

4. Diskussion

4.1 Struktur und Eigenschaften archaealer TIMs

4.1.1 Merkmale archaealer *tpi*-Gene

Sequenzeigenschaften

Mit der Klonierung und Sequenzierung der *tpi*-Gene der hyperthermophilen Archaea *T. tenax* und *M. fervidus* sowie des mesophilen *M. bryantii* wurde nicht nur angestrebt, die Aminosäuresequenz der kodierten Proteine zu ermitteln, sondern auch die Voraussetzung für die heterologe Expression der Enzyme und damit die Basis für eingehende strukturelle Untersuchungen zu schaffen. Zusammen mit der von Kohlhoff (1995) bearbeiteten TIM von *P. woesei* liegen damit Primärstrukturdaten und Expressionssysteme von vier archaealen TIMs vor.

Alle bisher identifizierten archaealen *tpi*-Gene kodieren für Proteine mit 220-230 Aminosäureresten und sind damit deutlich kürzer als ihre bacterialen und eucaryalen Homologen, die zumeist ca. 250 Aminosäurereste umfassen.

Tab. 11: Größe und GC-Gehalt archaealer *tpi*-Gene.

	Länge des <i>tpi</i> -Gens (bp)	GC-Gehalt des <i>tpi</i> -Gens (%)	GC-Gehalt des Genoms (%)
<i>M. bryantii</i>	681	37	32,7 ^a
<i>M. fervidus</i>	669	35,8	33 ^b
<i>P. woesei</i>	678 ^c	44,8 ^e	37,5 ^c
<i>T. tenax</i>	681	62	55,9 ^d

Quellen für die GC-Werte der Genome:

^a Balch et al., 1979^a

^b Stetter et al., 1981

^c Zillig et al., 1987

^d Leinfelder et al., 1985

^e nach Kohlhoff, 1995

Bei einem Vergleich der GC-Gehalte der *tpi*-Gene aus den vier untersuchten Organismen fällt auf, daß sie um 3-7 % über dem Gesamt-GC-Gehalt der jeweiligen Organismen liegen (Tab. 11). Eine Thermoadaptation auf Nukleinsäureebene im Sinne einer Intensivierung der Codon-Anticodon-Wechselwirkung bei der Translation durch eine generelle Erhöhung des GC-Gehalts im *tpi*-Gen der thermophilen Organismen läßt sich jedoch nicht unbedingt davon ableiten. Zum einen trifft diese Beobachtung auch für den mesophilen Methanogenen *M. bryantii* zu, zum anderen liegt der GC-Gehalt des *tpi*-Gens dieses mesophilen Archaeums über dem des thermophilen *M. fervidus*. Ein entsprechender Befund liegt auch im Fall der *gap*-Gene von *M. bryantii* und *M. fervidus* vor (Biro, 1990).

Transkriptions-, Translationssignale und genomischer Kontext

Bei den methanogenen Vertretern *M. bryantii* und *M. fervidus* findet man 70 Basen vor dem *tpi*-Gen die Sequenz TTTATA, welche mit dem Konsensus für die BoxA des archaealen Promoters (T/CTTAT/AA, Hain et al., 1992), der Bindestelle für das TBP (TATA-Bindeprotein), übereinstimmt. Die in den meisten methanogenen Archaea gefundene Assoziation des *tpi*-Gens mit dem *pgk*-Gen (Gotzes, 1996; Smith et al.; 1997; diese Arbeit) legt eine funktionelle Kopplung dieser Gene und eine mögliche Kotranskription nahe. Die experimentellen Beweise hierfür stehen allerdings noch aus.

Vor den *tpi*-Genen der beiden Methanogenen sowie von *P. woesei* finden sich die purinreichen Sequenzen TGGGGGA (*M. fervidus*), TGGAGGC (*M. bryantii*) bzw. TGGTGAT (*P. woesei*, Kohlhoff et al., 1996), die zu den 3'-Enden der jeweiligen 16S rRNS komplementär sind und als mögliche Ribosomenbindestellen angesehen werden können. Vor dem *T. tenax tpi*-Gen ist allerdings eine entsprechende Sequenzsignatur nicht erkennbar. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß die Translationsinitiation innerhalb der Archaea nicht notwendigerweise an das Vorhandensein einer Shine-Dalgarno-Sequenz gebunden ist. Diese Schlußfolgerung wird auch durch das offensichtliche Fehlen einer entsprechenden Signatur vor einigen Leserahmen des psychophilen Crenarchaeums *Cenarchaeum symbiosum* unterstützt (Schleper et al., 1998).

Im Fall von *T. tenax* beinhaltet das sequenzierte genomische Fragment neben dem *tpi*-Gen stromaufwärts einen Teil eines Leserahmens mit deutlicher Homologie zu Aconitasen, sowie stromabwärts einen unidentifizierten Leserahmen mit Homologen in anderen Archaea und den 5'-Bereich eines offenen Leserahmens für die Citrat-Synthase. Diese unmittelbare Nachbarschaft eines glycolytischen Gens mit Genen des Citrat-Zyklus ist bisher in anderen Archaea nicht beschrieben worden. Bei dem einzigen bisher partiell publizierten Genom eines crenarchaealen Vertreters, *Cenarchaeum symbiosum* (Schleper et al., 1998), liegt das *tpi*-Gen nicht im Verbund mit anderen Genen des zentralen Metabolismus vor.

Die Orientierung und die enge Assoziation des *tpi*-Gens mit dem für die Aconitase kodierenden Gen legen eine Kotranskription der beiden Leserahmen nahe. Northern Blot-Analysen unter Verwendung einer *tpi*-Antisense mRNS-Sonde deuten darauf hin, daß tatsächlich ein Transkript gebildet wird, welches in seiner Länge mit dem zu erwartenden Kotranskript übereinstimmt. Dies geht mit dem Befund einher, daß eine der BoxA des archaealen Promoters entsprechende Sequenz vor dem *tpi*-Gen nicht zu erkennen ist. Für einen Nachweis des Transkriptionsstarts vor dem Aconitase-Gen fehlt allerdings noch die vollständige Sequenz dieses Gens.

Northern Blot-Analysen von B. Tjaden in unserer Arbeitsgruppe weisen darauf hin, daß die Expression des *tpi*-Gens und damit auch des Aconitase-Gens offensichtlich über die angebotene C-Quelle reguliert wird: Unter heterotrophen Bedingungen (in Anwesenheit von Glucose) ist eine deutlich höhere Transkriptmenge festzustellen als unter autotrophen Bedingungen in Gegenwart von CO₂.

In *E. coli* sind insofern ähnliche Verhältnisse beschrieben, als der Regulator *csrA* in seiner Funktion als Induktor kataboler Prozesse eine Erhöhung der TIM-Expression bewirkt (Sabnis et al., 1995). Diese durch katabole Bedingungen beobachtbare Verstärkung der Expression eines Enzyms, das den EMP-Weg in beiden Richtungen katalysiert, ist zum jetzigen Zeitpunkt noch weitgehend unverstanden. Eine mögliche Erklärung könnte sein, daß die über den katabolen EMP-Weg angestrebte Energiekonservierung einen höheren Kohlenstoffflux erfordert als die Bereitstellung von Syntheseprodukten in anaboler Richtung.

Eine entsprechende Erklärung bietet sich für das offenbar gemeinsam mit dem *tpi*-Gen transkribierte Aconitase-Gen an. Da in der Gattung *Thermoproteus* der Citrat-Zyklus sowohl anabol als auch katabol betrieben wird (Schäfer et al., 1989), ist die Aktivität der Aconitase in beiden Fällen notwendig. Die erhöhte Kopienzahl der Aconitase-Transkripte unter heterotrophen Bedingungen könnte auch hier auf die Erfordernis eines höheren Durchsatzes in kataboler Richtung zurückgeführt werden.

Der offene Leserahmen unbekannter Funktion, der in entgegengesetzter Orientierung stromabwärts vom *tpi*-Gen liegt, überlappt mit diesem. Eine Sekundärstrukturvoraussage des putativen Proteins mit dem WWW-basierten Programm „Predator“ (EMBL, Heidelberg) ergab, daß es sich hier möglicherweise um ein Protein mit alternierenden α/β -Sekundärstrukturen handelt. Über eine mögliche Bedeutung der Überlappung der Transkripte kann angesichts der unbekanntenen Funktion dieses Proteins nur spekuliert werden.

Mit der putativen Citrat-Synthase, die durch den stromabwärts lokalisierten Leserahmen kodiert wird, ist ein zweites im Citrat-Zyklus involviertes Enzym identifiziert worden. Die Citrat-Synthase wurde in anderen Archaea (z.B. *P. furiosus*, Muir et al., 1995) intensiv untersucht und das Vorliegen dreidimensionaler Strukturen des Proteins aus Organismen mit einem Temperaturoptimum zwischen 10°C und 100°C haben zum Verständnis der Thermoadaptation von Proteinen beigetragen (Russell et al., 1997; 1998). Eine Analyse der Raumstruktur der *T. tenax* Citrat-Synthase wäre unter dem Aspekt interessant, die Stabilisierung des Enzyms durch hydrophobe Interaktionen und ionische Wechselwirkungen zu untersuchen. Derzeitig verfügbare Raumstrukturdaten deuten darauf hin, daß stabilisierende Netze ionischer Wechselwirkungen bei höheren Wachstumstemperaturen der Organismen verstärkt auftreten. Ein Vergleich der Raumstrukturen der Citrat-Synthasen von *S. solfataricus* (T. opt. 80°C), *T. tenax* (T. opt. 86°C) und *P. furiosus* (T. opt. 100°C) gäbe hierzu möglicherweise interessante Einsichten.

