

**ADP-bildende Acetyl-CoA Synthetasen aus hyperthermophilen *Archaea*:  
Molekularbiologische und biochemische Charakterisierung von neuartigen  
Enzymen der Acetat-Bildung und ATP-Synthese**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
Meike Musfeldt

Kiel 2001

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Januar 1998 bis Januar 2001 am Institut für Allgemeine Mikrobiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel im Labor von Herrn Prof. Dr. P. Schönheit durchgeführt.

Referent: Prof. Dr. P. Schönheit

Korreferent:

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt: Kiel,

Der Dekan

## Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt und nur die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Diese Arbeit war bisher noch nicht Bestandteil eines Prüfungsverfahrens, andere Promotionsversuche wurden nicht unternommen.

.....

Ein Teil der während der Doktorarbeit erzielten Ergebnisse ist in folgenden Artikeln veröffentlicht worden bzw. zur Veröffentlichung eingereicht:

Meike Musfeldt, Martina Selig und Peter Schönheit

Acetyl Coenzyme A synthetase (ADP-forming) from the hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus*: identification, cloning, separate expression of the encoding genes, *acdAI* and *acdBI*, in *Escherichia coli*, and in vitro reconstitution of the active heterotetrameric enzyme from its recombinant subunits

Journal of Bacteriology, Vol. 181, 5885-5888 (1999)

Meike Musfeldt und Peter Schönheit

A novel type of ADP-forming acetyl-CoA synthetase (ACD) in hyperthermophilic *Archaea*: heterologous expression and characterization of isoenzymes from the sulfate-reducer *Archaeoglobus fulgidus* and the methanogen *Methanococcus jannaschii*

Journal of Bacteriology (eingereicht), 2001

---

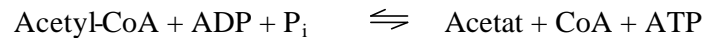
<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>12</b>
<b>3.1</b>	<b>Verwendetes Material.....</b>	<b>12</b>
3.1.1	Chemikalien und Feinchemikalien	12
3.1.2	Organismen und Plasmide	12
3.1.3	Oligonukleotide	14
<b>3.2</b>	<b>Nährmedien und Kulturbedingungen.....</b>	<b>15</b>
<b>3.3</b>	<b>Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>17</b>
3.3.1	Isolierung von genomischer DNA	17
3.3.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	17
3.3.2.1	PCR zur Amplifikation der zu klonierenden Gene	17
3.3.2.2	PCR zur Überprüfung einer erfolgreichen Klonierung ("Kolonie-Screening")	18
3.3.3	Reinigung von Nucleinsäuren aus Reaktionsansätzen	18
3.3.4	Konzentrationsbestimmung und Reinheitsanalyse von DNA	18
3.3.5	Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten	19
3.3.6	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	19
3.3.7	Enzymatische Modifikation von DNA	19
3.3.7.1	Restriktionshydrolyse	19
3.3.7.2	Dephosphorylierung	19
3.3.7.3	Ligation von DNA-Fragmenten	20
3.3.8	Transformation	20
3.3.8.1	Herstellung kompetenter Zellen (CaCl <sub>2</sub> )	20
3.3.8.2	Transformation	20
3.3.9	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	21
3.3.10	Sequenzierung von DNA	21
3.3.11	Ortsspezifische Mutagenese	21
<b>3.4</b>	<b>Auswahl der Expressionssysteme .....</b>	<b>23</b>
<b>3.5</b>	<b>Klonierung der verschiedenen Acetyl-CoA Synthetasen (ADP-bildend).....</b>	<b>23</b>
<b>3.6</b>	<b>Analyse von RNA .....</b>	<b>25</b>
3.6.1	Isolierung von Gesamt-RNA	25
3.6.2	Gelelektrophorese zur Auftrennung von Gesamt-RNA	25
3.6.3	RT-PCR	26

<b>3.7</b>	<b>Analyse von Proteinen</b> .....	<b>26</b>
3.7.1	Expression der Acetyl-CoA Synthetasen (ADP-bildend)	26
3.7.2	Zellernte und Zellaufschluß	27
3.7.3	Rekonstitution der rekombinanten Acetyl-CoA Synthetase (ADP-bildend) von <i>P. furiosus</i>	28
3.7.4	Reinigung der rekombinanten Acetyl-CoA Synthetasen (ADP-bildend)	28
3.7.4.1	Ultrafiltration	30
3.7.5	Colorimetrische Bestimmung der Proteinkonzentration	30
3.7.6	SDS-Polyacrylamidelektrophorese	31
<b>3.8</b>	<b>Charakterisierung der Enzyme</b> .....	<b>32</b>
3.8.1	Nachweis von Enzymaktivität	32
3.8.1.1	Bestimmung der ADP-ACS Aktivität mittels Ellmans-Reagenz	32
3.8.1.2	Bestimmung der ADP-ACS Aktivität mittels gekoppeltem Test mit PK/LDH	33
3.8.1.3	Hydroxamat-Test	33
3.8.2	Bestimmung der apparenten molekularen Masse mittels Gelfiltration	34
3.8.3	Bestimmung der kinetischen Parameter	34
3.8.4	Bestimmung der Temperaturoptima	34
3.8.5	Bestimmung der Thermostabilität	34
3.8.6	Bestimmung der pH-Optima	35
3.8.7	Analyse der Substratspezifitäten	35
3.8.8	Aggregationskurven	35
<b>3.9</b>	<b>Computergestützte Sequenzanalysen</b> .....	<b>36</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>37</b>
<b>4.1</b>	<b>Identifizierung, Klonierung und Expression der ADP-bildenden Acetyl-CoA Synthetase Isoform I von <i>Pyrococcus furiosus</i></b> .....	<b>37</b>
4.1.1	Identifizierung der Gene <i>acdAI</i> und <i>acdBI</i> und Analyse der Sequenzdaten	37
4.1.2	Klonierung der Gene in die Expressionsvektoren	38
4.1.3	Separate Expression der Untereinheiten	39
4.1.4	Rekonstitution der rekombinanten Untereinheiten	41
4.1.5	Reinigung der rekombinanten ADP-ACS I	42
4.1.6	Biochemische Charakterisierung	43
4.1.6.1	Molekulare und kinetische Parameter	43
4.1.6.2	Temperaturoptimum und Thermostabilität	45
4.1.6.3	pH-Optimum	47
4.1.6.4	Substratspezifitäten	47
<b>4.2</b>	<b>Identifizierung von putativen ADP-ACS in <i>Archaea</i>, <i>Eukarya</i> und <i>Bacteria</i></b> .....	<b>49</b>
<b>4.3</b>	<b>Klonierung und Expression zweier Isoenzyme der ADP-ACS aus dem hyperthermophilen Sulfatreduzierer <i>Archaeoglobus fulgidus</i></b> .....	<b>51</b>
4.3.1	Klonierung der Gene und Analyse der Sequenzdaten	51
4.3.2	Expression und Reinigung der rekombinanten Proteine	51
4.3.3	Biochemische Charakterisierung	55
4.3.3.1	Molekularer Aufbau und kinetische Parameter	55
4.3.3.2	Substratspezifitäten	57
4.3.3.3	pH-Optima	60

4.3.3.4	Temperaturoptimum und Temperaturstabilität	60
4.3.4	Nachweis der <i>in vivo</i> -Transkription der Gene <i>acd</i> AF1211 und <i>acd</i> AF1938 aus <i>A. fulgidus</i> mittels RT-PCR	62
<b>4.4</b>	<b>Klonierung und Expression der ADP-ACS MJ0590 aus dem hyperthermophilen methanogenen Archaeon <i>Methanococcus jannaschii</i></b>	<b>63</b>
4.4.1	Klonierung des Gens und Analyse der Sequenzdaten	63
4.4.2	Expression und Reinigung des rekombinanten Proteins	64
4.4.3	Biochemische Charakterisierung	65
4.4.3.1	Molekularer Aufbau und kinetische Parameter	65
4.4.3.2	Substratspezifitäten	67
<b>4.5</b>	<b>Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus der ADP-ACS am Beispiel der ADP-ACS AF1211: Ortsspezifische Mutagenese des Histidin<sup>249</sup> gegen Aspartat.</b>	<b>67</b>
4.5.1	Expression und Reinigung des mutierten Proteins	69
4.5.2	Biochemische Charakterisierung des mutierten Proteins	69
4.5.2.1	Molekularmasse	69
4.5.2.2	Aggregationstemperaturen	70
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>72</b>
5.1	Identifizierung und Expression der ADP-ACS Isoform I aus <i>P. furiosus</i>	72
5.2	Identifizierung putativer ADP-ACS in <i>Archaea</i> , <i>Eukarya</i> und <i>Bacteria</i>	74
5.3	Neuartige Isoenzyme aus <i>Archaeoglobus fulgidus</i>	76
5.4	Hypothetische Funktion der Isoenzyme aus <i>A. fulgidus</i>	77
5.5	Expression und Charakterisierung der ADP-ACS MJ0590 von <i>M. jannaschii</i>	79
5.6	Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus der ADP-ACS	80
5.7	Ausblick	82
<b>6</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>84</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG</b>	<b>92</b>
7.1	EMBL Datenbankeinträge	92
7.2	Sequenzen	94
<b>8</b>	<b>ABKÜRZUNGEN</b>	<b>103</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>105</b>
<b>10</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>106</b>

# 1 Zusammenfassung

Bei vergleichenden Untersuchungen zum Mechanismus der Essigsäurebildung in *Archaea* wurde ein für Prokaryoten neuartiges Enzym gefunden, eine ATP-bildende Acetyl-CoA Synthetase (ADP-ACS). Dieses Enzym koppelt die Bildung von Acetat aus Acetyl-CoA mit der Synthese von ATP über den Mechanismus der Substratstufenphosphorylierung.



Diese ungewöhnliche Synthetase wurde in allen untersuchten Acetat-bildenden *Archaea* (anaeroben hyperthermophilen *Cren-* und *Euryarchaeota* sowie in halophilen *Archaea*) nachgewiesen. Außerdem ist sie auch in den eukaryotischen Protisten *Giardia lamblia* und *Entamoeba histolytica* enthalten. Bisher wurden nur zwei Isoenzyme der ADP-bildenden Acetyl-CoA Synthetase aus *P. furiosus* gereinigt und biochemisch charakterisiert.

In der vorliegenden Arbeit sollten die Gene für die ADP-ACS von *P. furiosus*, Isoenzym I, identifiziert und funktionell in *E. coli* exprimiert werden. Weiterhin sollten aufgrund von Sequenzvergleichen weitere ADP-ACS homologe Enzyme in Genomen anderer Organismen identifiziert werden. Schließlich sollten ausgewählte hypothetische ADP-ACS aus hyperthermophilen *Archaea* exprimiert, biochemisch charakterisiert und mit der ADP-ACS Isoform I aus *P. furiosus* verglichen werden. Es wurden folgende Ergebnisse erzielt:

## **Expression und aktive Rekonstitution der ADP-bildenden Acetyl-CoA Synthetase Isoenzym I aus *P. furiosus***

Die einzigen bisher biochemisch charakterisierten ADP-ACS sind zwei Isoenzyme aus *P. furiosus*, I und II. Das Isoenzym I ist ein  $\alpha_2\beta_2$ -Heterotetramer mit einer Molekularmasse von 145 kDa, bestehend aus jeweils zwei Untereinheiten,  $\alpha$  (25 kDa) und  $\beta$  (47 kDa). Aufgrund der bekannten N-terminalen Aminosäuresequenzen der beiden Untereinheiten wurden die kodierenden Gene im Genom von *P. furiosus* identifiziert (Abb. 1). Die Gene für die  $\alpha$ -Untereinheit (*acdAI* Acetyl-CoA Synthetase ADP-bildend  $\alpha$ -Untereinheit des Isoenzym I) und die  $\beta$ -Untereinheit (*acdBI*) befinden sich an unterschiedlichen Orten im Genom. Die Gene für die Untereinheiten wurden in separate Vektoren kloniert und getrennt in *E. coli* exprimiert. Die rekombinanten Untereinheiten wurden zu einem aktiven Heterotetramer rekonstituiert und biochemisch charakterisiert. Das rekombinante Protein und das aus *P. furiosus* gereinigte Enzym wiesen weitgehend identische Eigenschaften auf.

### **Identifizierung weiterer putativer ADP-bildender Acetyl-CoA Synthetasen**

Vergleiche der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit der ADP-ACS I von *P. furiosus* mit verfügbaren Sequenzen aus Datenbanken ergaben Ähnlichkeiten mit einer Anzahl von homologen offenen Leserastern (ORFs) in verschiedenen *Archaea*, den *Bacteria* *Escherichia coli* und *Streptomyces coelicolor* sowie den Protisten *Giardia lamblia* und *Entamoeba histolytica*. Fünf hypothetische Gene aus dem sulfatreduzierenden Archaeon *Archaeoglobus fulgidus* und ein Gen aus dem methanogenen Archaeon *Methanococcus jannaschii* wiesen einen sehr hohen Grad an Identität auf. Aufgrund der Größe (~70 kDa) der aus diesen Genen abgeleiteten Polypeptide könnte es sich bei den Proteinen um Fusionen der homologen  $\alpha$ - (45 kDa) und  $\beta$ -Untereinheit (25 kDa) des *P. furiosus*-Proteins handeln.

### **Expression und biochemische Charakterisierung einer neuartigen ADP-bildenden Acetyl-CoA Synthetase in hyperthermophilen *Archaea***

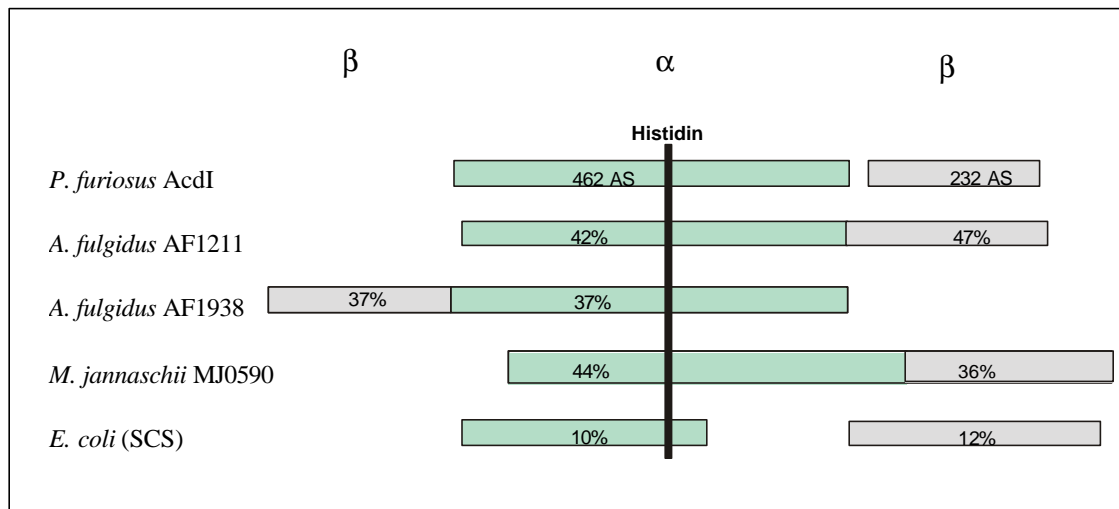
Um zu überprüfen, ob es sich bei den hypothetischen Proteinen um Fusionen der *P. furiosus*-Proteine handelt, wurden zwei ORFs (AF1211 und AF1938) aus *A. fulgidus* und ein ORF aus *M. jannaschii* (MJ0590) kloniert und in *E. coli* als funktionell aktive ADP-ACS exprimiert. Die rekombinanten Enzyme wurden gereinigt und biochemisch charakterisiert. Es wurden u.a. molekulare und kinetische Parameter, Temperaturoptima, Thermostabilitäten und Substratspezifitäten bestimmt. Alle drei Proteine bilden Homodimere von ungefähr 140 kDa mit zwei identischen 70 kDa-Untereinheiten und unterscheiden sich damit von der ADP-ACS I von *P. furiosus*, die ein Heterotetramer aus zwei verschiedenen Untereinheiten bildet. Damit stellen die Gene und ihre abgeleiteten Polypeptide Fusionen der homologen Untereinheiten aus *P. furiosus* dar. Die Fusionen in  $\alpha\beta$ - (AF1211, MJ0590) oder  $\beta\alpha$ -Orientierung (AF1938) bilden somit eine neuartige Form der ADP-ACS in *Archaea* (Abb.1).

Aufgrund ihrer Substratspezifitäten gegenüber CoA-Estern und den korrespondierenden Säuren konnten die rekombinanten ADP-ACS aus *A. fulgidus* als Isoenzym I und II identifiziert werden, die jeweils Ähnlichkeiten zu den Isoenzymen I und II von *P. furiosus* aufwiesen. So setzte die ADP-ACS AF1211, wie die ADP-ACS I von *P. furiosus*, bevorzugt Acetyl-CoA um und ist damit wahrscheinlich in erster Linie in die Acetat-Bildung involviert. Im Gegensatz dazu benutzt die ADP-ACS AF1938, wie die ADP-ACS II von *P. furiosus*, bevorzugt Phenylacetyl-CoA und ist damit vermutlich vor allem am Abbau aromatischer Aminosäuren beteiligt. In RT-PCR Experimenten konnte eine *in vivo* Transkription beider *Archaeoglobus*-ORFs bei Wachstum auf Zuckern und Peptiden gezeigt werden. Die ADP-ACS MJ0590 von *M. jannaschii* zeigt in ihren Substratspezifitäten, wie die ADP-ACS AF1211, Ähnlichkeiten zum Isoenzym I von *P. furiosus*.



### Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus

Aufgrund der Sequenzvergleiche dieser Arbeit und anderer Autoren wurden konservierte Sequenzmotive in mehreren ADP-ACS und verschiedenen anderen bekannten Enzymen gefunden, wie z.B. auch in der Succinyl-CoA Synthetase von *E. coli* (SCS). Die SCS von *E. coli* katalysiert eine zur ADP-ACS homologe Reaktion, an der ein konserviertes His<sup>246</sup> (Abb. 1) eine essentielle Rolle als Phosphorylakzeptor im Katalysemechanismus spielt (Succinyl-CoA + ADP + P<sub>i</sub> ⇌ Succinat + ATP + CoA). Das Vorkommen dieses Histidin in allen bekannten und putativen ADP-ACS könnte auf eine ähnliche Funktion in den Enzymen hinweisen. Um dies zu überprüfen, wurde in der rekombinanten ADP-ACS AF1211 von *A. fulgidus* das konservierte Histidin (His<sup>249</sup>) mittels ortsspezifischer Mutagenese gegen Aspartat ausgetauscht und die Auswirkungen auf das mutierte Enzym getestet. Der Austausch bewirkte einen völligen Verlust der Katalyseaktivität. Das veränderte Protein zeigte jedoch dasselbe Verhalten bei der chromatographischen Reinigung, eine intakte oligomere Struktur und ein ähnliches Aggregationsverhalten wie das unmutierte Protein. Das spricht dafür, daß das His<sup>249</sup> der ADP-ACS AF1211, ähnlich wie in der SCS von *E. coli*, am Katalysemechanismus beteiligt ist.



**Abb. 1 Vergleich des Polypeptidaufbaus der funktionell exprimierten ADP-ACS aus dem hyperthermophilen Sulfatreduzierer *Archaeoglobus fulgidus* (AF1211 und AF1938), dem methanogenen Archaeon *Methanococcus jannaschii* (MJ0590) und der Succinyl-CoA Synthetase von *Escherichia coli* (SCS) mit der α- und β-Untereinheit der Acd I von *Pyrococcus furiosus*.** Das konservierte Histidin, das in der SCS von *E. coli* eine essentielle Rolle im Katalysemechanismus hat, ist mit einem schwarzen Balken gekennzeichnet. Die Domänenstruktur ist farblich gekennzeichnet (grün = α, grau = β) und die Identität der Proteine auf Aminosäureebene in % angegeben. Abkürzungen: AS = Aminosäuren.

## 2 Einleitung

Die Isolierung von *Sulfolobus acidocaldarius* durch Thomas Brock und Mitarbeitern (Brock et al., 1972) stellte die Anfänge des Forschungsbereiches der hyperthermophilen Organismen in der Mikrobiologie dar. Seitdem sind eine Vielzahl von Hyperthermophilen beschrieben worden, die sich durch ein Wachstumsoptimum von über 80°C auszeichnen (Stetter, 1999). Die Lebensräume dieser Organismen sind meist in vulkanisch aktiven Zonen zu finden, vor allem in marinen Hydrothermalquellen, submarin erhitzten Sedimenten und terrestrischen Solfataren.

Die bisher isolierten hyperthermophilen Organismen sind Prokaryoten, die meisten von ihnen zählen zu der von Woese et al. 1987 beschriebenen Domäne der *Archaea* (Woese, 1987; Woese et al., 1990). Die Einteilung von Organismen in die drei Domänen *Bacteria*, *Eukarya* und *Archaea* und die Einordnung in den phylogenetischen Stammbaum erfolgt aufgrund der verschiedenen 16S/18S-rRNA-Sequenzmuster der Organismen. Die *Archaea* unterscheiden sich neben 16S-rRNA Sequenzmustern außerdem noch durch andere molekulare und biochemische Kennzeichen von den anderen beiden Domänen. Charakteristisch ist der veränderte Aufbau der Zellwand und der Cytoplasmamembran, die anstelle von Glycerinestern Di- und Tetraetherlipide enthält (De Rosa et al., 1986; Langworthy, Pond, 1986; De Rosa, Gambacorta, 1988). Es wird diskutiert, daß dieser Aufbau in den thermophilen Standorten zur Stabilität beitragen könnte. Die Zellwand enthält weder Muraminsäure noch D-Aminosäuren (Kandler, König, 1998). Die Zellwände der *Archaea* sind im Unterschied zu den *Bacteria* und *Eukarya* sehr unterschiedlich aufgebaut, sie können Proteine, Pseudomurein, Polysaccharide oder auch Methanochondroitin enthalten. Neben diesen Unterschieden im Aufbau gleichen jedoch auch viele Merkmale der *Archaea* denen der *Bacteria*: *Archaea* haben in etwa die gleiche Größe, ein großer Teil ihres metabolischen Stoffwechsels (Bult et al., 1996) ähnelt dem der *Bacteria*, es fehlen beiden die in den *Eukarya* vorhandenen Nuclei, und ihre Gene sind, wie bei den *Bacteria*, in polycistronischen Operons organisiert (Achenbach-Richter et al., 1988).

Viele Charakteristika der *Archaea* ähneln auch denen der Eukaryoten. Der Transkriptionsmodus, insbesondere der Aufbau der RNA-Polymerasen und ihrer Transkriptionsfaktoren (Thomm, 1996) sowie das Vorhandensein von Histonproteinen (Stein, Searcy, 1978) und das Vorkommen von Introns in tRNAs (Kaine et al., 1983) sind Beispiele dafür.

Die Domäne der *Archaea* wird in *Crenarchaeota* und *Euryarchaeota* eingeteilt (Woese, 1987; Woese et al., 1990). Die *Crenarchaeota* sind phänotypisch relativ homogen und meist hyperthermophil. In diese Gruppe gehören schwefelabhängige Organismen, wie z.B. die Ordnungen der *Sulfolobales* und *Desulfurococcales* (Woese, 1987). Die Gruppe der *Euryarchaeota* weist in Bezug auf Lebensraum und Physiologie sehr vielfältige Eigenschaften auf. Neben mesophilen sind auch thermophile Gattungen zu finden. Eine große Vielfalt

verschiedener Stoffwechseltypen, wie z.B. Methanogenese, Sulfatreduktion, heterotrophe Gärung und aerobe Atmung sind hier zu finden.

Bisher sind nur wenige hyperthermophile *Bacteria* bekannt (Abb. 4), alle gehören zu den Gattungen der *Aquificales* und *Thermotogales*. Die *Aquificales* (Huber et al., 1992) stellen die tiefste Abzweigung des Stammbaumes in der Domäne der *Bacteria* dar, die nächsthöhere bildet die Gattung der *Thermotogales* (Blöchl et al., 1995), wozu u.a. *Thermotoga maritima* (Huber et al., 1986) gehört.

Die extrem thermophilen Prokaryoten stehen an der hypothetischen Wurzel des phylogenetischen Stammbaumes (Abb. 4; Woese, 1987). Deshalb wird ihnen eine sehr ursprüngliche Organisation im Hinblick auf Stoffwechselausstattung und molekularen Aufbau zugesprochen (Wächtershäuser, 1992). Es wird außerdem angenommen, daß sich die hyperthermophilen Organismen in den noch vorhandenen Extremstandorten nur sehr langsam entwickelt haben (Kandler, 1992; Wächtershäuser, 1988, Zillig, 1991). Da man vermutet, daß sie den postulierten Urorganismen, den Progenoten, die sich unter thermophilen Bedingungen entwickelt haben (Doolittle, 2000), nahe stehen, könnte die Untersuchung der molekularen und biochemischen Grundlagen des hyperthermophilen Stoffwechsels Hinweise auf die Stoffwechselausstattung am Ursprung des Lebens geben und man könnte daraus Rückschlüsse auf die Evolution ziehen.

Der „thermophile Stoffwechsel“ ist sehr vielfältig (Danson, 1988; Stetter, 1993; Schönheit, Schäfer, 1995). In den vorwiegend anaeroben Biotopen sind vor allem Wasserstoff, Kohlendioxid, Schwefel und Schwefelverbindungen zu finden. Chemolithoautotrophe Stoffwechseltypen sind weit verbreitet, zu ihnen gehören 1) die Reduktion von Schwefel zu  $H_2S$  (dissimilatorische Schwefelreduktion, z.B. *Pyrodictium*), 2) die Reduktion von  $CO_2$  zu  $CH_4$  (Methanogenese, z.B. *Methanococcus*), 3) die Reduktion von Sulfat zu  $H_2S$  (dissimilatorische Sulfatreduktion, z.B. *Archaeoglobus*), 4) die Reduktion von Sauerstoff zu Wasser mit entweder  $H_2$  (Knallgasreaktion, z.B. *Aquifex*) oder schwefelhaltigen Verbindungen als Elektronendonatoren (aerobe Atmung, z.B. *Aquifex*) und 5) die Reduktion von Nitrat zu  $N_2$  (Denitrifikation, *Pyrobaculum*). Photoautotrophie wurde bei Hyperthermophilen bisher nicht beschrieben (Schönheit, Schäfer, 1995).

Eine große Gruppe zeigt ein chemoorganoheterotrophes Wachstum auf Peptiden und Zuckern (Schönheit, Schäfer, 1995; Leuschner, Antranikian, 1995). Außerdem sind Pyruvat und Laktat häufige Substrate. Es sind zwei Mechanismen des organotrophen Metabolismus' in Abhängigkeit vom Elektronenakzeptor beschrieben worden. Zum einen Wachstum, das von einem externen Elektronenakzeptor wie z.B. Schwefel, Sulfat, Sauerstoff oder Nitrat abhängig ist. Unter diesen Bedingungen werden die organischen Komponenten meist vollständig zu  $CO_2$  oxidiert, und die Energie wird durch aerobe oder anaerobe Atmung gewonnen. Zum anderen werden Zucker und Peptide ohne externen Elektronenakzeptor anaerob fermentiert, wobei vor allem Acetat, aber auch andere flüchtige Säuren oder Butanol neben  $CO_2$  und  $H_2$  gebildet werden (z.B. *Thermococcales*, *Desulfurococcales*, *Pyrodictiales*, *Thermotogales*, *Thermoproteales*).

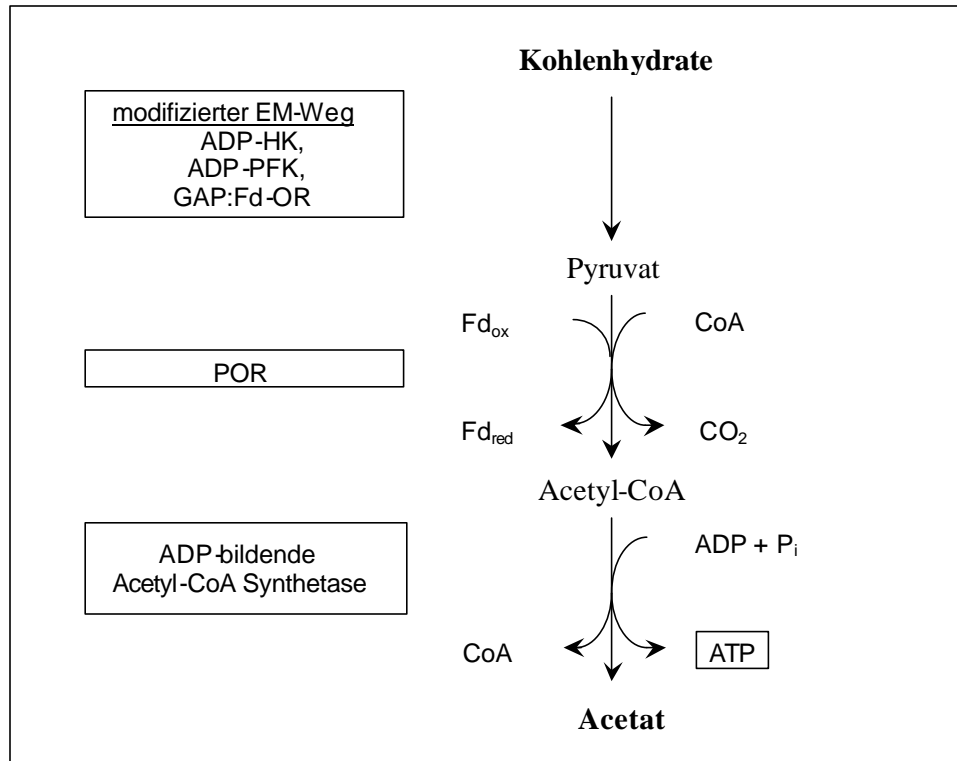
Viele hyperthermophile Mikroorganismen verwenden Zucker als Kohlenstoff- und Energiequelle. In den letzten Jahren sind eine Vielzahl von Untersuchungen zu den glykolytischen Stoffwechselwegen, der Umsetzung von Glukose zu Pyruvat, vorgenommen worden. Die Daten haben ergeben, daß alle untersuchten *Archaea* nicht die klassischen, sondern modifizierte Embden-Meyerhof- bzw. Entner-Doudoroff-Wege benutzen. Diese enthalten vor allem Modifikationen an den Schlüsselenzymen (De Vos et al., 1998; Selig et al., 1997).

So nutzen die Crenarcheoten *Thermococcus celer* und *Pyrococcus furiosus* zur Fermentation von Glukose einen modifizierten Embden-Meyerhof-Weg mit ADP-abhängiger Hexokinase und ADP-abhängiger 6-Phosphofruktokinase. Glycerinaldehyd-3-Phosphat wird über eine Glycerinaldehyd-3-Phosphat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (GAP:Fd-OR) zu 3-Phosphoglycerat umgesetzt und ersetzt somit die für *Bacteria* klassischen Enzyme Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase und 3-Phosphoglyceratkinase (Abb. 2; Schönheit, Schäfer, 1995; Selig et al., 1997). In *Thermoproteus tenax* wird diese Umsetzung durch eine nicht-phosphorylierende Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPN) ersetzt, bei der, wie in der klassischen Reaktion, reduziertes NAD(P)H entsteht.

Kürzlich wurde im archaeellen Sulfatreduzierer *Archaeoglobus fulgidus* Stamm 7324 Wachstum auf Stärke nachgewiesen (Labes, Schönheit, 2001). Ähnlich wie *Pyrococcus* setzt dieser Organismus Glukose über einen modifizierten Embden-Meyerhof-Weg mit ADP-abhängigen Kinasen und der GAP:Fd-OR zu Pyruvat um. *Sulfolobus* und *Thermoplasma* setzen Glukose über einen nicht-phosphorylierenden Entner-Doudoroff-Weg um (De Rosa et al., 1984; Danson, 1997), in dem die Glukose über nicht phosphorylierte Intermediate zu Glycerinaldehyd oxidiert wird. Die Umsetzung von Glycerinaldehyd zu Pyruvat erfolgt über eine spezifische Glycerinaldehyd-Dehydrogenase. Der weitere Abbau zu Pyruvat wird über die Enzyme Glycerat-Kinase, Mutase, Enolase und Pyruvat-Kinase katalysiert.

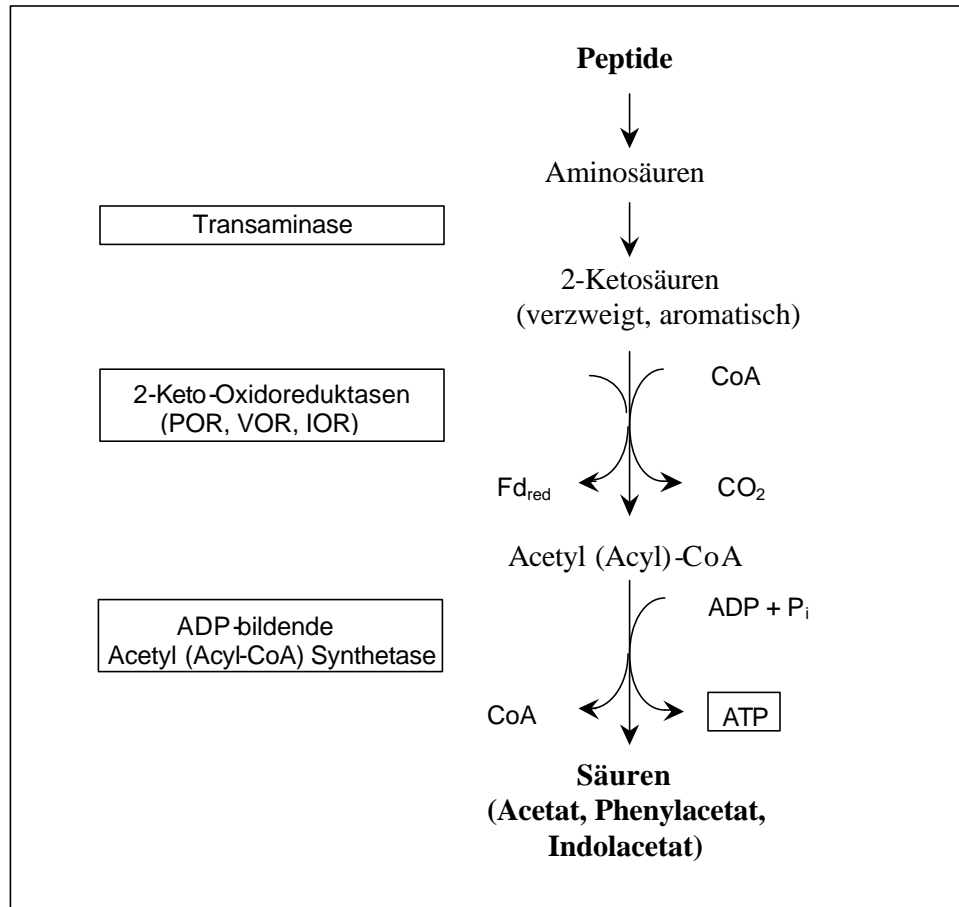
Für das halophile Archaeon *Halococcus saccharolyticus* wurde kürzlich ein partiell phosphorylierender Entner-Doudoroff-Weg zum Abbau von Glukose beschrieben, in dem der erste Phosphorylierungsschritt durch eine ATP-abhängige KDG-Kinase (Johnsen et al., 2001) erfolgt. Fruktose hingegen wird über einen modifizierten Embden-Meyerhof-Weg abgebaut (Johnsen et al., 2001). Dabei treten zwei neue Enzyme auf, eine Ketohekinase, die die ATP-abhängige Phosphorylierung von Fruktose zu Fruktose-1-Phosphat katalysiert und eine 1-Phosphofruktokinase, die Fruktose-1-Phosphat zu Fruktose-1,6-bisphosphat umwandelt.

Wenn das gebildete Pyruvat zu Acetat umgesetzt wird, so geschieht das in allen bisher untersuchten *Archaea* über die Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (POR) und über die ADP-bildende Acetyl-CoA Synthetase.



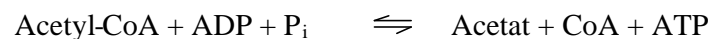
**Abb. 2** Rolle der ADP-bildenden Acetyl-CoA Synthetase im Kohlenhydratstoffwechsel in *P. furiosus*. EM-Weg = Embden-Meyerhof-Weg, POR = Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase, ATP = Adenosintriphosphat, ADP = Adenosindiphosphat, P<sub>i</sub> = anorganisches Phosphat, HK = Hexokinase, PFK = 6-Phosphofruktokinase, GAP:Fd-OR = Glycerinaldehyd-3-Phosphat:Ferredoxin-Oxidoreduktase, Fd = Ferredoxin.

Neben Zuckern können viele *Archaea* auch Peptide als Energie- und Kohlenstoffquelle verwenden. Bei der Fermentation von Peptiden, wie z.B. durch *P. furiosus* (Stetter 1986), *Hyperthermus butylicus* (Zillig et al., 1990) oder *Thermococcus celer* (Zillig et al., 1983), werden die aus den Peptiden erhaltenen Aminosäuren zu den korrespondierenden 2-Ketosäuren transaminiert (Andreotti et al., 1995; Heider et al., 1996). In *Pyrococcus* werden die Aminosäuren durch die 2-Ketosäure:Ferredoxin-Oxidoreduktasen in die entsprechenden CoA-Ester umgewandelt (Abb. 3): Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (POR, Kunow et al., 1995), Indolpyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (IOR, Mai, Adams, 1994) und 2-Ketoisovalerat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (VOR, Heider et al., 1996). Die POR setzt Pyruvat um, die VOR ist am aktivsten mit 2-Ketosäuren, die aus den verzweigten Aminosäuren Valin, Leucin, Isoleucin sowie Methionin entstanden sind (Heider et al., 1996), und die IOR ist spezifisch für die Umsetzung von aromatischen 2-Ketosäuren aus aromatischen Aminosäuren (Mai, Adams, 1994).



**Abb. 3** Rolle der ADP-bildenden Acetyl-CoA Synthetase im Peptidstoffwechsel in *P. furiosus*. POR = Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase, VOR = 2-Ketoisovalerat:Ferredoxin-Oxidoreduktase, IOR = Indolpyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase, ATP = Adenosintriphosphat, ADP = Adenosindiphosphat, P<sub>i</sub> = anorganisches Phosphat.

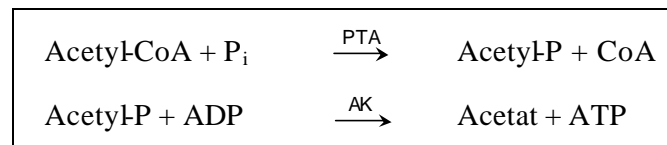
Bei vergleichenden Untersuchungen zum Mechanismus der Acetat-Bildung aus Zuckern und Peptiden wurde in hyperthermophilen Acetat-bildenden *Archaea* ein für Prokaryoten neuartiges Enzym, die ADP-bildende Acetyl-CoA Synthetase, gefunden. Sie katalysiert die Acetat-Bildung aus Acetyl-CoA und koppelt diese Reaktion mit der ATP-Bildung aus ADP und anorganischem Phosphat via Substratstufen-Phosphorylierung (Schäfer, Schönheit, 1991; Schäfer et al., 1993).



Die ADP-bildende Acetyl-CoA Synthetase wurde das erste Mal in den parasitisch lebenden, anaeroben Eukaryoten *Entamoeba histolytica* und *Giardia lamblia* nachgewiesen (Reeves et al., 1977; Müller, 1988; Sanchez, Müller, 1996), bei denen das Enzym bei der Bildung von Acetat und ATP im anaeroben Stoffwechsel eine Rolle spielt. In Acetat-bildenden Prokaryoten wurde diese ungewöhnliche Synthetase zum ersten Mal in dem

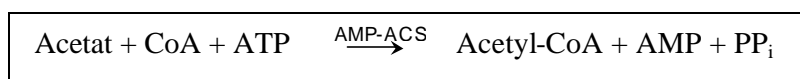
hyperthermophilen Archaeon *Pyrococcus furiosus* entdeckt (Schäfer, Schönheit, 1991), in dem das Enzym vermutlich die einzige energiekonservierende Reaktion beim Wachstum auf Kohlenhydraten und Peptiden zu Acetat katalysiert (Abb. 2 und 3). Später wurde die ADP-bildende Acetyl-CoA Synthetase in Rohextrakten vieler hyperthermophiler *Archaea* wie z.B. *Thermococcus*, *Desulfurococcus*, *Thermoproteus* und *Hyperthermus* (Schönheit, Schäfer, 1995; Schäfer, Schönheit, 1991; Glasemacher et al., 1997), aber auch in verschiedenen mesophilen halophilen *Archaea* wie *Halococcus*, *Halobacterium* und *Haloarcula* nachgewiesen (Bräsen, Schönheit, 2001).

Der Ein-Stufen-Mechanismus der Acetyl-CoA Synthetase ist von Interesse, da der bisher bekannte Mechanismus der Acetyl-CoA Umsetzung zwei Enzyme, die Phosphotransacetylase und die Acetat-Kinase, umfaßt. Er kommt in allen Acetat-bildenden Prokaryoten der Domäne der *Bacteria* vor (Thauer et al., 1977; Gottschalk, 1986; Schäfer et al., 1993).

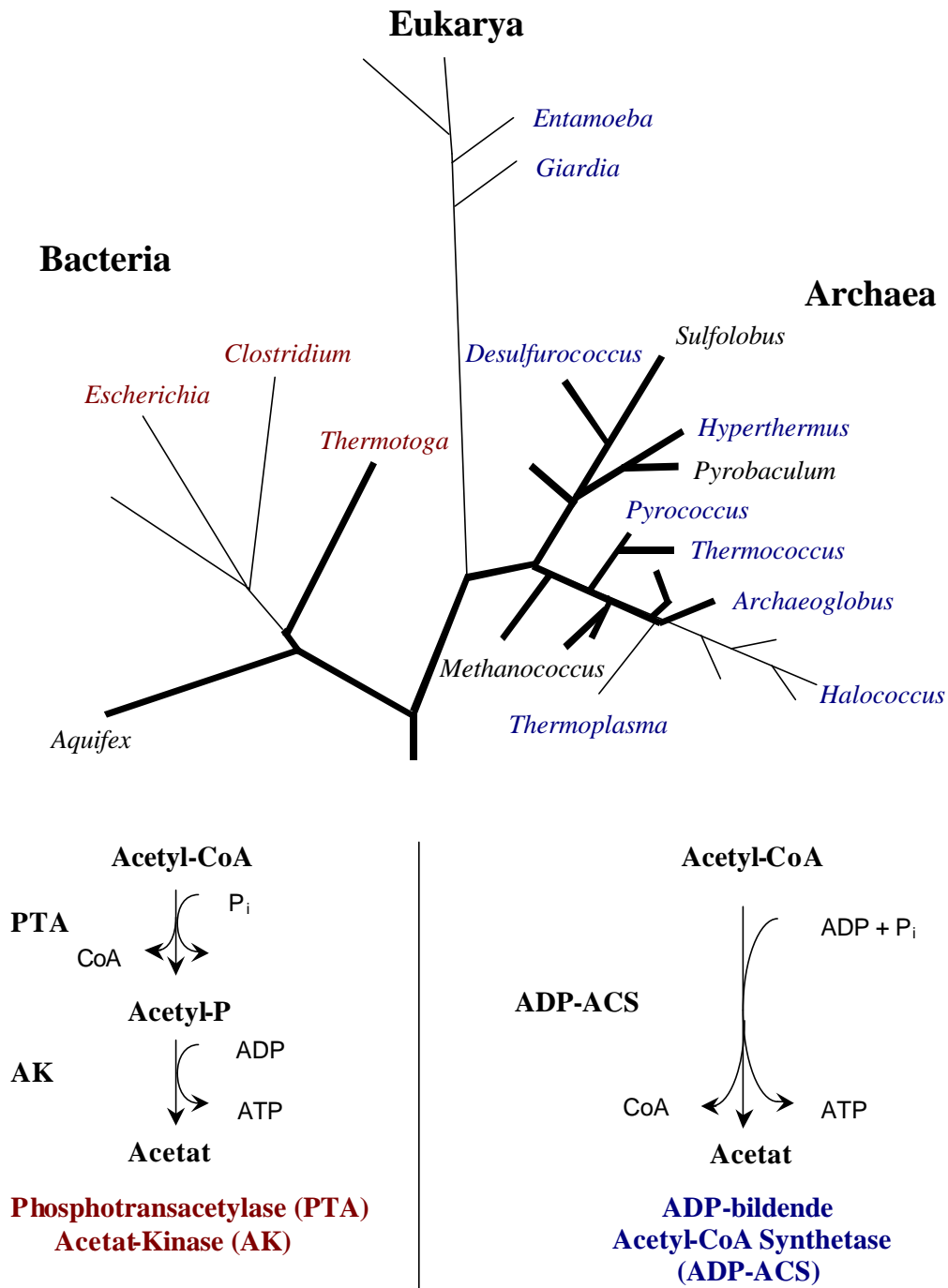


Diese beiden „klassischen“ Enzyme wurden in den Acetat-bildenden *Archaea* bisher nicht gefunden. Die Daten sprechen dafür, daß der Mechanismus der Acetat-Bildung in Prokaryoten domänenspezifisch ist (Abb. 4; Schäfer et al., 1993).

Zu unterscheiden ist die ADP-bildende Acetyl-CoA Synthetase von der AMP-bildenden Acetyl-CoA Synthetase (AMP-ACS). Dieses ubiquitär (in allen drei Domänen) verbreitete Enzym katalysiert die Aktivierung von Acetat zu Acetyl-CoA und bildet dabei AMP und Pyrophosphat (Karan et al. 2001; Bräsen, Schönheit, 2001).



