

**Identifizierung und Charakterisierung der Enzyme der
Acetatbildung und der Acetataktivierung
in halophilen und hyperthermophilen Archaea:**

ADP-bildende und AMP-bildende Acetyl-CoA Synthetasen
aus *Haloarcula marismortui* und *Pyrobaculum aerophilum*



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

vorgelegt von
Christopher Bräsen

- Kiel 2003 -

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Januar 2000 bis August 2003 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, den

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.

.....
(Christopher Bräsen)

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

Christopher Bräsen und Peter Schönheit

Mechanisms of acetate formation and acetate activation in halophilic archaea

Arch. Microbiol. (2001) 175:360-368

Christopher Bräsen, Claus Urbanke und Peter Schönheit

Unusual AMP-forming acetyl-CoA synthetases in archaea: An octameric extremely thermophilic enzyme from *Pyrobaculum aerophilum* and an extremely halophilic enzyme from *Haloarcula marismortui*

Christopher Bräsen und Peter Schönheit

ADP-forming acetyl-CoA synthetases from the hyperthermophilic crenarchaeon *Pyrobaculum aerophilum* and from the extremely halophilic euryarchaeon *Haloarcula marismortui*

Inhalt

1	Zusammenfassung	6
2	Summary	8
3	Einleitung	10
4	Material und Methoden	20
4.1	Physiologische Untersuchungen mit extrem halophilen Archaea	20
4.1.1	Wachstumsversuche und Züchtung	20
4.1.2	Suspensionsversuche	23
4.1.3	Zellernte und Aufschluss der Zellen.....	23
4.1.4	Nachweis von Enzymaktivitäten in Rohextrakten.....	23
4.1.5	Analytische Methoden.....	26
4.2	Molekularbiologische Methoden.....	28
4.2.1	Computergestützte Sequenzanalysen.....	28
4.2.2	Isolierung genomischer DNA.....	28
4.2.3	Polymerase Kettenreaktion.....	28
4.2.4	Konzentration und Reinheitsanalyse von DNA.....	31
4.2.5	Klonierung von PCR-Produkten in einen Vektor.....	31
4.2.6	Transformation	32
4.2.7	Sequenzierung	33
4.2.8	Expression	33
4.3	Proteinbiochemische Methoden.....	35
4.3.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	35
4.3.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	35
4.3.3	Blotten und N-terminale Aminosäuresequenzierung.....	36
4.3.4	Apparentes Molekulargewicht von nativen Proteinen.....	36
4.3.5	Dialyse.....	37
4.3.6	Ultrafiltration.....	37
4.3.7	Reinigung nativer Proteine	37
4.3.8	Reaktivierung von rekombinanter ACD und ACS aus <i>Ha. marismortui</i> aus Einschlusskörpern	39
4.3.9	Rekonstitution der rekombinanten ACD aus <i>P. aerophilum</i>	39
4.3.10	Reinigung rekombinanter Proteine.....	40
4.4	Charakterisierung von gereinigten Enzymen.....	41
4.4.1	Charakterisierung der ACD und der ACS aus <i>Ha. marismortui</i>	41
4.4.2	Charakterisierung der ACD und der ACS aus <i>P. aerophilum</i>	43

5	Ergebnisse.....	45
5.1	Identifizierung der Enzyme der Acetatbildung und der Acetataktivierung in halophilen Archaea.....	45
5.1.1	Wachstumsexperimente.....	45
5.1.2	Enzymaktivitäten in unterschiedlichen Wachstumsphasen von <i>Ha. marismortui</i>	48
5.1.3	Acetatverbrauch von <i>Ha. marismortui</i> in Zellsuspensionen.....	53
5.2	Reinigung und Charakterisierung der Enzyme der Acetatbildung und Acetataktivierung in <i>Ha. marismortui</i> : ACD und ACS.....	54
5.2.1	Reinigung und Charakterisierung der ACD aus <i>Ha. marismortui</i>	54
5.2.2	Reinigung und Charakterisierung der ACS aus <i>Ha. marismortui</i>	59
5.3	ACD und ACS aus dem hyperthermophilen Crenarchaeon <i>P. aerophilum</i>	64
5.3.1	Identifizierung und Charakterisierung der ACD aus <i>P. aerophilum</i>	64
5.3.2	Klonierung, Expression und Charakterisierung der rekombinanten ACS aus <i>P. aerophilum</i>	69
6	Diskussion.....	72
6.1	Acetatstoffwechsel in halophilen Archaea.....	72
6.2	ACD aus <i>Ha. marismortui</i> und <i>P. aerophilum</i>	76
6.3	ACS aus <i>Ha. marismortui</i> und <i>P. aerophilum</i>	82
7	Literatur.....	89
	Anhang.....	99
	Abkürzungen.....	103
	Danksagung.....	105
	Lebenslauf.....	106

1 Zusammenfassung

Acetat ist eines der wichtigsten Endprodukte energieliefernder Fermentationsprozesse vieler anaerober oder fakultativer Bacteria und Archaea. Darüber hinaus stellt Acetat aber auch ein weit verbreitetes Substrat für Katabolismus und Anabolismus aerober und anaerober pro- und eukaryontischer Mikroorganismen dar. Bisherige Untersuchungen deuten darauf hin, dass der Mechanismus der Acetatbildung in Prokaryonten domänenspezifisch ist. In Bacteria wird die Acetatbildung von zwei Enzymen, der Acetat Kinase (AK) und der Phosphotransacetylase (PTA), katalysiert, während in Archaea die Acetatbildung über nur ein Enzym, die ADP-bildende Acetyl-CoA Synthetase (ACD), erfolgt. Die Hauptmechanismen der Acetataktivierung, der weitverbreitete Mechanismus über eine AMP-bildende Acetyl-CoA Synthetase (ACS) bzw. der von weniger Organismen beschrittene Mechanismus über den reversiblen AK/PTA-Weg, kommen dagegen beide sowohl in Bacteria als auch in Archaea vor. Untersuchungen zur Acetatbildung in Archaea und dem daran beteiligten Enzym, der ACD, existierten bisher nur für wenige hyperthermophile, anaerobe Euryarchaeota. Zudem lagen über die Acetataktivierung in Archaea, außer für die methanogenen *Methanosaeta* und *Methanosarcina* Spezies, keine Informationen vor. Daher sollten in dieser Arbeit das Wachstum der halophilen Archaea auf Glucose und Acetat untersucht und die Enzyme der Acetatbildung und -aktivierung identifiziert, charakterisiert sowie die kodierenden Gene ermittelt werden. Außerdem sollten die Gene, die für die entsprechenden Enzyme in dem hyperthermophilen Crenarchaeon *Pyrobaculum aerophilum* kodieren, identifiziert, kloniert und exprimiert sowie die rekombinanten Proteine biochemisch charakterisiert werden.

Identifizierung und Charakterisierung der Enzyme der Acetatbildung und -aktivierung in halophilen Archaea

Wachstumsexperimente mit den extrem halophilen Archaea *Haloarcula marismortui*, *Halorubrum saccharovorum*, *Haloferax volcanii* und *Halococcus saccharolyticus* auf Glucose, Acetat und Glucose/Acetat enthaltenden Medien ergaben, dass die Haloarchaea Glucose und Acetat als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen können und dass Glucose gegenüber Acetat das bevorzugte Substrat ist. Zudem konnte mit Enzymmessungen in unterschiedlichen Wachstumsphasen gezeigt werden, dass die Aktivitäten von ACD und ACS substratabhängig reguliert werden. In Phasen der Acetatbildung bei Wachstum auf Glucose stieg die Aktivität der ACD an, wohingegen die der ACS abnahm. Dagegen stieg in Phasen des Acetatverbrauches umgekehrt die ACS Aktivität an, die der ACD nahm aber ab. Zusammen mit dem Befund, dass weder AK noch PTA nachgewiesen werden konnten, zeigten diese Experimente deutlich, dass die Acetatbildung in Haloarchaea von einer ACD katalysiert wird, während die Acetataktivierung über eine induzierbare ACS erfolgt.

ACD und ACS wurden aus *Ha. marismortui* gereinigt und charakterisiert. Die kodierenden Gene wurden identifiziert, kloniert und die rekombinanten Proteine aus Einschlusskörpern reaktiviert und gereinigt. Die ACD ist ein 166 kDa Homodimer und katalysierte die reversible

ADP- und P_i -abhängige Acetatbildung aus Acetyl-CoA. Das Enzym benötigte Hochsalzbedingungen (3 M KCl) für die Stabilität und setzte neben Acetat auch Propionat, Butyrat, Isobutyrat und Isovalerat, nicht aber die aromatischen Säuren Phenylacetat oder Indol-3-acetat um. Die ACS ist ein 71 kDa Monomer und katalysierte die ATP- und CoA-abhängige Umsetzung von Acetat zu Acetyl-CoA, wobei AMP und PP_i gebildet werden. Die ACS benötigte 1.25 M KCl für optimale Aktivität und setzte bevorzugt Acetat um und zusätzlich nur Propionat mit deutlich geringerer Effizienz. Der K_m -Wert der ACS für Acetat war mit 0.23 mM etwa 10fach kleiner als der der ACD (2.6 mM). Diese höhere Acetataffinität könnte der Grund für die Induktion der ACS bei Wachstum auf Acetat sein, weil Acetat v.a. in geringen Konzentrationen, wie sie in hypersalinen Habitaten vorkommen, erheblich effizienter aktiviert werden kann.

ADP-bildende und AMP-bildende Acetyl-CoA Synthetasen aus dem hyperthermophilen Crenarchaeon *Pyrobaculum aerophilum*

Im Genom von *P. aerophilum* wurden Gene identifiziert, die für eine putative ACD und eine ACS kodieren. Die ORFs wurden exprimiert und die rekombinanten Proteine biochemisch charakterisiert. Es wurde gezeigt, dass die ORFs PAE3250 und PAE3249 aus *P. aerophilum*, die für eine funktionelle ACD kodierten, eine für bisher charakterisierte ACD ungewöhnliche Genstruktur aufwiesen. Beide ORFs lagen im Genom einander überlappend vor, bildeten aber keinen einheitlichen Leserahmen. Demzufolge bestand das Enzym aus zwei Untereinheiten (50 kDa und 28 kDa) und zeigte eine heterooligomere Struktur. Die *P. aerophilum* ACD zeigte eine bisher für ACD nicht beschriebene Substratspezifität. Neben Acetyl-CoA wurden mit signifikanten Aktivitäten auch Isobutyryl-CoA und Phenylacetyl-CoA umgesetzt. Daneben wies das Enzym ein Temperaturoptimum von über 93°C und hohe Thermostabilität bis 100°C auf.

Die von dem ORF PAE2867 kodierte ACS aus *P. aerophilum* ist ein thermostabiles Enzym mit einer für ACS einzigartigen oligomeren Struktur. Das aus 77 kDa Untereinheiten bestehende Enzym wurde als 615 kDa Homooktamer charakterisiert. Das Enzym zeigte ein Temperaturoptimum von über 97°C und wies eine breitere Substratspezifität auf als alle bisher charakterisierten ACS. Neben Acetat wurden auch Formiat, Propionat, Butyrat und Isobutyrat als Substrate akzeptiert. Außerdem waren die Substrataffinitäten z.B. für Acetat (K_m -Wert 3 μ M) 100fach höher als für die meisten charakterisierten ACS. Sequenzvergleiche der in dieser Arbeit charakterisierten archaeellen ACS mit anderen bekannten und putativen ACS Sequenzen zeigten, dass diese Enzyme in allen drei Domänen hochkonservierte Proteine sind. Phylogenetische Analysen mit ACS Sequenzen aus allen drei Domänen ergaben eine separate archaeelle Gruppe, zu der auch die ACS aus *P. aerophilum* gehörte. Dieses spricht für eine monophyletische Entwicklungslinie der archaeellen ACS.

2 Summary

Acetate is an important end product of energy yielding fermentation processes of many anaerobic and facultative bacteria and archaea. Acetate is also a substrate of catabolism and anabolism in several aerobic and anaerobic prokaryotic and eukaryotic microorganisms. Previous studies have indicated that the mechanism of acetate formation in prokaryotes is domain-specific. In bacteria, acetyl-CoA is converted to acetate by the “classical” mechanism involving two enzymes, phosphotransacetylase (PTA) and acetate kinase (AK). In all acetate forming archaea studied so far, the formation of acetate is catalyzed by only one enzyme, an acetyl-CoA synthetase (ADP-forming) (ACD). In contrast, the two main mechanisms of acetate activation in prokaryotes occur both in bacteria and archaea. The mechanism via a single enzyme, an AMP-forming acetyl-CoA synthetase (ACS), is widely used, whereas the mechanism via the reversible AK/PTA pathway is used by fewer organisms. Acetate formation and the acetate forming enzyme in archaea, the ACD, has been studied only in a few hyperthermophilic anaerobic euryarchaea. Furthermore, acetate activation in archaea has not been studied so far, except for the methanogenic *Methanosaeta* and *Methanosarcina* species. Thus, in this thesis growth of halophilic archaea with glucose and acetate was studied. The enzymes of acetate formation and acetate activation were identified and characterized and the coding genes were discovered. In addition, the genes coding for the corresponding enzymes in the hyperthermophilic crenarchaeon *Pyrobaculum aerophilum* were identified, cloned and expressed, and the recombinant enzymes were characterized.

Identification and characterization of acetate forming and acetate activating enzymes in halophilic archaea

Growth experiments with *Haloarcula marismortui*, *Halorubrum saccharovorum*, *Haloferax volcanii* and *Halococcus saccharolyticus* on glucose, acetate and glucose/acetate mixtures revealed that the haloarchaea utilize both glucose and acetate as carbon and energy source and that glucose is the preferred substrate compared to acetate. Enzyme measurements in various growth phases indicated that the regulation of activities of ACD and ACS is dependent on the growth substrate. During periods of glucose consumption and acetate formation the activity of ACD was upregulated whereas the activity of ACS was downregulated. In contrast, upregulation of ACS and downregulation of ACD was observed during periods of acetate consumption. Neither AK nor PTA could be detected in crude extracts of any of the haloarchaea tested. These data strongly indicate that acetate formation in extremely halophilic archaea is catalyzed by ACD whereas acetate activation proceeds via an inducible ACS.

Both ACD and ACS were purified and characterized from *Ha. marismortui*. The coding genes were identified, cloned and expressed in *E. coli*. The recombinant enzymes were reactivated from inclusion bodies, purified and characterized. ACD is a 166 kDa homodimer and catalyzes the reversible ADP and P_i dependent acetate formation from acetyl-CoA. The enzyme requires high salt concentrations (3 M KCl) for stability. In addition to acetate,

propionate, butyrate, isobutyrate and isovalerate were accepted as substrates but not the aromatic acids phenylacetate and indol-3-acetate. ACS is a 71 kDa monomer which required 1.25 M KCl for optimal activity. The enzyme catalyzes ATP- and CoA-dependent conversion of acetate to acetyl-CoA, yielding AMP and PP_i. In addition to acetate only propionate was converted with much lower efficiency. The K_m value (0.23 mM) for acetate of ACS was 10fold lower as compared to ACD (2.6 mM). This higher affinity for acetate might be the reason for induction of ACS, which enables the organism to scavenge for small concentrations of acetate, shown to be present in hypersaline environments.

ADP-forming and AMP-forming acetyl-CoA synthetase from the hyperthermophilic crenarchaeon *Pyrobaculum aerophilum*

In the genome sequence of *P. aerophilum* genes were identified encoding a putative ACD and ACS, respectively. The coding function of these genes was proved by heterologous expression and characterization of the recombinant proteins. The ORFs PAE3250 and PAE3249, which code for α and β subunit of a functional ACD, had an unusual structure among all ACD genes identified so far. In the genome both ORFs overlap each other by 1 bp with PAE3250 preceding PAE3249. Thus, both genes are not in frame and hence encode two separated subunits α (50 kDa) and β (28 kDa). The *P. aerophilum* ACD is therefore a heterooligomer and exhibited a broader substrate specificity than the other ACD described so far. In addition to acetyl-CoA, both isobutyryl-CoA and phenylacetyl-CoA were converted to the corresponding acids. Aside from these unique features the protein had a temperature optimum of more than 93°C and was highly thermostable up to 100°C.

The highly thermostable ACS from *P. aerophilum* encoded by ORF PAE2867 has a unique oligomeric structure among all ACS described so far, which are monomers or homodimers. Composed of 77 kDa subunits the enzyme has an apparent molecular mass of 615 kDa indicating a homooctameric structure. The *P. aerophilum* ACS showed a temperature optimum of more than 97°C and an unusually broad substrate specificity. In addition to acetate, formate, propionate, butyrate and isobutyrate were accepted as substrates. Furthermore, the substrate affinities, e.g. for acetate (K_m 3 μ M), were up to 100fold higher as compared to the other ACS characterized so far.

Comparisons of amino acid sequences of the archaeal ACS characterized in this work with other putative and characterized ACS sequences revealed that ACS are well conserved through all three domains of life. Phylogenetic analyses indicate a distinct archaeal cluster within a prokaryotic group of sequences, suggesting a monophyletic lineage of the archaeal ACS.

3 Einleitung

Sequenzvergleiche von 16 S-rRNA und 18 S-rRNA aus prokaryontischen und eukaryontischen Organismen führten zu einem phylogenetischen Stammbaum des Lebens, nach dem sich die Gesamtheit der Organismen in die drei Domänen Eukarya, Bacteria und Archaea gliedert (Woese 1987; Woese et al. 1990). Die Archaea unterscheiden sich von den Bacteria und Eukarya neben den 16 S-rRNA Sequenzmustern durch zahlreiche molekulare und biochemische Merkmale. Die Art des Zellwandaufbaus und der Cytoplasmamembran ist für die Archaea charakteristisch. Die Zellwand enthält weder Muraminsäure noch D-Aminosäuren und kann Proteine, Pseudomurein, Polysaccharide oder auch Methanochondroitin enthalten (Kandler und König 1985; Kandler und König 1998). Die Plasmamembran besteht anstelle von Glycerinestern aus Di- oder Tetraetherlipiden (Langworthy und Pond 1986; De Rosa und Gambacorta 1988). Sie trägt zur Stabilität bei, die für die Besiedlung extremer Standorte nötig ist. Einige Charakteristika der Archaea ähneln denen der Eukarya, wie z.B. der Transkriptionsmodus (Thomm 1996) sowie das Vorhandensein von Histonproteinen (Stein und Searcy 1978; Grayling et al. 1996) und das Vorkommen von Introns in tRNAs (Kaine et al. 1983).

Die Domäne der Archaea wird in die Crenarchaeota und Euryarchaeota eingeteilt (Woese et al. 1990). Die Crenarchaeota sind phänotypisch relativ homogen und zum großen Teil hyperthermophil. In diese Gruppe gehören schwefelabhängige Ordnungen, wie z.B. die *Sulfolobales* und die *Desulfurococcales* sowie auch die *Thermoproteales* (Woese 1987). In letztere Ordnung wird auch das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte stäbchenförmige Archaeon *Pyrobaculum aerophilum* gestellt, das bei einem Wachstumsoptimum von 100°C mikroaerophil oder mit Nitratreduktion auf komplexen organischen Substanzen wie Hefeextrakt und Pepton, aber auch auf Propionat, Acetat und, wie kürzlich gezeigt wurde, auch auf Maltose wächst (Völkl et al. 1993; Gebhard 2002). Neben diesem chemoorganoheterotrophen Wachstum wurde auch chemolithoautotrophes Wachstum mit Wasserstoff oder Thiosulfat beschrieben (Völkl et al. 1993).

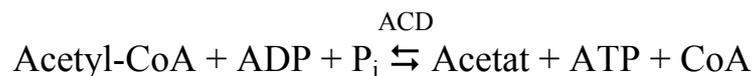
Die Euryarchaeota stellen eine phänotypisch heterogene Gruppe dar. Sie weisen in Bezug auf Lebensraum und Physiologie sehr vielfältige Eigenschaften auf. Neben mesophilen Organismen, unter denen die Methanogenen dominieren (Burggraf et al. 1991), sind thermophile Organismen der Ordnungen *Archaeoglobales*, *Thermoplasmatales* und *Thermococcales* und die extrem halophilen Organismen zu finden (Woese und Olsen 1986; Woese 1987). Diese extrem halophilen Archaea bilden als *Halobacteriaceae* die einzige Familie der *Halobacteriales*, die 17 Gattungen haloneutraler und haloalkaliphiler Organismen umfasst (Grant et al. 2001; Vreeland et al. 2002; Oren et al. 2002; Hezayen et al. 2002; Kamekura 1998). Die extrem halophilen Archaea sind charakterisiert als unbewegliche oder mit Geißelbüscheln bewegliche, chemoorganoheterotrophe, aerobe Stäbchen oder Coccen, z.T. auch unregelmäßig coccoid, flach, dreieckig bis quadratisch. Das Wachstumsoptimum liegt im Bereich von 40°C und einer Salzkonzentration zwischen 2 M

(12%) und 5.5 M (gesättigt), optimal bei 4.5 M (25%) NaCl (Kushner 1985; Kamekura 1998; Grant et al. 2001). Es werden keine Sporen oder sonstige Überdauerungsstadien ausgebildet. Die charakteristische Rotfärbung der Organismen geht auf C₅₀- (Bacterioruberine) und C₄₀-Carotinoide (Lycopene) in den Zellmembranen zurück, die die Zellen vor photooxidativen Schäden schützen (Grant et al. 2001; Oren 1994; Tindall 1992). Daneben enthalten die Membranen der meisten Haloarchaea Retinal-Proteine, von denen das Bacteriorhodopsin am bekanntesten ist. Es wirkt als lichtgetriebene Protonenpumpe und ermöglicht den *Halobacteriaceae* durch die dadurch mögliche ATP-Synthese z.T. ein anaerobes Wachstum (Hartmann et al. 1980; Lanyi 1993; Grant et al. 2001; Mukohata 1994; Mukohata et al. 1999; Oren 1994; Stoeckenius und Bogomolni 1982). Während das Bacteriorhodopsin bisher nur für *Halobacterium salinarum* und *Halorubrum sodomense* (ehem. *Halobacterium*) beschrieben wurde, sind das Halorhodopsin, ein lichtgetriebener Chlorid-Importer, und zwei photosensorische Rhodopsine (SRI und SRII), die an der Phototaxis beteiligt sind, innerhalb der extrem halophilen Archaea weiter verbreitet (Oren 1994; Grant et al. 2001; Montrone et al. 1993; Soppa et al. 1993). Neben dem anaeroben Wachstum durch lichtgetriebene Energiegewinnung wurde für einige Spezies außerdem anaerobes Wachstum mit der Fermentation von Arginin oder mit Nitrat- oder Fumaratatmung beschrieben (Hartmann et al. 1980; Ruepp und Soppa 1996; Oren 1991; Oren 1994; Kushner 1985; Tomlinson et al. 1986). Die extrem halophilen Archaea galten zunächst als Organismen mit insgesamt sehr komplexen Wachstumsansprüchen, die in erster Linie Aminosäuren verstoffwechseln. Es ist mittlerweile aber für viele extrem halophile Arten beschrieben worden, dass auch verschiedene Zucker, insbesondere Glucose, als Kohlenstoff- und Energiequelle genutzt werden können (Hochstein 1988; Rawal et al. 1988; Danson 1993; Grant et al. 2001; Tindall 1992; Kushner 1985). Zu diesen gehören auch die in dieser Arbeit untersuchten Organismen *Haloarcula marismortui* (Oren et al. 1988; Oren et al. 1990), *Halorubrum saccharovorum* (Tomlinson und Hochstein 1976; McGenity und Grant 1995), *Haloferax volcanii* (Mullakhanbhai und Larsen 1975; Torreblanca et al. 1986) und *Halococcus saccharolyticus* (Montero et al. 1989; Tomlinson und Hochstein 1972a).

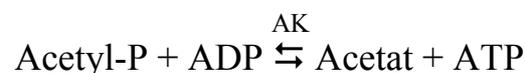
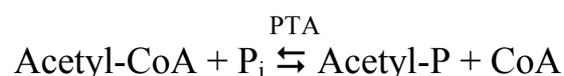
In allen bisher untersuchten Archaea erfolgt der Glucoseabbau nicht über die klassischen glykolytischen Abbauwege wie Embden-Meyerhof und Entner-Doudoroff Weg, sondern über modifizierte Formen dieser Wege (Selig et al. 1997; Verhees et al. 2003; Johnsen et al. 2001). Die anaeroben hyperthermophilen Archaea *Pyrococcus furiosus*, *Thermococcus celer*, *Thermoproteus tenax* und *Archaeoglobus fulgidus* bauen Glucose über modifizierte Embden-Meyerhof Wege ab, die ungewöhnliche, nicht klassische Zuckerkinasen und GAP-oxidierende Enzyme aufweisen (Selig et al. 1997; Schönheit und Schäfer 1995; Labes und Schönheit 2001). Die aeroben *Sulfolobus solfataricus* und *Thermoplasma acidophilum* setzen Glucose über einen modifizierten, nicht-phosphorylierten Entner-Doudoroff Weg um (De Rosa et al. 1984; Smith et al. 1989). Für die extrem halophilen Archaea wurde gezeigt, dass Glucose über einen modifizierten, partiell phosphorylierten Entner-Doudoroff Weg zu Pyruvat abgebaut wird, während Fructose über einen modifizierten Embden-Meyerhof Weg verstoffwechselt wird (Tomlinson et al. 1974; Rawal et al. 1988; Altekar und Rangaswamy 1990; Altekar und

Rangaswamy 1992; Johnsen et al. 2001). Die Acetyl-CoA Bildung aus Pyruvat erfolgt bei Haloarchaea ebenso wie bei allen anderen daraufhin untersuchten Archaea über eine Pyruvat: Ferredoxin Oxidoreduktase (POR) (Kerscher und Oesterhelt 1981; Schäfer et al. 1993).

Bei vergleichenden Untersuchungen der Acetatbildung aus Zuckern wurde erstmals in *P. furiosus* ein für Prokaryonten neuartiges Enzym, die Acetyl-CoA Synthetase (ADP-bildend) (ACD), gefunden (Schäfer und Schönheit 1991). Dieses ungewöhnliche Enzym katalysiert die reversible Acetatbildung aus Acetyl-CoA und die damit verbundene ATP-Bildung aus ADP und anorganischem Phosphat über Substratstufenphosphorylierung:



Erstmals beschrieben wurde die ACD in den eukaryontischen, parasitisch lebenden amitochondriaten Einzellern *Entamoeba histolytica* und *Giardia lamblia* (Reeves et al. 1977; Müller 1988; Sanchez und Müller 1996). In diesen Organismen ist die ACD an der fermentativen Energiegewinnung unter anaeroben Bedingungen beteiligt. In *P. furiosus* katalysiert die ACD die Hauptreaktion der Energiekonservierung bei Fermentation von Kohlenhydraten und Peptiden zu Acetat (Selig et al. 1997). Neben der ACD aus *P. furiosus* wurde dieses Enzym in allen acetatbildenden Archaea, insbesondere den hyperthermophilen zuckerfermentierenden Organismen der Gattungen *Thermococcus*, *Desulfurococcus* und in stärkegewachsenen Zellen von *Archaeoglobus fulgidus* Stamm 7324 gefunden (Schäfer und Schönheit 1991; Schäfer et al. 1993; Labes und Schönheit 2001). Dieser Ein-Stufen Mechanismus der Acetatbildung über eine ACD war von Interesse, weil der bisher bekannte Mechanismus der Acetyl-CoA Umsetzung zu Acetat zwei Enzyme, die Phosphotransacetylase (PTA) und die Acetat Kinase (AK) umfasst:



Dieser „klassische“ Zwei-Stufen Mechanismus kommt in allen acetatbildenden Prokaryonten aus der Domäne der Bacteria vor (Decker et al. 1970; Thauer et al. 1977; Gottschalk 1986; Schäfer et al. 1993), konnte aber in acetatbildenden Archaea bisher nicht nachgewiesen werden. Daraus wurde postuliert, dass der Mechanismus der Acetatbildung bei Prokaryonten domänenspezifisch ist (Schäfer et al. 1993) (Abbildung 1).

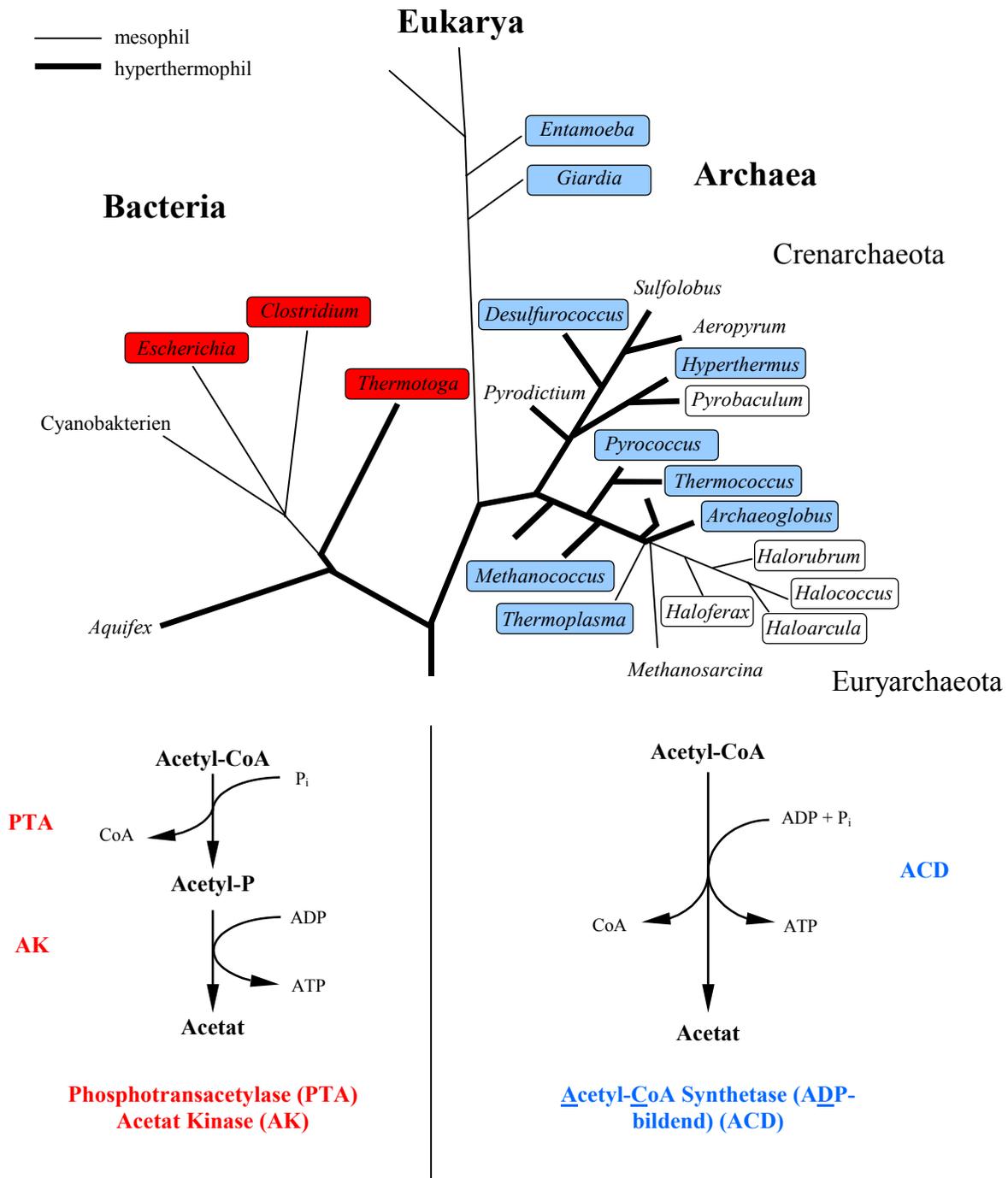


Abbildung 1 Verbreitung im phylogenetischen Stammbaum und Reaktionsgleichungen der Enzyme der Acetyl-CoA Umsetzung zu Acetat (Stetter 1996, modifiziert). Verzweigungsgrad und Verzweigungslängen basieren auf rRNA-Sequenzvergleichen (schematisch nach (Woese et al. 1990; Stetter 1993), modifiziert). Hyperthermophile Organismen sind durch dicke Linien dargestellt. Blau sind alle Organismen gekennzeichnet, die die ACD nutzen, rot diejenigen, die AK und PTA verwenden. Organismen, die in dieser Arbeit untersucht wurden, sind mit einem Rahmen ohne Farbe gekennzeichnet.

Auch für die mesophilen aeroben Haloarchaea war mehrfach beschrieben worden, dass bei aerobem Wachstum auf Zuckern, insbesondere auf Glucose und auch auf Fructose, signifikante Mengen an Acetat gebildet werden (Tomlinson und Hochstein 1972b; Tomlinson und Hochstein 1976; Hochstein 1978; Oren et al. 1988; Montero et al. 1989; Schäfer et al. 1993; Arahall et al. 1996). Die Acetatbildung unter aeroben Bedingungen spricht dafür, dass das über die POR aus Pyruvat gebildete Acetyl-CoA nur teilweise über den Citrat-Zyklus und die Atmungskette oxidiert wird (Danson 1993; Hochstein 1988). Entsprechend wurden als Ursache für diese aerobe Acetatbildung u.a. limitierende Aktivitäten der Enzyme des Citrat-Zyklus, z.B. der Citrat Synthase, diskutiert, die zu einer intrazellulären Anhäufung von Acetyl-CoA und Pyruvat führen (Hochstein, 1978). Acetyl-CoA und Pyruvat werden dann als Acetat bzw. in geringeren Mengen auch als Pyruvat ins Medium abgegeben. Erste Untersuchungen zum Mechanismus der Acetatbildung in *Hr. saccharovororum* deuteten darauf hin, dass die Acetatbildung nicht von den „klassischen“ eubakteriellen Enzymen AK und PTA katalysiert wird, sondern wie auch bei den anderen bisher untersuchten acetatbildenden Archaea von einer ACD (Schäfer et al. 1993).

Neben Zuckern können viele hyperthermophile Archaea, wie z.B. *Hyperthermus butylicus*, *P. furiosus*, und auch die Haloarchaea, Peptide als Kohlenstoff und Energiequelle nutzen. Im Zuge der Peptidfermentation in hyperthermophilen Archaea, z.B. in *P. furiosus*, werden die durch Transaminierung aus den jeweiligen Aminosäuren gebildeten 2-Ketosäuren über 2-Ketosäure: Ferredoxin Oxidoreduktasen in die korrespondierenden CoA-Ester umgewandelt (Abbildung 2). Dabei setzt die POR Pyruvat zu Acetyl-CoA um (Kunow et al. 1995). Die 2-Ketoisovalerat: Ferredoxin Oxidoreduktase (VOR) ist am aktivsten mit 2-Ketosäuren, die aus den verzweigten Aminosäuren Valin, Leucin, Isoleucin sowie Methionin entstehen (Heider et al. 1996). Die Indolpyruvat: Ferredoxin Oxidoreduktase (IOR) ist spezifisch für die Umsetzung von aromatischen 2-Ketosäuren aus aromatischen Aminosäuren (Mai und Adams 1994). Bei der Peptidfermentation setzt *P. furiosus* die durch die 2-Ketosäure: Ferredoxin Oxidoreduktasen gebildeten CoA-Ester zu den entsprechenden Säuren um, wie z.B. Acetat, Isobutyrat, Isovalerat und Phenylacetat (Abbildung 2) (Mai und Adams, 1996).

Diesen unterschiedlichen Fermentationsprodukten entsprechend wurden in *P. furiosus* zwei Isoenzyme der ACD mit unterschiedlichen Substratspezifitäten identifiziert, gereinigt und biochemisch charakterisiert (Mai und Adams 1996; Glasemacher et al. 1997). Diese ACD Isoenzyme sind 145 kDa Heterotetramere ($\alpha_2\beta_2$), die aus zwei Untereinheiten α (25 kDa) und β (47 kDa) bestehen. Aufgrund der Substratspezifitäten für die CoA-Ester und deren korrespondierenden Säuren wurden den ACD Isoenzymen I und II unterschiedliche Funktionen zugeordnet (Abbildung 2). Während das Isoenzym I im Zuge der Kohlenhydrat- und Pyruvatfermentation vor allem Acetyl-CoA zu Acetat umsetzt, katalysiert das Isoenzym II bevorzugt die Umsetzung der Abbauprodukte aromatischer Aminosäuren wie Phenylacetyl-CoA oder Indolacetyl-CoA zu den korrespondierenden Säuren und ist damit vermutlich hauptsächlich an der Peptidfermentation beteiligt (Mai und Adams 1996; Schut et al. 2003). Beide Isoenzyme setzen zusätzlich mit geringerer Effizienz jeweils auch den verzweigten

Acyl-Säure-Ester Isobutyryl-CoA um, was dafür spricht, dass beide Isoenzyme zusätzlich am Abbau verzweigtkettiger Aminosäuren beteiligt sind (Abbildung 2).

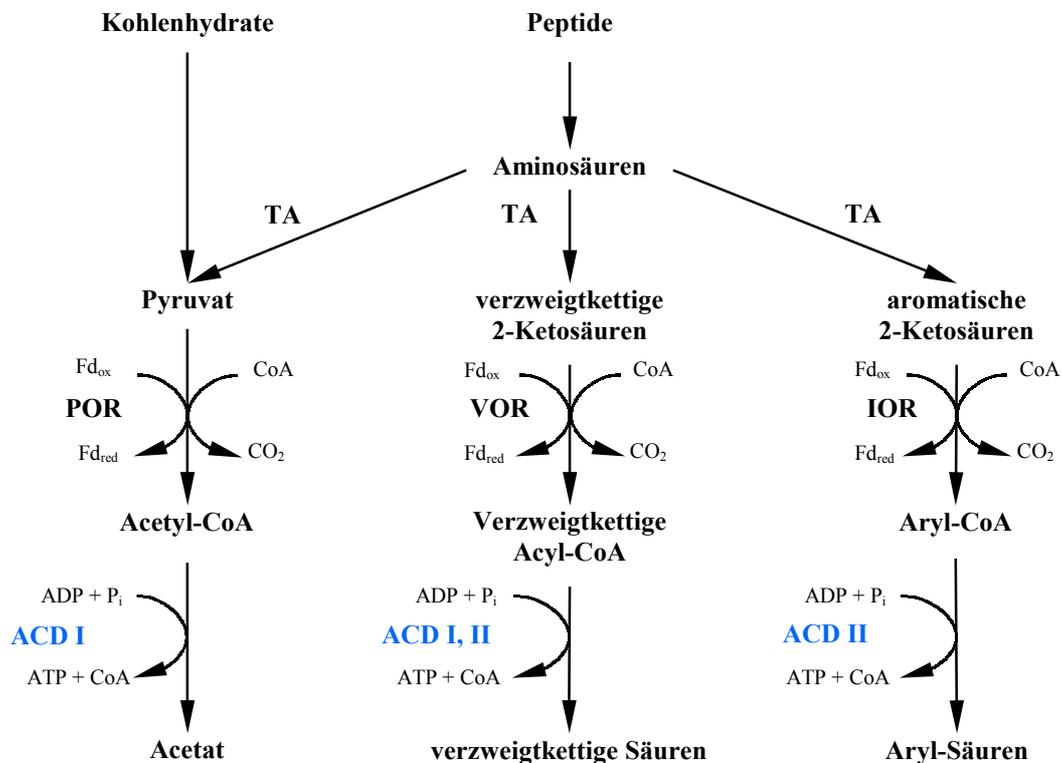


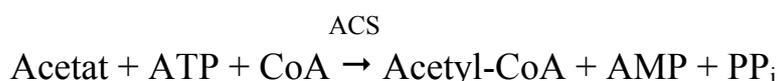
Abbildung 2 Funktion der ADP-bildenden Acetyl-CoA Synthetasen Isoenzyme ACD I und ACD II bei Kohlenhydrat- bzw. Peptidfermentation in *A. fulgidus* und *P. furiosus*. TA = Transaminasen, POR = Pyruvat: Ferredoxin Oxidoreduktase, VOR = 2-Ketoisovalerat: Ferredoxin Oxidoreduktase, IOR = Indolpyruvat: Ferredoxin Oxidoreduktase, ACD = ADP-bildende Acetyl-CoA Synthetase.

Die kodierenden Gene konnten mit Hilfe der N-terminalen Aminosäuresequenzen der Untereinheiten der *Pyrococcus* ACD (Isoform I) und der ACD aus *G. lamblia* in parallelen Studien mittels Klonierung und funktioneller Expression in *E. coli* identifiziert werden. Dabei zeigte sich, dass die für die α - und für die β -Untereinheit des Isoenzym I aus *P. furiosus* kodierenden Gene *acdIA* und *acdIB* an unterschiedlichen Orten im Chromosom lokalisiert und nicht in einem Operon organisiert sind. Dagegen stellt das kodierende Gen für die ACD aus *G. lamblia* eine Fusion der Homologen der α - und der β -Untereinheit von *P. furiosus* dar und kodiert für ein Protein mit 726 Aminosäuren und mit einer molekularen Masse von 78 kDa (Musfeldt et al. 1999; Sanchez et al. 1999). Mit Hilfe dieser Gene konnten in den sequenzierten Genomen der Archaea *P. horikoshii*, *P. abyssi*, *A. fulgidus* und *Methanococcus jannaschii* sowie einiger Bacteria, insbesondere *E. coli* und *Streptomyces coelicolor*, und Eukarya weitere ORFs identifiziert werden, die für hypothetische ACD kodieren. Interessanterweise stellten mit Ausnahme der Gene aus den *Pyrococcus* Stämmen alle identifizierten ORFs analog zum *G. lamblia* Gen fusionierte Homologe der α - und der β -Untereinheit von *P. furiosus* in verschiedenen Orientierungen ($\alpha\beta$ oder $\beta\alpha$) dar (Musfeldt et

al. 1999; Sanchez et al. 1999). Die kodierende Funktion zweier ORFs aus *A. fulgidus* (AF1211 und AF1938) und eines ORFs aus *M. jannaschii* (MJ0590) wurde mittels Klonierung und funktioneller Expression überprüft. Die beiden *A. fulgidus* ORFs kodieren für zwei ACD Isoenzyme, wobei die ACD AF1211 ähnliche Substratspezifitäten wie das Isoenzym I aus *P. furiosus* aufwies und die ACD AF1938 wie das Isoenzym II (Musfeldt und Schönheit 2002). Im Gegensatz zu den *P. furiosus* Enzymen handelt es sich bei diesen neuartigen ACD um 140 kDa Homodimere (α_2), die aus zwei 74 kDa Untereinheiten bestehen. Aufgrund der Substratspezifitäten wurde den beiden *A. fulgidus* Enzymen eine ähnliche Funktion zugeordnet wie den Isoenzymen aus *P. furiosus*. Der ORF MJ0590 aus *M. jannaschii* kodiert ebenfalls für eine homodimere ACD (160 kDa), die aus 74 kDa Untereinheiten besteht (Musfeldt und Schönheit 2002). Diese zeigt eine ähnliche Substratspezifität wie die Isoenzyme I aus *P. furiosus* und *A. fulgidus*. Eine Funktion dieses Enzyms in *M. jannaschii* beim Abbau des von diesem Organismus als Speicherstoff gebildeten Glycogen zu Acetat wurde diskutiert (Musfeldt und Schönheit 2002).

