

**Untersuchungen zur Regulation des zentralen
Kohlenhydratmetabolismus von *Thermoproteus tenax*
unter besonderer Berücksichtigung der
Phosphoenolpyruvat Synthetase und
Pyruvat, Phosphat Dikinase**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

des Fachbereichs

Bio- und Geowissenschaften, Landschaftsarchitektur
an der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Britta Tjaden

aus Emden

Februar 2003

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Fachbereich 9 in der Abteilung Mikrobiologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. R. Hensel

2. Gutachter: Prof. H. Esche

3. Gutachter: Prof. J. Soppa

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. G. B. Feige

Tag der mündlichen Prüfung: 29.04.2003

Man müßte das Leben so einrichten,
daß jeder Augenblick bedeutungsvoll ist.

(Iwan S. Turgenjew)

INHALTSVERZEICHNIS

	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
	TABELLENVERZEICHNIS	VI
1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	9
2.1	Enzyme, Kits, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	9
2.2	Geräte	11
2.3	Organismen und Wachstumsbedingungen	12
2.4	Plasmide	14
2.5	Molekularbiologische Arbeiten mit DNA	16
2.5.1	Isolierung von genomischer DNA aus <i>T. tenax</i>	16
2.5.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	16
2.5.2.1	Plasmid-Präparation durch alkalische Lyse.....	16
2.5.2.2	QIAGEN Plasmid-Präparation.....	17
2.5.2.3	Schnellpräparation von Plasmid-DNA ("boiling-prep").....	17
2.5.3	Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA.....	17
2.5.4	DNA-Präzipitation.....	17
2.5.5	Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA.....	18
2.5.6	Agarose-Gelelektrophorese von DNA.....	18
2.5.7	Reinigung von DNA-Fragmenten.....	19
2.5.7.1	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen.....	19
2.5.7.2	Reinigung von PCR-Fragmenten.....	19
2.5.8	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	19
2.5.8.1	Amplifikation von genomischer DNA und Plasmid-DNA mittels PCR.....	20
2.5.8.2	PCR-Mutagenese.....	20
2.5.8.3	Overlap Extension PCR.....	21
2.5.9	Enzymatische Modifikation von DNA.....	22
2.5.9.1	Restriktion von DNA.....	22
2.5.9.2	5'-Dephosphorylierung linearisierter Vektor-DNA.....	22
2.5.9.3	Ligation.....	23
2.5.10	Transformation.....	23
2.5.10.1	Präparation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	23
2.5.10.2	Transformation von kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen.....	24
2.5.10.3	Identifikation rekombinanter Klone durch Blau-Weiß-Differenzierung.....	24
2.5.11	Konstruktion einer Genbank von <i>T. tenax</i>	25
2.5.12	Southern Blot-Analysen.....	26
2.5.12.1	Kapillartransfer von DNA auf Nylon-Membranen (Southern Blot).....	26
2.5.12.2	Markierung von Oligonukleotiden mit Digoxigenin.....	26
2.5.12.3	Markierung von dsDNA mit Digoxigenin.....	27
2.5.12.4	Southern-Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten DNA-Sonden.....	27

2.5.12.5	Detektion von DNA-DNA-Hybriden durch immunologischen Nachweis.....	28
2.5.13	Sequenzierung.....	28
2.5.13.1	Sequenzierung von DNA mit [α - ³⁵ S]dATP.....	28
2.5.13.2	Automatisierte DNA-Sequenzierung.....	30
2.5.13.3	Computergestützte Auswertung von Nukleotidsequenzen.....	30
2.5.14	Gelretardationsexperimente.....	31
2.6	Molekularbiologische Arbeiten mit RNA.....	32
2.6.1	Behandlung von Lösungen, Gefäßen und Geräten	32
2.6.2	Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>T. tenax</i>	32
2.6.3	Bestimmung der Konzentration und Reinheit von RNA.....	33
2.6.4	Agarose/Formaldehyd-Gelelektrophorese von RNA.....	33
2.6.5	Northern Blot-Analysen.....	34
2.6.5.1	Kapillartransfer von RNA auf Nylon-Membranen (Northern Blot).....	34
2.6.5.2	Slot Blot.....	34
2.6.5.3	Synthese von DIG-markierten RNA-Sonden durch <i>in vitro</i> Transkription.....	35
2.6.5.4	Northern-Hybridisierung mit DIG-markierten RNA-Sonden.....	35
2.6.5.5	Detektion von RNA-RNA-Hybriden durch immunologischen Nachweis.....	36
2.6.5.6	Densitometrische Analysen der Hybridisierungssignale.....	36
2.6.6	Primer Extension-Analysen.....	36
2.7	Biochemische Methoden.....	38
2.7.1	Heterologe Expression der <i>T. tenax</i> PEPS, PPDK und Citrat Synthase 1 in <i>E. coli</i>	38
2.7.2	Präparative Enzymreinigungen.....	38
2.7.2.1	Reinigung der rekombinanten PEPS.....	38
2.7.2.2	Reinigung der rekombinanten PPDK.....	39
2.7.2.3	Anreicherung der rekombinanten Citrat Synthase 1.....	39
2.7.3	Enzymatische Messungen.....	40
2.7.3.1	Aktivitätsbestimmung der rekombinanten PPDK.....	40
2.7.3.2	Aktivitätsbestimmung der rekombinanten PEPS.....	41
2.7.3.3	Bestimmung der kinetischen Parameter K_M und v_{max}	42
2.7.4	Proteinanalytische Methoden.....	43
2.7.4.1	Proteinbestimmung [modifiziert nach BRADFORD, 1976].....	43
2.7.4.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	43
2.7.4.3	Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen.....	44
2.7.4.4	Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen unter nativen Bedingungen..	44
2.7.4.5	Elektro-Proteintransfer (Western Blot).....	45
2.7.4.6	Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz.....	45
3.	ERGEBNISSE.....	46
3.1	Die PEP Synthetase (PEPS) von <i>T. tenax</i>.....	46
3.1.1	Klonierung und Sequenzierung des <i>pps</i> -Gens von <i>T. tenax</i>	46
3.1.1.1	Ableitung von degenerierten Oligonukleotiden	46
3.1.1.2	Amplifikation und Klonierung eines <i>pps</i> -spezifischen 1,4 kb PCR-Produkts.....	47
3.1.1.3	Hybridisierung einer <i>pps</i> -spezifischen Sonde mit genomischer DNA aus <i>T. tenax</i>	47

3.1.1.4	Klonierung von zwei genomischen <i>Bam</i> HI-Fragmenten.....	48
3.1.1.5	Sequenzierung des genomischen Klons pPEP8kb-1	49
3.1.1.6	Sequenzierung des genomischen Klons pPEP4kb-4	49
3.1.1.7	Sequenz des <i>pps</i> -Gens und flankierender Bereiche.....	50
3.1.2	Heterologe Expression der <i>T. tenax</i> PEPS in <i>E. coli</i>	54
3.1.2.1	Inserierung des <i>pps</i> -Gens in den Expressionsvektor pET15b.....	54
3.1.2.2	Expression der PEPS in <i>E. coli</i>	54
3.1.3	Charakterisierung einer putativen chemischen Modifikation der PEPS	56
3.1.3.1	N-terminale Sequenzierung.....	56
3.1.3.2	Nachweis einer chemischen Modifikation	57
3.1.3.3	Konstruktion der PEPS-Mutante H406Q.....	62
3.1.3.4	Expression der PEPS-Mutante H406Q in <i>E. coli</i>	62
3.1.4	Biochemische Charakterisierung der PEPS.....	63
3.1.4.1	Reinigung der rekombinanten PEPS.....	63
3.1.4.2	Quartärstruktur der rekombinanten PEPS.....	65
3.1.4.3	Katalytische und regulative Eigenschaften der PEPS	65
3.1.5	Transkriptanalysen des <i>pps</i> -Gens von <i>T. tenax</i>	68
3.1.6	Regulation der Transkription des <i>pps</i> -Gens: Identifizierung einer putativen Cra-Bindungsstelle	71
3.2	Die Pyruvat, Phosphat Dikinase (PPDK) von <i>T. tenax</i>	74
3.2.1	Klonierung und Sequenzierung des <i>ppdk</i> -Gens von <i>T. tenax</i>	74
3.2.1.1	Hybridisierung einer <i>ppdk</i> -spezifischen Sonde mit genomischer DNA aus <i>T. tenax</i>	74
3.2.1.2	Klonierung und Sequenzierung eines 8 kb <i>Xba</i> I-Fragments.....	75
3.2.1.3	Sequenz des <i>ppdk</i> -Gens und flankierender Bereiche	76
3.2.2	Heterologe Expression der PPDK von <i>T. tenax</i> in <i>E. coli</i> und biochemische Charakterisierung.....	79
3.2.2.1	Inserierung des <i>ppdk</i> -Gens in den Expressionsvektor pET24a.....	79
3.2.2.2	Reinigung der rekombinanten PPDK.....	81
3.2.2.3	Quartärstruktur der rekombinanten PPDK.....	82
3.2.2.4	Katalytische und regulative Eigenschaften der PPDK.....	82
3.2.3	Transkriptanalysen des <i>ppdk</i> -Gens von <i>T. tenax</i>	87
3.3	Untersuchungen zum <i>acn-tpi-cis1</i>-Gencluster von <i>T. tenax</i>	88
3.3.1	Klonierung und Sequenzierung der <i>cis1</i> - und <i>acn</i> -Gene von <i>T. tenax</i>	89
3.3.1.1	Hybridisierung einer <i>cis1</i> -spezifischen Sonde mit genomischer DNA aus <i>T. tenax</i> und Klonierung eines 4 kb <i>Eco</i> RI/ <i>Xba</i> I -Fragments.....	89
3.3.1.2	Hybridisierung einer <i>acn</i> -spezifischen Sonde (I) mit genomischer DNA aus <i>T. tenax</i> und Klonierung eines 2 kb <i>Sal</i> I-Fragments.....	89
3.3.1.3	Hybridisierung einer <i>acn</i> -spezifischen Sonde (II) mit genomischer DNA aus <i>T. tenax</i> und Klonierung eines 2,5 kb <i>Nco</i> I-Fragments.....	90
3.3.2	Heterologe Expression von <i>acn</i> und <i>cis1</i> aus <i>T. tenax</i> in <i>E. coli</i> zur Überprüfung der Funktionalität der Genprodukte.....	95
3.3.2.1	Inserierung des <i>acn</i> -Gens in die Expressionsvektoren pET24a bzw. pCYB2 und heterologe Expression in <i>E. coli</i>	95
3.3.2.2	Inserierung des <i>cis1</i> -Gens in den Expressionsvektor pET11c und heterologe Expression in <i>E. coli</i>	96
3.3.3	Transkriptanalysen der <i>acn</i> -, <i>tpi</i> - und <i>cis1</i> -Gene von <i>T. tenax</i>	98

4.	DISKUSSION	101
4.1	Die PEPS von <i>T. tenax</i>	101
4.1.1	Sequenzeigenschaften und phylogenetische Einordnung der <i>T. tenax</i> PEPS	101
4.1.2	Expression der <i>T. tenax</i> PEPS in <i>E. coli</i> : Identifikation und Charakterisierung zweier Isoformen	103
4.1.3	Vergleichende Quartärstrukturanalyse archaealer und bacterialer PEP Synthetasen	105
4.1.4	Katalytische Eigenschaften der PEPS von <i>T. tenax</i>	106
4.1.5	Transkriptanalysen des <i>pps</i> -Gens von <i>T. tenax</i>	109
4.2	Die PPDK von <i>T. tenax</i>	112
4.2.1	Sequenzeigenschaften und phylogenetische Einordnung der <i>T. tenax</i> PPDK	112
4.2.2	Vergleichende Quartärstrukturanalyse der PPDK	114
4.2.3	Katalytische Eigenschaften der PPDK von <i>T. tenax</i>	115
4.3	Die PEPS und PPDK als zentraler Bestandteil des Kohlenhydratmetabolismus von <i>T. tenax</i>	117
4.4	Das <i>acn-tpi-cis1</i>-Gencluster von <i>T. tenax</i>	119
5.	ZUSAMMENFASSUNG	123
6.	LITERATUR	126
	ANHANG	141
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	145

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1	Phylogenetischer Baum der Archaea auf der Grundlage von 16S rRNA-Sequenzen [verändert nach PACE, 1997].....	1
Abb. 1.2	Elektronenmikroskopische Aufnahme von <i>Thermoproteus tenax</i> Kral.....	2
Abb. 3.1	Partielles Alignment archaealer und bacterialer PEPS-Sequenzen.....	46
Abb. 3.2	Schematische Darstellung und Sequenzierungsstrategie des 4 kb <i>Bam</i> HI-Fragments des Klons pPEP4kb-4.....	49
Abb. 3.3	Nukleotidsequenz des genomischen Klons pPEP4kb-4 (4095 bp).....	53
Abb. 3.4	Heterologe Expression der <i>T. tenax</i> PEPS in <i>E. coli</i>	56
Abb. 3.5	Alignment des konservierten Sequenzmotivs PS00370 einiger Vertreter der Familie der PEP-utilizing enzymes.....	58
Abb. 3.6	Phosphorylierung / Dephosphorylierung der PEPS.....	59
Abb. 3.7	Säure- bzw. Alkali-Behandlung der phosphorylierten Form der PEPS.....	61
Abb. 3.8	Heterologe Expression der WT-PEPS und der Mutante H406Q.....	63
Abb. 3.9	Reinigung der heterolog in <i>E. coli</i> exprimierten PEPS aus <i>T. tenax</i>	64
Abb. 3.10	Sättigungskinetiken der <i>T. tenax</i> PEPS für Pyruvat und ATP.....	66
Abb. 3.11	Hemmung der PEPS-Aktivität.....	67
Abb. 3.12	pSPT19-Vektorkonstrukt zur Generierung einer <i>pps</i> -spezifischen DIG-markierten antisense-mRNA durch <i>in vitro</i> Transkription.....	68
Abb. 3.13	Northern Blot-Analyse zum Nachweis des <i>pps</i> -Transkripts in <i>T. tenax</i>	69
Abb. 3.14	Northern Blot-Analysen: Abhängigkeit der <i>pps</i> -Transkriptmenge von der Wachstumsphase und der angebotenen Kohlenstoffquelle.....	70
Abb. 3.15	Northern Blot-Analyse (Slot-Blot) zum Nachweis des <i>pps</i> -Transkripts in <i>T. tenax</i>	71
Abb. 3.16	Putative Cra-Bindungsstelle im upstream-Bereich des <i>pps</i> -Gens von <i>T. tenax</i> ..	72
Abb. 3.17	Gelretardationsexperiment mit dem upstream-Bereich des <i>pps</i> -Gens und zellfreien Extrakten von <i>T. tenax</i> und <i>E. coli</i>	73
Abb. 3.18	Schematische Darstellung und Sequenzierungsstrategie des 8 kb <i>Xba</i> I-Fragments des Klons pPPDK-8.....	75
Abb. 3.19	Teil der Nukleotidsequenz des genomischen Klons pPPDK-8	78
Abb. 3.20	Strategie zur Klonierung des <i>ppdk</i> -Gens von <i>T. tenax</i>	80
Abb. 3.21	Reinigung der heterolog in <i>E. coli</i> exprimierten PPDK von <i>T. tenax</i>	81
Abb. 3.22	Sättigungskinetiken der <i>T. tenax</i> PPDK für PEP und AMP.....	83
Abb. 3.23	Hemmung der PPDK-Aktivität in kataboler Richtung (PEP → Pyruvat).....	84
Abb. 3.24	Sättigungskinetiken der <i>T. tenax</i> PPDK für Pyruvat und ATP.....	86
Abb. 3.25	Vektorkonstrukt pSPT19+PPDK zur Generierung einer <i>ppdk</i> -spezifischen DIG-markierten antisense-mRNA durch <i>in vitro</i> Transkription.....	87
Abb. 3.26	Northern Blot-Analyse zum Nachweis des <i>ppdk</i> -Transkripts in <i>T. tenax</i>	88
Abb. 3.27	Klonierungs- und Sequenzierungsstrategie der genetischen Umgebung von Aconitase, TIM und Citrat Synthase 1 aus <i>T. tenax</i>	91
Abb. 3.28	Assemblierte Nukleotidsequenz der genomischen Fragmente pAco-13, pAco2kb-3, TIM4 und pCis-1	95
Abb. 3.29	Anreicherung der heterolog exprimierten <i>T. tenax</i> Citrat Synthase 1.....	97
Abb. 3.30	pSPT19-Vektorkonstrukte zur Generierung von <i>acn</i> -, <i>tpi</i> - und <i>cis1</i> -spezifischen DIG-markierten antisense-mRNAs durch <i>in vitro</i> Transkription..	99
Abb. 3.31	Northern Blot-Analysen zum Nachweis der <i>acn</i> -, <i>tpi</i> - und <i>cis1</i> -Transkripte in <i>T. tenax</i>	100
Abb. 4.1	Phylogenetischer Baum der archaealen PEP Synthetasen.....	102

Abb. 4.2	Phylogenetischer Baum der archaealen PPDKs bzw. PPDK-Homologen.....	113
Abb. 4.3	Putative Promotorstrukturen des <i>ppdk</i> -Gens von <i>T. tenax</i>	114
Abb. 4.4	Wichtige Kontrollpunkte des EMP-Weges von <i>T. tenax</i> : Eine Arbeitshypothese.....	118
Abb. 4.5	'Neighborhood Display' bacterialer und archaealer <i>tpi</i> -Gene.....	120

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 2.1	Plasmide aus externen Bezugsquellen.....	14
Tab. 2.2	Plasmide, die in dieser Arbeit konstruiert wurden.....	15
Tab. 3.1	Primer, die zur Sequenzierung des Klons pPEP4kb-4 verwendet wurden.....	50
Tab. 3.2	Codon-Gebrauch des <i>pps</i> -Gens von <i>T. tenax</i>	55
Tab. 3.3	Chemische Stabilität von phosphorylierten Aminosäuren.....	60
Tab. 3.4	Anreicherungsprotokoll der heterolog exprimierten <i>T. tenax</i> PEPS, ausgehend von 4,4 g <i>E. coli</i> -Zellen.....	65
Tab. 3.5	Primer, die zur Sequenzierung des Klons pPPDK-8 verwendet wurden.....	76
Tab. 3.6	Reinigungsprotokoll der heterolog exprimierten <i>T. tenax</i> PPDK, ausgehend von 4,2 g <i>E. coli</i> -Zellen.....	82
Tab. 3.7	Primer, die zur Sequenzierung der genomischen Fragmente pAco2kb-3, pAco-13 und pCis-1 verwendet wurden.....	90
Tab. 4.1	Kinetische Parameter verschiedener PEP Synthetasen.....	107
Tab. 4.2	Inhibitoren der PEPS-Enzymaktivität (Richtung PEP-Synthese).....	108
Tab. 4.3	Vergleich der katalytischen Eigenschaften der <i>T. tenax</i> PPDK in kataboler und anaboler Reaktionsrichtung.....	115

1. EINLEITUNG

Extremophile Mikroorganismen stellen in vielerlei Hinsicht attraktive Studienobjekte der Mikrobiologie dar: Aufgrund ihrer Anpassung an extreme Bedingungen, wie sehr hohe oder sehr niedrige Temperaturen, extreme pH-Werte oder hohe Salzkonzentrationen, sind sie in der Lage, außergewöhnliche ökologische Nischen (z.B. heiße Solfatarenfelder, Salzseen, Black Smokers) zu besiedeln. Die ungewöhnlichen Lebensbedingungen dieser Organismen ließen in den letzten Jahrzehnten nicht nur Interesse an den molekularen Grundlagen der Anpassung, sondern auch an möglichen biotechnologischen Anwendungen, z.B. der Entwicklung von thermostabilen Proteinen oder genetischen Werkzeugen, aufkommen.

Ein Großteil der bisher isolierten extremophilen Mikroorganismen wurde aufgrund von 16S rRNA-Sequenzdaten der dritten Domäne des Lebens, den Archaea zugeordnet [WOESE & FOX, 1977; WOESE et al., 1990]. Die ursprüngliche phylogenetische Einteilung der Archaea in die Reiche der Crenarchaeota und Euryarchaeota wurde inzwischen durch eine Gruppe bisher nicht-kultivierbarer Archaea, die als Korarchaeota bezeichnet werden, erweitert [BARNES et al., 1996] (s. Abb. 1.1). Eine weitere Hauptentwicklungslinie der Archaea repräsentieren offensichtlich die erst kürzlich entdeckten Nanoarchaeota [HUBER et al., 2002].

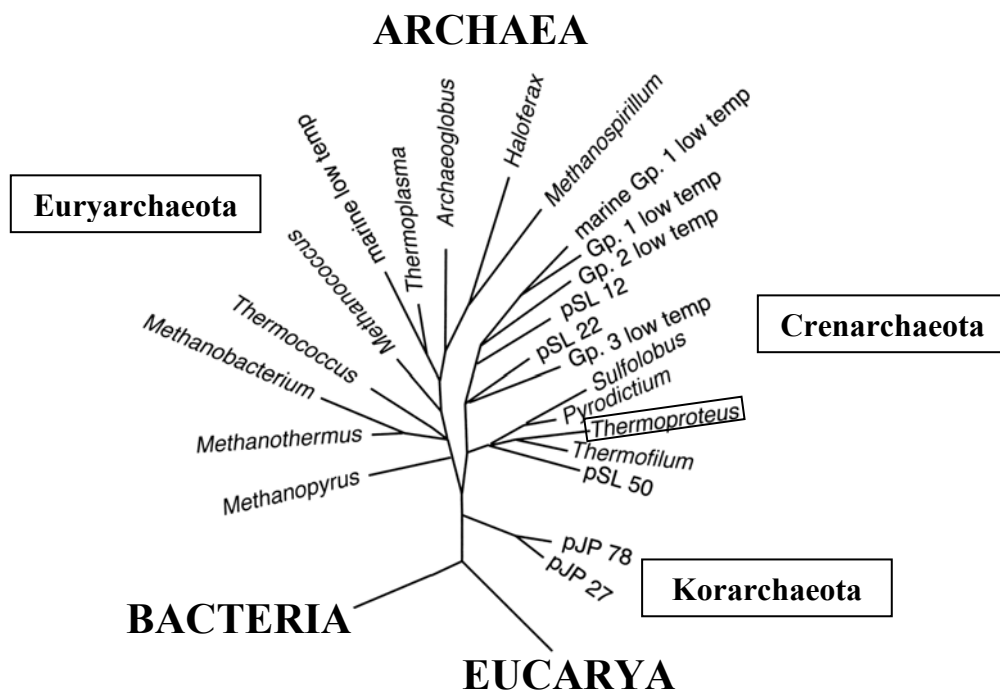


Abb. 1.1: Phylogenetischer Baum der Archaea auf der Grundlage von 16S rRNA-Sequenzen [verändert nach PACE, 1997].

Im Gegensatz zum Stoffwechsel der Eucarya und Bacteria sind die stoffwechselfysiologischen Eigenschaften der Archaea sowie die basalen Regulationsnetzwerke, die diese kontrollieren, bisher vergleichsweise wenig untersucht. Einen Beitrag zum allgemeinen Verständnis der vielfältigen Stoffwechselprozesse und deren Regulation in Archaea sollen die seit einigen Jahren in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Untersuchungen zum Kohlenhydratmetabolismus von *Thermoproteus tenax* leisten. *T. tenax*, der erste beschriebene hyperthermophile Organismus, ist ein Vertreter der Crenarchaeota und wurde 1981 aus einer Solfatare auf Island isoliert [ZILLIG et al., 1981; FISCHER et al., 1983; s. Abb. 1.2]. Dieser Organismus ist strikt anaerob und wächst optimal bei 86°C und bei einem pH von 5,6. In Gegenwart von elementarem Schwefel ist *T. tenax* sowohl zu chemolithoautotrophem Wachstum mit H₂ und CO₂ als alleiniger Kohlenstoffquelle als auch zu chemoorganoheterotrophem Wachstum mit organischen Substraten wie Glucose, Stärke oder Amylose befähigt. Bei autotrophem Wachstum wird CO₂ wahrscheinlich wie in dem nah verwandten Organismus *T. neutrophilus* [BEH et al., 1993] über einen reduktiven Tricarbonsäure (TCA)-Zyklus fixiert.

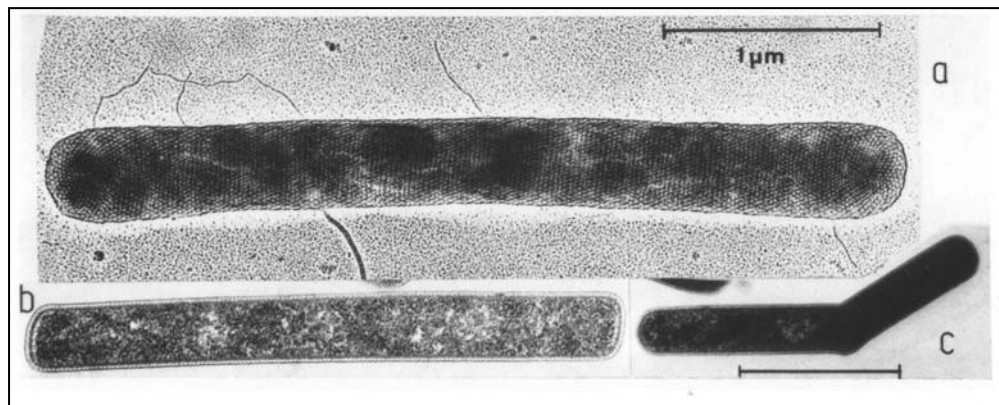


Abb. 1.2: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *Thermoproteus tenax* Kra1. [ZILLIG et al., 1981]

Als physiologische Besonderheit unter den bisher beschriebenen hyperthermophilen Archaea verwendet *T. tenax* zwei unterschiedliche Stoffwechselwege für den Glucose-Katabolismus: Zum einen den sogenannten 'nicht-phosphorylierenden' Entner-Doudoroff (ED)-Weg, bei dem die erste Phosphorylierung auf der Stufe des Glycerats erfolgt, zum anderen eine Variante des reversiblen Embden-Meyerhof-Parnas (EMP)-Weges, welche die Hauptabbauroute für Glucose in *T. tenax* darstellt [SIEBERS & Hensel, 1993; SIEBERS et al., 1997; SELIG et al., 1997;].

Die Variante des EMP-Weges zeichnet sich durch signifikante Unterschiede zum klassischen Weg der Bacteria aus. Die zwei typischen Kontrollpunkte des klassischen Weges, die antagonistisch arbeitenden und stark regulierten Enzympaare ATP-abhängige Phosphofruktokinase (PFK)/Fructosebiphosphatase und Pyruvat Kinase (PK)/Phosphoenolpyruvat Synthetase (PEPS), sind in *T. tenax* zum einen durch eine nicht-allosterische, reversible PP_i -abhängige PFK [SIEBERS et al., 1998] und zum anderen durch eine PK mit geringem regulatorischen Potential ersetzt, die nur durch ihr Substrat Phosphoenolpyruvat (PEP) aktiviert wird [SCHRAMM et al., 2000]. Eine Kontrolle des EMP-Weges hinsichtlich Richtung und Menge des Kohlenstoff-Fluxes scheint somit an diesen Stellen zu entfallen. Kompensiert wird das fehlende regulatorische Potential der PP_i -PFK und PK offensichtlich durch eine nicht-phosphorylierende Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPN): Dieses Enzym katalysiert in einer irreversiblen Reaktion die direkte Oxidation von Glycerinaldehyd-3-Phosphat zum 3-Phosphoglycerat und unterliegt einer starken allosterischen Regulation durch den Energiestatus der Zelle und diverse Stoffwechselintermediate [BRUNNER et al., 1998; BRUNNER et al., 2001]. Eine neben der GAPN ebenfalls in *T. tenax* vorliegende NADP-abhängige Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) repräsentiert das klassische phosphorylierende Enzym: Die NADP-GAPDH arbeitet reversibel und wird nicht allosterisch reguliert.

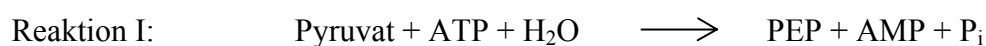
Auf Genebene zeichnet sich die Variante des EMP-Weges von *T. tenax* durch einen ungewöhnlichen genomischen Kontext des *tpi*-Gens aus: In der unmittelbaren Nachbarschaft des Gens, das für die Triosephosphat Isomerase (TIM, EC 5.3.1.1) codiert, wurden zwei Leserahmen mit Sequenzähnlichkeiten zu Genen des reversiblen TCA-Zyklus identifiziert, die für die Enzyme Aconitase (EC 4.2.1.3) bzw. Citrat Synthase (EC 4.1.3.7) codieren [SCHRAMM, 1999]. In den meisten bisher untersuchten Archaea und Bacteria liegt das *tpi*-Gen dagegen im Verbund mit weiteren Genen des EMP-Weges, z.B. für GAPDH und Phosphoglyceratkinase (PGK) vor. Derartige Gencluster sind ein auffälliges Merkmal bacterialer Genome und häufig ein Hinweis auf eine gemeinsame Regulation der assoziierten Gene. Bezüglich des *acn-tpi-cisI*-Genclusters von *T. tenax* war zu Beginn dieser Arbeit noch unklar, ob die enge Assoziation der Gene ebenfalls eine gemeinsame Regulation auf Transkriptionsebene impliziert.

Ebenfalls wenig bekannt war über den ersten Schritt der gluconeogenetischen Reaktionssequenz des EMP-Weges, d.h. die Synthese von PEP aus Pyruvat: Enzymatische Messungen in zellfreien Extrakten von *T. tenax* ließen unter autotrophen Wachstumsbedingungen eine PEPS-Aktivität erkennen, die allerdings aufgrund von interferierenden Reaktionen nur schwer nachweisbar war und daher nicht eingehender untersucht wurde [SIEBERS, 1995]. Ein wesentliches Anliegen dieser Arbeit bestand deshalb in der Charakterisierung der PEP-synthetisierenden Reaktion.

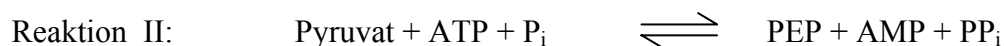
Detaillierte Untersuchungen bezüglich der Regulation des entsprechenden katalysierenden Enzyms auf Protein- und Genebene sollten damit zu einem umfassenderen Verständnis der Regulationsnetzwerke des EMP-Weges von *T. tenax* beitragen.

PEP-synthetisierende Reaktionen

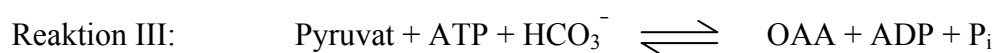
Die Aktivität einer PEPS (EC 2.7.9.2), also die direkte Synthese von PEP aus Pyruvat und ATP (s. Reaktion I), wurde erstmals in den 60er Jahren in *Escherichia coli* nachgewiesen [COOPER & KORNBERG, 1965].



In einer Reihe weiterer Veröffentlichungen wurde von Mikroorganismen und Pflanzen berichtet, in denen eine nahezu identische Reaktion abläuft [BENZIMAN, 1966; HATCH & SLACK, 1967]. Wie sich später allerdings herausstellte, handelt es sich dabei um eine Variation der PEPS-Reaktion, bei der zusätzlich Orthophosphat (P_i) involviert ist und Pyrophosphat (PP_i) gebildet wird (s. Reaktion II) [HATCH & SLACK, 1968; BENZIMAN & PALGI, 1970]. Katalysiert wird diese Reaktion durch das Enzym Pyruvat, Phosphat Dikinase (PPDK; EC 2.7.9.1), das ebenso wie die PEPS zur Familie der 'PEP-utilizing enzymes' gehört.



Die direkte Bildung von Phosphoenolpyruvat durch PEPS oder PPDK ist eine energetisch günstige Alternative zum zweistufigen Prozess vieler Säugetiere, Pflanzen und Mikroorganismen, bei dem Pyruvat zunächst durch das Enzym Pyruvat Carboxylase (EC 6.4.1.1; s. Reaktion III) zum Oxalacetat (OAA) carboxyliert wird, das dann durch die PEP Carboxykinase-Reaktion (EC 4.1.1.49 / 4.1.1.32 / 4.1.1.38; s. Reaktion IV) in Gegenwart von ATP, GTP oder PP_i zum PEP decarboxyliert wird.



PEPS-Aktivität wurde in der Zwischenzeit in vielen Bacteria und Archaea nachgewiesen und näher untersucht: Experimente mit Deletionsmutanten von *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium* haben gezeigt, daß das Enzym für das Wachstum dieser Organismen auf

C₃-Substraten wie Pyruvat, Lactat oder Alanin unerlässlich ist [COOPER & KORNBERG, 1974; SMYER & JETER, 1989]. In dem thermophilen methanogenen Archaeum *Methanothermobacter thermautotrophicus* (ehemals *Methanobacterium thermoautotrophicum*) spielt die PEPS eine essentielle Rolle beim autotrophen Wachstum auf CO₂ [EYZAGUIRRE et al., 1982]. Von vergleichbarer Wichtigkeit ist dieses Enzym für den hyperthermophilen Euryarchaeoten *Pyrococcus furiosus* beim Wachstum auf Pyruvat [SCHÄFER & SCHÖNHEIT, 1993].

Neben den genannten biochemischen Untersuchungen sind ferner diverse Sequenzdaten bacterialer und archaealer PEPS-Enzyme verfügbar: Die *ppsA*-Gene von *E. coli* K-12 und *P. furiosus* wurden kloniert und sequenziert [NIERSBACH et al., 1992; ROBINSON & SCHREIER, 1994; JONES et al., 1995]. Weiterhin wurde die Nukleotidsequenz eines PEPS-Homologen (MAPS, multimeric archaeal PEP synthase homologue) aus dem hyperthermophilen Crenarchaeoten *Staphylothermus marinus* durch N-terminale Sequenzierung von CNBr- und LysC-Spaltpeptiden und anschließende PCR mit abgeleiteten Oligonukleotidprimern ermittelt [CICICOPOL et al., 1994].

Nicht zuletzt wurden im Rahmen verschiedener Genomprojekte Nukleotidsequenzen identifiziert, die als PEPS-codierende Gene annotiert wurden, z.B. aus *Synechocystis* sp. [KANEKO et al., 1995], *Methanococcus jannaschii* [BULT et al., 1996], *Archaeoglobus fulgidus* [KLENK et al., 1997], *Helicobacter pylori* [TOMB et al., 1997], *M. thermautotrophicus* [SMITH et al., 1997], *Aquifex aeolicus* [DECKERT et al., 1998], *Pyrococcus horikoshii* [KAWARABAYASI et al., 1998], *Aeropyrum pernix* [KAWARABAYASI et al., 1999] und *Deinococcus radiodurans* [WHITE et al., 1999].

PPDK-Aktivität wurde zunächst in Pflanzen, später auch in Protozoen und Bakterien nachgewiesen. In C₄-Pflanzen wie Zuckerrohr und Mais spielt die PPDK eine wichtige Rolle bei der Photosynthese, da sie den primären CO₂-Akzeptor PEP bereitstellt [HATCH & SLACK, 1968]. Zusätzlich unterliegt die PPDK-Aktivität einer täglichen Licht-Dunkel-Regulation durch ein bifunktionelles Regulator-Protein: Die Inaktivierung der PPDK erfolgt im Dunkeln durch eine ADP-abhängige Phosphorylierung eines konservierten Threonin-Restes im aktiven Zentrum. Umgekehrt wird die PPDK im Licht durch Dephosphorylierung des Threonin-Restes aktiviert [ASHTON et al., 1984; BURNELL & HATCH, 1984, 1985, 1986].

Eine PPDK-Aktivität wurde mittlerweile auch in C₃-Pflanzen nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, daß die PPDKs in Blättern verschiedener Angiospermen und in Spinat-Chloroplasten ebenfalls einer Licht-/Dunkel-induzierten reversiblen Phosphorylierung unterliegen. Die exakten

metabolischen Funktionen der PPK in C₃-Pflanzen sind allerdings noch unbekannt [CHASTAIN et al., 2002].

In *Clostridium symbiosum* und *Entamoeba histolytica* arbeitet die PPK ausschließlich in kataboler Richtung und kompensiert damit die fehlende PK-Aktivität in diesen Organismen [REEVES, 1968; REEVES et al., 1968]. Auch die PPK des Darmparasiten *Giardia duodenalis* katalysiert unter physiologischen Bedingungen vornehmlich die katabole Reaktion. Allerdings kann die zusätzliche Existenz einer PK in diesem Organismus derzeit noch nicht befriedigend erklärt werden [HILTPOLD et al., 1999]. Im Gegensatz dazu katalysieren die PPKs von *Propionibacterium shermanii*, *Acetobacter xylinum* und *Rhodospirillum rubrum* die Synthese von PEP und arbeiten damit in gluconeogenetischer Richtung [EVANS & WOOD, 1971; BENZIMAN et al., 1969; BUCHANAN, 1974].

Zu Beginn dieser Arbeit existierten noch keine Informationen bezüglich archaealer PPKs. Erst kürzlich wurden im Zuge verschiedener Genomsequenzierungsprojekte archaeale *ppdk*-Genhomologe in *Thermoplasma acidophilum* [RUEPP et al., 2000], *Thermoplasma volcanium* [KAWASHIMA et al., 2000], *Pyrobaculum aerophilum* [FITZ-GIBBON et al., 2002], *Methanosarcina mazei* Goe1 [DEPPENMEYER et al., 2002] und *Methanosarcina acetivorans* [GALAGAN et al., 2002] gefunden. Allerdings sind bisher für die entsprechenden Genprodukte keine biochemischen Daten verfügbar.

Die durch die Pyruvat Carboxylase katalysierte Biotin-abhängige Carboxylierung von Pyruvat zu Oxalacetat (Reaktion III) stellt eine wichtige anaplerotische Reaktion zur Auffüllung des TCA-Zyklus in Säugetieren, Hefen und vielen Bakterien dar. In Verbindung mit dem Enzym PEP Carboxykinase (Reaktion IV) erfolgt die Bereitstellung von PEP für gluconeogenetische Zwecke.

Innerhalb der Archaea konnte eine Pyruvat Carboxylase-Aktivität bisher nur bei verschiedenen Methanogenen, z.B. *M. thermautotrophicus* [MUKHOPADHYAY et al., 1998] und *M. jannaschii* [MUKHOPADHYAY et al., 2000] nachgewiesen werden. In methanogenen Archaea stellt die Biosynthese von Oxalacetat eine der wichtigsten Reaktionen bei der CO₂-Fixierung dar. Als Besonderheit zeichnet sich das Enzym von *M. jannaschii* dabei durch eine Biotin-unabhängige Katalyse aus.

Auch Genhomologe der PEP Carboxykinase wurden mittlerweile in verschiedenen Archaea gefunden, z.B. in den Genomen von *A. pernix* [KAWARABAYASI et al., 1999], *Pyrococcus horikoshii* [KAWARABAYASI et al., 1998] und *Sulfolobus solfataricus* P2 [SHE et al., 2001]. Bislang sind allerdings noch keine biochemischen Daten bekannt.

Die Familie der PEP-utilizing enzymes

Die Familie der PEP-utilizing enzymes besteht aus drei Proteingruppen: (I) PEP Synthetasen (PEPS; EC 2.7.9.2), (II) Pyruvat, Phosphat Dikinasen (PPDK; EC 2.7.9.1) und (III) Enzym I des Phosphotransferasesystems (EC 2.7.3.9). Charakterisiert ist diese Familie durch strukturelle und funktionelle Gemeinsamkeiten: So setzen alle Vertreter dieser Enzymfamilie Pyruvat zu PEP um und nutzen dabei einen katalytischen Histidin-Rest, um den Phosphorylgruppen-Transfer zu vermitteln. Multiple Alignierungen von Vertretern der PEP-utilizing enzymes zeigten, daß einige Sequenzabschnitte stark konserviert sind, darunter das Sequenz-Motiv PS00370, das den katalytischen Histidin-Rest umgibt (s. auch Abb. 3.5), und das Motiv PS00742, das in der C-terminalen Domäne der Enzyme lokalisiert ist (Datenbankeinträge PROSITE).

Die C-terminale Domäne enthält laut biochemischen Untersuchungen und Mutagenese-Studien die Pyruvat/PEP-Bindestelle [CARROLL et al., 1994; YANKIE et al., 1995; XU et al., 1995a; XU et al., 1995b; SEOK et al., 1996]. Röntgenstrukturanalysen der *C. symbiosum* PPDK haben gezeigt, daß die entsprechende Domäne eine $(\beta/\alpha)_8$ -Faßstruktur, ein sogenanntes 'TIM barrel' ausbildet [HERZBERG et al., 1996; HERZBERG et al., 2002]. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit mit der Pyruvat/PEP-Bindedomäne der PK wird für die PPDK eine ähnliche Substrat-Bindung vermutet. Affinitätsmarkierungen und Mutagenese-Studien sprechen für eine Lokalisation der Nukleotid-Bindestelle innerhalb der N-terminalen Domäne von PEPS und PPDK [CARROLL et al., 1994; XU et al., 1995b; MCGUIRE et al., 1996]. Das in dieser Domäne enthaltene Faltungsmotiv, das sogenannte 'ATP-grasp fold', ist auch in vielen anderen ATP/ADP-umsetzenden Enzymen, z.B. D-Ala-D-Ala Ligase, Succinyl-CoA Synthetase, Carbamoylphosphat Synthetase und Glutathion Synthetase zu finden [HERZBERG et al., 1996; Ye et al., 2001]. Diese Enzyme werden zur Superfamilie der 'ATP-grasp fold enzymes' zusammengefaßt. Das Fehlen der Nukleotid-Bindedomäne im Enzym I des Phosphotransferase-Systems deckt sich mit der Tatsache, daß in dieser Proteingruppe ATP nicht als Cosubstrat dient. So ist das Enzym I nur aus zwei unabhängig gefalteten Domänen aufgebaut, während PEPS und PPDK aus drei Domänen bestehen. Dabei ist die Phosphohistidin-Domäne über flexible Polypeptid-Linker mit der C-terminalen Pyruvat/-PEP-Bindedomäne und der N-terminalen Nukleotid-Bindedomäne verbunden. Für den enzymatischen Phosphorylgruppen-Transfer wird ein sogenannter 'swiveling-domain'-Mechanismus vermutet, bei dem durch Schwenken der Phosphohistidin-Domäne um die zwei flexiblen Polypeptid-Linker eine Kommunikation zwischen den räumlich getrennten ($\approx 45 \text{ \AA}$) Reaktionszentren der C- und N-terminalen Domäne gewährleistet wird [HERZBERG et al., 1996].

Zielsetzung der Arbeit:

Mit der vorliegenden Arbeit soll ein Beitrag zur Aufklärung der komplexen Regulationsnetzwerke innerhalb des zentralen Kohlenhydratmetabolismus von *T. tenax* geleistet werden.

Im Vordergrund stehen dabei die Charakterisierung der PEP-synthetisierenden Reaktion in der gluconeogenetischen Reaktionssequenz des reversiblen EMP-Weges und Untersuchungen zur Regulation auf Protein- und Genebene.

Der zweite Teil der Arbeit befaßt sich mit der Fragestellung, ob die Leserahmen des ungewöhnlichen *acn-tpi-cis1*-Genclusters von *T. tenax* in einer Operonstruktur organisiert sind und damit als funktionelle Einheit einer gemeinsamen Regulation auf Transkriptebene unterliegen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Enzyme, Kits, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Acrylamid-Bisacrylamidlösung (37.5:1) 30%	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Agar-Agar	Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA
Agarose Ultrapure	Life Technologies, Eggenstein
Alkalische Phosphatase	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Alkohol Dehydrogenase aus <i>S. cerevisiae</i>	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Ammoniumperoxidsulfat	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Antibiotika	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragments	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Bacto-Pepton	Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA
Bradford-Reagenz zur Proteinbestimmung	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
CDP-Star	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Cytochrom C aus Rinderherz	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
DIG-High Prime	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DIG Oligonucleotide 3'-End Labeling Kit	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
D-Lactat Dehydrogenase aus <i>L. mesenteroides</i>	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
DNA High molecular weight marker II (DIG-labeled)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
DNA-Polymerase aus <i>Pyrococcus woesei</i>	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
dNTP Mix	Life Technologies, Eggenstein
Akku-Taq Polymerase ($T_{opt} = 68^{\circ}\text{C}$)	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Ferritin aus Pferdemiß	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Filterpapiere Whatman 3MM	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Hefeextrakt	Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA
L-Lactat Dehydrogenase aus Kaninchenmuskel	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
Molekularmassenstandards SDS-6H und SDS-7	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen

Oligonukleotide für PCR und Sequenzierung	ARK Scientific, Heidelberg; Life Technologies, Eggenstein
Pepton	Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA
Polaroid Filme	Bremaphot, Essen
Proteinase K	Merck, Darmstadt
Problott-Membran (PVDF)	Applied Biosystems, Foster City, USA
Pyruvat Kinase aus Kaninchenmuskel	Sigma-Aldrich Chemie, Deisenhofen
QIAGEN Plasmid-Kit, QIAquick Gel Extraction Kit, QIAquick Nucleotide removal Kit, QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot; New England Biolabs GmbH, Schwalbach
Rinderserumalbumin	Sigma-Chemie, München
RNA High molecular weight marker (DIG-labeled)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
RNase A	Merck, Darmstadt
RNase Away	Roth GmbH, Karlsruhe
RNase-Inhibitor	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Röntgenfilme CEA Typ RP (20 x 40 cm)	Röntgenbedarf Diether Linhardt, München
Roti-Phenol, Roti-Phenol/Chloroform	Roth GmbH, Karlsruhe
SDS	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
S&S NytranN Nylonmembran	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
Substrate / Cosubstrate für Enzymreaktionen	Sigma-Chemie, München; Gerbu Biotechnik GmbH, Gaiberg
Superscript II Reverse Transkriptase	Life Technologies, Eggenstein
T4 DNA-Ligase	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
T7 RNA-Polymerase	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
T7 Sequenase Version 2.0 DNA sequencing kit	Amersham Life Science, Braunschweig
TRIZol	Life Technologies, Paisley (GB)
X-Gal	Gerbu Biotechnik GmbH, Gaiberg

Alle nicht gesondert aufgeführten Festsubstanzen wurden von Fluka (Buchs, St. Gallen, Schweiz) bzw. Gerbu Biotechnik GmbH (Gaiberg) bezogen. Alle organischen Lösungsmittel stammten von J. T. Baker B. V., Deventer, Niederlande. Alle Chemikalien wiesen, soweit nicht anders angegeben, p. A. Qualität auf.

2.2 Geräte

Chemilumineszenz-Detektor	ChemiDoc Gel Documentation System (BioRad, München)
Chromatographieanlagen	HPLC: Pumpe 420, Gradientenformer 425, Detektor 432 (Kontron Instruments, Neufahrn b. München); Kollektor Frac-100 (Pharmacia LKB, Freiburg); Standardchromatographie mit Minipuls 3 Schlauchpumpen (Abimed, Langenfeld), UV-Detektor Uvicord SD, Einkanalschreiber Rec 101 (Pharmacia LKB, Freiburg)
Chromatographiesäulen	Leersäulen: C16/20, C26/40, C26/100 (Pharmacia LKB, Freiburg); Fertigsäulen: HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade, Superose 6 (Pharmacia LKB, Freiburg)
Dampfsterilisator	Webeco Modell H (Webeco GmbH, Bad Schwartau)
Dispergiergerät	Ultra Turrax T25 (IKA, Staufen)
Elektrophoresekammern für Agarose-Gelelektrophorese	Agagel Mini (Biometra, Göttingen); Eigenbau der Feinmechanik Universität Duisburg-Essen
Elektrophoresekammer für SDS-PAGE	Minigel-Twin (Biometra, Göttingen)
Elektrophoresekammer für Harnstoff-Polyacrylamid-Gele (Sequenzierung)	DNS Elektrophoresesystem Macrophor 2010, LKB, Bromma, Schweden
Elektrotransfer-Kammer	CarboGlas Semidry Transfersystem (Schleicher & Schüll, Dassel)
Fermenter	Biostat 100 L Fermenteranlage (B. Braun Biotech International, Melsungen)
Querstrom-Filtriereinheit	Pellicon (Millipore GmbH, Eschborn)
Hochdruckpresse für Zellaufschluß	French Press (SLM Aminco Instruments Inc., Vertrieb der Firma Sopra, Büttelborn)
Inkubatoren	RFI-125 Inkubator (Infors AG, Bottmingen, Basel, Schweiz); Certomat H / Certomat R (B. Braun AG, Melsungen)
Mikroskope	Olympus BH-2 RFCA (Olympus, Hamburg)

	Olympus CHT (Olympus, Hamburg)
Photometer	Eppendorf 1101M, thermostatisierbares UV/VIS Photospektrometer (Eppendorf, Hamburg); Philips 8720, thermostatisierbares UV/VIS Photospektrometer (Philips Analytical, Cambridge, England)
Plattenwärmetauscher	Plattenwärmetauscher GC 030P (SWEP Wärmetauscher Deutschland AG, Hildesheim)
Slot Blot-Apparatur	Bio-Dot SF Microfiltration Apparatus (BioRad Laboratories GmbH, München)
Thermocycler	Eigenbau der Werkstätten des Max-Planck-Instituts für Biochemie (Martinsried); iCycler (BioRad Laboratories GmbH, München)
Vakuum-Zentrifuge	Speedvac Concentrator (Savant, Farmingdale, GB)
Zentrifugen	Ultrazentrifuge Centrikon T 1170 (Kontron Instruments, Neufahrn b. München) Großzentrifuge Avanti J-25 (Beckmann, München) Tischzentrifuge Sigma 3K12 (B. Braun AG, Melsungen)

2.3 Organismen und Wachstumsbedingungen

Thermoproteus tenax Stamm Kra1; DSMZ 2078 [ZILLIG et al., 1981]

Escherichia coli K12 Stamm DH5 α ; DSMZ 6897 [HANAHAH, 1983]

Escherichia coli BL21(DE3); Firma Novagen [STUDIER & MOFFATT, 1986]

Escherichia coli BL21(DE3) pLysS; Firma Novagen [STUDIER & MOFFATT, 1986]

Escherichia coli BL21-CodonPlus(DE3)-RIL; Firma Stratagene [CARSTENS & WAESCHE, 1999]

Escherichia coli One Shot TOP10; Firma Invitrogen [GRANT et al., 1990]

Escherichia coli LJ110 fruR⁺ wt [Dr. Knut Jahreis, Universität Osnabrück, Abteilung Genetik]

Escherichia coli GGL102 fruR⁻ [Dr. Knut Jahreis, Universität Osnabrück, Abteilung Genetik]

Thermoproteus tenax Kra1 wurde in einem 100 l-Fermenter unter anaeroben Bedingungen bei 86°C und pH 5,6 kultiviert. Das zur Anzucht verwendete Komplexmedium setzte sich nach den Angaben von BROCK et al. [1972] wie folgt zusammen (Angaben pro l):

1,3 g (NH₄)₂SO₄, 0,28 g KH₂PO₄, 0,25 g MgSO₄ x 7H₂O, 0,07 g CaCl₂ x 2H₂O, 0,02 g FeSO₄ x 7H₂O, 1,8 mg MnCl₂ x 4H₂O, 4,5 mg Na₂B₄O₇ x 10H₂O, 0,22 mg ZnSO₄ x 7H₂O, 0,05 mg CuCl₂ x 2H₂O, 0,03 mg Na₂MoO₄ x 2H₂O, 0,03 mg VOSO₄ x 5H₂O, 0,01 mg CoSO₄ x 7H₂O, 1 mg Resazurin.

Nach Lösen der Komponenten wurde fein-dispergierter elementarer Schwefel in einer Konzentration von 5g/l zugegeben. Anaerobe Bedingungen wurden durch Zugabe von Na₂S x 7-9 H₂O hergestellt.

Kulturen, die unter autotrophen Wachstumsbedingungen angezogen wurden, wurden mit einem Gemisch aus 20% CO₂ / 80% H₂ [v/v] begast. Anzuchten unter heterotrophen Bedingungen erfolgten in Gegenwart von 1 g Glucose und 0,01 g Hefeextrakt (pro l Medium) und Begasung mit 20% H₂ / 80% N₂ [v/v].

Der Fermenter wurde mit 0,5-1 l einer Vorkultur (1 x 10⁸ Zellen/ml) beimpft und über einen Zeitraum von ca. einer Woche kultiviert. Der Wachstumsverlauf wurde über die Zunahme der Zellzahl verfolgt, die mit einer Neubauer-Zählkammer ermittelt wurde. Unter autotrophen Wachstumsbedingungen wurden Zelldichten von 3-4 x 10⁸ Zellen/ml erreicht, unter heterotrophen Bedingungen meist weniger (1 x 10⁸ Zellen/ml). Vor der Zellernte wurde ein Aliquot von 0,5-1 l Kulturflüssigkeit entnommen und bis zur Weiterverwendung als Vorkultur für eine neue Anzucht bei 4°C gelagert. Die restliche Kulturflüssigkeit wurde über einen Plattenwärmetauscher zunächst auf 10°C abgekühlt und zum Abtrennen des Schwefels und ausgefallener Metallsulfide filtriert (Faltenfilter, Schleicher & Schuell). Nach einer ca. 20fachen Aufkonzentrierung mit Hilfe einer Querstrom-Filtriereinheit (Pellicon, Millipore) wurde die Zellsuspension bei 10.000 x g zentrifugiert (15 min, 4°C) und das Zellpellet bei -80°C gelagert.

Die Anzucht von *Escherichia coli* erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37°C in dampfsterilisiertem flüssigen LB-Medium (1% Pepton, 0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl, pH 7) bzw. auf festen Nährböden, die zusätzlich 1,5% Agar enthielten. Eine optimale Sauerstoff-Versorgung in Flüssig-Kulturen wurde bei kleineren Kulturvolumina (2-400 ml) durch starkes Schütteln (220 Upm) in Reagenzgläsern bzw. Erlenmeyerkolben erreicht. Größere Kulturvolumina (bis 15 l) wurden mit sterilfiltrierter Preßluft mit einer Rate von 50 l/min begast. Antibiotika wurden entsprechend den Plasmid-codierten Resistenzen (Tab. 2.1) in folgenden

Konzentrationen eingesetzt: Ampicillin 100 µg/ml, Kanamycin 50 µg/ml, Chloramphenicol 34 µg/ml.

Die *E. coli* Stämme DH5α und TOP10 wurde zur Etablierung von Plasmiden und Gewinnung von Plasmid-DNA genutzt.

Die heterologe Expression von rekombinanten Proteinen erfolgte in den *E. coli* Stämmen BL21(DE3) bzw. BL21-CodonPlus(DE3)-RIL. Dabei wurde flüssiges LB-Medium mit 1% einer Vorkultur beimpft und anschließend das Wachstum photometrisch bis zu einer $OD_{578} = 0,6-0,8$ verfolgt. Durch Zugabe von 1 mM IPTG wurde die Expression des rekombinanten Proteins induziert und die Inkubation für weitere 3 h fortgesetzt. Nach Abkühlen der Kultur auf Eis wurde die Zellsuspension bei 6300 x g 15 min abzentrifugiert. Die Lagerung der Zellen erfolgte bei -80°C.

2.4 Plasmide

Tab. 2.1: Plasmide aus externen Bezugsquellen.

Vektor	Resistenz	Verwendung
pBluescript II KS ⁺ ¹	Amp ^r	Klonierung von genomischen Restriktionsfragmenten
pCR-TOPO 2.1 ²	Amp ^r	Klonierung von PCR-Produkten
pUC19 ³	Amp ^r	Klonierung von genomischen Restriktionsfragmenten
pET15b ⁴	Amp ^r	heterologe Expression von <i>T. tenax</i> -Proteinen in <i>E. coli</i>
pET11c ⁴	Amp ^r	heterologe Expression von <i>T. tenax</i> -Proteinen in <i>E. coli</i>
pET24a ⁴	Kan ^r	heterologe Expression von <i>T. tenax</i> -Proteinen in <i>E. coli</i>
pLysS ⁴	Cam ^r	heterologe Expression von T7 Lysozym in <i>E. coli</i>
RIL ¹	Cam ^r	Expression der seltenen tRNA-Gene <i>argU</i> , <i>ileY</i> , <i>leuW</i>
pSPT19 ⁵	Amp ^r	<i>in vitro</i> -Transkription
pP1 ⁶	Amp ^r	Expression von <i>E. coli</i> FruR
pCYB2 ⁷	Amp ^r	heterologe Expression von <i>T. tenax</i> -Proteinen in <i>E. coli</i>

Bezugsquellen: Stratagene, La Jolla/USA¹; Invitrogen, Leek/Niederlande²; Laborbestand³; Novagen, Bioggio-Lugano/Schweiz⁴; Boehringer Mannheim, Mannheim⁵; Dr. Knut Jahreis, Universität Osnabrück, Abteilung Genetik⁶; New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main⁷

Tab. 2.2: Plasmide, die in dieser Arbeit konstruiert wurden.

Plasmid	Beschreibung
pPEP1	1,4 kb-PCR-Produkt des <i>T. tenax pps</i> -Gens in pCR TOPO 2.1
pPEP4kb-4	genomisches 4 kb- <i>Bam</i> HI-Fragment von <i>T. tenax</i> in pBluescript II KS+
pPEP8kb-1	genomisches 8 kb- <i>Bam</i> HI-Fragment von <i>T. tenax</i> in pBluescript II KS+
pPPDK-8	genomisches 8 kb- <i>Xba</i> I-Fragment von <i>T. tenax</i> in pBluescript II KS+
pCis-1	genomisches 4 kb- <i>Eco</i> RI/ <i>Xba</i> I-Fragment von <i>T. tenax</i> in pBluescript II KS+
pAco2kb-3	genomisches 2 kb- <i>Sal</i> I-Fragment von <i>T. tenax</i> in pBluescript II KS+
pAco-13	genomisches 2,5 kb- <i>Nco</i> I-Fragment von <i>T. tenax</i> in pET15b
pET15b+PEPS	<i>T. tenax pps</i> -Gen in pET15b; Schnittstellen <i>Nco</i> I, <i>Bam</i> HI
pET15b+PEPS H406Q	mutiertes <i>T. tenax pps</i> -Gen H406Q in pET15b; Schnittstellen <i>Nco</i> I, <i>Bam</i> HI
pET24a+PPDK	<i>T. tenax ppdk</i> -Gen in pET24a; Schnittstellen <i>Nde</i> I, <i>Hind</i> III
pET11c+Cis1	<i>T. tenax cis1</i> -Gen in pET11c; Schnittstellen <i>Nde</i> I, <i>Bam</i> HI/ <i>Bgl</i> II
pET11c+Cis1 R373P	mutiertes <i>T. tenax cis1</i> -Gen R373P in pET11c; Schnittstellen <i>Nde</i> I, <i>Bam</i> HI/ <i>Bgl</i> II
pET24a+Acn	<i>T. tenax acn</i> -Gen in pET24a; Schnittstellen <i>Nde</i> I, <i>Sac</i> I
pCYB2+Acn	<i>T. tenax acn</i> -Gen in pCYB2; Schnittstellen <i>Nde</i> I, <i>Sma</i> I
pET11c+Bc-LDH	<i>B. caldotenax ldh</i> -Gen in pET11c; Schnittstellen <i>Nde</i> I, <i>Bam</i> HI
pET11c+Bst-LDH	<i>G. stearothermophilus ldh</i> -Gen in pET11c; Schnittstellen <i>Nde</i> I, <i>Bam</i> HI
pSPT19+PEPS	<i>T. tenax pps</i> -Gen in pSPT19; Schnittstellen <i>Eco</i> RI/ <i>Mun</i> I, <i>Bam</i> HI
pSPT19+PPDK	560 bp des <i>T. tenax ppdk</i> -Gens in pSPT19; Schnittstellen <i>Eco</i> RI, <i>Bam</i> HI
pSPT19+Cis1	<i>T. tenax cis1</i> -Gen in pSPT19; Schnittstellen <i>Eco</i> RI, <i>Bam</i> HI/ <i>Bgl</i> II
pSPT19+Acn	983 bp des <i>T. tenax acn</i> -Gens in pSPT19; Schnittstellen <i>Xba</i> I, <i>Pst</i> I
pSPT19+TIM*	<i>T. tenax tpi</i> -Gen in pSPT19; Schnittstellen <i>Eco</i> RI, <i>Pst</i> I

* [SCHRAMM, 1999]

2.5 Molekularbiologische Arbeiten mit DNA

2.5.1 Isolierung von genomischer DNA aus *T. tenax*

Die Präparation genomischer DNA aus *T. tenax* Zellen wurde in Anlehnung an ein Protokoll von WEIL et al. [1988], modifiziert nach MEAKIN et al. [1991] durchgeführt. Hierbei wurde 1 g Zellen unter ständiger Zugabe von flüssigem Stickstoff zermörsert und in 10 ml Aufschlußpuffer (250 mM Saccharose, 10 mM Tris pH 7,4, 10 mM EDTA, 1% SDS) aufgenommen. Anschließend wurde 100 µg/ml Proteinase K zugegeben und die Zelltrümmer abzentrifugiert (37.000 x g, 15 min, 4°C). Durch Zugabe von 10 ml eiskaltem Isopropanol und anschließender Inkubation bei -20°C für mindestens 30 min wurde die DNA aus dem Überstand gefällt, durch Zentrifugation sedimentiert (18.000 x g, 20 min, 4°C) und in 5 ml Inkubationspuffer (50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, pH 8) über Nacht bei 4°C schonend resuspendiert. Durch RNase-Verdau (100 µg/ml, 60 min, 37°C), Proteinase K-Verdau (100 µg/ml, 30 min, 37°C) sowie eine Phenol/Chloroform-Extraktion (s. 2.5.3) wurde die DNA gereinigt. Nach Denaturierung durch 1/5 Volumen NH₄-Acetat [10 M] und Ethanol-Fällung bei -20°C für 30 min wurde die DNA pelletiert (20.000 x g, 20 min, 4°C), zweimal mit 70% Ethanol gewaschen und schließlich in 400 µl A.bidest aufgenommen.

Die Ausbeute einer solchen Standard-Präparation betrug etwa 0,5 mg DNA/g Naßzellen.

2.5.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

2.5.2.1 Plasmid-Präparation durch alkalische Lyse

Plasmid-DNA zur Restriktion und Klonierung wurde mittels alkalischer Lyse isoliert [BIRNBOIM & DOLY, 1979].

Dabei wurden 1-2 ml einer Übernachtskultur abzentrifugiert (12.000 x g, 5 min) und das Zellpellet in 300 µl Puffer 1 (50 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 8, 100 µg/ml RNase A) resuspendiert. Durch Zugabe von 300 µl frisch angesetztem Puffer 2 (0,2 M NaOH, 1% SDS) und anschließende Inkubation von 5 min bei RT wurden die Zellen lysiert. Die Fällung genomischer DNA aus dem Ansatz erfolgte durch Zugabe von 300 µl kaltem Puffer 3 (3 M K-Acetat, pH 4,8) und anschließende Inkubation auf Eis für 20 min. Nach Entfernung der genomischen DNA durch Zentrifugation (20.000 x g, 15 min, 4°C) wurde die Plasmid-DNA mit 0,7 Volumen Isopropanol (10 min, RT) aus dem Ansatz gefällt, anschließend pelletiert (20.000 x g, 15 min, 4°C) und mit 70% Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde unter Vakuum vollständig getrocknet und in 50 µl A. bidest aufgenommen.

2.5.2.2 QIAGEN-Plasmid-Präparation

Plasmid-DNA, die zur Sequenzierung eingesetzt werden sollte, wurde mit dem Midi-Plasmid Kit der Firma QIAGEN laut Angaben des Herstellers präpariert. Dabei wurden Kulturvolumina von 25 ml (high-copy Plasmide) bzw. 50 ml (low-copy Plasmide) verwendet.

