

Trehalose Metabolismus in (Hyper-) thermophilen Archaea

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der

Naturwissenschaften

- Dr. rer. Nat. -

vorgelegt von

Anna Hagemann

geboren am 27.01.1984 in Mülheim an der Ruhr

Biofilm Centre, Molekulare Enzymtechnologie und Biochemie

Fachbereich Chemie

der

Universität Duisburg-Essen

2013

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von September 2009 bis Juni 2013 im Arbeitskreis von Prof. Dr. Bettina Siebers in der Fakultät Chemie, Biofilm Centre, Molekulare Enzymtechnologie und Biochemie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

Tag der Disputation: 24.07.2013

Gutachter: Prof. Dr. Bettina Siebers
Prof. Dr. Jochen Gutmann
Vorsitzender: Prof. Dr. Eckhard Spohr

*Für meine Großeltern,
in tiefer Verbundenheit.*

*Niemand weiß was er kann,
bevor er es versucht.*

-Publilius Syrus-

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	11
TABELLENVERZEICHNIS	12
EINLEITUNG	10
1.1 ARCHAEA	10
1.2 DAS LEBEN IN EXTREMEN HABITATEN UND DIE ROLLE DER KOMPATIBLEN SOLUTE	11
1.3 TREHALOSE	14
1.4 TREHALOSE METABOLISMUS	15
1.4.1 DER TPS/TPP- ODER TPSP-WEG	17
1.4.2 DER TRET-WEG.....	18
1.4.3 DER TREY/TREZ-WEG.....	19
1.4.4 DER TRES WEG	20
1.4.5 DER TREP-WEG	20
1.4.6 DER TREH-WEG	21
1.5 THERMOPROTEUS TENAX	21
1.6 SULFOLOBUS SOLFATARICUS UND SULFOLOBUS ACIDOCALDARIUS	23
1.7 ZIEL DER ARBEIT	25
METHODEN	27
2.1 CHEMIKALIEN UND PLASMIDE	27
2.2 GERÄTE	27
2.3 MIKROBIOLOGISCHE METHODEN	29
2.3.1 ANZUCHT VON <i>ESCHERICHIA COLI</i>	29
2.3.2 KULTIVIERUNG VON <i>THERMOPROTEUS TENAX</i>	29
2.3.3 KULTIVIERUNG VON <i>S. SOLFATARICUS</i> UND <i>S. ACIDOCALDARIUS</i>	30
2.4 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	32
2.4.1 ARBEITEN MIT DNA	32
2.4.2 ARBEITEN MIT RNA	37
2.4.3 „YEAST TWO-HYBRIDE“	42
2.4.4 KONSTRUKTION EINER DELETIONSMUTANTE IN <i>S. ACIDOCALDARIUS</i>	43
2.5 BIOCHEMISCHE METHODEN	46
2.5.1 HETEROLOGE EXPRESSION VON REKOMBINANTEN PROTEINEN IN <i>E. COLI</i> UND HERSTELLUNG VON ZELLFREIEN EXTRAKTEN	46
2.5.2 AUFREINIGUNG DER ZIELPROTEINE.....	47
2.5.3 CHROMATOGRAPHISCHE METHODEN	47
2.5.4 HETEROLOGE EXPRESSION VON REKOMBINANTEN PROTEINEN IN <i>S. SOLFATARICUS</i>	49
2.5.5 AUFREINIGUNG VON MEMBRAN GEBUNDENEN PROTEINEN AUS <i>S. SOLFATARICUS</i>	49
2.5.6 ZELLFREIER EXTRAKT VON <i>S. SOLFATARICUS</i> , <i>S. ACIDOCALDARIUS</i> UND <i>T. TENAX</i>	50
2.5.7 REINIGUNG DNA-BINDENDER PROTEINE	50
2.5.8 AUFREINIGUNG VON EINSCHLUSSKÖRPERN	51
2.5.9 PROTEINFÄLLUNG	51
2.5.10 ENZYM TESTS	52
2.6 ANALYTISCHE METHODEN	55
2.6.1 PROTEIN-QUANTIFIZIERUNG	55
2.6.2 DISKONTINUIERLICHE SDS-POLYACRYLAMID-GEL-ELEKTROPHORESE (SDS-PAGE).....	55
2.6.3 NATIVE GELELEKTROPHORESE	56
2.6.4 WESTERN-BLOT UND IMMUNODETEKTION.....	56
2.6.5 DÜNNSCICHTCHROMATOGRAPHIE (DC).....	57
2.6.6 SOFTWARE.....	58

2.6.7	INTERNET DATENBANKEN UND WERKZEUGE.....	58
<u>ERGEBNISSE</u>		<u>60</u>
3.1	<i>THERMOPROTEUS TENAX</i>	60
3.1.1	DER TPSP-WEG	60
3.1.2	DER TRET-WEG IN <i>T. TENAX</i>	70
3.2	DER TRET-WEG IN <i>SULFOLOBUS ACIDOCALDARIUS</i> UND <i>S. SOLFATARICUS</i>	80
3.2.1	UNTERSUCHUNG DER TRET-AKTIVITÄT IN <i>S. ACIDOCALDARIUS</i> UND <i>S. SOLFATARICUS</i> ROHEXTRAKTEN	81
3.2.2	HETEROLOGE EXPRESSION VON SACI_TRET UND SSO_TRET	82
3.2.3	INTERAKTIONSUNTERSUCHUNG VON TRET UND ORFY MITTELS „YEAST TWO HYBRID“	82
3.2.4	KONSTRUKTION UND ANALYSE VON VERSCHIEDENEN <i>S. ACIDOCALDARIUS</i> DELETIONSMUTANTEN.....	84
3.2.5	UNTERSUCHUNG DER DELETIONSMUTANTE <i>S. SOLFATARICUS</i> PBL2025 Δ TRET	89
<u>DISKUSSION</u>		<u>92</u>
4.1	<i>THERMOPROTEUS TENAX</i>	97
4.1.1	DER TPSP-WEG	97
4.1.2	BIFUNKTIONALITÄT DER TPSP	99
4.1.3	KOMPLEXBILDUNG VON TPSP UND GT IN <i>T. TENAX</i>	102
4.1.4	PHYLOGENETISCHE ASPEKTE DER TPSP	103
4.1.5	DIE ROLLE VON TREHALOSE IN <i>T. TENAX</i> – MODELL DER STRESSANTWORT	106
4.2	DER UNIDIREKTIONALE TRET/ORFY-WEG	109
4.2.1	<i>THERMOPROTEUS TENAX</i>	109
4.2.2	<i>SULFOLOBUS ACIDOCALDARIUS</i> UND <i>SULFOLOBUS SOLFATARICUS</i>	112
<u>ZUSAMMENFASSUNG.....</u>		<u>119</u>
<u>LITERATUR</u>		<u>122</u>
<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</u>		<u>133</u>
<u>LEBENS LAUF.....</u>		<u>138</u>
<u>ERKLÄRUNG</u>		<u>139</u>
<u>DANKSAGUNG</u>		<u>140</u>

Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1 Schematische Darstellung der verschiedenen Wege für die Trehalose Synthese und/oder den Abbau.....</i>	16
<i>Abbildung 2 Elektronenmikroskopische Aufnahme von <i>T. tenax</i>.....</i>	22
<i>Abbildung 3 Elektronenmikroskopische Aufnahme von <i>S. solfataricus</i> P2.....</i>	24
<i>Abbildung 4 AFM-Aufnahme von <i>S. acidocaldarius</i> DSM 639.....</i>	24
<i>Abbildung 5 Aufbau eines Northern-Blots für den Kapillartransfer.....</i>	39
<i>Abbildung 6 Herstellung der Genfragmente die für die in vitro Transkription mit T7-Promotor.....</i>	40
<i>Abbildung 7 Schematische Darstellung der Konstruktion einer Deletionsmutante in <i>S. acidocalarius</i>.....</i>	44
<i>Abbildung 8 Schematische Darstellung der Organisation des <i>msc-gt-tpsp</i>-Operons in <i>T. tenax</i>.....</i>	61
<i>Abbildung 9 Northern-Blot zur Bestimmung der Genomorganisation und Transkription des <i>msc</i> Gens.....</i>	62

Abbildung 10 Reinigung der rekombinanten TPSP, GT und der artifiziellen TPP- und TPS-Domänen aus <i>T. tenax</i>	64
Abbildung 11 Analyse der TPSP-Aktivität in Gegenwart von T6P bzw. UDPG und G6P über Dünnschichtchromatographie.....	65
Abbildung 12 Spezifische Aktivität der <i>T. tenax</i> TPSP und der artifiziellen TPS- und TPP-Domänen in An- und Abwesenheit der GT.....	66
Abbildung 13 Spezifische TPS-Aktivität der <i>T. tenax</i> TPSP und der artifiziellen TPS- und TPP-Domänen in An- und Abwesenheit der GT.....	66
Abbildung 14 Protein-Protein-Interaktion der TPSP aus <i>T. tenax</i> und der artifiziellen TPS- und TPP-Domänen mit der GT untersucht im „Yeast two-Hybrid“-System.....	69
Abbildung 15 Schematische Darstellung des <i>treT-orfY</i> -Operons in <i>T. tenax</i>	70
Abbildung 16 Reinigung der Proteine OrfY und TreT aus <i>T. tenax</i>	71
Abbildung 17 Größenbestimmung von TTX_OrfY über Gelfiltration.....	72
Abbildung 18 Einfluss der Glukose auf das native Molekulargewicht von OrfY aus <i>T. tenax</i>	72
Abbildung 19 Untersuchung zur Protein-Protein-Interaktion von TTX_TreT und TTX_OrfY im „Yeast two-Hybrid“-System.....	74
Abbildung 20 Kluster-Mappe erstellt mit dem Programm Clans.....	75
Abbildung 21 Schematische Abbildung der Enzymfamilien mit Ähnlichkeiten zu der OrfY-Struktur, sowie Zusammenfassung und Anordnung der verschiedenen Proteindomänen.....	76
Abbildung 22 Kristallstruktur von OrfY aus <i>T. tenax</i>	76
Abbildung 23 Dünnschichtchromatographie verschiedener Zucker nach Inkubation mit OrfY.....	77
Abbildung 24 Untersuchung der Bindung von OrfY an DNA.....	78
Abbildung 25 Bindung von OrfY an spezifische DNA-Fragmente.....	79
Abbildung 26 Northern-Analyse zur Bestimmung der Genomorganisation und Transkription von <i>orfY</i> <i>S. acidocaldarius</i> unter Temperaturstress.....	80
Abbildung 27 Analyse der TreT-Aktivität in <i>S. solfataricus</i> und <i>S. acidocaldarius</i> Rohextrakten.....	81
Abbildung 28 Protein-Protein-Interaktion von TreT und OrfY aus <i>T. tenax</i> , <i>S. acidocaldarius</i> und <i>S. solfataricus</i> untersucht im „Yeast two-Hybrid“-System.....	83
Abbildung 29 Wachstumskurven der verschiedenen <i>S. acidocaldarius</i> Deletionsmutanten und des Kontrollstamms unter verschiedenen Stressbedingungen.....	88
Abbildung 30 Wachstumskurven von <i>S. solfataricus</i> 2025 WT und <i>S. solfataricus</i> 2025Δ <i>treT</i> unter verschiedenen Stressbedingungen.....	90
Abbildung 31 Genomische Kontext-Analyse der Gene, die in Archaea für den TPS/TPP-Weg mit fusionierter TPSP oder einzelner TPS und TPP kodieren.....	98
Abbildung 32 Sequenzanalyse der fusionierten TPSP, wie auch der TPS- und TPP-Proteine nach (M. Zaparty et al., 2013).....	102
Abbildung 33 Phylogenetische „Maximum Likelihood Analyse“ der TPS-Domäne der fusionierten TPSP und von TPS-Proteinen mit einer einzelnen Domäne.....	105
Abbildung 34 Einfluss der TTX_MSC Expression auf das Wachstum von <i>E. coli</i> BL21(DE3) pLys pET24a:: <i>msc-C-His</i> in Abhängigkeit von osmotischem Stress.....	107
Abbildung 35 Modell der Stressantwort in <i>T. tenax</i> basierend auf TPSP, GT und MSC.....	108
Abbildung 36 Sequenzvergleich der TreTs und OrfYs aus <i>S. acidocaldarius</i> , <i>S. solfataricus</i> und <i>T. tenax</i>	112

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Liste der Geräte.....	27
Tabelle 2 Modifiziertes Minimalmedium entsprechend Brock et al. (1972).....	31
Tabelle 3 Auflistung der verwendeten Klonierungsprimer.....	34
Tabelle 4 Auflistung der Sequenzierungsprimer.....	34
Tabelle 5 Auflistung der für die EMSAs verwendeten Primer.....	36

INHALTSVERZEICHNIS

<i>Tabelle 6 Primer für die Herstellung der Genfragmente mittels in vitro Transkription.</i>	40
<i>Tabelle 7 Herstellung der Konstrukte für die „Yeast two-Hybrid“-Experimente</i>	43
<i>Tabelle 8 Auflistung der für die Deletionsmutanten verwendeten Primer.</i>	45
<i>Tabelle 9 Aufreinigung von S. solfataricus, S. acidocaldarius und T. tenax Zielenzymen.</i>	48
<i>Tabelle 10 Zusammensetzung des Trenngels einer SDS-PAGE</i>	55
<i>Tabelle 11: Immunodetektion von Proteinen mit His-Tag bzw. Strep-Tactin-Tag</i>	57
<i>Tabelle 12 Wachstum des Kontrollstammes MW001 und verschiedener Deletionsmutanten in Abhängigkeit von osmotischem und Temperatur-Stress</i>	86
<i>Tabelle 13 Verteilung von Homologen aus den Trehalose-Synthese-Wegen in Archaea</i>	94
<i>Tabelle 14 Zusammenfassung der Ergebnisse der „Yeast two-Hybrid“-Experimente</i>	113

Kapitel 1

Einleitung

Einleitung

1.1 Archaea

Wie Sequenzvergleiche der *ssrRNAs* pro- und eukaryontischer Organismen zeigen, bilden Archaea, neben den Bakterien und den Eukaryonten, die dritte Domäne des Lebens (Woese *et al.*, 1990). Die Domäne der Archaea gliedert sich in die Phyla der Euryarchaeota (Vertreter sind hauptsächlich Methanogene, extrem Halophile, Thermoazidophile und wenige (Hyper-) Thermophile (Woese *et al.*, 1990)) und der Crenarchaeota (Vertreter sind hauptsächlich (Hyper-) Thermophile (Woese *et al.*, 1990)). Als weitere Phyla sind mittlerweile die Korarchaeota (bisher ausschließlich unkultivierbare Vertreter (Auchtung *et al.*, 2006; Elkins *et al.*, 2008)), die Nanoarchaeota (bisher nur *Nanoarchaeum equitans*, nicht allein kultivierbar (Di Giulio, 2007; Huber *et al.*, 2002)) sowie die Thaumarchaeota (Vertreter sind einige Mesophile (Brochier-Armanet *et al.*, 2008; Pester *et al.*, 2011) und kürzlich die Aigarchaeota (bisher nur *Caldiarchoaeum subterraneum* (Nunoura *et al.*, 2011)) identifiziert worden. Viele bekannte Vertreter aus der Domäne der Archaea sind an Extrembedingungen angepasst, wobei mittlerweile – nicht zuletzt durch Metagenomanalysen – gezeigt werden konnte, dass Archaea auch in mesophilen Habitaten ubiquitär verbreitet sind und dabei wichtige Rollen in den globalen Nährstoffkreisläufen spielen. Es wird beispielsweise angenommen, dass hauptsächlich Archaea in die Ammoniumoxidation involviert sind (Jarrell *et al.*, 2011). Sie finden sich sogar in der humanen Mucosa, wobei bisher kein pathogenes Archaeum identifiziert wurde (Chaban *et al.*, 2006; DeLong, 1998; DeLong & Pace, 2001; A. V. Mardanov & Ravin, 2012; Matarazzo *et al.*, 2012).

Archaea besitzen zum einen sowohl eukaryontische, als auch bakterielle Merkmale, zeichnen sich zum anderen aber auch durch spezielle und ungewöhnliche Charakteristika aus. Sie weisen, wie Bakterien, eine prokaryontische Zellorganisation ohne Nukleus oder andere Kompartimentierungen auf. Ihr Chromosom liegt ringförmig vor, sie besitzen oft zusätzliche Plasmide und ihre Gene sind häufig in Operonstrukturen organisiert (Jarrell *et al.*, 2011). Demgegenüber ähneln z.B. die Mechanismen von Transkription und Translation (u.a. vorhandene Histone) eher denen der Eukaryonten (Jarrell *et al.*, 2011). Zu den einzigartigen Charakteristika zählen der Zellwandaufbau und der Aufbau der Cytoplasmamembran: Die Zellwand enthält weder Muraminsäure noch D-Aminosäuren. Sie kann stattdessen aus dem sog. Pseudomurein, das bei einigen methanogenen Archaeen gefunden wird (Methanobacteriales und Methanopyrus) (Visweswaran *et al.*, 2011) oder aus parakristallinen (Glyco-)Proteinen (S-Layer) aufgebaut sein (Ilk *et al.*, 2011). Andere Archaea verfügen über gar keine Zellwand (z.B. Thermoplasmatales (Itoh *et al.*, 2007; König *et al.*, 1983; König, Kralik *et al.*, 1982)). Die Plasmamembran besteht anstelle von Glycerinestern aus Di- oder Tetraetherlipiden,

hauptsächlich mit C₂₀ – C₄₀ Isoprenoid-Seitenketten (Hanford & Peeples, 2002). Zum Teil erscheinen Archaea in ungewöhnlichen Zellformen (z.B. *Haloquadratum walsbyi* (Walsby, 2005)) und sind, wenn beweglich, über sog. Archaeella (archaeale Flagella (Jarrell, 2012)) motil. Auch im Metabolismus, insbesondere im Kohlenhydratstoffwechsel, weisen Archaea einige Besonderheiten auf (Kouril *et al.*, 2013; Siebers & Schönheit, 2005; Verhees *et al.*, 2003, 2004). So erfolgt der Hexoseabbau in Archaea, wie in vergleichenden Studien gezeigt, nicht über die von Bakterien und Eukaryonten bekannten klassischen Abbauwege (klassischer Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) Weg bzw. Entner-Doudoroff (ED) Weg), sondern über Modifikationen dieser Wege: Die insbesondere aus anaeroben (hyper-) thermophilen Archaea beschriebenen modifizierten EMP-Wege verlaufen zwar über die bekannten Intermediate, weisen dabei aber neuartige Enzyme, wie z.B. ADP- bzw. PP_i-abhängige Kinasen und ungewöhnliche Glycerinaldehyd-3-Phosphat oxidierende Enzyme, wie die nicht phosphorylierende GAPDH (GAPN) und/oder die Ferredoxin-abhängige GAP-Oxidoreduktase auf. In den v.a. aus aeroben, extrem halophilen und thermoazidophilen Archaea beschriebenen modifizierten ED-Wegen wird nicht initial die Glukose phosphoryliert, sondern die Intermediate 2-Keto-3-Deoxy-Glukonat im sog. semi-phosphorylativen bzw. Glycerat im nicht-phosphorylativen ED-Weg (Kouril *et al.*, 2013). In den meisten ED-Weg nutzenden Archaea werden beide ED-Modifikationen gefunden, was als verzweigter ED-Weg bezeichnet wird (Ahmed, 2005). Auch bei den ED-Varianten sind ungewöhnliche, vom klassischen ED-Weg abweichende, Enzyme beteiligt (Siebers & Schönheit, 2005; Van Der Oost & Siebers, 2007). Zudem wurde bisher in Archaea kein vollständiger oxidativer Pentosephosphat-Weg nachgewiesen. Stattdessen werden Pentosen für den Anabolismus über einen nicht-oxidativen Pentosephosphat-Weg und/oder – vermutlich mehrheitlich – über den Ribulosemonophosphat-Weg (RuMP) synthetisiert (Orita *et al.*, 2006). Durch diese ungewöhnlichen Stoffwechselwege und insbesondere die daran beteiligten neuartigen Biokatalysatoren werden die Archaea zunehmend auch für die industrielle Anwendung interessant.

1.2 Das Leben in extremen Habitaten und die Rolle der kompatiblen Solute

Wie bereits beschrieben sind Archaea ubiquitär verbreitet, wobei viele der bisher bekannten Arten aus extremen Habitaten wie heißen Quellen, hydrothermalen Tiefseequellen (Black Smoker), thermalen Gegenden, Gletschern oder hypersalinen Seen isoliert worden sind, wo sie z.T. die mikrobiellen Populationen, die auch Bakterien und wenige Eukaryonten umfassen können, dominieren. So findet man Leben bei Temperaturen von -20°C (Eric Collins *et al.*, 2010) bis 113°C (Stetter, 1999), in Salzseen mit Konzentrationen nahe der Sättigung (Fendrihan *et al.*, 2006) und bei pH-Werten von 0 (Schleper, Puehler *et al.*, 1995; Schleper, Puhler *et al.*, 1995), bis pH 11 (Sorokin, 2005). Das Leben in solchen Extremhabitaten erfordert effektive

Adaptionsstrategien, die sich je nach Art und Kombination verschiedener Extrembedingungen unterscheiden.

Die Proteine von kryo- oder psychrophilen Archaea weisen z.B. als intrinsischen Faktor tendenziell mehr Glutamin, Threonin und hydrophobe Reste auf. Der verstärkte Kontakt von hydrophoben Resten und die Verminderung der Ladung destabilisiert die Oberfläche der Proteine, was möglicherweise die Flexibilität erhöht, die Aktivierungsenergie senkt und so die katalytische Aktivität bei geringen Temperaturen verstärkt (Cavicchioli, 2006).

Als extrinsische Faktoren kommen sogenannte „Cold-Shock-Proteine“ vor, die an einzelsträngige Nukleinsäuren (ssDNA oder RNA) binden und so bei tiefen Temperaturen die Transkription ermöglichen (z.B. CspA in *E. coli*) (Feller, 2003; Feng *et al.*, 1998). „Frotzschutzmoleküle“ lagern sich an Eiskristalle an, verhindern die Bildung von größeren Kristallen und verändern so den Gefrierpunkt, was aber bisher nur in Eukaryoten beobachtet wurde (Feller, 2010; Feller & Gerday, 2003; Georlette *et al.*, 2004).

Acidophile Archaea haben eine stark impermeable Membran, um den Protoneninflux in das Zytoplasma zu verhindern. Zudem besitzen sie sowohl eine große Anzahl an Protonenpumpen, als auch an DNA- und Proteinreparaturgenen (Baker-Austin & Dopson, 2007).

Extrem Halophile Archaea aus der Familie der Halobacteriaceae (z.B. *Halobacterium*, *Haloarcula*, *Haloquadratum*, *Halorhabdus*, *Natronobacterium*, und *Natronococcus*) verwenden die „Salt in“ Strategie. Dabei werden meist K⁺-Ionen in der Zelle akkumuliert, um die Osmolaritätsunterschiede zum umgebenden Medium auszugleichen und so einen Wasserverlust zu verhindern. Um die Enzyme vor den hohen Konzentrationen zu schützen, besitzen diese als intrinsische Anpassung eine große Anzahl an sauren Aminosäuren und sind meist abhängig von K⁺- und/oder Na⁺-Ionen (Empadinhas & da Costa, 2008; Siglioccolo *et al.*, 2011). Unter halophilen bzw. halotoleranten Bakterien, Archaea und einigen Eukaryoten (z.B. Mikroalgen der Gattung *Dunaliella*) ist zudem die „Salt out“ Strategie weit verbreitet, bei der anstelle von Salzionen kompatible Solute als Osmoprotektanden akkumuliert werden (da Costa *et al.*, 1998; Mavromatis *et al.*, 2009).

Auch die Anpassungsstrategien an (hyper)-thermophile Bedingungen beruhen u.a. auf intrinsischen Faktoren, d.h., dass die Struktur der Proteine im Gegensatz zu der von mesophilen Organismen verändert ist (Cowan, 1997). Sie weisen spezielle Eigenschaften auf, die sie von denen der mesophilen Organismen unterscheiden. Die Aminosäurezusammensetzung zeigt eine stärkere Verwendung von geladenen statt polaren Aminosäuren (mehr Glutaminsäure, Asparaginsäure, Arginin und Lysin, weniger Asparagin, Glutamin, Serin und Threonin), wodurch mehr Ionenpaare entstehen können (Suhre & Claverie, 2003). Des Weiteren findet man verstärkt verkürzte Loops (M. J. Thompson & Eisenberg, 1999), höhere Oligomerisierungsformen durch Bindungen zwischen den Untereinheiten, sowie distinkte und stärker kondensierte Sekundärstrukturen. Hyperthermophile Proteine weisen zudem stärkere

hydrophobe Interaktionen auf (Cambillau & Claverie, 2000; Daniel & Cowan, 2000; Imanaka, 2011; Littlechild *et al.*, 2007; Scandurra *et al.*, 2000; Vieille & Zeikus, 2001). Eine solche Anpassung durch intrinsische Faktoren bedeutet meist, dass eine Funktionalität unter nicht extremen Bedingungen nicht mehr gegeben ist. Zusätzlich zu diesen intrinsischen Anpassungsstrategien spielen zum anderen auch extrinsische Faktoren eine große Rolle. z.B. wird die Proteinfaltung durch Chaperone unterstützt (Bergeron *et al.*, 2008). Sogenannte Heat Shock Proteine (HSP) sind für die Faltung/Entfaltung unter Stressbedingungen (z.B. thermaler Stress) verantwortlich und schützen so die Proteine (De Maio, 1999). Die Zelle bzw. Zellkomponenten können aber auch durch kompatible Solute geschützt werden, die als extrinsische Faktoren nicht nur eine herausragende Rolle bei der Anpassung an Extrembedingungen spielen, sondern häufig auch bei der Stressantwort, d.h. bei der Reaktion auf die unspezifische Änderung der äußeren Einflüsse durch Stressoren. (Selye, 1977).

Kompatible Solute werden in allen drei Domänen des Lebens gefunden und stellen niedermolekulare Verbindungen dar, die entweder von der Zelle selbst *de novo* synthetisiert oder von außen aufgenommen werden (da Costa *et al.*, 1998). Eine ihrer wichtigsten Eigenschaften ist, dass sie nicht mit dem Metabolismus interferieren, obwohl sie eine sehr hohe intrazelluläre Konzentrationen erreichen können (Empadinhas & Da Costa, 2006). Kompatible Solute fungieren als Gegenspieler des osmotischen Drucks, optimieren die physikalischen Eigenschaften des Zytosols und stabilisieren die Konformation von Biomolekülen gegen Stressoren (Andersen *et al.*, 2010). Dabei gibt es zwei verschiedene Klassen: i) Die der Aminosäuren und ihrer Derivate und ii) die der Polyole und Zucker bzw. deren Derivate. Innerhalb der Archaea wurden von der Klasse der Aminosäuren bzw. Aminosäurederivaten beispielsweise Aspartat in der Ordnung *Thermococcus*, oder Glycin-Betain in *Methanosarcina mazei* Gö1 (Empadinhas & Da Costa, 2006, 2008) als kompatible Solute identifiziert. Auch Methylamine gehören in diese Gruppe (Pflüger *et al.*, 2003). Von der Gruppe der Polyole und Zucker bzw. deren Derivate wurden z.B. die Polyole Di-myo-Inositol-Phosphate (DIP) in *Pyrococcus woesei* (Martins & Santos, 1995), cyclisches-2,3-Bisphosphoglycerat (cDPG) in *Methanopyrus kandleri* (Shima *et al.*, 1998) und *Methanothermus fervidus* (Lehmacher *et al.*, 1990) und β - Mannosylglycerat ebenfalls in *Methanothermus fervidus* (Martins *et al.*, 1997) identifiziert. Als Zucker findet sich v.a. Trehalose in einer ganzen Reihe von Archaea, z.B. in *Thermoproteus tenax*, *Pyrobaculum aerophilum*, Sulfolobales (z.B. *S. solfataricus*) und *Thermoplasma acidophilum* (Martins *et al.*, 1997).

1.3 Trehalose

Das multifunktionale Disaccharid Trehalose besteht aus zwei Glukose-Einheiten, die über eine α,α -1,1-glykosidische Bindung verknüpft sind. Obwohl es drei mögliche Anomere gibt, α,β -1,1-Trehalose, β,β -1,1-Trehalose und α,α -1,1-Trehalose, kommt ausschließlich letzteres natürlich vor (Elbein *et al.*, 2003). Mit seinen besonderen chemischen Eigenschaften, wie extremer Thermostabilität (>99% (120°C/90min)), hoher pH Stabilität (>99% (pH 3.5-10, bei 100°C für 24 h)) und der Resistenz gegenüber der Maillard Reaktion, also der nicht-enzymatischen Bräunungsreaktion (Newton, 2011), ist Trehalose neben seinen vielfältigen biologischen Funktionen (s.u.) auch von großem Interesse für industrielle Anwendungen (Elbein *et al.*, 2003; Feller, 2010; N. K. Jain & Roy, 2008; Teramoto *et al.*, 2008). So wird Trehalose in der Medizin und der Pharmaindustrie (Kryopräservierung von Sperma, Stammzellen und Organen (N. K. Jain & Roy, 2008), Impfstoffzusatz), in der Lebensmittelindustrie (Tiefkühlprodukte und Süßungsmittel), in der Kosmetikindustrie (Körpercreme und Deodorant (Arguelles, 2000); (Higashiyama, 2002)) und in der Biotechnologie (Stabilisierung von DNA-Polymerasen, Restriktionsenzymen, DNA-Ligasen und Antikörpern (Colaco *et al.*, 1992; Gribbon *et al.*, 1996; Roser, 1991)) verwendet.

In vivo kommt Trehalose zum einen als Kohlenstoffspeicher (z.B. in *Saccharomyces cerevisiae* (Francois & Parrou, 2001) oder Insekten (N. Jain & Roy, 2009)) sowie zum anderen als kompatibles Solut vor. Als solches kann es Zellwand, Zellmembran und Proteine während einer Stressphase schützen (Andersen *et al.*, 2010; De Klerk & Pumutapon, 2008; Luo *et al.*, 2007). Diese Stressfaktoren können verschiedenster Art sein, wie Hitze, Kälte, Austrocknung, Wassermangel sowie osmotische und oxidative Veränderungen (Elbein *et al.*, 2003). Über den molekularen Mechanismus der protektiven bzw. stabilisierenden Wirkung von Trehalose existieren verschiedene Hypothesen: i) Die Wasser-Austausch Hypothese besagt, dass Trehalose das Wasser während der Austrocknung oder dem Gefrieren ersetzt und so die Zelle bzw. Zellkomponenten schützt (Hackel *et al.*, 2012; Iturriaga *et al.*, 2009). ii) Die Vitrification oder Verglasungs-Hypothese geht davon aus, dass durch die hohe Viskosität von Trehalose in der Glasform die Proteinbewegung und auch die Proteindomänen-Bewegung inhibiert wird, bzw. die Proteine in eine Glashülle eingeschlossen und so geschützt werden (Gil *et al.*, 1996; Hackel *et al.*, 2012; N. K. Jain & Roy, 2008; Sampedro & Uribe, 2004; Sussich *et al.*, 1998). Dabei bezieht sich „Glas“ nicht auf das herkömmlich bekannte Silika-basierte Glas, sondern auf eine amorphe, nicht kristalline biomolekulare Matrix, die durch ihre hohe Viskosität wie ein Feststoff wirkt (Klok, 2010). Die Glas-Transition hängt dabei von verschiedenen Einflüssen, wie Temperatur und Luftfeuchtigkeit ab (Crowe *et al.*, 1996). Durch die Inhibierung der Bewegung wird das Protein vor der Denaturierung bewahrt. iii) Nach der Wassereinschlusshypothese wird zum einen postuliert, dass Wasser zwischen Proteinoberfläche und Trehalose gefangen wird. Zum anderen

wird vermutet, dass eine direkte Wasserstoffbrückenbindung zwischen Trehalose und Protein ausgebildet wird und dass das eingeschlossene Wasser keine Rolle spielt (Gil *et al.*, 1996; Hackel *et al.*, 2012). Dabei schließen sich diese verschiedenen Theorien nicht unbedingt gegenseitig aus und die Wirkung der Trehalose könnte auf einer Kombination dieser unterschiedlichen molekularen Mechanismen basieren (Hackel *et al.*, 2012).

Trehalose wird in allen drei Domänen des Lebens gefunden, mit Ausnahme von höheren Vertebraten (N. K. Jain & Roy, 2008), wobei verschiedene Wege zur Synthese des Zuckers vorkommen. In Bakterien und Archaeen finden sich fünf verschiedene Wege, wohingegen nur zwei in Pilzen und nur einer in Pflanzen und Invertebraten gefunden wurde (Arguelles, 2000; Goedl *et al.*, 2006; N. K. Jain & Roy, 2008).

1.4 Trehalose Metabolismus

Der Trehalose-Metabolismus von Eukaryoten und Prokaryoten unterscheidet sich maßgeblich. In Eukaryoten (Pflanzen und niedere Invertebrate) gibt es nur einen Weg zur Trehalose Synthese, den osmoregulatorischen Trehalose Synthese Weg (OtsA/OtsB bzw. TPS/TPP) (Avonce *et al.*, 2006; Schiraldi *et al.*, 2002). Zum enzymatischen Abbau des Zuckers wurde in dieser Domäne bisher nur die Trehalase (TreH) gefunden (Elbein *et al.*, 2003). Eine Ausnahme bilden die Pilze. Hier findet sich zusätzlich die Trehalose Phosphorylase (TreP), die sowohl die Synthese, als auch die Degradation von Trehalose katalysieren kann (Schiraldi *et al.*, 2002; Wannet *et al.*, 1998). Bakterien und Archaeen stehen eine Vielzahl von Trehalose-Synthese-Wegen zu Verfügung. Zusätzlich zu den Enzymen TPS/TPP und TreP findet sich der Maltooligosyltrehalose Synthase/Trehalohydrolase-Weg (TreY/TreZ), der Trehalose-Synthase-Weg (TreS) (Talavera & Castresana, 2007), und der uni- und bidirektionale Trehalose Glykosyl transferierende Synthase-Weg (TreT). Einige dieser Wege sind reversibel und könnten, wie z.B. für die TreT beschrieben, ebenfalls den Trehalose-Abbau katalysieren (Qu *et al.*, 2004). Eine klassische Trehalase (TreH), wie sie aus Eukaryoten und Bakterien bekannt ist (s.o.), wurde allerdings in Archaea bisher nicht beschrieben.

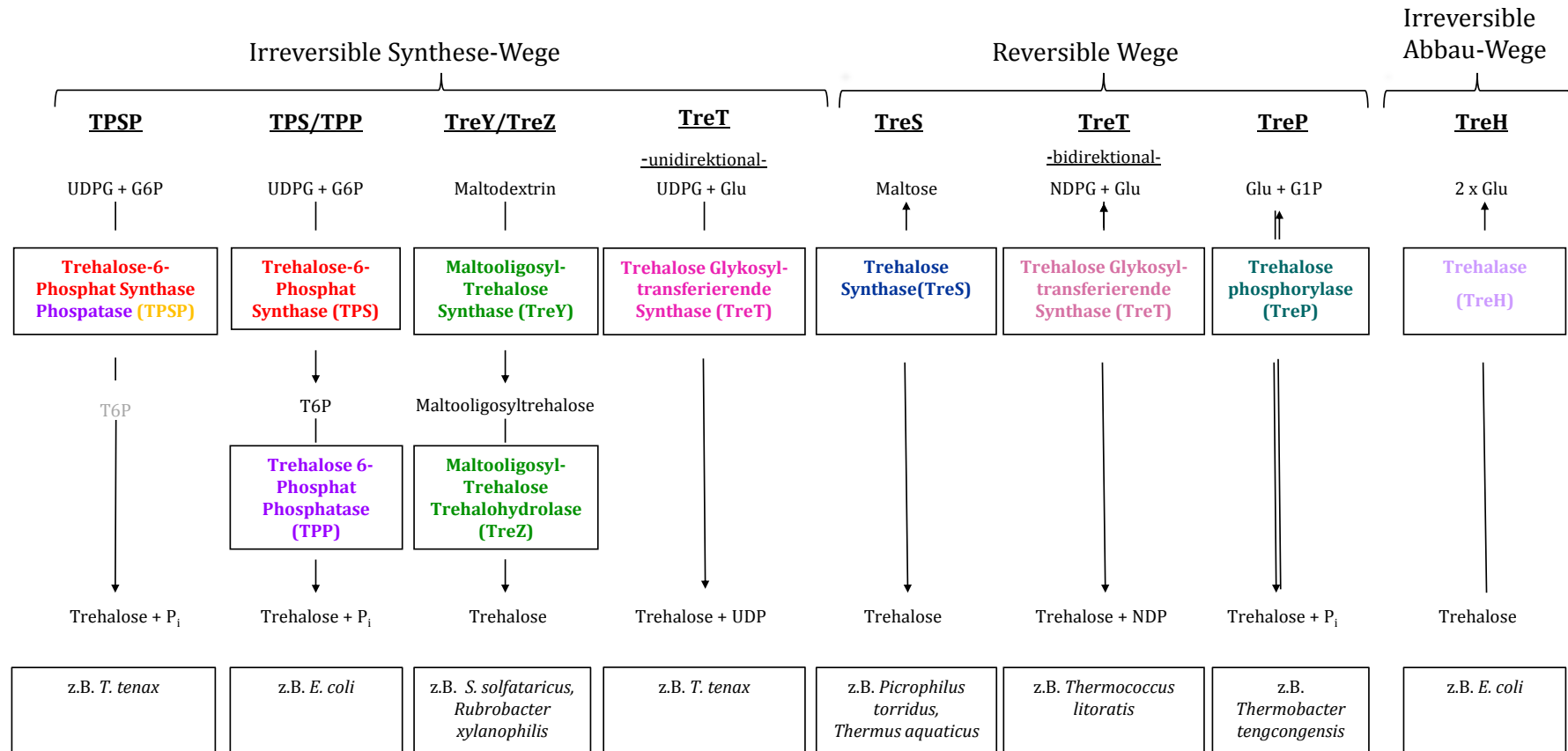


Abbildung 1 Schematische Darstellung der verschiedenen Wege für die Trehalose Synthese und/oder den Abbau

Abkürzungen: TPS/TPP Trehalose-6-Phosphat Synthase / Phosphat Phosphatase; TPSP, Trehalose-6-Phosphat Synthase Phosphatase; reversible TreT, Trehalose Glykosyl transferierende Synthase; unidirektionale TreT, Trehalose Glykosyl transferierende Synthase; TreS, Trehalose Synthase; TreY/TreZ, Maltooligosyltrehalose Synthase / Trehalohydrolase; TreP, Trehalose Phosphorylase; TreH, Trehalase; Die zwei Pfeile im TreP-Weg zeigen, dass dieser bisher entweder in ana- oder in kataboler Richtung beschrieben wurde.

1.4.1 Der TPS/TPP- oder TPSP-Weg

Der am weitesten verbreitete, in allen drei Domänen des Lebens vorkommende Trehalose Synthese Weg ist der TPS/TPP-Weg (Trehalose-6-Phosphate Synthase (TPS); Trehalose-6-Phosphate Phosphatase (TPP)), welcher ursprünglich als Schutzmechanismus gegen osmotischen Stress in *E. coli* beschrieben wurde (Giaever *et al.*, 1988) (Abbildung 1). Dabei katalysiert die TPS die α,α -Trehalose 6-Phosphate (T6P) Synthese aus Uridindiphosphat-Glukose (UDPG) und D-Glukose 6-Phosphat (G6P) unter UDP-Freisetzung. Das von der TPS gebildete T6P wird dann von der TPP (EC 3.1.3.12) dephosphoryliert und es entsteht Trehalose und P_i .

Man unterscheidet zwei verschiedene (Iso)-Formen der TPS. Die am häufigsten vorkommende ist die Uridindiphosphat (UDP) bildende TPS (EC 2.4.1.15), welche UDP-Glukose (UDPG) als Substrat nutzt, während die Guanosindiphosphat (GDP)-bildende TPS (EC 2.4.1.36) spezifisch für GDP ist. (Kaasen *et al.*, 1992).

Der TPS/TPP-Weg, der in Bakterien der am häufigsten vorkommende (Avonce *et al.*, 2006) und in Eukaryonten der universelle Trehalose Synthese Weg ist (ausgenommen Pilze), wurde bis jetzt nur in zwei Archaea, *T. tenax* und *T. acidophilum*, beschrieben (Rao *et al.*, 2006; Siebers *et al.*, 2004). Die Kristallstruktur der TPP von *T. acidophilum* wurde gelöst (Rao *et al.*, 2006). Informationen aus verfügbaren Genomsequenzen deuten darauf hin, dass die Gene, die für TPS und TPP kodieren, im Genom von *T. tenax* fusioniert sind, wobei das kodierte Fusionsprotein aus einer N-terminalen TPS- und einer C-terminalen TPP-Domäne besteht (Siebers *et al.*, 2011; Melanie Zaparty, 2007). Bisher lagen weder detaillierte biochemische Analysen noch Informationen zur Funktion dieser fusionierten TPSP in *T. tenax* vor, wobei die Fusion beider Enzyme sowie deren Genomorganisation auf neuartige Eigenschaften hinwiesen. Vor kurzem wurde die erste, bakterielle bifunktionale und fusionierte TPSP in *Cytophaga hutchinsonii* (ChTPSP) beschrieben (Avonce *et al.*, 2010), wobei hier die TPS-Aktivität erheblich (1000 x) geringer ist als die TPP-Aktivität. Auch in Pflanzen wie *Selaginella lepidophylla* und *Arabidopsis thaliana* (Blazquez *et al.*, 1998; Zentella *et al.*, 1999) oder in Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae* (Kaasen *et al.*, 1994) findet man fusionierte TPSP Strukturen, die jedoch nicht bifunktional sind. Diese TPSP-Proteine weisen hohe Homologien zur archaealen TPSP aus *T. tenax* auf, zeigen aber entweder nur TPS-oder nur TPP-Aktivität oder haben regulatorische oder strukturelle Funktionen (Avonce, 2006; Blazquez, 1993; Blazquez, 1998; Zentella, 1999).

1.4.2 Der TreT-Weg

2004 wurde die Trehalose Glykosyl transferierende Synthase (TreT) (E 2.4.1.245) von Qu *et al.* in dem hyperthermophilen Euryarchaeon *Thermococcus litoralis* beschrieben (Qu *et al.*, 2004) (Abbildung 1). Das Gen *treT* ist in einem Genklusters organisiert, welches ebenfalls für einen Maltose/Trehalose abhängigen ABC-Transporter und für den Transkriptionsregulator TrmB (K. Y. Lee *et al.*, 2002) kodiert. Es konnte gezeigt werden, dass das TreT Protein die Bildung von Trehalose aus Glukose und NDP-Glukose (Guanosindiphosphat -Glukose) mit einer deutliche Präferenz für ADP-Glukose katalysiert. Zwar konnte durch detaillierte enzymatische Analysen gezeigt werden, dass *in vitro* die biosynthetische Richtung präferiert wird, die Genom-Organisation spricht jedoch eher für eine degradierende Rolle des Enzyms. (Qu *et al.*, 2004). Dies wird durch Wachstumsexperimente gestützt die zeigen, dass *T. litoralis* während osmotischem Stress Trehalose akkumuliert. Der interne Trehalose Gehalt der Zellen, die bei 85°C auf Bacto Marine Broth Medium gezogen wurden, vervielfachte sich von 0,02 auf 0,37 µmol/mg Protein, wenn die Zellen durch eine Erhöhung der NaCl Konzentration von 2,0 auf 5,0 Gew.-% osmotischem Stress ausgesetzt wurden. Das Medium zur Anzucht enthielt Hefeextrakt (Lamosa *et al.*, 1998), der wiederum ca. 11 Gew.-% Trehalose beinhaltet (Xavier *et al.*, 1996), die durch Transporter oder Kanäle aufgenommen werden kann. Dies impliziert, dass *T. litoralis* die Aufnahme von Trehalose der *de novo* Synthese vorzieht (Lamosa, 1998). Sequenzanalysen sprechen dafür, dass dies auch der Fall bei dem hyperthermophilen Euryarchaeon *Pyrococcus furiosus* ist. Die TreTs aus *P. furiosus* und *T. litoralis* besitzen hohe Sequenzidentitäten (77% Identität der Aminosäuren bei einer Sequenz-Abdeckung von 99% (Woo *et al.*, 2010)) und detaillierte Analysen deuten auf einen horizontalen Gentransfer (HGT) eines 16-kb großen Fragments zwischen den beiden Organismen hin (Diruggiero, 2000), welches das Operon, das für den Maltose/Trehalose abhängigen ABC-Transporter kodiert (S. J. Lee *et al.*, 2005; Qu *et al.*, 2004). Dasselbe genomische Muster findet sich auch in *T. sibiricus* (A. Mardanov *et al.*, 2009). 2010 wurde die Kristallstruktur der TreT aus *P. horikoshii* beschrieben (Ryu *et al.*, 2011; Ryu *et al.*, 2005). Die Genom-Organisation der bisher beschriebenen Organismen unterscheidet sich fundamental von dem Gen-Cluster, dass in dem hyperthermophilen Crenarchaeon *Thermoproteus tenax* gefunden wurde. Hier liegt das Gen *treT* in einem Gen-Cluster mit einem Gen (*orfY*), das für ein Protein mit bisher unbekannter Funktion kodiert. Anders als die *T. litoralis* TreT, die reversibel ist und *in vivo* vermutlich den Trehalose-Abbau katalysiert, synthetisiert die *T. tenax* TreT ausschließlich die Trehalose-Synthese aus Glukose und UDP- und ADP-Glukose, wobei UDPG bevorzugt umgesetzt wird (Kouril *et al.*, 2008). Die TreT aus *T. tenax* wurde daher als neuartiger, unidirektionaler TreT-Weg beschrieben.

1.4.3 Der TreY/TreZ-Weg

Über den TreY/TreZ-Weg wird Trehalose aus Stärke oder Glykogen synthetisiert. Die Maltooligosyltrehalose Synthase (MTSase oder TreY) (E 5.4.99.15) katalysiert dabei die Konversion der terminalen α -1,4- Bindung eines linearen Dextrins zu der α -1,1- Bindung von Trehalosyldextrinen (Abbildung 1). Die Maltooligosyltrehalose Trehalohydrolase (MTHase oder TreZ) (E 3.2.1.141) spaltet dann die α -1,4- Bindung neben der α -1,1- Bindung, wodurch Trehalose frei gesetzt wird (Fang *et al.*, 2004; Fang, Tseng, Guo *et al.*, 2006; Kobayashi *et al.*, 1996; Yamamoto *et al.*, 2001) (Abbildung 1). In Archaea kommt der TreY/TreZ-Weg überwiegend in Sulfolobus Stämmen vor. Beide, TreY und TreZ, gehören zur Familie der α -Amylasen (Fang, Tseng, Chung *et al.*, 2006). In einigen Organismen, wie z.B. *S. solfataricus*, *S. acidocaldarius*, *S. islandicus*, *S. shibatae* (Di Lernia *et al.*, 1998) und *Metallosphaera hakonensis* (Seo *et al.*, 2008) liegen *treY* und *treZ* in einem Operon mit einem Gen (*treX*), das für ein Glykogen „debranching“ Enzym (TreX) kodiert (Woo, Ryu *et al.*, 2008; Yamamoto *et al.*, 2001). Es existieren dabei vier verschiedene Klassen von TreX-Enzymen (Barends, 2007; Nelson, 1968; Park, 2007; Saburi, 2006). TreX EC 3.2.1.70 ist eine Glucan 1,6- α -Glucosidase (Umsetzung von Isomaltoheptaose und H₂O zu Isomaltohexaose und D-Glukose), TreX EC 3.2.1.33 eine Amylo- β -1,6-Glucosidase (Umsetzung von 6-O- α -D-Glucosyl Cyclomaltoheptaose und H₂O zu D-Glukose und Cyclomaltoheptaose, TreX EC 3.2.1.68 eine Isoamylase (Hydrolyse von 1,6- α -D-glukosidischen Zweigen des Glycogens, des Amylopectins und des Grenzdextrins) und TreX EC 2.4.1.25 eine 4- α -Glucanotransferase (Transfer eines 1,4- α -D-Glucan-Segments zu einem Akzeptor, z.B. Glukose oder a 1,4- α -D-Glucan), wobei letzteres das am häufigsten vorkommende Enzym ist. Beschrieben wurde TreX (EC 2.4.1.25) aus *S. solfataricus* (J. T. Park *et al.*, 2008). Die Hydrolyse von Stärke durch den Rohextrakt von *S. solfataricus* wurde erstmals 1990 beschrieben (Lama *et al.*, 1990) und 1996 wurden erstmals alle drei Gene des Operons *treX*, *treY* und *treZ* aus *S. acidocaldarius* kloniert und die Proteine exprimiert (Maruta *et al.*, 1996). Auch in der Domäne der Bakterien wurde der TreY/TreZ-Weg Gene nachgewiesen (Avonce *et al.*, 2006). In *Rubrobacter xylanophilus* scheint dieser Weg nicht von Bedeutung für die Trehalose-Synthese zu sein (Nobre, 2008), wohingegen die homologe Überexpression von *Corynebacterium glutamicum* TreY/TreZ in diesem Organismus eine signifikante Steigerung der Trehaloseproduktion zeigte (Carpinelli *et al.*, 2006). In *Pseudomonas syringae* konnte eine Verbindung zwischen TreY/TreZ und TreS (1.4.3) gezeigt werden, da nach der Deletion nur eines Wegs keine Trehalose mehr synthetisiert werden konnte (Freeman *et al.*, 2010).

1.4.4 Der TreS Weg

Die Trehalose Synthase (TreS) (Talavera & Castresana) (EC 5.4.99.16) katalysiert die Konversion von Maltose zu Trehalose über eine intramolekulare Transglykosylierung der α 1,4- zur α 1,1,-Bindung (Chou *et al.*, 2010) (Abbildung 1). In Archaea wurde die TreS bisher nur aus dem thermoacidophilen Euryarchaeon *P. torridus* beschrieben. Blast-Analysen zeigen jedoch Homologien zu Proteinen aus den Euryarchaeota *Halorhabdus tiamatea* SARL4B (zwei Homologe mit 46% bzw. 32% Identität), *Halorubrum lacusprofundi* ATCC 49239 (38% Identität), *Methanosarcina acetivorans* C2A (32% Identität), und *Halomicrobium mukohataei* DSM 12286 (30% Identität). Das rekombinante Enzym katalysiert *in vitro* die Synthese von Trehalose, jedoch wurde die physiologische Rolle der TreS in *P. torridus* bisher nicht untersucht (Y. S. Chen *et al.*, 2006b). Daneben kommt die TreS in vielen Bakterien vor. Hier wurde gezeigt, dass in einigen Organismen (*Mycobacterium tuberculosis* und *Mycobacterium smegmatis*) die rekombinanten Proteine Synthase- und Amylase-Aktivität zeigen, also Trehalose aus Maltose bilden, aber auch die α -1-1-Bindung der Trehalose zur α -1-4-Bindung der Maltose umwandeln können (Pan, 2008; Pan, 2004). Dies konnte auch für TreS aus *Pimelobacter* sp. R48 (T. Nishimoto, M. Nakano *et al.*, 1996; Tomoyuki Nishimoto *et al.*, 1996; Tsusaki *et al.*, 1996) und *Thermus caldophilus* (Koh *et al.*, 1998) gezeigt werden mit dem Unterschied, dass das *T. caldophilus* Enzym auch die Synthese von $\alpha\beta$ -Trehalose katalysieren kann. Dies allerdings nur unter erhöhten Temperaturen. Die TreS aus *Thermus aquaticus* hingegen zeigt nur Synthese-Aktivität (T. Nishimoto, T. Nakada *et al.*, 1996).

1.4.5 Der TreP-Weg

Bei der Trehalose Phosphorylase werden zwei verschiedene Enzymklassen unterschieden. Während TreP (EC 2.4.1.231) α,α -Trehalose und Phosphat zu α -D-Glukose und α -D-Glukose-1-Phosphat konvertiert, katalysiert TreP (EC 2.4.1.64) die Bildung von β -D-Glukose und β -D-Glukose-1-Phosphat (Van der Borght *et al.*, 2011) (Abbildung 1). In Archaea wurde bisher keine TreP beschrieben, auch wenn Blast Analysen große Homologien von verschiedenen Proteinen aus *Pyrococcus horikoshii*, *Thermofilum pendens* und *Thermococcus barophilus* zu beschriebenen bakteriellen TrePs (z.B. aus *T. Brockii*) aufweisen.

Die β -D-Glukose-1-Phosphat synthetisierende TreP aus dem hyperthermophilen Bakterium *Thermoanaerobacter Brockii* (Maruta *et al.*, 2002) katalysiert hauptsächlich den Abbau von Trehalose. Dies konnte auch bei den Eukaryonten *Schizophyllum commune*, *Agaricus biosporus*, *Catellatospora ferruginea*, den Actinobacteria (z.B. *Micrococcus varians*) und dem Protisten *Euglena gracilis* gezeigt werden (Maruta *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu katalysiert TreP aus *Thermoanaerobacter tengcongensis* (83% Aminosäuren-Identität zu der TreP aus *T. Brockii*)

vorrangig die Synthese von Trehalose (Ren *et al.*, 2005). Die TreP aus dem Pilz *Grifola frondosa* katalysiert die Synthese von Trehalose aus α -D-Glukose und α -D-Glukose-1-Phosphat (Schiraldi *et al.*, 2002).

1.4.6 Der TreH-Weg

Die klassische Trehalase (TreH, EC 3.2.1.28) hydrolysiert α,α -Trehalose zu je einem β -D-Glukose- und einem α -D-Glukose-Molekül (Nwaka & Holzer, 1998) (Abbildung 1). TreH wird in vielen Organismen der Domänen der Bakterien und Eukaryonten gefunden, jedoch nicht in Archaea. Erstaunlicherweise findet man das Enzym auch in Säugern und dem Menschen, die keine Trehalose-Synthese-Wege besitzen. Es kommt in der Bürstensaummenbran der Nieren und der Membran der Darmzotten vor, wo es Trehalose hydrolysiert (Elbein *et al.*, 2003; Yoneyama & Lever, 1987). Hier wird der Zucker also nicht als kompatibles Solut verwendet, sondern dem Stoffwechsel zugeführt. In Archaea wurde bisher keine Trehalase beschrieben, jedoch können Archaea reversible Synthese-Wege wie z.B. den TreT Weg für den Trehalose Abbau nutzen (Qu, 2004). Möglich ist auch, dass Archaea neuartige Trehalasen besitzen, die die keine Homologien zu den bisher bekannten Enzymen aufweisen, oder aber völlig neuartige Wege für den Trehalose-Abbau nutzen.

1.5 *Thermoproteus tenax*

Das hyperthermophile Crenarchaeon *Thermoproteus tenax* Kra1 (DSM 2078) wurde 1981 aus einer Solfatare in Krafla auf Island isoliert (Zillig *et al.*, 1981). Sein Genom wurde 2011 veröffentlicht und umfasst 1,84 mbp, (Siebers *et al.*, 2011; M. Zaparty, 2003; Zillig *et al.*, 1981). Sein pH-Optimum liegt bei 5,5 und seine optimale Wachstumstemperatur bei 86°C. *T. tenax* ist ein Stäbchen-förmiger, strikt anaerober Schwefelreduzierer. Der Organismus ist sowohl in der Lage unter CO₂/H₂ Atmosphäre chemolithoautotroph, als auch unter Zugabe von verschiedenen organischen Substanzen wie Hefeextrakt, Glukose, Stärke, Amylase oder Glycerin chemoorganoheterotroph zu wachsen (Fischer *et al.*, 1983; Zillig *et al.*, 1981). Eine Besonderheit von *T. tenax* besteht darin, dass er verschiedene Wege zum Abbau von Glukose verwendet. Einerseits nutzt er eine Variante des reversiblen Embden-Meyerhof-Parnas-Weges (EMP) (Tjaden *et al.*, 2006; M. Zaparty *et al.*, 2008), andererseits eine verzweigte Modifikation des Entner-Doudoroff-Weges (ED) (mit einem nicht-phosphorylierende und einem semi-phosphorylierende ED-Zweig, (Ahmed *et al.*, 2005; Ahmed *et al.*, 2004)), wobei der Großteil der Glukose über den EMP-Weg abgebaut wird (85%EMP / 15%ED) (Siebers & Hensel, 1993); Selig, 1997).