Während für einige hyperthermophile Euryarchaeota damit der Mechanismus der Acetatbildung und das daran beteiligte Enzym, die ACD, sowohl funktionell als auch biochemisch gut charakterisiert waren, existierten für die mesophilen aeroben Haloarchaea kaum Informationen. Insbesondere über das haloarchaeelle Enzym der Acetatbildung lagen weder funktionelle noch biochemische Untersuchungen vor und auch die kodierenden Gene und ihre Struktur waren unbekannt. Deswegen war es Aufgabe dieser Arbeit, die Acetatbildung der extrem halophilen Archaea bei Wachstum auf Glucose näher zu untersuchen, das Enzym der Acetatbildung zu identifizieren und biochemisch zu charakterisieren sowie die kodierenden Gene und ihre Struktur zu ermitteln. Darüber hinaus sollte aus der Regulation der Aktivität des acetatbildenden Enzyms unter unterschiedlichen Wachstumsbedingungen die physiologische Funktion des Enzyms in den aeroben Organismen geklärt werden.

Acetat ist aber nicht nur eines der wichtigsten Endprodukte energieliefernder Fermentationsprozesse vieler anaerober oder fakultativer Prokaryonten, sondern auch ein weit verbreitetes Substrat für Katabolismus und Anabolismus aerober und anaerober, pro- und eukaryontischer Mikroorganismen. Generell sind bisher für den ersten Schritt im Acetatmetabolismus, der Aktivierung von Acetat zu Acetyl-CoA, zwei Hauptmechanismen beschrieben worden (Abbildung 3). Am weitesten verbreitet ist der Ein-Stufen Mechanismus über eine AMP-bildende Acetyl-CoA Synthetase (ACS):



Dieser Mechanismus kommt vor allem bei Eukaryonten und allen strikt aeroben sowie einigen fakultativen Bakterien vor, z.B. bei *E. coli* (Thauer 1988; Brown et al. 1977). Weniger

verbreitet ist der Zwei-Stufen Mechanismus über Acetat Kinase und Phosphotransacetylase (Abbildung 3). Dieser wurde nur für wenige Organismen beschrieben, unter anderem z.B. für *Corynebacterium glutamicum* und *Azotobacter vinelandii* und ebenfalls für *E. coli* (Brown et al. 1977; Tauchert et al. 1990; Reinscheid et al. 1999). Bei *E. coli* wird allerdings der AK/PTA-Weg nur bei hohen Acetatkonzentrationen beschriftet (Kumari et al. 1995). Der AK/PTA-Weg ist also reversibel und wird nicht nur - wie oben beschrieben - zur Acetatbildung herangezogen, sondern in einigen Fällen auch zur Acetataktivierung.

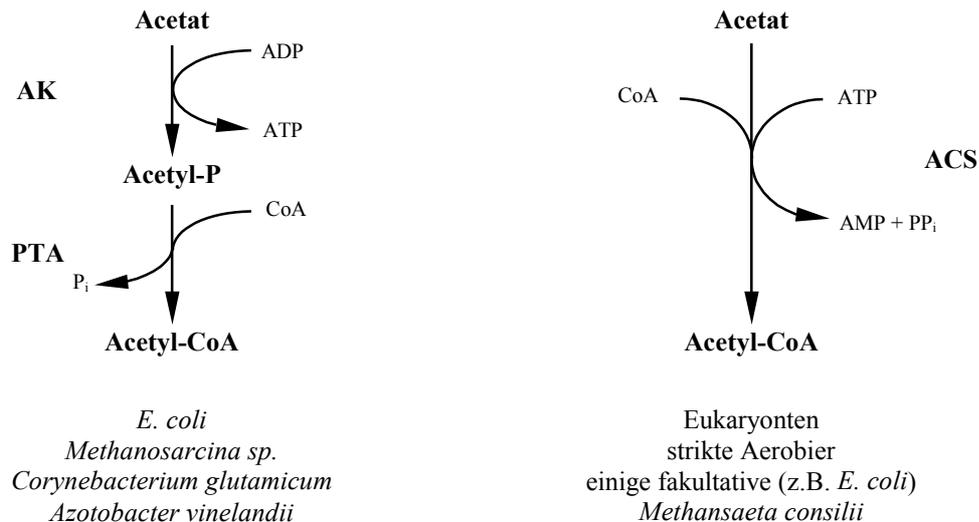


Abbildung 3 Hauptmechanismen der Acetataktivierung. (A) Mechanismus über Acetat Kinase (AK) und Phosphotransacetylase (PTA); (B) Mechanismus über die AMP-bildende Acetyl-CoA Synthetase (ACS).

In der Domäne der Archaea war über das Wachstum auf Acetat und über den Mechanismus der Acetataktivierung kaum etwas bekannt. Untersuchungen diesbezüglich existierten nur bei den strikt anaeroben acetoclastischen Methanogenen der Gattungen *Methanosarcina* und *Methanosaeta*, die durch Acetatdisproportionierung zu CH_4 und CO_2 wachsen. Dabei nutzen *Methanosaeta* Spezies den Mechanismus über eine ACS, während *Methanosarcina* Spezies Acetat über AK und PTA aktivieren (Jetten et al. 1989; Jetten et al. 1992; Teh und Zinder 1992; Aceti und Ferry 1988; Ferry 1997; Kenealy und Zeikus 1982). Beide Mechanismen wurden zudem in H_2 -verwertenden Methanogenen gefunden, die Acetat für den Baustoffwechsel benötigen (Oberlies et al. 1980; Shieh und Whitman 1987). Beide Mechanismen der Acetataktivierung kommen also sowohl in der Domäne der Bacteria als auch in der Domäne der Archaea vor. Daraus wird deutlich, dass im Gegensatz zur Acetatbildung der Mechanismus der Acetataktivierung in Prokaryonten nicht domänenspezifisch ist. Ein dritter, weniger verbreiteter Mechanismus der Acetataktivierung läuft über eine Succinyl-CoA: Acetat CoA-Transferase ($\text{Succinyl-CoA} + \text{Acetat} \rightleftharpoons \text{Succinat} + \text{Acetyl-CoA}$) und wurde bisher nur für einige anaerobe Eubakterien beschrieben (Thauer et al. 1989).

Für die aeroben Archaea der *Halobacteriaceae* existierten Hinweise, dass Acetat als Kohlenstoff- und Energiequelle genutzt werden kann (Oren et al. 1988; Montero et al. 1989; Oren 1995; Oren und Gurevich 1995; Kevbrina und Plakunov 1992). Dabei wurde für die Haloarchaea die Induktion der Schlüsselenzyme des Glyoxylat-Zyklus bei Wachstum in Gegenwart von Acetat mehrfach nachgewiesen, was darauf hindeutet, dass, wie bei allen fettsäureverstoffwechselnden Aerobiern, Acetat über den Glyoxylat-Zyklus in den Baustoffwechsel eingeschleust wird (Aitken und Brown 1969; Oren und Gurevich 1995; Serrano et al. 1998; Serrano und Bonete 2001b). Dagegen existieren keine detaillierten Untersuchungen zum Wachstum der halophilen Archaea auf Acetat und zum Mechanismus der Acetataktivierung. Daraus ergab sich die zweite Aufgabe dieser Arbeit: Es sollte das Wachstum der halophilen Archaea auf Acetat untersucht werden und das Enzym der Acetataktivierung identifiziert, charakterisiert sowie die kodierenden Gene ermittelt werden. Dabei war im Besonderen von Interesse, ob in vivo - analog zum reversiblen Mechanismus über AK und PTA in Bacteria - Acetat auch, falls vorhanden, über die in vitro reversible ACD aktiviert werden kann.

Für hyperthermophilen Crenarchaeota lagen zum Acetatstoffwechsel kaum Informationen vor. Für viele hyperthermophile Bacteria und Archaea war beschrieben, dass organische Substrate wie Zucker und Peptide u.a. zu Acetat fermentiert werden (Schönheit und Schäfer 1995). Dabei wurde gezeigt, dass auch in einigen hyperthermophilen Crenarchaeota die Acetatbildung bei Zucker- und Peptidfermentation nicht über den „klassischen“ eubakteriellen Zwei-Stufen Mechanismus mittels AK und PTA erfolgt, sondern über den archaeellen Ein-Stufen Mechanismus mittels ACD (Schäfer et al. 1993). Genauere biochemische Untersuchungen über dieses Enzym in Crenarchaeota lagen aber nicht vor. Während für viele hyperthermophile Organismen gezeigt werden konnte, dass bei Wachstum auf organischen Substraten wie Zuckern und Peptiden signifikante Mengen an Acetat gebildet werden, lagen zum Wachstum dieser Organismen auf Acetat keine Informationen vor. Erst kürzlich konnten für zwei hyperthermophile, anaerobe Euryarchaeota, *Ferroglobus placidus* und *Geoglobus ahangari*, erste Hinweise auf Acetatverwertung mit Fe(III) als Elektronenakzeptor erbracht werden (Tor et al. 2001). Auch für das hyperthermophile, acidophile Crenarchaeon *Sulfolobus acidocaldarius* wurde kürzlich Acetatwachstum dokumentiert. Dabei wurde das Vorhandensein der Schlüsselenzyme des Glyoxylat-Zyklus als anaplerotische Sequenz belegt, die damit auch in aeroben Archaea weit verbreitet zu sein scheint (Uhrigshardt et al. 2002). Über den Mechanismus der Acetataktivierung in hyperthermophilen Archaea war nichts bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit konnten mit Blast-P Suche im sequenzierten Genom von *P. aerophilum* (Fitz-Gibbon et al. 2002) sowie in den Genomen einiger weiterer hyperthermophiler Crenarchaeota sowohl ACD-homologe Sequenzen als auch zum Teil als ACS annotierte ORFs gefunden werden. Dagegen konnten Gene für die bifunktionellen Enzyme AK und PTA in keinem der crenarchaeellen Genome identifiziert werden, was darauf hindeutet, dass weder Acetatbildung noch Acetataktivierung in den hyperthermophilen Crenarchaeota von diesen Enzymen katalysiert wird. Die beiden ORFs PAE3250 und PAE3249 aus *P. aerophilum*, die putativ für α - und β -Untereinheit einer ACD kodieren,

wiesen dabei eine besondere Genstruktur auf. Beide ORFs lagen hintereinander, um ein Basenpaar einander überlappend im Genom vor, bildeten aber keinen einheitlichen Leserahmen. Da weder über ACD noch über ACS in hyperthermophilen Crenarchaeota biochemische Untersuchungen vorlagen, war es eine weitere Aufgabe dieser Arbeit, die aufgrund ihrer interessanten Struktur putativ für eine ACD kodierenden Gene und ein annotiertes ACS Gen aus *P. aerophilum* zu klonieren, zu exprimieren und die rekombinanten Proteine zu charakterisieren.

4 Material und Methoden

4.1 Physiologische Untersuchungen mit extrem halophilen Archaea

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Organismen *Haloarcula marismortui* (DSM 3752), *Halorubrum saccharovorum* (DSM 1137) (ehem. *Halobacterium saccharovorum*), *Haloferax volcanii* (DSM 3757) und *Halococcus saccharolyticus* (DSM 5350) wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig) bezogen.

4.1.1 Wachstumsversuche und Züchtung

Die Stammlösungen, aus denen die Medien für das Wachstum der extrem halophilen Archaea zusammengesetzt waren, sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1 Bestandteile der Medien für die Züchtung der extrem halophilen Archaea nach Tomlinson (1972b) sowie Schäfer et al. (1993) mit Modifikationen:

Mineralsalzlösung I (5 x)		Mineralsalzlösung II (5 x)	
MES	97.5g	Tris	30.4 g
KCl	10 g	KCl	10 g
Na-Glutamat	5 g	Na-Glutamat	5 g
Na-Citrat	15 g	Na-Citrat	15 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	100 g	MgSO ₄ x 7H ₂ O	100 g
(pH 7.35 mit 10 N NaOH eingestellt)		(pH 7.35 mit 10 N HCl eingestellt)	
Spurenelementlösung (100 x)		Vitaminlösung (100 x) (sterilfiltriert)	
EDTA (Titriplex II)	1.5 g	Biotin	2 mg
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0.01 g	Folsäure	2 mg
MnSO ₄ x H ₂ O	0.01 g	Pyridocin-HCl x H ₂ O	11 mg
FeSO ₄ x 7H ₂ O	0.5 g	Riboflavin	5 mg
CoCl	0.1 g	Thiamin-HCl	5 mg
ZnSO ₄	0.1 g	Nicotinamid	5 mg
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0.1 g	Ca-Pantothenat	5 mg
		Vitamin B ₁₂	0.1 mg
		p-Aminobenzoesäure	5 mg

Alle Lösungen wurden in 1 l A. bidest angesetzt und bei 4°C gelagert.

Die Medien für die Züchtung der extrem halophilen Archaea auf Glucose wurden mit den in Tabelle 1 aufgeführten Bestandteilen wie folgt angesetzt (Angaben pro Liter Medium), Glucose und Vitamine wurden nach Autoklavieren als sterilfiltrierte Stammlösungen zum Medium gegeben.

Tabelle 2 Medienzusammensetzung für die Züchtung von *Halorubrum saccharovororum*, *Haloarcula marismortui*, *Haloferax volcanii* und *Halococcus saccharolyticus* bei Wachstum auf Glucose:

Medium für <i>Halorubrum saccharovororum</i> auf 50 mM Glucose:		Medium für <i>Haloarcula marismortui</i> auf 25 mM Glucose:	
NaCl	250 g	NaCl	250 g
Mineralsalzlösung I	200 ml	Mineralsalzlösung I	200 ml
Spurenelementlösung	10 ml	Spurenelementlösung	10 ml
Hefeextrakt	2.5 g	Hefeextrakt	2.5 g
Casaminosäuren	5.0 g	Casaminosäuren	5.0 g
pH 7.35 (mit 10 N NaOH eingestellt)		pH 7.35 (mit 10 N NaOH eingestellt)	
Vitaminlösung	10 ml	Vitaminlösung	10 ml
Glucose x H ₂ O	10 g	Glucose x H ₂ O	5.0 g
Medium für <i>Haloferax volcanii</i> auf 25 mM Glucose:		Medium für <i>Halococcus saccharolyticus</i> auf 12.5 mM Glucose:	
NaCl	125 g	NaCl	250 g
Mineralsalzlösung I	200 ml	Mineralsalzlösung I	200 ml
Spurenelementlösung	10 ml	Spurenelementlösung	10 ml
Hefeextrakt	2.5 g	Hefeextrakt	2.5 g
Casaminosäuren	5.0 g	Casaminosäuren	5.0 g
pH 7.35 (mit 10 N NaOH eingestellt)		pH 7.35 (mit 10 N NaOH eingestellt)	
Vitaminlösung	10 ml	Vitaminlösung	10 ml
Glucose x H ₂ O	10 g	Glucose x H ₂ O	2.5 g
		CaCl ₂	0.1 g
		NH ₄ Cl	0.5 g
		K ₂ HPO ₄	0.05 g

Die Medien für die Züchtung der extrem halophilen Archaea auf Acetat wurden mit den in Tabelle 1 aufgeführten Bestandteilen wie folgt angesetzt (Angaben pro Liter Medium), Acetat und Vitamine wurden nach Autoklavieren als sterilfiltrierte Stammlösungen zum Medium gegeben.

Tabelle 3 Medienzusammensetzung für die Züchtung von *Halorubrum saccharovororum*, *Haloarcula marismortui*, *Haloferax volcanii* und *Halococcus saccharolyticus* bei Wachstum auf Acetat:

Medium für <i>Halorubrum saccharovororum</i> auf 40 mM Acetat:		Medium für <i>Haloarcula marismortui</i> auf 40 mM Acetat:	
NaCl	250 g	NaCl	250 g
Mineralsalzlösung II	200 ml	Mineralsalzlösung II	200 ml
Spurenelementlösung	10 ml	Spurenelementlösung	10 ml
Hefeextrakt	0.5 g	Hefeextrakt	0.5 g
pH 7.35 (mit 10 N NaOH eingestellt)		pH 7.35 (mit 10 N NaOH eingestellt)	
Vitaminlösung	10 ml	Vitaminlösung	10 ml
Na-Acetat	3.3 g	Na-Acetat	3.3 g
CaCl ₂	0.1 g		
NH ₄ Cl	0.5 g		
KH ₂ PO ₄	0.05 g		
Medium für <i>Haloferax volcanii</i> auf 40 mM Acetat:		Medium <i>Halococcus saccharolyticus</i> für auf 40 mM Acetat:	
NaCl	250 g	NaCl	250 g
Mineralsalzlösung II	200 ml	Mineralsalzlösung II	200 ml
Spurenelementlösung	10 ml	Spurenelementlösung	10 ml
Hefeextrakt	0.5 g	Hefeextrakt	0.5 g
pH 7.35 (mit 10 N HCl eingestellt)		pH 7.35 (mit 10 N HCl eingestellt)	
Vitaminlösung	10 ml	Vitaminlösung	10 ml
Na-Acetat	3.3 g	Na-Acetat	3.3 g
CaCl ₂	0.1 g	CaCl ₂	0.1 g
NH ₄ Cl	0.5 g	NH ₄ Cl	0.5 g
KH ₂ PO ₄	0.05 g	KH ₂ PO ₄	0.05 g

Die extrem halophilen Archaea wurden aerob bei 37°C entweder in Erlenmeyerkolben oder in 2-8 l Fermentern (fair men tec, Göttingen) gezüchtet. Die Erlenmeyerkolben wurden mit 20% Medium befüllt, 2%ig inokuliert und bei einer Schüttelgeschwindigkeit von 200 Upm auf einem Rundschtütler inkubiert. Das Wachstum der 10%ig inokulierten Fermenterkulturen erfolgte bei einer Rührergeschwindigkeit von 500 Upm und einer Druckluftdurchgasung von 600 ml/min. Als Inokulum diente eine über mindestens drei Passagen an das jeweilige Substrat adaptierte Vorkultur aus der exponentiellen Wachstumsphase. Zur Stammhaltung wurden Kulturen am Ende der exponentiellen Wachstumsphase bei 4°C gelagert. Diese konnten mehr als sechs Monate als Inokulum verwendet werden.

Das Wachstum wurde als Zunahme der Streuung bei 578 nm (ΔOD_{578}) photometrisch verfolgt (Pharmacia Biotech Ultraspec 2000, Pharmacia, Freiburg). Zur Glucose- und

Acetatbestimmung wurden aus den Kulturen steril entnommene Proben zentrifugiert (12000 x g, 10 min) und die zellfreien Überstände bei -20°C bis zur Substratbestimmung gelagert.

Zur Bestimmung der Enzymaktivitäten aus unterschiedlichen Wachstumsphasen von *Ha. marismortui* wurden Proben (100-200 ml) steril entnommen und die Zellen pelletiert (10000 x g, 10 min, 10°C). Die Zellpellets wurden in 100 ml Aufschlusspuffer (100 mM Tris-HCl pH 7.5 mit 200 g/l NaCl) gewaschen, erneut pelletiert und abschließend in Aufschlusspuffer resuspendiert (Endvolumen 1-2 ml). Diese Suspensionen wurden bis zur Messung der Enzymaktivität bei -20°C gelagert.

4.1.2 Suspensionsversuche

Glucosegewachsene Zellen von *Ha. marismortui* aus der exponentiellen und stationären Phase sowie acetatgewachsene Zellen aus der exponentiellen Phase wurden jeweils einmal in Suspensionspuffer (19.5 g/l MES pH 7.35 mit 2 g/l KCl und 250 g/l NaCl) gewaschen und dann in Suspensionspuffer resuspendiert, sodass Zellsuspensionen von ca. 12-18 mg/ml Protein entstanden. Diese wurden zu je 7 ml in Reagenzröhrchen überführt und mit Alukappen verschlossen. Acetat wurde als sterilfiltrierte Stammlösung (1 M) zu einer Endkonzentration von ca. 40 mM den Suspensionen zugegeben. Als Kontrolle dienten parallele Ansätze ohne Substrat. Die Suspensionen wurden schräg gestellt auf einem Rundschüttler bei 37°C und 200 Upm inkubiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden je 300 µl Probe entnommen und die Zellen 15 min bei 12000 x g pelletiert. In den Überständen wurde Acetat enzymatisch bestimmt (4.1.5).

4.1.3 Zellernte und Aufschluss der Zellen

Zur Herstellung von Zellextrakten wurden glucose- bzw. acetatgewachsene Kulturen der extrem halophilen Archaea in den jeweiligen Wachstumsphasen geerntet (5000-8000 x g, 20 min, 4°C), gewaschen (100 mM Tris-HCl pH 7.5 mit 200 g/l NaCl) und final in 1-2 ml desselben Puffers resuspendiert. Die so behandelten Zellen wurden durch Ultraschall mit einem Minitip (Branson Sonifier II Ultraschall desintegrator, Branson, Heinemann, Schwäbisch Gmünd) 3 min bei 30% duty cycle und output control 3 im Eisbad aufgeschlossen. Diese Suspension wurde anschließend 15 min bei 12000 x g zentrifugiert und der Überstand als zellfreier Extrakt direkt in die Enzymtests eingesetzt.

4.1.4 Nachweis von Enzymaktivitäten in Rohextrakten

Die Enzymaktivitätsbestimmungen wurden in Rohextrakten der extrem halophilen Archaea in einem Spektrophotometer (Pharmacia Biotech Ultraspec 2000 UV/visible Spectrophotometer, Pharmacia, Freiburg), dessen Küvettenhalter mit einem externen Wasserbad beheizt werden

konnte, in Halbmikro-Einwegküvetten ($d=1$) bei 37°C unter aeroben Bedingungen durchgeführt. Die Testlösungen wurden in den Küvetten bei 37°C vorinkubiert. Außerdem wurden die Startbarkeit der Reaktion mit den verschiedenen Substraten bzw. mit Extrakt sowie die Proteinabhängigkeit der Reaktion überprüft. Dabei gilt für alle Testsysteme: 1 Unit (U) ist definiert als $1\ \mu\text{mol}$ verbrauchtes Substrat bzw. gebildetes Produkt pro Minute.

4.1.4.1 ADP-bildende Acetyl-CoA Synthetase (ACD) (E.C. 6.2.1.13)

Die ACD katalysiert die Reaktion: $\text{Acetat} + \text{ATP} + \text{CoA} \rightleftharpoons \text{Acetyl-CoA} + \text{ADP} + \text{P}_i$. Die Aktivität wurde mit drei Testsystemen gemessen:

- a) Die Aktivität der ACD wurde als CoA- und acetatabhängige ADP-Bildung aus ATP gemessen, die über Pyruvat Kinase (PK) und Lactat Dehydrogenase (LDH) mit der Oxidation von NADH gekoppelt wurde. Die Extinktionsabnahme wurde bei $365\ \text{nm}$ verfolgt ($\epsilon_{365}=3.4\ \text{mM}^{-1}\ \text{cm}^{-1}$) (Schäfer und Schönheit 1991). Diese Reaktion stellt physiologisch die Rückreaktion der ACD dar. Der Testansatz enthielt $100\ \text{mM}$ Tris-HCl pH 9.0, $1.5\ \text{M}$ KCl, $10\ \text{mM}$ MgCl_2 , $10\ \text{mM}$ Na-Acetat, $1\ \text{mM}$ CoA, $2\ \text{mM}$ ATP, $2.5\ \text{mM}$ Phosphoenolpyruvat (PEP), $0.3\ \text{mM}$ NADH, $15\ \text{U}$ LDH, $4\ \text{U}$ PK und $0.007\text{-}0.7\ \text{mg}$ Protein. Da die Messgröße dieses Testsystems die ADP-Bildung ist, konnte mit diesem Test ebenfalls die Acetat Kinase (AK) gemessen werden (4.1.4.3). Die AK Reaktion läuft bereits nach Zugabe von Acetat und ATP ab, die Acetyl-CoA Synthetase Reaktion ist aber strikt CoA-abhängig. Auch eine ATPase konnte mit diesem Testsystem gemessen werden, wobei Acetat und CoA weggelassen wurden.
- b) Die Bestimmung der Aktivität der ACD in den unterschiedlichen Wachstumsphasen von *Ha. marismortui* wurde als ADP- und P_i -abhängige CoA-Freisetzung aus Acetyl-CoA mit Ellman's Thiolreagenz, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) bestimmt, wobei die Bildung des Thiophenolat-Anions als Extinktionszunahme bei $412\ \text{nm}$ gemessen wurde ($\epsilon_{412} = 13.6\ \text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Srere et al., 1963). Der Testansatz enthielt $100\ \text{mM}$ Tris-HCl pH 7.5, $3\ \text{M}$ KCl, $30\ \text{mM}$ MgCl_2 , $0.1\ \text{mM}$ DTNB, $1\ \text{mM}$ Acetyl-CoA, $5\ \text{mM}$ KH_2PO_4 , $2\ \text{mM}$ ADP und $0.4\text{-}1.5\ \text{mg}$ Protein.
- c) Die ATP- und CoA-abhängige Bildung von Acetyl-CoA wurde nach der Methode von Aceti und Ferry (1988) als Bildung eines Fe^{3+} -acetyl-Hydroxamat Farbkomplexes aus Acetyl-CoA und Hydroxamat bei $540\ \text{nm}$ gemessen ($\epsilon_{540} = 0.636\ \text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Ein Testansatz mit einem Volumen von $333\ \mu\text{l}$ mit $100\ \text{mM}$ Tris-HCl pH 9.0, $1.5\ \text{M}$ KCl, $10\ \text{mM}$ MgCl_2 , $400\ \text{mM}$ K-Acetat, $700\ \text{mM}$ Hydroxylammoniumhydrochlorid, $10\ \text{mM}$ ATP, $1.5\ \text{mM}$ CoA und $0.02\text{-}3.0\ \text{mg}$ Protein wurde nach entsprechender Inkubationszeit ($0\text{-}45\ \text{min}$) mit $333\ \mu\text{l}$ 10% (w/v) TCA gestoppt und auf Eis transferiert. Nach Zugabe von weiteren $333\ \mu\text{l}$ 2.5% (w/v) FeCl_3 in $2\ \text{N}$ HCl wurde der Niederschlag $10\ \text{min}$ bei $12000\ \text{x}$ g abzentrifugiert. Die Detektion erfolgte im Überstand bei $540\ \text{nm}$.

4.1.4.2 AMP-bildende Acetyl-CoA Synthetase (ACS) (E.C. 6.2.1.1)

Die ACS katalysiert die Reaktion: $\text{Acetat} + \text{ATP} + \text{CoA} \rightarrow \text{Acetyl-CoA} + \text{AMP} + \text{PP}_i$. Die Aktivität wurde mit drei Testsystemen gemessen:

- a) Die Aktivität der ACS wurde in physiologischer Richtung als CoA- und acetatabhängige AMP-Bildung aus ATP gemessen, die über PK, LDH und Myokinase (MK) mit der Oxidation von NADH gekoppelt wurde. Die Extinktionsabnahme wurde bei 365 nm verfolgt ($\epsilon_{365} = 3.4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Oberlies et al. 1980). Der Testansatz enthielt 100 mM Tris-HCl pH 9.0, 1.5 M KCl, 5 mM MgCl_2 , 2.5 mM Na-Acetat, 1 mM CoA, 2 mM ATP, 2.5 mM PEP, 0.3 mM NADH, 15 U LDH, 4 U PK, 3.6 U MK und 0.007-0.7 mg Protein. Ohne MK entspricht dieses Testsystem demjenigen, mit dem die ACD gemessen wird. Durch Zugabe von 3.6 U MK zum Testansatz auf ADP-bildende ACS konnte also im gleichen Ansatz auch eine ACS gemessen werden.
- b) Die Bestimmung der Aktivität der ACS in den unterschiedlichen Wachstumsphasen von *Ha. marismortui* wurde als AMP- und PP_i -abhängige CoA-Freisetzung aus Acetyl-CoA mit DTNB bestimmt, wobei die Bildung des Thiophenolat-Anions als Extinktionszunahme bei 412 nm gemessen wurde ($\epsilon_{412} = 13.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Srere et al., 1963). Der Testansatz enthielt 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 1.25 M KCl, 2.5 mM MgCl_2 , 0.1 mM DTNB, 1 mM Acetyl-CoA, 2 mM Pyrophosphat und 0.4-1.5 mg Protein.
- c) Die ATP- und CoA-abhängige Bildung von Acetyl-CoA wurde nach der Methode von Aceti und Ferry (1988) als Bildung eines Fe^{3+} -acetyl-Hydroxamat Farbkomplexes aus Acetyl-CoA und Hydroxamat bei 540 nm gemessen ($\epsilon_{540} = 0.636 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Ein Testansatz mit einem Volumen von 333 μl mit 100 mM Tris-HCl pH 9.0, 1.5 M KCl, 10 mM MgCl_2 , 400 mM Kalium-Acetat, 700 mM Hydroxylammoniumhydrochlorid, 10 mM ATP, 1.5 mM CoA und 0.02-3.0 mg Protein wurde nach entsprechender Inkubationszeit (0-45 min) mit 333 μl 10% (w/v) TCA gestoppt und auf Eis transferiert. Nach Zugabe von weiteren 333 μl 2.5% (w/v) FeCl_3 in 2 N HCl wurde der Niederschlag 10 min bei 12000 x g abzentrifugiert. Die Detektion erfolgte im Überstand bei 540 nm.

4.1.4.3 Acetat Kinase (E.C. 2.7.2.1)

Die AK katalysiert die Reaktion: $\text{Acetat} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{Acetyl-Phosphat} + \text{ADP}$. AK Aktivität in Rohextrakten der extrem halophilen Archaea wurde auf zweierlei Weise gemessen:

- a) Die ATP-abhängige Bildung von Acetyl-Phosphat wurde nach der Methode von Aceti und Ferry (1988) als Bildung eines Fe^{3+} -acetyl-Hydroxamat-Farbkomplexes aus Acetyl-Phosphat und Hydroxamat bei 540 nm gemessen ($\epsilon_{540} = 0.636 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Ein Testansatz mit einem Volumen von 333 μl mit 100 mM Tris-HCl pH 9.0, 1.5 M KCl, 10 mM MgCl_2 , 400 mM K-Acetat, 700 mM Hydroxylammoniumhydrochlorid, 10 mM ATP und 0.02-3 mg Protein wurde nach entsprechender Inkubationszeit (0-45 min) mit 333 μl 10% (w/v) TCA gestoppt und auf Eis transferiert. Nach Zugabe von weiteren 333 μl 2.5% (w/v) FeCl_3 in 2 N HCl wurde der Niederschlag 10 min bei 12000 x g abzentrifugiert. Die Detektion erfolgte im Überstand bei 540 nm.

b) Die acetatabhängige ADP-Bildung aus ATP wurde über PK und LDH mit der Oxidation von NADH gekoppelt, die bei 365 nm als Extinktionsabnahme gemessen wurde ($\epsilon_{365} = 3.4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Schäfer et al. 1993). Der Testansatz enthielt 100 mM Tris-HCl pH 9.0, 1.5 M KCl, 10 mM MgCl_2 , 10 mM Na-Acetat, 2 mM ATP, 2.5 mM PEP, 0.3 mM NADH, 15 U LDH, 4 U PK und 0.007-0.7 mg Protein.

4.1.4.4 Phosphotransacetylase (PTA) (E.C. 2.3.1.8.)

Die PTA katalysiert die Reaktion: Acetyl-Phosphat + CoA \rightleftharpoons Acetyl-CoA + P_i . Die Aktivität der PTA wurde als P_i -abhängige CoA-Freisetzung aus Acetyl-CoA mit DTNB bestimmt, wobei die Bildung des Thiophenolat-Anions als Extinktionszunahme bei 412 nm gemessen wurde ($\epsilon_{412} = 13.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Srere et al. 1963). Der Testansatz enthielt 100 mM Tris-HCl pH 9.0, 1.5 M KCl, 5 mM MgCl_2 , 0.1 mM DTNB, 0.1 mM Acetyl-CoA, 5 mM KH_2PO_4 und 0.08-4.0 mg Protein.

4.1.4.5 Isocitrat Lyase (ICL) (E.C. 4.1.3.1.)

Die ICL katalysiert die Reaktion: Isocitrat \rightarrow Glyoxylat + Succinat. Die ICL wurde nach Serrano et al. (1998) als isocitrat- und phenylhydrazinabhängige Bildung von Glyoxylat-Phenylhydrazon bei 324 nm gemessen ($\epsilon_{324} = 17 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Der Testansatz enthielt 70 mM HEPES-KOH pH 7.0, 1.9 M KCl, 5 mM MgCl_2 , 4 mM Phenylhydrazin, 4 mM D,L-Isocitrat und 0.08-4.2 mg Protein.

4.1.4.6 Malat Synthase (MS) (E.C. 4.1.3.2.)

Die MS katalysiert die Reaktion: Glyoxylat + Acetyl-CoA \rightarrow Malat + CoA. Die MS wurde nach Serrano et al. (1998) als glyoxylatabhängige CoA-Freisetzung aus Acetyl-CoA mit DTNB bestimmt, wobei die Bildung des Thiophenolat-Anions als Extinktionszunahme bei 412 nm gemessen wurde ($\epsilon_{412} = 13.6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Srere et al. 1963). Der Testansatz enthielt 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 3 M KCl, 30 mM MgCl_2 , 0.1 mM DTNB, 0.2 mM Acetyl-CoA, 0.5 mM Glyoxylat und 0.1-2.9 mg Protein.

4.1.5 Analytische Methoden

Bestimmung von Acetat. Die Acetatbestimmung erfolgte nach der Methode von Dorn et al. (1978) mit Hilfe der Enzyme ACS, MK, PK und LDH. Dabei werden pro mol Acetat 2 mol NADH oxidiert, was anhand der Extinktionszunahme bei 365 nm ($\epsilon_{365} = 3,4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) gemessen wurde. Der Testansatz enthielt 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM KCl, 20 mM MgCl_2 , 2 mM PEP, 2 mM ATP, 0.3 mM NADH, 1 mM CoA, 15 U LDH, 4 U PK und 1.5 U MK. Die Reaktion wurde bei 37°C nach einer Vorinkubation des Testansatzes bis zu einer konstanten Extinktion (E_1) durch Zugabe von 0.2 U ACS gestartet. Die ACS wurde als Lyophilisat eingewogen, in 100 mM Tris pH 8.0 gelöst und frisch verwendet. Nach ca. 5 min war das Acetat vollständig umgesetzt, und es wurde erneut die Extinktion (E_2) bestimmt. Aus

der Extinktionsdifferenz wurde mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten die Acetatkonzentration der Proben ermittelt.

Bestimmung von Glucose. Die Glucosebestimmung erfolgte unter Verwendung der Enzyme Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und Hexokinase, wobei pro mol Glucose ein mol NADP^+ reduziert wird, was als Extinktionszunahme bei 365 nm gemessen wurde (Kunst et al. 1986). Der Testansatz enthielt 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM MgCl_2 , 2 mM ATP, 2 mM NADP^+ , 7.5 U Hexokinase und 10 μl Probe (maximal 0.5 mM Glucose im Test). Nach einer Vorinkubation des Ansatzes bei 37°C bis zu einer konstanten Extinktion bei 365 nm (E_1), wurde die Reaktion durch Zugabe von 3.5 U Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase gestartet. Nach 15-20 min war die Glucose vollständig umgesetzt, und es wurde erneut die Extinktion (E_2) bestimmt. Aus der Extinktionsdifferenz wurde mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten ($\epsilon_{365} = 3.4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) die Glucosekonzentration der Proben ermittelt.

Colorimetrische Bestimmung von Protein nach Bradford. Die Proteinkonzentration wurde mit einer modifizierten Methode nach 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 A. bidest.) eingesetzt, gut gemischt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktion wurde bei 595 nm gemessen. Eine Proportionalität der Messwerte war bis zu einer Proteinmenge von 5 μg im Test gegeben. Die Eichung erfolgte mit einem Standard aus Rinderserum-Albumin Fraktion V (Merck, Darmstadt).

Colorimetrische Bestimmung von Protein nach Biuret. In Rohextrakten der extrem halophilen Archaea erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration nach einer modifizierten Biuret-Methode (Bode et al. 1968). Dabei wurden 150 μl Probe 1:1 mit 1 N NaOH verdünnt und mit 700 μl Reagenz (0.9 g Kaliumnatriumtartrat, 0.3 g CuSO_4 , 0.5 g KI in 40 ml 0.2 N NaOH lösen, mit 0.2 N NaOH auf 100 ml auffüllen) eingesetzt, gut gemischt und nach 30minütiger Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln die Extinktion bei 546 nm gemessen. Die Messwerte waren bis zu einer Proteinmenge von 3.0 mg im Test proportional. Die Eichung erfolgte mit einem Standard aus Rinderserum-Albumin Fraktion V (Merck, Darmstadt).

Bestimmung der Proteinkonzentration durch Absorption bei 280 nm. Um die Proteinkonzentration sowie die Verunreinigungen mit Nukleinsäuren der Lösungen für die analytische Ultrazentrifugation abschätzen zu können, wurde das E_{280}/E_{260} -Verhältnis bestimmt und daraus die Proteinkonzentration und der Nukleinsäureanteil errechnet.

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Computergestützte Sequenzanalysen

Mit den Aminosäuresequenzen von ACS aus Eukarya, Bacteria und Archaea wurde ein phylogenetischer Stammbaum erstellt. Im Folgenden werden die verwendeten Programme und Einstellungen dargestellt:

Die Sequenzalignments wurden mit ClustalX und der Neighbor-joining Methode unter Verwendung der Standardeinstellungen und der PAM Matrix erstellt (Thompson et al. 1997). Der phylogenetische Stammbaum wurde nach zwei Methoden konstruiert: 1. Neighbor-joining Methode mittels ClustalX und 2. Maximum Likelihood Methode mit Tree-Puzzle (TreePuzzle, Version 5.1, mit Standardeinstellungen (Schmidt et al. 2002)). Konfidenzintervalle wurden anhand von 100 Bootstrapping-Wiederholungen bestimmt.

4.2.2 Isolierung genomischer DNA

Genomische DNA von *Pyrobaculum aerophilum* (DSM 7523) wurde von der DSMZ (Braunschweig) bezogen.

Zur Extraktion genomischer DNA (Sambrook et al. 1989) aus *Haloarcula marismortui* (DSM 3752) wurden 250 mg Feuchtzellen in 5 ml TES-Puffer (10 ml TE-Puffer mit 0.86 g Saccharose; TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl pH 8.0 mit 0.1 mM EDTA) vorsichtig suspendiert. Nach Zugabe von 550 µl 10% SDS und 15 µl Proteinase K (20 mg/ml) wurde die Suspension für 30 min bei 60°C und anschließend nach Zugabe von 600 µl 5 M NaCl für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde für 30 min bei 4°C zentrifugiert (48000 x g) und die DNA aus dem Überstand mit einem Volumen eiskaltem Isopropanol gefällt, durch Zentrifugation für 10 min bei 4°C (24000 x g) pelletiert und der Überstand dekantiert. Das Präzipitat wurde in 500 µl TE-Puffer über Nacht bei 4°C resuspendiert, die Suspension abschließend mit 5 µl RNase (100 mg/ml) für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend bei -20°C gelagert.

Konzentration und Reinheit der erhaltenen genomischen DNA wurden jeweils sowohl photometrisch als auch über ein 0.8%iges Agarosegel bestimmt (4.2.4).

4.2.3 Polymerase Kettenreaktion

Mit der Polymerase Kettenreaktion (PCR) können DNA-Fragmente spezifisch amplifiziert werden (Mullis et al. 1986). Sie diente in dieser Arbeit der Amplifikation von offenen Leserahmen (ORF) aus genomischer DNA und der Überprüfung auf ein vorhandenes Insert in Transformanten. Die PCRs wurden in 50 µl Reaktionsansätzen in einem Thermocycler (T-3 oder T-personal, Biometra, Göttingen) durchgeführt, wobei die Programme immer in

Abhängigkeit von der Länge des zu erwartenden Produktes und der Schmelzpunkte der Oligonukleotid-Primer (MWG Biotech, Ebersberg) variiert wurden (Tabelle 4).

Amplifikation der zu klonierenden Gene. Zur Amplifikation der Gene wurden verschiedene Inkubationsprotokolle verwendet. Diese werden im Folgenden dargestellt:

Pyrobaculum aerophilum, ORF PAE3250: Der Reaktionsansatz enthielt 30 ng Template, je 300 nM forward und reverse Primer, 5 µl 10 x Reaktionspuffer (PeqLab, Erlangen), 2 mM MgSO₄, 300 µM dNTP-Mix und 2.5 U *Pwo*-DNA-Polymerase (PeqLab, Erlangen). Das Inkubationsprotokoll bestand aus initialer Denaturierung für 120 s bei 94°C, 10 Zyklen aus Denaturierung bei 94°C für 30 s, Annealing bei 45°C für 30 s und Polymerisation bei 72°C für 120 s, 25 Zyklen aus Denaturierung bei 94°C für 30 s, Annealing bei 49°C für 30 s und Polymerisation bei 72°C für 120 s (wobei bei jedem Zyklus die Synthesezeit um 20 s verlängert wurde) und einer abschließenden Polymerisation bei 72°C für 7 min.

Pyrobaculum aerophilum, ORF PAE3249: Der Reaktionsansatz enthielt 30 ng Template, je 200 nM forward und reverse Primer, 5 µl 10 x Reaktionspuffer (Biotherm, Hamburg), 1.5 mM MgCl₂, 300 µM dNTP-Mix und 1 U *Taq*-DNA-Polymerase (Biotherm, Hamburg). Das Inkubationsprotokoll bestand aus initialer Denaturierung für 270 s bei 95°C, 5 Zyklen aus Denaturierung bei 95°C für 30 s, Annealing bei 57°C für 20 s und Polymerisation bei 72°C für 90 s (wobei bei jedem Zyklus die Synthesezeit um 20 s verlängert wurde), 35 Zyklen aus Denaturierung bei 95°C für 30 s, Annealing bei 61°C für 20 s und Polymerisation bei 72°C für 90 s (wobei bei jedem Zyklus die Synthesezeit um 20 s verlängert wurde) und einer abschließenden Polymerisation bei 72°C für 7 min.

Pyrobaculum aerophilum, ORF PAE2867: Der Reaktionsansatz enthielt 30 ng Template, je 300 nM forward und reverse Primer, 5 µl 10 x Reaktionspuffer, 1.5 mM MgSO₄, 300 µM dNTP-Mix und 2.5 U *Pwo*-DNA-Polymerase. Das Inkubationsprotokoll bestand aus initialer Denaturierung für 120 s bei 94°C, 10 Zyklen aus Denaturierung bei 94°C für 30 s, Annealing bei 50°C für 30 s und Polymerisation bei 72°C für 180 s, 25 Zyklen aus Denaturierung bei 94°C für 30 s, Annealing bei 54°C für 30 s und Polymerisation bei 72°C für 180 s (wobei bei jedem Zyklus die Synthesezeit um 20 s verlängert wurde) und einer abschließenden Polymerisation bei 72°C für 7 min.