Obwohl die ADP-bildende Acetyl-CoA Synthetase in den Rohextrakten von allen bisher untersuchten Acetat-bildenden *Archaea* gefunden worden ist, wurden bisher nur zwei Isoenzyme dieser ungewöhnlichen Synthetase aus *P. furiosus* gereinigt und biochemisch charakterisiert (Glasemacher et al., 1997; Mai, Adams, 1996). Die Enzyme sind Heterotetramere ( $\alpha_2\beta_2$ ) mit einer Molekularmasse von 145 kDa, bestehend aus zwei Untereinheiten,  $\alpha$  (25 kDa) und  $\beta$  (47 kDa). Aufgrund ihrer unterschiedlichen Substratspezifitäten gegenüber CoA-Estern und den entsprechenden Säuren wurden sie als Isoenzyme beschrieben. Das Isoenzym I setzt im Zuge der Kohlenhydrat- und Pyruvat-Fermentation vorwiegend Acetyl-CoA zu Acetat um (Abb. 2). Das Isoenzym II setzt bevorzugt Abbauprodukte aromatischer Aminosäuren, wie Indolacetyl-CoA und Phenylacetyl-CoA, zu den korrespondierenden Säuren um und ist damit vermutlich an der Peptidfermentation beteiligt (Abb. 3; Glasemacher et al., 1997; Mai, Adams, 1996).



**Abb. 4** Verbreitung der Enzyme der Acetyl-CoA Umsetzung zu Acetat im phylogenetischen Stammbaum (Stetter, 1996, modifiziert). Verzweigungsgrad und Verzweigungslängen basieren auf 16S/18S-rRNA-Sequenzvergleichen (Woese et al., 1990). Hyperthermophile sind mit dicken Linien dargestellt. In blauer Schrift sind alle Organismen gekennzeichnet, die die ADP-bildende Acetyl-CoA Synthetase nutzen, in roter diejenigen, die das Enzympaar Phosphotransacetylase und Acetat-Kinase verwenden. In schwarzer Schrift sind Organismen angegeben, die keine Acetyl-CoA Synthetase besitzen bzw. von denen dies noch nicht bekannt ist. Abkürzungen AK = Acetat-Kinase, PTA = Phosphotransacetylase, ATP = Adenosintriphosphat, ADP = Adenosindiphosphat,  $P_i$  = anorganisches Phosphat.



Informationen über die Gene der ADP-bildenden Acetyl-CoA Synthetasen, ihren Aufbau und ihre Sequenz sowie ihre Lokalisation lagen noch nicht vor. Mit der vollständigen Sequenzierung des Genoms von *P. furiosus* (Utah Genome Center Website, 1999) und den ständig voranschreitenden Sequenzierungsprojekten weiterer Genome aus allen drei Domänen war es nun möglich, durch Zugang zu den Sequenzdaten dieses phylogenetisch interessante Enzym nicht nur biochemisch nach Expression näher zu untersuchen, sondern auch molekularbiologisch mit anderen Proteinen ähnlichen Aufbaus bzw. ähnlicher Funktion zu vergleichen.

Es war die Aufgabe dieser Arbeit, die Gene für die ADP-bildende Acetyl-CoA Synthetase Isoform I von *P. furiosus* zu identifizieren, zu beschreiben und die kodierten Proteine heterolog in *E. coli* zu exprimieren. Die rekombinante Acetyl-CoA Synthetase (ADP-bildend) sollte mit dem aus *P. furiosus* gereinigten Enzym (Glasemacher et al., 1997) verglichen werden. Mit der erhaltenen Gensequenz sollte dann in Datenbanken nach homologen Genen gesucht werden. Während dieser Arbeit wurden eine Vielzahl von homologen offenen Leserahmen (ORF) entdeckt, unter denen sich auch mehrere homologe ORFs aus den hyperthermophilen *Archaea Archaeoglobus fulgidus* und *Methanococcus jannaschii* befanden, die Homologe der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit von *P. furiosus* in einer fusionierten Form, in verschiedenen Orientierungen ( $\alpha\beta$  oder  $\beta\alpha$ ), enthielten. Einige ausgewählte ORFs aus diesen Organismen wurden ebenfalls kloniert und exprimiert. Die Proteine wurden mit den schon bekannten Proteinen von *P. furiosus* verglichen, und ihnen sollte, wenn möglich, eine physiologische Funktion zugeordnet werden. Weiterhin sollte versucht werden, konservierte Sequenzmotive zu identifizieren, deren Aminosäuren am Katalysemechanismus beteiligt sein könnten. Durch Mutation einzelner Aminosäuren sollte versucht werden, erste Hinweise auf den Reaktionsmechanismus zu bekommen. Die gereinigten Proteine sollten die Ausgangsbasis für eine Kristallisation der Enzyme schaffen, die die Voraussetzung für weitere Strukturuntersuchungen bildet.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Verwendetes Material

##### 3.1.1 Chemikalien und Feinchemikalien

Falls nicht anders vermerkt, stammten alle Chemikalien von den Firmen Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Roth (Karlsruhe), Difco (Stuttgart), Sigma-Aldrich (Deisenhofen), Biomol (Hamburg) sowie Gibco BRL (Karlsruhe).

Die Enzyme und Coenzyme stammten von den Firmen Biomol (Hamburg), Roche Diagnostics (Mannheim), MBI Fermentas (Vilnius, Litauen), NEB (Schwalbach), PeqLab (Erlangen) und Biotherm (Hamburg).

##### 3.1.2 Organismen und Plasmide

**Tabelle 1** Typstämme, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Stamm	DSM	Referenz
<i>Archaeoglobus fulgidus</i> 7324	DSM 8774	(Beeder et al., 1994)
<i>Archaeoglobus fulgidus</i> VC 16	DSM 4304	(Stetter, 1988)
<i>Methanococcus jannaschii</i>	DSM 2661	(Jones et al., 1983)
<i>Pyrococcus furiosus</i>	DSM 3638	(Fiala, Stetter, 1986)

**Tabelle 2** *Escherichia coli*-Derivate, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Stamm	Genotyp/Phänotyp	Referenz
DH10B	F <sup>-</sup> mrcA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80d lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697	(Grant et al., 1990)
JM109	e14 <sup>-</sup> (mcrA <sup>-</sup> ) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ) supE44 relA1 Δ(lac-proAB) (F' traD36 proAB lac <sup>d</sup> ΔM15)	(Yanisch-Perron et al., 1985)
BL21(DE3)	F <sup>-</sup> ompT hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) gal dcm (DE3)	(Studier, Moffatt, 1986)
BL21-CodonPlus (DE3)-RL	B F <sup>-</sup> ompT hsdS(r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) dcm <sup>+</sup> Tet <sup>r</sup> gal λ(DE3) endA Hte [argU ileY leu W cam <sup>r</sup> ]	(Carstens, 1999)

**Tabelle 3 Plasmide, die in dieser Arbeit verwendet oder konstruiert wurden.**

Plasmid	Selektion	Merkmale	Referenz
pET 14b	Amp <sup>r</sup>	Expressionsvektor mit T7-Promotor	Novagen, Madison, USA
pET 17b	Amp <sup>r</sup>	Expressionsvektor mit T7-Promotor	Novagen, Madison, USA
pET 19b	Amp <sup>r</sup>	Expressionsvektor mit T7- <i>lac</i> -Promotor	Novagen, Madison, USA
pUB520	Kana <sup>r</sup>	pFDX500 Derivat enthält das <i>E. coli dna Y</i> -Genprodukt	(Garcia et al., 1986)
pLys S	Cm <sup>r</sup>	T7-Lysozym exprimierendes Plasmid mit T7-Promotor	(Van Spanning et al., 1995)
acdBlpET14b	Amp <sup>r</sup>	Überproduktion des <i>P. furiosus</i> Genproduktes AJ240062	Diese Arbeit
acdAlpET17b	Amp <sup>r</sup>	Überproduktion des <i>P. furiosus</i> Genproduktes AJ240061	Diese Arbeit
acdMJ0590pET17b	Amp <sup>r</sup>	Überproduktion des <i>M. jannaschii</i> Genproduktes MJ0590	Diese Arbeit
acdAF1211pET17b	Amp <sup>r</sup>	Überproduktion des <i>A. fulgidus</i> Genproduktes AF1211	Diese Arbeit
acdAF1211pET19b	Amp <sup>r</sup>	Überproduktion des <i>A. fulgidus</i> Genproduktes AF1211	Diese Arbeit
acdAF1938pET17b	Amp <sup>r</sup>	Überproduktion des <i>A. fulgidus</i> Genproduktes AF1938	Diese Arbeit
acdAF1938pET19b	Amp <sup>r</sup>	Überproduktion des <i>A. fulgidus</i> Genproduktes AF1938	Diese Arbeit
acdAF1211His <sup>249</sup> Asp pET19b	Amp <sup>r</sup>	Überproduktion des <i>A. fulgidus</i> Genproduktes AF1211 (mutiert)	Diese Arbeit

### 3.1.3 Oligonukleotide

**Tabelle 4 Oligonukleotide für die Expression, Sequenzierung, RT-PCR und ortsspezifische Mutagenese.** Restriktionsschnittstellen (RE) sind fett gekennzeichnet, die jeweiligen Vorwärtsprimer mit F und die Rückwärtsprimer mit R.

Bezeichnung	Primersequenz	RE
T7-Promotor	5' - TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG - 3'	
T7-Terminator	5' - GCT AGT TAT TGC TCA GCG G - 3'	
acdBI exprF	5' - GAT G <b>CC ATG GAC</b> AGG GTT GCT AAG - 3'	<i>NcoI</i>
acdBI exprR	5' - CGC <b>CTC GAG</b> CTA AAG AAT CAT CCT AGC - 3'	<i>XhoI</i>
acdAI exprF	5' - AAT TTG A <b>CA TAT GAG</b> TTT GGA GGC TCT TTT TAA TC - 3'	<i>NdeI</i>
acdAI exprR	5' - CCG <b>CTC GAG</b> TTA CTT TTC TTT GTG TTT TGC TTT C - 3'	<i>XhoI</i>
acdAI 259F	5' - CTA GAG GAA TGT GGT CAA AAA G - 3'	
acdAI 619F	5' - CGA GAG CTA TTC TAA TTT ACA TG - 3'	
acdAI 678R	5' - GAA CCT CCT TCC ATC TTT C - 3'	
acdAI 850R	5' - CAA TGG TAT ATG CTC TTA AGA CTC - 3'	
acdAF1211 exprF	5' - GGC AAT <b>CTC ATA TGG</b> AGC GCT TGT TTT ACC - 3'	<i>NdeI</i>
acdAF1211 exprR	5' - ATG <b>CTC GAG</b> TTA CAC CTC CTC ACC CAA AAC CA - 3'	<i>XhoI</i>
acdAF1211 1F	5' - ATG GAG CGC TTG TTT TAC C - 3'	
acdAF1211 450F	5' - AAT AGC GTT CCT CAG CCA G - 3'	
acdAF1211 732F	5' - GGC AGC TTC AAG <u>CGA</u> CAC GGG AAG TCT GGC AGG - 3'	
acdAF1211 764R	5' - CCT GCC AGA CTT CCC GTG <u>TGG</u> CTT GAA GCT GCC - 3'	
acdAF1211 883F	5' - GCA ATT CTC ACT AAC TCA GGC - 3'	
acdAF1211 1361F	5' - GCG AGA AGG CTG AAG AAA T - 3'	
acdAF1211 360R	5' - AAC GCC ATA CCT TTC GG - 3'	
acdAF1211 716R	5' - GAC TTC CCC GCC TTC A - 3'	
acdAF1211 1045R	5' - CAT CAC CCA GAA TGT CAA C - 3'	
acdAF1211 1658R	5' - GGC ATC CTC CCC TCC A - 3'	
acdAF1211 2055R	5' - CAC CTC CTC ACC CAA AAC - 3'	
acdAF1938 exprF2	5' - CAC CAG <b>CCC ATA TGC</b> TAC TCC TCG AAC ACG - 3'	<i>NdeI</i>
acdAF1938 exprR2	5' - GAA <b>CTC GAG</b> TCA CGA CTG AAT TCT CCT TTT TGC G - 3'	<i>XhoI</i>
acdAF1938 1F	5' - ATG CTA CTC CTC GAA CAC G - 3'	
acdAF1938 361F	5' - GTT GAG GTT CTG AAG GA - 3'	
acdAF1938 701F	5' - GAA CTG TAG GCA AGC C - 3'	
acdAF1938 1051F	5' - AAC ACG GAA AAC GGA - 3'	
acdAF1938 1412F	5' - CTT CAA TTT GCG GAG - 3'	
ACDAF1838 2022R	5' - TCA CGA CTG AAT TCT CCT TT - 3'	
AFDNAL 1F	5' - ATG ATG TTG TTT GCC GAG T - 3'	
AFDNAL 1668R	5' - TTG TCT CTT TAC CTC GAA CTG T - 3'	
acdMJ0590 exprF	5' - GAG AAT <b>TCC ATA TGT</b> GGG GGA GGG ATT ATG AGC TTA AAT ATA - 3'	<i>NdeI</i>
acdMJ0590 exprR	5' - CCG <b>CTC GAG</b> TTA TTT AAT TAT TCT TGC ATC ACC - 3'	<i>XhoI</i>
acdMJ0590 398F	5' - TTA CGT ATA ATG AAC ACC CAT ATA A - 3'	
acdMJ0590 781F	5' - GAT GTT ATC TAT GAG GCA GCG - 3'	
acdMJ0590 1141F	5' - ACT CCA CAA GAG ATG ACA AAA - 3'	
acdMJ0590 1501F	5' - TAT GGT CTT CCA GTT CCT AAG - 3'	
acdMJ0590 1874F	5' - GCA TTT CGC CAA TAA CAA G - 3'	
acdMJ0590 153R	5' - ATA TTT TGG ATT TAT GGG ATA GA - 3'	
acdMJ0590 840R	5' - CTC AAA CGT ATA TGC CCT AAT T - 3'	

### 3.2 Nährmedien und Kulturbedingungen

#### Luria-Broth (LB<sub>0</sub>)

Bacto Trypton	10.0 g
Bacto Hefeextrakt	5.0 g
NaCl	5.0 g

ad 1000 ml mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>

Vor dem Autoklavieren wurde mit 5 M NaOH ein pH von 7.5 eingestellt.

#### LB<sub>0</sub>-Agar

Dem LB<sub>0</sub>-Flüssigmedium wurden 1.5% Bacto Agar zugefügt. Zur Selektion Plasmid-tragender *E. coli* wurden die Kulturmedien mit den entsprechenden Antibiotika versetzt.

#### Antibiotika-Zusätze für LB-Medium und LB-Agar

Ampicillin	100 µg/ml
Carbenicillin	100 µg/ml
Chloramphenicol	34 µg/ml
Kanamycin	30 µg/ml

Die Antibiotika wurden sterilfiltriert und dem LB<sub>0</sub>-Medium nach dem Autoklavieren (bei Agar direkt vor dem Gießen, wenn dieser auf etwa 55°C abgekühlt war) zugefügt.

#### SOC-Medium

Bacto Hefeextrakt	0.5%
Bacto Trypton	2.0%
NaCl	10.0 mM
KCl	2.5 mM
MgCl <sub>2</sub>	10.0 mM
MgSO <sub>4</sub>	10.0 mM
Glukose	20.0 mM

***E. coli* JM109 und *E. coli* DH10B:** Die Zellen von *E. coli* JM109 und DH10B wurden auf LB<sub>0</sub>-Medium kultiviert. Nach Transformation mit den verschiedenen Plasmiden wurden die Zellen auf LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum kultiviert, damit Zellen mit Plasmid selektioniert werden konnten.

***E. coli* BL21 (DE3) und BL21CodonPlus (DE3)-RIL:** *E. coli* BL21 (DE3) und BL21CodonPlus (DE3)-RIL wuchsen auf LB<sub>0</sub>-Medium bzw. auf LB-Medium mit Chloramphenicol, nach der Transformation mit den oben aufgeführten Plasmiden auch auf LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum. Für die Expression (3.7.1) wurden 20 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika mit einer Einzelkolonie von einer Transformantenplatte angeimpft und bei 37°C über Nacht auf einem Schüttler (200 Upm) inkubiert. Die Zellen wurden dann zentrifugiert und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert, um die extrazelluläre  $\beta$ -Lactamase zu entfernen. Diese Zellsuspension diente als Inokulum für 400 ml Ansätze mit Antibiotikum in 2 l Erlenmeyerkolben. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0.6-1 erfolgte die Induktion mit IPTG (0.4 mM bei T7-Promotor, 1 mM bei T7-*lac*-Promotor).

***Archaeoglobus fulgidus* Stamm 7324 (DSM 8774) und Stamm VC 16 (DSM 4204):** *Archaeoglobus fulgidus* wurde unter strikt anaeroben Bedingungen bei 76°C mit einer N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>-Atmosphäre (80%/20%, 1.2 bar) in geschlossenen Flaschen auf modifiziertem Medium nach Möller-Zinkhan (Möller-Zinkhan et al., 1989) gezüchtet. Das Basalmedium bestand aus 100 ml Salzlösung, 10 ml Spurenelementlösung, 2 mg (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O, 0.5 g Hefeextrakt, 5.5 g NaHCO<sub>3</sub>, 0.5 ml 0.5 M Na<sub>2</sub>S, 0.5 ml 0.5 M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (frisch), ad 950 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>. Das Medium wurde mit 25% HCl auf pH 6.8 eingestellt. Die Spurenelementlösung (100-fach) enthielt: 1.5 g Nitriiloacetic acid (Titriplex I) in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> gelöst, auf pH 6.5 mit KOH eingestellt, dann hinzugefügt: 3.0 g MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, 0.01 g Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>, 0.01 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.01 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O, 0.025 g NiCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O, 0.3 g Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> x 5H<sub>2</sub>O, 0.45 g MnSO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O, 0.1 g NaCl, 0.1 g FeSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, 0.18 g CoSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, 0.1 g CaCl x 2H<sub>2</sub>O, 0.18 g ZnSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, 0.01 g CuSO<sub>4</sub> x 5H<sub>2</sub>O, 0.02 g KAl(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> x 12H<sub>2</sub>O, ad 1000 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> (mit 5 N KOH auf pH 7.0 eingestellt). Die Mineralsalzlösung (10-fach) beinhaltete 74 g MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, 3.4 g KCl, 27.5 g MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O, 2.5 g NH<sub>4</sub>Cl, 1.4 g CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O, 1.4 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 180 g NaCl, Resazurin (15% w/v) 5 ml, ad 1000 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>. Als Kohlenstoff- und Energiequelle wurde dem Medium Laktat (10 mM) oder Stärke (1 g/l) zugesetzt.

***Pyrococcus furiosus* (DSM 3638):** *Pyrococcus furiosus* wurde unter streng anaeroben Bedingungen bei 90°C mit Stärke (5 g/l) als Kohlenstoff- und Energiequelle gezüchtet (Hethke et al., 1996).

### 3.3 Molekularbiologische Methoden

#### 3.3.1 Isolierung von genomischer DNA

Zur Extraktion genomischer DNA wurde das QIAGEN Genomic-tip Kit (Hilden) mit 100/G midi-Präparationssäulen verwendet. Hierzu wurden ca. 100 mg Feuchtzellen nach Anleitung des Herstellers aufgearbeitet. Die Konzentration und die Reinheit der erhaltenen DNA wurde sowohl photometrisch als auch über ein 0.8%-iges Agarosegel bestimmt (3.3.5).

#### 3.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (Mullis et al., 1986) ist eine Methode, um DNA-Fragmente spezifisch zu amplifizieren. Sie wurde in dieser Arbeit für die Amplifikation verschiedener, z.T. putativer, Acetyl-CoA Synthetase-Gene (ADP-bildend). Außerdem diente die PCR zur Überprüfung der Klone. Für die PCR wurde ein Biometra Thermocycler (T3, Biometra, Göttingen) verwendet. Die Reaktionen wurden jeweils in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt. Die PCR, bestehend aus den Phasen Denaturierung, Primer-Anlagerung und Kettenverlängerung, wurde in Abhängigkeit von der Länge des zu erwartenden Produktes und der Spezifität der Oligonukleotid-Primer in Bezug auf den vom Hersteller angegebenen Schmelzpunkt (MWG Biotech, Ebersberg; GibcoBRL, Karlsruhe) variiert. Die einzelnen PCR-Anwendungen werden im folgenden genauer dargestellt.

##### 3.3.2.1 PCR zur Amplifikation der zu klonierenden Gene

Zur Amplifikation der Gene für die Klonierung in Expressionsvektoren wurden die *Pwo*-DNA-Polymerase (Roche Diagnostics, Mannheim), das Expand<sup>TM</sup> long Template PCR System (Roche Diagnostics, Mannheim) oder das Sawady long PCR System (peqLab) verwendet, wobei die beiden letzteren eine Mischung der *Taq*- und der *Pwo*-DNA-Polymerase enthalten, um die Vorteile einer "proofreading"-Funktion mit der Amplifikation von langen PCR-Produkten zu vereinen. Neben den vom Hersteller mitgelieferten Reaktionspuffern wurden je 15 pmol der jeweiligen Oligonukleotid-Primer, 20 nmol dNTPs, 2.5 U DNA-Polymerase, 10-100 ng DNA als Template und 1.75-3 mM Mg<sup>2+</sup> (entweder als MgCl<sub>2</sub> oder als MgSO<sub>4</sub>) eingesetzt. Die Oligonukleotid-Primer wurden so konstruiert, daß sie neben den Sequenzen, die komplementär zu den Enden der gewünschten Gene sind, am 5'-Ende noch jeweils eine nicht-komplementäre Sequenz besitzen, die so in die PCR-Produkte an den Enden je eine Restriktionsschnittstelle für die Enzyme *Nco*I oder *Nde*I am Genanfang und *Xho*I (Biolabs, Frankfurt) am Genende einführten, über die dann die Klonierung in die Expressionsvektoren erfolgte. Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Nach einem initialen Denaturierungsschritt bei 93-95°C für 2 min folgten PCR-Zyklen bestehend aus Denaturierung (93-95°C, 10-20 s), Primerhybridisierung (45-65°C, 20 s) und Kettenverlängerung (68°C bzw. 72°C, 45 s-3 min). Ein 7-minütiger Polymerisierungsschritt bei 68 bzw. 72°C beendete den Reaktionszyklus. Die ersten 10 der 30 Zyklen wurden bei einer geringeren Temperatur (um 2-6°C) durchgeführt, da die Anbindung der Primer aufgrund

des nicht-komplementären Teils mit den einzuführenden Restriktionsschnittstellen nur bei geringeren Temperaturen stattfinden konnte. In den folgenden 20 Zyklen wurde die Hybridisierungstemperatur erhöht (um 2-6°C) und die Elongationszeit um 5-20 s pro Zyklus verlängert.

### **3.3.2.2 PCR zur Überprüfung einer erfolgreichen Klonierung ("Kolonie-Screening")**

Von den aus der Transformation (3.3.8.2) erhaltenen Kolonien wurden je ca. 10 ausgewählt, um sie auf Inserts der gewünschten Länge zu prüfen. Dieses ist erforderlich, da durch eine unvollständige Restriktionshydrolyse (3.3.7.1) Transformanten ohne Insert vorhanden sein können. Als Primer dienten der T7-Promotor- und der T7-Terminatorprimer, die in den pET-Vektoren an der Rändern der Klonierungsstelle hybridisieren. Neben der *Taq*-DNA-Polymerase (Biotherm, Hamburg) und dem vom Hersteller mitgelieferten Reaktionspuffer wurden je 10 pmol Primer, 10 nmol dNTPs, 0.5-1 U DNA-Polymerase und 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> verwendet. Das Template wurde in Form von ganzen Zellen, nach Picken der jeweiligen Kolonie mit einem sterilen Zahnstocher, hinzugegeben. Die PCR begann mit einem 5-minütigen Denaturierungsschritt bei 94°C, um die Zellen aufzuschließen. Darauf folgten 30 Zyklen mit Denaturierung (94°C, 20 s), Primerhybridisierung (48°C, 30 s) und Kettenverlängerung (72°C, 45 s-3 min). Die Reaktion wurde mit 7-minütiger Polymerisierung bei 72°C abgeschlossen.

### **3.3.3 Reinigung von Nucleinsäuren aus Reaktionsansätzen**

Um die PCR-Ansätze für die nachfolgende Restriktionshydrolyse (3.3.7.1) von störendem Enzym und von Puffer zu reinigen, wurden sie mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) oder dem NucleoSpin Extract Kit (Macherey Nagel, Düren) nach Anleitung der Hersteller gereinigt. Die Verfahren beruhen auf der Bindung von DNA-Fragmenten unter Hochsalzbedingungen an eine Silicamembran und der anschließenden Elution der Fragmente mit 50 mM Tris/HCl-Puffer, pH 8.0 oder H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>

### **3.3.4 Konzentrationsbestimmung und Reinheitsanalyse von DNA**

Die Konzentration von DNA wurde photometrisch durch Messen der Absorption bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Es gilt folgende Beziehung: Eine Absorption von 1.0 entspricht bei einer Schichtdicke von 1 cm einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml (Doppelstrang-DNA) bzw. 37 µg/ml (Einzelstrang-DNA, Sambrook et al., 1989). Darüber hinaus ist der Absorptionskoeffizient 260 nm/280 nm ein Maß für die Reinheit von Nucleinsäuren. Reine DNA-Lösungen haben einen Quotienten von ca. 1.8.

Alternativ wurde die Konzentration von Nucleinsäuren mittels Agarosegelelektrophorese (3.3.5) bestimmt. Dazu wurde die DNA unbekannter Konzentration neben DNA-Standards bekannter Konzentration aufgetragen. Die Konzentration wurde dann durch visuellen Vergleich der Bandenstärken abgeschätzt, wobei die Intensität proportional zur Masse ist.



### 3.3.5 Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in horizontalen 0.8- oder 2-%igen Agarosegelen. Dazu wurden 0.24 bzw. 0.6 g Agarose in 30 ml TBE-Puffer (8.9 mM Tris, 8.9 mM Borsäure, 0.2 mM EDTA) durch Aufkochen gelöst. Nach Abkühlung auf ca. 60°C wurden 2 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugegeben und in eine Gießvorrichtung (7x10 cm) gegossen (Biometra, Göttingen). Für analytische Gele wurde ein Kamm mit 12 Zähnen (max. 12 µl/Tasche), für präparative Gele ein Kamm mit 4 Zähnen (max. 50 µl/Tasche) verwendet. Die DNA-Proben wurden mit 1/6 Volumen 6x Auftragspuffer (50% Saccharose, 4 M Harnstoff, 50 mM EDTA, 0.1% Bromphenolblau) versetzt und zusammen mit einem Standard aufgetragen. Für die Elektrophorese genomischer DNA diente als Standard mit der Restriktionsendonuclease *Hind*III verdaute λ-DNA (Marker 2, Fermentas, Vilnius, Litauen), für PCR-Fragmente das mit *Alw*44I und *Mva*I verdaute Plasmid pBR322 (Marker 21, Fermentas, Vilnius, Litauen). Die Elektrophorese erfolgte bei Raumtemperatur mit einer Power Pac 300 Spannungsquelle bei konstant 100 V (Biorad, München) in 1x TBE-Puffer. Die Gele wurden auf einem UV-Schirm (366 nm) analysiert. Die Dokumentation erfolgte durch eine Videoaufnahme, die auf einem Computer gespeichert und/oder über einen Video Graphic Printer (UP-890 CE, Sony) ausgedruckt werden konnte.

### 3.3.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Im Anschluß an die Restriktionshydrolyse (3.3.7.1) wurden die PCR-Fragmente bzw. die hydrolysierten Plasmide über eine präparative Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. Die DNA-Banden wurden auf einem UV-Schirm mit einem Skalpell ausgeschnitten und über das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) oder NucleoSpin Extract Kit (Macherey Nagel, Düren) nach Anleitung der Hersteller aufgereinigt.

### 3.3.7 Enzymatische Modifikation von DNA

#### 3.3.7.1 Restriktionshydrolyse

Für Restriktionshydrolysen (Sambrook et al., 1989) wurden bei Plasmid-DNA 1-6 U Enzym/µg DNA, bei PCR-Produkten 5-10 U Enzym/µg DNA eingesetzt. Die Inkubation erfolgte in dem vom Hersteller angegebenen optimalen Puffer bei 37°C für 4-17 h.

#### 3.3.7.2 Dephosphorylierung

Um die Religation von nur mit einem Restriktionsenzym hydrolysierten Plasmid-DNAs zu verhindern, wurden die DNAs vor der Ligation mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert (Sambrook et al., 1989). Die Plasmid-DNA wurde mit 0.05 U alkalischer Phosphatase pro pmol Enden DNA-Fragment (Calf intestine alkaline phosphatase, Fermentas, Vilnius, Litauen) in dem vom Hersteller mitgelieferten Puffer bei 37°C für 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch 15-minütige Erhitzung auf 65°C gestoppt.

### 3.3.7.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten (Sambrook et al., 1989) erfolgte in einem Volumen von 10  $\mu$ l. Der Ligationsansatz enthielt neben den zu ligierenden DNA-Fragmenten 1 U T4-DNA-Ligase (Roche, Diagnostics, Mannheim) und T4-DNA-Ligasepuffer (Roche Diagnostics, Mannheim). Die hydrolysierten und gereinigten PCR-Fragmente (3.3.6) wurden dabei im 3 bis 5-fachen molaren Überschuß zu den zu ligierenden Plasmiden eingesetzt. Die Ansätze wurden bei 16°C über Nacht inkubiert und anschließend direkt in die CaCl<sub>2</sub>-Transformation (3.3.8) eingesetzt.

### 3.3.8 Transformation

#### 3.3.8.1 Herstellung kompetenter Zellen (CaCl<sub>2</sub>)

Die Herstellung CaCl<sub>2</sub>-kompetenter Zellen der *E. coli*-Stämme JM109, BL21(DE3), BL21(DE3) pLysS und BL21-CodonPlus(DE3)-RIL erfolgte in Anlehnung an das Protokoll im T-Cloning Kit Manual der Firma Fermentas (Vilnius, Litauen). 400 ml LB-Medium wurden 10%ig mit einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C auf dem Schüttler bis zu einer OD<sub>550</sub> von 0.6 inkubiert. Dann wurden die Kulturen 20 min auf Eis gelagert, 15 min abzentrifugiert (Sorvall Zentrifuge RC-5B, Rotor GS-3, 6000 Upm, 4°C) und der Kulturüberstand dekantiert. Die Zellen wurden in 200 ml eiskaltem TBS-Puffer aufgenommen (100 mM NaCl, 5 mM Tris, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.0) und wiederum abzentrifugiert (10 min, siehe oben). Das Pellet wurde in 200 ml eiskalter CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert (100 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM Tris, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.0), 20 min auf Eis inkubiert und 10 min wie zuvor abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 20 ml eiskalter CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert, 1 h auf Eis inkubiert und dann mit 5 ml sterilem Glycerin versetzt (Endkonzentration 15-20%). 200  $\mu$ l Aliquots wurden mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bei -70°C.

#### 3.3.8.2 Transformation

Es wurden sowohl Ligationsansätze als auch präparierte Plasmid-DNAs in verschiedene *E. coli*-Stämme transformiert. Je Transformationsansatz wurden 80  $\mu$ l kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, mit 10  $\mu$ l Ligationsansatz und 2  $\mu$ l 0.5 M  $\beta$ -Mercaptoethanol gemischt und für 60 min auf Eis inkubiert. Dann wurden die Ansätze für 40 Sekunden einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt und sofort für 1 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 400  $\mu$ l SOC-Medium wurden die Zellen für 30 min bei 37°C und Schütteln bei 200 Upm inkubiert. Aliquots dieser Ansätze wurden zur Selektion auf antibiotikahaltigen LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 3.3.9 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid -DNA erfolgte durch das QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Hilden), das NucleoSpin Plus Kit (Macherey Nagel, Düren) und das Plasmid Miniprep Kit I (PeqLab, Erlangen) nach Angaben der Hersteller.

### 3.3.10 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von Plasmid -DNA erfolgte durch Cycle Sequenzierung (Innis et al., 1992; Murray, 1989). Dabei wurden bei der Sequenzierung nach Sanger et al. (Sanger et al., 1977) die Kettenabbrüche durch den Einbau von Didesoxynucleotiden erzeugt, jedoch wurden analog zur PCR-Technik zyklische Wiederholungen von DNA-Denaturierung, Primerhybridisierung und eigentlicher Sequenzierreaktion durchgeführt. Durch die Verwendung unterschiedlich fluoreszenzmarkierter Didesoxynucleotide war es möglich, die vier Sequenzreaktionen in einem Ansatz durchzuführen. Die fluoreszenzmarkierten Produkte wurden mittels Kapillarelektrophorese bzw. Plattenelektrophorese aufgetrennt, mit einem Laser angeregt und die emittierte Fluoreszenz detektiert.

Die Sequenzierung erfolgte mit dem ABIPRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit nach dem vom Hersteller mitgelieferten Protokoll. Die Analyse der Sequenzierungsprodukte erfolgte auf dem ABIPRISM™ 310 und dem ABIPRISM™ 373 Genetic Analyser (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA).

### 3.3.11 Ortsspezifische Mutagenese

Die ortsspezifische Mutagenese wurde mit dem QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene nach Angaben des Herstellers ausgeführt. Als Ausgangsmaterial diente der Vektor acdAF1211pET17b (3.1.2), das Expressionsplasmid für die Überproduktion der Acetyl-CoA Synthetase (ADP-bildend) von *A. fulgidus*, die vom Gen AF1211 (Klenk et al., 1997) kodiert wird. Für die Mutation des Hisidin<sup>249</sup> gegen Aspartat (Gunasekera, Kemp, 2000) wurden die beiden komplementären Oligonucleotide acdAF1211/732F und acdAF1211/764R (3.1.2) (MWG, Ebersberg) eingesetzt. Sie enthalten im zentralen Bereich die Mutation des Histidincodons 249 CAC gegen das Codon GAC, das für Aspartat kodiert. Für die Mutagenesereaktion wurden 5 µl 10x Reaktionspuffer, 0,5 µl (11,4 ng) Template acdAF1211pET17b, 1,25 µl (125 ng) acdAF1211/732f, 1,25 µl (125 ng) acdAF1211/764r, 1 µl dNTP-Mix (aus dem Kit), ad 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> eingesetzt.

Zur Überprüfung der Mutagenese wurde das Kontrollplasmid pWhitescript™ verwendet. Bei pWhitescript™ ist im *lacZ*-Gen ein Stop-Codon (TAA) im Codon 9 eingebaut, das normalerweise aus dem Glutamin-Codon (CAA) besteht. Durch die Mutagenese mit den mitgelieferten Kontrollprimern #1 und #2 wird das T des Stop-Codons gegen das C des Glutamin-Codons ausgetauscht, so daß das intakte *lacZ*-Gen wiederhergestellt wird. Diese Mutation kann direkt auf LB-Platten mit Hilfe der Blau-Weiß-Selektion sichtbar gemacht

werden: Zellen mit dem Ausgangsplasmid bilden auf Indikatorplatten mit IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (20  $\mu$ l 100 mM IPTG je Indikatorplatte) und 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -Galaktopyranosid (20  $\mu$ l 10% (w/v), X-Gal gelöst in Dimethylformamid) weiße Kolonien, Zellen mit dem mutierten Plasmid aufgrund der aktiven  $\beta$ -Galaktosidase blaue Kolonien. Für die Kontrollreaktion wurden 5  $\mu$ l 10x Reaktionspuffer, 2  $\mu$ l (125 ng) Primer #1, 2  $\mu$ l (125 ng) Primer #2, 1  $\mu$ l dNTP-Mix, ad 41  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> eingesetzt.

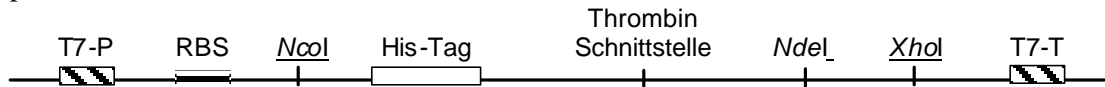
Vor dem Start wurde zu jedem Reaktionsansatz 1  $\mu$ l *PfuTurbo* DNA-Polymerase (2.5 U/ $\mu$ l) hinzugefügt, die aufgrund ihrer 3'-5'-„proofreading-Funktion“ eine 6-fach höhere Polymerisationsgenauigkeit hat. Die Reaktion wurde unter folgenden Bedingungen im Thermocycler durchgeführt: Nach dem initialen Denaturierungsschritt von 95°C für 30 s folgten 10 PCR-Zyklen bestehend aus Denaturierung (95°C, 30 s), Primerhybridisierung (55°C, 1 min), und Kettenverlängerung [68°C, 2 min/kb Plasmid, d.h. 9 min (Kontrollreaktion) bzw. 11 min (Mutagenesereaktion *acdAF1211 pET17b*)]. Im ersten Zyklus binden die Primer nur an die Ausgangs-DNA. Nach der Elongation entsteht ein Heteroduplex aus einem zirkulären Wildtypstrang und einem mutierten Strang, der dort, wo das elongierte 3'-Ende auf das 5'-Ende eines Primers trifft, eine Lücke („Nick“) enthält. Der mutierte Strang ist somit ein lineares Molekül, an dem die Primer bei einem erneuten Zyklus zwar binden können, der aber nicht elongiert werden kann. Da für die Neusynthese des mutierten Stranges nur Template-DNA als Ausgangsmatrize dient, treten Fehler selten auf, und man erhält nach 12 Zyklen 12:1 mutierte Stränge zu Template-DNA. Auf die PCR folgte ein Restriktionsverdau für 1 h bei 37°C mit 1  $\mu$ l *DpnI* (10 U/ $\mu$ l). *DpnI* schneidet spezifisch die Parental-DNA, die bei fast allen *E. coli*-Stämmen DAM-methyliert ist, an der Sequenz 5'-Gm<sup>6</sup>ATC-3'. Die DAM-Methylase transferiert eine Methylgruppe von S-Adenosylmethionin auf die N6-Position der Adenin-Reste in der Sequenz GATC, die bei einem GC-Gehalt von 50% durchschnittlich einmal in 256 bp vorkommt. Den in der Mutagenese-Reaktion neu synthetisierten DNA-Strängen fehlt diese DAM-Methylierung, so daß sie nicht hydrolysiert werden.

*E. coli* XL1-Blue superkompetente Zellen wurden mit 1  $\mu$ l des *DpnI* verdauten Mutageneseansatzes transformiert. Die transformierten Zellen wurden auf LB-Platten mit Ampicillin bzw. mit Ampicillin, IPTG und X-Gal (pWhitescript-Kontrolle) ausplattiert und die Platten bei 37°C über Nacht inkubiert. Von einem erhaltenen Klon wurde eine Plasmidpräparation (3.3.9) gemacht und das erhaltene Insert durch Sequenzierung (3.3.10) mit den Primern T7-Promotorprimer, T7-Terminatorprimer, *acdAF1211* 450f, *acdAF1211* 883f, *acdAF1211* 1361f, *acdAF1211* 456r und *acdAF1211* 716r (3.1.3) auf Inhalt des neuen Aspartat-Codons und Fehlerfreiheit der Sequenz des restlichen Gens überprüft.

### 3.4 Auswahl der Expressionssysteme

Als Expressionssystem wurden die Vektoren pET14b, pET17b und pET19b (Abb. 5) aus dem T7-Expressionssystem (Studier et al., 1990) von Novagen gewählt.

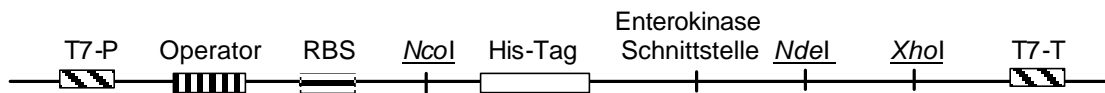
pET14b:



pET17b:



pET19b:



**Abb. 5 Schematische Darstellung der Klonierungsstellen der Expressionsvektoren pET14b, pET17b und pET19b.** Die ADP-ACS Gene wurden über die in Tab. 5 genannten Schnittstellen gerichtet in die Vektoren kloniert. Die Expression erfolgt mittels T7-Polymerase, die den T7-Promotor (T7-P) spezifisch erkennt. Die Transkription stoppt am T7-Terminator (T7-T). Die Ribosomenbindestelle (RBS) des *E. coli*-Phagen T7 ermöglicht eine effektive Translation.

Die T7-RNA-Polymerase erkennt hochspezifisch den T7-Promotor. Wird die Bildung der T7-RNA Polymerase in den Wirtszellen durch IPTG induziert, so wird das klonierte Gen, das unter der Kontrolle des starken T7-Promotors steht, in großen Mengen transkribiert und das Gen damit exprimiert. Der Anteil des exprimierten Gens kann bis zu 50% der Gesamtproteinmenge ausmachen. Solange keine T7-RNA-Polymerase vorhanden ist, wird das klonierte Gen nicht exprimiert, da die *E. coli*-RNA-Polymerase den T7-Promotor nicht erkennen kann.

### 3.5 Klonierung der verschiedenen Acetyl-CoA Synthetasen (ADP-bildend)

Die Acetyl-CoA Synthetase von *Pyrococcus furiosus* besteht als einziges der klonierten Enzyme aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit. Ihre Gene sind nicht als Operon angeordnet. Die  $\alpha$ -Untereinheit wurde in den Expressionsvektor pET17b und die  $\beta$ -Untereinheit wurde in den Vektor pET14b kloniert, um die Proteine rekombinant in *E. coli* herzustellen. Dafür wurden die Gene zunächst aus genomischer DNA von *P. furiosus* amplifiziert (3.3.2.1). Die gebildeten PCR-Produkte in der Größe von 2055 bzw. 699 bp wurden gereinigt (3.3.6). Für die Klonierung in die Expressionsvektoren pET17b bzw. pET14b wurden die gereinigten PCR-Produkte und die Vektor-DNAs mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *XhoI* für die  $\alpha$ -

Untereinheit und *NcoI* und *XhoI* für die  $\beta$ -Untereinheit hydrolysiert (3.3.7.1) und über Agarosegelelektrophorese gereinigt (3.3.6). Nach der Phosphatase-Behandlung der Vektor-DNA (3.3.7.2) wurden die PCR-Produkte mit den Vektor-DNAs ligiert (3.3.7.3). Die Ligationsansätze wurden in *E. coli* JM109 transformiert (3.3.8.2). Von je 10 Transformanten wurde durch Kolonie-Screening überprüft, ob sie ein Insert in erwarteter Länge aufwiesen (3.3.2.2). Von je einem positiven Klon wurde eine Plasmidpräparation durchgeführt (3.3.9) und durch Sequenzierung (3.3.10) der richtige Einbau und die Fehlerfreiheit des entsprechenden Gens überprüft. Beide Gene wurden mit den Oligonukleotid-Primern T7-Promotor- und T7-Terminatorprimer sequenziert, für die große  $\alpha$ -Untereinheit wurden zusätzlich die Primer *acdAI* 259F, *acdAI* 616F, *acdAI* 678R und *acdAI* 850R (3.1.3) verwendet. Die Plasmide wurden mit *acdAIpET17b* (*P. furiosus* Acetyl-CoA Synthetase ADP-bildend,  $\alpha$ -Untereinheit, Isoenzym I in pET17b) und *acdBIpET14b* (*P. furiosus* Acetyl-CoA Synthetase ADP-bildend,  $\beta$ -Untereinheit, Isoenzym I in pET14b) bezeichnet. Die Klonierung der Genprodukte *acdAF1211*, *acdAF1938* (*A. fulgidus*), *acdMJ0590* (*M. jannaschii*) erfolgte analog zur Klonierung der Genprodukte aus *P. furiosus* (Tabelle 5).

**Tabelle 5** Klonierung der ADP-AcetylCoA Synthetasen

DNA-Quelle	Primer	Restriktions-schnittstellen	Expressions-vektor	Bezeichnung (Vektor+Insert)
<i>P. furiosus</i>	<i>acdBI</i> exprF	<i>NcoI</i>	pET14b	<i>acdBIpET14b</i>
	<i>acdBI</i> exprR	<i>XhoI</i>		
<i>P. furiosus</i>	<i>acdAI</i> exprF	<i>NdeI</i>	pET17b	<i>acdAIpET17b</i>
	<i>acdAI</i> exprR	<i>XhoI</i>		
<i>A. fulgidus</i>	<i>acdAF1211</i> exprF	<i>NdeI</i>	pET17b	<i>acdAF1211pET17b</i>
	<i>acdAF1211</i> exprR	<i>XhoI</i>		
<i>A. fulgidus</i>	<i>acdAF1211</i> exprF	<i>NdeI</i>	pET19b	<i>acdAF1211pET19b</i>
	<i>acdAF1211</i> exprR	<i>XhoI</i>		
<i>A. fulgidus</i>	<i>acdAF1938</i> exprF2	<i>NdeI</i>	pET17b	<i>acdAF1938pET17b</i>
	<i>acdAF1938</i> exprR2	<i>XhoI</i>		
<i>A. fulgidus</i>	<i>acdAF1938</i> exprF2	<i>NdeI</i>	pET19b	<i>acdAF1938pET19b</i>
	<i>acdAF1938</i> exprR2	<i>XhoI</i>		
<i>A. fulgidus</i>	<i>acdAF1211</i> 732F	<i>NdeI</i>	pET19b	<i>acdAF1211His</i> <sup>249</sup>
	<i>acdAF1211</i> 764r	<i>XhoI</i>		AsppET19b
<i>M. jannaschii</i>	<i>acdMJ0590</i> exprF	<i>NdeI</i>	pET17b	<i>acdMJ0590pET17b</i>
	<i>acdMJ0590</i> exprR	<i>XhoI</i>		

### 3.6 Analyse von RNA

Bei allen in dieser Arbeit aufgeführten Methoden mit Gesamt-RNA (RNA-Isolierungen, Agarosegelelektrophoresen mit RNA, sowie RT-PCR) mußte Kontamination mit RNasen vermieden werden. Hierzu wurden alle Lösungen 1%-ig mit dem RNase-Inhibitor DMPC versetzt, 12 bis 24 h inkubiert und anschließend autoklaviert. Glasgefäße wurden mit 0.1 M NaOH und 1 mM EDTA vorbehandelt.