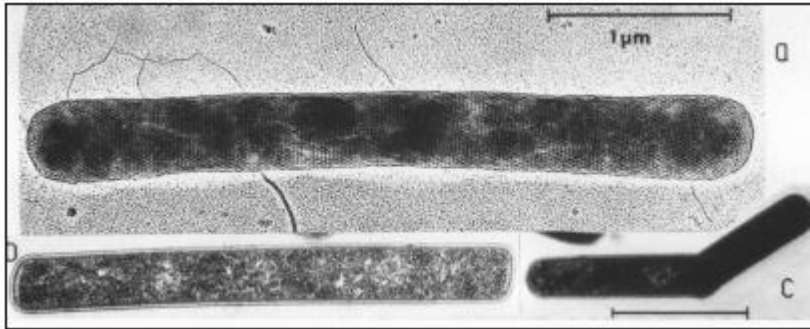


Abbildung 2 Elektronenmikroskopische Aufnahme von *T. tenax*

(Zillig *et al.*, 1981)

Wie in Abschnitt 1.3 beschrieben, findet man in *T. tenax* das kompatible Solut Trehalose. Es konnte gezeigt werden, dass beim Wachstum in einem Medium mit geringem Salzanteil (0,5 Gew.-%) eine intrazelluläre Trehalosekonzentration von rund 0,3 µmol/mg Protein vorliegt. Die Autoren vermuten, dass die Trehalose Synthese eine Antwort auf Temperaturstress sein könnte (Martins *et al.*, 1997). Dies konnte aber bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden. In der Genom-Sequenz von *T. tenax* wurden zwei der beschriebenen Trehalose-Synthese-Wege identifiziert die für Proteine kodieren, welche der Trehalose-Synthese zugeschrieben werden können (Siebers *et al.*, 2004; Siebers *et al.*, 2011). Der sog. TPS/TPP oder TPSP Weg (1.4.1) und der unidirektionale TreT-Weg (Kouril *et al.*, 2008). Der TPSP-Weg wurde mit Ausnahme der TPP-Struktur aus *T. acidophilum* (Rao *et al.*, 2006) zuvor ausschließlich für Eukaryonten und Bakterien beschrieben (Giaever *et al.*, 1988; Kaasen *et al.*, 1994). Erste Ergebnisse weisen darauf hin, dass es sich bei dem Protein TPSP um ein fusioniertes Enzym handelt. Eine solche Struktur wurde bisher in Archaea nicht untersucht. Das *tpsp* Gen bildet in *T. tenax* zusammen mit den Genen, die für eine putative Glykosyltransferase (*gt*) und einen mechanosensitiven Kanal (*msc*) kodieren, ein Gencluster. Bisher ist die TPSP nicht biochemisch charakterisiert worden. Die genomische Organisation deutet auf eine funktionelle Verbindung von TPSP GT und MSC hin, wobei aber die Funktion von GT und MSC bisher ebenfalls nicht untersucht wurden.

Die Funktion des *treT* Genprodukts wurde mittels funktioneller Überexpression, Reinigung und Charakterisierung des rekombinanten Enzyms nachgewiesen (Kouril *et al.*, 2008). Das Enzym gehört zur Familie der Glykosyltransferasen Gruppe 1 (Siebers *et al.*, 2004) und ist bisher die einzige beschriebene, unidirektionale TreT (TTX_TreT). Im Gegensatz zu der aus *T. litoralis* beschriebenen TreT katalysiert die TTX_TreT ausschließlich die Synthese von Trehalose aus Glukose und UDP- und ADP-Glukose, wobei UDPG favorisiert wird (Kouril *et al.*, 2008). Das Gen *treT* überlappt vier Basen mit einem stromaufwärts gelegenen Leserahmen, der für ein Gen mit bisher unbekannter Funktion kodiert (OrfY) (Kouril *et al.*, 2008; Siebers *et al.*, 2004). Die genomische Organisation spricht für eine funktionelle Verbindung der kodierten Proteine in der Trehalose-Synthese, wobei bisher nicht gezeigt werden konnte, dass beide Gene tatsächlich ein Operon bilden und co-transkribiert werden. Blast Analysen wiesen hohe Ähnlichkeiten von OrfY

und TreT zu Proteinen von einigen archaealen Mitgliedern der Ordnung Thermoproteales und Sulfolobales sowie in *Staphylothermus marinus* F1 und *Methanosaeta thermophila* PT auf, wobei für beide auch Homologe innerhalb der Bakterien gefunden wurden (Blast: Basic Local Alignment and Search Tool, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>; (Altschul *et al.*, 1990; Altschul *et al.*, 1997)). In allen Organismen bilden OrfY und TreT ein Genkluster. Bisher gibt es keine eindeutigen Hinweise auf die mögliche Funktion von OrfY.

1.6 *Sulfolobus solfataricus* und *Sulfolobus acidocaldarius*

S. solfataricus P2 (Sso, DSM1617; (Zillig *et al.*, 1980)) und *S. acidocaldarius* (Saci (DSM 639); (Brock *et al.*, 1972)) gehören zu dem Phylum Crenarchaeota. *S. solfataricus* wurde aus einer Solfatare im Pisciarelli Fumarolen Feld bei Neapel (Italien) isoliert (Zillig *et al.*, 1980), *S. acidocaldarius* aus einer Solfatare im Yellowstone Nationalpark (WY, USA) (Brock *et al.*, 1972). Beide sind aerob, thermoacidophil und zeigen ein optimales Wachstum bei 78-80°C (Sso:60-92°C; Saci 60-86°C) sowie bei einem pH von 3 (pH 2-4). Beide Genom-Sequenzen sind bekannt (*S. solfataricus* (She *et al.*, 2001), *S. acidocaldarius* (L. Chen *et al.*, 2005)) und es bestehen genetische Systeme mit dem beispielsweise Deletionsmutanten erstellt werden können. Zudem können beide Stämme als Wirtsorganismus für die thermophile Expression dienen (S. V. Albers *et al.*, 2006; Berkner *et al.*, 2010; Deng *et al.*, 2009; Grogan, 2009; Grogan & Gunsalus, 1993; Wagner *et al.*, 2009; Worthington *et al.*, 2003). Unterschiede zwischen den beiden Crenarchaeota zeigen sich bei der Anzahl der Kohlenhydrate und Zucker, die von den Organismen umgesetzt werden. *S. solfataricus* wächst heterotroph auf einer Vielzahl von Zuckern und kann zusätzlich auf L-Aminosäuren oder Komplexmedien, z.B. Trypton oder Hefeextrakt wachsen (S.-V. Albers *et al.*, 1999; Grogan, 1989). Die Zellen können ausschließlich in Minimalmedium (Brock *et al.*, 1972) mit definierten Kohlenhydraten oder Peptiden zu kultiviert werden. Im Allgemeinen wird ein komplexes Medium mit Peptiden und Zuckern als Kohlenstoffquelle verwendet. Im Gegensatz zu *S. solfataricus* ist das Substratspektrum von *S. acidocaldarius* insbesondere im Bezug auf Zucker eher limitiert (Grogan, 1989; Nunn *et al.*, 2010). Kürzlich wurde auch gezeigt, dass in *S. acidocaldarius* keine Glukose-induzierte Diauxie vorliegt. In der Studie wurde beobachtet, dass Zellen z.B. in einem Medium mit einer Mischung aus D-Glukose und D-Xylose simultan beide Zucker verwerten (Joshua *et al.*, 2011). Es ist möglich *S. acidocaldarius* auf L-Aminosäuren oder komplexen Medien wie auf Trypton zu kultivieren (Grogan, 1989).

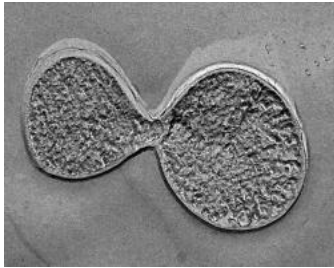


Abbildung 3 Elektronenmikroskopische Aufnahme von *S. solfataricus* P2.

(Freundlicherweise von S.-V. Albers, MPI Marburg bereitgestellt)

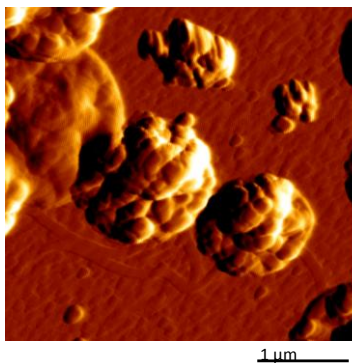


Abbildung 4 AFM-Aufnahme von *S. acidocaldarius* DSM 639.

(Freundlicherweise von Jens C. Benninghoff und Andrzej Kuklinski bereitgestellt)

Im Rohextrakt von *S. solfataricus* P2 wurde erstmalig 1990 die Hydrolyse von Stärke zu Glukose und Trehalose nachgewiesen (Lama *et al.*, 1990). Wie man später zeigen konnte, sind dafür Enzyme, die durch das *treY/treZ*-Genkluster kodiert werden verantwortlich, (Fang, Tseng, Guo *et al.*, 2006; Kang *et al.*, 2008; Maruta *et al.*, 1996; H. S. Park *et al.*, 2007; J. T. Park *et al.*, 2008; Woo, Lee *et al.*, 2008), das auch in *S. acidocaldarius* zu finden ist (Gueguen *et al.*, 2001; Maruta *et al.*, 1996; Mukai *et al.*, 1997). Martins *et al.* detektierten vergleichbar geringe Mengen von Trehalose (0,12 µmol/mg Protein im Gegensatz zu z.B. 3,7 µmol/mg Protein zyklisches-2,3-Bisphosphoglycerat in *Methanothermus kandleri*) und Glukose (0,03 µmol/mg Protein) in *S. solfataricus* (Martins *et al.*, 1997). So wie auch für *T. tenax* vermuteten die Autoren, dass Trehalose hier nicht als Osmoprotektant dient, sondern eher für die Antwort auf Temperaturstress von Bedeutung ist. Zum selben Schluss kommen auch da Costa *et al.* (da Costa *et al.*, 1998). Obwohl *S. solfataricus* und *S. acidocaldarius* über den TreY/TreZ Weg Trehalose aus Stärke synthetisieren können, besitzen beide Sulfolobus Spezies zusätzlich Gene (*treT* und *orfY*), die für TreT und OrfY kodieren und deren Genprodukte hohe Homologien zu den Enzymen aus *T. tenax* aufweisen (M. Zaparty & Siebers, 2011). Die Rolle von TreT/OrfY ist bisher nicht untersucht und die Bedeutung von Trehalose in Sulfolobales und generell in Archaea ist bislang unverstanden.

1.7 Ziel der Arbeit

Die bisher wenig erforschte Funktion von Trehalose in Archaea sollte in der vorliegenden Arbeit durch Analysen des Trehalose-Metabolismus in den Modell-Organismen *Thermoproteus tenax*, *S. solfataricus* und *S. acidocaldarius* untersucht werden.

Ein Schwerpunkt der Arbeit bildete die Untersuchung des TPSP Weges in *T. tenax*: Es sollte mit Northern Blot Analysen geklärt werden, ob das ungewöhnliche *tpsp*, *gt* und *msc* Gencluster ein Operon bildet. Um weiteren Aufschluss über die Funktion der kodierten Proteine und deren funktionelle Korrelation zu erhalten, sollten diese kloniert, exprimiert, gereinigt und biochemisch charakterisiert werden. Zusätzlich wurden die *tps* bzw. *tpp* kodierende Regionen der neuartigen, fusionierten TPSP getrennt kloniert, exprimiert und biochemisch vergleichend zum Fusionsprotein untersucht. Insbesondere die Funktion der putativen Glykosyltransferase (GT) sollte durch enzymatische Analysen zusammen mit der TPSP untersucht werden, wobei die „Yeast two-Hybride“ Methode Rückschlüsse über Protein-Protein-Interaktionen beider Enzyme zuließ.

Ein weiteres Ziel der Arbeit bestand in der Analyse des zweiten Trehalose-Synthese Weges, des TreT Weges, der in *T. tenax* identifiziert wurde. Das Gen *treT* überlappt 4 Basen mit *orfY*. Während die TreT gut untersucht ist, konnte die Rolle des Proteins OrfY bisher nicht entschlüsselt werden. OrfY sollte exprimiert, gereinigt und die Funktion mit verschiedenen biochemischen und molekularbiologischen Methoden analysiert werden. Durch die Aufklärung der Kristallstruktur von OrfY in Kollaboration mit Prof. A. Lupas, Dr. K. Zeth und Dr. J. Martin (MPI Tübingen) sollten weitere Hinweise zur Funktion gewonnen werden.

Auch die Rolle des TreT-Weges in Sulfolobus Spezies, der zusätzlich zum TreY/TreZ Weg den zweiten Trehalose-Synthese Weg in diesen Organismen darstellt, und insbesondere die Funktion von OrfY sind bisher völlig ungeklärt. Die genaue Funktion des Trehalose Synthese-Weges TreT/OrfY ist ebenfalls noch nicht untersucht worden. Mit den vorhandenen genetischen Systemen wurden Einfach- (*treT*, *orfY*, *treY*), Doppel- (*treT/orfY*, *treT/treY*, *orfY/treY*) und Dreifach-Mutanten (*orfY/treY/treT*) von *S. acidocaldarius*, sowie die *S. solfataricus* Δ *treT*-Deletionsmutante konstruiert und *in vivo* Wachstums-Versuche zur Analyse der Stressantwort durchgeführt.

KAPITEL 2

MATERIAL & METHODEN

Methoden

2.1 Chemikalien und Plasmide

Die (Co)Substrate ADP (Monokaliumsalz), ATP (Di-Natriumsalz), D-Fruktose 6-Phosphat (Di-Natriumsalz Hydrat), D-Glukose, α -D-Glukose 1-Phosphat (Di-Kaliumsalz), Formaldehyd-Lösung (37% in H₂O), sowie die Hilfsenzyme Lactat-Dehydrogenase (LDH, Hasenmuskel, EC 1.1.1.27), Pyruvatkinase (PK, Hasenmuskel, EC 2.7.1.40), Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase (G6PDH, *S. cerevisiae*, EC 1.1.1.49), Hexokinase (*S. cerevisiae*, EC 2.7.1.1) und Trehalase (TreH, Schweineniere, EC 3.2.1.28) wurden von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, GER) bezogen. NADP⁺ (Di-Natriumsalz) und NADH (Di-Natriumsalz) wurden von Gerbu Biotechnik GmbH (Wieblingen, GER) bezogen.

Alle anderen Chemikalien und Enzyme wurden von Abcam (Cambridge, UK), Ambion (Darmstadt, GER), Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH (Uppsala, Sweden), Bio-Rad Laboratories GmbH (München, GER), Biometra (Göttingen, GER), Difco Laboratories (Augsburg, GER), MEB Fermentas Life Science (St. Leon Rot, GER), Gerbu Biotechnik GmbH (Wieblingen, GER), Life Technologies (Karlsruhe, GER), Merck (Darmstadt, GER), QIAGEN (Hilden, GER), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, GER), Roth GmbH (Karlsruhe, GER), SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, GER), Sigma-Aldrich (Taufkirchen, GER) und VWR International (Langenfeld, GER) mit analytischem Reinheitsgrad bezogen. Für die heterologe Expression wurde das pET Vektor System (pET11c, pET15b, pET24a (Merck (Novagen) Darmstadt, GER)) und der Vektor pCold1 (TaKaRa Bio Inc., Japan) genutzt. Der Vektor pSVA406, welcher für die Konstruktion von Deletionsmutanten in *S. acidocaldarius* genutzt wird, wurde freundlicherweise von S.-V. Albers (MPI Marburg) (Wagner *et al.*, 2009) bereitgestellt.

2.2 GERÄTE

Tabelle 1 Liste der Geräte

Gerät	Beschreibung
Agarosegelelektrophorese System	B1A EasyCast™, Owl Separation Systems (Portsmouth (USA)); Power supply: Consort E835 (MS Laborgeräte)
Autoklaven	H+P Varioklav, 25T, Federgari Autoklav, Integra Bioscience (IBS) (Fernwald, GER) H+P Varioklav, 75S, Federgari Autoklav, Integra Bioscience (IBS) (Fernwald, GER)
Chromatographie Säulen	HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade, GE Healthcare (Freiburg, GER) Superose 6, 10/300 GL, GE Healthcare (Freiburg, GER), Ni-NTA prepacked column, Bio-Rad Laboratories GmbH (München, GER)

	<p>Q-Sepharose prepacked column Q-12, Bio-Rad Laboratories GmbH (München, GER)</p> <p>17,7 mL selbst gepackte Q-Sepharose-Säule (Bio-Scale MT20 Column, Bio-Rad Laboratories GmbH (München, GER), Säulenmaterial: Q-Sepharose, GE Healthcare (Freiburg, GER))</p> <p>Protino® Ni-TED-150 und 2000 gepackte Säulen und selbst gepackte 35 mL Säulen (Macherey und Nagel, Düren, GER)</p> <p>Ni-NTA Superflow 5 mL, Qiagen, (Hilden, GER)</p> <p>Resource S 6 mL Säule, GE Healthcare (Freiburg, GER)</p>
Sterile Werkbank	HERAsafe®KSP Class II Bio-safety Cabine (Kendro Laboratory Products GmbH, Langensbold; GER)
Fast Pressure Liquid Chromatography (FPLC)	<p>Biologic DuoFlow Pathfinder 20 system (Bio-Rad Laboratories GmbH (München, GER))</p> <p>System: F10 work station, MX-1 mixer, 3-Tray rack, AVR7-3 sample inject valve, QuadTec UV/Vis detector with 3 mm PEEK flow cell, system cable 25 (RS-232), BioFrac fraction collector</p>
Fermenter	Infors HT Minifors (Bottmingen, Schweiz)
Gel-Dokumentation	GelDoc Gel Documentation System, Bio-Rad Laboratories GmbH (München, GER)
Heizblöcke	<p>Thermoblock v4.6, Hardware & Service (Friedland, GER)</p> <p>TSC ThermoShaker, Analytik Jena (Jena, GER)</p>
Inkubatoren	<p>Infors HT Unitron (Bottmingen, Schweiz)</p> <p>Infors HT Thermotron (Bottmingen, Schweiz)</p> <p>Heraus B6 Kendro (Langensbold, GER)</p> <p>Heraus T20 Kendro (Langensbold, GER)</p>
Konzentrator	Concentrator plus, Bio-Rad Laboratories GmbH (München, GER)
Membran-Vakuum Pumpe	LABOPORT Typ:N816.3KN.18 (KNF Neuberger GmbH, Freiburg, GER)
Mikrowelle	HP1612, Siemens (München, GER)
pH-Meter	WTW Series inoLab pH 720 (WTW GmbH, Weilheim); pH-Elektrode: SenTIX 81 pH0-14/0-100°C/3mol/KCl (WTW GmbH, Weilheim, GER)
Photometer	<p>BioPhotometer Plus (Eppendorf AG, Hamburg, GER); Specord®200 und Specord®210 (Analytik Jena, Jena); Compact Regulator: JUMO dTRON 308 (Analytik Jena, Jena, GER)</p>
Plate Reader	Infinite M200, Tecan (Crailsheim, GER)
SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-System	<p>Hoefler Mighty small II Model SE250-10A-75 (Hoefler Pharmacia Biotech Inc., San Francisco); Mini-Protean 3 System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, GER); Energy supply: Consort E835 (MS Laborgeräte)</p>
Sonicator	Ultraschallprozessor UP 200s, Hielscher (Teltow, GER)
Thermocycler	<p>Mastercycler personal, Eppendorf (Hamburg, GER)</p> <p>Thermocycler C1000, Bio-Rad Laboratories GmbH (München, GER)</p>
UV Stratalinker	UV-Stratalinker™ 2400, Stratagene (Waldbronn, GER)
VersaDoc	VersaDoc Model 4000 System, Bio-Rad (München, GER)
Waagen	<p>KERN EW 4200-2NM (Kern & Sohn GmbH); TE124S (Sartorius AG, Goettingen); TE601 (Sartorius AG, Goettingen, GER)</p>
Wasserbad	Thermomix UB, B. Braun (Melsungen, GER)
Zentrifugen	<p>Sorvall Centrifuge RC26, Kendro (Langensbold, GER)</p> <p>Rotor: Sorvall SS-34, Kendro (Langensbold, GER)</p> <p>Rotor: F10S-6x500y, Fiberlite Piramoon Technologies (Santa Clara, USA)</p> <p>Optima Max-Up-Ultrazentrifuge, Beckman Coulter (Krefeld, GER)</p>

2.3 Mikrobiologische Methoden

2.3.1 Anzucht von *Escherichia coli*

Die Stämme *Escherichia coli* K-12 DH5 α (DSMZ 6897) (Klonierung), *E. coli* BL21(DE3) (Merck, (Novagen) Darmstadt, GER), *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-Ril, *E. coli* Rosetta(DE3) (Agilent Technologies (Stratagene) Waldbronn, GER) und *E. coli* Lemo21(DE3) (New England Biolabs) (Expression von rekombinanten Proteinen), sowie *E. coli* ER1821 (Methylierung für die Transformation von *Sulfolobus acidocaldarius*) wurden in 5-3500 mL Kulturen bei 22-37°C aerob (170 rpm) kultiviert. Als Flüssigmedium wurde Lysogeny Broth (LB) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, GER) mit den entsprechenden Antibiotika verwendet: (Ampicilin 100 μ g/mL (pET11c, pET15b, pSVA406, pGADT7, pCold1), Kanamycin 50 μ g/mL (pET24a, pM.EsaBC4I, pGBKT7) und Chloramphenicol 34 μ g/mL (Ril-Plasmid, pACYC184 Derivat). Das Wachstum wurde spektrophotometisch bei 600 nm überwacht. Für feste Medien wurde 1,5 Gew.-% Agarose verwendet.

2.3.2 Kultivierung von *Thermoproteus tenax*

Thermoproteus tenax Kra1 (DSM 2078) wurde anaerob und heterotroph bei 86°C und einem pH 5.5 in einem komplexen Medium (modifiziert nach (Brock *et al.*, 1972)) angezogen. Pro Liter: 1.3 g (NH₄)SO₄, 280 mg KH₂PO₄, 250 mg MgSO₄·7H₂O, 70 mg CaCl₂·2H₂O, 20 mg FeSO₄·7H₂O, 1.8 mg MnCl₂·4H₂O, 4.5 mg Na₂B₄O₇·10H₂O, 0.22 mg ZnSO₄·7H₂O, 0.05 mg CuCl₂, 0.05 mg Na₂MoO₄·2H₂O, 0.03 mg VOSO₄·H₂O, 0.01 mg CoSO₄·7H₂O, 1 mg Resazurin. Anschließend wurde das Medium auf 86°C erwärmt und der pH-Wert mit KOH auf pH 5.5 eingestellt. Die Kulturflaschen wurden mit ¼ Medium befüllt, mit Gummisepten verschlossen und die Gasphase durch N₂/H₂ (95/5 Vol.-%) ersetzt. Nach dem Autoklavieren wurden die Flaschen bei RT gelagert. Unmittelbar vor Gebrauch wurde das Medium durch Zugabe von elementarem Schwefel (1 g/l (S⁰)) und 0.3 g/l L-Cystein reduziert (ca. 2 Stunden, 86°C), mit Hefeextrakt (0,001 Gew.-%) versetzt, mit 4 Vol.-% Vorkultur (ca. 1 x 10⁸ Zellen/mL) inokuliert und bei 86°C stehend mit sporadischem Schwenken inkubiert. Das Wachstum wurde mikroskopisch mit einer Neubauer Zählkammer (Tiefe 0,02 mm) überwacht. Je nach physiologischem Zustand der Zellen dauerte es ca. 3-7 Tage, bis eine Zellzahl von 10⁸ erreicht wurde.

2.3.3 Kultivierung von *S. solfataricus* und *S. acidocaldarius*

Für die Konstruktion von Deletionsmutanten und die Charakterisierung des Phänotyps, sowie die Ermittlung von Enzymaktivitäten in zellfreiem Extrakt wurden die folgenden Stämme genutzt: *S. solfataricus* P2, *S. solfataricus* PBL2025, *S. solfataricus* M16, *S. acidocaldarius* DSM 639 und *S. acidocaldarius* MW001 (Uracil auxotroph). Diese Stämme wurden aerob in 7 mL -1 L Minimalmedium, entsprechend Brock *et al.* (Brock *et al.*, 1972) bei pH 3.5 bei 60 – 85°C kultiviert (Tabelle 2). Als Zucker wurden Trehalose, D-Glukose, Dextrin und D-Arabinose genutzt und je nach Applikation in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt (0,1 -0,4 Gew.-%). Peptide und Aminosäuren wurden in Form von Trypton oder NZ-Amin (Protein Hydrolysate NZ-Amine AS (Fluka) Sigma-Aldrich Taufkirchen, GER) eingesetzt. Für die Präparation von zellfreiem Extrakt zur Messung von Enzym-Aktivitäten wurden die Zellen bei einer optischen Dichte von ca. 0,85 (exponentielle Phase) mittels Zentrifugation (3,500 x g, 12 min, 4°C) geerntet und bei -80°C gelagert.

Für das Minimalmedium wurden alle Chemikalien in sterilem H₂O_{bidest} angesetzt und die Komponenten wurden wie in Tabelle 2 gezeigt gemischt. Brock I, II, und III, NaCl, KCl, 20 Gew.-% Dextrin und 20 Gew.-% Glukose wurden autoklaviert, wohingegen Uracil, Fe(II), Trypton und NZ-Amin steril filtriert wurden. Durch Zugabe von 50 Vol.-%iger Schwefelsäure wurde pH 3 eingestellt. Als Kohlenstoff- und Energiequelle wurden die oben aufgeführten Zucker und/oder Trypton/NZ-Amin verwendet. Um den Einfluss verschiedener abiotischer Stressfaktoren auf die Deletionsmutanten zu untersuchen, wurde das Wachstum der Zellen bei Temperaturveränderungen (von 78°C auf 86°C, bzw. 83°C und von 78°C auf 66°C) und osmotischen Veränderungen (mit 250 mM KCl und 300 mM NaCl) beobachtet. Der Stress wurde entweder ab einer OD₆₀₀ zwischen 0,3 und 0,5 induziert oder von Beginn des Wachstums an auf die Zellen ausgeübt. Alle Versuche wurden im Triplikat ausgeführt und enthielten 0,1 Gew.-% NZ-Amin, 5 mg/mL Uracil und 0,2 Gew.-% Dextrin.

Tabelle 2 Modifiziertes Minimalmedium entsprechend Brock *et al.* (1972).

Zutaten für Brock Medium-Lösungen und das finale Brock-Medium.

Brock I-Lösung (1000x)	Einwaage	1 L Medium
CaCl ₂ x 2H ₂ O	70 g/L	0,07 g
Brock II-Lösung (100x)		
(NH ₄) ₂ SO ₄	130 g/L	1,3 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	25 g/L	0,25 g
H ₂ SO ₄ (konz.)	3 mL/L (pH 3)	
Brock III-Lösung (200x)		500 mL
KH ₂ PO ₄	56 g/L	0,28 g
H ₂ SO ₄ (konz.)	5 mL/L (pH 3)	
MnCl ₂ x 4H ₂ O	360 mg/L	1.8 mg/L
Na ₂ B ₄ O ₇ x 4H ₂ O	0,9 mg/L	0,0045 mg/L
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	44 mg/L	0,22 mg/L
CuCl ₂ x 2H ₂ O	10 mg/L	0,05 mg/L
NaMoO ₄ x 2 H ₂ O	6 mg/L	30 mg/L
VO ₂ SO ₄ x 2H ₂ O	6 mg/L	0,030 mg/L
CoSO ₄ x 7 H ₂ O	2 mg/L	0,01 mg/L
1 L finales Brock-Medium		
Brock I	1 mL	
Brock II	10 mL	
Brock III	5 mL	
FeCl ₃ -Lösung (20 Gew.-%)	1 mL	0,02g
H ₂ SO ₄	300 µL pH 3-3.5	

Für die Herstellung von thermostabilen Platten wurden auf 1 l Brock Medium zusätzlich 6 mL 0,5 M CaCl₂ und 10 mL 1 M MgCl₂ und 0,6 Gew.-% Gelzan™ CM Gelrite® (Gellan-Gummi, Sigma) gegeben. Dazu wurden 500 mL H₂O mit 6 g Gellan-Gummi versetzt und unter Rühren auf einem Magnetrührer (225°C) erhitzt. Alle restlichen Komponenten wurden in die anderen 500 mL H₂O gegeben und auf ca. 80°C vorgewärmt. Sobald das Gellan-Gummi gelöst war, wurden die Heizplatte ausgestellt und die restlichen 500 mL zugegeben. Darauf folgte schnelles Einstellen des pH-Wertes auf 3-3,5 und das Gießen der Platten. Diese konnten mehrere Wochen bei 4°C gelagert werden.

2.4 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

2.4.1 Arbeiten mit DNA

2.4.1.1 Präparation von genomischer DNA

Für die Klonierung von Genen aus *S. solfataricus* bzw. *S. acidocaldarius* und zur Analyse von Deletionsmutanten wurden 4 mL Kultur mit einer OD_{600} von 0,8 in einem 2 mL Reaktionsgefäß pelletiert und die genomische DNA mit dem Qiagen Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, GER) nach Angaben des Herstellers für Gram-negative Bakterien isoliert. Die Inkubationszeit bei 56°C betrug 1-1,5 Stunden. Als Eluent wurden 150 µL RNase/DNase-freies Wasser verwendet. DNA von *Thermoproteus tenax* wurde freundlicherweise von Dr. Theresa Kouril zur Verfügung gestellt.

2.4.1.2 Konzentrationsbestimmung und Reinheitsanalyse von DNA

Die Konzentration der DNA wurde über eine Absorptionsmessung bei 260nm in einem BioPhotometer (Eppendorf AG, Hamburg) bestimmt. Eine Absorption (A_{260}) von 1 bei einer Wellenlänge von 260 nm und einer Schichtdicke von 1 cm entspricht 50 µg dsDNA pro mL. Der Absorptionskoeffizient der $OD_{260/280}$ (BioPhotometer) gibt die Reinheit der DNA wieder, wobei ein Verhältnis (A_{260}/A_{280}) von 1,8 – 2,0 ein guter Reinheitswert ist (Sambrook & Russell, 2001). Werte unter 1,8 oder über 2,0 deuten auf Verunreinigungen durch Proteine oder Phenol hin. Zusätzlich lässt sich das Verhältnis $OD_{260/230}$ zur Analyse des Reinheitsgrades verwenden. Dieser Wert sollte über 2,0 liegen. Ist dies nicht der Fall, liegt wahrscheinlich eine Verunreinigung durch Kohlenhydrate, Salze oder organische Lösungsmittel vor.

2.4.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Analyse und Präparation von Plasmiden, Restriktionsfragmenten, PCR-Produkten, genomischer DNA und Gesamt-RNA verwendet. Eine weitere Anwendung waren EMSAs („electrophoretic mobility shift assay“) (2.4.1.12). In der Regel wurden Gele verwendet, für welche 1 Gew.-% Agarose in 1 x TAE-Puffer (40 mM Tris, 40 mM Essigsäure, 1 mM EDTA, pH 8,5) gelöst wurde. Für sehr kleine DNA-Fragmente wurden 4 Gew.-%ige Agarosegele verwendet, die wegen der hohen Agarosekonzentration in TBE-Puffer (89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH 8) angesetzt wurden. Sowohl DNA, als auch RNA Proben wurden mit Ladepuffer (Fermentas) versetzt und genau wie der Größenstandard (GeneRuler 1 kb Ladder; GeneRuler 100 bp Ladder (Fermentas)) in die Geltaschen gegeben und bei 100-150 V aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde bei RT durchgeführt. Die Visualisierung

der DNA erfolgte unter UV-Licht (Gel-Dokumentationssystem (Bio-Rad)) nach Färbung in einem Ethidiumbromid-Bad (500 µg/L, RT, 15-20 min) und anschließender Entfärbung in H₂O.

2.4.1.4 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des Plasmid-Mini oder -Midi Kit (Fermentas, St. Leon-Rot, GER) isoliert. Als Eluent wurde RNase/DNase-freies Wasser verwendet.

2.4.1.5 Aufreinigung von DNA-Fragmenten und Plasmid-DNA

Für die Aufreinigung aus präparativen Gelen wurden die relevanten Banden unter UV-Licht ausgeschnitten und mit dem Wizard[®] SV Gel & PCR Kit (Promega, Mannheim, GER) nach Herstellerangaben behandelt und mit H₂O_{dest} eluiert. Für die Aufreinigung von PCR-Produkten wurde das QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) oder das Wizard[®] SV Gel & PCR Kit (Promega, Mannheim, GER) genutzt. Für das Entfernen von Nukleotiden wurde das QIAquick Nucleotide Removal Kit (Qiagen, Hilden) verwendet.

2.4.1.6 Amplifikation von genomischer DNA durch Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Für die Amplifikation von DNA wurden Thermocycler der Firmen Eppendorf und Bio-Rad genutzt. Für einen Ansatz (Volumen 10-50 µL) wurden 50–100 ng genomische oder Plasmid-DNA als Template, je 0,2 µM Primer, 0,2 mM dNTPs (PeqLab, Erlangen), 5 x Phusion[®] HF Puffer (Thermo Scientific), 3 Vol.-% DMSO und 1 U DNA Polymerase (Phusion High-Fidelity DNA Polymerase, Thermo Scientific) eingesetzt. Die Oligonukleotide wurden von Biolegio (Nijmegen, NL) bezogen. Die in dieser Arbeit verwendeten Klonierungs-Primer sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Die Amplifikation erfolgte wie nachstehend beschrieben, wobei die Schritte 2-4 mit 20-30 Zyklen wiederholt wurden.

1)	30 sec	98°C	Denaturierung der Templates
2)	10 sec	98°C	weitere Denaturierung der Templates
3)	30 sec	55-65°C	Anlagerung der Primer
4)	x sec	72°C	Elongation, je nach Länge des Amplifikates
5)	10 min	72°C	Inkubation

Die Dauer der Elongation berechnete sich nach der Länge des Amplifikates und der Prozessivität der Phusion Polymerase (2000 bp/min).

Tabelle 3 Auflistung der verwendeten Klonierungsprimer.

Die mit * gekennzeichneten Primer und die resultierenden Konstrukte wurden von Dr. M. Zaparty zur Verfügung gestellt.

Primerbezeichnung	Schnittstelle	Primersequenz (5'-3')	Vektor	Größe in bp
TTX <i>tps</i> F	<i>Eco</i> RI	GGCCGGGAATTCGTGCGCCTCATAGTGGTC	pET24a	1385
TTX <i>tps</i> R	<i>Sall</i>	CCGGCCGTCGACGATTAGGGAGTAGATGAAG		
TTX <i>tps</i> R mit His-Tag	<i>Sall</i>	CCGGCCGTCGACTTAGATTAGGGAGTAGATGAAG		
Saci <i>treT</i> F	<i>Nde</i> I	AGCCGGCATATGATGATAGAGAAATATG	pET11c/ pET15b	1206
Saci <i>treT</i> R	<i>Bam</i> HI	GGCCGGGATCCTTATACACTATTCCTC		
TTX <i>gt</i> F	<i>Nde</i> I	TCCTCAACATATGAACGTAGC	pET15b/ pColdI	1164
TTX <i>gt</i> R	<i>Bam</i> HI	CTCCACGGATCCCCTTTTAC		
Sso <i>treT</i> F	<i>Nde</i> I	GGGGCTCGAGCATATGGTTGTTAAGATGATTG	pET11c/ pET15b	1278
Sso <i>treT</i> R	<i>Bam</i> HI	GGCGGGGATCCTCAATGATTAGATATAGATTC		
TTX <i>treT</i> F	<i>Nde</i> I	GCGCGGCAGCCATATGATAGAGCGTTAC	pET11c/ pET15b	1206
TTX <i>treT</i> R	<i>Bam</i> HI	GGCGGGATCCTCAGGGAGCCGAATGCCG		
TTX <i>tpsp</i> F*	<i>Nde</i> I	TTCCGTGGGAGGACATATGCG	pET24a	2196
TTX <i>tpsp</i> R*	<i>Eco</i> RI	CGCCAGCGGCAATTCAGAGACAGGGG		
TTX <i>tpp</i> F*	<i>Nde</i> I	GAGAAGGCCCTCAGACATATGGA	pET24a	688
TTX <i>tpp</i> R*	<i>Eco</i> RI	GGTTGAATCTTAGCCCGCGG		

Tabelle 4 Auflistung der Sequenzierungsprimer

Sequenzierungsprimer:	Primersequenz (5'-3')
TTX <i>tpsp</i> innen F	TACTCCGCAATTTCTCCAG
TTX <i>tpsp</i> innen R	GTGCCGTCGTAGTCCAAGAGCAAG
Saci <i>treT</i> KO Test-PCR F	GGTTGCTCTATCGCCGTTTG
Saci <i>treT</i> KO Test-PCR R	AGGTGCACTAGCAGGACTTG
Saci <i>treT</i> KO Seq F	GATCTCTGGTGTGGCACTTTGTAAGTAG
Saci <i>treT</i> KO Seq R	CATTATGGGTCCTAGTCTCCTCTC
Saci <i>treY</i> KO Test-PCR F	GTCGTTTCTATGTCCATGTCAATATAGG
Saci <i>treY</i> KO Test-PCR R	CCTGACGGCAATGAAGTTGATG
Saci <i>treY</i> KO Seq F	CCAGCCTGAATGTCCGTAAG
Saci <i>treY</i> KO Seq R	GGAGAAAGGATAGCTGACGACAC
Saci <i>orfY</i> / <i>treY</i> KO Test-PCR F	ACTCAGGATTTCTCTCATTTT
Saci <i>ORFY</i> / <i>treY</i> KO Seq F	CCTCCGGTGACCTCTACATTG
pCold F	GCACACTTAATTATTAAGAG
pCold R	CCAAATGGCAGGGATCTTAG

2.4.1.7 Restriktion von DNA

Für den Verdau von DNA wurden die doppelsträngigen DNA-Moleküle mit der entsprechenden Menge „fast digest“ Restriktionsenzym (abhängig von dem genutzten Enzym und der Form der DNA (PCR-Produkt oder Vektor-DNA)) und dem korrespondierenden Puffer versetzt und bei 37°C nach Herstellerangaben inkubiert. Die genutzten Restriktionsenzyme sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

2.4.1.8 Ligation

Restringierte DNA-Fragmente und linearisierte Vektoren (50 – 400 ng) wurden in den molaren Verhältnissen 1:3 bis 1:1 mit 1U T4 DNA-Ligase (Fermentas) und dem entsprechenden

Puffer nach Herstellerangaben in einem finalen Volumen von 10-20 μL angesetzt. Die DNA-Ligase katalysiert dabei die Ausbildung der Phosphodiesterbindungen zwischen einer 3` Hydroxylgruppe und einer 5`-Phosphatgruppe. Die Ligation erfolgte 16°C über Nacht bzw. bei 37°C für eine Stunde.

2.4.1.9 Präparation von chemisch kompetenten *E. coli* Zellen

Die Herstellung kompetenter Zellen der *E. coli* Stämme DH5 α , BL21(DE3), BL21-CodonPlus(DE3)-RIL, Lemo21(DE3), Rosetta(DE3)-pET24a::*tpsp* und Rosetta(DE3) erfolgte nach der Calcium-Chlorid-Methode. 200 mL LB-Medium wurden 1 Vol.-%ig mit einer Übernachtskultur inokuliert und bei 37°C und 180 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 im Schüttler inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen für 10 min auf Eis inkubiert und dann zentrifugiert (4,000 x g, 7 min, 4°C). Die Zellpellets wurden vorsichtig in 10 mL eiskaltem Puffer (60 mM CaCl₂, 10 mM PIPES, 15 Vol.-% Glycerin, pH 7.0) gewaschen, zentrifugiert (4,000 x g, 5 min, 4°C), in 2 mL desselben Puffers resuspendiert und je in 80 μL Aliquots zunächst in flüssigem N₂ schockgefrostet und dann bei -80°C gelagert.

2.4.1.10 Transformation von *E. coli*

Der Stamm *Escherichia coli* K-12 DH5 α (DSMZ 6897) wurde für die Klonierung genutzt. Bei der Transformation von *E. coli* mit Fremd-DNA wurden 80 μL kompetente Zellen langsam auf Eis aufgetaut und vorsichtig mit Plasmid-DNA (1-2 μg) oder Ligationsansatz (10-20 μL) versetzt und mind. 30 min auf Eis inkubiert. Darauf folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 90 sec mit anschließender Zugabe von 800 μL LB-Medium. Der Ansatz wurde für 2 min auf Eis und dann 50 min bei 37°C im Schüttler inkubiert, sodass die Zellen zwei Verdopplungen durchlaufen konnten. Aliquots (100 μL und 800 μL) der transformierten Zellen wurden zur Selektion auf LB-Agar-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert. Waren keine Einzelkolonien erforderlich, wurde direkt LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika mit 20-50 μL Transformationsansatz inokuliert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C über Nacht unter aeroben Bedingungen.

2.4.1.11 DNA-Sequenzierung

Die automatisierte Sequenzierung der DNA führte die Firma LGC Genomics (Berlin, GER) durch. Dazu wurden 10 μL der Plasmid-DNA (80-100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) oder des PCR-Produkts (100 ng/ μL) und 2 μL der spezifischen Primer (10 μM) verwendet.

2.4.1.12 EMSA („Electrophoretic Mobility Shift Assay“)

Um eine Interaktion von OrfY mit einer bestimmten DNA Sequenz zu untersuchen, wurden zunächst verschiedene 25 bp und 200 bp lange dsDNA-Fragmente aus dem Promotorbereich von BRE-Site (Transkriptionsfaktor B „recognition element“) und TATA-Box, sowie aus dem kodierenden Bereich des Gens *treT* (Negativkontrolle) ausgewählt. Kurze Fragmente wurden über Hybridisierung kürzerer Oligonukleotide erstellt, längere Fragmente via PCR. Für die Hybridisierung wurden die Primer (Tabelle 5) in Hybridisierungspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 8, 0,1 Gew.-% EDTA, 0,2 M NaCl) gelöst. Die jeweils komplementären „forward“- und „reverse“-Primer wurden zusammen gegeben, für 5 min bei 95°C im Wasserbad denaturiert und langsam über Nacht auf RT runter gekühlt. Die hybridisierten DNA-Abschnitte wurden dann über ein 4 Gew.-%iges Agarose-Gel aufgetrennt und via Elektroelution aufgereinigt. Die längeren Fragmente wurden wie in Abschnitt 2.4.1.5 beschrieben aufgereinigt. 400 ng der gereinigten DNA-Fragmente wurden anschließend mit 5 µg OrfY gemischt und entweder direkt auf ein 4 Gew.-%iges TBE-Agarosegel aufgetragen oder zunächst 20 min bei 70°C inkubiert und anschließend aufgetragen.

Tabelle 5 Auflistung der für die EMSAs verwendeten Primer.

Die Nummern beziehen sich auf die Lage der Primer, wobei 1 die erste Base des Startkodons des Gens *orfY* bezeichnet.

Primerbezeichnung	Primersequenz (5'-3'),
-165 bis -140 For	TGAGCGGCCTTGCGCCGAACTGTTG
-165 bis -140 Rev	CAACAGTTCGGCGCAAGGCCGCTCA
-145 bis -120 For	TGTTGCAACAGTTTGTGCGTAGTCTA
-145 bis -120 Rev	TAGACTACGACAAACTGTTGCAACA
-125 bis -100 For	GTCTACCTTGCCCTTACTTCCCAC
-125 bis -100 Rev	GTGGGAAGTAAAGGCAAGGTAGAC
-105 bis -80 For	CCCACGGCGTTACTACGAAGTCCAC
-105 bis -80 Rev	GTGGACTTCGTAGTAACGCCGTGGG
-85 bis -60 For	TCCACCCCATGCCTCGCCCCCGCT
-85 bis -60 Rev	AGCGGGGGGCGAGGCATGGGGTGGA
-65 bis -40 For	CCGCTCTCCACTATTTAAGTTTTAG
-65 bis -40 Rev	CTAAAACCTAAATAGTGGAGAGCGG
-45 bis -20 For	TTTAGCCACCGACGCCTTTTTAATG
-45 bis -20 Rev	CATTAAAAAGGCGTCGGTGGCTAAA
-25 bis 0 For	TAATGTAGGCACGTGGAGACTCCAT
-25 bis 0 Rev	ATGGAGTCTCCACGTGCCTACATTA
-5 bis 20 For	TCCATGGCCGATCTTGACTCCAAGG
-5 bis 20 Rev	CCTTGGAGTCAAGATCGGCCATGGA
15 bis 40 For	CAAGGCCAAGTCGCCGTTTGTCTTC
15 bis 40 Rev	GAAGACAAACGGCGACTTGGCCTTG
Promotor <i>OrfF</i>	GGGGGAATTTCGTATTTATTCAGTAGGG
Promotor <i>OrfY</i> R	GGCGGGATCCGGGATAGATAATACGCCG

Promotor <i>treT</i> F	GGGGGAATTCGGAGTCTGTGGCC
Promotor <i>treT</i> R	GGCGGGATCCGGCGTATTTAAATATGGCG
Kontrolle (<i>treT</i> intern) F	GGGGGAATTCGGGCCTTCCTCAAGAGG
Kontrolle (<i>treT</i> intern) R	GGCGGGATCCTCAATGACTCCAACAGGGTCC

Zur Aufreinigung der DNA-Fragmente wurden die Banden aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und in Dialyseschläuche (Spectra/Por® Dialyse Membran (Ausschlussgrenze; Molecular Weight Cut off (MWCO): 3.5 kDa, Spectrum Laboratories, Inc., Breda, Niederlande)) gegeben, die mit TAE-Puffer (40 mM Tris, 40 mM Essigsäure, 1 mM EDTA, pH 8,5) gefüllt waren. Die Schläuche wurden so in die Laufkammer gelegt, dass die Laufstrecke aus dem Gel minimiert wird und anschließend mit Glasplatten beschwert. Bei 120V wurden die DNA-Fragmente 80 min eluiert. Um Verluste durch DNA-Interaktionen mit dem Schlauch zu vermeiden, wurde am Ende der Elution für 2 min die Polarität gewechselt. Der Puffer wurde mit dem eluierten DNA-Fragment aus dem Schläuchen entnommen und die DNA mit 0,1 x Volumen 3 M Natriumacetat gefällt. Die Lösung wurde dann mit 2 x Volumen Ethanol (100 Vol.-%) versetzt, zentrifugiert (16000 x g, 10 min, 4°C), das Pellet zweimal in 70 Vol.-% Ethanol gewaschen und schließlich in H₂O gelöst.

2.4.2 Arbeiten mit RNA

2.4.2.1 Behandlung von Lösungen, Glaswaren und Gebrauchsgegenständen

Für das Arbeiten mit RNA ist die Vermeidung von Kontaminationen mit RNasen essentiell. Aus diesem Grund wurden alle Puffer mit 0,1 Vol.-% Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt (außer Tris und SDS), bzw. mit fertigem DEPC-Wasser angesetzt. DEPC modifiziert Histidinreste in Proteinen, wodurch z.B. RNasen inaktiviert werden. Die behandelten Lösungen wurden über Nacht bei RT mit DEPC inkubiert und anschließend autoklaviert. Nach dem Autoklavieren zerfällt DEPC in Kohlenstoffdioxid (CO₂) und Ethanol (CH₃CH₂OH). Glaswaren wurden mind. 3 Std. bei 210°C sterilisiert. Plastikware, wie z.B. Gelkammern, wurde mit 3 Vol.-% Wasserstoffperoxid (H₂O₂) bzw. RNase Zap (Ambion) behandelt. Pipettenspitzen sowie Reaktionsgefäße wurden zweifach autoklaviert.

2.4.2.2 RNA-Isolierung aus *T. tenax* und *S. acidocaldarius*

Zur RNA-Isolierung aus *T. tenax* bzw. *S. acidocaldarius* wurden 0,1 g Zellen mit 1 mL TRIzol (Invitrogen) versetzt und durch Aufschluss in einem Potter (3 min bei *T. tenax*) bzw. durch heftiges Pipettieren (1 min bei *S. acidocaldarius*) homogenisiert. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde die Probe mit 200 µl Chloroform gemischt und nach weiteren 3 min zentrifugiert (4°C, 17500 x g, 15 min). Die obere, gelblich klare Phase (300- 500 µl) wurde mit dem RNeasy Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben gereinigt und anschließend in 30-50 µL RNase/DNase-freiem H₂O eluiert.

2.4.2.3 DNase-Verdau

Zur Entfernung von störender DNA aus der RNA-Präparation wurde 1 µg RNA mit 1 µL DNase-Puffer und 1 U DNaseI (RNase-frei) (ThermoFisher) versetzt und auf 10 µL mit RNase/DNase-freiem H₂O aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde für 30 min bei 37°C inkubiert und die Reaktion anschließend durch Zugabe von 1 µL EDTA (50 mM, pH 8) und Inkubation bei 65°C für 10 min (nach Herstellerangaben) gestoppt. Um die DNase zu entfernen, wurde der Ansatz nochmals über das RNeasy Kit (Qiagen, 2.4.2.2) gereinigt.

2.4.2.4 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der RNA

Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte photometrisch bei 260 und 280 nm. Eine Absorption (A_{260}) von 1 bei einer Wellenlänge von 260 nm und einer Schichtdicke von 1 cm entspricht 40 µg RNA pro mL. Der Absorptionskoeffizient von $OD_{260/280}$ (BioPhotometer) gibt die Reinheit der RNA wieder, wobei ein Verhältnis (A_{260}/A_{280}) von 1,9 – 2,1 ein guter Reinheitswert ist (Sambrook *et al.*, 1989).

2.4.2.5 Auftrennung der RNA mittels Agarose-Formaldehyd-Gelelektrophorese

Zur Qualitäts- und Größenbestimmung wurde die gereinigte RNA elektrophoretisch über 1,5 Gew.-%ige Agarose-MOPS-Formaldehydgele aufgetrennt. Dazu wurden 1,5 g Agarose in 10 mL 10-fach MOPS (200 mM 4-morpholinopropansulfonsäure (MOPS), 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA) und 73,8 mL H₂O_{bidest}+DEPC gelöst, aufgeköcht und nach Abkühlen auf 60°C mit 16,2 mL Formaldehyd versetzt. Nachdem das Gel gegossen und ausgehärtet war, wurden die RNA-Proben (5-10 µg) sowie der Marker (Roche) mit 3 x Volumen frischem Probenpuffer versetzt (250 µl deionisiertes Formamid; 83 µl Formaldehyd (37 Vol.-%); 50 µl 10 x MOPS-Puffer; 2,5 µl Bromphenolblau (2 Gew.-%); 14,5 µl H₂O_{bidest}+DEPC) und 10 min bei 95°C inkubiert. Da der Probenpuffer kein Glycerin zum Beschweren der Proben enthält, wurden diese zunächst in die noch leeren Geltaschen gefüllt und dann bei 75 V so lange elektrophoretisch aufgetrennt, bis die Proben in das Gel eingewandert waren (ca. 5 min). Anschließend wurde das Gel mit MOPS-Puffer überschichtet und ca. 1,5 Stunden aufgetrennt.

2.4.2.6 Northern-Blot (Kapillartransfer der RNA)

Die elektrophoretisch aufgetrennte RNA (2.4.2.5) wurde mittels Kapillartransfer aus dem Gel auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert.

Dazu wurde das Gel 2 x 15 min mit zweifachem Pufferwechsel bei RT in 20 x SSC-Puffer (3 M Natriumchlorid; 0,3 M Natriumcitrat (pH 7)) äquilibriert. Die Nylonmembran und das Whatman-Papier wurden ebenfalls in 20 x SSC-Puffer vorinkubiert. Der Aufbau des Blots erfolgte wie in

Abbildung 5 dargestellt und wurde mit 1-2 kg beschwert. Der Transfer erfolgt über Nacht bei 4°C.

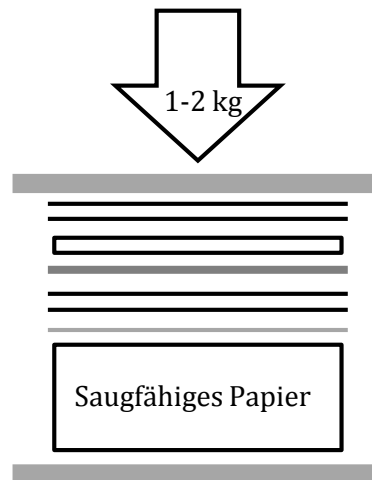


Abbildung 5 Aufbau eines Northern-Blots für den Kapillartransfer.

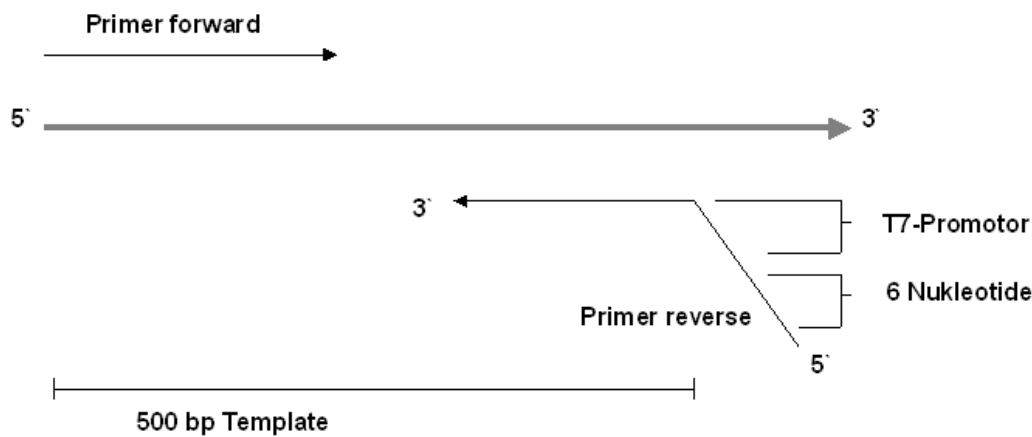
Oben und unten liegen jeweils 2 Glasplatten (grau), es folgt von unten nach oben: ein Stapel saugfähiges Papier, einmal trockenes Whatman-Papier (hellgrau), zweimal nasses Whatman-Papier (schwarz), die Membran (dunkelgrau), das Gel (schwarzer Kasten) und wieder zweimal nasses Whatman-Papier.

Danach wurde die Membran kurz mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}} + \text{DEPC}$ gewaschen und die RNA im UV-Stratalinker (Stratagene) ($\lambda = 254 \text{ nm}$, 3 min) auf der Membran fixiert. Die immobilisierte RNA wurde mit einer Methylenblaulösung (50 mg Methylenblau; 6,6 mL 3 M Natriumacetat (pH 5,2); 1 mL Essigsäure (100 Vol.-%), ad. 50 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}} + \text{DEPC}$) 1 min gefärbt und anschließend durch dreimaliges Waschen mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}} + \text{DEPC}$ entfärbt. Die Membran kann trocken in Folie verpackt einige Monate gelagert werden.

2.4.2.7 Herstellung von spezifischen, DIG-markierten RNA-Sonden mittels *in vitro* Transkription

Zur Herstellung der Sonden wurden Fragmente vom 3'-Ende der Gene mit einer Größe von ~200 bzw. 500 bp mit der Phusion-Polymerase amplifiziert, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (2.4.1.3), gereinigt (2.4.1.5), photometrisch quantifiziert (2.4.1.2) und schließlich als Template für die *in vitro* Transkription genutzt. Dazu wurde ein sequenzspezifischer „forward“ Primer und ein modifizierter „reverser“ Primer für die Amplifikation verwendet. Der „reverse“ Primer beinhaltet zusätzlich zur spezifischen Sequenz die T7-Bindestelle und sechs Nukleotide, die die Bindestelle stabilisieren sollen (Abbildung 6). Für die *in vitro* Transkription der antisense RNAs wurde das „T7 *in vitro* transcription kit“ (Fermentas Life Sciences) nach Herstellerangaben verwendet. Zur Markierung der Sonde wurde eine NTP-Mischung mit Digoxigenin (DIG)-markiertem UTP verwendet (10x: 10 mM ATP, 10 mM CTP, 10 mM GTP, 6,5 mM UTP, 3,5 mM Digoxigenin-11-UTP, pH 7,5, Roche), so dass jedes 20te bis 25te Nukleotid des neusynthetisierten Stranges ein DIG-UTP ist. Der Reaktionsansatz (20 μl) beinhaltete: 500-

1000 ng gereinigtes PCR Produkt, 4 µl Reaktionspuffer (5x), 25 U RNase-Inhibitor, 2 µl NTP-Markierungsmischung (10x), 20 U T7 RNA Polymerase in DNase/RNase-freiem H₂O. Der Reaktionsansatz wurde für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 2 µl 0.2 M EDTA, pH 8 wurde die Reaktion gestoppt. Die RNA wurde dann wie in Abschnitt 2.4.1.5 beschrieben aufgereinigt, in 20 µl H₂O_{bidest}+DEPC gelöst und die Konzentration photometrisch bestimmt (2.4.1.2). Zur Untersuchung der Markierung wurde ein Dot-Blot durchgeführt. Dazu wurde 1 µl der aufgereinigten RNA sowie 1 µL einer 1:10, 1:100 und 1:1000 Verdünnung auf eine Nylonmembran getropft, durch UV-Licht fixiert (Stratalinker, Stratagene, λ = 254 nm, 3 min) und mittels Chemilumineszenz (2.4.2.9) visualisiert. Um einen Abbau der RNA durch RNasen auszuschließen, wurden 5 µg der Probe mittels Agarose-Formaldehyd-Gelelektrophorese untersucht (2.4.2.5).



5'- GGGCCCTAATACGACTCACTATAGGG + spezifische Primer - 3'

Abbildung 6 Herstellung der Genfragmente die für die *in vitro* Transkription mit T7-Promotor.

Die unterstrichenen Basen zeigen die überhängenden 6 nt zur Bindung der Polymerase dar, die fett gedruckten die spezifische T7-Bindungsstelle.

Tabelle 6 Primer für die Herstellung der Genfragmente mittels *in vitro* Transkription.

