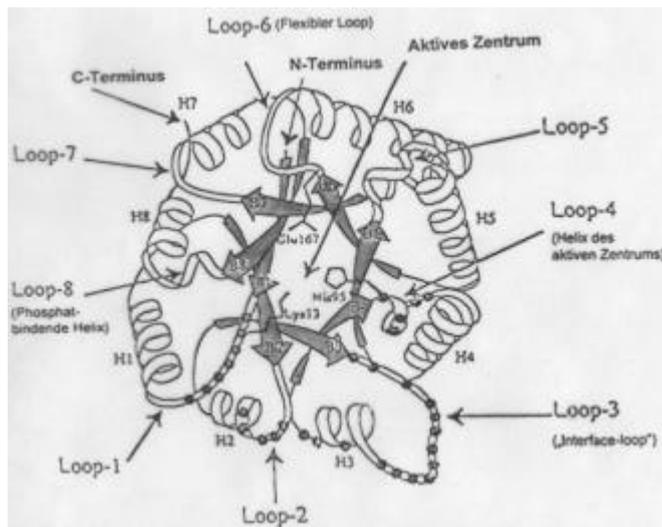


Abb. 1: Schematische Darstellung eines Monomers der TIM aus *Trypanosoma brucei*.

Mit schwarzen Punkten sind die Kontaktstellen der Untereinheiten gekennzeichnet. Die in allen bisher untersuchten Organismen konservierten Aminosäuren des aktiven Zentrums sind hervorgehoben. Funktionell charakterisierte Bereiche sind mit Pfeilen markiert (verändert nach Wierenga et al., 1992).

Detaillierte Analysen des Reaktionsmechanismus haben gezeigt, daß die Umwandlung von DHAP zu GAP nach der Bindung des Substrats in die folgenden Schritte unterteilt werden kann: Die unprotonierte Seitenkette des katalytischen Glu 167 zieht ein Proton am C₁-Atom ab, wodurch ein Endiolat-Intermediat entsteht, in welchem die C₁ und C₂-Atome, die an den C-Atomen gebundenen O-Atome, sowie C₃ und das an C₁ gebundene H-Atom in einer Ebene liegen (s. Abb. 2).

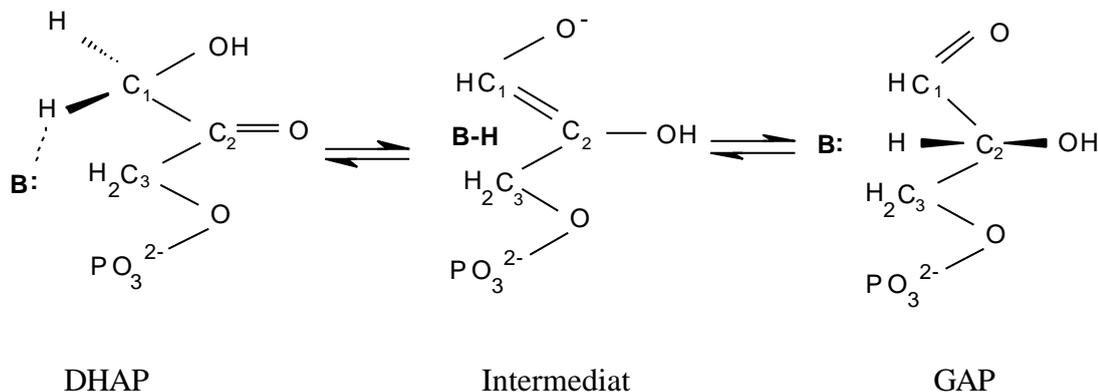


Abb. 2: Die TIM-katalysierte Reaktion (verändert nach Lolis & Petsko, 1990).

B: katalytische Base, **B-H:** katalytische Base mit protonierter Seitenkette.

Das katalytische Histidin ermöglicht anschließend den Protonentransfer zwischen den Sauerstoffatomen, worauf die protonierte Glutamatseitenkette das Proton an das C₂-Atom weitergibt.

Allosterische Eigenschaften konnten für die TIM bisher nicht nachgewiesen werden. Allerdings wurde eine Transkriptionskontrolle des *tpi*-Gens bei *Xanthobacter flavus* (Meijer et al., 1997) und *S. cerevisiae* (Kuroda et al., 1994) beschrieben. Um entsprechende Regulationsstudien auf Genebene bei *T. tenax* durchführen zu können, war die Identifikation des *tpi*-Gens aus diesem Organismus notwendige Voraussetzung.

aktivierbaren Enzyms aus *E. coli* (Mattevi et al., 1995) ergeben hat. Die katalytische A-Domäne weist ebenso wie die TIM ein symmetrisches $(\beta/\alpha)_8$ -Faßmotiv auf. Die dritte Domäne, B, besteht aus einem kleinen β -Faß aus 10 β -Strängen, welches das aktive Zentrum des Enzyms bedeckt. Die C-Domäne schließlich, die am C-Terminus des Proteins liegt, hat ein α/β open-sheet Motiv und besitzt organismenspezifisch regulatorische Bedeutung.