#### 3.6.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Die RNA-Isolierung aus Stärke-gewachsenen Zellen des *Archaeoglobus fulgidus*-Stammes 7324 (3.2) erfolgte mit dem RNeasy Isolierungs-Kit (Qiagen, Hilden), der eine schnelle Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen ermöglicht. Für die Isolierung wurden ca. 100 mg Feuchtzellen aus der logarithmischen Wachstumsphase in einem Glasmörser unter flüssigem Stickstoff pulverisiert. 1-2 Spatelspitzen wurden in ein Reaktionsgefäß gegeben und in 100 µl RNase-freiem  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  aufgenommen. Nach Zugabe von 350 µl RLT-Puffer (RNeasy Aufschluß Puffer), der nach Angaben des Herstellers mit  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt worden war, wurde der Ansatz gut durchmischt. Nach Zentrifugation (2 min, 13.000 Upm, Raumtemperatur) wurde der Überstand zur Homogenisation auf eine QIAshredder-Säule (Qiagen, Hilden) gegeben. Die weitere Extraktion der RNA erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Die DNA wurde durch Hydrolyse mit RNase-freier DNase (Qiagen, Hilden) durch 30-minütige Inkubation entfernt. Die Elution der RNA erfolgte durch Zugabe von 50 µl RNase-freiem  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ . Die Qualität der RNA wurde auf einem 1.3%-igem RNA-Agarosegel kontrolliert (3.6.2).

#### 3.6.2 Gelelektrophorese zur Auftrennung von Gesamt-RNA

Die Auftrennung von Gesamt-RNA erfolgte in 1.3%-igen Agarosegelen. Dazu wurden 0.4 g Agarose mit 3 ml 10x FA Laufpuffer (200 mM MOPS, 50 mM NaAc, 10 mM EDTA, pH 7.0) versetzt und mit RNase-freiem  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  auf 30 ml aufgefüllt und durch Aufkochen gelöst. Nach Abkühlung auf ca. 60°C wurde 1 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugegeben und in eine Gießvorrichtung (7x10 cm) gegossen (Biometra, Göttingen). Die RNA-Proben wurden mit 1/5 Volumen RNA-Auftragspuffer (0.05% (w/v) Bromphenolblau, 80 µl 500 mM EDTA, 720 µl 37% Formaldehyd, 2 ml 100% Glycerin, 3084 µl Formamid, 4 ml 200 mM MOPS, 116 µl  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ ) versetzt und zusammen mit einem Standard aufgetragen. Für die Elektrophorese von Gesamt-RNA diente eine RNA-Leiter (RNA Ladder Low Range, Fermentas, Vilnius, Litauen). Die Elektrophorese erfolgte bei konstant 100 V mit einer Power Pac 300 Spannungsquelle (Biorad, München) in 1x FA-Puffer (100 ml 10x FA-Puffer, 20 ml Formaldehyd (37%) pro 1000 ml Puffer).

Die Gele wurden auf einem UV-Schirm (366 nm) analysiert. Die Dokumentation erfolgte durch eine Videoaufnahme, die auf einem Computer digital gespeichert und/oder über einen Video Graphic Printer (UP-890 CE, Sony) ausgedruckt werden konnte.

### 3.6.3 RT-PCR

Die RT-PCR (Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion) ist eine hochsensible Methode, um die Expression spezifischer Gene auf mRNA-Ebene zu untersuchen. Hierzu wird die Synthese von cDNA aus RNA mit Hilfe der reversen Transkriptase und anschließender PCR kombiniert.

Diese Methode wurde mit dem QIAGEN oneStep RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die RT-PCR wurden 10 µl 5x oneStepRT-PCR Puffer (12.5 mM MgCl<sub>2</sub>), 10µl 5x QLösung, 2 µl dNTPs (10 mM), 1 µl RNase-Inhibitor (5 U, Humane Plazenta, Sigma, Deisenhofen), je 0.6 µM Oligonukleotid-Primer, 2 µl oneStep RT-PCR Enzym Mix und RNase-freies H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> gemischt und zuletzt isolierte Gesamt-RNA (3.6.1) hinzugegeben. Die oneStep RT-PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Einem 30-minütigen Reverse-Transkriptase-Schritt bei 50°C (vor dem Einstellen der Proben sollte der Thermocycler 50°C erreicht haben) folgte eine 15-minütige Denaturierung bei 95°C. Anschließend folgten 40 Zyklen PCR, die die entstandene cDNA amplifizieren. Mit Denaturierung (94°C, 30 sec), Primerhybridisierung (45-65°C), Kettenverlängerung (72°C, 1 min) und anschließender Beendigung des Reaktionszyklus mit einer 10-minütigen Polymerisierung entspricht sie einer „normalen“ PCR (3.3.2). Für die Gene *acdAF1211* (2055 bp) und *acdAF1938* (2022 bp) von *A. fulgidus* wurde die Temperatur des RT-PCR-Programms aufgrund der Größe der Fragmente (siehe QIAGEN OneStep RT-PCR Kit Handbook) im Reverse-Transkriptase-Schritt auf 45°C und im Elongationsschritt auf 68°C erniedrigt.

Als Positivkontrolle wurde das Gen für die DNA Ligase von *A. fulgidus* amplifiziert, welches eine ähnliche Länge (1658 bp) hat. Als Kontrolle für RNA, bei der die DNA noch nicht vollständig hydrolysiert war, diente eine PCR (3.3.2.1) mit RNA als Template, die vorher nicht mit reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben wurde.

## 3.7 Analyse von Proteinen

### 3.7.1 Expression der Acetyl-CoA Synthetasen (ADP-bildend)

Die Expression der potentiellen ADP-bildenden Acetyl-CoA Synthetasen von *P. furiosus*, *A. fulgidus* und *M. jannaschii* erfolgte in *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* BL21(DE3)pUBS520 und *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL. *E. coli* BL21(DE3) und *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL besitzen das Gen für die T7-RNA-Polymerase unter Kontrolle des lacUV5-Promotors. In den Expressionsvektoren stehen die klonierten Gene unter Kontrolle der T7-Transkription (Studier et al., 1990). Durch Zugabe von IPTG kann die Expression der klonierten Gene induziert werden. Einige Codons, wie z.B. die Arginincodons AGA und AGG, werden in *E. coli* selten benutzt. Die sie erkennenden tRNAs kommen deswegen kaum vor. Enthält das zu produzierende rekombinante Protein mehrere dieser Codons, kann dies insbesondere bei größeren Proteinen zu Verkürzungen kommen.



BL21-CodonPlus(DE3)-RIL besitzt zusätzliche Kopien der *argU*, *ileY* und *leuW* Gene, die für tRNA-Spezies kodieren, die die Arginincodons AGA und AGG, das Isoleucin-Codon AUA und das Leucin-Codon CUA erkennen. Das Plasmid pUBS520 kodiert zusätzlich für die tRNAs der Arginin-Codons AGA und AGG.

Die Plasmide *acdBIpET14b*, *acdAIpET17b*, *acdAF1211pET17b*, *acdAF1938pET17b* und *acdMJ0590pET17b* wurden in *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* BL21(DE3)pUBS520 und *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL transformiert. Je ein Transformant wurde nach zweimaligem Reinigungsausstrich für die Expression eingesetzt. Als Negativkontrolle für die Expression wurden Transformanten von *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* BL21(DE3)pUBS520 und *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL verwendet, die die Plasmide pET14b bzw. pET17b (ohne Insert) enthielten.

Um die optimalen Bedingungen für die Expression auszutesten, wurden, sofern nicht anders vermerkt, je 20 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum (3.1.2, 3.2) mit einer Einzelkolonie von einer Transformantenplatte angeimpft und bei 20°C, 30°C und 37°C auf dem Schüttler (200 Upm) bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.6 bis 1.0 inkubiert. Zur Kontrolle nicht-induzierter Zellen wurde vor Induktion je 1 ml abgenommen, zentrifugiert und bei -20°C tiefgefroren. Die restliche Kultur wurde mit 0.4 mM (pET17b) bzw. 1 mM (pET14b) IPTG induziert und bei der jeweiligen Temperatur inkubiert. Nach 1 h, 2 h und 3 h wurde, wie vor der Induktion, je 1 ml Kultur abgenommen, zentrifugiert und das Zellpellet bei -20°C eingefroren. Die Zellpellets wurden in je 80 µl Zellaufschlußpuffer (8 M Harnstoff, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris, pH 8.0) aufgenommen und zentrifugiert. Die Überstände, die neben löslichen Proteinen auch Zelleinschlußkörper und Membranbestandteile enthielten, wurden auf SDS-Polyacrylamidgelen (3.7.6) analysiert.

### 3.7.2 Zellern te und Zellaufschluß

Die präparative Expression der Acetyl-CoA Synthetasen (ADP-bildend) von *P. furiosus* erfolgte in *E. coli* BL21(DE3) bei 37°C, die der ADP-ACS AF1211 und ADP-ACS AF1938 von *A. fulgidus* in BL21(DE3)pUBS520 bei 37°C bzw. 20°C und die der ADP-ACS MJ0590 von *M. jannaschii* in BL21-CodonPlus(DE3)-RIL bei 37°C. Dafür wurden die Zellen, wie unter 3.2 beschrieben, in 400 ml LB mit entsprechendem Antibiotikum gezüchtet. Nach Induktion mit IPTG für 2 bis 3 h wurden die Zellen abzentrifugiert (Sorvall Zentrifuge RC-5B, Rotor GS-3, 5000 Upm, 20 min, 4°C) und die Zellpellets bei -20°C eingefroren. Die bei -20°C tiefgefrorenen Zellen (3.7.1) wurden auf Eis aufgetaut und in ca. 10 ml Puffer (100 mM Tris, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8.0) resuspendiert. Die Zellen wurden bei 150 MPa in einer French Press (American Instrument Company, Silver Spring, USA) aufgeschlossen. Durch einen Ultrazentrifugationsschritt (Beckmann L-60, Rotor Ti 70, 40000 Upm, 1h, 4°C) wurden die Zelltrümmer abgetrennt. Der Überstand (S100), der die löslichen Proteine enthält, wurde nach dem Zentrifugationsschritt entweder bei -20°C eingefroren oder sofort zur Reinigung des gewünschten Proteins weiterverarbeitet.

### 3.7.3 Rekonstitution der rekombinanten Acetyl-CoA Synthetase (ADP-bildend) von *P. furiosus*

Gleiche Volumen von Extrakten aus *E. coli* BL21(DE3)acdBIPET14b und BL21(DE3)acDAIPET17b, die die  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Untereinheit der ACS überexprimierten, wurden zusammengegeben, gemischt und 1 h auf Eis inkubiert. Danach folgte eine 15-minütige Hitzefällung und ein anschließender Enzymtest (3.8.1), um die Aktivität des rekonstituierten Proteins zu überprüfen.

### 3.7.4 Reinigung der rekombinanten Acetyl-CoA Synthetasen (ADP-bildend)

Die Reinigung der rekombinanten Proteine erfolgte in einer Kombination von Hitzefällung, um einen Großteil der *E. coli*-Proteine zu präzipitieren, und anschließenden chromatographischen Schritten (Tab 6).

**Acetyl-CoA Synthetase (ADP-bildend) von *P. furiosus*:** 4.8 g Zellpellet (3.7.1) (Zellpellet von je 400 ml BL21(DE3)pET17bacDAI und 400 ml BL21(DE3)pET14bacDBI) wurden aufgeschlossen (3.7.2), der lösliche Überstand rekonstituiert (3.7.3) und in 50 ml Sarstedt-Röhrchen für 15 min bei 80°C im Wasserbad erhitzt. Der Extrakt wurde 30 min zentrifugiert (5000 Upm, 4°C, Beckmann, TJ-6, München) und der Überstand mit einer Flußgeschwindigkeit von 5 ml/min auf eine 6-ml Resource Q Säule (Pharmacia Biotech Uppsala, Schweden) aufgetragen, die zuvor mit 20 mM Tris/HCl, pH 8.0, 10 mM MgCl<sub>2</sub> äquilibriert worden war. Das Protein wurde mit einer Flußrate von 5 ml/min und einem linearen Gradienten von 0 bis 0.4 M NaCl in Puffer (150 ml) von der Säule eluiert. Die Fraktionen mit der höchsten spezifischen Aktivität (bei 0.14 M NaCl) wurden zusammengegeben, auf 1 ml mit einem 20 kDa Filter aufkonzentriert (3.7.4.1) und mit einer Flußrate von 1 ml/min auf eine Superdex 200 (26x60) (Pharmacia, Uppsala, Schweden) aufgetragen. Als Puffer diente 100 mM Tris/HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, der auch in den folgenden Gelfiltrationsläufen benutzt wurde. Die Fraktionen mit der höchsten Aktivität ( $V_E = 173$  ml) wurden, wie auch in den nachfolgenden Proteinreinigungsverfahren, auf einem 12%-igem Polyacrylamidgel (3.7.6) auf ihre Reinheit geprüft. Das saubere Protein wurde zur weiteren Analyse des Proteins verwendet.

**Acetyl-CoA Synthetase (ADP-bildend) AF1211 von *A. fulgidus*:** 5.5 g Zellen wurden nach Aufschluß und Erhitzung für 30 min bei 80°C und 30-minütiger Zentrifugation auf einen Marco-Prep Diethylaminoethyl Anionenaustauscher (DEAE, BioRad, München) aufgetragen. Das Protein wurde bei einer Flußrate von 2 ml/min mit 120 ml 50 mM Piperazinpuffer (pH 6.5, 4°C) und drei linearen Gradienten von 0.2 M NaCl eluiert: 0-0.05 M NaCl (90 ml), 0.050-0.200 M NaCl (60 ml) und 0.2-2 M NaCl (60 ml). Die Fraktionen mit den höchsten Aktivitäten ( $V_E = 270-275$  ml, 0.25-0.75 M NaCl) wurden vereinigt und mit der Ultrafiltration (Ausschlußvolumen 10 kDa) auf 1 ml aufkonzentriert. Die konzentrierte Probe wurde mit einer Flußrate von 1 ml/min auf eine Superdex 200-Gelfiltrationssäule (26x60) aufgetragen.

Das eluierte Protein mit der höchsten spezifischen Aktivität (193 ml) wurde auf seine Reinheit geprüft (siehe oben) und für weitere Tests benutzt.

**Acetyl-CoA Synthetase (ADP-bildend) AF1211 His<sup>249</sup>Asp von *A. fulgidus*:** Die Reinigung des mutierten Proteins ADP-ACS AF1211His<sup>249</sup>Asp erfolgte analog dem Reinigungsschema des unmutierten Proteins (siehe oben).

**Acetyl-CoA Synthetase (ADP-bildend) AF1938 von *A. fulgidus*:** 4.7 g Zellen wurden aufgeschlossen und 60 min bei 70°C erhitzt. Das Protein ADP-ACS AF1938 konnte aufgrund seines His-tags über eine Ni-NTA-Agarose-Säule (Qiagen, Hilden, 7 ml) gereinigt werden. Der Expressionsvektor pET19b ist dabei so konstruiert, daß Fusionsproteine mit N-terminalen His-tag (10xHis) produziert werden, dieser ist später durch eine Enterokinase abspaltbar. Die Säule wurde mit 50 ml 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 8.0, 300 mM NaCl (Puffer A) äquilibriert, nach Proteinauftrag mit 10 ml 100 mM Imidazolpuffer in Puffer A gewaschen und mit 15 ml 500 mM Imidazol in Puffer A eluiert. Die Fraktionen mit der höchsten Aktivität wurden gepoolt, mit Ultrafiltration (Ausschlußvolumen 10 kDa) auf 1 ml aufkonzentriert und auf eine Superdex 200-Säule (16x26) mit 1 ml/min Flußrate aufgetragen. Das eluierte Protein (bei 65.5 ml) wurde zur Reinheitskontrolle auf ein 12%-iges Polyacrylamidgel aufgetragen und außerdem auf seine Aktivität überprüft. Die Gelfiltration hatte einen Verlust von 80% der ADP-ACS-Aktivität zur Folge.

**Acetyl-CoA Synthetase (ADP-bildend) MJ0590 von *M. jannaschii*:** 4.4 g Zellen wurden aufgeschlossen (BL21-CodonPlus (DE3)-RIL acdMJ0590pET17b) und 60 min bei 70°C erhitzt. Vorversuche ergaben, daß das Protein weder an einen Kationen- noch einen Anionenaustauscher bindet. Da die DNA und einige Proteine jedoch sehr gut an einen Anionenaustauscher binden, wurde diese Methode zur Entfernung der DNA aus dem Extrakt genutzt. Der Durchlauf mit Aktivität der ADP-ACS MJ0590 wurde mit der Ultrafiltrationszelle (Ausschlußvolumen 20 kDa) auf 1 ml aufkonzentriert und auf die Superdex 200-Säule (16x26) mit 1 ml/min Flußgeschwindigkeit aufgetragen. Das Protein eluierte bei 69.5 ml. Der Auftrag auf ein 12%-iges SDS-Gel ergab ein ca. 85% reines Protein, das zwei Banden im denaturierten Gel ergab.

**Tabelle 6** Reinigungsschema der verschiedenen ADP-Acetyl-CoA Synthetasen

<b>AcdA I</b>	<b>ADP-ACS AF1211 und ADP-ACS AF1211 His<sup>249</sup>Asp</b>	<b>ADP-ACS AF1938</b>	<b>ADP-ACS MJ0590</b>
	⇓		
	Fermentation und Ernte der <i>E. coli</i> -Zellen		
3 h 37°C	3 h 37°C	2 h 20°C	3 h 37°C
	⇓		
	Zellaufschluß der Zellen durch Hochdruckhomogenisation		
⇓	⇓	⇓	⇓
Hitzefällung 80°C, 15 min	Hitzefällung 80°C, 30 min	Hitzefällung 70°C, 60 min	Hitzefällung 70°C, 60 min
⇓	⇓	⇓	⇓
Resource Q Anionenaus- taucher	DEAE-Sepharose Anionenaus- taucher	Ni-NTA Säule Ni-Chelatsäule	DEAE-Sepharose Anionenaus- taucher
⇓	⇓	⇓	⇓
Superdex 200 (26x60)	Superdex 200 (26x60)	Superdex 200 (16x60)	Superdex 200 (16x60)

### 3.7.4.1 Ultrafiltration

Durch Ultrafiltration wurden Proteinlösungen aufkonzentriert, um kleine Volumina auf die Gelfiltrationssäule auftragen zu können. Die Ultrafiltration erfolgte in einer 80 ml oder einer 10 ml Ultrafiltrationszelle (Amicon, Beverly, USA) mit Filtern, die ein Ausschlußvolumen von 10, 20 oder 30 kDa (Amicon, Beverly, USA; Satorius, Göttingen) hatten.

### 3.7.5 Colorimetrische Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentrationen wurden mit einer modifizierten Methode nach Bradford (Bradford, 1976) bestimmt. Es wurden 100 µl Probe und 900 µl Bradford-Reagenz (35 mg Serva blue G, 25 ml 96% Ethanol und 50 ml ortho-Phosphorsäure ad 500 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>) eingesetzt, gut gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktion wurde bei 595 nm gemessen. Eine Proportionalität der Meßwerte war bis zu einer Proteinmenge von 8 µg im Test gegeben. Die Eichung erfolgte mit einem Standard aus Rinderserum-Albumin Fraktion V (Merck). 8 µg Protein entsprachen einer Extinktionsdifferenz von 0.745.

### 3.7.6 SDS-Polyacrylamidelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte elektrophoretisch nach Laemmli (Laemmli, 1970) in 12%-igen, diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen (7 cm x 8 cm x 0.1 cm) unter denaturierenden Bedingungen in Gegenwart von 0.1% SDS. Trenn- und Sammelgel hatten folgende Zusammensetzung:

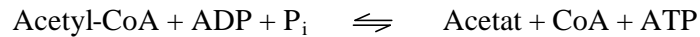
	<u>Trenngel (12%)</u>	<u>Sammelgel (3.75%)</u>
Acrylamid/Bisacrylamid (30%/ 0.8%)	2 ml	0.25 ml
1.5 M Tris/HCl Puffer pH 8.8 mit 0.4% SDS	1.25 ml	-
0.5 M Tris/HCl Puffer pH 6.8 mit 0.4% SDS	-	0.5 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	1.75 ml	1.175 ml
Ammoniumpersulfat, 10%-ige Lösung	17.5 µl	12.5 µl
TEMED	3.4 µl	2 µl

Die zu analysierenden Proben wurden mit 5x Auftragspuffer (0.5% SDS, 250 mM DTT, 250 mM Tris/HCl pH 6.8, 50% Glycerin, 0.5% Bromphenolblau) versetzt, 5 min auf 95°C erhitzt und sofort aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei Raumtemperatur in 1x Elektrophoresepuffer (25 mM Tris, 38.4 mM Glycin, 0.1% SDS) zunächst 10 min bei konstant 70 Volt in einer BIORAD Mini-PROTEAN 3 Cell (München). Im Trenngel wurde die Spannung auf 210 Volt (60 min) erhöht. Als Molekulargewichtsstandards dienten zwei Proteingemische (Sigma Dalton Mark VII-L und Sigma Dalton Mark 6H). Der Standard VII-L bestand aus Serumalbumin (Rind, 66 kDa), Eialbumin (45 kDa), Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (Kaninchen, 36 kDa), Kohlensäure-Anhydrase (Rind, 29 kDa), Trypsinogen (Rind, 24 kDa), Trypsin-Inhibitor (Sojabohne, 20.1 kDa), und  $\alpha$ -Lactalbumin (Rind, 14.2 kDa). Der Standard 6H bestand aus Myosin (Kaninchen, 205 kDa),  $\beta$ -Galactosidase (*E. coli*, 116 kDa), Phosphorylase b (Kaninchen, 97.4 kDa), Serumalbumin (Rind, 66 kDa), Eialbumin (45 kDa) und Kohlensäure-Anhydrase (Rind, 29 kDa). Die Färbung der Gele erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue R250. Dazu wurden die Gele in 25% Isopropanol und 10% Essigsäure 10 min fixiert und danach mindestens eine Stunde mit Färbelösung (10% Essigsäure, 30% Ethanol, 0.15% Coomassie Blue R250) gefärbt. Die anschließende Entfernung des nicht-proteingebundenen Farbstoffes erfolgte mit 10% Essigsäure.

### 3.8 Charakterisierung der Enzyme

#### 3.8.1 Nachweis von Enzymaktivität

Die ADP-bildende Acetyl-CoA Synthetase katalysiert folgende reversible Reaktion:



Die Bestimmung der Enzymaktivitäten wurde in beide Reaktionsrichtungen mit drei verschiedenen Testsystemen durchgeführt.

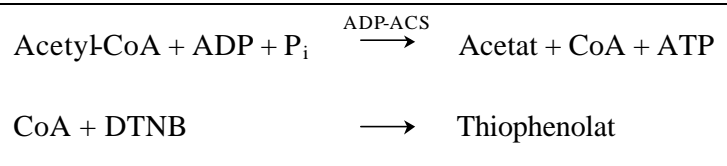
Falls nicht anders vermerkt, wurden die Enzymtests unter aeroben Bedingungen bei 55°C durchgeführt. Die Bestimmung der Raten erfolgte im beheizbaren UltrospecIII-Photometer oder im Ultrospec 4000 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden). Für Tests bis zu 55°C wurden Halbmikroküvetten verwendet, die mit dem entsprechenden Puffer vorinkubiert wurden, über 55°C wurden Glasküvetten (Hellma-Präzisionsküvetten, Ochs, Bovenden) verwendet. Die Startbarkeit der Tests wurde durch Zugabe der entsprechenden Substrate bzw. des Extraktes überprüft. Die spezifische Aktivität und die kinetischen Konstanten der Enzyme wurden im linearen Bereich der Proteinabhängigkeit gemessen.

Die Einheit der Enzymaktivität Unit ist definiert als der Verbrauch von 1 µmol Substrat bzw. der Bildung von 1 µmol Produkt in einer Minute.

##### 3.8.1.1 Bestimmung der ADP-ACS Aktivität mittels Ellmans-Reagenz

Die ADP- und P<sub>i</sub>-abhängige CoA-Freisetzung aus Acetyl-CoA wurde mit Ellmans Thiolreagenz, 5,5'-Dithio-bis(2-Nitrobenzoesäure) (DTNB), nachgewiesen, wobei die Bildung des Thiophenolat-Anions als Extinktionszunahme bei 412 nm gemessen wurde (Srere et al., 1963).

Testprinzip:

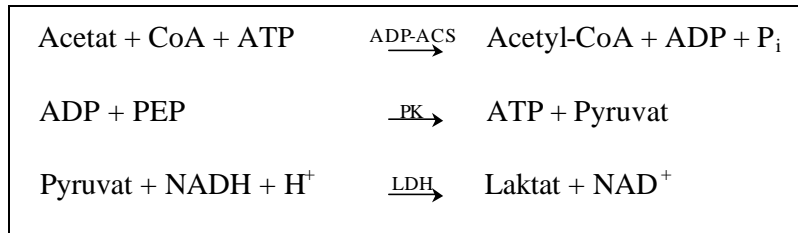


Der Testansatz enthielt 100 mM Tris/HCl pH 8.0, 0.1 mM DNTB, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM Acetyl-CoA, 5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2 mM ADP und Extrakt (50-500 ng). Der für die Berechnung der Enzymaktivität verwendete millimolare Extinktionskoeffizient beträgt ε<sub>412</sub>(DTNB) = 13.6 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>.

### 3.8.1.2 Bestimmung der ADP-ACS Aktivität mittels gekoppeltem Test mit PK/LDH

Die CoA-abhängige Bildung von Acetyl-CoA, ADP und  $P_i$  aus Acetat und ATP stellt die physiologische Rückreaktion der Acetyl-CoA Synthetase (ADP-bildend) dar. Sie wurde in einem gekoppelten optischen Test mittels Pyruvat-Kinase und Laktat-Dehydrogenase bei 365 nm verfolgt.

Testprinzip:

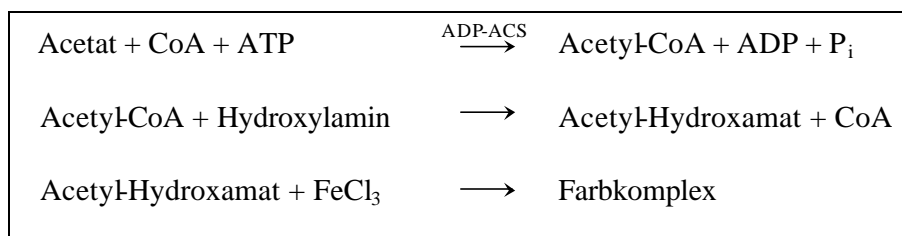


Der Testansatz enthielt 100 mM Tris/HCl pH 8.0, 10 mM  $MgCl_2$ , 5 mM Phosphoenolpyruvat (PEP), 0.3 mM NADH, 2 mM ATP, 10 mM Acetat, 2 U Pyruvat-Kinase, 5 U Laktat-Dehydrogenase, 0.5 mM CoA und Extrakt (50-500 ng). Der Extinktionskoeffizient für NADH beträgt  $\epsilon_{365}(\text{NADH}) = 3.4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Es wurde sichergestellt, daß die Hilfsenzyme die Reaktion nicht limitierten.

### 3.8.1.3 Hydroxamat-Test

Die ATP- und CoA-abhängige Bildung von Acetyl-CoA wurde nach der Methode von Aceti und Ferry (Aceti, Ferry, 1988) gemessen. Dabei reagiert Acetyl-Hydroxamat, welches aus Acetyl-CoA in Anwesenheit von Hydroxylamin entsteht, mit  $Fe^{3+}$  zu einem Farbkomplex, dessen Bildung bei 540 nm gemessen wird.

Testprinzip:



Der Testansatz mit einem Volumen von 333  $\mu\text{l}$  enthielt 100 mM Tris/HCl pH 8.0, 10 mM  $MgCl_2$ , 400 mM Acetat bzw. andere getestete Säuren, 700 mM Hydroxylammoniumchlorid, 10 mM ATP, 0.5 mM CoA und Extrakt (50-500 ng). Er wurde nach entsprechender Inkubationszeit (5-15 min) bei 55°C mit 333  $\mu\text{l}$  10% (w/v) Trichloressigsäure (TCA) gestoppt und auf Eis transferiert. Nach Zugabe von 333  $\mu\text{l}$  2.5% (w/v)  $FeCl_3$  in 2 N HCl wurde der Niederschlag 10 min bei 13.000 Upm abzentrifugiert und der Testansatz bei 540 nm detektiert. Der Extinktionskoeffizient für den Farbkomplex beträgt  $\epsilon_{540}(\text{Farbkomplex}) = 0.636 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

### 3.8.2 Bestimmung der apparenten molekularen Masse mittels Gelfiltration

Die apparente molekulare Masse der Acetyl-CoA Synthetasen (ADP-bildend) wurden unter nativen Bedingungen säulenchromatographisch auf Gelfiltrationssäulen (Superdex 200 16/26 und Superdex 26/60 prep grade, Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) ermittelt. Die Flußrate betrug 1 ml/min, und es wurde ein Probenvolumen von 1.0 ml aufgetragen. Als Säulenpuffer wurde 100 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub> pH 8.0 verwendet. Als Molekulargewichtsmarker dienen Thyroglobin (670 kDa, Biorad),  $\beta$ -Amylase (Süßkartoffel, 200 kDa, Sigma), Alkoholdehydrogenase (Hefe, 150 kDa, Sigma), IgG (Rind, 158 kDa, Biorad), Serumalbumin (Rind, 66 kDa, Merck), Ovalbumin (Huhn, 44 kDa, Biorad), Kohlensäure-Anhydrase (Rind, 29 kDa, Sigma), Myoglobin (Pferd, 17 kDa, Biorad) und Vitamin B<sub>12</sub> (1.35 kDa, Biorad).

### 3.8.3 Bestimmung der kinetischen Parameter

Die apparenten Michaelis-Menten-Konstanten ( $K_m$ -Werte) und die apparenten  $V_{max}$ -Werte wurden bei 55°C mit den beschriebenen Testsystemen gemessen (3.8.1). Die Substratkonzentrationen entsprechen den Standardbedingungen der Testsysteme (3.8.1). Die Substratkonzentrationen, für welche die Konstanten ermittelt worden sind, sind den Abbildungen zu entnehmen.

### 3.8.4 Bestimmung der Temperaturoptima

Die Temperaturoptima der Acetyl-CoA Synthetasen wurden mit Ellmans Reagenz (3.8.1.1) in 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM EPPS (N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[3-propane-sulfonic acid]) pH 7.0 bestimmt. Die Testansätze enthielten 0.5-1  $\mu$ g gereinigtes Enzym. Die Glasküvetten wurden ab einer Temperatur von 80°C mit Gummistopfen verschlossen, um eine Konzentrationsänderung durch Verdunstung zu verhindern.

### 3.8.5 Bestimmung der Thermostabilität

Die Messungen der Thermostabilität der Enzyme wurden in 100 mM Tris/HCl pH 8.0 durchgeführt. Die Acetyl-CoA Synthetase (ADP-bildend) von *P. furiosus* (Acd I) wurde bei 80, 90, 100 und 110°C über bis zu drei Stunden gemessen, die ADP-ACS AF1211 von *A. fulgidus* wurde bei 70, 80 und 85°C bis zu fünf Stunden gemessen. Bei der Acd I wurden je 320  $\mu$ l gereinigtes, mit Wachs überschichtetes Enzym (150  $\mu$ g/ml) im Thermoblock (TB1, Biometra) inkubiert. Bei der ADP-ACS AF1211 wurden je 50  $\mu$ l (17  $\mu$ g/ml) gereinigtes Enzym im Thermocycler (T3, Biometra) mit beheiztem Deckel inkubiert. Nach verschiedenen Zeitintervallen wurden die Proben auf Eis abgekühlt und die ADP-bildende Acetyl-CoA Synthetase-Aktivität mit Hilfe von Ellmans Reagenz (3.8.1.1) bestimmt. Die Aktivitäten wurden in prozentuale Restaktivitäten umgerechnet, wobei die spezifische Aktivität ohne Inkubation 100% entsprach.



### 3.8.6 Bestimmung der pH-Optima

Das pH-Optimum der ADP-bildenden Acetyl-CoA Synthetasen wurden in Richtung Acetyl-CoA-Bildung (ADP-ACS AF1211) bzw. Indolacetyl-CoA (ADP-ACS AF1938) Bildung mittels gekoppeltem Test mit PK/LDH (3.8.1.2) bestimmt. Die Testansätze enthielten zur Einstellung verschiedener pH-Werte je 100 mM Essigsäure pH 4.9 und 5.2, Piperazin pH 5.1 und 5.6, MES pH 5.5, Tris/HCl 6.0, 7.0, 7.5 und 8.1, Ethanolamin pH 8.5 und 9.0 oder Piperazin pH 9.0 und 9.5 (die pH-Werte galten bei 55°C). Durch die Überlappung der pH-Werte der verschiedenen Puffer konnte sichergestellt werden, daß die Reaktionsrate unabhängig von der Puffersubstanz war. Die spezifischen Aktivitäten wurden prozentual berechnet, die höchste Umsetzungsrate entsprach dabei 100%.

### 3.8.7 Analyse der Substratspezifitäten

Die Acetyl-CoA Synthetasen (ADP-bildend) wurden auf ihre Spezifität hinsichtlich verschiedener Säuren, CoA-Ester, Nucleotide und Kationen getestet. Die Säuren Propionat, Formiat, Succinat, Fumarat und Butyrat (1 M Stammlösung in 100 mM Tris/HCl pH 8.0) sowie Isovalerat und Isobutytrat (1 M in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>) wurden in einer Konzentration von 10 mM eingesetzt. Die Reaktion wurde in Richtung CoA-Ester-Bildung mit dem PK/LDH-Test (3.8.1.1) bei 55°C gemessen. Phenylacetat und Indol-3-Acetat wurden in einer 0.5 M Stammlösung in 96% Ethanol eingewogen und ebenfalls in einer Konzentration von 10 mM im Test eingesetzt. Die CoA-Ester Propionyl-CoA, Phenylacetyl-CoA und Butyryl-CoA wurden mit 0.1 mM in das Testsystem mit Ellmans Reagenz eingesetzt. ATP und GTP wurden mit einer Konzentration von 2 mM im Test eingesetzt. Die Kationenspezifitäten wurden mit 200 µM MgCl<sub>2</sub>, MnSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, NiCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, CoCl<sub>2</sub> im Test mit Ellmans Reagenz eingesetzt.

### 3.8.8 Aggregationskurven

Bei dieser Methode wird durch langsame Temperaturerhöhung das Aggregationsverhalten eines Proteins untersucht. Durch die Erhöhung der Temperatur geht das Protein vom nativen in den denaturierten und dann in den aggregierten Zustand über. Die Temperatur, bei der ein signifikanter Anstieg der Streuungsintensität zu beobachten ist, wird als Aggregations-temperatur definiert. Sie ist ein Maß für den Aggregationszustand eines Proteins und wurde durch graphische Extrapolation bestimmt. Die Messung erfolgte im beheizbaren UltospecIII-Photometer mit integrierter Software. Die Temperatur wurde im Versuch von 40°C bis 100°C mit 1°C/min erhöht, die Streuungsintensität wurde bei 600 nm verfolgt.

### **3.9 Computergestützte Sequenzanalysen**

Sequenzvergleiche, Datenbanksuchen und andere Programmanwendungen wurden mit dem Programmpaket von HUSAR (Heidelberg Unix SequenAnalysis Resources, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, <http://genome.dkfz-heidelberg.de>) und dem Programmpaket des NCBI (National Institutes of Health, Bethesda, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)) durchgeführt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Identifizierung, Klonierung und Expression der ADP-bildenden Acetyl-CoA Synthetase Isoform I von *Pyrococcus furiosus*

Bisher sind als einzige archaeele ADP-bildende Acetyl-CoA Synthetasen (ADP-ACS) zwei Isoenzyme aus *Pyrococcus furiosus* gereinigt und biochemisch charakterisiert worden (Glasemacher et al., 1997; Mai, Adams, 1996). In dieser Arbeit wurden zum ersten Mal die kodierenden Gene für die ADP-ACS Isoform I aus *P. furiosus* identifiziert, kloniert und in *E. coli* heterolog exprimiert. Nach der Rekonstitution des aktiven Heterotetramers ( $\alpha_2\beta_2$ ) wurde die ADP-ACS I von *P. furiosus* biochemisch charakterisiert. Ein Vergleich mit dem aus *P. furiosus* gereinigten Enzym zeigte sehr ähnliche molekulare und katalytische Eigenschaften von nativen und rekombinanten Enzym.

#### 4.1.1 Identifizierung der Gene *acdAI* und *acdBI* und Analyse der Sequenzdaten

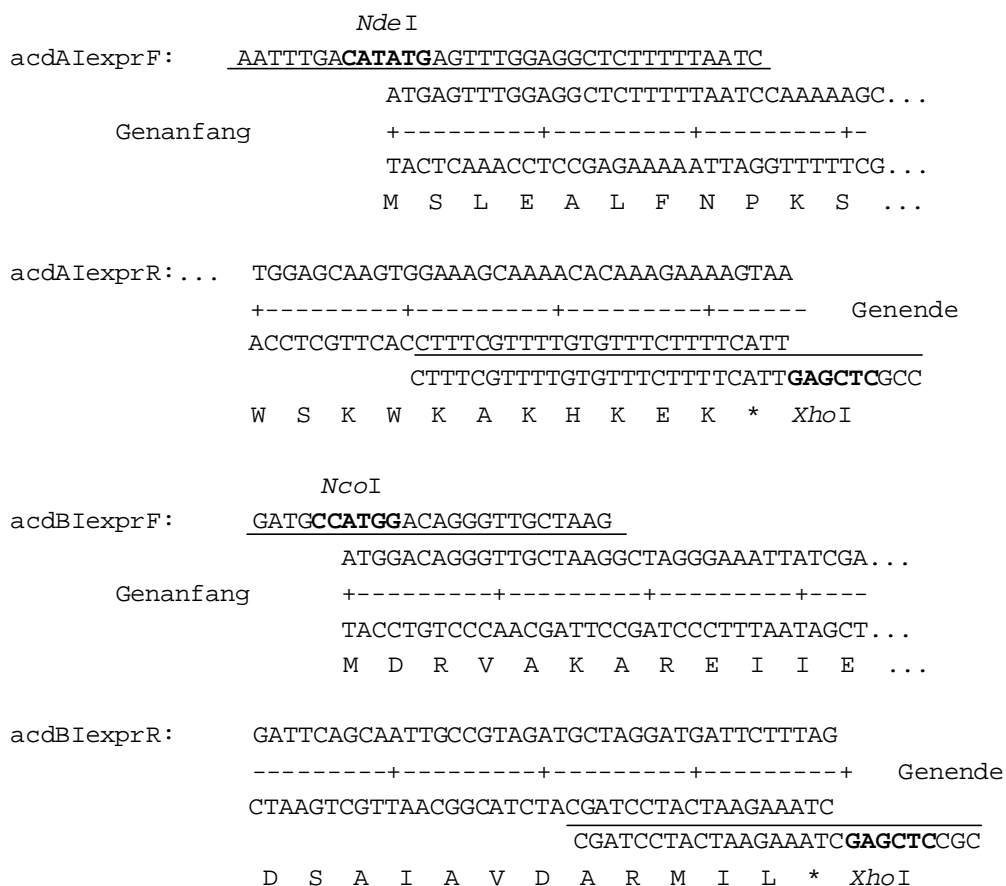
Aufgrund der von Glasemacher et al. determinierten N-terminalen Sequenzen der ADP-ACS von *P. furiosus* (45 kDa  $\alpha$ -Untereinheit: SLEALFNPKSVAVIGASAKPGKIGYAIMKNLI, 25 kDa  $\beta$ -Untereinheit: MDRVAKAREIIEKAKAENRRLVEP; Glasemacher et al., 1997) wurden zwei offene Leseraster in der vom Genom Center des Departments of Human Genetics der Universität Utah veröffentlichten Gesamtsequenz (Utah Genome Center Website, 1999) durch BLAST-Suche (Altschul et al., 1990) identifiziert. Die offenen Leseraster wurden als *acdAI* und *acdBI* (Acetyl-CoA Synthetase ADP-bildend) bezeichnet, um sie von der weit verbreiteten, AMP-bildenden Acetyl-CoA Synthetase zu unterscheiden. A und B stehen für die Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$ , I steht für den Enzymtyp I. Die Untereinheiten befanden sich an unterschiedlichen Genorten auf dem Segment MM4 des sequenzierten Genoms; die 49.964 Da große  $\alpha$ -Untereinheit nahm im Segment MM4 38-36281 den Leseraster -3 von Position 29441-28056 ein (Ortsangabe des Gens im Sequenzprojekt des Utah Genome Centers). Die 25.878 Da große  $\beta$ -Untereinheit befand sich im Segment MM4 38-15973 an Position 105827-105132 mit dem Leseraster -2. Die Proteine wurden unter den Zugangsnummern AJ240061 (*acdAI*) und AJ240062 (*acdBI*) beim European Molecular Biology Laboratory (EMBL) hinterlegt.

Die Analyse der Sequenzdaten ergab, daß der Leseraster für die  $\alpha$ -Untereinheit für ein Gen von 1386 Nukleotiden und ein Polypeptid mit 462 Aminosäuren (AS) kodiert, der Leseraster für die  $\beta$ -Untereinheit kodiert für 696 Nukleotide und 232 AS. Die kodierende Sequenz startet in beiden Genen mit dem Codon ATG und endet mit TAA (*acdAI*) bzw. TAG (*acdBI*). Unmittelbar stromaufwärts der Initiationscodons beider Gene befindet sich eine Ribosomenbindestelle mit der Sequenz GAGGT (siehe Anhang), die identisch zu den putativen Ribosomenbindestellen für andere *Pyrococcus*-Gene ist, wie z.B. für das Gen der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase von *P. wosei* (Zwickl et al., 1990) und das der  $\alpha$ -Amylase von *P. furiosus* (Jorgensen et al., 1997). Archaeele Promotor-Regionen, TATA-

Boxen und Initiatorelemente (Thomm, 1996) wurden nicht gefunden. Stromabwärts des *acdAI*-Gens wurde eine Pyrimidin-reiche Region gefunden, die 16-19 Nukleotide mit der Konsensussequenz TTTTTYT überspannt, was für eine Transkriptionsterminationsstelle spricht (Thomm, 1996). Der GC-Gehalt der Gene *acdAI* und *acdBI* beträgt 43.3 mol% und 40.3 mol% und ist somit wenig höher als der GC-Gehalt des gesamten Genoms von 38.5 mol%.

#### 4.1.2 Klonierung der Gene in die Expressionsvektoren

Zunächst wurden die identifizierten Gene für die  $\alpha$ - und die  $\beta$ -Untereinheit der ADP-ACS I von *P. furiosus* für die Klonierung mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert. Die verwendeten Primer wurden so konstruiert, daß sie am 5'-Ende noch jeweils eine Restriktionsschnittstelle für die Klonierung in die Expressionsvektoren pET14b und pET17b besaßen (Abb. 6).



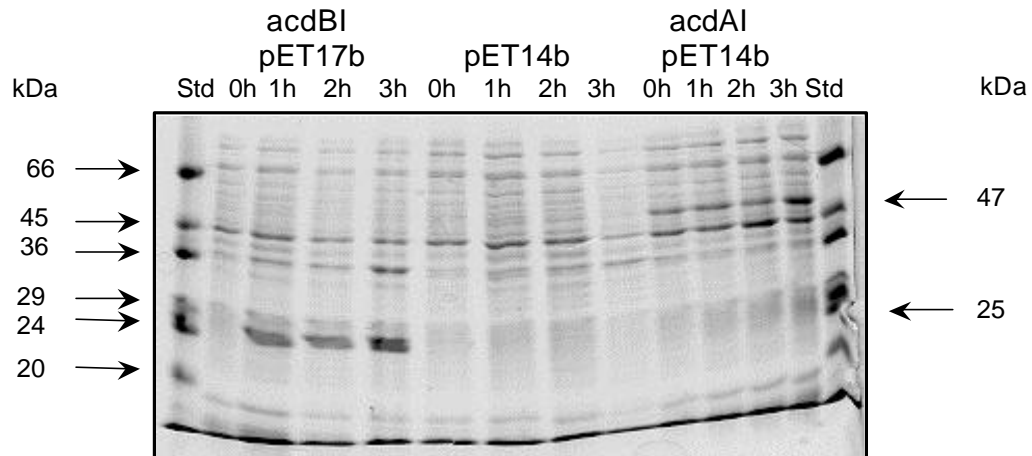
**Abb. 6 Konstruktion der Expressionsprimer.** Aufgeführt sind die Randbereiche der  $\alpha$ - (*acdAI*) und  $\beta$ - (*acdBI*) Untereinheit der ADP-ACS I von *P. furiosus* mit den Sequenzen der Primer *acdAI*exprF, *acdAI*exprR, *acdBI*exprF und *acdBI*exprR, die für die Amplifikation der Gene zur Klonierung in die Expressionsvektoren pET17b (*acdAI*) und pET14b (*acdBI*) eingesetzt wurden. Die Restriktionsschnittstellen, über die die Gene kloniert wurden, sind in den Primersequenzen fett gedruckt.