Die unterstrichenen Basen zeigen die überhängenden 6 nt zur Bindung der Polymerase dar, die fett gedruckten die spezifische T7-Bindungsstelle.

Gennr.	Primersequenz (5'-3')	Größe in bp
Saci1439	T7-rev: <u>GGGCCCTAATACGACTCACTATAGGG</u> TCACTGGAAGTCTATCCTCC 500bp-for: GGGGGGATAATGCTTTTTGTCAGGATAAT 200bp-for: GGGGGGTAGCTGACGACTTTT	500 200
Saci1440	T7-rev: <u>GGGCCCTAATACGACTCACTATAGGG</u> TCAATTCTAATTGATATACCCC 500bp-for: GGGGGGCCGATAAAACGACATACCTT 200bp-for: GGGGGGGGTAAAGGAAGTTAGGAGA	500 200
Saci1436	T7-rev: <u>GGGCCCTAATACGACTCACTATAGGG</u> TTACATTCTAACTAGTATCCTAGG 500bp-for: GGGGGGTGAAAGTAAGATAAGAA 200bp-for: GGGGGGATAAGGGATTAGATCTA	500 200

Saci1436	T7-rev: <u>GGGCCCTAATACGACTCACTATAGGGTTACATTCTAACTAGTATCCTAGG</u> 500bp-for: GGGGGGTGAAAGTAAGATAAGAA 200bp-for: GGGGGGATAAGGGATTAGATCTA	500 200
Saci1826	T7-rev: <u>GGGCCCTAATACGACTCACTATAGGGTCATTTCAACAACCACCTCTCT</u> 500bp-for: GGGGGGACCCTGTGTTCAAGTTCACATC 200bp-for: GGGGGGGATCTCTGGTGTGGCACTTTG	500 200
Saci1827	T7-rev: <u>GGGCCCTAATACGACTCACTATAGGGTTATACACTATTCTCTCAT</u> 500bp-for: GGGGGGACAAGTTAGCTAAGAGGCACG 200bp-for: GGGGGGTTAATGGGGTTACTGGGTTCC	500 200
TTX1304a	T7-rev: <u>GGGCCCTAATACGACTCACTATAGGGTCATCTTTTGAGGAGCCGGG</u> 500bp-for: CTCTCGGAGATATTCAGAAG 200bp-for: AAGGGCGCTGTCTCAAAGGA	500 200

2.4.2.8 Hybridisierung der immobilisierten RNA mit DIG-markierten Sonden

Eine Nylon-Membran mit 5-10 µg immobilisierter RNA wurde in DIG Easy-Hyb-Buffer (Roche, Mannheim) prähybridisiert (120 min 68°C unter ständigem Schwenken), um mögliche unspezifische Bindungen der Sonde zu verhindern. Für die Hybridisierung wurde die spezifische Sonde (200 oder 500 bp) mit einer Konzentration von 50-100 µg/µl in DIG Easy-Hyb-Buffer 10 min bei 100°C denaturiert, schnell auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde die Sonde zur Nylonmembran in den Hybridisierungs-Puffer gegeben und über Nacht bei 68°C unter ständigem Schwenken inkubiert. Im Anschluss wurde die Hybridisierungslösung abgegossen (lager- und wiederverwendbar, -80°C), der Blot zweimal in Niedrigsalzpuffer (5 min, RT, mit Pufferwechsel; 0,1 x SSC; 0,1 Gew.-% SDS) und zweimal in Hochsalzpuffer (15 min, 68°C, mit Pufferwechsel; 2 x SSC; 0,1 Gew.-% SDS) gewaschen, um Hintergrundsignale zu unterbinden.

2.4.2.9 Immunologische Detektion der RNA-Hybride

Die anschließende Detektion der RNA-Hybride erfolgte über Chemilumineszenz mit Hilfe des anti-DIG Antikörpers mit konjugierter alkalischer Phosphatase und CDP-Star (Chlor-substituiertes 1,2-Dioxetan, Tropix) als Substrat nach dem Boehringer Protokoll mit Modifikationen nach Engler-Blum (Engler-Blum *et al.*, 1993; Manual Roche Applied Science, 2003).

Der Blot wurde 5 min in Maleinsäurepuffer (0,1 M Maleinsäure; 3 M NaCl; (pH 8 mit Natriumhydroxid (fest)), ad. H₂O_{bidest+DEPC}) äquilibriert und dann 60 min bei RT in 2 Gew.-% Blockingreagenz (Roche, gelöst in Maleinsäurepuffer) inkubiert, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Anschließend wurde der DIG-Antikörper mit gekoppelter alkalischer Phosphatase (AP) (Roche) in der Verdünnung 1:20.000 zugegeben und ca. 30 min bei RT inkubiert. Der Blot wurde dann 15 min in Maleinsäurepuffer gewaschen (RT), anschließend 5 min in Detektionspuffer (0,1 M Tris; 0,1 M NaCl; (pH 9,5) ad. H₂O_{bidest+DEPC}) äquilibriert (RT), in eine Klarsichthülle gelegt und mit CDP-Star bedeckt. Die Detektion der Chemilumineszenz als Folge

der Phosphatase-Aktivität erfolgte mit Hilfe des VersaDoc-Systems (Molecular Imager VersaDoc MP 4000 System, Bio-Rad).

2.4.3 „Yeast two-hybride“

Protein-Protein-Interaktionen wurden über das „Yeast two-hybrid“ System mit dem Matchmaker system 3 (Clontech) analysiert. Die zu untersuchenden Gene wurden per PCR amplifiziert und in den mit *EcoRI* und *BamHI* linearisierten Vektor pGADT7 bzw. pGBKT7 ligiert. Dabei wurde jeweils ein Gen als „Köder“ und eins als „Beute“ ausgewählt. Für die Klonierung wurde das „In-Fusion® cloning system“ (Clontech, TaKaRa Biocompany, Saint-Germain-en-Laye, FR) nach Herstellerangaben genutzt. Positive Klone wurden durch Sequenzierung (2.4.1.11) verifiziert. Um die Protein-Protein-Interaktion zu untersuchen, wurden kompetente Zellen des Hefestamms AH109 (2.4.3.1) mit den beiden oben genannten Vektoren co-transformiert (2.4.3.2). Die Zellen wurden auf Selektivplatten (SD-Medium ohne Leucin und ohne Tryptophan) ausgestrichen und drei Tage bei 30°C inkubiert. Entstandene Kolonien wurden in flüssigem Selektivmedium (SD-Medium ohne Leucin und ohne Tryptophan) bis zu einer OD₆₀₀ von 1,5 kultiviert, auf eine OD₆₀₀ von 0,1 verdünnt und 5 µL auf Selektivplatten auf getropft (SD-Medium ohne Leucin, Tryptophan, Histidin und Adenin, mit X-α-Gal). Bilden Köder- und Beute-Protein einen Komplex, interagiert der Köder mit dem GAL4-Promoter, sodass die stromaufwärts gelegenen Reportergene transkribiert werden können. So deuten Wachstum und gleichzeitige Blaufärbung (durch die so induzierte α-Galaktosidase) der Kolonien auf eine Interaktion der untersuchten Proteine hin.

2.4.3.1 Erstellung kompetenter *Saccharomyces cerevisiae* AH109

5 mL einer 10 mL Übernacht-Kultur (30°C, 180 rpm) von *Saccharomyces cerevisiae* AH109 in YPD-Medium (20 g/L Difco Pepton, 10 g/L Hefeextrakt, 2 Gew.-% Glukose, pH 6,5) wurden in 100 mL YPD-Medium bei 30°C und 180 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 – 0,9 kultiviert und anschließend pelletiert (5 min, 2060 x g, RT). Die Zellen wurden dann in 50 mL Sorbitol-Puffer (10 mM Bicin pH 8,35, 1 M Sorbitol, 3 Vol.-% Ethylenglycol) gewaschen (10 min, 2060 x g, RT), anschließend in 2 mL Sorbitol-Puffer mit DMSO (55 µL DMSO auf 1 mL Sorbitol-Puffer) aufgenommen und 100 µL Aliquots bei -80°C gelagert.

2.4.3.2 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* AH109 Zellen

Die gefrorenen Hefe-Zellen (AH109) wurde mit 1 µg Plasmid und 5 µL ssDNA (Lachssperma 10 mg/mL, für 20 min bei 70°C vorgewärmt) versetzt und 5 min bei 37°C im Schüttler (180 rpm) inkubiert. Die Zellsuspension wurde mit 750 µL Polyethylenglycol (PEG)-

Bicin-Lösung (40 Vol.-% PEG1000, 200 mM Bicin, pH 8) vorsichtig vermischt und für 1 Std. bei 30°C inkubiert. Zur Zellernte wurden die Zellen sechs-mal für 10 sec zentrifugiert (max. 6000 x g). Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen vorsichtig mit 1 mL NaCl-Bicin-Puffer (150 mM NaCl, 10 mM Bicin) gewaschen (ohne das Pellet zu lösen). 900 µL des NaCl-Bicin-Puffers wurden abgenommen und die restlichen 100 µL zum Resuspendieren der Zellen genutzt. Anschließend wurden die Zellen auf SD -Leucin - Tryptophan-Platten (Matchmaker System 3, Clontech) mittels Glasperlen verteilt und 2-3 Tage bei 30°C inkubiert.

Tabelle 7 Herstellung der Konstrukte für die „Yeast two-Hybrid“-Experimente

Konstrukt	Primersequenz (5'-3'),	Restriktionsenzyme	Vektor	Größe in bp
TTX <i>tpsp</i>	F: GAGGACCTGCATATGCGCCTCATAGTGGTCTCCAACAG R: ATGCGGCCGCTGCAGAGGGGGCGCAACTGCTCCAATAG	<i>NdeI</i> <i>PstI</i>	pGBKT 7	2196
TTX <i>tps</i>	F: GAGGACCTGCATATGCGCCTCATAGTGGTCTCCAACAG R: ATGCGGCCGCTGCAGGATTAGGGAGTAGATGAAGTCGGT	<i>NdeI</i> <i>PstI</i>	pGBKT 7	1403
TTX <i>tp</i>	F: GAGGACCTGCATATGGAGGAGCTCTCGGTGGACAACTC R: ATGCGGCCGCTGCAGAGGGGGCGCAACTGCTCCAATAG	<i>NdeI</i> <i>PstI</i>	pGBKT 7	689
TTX <i>gt</i>	F: GATTACGCTCATATGAACGTAGCTGTAGTGGCGCCGAG; R: CATCTGCAGCTCGAGCGGTTGTGCCCTAAAATTAATTC	<i>NdeI</i> <i>XhoI</i>	pGADT 7	1164
TTX <i>treT</i>	F: GAGGACCTGCATATGATAGAGCGTTACGTGCAATTAT R: ATGCGGCCGCTGCAGGGGAGCCGAATGCCGCCCGTTAAAT	<i>NdeI</i> <i>PstI</i>	pGBKT 7	1206
TTX <i>orfY</i>	F: GATTACGCTCATATGGCCGATCTTGACTCCAAGGCCAA R: CATCTGCAGCTCGAGTAACAAGGCCCTCTCCAGCGTCC	<i>NdeI</i> <i>XhoI</i>	pGADT 7	651
Saci <i>treT</i>	F: ATGCGGCCGCTGCAGTACACTATTCCTCTCATTAACGT R: GAGGACCTGCATATGATAGAGAAATATGAGAAATTTATTG	<i>NdeI</i> <i>PstI</i>	pGBKT 7	1206
Saci <i>orfY</i>	F: CATCTGCAGCTCGAGTTTCAACAACCACCTCTCTAACG R: GATTACGCTCATATGATAGACCTAGACTCAAAGGGAAAAG	<i>NdeI</i> <i>XhoI</i>	pGADT 7	657
Sso <i>treT</i>	F: GAGGACCTGCATATGGTTGTTAAGATGATTGAGAAATAC R: ATGCGGCCGCTGCAGATGATTAGATATAGATTCATGAGAAT	<i>NdeI</i> <i>PstI</i>	pGBKT 7	1254
Sso <i>orfY</i>	F: CATCTGCAGCTCGAGTCTTAAACAACCACCTTTCTAGTA R: GATTACGCTCATATGATGGATCTAGACTCTAAAGGTAAAG	<i>NdeI</i> <i>XhoI</i>	pGADT 7	657

2.4.4 Konstruktion einer Deletionsmutante in *S. acidocaldarius*

Zur markerlosen Deletion eines Gens aus *S. acidocaldarius* wurde der Stamm MW001 verwendet. Dieser Stamm hat eine Deletion von über 322 bp im *pyrE* Gen und ist somit Uracil auxotroph. Aus diesem Grund nutzt man ein Plasmid, das zum einen eine Ampicillin-Kassette zur Selektion in *E. coli* und zum anderen eine *pyrE/F* Kassette (codiert für die Orotate Phosphoribosyltransferase und die Orotidine-5-Monophosphate Decarboxylase, welche die letzten beiden Schritte der *de novo* Synthese von Uracil darstellen ((Wagner *et al.*, 2009)) zur Selektion in *S. acidocaldarius* enthält. Während der ersten Selektion in *S. acidocaldarius* wird kein Uracil zum Medium gegeben, so dass nur Zellen die das Plasmid enthalten wachsen können.

Bei der zweiten Selektion wird Uracil und das Substratanalog „5-Fluorooritc Acid“ (5-FOA) zugegeben. Enthalten die Zellen die *pyrE/F* Kasette, wird 5-FOA in das toxische 5-Fluouracil umgewandelt (Grogan & Gunsalus, 1993).

Zur Erstellung des Deletionsplasmids wurden zwei Fragmente (stromauf- und abwärts vom Gen von Interesse (GvI)) jeweils mit einem Überhang der anderen Region (stromauf- oder abwärts vom GvI) via PCR amplifiziert, durch „overlap extention PCR“ verbunden (Abbildung 7A) und anschließend in den Vektor pSVA406 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von S.V. Albers) über die Schnittstellen *Bam*HI und *Nco*I kloniert.

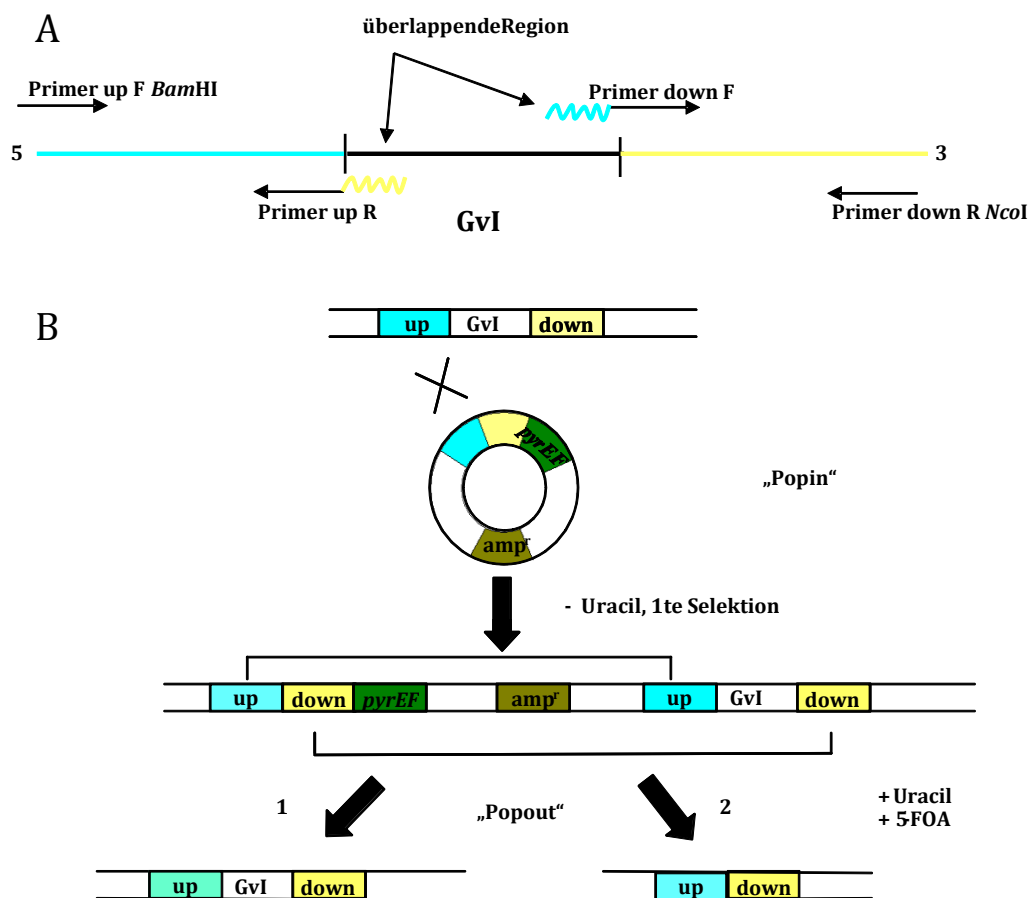


Abbildung 7 Schematische Darstellung der Konstruktion einer Deletionsmutante in *S. acidocalarius*.

Gen von Interesse (GvI) mit Primern und der stromauf- und abwärts Regionen (A), Darstellung der homologen Rekombination „Pop-in“, Insertion des Plasmids und mögliche Produkte nach der 2ten Selektion „Pop-out“ (B) (modifiziert nach (Wagner *et al.*, 2009)).

Nach einer Sequenzüberprüfung durch Sequenzierung (2.4.1.11) wurde der *E. coli* Stamm ER1821 mit dem Plasmid transformiert. Dieser Stamm besitzt das Plasmid pM.EsaBC4I (Kan^r), durch das die Deletionsplasmide methyliert werden, da diese sonst durch *Sua*I in der *S. acidocaldarius* Zelle abgebaut werden. Durch Elektroporation transformierte *S. acidocaldarius*

Zellen wurden auf Selektionsplatten-1 ((Wagner *et al.*, 2009), Brock-Medium, 0,6 Gew.-% GelZan, 0,1 Gew.-% NZ-Amin, 0,2 Gew.-% Dextrin) ausplattiert und für 5-7 Tage bei 78°C inkubiert. Die entstandenen Kolonien wurden zum einen zur Sicherung auf eine weitere Selektionsplatte-1 und zum anderen in 7 mL Brock Medium (+ 0,1 Gew.-% NZ- Amin, 0,2 Gew.-% Dextrin) überführt. Nach 3-4 Tagen Inkubation bei 78°C im Schüttler konnten je 20, 40, 60, 80, 100, 150 und 200 µL von den Flüssigkulturen auf Selektionsplatten-2 (2.3.3, Brock-Medium (Tabelle 2), 0,6 Gew.-% GelZan, 0,1 Gew.-% Trypton, 0,2 Gew.-% Dextrin, 5mg/mL Uracil, 100mg/mL 5-FOA) ausplattiert werden. Die Platten wurden wieder 5-7 Tage bei 78°C inkubiert und die entstandenen Kolonien via Kolonie-PCR untersucht. Dazu wurden die Zellen zunächst zur Sicherung auf eine neue Selektiosplatte-2 überimpft und anschließend für 10 min in 30 µL 0,2 M NaOH inkubiert. Zu den lysierten Zellen wurde dann zur Neutralisation 70 µL Tris-HCl-Puffer (260 mM, pH 7,8) gegeben. Von dieser Lösung wurden 0,5-1µL für die PCR eingesetzt. Die Deletionsmutanten wurde anschließend mittels Sequenzierung kontrolliert.

2.4.4.1 „Overlap-Extention“-PCR

Für eine „Overlap-Extention“-PCR wurden, bis auf die Primer, alle Komponenten für eine PCR zusammen gegeben (2.4.1.6) und die Proben für 8 Zyklen im Thermocycler inkubiert, wobei im PCR-Protokoll die letzte Inkubation bei 72°C von zehn auf zwei Minuten verkürzt wurde. Im Anschluss wurden die Primer zugegeben und das Programm mit 20 Zyklen wie in 2.4.1.6 beschrieben durchgeführt.

Tabelle 8 Auflistung der für die Deletionsmutanten verwendeten Primer.

Die Annealingtemperatur lag bei 53°C

Primerbezeichnung	Primersequenz (5'-3'),
Saci_1826 KO upstream F <i>Bam</i> HI	GGGGGATCCATGAATAGGCTGGTATTGC
Saci_1826 KO upstream R	CTCATATTTCTCTATCATAAAGAATCATTTGTCTCC
Saci_1826 KO downstream F	CAAATGATTCTTTATGATAGAGAAAATATGAGAAAATTTATTGG
Saci_1826 KO downstream R <i>Nco</i> I	GGGCCATGGGTCTTTGGCGTAATCAAAC
Saci_1827 KO upstream F <i>Bam</i> HI	GCGGGATCCTCCTCCAATATACTCTAAGC
Saci_1827 KO upstream R	ATTCTATCCTCGTTATTCAACAACCACCTCTCTAA
Saci_1827 KO downstream F	GGTGGTTGTTGAAATAACGAGGATAGAATTGGTAGC
Saci_1827 KO downstream R <i>Nco</i> I	GCGCCATGGGTGGTCTAGCATCATTATTC
Saci_1436 KO upstream F <i>Bam</i> HI	GAGGGATCCAGGCTAATAAACTGAACAATG
Saci_1436 KO upstream R	TTACATTTCTAACTAGGGTTGCTGATATCACTGGAACCTCTATCC
Saci_1436 KO downstream F	GTGATATCAGCAACCCTAGTTAGAATGTAAGTTATAATAATCCG
Saci_1436 KO downstream R <i>Nco</i> I	GAGCCATGGACTTGCGGAGTTAATAAATG
Saci_1826/1827 KO upstream F <i>Bam</i> HI	GGGGGATCCATGAATAGGCTGGTATTGC
Saci_1826/1827 KO upstream R	ATTCTATCCTCGAAGAATCATTTGTCTCC
Saci_1826/1827 KO downstream F	CAAATGATTCTTTGAGGATAGAATTGGTAGC
Saci_1826/1827 KO downstream R <i>Nco</i> I	GCGCCATGGGTGGTCTAGCATCATTATTC

2.4.4.2 Präparation von kompetenten *S. acidocaldarius* Zellen

50 mL frisches Brock-Medium (Tabelle 2) wurde mit einer Vorkultur von MW001 Zellen angeimpft und über Nacht bis zu einer OD₆₀₀ von 0,1 – 0,3 angezogen. Die Zellen wurden dann 20 min auf Eis gekühlt und anschließend zentrifugiert (2000 x g, 20 min, 4°C). Die Zellen wurden dann mit einem einfachen, einem halben Kulturvolumen und anschließend mit 1 mL eiskalter 20 mM Saccharose gewaschen und anzentrifugiert (2000 x g, 20 min, 4°C). Die Zellen wurden in 20 mM Saccharose gelöst, sodass die Suspension eine OD₆₀₀ von 10 hatte. Abschließend wurden die Zellen aliquotiert (50 µL) und bei -80°C gelagert.

2.4.4.3 Elektroporation von *S. acidocaldarius*

Die in 2.4.4.2 beschriebenen, kompetenten *S. acidocaldarius* Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut und anschließend mit 400 ng Plasmid versetzt. Die Zellen wurden dann in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (1 mm Spaltbreite, 100 µL Fassungsvermögen, Eppendorf) gegeben und im Eporator™ mit folgenden Einstellungen gepulst: 1500 V, 600 Ω, 25 µF. Sofort nach der Elektroporation wurden 50 µL vorgewärmte (RT) Regenerationslösung (2 x Lösung: 1 Gew.-% Saccharose, 20 mM β-Alanin/Malat-Puffer, pH 4,5, 10 mM MgSO₄) zugegeben und die Zellen im Thermoschüttler bei 75°C für 30 min bei 600 rpm geschüttelt. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Zellen auf Selektionsplatten-1 ausplattiert, in Plastiktüten eingeschweißt und für 5-7 Tage bei 78°C inkubiert.

2.5 BIOCHEMISCHE METHODEN

2.5.1 Heterologe Expression von rekombinanten Proteinen in *E. coli* und Herstellung von zellfreien Extrakten

Die Stämme *E. coli* BL21(DE3) (Merck (Novagen) Darmstadt, GER), *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL, *E. coli* Rosetta(DE3) (Agilent Technologies (Stratagene) Waldbronn, GER) und Lemo21(DE3) (New England BioLabs) wurden für die Expression von rekombinanten Proteinen genutzt. Alle *E. coli* Stämme wurden in 5 – 800 mL LB-Medium (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, GER) unter aeroben Bedingungen (Inkubationsschüttler, 180 rpm) in Reagenzgläsern oder Erlenmeyer-Kolben bei 22 -37°C kultiviert. Große Kulturvolmina von 2 - 3,5 L wurden in einem Fermenter mit Druckluftbegasung (3 bar) unter Rühren (600 rpm) angezogen. Für die Expression zweier Proteine in einem Stamm (*E. coli* Rosetta(DE3) transformiert mit pET24a::*tpsp* und pET15b::*gt*) wurde NZA-Medium (1 Gew.-% N-Z-Amine (Protein-Hydrolysat NZ-Amine AS), 0,5 Gew.-% Hefeextrakt, 1 Gew.-% NaCl, pH 7,2) oder 2YT-Medium (1,6 Gew.-% Trypton, 1 Gew.-% Hefeextrakt, 0,5 Gew.-% NaCl, pH 7,2) genutzt.

Antibiotika wurden je nach der durch das Plasmid kodierten Resistenz mit den folgenden Konzentrationen zugegeben: Ampicillin 100 µg/mL (pET11c, pET15b, pSVA406, pCold1), Kanamycin 50 µg/mL (pET24a, pM.EsaBC4I), Chloramphenicol 34 µg/mL (RIL Plasmid, pACYC184 Derivat). Das Wachstum wurde photometrisch bei 600 nm verfolgt.

Die Expression des rekombinanten Proteins wurde bei einer OD₆₀₀ von 0,3-0,8 durch Zugabe von 1 mM Isopropyl-beta-D-Thiogalactopyranoside (IPTG) induziert. Im Anschluss wurde die Fermentation für 3-4 h bei 37°C unter Schütteln fortgeführt. Bei der Verwendung des Stammes Lemo21(DE3) wurden zusätzlich 2 µM L-Rhamnose zugegeben und bei einer OD₆₀₀ von 0,3-0,5 die Expression durch Zugabe von 40 µM IPTG induziert. Die Proteinexpression erfolgte bei 22°C über Nacht. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (6,000 x g, 15 min, 4°C) und bei -80°C gelagert.

2.5.2 Aufreinigung der Zielproteine

Zum Aufschluss der Zellen wurden die Pellets im Verhältnis 1:3 (1 g Feuchtgewicht auf 3 mL Puffer) in dem entsprechenden Puffer gelöst (Tabelle 9) und mit Hochdruck in der French Press Zelle (drei Passagen bei 20000 psi) oder mit Ultraschall (3 x 5 min auf Eis, Amplitude 50%, Zeitzyklus 0,5) behandelt. Bei beiden Verfahren wurden die Zelllösungen auf Eis gelagert. Um Zellreste und unlösliche Fraktionen zu entfernen, wurde die Suspension zentrifugiert (16,000 x g, 45 min, 4°C). Der zellfreie Rohextrakt wurde 1:1 im jeweiligen Aufschlusspuffer verdünnt (siehe Tabelle 9) und dann für 20 min bei Temperaturen zwischen 60 und 95°C inkubiert, um thermolabile Proteine aus *E. coli* zu präzipitieren. Die denaturierten Proteine wurden durch Zentrifugation entfernt (16000 x g, 30 min, 4°C) und der klare Überstand über Nacht (in Dialyse Schläuchen; Spectra/Por® Dialyse Membran, Ausschlussgrenze; Molecular Weight Cut off (MWCO): 3.5 kDa, Spectrum Laboratories, Inc., Breda, Niederlande) gegen 1-5 L IC-Puffer (Zusammensetzung, siehe Tabelle 9) bei 4°C dialysiert, um Salze und niedermolekulare Bestandteile aus der Lösung zu entfernen.

2.5.3 Chromatographische Methoden

2.5.3.1 Anionenaustauschchromatographie

Für die Anionenaustauschchromatographie wurde die UNO Q12-Säule (Bio-Rad; Säulenbettvolumen: 12 mL, maximale Proteinladung: 160 mg, Flussrate: 2 mL/min, Säulengröße: 15x 68 mm, maximaler Druck: 700 psi) sowie eine gepackte Q-Sepharose-Säule (Bio-Scale MT20 Column, Bio-Rad, Säulenmaterial Q-Sepharose (GE), Flussrate: 2 mL/min, Säulengröße: 15 x 113 mm, maximaler Druck: 500 psi) mit einem Säulenbettvolumen von 17,7 mL verwendet. Die Säulen wurden vor dem Probenauftrag mit dem fünffachen

Säulenvolumen Niedrigsalzpuffer (20 mM HEPES/KOH oder 20 mM Tris/HCl pH 7-7,5, Tabelle 9) äquilibriert. Im Anschluss wurde die Proteinlösung aufgetragen, die Säule mit zweifachem Säulenvolumen gewaschen und die Proteine in IC-Puffer mit einem linearen Salzgradienten eluiert (0 - 1 M NaCl, 20-faches Säulenvolumen).

2.5.3.2 Gelfiltrations-Chromatographie (GF)

Die Proteinlösungen wurden vor dem Auftrag auf die Gelfiltrationssäule (GP) gegen den entsprechenden Puffer (siehe Tabelle 9) dialysiert. Für die GF wurde je nach Größe des Zielproteins eine Superose 6, 10/300 GL (GE, Amersham Biosciences; Trennung von Proteinen zwischen: 5 - 5000 kDa; Säulenbettvolumen: 24 mL; Flussrate: 0,5 mL/min, maximaler Druck: 200 psi) oder HiLoad 26/60 Superdex200 prep grad (GE, Amersham Biosciences; Trennung von Proteinen zwischen 10 - 600 kDa; Säulenbettvolumen: 330 mL; Flussrate: 1 mL/min, maximaler Druck: 50 psi) verwendet. Die Säulen wurden mit dem fünffachen Säulenvolumen desselben Auftrag-Puffers äquilibriert. Die Proteinlösung wurde über den Proben-Loop aufgetragen (100 µL – 5 mL, Bio-Rad) und die Proteine in dem jeweiligen Puffer (Tabelle 9) mit einer gleichbleibenden Flussrate aufgetrennt.

2.5.3.3 Affinitätschromatographie, Ni-TED

Die Proteinlösung wurde zunächst über Nacht gegen LEW-Puffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 8, Macherey und Nagel, Düren GER) dialysiert und dann nach Herstellerangaben auf die äquilibrierte Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit LEW-Puffer plus 250 mM Imidazol.

Alle aufgereinigten Proteine wurden für die Aktivitätstests bei 4°C gelagert.

Tabelle 9 Aufreinigung von *S. solfataricus*, *S. acidocaldarius* und *T. tenax* Zielenzymen.

Aufgelistet sind die Puffer für die Zelllyse (Lysepuffer), Anionenaustauschchromatographie (IC-Puffer), bzw. Affinitätschromatographie (AC-Puffer) und für die Gelfiltration (GF-Puffer), sowie die Temperatur der Hitzefällung.

Enzym	Lysepuffer	Temperatur	AC-Puffer	IC-Puffer	GF-Puffer
TTX TPSP	100 mM Tris/HCl (pH 7, 70°C) 7,5 mM DTT	90°C	Keine Aufreinigung mittels AC	20 mM Tris/HCl (pH 7, 70°C) 5 mM MgCl ₂ 7,5 mM DTT	50 mM Tris/HCl (pH 7, RT) 5 mM MgCl ₂ 7,5 mM DTT 300 mM NaCl
TTX TPS (His-Tag)	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, pH 8,	80°C	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, pH 8,	Keine Aufreinigung mittels IC	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, pH 8,
TTX TPP	100 mM Tris/HCl (pH 7, 70°C) 7,5 mM DTT	70°C	Keine Aufreinigung mittels AC	20 mM Tris/HCl (pH 7, 70°C) 5 mM MgCl ₂ 7,5 mM DTT	50 mM Tris/HCl (pH 7, RT) 5 mM MgCl ₂ 7,5 mM DTT 300 mM NaCl

TTX GT (His-Tag)	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, pH 8,	80°C	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, pH 8,	Keine Aufreinigung mittels IC	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, pH 8,
TTX TreT (His-Tag)	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, pH 8,	80°C	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, pH 8,	Keine Aufreinigung mittels IC	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, pH 8,
TTX OrfY	100 mM HEPES/NaOH (pH 7,7 RT)	80°C	Keine Aufreinigung mittels AC	20 mM HEPES/KOH (pH 7,7 RT)	50 mM HEPES/NaOH (pH 7,7, RT) 300 mM NaCl
Saci TreT	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, pH 8,	80°C	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, pH 8,	Keine weitere Aufreinigung	
Sso TreT	100 mM HEPES/NaOH (pH 7,7 RT)	60-80°C	Keine Aufreinigung mittels AC	Keine weitere Aufreinigung	

2.5.4 Heterologe Expression von rekombinanten Proteinen in *S. solfataricus*

Der Stamm *S. solfataricus* M16 mit pSVA80 wurde freundlicherweise von Julia Reimann bzw. Sonja V. Albers (MPI Marburg) zur Verfügung gestellt. Eine Vorkultur dieses Stammes wurde in Brock Medium (siehe 2.3.3. mit 0,1 Gew.-% NZ-Amin und 0,4 Gew.-% Glukose) bis auf eine OD₆₀₀ von ca. 0,5 angezogen und anschließend in 400 mL Expressionsmedium überführt (10 mL Vorkultur in 400 mL Brock mit 0,1 Gew.-% NZ-Amin und 0,2 Gew.-% D-Arabinose). Die Kultur wurde bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,8 durch Zentrifugation geerntet (6,000 x g, 15 min, 4°C) und bei -80°C gelagert.

2.5.5 Aufreinigung von Membran gebundenen Proteinen aus *S. solfataricus*

Zur Isolation von Membran-gebundenen Proteinen wurden die Zellen (1 g Feuchtzellen auf 3 mL Puffer) in Puffer 1 (20 mM HEPES/KOH, pH 7 mit geringer Menge an DNase I (Fermentas, Thermo Scientific)) mittels Hochdruck (French Press Zelle, 1200 psi, drei Passagen) aufgeschlossen. Intakte Zellen und Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (3000 x g, 20 min, 4°C) von der Membranfraktion abgetrennt. Die Membranfraktion wurden vom löslichen Überstand durch Ultrazentrifugation abgetrennt (100000 x g, 45 min, 4°C), mit Puffer 2 (Tris-HCl, pH 7,2, 2 Vol.-% Triton X-100) gewaschen (100000 x g, 45 min, 4°C) und dann in Puffer 2 (1 mL/1 g Feuchtgewicht) aufgenommen. Die Suspension wurde für 2 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend erneut zentrifugiert (100000 x g, 45 min, 4°C). Der Überstand wurde dann zur weiteren Aufreinigung über eine Ni-TED Säule (Macherey und Nagel) gegeben (2.5.3.3). In die Puffer des Herstellers wurden zusätzlich 0,05 Vol.-% Triton X-100 gegeben.

2.5.6 Zellfreier Extrakt von *S. solfataricus*, *S. acidocaldarius* und *T. tenax*

Die Zellen von *S. solfataricus* und *S. acidocaldarius* wurden wie in 2.3.3 beschrieben angezogen und in 50 mM HEPES/KOH-Puffer (pH 7 bei 70°C, 1 x Protease Inhibitor Cocktail ohne EDTA (Roche); 3 mL Puffer pro 1 g Feuchtgewicht) resuspendiert und mittels Ultraschall (3 x 5 min auf Eis, Amplitude 50%, Zeitzyklus 0,5) oder mit Hilfe von Hochdruck (French Press Zelle, drei Passagen bei 20000 psi) aufgeschlossen. *T. tenax* Zellen wurden in 50 mM HEPES/KOH, 5 mM DTT, 5 mM MgCl₂ (pH 7,5 bei 70°C, 3 mL Puffer pro 1 g Feuchtgewicht) gelöst und mittels Hochdruck (French Press Zelle, drei Passagen bei 20000 psi) aufgeschlossen. Bei beiden Verfahren wurde die Zellsuspension auf Eis gelagert. Zelltrümmer und unlösliche Fraktionen wurden mittels Zentrifugation (16000 x g, 45 min, 4°C) entfernt. Um Salze und niedermolekulare Bestandteile aus der Lösung zu entfernen, wurde der Überstand gegen 1-5 L Puffer (Tabelle 9) bei 4°C dialysiert (Dialyseschläuche mit einem molekularen Ausschlussgewicht von 3.5 kDa, Spectrum Laboratories, Inc., Breda, Niederlande).

2.5.7 Reinigung DNA-bindender Proteine

2.5.7.1 Polyethylenimin-Fällung

Die Polyethylenimine (PEI) Lösung (50 Vol.-% in H₂O) wurde mit Tris/HCl-Puffer (10 mM, pH 8) auf 10 Vol.-% verdünnt und über Nacht gegen diesen Puffer dialysiert. Zellaufschluss und Hitzefällung wurden wie in 2.5.2 beschrieben durchgeführt. Der Zellaufschluss erfolgte in Gegenwart von 500 mM NaCl, um mögliche Protein-DNA-Interaktion zu vermindern. Der Überstand nach der Hitzefällung wurde in einem kleinen Becherglas auf Eis gekühlt, auf einen Magnetrührer gestellt und tröpfchenweise unter Rühren mit der PEI-Lösung versetzt (Endkonzentration 0,5 Vol.-%). Die Suspension wurde weitere 30 min auf Eis gerührt und anschließend zentrifugiert (14.000 x g, 30 min, 4°C). Der Überstand wurde gegen den entsprechenden Puffer dialysiert und sowohl Pellet als auch Überstand via Agarose-Gel (2.4.1.3) und SDS-PAGE (2.6.2) untersucht.

2.5.7.2 DNase-Verdau

Zellaufschluss und Hitzefällung wurden wie in 2.5.1 und 2.5.2 beschrieben durchgeführt. Je 1 mL Überstand wurde mit 10 U DNase und DNase-Reaktionspuffer (Endkonzentration: 10 mM Tris-HCl, 2,5 mM MgCl₂, 0,5 mM CaCl₂, pH 7,6) versetzt und 1 -3 Std. bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung der DNase folgte eine Inkubation bei 80°C für 20 min mit anschließender Zentrifugation (20 min, 4°C, 16000 x g). Sowohl Pellet als auch Überstand wurden via Agarose-Gel (2.4.1.3) und SDS-PAGE (2.6.2) untersucht.

2.5.8 Aufreinigung von Einschlusskörpern

Die Bildung sogenannter Einschlusskörper kann bei der Überexpression von Proteinen in Bakterien vorkommen. Dies sind Ansammlungen des unlöslichen Proteins, die jedoch durch Zugabe von Detergenzien wie Harnstoff (8 M) oder Guanidiniumhydrochlorid (6 M) vollständig entfaltet und bei idealen Pufferbedingungen durch Entfernung der Detergenzien, z.B. durch Dialyse, wieder renaturiert werden können. Für die Aufreinigung solcher Proteine wurden Zellen (1 g Feuchtgewicht) in 5 mL LEW-Puffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 8, Macherey und Nagel) mittels Hochdruck (2.5.2) aufgeschlossen. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (30 min, 4°C, 10000 x g), das Pellet in 10 mL LEW-Puffer gelöst und anschließend zentrifugiert (30 min, 4°C, 10000 x g). Der Rückstand wurde in 10 mL/g Feuchtgewicht Denaturierungspuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 8 M Harnstoff, pH 8, Macherey und Nagel) unter Ultraschalleinwirkung (auf Eis, ca. 15 min, Amplitude 50%, Zeitzyklus 0,5) gelöst, für 1 Std auf Eis gerührt und erneut zentrifugiert (30 min, 20°C, 10000 x g). Der Überstand, der das denaturierte Zielprotein enthielt, wurde entweder nach Herstellerangaben auf eine Ni-TED-Säule aufgetragen (wenn das Zielprotein einen 6 x Histidin-Tag besitzt), mit 8 mL Denaturierungspuffer gewaschen, mit 55 mL LEW-Puffer auf der Säule zurück gefalten und anschließend eluiert (LEW-Puffer mit 250 mM Imidazol) oder auf eine Proteinkonzentration von 1 mg/mL verdünnt und zwecks Renaturierung der Proteins mittels Peristaltikpumpe (0,05 – 0,1 mL/min) in LEW-Puffer getropft, sodass eine Endkonzentration von 0,03 mg/mL entstand.

2.5.9 Proteinfällung

2.5.9.1 Acetonfällung

Die Proteinlösung wurde 1:1 mit 100 Vol.-% Aceton (Endkonzentration von Aceton: 50 Vol.-%) versetzt, für mind. 30 min bei -20°C inkubiert und anschließend zentrifugiert (20 min, 4°C, 16000 x g). Sollte das gefällte Protein weiter analysiert werden, wurde der Überstand abgenommen und das Pellet im Konzentrator unter Vakuum getrocknet (Concentrator plus, Program HV, 60°C, Eppendorf) vom restlichen Aceton befreit. Wurde der Überstand weiter untersucht, wurde dieser im Konzentrator vom Aceton befreit.

2.5.9.2 Trichloressigsäure-Fällung (TCA-Fällung)

Zur Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA) wurde eine Proteinlösung 2:1 mit 30 Gew.-% TCA gemischt (Endkonzentration von TCA: 10 Gew.-%) und anschließend zentrifugiert (10 min, 4°C, 16000 x g). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in H₂O_{bidest} resuspendiert und der pH ggf. mit 2-4 µL 1 M Tris/HCl pH 9 neutralisiert.

2.5.10 Enzym Tests

2.5.10.1 Maltase-Test mit p-Nitrophenyl- α -D-Glucopyranosid

Maltase (EC 3.2.1.20) katalysiert die Hydrolyse von nicht-reduzierenden α -1-4-gebundenen α -D-Glukose-Resten, wobei D-Glukose abgespalten wird. *OrfY* aus *T. tenax* liegt in einem Operon mit einem Gen, das für die unidirektionale TreT kodiert (Kouril *et al.*, 2008). Um zu überprüfen, ob *OrfY* Maltase-Aktivität zeigt, wurde eine durch Hitzeinkubation aufgereinigte *OrfY*-Proteinlösung wie beschrieben (2.5.1, 2.5.2) hergestellt. Die Hydrolyse von p-Nitrophenyl- α -D-Glucopyranosid (PNPG) zu α -D-Glukose + p-Nitrophenol resultiert in einem Anstieg der Absorption bei 400 nm der photometrisch nachweisbar ist. Für den Test wurden 33 μ L PNPG-Lösung (10 mM) und 934 μ L Kaliumphosphatpuffer (67 mM, pH 6,8, 1 mM Dithiothreitol (DTT)), in eine Quarzküvette (10 mm Suprasil, Hellma) gegeben und bis zur Gleichgewichtseinstellung bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 33 μ L der *OrfY*-Proteinlösung gestartet.

2.5.10.2 Test zur Amylaseaktivität von *OrfY*

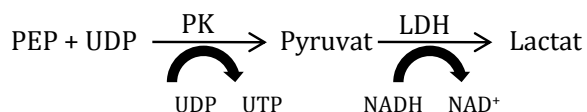
Um zu überprüfen, ob *OrfY* Amylaseaktivität oder eine Bindung an Zucker zeigt, wurden 5 μ g *OrfY* mit verschiedenen Zuckern (Ribose, Amylose, Trehalose, Dextrin, Amycol, Maltose und Glukose je 50 mM) 40 min bei 80°C inkubiert, die Proteine wie in 2.5.2 beschrieben gefällt und anschließend über Dünnschichtchromatographie analysiert (Absch. 2.6.5).

2.5.10.3 Nachweis der Trehalose-Bildung durch TreT, bzw. TPSP

Testreaktion:



Indikatorreaktion:

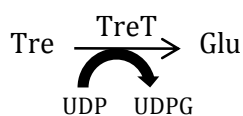


Zum Nachweis der Trehalose-Bildung durch TreT oder TPSP wurde ein diskontinuierlicher Test angewendet. Dazu wurde die Bildung von UDP an eine Indikatorreaktion mit zwei Hilfsenzymen gekoppelt. Die Pyruvat Kinase (PK) (Hasenmuskel; EC 5.4.2.1, Sigma) katalysiert die Dephosphorylierung von Phosphoenlpyruvat (PEP) zu Pyruvat, wobei UDP zu UTP phosphoryliert wird. Über die L-Lactat Dehydrogenase (LDH) (Hasenmuskel, EC 1.1.1.27, Sigma) wird Pyruvat zu Lactat reduziert und NADH zu NAD⁺ oxidiert, was photometrisch bei 340 nm verfolgt werden kann.

In der Regel wurde für die Bestimmung der TreT-Aktivität 0,5 mg Rohextrakt (*S. solfataricus*, *S. acidocaldarius*) oder 2-20 μL einer durch Hitzeinkubation (60-80°C) aufgereinigten rekombinanten TreT-Proteinlösung in 50 mM HEPES/KOH (pH 7, 70°C), 20 mM MgCl_2 , 10 mM Glukose und 10 mM UDP-Glukose (100 μL Testvolumen) bei 70°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von UDP-Glukose gestartet. Proben wurden zunächst zu den Zeitpunkten 0 und 20 min genommen. Diese wurden sowohl photometrisch, als auch mittels DC (2.6.5) analysiert. Für die weitere Charakterisierung der TPSP, wurde in einem Gesamtvolumen von 1 mL 100 mM Tris/HCl (pH 7, 80°C) mit 8 mM G6P, 10 mM DTT und 20 mM MgCl_2 mit 25 μg über Hitzeinkubation oder Ni-TED-Säule gereinigtem rekombinantem Protein (TPSP, TPP, TPS, GT, einzeln oder als Kombination) gemischt. Die Ansätze wurden für 5 min bei 80°C vorinkubiert, dann wurde die Testreaktion durch Zugabe von 4 mM UDPG gestartet und nach 0, 1, 3, 6, 9, 12, 15 und 18 min die Inkubation auf Eis gestoppt. Die Indikatorreaktion (500 μL Gesamtvolumen) wurde bei 37°C in 100 mM HEPES/KOH (pH 7,5, RT, bei TreT), bzw. 125 mM Tris/HCl (pH 7,2, RT bei TPSP) mit 10 mM MgCl_2 , 2 mM PEP, 0,1 mM NADH, 8 Units PK und 4 Units LDH durchgeführt. Die Lösung wurde mit der Probe aus der Testreaktion (Aliquot von 100 μL) versetzt und ohne LDH in einer Küvette für 3 min bis sich keine Absorptionsveränderung mehr zeigte inkubiert. Die Reaktion wurde über die Zugabe von LDH gestartet und die enzymatische Aktivität über die Messung der Abnahme der Absorption bei 340 nm (ϵ_{NADH} , RT = 3.4 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) photometrisch verfolgt. Negativkontrollen ohne UDP oder Enzym (GT, TPP oder TPSP) bzw. Rohextrakt, sowie ohne G6P, UDPG, wurden durchgeführt.

2.5.10.4 Nachweis der Trehalose-Abbau durch TreT

Testreaktion:



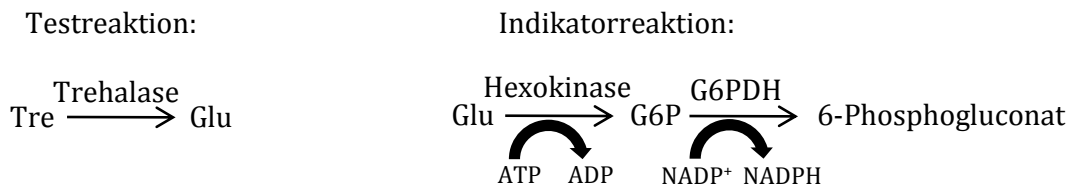
Indikatorreaktion:



Bei dem Abbau von Trehalose durch die bidirektionale TreT entsteht Glukose. Um den Trehalose-Abbau nachzuweisen, wurde die Bildung der Glukose über die Phosphorylierung zu G6P über Hexokinase (*Saccharomyces cerevisiae*; EC 2.7.1.1, Sigma), die anschließende Oxidation zu 6-Phosphogluconat einhergehend mit der Reduktion von NADP^+ zu NADPH via Glukose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PDH, *Saccharomyces cerevisiae*; EC 1.1.1.49, Sigma) gekoppelt. Für diesen diskontinuierlichen Assay wurde 1 mg Rohextrakt (*S. solfataricus*, *S. acidocaldarius*) oder 2-20 μL einer durch Hitzeinkubation (60-80°C) aufgereinigten rekombinanten TreT-Proteinlösung mit 20 mM MgCl_2 , 10 mM Trehalose, 10 mM UDP, 50 mM HEPES (pH 7, 70°C) versetzt (120 μL Totalvolumen) und bei 70°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe

von Trehalose gestartet und nach 0, 2, 4, 6 und 8 min durch Inkubation auf Eis gestoppt. Für die Indikatorreaktion wurden 100 μL der Testreaktion auf 400 μL Indikatorlösung gegeben, welche 100 mM HEPES/KOH (pH 7, 70°C), 5mM MgCl_2 , 5 mM NADP^+ , 5 mM ATP und 1.8 U Hexokinase beinhaltet. Die Lösung wurde 3 min in einer Quartz-Küvette (10 mm Suprasil; Hellma) bei 37°C bis sich keine Absorptionsveränderung mehr zeigte inkubiert. Die Reaktion wurde über die Zugabe von 1 U G6PDH gestartet und die enzymatische Aktivität über Messung der Zunahme der Absorption bei 340 nm (ϵ_{NADPH} , RT = 6,3 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) photometrisch verfolgt. Negativkontrollen ohne Trehalose und ohne Enzym bzw. Rohextrakt wurden durchgeführt.

2.5.10.5 Nachweis von Trehalose mittels Trehalase



Für einen direkten Nachweis von Trehalose wurde Trehalase (Schweineiere, EC 3.2.1.28) eingesetzt. Trehalase hydrolysiert die α -1.4-Bindung der Trehalose bei 37°C und einem pH von 5,7, sodass ein α -D-Glukose- und ein β -D-Glukose-Molekül entsteht. Die entstandene Glukose wurde dann, wie in 2.5.10.4 beschrieben, via Hexokinase und G6PDH detektiert.

2.5.10.6 Bestimmung der P_i -Konzentration mit Hilfe des Malachitgrün Tests



Bei der Umsetzung von Glukose-6-Phosphat und UDPG durch TPSP bzw. TPP wird im letzten Schritt Phosphat freigesetzt. Dieses wurde über den Malachitgrün-Test detektiert. Dazu wurden 4 mM MgCl_2 , 4 mM UDPG, 10 mM DTT in 10 mM Tris-HCl (pH 7 bei 80°C) mit 0,5 bzw. 1 μg gereinigtem Protein versetzt und bei 80°C für 3 min vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 8 mM G6P gestartet. Nach 0, 1, 2, 3, 4, 5 und 6 min wurden je 40 μL Probe genommen und sofort 1:1 in Tris-HCl (pH 7 bei 80°C) verdünnt und mit 20 μL Malachitgrün-Lösung gestoppt (nach Herstellerangaben, AnaSpec). Die Proben wurden in eine 96-well-Platte überführt, im Plattenlesegerät (Tecan) 5 min geschüttelt und anschließend bei 620 nm vermessen. Die P_i -Konzentration wurde aus einer Phosphatstandardkurve nach Herstellerangaben berechnet.

2.6 Analytische Methoden

2.6.1 Protein-Quantifizierung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Herstellerangaben über das Bio-Rad Protein Assay, welches auf der Methode nach (Bradford, 1976a, 1976b) basiert. Dazu wurde Rinderserumalbumin (BSA) als Standard (1-25 µg/mL) verwendet. Um die Proteinkonzentration zu bestimmen, wurden die Proben mit H₂O_{bidest} auf 600 µL Endvolumen verdünnt und mit 400 µL Bradford-Reagenz auf 1 mL aufgefüllt. Die Probe wurde dann für 5 min im Dunklen inkubiert und anschließend die Absorption bei 595 nm photometrisch detektiert (Biophotometer, Eppendorf).

2.6.2 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Größe, Reinheit und Anreicherung von Proteinen wurde mittels SDS-PAGE nach (Laemmli, 1970) untersucht. Über die Zugabe von Natriumdodecylsulfat (SDS) wurden die Polypeptide in ihre Primärstruktur denaturiert. Für eine möglichst gute Auftrennung der Proteine wurde die Konzentration von Polyacrylamid (PAA) an die Größe des zu untersuchenden Proteins angepasst, wobei bei größeren Proteinen geringere Konzentrationen von PAA benötigt werden. Das Sammelgel (4 Vol.-%: 400 µL Polyacrylamid, 750 µL Sammelpuffer (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, 0,4 Gew.-% SDS), 1,85 mL H₂O_{bidest}, 14 µL Ammoniumpersulfat (APS), 3 µL N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED), Endvolumen 3 mL) wird dabei unabhängig vom Trenngel (Tabelle 10) angesetzt. Die Polymerisation wird durch die Zugabe von TEMED gestartet.

Tabelle 10 Zusammensetzung des Trenngels einer SDS-PAGE

Chemikalien	7,5 Vol.-%	10 Vol.-%	12,5 Vol.-%	15 Vol.-%
Polyacrylamid	2,5 mL	3,3 mL	4,2 mL	5 mL
Trennpuffer (1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 0,4 Gew.-% SDS)	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL
H ₂ O _{bidest}	5 mL	4,2 mL	3,3 mL	2,5 mL
10 Gew.-% Ammoniumpersulfat (APS)	70 µL	70 µL	70 µL	70 µL
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	5 µL	5 µL	5 µL	5 µL
Endvolumen	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL

Das Trenngel wurde zwischen die Glasscheiben (Bio-Rad) gegossen, mit Isopropanol überschichtet und nach der Polymerisation (ca. 20 min) wird das Isopropanol entfernt und mit H₂O_{bidest} gespült. Im Anschluss wurde das Sammelgel über das Trenngel geschichtet und ein Kamm zur Ausbildung der Probestaschen eingesetzt. Nach der Polymerisation konnte das Gel

entweder sofort genutzt oder in einem feuchten Tuch bei 4°C gelagert werden. Für die Elektrophorese wurde als Stromgeber das Mighty Small II (SE250 / SE260) System (Amersham Pharmacia Biotech AB) oder das Mini-Protean 3-System (Bio-Rad Laboratories GmbH) bei 25 mA pro Gel genutzt. Die Proteinproben wurden vor dem Auftrag auf das SDS-Gel mit Probenpuffer (Endkonzentration: 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10 Vol.-% Glycerin, 2 Gew.-% SDS, 5 Gew.-% DTT und 0.005 Gew.-% Bromphenolblau) versetzt und bei 95°C für 5 min inkubiert. Durch das SDS werden die Proteine denaturiert und erhalten eine einheitlich negative Ladung. Anschließend wurden Proben und Marker (PageRuler Unstained Protein Ladder, Thermo Scientific) in die Probentaschen gegeben und die Elektrophorese in Elektrophoresepuffer (Rotiphorese-Puffer, Carl Roth) durchgeführt. Zur Visualisierung der Proteine wurden die Gele mit Coomassie-Färbelösung 20 min gefärbt (Coomassie (0,05 Gew.-% Serva BlueR, 40 Vol.-% Methanol, 10 Vol.-% Essigsäure, 50 Vol.-% H₂O_{bidest}) und durch 2-3 maliges Aufkochen in H₂O_{bidest} in der Mikrowelle wieder entfärbt. Die Dokumentation erfolgte über das Gel-Dokumentations-System (Gel-Doc, Bio-Rad).

2.6.3 Native Gelelektrophorese

Die native Größe von Proteinen wurde mittels nativer Gelelektrophorese untersucht. Bei dieser Methode werden die Proteine nicht durch SDS denaturiert, sondern nach Größe und Ladung getrennt. Dazu wurden 2 µg Protein 1:1 mit Ladepuffer (1,16 M Saccharose, 7 mM Bromphenolblau in 10 mL Elektrodenpuffer (10 mM Tris/HCl, 77 mM Glycin, pH 8,5)) versetzt und neben einem nativem Marker (nach Herstellerangaben, Amersham HMW Calibration Kit for Native Electrophoresis) auf ein natives Gel aufgetragen (Bio-Rad: Mini-PROTEAN TGX). Die Elektrophorese erfolgte erst bei 20 mA (10 min) und dann bei 40-50 mA (60 min).