2.5.2.3 Schnellpräparation von Plasmid-DNA ("boiling-prep")

Zur schnellen qualitativen Analyse von rekombinanten *E. coli*-Klonen konnte mittels dieser Methode aus Einzelkolonien Plasmid-DNA zur PCR-Amplifikation gewonnen werden. So war ein schnelles Screening von Klonen ohne vorherige Anzucht möglich.

Die Kolonien wurden mit einer sterilen Pipettenspitze von der Agar-Platte gepickt. Ein Teil der Zellen wurde auf einer weiteren Platte ausgestrichen, der Rest in 50 µl 10 mM Tris/HCl, pH 7 resuspendiert. Nach Lyse der resuspendierten Zellen durch Inkubation bei 94°C für 5 min und anschließender Zentrifugation (14.000 x g, 1 min) wurden 5 µl des Überstandes direkt als Template für die PCR eingesetzt.

2.5.3 Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA

Eine mehr oder weniger vollständige Entfernung von Proteinen aus DNA-Lösungen wurde durch Extraktion mit Phenol/Chloroform erreicht [SAMBROOK et al., 1989].

Zur Denaturierung der Proteine wurde die wäßrige DNA-Lösung mit 1 Vol Phenol versetzt, durch Vortexen zu einer weißlichen Emulsion vermischt und anschließend 10 min bei RT, 20.000 x g zentrifugiert. Die obere wäßrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß transferiert. Dabei war darauf zu achten, daß keine Partikel aus der Protein-haltigen Interphase mitgeführt wurden. Dieser Vorgang wurde jeweils mit 1 Vol Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Verhältnis 25:24:1) und 1 Vol Chloroform wiederholt. Anschließend wurde die DNA aus der Lösung präzipitiert (s. 2.5.4) und in *A. bidest* aufgenommen.

2.5.4 DNA-Präzipitation

Zur Aufkonzentrierung von DNA-Lösungen wurde die DNA mit Ethanol oder Isopropanol als Fällungsmittel präzipitiert [SAMBROOK et al., 1989].

Die Fällung mit 2,5 Vol Ethanol abs. erfolgte in Gegenwart von 1,5 M NH_4 -Acetat für mindestens 30 min bei -20°C . Alternativ wurde mit 0,7 Vol Isopropanol für 10 min bei RT gefällt. Anschließend wurde die DNA durch Zentrifugation ($20.000 \times g$, 15 min, 4°C) pelletiert, mit eiskaltem 70%igen Ethanol gewaschen und in einer adäquaten Menge A. bidest aufgenommen.

2.5.5 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA

Die Konzentration von DNA in wäßrigen Lösungen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260 \text{ nm}$ bestimmt. Dabei entspricht $\text{OD}_{260} = 1$ einer Konzentration von $50 \mu\text{g/ml}$ dsDNA bzw. $40 \mu\text{g/ml}$ ssDNA [SAMBROOK et al., 1989].

Das Verhältnis von OD_{260} zu OD_{280} gibt Auskunft über die Reinheit der DNA: Hinreichend saubere DNA-Präparationen haben ein Verhältnis $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ von 1,8 oder größer.

2.5.6 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA in Agarose-Gelen diente der Größen- und Mengenabschätzung von genomischer DNA, Plasmid-DNA und PCR-Produkten sowie der präparativen Gewinnung von DNA-Fragmenten [SAMBROOK et al., 1989].

Abhängig von den Fragmentgrößen der aufzutrennenden DNA wurden Gele verwendet, die zwischen 0,8 und 1,5% Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA) enthielten. Außerdem enthielten die Agarose-Gele zur Visualisierung der DNA $0,5 \mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid, einen Farbstoff, der in die DNA interkaliert und bei Bestrahlung mit UV-Licht fluoresziert.

Nach Versetzen der DNA-Proben mit Probenpuffer (6 x: 0,2% Bromphenolblau, 0,2% Xylencyanol FF, 60% Glycerin und 60 mM EDTA) erfolgte die Gelelektrophorese bei 60-100 V mit TAE-Puffer als Elektrophorese-Puffer. Nach Abschluß der Elektrophorese konnte die aufgetrennte DNA über die Fluoreszenz der DNA-Ethidiumbromid-Komplexe bei UV-Bestrahlung nachgewiesen werden. Anhand eines Längenstandards (GeneRulerTM 1kb DNA Ladder, MBI Fermentas) war eine Abschätzung der Größe und Menge von DNA-Fragmenten möglich.

Die Dokumentation der Agarose-Gele erfolgte mit einer Polaroid-Sofortbildkamera oder mit dem ChemiDoc-Geldokumentationssystem der Firma BioRad.

2.5.7 Reinigung von DNA-Fragmenten

2.5.7.1 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Zur präparativen Gewinnung von DNA aus Agarose-Gelen wurde der QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Dabei wurde die DNA durch 10-15 minütige Inkubation bei 50°C aus dem Gel gelöst, unter Hochsalzbedingungen an eine Kieselgel-Säule gebunden und mehrfach gewaschen. Unter Niedrigsalzbedingungen wurde die DNA mit 10 mM Tris/HCl, pH 8,5 und A. bidest eluiert. Reste des im Waschpuffer vorhandenen Ethanol wurden unter Vakuum entfernt.

2.5.7.2 Reinigung von PCR-Fragmenten

Für die Reinigung von PCR-Produkten direkt aus dem Amplifikationsansatz wurde der QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) nach Angaben des Herstellers verwendet.

Bis zu 10 µg amplifizierte DNA wurden dabei an eine Kieselgel-Säule adsorbiert, anschließend gewaschen und mit 10 mM Tris/HCl, pH 8,5 und A. bidest eluiert. Reste des im Waschpuffer vorhandenen Ethanol wurden unter Vakuum entfernt.

2.5.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist ein Verfahren, durch das Nukleotidsequenzen *in vitro* mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase exponentiell amplifiziert werden können [MULLIS et al., 1986].

Die PCR verläuft in drei Schritten:

1. Denaturierung: Aufschmelzen einer dsDNA (Template) bei 94°C in zwei Einzelstränge;
2. Annealing: Anlagerung von zwei begrenzenden Oligonukleotid-Primern;
3. Elongation: Verlängerung der Primer in 5'-3'-Richtung durch komplementäre Anlagerung von Nukleotiden mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase.

Der aus den Schritten 1-3 bestehende Zyklus wird 25-30fach wiederholt.

Für die Bestimmung der Annealingtemperatur von Oligonukleotiden ≤ 20 bp wurde der Schmelzpunkt nach folgender Faustregel berechnet [THEIN & WALLACE, 1986]:

$$T_m = (\% \text{ AT}) \times 2 + (\% \text{ GC}) \times 4$$

2.5.8.1 Amplifikation von genomischer DNA und Plasmid-DNA mittels PCR

PCR-Amplifikationen wurden mit 50-100 ng Template-DNA und je 1 μ M Primer in Reaktionsvolumina von 25-100 μ l durchgeführt. Der PCR-Ansatz enthielt desweiteren 200 μ M dNTPs, 1,5 mM MgCl₂ und einen für die verwendete DNA-Polymerase (z. B. *Taq*-Polymerase, *Pwo*-Polymerase) optimalen Puffer. Die DNA-Polymerase wurde nach Angaben des Herstellers eingesetzt, im allgemeinen 1 U Enzym pro 25 μ l Ansatz.

Eine Standard-PCR verlief nach folgendem Protokoll:

	Zyklus 1	Zyklen 2-31	Zyklus 32
Denaturierung:	94°C 2 min	94°C 1 min	
Annealing:		40-60°C 1 min	
Elongation:		68-72°C 1 min	68-72°C 10 min

Die 10 minütige Elongationsphase (Zyklus 32) war besonders wichtig für die Klonierung von PCR-Produkten mit Hilfe des Vektors pCR-TOPO 2.1, da hierdurch die Ausbeute an Produkten mit überhängenden 5'-Adenosinresten erhöht wurde (s. 2.5.9.3).

2.5.8.2 PCR-Mutagenese

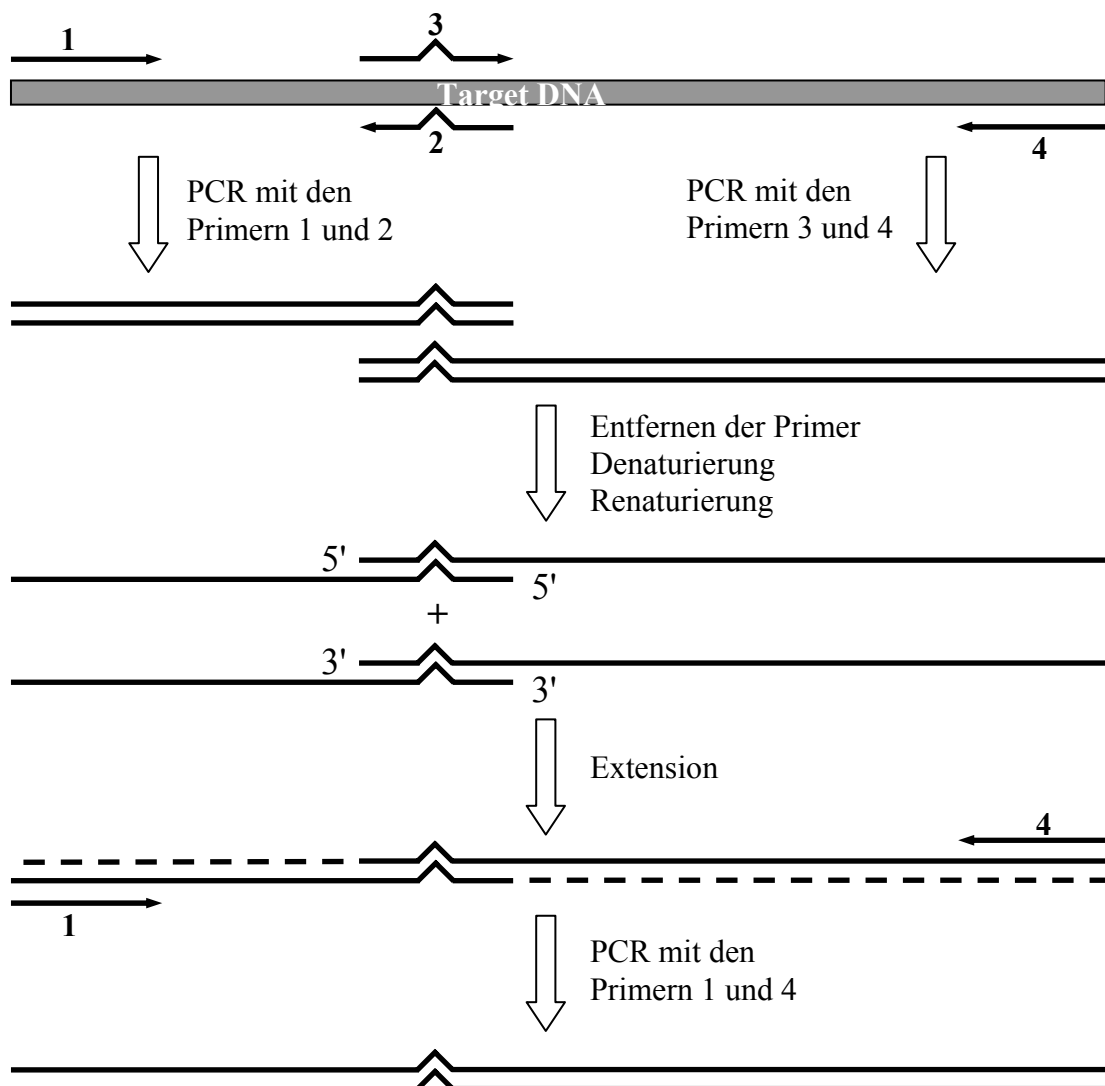
Zur Klonierung von Genen mit Hilfe der Vektoren pET11c, pET15b, pET24a und pSPT19 wurden unmittelbar vor und hinter dem Leserahmen Restriktionsschnittstellen mittels ortsgerechter Mutagenese eingeführt, indem die für die PCR eingesetzten Primer die Erkennungssequenz für das entsprechende Restriktionsenzym enthielten. Um die Fehlerrate bei der DNA-Amplifikation zu minimieren, wurde eine DNA-Polymerase mit zusätzlicher 3'-5' Exonuklease-Aktivität (einer sogenannten 'proofreading' Aktivität) verwendet, z. B. eine *Pwo*-Polymerase.

2.5.8.3 Overlap Extension PCR

Die Einführung von Mutationen mit Hilfe der 'klassischen' PCR-Mutagenese (2.5.8.2) ist durch die Länge der chemisch synthetisierten Primer limitiert und damit nicht für Mutationen innerhalb einer längeren DNA-Sequenz geeignet.

Die Overlap Extension PCR [HO et al., 1989] ist eine Methode, bei der zwei PCR-Produkte mit überlappender Sequenz zu einem längeren Produkt kombiniert werden, das anschließend reamplifiziert wird. Die überlappende Sequenz enthält dabei die gewünschte Mutation. Durch diese Methode ist es somit möglich, Mutationen an jeder beliebigen Stelle einer DNA-Sequenz einzuführen.

Das Prinzip dieser Methode wird durch folgendes Schema dargestellt:



Benötigt werden zwei innere (2 und 3) und zwei äußere Primer (1 und 4). In zwei getrennten PCR-Ansätzen werden mit den Primer-Kombinationen 1/2 bzw. 3/4 zwei Fragmente amplifiziert, deren überlappender Sequenzbereich die gewünschte Mutation enthält. Die PCR-Produkte werden über ein Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe des QIAGEN Gel Extraction Kit gereinigt, um die Primer zu entfernen.

Im zweiten Schritt der Overlap Extension PCR werden die PCR-Produkte in einem gemeinsamen Ansatz kurz denaturiert (94°C, 3 min) und anschließend renaturiert, um eine Hybridisierung der überlappenden Sequenzbereiche zu erreichen. Die Renaturierungsbedingungen (schnelle oder langsame Abkühlung, Temperatur) variieren in Abhängigkeit von der Länge und Nukleotidzusammensetzung des überlappenden Bereichs und müssen daher experimentell ermittelt werden. In Gegenwart von dNTPs und DNA-Polymerase werden in einer 15 minütigen Extensionsphase die Gegenstränge komplettiert, anschließend wird das kombinierte PCR-Produkt mit Hilfe der äußeren Primer 1 und 4 reamplifiziert (s. 2.5.8.1).

2.5.9 Enzymatische Modifikation von DNA

2.5.9.1 Restriktion von DNA

Die Restriktion von genomischer DNA und Plasmid-DNA erfolgte mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen nach Angaben der Hersteller. Dabei wurden 2-3 Units Enzym/ μg DNA eingesetzt und 1 h bei der empfohlenen Temperatur inkubiert.

2.5.9.2 5'-Dephosphorylierung linearisierter Vektor-DNA

Bei der Ligation (s. 2.5.9.3) ist die Rezirkularisierung des linearisierten Vektors gegenüber der Integration von Fremd-DNA begünstigt. Um ersteres zu verhindern, wurden die endständigen 5'-Phosphatgruppen der restringierten Vektor-DNA durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase (CIP) entfernt. Diese wurde dem Restriktionsansatz während der letzten 30 min der Inkubation direkt zugesetzt (0,05 Units/pmol DNA-Enden). Anschließend wurde der linearisierte und dephosphorylierte Vektor gelelektrophoretisch aufgetrennt, aus dem Agarosegel extrahiert und quantifiziert.

2.5.9.3 Ligation

Um DNA-Fragmente in Plasmide zu integrieren, wurde restringierte Fremd-DNA mit restringierter und dephosphorylierter Vektor-DNA mittels T4 Ligase verknüpft. Dieses Enzym katalysiert unter ATP-Verbrauch die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphatenden doppelsträngiger DNA-Moleküle.

Fremd-DNA und Vektor-DNA wurden zunächst in einem Verhältnis von 3:1 (bezogen auf äquimolare Mengen) in einem Volumen von 8 µl gelöst und 5 min bei 45°C inkubiert, um möglicherweise vorhandene Sekundärstrukturen aufzulösen. Nach Zugabe von 1 µl 10x Reaktionspuffer (400 mM Tris/HCl, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 5 mM ATP, pH 7,8) und 1 µl T4 Ligase (1 Weiss-Unit/µl) erfolgte die Ligation über Nacht bei 4°C oder alternativ für 2 h bei 16°C. Die Ligation wurde durch Hitzeeinwirkung (70°C, 10 min) beendet.

Der Ligationsansatz wurde entweder sofort zur Transformation eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

Abweichend hiervon wurde die Ligation von *Taq*-Polymerase amplifizierten PCR-Produkten in den Vektor pCR-TOPO 2.1 durchgeführt. Hierbei handelt es sich um einen Topoisomerase I-gekoppelten Vektor mit Thymidin-Überhang, der in Anwesenheit eines PCR-Produktes mit Adenosin-Überhang spontan mit diesem ligiert [SHUMAN, 1994]. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.5.10 Transformation

2.5.10.1 Präparation kompetenter *E. coli*-Zellen

Zellen der *E. coli*-Stämme DH5α und BL21(DE3) bzw. BL21-CodonPlus(DE3)-RIL wurden mit RbCl und CaCl₂ behandelt [PROMEGA TECHNICAL MANUAL, 1994], wodurch ihre Fähigkeit zur spontanen Aufnahme von Fremd-DNA erhöht wurde. Dafür wurde 0,2 ml einer Übernachtskultur in 20 ml frisches LB-Medium überführt und bei 37°C / 200 Upm bis zu einer OD₅₇₈ von 0,3-0,5 angezüchtet. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 2300 x g, 4°C wurden die Zellen in 10 ml eiskalter Lösung A (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, pH 7) resuspendiert und erneut pelletiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 10 ml eiskalter Lösung B aufgenommen (100 mM MOPS, 50 mM CaCl₂, 10 mM RbCl, pH 6,5) und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (700 x g, 15 min, 4°C) wurden die kompetenten Zellen vorsichtig in 2 ml eiskalter Lösung B resuspendiert. Sie wurden bis zur Transformation auf Eis aufbewahrt oder in

Gegenwart von 15% Glycerin mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Zellen konnten ohne merklichen Verlust ihrer Kompetenz über mehrere Monate bei -80°C gelagert werden.

Alternativ wurden kompetente Zellen nach der Methode von HANAHAN et al. [1986] präpariert. Dafür wurde 50 ml SOB-Medium (2% Bacto-Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 10 mM MgSO_4) mit 1% einer Übernacht-Kultur beimpft und bei 37°C / 250 Upm bis zu einer OD_{578} von 0,4-0,5 angezchtet. Die Zellen wurden 10 min auf Eis abgekühlt und anschließend zentrifugiert (1000 x g, 5 min, 4°C). Das Zellpellet wurde vorsichtig in 17 ml eiskaltem FSB-Puffer (10 mM K-Acetat, 100 mM KCl, 45 mM MnCl_2 , 10 mM CaCl_2 , 3 mM Hexamincobaltchlorid, 10% Glycerin, pH 6,4) resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 4 ml FSB-Puffer aufgenommen und auf Eis gelagert. Im Abstand von 5 min wurde die Zellsuspension zweimal mit 140 μl DMSO versetzt und anschließend in 150 μl Aliquots bei -80°C eingefroren.

2.5.10.2 Transformation von kompetenten *E. coli*-Zellen

Plasmid-DNA wurde mit 150 μl kompetenten *E. coli*-Zellen gemischt, 60 min auf Eis inkubiert und anschließend einem Hitzeschock von 45 sec bei 42°C unterzogen. Die Zellen wurden für 5 min auf Eis abgekühlt und anschließend in 1 ml LB-Medium für 1 h bei 37°C im Schüttler angezogen. Die Selektion transformierter Klone erfolgte durch Anzucht auf Antibiotika-enthaltenden Festmedien.

2.5.10.3 Identifikation rekombinanter Klone durch Blau-Weiß-Differenzierung

Zur Identifikation rekombinanter Klone wurde -wenn möglich- die Blau-Weiß-Differenzierung nach LANGLEY et al. [1975] genutzt. Für dieses System werden *E. coli*-Stämme eingesetzt, die ein trunkiertes β -Galactosidase-Gen *lacZ* enthalten, z. B. *E. coli* DH5 α . Geeignete Klonierungsvektoren wie z.B. die Plasmide pBluescript II KS+, pCR TOPO 2.1 und pUC19 besitzen das im Wirt fehlende 5'-Ende des *lacZ*-Gens, das für das sogenannte α -Peptid der β -Galactosidase codiert. Dieses kann die inaktive β -Galactosidase komplementieren, so daß in transformierten Zellen das vollständige Genprodukt, also eine funktionsfähige β -Galactosidase exprimiert wird. Plattiert man diese Zellen auf einem Festmedium mit IPTG und X-Gal aus, so kann die β -Galactosidase nach Induktion durch IPTG das chromogene Substrat X-Gal zu einem Indigo-Farbstoff umsetzen, wodurch die Kolonien eine blaue Färbung erhalten. Bei rekombinanten Klonen allerdings wird der vektoreigene Teil des *lacZ*-Gens durch die Insertion eines DNA-

Fragments in die multiple cloning site (MCS) nicht mehr im Leseraster transkribiert. Die β -Galactosidase ist damit inaktiv und die Kolonien erscheinen weiß.

Pro Festmedium-Platte wurden 40 μ l IPTG [200 mM] und 20 μ l X-Gal [4% in Dimethylformamid] frisch ausgestrichen.

2.5.11 Konstruktion einer Genbank von *T. tenax*

Die Etablierung von genomischen DNA-Banken erfolgt häufig über eine sogenannte 'shotgun'-Klonierung: Dazu zerlegt man das Genom zunächst in Fragmente geeigneter Größe und baut diese in einen Klonierungsvektor (Plasmid- oder Phagenvektor) ein. Man erhält so eine Genbank, die die Gesamt-DNA eines Organismus repräsentieren sollte.

Für die Konstruktion einer *T. tenax*-Genbank wurde zunächst hochmolekulare genomische DNA aus *T. tenax* wie unter 2.5.1 beschrieben isoliert. Die DNA wurde entweder mit der Restriktionsendonuklease *Hind*III vollständig verdaut (1 h, 37°C) oder partiell mit *Bsp*143I restringiert (8,5 min, 37°C), um überlappende Restriktionsfragmente zu erhalten.

Nach elektrophoretischer Auftrennung der restringierten DNA über ein präparatives Agarose-Gel wurden Fragmente mit einer Größe von 3-10 kb ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) aus dem Gel eluiert und gereinigt.

Der für die Klonierung der DNA-Fragmente verwendete Plasmidvektor pUC19 wurde mit *Hind*III bzw. *Bam*HI (das komplementäre Enden zu den *Bsp*143I-Fragmenten bildet) linearisiert und mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend wurden die genomischen Restriktionsfragmente mit dem so behandelten Vektor ligiert, und *E. coli* DH5 α -Zellen mit den rekombinierten DNA-Molekülen transformiert. Rekombinante Klone konnten über Blau-Weiß-Differenzierung identifiziert werden.

Die Genbank diente als Grundlage für das *T. tenax* Genomsequenzierungsprojekt, das in Zusammenarbeit mit H. P. Klenk von der Firma Epidauros (Bernried) und S. Schuster vom MPI für Entwicklungsbiologie (Tübingen) durchgeführt wurde.

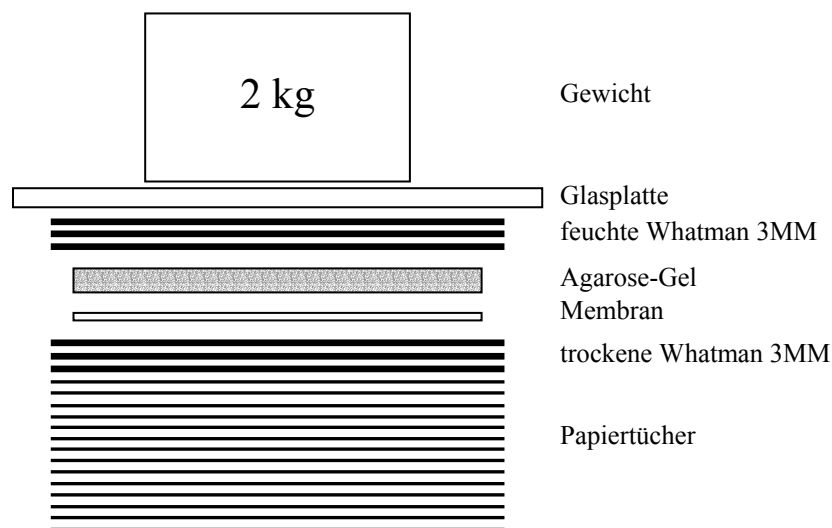
2.5.12 Southern Blot-Analysen

2.5.12.1 Kapillartransfer von DNA auf Nylon-Membranen (Southern Blot)

Gelelektrophoretisch aufgetrennte DNA wurde durch Kapillartransfer auf positiv geladene Nylon-Membranen übertragen [modifiziert nach SOUTHERN, 1975].

Dabei wurde das Agarose-Gel nach der Dokumentation auf Mindestgröße zugeschnitten, 2 x 10 min einer Säurebehandlung unterzogen (0,2 M HCl), 2 x 15 min in einer Denaturierungslösung (1 M NaCl, 0,5 M NaOH) und anschließend 2 x 15 min in einer Neutralisationslösung (3 M NaCl, 0,5 M Tris, pH 7,5) geschwenkt.

Sowohl das Agarose-Gel als auch die auf Gelgröße zugeschnittene Nylon-Membran (S&S NytranN) sowie drei Whatman-Papiere 3MM wurden 10 min in 10 x SSC-Puffer (1,5 M NaCl, 0,15 M Na-Citrat, pH 7) äquilibriert. Der Blot-Aufbau ist in der nachfolgenden Abbildung dargestellt:



Der Kapillartransfer erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Nach Beendigung des Transfers wurde die DNA mittels UV-Licht ($\lambda = 254 \text{ nm}$, 3 min) auf der Nylon-Membran fixiert. Der DNA-Blot wurde bis zu seiner Verwendung zwischen Whatman-Papieren 3MM gelagert.

2.5.12.2 Markierung von Oligonukleotiden mit Digoxigenin

Die Markierung von Oligonukleotiden mit Digoxigenin wurde mit dem DIG Oligonucleotide 3'-End Labeling Kit (Roche Diagnostics) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei

wurden die Oligonukleotide enzymatisch durch Einbau eines einzelnen Digoxigenin-gelabelten Didesoxy-Uridintriphosphates (DIG-ddUTP) am 3'-Ende markiert.

Im Detail wurden 100 pmol eines Oligonukleotids mit 4 µl Reaktionspuffer (5 x: 1 M K-Kakodylat, 1,25 mg/ml BSA, 0,125 M Tris/HCl, pH 6,6), 4 µl CoCl₂-Lösung (25 mM), 1 µl DIG-ddUTP (1 mM) und 1 µl Terminale Transferase (50 U/µl) in einem Gesamtvolumen von 20 µl gemischt, für 15 min bei 37°C inkubiert und dann auf Eis abgekühlt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 µl eines Glycogen/EDTA-Gemisches gestoppt, anschließend konnte das DIG-markierte Oligonukleotid bei -20°C in Gegenwart von 0,1 M LiCl mit 3 Vol Ethanol aus der Lösung gefällt werden. Nach Zentrifugation (12.000 x g, 20 min, 4°C) wurde das pelletierte Oligonukleotid mit 70%igem Ethanol gewaschen, unter Vakuum getrocknet und in 20 µl sterilem A. bidest aufgenommen.

2.5.12.3 Markierung von dsDNA mit Digoxigenin

Die Markierung von dsDNA mit Digoxigenin wurde mit dem DIG-High Prime Kit (Roche Diagnostics) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei wurden die DNA-Fragmente durch das Klenow-Enzym unter Verwendung unspezifischer Oligonukleotid-Primer vervielfältigt und gleichzeitig durch den Einbau von Digoxigenin-markiertem Desoxy-Uridintriphosphat (DIG-11-dUTP) markiert.

Im Detail wurde 1 µg dsDNA (in einem Volumen von 16 µl) durch Inkubation bei 100°C für 10 min und rasches Abkühlen in einem Eis/Ethanol-Bad denaturiert. Nach Zugabe von 4 µl DIG-High Prime Lösung (1 U/µl Klenow-Enzym, 1 mM dATP, 1 mM dCTP, 1 mM dGTP, 0,65 mM dTTP, 0,35 mM DIG-11-dUTP, 5x Reaktionspuffer in 50% Glycerin) wurde der Ansatz für 20 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Erhitzen auf 65°C für 10 min gestoppt. Die Ausbeute betrug etwa 2 µg neu-synthetisierte DIG-markierte DNA.

2.5.12.4 Southern-Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten DNA-Sonden

Vor der Hybridisierung wurde der DNA-Blot (s. 2.5.12.1) mindestens 2 h bei 68°C unter leichtem Schwenken in Hybridisierungspuffer inkubiert (5 x SSC, 4% Magermilch-Pulver, 0,1% N-Lauroylsarcosin, 0,01% SDS; 75 ml/100 cm² Blot-Fläche). Für die anschließende Hybridisierung wurden die DIG-markierten Sonden durch 10 minütige Inkubation bei 100°C und rasches Abkühlen in einem Eis/Ethanol-Bad denaturiert und schließlich in einer Konzentration von 20 ng/ml Puffer eingesetzt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht unter leichtem Schwenken bei 68°C (DIG-markierte dsDNA) bzw. 37-42°C (DIG-markierte Oligonukleotide).

Nach der Hybridisierung wurde der DNA-Blot zunächst bei RT 2 x 5 min mit Hochsalz-Puffer (2 x SSC, 0,1% SDS) gewaschen, um überschüssige DIG-Sonde zu entfernen. Stringentes Waschen erfolgte anschließend 3 x 20 min bei 68°C in einem Niedrigsalz-Puffer (0,1 x SSC, 0,1% SDS).

Eine Lagerung der im Hybridisierungspuffer gelösten Sonde bei -80°C war über mehrere Monate möglich.

2.5.12.5 Detektion von DNA-DNA-Hybriden durch immunologischen Nachweis

Die Hybride aus immobilisierter DNA und DIG-markierter Sonde wurden immunologisch unter Verwendung eines Antikörper-Konjugats (Anti-Digoxigenin/Alkalische Phosphatase) und einer anschließenden Detektionsreaktion mit dem Chemilumineszenz-Farbstoff CDP-Star (Tropix) nachgewiesen.

Dabei wurde der DNA-Blot bei RT zunächst für 1 h in Puffer A (0,9% NaCl, 50 mM Tris/HCl, pH 7,4) in Gegenwart von 5% Magermilch inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Nach Zugabe des Antikörper-Konjugats in einer Verdünnung von 1:20.000 und einer weiteren Stunde Inkubation bei RT wurde nicht-gebundener Antikörper mit Puffer A (3 x 15 min) entfernt.

Die Chemilumineszenz-Reaktion wurde in einer Klarsichtfolie durchgeführt, wobei der nasse Blot gleichmäßig mit CDP-Star bedeckt wurde. Die Chemilumineszenz-Signale konnten durch Autoradiographie (CEA-Röntgenfilme Typ RP) bzw. mit Hilfe des ChemiDoc Gel Documentation System (BioRad) nach einer Expositionszeit von 1-20 h detektiert werden.

2.5.13 Sequenzierung

2.5.13.1 Sequenzierung von DNA mit [α -³⁵S]dATP

Als Größenstandard für Primer Extension Analysen (s. 2.6.6) dienten Sequenzierreaktionen des entsprechenden Genabschnitts mit denselben Primern, die auch im Primer Extension Experiment verwendet wurden. Die Sequenzierung erfolgte durch das Kettenabbruchverfahren nach SANGER et al. [1977].

Probenvorbereitung:

32 µl Plasmid-DNA (3-5 µg) wurde zunächst durch Zugabe von 8 µl 2 M NaOH einer alkalischen Denaturierung unterzogen (10 min, RT), um Einzelstrang-DNA zu erhalten. Anschließend wurde die DNA mit 7 µl Na-Acetat (3 M, pH 4,8) und 200 µl Ethanol für mindestens 30 min bei -80°C präzipitiert. Nach Zentrifugation (14.000 x g, 20 min, 4°C) wurde das DNA-Pellet mit 75% Ethanol gewaschen und in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Sequenzierungsreaktion:

Die Sequenzierungsreaktion (Hybridisierung des Primers an die einzelsträngige Template-DNA, Markierungsreaktion, Kettenabbruch) erfolgte unter Verwendung des Sequenase Version 2.0 Sequenz Kit (United States Biochemical (USB), Braunschweig) nach Angaben des Herstellers. Für die Markierung wurde [α -³⁵S]dATP eingesetzt.

Das Sequenziergel: Vorbereitung, Elektrophorese und Autoradiographie

Die Produkte der Sequenzierreaktion wurden in einem 5%igen denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamid-Gel in 1 x TBE (10 x TBE: 0,9 M Tris, 0,9 M Borsäure, 20 mM EDTA, pH 8,0) als Laufpuffer aufgetrennt. Dabei wurden 0,2 mm dicke Flachgele der Größe 55 x 25 cm verwendet. Die dazu benutzten Glasplatten wurden zuvor mit Ethanol gereinigt und anschließend mit Repell-Silan (Dichlordimethylsilan) bzw. mit Binde-Silanlösung (17,5 µl γ -Methacryl-oxypropyltrimethyloxysilan + 175 µl 10%iger Essigsäure in 5 ml Ethanol) behandelt, um zu gewährleisten, daß das Gel nur an einer Platte haftet und nach dem Gellauf beim Trennen der Platten nicht zerreißt.

Gelzusammensetzung:	24,33 g	Harnstoff
	6 ml	10 x TBE
	7,5 ml	40% Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung (38,8:1,2)
	ad 60 ml	H ₂ O

Nach Zugabe von 50 µl TEMED und 300 µl 10% APS wurde das Gel zwischen die zuvor präparierten Platten gegossen. Ein Haifischzahnkamm für die Probestaschen wurde anschließend zwischen den Platten fixiert. Die Polymerisation des Gels dauerte ca. 30 min bei RT, danach konnten die Gele über Nacht bei 4°C gelagert werden.

Laufbedingungen der Gelelektrophorese: Vorlaufzeit 30 min, 50 W, 50°C
 Laufzeit 2,5 h, 50 W, 50°C

Nach der Elektrophorese wurde die Platte mit dem daran haftenden Gel 30 min in einer Fixierlösung aus 20% Methanol und 10% Essigsäure geschwenkt und anschließend 10 min mit H₂O gespült, um überschüssigen Harnstoff zu entfernen. Das Gel wurde zunächst bei 80°C ca. 2 h lang getrocknet, bevor ein Röntgenfilm zur Autoradiographie aufgelegt wurde. Die Expositionszeit betrug in der Regel 1-2 Tage bei RT, bessere Ergebnisse wurden erzielt, wenn die Exposition bei -80°C durchgeführt wurde.

Durch Schwenken in 2 M NaOH konnte anschließend das Gel wieder von der Glasplatte abgelöst werden.

2.5.13.2 Automatisierte DNA-Sequenzierung

Automatisierte DNA-Sequenzierungen [SANGER et al., 1977] wurden von der Firma Seqlab (Göttingen) und der GATC Biotech AG (Konstanz) bzw. vom DNA-Sequenzier-Service der Medizinischen Fakultät des Universitätsklinikums Essen mit einem ABI-Prism 377 Sequencer durchgeführt.

2.5.13.3 Computergestützte Auswertung von Nukleotidsequenzen

Software	Referenz	Anwendung
CHROMAS	McCarthy, unveröffentlicht	Visualisierung von Sequenzierchromatogrammen auf dem PC
GENMON 4.4	Gesellschaft für Biotechnische Forschung mbH, Braunschweig	Editierung von DNA-Sequenzen, Restriktionsanalysen, Bestimmung des Codon-Gebrauchs, Übersetzung von DNA- in Aminosäure-Sequenzen
BLAST 1.0 und 2.0	ALTSCHUL et al., 1997 (www.ncbi.nih.nlm.gov/blast)	Datenbankvergleiche von DNA- und Protein-Sequenzen
Clustal W 1.7	THOMPSON et al., 1994	Alignments von DNA- und Protein-Sequenzen

2.5.14 Gelretardationsexperimente

Mit Hilfe von Gelretardationsexperimenten können Interaktionen von DNA-bindenden Proteinen mit ihren Zielsequenzen untersucht werden. Der Test beruht auf der Beobachtung, daß Komplexe aus Protein und DNA langsamer durch nicht-denaturierende Polyacrylamid-Gele wandern als freie DNA-Fragmente.

Im Einzelnen wurde ein DNA-Fragment mit einer putativen Protein-Bindestelle über PCR amplifiziert und anschließend mit dem DIG Oligonucleotide 3'-End Labeling Kit (Roche Diagnostics) markiert (s. 2.5.12.2). Die DIG-markierte DNA wurde bei geringer Ionenstärke mit Protein aus Rohextrakten von *T. tenax* und *E. coli* inkubiert. Gebildete Protein-DNA-Komplexe wurden anschließend auf einem nicht-denaturierenden Polyacrylamid-Gel von ungebundener DNA getrennt. Nach Transfer auf Nylon-Membranen und anschließender Immunodetektion der DIG-Markierung wurde die Interaktion von Protein mit der DNA durch eine Retardation im Bezug auf freie DNA angezeigt.

Für die Herstellung von *T. tenax*- bzw. *E. coli*-Rohextrakten wurde 1 g Zellen in 2 ml TEK-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 8, 10 mM KCl, 1 mM EDTA, 10 mM β -Mercaptoethanol) aufgenommen, der zusätzlich als Protease-Hemmstoff 1 mM PMSF enthielt, und mittels dreimaliger Passage durch die Minizelle der Frenchpress (20.000 psi) aufgeschlossen. Nicht-aufgeschlossene Zellen und Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (80.000 x g, 60 min, 4°C) abgetrennt und der Überstand über Nacht bei 4°C gegen TEK-Puffer dialysiert. Die so behandelten Rohextrakte wurden dann entweder bei 4°C gelagert oder in Gegenwart von 25% Glycerin bei -80°C eingefroren.

Ein Standard-Reaktionsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

35-70 ng DIG-markiertes DNA-Fragment

5-30 μ g Protein

TEK-Puffer ad 15 μ l

In Konkurrenzexperimenten enthielt der Reaktionsansatz zusätzlich 2 μ g Lachssperm-DNA, die zuvor durch eine 5minütige Ultraschall-Behandlung fragmentiert worden war.

Die Reaktionsansätze wurden 15 min bei RT bzw. 37°C inkubiert, anschließend mit 5 μ l Probenpuffer (15% Ficoll 400, 0,005% Bromphenolblau, in TEK-Puffer) versetzt und sofort auf ein natives Polyacrylamid-Gel (4% Acrylamid-Bisacrylamid (37,5:1), 1 x TBE; [Sambrook et al., 1989]) aufgetragen. Nach einem Vorlauf von 30 min bei 10 mA erfolgte die Elektrophorese (Minigel-Twin-Kammer von Biometra) zunächst bei 15 mA zum Einlaufen der Proben ins Gel,

dann wurde sie bei 10 mA für 60 min fortgesetzt. Als Elektrophorese-Puffer wurde ein 0,5 x TBE-Puffer verwendet.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel auf eine positiv geladene Nylonmembran (S&S NytranN) geblottet, die vorher 5 min in 0,5 x TBE-Puffer äquilibriert wurde. Für den Blotaufbau wurde zunächst die Nylonmembran auf das Polyacrylamid-Gel gelegt, anschließend drei trockene Whatman-Papiere 3MM und zuoberst eine Glasplatte. Der Blot wurde mit einem Gewicht von 1 kg beschwert. Nach 60 min wurde die Nylonmembran kurz in 10 x SSC geschwenkt und die geblottete DNA durch UV-Licht ($\lambda = 254$ nm, 3 min) kovalent fixiert. Anschließend wurde analog zu 2.5.12.5 die DIG-markierte DNA in einer immunologischen Reaktion unter Verwendung eines Antikörper-Konjugats (Anti-Digoxigenin/Alkalische Phosphatase) und einer Detektionsreaktion mit dem Chemilumineszenz-Farbstoff CDP-Star (Tropix) nachgewiesen.

2.6 Molekularbiologische Arbeiten mit RNA

2.6.1 Behandlung von Lösungen, Gefäßen und Geräten

Zum Schutz vor RNasen wurden alle Lösungen mit 0,1% DEPC versetzt, über Nacht bei RT inkubiert und anschließend autoklaviert. Glasgeräte, -pipetten und -gefäße wurden durch Inkubation bei 200°C für mindestens 2 h sterilisiert. Nicht-hitzebeständige Geräte wurden mit 3% H₂O₂ oder RNase Away (Roth) behandelt.

2.6.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus *T. tenax*

Gesamt-RNA aus *T. tenax* wurde unter Verwendung von TRIzol nach Angaben des Herstellers (Life Technologies) isoliert. Das Reagenz ist eine Fertiglösung, die u. a. Phenol, Guanidinium-Isothiocyanat und einen roten Farbstoff zur Erkennung der organischen Phase enthält [CHOMCZYNSKI, 1993].

Zur Aufarbeitung wurden 0,1 g *T. tenax*-Zellen in 1 ml TRIzol homogenisiert und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurden die Phasen durch kräftiges Schütteln gemischt, 2-3 min bei RT inkubiert und anschließend zentrifugiert (12.000 x g, 15 min, 4°C). Die wäßrige, RNA-enthaltende Phase (ca. 400 µl) wurde vorsichtig abgenommen und zu je 40 µl aliquotiert. Durch Zugabe von 50 µl Isopropanol pro Aliquot und anschließende Inkubation für 10 min bei RT wurde die RNA aus der Lösung gefällt, durch Zentrifugation pelletiert

(12.000 x g, 10 min, 4°C) und mit 100 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Die RNA wurde unter 100% Ethanol bei -80°C gelagert.

Erst kurz vor ihrer Weiterverwendung wurde die RNA nochmals durch Zentrifugation pelletiert und nach Entfernen des Ethanol-Überstandes kurz bei 37°C im Heizblock getrocknet. Anschließend wurde das RNA-Pellet durch Inkubation bei 37°C vorsichtig in 15-20 µl DEPC-H₂O gelöst.

2.6.3 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von RNA

Die Konzentration von RNA in wässrigen Lösungen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm bestimmt. Dabei entspricht $OD_{260} = 1$ einer Konzentration von 40 µg/ml RNA [SAMBROOK et al., 1989].

Das Verhältnis von OD_{260} zu OD_{280} gibt Auskunft über die Reinheit der RNA: Hinreichend saubere RNA-Präparationen haben ein Verhältnis OD_{260}/OD_{280} von 2,0 oder größer.

2.6.4 Agarose/Formaldehyd-Gelelektrophorese von RNA

Die Agarose-Gelelektrophorese von RNA wurde unter denaturierenden Bedingungen in 1-1,2%igen MOPS/Formaldehyd-Gelen durchgeführt. Dabei wurde 1-1,2 g Agarose in 73,8 ml DEPC-H₂O und 10 ml 10 x MOPS-Puffer (10 x: 200 mM MOPS, 50 mM Na-Acetat, 10 mM EDTA, pH 7) durch Erhitzen gelöst. Nach Abkühlung auf ca. 60°C wurde unter leichtem Schwenken 16,2 ml Formaldehyd (37%) zugegeben, anschließend das Gel in die mit 3% H₂O₂ gesäuberte Gelkammer gegossen und nach vollständigem Auspolymerisieren mit dem späteren Laufpuffer (1 x MOPS-Puffer) überschichtet.

Die RNA-Proben und der verwendete DIG-markierte RNA-Längenstandard (Roche Diagnostics) wurden mit 3 Vol frisch angesetzttem Probenpuffer versetzt (250 µl deionisiertes Formamid, 83 µl Formaldehyd (37%), 50 µl 10fach-konzentrierter MOPS-Puffer, 2,5 µl Bromphenolblau (2%), 14,5 µl DEPC-H₂O), gründlich durchmischt und nach 10 minütiger Inkubation bei 65°C auf Eis abgekühlt. Pro Spur wurde 0,5-5 µg Gesamt-RNA bzw. 50 ng Längenstandard aufgetrennt.

Die Elektrophorese erfolgte bei 75-100 V für 2-3 h.

2.6.5 Northern Blot-Analysen

2.6.5.1 Kapillartransfer von RNA auf Nylon-Membranen (Northern Blot)

In ähnlicher Weise wie DNA wurde auch RNA durch Kapillartransfer auf inerte Trägermaterialien übertragen und dort immobilisiert.

Dafür wurde das Agarose-Gel nach Beendigung der Elektrophorese auf Mindestgröße zugeschnitten und 2 x 15 min in 20 x SSC-Puffer (3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat, pH 7) äquilibriert. Die positiv geladene Nylon-Membran (Roche Diagnostics) wurde ca. 1 min mit DEPC-H₂O angefeuchtet und anschließend in 20 x SSC-Puffer getränkt, ebenso drei auf Gelgröße zurechtgeschnittene Whatman 3MM-Papiere. Der Blotaufbau erfolgte wie unter 2.5.12.1 beschrieben; der Transfer erfolgte über Nacht bei 4°C.

Anschließend wurde der Northern Blot kurz mit DEPC-H₂O gespült, um die Salze zu entfernen. Die RNA wurde durch UV-Crosslinking ($\lambda = 254$ nm, 3 min) auf der Membran fixiert und schließlich durch Färbung mit Methylblau sichtbar gemacht. Dafür wurde der Blot ca. 1 min in der Färbelösung (50 mg Methylblau, 6,6 ml 3 M Na-Acetat, pH 5,2, 1 ml Eisessig, ad 50 ml mit DEPC-H₂O) geschwenkt, danach 3-4 mal mit DEPC-H₂O entfärbt und anschließend auf Whatman 3MM-Papier getrocknet. Die RNA-Blots konnten so über mehrere Monate bei RT gelagert werden.

2.6.5.2 Slot Blot

Beim Slot Blot werden die Proben (hier 0,625-10 µg Gesamt-RNA in 10 x SSC) mit Hilfe der BioDot Mikrofiltrations-Apparatur (BioRad) ohne vorherige elektrophoretische Auftrennung direkt auf positiv geladene Nylon-Membranen transferiert, und zwar in begrenzten schlitzförmigen Bereichen (Slots).

Dafür wurden zwei Lagen in 10 x SSC äquilibrierte Filter-Papiere (Bio-Dot SF 60, BioRad) in die gereinigte Apparatur gelegt, darüber die auf Filtergröße zugeschnittene und ebenfalls in 10 x SSC äquilibrierte Nylon-Membran (Roche Diagnostics). Die Apparatur wurde nach Angaben der Hersteller zusammengebaut und verschraubt. Nach Anlegen eines Vakuums mittels einer Vakuum-Pumpe wurden die Slots der Apparatur mit 500 µl 10 x SSC gespült. Anschließend wurde je 100 µl RNA-Probe aufgetragen, wobei die RNA direkt vor dem Probenauftrag für 10 min bei 65°C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt wurde. Nach Spülen der Slots mit weiteren 300 µl 10 x SSC wurde die Membran unter Vakuum aus der

Apparatur entfernt, die RNA durch UV-Crosslinking ($\lambda = 254 \text{ nm}$, 3 min) auf der Membran fixiert und mit Methylenblau angefärbt.

2.6.5.3 Synthese von DIG-markierten RNA-Sonden durch *in vitro* Transkription

Mit Hilfe des DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7) von Roche Diagnostics wurden nach Angaben des Herstellers DIG-markierte antisense mRNA-Sonden durch *in vitro* Transkription klonierter DNA mit T7 RNA-Polymerase hergestellt.

Dabei wurde die zu transkribierende DNA in die Polylinker-Region des Vektors pSPT19 inseriert, und zwar stromabwärts des vektoreigenen T7-Promotors. Nach Linearisierung der Template-DNA mit einem geeigneten Restriktionsenzym wurden mit Hilfe der T7 RNA-Polymerase „run off“-Transkripte definierter Länge erzeugt, wobei DIG-UTP als Substrat diente und in die Transkripte eingebaut wurde. Jedes 20. bis 25. Nukleotid der neusynthetisierten mRNA ist ein DIG-UTP. Ausgehend von 1 μg Template-DNA beträgt die Ausbeute ca. 10 μg DIG-markierte antisense-mRNA voller Länge. Diese wurde anschließend nach Angaben des Herstellers mit Ethanol gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen und in 50 μl DEPC-Wasser aufgenommen. Die Sonden konnte über mehrere Monate bei -80°C gelagert werden.

2.6.5.4 Northern-Hybridisierung mit DIG-markierten RNA-Sonden

Die Prähybridisierung des RNA-Blots erfolgte für mindestens 2 h bei 68°C unter leichtem Schwenken in DIG Easy Hyb-Puffer (Roche Diagnostics). Für die anschließende Hybridisierung wurden die DIG-markierten antisense mRNA-Sonden durch 10 minütige Inkubation bei 100°C und rasches Abkühlen in einem Eis/Ethanol-Bad denaturiert und schließlich in einer Konzentration von 50-100 ng/ml DIG Easy Hyb-Puffer eingesetzt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht unter leichtem Schwenken bei 68°C .

Nach der Hybridisierung wurde der RNA-Blot zunächst bei RT 2 x 5 min mit Hochsalz-Puffer (2 x SSC, 0,1% SDS) gewaschen, um überschüssige DIG-Sonde zu entfernen. Stringentes Waschen erfolgte anschließend 2 x 15 min bei 68°C in einem Niedrigsalz-Puffer (0,1 x SSC, 0,1 % SDS).

Eine Lagerung der in DIG Easy Hyb-Puffer gelösten Sonde bei -80°C war über mehrere Monate möglich.

2.6.5.5 Detektion von RNA-RNA-Hybriden durch immunologischen Nachweis

Die Hybride aus geblotteter Gesamt-RNA und DIG-markierter RNA-Sonde wurden immunologisch unter Verwendung eines Antikörper-Konjugats (Anti-Digoxigenin / Alkalische Phosphatase) und einer anschließenden Detektionsreaktion mit dem Chemilumineszenz-Farbstoff CDP-Star (Tropix) nachgewiesen [BOEHRINGER MANNHEIM MANUAL, 1995].

Dabei wurde der RNA-Blot bei RT zunächst für 5 min in Puffer 1 (0,1 M Maleat, 3 M NaCl, pH 8) äquilibriert und anschließend im gleichen Puffer in Gegenwart von 2% Blocking-Reagenz (Roche Diagnostics) 1 h bei RT inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Nach Zugabe des Antikörper-Konjugats in einer Verdünnung von 1:20.000 und weiteren 30 min Inkubation bei RT wurde nicht-gebundener Antikörper mit Puffer 1 (4 x 10 min) abgewaschen. Anschließend erfolgte eine 5 minütige Inkubation in Detektionspuffer (0,1 M NaCl, 0,1 M Tris/HCl, pH 9,5).

Die Chemilumineszenz-Reaktion wurde in einer Klarsichtfolie durchgeführt, wobei der nasse Blot gleichmäßig mit CDP-Star bedeckt wurde. Die Chemilumineszenz-Signale konnten durch Autoradiographie (CEA-Röntgenfilme Typ RP) bzw. mit Hilfe des ChemiDoc Gel Documentation System (Bio-Rad) nach einer Expositionszeit von 10 s - 60 min detektiert werden.

2.6.5.6 Densitometrische Analysen der Hybridisierungssignale

Densitometrische Analysen der Hybridisierungssignale erfolgten mit einem Laser-Densitometer UltrascanXL (Pharmacia LKB) nach Angaben des Herstellers. Diese Arbeiten wurden von Herrn Dr. Lothar Vaßen am Institut für Zellbiologie des Universitätsklinikums Essen (Tumorforschung) durchgeführt.

2.6.6 Primer Extension-Analysen

Die Primer Extension-Analyse ist eine Methode zur exakten Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes eines exprimierten Gens. Dies ist besonders wichtig im Hinblick auf die Definition des Promotor-Bereichs im upstream-Bereich eines Gens. Bei dieser Methode wird ein genspezifischer Antisense-Primer, der am 5'-Ende markiert ist, an die mRNA angelagert. Mit Hilfe einer Reversen Transkriptase wird dann der Primer zur cDNA verlängert ('Primer Extension'). Dabei kann die cDNA nur so lang werden, bis das Ende der mRNA und damit der Transkriptionsstart erreicht ist. Die so erhaltene cDNA wird auf einem Sequenzgel parallel zu

einer Sequenzierung des Genabschnitts aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Detektion mit einem Röntgenfilm erscheint das Signal der Primer-Markierung in Höhe des Nukleotids, bei dem die Transkription beginnt.

Zunächst wurde mit Hilfe einer T4-Polynukleotidkinase ein antisense-Oligonukleotid, das ca. 100-150 Nukleotide downstream vom putativen Transkriptionsstart binden sollte, mit [γ - 32 P]-ATP markiert. Dazu wurde der Reaktionsansatz aus 100 pmol Oligonukleotid, 10 μ Ci [γ - 32 P]-ATP und 2 U T4-Polynukleotidkinase in einem Gesamtvolumen von 12,5 μ l für 60 min bei 37°C inkubiert, und das markierte Oligonukleotid anschließend mit Hilfe des Nucleotide removal Kit (QIAGEN) gereinigt und mit 50 μ l EB-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,5) eluiert.

Das radioaktiv markierte Oligonukleotid wurde anschließend mit Gesamt-RNA aus autotroph oder heterotroph gezogenen *T. tenax*-Zellen hybridisiert. Dazu wurde der Hybridisierungsansatz (10 μ g RNA, 10 pmol markiertes Oligonukleotid, 0,3 M KCl, 20 mM Tris, 2 mM EDTA, pH 8,3, in einem Gesamtvolumen von 30 μ l) 4 min bei 80°C denaturiert und anschließend 60 min bei 50°C inkubiert. Nach einer Ethanol-Fällung über Nacht und anschließender Zentrifugation (20.000 x g, 10 min, RT) wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und dann im Heizblock bei 37°C getrocknet.

Die anschließende Synthese der cDNA wurde mit Hilfe der Superscript II Reversen Transkriptase (Life Technologies) durchgeführt. Dazu wurde das RNA-Pellet mit dem gebundenen Oligonukleotid in 19 μ l Reaktionsmix aufgenommen (4 μ l Erststrang-Puffer, 1 μ l 10 mM dNTP, 2 μ l 100 mM DTT, 2 μ l DMSO, 10 μ l DEPC-H₂O) und 2 min bei 50°C vortemperiert. Durch Zugabe von 1 μ l Superscript II Reverse Transkriptase erfolgte der Start der cDNA-Synthese, die für 30 min bei 50°C durchgeführt wurde. Nach einer anschließenden Phenol/Chloroform-Extraktion wurde die cDNA mit Ethanol aus dem wässrigen Überstand präzipitiert und das Pellet bei 37°C im Heizblock getrocknet. Die cDNA wurde dann in 10 μ l Stop-Puffer (Sequenase-Kit 2.0, USB) aufgenommen, 5 min bei 95°C denaturiert und davon 3 μ l auf ein Sequenzgel (s. 2.5.13.1) aufgetragen bzw. bei -20°C gelagert.

2.7 Biochemische Methoden

2.7.1 Heterologe Expression der *T. tenax* PEPS, PPDK und Citrat Synthase 1 in *E. coli*

In den Plasmid-Konstrukten pET15b+PEPS, pET24a+PPDK und pET11c+Cis1 stehen die Gene *pps*, *ppdk* bzw. *cis1* aus *T. tenax* unter Kontrolle des T7lac Promotors. Die Expression der rekombinanten Proteine wird in diesem System durch die Bereitstellung von T7 RNA Polymerase im Wirtstamm gewährleistet. Zu diesem Zweck wurden die Plasmid-Konstrukte in die *E. coli*-Stämme BL21(DE3) bzw. BL21-CodonPlus(DE3)-RIL transferiert. Diese Expressionsstämme enthalten eine chromosomale Kopie des T7 RNA Polymerase-Gens unter *lacUV5*-Kontrolle, dessen Expression durch IPTG induziert wird (s. 2.3). Der *lacUV5*-Promotor erlaubt jedoch auch im nicht-induzierten Zustand einen geringen Grad an Transkription des T7 RNA Polymerase-Gens. Für eine stringenter Kontrolle ist die gleichzeitige Expression von T7 Lysozym, einem natürlichen Inhibitor der T7 RNA Polymerase, möglich: Wirtstämme mit dem Plasmid pLysS produzieren geringe Mengen an T7 Lysozym, die den Basal-Level an T7 RNA Polymerase reduzieren und damit die Transkription des rekombinanten Gens im nicht-induzierten Zustand verhindern.

2.7.2 Präparative Enzymreinigungen

2.7.2.1 Reinigung der rekombinanten PEPS

Zellen des Expressionsklones *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL pET15b+PEPS wurden in Aufschlußpuffer (100 mM Tris/HCl, pH 7 (70°C), 100 mM β -Mercaptoethanol; 3 ml/g Zellen) resuspendiert und durch dreimalige Passage durch die Druckzelle der French Press (20.000 psi) aufgeschlossen. Zelltrümmer und nicht-aufgeschlossene Zellen wurden durch Ultrazentrifugation (80.000 x g, 1 h, 4°C) abgetrennt. Der zellfreie Extrakt wurde einer Hitzefällung (75°C, 20 min) unterzogen, wodurch ein großer Teil der *E. coli*-eigenen Proteine präzipitiert wurde. Nach erneuter Zentrifugation (47.900 x g, 30 min, 4°C) wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und über Nacht gegen 100 mM Tris/HCl, pH 7 (70°C), 10 mM β -Mercaptoethanol, 1 mM MgCl₂ dialysiert. Die Reinigung der PEPS aus dem dialysierten hitzegefällten Extrakt erfolgte bei 4°C im Kühlraum mittels Ionenaustausch-Chromatographie über Q-Sepharose fast flow (Pharmacia, Säulenvolumen 30 ml, Durchmesser 1 cm), die über Nacht gegen denselben Puffer (s.o.) äquilibriert worden war. Mit einer Flußrate von 0,3 ml/min wurde der Protein-Extrakt auf die Säule geladen und mit Äquilibrierungspuffer nachgespült. Die Durchfluß-Fractionen enthielten

den größten Teil der PEPS; diese wurden vereint, sterilfiltriert und für weitere Verwendung bei 4°C gelagert.

Die Anreicherung der PEPS-Mutante H406Q erfolgte nach dem gleichen Protokoll.

2.7.2.2 Reinigung der rekombinanten PPDK

E. coli-Zellen BL21-CodonPlus(DE3)-RIL pET24a+PPDK wurden in Aufschlußpuffer (100 mM Tris/HCl, pH 7 (90°C), 100 mM β -Mercaptoethanol; 3 ml/g Zellen) resuspendiert und durch dreimalige Passage durch die Druckzelle der French Press (20.000 psi) aufgeschlossen. Durch Ultrazentrifugation (80.000 x g, 1 h, 4°C) wurden nicht-aufgeschlossene Zellen und Zelltrümmer abgetrennt. Der zellfreie Extrakt wurde einer Hitzefällung (90°C, 20 min) unterzogen, um den größten Teil der *E. coli*-eigenen Proteine zu präzipitieren. Nach erneuter Zentrifugation (47.900 x g, 30 min, 4°C) wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und über Nacht gegen 100 mM Tris/HCl, pH 7 (70°C), 10 mM β -Mercaptoethanol dialysiert. Die Reinigung der PPDK aus dem dialysierten hitzegefällten Extrakt erfolgte bei 4°C im Kühlraum mittels Ionenaustausch-Chromatographie über Q-Sepharose fast flow (Pharmacia, Säulenvolumen 30 ml, Durchmesser 1 cm), die über Nacht gegen denselben Puffer äquilibriert worden war. Mit einer Flußrate von 0,3 ml/min wurde der Protein-Extrakt auf die Säule geladen, anschließend wurde über Nacht mit 5-10 Säulenvolumina Puffer (s.o.) gespült. Die Elution der PPDK erfolgte mit einem linearen Salzgradienten von 0-600 mM KCl (Gesamtvolumen 600 ml) mit einer Flußrate von 0,6 ml/min. Die PPDK eluierte im Bereich von 120-140 mM KCl. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereint, sterilfiltriert und für weitere Verwendung bei 4°C gelagert.

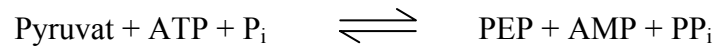
2.7.2.3 Anreicherung der rekombinanten Citrat Synthase 1

E. coli-Zellen BL21-CodonPlus(DE3)-RIL pET11c+Cis1 wurden in Aufschlußpuffer (100 mM Tris/HCl, pH 7 (90°C), 100 mM β -Mercaptoethanol, 5 mM Na-Citrat; 3 ml/g Zellen) resuspendiert und durch dreimalige Passage durch die Druckzelle der French Press (20.000 psi) aufgeschlossen. Durch Zentrifugation (47.900 x g, 1 h, 4°C) wurden nicht-aufgeschlossene Zellen und Zelltrümmer abgetrennt. Der zellfreie Extrakt wurde einer Hitzefällung (90°C, 20 min) unterzogen, um den größten Teil der *E. coli*-eigenen Proteine zu präzipitieren. Nach erneuter Zentrifugation (47.900 x g, 30 min, 4°C) wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und über Nacht gegen 100 mM Tris/HCl, pH 7 (50°C), 10 mM β -Mercaptoethanol, 5 mM Na-Citrat dialysiert.

2.7.3 Enzymatische Messungen

2.7.3.1 Aktivitätsbestimmung der rekombinanten PPDK

Die PPDK (EC 2.7.9.1) katalysiert die reversible Umsetzung von Pyruvat, ATP und P_i zu Phosphoenolpyruvat (PEP), AMP und PP_i . Dabei wird der β -Phosphatrest des ATP auf Pyruvat und der γ -Phosphatrest des ATP auf P_i übertragen.



Der Nachweis der PPDK-Aktivität in kataboler Richtung, also in Richtung der Synthese von Pyruvat und ATP, erfolgte in einem kontinuierlichen photometrischen Test bei 55°C in einem Eppendorf-Photometer mit temperierbarem Küvettenhalter. Dabei wurde die Synthese von Pyruvat an eine mesophile L-LDH (aus Kaninchenmuskel) als Hilfsenzym gekoppelt, deren Aktivität wiederum durch die Abnahme der Extinktion bei $\lambda = 366 \text{ nm}$ als Folge der Oxidation von NADH zu NAD^+ verfolgt werden konnte. Der Standard-Testansatz enthielt 100 mM Tris/HCl, pH 7 (55°C), 3 mM PEP, 5 mM AMP, 1 mM PP_i , 4 mM Mg-EDTA, 0,4 mM NADH und 20 U L-LDH aus Kaninchenmuskel in einem Reaktionsvolumen von 0,5 ml. Der Reaktionsstart erfolgte alternativ durch Zugabe von PP_i , AMP oder PPDK-Extrakt. Der Verlauf der Reaktion wurde mit einem an das Photometer angeschlossenen Kompensationsschreiber verfolgt.

Die Rückreaktion der PPDK, also die Synthese von PEP und AMP, konnte in einem diskontinuierlichen photometrischen Test nachgewiesen werden. Dabei wurde die eigentliche Testreaktion (Reaktionsvolumen 25-45 μl) bei 70°C in einem Wasserbad durchgeführt und nach 0, 60, 90 und 120 sec durch rasche Abkühlung in einem Eisbad gestoppt. Der Standard-Testansatz enthielt 80% PPDK-Extrakt in 100 mM Tris/HCl, pH 7 (70°C), 6 mM Pyruvat, 15 mM ATP, 5 mM KP_i , 10 mM $MgCl_2$ und 20 mM β -Mercaptoethanol.