Die *NdeI*-Schnittstelle am Anfang des Gens *acdAI*, die das Startcodon ATG des Gens mit einbezieht, gewährleistet, daß das Gen im richtigen Leseraster für die spätere Expression kloniert wird. Da das Gen für die  $\beta$ -Untereinheit (*acdBI*) jedoch eine Schnittstelle für *NdeI* enthält, wurde dem Gen die Schnittstelle *NcoI* angefügt, die es ermöglicht, das Gen in den Vektor pET14b zu klonieren. Diese Schnittstelle (CCATGG) bezieht ebenfalls ein Startcodon mitein. Nach dem ATG folgt jedoch noch als weiteres Nukleotid ein G, welches im Falle der kleinen Untereinheit kein Problem darstellte, da die zweite Aminosäure Asparagin ist, die in diesem Fall durch das Codon GAC kodiert wird. Die mittels PCR amplifizierte Gene wurden mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen hydrolysiert, mit einer Ligase ligiert und in *E. coli* JM109 transformiert. Der Einbau der Gene in die Vektoren wurde durch „Kolonie-Screening“ getestet. Von den Kolonien, die ein Gen in der gewünschten Länge enthielten, wurden Plasmidpräparationen gemacht und die Gene auf richtigen Einbau und Mutationsfreiheit durch Sequenzierung überprüft. Die Plasmide der beiden Klone wurden mit *acdAI*pET17b (Acetyl-CoA Synthetase ADP-bildend,  $\alpha$ -Untereinheit Isoenzym I in pET17b) und *acdBI*pET14b (Acetyl-CoA Synthetase ADP-bildend,  $\beta$ -Untereinheit Isoenzym I in pET14b) bezeichnet.

#### 4.1.3 Separate Expression der Untereinheiten

Um die ADP-bildende Acetyl-CoA Synthetase von *P. furiosus* zu exprimieren, wurden die Plasmide *acdAI*pET17b und *acdBI*pET14b getrennt in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Diese Zellen enthalten die T7-RNA-Polymerase, deren Expression und damit die Expression der klonierten Gene durch IPTG induziert werden kann. Die entstandenen Klone wurden als *E. coli* BL21(DE3) *acdAI*pET17b und BL21(DE3) *acdBI*pET14b bezeichnet. Als Negativkontrollen für die Expression wurden auch die Plasmide pET17b und pET14b ohne Insert in *E. coli* BL21(DE3) transformiert.

Zunächst wurden unterschiedliche Bedingungen für die Expression der rekombinanten Untereinheiten der ADP-ACS von *P. furiosus* getestet. Sowohl die Zelldichte ( $OD_{600}$ ) zum Zeitpunkt der Induktion, als auch die Inkubationsdauer bis zur Zellernte wurden variiert. Zur Auswertung unter den jeweiligen Bedingungen wurden die Proteine der Zellen vor und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Induktion mit IPTG auf SDS-Polyacrylamidgelen analysiert (Abb. 9).



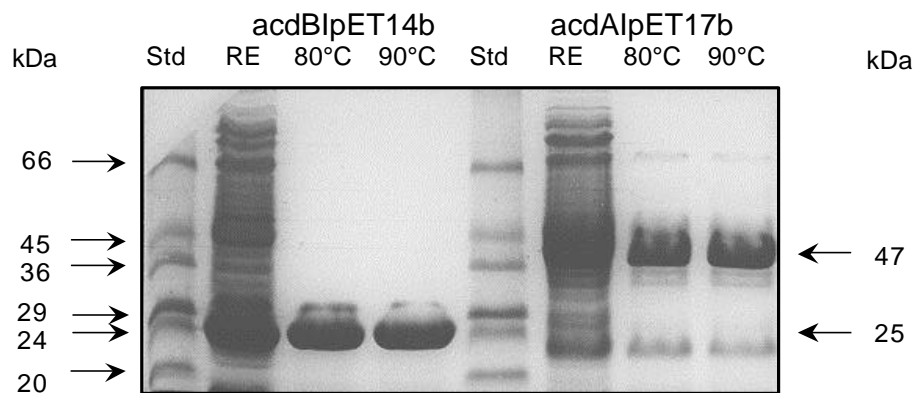
**Abb. 7** 12%-iges SDS-Polyacrylamidgel (Coomassie gefärbt) zur gelelektrophoretischen Auftrennung von Proteinen aus der Expression mit den Klonen *E. coli* BL21(DE3) *acdAI*pET17b, BL21(DE3) pET14b ohne Insert (Negativkontrolle) und BL21(DE3) *acdBI*pET14b. Die Induktion der Zellen erfolgte mit 0.4 mM IPTG bei einer  $OD_{600}$  von 0.8. Der Zellaufschluß erfolgte mit 8 M Harnstoff. Aufgetragen wurden die gesamten Zellproteine vor bzw. 1, 2 und 3 h nach der Induktion mit IPTG. Als Standard diente das Proteingemisch VII-L von Sigma. Std = Standard.

Die beiden Untereinheiten der ADP-ACS I von *P. furiosus* ließen sich in *E. coli* unter allen getesteten Bedingungen sehr gut exprimieren. Die Analyse der Zellproteine auf den Coomassie gefärbten SDS-Polyacrylamidgelen zeigten deutlich sichtbare Banden bei 47 bzw. 25 kDa, die den erwarteten Größen der Proteine entsprachen (Abb. 7). Sie waren bei den Negativkontrollen nicht vorhanden. Die Banden der beiden Untereinheiten waren schon eine Stunde nach Induktion gut zu sehen, die Expression konnte jedoch durch eine Inkubation von weiteren zwei Stunden maximiert werden. Die höchsten Proteinausbeuten ergaben sich mit einer Induktion bei einer optische Dichte ( $OD_{600}$ ) von 0.8.

Aufgrund der Vorversuche wurden für die Reinigung Untereinheiten *AcdA* I und *AcdB* I in den Expressionsstämmen BL21(DE3) *acdAI*pET17b und BL21(DE3) *acdBI*pET14b die folgenden Bedingungen gewählt: Induktion bei einer  $OD_{600}$  von 0.8 mit 0.4 mM IPTG für drei Stunden.

#### 4.1.4 Rekonstitution der rekombinanten Untereinheiten

Die Extrakte mit nur jeweils einer Untereinheit (BL21(DE3) *acdAlpET17b* bzw. BL21(DE3) *acdBlpET14b*) katalysierten weder die Reaktion in Richtung Acetat-Bildung noch in Richtung Acetyl-CoA-Bildung. Vorversuche ergaben, daß sowohl die  $\alpha$ - als auch die  $\beta$ -Untereinheit bei 80°C und 90°C für 15 min stabil blieben (Abb. 8).

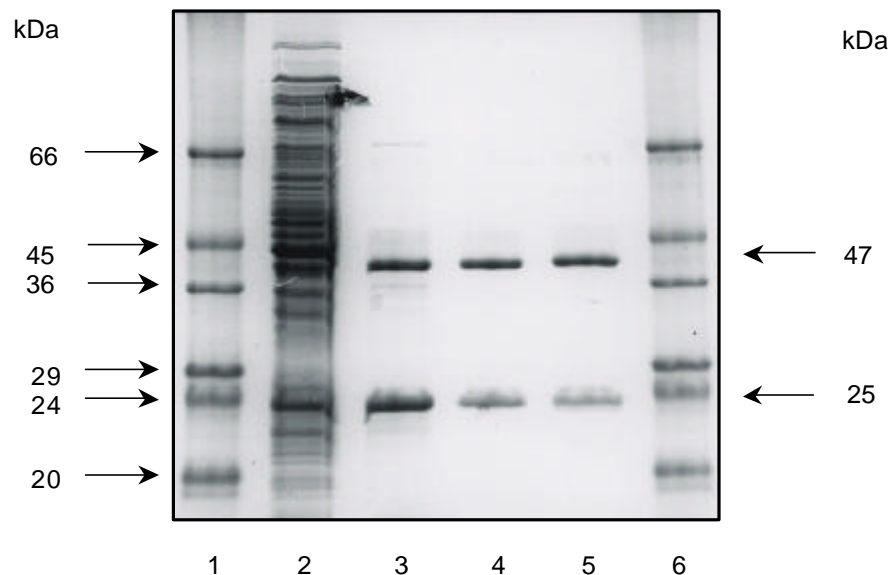


**Abb. 8 Separate Expression der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit der ADP-ACS I von *P. furiosus* in *E. coli* BL21(DE3).** Die Rohextrakte wurden im Vorversuch zur Rekonstitution des aktiven Enzyms 15 min auf 80°C bzw. 90°C erhitzt. Die Extrakte wurden auf einem 12%-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. RE = Rohextrakt, Std = Standard.

Für die Rekonstitution zur aktiven ADP-ACS aus den getrennt exprimierten Untereinheiten wurden gleiche Volumen Proteinextrakt der Untereinheiten zusammengegeben, gemischt und auf Eis inkubiert. Eine anschließende Hitzebehandlung bei 80°C, einer Temperatur die den *in vivo*-Bedingungen von *P. furiosus* entspricht, sollte die Oligomerisierung zu einem funktionsfähigen Heterotetramer unterstützen und zusätzlich störende *E. coli*-Proteine fällen. Nach dieser Behandlung konnte sowohl in die physiologische Richtung der Acetat- und ATP-Bildung (4 U/mg), als auch in der Gegenrichtung deutlich Katalyseaktivität (2 U/mg) festgestellt werden. Ohne Hitzebehandlung konnte ebenfalls Aktivität gemessen werden. Optimierungsversuche mit anderen Inkubationszeiten (auf Eis sowie bei der Hitzebehandlung), anderen Verhältnissen der Proteine zueinander und mit anderen Inkubationstemperaturen (60, 70 und 85°C) ergaben keine höhere Aktivität. Dieses Ergebnis zeigt, daß sich die ADP-ACS I von *P. furiosus* unter den gewählten Bedingungen zu einem aktiven Enzym aus seinen Untereinheiten rekonstituiert.

#### 4.1.5 Reinigung der rekombinanten ADP-ACS I

Nach Aufschluß der Expressionszellen, Hitzefällung und Rekonstitution zum aktiven Enzym wurde die ADP-ACS durch chromatographische Schritte gereinigt. Vorversuche zur Stabilität des Enzyms haben ergeben, daß die  $\alpha$ - und die  $\beta$ -Untereinheit unabhängig voneinander bei einer Inkubation von 15 min bei 80°C bzw. 90°C stabil blieben (Abb. 8). Dasselbe galt auch für das rekonstituierte aktive Enzym. Es ergaben sich jedoch kaum höhere Reinigungserfolge bei der Fällung der *E. coli*-Wirtsproteine bei 90°C, so daß eine 15-minütige Erhitzung auf 80°C mit einer anschließenden Pellettierung der denaturierten *E. coli*-Proteine als erster Reinigungsschritt diente. Der Auftrag des löslichen Überstandes auf einen Anionenaustauscher (Resource Q) mit einer anschließenden Elution durch einen linearen Salzgradienten reicherte das Enzym etwa 10-fach an. Eine Gelfiltration führte zu einer Reinheit des Proteins von über 95%. Zur Kontrolle der Reinigungsschritte dienten 12%-ige SDS-Polyacrylamidgele (Abb. 9).



**Abb. 9** Reinigung der rekombinanten ADP-ACS I von *P. furiosus* nach Rekonstitution aus den getrennt exprimierten Untereinheiten. Das Protein wurde über ein 12%-iges-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Aufgetragen wurden: Spur 2, 20  $\mu$ g des rekonstituierten Rohextraktes (S100); Spur 3, 6  $\mu$ g des Extrakt-Überstandes nach Erhitzung (15 min 80°C) und Zentrifugation; Spur 4, 2,5  $\mu$ g der rekombinanten ADP-ACS nach Anionenaustauschchromatographie (Resource Q); Spur 5, 2,5  $\mu$ g der nativen Acetyl-CoA Synthetase Isoform I aus *P. furiosus* (Glasmacher et al., 1997); Spur 1 und 6, Standard (Proteingemisch VII-L von Sigma).

Die rekombinante Acetyl-CoA Synthetase I (ADP-bildend) von *P. furiosus* konnte mit Hitzefällung, Anionenaustausch- und Gelfiltrationschromatographie bis annähernd zur Homogenität gereinigt werden, das Enzym wies eine Aktivität von 20 U/mg (in Richtung Acetyl-CoA Bildung bei 55°C) bzw. 11 U/mg (in Richtung Acetat-Bildung bei 55°C) auf. Mittels dieses effizienten Reinigungsverfahrens standen ausreichende Mengen Protein (5 mg) für eine umfassende Charakterisierung zur Verfügung.

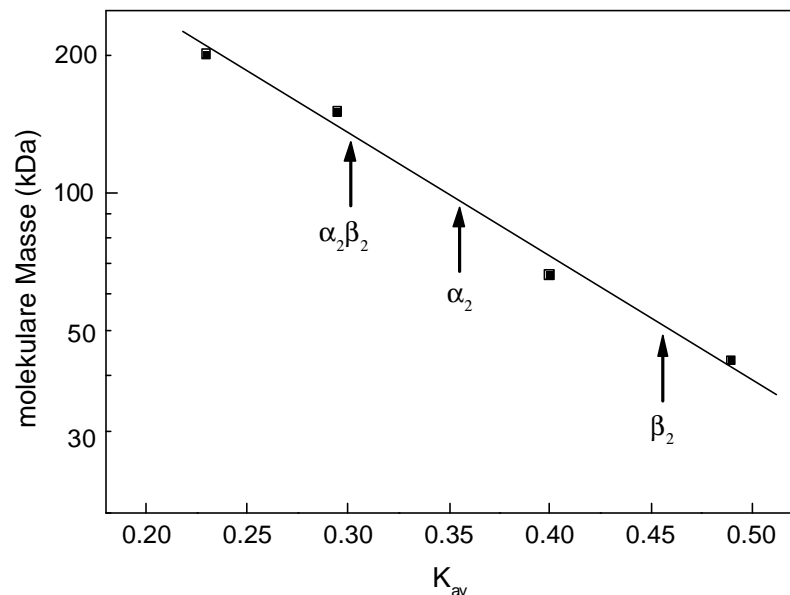


#### 4.1.6 Biochemische Charakterisierung

Die Acetyl-CoA Synthetase aus *P. furiosus* wurde 1991 von Schäfer (Schäfer, Schönheit, 1991) zum ersten Mal beschrieben und 1997 von Glasemacher et al. nativ gereinigt und eingehend charakterisiert (Glasemacher et al., 1997). Im folgenden wird eine detaillierte biochemische Charakterisierung der rekombinanten ADP-ACS I aus *P. furiosus* beschrieben und das rekombinante Protein mit dem aus *P. furiosus* gereinigten Enzym verglichen.

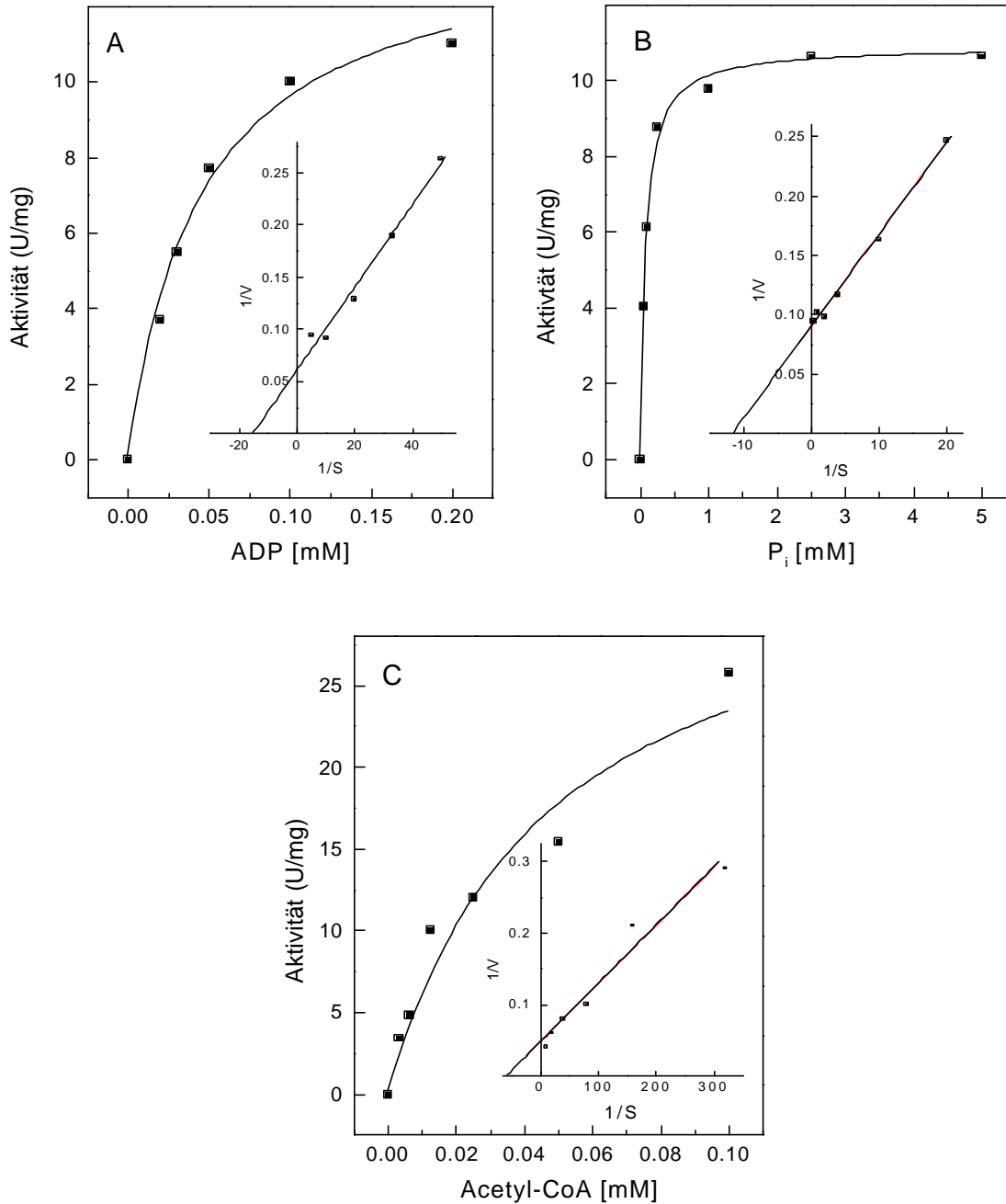
##### 4.1.6.1 Molekulare und kinetische Parameter

Die apparente molekulare Masse der rekombinanten ADP-ACS wurde durch Gelfiltration bestimmt (Abb. 10). Nach der separaten Expression lagen die Untereinheiten als Dimer vor, die  $\alpha$ -Untereinheit eluierte bei 90 kDa, die  $\beta$ -Untereinheit bei 55 kDa. Die Molekularmasse des Holoenzym betrug 145 kDa, was für eine  $\alpha_2\beta_2$ -Oligomerisierung für das aktive rekonstituierte Enzym spricht.



**Abb. 10 Bestimmung der apparenten molekularen Masse der rekombinanten ADP-ACS I von *P. furiosus* durch Gelfiltration an Superdex 200 HiLoad 26/60.** (■) Position der bestimmten Verteilerkoeffizienten ( $K_{av}$ ) folgender Molekularmassenstandards:  $\beta$ -Amylase (200 kDa), Alkoholdehydrogenase (150 kDa), Rinderserumalbumin Fraktion V (66 kDa), Eialbumin (44 kDa). Die Positionen des Holoenzym ( $\alpha_2\beta_2$ ), der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Zur kinetischen Charakterisierung der ADP-ACS I von *P. furiosus* wurde die Aktivität des Enzyms bei 55°C in die physiologische Richtung, d.h. der Acetat-Bildung, oder in Richtung der Acetyl-CoA-Bildung bestimmt. Die Abhängigkeit der Raten von der Substratkonzentration folgte mit allen Substraten einer Michaelis-Menten-Kinetik (Abb. 11). Aus den linearen Lineweaver-Burk-Diagrammen wurden die  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werte ermittelt.



**Abb. 11** Aktivität der rekombinanten Acetyl-CoA Synthetase I (ADP-bildend) von *P. furiosus* in Abhängigkeit von den Substratkonzentrationen. Gezeigt ist die spezifische Aktivität bei 55°C in Abhängigkeit von der Konzentration an ADP (A), P<sub>i</sub> (B) und Acetyl-CoA (C). Die Einschübe stellen die doppelt reziproke Auftragung der Rate gegen die Konzentration nach Lineweaver-Burk dar. S = Substrat [mM], V = Reaktionsgeschwindigkeit (U/mg).

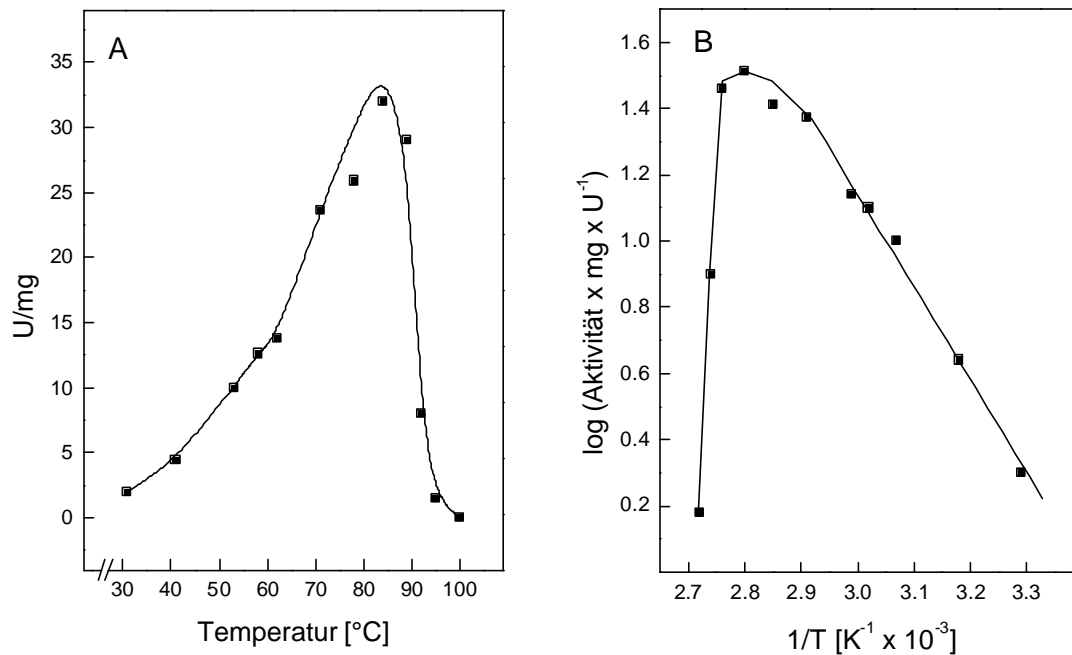
**Tabelle 7 Kinetische Parameter der rekombinanten Acetyl-CoA Synthetase I (ADP-bildend) von *P. furiosus* im Vergleich zum nativ gereinigten Enzym (Glasemacher et al., 1997).** Die apparenten  $V_{\max}$ -Werte wurden bei 55°C in Richtung der Acetat-Bildung (0.1 mM Acetyl-CoA, 0.2 mM ADP, 5 mM  $P_i$ ) und in Richtung der Acetyl-CoA-Bildung (10 mM Acetat, 2 mM ATP, 0.5 mM CoA-SH) gemessen.

	<b>ADP-ACS I von <i>P. furiosus</i></b>	
	<b>rekombinant</b> (aus <i>E. coli</i> )	<b>nativ</b> (aus <i>P. furiosus</i> )
Apparenter $K_m$ [ $\mu$ M]		
Acetyl-CoA	19	17
ADP	65	60
$P_i$	100	200
Apparenter $V_{\max}$ [U/mg bei 55°C] (in Richtung der Acetat-Bildung)	11	18
Apparenter $K_m$ [ $\mu$ M]		
Acetat	800	660
ATP	80	80
CoA-SH	21	30
Apparenter $V_{\max}$ [U/mg bei 55°C] (in Richtung der Acetyl-CoA-Bildung)	20	40

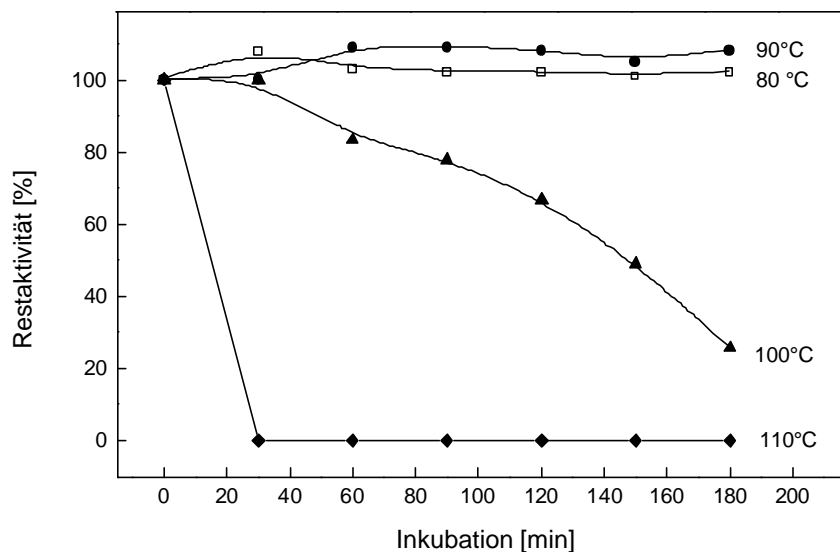
#### 4.1.6.2 Temperaturoptimum und Thermostabilität

Die Temperaturabhängigkeit der rekombinanten ADP-ACS I von *P. furiosus* wurde zwischen 30°C und 100°C in Richtung Acetat-Synthese untersucht. Das Temperaturoptimum lag bei 87°C (Abb. 12 A). Aus dem linearen Teil des Arrhenius-Diagramms (30°C bis 70°C) ergab sich eine Aktivierungsenergie von 32 kJ/mol (Abb. 12 B).

Die Thermostabilität der rekombinanten ADP-ACS von *P. furiosus* wurde bei 80°C, 90°C, 100°C und 110°C bestimmt. Die rekombinante ADP-ACS I zeigte eine hohe Thermostabilität bei 80°C und 90°C, das Enzym blieb über einen Inkubationszeitraum von drei Stunden stabil. Bei Inkubation bei einer Temperatur von 100°C behielt das Enzym nach zwei Stunden noch etwa 65% Restaktivität, während die Aktivität nach drei Stunden nur noch 25% betrug. Bei dem Ansatz, der bei 110°C inkubiert wurde, war schon nach 30 Minuten keine Aktivität mehr nachweisbar (Abb. 13).



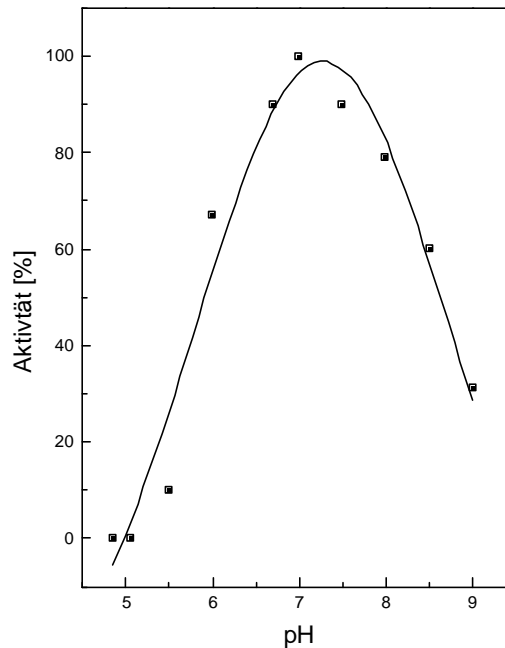
**Abb. 12** Einfluß der Temperatur auf die Aktivität der ADP-ACS I von *P. furiosus*. Spezifische Aktivitäten in Abhängigkeit von der Temperatur (A). Natürlicher Logarithmus der Raten gegen die reziproke Temperatur nach Arrhenius (B).



**Abb. 13** Thermostabilität der rekombinanten ADP-ACS I von *P. furiosus*. 0.4 µg des Enzyms sind in 100 mM EPPS-Puffer pH 7.0 bei 80°C, 90°C, 100°C und 110°C inkubiert worden. Nach den angegebenen Zeiten ist die Restaktivität in Richtung Acetyl-CoA-Bildung bestimmt worden. 100% Aktivität entsprachen 18 U/mg.

#### 4.1.6.3 pH-Optimum

Für die Bestimmung des pH-Optimums der ADP-ACS I von *P. furiosus* wurde die Aktivität in verschiedenen Puffern im Bereich von pH 5.5 bis 9.0 ermittelt. Das pH-Optimum lag bei einem pH von 7.2 (Abb. 14).



**Abb. 14** Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der rekombinanten ADP-ACS I von *P. furiosus* von verschiedenen pH-Werten. Die Enzymmessungen erfolgten bei 55°C in Richtung Acetyl-CoA-Bildung. 100% Aktivität entsprachen 18 U/mg.

#### 4.1.6.4 Substratspezifitäten

Als Substrate für die ADP-bildende Acetyl-CoA Synthetase wurden verschiedene unverzweigte und verzweigte organische Säuren, Abkömmlinge aromatischer Aminosäuren (Aryl-Säuren) sowie einige unverzweigte Acyl-CoA-Ester, ATP und GTP getestet. Die Spezifität für organische Säuren und Aryl-Säuren wurde in Richtung der Acyl- bzw. Aryl-CoA-Bildung gemessen, die für Acyl- bzw. Aryl-CoA-Ester wurde in Richtung der Säurebildung gemessen. Zum Vergleich sind die Daten der nativen ADP-ACS I aus *P. furiosus* von Glasemacher et al. aufgeführt (Tabelle 8). Das rekombinante Enzym entspricht in der Substratspezifität weitgehend dem gereinigten Protein aus *P. furiosus*. Die ADP-ACS von *P. furiosus* ist sehr spezifisch für Acetat (100%) und akzeptiert in gleichen Raten Propionat. Butyrat, Isobutyrat und Isovalerat wurden ebenfalls mit hohen Aktivitäten umgesetzt, während Succinat, Fumarat, Indolacetat und Phenylacetat nicht vom Enzym als Substrat akzeptiert wurden. In physiologischer Richtung (Säurebildung) erzielte Acetyl-CoA optimale Aktivität (Tabelle 8). Vom nativen Enzym wurde GTP (210%) in höheren Raten als ATP (100%) umgesetzt, im rekombinanten Enzym wurden die Nukleotide in gleichen Raten genutzt. Die Enzyme benötigten zweiwertige Kationen und zeigten eine ausgeprägte

Spezifität für Magnesium. Magnesium konnte jedoch annähernd durch Mangan ersetzt werden. Mit Cobalt zeigte das Enzym eine relativ gute Aktivität, während das Enzym mit Nickel und Calcium wenig (nativ) oder nicht aktiv (rekombinant) war.

**Tabelle 8 Substratspezifität der rekombinanten ADP-ACS I im Vergleich zum nativ gereinigten Enzym aus *P. furiosus* (Glasemacher et al., 1997).** Die Substratspezifitäten (relative Aktivität in %) wurden bei 55°C in Richtung Säurebildung bzw. in Richtung der CoA-Ester-Bildung gemessen. Die Kationen wurden in einer Konzentration von 200 µM getestet. 100% Aktivität entsprachen in Richtung Säure-Bildung 11 U/mg (rek.), 18 U/mg (nativ) und in Richtung CoA-Ester-Bildung 20 U/mg (rek.), 40 U/mg (nativ). Abkürzungen: n.b. = nicht bestimmt, 0 = keine Aktivität messbar.

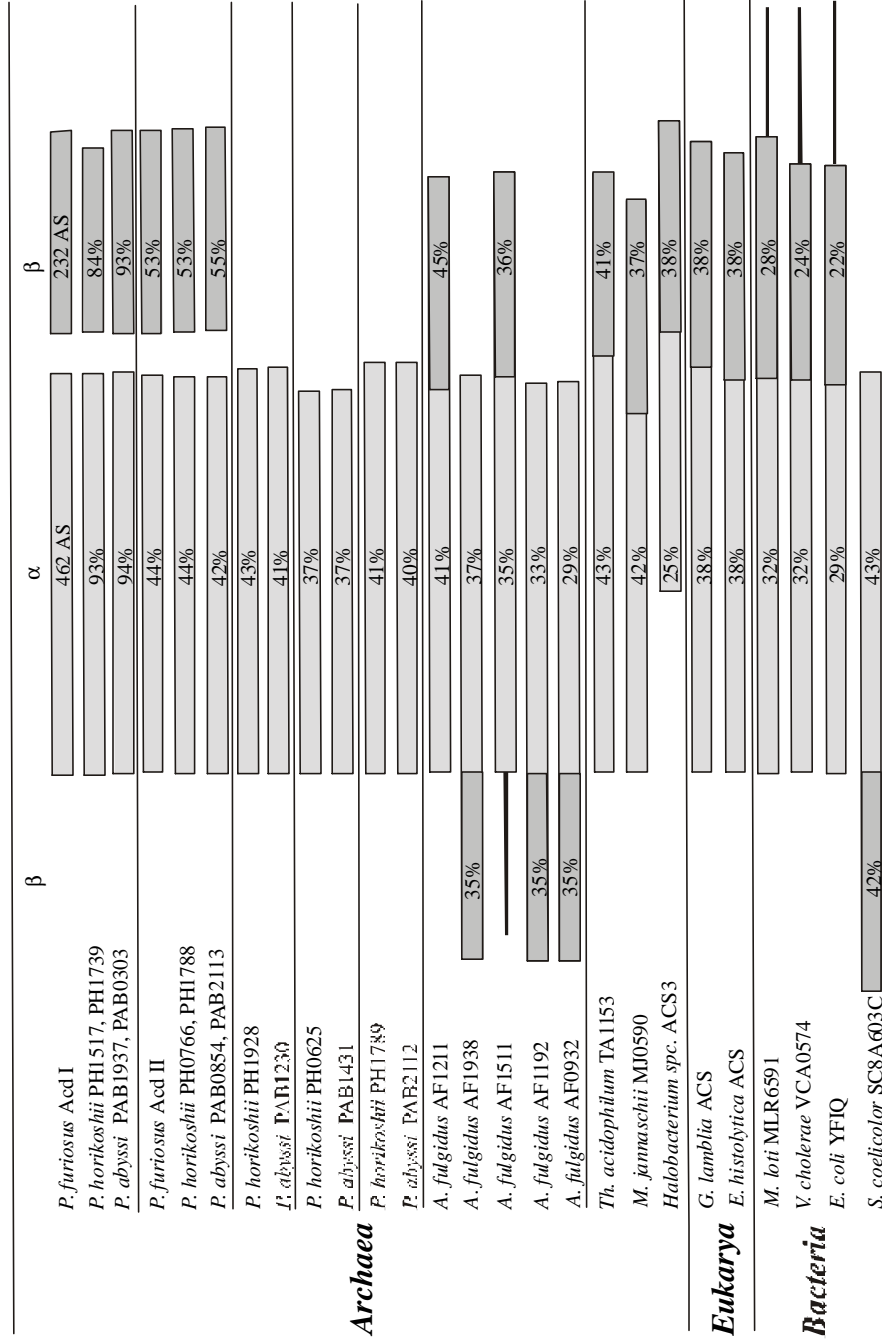
Substrate		ADP-ACS von <i>P. furiosus</i>	
		rekombinant (aus <i>E. coli</i> )	nativ (aus <i>P. furiosus</i> )
<b>unverzweigte Acyl-Säuren</b>	Acetat	100	100
	Propionat	110	100
	Butyrat	54	92
	Succinat	2	3
	Fumarat	1.5	2
<b>verzweigte Acyl- Säuren</b>	Isobutyrat	65	79
	Isovalerat	50	34
<b>Aryl-Säuren</b>	Indol-3-Acetat	0	<2
	Phenylacetat	0	<2
<b>unverzweigte Acyl-CoA-Ester</b>	Acetyl-CoA	100	100
	Propionyl-CoA	n.b.	110
	Butyryl-CoA	n.b.	92
<b>NTPs</b>	ATP	100	100
	GTP	100	210
<b>zweiwertige Kationen</b>	Mg <sup>2+</sup>	100	100
	Mn <sup>2+</sup>	84	68
	Co <sup>2+</sup>	44	44
	Ca <sup>2+</sup>	11	0
	Ni <sup>2+</sup>	3	0

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, daß die molekularen und kinetischen Eigenschaften des rekonstituierten Heterotetramers ( $\alpha_2\beta_2$ ) der ADP-ACS I von *P. furiosus* weitgehend mit dem aus *P. furiosus* gereinigten Enzym übereinstimmen. Damit ist das Protein für weitergehende Untersuchungen, wie z.B. Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse, geeignet.

## 4.2 Identifizierung von putativen ADP-ACS in *Archaea*, *Eukarya* und *Bacteria*

Sequenzvergleiche der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Gene *acdAI* und *acdBI* von *P. furiosus* zeigten Ähnlichkeiten zu verschiedenen hypothetischen Proteinen. Die Sequenzen der Proteine stammten von offenen Leserahmen in Genomen mehrerer *Archaea*, inklusive anderer *Pyrococcus*-Stämme, dem hyperthermophilen Sulfatreduzierer *Archaeoglobus fulgidus*, dem hyperthermophilen Methanogenen *Methanococcus jannaschii*, den *Bacteria* *Escherichia coli* und *Streptomyces coelicolor* und der schon bekannten ADP-ACS des amitochondriaten Eukaryoten *Giardia lamblia*. In den vollständig sequenzierten Genomen von *P. horikoshii* und *P. abyssi* sind jeweils fünf homologe Gene der  $\alpha$ -Untereinheit, aber nur zwei homologe Gene der  $\beta$ -Untereinheit enthalten. Dieselbe Anzahl von homologen ORFs findet sich auch im hyperthermophilen Sulfatreduzierer *A. fulgidus*. Diese und die davon abgeleiteten hypothetischen Proteine sowie alle anderen homologen ORFs bestehen nur aus einer Untereinheit. Sie repräsentieren offensichtlich Fusionen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit der ADP-ACS von *P. furiosus* (Abb. 15). Die Untereinheiten sind entweder in  $\alpha\beta$ -Anordnung (AF1211, AF1511, TA1153, MJ0590, ACS *G. lamblia*, ACS *E. histolytica*, MLR6591, VCA0574, YFIQ) oder in  $\beta\alpha$ -Anordnung (AF1938, AF1192, AF0932, SC8A603C) orientiert. Einige hypothetische Proteine besitzen noch zusätzlich Sequenzen am N- (AF1511) oder C-Terminus (MLR6591, VCA0574, YFIQ), die weder homolog zur  $\alpha$ - noch zur  $\beta$ -Untereinheit der ADP-ACS von *P. furiosus* sind.

Dieser Sequenzvergleich zeigt, daß ADP-ACS-ähnliche ORFs in allen drei Domänen des Lebens vorhanden sind. Interessanterweise stellen alle hypothetischen Proteine (Abb. 14) Fusionen der homologen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten dar und sind in  $\alpha\beta$ - oder  $\beta\alpha$ -Orientierung angeordnet. Die getrennte Anordnung der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit, wie sie bei den *Pyrococcus*-Stämmen zu finden ist, scheint eine Ausnahme zu sein. Alle anderen hypothetischen Proteine sind fusioniert. Um zu prüfen, ob es sich bei den hypothetischen Proteinen um einen neuartigen Typ von ADP-ACS handelt, der sich von den *Pyrococcus*-Enzymen unterscheidet, wurden einige ausgewählte ORFs heterolog exprimiert und biochemisch charakterisiert.



**Abb. 15 Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der  $\alpha$ -Untereinheit (462 AS) und der  $\beta$ -Untereinheit (232 AS) der ADP-ACS Isoform I von *P. furiosus* mit verschiedenen homologen ORFs aus den zugänglichen Datenbanken.** Folgende Sequenzen wurden in das Alignment einbezogen: PH1517 (460 AS), PH1739 (212 AS), PH0766 (457 AS), PH1788 (238 AS), PH1928 (466 AS), PH0625 (440 AS), PH1789 (472 AS) aus *P. horikoshii*; AcdAll (457 AS), AcdBII (238 AS) aus *P. furiosus*; PAB1937 (460 AS), PAB0303 (232 AS), PAB0854 (457 AS), PAB2113 (238 AS), PAB1230 (466 AS), PAB1431 (442 AS) aus *P. abyssi*; AF1211 (685 AS), AF1938 (673 AS), AF1511 (881 AS), AF1192 (664 AS), AF0932 (666 AS) aus *A. fulgidus*; TA1153 (698 AS) aus *Thermoplasma acidophilum*; MJ0590 aus *M. jannaschii*; ACS3 (542 AS) aus *Halobacterium* spc.; ACS (726 AS) aus *Giardia lamblia*; ACS (713 AS) aus *Entamoeba histolytica*; MLR6591 (893 AS) aus *Mesorhizobium loti*; VCA0574 (893 AS) aus *Vibrio cholerae*; YFIQ (886 AS) aus *Escherichia coli* und SC8A63C (714 AS) aus *Streptomyces coelicolor*. Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten der *P. furiosus* ADP-ACS I und die homologen Domänen zu den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten sind jeweils hell- und dunkelgrau in den getrennten oder fusionierten Proteinen unterlegt. Dünne Linien repräsentieren Teile ohne bekannte Homologien.



### 4.3 Klonierung und Expression zweier Isoenzyme der ADP-ACS aus dem hyperthermophilen Sulfatreduzierer *Archaeoglobus fulgidus*

Im folgenden wurden zwei der fünf homologen ORFs aus dem hyperthermophilen Sulfatreduzierer *A. fulgidus* ausgewählt, um sie weiter zu untersuchen. Sie weisen die größten Ähnlichkeiten zu der ADP-ACS von *P. furiosus* auf, und ihre Untereinheiten sind in unterschiedlicher Anordnung orientiert. Die ORFs AF1211 ( $\alpha\beta$ ) und AF1938 ( $\beta\alpha$ ) wurden kloniert, exprimiert und die Proteine biochemisch charakterisiert.

#### 4.3.1 Klonierung der Gene und Analyse der Sequenzdaten

Die Klonierung der ORFs AF1211 und AF1938 erfolgte analog dem Klonierungsprotokoll der ADP-ACS I von *P. furiosus*. Beide wurden mit den Restriktionsschnittstellen *Nde*I und *Xho*I in die Vektoren pET17b und zusätzlich in pET19b ligiert. pET19b erleichtert aufgrund des His-tags die Reinigung von Proteinen mit unbekannter Funktion. Die mit dem PCR-Produkt ligierten Vektoren wurden in *E. coli* JM109 transformiert und die Sequenzen der Gene in den Plasmiden auf Mutationsfreiheit überprüft. Die Plasmide der Klone wurden mit acdAF1211pET17b (Acetyl-CoA Synthetase ADP-bildend ORF AF1211 in pET17b), acdAF1211pET19b, acdAF1938pET17b und acdAF1938pET19b bezeichnet.

Der Leserahmen des Gens *acd* AF1211 von *A. fulgidus* kodiert für ein Gen von 2055 bp Länge und ein Polypeptid von 685 Aminosäuren (AS), der ORF AF1938 hat eine Länge von 2022 bp und kodiert damit für 673 AS. Beide Gene starten mit dem Codon ATG, AF1211 endet mit GTG, AF1938 mit TGA. Putative Ribosomenbindestellen, BoxA- und BoxB-Promotoren, wie sie bei Brown (Brown et al., 1989), Larsen (Larsen et al., 1999) oder Dahl (Dahl et al., 1993) beschrieben sind, wurden nicht identifiziert. Der GC-Gehalt des Gens AF1211 beträgt 46 mol%, der des Leserasters AF1938 48 mol%. Dieser ist somit etwas größer als der GC-Gehalt des gesamten Genoms von *A. fulgidus* mit 46 mol%.

#### 4.3.2 Expression und Reinigung der rekombinanten Proteine

**Expression des Proteins ADP-ACS AF1211.** Um das Protein des Gens AF1211 aus *A. fulgidus* zu exprimieren, wurden die Plasmide acdAF1211pET17b und acdAF1211pET19b in den Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Nach Expression, Ernte und Aufschluß der Zellen konnte bei keinem dieser Ansätze eine Expression des gewünschten Proteins festgestellt werden. Eine Untersuchung der Codon-Auswahl im Gen AF1211 zeigte, daß die Codons AGG und AGA für Arginin in *E. coli* kaum benutzt werden (Tabelle 9). Die sie erkennenden t-RNAs sind damit in *E. coli*-Zellen sehr selten vorhanden. Diese Codons kodieren jedoch für 85% des Arginins in der ADP-ACS AF1211, was bei der heterologen Expression zu Problemen führen kann.

**Tabelle 9 Häufigkeit einiger ausgewählter, zur Translation verwendeter Codons des Gens *acdAF1211* und *acdAF1938* im Vergleich zu hochexprimierten Genen von *E. coli*.** AS = Aminosäure; Anz.1211 und Anz.1938 = Gesamtzahl in der Sequenz des Proteins ADP-ACS AF1211 und AF1938; AF1211, AF1938 = Anteil der verwendeten Codons in Bezug auf die Aminosäure in der ADP-ACS AF1211 und AF1938; *Ec.* = Anteil der verwendeten Codons in Bezug auf die Aminosäure bei hochexprimierten Genen von *E. coli*.