Haloarcula marismortui, contig 158 (36001-38350) (ACD): Der Reaktionsansatz enthielt 33 ng Template, je 300 nM forward und reverse Primer, 5 µl 10 x Reaktionspuffer, 1.5 mM MgSO₄, 300 µM dNTP-Mix und 2.5 U *Pwo*-DNA-Polymerase. Das Inkubationsprotokoll bestand aus initialer Denaturierung für 120 s bei 94°C, 10 Zyklen aus Denaturierung bei 94°C für 30 s, Annealing bei 60°C für 30 s und Polymerisation bei 72°C für 180 s, 25 Zyklen aus Denaturierung bei 94°C für 30 s, Annealing bei 64°C für 30 s und Polymerisation bei 72°C für 180 s (wobei bei jedem Zyklus die Synthesezeit um 20 s verlängert wurde) und einer abschließenden Polymerisation bei 72°C für 7 min.

Haloarcula marismortui, contig 147 (19204-21199) (ACS): Der Reaktionsansatz enthielt 33 ng Template, je 300 nM forward und reverse Primer, 5 µl 10 x Reaktionspuffer, 1.5 mM MgSO₄, 300 µM dNTP-Mix und 2.5 U *Pwo*-DNA-Polymerase. Das Inkubationsprotokoll

bestand aus initialer Denaturierung für 120 s bei 94°C, 10 Zyklen aus Denaturierung bei 94°C für 30 s, Annealing bei 59°C für 30 s und Polymerisation bei 72°C für 180 s, 25 Zyklen aus Denaturierung bei 94°C für 30 s, Annealing bei 63°C für 30 s und Polymerisation bei 72°C für 120 s (wobei bei jedem Zyklus die Synthesezeit um 20 s verlängert wurde) und einer abschließenden Polymerisation bei 72°C für 7 min.

Tabelle 4 Oligonukleotide zur Amplifikation und Sequenzierung, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Restriktionsschnittstellen (RE) sind unterstrichen, die Vorwärtsprimer sind mit F und die Rückwärtsprimer mit R bezeichnet:

Name	Basensequenz (5' → 3')	RE
AcdAPae3250F	CTTCAATACAATT <u>CATATGCTCTCTAAG</u>	<i>NdeI</i>
AcdAPae3250R	<u>CAGAAATTCGGTGGGTCATAG</u>	<i>EcoRI</i>
AcdAPae473F	TTTAGCTCTCATCAGCCAGAG	
AcdBPae3249F	TAAATACGGGGAGCTAGCGAGGAGGCTATG	<i>NheI</i>
AcdBPae3249R	TAATCCTATGGATTTCTCGAGTTTAGGCCATCC	<i>XhoI</i>
AcsPae2867F	TCTTTAATTTGAGCTAGCCCAATGTCCTTAG	<i>NheI</i>
AcsPae2867R	CTAAAAC TGACTTGGATCCTCATGTTCTCGC	<i>BamHI</i>
AcsPae474F	GCTCCCAATAACCATGTTAG	
AcsPae1564R	CATATGTACCCGTCCTTATC	
AcdHarF	CCACCGAGTAGACATATGGGACGATTATCG	<i>NdeI</i>
AcdHarR	GTGACGACTCGAGTGTTCGTGTCGG	<i>XhoI</i>
AcdHar381F	TCTGGTTCGGCCGAACAGCC	
AcdHar761F	CCCACACCGGTGCGATGGCC	
AcdHar1817R	CAGCACCTCGACGAAAATTCGGC	
AcsHarF	CGATGATAGCATATGTCAGATGAAGATGTCC	<i>NdeI</i>
AcsHarR	CGTGGTGCTGCTCGAGGTTAGGG	<i>XhoI</i>
AcsHar282F	CGGCGACGAAGCCGCTATCG	
AcsHar1757R	GAGTTCCTCGTCCTCGTCGTAGC	
AcsHar684F	GATGGACGGCGACGGCTTCG	
T7-Promotor Primer	TAATACGACTCACTATAGGG	
T7-Terminator Primer	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	

Amplifikation zur Kontrolle einer Klonierung („Kolonie-Screening“). Transformanten wurden auf vorhandenes Insert in erwarteter Länge geprüft. Der Reaktionsansatz enthielt als Template einen Transformanten, der mit sterilem Zahnstocher von der Agarplatte aufgenommen wurde, je 200 nM Primer (T7-Promotor- und T7-Terminatorprimer), 5 µl 10 x Reaktionspuffer, 200 µM dNTPs und 3 mM MgCl₂. Die *Taq*-DNA-Polymerase (1 U, Biotherm, Hamburg) wurde nach dem initialen Denaturierungsschritt zugegeben. Das Inkubationsprotokoll bestand aus initialer Denaturierung für 300 s bei 94°C, 30 Zyklen aus

Denaturierung bei 94°C für 30 s, Annealing bei 48°C für 30 s und Polymerisation bei 72°C für 90 s und einer abschließenden Polymerisation bei 72°C für 7 min.

4.2.4 Konzentration und Reinheitsanalyse von DNA

Absorptionsmessung bei 260 nm und 280 nm. Die Konzentration von DNA wurde durch Absorptionsmessung bei 260 nm bestimmt. Es gilt: Eine Absorption von 1 bei 260 nm entspricht bei einer Küvettenschichtdicke von 1 cm einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml Doppelstrang-DNA bzw. 37 µg/ml Einzelstrang-DNA. Darüber hinaus ist der Absorptionskoeffizient 260/280 ein Maß für die Reinheit von Nukleinsäuren. Reine DNA-Lösungen haben einen Quotienten von 1.8 bis 2 (Sambrook et al. 1989).

Agarosegelelektrophorese. Zur Konzentrationsbestimmung von DNA wurden DNA-Standards bekannter Konzentrationen neben einer Probe mit unbekannter DNA-Konzentration aufgetragen. Durch visuellen Vergleich von Banden gleicher Laufstrecke konnte die DNA-Konzentration der Probe unter der Annahme, dass die Intensität proportional zur Masse ist, abgeschätzt werden. Daneben wurden Agarosegele dazu genutzt, DNA-Fragmente, Plasmide und genomische DNA der Größe nach analytisch oder präparativ zu trennen. Die Trennung erfolgte für hochmolekulare DNA in 0.8%igen und für niedermolekulare DNA in 2%igen Agarosegelen. Dazu wurde Agarose in 30 ml TBE-Puffer (89 mM Tris-HCl pH 8.0 mit 89 mM Borat und 2.5 mM EDTA) durch Aufkochen gelöst, nach Abkühlung auf etwa 60°C 30 µg Ethidiumbromid zugegeben und in eine Gießvorrichtung (7x10 cm) gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 6 x Auftragspuffer (Fermentas, Vilnius, Litauen) versetzt und neben einem Standard (*Hind*III verdaute λ-DNA oder Gene Ruler 100 bp DNA Ladder, Fermentas, Vilnius, Litauen) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei konstant 100 V in TBE-Puffer. Anschließend wurden die Gele auf einem UV-Schirm (366 nm) analysiert.

4.2.5 Klonierung von PCR-Produkten in einen Vektor

Vermehrung von Vektoren in *E. coli* und Isolierung von Plasmid-DNA. Vektoren ohne bzw. mit Insert wurden zur Klonierung bzw. zur Sequenzierung und Transformation in *E. coli* Stamm JM109 (Yanisch-Perron et al. 1985) in LB-Medium mit 100 µg/ml Carbenicillin vermehrt und anschließend daraus mit dem Plasmid Miniprep Kit (PeqLab, Erlangen) isoliert. Das LB-Medium hatte folgende Zusammensetzung: 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, pH 7.5.

Reinigung von DNA aus Reaktionsansätzen und Agarosegelen. PCR-Ansätze wurden für die Restriktionshydrolyse mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) von DNA-Polymerase, Salzen und Puffer gereinigt. Vektoren und amplifizierte DNA wurden für die Ligation von Restriktionsenzymen, Salzen und Puffer gereinigt, indem sie über präparative Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und die DNA-Banden auf einem UV-

Schirm mittels Skalpell ausgeschnitten wurden. Die DNA wurde mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) aus dem Gel extrahiert.

Restriktionshydrolyse von Vektoren und PCR-Produkten. Die Restriktionshydrolyse wurde jeweils als Doppel-Verdau angesetzt, d.h. beide Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs GmbH, Schwalbach/Taunus) wurden in einen Ansatz gegeben und in einem vom Hersteller mitgelieferten, optimalen Puffer mit der DNA inkubiert. Die Ansätze folgender Zusammensetzung wurden bei 37°C für 12 h inkubiert: 50 µl Plasmid-DNA (1 bis 10 µg DNA), jeweils 10 U Restriktionsendonuklease, 10 µl 10 x Reaktionspuffer auf 100 µl A. bidest. bzw. 25 µl PCR-Fragment (1 bis 10 µg DNA), jeweils 10 U Restriktionsendonuklease, 5 µl Reaktionspuffer auf 50 µl A. bidest.

Ligation eines DNA-Fragments in einen Vektor. Die 10 µl Ligationsansätze enthielten PCR-Fragment, Plasmid und 1 U T4-DNA-Ligase (Roche Diagnostics, Mannheim) mit entsprechendem T4-DNA-Ligasepuffer. Die zu ligierenden PCR-Fragmente wurden dabei im 3- bis 5fachen molaren Überschuss zu den Plasmiden eingesetzt. Die Ansätze wurden bei 16°C für 12 h inkubiert und anschließend direkt für die Transformation in *E. coli* JM109 eingesetzt.

4.2.6 Transformation

Herstellung CaCl₂-kompetenter Zellen. Die Herstellung kompetenter Zellen der *E. coli*-Stämme JM109 und BL21(DE3)-CodonPlus-RIL erfolgte in Anlehnung an das Protokoll im T-Cloning Kit Manual der Firma Fermentas (Vilnius, Litauen). 400 ml LB-Medium (4.2.5) wurden 10%ig mit einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C unter aeroben Bedingungen bis zu einer OD bei 578 nm von 0.6 inkubiert. Dann wurden die Kulturen 20 min auf Eis inkubiert und 15 min zentrifugiert (8000 x g, 4°C). Nach Zentrifugation wurde der Überstand dekantiert und das Zellpellet in 200 ml eiskaltem TBS-Puffer (5 mM Tris-HCl pH 7.0 mit 100 mM NaCl und 5 mM MgCl₂) suspendiert. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min wurde das Pellet in 200 ml eiskalter CaCl₂-Lösung (5 mM Tris-HCl pH 7.0 mit 100 mM CaCl₂ und 5 mM MgCl₂) suspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Suspension für 10 min zentrifugiert, in 20 ml eiskalter CaCl₂-Lösung suspendiert und 1 h auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde nun bis zu einer Endkonzentration von 20% mit Glycerin versetzt und in 200 µl Aliquots mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bei -70°C.

Transformation von einem Vektor in *E. coli*. Es wurden sowohl Ligationsansätze als auch gereinigte Plasmid-DNA in *E. coli* transformiert. Je Transformationsansatz wurden 80 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, mit 10 µl Ligationsansatz bzw. 1 bis 2 µg Plasmid-DNA vorsichtig gemischt und für 60 min auf Eis inkubiert. Die Ansätze wurden dann für 40 s einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt und für weitere 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 400 µl SOC-Medium (0.5% Hefeextrakt, 2% Trypton, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ und 20 mM Glucose, pH 7.0, auf 37°C vorgewärmt)

wurden die Zellen für 30 min bei 37°C unter aeroben Bedingungen inkubiert. Aliquots dieser Ansätze wurden zur Selektion auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten (LB-Medium (4.2.5) mit 18 g/l Agar) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.2.7 Sequenzierung

Alle im Rahmen dieser Arbeit konstruierten Vektoren wurden sequenziert. Das Insert und die flankierenden Bereiche des Vektors wurden jeweils auf Fehlerfreiheit überprüft. Die Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte nach Sanger, wobei durch Einbau von unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden Kettenabbrüche erzeugt wurden (Sanger et al. 1977). Die fluoreszenzmarkierten Produkte wurden mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt, mit einem Laser angeregt und die emittierte Fluoreszenz detektiert (ABI PRISM 310, Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA). Die Sequenzansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 0.2 bis 0.6 µg Plasmid-DNA, 0.5 µM Primer (T7-Promotor- bzw. Terminator-Primer oder, im Falle langer Inserts, mit zum Insert komplementär gewählten Primern), 3 µl Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (ABI PRISM, Applied Biosystems, Warrington, England) und 0.5 µl DMSO auf 10 µl A. bidest. Das Sequenzprotokoll bestand aus folgenden Zyklen: initialer Denaturierungsschritt bei 96°C für 180 s, 3 Zyklen mit Denaturierung bei 94°C für 30 s, Annealing bei 42°C für 30 s und Synthese bei 60°C für 120 s, 30 Zyklen mit Denaturierung bei 94°C für 30 s, Annealing bei 45°C für 30 s und Synthese bei 60°C für 120 s und einem abschließenden Syntheseschritt bei 60°C für 5 min. Die PCR-Ansätze wurden für die nachfolgende Sequenzierung gereinigt. Dazu wurden die Ansätze auf 100 µl mit A. bidest. aufgefüllt und 2 µl Dextranblau (20 ng/µl), 10 µl 3 M Natriumacetat pH 5.2 und 250 µl 99% Ethanol zugegeben. Durch 30minütige Zentrifugation wurde die DNA pelletiert, dann das Pellet zweimal mit 250 µl 70% Ethanol gewaschen und anschließend für 5 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Das getrocknete Pellet konnte nach Lösen in 12 µl A. bidest. zur Sequenzierung eingesetzt werden.

4.2.8 Expression

Als Expressionssystem wurde der eine Ampicillinresistenz tragende Vektor pET17b (Novagen, Schwalbach) gewählt, der jeweils kombiniert wurde mit dem Chloramphenicol-resistenten Expressionsstamm *E. coli* BL21(DE3)-CodonPlus-RIL (Stratagene, Amsterdam, Niederlande). Tabelle 5 gibt eine Übersicht über alle in dieser Arbeit klonierten ORFs:

Tabelle 5 Übersicht über die in dieser Arbeit klonierten ORFs. Die Quelle der DNA, der verwendete Vektor, die zum Klonieren verwendeten Schnittstellen, die Namen der Amplifikations-Primer, die Bezeichnung des konstruierten Vektors und die des Genproduktes sind für jeden ORF angegeben.

DNA-Quelle, ORF	Vektor	Schnittstellen	Primer	Bezeichnung Konstrukt	Bezeichnung Genprodukt
<i>P. aerophilum</i> PAE3250	pET17b	<i>NdeI</i> <i>EcoRI</i>	AcdAPae3250F AcdAPae3250R	AcdAPae-pET17b	ACDAPae
<i>P. aerophilum</i> PAE3249	pET17b	<i>NheI</i> <i>XhoI</i>	AcdBPae3249F AcdBPae3249R	AcdBPae-pET17b	ACDBPae
<i>P. aerophilum</i> PAE2867	pET17b	<i>NheI</i> <i>BamHI</i>	AcsPae2867F AcsPae2867R	AcsPae-pET17b	ACSPae
<i>Ha. marismortui</i> acd	pET17b	<i>NdeI</i> <i>XhoI</i>	AcdHarF AcdHarR	AcdHar-pET17b	ACDHar
<i>Ha. marismortui</i> acs	pET17b	<i>NdeI</i> <i>XhoI</i>	AcsHarF AcsHarR	AcsHar-pET17b	ACSHar

Die Expressionen wurden in LB-Medium (4.2.5) mit 100 µg/ml Carbenicillin und 34 µg/ml Chloramphenicol bei 37°C unter aeroben Bedingungen durchgeführt. Die Induktion erfolgte mit 0.4 mM IPTG. Nach Expression wurden die Zellen bei 4°C für 20 min mit 8000 x g pelletiert. Im Folgenden werden die Bedingungen der Expressionen für die exprimierten Proteine dargestellt:

ACDAPae wurde in 800 ml Medium exprimiert. Die Induktion erfolgte bei einer OD₅₇₈ von 0.8. Nach 4.5 h Expression wurden die Zellen bei einer OD₅₇₈ von 2.6 pelletiert.

ACDBPae wurde in 800 ml Medium exprimiert. Die Induktion erfolgte bei einer OD₅₇₈ von 1.1. Nach 4 h Expression wurden die Zellen bei einer OD₅₇₈ von 3.2 pelletiert.

ACSPae wurde in 800 ml Medium exprimiert. Die Induktion erfolgte bei einer OD₅₇₈ von 0.9. Nach 3 h Expression wurden die Zellen bei einer OD₅₇₈ von 2.2 pelletiert.

ACDHar wurde in 800 ml Medium exprimiert. Die Induktion erfolgte bei einer OD₅₇₈ von 1. Nach 3 h Expression wurden die Zellen bei einer OD₅₇₈ von 4.6 pelletiert.

ACSHar wurde in 800 ml Medium exprimiert. Die Induktion erfolgte bei einer OD₅₇₈ von 1.1. Nach 3 h Expression wurden die Zellen bei einer OD₅₇₈ von 2.1 pelletiert.

4.3 Proteinbiochemische Methoden

4.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen während der Reinigung von Proteinen erfolgte nach einer modifizierten Methode nach Bradford (4.1.5).

4.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese diente, neben der Reinheitskontrolle während der Proteinreinigung, der Bestimmung der apparenten molekularen Masse der Untereinheiten gereinigter Proteine. Die Elektrophorese erfolgte nach Laemmli in 12%igen, diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen (7 cm x 8 cm x 0.1 cm) in einer Mini Protean Elektrophorese Zelle (Biorad, München). Trenn- und Sammelgel hatten folgende Zusammensetzung (Laemmli 1970):

	Trenngel (12%)	Sammelgel (3.75%)
30% Acrylamid 0.8% Bisacrylamid	1 ml	0.25 ml
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	0.625 ml	-
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	-	0.3 ml
10% SDS	0.025 ml	0.05 ml
A. bidest.	0.818 ml	1.625 ml
10% Ammoniumpersulfat	12.5 µl	12.5 µl
TEMED	1.25 µl	2.5 µl

Die Proben wurden mit 5x Auftragspuffer (63 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% Glycerin, 0.5% Bromphenolblau) versetzt, 10 min bei 95°C inkubiert und in die Geltaschen pipettiert. Der Elektrophoresepuffer bestand aus 25 mM Tris mit 190 mM Glycin und 0.02% SDS (pH-Wert wie eingewogen). Das Einlaufen der Proben in das Sammelgel erfolgte bei 70 V für 10 min. Die Trennung der Proteine über das Trenngel erfolgte bei 210 V für 60 min. Als Molekulargewichtsmarker dienten Standards von Biorad (München) oder PeqLab (Erlangen). Nach der Elektrophorese wurden die Proteine für mindestens 10 min in 25% Isopropanol und 10% Essigsäure im Gel fixiert und anschließend mit 0.03% Coomassie Brilliant Blue R250 in 10% Essigsäure gefärbt. Abschließend erfolgte mit 10% Essigsäure die Entfernung von nicht-proteingebundenem Farbstoff.

4.3.3 Blotten und N-terminale Aminosäuresequenzierung

Um die nativ gereinigte ACS aus *Ha. marismortui* mit anderen, potentiell homologen Proteinen vergleichen zu können, wurde die Aminosäuresequenz am N-Terminus bestimmt. Dazu wurden etwa 15 µg Protein durch Blotten auf eine ImmobilonTM Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membran (Millipore, Eschborn) übertragen. Die Proben wurden zuvor auf ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel (4.3.2) aufgetragen. Als Laufpuffer diente 100 mM Tris-HCl pH 8.2 mit 100 mM Tricin und 0.1% SDS. Die Membran wurde vor dem Blotten in Methanol getaucht und die für das Blotten notwendigen Materialien (Membran, Gel, Adapter und Filterpapier) in Transferpuffer (50 mM Natriumborat pH 9.0 mit 20% Methanol und 0.02% SDS) äquilibriert. Es wurde eine Mini Trans-Blot Zelle (Biorad, München), betrieben mit einem PowerPac 1000 (Biorad, München), verwendet. Der Transfer des Proteins aus dem Gel auf die Membran erfolgte über 4 h bei konstant 35 V und 6 W. Anschließend wurde die Membran für 1 bis 2 min in 0.3% Coomassie Brilliant Blue R250 mit 50% Methanol und 10% Essigsäure gefärbt und in 50% Methanol mit 10% Essigsäure entfärbt. Die Proteinbanden wurden jeweils aus der Membran geschnitten und zur Sequenzierung an Herrn Dr. R. Schmid (Universität Osnabrück) geschickt. Für das Blotten und die N-terminale Aminosäuresequenzierung der ACD wurde das gereinigte Enzym (30 µg in 400 µl 50 mM Tris-HCl pH 7.0 mit 0.6 M (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgCl₂ und 10% Glycerol) an Herrn Dr. K. Schober (Universität Braunschweig) geschickt.

4.3.4 Apparentes Molekulargewicht von nativen Proteinen

Ausschluss-Chromatographie. Die apparenten molekularen Massen der gereinigten Proteine wurden unter nativen Bedingungen säulenchromatographisch mittels Ausschluss-Chromatographie an einer Superdex 200 HiLoad 16/60 (120 ml) (Pharmacia, Freiburg) bestimmt. Bei den Säulenläufen für die nativ und rekombinant gereinigten Proteine aus *Ha. marismortui* wurde als Laufpuffer 50 mM Tris-HCl pH 7.5 mit 2 M NaCl, 20 mM MgCl₂ und 10% Glycerol verwendet. Die Gelfiltration der rekombinanten Proteine aus *P. aerophilum* erfolgte mit 100 mM Tris-HCl pH 7.5. Alle ausschusschromatographischen Säulenläufe wurden mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min durchgeführt, wobei die Probenvolumina jeweils 1 ml betragen. Als Molekulargewichtsstandards dienten Dextran Blue (2000 kDa), β-Amylase (200 kDa), Alkohol Dehydrogenase (150 kDa), Rinderserum-Albumin (66 kDa), Carboanhydrase (29 kDa) und Cytochrom c (12.4 kDa) (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) oder der Molekulargewichtsstandard von Pharmacia (Freiburg) bestehend aus: Thyroglobulin (669 kDa), Ferritin (440 kDa), Catalase (232 kDa), Aldolase (158 kDa), Ovalbumin (43 kDa) und Ribonuclease A (13.7 kDa).

Analytische Ultrazentrifugation. Die molekularen Massen der rekombinanten Proteine aus *P. aerophilum* wurden zusätzlich über die Ermittlung des Sedimentations-Diffusionsgleichgewichtes mit analytischer Ultrazentrifugation bestimmt. Dazu mussten die

Lösungen der apparent homogenen Proteine nahezu vollständig von Nukleinsäuren gereinigt werden (4.3.10). Die Analyse der Proteine erfolgte dann durch Prof. Dr. C. Urbanke (MHH, Hannover).

4.3.5 Dialyse

Um die Proteinlösungen zu entsalzen, wurden diese gegen den jeweiligen Niedrigsalzpuffer dialysiert. Die Dialyse wurde unter aeroben Bedingungen mit dreimaligem Puffertausch für zweimal 1.5 h und anschließend über Nacht bei 4°C durchgeführt. Das Puffervolumen betrug jeweils 600 ml. Die verwendete Dialysemembran hatte eine molekulare Ausschlussgröße von 12 kDa.

4.3.6 Ultrafiltration

Ultrafiltrationen wurden mit Hilfe einer 100 ml oder 10 ml Ultrafiltrationszelle (Amicon, Beverly, USA) durchgeführt. Diese Methode diente dem Ankonzentrieren oder dem Umpuffern von Proteinlösungen während der Proteinreinigung. Zur Ultrafiltration konnten Filter (Sartorius, Göttingen) verschiedener Ausschlussgrößen eingesetzt werden. Die gewählte Ausschlussgröße lag jeweils unter der apparenten Größe der Untereinheiten der Proteine.

4.3.7 Reinigung nativer Proteine

Alle in dieser Arbeit gereinigten Proteine (4.3.10) wurden bis zur apparenten Homogenität angereichert. Die säulenchromatographischen Schritte wurden mit einer BioLogic Workstation (Biorad, München) und FPLC-Säulen von Pharmacia (Feiburg) und Biorad (München) bei 7 bis 15°C durchgeführt. Die Elution der Proteine von den Säulen wurde durch Absorptionsmessung bei 280 nm verfolgt. Zur Berechnung der spezifischen Aktivitäten wurde nach Ermittlung der Aktivität (U/ml) in den Fraktionen die Proteinkonzentration nach Bradford (4.1.5) bestimmt.

Reinigung der ACD aus *Ha. marismortui*. Der zellfreie Rohextrakt wurde aus 25 g glucosegewachsenen Feuchtzellen präpariert. Die Zellen wurden dazu in 70 ml 50 mM Tris-HCl pH 8.0 mit 20 mM MgCl₂, 2 M (NH₄)₂SO₄ und 10% Glycerol (v/v) suspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte unter aeroben Bedingungen mittels 3maliger Hochdruckhomogenisation in einer gekühlten French Press Zelle (American Instrument Company, Silver Spring, Maryland, USA) bei 86 bar. Diese Suspension wurde bei 100000 x g und 4°C für 90 min ultrazentrifugiert. Der 100000 x g Überstand wurde 20 min bei 70°C im Wasserbad inkubiert und auf Eis transferiert. Anschließend wurde nochmals bei 100000 x g und 4°C für 90 min ultrazentrifugiert. Der so erhaltene Überstand wurde gegen 50 mM Tris-HCl pH 7.0 mit 20 mM MgCl₂ und 10% Glycerol (v/v) (Puffer A) dialysiert (4.3.5) und auf

eine Q Sepharose HiLoad Säule (22 x 5 cm) aufgetragen, die in Puffer A äquilibriert war. Die Proteine wurden mit einer Flussrate von 1 ml/min und einem NaCl-Gradienten von 0 M bis 0.5 M in Puffer A eluiert. Die Fraktionen mit höchster ACD Aktivität wurden nach Ankonzentrieren mittels Ultrafiltration (4.3.6, Ausschlussgröße: 30 kDa) auf eine Superdex 200 HiLoad 16/60 (120 ml) Gelfiltrationssäule aufgetragen, die in 50 mM Tris-HCl pH 7.0 mit 2 M NaCl, 20 mM MgCl₂ und 10% Glycerol äquilibriert war. Die Proteine wurden mit einer Flussrate von 1 ml/min eluiert. Fraktionen mit höchster ACD Aktivität wurden auf 2 M (NH₄)₂SO₄ eingestellt und auf eine Phenyl Sepharose Säule (1 ml) aufgetragen, die mit 50 mM Tris-HCl pH 8.0 mit 20 mM MgCl₂ und 2 M (NH₄)₂SO₄ äquilibriert war. Die Elution der Proteine erfolgte bei einer Flussrate von 0.3 ml/min mit einem linearen Gradienten von 2 M (NH₄)₂SO₄ bis 0 M. Apparent homogenes Protein mit ACD Aktivität eluierte bei 0.5-0.8 M (NH₄)₂SO₄. Dieses Protein konnte ohne signifikanten Aktivitätsverlust über mehrere Wochen bei -20°C gelagert werden.

Reinigung der ACS aus *Ha. marismortui*. Der zellfreie Rohextrakt wurde aus 30 g acetatgewachsenen Feuchtzellen präpariert. Die Zellen wurden dazu in 70 ml 50 mM Tris-HCl pH 7.0 mit 200 g/l NaCl suspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte unter aeroben Bedingungen mittels 3maliger Hochdruckhomogenisation in einer gekühlten French Press Zelle bei 86 bar. Diese Suspension wurde bei 100000 x g und 4°C für 90 min ultrazentrifugiert. Der 100000 x g Überstand wurde 20 min bei 70°C im Wasserbad inkubiert und auf Eis transferiert. Anschließend wurde nochmals bei 100000 x g und 4°C für 90 min ultrazentrifugiert. Der so erhaltene Überstand wurde gegen Puffer A dialysiert (4.3.5) und auf eine Q Sepharose HiLoad Säule (22 x 5 cm) aufgetragen, die in Puffer A äquilibriert war. Die Proteine wurden mit einer Flussrate von 1 ml/min und einem NaCl-Gradienten von 0 M bis 0.5 M in Puffer A eluiert. Die Fraktionen mit höchster ACS Aktivität wurden auf 2 M (NH₄)₂SO₄ eingestellt und auf eine Phenyl Sepharose Säule (10 ml) aufgetragen, die mit 2 M (NH₄)₂SO₄ in Puffer A äquilibriert war. Die Elution der Proteine erfolgte bei einer Flussrate von 0.5 ml/min mit einem linearen Gradienten von 1.8 M bis 0.8 M (NH₄)₂SO₄. Die Fraktionen mit höchster ACS Aktivität (1.2-1.6 M (NH₄)₂SO₄) wurden nach Ankonzentrieren mittels Ultrafiltration (4.3.6, Ausschlussgröße: 30 kDa) auf eine Superdex 200 HiLoad 16/60 (120 ml) Gelfiltrationssäule aufgetragen, die in 2 M NaCl in Puffer A äquilibriert war. Die Proteine wurden mit einer Flussrate von 1 ml/min eluiert. In diesem Stadium war das Enzym apparent homogen, war über Wochen ohne Aktivitätsverlust stabil und wurde bei -20°C gelagert.

4.3.8 Reaktivierung von rekombinanter ACD und ACS aus *Ha. marismortui* aus Einschlusskörpern

Die beiden in Einschlusskörper exprimierten halophilen Proteine wurden nach einem jeweils modifizierten Verfahren von Connaris et al. (1999), das im Folgenden dargestellt wird, reaktiviert:

Reaktivierung der rekombinanten ACD aus *Ha. marismortui*. Nach Ernte der Zellen wurde das Pellet in 5 ml 20 mM Tris-HCl pH 7.5 mit 3 M KCl, 30 mM MgCl₂ und 10% Glycerol (v/v) (Puffer B) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Zugabe von 0.5 mg Lysozym und 0.1 Volumen 1% Triton X-100, anschließender Inkubation für 1 h bei 30°C, weiterer 15minütiger Inkubation auf Eis und abschließender Ultraschallbehandlung (dreimal 30 s, output control 3, duty cycle 30%). Dieser Extrakt wurde 30 min bei 40000 x g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal in Puffer B gewaschen und schließlich in 20 mM Tris-HCl pH 7.5 mit 8 M Harnstoff, 2 mM EDTA und 50 mM DTE resuspendiert und 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Das so entfaltete Proteingemisch wurde langsam in 400 ml Puffer B mit 2 mM ATP, 5 mM Na-Acetat, 10 µM CoA, 3 mM Glutathion (reduziert) und 0.3 mM Glutathion (oxidiert) verdünnt, bis eine Proteinkonzentration von 0.02 mg/ml erreicht war. Es folgte eine sechstägige Inkubation des Rückfaltansatzes bei 4°C, dessen ACD Aktivität über die Zeit verfolgt wurde.

Reaktivierung der rekombinanten ACS aus *Ha. marismortui*. Nach Ernte der Zellen wurde das Pellet in 5 ml 20 mM Tris-HCl pH 7.5 mit 2 M KCl und 2 mM EDTA (Puffer C) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte wie für die rekombinante ACD beschrieben. Das resultierende Pellet wurde zweimal in Puffer C gewaschen und schließlich in 20 mM Tris-HCl pH 7.5 mit 8 M Harnstoff, 2 mM EDTA und 50 mM DTE resuspendiert und 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Das so entfaltete Proteingemisch wurde langsam in 500 ml Puffer C mit 2 mM ATP, 2.5 mM Na-Acetat, 10 µM CoA, 3 mM Glutathion (reduziert) und 0.3 mM Glutathion (oxidiert) eingerührt (Proteinkonzentration: 0.03 mg/ml). Es folgte eine Inkubation des Rückfaltansatzes bei 4°C für 60 h, wobei die ACS Aktivität über die Zeit verfolgt wurde.

4.3.9 Rekonstitution der rekombinanten ACD aus *P. aerophilum*

Die Pellets nach Ernte der Zellen von *E. coli* BL21(DE3)-CodonPlus-RIL AcdAPae-pET17b und *E. coli* BL21(DE3)-CodonPlus-RIL AcdBPae-pET17b, die die α - und die β -Untereinheit der ACD überexprimierten, wurden in je 5 ml 50 mM Tris-HCl pH 8.5 resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte unter aeroben Bedingungen mittels viermaliger Hochdruckhomogenisation in einer gekühlten French Press Zelle bei 86 bar. Die Suspensionen wurden 45 min bei 100000 x g bei 4°C ultrazentrifugiert. Die in den so präparierten zellfreien Extrakten jeweils enthaltenen α - und β -Untereinheiten wurden etwa im Verhältnis 1:1 gemischt und 1 h auf Eis inkubiert. Es folgte eine 30minütige Hitzefällung bei

75°C und eine anschließende Ultrazentrifugation bei 100000 x g und 4°C für 45 min, wonach die ACD Aktivität des rekonstituierten Proteins im Ellman-Test (4.1.4.1) überprüft wurde.

4.3.10 Reinigung rekombinanter Proteine

Die allgemeinen Bedingungen für die Reinigung von rekombinanten Proteinen entsprachen denen der nativ gereinigten Proteine (4.3.7).

Reinigung der rekombinanten ACD aus *Ha. marismortui*. Der Rückfalteansatz (4.3.8) wurde mittels Ultrafiltration (4.3.6, Ausschlussgröße: 30 kDa) ankonzentriert, auf 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eingestellt und 45 min bei 100000 x g und 4°C ultrazentrifugiert. Diese Proteinlösung wurde nochmals ultrafiltriert und auf eine Superdex 200 HiLoad 16/60 (120 ml) Gelfiltrationssäule aufgetragen, die in 50 mM Tris-HCl pH 7.5 mit 2 M KCl, 20 mM MgCl_2 und 10% Glycerol äquilibriert war. Die Proteine wurden mit einer Flussrate von 1 ml/min eluiert. Die Fraktionen mit höchster ACD Aktivität wurden auf 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eingestellt und auf eine Phenyl Sepharose Säule (1 ml) aufgetragen, die mit 50 mM Tris-HCl pH 7.5 mit 20 mM MgCl_2 und 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ äquilibriert war. Die Elution der Proteine erfolgte bei einer Flussrate von 0.5 ml/min mit einem linearen Gradienten von 1.6 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bis 0 M. Apparent homogenes Protein mit ACD Aktivität eluierte bei 0.9-0.5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Dieses Protein konnte ohne signifikanten Aktivitätsverlust über mehrere Wochen bei -20°C gelagert werden.

Reinigung der rekombinanten ACS aus *Ha. marismortui*. Der Rückfalteansatz (4.3.8) wurde mittels Ultrafiltration (4.3.6, Ausschlussgröße: 30 kDa) ankonzentriert, auf 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eingestellt und 45 min bei 100000 x g und 4°C ultrazentrifugiert. Die so behandelte Proteinlösung wurde auf 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ eingestellt und auf eine Phenyl Sepharose Säule (1 ml) aufgetragen, die mit 50 mM Tris-HCl pH 7.5 mit 20 mM MgCl_2 und 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ äquilibriert war. Die Elution der Proteine erfolgte bei einer Flussrate von 1 ml/min mit einem linearen Gradienten von 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bis 0 M. Die Fraktionen mit höchster ACD Aktivität wurden durch Ultrafiltration ankonzentriert und auf eine Superdex 200 HiLoad 16/60 (120 ml) Gelfiltrationssäule aufgetragen, die in 50 mM Tris-HCl pH 7.5 mit 2 M KCl, 20 mM MgCl_2 und 10% Glycerol äquilibriert war. Die Proteine wurden mit einer Flussrate von 1 ml/min eluiert. In diesem Stadium war das Protein apparent homogen und konnte ohne signifikanten Aktivitätsverlust über mehrere Wochen bei -20°C gelagert werden.

Reinigung der rekombinanten ACD aus *P. aerophilum*. Der Extrakt mit der rekonstituierten ACD (4.3.9) wurde auf pH 9.0 eingestellt und auf eine Q Sepharose HiLoad Säule (20 ml) aufgetragen, die in 50 mM Tris-HCl pH 8.8 äquilibriert war. Die Elution der Proteine erfolgte mit einem linearen Gradienten von pH 8.8 nach pH 7.5 gefolgt von einem Gradienten von 0 M nach 0.75 M NaCl in 50 mM Tris-HCl pH 7.5. Die Fraktionen mit höchster ACD Aktivität wurden mit 10 mM MgCl_2 versetzt und einer Behandlung mit 500 Einheiten RNase-freier DNase I (Roche Diagnostics, Mannheim) für zwei Stunden bei 37°C

unterzogen. Nach anschließender Hitzefällung für 30 min bei 80°C und Ultrazentrifugation (30 min, 100000 x g, 4°C) wurde die Proteinlösung mittels Ultrafiltration ankonzentriert und auf eine Superdex 200 HiLoad 16/60 (120 ml) Gelfiltrationssäule aufgetragen, die in 50 mM Tris-HCl pH 7.5 äquilibriert war. Die Proteine wurden bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min eluiert. Die ACD war in diesem Stadium apparent homogen und annähernd nukleinsäurefrei. Die ACD war bei 4°C über mehrere Wochen ohne signifikanten Aktivitätsverlust stabil.

Reinigung der rekombinaten ACS aus *P. aerophilum*. Das Pellet nach Ernte der Zellen wurde in 3 ml 50 mM Tris-HCl pH 8.5 resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte unter aeroben Bedingungen mittels 4maliger Hochdruckhomogenisation in einer gekühlten French Press Zelle bei 86 bar. Der Extrakt wurde 45 min bei 50000 x g bei 4°C zentrifugiert. Nach anschließender Hitzefällung für 30 min bei 75°C und Zentrifugation (30 min, 50000 x g, 4°C) wurde 1 ml der Proteinlösung auf eine Superdex 200 HiLoad 16/60 (120 ml) Gelfiltrationssäule aufgetragen, die in 50 mM Tris-HCl pH 7.5 äquilibriert war. Die Proteine wurden mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min eluiert. Die Fraktionen mit der höchsten ACS Aktivität wurden mit 300 Einheiten RNase-freier DNase I (Roche Diagnostics, Mannheim) für zwei Stunden bei 37°C behandelt und einer weiteren Hitzefällung bei 86°C für 30 min unterzogen, anschließend ultrazentrifugiert (45 min, 100000 x g, 4°C) und nach Ultrafiltration (4.3.6) nochmals auf eine Superdex 200 HiLoad 16/60 (120 ml) Gelfiltrationssäule aufgetragen, die in 50 mM Tris-HCl pH 7.5 äquilibriert war. Die Proteine wurden mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min eluiert. Die in diesem Stadium apparent homogene und nukleinsäurefreie ACS war bei 4°C über mehrere Wochen stabil.

4.4 Charakterisierung von gereinigten Enzymen

Zur Charakterisierung der Enzyme gehörten die Bestimmung der kinetischen Parameter, des Temperaturoptimums, des pH-Optimums und der Substratspezifitäten. Im Falle der Proteine aus *Ha. marismortui* wurden zusätzlich die optimalen Salzkonzentrationen ermittelt, für die Enzyme aus *P. aerophilum* zusätzlich die Thermostabilität. Die Bestimmung der kinetischen Parameter erfolgte jeweils aus der Darstellung nach Lineweaver-Burk. Die allgemeinen Handhabungen der dazu eingesetzten Enzymtests, die im Folgenden beschrieben werden, entsprachen denen der Messungen in Rohextrakten der extrem halophilen Archaea (4.1.4).

4.4.1 Charakterisierung der ACD und der ACS aus *Ha. marismortui*

Die Charakterisierung beider Enzyme erfolgte bei 37°C unter aeroben Bedingungen. Während der Reinigung beider Enzyme wurde die Aktivität über die Bildung eines Fe³⁺-acetyl-Hydroxamat-Farbkomplexes aus Acetyl-CoA und Hydroxamat gemessen (4.1.4.1).

ACD. Die ACD aus *Ha. marismortui* katalysiert die reversible Reaktion: Acetat + ATP + CoA \rightleftharpoons Acetyl-CoA + ADP + P_i. Die kinetischen Parameter und die Substratspezifität der ACD für die verschiedenen Säuren (jeweils 10 mM) und CoA-Ester (jeweils 1.5 mM) wurden in Richtung der Acetyl-CoA Bildung in 100 mM Tris-HCl pH 7.5 mit 30 mM MgCl₂ und 3 M KCl im gekoppelten Test über PK und LDH gemessen (1 mM CoA, 2 mM ATP, 10 mM der jeweiligen organischen Säure) und in Richtung der Acetatbildung mit dem Ellman-Test (2 mM ADP, 5 mM P_i, 1.5 mM CoA-Ester) (4.1.4.1). Die Abhängigkeit der spezifischen Aktivität des gereinigten Enzyms vom pH-Wert wurde zwischen pH 5.0 und pH 10.0 im gekoppelten Test über PK und LDH getestet (4.1.4.1). Die Ansätze enthielten entweder jeweils 100 mM MES (pH 5.0 bis pH 7.0), Tris-HCl (pH 7.0 bis pH 9.0) oder Glycin (pH 9.0 bis pH 10.0) mit 30 mM MgCl₂ (ohne weiteres Salz). Die Temperaturabhängigkeit der ACD wurde zwischen 21°C und 50°C in 100 mM Tris-HCl pH 7.5 im gleichen Testsystem gemessen. Der Einfluss verschiedener Salze auf die Aktivität der ACD (bis 0.2 M MgCl₂, bis 3 M KCl und bis 3 M NaCl) wurde in 100 mM Tris-HCl pH 7.5 im Ellman-Test oder gekoppelt über PK und LDH ermittelt. Zur Bestimmung der Stabilität des gereinigten Enzyms in Abhängigkeit von der Salzkonzentration wurden jeweils 5 µg Protein über 48 h bei 4°C in 100 mM Tris-HCl pH 7.5 entweder mit 30 mM MgCl₂ oder mit 30 mM MgCl₂ und 10% Glycerol (v/v) oder mit 30 mM MgCl₂ und 3 M KCl inkubiert und die Aktivität über die Zeit verfolgt (Ellman-Test).

ACS. Die ACS aus *Ha. marismortui* katalysiert die Reaktion: Acetat + ATP + CoA → Acetyl-CoA + AMP + PP_i. Die K_m - und V_{max} -Werte sowie die Substratspezifität der ACS für die verschiedenen Säuren wurden in Richtung der Acetyl-CoA Bildung in 100 mM Tris-HCl pH 7.5 mit 5 mM MgCl₂, 1.25 M KCl, 2.5 mM der jeweiligen organischen Säure, 1 mM CoA und 2 mM ATP bestimmt. Die kinetischen Parameter in Richtung der Acetatbildung wurden mit dem Ellman-Test in 100 mM Tris-HCl pH 7.5 mit 2.5 mM MgCl₂, 1.25 M KCl, 2 mM AMP, 1.5 mM Acetyl-CoA und 2 mM PP_i ermittelt (4.1.4.2). Die Abhängigkeit der spezifischen Aktivität des gereinigten Enzyms vom pH-Wert wurde zwischen pH 5.0 und pH 9.0 im Ellman-Test ermittelt. Die Ansätze enthielten entweder jeweils 20 mM MES (pH 5.0 bis pH 7.0) oder Tris-HCl (pH 7.0 bis pH 9.0) mit 5 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 1.25 M KCl, 2.5 mM Na-Acetat, 1 mM CoA und 2 mM ATP. Die Temperaturabhängigkeit der ACS wurde zwischen 17°C und 45°C im gleichen Testsystem gemessen. Der Einfluss verschiedener Salze auf die Aktivität der ACS (bis 0.1 M MgCl₂, bis 3 M KCl und bis 3 M NaCl) wurde in 100 mM Tris-HCl pH 7.5 im gekoppelten Test über PK, LDH und MK ermittelt. Zur Bestimmung der Stabilität des gereinigten Enzyms in Abhängigkeit von der Salzkonzentration wurde jeweils 10 µg gereinigtes Protein über 48 h bei 4°C in 100 mM Tris-HCl pH 7.5 entweder mit 20 mM MgCl₂ oder mit 20 mM MgCl₂ und 10% Glycerol (v/v) oder mit 20 mM MgCl₂ und 3 M KCl inkubiert und die Aktivität über die Zeit verfolgt (gekoppelt über PK, LDH und MK).

4.4.2 Charakterisierung der ACD und der ACS aus *P. aerophilum*

Die Charakterisierung beider Enzyme erfolgte bei 85°C unter aeroben Bedingungen.

ACD. Die ACD aus *P. aerophilum* katalysiert die reversible Reaktion: Acetat + ATP + CoA \rightleftharpoons Acetyl-CoA + ADP + P_i. Während der Reinigung der ACD wurde die Aktivität in Richtung der Acetatbildung unter aeroben Bedingungen bei 85°C als ADP- und P_i-abhängige CoA-Freisetzung aus Acetyl-CoA mit DTNB gemessen (4.1.4.1). Der Testansatz enthielt 100 mM MES pH 6.5, 5 mM MgCl₂, 2 mM ADP, 5 mM P_i, 1.5 mM Acetyl-CoA und 0.1 mM DTNB. Dieses Testsystem wurde auch für die weitere Charakterisierung des Enzyms verwendet. Die Abhängigkeit der spezifischen Aktivität des gereinigten Enzyms vom pH-Wert wurde zwischen pH 5.0 und pH 7.5 bestimmt. Die Ansätze enthielten entweder jeweils 100 mM Piperazin (pH 5.0 bis pH 5.5), MES (pH 5.5 bis pH 7.0) oder Triethanolamin (pH 7.0 bis pH 7.5). Die Temperaturabhängigkeit der ACD wurde zwischen 27°C und 93°C in 100 mM MES pH 6.5 gemessen. Zur Bestimmung der Temperaturstabilität des gereinigten Enzyms wurde jeweils 1 µg Protein in 200 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7.0 über 120 min in geschlossenen Inkubationsgefäßen bei Temperaturen zwischen 80°C und 100°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Reaktionsgefäße 10 min auf Eis gekühlt und anschließend die Restaktivität bestimmt.

ACS. Die ACS aus *P. aerophilum* katalysiert die Reaktion: Acetat + ATP + CoA → Acetyl-CoA + AMP + PP_i. Während der Reinigung der ACS wurde die Aktivität in Richtung der Acetatbildung unter aeroben Bedingungen bei 85°C als AMP- und PP_i-abhängige CoA-Freisetzung aus Acetyl-CoA mit DTNB gemessen (4.1.4.2). Der Testansatz enthielt 100 mM MES pH 6.5, 0.5 mM AMP, 1 mM PP_i, 0.1 mM Acetyl-CoA und 0.1 mM DTNB. Dieses Testsystem wurde auch zur Bestimmung der kinetischen Parameter in Richtung der Acetatbildung verwendet. Die Abhängigkeit der spezifischen Aktivität des gereinigten Enzyms vom pH-Wert wurde zwischen pH 5.0 und pH 7.5 mit dem Ellman-Test bestimmt. Die Ansätze enthielten jeweils 100 mM Piperazin (pH 5.0 bis pH 6.0), MES (pH 5.5 bis pH 7.0) oder Triethanolamin (pH 7.0 bis pH 7.5). Die Temperaturabhängigkeit der ACS wurde zwischen 27°C und 97°C in einem diskontinuierlichen Testsystem gemessen. Der Testansatz enthielt in 500 µl: 100 mM MES pH 6.5, 10 mM MgCl₂, 2 mM ATP, 1 mM CoA und 5 mM Acetat. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Protein gestartet. Die Inkubationszeit betrug 1 bis 6 min. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 500 µl eisgekühltem Puffer (0.2 M Tris-HCl pH 7.6 mit 0.6 mM NAD⁺ und 5 mM D,L-Malat) gestoppt. Die Menge an gebildetem Acetyl-CoA wurde durch die Kopplung mit der Reduktion von NAD⁺ über Malat Dehydrogenase (12 U) und Citrat Synthase (2 U) bei 365 nm quantifiziert (Decker 1986). Mit diesem Testsystem wurden auch die *K_m*- und *V_{max}*-Werte in Richtung der Acetyl-CoA Bildung gemessen. Zur Bestimmung der Temperaturstabilität des gereinigten Enzyms wurde jeweils 6 µg Protein in 200 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7.0 über 120 min in geschlossenen Inkubationsgefäßen bei Temperaturen zwischen 80°C und 100°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Reaktionsgefäße 10 min auf Eis gekühlt und anschließend die Restaktivität im Ellman-Test bestimmt. Die Substratspezifität der ACS wurde in einem

weiteren diskontinuierlichen Testsystem ermittelt. Der Testansatz enthielt in 500 μ l: 100 mM MES pH 6.5, 10 mM $MgCl_2$, 2 mM ATP, 1 mM CoA und 5 mM der jeweiligen organischen Säure. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Protein gestartet. Die Inkubationszeit betrug 1 bis 3 min. Durch die Zugabe von 500 μ l eisgekühltem Puffer (0.2 M Tris-HCl pH 7.6 mit 0.6 mM NADH und 2.5 mM Phosphoenolpyruvat) wurde die Reaktion gestoppt. Die Menge an gebildetem AMP wurde durch die Kopplung mit der Oxidation von NADH über PK (4 U), LDH (15 U) und MK (3.6 U) bei 365 nm quantifiziert.

5 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zum archaeellen Acetatstoffwechsel und den daran beteiligten Enzymen durchgeführt:

1. In den halophilen Archaea *Haloarcula marismortui*, *Halorubrum saccharovororum*, *Halococcus saccharolyticus* und *Haloferax volcanii* wurden die Enzyme der Acetatbildung und der Acetataktivierung identifiziert sowie deren Regulation in Wachstumsexperimenten, Enzymmessungen in Zellextrakten und Experimenten mit Zellsuspensionen untersucht.
2. Die identifizierten Enzyme der Acetatbildung, die ADP-bildende Acetyl-CoA Synthetase (ACD), und der Acetataktivierung, die AMP-bildende Acetyl-CoA Synthetase (ACS), aus *Haloarcula marismortui* wurden gereinigt und biochemisch charakterisiert. Die kodierenden Gene wurden im partiell sequenzierten Genom von *Ha. marismortui* identifiziert, heterolog in *E. coli* exprimiert und die rekombinanten Proteine gereinigt und biochemisch charakterisiert.
3. Die Gene für die putative ACD aus *Pyrobaculum aerophilum* wurden identifiziert, in *E. coli* exprimiert und das gereinigte rekombinante Enzym biochemisch charakterisiert. Außerdem wurde das im Genom von *P. aerophilum* annotierte ACS Gen kloniert und das überexprimierte Protein gereinigt und charakterisiert.

5.1 Identifizierung der Enzyme der Acetatbildung und der Acetataktivierung in halophilen Archaea

Viele halophile Archaea sind in der Lage, sowohl mit Glucose als auch mit Acetat als Kohlenstoff- und Energiequelle zu wachsen. Dabei werden bei Wachstum auf Glucose größere Mengen an Säuren, insbesondere auch Acetat, ins Medium ausgeschieden (Tomlinson und Hochstein 1972b; Tomlinson und Hochstein 1976; Hochstein 1978; Oren et al. 1988; Montero et al. 1989; Schäfer et al. 1993; Arahall et al. 1996). Erste Untersuchungen mit *Hr. saccharovororum* deuteten darauf hin, dass Acetat, wie für andere Archaea beschrieben, über eine ACD gebildet wird (Schäfer et al. 1993). Detaillierte Untersuchungen zur Acetatbildung sowie zum Wachstum der halophilen Archaea auf Acetat und zum Mechanismus der Acetataktivierung lagen aber nicht vor.

5.1.1 Wachstumsexperimente

Die Wachstumsexperimente mit *Ha. marismortui*, *Hr. saccharovororum*, *Hf. volcanii* und *Hc. saccharolyticus* wurden in Erlenmeyerkolben durchgeführt, die 20% Medium enthielten und mit 2% einer exponentiell wachsenden, an das jeweilige Substrat adaptierten Vorkultur

inokuliert wurden. In Tabelle 6 und Tabelle 7 sind die Substratkonzentrationen und die den Medien zugefügten Mengen an Hefeextrakt und Casaminosäuren sowie die Wachstumsparameter zusammengefasst.

Tabelle 6 Wachstum von *Ha. marismortui*, *Hr. saccharovororum*, *Hf. volcanii* und *Hc. saccharolyticus* auf Glucose. ΔOD_{578} , Proteinbildung, Verdopplungszeiten und Acetatbildung sind dargestellt. Neben Glucose enthielten die Medien 0.25% Hefeextrakt und 0.5% Casaminosäuren; n.b. = nicht bestimmt.

Organismus	Substrat	ΔOD_{578}	Protein gebildet (mg/ml)	t_d (h)	Acetat gebildet (mM)
<i>Ha. marismortui</i>	25 mM Glucose	6.2	3.5	11	5-10
	ohne Glucose	3.2	1.8	15	0
<i>Hr. saccharovororum</i>	50 mM Glucose	4.7	2.4	11	35-45
	ohne Glucose	3.2	1.6	16	n.b.
<i>Hf. volcanii</i>	25 mM Glucose	7.2	n.b.	9	9
	ohne Glucose	4.7	n.b.	12	n.b.
<i>Hc. saccharolyticus</i>	15 mM Glucose	12.0	n.b.	12	2
	ohne Glucose	8.1	n.b.	13	n.b.

Wie in Abbildung 4 exemplarisch für *Ha. marismortui* dargestellt, wuchsen alle vier halophilen Archaea sowohl mit Glucose als auch mit Acetat als Kohlenstoff- und Energiequelle. Wie Tabelle 6 zeigt, wurden bei Wachstum auf Glucose Verdopplungszeiten von ca. 11 h und optische Dichten (ΔOD_{578}) von 7-11 erreicht. Die Kontrollen ohne Glucose wuchsen bis zu optischen Dichten von 3-7, sodass sich in allen untersuchten Fällen ein glucosespezifisches Wachstum einer ΔOD_{578} von 2-4 ergab (ca. 1.5 mg/ml Zellprotein). Die Glucose wurde während der exponentiellen Phase von allen vier untersuchten Organismen quantitativ verbraucht, wobei parallel Acetat in Konzentrationen von 2-10 mM (*Ha. marismortui*, *Hf. volcanii*, *Hc. saccharolyticus*) bzw. bis zu 40 mM (*Hr. saccharovororum*) ins Medium ausgeschieden wurden. In Abwesenheit der Glucose blieb diese Acetatbildung aus. Das während der exponentiellen Phase aus der Glucose gebildete Acetat wurde während der stationären Phase annähernd vollständig (*Ha. marismortui*, *Hf. volcanii*, *Hc. saccharolyticus*) bzw. teilweise (20 mM Acetat über 20 h, *Hr. saccharovororum*) wieder aufgenommen, allerdings ohne dass ein weiteres Wachstum zu verzeichnen war.

Das Medium bei Wachstum auf Acetat enthielt neben Hefeextrakt und 40 mM Acetat im Falle von *Hc. saccharolyticus*, *Hr. saccharovororum* und *Hf. volcanii* zusätzlich jeweils $CaCl_2$ (0.1 g/l), NH_4Cl (0.5 g/l) und K_2HPO_4 (0.05 g/l). Wie in Tabelle 7 dargestellt, wurden bei Wachstum auf dem Acetatmedium Verdopplungszeiten von ca. 24 h und optische Dichten (ΔOD_{578}) zwischen 1 und 5 erreicht, wobei das Acetat während der exponentiellen Phase vollständig umgesetzt wurde. Bei Wachstum ohne Acetat auf 0.05% Hefeextrakt wurden

5.1.2 Enzymaktivitäten in unterschiedlichen Wachstumsphasen von *Ha. marismortui*

Zellextrakte aller vier untersuchten halophilen Archaea wurden auf die Aktivität der potentiell acetat- bzw. acety-CoA-umsetzenden Enzyme ACD, ACS, AK und PTA hin untersucht. Außerdem wurden die Aktivitäten von Malat Synthase (MS) und Isocitrat Lyase (ICL), den Schlüsselenzymen des Glyoxylat-Zyklus, bestimmt. Die Zellextrakte wurden jeweils aus glucosegewachsenen Zellen aus exponentieller und stationärer Phase und aus acetatgewachsenen Zellen aus der exponentiellen Phase präpariert. In glucosegewachsenen Zellen aus der exponentiellen Phase, in der Acetat gebildet wird, konnte in allen untersuchten Haloarchaea eindeutig ACD Aktivität nachgewiesen werden, nicht aber die Aktivitäten von AK und PTA. Das wies darauf hin, dass die Acetatbildung in den Haloarchaea von einer ACD katalysiert wird und nicht von AK und PTA, den „klassischen“ bakteriellen Enzymen der Acetatbildung. In Zellextrakten acetat- und glucoseadaptierter Zellen aus der stationären Phase, in der Acetat aufgenommen wird, konnten sowohl ACD als auch ACS Aktivität nachgewiesen werden, aber wiederum nicht die Aktivitäten von AK und PTA. Das zeigte zwar, dass AK und PTA auch bei der Acetataktivierung in Haloarchaea keine Rolle spielen, der Mechanismus der Acetataktivierung konnte aber wegen des gleichzeitigen Vorhandenseins von ACS und der in vitro reversiblen ACD nicht eindeutig geklärt werden. Dagegen wiesen die in acetatadaptierten Zellen deutlich messbaren Aktivitäten von MS (0.004-0.05 U/mg) und ICL (0.001-0.04 U/mg) darauf hin, dass, wie bei allen anderen fettsäureverstoffwechselnden Aerobiern, auch in den Haloarchaea der Glyoxylat-Zyklus die anaplerotische Sequenz bildet.

Um die Mechanismen der Acetatbildung und Acetataktivierung eindeutig identifizieren zu können, wurde die Regulation der Aktivitäten von ACD und ACS während des Wachstums von *Ha. marismortui* untersucht. Zusätzlich wurden die Aktivitäten der Glucose Dehydrogenase (Glc-DH) als Indikatorenzym für den Glucosemetabolismus und der MS als Indikatorenzym des Acetatmetabolismus gemessen. Dazu wurden glucose- bzw. acetatadaptierte Zellen auf Medien überimpft, die das jeweils anderen Substrat enthielten. Zudem wurden Zellen, die an keines der beiden Substrate adaptiert waren, auf ein Medium überimpft, das beide Substrate, Glucose und Acetat, enthielt. Außerdem wurden glucoseadaptierte Zellen auf ein Medium überimpft, das nur Hefeextrakt enthielt (ohne Acetat und Glucose). Die Wachstumsexperimente wurden in 2 l-Fermentern durchgeführt. In regelmäßigen Abständen wurden 100-200 ml der Kulturen geerntet und aus den Überständen die Glucose- und die Acetatkonzentration bestimmt. Zudem wurden die Aktivitäten von ACD und ACS, die Aktivität der Glc-DH, des ersten Enzyms im Glucoseabbau von Haloarchaea über einen modifizierten ED-Weg, und die Aktivität der MS, eines der beiden Schlüsselenzyme des Glyoxylat-Zyklus, gemessen.

Acetatadaptierte Zellen auf Glucose (Abbildung 5). Acetatadaptierte Zellen von *Ha. marismortui* aus der exponentiellen Phase wurden auf Medium angeimpft, das neben 0.25% Hefeextrakt und 0.5% Casaminsäuren etwa 20 mM Glucose enthielt. Die Zellen wuchsen nach einer lag-Phase (10 h) mit einer Verdopplungszeit von 10 h bis zu einer ΔOD_{578} von 5.7.

Dabei wurde die Glucose vollständig verbraucht. Während der exponentiellen Phase wurden etwa 5 mM Acetat gebildet, das mit Eintritt in die stationäre Phase innerhalb von 30 h wieder aufgenommen wurde. Die Aktivitäten der ACD und der Glc-DH stiegen während der exponentiellen Phase parallel zum Glucoseverbrauch und zur Acetatbildung von 5 auf 40 mU/mg bzw. von 30 auf 60 mU/mg an. Nach Verbrauch der Glucose nahmen die Aktivitäten beider Enzyme in der stationären Phase parallel zum Verbrauch des ausgeschiedenen Acetats auf 30 mU/mg (ACD) und 40 mU/mg (Glc-DH) ab. Die Aktivitäten der MS und der ACS verhielten sich genau entgegengesetzt: Während des Glucoseverbrauchs und der Acetatbildung in der exponentiellen Phase nahm die Aktivität beider Enzyme von 6 mU/mg (ACS) und 11 mU/mg (MS) ab, bis beide nicht mehr messbar waren. Beide Enzymaktivitäten stiegen aber nach Verbrauch der Glucose in der stationären Phase parallel zum Acetatverbrauch wieder auf 5 mU/mg (ACS) bzw. 7 mU/mg (MS) an.

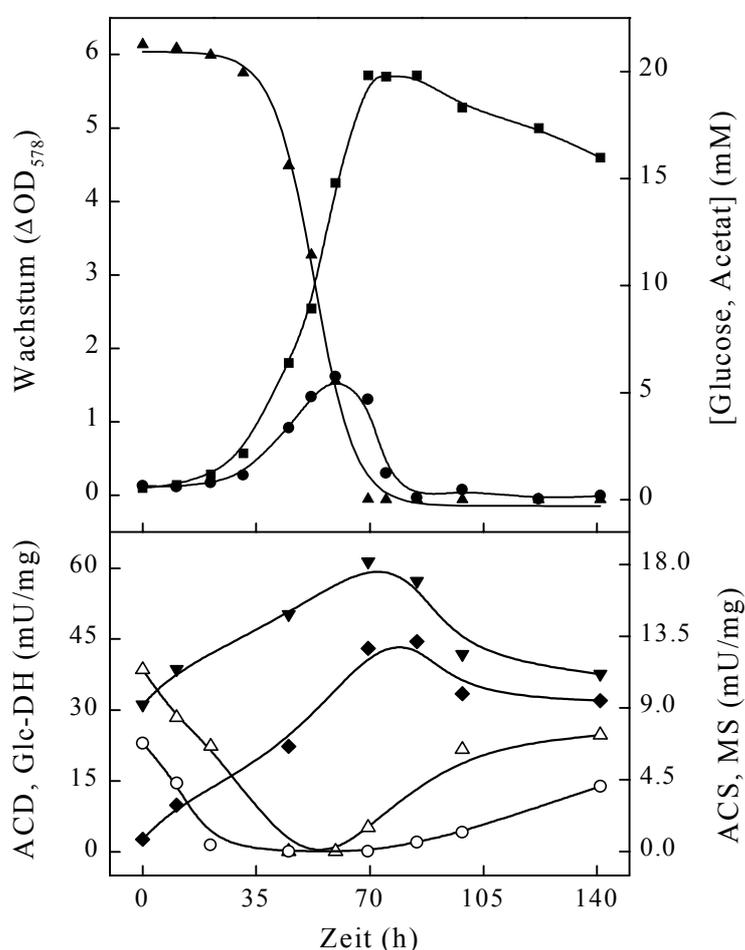


Abbildung 5 Enzymaktivitäten von *Ha. marismortui* bei Wachstum acetatadaptierter Zellen auf Glucose. Acetatgewachsene Zellen wurden auf Medium mit 25 mM Glucose, 0.25% Hefeextrakt und 0.5% Casaminsäuren angeimpft. Die Versuche wurden bei 37°C durchgeführt und das Wachstum als Zunahme der ΔOD_{578} (■) verfolgt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden jeweils 100-200 ml der Kultur geerntet und aus den Mediumüberständen die Glucose-(▲) und Acetatkonzentration (●) bestimmt. Aus den Zellen wurden Rohextrakte präpariert und darin die Aktivitäten von ACD (◆), Glc-DH (▼), ACS (○) und MS (△) gemessen.

Glucoseadaptierte Zellen auf Acetat (Abbildung 6). Glucoseadaptierte Zellen von *Ha. marismortui* aus der exponentiellen Phase wurden auf Medium angeimpft, das 40 mM Acetat und 0.05% Hefeextrakt enthielt. Zu Beginn wuchsen die Zellen mit einer Verdopplungszeit von 10 h bis zu einer ΔOD_{578} von 0.9. In dieser Zeit konnte keine Acetataufnahme beobachtet werden, was dafür spricht, dass das Wachstum in dieser Phase auf die Komplexbestandteile und die über das Inokulum eingebrachte Glucose (1.7 mM) zurückzuführen war. Nach 15 h verlangsamte sich das Wachstum bis zu einer Verdopplungszeit von ca. 50 h. Die Zellen wuchsen bis zu einer ΔOD_{578} von 1.8, wobei nach 90 h das angebotene Acetat quantitativ verbraucht war und die Zellen in die stationäre Phase eintraten. Die Aktivitäten von ACD und Glc-DH nahmen parallel zum Acetatverbrauch von 70 auf 15 mU/mg bzw. von 80 auf 30 mU/mg ab. Die Aktivität der MS, die zu Beginn nicht messbar war, stieg nach Verbrauch der restlichen Glucose im Medium auf 10 mU/mg an. Die Aktivität der ACS, die am Anfang des Versuchs ebenfalls noch nicht messbar war, stieg parallel zum Acetatverbrauch kontinuierlich bis zu einer Aktivität von 10 mU/mg an.

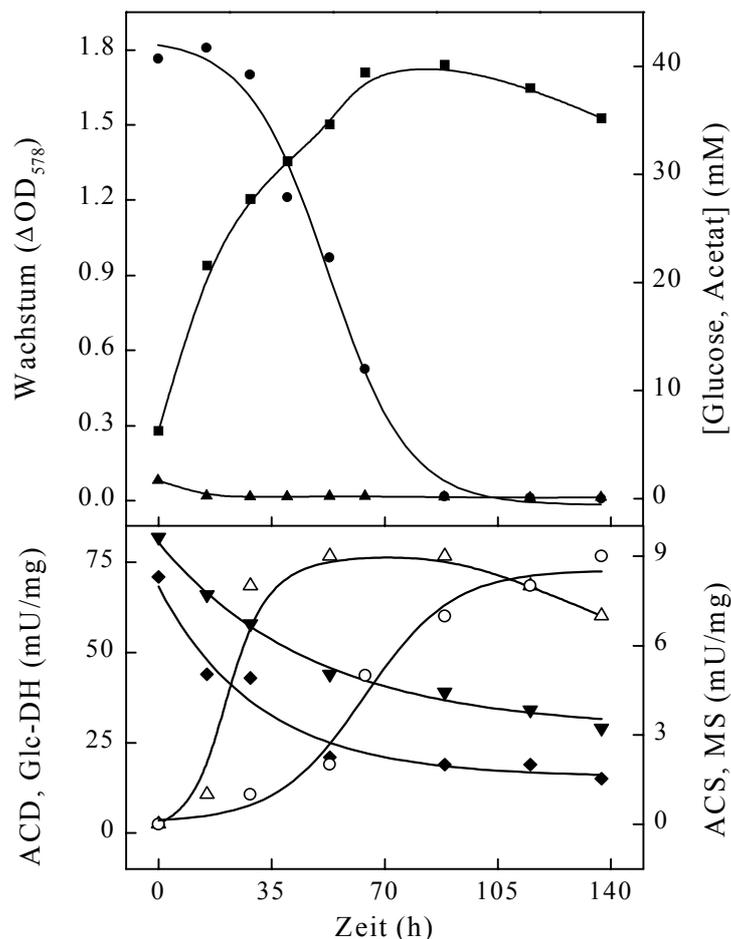


Abbildung 6 Enzymaktivitäten von *Ha. marismortui* bei Wachstum glucoseadaptierter Zellen auf Acetat. Glucosegewachsene Zellen wurden auf Medium mit 40 mM Acetat und 0.05% Hefeextrakt angeimpft. Die Versuche wurden bei 37°C durchgeführt und das Wachstum als Zunahme der ΔOD_{578} (■) verfolgt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden jeweils 100-200 ml der Kultur geerntet und aus den Mediumüberständen die Glucose-(▲) und Acetatkonzentration (●) bestimmt. Aus den Zellen wurden Rohextrakte präpariert und darin die Aktivitäten der ACD (◆), der Glc-DH (▼), der ACS (○) und der MS (△) gemessen.

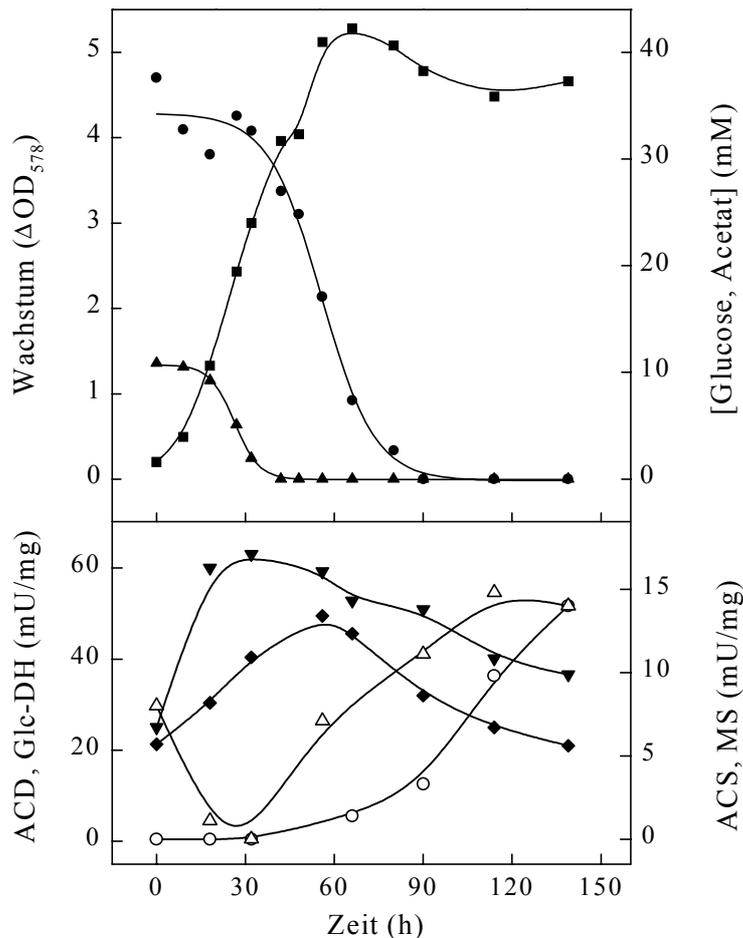


Abbildung 7 Enzymaktivitäten von *Ha. marismortui* bei Wachstum komplexadaptierter Zellen auf Glucose und Acetat. Zellen, die auf 0.25% Hefeextrakt und 0.5% Casaminosäuren adaptiert waren, wurden auf Medium mit 10 mM Glucose, 30 mM Acetat sowie 0.25% Hefeextrakt und 0.5% Casaminosäuren angeimpft. Die Versuche wurden bei 37°C durchgeführt und das Wachstum als Zunahme der ΔOD_{578} (■) verfolgt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden jeweils 100-200 ml der Kultur geerntet und aus den Mediumüberständen die Glucose-(▲) und Acetatkonzentration (●) bestimmt. Aus den Zellen wurden Rohextrakte präpariert und darin die Aktivitäten der ACD (◆), der Glc-DH (▼), der ACS (○) und der MS (△) gemessen.

Diauxisches Wachstum auf Glucose und Acetat (Abbildung 7). Bisher war in der Domäne der Archaea weder das Wachstum bei gleichzeitigem Vorhandensein von Glucose und Acetat im Medium untersucht noch war diauxisches Wachstum auf diesen beiden Substraten beschrieben worden. Daher wurden Zellen von *Ha. marismortui* aus der exponentiellen Phase, die an 0.25% Hefeextrakt und 0.5% Casaminosäuren adaptiert waren, auf Medium angeimpft, das neben 0.25% Hefeextrakt und 0.5% Casaminosäuren etwa 10 mM Glucose und 30 mM Acetat enthielt. Während des biphasischen Wachstums der Zellen auf diesem Medium wurden die Substrate deutlich sequentiell aufgenommen, wobei Glucose das bevorzugte Substrat war. Während der ersten Phase des Wachstums wuchsen die Zellen mit einer Verdopplungszeit von 10 h bis zu einer ΔOD_{578} von 4.0 bei gleichzeitigem Verbrauch der Glucose. Nach vollständigem Verbrauch der Glucose traten die Zellen in eine sechsstündige lag-Phase ein. Danach wuchsen die Zellen unter Verbrauch des Acetats bis zu einer ΔOD_{578} von 5.2. Die Aktivitäten von ACD und Glc-DH stiegen parallel zum Glucoseverbrauch von 20 auf 50

mU/mg bzw. von 25 auf 60 mU/mg an. Nachdem die Glucose verbraucht war, nahmen die Aktivitäten beider Enzyme in der Phase des Acetatverbrauchs auf 20 mU/mg (ACD) und 40 mU/mg (Glc-DH) ab. Die Aktivität der MS verhielt sich genau entgegengesetzt: Während des Glucoseverbrauchs nahm die Aktivität von ca. 10 mU/mg ab bis keine Aktivität mehr messbar war und stieg nach Verbrauch der Glucose wieder bis zu einer maximalen Aktivität von 15 mU/mg an. Die ACS konnte zu Beginn des Versuches nicht nachgewiesen werden und stieg erst mit einsetzendem Acetatverbrauch auf 15 mU/mg an.

Glucoseadaptierte Zellen auf Hefeextrakt und Casaminosäuren (ohne Acetat oder Glucose) (Abbildung 8). Glucoseadaptierte Zellen von *Ha. marismortui* aus der exponentiellen Phase wurden auf Medium angeimpft, das 0.25% Hefeextrakt und 0.5% Casaminosäuren enthielt. Die Zellen wuchsen mit einer Verdopplungszeit von 13 h bis zu einer ΔOD_{578} von 2.5. Die über das Inokulum eingebrachte Glucose (1.7 mM) war dabei nach 15 h verbraucht. In diesem Zeitraum stieg die Acetatkonzentration im Medium von etwa 1 mM auf knapp 2 mM an.

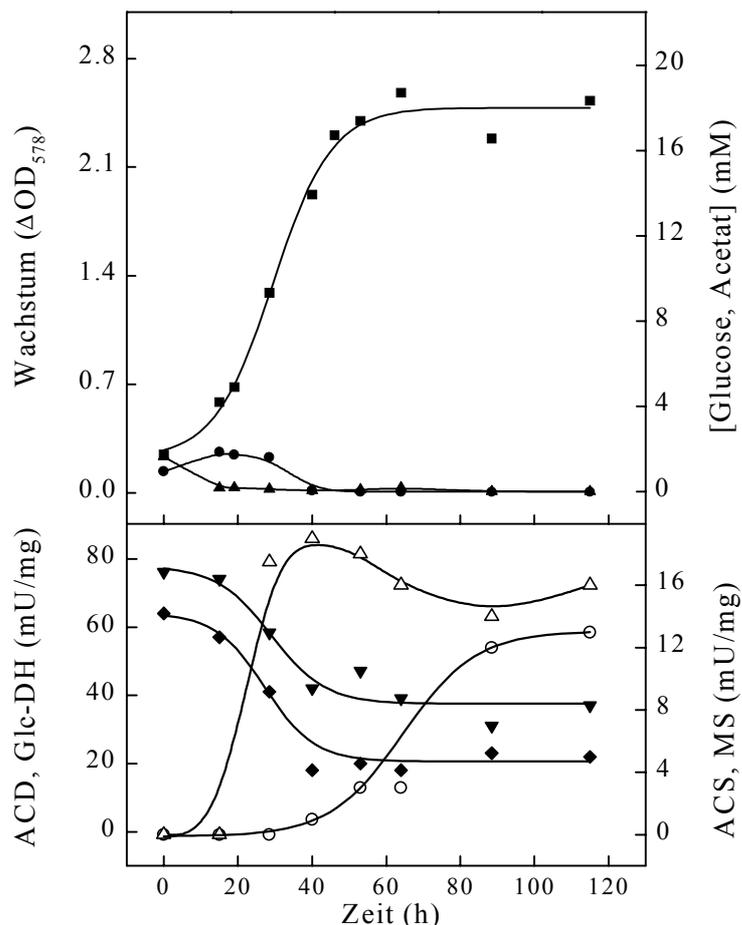


Abbildung 8 Enzymaktivitäten von *Ha. marismortui* bei Wachstum glucoseadaptierter Zellen auf 0.25% Hefeextrakt und 0.5% Casaminosäuren ohne Glucose und Acetat. Glucosegewachsene Zellen wurden auf Medium mit 0.25% Hefeextrakt und 0.5% Casaminosäuren angeimpft. Die Versuche wurden bei 37°C durchgeführt und das Wachstum als Zunahme der ΔOD_{578} (■) verfolgt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden jeweils 100-200 ml der Kultur geerntet und aus den Mediumüberständen die Glucose-(▲) und Acetatkonzentration (●) bestimmt. Aus den Zellen wurden Rohextrakte präpariert und darin die Aktivitäten der ACD (◆), der Glc-DH (▼), der ACS (○) und der MS (△) gemessen.

Zu Beginn der stationären Phase war aber auch kein Acetat mehr im Medium nachweisbar. Die Aktivitäten der ACD, der Glc-DH und der MS verhielten sich dabei annähernd genauso wie bei Wachstum glucoseadaptierter Zellen auf Acetat: ACD und Glc-DH Aktivität nahmen von 60 auf 20 mU/mg bzw. von 80 auf 40 mU/mg am Ende der exponentiellen Phase ab. Die MS Aktivität, die zu Beginn noch nicht messbar war, stieg nach Verbrauch der restlichen Glucose auf eine Aktivität von ca. 20 mU/mg an. Die Aktivität der ACS war dagegen erst am Ende der exponentiellen Phase messbar und stieg während der stationären Phase bis auf eine Aktivität von ca. 13 mU/mg an.

In allen vier Experimenten stiegen in Phasen von Glucoseverbrauch und Acetatbildung die Aktivitäten von ACD und Glc-DH an, während in diesen Phasen die Aktivitäten von ACS und MS abnahmen. Umgekehrt stiegen in Phasen des Acetatverbrauchs die ACS und die MS Aktivitäten an, wohingegen die Aktivitäten von ACD und Glc-DH abnahmen. Zudem zeigten die Zellen bei diauxischem Wachstum eine sequenzielle Aufnahme der Substrate, wobei Glucose gegenüber Acetat bevorzugt metabolisiert wurde. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass

1. die ACD die Acetatbildung während des Wachstums auf Glucose katalysiert.
2. die ACS die Acetataktivierung während des Wachstums auf Acetat katalysiert.
3. die Enzyme des Acetatstoffwechsels ACS und MS scheinbar durch Glucose reprimiert werden.

5.1.3 Acetatverbrauch von *Ha. marismortui* in Zellsuspensionen

Um weitere Hinweise darauf zu erhalten, dass die Acetataktivierung von der ACS katalysiert wird, die in vitro reversible ACD aber ausschließlich der Acetatbildung dient, wurden Experimente mit Zellsuspensionen durchgeführt. Dazu wurden Zellsuspensionen acetat- und glucosegewachsener Zellen sowohl aus der exponentiellen als auch aus der stationären Phase in Gegenwart von 40 mM Acetat inkubiert. Wie in Abbildung 9 dargestellt, konnte Acetat nur von denjenigen Zellen verbraucht werden, die eine ACS enthielten, nämlich von acetat- und glucosegewachsenen Zellen aus der stationären Phase, in der ausgeschiedenes Acetat wieder aufgenommen wird. Dabei betrug die Rate der Acetataufnahme etwa 4 nmol pro Minute und mg Protein. Dagegen waren glucosegewachsene Zellen aus der exponentiellen Phase, die ausschließlich ACD, nicht aber ACS Aktivität aufwiesen, nicht in der Lage in Suspension Acetat aufzunehmen. Dieser Befund untermauert die Schlussfolgerungen aus den Untersuchungen zur Regulation der Enzymaktivitäten, dass die Acetataktivierung in Haloarchaea ausschließlich von der ACS katalysiert wird und nicht von der ACD.

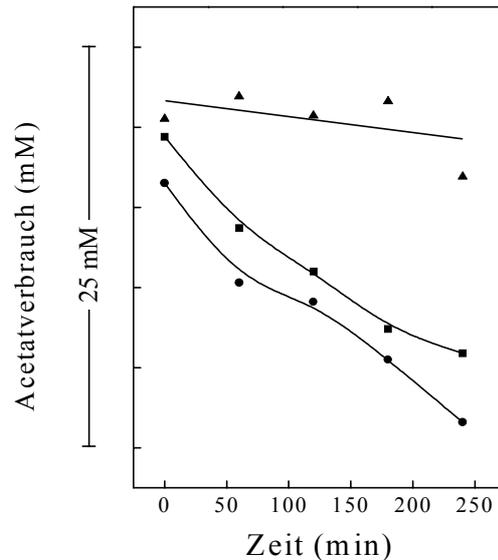


Abbildung 9 Acetatverbrauch in Zellsuspensionen von glucosegewachsenen Zellen aus der exponentiellen Phase(▲), glucosegewachsenen Zellen aus der stationären Phase (●) und acetatgewachsenen Zellen aus der exponentiellen Phase (■) von *Ha. marismortui*. 10 ml Zellsuspension mit 8-10 mg/ml Protein und 40 mM Acetat wurden in 100 ml Erlenmeyerkolben inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Menge an verbrauchtem Acetat bestimmt.

5.2 Reinigung und Charakterisierung der Enzyme der Acetatbildung und Acetataktivierung in *Ha. marismortui*: ACD und ACS

Die im Rahmen dieser Arbeit in Haloarchaea identifizierten Enzyme der Acetatbildung (ACD) und der Acetataktivierung (ACS) wurden aus *Ha. marismortui* gereinigt und biochemisch charakterisiert. Im partiell sequenzierten Genom von *Ha. marismortui* wurden mit Hilfe der N-Termini die kodierenden Gene für eine putative ACD und eine putative ACS identifiziert. Die kodierende Funktion der Gene wurde mittels Klonierung und funktioneller Expression in *E. coli* überprüft. Die rekombinanten Enzyme wurden aus Einschlusskörpern reaktiviert, gereinigt und charakterisiert. Die Ergebnisse werden im Folgenden dargestellt.

5.2.1 Reinigung und Charakterisierung der ACD aus *Ha. marismortui*

Reinigung der nativen ACD. Die ACD wurde aus glucosegewachsenen Zellen bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Die Reinigung erfolgte mit einer Hitzefällung und nachfolgend mit drei Reinigungsschritten an einer Q Sepharose Säule, einer Gelfiltrationssäule und einer Phenyl Sepharose Säule. Dabei wurde die ACD 234fach mit einer Gesamtausbeute von 6% und einer spezifischen Aktivität von 33 U/mg (37°C) angereichert, was einem Anteil von 0.4% nativer ACD an löslichem Protein entspricht (Tabelle 8). Der Reinheitsgrad der ACD wurde nach jedem Reinigungsschritt

gelelektrophoretisch analysiert. Nach dem letzten Reinigungsschritt zeigte sich auf dem SDS-Gel nur eine Bande (Abbildung 10). Die apparente native molekulare Masse der ACD aus *Ha. marismortui* wurde mit 166 kDa, die der Untereinheit mit 87 kDa bestimmt. Die Ergebnisse sprechen für eine homodimere Struktur des Proteins.

Tabelle 8 Reinigung der ACD aus *Ha. marismortui*. Die Enzymaktivität wurde bei 37°C im gekoppelten Testsystem über PK und LDH als Bildung von ADP aus Acetat, ATP und CoA in 0.1 M Tris-HCl pH 9.0 mit 1.5 M KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM Acetat, 2 mM ATP und 1 mM CoA gemessen.

Reinigungsschritt	Protein (mg)	Aktivität (U)	Spez. Aktivität (U/mg)	Ausbeute (%)	Anreicherung (-fach)
Zellfreier Extrakt	1496	209	0.14	100	1
Hitzefällung	817	160	0.2	77	1.5
Q Sepharose	8.96	75	8.94	33	56.4
Superdex 200	1.16	30	25.9	14	185.0
Phenyl Sepharose	0.35	12	32.9	6	234.1

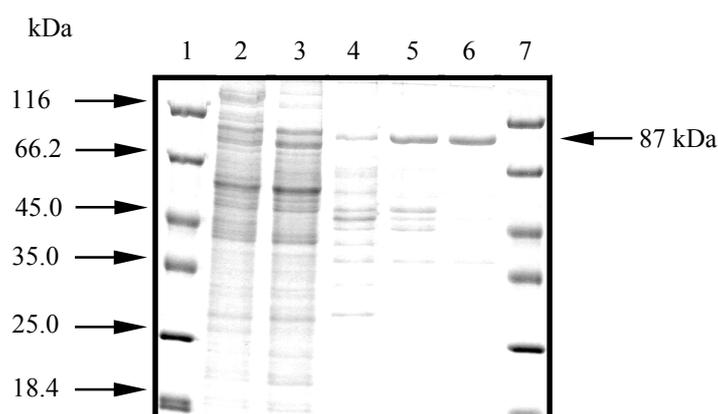


Abbildung 10 Reinigung der ACD aus *Ha. marismortui*. SDS-PAGE und anschließende Färbung mit Coomassie Brilliantblau von aufeinanderfolgenden Reinigungsschritten. Die Pfeile auf der linken Seite deuten auf die Markerproteine, der Pfeil rechts auf die Bande des gereinigten Enzyms. **Spur 1:** Molekulargewichtsstandard; **Spur 2:** zellfreier Rohextrakt; **Spur 3:** nach Hitzefällung; **Spur 4:** nach Q Sepharose; **Spur 5:** nach Superdex; **Spur 6:** nach Phenyl Sepharose.

Die N-terminale Aminosäuresequenz (20 Aminosäuren) der Untereinheit der gereinigten ACD wurde bestimmt mit: GRLSTLFAPERVAVVGATDS und war identisch zur N-terminalen Sequenz eines ORFs aus dem Contig158 im partiell sequenzierten Genom von *Ha. marismortui* (Zhang et al. 2003). Die kodierende Sequenz dieses ORFs, im Folgenden als *acd* bezeichnet, startet mit ATG und endet mit TGA (siehe Anhang).

Klonierung, Expression und Reinigung der rekombinanten ACD. Das *acd* Gen aus *Ha. marismortui*, das für eine hypothetische ACD kodiert und mit Hilfe des N-Terminus der nativ gereinigten ACD aus *Ha. marismortui* identifiziert wurde, besteht aus 2106 Basenpaaren und kodiert für ein Polypeptid mit 701 Aminosäuren, was einer kalkulierten molekularen Masse

von 74.3 kDa entspricht. Das Gen wurde in den Vektor pET17b kloniert und zur Expression in *E. coli* BL21(DE3)-CodonPlus-RIL transformiert. Nach Überexpression eines 85 kDa Proteins in Einschlusskörpern wurde dieses durch Entfaltung in 8 M Harnstoff und anschließender Rückfaltung in 3 M KCl reaktiviert. Dabei zeigte sich, dass die maximale ACD Aktivität nach 20 h Inkubation im Rückfaltungspuffer erreicht war und durch weitere Inkubation nicht mehr gesteigert werden konnte. Das rekombinante Enzym wurde anschließend mittels Ammoniumsulfatfällung und zweier säulenchromatographischer Schritte an einer Gelfiltrationssäule und an einer Phenyl Sepharose Säule bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Die ACD ergab eine 85 kDa Bande auf einem SDS-Polyacrylamidgel und wies eine spezifische Aktivität von 30 U/mg (37°C, in Richtung der Acetatbildung) auf. Das native apparente Molekulargewicht wurde mit 162 kDa bestimmt. Die Ergebnisse sprechen für eine homodimere Struktur des Proteins.

Biochemische Charakterisierung der ACD. Die nativ und die rekombinant gereinigte ACD aus *Ha. marismortui* wurden in Bezug auf katalytische Eigenschaften, Temperaturoptimum, optimale Salzkonzentrationen für Aktivität und Stabilität und in Bezug auf die Substratspezifität biochemisch charakterisiert. Dabei ergaben sich für die rekombinante ACD sehr ähnliche Ergebnisse wie für die nativ gereinigte ACD.

Katalytische Eigenschaften. Die ACD aus *Ha. marismortui* katalysiert die reversible Reaktion: $\text{Acetat} + \text{ATP} + \text{CoA} \rightleftharpoons \text{Acetyl-CoA} + \text{ADP} + \text{P}_i$. Die Abhängigkeit der Rate folgte in beiden Reaktionsrichtungen einer Michaelis-Menten Kinetik. Die apparenten V_{\max} - und K_m -Werte, die aus den Darstellungen nach Lineweaver-Burk ermittelt wurden, betragen für das native Enzym in Richtung der Acetatbildung 48 U/mg, 0.45 mM (Acetyl-CoA), 0.046 mM (ADP) und 1.98 mM (P_i), und in Richtung der Acetyl-CoA Bildung 40 U/mg, 1.1 mM (Acetat), 0.08 mM (CoA) und 0.3 mM (ATP). Für das rekombinante Enzym wurden Werte in ähnlicher Größenordnung ermittelt (Tabelle 9). Das pH-Optimum der ACD lag bei pH 7.5, wobei noch 60% der Aktivität bei pH 6.5 und 8.5 gemessen wurde. Das Temperaturoptimum lag bei 43°C. Die Darstellung der Daten nach Arrhenius ergab einen linearen Bereich zwischen 24°C und 37°C, daraus wurde eine Aktivierungsenergie von 57 kJ/mol ermittelt.

Tabelle 9 Molekulare und kinetische Eigenschaften der nativen und rekombinanten ACD aus *Ha. marismortui*. n.b. = nicht bestimmt; die kinetischen Konstanten wurden bei 37°C bestimmt.

	Substrat	natives Enzym	rekombinantes Enzym
Apparente molekulare Masse des Enzyms (kDa)		166	162
Apparente molekulare Masse der Untereinheit (kDa)		87	85
Oligomere Struktur		α_2	α_2
Apparenter K_m -Wert (mM)	Acetyl-CoA	0.45	0.41
	ADP	0.05	0.02
	P _i	1.98	1.3
Apparenter V_{max} -Wert (U/mg) (in Richtung der Acetatbildung)		48	34
Apparenter K_m -Wert(mM)	Acetate	2.6	1.7
	ATP	0.33	0.38
	CoA-SH	0.08	0.06
Apparenter V_{max} -Wert (U/mg) (in Richtung der Acetyl-CoA Bildung)		40	36
pH-Optimum		7.5	n.b.
Temperaturoptimum (°C)		43	n.b.
Arrhenius Aktivierungsenergie (24-37°C) (kJ/mol)		57	n.b.

Optimale Salzkonzentration für Aktivität und Stabilität. Die Aktivität der ACD wurde in Abhängigkeit von der Konzentration an KCl und NaCl in Gegenwart von 30 mM MgCl₂ getestet. Dabei zeigte sich, dass die Aktivität von KCl und NaCl weitgehend unabhängig war. Bei NaCl-Konzentrationen über 2 M wurde das Enzym leicht inhibiert (70% Restaktivität bei 3 M NaCl). Die für die Aktivität des Enzyms optimale MgCl₂-Konzentration lag sowohl unter Hochsalz- als auch unter Niedrigsalzbedingungen bei 30 mM. Die Untersuchungen zur Abhängigkeit der Stabilität des gereinigten Enzyms von der Salzkonzentration zeigten, dass die ACD nur unter Hochsalzbedingungen (3 M) über 48 h stabil war. KCl konnte sehr effektiv durch 20% Glycerol ersetzt werden. Unter Niedrigsalzbedingungen war nach 48 h annähernd keine Aktivität mehr messbar. Die Halbwertszeit unter diesen Bedingungen betrug etwa 5 h (Abbildung 11).

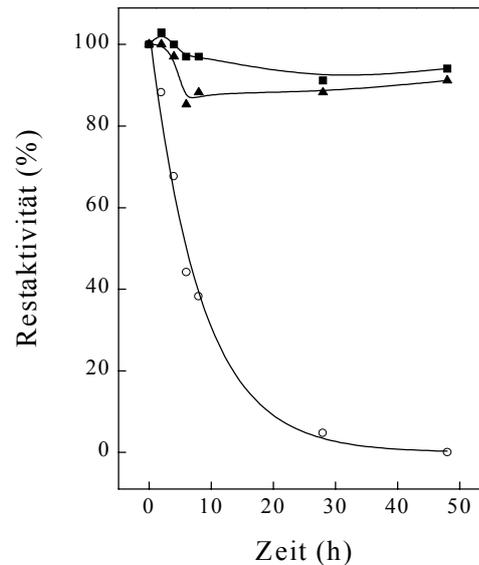


Abbildung 11 Stabilität der ACD aus *Ha. marismortui* in Abhängigkeit von der Salzkonzentration. Restaktivität des nativen Enzyms nach Inkubation bei 4°C in 100 mM Tris-HCl pH7.5 mit 30 mM MgCl₂ (○), 30 mM MgCl₂ und 20% Glycerol (■) und 30 mM MgCl₂ und 3 M KCl (▲). 100% Aktivität entsprachen 35 U/mg.

Substratspezifität. Als Substrate für die ACD aus *Ha. marismortui* wurden neben Acetat verschiedene unverzweigte und verzweigte Acyl-Säuren sowie Aryl-Säuren getestet. Dabei zeigte sich, dass das Enzym neben Acetat (100%) mit annähernd gleicher Effizienz die unverzweigten, kurzkettigen Acyl-Säuren Propionat (108%) und Butyrat (98%) und weniger effizient auch die verzweigten Acyl-Säuren Isobutyrat (38%) und Isovalerat (25%) umsetzte. Mit Isobutyrat zeigte die ACD eine Substrathemmung: Maximale Aktivität wurde bei 2.5 mM Isobutyrat (38%) erreicht. Bei Konzentrationen von über 2.5 mM sank die Aktivität ab, bei 10 mM war keine Isobutyratumsetzung mehr messbar. Der K_m -Wert für Isobutyrat lag bei 0.6 mM (Abbildung 12). Die Aryl-Säuren Phenylacetat und Indol-3-acetat sowie die Dicarbonsäuren Succinat und Fumarat wurden nicht als Substrat akzeptiert. ATP (100%) konnte nur sehr ineffizient durch GTP (11%) ersetzt werden. In der physiologischen Richtung war das Enzym spezifisch für Acetyl-CoA und ADP (100%). Phenylacetyl-CoA (1%) und GDP (5%) wurden nicht als Substrate akzeptiert.

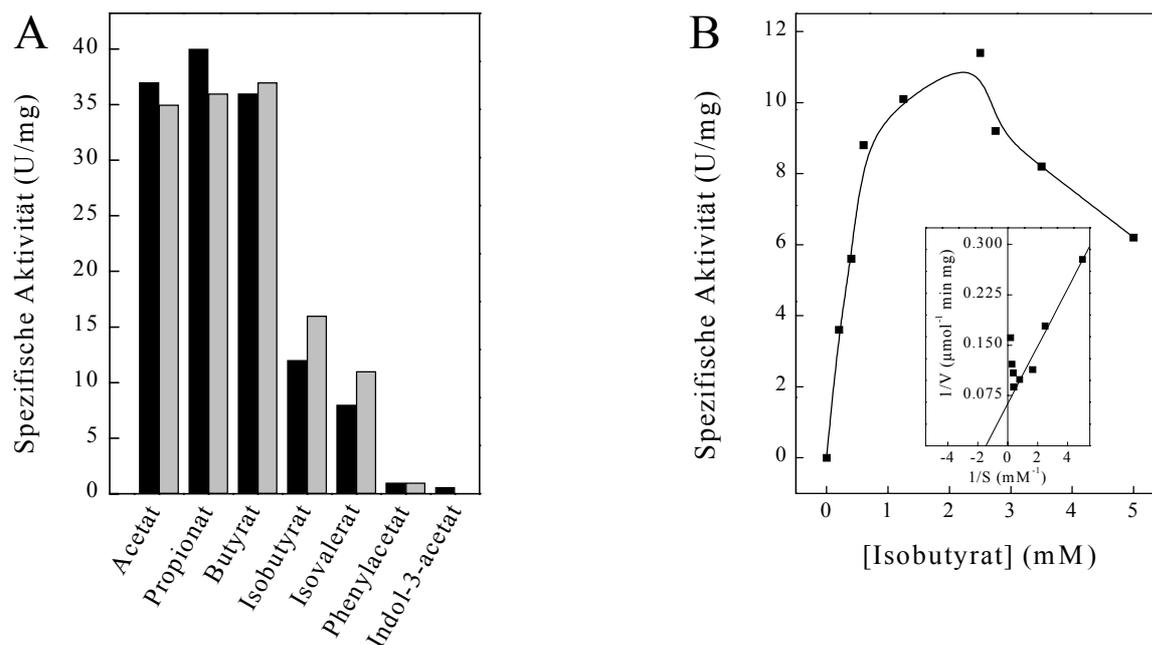


Abbildung 12 Spezifität für verschiedene organische Säuren und Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der ACD aus *Ha. marismortui* von der Isobutyratkonzentration. **A** Spezifische Aktivität der nativen (schwarze Balken) und rekombinanten (graue Balken) ACD mit verschiedenen organischen Säuren (jeweils 10 mM), Isobutyrat und Isovalerat (2.5 mM). **B** Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von der Isobutyratkonzentration. Der Einschub zeigt die doppelt reziproke Auftragung nach Lineweaver-Burk. Die Testansätze enthielten 0.9 μg Protein.

Die Ergebnisse zeigen, dass die ACD ein mesophiles Enzym ist, das - den Wachstumsbedingungen von *Ha. marismortui* entsprechend - hohe Salzkonzentrationen für die Stabilität benötigte. Die ACD zeigte zudem eine ähnliche Substratspezifität wie die ACD I aus *P. furiosus*, was vermuten lässt, dass der *Ha. marismortui* ACD eine Funktion im Kohlenhydratstoffwechsel zukommt.

5.2.2 Reinigung und Charakterisierung der ACS aus *Ha. marismortui*

Reinigung der nativen ACS. Die ACS wurde aus Acetat-gewachsenen Zellen bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Die Reinigung erfolgte mit einer Hitzefällung und nachfolgend mit drei Reinigungsschritten an einer Q Sepharose Säule, einer Phenyl Sepharose Säule und einer Gelfiltrationssäule. Dabei wurde die ACS 268fach mit einer Gesamtausbeute von 28% und einer spezifischen Aktivität von 13 U/mg (37°C) angereichert, was einem Anteil von 0.4% nativer ACS an löslichem Protein entspricht (Tabelle 10). Der Reinheitsgrad der ACS wurde nach jedem Reinigungsschritt gelelektrophoretisch analysiert. Nach dem letzten Reinigungsschritt zeigte sich auf dem SDS-Gel nur eine Bande (Abbildung 13). Die apparente native molekulare Masse der ACS aus *Ha. marismortui* wurde mit 72 kDa, die der Untereinheit mit 89 kDa bestimmt. Die Ergebnisse sprechen für eine monomere Struktur des Proteins (Tabelle 11).

Tabelle 10 Reinigung der ACS aus *Ha. marismortui*. Die Enzymaktivität wurde bei 37°C im Hydroxamat-Test als Bildung von Acetyl-CoA aus Acetat, ATP und CoA in 0.1 M Tris-HCl pH 7.5 mit 700 mM Hydroxylammoniumhydrochlorid, 30 mM MgCl₂, 400 mM Kalium-Acetat, 10 mM ATP und 1 mM CoA gemessen.

Reinigungsschritt	Protein (mg)	Aktivität (U)	Spez. Aktivität (U/mg)	Ausbeute (%)	Anreicherung (-fach)
Zellfreier Extrakt	1705	85	0.05	100	1
Hitzefällung	755	186	0.246	216	4.9
Q Sepharose	39.8	106	2.66	125	53.2
Phenyl Sepharose	4.93	42	8.5	49	169
Superdex 200	1.79	24	13.4	28	268

Die N-terminale Aminosäuresequenz (20 Aminosäuren) der gereinigten ACS wurde bestimmt mit: MDEDVQLEARLEEQEVFE und war identisch zur N-terminalen Sequenz eines ORFs aus dem Contig147 im partiell sequenzierten Genom von *Ha. marismortui* (Zhang et al. 2003). Die kodierende Sequenz dieses ORFs, im Folgenden als *acs* bezeichnet, startet mit ATG und endet mit TGA (siehe Anhang).

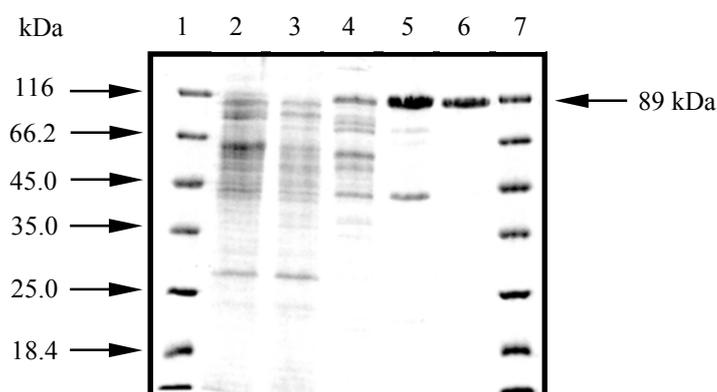


Abbildung 13 Reinigung der ACS aus *Ha. marismortui*. SDS-PAGE und anschließende Färbung mit Coomassie Brilliantblau von aufeinanderfolgenden Reinigungsschritten. Die Pfeile auf der linken Seite deuten auf die Markerproteine, der Pfeil rechts auf die Bande des gereinigten Enzyms. **Spur 1:** Molekulargewichtsstandard; **Spur 2:** zellfreier Rohextrakt; **Spur 3:** nach Hitzefällung; **Spur 4:** nach Q Sepharose; **Spur 5:** nach Phenyl Sepharose; **Spur 6:** nach Superdex; **Spur 7:** Molekulargewichtsstandard.

Klonierung, Expression und Reinigung der rekombinanten ACS. Das *acs* Gen aus *Ha. marismortui*, das für eine hypothetische ACS kodiert und mit Hilfe des N-Terminus der nativ gereinigten ACS aus *Ha. marismortui* identifiziert wurde, besteht aus 1995 Basenpaaren und kodiert für ein Polypeptid mit 664 Aminosäuren, was einer kalkulierten molekularen Masse von 74.2 kDa entspricht. Das Gen wurde in den Vektor pET17b kloniert und zur Expression in *E. coli* BL21(DE3)-CodonPlus-RIL transformiert. Nach Überexpression eines 89 kDa Proteins in Einschlusskörpern wurde dieses durch Entfaltung in 8 M Harnstoff und

anschließender Rückfaltung in 2 M Kgl reaktiviert. Dabei zeigte sich, dass die ACS Aktivität nach 60 h Inkubation im Rückfaltepuffer bis auf ca. 0.06 U/ml anstieg, was einer spezifischen Aktivität von ca. 2 U/mg entsprach (Abbildung 14). Das rekombinante Enzym wurde anschließend mittels Ammoniumsulfatfällung und zweier säulenchromatographischer Schritte an einer Phenyl Sepharose Säule und einer Gelfiltrationssäule bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Die ACS ergab eine 89 kDa Bande auf einem SDS-Polyacrylamidgel und wies eine spezifische Aktivität von 25 U/mg auf (37°C, in Richtung der Acetyl-CoA Bildung). Das native apparente Molekulargewicht wurde mit 72 kDa bestimmt. Die Ergebnisse sprechen für eine monomere Struktur des Proteins

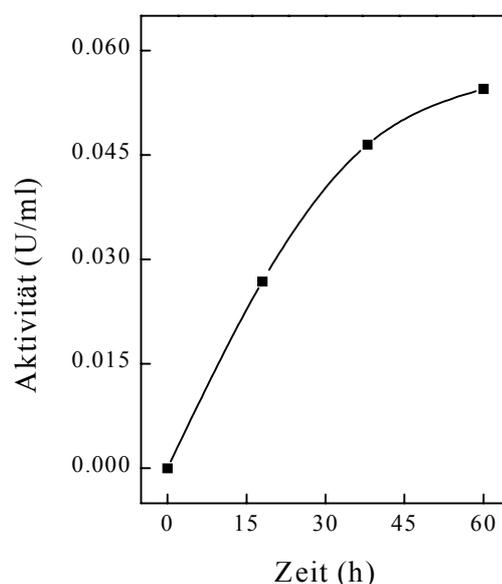


Abbildung 14 Rückfaltung der rekombinanten ACS nach Entfaltung in 8 M Harnstoff. 13 mg entfaltetes Protein wurden in 500 ml Rückfaltepuffer bei 4°C inkubiert. Der Rückfaltepuffer enthielt 20 mM Tris-HCl pH 7.5 mit 2 M KCl, 2 mM EDTA, 2.5 mM Na-Acetat, 2 mM ATP, 10 µM CoA, 3 mM GSH, 0.3 mM GSSG. Die Aktivität wurde in Richtung der Acetatbildung mit dem Ellman-Test bestimmt.

Biochemische Charakterisierung der ACS. Die nativ und die rekombinant gereinigte ACS aus *Ha. marismortui* wurden in Bezug auf katalytische Eigenschaften, Temperaturoptimum, optimale Salzkonzentrationen für Aktivität und Stabilität und in Bezug auf die Substratspezifität biochemisch charakterisiert. Dabei ergaben sich für die rekombinante ACS sehr ähnliche Ergebnisse wie für die nativ gereinigte ACS.

Tabelle 11 Molekulare und kinetische Eigenschaften der nativen und rekombinanten ACS aus *Ha. marismortui*. n.b. = nicht bestimmt, die kinetischen Konstanten wurden bei 37°C bestimmt.

	Substrat	natives Enzym	rekombinantes Enzym
Apparente molekulare Masse des Enzyms (kDa)		72	72
Apparente molekulare Masse der Untereinheit (kDa)		89	89
Oligomere Struktur		α	α
Apparenter K_m -Wert (mM)	Acetyl-CoA	0.41	1.08
	AMP	0.25	0.36
	PP _i	0.38	0.43
Apparenter V_{max} -Wert (U/mg) (in Richtung der Acetatbildung)		6.2	4.1
Apparenter K_m -Wert (mM)	Acetate	0.23	0.36
	ATP	0.56	0.35
	CoA-SH	0.38	0.31
Apparenter V_{max} -Wert (U/mg) (in Richtung der Acetyl-CoA Bildung)		26	26
pH-Optimum		7.5	n.b.
Temperaturoptimum (°C)		41	n.b.
Arrhenius Aktivierungsenergie (25–39°C) (kJ/mol)		97	n.b.

Katalytische Eigenschaften. Die ACS aus *Ha. marismortui* katalysiert die Reaktion: Acetat + ATP + CoA \rightarrow Acetyl-CoA + AMP + PP_i. Die Abhängigkeit der Rate folgte in beiden Reaktionsrichtungen einer Michaelis-Menten Kinetik. Die apparenten V_{max} - und K_m -Werte, die aus den Darstellungen nach Lineweaver-Burk ermittelt wurden, betragen für das native Enzym in Richtung der Acetyl-CoA Bildung 26 U/mg, 0.23 mM (Acetat), 0.38 mM (CoA) and 0.56 mM (ATP) und in Richtung der Acetatbildung 6.2 U/mg, 0.41 mM (Acetyl-CoA), 0.25 mM (AMP) und 0.38 mM (PP_i). Für das rekombinante Enzym wurden Werte in ähnlicher Größenordnung ermittelt (Tabelle 11). Das pH-Optimum der ACS lag bei pH 7.5, wobei noch 30 bis 40% der Aktivität bei pH 6.5 und 8.5 gemessen wurden. Das Temperaturoptimum lag bei 41°C. Die Darstellung der Daten nach Arrhenius ergab einen linearen Bereich zwischen 25 und 39°C, daraus wurde eine Aktivierungsenergie von 97 kJ/mol ermittelt.

Optimale Salzkonzentration für Aktivität und Stabilität. Die Aktivität der ACS wurde in Abhängigkeit von der Konzentration an KCl und NaCl (je 0-3 M) in Gegenwart von 5 mM MgCl₂ getestet. Das Enzym zeigte maximale Aktivität zwischen 1.0 und 1.5 M KCl (Optimum bei 1.25 M KCl), bei KCl-Konzentrationen von 0.5 M und 2.5 M wurden noch 50% bzw. 60% der Aktivität gemessen. Dagegen hatte NaCl inhibitorischen Effekt: Zwischen 0.5 und 3 M NaCl zeigte das Enzym nur noch ca. 20% der Maximalaktivität (Abbildung 15). Die Aktivität der ACS war in Anwesenheit von 1.25 M KCl zwischen 3.5 und 15 mM MgCl₂

am höchsten (optimal bei 5mM). Die Stabilitätskurven des gereinigten Enzyms in Abhängigkeit von der Salzkonzentration zeigten jeweils in Gegenwart von 20 mM MgCl₂ sowohl in Hochsalz-Puffer (3 M) als auch in Niedrigsalz-Puffer mit und ohne 20% Glycerol über 48 h die gleichen Verläufe. Hier erschien eher die experimentell notwendige Herabsetzung der Proteinkonzentration eine destabilisierende Wirkung auf die ACS zu haben. Insgesamt sprechen die Ergebnisse dafür, dass im Gegensatz zur ACD aus *Ha. marismortui* die ACS Hochsalzbedingungen für die Aktivität, nicht aber für die Stabilität benötigt.

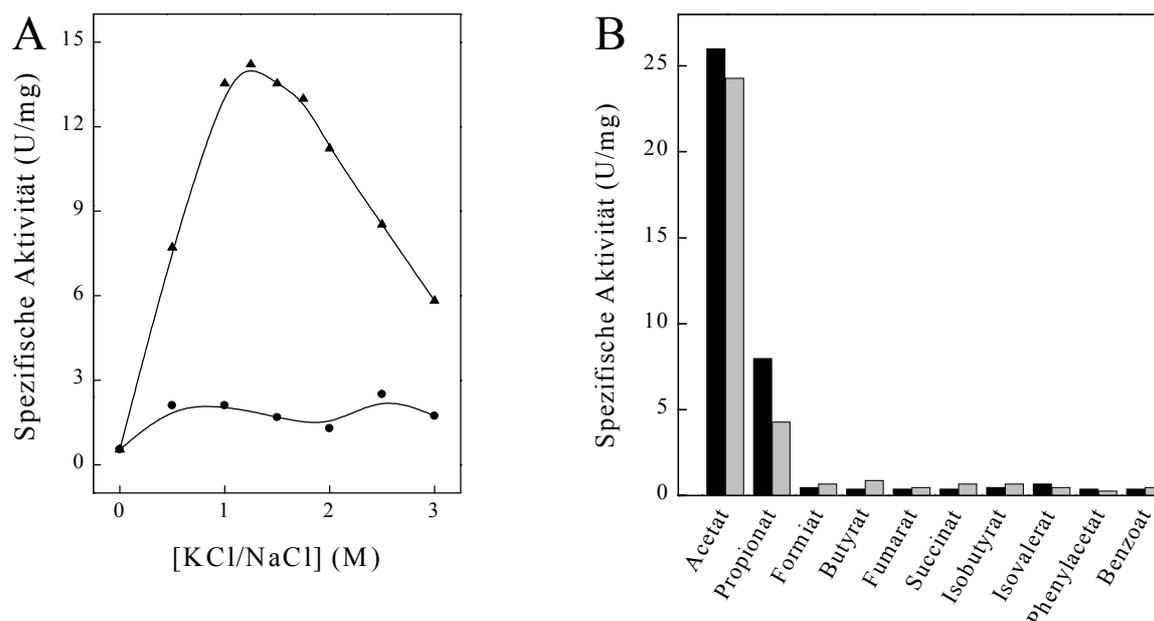


Abbildung 15 Salzabhängigkeit der Aktivität und Substratspezifität der ACS aus *Ha. marismortui*. **A** Spezifische Aktivität des nativen Enzyms in Abhängigkeit von der KCl- (▲) und der NaCl- (●) Konzentration in Gegenwart von 5 mM MgCl₂. **B** Spezifische Aktivität der nativen (schwarze Balken) und rekombinanten (graue Balken) ACS mit verschiedenen organischen Säuren (jeweils 2.5 mM).

Substratspezifität. Als Substrate für die ACS aus *Ha. marismortui* wurden neben Acetat verschiedene unverzweigte und verzweigte Acyl-Säuren sowie Aryl-Säuren getestet. Dabei zeigte sich, dass das Enzym spezifisch für Acetat (100%) war. Mit deutlich verminderter Effizienz wurde nur Propionat (32%) umgesetzt. Die anderen getesteten kurzkettigen Acyl-Säuren Butyrat und Formiat sowie die Dicarbonsäuren Succinat und Fumarat, die verzweigten Acyl-Säuren Isobutyryrat und Isovalerat oder die Aryl-Säuren Phenylacetat und Benzoat wurden nicht als Substrat akzeptiert.

5.3 ACD und ACS aus dem hyperthermophilen Crenarchaeon *P. aerophilum*

Eine ACD wurde in Rohextrakten vieler hyperthermophiler, acetatbildender Archaea, wie *Pyrococcus*, *Thermococcus*, *Archaeoglobus*, *Thermoplasma*, *Desulfurococcus* und *Hyperthermus* nachgewiesen (Schäfer und Schönheit 1991; Schäfer et al. 1993; Labes und Schönheit 2001). Im Rahmen dieser Arbeit konnte zudem in hefeextraktgewachsenen Zellen von *P. aerophilum* eine ACD mit 0.013 U/mg gemessen werden. Während die euryarchaeellen Enzyme aus *Pyrococcus furiosus*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Methanococcus jannaschii* (Mai und Adams 1996; Glasemacher et al. 1997; Musfeldt et al. 1999; Musfeldt und Schönheit 2002) und auch aus dem mesophilen Haloarchaeon *Haloarcula marismortui*, wie hier beschrieben, gereinigt und biochemisch charakterisiert sind, fehlen solche Untersuchungen für die crenarchaeellen Enzyme. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei ORFs, PAE3250 und PAE3249, identifiziert, die putativ für die α - und die β -Untereinheiten einer ACD kodieren. PAE3250 und PAE3249 wurden kloniert und getrennt in *E. coli* exprimiert. Diese getrennt exprimierten Untereinheiten wurden zum aktiven Enzym rekonstituiert und dieses anschließend gereinigt und biochemisch charakterisiert.

Bisher waren einige mesophile ACS aus den Domänen der Bacteria und Eukarya gereinigt und biochemisch charakterisiert. Dagegen lagen detaillierte biochemische Untersuchungen nur zu einer archaeellen ACS, der aus *Methanosaeta consilii* (ehem. *Methanotrix soehngenii*) (Jetten et al. 1989; Teh und Zinder 1992), und, wie in dieser Arbeit beschrieben, zu der ACS aus dem mesophilen Euryarchaeon *Haloarcula marismortui* vor. Eine hyperthermophile ACS ist aber bisher nicht beschrieben worden. Im vollständig sequenzierten Genom von *P. aerophilum* (Fitz-Gibbon et al. 2002) waren Gene annotiert, die für eine putative ACS kodieren, wobei der ORF PAE2867 die größte Ähnlichkeit zu den bisher charakterisierten ACS hatte. Dieser wurde kloniert, exprimiert und das gereinigte Enzym biochemisch charakterisiert.

5.3.1 Identifizierung und Charakterisierung der ACD aus *P. aerophilum*

Identifizierung einer ACD in *P. aerophilum*. Im Genom von *P. aerophilum* konnten mit BLAST-P Suche (Altschul et al. 1990) die ORFs PAE3250 und PAE3249 als hypothetische Gene der α - und der β -Untereinheit einer ACD identifiziert werden. ORF PAE3250 zeigte 40% Identität zur Sequenz der α -Untereinheit aus *P. furiosus* (ACD I) und ORF PAE3249 zeigte 48% Identität zur Sequenz der β -Untereinheit aus *P. furiosus* (ACD I). Sequenzvergleiche und die Kristallstruktur der Succinyl-CoA Synthetase aus *E. coli*, die zur gleichen Proteinfamilie gehört, ergaben außerdem, dass ein für die katalytische Aktivität essentieller Histidinrest auch in ORF PAE3250 vorhanden ist (Majumdar et al. 1991; Wolodko et al. 1994; Fraser et al. 1999). Interessanterweise lagen PAE3250 und PAE3249

hintereinander überlappend im Genom vor, wobei Thymin und Guanin des Stop-Codons TGA von PAE3250 gleichzeitig Thymin und Guanin des Start-Codons ATG von PAE3249 bildeten (Abbildung 16). Beide ORFs bildeten also eindeutig keinen einheitlichen Leserahmen und kodieren somit nicht für ein aus α - und β -Untereinheit fusioniertes Protein wie es für *A. fulgidus* und *M. jannaschii* beschrieben wurde (Musfeldt und Schönheit 2002). Beide Gene liegen aber auch nicht, wie für *P. furiosus* beschrieben, an unterschiedlichen Orten verteilt auf dem Chromosom (Musfeldt et al. 1999). Die ungewöhnliche Struktur, die die beiden ORFs aufweisen, war bisher noch für keines der identifizierten ACD Gene beschrieben worden. Um zu prüfen, ob die ORFs PAE3250 und PAE3249 für eine funktionelle ACD kodieren, wurden beide kloniert, die getrennt exprimierten Untereinheiten zum aktiven Enzym rekonstituiert und dieses charakterisiert.

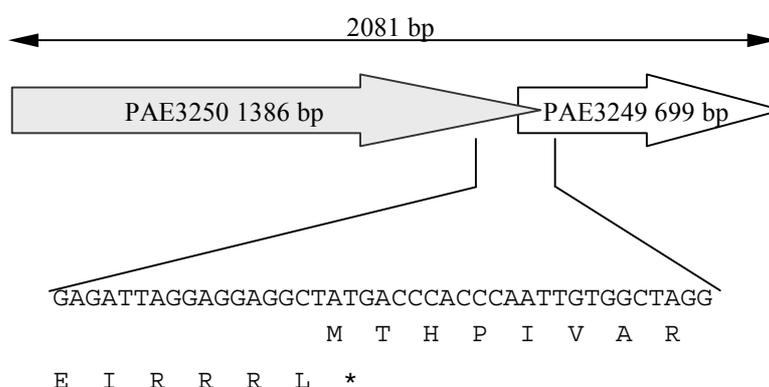


Abbildung 16 Schematische Darstellung der Lage der ORFs PAE3250 und PAE3249 auf dem Chromosom von *P. aerophilum*. Der Einschub zeigt die Nukleinsäuresequenz des überlappenden Bereiches beider ORFs und deren C- (PAE3250) bzw. N-terminale (PAE3249) Aminosäuresequenz.

Der ORF PAE3250 besteht aus 1386 Basenpaaren und kodiert für ein Polypeptid mit 461 Aminosäuren, was einer kalkulierten molekularen Masse von 50.1 kDa entspricht. Der ORF PAE3249 besteht aus 699 Basenpaaren und kodiert für ein Polypeptid mit 232 Aminosäuren, was einer kalkulierten molekularen Masse von 25.7 kDa entspricht. Die kodierende Funktion beider ORFs wurde mittels funktioneller Expression in *E. coli* nachgewiesen. Dazu wurden beide Gene jeweils in den Vektor pET17b kloniert und zur Expression in *E. coli* BL21(DE3)-CodonPlus-RIL transformiert. Nach getrennter Überexpression eines 50 und eines 27 kDa Proteins wurden diese im Verhältnis von etwa 1:1 gemischt und eine Stunde auf Eis inkubiert. Nach einem 30minütigen Hitzeschritt bei 75°C wurde das so rekonstituierte Protein an einer Q Sepharose Säule und an einer Gelfiltrationssäule bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Das Protein ergab eine 50 und eine 28 kDa Bande auf einem SDS-Polyacrylamidgel (Abbildung 17) und wies eine spezifische ACD Aktivität von etwa 13 U/mg (85°C) auf. Die native apparente molekulare Masse konnte weder mit Gelfiltration noch mit analytischer Ultrazentrifugation eindeutig geklärt werden. Gelfiltrationen ergaben ein natives Molekulargewicht von 450-920 kDa. Die Ultrazentrifugationen ergaben, dass die Moleküle stark aggregiert sind (2000-3000 kDa). Zu einem geringen Prozentsatz war eine zweite Spezies mit 300-800 kDa vorhanden. Aus diesen Ergebnissen lässt sich keine eindeutige

Aussage über die native molekulare Masse und damit zur oligomeren Struktur des Enzyms ableiten. Insgesamt sprechen die Ergebnisse aber dafür, dass die ACD aus *P. aerophilum* eine erheblich höhere molekulare Masse und einen höheren Oligomerisierungsgrad aufweist als die bisher charakterisierten ACD, deren molekulare Masse bei 150 kDa liegt. Im Folgenden werden die Ergebnisse der biochemischen Charakterisierung der ACD aus *P. aerophilum* dargestellt.

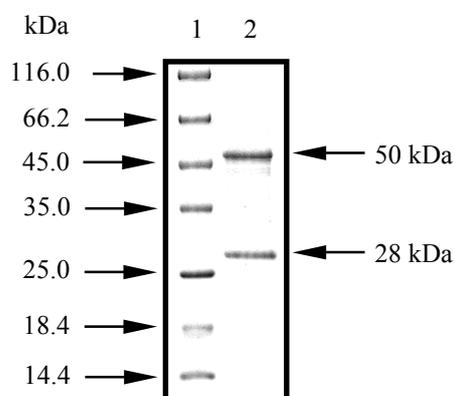


Abbildung 17 Reinigung der rekombinanten ACD aus *P. aerophilum*. SDS-PAGE und anschließende Färbung mit Coomassie Brilliantblau von gereinigter ACD. Pfeile auf der linken Seite deuten auf die Markerproteine, die Pfeile rechts auf die Banden der Untereinheiten der ACD.

Tabelle 12 Molekulare und kinetische Eigenschaften der rekombinanten ACD aus *P. aerophilum*. Die kinetischen Konstanten wurden bei 37°C bestimmt.

	Substrat	ACD
Apparente molekulare Masse des Enzyms (kDa)		(> 150 kDa)
Apparente molekulare Masse der Untereinheiten (kDa)		α 50 β 28
Oligomere Struktur		?
Apparenter K_m -Wert (mM)	Acetyl-CoA	0.12
	ADP	0.14
	P_i	1.3
Apparenter V_{max} -Wert (in Richtung der Acetatbildung, U/mg)		12
V_{max}/K_m -Wert (mit Acetyl-CoA)		100
Apparenter K_m -Wert (mM)	Isobutyryl-CoA	0.04
Apparenter V_{max} -Wert (in Richtung der Isobutyratbildung, U/mg)		11
V_{max}/K_m -Wert (mit Isobutyryl-CoA)		300
Apparenter K_m -Wert(mM)	Phenylacetyl-CoA	0.11
Apparenter V_{max} -Wert (in Richtung der Phenylacetatbildung, U/mg)		7
V_{max}/K_m -Wert (mit Phenylacetyl-CoA)		64
pH-Optimum		6.5
Temperaturoptimum		> 93
Arrhenius Aktivierungsenergie (27-93°C) (KJ/mol)		114

Biochemische Charakterisierung. Die kinetischen und thermophilen Eigenschaften der ACD aus *P. aerophilum* wurden analysiert. Die apparenten K_m - und V_{max} -Werte wurden in Richtung der Acetatbildung gemessen und folgten einer Michaelis-Menten-Kinetik. Die K_m -Werte wurden mit 0.12 mM (Acetyl-CoA), 0.14 mM (ADP) und 1.3 mM (P_i), der V_{max} -Wert mit 12 U/mg bestimmt. In Richtung der Acetyl-CoA Bildung war unter den gewählten Bedingungen keine Aktivität messbar, was zuvor bereits auch für die rekombinante ACD aus *M. jannaschii* beschrieben worden ist.

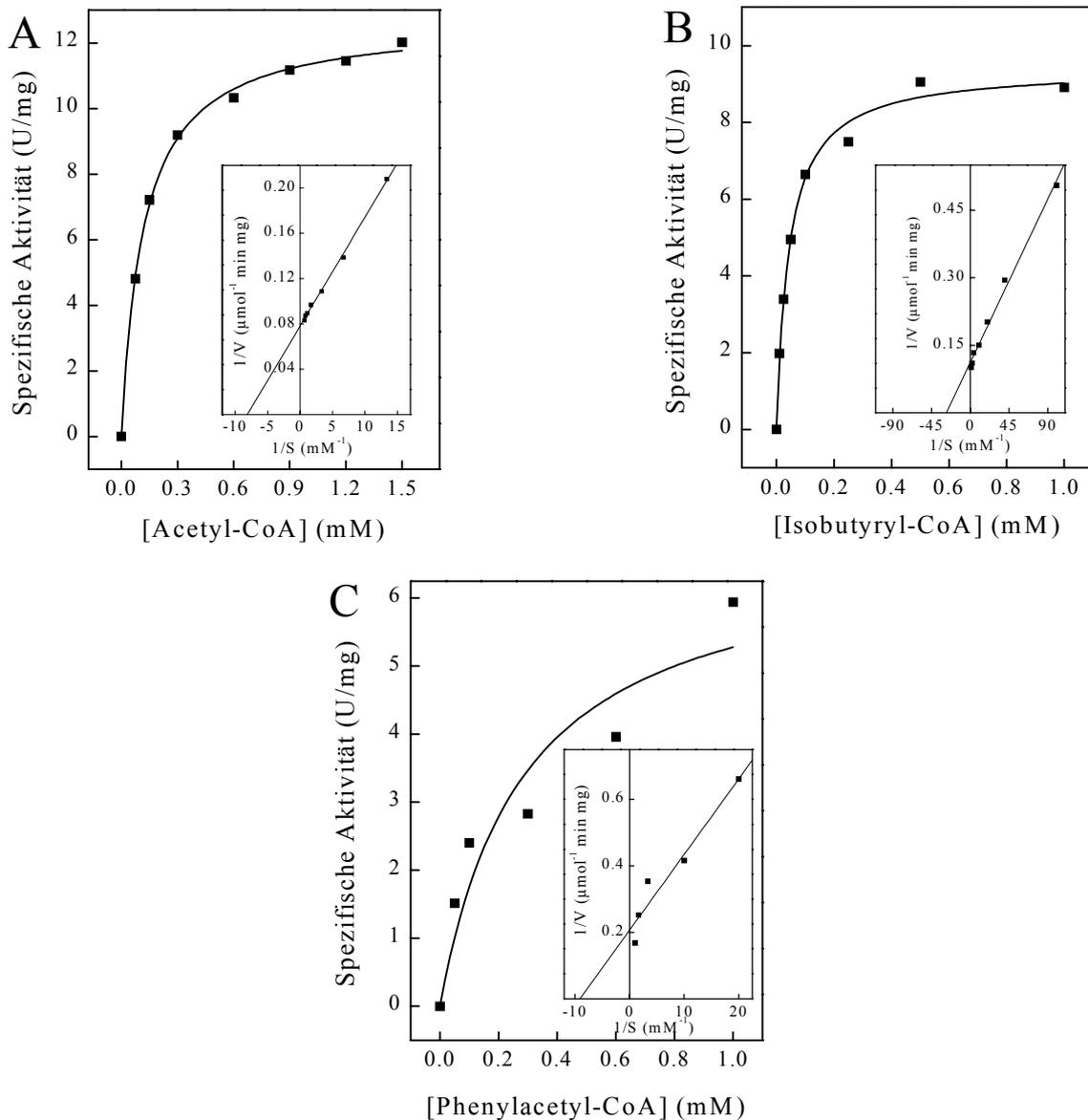


Abbildung 18 Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der rekombinanten ACD aus *P. aerophilum* von der Substratkonzentration. Dargestellt ist die spezifische Aktivität bei 85°C in Abhängigkeit von der Acetyl-CoA- (A), der Isobutyryl-CoA- (B) und der Phenylacetyl-CoA- (C) Konzentration. Die Konzentration von ADP und P_i betrug jeweils 2 mM bzw. 5 mM. Die Einschübe zeigen dieselben Daten in der doppelt reziproken Auftragung nach Lineweaver-Burk. Die Testansätze enthielten jeweils 0.5 μ g Protein.

Die Aktivität der ACD wurde mit Isobutyryl-CoA und Phenylacetyl-CoA gemessen. Es zeigte sich, dass im Vergleich zu Acetyl-CoA das Enzym Isobutyryl-CoA mit mehr als 90% der Aktivität (11 U/mg) und Phenylacetyl-CoA mit etwa 60% der Aktivität (7 U/mg) umsetzte. Die K_m -Werte betragen 0.04 mM für Isobutyryl-CoA und 0.11 mM für Phenylacetyl-CoA (Abbildung 18). Aus der Ermittlung der V_{max}/K_m -Werte ergab sich, dass Isobutyryl-CoA mit dreifach höherer Effizienz als Acetyl-CoA und fünffach höherer Effizienz als Phenylacetyl-CoA umgesetzt wird.

Das Temperaturoptimum der ACD aus *P. aerophilum* wurde getestet. Bis zur höchsten getesteten Temperatur von 93°C stieg die Aktivität exponentiell an, damit lag das Temperaturoptimum über 93°C. Die Darstellung der Daten nach Arrhenius ergab einen linearen Bereich zwischen 27°C und 93°C, daraus wurde eine Aktivierungsenergie von 114 kJ/mol ermittelt. Die Thermostabilität wurde über einen Zeitraum von 120 Minuten getestet. Bei 80°C konnte kein signifikanter Aktivitätsverlust beobachtet werden, bei 90°C betrug die Halbwertszeit 105 Minuten und bei 100°C 13 Minuten. Die Zugabe von 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ konnte die ACD gegen die Hitzeinaktivierung bei 100°C stabilisieren, d.h. nach 120 Minuten wurden noch annähernd 100% der Aktivität gemessen.