2.6.4 Western-Blot und Immunodetektion

Proteine mit einem 6xHistidin-Tag oder einem Strep-Tactin-Tag, wurden mittels Western-Blot und anschließender Immunodetektion untersucht. Dazu wurden die Proteinlösungen via SDS-PAGE (2.6.2) aufgetrennt und anschließend über Nacht (4°C, 12V) durch einen Wetblot (Mini Trans Blot Cell, Bio-Rad) in Transferpuffer (25 mM Tris, 190 mM Glycin, 20 Vol.-% Methanol, pH 8,3) auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid) übertragen. Die Membran wurde anschließend wie folgt behandelt (Tabelle 11):

Tabelle 11: Immunodetektion von Proteinen mit His-Tag bzw. Strep-Tactin-Tag

	6 x Histidin-Tag	Strep-Tactin-Tag
Fixierung der Proteine auf der Membran nach Western-Blot	5 min in 20 Vol.-% Methanol	5 min in 20 Vol.-% Methanol
Waschen 1	3 x 5 min in TBST	3 x 5 min in TBST
Blocken	60 min TBST + 5 Gew.-% Milchpulver	120 min TBST mit 0,2 Gew.-% I-Block (Tropix, Applied Biosystems)
Waschen 1	-	3 x 5 min Waschen in TBST + 0,1 Gew.-% I-Block
Hybridisierung	90 min in TBST + 2,5 Gew.-% Milchpulver + 1:1000 Anti-6 x His-Tag-Antikörper (Maus monoclonal, Abcam)	60 min in TBST + 0,1 Gew.-% I-Block + 0,25:1000 Strep-Tactin AP Konjugate (Neuromics, Edina, MN, USA)
Waschen 2	3 x 5 min in TBST	3 x 5 min in TBST + 0,1 Gew.-% I-Block
Waschen 3	2 x 1 min H ₂ O _{bidest}	2 x 5 min in TBS

TBST: TBS (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5) + 0,3 Vol.-% Tween20

Anschließend wurde die Membran in einer Klarsichthülle mit Chlor-substituiertem 1,2-Dioxetan (CDP-Star (Tropix)) überschichtet. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des VersaDocs (Molecular Imager VersaDoc MP 4000 System, Bio-Rad).

2.6.5 Dünnschichtchromatographie (DC)

Die Dünnschichtchromatographie (DC) wurde für die qualitative Detektion von Zuckern verwendet. Dabei wurde zum einen die Enzymaktivität (Synthese und Abbau) im Rohextrakt von *S. solfataricus* und *S. acidocaldarius*, wie auch die Zuckerbindung bzw. Umsetzung durch OrfY untersucht. Die stationäre Phase der Platten besteht aus Silicagel, dass auf einer Glasplatte immobilisiert wurde (Silicagel G60 Platten, Merck). Die Auftrennung erfolgte in einer Laufkammer, die mit 100 mL Laufmittel (50 mL Butan-1-ol, 30 mL Ethanol und 20 mL H₂O) gefüllt war. Der jeweilige Enzymtest wurde auf Eis gestoppt; durch Zugabe von Aceton (1:1) und anschließende Inkubation (30 min bei -20°C) wurden die Proteine denaturiert und über Zentrifugation (21000 x g, 20 min, 4°C) abgetrennt. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die Probe in einer Konzentration-Zentrifuge (Concentrator plus, Eppendorf) bei 60°C von Aceton befreit und aufkonzentriert. 20 µl der Proben und 10 mM der entsprechenden Standard-Lösungen (2.5.10.2) wurden langsam auf die Silicagel Platten aufgetragen, wobei ein möglichst kleiner Spot entstehen sollte. Die Platten wurden über Nacht bei RT in der Laufkammer inkubiert, am nächsten Morgen kurz getrocknet, dann stehend mit 20 Vol.-%iger H₂SO₄-Lösung besprüht und für 15-20 min bei 100°C inkubiert. Die Ergebnisse wurden mit dem Gel-Dokumentations-System (Gel Doc, Bio-Rad) dokumentiert.

2.6.6 Software

- CHROMAS: Eine Software zur Visualisierung der Sequenzierungsergebnisse
- Clone Manager: Das Programm Clone Manager wurde zur Konstruktion von Vektoren und zur Erstellung von Primern verwendet
- I-Control 1.7: Software zur Nutzung des Tecan Readers
- Pymol: Das Programm wurde zur Visualisierung und Bearbeitung von pdb. Dateien verwendet um Proteinkristalle zu analysieren
- WINASPECT (Analytik Jena, Jena): Untersuchung von Enzymaktivitäten

2.6.7 Internet Datenbanken und Werkzeuge

- NCBI BLAST: Zur Untersuchung der Ähnlichkeiten von DNA/Protein-Sequenzen, zu finden auf der Internetseite des „The National Centre for Biotechnology Information“ (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)
- BRENDA: „The Comprehensive Enzyme Information System“, diese Datenbank umfasst eine große Anzahl funktioneller Enzymdaten und entsprechender Literatur (<http://www.brenda-enzymes.org/>).
- UniProt: Diese Datenbank beinhaltet Proteinsequenzen und funktionelle Informationen (<http://www.uniprot.org/>)
- KEGG: „Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes“ Datenbank (<http://www.genome.jp/kegg/>)
- STRING: Diese Datenbank wurde zur Analyse der Genumgebung genutzt (<http://string.embl.de>)
- IMG: „Integrated Microbial Genome“ wurde zur BLAST-Analyse und zur Untersuchung des genomischen Kontexts verwendet (<http://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/w/main.cgi>).
- HHPred: Diese Datenbank ist Teil der Internetseite des „Bioinformatics Toolkit“ des Max-Planck Instituts für Entwicklungsbiologie in Tübingen und wurde zur Vorhersage der Sekundärstruktur verwendet (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>).

KAPITEL 3

ERGEBNISSE

Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zum archaealen Trehalose-Metabolismus und den daran beteiligten Enzymen in den hyperthermophilen Crenarchaeota *Thermoproteus tenax*, *Sulfolobus acidocaldarius* und *Sulfolobus solfataricus* durchgeführt.

Die Operon-Struktur der Gene *tpsp*, *gt* und *msc* in *T. tenax* wurde mittels Northern-Blot-Analysen untersucht. Die rekombinante fusionierte TPSP, deren artifizielle TPS- und TPP-Domäne sowie die GT wurden gereinigt und unter besonderer Berücksichtigung des Einflusses der GT auf die Aktivität der TPSP sowie der artifiziellen TPS- und TPP-Domänen charakterisiert. Die Interaktion der Proteine wurde mittels „Yeast two-Hybrid“-Analyse untersucht.

In *T. tenax* wurde die Funktion von OrfY im unidirektionalen TreT-Weg analysiert. Das Gen *orfY* bildet zusammen mit dem *treT* Gen in *T. tenax* und anderen Crenarchaeota eine Operonstruktur. Das Protein OrfY wurde in *E. coli* exprimiert, gereinigt und von Prof. Dr. A. Lupas, Dr. J. Martin und Dr. K. Zeth (MPI Tübingen) kristallisiert sowie bioinformatisch detailliert untersucht. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde OrfY biochemisch charakterisiert und der Einfluss auf die TreT-Aktivität sowie die Protein-Protein-Interaktion zwischen OrfY und TreT im „Yeast two-Hybrid“-System untersucht.

Darüber hinaus wurden Studien zur physiologischen Funktion des TreT-Weges in *Sulfolobus acidocaldarius* und *S. solfataricus* durchgeführt. Northern-Blot-Analysen gaben Aufschluss über die Operonorganisation des, für eine putative unidirektionale TreT kodierenden, Gens *treT* mit *orfY* in *S. acidocaldarius*. In Rohextrakten von *S. acidocaldarius* und *S. solfataricus* wurde die TreT-Aktivität bestimmt und die Protein-Protein-Interaktion von TreT und OrfY mittels „Yeast two-Hybrid“-Methode analysiert. Insbesondere wurde die physiologische Funktion von TreT, bzw. TreT und OrfY durch die Konstruktion von Deletionsmutanten in den beiden *Sulfolobus* Stämmen untersucht.

3.1 *Thermoproteus tenax*

3.1.1 Der TPSP-Weg

3.1.1.1 Genom Organisation des TPSP-Operons

Bei Untersuchungen des Trehalose-Metabolismus wurde der TPSP-Weg (Trehalose-6-Phosphat Synthase/Phosphatase-Weg) in dem hyperthermophilen Crenarchaeon *T. tenax* identifiziert (Siebers *et al.*, 2004). In diesem Weg zur Trehalose-Synthese wird UDPG und G6P über die Trehalose-6-Phosphat Synthase (TPS) zu T6P und UDP und das T6P dann durch Trehalose-6-Phosphat Phosphatase (TPP) weiter zu Trehalose und P_i umgesetzt. Durch Genom-Analysen wurde in *T. tenax* ein Gen identifiziert, das für eine fusionierte TPSP (*tpsp*, 2196 bp,

TTX_1304, 732 aa, 80-92 kDa) kodiert. Es besteht aus einer N-terminalen TPS- (1272 bp, 424 aa, 50 kDa, Position 39-1311 der *tpsp*) und einer C-terminalen TPP-Domäne (759 bp, 253 aa, 33 kDa, Position 1438-2196 der *tpsp*) (Abbildung 8). Das *tpsp* Gen liegt stromabwärts von einem Gen, das für eine putative Glykosyltransferase (*gt*, TTX_1305, 1164 bp, 388 aa, ~45 kDa) kodiert. Zwischen diesen beiden Genen befindet sich eine intergene Region von 23 Basen (AAAGGCGTTCCGTGGGAGGACAA). Die Promotor-Elemente des *tpsp* Gens überschneiden dabei mit der 5'-Region des *gt* Gens. Die putative „Bre-Site“ (Transkriptionsfaktor-B-Erkennungselement „transcription factor B recognition element“, CACAAC) liegt stromaufwärts vom Stoppkodon der *gt* (TAA), das seinerseits einen Bestandteil der TATA-Box (CGTAAAAA) des Gens *tpsp* bildet (Abbildung 8). Das *gt* Gen überlappt drei Basen mit dem stromaufwärts lokalisierten *msc* Gen, das für einen putativen kleinen mechanosensitiven Kanal kodiert (TTX_1304a, 594 bp, 197 aa, ~23 kDa). Diese Organisation spricht für eine Operonstruktur der beschriebenen Gene, wobei nur *tpsp* und *msc* die klassischen Elemente einer Promotorregion (Bre site (kursiv und unterstrichen) und TATA-Box (kursiv und fett)) zeigen (Abbildung 8).

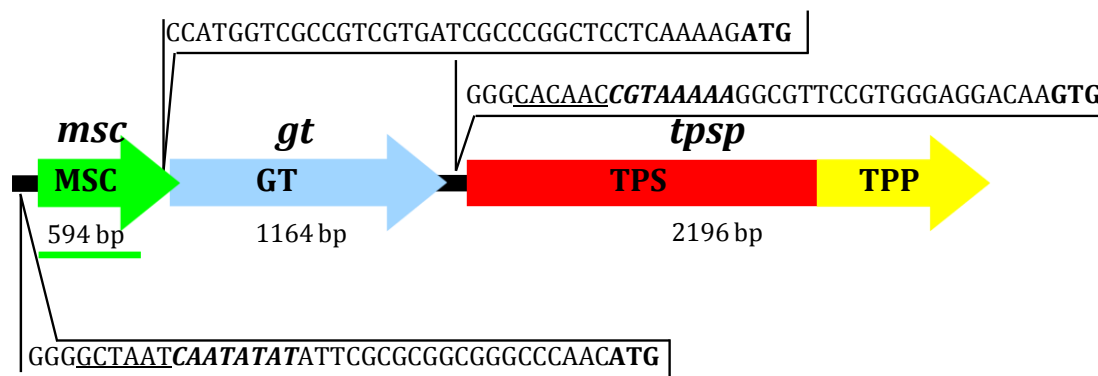


Abbildung 8 Schematische Darstellung der Organisation des *msc-gt-tpsp*-Operons in *T. tenax*.

Die Gene, die für die Trehalose-6-Phosphat Synthase (rot), Trehalose-6-Phosphat Phosphatase (gelb), die putative Glykosyl Transferase (blau) und den putativen mechanosensitiven Kanal (grün) kodieren sind gezeigt. Die Promoterregion von *msc* und *tpsp* mit den Promotorelementen (Bre site (kursiv und unterstrichen), TATA-Box (fett und kursiv und Startcodon (fett))) sind als graue Boxen dargestellt. Die Sequenz der stromaufwärts liegenden Regionen der Gene sind in eckigen Klammern dargestellt. Die Position der mRNA-Sonde ist als grüner Balken unter dem *msc*-Gen gezeigt.

Erste Ergebnisse aus Northern-Blot Analysen mit antisense RNA-Sonden gegen *tpp* und *tps* und mit antisense RNA-Sonden gegen *gt* (M. Zaparty, 2003) deuten darauf hin, dass *tpsp*, *gt* und *msc* ein Operon bilden, jedoch konnte dies bisher nicht mit Sonden gegen das *msc* Gen nachgewiesen werden. Um zum einen die Operon-Struktur mit Antisense-RNA-Sonden gegen *msc* und zum anderen einen stressinduzierten Unterschied in den Transkriptmengen semiquantitativ zu untersuchen, wurden Northern Blot Analysen durchgeführt. Dazu wurde *T. tenax* entweder heterotroph unter Standardbedingungen (2.3.2) bis zu einer Zellzahl von $1 \cdot 10^8$ Zellen/mL kultiviert (K, Kontrolle), und dann 3 Std mit 50 mM NaCl inkubiert (osmotischer Stress) oder

kontinuierlich bei 75, 80 oder 91°C angezogen (Temperatur Stress). Die Zellen wurden anschließend geerntet und die mRNA mit TriZol wie in 2.4.2.2 beschrieben isoliert, über ein Agrose-Formaldehydgel aufgetrennt, mittels Kapillartransfer auf eine Nylonmembran übertragen und anschließend eine Northern Blot Analyse durchgeführt (2.4.2.6). Dazu wurde der Blot mit einer 500 nt-großen Antisense-RNA gegen das *msc*-Gen hybridisiert und mit einem mit alkalischer Phosphatase (AP) gekoppeltem Antikörper inkubiert. Durch die Zugabe von CDP-Star und die Umsetzung dieses Substrats durch die AP konnte mit dem Versa-Doc-System (Bio-Rad) Chemilumineszenz detektiert werden.

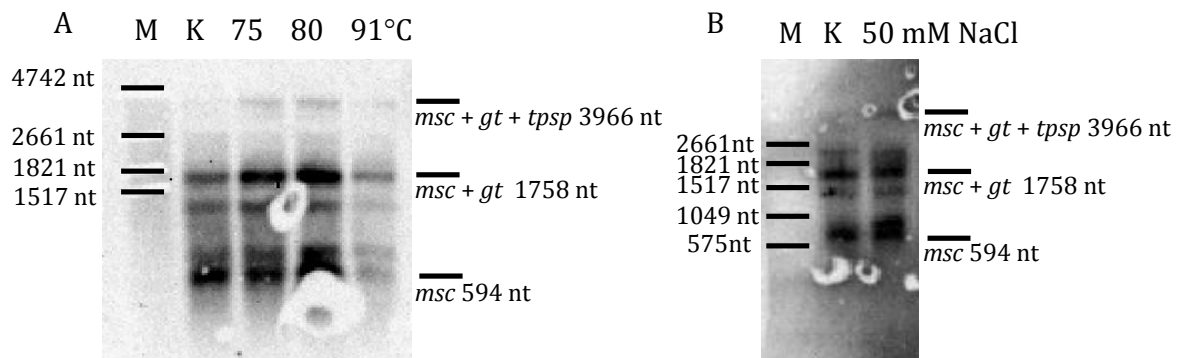


Abbildung 9 Northern-Blot zur Bestimmung der Genomorganisation und Transkription des *msc* Gens.

5 µg Gesamt-RNA wurden über ein Agrose-Formaldehydgel aufgetrennt, mittels Kapillartransfer auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit einer 500 nt Antisense-RNA-Sonde gegen das *msc* Transkript hybridisiert. Von links nach rechts wurde aufgetragen: Marker (M, Molecular Weight Marker I, DIG-labeled, Roche Applied Science), Kontroll-RNA (K), RNA nach Anzucht bei 75, 80 und 91°C (A); Marker (M, s.o.) Kontroll-RNA (K), gesamt RNA von Zellen nach Zugabe von 50 mM NaCl für 3 Std. (B); Rechts neben den Abbildungen wurden die mono-, bi- und tri-cistronischen Transkripte mit der entsprechenden Größe markiert.

Die Northern Analysen aus Abbildung 9 zeigen bei allen vier RNA-Isolaten nach Anzucht unter Temperaturstress (75°C, 80 °C (Kältestress) bzw. 91°C (Hitzestress)) und osmotischem Stress (50 mM NaCl) im Vergleich zur Kontroll-RNA (unter Standardbedingungen kultiviert) mono-, bi- und tri-cistronische Transkripte, die der Größe von *msc* (594 nt), *msc + gt* (1758 nt) und dem gesamten Operon (3966 nt) entsprechen. Das tri-cistronische Transkript deutet darauf hin, dass alle drei Gene in einem Operon organisiert sind, wobei die mono- und bi-cistronischen Transkripte aber möglicherweise auf eine posttranskriptionale Modifikation der RNA hinweisen könnten. Da in jedem Versuch die gleiche Menge RNA aufgetragen und auch die gleiche Sonden-Konzentration verwendet wurde, lässt die Intensität der Banden zumindest vorläufige Rückschlüsse auf die Transkriptmengen unter den jeweiligen Bedingungen zu. Nach Anzucht der Zellen bei 75°C, bzw. 80°C scheinen die Transkriptmengen sowohl der mono- als auch der bi- und tri-cistronischen Transkripte im Vergleich zu den Kontrollzellen bzw. den 91°C-Zellen (Abbildung 9) deutlich erhöht. Auch die Intensität der Transkripte aus den mit 50 mM NaCl

gestressten Zellen ist höher, als in den Kontroll-Zellen. Die zwei Banden, die nicht zu den Größen der möglichen Transkripte passen, erscheinen bei allen sechs Versuchen auf der gleichen Höhe, was auf unspezifische Bindungen hindeutet. Die mono-, bi- und tri-cistronischen Transkripte können möglicherweise durch posttranskriptionale Modifikationen hervorgerufen werden, hier sind aber weitere Untersuchungen notwendig. Die Northern Analysen sprechen dafür, dass *tpsp*, *gt* und *msc* in einem Operon organisiert sind und dass die Transkription des *tpsp* Operons durch Stressoren induziert wird.

3.1.1.2 Heterologe Expression von Proteinen aus *T. tenax*

Zur Untersuchung des TPSP-Weges, wurden aus *T. tenax* die offenen Leserahmen TTX_1304 (*tpsp*, 2196 bp) und TTX_1305 (*gt* 1164 bp) sowie die Genregionen der *tpsp*, die für die TPS- (artifizielle TTX_1304-N-term (*tps*, 1272 bp, Position 39-1311 der *tpsp*)) bzw. TPP-Domäne (die artifizielle TTX_1304-C-term (*tpp*, 758 bp, Position 1438-2196 der *tpsp*)) kodieren in verschiedene Vektoren (Tabelle 3) kloniert (bereits vorhandene Vektoren: pET24a::*tpsp* und pET24a::*tpp* (M. Zaparty, 2003; Melanie Zaparty, 2007)) und unter Verwendung der *E. coli*-Stämme *E. coli* Rosetta(DE3)-, *E. coli* BL21(DE3) und *E. coli* Lemo(DE3) exprimiert. Des Weiteren wurden *E. coli* Rosetta(DE3)-Zellen mit beiden Vektoren pET24a::TTX*tpsp* und pET15b::TTX*gt* transformiert, um einen Einfluss der Co-Expression der beiden Proteine aufeinander zu untersuchen. Hier sollte überprüft werden, ob dadurch eine bessere Expression der GT erzielt werden konnte.

Die TPSP wurde nach der Expression bis zur apparenten Homogenität mittels Anionenaustauschchromatographie und Gelfiltration aufgereinigt (Abbildung 10A). Das Protein ergibt drei Banden (80-92 kDa) nach Auftrennung über SDS-PAGE, obwohl die kalkulierte Masse 82 kDa beträgt. Sowohl eine N-terminale Sequenzierung dieser Banden (Melanie Zaparty, 2007), als auch eine Untersuchung mittels MALDI-TOF (Dr. Melanie Brocker (Forschungszentrum Jülich, Deutschland)) zeigte, dass es sich bei allen drei Banden um die TPSP handelt. Die native Größe der TPSP liegt nach der Berechnung der Laufstrecke über eine native PAGE bei ca. 239 kDa, was auf einen Homo-Trimer hindeuten würde (Abbildung 10).

Die GT (45 kDa) wurde in *E. coli* Rosetta(DE3) bzw. BL21(DE3) nahezu ausschließlich in „inclusion bodies“ exprimiert. Durch die Expression in *E. coli* Lemo(DE3) bei 22°C lag eine ausreichende Menge des Proteins im löslichen Überstand vor und wurde über eine Ni-TED-Säule und anschließende Gelfiltration bis zur apparenten Homogenität gereinigt (Abbildung 10A). Eine Co-Expression von TPSP und GT in *E. coli* Rosetta(DE3)-Zellen (transformiert mit pET24a::*tpsp* und pET15b::*gt*), um eine mögliche stabilisierende Wirkung der beiden Proteine aufeinander auszunutzen, führte zu keiner weiteren Verbesserung der Expression der GT in löslicher Form.

Die artifiziellen TPS- (50 kDa) und TPP- (33 kDa) Domänen lagen nach der Expression in *E. coli* Rosetta(DE3) löslich vor. Beide wurden mittels Ni-TED (Macherey und Nagel) (TPS) bzw. Anionenaustauschchromatographie (TPP) und Gelfiltration bis zur apparenten Homogenität gereinigt (Abbildung 10B). Die durch SDS-PAGE ermittelten molekularen Massen von 55 kDa bzw. 30 kDa korrelierten gut mit den kalkulierten Molekulargewichten von TPS- bzw. TPP-Domäne.

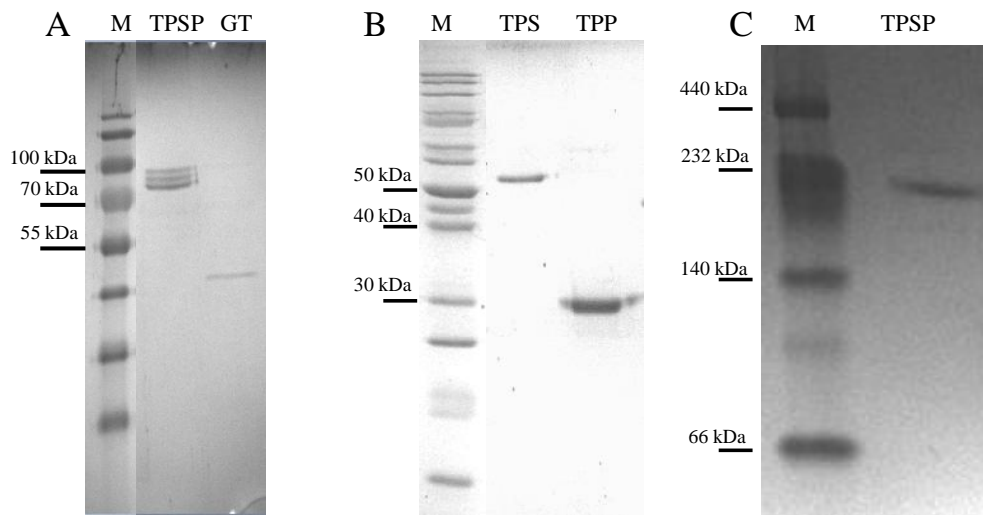


Abbildung 10 Reinigung der rekombinanten TPSP, GT und der artifiziellen TPP- und TPS-Domänen aus *T. tenax*.

TTX_TPSP, TTX_GT (10 Vol.-% PAA-Gel), (M, PageRuler Prestained Protein Ladder) (A), artifiziellen TTX_TPS- und TTX_TPP-Domänen (12 Vol.-% PAA-Gel), (M, PageRuler Unstained Protein Ladder) (B), Native PAGE (Bio-Rad) (M, Amersham) der TPSP (2 µg) (C). Die Gele wurden mit Coomassi-Blau gefärbt.

3.1.1.3 Untersuchungen zur Aktivität der TPSP

Die Aktivität der gereinigten TPSP wurde anhand diskontinuierlicher Testsysteme untersucht. Die DC-Analysen zeigten, dass unter allen getesteten Bedingungen Trehalose aus T6P (Phosphatase-Aktivität) gebildet wurde, wobei die zunehmenden Signalstärken auf eine temperaturabhängige Aktivitätszunahme bei 90 bzw. 95°C im Vergleich zu 70°C hindeuten (Abbildung 11A). Demgegenüber zeigte die Untersuchung nach Inkubation der TPSP mit 4 mM UDPG und 8 mM G6P keine Bildung von Trehalose (Synthase- und Phosphatase-Aktivität) (Abbildung 11B). Die fusionierte TPSP weist also ausschließlich T6P-Phosphatase- nicht aber T6P-Synthase-Phosphatase-Aktivität auf.

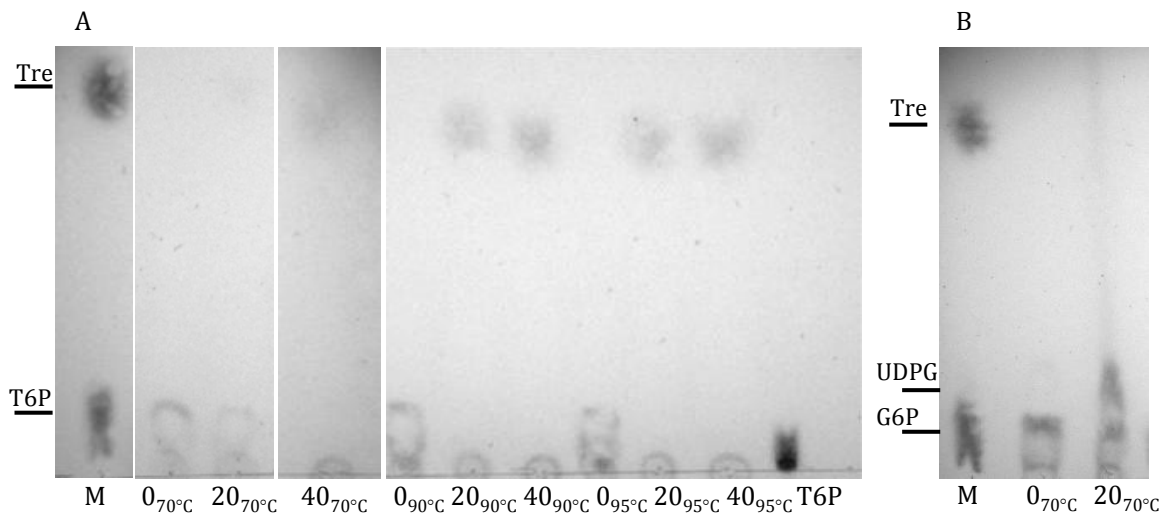
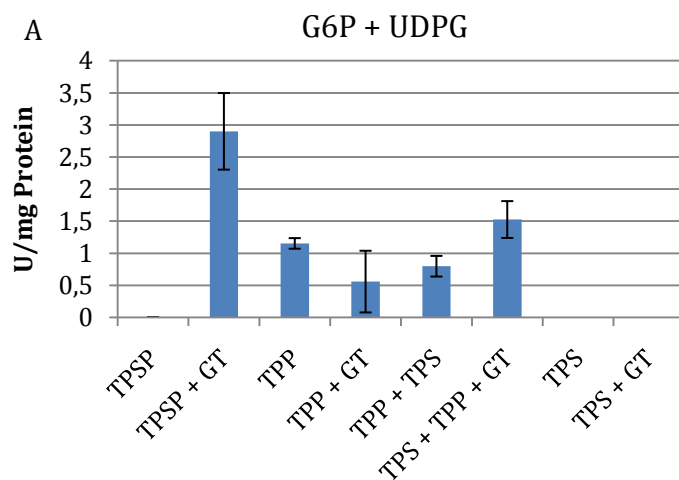


Abbildung 11 Analyse der TPSP-Aktivität in Gegenwart von T6P bzw. UDPG und G6P über Dünnschichtchromatographie

Die TPSP wurde für 0, 20 und 40 min bei 70, 90 und 95°C in 100 mM Tris (pH 7, 80°C) mit 2 mM T6P und 4 mM MgCl₂ (A) und für 0 und 20 min bei 70°C in 100 mM Tris (pH 7, 80°C) mit 4 mM UDPG, 8 mM G6P und 4 mM MgCl₂ (B) inkubiert und anschließend über DC-Platten (Silicagel G60 Platten, Merck, Laufmittel (50 mL Butan-1-ol, 30 mL Ethanol und 20 mL H₂O (5:3:2 Vol.-%)) analysiert. Als Standard wurden je 10 mM G6P, UDPG, T6P und Trehalose (20 min bei 95°C inkubiert) aufgetragen. Die Detektion erfolgte über Besprühen mit 20 Vol.-% H₂SO₄ und Erhitzen bei 100°C für 20 min.

Weiterhin wurde die kombinierte TPS+TPP- bzw. TPP-Aktivität der fusionierten TPSP über den kolorimetrischen Nachweis der P_i-Bildung aus UDPG und G6P, bzw. T6P mittels Malachitgrüntest quantitativ bestimmt. Dazu wurde mit einem Phosphat-Standard zunächst eine Kalibriergerade nach Herstellerangaben erstellt (AnaSpec, SensoLyte® MG Phosphate Assay Kit, Colorimetric) und daraus der Extinktionskoeffizient bei 622 nm von 8,07 mM⁻¹cm⁻¹ für Malachitgrün ermittelt.



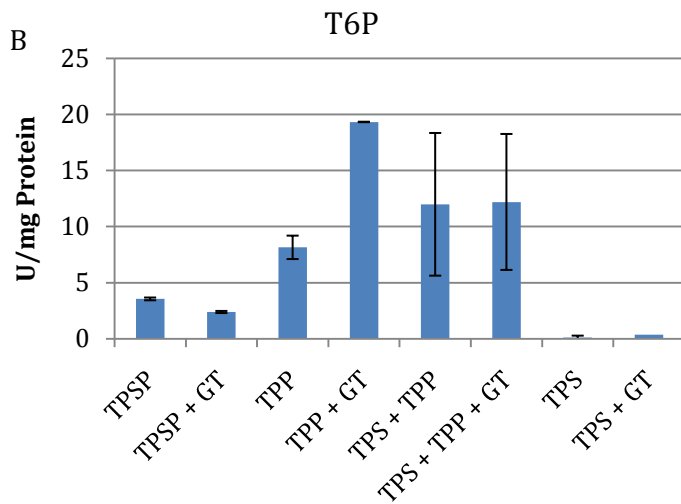


Abbildung 12 Spezifische Aktivität der *T. tenax* TPSP und der artifizierten TPS- und TPP-Domänen in An- und Abwesenheit der GT.

Bestimmt wurde die Freisetzung von anorganischem Phosphat (P_i) bei 80°C mit 4 mM UDPG und 8 mM G6P (A) bzw. 8 mM T6P (B) als Substrat. Der P_i -Nachweis erfolgte über den Malachitgrün-Test Kit von SensoLyte (Seraing, Belgien).

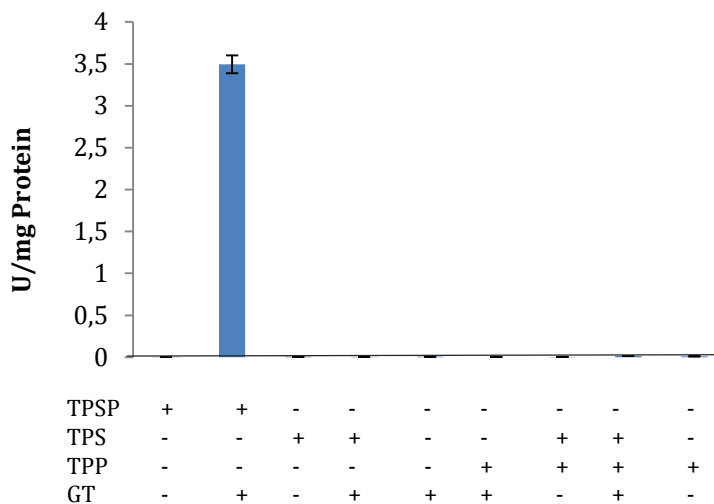


Abbildung 13 Spezifische TPS-Aktivität der *T. tenax* TPSP und der artifizierten TPS- und TPP-Domänen in An- und Abwesenheit der GT.

Der Nachweis erfolgte bei 80°C. Das bei der Synthese von T6P aus UDPG und G6P freiwerdende UDP wurde photometrisch in einem diskontinuierlichen Test über die Abnahme der Absorption bei 340 nm verfolgt, die durch eine Kopplung der Oxidation von NADH zu NAD^+ über PK und LDH erfolgte. (+) zeigt die Zugabe (-) das Fehlen des Proteins an.

In Übereinstimmung mit den dünschichtchromatographischen Analysen zeigte die TPSP mit G6P und UDPG als Substrat keine P_i -Bildung und damit keine kombinierte TPS/TPP-Aktivität (Abbildung 12), während TPP-Aktivität als P_i -Bildung aus T6P mit 3 U/mg Protein eindeutig bestimmt werden konnte (Abbildung 12B). Entsprechend konnte auch für die fusionierte TPSP keine TPS-Aktivität in Form von UDP-Freisetzung aus UDPG und G6P im gekoppelten Test über PK und LDH gezeigt werden (Abbildung 13).

Um die funktionelle Interaktion von TPSP und GT in der Trehalose-Bildung zu untersuchen, wurde die gereinigte, rekombinante GT zu den TPSP-Aktivitätstests zugegeben. In Gegenwart der GT katalysierte die fusionierte TPSP die P_i Freisetzung aus UDPG und G6P und besitzt damit kombinierte TPS/TPP-Gesamt-Aktivität (2,9 U/mg Protein) (Abbildung 12A). Die Phosphatase-Aktivität der TPSP blieb durch Zugabe der GT mit 2,5 U/mg Protein annähernd unverändert (Abbildung 12B). Eine Synthase-Aktivität der GT allein konnte nicht gezeigt werden (Abbildung 13), was zeigt, dass GT nicht die TPS substituiert. Während die TPS-Aktivität (UDP-Freisetzung aus UDPG und G6P) in Abwesenheit der GT nicht nachzuweisen war (s.o.), konnte die TPS-Aktivität der TPSP in Gegenwart der GT mit 3 U/mg Protein eindeutig bestimmt werden (Abbildung 13). Das spricht dafür, dass v.a. die TPS-Aktivität der TPSP durch die GT aktiviert wird während die TPP-Aktivität von der GT weitgehend unbeeinflusst bleibt. Die artifizielle TPS zeigte dagegen bei keinem der Versuche Aktivität, weder mit noch ohne Zugabe von GT, was darauf hindeutet, dass die fusionierte Struktur der TPSP eine Voraussetzung für die Aktivierung der TPS-Aktivität durch die GT darstellt.

Die Phosphatase-Aktivität (gemessen als P_i -Bildung aus T6P) der artifiziellen TPP (~10 U/mg Protein) war etwa doppelt so hoch wie die der fusionierten TPSP (<5 U/mg Protein) und wurde durch die Zugabe von GT auf ~20 U/mg Protein gesteigert. Generell war die Phosphatase-Aktivität der fusionierten TPSP bei allen Versuchen geringer, als die der artifiziellen TPP-Domäne, was vermuten lässt, dass die TPP durch die Fusionierung mit der TPS eher gehemmt wird.

Die geringe Aktivität der artifiziellen TPP mit UDPG und G6P als Substrat ist vermutlich auf eine G6P-umsetzende Seitenaktivität der TPP zurückzuführen. Diese Seitenaktivität von rund 1 U/mg wurde weder durch Zugabe der GT noch durch die artifizielle TPS-Domäne oder von beiden Proteinen signifikant beeinflusst (0,8 - 1,5 U/mg Protein) (Abbildung 12A).

Insgesamt zeigen die Ergebnisse eine Bifunktionalität, d.h. eine kombinierte TPS- und TPP-Aktivität der fusionierten TPSP, allerdings nur in Gegenwart der GT. Dabei aktiviert die GT hauptsächlich die TPS-Aktivität, wofür die fusionierte Struktur die Voraussetzung ist. Dagegen wird die TPP-Aktivität durch die Fusion eher inhibiert, da die Phosphatase Aktivität der artifiziellen TPP (Abbildung 12B), viel größer ist als die der fusionierten TPSP. Die TPS scheint also den limitierenden Faktor der Reaktion darzustellen.

3.1.1.4 Komplexbildung von TPSP und GT

Die *in vitro* Enzymtests wiesen auf eine Aktivierung der TPS-Aktivität und damit der Bifunktionalität der fusionierten *T. tenax* TPSP durch Interaktionen mit der GT hin. Diese TPSP-GT-Interaktion wurde mit dem „Yeast two-Hybrid“-System untersucht. Dazu wurden die Gene *tpsp* und *gt*, sowie die artifiziellen, verkürzten Genabschnitte der *tpsp*, *tps* (N-terminal) und *tpp*

(C-terminal) aus *T. tenax*, in die Vektoren pGADT7 (*gt*), bzw. pGBKT7 (*tpsp*, *tpp*, *tps*) kloniert, welche neben der T7-Promotorregion auch die ADH1-Promotorregion aufweisen. Zudem verfügen sie über Gene, die für den Transkriptionsfaktor (DNA Bindungsdomäne (GAL4 DNA-BD; in pGBKT7) und die Aktivator-domäne (GAL4 AD; in pGADT7)) kodieren. Die Reportergene, die in den AH109 Zellen vorliegen (ADE2 (YOR128C, Phosphoribosylaminoimidazole Carboxylase, wird bei Adenin Mangel angereichert, katalysiert die *de novo* Purine/Nukleotid Biosynthese), HIS3 (YOR202W, Imidazoleglycerol-Phosphate Dehydratase und katalysiert die Histidin-Biosynthese), MEL1 (stimuliert die α -Galactosidase-Aktivität) und AUR1-C (Inositol-Phosphoryl-Ceramid-Synthase, Resistenz gegen hochtoxisches Aureobasidin A) können nur transkribiert werden, wenn eine Interaktion der zu untersuchenden Proteine vorliegt. Zudem enthalten die beiden Vektoren pGBKT7 und pGADT7 Selektionsmarker (TRP1 (YDR007W, Phosphoribosyl-Anthranilat Isomerase, katalysiert die Tryptophan-Biosynthese, pGBKT7), LEU2 (YCL018W, β -Isopropylmalate Dehydrogenase, katalysiert die Leucin-Biosynthese, pGADT7)), die Aufschluss darüber geben, ob die Transformation der Hefezellen mit dem jeweiligen Plasmid erfolgreich war.

Kompetente *S. cerevisiae* AH109-Zellen wurden je mit pGADT7::*gt* und einem pGBKT7-Konstrukt transformiert und mittels Interaktionsplatten mit Selektivmedium 1 (-Leucin, -Tryptophan, Abbildung 14A) untersucht (2.4.3). Da alle Klone auf Selektivmedium 1 anwuchsen, war die Transformation der AH109-Zellen erfolgreich. Bei einer Interaktion der fusionierten Proteine (GT und TPSP, TPP- oder TPS-Domäne), bindet die GAL4 DNA-BD und die GAL4-AD und ermöglicht so das Ablesen der Reportergene. Die Interaktion der Proteine wurde über das Selektivmedium 2 (-Leucin, -Tryptophan, -Histidin, -Adenin, + α -X-Gal-Platten) untersucht. Wachstum und Blaufärbung der Kolonien deuteten auf eine Interaktion der Proteine hin, da nur dadurch GAL4-AD an die GAL4-DNA-BD binden kann und die Reportergene transkribiert und translatiert werden können. Die Transformanden zeigten folgendes Bild: Die mit pGBKT7::*tpsp* und pGADT7::*gt* transformierte Kolonie von AH109 war blau, die Zellen, die mit pGBKT7::*tps* und pGADT7::*gt* transformiert wurden, ebenso wie die mit pGBKT7::*tpp* und pGADT7::*gt* konnten nicht wachsen. Positiv- (pGBKT7::*tfb3* + pGADT7::*rpok*, freundlicherweise von Prof. Dr. Malcolm White zur Verfügung gestellt (St. Andrews)) und Negativkontrolle (pGBKT7 + pGADT7) sowie die falsch-Positivkontrolle (pGBKT7 + pGADT7::*gt*) zeigten die zu erwartenden Ergebnisse. GT und TPSP interagieren also *in vivo* vermutlich durch die Bildung eines Proteinkomplexes während eine solche Interaktion der GT mit einem der verkürzten, artifiziellen Proteindomänen TPS oder TPP nicht gezeigt werden konnte. Das spricht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus den Aktivitätstests wiederum dafür, dass die Fusionierung der TPSP eine Voraussetzung für die Komplexbildung und damit auch für die Aktivität der TPSP ist.

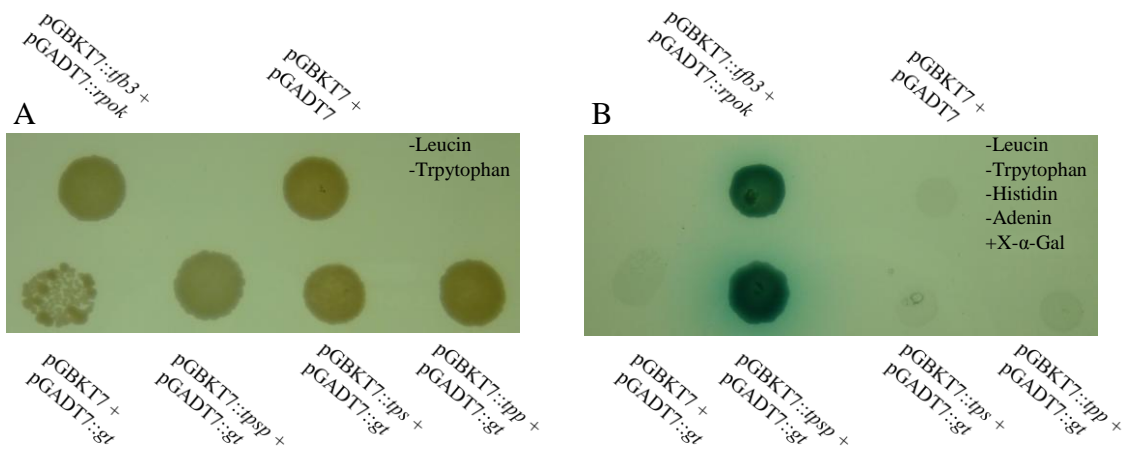


Abbildung 14 Protein-Protein-Interaktion der TPSP aus *T. tenax* und der artifiziellen TPS- und TPP-Domänen mit der GT untersucht im „Yeast two-Hybrid“-System.

S. cerevisiae-Zellen wurden mit verschiedenen pGBKT7-Konstrukten und pGADT7::gt, sowie den leeren Vektoren (Negativkontrolle), dem leeren pGBKT7 und pGADT7::gt (falsch-Positivkontrolle) und pGBKT7::tfb3 und pGADT7::rpok (Positivkontrolle) transformiert. Die Detektion erfolgte auf SD-Medium-Platten ohne Tryptophan und Leucin (A) und ohne Histidin, Tryptophan, Adenin und Leucin, mit X- α -Gal (B).

3.1.2 Der TreT-Weg in *T. tenax*

3.1.2.1 Analyse des TreT Operons

In *T. tenax* wurde ein Gen identifiziert, das für eine Trehalose Glykosyl transferierende Synthase (TreT) kodiert (TTX_0217, 1206 bp, 402 aa, 44 kDa) (Kouril *et al.*, 2008). Dieses Gen überlappt vier Basen mit dem stromaufwärts liegenden Gen *orfY* (TTX_0218, 657 bp, 219 aa, ~24 kDa), das für ein Protein mit bisher unbekannter Funktion (OrfY) kodiert. Die Genorganisation spricht dafür, dass beide Gene ein Operon bilden (Abbildung 15).

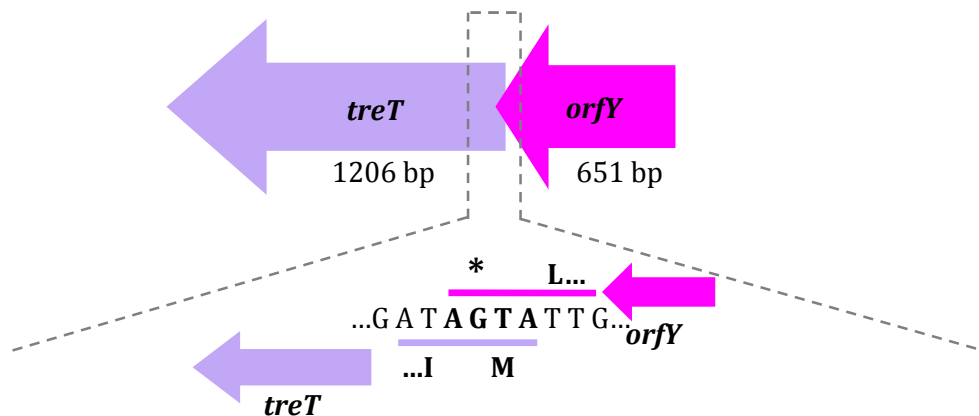


Abbildung 15 Schematische Darstellung des *treT-orfY*-Operons in *T. tenax*.

Die Gene die für die Glykosyl transferierende Synthase (TreT, lila) und OrfY („Open reading frame“ Y, OrfY, pink) kodieren sind gezeigt. Die Größe der Gene, sowie deren Überschneidungssequenz mit je drei Basen stromauf und stromabwärts ist dargestellt. M (Methionin (ATG)) steht für das Startcodon der *treT* und * für das Stoppcodon des *orfY* Gens (TGA).

3.1.2.2 Heterologe Expression der TTX_TreT und des TTX_OrfY in *E. coli*

Die für die Proteine TTX_TreT und TTX_OrfY kodierenden Gene wurden in die Plasmide pET15b, bzw. pET24a kloniert und in *E. coli* Rosetta(DE3) exprimiert. Die Expression von TTX_OrfY ergab eine große Menge an löslichem Protein (Abbildung 16), das mittels Hitzefällung (80°C), Anionenaustauschchromatographie und Gelfiltration bis zur apparenten Homogenität gereinigt werden konnte. Die TTX_TreT hingegen lag nach der Expression in Rosetta(DE3) hauptsächlich in Einschlusskörpern vor. Durch eine Expression in dem Stamm *E. coli* Lemo21(DE3) bei 22°C über Nacht konnte eine geringe, aber ausreichende Menge TreT im Überstand detektiert werden, so dass über eine entsprechende Zellmasse genügend gereinigte TTX_TreT erzeugt werden konnte. Das Enzym wurde durch Hitzefällung (80°C) und Affinitätschromatographie (Ni-TED-Säulen (Macherey und Nagel, Düren, D, 7 mL Bettvolumen)) gereinigt und via SDS-PAGE untersucht. Die kalkulierte Größe der TTX_TreT von 44 kDa stimmt in etwa mit der detektierten Größe von rund 50 kDa überein. Hohe Konzentrationen der TTX_TreT (ab 0,5 mg/mL) führten jedoch dazu, dass das Protein präzipitierte.

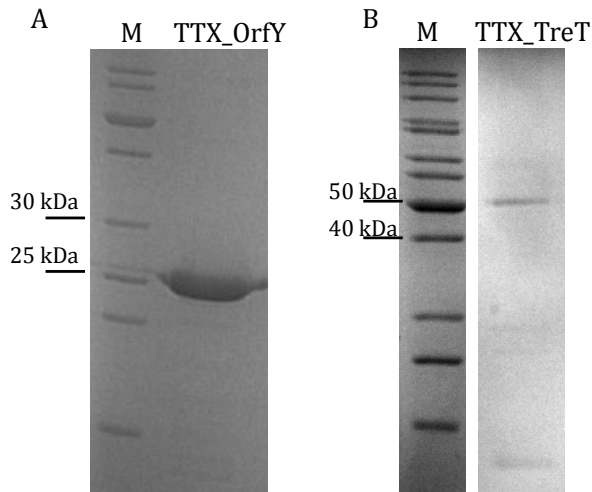


Abbildung 16 Reinigung der Proteine OrfY und TreT aus *T. tenax*.

TTX_OrfY (nach GF) und TTX_TreT (nach Ni-TED) aufgetrennt über ein 12 Vol.-% PAA-Gel. Die Gele wurden mit Coomassi-Blau gefärbt.

In Zusammenarbeit mit Dr. J. Martin, Dr. K. Zeth und Prof. Dr. A. Lupas (MPI Tübingen) wurde die TTX_TreT mittels CD-(Circulardichroismus)-Spektroskopie und Fluoreszenzmessungen untersucht. Dabei wiesen die Spektren auf eine korrekte Faltung des Proteins hin, was sich auch über die größere Proteaseresistenz gegenüber Proteinase K und Trypsin zeigte (persönliche Korrespondenz Dr. J. Martin, MPI Tübingen). Die Schmelztemperatur liegt in Übereinstimmung mit dem Wachstumsoptimum von *T. tenax* bei etwas mehr als 80°C.

Die Enzymaktivität wurde in beiden Reaktionsrichtungen untersucht, wobei übereinstimmend mit vorherigen Arbeiten (Kouril *et al.*, 2008) ausschließlich Aktivität in Richtung der Trehalose Bildung aus UDPG und Glukose, nicht aber in Richtung Trehalose Abbau beobachtet wurde. OrfY zeigte keinen Einfluss auf die Aktivität der TreT.

3.1.2.3 Größenbestimmung von OrfY

Die native molekulare Masse von OrfY wurde mittels Gelfiltration (Superose 6, 10/300 GL (GE, Amersham Biosciences)) bestimmt. Dazu wurde das „Gel Filtration Calibration Kit LMW“ (GE Healthcare: mit Thyroglobulin (669 kDa), Ferritin (440 kDa), Aldolase (158 kDa), Ovalbumin (44 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Ribonuclease (13,7 kDa) und Aprotinin (6,5 kDa)) als Standard verwendet.

Zur Größenbestimmung von OrfY wurden 280 µg aufgereinigtes Protein nach vorheriger Inkubation (1 Std, 80°C) in An- bzw. Abwesenheit von 10 mM Glukose, 10 mM Trehalose oder 300 mM Trehalose in Gegenwart der verschiedenen Zucker über die Gelfiltrationssäule aufgetrennt, die Retentionszeit ermittelt, das Eluat aus den jeweiligen Fraktionen mittels SDS-PAGE (2.6.2) analysiert und so das Molekulargewicht (MW) berechnet. Beispielsweise wird hier das Chromatogramm von OrfY in Gegenwart von 10 mM Glukose abgebildet.

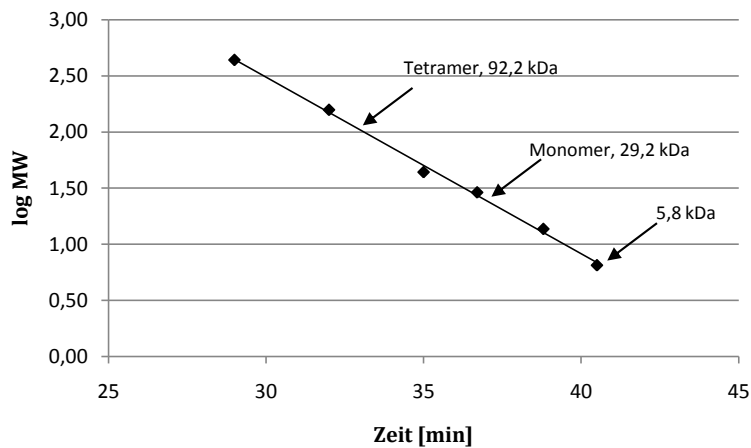


Abbildung 17 Größenbestimmung von TTX_OrfY über Gelfiltration.

Die Auftrennung der Markerproteine (Thyroglobulin (669 kDa), Ferritin (440 kDa), Aldolase (158 kDa), Ovalbumin (44 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Ribonuclease (13,7 kDa) und Aprotinin (6,5 kDa) (Gel Filtration Calibration Kit LMW (GE Healthcare))), sowie 200 μ l OrfY (0,47 mg/ml) ist gezeigt. Aufgetragen wurde der Logarithmus des Molekulargewichts gegen die Retentionszeit. Die Molekulare Masse von OrfY wurde durch Ermittlung der Retentionszeit aus der Ausgleichsgerade bestimmt. Die Laufgeschwindigkeit betrug 2 mL/min (Superose 6, 10/300 GL (GE, Amersham Biosciences)). Die Proben, in denen OrfY detektiert wurde, sind durch Pfeile markiert. $R^2 = 0,9972$, $y = -0,3151x + 7,2157$.

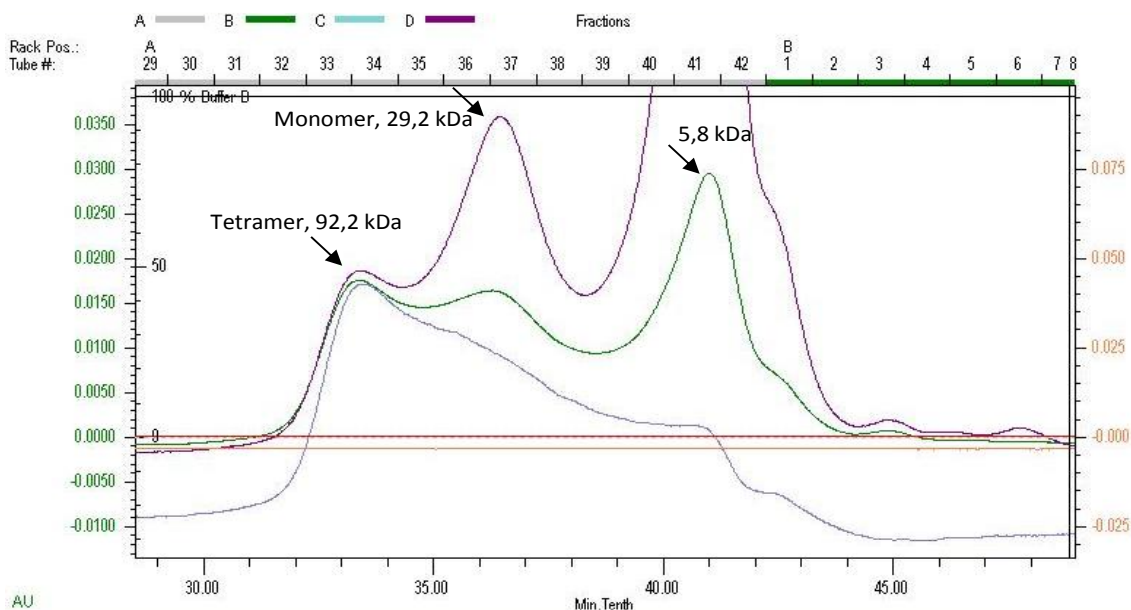


Abbildung 18 Einfluss der Glukose auf das native Molekulargewicht von OrfY aus *T. tenax*.

Chromatogramm der Gelfiltration (Superose 6, 10/300 GL (GE, Amersham Biosciences)) von TTX_OrfY nach Inkubation (1 Std., 80°C) und Auftrennung in Gegenwart von 10 mM Glukose. Die Spektren bei verschiedenen Wellenlängen (240 nm (blau), 280 nm (grün) und 260 nm (lila)) sind gezeigt. Die Laufgeschwindigkeit betrug 2 mL/min. Die Pfeile deuten auf die Fraktionen, in denen OrfY via SDS-PAGE identifiziert wurde.

Es wurde hauptsächlich das Monomer von OrfY mit ~24 kDa detektiert (siehe Abbildung 17 und Abbildung 18). Nach der Inkubation und Auftrennung in Gegenwart von 10 mM Glukose wurde ein weiterer Peak detektiert, der auf eine Proteingröße von ~92 kDa, also die Bildung eines Tetramers schließen lässt. Nach Inkubation mit Trehalose wurden zusätzlich ein Di- und Tetramer (51 kDa bzw. 83 kDa) detektiert (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich erschien bei allen Auftrennungen OrfY immer in einer Fraktion, die mit einer Retentionszeit von ca. 36,5 min und dem sich daraus ergebenden MW von rund 6 kDa weder dem kalkulierten, noch dem über SDS-PAGE ermitteltem Molekulargewicht entspricht. Die Analyse mittels SDS-PAGE (2.6.2) bestätigte jedoch, dass OrfY in diesen Fraktionen vorlag. Bei der Detektion der Proteinfractionen bei 260 nm (lila, zur Detektion von DNA) zeigten sich wie bei 280 nm (grün, zur Detektion von Proteinen) deutliche Maxima. Dies weist darauf hin, dass in den OrfY Fraktionen DNA enthalten sein könnte. Das verlangsamte Laufverhalten der Fraktionen, die einem Molekulargewicht von ~6 kDa entsprechen, könnte zum einen durch die gebundene DNA resultieren, aber auch durch eine Interaktion mit der Säulenmatrix der Superose 6, 10/300 GL, die hauptsächlich aus Agarose also aus Zuckern besteht. Da Di- und Tetramere von OrfY nur unter Einfluss von Zucker (Trehalose und Glukose) beobachtet wurden, könnte dies auf eine Beeinflussung der Oligomerisierung des Proteins hindeuten.

3.1.2.4 Bioinformatische und strukturelle Analyse von TTX_TreT und OrfY

3.1.2.4.1 Protein-Protein-Interaktion

Die Gene *orfY* und *treT* aus *T. tenax* wurden in die Vektoren pGADT7, bzw. pGBKT7 kloniert. Wie oben beschrieben (2.4.3.2) wurden *S. cerevisiae* AH0109-Zellen mit je zwei Konstrukten (pGBKT7 und pGADT7) transformiert und mittels Interaktionsplatten untersucht (2.4.3). Die Blaufärbung der Kolonie der entsprechenden Hefe-Transformanden (pGADT7::*TTX_orfY* + pGBKT7::*TTX_treT*) auf Selektionsmedium 2 (-Ad, -His, -Leu, -Trp, + X- α -Gal) zeigte, dass TTX_TreT und TTX_OrfY *in vivo* interagieren (Abbildung 19E und F) und lässt vermuten, dass sie möglicherweise einen Proteinkomplex bilden. Positiv- und Negativkontrolle (pGADT7::*rpok* + pGBKT7::*tfb3* (Positivkontrolle freundlicherweise von Prof. Dr. Malcolm White zur Verfügung gestellt (St. Andrews)) (Abbildung 19A und B, links), bzw. pGBKT7 + pGADT7::*rpok* (Abbildung 19A und B, rechts)) sowie die falsch-Positivkontrolle (pGBKT7 + pGADT7::*TTX_orfY* (Abbildung 19C und D)) zeigten die zu erwartenden Ergebnisse.