Die Regulation der PK nimmt in vielen Organismen eine zentrale Rolle bei der Kontrolle des Kohlenstoffluxes durch den katabolen EMP-Weg ein. Bei den meisten eucaryalen Organismen ist eine allosterische Regulation und Aktivierung des Enzyms durch Fructose-1,6-bisphosphat (FBP) beschrieben (Fothergill-Gilmore & Michels, 1993), wohingegen PKs aus Prokaryoten entweder durch FBP oder andere Zuckerphosphate (z.B. Ribose-5-phosphat [Sakai & Ohta, 1987]) aktiviert werden können. Eine zweite Gruppe prokaryotischer PKs weist auch in Abwesenheit heterotroper Effektoren basale Aktivität auf und kann z.B. durch Adenosinmonophosphat (AMP) oder Ribose-5-Phosphat aktiviert werden (Fothergill-Gilmore & Michels, 1993).

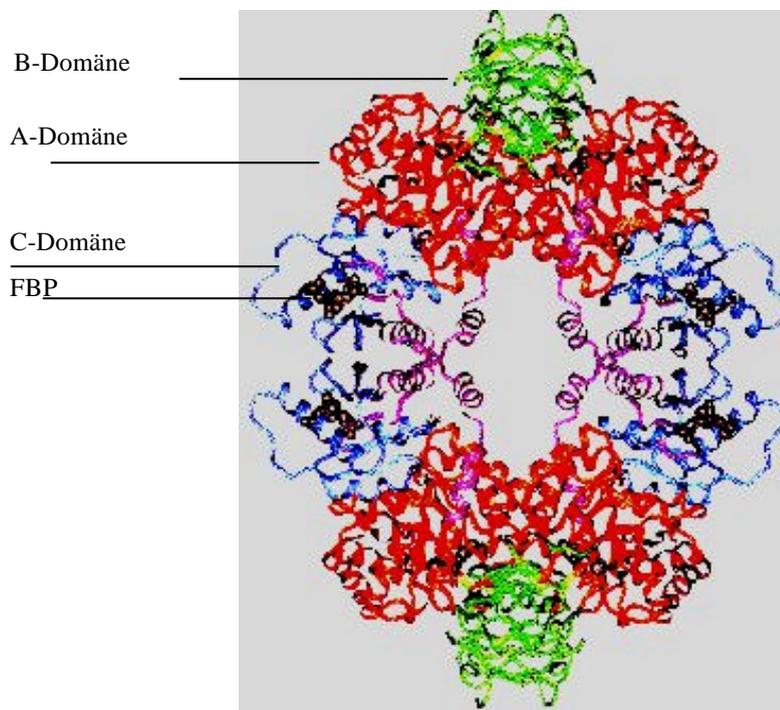


Abb. 4: Struktur der Hefe Pyruvat-Kinase in Gegenwart des allosterischen Effektors Fructose-1,6-bisphosphat (FBP, Abbildung aus Jurica et al., 1998).

Darstellung des Tetramers und der Domänen der vier Untereinheiten. Die FBP-Moleküle sind als schwarze Kugeln in der C-Domäne erkennbar. Die N-terminale α -Helix ist nicht eingezeichnet.

Bei Archaea ist wenig über die Funktion der PK bekannt. Lediglich für die PK aus *Thermoplasma acidophila* liegt eine phänotypische Beschreibung vor, das Gen konnte jedoch bisher nicht identifiziert werden (Potter & Fothergill-Gilmore, 1992). In den bisher analysierten archaealen Genomen konnte zwar das kodierende Gen (*pyk*) für PK in *Pyrobaculum aerophilum* (Fitz-Gibbon et al., 1997), *Methanococcus jannaschii* (Bult et al., 1996) und *Pyrococcus horikoshii* (Kawarabayasi et al., 1998) annotiert werden (s. Tab. 1), funktionelle Untersuchungen am Produkt fehlen aber. Um diese Kenntnislücke zu schließen, insbesondere aber auch um die Bedeutung der PK in der Regulation des Kohlenhydratmetabolismus von *T. tenax* aufzuklären, sollte die PK dieses Archaeums funktionell und strukturell analysiert werden. Die Reinigung der PK aus *T. tenax* wurde

bereits in der Dissertationsschrift von B. Siebers (1995) beschrieben. Ebenso konnte die Aminosäure-Sequenz eines Bromcyan-Fragments ermittelt werden, von der ausgehend in der vorliegenden Arbeit die Klonierung des kodierenden Gens vorgenommen werden sollte. Anschließend war die Expression des Proteins in *E. coli* vorgesehen, um die Regulation des Proteins im Detail studieren zu können. Durch Transkriptanalysen sollte parallel untersucht werden, ob die PK-Aktivität in *T. tenax* auf mRNA-Ebene reguliert wird.

Außerdem sollte eine phylogenetische Analyse vorgenommen werden, um den evolutionären Zusammenhang und die Verwandtschaftsbeziehungen der PKs aus den verschiedenen Domänen des Lebens aufzuklären. Für die TIMs hat eine entsprechende Untersuchung ergeben, daß die eucaryalen Enzyme von einem α -Proteobacterium abstammen (Keeling & Doolittle, 1997), was im Einklang mit einem frühen Endosymbiose-Ereignis steht, das zur Bildung der Mitochondrien führte.

Thermale Stabilisierung von Enzymproteinen durch niedermolekulare Verbindungen

Bei den Untersuchungen der TIMs aus hyperthermophilen Archaea sollte auch ihre thermale Stabilität in Gegenwart und Abwesenheit niedermolekularer Substanzen (low molecular weight compounds= LMCs) analysiert werden. Es gibt zunehmend Hinweise auf eine Stabilisierung von Proteinen gegen thermische Denaturierung durch LMCs wie zyklisches 2,3-Diphosphoglycerat (cDPG), Mannosylglycerat und Di-*myo*-Inositol-1,1'-phosphat (DIP) (Hensel & König, 1988; Ramos et al., 1997; Scholz et al., 1998). Die intrazelluläre Konzentration dieser niedermolekularen Komponenten wird als Antwort auf erhöhte Wachstumstemperaturen bei einigen hyperthermophilen Organismen erhöht (Hensel & König, 1988; Martins et al., 1997). Die Ergebnisse legen den Schluß nahe, daß diese LMCs zur Anpassung an thermophile Habitate beitragen.

Einen Hinweis auf die Funktion dieser Substanzen als Thermoprotektoren *in vivo* stellt die Fähigkeit dar, Proteine *in vitro* gegen irreversible Hitzedenaturierung zu schützen. Als Untersuchungsobjekte bieten sich die in dieser Arbeit charakterisierten TIMs aus *P. woesei*, *M. fervidus* und *T. tenax* an, da die Konzentrationen der niedermolekularen Substanzen in den jeweiligen Organismen gut charakterisiert sind. So akkumulieren Methanogene wie z.B. *M. fervidus* zyklisches 2,3-Diphosphoglycerat (300 mM, Hensel & König, 1988), *P. woesei* Di-*myo*-Inositol-1,1'-phosphat (600 mM, Scholz et al., 1992) und *T. tenax* Trehalose (ca. 70 mM, Martins et al., 1997; Martins, persönliche Mitteilung). Die Fähigkeit dieser niedermolekularen Substanzen, die Enzyme aus den verschiedenen Organismen gegen thermische Inaktivierung zu schützen, soll geprüft werden.

Fragestellungen und Motivation

Aus den oben ausgeführten Befunden ergaben sich für meine Arbeit folgende Fragestellungen:

- Wie erfolgt die Regulation der TIM und der PK von *T. tenax* auf Gen- und Proteinebene?
- Lassen sich Merkmale der Thermoadaptation durch vergleichende Analyse an mesophilen und thermophilen TIMs ableiten?
 - Ergeben sich insbesondere Hinweise auf eine Protektion der Peptidkette gegen hitzeinduzierte kovalente Modifikation?
 - Läßt sich am Beispiel der archaealen TIMs der Trend zur Bildung höherer Oligomere bei Enzymproteinen thermophiler Organismen bestätigen?
- Welches Bild der phylogenetischen Diversifikation der PKs ergibt sich unter Einbeziehung des *T. tenax*-Enzyms

Im ersten Teil der Arbeit wird ein Beitrag zum Verständnis der Funktionsweise, der Quartärstruktur und der thermalen Stabilität archaealer Triosephosphat-Isomerasen geliefert, während im zweiten Teil die Regulation der Pyruvat-Kinase aus *T. tenax* im Mittelpunkt der Untersuchungen steht.