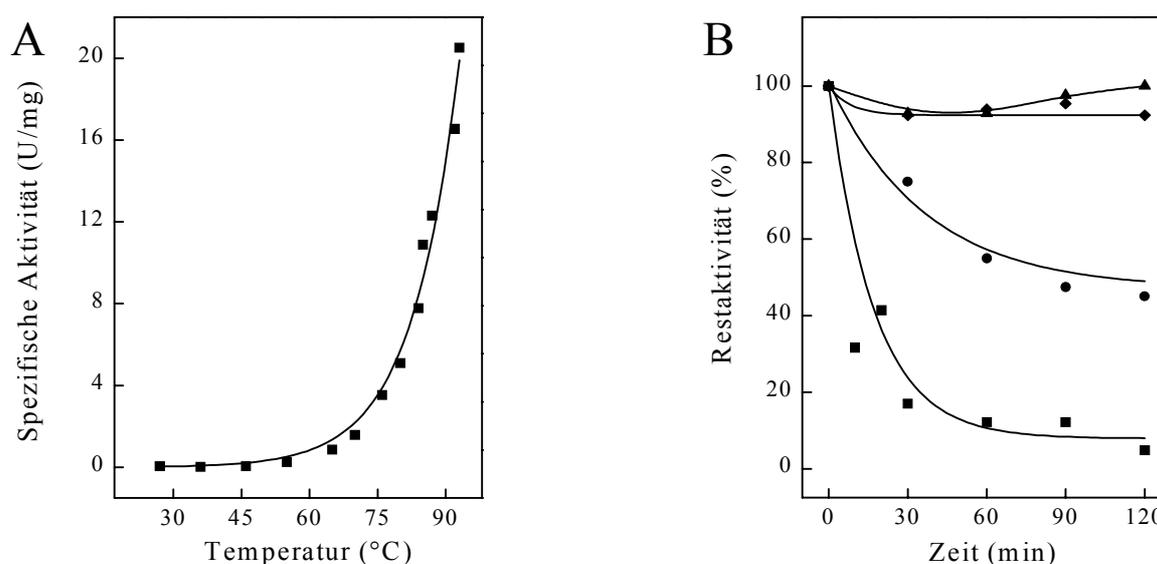


Abbildung 19 Temperaturabhängigkeit der Aktivität und Thermostabilität der ACD aus *P. aerophilum*. **A** Spezifische Aktivität in Abhängigkeit von der Temperatur. **B** Thermostabilität nach Inkubation bei 80°C (▲), 90°C (●), 100°C (■) und 100°C mit 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (◆). 100% Aktivität entsprechen etwa 8 U/mg.

Die Ergebnisse zeigen, dass die ORFs PAE3250 und PAE3249 für eine funktionelle ACD kodieren. Damit wurde die erste crenarchaeelle ACD charakterisiert, die in Bezug auf die Genstruktur und in Bezug auf ihre Substratspezifität für ACD bisher einzigartige Eigenschaften aufweist. Mit der Substratspezifität für unverzweigte und verzweigte Acylsäuren sowie zusätzlich für Arylsäuren vereinigt dieses Enzym die Substratspezifitäten beider ACD Isoenzyme, ACD I und ACD II, aus *P. furiosus*.

5.3.2 Klonierung, Expression und Charakterisierung der rekombinanten ACS aus *P. aerophilum*

Identifizierung einer ACS in *P. aerophilum*. Der ORF PAE2867 aus dem Genom von *P. aerophilum* ist aufgrund seiner Ähnlichkeit zu anderen ACS als hypothetisches ACS Gen annotiert (Fitz-Gibbon et al. 2002). Das Gen besteht aus 2013 Basenpaaren und kodiert für ein Polypeptid mit 670 Aminosäuren, was einer kalkulierten molekularen Masse von 76.2 kDa entspricht. Um zu prüfen, ob der ORF PAE2867 für eine funktionelle ACS kodiert, wurde das Gen in den Vektor pET17b kloniert und zur Expression in *E. coli* BL21(DE3)-CodonPlus-RIL transformiert. Nach Überexpression eines 77 kDa Proteins wurde dieses über zwei Hitzeschritte bei 75°C und 86°C und an einer Gelfiltrationssäule bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Die ACS ergab eine 77 kDa Bande auf einem SDS-Polyacrylamidgel (Abbildung 20) und wies eine spezifische ACS Aktivität von etwa 37 U/mg (85°C, in Richtung der Acetyl-CoA Bildung) auf.

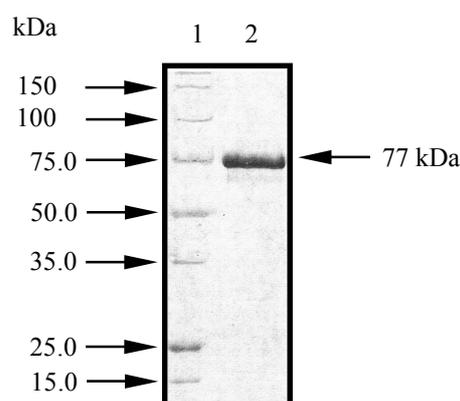


Abbildung 20 Reinigung der rekombinanten ACS aus *P. aerophilum*. SDS-PAGE und anschließende Färbung mit Coomassie Brilliantblau von gereinigter ACS. Pfeile auf der linken Seite deuten auf die Markerproteine, die Pfeile rechts auf die Banden der Untereinheiten der ACS

Die native apparente molekulare Masse wurde sowohl mit Gelfiltration als auch mittels analytischer Ultrazentrifugation bestimmt. Die Gelfiltrationen ergaben uneindeutige Ergebnisse zwischen 340 und 625 kDa. Bei der analytischen Ultrazentrifugation (Sedimentations-Diffusionsgleichgewicht) ergab sich eine Molmasse von 615 +/- 30. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass es sich um ein Protein mit homooktamerer Struktur handelt (Tabelle 13). Im Folgenden werden die Ergebnisse der biochemischen Charakterisierung der ACS aus *P. aerophilum* dargestellt.

Biochemische Charakterisierung. Die kinetischen und thermophilen Eigenschaften der ACS aus *P. aerophilum* wurden analysiert. Die apparenten K_m - und V_{max} -Werte wurden in beiden Reaktionsrichtungen gemessen und folgten jeweils einer Michaelis-Menten-Kinetik. Die K_m -Werte wurden in Richtung der Acetatbildung mit 6.5 μ M (Acetyl-CoA), 7.5 μ M (AMP) und

58 μM (PP_i), der V_{max} -Wert mit 12 U/mg bestimmt und in Richtung der Acetyl-CoA Bildung mit 3.1 μM (Acetat), 330 μM (ATP) und 70 μM (CoA), der V_{max} -Wert mit 37 U/mg.

Tabelle 13 Molekulare und kinetische Eigenschaften der rekombinanten ACS aus *P. aerophilum*. Die kinetischen Konstanten wurden bei 85°C bestimmt.

	Substrat	ACS aus <i>P. aerophilum</i>
Apparente molekulare Masse des Enzyms (kDa)		615
Apparente molekulare Masse der Untereinheit (kDa)		77
Oligomere Struktur		α_8
Apparenter K_m -Wert (μM)	Acetyl-CoA	6.5
	AMP	7.5
	PP_i	58
Apparenter V_{max} -Wert (in Richtung der Acetatbildung, U/mg)		12
Apparenter K_m -Wert (μM)	Acetat	3.1
	ATP	330
	CoA	70
Apparenter V_{max} -Wert (in Richtung der Acetyl-CoA Bildung, U/mg)		37
pH-Optimum		6.5
Temperaturoptimum ($^{\circ}\text{C}$)		> 97
Arrhenius Aktivierungsenergie (27-97°C) (kJ/mol)		118

Das Temperaturoptimum der ACS aus *P. aerophilum* wurde getestet. Bis zur höchsten getesteten Temperatur von 97°C stieg die Aktivität exponentiell an, damit lag das Temperaturoptimum über 97°C. Die Darstellung der Daten nach Arrhenius ergab einen linearen Bereich zwischen 27 und 97°C, daraus wurde eine Aktivierungsenergie von 118 kJ/mol ermittelt. Die Thermostabilität wurde über einen Zeitraum von 120 Minuten getestet. Bei 90°C konnte kein signifikanter Aktivitätsverlust beobachtet werden, bei 95°C konnten nach 120 Minuten noch 75% der Aktivität gemessen werden, bei 98°C betrug die Halbwertszeit 72 Minuten und bei 100°C 8 Minuten. Die Halbwertszeit bei 100°C konnte durch die Zugabe von 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ auf 24 Minuten erhöht werden.

Die Substratspezifität der ACS für unterschiedliche organische Säuren wurde analysiert. Neben Acetat (100%) und Propionat (118%) wurden auch Formiat (27%), Butyrat (25%) und auch die verzweigtkettige Acyl-Säure Isobutyrat (28%) umgesetzt, während die Dicarbonsäuren Fumarat (2%) und Succinat (7%), die verzweigtkettige Acyl-Säure Valerat (1%) und die Aryl-Säure Phenylacetat (3%) nicht als Substrate dienten.

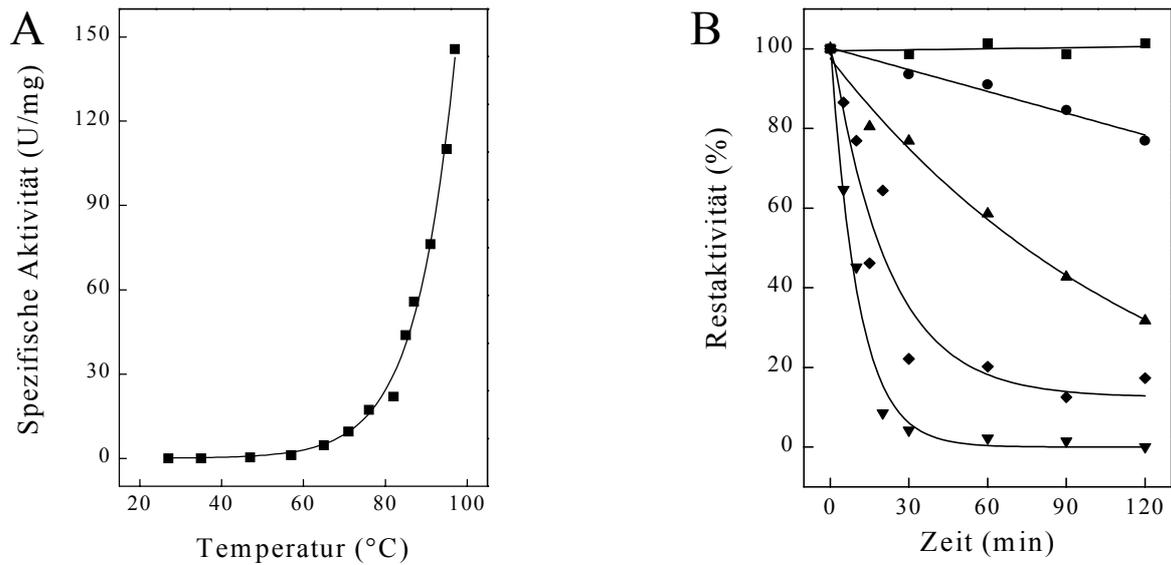


Abbildung 21 Temperaturabhängigkeit der Aktivität und Thermostabilität der ACS aus *P. aerophilum*. **A** Spezifische Aktivität in Abhängigkeit von der Temperatur. **B** Thermostabilität nach Inkubation bei 90°C (■), 95°C (●), 98°C (▲), 100°C (▼) und 100°C mit 1 M (NH₄)₂SO₄ (◆). 100% Aktivität entsprechen etwa 10 U/mg

Die Ergebnisse zeigen, dass der ORF2867 für eine funktionelle ACS kodiert. Damit wurde die erste hyperthermophile ACS charakterisiert. Mit der oktameren Struktur, den hohen Substrataffinitäten und der breiten Substratspezifität weist die ACS aus *P. aerophilum* eine Reihe ungewöhnlicher Charakteristika auf, die sie deutlich von allen bisher beschriebenen ACS unterscheidet.

6 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die Enzyme der Acetatbildung und -aktivierung in Haloarchaea identifiziert und biochemisch charakterisiert. Während die Acetatbildung von einer ADP-bildenden Acetyl-CoA Synthetase (ACD) katalysiert wird, erfolgt die Acetataktivierung über eine induzierbare AMP-bildende Acetyl-CoA Synthetase (ACS) (Abbildung 22). Die kodierenden Gene wurden im partiell sequenzierten Genom identifiziert und funktionell in *E. coli* exprimiert. Da über die entsprechenden Enzyme in Crenarchaeota bisher keine Informationen vorlagen, wurden zudem zwei ORFs aus dem Genom von *P. aerophilum*, die putativ für die α - und β -Untereinheit einer ACD kodieren, und ein als ACS Gen annotierter ORF, kloniert, exprimiert und die rekombinanten Proteine biochemisch charakterisiert.

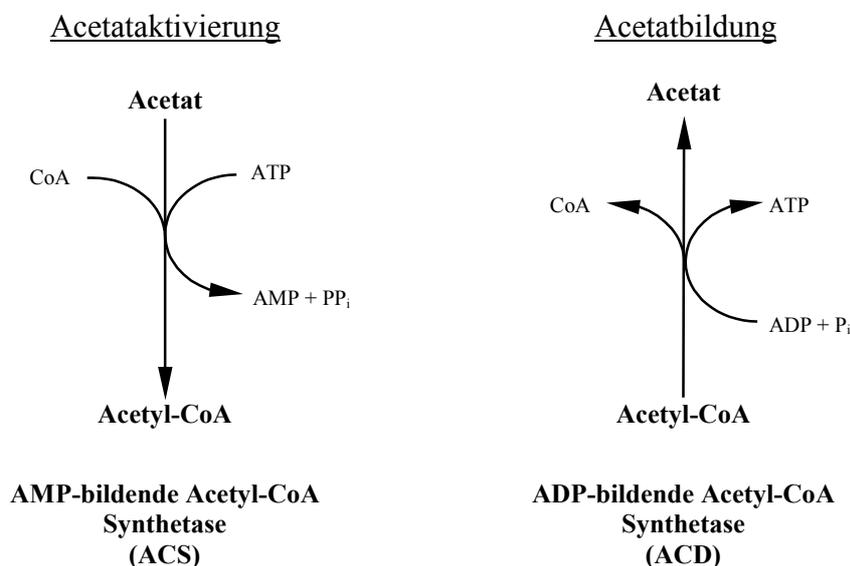


Abbildung 22 Vorgeschlagene Mechanismen der Acetataktivierung und Acetatbildung in extrem halophilen Archaea.

6.1 Acetatstoffwechsel in halophilen Archaea

Acetatbildung in extrem halophilen Archaea. Für einige anaerobe hyperthermophile Archaea war gezeigt, dass die Acetatbildung nicht wie bei Bacteria über AK und PTA, sondern über eine ACD erfolgt (Schäfer et al. 1993; Schäfer und Schönheit 1991). Auch für Haloarchaea war Acetatbildung aus Glucose und anderen Zuckern sowie aus Glycerol mehrfach beschrieben, jedoch nicht im Detail untersucht (Tomlinson und Hochstein 1972b; Hochstein 1978; Montero et al. 1989; Oren et al. 1988). Erste Hinweise mit *Hr. saccharovorum* sprachen dafür, dass diese Acetatbildung ebenfalls von einer ACD katalysiert

wird. Da alle darauf hin untersuchten acetatbildenden Archaea Acetat über eine ACD bilden, wurde postuliert, dass die Acetatbildung in Prokaryonten domänenspezifisch ist (Schäfer et al. 1993). Durch Messung der Enzymaktivitäten während des Wachstums wurde gezeigt, dass in allen untersuchten extrem halophilen Archaea parallel zur Acetatbildung bei exponentiellem Wachstum auf Glucose die Aktivität einer ACD ansteigt. Dagegen konnten die Aktivitäten von AK und PTA, den bakteriellen Enzymen der Acetatbildung, nicht nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Acetatbildung auch in extrem halophilen Archaea von einer ACD katalysiert wird. Damit wurde die postulierte Domänenspezifität der Acetatbildung bestätigt. Während in der Domäne der Archaea Acetatbildung bei aerobem Wachstum u.a. auf Glucose bisher nur für die extrem Halophilen gezeigt wurde, wurde dieses Phänomen für Bacteria als „overflow-Metabolismus“ bereits mehrfach beschrieben, z.B. für *B. subtilis*, *E. coli* und *C. glutamicum* (Tobisch et al. 1999; Grundy et al. 1993; Brown et al. 1977; Reinscheid et al. 1999). Analog zur ACD aus dem Archaeon *Ha. marismortui* wurde dabei auch eine Stimulierung der acetatbildenden Enzyme der Bacteria, AK und PTA, für *B. subtilis* und *E. coli* bei Wachstum auf Glucose dokumentiert (Presecan-Siedel et al. 1999; Grundy et al. 1993; Oh et al. 2002). Der Grund für diese Acetatbildung unter aeroben Bedingungen könnte eine Limitierung des Citrat-Zyklus und der Atmungskette sein (Hochstein 1978; el-Mansi und Holms 1989; Andersen und von Meyenburg 1980). Für *B. subtilis* und *E. coli* wurde gezeigt, dass Glucose reprimierenden Einfluss auf die Expression der Enzyme des Citrat-Zyklus hat (Tobisch et al. 1999; Oh et al. 2002). Auch für *Hf. volcanii* wurde in DNA-microarrays gezeigt, dass die Transkription einiger Gene des Citrat-Zyklus und einiger Atmungskettenkomponenten bei Wachstum auf Glucose reprimiert wird (Zaigler et al. 2003). Dadurch könnte es zu einer intrazellulären Akkumulierung von Acetyl-CoA und Pyruvat kommen, die dann als Acetat und Pyruvat ins Medium ausgeschieden werden. Damit stimmen die mit *Ha. marismortui* erzielten Ergebnisse dieser Arbeit überein, nach denen die Aktivität der Glc-DH und auch die der ACD parallel zum Glucoseverbrauch und zur Acetatbildung ansteigt. Bei Wachstum auf Komplexbestandteilen, aus denen kein Acetat gebildet wird, nehmen die Aktivitäten von ACD und Glc-DH aber ab. Ähnlich den bakteriellen Enzymen AK und PTA, könnte damit der ACD in den aeroben extrem halophilen Archaea in erster Linie eine „Ventil“-Funktion im Zuckermetabolismus zukommen, die in der Energiegewinnung aus überschüssigem Acetyl-CoA besteht, wenn dieses durch Limitierung von Citrat-Zyklus und Atmungskette nicht vollständig oxidiert werden kann. Im Gegensatz dazu haben die ACD Isoenzyme aus den anaeroben hyperthermophilen Euryarchaeota *P. furiosus* und *A. fulgidus* eine essentielle Funktion bei der Energiekonservierung sowohl in der Kohlenhydratfermentation als auch in der Peptidfermentation (Mai und Adams 1996; Musfeldt und Schönheit 2002). Dies wurde dadurch bestätigt, dass die ACD I und ACD II in *P. furiosus* bei Wachstum auf Kohlenhydraten oder Peptiden nicht signifikant reguliert werden (Schut et al. 2003).

Acetataktivierung in extrem halophilen Archaea. Zum Wachstum von Archaea auf Acetat und zum Acetatstoffwechsel lagen nur Informationen von den Methanogenen vor. Kürzlich wurde auch für zwei hyperthermophile Archaea Wachstum auf Acetat dokumentiert (Tor et

al. 2001). Für die aeroben Archaea der *Halobacteriaceae* und bei *Sulfolobus acidocaldarius* existierten aber lediglich Hinweise, dass Acetat als Kohlenstoff- und Energiequelle genutzt werden kann (Oren und Gurevich 1995; Oren 1995; Oren et al. 1988; Kevbrina und Plakunov 1992). In Gegenwart von Acetat wurde die Induktion der Schlüsselenzyme des Glyoxylat-Zyklus als anaplerotische Sequenz mehrfach nachgewiesen (Uhrigshardt et al. 2002; Oren und Gurevich 1995; Serrano et al. 1998; Aitken und Brown 1969; Serrano und Bonete 2001a). Hinsichtlich der Acetataktivierung zu Acetyl-CoA in Archaea lagen jedoch außer für die acetoclastischen Methanogenen der Gattungen *Methanosarcina* und *Methanosaeta* (ehem. *Methanotrix*) keine Ergebnisse vor. Diese aktivieren Acetat über AK und PTA bzw. über eine ACS (Jetten et al. 1992; Ferry 1992; Ferry 1997). Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die halophilen Archaea mit Acetat als Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen. Darüber hinaus wird das in der exponentiellen Phase bei Wachstum auf Glucose gebildete Acetat in der stationären Phase wieder aufgenommen. Parallel zur Acetataufnahme steigt die Aktivität einer ACS an, während die der ACD abnimmt. Bei Wachstum auf Glucose wird dagegen die ACS Aktivität vollständig herunterreguliert. Zudem zeigten die Suspensionsexperimente, dass nur Zellen, die ACS Aktivität enthalten, in der Lage sind, Acetat zu metabolisieren. Diese Befunde sprechen dafür, dass die Acetataktivierung von der ACS, nicht aber von der ACD katalysiert wird, obwohl letztere in den halophilen Archaea in vitro reversibel ist. Damit kommt der ACS in Haloarchaea die acetataktivierende Rolle zu, während die ACD ausschließlich acetatbildende Funktion hat. Eine entsprechende Rolle der ACS wurde für *B. subtilis* beschrieben: Bei diesem Organismus wird die ACS, wie in *Ha. marismortui* auch, in Gegenwart von Glucose reprimiert (Grundy et al. 1994; Grundy et al. 1993). In *E. coli* erfolgt dagegen die Acetataktivierung bei niedrigen Acetatkonzentrationen über eine glucosereprimierte, acetatinduzierte ACS. Dagegen wird bei hohen Acetatkonzentrationen der Weg über AK und PTA beschritten (Kumari et al. 1995; Kumari et al. 2000), wobei auch gezeigt wurde, dass die Expression von AK und PTA bei Wachstum auf Acetat herunterreguliert wird (Oh et al. 2002). In Übereinstimmung damit weist die ACS eine höhere Affinität für Acetat (K_m -Wert: 0.2 mM) auf als die AK (K_m -Wert: 7 mM) (Kumari et al. 1995; Fox und Roseman 1986). Es wurde diskutiert, dass das Vorhandensein beider Aktivierungswege in *E. coli* einen Vorteil unter Bedingungen darstellt, unter denen die Acetatkonzentration in weiten Bereichen variiert. Bei geringen Acetatkonzentrationen stellt die hohe Acetataffinität der ACS einen Vorteil dar. Dagegen könnte ein Problem der ACS bei hohen Acetatkonzentrationen darin bestehen, dass Acetat nicht schnell genug umgesetzt wird, sodass es seine toxische Wirkung z.B. als Entkoppler entfalten kann (Kumari et al. 1995). Ähnliches wurde für die acetoclastischen Methanogenen beschrieben: *Methanosaeta ssp.*, die Acetat über eine ACS (K_m -Wert für Acetat: 0.8 mM) aktivieren, finden sich in erster Linie in Habitaten mit geringen Acetatkonzentrationen. Dagegen kommen *Methanosarcina ssp.*, bei denen die Acetataktivierung über AK (K_m -Wert für Acetat: 22 mM) und PTA erfolgt, v.a. an Standorten mit hoher Acetatverfügbarkeit vor (Jetten et al. 1992; Jetten et al. 1989; Aceti und Ferry 1988; Ferry 1992). Auch in *C. glutamicum* wird Acetat ausschließlich über AK und PTA aktiviert (Reinscheid et al. 1999). AK und PTA haben also sowohl acetatbildende als

auch acetataktivierende Funktion, wobei die acetatbildende und ATP-generierende Funktion wegen des hohen K_m -Wertes für Acetat in den meisten Organismen überwiegt. Für das archaeele Enzym der Acetatbildung, die ACD, wurde bisher aber ausschließlich eine katabole Funktion beschrieben. Damit könnte die Induktion der ACS in den Haloarchaea bei Wachstum auf Acetat eine Anpassung an die niedrigen Acetatkonzentrationen in hypersalinen Habitaten darstellen (Oren 1995).

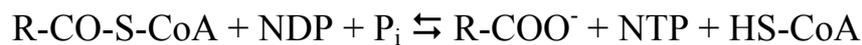
Um weitere Hinweise auf die Regulation der am Acetatstoffwechsel beteiligten Enzyme zu erhalten, wurde *Ha. marismortui* auf einem Medium kultiviert, das Glucose und Acetat enthielt. Dabei zeigte *Ha. marismortui* biphasisches Wachstum mit Glucose als bevorzugtem Substrat. Damit wurde erstmals eine Glucose-Acetat-Diauxie in der Domäne der Archaea beschrieben. Diese spiegelte sich auch in den Enzymaktivitäten wider: Während in der ersten Wachstumsphase parallel zur Glucoseaufnahme Glc-DH und ACD Aktivität anstiegen, wurde die Aktivität der acetatverwertenden Enzyme ACS und MS vollständig herunterreguliert. In der zweiten Wachstumsphase, während der Acetataufnahme, nahm umgekehrt die Aktivität von ACS und MS zu, während die Aktivität der glucoseverwertenden Enzyme Glc-DH und ACD abnahm. Glucose-Acetat-Diauxie wurde bisher für einige Bakterien wie z.B. *Thiobacillus A2*, *Azotobacter vinelandii* und *E. coli* sowie mit Suspensionszellen von *Oryza sativa* (Reis) gezeigt. Dabei war bei *E. coli* Glucose das bevorzugte Substrat, während von *Thiobacillus A2*, *A. vinelandii* und *O. sativa* Acetat bevorzugt genutzt wurde (Wood und Kelly 1977; Tauchert et al. 1990; Brown et al. 1977; Lee und Lee 1996). Im Allgemeinen wird diauxisches Wachstum als Ausdruck einer Katabolitrepression des Abbaus eines nicht-bevorzugten Substrates durch ein bevorzugtes Substrat gewertet. Entsprechend wurde für die ACS und die Glyoxylat-Zyklus Enzyme MS und ICL in *E. coli* Glucoserepression beschrieben, wobei daneben auch Acetatinduktion und andere Faktoren bei der Regulation eine Rolle spielen (Kumari et al. 2000; Kumari et al. 1995; Cronan und LaPorte 1996). Für *A. vinelandii*, *Thiobacillus A2* und *O. sativa* wurde dagegen eine Katabolitrepression der Glucoseaufnahme und von Enzymen des Glucosemetabolismus durch Acetat diskutiert (Wood und Kelly 1977; Tauchert et al. 1990; Lee und Lee 1996). Dagegen werden von *C. glutamicum* Glucose und Acetat simultan verstoffwechselt. Dementsprechend wurde gezeigt, dass die Enzyme des Acetatmetabolismus, AK und PTA sowie MS und ICL, unabhängig vom Vorhandensein anderer Substrate in Gegenwart von Acetat induziert werden und nicht durch Glucose reprimiert werden (Wendisch et al. 2000). Damit deuten sich bezüglich der Funktion und der Regulation der Enzyme des Acetatstoffwechsels in Haloarchaea einige Parallelen zu den Bacteria *E. coli* und *B. subtilis* an. Ob es sich bei der Regulation der haloarchaeellen Enzyme des Acetatstoffwechsels um eine Form von Katabolitrepression handelt, die innerhalb der Archaea z.B. für die α -Amylase aus *Sulfolobus solfataricus* diskutiert wurde, wäre in weiteren Untersuchungen zu klären (Haseltine et al. 1996).

Um weitere Information über die identifizierten Enzyme der Acetatbildung und der Acetataktivierung in Haloarchaea, ACD und ACS, zu erhalten, insbesondere um die ausschließlich katabole Funktion der ACD auf biochemischer Ebene erklären zu können,

wurden ACD und ACS aus *Ha. marismortui* gereinigt und mit besonderer Berücksichtigung der kinetischen Konstanten biochemisch charakterisiert. Die Gene wurden identifiziert und funktionell in *E. coli* exprimiert.

6.2 ACD aus *Ha. marismortui* und *P. aerophilum*

Detaillierte biochemische Informationen über ACD sowie über deren kodierende Gene lagen bisher nur für anaerobe hyperthermophile Euryarchaeota und amitochondriate eukaryontische Protisten vor. Es wurde vorgeschlagen, die ACD aufgrund signifikanter Sequenzhomologien zusammen mit Pimeloyl-CoA Synthetasen, Succinyl-CoA Synthetasen, Malyl-CoA Synthetasen, ATP Citrat Lyasen und einer Anzahl weiterer Proteine unbekannter Funktion zur Protein-Superfamilie der NDP-bildenden Acyl-CoA Synthetasen zusammenzufassen (Sanchez et al. 2000). Die ACD katalysieren die Umsetzung eines Acyl-CoA Esters zur korrespondierenden Säure, wobei diese Reaktion mit der ATP-Bildung aus ADP und P_i über Substratstufenphosphorylierung gekoppelt wird:



Einige Proteine dieser Familie arbeiten in vivo auch in die Umkehrrichtung, indem sie die Umsetzung von Mono- oder Dicarbonsäuren, Coenzym A und Purinnukleotid-Triphosphat zum entsprechenden Acyl-CoA Ester unter Bildung des Purinnukleotid-Diphosphats katalysieren. Neben den für diese Familie vorgeschlagenen Signaturmotiven enthalten die meisten der Proteine einen hochkonservierten, katalytisch essentiellen Histidinrest ($\text{His}^{246}\alpha$). Wie Untersuchungen mit der Succinyl-CoA Synthetase (SCS) aus *E. coli* ergaben, beinhaltet der Katalysemechanismus die intermediäre Phosphorylierung des Enzyms am $\text{His}^{246}\alpha$ in Gegenwart von Acyl-CoA Ester, Magnesium und Phosphat (Majumdar et al. 1991; Wolodko et al. 1994; Fraser et al. 1999). Hinsichtlich der Anordnung der in diesen Proteinen auftretenden homologen Domänen und hinsichtlich der oligomeren Struktur weist die Proteinfamilie große Heterogenität auf (Sanchez et al. 2000). So ist z.B. die gut untersuchte und bereits kristallisierte SCS aus *E. coli* ein Heterotetramer ($\alpha_2\beta_2$). Für ACD wurden heterooligomere Strukturen bisher nur für die ACD Isoenzyme I und II aus dem hyperthermophilen Euryarchaeon *P. furiosus* gezeigt, bei denen es sich um 140 kDa Heterotetramere ($\alpha_2\beta_2$) aus je zwei α - (45 kDa) und β -Untereinheiten (25 kDa) handelt (Mai und Adams 1996; Musfeldt et al. 1999; Glasemacher et al. 1997). Eine ähnliche Struktur weisen ebenfalls die putativen ACD in den verwandten *P. horikoshii* und *P. abyssi* auf (Sanchez et al. 2000; Musfeldt und Schönheit 2002). Die übrigen bisher charakterisierten ACD aus hyperthermophilen Euryarchaeota und eukaryontischen Protisten repräsentieren Fusionen der homologen α - und β -Untereinheit aus *P. furiosus*, die in $\alpha\beta$ -Orientierung (ACD AF1211 *A. fulgidus*, ACD MJ0590 *M. jannaschii*, *G. lamblia*, *E. histolytica*) oder in $\beta\alpha$ -

Orientierung (ACD AF1938 *A. fulgidus*) vorliegen. Die funktionellen Enzyme sind als 140 kDa Homodimere charakterisiert worden, die aus 70 kDa Untereinheiten aufgebaut sind (Sanchez et al. 2000; Sanchez et al. 1999; Sanchez und Müller 1996; Musfeldt und Schönheit 2002).

Eine solche Struktur wie auch die 166 kDa ACD aus *Ha. marismortui* auf, die aus 87 kDa Untereinheiten zusammengesetzt ist. Das aus 2106 Basenpaaren bestehende Gen wurde im partiell sequenzierten Genom anhand der N-terminalen Sequenz des gereinigten Enzyms identifiziert (Zhang et al. 2003). Es liegt in $\alpha\beta$ -Orientierung vor und kodiert für eine funktionelle ACD aus 701 Aminosäuren mit einer kalkulierten molekularen Masse von 74.2 kDa. Damit wurde das apparente Molekulargewicht überbestimmt, was aber für halophile Proteine zumindest unter denaturierenden Bedingungen ein bekanntes Phänomen ist und auf den erhöhten Anteil an sauren Aminosäuren zurückgeführt wird (Bonete et al. 1996). Mit einem Temperaturoptimum von 43°C ist die ACD aus *Ha. marismortui* die erste charakterisierte mesophile ACD aus einem aeroben Prokaryonten und wies ihrer Herkunft entsprechend eine Reihe für halophile Proteine charakteristische Eigenschaften auf. Im Besonderen war die Stabilität und die korrekte Faltung abhängig von hohen Salzkonzentrationen, was in Übereinstimmung mit den intrazellulär hohen Salzkonzentrationen in Haloarchaea ist.

Ein auffälliger Unterschied zwischen *P. furiosus* und *Ha. marismortui* hinsichtlich der Acetatbildung über die ACD besteht darin, dass *P. furiosus* Acetat bei fermentativem Wachstum sowohl auf Kohlenhydraten als auch auf Peptiden bildet (Schäfer et al. 1993). Dementsprechend wurde den ACD Isoenzymen aus *P. furiosus* sowohl eine Funktion im Peptidmetabolismus (ACD I und ACD II) als auch eine Rolle bei der Kohlenhydratfermentation (ACD I) zugeschrieben. Ähnliches wurde für die charakterisierten ACD Isoenzyme aus *A. fulgidus* diskutiert (Mai und Adams 1996; Musfeldt und Schönheit 2002). Im Gegensatz dazu bildete *Ha. marismortui* nur bei aerobem Wachstum auf Zuckern Acetat, nicht aber bei Wachstum auf Hefeextrakt und Casaminosäuren. Ein Grund dafür könnte im K_m -Wert der halophilen ACD für Acetyl-CoA liegen. Dieser liegt mit 0.45 mM 40-50fach über denen der hyperthermophilen ACD (0.025 mM für die ACD I aus *P. furiosus* und 0.01 mM für die ACD I aus *A. fulgidus*) (Mai und Adams 1996; Musfeldt und Schönheit 2002; Glasemacher et al. 1997). Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass Acetat nur bei relativ hohen intrazellulären Acetyl-CoA Konzentrationen gebildet wird. Diese treten vermutlich nur bei hohen glykolytischen Flussraten und gleichzeitiger Limitierung des Citrat-Zyklus und der Atmungskette auf, wie es bei Wachstum auf z.B. Glucose der Fall sein könnte (6.1) (Zaigler et al. 2003). Die ACD aus *Ha. marismortui* wies in Analogie zur ACD I aus *P. furiosus* ähnliche Substratspezifität für verschiedene organische Säuren auf, was ebenfalls auf eine Funktion des Enzyms im Kohlenhydratmetabolismus hindeutet. Auffälligerweise zeigte die *Ha. marismortui* ACD mit den verzweigt-kettigen Acyl-Säuren Isobutyrat und Isovalerat, den Abbauprodukten verzweigt-kettiger Aminosäuren in *P. furiosus*, eine Hemmung bei Konzentrationen über 2.5 mM. Der K_m -Wert für Isobutyrat lag bei 0.6 mM und war damit

8fach kleiner als der für Acetat (2.6 mM). Zudem wurde in *Ha. marismortui* kein zur ACD II aus *P. furiosus* analoges Isoenzym gefunden, dem v.a. eine Funktion im Peptidstoffwechsel zugeschrieben wird und das bevorzugt Aryl-CoA Ester umsetzt (Mai und Adams 1996). Diese Befunde weisen zusätzlich darauf hin, dass die ACD in den Haloarchaea für den Peptidmetabolismus nicht benötigt wird, sondern in erster Linie eine „Ventil“-Funktion beim Wachstum auf Zuckern ausübt (Abbildung 23). Demgegenüber haben die ACD in *P. furiosus*, der nicht über einen Citrat-Zyklus verfügt, eine essentielle Bedeutung im Energiestoffwechsel bei Wachstum sowohl auf Zuckern als auch auf Peptiden, wo sie die wichtigste ATP-generierende Reaktion katalysieren.

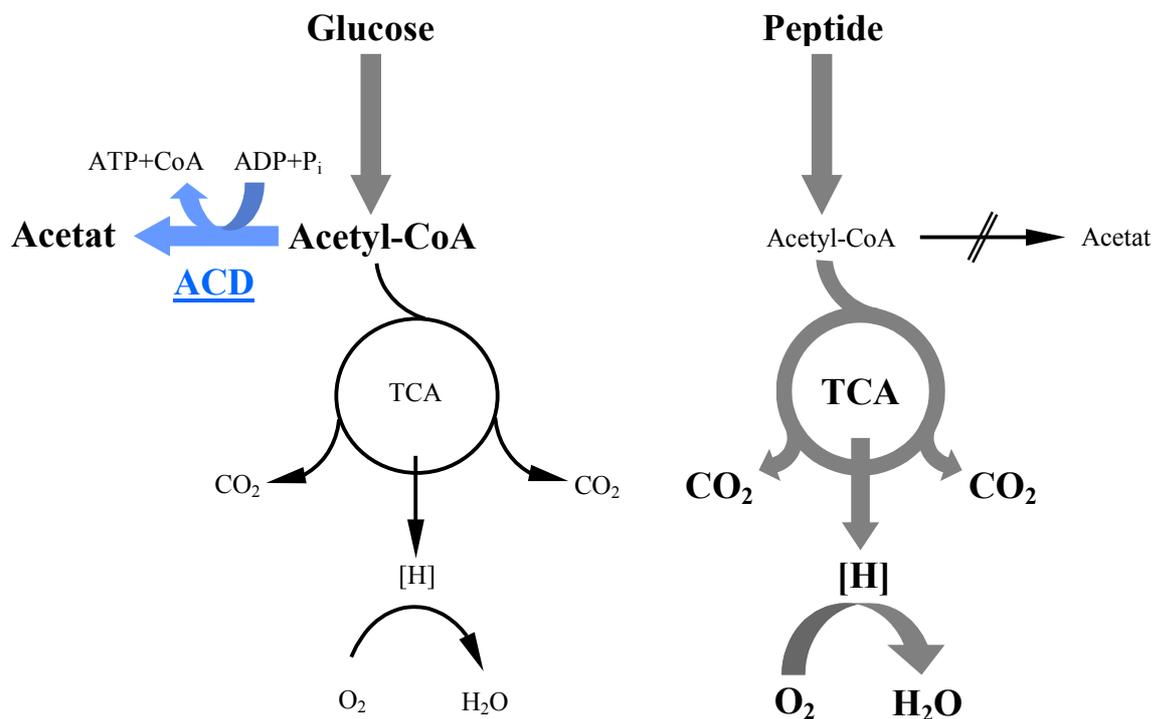


Abbildung 23 Hypothetische Funktion der ACD in halophilen Archaea bei Wachstum auf Glucose im Vergleich zu Wachstum auf Peptiden. Die dünnen Pfeile deuten eine Repression an, die dicken Induktion. TCA = Tricarboxylic acid cycle (Citrat-Zyklus).

Eine im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Blast-P Analyse (Altschul et al. 1990) ergab neben einigen bereits aus früheren Studien bekannten Sequenzen, denen aber z.T. das katalytisch essentielle Histidin fehlte, eine Reihe weiterer ACD-homologer Proteine aus allen drei Domänen, die meisten aus Archaea und den Proteobakterien. Alle ACD-Homologe wiesen mehr als 28% Identität zur α - und β -Untereinheit der ACD I aus *P. furiosus* sowie große Ähnlichkeit zu den vorgeschlagenen Signaturmotiven der Proteinfamilie der NDP-bildenden Acyl-CoA Synthetasen auf und enthielten insbesondere das konservierte Histidin (Sanchez et al. 2000). Letzteres fehlt allerdings in den meisten enterobakteriellen Sequenzen, deren Funktion aber bisher ungeklärt ist. Eukaryontische ACD-Homologe wurden nur in den Genomen der parasitischen *Plasmodium falciparum* und *Plasmodium yoeli* sowie in *Spironucleus barhanus* gefunden. Die meisten dieser putativen ACD liegen als Fusionen der

homologen α - und β -Untereinheit in $\alpha\beta$ -Orientierung vor, von denen viele der bakteriellen Sequenzen zusätzlich eine C-terminale Acetyltransferase-Domäne aufweisen, wie sie bereits für putative ACD-Homologe einiger Enterobakterien beschrieben wurde (Sanchez et al. 2000). Als einzige archaeelle Sequenz wies eine solche Acetyltransferase-Domäne der ORF AF1511 aus *A. fulgidus* auf, bei dem diese aber N-terminal lokalisiert ist (Sanchez et al. 2000). Putative ACD-homologe Fusionsproteine in $\beta\alpha$ -Orientierung wurden dagegen nur in *A. fulgidus* und *Streptomyces* Spezies (Sanchez et al. 2000; Musfeldt und Schönheit 2002) sowie zusätzlich in *Ralstonia metallidurans* gefunden. Außerdem konnten separate α - und β -Untereinheiten zusätzlich zu den *Pyrococcus* Spezies nur in den Archaea *Methanosarcina acetivorans*, *Methanosarcina mazei* und *P. aerophilum* nachgewiesen werden. Damit wird deutlich, dass - wie bereits früher diskutiert (Muskfeldt und Schönheit 2002) - nicht nur die separate Anordnung der Untereinheiten sondern auch die $\beta\alpha$ -Orientierung in fusionierten ACD eher eine Ausnahme darstellt und dass ACD in der Regel als Fusionsproteine in $\alpha\beta$ -Orientierung vorliegen. In Abbildung 24 sind die unterschiedlichen Möglichkeiten der Anordnung der kodierenden Gene für charakterisierte und putative ACD gezeigt.