Medium	Kontrollen		Interaktion TreT/OrfY	
-Leucin -Tryptophan	<p>A</p>	<p>C</p>	<p>E</p>	
-Leucin -Tryptophan -Adenin -Histidin +X- α -Gal	<p>B</p>	<p>D</p>	<p>F</p>	

Abbildung 19 Untersuchung zur Protein-Protein-Interaktion von TTX_TreT und TTX_OrfY im „Yeast two-Hybrid“-System.

S. cerevisiae wurden mit pGBKT7::*tfb3* und pGADT7::*rpok* als Positivkontrolle (freundlicher Weise von Prof. Dr. M. White zur Verfügung gestellt (St. Andrews)), den leeren Vektoren pGADT7 und pGBKT7 als Negativkontrolle (A und B), mit pGBKT7 und pGADT7:: TTX_*orfY* (C und D) sowie mit pGBKT7::TTX_*treT* und je pGADT7::TTX_*orfY* (E und F) transformiert. Die Detektion erfolgte auf SD-Medium-Platten ohne Leucin und ohne Tryptophan (A,C und E) und auf SD-Medium-Platten ohne Histidin, Tryptophan, Adenin und Leucin, mit X- α -Gal (B, D und F).

3.1.2.4.2 Strukturelle und funktionelle Charakterisierung von OrfY

OrfY wurde von Dr. Jörg Martin, Dr. Kornelius Zeth und Prof. Dr. Andrei Lupas (MPI Tübingen) untersucht und kristallisiert. Die Kristallisation zeigte eine Auflösung bei 2,8 Å. Lichtbrechungs-Experimente zeigten, dass OrfY nativ eher als Tetramer vorliegt, was als solches übereinstimmend auch bei der Gelfiltrationschromatographie unter Trehalose- und Glukosezugabe (je 10 mM) detektiert werden konnte (3.1.2.3). OrfY besteht aus zwei nahezu identischen Domänen, die in HHpred Vorhersagen als TetR-Transkriptionsregulator-ähnliche Helix-turn-Helix (HTH)-Domänen identifiziert wurden. Diese duplizierten HTH-Domänen sind durch zwei auffällige, lange 2-strängige antiparallele β -Stränge miteinander verbunden, die gegeneinander verdreht sind. In der DALI Datenbank konnten keine vergleichbaren Proteinstrukturen gefunden werden, womit die OrfY-Struktur ein neuartiges Strukturmotiv aufweist. Ähnliche, dann aber nicht duplizierte HTH-Domänen finden sich – wie in der mit dem „CLANS-Software Paket“ erstellten „Cluster-Map“ in Abbildung 20 dargestellt – neben den OrfY Homologen aus Bakterien und Archaea ebenfalls in Amylasen, PEP bindenden Proteinen, die teilweise als PEP Synthasen oder Pyruvat-Phosphat-Dikinasen oder Antwort Regulatoren annotiert sind. Zudem weisen dieses Strukturmotiv auch Proteine unbekannter Funktion aus thermoacidophilen Organismen und proteinkodierende Sequenzen aus Metagenomprojekten auf, deren Funktion ebenfalls nicht bekannt ist (die jeweilige Distanz zur OrfY-Gruppe stellt dabei ein Maß für die Ähnlichkeit der jeweiligen HTH-Domänen zueinander dar).

In OrfY wurden anhand von Strukturvergleichen konservierte Reste identifiziert, H49/157 und D67/171, die ein aktives Zentrum bilden könnten; die Struktur um das vermutlich aktive Zentrum wird durch die Aromaten F12/120 und W71/175 stabilisiert. Das könnte darauf schließen lassen, dass OrfY eine enzymatische Aktivität aufweist. Docking Analysen (PatchDock) deuten an, dass Trehalose an dieses aktive Zentrum binden könnte. Dies stimmt mit den oben beschriebenen Gelfiltrationsexperimenten überein, die darauf hindeuten, dass die Gegenwart von Trehalose oder Glukose die Oligomerisierung von OrfY beeinflussen (s.o.). Die Messung des UV-Spektrums der Proteinpräparation zeigte ein Maximum bei 260 nm, was in Übereinstimmung mit der HTH-Domänenstruktur, die vielfach bei DNA-Bindeproteinen gefunden wird (Kohn, 1997; Santos, 2009), auf DNA-Bindung durch OrfY hinweist. Entsprechende Evidenzen auf DNA-Bindung ergaben sich ebenfalls durch die Chromatogramme aus den Gelfiltrationsläufen. Diese zeigen, dass die Protein-Peaks bei 280 nm jeweils gemeinsam mit den 260 nm Peaks eluieren (Abbildung 18).

Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass OrfY zum einen Zucker binden und eventuell auch enzymatisch umsetzen könnte, zum anderen als Helix-turn-Helix-Domänen-Protein aber auch DNA binden könnte. Deswegen wurden weitere Experimente zur Aktivität bzw. Bindungsstudien mit Zuckern und DNA durchgeführt.

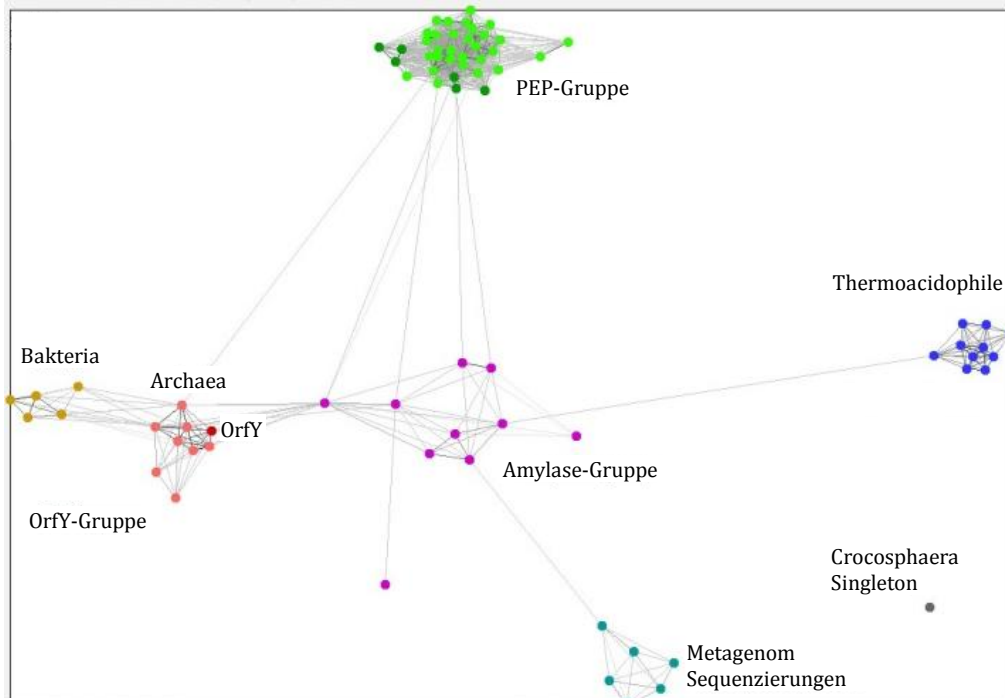


Abbildung 20 Cluster-Mappe erstellt mit dem Programm Clans.

Die Abbildung zeigt (<ftp://ftp.tuebingen.mpg.de/pub/protevo/CLANS/>) (Frickey & Lupas, 2004) das Vorkommen der OrfY-Struktur in verschiedenen Protein-Gruppen (Prof. Dr. Andrei Lupas, MPI Tübingen), wobei die jeweilige Distanz zur OrfY-Gruppe ein Maß für die Ähnlichkeit der jeweiligen HTH-Domänen zueinander darstellt.

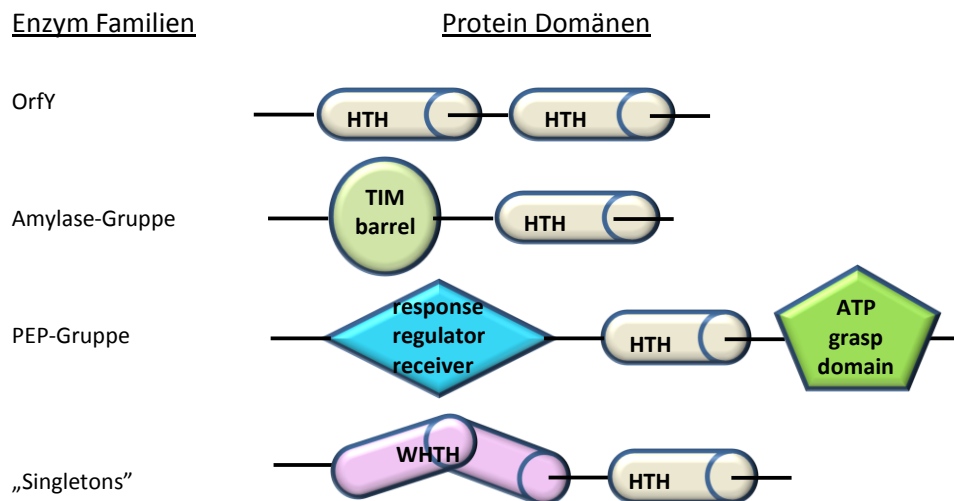


Abbildung 21 Schematische Abbildung der Enzymfamilien mit Ähnlichkeiten zu der OrfY-Struktur, sowie Zusammenfassung und Anordnung der verschiedenen Proteindomänen.

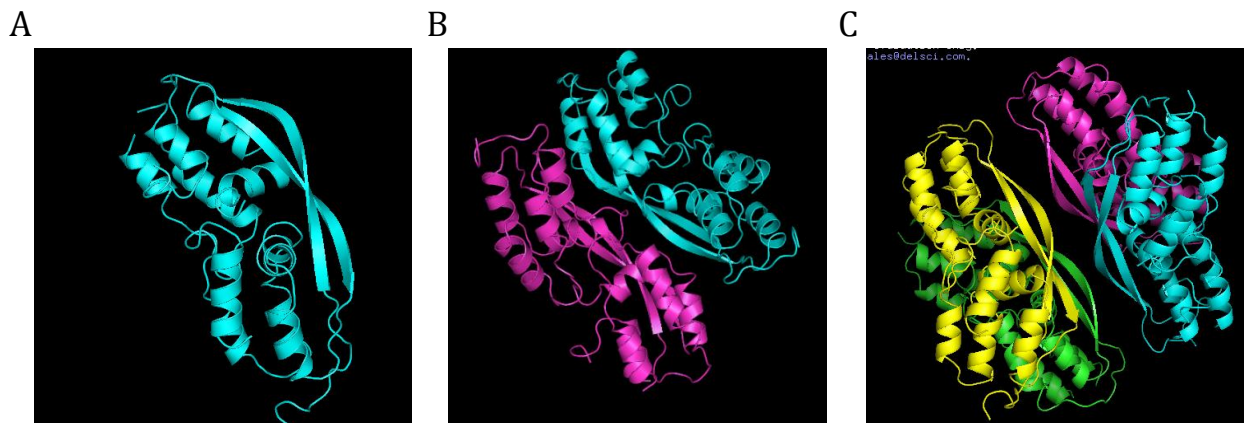


Abbildung 22 Kristallstruktur von OrfY aus *T. tenax*.

Die Struktur der Monomers (A), Dimers (B) und Tetramers (C) ist gezeigt (dargestellt mit Pymol).

Untersuchungen zur enzymatischen Aktivität bzw. Zuckerbindung von OrfY

Wie bereits erwähnt, hat OrfY keinen Einfluss auf die Aktivität der TTX_TreT. Auch OrfY alleine zeigte weder Synthese von Trehalose aus UDPG und Glukose noch den Abbau von Trehalose unter den in 2.5.10.3, 2.5.10.4 und 2.5.10.5 beschriebenen Bedingungen. Da das HTH-Motiv von OrfY Ähnlichkeiten zu Motiven von α -Amylasen aufweist, wurde wie in 2.5.10.1 beschrieben mit p-Nitrophenyl- α -D-Glucopyranosid (pNPG) getestet, ob OrfY die Abspaltung von α -Glukose katalysiert (Kato *et al.*, 2007). Im Test mit OrfY zeigte sich kein Anstieg der Absorption, was bedeutet, dass das Protein unter diesen Bedingungen keine α -1-4-Bindungen hydrolysiert.

Des Weiteren wurden mittels Dünnschichtchromatographie die Bindung bzw. Entstehung möglicher Reaktionsprodukte nach Inkubation von verschiedenen Zuckern mit OrfY untersucht. Dazu wurde OrfY mit Maltose, Trehalose und Glukose (Abbildung 23), bzw. Amycol, Dextrin,

Maltose, Ribose, Arabinose und Xylose (Daten nicht gezeigt) versetzt und bei 80°C für 40 min inkubiert (2.5.10.2).

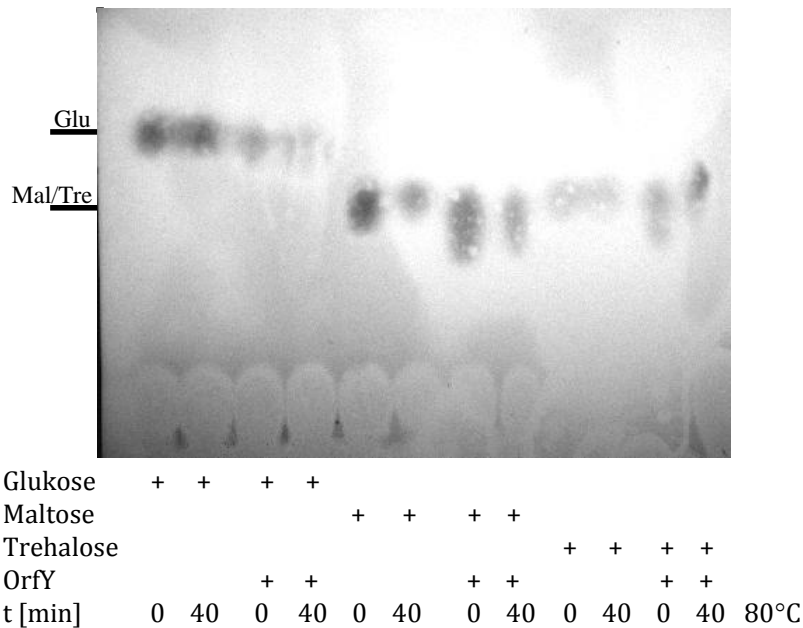


Abbildung 23 Dünnschichtchromatographie verschiedener Zucker nach Inkubation mit OrfY.

Inkubation von 5 µg OrfY mit Glukose, Maltose und Trehalose (je 20 mM). Aufgetragen wurde der Ansatz ohne (40 min auf Eis) und nach 40 min Inkubation bei 80°C. Das + zeigt die Anwesenheit des Zuckers bzw. Proteins. Die Ansätze wurden über DC-Platten (Silicagel G60 Platten, Merck, Laufmittel (50 mL Butan-1-ol, 30 mL Ethanol und 20 mL H₂O (5:3:2 Vol.-%)) analysiert. Die Detektion erfolgte über Besprühen mit 20 Vol.-% H₂SO₄ und Erhitzen für 20 min bei 100°C.

Das unveränderte Signalmuster der Ansätze in der DC im Vergleich zur Kontrolle ohne Protein (Abbildung 23) deutet darauf hin, dass unter den gewählten Bedingungen keine Bindung der Zucker (Maltose, Glukose oder Trehalose (Abb), bzw. Amycol, Dextrin, Ribose, Arabinose und Xylose (Daten nicht gezeigt)) an OrfY erfolgte. Weiterhin scheint keine Spaltung der Zucker vorzuliegen, da keine Veränderung des Laufverhaltens beobachtet wurde.

3.1.2.4.3 Untersuchung der Bindung von DNA an OrfY

Die Struktur von OrfY und deren vergleichende Analyse sowie Sequenzvergleiche sprechen dafür, dass OrfY aus einer duplizierten HTH-Domäne aufgebaut ist, wie sie z.B. in Transkriptionsregulatoren der TetR Familie gefunden werden. Diese Domänen zeigen häufig eine DNA-Bindung an (Kohn *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 2009). Über die Erkennungshelix bindet die DNA sequenzspezifisch an die Aminosäuren. Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass während der Gelfiltrationschromatographie zur Bestimmung der nativen Größe von OrfY, möglicherweise DNA an das Protein gebunden war. Um dies zu testen, wurde OrfY nach Zellaufschluss, anschließender Hitzefällung (80°C, 20 min) und Zentrifugation auf ein Agarose-

Gel aufgetragen (2.4.1.3) und nach Färbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht untersucht (Abbildung 24, RE). Abbildung 24 (RE) zeigt eine große Menge DNA < 2 kbp. Zur Abtrennung der DNA wurde dann wie in 2.5.7.1 beschrieben eine Polyethylenimin Fällung durchgeführt (Abbildung 24). Anschließend wurden Überstand und Pellet über SDS-PAGE untersucht (Daten nicht gezeigt). Dabei zeigte sich OrfY in beiden Fraktionen. Nach der ersten PEI-Fällung enthielten der Überstand und das Pellet noch immer sehr viel DNA (Abbildung 24A (F1) und B), so dass eine zweite PEI-Fällung angeschlossen wurde. Auch hier wurde der Überstand via Agarosegelelektrophorese untersucht (Abbildung 24A, F2) und wies keine Rest-DNA mehr auf. Bei der anschließenden Dialyse zur Entfernung des restlichen PEIs denaturierte das Protein, was möglicherweise auf eine stabilisierende Wirkung der DNA hinweisen könnte.

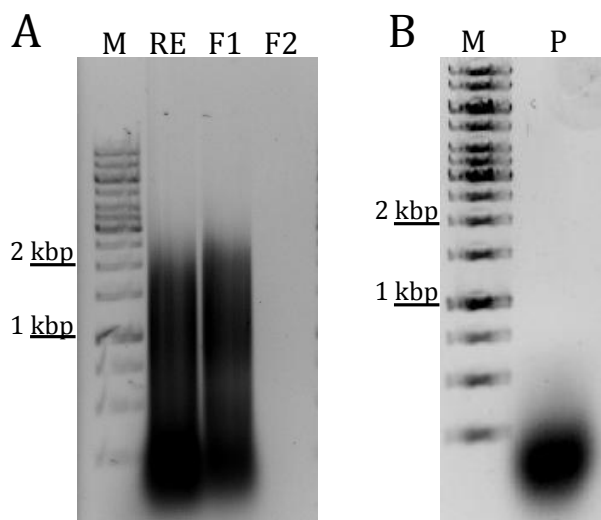


Abbildung 24 Untersuchung der Bindung von OrfY an DNA.

OrfY-Proteinlösung nach Auftrennung über Agarosegelelektrophorese (1 Gew.-%) und Anfärbung mit Ethidiumbromid. Marker (M, Gene Ruler 1 kb DNA-Ladder, Thermo Scientific), zellfreier Extrakt (RE), Überstand nach PEI-Fällung 1 (F1), Überstand nach PEI-Fällung 2 (F2) (A); Marker (M, s.o.), Pellet nach erster PEI-Fällung (P) (B).

Als Alternative zur PEI-Fällung wurde OrfY mit DNaseI behandelt. Der Vorgang wurde bis zu fünfmal wiederholt. Bei dieser Methode wurde nicht die gesamte DNA abgetrennt, was möglicherweise der Grund dafür ist, dass OrfY nach dieser Behandlung weiterhin löslich vorlag und nicht, wie nach der PEI-Fällung, denaturierte. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Bindung von DNA an OrfY stabilisiert.

3.1.2.4.4 Untersuchung der Bindung von DNA an OrfY

Die Bindung des gereinigten OrfY an spezifische DNA-Fragmente wurde in elektrophoretischen Mobilitäts-Shiftassays (EMSAs) untersucht. Dazu wurden zum einen kleine, 25 bp große, mittels Hybridisierung generierte doppelstängige DNA-Fragmente gewählt (2.4.1.12), die den angenommenen Promotor-Bereich (Bre-Site und TATA-Box) von der Position

-165 bis +40 des *orfY* Gens abdecken. Zum anderen wurden 250 bp große DNA-Fragmente via PCR hergestellt (die Plasmide und Primer wurden freundlicherweise von Dr. Theresa Kouril zur Verfügung gestellt), die den Sequenzbereich vor den Genen *treT* (*treTProm*) bzw. *orfY* (*orfYProm*) abdecken, um eine Bindung von OrfY an diese Sequenzen zu untersuchen. Als Negativkontrolle wurde ein interner Genabschnitt des *treT* Gens gewählt.

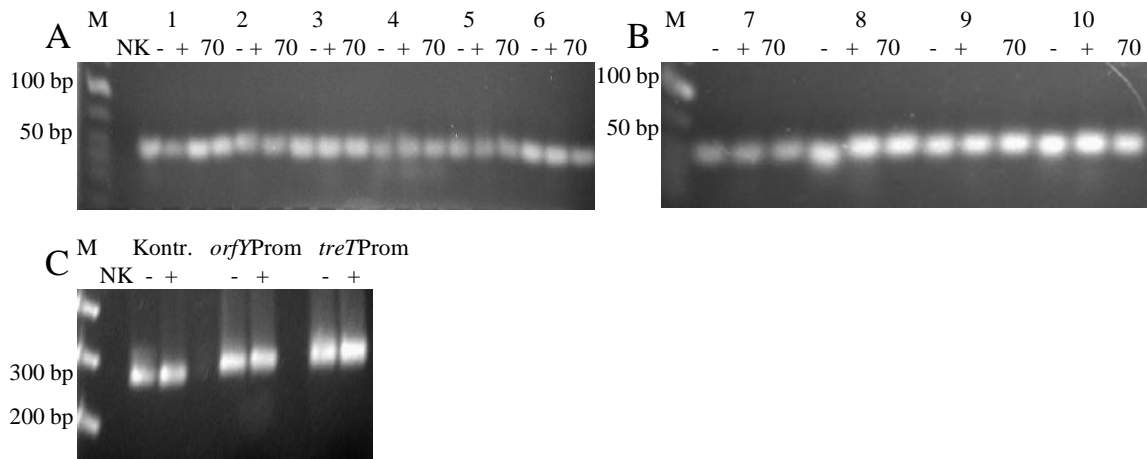


Abbildung 25 Bindung von OrfY an spezifische DNA-Fragmente.

EMSA wurden mit je 400 ng der 25 bp DNA-Proben und 5 µg OrfY (A und B), bzw. 400 ng 250 bp große DNA-Proben mit 5 µg Protein (C) durchgeführt. Auf das 4 Gew.-%ige TBE-Agarosegel der Marker (M, Gen Ruler™ Low Range DNA Ladder, Fermentas), eine Negativkontrolle (ohne DNA; NK) und jeweils Probe (1-10) ohne Protein (-), mit Protein (+) und mit Protein nach Inkubation (1 Stunde, 70°C) aufgetragen (70). Die Proben 1-10 beziehen sich auf die Position der DNA-Fragmente (25 bp), die den Bereich von -165 bis +40 abdecken und dabei 5 bp überlappen, wobei Position 1 die erste Base von *orfY* darstellt (A und B). Auf ein 1 Gew.-% TAE-Agarosegel wurde der Marker (M, Gene Ruler 100 bp DNA Ladder, Fermentas), eine negativ Kontrolle (ohne DNA; NK) und die Proben *treTProm*, *orfYProm* und die Kontrolle ohne Protein (-) und mit Proteine 20 min bei 70°C inkubiert (+) aufgetragen (C).

Die Agarosegele zeigen keine Veränderung im Laufverhalten der jeweiligen DNA-Fragmente nach Inkubation mit OrfY, was entweder daran liegen kann, dass OrfY nicht an die entsprechenden Sequenzen (25 bzw. 250 bp) bindet, oder dass die Bindung von OrfY an die DNA-Fragment nicht die Auftrennung durch das Agarosegel überdauern kann. Des Weiteren ist es möglich, dass noch DNA-Reste an OrfY gebunden waren und daher keine Bindung erfolgen konnte. Experimente zur Entfernung der DNA mit PEI zeigten, dass OrfY ohne jegliche DNA präzipitierte (Nachweis im Agarosegel).

3.2 Der TreT-Weg in *Sulfolobus acidocaldarius* und *S. solfataricus*

Wie bereits in 1.4.2 beschrieben, wurde in *S. acidocaldarius* und *S. solfataricus* ebenfalls die Anwesenheit von TreT und OrfY berichtet (Zaparty, 2011). Die Genorganisation in *S. acidocaldarius* und *S. solfataricus* ähnelt stark der in Abbildung 8 gezeigten Organisation der TTX Gene, wobei kleine Abweichungen in der Größe der Gene vorhanden sind (TTX_orfY 651 bp, Saci_orfY 657 bp, Sso_orfY 657; TTX_treT 1206 bp, Saci_treT 1206 bp, Sso_treT 1254 bp). Auch hier überlappen beide Gene um vier Basenpaare (atga (Start *treT* atg, Stopp *orfY* tga)), was dafür spricht, dass auch in *S. acidocaldarius* und *S. solfataricus* beide Gene ein Operon bilden. Um dies weiter zu untersuchen, wurde eine 500 nt lange antisense-RNA-Sonde gegen Saci_orfY generiert. Die RNA aus *S. acidocaldarius* wurde wie in 2.4.2.2 beschrieben extrahiert, in einem Agarose-Formaldehydgel aufgetrennt (2.4.2.5), mittels Kapillartransfer auf einer Nylonmembran fixiert (2.4.2.6) und mit der antisense-RNA-Sonde hybridisiert (2.4.2.8).

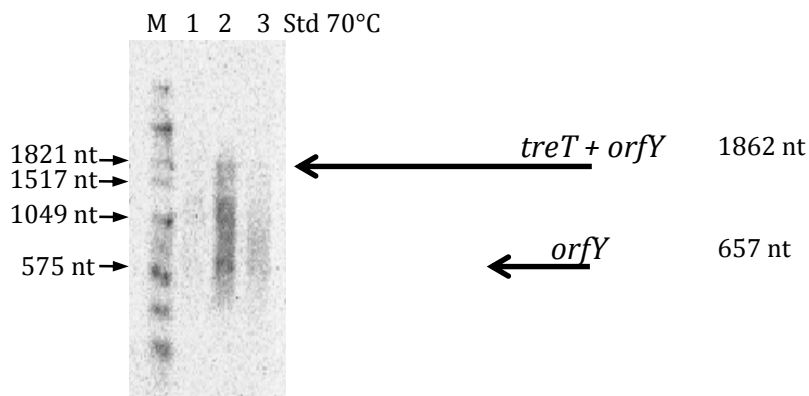


Abbildung 26 Northern-Analyse zur Bestimmung der Genomorganisation und Transkription von *orfY* *S. acidocaldarius* unter Temperaturstress.

5 µg RNA wurde über ein Agarose-Formaldehydgel aufgetrennt, mittels Kapillartransfer auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit einer 500 nt antisense-RNA-Sonde (Position 157 bis 657) gegen das *orfY* Gen hybridisiert. Von links nach rechts wurde aufgetragen: Marker (M, RNA Molecular Weight Marker I, DIG-labeled, Roche), 5 µg RNA nach Inkubation der Zellen bei 70°C für 1, 2, 3 Std (1, 2, 3). Die Größe der Transkripte ist rechts angegeben. Die Detektion erfolgte durch Messung der Chemilumineszenz.

Ohne Inkubation (Daten nicht gezeigt), sowie nach 1 und 3 Stunden Inkubation bei 70°C waren keine bzw. nur schwache Signale zu beobachten. Nur bei den durch Temperatur gestressten Zellen (2 h, 70°C) konnte in Northern-Blot Analysen ein bi-cistronisches Transkript der Größe von *treT* und *orfY* (~1860 nt) nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass beide Gene ein Operon bilden. Eine weitere Bande korreliert mit einem mono-cistronischen Transkript der Größe von *orfY* (~660 nt), wobei das Hintergrundsignal möglicherweise auf unspezifische Bindungen der Sonde hindeutet.

3.2.1 Untersuchung der TreT-Aktivität in *S. acidocaldarius* und *S. solfataricus* Rohextrakten

Da Trehalose oftmals in der Funktion als kompatiblen Solut Zellen vor osmotischem Stress schützt, wurde die TreT-Aktivität in Rohextrakten von *S. acidocaldarius* DSM639 (mit und ohne osmotischen Stress (200 mM NaCl)) und *S. solfataricus* P2 untersucht. Dabei konnte weder die TreT katalysierte Trehalose-Synthese über UDP-Bildung aus UDPG und Glukose, noch der Trehalose-Abbau als Glukose-Bildung aus Trehalose und UDP in diskontinuierlichen Enzym-Tests beobachtet werden. Auch dünn-schichtchromatographisch konnte nach 40 min Inkubation von *S. acidocaldarius* (Abbildung 27A) und *S. solfataricus* (Abbildung 27B) Rohextrakten (1 mg Protein) in Gegenwart von UDPG und Glukose weder unter Normalbedingungen (Spur 3-4) noch in unter osmotischem Stress (200 mM NaCl) angezogenen Zellen (Spur 7-8) Trehalose-Bildung (Trehalose-Standard Spur 2) nachgewiesen werden. Die Dünnschichtchromatogramme zeigen jeweils nur Signale/Banden auf der Höhe von Glukose und UDPG (Standard jeweils in Spur S in A und B). In den Kontrollansätze ohne Glukose in Spur 5, und 6 (Abbildung 27A) und Spur 3, 4, 7 und 8 (Abbildung 27B) und ohne Rohextrakt wurde erwartungsgemäß nur UDPG bzw. UDPG und Glukose aber keine Trehalose detektiert.

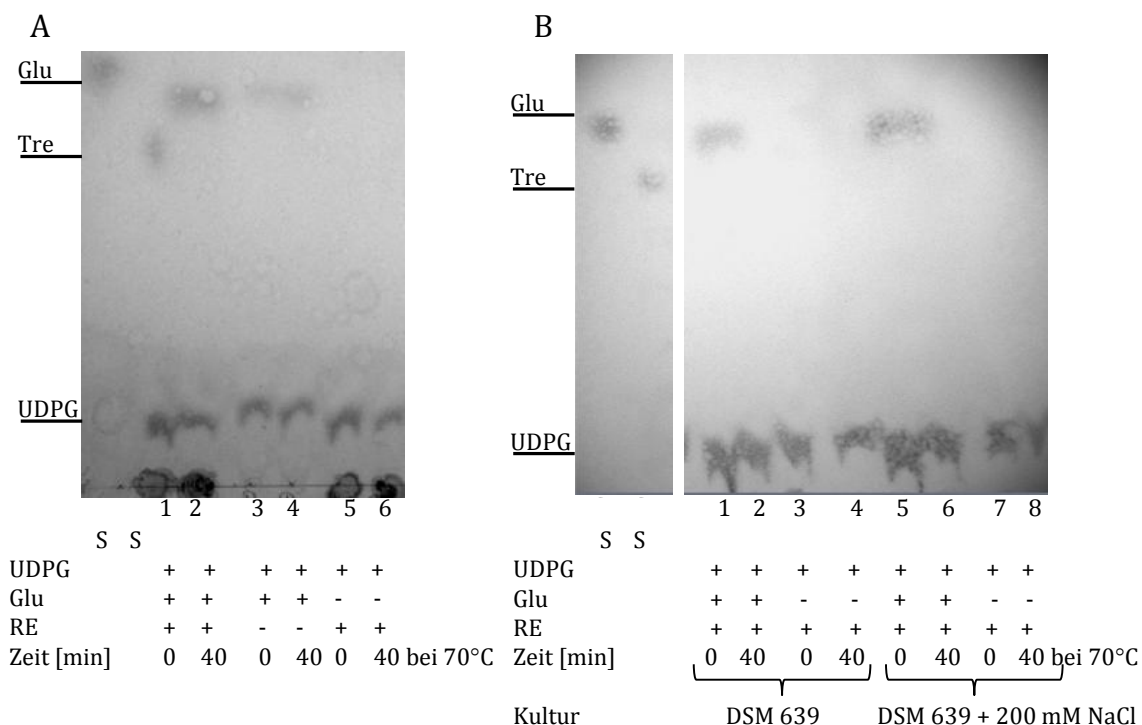


Abbildung 27 Analyse der TreT-Aktivität in *S. solfataricus* und *S. acidocaldarius* Rohextrakten.

1 mg zellfreier Rohextrakt von *S. solfataricus* (A) bzw. *S. acidocaldarius* DSM 639, bzw. *S. acidocaldarius* DSM 639 200 mM NaCl (1 Std inkubiert) (B) wurde mit 50 mM HEPES (pH 7, 70°C), 20 mM MgCl₂, 10 mM UDPG und 10 mM Glu für 40 min bei 70°C inkubiert. Die Standards Trehalose und Glukose, sowie UDPG sind links gezeigt. Die Ansätze wurden über DC-Platten (Silicagel G60 Platten, Merck Laufmittel (50 mL Butan-1-ol, 30 mL Ethanol und 20 mL H₂O (5:3:2 Vol.-%)) analysiert. Die Detektion erfolgte über Besprühen mit 20 Vol.-% H₂SO₄ und Erhitzen für 20 min bei 100°C.

3.2.2 Heterologe Expression von Saci_TreT und Sso_TreT

Die *treT* kodierenden Gene aus *S. acidocaldarius* und *S. solfataricus* wurden jeweils sowohl in den Vektor pET15b, als auch pET11c mit bzw. ohne His-Tag kloniert (*Saci_treT*: Sonja Heldt, Bachelor-Arbeit) und in zwei verschiedenen *E. coli* Stämmen (*E. coli* Rosetta(DE3), *E. coli* Lemo(DE3) für *Saci_treT*, bzw. *E. coli* Rosetta (DE3), BL21(DE3), BL21(DE3) + pRIL für *Sso_treT*) exprimiert. Nach der Expression in *E. coli* Rosetta und folgender SDS-PAGE-Analyse konnte eine Bande der kalkulierten molekularen Masse der *Saci_TreT* ausschließlich in Einschlusskörpern detektiert werden. Auch eine Aufreinigung des evtl. in kleiner Menge in den löslichen Überstand exprimierten Proteins über Ni-TED-Säulen (Macherey und Nagel) führte zu keinem nachweisbaren Produkt. Durch Expression in *E. coli* Lemo(DE3) konnte nach SDS-PAGE in der löslichen Fraktion nach Hitzeinkubation bei 70°C eine schwache Bande der erwarteten Größe nachgewiesen werden, die über eine Ni-TED-Säule angereichert und über Western-Blot mit Anti-His-Antikörper mit anschließender Immunodetektion als His-getaggte, rekombinante *Saci-TreT* identifiziert wurde. Für die anschließenden Enzymmessungen wurde die partiell gereinigte *TreT* mit Ultrafiltration aufkonzentriert und mit Trehalose, bzw. UDPG und Glu inkubiert. Es konnte aber auch mit der rekombinant hergestellten *Saci-TreT* photometrisch weder die Bildung von Glukose aus Trehalose und UDP, noch UDP-Bildung aus UDPG und Glukose und damit weder *TreT*-Aktivität in Richtung des Trehalose-Abbaus noch der Trehalose-Synthese gemessen werden.

Die *Sso_TreT* lag nach der Expression in allen drei Stämmen ausschließlich in unlöslichen Einschlusskörpern vor.

3.2.3 Interaktionsuntersuchung von *TreT* und *OrfY* mittels „Yeast two Hybrid“

Auch *TreT* und *OrfY* von *S. acidocaldarius* und *S. solfataricus* wurden mittels „Yeast two-Hybrid“-Analyse auf Protein-Protein-Interaktion hin untersucht (2.4.3). Dazu wurden wie in 2.4.3 beschrieben die Gene *orfY* und *treT* aus *S. solfataricus* und *S. acidocaldarius* in die Vektoren pGADT7, bzw. pGBKT7 kloniert, *S. cerevisiae* je mit beiden Plasmiden transformiert und mittels Interaktionsplatten untersucht (2.4.3). Dabei dienten *treT* und *orfY* aus *T. tenax* sowie *rpok* und *tfb3* als Positivkontrollen. Außerdem wurde die Kreuzinteraktion *OrfY* aus *S. acidocaldarius* und *S. solfataricus* mit der *TreT* aus *T. tenax* analysiert. Eine Interaktion konnte wie in Abbildung 28 dargestellt weder zwischen *Sso_TreT* und *Sso_OrfY*, noch zwischen *Saci_TreT* und *Saci_OrfY* beobachtet werden. Auch eine Kreuzinteraktion zwischen den beiden Sulfolobus Stämmen (also *Saci_TreT* mit *Sso_OrfY* und umgekehrt) konnte nicht gezeigt werden. Dagegen zeigten die *TTX_TreT* und *Sso_OrfY* eine Interaktion.

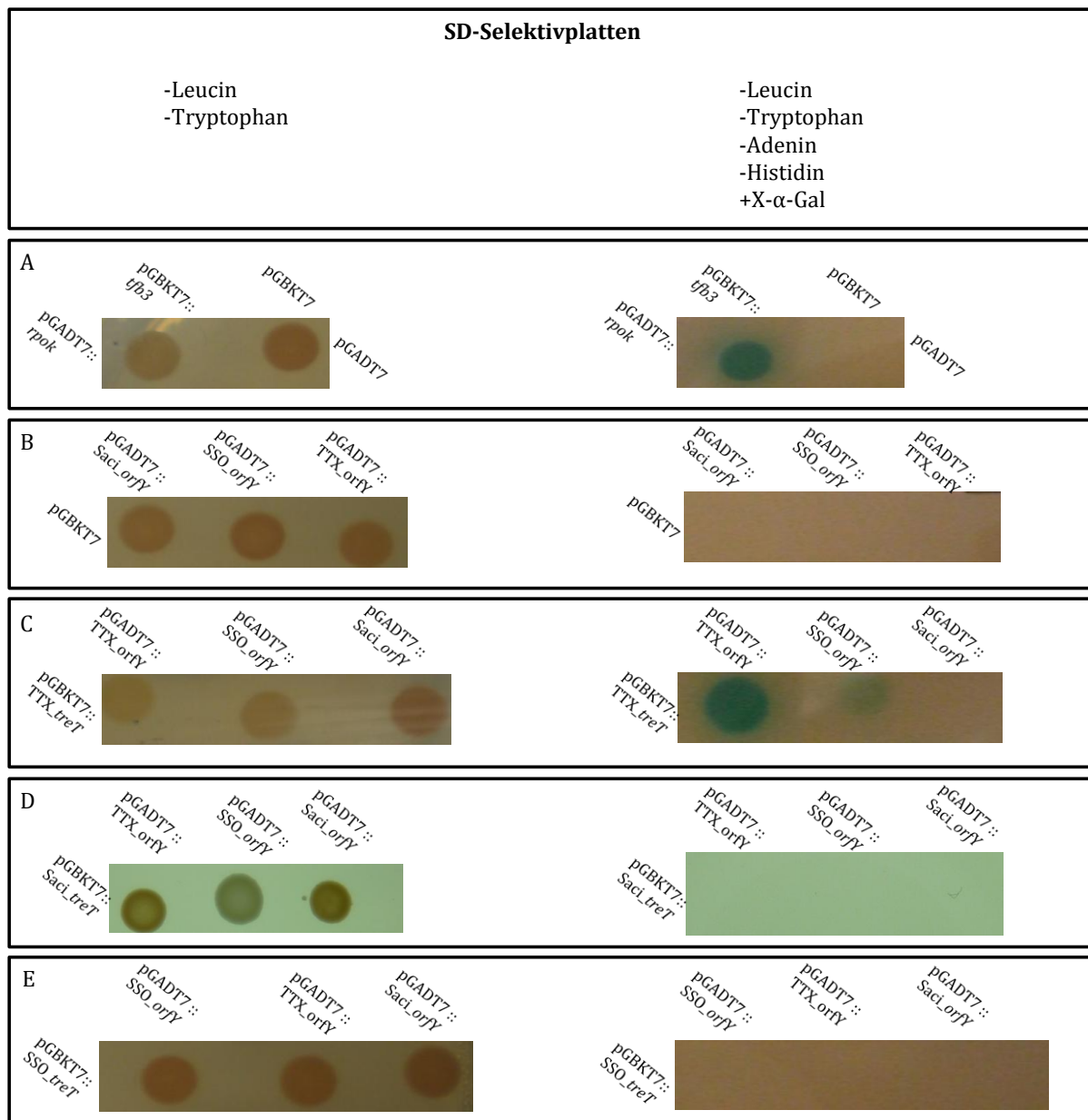


Abbildung 28 Protein-Protein-Interaktion von TreT und OrfY aus *T. tenax*, *S. acidocaldarius* und *S. solfataricus* untersucht im „Yeast two-Hybrid“-System.

S. cerevisiae wurde mit pGBKT7::*tfb3* und pGADT7::*rpok* als Positivkontrolle (freundlicherweise von Prof. Dr. M. White zur Verfügung gestellt (St. Andrews)) und den leeren Vektoren pGADT7 und pGBKT7 als negativ Kontrolle (A), pGBKT7 und pGADT7::*TTX_orfY*, pGADT7::*Saci_orfY* oder pGADT7::*Sso_orfY* (B), pGBKT7::*TTX_treT* und pGADT7::*TTX_orfY*, pGADT7::*Saci_orfY* oder pGADT7::*Sso_orfY* (C), pGBKT7::*Saci_treT* und pGADT7::*TTX_orfY*, pGADT7::*Saci_orfY*, oder pGADT7::*Sso_orfY* (D) und pGBKT7::*Sso_treT* und pGADT7::*TTX_orfY*, pGADT7::*Saci_orfY*, oder pGADT7::*Sso_orfY* (E) transformiert. Links sind die SD-Medium-Platten ohne Leucin und ohne Tryptophan, rechts die SD-Medium-Platten ohne Histidin, Tryptophan, Adenin und Leucin, aber mit X- α -Gal gezeigt.

3.2.4 Konstruktion und Analyse von verschiedenen *S. acidocaldarius* Deletionsmutanten

Durch Konstruktion von verschiedenen Deletionsmutanten (MW001 Δ orfY, MW001 Δ treT (Dr. Benjamin H. Mayer, MPI Marburg) MW001 Δ treY, MW001 Δ orfY Δ treT, MW001 Δ orfY Δ treY, MW001 Δ treT Δ treY und MW001 Δ treY Δ orfY Δ treT) und Wachstumsversuche sollte die Funktion bzw. die Bedeutung der beiden Trehalose-Synthese-Weg TreT/OrfY und TreY/TreZ in *S. acidocaldarius* aufgeklärt werden. Der Wachstumsphänotyp der Mutanten wurde unter Normalbedingungen und unter verschiedenen Stressbedingungen (osmotischer Stress bei 250 mM KCl bzw. 300 mM NaCl und Temperaturstress bei 83°C) vergleichend zum Wildtyp untersucht. Die Deletion von *treY* als erstes Enzym (TreY) des TreY/TreZ-Weges sollte dabei zu einer vollständigen Inaktivierung dieses Wegs führen und damit die Deletion die Bildung von Trehalose aus Glykogen unterbunden werden. Die Triplemutante MW001 Δ treY Δ orfY Δ treT, in der beide Trehalose-Synthese-Wege nicht mehr funktionell sein sollten, sollte zeigen, ob die Trehalose-Synthese generell unter den gewählten Bedingungen essentiell für das Wachstum der Zellen ist. Zusammen mit den für die Tripelmutante erzielten Ergebnissen sollten die Doppelmutanten (MW001 Δ orfY Δ treY, MW001 Δ treT Δ treY und MW001 Δ orfY Δ treY) unter Berücksichtigung der Einfachmutanten (MW001 Δ orfY und MW001 Δ treT) Aufschluss über die Bedeutung des TreT-Weges insgesamt und über die Funktion von TreT und OrfY im TreT-Weg geben. Anhand der MW001 Δ treY Einfachmutante in Verbindung mit der Triplemutante sollte die Bedeutung des TreY/TreZ-Weges für das Wachstum unter Normal- bzw. Stressbedingungen untersucht werden.

Die Mutanten bzw. der Wildtyp wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 – 1,2 unter Normalbedingungen vorkultiviert und anschließend in Brock-Medium (+ 0,1 Gew.-% NZ-Amin, 0,2 Gew.-% Dextrin, 10 mg/ml Uracil) zu einer Anfangs-OD₆₀₀ von 0,01 überimpft. Die Inkubation erfolgte unter aeroben Bedingungen in speziellen Langhalskolben, zur Vermeidung von großen Flüssigkeitsverlusten durch Evaporation.

Dabei wurden die Zellen den jeweiligen Stressoren (osmotischer Stress beider 250 mM KCl, bzw. 300 mM NaCl, Temperaturstress bei 83°C) entweder von Anfang an (initial) oder erst in der exponentiellen Phase ab einer OD₆₀₀ von 0,3 - 0,5 (exponentielle-Phase) ausgesetzt, um zusätzlich auch eine evtl. Abhängigkeit der Stressantwort von der Wachstumsphase zu erfassen. Die gewählten Salzkonzentrationen ergaben sich nach Vorversuchen mit MW001. Bei diesen Konzentrationen kann der Wildtyp (MW001) noch ohne Beeinträchtigung wachsen. Das Wachstum von Deletions-Mutanten und Wildtyp-Stamm MW001 als Kontrolle wurde unter den jeweiligen Stressbedingungen vergleichend zu Normalbedingungen (76°C, Brock-Medium (+ 0,1 Gew.-% NZ-Amin, 0,2 Gew.-% Dextrin, 10 mg/ml Uracil)) durchgeführt.

Abbildung 29A zeigt, dass kein Wachstumsunterschied zwischen den Mutanten und dem Wildtyp MW001 unter Standardbedingungen besteht. Alle acht Kurven verlaufen gleich.

Die Triple-Mutante zeigt unter osmotischem Stress (NaCl und KCl) sowohl von Anfang an als auch ab der exponentiellen Phase im Vergleich zum Wildtyp stark eingeschränktes bzw. gar kein Wachstum. Auch die Doppelmutanten (MW001 Δ orfY Δ treY, MW001 Δ treT Δ treY und MW001 Δ orfY Δ treY) zeigten bei initial zugegebenen 300 mM NaCl ebenso kein Wachstum mehr wie auch die MW001 Δ treT und MW001 Δ orfY Einfachmutanten. Einzig die TreY-Einfachmutante kann unter diesen Bedingungen im Vergleich zum Wildtyp, allerdings etwas verzögert (rund 24 Stunden), wachsen.

Osmotischer Stress mit NaCl-Zugabe in der exponentiellen Phase bewirkte beim Wildtyp zunächst eine Wachstumsinhibierung. Nach einer Adaptationsphase von 10-20 h wuchsen die Zellen dann allerdings mit verminderter Rate weiter. In Übereinstimmung mit den Versuchen unter initialer NaCl-Zugabe zeigten neben der Triplemutante auch die MW001 Δ orfY Δ treY Doppelmutanten im Vergleich zum Wildtyp starke Wachstumsinhibierung bei der Applikation von osmotischem Stress (300 mM NaCl) in der exponentiellen Phase. Die *treT* und *orfY* Einzelmutanten und die *treT/orfY* Doppelmutante zeigen dagegen unter letzteren Bedingungen weniger oder kein eingeschränktes Wachstum während die *treY* Mutante im Gegensatz zum initialen Salzstress nahezu vollständig inhibiert wird. Diese Unterschiede im Wachstumsphänotyp abhängig davon, wann der osmotische Stress appliziert wird, könnten auf eine wachstumsphasenabhängige Regulation der Expression der Gene zurückzuführen sein. Beispielsweise könnten TreT/OrfY in der frühen stationären Phase aus der die Experimente angeimpft wurden, oder in der lag-Phase kurz nach Überimpfen exprimiert werden, und nach dem Überimpfen auf 300 mM NaCl enthaltendes Medium die Terhalose-Synthese in der *treY* Mutante übernehmen, die dadurch dann anwachsen kann. Demgegenüber könnten TreT/OrfY in der exponentiellen Phase reprimiert sein, wodurch das Wachstum der *treY* Einzelmutante stark eingeschränkt wird, weil TreT/OrfY die TreY-Aktivität nicht mehr ersetzen können. Umgekehrt kann so auch das gute Wachstum der MW001 Δ treT Mutante erklärt werden, die unter später Applikation des Salzstress wildtypähnlich wächst durch initialen Salzstress aber nahezu vollständig inhibiert wird. Allerdings kann das nahezu Wildtyp-ähnliche Wachstum der MW001 Δ treT Δ treY Doppelmutante damit nicht erklärt werden, da die MW001 Δ treY Einzelmutante völlig inhibiert wird, was auf ein Artefakt hinweisen würde.

Die Effekte von 250 mM KCl auf das Wachstum sind im Vergleich zu 300 mM NaCl wesentlich weniger ausgeprägt (Abbildung 29 D und E). Bis auf die MW001 Δ treT Einzelmutante, zeigten alle Mutanten eine leichte Inhibierung des Wachstums und bei initialem oder ab der exponentiellen Phase appliziertem Stress, wobei die Triplemutante am stärksten eingeschränkt schien. Diese zeigt eine Wachstumsverzögerung unter initialem Stress von rund 30 Stunden. Der stärkere Effekt den die MW001 Δ orfY Mutante im Vergleich zur MW001 Δ treT Mutante könnte evtl. auf eine regulatorische Bedeutung von OrfY hinweisen. Eine interessante Beobachtung, da

dem Protein durch Enzymmessungen bislang keine enzymatische Funktion im TreT-Weg zugeordnet werden konnte.

Bei Temperaturstress zeigen die Mutanten im Vergleich zum Wildtyp allenfalls untergeordnete Effekte.

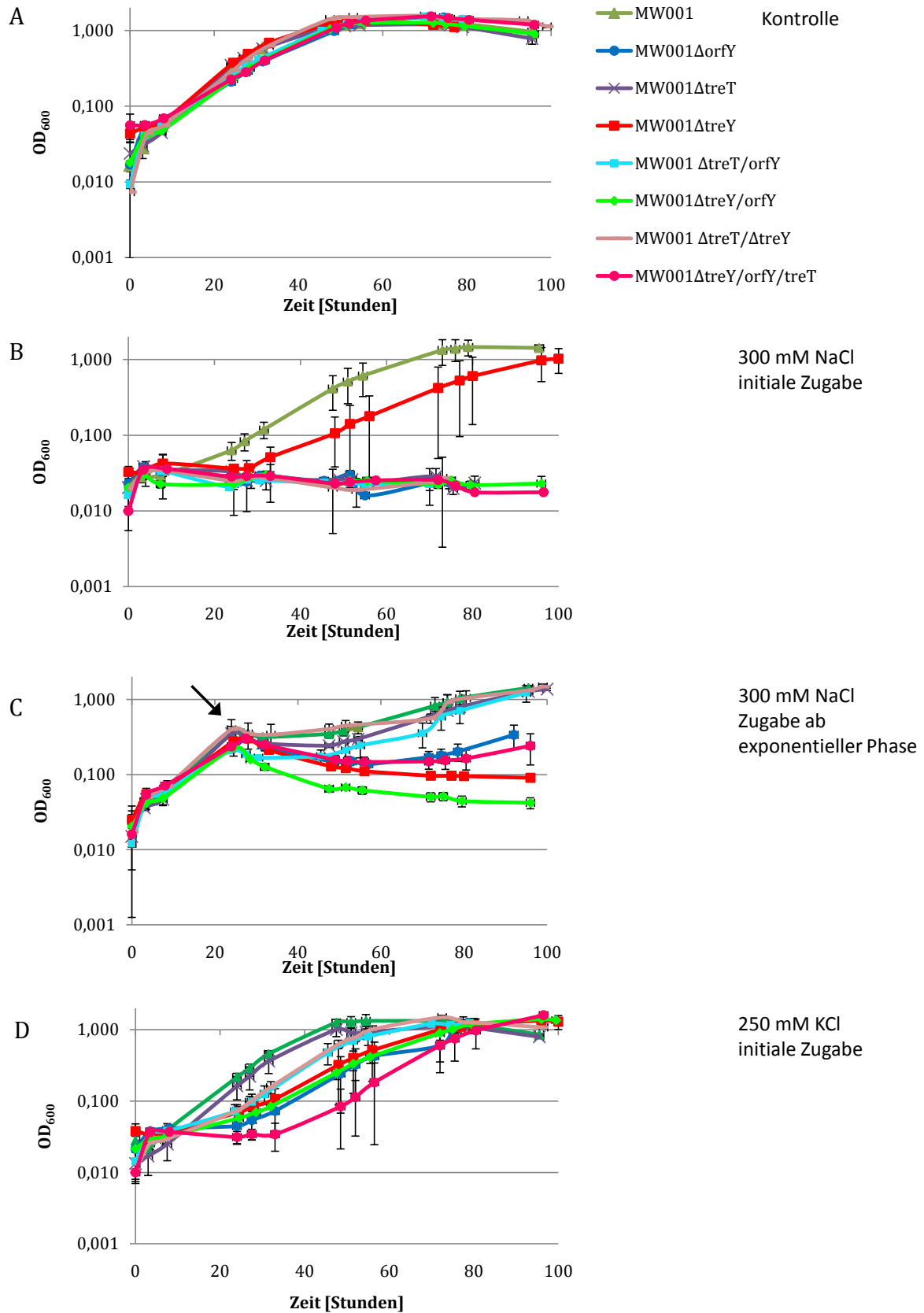
Tabelle 12 Wachstum des Kontrollstammes MW001 und verschiedener Deletionsmutanten in Abhängigkeit von osmotischem und Temperatur-Stress.

Das Wachstum des Kontrollstammes MW001 wurde als normales Wachstum angesehen (+++), vermindertes Wachstum wurde mit (++) bezeichnet, geringes oder verspätetes Wachstum mit (+) und kein Wachstum oder Absterben mit (-) bezeichnet. Aufgelistet wurde das Wachstum von MW001 und den Mutanten MW001 Δ orfY, MW001 Δ treT, MW001 Δ treY, MW001 Δ orfY Δ treT, MW001 Δ orfY Δ treY, MW001 Δ treT Δ treY und MW001 Δ treY Δ orfY Δ treT jeweils unter Standardbedingungen (Brock Medium, 0,1 Gew.-% NZ-Amin, 0,2 Gew.-% Dextrin, 10 mg/mL Uracil), mit osmotischem Stress durch initiale Zugabe von NaCl, bzw. KCl (initial) oder durch Zugabe von NaCl, bzw. KCl in der exponentiellen Phase (log) und unter Temperaturstress durch Wachstum bei 83°C von Beginn an (initial) oder ab der exponentiellen Phase (log); n=3

Stamm	Kontrolle	300 mM	300 mM	250 mM	250 mM	83°C	83°C
		NaCl initial	NaCl log	KCl initial	KCl log		
MW001	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MW001 Δ orfY	+++	-	+	++	++	+++	+++
MW001 Δ treT	+++	-	++	+++	+++	+++	+++
MW001 Δ treY	+++	++	-	++	++	+++	+++
MW001 Δ orfY Δ treT	+++	-	++	++	++	++	++
MW001 Δ orfY Δ treY	+++	-	-	++	++	++	+++
MW001 Δ treT Δ treY	+++	-	+++	++	++	+++	++
MW001 Δ treY Δ orfY Δ treT	+++	-	+	+	++	+++	+++

Zusammenfassend sprechen diese Ergebnisse dafür, dass die Trehalose-Synthese in *S. acidocaldarius* bei der Stressantwort eine Rolle spielt. Mutationen in den Trehalose-Synthesewegen rufen nur unter Stressbedingungen einen veränderten Phänotypen hervor. Unter Standardbedingungen kann kein vom Wildtyp abweichendes Wachstum der Mutanten beobachtet werden. Die Trehalose-Synthese ist dabei vor allem bei der Antwort auf osmotischem Stress von Bedeutung, während das annähernd uneingeschränkte Wachstum bei moderatem Temperaturstress eine untergeordnete Rolle von Trehalose bei der Antwort auf suboptimal erhöhte Wachstumstemperaturen hinweist. Die Ergebnisse deuten weiter darauf hin, dass die beiden Trehalose-Synthesewege in Abhängigkeit von der Wachstumsphase reguliert sein könnten. Da die Einzelmутanten MW001 Δ treT und MW001 Δ orfY sowie die Doppelmutante ähnliche Phänotypen zeigen, deutet zudem darauf hin, dass sowohl TreT als

auch OrfY, obwohl letzterem keine enzymatische Funktion zugeordnet werden konnte (s.o.), für einen funktionellen TreT-Weg in *S. acidocaldarius* essentiell sind.