AS	Codon	Anz. AF1211	AF1211	Anz. AF1938	AF1938	<i>Ec.</i>
<b>Arg</b>	<b>AGG</b>	<b>21.00</b>	<b>0.51</b>	<b>34.00</b>	<b>0.61</b>	<b>0.00</b>
<b>Arg</b>	<b>AGA</b>	<b>14.00</b>	<b>0.34</b>	<b>9.00</b>	<b>0.32</b>	<b>0.00</b>
Arg	CGG	0.00	0.00	2.00	0.07	0.00
Arg	CGA	3.00	0.07	0.00	0.00	0.01
Arg	CGT	0.00	0.00	0.00	0.00	0.74
Arg	CGC	3.00	0.07	0.00	0.00	0.25
<b>Ile</b>	<b>ATA</b>	<b>11.00</b>	<b>0.28</b>	<b>18.00</b>	<b>0.33</b>	<b>0.00</b>
Ile	ATT	21.00	0.52	19.00	0.35	0.17
Ile	ATC	8.00	0.20	17.00	0.31	0.83
Leu	TTG	10.00	0.17	6.00	0.14	0.03
Leu	TTA	2.00	0.03	3.00	0.07	0.02
Leu	CTG	23.00	0.39	9.00	0.20	0.83
<b>Leu</b>	<b>CTA</b>	<b>3.00</b>	<b>0.05</b>	<b>4.00</b>	<b>0.09</b>	<b>0.00</b>
Leu	CTT	6.00	0.10	10.00	0.23	0.04
Leu	CTC	15.00	0.25	12.00	0.27	0.07

Nach Co-Transformation des Plasmides pUBS520 (Brinkmann et al., 1989), das zusätzlich für die tRNAs AGA und AGG kodiert, war sowohl mit *acdAF1211pET17b* als auch *acdAF1211pET19b* eine starke Überexpression des Proteins mit einer Proteinbande bei 70 kDa zu beobachten. Versuche zur Optimierung der Expressionsbedingungen ergaben die höchste Proteinausbeute bei einer dreistündigen Expression bei 37°C mit Zellen, die bei einer OD<sub>600</sub> von 0.8 induziert wurden.

**Expression des Proteins ADP-ACS AF1938.** Zur Expression der putativen ADP-ACS AF1938 von *A. fulgidus* wurden die Plasmide *acdAF1938pET17b* und *acdAF1938pET19b* in die Expressionsstämme *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* BL21(DE3)pUBS520 und *E. coli* BL21-Codon Plus(DE3)-RIL transformiert, wobei letzterer zusätzlich zu den tRNAs AGA und AGG auch noch für die tRNAs AUA (Isoleucin) und CUA (Leucin) kodiert. Eine Auflistung der Verwendung dieser Codons in den Genen AF1211 und AF1938 ist in Tabelle 9 gegeben. Eine sehr gute Überexpression wurde mit dem Vektor *acdAF1938pET19b* schon nach einstündiger Induktion in den Expressionsstämmen in BL21(DE3)pUBS520 und BL21-Codon Plus(DE3)-RIL erreicht. Die Zellen wurden bei einer OD<sub>600</sub> von 0.8 induziert und für die Testexpression mit Harnstoff aufgeschlossen. Im Gegensatz dazu konnte mit keinem der Stämme eine Expression mit dem Vektor *acdAF1211pET17b* erzielt werden. Bei dem Aufschluß der Zellen BL21(DE3)pUBS520 und BL21-Codon Plus(DE3)-RIL mit dem Plasmid *acdAF1938pET19b* mit Ultraschall und anschließender Zentrifugation stellte sich heraus, daß sich der überwiegende Teil des Proteins nicht im löslichen Überstand, sondern als Einschlusskörper im

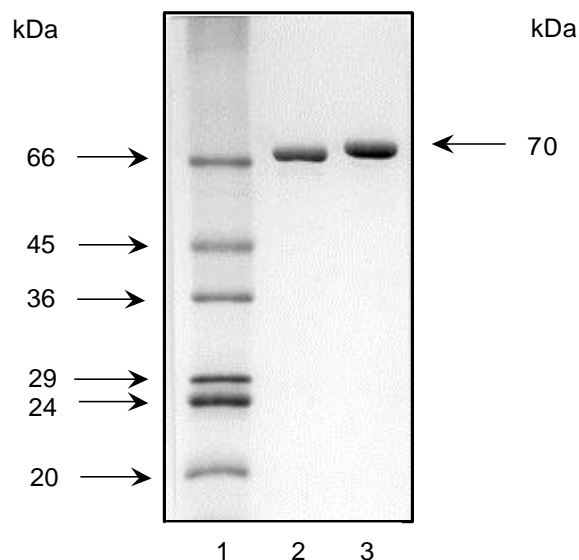
Pellet nichtlöslicher Proteine und Zelltrümmer befand. Optimierungsexperimente zur Maximierung der Ausbeute des exprimierten Enzyms im Überstand ergaben, daß bei einer  $OD_{600}$  von 0.8 bei der Induktion und einer zweistündigen Expression bei 20°C die höchste Ausbeute löslichen Proteins im Stamm *E. coli* BL21(DE3)pUBS520 erreicht wurde.

**Reinigung der ADP-ACS AF1211.** Für die Reinigung des Proteins ADP-ACS AF1211 wurde der Stamm *E. coli* BL21(DE3)pUBS520 acdAF1211pET17b in 800 ml LB-Medium kultiviert. Ein Großteil der Wirtspoteine des exprimierten und aufgeschlossenen Zellextraktes wurde durch 30-minütige Erhitzung auf 80°C gefällt. Der aus diesem Reinigungsschritt resultierende lösliche Überstand des Proteins ADP-ACS AF1211 wurde durch Anionenaustauschchromatographie an einer DEAE(Diaminoethyl)-Sephrose und eine anschließende Gelfiltration an einer Superdex 200-Säule bis zur annähernden Homogenität gereinigt (Tabelle 10, Abb. 16).

**Reinigung der ADP-ACS AF1938.** Für die Reinigung des Proteins ADP-ACS AF1938 wurde der Stamm *E. coli* BL21(DE3)pUBS520 acdAF1938pET19b in 800 ml LB-Medium kultiviert. Die Wirtspoteine von *E. coli* BL21(DE3)pUBS520 acdAF1938pET19b wurden durch 60-minütige Denaturierung bei 70°C gefällt. Die Reinigungsschritte wurden mit dem Substrat Indolacetat überprüft, da das Enzym mit diesem Substrat die höchste Aktivität aufwies. Dem ersten Reinigungsschritt folgte eine Affinitätschromatographie mit einer Ni-NTA-Agarose-Säule, da das im Vektor pET19b exprimierte Enzym einen His-tag am N-Terminus besitzt. Die spezifische Aktivität betrug nach diesem Schritt 1.5 U/mg. Eine darauf folgende Gelfiltration (Abb. 16) führte optisch auf dem SDS-Gel zu einer Reinheit von über 95%, hatte jedoch einen Verlust der spezifischen Aktivität von 80% zur Folge, so daß für die folgende Charakterisierung des Proteins Fraktionen der Affinitätschromatographie verwendet wurden. Versuche, die Einschlußkörper aus Zellextrakten mit dem Vektor acdAF1938pET19b unter denaturierenden Bedingungen (8 M Harnstoff) an die Ni-Säule zu binden, um das Protein an der Säule durch langsam geringer werdende Konzentration des denaturierenden Agens zu renaturieren, führten zu einer sehr schlechten Ausbeute. Die Hydrolyse des His-tags aus dem Fusionsprotein mit Enterokinase führte zu keinem Erfolg.

**Tabelle 10 Anreicherungstabelle der rekombinanten ADP-ACS AF1211 von *A. fulgidus*.** Die Enzymaktivitäten wurden bei 55°C in Richtung der Acetat-Bildung gemessen. Die Proteinkonzentrationen wurden nach Bradford bestimmt.

Reinigungsschritt	Protein [mg]	Aktivität [U]	Spez. Aktivität [U/mg]	Ausbeute [%]	Anreicherung (-fach)
zellfreier Rohextrakt	83	772	9.0	100	1
15 min 80°C	10.5	600	58.1	77.8	6.5
Resource Q	6.9	530	66.8	68.7	7.4
Superdex	6	422	84.4	54.7	9.4



**Abb. 16 SDS Gelelektrophorese der gereinigten Fraktionen der rekombinanten Acetyl-CoA-Synthetasen (ADP-bildend) AF1211 und AF1938 von *A. fulgidus*.** Die Proteine wurden über ein 12%-iges Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Aufgetragen wurden in Spur 1, molekularer Größenstandard VIHL von Sigma; in Spur 2, 0.9 µg gereinigtes Protein aus *E. coli* BL21(DE3)pUBS520 acdAF1211pET17b; in Spur 3, 0.9 µg gereinigtes rekombinantes Protein aus *E. coli* BL21(DE3)pUBS520 acdAF1938pET19b.

Die Ergebnisse zeigen, daß die offenen Leserahmen AF1211 und AF1938 für Proteine kodieren, die ADP-ACS Aktivität aufweisen. Im folgenden wird eine detaillierte biochemische Charakterisierung der rekombinanten Enzyme beschrieben.

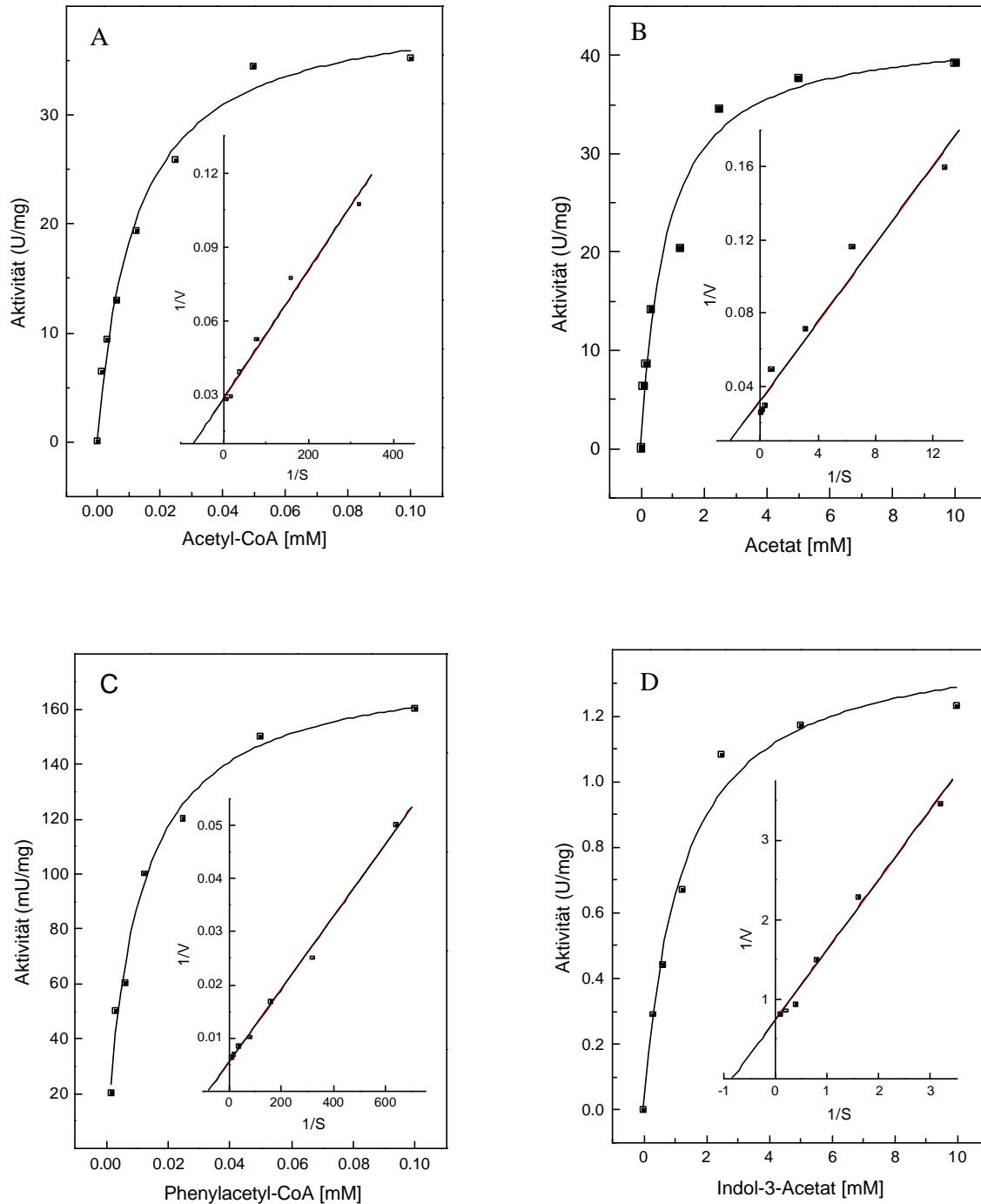
### 4.3.3 Biochemische Charakterisierung

Die gereinigten rekombinanten Proteine ADP-ACS AF1211 und ADP-ACS AF1938 wurden biochemisch charakterisiert, um sie mit der in dieser Arbeit beschriebenen rekombinant exprimierten ADP-ACS I und den bereits bekannten nativen ADP-ACS I und II von *P. furiosus* vergleichen zu können und ihnen eine potentielle Funktion im Organismus zuordnen zu können.

#### 4.3.3.1 Molekularer Aufbau und kinetische Parameter

Das theoretische Molekulargewicht der Proteine ADP-ACS AF1211 und ADP-ACS AF1938 von ungefähr 75 kDa und die apparenten Molekularmassen der rekombinanten Enzyme ADP-ACS AF1211 und ADP-ACS AF1938 von jeweils 140 kDa sprechen für eine homodimere Zusammensetzung beider Enzyme.

Kinetische Konstanten (apparente  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werte) wurden für beide Enzyme von *A. fulgidus* bei 55°C sowohl in Richtung Acetyl-CoA als auch in Richtung Acetat-Bildung bestimmt. Die Auftragung der Meßergebnisse mit variiertes Substratkonzentration nach Michaelis-Menten und Lineweaver-Burk folgte unter allen bestimmten Bedingungen einer Michaelis-Menten-Kinetik.  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werte wurden aus den Lineweaver-Burk-Diagrammen ermittelt (Abb. 17).



**Abb. 17** Aktivität der rekombinanten Acetyl-CoA Synthetasen ADP-ACS AF1211 (A, B) und ADP-ACS AF1938 (C, D) von *A. fulgidus* in Abhängigkeit von den Substratkonzentrationen. Gezeigt sind die spezifischen Aktivitäten bei 55°C in Abhängigkeit von der Konzentration an Acetyl-CoA (A) und Acetat (B) der ADP-ACS AF1211. Für die ADP-ACS AF1938 sind die Abhängigkeiten von der Konzentration an Phenylacetyl-CoA (C) und Indol-3-Acetat (D) gezeigt. Die Einschübe stellen die doppelt reziproke Auftragung der Rate gegen die Konzentration nach Lineweaver-Burk dar.  $S$  = Substrat [mM],  $V$  = Reaktionsgeschwindigkeit [U/mg].

**Tabelle 11 Kinetische Parameter der rekombinanten Acetyl-CoA Synthetasen ADP-ACS AF1211 und ADP-ACS AF1938 von *A. fulgidus*.** Die apparenten  $V_{\max}$ -Werte wurden bei 55°C in Richtung der Säurebildung (0.1 mM Acetyl-CoA, Phenylacetyl-CoA; 0.2 mM ADP; 5 mM  $P_i$ ) und in Richtung der CoA-Ester-Bildung (10 mM Acetat, Indol-3-Acetat und Phenylacetat, 2 mM ATP, 0.5 mM CoA-SH) gemessen. n.b. = nicht bestimmt, 0 = keine Aktivität messbar.

	rekombinante ADP-ACS von <i>A. fulgidus</i>	
	ADP-ACS AF1211	ADP-ACS AF1938
Apparente $K_m$ -Werte [ $\mu$ M]		
Acetyl-CoA	10	0
Phenylacetyl-CoA	0	17
ADP	7	n.b.
$P_i$	110	n.b.
Apparente $V_{\max}$ -Werte [U/mg bei 55°C]		
in Richtung der Acetat-Bildung	75	
in Richtung der Phenylacetat-Bildung		1
Apparente $K_m$ -Werte [ $\mu$ M]		
Acetat	340	2580
Indol-3-Acetat	n.b.	1240
Phenylacetat	n.b.	2510
ATP	130	30
CoA-SH	27	530
Apparenter $V_{\max}$ -Werte [U/mg bei 55°C]		
in Richtung der Acetyl-CoA-Bildung	65	
in Richtung Phenylacetyl-CoA-Bildung		1.5

#### 4.3.3.2 Substratspezifitäten

Die Spezifitäten der ADP-ACS AF1211 und der ADP-ACS AF1938 für verschiedene organische Säuren, Acyl-CoA-Ester und Nukleotide wurden in Tabelle 12 verglichen: ADP-ACS AF1211 setzte neben Acetat (100%) Propionat, Butyrat und Isobutyrat in hohen Raten um. Fumarat, Isovalerat und Succinat (<10%) wurden nicht effizient genutzt, während Phenylacetat und Indolacetat nicht signifikant umgesetzt wurden (<5%). Zusätzlich zu Acetyl-CoA (100%) werden Propionyl-CoA und Butyryl-CoA in sehr hohen Raten genutzt. Mit Phenylacetyl-CoA konnte keine signifikante Aktivität gemessen werden. GTP wurde mit gleicher Rate umgesetzt wie ATP. Das Enzym ADP-ACS AF1938 wies eine völlig andere Spezifität gegenüber den getesteten Substraten auf. Es setzte vor allem die Abkömmlinge aromatischer Aminosäuren wie Indolacetat (aus Tryptophan) und Phenylacetat (aus Phenylalanin) zu 100% bzw. 65% um. Isovalerat und Propionat wurden in Raten über 40% umgesetzt, während Isobutyrat, Fumarat, Succinat und Butyrat geringe Raten zwischen 18%

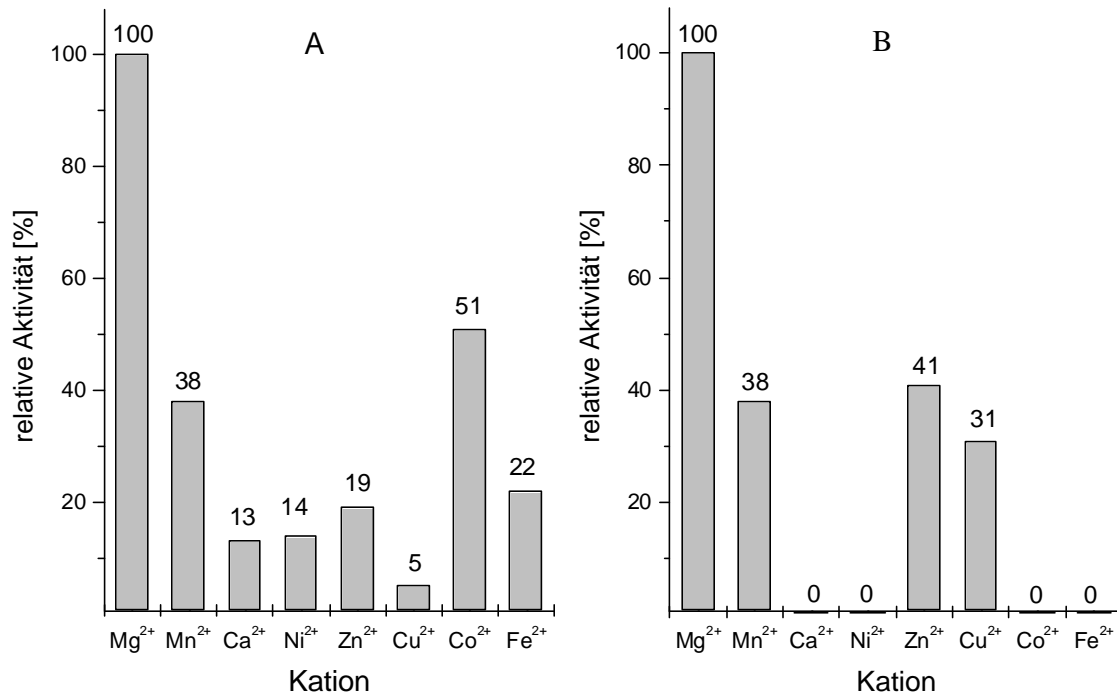
und 36% aufwiesen. Acetat (13%) wurde im Vergleich zur ADP-ACS AF1211 am schlechtesten umgesetzt. Außerdem war mit dem Substrat Acetyl-CoA in der physiologischen Richtung der Säure-Bildung keine Aktivität zu messen, wobei der Aryl-CoA-Ester Phenylacetyl-CoA ein effektives Substrat war (100%). Als Nukleotid wird ATP (100%) gegenüber GTP (67%) bevorzugt (Tab. 12).

**Tabelle 12 Substratspezifitäten der rekombinanten ADP-ACS AF1211 und AF1938 von *A. fulgidus*.** Die Substratspezifitäten (relative Aktivität in %) wurden bei 55°C in Richtung Säurebildung bzw. in Richtung der CoA-Ester-Bildung gemessen. 100% entsprachen in Richtung Säure-Bildung mit ADP-ACS AF1211 75 U/mg, mit ADP-ACS AF1938 1 U/mg; in Richtung CoA-Ester-Bildung mit ADP-ACS AF1211 65 U/mg, mit ADP-ACS AF1938 1.5 U/mg. Abkürzungen: n.b. = nicht bestimmt; 0 = keine Aktivität meßbar.

		<b>rekombinante ADP-ACS von <i>A. fulgidus</i></b>	
		<b>relative Aktivität [%]</b>	
<b>Substrate</b>		<b>ADP-ACS AF1211</b>	<b>ADP-ACS AF1938</b>
<b>unverzweigte Acyl-Säuren</b>	Acetat	100	13
	Propionat	100	42
	Butyrat	84	36
	Succinat	9	18
	Fumarat	10	29
<b>verzweigte Acyl-Säuren</b>	Isobutyrat	56	31
	Isovalerat	10	59
<b>Aryl-Säuren</b>	Indol-3-Acetat	4	100
	Phenylacetat	8	65
<b>unverzweigte Acyl-CoA-Ester</b>	Acetyl-CoA	100	0
	Propionyl-CoA	110	n.b.
	Butyryl-CoA	69	n.b.
<b>Aryl-CoA-Ester</b>	Phenylacetyl-CoA	0	100
<b>NTPs</b>	ATP	100	100
	GTP	100	67

Die Untersuchung der Kationenspezifitäten sowohl der ADP-ACS AF1211 als auch der ADP-ACS AF1938 zeigten eine hohe Spezifität für  $Mg^{2+}$  (100%).  $Co^{2+}$  (51%) und  $Mn^{2+}$  (38%) konnten  $Mg^{2+}$  in ADP-ACS AF1211 noch bedingt ersetzen, während alle anderen getesteten zweiwertigen Kationen mit dem Enzym nur sehr geringe Aktivitäten erzielten. ADP-ACS AF1938 reagierte ebenso bedingt mit  $Mn^{2+}$  (38%), außerdem mit  $Zn^{2+}$  (41%) und  $Cu^{2+}$  (31%). Im Gegensatz zur ADP-ACS AF1211 reagierte es überhaupt nicht mit  $Ca^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  und  $Fe^{2+}$  (Abb. 18).

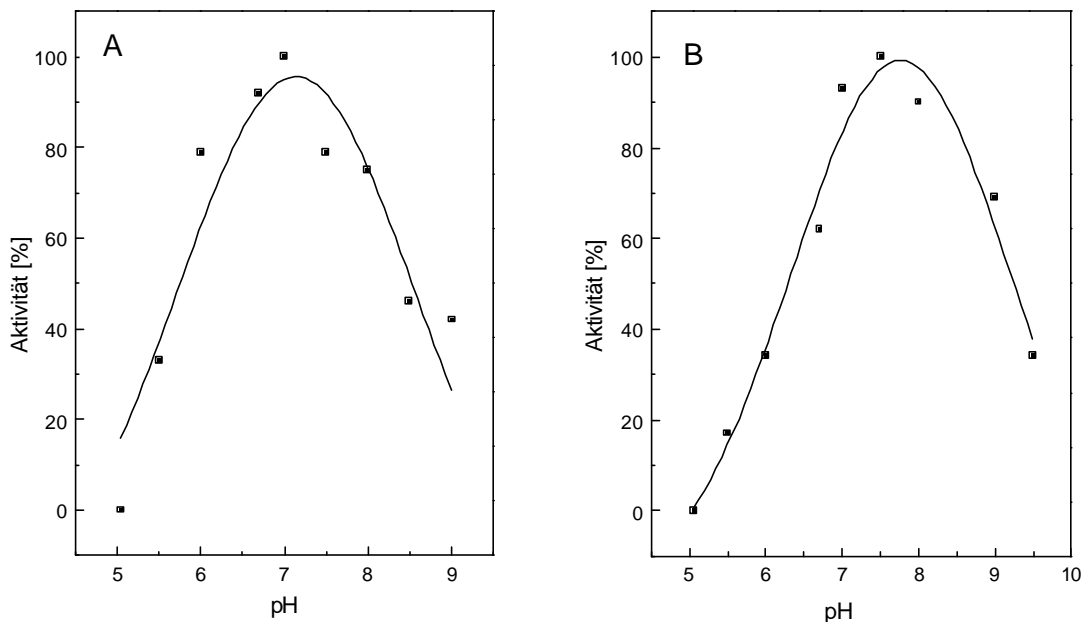




**Abb. 18 Kationenspezifitäten der rekombinanten ADP-ACS AF1211-Aktivität und der ADP-ACS AF1938 von *A. fulgidus*.** Alle Kationen wurden in einer Konzentration von 200  $\mu$ M bei 55°C in Richtung Acetyl-CoA-Bildung getestet. 100% Aktivität entsprechen mit der ADP-ACS AF1211 60 U/mg, mit ADP-ACS AF1938 1.5 U/mg.

### 4.3.3.3 pH-Optima

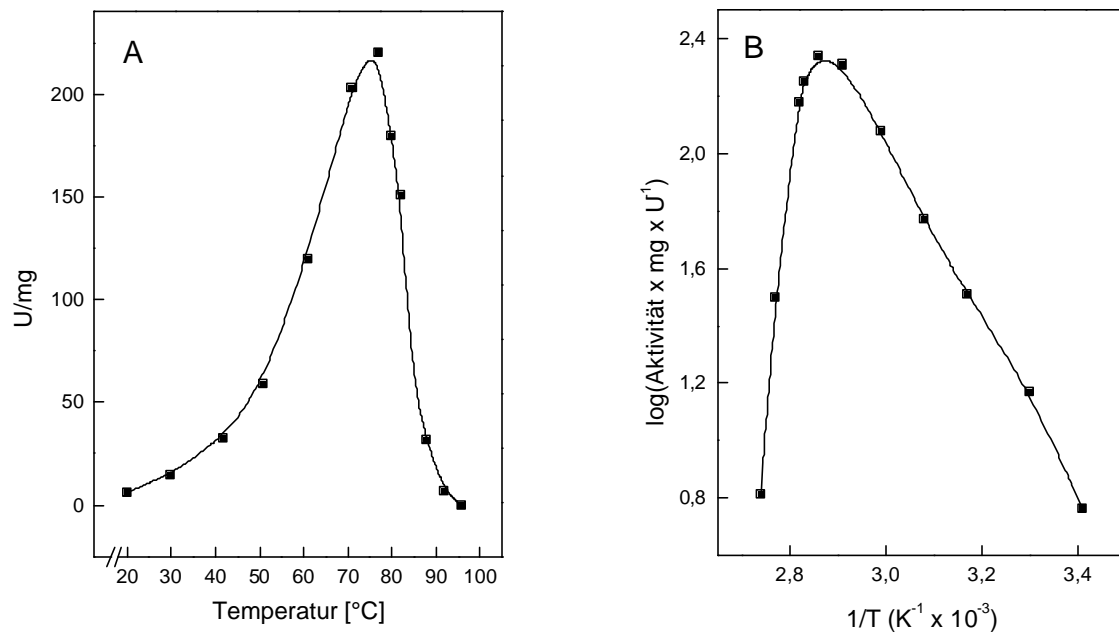
Das pH-Optimum der Enzyme ADP-ACS AF1211 und ADP-ACS AF1938 von *A. fulgidus* wurde mit verschiedenen Puffern mit konstanter Ionenstärke über den Bereich von pH 5.0 bis 9.0 bestimmt. Die höchsten Aktivitäten wurden mit ADP-ACS AF1211 bei einem pH-Wert von 7.0 gemessen, mit ADP-ACS AF1938 bei einem pH-Wert von 7.5 (Abb. 19).



**Abb. 19** pH-Abhängigkeit der rekombinanten ADP-ACS AF1211 (A) und AF1938 (B) von *A. fulgidus*. Die Enzymmessungen erfolgten bei 55°C in Richtung Acetyl-CoA-Bildung (ADP-ACS AF1211) bzw. Indolacetyl-CoA-Bildung (ADP-ACS AF1938). 100% relative Aktivität entsprach beim Enzym ADP-ACS AF1211 60 U/mg, beim Enzym ADP-ACS AF1938 1.5 U/mg.

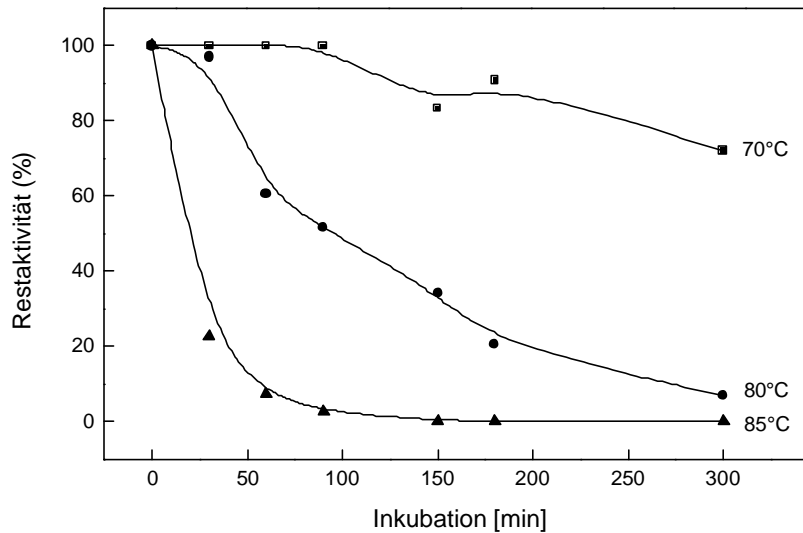
### 4.3.3.4 Temperaturoptimum und Temperaturstabilität

Die Bestimmung des Temperaturoptimums der rekombinanten ADP-ACS AF1211 von *A. fulgidus* erfolgte bei pH 7.0 in 100 mM EPPS-Puffer in Richtung Acetat-Bildung. Abbildung 20 A zeigt die Temperaturkurve der ADP-ACS AF1211 von *A. fulgidus*, aus der sich ein Optimum von 77°C ergibt. Abbildung 20 B zeigt den Arrhenius Plot derselben Daten, aus dessen linearen Verlauf des Graphen zwischen 20°C und 65°C eine Aktivierungsenergie von 25 kJ/mol berechnet wurde.



**Abb. 20** Einfluß der Temperatur auf die Aktivität der ADP-ACS AF1211 von *A. fulgidus*. Spezifische Aktivität in Abhängigkeit von der Temperatur (A). Natürlicher Logarithmus der Raten gegen die reziproke Temperatur nach Arrhenius (B).

Die Langzeit-Thermostabilität der rekombinanten ADP-ACS AF1211 von *A. fulgidus* wurde bei 70°C, 80°C und 85°C gemessen. Das Enzym zeigte hohe Stabilität gegen Hitzeinaktivierung bis zu einer Temperatur von 80°C. Es verlor nicht signifikant an Aktivität bei einer fünfstündigen Inkubation bei 70°C und zeigte bei 80°C immer noch eine Halbwertszeit von 100 Minuten. Ein fast vollständiger Aktivitätsverlust wurde nach einer 100-minütigen Erhitzung bei 85°C beobachtet (Abb. 21).



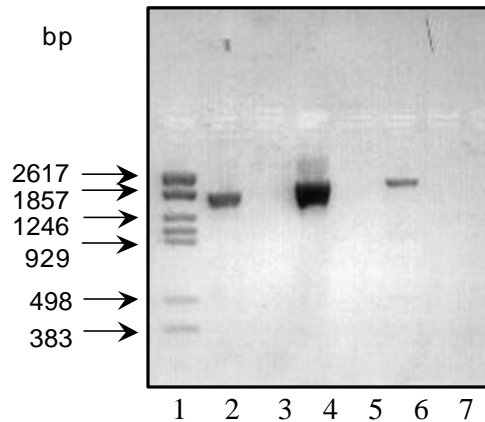
**Abb. 21** Langzeit-Thermostabilität der ADP-ACS AF1211 von *A. fulgidus*. Die Restaktivität in % wurde in Richtung Acetat-Bildung bei 55°C gemessen. 100% Aktivität entsprach 60 U/mg.

Die Daten zeigen, daß die ORFs *acdAF1211* und *acdAF1938* für ADP-bildende Acetyl (Acyl)-CoA Synthetasen kodieren. Aufgrund der molekularen Eigenschaften und ihrer Spezifitäten gegenüber CoA-Estern und Säuren können die rekombinanten ADP-ACS aus *A. fulgidus* als Isoenzyme in Analogie zu den bekannten Enzymen Acd I und II von *P. furiosus* beschrieben werden. Im Unterschied zu der ADP-ACS aus *P. furiosus* sind beide *A. fulgidus*-Isoenzyme homodimere Proteine, deren Untereinheiten Fusionen der homologen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit der Acd I aus *Pyrococcus* in unterschiedlicher Orientierung (AF1211  $\alpha\beta$ ; AF1938  $\beta\alpha$ ) darstellen.

#### 4.3.4 Nachweis der *in vivo*-Transkription der Gene *acdAF1211* und *acdAF1938* aus *A. fulgidus* mittels RT-PCR

Um zu prüfen, ob die ORFs AF1211 und AF1938 auch *in vivo* transkribiert werden, wurden RT-PCR-Experimente durchgeführt. Dazu wurde der Stamm *A. fulgidus* 7324 verwendet, der beim Wachstum auf Stärke in Gegenwart von Peptiden Acetat bildet (Labes, Schönheit, 2001). Das Gen *acdAF1211* des Stammes 7324 zeigte nach Klonierung und Sequenzierung (siehe Anhang) eine 98% -ige Identität zum ORF AF1211 von VC16, was darauf hinwies, daß die ADP-ACS AF1211 in beiden Stämmen von *A. fulgidus* nahezu identisch sind. Aufgrund der Substratspezifität der ADP-ACS AF1211 für Acetyl-CoA und der Spezifität der ADP-ACS AF1938 für Abkömmlinge aromatischer Aminosäuren sollten die Gene *acdAF1211* und *acdAF1938* bei Wachstum auf Stärke und Peptiden transkribiert werden. Mittels RT-PCR konnte eine Transkription beider Gene gezeigt werden. Die PCR Produkte wiesen die erwartete Länge von 2055 bp (*acdAF1211*) und 2022 bp (*acdAF1938*) auf (Abb. 22) und wurden durch Sequenzierung überprüft. Die Negativkontrollen, in denen eine PCR mit Gesamt-RNA ohne Umschreibung in cDNA durchgeführt wurde, wiesen keine Produkte auf.

Die Daten deuten darauf hin, daß die ORFs *acdAF1211* und *acdAF1938* eine physiologische Rolle bei der Umsetzung von Kohlenhydraten und Peptiden spielen.



**Abb. 22** RT-PCR von cDNA amplifiziert mit spezifischen Primern zum Nachweis der mRNA der Gene AF0623 (DNA Ligase), *acdAF1211* (ADP-ACS I) und *acdAF1938* (ADP-ACS II) von *A. fulgidus*. Spur 1, Marker 21 (Fermentas); 2, AF0623; 4, *acdAF1211*; 6, *acdAF1938*; Spuren 3, 5 und 7, PCR mit der Gesamt-RNA ohne Umschreibung in cDNA durch die Reverse Transkriptase (Negativkontrollen).

#### 4.4 Klonierung und Expression der ADP-ACS MJ0590 aus dem hyperthermophilen methanogenen Archaeon *Methanococcus jannaschii*

Bei der Identifizierung weiterer ADP-ACS (Abb. 15) wurde in *M. jannaschii* ein offener Leserahmen mit einer hohen Sequenzidentität identifiziert, der ebenfalls für eine putative fusionierte ADP-ACS mit einer  $\alpha\beta$ -Anordnung kodieren könnte. Um herauszufinden, ob das kodierte Protein Aktivität aufweist, wurde der ORF *acdMJ0590* kloniert und exprimiert.

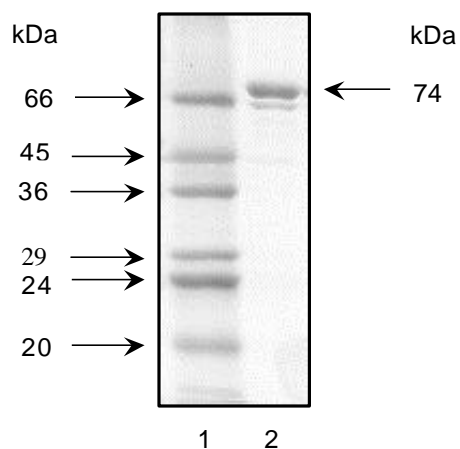
##### 4.4.1 Klonierung des Gens und Analyse der Sequenzdaten

Die Klonierung des ORFs *acdMJ0590* erfolgte analog der Klonierung der ADP-ACS von *P. furiosus*. Das PCR-Produkt aus der Amplifizierung mit den Primern *acdMJ0590exprF* und *acdMJ0590exprR* wurde mit den Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *XhoI* in den Expressionsvektor pET17b ligiert. Die daraus resultierenden Plasmide wurden durch Sequenzierung auf korrekten Einbau und Fehlerfreiheit der Sequenz überprüft. Die Plasmide der Klone wurden mit *acdMJ0590pET17b* (Acetyl-CoA Synthetase ADP-bildend ORF MJ0590 in pET17b) bezeichnet. Der Leserahmen des Gens *acdMJ0590* kodiert für ein Gen von 2112 bp Länge und ein Polypeptid von 704 Aminosäuren. Das Gen startet mit ATG und endet mit TAA. Putative Ribosomenbindestellen und archaeele Promotoren (siehe auch 4.1.1 und 4.3.1) konnten nicht identifiziert werden. Der GC-Gehalt des Gens beträgt 31 mol%, der des gesamten Genoms von *M. jannaschii* beträgt 31.4 mol%.

#### 4.4.2 Expression und Reinigung des rekombinanten Proteins

**Expression des Proteins ADP-ACS MJ0590.** Um das Gen *acdMJ0590* aus *M. jannschii* zu exprimieren, wurde das Plasmid *acdMJ0590pET17b* in die Expressionsstämme *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* BL21(DE3)pUBS520 und *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL transformiert. Für die Expression wurden die drei mit dem Plasmid *acdMJ0590pET17b* transformierten Stämme mit 0.4 mM IPTG bei 37°C für ein bis drei Stunden induziert. Unter diesen Bedingungen wurde das Protein ADP-ACS MJ0590 nur im Stamm *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL exprimiert, wobei schon im Rohextrakt zu erkennen war, daß nicht nur eine Bande bei 74 kDa, sondern eine weitere, schwächere Bande bei ca. 62 kDa exprimiert wurde. In den beiden anderen Expressionsstämmen wurde unter keinen Bedingungen eine Expression festgestellt. Optimierungsexperimente ergaben, daß die größte Ausbeute des Proteins durch eine dreistündigen Expression bei 37°C erhalten wurde.

**Reinigung des Proteins ADP-ACS MJ0590.** Für die Reinigung wurde der Stamm *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL *acdMJ0590pET17b* in 800 ml LB-Medium kultiviert. Ein Großteil der Wirtsproteine des Zellextraktes konnte durch 60-minütige Erhitzung auf 70°C gefällt werden. Das Protein konnte weder durch Kationen-, noch durch Anionenaustauschchromatographie gebunden werden, jedoch wurde DNA und einige kleine Proteine an den Anionenaustauscher (DEAE-Sepharose) gebunden, so daß dies als weiterer Reinigungsschritt genutzt wurde. Nach dem anschließenden Gelfiltrationsschritt wies das Enzym ADP-ACS-Aktivität auf, dem Coomassie gefärbten SDS-Gel ergab sich eine Reinheit von 80-90%. Die beiden Banden konnten unter diesen Bedingungen nicht voneinander getrennt werden, wobei die kleine 62 kDa-Bande etwa 5-10% der großen Bande 72 kDa-Bande ausmachte. Die gereinigten Fraktionen aus der Gelfiltration (Abb. 23) zeigten eine Aktivität von 2.5 U/mg und wurden für die weitere Charakterisierung der ADP-ACS MJ0590 eingesetzt.



**Abb. 23 SDS-Gelelektrophorese der gereinigten Fraktionen der rekombinanten Acetyl-CoA Synthetase (ADP-bildend) MJ0590 von *M. jannaschii*.** Die Proteine wurden über ein 12%-iges Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Aufgetragen wurden in der Spur 1 der molekulare Größenstandard VII-L von Sigma, in Spur 2, 1.6 µg gereinigtes Proteins aus *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL *acdMJ0590pET17b*.

#### 4.4.3 Biochemische Charakterisierung

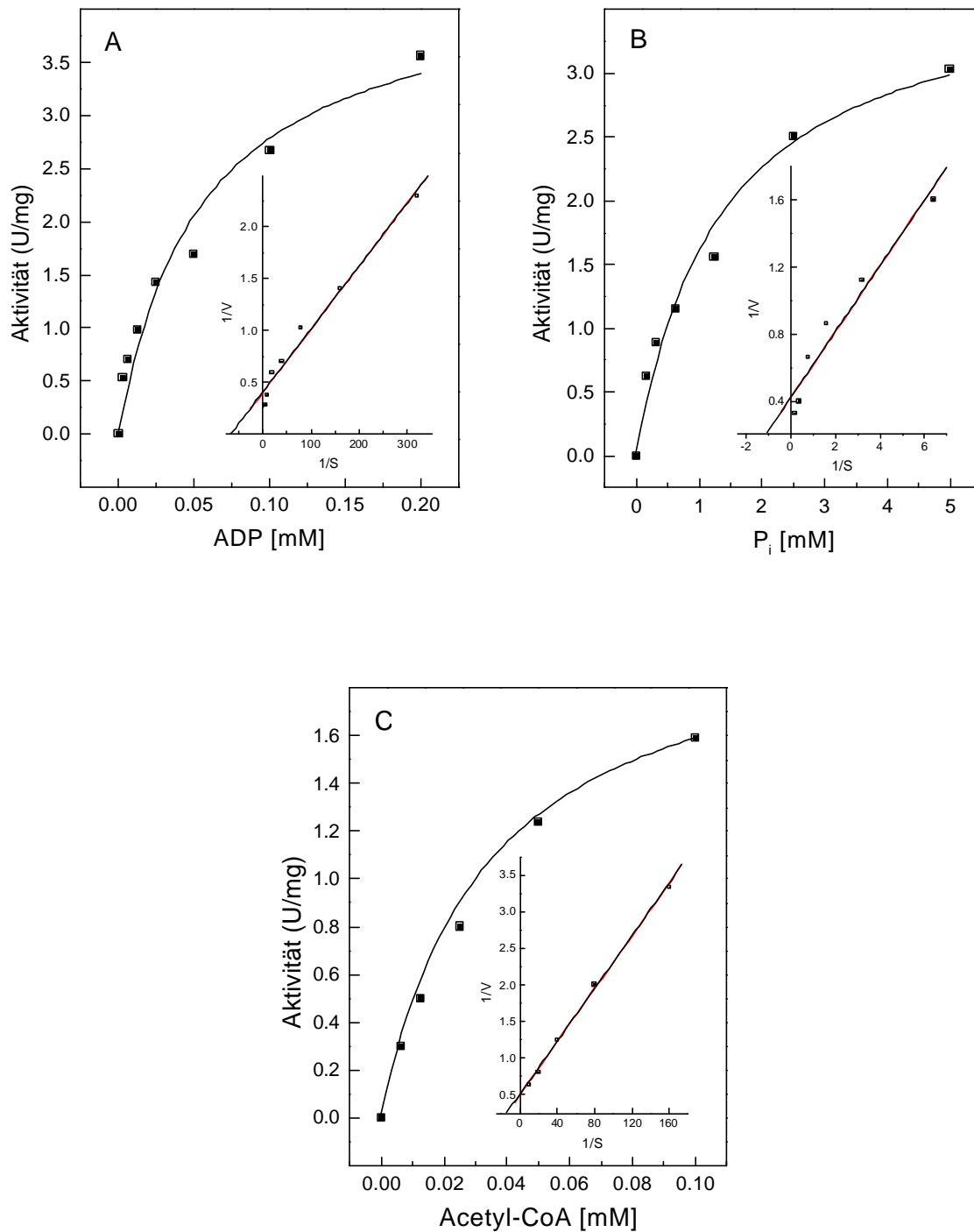
Das durch das Gen *acdMJ0590* von *M. jannaschii* kodierte Enzym ADP-ACS MJ0590 zeigte ebenfalls ADP-ACS Aktivität. Um es aufgrund seiner Größe, Zusammensetzung und Substratspezifität einem ADP-ACS-Typus zuordnen zu können, wurde es kurz charakterisiert, was im folgenden dargestellt wird.