4.1.2 Expression archaealer TIMs in *E. coli*

In der vorliegenden Arbeit wurden die TIMs aus den hyperthermophilen Archaea *M. fervidus* und *T. tenax* sowie dem mesophilen *M. bryantii* in *E. coli* exprimiert. Während für den Expressionsnachweis der ersten beiden Proteine ihre Hitzestabilität ausgenutzt werden konnte, wurde für die Expression der TIM aus dem mesophilen *M. bryantii* eine *tpi*-defekte *E. coli*-Mutante gewählt, um eine spezifische Aktivitätsbestimmung des heterolog exprimierten Enzyms zu ermöglichen.

Offensichtlich behindert die niedrige Wachstumstemperatur von *E. coli* nicht prinzipiell die Expression von Enzymen aus hyperthermophilen Archaea. In unserer Arbeitsgruppe erwies sich dieses Expressionssystem als durchweg geeignet (u.a. Kohlhoff et al., 1996, Hess et al., 1995). Allerdings waren die Expressionsleistungen häufig verschieden. Gute Ausbeuten wurden z.B. im Fall der GAPDH aus *P. woesei* erzielt (3 mg Protein/g Naßzellen; Zwickl et al., 1990), während die in dieser Arbeit beschriebene Expression der *M. fervidus* TIM unter Verwendung des Vektors pJF118EH sehr niedrig lag (20 µg Protein/g Naßzellen).

Für diese schlechte Expressionsleistung können verschiedene Gründe verantwortlich sein: So beeinflusst sicher der abweichende Codon-Gebrauch über die Translation die Proteinsyntheserate. Von den 222 Codons der *M. fervidus*-TIM gehören 44 (20%) zu denjenigen Codons, die in stark exprimierten Genen von *E. coli* nur einen Anteil von 2,1% an allen verwendeten Codons ausmachen (nach Wisconsin Sequence Analysis Package, GCG Inc.). Zusätzlich sind in der *M. fervidus*-TIM ebenso wie in der *T. tenax*-TIM häufig Codons (GGA-Gly, ATA-Ile, CTA-Leu, AGA-Arg) zu finden, denen eine regulatorische Funktion bei der Kontrolle schwach exprimierter Gene in *E. coli* zugeschrieben wird (Grosjean & Fiers, 1982).

Der Befund, daß die *M. fervidus*-TIM in einem anderen Expressionssystem (Vektor pET15b) deutlich besser exprimiert werden konnte, weist jedoch darauf hin, daß auch die Struktur des rekombinanten Plasmids entscheidenden Einfluß auf die Expressionsrate nehmen kann (Makrides, 1996): So ist z.B. die freie Zugänglichkeit der Ribosomenbindestelle eine Vorbedingung für eine effiziente Translation. Möglicherweise bilden sich im rekombinanten pJF118 EH-Plasmid Sekundärstrukturen um die Ribosomenbindestelle des *tpi*-Gens von *M. fervidus* aus, die die Translationsinitiation negativ beeinflussen (Abb. 31).

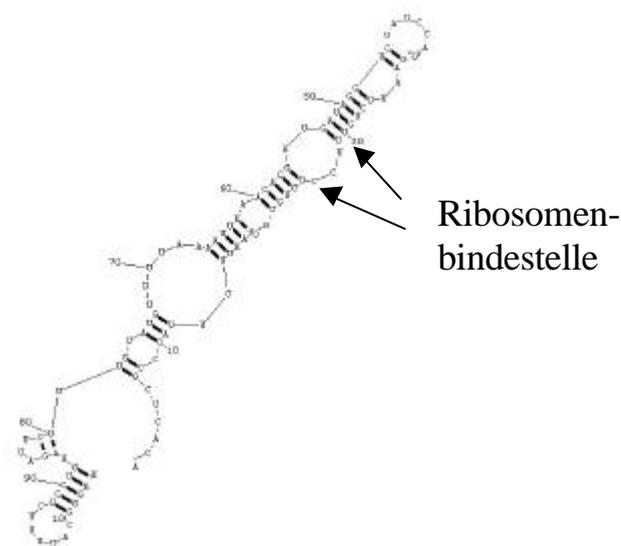


Abb. 31: Mögliche mRNS-Sekundärstruktur des rekombinanten pJF118EH-Plasmids, die sich im Bereich der Shine-Dalgarno-Sequenz vor dem *tpi*-Gen von *M. fervidus* ausbilden könnte.

Die Abbildung wurde mit Hilfe des Programms "RNA Structure" (Walter et al., 1994) erstellt. Der Bereich der Ribosomenbindestelle ist durch Pfeile eingegrenzt.

4.1.3 Vergleichende Primärstrukturanalyse archaealer TIMs mit Enzymen aus den Domänen der Bacteria und Eucarya

Eine Methode zur Analyse Thermophilie-spezifischer Merkmale besteht in einem Vergleich zwischen Proteinhomologen aus meso- und thermophilen Organismen. Wesentlich dabei ist, daß der Vergleich zwischen möglichst eng verwandten Spezies durchgeführt wird, um eine Verfälschung oder Überdeckung der entsprechenden Merkmale (auf den verschiedenen Ebenen der Proteinstruktur: Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur) durch zu große phylogenetische Distanz zu vermeiden. Die Ergebnisse dieser Analyse müssen dann im Experiment überprüft werden.

Für entsprechende Untersuchungen an archaealen TIMs stehen inklusive der Daten der abgeschlossenen Genomprojekte bislang sieben Sequenzen aus hyperthermophilen Archaea und die Sequenz des mesophilen *M. bryantii* zur Verfügung. Allerdings reduziert der beschränkte Datenumfang -insbesondere an mesophilen Referenzsequenzen- den Aussagewert dieser Vergleiche und die Schlußfolgerungen müssen als vorläufig angesehen werden.

In der Vergangenheit wurde häufig der Versuch unternommen, durch Vergleiche der Aminosäure-Zusammensetzungen von meso- und thermophilen Protein-Homologen Hinweise auf thermoadaptive Trends zu erhalten (Argos et al., 1979). Abgeleitete Tendenzen wie z.B. die Erhöhung des Arg/Lys- oder des Ala/Gly-Verhältnisses in thermophilen Sequenzen (Menendez-Arias & Argos, 1989) erwiesen sich als nicht allgemein anwendbar. Offensichtlich sind die Möglichkeiten der Natur, konformell stabile Proteine zu synthetisieren zu vielfältig, als daß man sie auf die Zu- oder Abnahme bestimmter Aminosäurereste reduzieren könnte. Eine gewisse Ausnahme hiervon bilden thermolabile Reste, die in Proteinen thermophiler Organismen häufig diskriminiert werden.

Wie Untersuchungen u.a. in unserem Labor zeigen, unterliegen auch thermophile Proteine prinzipiell hitzeinduzierten kovalenten Schädigungen. Asn- und Gln-Reste unterliegen Deamidierungsreaktionen, Cystein-Reste neigen zu Oxidationsreaktionen. Ferner können Peptidbindungen, an denen Asn bzw. Gln beteiligt sind, bei hohen Temperaturen bevorzugt gespalten werden.

Strategien, die kovalente Stabilität eines thermophilen Proteins zu erhöhen, bestehen darin, labile Reste aus exponierten Regionen (z.B. Loop-Bereichen) zu entfernen (Russell et al., 1997), oder die Reste durch Wasserstoffbrücken-Netzwerke so zu fixieren, daß die Bildung entsprechender Übergangszustände, über welche die chemischen Modifikationsreaktionen verlaufen, verhindert werden. Entsprechend der erstgenannten Strategie sollte man erwarten, daß tendenziell bei Proteinen aus thermophilen Organismen Gln, Asn und Cys in geringerer Frequenz auftreten. Dies konnte bei einem Vergleich einer Reihe von Enzymen aus nahe verwandten Organismen bestätigt werden (Hess et al., 1995). Vergleicht man allerdings die Aminosäurezusammensetzung der TIMs aus dem mesophilen *B. subtilis* und dem thermophilen *B. stearotherophilus* (Tab. 12), so läßt sich diese Tendenz nicht erkennen. Die Thermoadaptation könnte in diesem Fall eher auf der Stabilisierung thermolabiler Reste durch Rigidisierung der Proteinkonformation beruhen.

Ein Vergleich zwischen der Aminosäurezusammensetzung von Genomen meso- und thermophiler Bacteria ergibt eine deutliche Abnahme an Gln-Resten, wohingegen der Anteil an Cys und Asn im thermophilen Vertreter weniger stark reduziert ist (Deckert et al., 1998). Hier muß jedoch eingewendet werden, daß zum einen die für diese Analyse herangezogenen Organismen (u.a. *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma genitalium*, *E. coli*, *Aquifex aeolicus*) phylogenetisch sehr divers waren. Zum anderen wurden für diesen Vergleich alle Proteine der jeweiligen Organismen, also auch Nicht-Homologe, undifferenziert berücksichtigt, was methodisch bedenklich erscheint.