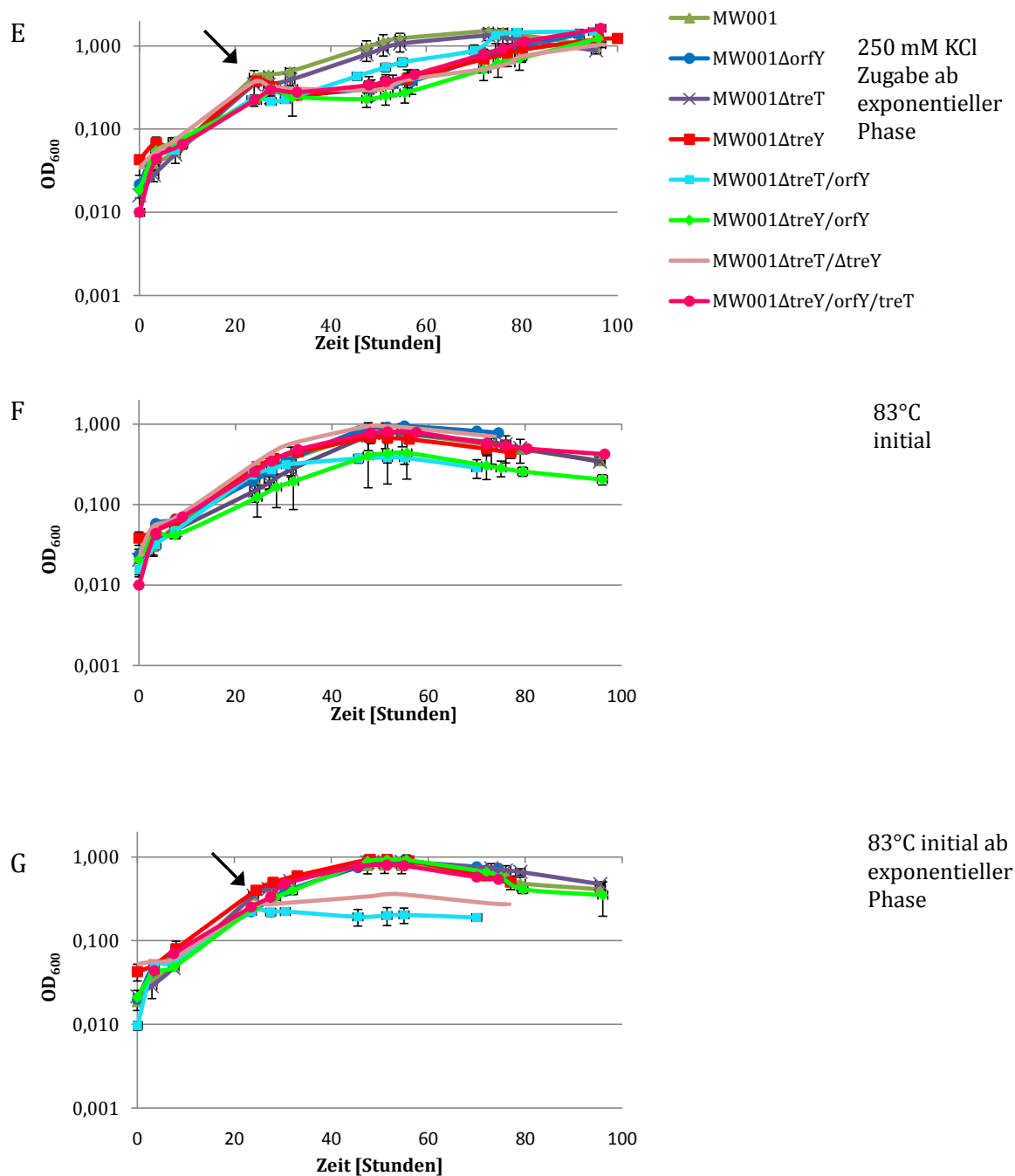


Abbildung 29 Wachstumskurven der verschiedenen *S. acidocaldarius* Deletionsmutanten und des Kontrollstamms unter verschiedenen Stressbedingungen.

Kontrolle (76°C) (A), 300 mM NaCl von Beginn an (B), 300 mM NaCl ab einer OD_{600} von 0,3 – 0,5 (C), 250 mM KCl von Beginn an (D), 250 mM KCl ab einer OD_{600} von 0,3 – 0,5 (E), 83°C von Beginn an (F), 83°C ab einer OD_{600} von 0,3 – 0,5 (G). Der Kontrollstamm MW001 (dunkelgrünes Dreieck) und die verschiedenen Mutanten MW001 Δ orfY (blauer Kreis), MW001 Δ treT (violettetes Kreuz), MW001 Δ treY (rotes Quadrat), MW001 Δ orfY Δ treT (hellblaues Rechteck), MW001 Δ orfY Δ treY (hellgrüne Raute), MW001 Δ treT Δ treY (rosa Strich) und MW001 Δ treY Δ orfY Δ treT (pinker Kreis) sind gezeigt. Die Pfeile deuten auf die Zugabe von Salz, bzw. die Temperaturerhöhung hin; n=3

3.2.5 Untersuchung der Deletionsmutante *S. solfataricus* PBL2025 Δ *treT*

Die *TreT*-Deletionsmutante von *S. solfataricus* PBL2025 wurde von Dr. S. V. Albers und Dr. J. Reimann (MPI Marburg) zur Verfügung gestellt. Die Wachstumsversuche wurden von Sonja Heldt während ihrer Bachelorarbeit durchgeführt. Dazu wurden Wildtyp (*S. solfataricus* PBL2025) und Mutante *S. solfataricus* PBL2025 Δ *treT* jeweils unter denselben Wachstumsbedingungen untersucht. Unter Standardbedingungen (Brock-Medium +0,4 Gew.-% Glukose, 0,1 Gew.-% Trypton, pH 3, 78°C) zeigten Wildtyp und Mutante den gleichen Phänotyp. Beide Kulturen wuchsen über ca. 70 Std. bis zu einer OD₆₀₀ von 1,9. Um den Einfluss von *TreT* unter osmotischem Stress auf das Wachstum der Zellen zu untersuchen, wurden dem Medium zusätzlich verschiedene Konzentrationen von NaCl zugegeben (Konzentrationen von 100, 150, 200, 250, 270, 300, 320, 350, 400, 450, 600, 650 und 700 mM wurden getestet). Der Wildtyp zeigte mit zunehmender NaCl Konzentration abnehmende Wachstumsraten. Die Mutante zeigte bis zu einer NaCl-Konzentration von 600 mM keinen abweichenden Wachstumsphänotyp (am Beispiel 200 mM NaCl dargestellt (Abbildung 30B)). Erst ab einer Konzentration von 650 mM NaCl zeigte die *treT* Mutante im Vergleich zum Wildtyp vermindertes Wachstum und ab 700 mM vollständige Inhibierung, während der Wildtyp nach 16 Tagen einer OD₆₀₀ von ca. 0,8 erreichte. Die Stämme wurden weiterhin in Abhängigkeit vom Temperatur-Stress untersucht. Dazu wurden sie in Standard-Brock-Medium (Brock-Medium (+0,4 Gew.-% Glukose, 0,1 Gew.-% Trypton, pH3)) bei 60°C (Kälte-Schock), bzw. 85°C (Hitze-Schock) inkubiert. Bei 60°C konnte kein Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante beobachtet werden (Abbildung 30D), wohingegen die Deletion von *treT* bei 85°C zu einem unwesentlich geringeren Wachstum führt (Abbildung 30 E).

Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse dafür, dass auch in *S. solfataricus* der *Tre/OrfY*-Weg eine Rolle bei der Stressantwort (besonders auf osmotischem Stress) spielt. Im Gegensatz zu *S. acidocaldarius* wurde hier beobachtet, dass die Deletion von *treT* auch unter einer erhöhten Wachstumstemperatur zu einer leichten Inhibition des Wachstums führte. Dieser Weg könnte in *S. solfataricus* also auch für die Thermoadaptation von Bedeutung sein.

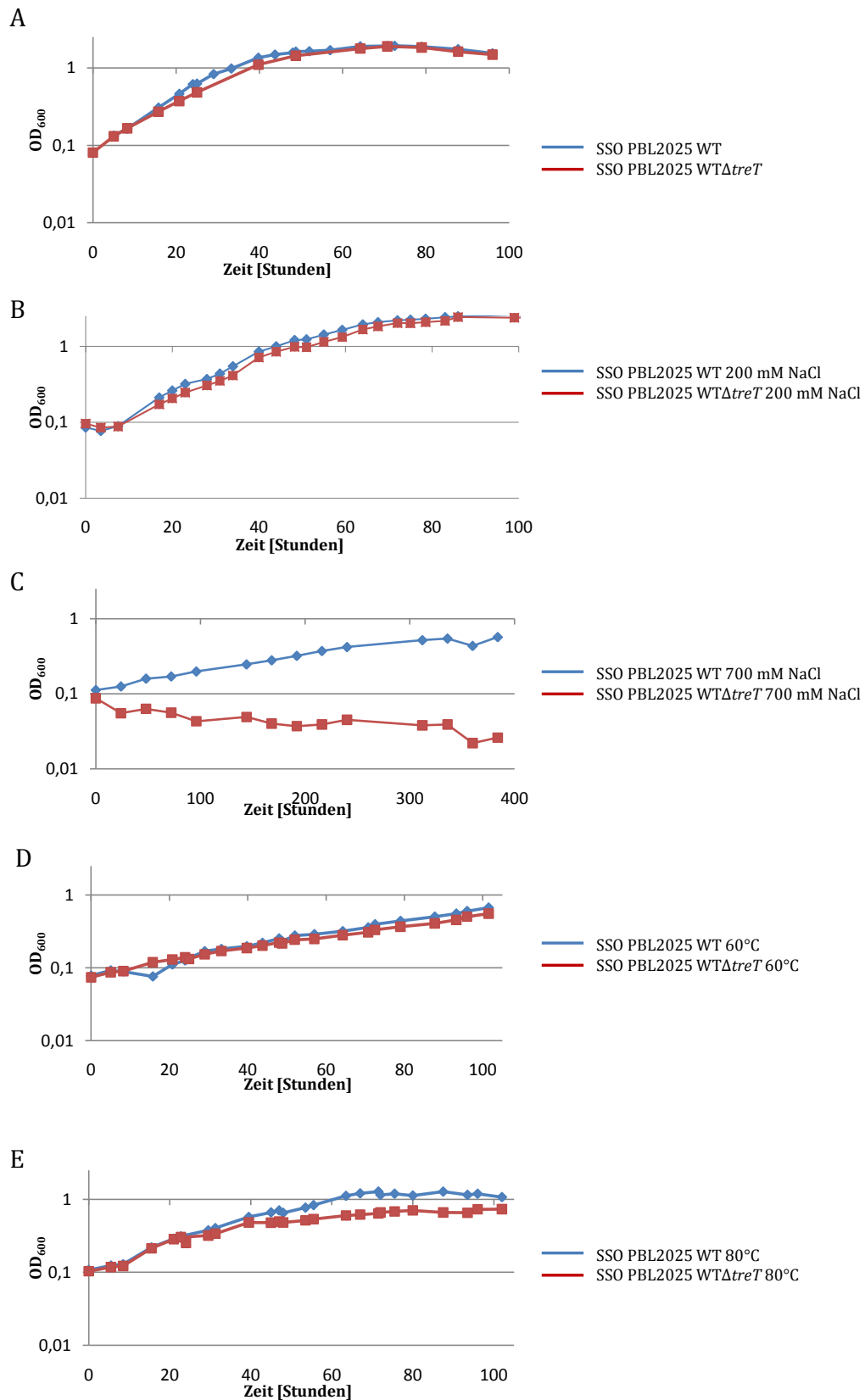


Abbildung 30 Wachstumskurven von *S. solfataricus* 2025 WT und *S. solfataricus* 2025Δ*treT* unter verschiedenen Stressbedingungen.

Die Zellen wurden in Brock-Medium (+0,4 Gew.-% Glukose, 0,1 Gew.-% Trypton, pH3) gezogen. Kontrollzellen 78°C (A) 78°C, 200 mM NaCl (B), 78°C, 700 mM NaCl (C), 60°C (D), 85°C (E).

KAPITEL 4

DISKUSSION

Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Trehalose-Metabolismus in den drei Crenarchaeota *Thermoproteus tenax* Kra1, *Sulfolobus solfataricus* P2 und *S. acidocaldarius* DSM639 untersucht. Der in *T. tenax* identifizierte TPSP-Weg mit dem bifunktionalen Fusionsprotein Trehalose-6-Phosphat Synthase / Phosphatase TPSP und der aktivierenden Glykosyltransferase GT konnte als der erste, Trehalose-bildende Proteinkomplex in Prokaryoten beschrieben werden.

Der Trehalose Glykosyl transferierende Synthase-Weg (TreT-Weg) mit OrfY wurde sowohl in *T. tenax*, wie auch in den beiden Sulfolobus Stämmen *S. solfataricus* P2 und *S. acidocaldarius* DSM639 identifiziert (Kouril *et al.*, 2008; Siebers & Schönheit, 2005; Siebers *et al.*, 2004; Siebers *et al.*, 2011; M. Zaparty & Siebers, 2011). Mittels biochemischer, wie auch molekularbiologischer Methoden konnte zum einen gezeigt werden, dass der TreT-Weg in *T. tenax* unidirektional und zum anderen, dass er essentiell für die Stressantwort in den beiden Sulfolobus Stämmen ist. Zudem sprechen die Ergebnisse mit Deletionsstämmen aus Sulfolobus dafür, dass beide, OrfY und TreT, essentiell für die Funktion des TreT-Weges sind. Bioinformatische, kristallographische (Prof. A. Lupas, Dr. J. Martin, Dr. K. Zeth (MPI Tübingen)) und biochemische/molekularbiologische Analysen deuten zudem darauf hin, dass OrfY bedingt durch das identifizierte duplizierte HTH-Motiv in die Bindung von DNA involviert sein könnte.

Trehalose wurde in den zwei, im Rahmen dieser Arbeit untersuchten, Organismen *Thermoproteus tenax* Kra1 und *Sulfolobus solfataricus* P2 nachgewiesen. Dabei erreichte die intrazelluläre Trehalose-Konzentration bei *T. tenax* 0,3 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ Protein und bei *S. solfataricus* 0,12 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ Protein (Martins *et al.*, 1997). Die nahe Verwandtschaft von *S. solfataricus* und *S. acidocaldarius* sowie die Ähnlichkeiten im Trehalose-Metabolismus, einschließlich der beteiligten Enzyme, deuten darauf hin, dass Trehalose auch in *S. acidocaldarius* als Osmolyt vorkommt. Für eine Funktion als Osmolyt *T. tenax* und weniger als Speicherstoff spricht, dass *T. tenax* nicht auf Trehalose wachsen kann (Melanie Zaparty, 2007). Der Organismus nimmt den Zucker weder aus der Umwelt auf, noch konnte der Abbau von Trehalose durch *T. tenax* Rohextrakt nachgewiesen werden (Melanie Zaparty, 2007). Außerdem wurde gezeigt, dass das Crenarchaeon Glykogen als Kohlenstoffspeicher nutzt (König, Skorko *et al.*, 1982). Auch *S. solfataricus* zeigt nur ein geringes und *S. acidocaldarius* sogar keinerlei Wachstum auf Trehalose (Grogan, 1989) und in beiden Organismen konnte gezeigt werden, dass Glykogen als Kohlenstoffspeicher intrazellulär angereichert wird (König, Skorko *et al.*, 1982).

In allen drei untersuchten Organismen wurden je zwei Wege zur Trehalose-Synthese identifiziert. Im Genom von *T. tenax* wurden der TPSP- und der TreT-Weg identifiziert (Kouril *et al.*, 2008; Siebers & Schönheit, 2005; Siebers *et al.*, 2004; Siebers *et al.*, 2011), während in beiden

Sulfolobus Spezies sowohl die für den TreY/TreZ-Weg (Lama *et al.*, 1990; Martins *et al.*, 1997; Maruta *et al.*, 1996) sowie auch die für die Proteine TreT und OrfY kodierenden Gene identifiziert wurden (M. Zaparty & Siebers, 2011). Knapp die Hälfte (49 von 122) aller bisher sequenzierten archaealen Genome weisen Gene auf, die für Proteine kodieren, welche mit dem Trehalose-Metabolismus verbunden sind (Tabelle 13). 18 dieser 49 Spezies besitzen dabei Homologe, die für Proteine aus zwei verschiedenen Trehalose-Metabolismus-Wegen kodieren. Dabei treten bestimmte Kombinationen der Wege vermehrt auf, wie z.B. TreT-Weg mit OrfY in Kombination mit dem TreY/TreZ-Weg (Tabelle 13) oder TPSP-Weg zusammen mit dem TreT/OrfY-Weg (Tabelle 13). Dies unterstreicht die große Bedeutung von Trehalose auch in der Domäne der Archaea. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Sequenzanalysen ergaben eine distinkte Verteilung der Trehalose-Synthese-Wege innerhalb der Archaea. Der TreS-Weg sowie der TreT-Weg ohne *orfY* werden von den Euryarchaeota bevorzugt, wobei die untersuchten Thermococcales ausschließlich den TreT-Weg ohne OrfY aufweisen. Auch der TPS/TPP-Weg mit abgetrennten TPS- und TPP-Proteinen konnte nur in Euryarchaeota (z.B. in Thermoplasmatales, Halobacteriales und Methanobacteriales) gefunden werden (Tabelle 13), wohingegen die Crenarchaeota Kombinationen aus dem TPSP-Weg (fusionierte TPSP) und dem TreT-Weg mit *orfY* bzw. dem TreY/TreZ-Weg mit TreT/OrfY präferieren. In den Crenarchaeota zeigten sich zudem deutliche Unterschiede zwischen der Ordnung Thermoproteales, in der hauptsächlich der TPSP- und TreT-Weg mit *orfY* gefunden wird, und der Ordnung der Sulfolobales, bei denen zum größten Teil der TreT-Weg mit *orfY* und der TreY/TreZ-Weg identifiziert wurde (Tabelle 13).

Methanobateriales	<i>Methanobacterium</i> sp. SWAN-1
	<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i> str. Delta H
	<i>Methanothermobacter marburgensis</i> str. Marburg

√	√										
	√										
	√										

Methanosarcinales	<i>Methanosarcina acetivorans</i> C2A
	<i>Methanosarcina barkeri</i> str. Fusaro
	<i>Methanosaeta thermophila</i> PT

							√		√		
									√		
		√			√	√					

Archaeoglobales	<i>Archaeoglobus profundus</i> DSM 5631
-----------------	---

		√									
--	--	---	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Methanomicrobiales	<i>Methanoculleus marisnigri</i> JR1
	<i>Methanoculleus bourgensis</i> MS2

		√			√						
		√									

Thermococcales	<i>Pyrococcus horikoshii</i> OT3
	<i>Thermococcus barophilus</i> MP
	<i>Thermococcus sibiricus</i> MM 739,
	<i>Pyrococcus furiosus</i> DSM 3638,
	<i>Thermococcus litoralis</i>

					√ ₃						
					√						
					√ ₄						
					√ ₅						
					√ ₆						

B) Phylum Crenarchaeota

Ordnung	Art
Thermoproteales	<i>Thermoproteus tenax</i> Kra1
	<i>Thermoproteus uzoniensis</i> 768-20
	<i>Pyrobaculum neutrophilum</i> V24Sta
	<i>Pyrobaculum aerophilum</i> str. IM2
	<i>Pyrobaculum calidifontis</i> JCM 11548
	<i>Pyrobaculum</i> sp. 1860
	<i>Pyrobaculum arsenaticum</i> DSM 13514
	<i>Pyrobaculum oguniense</i> TE7
	<i>Pyrobaculum islandicum</i> DSM 4184
	<i>Thermogladius cellulolyticus</i> 1633

TPP	TPS	TPSP	GT	MSC	TreT	OrfY	TreS	TreP	TreX	TreY	TreZ
		√ ₇	√ ₇	√ ₇	√ ₈	√ ₈					
		√	√	√							
		√	√	√							
		√	√	√	√	√					
		√	√	√	√	√					
		√	√	√							
		√	√	√	√	√					
		√	√	√							√
			√	√							

	<i>Vulcanisaeta distributa</i> DSM 14429
	<i>Vulcanisaeta moutnovskia</i> 768-28
	<i>Desulfurococcus fermentans</i> DSM 16532
	<i>Thermofilum pendens</i> Hrk 5
	<i>Thermoproteus tenax</i> Kra1

			√	√							
			√	√							
			√	√							
					√			√			
		√ ₇	√ ₇	√ ₇	√ ₈	√ ₈					

Sulfolobales	<i>Sulfolobus islandicus</i> L.D.8.5
	<i>Sulfolobus islandicus</i> Y.N.15.51
	<i>Sulfolobus islandicus</i> Y.G.57.14
	<i>Sulfolobus islandicus</i> M.16.4
	<i>Sulfolobus solfataricus</i> 98/2
	<i>Sulfolobus solfataricus</i> P2
	<i>Sulfolobus islandicus</i> M.16.27
	<i>Sulfolobus islandicus</i> M.14.25
	<i>Sulfolobus islandicus</i> L.S.2.15
	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i> DSM 639
	<i>Sulfolobus tokodaii</i> str. 7
	<i>Metallosphaera sedula</i> DSM 5348
	<i>Metallosphaera cuprina</i> Ar-4
	<i>Acidianus hospitalis</i> W1
<i>Sulfolobus islandicus</i> REY15A	
<i>Sulfolobus islandicus</i> HVE10/4	

					√	√				√	√
					√	√					√
					√	√			√	√	
					√	√			√	√	√
					√	√					
					√	√			√ ₉	√ ₉	√ ₉
					√	√			√	√	√
					√	√			√	√	√
					√	√			√ ₁₀	√ ₁₀	√ ₁₀
					√	√			√	√	√
					√	√					
									√	√	√
									√	√	√
									√	√	
									√	√	√

Desulfurococcaceae	<i>Staphylothermus hellenicus</i> DSM 12710
	<i>Staphylothermus marinus</i> F1

					√						
					√	√					

4.1 *Thermoproteus tenax*

4.1.1 Der TPSP-Weg

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die zu TPS und TPP homologen Domänen in *T. tenax* fusioniert sind und das TPSP kodierende Gen (*tpsp*, 2196 bp) ein Operon zusammen mit zwei stromaufwärts liegenden Genen bildet. Diese kodieren für eine putative Glykosyltransferase (GT, 387 aa, *gt*, 1161 bp) und einen kleinen, leitenden mechanosensitiven Kanal (MSC, 197 aa, *msc*, 591 bp) (Abbildung 31). Durch Northern-Blot Analysen mit antisense-RNA-Sonden gegen den *msc* (3.1.1.1) konnten mono-, bi- und tricistronische Transkripte (*tpsp* + *gt* + *msc*, *gt* + *msc* und *msc*) detektiert werden. Dies korreliert mit den Beobachtungen von Siebers und Zaparty (M. Zaparty, 2003; Melanie Zaparty, 2007), die das putative Operon mit antisense-RNA-Sonden gegen *tps*, *tpp*, und *gt* untersuchten. Möglicherweise wird die RNA hier durch posttranskriptionale Modifikationen verändert (Evguenieva-Hackenberg & Klug, 2011), um eine möglichst effiziente Antwort auf verschiedene Stressoren zu ermöglichen.

TPSP Fusionsproteine aus N-terminaler TPS- und C-terminaler TPP-Domäne sind ungewöhnlich in Archaea und wurden bisher durch Blast-Analysen (Altschul *et al.*, 1990; Altschul *et al.*, 1997) nur in einigen anderen Thermoproteales identifiziert (*Thermoproteus uzoniensis* 768-20, *Pyrobaculum neutrophilum* V24Sta, *Pyrobaculum aerophilum* str. IM2, *Pyrobaculum calidifontis* JCM 11548, *Pyrobaculum* sp. 1860, *Pyrobaculum arsenaticum* DSM 13514, *Pyrobaculum oguniense* TE7 und *Pyrobaculum islandicum* DSM 4184 (Tabelle 13)). *Thermogladius cellulolyticus* 1633, *Vulcanisaeta distributa* DSM 14429, *Vulcanisaeta moutnovskia* 768-28 und *Desulfurococcus fermentans* DSM 16532 weisen zwar Proteine mit großen Homologien zu GT und MSC, jedoch keine fusionierte TPSP auf (Tabelle 13). *Caldivirga maquilingensis* und *Thermofilum pendens* zeigen den TPSP-Weg gar nicht. In den Euryarchaeota *Methanosaeta thermophila*, *Methanocellus marisnigri*, *Methanoculleus bourgensis* MS2 und *Archaeoglobus profundus* (Tabelle 13) konnten weder Sequenzen mit Homologien zu GT noch zu MSC identifiziert werden. Sie scheinen aber trotzdem eine fusionierte TPSP zu besitzen. Alle anderen Archaea, in denen Homologe zu TPS/TPP-Weg Enzymen nachgewiesen werden konnten, zeigen nur separierte TPS- und TPP-Enzyme, wie z.B. *Thermoplasma acidophilum*. Für dieses Euryarchaeon wurde die Kristallstruktur des TPP-Enzyms gelöst (Rao *et al.*, 2006) (Tabelle 13 und Abbildung 31).

Auch in Bakterien und Eukaryonten ist der TPS/TPP-Weg weit verbreitet, wobei in Eukaryonten v.a. fusionierte TPSPs, in Bakterien mehrheitlich die nicht-fusionierten TPS- und TPP-Enzyme vorkommen, wenn gleich kürzlich einige fusionierte TPSP-Proteine hauptsächlich in der Gruppe Bacteroidetes, den Cyanobacteria und Proteobacteria identifiziert wurden. Eine dieser bakteriellen TPSP-Fusionen wurde aus dem Gram-negativen Bakterium *Cytophaga hutchinsonii*

durch Komplementation Studien in Hefe funktional als bifunktional charakterisiert (Avonce *et al.*, 2010).

In Eukaryoten ist die fusionierte TPSP Struktur vorherrschend. So findet man TPSP Fusionsproteine in Pflanzen wie *Selaginella lepidophylla* und *Arabidopsis thaliana* (Blazquez *et al.*, 1998; Zentella *et al.*, 1999) oder in Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae* (Kaasen *et al.*, 1994). Diese TPSP-Proteine weisen hohe Homologien zur archaealen TPSP aus *T. tenax* auf (*S. lepidophylla* SITPS1: 35%, *A. thaliana* AtTPS1: 35% und *S. cerevisiae* ScTPS1: 38% aa Identität (Melanie Zaparty, 2007)), zeigen jedoch entweder nur TPS- oder nur TPP-Aktivität oder haben regulatorische oder strukturelle Funktionen (Avonce, 2006; Blazquez, 1993; Blazquez, 1998; Zentella, 1999).

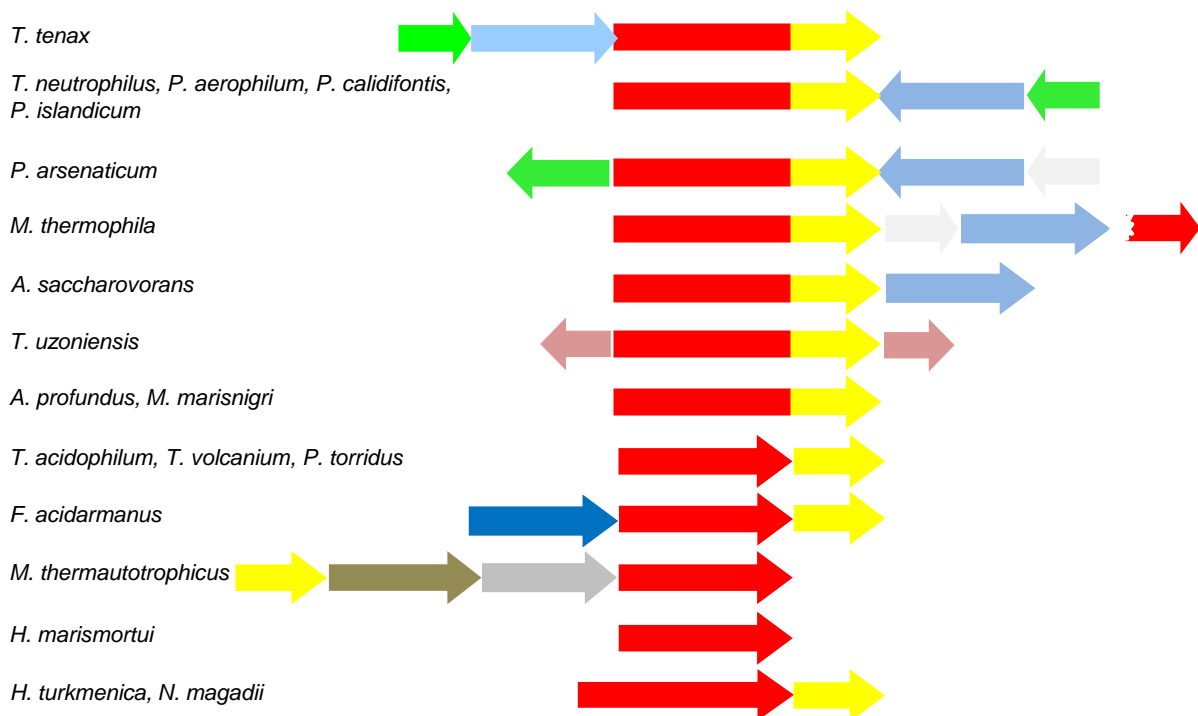


Abbildung 31 Genomische Kontext-Analyse der Gene, die in Archaea für den TPS/TPP-Weg mit fusionierter TPSP oder einzelner TPS und TPP kodieren.

Das Vorkommen und die Organisation der Gene wurde mittels Blast (NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)) und IMG 2.0 (<http://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/w/main.cgi>) analysiert. Als Template wurde die *T. tenax* TPSP gewählt. Jeder Pfeil steht für ein Gen (5'-3' Richtung) und die Größe entspricht der Genlänge. Die Darstellung der Genomregion basiert auf der 5'-3' Richtung des *tps(p)* Gens in dem jeweiligen Organismus. Die Gene wurden farblich markiert: *tps* (rot); *tpp* (gelb), *gt* (hellblau); *msc* (grün), unbekannt (hellgrau), *Glukose Dehydrogenase* (rosa), *Glykoside Hydrolase* (dunkelblau), *Phosphomannomutase* (braun), *Mannose-1-Phosphat Guanyltransferase* (grau). Der unterbrochene, rote Pfeil stellt ein N-terminales *tps* Genfragment in *M. thermophila* da.

4.1.2 Bifunktionalität der TPSP

GT und TPSP wurden heterolog in *E. coli* Lemo(DE3) bzw. *E. coli* Rosetta DE3 exprimiert. Die TPSP zeigte drei Banden zwischen 80 und 92 kDa im SDS-Gel. Massenspektrometrische Untersuchungen (Dr. M Brocker, Forschungszentrum Jülich), wie auch eine N-terminale Sequenzierung (Melanie Zaparty, 2007) zeigten, dass es sich hier bei allen drei Banden um die TPSP handelt. Möglicherweise resultiert dies aus posttranslationalen Modifikationen (Methylierung, Glykosylierung etc.) der TPSP, wobei eine Phosphorylierung ausgeschlossen werden kann (Melanie Zaparty, 2007). Die Hypothese einer posttranslationalen Modifikation konnte aber bisher nicht bestätigt werden.

Die Proteinsequenz der *T. tenax* TPSP deutet auch eine Bifunktionalität hin. Die Reste der TPS-Domäne, die an der Katalyse und der Substratbindung des *E. coli* OtsA Proteins beteiligt sind, sind auch im *T. tenax* TPSP Fusionsprotein hoch konserviert (Abbildung 32) (Gibson *et al.*, 2004; Gibson *et al.*, 2002). Dies ist auch der Fall für die TPP-Domäne. Sie weist drei Motive auf, die in bekannten TPPs für die Bildung des aktiven Zentrums nötig sind. Diese Motive sind hoch konserviert: In Motiv 1 (DXDX(T/V)), formt das erste Aspartat ein Phosphoaspartat-Intermediat mit dem Substrat. Motiv 2 (SG) bildet mit dem konservierten Serin (oder Threonin) möglicherweise eine Wasserstoffbrückenbindung zu einem Phosphoryl-Sauerstoff-Atom. Motiv 3 (K(X)16-30(G/S)(D/S)XXX(D/N)) bildet einen Teil des aktiven Zentrums und fungiert als Metalligand (Abbildung 32) (Avonce *et al.*, 2006; Rao *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu zeigen die bisher aus Eukaryoten wie Hefen und Pflanzen (z.B. *S. cerevisiae*, *S. lepidophylla* und *Arabidopsis thaliana*) charakterisierten TPSP Fusionsproteine entweder nur TPS- oder TPP-Aktivität, sind also nicht bifunktional. Zeigen sie nur TPS-Aktivität, so fehlen die konservierten Motive im TPP-Abschnitt oder sind nur teilweise vorhanden, zeigen sie TPP-Aktivität, so sind die konservierten Reste in der TPS-Domäne nicht oder nur teilweise konserviert. Enzymatisch inaktive TPSPs, denen TPS- und TPP-Motive (in Teilen) fehlen, erfüllen z.B. in *S. cerevisiae* regulatorische oder strukturelle Funktionen (Bell *et al.*, 1998) (Abbildung 32). Die TPS-Domäne der *T. tenax* TPSP zeigt einen inhibitorischen Effekt auf die Aktivität der TPP. Die artifizielle TPP-Domäne weist eine signifikant höhere Phosphatase-Aktivität auf als das Fusionsprotein (4 U/mg zu 8 U/mg ohne GT, bzw. 3 U/mg zu 20 U/mg mit GT). Dies kann nicht über die Sequenzen erklärt werden. Es ist möglich, dass dieser Effekt durch strukturelle Wechselwirkungen der Domänen untereinander zustande kommt und so entweder die Bindung des Substrats an die TPP erschwert, oder die Flexibilität des Proteins eingeschränkt wird.

Die einzige bisher untersuchte fusionierte bakterielle TPSP aus *C. hutchinsonii* komplementiert in Hefe-Mutanten sowohl für Tps1 als auch für Tps2, die jeweils ausschließlich TPS- bzw. TPP-Aktivität zeigen, und wurde somit ebenfalls als bifunktional charakterisiert. Wie auch die

T. tenax TPSP, zeigt dieses Enzym eine hohe Konservierung der Motive und Substratbindestellen (Avonce *et al.*, 2010).

```

T_ten_TPSP      1  -----MRLIVVSNRLPVTIS--PSG--EII--RESVGGIATAMKS-----ELGAVNGGREL
C_hut_TPSP     1  -----MNDEKRLIIVAYRIPFKVT--FKESGERVLOQNSCGLVSAIIS-----LAEKGDVFGKN
S_cer_TPS1     1  MTTDNAKAQLTSSSGGNIIVVSNRLPVTITKNSSTGQYAYAMSSCGLVTALEG-----LKKTYTFKWF
S_cer_TSL1     302 VSDLEMDDAKQDYKVPVFGGYSNKKSLKLYALLRSSQELFSRLPWSIVPSIKNGAMKNAINTAVLENI
S_cer_TPS3     273 -SDLET-DATKYNVPLFGGYSNNAKLRASS--LMRNSYELFKHLPWTVSDSKGNGSLKNAVNIAVAETV
S_cer_TPS2     29  LGESNDDWKISATTGNSALYSSLEYLQFDSTEYEQHVVGWGTGEITRTERNLFTREAKEKPODLLDDPLYL
S_lep_TPSP     89  PSLSDPEPSKISSGRGQRLLVVANRLPLSATRKGETEWNII--EMSAGGLVSAIILG-----VKQFEV
E_coli_TPS     1  -----MSRLVVSNRIAPPDE--HAA-----SAGGLAVGILG-----ALKAAGG----
T_acid_TPS     1  -----MRYIVVSSRCPPFSDH--KAAGKEI--IKENVGGVATARR-----AMEKYGG----
    
```

```

T_ten_TPSP      45  GLEEVVWVWGSVPSERESNDRERL-----RGMGLEPVPLSSEEEVEGEGEENSNSTLWELFHFHGF----S
C_hut_TPSP     53  --QKIHWFGYS--TPDILQEGETQVEN-----ENFIVHPVLIEDALNDAYYEGEENSTLWELFHSYY----P
S_cer_TPS1     65  -----WPGLE-IPDDEKDQVRKDLI-----EKFNAVPIFLSDEIADLHYNGEENSNLWELFHYH----P
S_cer_TSL1     372 PHRHVWVGTGVIPTDEIPENILANIISDLKDKYDSYVPLTDDVTFKAAYKNCKQILWELFHYQIPDNP
S_cer_TPS3     340 KEP-VSIVGVTMGIPTEDELPHVCHKIISKLEQDFSSFPVVTDDITFKGAYKNWAKQILWELFHYQIPDNP
S_cer_TPS2     99  TKEQINGLTTTLQDHMKSDKEAKTDTTQTAPVTNNVHPVWLLRK-NQSRWRNVAEKVWELFHYILN--P
S_lep_TPSP     151 -----WPGVY-VQDEKGEKSLRGAI-----EKGQVPLLDATVDQYNGEENSNLWELFHYIGL--R
E_coli_TPS     38  -----LWFGWSETGNEDQPLKVKK-----GNITWASFNLSQDLDEYINQESNAVWELWAFHYR----L
T_acid_TPS     44  -----TWCWG--DGKLDGKYLDDEDV-----GKYRIRRVMLSVPEKHGYVDL--SNRTLWELFHYF----R
    
```

```

T_ten_TPSP      106 EYATYEEK-----HWRVARGVNEKYAKAVVALARPGDLVWIHDYHMLLAPAVR-----EAAEVGVGFF
C_hut_TPSP     111 YLTSFNEE-----DYEAVVANKAIFADQINAFIRPGDMVWIQDYQLMLLPGLMR-----SENPDASIGYF
S_cer_TPS1     119 GEINFDEN-----AWLAVNEANQFTTNETAKTMNHNDLIWVHDYHMLLWPEMLRVKIHEKQLQNVKVGWF
S_cer_TSL1     442 NSKAFEDH-----SWKFYRNLQRFADAVKIYKGDITWIHDYHMLLWPMQVVR-----DVLPFKAKIGFT
S_cer_TPS3     409 NSKAFEDH-----SWDYVQKVNQKFSDRITVSVYKPGDITWIHDYHMLLWPMQVVR-----EKLPAKAKIGFF
S_cer_TPS2     166 SNEGEQEK-----NWWYDYVKFNEAAYAQKIGEVYRKGDTIWIHDYHMLLWQLLR---MKFNDESIIGYF
S_lep_TPSP     207 QEDRLAATRSLLSQFNAYKRANRLFAEAVNFYQEGDVVWCHDYHMLLWELFHSYLR-----EKDSQMKVGWF
E_coli_TPS     94  DLVQFQRP-----AWDGYLRVWALLADKLLPLLQDDITWIHDYHMLLWFAHELR-----KRGVNNRIGFF
T_acid_TPS     98  ERVKYTN-----GYEIVRRVNEKFTNMIVQSLSPEDVWIHDYHMLLWPKMLR-----DRGITNRIITFT
    
```

```

T_ten_TPSP      165 LHHPFPFAEILQLLPSEWRREILEGLLGSDLVGFHHTYFYSANFSRSVVRVRELGYKVE-MGAIYAVGH----
C_hut_TPSP     171 HHHPFAFTEIFRLLPKQWQTEILLKGMIGADLVGFHHTNDYSQYFTRSSVQVRLVGYDIT-ARDISIPN----
S_cer_TPS1     184 LHHPFPSSSEIYRILE--VRQELIKGLVSCDLVGFHHTYDYARHFLSSVQVRLVNTL-PNGVEYQG----
S_cer_TSL1     502 LHVSFPSSSEVFRCLA--QREKILEGLTADDFVGFQTRFYARHFLQTSNRLLMADVVDHDEELKLYNG----
S_cer_TPS3     469 LHVSFPSSSEVFRCLA--NRERILEGIIICANFVGFQTKFYKRHFLQTCNRLLAADVS-NDEVKYHC----
S_cer_TPS2     229 HHAPFPSSSEIYRCLP--RRKQILDGLVCANRICEQNESESRHFVSSCRRLLDATAK-KSKNSSNSDQYQV
S_lep_TPSP     272 LHHPFPSSSEIYRCLP--LRAELIQGLVADLVGFHHTYDYARHFWACTRILGLEGT-PEGVEDQG----
E_coli_TPS     154 LHHPFPFPEIFNALP--TYDTLLEQLCDYDLGFGQTEENDRLAFLDCLSNLTRVTTRSASHTAWG----
T_acid_TPS     158 WHHPFWSKEMFETLP--ESRDLIDSLRSDFITFHTETVRKNET-----DILL-DEN-----
    
```

```

T_ten_TPSP      229 ----RRVRVGVPEIGIDFDRFYNSQDPSVVEEMAKLREMLGRAKVVFSIDRLDYTKGLRRVAAWERFL
C_hut_TPSP     235 ----RIVRVDTFPISIDYKNFQELYNDPGVIEKRKEFLKDLASBKNIFFSVDRLDYSKGLIHRINGFEYFL
S_cer_TPS1     246 ----RFRVVGAEPIGIDVDKFTDGLKKEVSQKRIQQLKETFKGCKLIVGDRLDYIKGVPQKLHAMEVFL
S_cer_TSL1     565 ----RVVSVRFTFPIGIDAFDLQSLKDGSMQWRQLIRERWRQKGLIVCRDQFDRIRGLHKKLIDAYEKFL
S_cer_TPS3     531 ----NIVSVMYAPIGIDYHLSQLRNGSVLEWRQLIKERWRNKKLIVCRDQFDRIRGLQKKMLAYERFL
S_cer_TPS2     296 SVYGGDVLVDSLPIGIVNTTQILKDAFTKIDSKVLSIKQAYQNKKIIGRDRLDVSRGVVQKLRAFETFL
S_lep_TPSP     334 ----KNTRVAAPFPIGIDSERFIEAVETAIVKHHMOELSORFAGRKVMLGVDRLDMIKGHPQKLDAEFKFL
E_coli_TPS     217 ----KAFRTEVYPIGIEPKELIAQVAGL--LPPKLAQLKAEKKNVQNIFFSVERLDYSKGLPERFLAYEALL
T_acid_TPS     206 ----SRAKSLVPIPIGIDYRYFSKTRG-----TDIKSYALMDR-KLIFSIDRLDYTKGVNRRVLSIEEL
    
```

```

T_ten_TPSP      295 REHPERWGRAVEVLLVVVPSR--TGVPVMEEMKROIDREVRGRINGELGELN--VPIVYLYRFIPSPITLALY
C_hut_TPSP     301 DQYQVWHTRVVLTIVVPSR-ETILKYEAMKHELEEAAGRINGKYGTIGW-RPVIYLYRSLSFEEELGALY
S_cer_TPS1     312 NEHPERWGRKVVLMQAVPSR--GDVEEYQYLRVWVNELVGRINGQEGTVEE--VPIHFMHKSIPFEEILSLY
S_cer_TSL1     631 VENPEYVEKSTLQICIGSS-KDV-ELE---RQIMVVDRLNSLSTN--SISQPVVELHQDLDFQYLAIS
S_cer_TPS3     597 IENPEYIEKVVLLQICIGKS-SDP-EYE---RQIMVVDRLNSLSSN--SISQPVVELHQDLDFQYLAIS
S_cer_TPS2     366 AMYPERWDDQVLLQVSSPTANRNSPQITRLEQQVNELVNSINSEYGNLNE--SPVQHYMIRIPKDVYLSLL
S_lep_TPSP     400 EENSEWRDKVVLQIAPVPR--TDVLEYQKLTQVHEIVGRINGRFGS--TA-VPIHHLDRSMKFPFLCALY
E_coli_TPS     282 EKYVQHIGKIRYTIAPTISR--GDVQAYQDIRHQVENEAGRINGKYGQIGW--TPPLYVINGHFDRLKLLMKLF
T_acid_TPS     265 RRHPDLVGVKVVYVMIVTPSR--TTVSDYVAMKRELEMHVGRINGEFGS--SW-MPIHLYMYRKISDKMLVSYL
    
```

```

T_ten_TPSP 363 NTADVALITPTLRDGMNLVAKEFVASKRRC-----RGLVILSELAGASKELA-EALVINPNDVGGTAEAT
C_hut_TPSP 369 TIADVALITPTLRDGMNLVAKEFVATRTK-----KGLVILSELMAGASLELN-GAILNPTDKRTLAAT
S_cer_TPS1 380 AVSDVCLVSSSTRDGMNLVSYEYIACQEEK-----KGLVILSEFTGAAQSLN-GAILVNPWNTDLDSDAI
S_cer_TSL1 696 SEADIFVYVSSLRDRGMNLTCHEFTVCSEK-----NAPLLLSEFTGSASLINDGAILINPNDTKNFSQAI
S_cer_TPS3 662 CEADVFLMDALREGMNLTCHEFTVSSFTK-----NAPLLLSEFTGSSSVLKEGAILINPNDINHVAQSI
S_cer_TPS2 435 RVADICLITSVRDGMNTALELVTVKSHMSNFLCYGNPLILSEESGSSNVLK-DAIVVNPWDSVAVAKSI
S_lep_TPSP 468 AITDVLVMTSLRDGMNLVSYEFVACQK-----KGLVILSEFAGAAQSLGAGSILINPWNIESSNAI
E_coli_TPS 350 RYSDVGLVMTPLRDGMNLVAKEVVAQDPAN-----PGLVLSQFAGAAANEIT-SALIVNPHYDRDEVAAAL
T_acid_TPS 333 KNADIALITPTLRDGLNLVSKFVVAASD-----KGLVILSRFAGASNCLD-GAVVVNPNNSLGEVAAEAT
    
```

```

T_ten_TPSP 426 ABALSMSEDEQCRRIRAWQERLRMRDVVRWGTFEIIYSIISAKSAREEVEKALRYMEELSVDKLSDFAKA
C_hut_TPSP 432 IQALTMDEQEQTQRMQMQDRRVYDIFKWTEDYMDQLDI IKLKQMEFEEKIINQDVLKSFQKIFD--ES
S_cer_TPS1 443 NEALITPDVKEVNWEKLYKYISKYTSAFWGENEVHELYS-----TSSSSTSSSATKN
S_cer_TSL1 760 LKCLEMPFDKRRPQWKIKMKDINNDSTNWIKTSLQDTHISWQFNQEGSKIIKLNKTKLMDYQSS--KK
S_cer_TPS3 726 KRSLEMSPEEKRRRFRWKLFKSVIEHDSNWIITKCFEYNNAWESNQETSTVFNLAPEKFCADYKAS--KK
S_cer_TPS2 504 NMALKLDKBEKSNLESKIWKEV--PTIQDWTNKLSSLEKEQASSDDMERKMTPALNRPVLLNYK--QA
S_lep_TPSP 532 ADALNMPPEEEREERHRNFMHTTHSAQVWAETFISELNDSELEAELRTHI PPQLPLDKAVAKYSESKN
E_coli_TPS 414 DRALTMSLAERISRHAELDVVKNDINHWOCEFISDLKQIVPRSAESQQRDKVATFPKLA*
T_acid_TPS 394 YSAMNMGEDIEIRELRKMKKEEVSRRDIDWVIRR-INAIAKRKINDRVT*
E_coli_TPP 1 -----MTEPLTETPELS
T_acid_TPP 1 -----MIEQSLEDALYAIVT
    
```

Motiv I

Motiv

```

T_ten_TPSP 496 KRRILLLLFYDG-----TLVPHYPYPHMAVPDGDLELILSRFAALPETAVYVVSGRGRDFLDGVLGRL
C_hut_TPSP 500 SRRLFLLLFYDG-----TLSPVVPDPSSSKPSVGIVDVLKRLSSDFNVNVAIISGRDKEFNLN-YIFDP
S_cer_TSL1 828 RMFVFNIAE-----PPSSRMISILNDMTSKGNIVYIINSEFPKPILENLVSRVQ
S_cer_TPS3 804 HLFIFKLTSE-----PPTSRMISLSELESSN-NIVYVLSSEFTKNTFESLYNGVL
S_cer_TPS2 570 KRRFLFLFYDG-----TLTPVVKDPAAPAI PSARLYTILQKFCADPHNQIWIISGRDQKFLNKLGGK
S_lep_TPSP 602 RLVILGHNSTLTAQVEAPRGRAPDQIREMKIRLHPSIKDILNVLCSDPKTTIVILSGSERVALDEVFGEF
E_coli_TPP 13 AKYAWFFLLG-----TLAEIKPHDPQVVVDNIIQGLQLLATASD GALALISGRSMVELDALAKPY
T_acid_TPP 16 QNPMIFLLFYDG-----TLVPIIMNPEESYADAGLISLISDLKERFDT--YIVTGRSPPEISRFELP-L
    
```

```

T_ten_TPSP 558 P--VGLVAEHGFFLKHGPG-----GEWKSLG--KVDPSPWRQYAKGIMEDFASNVPGSEFVEVKEAGIAWHY
C_hut_TPSP 561 N--TILSAEHGAEFLRIPG-----QDWELOQY--DYNDQWRKSVLPVFQKYTRDRCAGSFLENKSTSLAWHY
S_cer_TSL1 876 N--IGLTAENGAYVSLNG-----VWYNIV--DQVDMRNDVAKILEDKVERIPGSIYKINEMIKHEHT
S_cer_TPS3 841 N--IGLTAENGAYVVRVNG-----SWYNIV--EELDWMKEVAKIFDEKVERIPGSIYKIADSMIRFHT
S_cer_TPS2 632 LPQLGLSAEHGCFMKDVS-----CQDWWNLTEKVDMSMQVRVNEVMEEFTRTPGSEFIERKKVALTWHY
S_lep_TPSP 672 D--LWLAENGMEFLRHTQ-----GEMWMTMPEHLNMDLLESVQLVFDYFCERTPERSFVETRETSLVVNY
E_coli_TPP 75 R--FPLAGVHGAERRDIN-----GKTHIVH--LPDAIARDISVQ-LHTVIAQYPGAELKAGMAFALVNY
T_acid_TPP 75 D--INMICYHGACSKINGQIVYNNGSDRFLG--VFDRIYED-----TRSWVSDFPGLRPLRYRKNIAVLYHL
    
```

Motiv III

```

T_ten_TPSP 618 --RNADEETIAEKAVVELIDALSNAI-AGSGLSILRGKVVVEVPACYTKGTAAKMLLDELSP-----
C_hut_TPSP 621 --RNTEKEYAHIRSRFIEELENKVGIKSNLAIIDGDKVIEMKPSDVKKGIAARKICDLYQP-----
S_cer_TSL1 934 --ENAEQDQDRVASVIGDAITHINTVDFHRGIIHAYVYKVVSVQVGLSLSAAQFLFRFYNSA-----
S_cer_TPS3 899 --ENAEQDQDRVPTVIGEATHINTLDFDRDIHAYVHKDIEVFVQQTGLALAAAEFLMKFYNSG-----
S_cer_TPS2 696 --RRTPVELG-EFHAKELKEKLLSFTDDFDLEVMDGKANIIEVPRFVVKGEIVKRLVWHQHGKPDMLKG
S_lep_TPSP 734 --KYADVEFGRVQARDMLQHLWTGPISNAAVDVVQGGKSVVEVPVGVSKGSAIDRLILGEIVH-----
E_coli_TPP 134 --RQAPQ--HEDALMTLAQRITQ---IWPQVALQQGKCVVEIKPRGTSKGEATAAFMQEAPFIG-----
T_acid_TPP 136 GLMGADMKPKLRSRIEETARIF-----GVETYYGKMLIELRVFGVVKGSAIRSVRGERP-----
    
```

Motiv III

```

T_ten_TPSP 677 -----DFVFVAGDEEIDEGMTEVAPQ-SAYTVKVGPGPTLAKFRVGDYRGIRSLLEQLRPP*
C_hut_TPSP 681 -----DFILSICDRTDDEDMKALPD-NALTIKVGKNSSAKFTIKTQEEVMTILNFTL*
S_cer_TSL1 994 -----SDPLDTSQGQI-TNIQTSPQQN-PSDQEQPPASPVTSMNHIDFACVSGSSSPVLEPLF
S_cer_TPS3 959 -----VSPTDNT--RI-SLSRTSSSMS-VGNKKH-----FQNQVDFVCVSGSTSPPIEPLF
S_cer_TPS2 763 ISEKLPKDEMPDFVLCIGDFDDEDMTRQLNT-IETCWKEKYPDQKNQWGNYGFPVTVGSASKKTVAK
S_lep_TPSP 794 -----SKHMTIPIDYVLCIGHFLSKDEDINTFFEP-ELPLDRDSSTSNCGKPLGGKLPDRKSSKSSSRMK
E_coli_TPP 191 -----RTPVFLGDLTDESGAVVNRLGGMSVKIGTGATQASWRLAGVPDWSWLEMITTALQ
T_acid_TPP 190 -----AIIAGCDATDEAAE-AND-DALTIKVGEGETHAKFHVADYIEIRKILKFIEMLGV
    
```

T_ten_TPSP		Stopp	731 aa
C_hut_TPSP		Stopp	733 aa
S_cer_TPS1		Stopp	474 aa
S_cer_TSL1	1051	KLVNDEASEGQVKAGHAI	1068 --- *Stopp 1098 aa
S_cer_TPS3	1007	KLVKQVEKNNLKFYTI	1024 --- *Stopp 1054 aa
S_cer_TPS2	831	AHLTDPQQVLETGLLVG	848 --- *Stopp 896 aa
S_lep_TPSP	860	PPVSSPKSPGRGSEQQQQ	877 --- *Stopp 994 aa
E_coli_TPS		Stopp	474 aa
T_acid_TPS		Stopp	441 aa
E_coli_TPP	249	QKRENNRSDDYESFSRSI*	Stopp 266 aa
T_acid_TPP	244	QKKQ*	Stopp 247 aa

Abbildung 32 Sequenzanalyse der fusionierten TPSP, wie auch der TPS- und TPP-Proteine nach (M. Zaparty *et al.*, 2013).

Folgende Sequenzen sind gezeigt: *Thermoproteus tenax* (T_ten_TPSP, CCC81939), *Cytophaga hutchinsonii* (C_hut_TPSP, ABG57690), *Saccharomyces cerevisiae* (S_cer_TPS1 (AAT93166), S_cer_TPS2 (EDV08225), S_cer_TSL1 (CAY81720) und S_cer_TPS3 (EEU06667)), *Selaginella lepidophylla* (S_lep_TPS/TPP, AAD00829), *Escherichia coli* (E_coli_TPS, AAC74966) und *Thermoplasma acidophilum* (T_acid_TPP, CAC12334). Die Sequenzanalyse wurde mit dem Programm Clustal W 1.83 (J. D. Thompson *et al.*, 1994) erstellt und manuell mit dem Programm des MUST packages (Philippe, 1993) editiert. Aminosäuren, die in die G6P- (▲) und UDPG- (◆) Bindung in der TPS-Domäne involviert sind, sowie auch solche, die teilweise das aktive Zentrum der TPP-Domäne bilden (●) (wie durch die Kristallstrukturen der *E. coli* TPS (Gibson *et al.*, 2004; Gibson *et al.*, 2002) und der *T. acidophilum* TPP (Rao *et al.*, 2006) gezeigt), wurden oberhalb der Sequenz markiert. Die drei konservierten Motive der TPP-Domäne und anderer Proteine der HAD Superfamilie wurden in grauen Boxen hinterlegt. Die hoch konservierten Motive wurden in rot markiert (Rao *et al.*, 2006). Stopps der Sequenzen wurden durch Sterne dargestellt.

4.1.3 Komplexbildung von TPSP und GT in *T. tenax*

Die enzymatischen Analysen zeigen *in vivo* und *in vitro*, dass für die bifunktionale, kombinierte TPS- und TPP-Aktivität die GT vermittelte Aktivierung der *T. tenax* TPSP essentiell ist. Dabei aktiviert die GT ausschließlich die TPS, da TPSP ohne GT keinerlei Synthase-Aktivität zeigte, wohingegen die Phosphatase-Aktivität der TPSP durch die Zugabe von GT nur geringfügig beeinflusst wurde. Die artifizielle TPS-Domäne weist dagegen keine Aktivität, unabhängig von der Zugabe von GT und/oder TPP. Zudem zeigten die „Yeast two-Hybrid“-Experimente, dass ausschließlich TPSP und GT *in vivo* miteinander interagieren, was weder für die artifizielle TPP und GT noch für die artifizielle TPS und GT gezeigt werden konnte. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Aktivierung durch die Komplexbildung von TPSP und GT und nicht durch Proteinmodifikation zustande kommt und dass für diese GT vermittelte Aktivierung der TPS-Aktivität der TPSP und damit für deren Bifunktionalität die fusionierte TPSP-Form des Proteins essentiell ist.