##### 4.4.3.1 Molekularer Aufbau und kinetische Parameter

Die apparente Molekularmasse der rekombinanten ADP-ACS MJ0590 wurde auf einer kalibrierten Gelfiltration mit 160 kDa bestimmt. Somit scheint das Protein als  $\alpha_2$ -Dimer vorzuliegen. Zur Charakterisierung der ADP-ACS-Aktivität des durch das Gen *acdMJ0590* kodierten Proteins wurde die spezifische Aktivität bei 55°C in Abhängigkeit von der Acetyl-CoA-, der  $P_i$ - und der ADP-Konzentration gemessen. Durch einen Auftrag der Ergebnisse nach Michaelis-Menten und Lineweaver-Burk wurden die Werte aus Abbildung 24 und Tabelle 13 bestimmt.

**Tabelle 13 Kinetische Parameter der rekombinanten ADP-ACS MJ0590 von *M. jannaschii*.** Die apparenten  $V_{\max}$ -Werte wurden bei 55°C in Richtung der Acetat-Bildung (0.1 mM Acetyl-CoA, 0.2 mM ADP, 5 mM  $P_i$ ) gemessen.

<b>ADP-ACS von <i>M. jannaschii</i></b>	
<b>rekombinant</b>	
<b>(aus <i>E. coli</i>)</b>	
Apparenter $K_m$ [µM]	
Acetyl-CoA	37
ADP	15
$P_i$	470
Apparenter $V_{\max}$ [U/mg bei 55°C]	2.5
in Richtung der Acetat-Bildung	



**Abb. 24** Aktivität der rekombinanten Acetyl-CoA Synthetase-Aktivität (ADP-bildend) ADP-ACS MJ0590 von *M. jannaschii*. Gezeigt ist die spezifische Aktivität bei 55°C in Abhängigkeit von der Konzentration an ADP (A), P<sub>i</sub> (B) und Acetyl-CoA (C). Die Einschübe stellen die doppelt reziproke Auftragung der Rate gegen die Konzentration nach Lineweaver-Burk dar. S = Substrat [mM], V = Reaktionsgeschwindigkeit (U/mg).



#### 4.4.3.2 Substratspezifitäten

Die Substratspezifitäten der ADP-ACS MJ0590 von *M. jannaschii* wurden mit verschiedenen organischen Säuren und CoA-Estern getestet. In Richtung der CoA-Ester-Synthesen konnte mit den organischen Säuren Acetat, Propionat, Butyrat, Succinat, Fumarat, Isobutyrat, Isovalerat, Indolacetat und Phenylacetat unter den gewählten Testbedingungen weder mittels gekoppeltem Test mit PK/LDH noch im Hydroxamat-Test eine meßbare Aktivität gezeigt werden. Phenylacetyl-CoA wurde ebenfalls nicht als Substrat verwertet, während das Enzym Acetyl-CoA (100%) und Butyryl-CoA (120%) gut umsetzte.

Die Daten zeigen, daß der ORF MJ0590 aus *M. jannaschii* für eine homodimere ADP-ACS kodiert, deren Untereinheiten (70 kDa) eine Fusion der homologen ADP-ACS I von *P. furiosus* in  $\alpha\beta$ -Anordnung darstellt.

#### 4.5 Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus der ADP-ACS am Beispiel der ADP-ACS AF1211: Ortsspezifische Mutagenese des Histidin<sup>249</sup> gegen Aspartat

Aufgrund der durchgeführten Sequenzvergleiche und einer Untersuchung der Sequenzmotive von Sanchez et al. (Sanchez et al., 1999) wurden nicht nur putative ADP-ACS, sondern auch bekannte Proteine mit nachgewiesener enzymatischer Funktion identifiziert. Dazu gehört auch die Succinyl-CoA Synthetase von z.B. *E. coli* (Buck, Guest, 1989). Dieses Enzym wies nur eine sehr geringe Gesamtidentität zu der ADP-ACS von *P. furiosus* auf, hat mit ihr und den putativen ADP-ACS aus Abbildung 15 jedoch einige Sequenzmotive gemeinsam. So wurde z.B. ein konserviertes His<sup>246</sup> in der  $\alpha$ -Untereinheit der Succinyl-CoA Synthetase (SCS) von *E. coli* identifiziert, das sowohl in den bekannten, als auch fast allen putativen ADP-ACS (mit Ausnahme von YFIQ aus *E. coli*) vorhanden ist (Abb. 25). Die SCS von *E. coli* ist gut untersucht. Sie katalysiert eine zur ADP-ACS homologe Reaktion ( $\text{Succinyl-CoA} + \text{ADP} + \text{P}_i \rightleftharpoons \text{Succinat} + \text{ATP (GTP)} + \text{CoA}$ ). Im Reaktionsmechanismus wird zuerst ein freies Phosphat kovalent an das Histidin<sup>246</sup> des Enzyms gebunden. Über einen Enzym-Succinyl-Phosphat-Komplex wird es dann auf ADP übertragen, wobei ATP, Succinat und CoA frei werden (Majumdar et al., 1991; Wolodko et al., 1983). Unterstützt wird das Reaktionsmodell durch die Kristallstruktur (Wolodko et al., 1994; Fraser et al., 1999) und ein Experiment, in dem das His<sup>246</sup> gegen Aspartat ausgetauscht wurde, was einen vollständigen Verlust der Enzymaktivität der SCS zur Folge hatte (Majumdar et al., 1991). Um zu prüfen, ob das konservierte Histidin auch am Katalysemechanismus der ADP-ACS beteiligt ist, wurde das dem His<sup>246</sup> der SCS homologe His<sup>249</sup> der ADP-ACS AF1211 in Analogie zum Experiment in der SCS von *E. coli* gegen Aspartat ausgetauscht und der Effekt auf das Enzym untersucht.

### α-Untereinheit

AcdA I	: KKPIIVIKAGRSE	AKAAASHTGSLAG	-SDKVYSAAFQ	S : 275		
PH1517	: KKPIIVIKAGRSE	AKAAASHTGSLAG	-SDTIYSAAFQ	KT : 275		
PAB1937	: KKPIIVIKAGRSE	AKAAASHTGSLAG	-SDTIYSAAFQ	S : 275		
Acd II	: KKPIIALKAGKSE	SGARAASHTGSLAG	-SWKIYEAAFQ	S : 268		
PH0766	: KKPIIALKAGKSE	SGARAASHTGSLAG	-SWKIYEAAFQ	S : 268		
PAB0854	: KKPVIALKAGKSE	SGARAASHTGSLAG	-SWKIYEAAFQ	S : 268		
PH1928	: VKPVIVLKAGRTE	AGAKAAASHTGSLAG	-SYRIYEAVFE	QT : 279		
PAB1230	: VKPVIIILKAGRTE	AGAKAAASHTGSLAG	-SYKIYEAAFQ	S : 279		
PH0625	: KKPVIIILKAGKSK	GAKAAQSHTGSLAG	-SYEIQAAAFQ	QA : 265		
PAB1431	: KKPVIIILKAGKSE	GAKAAQSHTGSLAG	-SYEIKAVFKQ	G : 265		
PH1789	: IKPIIALKSGRTE	YGAKAAASHTGSLAG	-QDVIYDAVFK	QT : 286		
PAB2112	: IKPIIALKSGRTE	YGAKAAASHTGSLAG	-QDVIYDAVFK	QT : 286		
AF1211	: RKPVVVMKAGKSQ	SGAKAAASHTGSLAG	-SYEAYRAAFR	QS : 263		
AF1938	: EKPVVVFKSGRTE	YGQAAMSHAS	ICG-DDDVFD	AVCRQA : 270		
AF1511	: KKPILAIASGVT	PAGAKAVASHTG	AIIVSSSGIA	IDALFKQT : 273		
AF1192	: TKPIVVLKSGRTE	AGKRSALSHAS	IST-SEEIFE	ACKQA : 266		
AF0932	: EKKVVVMKSGRSS	VADKASVSH	TGSMAG-DYRV	FASAMKQA : 269		
TA1153	: KKPVIMLKSGISK	HGSVAAASHTGSLAG	-SHRVYDGALK	QA : 272		
MJ0590	: KKPIIALKSGRTE	VGKKAASHTGSLAG	-EDVIYEAAF	KEA : 271		
Halob. ACS	: DTPAVVVKSGRTE	AGAQAASHTGT	IAG-SEAA	YEAGFKQA : 114		
G.lambli	: KKPVIIILKSGT	SAAGAAAASHTG	ALAG-NDIA	FDLAFKA : 281		
E.histolyt	: DKPIILLKAGKS	SEGAAMSH	TGSLAG-ND	AVYDAVFDRC : 270		
MLR6591	: LKPVIVIKSGR	HEQAAKAAATHT	GALSG-ADR	VDAALRRA : 270		
VCA0574	: NRRILVLKGGRT	KAGKAAQMTG	GGDDT-LD	IYDSAIRRT : 272		
YFIQ	: NKPIILVIKSGR	SPAAQRLN	TAG----	MDPAWDAIQRA : 262		
SC8A6.03C.	: RKPVVVLKAGRT	AAGAKAAGSH	TGALAG-DD	AVYDDILRQA : 268		
SCSα E.coli:	TKPVVGYIAGVT	APKPKG-RMGE	IAGAI IAGG	KGTAD	EKF	FAAL : 266

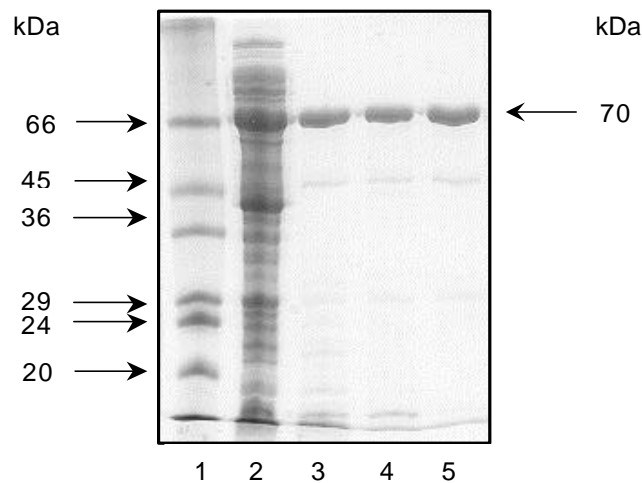
His<sup>246</sup>

**Abb. 25** Ausschnitt aus dem Vergleich der Aminosäuresequenzen der α-Untereinheit der ADP-ACS I von *P. furiosus* mit den α-Untereinheiten bekannter und putativer ADP-ACS sowie der Succinyl-CoA Synthetase (SCS) aus *E. coli*. Folgende Aminosäuresequenzen wurden in den Vergleich einbezogen: AcdA I, AcdB I, AcdAll, AcdBII aus *P. furiosus*; PH1517, PH1739, PH0766, PH1788, PH1928, PH0625, PH1789 aus *P. horikoshii*; PAB1937, PAB0303, PAB0854, PAB2113, PAB1230, PAH1431 aus *P. abyssi*; AF1211, AF1938, AF1511, AF1192, AF0932 aus *A. fulgidus*; TA1153 aus *Thermoplasma acidophilum*; MJ0590 aus *M. jannaschii*; ACS3 aus *Halobacterium spec.*; ADP-ACS aus *Giardia lamblia*; ADP-ACS aus *Entamoeba histolytica*; MLR6591 aus *Mezorhizobium loti*; VCA0574 aus *Vibrio cholerae*; YFIQ aus *E. coli*, SC8A63C aus *Streptomyces coelicolor* und SCSα aus *E. coli*. Die Position im Protein sind angegeben. Das His<sup>246</sup> aus der SCS und die homologen Histidine der anderen Proteine sind schwarz unterlegt, identische oder ähnliche Aminosäuren sind grau untererlegt.

Die zielgerichtete Mutagenese erfolgte mittels zweier Oligonukleotide, die in ihrem zentralen Bereich die Mutation des Histidin-Codons 249 CAC gegen GAC für Aspartat enthielten. Die Sequenz des erhaltenen Expressionsplasmides acdAF1211pET17b enthielt das neue Aspartat-Codon, die Sequenz des restlichen Gens war fehlerfrei. Das Expressionsplasmid wurde mit acdAF1211His<sup>249</sup>AsppET17b (*A. fulgidus* Acetyl-CoA Synthetase ADP-bildend Gen AF1211 in den das Histidin an der Position 249 gegen Aspartat ausgetauscht wurde in pET17b) bezeichnet. Das erfolgreich mutierte Gen wurde anschließend exprimiert und charakterisiert.

#### 4.5.1 Expression und Reinigung des mutierten Proteins

Das mutierte Protein ADP-ACS AF1211His<sup>249</sup>Asp wurde mit der gleichen Methode exprimiert und gereinigt wie das unmutierte Enzym ADP-ACS AF1211 (3.7.4). Das erhaltene Protein zeigte jedoch keine Aktivität. Nach Hitzefällung, Anionenaustausch- und Gelfiltrationschromatographie wies das Protein eine Reinheit von mehr als 90% auf (Abb. 26).



**Abb. 26** Reinigung der rekombinanten ADP-ACS AF1211 His<sup>249</sup>Asp von *A. fulgidus*. Das Protein wurde über ein 12%-iges Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Aufgetragen wurden in der Spur 1, Standard (Proteingemisch VII-L von Sigma; Spur 2, 10 µg Rohextrakt (S100); Spur 3, 2 µg des Extrakt-Überstandes nach Erhitzung (30 min, 80°C) und Zentrifugation; Spur 4, 1.2 µg der ADP-ACS MJ0590 nach Anionenaustauschchromatographie (DEAE-Sepharose); Spur 5, 1.2 µg des gereinigten Enzyms nach der Gelfiltration.

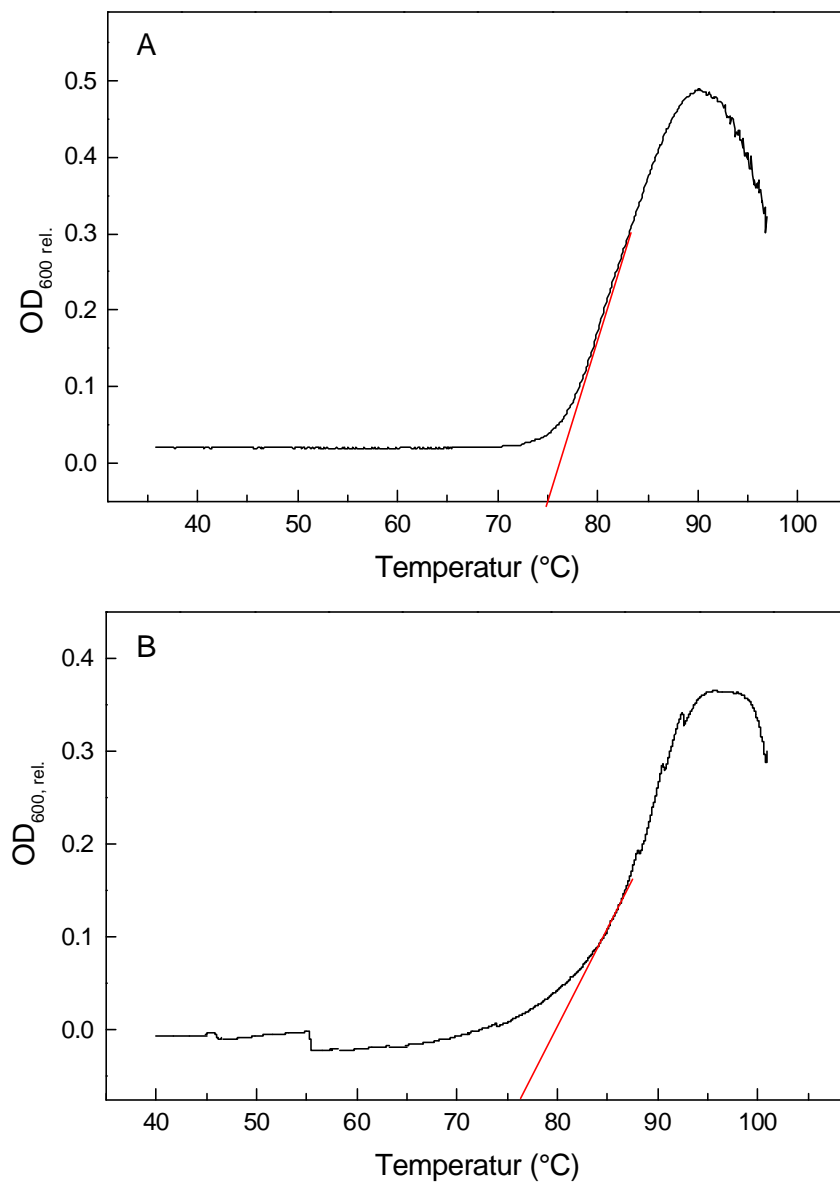
#### 4.5.2 Biochemische Charakterisierung des mutierten Proteins

##### 4.5.2.1 Molekularmasse

Die apparente Molekularmasse des rekombinanten Enzyms ADP-ACS AF1211His<sup>249</sup>Asp wurde mittels Gelfiltration mit 140 kDa bestimmt. Somit scheint die Oligomerisierungsstruktur ( $\alpha_2$ ) des unmutierten Proteins im mutierten Protein erhalten geblieben zu sein.

#### 4.5.2.2 Aggregationstemperaturen

Die Aggregationstemperatur ist ein indirektes Maß für den Faltungszustand eines Proteins. Diese wurde sowohl von der rekombinanten ADP-ACS AF1211 (Abb 27 A) als auch von der mutierten, rekombinanten ADP-ACS AF1211His<sup>249</sup>Asp (Abb. 27 B) durch graphische Extrapolation auf etwa 75°C bestimmt. Sie entsprach damit ungefähr dem Temperaturoptimum der ADP-ACS AF1211, das bei 77°C lag. Der Austausch des Histidins gegen Aspartat änderte das Aggregationsverhalten der ADP-ACS AF1211His<sup>249</sup>Asp nicht.



**Abb. 27** Streuungsintensität (OD<sub>600</sub>) in Abhängigkeit von der Temperatur beim rekombinanten Wildtyp-Enzym ADP-ACS AF1211 von *A. fulgidus* (A) im Vergleich zur Mutante ACS1211His<sup>249</sup>Asp (B). Beide Proteine wurden in einer Konzentration von 100 µg/ml eingesetzt. Bestimmung der Aggregationstemperatur durch graphische Extrapolation (roten Linien).

Diese Mutation bewirkt den völligen Verlust der Enzymaktivität und ist demnach nicht Folge eines geänderten Faltungszustandes. Nach dem Versuch war eine starke Trübung der Lösung sichtbar, die durch Abkühlung nicht rückgängig gemacht werden konnte, was auf eine irreversible Denaturierung des Proteins schließen läßt.

Die Ergebnisse zeigen, daß das mutierte inaktive Protein ADP-ACS AF1211His<sup>249</sup>Asp gleiche molekulare Eigenschaften, ein gleiches Verhalten bei der chromatographischen Reinigung und ein gleiches Aggregationsverhalten, wie die unmutierte aktive ADP-ACS AF1211, hat. Die Daten werden so interpretiert, daß das His<sup>249</sup> der ADP-ACS AF1211, in Analogie zum am Reaktionsmechanismus der SCS von *E.coli*, an der Phosphorylierung des Enzyms beteiligt ist.

## 5 Diskussion

Die ADP-bildende Acetyl-CoA Synthetase (ADP-ACS) repräsentiert ein neuartiges Enzym der Acetat-Bildung und Energiekonservierung ( $\text{Acetyl-CoA} + \text{ADP} + \text{P}_i \rightleftharpoons \text{Acetat} + \text{ATP} + \text{CoA}$ ) in *Archaea* und eukaryotischen amitochondriaten Protisten. Die einzigen bisher charakterisierten ADP-ACS in *Archaea* sind zwei Isoformen (I und II) aus *Pyrococcus furiosus*, die gereinigt und biochemisch charakterisiert worden sind (Glasemacher et al., 1997; Mai, Adams, 1996). In dieser Arbeit wurden die Identifizierung der für die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit der ADP-ACS Typ I von *P. furiosus* kodierenden Gene (*acdAI* und *acdBI*), ihre Klonierung und funktionelle Expression in *E. coli* dokumentiert. Weiterhin wurden drei unbekannte ORFs aus *Archaeoglobus fulgidus* (AF1211, AF1938) und *Methanococcus jannaschii* (MJ0590) als Gene identifiziert, deren Proteine als ADP-ACS charakterisiert werden konnten. Diese Proteine stellten Fusionen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit der ADP-ACS von *P. furiosus* dar. Die *Archaeoglobus*-Proteine konnten aufgrund ihrer molekularen Eigenschaften und ihrer unterschiedlichen Substratspezifitäten als Isoenzyme beschrieben werden. Schließlich konnten durch gerichtete Mutation der ADP-ACS AF1211 von *A. fulgidus* erste Hinweise auf den Reaktionsmechanismus gewonnen werden.

### 5.1 Identifizierung und Expression der ADP-ACS Isoform I aus *P. furiosus*

In der vorliegenden Arbeit wurde die Identifizierung zweier ORFs im Genom von *P. furiosus* über ihre N-terminalen Aminosäuresequenzen dokumentiert, die für die funktionalen Gene der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit der ADP-ACS Isoform I, *acdAI* und *acdBI*, kodieren. Die Gene liegen an verschiedenen Stellen im Genom, d.h. es liegt keine Operonstruktur vor. Ihre Identifikation wurde durch heterologe Überexpression in *E. coli* überprüft, die einzelnen Untereinheiten zeigten keine ADP-ACS-Aktivität. Die Rekonstitution zu einem aktiven Heterotetramer gelang durch gemeinsame Inkubation der beiden Untereinheiten mit anschließende Hitzebehandlung bei 80°C. Auch ohne Erhitzung konnte ADP-ACS-Aktivität gemessen werden, jedoch in deutlich geringeren Raten, als bei den hitzebehandelten Extrakten. Das läßt darauf schließen, daß die Temperaturbehandlung für die korrekte Oligomerisierung des Enzyms wichtig ist. Die gewählte Temperatur entspricht den *in vivo*-Bedingungen in den hyperthermophilen Habitaten von *P. furiosus* mit Wachstumstemperaturen zwischen 70°C und 106°C (Stetter et al., 1987).

Bis heute sind viele thermostabile Proteine von *Pyrococcus*-Spezies und anderen hyperthermophilen *Archaea* und *Bacteria* funktionell in *E. coli* exprimiert worden (Adams, 1996; Leuschner, Antranikian, 1995). Die meisten dieser Enzyme sind entweder monomer oder homooligomer aus einer einzigen Untereinheit zusammengesetzt (dimer, tetramer, hexamer, dodekamer). Somit werden die rekombinanten Proteine aus der Expression einzelner kodierender Gene erhalten. Bisher sind nur drei heterooligomere Enzyme von hyperthermophilen Organismen funktionell in *E. coli* überexprimiert worden: Die reverse

Gyrase von *Methanopyrus kandleri* (Krah et al., 1997), ein heterodimeres Enzym ( $\alpha\beta$ ;  $\alpha$ , 138 kDa;  $\beta$ , 43 kDa), die DNA Topoisomerase VI von *Sulfolobus* (Buhler et al., 1998), ein heterotetrameres Enzym ( $\alpha_2\beta_2$ ;  $\alpha$ , 47 kDa;  $\beta$ , 60 kDa) und die Indolpyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (IOR) von *Pyrococcus kadakaraensis* (Siddiqui et al., 1998), ebenfalls ein heterotetrameres Enzym ( $\alpha_2\beta_2$ ;  $\alpha$ , 71 kDa;  $\beta$ , 24 kDa).

Bei allen drei Enzymen wurden, wie bei der ADP-ACS I von *P. furiosus*, die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten getrennt in *E. coli* exprimiert und durch *in vitro*-Rekonstitution aus den rekombinanten Untereinheiten zu einem aktiven Enzym oligomerisiert. Für die IOR wurde zusätzlich eine Ko-Expression der im Tandem angeordneten Gene, die für die Untereinheiten kodierten, beschrieben (Siddiqui et al., 1998). Alle drei Enzyme mußten erhitzt werden, um volle Aktivität zu zeigen. Das Heterooligomer der reversen Gyrase von *Methanopyrus kandleri* war ohne Erhitzung nicht stabil und die IOR von *P. kadakaraensis* zeigte ohne Erhitzung nur geringe Aktivität. Erst nach gemeinsamer Erhitzung der beiden Untereinheiten zeigten beide Enzyme volle Aktivität und Stabilität. Wurden die Untereinheiten der IOR zuerst getrennt erhitzt, zeigten sie nach Vereinigung keine Aktivität, auch eine nachfolgende Erhitzung konnte dies nicht ändern. Diese Resultate wurden so gedeutet, daß einmal erhitzte Untereinheiten sich falsch falten und dann nicht mehr für die korrekte Oligomerisierung genutzt werden können (Siddiqui et al., 1998). Bei der ADP-ACS I von *P. furiosus* war dies jedoch nicht der Fall, auch die vor der Vereinigung erhitzten Untereinheiten ließen sich zum aktiven Holoenzym rekonstituieren. Es wurde gezeigt, daß schon die getrennt exprimierten und erhitzten Untereinheiten als  $\alpha_2$ - (90 kDa) bzw.  $\beta_2$ -Dimer (55 kDa) vorliegen. Diese Anordnung scheint die  $\alpha_2\beta_2$ -Oligomerisierung sterisch nicht zu behindern, was vermuten läßt, daß auch im nativen Enzym die  $\alpha_2$ - und  $\beta_2$ -Untereinheiten eng miteinander verbunden sind und sich durch Erhitzung problemlos zum Holoenzym rekonstituieren lassen.

Der Vergleich der molekularen und kinetischen Eigenschaften der rekombinanten ADP-ACS I (Acd I) mit dem aus *P. furiosus* gereinigten Protein (Glasemacher et al., 1997) zeigte, daß beide Enzyme weitgehend identisch sind, bis auf die geringere spezifische Aktivität der rekombinanten ADP-ACS I: Die Maximalgeschwindigkeit ( $V_{\max}$ ) des rekombinanten Enzyms war sowohl in Richtung der Acetat-Bildung, als auch in Richtung der Acetyl-CoA-Bildung um jeweils etwa 50% geringer. Dies könnte auf eine unvollständige Oligomerisierung oder die Notwendigkeit von zusätzlichen *in vivo*-Faktoren, wie z.B molekularen Chaperonen (Ellis, van, V, 1991; Frydman, Hartl, 1996), zurückzuführen sein. Die Ausbeuten der rekombinanten Expression und Reinigung waren jedoch um ein vielfaches höher, als die der nativen Reinigung. Zusätzlich kann *E. coli* bei wesentlich einfacheren Bedingungen kultiviert werden, als es bei der Kultivierung von *P. furiosus* der Fall ist. Mittels eines effizienten Reinigungsverfahrens stand die ADP-ACS I für eine umfassende Charakterisierung in ausreichender Menge zur Verfügung.

Neben der Größe und Zusammensetzungen des Enzyms stimmten auch die kinetischen Parameter und das Temperaturverhalten der rekombinanten ADP-ACS sehr gut mit der nativen ADP-ACS I von *P. furiosus* überein. Die Substratspezifitäten der Enzyme

unterscheiden sich kaum voneinander, beide nutzen vor allem Acetat. Propionat und Butyrat sind ebenfalls sehr gute Substrate, während unverzweigte Acyl-Säuren und Aryl-Säuren als Abkömmlinge aromatischer Aminosäuren nicht bzw. kaum umgesetzt wurden.

Die Gensequenzen der Untereinheiten der Acd I von *P. furiosus* wiesen keine Ähnlichkeiten zur Acetat-Kinase oder zur Phosphotransacetylase der *Bacteria* auf, die in der Summe die gleiche Reaktion katalysieren. Damit kann ausgeschlossen werden, daß die ADP-ACS mit diesen Enzymen phylogenetisch verwandt ist (Schäfer et al., 1993). Ebenfalls konnten keine Gemeinsamkeiten mit den Genen der AMP-ACS gefunden werden, die die Aktivierung von Acetat in allen drei Domänen des Lebens katalysiert.

## 5.2 Identifizierung putativer ADP-ACS in *Archaea*, *Eukarya* und *Bacteria*

Nach der Identifizierung der Gene für die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit der ADP-ACS I (Acd I) aus *P. furiosus* konnten Sequenzvergleiche mit der immer größer werdenden Anzahl verfügbarer Sequenzen in den Datenbanken durchgeführt werden, um weitere putative ADP-ACS zu identifizieren. Die BLAST-Suche in den zugänglichen Datenbanken ergab große Ähnlichkeiten zu einer Anzahl von bisher noch nicht charakterisierten Proteinen in allen drei Domänen, die durch hypothetische ORFs kürzlich sequenzierter Genome kodiert werden (Abb. 14), aber auch zu ORFs aus dem Protisten *Giardia lamblia* (Lindmark, 1980; Sanchez et al., 1999) und der erst kürzlich sequenzierten ADP-ACS aus *Entamoeba histiolytica* (Reeves et al., 1977; Ruepp et al., 2000). Die höchsten Ähnlichkeiten ergaben sich mit hypothetischen ORFs aus der Domäne der *Archaea*. Interessanterweise enthalten die vollständig sequenzierten Genome der *Pyrococcus*-Spezies *P. horikoshii* (Kawarabayasi et al., 1998) und *P. abyssi* (Genoscope, 1999) fünf homologe Gene der  $\alpha$ -Untereinheit, aber nur zwei homologe Gene für die  $\beta$ -Untereinheit. Die ORFs PH1517 und PAB1937 mit sehr hohen Identitäten (93% und 94%) kodieren vermutlich für die entsprechende ADP-ACS I Untereinheit  $\alpha$ , PH1739 und PAB0303 für die Untereinheit  $\beta$  der ADP-ACS I. Die von den ORFs abgeleiteten Sequenzen der Untereinheiten der ADP-ACS II, die durch die N-terminalen Sequenzen aus der Reinigung von Adams (Mai, Adams, 1996) bestimmt wurden, finden ebenfalls ihre Entsprechungen in den Genomen von *P. horikoshii* und *P. abyssi* (PH0766, PAB0854,  $\alpha$ ; PH1788, PAB2113,  $\beta$ ). Die Aminosäuresequenz der ADP-ACS II zeigte eine Identität der Sequenz von 44% zu der ACS I von *P. furiosus*, eine ähnliche Identität wurde zu den anderen drei homologen Proteinen der  $\alpha$ -Untereinheit in den verschiedenen *Pyrococcus*-Spezies gefunden (37-44%). Alle fünf Proteine sind in etwa gleich groß (440-462 AS), was auch für die zwei homologen Proteine der  $\beta$ -Untereinheit zutrifft (232-238 AS). Welche Funktion die anderen drei hypothetischen Proteine haben, bleibt zu untersuchen. Es wäre möglich, daß sie mit den  $\beta$ -Untereinheiten der ADP-ACS I oder II zu einem funktionellen Enzym zusammentreten. Dieses Phänomen ist z.B. für die ATP- und GTP-spezifischen Isoformen der Succinyl-CoA Synthetase der Taube beschrieben (Johnson et al., 1998). Beide Isoformen benutzen dieselbe  $\alpha$ -Untereinheit, aber verschiedene  $\beta$ -



Untereinheiten. Eine weitere Möglichkeit wäre, daß sie für funktionslose Relikte aus Genduplikationen bzw. für nicht mehr genutzte Gene kodieren. Dieselbe Anzahl von homologen ORFs im archaeellen Sulfatreduzierer *Archaeoglobus fulgidus* (Klenk et al., 1997) spricht jedoch dagegen. Die feste Anzahl und die offensichtlich unabhängige Replikation der Gene in *A. fulgidus* und den *Pyrococcus*-Stämmen deutet auf eine wichtige Rolle der Enzyme im Metabolismus der Organismen hin.

Die ORFs in *Archaeoglobus* werden jedoch nicht durch zwei getrennte Gene kodiert, sondern durch fusionierte ORFs, die entweder in  $\alpha\beta$ - oder in  $\beta\alpha$ -Orientierung angeordnet sind (Abb. 15). Zwei dieser putativen ORFs (AF1211 und AF1511) weisen eine  $\alpha\beta$ -Orientierung auf, wobei AF1511 am N-Terminus noch eine zusätzliche, 188 AS lange Domäne besitzt, die weder zur  $\alpha$ - noch zur  $\beta$ -Untereinheit homolog ist. Bei den anderen drei ORFs (AF1938, AF1192 und AF0932) findet man eine  $\beta\alpha$ -Anordnung der Untereinheiten. Dieser neuartige Aufbau von putativen ADP-ACS wurde bisher in *Archaea* nicht beschrieben, wohl aber in dem eukaryotischen Protisten *G. lamblia* (Sanchez et al., 1999). Für dieses Enzym wurden jedoch nur die heterologe Expression und die Ermittlung von drei kinetischen Konstanten beschrieben. Eine detaillierte biochemische Untersuchung und eine Analyse der molekularen Masse des Enzyms und der Untereinheiten stehen noch aus.

Unter den archaeellen ORFs befinden sich außerdem noch jeweils ein putatives Protein von *Thermoplasma acidophilum* (Ruepp et al., 2000), *Methanococcus jannaschii* (Bult et al., 1996) und *Halobacterium spec.* (Ng et al., 2001). Bis auf *Halobacterium spec.* machen die homologen Bereiche zu den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten von *P. furiosus* in den fusionierten ORFs jeweils etwa die Summe der einzelnen Untereinheiten aus, der homologe Teil der  $\alpha$ -Untereinheit des Proteins aus *Halobacterium* besteht jedoch nur aus 294 AS, statt aus 440 bis 483 AS. Es wäre interessant zu untersuchen, ob dieses relativ „kurze“ Protein eine ADP-ACS-Aktivität besitzt.

In der Domäne der *Bacteria* finden sich Proteine zweier  $\gamma$ -Proteobakterien, ein hypothetischer ORF von *Escherichia coli* (YFIQ; Perna et al., 2001) und einer von *Vibrio cholerae* (VCA0574; Heidelberg et al., 2000). Weitere putative ADP-ACS-Sequenzen zeigen das  $\alpha$ -Proteobakterium *Mezorhizobium loti* (MLR6591, Kaneko et al., 2000), das zu der Stickstoff-fixierenden Rhizobiengruppe gehört, sowie das Gram-positive Bakterium *Streptomyces coelicolor* (SC8A603C, Sanger Institute, 1997). In vielen anderen Genomen, z.B. denen der Gram-positiven Bakterien *Bacillus subtilis* und *Clostridium acetobutylicum* sowie in Hefe und vermutlich allen höheren Eukaryoten, sind keine ADP-ACS-ähnlichen Gene zu finden.

Homologe der ADP-ACS sind in allen drei Domänen zu finden, die Funktion dieser putativen ADP-ACS in der Domäne der *Bacteria* ist jedoch unbekannt. Da die Genome der meisten *Bacteria* auch für die Gene der Phosphotransacetylase und der Acetat-Kinase kodieren, werden diese hypothetischen ADP-ACS wahrscheinlich nicht die Acetat-Bildung katalysieren. Die Aufklärung der physiologischen Funktion erfordert jedoch die Expression und Charakterisierung dieser Proteine.

Die phylogenetische Verteilung der putativen ADP-ACS ist ungewöhnlich, aus welcher Domäne die Gene ursprünglich stammen, kann zur Zeit nicht beantwortet werden. Auch kann nicht gesagt werden, ob die separate Anordnung der Gene und Polypeptide in *Pyrococcus* auf ein Gensplitting von fusionierten ADP-ACS zurückzuführen ist oder ob die fusionierten ADP-ACS ein Resultat eines Fusionsereignisses von ADP-ACS-Vorfahren mit separaten Genen und Polypeptiden sind. Auf jeden Fall scheint die separate Anordnung der Untereinheiten und ihrer Gene, wie es in den *Pyrococcus*-Enzymen der Fall ist, eine Ausnahme zu sein.

### 5.3 Neuartige Isoenzyme aus *Archaeoglobus fulgidus*

Um zu überprüfen, ob es sich bei den identifizierten homologen ORFs in *A. fulgidus* um funktionelle ADP-ACS handelt, wurden zwei der fünf ORFs, *acdAF1211* und *acdAF1938*, mit der höchsten Sequenzidentität zu der bekannten ADP-ACS I von *P. furiosus* und mit unterschiedlichen Orientierungen der homologen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit ( $\alpha\beta$  und  $\beta\alpha$ ) weiter untersucht. Die Gene *acdAF1211* und *acdAF1938* wurden in geeignete Vektoren kloniert. Ein Vektor diente der Expression der nativen Form (pET 17b), ein anderer der Expression als Fusionsprotein mit einem His-tag (pET19b). Diese Fusion erleichtert die Reinigung erhaltener Proteine, insbesondere funktionsloser Proteine oder solcher mit unbekannter Funktion. Eine Untersuchung der Codon-Auswahl für das Gen *acdAF1211* zeigte, daß die für Arginin kodierenden Codons AGG und AGA in *E. coli* sehr selten genutzt werden, sie aber 85% aller Kodierungen für Arginin in dem Gen AF1211 ausmachen. Nur durch Co-Expression mit dem Plasmid pUBS520 (Brinkmann et al., 1989), welches zusätzliche Gene für die tRNAs AGA und AGG besitzt, konnte sowohl in pET17b als auch in pET19b eine starke Überexpression eines einzelnen Proteins mit etwa 70 (in pET17b) bzw. 72 kDa (in pET19b) induziert werden. Die Expression eines ungefähr 2 kDa größeren Proteins im Plasmid *acdAF1938pET19b* ist auf die zusätzlichen 23 Aminosäuren des His-tags zurückzuführen. Der größte Teil des Proteins lag jedoch nicht in löslicher Form im Cytoplasma vor, sondern wie sich nach Aufschluß und Zentrifugation der Zellen zeigte als Einschlußkörper im Pellet nicht löslicher Proteine und Zelltrümmer. Einschlußkörper können entstehen, wenn bei der Überexpression zuviel Protein in zu kurzer Zeit gebildet wird. Hydrophobe Bereiche der gebildeten Proteine aggregieren und liegen somit nicht in nativer Konformation vor. Durch kürzere Kultivierung bei geringeren Temperaturen kann die Aggregation oft verhindert oder reduziert werden. Optimierungsexperimente führten zu einer maximalen Ausbeute löslichen Proteins durch Verkürzung der Expression auf zwei Stunden bei 20°C mit dem Stamm *E. coli* BL21(DE3)pUBS520 *acdAF1938pET19b*, das dann gereinigt und charakterisiert werden konnte.

Beide *Archaeoglobus*-Proteine zeigten ADP-ACS-Aktivität. Die ADP-ACS AF1211 konnte 10-fach bis zu einer spezifischen Aktivität von 85 U/mg bei 55°C und mit einer Ausbeute von 55% gereinigt werden. Bei der Reinigung der ADP-ACS AF1938 wurde eine spezifische Aktivität von 1.5 U/mg erreicht. Die Gründe für diese geringe spezifische Aktivität sind nicht

bekannt. Möglich wäre ein Einfluß des His-tags auf die Katalyseaktivität, wie es z.B. für die cytosolische Pyrophosphatase von *Sulfolobus* (Hansen, 1998) beschrieben ist. Mit der Expression und Reinigung der Proteine, die durch die *Archaeoglobus*-ORFs AF1211 und AF1938 kodiert sind, stand genügend Protein zur Verfügung, um die Enzyme eingehend zu charakterisieren.

Die Ergebnisse zeigten, daß die Fusionsgene für funktionelle Enzyme kodieren. Die Untereinheiten der Enzyme haben eine molekulare Masse von ca. 74 kDa. Beide Enzyme haben eine native Größe von jeweils 140 kDa und scheinen somit als  $\alpha_2$ -Homodimere vorzuliegen. Das Temperaturoptimum der ADP-ACS I (AF1211) lag bei 77°C, was in etwa den *in vivo*-Bedingungen entspricht. Das Enzym zeigte eine hohe Thermostabilität, an der vor allem Wasserstoffbrückenbindungen und Salzbrücken beteiligt sind (Vogt, Argos, 1997; Vogt et al., 1997; Ermler et al., 1997). Ob und wie viele Salzbrücken an der Thermostabilität der ADP-ACS AF1211 beteiligt sind, bleibt noch zu untersuchen.

#### 5.4 Hypothetische Funktion der Isoenzyme aus *A. fulgidus*

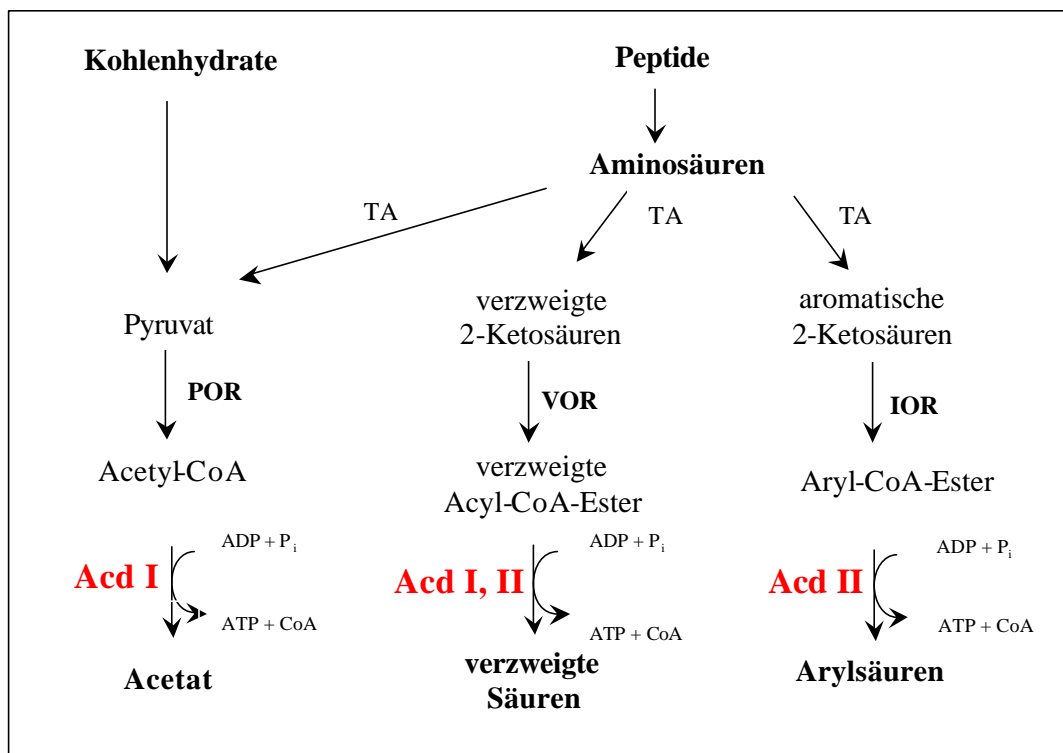
Die Bestimmung der Substratspezifitäten ergab, daß die ADP-ACS AF1211 neben Acetat vor allem unverzweigte Acyl-Säuren, aber auch in einem hohen Maß die verzweigte Acyl-Säure Isobutyrat nutzt. Abkömmlinge aromatischer Aryl-Säuren und die unverzweigten Säuren Succinat und Fumarat wurden, ähnlich wie bei der ADP-ACS I (Acd I) von *P. furiosus*, kaum umgesetzt. Die ADP-ACS AF1938 zeigte im Gegensatz zu der ADP-ACS I von *P. furiosus* und der ADP-ACS AF1211 eher eine Substratspezifität, die der des nativ von Adams gereinigten Isoenzym II aus *P. furiosus* (ADP-ACS II) entsprach (Mai, Adams, 1996). Das Enzym setzte vor allem Arylsäuren aus aromatischen Aminosäuren um, während Acetat nur mit geringer Aktivität genutzt wurde.

Basierend auf den verschiedenen Substratspezifitäten und den kinetischen Konstanten für verschiedene CoA-Ester und deren korrespondierenden Säuren, können die durch *acd* AF1211 und *acd* AF1938 kodierten ADP-ACS, in Analogie zu den Isoenzymen I und II der ADP-ACS von *P. furiosus*, als Isoenzyme betrachtet werden. Diese Hypothese kann durch die bevorzugte Nutzung von Acetyl-CoA, nicht aber von Phenylacetyl-CoA, durch das Enzym ADP-ACS AF1211 (ADP-ACS I) begründet werden. Somit ist das Enzym ähnlich zu der ADP-ACS I von *P. furiosus*, das in erster Linie an der Acetat-Bildung beteiligt ist (Mai, Adams, 1996; Adams et al., 2001). Im Gegensatz dazu nutzte die ADP-ACS AF1938 (ADP-ACS II) bevorzugt Phenylacetyl-CoA gegenüber Acetyl-CoA und ist somit ähnlich zu der ADP-ACS II von *P. furiosus*, die in den Abbau aromatischer Aminosäuren involviert ist (Mai, Adams, 1996; Adams et al., 2001).

In Analogie zu *P. furiosus* wird ein Schema (Abb. 28) der möglichen Funktion der ADP-ACS Isoenzyme ADP-ACS I (AF1211) und ADP-ACS II (AF1938) in der Zucker- und Peptidfermentation vorgeschlagen. Demnach ist die ADP-ACS I, die eine hohe Affinität zu Acetyl-CoA hat und Phenylacetyl-CoA nicht umsetzt, wahrscheinlich an der Acetyl-CoA-

Umsetzung zu Acetat als Teil der Stärke- und Peptidfermentation über Pyruvat beteiligt. Die Bildung von Acetyl-CoA aus Pyruvat wird von der Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase katalysiert (POR). Das kodierende Gen ist in *A. fulgidus* vorhanden, und das Enzym ist gereinigt worden (Kunow et al., 1995).