Der Nachweis des Reaktionsprodukts PEP erfolgte in einer Indikatorreaktion bei RT in einem Volumen von 1 ml, wobei zunächst nicht-umgesetztes Pyruvat durch L-LDH aus Kaninchenmuskel zu Lactat reduziert wurde. Anschließend konnte das durch die PPDK gebildete PEP mittels der Hilfsenzyme PK und L-LDH aus Kaninchenmuskel und der damit verbundenen Abnahme der Extinktion bei $\lambda = 366 \text{ nm}$ (s.o.) nachgewiesen werden. Die Indikatorreaktion enthielt 100 mM Tris/HCl, pH 7 (RT), 20 mM $MgCl_2$, 1 mM ADP, 0,4 mM NADH, 10 U L-LDH, 5 U PK.

2.7.3.2 Aktivitätsbestimmung der rekombinanten PEPS

Die PEPS (EC 2.7.9.2) katalysiert die irreversible Umsetzung von Pyruvat und ATP zu PEP, AMP und P_i, wobei analog zur PPDK-Reaktion der β-Phosphatrest des ATP auf Pyruvat übertragen wird.



Der Nachweis der PEPS-Reaktion erfolgte in einem diskontinuierlichen photometrischen Test bei 70°C wie schon für die PPDK beschrieben (s. 2.7.3.1). Der Standard-Testansatz enthielt dabei 10-80% PEPS-Extrakt in 100 mM Tris/HCl, pH 7 (70°C), 6 mM Pyruvat, 10 mM ATP, 10 mM MgCl₂ und 20 mM β-Mercaptoethanol.

Eine weitere Möglichkeit, die Aktivität der PEPS nachzuweisen, ist ein kontinuierlicher photometrischer Enzym-Assay, bei dem der ATP-abhängige Verbrauch von Pyruvat an die Aktivität einer Lactat Dehydrogenase, nämlich die Umsetzung von Lactat in Pyruvat, gekoppelt ist: Pro Molekül Pyruvat, das aus dem Gleichgewicht der LDH-Reaktion entfernt wird, wird ein Molekül NAD zu NADH⁺ reduziert, was als Zunahme der Extinktion bei λ = 366 nm verfolgt werden kann [EYZAGUIRRE et al., 1982].

Da mit der mesophilen LDH aus Kaninchenmuskel als Hilfsenzym keine PEPS-Aktivität nachweisbar war, sollte dieser Enzym-Assay bei höheren Temperaturen etabliert werden. Zu diesem Zweck wurden die *ldh*-Gene der thermophilen Bakterien *B. caldotenax* (DSM 406) und *G. stearothermophilus* (DSM 2027) jeweils in den Expressionsvektor pET11c (Schnittstellen: *NdeI/BamHI*) kloniert und heterolog in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert (NCBI-Datenbankeinträge der *ldh*-Gene: M19395 bzw. M19396).

Folgende Primer wurden für die PCR-Amplifikation verwendet (Restriktionsschnittstellen fettgedruckt, Start- und Stopcodons unterstrichen):

B. caldotenax:

LDH-*NdeI* 5'-GGAAGAAGAGGTGAATACATATGAAAAACGGGAGAGG-3'
 LDH-anti 5'-GATGAAGCCAATGGATCCGCTTTTACTGAGC-3'

G. stearothermophilus:

Bst-LDH-5' 5'-GGGAGGATGAATCATATGAAAAACAACGG-3'
 Bst-LDH-3' 5'-ACTTTTCGTTTGGATCCTCATCGC-3'

Leider stellte sich heraus, daß die *G. stearothermophilus* LDH in der Richtung Lactat → Pyruvat durch ATP gehemmt wird und deshalb nicht im PEPS-Assay eingesetzt werden konnte, während die *B. caldotenax* LDH nur bis zu einer Temperatur von 60°C stabil war.

Aus diesem Grund wurde für biochemische Untersuchungen die Enzymaktivität der PEPS ausschließlich mit dem diskontinuierlichen Test bei 70°C (s.o.) bestimmt.

2.7.3.3 Bestimmung der kinetischen Parameter K_M und v_{max}

Zur Berechnung von Enzymaktivitäten wird die Initialgeschwindigkeit v unmittelbar nach Reaktionsstart herangezogen, wobei sich die spezifische Aktivität einer Enzym-Lösung folgendermaßen ermitteln läßt:

$$\text{spezifische Aktivität (U/mg Protein)} = \frac{\Delta E_{366} / \text{min} * V_{\text{Gesamt}}}{\epsilon * d * cp * V_{\text{Enzym}}}$$

$\Delta E_{366} / \text{min}$: Extinktionsänderung bei 366 nm pro Minute

V_{Gesamt} : Gesamt-Volumen des Testansatzes [ml]

V_{Enzym} : Volumen der eingesetzten Enzymlösung [ml]

d : Schichtdicke der Küvette [cm]

ϵ : molarer Extinktionskoeffizient von NADH bei 366 nm [$\text{cm}^2/\mu\text{M}$]

($\epsilon_{\text{NADH}}(55^\circ\text{C}) = 3,33 \text{ cm}^2/\mu\text{M}$; $\epsilon_{\text{NADH}}(\text{RT}) = 3,4 \text{ cm}^2/\mu\text{M}$ [FABRY & HENSEL, 1987])

cp : Proteinkonzentration [mg/ml]

Die Auswertung der experimentell ermittelten Daten erfolgte mit Hilfe des Grafik-Programms SigmaPlot (Version 8.0, SPSS Science) und dem dazugehörigen Modul Enzyme Kinetics 1.1.

Die enzymkinetischen Parameter K_M und v_{max} wurden zunächst durch direkte Auftragung der Umsatzraten gegen die eingesetzten Substratkonzentrationen ermittelt. Nach der Michaelis-Menten-Gleichung ist

$$v = \frac{v_{max} * [S]}{K_M + [S]}$$

mit S = Substrat; v = Umsatzrate; v_{max} = maximale Umsatzrate; K_M = Michaelis Menten Konstante.

Zur Bestimmung von K_M und v_{\max} wurden die linearisierten Auftragungen der Daten nach HANES [1932] und LINEWEAVER & BURK [1934] herangezogen:

Transformation nach Hanes:
$$\frac{[S]}{v} = [S] * \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_M}{V_{\max}}$$

Transformation nach Lineweaver & Burk:
$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{\max}} * \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

In der Transformation ergibt sich aus den y-Achsenabschnitten K_M/v_{\max} (Hanes) bzw. $1/v_{\max}$ (Lineweaver & Burk), aus den x-Achsenabschnitten $-K_m$ (Hanes) bzw. $-1/ K_m$ (Lineweaver & Burk).

2.7.4 Proteinanalytische Methoden

2.7.4.1 Proteinbestimmung [modifiziert nach BRADFORD, 1976]

Die Bestimmung des Proteingehaltes wurde mit Hilfe des BioRad Protein-Assay gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Standardprotein wurde Rinderserumalbumin (BSA) eingesetzt.

2.7.4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte durch Glycin-SDS-PAGE nach LAEMMLI [1970]. Dabei wurden 1 mm dicke Flachgele der Größe 8,6 x 7,7 cm benutzt. Die Acrylamidkonzentration im Sammelgel betrug 4,9%, im Trenngel variierte die Konzentration je nach gewünschter Auftrennung der Proteine zwischen 7,5 und 12%. Die Herstellung der SDS-Gele erfolgte mit Hilfe einer 30%igen Acrylamid-Bisacrylamid-Fertiglösung (37,5 : 1).

Die Proteinproben wurden vor der Elektrophorese in 2fach oder 5fach konzentrierten Probenpuffer aufgenommen (Endkonzentrationen: 62,5 mM Tris/HCl, pH 6,8, 10% Glycerin, 2% SDS, 5% β -Mercaptoethanol, 0,005% Bromphenolblau) und 2-3 min bei 94°C inkubiert. Die Elektrophorese wurde in einer Minigel-Twin-Kammer (Biometra) bei 10-18 mA durchgeführt.

Die Detektion der gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine erfolgte durch Färben des Acrylamidgels in einer Lösung aus 40% Methanol, 10% Essigsäure und 0,25% Coomassie Brilliant Blue R-250 und anschließende Entfärbung in einer Lösung aus 5% Methanol und 7,5% Essigsäure [WEBER & OSBORN, 1969].

2.7.4.3 Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen

Das Molekulargewicht von Protein-Untereinheiten wurde über ihre Wanderungstrecke in der SDS-PAGE bestimmt, wobei als Größenstandards die Molekulargewichtsmarker SDS-6H (Myosin aus Kaninchenmuskel (205.000), β -Galaktosidase aus *E. coli* (116.000), Phosphorylase B aus Kaninchenmuskel (97.400), Albumin aus Rind (66.000), Albumin aus Ei (45.000), Carboanhydrase aus Rindererythrocyten (29.000)) bzw. SDS-7 (Albumin aus Rind (66.000), Albumin aus Ei (45.000), GAPDH aus Kaninchenmuskel (36.000), Carboanhydrase aus Rindererythrocyten (29.000), Trypsinogen aus Rinderpankreas (24.000), Trypsininhibitor aus Sojabohne (20.100), α -Lactalbumin aus Rindermilch (14.200)) verwendet wurden.

Die Auswertung erfolgte anhand einer Eichkurve, in welcher der Logarithmus der Molekulargewichte der Markerproteine gegen ihre relative Mobilität aufgetragen wurde.

2.7.4.4 Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen unter nativen Bedingungen

Die Bestimmung des Molekulargewichts unter nativen Bedingungen erfolgte durch Molekularsieb-Chromatographie mit den Gelfiltrationssäulen HiLoad 26/60 Superdex 200 Prepgrade (Pharmacia; Säulenvolumen 330 ml) bzw. Superose 6 (Pharmacia; Säulenvolumen 25 ml). Die Gelfiltration wurde mit Hilfe einer HPLC-Anlage (Kontron Instruments) in einem Tris/KCl-Puffer (50-100 mM Tris/HCl, pH 7,5, 300 mM KCl, 7,5 mM DTT) durchgeführt. Bei Verwendung der präparativen Säule konnten mit Hilfe des Pharmacia Superloops bis zu 10 ml Proteinlösung aufgetragen werden. Die Flußrate betrug 0,75 ml/min und die Fraktionen (1,5 ml) wurden ab der 100. min gesammelt. Bei der analytischen Molekularsieb-Chromatographie mit Superose 6 betrug das Probenvolumen maximal 200 μ l; bei einer Flußrate von 0,3 ml/min wurden Fraktionen mit einem Volumen von 100 μ l gesammelt.

Als Eichproteine wurden Ferritin (MW 443.000; 1 mg), Alkohol-Dehydrogenase (MW 148.000; 1,25 mg), D-Lactat-Dehydrogenase (MW 78.000; 0,118 mg) und Cytochrom C (MW 12.500; 2 mg) eingesetzt und nach der Gelfiltration photometrisch nachgewiesen:

Ferritin:	Absorption bei 217 nm
Alkohol-Dehydrogenase:	Aktivitätsbestimmung im optischen Test bei 366 nm (RT): 0,1 M Tris/HCl, pH 7,0; 0,4 mM NADH; 2 mM Acetaldehyd
D-Lactat-Dehydrogenase:	Aktivitätsbestimmung im optischen Test bei 366 nm (RT): 0,1 M Tris/HCl, pH 7,0; 0,4 mM NADH; 2 mM Pyruvat
Cytochrom C :	Absorption bei 416 nm

2.7.4.5 Elektro-Proteintransfer (Western Blot)

Der Proteintransfer aus Acrylamidgelen auf ein festes Trägermaterial zur N-terminalen Sequenzierung erfolgte mittels Elektro-Blotting nach dem von ECKERSKORN et al. [1988] beschriebenen Semidry-Verfahren in einer CarboGlas Semidry-Kammer (Schleicher & Schuell). Als Trägermaterial wurden hydrophobe Membranen (ProBlott™, Applied Biosystems) verwendet.

Das Proteingel wurde nach Beendigung der Elektrophorese und Abtrennung des Sammelgels für 5 min in Transferpuffer (10 mM CAPS, pH 11, 10% Methanol) äquilibriert. Die Membran wurde kurz mit 100% Methanol befeuchtet und anschließend ebenfalls in Transferpuffer äquilibriert, desgleichen sechs auf Gelgröße zugeschnittene Whatman-Papiere 3MM. Der Aufbau des Blots erfolgte nach einer Vorschrift von JUNGBLUT et al. [1990]: Drei Whatman-Papiere wurden tropfnaß auf die Anode gelegt. Darauf wurde die Membran positioniert und das Gel luftblasenfrei aufgelegt. Drei weitere Whatman-Papiere schlossen den Blotaufbau ab. Der Transfer erfolgte für 3 h mit 1 mA/cm² Gelfläche.

Anschließend wurde die Membran 1 min in 40% Methanol, 1% Essigsäure, 0,1% Coomassie Blue R-250 gefärbt, einige Minuten mit 100% Methanol entfärbt und bei RT getrocknet.

2.7.4.6 Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz

Die Analyse der N-terminalen Aminosäuresequenzen von gelelektrophoretisch aufgetrennten und auf hydrophoben Membranen immobilisierten Proteinen erfolgte durch automatisierten Edman-Abbau in einem Gasphasen-Sequenator (Proteinsequenzer 473A, Applied Biosystems). Diese Arbeiten wurden von Herrn Dr. Roland Schmid am Institut für Mikrobiologie der Universität Osnabrück durchgeführt.

3. ERGEBNISSE

3.1 Die PEP Synthetase (PEPS) von *T. tenax*

Der Nachweis einer PEPS-Aktivität in autotroph gezogenen *T. tenax*-Zellen wurde bereits von B. Siebers aus unserer Arbeitsgruppe erbracht [SIEBERS, 1995]. Aufgrund von interferierenden Reaktionen im zellfreien *T. tenax*-Extrakt war eine Charakterisierung der PEPS jedoch nicht möglich. Um eingehende kinetische Untersuchungen am Enzym durchzuführen und Einblicke in die Regulation der Enzymreaktion zu erhalten, sollte deshalb das für die PEPS codierende *pps*-Gen im *T. tenax*-Genom identifiziert und das Enzym heterolog in *E. coli* exprimiert werden.

3.1.1 Klonierung und Sequenzierung des *pps*-Gens von *T. tenax*

3.1.1.1 Ableitung von degenerierten Oligonukleotiden

Durch multiple Alignment bekannter archaealer und bacterialer PEPS-Sequenzen (s. Abb. 3.1) wurden die konservierten Sequenz-Motive FAGQQ, MDIEWA und NPMIGW identifiziert.

<i>H. pylori</i> ^a	DLPDAS	FAGQQD	TYLNIK	GKTELI	HYIKSCLASL	FTDRAISY	RASRGFD	HDLKVAL	SVGVQ	189
<i>Synechocystis spec</i> ^b	DLPEAS	FAGQQE	TYLNVH	SLSCVLES	CHKCFASL	FTDRAISY	RHHNGFD	HFAVAL	SVGVQ	208
<i>E. coli</i> ^c	DMPDAS	FAGQQE	TFLNVQ	GFDVAV	LVAVKHVF	ASLFDRAI	SYRVHQ	GDHRG	VALSAGVQ	193
<i>S. marinus</i> ^d	DMPEAS	FAGQQD	TYLNVY	GEDNVV	YVVKRCW	ASLFTSRA	VFYRVA	QGI	PHEKSLMSVTVQ	194
<i>P. furiosus</i> ^e	DLPEAS	FAGQQE	TYLDVL	GADDVI	DKVKRCW	ASLWTARAT	FYRAKQ	GFDH	SKVYLSAVVQ	219
<i>M. jannaschii</i> ^f	DLPEAS	FAGQQD	TYLNIK	GAENVV	KYVQKCF	SLSLFT	PRAIFY	REQQ	GFDHFKVALA	196
		.:*****:*.*::	.	::	:	: **:	**	**	. * *	::. **
<i>H. pylori</i>	VLILAKYA	IEIEKHYS	KEAKQY	RPM	DI EWAKDGES	---	GEIFIVQ	ARPETV	QSQKSKEES	350
<i>Synechocystis spec</i>	ILQLARWACI	IEDHYS	GVRGVY	TPM	DI EWAKDGQT	---	GELFIVQ	ARPETV	QSQKS---	365
<i>E. coli</i>	VQELAKQAV	QIEKHYG	-----	RP	DI EWAKDGHT	---	GKLFIVQ	ARPETV	RSR-----	344
<i>S. marinus</i>	VKRLAELALL	IEKHYG	-----	RH	DI EWAVDY	DIPFPD	NVFI	VARLET	VWSVRK-EKE	361
<i>P. furiosus</i>	II EVAKM	GQKIEDHYG	-----	WP	DI EWAYDKDD	---	GKLYIVQ	SRPITTL	KE-----	365
<i>M. jannaschii</i>	IKELAKI	GLNIEKHYG	-----	KP	DI VEWAYEK	-----	GK FYMLQ	ARPITTL	LKK-----	334
	:	*.* .	**.*.*.		*:***:		:	*:*	*. .	
<i>H. pylori</i>	ISAAFY	PKPVIV	RTSDFKS	NEYMR	MLGGSS	YEPNEE	NPMLG	YRGAS	RYSESYNEAF	635
<i>Synechocystis spec</i>	I A A A F Y P K P V V	V R M S D F K S N E Y A N L L G G R Q F E P K E E N P M I G W R G A S R Y Y D P N Y R E A Y A L E								648
<i>E. coli</i>	L G A A F Y P K R V I V R L S D F K S N E Y A N L V G G E R Y E P D E E N P M L G F R G A G R Y V S D S F R D C F A L E									625
<i>S. marinus</i>	V A Q A I Y P R P V V V R F S D F K T N E Y R G L K G G E K Y E P E E R N P M I G W R G V S R Y I H P K Y E P A F R L E									645
<i>P. furiosus</i>	V A A A F Y P R P V V Y R T L D A P T N E F R E M P G G E - D E P E E R N P M L G W R G I R R G L D Q - - P E L L R A E									631
<i>M. jannaschii</i>	V A D A F Y P R P V T Y R T L D A P T D E F R G L E G G E - N E P I E H N P M L G W R G I R R D L D E - - V D I L K C E									1008
	::	*:***:	* * *	:::	:	**	**	*.*	***:***	*

Abb. 3.1: Partielles Alignment archaealer und bacterialer PEPS-Sequenzen. Die konservierten Motive FAGQQ, MDIEWA und NPMIGW sind grau hinterlegt. Die Nummerierungen beziehen sich auf die entsprechenden Aminosäurepositionen.

NCBI-Datenbankeinträge (<http://ncbi.nlm.nih.gov>) und Referenzen der gezeigten Protein-Sequenzen: ^a P56070 TOMB et al., 1997; ^b Q55905 KANEKO et al., 1995; ^c P23538 BLATTNER et al., 1997; ^d P46893 CICICOPOL et al., 1994; ^e P42850 JONES 1995; ^f Q57962 BULT et al., 1996.

Die durch Sequenzvergleich ermittelten konservierten Aminosäuresequenzen (s. Abb. 3.1) wurden zur Ableitung degenerierter Oligonukleotide herangezogen:

FAGQQ:	5'-TTYGCNNGNCARCARGA-3'	
MDIEWA:	5'-GCCCAYTCDATRTCCAT-3'	revers komplementär
NPMIGW:	5'-CCANCCDATCATNGGRTT-3'	revers komplementär

Die Konstruktion der Oligonukleotide erfolgte dabei unter Berücksichtigung des Codon-Gebrauchs von *T. tenax*, der von den codierenden Genen der NADP-GAPDH, GAPN und TIM abgeleitet worden war [BRUNNER, 1998; SCHRAMM, 1999].

3.1.1.2 Amplifikation und Klonierung eines *pps*-spezifischen 1,4 kb PCR-Produkts

Durch PCR-Amplifikation eines internen Fragments der *pps*-Sequenz sollte eine spezifische DNA-Sonde zur Isolierung des gesamten Gens generiert werden.

Zu diesem Zweck wurden die aus den Konsensus-Motiven FAGQQ, MDIEWA und NPMIGW abgeleiteten Oligonukleotide (s.o.) als Primer in einer PCR mit genomischer *T. tenax*-DNA als Template verwendet, und zwar in den Kombinationen FAGQQ/MDIEWA bzw. FAGQQ/NPMIGW. Unter den gewählten PCR-Bedingungen (35 Zyklen 30 s 94°C/ 45 s 40°C/ 60 s 72°C, anschließend 10 min 72°C) konnte mit der Primer-Kombination FAGQQ/NPMIGW ein DNA-Fragment der erwarteten Größe von ca. 1,4 kb amplifiziert werden. Dieses DNA-Fragment wurde gereinigt und in den Vektor pCR-TOPO 2.1 inseriert. Nach Transformation kompetenter *E. coli* TOP10-Zellen konnten rekombinante Klone über Blau-Weiß-Differenzierung und Restriktionsanalyse mit *EcoRI* identifiziert werden. Das Insert eines Klon (pPEP1) wurde mit den Vektorprimern M13for (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') und M13rev (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') sequenziert. Die von dieser Nukleotid-Sequenz (Abb. 3.3, Position 1061 → 2428) abgeleitete Aminosäure-Sequenz zeigte nach Datenbankvergleichen eine deutliche Ähnlichkeit zu archaealen und bacterialen PEPS-Enzymen.

3.1.1.3 Hybridisierung einer *pps*-spezifischen Sonde mit genomischer DNA aus *T. tenax*

Das mit den Primern FAGQQ und NPMIGW amplifizierte *pps*-spezifische PCR-Produkt (s. 3.1.1.2) wurde mit Digoxigenin markiert und als Sonde zur Hybridisierung genomischer *T. tenax*-DNA eingesetzt. Die DNA wurde zuvor mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut, elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nylonmembranen transferiert und mit UV-Licht

fixiert. Unter den gewählten Bedingungen (Hybridisierung über Nacht bei 68°C; stringentes Waschen mit 0,1 x SSC, 0,1% SDS bei 68°C) traten folgende starke Hybridisierungssignale auf:

<i>Bam</i> HI: 4 kb; 8 kb	<i>Sa</i> II: 5,0 kb; 12 kb
<i>Hind</i> III: 6,5 kb; 9,5 kb	<i>Xba</i> I: 12 kb; 20 kb
<i>Sac</i> I: 0,8 kb; 1,8 kb; 5,5 kb	<i>Xho</i> I: 6 kb; 9 kb

Zum Teil waren zusätzliche Signale wesentlich schwächerer Intensität erkennbar, die auf eine Kreuzreaktion der Sonde mit weiteren Sequenzbereichen im Genom hindeuteten.

Unter den genomischen DNA-Fragmenten, die ein starkes Hybridisierungssignal zeigten, wurden die 4 kb und 8 kb großen *Bam*HI-Fragmente für die Klonierung ausgewählt. Die Tatsache, daß mit jedem der verwendeten Restriktionsenzyme mindestens zwei starke Signale detektiert wurden, ließ entweder mehrere Gen-Loci oder interne Schnittstellen vermuten. Eine Klonierung beider genomischer Fragmente erschien daher sinnvoll, um die komplette genetische Information des *pps*-Gens zu erhalten.

3.1.1.4 Klonierung von zwei genomischen *Bam*HI-Fragmenten

Genomische *T. tenax*-DNA wurde mit *Bam*HI verdaut, gelelektrophoretisch aufgetrennt und DNA-Fragmente im Bereich von 3,5-4,5 kb bzw. 7-9 kb ausgeschnitten. Anschließend wurden die gereinigten Fragmente in den Vektor pBluescript KS+ ligiert.

Nach Transformation kompetenter *E. coli* DH5 α -Zellen konnten rekombinante Klone durch Blau-Weiß-Differenzierung identifiziert werden. Diese wurden über PCR mit den Primern FAGQQ und NPMIGW (s. 3.1.1.1) auf Anwesenheit der *pps*-Sequenz getestet. Dabei konnte ein Klon mit einem 4 kb Insert identifiziert werden, bei dem ein PCR-Produkt der entsprechenden Größe (1,4 kb) amplifiziert wurde. Dieser Klon (pPEP4kb-4) wurde daraufhin sequenziert (s. 3.1.1.6).

Die Identifizierung eines positiven Klons mit inseriertem 8 kb *Bam*HI-Fragment war über Boiling-PCR nicht möglich. Deshalb wurde Plasmid-DNA rekombinanter Klone gegen die *pps*-spezifische Sonde hybridisiert. Ein Klon (pPEP8kb-1) zeigte ein starkes Hybridisierungssignal und wurde deshalb sequenziert.

3.1.1.5 Sequenzierung des genomischen Klons pPEP8kb-1

Die Sequenzierung des Klons pPEP8kb-1 ergab keinen Hinweis auf einen offenen Leserahmen mit Sequenzähnlichkeiten zu PEP Synthetasen. Möglicherweise kam es -trotz stringenter Hybridisierungsbedingungen- aufgrund der Länge der verwendeten DNA-Sonde (1,4 kb; s. 3.1.1.3) zu unspezifischen Bindungen mit genomischer *T. tenax*-DNA und damit zu falsch-positiven Signalen.

Eine schematische Darstellung der Sequenzierungsstrategie des Klons pPEP8kb-1 und der identifizierten Leserahmen ist im Anhang hinterlegt. Die komplette Nukleotidsequenz und eine Tabelle mit den zur Sequenzierung verwendeten Primern sind beigefügt.

3.1.1.6 Sequenzierung des genomischen Klons pPEP4kb-4

Wie die Sequenzierung des Klons pPEP4kb-4 zeigte, enthielt das genomische 4 kb *Bam*HI-Fragment den kompletten codierenden Bereich des *pps*-Gens (Abb. 3.2). Sämtliche zur Sequenzierung verwendeten Primer sind in Tab. 3.1 aufgeführt.

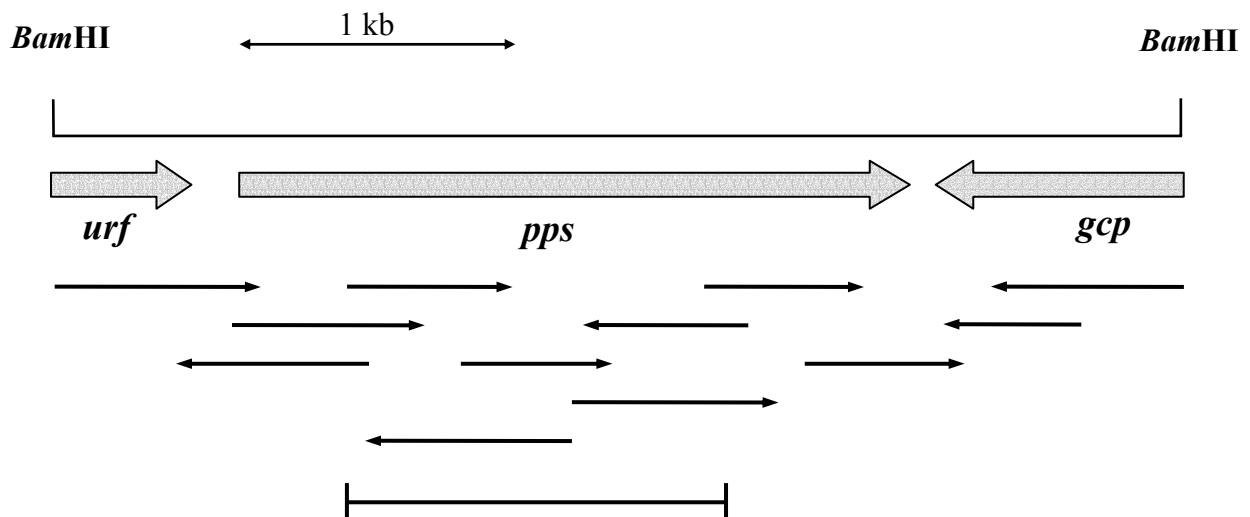


Abb. 3.2: Schematische Darstellung und Sequenzierungsstrategie des 4 kb *Bam*HI-Fragments des Klons pPEP4kb-4.

Identifizierte Leserahmen und deren Orientierung sind durch Blockpfeile dargestellt (*urf*: Ähnlichkeit mit unbekanntem Leserahmen in *P. aerophilum*; *pps*: PEPS; *gcp*: O-Sialoglycoprotein-Endopeptidase). Dünne Pfeile zeigen den Bereich und die Leserichtung der einzelnen Sequenzierungen an. Das 1,4 kb große PCR-Produkt pPEP1 ist als Balken dargestellt.

Tab. 3.1: Primer, die zur Sequenzierung des Klons pPEP4kb-4 verwendet wurden.
Die Positionsangaben beziehen sich auf Abb. 3.3 (Nummerierung rechts).

Primer	Länge	Sequenz	Position
T3	20 bp	5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3'	Vektor-Primer
T7	22 bp	5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3'	Vektor-Primer
FAGQQ	17 bp	5'-TTYGCNGGNCARCARGA-3'	1061 → 1077
pepsi-1	21 bp	5'-AAGTCCGGCGCTCCTGCGTTG-3'	1472 → 1492
pepsi-2	18 bp	5'-AAGACGAACGAGTACAGG-3'	2354 → 2371
pepsi-3	19 bp	5'-AGATGCCCAGACCCTCTTG-3'	1141 → 1123
pepsi-4	18 bp	5'-AACTCAGCTGACTCTAGG-3'	2719 → 2736
pepsi-5	31 bp	5'-GTATTAATACCACTCGCAATTGCGCCCCATG-3'	643 → 673
pepsi-6	31 bp	5'-GCAGCAAAGGAGGGGGATCCGCTAATATTTC-3'	3124 → 3094
pepsi-7	16 bp	5'-ATCTCCTCCCTCACCT-3'	2514 → 2499
sialo-1	20 bp	5'-AAGTTCGCTAGGGAGGTGGG-3'	3724 → 3705
H406Qfor	24 bp	5'-CCGCACCTCTCAGGCCGCCATAGT-3'	1876 → 1899
H406Qrev	24 bp	5'-ACTATGGCGGCCTGAGAGGTGCGG-3'	1899 → 1876

3.1.1.7 Sequenz des *pps*-Gens und flankierender Bereiche

Das für die PEPS aus *T. tenax* codierende *pps*-Gen umfaßt 2433 bp (Abb. 3.3) mit einem GC-Gehalt von 54,7%. Die korrespondierende Primärsequenz von 810 Aminosäureresten zeigt eine große Ähnlichkeit zur Familie der 'PEP-utilizing enzymes', zu der neben der PEPS (EC 2.7.9.2) auch die PPK (EC 2.7.9.1) und das Enzym I des bakteriellen Phosphotransferasesystems (EC 2.7.3.9) gehören. So enthält die *T. tenax* PEPS ebenfalls die innerhalb der Familie der PEP-utilizing enzymes konservierten Sequenz-Motive PS00370 ((G(GA)XTXH(STA)(STAV)(LIVM)₂(STAV)(RG)) und PS00742 ((DEQSK)X(LIVMF)S(L,I,VMF)G(ST)ND(LIVM)XQ(LIVMFYGT)(STALIV)(LIVMF)(GAS)X₂R) [PROSITE Datenbankeinträge].

Der Translationsstart der *T. tenax* PEPS wurde indirekt durch Sequenzvergleich mit homologen Proteinen festgelegt: Eingegrenzt durch die deutliche Sequenzähnlichkeit ab dem Isoleucin-Rest an Position 4 (Position 680-682 in der Nukleotidsequenz, Abb. 3.3) und dem Beginn des offenen Leserahmens 15 bp stromaufwärts, scheint das Methionin-Codon an Position 671-673 als Translationsstart am wahrscheinlichsten.

Der Versuch, den Transkriptionsstart des *pps*-Gens durch Primer Extension Analysen festzulegen, blieb leider erfolglos: Trotz Variation der Primer (s.u.) und der Bedingungen für Primer-Annealing und cDNA-Synthese konnte kein eindeutiges Signal identifiziert werden. Eine mögliche Ursache könnten Probleme der Reversen Transkriptase mit Sekundärstrukturen innerhalb der mRNA gewesen sein, vorstellbar wären aber auch alternative Transkriptionsstarts des *pps*-Gens.

Die für die Primer Extension Experimente verwendeten Primer hatten folgende Sequenzen (Positionsangaben beziehen sich auf Abb. 3.3):

Pepsi 1 Prex:	5'-CCTGGAGGCACGCGGACG-3'	Position 780 → 762
Pepsi 2 Prex:	5'-AGTTTGCCCCCTTGCCGC-3'	Position 743 → 726
Pepsi 3 Prex:	5'-AGACCTCGCCCAAGTTTGCCCC-3'	Position 755 → 733
Pepsi 4 Prex:	5'-TCTTTCTTCGTGATCTCCTCTAGCCAT-3'	Position 711 → 685

Aufgrund der Tatsache, daß ein Mapping des Transkriptionsstarts durch Primer Extension nicht erfolgreich war, war eine Identifizierung putativer Promotorelemente nur bedingt möglich: Betrachtet man die Sequenzregion stromaufwärts des *pps*-Gens, so entdeckt man mehrere Bereiche, die als putative Promotorstrukturen in Betracht kämen, da sie eine signifikante Ähnlichkeit zu der für Crenarchaeoten beschriebenen BRE-site (TFB recognition element; Konsensus-Sequenz RNWAAW) und TATA-Box (Konsensus-Sequenz YTTTTAAA) aufweisen [SOPPA, 1999]. Diese möglichen Promotorelemente sind in Abbildung 3.3 dargestellt (BRE-site unterstrichen; TATA-Box in Fettdruck).

Stromaufwärts des *pps*-Gens liegt ein Sequenz-Bereich mit Ähnlichkeit (34% identische Aminosäurereste) zu einem unbekanntem ORF in *Pyrobaculum aerophilum*, stromabwärts befindet sich in entgegengesetzter Transkriptionsrichtung ein Teil der genetischen Information einer O-Sialoglucoprotein-Endopeptidase (Abb. 3.2).

	GGATCCTCGC	CTGAGGAGGA	GTTGGCCGCA	TATGCGGGCG	GGGCCGACGG	GACGTTGTCT	60
	GAGATAAAGC	ATAGGTTCCG	TGTACCAGAC	CAAGCCGACG	ATGCTGCGTT	GCTGGTCCGT	120
	GAGGCAGACA	GTCTGGAGGA	GCTCAGAAAG	TACGTGCGTC	GTGCAGGCCA	GGTCTATAGG	180
	CGACGGGTGG	AGGTCGCTCT	TTTGGCGAGA	TTGAGGGCGG	CAGTGGAGCT	AGGCCAATAT	240
	ATTTCAAGCT	TTGTGATAAC	CAAGGCGCCA	GATATCGTGT	CCTTCGAGCC	GGCGACGAGT	300
	CTACCCGAGA	TAGGAAGGTG	TATCCACTGC	GGGGTGGACT	TTCTTATGTA	CGGCGCTAAG	360
	ACAAAGAGGT	GTATCTACTG	TGGCCGCGCG	CTTAGAGGCG	TCATAACTCA	GCGTAAGCCG	420
	ACGTTAAGGC	CAGAGATATT	GCGGGCGATA	CACAGGAAGT	TGGCGGACAA	CTTACCCAAG	480
	AAGATCGTAG	TGATATAGCA	TCTCCGGATC	AGAATAACGA	ATATATAAG	TCTTCAAAAC	540
	AATATAGTTT	ACCTACTAAG	ATCCTGAAAC	TTTAGAGTAA	TTATATATTA	CGTGTTTTCT	600
	AGGCTATAGC	CGGATCATCT	ATCTCTTCGA	GTTTAATAGG	TAGTATTAAT	ACCACTCGTA	660
1	*	M G L	I L W L	E E I	T K K	D H A L	
	ATAACGCCCC	ATGGGGCTCA	TTCTATGGCT	AGAGGAGATC	ACGAAGAAAAG	ATCACGCTCT	720
18	V G G	K G A	N L G E	V S R	L V R	V P P G	
	AGTGGGCGGC	AAGGGGGCAA	ACTTGGGCGA	GGTCTCCAGA	CTCGTCCGCG	TGCTCCAGG	780
38	F V V	T T E	A F R A	F L E	T T G	L K S K	
	CTTTGTTCGTA	ACTACCGAGG	CCTTTAGGGC	CTTCTAGAG	ACCACTGGGC	TAAAGTCTAA	840
58	I S E	V L K	S V R G	G S P	E D Y	E K A S	
	GATATCGGAG	GTCCTAAAGT	CGGTGAGGGG	CGGCTCGCCC	GAGGACTACG	AGAAGGCCTC	900
78	E T I	R E M	I Y R E	P M P	R E I	A D E I	
	GGAGACCATC	AGAGAGATGA	TATACAGAGA	GCCTATGCCT	AGGGAGATCG	CCGACGAGAT	960
98	V R A	Y L K	L S E K	V G V	K D V	S V A V	
	AGTTAGAGCG	TACCTCAAGC	TCTCGGAGAA	AGTCGGCGTT	AAGGACGTCT	CAGTGGCCGT	1020
118	R S S	A T A	E D I Q	E A S	F A G	Q Q D T	
	GCGTCTCTCA	GCCACCGCCG	AGGATATACA	GGAGGCATCA	TTGCGCGGAC	AACAAGACAC	1080
138	Y L N	V R G	S E N V	I E H	V K R	V W A S	
	TTATTTGAAC	GTGAGAGGCT	CTGAGAACGT	AATAGAGCAC	GTCAAGAGGG	TCTGGGCATC	1140
158	L Y T	A R A	I Y Y R	E Q M	G I S	H D N V	
	TCTCTACACG	GCTAGAGCCA	TCTACTATAG	AGAGCAGATG	GGTATATCTC	ACGATAACGT	1200
178	S I A	V V V	Q K L V	N A R	S A G	V M F T	
	CTCAATAGCG	GTTGTGGTTC	AGAAGTTGGT	CAACGCCAGA	TCTGCGGGCG	TTATGTTTAC	1260
198	L D P	T N G	D T S K	V V I	E A A	W G L G	
	CCTTGATCCC	ACAAACGGCG	ACACATCTAA	AGTAGTTATC	GAGGCCGCCT	GGGGTCTAGG	1320
218	E G V	V R G	I V T P	D E Y	V V D	K N T L	
	CGAGGGCGTC	GTCAGAGGTA	TTGTGACGCC	TGACGAGTAC	GTAGTGGACA	AAAATACCCT	1380
238	K I V	E R R	I S Q K	R L A	V V R	D E R G	
	TAAGATCGTG	GAGCGCCGCA	TTTCCCAGAA	GAGGTTGGCT	GTAGTCAGAG	ATGAGAGGGG	1440
258	L T K	E V E	L P P E	K S G	A P A	L T D E	
	CCTCACCAAG	GAGGTAGAGC	TACCTCCAGA	GAAGTCCGGC	GCTCCTGCGT	TGACAGACGA	1500
278	E V I	E Y A	K M A L	E L E	R H Y	G H P L	
	GGAGGTAATT	GAATATGCTA	AAATGGCTCT	GGAGCTAGAG	CGGCACTACG	GCCACCCGCT	1560
298	D I E	F S V	D S D V	P F P	Q N L	Y V V Q	
	CGACATCGAG	TTCTCGGTAG	ATTCAGATGT	ACCGTTTCCA	CAGAACCCTCT	ACGTAGTACA	1620
318	V R P	E T V	W S R R	A Q P	A E A	K E A K	
	AGTAAGGCC	GAGACCGTAT	GGAGCAGGAG	GGCCAGCCCC	GCCGAGGCCA	AGGAGGCTAA	1680
338	A E G	R V V	V K G I	A A S	P G V	A V G R	
	GGCCGAGGGG	AGGGTCGTCG	TTAAGGGCAT	AGCGGCGAGT	CCC GGCGTCG	CCGTAGGCAG	1740
358	A K I	C L T	L E D A	K R K	L Q K	G D I L	
	GGCTAAGATC	TGTCTAACTT	TAGAGGACGC	CAAGAGGAAG	CTACAGAAAAG	GCGATATACT	1800
378	V T K	M T D	P D W V	P Y M	R L A	S A I V	
	TGTGACTAAG	ATGACAGACC	CAGATTGGGT	GCCCTACATG	AGGCTCGCCT	CGGCGATAGT	1860
398	T D E	<u>G G R</u>	<u>T S H A</u>	<u>A I V</u>	<u>S R E</u>	L G I P	
	TACAGACGAG	GGCGGCCGCA	CCTCTCATGC	CGCCATAGTG	AGCAGAGAGC	TCGGGATACC	1920
418	A V V	G T G	N A T Q	V L R	D G E	L Y T V	
	AGCGGTGGTG	GGCACCGGCA	ACGCCACACA	AGTCCTCAGG	GATGGCGAGC	TGTATACTGT	1980
438	D G S	K G V	V L E G	A A V	Q P Q	A K V A	
	GGACGGCAGC	AAGGGAGTAG	TGCTGGAAGG	GGCAGCCGTA	CAACCACAGG	CTAAGGTCCG	2040
458	E A A	Q A A	I A V P	K E I	I L H	I Y R S	
	CGAAGCGGCA	CAGGCGGCGA	TAGCTGTGCC	CAAGGAGATT	ATACTCCATA	TATATAGATC	2100
478	I P T	G T K	V Y M N	L G E	P D K	I D E Y	
	TATACCCACT	GGACGAAGG	TCTATATGAA	TCTGGGCGAG	CCCGATAAAA	TAGACGAGTA	2160
498	K D L	P F E	G I G L	M R I	E F V	I T S W	
	CAAGGATCTG	CCGTTCCGAG	GCATAGGCTT	GATGAGGATA	GAGTTTGTCA	TAACCAGTTG	2220

518	I G E H P L Y L M S I G R E D K F V D K	
	GATCGGCGAG CATCCGCTGT ATCTGATGTC TATAGGGCGC GAGGACAAGT TCGTGGACAA	2280
538	M A E G V A R V A S A I Y P R P V V V R	
	GATGGCCGAG GGCCTGGCTA GGGTCGCATC GGCGATATAT CCTAGGCCCG TCGTCGTCAG	2340
558	F S D F K T N E Y R S L Q G G E K F E P	
	ATTCTCAGAC TTTAAGACGA ACGAGTACAG GAGCTTACAA GGAGGCGAAA AGTTCGAGCC	2400
578	E E R N P M L G W R G V S R Y V S L Q Y	
	GGAGGAGAGA AACCCGATGT TGGGGTGGCG CGGCGTATCC AGGTATGTAT CGCTGCAGTA	2460
598	E K A F R L E L R A I K K V R E E M G L	
	CGAGAAGGCG TTCCGGCTAG AGCTGAGGGC CATCAAGAAG GTGAGGGAGG AGATGGGCTT	2520
618	T N V W V M A P F V R T T W E A E R F N	
	GACTAATGTT TGGGTCATGG CCCCATTCTG GAGGACTACT TGGGAGGCCG AGCGCTTCAA	2580
638	R L L E E E G L V R D R D F K V W A M A	
	CAGGTTGCTT GAGGAGGAGG GCCTGGTGAG GGACAGAGAT TTCAAGGTCT GGGCGATGGC	2640
658	E V P S V A F L V E E F A P Y F <u>D G F S</u>	
	CGAGGTGCCC TCAGTTGCGT TTCTAGTTGA GGAGTTTGGCT CCGTATTTTCG ACGGCTTCTC	2700
678	<u>I G S N D L T Q L T L G V D R D N D F L</u>	
	CATAGGCTCT AACGATTTAA CTCAGCTGAC TCTAGGCGTT GATAGAGACA ACGACTTTCT	2760
698	V R I N P K Y F D E R E M P V L K A I Y	
	AGTGAGGATA AACCCGAAGT ACTTTCGACGA GAGGGAAATG CCGGTGCTGA AGGCGATATA	2820
718	E L I Q R A H R V G K T V S I C G Q G P	
	TGAGCTCATC CAGAGGGCCC ACAGAGTGGG CAAGACGGTA TCGATATGCG GTCAAGGTCC	2880
738	S V Y P Q L V E F L V R A G I D S I S V	
	CTCGGTCTAT CCGCAGCTAG TTGAGTTCTT AGTGAGAGCC GGCATAGACA GCATCTCGGT	2940
758	N P D A V L N T R I L V A S V E M K L L	
	GAACCCGAC GCGGTGCTCA AACTAGAAT CTTGGTAGCC TCCGTCGAGA TGAAGTTGCT	3000
778	R E R L D A I Y R A L Y K V G D D E E F	
	GAGAGAGAGA CTCGACGCCA TTTACAGGGC GTTATACAAG GTGGGCGACG ACGAGGAATT	3060
798	R E I I K K V F G G L K Y *	
	CAGAGAAATA ATAAAGAAGG TATTCGGGGG ACTGAAATAT TAGCAGAGCA CCCTCCTTTG	3120
	CTGCTCCGCC CTTCCCCGAG AGCTCGGGGC GCGTCGGCTC TCCCTCGGAG CCGTTGCAAC	3180
	TCATTAGTT <i>CGCCCTTGAG</i> <i>CTACTGTCGC</i> <i>TGTAGCAGAG</i> <i>GTCGTTGAAC</i> <i>CAAGGCACGT</i>	3240
	<i>CCACTTGATC</i> <i>TAACCTCCAC</i> <i>CTCTGTTTTA</i> <i>CAAAGCTCCT</i> <i>CTCGACATTC</i> <i>ACGAAGAGGC</i>	3300
	<i>CTCGCTTGAA</i> <i>GGCATAATAG</i> <i>CCAGCCAGTG</i> <i>CGATCATGGC</i> <i>GCCGTTATCG</i> <i>CCGGCGTATT</i>	3360
	<i>CCGGCGGCAC</i> <i>TATCTTGAGG</i> <i>GAGACTCCTC</i> <i>TATCCTCGGC</i> <i>TATAGCTCTA</i> <i>AGTATAGAGC</i>	3420
	<i>CGAGCCTGGG</i> <i>GCTTCTCGCC</i> <i>ACACCGCCGG</i> <i>CCACAATAA</i> <i>CTCCCTCTC</i> <i>ATTGTGTAAG</i>	3480
	<i>CCAATGCTCT</i> <i>TTCGACGACC</i> <i>TCTGCCAACA</i> <i>TATAGTACGA</i> <i>GTTCTCAATA</i> <i>ACAGATTTGC</i>	3540
	<i>AGAGGGTCGG</i> <i>TAAGTCGGCC</i> <i>CGCCCCGTTCT</i> <i>TGTATAAATA</i> <i>GATAGCTTGA</i> <i>GTTACCAGGC</i>	3600
	<i>CCGAGAAGGC</i> <i>GAGATCTTGC</i> <i>CCTATTATGT</i> <i>TCATGGGTAG</i> <i>CGGAAGAACT</i> <i>CTCTCCGCCC</i>	3660
	<i>TCTCGGCGCA</i> <i>CTTCTCCACG</i> <i>GCTGGGACGC</i> <i>CGGGATATCC</i> <i>AAGCCCCACC</i> <i>TCCCTAGCGA</i>	3720
	<i>ACTTGTCAAT</i> <i>GGCATTTCG</i> <i>ATTGCTAGAT</i> <i>CGAGCGTCTC</i> <i>TCCGAATACT</i> <i>CTGTAGCGCC</i>	3780
	<i>CGTCGGCGAA</i> <i>TCCCCTATG</i> <i>ACCGTGTGCC</i> <i>CGCCTGAAAT</i> <i>CAAGAGCACG</i> <i>AGGGGATCGC</i>	3840
	<i>AACTCCTCGT</i> <i>GGAATATCTG</i> <i>GCGATCTCTA</i> <i>TGTGTGCAAT</i> <i>TCCATGGTGT</i> <i>ACGGGCACTA</i>	3900
	<i>GGGGCCTCCT</i> <i>ATATTTAACA</i> <i>GCCAAGGAGC</i> <i>GCGCCAGGAC</i> <i>GCGCCCATC</i> <i>CTTAGAGCAG</i>	3960
	<i>GTCCCAGCCC</i> <i>GGGGCCTGCG</i> <i>GAGTAGGCCA</i> <i>CTGCATCGAT</i> <i>ATCTCTGGGC</i> <i>GATCTTCCCCG</i>	4020
	<i>CGATCTCTAG</i> <i>GGCTTTTTTC</i> <i>AACAAAATTA</i> <i>CGGCGACTTT</i> <i>AGCGTGATGC</i> <i>TCAGCCGCCT</i>	4080
	<i>CGCGGGGATG</i> <i>GATCC</i>	

Abb. 3.3: Nukleotidsequenz des genomischen Klon pPEP4kb-4 (4095 bp).

Die für die PEPS aus *T. tenax* codierende Nukleotidsequenz erstreckt sich von Position 671 bis 3103 (Nummerierung rechts). Die korrespondierende Aminosäuresequenz (810 AS, Nummerierung links) ist darüber dargestellt. Stopcodons werden durch Sternchen symbolisiert. Die putativen Promotor-Strukturen BRE-site und TATA-Box sind unterstrichen bzw. fettgedruckt. Weitere Leserahmen (*urf*: Position 1 → 498 (unvollständig) und *gcp*: Position 4095 → 3185 (unvollständig)) sind kursiv gesetzt. Die unter den PEP-utilizing enzymes konservierten Sequenzmotive PS00370 (Aminosäureposition 401 → 412) und PS00742 (Aminosäureposition 674 → 692) sind doppelt unterstrichen.

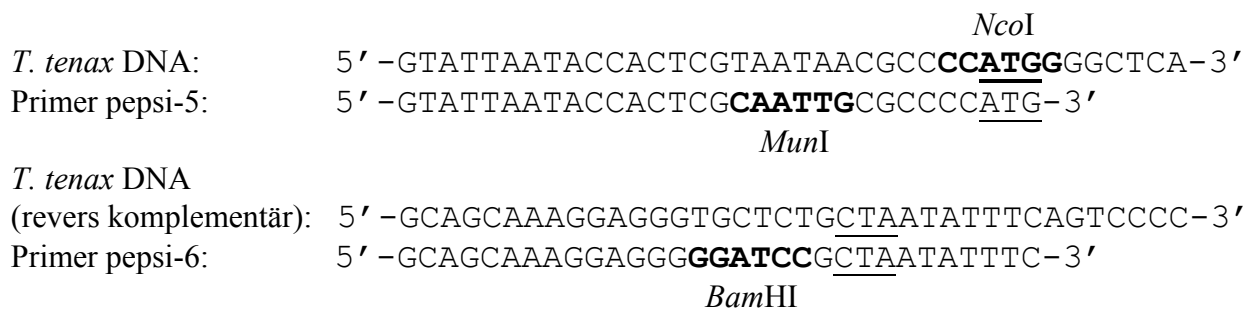
Die gesamte Sequenz wurde bei EMBL unter der Accession-No. AJ515537 hinterlegt.

3.1.2 Heterologe Expression der *T. tenax* PEPS in *E. coli*

3.1.2.1 Inserierung des *pps*-Gens in den Expressionsvektor pET15b

Das *pps*-Gen aus *T. tenax* wurde über PCR mit den Primern pepsi-5 und pepsi-6 (s.u.) und genomischer *T. tenax*-DNA als Template amplifiziert (Bedingungen: 2 min 94°C; 30 Zyklen mit 1,5 min 94°C/ 1 min 63°C/ 1,5 min 72°C; 10 min 72°C) und 9 bp hinter die vektoreigene Shine-Dalgarno Sequenz des Expressionsvektors pET15b inseriert. Zu diesem Zweck wurde eine unmittelbar vor dem Startcodon des *pps*-Gens lokalisierte *Nco*I-Schnittstelle genutzt; stromabwärts der *pps*-Sequenz wurde mittels PCR-Mutagenese eine *Bam*HI-Schnittstelle eingeführt. Die Primer pepsi-5 und pepsi-6 wurden außerdem zur Klonierung in den Vektor pSPT19 verwendet (s. 3.1.5), daher erfolgte bei pepsi-5 der zusätzliche Einbau einer *Mun*I-Schnittstelle.

Die zur Amplifikation verwendeten Primer hatten folgende Sequenzen (Restriktionsschnittstellen fettgedruckt, Start- und Stopcodon unterstrichen):



Nach Transformation kompetenter *E. coli* DH5 α -Zellen mit dem Plasmid-Konstrukt pET15b+PEPS wurde die korrekte Insertion und Nukleotidsequenz des rekombinanten *pps*-Gens durch Sequenzierung beider Stränge überprüft.

3.1.2.2 Expression der PEPS in *E. coli*

Um die *T. tenax* PEPS heterolog in *E. coli* zu exprimieren, wurde das Plasmidkonstrukt pET15b+PEPS in den Expressionsstamm BL21(DE3) bzw. BL21(DE3) pLysS transferiert. In beiden Fällen war die Expression der *T. tenax* PEPS nur sehr gering: Nach Aufschluß der Zellen und partieller Reinigung durch Hitzefällung (75°C, 20 min) traten im SDS-Gel zwei schwache Banden mit den apparenten Molekülmassen von 94 kDa bzw. 88 kDa auf, die bei der Kontrolle (Plasmid pET15b ohne inseriertes *pps*-Gen; Daten nicht gezeigt) fehlten. Aufgrund der großen Ähnlichkeit der abgeleiteten Molekülmassen mit der theoretischen molekularen Masse der PEPS von 90,5 kDa kamen beide Protein-Spezies als Expressionsprodukte des *pps*-Gens in Frage.

Eine häufig beobachtete Ursache für eine geringe heterologe Expression in *E. coli* sind Unterschiede im Codon-Gebrauch zwischen Fremd-Gen und Wirtszelle. Die Überexpression eines Gens mit Codons, die von *E. coli* selten genutzt werden, resultiert in einem Mangel der entsprechenden tRNAs im internen tRNA-Pool. Als Konsequenz findet die Translation der rekombinanten mRNAs verzögert statt, was wiederum zu einer erhöhten Abbaurrate der Transkripte führt. Das Ergebnis ist eine schlechte Expression des rekombinanten Proteins und die Bildung verkürzter Translationsprodukte.

Vergleicht man den Codon-Gebrauch von *E. coli* mit dem des *pps*-Gens aus *T. tenax*, so erkennt man, daß gerade die in *E. coli* sehr seltenen Arginin-Codons AGA und AGG und das Isoleucin-Codon ATA im *pps*-Gen gehäuft auftreten. Etwas weniger drastisch ist dies im Fall des Leucin-Codons CTA (Tab. 3.2).

Tab. 3.2: Codon-Gebrauch des *pps*-Gens von *T. tenax*.

Codons, die in *E. coli* selten vorkommen (bis max. 0,03%), sind grau unterlegt.

AS	Codon					
Ala	GCA: 6	GCC: 33	GCG: 18	GCT: 12		
Cys	TGC: 1	TGT: 1				
Asp	GAC: 27	GAT: 15				
Glu	GAA: 7	GAG: 70				
Phe	TTC: 18	TTT: 8				
Gly	GGA: 4	GGC: 40	GGG: 10	GGT: 5		
His	CAC: 6	CAT: 3				
Ile	ATA: 29	ATC: 13	ATT: 6			
Lys	AAA: 8	AAG: 41				
Leu	CTA: 16	CTC: 15	CGT: 14	CTT: 4	TTA: 5	TTG: 11
Met	ATG: 18					
Asn	AAC: 16	AAT: 3				
Pro	CCA: 7	CCC: 13	CCG: 10	CCT: 7		
Gln	CAA: 7	CAG: 13				
Arg	AGA: 22	AGG: 28	CGA: 0	CGC: 8	CGG: 2	CGT: 0
Ser	AGC: 5	AGT: 2	TCA: 7	TCC: 7	TCG: 12	TCT: 10
Thr	ACA: 6	ACC: 11	ACG: 6	ACT: 13		
Val	GTA: 21	GTC: 28	GTG: 31	GTT: 13		
Trp	TGG: 10					
Tyr	TAC: 15	TAT: 13				
*	TAA: 0	TAG: 1	TGA: 0			

Die Vermutung lag damit nahe, daß ein Mangel der entsprechenden tRNAs die Ursache für die geringe Expression der *T. tenax* PEPS in *E. coli* sein könnte. Durch die gleichzeitige Expression seltener tRNA-Gene mit Hilfe des Expressionsstammes BL21-CodonPlus(DE3)-RIL (Stratagene) konnte dieses Problem gelöst werden: Dieser Stamm enthält ein Plasmid (RIL), das zusätzliche Kopien der *argU*, *ileY* und *leuW* tRNA-Gene trägt. Die durch diese Gene codierten tRNAs erkennen die Codons AGA/AGG (Arginin), AUA (Isoleucin) und CUA (Leucin). Die heterologe Expression der *T. tenax* PEPS konnte dadurch signifikant gesteigert werden, deutlich erkennbar am Auftreten der starken Doppelbande im Proteingel (Abb. 3.4).

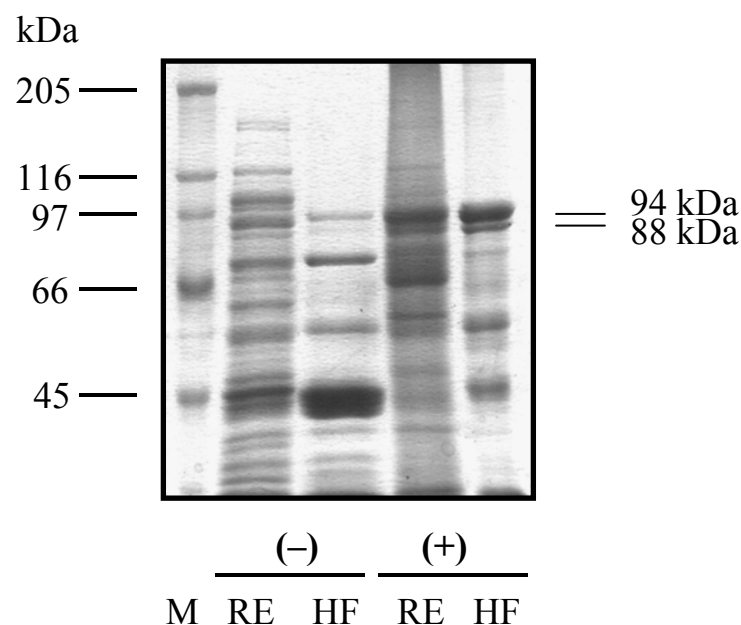


Abb. 3.4: Heterologe Expression der *T. tenax* PEPS in *E. coli*.

SDS-PAGE Elektropherogramm (10 %); (-) Expression in *E. coli* BL21(DE3); (+) Expression in *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL; M: Proteinstandard; RE: zellfreier Rohextrakt; HF: hitzegefällter Proteinextrakt.

3.1.3 Charakterisierung einer putativen chemischen Modifikation der PEPS

3.1.3.1 N-terminale Sequenzierung

Um festzustellen, bei welcher der zwei in Frage kommenden Proteinspezies mit den apparenten Molekülmassen von 94 kDa bzw. 88 kDa es sich um das Genprodukt des *pps*-Gens handelt, wurden beide Spezies mit Hilfe eines Gasphasensequenzators N-terminal über einen Bereich von 14 Aminosäureresten sequenziert. Die ermittelten Sequenzen (GLILWLEEITKGDH; ohne N-terminales Methionin) stimmten in beiden Fällen mit der von der Nukleotidsequenz des *pps*-

Gens abgeleiteten Aminosäuresequenz überein. Eine Trunkierung am N-Terminus der PEPS als Grund für das Auftreten einer zweiten Proteinspezies mit geringerem Molekulargewicht konnte somit ausgeschlossen werden.

Die für beide Proteinspezies festgestellte posttranslationale Prozessierung des Start-Methionins (s.o.) steht im Einklang mit der beschriebenen Substrat-Spezifität der *E. coli*-eigenen Methionin Aminopeptidase (MAP) bezüglich des Aminosäurerestes an Position 2: bei Aminosäuren mit kleinen Seitenketten (Glycin, Alanin, Prolin) findet bevorzugt die Abspaltung des aminoständigen Methionins statt, während die MAP bei Resten mit größeren Seitenketten (Arginin, Lysin, Phenylalanin, Methionin, Glutamat, Leucin) dazu nicht in der Lage ist [BEN-BASSAT et al., 1987].

3.1.3.2 Nachweis einer chemischen Modifikation

Eine weitere mögliche Erklärung für das Auftreten der Doppelbande wäre eine posttranslationale Modifikation des Enzyms, die zu einem veränderten Laufverhalten im SDS-Gel führt.

Eine häufig vorkommende Art von chemischer Modifikation ist die Phosphorylierung von Proteinen, bei der Phosphoryl-Gruppen kovalent an bestimmte Aminosäurereste gebunden werden. Dabei unterscheidet man *O*-Phosphate (Phosphoserin, Phosphothreonin, Phosphotyrosin), *N*-Phosphate (Phosphoarginin, Phosphohistidin, Phospholysin), Acyl-Phosphate (Phosphoaspartat, Phosphoglutamat) und *S*-Phosphate (Phosphocystein) [DUCLOS et al., 1991].

Phosphorylierungen bzw. Dephosphorylierungen haben Bedeutung bei der Regulierung der biologischen Aktivität von Proteinen und werden meist durch spezifische Proteinkinasen bzw. Proteinphosphatasen katalysiert. Phosphorylierte Aminosäuren treten aber auch als Zwischenprodukte bei enzymatischen Reaktionen auf. So wird im Verlauf der enzymatischen Reaktion der PEPS ein Histidin-Rest im aktiven Zentrum durch ATP phosphoryliert. Anschließend wird die Phosphoryl-Gruppe auf Pyruvat übertragen [NARINDRASORASAK & BRIDGER, 1977]. Dieser katalytische Histidin-Rest, der den Phosphorylgruppen-Transfer von ATP auf Pyruvat vermittelt, ist Teil der hochkonservierten Sequenzsignatur G(GA)XTXH(STA)(STAV)(LIVM)₂(STAV)(RG) (PROSITE PS00370), die in allen Vertretern der Familie der PEP-utilizing enzymes vorkommt und auch in der Aminosäuresequenz der *T. tenax* PEPS enthalten ist (Abb. 3.5).

Archaea	{	<i>T. tenax</i> PEPS ^a	GGRTSHAAIVSR	406
		<i>S. marinus</i> MAPS ^b	GGMTSHAAIVSR	447
		<i>P. furiosus</i> PEPS ^c	GGRTSHAAIVSR	442
		<i>P. horikoshii</i> PEPS ^d	GGRTSHAAIVSR	444
		<i>M. thermautotrophicus</i> PEPS ^e	GGVTCHAAIVSR	424
		<i>A. fulgidus</i> PEPS ^f	GGMTCHAAIVSR	398
			** * * * * * * *	
Bacteria	{	<i>E. coli</i> PEPS ^g	GGRTCHAAIIAR	421
		<i>H. pylori</i> PEPS ^h	GGRTCHAAIVAR	430
		<i>A. aeolicus</i> PEPS ⁱ	GGRTSHAAIVAR	433
		<i>E. coli</i> Enzym I ^j	GGRTSHTSIMAR	189
		<i>B. subtilis</i> Enzym I ^k	GGRTSHSAIMAR	189
		<i>G. stearothermophilus</i> Enzym I ^l	GGRTSHSAIMAR	195
Eucarya	{	<i>C. symbiosum</i> PPDK ^m	GGMTSHAAVVAR	455
		<i>Z. mays</i> PPDK ⁿ	GGMTSHAAVVAR	458
		<i>O. sativa</i> PPDK ^o	GGMTSHAAVVAR	458
		<i>E. histolytica</i> PPDK ^p	GGKTSHAAVVAR	454
			** * * * * * *	

Abb. 3.5: Alignment des konservierten Sequenzmotivs PS00370 einiger Vertreter der Familie der PEP-utilizing enzymes.

Der katalytische Histidin-Rest ist grau hinterlegt. Die Nummerierungen beziehen sich auf die Position des Histidin-Restes in der jeweiligen Aminosäuresequenz.