Damit wurde erstmals in Prokaryoten ein Trehalose-Synthase-Komplex nachgewiesen. Bisher wurde eine Komplex-Bildung von Proteinen, die an der Trehalose-Synthese beteiligt sind nur für *S. cerevisiae* beschrieben. Dieser Komplex besteht aus den vier Proteinen ScTps1 (TPS-Aktivität, nicht-fusionierte TPS-Struktur), ScTps2 (TPP-Aktivität, fusionierte TPSP-Struktur) sowie ScTsl1 und ScTps3, die beide fusionierte TPSP-Strukturen aber weder TPS noch TPP-Aktivität zeigen und regulatorische und strukturelle Funktion ausüben (Bell *et al.*, 1998). ScTps1 kann sowohl frei als auch komplexgebunden in Hefe vorkommen (Bell *et al.*, 1998), wobei die Aktivität der freien Form signifikant auf rund 20% reduziert ist. Freie ScTps1 Proteine synthetisieren T6P, wohin gegen komplexgebundene die Trehalose-Synthese zusammen mit ScTps2 katalysieren. Diese verschiedenen Funktionen werden durch freies P_i entweder stimuliert (T6P-Synthese) oder inhibiert (Trehalose-Synthese). Dadurch wiederum werden die intrazellulären T6P- und Trehalose-Konzentrationen reguliert. (Bell *et al.*, 1992; Bell *et al.*, 1998; Blazquez *et al.*, 1993; Bonini *et al.*, 2000; Thevelein & Hohmann, 1995). Die Aktivität der ScTps1 kann also durch

Komplexbildung/-dissoziation reguliert werden, wodurch eine Feinabstimmung der metabolischen Prozesse ermöglicht wird. Auch die Komplexbildung von TPSP und GT in *T. tenax* besäße regulatorisches Potential, indem die Synthese-Aktivität der TPSP über die Komplexbildung mit GT aktiviert bzw. über dessen Dissoziation deaktiviert werden kann. Diese potentiell regulatorischen Eigenschaften des neuartigen TPSP-Komplexes in *T. tenax* müssten durch weitere Studien v.a. auch in Analysen zur Struktur und Zusammensetzung des Komplexes untersucht werden. Im Vergleich zum Hefe Trehalose-Synthase Komplex erscheint der TPSP-GT-Komplex aus *T. tenax* in seiner Struktur wesentlich einfacher aufgebaut und könnte somit eine ursprünglichere Form des Trehalose-Synthase-Komplexes mit regulatorischem Potential darstellen.

Auch für das, neben der *T. tenax* TPSP, bisher einzige untersuchte prokaryotische TPSP Fusionsprotein aus *C. hutchinsonii* wurde, ähnlich wie für das *T. tenax* Enzym, eine erhebliche Diskrepanz zwischen TPP- und TPS-Aktivität, die in *C. hutchinsonii* 1000-fach niedriger ist, beschrieben. (Avonce *et al.*, 2010). Das könnte darauf hinweisen, dass auch in *C. hutchinsonii* eine TPS-Aktivierung für eine effiziente Trehalose-Synthese notwendig sein könnte, was wiederum durch Komplexbildung mit einem Aktivatorprotein ähnlich der GT in *T. tenax* geschehen könnte. Die putative GT aus *T. tenax* zeigt am C-Terminus Homologien zur Gruppe 1 der Glykosyltransferasen (pfam00534). Diese Glykosyltransferasen katalysieren die Übertragung von aktivierten Zuckern (UDP/ADP/GDP/CDP-gebundene Zucker) auf diverse Substanzen wie z.B. Glukose, Glykogen, Fruktose-6-Phosphat und Lipopolysaccharide. Unter Berücksichtigung, dass Glykosyltransferasen in nahezu allen Organismen weit verbreitet sind und vielfältige Funktionen ausüben, könnte spekuliert werden, dass auch in anderen Prokaryoten mit TPSP Fusionen Komplexbildung mit GT-artigen Aktivator Proteinen weit verbreitet sein könnte. Die Komplexbildung der TPSP mit GT könnte eine Art Regulator für die Trehalose-Synthese in Prokaryoten sein.

4.1.4 Phylogenetische Aspekte der TPSP

Phylogenetische Analysen ergaben, dass die TPS-Domänen von fusionierten TPSP- und nicht fusionierten TPS-Enzymen deutlich voneinander getrennte Kluster bilden. Die Gruppe der fusionierten TPSPs gliederte sich in zwei monophyletische Linien: (i) die eukaryontischen TPSP Fusionsproteine, die sich wiederum in die Klasse I (ähnlich der *S. cerevisiae* ScTPS1) und Klasse II (ähnlich der *S. cerevisiae* ScTPS2) Enzyme untergliedert, und (ii) die prokaryotischen TPSP-Sequenzen (Bootstrap 69%). Mehr als die Hälfte dieser prokaryotischen TPSP Fusionen stammen dabei aus dem bakteriellen Phylum Bacteroidetes, die damit die einzige größere zusammenhängende taxonomische Gruppe innerhalb dieses Clusters bildet. Die archaealen Sequenzen u.a. auch die *T. tenax* TPSP, zeigen jenseits der taxonomischen Ebene der Familie (z.B.

Thermoproteaceae) kaum Ähnlichkeiten und bilden innerhalb der prokaryotischen Fusionsproteine keine einheitliche Gruppe sondern sind über den gesamten Cluster unregelmäßig verteilt. Diese Gesamttopologie des phylogenetischen Stammbaumes ergab sich in ähnlicher Weise sowohl mit der Maximum Likelihood Methode als auch mit MrBayes und legt das evolutive Szenario nahe, dass die Fusion der TPS und TPP Sequenzen vor der Entstehung der rezenten Eukaryoten vermutlich im bakteriellen Phylum der Bacteroidetes stattgefunden hat. Über mehrere unabhängige horizontale Gentransfers (HGT) sind die fusionierten Sequenzen dann vermutlich in die anderen bakteriellen und archaealen Gruppen übertragen worden. In einem weiteren HGT hätte dann auch der Vorläufer heutiger Eukaryoten die Fusionssequenz erhalten, wo dann eine Genduplikation zur Entstehung der Klasse I und II Enzyme geführt haben könnte. Gegen dieses Szenario spricht der relativ geringe Bootstrapwert für die Monophylie der pro- und eukaryotischen TPSP Fusionen, der aber mit dem hohen Alter des Fusionsevents und mit der Überlagerung der phylogenetischen „Signale“ durch eine Reihe unabhängiger HGTs erklärt werden könnte. Zusätzlich sind vermutlich die tief abzweigenden Gruppen der Delta-Proteobakterien und der Krustaceen in unabhängigen Fusionsereignissen entstanden, was sich ebenfalls auf den Bootstrapsupport auswirken könnte. Eine ähnliche wie die hier beschriebene Gesamttopologie wurde ebenfalls in einer phylogenetischen Analyse der TPP-Domäne fusionierter TPSP und nicht fusionierter TPS/TPP Sequenzen gefunden, wobei die sehr inhomogene Verteilung der prokaryotischen TPSP Fusionen mit mehreren Fusionsereignissen erklärt wurde und nicht mit mehreren unabhängigen HGTs.

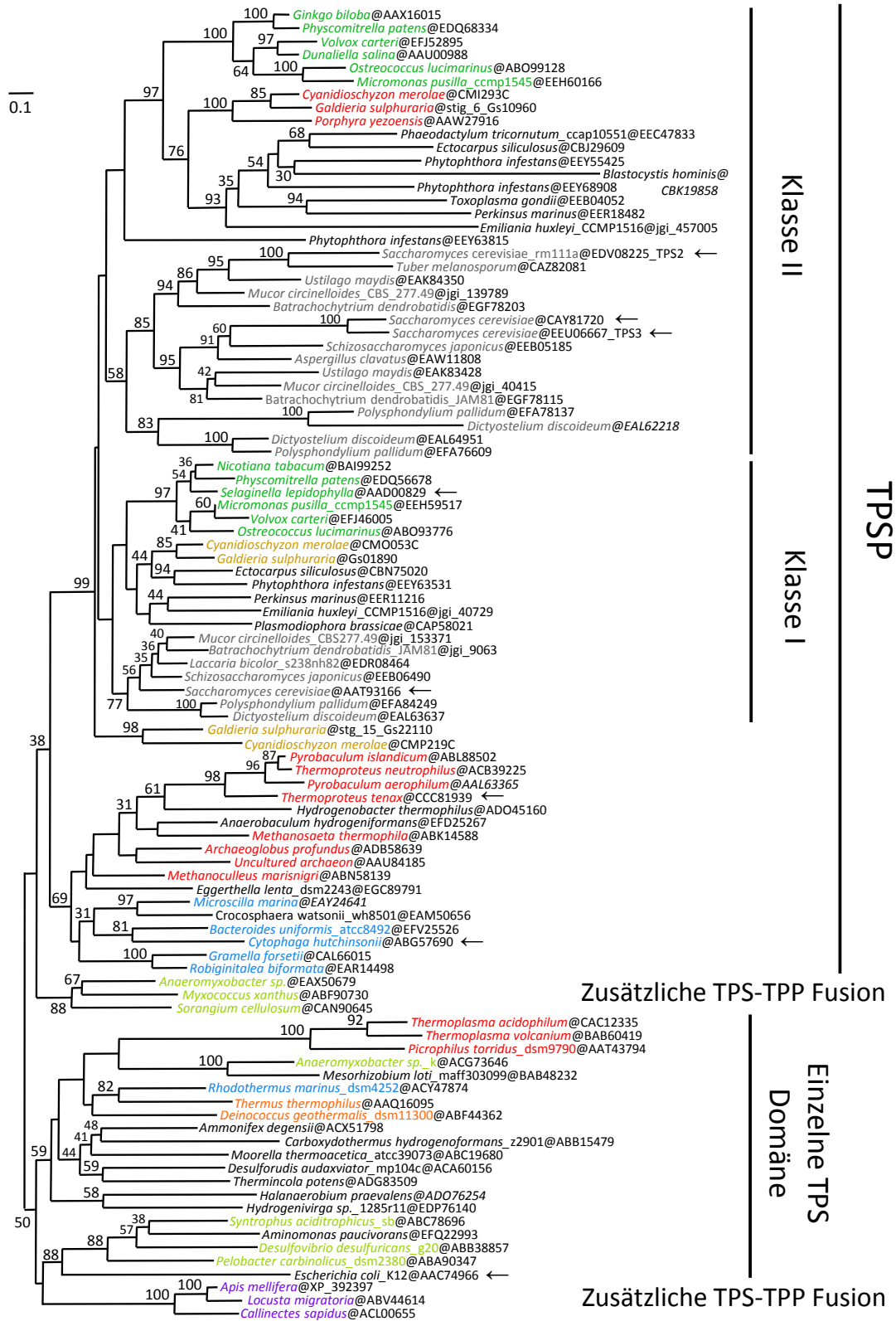


Abbildung 33 Phylogenetische „Maximum Likelihood Analyse“ der TPS-Domäne der fusionierten TPSP und von TPS-Proteinen mit einer einzelnen Domäne.

Der phylogenetische Baum wurde von Dr. H. Brinkmann (Montreal, Canada) mit dem Programm RAXML mit einem LG+F+Γ4 Modell von Sequenzevolutionen abgeleitet, die auf 99 Sequenzen und 203 Positionen beruhen. Die TPSP Sequenzen im oberen Teil des Baums entsprechen den Enzymen mit fusionierten TPS- und TPP-Domänen. Die Sequenzen der nicht fusionierten, einzelnen TPS-Domänen klustern im unteren Teil des Baumes. Die Bootstrap (BS) Werte sind nur an den internen Verzweigungen angegeben, wenn sie

≥ 30% waren. Die verschiedenen Gruppen wurden farblich markiert: Unikonta (grau); Rotalgen (braun), grüne Pflanzen (grün); Archaea (rot); Bacteroidetes (blau); Delta-Proteobacteria (hellgrün); Deinococci-Thermus (orange) und Pancrustacea (magenta). Der Maßstab gibt den Mittelwert der Substitutionen pro Position wieder. Die Pfeile deuten auf die Organismen, in denen TPS oder TPSP beschrieben wurde.

4.1.5 Die Rolle von Trehalose in *T. tenax* – Modell der Stressantwort

Die aus den Untersuchungen zum TPSP Weg in *T. tenax* erzielten Ergebnisse deuten darauf hin, dass Trehalose in diesem Crenarchaeon als kompatibles Solut zur Stressprotektion und nicht als Kohlenstoffquelle oder Speichermolekül fungiert (Kouril *et al.*, 2008). (i) *T. tenax* ist weder in der Lage auf Trehalose zu wachsen, (ii) noch konnte ein Abbau des Zuckers durch *T. tenax* Rohextrakte nachgewiesen werden (Zaparty, 2007). (iii) Weiterhin wurden keine Homologe zu bekannten Trehalose-abbauenden Enzymen, wie z.B. Trehalasen oder Trehalose Phosphorylasen im *T. tenax*-Genom identifiziert. (iv) Der unidirektionale TreT-Weg, der ausschließlich die Trehalose-Synthese katalysiert, ist zusätzlich zum TPSP-Weg vorhanden (1.4.1) und wurde Glykogen als Speichermolekül in *T. tenax* nachgewiesen (König, Skorko *et al.*, 1982). Außerdem kommt das *tpsp* Gen in *T. tenax* mit einem putativen mechanosensitiven Kanal (MSC) in einem Operon vor, was dafür spricht, dass die synthetisierte Trehalose nicht als Kohlenstoffquelle genutzt, sondern viel mehr zum Schutz der Zelle, bei sich ändernden Umgebungsbedingungen, ausgeschleust wird.

Mechanosensitive Ionen-Kanäle (MSC) kommen in allen drei Domänen des Lebens vor (Kloda & Martinac, 2001c; Martinac, 2004). Sie reagieren auf Änderungen der Membranspannung infolge osmotischen Wassereinstroms, öffnen sich und können dann gelöste Substanzen freisetzen. Auf diese Weise bewahren sie die Zelle ggf. vor dem Platzen unter hypoosmotischen Bedingungen/Stress. Dies wurde bei bakteriellen MSCs in Bezug auf osmotischen Stress hin gut untersucht, wo der Kanal essentiell für die Regulation des Zellvolumens ist (Booth *et al.*, 2007). Bisher wurden fünf MSCs aus der Domäne der Archaea beschrieben: MscA1 und MscA2 aus *Haloferax volcanii* (Le Dain *et al.*, 1998), MscTA, dessen Kristallstruktur aus *Thermoplasma acidophilum* gelöst wurde (Kloda & Martinac, 2001a, 2001c; Liu *et al.*, 2010) und MscMJ und MscMJLR aus *Methanococcus jannaschii* (Kloda & Martinac, 2001b, 2001d). Sie alle ähneln eher bakteriellen als eukaryontischen Kanälen (Kloda & Martinac, 2001b). Der putative MSC aus *T. tenax* konnte in verschiedenen *E. coli* Stämmen und unter Verwendung verschiedener Plasmide nicht ausreichend exprimiert werden, da in allen Fällen das Wachstum der Wirtsstämme stark inhibiert wurde. Durch die Zugabe von 300 mM KCl oder 300 mM NaCl konnte keine verbesserte Expression des MSC erreicht werden (Abbildung 34) (M. Zaparty *et al.*, 2013). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der MSC aus *T. tenax* einen Effekt auf die osmotische Homöostase von *E. coli* hat, was ebenfalls von dem MSC aus *Methanococcus jannaschii* berichtet wurde (Kloda, 2001).

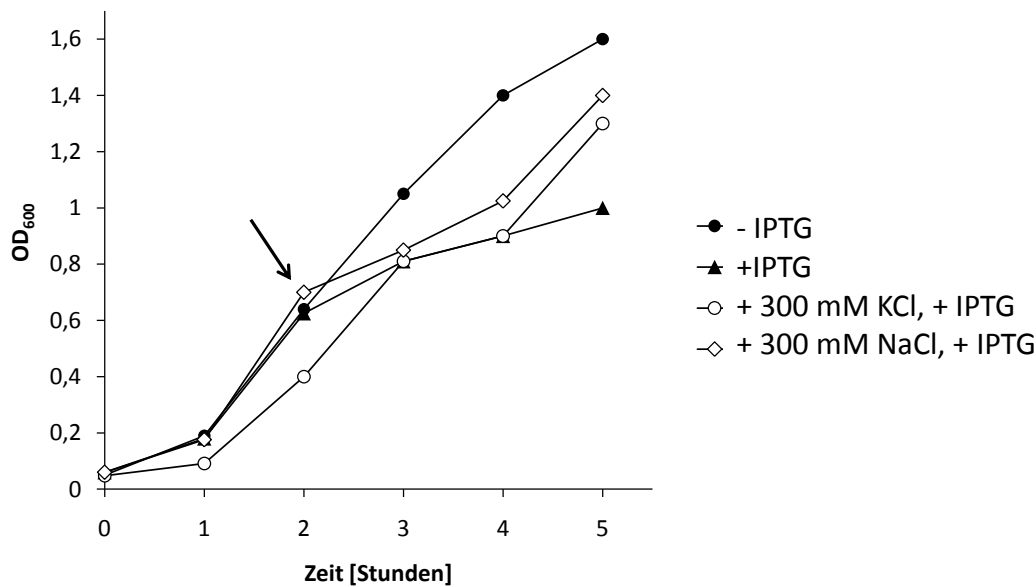


Abbildung 34 Einfluss der TTX_MSC Expression auf das Wachstum von *E. coli* BL21(DE3) pLys pET24a::msc-C-His in Abhängigkeit von osmotischem Stress.

Gezeigt ist das Wachstum von *E. coli* BL21(DE3) pLys pET24a::msc-C-His ohne Induktion (●), mit Induktion durch Zugabe von 1 mM IPTG (▲), mit zusätzlich 300 mM KCl im Medium und Induktion durch 1 mM IPTG (○) und mit zusätzlich 300 mM NaCl im Medium und Induktion durch 1 mM IPTG (◇). Die Induktion erfolgte bei einer OD₆₀₀ von ~ 0,6 (markiert durch einen Pfeil) (Melanie Zaparty, 2007).

Es liegt also nahe, dass der MSC und damit auch das gesamte Operon einschließlich TPSP und GT aus *T. tenax* eine Funktion unter hypoosmotischen Stressbedingungen erfüllt. Aus diesen Ergebnissen kann das folgende Modell für die Funktionen von TPSP, GT und MSC erstellt werden (Abbildung 35).

- 1) Eine Stresssituation (z.B. durch einen hyperosmotischen Schock oder Temperaturänderungen) induziert auf bisher unbekannte Weise die Komplexbildung von TPSP und GT und somit die Trehalose-Synthese.
- 2) Dies führt zu einer erhöhten Konzentration von Trehalose in der Zelle, wodurch die Membran sowie Proteine geschützt werden.
- 3) Verändern sich die Bedingungen (z.B. Hypotonie des Mediums) kommt es infolge der nicht zuletzt durch die Akkumulierung von Trehalose hohen Osmolarität des Zellinneren zu massivem Wassereinstrom. Dies bewirkt eine Änderung der Membranspannung, wodurch sich der MSC öffnet und hydrierte Solute (z.B. Trehalose) an das Medium abgegeben werden kann. Durch das rasche Entfernen des Osmolyts kann die Zelle vor dem Platzen bewahrt werden und sich so schneller an wechselnde Bedingungen anpassen. Möglicherweise dissoziiert die GT nach der Beendigung des Stresses wieder von der TPSP.

- 4) Letztendlich schließt sich der MSC wieder. Die GT scheint bei der Synthese von Trehalose eine tragende Rolle zu spielen. Nur durch diesen Aktivator kann Trehalose gebildet werden.

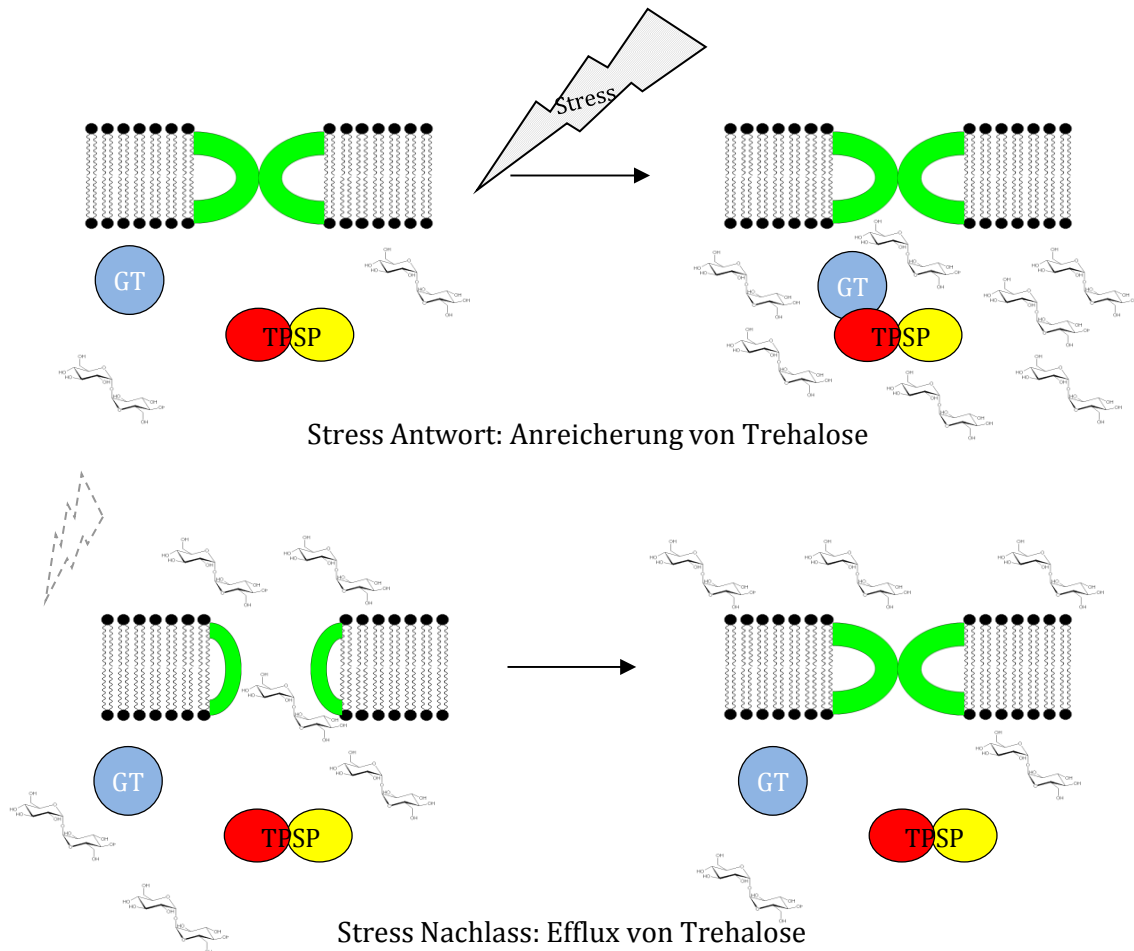


Abbildung 35 Modell der Stressantwort in *T. tenax* basierend auf TPSP, GT und MSC.

Als Stressantwort wird, durch die Komplexbildung von TPSP (gelb/rot) und GT (blau), Trehalose gebildet, was zu einer Anreicherung des Zuckers führt (oben rechts). Ist der Stress vorbei, öffnet sich der MSC (grün) durch die Änderung der Membranspannung und Trehalose kann an das Medium abgegeben werden (unten links). Letztendlich schließt sich der Kanal wieder (unten rechts).

4.2 Der unidirektionale TreT/OrfY-Weg

4.2.1 *Thermoproteus tenax*

Im Genom von *T. tenax* wurde neben dem TPSP-Weg auch der TreT-Weg gefunden, welcher als erster unidirektionaler TreT-Weg identifiziert wurde (Kouril *et al.*, 2008). Das Protein zeigt sehr hohe Homologien zu den beschriebenen TreTs von *Thermococcus litoralis* (Qu *et al.*, 2004) und *Pyrococcus horikoshii* (Ryu *et al.*, 2005), die im Gegensatz zur TTX_TreT die degradierende und die synthetisierende Reaktionsrichtung katalysieren. Diese liegen in einem Gen-Cluster mit einem Trehalose/Maltose-abhängigen ABC-Transporter (Qu *et al.*, 2004), was unter anderem eher eine Trehalose abbauende Funktion vermuten lässt. In beiden Organismen wurden Mannosylglycerat und di-myo-Inositolphosphat in großen Mengen als kompatible Solute angereichert; Trehalose konnte hingegen in *P. horikoshii* nur in Spuren gefunden werden und auch in *T. litoralis* ist Trehalose unter keiner der getesteten Stressoren das vorherrschende Solut (Empadinhas *et al.*, 2001; Lamosa *et al.*, 1998). Im Gegensatz zu der Genomorganisation der beiden bekannten archaealen TreTs, bei der die *treT* in einem Trehalose/Maltose-abhängigen ABC-Transporter-Gencluster mit zwei integralen Permeasen (*malF* und *malG*), einem Regulator (*trmB*), einem Trehalose/Maltose-Bindeprotein (*malE*), einer ATP-Fruktokinase (*frk*) und einem ATP-Bindeprotein (*malk*) (Qu *et al.*, 2004) liegt, bildet die TTX_TreT mit einem stromaufwärts liegenden Gen (*orfY*, 651 bp, OrfY, 237 aa, 24 kDa) ein Operon. Diese Organisation ist innerhalb der Thermoproteales und Sulfolobales stark verbreitet, wurde aber bisher nicht in dem Phylum der Euryarchaeota gefunden (Ausnahme *Methanosaeta thermophila*) (Tabelle 13).

In Übereinstimmung mit früheren Studien (Kouril *et al.*, 2008) katalysiert die TTX_TreT ausschließlich die Synthese von Trehalose aus Glukose und UDPG/ADPG, wobei UDPG favorisiert wird. Auch im zellfreien Rohextrakt von *T. tenax* (heterotrophe und autotrophe Anzucht) konnte nur die Synthese von Trehalose nachgewiesen werden. Die Aktivität des Enzyms wird durch die Zugabe von Mg²⁺-Ionen gesteigert, wohingegen sie durch die Zugabe von EDTA inhibiert (Kouril *et al.*, 2008). Der Schmelzpunkt der TTX_TreT liegt in guter Übereinstimmung mit dem hyperthermophilen Eigenschaften von *T. tenax* bei ca. 80°C (Dr. J. Martin, Prof. Dr. A. Lupas, Dr. K. Zeth MPI Tübingen). Blast X Recherchen zeigen eine konservierte Region (C-Terminus, aa 199-369), die zu der Glykosyltransferasen Gruppe 1 zählt (Kouril *et al.*, 2008).

TTX_OrfY wurde heterolog in *E. coli* Rosetta(DE3) exprimiert und aufgereinigt, wobei die detektierte molekulare Masse von rund 30 kDa in der SDS-PAGE mit der kalkulierten MW von

24 kDa korreliert. Auch das native Molekulargewicht des Monomers von rund 28 kDa stimmt damit überein. Zusätzlich zu dem Monomer eluierte das Protein bei der nativen Größenbestimmung auch in Fraktionen, die mit rund 90 kDa eher für ein Tetramer sprechen. Auch bei den Kristallstruktur-Analysen und Lichtbrechungsexperimenten wurde ein Tetramer detektiert. Die 6 kDa Fraktion in den Gelfiltrationsexperimenten entsprach allerdings nicht der erwarteten Größe. Die verlängerte Retentionszeit und die sich daraus ergebende Größe von 6 kDa könnte einerseits durch Wechselwirkungen des Proteins mit der Säulenmatrix und andererseits aus verstärkter DNA-Bindung resultieren. Da gezeigt werden konnte, dass OrfY unspezifische DNA bindet (Gelfiltration und Agarose-Gelelektrophorese), lässt sich vermuten, dass die DNA das Protein auf der Säule zurückgehalten hat. Andererseits zeigen die bioinformatischen Analysen, dass OrfY möglicherweise Zucker binden kann, die eine Oligomerisierung begünstigen könnten. Dies würde die detektierte Tetramer Struktur erklären. Blast-Analysen zeigen, dass OrfY hohe Homologien zu mögliche Proteinen bei einer Vielzahl der Thermoproteales und Sulfolobales aufweist (Tabelle 13). Eine Überlappung von vier Basen (ATGA) der beiden Gene *treT* und *orfY* deutet auf eine Operonorganisation hin; putative Promotorstrukturen wie die TATA-Box wurden nur vor dem Gen *orfY* gefunden (Kouril *et al.*, 2008). Diese Genorganisation ist auch in einigen anderen Vertretern der Crenarchaeota konserviert (Tabelle 13), konnte aber im Phylum der Euryarchaeota nicht identifiziert werden. Auch in der Domäne der Bakterien findet sich das TreT/OrfY-Cluster, z.B. in *Caldiserium exile* (TreT 33%, OrfY 33% Identität der Aminosäuren) oder in *Coprothermobacter proteolyticus* (TreT 30%, OrfY 29% Identität der Aminosäuren). Beide gehören zu verschiedenen Phyla (Caldiseria bzw. Firmicutes). Die Operon-Organisation von TreT und OrfY ist der erste Hinweis auf eine funktionale Verbindung der beiden Proteine, wenngleich die enzymatischen Analysen mit TreT zeigen, dass OrfY die Aktivität der TreT nicht beeinflusst. Analysen von Dr. J. Martin, Dr. K. Zeth und Prof. A. Lupas deuten auf verschiedene Funktionen von OrfY hin. Sie konnten zeigen, dass OrfY eine völlig neuartige Faltung aufweist, die ein dupliziertes HTH-Motiv beinhaltet. Homologe zu diesem HTH-Motiv werden u.a. in PEP-bindenden Proteinen, Proteinen unbekannter Funktion aus Thermoacidophilen und Proteinen der Familie der α -Amylasen gefunden. Besonders das Vorkommen in α -Amylasen ist dabei sehr interessant. So könnte OrfY möglicherweise ein Amylase-Produkt binden/umsetzen. In dieser Studie konnte unter den gewählten Bedingungen weder die Bindung noch die Spaltung von verschiedenen Zuckern durch OrfY beobachtet werden. *In silico* Docking Analysen ergaben aber, dass OrfY eine Bindetasche aufweist, in die z.B. Trehalose gut binden könnte. Zudem zeigten die Gelfiltrationsexperimente, dass die Gegenwart von Zuckern das Laufverhalten von OrfY und damit den Oligomerisierungsgrad beeinflusste. Andererseits spricht das HTH-Motiv auch für die Bindung des Proteins an DNA (Kohn *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 2009). Dies wurde auch durch photometrische Messungen bei 260 nm, Untersuchungen via Agarosegel-Elektrophorese und

Gelfiltration belegt. Eine spezifische Bindung von OrfY an die gewählten DNA-Fragmente der Promotorregion des OrfY kodierenden Gens konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, wobei nicht auszuschließen ist, dass noch gebundene DNA mit den EMSAs interferiert. Strukturanalysen mit dem Programm HHpred (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>, (Söding, 2005a, 2005b; Söding *et al.*, 2005) weisen Ähnlichkeiten von OrfY zu transkriptionellen Regulatoren und DNA-bindenden Proteinen der TetR-Familie auf (transkriptioneller Regulator *Marinobacter aquaeoli*, 13% Identität der Aminosäuren; DNA/RNA-Bindung *Shewanella amazonensis*, 14% Identität der Aminosäuren; DNA/RNA-Bindung *Shewanella loihica*, 14% Identität der Aminosäuren; Genregulator, *Streptomyces coelicolor*, 13% Identität der Aminosäuren, *Pectobacterium atrosepticum*, 13% Identität der Aminosäuren; DNA-Bindung *Novoshingobium aromaticivorans*, 12% Identität der Aminosäuren und transkriptioneller Regulator *Bacillus cereus* atcc 14579, 16% Identität der Aminosäuren). Möglicherweise erfüllt OrfY eine ähnliche Rolle.

Des Weiteren konnte mittels „Yeast two-Hybrid“-Analyse gezeigt werden, dass TreT und OrfY aus *T. tenax in vivo* in Hefezellen einen Komplex bilden. Dies untermauert die Vermutung, dass TreT und OrfY eine funktionelle Einheit bilden und sich *in vivo* auf eine bisher unbekannt Art beeinflussen.

Da *T. tenax* bis dato nicht genetisch manipulierbar ist, wurden weitere Versuche mit den beiden Sulfolobus-Stämmen *S. acidocaldarius* und *S. solfataricus* durchgeführt. Beide Organismen weisen Gene auf, die für eine putative unidirektionale TreT (Saci 67%, Sso 68% Identität der Aminosäuren bei einer Sequenzabdeckung von 99%) und für OrfY (Saci 48%, Sso 52% Identität der Aminosäuren bei einer Sequenzabdeckung von 100%) kodieren. Sie zeigen sehr hohe Homologien zur TTX_TreT, respektive zu OrfY auf.

A)

```
Sso_TreT      MVVKMIEKYVEFIGEHELDIAFKIAEKIKDLSILHVNSTKAGGGVAEILNRMLPLMKELG
Saci_TreT    ----MIEKYEKFIGEHELDLFLKIAERIKDLSILHVNSTKAGGGVAEILNRMVPLMKELG
TTX_TreT     ----MIERYVEFIGEHELNAIFKYAERLRDLSILHINSTAAGGGVAEILHRLIPLMRELG
              ***.* :*****:.* **::*****:*** *****:*.:.***:***
```

```
Sso_TreT      LNVDWKVIKGDNEFFNVTKSFHNSLQNGTGNIPDEYFKIYDKWQELNLSIPLDYDIMFI
Saci_TreT    LNVDWRVIKGDNEFFNVTKSFHNSLQNGIGNITEEHFRIYDKWQELNLSIPLDYDVMFI
TTX_TreT     LNVEWKVIRGNEEFFRVTKSFHNALQTGAGSIPREYFEIYDRWQELNLSIPLDYDVVFI
              ***:*.***:*.:.***.*****:*.*. *.*. *:.***:***:*. *****:***
```

```
Sso_TreT      HDPQPAGLIKFKKGNNSKWIWRCHIDISNPYPPVWNFLRKYISKYDSMIISVPSFGRDDI
Saci_TreT    HDPQPAGLIKFKKGN-NRWIWRCHIDISNPYPPVWDFLKKYVSEYNASIIISVPSFGRDDI
TTX_TreT     HDPQPAGLIRYKRRG--VWIWRCHIDISNPHEVWAFKRYISAYDGVIVSIPEFARDDL
              *****:*.:. * *****:*. ** *:.*. * *:. *:.*. *:.***:
```

```
Sso_TreT      EIPQFVIPPSIDPLSIKNRDMSETTILRILYKFGINLEKPLITQVSRFDYAKDPLGVIQA
Saci_TreT    DIPQFIIPPSIDPLSEKNKHISETTKLRIMSKFGISEDKPLVTQISRFDYAKDPLGVIIA
TTX_TreT     DVPQISIPPSIDPLSPKNVPLPRATVDRIVRKYGVDPERPIVLQVSRFDRAKDPVGVIEA
              :.***: ***** ** :..* ** :*:. :.***: *:.*** *****:***:*
```

```
Sso_TreT      YKLAKRHVDIQLLYVGSPATDDPEGEKVYSEVVKASEGDKDIHLLMLPPYSLEINVFTQ
Saci_TreT    YKLAKRHVDLQLAYVGSPATDDPEGEKVYNEVIRESRDDKDIHLLMLPPYSLEINAFQS
TTX_TreT     YKLARRHVDVQLVYLGSPASDDPEGEEVYREALRAAGDDKDIHLLMLPPNSHIEVNAFQR
              ***:***:*. * *:.***:*****:*** *:. : .*****:***** *:.*.***
```

```

Sso_TreT      ASTVVMQKSIKEGFGLTVSEAMWKRKPVIGGNTGGIPLQVINGITGFLVNSPQGASHYII
Saci_TreT    ASTVVMQKSIKEGFGLTVSEAMWKNKPVIGGNTGGIPLQVINGVTGFLVNSPQAAHYTI
TTX_TreT     AAAVVLQKSIREGFGLTVSEALWKRKRPVIGGNTGGIRIQVIHGVTGFLVDSPKAAHYIV
              *::**::***::*****::**.:*****   :***.*:*****:*.:.** :

Sso_TreT     YLIRNEEIRRLGNTNAREHIRRNFLITRELRDYLMTIVYVANRGLASLNSHESISNH   418 aa
Saci_TreT    YLTRNAKVRHTMGTNAREHVRNFLITRELRDYLMTIMYVNERNSV-----   402 aa
TTX_TreT     YLLKNKRLRREMGAAGREHVRNFLITQQLRRYLMTILYLTGRHSAP-----   402 aa
              ** :* .:* :*: .***.*****:.* *****:* * .

B)

Sso_OrfY     MMDLDSKKGKIPFI FYAAYYPPLYSKLKAISLRELVEGIRKADKYTLFYHVFHPIFSSHL
Saci_OrfY    MIDLDSKKGKIQFQFYAAYYPPIYSKLKANNIRELMGKCDNYSLFYHIFHPVFSSHL
TTX_OrfY     MADLDSKAK-SPFVFKSAYYLSLYTKRRARNLRQLAEGIRAADPGVIFHHVHFVFAKHL
              * *****.* * * :*** .:*** :* .:*:* ***: .* :***:** :*:.**

Sso_OrfY     IPEEYSNDFAHWIAESLGDKELAEVLSDIPGAEPRTIEDIRNDLIEILEPRINERRGIRE
Saci_OrfY    IPEEYSNDFAHWISESLGDKELAEVLSDIPGAEPRTVDNIRSDLINVLSLRSNGRVALSP
TTX_OrfY     LHPYYTNDFARWVGEELNDDDLAIELSSISGAEPATVEDVRRELLAVLEPRADERAARE
              : *::***:*.:.*.*.:.** :*.*.*** *:::.* :*: .*. * : * .

Sso_OrfY     FVfVScTPIVYkTNYvANTLAEFLDLIQIIPDRALVWHFVSKRILGISKRNDFSEWLESN
Saci_OrfY    FVfVScRVITYkTNYvANTLGEFLDCLSEIPGRSLVWHFVTRRVLYGYNRNDfSSWLETN
TTX_OrfY     FVfVSMVPIVYEVGLKAETLAEFLDAVAAPPEsvAYHFVTARVLYGNRNDfSRWLVEE
              ***** *.*:.. *:*.*.*** : * .:..:***: *.* . ***** ** :

Sso_OrfY     FGLSELAENLSKIDPQTYVYEEVLRDIIIRILERWLLR   218 aa
Saci_OrfY    FGLSEVAEELS KIDPQTYVDEEVLRSDI IKTLERWLLK   218 aa
TTX_OrfY     FGLTSAADALSRI DPLIYNDERQLKSEVVRTLERALL-   217 aa
              ***:. * : **:* ** * * . * : : : : * ** **

```

Abbildung 36 Sequenzvergleich der TreTs und OrfYs aus *S. acidocaldarius*, *S. solfataricus* und *T. tenax*

Gezeigt ist der Sequenzvergleich der TTX_TreT mit den TreTs aus *S. acidocaldarius* (Saci) und *S. solfataricus* (Sso)(A) und von TTX_OrfY mit den OrfYs aus Saci und Sso (B). (*) Sterne zeigen identische Aminosäuren an, (:) Doppelpunkte hoch konservierte Aminosäuren und (.) Punkte schwach konservierte Aminosäuren. Als Programm wurde ClustalW verwendet (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>).

4.2.2 *Sulfolobus acidocaldarius* und *Sulfolobus solfataricus*

Die Rolle von Trehalose in der Ordnung der Sulfolobales ist bisher nicht geklärt. Trehalose wird intrazellulär in Konzentrationen bis zu 0,12 µmol/mg Protein in *S. solfataricus* gefunden (Martins *et al.*, 1997). Auch in Metabolom-Untersuchungen wurde kürzlich Trehalose als relativ starkes Signal in *S. solfataricus* P2 detektiert (Wieloch, 2012). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Glykogen als Kohlenstoffspeicher in diesem Organismus angereichert wird (König, Skorko *et al.*, 1982). In *S. acidocaldarius* Zellen konnte über Northern-Blot-Analysen gezeigt werden, dass Saci_TreT und Saci_OrfY ein Operon bilden, jedoch konnte im Gegensatz zu TTX_TreT und OrfY keine Protein-Protein-Interaktion detektiert werden. Andererseits sprechen die Ergebnisse der Wachstumsexperimente mit den Deletionsmutanten dafür, dass sowohl TreT als auch OrfY für einen funktionellen TreT-Weg essentiell sind.

Die Ergebnisse der „Yeast two-Hybrid“-Experimente zeigen im Gegensatz zu *T. tenax* keine Interaktion von TreT und OrfY in beiden *Sulfolobus* Spezies. Man könnte spekulieren, dass zur

Interaktion zusätzliche Faktoren, die in dem Hefestamm nicht vorliegen, essentiell sind, oder dass unter den getesteten Bedingungen keine Interaktion möglich ist. Andererseits konnte für die Positivkontrollen *rpoK* und *tfb3* aus *S. solfataricus* eine Interaktion gezeigt werden, was dafür spricht, dass das System grundsätzlich für Proteine aus diesem Organismus anwendbar ist. Es konnte eine schwache Interaktion der TTX_TreT mit dem Sso_OrfY beobachtet werden. Sso_OrfY ähnelt dem TTX_OrfY mehr als dem Saci_OrfY. Dies könnte ein Grund dafür sein, dass nur eine Interaktion von TTX_TreT und Sso_OrfY nachgewiesen werden konnte (Abbildung 28).

Tabelle 14 Zusammenfassung der Ergebnisse der „Yeast two-Hybrid“-Experimente.

Interagierende Proteine (√) bzw. nicht interagierende Proteine (-) sind gekennzeichnet.

	TTX_TreT	Saci_TreT	Sso_TreT
TTX_OrfY	√	-	-
Saci_OrfY	-	-	-
Sso_OrfY	√	-	-

Zur weiteren Untersuchung der Rolle von TreT in Sulfolobus Spezies wurden Deletionsmutanten erstellt. In *S. acidocaldarius* wurden die Mutanten (MW001 Δ orfY, MW001 Δ treT (Dr. B. H. Mayer), MW001 Δ treY, MW001 Δ orfY Δ treT, MW001 Δ orfY Δ treY, MW001 Δ treT Δ treY und MW001 Δ treY Δ orfY Δ treT) konstruiert. Unter Standardbedingungen und verschiedenen Stressbedingungen (osmotischer Stress bei 250 mM NaCl bzw. 300 mM KCl und Temperaturstress von 83°C) wurde das Wachstum der Mutanten vergleichend zum Wildtyp photometrisch bei 600 nm untersucht. Die Deletion von *treY* wurde zusätzlich zu *treT* und *orfY* gewählt, da die Maltooligosyl-Trehalose-Synthase (TreY) das erste Enzym des TreY/TreZ-Weges ist und dieser nach der Deletion nicht mehr funktionell sein sollte. Zudem wird durch diese Mutante der Glykogenabbau in der Zelle nicht beeinflusst. Die Triplemutante (MW001 Δ treY Δ orfY Δ treT) sollte zeigen, dass die Trehalose-Synthese unter den gewählten Stresssituationen essentiell für das Wachstum der Zellen ist, da in dieser Mutante beide bekannten Trehalose-Synthese-Wege nicht mehr funktionell sein sollten. Ergänzend sollten die Doppelmutanten (MW001 Δ orfY Δ treT, MW001 Δ orfY Δ treY, MW001 Δ treT Δ treY) zusammen mit den Einzelmutaten (MW001 Δ orfY, MW001 Δ treT) Aufschluss über die Bedeutung des TreT-Weges und über die einzelnen Funktionen von TreT und OrfY innerhalb des TreT-Weges geben. Die Einzelmutante (MW001 Δ treY) sollte in Kombination mit der Triplemutante die Bedeutung des TreY/TreZ-Weges wieder geben.

Der Phänotyp der verschiedenen Deletionsmutanten zeigte unter Standardbedingungen keinen Unterschied zu dem des Wildtyps. Auch unter Temperaturstress zeigten WT und Mutanten kaum Unterschiede im Wachstumsphänotyp wobei bei allen Stämmen ein geringeres Wachstum

und ein schnelleres Erreichen der Absterbephase als unter Normalbedingungen zu beobachten war. Dagegen waren z.T. deutliche Unterschiede zwischen Mutanten und WT unter Salzstress zu beobachten, was auf eine generelle Funktion von Trehalose in der Adaptation von *Sulfolobus* an osmotischen Stress hinweist. Dies steht z.T. im Einklang mit den hier erzielten Ergebnissen für *S. solfataricus*. Auch zeigt der Wildtyp gegenüber der TreT-Mutante eine höhere Resistenz gegen den osmotischen Stress.

Der Effekt mit KCl war weniger stark ausgeprägt als mit NaCl, was zum einen auf die gegenüber KCl (250 mM) leicht erhöhte NaCl-Konzentration (300 mM) zurückzuführen sein könnte, zum anderen aber auch auf eine geringere Toleranz gegenüber NaCl. Na⁺-Ionen sind in höheren Konzentrationen häufig schädlich für die Zellen, wohingegen die ebenfalls einwertigen K⁺-Ionen kompatibel mit dem Metabolismus der Zellen sind (Maathuis & Amtmann, 1999). Sie dienen in der Zelle beispielsweise als Stabilisator und Effektor von Proteinen/Enzymen, wie z.B. in die Na⁺, K⁺-ATPase aus Nebennierenmark (Schwein), die durch K⁺ stabilisiert, durch Na⁺ aber destabilisiert (Kaufman *et al.*, 2012). Beide Ionen haben ähnliche physiochemische Strukturen. Das kleinere Na⁺-Ion kann durch eine große Hydrathülle das größere K⁺-Ion imitieren und so durch die K⁺-Ionenkanäle in die Zelle geschleust werden (Hagemann, 2011). Dies kann dann zum Kaliummangel in der Zelle führen, wodurch Kalium-abhängige Prozesse gehemmt werden (Maathuis & Amtmann, 1999).

Die Zugabe von KCl resultierte bei keiner der gewählten Mutanten in einer anhaltenden Inhibition des Wachstums. Wie zu erwarten zeigte die Triple-Mutante das schwächste Wachstum, konnte jedoch nach ca. 40 Std. (initiale Zugabe) ähnlich wie die anderen Zellen, anwachsen. Alle weiteren Mutanten zeigten kaum signifikante Unterschiede im Phänotyp.

Unter initialem NaCl-Stress wurde beobachtet, dass die Triple-Mutante kein Wachstum zeigte. Dies untermauert einerseits die Hypothese, dass Trehalose unter diesen Bedingungen essentiell für das Wachstum der Zellen ist und andererseits dass es keinen anderen Weg als die bereits Beschriebenen zur Trehalose-Synthese gibt. Auch die drei Doppelmutanten MW001 Δ treT Δ orfY, MW001 Δ treY Δ orfY und MW001 Δ treT Δ treY, sowie die Einzelmutanten MW001 Δ orfY und MW001 Δ treT zeigen unter initialem NaCl-Stress kein Wachstum, was bedeutet, dass sowohl TreT als auch OrfY für die Trehalose-Synthese unter diesen Bedingungen essentiell sind.

Wird NaCl erst in der exponentiellen-Phase zugegeben, beeinflusst dies das Wachstum der Mutanten weniger stark als unter initialem Stress. Wie zu erwarten, zeigt die Triple-Mutante kaum Wachstum (Abbildung 29C). Auffällig ist, dass die Mutante MW001 Δ treY im Gegensatz zu den initialen Stress kein Wachstum zeigt. Dazu passt die Beobachtung, dass auch MW001 Δ treY Δ orfY nicht in der Lage ist wieder anzuwachsen. Nur die Doppelmutante MW001 Δ treT Δ treY zeigt keine Inhibierung des Wachstums, was möglicherweise ein Artefakt darstellt. Dieser Versuch bedarf weiterer Validierungen. Die Doppelmutante MW001 Δ treT Δ orfY,

sowie die beiden Einzelmutanten MW001 Δ *treT* und MW001 Δ *orfY* zeigen kaum eine Inhibierung des Wachstums. Diese Ergebnisse deuten möglicherweise auf eine Wachstumsabhängigkeit der beiden Wege (TreT/OrfY bzw. TreY/TreZ-Weg) hin. Vergleicht man die beiden Versuche (initiale und spätere Zugabe von NaCl) so lässt sich vermuten, dass TreT/OrfY essentiell für das Anwachsen der Zellen ist. Dies könnte zum einen darauf hin deuten, dass beide Gene in der lag-Phase induziert werden, oder dass sie in der stationären Phase exprimiert werden und nach dem Überimpfen der Vorkultur bereits aktiv sind. TreY ist dabei nicht von Bedeutung, da die Einzelmutante ähnlich dem Wildtyp wächst. Zieht man nun in Betracht, dass der TreY/TreZ Maltodextrine und Glykogen als Substrat umsetzt, kann man spekulieren, dass dieser zu Beginn des Zellwachstums nicht von Bedeutung ist, da an dieser Stelle noch kein Speichermolekül (Glykogen) gebildet wurde. Der TreY/TreZ-Weg scheint also eher für die Protektion von *S. acidocaldarius* gegen Na⁺-Ionen in der exponentiellen Phase wichtig zu sein. Scheinbar werden die Proteine TreT und OrfY hauptsächlich in der lag-Phase, oder der stationären Phase (unter Annahme, dass TreT und OrfY nach dem Überimpfen noch exprimiert und aktiv sind) exprimiert, TreY hingegen in der exponentiellen Phase. Dies würde auch zu den Ergebnissen von MW001 Δ *orfY* und MW001 Δ *treT* passen. Liegt eine Deletion eines der Gene aus dem TreT-Operon vor, so kann dies erst in der exponentiellen Phase durch den TreY/TreZ-Weg ausgeglichen werden. Andersherum kann eine Deletion von *treY* nur in der lag-Phase durch TreT und OrfY ausgeglichen werden. Um diese Hypothese weiter zu untersuchen, würde es sich anbieten die Aktivitäten von TreT bzw. TreY/TreZ im Rohextrakt unter Salzstress in verschiedenen Wachstumsphasen zu untersuchen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass keine TreT-Aktivität im Rohextrakt von *S. acidocaldarius* und *S. solfataricus* in der exponentiellen Phase (OD₆₀₀ von 0,8) vorlag. Des Weiteren könnten qRT-PCR-Analysen Aufschluss darüber bringen, ob die Gene der beiden verschiedenen Trehalose-Synthese-Wege unter den beschriebenen Bedingungen (Salzstress und Wachstumsphasen) reguliert sind.

Der Befund, dass die MW001 Δ *orfY* Einzelmutante in einigen Fällen unter osmotischem Stress eine stärkere Inhibition im Wachstum zeigt als die MW001 Δ *treT* Einzelmutante, könnte in Kombination mit den Ergebnissen aus den DNA-Bindungsstudien für eine regulatorische Funktion von OrfY sprechen. Wie in 3.1.2.4 gezeigt, hat OrfY Ähnlichkeiten zu transkriptionellen Regulatoren und DNA-bindenden Proteinen der TetR-Familie. Möglicherweise dient OrfY auch als eine Art Induktor und/oder Repressor. Ist dieser deletiert, kann nicht mehr so viel Trehalose gebildet werden bzw. wird die Bildung von Trehalose nicht mehr kontrolliert. Auch diese Hypothese müsste mit weiteren Versuchen, wie Reportergentests untersucht werden.

Zusammengefasst zeigt sich, dass die Deletion dieser Gene unter Standardbedingungen keinen Einfluss auf das Wachstum von *S. acidocaldarius* hat. Es scheint also, dass die Trehalose-Synthese in erster Linie in Stresssituationen (besonders unter osmotischem Stress) von

Bedeutung ist. Dies untermauert weiterhin die Hypothese, dass Trehalose als kompatibles Solut in *Sulfolobus* Spezies vorkommt, während Glykogen der bevorzugte Kohlenstoffspeicher ist. Des Weiteren scheint es, als würden die beiden Trehalose-Synthese-Wege in *S. acidocaldarius* in unterschiedlichen Phasen des Wachstums von Bedeutung sein. Demnach würde der TreT/OrfY-Weg in erster Linie während der lag-Phase eine große Rolle spielen, wohingegen der TreY/TreZ-Weg die Trehalose-Synthese in der log-Phase übernimmt. In dem Rohextrakt von unter osmotischem Stress kultivierten *S. acidocaldarius* Zellen konnte keine TreT-Aktivität festgestellt werden. Dies mag mit der Wachstumsphase zusammenhängen.

Der Stamm *S. solfataricus* PBL2025 Δ *treT* zeigte sowohl unter Standardbedingungen und mildem bis mittlerem osmotischen Stress (200 mM – 600 mM NaCl), sowie bei suboptimaler Wachstumstemperatur (60°C) keinen veränderten Phänotypen im Vergleich zum Wildtyp *S. solfataricus* PBL2025. Bei einer Erhöhung der Temperatur auf 85°C zeigte die Mutante ein leicht verringertes Wachstum. Einen wesentlich deutlicheren Effekt hatte die Zugabe von 700 mM NaCl zum Medium, was das Wachstum der Mutante inhibierte nicht aber das Wachstum des WT. Das deutet darauf hin, dass der TreT Weg in *S. solfataricus* für die osmotische Stressantwort unter erhöhten Salzkonzentrationen essentiell ist. Entweder wird bei osmotischem Stress eher der TreT-Weg als der TreY/TreZ-Weg induziert, oder eine Kombination aus beiden. Dafür würde sprechen, dass bis zu einer Konzentration von 600 mM NaCl keine Änderungen im Wachstum detektiert werden konnten. Möglicherweise kann bis zu dieser Konzentration genug Trehalose über den TreY/TreZ-Weg zum Schutz der Zelle synthetisiert werden.

Mittels Metabolom-Analyse in *S. solfataricus* P2 konnte gezeigt werden, dass unter verschiedenen Temperaturen (70, 80°C) Trehalose das vorrangige Metabolit des zentralen Stoffwechsels ist. Der Trehalosepeak der GC-MS-Messungen zeigte immer die höchste Intensität (Wieloch, 2012). Von Martins *et al.* 1997, die Trehalose unter Normalbedingungen (Niedrigsalz) in *S. solfataricus* identifizierten, wurde postuliert, dass Trehalose in den (hyper-) thermophilen Archaea *T. acidophilum*, *T. tenax* und den Sulfolobales nicht als Osmoprotektant fungiert, da das Medium an sich eine sehr geringe Salzkonzentration enthält (Martins *et al.*, 1997). Es wäre sehr aufschlussreich, weitere Mutanten unter diesem Gesichtspunkt zu analysieren. In *S. solfataricus* wäre die zusätzliche Konstruktion einer TreY-Mutante sehr interessant. Auch eine Doppelmutante (Δ *treT* Δ *treY*) würde Aufschluss über die Funktion der TreT geben, jedoch ist es bisher nicht möglich markerlose Mutanten in *S. solfataricus* zu erstellen.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Deletion von *treT* bei *S. solfataricus*, zu einer vollständigen Inhibierung des Wachstums führt, wenn die Zellen initial mit 700 mM NaCl gestresst werden. Es liegt nahe, dass auch in *S. solfataricus* die beiden Trehalose-Synthese-Wege in verschiedenen Phasen des Wachstums reguliert sind. Übereinstimmend wurde bei Rohextrakt-Messungen mit Zellen, die in der exponentiellen Phase geerntet wurden, keine TreT-

Aktivität detektiert. Der Abbau von Trehalose in beiden Organismen ist bisher nicht geklärt. Es finden sich weder Homologe zu bekannten Trehalasen, noch zu MSCs. Möglicherweise verfügen *S. solfataricus* und *S. acidocaldarius* über völlig neuartige und gänzlich unbekannte Enzyme zum Abbau oder Export von Trehalose.

ZUSAMMENFASSUNG

Zusammenfassung

Die Rolle und Synthese von Trehalose sowie die Regulation der Trehalose-Synthese-Wege in Archaea ist bisher nicht völlig geklärt. In dieser Arbeit sollten der TPSP-Weg aus *T. tenax*, sowie der TreT/OrfY-Weg in den Crenarchaeota *T. tenax*, *S. acidocaldarius* und *S. solfataricus* untersucht werden, um eine mögliche Funktion von Trehalose als kompatibles Solut aufzuklären.

Die *T. tenax* Trehalose-6-Phosphat Synthase/Phosphatase (TPSP) zeigt eine hohe Phosphatase-Aktivität, muss jedoch über die kotranskribierte Glykosyltransferase (GT) aktiviert werden um über die bifunktionale Synthase-Phosphatase-Aktivität zu verfügen. Dabei beruht die Aktivierung der TPS-Aktivität durch GT auf der Fusion der beiden Domänen (TPS und TPP) der TPSP. „Yeast two-Hybrid“-Experimente deuten auf eine Komplexbildung *in vivo* hin; somit könnte dieser Komplex je nach Bedarf gesteuert werden. Zusätzlich zu diesem einzigartigen Komplex wurden Hinweise auf einen mechanosensitiven Kanal gefunden, der sich wahrscheinlich auf Änderungen der Membranspannung hin öffnet und schließt. So konnte ein Modell für die Stressantwort in *T. tenax* erstellt werden. Unter Stresseinwirkung, wie der Erhöhung der Salzkonzentration im Medium, bilden TPSP und GT einen Komplex, was zur Synthese von Trehalose führt. Somit kann die Zelle vor Schäden durch die gesteigerte Osmolarität geschützt werden. Ändern sich die Umgebungsbedingungen, so ändert sich auch die Membranspannung der Zelle. In Folge dessen öffnet sich der mechanosensitive Kanal und hydrierte Solute, wie z.B. Trehalose können aus der Zelle ausgeschleust werden. Normalisiert sich die Membranspannung, so schließt sich der Kanal wieder.