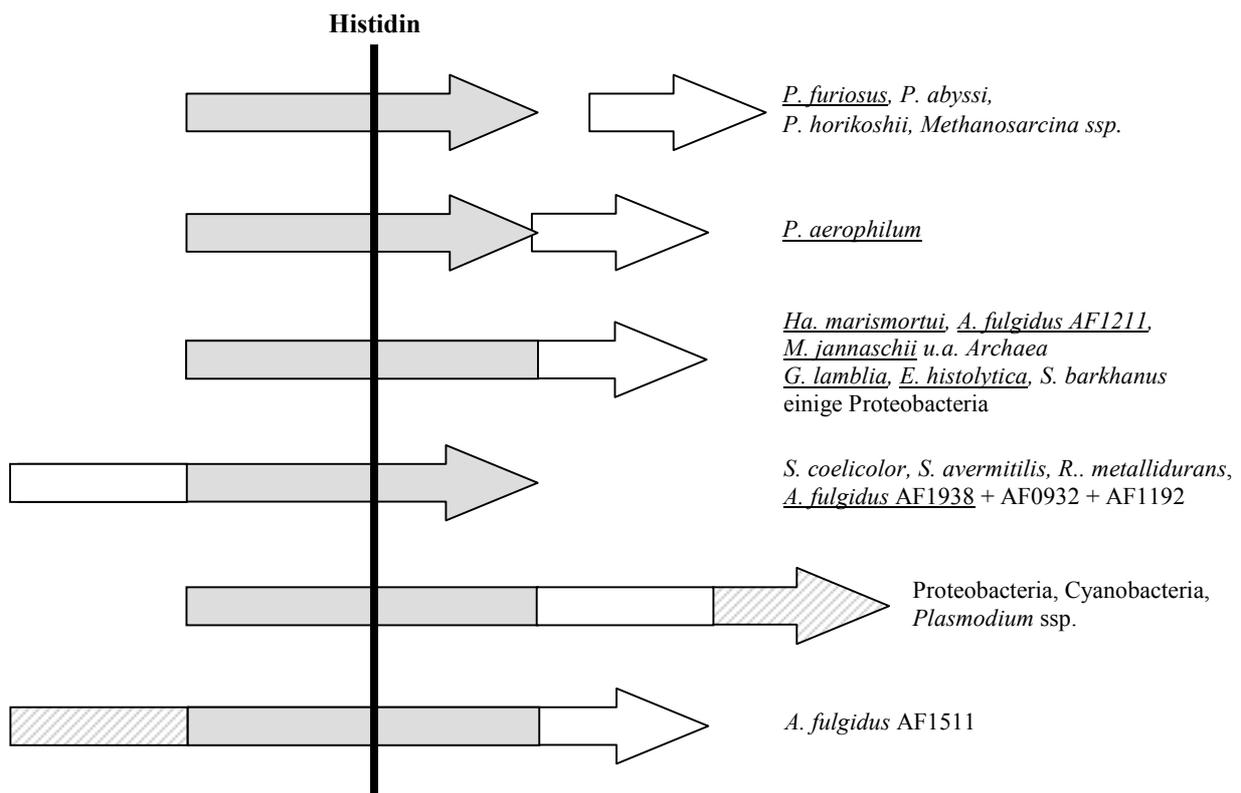


Abbildung 24 Struktur der für α - und β -Untereinheiten kodierenden Gene charakterisierter und putativer ACD. Unterstreichungen markieren charakterisierte ACD. Die Pfeile repräsentieren die einzelnen Gene, graue Bereiche symbolisieren die α -Untereinheit, weiße die β -Untereinheit, grau schraffiert sind die Acetyltransferase-Domänen dargestellt.

Daraus wird deutlich, dass die ORFs PAE3250 und PAE3249 aus *P. aerophilum* (Fitz-Gibbon et al. 2002), die für α - und β -Untereinheit einer funktionellen ACD kodierten, eine für ACD-Gene einzigartige Struktur besitzen. Während alle anderen für α - und β -Untereinheiten kodierenden ACD Gene entweder fusioniert oder aber separat und dann an unterschiedlichen Orten im Chromosom lokalisiert sind, liegen die Gene im Chromosom von *P. aerophilum* einander überlappend vor, ohne aber einen einheitlichen Leserahmen zu bilden. Somit kodieren die ORFs nicht für ein aus α - und β -Untereinheit fusioniertes Protein. Beide Gene liegen aber auch nicht, wie für *P. furiosus* beschrieben, an unterschiedlichen Orten verteilt auf dem Chromosom (Musfeldt et al. 1999). Damit könnte die ACD aus *P. aerophilum* einen Übergangszustand zwischen ACD mit fusionierten und separaten Untereinheiten repräsentieren, die entweder durch Genfusion oder aber durch Genspaltung auseinander hervorgegangen sein könnten. Aufgrund der interessanten Struktur der Gene und weil bisher keine crenarchaeelle ACD biochemisch charakterisiert war, wurden die ORFs PAE3250 und PAE3249 separat in *E. coli* exprimiert, die Untereinheiten zum nativen Enzym rekonstituiert und das gereinigte Enzym biochemisch charakterisiert.

Den separaten Genen entsprechend besteht das Enzym aus zwei verschiedenen Untereinheiten, α (50 kDa) und β (28 kDa), wobei das native Molekulargewicht und damit die oligomere Struktur weder mit Gelfiltration noch mit analytischer Ultrazentrifugation eindeutig geklärt werden konnte. Die ACD aus *P. aerophilum* ist die erste charakterisierte crenarchaeelle ACD und zeigte hinsichtlich ihrer Thermophilie ähnliche Eigenschaften wie die euryarchaeellen ACD Isoenzyme aus *P. furiosus*. In Übereinstimmung mit dem Wachstumsoptimum von ca. 100°C lag das Temperaturoptimum mit über 93°C im Bereich des Temperaturoptimums der ACD Isoenzyme I und II aus *P. furiosus*, das mit 90°C bzw. über 90°C angegeben wurde (Glasemacher et al. 1997; Mai und Adams 1996). Zudem zeigten die Enzyme sowohl aus *P. aerophilum* als auch aus *P. furiosus* in Gegenwart von Salz über 2 h Inkubation bei 100°C keinen signifikanten Aktivitätsverlust (Glasemacher et al. 1997). Im Gegensatz zu den ACD Isoenzymen aus *P. furiosus* und *A. fulgidus* war die *P. aerophilum* ACD in Richtung der CoA-Ester Bildung unter den gewählten Reaktionsbedingungen nicht messbar. Ähnliches wurde für die ACD aus *M. jannaschii* beschrieben, wobei die Ursachen für diese Irreversibilität nicht bekannt sind (Musfeldt und Schönheit 2002). Eine Besonderheit der ACD aus *P. aerophilum* sind die Substratspezifität und die kinetischen Konstanten für die verschiedenen CoA-Ester. Aus *P. furiosus* und *A. fulgidus* waren je zwei Isoenzyme, ACD I und ACD II bzw. ACD AF1211 und ACD AF1938, charakterisiert, die - wie in Tabelle 14 dargestellt - entweder bevorzugt die CoA-Ester unverzweigter Acylsäuren (ACD I) oder Arylsäuren (ACD II) umsetzen, beide mit geringerer Effizienz auch die der verzweigt-kettigen Acylsäuren. Dagegen setzt die ACD aus *P. aerophilum* alle drei Arten von CoA-Estern um, am effizientesten die der verzweigten Acylsäuren (Tabelle 14). Der V_{\max}/K_m -Wert war für Isobutyryl-CoA dreifach höher als für Acetyl-CoA und fünffach höher als für Phenylacetyl-CoA. Zudem konnten im Genom keine weiteren ACD-homologen ORFs identifiziert werden. Während also in den Euryarchaeota *P. furiosus* und *A. fulgidus* die Umsetzung von Acyl- und

Aryl-CoA Estern von jeweils einem für das Substrat spezifischen Isoenzym katalysiert wird, scheint die Umsetzung dieser Verbindungen in *P. aerophilum* über nur ein multifunktionelles Enzym mit breiterer Substratspezifität zu erfolgen. Ein ähnlicher Sachverhalt wurde für die ATP-abhängige Glucokinase aus dem Crenarchaeon *Aeropyrum pernix* beschrieben, die eine breite Substratspezifität für Hexosen aufweist und neben Glucose auch Fructose und Mannose umsetzt (Hansen et al. 2002). Dagegen enthalten Prokaryonten normalerweise eine ganze Reihe von Enzymen, die spezifisch eine bestimmte Hexose phosphorylieren. Eine ähnlich breite Substratspezifität für Hexosen wurde ebenfalls für die ATP-abhängige Hexokinase aus *Thermoproteus tenax* beschrieben (Dorr et al. 2003). Auch für *Sulfolobus solfataricus* wurde beschrieben, dass Enzyme des Glucoseabbaus über einen modifizierten ED Weg, die Glc-DH und die KDG Aldolase, ebenfalls Galactose umsetzen, sodass multifunktionelle Enzyme in Crenarchaeota u.U. ein generelles Phänomen sein könnten (Lamble et al. 2003).

Tabelle 14 Relative Aktivitäten und K_m -Werte der ACD aus *Ha. marismortui*, *P. aerophilum* und *P. furiosus* für Acetyl-CoA, Isobutyryl-CoA und Phenylacetyl-CoA sowie den korrespondierenden Säuren.
^a = (Mai und Adams 1996), ^b = (Musfeldt und Schönheit 2002), n.b. = nicht bestimmt, n.m. = nicht messbar.

Substrat	ACD					
	ACD	ACD	ACD I ^a	ACD AF1211 ^b	ACD II ^a	ACD AF1938 ^b
	<i>P. aerophilum</i>	<i>Ha. marismortui</i>	<i>P. furiosus</i>	<i>A. fulgidus</i>	<i>P. furiosus</i>	<i>A. fulgidus</i>
Acetyl-CoA	100	100	100	100	30	0
Acetat	n.m.	100	100	100	75	13
Isobutyryl-CoA	92	n.b.	77	n.b.	6	n.b.
Isobutyrat	n.m.	38	85	56	25	31
Phenylacetyl-CoA	58	0.01	0	0	100	100
Phenylacetat	n.m.	0.03	0	8	100	65

Damit wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals ACD aus aeroben Archaea charakterisiert, die hinsichtlich ihrer biochemischen Eigenschaften und - im Falle des halophilen Enzyms - auch hinsichtlich der physiologischen Funktion neuartig sind. Die Bedeutung der ACD im Stoffwechsel der ebenfalls aeroben *P. aerophilum*, der *Thermoplasma* Spezies und *Sulfolobus* Spezies wäre genauer zu untersuchen. Erste Hinweise sprechen dafür, dass das Enzym in *P. aerophilum* im Gegensatz zu den Haloarchaea eher im Peptidstoffwechsel eine Rolle spielt als im Kohlenhydratstoffwechsel, da ACD Aktivität in Zellextrakten hefeextraktgewachsener Zellen, nicht aber in denen maltosegewachsener Zellen gemessen wurde. Zudem wäre von Interesse, die Funktion einiger der neu identifizierten ACD-homologen Sequenzen durch Expression zu überprüfen. Insbesondere die Bedeutung der ACD-ähnlichen Proteine in Bacteria und *Methanosarcina* Spezies wäre interessant, da die meisten dieser Organismen zusätzlich Gene für AK und PTA enthalten, die die gleiche Reaktion katalysieren. Auch die Funktion der in vielen ACD-Homologen auftretenden Acetyltransferasedomäne wäre durch weitere Studien zu klären.

6.3 ACS aus *Ha. marismortui* und *P. aerophilum*

In den extrem halophilen Archaea wurde eine ACS als acetataktivierendes Enzym identifiziert. ACS sind ubiquitär verbreitet und aus den Domänen der Bacteria und Eukarya mehrfach charakterisiert worden. Dagegen liegen genauere biochemische Untersuchungen der ACS aus der Domäne der Archaea nur aus *Methanosaeta* spp. vor (Jetten et al. 1989).

In dieser Arbeit wurde die erste ACS aus einem archaeellen Aerobier, aus *Ha. marismortui*, gereinigt und charakterisiert. Anhand der N-terminalen Aminosäuresequenz des gereinigten Enzyms wurde im partiell sequenzierten Genom von *Ha. marismortui* ein ORF identifiziert (Zhang et al. 2003), der, wie die funktionelle Expression in *E. coli* zeigte, für die ACS kodiert. Die apparente molekulare Masse des monomeren Proteins wurde mit 89 kDa bestimmt, das Gen besteht aus 1995 Basenpaaren und kodiert für ein Polypeptid mit 664 Aminosäuren mit einer kalkulierten molekularen Masse von 74.2 kDa. Wie auch bei der ACD aus *Ha. marismortui*, wurde also das Molekulargewicht unter denaturierenden Bedingungen überbestimmt, was durch einen erhöhten Anteil an sauren Aminosäuren erklärt wurde (Bonete et al. 1996) (6.2). Daneben zeigte auch die ACS einige für halophile Proteine charakteristische Eigenschaften wie z.B. ein Salzoptimum bei 1.25 M KCl. Zudem war die Rückfaltung des rekombinanten Proteins abhängig von hohen Salzkonzentrationen, was auch für die meisten der anderen heterolog exprimierten halophilen Proteine beschrieben wurde. Das deutet darauf hin, dass für die korrekte Faltung der Proteine hohe Salzkonzentrationen benötigt werden, was mit den intrazellulär hohen Salzkonzentrationen in Haloarchaea übereinstimmt (Pire et al. 2001; Camacho et al. 2002; Blecher et al. 1993; Cendrin et al. 1993; Connaris et al. 1999a). Die monomere Struktur der ACS aus *Ha. marismortui* stimmt, wie in Tabelle 15 dargestellt, mit den oligomeren Strukturen anderer charakterisierter ACS überein, die in der Regel Monomere oder Homodimere sind. Um die ausschließlich acetataktivierende Funktion der ACS bzw. die ausschließlich acetatbildende Funktion der ACD erklären zu können, waren v.a. die kinetischen Konstanten, insbesondere der K_m -Wert für Acetat, von Interesse. Dieser liegt für die ACS aus *Ha. marismortui* mit 0.23 mM im Bereich der meisten anderen charakterisierten ACS (Tabelle 15). Dagegen liegt der K_m -Wert der ACD für Acetat mit 2.6 mM 10fach höher. Die V_{max} -Werte in Richtung der Acetataktivierung liegen mit 26 U/mg (ACS) bzw. 40 U/mg (ACD) für beide Enzyme in vergleichbaren Größenordnungen, wobei der V_{max} -Wert der ACD deutlich kleiner ist als der der meisten Acetat Kinasen. Der AK/PTA-Weg in Methanogenen weist dagegen bei höheren K_m -Werten für Acetat erheblich höhere V_{max} -Werte auf (*M. thermophila* AK: V_{max} 660 U/mg, K_m 22 mM) als die ACS (*M. consilii* ACS: V_{max} 55 U/mg, K_m 0.9 mM) (Aceti und Ferry 1988; Jetten et al. 1989). Für die Enzyme in *E. coli* wurde ähnliches beschrieben (Brown et al. 1977; Fox und Roseman 1986). Aufgrund der höheren V_{max} -Werte stellt der AK/PTA-Weg bei hohen Acetatkonzentrationen einen Vorteil gegenüber dem ACS-Weg dar (Jetten et al. 1989; Jetten et al. 1992; Kumari et al. 1995). Die vergleichbaren V_{max} -Werte der ACS und der ACD sowie der erheblich kleinere K_m -Werte der ACS für Acetat könnte demnach erklären, warum die ACD in Haloarchaea

ausschließlich katabole Funktion hat und die Acetataktivierung auch bei hohen Acetatkonzentrationen (40 mM) von der ACS katalysiert wird (6.1). Zusätzlich könnte der Befund, dass nur der ACS Weg zur Acetataktivierung beschriftet wird, eine Anpassung an die niedrigen Acetatkonzentrationen, die in hypersalinen Habitaten im mikromolaren Bereich liegen (Oren 1995), darstellen.

Tabelle 15 Apparente molekulare Massen, oligomere Struktur und K_m -Wert für Acetat von ACS aus Prokaryonten und Eukaryonten. Referenzen: ^{a,b}Diese Arbeit, ^c(Jetten et al. 1989), ^d(Kumari et al. 1995), ^e(O'Sullivan und Ettliger 1976), ^f(Kim et al. 1996), ^g(Preston et al. 1990), ^h(Frenkel und Kitchens 1977), ⁱ(Martinez-Blanco et al. 1992), ^j(Zeiger und Randall 1991), ^k(Ishikawa et al. 1995; Kim et al. 1996).

Organismus	Apparente molekulare Masse (kDa)		Oligomere Struktur	K_m -Wert für Acetat (mM)
	Natives Enzyme	Untereinheit		
<i>Haloarcula marismortui</i> ^a	72	72	α	0.23
<i>Pyrobaculum aerophilum</i> ^b	615	77	α_8	0.003
<i>Methanosaeta consilii</i> ^c	148	73	α_2	0.86
<i>Escherichia coli</i> ^d	72	72	α	0.2
<i>Azotobacter aceti</i> ^e	60	77	α	0.25
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ^f	130	67	α_2	0.033
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> ^g	150	72	α_2	0.146
<i>Sacharomyces cerevisiae</i> ^h	151	78	α_2	0.28
<i>Penicillium chrysogenum</i> ⁱ	139	70	α_2	6.8
<i>Spinacea oleracea</i> ^j	73	73	α	0.057
<i>Bos taurus</i> ^k	57	72	α	0.16

Der ORF PAE2867, der im Genom von *P. aerophilum* als ACS annotiert war (Fitz-Gibbon et al. 2002), wurde kloniert und exprimiert. Die biochemische Charakterisierung ergab den Nachweis, dass ORF PAE2867 für eine ACS kodiert. In Übereinstimmung mit der optimalen Wachstumstemperatur des Organismus von 100°C zeigte das Enzym ein Temperaturoptimum von über 97°C und eine hohe Thermostabilität. Damit war die ACS aus *P. aerophilum* die erste bisher charakterisierte hyperthermophile ACS. Die apparente molekulare Masse des Enzyms wurde mittels Gelfiltration und analytischer Ultrazentrifugation bestimmt. Während alle bisher charakterisierten mesophilen ACS ein natives Molekulargewicht von etwa 75 kDa bzw. 150 kDa aufweisen und Monomere oder Homodimere sind (Tabelle 15), wurde die native molekulare Masse der *P. aerophilum* ACS mit 615 kDa bestimmt. Bei einer molekularen Masse der Untereinheiten von 77 kDa (kalkuliert 76.2 kDa) sprach das für eine homooktamere Struktur des hyperthermophilen Proteins und damit für einen wesentlich höheren Oligomerisierungsgrad als bei den mesophilen ACS. Ein höherer Oligomerisierungsgrad im Vergleich zu den mesophilen Homologen wurde für eine ganze

Reihe hyperthermophiler Proteine aus Bacteria und Archaea beschrieben, z.B. für die Phosphoglycerat Kinasen aus *Pyrococcus woessii* und *Methanothermus fervidus* (Hess et al. 1995). Diese liegen im Gegensatz zu den monomeren mesophilen Enzymen als Dimere vor. Für die Formyltransferase aus *Methanopyrus kandleri*, die in Abhängigkeit von der Salzkonzentration als Mono-, Di- oder Tetramer vorliegt, wurde gezeigt, dass nur die tetramere Form aktiv und thermostabil ist, wohingegen die aktive dimere Form thermolabil ist (Shima et al. 1998; Shima et al. 2000). Oligomerisierung könnte somit ein wichtiger Mechanismus zur Stabilisierung hyperthermophiler Proteine sein (Vieille und Zeikus 2001). Eine weitere Besonderheit der ACS aus *P. aerophilum* ist die erheblich höhere Substrataffinität des Enzyms im Vergleich zu allen bisher beschriebenen ACS. Wie Tabelle 15 zeigt, liegt z.B. der K_m -Wert für Acetat mit 3 μM 100fach unter dem der meisten anderen ACS. Aber auch die K_m -Werte für die anderen Substrate lagen z.T. deutlich unter denen der bisher charakterisierten Enzyme, insbesondere auch unter denen der ACS aus *Ha. marismortui*.

Viele der bisher charakterisierten ACS sind spezifisch für Acetat (100%). Lediglich Propionat (10%) wird mit allerdings deutlich verminderter Effizienz umgesetzt. Dagegen weist die ACS aus *P. aerophilum* eine relativ breite Substratspezifität auf. Zusätzlich zu Acetat (100%) werden Propionat (118%), Formiat (27%), Butyrat (25%) und auch die verzweigt-kettige Acyl-Säure Isobutyrat (28%) umgesetzt. Die Dicarbonsäuren Fumarat (2%) und Succinat (7%), die verzweigt-kettige Acyl-Säure Valerat (1%) und die Aryl-Säure Phenylacetat (3%) werden dagegen nicht als Substrat akzeptiert. Eine ebenfalls sehr breite Substratspezifität wurde bisher nur für die ACS aus *Penicillium chrysogenum* beschrieben, die neben Acetat (100%) und Propionat (48%) noch Butyrat (20%) und Valerat (7%) umsetzt und mit sehr geringen Aktivitäten noch eine Reihe weiterer organischer Säuren (Martinez-Blanco et al. 1992). Eine Rolle dieses Enzyms in der Aktivierung von Seitenketten bei der Synthese von Penicillinen durch diesen Organismus wurde diskutiert. Die breitere Substratspezifität crenarchaeeller Enzyme wurde bereits im Zusammenhang mit der ACD aus *P. aerophilum* erörtert (6.2).

In weiteren Untersuchungen könnte geklärt werden, welche physiologische Funktion die *P. aerophilum* ACS einnimmt und welche Bedeutung die hohe Substrataffinität und die breite Substratspezifität in vivo haben.

Die ACS sind, wie das Alignment in Abbildung 25 zeigt, gut konservierte Proteine und gehören zusammen mit anderen Acyl- und Aryl-CoA Synthetasen, Luciferase und Adenylierungsdomänen von nicht ribosomalen Peptidsynthetasen zur Acyladenylat/Thioesterbildenden Superfamilie. Diese Enzyme katalysieren eine Zwei-Stufen-Reaktion: In der ersten Teilreaktion wird unter Freisetzung von Pyrophosphat ein Acyl-Adenylat Intermediat gebildet. Dieses ist das Substrat der zweiten Teilreaktion, in der AMP durch CoA ersetzt und unter Freisetzung von AMP Acetyl-CoA gebildet wird (Gulick et al. 2003). Die Proteine dieser Familie haben einige konservierte Sequenzmotive gemeinsam, wobei als Konsensussequenz T[SG]-S[G]-G-[ST]-T[SE]-G[S]-X-P[M]-K-G[LF] vorgeschlagen wurde (Toh 1991; Lee et al. 2001). Die bisher einzige Kristallstruktur der ACS aus *Salmonella*

enterica hat ergeben, dass das monomere Enzym aus zwei Domänen aufgebaut ist, einer größeren N-terminalen globulären Domäne aus drei β -Faltblatt Strukturen mit den Substratbindestellen (517 Reste) und einer kleineren C-terminalen Domäne aus einem β -Faltblatt, das auf beiden Seiten von je zwei α -Helices umgeben ist (130 Reste). Diese C-terminale Domäne weist neben einigen weiteren für die Substratbindung wichtigen Resten ein für die erste Teilreaktion essentielles Lysin (K609) auf (Gulick et al. 2003).

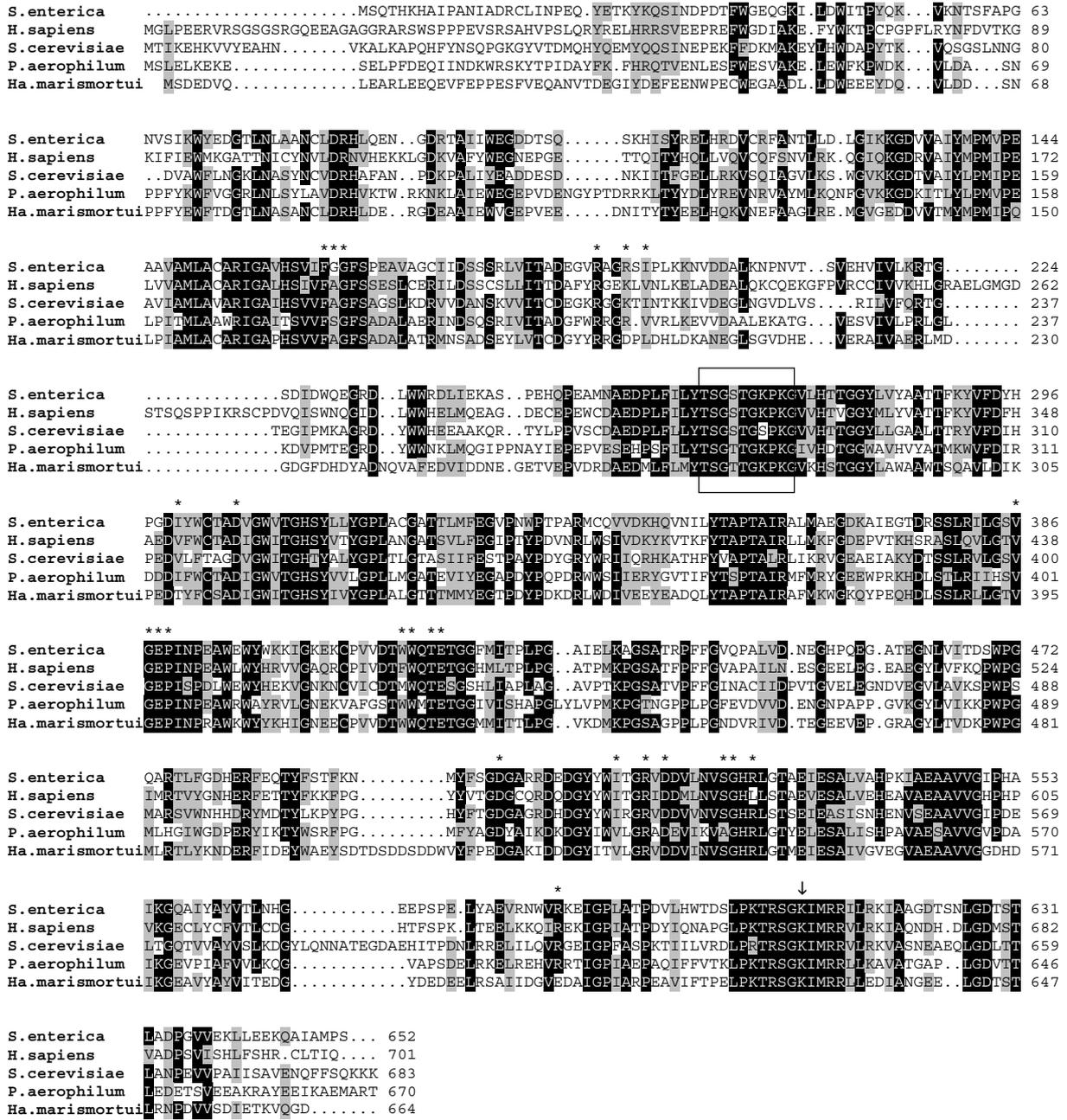


Abbildung 25 Multiples Sequenzalignment der ACS aus *Ha. marismortui* und *P. aerophilum* mit Aminosäuresequenzen von ACS aus den Domänen der Eukarya, Bacteria und Archaea. Das Alignment wurde mit ClustalX mit Standardeinstellungen (Thompson et al. 1997) erstellt. Aminosäurereste, die an der Bindung des Acyl-Adenylats und von CoA in der ACS aus *S. enterica* beteiligt sind, sind durch Sterne markiert. Der Pfeil markiert den katalytisch und regulatorisch essentiellen Lysinrest. Das ACS Signaturmotiv ist durch einen Rahmen hervorgehoben. Die NCBI Accession-Nummern: *S. enterica* 1PG4_A, *H. sapiens* NP_061147, *S. cerevisiae* S30019, *P. aerophilum* NP_560315.

Es wurde vorgeschlagen, dass das Enzym zwischen erster und zweiter Teilreaktion eine durch die Bindung von CoA hervorgerufene Konformationsänderung durchmacht, die das für die erste Teilreaktion essentielle Lysin aus dem aktiven Zentrum entfernt, und so die Thiolgruppe des CoA zum Acyladenylat-Intermediat in die richtige Position gebracht wird (Gulick et al. 2003). Das Alignment in Abbildung 25 zeigt, dass viele der für die Substratbindung verantwortlichen Reste der ACS aus *S. enterica* und v.a. das Lysin 609 auch in den anderen ACS, insbesondere denen aus *Ha. marismortui* und *P. aerophilum*, hochkonserviert sind. Dieser Lysinrest ist insofern von Bedeutung, als dass er nicht nur katalytische, sondern auch regulatorische Funktion hat. Dies wurde für die ACS aus *S. enterica* und *Saccharomyces cerevisiae* gezeigt (Starai et al. 2003; Starai et al. 2002). Bisher war für viele ACS transkriptionelle Kontrolle beschrieben worden, u.a. für die Enzyme aus *E. coli* und *B. subtilis* (Kumari et al. 2000; Grundy et al. 1994). Erst kürzlich konnte erstmals posttranslationale Regulation der ACS aus *S. enterica* und *S. cerevisiae* nachgewiesen werden. Durch Acetylierung des Lysin 609 wird das Enzym inaktiviert. Durch welchen Mechanismus diese Acetylierung erfolgt, ist noch unklar, wobei diskutiert wurde, dass die intrazelluläre Konzentration an Acetyl-CoA als Substrat für die Acetylierung eine Rolle spielen könnte (Starai et al. 2003). Dagegen konnte gezeigt werden, dass Sir2 Proteine (Sirtuine), die eine NAD⁺-abhängige Deacetylaseaktivität besitzen, für die Aktivität der ACS in vivo notwendig sind, indem sie das acetylierte Enzym deacetylieren und so aktivieren. Bisher waren als Substrate von Sirtuinen in Archaea und v.a. Eukaryonten Komponenten des Chromatins und der Transkription beschrieben. Dementsprechend war eine wichtige Funktion dieser Proteine v.a. in der Chromosomenstabilisierung, dem „gene silencing“ und der Zellalterung bekannt. Da das Lysin609 in nahezu allen Proteinen der Acyladenylat/Thioester-bildenden Superfamilie konserviert ist, wurde diskutiert, dass dies ein genereller Mechanismus sein könnte, über den diese Enzyme posttranslational reguliert werden (Starai et al. 2003; Starai et al. 2002). Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch im Genom von *P. aerophilum* zwei ORFs und in den partiell sequenzierten Genomen der extrem halophilen Archaea *Ha. marismortui* und *Hf. volcanii* je ein ORF identifiziert, die für Proteine mit jeweils 39% Identität zu Sir2-Afl aus *A. fulgidus* kodieren. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass auch in den Haloarchaea die ACS posttranslational über eine Acetylierung/Deacetylierung des Lysin609 reguliert wird. Aufgrund der physiologischen und auch biochemischen Ähnlichkeiten im Acetatstoffwechsel und den daran beteiligten Enzymen wäre es interessant, die Regulation der Enzyme von Acetatbildung und -aktivierung in halophilen Archaea, v.a. der ACS, sowohl auf transkriptioneller Ebene als auch auf posttranslationaler Ebene vergleichend zu den Bacteria, wie *E. coli*, *S. enterica* und *B. subtilis*, zu untersuchen.

Die ACS aus *Ha. marismortui* und *P. aerophilum* wurden mit ACS aus allen drei Domänen des Lebens bezüglich ihrer evolutionären Verwandtschaft untersucht. Wie der phylogenetische Stammbaum in Abbildung 26 darstellt, bilden die ausgewählten ACS eine große prokaryontische und eine große eukaryontische Abteilung. Der Stammbaum wurde mit Hilfe zweier unabhängiger Methoden, der Neighbor-Joining Methode und der Maximum-Likelihood Methode, erstellt. Beide zeigten hohe Übereinstimmungen.

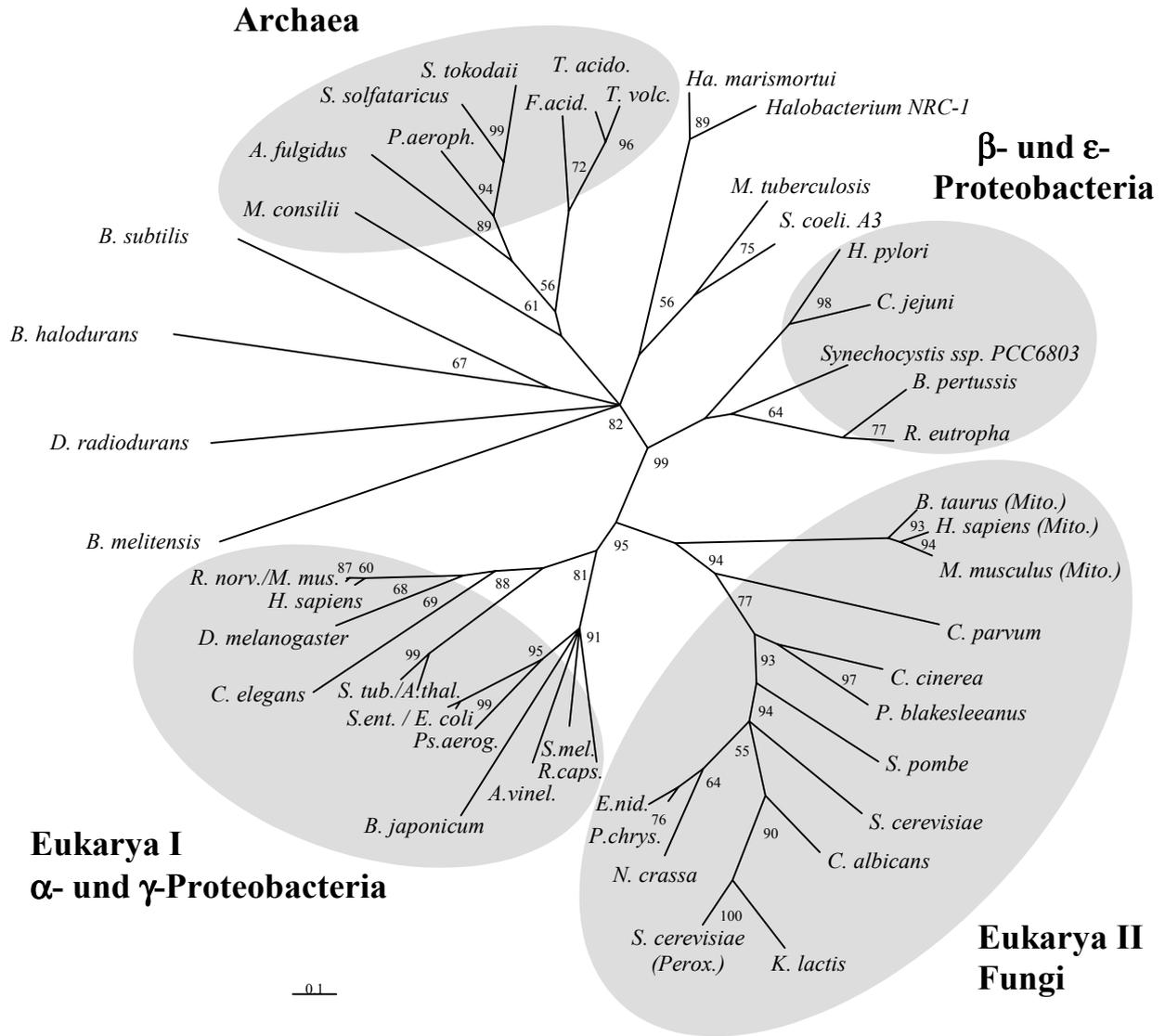


Abbildung 26 Phylogenetische Verwandtschaft von ACS aus Eukarya, Bacteria und Archaea. Die Zahlen an den Knotenpunkten sind die Bootstrap-Werte nach Maximum-Likelihood. NCBI Accession-Nummern oder die SwissProt-Nummern der Sequenzen: *A. thal.*, *Arabidopsis thaliana* NP_198504; *A. fulgidus*, *Archaeoglobus fulgidus* NP_069202; *A. vinel.*, *Azotobacter vinelandii* ZP_00091225; *B. halodurans*, *Bacillus halodurans* NP_242003, *B. subtilis*, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* NP_390846; *B. pertussis*, *Bordatella pertussis* NP_881040; *B. taurus (Mito.)*, *Bos taurus* (mitochondriale ACS) NP_777171; *B. japonicum*, *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 AAK95494; *B. melitensis*, *Brucella melitensis* 16M AAL51488; *C. elegans*, *Caenorhabditis elegans* NP_497782; *C. jejuni*, *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* str. NCTC 11168 NP_282668; *C. albicans*, *Candida albicans* CAA22000; *C. cinerea*, *Coprinopsis cinerea* CAA75613; *C. parvum*, *Cryptosporidium parvum* Q27549; *D. radiodurans*, *Deinococcus radiodurans* (strain R1) D75516; *D. melanogaster*, *Drosophila melanogaster* S52154; *E. nid.*, *Emericella nidulans* CAA34858; *E. coli*, *Escherichia coli* K12 AAC77039; *F. acid.*, *Ferroplasma acidarmanus* ZP_00000146; *Ha. marismortui*, *Haloarcula marismortui*; *Halobacterium NRC-1*, *Halobacterium sp. NRC-1* NP_279934; *H. pylori*, *Helicobacter pylori* 26695 NP_207835; *H. sapiens*, *Homo sapiens* (cytoplasmatisch ACS) NP-061147; *H. sapiens (Mito.)*, *Homo sapiens* (mitochondriale ACS) Q9NUB1; *K. lactis*, *Kluyveromyces lactis* AAC16713; *M. consilii*, *Methanosaeta consilii* AAA73007; *M. mus.*, *Mus musculus* (cytoplasmatische ACS) Q9QXG4; *M. musculus (Mito.)*, *Mus musculus* (mitochondriale ACS) NP_542142; *M. tuberculosis*, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv NP_218184; *N. crassa*, *Neurospora crassa* SYNCAA; *P. chrys.*, *Penicillium chrysogenum* JN0781; *P. blakesleeianus*,

Phycomyces blakesleeanus S46276; *Ps. aerog.*, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 AAG04276; *P. aeroph.*, *Pyrobaculum aerophilum* strain IM2 NP_560315; *R. eutropha*, *Ralstonia eutropha* P31638; *R. norv.*, *Rattus norvegicus* XP_230773; *R. caps.*, *Rhodobacter capsulatus* T03473; *S. cerevisiae*, *Saccharomyces cerevisiae* (cytoplasmatische ACS) NP_013254; *S. cerevisiae* (Perox.), *Saccharomyces cerevisiae* (peroxisomale ACS) S30019; *S. ent.*, *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* LT2 Q8ZKF6; *S. pombe*, *Schizosaccharomyces pombe* P78773; *S. mel.*, *Sinorhizobium meliloti* NP_387433; *S. tub.*, *Solanum tuberosum* CAA67130; *S. coeli. A3*, *Streptomyces coelicolor* A3(2) NP_627761; *S. solfataricus*, *Sulfolobus solfataricus* NP_344180; *S. tokodaii*, *Sulfolobus tokodaii* NP_378009; *Synechocystis* ssp. PCC6803 Q55404; *T. acido.*, *Thermoplasma acidophilum* NP_393899; *T. volc.*, *Thermoplasma volcanium* BAB60317.

In Übereinstimmung mit einer früheren Studie war die eukaryontische Gruppe in zwei Untergruppen unterteilt (Karan et al. 2001), von denen die eine v.a. die Sequenzen aus Pilzen enthielt und die zweite die aus Pflanzen und Tieren. Mit letzterer fielen auch die Sequenzen aus α - und γ -Proteobakterien zusammen. Dies wurde als Indiz dafür gewertet, dass die eukaryontischen ACS mitochondrialen oder bakteriellen Ursprungs sind (Karan et al. 2001). Dabei bleibt anzumerken, dass die mitochondrialen Enzyme aus *B. taurus*, *M. musculus* und *H. sapiens* zusammen mit der Sequenz aus dem Protisten *C. parvum* in der vorliegenden Analyse in die Pilzgruppe fallen. Während die bereits erwähnte frühere Studie nur relativ wenige prokaryontische Sequenzen berücksichtigte, konnten im Rahmen dieser Arbeit eine Reihe weiterer bakterieller und v.a. archaeeller Sequenzen in die Analyse mit einbezogen werden. Es ergaben sich innerhalb der prokaryontischen Abteilung eine separate bakterielle Gruppe aus β - und ϵ -proteobakteriellen Sequenzen und einer cyanobakteriellen Sequenz sowie eine eigenständige archaeelle Gruppe, zu der auch die ACS aus *P. aerophilum* gehörte. Dagegen fielen die halophilen Sequenzen nicht in diese Gruppe, was eventuell mit der halophilen Adaptierung der Enzyme und damit verbundenen Besonderheiten in der Aminosäurezusammensetzung zusammenhängen könnte. Mit diesem phylogenetischen Stammbaum konnte erstmals gezeigt werden, dass die archaeellen ACS eine eigenständige Gruppe bilden, die den bakteriellen ACS näher steht als den eukaryontischen.

7 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
- Aitken DM, Brown AD (1969) Citrate and glyoxylate cycles in the halophile *Halobacterium salinarium*. *Biochim.Biophys.Acta* 177:351-354
- Altekar W, Rangaswamy V (1990) Indication of a modified EMP pathway for fructose breakdown in a halophilic archaeobacterium. *FEMS Microbiol.Lett.* 69:139-143
- Altekar W, Rangaswamy V (1992) Degradation of endogenous fructose during catabolism of sucrose and mannitol in halophilic archaeobacteria. *Arch.Microbiol.* 158:356-363
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J.Mol.Biol.* 215:403-410
- Andersen KB, von Meyenburg K (1980) Are growth rates of *Escherichia coli* in batch cultures limited by respiration? *J.Bacteriol.* 144:114-123
- Arahal DR, Dewhirst FE, Paster BJ, Volcani BE, Ventosa A (1996) Phylogenetic analyses of some extremely halophilic archaea isolated from Dead Sea water, determined on the basis of their 16S rRNA sequences. *Appl.Environ.Microbiol.* 62:3779-3786
- Blecher O, Goldman S, Mevarech M (1993) High expression in *Escherichia coli* of the gene coding for dihydrofolate reductase of the extremely halophilic archaeobacterium *Haloferax volcanii*. Reconstitution of the active enzyme and mutation studies. *Eur.J Biochem.* 216:199-203
- Bode C, Goebell H, Stahler E (1968) [Elimination of errors caused by turbidity in the determination of protein by the biuret method] Zur Eliminierung von Trübungsfehlern bei der Eiweißbestimmung mit der Biuretmethode. *Z.Klin.Chem.Klin.Biochem.* 6:418-422
- Bonete MJ, Pire C, LLorca FI, Camacho ML (1996) Glucose dehydrogenase from the halophilic Archaeon *Haloferax mediterranei*: enzyme purification, characterisation and N-terminal sequence. *FEBS Lett.* 383:227-229
- 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
- Brown TDK, Jones-Mortimer MC, Kornberg HL (1977) The enzymic interconversion of acetate and acetyl-coenzyme A in *Escherichia coli*. *J.Gen.Microbiol.* 102:327-336
- Burggraf S, Stetter KO, Rouvier P, Woese CR (1991) *Methanopyrus kandleri*: an archaeal methanogen unrelated to all other known methanogens. *System.Appl.Microbiol.* 14:346-351
- Camacho M, Rodriguez-Arnedo A, Bonete MJ (2002) NADP-dependent isocitrate dehydrogenase from the halophilic archaeon *Haloferax volcanii*: cloning, sequence determination and overexpression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol.Lett.* 209:155-160
- Cendrin F, Chroboczek J, Zaccai G, Eisenberg H, Mevarech M (1993) Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of the gene coding for malate dehydrogenase of the extremely halophilic archaeobacterium *Haloarcula marismortui*. *Biochemistry* 32:4308-4313
- Connaris H, Chaudhuri JB, Danson MJ, Hough DW (1999) Expression, reactivation, and purification of enzymes from *Haloferax volcanii* in *Escherichia coli*. *Biotechnol.Bioeng.* 64:38-45

- Cronan JE, LaPorte D (1996) Tricarboxylic Acid Cycle and Glyoxylate Bypass. In: Neidhardt, F. C. et al. (eds) *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd edn. American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp 206-216
- Danson MJ (1993) Central metabolism of the archaea. In: Kates, M. (ed) *The Biochemistry of Archaea (Archaeobacteria)*. Elsevier Science Publishers B. V., pp 1-24
- De Rosa M, Gambacorta A (1988) The Lipids of Archaeobacteria. *Prog.Lipid Res.* 27:153-175
- 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
- Decker K (1986) In: Bergmeyer, H.-U. (ed) *Methods of Enzymatic Analysis*, Third Edition edn. Verlag Chemie, Weinheim.
- Decker K, Jungermann K, Thauer RK (1970) Energy production in anaerobic organisms. *Angew.Chem.Int.Ed.Engl.* 9:138-158
- Dorn M, Andreesen JR, Gottschalk G (1978) Fermentation of fumarate and L-malate by *Clostridium formicoaceticum*. *J.Bacteriol.* 133:26-32
- Dorr C, Zaparty M, Tjaden B, Brinkmann H, Siebers B (2003) The hexokinase of the hyperthermophile *Thermoproteus tenax*: ATP-dependent hexokinases and ADP-dependent glucokinases, two alternatives for glucose phosphorylation in Archaea. *J.Biol.Chem.*
- El-Mansi EM, Holms WH (1989) Control of carbon flux to acetate excretion during growth of *Escherichia coli* in batch and continuous cultures. *J.Gen.Microbiol.* 135:2875-2883
- Ferry JG (1992) Methane from acetate. *J.Bacteriol.* 174:5489-5495
- Ferry JG (1997) Enzymology of the fermentation of acetate to methane by *Methanosarcina thermophila*. *Biofactors* 6:25-35
- Fitz-Gibbon ST, Ladner H, Kim UJ, Stetter KO, Simon MI, Miller JH (2002) Genome sequence of the hyperthermophilic crenarchaeon *Pyrobaculum aerophilum*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 99:984-989
- Fox DK, Roseman S (1986) Isolation and characterization of homogeneous acetate kinase from *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *J.Biol.Chem.* 261:13487-13497
- 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
- Frenkel EP, Kitchens RL (1977) Purification and properties of acetyl coenzyme A synthetase from bakers' yeast. *J.Biol.Chem.* 252:504-507
- Gebhard S (2002) Zuckerstoffwechsel von hyperthermophilen Archaea: Charakterisierung der Glycerinaldehyd-3-Phosphat: Ferredoxin Oxidoreduktase aus *Archaeoglobus fulgidus* und Enzyme des Glucoseabbaus in *Pyrobaculum aerophilum*. Diplomarbeit, Institut für Allgemeine Mikrobiologie, Universität Kiel.