NCBI-Datenbankeinträge (<http://ncbi.nlm.nih.gov>) und Referenzen der gezeigten Protein-Sequenzen: ^a diese Arbeit; ^b(P46893) CICICOPOL et al., 1994; ^c(P42850) ROBINSON & SCHREIER, 1994; ^d(O57830) KAWARABAYASI et al., 1998; ^e(O27190) SMITH et al., 1997; ^f(O29548) KLENK et al., 1997; ^g(P23538) NIERSBACH et al., 1992; ^h(P56070) TOMB et al., 1997; ⁱ(O67899) DECKERT et al., 1998; ^j(P08839) SAFFEN et al., 1987; ^k(P08838) REIZER et al., 1993; ^l(P42014) LAI & INGRAM, 1995; ^m(P22983) POCALYKO et al., 1990; ⁿ(P11155, matures Protein) MATSUOKA et al., 1988; ^o(T02979, matures Protein) IMAIZUMI et al., 1997; ^p(P37213) BRUCHHAUS & TANNICH, 1993.

Für die *E. coli* PEPS konnte gezeigt werden, daß die Phosphorylierung des katalytischen Histidin-Restes einen stark stabilisierenden Effekt auf die dimere Struktur des Enzyms aufweist, vermutlich durch eine strukturelle Veränderung im Bereich der Untereinheiten-Kontakte [NARINDRASORASAK & BRIDGER, 1977]. Deshalb lag es nahe zu untersuchen, ob eine Phosphorylierung der *T. tenax* PEPS und eine möglicherweise damit einhergehende strukturelle Veränderung des Proteins die Ursache für die unterschiedliche Mobilität der zwei Proteinbanden im SDS-Gel ist.

Durch eine 20 minütige Inkubation von hitzegefälltem Proteinextrakt bei 70°C in Gegenwart von 5 mM ATP und 5 mM MgCl₂ sollte eine vollständige Phosphorylierung des rekombinanten Enzyms gewährleistet werden. Nach Auftrennung der Probe und einer unbehandelten Kontrolle auf einem Polyacrylamid-Gel (Abb. 3.6, Spuren 1 und 2) zeigte sich, daß nach Inkubation mit

ATP und $MgCl_2$ nur noch die Proteinbande mit der apparenten Molekülmasse von 94 kDa vorhanden war. Dies wurde als ein starkes Indiz dafür gewertet, daß es sich bei der langsamer wandernden Proteinspezies um die phosphorylierte Form der PEPS handelt.

In einem weiteren Versuchsansatz, der auf die Dephosphorylierung der putativ phosphorylierten Proteinspezies abzielte, konnte gezeigt werden, daß nach Inkubation von hitzegefälltem Proteinextrakt mit 10 mM Pyruvat (70°C, 20 min) ein verstärktes Auftreten der schneller wandernden 88 kDa-Bande zu beobachten war (Abb. 3.6, Spur 3). Dieses Ergebnis unterstützt die Annahme, daß es sich dabei um die dephosphorylierte Form der PEPS handelt.

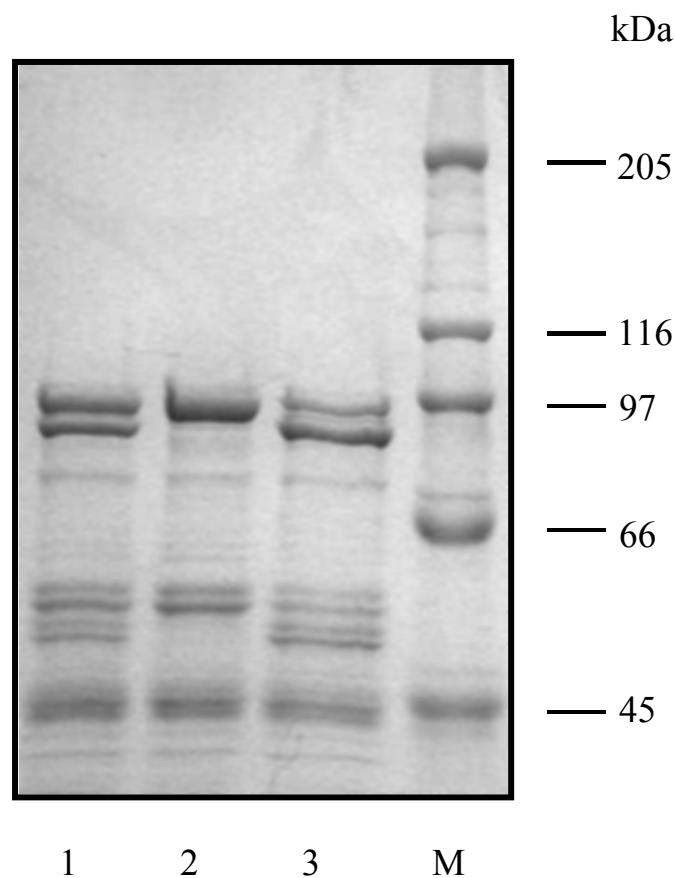


Abb.: 3.6: Phosphorylierung / Dephosphorylierung der PEPS.

SDS-PAGE Elektropherogramm (7,5%); Spur 1: Kontrolle (hitzegefällter Proteinextrakt); Spur 2: Phosphorylierung der PEPS (5 mM ATP, 5 mM $MgCl_2$); Spur 3: Dephosphorylierung der PEPS (10 mM Pyruvat); M: Proteinstandard.

Das Auftreten der PEPS-Doppelbande im Polyacrylamid-Gel dürfte somit auf eine reversible Phosphorylierung des Enzyms zurückzuführen sein. Dieses Ergebnis läßt allerdings noch keine eindeutige Aussage darüber zu, ob es sich bei dem phosphorylierten Aminosäure-Rest um den putativen katalytischen Histidin-Rest an Position 406 oder um einen anderen Aminosäure-Rest im Protein handelt.

Zur Identifizierung der phosphorylierten Aminosäure stehen einige diagnostische Tests zur Verfügung, die auf der chemischen Stabilität der Phosphoaminosäuren gegenüber extremen pH-Werten, Hydroxylamin und Pyridin beruhen [s. Tab. 3.3, verändert nach DUCLOS et al., 1991].

Tab. 3.3: Chemische Stabilität von phosphorylierten Aminosäuren.

Phosphoaminosäure	saurem pH	stabil in:		
		alkalischem pH	Hydroxylamin	Pyridin
<i>O</i> -Phosphate:				
Phosphoserin	+	–	+	+
Phosphothreonin	+	±	+	+
Phosphotyrosin	+	+	+	+
<i>N</i> -Phosphate:				
Phosphoarginin	–	–	–	–
Phosphohistidin	–	+	–	–
Phospholysin	–	+	–	–
Acyl-Phosphate:				
Phosphoaspartat	–	–	–	–
Phosphoglutamat	–	–	–	–
<i>S</i> -Phosphate:				
Phosphocystein	+	+	+	+

Die phosphorylierte Form der *T. tenax* PEPS wurde auf ihre Stabilität gegenüber saurem bzw. alkalischem pH getestet, indem hitzegefällter Proteinextrakt zunächst mit ATP phosphoryliert und anschließend durch Zugabe von konzentrierter Salzsäure bzw. Kali-Lauge auf verschiedene pH-Werte (1-14) eingestellt wurde. Die Proben wurden 30 min bei RT inkubiert, anschließend neutralisiert und über ein Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Die Säure-Behandlung bewirkte ab $\text{pH} \leq 3$ eine Reduktion der phosphorylierten Proteinspezies (Abb. 3.7, Spur 3 (pH 3) und Spur 4

(pH 1)), während die Alkali-Behandlung (Abb. 3.7, Spur 5 (pH 14)) keinen Effekt zeigte. Die Ergebnisse sprechen dafür, daß es sich bei der Modifikation der PEPS entweder um die Phosphorylierung eines Histidin- oder eines Lysin-Restes handelt.

Eine Unempfindlichkeit der Phosphoaminosäure gegenüber Hydroxylamin (0,5 M; 30 min Inkubation bei 37°C), wie sie für Phosphohistidin und Phospholysin beschrieben ist, war nicht feststellbar. Allerdings schließt dies nicht das Vorliegen eines Phosphohistidin-Restes aus, da eine geringe Reaktivität mit Hydroxylamin auch schon für den Phosphohistidin-Rest der *E. coli* PEPS beschrieben wurde [NARINDRASORASAK & BRIDGER, 1977].

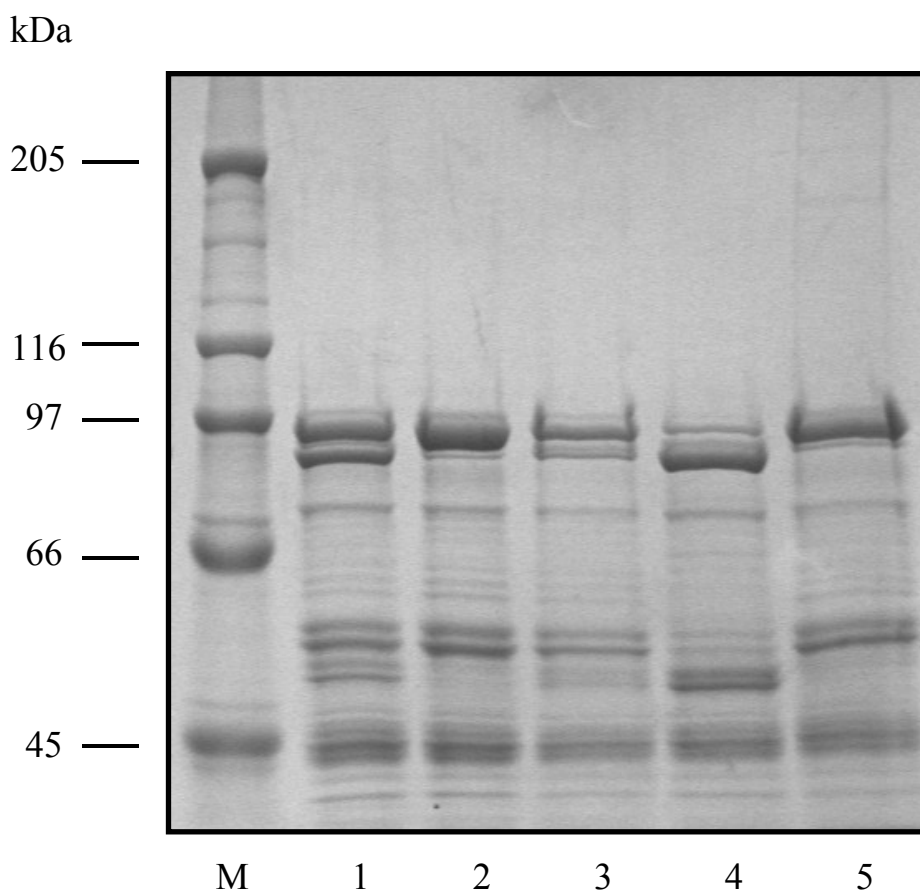


Abb. 3.7: Säure- bzw. Alkali-Behandlung der phosphorylierten Form der PEPS.

SDS-PAGE Elektropherogramm (7,5%); M: Proteinstandard; Spur 1: hitzegefällter Proteinextrakt; Spur 2: Phosphorylierung der PEPS (5 mM ATP, 5 mM MgCl₂); Spur 3: Säure-Behandlung, pH 3; Spur 4: Säure-Behandlung, pH 1; Spur 5: Alkali-Behandlung, pH 14.

3.1.3.3 Konstruktion der PEPS-Mutante H406Q

Endgültigen Aufschluß darüber, ob der putative katalytische Histidin-Rest an Position 406 der *T. tenax* PEPS durch ATP phosphoryliert wird und außerdem für das Auftreten der Protein-Doppelbande im Polyacrylamid-Gel verantwortlich ist, sollte der Austausch dieser Aminosäure gegen einen nicht-phosphorylierbaren Glutamin-Rest bringen.

Dies wurde durch Overlap Extension PCR erreicht (s. 2.5.8.3). Die äußeren Primer pepsi-5 und pepsi-6 (s. Tab. 3.1) enthielten die Restriktionsschnittstellen für *Nco*I bzw. *Bam*HI zur Klonierung in den Expressionsvektor pET15b. Bei den internen Primern H406Qfor (5'-CCGCACCTCTCAGGCCGCCATAGT-3'; Position 1876 → 1899, Abb. 3.3) und H406Qrev (5'-ACTATGGCGGCCTGAGAGGTGCGG-3', Position 1899 → 1876, Abb. 3.3) ist das Codon für Histidin406 (CAT) gegen eines für Glutamin (CAG) getauscht (durch kursive Schrift hervorgehoben).

In zwei getrennten PCR-Ansätzen wurden mit den Primer-Kombinationen pepsi-5/H406Qrev bzw. pepsi-6/H406Qfor und genomischer *T. tenax*-DNA als Template unter den gewählten Bedingungen (2 min 94°C; 30 Zyklen mit 1 min 94°C/ 1 min 64°C/ 1 min 68°C; 10 min 68°C) zwei ca. 1250 bp große Fragmente amplifiziert, deren überlappender Sequenzbereich von 24 Nukleotiden die gewünschte Mutation enthielt.

Im zweiten Schritt der Overlap Extension PCR wurden die beiden PCR-Produkte in einem gemeinsamen Ansatz kurz denaturiert (94°C, 3 min) und anschließend renaturiert (58°C, 10 min), um eine Hybridisierung der überlappenden Sequenzbereiche zu erreichen. Nach einer Extensionsphase zur Komplettierung der Gegenstränge (68°C, 15 min) wurde das kombinierte PCR-Produkt mit Hilfe der äußeren Primer pepsi-5 und pepsi-6 reamplifiziert (2 min 94°C; 15 Zyklen mit 1 min 94°C/ 1 min 64°C/ 1 min 68°C; 10 min 68°C) und anschließend in den Expressionsvektor pET15b inseriert.

3.1.3.4 Expression der PEPS-Mutante H406Q in *E. coli*

Die heterologe Expression der PEPS-Mutante H406Q in dem *E. coli*-Stamm BL21-CodonPlus(DE3)-RIL und die partielle Anreicherung durch Hitzefällung erfolgte analog zur WT-PEPS. Die Mutante H406Q zeigte wie erwartet keine PEPS-Aktivität und unterstützt damit die Annahme, daß es sich bei dem ausgetauschten Histidin-Rest an Position 406 tatsächlich um den katalytischen Rest handelt.

Ist nun die Phosphorylierung des katalytischen His406 wirklich der Grund für das Auftreten der Doppelbande im SDS-Gel, so sollte der Austausch dieses Restes gegen einen nicht-

phosphorylierbaren Glutamin-Rest dazu führen, daß nur noch eine Form des Enzyms, und zwar die nicht-phosphorylierte Form exprimiert wird, die nach den bisherigen Ergebnissen der unteren Proteinbande im SDS-Gel entspräche. Tatsächlich erscheint die exprimierte Mutante H406Q im Polyacrylamid-Gel nur als eine Bande (Abb. 3.8), die wie vermutet gegenüber Säure- und Alkali-Behandlung stabil ist (Daten nicht gezeigt). Überraschenderweise läuft H406Q jedoch nicht auf Höhe der unteren Bande, sondern zwischen den beiden Proteinbanden der WT-PEPS. Möglicherweise sind –bedingt durch den eingeführten Glutamin-Rest– konformelle Änderungen für dieses intermediäre Laufverhalten verantwortlich.

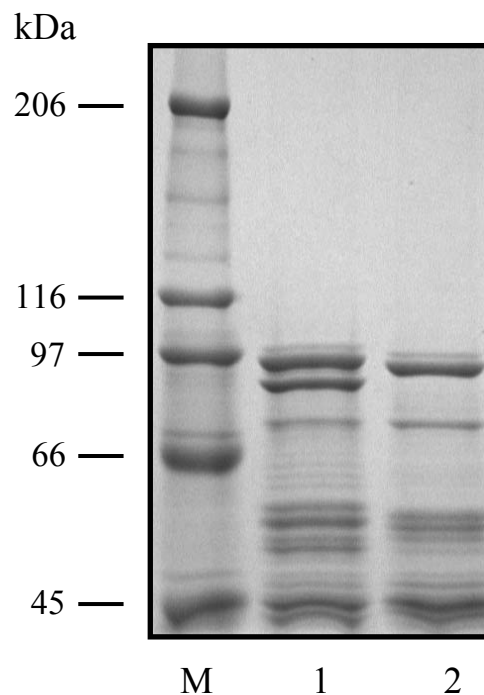


Abb. 3.8: Heterologe Expression der WT-PEPS und der Mutante H406Q.

SDS-PAGE Elektropherogramm (7,5%); M: Proteinstandard; Spur 1: hitzegefällter Proteinextrakt WT-PEPS; Spur 2: hitzegefällter Proteinextrakt PEPS-Mutante H406Q.

3.1.4 Biochemische Charakterisierung der PEPS

3.1.4.1 Reinigung der rekombinanten PEPS

Für die Reinigung der heterolog in *E. coli* exprimierten *T. tenax* PEPS wurden ca. 4 g Zellen (Naßgewicht) des PEPS-Expressionsklons (s. 3.1.2) in 100 mM Tris/HCl, pH 7 (70°C), 100 mM β -Mercaptoethanol resuspendiert und mit der French Press aufgeschlossen. Mittels Ultrazentrifugation wurde ein zellfreier Rohextrakt gewonnen, aus dem durch Hitzebehandlung

(75°C, 20 min) ein Großteil der *E. coli*-Proteine ausgefällt werden konnten. Höhere Temperaturen (85-90°C) resultierten in einer geringeren Ausbeute der PEPS.

Durch eine anschließende Ionenaustausch-Chromatographie (Q-Sepharose fast flow) konnte die rekombinante PEPS weiter angereichert werden, wobei das Enzym im Durchfluß eluierte, während der größte Teil der *E. coli*-Proteine durch Bindung an das Säulenmaterial abgetrennt wurde. Versuche, die PEPS über eine zusätzliche Ionenaustausch-Chromatographie mit DEAE-Cellulose oder über Affinitätschromatographie mit ADP-Agarose, ATP-Agarose bzw. verschiedenen Farbstoffsäulen (Sigma) weiter anzureichern, scheiterten an der ebenfalls sehr schwachen Bindung der PEPS an die genannten Säulenmaterialien (Daten nicht gezeigt).

Die spezifische Aktivität der PEPS verringerte sich im Laufe der Anreicherung (s. Tab. 3.4). Möglicherweise ist eine Dissoziation der multimeren PEPS in ihre Untereinheiten für diese Inaktivierung verantwortlich (s. 3.1.4.2).

Insgesamt konnten aus 4,4 g *E. coli*-Zellen ca. 8 mg rekombinante *T. tenax* PEPS mit einer spezifischen Aktivität von 0,3 U/mg Protein (Test bei 70°C) isoliert werden.

Abbildung 3.9 und Tabelle 3.4 dokumentieren den Verlauf der Reinigung.

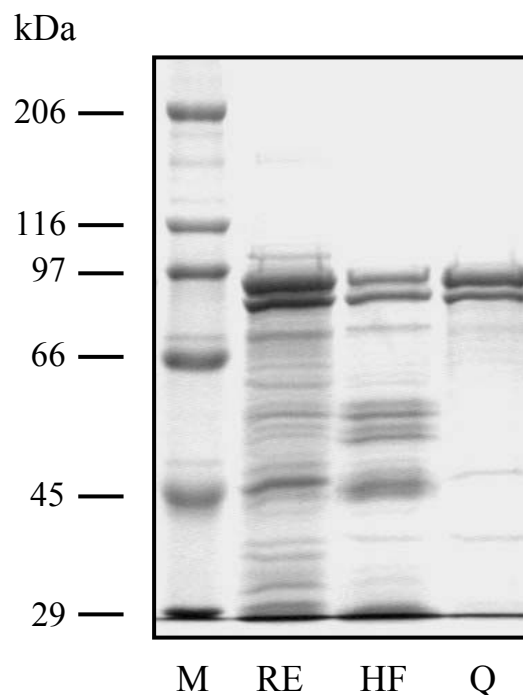


Abb. 3.9: Reinigung der heterolog in *E. coli* exprimierten PEPS von *T. tenax*.

SDS-PAGE Elektropherogramm (7,5%); M: Proteinstandard; RE: zellfreier Rohextrakt; HF: hitzegefällter Proteinextrakt; Q: Q-Sepharose Durchfluß-Fractionen.

Tab. 3.4: Anreicherungsprotokoll der heterolog exprimierten *T. tenax* PEPS, ausgehend von 4,4 g *E. coli*-Zellen.

Reinigungsschritt	Protein (mg)	Gesamt-Aktivität (U)	Spezifische Aktivität (U/mg)	Ausbeute (%)
Rohextrakt	308	-	-	-
Hitzefällung	61	27,5	0,45	100
Q-Sepharose (Durchfluß)	8,6	2,6	0,3	9,5

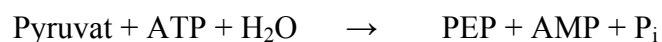
3.1.4.2 Quartärstruktur der rekombinanten PEPS

Eine exakte Bestimmung der molekularen Masse der nativen PEPS war mittels Molekularsieb-Chromatographie nicht möglich: Sowohl bei Verwendung der präparativen (Superdex 200 Pregrade) als auch der analytischen Gelfiltrationssäule (Superose 6) eluierte das Enzym im Ausschlußvolumen und hat damit unter nativen Bedingungen eine Molekülmasse > 440 kDa. Mit einer Molekülmasse der Untereinheiten von ca. 90 kDa handelt es sich bei der *T. tenax* PEPS also offensichtlich um ein multimeres Enzym.

Eine Aussage über den genauen Oligomerisierungsgrad der PEPS ist derzeit nicht möglich.

3.1.4.3 Katalytische und regulative Eigenschaften der PEPS

Die PEPS aus *T. tenax* katalysiert die irreversible Umsetzung von Pyruvat und ATP zu PEP, AMP und P_i:



Eine Aktivität in kataboler Richtung (PEP → Pyruvat) konnte nicht nachgewiesen werden.

Die Bestimmung der enzymkinetischen Parameter und der Regulierbarkeit der rekombinanten PEPS erfolgte in einem diskontinuierlichen photometrischen Test bei 70°C, wie beschrieben unter 2.7.3.2. Im Gegensatz zu den Enzymen verschiedener Bacteria und Archaea zeigten dabei monovalente Kationen (KCl, NaCl, NH₄Cl, NH₄SO₄) im Testpuffer keinen Einfluß auf die maximale Umsatzgeschwindigkeit.

Aus Substrat-Sättigungskinetiken wurde für Pyruvat ein apparenter K_M von 0,27 mM, für ATP ein K_M von 1 mM abgeleitet. In beiden Fällen folgt das Enzym einer klassischen Michaelis-Menten-Kinetik (Abb. 3.10).

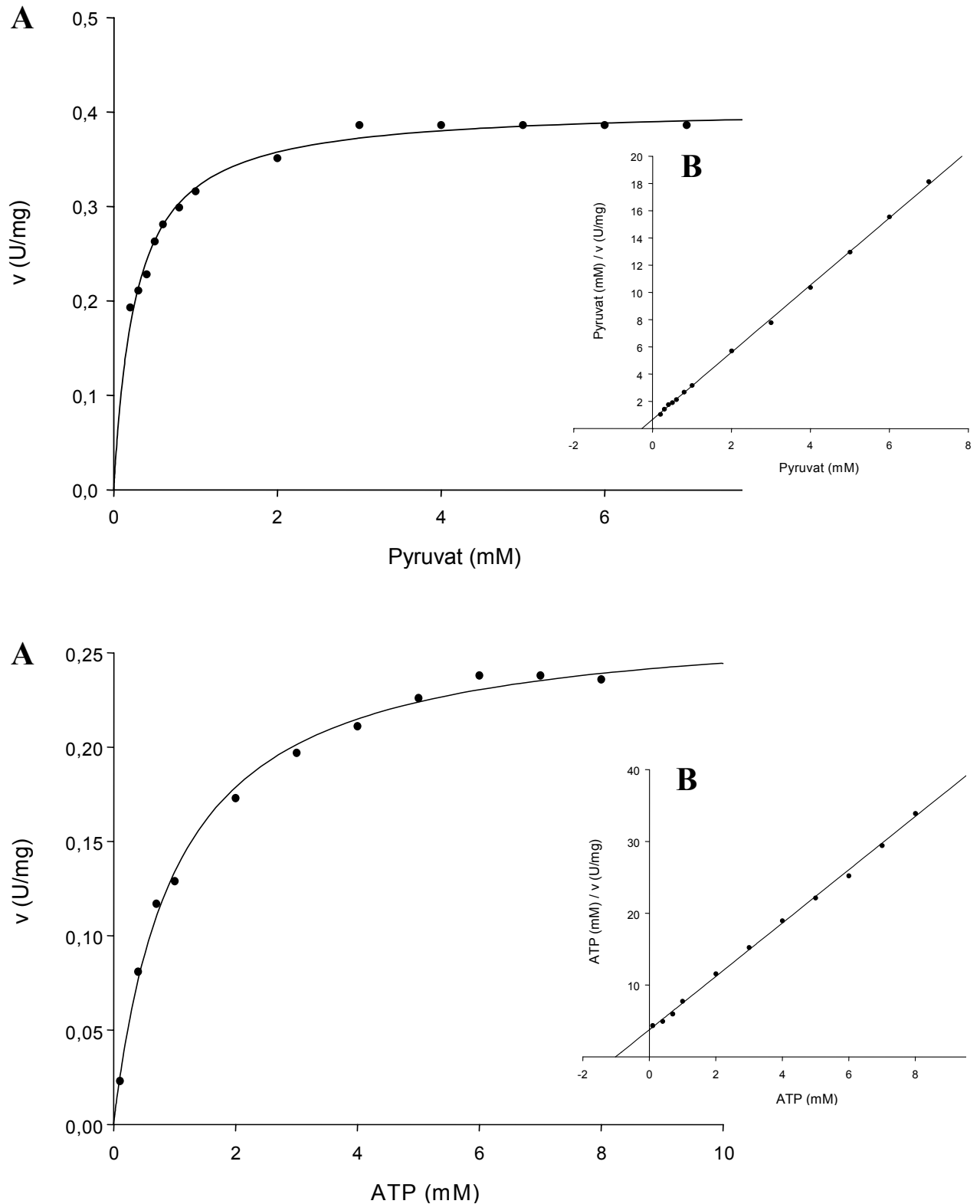


Abb. 3.10: Sättigungskinetiken der *T. tenax* PEPS für Pyruvat (oben) und ATP (unten). Die Enzymaktivität wurde im diskontinuierlichen Test bei 70°C bestimmt. Die jeweils invariablen Substrate wurden dabei in sättigenden Konzentrationen eingesetzt. A) direkte Auftragung der Daten; B) Transformation der Daten nach HANES [1932].

Die PEPS zeichnet sich durch eine hohe Spezifität für ATP aus; andere Phosphatdonatoren wie GTP, CTP, ITP oder UTP werden nicht umgesetzt.

Die Regulierbarkeit der PEPS wurde bei halbsättigenden Konzentrationen der Substrate Pyruvat und ATP untersucht. Zunächst wurden verschiedene Nukleotide und Metabolite in Konzentrationen von 5-10 mM im Enzymtest eingesetzt, um einen ersten Hinweis zu erhalten, welche Substanzen einen Einfluß auf die Aktivität der PEPS nehmen. Kein nennenswerter Effekt wurde mit Glucose-1-Phosphat, Glucose-6-Phosphat, Fructose-6-Phosphat, Fructose-1,6-bisphosphat, 2-Phosphoglycerat, Oxalacetat und UDP beobachtet, während α -Ketoglutarat, AMP und ADP deutlich inhibierend auf die Umsatzgeschwindigkeit der PEPS wirkten. Einen ebenfalls -wenn auch wesentlich geringeren- inhibierenden Effekt zeigten Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP), Dihydroxyacetonphosphat (DHAP), 3-Phosphoglycerat (3-PG) und P_i . Keine der untersuchten Substanzen zeigte einen aktivierenden Effekt. Die Wirkung der oben genannten Inhibitoren auf die Aktivität der PEPS wurde anschließend genauer untersucht (Abb. 3.11).

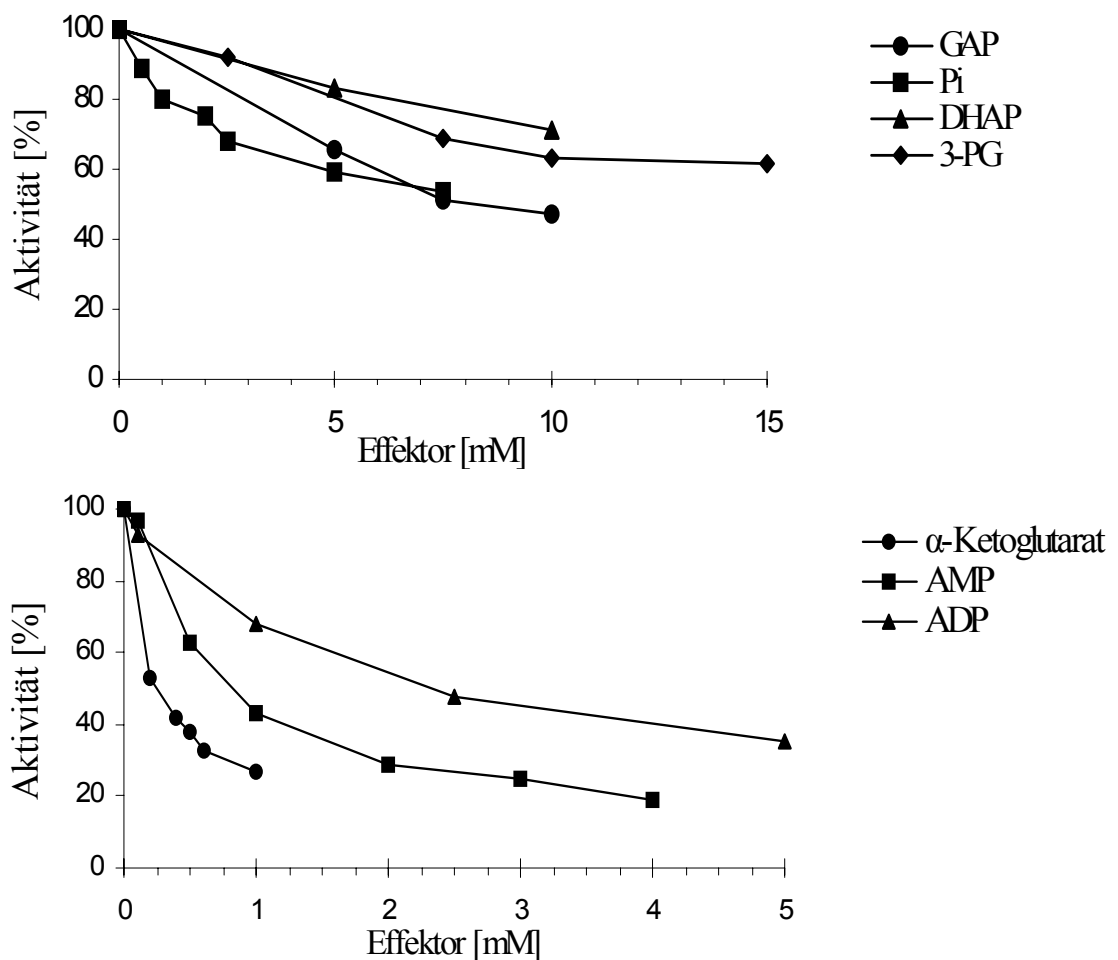


Abb. 3.11: Hemmung der PEPS-Aktivität.

Die Bestimmung der Enzymaktivitäten erfolgte im diskontinuierlichen Test bei 70°C mit halbsättigenden Konzentrationen der Substrate Pyruvat und ATP.

3.1.5 Transkriptanalysen des *pps*-Gens von *T. tenax*

Um festzustellen, ob neben der Regulation der PEPS-Aktivität auf Proteinebene (s. 3.1.4.3) auch eine Regulation über die Transkriptmenge des *pps*-Gens stattfindet und inwieweit die Transkriptmenge durch trophische Anzuchtbedingungen und/oder durch die Wachstumsphasen von *T. tenax* beeinflusst wird, wurden Northern Blot-Analysen mit autotroph bzw. heterotroph kultivierten Zellen durchgeführt, die zu verschiedenen Zeiten der Fermentation geerntet wurden. Die Detektion der *pps*-Transkripte erfolgte mit Hilfe einer spezifischen DIG-markierten antisense-mRNA-Sonde. Dazu wurde das komplette *pps*-Gen mit Hilfe der Mutagenese-Primer pepsi-5 und pepsi-6 (s. Tab. 3.1) amplifiziert und in den *EcoRI*-/*Bam*HI-geschnittenen Transkriptionsvektor pSPT19 ligiert. Wegen einer internen *EcoRI*-Schnittstelle wurde bei der Amplifikation des *pps*-Gens eine *MunI*-Schnittstelle generiert. *MunI* und *EcoRI* erzeugen kompatible Enden, so daß eine Ligation möglich war, die Schnittstellen allerdings verloren gingen.

Nach Linearisierung des Vektorkonstruktes (Abb. 3.12) mit *NcoI* wurde durch *in vitro* Transkription mit Hilfe der T7 RNA-Polymerase unter gleichzeitigem Einbau von DIG-UTP eine *pps*-spezifische antisense-mRNA synthetisiert.

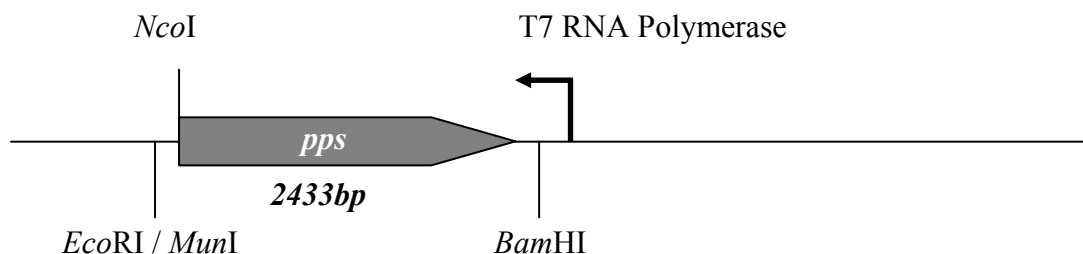


Abb. 3.12: pSPT19-Vektorkonstrukt zur Generierung einer *pps*-spezifischen DIG-markierten antisense-mRNA durch *in vitro* Transkription.

Die komplette Nukleotidsequenz des *pps*-Gens (2433 bp) wurde in die multiple Klonierungsstelle (MCS) des Vektors pSPT19 ligiert. Bindungsstelle und Transkriptionsrichtung der T7 RNA Polymerase sind durch einen Pfeil dargestellt.

Die *pps*-spezifische antisense-mRNA-Sonde wurde über Nacht bei 68°C gegen Gesamt-RNA aus autotrophen *T. tenax*-Zellen der frühstationären Wachstumsphase hybridisiert, und RNA-RNA-Hybride anschließend immunologisch nachgewiesen. Entsprechend der Länge des *pps*-Gens (2433 bp) konnte ein starkes Hybridisierungssignal bei 2,5 kb detektiert werden (Abb. 3.13). Dieses Ergebnis spricht dafür, daß es sich bei dem *pps*-Transkript um eine

monocistronische mRNA handelt, so daß eine Organisation des *pps*-Gens in einem Operon ausgeschlossen werden kann.

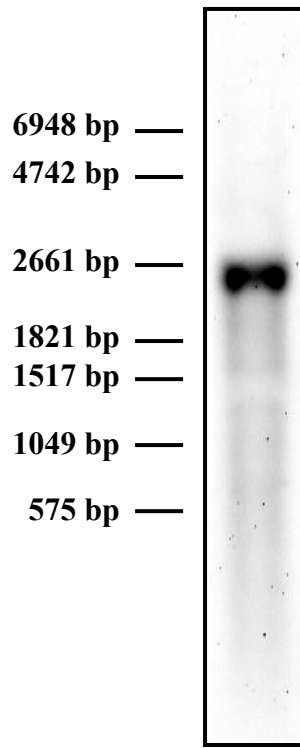


Abb. 3.13: Northern Blot-Analyse zum Nachweis des *pps*-Transkripts in *T. tenax*.

Die Hybridisierung der *pps*-spezifischen Sonde mit 5 µg Gesamt-RNA aus autotrophen Zellen (frühstationäre Wachstumsphase) erfolgte über Nacht bei 68°C. Die Größe des Transkripts wurde mit Hilfe eines RNA-Längenstandards (linke Seite) bestimmt.

Der Einfluß von Anzuchtbedingungen und Wachstumsphase auf die *pps*-Transkriptmenge wurde untersucht, indem *T. tenax*-Zellen aus verschiedenen Wachstumsphasen von autotrophen und heterotrophen Kulturen für Northern Blot-Analysen verwendet wurden. Dazu wurden aus einer laufenden 100 l-Fermentation Proben von je 30 l entnommen, und zwar aus der logarithmischen (I; $1-3,5 \times 10^7$ Zellen/ml), der spätlogarithmischen (II; $3,5-6 \times 10^7$ Zellen/ml) und der frühstationären Wachstumsphase (III; $0,5-1 \times 10^8$ Zellen/ml), und die geernteten Zellen zur Präparation von Gesamt-RNA verwendet. Die Gesamt-RNA wurde elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nylonmembranen immobilisiert und mit der *pps*-spezifischen antisense-mRNA-Sonde hybridisiert (Abb. 3.14).

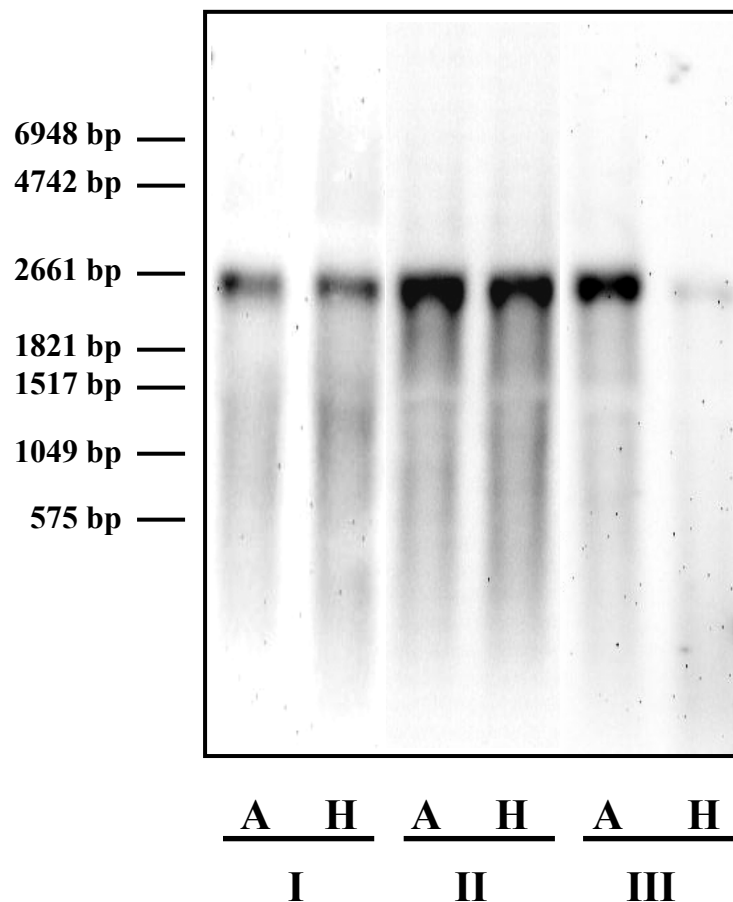


Abb. 3.14: Northern Blot-Analysen: Abhängigkeit der *pps*-Transkriptmenge von der Wachstumsphase und der angebotenen Kohlenstoffquelle.

Die Hybridisierung der *pps*-spezifischen Sonde mit je 5 µg Gesamt-RNA aus autotrophen (A) bzw. heterotrophen (H) Zellen unterschiedlicher Wachstumsphasen (logarithmisch (I), spätlogarithmisch (II), frühstationär (III)) erfolgte über Nacht bei 68°C. Die Größe der Transkripte wurde mit Hilfe eines RNA-Längenstandards (linke Seite) bestimmt.

Das Ergebnis dieser Northern Blot-Analysen war äußerst überraschend: Wie in Abbildung 3.14 erkennbar, sind in der logarithmischen (I) und spätlogarithmischen (II) Wachstumsphase keinerlei Unterschiede bezüglich der mRNA-Kopienzahl des *pps*-Gens in autotroph bzw. heterotroph kultivierten *T. tenax*-Zellen erkennbar, während in der frühstationären Wachstumsphase (III) eine deutliche Dominanz der *pps*-Transkripte in autotrophen Zellen festzustellen war.

Dieses Ergebnis konnte durch Slot-Blot Analysen bestätigt werden. Dafür wurden unterschiedliche Mengen Gesamt-RNA (0,625 - 10 µg) aus autotroph bzw. heterotroph gezogenen *T. tenax*-Zellen der frühstationären Wachstumsphase ohne vorherige elektrophoretische Auftrennung direkt auf Nylonmembranen transferiert und anschließend mit der *pps*-spezifischen antisense-mRNA-Sonde hybridisiert (Abb. 3.15).

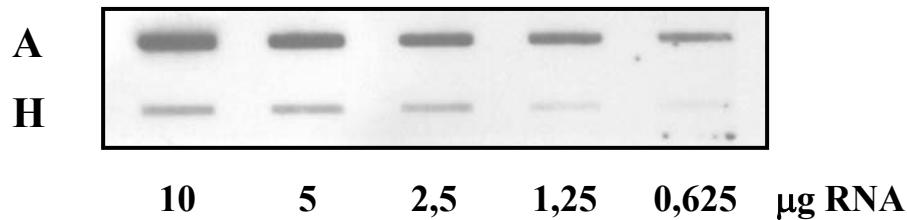


Abb. 3.15: Northern Blot-Analyse (Slot-Blot) zum Nachweis des *pps*-Transkripts in *T. tenax*. Die Hybridisierung der *pps*-spezifischen Sonde mit Gesamt-RNA (0,625-10 µg) aus autotrophen (A) bzw. heterotrophen (H) Zellen der frühstationären Wachstumsphase erfolgte über Nacht bei 68°C.

Die densitometrische Analyse der Hybridisierungssignale ergab, daß unter autotrophen Wachstumsbedingungen in Zellen der frühstationären Wachstumsphase eine mindestens 7-fach höhere *pps*-Transkriptmenge vorliegt als unter heterotrophen Bedingungen.

3.1.6 Regulation der Transkription des *pps*-Gens: Identifizierung einer putativen Cra-Bindungsstelle

Um nähere Einblicke in die Regulationsmechanismen zu erhalten, die für das unterschiedliche Expressionsmuster der PEPS in der frühstationären Wachstumsphase verantwortlich sind, wurde der Sequenzabschnitt stromaufwärts des *pps*-Gens auf putative Bindungsstellen für regulatorische Transkriptionsfaktoren untersucht. Dabei konnte ein Bereich mit großer Ähnlichkeit zur Cra-Bindungsstelle der Enterobakterien identifiziert werden (Position 563 → 576, Abb. 3.16 A). Das Cra-Protein (catabolite repressor-activator; früher: FruR), ein globaler Transkriptionsregulator, gehört zur GalR-LacI-Familie der Regulatorproteine und kontrolliert die Expression verschiedener Stoffwechselwege des Kohlenhydratmetabolismus [Übersicht in: SAIER & RAMSEIER, 1996; RAMSEIER, 1996]. Auf der Basis von 11 eindeutig identifizierten Cra-Operatoren konnte eine Konsensus-Sequenz (s. Abb. 3.16 B) für die Bindung von Cra abgeleitet werden [RAMSEIER et al., 1995]. Dabei bindet das Cra-Protein bei einer Hemmung der Transkription stromabwärts oder überlappend mit dem Promotor, während bei Aktivierung der Transkription eine Bindung stromaufwärts vom Promotor erfolgt.

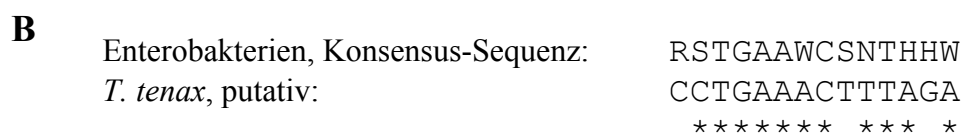
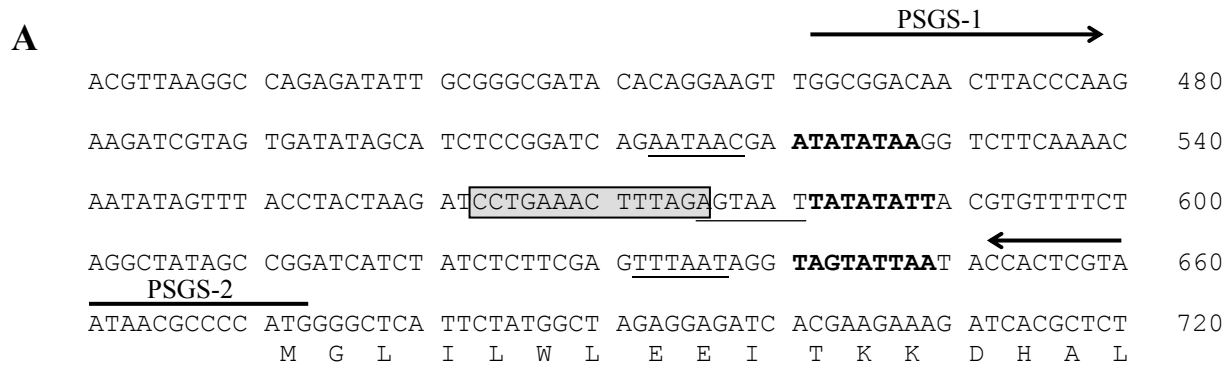


Abb. 3.16: Putative Cra-Bindungsstelle im upstream-Bereich des *pps*-Gens von *T. tenax*.

A) Die putative Cra-Bindungsstelle ist grau hinterlegt. Die Primer PSGS-1 und PSGS-2 zur PCR-Amplifikation des upstream-Bereiches sind als Pfeile dargestellt. Die putativen Promotorstrukturen BRE-site und TATA-Box sind unterstrichen bzw. durch Fettdruck hervorgehoben. Der für die PEPS codierende Bereich beginnt bei Position 671, die korrespondierende Aminosäuresequenz ist unter der Nukleinsäuresequenz dargestellt. Die Nummerierung der Basenabfolge bezieht sich auf die Sequenz des genomischen Klon pPEP4kb-4 in Abbildung 3.3.

B) Alignment der Konsensus-Sequenz der Cra-Bindungsstelle in Enterobakterien und der putativen Cra-Bindungsstelle im Promotorbereich des *pps*-Gens von *T. tenax*. Übereinstimmende Basen sind durch Sternchen (*) dargestellt.

Gelretardationsexperimente sollten erste Hinweise liefern, ob eine spezifische Interaktion zwischen der putativen Cra-Bindungsstelle (s.o.) und Protein aus *T. tenax* stattfindet. Die Methode basiert auf der Beobachtung, daß Komplexe aus Protein und DNA in einer nicht-denaturierenden Gelelektrophorese langsamer wandern als Protein-freie DNA-Moleküle.

Mit der Primer-Kombination PSGS1 (5'-GGCGGACA ACTTACCCA A-3'; Position 462 → 479 in Abb. 3.16) und PSGS2 (5'-CATGGGGCGTTATTACGAGTGG-3'; Position 673 → 652 in Abb. 3.16) und *T. tenax* DNA als Template wurde zunächst ein 212 bp großes PCR-Produkt amplifiziert, das die putative Cra-Bindungsstelle beinhaltet (PCR-Bedingungen: 3 min 95°C; 30 Zyklen mit 30 sec 95°C / 30 sec 53°C / 1 min 72°C; 10 min 72°C). Das PCR-Produkt wurde anschließend am 3'-Ende mit Digoxigenin markiert.

Beim Gelretardationsexperiment wurde *T. tenax* Rohextrakt (5 µg Protein) in Gegenwart der DIG-markierten DNA-Sonde (35 ng) bei RT bzw. 37°C für 15 min inkubiert und anschließend über ein natives Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Um die Entstehung unspezifischer Protein-DNA-Komplexe zu verhindern, enthielten die Reaktionsansätze generell 2 µg Lachssperm-DNA. Nach der Elektrophorese wurde das Gel auf eine positiv geladene Nylonmembran geblottet und die DIG-markierte DNA in einer immunologischen Reaktion nachgewiesen (s. 2.5.14).

Unabhängig von der Inkubationstemperatur konnte mit *T. tenax* Rohextrakt ein retardierter Protein-DNA-Komplex beobachtet werden, der in der Kontrolle ohne Protein nicht auftrat (Abb. 3.17, Spuren 1-3). Parallel dazu wurden Experimente mit *E. coli* Rohextrakten durchgeführt: Zum einen wurde ein *E. coli* Wildtyp-Stamm (*E. coli* K-12 LJ100; Spur 4) verwendet, zum anderen eine *fruR*⁻-Mutante (*E. coli* K-12 GGL102; Spur 5), bei der im Gegensatz zum Wildtyp keine Cra-Expression stattfindet. In beiden Fällen wurde keine Gelretardation der verwendeten DNA-Sonde hervorgerufen. Auch mit dem Rohextrakt des *E. coli*-Klons DH5α pP1, der aufgrund des Plasmids pP1 erhöhte Mengen an Cra produziert, konnte keine retardierte Bande beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Das *E. coli*-eigene Cra-Protein scheint demnach nicht an den upstream-Bereich des *pps*-Gens von *T. tenax* zu binden.

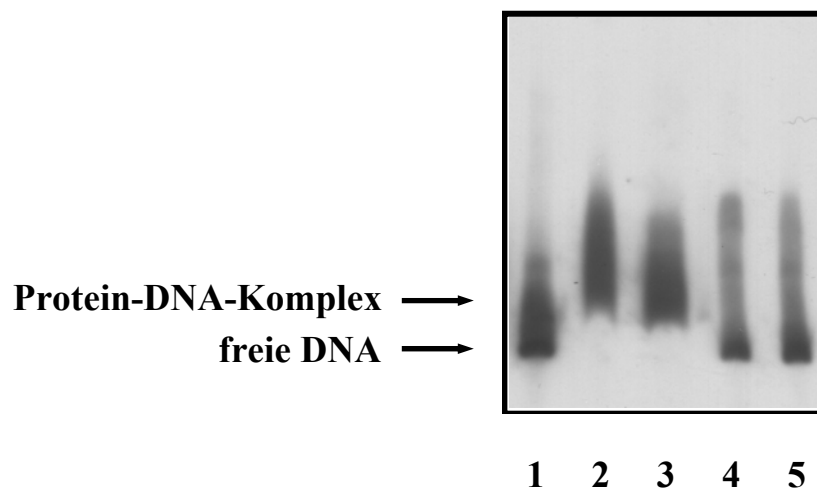


Abb. 3.17: Gelretardationsexperiment mit dem upstream-Bereich des *pps*-Gens und zellfreien Extrakten von *T. tenax* und *E. coli*.

Spur 1: Kontrolle ohne Protein; Spur 2: Inkubation mit *T. tenax* Rohextrakt, RT; Spur 3: Inkubation mit *T. tenax* Rohextrakt, 37°C; Spur 4: Inkubation mit *E. coli* WT Rohextrakt, 37°C; Spur 5: Inkubation mit *E. coli fruR*⁻ Rohextrakt, 37°C; genaue Versuchsbedingungen siehe Text.

Die Tatsache, daß mit *T. tenax* Rohextrakt, nicht aber mit *E. coli* Extrakten ein retardierter Protein-DNA-Komplex beobachtet werden kann, läßt eine spezifische Interaktion zwischen *T. tenax* Protein und dem untersuchten upstream Bereich des *pps*-Gens vermuten. Ob der putativen Cra-Bindungsstelle in diesem DNA-Abschnitt tatsächlich eine funktionelle Bedeutung zukommt oder ob die Retardation auf die Bindung von basalen Transkriptionsfaktoren (TATA-Box binding protein (TBP), Transkriptionsfaktor B (TFB)) zurückzuführen ist, muß in weiterführenden Experimenten, z. B. durch DNaseI *in vitro*-footprinting Analysen, untersucht werden.

3.2 Die Pyruvat, Phosphat Dikinase (PPDK) von *T. tenax*

Zu Beginn dieser Arbeit existierten noch keinerlei Informationen bezüglich archaealer PPDKs. Alle bis dahin identifizierten und charakterisierten Enzyme waren eucaryalen oder bacterialen Ursprungs. Umso überraschender war die offensichtliche Existenz eines *ppdk*-Genhomologen im *T. tenax*-Genom: Im Zuge des Genomsequenzierungsprojekts (s. 2.5.11) wurde mit Hilfe der in dieser Arbeit konstruierten Genbank eine ca. 950 bp lange Nukleotid-Sequenz identifiziert (Abb. 3.19, Position 2518 → 3459), deren abgeleitete Aminosäure-Sequenz nach BLAST-Datenbankvergleichen eine große Ähnlichkeit zum C-Terminus eucaryaler und bacterialer PPDKs aufwies.

Für den Nachweis der Funktionalität des entsprechenden Genproduktes war es zunächst erforderlich, die komplette genetische Information der PPDK im *T. tenax*-Genom zu identifizieren. Die anschließende heterologe Expression des *ppdk*-Gens in *E. coli* sollte die Voraussetzung für eingehende kinetische Untersuchungen des Enzyms sein und außerdem einen Vergleich der katalytischen und regulativen Fähigkeiten von PPDK und PEPS erlauben.

3.2.1 Klonierung und Sequenzierung des *ppdk*-Gens von *T. tenax*

3.2.1.1 Hybridisierung einer *ppdk*-spezifischen Sonde mit genomischer DNA aus *T. tenax*

Durch PCR-Amplifikation der aus dem Genomprojekt bekannten Teilsequenz des *ppdk*-Gens (s.o.) sollte eine spezifische Sonde für Southern-Hybridisierungen generiert werden.

Zu diesem Zweck wurden die Primer *ppdk*-for19 und *ppdk*-rev19 (s. Tab. 3.5) von der 950 bp-Teilsequenz abgeleitet und in einer PCR mit genomischer *T. tenax*-DNA als Template verwendet. Die Primer wurden gleichzeitig für die Klonierung in den Vektor pSPT19 (s. 3.2.3)

verwendet, deshalb erfolgte bei *ppdk-for19* der zusätzliche Einbau einer *EcoRI*-Schnittstelle; *ppdk-rev19* enthält eine endogene Erkennungssequenz für *Bam*HI.

Unter den gewählten PCR-Bedingungen (2 min 94°C; 30 Zyklen 1 min 94°C/ 1 min 54°C/ 1 min 72°C; anschließend 10 min 72°C) konnte ein DNA-Fragment der erwarteten Länge von 575 bp amplifiziert werden. Dieses wurde mit Digoxigenin markiert und als Sonde zur Hybridisierung restringierter genomischer *T. tenax*-DNA eingesetzt.

Ein 8 kb-großes *Xba*I-Fragment gab nach Hybridisierung über Nacht bei 68°C und anschließendem stringenten Waschen (0,1 x SSC, 0,1% SDS, 68°C) ein starkes Signal und wurde für die Klonierung ausgewählt.

3.2.1.2 Klonierung und Sequenzierung eines 8 kb *Xba*I-Fragments

Genomische *T. tenax*-DNA wurde mit *Xba*I verdaut, gelelektrophoretisch aufgetrennt und DNA-Fragmente im Bereich von 7-9 kb ausgeschnitten. Anschließend wurden die gereinigten Fragmente in den Vektor pBluescript KS+ ligiert.

Nach Transformation kompetenter *E. coli* DH5 α -Zellen wurden rekombinante Klone über Blau-Weiß-Differenzierung identifiziert und anschließend in einer Boiling-PCR mit den Primern *ppdk-for19* und *ppdk-rev19* auf Anwesenheit der *ppdk*-Sequenz getestet. Dabei wurde ein positiver Klon (pPPDK-8) mit einem 8 kb-Insert identifiziert, dessen anschließende partielle Sequenzierung zeigte, daß der komplette codierende Bereich des *ppdk*-Gens in dem genomischen Fragment enthalten war (Abb. 3.18). Sämtliche zur Sequenzierung verwendeten Primer sind in Tab. 3.5 aufgeführt.

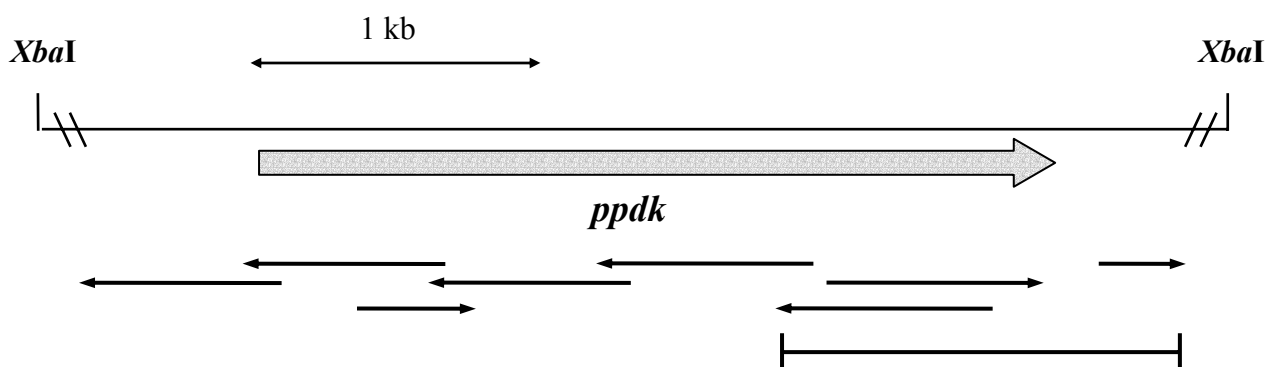


Abb. 3.18: Schematische Darstellung und Sequenzierungsstrategie des 8 kb *Xba*I-Fragments des Klons pPPDK-8.

Das für die *T. tenax* PPDK codierende Gen und dessen Orientierung wird durch den Blockpfeil verdeutlicht. Dünne Pfeile geben den Bereich und die Leserichtung der einzelnen Sequenzierungen an. Ebenfalls dargestellt ist der Sequenzbereich, der aus dem *T. tenax*-Genomprojekt bekannt war (Balken).

Tab. 3.5: Primer, die zur Sequenzierung des Klons pPPDK-8 verwendet wurden.
Die Positionsangaben beziehen sich auf die Nummerierung (rechte Seite) in Abb. 3.19.

Primer	Länge	Sequenz	Position
ppdk-1	18 bp	5'-AAGATCGCCTTGAAATCC-3'	2624 → 2607
ppdk-2	18 bp	5'-ATGAAGCCTCGGCCCTCG-3'	3802 → 3819
ppdk-3	17 bp	5'-AGTCCTTTGGCGATGGG-3'	1994 → 1978
ppdk-6	20 bp	5'-TTCAACTGCCTCCTTTAGGC-3'	1356 → 1337
ppdk-8	17 bp	5'-AAGCTGGCGCCCTTGCC-3'	791 → 775
ppdk-for19	20 bp	5'-CCGCTCCACGAATTCCTGCC-3'	2671 → 2690
ppdk-rev19	21 bp	5'-CCCTCTGGATCCAACGTCTCG-3'	3245 → 3225

3.2.1.3 Sequenz des *ppdk*-Gens und flankierender Bereiche

Das für die PPDK aus *T. tenax* codierende Gen umfaßt 2748 bp (Abb. 3.19, Position 712 → 3459) mit einem GC-Gehalt von 52,6%. Die korrespondierende Primärsequenz von 915 Aminosäuren zeigt wie die *T. tenax* PEPS eine große Ähnlichkeit zur Familie der PEP-utilizing enzymes und enthält ebenfalls die in dieser Protein-Familie konservierten Sequenz-Motive PS00370 und PS00742 (PROSITE Datenbankeinträge).

Der Translationsstart der PPDK wurde indirekt durch Sequenzvergleich mit homologen bacterialen und eucaryalen Proteinen festgelegt, wobei die Sequenzähnlichkeit ab dem Valin-Rest an Position 6 (Position 727-729 in der Nukleotidsequenz, Abb. 3.19) und der Beginn des offenen Leserahmens 24 bp stromaufwärts nur das Methionin-Codon an Position 712-714 als Kandidaten für den Translationsstart zulassen.

Der Sequenzbereich 22-35 bp stromaufwärts des *ppdk*-Gens zeigt eine signifikante Ähnlichkeit zu den Promotorelementen BRE-site (crenarchaeale Konsensus-Sequenz RNWAAW, unterstrichen) und TATA-Box (crenarchaeale Konsensus-Sequenz YTTTTAAA, fettgedruckt) [SOPPA, 1999].

	CCCCCGGCA	TCTTAGGGCG	TGGACGCAAC	CTCCAATAGG	CTCCTCTTTG	AGCGCGGCTA	60
	CATAGACTAC	GTCCAGTGGC	GGTGGCCGAC	GTAGCGCTGT	GGAGGAACGT	CCCCGCGATA	120
	CATCGTCGAG	GCTGCGTTTA	AGCCTAGGGA	GGGCTTCGAC	TTCATGTGCA	GCAAGTTAAA	180
	AGAGGCGGGA	GTTTTCATGA	TAGCGCTCTC	GGCCGGAGTG	AGCTACGCTA	GACGGCTCTC	240
	CTTCTGTTTT	GGACGAATTT	CTTGTGAATG	ATGTGATATA	CAATGGGGAG	TCTGTGTGCG	300
	ACATCAATGT	GTTTGTCAAC	AACAGCAACA	AGGCCCAACT	TGCGTCGGAG	ATACTGTCAA	360
	AACATGGAGT	CCCGTTGGAC	GAAACAGTCG	CGGTGGGTGA	CAGCGAAACG	GATATACCTC	420
	TATTGGAGGA	GGCCGGATTG	TCCATTGCCT	TCAATCCCAC	CAGCAGGCGC	GTTGAAGAAG	480
	CCGCCGATGT	TGTAATAAGG	TCTAACAAGC	TTTATCTTCT	TACCAAATAC	CTATTGGCTA	540
	TACTCAAAAG	CAGATAGATC	AATTAATTCT	TAATTATCTA	TTATTATAAA	TAACCTTAAA	600
	TATTATCTGA	AATAAATTTT	ATTTACTTTA	ATAATATCAT	TTGTATTAAT	AGATTCTTAT	660
1					*	M P K	
	TTTAAAAAAC	TTAAACAATA	ATCTTTTTAT	TTTATGCTAT	AATTAGATTA	TATGCCTAAA	720
4	K Y V	F D F D	E A D	Y R N	K R L F	G G K	
	AAGTACGTCT	TCGATTTCGA	TGAAGCCGAC	TATCGAAATA	AGAGGCTCTT	CGGCGGCAAG	780
24	G A S	L V Q M	A Q L	G L R	V P P G	F I I	
	GGCGCCAGCT	TGGTACAGAT	GGCGCAACTG	GGCCTCAGAG	TGCCGCCGGG	CTTTATAATA	840
44	T T E	A C K D	F F G	P K R	E E I A	E L E	
	ACAACGAGG	CGTGTAAAGA	CTTCTTCGGG	CCCAAGAGGG	AGGAGATAGC	GGAGCTCGAG	900
64	A Q L	A R Q P	P P D	V R D	A L I T	K L F	
	GCACAATTAG	CCAGACAGCC	GCCGCCGGAT	GTCAGAGATG	CGCTTATCAC	AAAGTTGTTC	960
84	S I I	D S L D	L P Q	G L W	E E V V	E H M	
	TCAATAATAG	ATAGCTTAGA	TCTGCCACAG	GGACTGTGGG	AGGAGGTCGT	GGAGCATATG	1020
104	K R L	E D R T	G R R	F G D	P K N P	L L V	
	AAGAGGCTAG	AGGACAGAAC	AGGCCGTAGA	TTCGGCGATC	CGAAGAATCC	CTTGTGTTGG	1080
124	S V R	S G A A	V S M	P G M	M D T V	L N L	
	TCCGTGAGAT	CCGGCGCGGC	TGTGTCGATG	CCTGGCATGA	TGGACACAGT	GCTCAACCTC	1140
144	G L N	D E T V	K G L	A E Q	T N N E	W F A	
	GGCCTAAACG	ATGAGACCGT	TAAAGGCCTC	GCCGAACAGA	CCAACAACGA	GTGGTTCGCC	1200
164	Y D A	Y R R F	I N M	F G R	I V L N	I D D	
	TACGATGCAT	ATAGACGCTT	TATTAATATG	TTCGGAAGAA	TTGTATTAAA	TATAGATGAT	1260
184	K L F	S K A W	D D I	K R K	Y G V K	E D P	
	AAACTATTCT	CAAAAGCATG	GGATGATATT	AAGAGGAAAT	ATGGCGTAAA	GGAGGATCCG	1320
204	Q M P	I E G L	K E A	V E I	F K K I	V A E	
	CAGATGCCGA	TCGAGGGCCT	AAAGGAGGCA	GTTGAAATAT	TTAAGAAGAT	AGTGGCAGAG	1380
224	S R G	A F P Q	D P W	E Q L	K L A I	K A V	
	AGCCGCGGAG	CCTTCCCGCA	AGACCCTTGG	GAGCAGTTGA	AGTTGGCCAT	AAAGCTGTG	1440
244	F R S	W D S P	R A I	F Y R	I A E K	I T S	
	TTTCGATCTT	GGGATAGCCC	AAGGGCTATC	TTCTATAGAA	TCGCCGAAAA	GATAACAAGC	1500
264	D I A	D C T A	V N V	V T M	V F G N	M G W	
	GATATCGCCG	ACTGCACCGC	TGTGAATGTA	GTCACTATGG	TGTTCCGCAA	CATGGGCTGG	1560
284	D S G	T G V V	F S R	D V A	T G E N	R L Y	
	GACAGCGGAA	CAGGCGTCGT	CTTCTCGAGG	GACGTGGCCA	CTGGAGAGAA	CAGGCTATAT	1620
304	G E F	L P V A	Q G E	D V V	A G I R	T P M	
	GGAGAGTTTC	TCCCTGTGGC	TCAGGGAGAG	GACGTTGTGG	CAGGGATAAG	GACCCCCATG	1680
324	D I D	E F K K	R F P	H L Y	E E L Y	N G V	
	GATATAGACG	AATTCAAGAA	GAGGTTTCCA	CATTTATATG	AAGAGTTATA	TAATGGTGTT	1740
344	K L L	E K V N	K D V	Q D V	E F T V	E R G	
	AAGTTATTAG	AAAAAGTAAA	TAAAGATGTA	CAAGACGTAG	AGTTCACTGT	AGAGCGCGGG	1800
364	R L Y	F L Q C	R N A	K M T	P M A R	V K T	
	AGACTCTACT	TCCTGCAGTG	TCGCAACGCC	AAAATGACTC	CCATGGCGAG	GGTCAAGACG	1860
384	A V D	M A K E	G I I	T K D	E A L M	K V S	
	GCCGTTGATA	TGGCCAAAGA	GGGCATAATA	ACTAAGGATG	AGGCTCTGAT	GAAGTCTCT	1920
404	P E H	V L Q L	L Y P	R I D	P K A N	A R P	
	CCAGAGCATG	TCCTCCAGCT	CCTTTATCCG	CGCATCGATC	CTAAGGCAAA	CGCGAGGCCC	1980
424	I A K	G L P A	S P G	A V S	G Q L V	F N P	
	ATCGCCAAAG	GACTGCCCGC	GAGCCCTGGC	GCCGTCTCGG	GGCAATTAGT	GTTCAATCCG	2040
444	D D A	V K W A	R D G	K K V	V L A R	V E T	
	GACGATGCCG	TAAAGTGGGC	CCGCGATGGA	AAAAAGGTTG	TGCTCGCCAG	AGTTGAGACA	2100
464	K P D	D V H G	F Y A	A V G	I L T T	R G G	
	AAGCCCGACG	ACGTCCACGG	CTTTTACGCG	GCCGTGGGCA	TTTTGACCAC	AAGAGGGGGT	2160
484	<u>M T S</u>	<u>H A A V</u>	<u>V A R</u>	A I G	K P A V	V G A	
	ATGACCTCAC	ACGCGGCTGT	TGTCGCTAGA	GCTATAGGCA	AACCTGCCGT	TGTCGGAGCG	2220

504	E D A V V D E Q N K V L R A G G L I L K	
	GAGGACGCTG TTGTGGATGA ACAGAACAAG GTGTTGAGAG CGGGCGGCTT AATATTGAAG	2280
524	E G D W V T I D G N T G L V Y P G V V P	
	GAGGGGGACT GGGTACTAT CGATGGAAAC ACAGGCCTTG TATATCCAGG TGTGGTCCCA	2340
544	T L E P E L I P E L E E L L R W A D E V	
	ACGTTGGAGC CAGAGCTGAT ACCTGAGCTA GAGGAGCTGT TGAGGTGGGC CGACGAAGTG	2400
564	R R L G V R A N A D L P E D A A I A R K	
	AGGAGGCTCG GCGTTAGGGC CAACGCCGAT CTTCCAGAGG ATGCCGCCAT AGCAGAAAAG	2460
584	F G A E G I G L L R I E R M F R K P E R	
	TTCGGCGCAG AGGGATAGG GTTGTGAGG ATAGAGCGGA TGTTTCAGAAA GCCTGAGCGC	2520
604	L D L L R R I I L A E N R E E R I K H L	
	CTCGACCTCC TTCGTCGGAT AATTTTGGCA GAAAATAGAG AGGAGAGAAT AAAACATCTG	2580
624	E Q L Y R M L K E D F K A I F E I M D G	
	GAACAGCTCT ATAGGATGTT AAAGGAGGAT TTCAAGGCGA TCTTCGAAAAT AATGGATGGA	2640
644	L P V V V R L I D P P L H E F L P K P E	
	TTGCCCGTAG TAGTAAGGCT CATAGATCCT CCGCTCCACG AGTTCCTGCC GAAGCCGGAG	2700
664	E V L Q Q I C E G R M S G K D V S S L E	
	GAGGTGCTTC AACAGATATG CGAGGGGAGG ATGTCAGGTA AAGATGTGTC CTCATTGGAG	2760
684	R L Y N R L K A L Q E A N P M L G H R G	
	AGGCTGTACA ATAGATTGAA GGCCCTGCAG GAGGCCAACCT CTATGTTGGG CCATAGAGGT	2820
704	V R V G V S Y P E V Y Y Y L T K A I A E	
	GTGCGCGTGG GGGTGAAGTA CCCCAGGGTC TACTATTATT TGACCAAGGC TATCGCGGAG	2880
724	A A S E L K K E G R N P V V E I M I P Q	
	GCCGCCTCAG AGCTCAAGAA AGAGGGCCCG AACCCGGTCG TAGAGATAAT GATACCTCAG	2940
744	V S D V R E I K Y V K E K G I M P A L R	
	GTGAGCGACG TAAGGGAGAT TAAATATGTA AAGGAAAAGG GAATAATGCC GGCCTGAGG	3000
764	D V E E S S G V K L D I K I G T M I E T	
	GATGTGGAGG AGAGCTCCGG AGTTAAGTTA GATATCAAGA TAGGCACTAT GATAGAGACT	3060
784	V R A A L T V E K I A R E V <u>D F I S F G</u>	
	GTGCGCGCTG CGCTCACCGT AGAGAAAATA GCGCGAGAGG TCGACTTCAT CAGCTTCGGC	3120
804	<u>T N D L T Q A V F S F S R</u> D D A E N K F	
	ACAAACGATC TCACGCAGGC CGTGTTTAGC TTCAGCAGAG ACGACGCAGA GAACAAGTTT	3180
824	I P Q Y L D L K I L D A D P F E T L D P	
	ATACCGCAAT ACCTCGACCT CAAGATACTC GACGCAGATC CTTTCGAGAC GTTGGATCCA	3240
844	E G V A K L V E Q A S R S A K E A N P A	
	GAGGGTGTGG CTAAGCTGGT CGAGCAGGCT TCCAGGTCCG CCAAGGAGGC TAACCCGGCC	3300
864	I E V G V C G E H G G E P K S I S L F S	
	ATTGAGGTTG GGGTCTGCGG CGAACACGGC GGCGAGCCGA AGTCCATATC GCTCTTCAGC	3360
884	R M K I D Y V S A S P F R V P L A R L A	
	AGAATGAAGA TAGATTACGT CAGCGCCTCG CCGTTTAGGG TTCCTCTGGC TAGACTTGCG	3420
904	A A Q A A I A S S K R E *	
	GCCGCTCAAG CGGCTATCGC AAGCTCCAAA CGTGAGTAGT CAGACTGGGA CGGCTCTTTC	3480
	ATTTGATCGG CATATCGGAA TTCATCACTA GAGACAACGC TCATATCTCG CTAAAAGCT	3540
	TAATAAGCTC GTGGGTGTGC AATAACAGCC CCGGGAGATC GTCCCCGAAG GAGCACCCCTT	3600
	AACCCGCCGG GTAGTGCATT CGAGGGGGCT CCGGGGCGGA TGACCCGCCG ACACGCCGCG	3660
	TGGGCCGGCG CGGCTGGTCG GACGGGGGTT GCAGTGGGCT GGACGGGGCGC CGCCTGTCCC	3720
	TCCCTCCGGA GCCCTAGGTC AGGGGGGCC GTAACCTCCG CGGCGCCGGC CGTCGCTCCC	3780
	ACGTGGGCGG TCTGGCGGGC GATGAAGCCT CGGCCCTCGG GGCCTGCCCA GCCGGCGTAC	3840
	CCAAGCCGTA GGGCTTGGCG GCGCCGGCGA AGGCGGCGAA CCAGGGGA	

Abb. 3.19: Teil der Nukleotidsequenz des genomischen Klons pPPDK-8.

Die für die PPDK aus *T. tenax* codierende Nukleotidsequenz erstreckt sich von Position 712 bis 3459 (Nummerierung rechts). Die korrespondierende Aminosäuresequenz (915 AS, Nummerierung links) ist darüber dargestellt. Stopcodons werden durch Sternchen symbolisiert. Die putativen Promotor-Strukturen BRE-site und TATA-Box sind unterstrichen bzw. fettgedruckt. Die unter den PEP-utilizing enzymes konservierten Sequenz-Motive PS00370 (Aminosäureposition 482 → 493) und PS00742 (Aminosäureposition 798 → 816) sind doppelt unterstrichen.

Die gesamte Sequenz wurde bei EMBL unter der Accession-No. AJ515538 hinterlegt.

3.2.2 Heterologe Expression der PPK von *T. tenax* in *E. coli* und biochemische Charakterisierung

3.2.2.1 Inserierung des *ppdk*-Gens in den Expressionsvektor pET24a

Der Versuch, das komplette 2748 bp große *ppdk*-Gen über PCR zu amplifizieren, blieb erfolglos; lediglich kleinere Teilstücke ließen sich amplifizieren. Eine mögliche Erklärung dafür wäre das Auftreten von Sekundärstrukturen innerhalb der Nukleotidsequenz. Jedoch konnte trotz Zugabe von DMSO, einem Reagenz, welches die Strangtrennung erleichtert und dadurch Sekundärstrukturen auflöst [MELCHIOR & VON HIPPEL, 1973], kein PCR-Produkt der entsprechenden Größe amplifiziert werden. Aus diesem Grunde wurde folgende Klonierungsstrategie verfolgt (s. Abb. 3.20):

(A) Aus dem genomischen Klon pPPDK-8 wurde ein 2529 bp großes *NdeI/HindIII*-Fragment herausgeschnitten, wobei die *NdeI*-Schnittstelle an Position 395 des *ppdk*-Gens lokalisiert ist, während *HindIII* 86 bp stromabwärts vom Stopcodon schneidet.

(B) Mit der Primer-Kombination *ppdk*-for *NdeI* (s.u.) / *ppdk*-3 (s. Tab. 3.5) und genomischer *T. tenax*-DNA als Template konnte über PCR-Mutagenese (2 min 94°C; 30 Zyklen mit 45 sec 94°C/ 45 sec 54°C/ 1,5 min 72°C; 7 min 72°C) ein 1294 bp großes Fragment amplifiziert werden, bei dem unmittelbar vor dem Startcodon des *ppdk*-Gens eine *NdeI*-Schnittstelle eingeführt wurde. Der zur PCR-Amplifikation eingesetzte Mutagenese-Primer *ppdk*-for *NdeI* hatte folgende Sequenz (Restriktionsschnittstelle fettgedruckt, Startcodon des *ppdk*-Gens unterstrichen):

T. tenax-DNA: 5' -AATTAGATTATATGCCTAAAAAGTACGTC-3'

Primer *ppdk*-for *NdeI*: 5' -AATTAGAT**CATATG**CCCTAAAAAGTACGTC-3'

NdeI

(C) Das 1294 bp PCR-Produkt wurde mit *NdeI* verdaut, ein 309 bp großes Restriktionsfragment isoliert und (D) mit dem 2539 bp *NdeI/HindIII* Fragment ligiert. (E) Anschließend wurde das komplette Fragment 9 bp hinter die vektoreigene Shine-Dalgarno Sequenz des Expressionsvektors pET24a inseriert.

Nach Transformation kompetenter *E. coli* DH5 α -Zellen mit dem Plasmid-Konstrukt pET24a+PPDK wurde die korrekte Insertion und Nukleotidsequenz des rekombinanten *ppdk*-Gens durch Sequenzierung beider Stränge verifiziert. Anschließend wurde das Plasmid in den *E. coli*-Expressionsstamm BL21-CodonPlus(DE3)-RIL kloniert.

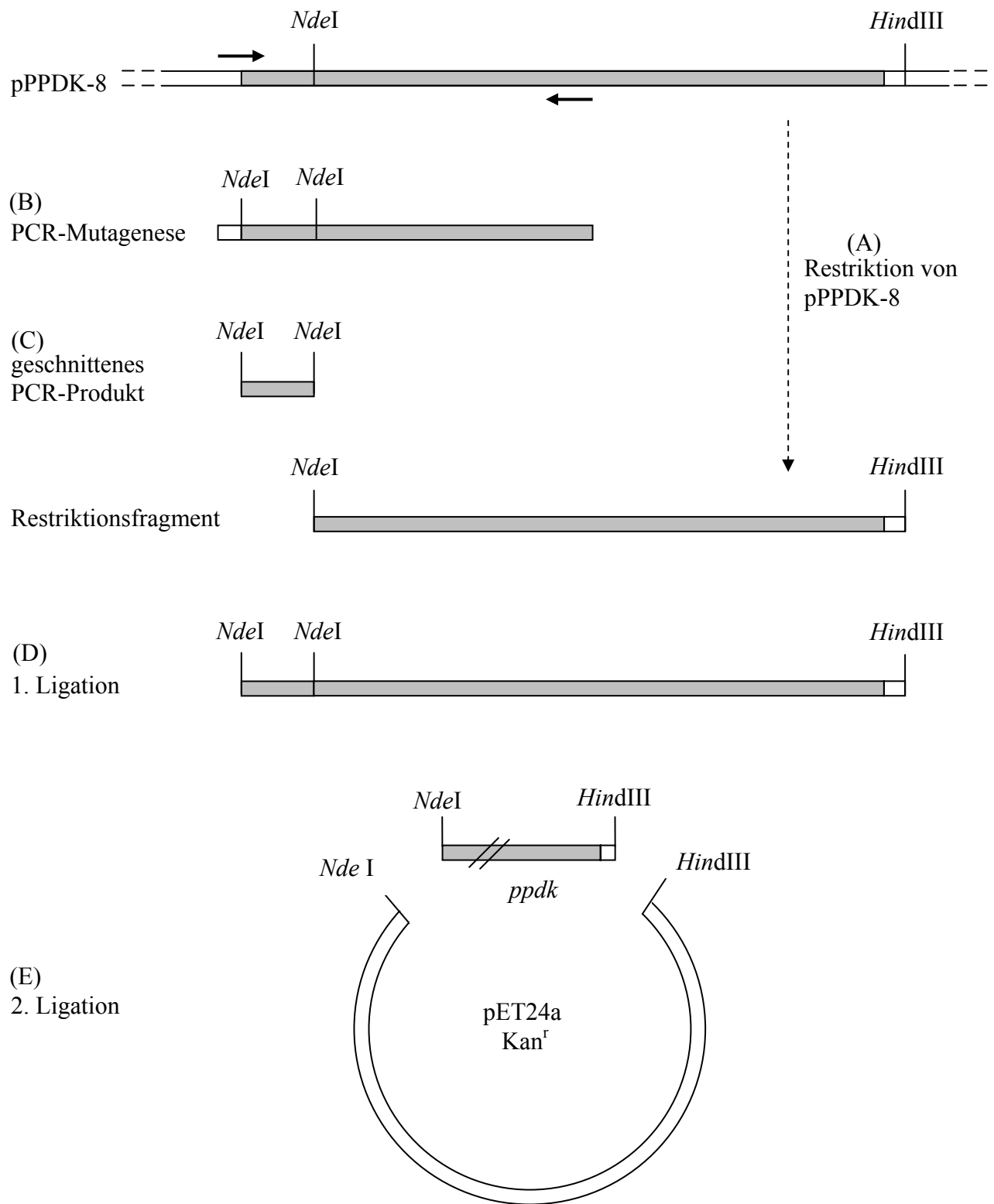


Abb. 3.20: Strategie zur Klonierung des *ppdk*-Gens von *T. tenax*.

Der für die *T. tenax* PPDK codierende Sequenzbereich innerhalb des Klons pPPDK-8 ist als grauer Balken dargestellt. Die kurzen Pfeile symbolisieren die für die PCR-Amplifikation verwendeten Primer *ppdk*-for *Nde* und *ppdk*-3. Einzelheiten s. Text.

3.2.2.2 Reinigung der rekombinanten PPDK

Für die Reinigung der heterolog in *E. coli* exprimierten *T. tenax* PPDK wurden ca. 4 g Zellen (Naßgewicht) des PPDK-Expressionsklons (s. 3.2.2.1) in 100 mM Tris/HCl, pH 7 (70°C), 100 mM β -Mercaptoethanol resuspendiert und mit der French Press aufgeschlossen. Mittels Ultrazentrifugation wurde ein zellfreier Rohextrakt gewonnen, aus dem durch Hitzebehandlung (90°C, 20 min) ca. 85% der *E. coli*-Proteine ausgefällt werden konnten. Durch eine anschließende Ionenaustausch-Chromatographie (Q-Sepharose fast flow) wurde die rekombinante PPDK zur Homogenität gereinigt.

Insgesamt konnten aus 4,2 g *E. coli*-Zellen 2 mg homogene *T. tenax* PPDK mit einer spezifischen Aktivität von 2 U/mg Protein isoliert werden.

Abbildung 3.21 und Tabelle 3.6 dokumentieren den Verlauf der Reinigung.

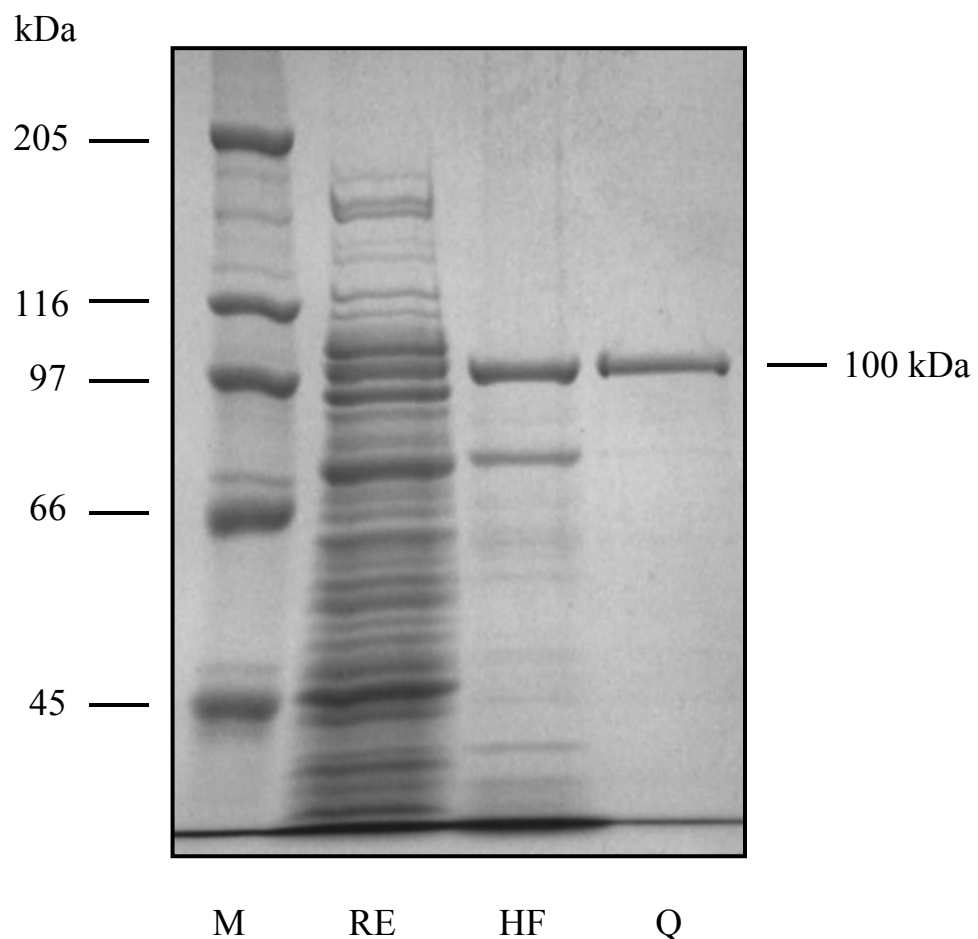


Abb. 3.21: Reinigung der heterolog in *E. coli* exprimierten PPDK von *T. tenax*. SDS-PAGE Elektropherogramm (7,5%); M: Proteinstandard; RE: zellfreier Rohextrakt; HF: hitzegefällter Extrakt; Q: Fraktionen nach Q-Sepharose.

Tab. 3.6: Reinigungsprotokoll der heterolog exprimierten *T. tenax* PPDK, ausgehend von 4,2 g *E. coli*-Zellen. Die Messung der Enzymaktivität im Verlauf der Reinigung erfolgte bei 55°C in Richtung Pyruvat-Synthese (s. 2.7.3.1).

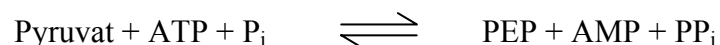
Reinigungsschritt	Protein (mg)	Gesamt-Aktivität (U)	Spezifische Aktivität (U/mg)	Reinigung (x-fach)	Ausbeute (%)
Rohextrakt	210	-	-	-	-
Hitzefällung	31	12	0,385	-	100
Q-Sepharose	2	4	2	5,2	33

3.2.2.3 Quartärstruktur der rekombinanten PPDK

Das Molekulargewicht der nativen PPDK wurde über Gelfiltration (Superose 6) zu 250.000 bestimmt. Die molekulare Masse der Enzymuntereinheiten beträgt nach SDS-PAGE 100 kDa (Abb. 3.21) und stimmt damit mit der theoretischen molekularen Masse von 102,3 kDa gut überein. Diese Daten sprechen dafür, daß die *T. tenax* PPDK unter nativen Bedingungen als homomeres Dimer vorliegt.

3.2.2.4 Katalytische und regulative Eigenschaften der PPDK

Die PPDK aus *T. tenax* katalysiert die reversible Umsetzung von Pyruvat, ATP und P_i zu PEP, AMP und PP_i.



Der Nachweis der PPDK-Aktivität in kataboler Richtung (PEP → Pyruvat) erfolgte in einem kontinuierlichen photometrischen Test bei 55°C, in anaboler Richtung (Pyruvat → PEP) in einem diskontinuierlichen photometrischen Test bei 70°C (s. 2.7.3.1).

Monovalente Kationen (NaCl, KCl, NH₄Cl) hatten in beiden Richtungen keinen Einfluß auf v_{max}.

Katabole Richtung (PEP → Pyruvat):

Aus Substrat-Sättigungskinetiken wurde für PEP ein apparenter K_M von 0,455 mM, für AMP ein K_M < 1 µM abgeleitet (Abb. 3.22). Eine genauere Angabe des K_{M(AMP)} war mit der gewählten Testmethode nicht möglich. In beiden Fällen folgt die PPDK einer klassischen Michaelis-Menten-Kinetik, wobei das Enzym bei PEP-Konzentrationen > 6 mM einer Hemmung unterliegt.

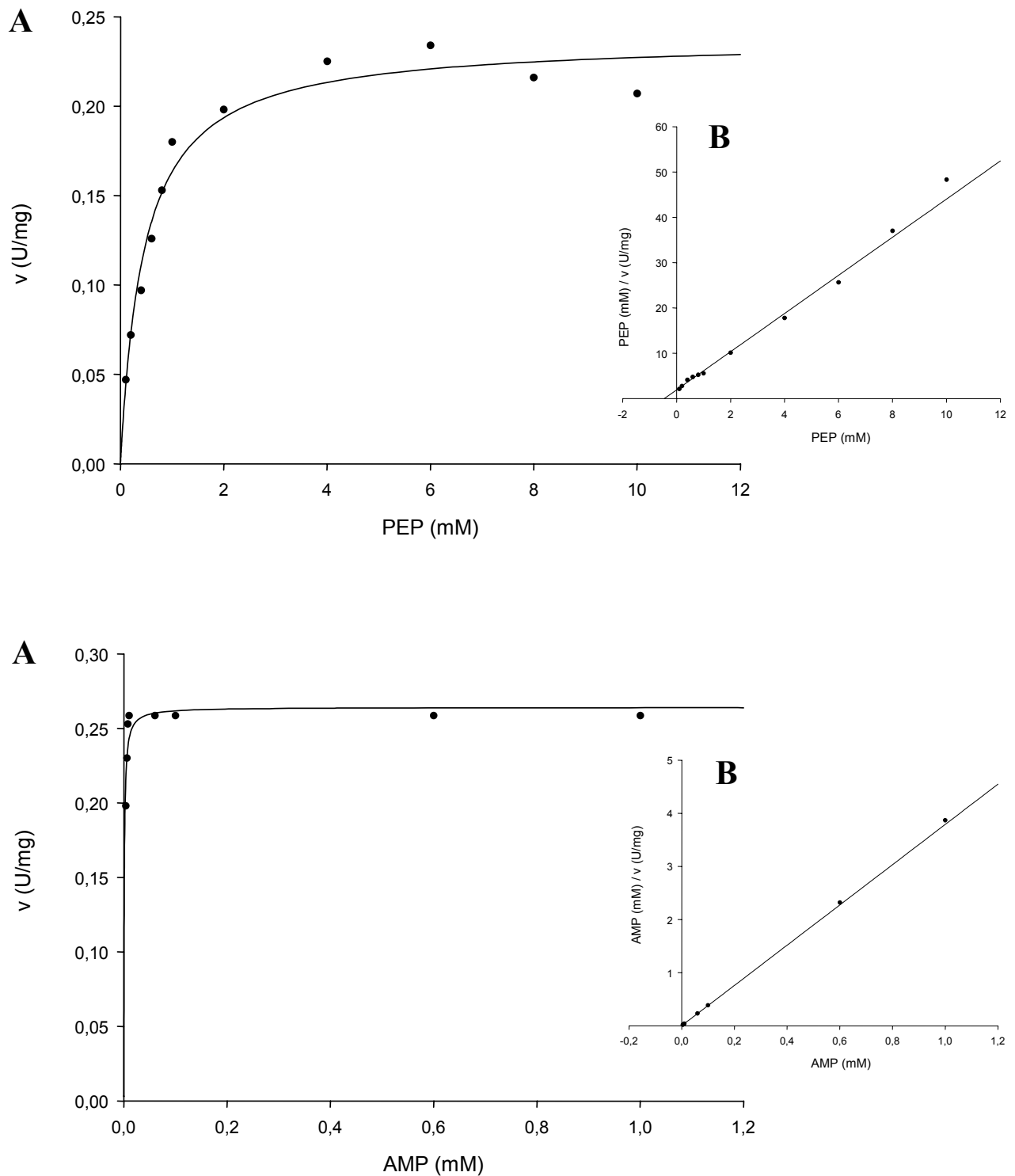


Abb. 3.22: Sättigungskinetiken der *T. tenax* PDK für PEP (oben) und AMP (unten).

Die Enzymaktivitäten wurden im kontinuierlichen Test bei 55°C bestimmt. Die jeweils invariablen Substrate wurden dabei in sättigenden Konzentrationen eingesetzt. A) direkte Auftragung der Daten; B) Transformation der Daten nach HANES [1932].

Die katabole PPDK-Reaktion zeichnet sich durch eine strikte Abhängigkeit von Pyrophosphat aus. Desweiteren kann PP_i nicht durch P_i ersetzt werden. Allerdings bewirkt eine PP_i -Konzentration > 5 mM eine Hemmung der PPDK-Aktivität um ca. 50%. Interessanterweise wird unter Standard-Testbedingungen (3 mM PEP; 5 mM AMP; 0,6 mM PP_i) nur ein geringer Anteil des Substrats (im μ M-Bereich) umgesetzt: Erst nach weiterer Zugabe von PP_i zum Testansatz läuft die Reaktion für kurze Zeit weiter, dann muß erneut PP_i nachgelegt werden. Vermutlich liegen in der Enzym-Präparation Komponenten vor, die PP_i mit hoher Affinität binden, so daß es für die PPDK-Reaktion nicht mehr verfügbar ist. Eine Bestimmung des K_M für Pyrophosphat war unter diesen Bedingungen nicht möglich.

Untersuchungen zur Regulierbarkeit der *T. tenax* PPDK wurden bei halbsättigender Konzentration des Substrats PEP (0,5 mM) durchgeführt. Aufgrund des sehr niedrigen $K_{M(AMP)}$ und der Tatsache, daß PP_i im Testansatz limitierend ist, wurden die Cosubstrate AMP und Pyrophosphat in Konzentrationen von 0,1 mM bzw. 0,6 mM eingesetzt.

Keinen Effekt auf die Umsatzgeschwindigkeit der PPDK zeigten die Substanzen Glucose-6-Phosphat, Fructose-6-Phosphat, Fructose-1,6-bisphosphat, Dihydroxyacetonphosphat, Glycerinaldehyd-3-Phosphat, 3-Phosphoglycerat, 2-Phosphoglycerat, 6-Phosphonogluconat, α -Ketoglutarat und P_i . Im Gegensatz dazu zeigte ATP einen stark inhibierenden Effekt, in geringerem Maße hemmend erwiesen sich auch UDP und Glucose-1-Phosphat (Glc-1-P) (Abb. 3.23).

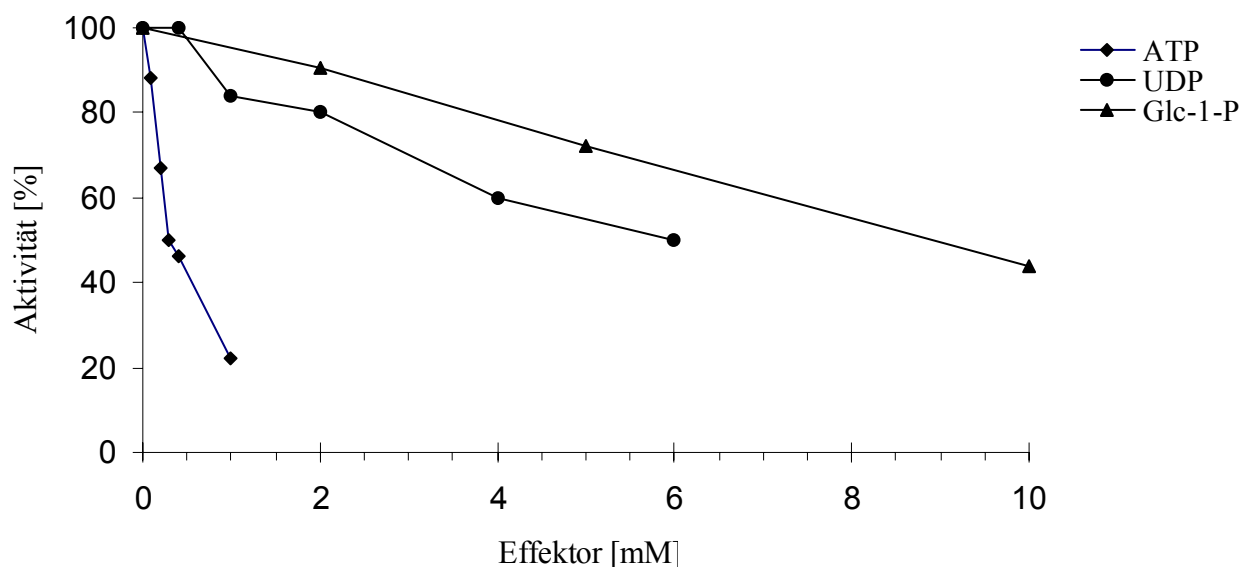


Abb. 3.23: Hemmung der PPDK-Aktivität in kataboler Richtung (PEP \rightarrow Pyruvat).

Die Bestimmung der Enzymaktivitäten erfolgte im kontinuierlichen Test bei 55°C mit 0,5 mM PEP, 0,1 mM AMP, 0,6 mM PP_i .

Überraschenderweise gibt es erste Hinweise dafür, daß die *T. tenax* PPDK in kataboler Richtung möglicherweise ADP als alternatives Substrat verwendet. Eine Verunreinigung der verwendeten ADP-Charge durch AMP konnte dabei durch IC-Analysen weitgehend ausgeschlossen werden (freundlicherweise durchgeführt von P. Moritz, Universität Essen, Arbeitsgruppe Mikrobiologie). Als Cosubstrat ist jedoch auch in diesem Fall PP_i zwingend notwendig, d.h. die PPDK zeigt eindeutig keine PK-Aktivität ($PEP + ADP \rightarrow \text{Pyruvat} + ATP$). Mit P_i anstelle von PP_i ist ebenfalls keine Aktivität nachweisbar.

Welche Produkte aus " $PEP + ADP + PP_i$ " gebildet werden, ist noch unklar und bedarf weiterer Experimente. Sicher ist nur die Synthese von Pyruvat, da dieses im gekoppelten Test über die LDH-Reaktion enzymatisch nachgewiesen wurde.

Anabole Richtung (Pyruvat \rightarrow PEP):

Bei der Analyse des Sättigungsverhaltens mit Pyruvat als variablem Substrat zeigt die PPDK eine klassische Michaelis-Menten-Kinetik mit einem apparenten K_M von 0,76 mM (Abb. 3.24). Abweichungen ergeben sich erst bei hohen Konzentrationen; so unterliegt das Enzym bei Pyruvat-Konzentrationen > 10 mM einer Hemmung.

Demgegenüber ergeben entsprechende Kinetiken für ATP eine positiv kooperative Substratsättigung (Abb. 3.24) mit einem Hill-Koeffizienten $n = 1,5$ und einem apparenten $K_{M(ATP)}$ von 9 mM.

Eine Bestimmung des K_M -Wertes für P_i war nicht möglich: Die Verunreinigung der verwendeten ATP-Chargen mit Orthophosphat erlaubte sogar eine Aktivität der PPDK ohne externe Zugabe von P_i zum Testansatz. P_i -Konzentrationen > 10 mM wirkten sich jedoch hemmend auf die Enzymaktivität aus.

Im Gegensatz zur Reaktion der PPDK in kataboler Richtung scheint die Aktivität des Enzyms in anaboler Richtung nicht durch Intermediate des Energie- und Kohlenhydratstoffwechsels moduliert zu werden: AMP, ADP, UDP, Glucose-1-Phosphat, Glucose-6-Phosphat, Fructose-6-Phosphat, Fructose-1,6-bisphosphat, Dihydroxyacetonphosphat, Glycerinaldehyd-3-Phosphat, 3-Phosphoglycerat, 2-Phosphoglycerat, α -Ketoglutarat und Oxalacetat in Konzentrationen von 1-5 mM zeigten keinen Einfluß auf die Umsatzgeschwindigkeit der PPDK.

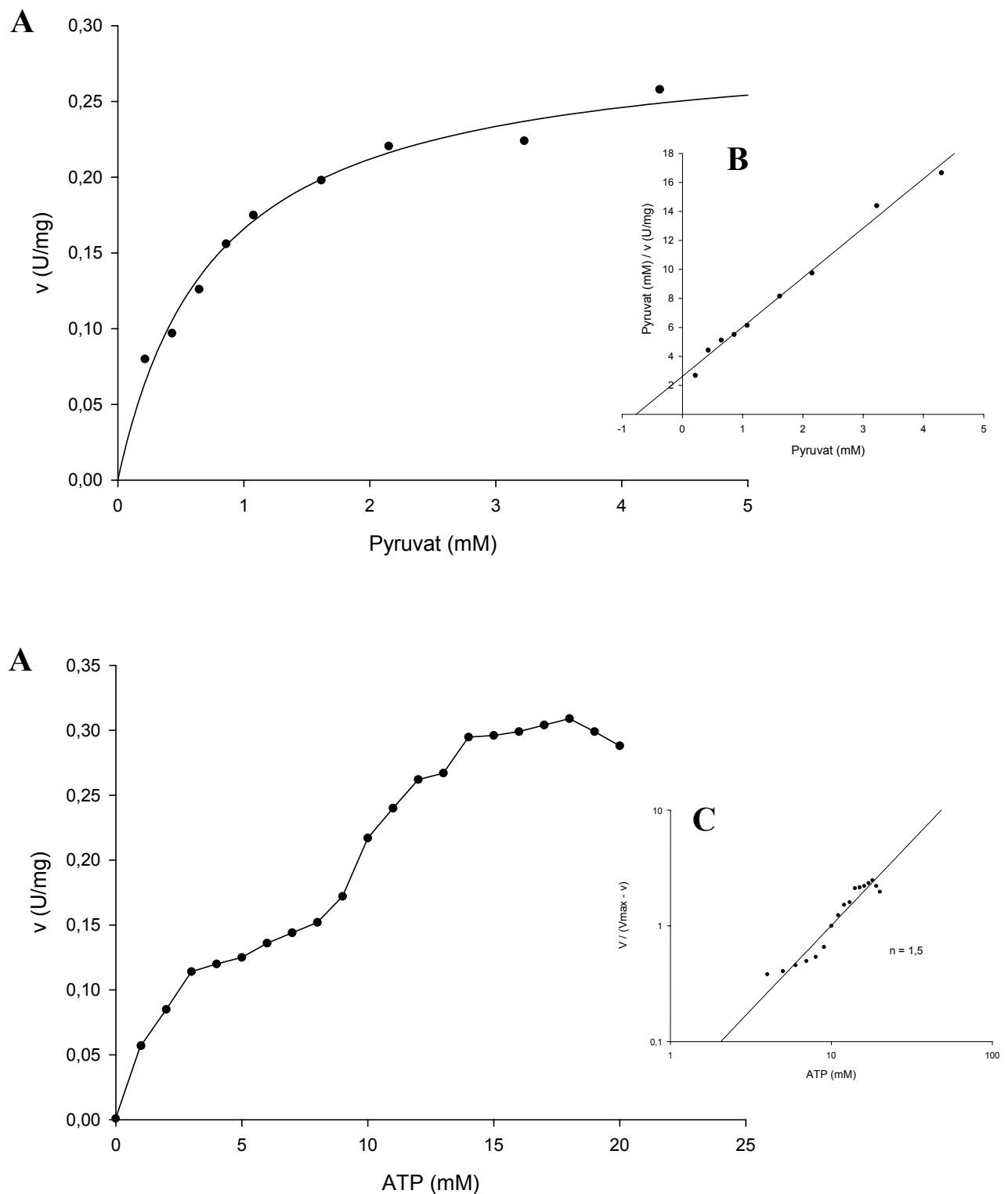


Abb. 3.24: Sättigungskinetiken der *T. tenax* PPDK für Pyruvat (oben) und ATP (unten).

Die Enzymaktivitäten wurden im diskontinuierlichen Test bei 70°C bestimmt. Die jeweils invariablen Substrate wurden dabei in sättigenden Konzentrationen eingesetzt. A) direkte Auftragung der Daten; B) Transformation der Daten nach HANES [1932]; C) Transformation der Daten nach HILL [1925] (Messwerte für ATP \leq 2 mM wurden für diese Darstellung nicht verwendet).

3.2.3 Transkriptanalysen des *ppdk*-Gens von *T. tenax*

Die durch vorangegangene biochemische Untersuchungen gezeigte Regulierbarkeit der PPDK wirft die Frage auf, ob neben dieser Regulation auf Proteinebene auch eine Regulation der PPDK-Aktivität auf Genebene vorliegt. Um zu klären, inwieweit eine Kontrolle der Transkriptmenge durch die Anzuchtbedingungen stattfindet, wurden Northern Blot-Analysen mit autotroph bzw. heterotroph kultivierten *T. tenax*-Zellen durchgeführt.

Die Detektion der *ppdk*-Transkripte erfolgte dabei mit Hilfe einer spezifischen DIG-markierten antisense-mRNA-Sonde. Zur Konstruktion dieser Sonde wurde zunächst mit den Primern *ppdk*-for19 und *ppdk*-rev19 (s. Tab. 3.5; PCR-Bedingungen s. 3.2.1.1) eine 575 bp-Teilsequenz des *ppdk*-Gens amplifiziert und in den *EcoRI*-/*Bam*HI-geschnittenen Transkriptionsvektor pSPT19 ligiert. Das Vektorkonstrukt pSPT19+PPDK (Abb. 3.25) wurde mit *EcoRI* linearisiert, anschließend erfolgte durch *in vitro* Transkription mit der T7 RNA-Polymerase -unter gleichzeitigem Einbau von DIG-UTP- die Synthese der *ppdk*-spezifischen antisense-mRNA.

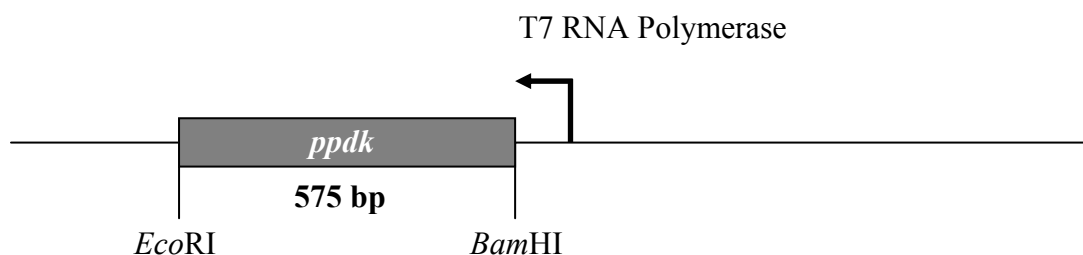


Abb. 3.25: Vektorkonstrukt pSPT19+PPDK zur Generierung einer *ppdk*-spezifischen DIG-markierten antisense-mRNA durch *in vitro* Transkription.

Die in die MCS des Vektors pSPT19 ligierte Teilsequenz des *ppdk*-Gens entspricht Position 2671 → 3245 in Abb. 3.19. Bindungsstelle und Transkriptionsrichtung der T7 RNA Polymerase sind durch einen Pfeil dargestellt.

Wie aus Abbildung 3.26 ersichtlich, konnte ein Hybridisierungssignal bei ca. 2,8 kb detektiert werden, das mit der Länge des *ppdk*-Gens (2748 bp) korreliert und für eine monocistronische mRNA spricht. Ein Unterschied in der Intensität der Signale in autotrophen bzw. heterotrophen Zellen der spätlogarithmischen Wachstumsphase ist nicht erkennbar, so daß eine konstitutive Transkription des *ppdk*-Gens unabhängig von den trophischen Anzuchtbedingungen angenommen wird.

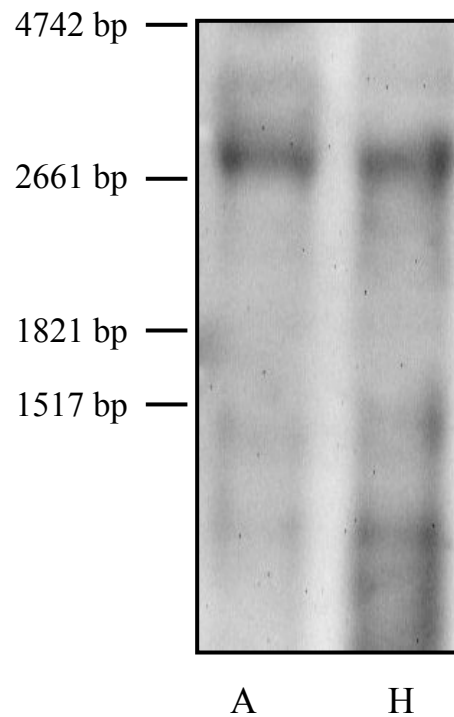


Abb. 3.26: Northern Blot-Analyse zum Nachweis des *ppdk*-Transkripts in *T. tenax*.

Die Hybridisierung der *ppdk*-spezifischen Sonde mit je 5 µg Gesamt-RNA aus autotrophen (A) bzw. heterotrophen (H) *T. tenax*-Zellen (spätlogarithmische Wachstumsphase) erfolgte über Nacht bei 68°C. Die Größe des Transkripts wurde mit Hilfe eines RNA-Längenstandards (linke Seite) bestimmt.

3.3 Untersuchungen zum *acn-tpi-cisI*-Gencluster von *T. tenax*

Wie schon von SCHRAMM [1999] gezeigt werden konnte, ist das für die Triosephosphat Isomerase (TIM) aus *T. tenax* codierende Gen mit den Genen für Aconitase und Citrat Synthase assoziiert: Das genomische Fragment TIM4, das in der genannten Arbeit isoliert und sequenziert wurde, beinhaltet neben der kompletten genetischen Information der TIM (*tpi*) zusätzlich 40 bp stromaufwärts einen Teil eines Leserahmens mit deutlicher Ähnlichkeit zu Aconitasen (*acn*), während 1325 bp stromabwärts ein Teil eines Gens (*cisI*) mit Ähnlichkeit zu Citrat Synthasen lokalisiert ist (Abb. 3.27). Diese unmittelbare Nachbarschaft von Genen des reversiblen TCA-Zyklus (*acn*, *cisI*) mit einem Gen des EMP-Weges (*tpi*) ist äußerst ungewöhnlich, da in den meisten bisher untersuchten Archaea und Bacteria das *tpi*-Gen im Verbund mit weiteren Genen des EMP-Weges, z. B. für GAPDH und PGK vorliegt.

Die enge Assoziation von *acn* und *tpi* läßt eine mögliche Organisation der beiden Gene in einer Operonstruktur vermuten. Dies sollte über Northern Blot-Analysen näher untersucht werden. Transkriptionsstudien sollten ebenfalls mit dem *cisI*-Gen durchgeführt werden. Dafür war es zunächst notwendig, die partiellen Gensequenzen von *acn* und *cisI* zu komplettieren. Zur Identifizierung der vollständigen genetischen Information von Aconitase und Citrat Synthase 1 wurden Southern-Hybridisierungen mit Sonden durchgeführt, die von der genetischen Information des Fragments TIM4 abgeleitet wurden.

3.3.1 Klonierung und Sequenzierung der *cisI*- und *acn*-Gene von *T. tenax*

3.3.1.1 Hybridisierung einer *cisI*-spezifischen Sonde mit genomischer DNA aus *T. tenax* und Klonierung eines 4 kb *EcoRI/XbaI* -Fragments

Für die Konstruktion einer *cisI*-spezifischen DNA-Sonde wurde aus dem genomischen Fragment TIM4 ein 481 bp großes *SspI/BamHI*-Restriktionsfragment herausgeschnitten (s. Abb. 3.27) und mit Digoxigenin markiert. Die Sonde wurde zur Hybridisierung restringierter genomischer DNA eingesetzt. Ein ca. 4 kb großes *EcoRI/XbaI*-Fragment gab dabei ein starkes Hybridisierungssignal. Dieses genomische Fragment wurde in den Vektor pBluescript KS+ inseriert und anschließend in *E. coli* DH5 α kloniert. Über erneute Southern-Hybridisierung mit der *cisI*-spezifischen Sonde wurde ein positiver Klon (pCis-1) identifiziert und anschließend sequenziert (Abb. 3.27, 3.28).

3.3.1.2 Hybridisierung einer *acn*-spezifischen Sonde (I) mit genomischer DNA aus *T. tenax* und Klonierung eines 2 kb *SalI*-Fragments

Ein 825 bp großes *BamHI/EcoRI*-Restriktionsfragment des genomischen Fragments TIM4 (s. Abb. 3.27) wurde mit Digoxigenin markiert und als *acn*-spezifische Sonde zur Hybridisierung restringierter genomischer *T. tenax*-DNA eingesetzt. Dabei wurde ein stark signalgebendes 2 kb *SalI*-Fragment identifiziert, welches anschließend in den Vektor pBluescript KS+ inseriert und in *E. coli* DH5 α kloniert wurde. Rekombinante Klone wurden über Southern-Hybridisierung mit der *acn*-spezifischen Sonde auf Anwesenheit der *acn*-Sequenz getestet. Wie die anschließende Sequenzierung eines positiven Klons (pAco2kb-3) zeigte, enthielt das genomische 2 kb *SalI*-Fragment knapp 2/3 (1710 bp) des *acn*-Gens (Abb. 3.27). Diese genetische Information wurde nun verwendet, um über PCR eine weitere *acn*-spezifische Sonde (II) zur vollständigen Klonierung des Aconitase-Gens zu generieren.

3.3.1.3 Hybridisierung einer *acn*-spezifischen Sonde (II) mit genomischer DNA aus *T. tenax* und Klonierung eines 2,5 kb *NcoI*-Fragments

Anhand der Sequenzinformation des genomischen Klons pAco2kb-3 wurden die Primer aco-3 (5'-CGACGGCAACACTCTGG-3'; Position 1735 → 1751 in Abb. 3.28) und aco-4 (5'-AGAGGAGGCGAGGCGAGG-3'; Position 2430 → 2413 in Abb. 3.28) abgeleitet und in einer PCR mit *T. tenax*-DNA als Template eingesetzt. Unter den gewählten Bedingungen (2 min 94°C; 30 Zyklen mit 30 sec 94°C / 45 sec 53°C / 60 sec 72°C; 5 min 72°C) konnte ein 695 bp großes *acn*-spezifisches PCR-Produkt amplifiziert werden, das mit Digoxigenin markiert und als Sonde zur Hybridisierung restringierter genomischer *T. tenax*-DNA eingesetzt wurde. Ein 2,5 kb *NcoI*-Fragment gab ein starkes Hybridisierungssignal und wurde deshalb in den Vektor pET15b inseriert und anschließend in *E. coli* DH5α kloniert.

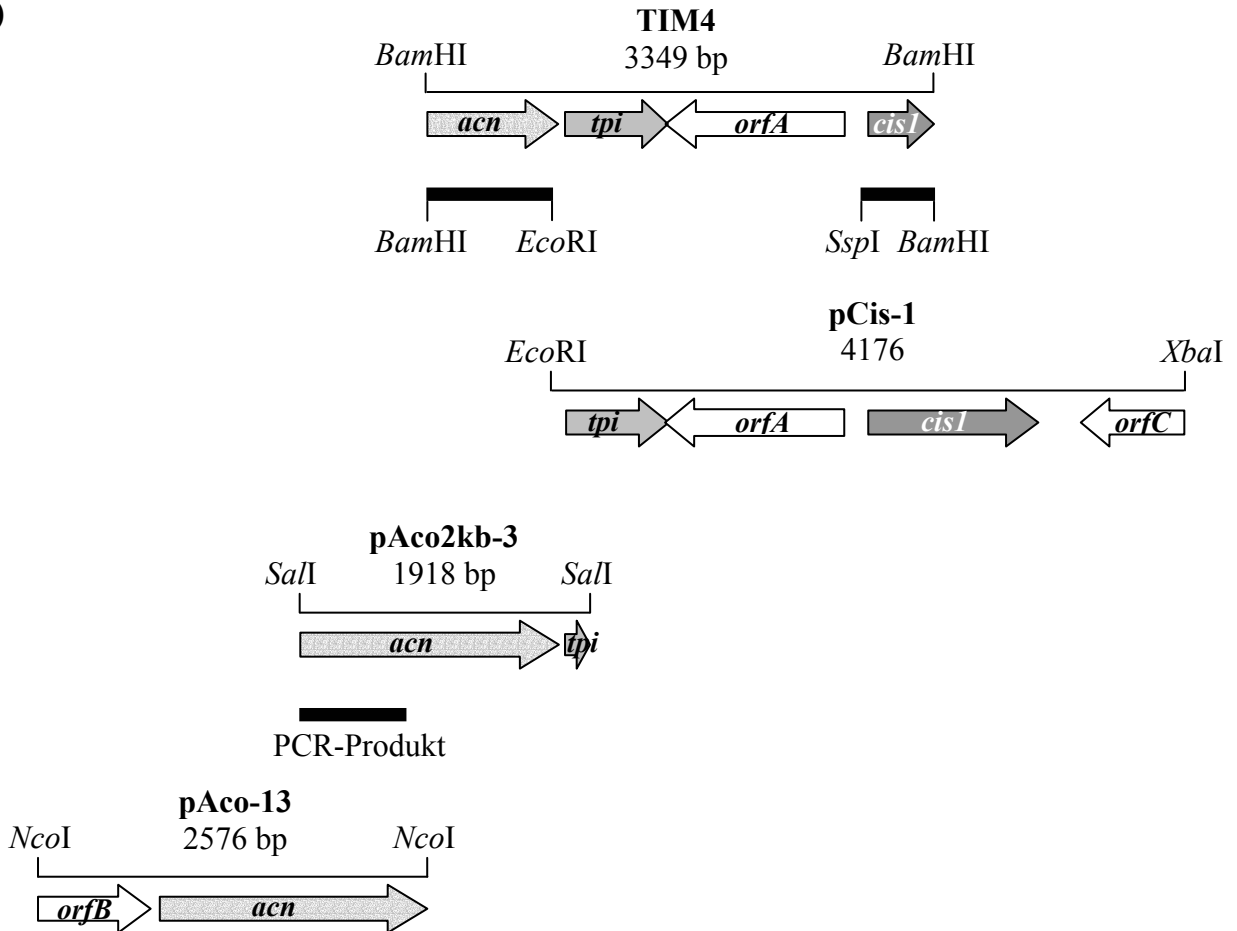
Die Identifizierung eines positiven Klons (pAco-13) erfolgte über Boiling-PCR mit den Primern aco-3 und aco-4 (s.o.). Wie die anschließende Sequenzierung dieses Klons zeigte, enthielt das genomische 2,5 kb *NcoI*-Fragment den fehlenden codierenden Bereich des *acn*-Gens (Abb.3.27).

Eine schematische Darstellung der Strategie zur Klonierung der *cisI*- und *acn*-Gene aus *T. tenax* sowie die Assemblierung der genomischen Einzelfragmente ist in Abbildung 3.27 wiedergegeben. Sämtliche zur Sequenzierung der Klone pCis-1, pAco2kb-3 und pAco-13 verwendeten Primer sind in Tab. 3.7 aufgeführt. Die gesamte Nukleotidsequenz des *acn-tpi-cisI*-Genclusters ist in Abbildung 3.28 dargestellt.

Tab. 3.7: Primer, die zur Sequenzierung der genomischen Fragmente pAco2kb-3, pAco-13 und pCis-1 verwendet wurden. Die Positionsangaben beziehen sich auf Abb. 3.28.

Primer	Sequenz	Position
T3	5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3'	Vektor-Primer
T7	5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3'	Vektor-Primer
aco-2	5'-AAGTGCCTCTGACCATAACCTCCC-3'	2921 → 2898
aco-6	5'-GGGGACGTCTTGAGCGAC-3'	1945 → 1927
aco-7	5'-GGCGCTCTGGGCCACT-3'	1288 → 1272
aco-8	5'-GGATCGCCAATAAGACCA-3'	717 → 700
aco-9	5'-GGGTCGAGAGAGGTGGA-3'	295 → 279
cis-4	5'-CAAGGAGAGGCTCGCCTC-3'	5679 → 5696
cs-5	5'-GGTCTATCTGGGCAACTA-3'	7086 → 7069
cs-6	5'-TGGGAGAGCCGGGGAGA-3'	6176 → 6192

A)



B)

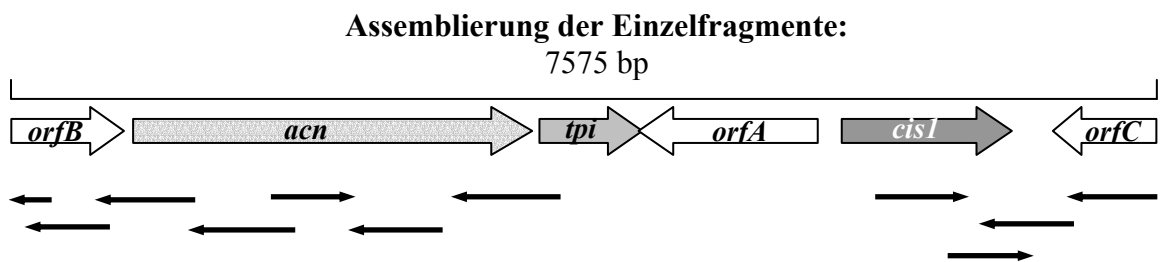


Abb. 3.27: Klonierungs- und Sequenzierungsstrategie der genetischen Umgebung von Aconitase, TIM und Citrat Synthase 1 aus *T. tenax*.

A) Dargestellt sind die genomischen Fragmente TIM4 [SCHRAMM, 1999], pCis-1, pAco2kb-3 und pAco-13. Identifizierte Leserahmen und deren Orientierung sind durch Blockpfeile dargestellt (*acn*: Aconitase; *tpi*: TIM; *cis1*: Citrat Synthase 1; *orfA*, *orfC*: offene Leserahmen mit Ähnlichkeiten zu hypothetischen Proteinen aus *P. aerophilum* bzw. *S. solfataricus*; *orfB*: offener Leserahmen mit Ähnlichkeit zu einem Eisen-Transportsystem aus *S. typhimurium* (27% identische Aminosäurereste)). Schwarze Balken kennzeichnen die Sequenzbereiche, die als Sonden für Southern-Hybridisierungen verwendet wurden (Einzelheiten s. Text).

B) Assemblierung der Einzelfragmente zu einer Gesamtsequenz von 7575 bp. Dünne Pfeile verdeutlichen den Bereich und die Leserichtung der einzelnen Sequenzierungen.

	CCATGGCGGT	CAATAGGCGG	ATGACCTTCC	TGGCCCACGC	CCAGAGCCAC	TCCATCTTGA	60
	CTGCGTCTTT	GTCGGCTGCG	GTCACCACAG	CCCTCTTGAA	GATATCGTGG	TTCTCCCCCT	120
	ACTTCACGTT	GGTCGTGATA	GCGTATACGA	TCGCCTTGAA	CCTCCTCGTG	CTCTTAGTGG	180
	CCCCTCGGG	TTTCAAGGAG	GACGTAGCCA	CCGGCATAGT	GATGTCGTTT	CAACTGGCCG	240
	CCACAATATT	CTTGATATAC	GTCCTGAGGT	CTCTCGTGTC	CACCTCTCTC	GACCCTCTGG	300
	CCCTCTTCAC	AGGCGAGTAT	CTGTTGATAA	CGTCCTCCGA	TGTAATCCAA	CTGGCGCCGG	360
	TCCTAGCCGC	TACATCGCTC	TTCGTAGCGT	TGGCTGGAGT	GCCCTTCCTC	TATATCGCCC	420
	TCGACCCCGA	GTATGCCTCG	TCCTTGGGCT	TGAGGCCGAC	TTTGTACGAA	GTCTCTTCA	480
	TAATAGCCAT	GTCCTCGGCG	GCGGCCGTGA	GCGTCAACGT	CATGGGGGCG	TTGATACCTG	540
	CCCTAGTTCT	GGTCGTGCCG	GCGCGAGCTG	CAGCGAAGAC	GACGCAAAGT	TTAGTGAGAC	600
	AGATCCCCAC	TGCTTCATCT	TACGGCGTCA	TCTCCGCCTC	TGTGTCGCAC	TTTATATACG	660
	CCGAGCTCCC	TTGGATGTGG	CCCAACGTGG	CGGTAGCGCT	GGTCTTATTG	GCGATCCTTC	720
	TGTATAGCAT	AAGGCCGTTA	ACGCGTTAAA	GAATAGGCAT	TTGCCATAAA	<u>GAATATTAT</u>	780
1			M P Y	V K A	E A K	L S V G	
	ATATTGCACT	ATAGAGGAGG	TCATGCCTTA	TGTAAAGGCA	GAGGCGAAGC	TCTCAGTAGG	840
14	P R T	Y K I	Y K L R	A L E	A E G	Y D V S	
	CCCCCGCACC	TATAAGATCT	ACAAGCTGAG	GGCTCTGGAG	GCCGAGGGAT	ATGACGTATC	900
34	R L P	Y S I	R V L L	E N V	L R N	Y D G R	
	TAGACTGCCT	TACAGCATAA	GGGTGCTTCT	GGAGAACGTG	CTCCGCAACT	ACGACGGAAG	960
54	D I A	Q E H	I D A L	A R W	N P K	S P E G	
	AGATATCGCC	CAAGAGCATA	TCGATGCGCT	GGCTAGGTGG	AACCCCAAGT	CGCCGGAGGG	1020
74	E V A	L K V	T R V V	M Q D	Y T G	V P A V	
	AGAGGTGGCG	CTGAAGGTGA	CGAGGGTCGT	TATGCAAGAC	TACACAGGGG	TTCCAGCCGT	1080
94	V D L	A T M	R E I A	A K S	G R D	P S V V	
	AGTGGACTTG	GCCACTATGA	GGGAGATAGC	CGCTAAATCS	GGGCGGGACC	CCAGTGTAGT	1140
114	N P R	V P V	D L I I	D H S	V Q V	D H W A	
	CAACCCCAAG	GTCCCCGTGG	ACCTTATCAT	AGACACTCA	GTCCAAGTGG	ACCATGGGC	1200
134	S P Q	A L S	L N I R	L E I	E R N	R E R Y	
	ATCCCCCAG	GCCCTCTCTT	TGAACATCCG	GCTCGAGATA	GAGAGGAATA	GAGAGAGGTA	1260
154	V F L	K W A	Q S A F	K N L	R V F	P P G T	
	TGTCTTCCTG	AAGTGGGCCC	AGAGCGCCTT	CAAGAACCTC	CGGGTATTCC	CGCCGGGCAC	1320
174	G I I	H Q V	N L E Y	L A R	V V W	T E G D	
	CGGCATAATA	CACCAGGTAA	ACTTGGAGTA	TTTGGCCAGA	GTGGTGTGGA	CTGAGGGCGA	1380
194	T A F	F E T	L V G M	D S H	T T M	I N G L	
	TACGGCCTTC	TTCGAGACTC	TCGTGGGGAT	GGACAGCCAC	ACTACGATGA	TAAACGGCCT	1440
214	G V V	G W G	V G G V	E A E	A A M	L G E P	
	CGGTGTCGTG	GGGTGGGGAG	TAGGGGGCGT	AGAGGCCGAG	GCAGCGATGC	TCGGAGAGCC	1500
234	I T I	R V P	R V V G	V R L	Y G E	P R P G	
	CATAACCATA	AGAGTGCCGA	GGGTGGTGGG	AGTGAGGCTC	TACGGCGAGC	CGCGCCCCGG	1560
254	V T A	T D I	V L A V	T E A	L R K	V N V V	
	CGTCACTGCA	ACCGATATAG	TCCTGGCGGT	GACCGAGGCG	TTGAGGAAGG	TGAACGTAGT	1620
274	D A F	V E F	F G E G	V R K	L S V	P D R A	
	GGACGCGTTC	GTAGAGTTCT	TCGGCGAGGG	AGTAAGGAAG	CTCTCGGTGC	CGGACAGAGC	1680
294	T I A	N M A	P E Y G	S T V	G L F	P V D G	
	CACGATAGCC	AACATGGCGC	CCGAGTATGG	ATCCACGGTG	GGGCTGTTCC	CCGTCGACGG	1740
314	N T L	D Y L	S A T G	R P E	E L I	A L V K	
	CAACACTCTG	GACTATCTGT	CTGCCACCGG	AAGGCCTGAG	GAGTTGATAG	CCTTGGTCAA	1800
334	K Y Y	E E Q	G V F R	G V E	D A E	Y S Q V	
	GAAATACTAC	GAGGAGCAGG	GCGTGTTCAG	AGGAGTTGAG	GACGCCGAGT	ACAGCCAGGT	1860
354	V D F	D L S	A V E P	S A A	G P T	L P W Q	
	GGTGGACTTC	GATTTGTCTG	CAGTGGAGCC	GTCCGCCGCC	GGTCCCACCC	TCCCCTGGCA	1920
374	R R S	L Q D	V P K S	F V E	F L A	Q R K K	
	AAGGAGGTCG	CTCCAAGACG	TCCCCAAAAG	CTTCGTCGAG	TTCTTGGCAC	AGAGGAAGAA	1980
394	R D K	R K A	V E I E	I G G	R R T	E F G D	
	GAGGGACAAG	AGGAAGGCCG	TAGAGATAGA	GATCGGAGGG	AGGAGAACGG	AGTTCGGAGA	2040
414	G D V	A I A	A I T S	C T N	T S N	P Y L L	
	CGGCGATGTG	GCCATAGCGG	CTATAACGAG	CTGCACCAAC	ACGTCAAATC	CCTATCTTTT	2100
434	V A A	G L V	A K K A	V E A	G L S	V P P Y	
	GGTCGCGGCG	GGGCTAGTGG	CGAAGAAGGC	CGTGGAGGCC	GGCTTGTCTG	TGCCGCCGTA	2160
454	V K T	S F A	P G S R	A V E	E I L	R R A G	
	CGTCAAGACG	AGCTTCGCGC	CCGGTCCCCG	CGCCGTGGAG	GAGATCCTGA	GGAGGGCAGG	2220
474	L M P	Y L E	K L G F	H V V	A Y G	C T T C	
	CTTGATGCCA	TATTTAGAGA	AGCTGGGCTT	CCACGTAGTT	GCCTACGGGT	GCACCACGTG	2280

494	I G N S G P L P Q P V S K A I K E Y D I	
	TATAGGGAAC TCAGGCCCTC TGCCGCAGCC CGTCTCCAAG GCCATAAAGG AGTACGACAT	2340
514	M A A A V L S G N R N F E G R V H P E I	
	AATGGCAGCC GCAGTGTGT CGGGCAACCG CAACTTCGAG GGCAGAGTAC ACCCGGAGAT	2400
534	R A A Y L A S P P L V V A Y A L A G S V	
	AAGAGCCGCC TACCTCGCCT CGCCTCCTCT CGTGGTGGCC TATGCCCTGG CCGGATCGGT	2460
554	L R D L S R E P L G V G K E G K P V Y L	
	GTTGAGGGAT CTATCGAGGG AGCCCCTCGG CGTAGGGAAA GAGGGCAAGC CCGTCTATCT	2520
574	K D V W P S P E E V N E V V A R A M D P	
	GAAGGACGTC TGGCCCAGCC CAGAGGAGGT CAACGAAGTC GTGGCGAGGG CCATGGATCC	2580
594	K I Y T E K Y S K I G E L V P E W S E L	
	CAAGATCTAT ACAGAGAAGT ATTCAAAGAT AGGCGAGCTA GTCCCCGAGT GGAGCGAGCT	2640
614	K A P S G N L Y Q W R S D D T Y I Q P S	
	GAAGGCTCCA TCGGGGAACC TCTATCAGTG GAGATCCGAC GACACCTATA TACAGCCATC	2700
634	P L F E G R P T T G D I I N A R P L L I	
	GCCGTTGTTT CAGGGGAGGC CGACCACCGG CGACATCATC AACGCAAGGC CGTTGTTGAT	2760
654	L G D S I T T D H I S P A G S I P P D S	
	CTTAGGCGAC AGCATCACCA CAGACCACAT CTCGCCCGCC GGCTCCATCC CGCCGACAG	2820
674	P A G K Y L A E R G V Q Q R D F N T F G	
	CCCTGCGGGG AAGTACTTGG CCGAGAGAGG GGTGCAACAG AGGGACTTCA ATACGTTCCG	2880
694	A R R G N W E V M V R G T F W S K G Y I	
	CGCCAGGAGG GGCAATTGGG AGGTTATGGT CAGAGGCACT TTCTGGAGCA AGGGCTATAT	2940
714	N K I E G G L E G G Y T I K Y P E G L K	
	CAACAAAATC GAGGGCGGCC TCGAGGGGGG ATACACTATA AAGTACCCAG AGGGGCTCAA	3000
734	T T V Y E A A M M Y K R E G V P V V I V	
	GACTACAGTG TATGAGCCCG CCATGATGTA CAAGAGGGAG GGCGTGCCCG TGGTCACTCGT	3060
754	A G K T Y G A G S S R D W A A K G P K L	
	TGCCGGCAAA ACCTATGGCG CCGGCTCCAG CAGAGATTGG GCGCCAAGG GCCCGAAGCT	3120
774	L G V K A V I A E S F E R I H R S N L T	
	CTTGGGAGTC AAGGCCGTGA TAGCAGAGAG CTTTGAAAAGA ATACACAGGT CTAATTTGAC	3180
794	M V G I V P I Q L P Q G V T V D S L N L	
	GATGGTGGGA ATTGTGCCTA TACAGCTGCC CCAAGGCGTG ACCGTGGACA GCCTAAACCT	3240
814	K G P E T I D I I G L E N L A P G K E L	
	CAAGGGCCCC GAGACCATCG ACATAATAGG ACTGGAGAAT CTGGCTCCGG GGAAGGAGCT	3300
834	T L R I H R P D G R T D E L R A K A A V	
	AACGTTGAGG ATACACAGGC CAGACGGCAG AACCGACGAG CTGAGGGCCA AGGCCGCTGT	3360
854	Y T W A E V E Y I K H G G I L P Y V L R	
	CTATACGTGG GCTGAGGTCG AGTATATAAA GCACGGCGGA ATTCTGCCGT ATGTGTTAAG	3420
874	K L L E K S *	
	GAAATTACTC GAAAAGAGTT GATTTTTGTG AAACACATAA AAGGCAGTCC CCGTCCTTGA	3480
1	M R L P I L I I N F K A Y G E A A G K	
	CCATGAGGCT TCCGATTCTG ATAATAAACT TCAAGGCATA CGGCGAGGCG GCCGGCAAAA	3540
20	R A V E L A K A A E R A A R E L G V N A I	
	GGGCCGTTGA GTTAGCCAAG GCGGCCGAGA GAGATGCCAG AGAGCTCGGC GTPAAATATCG	3600
40	V V A P N H L E L G L V S Q S V D I P V	
	TTGTGGCTCC CAACCACTTG GAGCTGGGCT TGGTCTCTCA GTCCGTCGAC ATACCTGTCT	3660
60	Y A Q G A D V E A G G A H T A H V S L E	
	ATGCCAGGG CGCCGATGTA GAGGCAGGAG GAGCCCACAC TGCACATGTG TCGCTGGAGA	3720
80	N I K E A G G S G V I L N H S E A P L K	
	ACATAAAGGA GCGGGCGGC TCAGGCGTGA TATTGAACCA CAGCGAGGCT CCTCTGAAGC	3780
100	L N D L A R L V A K A K S L G L D V V V	
	TAAATGATCT AGCCAGACTG GTGGCCAAGG CCAAGTCCCT AGGCCTCGAT GTAGTCGTGT	3840
120	C A P D P R T S L A A A A L G P H A V A	
	GTGCTCCAGA CCCGAGGACC AGCCTGGCGG CGGCCGCCCT GGGGCCTCAC GCAGTGGCCG	3900
140	V E P P E L I G T G R A V S R Y K P E A	
	TGGAGCCTCC GGAGCTCATC GGCACCGCA GAGCGGTATC GAGATACAAG CCAGAGGCCA	3960
160	I V E T V G L V S R H F P E V S V I T G	
	TTGTTGAGAC GGTGGGCTTA GTGTGAGGC ACTTCCCCGA GGTGTCCGTG ATAACGGGCG	4020
180	A G I E S G G D D V A A A L R L G T R G V	
	CAGGCATAGA GTCGGGGGAC GACGTGGCCG CCGCGCTGAG GCTTGGGACC AGGGGGGTCC	4080
200	L L A S A A V K A K D P Y A K I V E L A	
	TGTTGGCAAG CGCCGCCGTG AAGGCGAAGG ACCCCTACGC CAAAATAGTT GAGCTCGCCA	4140

220	K P L S E L R *								
	AGCCTCTGTC	AGAGCTCCGC	TGACTCCAAC	TGCTCAGGA	CATAGCGCCT	TATCTCGTCC			4200
	TCGCTTGGGA	TACTCTCCAC	TATCTTGCCG	TCCTCCATGT	ACTTCTTGAT	CAAGGGCCTC			4260
	CCCTCGGAGC	CATCGGCGCA	TTTGGGCGGC	GGCTCGCCCC	ACGGCCTCAC	AACCCCTCTTG			4320
	AGGCCGCCGC	AGTCGTAGAG	CTGTTTGAAG	CCGGGGAGCT	TCCCCCTCTT	GGTTATGGGA			4380
	GTCCACGCTC	CTCCACCTT	CACCTCAACT	ATGTCCATAG	AGATGTCCAC	GCTGGGCGGG			4440
	AAGGCTATGG	ATGTGCCCC	GCCGAATGCA	TCCACTATAT	CGGCCAGTTC	CGCCACGGCC			4500
	TCCTCGTCCA	GCCCTCCGCT	TACGACGATC	TTCACGTCCC	TCCGCCCAT	CAGCTCCAAC			4560
	GTCCAACGGA	CCTCCTCCAC	TATCCTCCTC	ATGTTGCCCC	TCCTGCTCCC	CGGCGTGTCC			4620
	AAACGGACTC	CCCAGGCCT	TTCGCCCAAC	CTCTTGACCG	CGAGGACGGC	CTCCTCCCTT			4680
	TCGTGAGGA	AAGTGTGAGC	GAGCACAATG	CGGGGGACTT	GGGGAGGGGC	CGCGGCGTCG			4740
	AACCAGACCC	AAGCCTCGGT	GTGGTCCCCC	TTGAGCGCTC	TGAAGATTAT	CATGAGGGCG			4800
	TGGGGCATCG	TGCCGACCGC	CTGCTTGCCC	ATAAGTTCTG	CGCCCAACAC	GCCCCGCCACG			4860
	CCGTGCGAGC	CTCCAATGTA	CGCCGCTCTG	TCGGCCATTG	GCTGGACGGC	CGGGTGGAGG			4920
	ACGCGCGCGC	CGAAGAATAG	ACAGCTCTTG	TCGCCGGCAG	CCTTCTTAAC	TCTCGCCGCC			4980
	TTAGTGGCAA	TGCTCGAGTA	ATGTCTCAGA	ATGCCAAAA	CTGTGGTCTC	GAACACAGCG			5040
	AAGTCCACGT	ATCTGCCCTC	TATTACCATG	AGAGGTTGGT	TCTCGCCGAA	AAGGGTCCCC			5100
	TCGGGGAGGG	CGTAGACAGT	AACGGGCTTG	CCCTCGAGGG	CGTAGAGCGC	CTCCTTCAGA			5160
	CCGGCGAAGA	CGGCCCACTT	ATATCCCTCC	GGCAGAGATG	CAACGTGGAA	CTCGGCCCTC			5220
	ACCACCGCGT	CGTCGAGCCC	GGCGGCCTTC	AGCGTCTCGA	CGGTCTTGAT	AAAATAGATG			5280
	TCTGTGGCAC	GCCGGGAGAT	TATATCGTCG	GCCGTAGCTA	TGTGGAACCTT	CGCCATAGCC			5340
	TAGAACAGAA	GGGAGTTTTT	GAGCATTAGT	TTCCTCGCTC	ATTTAACTCC	<u>ACAATTACAA</u>			5400
	<u>AATTATAATT</u>	ATAATTATTG	CCAATTGAAC	<u>AATCTATATA</u>	<u>AATATTATGT</u>	<u>ATCAATTAAA</u>			5460
1			M Q Y S	P G L E	G I I				
	<u>ATAAAAATAA</u>	TATATTGATA	TACGCCTATG	CAGTACAGCC	CAGGTTTAGA	GGGAATAATA			5520
12	V K E S K I C	L I D V E N	S K I Y	Y R G					
	GTAAAAGAAA	GTAAAATTTG	TTTAATAGAC	VTCGAGAACT	CCAAGATATA	CTACGAGAGC			5580
32	Y D I E E L A	D K S T F E	E T A Y	L L I					
	TACGACATAG	AGGAGCTCGC	CGATAAATCG	ACCTTTGAGG	AGACGGCATA	TCTGTTGATC			5640
52	Y G Q L P R A	S E L D A F	K E R L	A S L					
	TACGGCCAAC	TTCCGAGGGC	CTCCGAGCTC	GATGCGTTCA	AGGAGAGGCT	CGCCTCGCTG			5700
72	R R P P E H V	V K L L G L	L P K S	A E P					
	AGGCGGCCCC	CCGAGCATGT	GGTGAAGTTG	CTCGGCCTGC	TCCCCAAAAG	CGCCGAGCCT			5760
92	I D V L R T A	V S A M G M	G R N L	S D R					
	ATCGACGTCC	TCAGAACCGC	CGTCTCGGCC	ATGGGCATGG	GCAGAAATCT	GTCGGACAGA			5820
112	S P E A E L E	R G L E V I	A S M P	F I A					
	TCCCCGGAGG	CGGAGCTGGA	GAGAGGCTTG	GAGGTGATCG	CGTCTATGCC	CTTCATTGCC			5880
132	A N W D R T R	R G L E I A	D P Q A	E G H					
	GCCAACTGGG	ATAGAACGAG	GCGCGGGCTT	GAGATCGCGG	ATCCGCAGGC	CGAGGGCCAT			5940
152	A E Y F L R A	L K G D A S	P R Q I	K A M					
	GCCGAGTATT	TCCTCAGAGC	GCTCAAGGGG	GATGCGTCCC	CCAGACAGAT	CAAGGCGATG			6000
172	D V M L I I Y	A E H G M N	N S A F	T A V					
	GACVTCATGT	TGATAATCTA	CGCCGAGCAC	GGCATGAACA	ACAGCGCCTT	CACAGCTGTG			6060
192	T V A S T L S	D M Y S V I	S A A I	A S L					
	ACAGTGGCCT	CGACGCTCTC	CGATATGTAC	TCAGTGATCT	CGGCAGCTAT	AGCGAGCCTC			6120
212	K G P L H G G	A N I D A A	K M I E	E V G					
	AAGGGCCCGC	TCCACGGAGG	GGCCAATATA	GATGCGGCCA	AAATGATAGA	GGAGGTGGGA			6180
232	E P G R V Q R	W V D E A L	A A G K	R I P					
	GAGCCGGGGA	GAGTCCAGAG	GTGGGTGGAC	GAGGCGCTCG	CGGCGGGCAA	GAGAATACCT			6240
252	G F G H R L Y	K R G P D P	R L R V	L R R					
	GGCTTCGGGC	ACAGGCTCTA	CAAGAGGGGG	CCCGACCCGC	GCCTGAGGGT	TTTGAGGCGG			6300
272	L A R E L A E	E A G D Y K	Y Y E I	A E R					
	CTGGCCCCGCG	AGCTCGCCGA	GGAGGCCGGC	GACTATAAAT	ACTACGAGAT	CGCTGAGAGG			6360
292	L E E Y V H S	R L S H K G	I Y A N	T D L					
	CTCGAGGAGT	ACGTCCACTC	TAGGCTTTCT	CACAAGGGGA	TCTACGCAA	CACTGACCTT			6420
312	Y A A V I F K	Y L G L P T	D L N L	P A F					
	TACGCCGCGG	TCATCTTCAA	ATATCTGGGC	CTTCCCACAG	ACCTCAATCT	GCCGGCCTTC			6480
332	A M S R A A G	W V A H A V	E Y R R	N N R					
	GCCATGTGCG	GCGCAGCCGG	CTGGGTGGCG	CACGCAGTGG	AGTATAGAAG	GAACAACAGA			6540
352	L I R P T E R	Y I G P V G	L R Y I	P L E					
	TTGATACGCC	CCACCGAGAG	ATACATTGGA	CCAGTCGGCC	TTAGGTATAT	CCCTCTGGAG			6600
372	A R G *								
	GCCCCGGGGCT	GATTATCCCG	CCCTTAAGGG	AGGACATAGC	TCTCTCACAC	TTCTTGATCG			6660

TTGAAAAATT	CTGTTCTGGC	GCAGGCGGGA	GGCCTAAATC	ACGCGCGTGC	GTCTACGGCG	6720
GCTGGGGGGG	CAGTGTCTCA	TGAGGGGGCT	CTGCCCTGAC	TGGAGGGGGA	CCTGCCGCC	6780
GGCCCCACGC	CCGATGGCCC	CGCGCCGGAG	GTATTTTGGG	TACCGATGAA	GGCGTGGGCG	6840
AGGAGGAAGC	CCCTAGGCGC	AACAGCCTAG	GGACAAGCGA	CAAACGGTTA	CCCCAAGGCT	6900
GTAATATTGT	AGACCCTCAG	CAGAGCCGCC	GTGCTGTATC	CAAACGTAGG	CCGGTTGGAC	6960
CGAGTAGAAA	ACAGCCGTAC	CTCGCCAAAT	ATGTTCCCAT	AGACATCGCG	CAGTATTATA	7020
TCGCCCCAGT	CGTTGAGCGG	CCTCAGCTCG	ACCCACGCGG	ACGCAGGGTA	GTTGCCCAGA	7080
TAGACCGAGG	TTGAGCCACA	GAGGGCATAG	AAGTTATCGC	CCGATATGTT	TACGCCGAAA	7140
ATCGGCGTCA	AGCTCTGGCT	GAATACGGCG	TAGGTGCCGG	CCCCTGTGAA	GTTGGATATA	7200
TAGGTCAAGG	CCCCGATAT	GAGGGATCTA	TAGAAGACCA	CATAGGGAGA	GCCCTGAAGC	7260
ACTAGGGCGC	TACTGGTCTG	AGCGGCCGAC	TGGCCGTAAA	CGCTCCAGTT	TGAGGGCAGA	7320
GGGCACTGGG	TCTCCGTCAA	ATTTACGTTT	TTCCACTCGA	TTATGGTATT	GCCGTTGGAC	7380
GAGTAGGTGA	CTAGGGCGAA	GCCCACGATA	TACCCCGTCG	AATACACCTG	CGGTATACTG	7440
AACGGAAGCC	ACTGTTTCTT	TTTGTGTTGTT	ATATTGAGAT	ATATGGAAAAT	GTAGGGAAACA	7500
CTGTAGCCAT	AGATATATTT	GGAGAGGTTT	GCAGGGCTTC	TACCGTTCAC	TGAGTAGTAG	7560
TATATAACCT	CTAGA					

Abb. 3.28: Assemblierte Nukleotidsequenz der genomischen Fragmente pAco-13, pAco2kb-3, TIM4 und pCis-1.

Die zusammengesetzte Nukleotidsequenz (7575 bp, Nummerierung rechts) enthält die Gene für Aconitase (*acn*, Position 803 → 3442), Triosephosphat Isomerase (*tpi*, Position 3483 → 4163) und Citrat Synthase 1 (*cis1*, Position 5488 → 6612), sowie die offenen Leserahmen *orfA* (Position 5336 → 4149), *orfB* (Position 1 → 749, unvollständig) und *orfC* (Position 7575 → 6888, unvollständig).

Die Aminosäuresequenzen von Aconitase, TIM und Citrat Synthase 1 sind über den korrespondierenden Nukleotidsequenzen dargestellt (Nummerierung links). Stopcodons werden durch Sternchen symbolisiert. Die putativen Promotor-Strukturen BRE-site und TATA-Box sind unterstrichen bzw. fettgedruckt.

Die gesamte Sequenz wurde bei EMBL unter der Accession-No. AJ515539 hinterlegt.

3.3.2 Heterologe Expression von *acn* und *cis1* aus *T. tenax* in *E. coli* zur Überprüfung der Funktionalität der Genprodukte

3.3.2.1 Inserierung des *acn*-Gens in die Expressionsvektoren pET24a bzw. pCYB2 und heterologe Expression in *E. coli*

Für die heterologe Expression der *T. tenax* Aconitase in *E. coli* wurde das *acn*-Gen mit Hilfe der Mutagenese-Primer Acn-Nde und Acn-Sac (s.u.) und *T. tenax*-DNA als Template amplifiziert (PCR-Bedingungen: 2 min 94°C; 30 Zyklen mit 1 min 94°C / 1 min 50°C / 2,5 min 68°C; 7 min 68°C). Dabei wurden unmittelbar vor dem Startcodon des *acn*-Gens eine *NdeI*-Schnittstelle und hinter dem Stopcodon eine *SacI*-Schnittstelle eingeführt. Das Gen wurde anschließend in den *NdeI/SacI*-geschnittenen Expressionsvektor pET24a inseriert und in die Expressionsstämme BL21(DE3) bzw. BL21-CodonPlus(DE3)-RIL kloniert.

Die zur Amplifikation verwendeten Primer hatten folgende Sequenzen (Restriktionsschnittstellen fettgedruckt, Start- und Stopcodon unterstrichen):

Acn-Nde: 5'- GCACTATAGAGGAGCATATGCCTTATGTAA-3'

Acn-Sac: 5'-TTTTATGTGTTTACACGAGCTCAACTCTT-3'

In beiden Fällen war die Expressionsrate sehr gering: Nach Aufschluß der Zellen und anschließender Hitzebehandlung (75°C, 20 min) konnte im SDS-Gel keine Proteinbande mit der entsprechenden Größe von 96,5 kDa identifiziert werden (Daten nicht gezeigt).

Trotz der ebenfalls schwachen Expression in dem *E. coli*-Stamm Rosetta™ (Novagen) konnte die Funktionalität der rekombinanten Aconitase im enzymatischen Test nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Umklonierung des Plasmids pET24a+Acn und die enzymatischen Messungen wurden dabei freundlicherweise von Helge Uhrigshardt (Universität Lübeck, Institut für Biochemie) durchgeführt.

In einem weiteren Versuch zur Steigerung der Expressionsrate wurde das Aconitase-Gen in den Vektor pCYB2 des IMPACT™ I One-Step Protein Purification Systems (New England Biolabs) ligiert. Bei diesem System wird das Zielgen am 3'-Ende mit einer DNA-Sequenz fusioniert, die für eine Chitin-Bindedomäne mit einem selbstspaltenden Proteinelement (Intein) codiert. Die Chitin-Bindedomäne erlaubt nach der Expression des Fusionsgens in *E. coli* eine schnelle Anreicherung des resultierenden Fusionsproteins über eine Chitin-Affinitätssäule. Über die selbstspaltende Aktivität des Inteins unter reduzierenden Bedingungen läßt sich im Anschluß die Chitin-Bindedomäne vom Zielprotein trennen.

Die PCR-Amplifikation des *acn*-Gens erfolgte mit den Mutagenese-Primern Acn-Nde2 (5'-TATAGAGGAGCATATGCCTTATGTAAAGGC-3') und Acn-Sma (5'-TATGTGTTTCACAACCCGGGCTCTTTTCG-3') (Restriktionsschnittstellen fettgedruckt, Startcodon unterstrichen). Dabei wurden die für die Ligation in den Expressionsvektor pCYB2 benötigten Schnittstellen *Nde*I (5'-terminal) und *Sma*I (3'-terminal) eingeführt, wobei das *acn*-Gen ohne Stop-Codon amplifiziert wurde. Nach blunt-end Ligation des PCR-Produktes an das für die Chitin-Bindedomäne codierende Gen wurde das Plasmid-Konstrukt pCYB2+Acn in die Expressionstämme BL21(DE3) bzw. BL21-CodonPlus(DE3)-RIL kloniert.

Wie jedoch schon mit dem Expressionsvektor pET24a beobachtet werden konnte (s.o), war auch in diesem Fall die Expressionseffizienz so gering, daß in der SDS-PAGE kein heterolog exprimiertes Enzym nachgewiesen werden konnte.

3.3.2.2 Inserierung des *cisI*-Gens in den Expressionsvektor pET11c und heterologe Expression in *E. coli*

Das *cisI*-Gen aus *T. tenax* wurde mit Hilfe der Mutagenese-Primer Cis-Nde und Cis-BglIII (s. u.) und *T. tenax*-DNA als Template amplifiziert (PCR-Bedingungen: 2 min 94°C; 30 Zyklen mit 45 sec 94°C / 45 sec 58°C / 90 sec 72°C; 7 min 72°C), wobei unmittelbar vor dem Startcodon des *cisI*-Gens eine *Nde*I-Schnittstelle und hinter dem Stopcodon eine *Bgl*III-Schnittstelle

eingeführt wurde. Anschließend wurde das *cisI*-Gen 9 bp hinter die vektoreigene Shine-Dalgarno Sequenz des *NdeI*-/*Bam*HI-geschnittenen Expressionsvektors pET11c inseriert. Die zur PCR-Amplifikation verwendeten Primer hatten folgende Sequenzen (Restriktionsschnittstellen fettgedruckt, Start- und Stopcodon unterstrichen):

Primer Cis-Nde: 5'-ATTGATATACGCATATGCAGTACAGCCC-3'

Primer Cis-BglIII: 5'-TTAAGGGCGAGATCTTCAGCCCCG-3'

Die korrekte Insertion und Nukleotidsequenz des rekombinanten *cisI*-Gens wurde durch Sequenzierung beider Stränge überprüft. Anschließend wurde das Plasmid-Konstrukt pET11c+Cis1 in den *E. coli*-Expressionsstamm BL21-CodonPlus(DE3)-RIL kloniert.

Für die Anreicherung der heterolog exprimierten *T. tenax* Citrat Synthase 1 wurden Zellen des Expressionsklons in 100 mM Tris/HCl, pH 7 (90°C), 100 mM β -Mercaptoethanol, 5 mM Na-Citrat resuspendiert und mit der French Press aufgeschlossen. Durch Ultrazentrifugation wurde ein zellfreier Rohextrakt gewonnen, aus dem durch Hitzebehandlung (90°C, 20 min) ein Großteil der *E. coli*-Proteine entfernt werden konnte. Laut SDS-PAGE beträgt die apparente Molekülmasse der Citrat Synthase 1-Untereinheiten ca. 42 kDa. Dies stimmt sehr gut mit der theoretischen molekularen Masse von 41,8 kDa überein.

Der Verlauf der Anreicherung ist in Abbildung 3.29 dargestellt.

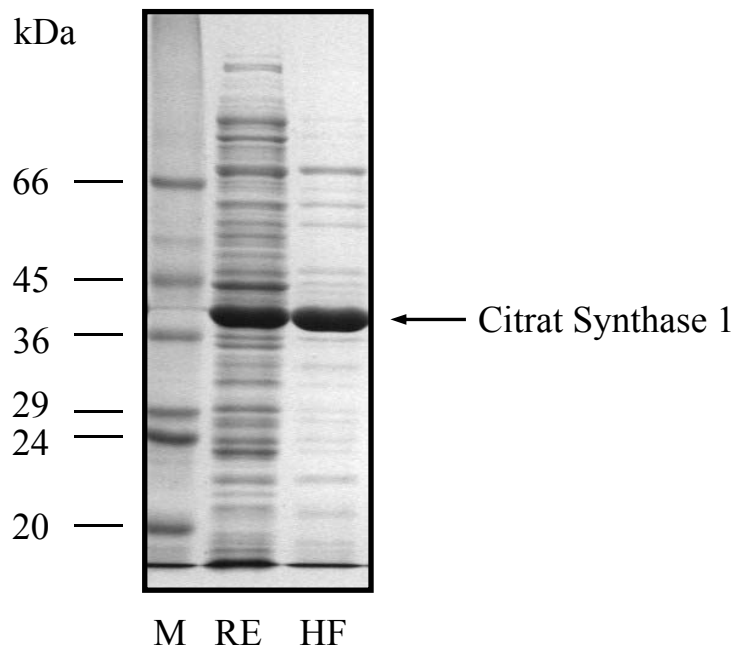


Abb. 3.29: Anreicherung der heterolog exprimierten *T. tenax* Citrat Synthase 1. SDS-PAGE Elektropherogramm (10%); M: Proteinstandard; RE: zellfreier Rohextrakt; HF: hitzegefällter Extrakt (90°C, 20 min).

Die biochemische Charakterisierung der rekombinanten *T. tenax* Citrat Synthase 1 und einer ebenfalls klonierten Enzym-Mutante R373P (Daten nicht gezeigt) wird zur Zeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Michael Danson (University of Bath, Centre of Extremophile Research, UK) durchgeführt.

3.3.3 Transkriptanalysen der *acn*-, *tpi*- und *cis1*-Gene von *T. tenax*

Die enge Assoziation der Gene für Aconitase (*acn*) und TIM (*tpi*), die gleiche Orientierung beider Leserahmen und darüber hinaus die fehlenden Promotorstrukturen stromaufwärts des *tpi*-Gens sind starke Indizien für eine gemeinsame Transkription beider Gene. Ebenfalls interessant ist die Nachbarschaft des Gens für die Citrat Synthase 1 (*cis1*) 1325 bp stromabwärts des *tpi*-Gens.

Northern Blot-Analysen mit spezifischen antisense-mRNA-Sonden gegen die Transkripte aller drei Gene sollten zum einen eine mögliche Organisation der Gene in Operonstrukturen aufklären, zum anderen sollte untersucht werden, ob in Abhängigkeit von den trophischen Anzuchtbedingungen (autotroph/heterotroph) eine Regulation der Transkriptmenge stattfindet.

Zur Herstellung der spezifischen antisense-mRNAs wurden die kompletten *tpi*- und *cis1*-Gene bzw. eine Teilsequenz des *acn*-Gens in die MCS des Vektors pSPT19 inseriert (Abb. 3.30). Dabei wurde das *tpi*-Gen mit den Primern TTXTIM EX1 (5'-GGCAGTCCCCGGAATTCACC ATGAGGCTTC-3') und TTXTIM EX2 (5'-CCTGAGGCAGCTGCAGTCAGCGGAGCTC-3') [SCHRAMM, 1999], das *cis1*-Gen mit den Primern Cis Eco (5'-ATACGCGAATTCAG TACAGCC-3') und Cis BglII (5'-TTAAGGGCGAGATCTTCAGCCCCGGG-3') amplifiziert und in den *EcoRI*-/*PstI*- bzw. *EcoRI*-/*BamHI*-geschnittenen Vektor inseriert (Restriktionsschnittstellen unterstrichen, Start- und Stopcodons fettgedruckt). Für die Herstellung der Aconitase-Sonde wurde ein 983 bp großes *XbaI*-/*PstI*-Restriktionsfragment des genomischen Fragments pAco-13 (Position 900 → 1882 in Abb. 3.28) in die entsprechenden Schnittstellen des Vektors ligiert.

Nach Linearisierung der Vektorkonstrukte mit *EcoRI* (*tpi*- und *cis1*-Sonde) bzw. *XbaI* (*acn*-Sonde) wurden durch *in vitro* Transkription mit Hilfe der T7 RNA Polymerase unter gleichzeitigem Einbau von DIG-UTP spezifische antisense-mRNAs synthetisiert.

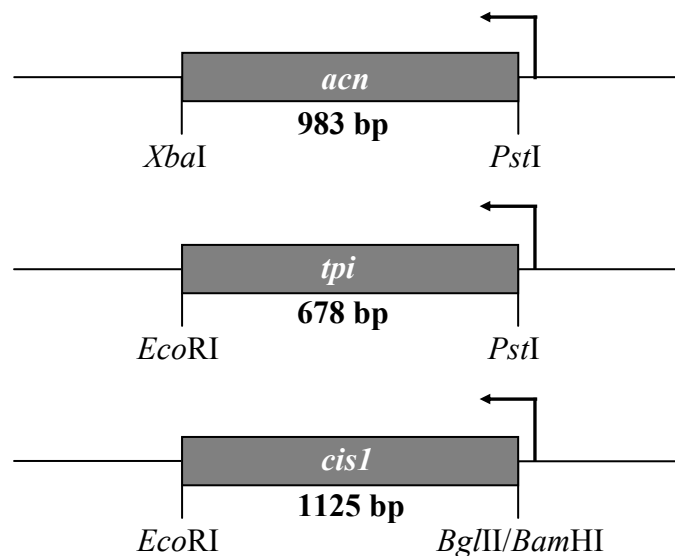


Abb. 3.30: pSPT19-Vektorkonstrukte zur Generierung von *acn*-, *tpi*- und *cisI*-spezifischen DIG-markierten antisense-mRNAs durch *in vitro* Transkription.

Die Bindungsstellen der T7 RNA Polymerase und die Richtung der *in vitro* Transkription sind durch Pfeile dargestellt.

Die Detektion der Aconitase-, TIM- und Citrat Synthase 1-Transkripte in autotrophen bzw. heterotrophen *T. tenax*-Zellen erfolgte über stringente Hybridisierung der entsprechenden spezifischen DIG-Sonden mit Gesamt-RNA aus *T. tenax* und anschließenden immunologischen Nachweis der RNA-RNA-Hybride.

Wie in Abb. 3.31 erkennbar, wird mit der *cisI*-Sonde ein Hybridisierungssignal bei ca. 1,2 kb detektiert. Dieses Transkript entspricht der Länge des Citrat Synthase 1-Gens (1125 bp), läßt also eine monocistronische mRNA vermuten. Ein Unterschied in der mRNA-Kopienzahl in autotrophen und heterotrophen Zellen ist nicht erkennbar, was für eine konstitutive Transkription des *cisI*-Gens spricht. Interessanterweise erscheinen in heterotrophen Zellen zwei weitere Signale (ca. 1,3 kb und 0,6 kb), deren Auftreten derzeit noch nicht abschließend interpretiert werden kann: Eine Organisation mit den unmittelbar benachbarten Leserahmen *orfA* und *orfC* ist aufgrund der entgegengesetzten Transkriptionsorientierung nicht möglich; eine gemeinsame Transkription mit dem *tpi*-Gen ist wegen fehlender Promotorstrukturen (s. o.) unwahrscheinlich und hätte außerdem ein erheblich größeres Transkript (ca. 3,2 kb) zur Folge. Möglicherweise ist das 1,3 kb Signal auf eine Kreuzreaktion der *cisI*-Sonde mit dem Transkript einer weiteren, erst kürzlich im Genom identifizierten Citrat Synthase (*cis2*, 1233 bp) zurückzuführen.

Im Gegensatz zur Hybridisierung mit der *cis1*-Sonde werden mit den *tpi*- und *acn*-spezifischen Sonden je zwei Signale gleicher Intensität detektiert. Das jeweils größere Transkript reagiert mit beiden Sonden und entspricht mit einer Größe von ca. 3,5 kb einem bicistronischen Transkript von *acn* und *tpi*. Die beiden kleineren Signale wiederum (2,7 kb mit der *acn*-Sonde, 0,7 kb mit der *tpi*-Sonde) korrelieren mit den erwarteten Längen der Einzeltranskripte.

Beim Vergleich der Transkriptmengen in autotrophen und heterotrophen Zellen wird deutlich, daß unter heterotrophen Bedingungen, also in Anwesenheit von Glucose, eine deutlich höhere mRNA-Kopienzahl vorliegt als unter autotrophen Bedingungen mit CO₂ als alleiniger Kohlenstoffquelle. Die koordinierte Expression von Aconitase und TIM wird offensichtlich über die angebotene Kohlenstoffquelle reguliert.

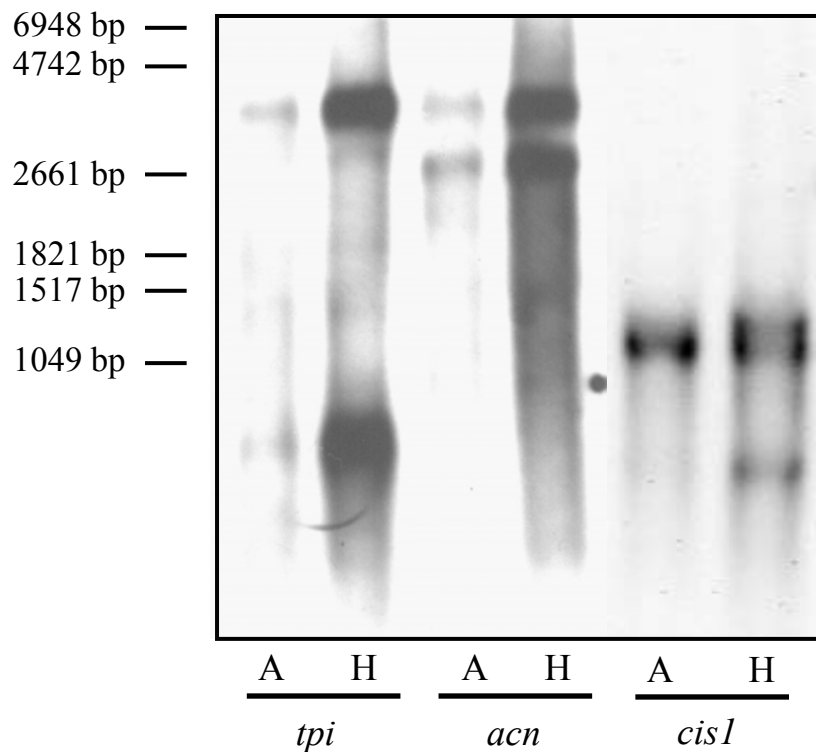


Abb. 3.31: Northern Blot-Analysen zum Nachweis der *acn*-, *tpi*- und *cis1*-Transkripte in *T. tenax*.

Die Hybridisierung der spezifischen Sonden mit je 5 µg Gesamt-RNA aus autotrophen (A) bzw. heterotrophen (H) *T. tenax*-Zellen der frühstationären Wachstumsphase erfolgte über Nacht bei 68°C. Die Größe der Transkripte wurde mit Hilfe eines RNA-Längenstandards (linke Seite) bestimmt.

4. DISKUSSION

4.1 Die PEPS von *T. tenax*

Trotz ihrer zentralen Rolle in der Gluconeogenese und in der Bereitstellung von PEP für biosynthetische Zwecke (z.B. für die Biosynthese aromatischer Aminosäuren über den Shikimat-Weg) sind die PEP Synthetasen der Prokaryoten bisher nur wenig untersucht worden.

Umfassende biochemische Daten sind derzeit nur für die *E. coli* PEPS und für die Enzyme der Euryarchaeoten *P. furiosus* und *M. thermautotrophicus* verfügbar.

Für die PEPS des Crenarchaeoten *S. marinus* sind zwar intensive strukturelle Studien durchgeführt worden, allerdings ist nicht bekannt, ob das Enzym aktiv ist und welche katalytischen Fähigkeiten es besitzt, da es ausschließlich aufgrund seiner ungewöhnlichen Größe gereinigt wurde.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich u.a. mit der PEPS von *T. tenax*, der ersten crenarchaealen PEPS, die sowohl strukturell als auch funktionell charakterisiert wurde.

4.1.1 Sequenzeigenschaften und phylogenetische Einordnung der *T. tenax* PEPS

Da die Aktivität der PEPS im zellfreien Rohextrakt von *T. tenax* durch verschiedene Konkurrenzreaktionen beeinflusst wird und somit nur schwer nachweisbar ist [SIEBERS, 1995], sollte die heterologe Expression der PEPS in *E. coli* eingehende strukturelle und funktionelle Untersuchungen dieses Enzyms ermöglichen. Voraussetzung hierfür war die Identifizierung des PEPS-codierenden Gens im *T. tenax*-Genom.

Die zu Beginn dieser Arbeit verfügbaren Sequenzinformationen der bacterialen PEPSs aus *E. coli*, *H. pylori* und *Synechocystis spec.* und der archaealen Pendanten aus *S. marinus*, *P. furiosus* und *M. jannaschii* wurden zur Identifizierung konservierter Bereiche durch multiple Alignierung herangezogen. Mit Hilfe der daraus abgeleiteten Oligonucleotid-Primer konnte ein Teilstück des PEPS-Gens durch PCR amplifiziert werden, das im weiteren als Sonde für die Identifizierung der Gesamtsequenz mittels Southern Blot-Analysen eingesetzt wurde.

Das *pps*-Gen von *T. tenax* umfaßt 2433 bp und codiert für ein Protein von 810 Aminosäuren. NCBI-Datenbankvergleiche der Primärstruktur mit dem Programm BLAST zeigten nicht nur eine ausgeprägte Sequenzähnlichkeit des Enzyms zu archaealen und bacterialen PEPSs, sondern auch zu Vertretern der anderen zwei Gruppen der PEP-utilizing enzymes, den PPDKs und dem Enzym I des bacterialen Phosphotransferasesystems.

Phylogenetische Analysen aller derzeit verfügbaren archaealen PEPS-Sequenzen (Abb. 4.1) decken sich größtenteils mit den auf 16S rRNA-Vergleichen beruhenden Stammbäumen der Organismen: Mit einem Bootstrap-Wert von 100% ist eine klare Trennung der Crenarchaeota und Euryarchaeota erkennbar, die *Pyrococcus*-Spezies und die Methanogenen bilden jeweils eine monophyletische Gruppe.

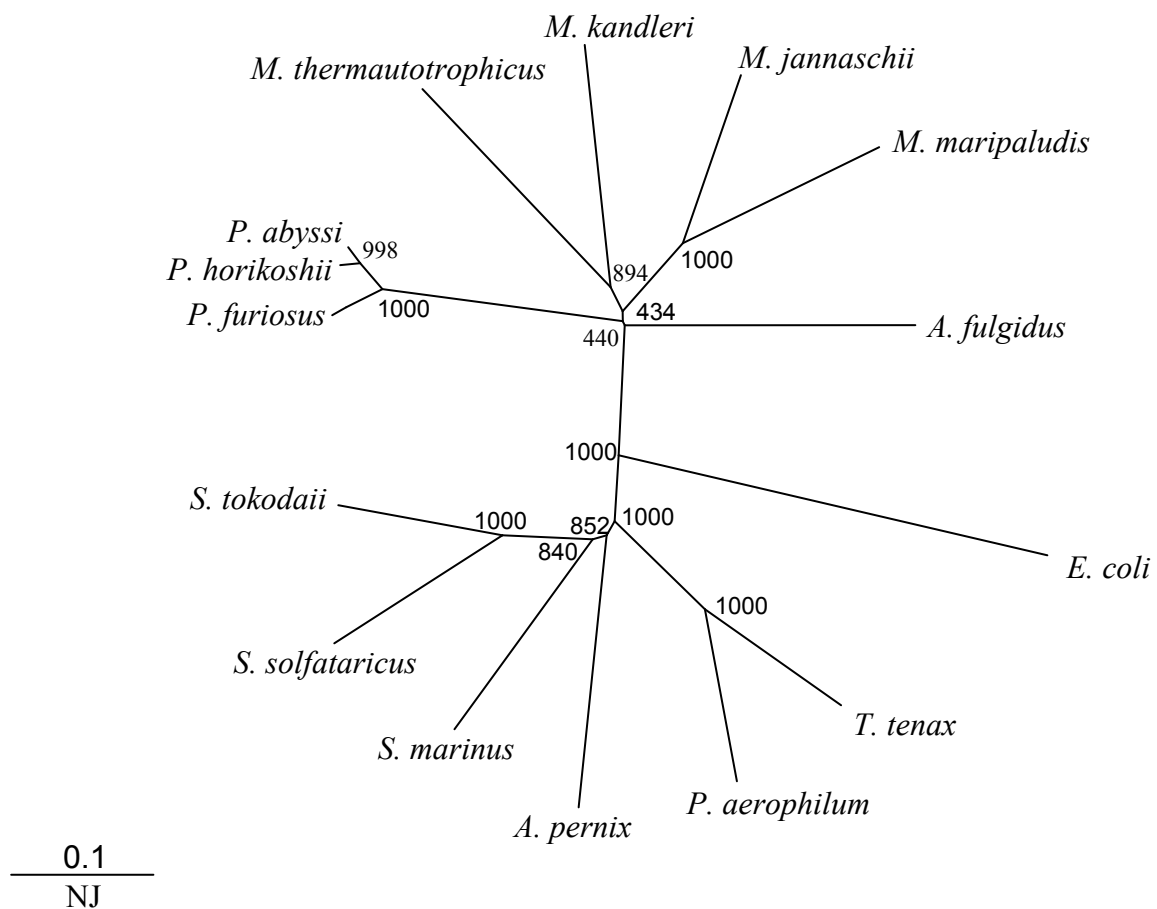


Abb. 4.1: Phylogenetischer Baum der archaealen PEP Synthetasen.

Der Baum wurde mit Hilfe des Programms CLUSTAL W [THOMPSON et al., 1994] nach dem Neighbor-Joining-Algorithmus [SAITOU & NEI, 1987] berechnet. Die Bootstrap-Werte neben jedem Knoten spiegeln jeweils 1000 Berechnungen wider. Die *E. coli* PEPS als einzige bakterielle Sequenz dient der Bewurzelung des archaealen Baums.

Einträge der Proteinsequenzen in der NCBI-Datenbank (<http://ncbi.nlm.nih.gov>): *P. aerophilum* AAL64184; *A. pernix* Q9YEC5; *S. marinus* P46893; *S. solfataricus* AAK41168; *S. tokodaii* BAB66277; *A. fulgidus* O29548; *M. jannaschii* Q57962; *M. maripaludis* AAD28736; *M. thermautotrophicus* O27190; *M. kandleri* AAM01469; *P. furiosus* P42850; *P. horikoshii* O57830; *P. abyssi* Q9V2H7; *E. coli* P23538; *T. tenax* diese Arbeit.

4.1.2 Expression der *T. tenax* PEPS in *E. coli*: Identifikation und Charakterisierung zweier Isoformen

Die heterologe Expression der *T. tenax* PEPS in *E. coli* resultierte im Auftreten zweier Proteinbanden (apparente Molekülmassen von 94 bzw. 88 kDa) in der denaturierenden Gelelektrophorese. Die N-terminalen Sequenzen beider Protein-Spezies waren jedoch –mit Ausnahme des prozessierten aminoständigen Methionin-Restes– identisch mit der von der Nukleotidsequenz des *pps*-Gens abgeleiteten Aminosäuresequenz. Eine Trunkierung am N-Terminus als Grund für das unterschiedliche Migrationsverhalten konnte somit ausgeschlossen werden.

Ähnliche Beobachtungen wurden auch für das PEPS-Homolog (MAPS) aus *S. marinus* gemacht [CICICOPOL et al., 1994]: Bei der Anreicherung eines hochmolekularen Protein-Komplexes, der später als MAPS identifiziert wurde, trat das gereinigte Protein zum Teil als Doppelbande im SDS-Gel auf, wobei die relative Intensität der Banden zueinander variierte. Die Bromcyan-Spaltung beider Protein-Spezies lieferte Peptide mit identischen apparenten Molekulargewichten, deren N-terminalen Sequenzen alle dem MAPS Protein zugeordnet werden konnten.

Die PEPS aus *P. furiosus* hat laut SDS-PAGE eine apparente Molekülmasse von 92 kDa, wobei in einigen Enzym-Präparationen unter bestimmten Bedingungen, die jedoch von den Autoren nicht weiter erläutert wurden, ebenfalls eine zweite Bande mit größerer Mobilität auftrat [HUTCHINS et al., 2001]. Die spezifischen PEPS-Aktivitäten dieser unterschiedlichen Präparationen (mit einer und zwei Banden) waren vergleichbar, und beide Protein-Spezies hatten die gleiche N-terminale Aminosäuresequenz.

Die *P. furiosus* PEPS ist ebenfalls Gegenstand der Untersuchungen einer japanischen Arbeitsgruppe: Die N-terminale Sequenz des zunächst als AMP-abhängige (ATP-bildende) Kinase klassifizierten Enzyms [SAKURABA et al., 1999] stimmt laut Datenbankvergleich mit dem Genprodukt des *mlrA*-Gens überein [ROBINSON & SCHREIER, 1994], dessen Sequenz parallel dazu auch von JONES et al. [1995] bestimmt und als putatives PEPS-codierendes Gen (*ppsA*) beschrieben wurde. Bei der Reinigung der heterolog in *E. coli* exprimierten *P. furiosus* PEPS traten ebenfalls zwei Proteinbanden in der SDS-PAGE auf, deren N-terminalen Sequenzen mit dem *ppsA*-Genprodukt übereinstimmten [SAKURABA et al., 2001]. Interessanterweise waren die apparenten Molekülmassen dieser beiden Protein-Spezies mit 78 und 83 kDa um einiges kleiner als bei HUTCHINS et al. [2001] beschrieben (92 kDa, s.o.). Weitere Widersprüche, vor allem die stark voneinander abweichenden katalytischen Fähigkeiten der nativen und rekombinanten *P. furiosus* PEPS (s. Kap. 4.1.4), aber auch die Unterschiede in den veröffentlichten

Nukleotidsequenzen (*mlrA*: 2385 bp; *ppsA*: 2454 bp), sind bisher von den beiden Arbeitsgruppen nicht weiter geklärt worden.

Wie hier dargestellt, wurde das Auftreten einer PEPS-Doppelbande in der SDS-PAGE unabhängig voneinander für die nativen Enzyme aus *S. marinus* und *P. furiosus*, sowie für die rekombinante *P. furiosus* PEPS beobachtet. In keinem dieser Fälle wurden jedoch weiterführende Untersuchungen zur Aufklärung des Phänomens durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese getestet, daß es sich bei den zwei in der SDS-PAGE auftretenden Protein-Spezies um phosphorylierte bzw. nicht-phosphorylierte Isoformen der PEPS handeln könnte. Gestützt wird diese Vermutung durch die Beobachtung, daß die relative Intensität der Proteinbanden zueinander durch unterschiedliche Vorinkubation der *T. tenax* PEPS verändert werden kann: Nach Inkubation der PEPS mit ATP und MgCl₂ war nur noch die 94 kDa-Proteinbande zu sehen, während in Gegenwart von Pyruvat, also unter Bedingungen, die eine Dephosphorylierung des Enzyms bewirken, ein verstärktes Auftreten der 88 kDa-Bande beobachtet werden konnte. Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß es sich bei der Protein-Spezies mit der geringeren Mobilität um die phosphorylierte Form der PEPS und bei der Protein-Spezies mit der größeren Mobilität um die nicht-phosphorylierte Form der PEPS handelt. Die Empfindlichkeit des phosphorylierten Aminosäure-Restes gegenüber sauren pH sowie die Tatsache, daß kein Effekt durch Alkali-Behandlung erzielt werden konnte, sind Indizien dafür, daß es sich bei dem modifizierten Rest um einen Histidin- oder Lysin-Rest handelt [DUCLOS et al., 1991]. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß der Austausch des putativen katalytischen Histidin-Restes an Position 406 der *T. tenax* PEPS gegen einen nicht-phosphorylierbaren Glutamin-Rest nicht nur in einem Verlust der Enzymaktivität resultierte, sondern auch das Auftreten von nur einer Proteinbande im Polyacrylamid-Gel bewirkte, die gegenüber Säure- und Alkali-Behandlung stabil war. Das Laufverhalten der PEPS-Mutante H406Q in der SDS-PAGE entsprach jedoch weder der nicht-phosphorylierten noch der phosphorylierten Form der Wildtyp-PEPS. Möglicherweise sind konformelle Änderungen aufgrund des eingeführten Glutamin-Restes für dieses Laufverhalten verantwortlich.

Insgesamt sprechen die Ergebnisse deutlich dafür, daß als Folge einer reversiblen Phosphorylierung am katalytischen His406 zwei Isoformen der *T. tenax* PEPS mit unterschiedlicher Mobilität im SDS-Gel auftreten. Dabei handelt es sich bei der langsamer wandernden Protein-Spezies (app. Molekülmasse 94 kDa) um die phosphorylierte, bei der Protein-Spezies mit der größeren Mobilität (app. Molekülmasse 88 kDa) um die nicht-phosphorylierte Form der PEPS.

4.1.3 Vergleichende Quartärstrukturanalyse archaealer und bacterialer PEP Synthetasen

Quartärstrukturanalysen mittels Molekularsiebchromatographie lassen für die *T. tenax* PEPS eine multimere Struktur vermuten: Das Enzym eluierte im Ausschlußvolumen der verwendeten Gelfiltrationssäulen und hat damit unter nativen Bedingungen eine Molekülmasse > 440.000 Da, während das theoretische Molekulargewicht der Untereinheiten ca. 90.500 beträgt.

Die Bildung eines hochmolekularen Proteinkomplexes steht im Einklang mit Analysen der PEPS aus *P. furiosus* und *S. marinus*, die ebenfalls multimere Enzyme darstellen. Während die *P. furiosus* PEPS in zwei Formen vorliegt, einem aktiven Homooctamer von ca. 690 kDa und einer inaktiven Form mit einer molekularen Masse von ca. 1,64 MDa [HUTCHINS et al., 2001], handelt es sich bei der *S. marinus* PEPS gemäß der Retentionszeit bei der Gelfiltration um ein Multimer von ca. 2 MDa [CICICOPOL et al., 1994]. Massenbestimmungen mittels Raster-Transmissionselektronenmikroskopie (STEM) und Cryo-Elektronenmikroskopie [HARAUZ et al., 1996; HARAUZ & LI, 1997] bestätigten, daß die *S. marinus* PEPS einen 2,25 MDa großen homomultimeren Komplex aus 24 Untereinheiten bildet. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen ein globuläres Partikel von ca. 20 nm Durchmesser mit einer zentralen Pore oder Kavität. In dem von CICICOPOL et al. [1999] vorgeschlagenen Modell des MAPS-Komplexes besteht das 24-mer aus sechs Bündeln von Tetrameren, die zu den Ecken eines imaginären Oktaeders zeigen. Ein Atommodell der monomeren Untereinheit wurde durch "molecular modeling" mit der Kristallstruktur der *C. symbiosum* PPDK als Referenz konstruiert [LI et al., 2000].

Im Gegensatz zu den erwähnten archaealen Enzymen handelt es sich bei der *E. coli* PEPS, dem einzigen bacterialen Enzym, für das Strukturdaten verfügbar sind, um ein reversibel dissoziierbares Dimer [NARINDRASORASAK & BRIDGER, 1977].

Die Tendenz hyperthermophiler Organismen zur Bildung höherer Oligomerisierungsformen ist schon für mehrere Enzyme beschrieben worden, u.a. für Phosphoribosyl-Anthranilat-Isomerasen [HENNIG et al., 1997], Ornithin-Carbamoyl-Transferasen [VILLERET et al., 1998] und 3-Phosphoglycerat Kinasen [HESS et al., 1995]. Ein weiteres Beispiel sind die TIMs der hyperthermophilen Archaea *T. tenax*, *P. woesei* und *M. fervidus*, die im Gegensatz zu den dimeren TIMs mesophiler Archaea, Bacteria und Eucarya durch die Bildung von Tetrameren charakterisiert sind [KOHLHOFF et al., 1996; SCHRAMM, 1999; SCHRAMM et al., 2001]. Kristallstruktur-Analysen der *P. woesei* TIM zeigten, daß zwei klassische TIM Dimere über vorwiegend hydrophobe Wechselwirkungen interagieren, während gleichzeitig durch Verkürzung von Helices und Loops eine kompakte Struktur der Monomeren erreicht wird [WALDEN et al., 2001].

Der beschriebene Trend zur Bildung oligomerer Proteinkomplexe in Hyperthermophilen wird im Zusammenhang mit einer erhöhten Thermostabilität durch zusätzliche Untereinheiten-Kontakte diskutiert. In der *S. marinus* PEPS wurde vermutet, daß die C-terminale Domäne des Enzyms für die Assemblierung der Untereinheiten zu einem multimeren Komplex verantwortlich ist [CICICOPOL et al., 1999]. Durch die Konstruktion von Deletionsmutanten und synthetischen Peptiden, die auf ihr Potential zur Oligomerisierung untersucht wurden, konnte die Existenz eines kurzen C-terminalen Oligomerisierungsmotivs bestätigt werden, auf das schon multiple Sequenzalignierungen und Sekundärstrukturvorhersagen hingedeutet hatten. Bei diesem Motiv handelt es sich um eine C-terminale Extension von ca. 20 Aminosäureresten mit einem hohen Potential zur Bildung von α -helikalen coiled-coil Strukturen, einem weitverbreiteten Assemblierungsmotiv in Proteinen.

Neben der *S. marinus* PEPS besitzt auch das ebenfalls multimeren *P. furiosus* Enzym das C-terminale Oligomerisierungsmotiv, während die PEP Synthetasen aus diversen anderen hyperthermophilen Organismen dieses Motiv nicht enthalten (z.B. *M. jannaschii*, *A. fulgidus* und *A. aeolicus*). Leider liegen in diesen Fällen keine entsprechenden Daten bezüglich der Quartärstruktur vor. Eine Sekundärstrukturanalyse der *T. tenax* PEPS mit dem Programm COILS [www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html; LUPAS et al., 1991; LUPAS, 1996] ergab ebenfalls keinerlei Hinweise auf die Bildung von coiled-coil Strukturen am C-Terminus des Enzyms (Daten nicht gezeigt), so daß hier ein anderer Mechanismus zur Vermittlung der Untereinheiten-Assemblierung vermutet wird.

4.1.4 Katalytische Eigenschaften der PEPS von *T. tenax*

Die PEPS von *T. tenax* katalysiert die irreversible Umsetzung von Pyruvat und ATP zu PEP, AMP und P_i . Die Rückreaktion, also die Pyruvat-Synthese, konnte nicht nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der vermuteten anabolen Rolle der PEPS im EMP-Weg von *T. tenax*.

Im Gegensatz dazu ist für die Enzyme aus *E. coli*, *P. furiosus* und *M. thermoautotrophicus* jeweils auch die Rückreaktion beschrieben (K_M -Werte s. Tab. 4.1). Allerdings katalysieren die zwei archaealen Vertreter die Rückreaktion mit einer katalytischen Effizienz, die zwei Größenordnungen kleiner ist als die der PEP-Synthese [HUTCHINS et al., 2001; EYZAGUIRRE et al., 1982]. Zusammen mit den hohen K_M -Werten für Phosphat (s. Tab. 4.1) scheint es offensichtlich, daß die PEPS auch in diesen Organismen eine praktisch irreversible Phosphorylierung von Pyruvat katalysiert.

Tab. 4.1: Kinetische Parameter verschiedener PEP Synthetasen.

^aHUTCHINS et al., 2001; ^bSAKURABA et al., 1999; ^cEYZAGUIRRE et al., 1982; ^dBERMAN & COHN, 1970; n.b.: nicht bestimmt. Die spez. Aktivitäten wurden in Richtung PEP-Synthese bestimmt.

Kinetische Parameter	<i>T. tenax</i>	<i>P. furiosus</i> ^a / ^b	<i>M. thermoautotrophicus</i> ^c	<i>E. coli</i> ^d
K _{M, Pyruvat} [mM]	0,27	0,11 / n.b.	0,04	0,083
K _{M, ATP} [mM]	1	0,13 / n.b.	0,7	0,028
K _{M, PEP} [mM]	-	0,4 / 1	0,36	n.b.
K _{M, AMP} [mM]	-	1 / 0,1	0,45	n.b.
K _{M, Pi} [mM]	-	38,4 / 35	100	10,4
spez. Aktivität [U/mg]	0,3	14,9 / 0,3	0,29	8,9

Im Gegensatz zu den von HUTCHINS et al. [2001] veröffentlichten Daten findet die Reaktion der *P. furiosus* PEPS laut SAKURABA et al. [1999, 2001] bevorzugt in Richtung Pyruvat-Synthese statt: Das gereinigte Enzym zeigt in der Rückreaktion (Pyruvat-Synthese) mit einer spezifischen Aktivität von 13,3 U/mg eine 44fach höhere Reaktionsrate als in Richtung PEP-Synthese (0,3 U/mg). Die Autoren sehen daher die Aufgabe der PEPS in der Regeneration von ATP aus AMP, das durch die ADP-abhängigen Enzyme Glucokinase und Phosphofruktokinase in früheren Schritten des modifizierten EMP-Weges von *P. furiosus* gebildet wird [KENGEN et al., 1994]. Als weiteren Hinweis auf die Richtigkeit dieser Hypothese führen sie die geringe Adenylat Kinase-Aktivität (0,013 U/mg) in Rohextrakten von *P. furiosus* an. Laut HUTCHINS et al. [2001] ist allerdings eine signifikante Adenylat Kinase-Aktivität in *P. furiosus*-Extrakten nachweisbar (0,22-0,37 U/mg), was darauf hindeutet, daß die Interkonversion von AMP, ADP und ATP auch durch einen konventionellen Mechanismus stattfinden kann. Aufgrund der offensichtlich unklaren katalytischen Eigenschaften der *P. furiosus* PEPS ist ein Vergleich mit dem Enzym aus *T. tenax* äußerst schwierig.

Die PEPS von *T. tenax* ist ebenso wie die anderen archaealen und bacterialen Enzyme hochspezifisch für ihr Cosubstrat: Von den untersuchten Phosphatdonatoren wurde ausschließlich ATP für die PEP-Synthese genutzt.

Untersuchungen zur Regulierbarkeit der *T. tenax* PEPS haben gezeigt, daß die Enzym-Aktivität auf vielfältige Weise durch Intermediate des Energiestoffwechsels und durch Stoffwechselprodukte des zentralen Kohlenhydratmetabolismus (EMP-Weg, TCA-Zyklus) moduliert wird. Vor allem α -Ketoglutarat, AMP und ADP wirken stark inhibierend auf die

Umsatzgeschwindigkeit der PEPS, in geringerem Maße auch Glycerinaldehyd-3-Phosphat, Dihydroxyacetonphosphat, 3-Phosphoglycerat und P_i . Eine Aktivierbarkeit der PEPS-Aktivität konnte nicht festgestellt werden. Diese Ergebnisse decken sich weitgehend mit den Daten, die bezüglich der Regulierbarkeit der PEPS aus *E. coli* und *M. thermotrophicus* verfügbar sind (s. Tab. 4.2). Unterschiede zur *T. tenax* PEPS resultieren möglicherweise aus der Tatsache, daß die entsprechenden Effektorstudien unter sättigenden Substrat-Konzentrationen (ATP bei *E. coli* bzw. ATP und Pyruvat bei *M. thermotrophicus*) durchgeführt wurden. Generell kann man sagen, daß der Energiestatus der Zelle eine wichtige Rolle bei der Regulation der PEPS-Aktivität spielt: So wird bei einem niedrigem Energiestatus (geringes ATP/ADP-Verhältnis) der Kohlenstoff-Flux in den TCA-Zyklus gewährleistet, während mit zunehmendem ATP/ADP-Verhältnis die Bereitstellung von Kohlenstoff für biosynthetische Zwecke durch die Aktivität der PEPS begünstigt wird. Für die *E. coli* PEPS konnte weiterhin gezeigt werden, daß die Regulation der Enzymaktivität als Reaktion auf Veränderungen des Energiestatus in der Zelle durch verschiedene Stoffwechselintermediate (s. Tab. 4.2) moduliert wird. Es wird daher ein sehr komplexes, möglicherweise kumulatives Inhibierungsmuster der *E. coli* PEPS angenommen [CHULAVATNATOL & ATKINSON, 1973].

Tab. 4.2: Inhibitoren der PEPS-Enzymaktivität (Richtung PEP-Synthese).

Die relativen Umsatzgeschwindigkeiten, die aus den angeführten Effektor-Konzentrationen resultieren, sind in % angegeben. ^aEYZAGUIRRE et al., 1982; ^bCHULAVATNATOL & ATKINSON, 1973; n.b.: nicht bestimmt; (-) : kein Effekt.

Inhibitoren	<i>T. tenax</i>		<i>M. thermotrophicus</i> ^a		<i>E. coli</i> ^b	
α-Ketoglutarat	0,25 mM	50%	5 mM	70%	1,5 mM	50%
AMP	0,75 mM	50%	5 mM	50%	2 mM	50%
ADP	2,25 mM	50%	5 mM	64%	2 mM	62%
P_i	5 mM	59%	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
GAP	7,5 mM	50%	n.b.	n.b.	(-)	(-)
3-Phosphoglycerat	7,5 mM	69%	n.b.	n.b.	2 mM	90%
DHAP	10 mM	71%	n.b.	n.b.	(-)	(-)
PP _i	n.b.	n.b.	2,5 mM	64%	n.b.	n.b.
Oxalacetat	(-)	(-)	n.b.	n.b.	0,3 mM	50%
PEP	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	0,1 mM	47%
ADP-Glucose	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	3 mM	80%

4.1.5 Transkriptanalysen des *pps*-Gens von *T. tenax*

Laut Northern Blot-Analysen mit einer *pps*-spezifischen mRNA-Sonde wird das *pps*-Gen als monocistronisches Transkript abgelesen, das mit einer Länge von ca. 2,5 kb der Größe des für die PEPS codierenden Leserahmens (2433 bp) entspricht.

Primer Extension-Experimente zur Bestimmung des Transkriptionsstartpunktes des *pps*-Gens lieferten trotz Variation der Primer und der Bedingungen für Primer-Annealing und cDNA-Synthese kein eindeutiges Signal, möglicherweise aufgrund von Problemen der Reversen Transkriptase mit Sekundärstrukturen innerhalb der mRNA. Eine weitere denkbare Erklärung wären alternative Transkriptionsstarts des *pps*-Gens. Für diese Hypothese spricht zum einen die Tatsache, daß in der Sequenzregion stromaufwärts des *pps*-Gens mehrere putative Promotorstrukturen (BRE-site, TATA-Box, s. Abb. 3.3) identifiziert werden konnten, zum anderen wurde die Möglichkeit eines multiplen Promotorsystems auch schon für das *ppsA*-Gen von *E. coli* beschrieben: Während NÈGRE et al. [1998] den Transkriptionsstartpunkt 50 bp stromaufwärts des Translationsstarts bestimmten, konnten NIERBACH et al. [1992] zeigen, daß ein Bereich 650 bp stromaufwärts des *ppsA*-Gens ebenfalls für die Transkription essentiell ist. Nach Meinung der Autoren sprechen diese Ergebnisse dafür, daß das *ppsA*-Gen durch ein multiples Promotor-System kontrolliert wird, in dem jeder Promotor unter bestimmten physiologischen Bedingungen aktiviert wird [NÈGRE et al., 1998].

Durch Northern Blot-Analysen mit autotroph bzw. heterotroph gezogenen *T. tenax*-Zellen verschiedener Wachstumsphasen sollte der Einfluß der trophischen Anzuchtbedingungen und der Wachstumsphase auf die *pps*-Transkriptmenge untersucht werden. Dabei stellte sich heraus, daß die angebotene Kohlenstoffquelle (CO₂ unter autotrophen bzw. Glucose unter heterotrophen Bedingungen) in der logarithmischen und spätlogarithmischen Wachstumsphase offensichtlich keinen Einfluß auf die mRNA-Kopienzahl des *pps*-Gens hat und die Expression der PEPS somit allem Anschein nach konstitutiv erfolgt.

Die Beobachtung, daß die *T. tenax* PEPS als gluconeogenetisches Enzym unter heterotrophen Wachstumsbedingungen genauso stark exprimiert wird wie unter autotrophen Bedingungen, scheint zunächst wenig Sinn zu machen: Es ist eher unwahrscheinlich, daß das von der PEPS produzierte PEP unter heterotrophen Bedingungen für biosynthetische Zwecke benötigt wird, da durch die Glykolyse ausreichend PEP bereitgestellt wird. Möglicherweise erlaubt die konstitutive Expression der PEPS (neben der beobachteten Regulation des Enzyms auf Proteinebene, s. 4.1.4) eine rasche Reaktion der Zelle auf die Verschiebung des Kohlenstoff-Angebotes von organischen Substraten nach CO₂. Eine schnelle Anpassung des Metabolismus an

die äußeren Bedingungen bietet dem Organismus eventuell einen Selektionsvorteil, so daß der erhöhte Energieaufwand durch die konstitutive Synthese der PEPS in Kauf genommen wird.

Möglicherweise ist die konstitutive Expression der PEPS auch unter dem Aspekt einer sogenannten 'energy spilling'-Reaktion über einen scheinbar nutzlosen Kreislauf ('futile cycle') zwischen PEP und Pyruvat durch das antagonistisch arbeitende Enzympaar PK/PEPS zu sehen: Es wird vermutet, daß ein solcher 'futile cycle' von einigen Bakterien bei Wachstum in Gegenwart hoher Kohlenhydrat-Konzentrationen genutzt wird, um überschüssige Energie zu entfernen, da diese für die Zelle schädlich sein kann [RUSSELL, 1998]. In Substrat-gesättigten Organismen entsteht häufig ein metabolisches Ungleichgewicht, da während der Glykolyse mehr Energie produziert wird als für Zellerhalt und -wachstum nötig ist. Die Beseitigung der katabolen Energie, die über den anabolen Bedarf hinaus produziert wird, wird 'energy spilling' genannt [RUSSELL & COOK, 1995].

Die Existenz eines 'futile cycle' zwischen PEP und Pyruvat konnte bisher jedoch in keinem Organismus experimentell nachgewiesen werden: In *E. coli* z.B. wird ein potentieller 'futile cycle' zwischen Glykolyse und Gluconeogenese durch die straffe Regulation dieser Stoffwechselwege verhindert [CHAO & LIAO, 1994; PATNAIK et al., 1992]. Im Gegensatz dazu wird die PEPS-Expression des heterotrophen Euryarchaeoten *P. furiosus* durch das Substrat Maltose induziert [ROBINSON & SCHREIER, 1994; SAKURABA et al., 2001]. Bei Wachstum auf hohen Maltose-Konzentrationen macht die *P. furiosus* PEPS einen großen Anteil (ca. 5%) des zellulären Proteins aus [HUTCHINS et al., 2001]. Unter diesen Wachstumsbedingungen wäre ein metabolisches Ungleichgewicht der Zelle denkbar, so daß die Autoren einen 'energy spilling'-Mechanismus als Funktion der PEPS in *P. furiosus* nicht ausschließen.

Übereinstimmend mit der Hypothese einer 'energy spilling'-Reaktion als Erklärung für eine vergleichbare Expression der *T. tenax* PEPS unter heterotrophen wie unter autotrophen Bedingungen ist auch die Beobachtung, daß –im Gegensatz zur logarithmischen und spätlogarithmischen Wachstumsphase– in der frühstationären Wachstumsphase eine deutliche Dominanz der *pps*-Transkripte in autotrophen verglichen mit heterotrophen Zellen vorliegt: Der im Laufe der heterotrophen Fermentation zunehmende Mangel an elementarem Schwefel, dessen Reduktion die Energie für eine aktive Glucoseaufnahme liefert [SIEBERS, 1995], führt zu einer geringeren Energie-Produktion der Zelle und macht demnach eine Entfernung überschüssiger Energie mit Hilfe des 'futile cycle' nicht mehr erforderlich. Die Expressionsrate der PEPS ist somit unter diesen Bedingungen nur sehr gering. Unter autotrophen Wachstumsbedingungen wiederum ist die PEPS als gluconeogenetisches Enzym unentbehrlich, so daß eine Expression des *pps*-Gens während der gesamten Fermentation essentiell ist.

Über die entsprechenden Regulationsmechanismen der PEPS-Expression kann derzeit nur spekuliert werden. Bisher sind in *T. tenax* weder Faktoren bekannt, welche die mRNA-Stabilität bzw. die Geschwindigkeit der mRNA-Degradation beeinflussen, noch konnte die Existenz von regulativen Transkriptionsfaktoren nachgewiesen werden. Allerdings befindet sich stromaufwärts des *pps*-Gens ein Bereich mit großer Ähnlichkeit zur Cra-Bindungsstelle der Enterobakterien (s. Abb. 3.16 A). Das Cra-Protein (catabolite repressor-activator) ist ein globaler Transkriptionsregulator in Enterobakterien und gehört zur GalR-LacI-Familie der Regulatorproteine [JAHREIS et al., 1991]. Es wurde ursprünglich als Repressor-Protein des Fructose-PTS in *E. coli* und *S. typhimurium* identifiziert (früherer Name: FruR) [GEERSE et al., 1986; CHIN et al., 1987]. Cra kontrolliert in diesen Organismen die Richtung des Kohlenstoff-Flusses durch verschiedene Stoffwechselwege: Es reprimiert die Gene für Enzyme der Glykolyse und des Entner-Doudoroff-Weges, aktiviert hingegen die Gene für Enzyme der Gluconeogenese (u.a. *ppsA* [GEERSE et al., 1989]), des Glyoxylat-Nebenweges und des TCA-Zyklus.

Auf der Basis mehrerer identifizierter Cra-Operatoren wurde eine Konsensus-Sequenz für die Bindung von Cra abgeleitet [RAMSEIER et al., 1995]. Es handelt sich dabei um ein unvollkommenes Palindrom, dessen linke Hälfte besser konserviert ist als die rechte. Die Bindung des Cra-Proteins an die Operator-Sequenz erfolgt stromabwärts oder überlappend mit dem Promotor, wenn die Transkription inhibiert wird, wohingegen bei Aktivierung der Transkription eine Bindung stromaufwärts vom Promotor erfolgt.

Die putative Cra-Bindungsstelle stromaufwärts des *pps*-Gens von *T. tenax* deckt sich in 11 von 14 Positionen mit der beschriebenen Konsensus-Sequenz (s. Abb. 3.16B). In Gelretardations-Experimenten mit einem 212 bp großen PCR-Produkt, welches die putative Cra-Bindungsstelle beinhaltet, konnte gezeigt werden, daß mit *T. tenax* Rohextrakt, nicht aber mit verschiedenen *E. coli* Rohextrakten (WT, *fruR*⁻-Mutante, Cra-Expressionsstamm) eine Retardation des PCR-Produktes und damit eine spezifische Interaktion zwischen Protein und DNA hervorgerufen wird. Eine Bindung des *E. coli*-eigenen Cra-Proteins an die putative Cra-Bindungsstelle stromaufwärts des *T. tenax pps*-Gens wäre auch –trotz der auffallenden Sequenzähnlichkeit mit der Konsensus-Sequenz in Enterobakterien– sehr überraschend gewesen.

Da das im Gelretardationsexperiment verwendete PCR-Produkt mehrere mögliche Promotorstrukturen beinhaltet (BRE-site, TATA-Box, s. Abb. 3.16A), kann zur Zeit noch nicht abschließend geklärt werden, ob der putativen Cra-Bindungsstelle wirklich eine funktionelle Bedeutung durch Bindung eines regulativen Transkriptionsfaktors zukommt, oder ob der retardierte Protein-DNA-Komplex auf die spezifische Bindung basaler Transkriptionsfaktoren (TBP, TFB) zurückzuführen ist. Experimente mit kürzeren DNA-Sonden, in denen die putativen

Promotor-Regionen fehlen, sowie DNaseI *in vitro*-footprinting Analysen könnten nähere Anhaltspunkte liefern. Der upstream-Bereich des *pps*-Gens von *T. tenax* wird derzeit in unserer Arbeitsgruppe genutzt, um über Affinitätschromatographie mit dem 'DNA-binding protein purification Kit' (Roche Diagnostics) eine Anreicherung des vermeintlichen regulativen Transkriptionsfaktors zu erreichen (persönliche Information B. Siebers). Ziel ist es, den gereinigten Transkriptionsfaktor N-terminal zu sequenzieren und mit dieser Sequenzinformation das entsprechende Gen zu identifizieren. Bisher konnte im laufenden *T. tenax*-Genomprojekt kein Cra-homologes Gen identifiziert werden, jedoch wurden Sequenzen mit Ähnlichkeiten zu anderen bacterialen Transkriptionsregulatoren, z.B. zu PurR, einem Regulator der GalR-LacI-Familie, aber auch zu Regulatoren aus der Lrp/AsnC- und ArsR-Familie gefunden.

4.2 Die PPDK von *T. tenax*

4.2.1 Sequenzeigenschaften und phylogenetische Einordnung der *T. tenax* PPDK

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ging man lange Zeit davon aus, daß das Enzym PPDK nur auf Eucarya und Bacteria beschränkt sei und es keine Vertreter in der dritten Entwicklungslinie des Lebens, den Archaea, gäbe.

Überraschenderweise konnte jedoch im Zuge des Genomsequenzierungsprojektes von *T. tenax*, das auf der Grundlage der in dieser Arbeit konstruierten Genbank durchgeführt wurde, eine Teilsequenz (950 bp) eines *ppdk*-Genhomologen identifiziert werden. Ausgehend von dieser Teilsequenz wurde eine spezifische DNA-Sonde für Southern-Hybridisierungen generiert, mit deren Hilfe das komplette *ppdk*-Gen (2748 bp) kloniert und anschließend sequenziert werden konnte. Neben dieser ersten archaealen *ppdk*-Sequenz wurden mittlerweile auch Genhomologe in *P. aerophilum* [FITZ-GIBBON et al., 2002], *T. acidophilum* [RUEPP et al., 2000], *T. volcanium* [KAWASHIMA et al., 2000], *M. mazei* Goel [DEPPENMEYER et al., 2002] und *M. acetivorans* [GALAGAN et al., 2002] gefunden. Da es sich dabei ausschließlich um Sequenzinformationen aus den entsprechenden Genomprojekten handelt, existieren für die jeweiligen Genprodukte jedoch keine biochemischen Daten.

Aufgrund der geringen Anzahl verfügbarer archaealer PPDK-Sequenzen läßt die phylogenetische Analyse außer einer eindeutigen Trennung der Crenarchaeota und Euryarchaeota keine weiteren Aussagen zu (Abb. 4.2).

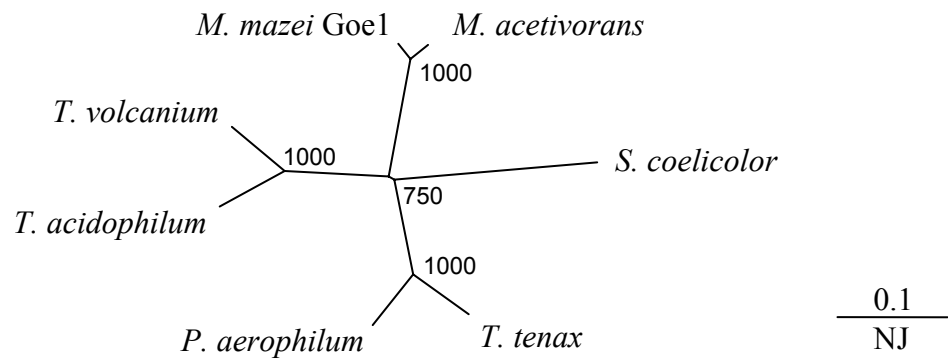


Abb. 4.2: Phylogenetischer Baum der archaealen PPKs bzw. PPK-Homologen.

Der Baum wurde mit Hilfe des Programms CLUSTAL W [THOMPSON et al., 1994] nach dem Neighbor-Joining-Algorithmus [SAITOU & NEI, 1987] berechnet. Die Bootstrap-Werte neben jedem Knoten spiegeln jeweils 1000 Berechnungen wider. Die *S. coelicolor* PPK als einzige bakterielle Sequenz dient der Bewurzelung des archaealen Baums.

Einträge der Proteinsequenzen in der NCBI-Datenbank (<http://ncbi.nlm.nih.gov>): *P. aerophilum* AAL64879; *T. acidophilum* CAC12015; *T. volcanium* BAB60148; *M. mazei* Goel AAM31466; *M. acetivorans* AAM04052; *S. coelicolor* T37037; *T. tenax* diese Arbeit.

Stromaufwärts des *ppdk*-Gens konnten zwei Sequenzbereiche mit signifikanter Ähnlichkeit zu den crenarchaealen Konsensus-Sequenzen der Promotorelemente BRE-site und TATA-Box [SOPPA, 1999] identifiziert werden (Abb. 4.3).

Der geringe Abstand dieser beiden putativen Promotor-Strukturen zum codierenden Bereich des *ppdk*-Gens sowie die Tatsache, daß sich vor dem Startcodon keine Shine-Dalgarno Sequenz (SD) und somit keine Ribosomenbindestelle befindet, legt den Schluß nahe, daß Transkriptions- und Translationsstart des *ppdk*-Gens nahe beieinander liegen, wie schon für drei weitere Gene aus *T. tenax* beschrieben [*pyk*: SCHRAMM et al., 2000; *fba*: SIEBERS et al., 2001; *gapN*: B. Tjaden, unveröffentlicht; s. Abb. 4.3]. Dies deckt sich mit der Beobachtung, daß einige Archaea (z.B. *S. solfataricus*) einen großen Anteil an mRNAs ohne Shine-Dalgarno Sequenz bzw. ohne 5'-UTR besitzen [CONDO et al., 1999], wobei der Mechanismus der Translationsinitiation derzeit noch unbekannt ist. Da diese SD-unabhängige Translation in allen drei Domänen des Lebens gefunden wurde, handelt es sich dabei vermutlich um einen primitiven Mechanismus des Ribosoms, das Initiationscodon für die Translation zu erkennen. Die SD-Sequenzen der Bacteria und Archaea und die CAP-Struktur am 5'-Ende eucaryaler mRNAs sind wahrscheinlich spätere Verfeinerungen dieses Mechanismus.

	<u>BRE-site:</u>	<u>TATA-Box:</u>
Crenarchaeale		
Konsensus-Sequenzen:	RNWAAW	YTTTTAAA
<i>fba:</i>	<u>GACAAAAAG</u> ATATTAAA ATGGATAATTGCTCAAGGATCA <u>ATG</u>	
<i>pyk:</i>	<u>CGGTATAGCTT</u> CATATAAA TAAAGATCGCGCGAGTAGTATCT <u>GTG</u>	
<i>gapN:</i>	<u>CCGTCAA</u> CTTTATTA AAGGTGTAGCCGTAGGTATAGT <u>ATG</u>	
<i>ppdk:</i>	<u>CAATAAT</u> CTTTTTAT TTTATGCTATAATTAGATTAT <u>ATG</u>	

Abb. 4.3: Putative Promotorstrukturen des *ppdk*-Gens von *T. tenax*.

Die Promotorregionen der *fba*-, *pyk*- und *gapN*-Gene von *T. tenax* sowie die crenarchaealen Konsensus-Sequenzen von BRE-site und TATA-Box [SOPPA, 1999] wurden zur Identifikation putativer Promotorstrukturen des *ppdk*-Gens herangezogen. Die Transkriptionstartpunkte sind durch Pfeile dargestellt, die Translationsstarts sind doppelt unterstrichen. Die Promotorelemente BRE-site und TATA-Box sind unterstrichen bzw. fettgedruckt.

4.2.2 Vergleichende Quartärstrukturanalyse der PPDK

Mit einer über Gelfiltration bestimmten Molekülmasse von ca. 250 kDa und einer theoretischen Molekülmasse der Enzym-Untereinheiten von ca. 100 kDa liegt die *T. tenax* PPDK unter nativen Bedingungen wahrscheinlich als homomeres Dimer vor. Als solche sind auch die bacterialen PPDKs (Bsp. *C. symbiosum* [HERZBERG et al., 1996], *Microbispora rosea* [EISAKI et al., 1999]) beschrieben, im Gegensatz zu den PPDKs in Pflanzen und Protozoen, bei denen es sich um tetramere Enzyme handelt [Bsp. *Z. mays* [SUGIYAMA, 1973]; *E. histolytica* [SAAVEDRA-LIRA et al., 1998]).

Die PPDK-Tetramere sind größtenteils Kälte-sensitiv: In *Z. mays* z.B. bewirken Temperaturen unter 10°C eine Inaktivierung des Enzyms [SUGIYAMA, 1973], hervorgerufen durch Dissoziation der aktiven Tetramere in inaktive Dimere und Monomere, die bei Wärmeeinwirkung wieder reassoziieren können. So zeigt die Mais-PPDK in Gelfiltrationsexperimenten bei niedrigen Temperaturen ein anderes Elutionsprofil als bei RT: Das apparente Molekulargewicht der PPDK ist bei 4°C nur halb so groß wie bei RT, ein sicherer Hinweis für eine Kälte-induzierte Dissoziation der Tetrameren.

Derzeit kann noch nicht ausgeschlossen werden, daß die PPDK von *T. tenax* nicht ebenfalls einer Dissoziation während der Molekularsiebchromatographie unterliegt und es sich damit um ein tetrameres Enzym handelt. Endgültige Klarheit darüber würden Sedimentationsgleichgewichtsanalysen mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifugation bringen. Hilfreich wären außerdem strukturelle Daten weiterer archaer PPDKs.

4.2.3 Katalytische Eigenschaften der PPDK von *T. tenax*

Im Gegensatz zur unidirektionell arbeitenden PEPS katalysiert die PPDK von *T. tenax* eine reversible Reaktion, nämlich die Synthese von Pyruvat in kataboler sowie die Synthese von PEP in anaboler Richtung. Allerdings läßt die PPDK aufgrund ihrer enzymatischen Eigenschaften die Pyruvat-Synthese als bevorzugte Reaktionsrichtung erkennen: Zum einen ist die Umsatzgeschwindigkeit der katabolen Reaktion doppelt so groß wie die der anabolen Reaktion, zum anderen ist die Substrataffinität für das katabole Cosubstrat AMP um mindestens 4 Größenordnungen höher als zum anabolen Cosubstrat ATP (s. Tab. 4.3). In anaboler Richtung konnten weiterhin ausgeprägte homotrop kooperative Effekte mit ATP beobachtet werden, die möglicherweise mit einer positiven Kooperativität zwischen den zwei ATP-Bindungsstellen des PPDK-Dimers erklärbar sind. Inwieweit dies eine physiologische Bedeutung hat, ist derzeit nicht klar.

Tab. 4.3: Vergleich der katalytischen Eigenschaften der *T. tenax* PPDK in kataboler und anaboler Reaktionsrichtung.

Für die Messungen der Umsatzgeschwindigkeiten wurde hitzegefällter Zellextrakt (s. 2.7.2.2) verwendet. n.b.: nicht bestimmt; * extrapoliert unter Berücksichtigung eines Q_{10} -Wertes von 2.

katalytische Parameter	katabol (Pyruvat-Synthese)	anabol (PEP-Synthese)
V_{\max} bei 55°C	0,46 U/mg	n.b.
V_{\max} bei 70°C	1,38 U/mg*	0,62 U/mg
K_M (PEP)	0,455 mM	-
K_M (AMP)	< 1µM	-
K_M (Pyruvat)	-	0,76 mM
K_M (ATP)	-	9 mM

Während für die anabole Reaktionsrichtung (PEP-Synthese) keine Regulierbarkeit durch Stoffwechselprodukte oder Intermediate des Energiestoffwechsels nachgewiesen werden konnte, wurde für die katabole Reaktion (Pyruvat-Synthese) eine 50%ige Inhibierung der Umsatzgeschwindigkeit in Gegenwart von 0,3 mM ATP, 6 mM UDP oder 9 mM Glc-1-P festgestellt. Wie bei der PEPS spielt offensichtlich auch bei der Regulation der PPDK-Aktivität der Energiestatus der Zelle eine wichtige Rolle: Ist er zu niedrig, ist also das ATP/ADP-Verhältnis gering, so muß ein verstärkter Kohlenhydrat-Abbau zwecks Energiegewinn stattfinden. Unter diesen Bedingungen ist die PPDK aktiv und setzt PEP zu Pyruvat um, wobei gleichzeitig ATP synthetisiert wird. Ein hoher ATP-Spiegel und damit ein hoher Energiestatus der Zelle bewirkt dagegen eine Hemmung der PPDK und unterstützt damit zusätzlich die Vermutung, daß dem Enzym im zentralen Kohlenhydratmetabolismus von *T. tenax* hauptsächlich eine katabole Funktion zukommt.

Ein wesentlich geringeres Inhibierungspotential als ATP besitzen UDP und Glc-1-P. Der hemmende Effekt dieser beiden Substanzen kann derzeit noch nicht befriedigend erklärt werden, zumal Glc-1-P als Aktivator der ausschließlich in kataboler Richtung arbeitenden GAPN beschrieben ist [BRUNNER, 1998] und damit entsprechend der Annahme einer vorwiegend katabolen Funktion der PPDK eher eine Aktivierung des Enzyms vermuten lassen würde.

Die Informationen zur Regulierbarkeit der PPDKs durch Stoffwechselmetabolite sind in der Literatur äußerst dürftig. Für Effektorstudien wurden lediglich die Produkte der PPDK-Reaktionen herangezogen; diese bewirkten häufig eine kompetitive feedback-Hemmung der PPDK-Aktivität [REEVES, 1968; BENZIMAN & PALGI, 1970]. Oxalat, ein Strukturanalogon zum PEP, bewirkt in *C. symbiosum* und *G. duodenalis* eine effiziente Inhibierung der PPDK [MICHAELS et al., 1975; HILTPOLD et al., 1999]. Desweiteren konnte gezeigt werden, daß einige nicht-hydrolysierbare Pyrophosphat-Analoga (Bisphosphonate) einen hemmenden Effekt auf die PPDK-Aktivität verschiedener parasitärer Protozoa ausüben [SAAVEDRA-LIRA et al., 1998; HILTPOLD et al., 1999]. Die Tatsache, daß PP_i -abhängige Enzyme wie die PPDK zwar in vielen Pathogenen (z.B. *Trypanosoma*, *Giardia*, *E. histolytica*), nicht aber in ihren menschlichen Wirten vorkommen, macht die Bisphosphonate und andere spezifische Inhibitoren der PPDK zu potentiellen Kandidaten für die Entwicklung neuer und effektiver Arzneimittel.

In C_3 - und C_4 -Pflanzen findet eine Regulation der PPDK-Aktivität hauptsächlich durch eine Licht-/Dunkel-induzierte reversible Phosphorylierung an einem konservierten Threonin-Rest des aktiven Zentrums statt. Katalysiert wird diese posttranslationale Modifikation dabei von einem bifunktionellen Regulator-Protein. Bei geringer Lichtintensität erfolgt eine Inaktivierung der PPDK durch Phosphorylierung des regulatorischen Threonin-Restes mit ADP; im Licht wird die

Aktivität durch Dephosphorylierung mit P_i -unter gleichzeitiger Bildung von PP_i - wieder hergestellt. Diese Regulation gewährleistet unter Bedingungen, unter denen die Pflanze Photosynthese betreibt, eine Regeneration des primären CO_2 -Akzeptors PEP durch die Aktivität der PPDK, während im Dunkeln die Aktivität der PPDK abgeschaltet wird.

Obwohl der erwähnte regulatorische Threonin-Rest in allen PPDKs und auch unter den anderen Mitgliedern der PEP-utilizing enzymes hochkonserviert ist (s. Abb. 3.5), konnte eine derartige Kontrolle der Protein-Aktivität bislang nur in PPDKs von Pflanzen nachgewiesen werden.

4.3 Die PEPS und PPDK als zentraler Bestandteil des Kohlenhydratmetabolismus von *T. tenax*

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, gehen in der Variante des EMP-Weges von *T. tenax* mit dem Einsatz einer reversiblen PP_i -PFK und einer PK mit geringem allosterischen Potential zwei wichtige Kontrollpunkte des klassischen EMP-Weges der Bacteria verloren. Offensichtlich als Ersatz für diese fehlenden Regulationsmöglichkeiten besitzt *T. tenax* neben der klassischen bidirektionellen NADP-GAPDH eine nicht-phosphorylierende GAPDH (GAPN), die unidirektionell arbeitet und sich durch ein hohes Regulationspotential auszeichnet.

Daneben konnte in dieser Arbeit mit der PEPS und PPDK im unteren Abschnitt des EMP-Weges von *T. tenax* eine weitere wichtige Schaltstelle des Kohlenhydratmetabolismus identifiziert werden, die über den anabolen und katabolen Kohlenstoff-Flux in der Zelle entscheidet. Dabei lassen die *in vitro* festgestellten katalytischen und regulativen Eigenschaften für beide Enzyme eine bevorzugte Reaktionsrichtung erkennen und ermöglichen damit eine Ableitung ihrer *in vivo*-Funktion: Während die PEPS aufgrund ihrer irreversiblen Umsetzung von Pyruvat zu PEP als strikt anaboles Enzym festgelegt ist, scheint der reversibel arbeitenden PPDK hinsichtlich ihrer enzymatischen Eigenschaften eher eine katabole Funktion zuzukommen. Beide Enzyme werden durch den Energiestatus der Zelle sowie durch verschiedene Intermediate des Kohlenhydrat-Metabolismus in ihrer Aktivität beeinflusst. Die PPDK ergänzt dabei die katalytischen und regulativen Fähigkeiten der PK und erlaubt durch die Verwendung alternativer Cosubstrate (AMP, PP_i) eine flexiblere Nutzung der intrazellulären Pools.

Der derzeitige Kenntnisstand bezüglich der Funktion und Regulation des EMP-Weges von *T. tenax* ist in Abb. 4.4 zusammengefaßt.

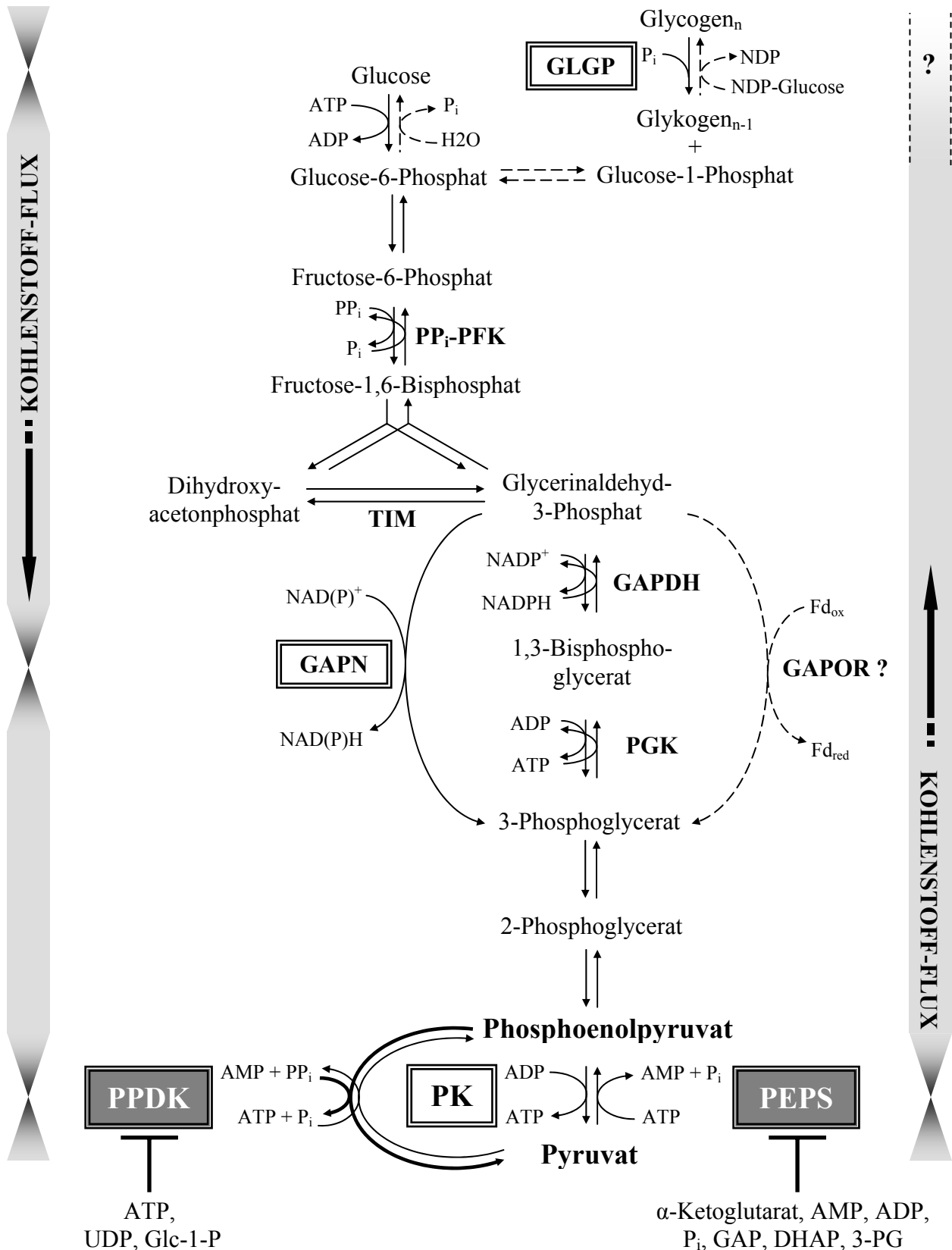


Abb. 4.4: Wichtige Kontrollpunkte des EMP-Weges von *T. tenax*: Eine Arbeitshypothese. Enzyme, die auf Proteinebene reguliert werden, sind eingerahmt. Bisher unbekannte Reaktionen sind durch gestrichelte Pfeile angedeutet. Die Inhibitoren der PPDK und PEPS sind unterhalb der Enzyme dargestellt. Die Kontrollpunkte des katabolen und anabolen Kohlenstoff-Fluxes durch den reversiblen EMP-Weg werden am linken bzw. rechten Rand durch Verengungen veranschaulicht.

Die konstitutive Expression der PEPS und PPDK während der logarithmischen Wachstumsphase von *T. tenax* erlaubt eine schnelle Anpassung des Organismus an Änderungen der trophischen Bedingungen und ergänzt damit die eher langfristige Regulation der PK auf mRNA-Ebene, die verstärkt unter heterotrophen Wachstumsbedingungen exprimiert wird [SCHRAMM et al., 2000]. Desweiteren wird durch die konstitutive Expression gewährleistet, daß die PEPS auch unter heterotrophen Bedingungen –möglicherweise als Ventil für überschüssige Energie (s. 4.1.5)– katalytisch aktiv ist, während die PPDK als 'stand-by' Enzym bei einem Energie-Notstand unter autotrophen Bedingungen über den Abbau interner Kohlenstoff-Quellen (Glykogen) die Synthese von ATP erlaubt.

Mit zunehmendem Einblick in die molekulargenetischen und physiologischen Eigenschaften zeichnet sich *T. tenax* damit immer mehr als Organismus mit großer stoffwechselphysiologischer Vielfalt und Anpassungsfähigkeit aus. Als weiteres Beispiel für die metabolische Vielfalt von *T. tenax* sei hier auch das erst kürzlich im Zuge des Genomsequenzierungsprojekts identifizierte Genhomolog einer Ferredoxin-abhängigen Glycerinaldehyd-3-Phosphat Oxidoreduktase (GAPOR) genannt: Dieses Enzym katalysiert (wie die GAPN) eine nicht-phosphorylierende irreversible Oxidation von Glycerinaldehyd-3-Phosphat zum 3-Phosphoglycerat. Erste Northern Blot-Analysen haben die Expression der GAPOR in *T. tenax* bestätigt (persönliche Information B. Siebers).

Ein derartiger funktionaler Parallelismus, wie er in *T. tenax* durch die Enzympaare PK/PPDK und GAPN/GAPOR demonstriert wird, erlaubt dem Organismus eine schnelle und effiziente Reaktion auf Veränderungen der extra- und intrazellulären Bedingungen (Nährstoffverhältnisse, Energiezustand, Metabolit-Pools etc.) und bietet damit möglicherweise einen Selektionsvorteil gegenüber konkurrierenden Organismen.

4.4 Das *acn-tpi-cis1*-Gencluster von *T. tenax*

Bereits in der Dissertation von A. Schramm aus unserer Arbeitsgruppe wurde auf die ungewöhnliche Lokalisation zweier Leserahmen mit Ähnlichkeit zu Genen des reversiblen TCA-Zyklus (*acn*, Aconitase; *cis1*, Citrat Synthase 1) in der unmittelbaren Nachbarschaft des *tpi*-Gens von *T. tenax* hingewiesen [SCHRAMM, 1999]. Die zum damaligen Zeitpunkt noch unvollständigen Nukleotidsequenzen beider Leserahmen wurden im Zuge dieser Arbeit durch Klonierung und Sequenzierung mehrerer genomischer Restriktionsfragmente komplettiert. Dabei konnte eine Lokalisation weiterer Gene des zentralen Kohlenhydratmetabolismus in den flankierenden Bereichen ausgeschlossen werden.

Die bis dahin ausschließlich auf Sequenz-Ähnlichkeiten beruhende Vermutung, daß es sich bei den identifizierten Leserahmen im genomischen Kontext des *tpi*-Gens um die codierenden Gene der Aconitase und Citrat Synthase 1 handelt, wurde durch heterologe Expression der Gene in *E. coli* und anschließende Überprüfung der Enzymaktivitäten der Genprodukte bestätigt.

Das *acn-tpi-cis1*-Gencluster von *T. tenax* ist insofern äußerst ungewöhnlich, als daß das *tpi*-Gen der meisten bisher untersuchten Archaea und Bacteria im Verbund mit weiteren Genen des EMP-Weges vorliegt und nicht wie im Fall von *T. tenax* mit Genen des TCA-Zyklus. Mit Hilfe des STRING-Webinterface [Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins; <http://www.bork.embl-heidelberg.de/STRING>; SNEL et al., 2000; VON MERING et al., 2003] war es möglich, in einem 'Neighborhood Display' den genomischen Kontext des *tpi*-Gens verschiedener Bacteria und Archaea mit der entsprechenden Genorganisation im *T. tenax*-Genom zu vergleichen:

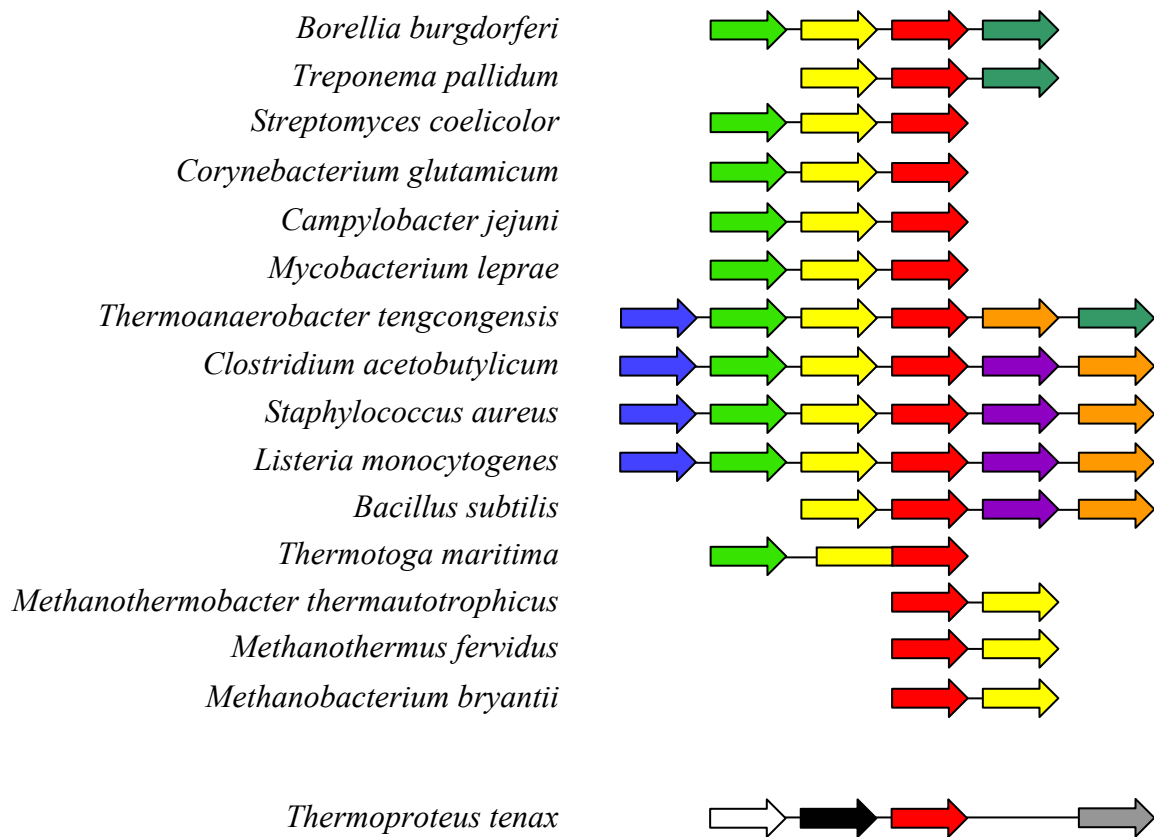


Abb. 4.5: 'Neighborhood Display' bacterialer und archaealer *tpi*-Gene.

Blau: codierendes Gen eines Transkriptionsregulators (putativ); hellgrün: *gap*, Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase; gelb: *pgk*, 3-Phosphoglyceratkinase; rot: *tpi*, Triosephosphat Isomerase; dunkelgrün: (putative) Untereinheit einer Präprotein-Translokase; orange: *eno*, Enolase; lila: *pgm*, Phosphoglyceratmutase; weiß: codierendes Gen eines Eisentransport-Proteins (putativ); schwarz: *acn*, Aconitase; grau: *cis1*, Citrat Synthase 1.

Die Existenz von Genclustern ist ein auffälliges Merkmal bacterialer Genome. Sie codieren dabei häufig für Enzyme, die konsekutive Reaktionen eines Stoffwechselweges katalysieren. Die Gencluster werden meist ausgehend von einem einzigen Promotor in eine polycistronische mRNA transkribiert, so daß über die Kontrolle dieses Promotors eine Regulation des gesamten Stoffwechselweges möglich ist.

Auch im Genom von *T. tenax* wurden mittlerweile mehrere Cluster funktionell assoziierter Gene identifiziert: So sind z.B. die codierenden Gene der PGK und NADP-abhängigen GAPDH [BRUNNER et al., 2001] bzw. der FBP-Aldolase und PP_i-PFK [SIEBERS et al., 2001] in Operonstrukturen organisiert. Die Gene werden co-transkribiert und unterliegen in Abhängigkeit von den trophischen Anzuchtbedingungen einer gemeinsamen Regulation auf Transkriptionsebene.

Wie Northern Blot-Analysen des *acn-tpi-cisI*-Clusters von *T. tenax* gezeigt haben, wird das *cisI*-Gen singular transkribiert, während die mit nur 40 bp Abstand sehr eng assoziierten Gene für Aconitase und TIM als bicistronisches Transkript abgelesen werden. Das zusätzliche Auftreten der kleineren mRNA-Spezies, die von ihrer Größe dem jeweiligen monocistronischen Transkript entsprechen, ist wahrscheinlich das Resultat einer posttranskriptionalen Prozessierung des Co-Transkripts. Die Annahme einer getrennten Transkription beider Gene ist aufgrund der fehlenden Promotorstrukturen stromaufwärts des *tpi*-Gens eher unwahrscheinlich.

Die koordinierte Expression der Aconitase und TIM wird überraschenderweise über die angebotene Kohlenstoffquelle reguliert: So liegt unter heterotrophen Anzuchtbedingungen, also in Anwesenheit von Glucose, eine deutlich höhere mRNA-Kopienzahl von *acn* und *tpi* vor als unter autotrophen Bedingungen mit CO₂ als alleiniger Kohlenstoffquelle. Die Tatsache, daß der Aconitase und TIM als essentielle Komponenten reversibler Stoffwechselwege (TCA-Zyklus bzw. EMP-Weg) eine wichtige Funktion sowohl im Anabolismus als auch im Katabolismus von *T. tenax* zukommt, hätte jedoch eher eine konstitutive Expression beider Enzyme, also unabhängig von den trophischen Anzuchtbedingungen vermuten lassen. Möglicherweise erfordert die in kataboler Richtung stattfindende Energiekonservierung einen höheren Kohlenstoff-Flux durch die Stoffwechselwege als die Bereitstellung von Syntheseprodukten in anaboler Richtung und liefert damit eine Erklärung für die verstärkte Expression der Aconitase und TIM unter heterotrophen Wachstumsbedingungen. Im Widerspruch dazu steht jedoch die Beobachtung, daß sowohl die TIM (persönliche Information A. Schramm) als auch die Aconitase (diese Arbeit, Daten nicht gezeigt) in zellfreien Extrakten von autotroph und heterotroph gezogenen *T. tenax*-Zellen vergleichbare Enzymaktivitäten aufweisen. Diese Diskrepanz zwischen Transkript-Menge und Enzymaktivitäten ist möglicherweise ein Hinweis für posttranskriptionale Regulationsmechanismen.

Die gemeinsame Transkription von *tpi* und *acn* spiegelt eine enge funktionelle Beziehung zwischen EMP-Weg und TCA-Zyklus in *T. tenax* wider und ist ein starkes Indiz für eine direkte Koordination der beiden reversiblen Stoffwechselwege unter anabolen und katabolen Bedingungen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Der Mechanismus und die komplexen Regulationsnetzwerke des zentralen Kohlenhydrat-metabolismus von *T. tenax* stehen seit einigen Jahren im Mittelpunkt der Forschung unserer Arbeitsgruppe. Ein wesentliches Anliegen der vorliegenden Untersuchungen bestand darin, den ersten Schritt des anabolen EMP-Weges, d.h. die Synthese von Phosphoenolpyruvat (PEP) aus Pyruvat zu charakterisieren.

Die Identifizierung einer PEP Synthetase (PEPS)-Aktivität in zellfreien Extrakten von *T. tenax* [SIEBERS, 1995] wurde im Zuge dieser Arbeit durch Klonierung und Sequenzierung des codierenden Gens (*pps*) bestätigt. Überraschenderweise wurde zusätzlich ein Leserahmen identifiziert, der für ein bis dahin ausschließlich auf die Domänen Eucarya und Bacteria beschränktes Enzym, die Pyruvat, Phosphat Dikinase (PPDK) codiert: Dieses Enzym katalysiert in einer mit der PEPS vergleichbaren Reaktion die Interkonversion von Pyruvat und PEP. Mit dem Ziel, durch einen direkten Vergleich der katalytischen und regulativen Fähigkeiten von PEPS und PPDK diese ungewöhnliche Coexistenz zu erklären, wurden beide Enzyme heterolog in *E. coli* exprimiert und sowohl funktionell als auch strukturell charakterisiert.

Die PEPS von *T. tenax* katalysiert in einer irreversiblen Reaktion die Umsetzung von Pyruvat und ATP zu PEP, AMP und P_i. Durch gezielte Mutagenese konnte der Histidin-Rest an Position 406 des Enzyms als katalytisch essentieller Rest identifiziert werden, der am Phosphorylgruppen-Transfer von ATP auf Pyruvat beteiligt ist. Die aus der reversiblen Phosphorylierung des katalytischen Histidin-Restes resultierenden Isoformen der PEPS (phosphoryliert / dephosphoryliert) zeichnen sich durch unterschiedliche Mobilität in der SDS-PAGE aus.

Unter nativen Bedingungen bildet die *T. tenax* PEPS –wie die Enzyme der hyperthermophilen Archaea *P. furiosus* und *S. marinus*– einen multimeren Proteinkomplex aus. Im Gegensatz dazu liegt die mesophile *E. coli* PEPS als homomeres Dimer vor. Dieser Befund steht im Einklang mit der bei hyperthermophilen Organismen häufig beobachtbaren Tendenz zur Bildung höherer Oligomerisierungsformen von Enzymproteinen, die im Zusammenhang mit der Anpassung an extrem hohe Temperaturen diskutiert wird.

Wie am heterolog in *E. coli* exprimierten Enzym untersucht, zeichnet sich die PEPS durch ein großes regulatorisches Potential aus: So wirken vor allem α -Ketoglutarat, AMP und ADP, in geringerem Maße auch GAP, DHAP, 3-PG und P_i inhibierend auf die Umsatzgeschwindigkeit des Enzyms.

Die PPDK von *T. tenax* katalysiert die reversible Umsetzung von Pyruvat, ATP und P_i zu PEP, AMP und PP_i . Die enzymatischen Eigenschaften der PPDK lassen allerdings eine deutliche Bevorzugung der katabolen Reaktion (Pyruvat-Synthese) erkennen. Im Gegensatz zur anabolen Reaktionsrichtung (PEP-Synthese), die offenbar nicht auf Protein-Ebene reguliert wird, wurde für die katabole Reaktion eine Inhibierung der Umsatzgeschwindigkeit durch ATP, UDP und Glc-1-P festgestellt.

Die *T. tenax* PPDK liegt nach vorliegenden Untersuchungen als homomeres Dimer vor und ist damit den bacterialen Enzym-Homologen ähnlicher als den PPDKs aus Pflanzen und Protozoen, die ausschließlich homomere Tetramere bilden.

Mit der strukturellen und funktionellen Charakterisierung der PEPS und der ersten archaealen PPDK konnte in dieser Arbeit im unteren Abschnitt des EMP-Weges eine wichtige Schaltstelle des Kohlenhydratmetabolismus von *T. tenax* identifiziert werden, die über die Richtung des Kohlenstoff-Fluxes in der Zelle entscheidet. Dabei ist die PEPS aufgrund ihrer unidirektionellen Reaktion als strikt anaboles Enzym festgelegt, während die PPDK vornehmlich eine katabole Funktion innerhalb des EMP-Weges erfüllt. Beide Enzyme werden durch den Energiestatus der Zelle sowie durch verschiedene Intermediate des Kohlenhydratmetabolismus auf Proteinebene reguliert. Die katabole Reaktion der PPDK ergänzt dabei die katalytischen und regulativen Fähigkeiten der PK.

Northern Blot-Analysen weisen darauf hin, daß die codierenden Gene der PEPS und PPDK während des exponentiellen Wachstums von *T. tenax* unter autotrophen und heterotrophen Bedingungen gleich stark exprimiert werden. Der eher überraschende Befund einer konstitutiven Expression wird damit erklärt, daß beide Enzyme bei einer Veränderung der trophischen Bedingungen möglichst unmittelbar für die entsprechend geforderte Reaktionsrichtung zur Verfügung stehen sollten und damit ausschließlich auf Proteinebene reguliert werden. Die konstitutive Expression läßt zudem die Möglichkeit offen, daß die PEPS auch unter heterotrophen, die PPDK auch unter autotrophen Bedingungen katalytisch aktiv ist: So kann die PEPS unter heterotrophen Bedingungen möglicherweise über einen 'futile cycle' mit der PK und/oder PPDK als Ventil für überschüssige Energie wirken ('energy-spilling'), während die PPDK bei einem Energie-Notstand unter autotrophen Bedingungen als 'stand-by' Enzym ATP-Synthese über den Abbau interner C-Quellen (Glykogen) erlaubt.

Im Gegensatz zur logarithmischen Wachstumsphase wird in der stationären Wachstumsphase bei heterotroph gezogenen *T. tenax*-Zellen eine deutliche Reduktion der *pps*-Transkripte beobachtet, die dafür spricht, daß die Transkription des Gens unter einer übergeordneten, Wachstumsphasen-abhängigen Kontrolle steht. Möglicherweise soll unter Bedingungen, die eher durch Energie-

Mangel der Zelle ausgezeichnet sind und damit ein Energie-Ventil als überflüssig erscheinen lassen, die Energie für die Expression der PEPS gespart werden.

In einem weiteren Projekt dieser Arbeit wurde die bis dahin unvollständige genetische Information eines *acn-tpi-cis1*-Genclusters durch Klonierung und Sequenzierung der flankierenden Bereiche komplettiert. Untersuchungen zur Transkription des ungewöhnlichen Genclusters haben gezeigt, daß das codierende Gen der Citrat Synthase 1 als monocistronische mRNA abgelesen wird, während das *tpi*-Gen mit dem eng assoziierten Aconitase-Gen cotranskribiert wird. Die verstärkte Expression von Aconitase und TIM unter heterotrophen Wachstumsbedingungen spricht dabei für eine Regulation auf Transkriptionsebene in Abhängigkeit von der angebotenen Kohlenstoff-Quelle.

Die gemeinsame Transkription von Genen des EMP-Weges (*tpi*) und des TCA-Zyklus (*acn*) wird als starkes Indiz für eine enge funktionelle Kopplung und direkte Koordination der beiden reversiblen Stoffwechselwege gewertet.

6. LITERATUR

ALTSCHUL SF, MADDEN TL, SCHÄFFER AA, ZHANG J, ZHANG Z, MILLER W & LIPMAN DJ (1997)

Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.
Nucl Acids Res 25, 3389-3402

ASHTON AR, BURNELL JN & HATCH MD (1984)

Regulation of C4 photosynthesis: inactivation of pyruvate, P_i dikinase by ADP-dependent phosphorylation and activation by phosphorolysis.
Arch Biochem Biophys 230, 492-503

BARNS SM, DELWICHE CF, PALMER JD & PACE NR (1996)

Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences.

Proc Natl Acad Sci USA 93, 9188-9193

BEH M, STRAUSS G, HUBER R, STETTER KO & FUCHS G (1993)

Enzymes of the reductive citric acid cycle in the autotrophic eubacterium *Aquifex pyrophilus* and in the archaeobacterium *Thermoproteus neutrophilus*.

Arch Microbiol 160, 306-311

BEN-BASSAT A, BAUER K, CHANG S-Y, MYAMBO K, BOOSMAN A & CHANG S (1987)

Processing of the initiation methionine from proteins: Properties of the *Escherichia coli* methionine aminopeptidase and its gene structure.

J Bacteriol 169, 751-757

BENZIMAN M (1966)

Implication of the direct phosphorylation of pyruvate in cellulose synthesis of *Acetobacter xylinum*.

Biochem Biophys Res Commun 24, 391-394

BENZIMAN M, EISEN N & PALGI A (1969)

Properties and physiological role of the PEP-Synthase of *A. xylinum*.

FEBS Letters 3, 156-159

BENZIMAN M & PALGI A (1970)

Characterization and properties of the pyruvate phosphorylation system of *Acetobacter xylinum*.

J Bacteriol 104, 211-218

BIRNBOIM HC & DOLY J (1979)

A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.

Nucl Acids Res. 7, 1513-1523

BLATTNER FR, PLUNKETT III G, BLOCH CA, PERNA NT, BURLAND V, RILEY M, COLLADOVIDES J, GLASNER JD, RODE CK, MAYHEW GF, GREGOR J, DAVIS NW, KIRKPATRICK HA, GOEDEN MA, ROSE DJ, MAU B & SHAO Y (1997)

The complete genome sequence of *Escherichia coli* K12.

Science 277, 1453-1462

BOEHRINGER MANNHEIM MANUAL (1995)

The DIG system user's guide for filter hybridization.

BRADFORD MM (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

BROCK TD, BROCK KM, BELLEY RT & WEISS RL (1972)

Sulfolobus: A new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature.

Arch Microbiol 84, 54-68

BRUCHHAUS I & TANNICH E (1993)

Primary structure of the pyruvate phosphate dikinase in *Entamoeba histolytica*.

Mol Biochem Parasitol 62, 153-156

BRUNNER NA (1998)

Physiologische Funktion und phylogenetische Zuordnung zweier Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenasen des hyperthermophilen Archaeums *Thermoproteus tenax*.

Dissertation, Universität-GH Essen

BRUNNER NA, BRINKMANN H, SIEBERS B & HENSEL R (1998)

NAD⁺-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Thermoproteus tenax*: The first identified member of the aldehyde dehydrogenase superfamily is a glycolytic enzyme with unusual regulatory properties.

J Biol Chem 273, 6149-6156

BRUNNER NA, SIEBERS B & HENSEL R (2001)

Role of two different glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases in controlling the reversible Embden-Meyerhof-Parnas pathway in *Thermoproteus tenax*: regulation on protein and transcript level.

Extremophiles 5, 101-109

BUCHANAN BB (1974)

Orthophosphate requirement for the formation of phosphoenolpyruvate from pyruvate by enzyme preparations from photosynthetic bacteria.

J Bacteriol 119, 1066-1068

BULT CJ, WHITE O, OLSEN GJ, ZHOU L, FLEISCHMANN RD, SUTTON GG, BLAKE JA, FITZGERALD LM, CLAYTON RA, GOCAYNE JD, KERVELAGE AR, DOUGHERTY BA, TOMB J-F, ADAMS MD, REICH CI, OVERBEEK R, KIRKNESS EF, WEINSTOCK KG, MERRICK JM, GLODEK A, SCOTT JL, GEOGHAGEN NSM, WEIDMAN JF, FUHRMANN JL, NGUYEN D, UTTERBACK TR, KELLEY JM, PETERSON JD, SADOW PW, HANNA MC, COTTON MD, ROBERTS KM, HURST MA, KAINE BP, BORODOVSKY M, KLENK H-P, FRASER CM, SMITH HO, WOESE CR & VENTER JC (1996)

Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*.

Science 273, 1058-1073

BURNELL JN & HATCH MD (1984)

Regulation of C4 photosynthesis: identification of a catalytically important histidine residue and its role in the regulation of pyruvate, P_i dikinase.

Arch Biochem Biophys 231, 175-182

BURNELL JN & HATCH MD (1985)

Regulation of C4 photosynthesis: purification and properties of the protein catalyzing ADP-mediated inactivation and P_i-mediated activation of pyruvate, P_i dikinase.

Arch Biochem Biophys 237, 490-503

BURNELL JN & HATCH MD (1986)

Activation and inactivation of an enzyme catalyzed by a single, bifunctional protein: a new example and why.

Arch Biochem Biophys 245, 297-304

CARSTENS C-P & WAESCHE A (1999)

Codon bias-adjusted BL21 derivatives for protein expression.

Strategies Newsletter Vol.12(2)

CARROLL LJ, XU Y, THRALL SH, MARTIN BM & DUNAWAY-MARIANO D (1994)

Substrate binding domains in pyruvate phosphate dikinase.

Biochemistry 33, 1134-1142

CHAO Y-P & LIAO JC (1994)

Metabolic responses to substrate futile cycling in *Escherichia coli*.

J Biol Chem 269, 5122-5126

CHASTAIN CJ, FRIES JP, VOGEL JA, RANDKLEV CL, VOSSEN AP, DITTMER SK, WATKINS EE, FIEDLER LJ, WACKER SA, MEINHOVER KC, SARATH G & CHOLLET R (2002)

Pyruvate, Orthophosphate Dikinase in leaves and chloroplasts of C₃ plants undergoes light-/dark-induced reversible phosphorylation.

Plant Physiol 128, 1368-1378

CHIN AM, FEUCHT BU & SAIER MH JR. (1987)

Evidence for regulation of gluconeogenesis by the fructose phosphotransferase system in *Salmonella typhimurium*.

J Bacteriol 169, 897-899

CHOMCZYNSKI P (1993)

A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples.

Biotechniques 15, 532-534, 536-537

CHULAVATNATOL M & ATKINSON DE (1973)

Phosphoenolpyruvate synthetase from *Escherichia coli*.

J Biol Chem 248, 2712-2715

CICICOPOL C, PETERS J, KELLERMANN J & BAUMEISTER W (1994)

Primary structure of a multimeric protein, homologous to the PEP-utilizing enzyme family and isolated from a hyperthermophilic archaeobacterium.

FEBS Letters 356, 345-350

CICICOPOL C, PETERS J, LUPAS A, CEJKA Z, MÜLLER SA, GOLBIK R, PFEIFER G, LILIE H, ENGEL A & BAUMEISTER W (1999)

Novel molecular architecture of the multimeric archaeal PEP-synthase homologue (MAPS) from *Staphylothermus marinus*.

J Mol Biol 290, 347-361

CONDO I, CIAMMARUCONI A, BENELLI D, RUGGERO D & LONDEI P (1999)

Cis-acing signals controlling translational initiation in the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*.

Molec Microbiol 34, 377-384

COOPER RA & KORNBERG HL (1965)

Net formation of phosphoenolpyruvate from pyruvate by *Escherichia coli*.

Biochem Biophys Acta 104, 618-620

COOPER RA & KORNBERG HL (1974)

Phosphoenolpyruvate synthetase and pyruvate, phosphate dikinase.

In: The Enzymes Vol 10, ed. by Boyer PD, Academic Press, New York, 631-649

DECKERT G, WARREN PV, GAASTERLAND T, YOUNG WG, LENOX AL, GRAHAM DE, OVERBEEK R, SNEAD MA, KELLER M, AUJAY M, HUBER R, FELDMAN RA, SHORT JM, OLSEN GJ & SWANSON RV (1998)

The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*.

Nature 392, 353-358

DEPPENMEIER U, JOHANN A, HARTSCH T, MERKL R, SCHMITZ RA, MARTINEZ-ARIAS R, HENNE A, WIEZER A, BAEUMER S, JACOBI C, BRUEGGEMANN H, LIENARD T, CHRISTMANN A, BOEMECKE M, STECKEL S, BHATTACHARYYA A, LYKIDIS A, OVERBEEK R, KLENK HP, GUNSALUS RP, FRITZ HJ & GOTTSCHALK G (2002)

The genome of *Methanosarcina mazei*: Evidence for lateral gene transfer between Bacteria and Archaea.

J Mol Microbiol Biotechnol 4, 453-461

DUCLOS B, MARCANDIER S & COZZONE AJ (1991)

Chemical properties and separation of phosphoamino acids by thin-layer chromatography and/or electrophoresis.

Methods Enzymol 201, 10-21

ECKERSKORN C, MEWES W, GORETZKI H & LOTTSPREICH F (1988)

A new siliconized glass fiber as support for chemical analysis of electroblotted proteins.

Eur J Biochem 176, 509-519

EISAKI N, TATSUMI H, MURAKAMI S & HORIUCHI T (1999)

Pyruvate phosphate dikinase from a thermophilic actinomyces *Microbispora rosea* subsp. *aerata*: purification, characterization and molecular cloning of the gene.

Biochim Biophys Acta 1431, 363-373

EVANS HJ & WOOD HG (1971)

Purification and properties of the pyruvate phosphate dikinase from propionic acid bacteria.