Tab. 12: Relative Aminosäurezusammensetzung (in %) von mesophilen und thermophilen TIMs:

	Mesophile		Thermophile					
	<i>M. bryantii</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. stearo.</i>	<i>T. maritima</i>	<i>M. fervidus</i>	<i>P. woesei</i>	<i>T. tenax</i>	<i>A. fulgidus</i>
Domäne:	Archaea	Bacteria	Bacteria	Bacteria	Archaea	Archaea	Archaea	Archaea
geladen:								
Glu	9,7	10,8	7,9	11	10	9,3	7,5	9,4
Asp	5,3	4,8	4,7	3,6	4,5	2,6	3,5	4,0
Lys	5,8	8,3	4,7	7,1	9,1	7,6	5,3	6,3
Arg	1,8	2,4	4,3	6	1,8	3,1	5,3	4,9
His	2,7	2,0	2,3	1,6	1,8	1,8	2,6	1,8
polar/ ungeladen:								
Gly	7,5	8,3	8,7	9,5	6,8	8	8,8	8,1
Ser	6,6	7,1	5,1	4,7	7,3	4,4	5,7	5,8
Thr	5,8	4,0	4,7	4	4,1	5,8	2,6	3,1
Asn	4,9	2,0	2,0	2,4	4,5	4,4	2,6	4,5
Gln	0,8	3,2	5,5	3,6	1,8	1,3	0,8	0,9
Cys	1,3	1,2	1,6	1,1	1,8	1,3	0,4	1,3
hydrophob:								
Tyr	1,3	2,0	2,0	2,4	1,4	1,3	1,7	2,2
Leu	9,3	6,3	6,3	9,1	8,6	7,6	11,5	9,4
Met	1,3	2,0	2,0	2	1,8	2,6	0,4	1,4
Val	8	8,7	8,7	9,5	12,2	12,0	11,0	13,0
Ile	11,0	6,0	6,0	9,1	7,3	7,6	5,3	5,4
Trp	0	0,8	0,8	0	0	0	0	0
Pro	5,3	3,2	3,2	2,8	4,5	5,8	5,7	3,1
Phe	1,3	3,2	3,2	4,7	0,9	1,3	0,8	2,7
Ala	9,7	11,5	11,5	6	9,5	12,0	17,0	12,6

Referenzen siehe Abb. 32. *B. stearo.*: *Bacillus stearotherophilus*

Bei einem Vergleich der Aminosäuregehalte zwischen archaealen mesophilen und thermophilen TIMs ist zwar eine leichte Reduzierung des Asn-Gehalts bei den thermophilen Vertretern gegenüber *M. bryantii* zu konstatieren, dies gilt jedoch nicht für Gln und Cys. Möglicherweise ist *M. bryantii* als mesophile Referenz ungeeignet. Hinweise auf eine mögliche thermophile Vergangenheit von *M. bryantii*, die sich aus der TIM-Sequenz ergibt, werden im nächsten Abschnitt diskutiert.

Bei archaealen TIMs aus thermophilen Organismen ist der Anteil an hydrophoben Aminosäuren besonders hoch (im Durchschnitt >50% verglichen mit einem Anteil hydrophober Aminosäuren im Genom der Thermophilen von 43%, Deckert et al., 1998). Ein Grund hierfür könnte sein, daß die Dimerisierung der archaealen TIM-Dimere zum Tetramer (s. 4.1.4) über hydrophobe Wechselwirkungen ermöglicht wird, was sich in einer Erhöhung des Anteils an hydrophoben Aminosäuren widerspiegeln würde. Die TIM des mesophilen *M. bryantii*, die nach den vorliegenden Daten ein Dimer bildet, weist dagegen nur einen Anteil an hydrophoben Aminosäuren von 47% auf.

Analyse thermolabiler Reste in TIMs

Hinweise auf eine mögliche Thermophilie-spezifische Substitution von Asn-Resten in der archaealen TIM-Struktur ergaben Sequenzvergleiche von TIMs aus den drei Domänen: Auffälligerweise wurde das bei allen bacterialen und eucaryalen TIMs konservierte Asn an Position 13 (Numerierung des Hefe-Enzyms, Abb. 32) durch His (in den thermophilen Bacteria) bzw. Tyr (bei den Archaea) ersetzt. Wie Untersuchungen von Ahern et al. (1987) zeigten, ist der Asn-Rest 13 der Hefe-TIM thermolabil und an der irreversiblen thermischen Inaktivierung des Enzyms maßgeblich beteiligt. Unter dem Aspekt der Thermoprotektion wäre die Ersetzung von Asn in den thermophilen Bacteria und Archaea somit verständlich. Eine ähnliche Situation findet sich an Position 64: Alle TIMs aus mesophilen Bacteria und Eucarya besitzen an dieser Position Asn. Der Befund, daß dieser Aminosäurerest bei den Enzymen des thermophilen Bacteriums *B. stearothermophilus* (Delboni et al., 1995) und allen thermophilen Archaea ersetzt ist, könnte auch unter einem thermoprotektiven Aspekt interpretiert werden. Der andere, ebenfalls thermophile Vertreter der Bacteria, *T. maritima* besitzt zwar Asn 64, jedoch bildet in diesem Fall die TIM einen bifunktionellen, tetrameren Komplex mit der 3-PGK (Schurig et al., 1995) und schützt möglicherweise dadurch diesen Aminosäurerest vor kovalenter Modifikation.

Die thermoadaptive Begründung für diese Asn-Austausche wird allerdings dadurch in Frage gestellt, daß auch in der TIM des mesophilen *M. bryantii* diese Reste an beiden Positionen ausgetauscht sind. Es bleibt derzeit offen, ob diese Austausche als Archaea-spezifisch oder als Thermophilie-spezifisch anzusehen sind.

Aufgrund der überraschend hohen Thermostabilität des *M. bryantii*-Enzyms ist es denkbar, daß der Organismus thermophile Vorfahren besitzt und daß damit die beobachteten Austausche Relikte seiner thermophilen Vergangenheit darstellen. Für eine exakte Schlußfolgerung müßten Mutationsstudien unternommen werden, um die Bedeutung der Aminosäureaustausche letztlich zu klären. Ferner müssen weitere Proteine von *M. bryantii* in dieser Hinsicht analysiert werden, um die Vermutung zu erhärten, daß dieser Organismus von einem thermophilen Vorfahren abstammt.

		1	10	20	30	40	50	60					
EUCARYOTA	YEAST	-----	ARTFFVGGNFKLN	NGSKQSIKEIVERLNTASIPEN	-----	VEVVICPPATYLDYSVSLVKKPQVTVGA	Q	NAY					
	HUMAN	-----	APSRKFFVGGNWKMN	GRKQSLGELIGLTLNAAKVPAD	-----	TEVVCAPPTAYIDFARQKLDPKI	AVAA	Q	NCY				
	CHICK	-----	APRKFFVGGNWKMN	GDKKS LGELIHTLNGAKLSAD	-----	TEVVCGAPSIYLD FARQKLD	DAKIGVAA	Q	NCY				
	DROME	-----	MSRKFCVGGNWKMN	GDQKSI AEIAKTLSSAALDPN	-----	TEVVI GCPAIYLMYARNLLPCEL	GLAG	Q	NAY				
	ARATH	-----	MARKFFVGGNWKCN	GTAEVKKIVNTLNEAQVPSQD	VVEVVV	SPPYVFLPLVKSTLRSD	FFVAA	Q	NCW				
	MAIZE	-----	GRKFFVGGNWKCN	GTDDQVEKIVKTLNEGQVPPSD	VVEVVV	SPPYVFLPVVKSQ	LRQEFVAA	Q	NCW				
	SECCE	----	MAGSGKFFVGGNWKCN	GTKE SISKLVSDLNAATLES	-----	VDVVVAPFFIYIDQVKSS	LTDRIEVSA	Q	NTW				
	TRYBB	----	MSKPQPIAAANWKC	NGSQSLSLIDLFNST	SINHD	-----	VQCVVASTFVHLAMTKERLS	HPKFVIAA	Q	NAI			
	LEIME	----	MSAKPQPIAAANWKC	NGTTASIEKLVQVFNEHT	ISHD	-----	VQCVVAPT FVHIPLVQAKLR	NPKYVISA	ENAI				
	PLAFA	-----	MARKYFVAANWKC	NGTLESIKSLTNSFN	NLDFDPSK	-----	LDVVVFPVSVHYDHTR	KLLQSKFSTGI	Q	NV			
BACTERIA	ECOLI	-----	MRHPLVMGNWKL	NGSRHMVHELVS	NLRKELAGVAGCAVA	IAPPEMYIDMAKREA	EGSHIMLGA	Q	NVD				
	BACSU	-----	MRKPIIAGNWKMN	NKTLGEAVSFVEVK	SSIPAAD	-----	KAEAVVSPALFLEK	LASAVKGTDLK	VGA	Q	NMH		
	BACST	-----	MRKPIIAGNWKMN	HTLAEAVQFVEDV	KGHVPPADEVI	SVV	CAPFLFLDR	LVQAADG	TDLKI	GA	Q	TMH	
	THEMA	-----	ITRKLILAGNWKMN	HTISEAKKFVSL	LVNELHDVKEFE	IVV	CPPFTAL	SEVGEILSGR	NIKLGA	Q	NVF		
	ARCFU	-----	MRKMGVVIINFKAY	KEGFGKRALELAK	IAENVASRCDEY	VGIAVSFLDL	PVIAREVS	-----	IDVYA	Q	HVD		
	PYRHO	----	MVPMKLEPIIAINFKTY	IEATGKRALEIAKAA	ERVYK	ETGVTIVVAP	Q	LVDLR	MIAENVE	-----	IPVFA	Q	HID
	PYRWO	----	MAKLKEPIIAINFKTY	IEATGKRALEIAKAA	EKVYK	ETGVTIVVAP	Q	LVDLR	MIAESVE	-----	IPVFA	Q	HID
	METTH	ML	EDELKDP	IVILNFKTY	LESTGERALELAS	ICGDVADET	GVNMAVAP	QHMDLHRV	SDAVE	-----	IPVLA	Q	HID
	METJA	-----	MLIVINYKTYNES	IGNRGL	EIAKIAEKV	SEESGITIG	VAPQFV	DLRMI	VENVN	-----	IPVYA	Q	HID
	METFE	-----	MLDRPIIVLNFKTY	KESTGENALKLAK	KCEQVSE	EYGVKII	VAPQHMDL	RYVSEN	VNVN	-----	IPVIA	Q	HID
ARCHAEA	METBR	----	MNEIKETPIIVLNFKTY	LESTGENALKLAK	GSEMVAEET	GVNIMVHP	QYADI	YRIAHEVN	-----	IPVLA	Q	HID	
	THETX	-----	MRLPILIIINFKAY	GEAAGKRAVELAKAA	ERAAREL	GVNI	VVAPNHLE	LGLVLSQ	SVD	-----	IPVYA	Q	GAD

⊕

Abb. 32: Vergleich des N-terminalen Bereichs von TIMs aus 22 Organismen.

Die Numerierung bezieht sich auf die entsprechenden Positionen im Hefe-Enzym. Das an der Katalyse beteiligte, in allen Organismen konservierte Lysin, ist durch ⊕ gekennzeichnet. Die thermolabilen Asparaginreste bzw. deren Substituenten in den thermophilen und archaealen Spezies sind unterstrichen. "-" markiert Lücken, die zur besseren Alignierung der Sequenzen eingeführt wurden. Die Markierungen grenzen die Vertreter der **EUCARYA**, **BACT** (=Bacteria) und **ARCHAEA** voneinander ab. YEAST: *Saccharomyces cerevisiae* (P00942), HUMAN: *Homo sapiens* (U47924), CHICK: *Gallus gallus* (P00940), DROME: *Drosophila melanogaster* (P29613), ARATH: *Arabidopsis thaliana* (P48491), MAIZE: *Zea mays* (L00371), SECCE: *Secale cereale* (P46226), TRYBB: *Trypanosoma brucei* (P04789), LEIME: *Leishmania mexicana* (P48499), PLAFA: *Plasmodium falciparum* (Q07412), ECOLI: *Escherichia coli* (P04790), BACSU: *Bacillus subtilis* (P27876), BACST: *Bacillus stearothermophilus* (P00943), THEMA: *Thermotoga maritima* (L27492), ARCFU: *Archaeoglobus fulgidus* (AE000876), PYRHO: *Pyrococcus horikoshii* (AP000007), PYRWO: *Pyrococcus woesei* (Y09481), METTH: *Methanobacterium thermoautotrophicum* (AE000876), METJA: *Methanococcus jannaschii* (Q58923), METFE: *Methanothermus fervidus* (diese Arbeit), METBR: *Methanobacterium bryantii* (Y11302), THETX: *Thermoproteus tenax* (diese Arbeit). Die Angaben hinter den Organismen beziehen sich auf die Einträge in der NCBI-Datenbank (vgl. Abb. 23).

Analyse archaeenspezifischer Deletionen in der TIM-Sequenz

Ein Vergleich von TIM-Proteinen aus Archaea mit den Homologen aus Bacteria und Eucarya zeigt, daß die archaealen Proteine in der Regel um 20-30 AS verkürzt sind. Ein Alignment der Sequenzen verdeutlicht, daß bei den archaealen Vertretern im Bereich der inaktiven Flanke des Enzyms und am Boden des $(\beta/\alpha)_8$ -Fasses Deletionen in Loop-Regionen im Bereich der Helices 4-6 auftreten (Abb. 33).

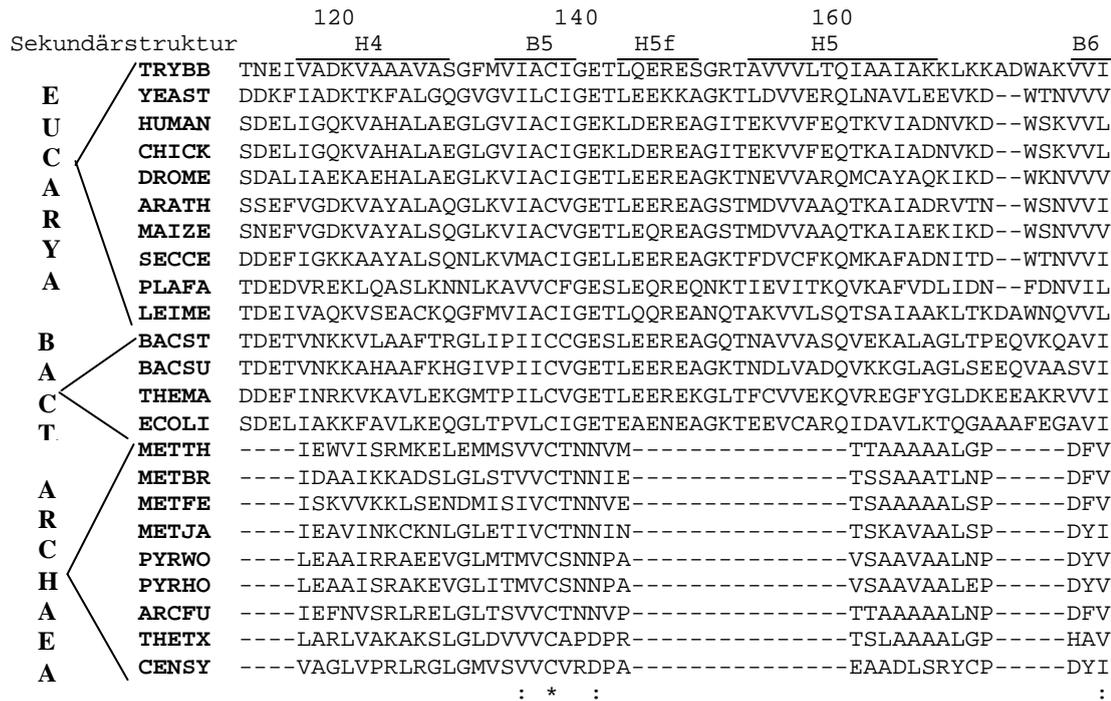


Abb. 33: Partielles Alignment von 23 TIM-Sequenzen aus den drei Domänen Eucarya, Bacteria und Archaea.

Die Sekundärstruktur motive beziehen sich auf die Struktur der TIM von *Trypanosoma brucei* (Wierenga et al., 1992). "*" kennzeichnet Positionen, die in allen Organismen konserviert sind, ":" steht für chemisch ähnliche Aminosäuren. "-" markiert Lücken, die zur besseren Aligrierung der Sequenzen eingeführt wurden. Die Bezeichnung der Arten erfolgte nach dem in Abb. 32 angegebenen Schlüssel.

Ursprünglich wurde vermutet, daß diese Verkürzungen in Verbindung mit der Bildung der neuen Untereinheiten-Kontaktstellen im tetrameren Verband der TIMs der hyperthermophilen Archaea stehen (Kohlhoff et al., 1996). Die dimere TIM von *M. bryantii* jedoch weist dieselben Verkürzungen auf wie die als Tetramere nachgewiesenen TIMs von *P. woesei*, *M. fervidus* und *T. tenax*. Weil keine dreidimensionalen Strukturdaten von archaealen TIMs vorliegen, ist die Bedeutung der auffallenden Verkürzungen weitgehend offen. Da sie auch bei dem psychrophilen Archaeum *Cenarchaeum symbiosum* auftreten, scheinen sie eher ein domänenspezifisches Merkmal darzustellen. Sollten sie an der Tetramerisierung beteiligt sein, könnten sie als notwendige, nicht aber als hinreichende Bedingung für den höheren Aggregationszustand angesehen werden.

4.1.4 Vergleichende Quartärstrukturanalyse archaealer TIMs

Die vorstehenden Untersuchungen zeigen, daß in den untersuchten hyperthermophilen Archaea tetramere TIM-Strukturen vorliegen. Bei der TIM des mesophilen *M. bryantii* handelt es sich nach den vorliegenden Erkenntnissen dagegen wie bei den TIMs aus den Domänen Eucarya und Bacteria um ein Dimer. Die Ergebnisse der Quartärstrukturanalysen faßt Tab. 13 zusammen.

Tab. 13: Molekulargewichte archaealer Triosephosphat-Isomerasen.

	M_r Untereinheit	M_r berechnet	M_r nativ
<i>M. bryantii</i>	24.000 ^a	23.892	57.000 ^b
<i>M. fervidus</i>	23.500 ^a	23.598	95.000 ^{b,c}
<i>P. woesei</i>	24.000 ^a	23.697 ^a	100.000 ^{b,c}
<i>T. tenax</i>	24.000	23.282	104.000 ^c

^a Daten aus Kohlhoff, 1995; Kohlhoff et al., 1996

M_r Untereinheit: abgeleitet aus der SDS-PAGE

M_r berechnet: berechnet aus der Aminosäurezusammensetzung

M_r nativ: ^b Ergebnis der Gelfiltration ^c Ergebnis der Ultrazentrifugation

Ähnliche Trends zur Bildung höherer Oligomeren bei thermophilen Enzymhomologen konnten z.B. auch für 3-Phosphoglycerat-Kinasen (3-PGKs, Hess et al., 1995), Phosphoribosyl-Anthranilat-Isomerasen (PRAIs, Hennig et al., 1997) und Ornithin-Carbamoyltransferasen (OTCasen, Villeret et al., 1998) beobachtet werden. Es liegt daher nahe, eine Verbindung zwischen der Bildung höher aggregierter Formen und der Anpassung an hohe Temperaturen herzustellen. Eine Erklärung für die Tendenz zur Bildung von höheren Oligomeren könnte in einer Erhöhung der Thermostabilität dieser Proteine durch zusätzliche Untereinheiten-Kontakte gesehen werden. Generell ist zu erwarten, daß diese Strategie der Thermoadaptation nur dann angewendet werden kann, wenn die höhere Aggregationsform die Zugängigkeit des aktiven Zentrums nicht beeinträchtigt.

Für die TIM der thermophilen Archaea liegen noch keine 3D-Strukturdaten vor, so daß über die Assoziation der Untereinheiten im Tetramer keine Aussagen getroffen werden können. Ein von uns postuliertes Modell geht davon aus, daß die Dimerisierung der Dimere über katalytisch inaktive Bereiche, den "Boden" und die Flanke (α -Helices 4 bis 6) des $(\beta/\alpha)_8$ -Fasses erfolgt. Diese Modellvorstellung wird gestützt durch einen analogen Befund bei der PRAI von *T. maritima*. Dieses Enzym, das ebenfalls zur Familie der $(\beta/\alpha)_8$ -Faßproteine gehört, liegt im Gegensatz zu monomeren Homologen aus mesophilen Organismen als Dimer vor. Die Röntgenstrukturanalyse wies den katalytisch inaktiven Teil des $(\beta/\alpha)_8$ -Fasses als Kontaktstelle für die Dimerisierung aus, die durch hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert wird (Hennig et al., 1997).

Kristallographische Analysen an den TIMs von *M. fervidus* und *P. woesei*, die derzeit von der Arbeitsgruppe Taylor (Bath, UK) durchgeführt werden, sollen Klarheit über die Assoziation der TIM-Tetramere liefern.

Um einen Zusammenhang zwischen Oligomerisierung und Thermoadaptation, d.h. Thermostabilisierung herzustellen, gilt z.Zt. der TIM von *T. tenax* besonderes Interesse. Der Befund, daß das Enzym unter den Bedingungen der Gelfiltration ein deutlich geringeres Molekulargewicht (67.000) aufwies als unter denen der analytischen Gleichgewichtszentrifugation (104.000) ist ein deutlicher Hinweis darauf, daß das Protein einer konzentrationsabhängigen Dissoziation unterliegt. Die Dimer-Tetramer-Gleichgewichtslage und ihre Beeinflussung durch verschiedene Parameter (Temperatur, Ionenstärke, extrinsische Faktoren) wird derzeit untersucht. Die Kenntnis der Gleichgewichtslage zwischen Dimer und

Tetramer würde erlauben, quantitative Beziehungen zwischen der Untereinheiten-Bindung und der Thermostabilität herzustellen.

Weiterhin ist es von Interesse, den Einfluß von Trehalose auf die Quartärstruktur der *T. tenax*-TIM zu untersuchen. Im Fall der *T. tenax*-TIM scheint Trehalose in einer Konzentration von 300 mM die Dissoziation in Dimere zu begünstigen. In Gegenwart von Trehalose eluierte bei der Gelfiltration das Maximum der TIM-Aktivität bei 54.000 und bei der Gleichgewichts-Ultrazentrifugation erhöhte sich der Anteil der langsamer sedimentierenden Form von 10% auf 30% (Abb. 13). Über die Funktion von Trehalose, die in *T. tenax* unter normalen Wachstumsbedingungen in einer Konzentration von ca. 70 mM akkumuliert (Martins et al., 1997; Martins, persönliche Mitteilung) wird, ist derzeit nichts bekannt. Bei dem hyperthermophilen Euryarchaeoten *Thermococcus litoralis*, der ein sehr effizientes Aufnahmesystem für Trehalose besitzt (Horlacher et al., 1998), führen Streßbedingungen wie z.B. Erhöhung der NaCl-Konzentration oder der Temperatur zur Akkumulation von Trehalose (Lamosa et al., 1998). In *T. tenax* ist eine Funktion der Trehalose als Thermoprotektans aufgrund der geringen intrazellulären Konzentration nicht zu erwarten. Allerdings liegen keine Untersuchungen zur Änderung des intrazellulären Trehalosegehalts als Reaktion auf andere Streßfaktoren als Temperatur bei *T. tenax* vor.

4.1.5 Enzymatische Aktivität und thermale Stabilität archaealer TIMs

Bezüglich der katalytischen Umsatzgeschwindigkeit ist die TIM eines der am höchsten evolvierten Enzyme. Diese Einschätzung wird durch die katalytischen Eigenschaften der *M. fervidus*- und *P. woesei*-TIM bestätigt. Selbst bei suboptimalen Temperaturbedingungen (70°C) zeigen die beiden Enzyme spezifische Aktivitäten von 2200 bzw. 3900 U/mg (gemessen in glycolytischer Richtung; Kohlhoff, 1995). Demgegenüber liegt die spezifische Aktivität der *T. tenax*-TIM mit 620 U/mg bei 70°C deutlich niedriger. Die Ursachen für diese relativ niedrige spezifische Aktivität sind derzeit nicht bekannt. Als mögliche Erklärungen können die leichte Dissozierbarkeit des Enzyms, die eventuell zu einer Aktivitätsminderung führen können oder das Fehlen von Aktivatoren, die im *in vitro*-Test nicht berücksichtigt wurden, genannt werden.

Um die physiologische Aktivität der TIMs der thermophilen Archaea miteinander vergleichen zu können, wurde in Tab. 14 die Spezifitäts-Konstante $k_{\text{cat}}/K_{\text{M, DHAP}}$, welche ein Maß für die Geschwindigkeit der enzymatischen Reaktion unter substratlimitierenden Bedingungen darstellt, ermittelt und mit dem relativen Anteil des Enzyms in zellfreien Extrakten multipliziert.

Tab. 14: Vergleich katalytischer Eigenschaften archaealer TIMs.

Organismus	spez. Aktivität des homogenen Proteins bei 70°C [U/mg]	$K_{\text{M, DHAP}}$ bei 70°C [mM]	Enzymkonzentration (Anteil des Enzyms am Gesamtprotein) [$\times 10^{-2}$]	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M, DHAP}} \times$ Enzymkonz. [$\text{min}^{-1} \times \text{mM}^{-1}$]
<i>T. tenax</i>	620	1,3	0,06	6
<i>P. woesei</i>	3900	2,3	0,04	16
<i>M. fervidus</i>	2200	2,0 ^a	0,027	7

^a für das rekombinante Enzym bestimmter Wert

Unter der Annahme vergleichbarer Substratkonzentrationen geben die ermittelten Werte Aufschluß über die relativen Umsatzgeschwindigkeiten unter nicht-sättigenden Bedingungen, wie sie in der Zelle anzunehmen sind. Wie zu ersehen, liegen die Werte für alle drei Enzyme in vergleichbarer Größenordnung. Dies deutet darauf hin, daß in den untersuchten Organismen unter *in vivo*-Bedingungen eine vergleichbare TIM-Gesamt-Aktivität vorliegt. Die biochemischen Eigenschaften der in *E. coli* exprimierten und der aus den thermophilen Archaea isolierten Enzyme waren in den untersuchten Fällen vergleichbar. Eine Ausnahme stellt lediglich die höhere Affinität des rekombinanten *M. fervidus*-Enzyms zum Substrat DHAP im Vergleich zum authentischen Enzym dar (2 mM gegenüber 8,8 mM für das aus *M. fervidus* isolierte Enzym). Ursachen hierfür könnten methodischer Natur sein: Die kinetischen Messungen des aus *M. fervidus* isolierten Enzyms wurden in Gegenwart des kompetitiven Inhibitors Arsenat durchgeführt. Damit konnten die $K_{M, DHAP}$ -Werte nur indirekt bestimmt werden (Kohlhoff, 1995).