- Glasmacher 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*, 2nd edn. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Grant WD, Kamekura M, McGenity TJ, Ventosa A (2001) Class III. Halobacteria class. nov. In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd edn. Springer-Verlag, New York, pp 294-334
- Grayling RA, Sandman K, Reeve JN (1996) Histones and chromatin structure in hyperthermophilic *Archaea*. *FEMS Microbiol.Rev.* 18:203-213
- Grundy FJ, Turinsky AJ, Henkin TM (1994) Catabolite regulation of *Bacillus subtilis* acetate and acetoin utilization genes by CcpA. *J.Bacteriol.* 176:4527-4533
- Grundy FJ, Waters DA, Allen SH, Henkin TM (1993) Regulation of the *Bacillus subtilis* acetate kinase gene by CcpA. *J.Bacteriol.* 175:7348-7355
- Gulick AM, Starai VJ, Horswill AR, Homick KM, Escalante-Semerena JC (2003) The 1.75 Å crystal structure of acetyl-CoA synthetase bound to adenosine-5'-propylphosphate and coenzyme A. *Biochemistry* 42:2866-2873
- Hansen T, Reichstein B, Schmid R, Schönheit P (2002) The first archaeal ATP-dependent glucokinase, from the hyperthermophilic crenarchaeon *Aeropyrum pernix*, represents a monomeric, extremely thermophilic ROK glucokinase with broad hexose specificity. *J Bacteriol.* 184:5955-5965
- Hartmann R, Sickinger HD, Oesterhelt D (1980) Anaerobic growth of halobacteria. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 77:3821-3825
- Haseltine C, Rolfsmeier M, Blum P (1996) The glucose effect and regulation of alpha-amylase synthesis in the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *J.Bacteriol.* 178:945-950
- Heider J, Mai X, Adams MWW (1996) Characterization of 2-ketoisovalerate ferredoxin oxidoreductase, a new and reversible coenzyme A-dependent enzyme involved in peptide fermentation by hyperthermophilic archaea. *J.Bacteriol.* 178:780-787
- Hess D, Krüger K, Knappik A, Palm P, Hensel R (1995) Dimeric 3-phosphoglycerate kinases from hyperthermophilic Archaea - Cloning, sequencing and expression of the 3-phosphoglycerate kinase gene of *Pyrococcus woesei* in *Escherichia coli* and characterization of the protein. Structural and functional comparison with the 3-phosphoglycerate kinase of *Methanothermus fervidus*. *Eur.J.Biochem.* 233:227-237
- Hezayen FF, Tindall BJ, Steinbuchel A, Rehm BH (2002) Characterization of a novel halophilic archaeon, *Halobiforma haloterrestriis* gen. nov., sp. nov., and transfer of *Natronobacterium nitratireducens* to *Halobiforma nitratireducens* comb. nov. *Int.J.Syst.Evol.Microbiol.* 52:2271-2280
- Hochstein LI (1978) Carbohydrate metabolism in the extremely halophilic bacteria: The role of glucose in the regulation of citrate synthase activity. In: Caplan SR, Ginzburg M (eds.) *Energetics and Structure of Halophilic Microorganisms*, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, pp 397-412.
- Hochstein LI (1988) The physiology and metabolism of the extremely halophilic bacteria. In: Rodriguez-Valera, F. (ed) *Halophilic Bacteria*, 1 edn. CRC PRESS, pp 67-83

- Ishikawa M, Fujino T, Sakashita H, Morikawa K, Yamamoto T (1995) Kinetic properties and structural characterization of highly purified acetyl-CoA synthetase from bovine heart and tissue distribution of the enzyme in rat tissues. *Tohoku J.Exp.Med.* 175:55-67
- Jetten MS, Stams AJ, Zehnder AJ (1989) Isolation and characterization of acetyl-coenzyme A synthetase from *Methanotherix soehngenii*. *J.Bacteriol.* 171:5430-5435
- Jetten MSM, Stams AJM, Zehnder AJB (1992) Methanogenesis from acetate: a comparison in *Methanotherix soehngenii* and *Methanosarcina* spp. *FEMS Microbiol.Rev.* 88:181-198
- 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
- Kaine BP, Gupta R, Woese CR (1983) Putative introns in tRNA genes of prokaryotes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 80:3309-3312
- Kamekura M (1998) Diversity of extremely halophilic bacteria. *Extremophiles* 2:289-295
- Kandler O, König H (1985) Cell envelopes of archaea. In: Woese, C. R. and Wolfe, R. S. (eds) *The Bacteria*. Academic Press, New York, pp 413-457
- Kandler O, König H (1998) Cell wall polymers in Archaea (Archaeobacteria). *Cell Mol.Life Sci.* 54:305-308
- Karan D, David JR, Capy P (2001) Molecular evolution of the AMP-forming Acetyl-CoA synthetase. *Gene* 265:95-101
- Kenealy WR, Zeikus JG (1982) One-carbon metabolism in methanogens: evidence for synthesis of a two-carbon cellular intermediate and unification of catabolism and anabolism in *Methanosarcina barkeri*. *J.Bacteriol.* 151:932-941
- Kerscher L, Oesterhelt D (1981) Purification and properties of two 2-oxoacid: ferredoxin oxidoreductases from *Halobacterium halobium*. *Eur.J.Biochem.* 116:587-594
- Kevbrina MV, Plakunov VK (1992) Acetate metabolism in *Natronococcus occultus*. *Mikrobiologia* 61:770-775
- Kim YS, An JH, Yang BH, Kim KW (1996) Properties of Acetyl-CoA Synthetase from *Pseudomonas fluorescens*. *J.Biochem.Mol.Biol.* 29:277-285
- Kumari S et al. (2000) Regulation of acetyl coenzyme A synthetase in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* 182:4173-4179
- Kumari S, Tishel R, Eisenbach M, Wolfe AJ (1995) Cloning, characterization, and functional expression of *acs*, the gene which encodes acetyl coenzyme A synthetase in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* 177:2878-2886
- 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
- Kunst A, Draeger B, Ziegenhorn J (1986) D-Glucose. In: Bergmeyer, H.-U. (ed) *Methods of Enzymatic Analysis*, Third Edition edn. Verlag Chemie, Weinheim, pp 163-172

- Kushner DJ (1985) The Halobacteriaceae. In: Sokatch, J. R. and Ornston, L. N. (eds) The Bacteria. Academic Press, Orlando, San Diego, New York, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo, pp 173-214
- Labes A, Schönheit P (2001) Sugar utilization in the hyperthermophilic, sulfate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus* strain 7324: starch degradation to acetate and CO₂ via a modified Embden-Meyerhof pathway and acetyl-CoA synthetase (ADP-forming) [published erratum appears in Arch.Microbiol. 2001 177: 431-432]. Arch.Microbiol. 176:329-338
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685
- Lamble HJ, Heyer NI, Bull SD, Hough DW, Danson MJ (2003) Metabolic pathway promiscuity in the archaeon *Sulfolobus solfataricus* revealed by studies on glucose dehydrogenase and 2-keto-3-deoxygluconate aldolase. J.Biol.Chem. 278:34066-34072
- Langworthy TA, Pond JL (1986) Archaeobacterial ether lipids and chemotaxonomy. System.Appl.Microbiol. 7:253-257
- Lanyi JK (1993) Proton translocation mechanism and energetics in the light- driven pump bacteriorhodopsin. Biochim.Biophys.Acta 1183:241-261
- Lee HY, Na KB, Koo HM, Kim YS (2001) Identification of active site residues in *Bradyrhizobium japonicum* acetyl-CoA synthetase. J.Biochem.(Tokyo) 130:807-813
- Lee TK, Lee WS (1996) Diauxic growth in rice suspension cells grown on mixed carbon sources of acetate and glucose. Plant. Physiol. 110:465-470
- Mai X, Adams MW (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
- Martinez-Blanco H et al. (1992) Isolation and characterization of the acetyl-CoA synthetase from *Penicillium chrysogenum*. Involvement of this enzyme in the biosynthesis of penicillins. J.Biol.Chem. 267:5474-5481
- McGenity TJ, Grant WD (1995) Transfer of *Halobacterium saccharovorum*, *Halobacterium sodomense*, *Halobacterium trapanicum* NRC 34021 and *Halobacterium lacusprofundi* to the Genus *Halorubrum* gen. nov., as *Halorubrum saccharovorum* comb. nov., *Halorubrum sodomense* comb. nov., *Halorubrum trapanicum* comb. nov., and *Halorubrum lacusprofundi* comb. nov. System.Appl.Microbiol. 18:237-243
- Montero CG, Ventosa A, Rodriguez-Valera F, Kates M, Moldoveanu N, Ruiz-Berraquero F (1989) *Halococcus saccharolyticus* sp. nov., a new species of extremely halophilic non-alkaliphilic cocci. System.Appl.Microbiol. 12:167-171

- Montrone M, Marwan W, Grunberg H, Musseleck S, Starostzik C, Oesterhelt D (1993) Sensory rhodopsin-controlled release of the switch factor fumarate in *Halobacterium salinarium*. Mol.Microbiol. 10:1077-1085
- Mukohata Y (1994) Comparative studies on ion pumps of the bacterial rhodopsin family. Biophys.Chem. 50:191-201
- Mukohata Y, Ihara K, Tamura T, Sugiyama Y (1999) Halobacterial rhodopsins. J.Biochem.(Tokyo) 125:649-657
- Mullakhanbhai MF, Larsen H (1975) *Halobacterium volcanii* spec. nov., a Dead Sea halobacterium with a moderate salt requirement. Arch.Microbiol. 104:207-214
- Müller M (1988) Energy metabolism without mitochondria. Annu.Rev.Microbiol. 42:465-488
- 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
- Musfeldt M, Schönheit P (2002) Novel type of ADP-forming acetyl coenzyme A synthetase in hyperthermophilic archaea: heterologous expression and characterization of isoenzymes from the sulfate reducer *Archaeoglobus fulgidus* and the methanogen *Methanococcus jannaschii*. J.Bacteriol. 184:636-644
- 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
- O'Sullivan J, Ettliger L (1976) Characterization of the acetyl-CoA synthetase of *Acetobacter aceti*. Biochim.Biophys.Acta 450:410-417
- Oberlies G, Fuchs G, Thauer RK (1980) Acetate thiokinase and the assimilation of acetate in *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Arch.Microbiol. 128:248-252
- Oh MK, Rohlin L, Kao KC, Liao JC (2002) Global expression profiling of acetate-grown *Escherichia coli*. J.Biol.Chem. 277:13175-13183
- Oren A (1991) Anaerobic growth of halophilic archaeobacteria by reduction of formate. J.Gen.Microbiol. 137:1387-1390
- Oren A (1994) The ecology of the extremely halophilic archaea. FEMS Microbiol.Rev. 13:415-439
- Oren A (1995) Uptake and turnover of acetate in hypersaline environments. FEMS Microbiol.Ecol. 18:75-85
- Oren A, Eleri R, Watanabe S, Ihara K, Corcelli A (2002) *Halomicrobium mukohataei* gen. nov., comb. nov., and emended description of *Halomicrobium mukohataei*. Int.J.Syst.Evol.Microbiol. 52:1831-1835
- Oren A, Ginzburg M, Ginzburg BZ, Hochstein LI, Volcani BE (1990) *Haloarcula marismortui* (Volcani) sp. nov., nom. rev., an extremely halophilic bacterium from the Dead Sea. Int.J.Syst.Bacteriol. 40:209-210
- Oren A, Gurevich P (1995) Isocitrate lyase activity in halophilic archaea. FEMS Microbiol.Lett. 130:91-95

- Oren A, Lau PP, Fox GE (1988) The taxonomic status of "*Halobacterium marismortui*" from the Dead Sea: a comparison with *Halobacterium vallismortis*. *Syst.Appl.Microbiol.* 10:251-258
- Pire C, Esclapez J, Ferrer J, Bonete MJ (2001) Heterologous overexpression of glucose dehydrogenase from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*, an enzyme of the medium chain dehydrogenase/reductase family. *FEMS Microbiol.Lett.* 200:221-227
- Presecan-Siedel E et al. (1999) Catabolite regulation of the pta gene as part of carbon flow pathways in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 181:6889-6897
- Preston GG, Wall JD, Emerich DW (1990) Purification and properties of acetyl-CoA synthetase from *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids. *Biochem.J.* 267:179-183
- Rawal N, Kelkar SM, Altekar W (1988) Alternative routes of carbohydrate metabolism in halophilic archaeobacteria. *Indian J.Biochem.Biophys.* 25:674-686
- 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
- Reinscheid DJ, Schnicke S, Rittmann D, Zahn U, Sahm H, Eikmanns BJ (1999) Cloning, sequence analysis, expression and inactivation of the *Corynebacterium glutamicum* pta-ack operon encoding phosphotransacetylase and acetate kinase. *Microbiology* 145:503-513
- Ruepp A, Soppa J (1996) Fermentative arginine degradation in *Halobacterium salinarium* (formerly *Halobacterium halobium*): genes, gene products, and transcripts of the arcRACB gene cluster. *J.Bacteriol.* 178:4942-4947
- Sambrook S, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2 edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
- Sanchez LB, Galperin MY, Muller M (2000) Acetyl-CoA synthetase from the amitochondriate eukaryote *Giardia lamblia* belongs to the newly recognized superfamily of acyl-CoA synthetases (Nucleoside diphosphate-forming). *J.Biol.Chem.* 275:5794-5803
- Sanchez LB, Morrison HG, Sogin ML, Müller 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 F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 74:5463-5467
- Schäfer T, Schönheit P (1991) Pyruvate metabolism of the hyperthermophilic archaeobacterium *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
- Schmidt HA, Strimmer K, Vingron M, von Haeseler A (2002) TREE-PUZZLE: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing. *Bioinformatics* 18:502-504

- Schönheit P, Schäfer T (1995) Metabolism of hyperthermophiles. *World J.Microbiol.Biotechnol.* 11:26-57
- Schut GJ, Brehm SD, Datta S, Adams MW (2003) Whole-genome DNA microarray analysis of a hyperthermophile and an archaeon: *Pyrococcus furiosus* grown on carbohydrates or peptides. *J. Bacteriol.* 185:3935-3947
- 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
- Serrano JA, Bonete MJ (2001) Sequencing, phylogenetic and transcriptional analysis of the glyoxylate bypass operon (ace) in the halophilic archaeon *Haloferax volcanii*. *Biochim.Biophys.Acta* 1520:154-162
- Serrano JA, Camacho M, Bonete MJ (1998) Operation of glyoxylate cycle in halophilic archaea: presence of malate synthase and isocitrate lyase in *Haloferax volcanii*. *FEBS Lett.* 434:13-16
- Shieh JS, Whitman WB (1987) Pathway of acetate assimilation in autotrophic and heterotrophic methanococci. *J.Bacteriol.* 169:5327-5329
- Shima S, Thauer RK, Ermler U, Durchschlag H, Tziatzios C, Schubert D (2000) A mutation affecting the association equilibrium of formyltransferase from the hyperthermophilic *Methanopyrus kandleri* and its influence on the enzyme's activity and thermostability. *Eur.J.Biochem.* 267:6619-6623
- Shima S et al. (1998) Lyotropic-salt-induced changes in monomer/dimer/tetramer association equilibrium of formyltransferase from the hyperthermophilic *Methanopyrus kandleri* in relation to the activity and thermostability of the enzyme. *Eur.J.Biochem.* 258:85-92
- Smith LD, Budgen N, Bungard SJ, Danson MJ, Hough DW (1989) Purification and characterization of glucose dehydrogenase from the thermoacidophilic archaebacterium *Thermoplasma acidophilum*. *Biochem.J.* 261:973-977
- Soppa J, Duschl J, Oesterhelt D (1993) Bacterioopsin, haloopsin, and sensory opsin I of the halobacterial isolate *Halobacterium* sp. strain SG1: three new members of a growing family. *J. Bacteriol.* 175:2720-2726
- 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
- Starai VJ, Celic I, Cole RN, Boeke JD, Escalante-Semerena JC (2002) Sir2-dependent activation of acetyl-CoA synthetase by deacetylation of active lysine. *Science* 298:2390-2392
- Starai VJ, Takahashi H, Boeke JD, Escalante-Semerena JC (2003) Short-chain fatty acid activation by acyl-coenzyme A synthetases requires SIR2 protein function in *Salmonella enterica* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 163:545-555
- Stein DB, Searcy DG (1978) Physiologically important stabilization of DNA by a prokaryotic histone-like protein. *Science* 202:219-221
- Stoeckenius W, Bogomolni RA (1982) Bacteriorhodopsin and related pigments of halobacteria. *Annu.Rev.Biochem.* 51:587-616
- Tauchert K, Jahn A, Oelze J (1990) Control of diauxic Growth of *Azotobacter vinelandii* on Acetate and Glucose. *J.Bacteriol.* 172:6447-6451

- Teh YL, Zinder SH (1992) Acetyl-coenzyme A synthetase in the thermophilic, acetate-utilizing methanogen *Methanothermobacter* sp. strain CALS-1. FEMS Microbiol.Lett. 98:1-8
- Thauer RK (1988) Citric-acid cycle, 50 years on. Modifications and an alternative pathway in anaerobic bacteria. Eur.J.Biochem. 176:497-508
- Thauer RK, Jungermann K, Decker K (1977) Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. Bacteriol.Rev. 41:100-180
- Thauer RK, Möller-Zinkhan D, Spormann AM (1989) Biochemistry of acetate catabolism in anaerobic chemotrophic bacteria. Annu.Rev.Microbiol. 43:43-67
- Thomm M (1996) Archaeal transcription factors and their role in transcription initiation. FEMS Microbiol.Rev. 18:159-171
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. 25:4876-4882
- Tindall BJ (1992) The Family Halobacteriaceae. In: Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., and Schleifer, K. H. (eds) The Prokaryotes. A Handbook of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications, 2nd edn. Springer-Verlag, New York, pp 768-808
- Tobisch S, Zuhlke D, Bernhardt J, Stulke J, Hecker M (1999) Role of CcpA in regulation of the central pathways of carbon catabolism in *Bacillus subtilis*. J.Bacteriol. 181:6996-7004
- Toh H (1991) Sequence analysis of firefly luciferase family reveals a conservative sequence motif. Protein Seq.Data Anal. 4:111-117
- Tomlinson GA, Hochstein LI (1972a) Isolation of carbohydrate-metabolizing, extremely halophilic bacteria. Can.J.Microbiol. 18:698-701
- Tomlinson GA, Hochstein LI (1972b) Studies on acid production during carbohydrate metabolism by extremely halophilic bacteria. Can.J.Microbiol. 18:1973-1976
- Tomlinson GA, Hochstein LI (1976) *Halobacterium saccharovorum* sp. nov., a carbohydrate-metabolizing, extremely halophilic bacterium. Can.J.Microbiol. 22:587-591
- Tomlinson GA, Jahnke LL, Hochstein LI (1986) *Halobacterium denitrificans* sp. nov., an extremely halophilic denitrifying bacterium. Int.J.Syst.Bacteriol. 36:66-70
- 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
- Tor JM, Kashefi K, Lovley DR (2001) Acetate oxidation coupled to Fe(III) reduction in hyperthermophilic microorganisms. Appl.Enviro.Microbiol. 67:1363-1365
- Torreblanca M, Rodriguez-Valera F, Juez G, Ventosa A, Kamekura M, Kates M (1986) Classification of non-alkaliphilic halobacteria based on numerical taxonomy and polar lipid composition, and description of *Haloarcula* gen. nov. and *Haloferax* gen. nov. System.Appl.Microbiol. 8:89-99
- Uhrigshardt H, Walden M, John H, Petersen A, Anemuller S (2002) Evidence for an operative glyoxylate cycle in the thermoacidophilic crenarchaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. FEBS Lett. 513:223-229

- Verhees CH et al. (2003) The unique features of glycolytic pathways in Archaea. *Biochem.J.* 375:231-246
- Vieille C, Zeikus GJ (2001) Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 65:1-43
- Völkl P et al. (1993) *Pyrobaculum aerophilum* sp. nov., a novel nitrate-reducing hyperthermophilic archaeum. *Appl.Environ.Microbiol.* 59:2918-2926
- Vreeland RH, Straight S, Krammes J, Dougherty K, Rosenzweig WD, Kamekura M (2002) *Halosimplex carlsbadense* gen. nov., sp. nov., a unique halophilic archaeon, with three 16S rRNA genes, that grows only in defined medium with glycerol and acetate or pyruvate. *Extremophiles* 6:445-452
- Wendisch VF, de Graaf AA, Sahm H, Eikmanns BJ (2000) Quantitative determination of metabolic fluxes during cointilization of two carbon sources: comparative analyses with *Corynebacterium glutamicum* during growth on acetate and/or glucose. *J. Bacteriol.* 182:3088-3096
- 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 Eucarya. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 87:4576-4579
- Woese CR, Olsen GJ (1986) Archaeobacterial phylogeny: perspectives on the urkingdom. *System.Appl.Microbiol.* 7:161-177
- 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
- Wood AP, Kelly DP (1977) Heterotrophic growth of *Thiobacillus* A2 on sugars and organic acids. *Arch.Microbiol.* 113:257-264
- 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
- Zaigler A, Schuster SC, Soppa J (2003) Construction and usage of a onefold-coverage shotgun DNA microarray to characterize the metabolism of the archaeon *Haloferax volcanii*. *Mol.Microbiol.* 48:1089-1105
- Zeiger CA, Randall DD (1991) Spinach leaf acetyl-coenzyme A synthetase: Purification and characterization. *Plant Physiol.* 96:382-389
- Zhang P, Ng WV and DasSarma S (2003) <http://zdna2.umbi.umd.edu> personal communication.

Anhang

Sequenz der *acd* aus *Ha. marismortui* aus contig158 (Zahlen in Klammern bezeichnen die Positionen im contig158)

1 (38212) ATGGGACGATTATCGACGTTGTTTGGCCGGAACGTGTCGACGTGGTTCGGGGCGACCGAT 60 (38271)
 1 M G R L S T L F A P E R V A V V G A T D 20

61 (38272) TCGGAGGGATCCGTCGGTCACGCGGTACCACGAACCTGCTCGATTTCGTTTACAGGGGAG 120 (38331)
 21 S E G S V G H A V T T N L L D S F T G E 40

121 (38332) GTCGTGGCCGTGAACCCGAACAAAGAGACAGTACTTGGATTGCCGTGTTACGACAACCTC 180 (38391)
 41 V V A V N P N K E T V L G L P C Y D N L 60

181 (38392) GCCCGCTGGACGACCCCGGGTCGGTCGACGTTGCCGTGTCGTCGTCGCCCGACCGGTG 240 (38451)
 61 A R L D D P G S V D V A V V V V P P T V 80

241 (38452) GCGGTTCGAGGTCATCGAGAACGCTGGGGAAGCGGTATCGAAAACGTCGTCGTCATCACC 300 (38511)
 81 A V E V I E N A G E A G I E N V V V I T 100

301 (38512) GCTGGCTTCGGTGAGACTGGCAGTGTGGGGCCGAACGTGAAAAGCGCTCCGGGAAGCG 360 (38571)
 101 A G F G E T G S D G A E R E K R L R E A 120

361 (38572) GCCAGTGAATACGACCTGAATCTGGTCGGCCGAACAGCCTCGGCGTGATGTCGACCCCC 420 (38631)
 121 A S E Y D L N L V G P N S L G V M S T P 140

421 (38632) GTCGGGCTCAACGCCACTTTCGGCAATGAGATGGCCAGCGACGGCGACATCTCCTTTATG 480 (38691)
 141 V G L N A T F G N E M A S D G D I S F M 160

481 (38692) AGCCAGTCGGGCGCGTTCATCACC CGCTGCTGGACTGGGCGCCGAGCGCGATGTCGGC 540 (38751)
 161 S Q S G A F I T A V L D W A A E R D V G 180

541 (38752) TTCAAGGACATCGTCTCGCTCGGGAACAAAGCAGTACTCGACGAGAGTGATTCGTCGCT 600 (38811)
 181 F K D I V S L G N K A V L D E S D F V A 200

601 (38812) GAGTGGGGTGACGACCTGATACTGATGTCATCTGGGCTATCTTGAGGACATCAATGAT 660 (38871)
 201 E W G D D P D T D V I L G Y L E D I N D 220

661 (38872) GGGTCCCTCGTTCGTACAGACGGCTCGTGAGGTGACACAGGAGACGCCGATTGTGCTTGTC 720 (38931)
 221 G S S F V Q T A R E V T Q E T P I V L V 240

721 (38932) AAGTCCGGCCGACGGACGCGGGTGCAGCGCGGCCGCTCCACACCCGGTGCATGGCC 780 (38991)
 241 K S G R T D A G A S A A A S H T G A M A 260

781 (38992) GGGTCGGAGCGGGCCTACGAGGACGGCTCGATAAGGCCGGAACGCTCCGCGTTGAATCT 840 (39051)
 261 G S E R A Y E A G L D K A G T L R V E S 280

841 (39052) GTGCAGAACTGTTTCGATTACGCGCAGATTCTCGCCGGCCAGCCGCTCCCGATGGAGAC 900 (39111)
 281 V Q E L F D Y A Q I L A G Q P L P D G D 300

901 (39112) GAAATCGCCATCGTCACAAACGCCGGCGTCCCGCGTGATGACGACCGACCGCTCGGC 960 (39171)
 301 E I A I V T N A G G P G V M T T D A V G 320

961 (39172) GACTCGGACCTGCAACTCGCGCAGTTCGGTGACAAGACGTTCTCCGACTCCGCGAAGAG 1020 (39231)
 321 D S D L Q L A Q F G D K T F S R L R E E 340

1021 (39232) ATGCCTGATGAGGCCAACATCTACAACCCGGTCGACATTATCGGCGATGCTCCCGCCGAG 1080 (39291)
 341 M P D E A N I Y N P V D I I G D A P A E 360

1081 (39292) CGCTTCGAGACAGCCCTCGAAACAGTCTTTCGGACGACAACGTTTCGATGGCCGTCGTC 1140 (39351)
 361 R F E T A L E T V L A D D N V S M A V V 380

1141 (39352) GTCGCCTGTCCGACCGCAGTGTCTTCCTTCGAGGAACCTCTCGAACGCATCGTCGAACAG 1200 (39411)
 381 V A C P T A V L S F E E L S E R I V E Q 400

1201 (39412) CAAGAGCAGTTCGGGAAACCGGTGCGGGCGACGCTGATGGGCGGGAAGTCGGTTGACGCT 1260 (39471)
 401 Q E Q F G K P V A A T L M G G K S V D A 420

1261 (39472) GGTGCGAACGTCCTGAGCGAAGCGGGCGTGCAGAACCTACTTCGACCCGGCCCGCGCGTC 1320 (39531)
 421 G A N V L S E A G V P N Y F D P A R A V 440

1321 (39532) GGCAGTCTGGGCGCGCTCAAGCGCTACCAGAAATCAAAGCGACGGAGTACGAGGAACCG 1380 (39591)
 441 G S L G A L K R Y R E I K A T E Y E E P 460

1381 (39592) ACGACGTTTCGACGTTGACCGCGAGCGGGCCCGGAGATACTCGAATCCGGCGCCCGGCGC 1440 (39651)
 461 T T F D V D R E R A R E I L E S G A R R 480

1441(39652) GGGTCGAACCGGCTCGGCGTGGAAGCGATGGAAGTCTTGACGCGTACGGGATTCCGACA 1500(39711)
 481 G S N R L G V E A M E L L D A Y G I P T 500
 1501(39712) CCACAGGGTGATGTCGTCTCCTCGCCCGTCGAAGCGGAGGCTGTCGCCGAGGAAATCGGC 1560(39771)
 501 P Q G D V V S S P V E A E A V A E E I G 520
 1561(39772) GACGACGTGGTGATGAAAATCGTCAGTCCGGATATCCTGCATAAGTCCGACATCGGGCGGC 1620(39831)
 521 D D V V M K I V S P D I L H K S D I G G 540
 1621(39832) GTCGAGGTCGCTGTCCCGTCGAGGAAGTTCGCGACAcCTACGAggAccTCGTCTGTCAGG 1680(39891)
 541 V E V A V P V E E V R D T Y E D L V V R 560
 1681(39892) GCACGCAACTATCAGGAAGACGCGACGATTCTTGCGGTTCAgGTACAGGAGATGGTCGAC 1740(39951)
 561 A R N Y Q E D A T I L G V Q V Q E M V D 580
 1741(39952) CTCGACAACGGCGTCGAGACGATTCTCGGGATGAACCGCGACCCGCAGTTCGGACCGTTG 1800(40011)
 581 L D N G V E T I L G M N R D P Q F G P L 600
 1801(40012) CTGTTGTTCGGTCTCGGCGGAATTTTCGTGAGGTGCTCGAAGACAACACTGTCAGTGTC 1860(40071)
 601 L L F G L G G I F V E V L E D N T V S V 620
 1861(40072) GCTCCTGTGAGCGAGACCGAGCGAAAGGGATGCTCGATGACATCGACTCTGCGCCGCTG 1920(40131)
 621 A P V S E T E A K G M L D D I D S A P L 640
 1921(40132) TTACGCGGTGCTCGGGGCCGACCCCGTCGACGAGGCCACGCTCGTTCGAGACAATCCAG 1980(40191)
 641 L R G A R G R D P V D E A T L V E T I Q 660
 1981(40192) CGGCTCTCGCAACTCGTCACTGACTTCCCCGCGATCGTGGAAGTGGACATCAACCCCTC 2040(40251)
 661 R L S Q L V T D F P A I V E L D I N P L 680
 2041(40252) GTCGCGACGCCCGACGGGGTGCAGGCGGTGACCTGCGACTCACCTCGACCAGGAGAAA 2100(40311)
 681 V A T P D G V Q A V D L R L T L D Q E K 700
 2101(40312) CTATGA 2106(40317)
 701 L * 701

Sequenz der *acs* aus *Ha. marismortui* aus contig147 (Zahlen in Klammern bezeichnen die Positionen im contig147)

1(19204) ATGTCAGATGAAGATGTCCAACCTCGAAGCACGGCTCGAAGAGCAGGAGTTTTTCGAGCCG 60(19263)
 1 M S D E D V Q L E A R L E E Q E V F E P 20

61(19264) CCGGAGTCGTTTCGTCGAGCAGGCGAACGTACCGGATGAGGGTATCTACGACGAGTTCGAG 120(19323)
21 P E S F V E Q A N V T D E G I Y D E F E 40

121(19324) GAGAACTGGCCGAGTGTCTGGGAGGGGGCCGCTGACCTTCTCGACTGGGAGGAGGAGTAC 180(19383)
41 E N W P E C W E G A A D L L D W E E E Y 60

181(19384) GATCAGGTA CTGACGACTCGAACCCGCCGTCTACGAGTGGTTCACAGACGGGACGCTA 240(19443)
61 D Q V L D D S N P P F Y E W F T D G T L 80

241(19444) AACGCCTCAGCGAACTGTCTGGACCCACCTCGACGAGCGCGGACGAAGCCGCTATC 300(19503)
81 N A S A N C L D R H L D E R G D E A A I 100

301(19504) GAGTGGGTTCGGCGAGCCAGTCGAGGAAGACAATATCACCTACACGTACGAGGAACCTCAT 360(19563)
101 E W V G E P V E E D N I T Y T Y E E L H 120

361(19564) CAGAAGGTCAACGAGTTCGCGGCCGCTGCGTGAGATGGGTGTCGGCGAAGATGATGTC 420(19623)
121 Q K V N E F A A G L R E M G V G E D D V 140

421(19624) GTGACGATGTATATGCCGATGATTCGCGAGCTTCCCATCGCCATGCTGGCCTGTGCCCGC 480(19683)
141 V T M Y M P M I P Q L P I A M L A C A R 160

481(19684) ATCGGCGCGCCCACTCCGTTGTGTTTCGCGGCTTCTCCGCGACGCGCTCGCGACCCGA 540(19743)
161 I G A P H S V V F A G F S A D A L A T R 180

541(19744) ATGAACTCCGCGACTCGGAGTATCTGGTTACTGCGACGGCTACTACCGCCGCGGCGAC 600(19803)
181 M N S A D S E Y L V T C D G Y Y R R G D 200

601(19804) CCGCTTGACCACCTCGACAAAGCCAAGGGCTGAGCGGCTTGACCACGAGGTGGAA 660(19863)
201 P L D H L D K A N E G L S G V D H E V E 220

661(19864) CGCGCCATCGTCGCCGACGGCTGATGGACGGCGACGGCTTCGACCACGACTACGCGGAC 720(19923)
221 R A I V A E R L M D G D G F D H D Y A D 240

721(19924) AATCAGGTCGCCTTCGAGGATGTCATCGACGACAACGAAGGCGAGACTGTGCAACCAGTC 780(19983)
241 N Q V A F E D V I D D N E G E T V E P V 260

781(19984) GACCGCGACGCGGAGGACATGCTGTTCTCATGTACACCTCCGGGACCACCGGAAACCA 840(20043)
261 D R D A E D M L F L M Y T S G T T G K P 280

841(20044) AAAGGCGTCAAACACTCCACCGCGGTACCTCGCCTGGGCGGCTGGACATCGCAGGCG 900(20103)
281 K G V K H S T G G Y L A W A A W T S Q A 300

901(20104) GTGCTCGACATCAAACCCGAGGACACGTACTTCTGCTCTGCCGATATCGGCTGGATTACC 960(20163)
301 V L D I K P E D T Y F C S A D I G W I T 320

961(20164) GGTCACTCCTACATCGTCTACGGCCCGCTCGCGCTCGGACGACGACGATGATGTACGAG 1020(20223)
321 G H S Y I V Y G P L A L G T T T M M Y E 340

1021(20224) GGGACCCGGACTACCCGACAAGGACCGCCTCTGGGACATCGTCGAGGAGTACGAAGCC 1080(20283)
341 G T P D Y P D K D R L W D I V E E Y E A 360

1081(20284) GACCAACTGTACACCGCGCCGACAGCTATCCGGCGTTCATGAAGTGGGGCAAACAGTAC 1140(20343)
361 D Q L Y T A P T A I R A F M K W G K Q Y 380

1141(20344) CCCGAGCAACACGACCTCTCTAGCCTGCGCCTGCTTGGCACGGTTCGGTACGCAATCAAC 1200(20403)
381 P E Q H D L S S L R L L G T V G E P I N 400

1201(20404) CCCCCTGCTGGAATGGTACTACAAACATATCGGCAACGAGGAGTGTCCCCTGTCGAC 1260(20463)
401 P R A W K W Y Y K H I G N E E C P V V D 420

1261(20464) ACCTGGTGGCAGACCGAAACCGGCGCATGATGATAACGACGTTACCCGGCGTCAAGGAC 1320(20523)
421 T W W Q T E T G G M M I T T L P G V K D 440

1321(20524) ATGAAACCGGGTTCGGCCGGCCGCTACCGGGCAACGACGTACGCATCGTCGACACC 1380(20583)
441 M K P G S A G P P L P G N D V R I V D T 460

1381(20584) GAGGGTGAGGAAGTCGAACCCGGCCGCGCTACCTGACCGTTCGACAAGCCGTGGCCC 1440(20643)
461 E G E E V E P G R A G Y L T V D K P W P 480

1441(20644) GGGATGCTCCGACGCTGTACAAGAACGACGACGTTTCATCGACGAATACTGGGCCGAG 1500(20703)
481 G M L R T L Y K N D E R F I D E Y W A E 500

1501(20704) TACTCGGATACCGATAGCGACGACTCTGACGACTGGGTGTA CTTCCTCCGAGGACGGCGCA 1560(20763)
501 Y S D T D S D D S D D W V Y F P E D G A 520

1561(20764) AAAATCGACGACGACGGCTACATCACCGTGTGGGACGGGTCGACGACGTGATCAACGTC 1620(20823)
521 K I D D D G Y I T V L G R V D D V I N V 540

1621(20824) TCCGGCCACCGTCTCGGGACGATGGAATCGAGAGCGCTATCGTCGGCGTGAAGCGGTT 1680(20883)
541 S G H R L G T M E I E S A I V G V E G V 560

1681(20884) GCCGAAGCCGCTGTCGTCGGTGGCGACCACGATATCAAGGGCGAGGCGGTGTACGCCTAC 1740(20943)
561 A E A A V V G G D H D I K G E A V Y A Y 580

1741 (20944) GTCATCACCGAGGACGGCTACGACGAGGACGAGGAACTCCGCAGTGCATTATCGACGGC 1800 (21003)
581 V I T E D G Y D E D E E L R S A I I D G 600

1801 (21004) GTCGAGGATGCTATCGGCCGATCGCGCGCCGGAAGCGGTCATCTTCACGCCCGAACTG 1860 (21063)
601 V E D A I G P I A R P E A V I F T P E L 620

1861 (21064) CCGAAGACCCGCTCCGGGAAGATCATGCGCCGCCTGCTGGAAGACATCGCCAACGGCGAG 1920 (21123)
621 P K T R S G K I M R R L L E D I A N G E 640

1921 (21124) GAACTGGGCGATACGAGTACGCTGCGAAACCCTGACGTTGTCAGTGATATCGAGACCAAG 1980 (21183)
641 E L G D T S T L R N P D V V S D I E T K 660

1981 (21184) GTCCAGGGTGACTGA 1995 (21198)
661 V Q G D * 664

Abkürzungen

ATP	Adenosintri-phosphat
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
A. bidest.	Zweifach deionisiertes Wasser
ACD	ADP-bildende Acetyl-CoA Synthetase
ACS	AMP-bildende Acetyl-CoA Synthetase
AK	Acetat Kinase
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
CoA	Coenzym A
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DTE	Dithioerythritol
DTNB	5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
h	Stunde
IPTG	Isopropylthiogalactosid
LDH	Lactat Dehydrogenase
K_m	Michaeliskonstante
MES	2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure
min	Minute
OD	Optische Dichte
ORF	Open reading frame
PCR	Polymerase chain reaction
PEP	Phosphoenolpyruvat
PK	Pyruvat Kinase
P_i	Anorganisches Phosphat
PP_i	Pyrophosphat
PTA	Phosphotransacetylase
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
TCA	Trichloroacetic acid
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
V_{max}	Maximalgeschwindigkeit des Substratumsatzes
(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Masse pro Volumen

Symbole für den Nukleinsäurecode

A	Desoxyadenosin	G	Desoxyguanosin
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

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. P. Schönheit für die Überlassung des Themas, für die Betreuung und Förderung und für hilfreiche Diskussionen.

Prof. Dr. C. Urbanke von der Medizinischen Hochschule Hannover danke ich für die analytische Ultrazentrifugation mit der ACD und mit der ACS aus *P. aerophilum*.

Herrn Dr. R. Schmidt von der Universität Osnabrück, Fachbereich Mikrobiologie, danke ich für die N-terminale Aminosäuresequenzierung der gereinigten ACS aus *Ha. marismortui*.

Herrn Dr. K. Schober von der Universität Braunschweig danke ich für die N-terminale Aminosäuresequenzierung der gereinigten ACS aus *Ha. marismortui*.

Herrn Preidel danke ich für die Massenkultivierung von *Ha. marismortui* auf Acetat sowie für einige Wachstumsversuche mit *Hc. saccharolyticus*.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern am Institut für Allgemeine Mikrobiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel möchte ich für die angenehme Zusammenarbeit danken.

Lebenslauf

Christopher Bräsen

geb. am: 18. Juli 1970

Staatsangehörigkeit: deutsch

Wohnort: Kiel

Schulbildung

1977 – 1981 Grundschule

1981 – 1990 Gymnasium

Mai 1990 Allgemeine Hochschulreife

Studium

Oktober 1991 – September 1999 Studium der Biologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Juni 1998 Diplomprüfung in den Fächern Mikrobiologie, Botanik und Biochemie

Juli 1998 – Juli 1999 Experimentelle Diplomarbeit am Institut für Allgemeine Mikrobiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. P. Schönheit mit dem Thema: „Acetat-Stoffwechsel bei aeroben Archaea: Mechanismen der Acetatbildung und Acetataktivierung bei den extrem halophilen Archaea *Halococcus saccharolyticus* und *Halorubrum saccharovororum*“.

August 1999 Beginn der experimentellen Arbeiten zu der vorliegenden Dissertation am Institut für Allgemeine Mikrobiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. P. Schönheit.

Berufstätigkeit

Oktober 1990 – August 1991 Freiwilliges soziales Jahr in der ev.-luth. St. Johannis Kirchengemeinde Neumünster

August 1992 – Oktober 1993 Zivildienst im MBK-Jugendfreizeitheim Berghof bei Detmold

Seit August 1999 wissenschaftlicher Mitarbeiter bei Prof. Dr. P. Schönheit am Institut für Allgemeine Mikrobiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.