Biochemistry 10, 721-729

EYZAGUIRRE J, JANSEN K & FUCHS G (1982)

Phosphoenolpyruvate synthetase in *Methanobacterium thermoautotrophicum*.
Arch Microbiol 132, 67-74

FABRY S & HENSEL R (1987)

Purification and characterization of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the thermophilic archaebacterium *Methanothermus fervidus*.
Eur J Biochem 165, 147-155

FISCHER F, ZILLIG W, STETTER KO & SCHREIBER G (1983)

Chemolithoautotrophic metabolism of anaerobic extremely thermophilic Archaeobacteria.
Nature 301, 511-513

FITZ-GIBBON ST, LADNER H, KIM UJ, STETTER KO, SIMON MI & MILLER JH (2002)

Genome sequence of the hyperthermophilic crenarchaeon *Pyrobaculum aerophilum*.
Proc Natl Acad Sci USA 99, 984-989

GALAGAN JE, NUSBAUM C, ROY A, ENDRIZZI MG, MACDONALD P, FITZHUGH W, CALVO S, ENGELS R, SMIRNOV S, ATNOOR D, BROWN A, ALLEN N, NAYLOR J, STANGE-THOMANN N, DEARELLANO K, JOHNSON R, LINTON L, MCEWAN P, MCKERNAN K, TALAMAS J, TIRRELL A, YE W, ZIMMER A, BARBER RD, CANN I, GRAHAM DE, GRAHAME DA, GUSS AM, HEDDERICH R, INGRAM-SMITH C, KUETTNER HC, KRZYCKI JA, LEIGH JA, LI W, LIU J, MUKHOPADHYAY B, REEVE JN, SMITH K, SPRINGER TA, UMayAM LA, WHITE O, WHITE RH, CONWAY DE MACARIO E, FERRY JG, JARRELL KF, JING H, MACARIO AJ, PAULSEN I, PRITCHETT M, SOWERS KR, SWANSON RV, ZINDER SH, LANDER E, METCALF WW & BIRREN B (2002)

The genome of *M. acetivorans* reveals extensive metabolic and physiological diversity.
Genome Res 12, 532-42

GEERSE RH, RUIG CR, SCHUITEMA AR & POSTMA PW (1986)

Relationship between pseudo-HPr and the PEP:fructose phosphotransferase system in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*.
Mol Gen Genet 203, 435-444

Geerse RH, van der Pluijm J & Postma PW (1989)

The repressor of the PEP:fructose phosphotransferase system is required for the transcription of the *pps* gene of *Escherichia coli*.
Mol Gen Genet 218, 348-52

GRANT SG, JESSEE J, BLOOM FR & HANAHAHAN D (1990)

Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants.
Proc Natl Acad Sci USA 87, 4645-4649

HANAHAHAN D (1983)

Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids.
J Mol Biol 166, 557-580

HANES CS (1932)

The determination of enzyme dissociation constants.
Biochem J 26, 1406-1421

HARAUZ G, CICIPOL C, HEGERL R & CEJKA Z (1996)

Structural studies on the 2.25-MDa homomultimeric phosphoenolpyruvate synthetase from *Staphylothermus marinus*.

J Struct Biol 116, 290-301

HARAUZ G & LI W (1997)

Three-dimensional cryoelectron microscopic reconstruction of the 2.25-MDa homomultimeric phosphoenolpyruvate synthetase from *Staphylothermus marinus*.

Biochem Biophys Res Commun 241, 599-605

HATCH MD & SLACK CR (1967)

The participation of phosphoenolpyruvate synthetase in photosynthetic CO₂ fixation of tropical grasses.

Arch Biochem Biophys 120, 224-225

HATCH MD & SLACK CR (1968)

A new enzyme for the interconversion of pyruvate and phosphopyruvate and its role in the C₄ dicarboxylic acid pathway of photosynthesis.

Biochem J 106, 141-146

HENNIG M, STERNER R, KIRSCHNER K & JANSONIUS JN (1997)

Crystal structure at 2.0 Å resolution of phosphoribosyl anthranilate isomerase from the hyperthermophile *Thermotoga maritima*: possible determinants of protein stability.

Biochemistry 36, 6009-6016

HERZBERG O, CHEN CCH, KAPADIA G, MCGUIRE M, CARROLL LJ, NOH SJ & DUNAWAY-MARIANO D (1996)

Swiveling-domain mechanism for enzymatic phosphotransfer between remote sites.

Proc Natl Acad Sci USA 93, 2652-2657

HERZBERG O, CHEN CCH, LIU S, TEMPCZYK A, HOWARD A, WEI M, YE D & DUNAWAY-MARIANO D (2002)

Pyruvate site of pyruvate phosphate dikinase: Crystal structure of the enzyme-phosphonopyruvate complex, and mutant analysis.

Biochemistry 41, 780-787

HESS D, KRÜGER K, KNAPPIK A, PALM P & HENSEL R (1995)

Dimeric 3-phosphoglycerate kinases from hyperthermophilic Archaea. Cloning, sequencing and expression of the 3-phosphoglycerate kinase gene of *Pyrococcus woesei* in *Escherichia coli* and characterization of the protein. Structural and functional comparison with the 3-phosphoglycerate kinase of *Methanothermus fervidus*.

Eur J Biochem 233, 227-237

HILL R (1925)

A measure of cooperativity.

Proc R Soc B100, 419

HILTPOLD A, THOMAS RM & KÖHLER P (1999)

Purification and characterization of recombinant pyruvate phosphate dikinase from *Giardia*.

Mol Biochem Parasitol 104, 157-169

HO SN, HUNT HD, HORTON RM, PULLEN JK & PEASE LR (1989)

Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction.
Gene 77, 51-59

HUBER H, HOHN MJ, RACHEL R, FUCHS T, WIMMER VC UND STETTER KO (2002)

A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont.
Nature 417, 27-28

HUTCHINS AM, HOLDEN JF & ADAMS MWW (2001)

Phosphoenolpyruvate synthetase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*.
J Bacteriol 183, 709-715

IMAIZUMI N, KU MS, ISHIHARA K, SAMEJIMA M, KANEKO S & MATSUOKA M (1997)

Characterization of the gene for pyruvate, orthophosphate dikinase from rice, a C3 plant, and a comparison of structure and expression between C3 and C4 genes for this protein.
Plant Mol Biol 34, 701-716

JAHREIS K, POSTMA PW & LENGELER JW (1991)

Nucleotide sequence of the *ilvH-fruR* gene region of *Escherichia coli* K12 and *Salmonella typhimurium* LT2.
Mol Gen Genet 226, 332-336

JONES CE, FLEMING TM, PIPER PW, LITTLECHILD JA & COWAN DA (1995)

Cloning and sequencing of a gene from the archaeon *Pyrococcus furiosus* with homology to a gene encoding phosphoenolpyruvate synthetase from *Escherichia coli*.
Gene 160, 101-103

JUNGBLUT P, ECKERSKORN C, LOTTSPREICH F & KLOSE J (1990)

Blotting efficiency investigated by using two-dimensional electrophoresis, hydrophobic membranes and proteins from different sources.
Electrophoresis 11, 581-588

KANEKO T, TANAKA A, SATO S, KOTANI H, SAZUKA T, MIYAJIMA N, SUGIURA M & TABATA S (1995)

Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. I. Sequence features in the 1 Mb region from map positions 64% to 92% of the genome.
DNA Research 2(4):153-66, 191-8

KAWARABAYASI Y, SAWADA M, HORIKAWA H, HAIKAWA Y, HINO Y, YAMAMOTO S, SEKINE M, BABA S, KOSUGI H, HOSUYAMA A, NAGAI Y, SAKAI M, OGURA K, OTUKA R, NAKAZAWA H, TAKAMIYA M, OHFUKU Y, FUNAHASHI T, TANAKA T, KUDOH Y, YAMAZAKI J, KUSHIDA N, OGUCHI A, AOKI K, NAKAMURA Y, ROBB TF, HORIKOSHI K, MASUCHI Y, SHIZUYA H & KIKUCHI H (1998)

Complete sequence and gene organization of the genome of a hyperthermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus horikoshii* OT3.
DNA Research 5, 55-76

KAWARABAYASI Y, HINO Y, HORIKAWA H, YAMAZAKI S, HAIKAWA Y, JIN-NO K, TAKAHASHI M, SEKINE M, BABA SI, ANKAI A, KOSUGI H, HOSOYAMA A, FUKUI S, NAGAI Y, NISHIJIMA K, NAKAZAWA H, TAKAMIYA M, MASUDA S, FUNAHASHI T, TANAKA T, KUDOH Y, YAMAZAKI J, KUSHIDA N, OGUCHI A, AOKI KI, KUBOTA K, NAKAMURA Y, NOMURA N, SAKO Y & KIKUCHI H (1999)

Complete genome sequence of an aerobic hyperthermophilic crenarchaeote, *Aeropyrum pernix* K1.

DNA Res 6, 83-101

KAWASHIMA T, AMANO N, KOIKE H, MAKINO S, HIGUCHI S, KAWASHIMA-OHYA Y, WATANABE K, YAMAZAKI M, KANEHORI K, KAWAMOTO T, NUNOSHIBA T, YAMAMOTO Y, ARAMAKI H, MAKINO K & SUZUKI M (2000)

Archaeal adaptation to higher temperatures revealed by genomic sequence of *Thermoplasma volcanium*.

Proc Natl Acad Sci USA 97, 14257-14262

KENGEN SW, DE BOK FA, VAN LOO ND, DIJKEMA C, STAMS AJ & DE VOS WM (1994)

Evidence for the operation of a novel Embden-Meyerhof pathway that involves ADP-dependent kinases during sugar fermentation by *Pyrococcus furiosus*.

J Biol Chem 269, 17537-17541

KLENK H-P, CLAYTON RA, TOMB J-F, WHITE O, NELSON KE, KETCHUM KA, DODSON RJ, GWINN M, HICKEY EK, PETERSON JD, RICHARDSON DL, KERLAVAGE AR, GRAHAM DE, KYRPIDES NC, FLEISCHMANN RD, QUACKENBUSH J, LEE NH, SUTTON GG, GILL S, KIRKNESS EF, DOUGHERTY BA, MCKENNEY K, ADAMS MD, LOFTUS B, SCOTT P, REICH CI, MCNEIL LK, BADGER JH, GLODEK A, ZHOU L, OVERBEEK R, GOCAYNE JD, WEIDMAN JF, McDONALD L, UTTERBACK T, COTTON MD, SPRIGGS T, ARTIACH P, KAINE BP, SYKES SM, SADOW PW, D'ANDREA KP, BOWMAN C, FUJII C, GARLAND SA, MASON TM, OLSEN GJ, FRASER CM, SMITH HO, WOESE CR & VENTER JC (1997)

The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*.

Nature 390, 364-370

KOHLHOFF M, DAHM A & HENSEL R (1996)

Tetrameric triosephosphate isomerase from hyperthermophilic Archaea.

FEBS Lett 383, 245-250

LAEMMLI UK (1970)

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature 227, 680-685

LAI X & INGRAM LO (1995)

Discovery of a *ptsHI* operon, which includes a third gene (*ptsT*), in the thermophile *Bacillus stearothermophilus*.

Microbiology 141, 1443-1449

LANGLEY KE, VILLAREJO MR, FOWLER AV, ZAMENHOF PJ & ZABIN I (1975)

Molecular basis of β -galactosidase α -complementation.

Proc Natl Acad Sci USA 72, 1254-1257

LI W, OTTENSMEYER FP & HARAUZ G (2000)

Quarternary organization of the *Staphylothermus marinus* phosphoenolpyruvate synthase: Angular reconstitution from cryoelectron micrographs with molecular modeling.
J Struct Biol 132, 226-240

LINEWEAVER H & BURK D (1934)

The determination of enzyme dissociation constants.
J Am Chem Soc 56, 658-660

LUPAS A, VAN DYKE M & STOCK J (1991)

Predicting coiled coils from protein sequences.
Science 252, 1162-1164

LUPAS A (1996)

Prediction and analysis of coiled-coil structures.
Meth Enzymology 266, 513-525

MATSUOKA M, OZEKI Y, YAMAMOTO N, HIRANO H, KANO-MURAKAMI Y & TANAKA Y (1988)

Primary structure of maize pyruvate, orthophosphate dikinase as deduced from cDNA sequence.
J Biol Chem 263, 11080-11083

MCGUIRE, CARROL LJ, YANKIE L, THRALL SH & DUNAWAY-MARIANO D (1996)

Determination of the nucleotide binding site within *Clostridium symbiosum* pyruvate phosphate dikinase by photoaffinity labeling, site-directed mutagenesis and structural analysis.
Biochemistry 35, 8544-8552

MEAKIN SA, NASH J, MURRAY WD, KENNEDY KJ & SPROTT GD (1991)

A generally applicable technique for the extraction of restrictable DNA from methanogenic bacteria.
J Microbiol Meth 14, 119-126

MELCHIOR WB & VON HIPPEL PH (1973)

Alteration of the relative stability of dA-dT and dG-dC base pairs in DNA.
Proc Natl Acad Sci USA 70, 298-302

MICHAELS G, MILNER Y & REED GH (1975)

Magnetic resonance and kinetic studies of pyruvate, phosphate dikinase. Interaction of oxalate with the phosphorylated form of the enzyme.
Biochemistry 14, 3213-3219

MUKHOPADHYAY B, STODDARD SF & WOLFE RS (1998)

Purification, regulation, and molecular and biochemical characterization of pyruvate carboxylase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* strain ΔH^* .
J Biol Chem 273, 5155-5166

MUKHOPADHYAY B, PATEL VJ & WOLFE RS (2000)

A stable archaeal pyruvate carboxylase from the hyperthermophile *Methanococcus jannaschii*.
Arch Microbiol 174, 406-414

MULLIS KB, FALOONA S, SCHARF R, SAIKI RK, HORN G & EHRlich H (1986)
Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction.
Cold Spring Harbor Symposium of Quantitative Biology 51, 263-273

NARINDRASORASAK S & BRIDGER WA (1977)
Phosphoenolpyruvate Synthetase of *Escherichia coli*: Molecular weight, subunit composition, and identification of phosphohistidine in phosphoenzyme intermediate.
J Biol Chem 252, 3121-3127

NÈGRE D, OUDOT C, PROST JF, MURAKAMI K, ISHIHAMA A, COZZONE AJ & CORTAY JC (1998)
FruR-mediated transcriptional activation at the *ppsA* promoter of *Escherichia coli*.
J Mol Biol 276, 355-65

NIERSBACH M, KREUZALER F, GEERSE RH, POSTMA PW & HIRSCH HJ (1992)
Cloning and nucleotide sequence of the *Escherichia coli* K-12 *ppsA* gene.
Mol Gen Genet 231, 332-336

PACE NR (1997)
A molecular view of microbial diversity and the biosphere.
Science 276, 734-740

PATNAIK R, ROOF WD, YOUNG RF & LIAO JC (1992)
Stimulation of glucose catabolism in *Escherichia coli* by a potential futile cycle.
J Bacteriol 174, 7527-7532

POCALYKO DJ, CARROLL LJ, MARTIN BM, BABBITT PC & DUNAWAY-MARIANO D (1990)
Analysis of sequence homologies in plant and bacterial pyruvate phosphate dikinase, Enzyme I of the bacterial phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system and other PEP-utilizing enzymes. Identification of potential catalytic and regulatory motifs.
Biochemistry 29, 10757-10765

PROMEGA TECHNICAL MANUAL (1994)
Alters sites® II *in vitro* mutagenesis systems.

RAMSEIER TM (1996)
Cra and the control of carbon flux via metabolic pathways.
Res Microbiol 147, 489-93

RAMSEIER TM, BLEDIG S, MICHOTEY V, FEGHALI R & SAIER MH JR. (1995)
The global regulatory protein FruR modulates the direction of carbon flow in *Escherichia coli*.
Molec Microbiol 16, 1157-1169

REEVES RE (1968)
A new enzyme with the glycolytic function of pyruvate kinase.
J Biol Chem 243, 3202-3204

REEVES RE, MENZIES RA & HSU DS (1968)
The pyruvate-phosphate dikinase reaction. The fate of phosphate and the equilibrium.
J Biol Chem 243, 5486-5491

REIZER J, HOISCHEN C, REIZER A, PHAM TN & SAIER MH JR. (1993)

Sequence analyses and evolutionary relationships among the energy-coupling proteins Enzyme I and HPr of the bacterial phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system.
Protein Sci 2, 506-521

ROBINSON KA & SCHREIER HJ (1994)

Isolation, sequence and characterization of the maltose-regulated *mlrA* gene from the hyperthermophilic archaeum *Pyrococcus furiosus*.
Gene 151, 173-176

RUEPP A, GRAML W, SANTOS-MARTINEZ ML, KORETKE KK, VOLKER C, MEWES HW, FRISHMAN D, STOCKER S, LUPAS AN & BAUMEISTER W (2000)

The genome sequence of the thermoacidophilic scavenger *Thermoplasma acidophilum*.
Nature 407, 508-513

RUSSEL JB & COOK GM (1995)

Energetics of bacterial growth: Balance of anabolic and catabolic reactions.
Microbiol Rev 59, 48-62

RUSSELL JB (1998)

Strategies that ruminal bacteria use to handle excess carbohydrate.
J Anim Sci 76, 1955-1963

SAAVEDRA-LIRA E, RAMIREZ-SILVA L & PEREZ-MONTFORT R (1998)

Expression and characterization of recombinant pyruvate phosphate dikinase from *Entamoeba histolytica*.
Biochim Biophys Acta 1382, 47-54

SAFFEN DW, PRESPEER KA, DOERING TL & ROSEMAN S (1987)

Sugar transport by the bacterial phosphotransferase system. Molecular cloning and structural analysis of the *Escherichia coli ptsH*, *ptsI* and *crr* genes.
J Biol Chem 262, 16241-16253

SAIER MH JR & RAMSEIER TM (1996)

The catabolite repressor/activator (Cra) protein of enteric bacteria.
J Bacteriol 178, 3411-3417

SAITU N & NEI M (1987)

The Neighbor-Joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees.
Mol Biol Evol 4, 406-425

SAKURABA H, UTSUMI E, KUJO C & OHSHIMA T (1999)

An AMP-dependent (ATP-forming) kinase in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: Characterization and novel physiological role.
Arch Biochem Biophys 364, 125-128

SAKURABA H, UTSUMI E, SCHREIER HJ & OHSHIMA T (2001)

Transcriptional regulation of phosphoenolpyruvate synthase by maltose in the hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus furiosus*.
J Biosci Bioeng 92, 108-113

SAMBROOK J, FRITSCH EF & MANIATIS T (1989)

Molecular cloning. A laboratory manual.
Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

SANGER F, NICKLEN S & COULSON AR (1977)

DNA-Sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc Natl Acad Sci USA 74, 5463-5467

SCHÄFER T & SCHÖNHEIT P (1993)

Gluconeogenesis from pyruvate in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: involvement of reactions of the Embden-Meyerhof pathway.
Arch Microbiol 159, 354-363

SCHRAMM A (1999)

Strukturelle und funktionelle Charakterisierung zweier glykolytischer Enzyme des hyperthermophilen Archaeums *Thermoproteus tenax*.
Dissertation, Universität-GH Essen

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

SCHRAMM A, KOHLHOFF M & HENSEL R (2001)

Triose-phosphate isomerase from *Pyrococcus woesei* and *Methanothermus fervidus*.
Methods Enzymol 331, 62-77

SELIG M, XAVIER KB, SANTOS H & SCHÖNHEIT P (1997)

Comparative analysis of Embden-Meyerhof and Entner-Doudoroff glycolytic pathways in hyperthermophilic archaea and the bacterium *Thermotoga*.
Arch Microbiol 167, 217-232

SEOK Y-J, LEE BR, ZHU P-P & PETERKOFKY A (1996)

Importance of the carboxy-terminal domain of enzyme I of the *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system for phosphoryl donor specificity.
Proc Natl Acad Sci USA 93, 347-351

SHE Q, SINGH RK, CONFALONIERI F, ZIVANOVIC Y, ALLARD G, AWAYEZ MJ, CHAN-WEIHER CC, CLAUSEN IG, CURTIS BA, DE MOORS A, ERAUSO G, FLETCHER C, GORDON PM, HEIKAMP-DE JONG I, JEFFRIES AC, KOZERA CJ, MEDINA N, PENG X, THI-NGOC HP, REDDER P, SCHENK ME, THERIAULT C, TOLSTRUP N, CHARLEBOIS RL, DOOLITTLE WF, DUGUET M, GAASTERLAND T, GARRETT RA, RAGAN MA, SENSEN CW & VAN DER OOST J (2001)

The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2.
Proc Natl Acad Sci USA 98, 7835-40

SHUMAN S (1994)

Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase.
J Biol Chem 269, 32678-32684

SIEBERS B & HENSEL R (1993)

Glucose catabolism of the hyperthermophilic archaeum *Thermoproteus tenax*.
FEMS Microbiol Lett 111, 1-8

SIEBERS B (1995)

Untersuchungen zum Kohlenhydrat-Metabolismus des hyperthermophilen Archaeums *Thermoproteus tenax*.
Dissertation, Universität-GH Essen

SIEBERS B, WENDISCH VF & HENSEL R (1997)

Carbohydrate metabolism in *Thermoproteus tenax*: *in vivo* utilization of the non-phosphorylative Entner-Doudoroff pathway and characterization of its first enzyme, glucose dehydrogenase.
Arch Microbiol 168, 120-127

SIEBERS B, KLENK H-P & HENSEL R (1998)

PP_i-dependent phosphofruktokinase from *Thermoproteus tenax*, an archaeal descendant of an ancient line in phosphofruktokinase evolution.
J Bacteriol 180, 2137-2143

SIEBERS B, BRINKMANN H, DÖRR C, TJADEN B, LILIE H, VAN DER OOST J & VERHEES CH (2001)

Archaeal fructose-1.6-bisphosphate aldolases constitute a new family of archaeal type class I aldolase.
J Biol Chem 276, 28710-28718

SMITH DR, DOUCETTE-STAMM LA, DELOUGHERY C, LEE H, DUBOIS J, ALDREDGE T, BASHIRZADEH R, BLAKELEY D, COOK R, GILBERT K, HARRISON D, HOANG L, KEAGLE P, LUMM W, POTHIER B, QIU D, SPADAFORA R, VICAIRE R, WANG Y, WIERZBOWSKI J, GIBSON R, JIWANI N, CARUSO A, BUSH D, SFER H, PATWELL D, PRABHAKAR S, MCDUGALL S, SHIMER G, GOYAL A, PIETROKOVSKI S, CHURCH G, DANIELS CJ, MAO J-I, RICE P, NÖLLING J & REEVE JN (1997)

Complete genome sequence of *Methanobacterium thermoautotrophicum* ΔH: Functional analysis and comparative genomics.
J Bacteriol 179, 7135-7155

SMYER JR & JETER RM (1989)

Characterization of phosphoenolpyruvate synthase mutants in *Salmonella typhimurium*.
Arch Microbiol 153, 26-32

SNEL B, LEHMANN G, BORK P & HUYNEN MA (2000)

STRING: a web-server to retrieve and display the repeatedly occurring neighbourhood of a gene.
Nucleic Acids Res 28, 3442-3444

SOPPA J (1999)

Normalized nucleotide frequencies allow the definition of archaeal promotor elements for different groups and reveal base-specific TFB contacts upstream of the TATA box.
Molec Microbiol 31, 1589-1601

SOUTHERN EM (1975)

Detection of specific sequences among DNA-fragments separated by gel electrophoresis.
J Mol Biol 98, 503-517

STUDIER FW & MOFFATT BA (1986)

Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes.

J Mol Biol 189, 113-130

SUGIYAMA T (1973)

Purification, molecular, and catalytic properties of pyruvate phosphate dikinase from the maize leaf.

Biochemistry 12, 2862-2868

THEIN SL & WALLACE RB (1986)

The use of synthetic oligonucleotides as specific hybridization probes in the diagnosis of genetic disorders.

In: Davis (editor), Human genetic diseases, a practical approach, IRL Press.

THOMPSON JD, HIGGINS DG & GIBSON TJ (1994)

CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice.

Nucl Acids Res 22, 4673-4680

TOMB JF, WHITE O, KERLAVAGE AR, CLAYTON RA, SUTTON GG, FLEISCHMANN RD, KETCHUM KA, KLENK HP, GILL S, DOUGHERTY BA, NELSON K, QUACKENBUSH J, ZHOU L, KIRKNESS EF, PETERSON S, LOFTUS B, RICHARDSON D, DODSON R, KHALAK HG, GLODEK A, MCKENNEY K, FITZGERALD LM, LEE N, ADAMS MD, VENTER JC, ET AL. (1997)

The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*.

Nature 388, 539-47

VILLERET V, CLANTIN B, TRICOT C, LEGRAIN C, ROOVERS M, STALON V, GLANSDORFF N & VAN BEEUMEN J (1998)

The crystal structure of *Pyrococcus furiosus* ornithine carbamoyltransferase reveals a key role for oligomerization in enzyme stability at extremely high temperatures.

Proc Natl Acad Sci USA 95, 2801-2806

VON MERING C, HUYNEN M, JAEGGI D, SCHMIDT S, BORK P & SNEL B (2003)

STRING: a database of predicted functional associations between proteins.

Nucleic Acids Res 31, 258-261

WALDEN H, BELL GS, RUSSEL RJ, SIEBERS B, HENSEL R & TAYLOR GL (2001)

Tiny TIM: a small, tetrameric, hyperthermostable triosephosphate isomerase.

J Mol Biol 306, 745-757

WEBER K & OSBORN M (1969)

The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.

J Biol Chem 244, 4406-4412

WEIL CF, CRAM DS, SHERF BA & REEVE JN (1988)

Structure and comparative analysis of the genes encoding components C of methyl coenzyme M reductase in the extremely thermophilic archaebacterium *Methanothermus fervidus*.

J Bacteriol 70, 4718-4726

WHITE O, EISEN JA, HEIDELBERG JF, HICKEY EK, PETERSON JD, DODSON RJ, HAFT DH, GWINN ML, NELSON WC, RICHARDSON DL, MOFFAT KS, QIN H, JIANG L, PAMPHILE W, CROSBY M, SHEN M, VAMATHEVAN JJ, LAM P, McDONALD L, UTTERBACK T, ZALEWSKI C, MAKAROVA KS, ARAVIND L, DALY MJ, MINTON KW, FLEISCHMANN RD, KETCHUM KA, NELSON KE, SALZBERG S, SMITH HO, VENTER JC & FRASER CM (1999)

Genome sequence of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* R1.
Science 286, 1571-1577

WOESE CR & FOX GE (1977)

Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms.
Proc Natl Acad Sci USA 74, 5088-5090

WOESE CR, KANDLER O & WHEELIS ML (1990)

Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya.
Proc Natl Acad Sci USA 87, 4576-4579

XU Y, YANKIE L, SHEN L, JUNG Y-S, MARIANO PS & DUNAWAY-MARIANO D (1995A)

Location of the catalytic site for phosphoenolpyruvate formation within the primary structure of *Clostridium symbiosum* pyruvate phosphate dikinase. 1. Identification of an essential cysteine by chemical modification with [1-¹⁴C]bromopyruvate and site-directed mutagenesis.
Biochemistry 34, 2181-2187

XU Y, MCGUIRE M & DUNAWAY-MARIANO D (1995B)

Separate site catalysis by pyruvate phosphate dikinase as revealed by deletion mutants.
Biochemistry 34, 2195-2202

YANKIE L, XU Y & DUNAWAY-MARIANO D (1995)

Location of the catalytic site for phosphoenolpyruvate formation within the primary structure of *Clostridium symbiosum* pyruvate phosphate dikinase. 2. Site-directed mutagenesis of an essential arginine contained within an apparent P-loop.
Biochemistry 34, 2188-2194

YE D, WEI M, MCGUIRE M, HUANG K, KAPADIA G, HERZBERG O, MARTIN BM & DUNAWAY-MARIANO D (2001)

Investigation of the catalytic site within the ATP-grasp domain of *Clostridium symbiosum* pyruvate phosphate dikinase.
J Biol Chem 276, 37630-37639

ZILLIG W, STETTER KO, SCHÄFER W, JANEKOVIC D, WUNDERL S, HOLZ I & PALM P (1981)

Thermoproteales: A novel type of extremely thermoacidophilic anaerobic archaebacteria isolated from icelandic solfatares.
Zentralbl. Bacteriol. Hyg. I Abt. Orig. C 2, 205-227

ANHANG

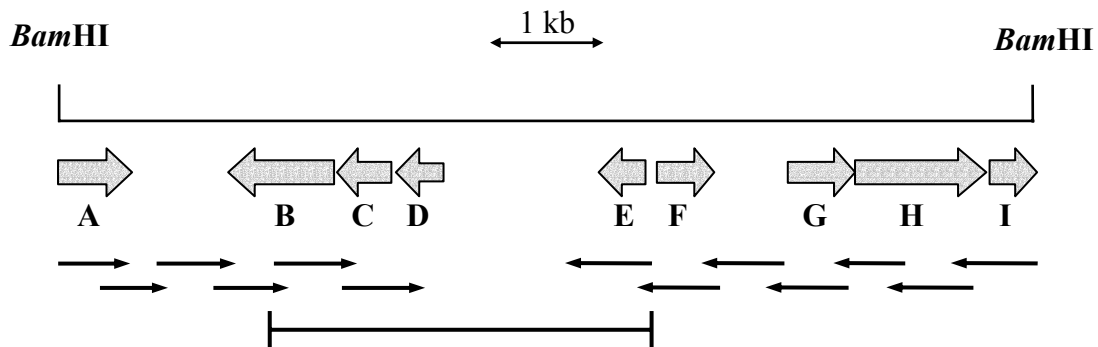


Abb. A.1: Schematische Darstellung und Sequenzierungsstrategie des 8 kb *Bam*HI-Fragments des Klon pPEP8kb-1.

Identifizierte Leserahmen (A-I) und deren Orientierung sind durch Blockpfeile dargestellt. Die Leserahmen zeigten nach BLAST-Datenbankvergleichen die größten Homologien zu folgenden Proteinen (Aminosäure-Identitäten in %):

(A) D-Prolin Dehydrogenase, *P. islandicum*, 58%; (B) putativer Ribose ABC-Transporter, *P. aerophilum*, 49%; (C) hypothetisches Protein, *P. aerophilum*, 53%; (D) hypothetisches Protein, *P. aerophilum*, 62%; (E) hypothetisches Protein, *S. tokodaii*, 42%; (F) hypothetisches Protein, *P. aerophilum*, 34%; (G) hypothetisches Protein, *P. aerophilum*, 51%; (H) putative Glycosyltransferase, *P. aerophilum*, 40%; (I) Trehalose-6-Phosphat Synthase, *P. aerophilum*, 61%.

Im unteren Teil der Abbildung geben dünne Pfeile den Bereich und die Leserichtung der einzelnen Sequenzierungen an. Ebenfalls dargestellt ist ein Sequenzbereich, der aus dem *T. tenax*-Genomprojekt bekannt war und zur Komplettierung der Nukleotidsequenz herangezogen wurde (Balken).

GGATCCGCTG	GGGCTAGGC	TTGAGGAAGG	GCAGTGCATG	GGCCAGAGGG	CTCTGCTCTA	60
TTTGGACGCA	GCGAAGATAG	CCACTGAGCT	GCTCGCCGAT	CGTATGACCA	GAGAGTTGGC	120
CGACGCAAAG	TTCGTTGAGG	CCAGAGCTGT	AGAAGTCGCA	GGCAGGGAGG	TGCGGCTCGA	180
GGGCGGCGGA	AAGGTGGAGG	GAGACGTAGT	CGTAGTCGCG	GCGGGGTGGT	GGGCGAGGAA	240
GCTGGGGCTG	CCCCTGGCCC	CACTTAAAGG	GTACGGCTTT	AGGACTAACG	CGAAAACGTC	300
CGCGACGGTG	GCCAACTGGG	CTCTGGGGAT	CTTTGTAGTG	CCGCTGAGCC	GTTGGACGAA	360
GATCACAGGG	CGCTTCGACC	TAGACGGAAC	TGAGGACCAC	AAGCCGGCGG	AGAAGGTGCT	420
TAATGCAGCG	AGGGGGTGGC	TCGGCTCTTT	CGACGTTATA	GATATGGCTG	TAGGATATAG	480
GCCCTGCACG	CCCACGGGT	TCCCCATCGT	GGATGTGCTG	GGCGGAGTGG	TGGTGGCCAC	540
CGGCGCGTGT	AGACTCGGCT	GGACCTTCGC	TCCAGCGTTG	GGGAAGAAGG	CGGCCGATCT	600
GGCTCTGGGC	AGGGAGAAGC	CCGGCGCACT	TTCGGCGGCT	AGATTGAGGT	AGGGCGCCCA	660
ACCTTTTCTC	TGTCTCTGGC	CGTCTGCGCG	GCGAGTATAG	CCGACGGGCA	TGTCTCTTTC	720
CGCTGCTGCG	ATGTACGCCT	GACAGCTGCG	CGGGGGCCTA	AAGCGCCCGA	AGAGGCGCGG	780
CCGCCAGCAG	CGAGGCGGGC	GCCGACGCTA	TGAGCAATAT	ATCCCACTTA	GTAAAATAGG	840
GAGGCCTCTT	CGGCGAGGCA	CTCGAAGCTC	CTTTGTCTTA	TCTGGACCTC	TAGATATTCG	900
GCGTAGTCGA	ATATGAACAC	CAAGAGGGGT	AAAGCCGACT	GGAGGACGGC	CCTGGGGCCT	960
TTGGCGCCG	GCCCTTAGC	CACAGCCAAT	AACGCTTTCA	CCTTCGCGCG	AGATCACCGA	1020
GGACGCCCTT	AAACTTATGG	GTATTACCTA	GGCCCACTGG	CCTTTGACCC	CTATTCTCTT	1080
GAGCGCCCAG	ACGACTTCGC	CCGGGGAGAC	CGCGTTGAAG	AGCAGGCCTA	GGACGGCCAA	1140
GTTTTTGAAG	AGCGTCAAAG	TGGGGAGCAG	CGCCCCCGCG	GGCCCAACGA	AGGCGGCGAG	1200
GGAGACGAAG	GACATAAGAG	CGAGGGCCCC	CGCCGCGGCC	GCGACCTTCC	GGTGTAGCGC	1260
CAGCAACGGC	GCCAGCCCTA	TCGCCGCTC	CCACCCCGCC	GGCAGAAGGA	GCAGTAGAGC	1320
CAGTTTAGCC	AATCCGTACT	TCGGCGTCTG	CATATCTGGA	GACAAAGATT	GGGTCGTGGC	1380

TGGCGAACAC	CACAGTCCCT	CCGTAGGACT	TGATGAGCCT	CCCGACCCAC	TCGGCATAAC	1440
TTCTATCTAC	GCCGGCCGTC	GGCTCGTCGA	CGAGGAGGAG	CCGCGGCCCTC	CTCGATAGCT	1500
CCCAGAGCAA	CGCCGCGAGC	CTCGCCTCGC	CCACGGAAAG	CGTGAACGGG	CTCCTCCCCC	1560
GCTCCACACC	CAACGTATCC	AACACCAGAG	AGGGGGCCCT	CCTGAGGTCG	GGCGAAGTGA	1620
AGTACATATA	GGGGTTCTGA	GGCACGTAGC	CCGACGGGGG	AACAGCCCCT	CGTGCCCCCTC	1680
AGCTTACGG	CGCCCGCCAG	AGCCAGCAGA	GTGTAGGTCT	TGCCGGAGCC	GACTGGGCCG	1740
GTGACTGCGA	TCTTCCGCC	GGCCTCCCAA	CGCGTGCCCC	TTATCTCCAC	GCCGCAGCCC	1800
TCTGCATCGT	CCAGCCTGGG	GAGGGGAGG	TCGCGGCCTC	TAACGAAGTA	GGGCCCCAC	1860
CCCCTTCTGG	CGCCCTCCTC	GATGAGCTCC	TCGGCGTCCA	CCTCGGTGCG	CCGCCCGCCT	1920
TCAACTAGGT	AGAATCTATC	TGCGTCCAGG	AAGAGCTCGA	CTCTGTGCTC	AGCCACAAGG	1980
ACCGCTCTGC	CCTCCTCGGC	CAGCCCGAAT	ATCTTGTCTC	TCACGGCTCT	GGCGCGGCC	2040
GGGTCTAGGA	AGGCTGTGGG	CTCGTCGAAG	ATGACTGAGG	CGGCCCCCGA	TAGGCGGGCC	2100
AGCTCTACGG	CCAACAGCTG	TCTCTGGCCC	GGCGAGAGCC	TCTCTATGGG	CGTCTCCGGC	2160
GCGTTTACGC	CGTCGCAGGA	GACCGTGAGG	AGCTCCTCCC	GCACCGTGGT	GGCTATCAAG	2220
TTGAAGTCCA	CGTCTGGAA	GACGAAATAG	GGCCTATCCA	GCCTTAACGC	CCCCTCTCGG	2280
GGCAGGACCC	CCGCCATAGC	CTTAATTATG	GCGGACTTCC	CGCCCCCGT	CGGGCCGAAC	2340
AAGACTGCTA	CCTCGCCCTC	CTTACCTCT	AGGTGACGC	ACTGGGCCAA	CGGCTGCCG	2400
CCGGCGTATG	CAGTGAGGCA	TCTGGCGTAG	ATCACAGCGC	GACGACGTAC	GACGCCCT	2460
TCACCTCCTC	GAGGAGCCTC	CTTCCCTCT	CAGAGATGCC	GCTCCCTCTA	TCTCTCAGCG	2520
ACGTCCCCTC	GTAGGCCGAG	GCCAGGAACA	CCTGCGCCGC	GCTGAAGGCC	TCCCAGAAGA	2580
GGGAGGGGTC	CCCCCTGTGG	AAGTAGATTG	TCAAGTCGTT	GACGGCCAAG	ACGGGCGTGG	2640
GGTCGGCCAT	ATACCTCTTG	AATAACGCCG	CAGCCTTTTC	GGCGTTCTCA	TCGGCGAGCT	2700
TCAGCTCCTC	ATCGGGCGAT	CTGGCCTCGA	GGCGGGGGG	TCTGAACTCG	TCCGTCAGAT	2760
ACCGCGGCCG	CTCCCTTAGA	TACCGCCTAA	GCTTAGCGCC	GACGCCCATC	CGTCCGGCG	2820
CAAGTTCGAC	GACAGTGACC	CCCACGCCGA	GGGAGACCAT	GGCGTCGACC	AACCGGCCA	2880
AGAGCTCGA	CTTCCCCCTC	CTTACTTCGC	CGACAATTAA	AACGTATAT	TTTGCCAAGG	2940
GCCTCAGAG	CTAGGGCTAC	GGCGTACGCC	CGGAGATTGC	CGATGGCTGT	GGAGAGGCC	3000
CAGCCGGCGG	TGACCGGTAT	CAGAGCTGCC	GCAAAGTGGT	TCCCCAGGCC	GAGGGCCGGC	3060
CCTATTACGT	ATACGGAGAG	CGGGAGCCCT	ATGCCGAGGG	TGCCCACTGG	CTCGAACCAC	3120
ACGACCCAAG	GCCTCCGTTT	GAACGCCGTA	GAGGCCAGGC	CCACCAACAG	GGCGCCGGGT	3180
ATGCTCCCGG	GGAACGCGAA	GATAGTCCCC	AGGCCAACA	TCAGCCTTAT	TGTAGAGATC	3240
AATATTGCGA	CCACCACCGC	CCAAGGCCCC	AGGACTAGCC	CGGCGAGGCC	GTTACAAAAG	3300
GATTGCCCTG	GGAAGGCCTT	GGTGGGACCT	ACAGGTATAT	TCAGCGGCGC	GAGCGCCAGA	3360
CCGAGCCCCG	TGAAGACCAC	TATGTAGCTC	AGCTTCATGG	TCCCAGAGGC	GTGTTACTA	3420
TTTATCTTTG	AGCTCCTTTA	CTTCAATCGA	CTCGCCCTCA	GCGGCCGCAA	AGGCGGAAAT	3480
GTCGGCGGAG	AGACATAGGC	GGATGAACAG	TGCTCCGGGA	GCGGCCATAG	GTTTGACAAA	3540
CTGAATAGAT	CGACCCAAGC	CTCCAACGGA	GGGCTTTTGC	GACGAAAAAT	ACGCCGAATT	3600
TTACGCCGTC	AAATACGCCG	AAAATTACGG	CGCAATCCGG	AGTACAATTC	CCCCTTGAAA	3660
GCGATTTTCA	ACTTCCCCCG	GTGCGTCCAC	CGTGTAGCT	GGCACAGCCT	AACACAAGGG	3720
GGGAGTTGTC	AGAGGAGGAG	TTGAGTTAGG	CGCCGTGCGC	GTTAACCTGA	CATCGACATC	3780
GAAGTTAATA	TCATTAGAAT	TGAAAATTTA	CGGCGTGTGT	TAACGGCGTA	TCTCCCGCCT	3840
CATGAGCACT	TTGCCCTCTC	CGTCGATTAT	TTGACGACT	CTGTGGTAGG	GGATATATGT	3900
GCCCGACTTC	GTCGTGAAGC	CTCCCTGGCC	TATCTCGTCC	ACTTCCGAGA	AGTCTATCTT	3960
CGCCACTCCG	CCAGGCGACC	CTCTGTTTAC	GTAGACTATA	ACGCCCTGTC	CGCCGTTCCA	4020
CTTGAGCTTG	TTCAAGAGCG	ACCTCATGGG	GTTTCCACG	TAGCTACGGT	CGTACATTAT	4080
TAAATTATTG	GGCCGCTTCT	ACGTAAGTTA	TTTATATGGG	ATGATTTCTC	TCGGCGCTCC	4140
GGAGGATTTT	TATCCTGGGG	CACACGGCGT	GCACATGATG	GCCTTGCCCC	TCAAGGCCGG	4200
ACTCCTCCCG	GAGTTCGTGA	GGAGCCTCGA	CGCAGCCTAC	CTCACCGCCA	TCGACGTGAG	4260
GCTGAGGAGG	CTCTTCGGCA	GAGGGCTGGC	CGAGTTCGCC	GAGGAGGAGC	CGGAGGGGCT	4320
GTACGCCGCG	CTGGAGAGGG	CGGTGGGAAG	GCACAACGCG	GAGGTCTTCT	TCATAATGTT	4380
CTCCAGGTGG	CTGGAGAGGA	GGGCCAAGAC	CGAGAATTGA	CTAGCTCAGT	CTTTGAACAA	4440
CTAGACCTTT	TTTCCGCAAG	TCCCAACGCC	TCACAGACTA	CCTCCGCATC	TCCGGCCAGG	4500
AGCACGCCGC	TGGCTATCTC	TCTGGCGAGC	CTGGTGCCCG	CCATCCTTCT	GAGCTCATCC	4560
ACCGTGTAGA	CCCGGGGCTC	TAGATCGACG	GGGAACGTCG	GGTCGAGGAA	GTCAGGTATT	4620
CTGTCCATAG	GCCTTCTCCC	GTCCTCTCTC	ACCACTATCA	CAACGTCGGC	GTCTGAAAAC	4680
GCCGTGTAGT	CCCCCCTCGC	AAGAGAGCCT	ATCAGAACCA	CCGCCAGAGC	CCCCCGCTCC	4740
ACAGCCCATC	TGGCGTACCG	GGAAAGCTCC	CTAAACACCC	TCTCCACATC	TAGTCTGAAG	4800
AGCCTCACCG	ACATATCTCA	CAATCCTCTC	TGCTGCGCTG	ACGGCGCCCT	CCGCATCCCC	4860
CCTGGTGAAG	TAGTCCATCG	GAGCTCCCTC	GGGGTGC GCG	TTGGGGTACC	TAGACGGTAT	4920
ATAGAATTTG	TCGAGCCCCT	TCGCCGCATC	GACGAGGTCG	TCGGGCGGTC	GGACGTGCGC	4980
CGGGAGGCCG	GCCAGAAGCC	TAGAGACGGA	GTGGCCCCAC	GCCTCCACTC	CCAGACATTG	5040
GTAGAGGGCC	TTGACTGCCT	TCTCCGCGGC	TTGATGCGCG	GCGAAACACG	CCCCTCGTGA	5100
GTCTCCAAAC	TCCAGAGACC	TCCTGGCGTG	CTCCAGGTGCG	CGGAGGGCCT	GTCTAAACCA	5160

GTCGCGCGCC	CTAGAGACCA	CACAGCTGTA	TGTATGCCGC	TTTTAAAAAA	TGTTATGGGG	5220
CCAGCTGGAT	TTATCGGCTC	AGAAAGAGAT	ATGTGCATCC	ACCTGTTCAA	GCTCCTGATG	5280
CGCGCCTACG	ACCCAGCGAG	GCTGCAGACG	CCTCGGAAGG	TGGGCGACGA	AGCCTTCCGA	5340
ATCTACGGCG	AGGTCTTGAG	AGCGCTACAC	GAGAGGTTGC	GCCGCGGACA	ACGCTTCGTG	5400
GCCAAGGAGG	AGGTTCGAGG	CGATATCCTC	GAGAGGTATA	GAGGGTTGGC	CAGATCGATG	5460
GTCGCCAACG	ACATGAGGAG	GCTGGGGGTG	CTGACGATGG	GAGGCGGGGG	CAACTGGCAG	5520
GACGACCGGC	CAGCCGCCGT	GACTCCTCTC	GGCGAGTTCG	CCGCCAGCTG	CGCGGCGCGC	5580
ATTAGAGACG	CCGAGGTCTT	CGGCGCTGTG	CCCTTCTTGT	TGTGCAGATT	AAGGGACTGG	5640
GGGCTCGACC	CCGGGGAGGC	CGGCTACTGC	CGTCTATCA	AGACCTCGAG	GGACCCCTTG	5700
TTCGAGAGAG	CTCTCCATTT	AGCGGGCGGC	CATATATACC	TCTGTCTCCC	GTACGCTGCG	5760
GAGGTCTCCG	TCCTTGCGCT	GTAGCGCTAT	GGGGCCCGGA	CTATCGCGGC	TCCGCGTTGC	5820
CGACAGGCC	GGGGCCTCTC	GCCGAAGCGG	CCGGCGCCCT	CGGCGGCGGG	CCGAGGGGGG	5880
ACTTCCGCGG	GATCTGGAGC	TCTACGATGA	GGCGACCTCA	GCTGTGAACG	GGTAGGTCGT	5940
GCCGACCGAC	AGCTCCACCT	GTCCCTCAA	CGTGGTCCCA	GGGGGCGCCC	TCACGGGGCA	6000
CTGAGCCCTC	ACGACGACCG	CTCCCTGGC	CATGGGGAGC	GCGCCGCCGC	CTGTCCCGTT	6060
TACGTCCACG	TGGGAGCACC	TCTCGCCCTC	GAGAGCGATT	GAGGATATCT	GTACAACCGG	6120
CGCAGTGCCG	GGGTTGAGTG	CCGTGAGCAC	TAGAGTCCCG	TTCTGGTAGT	ACGTAGCCGA	6180
GAGTATCGCT	AAGTTGGGCA	CCGGCCTCAC	CAGGCTGGCC	CAAGTGGTGT	AGATGTACCA	6240
GCCCACCGCC	ACCGCTATGG	CGACGGTAGC	AGCCAGGAGT	ATTACGGGCT	CCAGCGAGAT	6300
CTGCCCTCGC	ATCGTCTCAG	ACGGCGCATG	CGTTTTAAGG	CTTGCGCCCC	CGCTCTGTGCG	6360
ATGTAGAGGC	CAGCGGCCTA	AGCCGCCGCA	TCTGGGCGGG	GCTAATCAAT	ATATATTCGC	6420
GCGGCGGGCC	CAACATGGGA	CTCTTGGAA	ACCTCATCGT	CCTGTCTGTC	GGCGCTCTCA	6480
TCATGTTGTT	GGGCTATGCG	GCCGGCAGGC	TGGCCAAGTT	CCTTCTCTCG	GAGATATFCA	6540
GAAGGCTCGG	GCTCAACGAC	TGGTTCAGAA	ACTTCAACAT	AGGGAGGGCT	ATGTTGAAGT	6600
CCGGCTTCAC	CGCCGGGGAC	TTCTTCGCCT	CTCTGGCCGC	TTGGGTGATC	TATATCGCCG	6660
CCTTCCCTTG	GGCGGGCTCC	TATGTGCTGA	ACAACCTCGG	CTACGCCTAT	GTGGCGGCC	6720
TCTTCGACGA	AGTCTTGGCC	GTGTACGTCT	ACGGCTTGT	GAAGTCTTTC	GTGGCGGCCA	6780
TAGTGGGCTT	TATAATGGTG	GACGGCTTCG	TGGAGTACGT	CTACAAGGGC	GCTGTCTCAA	6840
AGGAGGCGGA	GCTCGTGGGA	CCTATAGCGG	ACTACCTCAG	GATAGTGCTC	TACCTCGTGG	6900
TGGTCACCTT	CGCCCTCCAA	CAGGGCGGCA	TAGACGTCTT	CGATACTGAG	CGCCATGCTT	6960
ATGCCTATCG	CGTGGGGCCT	GGTCGCGGCC	ATGGTCGCCG	TCGTGATCGC	CCGGCTCCTC	7020
AAAAGATGAA	CGTAGCTGTA	GTGGCGCCGC	AGACCTCCCG	TTGGAGGGAC	GCCGATAGGG	7080
CCGGGGCTCT	GTTAGTGAGG	GCGCTCAACA	GATATGCCAA	GGCCTGGCTG	ATAACCAGCG	7140
TATACCACGA	GGGAGAGCCC	GCAGCGGACG	AGGAGGTACT	GGAGAGGAGT	CTGGGCGGCT	7200
ACGTGGCGCT	CAAGGAGGAC	CCCTCGGGGG	TTCCGACAAT	CAGAGTACTG	AGCCAGAGGT	7260
CTCTGTGAGG	AAGCATCTCC	CTCAGGAGCT	TCCCTCGAT	TTTGAGGAAC	ATAGACGACG	7320
TACTGGGCTT	CGACGTAGTC	GTCGTCTCT	CGAGCTTCTG	GAACGGGCCC	GAGGAGGTAG	7380
CGCGCTGGGC	TGAGGTGAGA	AGGTCCCTCG	CTGCTCTGGG	CGAGGCCAGA	GGCGTGACCG	7440
TAGTATACAT	ACCGCTGTAT	CTGCCGCCCT	CGCCGAGCGC	CCGGTCCCTC	CTGGGCGCCT	7500
CGAAGCTCAT	GTGGTGCGCC	TTGCACTGCC	CCCCTGTGAT	CCGCGCTGCA	GATTTAGTTG	7560
TGGCAATGAG	CGAGGAGGAG	GCCGAGGAGC	TGTCGCAGTA	TAGGCCCGCG	AGGATCGCGG	7620
TGGCCCCCAA	TTGGATCGAC	GAAGAGCTGT	TGGCCCGCGC	GAGCCGCCCT	CCTCCGGGCG	7680
AGTAGAGGG	AGCGGAGGCC	GTGGTGGCC	ACGTTGGGCC	GCTTGAGGAG	GACAAAACT	7740
TAGAGTGTT	GGCCAAGACG	GCCGAGCGCT	TCTCCTCGGC	GGCAACATC	GTCTGACCGG	7800
CCGTAGGCGC	TGGGGGCGAG	GCACAGCGAC	TCAAGAGGGC	CCGGCCCAAG	AACCTCTTGG	7860
TCCTTGAGGA	CGTGGAGCCC	GAGCCGGTGA	TGGCGAAGTC	CGCGTTGGGA	GTGACCTCT	7920
CCTCCTACGA	GCCGGCGGGC	ATTGCGGTGT	TGGAGTTCAT	GGGCCTGGGA	GTGCCCGTCG	7980
CGGTCTCGCA	GTACAACCAC	GCCTCGAGGT	TGGTCAGAGA	CGGCGTAGAC	GGAGTTAGGC	8040
TCGCCCAACT	GGGCGACGCG	CCCAGAGTGA	TAGAGTCCCT	CGTGAGGCGG	CTGGATGTGT	8100
TGGCCGAGAT	GGGGGCCAAG	GCCAAGGAGA	GGGCGCCTCA	GCTGAGCATC	GGGCGCCTCG	8160
CCGAATTAAT	TTTAGGGGCA	CAACCGTAAA	AAGGCGTTCC	GTGGGAGGAC	AAGTGCGCCT	8220
CATAGTGGTC	TCCAACAGAT	TGCCCCGTCAC	TATATCGCCG	AGCGGCGAGA	TAAGGGAGTC	8280
CGTGGGCGGC	CTTGCGACTG	CTATGAAGTC	CTTCTCGGC	GCCGTGAACG	GGGCGAGAGA	8340
GCTGGGCTC	GAGGAGGTCG	TCTGGGTGCG	CTGGTCAGGC	GTGCCCTCGG	AGAGGGAGTC	8400
CAACGATCTG	AGGGAGCGCC	TCAGAGGGAT	GGGCTAGAG	CCTGTCCCCC	TCTCGTCTGA	8460
GGAGGTCGAG	GGGTTCTACG	AGGGCTTTTC	CAATTCGACT	CTCTGGCCGC	TCTTCCACGG	8520
CTTCTCGGAG	TATGCGACGT	ATGAGGAGAA	GCACTGGCGC	GCCTACAGAG	GCGTCAACGA	8580
GAAGTACGCC	AAAGCGGTGC	TAGCTCTGGC	GCGCCCCGGC	GACCTAGTGT	GGATCC	

Abb. A.2: Nukleotidsequenz des genomischen Klon pPEP8kb-1 (8636 bp).

Tab. A.1: Primer, die zur Sequenzierung des Klons pPEP8kb-1 verwendet wurden.
Die Positionsangaben beziehen sich auf Abb. A.2 (Nummerierung rechts).

Primer	Länge	Sequenz	Position
T3	20 bp	5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3'	Vektor-Primer
T7	22 bp	5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3'	Vektor-Primer
8kb-1	17 bp	5'-GGCCACCGGCGCGTGTA-3'	535 → 551
8kb-2	17 bp	5'-CCAGTTGGGCGAGCCTA-3'	8052 → 8036
8kb-3	19 bp	5'-GGCGGAGGCGGCAGATACA-3'	7474 → 7456
8kb-4	19 bp	5'-GCATGGCGCTCAGTATCGA-3'	6958 → 6940
8kb-5	19 bp	5'-CACTGGCCTTTGACCCCTA-3'	1055 → 1073
8kb-6	16 bp	5'-TACATCGACAGAGCGG-3'	6365 → 6350
8kb-7	19 bp	5'-AAGTGAAGTACATATAGGG-3'	1615 → 1633
8kb-8	17 bp	5'-ACCTCCGCAGCGTACGG-3'	5765 → 5749
8kb-9b	16 bp	5'-TCCTCCCGCACCGTGG-3'	2194 → 2209
8kb-10	17 bp	5'-CCGCGACCTGGAGCACG-3'	5143 → 5127
8kb-11	17 bp	5'-AAGCTTAGCGCCGACGC-3'	2789 → 2805

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Allgemeine Abkürzungen

Abb.	Abbildung
A. bidest	zweifach destilliertes Wasser
Amp ^r	Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
Cam ^r	Chloramphenicol-Resistenz
CAPS	3-[Cyclohexylamino]-1-propansulfonsäure
CDP	Dinatrium 2-chloro-5 (4-methoxyspiro {1,2-dioxetan-3,2'-(5'-chloro) tricyclo [3.3.1.1 ^{3,7}] decan} -4-yl)-1-phenylphosphat
CIP	Alkalische Phosphatase (calf intestinal phosphatase)
DEAE	Diethylaminethylether
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
EMP	Emden-Meyerhof-Parnas
g	Gramm
x g	Fallbeschleunigung
GLGP	Glycogen-Phosphorylase
h	Stunde
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
Kan ^r	Kanamycin-Resistenz
kb	Kilobasen

kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LDH	Lactat Dehydrogenase
M	molar (mol/l)
m	milli (10^{-3})
μ	mikro (10^{-6})
MCS	Multiple Klonierungsstelle (multiple cloning site)
min	Minute
MOPS	4-Morpholinpropansulfonsäure
MW	Molekulargewicht
NAD ⁺	Nicotinamid-adenin-dinukleotid (oxidiert)
NADH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid (reduziert)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OD	optische Dichte
p. a.	pro analysi
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PEP	Phosphoenolpyruvat
PEPS	Phosphoenolpyruvat Synthetase
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
P _i	anorganisches Phosphat
PK	Pyruvat Kinase
PPDK	Pyruvat, Phosphat Dikinase
PP _i	anorganisches Pyrophosphat
PTS	Phosphotransferase System
<i>Pwo</i> -Polymerase	DNA-Polymerase aus <i>Pyrococcus woesei</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodiumdodecylsulfate)
sec	Sekunde
s. / s. o./ s. u.	siehe / siehe oben / siehe unten
SSC	standard saline citrate

Tab.	Tabelle
<i>Taq</i> -Polymerase	DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBP	TATA-box Bindeprotein
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamid
TFB	Transkriptionsfaktor B
T _m	Schmelzpunkt von DNA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Enzymeinheit (Unit)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslated region
UV	ultraviolett
V	Volt
Vol	Volumen
W	Watt
WT	Wildtyp
www	world wide web
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid

Nukleoside und Nukleotide

A	Adenosin	ATP	Adenosintriphosphat
		ADP	Adenosindiphosphat
		AMP	Adenosinmonophosphat
C	Cytidin	CTP	Cytidintriphosphat
G	Guanosin	GTP	Guanosintriphosphat
T	Thymidin	TTP	Thymidintriphosphat
U	Uridin	UTP	Uridintriphosphat
		UDP	Uridindiphosphat
I	Inosin	ITP	Inosintriphosphat
N	Nukleosid (unspezifiziert)	NTP	Nukleosidtriphosphat
		dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat

UIPAC-Code der Nukleinsäuren

B:	G/T/C	K:	G/T	S:	G/C	Y:	T/C
D:	G/A/T	M:	A/C	V:	G/A/C	N	:
H:	A/T/C	R:	A/G	W:	A/T	A/C/G/T	

Aminosäuren:

A	Alanin	I	Isoleucin	R	Arginin
C	Cystein	K	Lysin	S	Serin
D	Asparaginsäure	L	Leucin	T	Threonin
E	Glutaminsäure	M	Methionin	V	Valin
F	Phenylalanin	N	Asparagin	W	Tryptophan
G	Glycin	P	Prolin	X	unspezifiziert
H	Histidin	Q	Glutamin	Y	Tyrosin

Abkürzungen der OrganismenArchaea

<i>A. pernix</i>	<i>Aeropyrum pernix</i>
<i>A. fulgidus</i>	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>
<i>M. jannaschii</i>	<i>Methanococcus jannaschii</i>
<i>M. maripaludis</i>	<i>Methanococcus maripaludis</i>
<i>M. kandleri</i>	<i>Methanopyrus kandleri</i>
<i>M. acetivorans</i>	<i>Methanosarcina acetivorans</i>
<i>M. mazei</i>	<i>Methanosarcina mazei</i>
<i>M. thermautotrophicus</i>	<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i>
<i>P. aerophilum</i>	<i>Pyrobaculum aerophilum</i>
<i>P. abyssi</i>	<i>Pyrococcus abyssi</i>
<i>P. furiosus</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
<i>P. horikoshii</i>	<i>Pyrococcus horikoshii</i>
<i>P. woesei</i>	<i>Pyrococcus woesei</i>
<i>S. marinus</i>	<i>Staphylothermus marinus</i>
<i>S. solfataricus</i>	<i>Sulfolobus solfataricus</i>
<i>S. tokodaii</i>	<i>Sulfolobus tokodaii</i>
<i>T. acidophilum</i>	<i>Thermoplasma acidophilum</i>
<i>T. volcanium</i>	<i>Thermoplasma volcanium</i>
<i>T. tenax</i>	<i>Thermoproteus tenax</i>

Bacteria

<i>A. aeolicus</i>	<i>Aquifex aeolicus</i>
<i>B. caldotenax</i>	<i>Bacillus caldotenax</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>C. symbiosum</i>	<i>Clostridium symbiosum</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>G. stearothermophilus</i>	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
<i>L. mesenteroides</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>M. rosea</i>	<i>Microbispora rosea</i>
<i>S. typhimurium</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<i>S. coelicolor</i>	<i>Streptomyces coelicolor</i>

Eucarya

<i>E. histolytica</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>
<i>G. duodenalis</i>	<i>Giardia duodenalis</i>
<i>O. sativa</i>	<i>Oryza sativa</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Z. mays</i>	<i>Zea mays</i>

DANKSAGUNG

Ein aufrichtiges 'Dankeschön' möchte ich an dieser Stelle an all jene richten, die an der Erstellung dieser Arbeit mitgewirkt haben und ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre:

- Meinem Doktorvater Reinhard Hensel danke ich herzlich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und vor allem für die Unterstützung und den großzügigen wissenschaftlichen Freiraum bei der Bearbeitung meines Themas.
- Für das angenehme Arbeitsklima möchte ich allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Mikrobiologie an dieser Stelle herzlich danken: Hatim Ahmed, Karin Bendt, Fabian Blombach, Nina Brunner, Anja Cargill, Christine Dörr, Hildegard Eling, Gerrit John, Ute Knörr, Thomas Knura, Ilona Kometiani, Steffi Kröner, Oliver Locker-Grütjen, Jörg Meyer, Klaus Michalke, Patrick Moritz, Maren Raabe, Bianca Reichstein, Alexander Schramm, Bettina Siebers, Kim Stubbe, Stefan Wolff und Melanie Zaparty.
- Mein besonderer Dank gilt meinen Mitstreitern im "Damenlabor" für eine tolle Zusammenarbeit und viele lustige Momente im Laboralltag: Fabian Blombach, Christine Dörr, Ilona Kometiani, Bettina Siebers und Melanie Zaparty.
- Großer Dank gebührt Christine Dörr für ihren tatkräftigen Einsatz bei den enzymatischen Messungen.
- Für intensives und vor allem kritisches Korrekturlesen möchte ich besonders Alexander Schramm danken.
- Dr. Roland Schmid aus der Arbeitsgruppe Mikrobiologie, Universität Osnabrück sei gedankt für die Durchführung der N-terminalen Sequenzierung.
- Mein Dank gilt auch Helge Uhrigshardt von der Universität Lübeck für die funktionelle Expression der Aconitase.
- Nicht zuletzt möchte ich besonders meinen Eltern danken für ihre Unterstützung in allen Lebenslagen, desweiteren meinem Bruder Ole, meinen Freunden und Thomas: Ihr wißt schon, wofür!

LEBENS LAUF

Name: Britta Tjaden
Adresse: Rellinghauserstr. 151, 45128 Essen
Geburtstag: 17.03.1972
Geburtsort: Emden
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig
Eltern: Ahlrich Richard Tjaden
Gertrude Anneliese Tjaden geb. Brink

SCHULISCHER WERDEGANG

1978-1982: Grundschule Früchteburg (Emden)
1982-1984: Orientierungsstufe Barenburgschule (Emden)
1984-1991: Gymnasium am Treckfahrtstief (Emden)

AKADEMISCHER WERDEGANG

1991-1996: Studium der Biologie
Universität Osnabrück
Abschluß: Diplom (Mikrobiologie, Pflanzenphysiologie, Biochemie)
bis Sept. 1997: wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe Mikrobiologie,
Universität Osnabrück
1997-2003: Promotion
Universität Duisburg-Essen
Abschluß: Dr. rer. nat.

DIPLOMARBEIT

Zeitraum: April 1996 - Dezember 1996
Betreuer: Prof. Dr. K.H. Altendorf (Lehrstuhl für Mikrobiologie), Dr. K. Jung
Thema: "Funktionelle Rekonstitution und Charakterisierung der Sensorkinase
KdpD aus *Escherichia coli*"

PROMOTIONSARBEIT

Zeitraum: November 1997 - Februar 2003
Betreuer: Prof. Dr. R. Hensel (Mikrobiologie)
Thema: "Untersuchungen zur Regulation des zentralen Kohlenhydratmetabolismus
von *Thermoproteus tenax* unter besonderer Berücksichtigung der
Phosphoenolpyruvat Synthetase und Pyruvat, Phosphat Dikinase"

ERKLÄRUNGEN

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, gemäß § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., daß ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Untersuchungen zur Regulation des zentralen Kohlenhydratmetabolismus von *Thermoproteus tenax* unter besonderer Berücksichtigung der Phosphoenolpyruvat Synthetase und Pyruvat, Phosphat Dikinase“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Frau Britta Tjaden befürworte.

Essen, 19.02.2003

Prof. Dr. Reinhard Hensel

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., daß ich die vorliegende Dissertation selbständig verfaßt und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, 19.02.2003

Britta Tjaden

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., daß ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und daß diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, 19.02.2003

Britta Tjaden