Intrinsische Stabilität

Die TIM von *P. woesei* und *T. tenax* erwiesen als gleichermaßen stabil, unabhängig davon, ob sie aus den Organismen selbst oder aus *E. coli*-Zellen gereinigt wurde (Kohlhoff, 1995). Bezüglich der thermalen Stabilität ist die rekombinante *M. fervidus*-TIM dagegen labiler als das aus *M. fervidus* isolierte Enzym. Bei *M. fervidus* beträgt $t_{0,5}$ 30 min. bei 83°C für das rekombinante Enzym gegenüber $t_{0,5}$ = 60 min. bei 88°C für das aus *M. fervidus* isolierte Enzym. Dies ist möglicherweise darin begründet, daß bei dem in *E. coli* exprimierten Enzym eine Abspaltung der N-terminalen Aminosäure im Gegensatz zum authentischen Enzym unterbleibt. Da die Assoziation von N- und C-Terminus einer der Faktoren der Thermostabilität eines Enzyms sein kann (Macedo-Ribeiro et al., 1996, und hierin angegebene Referenzen), liegt hier möglicherweise die Ursache für die verringerte Thermostabilität der rekombinanten *M. fervidus*-TIM. Eine Möglichkeit, diese Hypothese zu testen, wäre die Koexpression einer Methionin-Aminopeptidase in *E. coli*, welche die Prozessierung des N-Terminus gewährleisten sollte. In unserer Arbeitsgruppe wurde dieses Verfahren bereits mit Erfolg angewendet (Matussek et al., 1998).

Stabilisierung archaealer TIMs durch niedermolekulare Komponenten

Die Hypothese, daß Komponenten des Zellmilieus die Stabilität von intrazellulären Proteinen unterstützen, geht auf die Beobachtung zurück, daß insbesondere Enzymproteine von *M. fervidus* eine sehr geringe thermale Stabilität *in vitro* aufweisen. So weisen z.B. die GAPDH und 3-PGK dieses Organismus bei 88°C lediglich Halbwertszeiten der Inaktivierung von 10 min. auf (Hensel & König, 1988; Hess et al., 1995). In Gegenwart von 300 mM K_3 -cDPG, das aus diesem Organismus isoliert wurde, konnte eine deutliche Erhöhung der thermalen Stabilität festgestellt werden. Entsprechende Stabilisierungseffekte wurden auch mit dem Kaliumsalz von DIP, das aus *P. woesei*-Zellen isoliert wurde, am Beispiel der GAPDH dieses Organismus beschrieben (Scholz et al., 1992).

In dieser Arbeit sollte der Versuch unternommen werden, niedermolekulare Verbindungen (LMCs), die in hyperthermophilen Archaea vorkommen, auf ihre mögliche Funktion als Thermoprotektoren von Makromolekülen am Beispiel der TIMs dieser Organismen zu überprüfen. Dabei wurden die Kaliumsalze von DIP, cDPG sowie Trehalose, die in *P. woesei*, *M. fervidus* bzw. in *T. tenax* angereichert werden, in die Untersuchungen einbezogen.

Als Vergleich wurde die Stabilisierungseffizienz verschiedener anorganischer Kaliumsalze sowie einiger Polyole, die nicht in den betreffenden Archaea vorkommen (Glycerol, PEG

4000, Inositol), herangezogen. Es stellte sich heraus, daß die Kaliumsalze von DIP und cDPG in der Lage sind, die TIMs aus *M. fervidus* und *P. woesei* signifikant gegen thermale Inaktivierung zu schützen (Abb. 18). Bemerkenswert ist, daß eine deutliche Stabilisierung durch 300 mM K_3 -cDPG und K-DIP auch für die *P. woesei*-TIM beobachtet werden kann, obwohl dieses Enzym bereits eine außergewöhnlich hohe intrinsische Stabilität aufweist ($t_{0,5}$ bei 104°C: 280 min. [Kohlhoff, 1995]).

Über die Natur dieses protektiven Mechanismus liegen im Moment nur wenige Daten vor. Aus Neutronenkleinwinkelstreuungsexperimenten an der GAPDH von *M. fervidus* in Gegenwart von K_3 -cDPG wurde darauf geschlossen, daß die stabilisierende Wirkung des cDPGs in erster Linie auf einem präferierten Ausschlußeffekt beruht, wohingegen für das K^+ -Ion direkte Interaktion mit dem Protein postuliert werden kann (May et al., unveröffentlicht). Entsprechende Untersuchungen für das Kaliumsalz von DIP liegen zur Zeit noch nicht vor. Um die auch unter biotechnologischen Gesichtspunkten interessante thermoprotektive Wirkung von cDPG und DIP aufzuklären, sind weitere physikalische Untersuchungen nötig (z.B. Gleichgewichtsdialysen, spektroskopische Analysen, mikrokalorimetrische Messungen etc.).

Die Beobachtung, daß die TIMs von *P. woesei*, *M. fervidus* und *T. tenax* durch anorganische Kaliumsalze in der Reihung $KPi > K_2SO_4 > KCl$ stabilisiert werden können, deutet darauf hin, daß die stabilisierende Wirkung dieser Anionen auf einem präferierten Ausschlußeffekt beruht (vgl. Timasheff & Arakawa, 1989). Ob diese indirekte Interaktion zwischen Protein und den niedermolekularen Komponenten als Hauptursache für die beobachteten Stabilisierungseffekte gelten kann, bleibt jedoch offen.

Für eine gewisse spezifische Wechselwirkung zwischen DIP und der TIM von *P. woesei* spricht die Beobachtung, daß Inositol im Vergleich zu anderen Polyolen (Trehalose, Glycerol, PEG 4000) die beste Stabilisierungseffizienz aufweist und auch in Gegenwart von 300 mM KSO_4 , das die hohe *in vivo*-Ionenstärke des Organismus imitieren sollte, deutlich besser als Trehalose und Glycerol wirkt. Überraschenderweise übt PEG 4000 in Kombination mit Kaliumsulfat ebenfalls eine thermostabilisierende Wirkung auf die *P. woesei* aus, während ohne zusätzliche Salze kein Effekt beobachtet werden kann. Glycerol, als Kryoprotektans bekannt, kann nach den vorliegenden Daten weder als alleiniger Effektor noch in Kombination mit Kaliumsalzen als thermostabilisierendes Agens wirken. Weiterhin dürfte Trehalose nach den vorliegenden Ergebnissen bei thermophilen Organismen keine Bedeutung als Thermoprotektans zukommen, obwohl für dieses Polyol ein stabilisierender Effekt auf Proteine aus mesophilen Enzymen beschrieben ist (Carninci et al., 1998).

4.2 Strukturelle und funktionelle Untersuchungen an der Pyruvat-Kinase von *T. tenax*

4.2.1 Sequenzeigenschaften des kodierenden Gens und der abgeleiteten Primärstruktur des Proteins

Bereits in der Dissertation von B. Siebers (1995) war die Reinigung der Pyruvat-Kinase aus *T. tenax* beschrieben worden. Dabei stand für eine eingehende phänotypische Beschreibung jedoch nur wenig homogenes Protein zur Verfügung. Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, das für die PK kodierende Gen zu identifizieren und in *E. coli* zu exprimieren, um genügend Protein für eine Charakterisierung des Enzyms zu erhalten. Ausgehend von partiellen PK-Peptidsequenzen wurde das *pyk*-Gen mit Hilfe abgeleiteter Oligonukleotidsonden kloniert und anschließend sequenziert. Das Gen umfaßt 1338 bp und kodiert für ein Protein von 446 Aminosäuren. Damit zählt die PK von *T. tenax* zu den kleinsten bisher identifizierten Enzymen mit dieser katalytischen Funktion. Das Gen liegt ohne Assoziation mit anderen glycolytischen Genen im Genom von *T. tenax* vor. Auch in den Genomen von *Pyrococcus*

	83	92
YEAST	LDTKGPEIRT	
HUMAN	LDTKGPEIRT	
GLYMA	LDTKGPEIRT	
BACST	LDTKGPEIRT	
ECOLI II	ADLQGPKIRV	
CORGL	ADLQGPKIRL	
THETX	ADLRGPSVRT	
	*	** *

Abb. 35: Vergleich einer konservierten Region in der PK-Sequenz, die für die Abhängigkeit oder Unabhängigkeit der Enzyme von K⁺-Ionen verantwortlich gemacht werden kann.

Die Zahlen beziehen sich auf die Position der Aminosäuren im Hefeenzym. Die Bezeichnung der Organismen entspricht der in dieser Arbeit verwendeten Nomenklatur (s. Abb. 23). "*" kennzeichnet Aminosäurereste, die in allen Organismen konserviert sind.

4.2.2 Transkriptanalysen des *pyk*-Gens

Wie Northern Blot-Analysen zeigten wird das *pyk*-Gen als monocistronisches Transkript abgelesen. Die Transkriptlänge von 1,3 kb stimmt gut mit der durch die Sequenzanalyse bestimmten Größe des offenen Leserahmens von 1338 bp überein. Eine in den Northern Blot-Analysen auftretende schwache Bande bei 1,6 kb wird als Hintergrundsignal angesehen.