Die ADP-ACS II ist vor allem in den Abbau von Aryl-CoA-Estern zu den korrespondierenden Säuren als Teil des Abbaus von aromatischen Aminosäuren (Phenylalanin) über aromatische 2-Ketosäuren einbezogen. Das Enzym hat eine hohe Affinität für Phenylacetyl-CoA (Aryl-CoA-Ester). Weiterhin nehmen sowohl die ADP-ACS I (AF1211) als auch die ADP-ACS II (AF1938) am Abbau verzweigter Aminosäuren (Valin, Leucin und Isoleucin) über verzweigte Acyl-CoA-Ester teil.



**Abb. 28 Hypothetische Funktion der ADP-bildenden Acetyl-CoA Synthetasen Isoenzyme Acd I (ADP-ACS AF1211) und Acd II (ADP-ACS AF1938) in *A. fulgidus* in Analogie zur Funktion der Acd I und II aus *P. furiosus* (Mai, Adams, 1996).** Die Umsetzung von Stärke zu Pyruvat erfolgt über einen modifizierten Embden-Meyerhof-Weg. Über die POR erfolgt der Abbau zu Acetyl-CoA. Die ADP-ACS Isoform I (Acd I) bildet dann unter ATP-Gewinn Acetat. Verzweigte Acyl-CoA-Ester, die aus verzweigten Aminosäuren wie Valin, Leucin und Isoleucin durch die Umwandlung mit der VOR stammen, werden sowohl von der Isoform I (Acd I) als auch von der Isoform II (Acd II) als Substrate verwendet. Aryl-CoA-Ester aus aromatischen Aminosäuren, wie Phenylalanin, werden in *A. fulgidus* jedoch nur mit der Acetyl-CoA Synthetase Isoform II (Acd II) unter Energiegewinn oxidiert.

Abkürzungen: TA = Transaminase, POR = Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase, VOR = 2-Ketoisovalerat:Ferredoxin-Oxidoreduktase, DR = Indolpyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase, Acd I und II = Acetyl-CoA Synthetase (ADP-bildend) Isoform I und II.

Durch die Reinigung einer vor allem Acetat-verwertenden ADP-ACS aus *A. fulgidus* Stamm 7324 (Hansen und Schönheit, unveröffentlicht), deren N-terminale Aminosäuresequenz darauf hindeutet, daß es sich um das ADP-ACS AF1211-Homolog handelt, kann die Annahme, daß es sich bei der ADP-ACS AF1211 um das Hauptenzym der Acetat-Bildung in *A. fulgidus* handelt, noch unterstützt werden. Zusätzlich weisen RT-PCR-Experimente mit Stärke- und Hefeextrakt-gewachsenen Zellen darauf hin, daß die beiden ORFs *acd* AF1211 und *acd* AF1938 *in vivo* unter diesen Wachstumsbedingungen wie postuliert exprimiert werden.

Ferner sollte bemerkt werden, daß im Genom von *A. fulgidus* die zu *P. furiosus* homologen Gene für die Bildung von Aryl-CoA-Estern, wie die Indolpyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (IOR) und das Gen für die Bildung von verzweigten Acyl-CoA-Estern, 2-Ketoisovalerat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (VOR), enthalten sind (Klenk et al., 1997). Das Vorhandensein dieser Gene unterstreicht den vorgeschlagenen Abbauweg.

### 5.5 Expression und Charakterisierung der ADP-ACS MJ0590 von *M. jannaschii*

Der einzige ORF (MJ0590) aus *Methanococcus jannaschii*, der zur ADP-ACS von *P. furiosus* homolog ist, weist, wie die *Archaeoglobus*-ORFs, eine fusionierte Anordnung der kodierten  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten in  $\alpha\beta$ -Orientierung auf. Die Expression des Plasmides *acd*MJ0590pET17b konnte nur im Stamm *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL gezeigt werden. Nach Hitzefällung und zwei Chromatographieschritten wies das Protein eine Reinheit von etwa 80-90% und eine Aktivität von 2.5 U/mg auf. Die apparente Molekularmasse des nativen Enzyms wurde mit 160 kDa bestimmt. Bei einer berechneten molekularen Masse der Untereinheit von 78 kDa weisen diese Daten auf ein  $\alpha_2$ -Homodimer hin. Das Enzym setzt in hohen Raten Acetyl-CoA und Butyryl-CoA, nicht aber Phenylacetyl-CoA, um. Dieses entspricht den Werten der rekombinanten ADP-ACS AF1211 von *A. fulgidus*. Im Gegensatz dazu zeigte das Enzym unter den gewählten Reaktionsbedingungen keine signifikante Rate in die entgegengesetzte Reaktionsrichtung, d.h. in die ATP- und CoA-abhängige Umsetzung von Acetat oder anderen Säuren zu den korrespondierenden CoA-Estern. Die Ursachen für die Irreversibilität sind nicht bekannt.

Die Daten zeigen, daß der ORF MJ0590 aus *M. jannaschii* für eine homodimere ADP-bildende Acetyl-CoA Synthetase kodiert, deren Untereinheit einer Fusion der homologen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit von der *acdI* von *P. furiosus* entspricht. Da für *M. jannaschii* keine Acetat-Bildung beschrieben ist, können über die physiologische Rolle dieses Enzym *in vivo* nur Vermutungen gemacht werden. Bei vielen Methanogenen, u.a. *Methanococcus jannaschii*, wurde Glycogen als Speicherstoff gefunden (König et al., 1985; Yu et al., 1994), dem man eine Rolle als endogenen Elektronendonator unter limitierten Wachstumsbedingungen zuschreibt (König et al., 1985). Bei der Metabolisierung dieses Glycogens über Acetyl-CoA zu Acetat könnte die ADP-ACS eine Rolle spielen. Ob das der Fall ist, bleibt genauer zu untersuchen.

## 5.6 Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus der ADP-ACS

Aufgrund von ausgedehnteren Sequenzvergleichen dieser Arbeit und einer kürzlich durchgeführten Sequenzstudie von Sanchez et al. (Sanchez et al., 1999), denen die Aminosäuresequenzen der ADP-ACS von *P. furiosus* und *G. lamblia* zugrunde gelegt wurden, sind zusätzlich zu den schon bekannten putativen ORFs einige Proteine mit bekannter enzymatischer Funktion gefunden worden. Diese Proteine hatten eine weit geringere Gesamtidentität zu den ADP-ACS von *P. furiosus*, als die hier untersuchten ORFs von *Archaeoglobus* oder *Methanococcus*. Unter den Proteinen befanden sich z.B. die Succinyl-CoA Synthetase von *E. coli* (Buck, Guest, 1989), die Malyl-CoA Synthetase von *Methylobacterium extorquens* (Chistoserdova, Lidstrom, 1994), die humane ATP-Citrat Lyase (Elshourbagy et al., 1992) und die Pimeloyl-CoA Synthetase von *Pseudomonas medocina* (Binieda et al., 1999). Trotz der geringeren Gesamtidentität zur ADP-ACS von *P. furiosus* von 8-12% haben diese Enzyme gemeinsam, daß sie eine ADP- oder GDP-bildende Synthetase-Reaktion katalysieren. So ist die Succinyl-CoA Synthetase (SCS) Bestandteil des Citrat-Zyklus in den Mitochondrien und katalysiert ATP- bzw. GTP-Bildung durch Substratstufenphosphorylierung ( $\text{Succinyl-CoA} + \text{ADP} + \text{P}_i \rightleftharpoons \text{Succinat} + \text{ATP} + \text{CoA}$ ) und spielt somit in den Mitochondrien eine essentielle Rolle. In *Pyrococcus* ist die Bedeutung der ADP-ACS wahrscheinlich noch größer, da sie vermutlich die einzige energieliefernde Reaktion beim Abbau von Pyruvat und Stärke katalysiert.

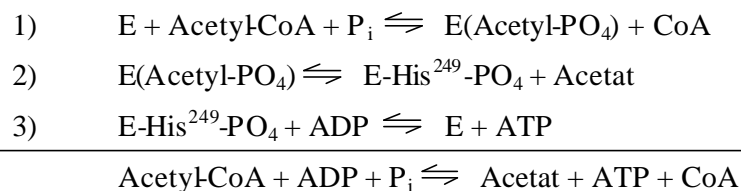
Die übrigen gefundenen Enzyme katalysieren folgende Reaktionen: Die Malyl-CoA Synthetase aus dem Serin-Weg der Methyloproten katalysiert die Bildung von Malyl-CoA aus Malat, ATP und CoA ( $\text{Malat} + \text{ATP} + \text{CoA} \rightleftharpoons \text{Malyl-CoA} + \text{ADP} + \text{P}_i$ ). Die humane ATP-Citrat Lyase katalysiert die Acetyl-CoA-Bildung aus dem aus den Mitochondrien ins Cytosol transportierten Citrat ( $\text{Citrat} + \text{ATP} + \text{CoA} \rightleftharpoons \text{Acetyl-CoA} + \text{ADP} + \text{Oxalacetat} + \text{P}_i$ ) und die Pimeloyl-CoA Synthetase katalysiert die Reaktion von Pimeloylsäure zu Pimeloyl-CoA bei der Biotin-Bildung ( $\text{Pimeloylsäure} + \text{ATP} + \text{CoA} \rightleftharpoons \text{Pimeloyl-CoA} + \text{ADP} + \text{P}_i$ ).

Bisher gab es nur wenige Organismen, für die eine ADP-ACS nachgewiesen wurde. Aufgrund der Identifikation der Gene der ADP-ACS von *P. furiosus*, die die Grundlage für die Untersuchungen von Sanchez et al. darstellten (Sanchez et al., 1999), ist es nun möglich geworden, die Familie der ADP-ACS auf eine Familie der NDP-bildenden Acyl-CoA Synthetasen auszuweiten. Sanchez et al. haben außerdem eine phylogentische Verwandtschaft zwischen den verschiedenen hypothetischen Proteinen und den bekannten Enzymen von *Pyrococcus* und *Giardia* vorgeschlagen. Die nur auf den Sequenzähnlichkeiten beruhenden Annahmen können durch die vorliegenden Daten der biochemischen Charakterisierung der funktionellen ADP-ACS AF1211, AF1938 und MJ0590 unterstützt werden.

Zusätzlich zeigte sich bei einer näheren Untersuchung des ausgedehnteren Sequenzalignments (Sanchez et al., 1999), daß viele Aminosäurereste, die für die Katalyse der Succinyl-CoA Synthetase (Wolodko et al., 1994; Fraser et al., 1999) von Bedeutung sind, auch in den hypothetischen und nachgewiesenen ADP-ACS konserviert sind. So ist z.B. das His<sup>246</sup>α der α-Untereinheit der SCS (Buck, Guest, 1989), die aus 288 Aminosäuren besteht, absolut

konserviert in allen Proteinen der vorgeschlagenen Familie der NDP-bildenden Acyl-CoA Synthetasen. Einzige Ausnahme ist das Histidin im ORF YFIQ von *E. coli*. Das His<sup>246</sup> ist an der Phosphorylierung in der SCS-katalysierten Reaktion beteiligt (Wolodko et al., 1994; Fraser et al., 1999). Zwei Aminosäuren interagieren wahrscheinlich mit der phosphorylierten und der dephosphorylierten Form dieses Histidins (Fraser et al., 1999). Davon ist das Glu<sup>208</sup> $\alpha$  der SCS absolut konserviert in allen ADP-ACS, während das Glu<sup>197</sup> $\beta$  der SCS in allen ADP-ACS durch Aspartat substituiert ist. Auch die Aminosäuren, die die Coenzym-A-Bindestelle auf der  $\alpha$ -Untereinheit der *E. coli*-SCS ausmachen, wie Pro<sup>40</sup> $\alpha$ , Lys<sup>42</sup> $\alpha$ , Val<sup>72</sup> $\alpha$ , Pro<sup>73</sup> $\alpha$ , Ile<sup>95</sup> $\alpha$  und Cys<sup>123</sup> $\alpha$ , sind generell in den ADP-ACS Sequenzen konserviert. Nur in der ADP-ACS AF1211 ist das Pro<sup>40</sup> $\alpha$  durch ein Alanin ersetzt und das Ile<sup>95</sup> des ORFs AF1938 durch das ebenfalls hydrophobe Valin. Die mit dem CoA reagierenden Aminosäurereste auf der  $\beta$ -Untereinheit der *E. coli*-SCS zeigen einen geringeren Grad der Konservierung. So sind Glu<sup>33</sup> $\beta$ , Ser<sup>36</sup> $\beta$  und Lys<sup>66</sup> $\beta$  in allen Enzymen der vorgeschlagenen Familie substituiert. Insgesamt läßt die Konservierung der an der Phosphorylierung und der CoA-Bindung beteiligten Aminosäuren und der Magnesium-bindenden Aminosäuren (Asn<sup>199</sup>-Pro<sup>200</sup> $\beta$  der SCS) auf einen ähnlichen Reaktionsmechanismus von SCS, ADP-ACS und den anderen ADP-bildenden Enzymen schließen (Sanchez et al., 1999).

Ausgehend von der Kristallstruktur der SCS von *E. coli* (Wolodko et al., 1994; Fraser et al., 1999) und anderen Untersuchungen zur Bedeutung dieses Histidins (Majumdar et al., 1991; Patel, Owen, 1976) wird folgender hypothetischer Mechanismus der Katalyse der ADP-ACS AF1211 am homologen His<sup>249</sup> postuliert:



Die Phosphorylierung des N-3 des Imidazolringes des Histidins im aktiven Zentrum läuft nach diesem Mechanismus folgendermaßen ab: Das Enzym (E) reagiert mit Acetyl-CoA und freiem Phosphat (P<sub>i</sub>) zum Acetyl-Phosphat-Komplex, wobei CoA freigesetzt wird (1). Im zweiten Schritt wird das Acetat frei und das Phosphat wird kovalent an das His<sup>249</sup> des Enzyms gebunden (2). Im letzten Schritt wird das Phosphat auf ADP übertragen, und es entstehen das regenerierte Enzym und ATP.

Die Bedeutung des spezifischen Histidinrestes in der SCS von *E. coli* wurde schon 1991 von Majumdar et al. gezeigt (Majumdar et al., 1991). Ein Austausch des Histidins 246 gegen Aspartat führte zu einem vollständigen Verlust der Katalyseaktivität des Enzyms. Ein ähnliches Experiment wurde mit der humanen ATP-Citrat Lyase durchgeführt (Elshourbagy et al., 1992). Ihr Katalysemechanismus beinhaltet ebenfalls die Teilnahme eines Phosphoenzym-Intermediates (Patel, Owen, 1976), das aus der Phosphorylierung des Enzyms

am His<sup>765</sup> im katalytischen Zentrum in Gegenwart von Substrat, Magnesium und ATP entsteht. Die Mutagenese dieses dem His<sup>246</sup> der SCS homologen His<sup>765</sup> durch Alanin führte ebenfalls zum vollständigen Verlust der Katalyseaktivität des Enzyms.

In Anlehnung an diese Experimente wurde das His<sup>249</sup> der ADP-ACS AF1211 durch Aspartat mit zielgerichteter Mutation ausgetauscht, um die Auswirkungen auf das fusionierte Enzym zu testen. Das Protein wurde, wie die unmutierte Form, transformiert und unter denselben Bedingungen exprimiert und gereinigt, um die Eigenschaften dieses Proteins näher untersuchen zu können. Die mutierte ADP-ACS AF1211His<sup>249</sup>Asp zeigte in keiner der beiden Reaktionsrichtungen Aktivität. Da das Protein sich während der Reinigung jedoch genauso verhielt wie das unmutierte Enzym, konnte es gut gereinigt werden. Die molekulare Masse des mutierten Proteins stimmte mit der ADP-ACS AF1211 überein. Ein Hinweis für die gleiche Faltung des mutierten und des unmutierten Proteins sind die aufgenommenen Aggregationskurven. Die sehr ähnlichen Aggregationskurven der beiden Proteine lassen vermuten, daß die Mutation keine Auswirkung auf die Tertiärstruktur und damit auf die Temperaturstabilität hat. Dieses Experiment und die Übereinstimmung der nativen molekularen Massen geben einen Hinweis darauf, daß es sich bei der Mutation des His<sup>249</sup> ebenfalls, wie in den oben beschriebenen Experimenten von Elshourbagy und Majumdar, um die Mutation des an der Phosphorylierung im aktiven Zentrum beteiligten Histidins handelt und es deshalb keine Aktivität zeigt. Eine weitere Untersuchung dieser Hypothese durch Nachweis der Bildung des Zwischenproduktes, Mutation weiterer Aminosäuren, die an dieser Reaktion beteiligt sind sowie die Aufklärung der Kristallstruktur sind nötig, um die Hinweise auf diesen Mechanismus noch zu unterstützen.

## 5.7 Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben die Grundlagen für folgende Untersuchungen in der Zukunft gelegt:

Durch den Zugang zu den rekombinanten Proteinen sind die Voraussetzungen für die Untersuchung von Struktur und Funktionsbeziehungen an der ADP-ACS, wie sie auch für die SCS von *E. coli* gemacht worden sind, geschaffen. Kristallisationsversuche sind in der Arbeitsgruppe Schönheit von Dr. T. Hansen und B. Hoffmann bereits gemacht worden. Erste Kristalle der ADP-ACS Isoform I von *P. furiosus* sind bereits erhalten worden. Die Röntgenstrukturanalyse ermöglicht weitere Einblicke in die Natur dieses Proteins und könnte den Funktionsmechanismus im Detail aufklären. Daneben könnten durch Mutagenesen der Aminosäuren, die vermutlich an der Reaktion beteiligt sind, weitere Indizien für die Funktionsweise des Enzyms gefunden werden. Die Kristallstruktur könnte außerdem Aufschluß über die Faltung der homologen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten in den fusionierten Proteinen geben. Trotz der Anordnung der Proteine in  $\alpha\beta$ - oder  $\beta\alpha$ -Orientierung, katalysieren beide ADP-ACS-Reaktionen.



Es wäre weiterhin interessant, die ADP-ACS-Homologe aus den *Bacteria* zu exprimieren. Der Mechanismus der Acetat-Bildung in Prokaryoten scheint domänenspezifisch zu sein. Die *Bacteria* nutzen zur Acetat-Bildung den Zwei-Stufen-Mechanismus über die Phosphotransacetylase und die Acetat-Kinase, während die *Archaea* den Ein-Stufen-Mechanismus über die ADP-bildende Acetyl-CoA Synthetase verwenden. Welche Rolle die ADP-ACS-Homologe in den *Bacteria* also spielen, bleibt damit zu untersuchen.

Durch die vorliegende Arbeit sind die Voraussetzungen für diese Untersuchungen und die Klassifizierung der neu beschriebenen Familie der NDP-bildenden Acyl-CoA Synthetasen geschaffen worden. Die Erweiterung der Kenntnisse über die ADP-ACS konnte somit einen großen Beitrag zur Aufklärung dieses interessanten Enzyms sowie der neuen Enzymfamilie geben.

## 6 Literatur

- Aceti DJ, Ferry JG (1988) Purification and characterization of acetate kinase from acetate-grown *Methanosarcina thermophila*. Evidence for regulation of synthesis. *J.Biol.Chem.* 263:15444-15448
- Achenbach-Richter L, Gupta R, Zillig W, Woese CR (1988) Rooting the archaeobacterial tree: the pivotal role of *Thermococcus celer* in archaeobacterial evolution. *System.Appl.Microbiol.* 10:231-240
- Adams MWW, Holden JF, Menon AL, Schut GJ, Grunden AM, Hou C, Hutchins AM, Jenney FE, Kim C, Ma K, Pan G, Roy R, Sapra R, Story SV, Verhagen MF (2001) Key role for sulfur in peptide metabolism and in regulation of three hydrogenases in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J.Bacteriol.* 183:716-724
- Adams MWW (1996) Enzymes and proteins from hyperthermophilic microorganisms. *Adv.Protein Chem.* 48:1-509
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J.Mol.Biol.* 215:403-410
- Andreotti G, Cubellis MV, Nitti G, Sannia G, Mai X, Adams MWW, Marino G (1995) An extremely thermostable aromatic aminotransferase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Biochim.Biophys.Acta* 1247:90-96
- Beeder J, Nilsen RK, Rosnes JT, Torsvik T, Lien T (1994) *Archaeoglobus fulgidus* isolated from hot North Sea oil field waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:1227-1231
- Binieda A, Fuhrmann M, Lehner B, Rey-Berthod C, Frutiger-Hughes S, Hughes G, Shaw NM (1999) Purification, characterization, DNA sequence and cloning of a pimeloyl-CoA synthetase from *Pseudomonas mendocina* 35. *Biochem.J.* 340:793-801
- Blöchl E, Burggraf S, Fiala G, Lauerer G, Huber G, Huber R, Rachel R, Segerer A, Stetter KO, Völkl P (1995) Isolation, taxonomy and phylogeny of hyperthermophilic microorganisms. *World J.Microbiol.Biotechnol.* 11:9-16
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 72:248-254
- Bräsen C, Schönheit P (2001) Mechanisms of acetate formation and acetate activation in halophilic *archaea*. *Arch. Microbiol.* 175:360-368
- Brinkmann U, Mattes RE, Buckel P (1989) High-level expression of recombinant genes in *Escherichia coli* is dependent on the availability of the dnaY gene product. *Gene* 85:109-114
- Brock TD, Brock KM, Belly RT, Weiss RL (1972) *Sulfolobus*: a new genus of sulfur-oxidizing bacteria living at low pH and high temperature. *Arch.Microbiol.* 84:54-68
- Brown JW, Daniels CJ, Reeve JN (1989) Gene structure, organization, and expression in archaeobacteria. *Crit.Rev.Microbiol.* 16:287-338
- Buck D, Guest JR (1989) Overexpression and site-directed mutagenesis of the succinyl-CoA synthetase of *Escherichia coli* and nucleotide sequence of a gene (g30) that is adjacent to the suc operon. *Biochem. J.* 260:737-747

- Buhler C, Gadelle D, Forterre P, Wang JC, Bergerat A (1998) Reconstitution of DNA topoisomerase VI of the thermophilic archaeon *Sulfolobus shibatae* from subunits separately overexpressed in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 26:5157-5162
- Bult CJ, White O, Olsen GJ, Zhou L, Fleischmann RD, Sutton GG, Blake JA, Fitzgerald LM, Clayton RA, Gocayne JD, Kerlavage AR, Dougherty BA, Tomb JF, Adams MD, Reich CI, Overbeek R, Kirkness EF, Weinstock KG, Merrick JM, Glodek A, Scott JL, Geoghagen NSM, Venter JC (1996) Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* 273:1058-1073
- Carstens C (1999) Codon Bias-Adjusted B121 Derivatives for Protein Expression. *Strategies* 12:49-51
- Chistoserdova LV, Lidstrom ME (1994) Genetics of the serine cycle in *Methylobacterium extorquens* AM1: identification, sequence, and mutation of three new genes involved in C1 assimilation, *orf4*, *mtkA*, and *mtkB*. *J.Bacteriol.* 176:7398-7404
- Dahl C, Kredich NM, Deutzmann R, Trüper HG (1993) Dissimilatory sulphite reductase from *Archaeoglobus fulgidus*: physico-chemical properties of the enzyme and cloning, sequencing and analysis of the reductase genes. *J.Gen.Microbiol.* 139:1817-1828
- Danson MJ (1988) Archaeobacteria: the comparative enzymology of their central metabolic pathways. *Adv.Microb.Physiol.* 29:165-231
- Danson MJ (1997) Central metabolism of the archaea. (book chapter) Kates M, Kushner DJ, Matheson AT (eds) *The Biochemistry of Archaea*. Elsevier,
- De Rosa M, Gambacorta A (1988) The Lipids of Archaeobacteria. *Prog.Lipid Res.* 27:153-175
- De Rosa M, Gambacorta A, Gliozzi A (1986) Structure, biosynthesis, and physicochemical properties of archaeobacterial lipids [published erratum appears in *Microbiol Rev* 1987 Mar;51(1):178]. *Microbiol.Rev.* 50:70-80
- De Rosa M, Gambacorta A, Nicolaus B, Giardina P, Poerio E, Buonocore V (1984) Glucose metabolism in the extreme thermoacidophilic archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus*. *Biochem.J.* 224:407-414
- De Vos WM, Kengen SW, Voorhorst WG, van der Oost J (1998) Sugar utilization and its control in hyperthermophiles. *Extremophiles* 2:201-205
- Doolittle WF (2000) Stammbaum des Lebens. *Spektrum der Wissenschaft* 4:52-57
- Ellis RJ, van der Vries (1991) Molecular chaperones. *Annu.Rev.Biochem* 60:321-347
- Elshourbagy NA, Near JC, Kmetz PJ, Wells TN, Groot PH, Saxty BA, Hughes SA, Franklin M, Gloger IS (1992) Cloning and expression of a human ATP-citrate lyase cDNA. *Eur.J.Biochem.* 204:491-499
- Ermler U, Merckel M, Thauer RK, Shima S (1997) Formylmethanofuran: tetrahydromethanopterin formyltransferase from *Methanopyrus kandleri* - new insights into salt-dependence and thermostability. *Structure* 5:635-646
- Fiala G, Stetter KO (1986) *Pyrococcus furiosus* sp. nov. represents a novel genus of marine heterotrophic archaeobacteria growing optimally at 100°C. *Arch.Microbiol.* 145:56-61
- Field J, Rosenthal B, Samuelson J (2000) Early lateral transfer of genes encoding malic enzyme, acetyl-CoA synthetase and alcohol dehydrogenases from anaerobic prokaryotes to *Entamoeba histolytica*. *Mol.Microbiol.* 38:446-455

- Fraser ME, James MN, Bridger WA, Wolodko WT (1999) A detailed structural description of *Escherichia coli* succinyl-CoA synthetase. *J.Mol.Biol.* 285:1633-1653
- Frydman J, Hartl FU (1996) Principles of chaperone-assisted protein folding: differences between *in vitro* and *in vivo* mechanisms. *Science* 272:1497-1502
- Garcia GM, Mar PK, Mullin DA, Walker JR, Prather NE (1986) The *E. coli* dnaY gene encodes an arginine transfer RNA. *Cell* 45:453-459
- Genoscope (1999) Genome Sequence of *Pyrococcus abyssi*. Internet Communication <http://www.genoscope.cns.fr>
- Glasemacher J, Bock A-K, Schmid R, Schönheit P (1997) Purification and properties of acetyl-CoA synthetase (ADP-forming), an archaeal enzyme of acetate formation and ATP synthesis, from the hyperthermophile *Pyrococcus furiosus*. *Eur.J.Biochem.* 244:561-567
- Gottschalk G (1986) Bacterial metabolism. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Grant SG, Jessee J, Bloom FR, Hanahan D (1990) Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc.Natl.Acad. Sci.U.S.A.* 87:4645-4649
- Gunasekera D, Kemp RG (2000) Genomic organization, 5'flanking region and tissue-specific expression of mouse phosphofructokinase C gene. *Gene* 260:103-112
- Hansen T (1998) Charakterisierung, Struktur und Thermostabilität der cytosolischen Pyrophosphatase aus *Sulfolobus acidocaldarius*. MUL Lübeck, Germany. Thesis/ Dissertation
- Heidelberg JF, Eisen JA, Nelson WC, Clayton RA, Gwinn ML, Dodson RJ, Haft DH, Hickey EK, Peterson JD, Umayam L, Gill SR, Nelson KE, Read TD, Tettelin H, Richardson D, Ermolaeva MD, Vamathevan J, Bass S, Qin H, Dragoi I, Sellers P, McDonald L, Utterback T, Fleishmann RD, Nierman WC, White O (2000) DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* 406:477-483
- Heider J, Mai X and Adams M W W (1996) Characterization of 2-ketoisovalerate ferredoxin oxidoreductase, a new and reversible coenzyme A-dependent enzyme involved in peptide fermentation by hyperthermophilic archaea. *J.Bac.* 178(3): 780-787
- Hethke C, Geerling AC, Hausner W, de Vos WM, Thomm M (1996) A cell-free transcription system for the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Nucleic Acids.Res.* 24:2369-2376
- Huber R, Langworthy TA, König H, Thomm M, Woese CR, Sleytr UB, Stetter KO (1986) *Thermotoga maritima* sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up to 90°C. *Arch.Microbiol.* 144:324-333
- Huber R, Wilharm T, Huber D, Trincone A, Burggraf S, König H, Rachel R, Rockinger I, Fricke H, Stetter KO (1992) *Aquifex pyrophilus* gen. nov. sp. nov., represents a novel group of marine hyperthermophilic hydrogen-oxidizing bacteria. *System.Appl. Microbiol.* 15:340-351
- Innis MS, Myambo KB, Gelfand DH, Brown MA (1992) DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Biotechnology* 24:6-10
- Johnsen U, Selig M, Xavier KB, Santos H, Schönheit P (2001) Different glycolytic pathways for glucose and fructose in the halophilic archaeon *Halococcus saccharolyticus*. *Arch.Microbiol.* 175:52-61

- Johnson JD, Muhonen WW, Lambeth DO (1998) Characterization of the ATP- and GTP-specific succinyl-CoA synthetases in pigeon. The enzymes incorporate the same alpha-subunit. *J.Biol.Chem.* 273:27573-27579
- Jones WJ, Leigh JA, Mayer F, Woese CR, Wolfe RS (1983) *Methanococcus jannaschii* sp. nov., an extremely thermophilic methanogen from a submarine hydrothermal vent. *Arch.Microbiol.* 136:254-261
- Jorgensen, S., Vorgias, C. E., and Antranikian, G. (1997) Cloning, sequencing, characterization, and expression of an extracellular alpha-amylase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* 272(26), 16335-16342.
- Kaine BP, Gupta R, Woese CR (1983) Putative introns in tRNA genes of prokaryotes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 80:3309-3312
- Kandler O (1992) Where next with the archaeobacteria? *Biochemistry Society Symposium* 58:195-207
- Kandler O, König H (1998) Cell wall polymers in *Archaea* (Archaeobacteria). *Cell. Mol.Life Sci.* 54:305-308
- Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, Asamizu E, Kato T, Sasamoto S, Watanabe A, Idesawa K, Ishikawa A, Kawashima K, Kimura T, Kishida Y, Kiyokawa C, Kohara M, Matsumoto M, Matsuno A, Mochizuki Y, Nakayama S, Nakazaki N, Shimpo S, Sugimoto M, Takeuchi C, Yamada M, Tabata S (2000) Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res.* (6.):381-406. 7:381-406
- Karan D, David JR, Capy P (2001) Molecular evolution of the AMP-forming Acetyl-CoA synthetase. *Gene* 265:95-101
- Kawarabayasi Y, Sawada M, Horikawa H, Haikawa Y, Hino Y, Yamamoto S, Sekine M, Baba S, Kosugi H, Hosoyama A, Nagai Y, Sakai M, Ogura K, Otsuka R, Nakazawa H, Takamiya M, Ohfuku Y, Funahashi T, Tanaka T, Kudoh Y, Yamazaki J, Kushida N, Oguchi A, Aoki K, Kikuchi H (1998) Complete sequence and gene organization of the genome of a hyperthermophilic archaeobacterium, *Pyrococcus horikoshii* OT3. *DNA Res.* 5:55-76
- Klenk HP, Clayton RA, Tomb JF, White O, Nelson KE, Ketchum KA, Dodson RJ, Gwinn M, Hickey EK, Peterson JD, Richardson DL, Kerlavage AR, Graham DE, Kyrpides NC, Fleischmann RD, Quackenbush J, Lee NH, Sutton GG, Gill S, Kirkness EF, Dougherty BA, McKenney K, Adams MD, Loftus B, Venter JC (1997) The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus* [published erratum appears in *Nature* 1998 Jul 2;394(6688):101]. *Nature* 390:364-370
- König H, Nusser E, Stetter KO (1985) Glycogen in *Methanlobus* and *Methanococcus*. *FEMS Microbiol.Lett.* 28:265-269
- Krah R, O'Dea MH, Gellert M (1997) Reverse gyrase from *Methanopyrus kandleri*. Reconstitution of an active extremeozyme from its two recombinant subunits. *J.Biol.Chem.* 272:13986-13990
- Kunow J, Linder D, Thauer RK (1995) Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase from the sulfate reducing *Archaeoglobus fulgidus*: molecular composition, catalytical properties, and sequence alignments. *Arch.Microbiol.* 163:21-28
- Labes, A. and Schönheit, P. (2001) Sugar utilization in the hyperthermophilic, sulfate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus* strain 7324: starch degradation to acetate and CO<sub>2</sub> via a modified Embden-Meyerhof pathway and acetyl-CoA synthetase (ADP-forming). *Arch. Microbiol.* (eingereicht)

- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Langworthy TA, Pond JL (1986) Archaeobacterial ether lipids and chemotaxonomy. *System.Appl.Microbiol.* 7:253-257
- Larsen O, Lien T, Birkeland NK (1999) Dissimilatory sulfite reductase from *Archaeoglobus profundus* and *Desulfotomaculum thermocisternum*: phylogenetic and structural implications from gene sequences. *Extremophiles* 3:63-70
- Leuschner C, Antranikian G (1995) Heat-stable enzymes from extremely thermophilic microorganisms. *World J.Microbiol.Biotechnol.* 11:95-114
- Lindmark DG (1980) Energy metabolism of the anaerobic protozoon *Giardia lamblia*. *Mol.Biochem. Parasitol.* 1:1-12
- Mai X, Adams MWW (1994) Indolepyruvate:ferredoxin oxidoreductase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. A new enzyme involved in peptide fermentation. *J.Biol.Chem.* 269:16726-16732
- Mai X, Adams MWW (1996) Purification and characterization of two reversible and ADP-dependent acetyl coenzyme A synthetases from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J.Bacteriol.* 178:5897-5903
- Majumdar R, Guest JR, Bridger WA (1991) Functional consequences of substitution of the active site (phospho)histidine residue of *Escherichia coli* succinyl-CoA synthetase. *Biochim.Biophys. Acta* 1076:86-90
- Möller-Zinkhan D, Börner G, Thauer RK (1989) Function of methanofuran, tetrahydromethanopterin, and coenzyme F<sub>420</sub> in *Archaeoglobus fulgidus*. *Arch.Microbiol.* 152:362-368
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* 51 Pt 1:263-273
- Murray V (1989) Improved double-stranded DNA sequencing using the linear polymerase chain reaction. *Nucleic Acids.Res.* 17:8889
- Musfeldt M, Selig M, Schönheit P (1999) Acetyl coenzyme A synthetase (ADP-forming) from the hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus*: identification, cloning, separate expression of the encoding genes, *acdAI* and *acdBI*, in *Escherichia coli*, and in vitro reconstitution of the active heterotetrameric enzyme from its recombinant subunits. *J.Bacteriol.* 181:5885-5888
- Müller M (1988) Energy metabolism without mitochondria. *Annu.Rev.Microbiol.* 42:465-488
- Ng WV, Kennedy SP, Mahairas GG, Berquist B, Pan M, Shukla HD, Lasky SR, Baliga NS, Thorsson V, Sbrogna J, Swartzell S, Weir D, Hall J, Dahl TA, Welti R, Goo YA, Leithausen B, Keller K, Cruz R, Danson MJ, Hough DW, Maddocks DG, Jablonski PE, Krebs MP, Angevine CM, Dale H, Isenbarger TA, Peck RF, Pohlschroder M, Spudich JL, Jung KW, Alam M, Freitas T, Hou S, Daniels CJ, Dennis PP, Omer AD, Ebhardt H, Lowe TM, Liang P, Riley M, Hood L, DasSarma S (2000) Genome sequence of *Halobacterium* species NRC-1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 97(22):12176-12181
- Patel MS, Owen OE (1976) Lipogenesis from ketone bodies in rat brain. Evidence for conversion of acetoacetate into acetyl-coenzyme A in the cytosol. *Biochem J.* 156:603-607

- Perna NT, Plunkett G, Burland V, Mau B, Glasner JD, Rose DJ, Mayhew GF, Evans PS, Gregor J, Kirkpatrick HA, Posfai G, Hackett J, Klink S, Boutin A, Shao Y, Miller L, Grotbeck EJ, Davis NW, Lim A, Dimalanta ET, Potamousis KD, Apodaca J, Anantharaman TS, Lin J, Yen G, Schwartz DC, Welch RA, Blattner FR (2001) Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* 409:529-533
- QIAGEN (1997) QIAexpressionist.
- Redenbach M, Kieser HM, Denapaite D, Eichner A, Cullum J, Kinashi H, Hopwood DA (1996) A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8 Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Mol.Microbiol.* 21:77-96
- Reeves RE, Warren LG, Susskind B, Lo HS (1977) An energy-conserving pyruvate-to-acetate pathway in *Entamoeba histolytica*. Pyruvate synthase and a new acetate thiokinase. *J.Biol.Chem.* 252:726-731
- Ruepp A, Graml W, Santos-Martinez ML, Koretke KK, Volker C, Mewes HW, Frishman D, Stocker S, Lupas AN, Baumeister W (2000) The genome sequence of the thermoacidophilic scavenger *Thermoplasma acidophilum*. *Nature* 407:508-513
- Sambrook S, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Sanchez-Martinez C, Estevez AM, Aragon JJ (2000) Phosphofructokinase C isozyme from ascites tumor cells: cloning, expression, and properties. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271:635-640
- Sanchez LB, Morrison HG, Sogin ML, Muller M (1999) Cloning and sequencing of an acetyl-CoA synthetase (ADP-forming) gene from the amitochondriate protist *Giardia lamblia*. *Gene* 233:225-231
- Sanchez LB, Müller M (1996) Purification and characterization of the acetate forming enzyme, acetyl-CoA synthetase (ADP-forming) from the amitochondriate protist *Giardia lamblia*. *FEBS Lett.* 378:240-244
- Sanger Institute (1997) *Genome Sequence of Streptomyces coelicolor*. Internet Communication <http://www.sanger.ac.uk>
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 74:5463-5467
- Schäfer, T (1995) Einfluß von zusätzlich eingefügten Disulfidbrücken auf die Stabilität des rekombinanten humanen Interferon- $\gamma$  (rhu-IFN- $\gamma$ ). Thesis/Dilomarbeit
- Schäfer T, Schönheit P (1991) Pyruvate metabolism of the hyperthermophilic archaebacterium *Pyrococcus furiosus*. Acetate formation from acetyl-CoA and ATP synthesis are catalysed by an acetyl-CoA synthetase (ADP-forming). *Arch.Microbiol.* 155:366-377
- Schäfer T, Selig M, Schönheit P (1993) Acetyl-CoA synthetase (ADP-forming) in archaea, a novel enzyme involved in acetate and ATP synthesis. *Arch.Microbiol.* 159:72-83
- Schönheit P, Schäfer T (1995) Metabolism of hyperthermophiles. *World J.Microbiol. Biotechnol.* 11:26-57
- Selig M, Xavier KB, Santos H, Schönheit P (1997) Comparative analysis of Embden-Meyerhof and Entner-Doudoroff glycolytic pathways in hyperthermophilic archaea and the bacterium *Thermotoga*. *Arch.Microbiol.* 167:217-232

- Siddiqui MA, Fujiwara S, Takagi M, Imanaka T (1998) In vitro heat effect on heterooligomeric subunit assembly of thermostable indolepyruvate:ferredoxin oxidoreductase. FEBS Lett. 434:372-376
- Srere PA, Brazil H, Gonen L (1963) The citrate condensing enzyme of pigeon breast muscle and moth flight muscle. Acta Chem.Scand. 17:129-134
- Stein DB, Searcy DG (1978) Physiologically important stabilization of DNA by a prokaryotic histone-like protein. Science 202:219-221
- Stetter KO (1988) *Archaeoglobus fulgidus* gen. nov., sp. nov.: a new taxon of extremely thermophilic archaeobacteria. System.Appl.Microbiol. 10:172-173
- Stetter KO (1993) Life at the upper temperature border. In: Tran Thanh Van J, Tran Thanh Van K, Mounolon JC, et al (eds) Frontiers of Life. Editions Frontiers, Gif-sur-Yvette, pp 195-219
- Stetter KO (1996) Hyperthermophiles in the history of life. Ciba.Found.Symp. 202:1-10
- Stetter KO (1999) Extremophiles and their adaptation to hot environments. FEBS Lett. 452:22-25
- Stetter KO, Lauerer G, Thomm M, Neuner A (1987) Isolation of extremely thermophilic sulfate reducers: evidence for a novel branch of archaeobacteria. Science 236:822-824
- Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, Hickey MJ, Brinkman FS, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, Garber RL, Goltry L, Tolentino E, Westbrook-Wadman S, Yuan Y, Brody LL, Coulter SN, Folger KR, Kas A, Larbig K, Lim R, Smith K, Spencer D, Wong GK, Wu Z, Paulsen IT (2001) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. Nature 406:959-964
- Studier FW, Moffatt BA (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. J.Mol.Biol. 189:113-130
- Studier FW, Rosenberg AH, Dunn JJ, Dubendorff JW (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. Methods Enzymol. 185:60-89
- Thauer RK, Jungermann K, Decker K (1977) Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. Bacteriol.Rev. 41:100-180
- Thomm M (1996) Archaeal transcription factors and their role in transcription initiation. FEMS Microbiol.Rev. 18:159-171
- Tomlinson GA, Koch TK, Hochstein LI (1974) The metabolism of carbohydrates by extremely halophilic *bacteria*: glucose metabolism via a modified Entner-Doudoroff pathway. Can.J.Microbiol. 20:1085-1091
- Utah Genome Center Website. Genome sequence from *Pyrococcus furiosus*. Department of Human Genetics, University of Utah. 11-5-1999. Internet Communication <http://www.genome.utah.edu>
- Van Spanning RJ, De Boer AP, Slotboom DJ, Reijnders WN, Stouthamer AH (1995) Isolation and characterization of a novel insertion sequence element, IS1248, in *Paracoccus denitrificans*. Plasmid 34:11-21
- Vogt G, Argos P (1997) Protein thermal stability: hydrogen bonds or internal packing? Fold.Des. 2:S40-S46



- Vogt G, Woell S, Argos P (1997) Protein thermal stability, hydrogen bonds, and ion pairs. *J.Mol.Biol.* 269:631-643
- Wächtershäuser G (1988) Pyrite formation, the first energy source for life: a hypothesis. *System.Appl.Microbiol.* 10:207-210
- Wächtershäuser G (1992) Groundworks for an evolutionary biochemistry: the iron-sulphur world. *Prog.Biophys.Mol.Biol.* 58:85-201
- Woese CR (1987) Bacterial evolution. *Bacteriol.Rev.* 51:221-271
- Woese CR, Kandler O, Wheelis ML (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eukarya*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 87:4576-4579
- Wolodko WT, Brownie ER, O'Connor MD, Bridger WA (1983) Thiophosphorylation as a probe for subunit interactions in *Escherichia coli* succinyl coenzyme A synthetase. Further evidence for catalytic cooperativity and substrate synergism. *J.Biol.Chem* 258:14116-14119
- Wolodko WT, Fraser ME, James MN, Bridger WA (1994) The crystal structure of succinyl-CoA synthetase from *Escherichia coli* at 2.5-Å resolution. *J.Biol.Chem* 269:10883-10890
- Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33:103-119
- Yu JP, Ladapo J, Whitman WB (1994) Pathway of glycogen metabolism in *Methanococcus marisaludis*. *J.Bacteriol.* 176:325-332
- Zillig W (1991) Comparative biochemistry of *Archaea* and *Bacteria*. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 1:544-551
- Zillig W, Holz I, Janekovic D, Klenk HP, Imself E, Trent J, Wunderl S, Forjaz VH, Coutinho R, Ferreira T (1990) *Hyperthermus butylicus*, a hyperthermophilic sulfur-reducing archaeobacterium that ferments peptides. *J.Bacteriol.* 172:3959-3965
- Zillig W, Holz I, Janekovic D, Schäfer W, Reiter WD (1983) The Archaeobacterium *Thermococcus celer* represents a novel genus within the thermophilic branch of the Archaeobacteria. *System.Appl.Microbiol.* 4:88-94
- Zwickl P, Fabry S, Bogedain C, Haas A, Hensel R (1990) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the hyperthermophilic archaeobacterium *Pyrococcus woesei*: characterization of the enzyme, cloning and sequencing of the gene, and expression in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* 172:4329-4338

