

5. Zusammenfassung

Hauptziel dieser Arbeit war es, die strukturellen und funktionellen Eigenschaften der Triosephosphat-Isomerase (TIM) und der Pyruvat-Kinase (PK) des hyperthermophilen Archaeums *T. tenax* zu charakterisieren und damit einen Beitrag zur Aufklärung der Regulation des Embden-Meyerhof-Parnas-Weges (EMP-Weg) in diesem Organismus zu leisten. Auf der Basis der Struktur- und Funktionsdaten sollte auch eine Analyse thermoadaptiver Merkmale sowie phylogenetische Studien durchgeführt werden.

Im ersten Teil der Arbeit wurde das TIM-kodierende *tpi*-Gen aus *T. tenax* kloniert und sequenziert. Zu vergleichenden Untersuchungen wurde die TIM von *T. tenax* ebenso wie die TIMs des mesophilen Methanogenen *M. bryantii* und des hyperthermophilen Methanogenen *M. fervidus* in *E. coli* exprimiert.

Das *tpi*-Gen von *T. tenax* ist mit dem Aconitase-Gen assoziiert und wird nach preliminären Untersuchungen möglicherweise mit diesem kotranskribiert. Dabei liegt die Kopienzahl der Transkripte unter heterotrophen Wachstumsbedingungen deutlich höher als unter autotrophen und spricht für eine Regulation auf Transkriptebene.

Die TIM von *T. tenax* liegt nach den vorliegenden Untersuchungen ebenso wie die TIMs der hyperthermophilen Euryarchaeota *M. fervidus* und *P. woesei* als Tetramer vor. Im Gegensatz dazu sind alle bekannten TIMs aus Eucarya und Bacteria sowie die TIM von *M. bryantii* Dimere. Dies bestätigt einen Trend zur Bildung höherer Aggregationsformen, der inzwischen auch bei anderen Enzymen aus hyperthermophilen Organismen vorgefunden wurde und unter dem Aspekt der Thermoadaptation interpretiert wird.

Der zweite Teil der Arbeit setzt sich mit der strukturellen und funktionellen Charakterisierung der PK auseinander. Das PK-kodierende *pyk*-Gen liegt isoliert im Genom von *T. tenax* und wird als monocistronische mRNS abgelesen. Die *pyk*-Transkriptmenge liegt in heterotrophen Zellen höher als in autotrophen Zellen und korreliert mit der PK-Aktivität in Zellen, die unter den entsprechenden trophischen Bedingungen angezogen wurden. Neben dieser Regulation auf Transkriptebene liegt eine Regulationsmöglichkeit auf Proteinebene vor: Das Enzym weist eine positive Bindungskoopertivität für das Substrat Phosphoenolpyruvat sowie Mg^{2+} - bzw. Mn^{2+} -Ionen auf. Die Ergebnisse deuten daraufhin, daß die PK neben der nicht-phosphorylierenden GAPDH einen weiteren wichtigen Kontrollpunkt im EMP-Weg von *T. tenax* darstellt, über den der Organismus in die Lage versetzt wird, den Kohlenstoffflux durch den Abbauweg kurzfristig (auf Proteinebene) und langfristig (durch genetische Regulation) zu ändern.

Die phylogenetische Analyse zeigte, daß sich im Verlauf der Evolution zwei Großgruppen von PKs (PK I und PK II) gebildet haben. Die PKs der Eucarya, einige Enzyme von gram-positiven und gram-negative Bacteria gehören zu der Großgruppe PK I, während die andere Gruppe (PK II) einen Großteil der gram-negativen Bacteria, Myco- und Corynebacteria, plastidäre Enzyme sowie die Archaea als monophyletische Gruppe umfaßt. Die Topologie des Baums legt nahe, daß die eucaryalen PKs von einem proteobacterialen Vorläuferenzym abstammen.