Der TreT/OrfY-Weg in *T. tenax* besteht aus der Trehalose Glykosyltransferierenden Synthase (TreT) und einem offenen Leserahmen unbekannter Funktion (OrfY). Wie von Kouril *et al.* 2008 gezeigt wurde, ist die TTX_TreT unidirektional, kann also nur die Synthese von Trehalose katalysieren und diese nicht abbauen. Dabei ist die Aktivität der TreT unabhängig von OrfY. Auch in *S. solfataricus* und *S. acidocaldarius* wurden die Gene *treT* und *orfY* identifiziert; in *S. acidocaldarius* bilden sie ein Operon. Dies scheint einzigartig für Thermoproteales und Sulfolobales, sowie für einige Bakterien. Ein Schwerpunkt der Arbeit war die Untersuchung von OrfY. Die Kristallisierung des Proteins (Dr. J. Martin, Prof. Dr. A. Lupas, MPI Tübingen) zeigte, dass das Protein OrfY eine völlig neuartige Faltung besitzt. OrfY besteht aus zwei nahezu identischen Domänen, die in HHpred Vorhersagen als TetR-Transkriptionsregulator-ähnliche Helix-turn-Helix (HTH)-Domänen identifiziert wurden. Ähnliche, jedoch nicht duplizierte HTH-Domänen finden sich neben den OrfY Homologen aus Bakterien und Archaea ebenfalls in Amylasen, PEP bindenden Proteinen, die teilweise als PEP Synthasen oder Pyruvat-Phosphat-

Dikinasen oder Antwort Regulatoren annotiert sind, wie auch in Proteinen unbekannter Funktion aus thermoacidophilen Organismen und proteinkodierenden Sequenzen aus Metagenomprojekten. Strukturvergleiche zeigten konservierte Reste (H49/157 und D67/171), die ein aktives Zentrum bilden könnten, welches durch die Aromaten F12/120 und W71/175 vermutlich stabilisiert wird. Dies deutet auf eine enzymatische Aktivität hin. Es konnte gezeigt werden, dass die Gegenwart von Trehalose oder Glukose die Oligomerisierung von OrfY beeinflussen. Des Weiteren wurde übereinstimmend mit der HTH-Domänenstruktur eine starke DNA-Bindung beobachtet. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass OrfY einerseits Zucker binden und eventuell auch enzymatisch umsetzen kann, zum anderen als Helix-turn-Helix-Domänen-Protein aber auch DNA binden könnte.

In den beiden untersuchten Sulfolobus Spezies findet sich zusätzlich zum TreT/OrfY-Weg ein zweiter Weg zur Trehalose-Synthese, der TreY/TreZ-Weg (Lama, 1990; Maruta, 1996). Für beide Organismen wurden Deletionsmutanten konstruiert (MW001 Δ orfY, MW001 Δ treT, MW001 Δ treY, MW001 Δ orfY Δ treT, MW001 Δ orfY Δ treY, MW001 Δ treT Δ treY und MW001 Δ treY Δ orfY Δ treT, bzw. *S. solfataricus* PBL2025 Δ treT), deren Wachstum unter verschiedenen Stressoren (erhöhte Salzkonzentration ((250 mM KCl, bzw. 300 mM NaCl) initial oder ab der logarithmischen-Wachstumsphase zugegeben (in *S. acidocaldarius*), bzw. 200 mM – 700 mM NaCl, initial zugegeben (bei *S. solfataricus*), so wie eine erhöhte Wachstumstemperatur von 83, bzw. 85°C) untersucht wurde. Durch diese Experimente konnte gezeigt werden, dass Trehalose für beide Organismen unter Salzstress (besonders NaCl) wichtig ist. Sowohl der TreT/OrfY- als auch der TreY/TreZ-Weg sind essentiell für eine Stressantwort; es scheint keinen weiteren Trehalose-Synthese-Weg in diesen Organismen zu geben. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass OrfY eine Rolle bei der Bildung von Trehalose spielt. Des Weiteren zeigte sich, dass sowohl Mutanten ohne *orfY*, als auch ohne *treT* einen veränderten Phänotyp gegenüber dem Wildtyp unter Stresseinwirkung ausweisen, was bedeutet, dass sowohl TreT als auch OrfY für einen funktionellen TreT/OrfY-Weg essentiell sind. Dabei könnte OrfY eine regulatorische Funktion haben, was zu den HHPred Vorhersagen des TTX_OrfYs passt. Die Versuche legen nahe, dass der TreT/OrfY-Weg wie auch der TreY/TreZ-Weg nicht konstitutiv genutzt wird, sondern beide Wege Wachstumsphasen abhängig sind. Um dies weiter zu untersuchen, müssen Rohextrakt-Analysen mit Zellen aus verschiedenen Wachstumsphasen durchgeführt werden. Die Trehalose-Synthese scheint also in den beiden Sulfolobus Spezies unter Stressbedingungen induziert zu werden und das Disaccharid als kompatibles Solut zu fungieren.

LITERATUR

Literatur

- Ahmed, H., Ettema, T. J. G., Tjaden, B., Geerling, A. C. M., Van Der Oost, J., & Siebers, B. (2005). The semi-phosphorylative entner-doudoroff pathway in hyperthermophilic archaea: A re-evaluation. *Biochemical Journal*, 390, 529-540.
- Ahmed, H., Tjaden, B., Hensel, R., & Siebers, B. (2004). Embden-meyerhof-parnas and entner-doudoroff pathways in *Thermoproteus tenax*: Metabolic parallelism or specific adaptation? *Biochemical Society Transactions*, 32, 303-304.
- Albers, S.-V., Elferink, M. G. L., Charlebois, R. L., Sensen, C. W., Driessen, A. J. M., & Konings, W. N. (1999). Glucose transport in the extremely thermoacidophilic *Sulfolobus solfataricus* involves a high-affinity membrane-integrated binding protein. *Journal of Bacteriology*, 181, 4285-4291.
- Albers, S. V., Jonuscheit, M., Dinkelaker, S., Urich, T., Kletzin, A., Tampé, R., et al. (2006). Production of recombinant and tagged proteins in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 102-111.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215, 403-410.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., et al. (1997). Gapped blast and psi-blast: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25, 3389-3402.
- Andersen, H. D., Wang, C., Arleth, L., Peters, G. H., & Westh, P. (2010). Reconciliation of opposing views on membrane-sugar interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 1874-1878.
- Arguelles, J. C. (2000). Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: A comparative analysis. *Arch Microbiol*, 174, 217-224.
- Auchtung, T. A., Takacs-Vesbach, C. D., & Cavanaugh, C. M. (2006). 16s rRNA phylogenetic investigation of the candidate division "Korarchaeota". *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 5077-5082.
- Avonce, N., Mendoza-Vargas, A., Morett, E., & Iturriaga, G. (2006). Insights on the evolution of trehalose biosynthesis. *BMC Evol Biol*, 6, 109.
- Avonce, N., Wuyts, J., Verschooten, K., Vandesteene, L., & Van Dijck, P. (2010). The *Cytophaga hutchinsonii* *chtpp*: First characterized bifunctional tps-tpp protein as putative ancestor of all eukaryotic trehalose biosynthesis proteins. *Mol Biol Evol*, 27, 359-369.
- Baker-Austin, C., & Dopson, M. (2007). Life in acid: pH homeostasis in acidophiles. *Trends in Microbiology*, 15, 165-171.
- Bell, W., Klaassen, P., Ohnacker, M., Boller, T., Herweijer, M., Schoppink, P., et al. (1992). Characterization of the 56-kDa subunit of yeast trehalose-6-phosphate synthase and cloning of its gene reveal its identity with the product of *cif1*, a regulator of carbon catabolite inactivation. *Eur J Biochem*, 209, 951-959.
- Bell, W., Sun, W., Hohmann, S., Wera, S., Reinders, A., De Virgilio, C., et al. (1998). Composition and functional analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* trehalose synthase complex. *J Biol Chem*, 273, 33311-33319.
- Bergeron, L. M., Lee, C., Tokatlian, T., Hájllrigl, V., & Clark, D. S. (2008). Chaperone function in organic co-solvents: Experimental characterization and modeling of a hyperthermophilic chaperone subunit from *Methanocaldococcus jannaschii*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1784, 368-378.
- Berkner, S., Wlodkowski, A., Albers, S. V., & Lipps, G. (2010). Inducible and constitutive promoters for genetic systems in *Sulfolobus acidocaldarius*. *Extremophiles*, 14, 249-259.
- Blazquez, M. A., Lagunas, R., Gancedo, C., & Gancedo, J. M. (1993). Trehalose-6-phosphate, a new regulator of yeast glycolysis that inhibits hexokinases. *FEBS Lett*, 329, 51-54.
- Blazquez, M. A., Santos, E., Flores, C. L., Martinez-Zapater, J. M., Salinas, J., & Gancedo, C. (1998). Isolation and molecular characterization of the *Arabidopsis thaliana* *tps1* gene, encoding trehalose-6-phosphate synthase. *Plant J*, 13, 685-689.

- Bonini, B. M., Van Vaeck, C., Larsson, C., Gustafsson, L., Ma, P., Winderickx, J., et al. (2000). Expression of *Escherichia coli* otsA in a *Saccharomyces cerevisiae* tps1 mutant restores trehalose 6-phosphate levels and partly restores growth and fermentation with glucose and control of glucose influx into glycolysis. *Biochem J*, 350 Pt 1, 261-268.
- Booth, I. R., Edwards, M. D., Black, S., Schumann, U., & Miller, S. (2007). Mechanosensitive channels in bacteria: Signs of closure? *Nat Rev Microbiol*, 5, 431-440.
- Bradford, M. M. (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.
- Brochier-Armanet, C., Boussau, B., Gribaldo, S., & Forterre, P. (2008). Mesophilic crenarchaeota: Proposal for a third archaeal phylum, the thaumarchaeota. *Nature Reviews Microbiology*, 6, 245-252.
- Brock, T. D., Brock, K. M., Belly, R. T., & Weiss, R. L. (1972). Sulfolobus: A new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. *Arch Mikrobiol*, 84, 54-68.
- Cambillau, C., & Claverie, J. M. (2000). Structural and genomic correlates of hyperthermostability. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 32383-32386.
- Carpinelli, J., KrÄmer, R., & Agosin, E. (2006). Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for trehalose overproduction: Role of the treyZ trehalose biosynthetic pathway. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 1949-1955.
- Cavicchioli, R. (2006). Cold-adapted archaea. *Nature Reviews Microbiology*, 4, 331-343.
- Chaban, B., Ng, S. Y. M., & Jarrell, K. F. (2006). Archaeal habitats - from the extreme to the ordinary. *Canadian Journal of Microbiology*, 52, 73-116.
- Chen, L., Brugger, K., Skovgaard, M., Redder, P., She, Q., Torarinsson, E., et al. (2005). The genome of *Sulfolobus acidocaldarius*, a model organism of the crenarchaeota. *J Bacteriol*. 2005 Jul;187(14):4992-9.
- Chen, Y. S., Lee, G. C., & Shaw, J. F. (2006). Gene cloning, expression, and biochemical characterization of a recombinant trehalose synthase from *Picrophilus torridus* in *Escherichia coli*. *J Agric Food Chem*, 54, 7098-7104.
- Chou, H. H., Chang, S. W., Lee, G. C., Chen, Y. S., Yeh, T., Akoh, C. C., et al. (2010). Site-directed mutagenesis improves the thermostability of a recombinant *Picrophilus torridus* trehalose synthase and efficiency for the production of trehalose from sweet potato starch. *Food Chemistry*, 119, 1017-1022.
- Colaco, C., Sen, S., Thangavelu, M., Pinder, S., & Roser, B. (1992). Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: Simplified molecular biology. *Nature Biotechnology*, 10, 1007-1011.
- Cowan, D. A. (1997). Thermophilic proteins: Stability and function in aqueous and organic solvents. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Physiology*, 118, 429-438.
- Crowe, L. M., Reid, D. S., & Crowe, J. H. (1996). Is trehalose special for preserving dry biomaterials? *Biophysical Journal*, 71, 2087-2093.
- da Costa, M. S., Santos, H., & Galinski, E. A. (1998). An overview of the role and diversity of compatible solutes in bacteria and archaea. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 61, 117-153.
- Daniel, R. M., & Cowan, D. A. (2000). Biomolecular stability and life at high temperatures. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 57, 250-264.
- De Klerk, G. J., & Pumitapon, P. (2008). Protection of in-vitro grown *Arabidopsis* seedlings against abiotic stresses. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 95, 149-154.
- De Maio, A. (1999). Heat shock proteins: Facts, thoughts, and dreams. *Shock*, 11, 1-12.
- Delong, E. F. (1998). Everything in moderation: Archaea as 'non-extremophiles'. *Current Opinion in Genetics and Development*, 8, 649-654.
- DeLong, E. F., & Pace, N. R. (2001). Environmental diversity of bacteria and archaea. *Systematic Biology*, 50, 470-478.
- Deng, L., Zhu, H., Chen, Z., Liang, Y. X., & She, Q. (2009). Unmarked gene deletion and host-vector system for the hyperthermophilic crenarchaeon *Sulfolobus islandicus*. *Extremophiles*, 13, 735-746.

- Di Giulio, M. (2007). The tree of life might be rooted in the branch leading to nanoarchaeota. *Gene*, 401, 108-113.
- Di Lernia, I., Morana, A., Ottombrino, A., Fusco, S., Rossi, M., & De Rosa, M. (1998). Enzymes from *Sulfolobus shibatae* for the production of trehalose and glucose from starch. *Extremophiles*, 2, 409-416.
- DiRuggiero, J., Dunn, D., Maeder, D. L., Holley-Shanks, R., Chatard, J., Horlacher, R., et al. (2000). Evidence of recent lateral gene transfer among hyperthermophilic archaea. *Molecular Microbiology*, 38, 684-693.
- Elbein, A. D., Pan, Y. T., Pastuszak, I., & Carroll, D. (2003). New insights on trehalose: A multifunctional molecule. *Glycobiology*, 13, 17R-27R.
- Elkins, J. G., Podar, M., Graham, D. E., Makarova, K. S., Wolf, Y., Randau, L., et al. (2008). A korarchaeal genome reveals insights into the evolution of the archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 8102-8107.
- Empadinhas, N., & Da Costa, M. S. (2006). Diversity and biosynthesis of compatible solutes in hyper/thermophiles. *International Microbiology*, 9, 199-206.
- Empadinhas, N., & da Costa, M. S. (2008). Osmoadaptation mechanisms in prokaryotes: Distribution of compatible solutes. *Int Microbiol*, 11, 151-161.
- Empadinhas, N., Marugg, J. D., Borges, N., Santos, H., & Da Costa, M. S. (2001). Pathway for the synthesis of mannosylglycerate in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii*: Biochemical and genetic characterization of key enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 43580-43588.
- Engler-Blum, G., Meier, M., Frank, J., & Muller, G. A. (1993). Reduction of background problems in nonradioactive northern and southern blot analyses enables higher sensitivity than 32p-based hybridizations. *Analytical Biochemistry*, 210, 235-244.
- Eric Collins, R., Rocap, G., & Deming, J. W. (2010). Persistence of bacterial and archaeal communities in sea ice through an arctic winter. *Environmental Microbiology*, 12, 1828-1841.
- Evguenieva-Hackenberg, E., & Klug, G. (2011). New aspects of rna processing in prokaryotes. *Current Opinion in Microbiology*, 14, 587-592.
- Fang, T. Y., Hung, X. G., Shih, T. Y., & Tseng, W. C. (2004). Characterization of the trehalosyl dextrin-forming enzyme from the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* atcc 35092. *Extremophiles*, 8, 335-343.
- Fang, T. Y., Tseng, W. C., Chung, Y. T., & Pan, C. H. (2006). Mutations on aromatic residues of the active site to alter selectivity of the *Sulfolobus solfataricus* maltooligosyltrehalose synthase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 3585-3590.
- Fang, T. Y., Tseng, W. C., Guo, M. S., Shih, T. Y., & Hung, X. G. (2006). Expression, purification, and characterization of the maltooligosyltrehalose trehalohydrolase from the thermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* atcc 35092. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7105-7112.
- Feller, G. (2010). Protein stability and enzyme activity at extreme biological temperatures. *Journal of Physics Condensed Matter*, 22.
- Feller, G., & Gerday, C. (2003). Psychrophilic enzymes: Hot topics in cold adaptation. *Nature reviews. Microbiology*, 1, 200-208.
- Fendrihan, S., Legat, A., Pfaffenhuemer, M., Gruber, C., Weidler, G., Gerbl, F., et al. (2006). Extremely halophilic archaea and the issue of long-term microbial survival. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 5, 203-218.
- Feng, W., Tejero, R., Zimmerman, D. E., Inouye, M., & Montelione, G. T. (1998). Solution nmr structure and backbone dynamics of the major cold-shock protein (cspa) from *Escherichia coli*: Evidence for conformational dynamics in the single-stranded rna-binding site. *Biochemistry*, 37, 10881-10896.
- Fischer, F., Zillig, W., Stetter, K. O., & Schreiber, G. (1983). Chemolithoautotrophic metabolism of anaerobic extremely thermophilic archaeobacteria. *Nature*, 301, 511-513.
- Francois, J., & Parrou, J. L. (2001). Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 25, 125-145.

- Freeman, B. C., Chen, C., & Beattie, G. A. (2010). Identification of the trehalose biosynthetic loci of *Pseudomonas syringae* and their contribution to fitness in the phyllosphere. *Environmental Microbiology*, 12, 1486-1497.
- Frickey, T., & Lupas, A. (2004). Clans: A java application for visualizing protein families based on pairwise similarity. *Bioinformatics*, 20, 3702-3704.
- Georlette, D., Blaise, V., Collins, T., D'Amico, S., Gratia, E., Hoyoux, A., et al. (2004). Some like it cold: Biocatalysis at low temperatures. *FEMS Microbiology Reviews*, 28, 25-42.
- Giaever, H. M., Styrvold, O. B., Kaasen, I., & Strom, A. R. (1988). Biochemical and genetic characterization of osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 170, 2841-2849.
- Gibson, R. P., Tarling, C. A., Roberts, S., Withers, S. G., & Davies, G. J. (2004). The donor subsite of trehalose-6-phosphate synthase: Binary complexes with udp-glucose and udp-2-deoxy-2-fluoro-glucose at 2 Å... resolution. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 1950-1955.
- Gibson, R. P., Turkenburg, J. P., Charnock, S. J., Lloyd, R., & Davies, G. J. (2002). Insights into trehalose synthesis provided by the structure of the retaining glucosyltransferase otsa. *Chem Biol*, 9, 1337-1346.
- Gil, A. M., Belton, P. S., & Felix, V. (1996). Spectroscopic studies of solid α -D-trehalose. *Spectrochimica Acta - Part A Molecular Spectroscopy*, 52, 1649-1659.
- Goedl, C., Griessler, R., Schwarz, A., & Nidetzky, B. (2006). Structure-function relationships for *Schizophyllum commune* trehalose phosphorylase and their implications for the catalytic mechanism of family gt-4 glycosyltransferases. *Biochemical Journal*, 397, 491-500.
- Gibbon, E. M., Sen, S. D., Roser, B. J., & Kampinga, J. (1996). Stabilisation of vaccines using trehalose (q-t4) technology. *Developments in biological standardization*, 87, 193-199.
- Grogan, D. W. (1989). Phenotypic characterization of the archaeobacterial genus *Sulfolobus*: Comparison of five wild-type strains. *Journal of Bacteriology*, 171, 6710-6719.
- Grogan, D. W. (2009). Homologous recombination in *Sulfolobus acidocaldarius*: Genetic assays and functional properties. *Biochemical Society Transactions*, 37, 88-91.
- Grogan, D. W., & Gunsalus, R. P. (1993). *Sulfolobus acidocaldarius* synthesizes ump via a standard de novo pathway: Results of a biochemical-genetic study. *Journal of Bacteriology*, 175, 1500-1507.
- Gueguen, Y., Rolland, J. L., Schroeck, S., Flament, D., Defretin, S., Saniez, M. H., et al. (2001). Characterization of the maltooligosyl trehalose synthase from the thermophilic archaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. *FEMS Microbiology Letters*, 194, 201-206.
- Hackel, C., Zinkevich, T., Belton, P., Achilles, A., Reichert, D., & Krushelnitsky, A. (2012). The trehalose coating effect on the internal protein dynamics. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 14, 2727-2734.
- Hagemann, M. (2011). Molecular biology of cyanobacterial salt acclimation. *FEMS Microbiology Reviews*, 35, 87-123.
- Hanford, M. J., & Peeples, T. L. (2002). Archaeal tetraether lipids: Unique structures and applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*, 97, 45-62.
- Higashiyama, T. (2002). Novel functions and applications of trehalose. *Pure and Applied Chemistry*, 74, 1263-1269.
- Huber, H., Hohn, M. J., Rachel, R., Fuchs, T., Wimmer, V. C., & Stetter, K. O. (2002). A new phylum of archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature*, 417, 63-67.
- Ilk, N., Egelseer, E. M., & Sleytr, U. B. (2011). S-layer fusion proteins-construction principles and applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 22, 824-831.
- Imanaka, T. (2011). Molecular bases of thermophily in hyperthermophiles. *Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences*, 87, 587-602.
- Itoh, T., Yoshikawa, N., & Takashina, T. (2007). *Thermogymnomonas acidicola* gen. Nov., sp. Nov., a novel thermoacidophilic, cell wall-less archaeon in order thermoplasmatales, isolated from a solfataric soil in hakone, japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57, 2557-2561.
- Iturriaga, G., Suarez, R., & Nova-Franco, B. (2009). Trehalose metabolism: From osmoprotection to signaling. *Int J Mol Sci*, 10, 3793-3810.

- Jain, N., & Roy, I. (2009). Effect of trehalose on protein structure. *Protein Science*, 18, 24-36.
- Jain, N. K., & Roy, I. (2008). Trehalose and protein stability. *Current Protocols in Protein Science*, 4.9.1-4.9.12.
- Jarrell, K. F. (2012). Control of archaellation in *Sulfolobus acidocaldarius*: Unravelling of the regulation of surface structure biosynthesis in archaea begins. *Molecular Microbiology*, 86, 1-5.
- Jarrell, K. F., Walters, A. D., Bochiwal, C., Borgia, J. M., Dickinson, T., & Chong, J. P. J. (2011). Major players on the microbial stage: Why archaea are important. *Microbiology*, 157, 919-936.
- Joshua, C. J., Dahl, R., Benke, P. I., & Keasling, J. D. (2011). Absence of diauxie during simultaneous utilization of glucose and xylose by *Sulfolobus acidocaldarius*. *Journal of Bacteriology*, 193, 1293-1301.
- Kaasen, I., Falkenberg, P., Styrvold, O. B., & Strom, A. R. (1992). Molecular cloning and physical mapping of the otsba genes, which encode the osmoregulatory trehalose pathway of *Escherichia coli*: Evidence that transcription is activated by katf (appr). *Journal of Bacteriology*, 174, 889-898.
- Kaasen, I., McDougall, J., & Strom, A. R. (1994). Analysis of the otsba operon for osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli* and homology of the otsa and otsb proteins to the yeast trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex. *Gene*, 145, 9-15.
- Kang, H. K., Cha, H., Yang, T. J., Park, J. T., Lee, S., Kim, Y. W., et al. (2008). Enzymatic synthesis of dimaltosyl- α -cyclodextrin via a transglycosylation reaction using trex, a *Sulfolobus solfataricus* p2 debranching enzyme. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 366, 98-103.
- Kato, S., Shimizu-Ibuka, A., Mura, K., Takeuchi, A., Tokue, C., & Arai, S. (2007). Molecular cloning and characterization of an α -amylase from *Pichia burtonii* 15-1. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 71, 3007-3013.
- Kaufman, S. B., González-Flecha, F. L., & González-Lebrero, R. M. (2012). Opposing effects of Na⁺ and K⁺ on the thermal stability of Na⁺,K⁺-ATPase. *Journal of Physical Chemistry B*, 116, 3421-3429.
- Kloda, A., & Martinac, B. (2001a). Mechanosensitive channel of *thermoplasma*, the cell wall-less archaea: Cloning and molecular characterization. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 34, 321-347.
- Kloda, A., & Martinac, B. (2001b). Mechanosensitive channels in archaea. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 34, 349-381.
- Kloda, A., & Martinac, B. (2001c). Molecular identification of a mechanosensitive channel in archaea. *Biophys J*, 80, 229-240.
- Kloda, A., & Martinac, B. (2001d). Structural and functional differences between two homologous mechanosensitive channels of *Methanococcus jannaschii*. *EMBO Journal*, 20, 1888-1896.
- Klok, C. J. (2010). Biological glass: A strategy to survive desiccation and heat. *Journal of Experimental Biology*, 213.
- Kobayashi, K., Kato, M., Miura, Y., Kettoku, M., Komeda, T., & Iwamatsu, A. (1996). Gene cloning and expression of new trehalose-producing enzymes from the hyperthermophilic archaeum *Sulfolobus solfataricus* km1. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 60, 1882-1885.
- Koh, S., Shin, H. J., Kim, J. S., Lee, D. S., & Lee, S. Y. (1998). Trehalose synthesis from maltose by a thermostable trehalose synthase from *Thermus caldophilus*. *Biotechnology Letters*, 20, 757-761.
- Kohn, W. D., Mant, C. T., & Hodges, R. S. (1997). Alpha-helical protein assembly motifs. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 2583-2586.
- König, H., Kandler, O., Jensen, M., & Rietschel, E. T. (1983). The primary structure of the glycan moiety of pseudomurein from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie*, 364, 627-636.
- König, H., Kralik, R., & Kandler, O. (1982). Structure and modifications of pseudomurein in methanobacteriales. *Zentralblatt für Bakteriologie. Allgemeine Angewandte und Okologische Microbiologie Abt.1 Orig.C Hyg.*, 3, 179-191.

- König, H., Skorko, R., Zillig, W., & Reiter, W. D. (1982). Glycogen in thermoacidophilic archaebacteria of the genera *sulfolobus*, *thermoproteus*, *desulfurococcus* and *thermococcus*. *Arch Microbiol*, 132, 297-303.
- Kouril, T., Wieloch, P., Reimann, J., Wagner, M., Zaparty, M., Albers, S. V., et al. (2013). Unraveling the function of the two entner-doudoroff branches in the thermoacidophilic crenarchaeon *sulfolobus solfataricus* p2. *FEBS Journal*, 280, 1126-1138.
- Kouril, T., Zaparty, M., Marrero, J., Brinkmann, H., & Siebers, B. (2008). A novel trehalose synthesizing pathway in the hyperthermophilic crenarchaeon *Thermoproteus tenax*: The unidirectional tret pathway. *Arch Microbiol*, 190, 355-369.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lama, L., Nicolaus, B., Trincone, A., Morzillo, P., De Rosa, M., & Gambacorta, A. (1990). Starch conversion with immobilized thermophilic archaebacterium *Sulfolobus solfataricus*. *Biotechnology Letters*, 12, 431-432.
- Lamosa, P., Martins, L. O., Da Costa, M. S., & Santos, H. (1998). Effects of temperature, salinity, and medium composition on compatible solute accumulation by *thermococcus* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3591-3598.
- Le Dain, A. C., Saint, N., Kloda, A., Ghazi, A., & Martinac, B. (1998). Mechanosensitive ion channels of the archaeon *Haloflex volcanii*. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 12116-12119.
- Lee, K. Y., Chang, Y. D., & Kim, Y. G. (2002). Trehalose, a major sugar cryoprotectant of the overwintering rice water weevil, *Lissorhoptrus oryzophilus* (coleoptera: Curculionidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 5, 35-41.
- Lee, S. J., Moulakakis, C., Koning, S. M., Hausner, W., Thomm, M., & Boos, W. (2005). Trmb, a sugar sensing regulator of abc transporter genes in *Pyrococcus furiosus* exhibits dual promoter specificity and is controlled by different inducers. *Molecular Microbiology*, 57, 1797-1807.
- Lehmacher, A., Vogt, A. B., & Hensel, R. (1990). Biosynthesis of cyclic 2,3-diphosphoglycerate. Isolation and characterization of 2-phosphoglycerate kinase and cyclic 2,3-diphosphoglycerate synthetase from *Methanothermus fervidus*. *FEBS Letters*, 272, 94-98.
- Littlechild, J. A., Guy, J., Connelly, S., Mallett, L., Waddell, S., Rye, C. A., et al. (2007). Natural methods of protein stabilization: Thermostable biocatalysts. *Biochemical Society Transactions*, 35, 1558-1563.
- Liu, Z., Walton, T. A., & Rees, D. C. (2010). A reported archaeal mechanosensitive channel is a structural homolog of marR-like transcriptional regulators. *Protein Science*, 19, 808-814.
- Luo, Y., Yang, X. H., & Wang, W. (2007). Trehalose-mediated signal transduction and stress tolerance in plants. *Shengtai Xuebao/Acta Ecologica Sinica*, 27, 5382-5389.
- Maathuis, F. J. M., & Amtmann, A. (1999). K⁺ nutrition and na⁺ toxicity: The basis of cellular k⁺/na⁺ ratios. *Annals of Botany*, 84, 123-133.
- Manual Roche Applied Science, R. 2003. Dig application manual for filter hybridization.
- Mardanov, A., Ravin, N., Svetlitchnyi, V., Beletsky, A., Miroshnichenko, M., Bonch-Osmolovskaya, E., et al. (2009). Metabolic versatility and indigenous origin of the archaeon *Thermococcus sibiricus*, isolated from a siberian oil reservoir, as revealed by genome analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 4580-4588.
- Mardanov, A. V., & Ravin, N. V. (2012). The impact of genomics on research in diversity and evolution of archaea. *Biochemistry (Moscow)*, 77, 799-812.
- Martinac, B. (2004). Mechanosensitive ion channels: Molecules of mechanotransduction. *J Cell Sci*, 117, 2449-2460.
- Martins, L. O., Huber, R., Huber, H., Stetter, K. O., Da Costa, M. S., & Santos, H. (1997). Organic solutes in hyperthermophilic archaea. *Appl Environ Microbiol*, 63, 896-902.
- Martins, L. O., & Santos, H. (1995). Accumulation of mannosylglycerate and di-myo-inositol-phosphate by *Pyrococcus furiosus* in response to salinity and temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 3299-3303.
- Maruta, K., Mitsuzumi, H., Nakada, T., Kubota, M., Chaen, H., Fukuda, S., et al. (1996). Cloning and sequencing of a cluster of genes encoding novel enzymes of trehalose biosynthesis from

- thermophilic archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Biochim Biophys Acta*, 1291, 177-181.
- Maruta, K., Mukai, K., Yamashita, H., Kubota, M., Chaen, H., Fukuda, S., et al. (2002). Gene encoding a trehalose phosphorylase from *Thermoanaerobacter brockii* atcc 35047. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 66, 1976-1980.
- Matarazzo, F., Ribeiro, A. C., Faveri, M., Taddei, C., Martinez, M. B., & Mayer, M. P. A. (2012). The domain archaea in human mucosal surfaces. *Clinical Microbiology and Infection*, 18, 834-840.
- Mavromatis, K., Ivanova, N., Anderson, I., Lykidis, A., Hooper, S. D., Sun, H., et al. (2009). Genome analysis of the anaerobic thermohalophilic bacterium *Halothermothrix orenii*. *PLoS ONE*, 4.
- Mukai, K., Tabuchi, A., Nakada, T., Shibuya, T., Chaen, H., Fukuda, S., et al. (1997). Production of trehalose from starch by thermostable enzymes from *Sulfolobus acidocaldarius*. *Starch - Stärke*, 49, 26-30.
- Newton, D. W. (2011). Maillard reactions in pharmaceutical formulations and human health. *International Journal of Pharmaceutical Compounding*, 15, 32-40.
- Nishimoto, T., Nakada, T., Chaen, H., Fukuda, S., Sugimoto, T., Kurimoto, M., et al. (1996). Purification and characterization of a thermostable trehalose synthase from *Thermus aquaticus*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 60, 835-839.
- Nishimoto, T., Nakano, M., Nakada, T., Chaen, H., Fukuda, S., Sugimoto, T., et al. (1996). Purification and properties of a novel enzyme, trehalose synthase, from *Pimelobacter* sp. R48. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 60, 640-644.
- Nishimoto, T., Nakano, M., Nakada, T., Chaen, H., Fukuda, S., Sugimoto, T., et al. (1996). Purification and properties of a novel enzyme, trehalose synthase, from *Pimelobacter* sp. R48. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 60, 640-644.
- Nunn, C. E. M., Johnsen, U., Schönheit, P., Fuhrer, T., Sauer, U., Hough, D. W., et al. (2010). Metabolism of pentose sugars in the hyperthermophilic archaea *Sulfolobus solfataricus* and *Sulfolobus acidocaldarius*. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 33701-33709.
- Nunoura, T., Takaki, Y., Kakuta, J., Nishi, S., Sugahara, J., Kazama, H., et al. (2011). Insights into the evolution of archaea and eukaryotic protein modifier systems revealed by the genome of a novel archaeal group. *Nucleic Acids Research*, 39, 3204-3223.
- Nwaka, S., & Holzer, H. (1998). Molecular biology of trehalose and the trehalases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, 58, 197-237.
- Orita, I., Sato, T., Yurimoto, H., Kato, N., Atomi, H., Imanaka, T., et al. (2006). The ribulose monophosphate pathway substitutes for the missing pentose phosphate pathway in the archaeon *Thermococcus kodakaraensis*. *Journal of Bacteriology*, 188, 4698-4704.
- Park, H. S., Park, J. T., Kang, H. K., Cha, H., Kim, D. S., Kim, J. W., et al. (2007). Trex from *Sulfolobus solfataricus* atcc 35092 displays isoamylase and 4- α -glucanotransferase activities. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 71, 1348-1352.
- Park, J. T., Park, H. S., Kang, H. K., Hong, J. S., Cha, H., Woo, E. J., et al. (2008). Oligomeric and functional properties of a debranching enzyme (trex) from the archaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. *Biocatalysis and Biotransformation*, 26, 76-85.
- Pester, M., Schleper, C., & Wagner, M. (2011). The thaumarchaeota: An emerging view of their phylogeny and ecophysiology. *Current Opinion in Microbiology*, 14, 300-306.
- Pflüger, K., Baumann, S., Gottschalk, G., Lin, W., Santos, H., & Müller, V. (2003). Lysine-2,3-aminomutase and β -lysine acetyltransferase genes of methanogenic archaea are salt induced and are essential for the biosynthesis of ϵ -acetyl- β -lysine and growth at high salinity. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 6047-6055.
- Philippe, H. (1993). Must, a computer package of management utilities for sequences and trees. *Nucleic Acids Research*, 21, 5264-5272.
- Qu, Q., Lee, S. J., & Boos, W. (2004). Tret, a novel trehalose glycosyltransferring synthase of the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*. *J Biol Chem*, 279, 47890-47897.

- Rao, K. N., Kumaran, D., Seetharaman, J., Bonanno, J. B., Burley, S. K., & Swaminathan, S. (2006). Crystal structure of trehalose-6-phosphate phosphatase-related protein: Biochemical and biological implications. *Protein Sci*, 15, 1735-1744.
- Ren, Y., Dai, X., Zhou, J., Liu, J., Pei, H., & Xiang, H. (2005). Gene expression and molecular characterization of a thermostable trehalose phosphorylase from *Thermoanaerobacter tengcongensis*. *Sci China C Life Sci*, 48, 221-227.
- Roser, B. (1991). Trehalose, a new approach to premium dried foods. *Trends in Food Science and Technology*, 2, 166-169.
- Ryu, S. I., Kim, J. E., Kim, E. J., Chung, S. K., & Lee, S. B. (2011). Catalytic reversibility of *Pyrococcus horikoshii* trehalose synthase: Efficient synthesis of several nucleoside diphosphate glucoses with enzyme recycling. *Process Biochemistry*, 46, 128-134.
- Ryu, S. I., Park, C. S., Cha, J., Woo, E. J., & Lee, S. B. (2005). A novel trehalose-synthesizing glycosyltransferase from *Pyrococcus horikoshii*: Molecular cloning and characterization. *Biochem Biophys Res Commun*, 329, 429-436.
- Sambrook, J., & Russell, D. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual*: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sampedro, J. G., & Uribe, S. (2004). Trehalose-enzyme interactions result in structure stabilization and activity inhibition. The role of viscosity. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 256-257, 319-327.
- Santos, C. L., Tavares, F., Thioulouse, J., & Normand, P. (2009). A phylogenomic analysis of bacterial helix-turn-helix transcription factors. *FEMS Microbiology Reviews*, 33, 411-429.
- Scandurra, R., Consalvi, V., Chiaraluce, R., Politi, L., & Engel, P. C. (2000). Protein stability in extremophilic archaea. *Front Biosci*, 5, D787-795.
- Schiraldi, C., Di Lernia, I., & De Rosa, M. (2002). Trehalose production: Exploiting novel approaches. *Trends in Biotechnology*, 20, 420-425.
- Schleper, C., Puehler, G., Holz, I., Gambacorta, A., Janekovic, D., Santarius, U., et al. (1995). Picrophilus gen. Nov., fam. Nov.: A novel aerobic, heterotrophic, thermoacidophilic genus and family comprising archaea capable of growth around pH 0. *Journal of Bacteriology*, 177, 7050-7059.
- Schleper, C., Puhler, G., Kuhlmoorgen, B., & Zillig, W. (1995). Life at extremely low pH [2]. *Nature*, 375, 741-742.
- Selye, H. (1977). Present status of the stress concept. *Clinical Therapeutics*, 1, 3-15.
- Seo, J. A., Kwon, H. J., Kim, H. K., & Hwang, Y. H. (2008). A study of α -relaxations in trehalose super cooled liquids pp. 702-705).
- She, Q., Singh, R. K., Confalonieri, F., Zivanovic, Y., Allard, G., Awayez, M. J., et al. (2001). The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, 7835-7840.
- Shima, S., Hårrault, D. A., Berkessel, A., & Thauer, R. K. (1998). Activation and thermostabilization effects of cyclic 2,3- diphosphoglycerate on enzymes from the hyperthermophilic *Methanopyrus kandleri*. *Archives of Microbiology*, 170, 469-472.
- Siebers, B., & Hensel, R. (1993). Glucose catabolism of the hyperthermophilic archaeum *Thermoproteus tenax*. *FEMS Microbiology Letters*, 111, 1-7.
- Siebers, B., & Schönheit, P. (2005). Unusual pathways and enzymes of central carbohydrate metabolism in archaea. *Current Opinion in Microbiology*, 8, 695-705.
- Siebers, B., Tjaden, B., Michalke, K., Dorr, C., Ahmed, H., Zaparty, M., et al. (2004). Reconstruction of the central carbohydrate metabolism of *Thermoproteus tenax* by use of genomic and biochemical data. *J Bacteriol*, 186, 2179-2194.
- Siebers, B., Zaparty, M., Raddatz, G., Tjaden, B., Albers, S. V., Bell, S. D., et al. (2011). The complete genome sequence of *Thermoproteus tenax*: A physiologically versatile member of the crenarchaeota. *PLoS ONE*, 6.
- Siglioccolo, A., Paiardini, A., Piscitelli, M., & Pascarella, S. (2011). Structural adaptation of extreme halophilic proteins through decrease of conserved hydrophobic contact surface. *BMC Structural Biology*, 11.
- Söding, J. (2005a). Erratum: Protein homology detection by hmm-hmm comparison (bioinformatics (2005) vol. 21 (951-960)). *Bioinformatics*, 21, 2144.

- Söding, J. (2005b). Protein homology detection by hmm-hmm comparison. *Bioinformatics*, 21, 951-960.
- Söding, J., Biegert, A., & Lupas, A. N. (2005). The hhpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Research*, 33, W244-W248.
- Sorokin, D. Y. (2005). Is there a limit for high-ph life? *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 1405-1406.
- Stetter, K. O. (1999). Extremophiles and their adaptation to hot environments. *FEBS Letters*, 452, 22-25.
- Suhre, K., & Claverie, J. M. (2003). Genomic correlates of hyperthermostability, an update. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 17198-17202.
- Sussich, F., Urbani, R., Princivale, F., & Cesàro, A. (1998). Polymorphic amorphous and crystalline forms of trehalose. *Journal of the American Chemical Society*, 120, 7893-7899.
- Talavera, G., & Castresana, J. (2007). Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Syst Biol*, 56, 564-577.
- Teramoto, N., Sachinvala, N. D., & Shibata, M. (2008). Trehalose and trehalose-based polymers for environmentally benign, biocompatible and bioactive materials. *Molecules*, 13, 1773-1816.
- Thevelein, J. M., & Hohmann, S. (1995). Trehalose synthase: Guard to the gate of glycolysis in yeast? *Trends Biochem Sci*, 20, 3-10.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). Clustal w: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22, 4673-4680.
- Thompson, M. J., & Eisenberg, D. (1999). Transproteomic evidence of a loop-deletion mechanism for enhancing protein thermostability. *Journal of Molecular Biology*, 290, 595-604.
- Tjaden, B., Plagens, A., Dörr, C., Siebers, B., & Hensel, R. (2006). Phosphoenolpyruvate synthetase and pyruvate, phosphate dikinase of *Thermoproteus tenax*: Key pieces in the puzzle of archaeal carbohydrate metabolism. *Molecular Microbiology*, 60, 287-298.
- Tsusaki, K., Nishimoto, T., Nakada, T., Kubota, M., Chaen, H., Sugimoto, T., et al. (1996). Cloning and sequencing of trehalose synthase gene from *Pimelobacter* sp. R48. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1290, 1-3.
- Van der Borght, J., Chen, C., Hoflack, L., Van Renterghem, L., Desmet, T., & Soetaert, W. (2011). Enzymatic properties and substrate specificity of the trehalose phosphorylase from *Caldanaerobacter subterraneus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 6939-6944.
- Van Der Oost, J., & Siebers, B. 2007. The glycolytic pathways of archaea: Evolution by tinkering. In R. A. Garrett & H.-P. Klenk (Eds) *Archaea: Evolution, physiology and molecular biology* pp. 247-259). Singapore: Blackwell Publishing.
- Verhees, C. H., Kengen, S. W. M., Tuininga, J. E., Schut, G. J., Adams, M. W. W., De Vos, W. M., et al. (2003). The unique features of glycolytic pathways in archaea. *Biochemical Journal*, 375, 231-246.
- Verhees, C. H., Kengen, S. W. M., Tuininga, J. E., Schut, G. J., Adams, M. W. W., De Vos, W. M., et al. (2004). Erratum: The unique features of glycolytic pathways in archaea (biochemical journal (2003) 375 (231-246)). *Biochemical Journal*, 377, 819-822.
- Vieille, C., & Zeikus, G. J. (2001). Hyperthermophilic enzymes: Sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65, 1-43.
- Visweswaran, G. R. R., Dijkstra, B. W., & Kok, J. (2011). Murein and pseudomurein cell wall binding domains of bacteria and archaea—a comparative view. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92, 921-928.
- Wagner, M., Berkner, S., Ajon, M., Driessen, A. J. M., Lipps, G., & Albers, S. V. (2009). Expanding and understanding the genetic toolbox of the hyperthermophilic genus *Sulfolobus*. *Biochemical Society Transactions*, 37, 97-101.
- Walsby, A. E. (2005). Archaea with square cells. *Trends in Microbiology*, 13, 193-195.
- Wannet, W. J. B., Op Den Camp, H. J. M., Wisselink, H. W., Van Der Drift, C., Van Griensven, L. J. L. D., & Vogels, G. D. (1998). Purification and characterization of trehalose phosphorylase from the commercial mushroom *Agaricus bisporus*. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1425, 177-188.

- Wieloch, P. A. 2012. Metabolomanalyse des hyperthermophilen archaeons *Sulfolobus solfataricus* unter dem Einfluss von Temperaturveränderungen mit Gaschromatographie-massenspektrometrie *Fakultät für Lebenswissenschaften* (p. 225). Braunschweig: technische Universität Carolo-Wilhelmina
- Woese, C. R., Kandler, O., & Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains archaea, bacteria, and eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 4576-4579.
- Woo, E. J., Lee, S., Cha, H., Park, J. T., Yoon, S. M., Song, H. N., et al. (2008). Structural insight into the bifunctional mechanism of the glycogen-debranching enzyme trex from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Journal of Biological Chemistry*, 283, 28641-28648.
- Woo, E. J., Ryu, S. I., Song, H. N., Jung, T. Y., Yeon, S. M., Lee, H. A., et al. (2008). Structural insights on the new mechanism of trehalose synthesis by trehalose synthase tret from *pyrococcus horikoshii*. *Journal of Molecular Biology*, 404, 247-259.
- Woo, E. J., Ryu, S. I., Song, H. N., Jung, T. Y., Yeon, S. M., Lee, H. A., et al. (2010). Structural insights on the new mechanism of trehalose synthesis by trehalose synthase tret from *Pyrococcus horikoshii*. *Journal of Molecular Biology*, 404, 247-259.
- Worthington, P., Hoang, V., Perez-Pomares, F., & Blum, P. (2003). Targeted disruption of the α -amylase gene in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Journal of Bacteriology*, 185, 482-488.
- Xavier, K. B., Martins, L. O., Peist, R., Kossmann, M., Boos, W., & Santos, H. (1996). High-affinity maltose/trehalose transport system in the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis*. *Journal of Bacteriology*, 178, 4773-4777.
- Yamamoto, T., Maruta, K., Watanabe, H., Yamashita, H., Kubota, M., Fukuda, S., et al. (2001). Trehalose-producing operon treyz from arthrobacter ramosus s34. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 65, 1419-1423.
- Yoneyama, Y., & Lever, J. E. (1987). Apical trehalase expression associated with cell patterning after inducer treatment of llc-pk1 monolayers. *Journal of Cellular Physiology*, 131, 330-341.
- Zaparty, M. 2003. Untersuchung zur bedeutung von trehalose und deren synthese im hyperthermophilen crenarchaeum *Thermoproteus tenax* *Fachbereich Biologie und Gephygraphie*. Essen: Universität Duisburg-Essen.
- Zaparty, M. 2007. Transcriptional regulation of the central carbohydrate metabolism and synthesis of trehalose in the hyperthermophilic crenarchaeote *Thermoproteus tenax* *Fachbereich Biologie und Geografie*. Essen: Duisburg-Essen.
- Zaparty, M., Hagemann, A., Bräsen, C., Hensel, R., Lupas, A. N., Brinkmann, H., et al. (2013). The first prokaryotic trehalose synthase complex identified in the hyperthermophilic crenarchaeon *Thermoproteus tenax*. *PLoS ONE*, 8.
- Zaparty, M., & Siebers, B. 2011. Physiology, metabolism and enzymology of thermoacidophiles. In K. Horikoshi, G. Antranikian, A. T. Bull, F. T. Robb & K. O. Stetter (Eds) *Extremophiles handbook* pp. 602-639). Tokyo: Springer.
- Zaparty, M., Tjaden, B., Hensel, R., & Siebers, B. (2008). The central carbohydrate metabolism of the hyperthermophilic crenarchaeote *Thermoproteus tenax*: Pathways and insights into their regulation. *Archives of Microbiology*, 190, 231-245.
- Zentella, R., Mascorro-Gallardo, J. O., Van Dijck, P., Folch-Mallol, J., Bonini, B., Van Vaeck, C., et al. (1999). A *Selaginella lepidophylla* trehalose-6-phosphate synthase complements growth and stress-tolerance defects in a yeast tps1 mutant. *Plant Physiol*, 119, 1473-1482.
- Zillig, W., Stetter, K. O., Schafer, W., Janekovic, D., Wunderl, S., Holz, I., et al. (1981). Thermoproteales - a novel type of extremely thermoacidophilic anaerobic archaeobacteria isolated from icelandic solfataras. *Zentralblatt Fur Bakteriologie Mikrobiologie Und Hygiene I Abteilung Originale C-Allgemeine Angewandte Und Okologische Mikrobiologie*, 2, 205-227.
- Zillig, W., Stetter, K. O., & Wunderl, S. (1980). The sulfolobus-'caldariella' group: Taxonomy on the basis of the structure of DNA-dependent rna polymerases. *Archives of Microbiology*, 125, 259-269.

APPENDIX

Abkürzungsverzeichnis

aa	Aminosäure
AC	Affinitätschromatographie
AD	Aktivator-Domäne
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BD	Bindedomäne
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin
bzw.	Beziehungsweise
ca.	circa = ungefähr
CDP-Star	Disodium 2-chloro-5-(4-methoxyspiro[1,2-dioxetane-3,2'-5 chlorotricyclo[3.3.1.1 ^{3,7}]decan])-4-yl]-1-phenyl phosphate
cDPG	cyclisches-2,3-Bisphosphoglycerat
DC	Dünnschichtchromatographie
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DIP	<u>Di</u> -myo- <u>In</u> ositol- <u>Ph</u> osphate
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ED	Entner-Doudoroff-Weg
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMP	Embden-Meyerhof-Parnas-Weg
et al.	et alii = und die Anderen
g	Gramm
G6P	Glukose-6-Phosphat
G6PDH	Glukose 6-Phosphat Dehydrogenase
GAP	Glycerinaldehyd-3-Phosphat

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GAPN	nicht phosphorylierende GAPDH
GDH	Glukose Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GER	Germany
GF	Gelfiltration
ggf.	gegebenenfalls
GT	Glykosyltransferase
GvI	Gen von Interesse
H ₂ O _{bidest}	zweifach destilliertes Wasser
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HGT	horizontaler Gentransfer
HK	Hexokinase
HP	Hitzegefällte Fraktion
HSP	„Heat shock protein“
IC	Ionenaustauschchromatographie
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
K	Kontrolle
Kan	Kanamycin
kDa	Kilodalton
L	Liter
LB	Luria-Bertani
LDH	Lactat Dehydrogenase
m	milli (10 ⁻³)
M	molar (mole/l)
mA	Milliamper
mbp	Megabasenpaare
MSC	mechanosensitiver Kanal
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MPI	Max Planck Institute
MW	„molecular weight“, Molekulares Gewicht
NAD ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (oxidiert)
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (reduziert)
NADP ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (oxidiert)
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (reduziert)
NCBI	National Center for Biotechnology Information

NDP	Nukleosiddiphosphate
np	nicht phosphorylierend
nt	Nukleotide
OD	Optische Dichte
ORF	„open reading frame“, offener Leserahmen
OrfY	open reading frame Y
OtsA/OtsB	osmoregulatorischen Trehalose Synthese A/B
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamide Gel Elektrophorese
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase Kettenreaktion
PEP	Phosphoenolpyruvat
pH	negativer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration (H ⁺)
P _i	anorganisches Phosphat
PP _i	Pyrophosphate
PK	Pyruvatkinase
Psi	pounds per square inch; 1 psi ~ 69 mbar
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RE	zellfreier Rohextrakt
RNA	ribonucleic acid
rRNA	ribosomal ribonucleic acid
RT	Raumtemperatur
Saci	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>
SD Medium	ein synthetisches minimal Medium
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunden
s.o.	siehe oben
sp	semiphosphorylierend
Sso	<i>Sulfolobus solfataricus</i>
Std	Stunde
s.u.	siehe unten
T6P	Trehalose-6-Phosphat
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq-Polymerase	DNA-Polymerase von <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	„Tris-buffered Saline“
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin

TPP	Trehalose-6-Phosphat Phosphatase
TPS	Trehalose-6-Phosphat Synthase
TPSP	Trehalose-6-Phosphat Phosphatase/Synthase
Tre	Trehalose
TreH	Trehalase
TreP	Trehalose Phosphorylase
TreS	Trehalose Synthase
TreT	Glykosyl transferierende Synthase
TreX	„Glycogen debranching Enzym“
TreY	Maltooligosyltrehalose Synthase
TreZ	Malto-oligosyltrehalose Trehalohydrolase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
TTX	<i>Thermoproteus tenax</i>
U	unit = Enzymaktivität
u.a.	unter Anderem
UDP	Uridin 5'-Triphosphat
UDPG	Uridin 5'-Triphosphat-Glukose
UV	ultraviolet
V	Volt
Vol	Volume
W	Watt
X α Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl α -D-Galactopyranosid
x g	Erdbeschleunigung
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
°C	Grad Celsius
ε	Extinktionskoeffizient
μ	micro (10^{-6})
λ	Lambda, Wellenlänge
Gew.-%	Gewichtsprozent
Vol.-%	Volumenprozent

Liste der Veröffentlichungen

Plagens, A., Tjaden, B., **Hagemann, A.**, Randau, L., Hensel, R.; Characterization of the CRISPR/Cas subtype I-A system of the hyperthermophilic crenarchaeon *Thermoproteus tenax*; Jbac, Volume 194, 2012, Pages 2491-2500

Zaparty, M., **Hagemann, A.**, Bräsen, C., Hensel, R., Lupas, A.N., Brinkmann, H., Siebers, B.; The first prokaryotic trehalose synthase complex identified in the hyperthermophilic Crenarchaeon *Thermoproteus tenax*; PlosOne 8(4): e61354

Beiträge zu Konferenzen

Hot trehalose: The unusual bifunctional TPSP pathway in *Thermoproteus tenax*: **Anna Hagemann**, Melanie Zaparty, Christopher Bräsen & Bettina Siebers (Posterpräsentation), VAAM Tübingen, März 2012

Hot Trehalose: The Unusual Bifunctional TPSP Pathway of *Thermoproteus tenax*. **Anna Hagemann**, Melanie Zaparty, Christopher Bräsen & Bettina Siebers (Posterpräsentation), GRC: Archaea: Ecology, Metabolism & Molecular Biology (Waterville Vally, NH, U.S.A.), August 2011

Hot Trehalose: The Unusual Bifunctional TPSP Pathway of *Thermoproteus tenax*. **Anna Hagemann**, Melanie Zaparty, Christopher Bräsen & Bettina Siebers (Posterpräsentation), VAAM Karlsruhe, April 2011

Trehalose metabolism via the TreT pathway in Archaea. **Anna Hagemann** (Vortrag), Osmomeeting, Marburg, Oktober 2010

The TreT-pathway in (hyper-) thermophilic Archaea. **Anna Hagemann**, (Vortrag), Archaea Meeting Schmitten/Taunus, September 2010

“Archaeal chocolate” Stress protection by trehalose? **Anna Hagemann**, M. Zaparty, M. Wagner, S.V. Albers, K. Zeth, J. Martin, A. Lupas & B. Siebersn (Posterpräsentation), VAAM Hannover, März 2010

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel

Trehalose Metabolismus in (hyper-) thermophilen Archaea

selbst verfasst und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen benutzt habe, und dass die Arbeit in dieser oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Universität eingereicht wurde.

Essen,

Anna Hagemann

Danksagung

Besonders bedanken möchte ich mich zunächst bei Frau Prof. Dr. Bettina Siebers für ihre Unterstützung, konstruktiven Anregungen und hilfreichen Ratschläge, sowie für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Ein großes Dankeschön geht an Dr. Christopher Bräsen für seine Diskussionsbereitschaft und die geduldigen und detaillierten Korrekturen meiner Arbeit.

Für die technische Assistenz und tatkräftige Unterstützung im Labor danke ich herzlichst Sabine Dietl und Thomas Knura.

Dr. Melanie Zaparty möchte ich für die Projektvorbereitung, ihr offenes Ohr und ihre warmen Worte, selbst aus der Ferne, danken. Dr. Benjamin H. Meyer danke ich für die Konstruktion des MW001 Δ *treT*-Stammes, sowie Dr. Julia Reimann für die Konstruktion des *S. solfataricus*PBL2025 Δ *treT*-Stammes und Dr. Sonja Verena Albers für die Bereitstellung dieser und die schöne Zeit in ihrem Labor (MPI, Marburg). Für die Plasmide pGBKT7::*tfb3* und pDAGT7::*rpok* danke ich besonders Prof. Dr. Malcolm Wright (St. Andrews). Für die gute Zusammenarbeit, die Kristallisation und die bioinformatischen Untersuchungen danke ich Prof. Dr. Andrei N. Lupas, Dr. Jörg Martin und Dr. Kornelius Zeth (MPI Tübingen).

Meinen Studenten Sonja Heldt („Yeast two-Hybrid“-Experimente mit OrfY und TreT, sowie Klonierung der Saci_TreT) und Fabian Ruhnau danke ich für ihre gewissenhafte Arbeit.

Silke Jachlewski, Julia Kort und Dr. Britta Tjaden danke ich herzlich für ihre Hilfe bei Formulierungsfragen und Julia Lamberty für das Korrekturlesen meiner Arbeit zu allen Tageszeiten.

Theresa Kouril, Julia Kort und Dominik Esser möchte ich für die wunderbare Zeit im Büro, ihre Ratschläge, sowie für interessante und lustige Gedankenaustausche danken.

Vielen Dank an die „Dinner-Truppe“ Bernadette, Jens, Julia, Silke und Verena für wunderbare, lustige und leckere Stunden mit euch.

Dem „neuen Damen-Labor“ und den Mädels Theresa und Verena, danke ich für exzellentes Team-Work, wie man es sich besser kaum vorstellen kann, viel Spaß, Musik, Unterstützung, sowie für ihre Freundschaft.

Dem ganzen Team Bernadette, Britta, Dom, Jens, Jule, Kohei, Sabine, Silke, Theresi, Thomas und Verena, danke ich für eine großartige Zeit, inspirierende Kaffeepausen, viel Rückhalt und Unterstützung!

Meiner Familie möchte ich für ihren Glauben in mich danken und meinen Freunden für ihr Anfeuern und ihr großes Interesse!

Besonders meinen Eltern, Heidrun und Heinz Hagemann, meiner Tante Sabine Hagemann und meinem Freund Sebastian danke ich für ihre Unterstützung, ihr Verständnis, ihre Liebe und ihren Rückhalt, auch in schwierigen Zeiten.