In der -25-Region vor dem *pyk*-Gen wurde das Motiv TATAAAT identifiziert, das gut mit der archaealen Bindungssequenz BoxA für das TBP-Protein (TATA-Bindeprotein) übereinstimmt (Hain et al., 1992). Wie Primer Extension Analysen zeigten, liegt der Transkriptionsstart eine Base stromaufwärts vom Beginn des offenen Leserahmens, so daß keine Shine-Dalgarno-Sequenz (SD-Sequenz) für die Erkennung der mRNS am Ribosom vorhanden ist. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, daß ein SD-unabhängiger Mechanismus für die Erkennung der mRNS durch das Ribosom vorhanden sein muß, dessen Natur allerdings bis jetzt unbekannt ist (vgl. 4.1.1).

Durch die Northern Blot-Analysen und Primer Extension Experimente wurde festgestellt, daß in *T. tenax* eine erhöhte *pyk*-mRNS-Menge in heterotrophen Zellen gegenüber autotrophen Zellen vorliegt. Dies steht in Einklang mit der Tatsache, daß die Aktivität der PK in zellfreien Extrakten von heterotroph gezogenen Zellen um den Faktor 4 höher liegt als in autotroph gezogenen Zellen (Siebers, 1995). Ein ähnlicher Zusammenhang ist u.a. auch für *S. cerevisiae* beschrieben. Bei diesem Organismus liegt die PK-Aktivität in Zellen, die auf glycolytischen Substraten wuchsen, um den Faktor 6 bis 20 höher als bei gluconeogenetischen Substraten (Maitra & Lobo, 1971).

Demgegenüber steht der Befund, daß in 2D-gelelektrophoretisch aufgetrennten zellfreien Extrakten von *T. tenax* in auto- und heterotrophen Zellchargen gleiche PK-Mengen vorzuliegen scheinen (Siebers, 1995). Diese Auswertung wurde jedoch durch "Perlschnur"-Effekte erschwert, d.h. in der 2D-Gelelektrophorese sind mehrere Banden zu erkennen, die der PK-Aktivität zugeordnet werden können. Ein möglicher Ansatz, um der Frage nach einer differentiellen PK-Expression in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle nachzugehen, besteht darin, mit Hilfe eines Anti-PK-Antikörpers das Verhältnis der PK-Menge in autotrophen und heterotrophen Zellen zu bestimmen. Möglicherweise kann dadurch entschieden werden, ob *pyk*-Transkriptmenge, Proteinmenge und PK-Aktivität in auto- und heterotrophen Zellen miteinander in Korrelation stehen.

4.2.3 Biochemische Eigenschaften des Enzyms aus *T. tenax* und des rekombinanten Proteins

Ein Großteil der Messungen wurde aus Gründen der besseren Verfügbarkeit mit dem rekombinanten Enzym durchgeführt. Die biochemischen Daten des aus *T. tenax* isolierten und des rekombinanten Enzyms stimmen gut miteinander überein. In den folgenden Ausführungen wird daher nicht zwischen den verschiedenen Enzympräparationen unterschieden.

Die PK aus *T. tenax* ist, wie fast alle beschriebenen Pyruvat-Kinasen, ein homomeres Tetramer und weist ein Molekulargewicht von 200.000 +/- 10.000 auf. Für Substrat- und Metallionensättigung wurden positiv kooperative Effekte festgestellt. Dabei ist davon auszugehen, daß die Metallionen sowohl an der Kosubstrat- als auch an der Substratbindung beteiligt sind, da die relevanten Aminosäurereste, die bei 3D-Analysen von PKs identifiziert wurden, im *T. tenax*-Enzym konserviert sind (Arg 30, Asn 32, His 35, Glu 215, Asp 239; Numerierung des *T. tenax*-Enzyms). Eine physiologische Bedeutung der Kooperativität der Metallionenbindung läßt sich jedoch nur schwerlich erkennen, da größere Schwankungen der intrazellulären Konzentration zweiwertiger Metallionen eher unwahrscheinlich sind. Die positive Bindungskoopertivität der Substratbindung dagegen ist ein Merkmal, das in allen enzymatisch charakterisierten PKs gefunden wurde (Fothergill-Gilmore & Michels, 1993). Diese Eigenschaft erlaubt es dem Enzym, seine Aktivität in einem engen Konzentrationsbereich von PEP spontan und effizient zu regulieren.

Für das rekombinante Protein konnte keine Hemmung durch Phosphat festgestellt werden. Diese in der Dissertation von B. Siebers beschriebene Eigenschaft ließ sich mit meinen PK-Präparationen aus *T. tenax* nicht reproduzieren. Heterotrope Effektoren konnten nicht identifiziert werden, so daß derzeit keine Anhaltspunkte für eine "feed-forward"-Aktivierung des Enzyms, wie sie für Enzyme der Eucarya und Bacteria beschrieben sind, vorliegen.

Als bisher einzige Schrittmacherreaktion der Glycolyse in *T. tenax* konnte die Reaktion der nicht-phosphorylierenden GAPDH (GAPN) identifiziert werden, die durch verschiedene allosterische Effektoren, wie NADPH und Glucose-1-phosphat, gehemmt bzw. aktiviert wird (Brunner et al., 1998). Die andere bekannte Kontrollstelle der Glycolyse in vielen Organismen, die Phosphofruktokinase, arbeitet in *T. tenax* bidirektional und kann daher den Metabolitenflux nicht kontrollieren (Siebers et al., 1998). In dieser Arbeit wurde mit der PK ein zweiter Kontrollpunkt der Glycolyse in *T. tenax* identifiziert: Das Enzym wird allosterisch durch homotrope Effekte reguliert. Die positive Bindungskoopertivität des Enzyms erlaubt es dem Organismus unmittelbar auf Änderungen des intrazellulären Milieus (über Veränderungen der PEP-Konzentration) zu reagieren und den Verbrauch an Pyruvat zu kontrollieren. Wie Transkript-Analysen mit Extrakten aus heterotrophen und autotrophen Zellen zeigten, wird die Aktivität des Enzyms zusätzlich auf der Genebene reguliert: Die PK-Aktivität und die Kopienzahl der *pyk*-Transkripte liegen in heterotrophen Zellen um den Faktor vier höher als in autotrophen Zellen.

Die PK muß daher neben der GAPN als zweiter Kontrollpunkt des EMP-Weges in *T. tenax* angesehen werden, über den der Organismus in die Lage versetzt wird, den Metabolitenflux durch diesen Abbauweg kurzfristig (auf Proteinebene) sowie langfristig (durch genetische Regulation) zu ändern.

4.2.4 Phylogenetische Zuordnung der Pyruvat-Kinase von *T. tenax*

Die Untersuchungen zur Rekonstruktion des phylogenetischen Stammbaums der PK sowie die Eingliederung der *T. tenax*-PK in diesen Stammbaum wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Henner Brinkmann (TU Braunschweig) durchgeführt.

Die Topologie des in Abb. 36 dargestellten phylogenetischen Baums, der mit Hilfe des Programms PAUP (Swofford, 1996) erstellt wurde, ist charakterisiert durch eine tiefe Verzweigung, welche die Phylogenie der PK in zwei Entwicklungslinien teilt. Die

Deszendenten der beiden Linien werden im folgenden als PK Großgruppe I (PK I) und PK Großgruppe II (PK II) bezeichnet. Die PKs der Eucarya, einige Enzyme von gram-positiven Bacteria und die *E. coli* PK1 gehören zu der Großgruppe PK I, während die andere Gruppe (PK II) einen Großteil der gram-negativen Bacteria, Myco- und Corynebakterien, Archaea, sowie plastidäre Enzyme umfaßt.

Die tiefe Aufspaltung des PK-Baums in zwei Äste spricht für ein sehr frühes Gen-Duplikations-Ereignis, auf das die beiden paralogen Linien zurückgehen. Interessanterweise treten eucaryale Enzyme ausschließlich in der Gruppe I auf, in dem auch die PK I-Enzyme der Proteobacteria zu finden sind. Entsprechende Beobachtungen wurden auch für die TIM beschrieben (Keeling & Doolittle, 1997). In diesem Fall wurde der phylogenetische Ursprung der eucaryalen Enzyme in der Gruppe der α -Proteobacteria lokalisiert und damit die Integration des entsprechenden Gens in das eucaryale Genom mit einem frühen Endosymbiose-Ereignis, das zur Bildung der Mitochondrien führte, in Zusammenhang gebracht. Auch wenn zur Zeit keine Sequenzen von PK I-Enzymen aus dem Bereich der α - oder β -Proteobacteria bekannt sind, legt die Topologie des Baums nahe, daß entsprechend der Situation bei den TIMs die eucaryalen Enzyme von den PK I-Enzymen der Proteobacteria abstammen.

Die bisher sequenzierten PKs aus Archaeen bilden eine monophyletische Gruppe innerhalb der PK II (Abb. 36). Die *T. tenax*-PK bildet mit der PK von *P. aerophilum* eine crenarchaeale Unter-Gruppe, die sich von den euryarchaealen PKs aus *M. jannaschii* und *P. horikoshii* abgrenzen läßt. Die Tatsache, daß die *M. jannaschii*-PK den beiden crenarchaealen PKs näher steht, könnte in der langsamen Evolutionsgeschwindigkeit der *P. horikoshii*-PK, die sich in der relativ kurzen Astlänge widerspiegelt, begründet sein.

4.2.5 Die phylogenetische Dichotomie der PKs geht mit einer differentiellen Regulation einher

Die frühe Trennung der beiden PK-Linien spiegelt sich auch in einer auffälligen phänotypischen Differenzierung von PK I- und PK II- Enzymen wider. So scheint den PK I-Enzymen (eucaryaler wie bacterialer Herkunft) gemeinsam, daß ihre Aktivität nur in Gegenwart von Effektoren wie Fructose-1,6-bisphosphat oder anderen Zuckerphosphaten gewährleistet ist. Demgegenüber besitzen die PK II-Enzyme auch ohne Effektoren basale Aktivität. Außerdem werden sie auf Proteinebene in erster Linie durch Nukleotide (ATP/AMP) reguliert (Jetten et al., 1994; Potter & Fothergill-Gilmore, 1992), so daß hier keine "feed-forward"-Aktivierung, sondern eine Regulation über den Energiezustand der Zelle erzielt wird. Für *E. coli*, der beide PK-Typen besitzt, konnte für das Enzym aus der Gruppe II gezeigt werden, daß neben einer Aktivierung durch AMP und Ribose-5-phosphat die Regulation in erster Linie auf der Ebene der Transkription stattfindet. Der globale Regulator FruR, der für die Kontrolle der Verwertung von mehreren Dutzend verschiedener Kohlenstoffquellen in *E. coli* verantwortlich ist (Ramseier et al., 1995), reprimiert die Transkription des als *pykF* bezeichneten Gens. Durch Aktivatoren wie Fructose-1-phosphat oder Fructose-1,6-bisphosphat wird die Bindung von FruR an den *pykF*-Promoter inhibiert, so daß das Gen abgelesen werden kann ("FruR-vermittelte Katabolit-Aktivierung"; Bledig et al., 1996).

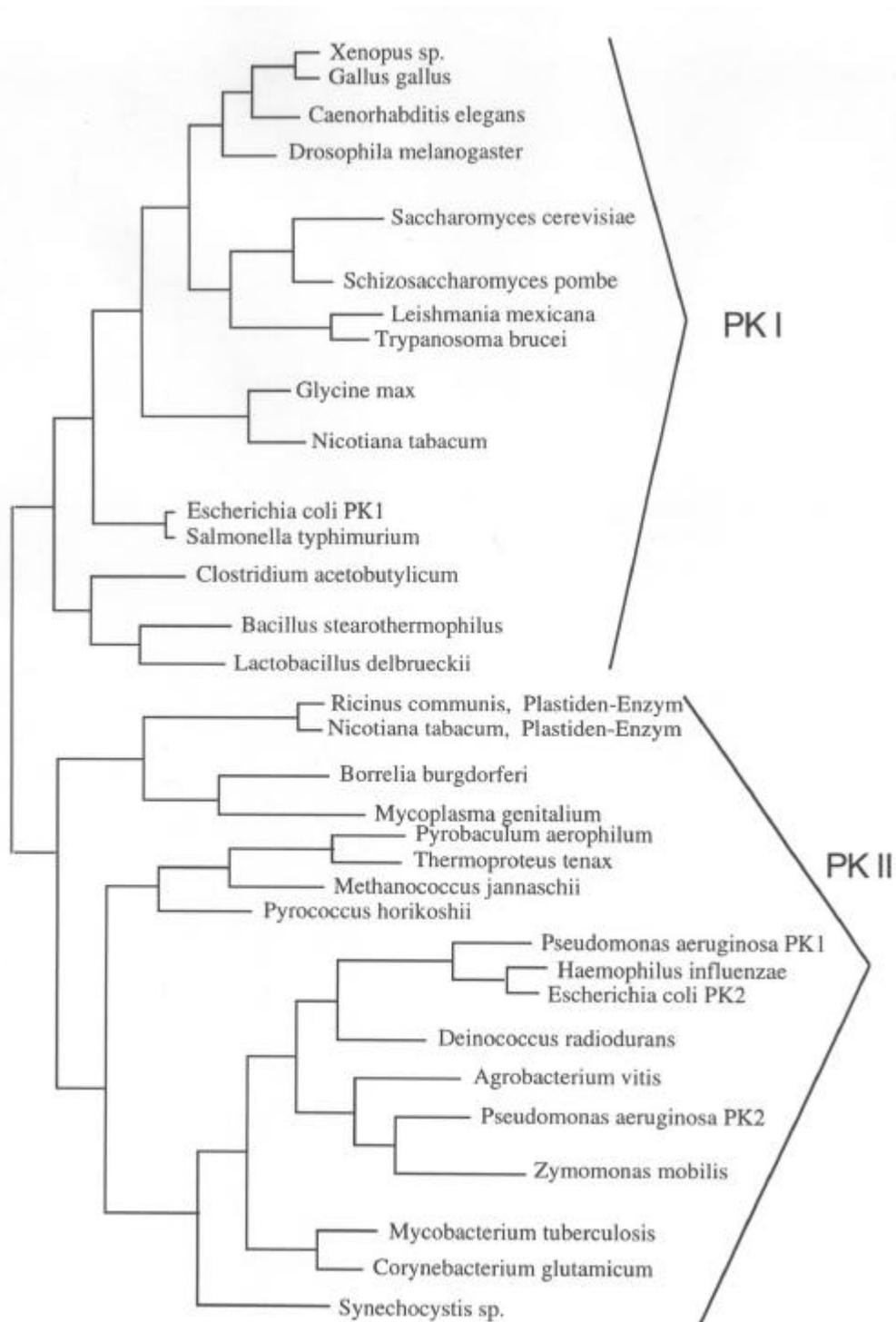


Abb. 36: Phylogenetische Zuordnung von 33 PKs aus den drei Domänen des Lebens.

Der Baum wurde mit Hilfe des Programms PAUP (Swofford, 1996) erstellt. PKI und PKII bezeichnen zwei phylogenetische Großgruppen von PKs.

Herkunft der Sequenzen, sofern sie nicht bereits in Abb. 23 angegeben sind: *Gallus gallus*: J00903, *Drosophila melanogaster*: AF06247, *Leishmania mexicana*: X74944, *Salmonella typhimurium*: X39945, *Clostridium acetobutylicum*: U52366, *Lactobacillus delbrueckii*: P34038, *Nicotiana tabacum*, cytosolisches Enzym: Z29492, *Borrelia burgdorferi* AE001141, *Mycoplasma genitalium*: U39698, *Zymomonas mobilis*: AF079586, *Mycobacterium tuberculosis*: Z95554, *Synechocystis* sp.: D90907. Die *Deinococcus radiodurans* und *Pseudomonas aeruginosa* PKs wurden in WWW-Datenbanken identifiziert (<http://www.tigr.org> bzw. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/unfinishedgenome.html>).

Wie in der vorliegenden Arbeit ausgeführt, geht das Erscheinungsbild der *T. tenax*-PK mit dem der übrigen PK II-Enzyme einher: Auch das archaeale Enzym ist in Abwesenheit von Effektoren aktiv und unterliegt wie das homologe Enzym aus *E. coli* einer genetischen Kontrolle. Wie Northern Blot- und Primer Extension-Analysen zeigen, scheint die PK-Aktivität über die Kopienzahl der Transkripte reguliert zu werden. Ob dies über eine entsprechende Regulation der Transkription oder der mRNS-Degradation stattfindet, ist noch offen.

Bei *T. tenax* sind bisher weder Faktoren bekannt, welche die Transkriptionsrate beeinflussen noch solche, die für die mRNS-Degradationsgeschwindigkeit verantwortlich sind. Dennoch müssen solche nach den vorliegenden Ergebnissen und den Daten aus archaealen Genomprojekten postuliert werden: Die Kontrolle der *pyk*-Transkription in Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen deuten darauf hin, daß ein entsprechender Mechanismus wie z.B. in *E. coli* vorliegen könnte. Die Untersuchungen zur Transkriptionsregulation in Archaea stehen jedoch erst am Anfang. Bisher wurden u.a. Homologe zu dem bacterialen Regulator Lrp (Charlier et al., 1997), zu "basic region leucine-zipper" Proteinen (Krüger et al., 1998) und zu Hitzeschockproteinen (Kuo et al., 1997) gefunden. Auch konnte spezifische RNaseE-Aktivität, die Ähnlichkeiten zu den in Bacteria und Eucarya vorkommenden regulatorischen RNAsen besitzt, in Archaea nachgewiesen werden (Franzetti et al., 1997).

Die Aktivitäten dieser Proteine ebenso wie die in Genomanalysen entdeckten archaealen Homologen zu Transkriptionsregulatoren wie z.B. ArsR oder AsnC aus *A. fulgidus* (Klenk et al., 1997) müssen jedoch eingehender *in vitro* und *in vivo* untersucht werden.

Die Aufklärung der Regulation der Glycolyse in *T. tenax* trägt sicher zu einem allgemeinem Verständnis basaler Regulationsnetzwerke in Archaea bei und bleibt ein motivierendes Ziel für weitere Forschungen.