## 7 Anhang

### 7.1 EMBL Datenbankeinträge

ADP-ACS	*hyp. (x)	ID-Nummer	AS	Literaturstelle
<i>Archaea</i>				
<i>Pyrococcus furiosus</i> ACDI		AJ240061	462	(Musfeldt et al., 1999)
<i>Pyrococcus horikoshii</i> PH1517	x	AP000006 BAA30625.1	460	(Kawarabayasi et al., 1998)
<i>Pyrococcus abyssi</i> PAB1937	x	AJ248285	460	(Genoscope, 1999)
<i>Pyrococcus furiosus</i> ACDIb		AJ240062	232	(Musfeldt et al., 1999)
<i>Pyrococcus horikoshii</i> PH1739	x	AP000007 BAA30853.1	212	(Kawarabayasi et al., 1998)
<i>Pyrococcus abyssi</i> PAB0303	x	AJ248284	232	(Genoscope, 1999)
<i>Pyrococcus furiosus</i> ACDIIa		Pf_549216	457	(Utah Genome Center Website, 1999)
<i>Pyrococcus horikoshii</i> PH0766	x	AP000003 BAA31055.1	457	(Kawarabayasi et al., 1998)
<i>Pyrococcus abyssi</i> PAB0854	x	AJ248287	457	(Genoscope, 1999)
<i>Pyrococcus furiosus</i> ACDIIb		Pf_1692499	238	(Utah Genome Center Website, 1999)
<i>Pyrococcus horikoshii</i> PH1788	x	AP000007 BAA30907.1	238	(Kawarabayasi et al., 1998)
<i>Pyrococcus abyssi</i> PAB2113	x	AJ248284	238	(Genoscope, 1999)
<i>Pyrococcus horikoshii</i> PH1928	x	AP000007 BAA29714.1	466	(Kawarabayasi et al., 1998)
<i>Pyrococcus abyssi</i> PAB1230	x	AJ248288	466	(Genoscope, 1999)
<i>Pyrococcus horikoshii</i> PH0625	x	AP000003 BAA29714.1	440	(Kawarabayasi et al., 1998)
<i>Pyrococcus abyssi</i> PAB1431	x	AJ248287	440	(Genoscope, 1999)
<i>Pyrococcus horikoshii</i> PH1789	x	AP000007 BAA30908.1	472	(Kawarabayasi et al., 1998)
<i>Pyrococcus abyssi</i> PAB2112	x	AJ248284	472	(Genoscope, 1999)
<i>Archaeoglobus fulgidus</i> AF1211		AE001020	685	(Klenk et al., 1997)
<i>Archaeoglobus fulgidus</i> AF1938		AE000970	673	(Klenk et al., 1997)
<i>Archaeoglobus fulgidus</i> AF1511	x	AE000998	881	(Klenk et al., 1997)
<i>Archaeoglobus fulgidus</i> AF1192	x	AE001022	664	(Klenk et al., 1997)
<i>Archaeoglobus fulgidus</i> AF0932	x	AE001039	666	(Klenk et al., 1997)
<i>Thermoplasma acidophilum</i> TA1153	x	AL445066	698	(Ruepp et al., 2000)
<i>Methanococcus jannaschii</i>		U67507	704	(Bult et al., 1996)
<i>Halobacterium spec.</i>	x	AE005031	542	(Ng et al., 2001)

	<b>*hyp.</b>	<b>ID-Nummer</b>	<b>AS</b>	<b>Literaturstelle</b>
<b><u>Bacteria</u></b>				
<i>Giardia lamblia</i>		AF107206	726	(Sanchez et al., 1999)
<i>Entamoeba histolytica</i>		AF286346	713	(Field et al., 2000)
<b><u>Eukarya</u></b>				
<i>Mesorhizobium loti</i> MLR6591	x	NP107068.1	893	(Kaneko et al., 2000)
<i>Vibrio cholerae</i> VCA0574	x	AE004388	893	(Heidelberg et al., 2000)
<i>Escherichia coli</i> YFIQ	x	AE000344	886	(Perna et al., 2001)
<i>Streptomyces coelicolor</i> SC8A6.03C.	x	AL031013	714	(Redenbach et al., 1996)
<b>Pimeloyl-CoA Synthetase</b>				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	x	AE004534	715	(Stover et al., )
<i>Pseudomonas medocina</i>		AJ012480	711	(Binieda et al., 1999)
<b>Malyl-CoA Synthetase</b>				
<i>Methylobacterium extorquens</i>		AAB5888		(Chistoserdova, Lidstrom, 1994)
<b>ATP-Citrat Lyase</b>				
<i>Homo sapiens</i>		CAA45614.1	1105	(Elshourbagy et al., 1992)
<b>Succinyl-CoA Synthetase</b>				
<i>Escherichia coli</i> $\alpha$		AAA23900.1	288	(Buck, Guest, 1989)
<i>Escherichia coli</i> $\beta$		AAA23899.1	388	(Buck, Guest, 1989)

\*hyp. = hypothetisch Proteine

## 7.2 Sequenzen

*acdAI* von *Pyrococcus furiosus*

Translationsstart  
↓

RBS

```

- 27 ATGGAAGCAATTTCAGAGGTGATTAAATCAGTTTGGAGGCTCTTTTAATCCAAAAAGC 33
      * M S L E A L F N P K S -
34  GTCGCAGTTATAGGAGCTTCTGCAAAGCCTGGGAAAATAGGATATGCAATTATGAAAAAT 9
      V A V I G A S A K P G K I G Y A I M K N -
94  CTCATAGAATATGGGTATGAAGGCAAAATATAACCCAGTAAACATCAAAGCGGGGAAATA 153
      L I E Y G Y E G K I Y P V N I K G G E I -
154 GAGATTAACGGAAGGAAATTCAAAGTCTACAAGAGCGTTCTTGAGATTCTTGATGAAGTA 213
      E I N G R K F K V Y K S V L E I P D E V -
214 GATATGGCAGTCATTGTAGTTCCAGCTAAGTTTGTCCCTCAGGTTCTAGAGGAATGTGGT 273
      D M A V I V V P A K F V P Q V L E E C G -
274 CAAAAAGGCGTCAAGGTCGTCCCAATTATAAGCTCTGGATTGGAGAGCTAGGAGAAGAA 333
      Q K G V K V V P I I S S G F G E L G E E -
334 GGAAAGAAAGTCGAGCAACAACCTTGTGCAAACTGCCAGAAAATATGGAATGAGGATCCTT 393
      G K K V E Q Q L V E T A R K Y G M R I L -
394 GGTCTAACATCTTCGGAGTTGTATACACTCCAGCAAAGCTTAATGCAACATTCGGTCCA 453
      G P N I F G V V Y T P A K L N A T F G P -
454 ACTGACGTTCTCCCAGGGCCATTAGCACTAATTAGCCAAAGCGGTGCCCTTGGAAATTGCA 523
      T D V L P G P L A L I S Q S G A L G I A -
514 CTAATGGGATGGACAATACTGGAGAAAATAGGACTTTCAGCCGTTGTTAGCGTTGGGAAT 573
      L M G W T I L E K I G L S A V V S V G N -
574 AAAGCCGACATTGACGATGCAGACCTTCTAGAGTTCTTCAAGGATGATGAGAATACGAGA 633
      K A D I D D A D L L E F F K D D E N T R -
634 GCTATTCTAATTTACATGGAAGGTGTGAAAGATGGAAGGAGGTTTCATGGAGGTAGCAAAA 693
      A I L I Y M E G V K D G R R F M E V A K -
694 GAGGTTAGCAAGAAGAAGCCAATAATTGTCATTAAAGCCGGAAGAAGCGAGAGAGGAGCA 753
      E V S K K K P I I V I K A G R S E R G A -
754 AAAGCAGCCGCTTACACACGGGATCTCTTGCAGGTAGTGACAAAGTTTATAGCGCAGCA 813
      K A A A S H T G S L A G S D K V Y S A A -
814 TTTAAGCAGAGTGGAGTCTTAAGAGCATATACCATTTGGTGAAGCTTTTGACTGGGCAAGA 873
      F K Q S G V L R A Y T I G E A F D W A R -
874 GCTTTAAGCAATCTACCTGAGCCACAAGGAGATAACGTTGTGATAATCACCAACGGAGGA 933
      A L S N L P E P Q G D N V V I I T N G G -
934 GGAATTGGAGTAATGGCAACTGACGCCGAGAAGAAGAAGGCTTACACCTCTATGACAAC 993
      G I G V M A T D A A E E E G L H L Y D N -
994 CTTGAAGAGCTCAAGATATTCGCAAACCACATGCCACCATTTGGAAGCTATAAGAATCCC 1053
      L E E L K I F A N H M P P F G S Y K N P -
1054 GTTGACTTAAC TGAATGGCAGATGGAAAGAGTTATGAAGGTGCTATAAGGGATGCTCTT
      V D L T G M A D G K S Y E G A I R D A L -
1114 GCTCATCCAGAAATGCACTCAATAGCAGTTCTCTATTGTGCACTGCCGTCCTTGATCCA 1173
      A H P E M H S I A V L Y C Q T A V L D P -

```

1174 AGAGAACTGGCTGAGATAGTGATAAGAGAGTACAACGAAAGTGGAAGAAAGAAGCCTCTT 1233  
 R E L A E I V I R E Y N E S G R K K P L -

1234 GTAGTTGCAATTGTGGGTGGTATAGAGGCAAAGAAGCCATAGACATGCTAAACGAGAAC 1293  
 V V A I V G G I E A K E A I D M L N E N -

1294 GGAATTCCTGCATATCCAGAACCAGAAAGGGCAATAAAGGCATTATCAGCACTGTACAAG 1353  
 G I P A Y P E P E R A I K A L S A L Y K -

**STOP-CODON**

1354 TGGAGCAAGTGGAAGCAAAACACAAAGAAAAGTAAAGAAATCAATGGGCGTTCTTT 1413  
 W S K W K A K H K E K \*

### *acdBI* von *Pyrococcus furiosus*

**RBS**

-60 GGAAATACTTTTAACTACATGAAATTATTTGGAATTGTCAAGATTATG**AGGTGA**ATTGAG -1  
**TRANSLATIONSSTART**  
 -

1 **ATG**GACAGGGTTGCTAAGGCTAGGGAAATTATCGAAAAGGCAAAGCTGAAAATAGACCA 60  
 M D R V A K A R E I I E K A K A E N R P -

-61 CTAGTTGAACCAGAGGCCAAGGAGATTCTGAAGCTTTATGGAATCCAGTACCTGAGTTT 120  
 L V E P E A K E I L K L Y G I P V P E F -

121 AAAGTTGCTAGAAACGAGGAAGAGGCTGTAAAATTTTCAGGAGAGATTGGATATCCAGTT 180  
 K V A R N E E E A V K F S G E I G Y P V -

181 GTCATGAAGATAGTTTCACCTCAGATAATCCACAAGAGCGATGCTGGTGGAGTGAAGATA 240  
 V M K I V S P Q I I H K S D A G G V K I -

241 AACATCAAGAATGACGAGGAAGCTAGAGAAGCTTTTAGAACTATAATGCAAAACGCAAGA 300  
 N I K N D E E A R E A F R T I M Q N A R -

301 AATTACAAGCCCATGCAGATCTCTGGGGTGTATAATCTACAGAATGCTCCCCCTGGGA 360  
 N Y K P D A D L W G V I I Y R M L P L G -

361 AGAGAAGTTATAGTAGGTATGATAAGAGATCCACAGTTTGGACCTGCAGTGATGTTTGGT 420  
 R E V I V G M I R D P Q F G P A V M F G -

421 CTTGGTGAATATTTGTGGAATTCCTAAAGATGTTAGCTTCAGAGTGGCGCCAATAACA 480  
 L G G I F V E I L K D V S F R V A P I T -

481 AAAGAAGATGCTCTTGAAATGATTAGGAAATTAAGCATATCCAATTCTTGCTGGAGCT 540  
 K E D A L E M I R E I K A Y P I L A G A -

541 AGAGGAGAGAAACCCGTTAACATTGAAGCTCTTGCTGACATAATTGTAAAGTTGGAGAG 600  
 R G E K P V N I E A L A D I I V K V G E -

601 CTAGCTTTAGAGTTGCCAGAAATCAAGGAAATGACATAAATCCAATCTTCGCATATGAG 660  
 L A L E L P E I K E I D I N P I F A Y E -

**STOP-CODON    TERMINATIONS-SIGNAL?**

661 GATTCAGCAATTGCCGTAGATGCTAGGATGATTCCT**TAG**CTCTTTTCGTAAT**TTTTTATT** 720  
 D S A I A V D A R M I L \* -

721 TCTATATTGAGAAAACCTTAAAAGAGTGTTGTCTCAATAAAAATGGAAGTATACAA 780

### *acdAF1211* von *Archaeoglobus fulgidus* Typstamm VC16

1 ATGGAGCGCTTGTTTTACCCGAAAGTCGTGGCAGTGATAGGTGCTTCACCTCAGGAGGGA 60  
 M E R L F Y P K V V A V I G A S P Q E G -

61 AAGGTGGGTAACACGATTATGAAAATCTCAGAACTTCAGCGGCACTGTCTATGCTGTA 120  
 K V G N T I M K N L R N F S G T V Y A V -

121 AACCCGAAGTACAGGGAAATACTTGGATTCCCGTGCTACCCCTCGGTACTCAAGATACCC 180  
N P K Y R E I L G F P C Y P S V L K I P -

181 GAAAATGTGGACCTGGCCATCATCGTTGTTCCAGCGAAGCTCGTTCGAAGGCAGTGGAG 240  
E N V D L A I I V V P A K L V P K A V E -

241 GAGTGCGGAAGGAAGGACGTTGAAGGTGCCGTGGTGATTTCGGCAGGCTTCAAGGAGGCC 300  
E C G R K D V E G A V V I S A G F K E A -

301 GGGATTGAGGGGGCAAAGCTTGAGAGGGAACCTGGTCGAGGTGGCCGAAAGGTATGGCGTT 360  
G I E G A K L E R E L V E V A E R Y G V -

361 AAGCTGGTTGGCCCCAACTGTCTCGGCATGATAAACACCCGAGATTGCTATGAACGCCACG 420  
K L V G P N C L G M I N T E I A M N A T -

421 TTCAGCAGAGTGGCCCCGAAAAGGGCAGAATAGCGTTCCTCAGCCAGTCCGGAGCCTTC 480  
F S R V A P E K G R I A F L S Q S G A F -

481 ATTCTCGCGGTTCTTGAATGGTCAAAACGCAACGGTGTGCGGTTTCAGCAAGGTTGTCAGC 540  
I L A V L E W S K R N G V G F S K V V S -

541 TTGGGAAACAAGGCCATGCTCGACGAATCCGACTTCTGGAGTACCTGGCCAAAGATGAC 600  
L G N K A M L D E S D F L E Y L A K D D -

601 TCAACCGACGTCATTCTGATTACATGGAGGGTGTGGAAGATGGGCGAAAGTTCATGAGG 660  
S T D V I L I Y M E G V E D G R K F M R -

661 GTGGCGAAGAGTGTGGCAAGGAGGAAACCAAGTAGTGGTGTGAAGCGGGGAAGTCCAG 720  
V A K S V A R R K P V V V M K A G K S Q -

721 AGCGGTGCAAAGGCAGCTTCAAGCCACACGGGAAGTCTGGCAGGTAGCTACGAAGCTTAC 780  
S G A K A A S S H T G S L A G S Y E A Y -

781 AGAGCTGCATTACAGCAGAGTGGCGTTATTGAGGCGAGTTCAGTTGAAGAGCTATTTGAC 840  
R A A F R Q S G V I E A S S V E E L F D -

841 TTCGCACTGCTGCTGCTAAAATACAGAAAAGCCGAAACTTAGCAATTCTCACTAACTCA 900  
F A L L L L K Y R K A G N L A I L T N S -

901 GGCGGCCCGGGAGTTATGGCAGCGGATGCATGCGACCAGTTGGTGTGCCTCTGGCAAAC 960  
G G P G V M A A D A C D Q F G V P L A N -

961 TTCAATTTTGAACAATAAGGAAGCTCAAGGAGTTTCTGCCGCTGAGTCGAACCTTCTAC 1020  
F N F E T I R K L K E F L P A E S N F Y -

1021 AACCCGGTTGACATTCTGGGTGATGCCAGCGCCGAGAGATTTTCAAGATCCCTTCAAATT 1080  
N P V D I L G D A S A E R F S R S L Q I -

1081 CTTTCAGAGGATGAAAACGTGGACATCGTCTCACCATACTCACACCCACAGCGCAGATG 1140  
L S E D E N V D I V L T I L T P T A Q M -

1141 GACTTTTTTAAAGGCTGCGGAGAGTGTGTCGGAAGAATGCAGTTTGTCTGCTCATGGGT 1200  
D F L K A A E S V V G K N A V C C F M G -

1201 GGGGAGAGTGTAGATGAATCGGAAAGGATTCTGAGGAGTTCGGGCATTCGAACTTCTTC 1260  
G E S V D E S E R I L R S S G I P N F F -

1261 GACCCCGTGAGAGCGGTGAGGGCCATCTCGGTACTCGGAAGGTACTCTAAAATCTCTGCA 1320  
D P V R A V R A I S V L G R Y S K I S A -

1321 AAGGAAAGAGTGAAGGAAGACTTGGATGTGAGTGTGGAGCGGAGAAGGCTGAAGAAATT 1380  
K E R V K E D L D V S V E R E K A E E I -

1381 ATCGAAAAGCTGCTGGAGAGTGGTGGCAGAGTGGTGGGGCGGAAGGTTTGCCAGTACTG 1440  
I E K L L E S G G R V V G A E G L P V L -

1441 GAGGCATACGGCATTGAGGTTGCACCCACGGAATAGCCAGGAACGTTGACGAGGCGAGA 1500  
E A Y G I E V A P Y G I A R N V D E A R -

1501 GATATTGCGGAAAGCATTGGCTACCCGGTTGTTCTGAAGTTGTTTCCCCGATGTCGTG 1560  
 D I A E S I G Y P V V L K V V S P D V V -

1561 CACAAGAGTGATGTTGGTGGAGTAAACTCAATGTGGGGGAGAACGATTTGGAGAAAGCC 1620  
 H K S D V G G V K L N V G E N D L E K A -

1621 TTCTTCGAGATACTGTCAAACGTGGAGGGGAGGATGCCAAAGGCAAGAATTGAGGGTGTG 1680  
 F F E I L S N V E G R M P K A R I E G V -

1681 CTCGTTCAGAAGATGGTTGATGGGGGAAAGGAGCTGATAGTGGGTATGAAAAGGGATCCA 1740  
 L V Q K M V D G G K E L I V G M K R D P -

1741 CAGTTCGGTCCGATGATTATGTTTCGGAATGGGTGGGTTTACGTTGAGGTGCTGAAAGAC 1800  
 Q F G P M I M F G M G G V Y V E V L K D -

1801 GTTTCCTTCAGAATCGCCCCGATAACGAGAAGGGAGGCCATGAAATGGTCAGGGAAGTC 1860  
 V S F R I A P I T R R E A H E M V R E V -

1861 AAGGCTTACCGAATTTTGAGGGGGCTGAGGGGTGAGAAGCCAGCCGACATCGATGCGATT 1920  
 K A Y R I L R G L R G E K P A D I D A I -

1921 GCTGATTTGCTTTTTCGAGTTTCAAACCTAAGCTTGACCACCCCGAGGTCCTCGAAATG 1980  
 A D L L L R V S K L S L D H P E V L E M -

1981 GACCTGAATCCTGTCAAGGTGTTTGAGAGTGGATATGCTGTGGTGGATTTTCAGGATGGTT 2040  
 D L N P V K V F E S G Y A V V D F R M V -

2041 TTGGGTGAGGAGGTG 2055  
 L G E E V -

### ***acd AF1211 (7324) von Archaeoglobus fulgidus Stamm 7324***

1 ATGGAGCGCTTGTTTTACCCGAAAGTCGTGGCAGTGATAGGTGCTTACCTCAAGAGGGA 60  
 (M E R L F Y P) K V V A V I G A S P Q E G -

61 AAGGTGGGTAACACGATTATGAAAAATCTCAGAAACTTCAGCGGCACTGTCTATGCTGTA 120  
 K V G N T I M K N L R N F S G T V Y A V -

121 AACCCGAAGTACAGCGAAATACTTGGATTCCCGTGCTACCCCTCGGTACTCAAGATACCT 180  
 N P K Y R E I L G F P C Y P S V L K I P -

181 GAAAATGTGGACCTGGCCATCATCGTTGTTCCAGCGAAGCTCGTTCGGAAGGCAGTGGAG 240  
 E N V D L A I I V V P A K L V P K A V E -

241 GAGTGCGGAAGGAAGGCGTGAAGGTTCCGTGGTTTATTCGCGAGGCTTCAAGGAGGCC 300  
 E C G R K G V E G A V V I S A G F K E A -

301 GGGATTGAGGGGGCAAAGCTTGAGAGGGAAGTGGTCGAGGTGGCCGAAAGGTATGGCGTT 360  
 G I E G A K L E R E L V E V A E R Y G V -

361 AAGCTGGTTGGCCCCAACTGTCTCGGCATGATAAACACCGAGATTGCTATGAACGCCACG 420  
 K L V G P N C L G M I N T E I A M N A T -

421 TTCAGCAGAGTGGCCCCGAAAAGGGCAGAATAGCGTTCCTCAGCCAGTCCGGAGCCTTC 480  
 F S R V A P E K G R I A F L S Q S G A F -

481 ATTCTCGCGGTTCTTGAATGGTCAAACGCAACGGTGTGCGGTTTCAGCAAGGTTGTCAGC 540  
 I L A V L E W S K R N G V G F S K V V S -

541 TTGGGAAACAAGGCCATGATCGACGAATCCGACTTCTGGAGTACCTGGCCAAAGATGAC 600  
 L G N K A M I D E S D F L E Y L A K D D -

601 TCAACCGACGTCATTCTGATTTACATGGAGGGTGTGGAAGATGGGCGAAAGTTCATGAGG 660  
 S T D V I L I Y M E G V E D G R K F M R -

661 GTGGCGAAGAGTGTGGCAAGGAGGAAACCAGTAGTGGTGATGAAGGCGGGGAAGTCCCAG 720  
V A K S V A R R K P V V V M K A G K S Q -

721 AGCGGTGCAAAGGCAGCTTCAAGCCACACGGGAAGTCTGGCAGGTAGCTACGAAGCTTAC 780  
S G A K A A S S H T G S L A G S Y E A Y -

781 AGAGCTGCCCTTCAGGCAGAGCGGGTTATTGAGGCGAGTTCAGTTGAAGAGCTTTTGGAC 840  
R A A F R Q S G V I E A S S V E E L F D -

841 TTCGACTGCTGCTGCTAAAATACAGAAAAGCCGAAACTTAGCAATTCTCACTAACTCA 900  
F A L L L L K Y R K A G N L A I L T N S -

901 GCGCGCCCGGGAGTTATAGCAGCAGATGCATGCGACCAGTTTGGTGTGCCTCTGGCAAAAT 960  
G G P G V I A A D A C D Q F G V P L A N -

961 TTCAATTTTGAACAATAAGGAAGCTCAAGGAGTTCCTGCCCGCTGAAATCGAACTTCTAC 1020  
F N F E T I R K L K E F L P A E S N F Y -

1021 AACCCGGTTGACATTCTGGGTGATGCCAGCGCCGAGAGATTTTCAAGATCCCTTCAAAT 1080  
N P V D I L G D A S A E R F S R S L Q I -

1081 CTTTCAGAGGATGAAAACGTGGACATCGTCTGCCATACTCACACCCACAGCGCAGATG 1140  
L S E D E N V D I V L A I L T P T A Q M -

1141 GACTTTTTAAAGGCTGCGGAGAGTGTCTGCGAAAGAATGCAGTTTGTCTCATGGGT 1200  
D F L K A A E S V V G K N A V C C F M G -

1201 GGGGAGAGTGTAGATGAACCTGAAAGGATTCTGAGAGTTCGGGCATTCCGAACTTCTTC 1260  
G E S V D E P E R I L R S S G I P N F F -

1261 GACCCCGTGAGAGCGGTGAGGGCCATCTCGGTGCTCAGAAGGTACTCTGAAATCTCTGCA 1320  
D P V R A V R A I S V L R R Y S E I S A -

1321 AAGGAAAGAGTGAAGGAAGACTTGGATGTGAGTGTGGAGCGGAGAAGGCTGAAGAAAT 1380  
K E R V K E D L D V S V E R E K A E E I -

1381 ATCGAAAAGCTGCTGGAGAGTGGTGGCAGAGTGGTGGGGCGGAAGTTTGCCAGTACTG 1440  
I E K L L E S G G R V V G A E G L P V L -

1441 GAGGCATACGGCATTGAGGTTGCACCCTACGGAATAGCCAGGAACGTTGACGAGGCGAGA 1500  
E A Y G I E V A P Y G I A R N V D E A R -

1501 GATATTGCGGAAAGCATTGGCTACCCGGTTGTTCTGAAGTTGTTTCCCCGATGTCGTG 1560  
D I A E S I G Y P V V L K V V S P D V V -

1561 CACAAGAGTGATGTTGGTGGAGTAAAACCAATGTGGGGGAGAACGATTTTGAGAAAGCC 1620  
H K S D V G G V K L N V G E N D F E K A -

1621 TTCTTCGAGATACTGTCAAACGTGGAGGGGAGGATGCCAAAGGCAAGAATTGAGGGTGTG 1680  
F F E I L S N V E G R M P K A R I E G V -

1681 CTCGTTCAGAAGATGGTTGATGGGGGAAAGGAGCTGATAGTGGGTATGAAAAGGGATCCA 1740  
L V Q K M V D G G K E L I V G M K R D P -

1741 CAGTTCGGTCCGATGATTATGTTCCGAATGGGTGGGGTTTACGTGAGAGTGCTGAAAGAC 1800  
Q F G P M I M F G M G G V Y V E V L K D -

1801 GTTTCCTTCAGAATCGCCCCGATAACGAAAGGGGAGGCCCATGAAATGGTCAGGGAAGTC 1860  
V S F R I A P I T K R E A H E M V R E V -

1861 AAGCCTTACCGAATTTTGGGGGCTGAGGGGTGAGAAGCCAGCCGACATCGATGCGATT 1920  
K A Y R I L R G L R G E K P A D I D A I -

1921 GCTGATTTGCTTTTGGAGTTTCAAACTAAGCTTGGACCACCCCGAGGTCTCGAAATG 1980  
A D L L L R V S K L S L D H P E V L E M -

1981 GACCTGAATCCTGTTAAGGTGTTTGGAGTGGATATGCTGTGGTGGATTTTCAGGATGGTT 2040  
D L N P V K V F E S G Y A V V D F (R M V -

2041 TTGGGTGAGGAGGTG 2055  
L G E E V) -



**acd AF1938 von *Archaeoglobus fulgidus* Typstamm VC16**

1 ATGCTACTCCTCGAACACGAATCCAAAGCTCTGCTGGAAAAGTACGGCATAAAGACTGCA 60  
 M L L L E H E S K A L L E K Y G I K T A -  
 61 AAGTGCATCTTCTGCGAAACAGAAGAGCAGGCTGTTAAAGCTGCGAAGGAAATCGGCTTT 120  
 K C I F C E T E E Q A V K A A K E I G F -  
 121 CCCGTTGTGATGAAGGTTGCAGGGAGGAAATTTGTCACAAAAGCGATGTTGGTGGAGTC 180  
 P V V M K V A G R E I V H K S D V G G V -  
 181 ATTCTTAACGTTAAATCGGAGGATGAGGTTAGAGAGGTTTTTCAAAGGCTGATGTCCATT 240  
 I L N V K S E D E V R E V F Q R L M S I -  
 241 CCAAAGGCTGAGGGAGTTAACATTCAGCCCCAGCTTGAGAAGGGGATCGAGGTTATTGTT 300  
 P K A E G V N I Q P Q L E K G I E V I V -  
 301 GGC GTTGCAGAGAACGAGCAGTTTGAAGCGTTGCAATGTTTGGGCTTGGTGGTGTTTTT 360  
 G V A E N E Q F G S V A M F G L G G V F -  
 361 GTTGAGGTTCTGAAGGATGTCAGTTTCCGGCTTTTGCCTTAACAAGGAGAGATGCGGAG 420  
 V E V L K D V S F R L L P L T R R D A E -  
 421 GAGATGGTTAGGGAGGTTAAGGGGTATAAATTGTTGGAGGGTTACAGAAGAGTTAAGGGG 480  
 E M V R E V K G Y K L L E G Y R R V K G -  
 481 GATGTTGGGGCTGTGTTGATTTGCTGCTTAAGCTGAATGAGGTTGTTGAGAGGGAGAGT 540  
 D V G A V V D L L L K L N E V V E R E S -  
 ATAGTGGAGATGGACCTGAATCCTGTGTTTGTATGAGAGAGGAGCTGTTGTCGCAGAC  
 I V E M D L N P V F V Y E R G A V V A D -  
 601 GCGAGGATAGTTGTTGGGGAGAGGAAGAGGTTCTGACTACACGATTCGGGATTTGCGGGAC 660  
 A R I V V G E R K R F D Y T I P D L R D -  
 661 CTTTTCTACCCGAAAAGCGTTGCCGTCATAGGAGCTTCAAGAACTGTAGGCAAGCCGGGA 720  
 L F Y P K S V A V I G A S R T V G K P G -  
 721 TTTAACATAGTCTGGAATTTAAAGCAGAATGGGTTTATGGGTAAAATTTACCCGGTAAAT 780  
 F N I V W N L K Q N G F M G K I Y P V N -  
 781 CCGAACGCTGACAAGATACTCGAATTGAAGTGCTACCCCTCAATTCTAGACATCCCGGAT 840  
 P N A D K I L E L K C Y P S I L D I P D -  
 841 GAGGTGGACATGGCGATAATTGCCGTTCCGGCTAAAATTTGTTCCGGAAGTGATGGCGGAG 900  
 E V D M A I I A V P A K I V P E V M A E -  
 901 TGCGCTCAGAAGGAATCAAAGGAGCGGTCATAGTGAGCTCGGGCTTCAGCGAGGAAGGG 960  
 C A Q K G I K G A V I V S S G F S E E G -  
 961 GAGAAGGGGGCTGAATACGAGAGAAGGGTGCTCGAAATTGCCAAGAAGCACGGAATAAGG 1020  
 E K G A E Y E R R V L E I A K K H G I R -  
 1021 ATTTTCGGCCCTAACACGACGGGCGTGCTCAACACGAAAACGGATTCATTACATCCTTT 1080  
 I F G P N T T G V L N T E N G F I T S F -  
 1081 GCAATCCAGCCCCTCATCAAGAAGGAAACATCGGCATAATCGCACAGACGGGGCTATTC 1140  
 A I Q P V I K K G N I G I I A Q T G L F -  
 1141 CTCGGAATTATGATGGATATAGTCACGTCAAACCATCCGAGCATAGGCTTCAGCAAAATC 1200  
 L G I M M D I V T S N H P S I G F S K I -  
 1201 GTAGGAATGGGAAACAAAATCGATGTGGAGGACTACGAGGTTCTCGATTTTCTGCTGAAA 1260  
 V G M G N K I D V E D Y E V L D F L L K -  
 1261 GATGAGCAGACGAAGGTAATAGGCATTTACATGGAAGGAATAAAGAATGGCAGGGCTTTT 1320  
 D E Q T K V I G I Y M E G I K N G R A F -

1321 TACGATGTTGCCTCCAGTGCTGAGAAGCCCATCGTGGTTTTCAAGAGCGGAAGGACGGAG 1380  
Y D V A S S A E K P I V V F K S G R T E -

1381 TACGGGCAAAGGCCGAATGAGCCACACGGCTTCAATTTGCGGAGACGATGACGTTTTTC 1440  
Y G Q K A A M S H T A S I C G D D D V F -

1441 GATGCCGTGTGCAGGCAAGCGAACCTCGTAAGGGTTTACAGCTTCGACGAGCTTTTCGAC 1500  
D A V C R Q A N L V R V Y S F D E L F D -

1501 GTGACCAAAGCCTTTTCGCTCCAGCCCCTTCCAAAAGGGGACAGGGTGGCAATCATCCAC 1560  
V T K A F S L Q P L P K G D R V A I I H -

1561 TACACCGTTCTGGTTGTGTTCAGGGGTGACGCTGCATACTTTGCCGGATTAAAGCTA 1620  
Y T G S G C V Q G S D A A Y F A G L K L -

1621 GCAGAATTTTCAAAGATACTGTTGATAAAATAAGTGAAGTCACACCCGAATGGCACAAC 1680  
A E F S K D T V D K I S E V T P E W H N -

1681 GTGAACAACCCAATTGATATATGGCCAATGGTGAATACTACGGAGCCTTCAAGGCTTAT 1740  
V N N P I D I W P M V E Y Y G A F K A Y -

1741 CAGACCGCAATAGAAGCTGTAATGGAGGATGAAGGCGTGGATTTCGTCATCGCGTGCCTA 1800  
Q T A I E A V M E D E G V D S V I A C V -

1801 TGGGCAAACAGGCTCATCAACGCCGACTTTGAGCCGGATTACAAGGCCTCAAGAAGTAC 1860  
W A N R L I N A D F E P D Y K S L K K Y -

1861 GGCAAGCCCATCTACTTCTGCGTTGAGGGGCAAGAGACGTCGTTTTTCGACCACAAAAAT 1920  
G K P I Y F C V E G A R D V V F D H K N -

1921 GCCCTTGAGCTTAACGGTATTCCCCTTTACACCAACGTGATAAACGCGGTGAATGTTCTC 1980  
A L E L N G I P V Y T N V I N A V N V L -

1981 GGAAAGGTGACGAAATACGCAAAAAGGAGAATTCAGTCGTGA 2011  
G K V T K Y A K R R I Q S \* -

***acdMJ0590 von Methanococcus jannaschii***

1 ATGTGGGGGAGGGATTATGAGCTTAAATATATTTCTATCCAAAATCAGTTGCTATTATT 60  
M W G R D Y E L K Y I S Y P K S V A I I -

61 GGAGCTTCAAAAAGTGAAGGAAAGGTTGGATATGCAATAATGAAAAATTTAAAAGACTTT 120  
G A S K T E G K V G Y A I M K N L K D F -

121 AATGGAAAAATCTATCCATAAAATCCAAAATATGATGAAATATTCGGAATAAAATGCTAT 180  
N G K I Y P I N P K Y D E I F G I K C Y -

181 AAATCAGTTTTGGACGTTGAGGATGACATAGATTTGGCAGTTATAGTAGTTCCAAATATT 240  
K S V L D V E D D I D L A V I V V P N I -

241 GTTGTTCCTAAGGTATTGGAAGAATGTGGAAAAAAGGGTTAAAGGGCTGTAATTATT 300  
V V P K V L E E C G K K G V K G A V I I -

301 ACAGCTGGCTTTTCAGAAGTAGGAAATATGAGTTGGAAAAATAAAATTAAGAAATAGCA 360  
T A G F S E V G N Y E L E N K I K E I A -

361 AAAAGATACAACATAAGAATTATAGGGCCTAATGTTTtaggtataatgaacacccatata 420  
K R Y N I R I I G P N C L G I M N T H I -

421 AACTTAAATGCCACATTTGCGAAGGTATTTCTCCAAAAGGAGGAGTTCAATAATCTCA 480  
N L N A T F A K V F P P K G G V S I I S -

481 CAAAGTGGGGCTGTTTTAAATGCCATATTAGACATAGCCCCTTTATTGAATATTGGCTTT 540  
Q S G A V L N A I L D I A P L L N I G F -

541 TCTAAAGTTGTTAGCATTGGAAATAAAGCTGATATTCAGGAAAGTGATTTATTAGAGTAT 600  
S K V V S I G N K A D I Q E S D L L E Y -

601 TTTTATAGATGATGAAGATACTAAGATAGTTGTTTTATACATAGAAGGATTAAGGATAAG 660  
F L D D E D T K I V V L Y I E G L K D K -

661 AGATTTTTTAAAGTAGCTAAAAATTATCTAAGAAAAAGCCAATAATTGCCCTAAAATCT 720  
R F L K V A K K L S K K K P I I A L K S -

721 GGAAGAACTGAAGTAGGAAAGAAAGCGCAAAATCCCACACTGGCTCTTTAGCTGGAGAA 780  
G R T E V G K K A A K S H T G S L A G E -

781 GATGTTATCTATGAGGCAGCGTTTAAAGAAGCTGGGATAATTAGGGCATATACGTTTGAG 840  
D V I Y E A A F K E A G I I R A Y T F E -

841 GAGTTAGTTGATTTAATCCATTTATTCTCAACACAGCCAACAATAAGCTCAAATGAAATT 900  
E L V D L I H L F S T Q P T I S S N E I -

901 GGAATAATAACAAATGCAGGAGGATTTGGAGTTTTCAGCTGATAGCTGTGTGATTAT 960  
G I I T N A G G F G V L A A D S C V D Y -

961 AACATGAAGCTATCTAACTTTGAAAAATCAACAATAGAAAAGCTTAAAAATATCTGCCA 1020  
N M K L S N F E K S T I E K L K N I L P -

1021 CCAACTGCCAATATATCAAATCCATTGGATATTATAGGAGATGCCACACCAGAGAGATAT 1080  
P T A N I S N P L D I I G D A T P E R Y -

1081 AAAAAGGTTATAGAAGTTTTAGCTGAAGATAGCAATGTTAAGGGGCTTTTAGTTATCTTA 1140  
K K V I E V L A E D S N V K G L L V I L -

1141 ACTCCACAAGAGATGACAAAACCATTAGAAGTTGCTAAATCTATTATAGAAGTTAAAAAT 1200  
T P Q E M T K P L E V A K S I I E V K N -

1201 TCCCATAAAGAATTTAAAAATAAACCGTTAATTACTTCATTTGTTGGAGGAGTTTCAGTT 1260  
S H K E F K N K P L I T S F V G G V S V

1261 AAAGGAGCTAAAAGTTATTTAAGGAAGAATGGAATCCCTGCATACATAACTCCAGAAAAT 1320  
K G A K S Y L R K N G I P A Y I T P E N -

1321 GGTGTCAAAGCCCTATCTCATCTCTATAAATATAGCTTAATGAAAGTTAAGGAAGATTAT 1380  
G V K A L S H L Y K Y S L M K V K E D Y -

1381 GATGAATACTTAGAAAATATTAAGAAGAGTTTCATAAAAATTAAGGAAAATAAAGAA 1440  
D E Y L E N I K E E F I K I T E E N K E -

1441 ATTATTAAGAATTATTATCAAATCCAAATGAATACACTGCTAAAAAATTATTAAGCATT 1500  
I I K E L L S N P N E Y T A K K L L S I -

1501 TATGGTCTTCCAGTTCCTAAGGGCTATTTAGCTAAAAATGAAGATGAAGCTTTAGAATAT 1560  
Y G L P V P K G Y L A K N E D E A L E Y -

1561 TGCAAAAAATTAGGTAAATGCGTAATGAAAATGTTCTCACCACAAATAATACATAAAACG 1620  
C K K L G K C V M K I V S P Q I I H K T -

1621 GAGGCAGGAGGAGTTATAATAAATCCAAAAATCCTAAAGAGGCATTTAAAAAATTAATT 1680  
E A G G V I I N P K N P K E A F K K L I -

1681 GAAAATGCTAAGGAATATGCAAAAAGAATGGGCATTGATAATTTAATTATAGAGGGAGTG 1740  
E N A K E Y A K R M G I D N L I I E G V -

1741 TTAGTTGAAGAGTTCATTGAGAAAGATATGATGGAAATTATAATAGGGGCTAAGAGGGAT 1800  
L V E E F I E K D M M E I I I G A K R D -

1801 GATATTTTTGGCTCTGTAGTTATGGTTGGGTTAGGAGGAGTATTTGTTGAGGTTTTAAAA 1860  
D I F G S V V M V G L G G V F V E V L K -

1861 GATGTATCTTTTGGCATTTCGCCAATAACAAGGGACTTTGCTCATGAGATGTTGAGGGAA 1920  
D V S F G I S P I T R D F A H E M L R E -

```
1921 TTGAAATCCTATAAAGTCTTAGAAGGCGTTAGAGGAAGACCTAAGAGAGATATTAAC TTT 1980
    L K S Y K V L E G V R G R P K R D I N F -
1981 ATTGTTGATACCCCTAATAAAGATTGGAGTATTTATGGATATTCACAAAGAGATTAAAGAG 2040
    I V D T L I K I G V F M D I H K E I K E -
2041 CTTGATTTAAACCCAGTATTTGTCTTTAATGAAAAAGAGGGAGGATGTATAGGTGATGCA 2100
    L D L N P V F V F N E K E G G C I G D A -
2101 AGAATAATTTAAA 2113
    R I I K -
```

**Sequenzen der in der vorliegenden Arbeit benutzten ORFs:** *acdAI* und *acdBI* von *P. furious*, *acdAF1211* und *acdAF1938* von *A. fulgidus* Typstamm VC16, *acdAF1211*-Homolog aus dem Stamm *A. fulgidus* 7324 und *acdMJ0590* aus *M. jannaschii*. Es sind die Nucleotidsequenzen mit den jeweiligen Positionen sowie die sich daraus ergebenden Aminosäuresequenzen angegeben. In dem *acdAF1211*-Homolog aus dem Stamm *A. fulgidus* 7324 sind die vom Typstamm VC16 abweichenden Nucleotide und abgeleiteten Aminosäuren des Gens AF1211 durch graue Unterlegung der Buchstaben gekennzeichnet. Die durch Vorgabe der Klonierungsprimer vorgegebenen Aminosäuren am N- und C-Terminus sind im AF1211-Homolog eingeklammert. Abkürzungen: RBS = Ribosomenbindestelle.

## 8 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
Acd	Acetyl-Coenzym A Synthetase (ADP-bildend)
ACS	Acetyl-Coenzym A Synthetase
ADP	Adenosindiphosphat
ADP-ACS	ADP-bildende Acetyl-CoA Synthetase
<i>A. fulgidus</i>	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CoA	Coenzym A
Da	Dalton
DEAE	Diethylaminoethyl
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSM(Z)	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen
DTE	Dithiotreitol
DTT	Dithioerytreitol
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-Nitrobenzoesäure)
$\epsilon$	Extinktionskoeffizient
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPPS	N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[3-propane-sulfonic acid]
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
Fd	Ferredoxin
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
GC-Gehalt	Guanin -Cytosin-Gehalt
g	Gramm
g	relative Zentrifugalbeschleunigung (9.81 m/s <sup>2</sup> )
h	Stunde
H <sup>+</sup>	Proton
HiLoad	high load capacity
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	zweifach deionisiertes Wasser
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
K <sub>m</sub>	Michaeliskonstante
l	Liter
LB	Luria-Bertani
Lsg.	Lösung
LDH	Lactat-Dehydrogenase
m	Meter
M	molar
MES	2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure
min	Minute

<i>M. jannaschii</i>	<i>Methanococcus jannaschii</i>
NADP <sup>+</sup>	Nicotin-adenin-dinucleotid-phosphat
NADH	Reduziertes Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
n.b.	nicht bestimmt
OR	Oxidoreduktase
ORF	offener Leserahmen
OD <sub>x</sub>	optische Dichte bei x Nanometer
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEP	Phosphoenolpyruvat
<i>P. furiosus</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
<i>Pfu</i> -Turbo	<i>Pyrococcus furiosus</i> -Turbo DNA-Polymerase
P <sub>i</sub>	anorganisches Phosphat
PP <sub>i</sub>	Pyrophosphat
Pwo	<i>Pyrococcus woesei</i>
RBS	Ribosomenbindestelle
rek.	rekombinant
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunden
SDS	Natriumdedocylsulfat
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
T <sub>m</sub>	Schmelzpunkt
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Masse pro Volumen
V	Volt
V	Geschwindigkeit des Substratumsatzes
V <sub>max</sub>	Maximalgeschwindigkeit des Substratumsatzes
°C	Grad Cesium

Symbole für den Nukleinsäurecode:

A	Desoxyadenosin	G	Desoxguanosin
C	Desoxycytidin	T	Desoxythymidin

Symbole für Aminosäuren:

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

## 9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Peter Schönheit für die Überlassung des Themas, die Betreuung und Förderung und für die hilfreichen Diskussionen.

Kerstin Lutter-Mohr danke ich für die ständige Unterstützung und die tolle Zusammenarbeit in "E28".

Antje Labes, Ulrike Johnsen und Christopher Bräsen möchte ich ganz besonders herzlich für die entspannte Atmosphäre, die konstruktive Zusammenarbeit im Labor, die Hilfe in Computerangelegenheiten und die ständige Gesprächsbereitschaft auf der „Bank“ danken.

Bei Bente Rudolph und Thorsten Marezky möchte ich mich für die engagierte und zuverlässige Arbeit als Praktikanten und auch für die „lernintensive Zeit“ danach bedanken.

Dr. Martina Selig danke ich für die nette Einführung in die Arbeitsgruppe und für die geduldige Einarbeitung in die Proteinbiochemie.

Dr. Thomas Hansen sei sehr gedankt für seine Diskussionsbereitschaft und Hilfe in vielen Bereichen.

Allen übrigen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Allgemeine Mikrobiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel – besonders Frau Brigitte Vass - möchte ich für die angenehme Zusammenarbeit danken.

Abschließend möchte ich der Europäischen Union und der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit danken.

## 10 Lebenslauf

Meike Musfeldt

geb. am: 14.06.1968

Staatsangehörigkeit: deutsch

### *Schulbildung:*

1974-1978      Grundschule Burg/Dithmarschen

1978-1987      Meldorfer Gelehrtenschule

Juni 1987      Allgemeine Hochschulreife

### *Ausbildung:*

1987-1990      Ausbildung zur Bankkauffrau in der Verbandsparkasse Meldorf

### *Hochschulausbildung:*

WS 1990/91      Studiengang Biologie an der Justus-Liebig-Universität Gießen

SS 1991-96      Studium der Biologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Hauptfach: Mikrobiologie, Nebenfächer: Biochemie und Botanik

Juni 1996-97      Diplomarbeit am Institut für Allgemeine Mikrobiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel bei Herrn Prof. Dr. M. Thomm mit dem Thema: „Charakterisierung und Expression des potentiellen Elongationsfaktors TFIS in *Archaea*“.

August 1997      Abschluß als Diplombiologin

Januar 1998      Beginn der experimentellen Arbeiten zu der vorliegenden Dissertation am Institut für Allgemeine Mikrobiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. P. Schönheit

### *Berufstätigkeit:*

1997-2001      Wissenschaftliche Angestellte am Institut für Allgemeine Mikrobiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel