

# **ADP-abhängige Acyl-CoA Synthetasen in Archaea, Bacteria und Eukarya:**

Charakterisierung, Funktion und Phylogenie

Dissertation

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

vorgelegt von

Marcel Clemens Schmidt

Kiel 2013

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von August 2007 bis Oktober 2012 am Institut für allgemeine Mikrobiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel im Labor von Herrn Prof. Dr. Peter Schönheit durchgeführt.

Erster Gutachter: Prof. Dr. Peter Schönheit  
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Knut J. Heller  
Tag der mündlichen Prüfung: 21.03.2013  
Zum Druck genehmigt: Kiel, den 21.03.2013

gez. Prof. Dr. Wolfgang J. Duschl, Dekan

## Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe nach den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Diese Arbeit war bislang noch nicht Bestandteil eines Prüfungsverfahrens. Andere Promotionsversuche wurden nicht unternommen.

.....

Marcel C. Schmidt

Ein Teil der während dieser Doktorarbeit erzielten Ergebnisse werden in den folgenden Artikeln zur Veröffentlichung eingereicht:

Marcel Schmidt and Peter Schönheit

Acetate-formation by the phototrophic bacterium *Chloroflexus aurantiacus* is catalysed by an ADP-forming Acetyl-CoA Synthetase

Marcel Schmidt and Peter Schönheit

Unusual ADP-forming Acyl-CoA Synthetases in the hyperthermophilic Archaea *Pyrococcus furiosus* and *Candidatus Korarchaeum cryptophilum*.

Marcel Schmidt, Christopher Bräsen, Peter Schönheit

ADP-forming Pimeloyl-CoA Synthetases and Feruloyl-CoA Synthetases in the bacteria *Ralstonia eutropha* and *Delftia acidovorans*.

# Inhalt

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Summary.....</b>	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>7</b>
3.1	Succinyl-CoA Synthetasen.....	7
3.1.1	SCS-ähnliche Acyl-CoA Synthetasen.....	8
3.2	ADP-bildende Acetyl-CoA Synthetasen.....	10
3.2.1	ACDs in Archaea.....	13
3.2.2	ACD-Homologe in Bacteria.....	17
3.2.3	ACDs in Eukarya.....	20
<b>4</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>21</b>
4.1	Spezielle Chemikalien, Enzyme und Materialien.....	21
4.2	Verwendete <i>E. coli</i> -Stämme.....	22
4.3	Verwendete Plasmidvektoren.....	22
4.4	Wachstum von <i>E. coli</i> .....	22
4.5	Synthetische Oligonucleotide.....	23
4.6	Proteinbiochemische Standardmethoden.....	24
4.6.1	Colorimetrische Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	24
4.6.2	Colorimetrische Bestimmung der Proteinkonzentration nach Biuret.....	24
4.6.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	25
4.6.4	Ultrafiltration.....	26
4.6.5	Bestimmung des nativen Molekulargewichts von Proteinen.....	26
4.7	Molekularbiologische Standardmethoden.....	26
4.7.1	Polymerase Kettenreaktion.....	26
4.7.2	Ortsspezifische Mutagenese.....	29
4.7.3	Reverse-Transkriptase PCR.....	30
4.7.4	Reinigung von PCR-Produkten und Restriktionsansätzen.....	31
4.7.5	Reinheitsanalyse, Größen- und Konzentrationsbestimmung von DNA.....	31
4.7.6	Restriktionshydrolyse von Vektoren und PCR-Produkten.....	31
4.7.7	Herstellung kompetenter Zellen.....	32
4.7.8	Ligation und Transformation von Vektoren.....	33
4.7.9	Kontrolle einer Klonierung.....	34
4.7.10	Sequenzierung.....	34
4.8	Wachstum, Zellsuspensionen und Enzymaktivität in Extrakten von <i>Chloroflexus aurantiacus</i> .....	37
4.8.1	Herstellung von Zellsuspensionen.....	39
4.8.2	Bestimmung von Acetat in Wachstumsüberständen und Zellsuspensionen.....	39
4.8.3	Bestimmung von Glucose in Wachstumsüberständen und Zellsuspensionen.....	40
4.8.4	Bestimmung von Enzymaktivitäten in Zellextrakten von <i>C. aurantiacus</i> .....	40
4.9	Reinigung der ACD aus <i>Chloroflexus aurantiacus</i> .....	41
4.10	Überexpression und Reinigung rekombinanter Proteine.....	42
4.10.1	Überexpression.....	42
4.10.2	Herstellung von zellfreien Extrakten.....	44
4.10.3	Reinigung von rekombinanten Proteinen.....	44

---

4.11	Messung von Enzymaktivitäten.....	48
4.11.1	Aktivitätsassays mit Ellmans Reagenz (Ellman-Test).....	49
4.11.2	Aktivitätsassays mit Pyruvatkinase/Lactatdehydrogenase (PK/LDH-Test).....	49
4.11.3	Aktivitätsassays mit Ferulat (Ferulat-Test).....	50
4.12	Charakterisierung rekombinanter Enzyme.....	50
4.12.1	ACD aus <i>Chloroflexus. aurantiacus</i> .....	50
4.12.2	ACDs und SCS aus <i>Ca. K. cryptophilum</i> .....	51
4.12.3	ACD aus <i>Entamoeba histolytica</i> .....	52
4.12.4	ACD aus <i>Methanosarcina mazei</i> .....	52
4.12.5	ACDs aus <i>Pyrococcus furiosus</i> .....	53
4.12.6	FSC aus <i>Delftia acidovorans</i> .....	53
4.12.7	PCSs aus <i>Ralstonia eutropha</i> .....	54
4.13	Bioinformatische Methoden.....	55
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>56</b>
5.1	Experimente zum Einfluss der Untereinheiten von ACDs aus <i>P. furiosus</i> auf Substratspektrum und Reaktionskinetik.....	57
5.2	Acyl-CoA Synthetasen in <i>Candidatus korarchaeum cryptophilum</i> .....	62
5.2.1	Charakterisierung von ACDs aus <i>Ca. K. cryptophilum</i> .....	62
5.2.2	Charakterisierung der SCS aus <i>Ca. K. cryptophilum</i> .....	71
5.3	Acetyl-CoA Synthetase aus <i>Methanosarcina mazei</i> .....	76
5.4	Acetatbildung aus Glucose in <i>Chloroflexus aurantiacus</i> .....	78
5.4.1	Wachstumsexperimente mit <i>Chloroflexus aurantiacus</i> J10-fl.....	78
5.4.2	Experimente mit Zellsuspensionen.....	79
5.4.3	Bestimmung von ACD-Aktivität in Zellextrakten.....	80
5.4.4	Reinigung der ACD aus <i>C. aurantiacus</i> und Identifizierung des codierenden Gens.....	80
5.4.5	Klonierung des <i>acd</i> -Gens, heterologe Expression und Reinigung der ACD.....	81
5.4.6	Biochemische Charakterisierung der rekombinanten ACD.....	82
5.4.7	Nachweis des Transkripts von <i>Caur_3920</i> .....	85
5.5	Feruloyl-CoA Synthetase (FCS) in <i>Delftia acidovorans</i> .....	87
5.6	Pimeloyl-CoA Synthetasen in <i>Ralstonia eutropha</i> .....	91
5.6.1	Charakterisierung von PCS aus <i>R. eutropha</i> .....	91
5.6.2	Aktivitätstests mit RaPCS1-Mutanten aus <i>R. eutropha</i> .....	95
5.7	Acetyl-CoA Synthetase in <i>Entamoeba histolytica</i> .....	97
<b>6</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>100</b>
6.1	Rolle der ACDs in Archaea.....	101
6.2	ACD in Eukarya.....	108
6.3	ACD-Homologe in Bacteria.....	110
6.4	Funktion von ACD-Homologen in den drei Domänen des Lebens.....	123
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>126</b>
	<b>Anhang</b> .....	<b>134</b>
	<b>Abkürzungen</b> .....	<b>136</b>
	<b>Danksagung</b> .....	<b>139</b>
	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>140</b>

# 1 Zusammenfassung

ADP-bildende Acetyl-CoA Synthetasen (ACD) gehören wie die Succinyl-CoA Synthetasen (SCS) zur Proteinfamilie der NDP-bildenden Acyl-CoA Synthetasen. Beide Enzyme sind ubiquitär in allen drei Domänen des Lebens vorhanden und katalysieren die NDP- und  $P_i$ -abhängige Umsetzung von Acyl-CoA Estern (Acetyl-CoA bzw. Succinyl-CoA) zu den korrespondierenden Säuren unter der Bildung von NTP über Substratstufenphosphorylierung.



Die ACD-Reaktion wurde erstmals in dem Acetat bildenden Protisten *Entamoeba histolytica* beschrieben, nicht aber charakterisiert. Erste detaillierte Analysen von ACDs in Prokaryoten wurden in dem hyperthermophilen Archaeon *Pyrococcus furiosus* durchgeführt und dabei zwei  $\alpha_2\beta_2$ -heterotetramere ACD-Isoenzyme - ACDI und ACDII - identifiziert, die sich hinsichtlich ihres Substratspektrums und ihrer kinetischen Konstanten unterscheiden. Ein weiteres ACD-Isoenzym wurde in *Thermococcus kodakaraensis* charakterisiert, welches mit hoher Effizienz Succinat umsetzt. Es ist bisher nicht bekannt, welche Untereinheit in ACDs die Substratspezifität determiniert. Inzwischen wurde die ACD in allen untersuchten Acetat bildenden Archaea identifiziert und eine Funktion bei der Säurebildung während des Kohlenhydrat- und Peptidabbaus wurde nachgewiesen. Kürzlich wurden auch im Genom des Korarchaeoten *Candidatus Korarchaeum cryptophilum*, einem sehr ursprünglichen Organismus, vier ACD-Homologe und ein SCS-Homolog identifiziert, deren Funktion bislang unklar ist. Auch in einigen Acetat bildenden Bakterien, wie z.B. *Chloroflexus aurantiacus*, finden sich Gene für ACDs, deren Funktion aber unbekannt ist. In anderen Bakterien, wie *Pseudomonas mendocina* und *Delftia acidovorans*, weisen funktionelle Analysen darauf hin, dass ACD-Homologe, anders als in Archaea, an der Aktivierung bestimmter Säuren wie Pimelat und Ferulat beteiligt sind. Je nach Substrat werden diese Enzyme als Pimeloyl-CoA Synthetase (PCS) oder als Feruloyl-CoA Synthetase (FCS) bezeichnet. Zu diesen Enzymen liegen nur wenige biochemische Daten vor. Insbesondere wurde bislang noch keine FCS biochemisch charakterisiert. In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle und Funktion von Acyl-CoA Synthetasen in den drei Domänen des Lebens untersucht.

## ACD in Archaea.

*ACD in P. furiosus.* Es sollte geprüft werden, ob *P. furiosus* ein ACD-Isoenzym enthält, das effizient Succinat umsetzt. ORF Pf\_0233 und Pf\_1837 wurden kloniert und heterolog in *E. coli* exprimiert. Das gereinigte, rekonstituierte ACD-Isoenzym zeigte eine siebenfach höhere Aktivität mit Succinat als mit Acetat, was das Enzym als ACD<sub>succ</sub> klassifiziert. Die ACD könnte daher, wie für *T. kodakaraensis* gezeigt, am Abbau von Glutamat zu Succinat

beteiligt sein. Durch Erstellung chimärer ACDs aus den Untereinheiten zweier ACD-Isoenzyme sollte der Einfluss der Untereinheiten auf die Substratspezifität von ACDs untersucht werden. Mit je einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit von ACDI und ACD<sub>succ</sub> wurden vier aktive  $\alpha_2\beta_2$ -heterotetramere Enzyme rekonstituiert und hinsichtlich ihres Substratspektrums analysiert. Eine Chimäre aus ACD<sub>succ</sub> $\alpha$  und ACIDI $\beta$  ergab ein zur ACD<sub>succ</sub> identisches Substratspektrum, während eine Kombination der ACIDI $\alpha$  mit der  $\beta$ -Untereinheit der ACD<sub>succ</sub> ein Substratspektrum wie die ACDI zeigte. Die Ergebnisse der Untersuchungen der ACD-Chimären weisen darauf hin, dass das Substratspektrum der ACDs in *P. furiosus* durch die  $\alpha$ -Untereinheit determiniert wird.

*ACDs und SCS in Ca. K. cryptophilum.* Im Genom des hyperthermophilen Korarchaeoten *Ca K. cryptophilum*, der zu den ursprünglichsten Organismen zählt, sind Homologe von vier ACD $\alpha$ - und einer ACD $\beta$ -Untereinheit sowie die Untereinheiten einer SCS annotiert. Die ACD-Untereinheiten wurden getrennt exprimiert, gereinigt und zu vier  $\alpha_2\beta_2$ -heterotetrameren ACD-Isoenzymen rekonstituiert. Es konnten dabei drei aktive hyperthermophile ACDs ( $T_{\text{opt}} = 85\text{ °C}$ ) charakterisiert werden (ckcACD1, ckcACD3 und ckcACD4). Die ckcACD2 zeigte keine Aktivität. Bei ckcACD1 und ckcACD4 handelt es sich um ACDs mit einem neuartigen Substratspektrum, die Arylsäuren sowie verzweigte und unverzweigte Acylsäuren und deren korrespondierende CoA-Ester als Substrat verwenden. Die ckcACD3 setzte hingegen effektiv Acetyl-CoA bzw. Acetat um und zeigte keine Aktivität mit Arylsäuren. Die  $\alpha$ - und die  $\beta$ -Untereinheit der SCS wurden getrennt exprimiert, gereinigt und zu einem aktiven 134 kDa  $\alpha_2\beta_2$ -Heterotetramer rekonstituiert. Die hyperthermophile SCS ( $T_{\text{opt}} \sim 85\text{ °C}$ ) zeigte eine hohe Spezifität für Succinyl-CoA und Succinat. Genomanalysen sprechen dafür, dass die ACDs und die SCS eine zentrale Rolle bei der Energiekonservierung im Zuge der Peptidfermentation spielen.

*ACD in M. mazei.* Die Gene der getrennt vorliegenden ACD $\alpha$ - und ACD $\beta$ -Untereinheiten MM\_0358 und MM\_0493 wurden kloniert, heterolog in *E. coli* exprimiert, gereinigt und als aktive ACD rekonstituiert. Das 170 kDa-Enzym ( $\alpha_2\beta_2$ ) katalysierte die Umsetzung von Acetyl-CoA und Isobutyryl-CoA mit gleicher Effizienz, Phenylacetyl-CoA wurde nicht akzeptiert. Die ACD katalysierte mit geringerer Aktivität auch die Säureaktivierung.

### **ACD in Eukarya.**

*ACD in E. histolytica.* Die ACD aus *E. histolytica* wurde heterolog exprimiert, gereinigt und als 164 kDa Homodimer charakterisiert. Neben Acetat bzw. Acetyl-CoA setzte die ACD auch die Säuren Propionat und Thioglycolat um. Verzweigte Acylsäuren und Arylsäuren sowie deren CoA-Ester wurden nicht akzeptiert. Das Substratspektrum des Enzyms und Genomanalysen lassen auf eine physiologische Rolle bei der Glucose- und Peptidfermentation zu Acetat und Propionat schließen.

**ACD-Homologe in Bacteria.**

*ACD in C. aurantiacus.* Im Genom von *C. aurantiacus* finden sich keine Gene für die typischen Enzyme bakterieller Acetatbildung, Phosphotransacetylase (PTA) und Acetatkinase (AK), jedoch ein ACD-Homolog. Durch Wachstumsexperimente und Zellsuspensionen wurde die Acetatbildung aus Glucose in *C. aurantiacus* analysiert. Pro Mol Glucose wurden bis zu 1.2 Mol Acetat gebildet. In Zellextrakten konnten keine Aktivitäten von AK und PTA nachgewiesen werden, aber eine durch Glucose induzierte ACD-Aktivität. Das Enzym wurde aus auf Glucose gewachsenen Zellen gereinigt und das kodierende Gen als Caur\_3920 identifiziert. Mit einem Molekulargewicht von 300 kDa wies das Enzym eine für ACDs ungewöhnliche homotetramere Struktur auf. Die rekombinant exprimierte ACD setzte ähnlich der ACIDI aus *P. furiosus* mit hoher Aktivität Acetyl-CoA und nur mit geringer Effizienz Phenylacetyl-CoA um. Diese Ergebnisse sprechen für eine funktionelle Beteiligung der ACD bei der Acetatbildung aus Glucose. Dies ist der erste Nachweis einer funktionellen ACD in der Domäne der Bacteria. Phylogenetische Analysen deuten darauf hin, dass das *acd*-Gen über lateralen Gentransfer von Archaea aufgenommen wurde, um das Fehlen von AK und PTA zu komplementieren.

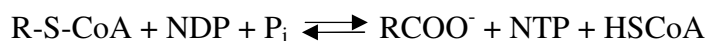
*PCS in Ralstonia eutropha.* Im Genom von *R. eutropha* wurden bei Sequenzvergleichen zwei putative PCSs identifiziert, die als RaPCS1 und RaPCS2 gereinigt und charakterisiert wurden. Beide rekombinanten Enzyme bilden Homodimere und setzen mit der höchsten spezifischen Aktivität Pimelat, HSCoA und ATP zu Pimeloyl-CoA, ADP und Phosphat um. Damit konnten erstmals ADP-bildende PCSs nachgewiesen werden. Neben Pimelat (9.5 U/mg = 100 %) setzte die RaPCS1 auch Adipat, Phenylacetat, Isobutytrat und Thioglycolat mit über 30 % der Rate um. Die RaPCS2 nutzte neben Pimelat (11.5 U/mg) nur Butyrat effizient. Keine der PCS konnte die CoA-Ester Acetyl-CoA, Isobutyryl-CoA oder Phenylacetyl-CoA umzusetzen, was darauf hindeutet, dass die PCS ausschließlich an der Säureaktivierung beteiligt ist. Alle bislang charakterisierten ACDs enthalten zwei katalytisch essentielle Histidine, die auch in PCS hochkonserviert sind. Mittels ortsspezifischer Mutagenese wurden beide Histidine jeweils gegen Alanin ausgetauscht, was in beiden Fällen zum Verlust der PCS-Aktivität führte. Dies lässt auf eine essentielle Beteiligung beider Histidine an der Pimelataktivierung schließen. Phylogenetische Analysen deuten darauf hin, dass PCSs gemeinsam mit FCS eine distinkte phylogenetische Gruppe innerhalb der ACD-homologen Acyl-CoA Synthetasen bilden.

*FCS in D. acidovorans.* Die rekombinante FCS ist ein 170 kDa Homodimer und katalysiert die Umsetzung von Ferulat, HSCoA und ATP zu Feruloyl-CoA, ADP und  $P_i$ . Das Enzym ist hoch spezifisch für Ferulat ( $K_m = 4 \mu\text{M}$ ). Neben Ferulat (12 U/mg = 100 %) setzt die FCS nur Adipat (7 %), Butyrat (12 %) und Pimelat (4 %) mit geringer Effizienz um. Damit konnte erstmals eine ADP-bildende FCS charakterisiert werden.



## 2 Summary

The family of NDP-forming acyl-CoA synthetases comprises, amongst other synthetases, succinyl-CoA synthetases (SCS) and acetyl-CoA synthetases (ACD). Both enzymes are ubiquitous in the three domains of life, catalysing the NDP- and  $P_i$ -dependent conversion of acyl-CoA esters (succinyl-CoA or acetyl-CoA) to the corresponding acids while coupling the reaction with the formation of NTP by substrate-level-phosphorylation.



ACD-activity was first detected in the acetate-forming eukaryote *Entamoeba histolytica*, but the enzyme has not been characterised so far. The first detailed description of ACDs in prokaryotes was carried out in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*, where two  $\alpha_2\beta_2$ -heterotetrameric isoenzymes (ACDI and ACDII) were distinguished in respect to their substrate specificity and kinetic constants. Another ACD-isoenzyme was characterised in *Thermococcus kodakaraensis*, which catalyses the conversion of succinate to succinyl-CoA with high efficiency. It has still not been solved which subunit determines the substrate specificity of ACDs. In all acetate-forming archaea studied so far, ACDs have been identified and an acid-forming function during fermentation of carbohydrates and peptides has been shown. Recently four ACD-homologues and an SCS-homologue were identified in the genome of the primordial organism *Candidatus Korarchaeum cryptophilum* but the function of these homologues is still unsolved. Genes for ACDs can also be found in some acetate-forming Bacteria like *Chloroflexus aurantiacus*, but their function is yet unknown. Functional analyses of ACD-homologues in other bacteria like *Pseudomonas mendocina* and *Delftia acidovorans* provide evidence that these ACD-homologues are involved in the activation of certain acids like pimelate and ferulate, in contrast to archaea. According to their substrate these enzymes are referred to as pimeloyl-CoA synthetase (PCS) or feruloyl-CoA synthetase (FCS). Only little data are available for these enzymes. Especially no biochemical characterisation of FCS has been performed so far. This study aimed to investigate the roles and possible functions of acyl-CoA Synthetases in the three domains of life.

### ACD in Archaea.

*ACD in P. furiosus.* It had to be tested, if *P. furiosus* contains an ACD-isoenzyme that efficiently converts succinate to succinyl-CoA. ORF Pf\_0233 and Pf\_1837 were cloned and expressed heterologous in *E. coli*. The purified ACD-isoenzyme showed a seven fold higher activity with succinate than with acetate, classifying the enzyme as an ACD<sub>succ</sub>. According to these results it might be possible that the enzyme participates in degradation of glutamate to succinate. In order to study the influence of the subunits on substrate specificity of ACDs,

four chimeric ACDs were constructed out of the subunits of two ACD-isoenzymes in *P. furiosus*. Four active  $\alpha_2\beta_2$ -heterotetrameric enzymes were reconstituted, each with an  $\alpha$ - and a  $\beta$ -subunit of ACD<sub>succ</sub> and ACIDI respectively, and they were analysed in regard to their substrate specificity. A chimaera of ACD<sub>succ</sub> $\alpha$  and ACIDI $\beta$  showed the same substrate specificity as ACD<sub>succ</sub> did, whereas a combination of ACIDI $\alpha$  and ACD<sub>succ</sub> $\beta$  exhibited the same substrate specificity as ACIDI did. The data indicate that substrate specificity of ACDs is determined by the  $\alpha$ -subunit.

*ACD and SCS in Ca. K. cryptophilum.* In the genome of the hyperthermophilic korarchaeon *Ca. K. cryptophilum*, one of the most primordial organisms discovered so far, four homologues of an ACD $\alpha$ - and a homologue of an ACD $\beta$ -subunit, as well as both subunits of a SCS, are annotated. All of the ACD-subunits were expressed and purified separately and subsequently reconstituted to four  $\alpha_2\beta_2$ -heterotetrameric ACD-isoenzymes. Three active hyperthermophilic ACDs ( $T_{opt} = 85\text{ }^\circ\text{C}$ ) could be characterised (ckcACD1, ckcACD3, ckcACD4), while ckcACD2 showed no activity. As the two enzymes ckcACD1 and ckcACD4 catalysed the reaction primarily with aryllic acids, as well as with unbranched and branched chain fatty acids and the corresponding CoA-esters, they showed a novel type of substrate specificity for ACDs. In contrast ckcACD3 catalysed predominantly the conversion of acetyl-CoA and acetate and showed no activity with aryllic acids. The  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunit of the SCS were separately expressed, purified and subsequently reconstituted to an active 134 kDa  $\alpha_2\beta_2$ -heterotetramere. The hyperthermophilic SCS exhibited high specificity for succinyl-CoA and succinate. Analyses of the genome indicate that these ACDs and the SCS play a central role in energy-conservation during the fermentation of peptides.

*ACD in Methanosarcina mazei.* The genes MM\_0358 and MM\_0493, encoding the putative  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunit are situated separately in the genome. The genes were cloned, expressed heterologous in *E. coli*, purified and reconstituted as an active ACD. The 170 kDa enzyme ( $\alpha_2\beta_2$ ) catalysed the conversion of acetyl-CoA and isobutyryl-CoA with the same efficiency, whereas phenylacetyl-CoA was not converted. The enzyme converted the activation of the corresponding acids only with low efficiency. There is no evidence in the present data to conclude a metabolic function.

### **ACD in Eukarya**

*ACD in E. histolytica.* After heterologous expression in *E. coli* the ACD from *E. histolytica* was purified and characterised as a 164 kDa homodimere. In addition to acetate and acetyl-CoA respectively, the ACD effectively utilizes propionate and thioglycolate as substrate. Branched-chain fatty acids and aryllic acids as well as the corresponding CoA-esters were not accepted. The substrate specificities, in accordance with genomic studies, suggest a physiological role of the ACD in the fermentation of glucose and peptides to acetate and propionate.

**ACD-homologues in bacteria.**

*ACD in C. aurantiacus.* The genes for acetate kinase (AK) and phosphotransacetylase (PTA), the typical enzymes of acetate formation in bacteria, are missing in *C. aurantiacus*, yet an ACD-homologue can be found. The formation of acetate from glucose in *C. aurantiacus* was analysed by growth experiments and cell suspensions. Per mole of glucose 1.2 moles of acetate were formed. No activity of AK and PTA could be measured in cell-free extracts, but an inducible activity of an ACD was detected. The enzyme was purified from cells grown on glucose and the gene encoding the ACD was identified as Caur\_3920. The molecular mass of the enzyme was determined as 300 kDa, indicating a heterotetrameric structure, which is quite unusual for ACDs. The recombinant ACD showed high activity with acetyl-CoA but only low activity with phenylacetyl-CoA, thus its substrate specificity is similar to that of ACIDI from *P. furiosus*. These results indicate an implication of the ACD in acetate formation from glucose. This is the first report ever of a functional ACD in the bacterial domain. Phylogenetic analyses suggest that the *acd*-gene was adapted from archaea by horizontal gene transfer to complement the absence of AK and PTA.

*PCS in Ralstonia eutropha.* Sequence comparison led to the identification of two putative PCSs in the genome of *R. eutropha* which were purified and characterised as RaPCS1 and RaPCS2. Both recombinant enzymes are homodimers and catalysed with highest specificity the conversion of pimelate, HSCoA and ATP to pimeloyl-CoA, ADP and P<sub>i</sub>. This study is the first report of an ADP-formation by PCSs. In addition to pimelate (9.5 U/mg = 100 %) RaPCS1 converted adipate, phenylacetate, isobutyrate and thioglycolate with more than 30 % of the activity with pimelate. RaPCS2 catalysed the reaction only efficiently with pimelate (11.5 U/mg) and butyrate. Neither RaPCS1 nor RaPCS2 were able to catalyse the reaction with CoA-esters like acetyl-CoA, isobutyryl-CoA or phenylacetyl-CoA, indicating that PCS only participates in acid formation. Two catalytically essential histidine-residues, conserved in all ACDs characterised so far, are also highly conserved in PCSs. Each of the histidine-residues was mutated to alanine by site-directed mutagenesis, causing a complete loss of PCS-activity. The data indicate that both histidine-residues are essential for the activation of pimelate by PCSs. Phylogenetic analyses indicate that PCSs and FCSs form a distinct phylogenetic cluster within the ACD-homologous Acyl-CoA Synthetases.

*FCS in D. acidovorans.* The recombinant FCS formed a 170 kDa homodimere and catalysed the conversion of ferulate, ATP and HSCoA to feruloyl-CoA, ADP and P<sub>i</sub>. The enzyme was highly specific for ferulate (K<sub>m</sub> = 4 μM). In addition to ferulate (12 U/mg = 100 %) the FCS only converted adipate (7 %), butyrate (12 %) and pimelate (4 %) with low efficiency. This is the first report of the characterisation of an ADP-forming FCS so far.

### 3 Einleitung

Die Superfamilie der NDP-bildenden Acyl-CoA Synthetasen ist eine Gruppe von ubiquitär vorhandenen Enzymen, die die reversible NDP- und  $P_i$ -abhängige Umsetzung von Acyl-CoA Estern zu der korrespondierenden Säure katalysieren und dabei NTP über Substratstufenphosphorylierung synthetisieren und HSCoA freisetzen.

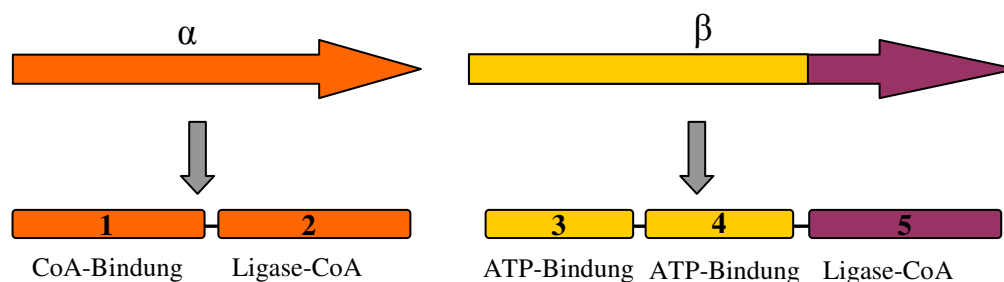


Zu diesen Enzymen gehören unter anderem Succinyl-CoA Synthetasen und ADP-bildende Acetyl-CoA Synthetasen (Sanchez et al. 2000).

#### 3.1 Succinyl-CoA Synthetasen

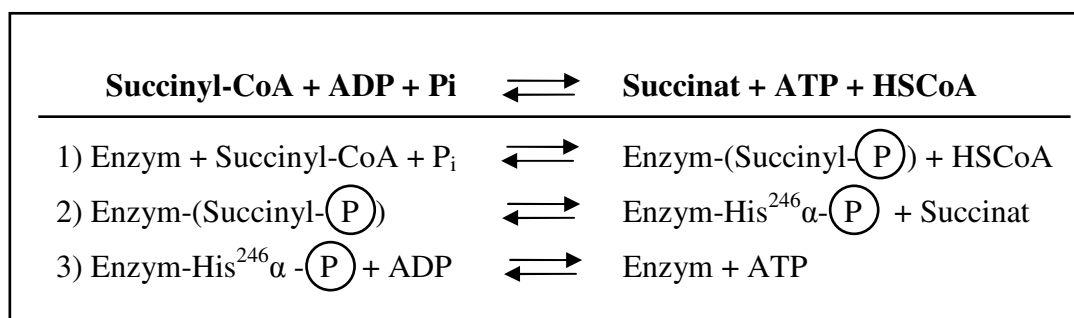
Succinyl-CoA Synthetasen (SCS) katalysieren die ADP- bzw. GDP- sowie  $P_i$ -abhängige Umsetzung von Succinyl-CoA zu Succinat im Citratzyklus und wurden in allen drei Domänen des Lebens, Archaea, Bacteria und Eukarya, nachgewiesen. Alle bisher charakterisierten SCSs zeigten dabei eine hohe Substratspezifität für Succinyl-CoA und Succinat.

In Eukarya und gram-positiven Bacteria bilden SCSs Heterodimere aus einer ca. 30 kDa großen  $\alpha$ -Untereinheit und einer ca. 40 kDa großen  $\beta$ -Untereinheit. In gram-negativen Bacteria und Archaea, mit Ausnahme von *Thermoplasma*, bilden die SCS  $\alpha_2\beta_2$ -heterotetramere Quartärstrukturen aus (Weitzman und Kinghorn 1978; Danson et al. 1985). Das aktive Zentrum wird dabei jeweils aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit gebildet. Der strukturelle Aufbau der SCS ist in *E. coli* gut untersucht worden. Die SCS ist aus fünf Domänen aufgebaut: Eine CoA-Binde-Domäne (Domäne 1) und eine C-terminal daran verknüpfte Ligase-CoA-Domäne (Domäne 2) bilden die SCS $\alpha$ -Untereinheit. In der SCS $\beta$ -Untereinheit bilden die Domänen 3 und 4 die Nucleotid-Binde-Domäne (ATP-graspfold), an die C-terminal eine weitere Ligase-CoA-Domäne (Domäne 5) gebunden ist (Abbildung 1) (Wolodko et al. 1994; Joyce et al. 2000; Fraser et al. 2002).



**Abbildung 1 Schema der Domänenorganisation in der SCS aus *E. coli*.** Die Nummerierung der Domänen entspricht der Nummerierung im Text. Die Polypeptide der Untereinheiten sind durch Pfeile dargestellt, die Domänen werden durch Balken symbolisiert. Die Domänen 1 und 2 der  $\alpha$ -Untereinheit sind orange, die Domänen der ATP-graspföld (3 und 4) gelb und die Ligase-CoA-Domäne der  $\beta$ -Untereinheit (5) lila dargestellt.

Mit Hilfe von Mutations-, Arsenolyse- und Phosphorylierungsexperimenten wurde für die SCS aus *E. coli* ein drei-Stufen-Reaktionsmechanismus postuliert (Majumdar et al. 1991; Fraser et al. 2002).

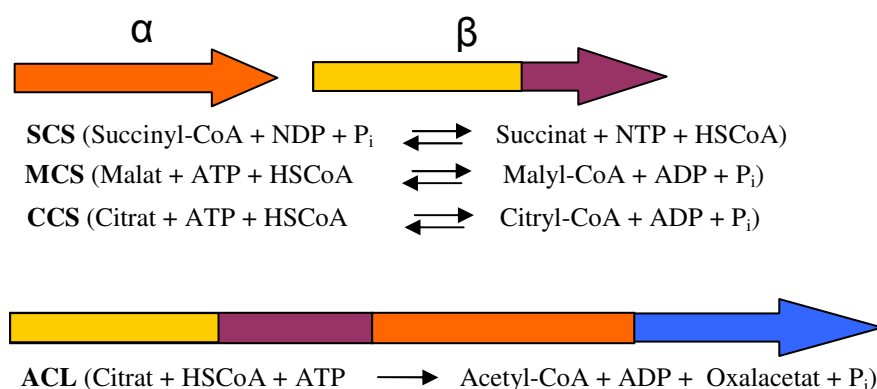


In der ersten Teilreaktion wird Succinyl-CoA zu enzymgebundenem Succinyl-Phosphat (Succinyl-(P)) umgesetzt, wobei HSCoA freigesetzt wird. In der zweiten Teilreaktion wird Succinat freigesetzt und ein Histidin in der  $\alpha$ -Untereinheit, Histidin<sup>246</sup> $\alpha$  intermediär phosphoryliert. Die Übertragung des Phosphoryl-Rests vom His<sup>246</sup> $\alpha$  auf das auf der  $\beta$ -Untereinheit gebundene ADP unter Bildung von ATP findet in der dritten Teilreaktion statt (Fraser et al. 2002). Neben einigen weiteren Sequenzmustern zeigt sich insbesondere dieses an der Phosphorylierungsreaktion beteiligte Histidin in allen bislang untersuchten SCSs hochkonserviert (Sanchez et al. 2000).

### 3.1.1 SCS-ähnliche Acyl-CoA Synthetasen

Neben der SCS existieren eine Reihe von Synthetasen, die hohe Sequenzhomologien zur SCS aufweisen und über die gleiche Domänenorganisation (1-2-3-4-5) verfügen. Diese Enzyme,

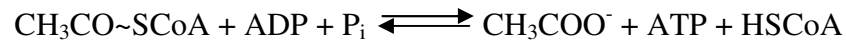
die ATP-Citrat Lyasen (ACL), Malyl-CoA Synthetasen (MCS) und Citryl-CoA Synthetasen (CCS), werden daher ebenfalls zu den NDP-bildenden Acyl-CoA Synthetasen gezählt (Sanchez et al. 2000). Anders als die SCS katalysieren ACL, MCS und CCS in physiologischer Richtung die Säureaktivierung. ACL katalysieren die ATP- und HSCoA-abhängige Umsetzung von Citrat zu Acetyl-CoA, ADP, P<sub>i</sub> und Oxalacetat während der Fettsäuresynthese aus Kohlenhydraten oder bei der CO<sub>2</sub>-Fixierung über den reduktiven Citratzyklus (Aoshima et al. 2004; Sun et al. 2010). MCS setzen Malat, HSCoA und ATP zu Malyl-CoA, ADP und P<sub>i</sub> bei der Formaldehyd-Assimilation in methylotherphen Organismen um (Hanson und Hanson 1996). Die CCS katalysiert die ATP- und HSCoA-abhängige Aktivierung von Citrat zu Citryl-CoA im reduktiven Citratzyklus z.B. in *Hydrogenobacter thermophilus* (Aoshima et al. 2004). Im Gegensatz zu SCS, MCS und CCS, die aus jeweils zwei getrennten Untereinheiten, α und β, aufgebaut sind (Abbildung 1 und Abbildung 2 oben), liegen ACL, z. B. in *Homo sapiens*, als fusionierte Polypeptidketten in βα-Orientierung vor (Sun et al. 2010). Zusätzlich ist C-terminal eine Citratsynthase-Domäne angelagert (Abbildung 2).



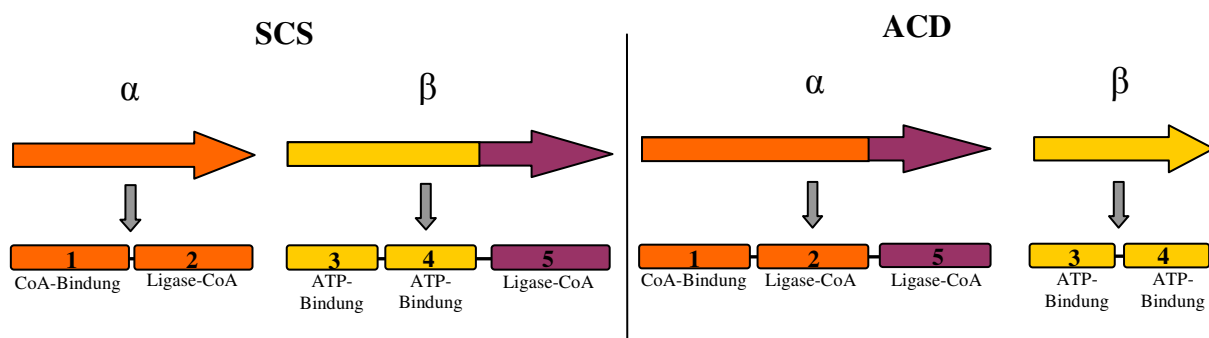
**Abbildung 2 Domänenorganisation von SCS und SCS-homologen NDP-bildenden Acyl-CoA Synthetasen.** Die Abbildung zeigt vergleichend die Domänenorganisation in SCS, MCS, CCS und ACL. Zusätzlich ist die katalysierte Reaktion angegeben. Homologe Bereiche sind durch gleiche Farbgebung kenntlich gemacht. Farbgebung der homologen Bereiche: Orange: SCSα-Untereinheit, gelb: ATP-Grasp-fold der β-Untereinheit, lila: Ligase-CoA Domäne der β-Untereinheit, blau: Citratsynthase-Domäne der ACL.

### 3.2 ADP-bildende Acetyl-CoA Synthetasen

Erst in den letzten Jahren wurden Acetyl-CoA Synthetasen (Musfeldt 2001) (ACD) identifiziert und detailliert charakterisiert. Diese ebenfalls zur Superfamilie der NDP-bildenden Acyl-CoA Synthetasen zählenden Enzyme weisen hohe Sequenzhomologien zu SCS auf und katalysieren die reversible ADP- und P<sub>i</sub>-abhängige Umsetzung von Acetyl-CoA zu Acetat, HSCoA und ATP:

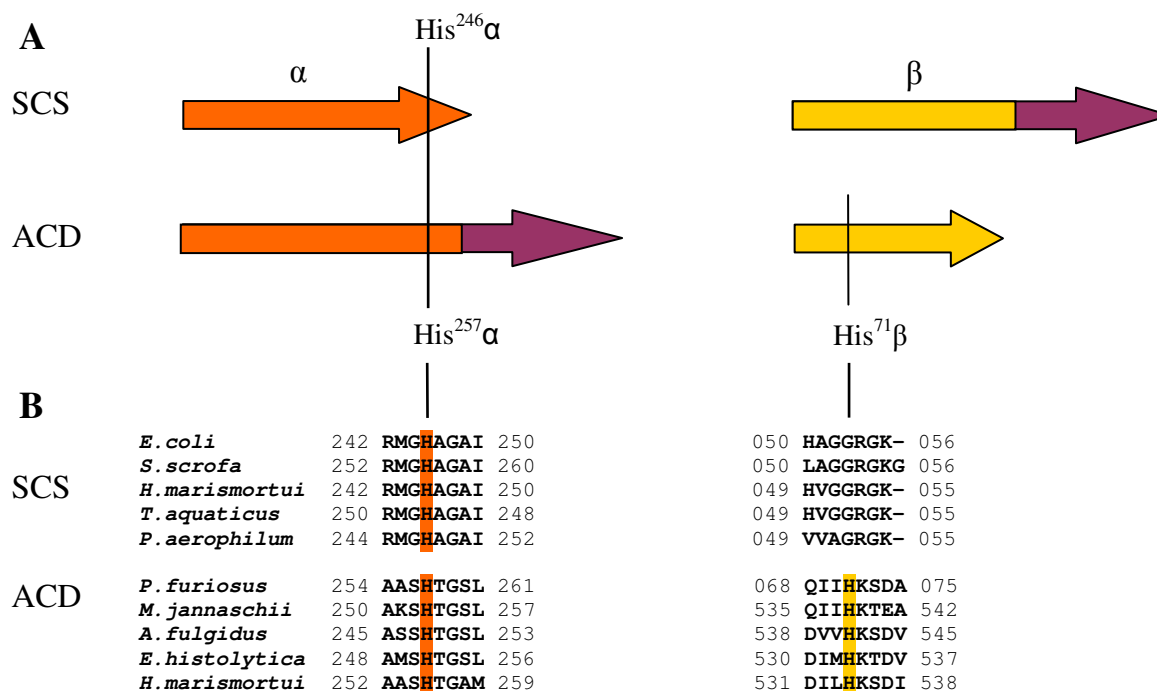


Die ACD-Reaktion wurde zunächst als neuartige Form der Acetatbildung in dem eukaryontischen Parasiten *Entamoeba histolytica* nachgewiesen, aber nicht charakterisiert (Reeves et al. 1977). Später wurde ACD-Aktivität auch in hyperthermophilen und halophilen Archaea beschrieben (Schäfer und Schönheit 1991; Schäfer et al. 1993), Aus dem hyperthermophilen Archaeon *Pyrococcus furiosus* wurde eine ACD erstmals gereinigt, biochemisch charakterisiert und die kodierenden Gene identifiziert (Mai und Adams 1996b; Glasemacher et al. 1997; Musfeldt et al. 1999). Die ACD aus *P. furiosus* ist wie die SCS aus *E. coli* aus getrennt im Genom liegenden  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten aufgebaut, die zu einem  $\alpha_2\beta_2$ -heterotetrameren Enzym rekonstituieren. ACDs bestehen zwar aus den gleichen fünf Domänen wie die SCS, unterscheiden sich aber in deren Anordnung. Während bei der SCS an die ATP-Bindedomäne in der  $\beta$ -Untereinheit C-terminal eine Ligase-CoA-Domäne gebunden ist (Domäne 5), ist diese Ligase-CoA-Domäne in ACDs C-terminal an die  $\alpha$ -Untereinheit geknüpft (Abbildung 3) (Sanchez et al. 2000).



**Abbildung 3 Vergleich der Proteindomänen-Organisation in SCSs und ACDs.** Es ist die unterschiedliche Organisation der Proteindomänen in der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit von SCSs (links) und ACDs (rechts) dargestellt. Die Nummerierung der Domänen entspricht der vorausgegangenen Nummerierung im Text. Homologe Bereiche sind durch gleiche Farbgebung kenntlich gemacht. Farbgebung: Domäne 1 und 2 (entspricht SCS $\alpha$ ) = orange, Domäne 3 und 4 (ATP-Bindedomäne) = gelb, Domäne 5 (Ligase-CoA) = lila.

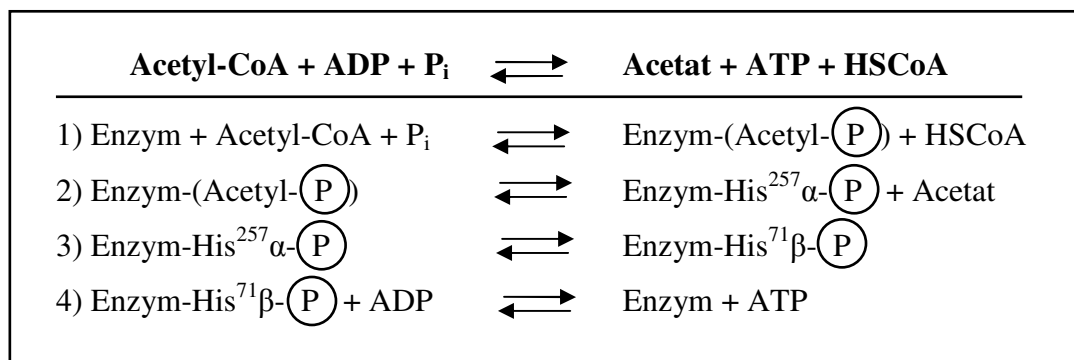
In der ACD aus *P. furiosus* und allen anderen bislang untersuchten ACDs ist das in der SCS katalytisch essentielle Histidin (His<sup>246</sup> $\alpha$ ) ebenfalls streng konserviert. Darüber hinaus wurde bei *P. furiosus* in der  $\beta$ -Untereinheit ein zweites Histidin (His<sup>71</sup> $\beta$ ) identifiziert, das in ACDs hochkonserviert ist, nicht aber in SCS (Abbildung 4) (Bräsen et al. 2008).



**Abbildung 4 Vergleich der Untereinheitenkomposition und konservierter Histidine in ausgewählten SCSs und ACDs.** **A:** Es ist die unterschiedliche Zusammensetzung der Untereinheiten der SCS in *E. coli* und der ACD in *P. furiosus* dargestellt. Homologe Bereiche sind durch gleiche Farbgebung kenntlich gemacht. Farbgebung: Domäne 1 und 2 (entspricht SCS $\alpha$ ) = orange, Domäne 3 und 4 (ATP-Bindedomäne) = gelb, Domäne 5 (Ligase-CoA) = lila. Die Nummerierung der konservierten Histidine entspricht der Position in der Aminosäuresequenz in *E. coli* (SCS) und *P. furiosus* (ACD). **B:** Ausschnitt aus einem Aminosäuresequenzalignment ausgewählter SCSs und ACDs. Die Accessionnummern sind wie folgt: **SCS:** *E. coli* YP\_002400553.1 (SCS $\alpha$ ) ZP\_07134987.1 (SCS $\beta$ ); *Sus scrofa* O1969.2 (SCS $\alpha$ ) P53590.2 (SCS $\beta$ ); *H. marismortui* YP\_135205.1 (SCS $\alpha$ ) YP\_135204.1 (SCS $\beta$ ); *T. aquaticus* ZP\_03497170.1 (SCS $\alpha$ ) ZP\_03497169.1 (SCS $\beta$ ); *P. aerophilum* NP\_559922.1 (SCS $\alpha$ ) NP\_559921.1 (SCS $\beta$ ); **ACD:** *P. furiosus* NP\_579269.1 ACD $\alpha$  NP\_579516.1 (ACD $\beta$ ); *M. jannaschii* NP\_247570.1; *A. fulgidus* (AF1211) NP\_070039.1; *E. histolytica* XP\_656290.1; *H. marismortui* YP\_135572.1.

In detaillierten Mutageneseexperimenten und Phosphorylierungsstudien mit der ACD aus *P. furiosus* wurde bewiesen, dass in ACDs beide Histidine katalytisch essentiell sind. Durch einen Austausch des Histidin<sup>257</sup> $\alpha$  gegen Aspartat bzw. des Histidin<sup>71</sup> $\beta$  gegen Alanin konnte die ACD-Reaktion vollständig inhibiert werden. Daher wird im Gegensatz zur SCS für die Reaktion der ACD ein vierstufiger Reaktionsmechanismus angenommen (Bräsen et al. 2008).

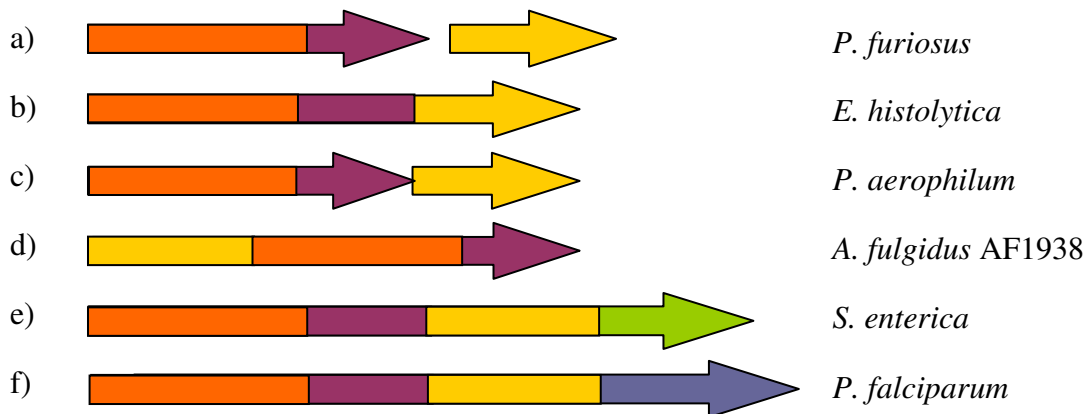




Hierbei wird zunächst ein der CoA-Ester phosphoryliert, wobei ein enzymgebundenes Acetylphosphat (Acetyl-(P)) entsteht und HSCoA freigesetzt wird (1). Durch Phosphorylgruppen-Übertragung vom Acetylphosphat wird in der α-Untereinheit ein Histidin an Position 257 transient phosphoryliert (2). Von diesem Histidin wird der Phosphorylrest aber nicht, wie für SCS beschrieben, direkt auf ADP, sondern in einer weiteren Teilreaktion auf ein Histidin in Position 71 der β-Untereinheit übertragen (3), welches dann in der vierten Teilreaktion ADP zu ATP phosphoryliert (4).

Inzwischen wurden ACDs in vielen weiteren Archaea identifiziert und charakterisiert, darunter die hyperthermophilen Archaea *Thermococcus kodakaraensis*, *Pyrobaculum aerophilum* und *Archaeoglobus fulgidus*, sowie *Haloarcula marismortui*, *Methanocaldococcus jannaschi* und der Eukaryot *Giardia lamblia* (Sanchez und Müller 1996; Musfeldt und Schönheit 2002; Bräsen und Schönheit 2004b; Shikata et al. 2007). Dabei wurde gezeigt, dass ACDs sich hinsichtlich ihrer Genorganisation und oligomeren Struktur sowie im Substratspektrum unterscheiden. Während ACDs in *P. furiosus* und *T. kodakaraensis* α<sub>2</sub>β<sub>2</sub>-Heterotetramere aus getrennt vorliegenden Untereinheiten bilden, sind die Homologen der ACDα- und ACDβ-Untereinheiten in den Archaeen *H. marismortui*, *M. jannaschii* und *A. fulgidus* sowie den Eukaryoten *G. lamblia* und *E. histolytica* zu einem Polypeptid fusioniert - entweder in αβ- oder seltener in βα-Orientierung (Abbildung 5) (Musfeldt et al. 1999; Sanchez et al. 2000; Musfeldt und Schönheit 2002; Bräsen und Schönheit 2004b; Shikata et al. 2007). Die Holoenzyme der fusionierten ACDs bilden Homodimere von ca. 150 kDa Größe aus 75 kDa Untereinheiten. In dem Crenarchaeon *P. aerophilum* kodieren die ORFs PAE3250 und PAE3249 für die α- und β-Untereinheit einer ACD und liegen hintereinander in αβ-Orientierung um ein Basenpaar überlappend im Genom vor. Sie bilden aber keinen einheitlichen Leserahmen und zeigen somit eine bislang einzigartige Genorganisation für ACDs (Bräsen and Schönheit 2004b). Neben diesen getrennten oder fusionierten Formen der Genorganisation finden sich

auch komplexere fusionierte ACD-Homologe, die eine C-terminale Extension tragen. So weist die ACD des Malariaerregers *P. falciparum* C-terminal eine zusätzliche, ca. 270 Aminosäuren lange Region auf, deren Funktion aber bislang völlig ungeklärt ist (Sanchez et al. 2000). In *Salmonella enterica* wurde ein ACD-Homolog beschrieben, das zusätzlich C-terminal eine Acetyltransferasedomäne trägt. Dem Enzym wird eine Funktion bei der posttranslationalen Regulation durch Acetylierung von Proteinen zugeschrieben und als Protein-Acetyltransferase (PAT) bezeichnet. Die Sequenz dieser Protein-Acetyltransferasen enthält zumeist nicht das für die Katalyse essentielle  $\alpha$ -Histidin und katalysiert nicht die ACD-Reaktion (Sanchez et al. 2000; Starai und Escalante-Semerena 2004b). Eine Übersicht über die unterschiedliche Genorganisation von ACDs ist in Abbildung 5 dargestellt.

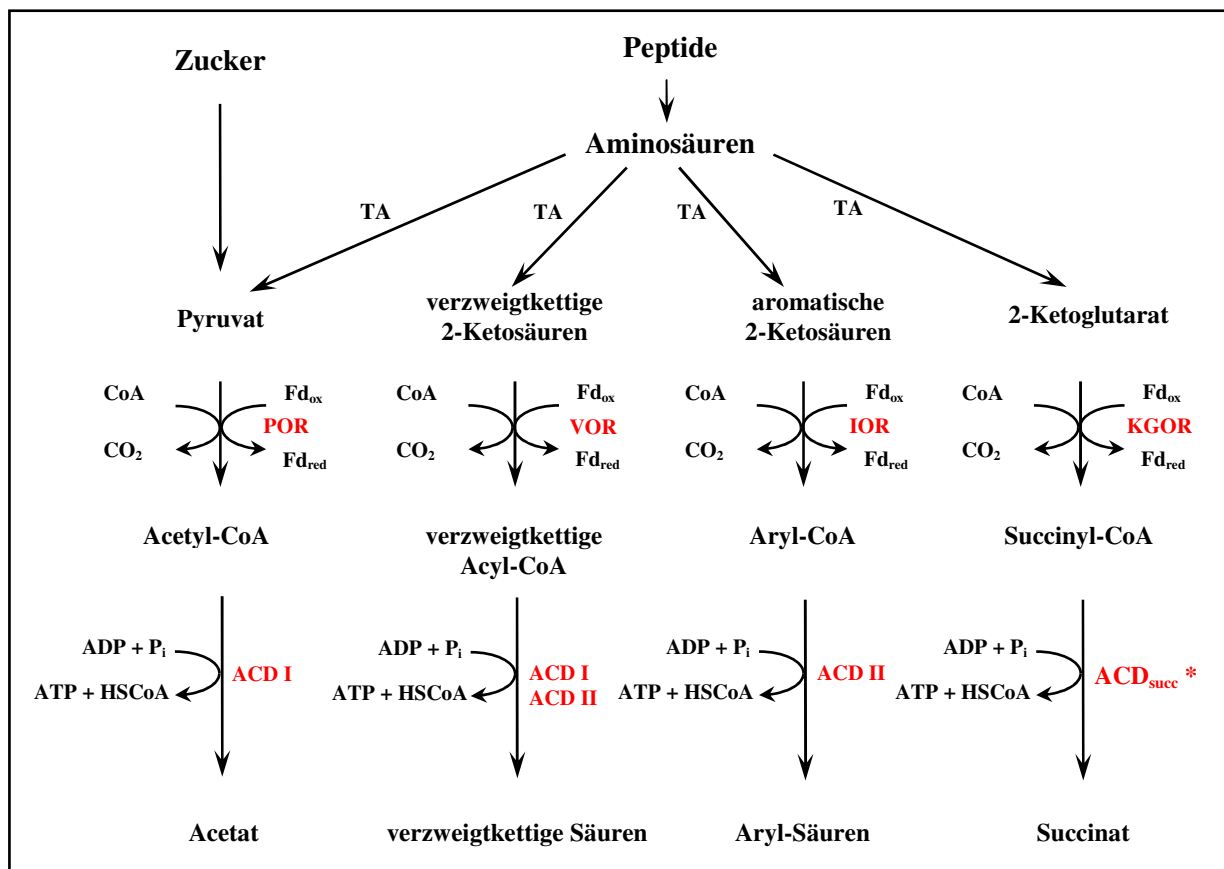


**Abbildung 5 Übersicht über die unterschiedliche Genorganisation von ACDs.** Homologe Bereiche sind durch gleiche Farbgebung kenntlich gemacht. a) getrennte Genorganisation in *P. furiosus*; b) fusionierte Form z.B. *E. histolytica*; c) überlappende Gene in *P. aerophilum*; d) fusionierte Form in  $\beta\alpha$ -Orientierung in *A. fulgidus* (AF1938); e) ACD-Homolog mit Acetyltransferasedomäne in *S. enterica*; f) ACD in *P. falciparum*. Farbgebung:  $\alpha$ -Untereinheit = orange (Domäne 1 und 2) + lila (Domäne 5),  $\beta$ -Untereinheit = gelb; Acetyltransferasedomäne = grün; zusätzliche Domäne unbekannter Funktion in *P. falciparum* = blau.

### 3.2.1 ACDs in Archaea

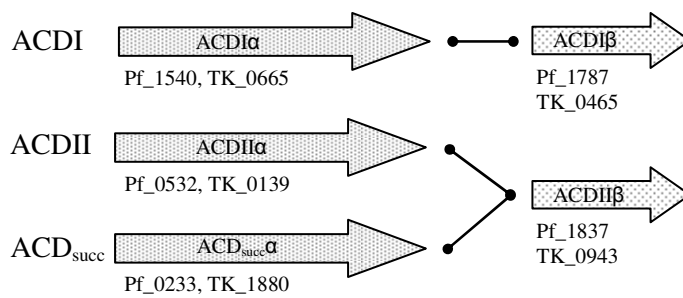
Funktionelle Analysen von ACDs wurden erstmals in dem zu den *Thermococcales* zählenden *P. furiosus* detailliert durchgeführt. *P. furiosus* wächst heteroorganotroph auf Zuckern (Maltose oder Amylose) und Peptiden. Die daraus entstehende Glucose wird über den modifizierten Emden-Meyerhof-Weg zu der 2-Ketosäure Pyruvat fermentiert und Pyruvat über eine Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (POR) zu Acetyl-CoA umgewandelt. Aus Acetyl-CoA wird anschließend über eine ACD Acetat gebildet (Blamey und Adams 1993; Siebers und Schönheit 2005; Schönheit 2008). Aminosäuren werden in *P. furiosus* zunächst über Transaminasen oder Glutamatdehydrogenasen zu den korrespondierenden 2-Ketosäuren abgebaut (Andreotti

et al. 1995). Diese 2-Ketosäuren werden dann durch 2-Ketosäure:Ferredoxin-Oxidoreduktasen zu den jeweiligen CoA-Estern aktiviert. In *P. furiosus* wurden neben der POR drei weitere 2-Ketosäure-Oxidoreduktasen identifiziert. 2-Ketosäuren, die aus Methionin oder den verzweigten Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin entstehen, werden bevorzugt von der 2-Ketoisovalerat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (VOR) umgesetzt. Die Umsetzung von 2-Ketosäuren, die aus aromatischen Aminosäuren entstanden sind, wird durch die Indolpyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (IOR) katalysiert. 2-Ketoglutarat wird durch die 2-Ketoglutarat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (KGOR) zu Succinyl-CoA abgebaut. Die gebildeten CoA-Ester werden durch ACDs zu den korrespondierenden Säuren umgesetzt und dabei ATP über Substratstufenphosphorylierung gebildet (Abbildung 6) (Mai und Adams 1994; Heider et al. 1995; Mai und Adams 1996a; Shikata et al. 2007).



**Abbildung 6** Postuliertes Schema des Abbaus von Zuckern und Aminosäuren und Funktion der ACDs in *P. furiosus* und *T. kodakaraensis*. Der Abbau von Zuckern und Peptiden erfolgt über Transaminasen, 2-Ketosäure:Ferredoxin-Oxidoreduktasen und ACDs (modifiziert nach Mai und Adams 1996). TA = Transaminase; Fd<sub>ox</sub> = oxidiertes Ferredoxin; Fd<sub>red</sub> = reduziertes Ferredoxin; POR = Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase; VOR = 2-Ketoisovalerat:Ferredoxin-Oxidoreduktase; IOR = Indolpyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase; KGOR = 2-Ketoglutarat:Ferredoxin-Oxidoreduktase; ACD = Acetyl-CoA Synthetase (Musfeldt 2001). \*für *P. furiosus* postuliert (diese Arbeit).

Auf Grund unterschiedlicher Substratspezifitäten wurden in *P. furiosus* zwei distinkte ACD-Isoenzyme, ACDI und ACDII, identifiziert und charakterisiert. Beide Enzyme sind  $\alpha_2\beta_2$ -Heterotetramere von 145 kDa Größe aus Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 47 kDa ( $\alpha$ ) und 25 kDa ( $\beta$ ). Die Gene für die jeweiligen Untereinheiten liegen unabhängig voneinander im Genom von *P. furiosus* vor. Die ACDI setzt bevorzugt Acetyl-CoA zu Acetat um. Diesem Enzym wird vor allem eine Rolle bei der Fermentation von Kohlenhydraten zugeschrieben. Die ACDII katalysiert die Umsetzung von aromatischen CoA-Estern wie Phenylacetyl-CoA und ist daher wahrscheinlich an der Peptidfermentation beteiligt. Beide Enzyme setzen auch effektiv verzweigte Acyl-CoA Ester wie Isobutyryl-CoA um, zeigen aber keine Aktivität mit Succinyl-CoA (Mai und Adams 1996b; Glasemacher et al. 1997; Musfeldt et al. 1999). Neben diesen beiden gut untersuchten ACDs finden sich in *P. furiosus* drei weitere paraloge ACD $\alpha$ -Untereinheiten, jedoch keine weiteren ACD $\beta$ -Untereinheiten. Die Funktion dieser weiteren  $\alpha$ -Untereinheiten ist nicht geklärt. Die von den ACDs gebildeten Säuren, hauptsächlich Acetat, Isobutyrat, Isovalerat und Phenylacetat, werden ins Medium abgegeben. In dem mit *P. furiosus* nahe verwandten *Thermococcus kodakaraensis* finden sich alle homologen Gene der Zucker- und Peptidfermentation aus *P. furiosus*, sodass angenommen werden kann, dass die dortige Aminosäurefermentation nach einem analogen Schema abläuft. Zudem wurde für *T. kodakaraensis* Succinatbildung aus Succinyl-CoA beschrieben. Hier wurde bei Untersuchungen zur Succinatbildung neben einer ACD mit ACDII-Aktivität ein weiteres ACD-Isoenzym (ACD<sub>succ</sub>) identifiziert, das eine hohe Aktivität mit Succinat zeigt und an der Succinatbildung beteiligt ist. Dies ist ungewöhnlich, da alle bislang in Archaea beschriebenen ACDs keine oder lediglich geringe Aktivität mit Succinat oder Succinyl-CoA zeigten. Sowohl die ACDII-ähnliche als auch die neuartige ACD<sub>succ</sub> wiesen eine  $\alpha_2\beta_2$ -heterotetramere Struktur auf und sind aus unterschiedlichen  $\alpha$ -Untereinheiten (TK1880 und TK0139) aufgebaut, verwenden aber die gleiche  $\beta$ -Untereinheit (TK0943) (Shikata et al. 2007). Bei Aminosäuresequenzvergleichen wurden in *P. furiosus* die homologen ACD-Untereinheiten PF0233 ( $\alpha$ ) und Pf1837 ( $\beta$ ) identifiziert, die jeweils über 80 % identisch mit den Untereinheiten der Succinat umsetzenden ACD<sub>succ</sub> aus *T. kodakaraensis* sind (Shikata et al. 2007). Dies lässt vermuten, dass diese beiden homologen ORFs aus *P. furiosus* ebenfalls für eine ACD kodieren, die effizient Succinyl-CoA zu Succinat umsetzt und daher *in vivo* an der Succinatbildung beteiligt sein könnte. Ähnlich wie für *T. kodakaraensis* beschrieben, entspricht Pf1837 der  $\beta$ -Untereinheit der ACDII aus *P. furiosus* während PF0233 keiner bislang charakterisierten ACD zugeordnet werden kann (Abbildung 7).



**Abbildung 7 Schema der Kombination paraloger  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten von ACDs in *P. furiosus* und *T. kodakaraensis*.** Das Schema zeigt die Kombination von ACD $\alpha$ - und ACD $\beta$ -Untereinheiten zu ACDI, ACDII und ACD<sub>succ</sub>. Die jeweiligen ORF-Bezeichnungen der Untereinheiten aus *P. furiosus* (Pf) und der zugeordneten Homologen aus *T. kodakaraensis* (TK) sind angegeben. ACDII und ACD<sub>succ</sub> verwenden die gleiche  $\beta$ -Untereinheit (Modifiziert nach Shikata et al. 2007).

Die Zielsetzung dieser Arbeit war es daher, die ORFs PF0233 und PF1837 zu klonieren und das Substratspektrum der hypothetischen ACD zu charakterisieren. Zusätzlich sollten aus beiden ACD-Untereinheiten und den Untereinheiten der ACDI aus *P. furiosus* PF1540 ( $\alpha$ ) und PF1787 ( $\beta$ ) durch unterschiedliche Kombination chimäre ACDs erstellt werden, um den Einfluss der Untereinheiten auf die Substratspezifität zu untersuchen.

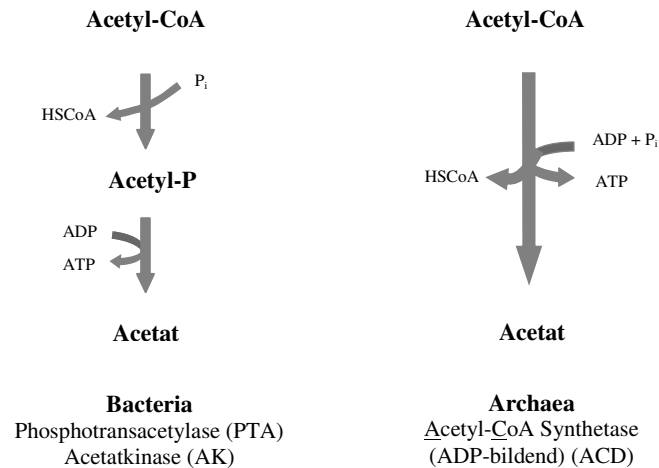
Mittlerweile wurden zahlreichen weiteren archaeellen ACDs Funktionen zugeordnet. In *A. fulgidus* sind zwei ACD-Homologe, AF1211 und AF1938, beschrieben, die ähnliche Substratspektren wie die ACDI (AF1211) und die ACDII (AF1938) aus *P. furiosus* haben. Folgerichtig wird diesen Enzymen auch eine ähnliche Funktion bei der Fermentation von Zuckern und Aminosäuren zugeschrieben (Musfeldt und Schönheit 2002). Eine vergleichbare Rolle wird für die ACD aus *P. aerophilum* angenommen. Dieses Enzym zeigt eine ungewöhnlich breite Substratspezifität sowohl für Acetyl-CoA als auch für verzweigte und aromatische CoA-Ester und vereint somit die Funktion von ACDI und ACDII in einem Enzym (Bräsen und Schönheit 2004b). In dem halophilen Archaeon *H. marismortui* wurde eine Glucose induzierte ACD mit ACDI-Aktivität beschrieben, der eine Funktion als eine Art „Overflow“-Mechanismus bei hohen glykolytischen Flussraten zugeschrieben wird (Bräsen und Schönheit 2004b). In *M. jannaschii* wurde eine fusionierte ACD identifiziert, die die Reaktion nur in Richtung der Säurebildung effizient katalysiert. Für diese ACD wurde eine Funktion bei der Energiegewinnung aus dem Speicherstoff Glykogen diskutiert (Musfeldt 2001; Musfeldt und Schönheit 2002). Demgegenüber findet sich in dem ebenfalls methanogenen Archaeon *Methansarcina mazei* eine aus getrennten Untereinheiten bestehende ACD. Die Funktion dieser ACD ist nicht bekannt.

Daher war es Ziel dieser Arbeit zu prüfen, ob die ORFs MM\_0358 und MM\_0493 in *M. mazei* für die Untereinheiten einer katalytisch aktiven ACD kodieren. Dazu wurden die Untereinheiten heterolog in *E. coli* exprimiert und das rekonstituierte Protein charakterisiert.

Die Abteilung der Korarchaeoten wird auf Grund von rRNA-Analysen zu den ursprünglichsten Mikroorganismen auf der Erde gezählt. Neuere Analysen gehen davon aus, dass die Korarchaeota eine eigene Abteilung bilden, die zwischen Crenarchaeota und Euryarchaeota abzweigt, jedoch eine deutliche Orientierung in Richtung der Crenarchaeota zeigt (Robertson et al. 2005; Elkins et al. 2008). Kürzlich wurde das Genom des bislang unkultivierten Korarchaeoten *Candidatus korarchaeum cryptophilum* vollständig sequenziert und mehrere Oligopeptidtransporter, Peptidasen und Transaminasen entdeckt - ein Hinweis auf Peptidfermentation. Darüber hinaus wurden Gene für vier 2-Ketosäure:Ferredoxin-Oxidoreduktasen identifiziert, die beim Peptidabbau entstandene 2-Ketosäuren in CoA-Ester umwandeln können. Schließlich finden sich die Gene für vier ACD $\alpha$ -Homologe (kcr\_0030, kcr\_0073, kcr\_0198 und kcr\_1138) und ein ACD $\beta$ -Homolog (kcr\_0115) sowie beide Untereinheiten einer SCS (SCS $\alpha$  = kcr\_1393, SCS $\beta$  = kcr\_1392), die die Umwandlung der entstandenen CoA-Ester in die korrespondierenden Säuren katalysieren könnten. Es wurde daher diskutiert, dass die Peptidfermentation in *Ca. K. cryptophilum* ähnlich wie für *P. furiosus* gezeigt verlaufen könnte (vergleiche Abbildung 6) (Elkins et al. 2008). Bislang wurden jedoch weder die hypothetischen ACDs noch die putative SCS charakterisiert. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war daher, die Untereinheiten der hypothetischen Acyl-CoA Synthetasen zu klonieren und heterolog zu exprimieren. Anschließend sollten die gereinigten und rekonstituierten Proteine charakterisiert werden.

### **3.2.2 ACD-Homologe in Bacteria**

Im Genom vieler Bakterien konnten ACD-Homologe nachgewiesen werden. Deren Funktion ist aber bislang weitgehend unklar. Zwar wurde eine ACD in allen bisher untersuchten Acetat bildenden Archaea als Enzym der Acetatynthese identifiziert, in Bakterien wird Acetat aber in der Regel in zwei Schritten über die Enzyme Phosphotransacetylase (PTA) und Acetatkinase (AK) gebildet. Daher wird angenommen, dass die Acetatbildung domänenspezifisch verläuft (Abbildung 8) (Schäfer et al. 1993).



**Abbildung 8 Hauptmechanismen der Acetatbildung in Bacteria und Archaea.** Links: Zweistufige Acetatbildung in Bacteria über Phosphotransacetylase (PTA) und Acetatkinase (AK). Rechts: Einstufige Acetatbildung in Archaea über Acetyl-CoA Synthetase (ADP-bildend) (ACD).

Folglich erscheint eine Beteiligung der ACDs an der Acetatsynthese in Bakterien zunächst unwahrscheinlich. Allerdings weisen einige Acetat bildende Bakterien, wie z. B. *Chloroflexus aurantiacus*, *Syntrophus aciditrophicus* und *Pelotomaculum thermopropionicum*, keine Gene für AK und PTA auf. Bei Sequenzvergleichen konnten jedoch ein oder mehrere ACD-Homologe im Genom dieser Bakterien identifiziert werden (McInerney et al. 2007). Eine mögliche Funktion der ACD als Enzym der Acetatbildung in diesen Organismen sollte im Verlauf dieser Arbeit am Beispiel von *C. aurantiacus* untersucht werden. Dieses thermophile, filamentöse, anoxygene, phototrophe Bakterium wächst photolithoautotroph, photoheterotroph oder chemoorganoheterotroph am Rande heißer Quellen bei 50 – 60 °C (Pierson und Castenholz 1974; Hanada und Pierson 2006). Bei anaerobem, heterotrophem Wachstum auf unterschiedlichen Kohlenhydraten wurde Acetatbildung für verschiedene *C. aurantiacus*-Stämme nachgewiesen (Krasil'nikova und Kondrat'eva 1987). Auf Grund von Enzymaktivitäten in Zellextrakten von Glucose gewachsenen Zellen wird für *C. aurantiacus* ein Abbau der Glucose über den Embden-Meyerhof-Weg postuliert (Krasil'nikova et al. 1986; Krasil'nikova und Kondrat'eva 1987). Im kürzlich sequenzierten Genom konnten alle zugehörigen Gene bis auf die Fructose-Bisphosphat-Aldolase nachgewiesen werden. Das entstehende Pyruvat wird vermutlich über eine Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreductase in Acetyl-CoA umgewandelt (Tang et al. 2011). Das Enzym der Acetatsynthese konnte aber bislang noch nicht identifiziert werden. Es war Ziel dieser Arbeit, die Acetatbildung in *C. aurantiacus* bei Wachstum auf Glucose mit Hilfe von Wachstumsexperimenten und Zellsuspensionen detailliert zu analysieren und das Acetat bildende Enzym zu identifizieren und zu reinigen. Zusätzlich sollte das kodierende

Gen ermittelt und das Enzym heterolog in *E. coli* exprimiert und charakterisiert werden. Dadurch sollte untersucht werden, ob die putative ACD an der Acetat-Bildung beteiligt ist.

**Pimeloyl-CoA und Feruloyl-CoA Synthetasen.** Für einige ACD-Homologe in Bakterien, z. B. *Pseudomonas mendocina*, *Delftia acidovorans* und *Sphingomonas paucimobilis*, konnten durch Funktionsanalysen Hinweise auf eine spezifische Rolle bei der Aktivierung von Pimelat oder Ferulat gefunden werden. Diese Synthetasen sind *in vivo* demnach, anders als ACDs, an der Säureaktivierung beteiligt und werden je nach Substrat als Pimeloyl-CoA Synthetase (PCS) oder Feruloyl-CoA Synthetase (FCS) bezeichnet. PCS und FCS bestehen aus fusionierten Homologen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit der ACD aus *P. furiosus* und entsprechen daher in ihrer Domänenorganisation den ACDs. Außerdem sind beide in ACDs katalytisch essentiellen Histidine auch in der PCS und der FCS konserviert (Sanchez et al. 2000).

*Pimeloyl-CoA Synthetasen* katalysieren die ATP- und HSCoA-abhängige Umsetzung von Pimelat zu Pimeloyl-CoA als ersten Schritt der Biotin-Biosynthese oder bei Wachstum auf Pimelat. Es sind zwei Arten von PCS in Bakterien beschrieben: In *Bacillus sphaericus* wurde ein 60 kDa großes AMP-bildendes, homodimeres Enzym charakterisiert, das hochspezifisch Pimelat zu Pimeloyl-CoA umsetzt (Ploux et al. 1992). Zuvor wurde bereits eine AMP-bildende PCS aus *Bacillus megaterium* partiell gereinigt und charakterisiert (Izumi et al. 1974). Demgegenüber wurde aus dem Bakterium *Pseudomonas mendocina* ein 200 – 300 kDa großes Enzym gereinigt und als funktionelle PCS charakterisiert, welches sowohl auf Sequenzebene als auch in der Domänenstruktur hohe Ähnlichkeiten mit ACDs aufweist. Ob es sich um ein AMP- oder ADP-bildendes Enzym handelt, wird kontrovers diskutiert (Binieda et al. 1999; Sanchez et al. 2000). Bislang liegen nur wenige Daten zu diesen ACD-Homologen vor. Insbesondere ist nichts über den Reaktionsmechanismus bekannt. Auf Grund der hohen Sequenzhomologien zu ACDs, insbesondere der Konservierung der beiden für die ACD katalytisch essentiellen Histidinreste, kann man annehmen, dass der Reaktionsmechanismus ähnlich wie in ACDs verläuft. Daher war es Aufgabe dieser Arbeit, zwei hypothetische Pimeloyl-CoA Synthetasen aus dem Bakterium *Ralstonia eutropha* rekombinant in *E. coli* zu exprimieren, zu reinigen und zu charakterisieren. Anschließend war es Ziel in einer der beiden PCS durch ortsspezifische Mutagenese die beiden konservierten Histidine gegen Alanin auszutauschen und den Einfluss der Austausch auf die Reaktionskinetik zu untersuchen.

*Feruloyl-CoA Synthetasen* katalysieren die ATP- und HSCoA-abhängige Aktivierung von Ferulat zu Feruloyl-CoA bei Wachstum auf Ferulat oder im Rahmen der Vanillin-Biosynthese



(Narbad und Gasson 1998; Plaggenborg et al. 2001). Ähnlich wie bei den PCS sind ein Großteil der bislang identifizierten FCS AMP-bildende Enzyme (AMP-FCS), die zur Superfamilie der Adenylat formenden Enzyme gehören, wie z.B. die AMP-FCS aus *Pseudomonas* sp. HR199, *Pseudomonas putida* oder *Amycolatopsis* sp. Str. HR167 (Overhage et al. 1999; Achterholt et al. 2000; Plaggenborg et al. 2003). In *Delftia acidovorans* und in *Sphingomonas paucimobilis* wurden dagegen zwei funktionale Feruloyl-CoA Synthetasen identifiziert, die hohe Sequenzhomologien zu NDP-bildenden Acyl-CoA Synthetasen aufweisen (Plaggenborg et al. 2001; Masai et al. 2002). Die *fcs*-Gen-defizienten Mutanten von *D. acidovorans* konnten nicht mehr auf Ferulat als Substrat wachsen (Plaggenborg et al. 2001). Obwohl mehrere Studien existieren, in denen funktionelle FCS identifiziert worden sind, wurden bislang weder AMP-FCS noch ACD-ähnliche FCS biochemisch charakterisiert. Daher war es Aufgabe dieser Arbeit, am Beispiel der FCS aus *D. acidovorans* erstmals eine FCS heterolog in *E. coli* zu exprimieren, zu reinigen und zu charakterisieren.

### 3.2.3 ACDs in Eukarya

Während SCS-Homologe in Eukaryoten weit verbreitet sind, sind ACDs bislang nur in den Acetat bildenden Protisten *Entamoeba histolytica* und *Giardia lamblia* beschrieben. Darüber hinaus finden sich ACD-Homologe in Trichomonaden und Plasmodien sowie in *Blastocystis*, nicht aber in „höheren“ Eukaryoten wie Animalia, Plantae oder Fungi (siehe Abbildung 36, S. 101). Die ACD aus *Giardia lamblia* setzte neben Acetyl-CoA und Propionyl-CoA auch Succinyl-CoA effektiv um. Allerdings wird die Rückreaktion, also die Säureaktivierung, nicht katalysiert (Sanchez und Müller 1996). Bei der Erstbeschreibung der ACD-Reaktion in *E. histolytica* wurde das Enzym angereichert und eine ADP-abhängige Umsetzung von Acetyl-CoA und Propionyl-CoA nachgewiesen (Reeves et al. 1977). Auf Grund von Genomanalysen wurde der ACD eine Rolle bei der Acetatbildung aus Kohlenhydraten sowie der Energiegewinnung aus Aminosäuren zugeschrieben (Loftus et al. 2005; Anderson and Loftus 2005b; Müller et al. 2012). Bisher wurde die ACD allerdings nicht näher charakterisiert. Daher sollte in dieser Arbeit die ACD aus *E. histolytica* heterolog in *E. coli* exprimiert, gereinigt und charakterisiert werden.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Spezielle Chemikalien, Enzyme und Materialien

ABTS (2,2-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure))	Roche Diagnostics, Mannheim
Acetyl-CoA	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Acetyl-CoA Synthetase (AMP-bildend) (ACS)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf oder Megazyme, Coring System Diagnostix GmbH, Gernsheim
Carbenicillin	Roth, Karlsruhe
Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant blue R250	Roth, Karlsruhe
Glucose-Oxidase (GOD)	Roche Diagnostics, Mannheim
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase	Roche Diagnostics, Mannheim
Hexokinase	Roche Diagnostics, Mannheim
Isobutyryl-CoA	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktosid (IPTG)	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Lactat-Dehydrogenase (LDH)	Roche Diagnostics, Mannheim
Myokinase (MK)	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Peroxidase (POD)	Roche Diagnostics, Mannheim
Phenylacetyl-CoA	Sigma-Aldrich, Schnelldorf
Pwo-Polymerase	PeqLab, Erlangen
Pyruvatkinase (PK)	Roche Diagnostics, Mannheim
Qiaprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
T4 DNA Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot
Taq-Polymerase	PeqLab, Erlangen

Alle nicht aufgeführten Chemikalien und Feinchemikalien stammen von den Firmen Roth (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (Schnelldorf).

## 4.2 Verwendete *E. coli*-Stämme

Die folgenden *E. coli*-Stämme fanden in dieser Arbeit Verwendung. Alle Stämme wurden von Agilent Technologies, Waldbronn bezogen. In Klammern ist die jeweilige Antibiotika-Resistenz des Stammes angegeben.

**Tabelle 1 Verwendete *E. coli*-Stämme.** Die Bezeichnung der in dieser Arbeit für Klonierung, Plasmidvermehrung und Expression verwendeten *E. coli*-Stämme und der betreffende Genotyp sind angegeben. Eine gegebene Antibiotikaresistenz ist in Klammern hinter der Stamm-Bezeichnung aufgeführt.

Stamm	Genotyp
<b>Klonierung und Plasmidvermehrung:</b>	
<i>E. coli</i> JM109	<i>e14-(McrA-) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(r<sub>K</sub> m<sub>K</sub>) supE44 relA1Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB lacIqZΔM15]</i>
<i>E. coli</i> XL1-Blue Mrf'	<i>Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]</i>
<i>E. coli</i> XL10-Gold	<i>endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Hte Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 tet<sup>R</sup> F'[proAB lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10(Tet<sup>R</sup> Amy Cm<sup>R</sup>)]</i>
<b>Expression:</b>	
<i>E. coli</i> BL21(DE3)CodonPlus RIL (Chloramphenicol)	<i>F' ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) λ(DE3) pLysS(cm<sup>R</sup>)</i>
<i>E. coli</i> Rosetta(DE3) pLysS (Chloramphenicol)	<i>F' ompT hsdS<sub>B</sub>(R<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) pLysSRARE (Cam<sup>R</sup>)</i>

## 4.3 Verwendete Plasmidvektoren

Vektor	Antibiotikaresistenz
pET14b	Ampicillin
pET17b	Ampicillin
pET19b	Ampicillin
pET28a	Kanamycin

Alle verwendeten Plasmidvektoren stammen von der Firma Novagen, Schwalbach.

## 4.4 Wachstum von *E. coli*

Das Wachstum von *E. coli* erfolgte aerob bei 37 °C in LB-Medium (Roth, Karlsruhe). Flüssigkulturen wurden für 12 –16 h bei 120 – 150 U/min auf einem Schüttler inkubiert. Kulturen auf LB-Agar-Platten (LB-Medium + 1.8 % Agar-Agar, Roth, Karlsruhe) wurden nicht geschüttelt. Die Selektion auf Transformanten erfolgte bei Vektoren mit Ampicillin-Resistenz durch Zugabe von 100 µg/ml Carbenicillin zum Medium. Vektoren mit Kanamycin-Resistenz wurden durch Zugabe von 30 µg/ml Kanamycin selektiert. Zur Anzucht von transformierten Expressionsstämmen wurde dem Medium zusätzlich 34 µg/ml Chloramphenicol zugesetzt.

## 4.5 Synthetische Oligonucleotide

**Tabelle 2 Oligonucleotide die in dieser Arbeit verwendet wurden.** Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen. Die Vorwärtsprimer sind jeweils mit fs, die Rückwärtsprimer mit rs bezeichnet.

Bezeichnung	Basensequenz 5' → 3'	Schnittstelle
Caur3920fs	CCCAT <u>CATATG</u> CTAGAAGC	NdeI
Caur3920rs	<u>CTCGAGC</u> ATTAGTTGAGGA	XhoI
Caur_3920intfs*	CGAACTGTTAGCTACCG	
Caur_3920intrs*	CAAAACTTCACGGCCTTTAC	
CaurACDRfs	GCTAGAAGCTATCTTCTCTCCACAATCG	
CaurACDRrs	GTTCCAGGCTTCTAGCAACGCTAC	
CaurACDNPTARTfs	GGAATGGGAGGCATTTATGTCGAGG	
CaurACDNPTARrs	CATCGCGCAGCGTTTTGGCAAATG	
CaurNPTARTfs	CGTGCAGCGTTATGTTGGGGATC	
CaurNPTARrs	GATTTGCAACCCCAACAGGCGATAC	
DaciFCSfs	GGAGACAC <u>CATATG</u> ACAACGACAGAGATG	NdeI
DaciFCSrs	GGAAAGCGAGAAAGGGATCCGCATG	BamHI
DaciFCSintseq*	CGCCATGATCGTCGAGCAGATC	
EHI178960fs	CATCATT <u>CATATG</u> CAATTTGAGC	NdeI
EHI178960rs	GACATGTA <u>ACTCGAGT</u> AATTTTC	XhoI
EHI178960int*	GATAGATGTGGATGTATTCGTGTAG	
kcr_0030fs	CATGAGGGGG <u>CATATG</u> AGCCTGGATGTC	NdeI
kcr_0030rs	GACC <u>CTCGAGT</u> TTTTACTTAAGACTTACCTTTG	XhoI
kcr_0073fs	CTGAAATGGGGTGAACCC <u>CATATG</u> AAAAATAC	NdeI
kcr_0073rs	GGT <u>GAATTCTT</u> CAGTGAGACTCGAAGTAC	EcoRI
kcr_0115fs	CGGTGAT <u>CATATG</u> AGCTCAAGGGACC	NdeI
kcr_0115rs	CTTCT <u>CGAGA</u> AGCCCTCACCTCAG	XhoI
kcr_0198fs	CTTGGGATGC <u>CATATG</u> AACGACCTAGAGAGGC	NdeI
kcr_0198rs	GATGAACGT <u>CTCGAGAT</u> CACCTCACGGCCAGG	XhoI
Kcr_0198int*	CAGGGAATGTAGCTTTTTATC	
kcr_1138fs	CATAAGGGGTGGT <u>CATATG</u> AGCTTGC	NdeI
kcr_1138rs	GCTATTGCGCGGCCGCTGATAATAATATTG	NotI
kcr_1392fs	CGATGTTT <u>AGCTAGC</u> AGATGCATCATG	NheI
kcr_1392rs	GGTTAAGAGCCGGATCCTCTACC	BamHI
kcr_1393fs	GAGGTGAAC <u>CATATG</u> GCGGATAC	NdeI
kcr_1393rs	CTT <u>ACTCGAGG</u> ACTTTAATGCC	XhoI
MM0358fs	GTGAGGTTT <u>CATATG</u> GATATAGAGGAAGC	NdeI
MM0358rs	C <u>ACTCGAGC</u> TTAACACTTTATTTCTGCCTG	XhoI
MM0358int14fs*	GAGGCCTGTCAGGGATGGGGTTTC	
MM0358int14rs*	CCAATCTTCGTAGCTTGCAACCTCGATTATG	
MM0493fs	GAGGGCGT <u>CATATG</u> AGTATGAAGC	NdeI
MM0493rs	CC <u>ACTCGAG</u> ATAAAAAATTAATTTTCTTCAATG	XhoI
Pfu0233fs	GGTGATGAAC <u>CATATG</u> ACAGTTAACC	NdeI
Pfu0233rs	GAACT <u>CGAGAA</u> ATTAGAGCTCAGC	XhoI

**Tabelle 1 Fortsetzung Oligonukleotide die in dieser Arbeit verwendet wurden.** Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen. Die Vorwärtsprimer sind jeweils mit fs, die Rückwärtsprimer mit rs bezeichnet

Bezeichnung	Basensequenz 5'→3'	Schnittstelle
Pfu0233sp1s*	GTAAAGAGGGCTAGAAAGTG	
Pfu0233sp2s*	CTAAAGGATGATCCAAAAACCAAG	
Pfu1837fs	GATGGGGGAATGACATATGAAGGG	NdeI
Pfu1837rs	GGTAAACTCGAGGCTATCCCTTAAG	XhoI
RaEuB0370fs	GTCGAGGAGCATATGTCGCAACGAG	NdeI
RaEuB0370rs	GTCAGACAAGGATCCATGTTCGATCAATC	BamHI
RaEuB0370H269Ars***	GCGCGGCCGTGGCCGATGCGGCCG	
RaEuB0370H539Afs***	CGGCCGACATCCAGGCCAAGTCCGACGTCG	
RaEuB0370H539Ars***	CGACGTCGGACTTGGCCTGGATGTTCGGCCG	
RaEuB0370H539Asp1f*	CGGCTATATCGAGGGCATC	
RaEuB0370H539Asp2f*	GTATCGACTGCGCGATC	
RaEuB0370H539Asp3f*	CAACCATCGAACGCATTG	
RaEuB0404fs	CGACGGGGGATCCATGACTACCAAG	BamHI
RaEuB0404rs	CAACGCCTCGAGCGCTTATGCAC	XhoI
T7-Promoter Primer**	TTAATACGACTCACTATAGGG	
T7-Terminator Primer**	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	

\* Primer zur Sequenzierung

\*\* Standard Vektorprimer

\*\*\* Mutageneseprimer

## 4.6 Proteinbiochemische Standardmethoden

### 4.6.1 Colorimetrische Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Proteinkonzentration während der Reinigung und Charakterisierung von Enzymen wurde mit einer modifizierten Methode nach Bradford bestimmt (Bradford 1976). Dazu wurden 100 µl einer proteinhaltigen Probe mit 900 µl Bradford-Reagenz (70 mg Coomassie Brilliant Blue, 50 ml 99% Ethanol, 100 ml 80% Ortho-Phosphorsäure ad 1000 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>) versetzt, gemischt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktion wurde bei 595 nm bestimmt. Eine Eichung erfolgte zu jeder Messung mit Hilfe eines Standards aus Rinderseerum-Albumin Fraktion V. Eine Proportionalität der Messwerte war bis zu einer Proteinkonzentration von 5 µg im Test gegeben.

### 4.6.2 Colorimetrische Bestimmung der Proteinkonzentration nach Biuret

Die Relation von optischer Dichte (OD) bei 600 nm und der Proteinkonzentration in Zellkulturen von *Chloroflexus aurantiacus* wurde mit einer modifizierten Methode von Biuret ermittelt (Bode et al. 1968). Zunächst wurden 200 µl Zellsuspension bei definierter OD<sub>600</sub> mit 200 µl 1 M NaOH versetzt und 30 min bei 100 °C inkubiert. Anschließend wurden 300 µl der

inkubierten Probe mit 700 µl Biuret-Reagenz (9 g/l Kaliumnatriumtartrat, 3 g/l Kupfersulfat-Pentahydrat, 5 g/l Kaliumiodid in 0.2 M NaOH) versetzt und 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Extinktion wurde bei 546 nm bestimmt. Die Eichung erfolgte mit einem Standard aus Rinderserum-Albumin Fraktion V. Die Messwerte waren bis zu einer Proteinmenge von 3 mg im Test proportional.

#### 4.6.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE diente im Verlauf der Arbeit der Reinheitskontrolle während der Reinigung von Proteinen und der Bestimmung der apparenten molekularen Größe der Protein-Untereinheiten. Die Elektrophorese erfolgte in 12%igen oder 10%igen diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen (7 cm x 8 cm x 0.075 cm) in einer Mini Protean Elektrophorese Zelle (Biorad, München). Trenn- und Sammelgel waren wie folgt zusammengesetzt:

**Tabelle 3 Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele der SDS-PAGE.**

	Trenngel (12 %)	Trenngel (10 %)	Sammelgel (3.35 %)
30% Acrylamid 0.8 % Bisacrylamid	1 ml	0.833 ml	0.25 ml
1.5 M Tris-HCl pH, 8.8	0.625 ml	0.625 ml	--
0.5 M Tris-HCl pH, 6.8	--	--	0.3 ml
10% SDS	0.025 ml	0.025 ml	0.05 ml
Aqua bidest	0.818 ml	0.985 ml	1.625 ml
10% Ammoniumpersulfat	12.5 µl	12.5 µl	12.5 µl
TEMED	1.25 µl	1.25 µl	2.5 µl

Die Trichloressigsäure-Fällung wurde zur Konzentration von Proteinlösungen vor der SDS-PAGE verwendet. Hierzu wurden zwei Volumen Probe mit einem Volumen 30 %iger Trichloressigsäure (TCA) versetzt und 10 min bei 13200 rpm und 4 °C zentrifugiert (Centrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg). Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet wurde in 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> und 2 µl 1 M Tris-HCl pH 9.0 resuspendiert. Die Proben wurden mit 5x Auftragspuffer (Fermentas, St. Leon-Rot) und 20x DTT versetzt, 10 min bei 98 °C inkubiert, auf Raumtemperatur abgekühlt und in die Geltaschen transferiert. Der Elektrophoresepuffer bestand aus 25 mM Tris, 190 mM Glycin und 0.02% SDS. Die Auftrennung erfolgte für 10 min bei 70 V und anschließenden für 50 min bei 210 V. Als Standard-Molekulargewichtsmarker diente Protein Marker I von PeqLab (Erlangen). Die Färbung der Proteine erfolgte durch Inkubation für 1 min mit 1 % Coomassie Brilliant Blue R250 in 10 %

Essigsäure. Der nicht-proteingebundene Farbstoff wurde durch Inkubation mit 10 % Essigsäure entfernt.

#### **4.6.4 Ultrafiltration**

Die Ultrafiltration diente dem Umpuffern oder dem Ankonzentrieren von Proteinlösungen während der Reinigung. Die Methode wurde mit Hilfe einer 10 ml oder 100 ml Ultrafiltrationszelle (Amicon, Beverly, USA) durchgeführt. Es wurden Filter (Sartorius, Göttingen) mit Ausschlussgrößen von 10 – 30 kDa eingesetzt. Die Ausschlussgröße betrug dabei jeweils maximal 50% der apparenten Größe der Untereinheiten. Nach erfolgter Ultrafiltration wurde der Überstand für 10 min bei 4 °C und 13000 rpm (Centrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert, um präzipitiertes Protein aus der Lösung zu entfernen.

#### **4.6.5 Bestimmung des nativen Molekulargewichts von Proteinen**

Die apparenten molekularen Massen der nativen und rekombinanten Proteine wurden säulenchromatographisch mittels Größen-Ausschlusschromatographie an einer HiLoad 16/60 Superdex 200 prepgrade (GE Healthcare, Freiburg) mit einem Volumen von 120 ml bestimmt. Das auf die Säule aufgetragene Probenvolumen betrug 1 ml. Die Elution erfolgte mit 100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5, bei einer Flussrate von 1 ml/min. Die Säule wurde zuvor mit dem „LMW Gel Filtration Calibration Kit“ bzw. „HMW Gel Filtration Calibration Kit“ von GE Healthcare (Freiburg) nach Handbuch kalibriert.

### **4.7 Molekularbiologische Standardmethoden**

#### **4.7.1 Polymerase Kettenreaktion**

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) diente in dieser Arbeit der spezifischen Amplifikation von offenen Leserahmen (ORF) aus genomischer DNA, der Überprüfung auf vorhandenes Insert in putativen Transformanten oder der Mutagenese. Die PCRs wurden in 50 µl Reaktionsansätzen in einem Thermocycler (T-3, Biometra, Göttingen) durchgeführt. Die Programme wurden in Abhängigkeit von der Produktlänge und den Schmelzpunkten der Oligonucleotid-Primer (MWG Biotech, Ebersberg) variiert. Alle Reaktionskomponenten mit Ausnahme der Primer und der DNA stammten von PeqLab (Erlangen). Die verwendeten Oligonucleotide sind in Tabelle 2 aufgeführt.

**Zur Amplifikation der Gene wurden folgende Protokolle verwendet:**

*Chloroflexus aurantiacus*, ORF Caur\_3920: Der 50 µl-Ansatz enthielt 65 ng Template, 300 nM Primer Caur\_3920fs und Caur\_3920rs, 5 µl 10x Reaktionspuffer, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 300 µM dNTP-Mix und 2.5 U *Pwo*-DNA-Polymerase. Der Ansatz wurde wie folgt inkubiert: 300 s Denaturierung bei 95 °C, 10 Zyklen aus Denaturierung bei 95 °C für 30 s, Annealing bei 55 °C für 30 s, Elongation bei 72 °C für 180 s (dieser Schritt wurde mit jedem Zyklus um 20 s verlängert), 25 Zyklen aus Denaturierung bei 95 °C für 30 s, Annealing bei 58 °C für 30 s, Elongation bei 72 °C für 180 s (bei diesem Schritt wurde die Synthesezeit mit jedem Zyklus um 20 s verlängert), abschließende Elongation bei 72 °C für 420 s.

*Delftia acidovorans*, ORF 2 *fcs* Gen: Die DNA stammte von der DSMZ (DSM 39). Der Reaktionsansatz enthielt 30 ng Template, 300 nM Primer DaciFCSfs, 300 nM Primer DaciFCSrs, 5 µl 10x Reaktionspuffer, 1.5 mM MgSO<sub>4</sub>, 300 µM dNTP-Mix und 1.25 U *Pwo*-DNA-Polymerase. Der Ansatz wurde wie folgt inkubiert: 480 s Denaturierung bei 98 °C, 10 Zyklen aus Denaturierung bei 98 °C für 45 s, Annealing bei 55 °C für 30 s, Elongation bei 68 °C für 180 s, 30 Zyklen aus Denaturierung bei 98 °C für 45 s, Annealing bei 58 °C für 30 s, Elongation bei 68 °C für 180 s, abschließende Elongation bei 68 °C für 420 s.

*Entamoeba histolytica* ORF EHI\_78960: Der Reaktionsansatz enthielt 200 ng Template, 300 nM Primer EHI178960fs, 300 nM Primer EHI178960rs, 5 µl 10x Reaktionspuffer, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 300 µM dNTP-Mix und 2.5 U *Pwo*-DNA-Polymerase. Der Ansatz wurde wie folgt inkubiert: 300 s Denaturierung bei 95 °C, 10 Zyklen aus Denaturierung bei 95 °C für 30 s, Annealing bei 47 °C für 30 s, Elongation bei 72 °C für 150 s, 25 Zyklen aus Denaturierung bei 95 °C für 30 s, Annealing bei 49 °C für 30 s, Elongation bei 72 °C für 150 s (bei jedem Zyklus wurde die Synthesezeit um 20 s verlängert), abschließende Elongation bei 72 °C für 420 s.

*Candidatus korarchaeum kryptophilum*. Die Gene der ORFs *kcr\_0030*, *kcr\_0073*, *kcr\_0115*, *kcr\_0198*, *kcr\_1138*, *kcr\_1392* und *kcr\_1393* wurden nach nahezu identischen Protokollen amplifiziert. Die verwendeten Primer sind Tabelle 4 zu entnehmen. Die Annealingtemperatur richtete sich nach den Schmelzpunkten der jeweiligen Primer. Der jeweilige Reaktionsansatz enthielt 50 ng Template-DNA, 300 nM Vorwärts- bzw. Rückwärtsprimer (*kcr\_0115*: 400 nM), 5 µl 10x Reaktionspuffer, 2 mM MgSO<sub>4</sub> (*kcr\_0073*: 2.5 mM), 300 µM dNTP-Mix und 2.5 U *Pwo*-DNA-Polymerase. Die Ansätze wurden wie folgt inkubiert: 300 s Denaturierung bei 95 °C, 10 Zyklen aus Denaturierung bei 95 °C für 30 s, Annealing bei 52 °C – 64 °C für 30 s, Elongation bei 72 °C für 180 s (*kcr\_0115*: 150 s) (bei diesem Schritt wurde die Syn-



thesezeit mit jedem Zyklus um 20 s verlängert), 25 Zyklen aus Denaturierung bei 95 °C für 30 s, Annealing bei 55 °C – 66 °C für 30 s, Elongation bei 72 °C für 180 s (kcr\_0115: 150 s) (bei jedem Zyklus wurde die Synthesezeit um 20 s verlängert), abschließende Elongation bei 72 °C für 420 s.

*Methanosarcina mazei* ORF MM0358 und MM0493: Die 50 µl Reaktionsansätze enthielt jeweils 80 ng Template, je 300 nM Vorwärts- bzw. Rückwärtsprimer, 5 µl 10x Reaktionspuffer, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 300 µM dNTP-Mix und 2.5 U *Pwo*-DNA-Polymerase. Die Ansätze wurden wie folgt inkubiert:

*MM\_0358*. 300 s Denaturierung bei 95 °C, 10 Zyklen aus Denaturierung bei 95 °C für 30 s, Annealing bei 55 °C für 30 s, Elongation bei 72 °C für 150 s (bei diesem Schritt wurde die Synthesezeit mit jedem Zyklus um 20 s verlängert), 25 Zyklen aus Denaturierung bei 95 °C für 30 s, Annealing bei 58 °C für 30 s, Elongation bei 72 °C für 150 s (bei jedem Zyklus wurde die Synthesezeit um 20 s verlängert), abschließende Elongation bei 72 °C für 420 s.

*MM\_0493*. 300 s Denaturierung bei 95 °C, 10 Zyklen aus Denaturierung bei 95 °C für 30 s, Annealing bei 52 °C für 30 s, Elongation bei 72 °C für 120 s (bei diesem Schritt wurde die Synthesezeit mit jedem Zyklus um 20 s verlängert), 25 Zyklen aus Denaturierung bei 95 °C für 30 s, Annealing bei 55 °C für 30 s, Elongation bei 72 °C für 120 s (bei jedem Zyklus wurde die Synthesezeit um 20 s verlängert), abschließende Elongation bei 72 °C für 420 s.

*Pyrococcus furiosus* ORF Pfu\_0233 und ORF Pfu\_1837: Die 50 µl Reaktionsansätze enthielten jeweils 23 ng Template, je 300 nM Vorwärts- bzw. Rückwärtsprimer, 5 µl 10x Reaktionspuffer, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 300 µM dNTP-Mix und 2.5 U *Pwo*-DNA-Polymerase. Die Ansätze wurden wie folgt inkubiert:

*Pfu\_0233*. 270 s Denaturierung bei 94 °C, 5 Zyklen aus Denaturierung bei 94 °C für 30 s, Annealing bei 50 °C für 30 s, Elongation bei 72 °C für 90 s, 35 Zyklen aus Denaturierung bei 94 °C für 30 s, Annealing bei 55 °C für 30 s, Elongation bei 72 °C für 90 s (bei jedem Zyklus wurde die Synthesezeit um 10 s verlängert), abschließende Elongation bei 72 °C für 300 s.

*Pfu1837*. 270 s Denaturierung bei 94 °C, 5 Zyklen aus Denaturierung bei 94 °C für 30 s, Annealing bei 52 °C für 30 s, Elongation bei 72 °C für 60 s, 35 Zyklen aus Denaturierung bei 94 °C für 30 s, Annealing bei 57 °C für 30 s, Elongation bei 72 °C für 60 s (bei jedem Zyklus wurde die Synthesezeit um 10 s verlängert), abschließende Elongation bei 72 °C für 300 s.

*Ralstonia eutropha* ORF H16\_B0370: Der Reaktionsansatz enthielt 95 ng Template, 400 nM Primer RaEuB0370fs, 400 nM Primer RaEuB370rs, 5 µl 10x Reaktionspuffer, 2.5 mM MgSO<sub>4</sub>, 300 µM dNTP-Mix und 1.25 U *Pwo*-DNA-Polymerase. Der Ansatz wurde wie folgt

inkubiert: 300 s Denaturierung bei 95 °C, 10 Zyklen aus Denaturierung bei 95 °C für 30 s, Annealing bei 62 °C für 30 s, Elongation bei 68 °C für 180 s, 30 Zyklen aus Denaturierung bei 95 °C für 30 s, Annealing bei 66 °C für 30 s, Elongation bei 68 °C für 180 s (bei jedem Zyklus wurde die Synthesezeit um 10 s verlängert), abschließende Elongation bei 68 °C für 420 s.

*Ralstonia eutropha* ORF H16\_B0404: Der Reaktionsansatz enthielt 95 ng Template, 300 nM Primer RaEuB0404fs, 300 nM Primer RaEuB0404rs, 5 µl 10x Reaktionspuffer, 1.5 mM MgSO<sub>4</sub>, 300 µM dNTP-Mix und 1.25 U *Pwo*-DNA-Polymerase. Der Ansatz wurde wie folgt inkubiert: 300 s Denaturierung bei 98 °C, 10 Zyklen aus Denaturierung bei 98 °C für 30 s, Annealing bei 58 °C für 30 s, Elongation bei 68 °C für 180 s, 30 Zyklen aus Denaturierung bei 98 °C für 30 s, Annealing bei 60 °C für 30 s, Elongation bei 68 °C für 180 s (bei jedem Zyklus wurde die Synthesezeit um 20 s verlängert), abschließende Elongation bei 68 °C für 420 s.

#### 4.7.2 Ortsspezifische Mutagenese

Durch Sequenzvergleiche und multiple Alignments mit verschiedenen ACDs wurden in der von ORF H16\_B0370 kodierten PCS aus *Ralstonia eutropha* zwei in ACDs für die Reaktion essentielle Histidine identifiziert, die auch in PCS (H<sup>269</sup> und H<sup>539</sup>) konserviert sind. Diese wurden zu Alanin mutiert.

Mutanten von pET19bRaPCS1 wurden durch ortsspezifische Mutagenese mit dem „Quick-Change site-directed mutagenesis II XL Kit“ (Stratagene) nach Herstellerangaben erstellt. Es wurden für die Erstellung der RaPCS1H269A-Mutante die Oligonucleotide RaEuB0370H269Afs und RaEuB0370H269Ars verwendet. Für die RaPCS1H539A-Mutante fanden die Oligonucleotide RaEuB0370H539Afs und RaEuB0370H539Ars Verwendung. Der Reaktionsansatz für die Mutagenese enthielt jeweils in 50 µl: 36 ng Parental-DNA (pET19bRaPCS1), 3 µl Quicksolution, je 250 nM Vorwärts- bzw. Rückwärtsprimer, 5 µl Puffer, 1 µl dNTP-Lösung, 1 U *Pfu*-Ultra DNA-Polymerase, ad 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>

Der Ansatz der RaPCS1H269A-Mutante wurde wie folgt inkubiert: initiale Denaturierung für 60 s bei 96 °C, dann 18 Zyklen aus Denaturierung bei 95 °C für 50 s, Annealing bei 60 °C für 50 s und Amplifikation bei 68 °C für 540 s. Es folgte eine abschließende Amplifikation bei 68 °C für 420 s. Das Inkubationsprotokoll der RaPCS1H539A-Mutante war wie folgt: initiale Denaturierung für 60 s bei 96 °C, dann 16 Zyklen aus Denaturierung bei 95 °C für 30 s, Annealing bei 60 °C für 60 s und Amplifikation bei 68 °C für 600 s. Es folgte eine abschließende Amplifikation bei 68 °C für 420 s.

### 4.7.3 Reverse-Transkriptase PCR

Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) wurde genutzt, um in auf Glucose gewachsenen Zellen von *C. aurantiacus* Transkript von Caur\_3920 und Caur\_3921 nachzuweisen sowie die Cotranskription beider ORFs zu untersuchen. Das Enzym Reverse Transkriptase schreibt ein mRNA-Template in cDNA um. Die cDNA kann dann in einer Standard-PCR amplifiziert werden.

**Isolierung von mRNA aus Zellen von *C. aurantiacus*.** Die auf Glucose gewachsenen Zellen von *C. aurantiacus* wurden bei einer OD<sub>600</sub> von 4.2 durch Zentrifugation für 20 min bei 13.000 rpm (Eppendorf Minispinn, Hamburg) geerntet. Die Isolierung von 73.5 mg GesamtrNA erfolgte aus 63 mg Zellen mit Hilfe von TRI-Reagenz (Sigma Aldrich, Schnellendorf) nach der zugehörigen Vorschrift. Die gewonnene RNA wurde anschließend mittels „DNaseI, RNase-free-Kit“ (Fermentas, St. Leon-Rot) nach den Angaben im Handbuch behandelt, um genomische DNA zu entfernen.

**RT-PCR.** Die RT-PCR wurde mit dem „OneStep RT-PCR kit“ (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurden drei unterschiedliche Fragmente aus RNA amplifiziert. Ein Fragment überspannte einen 546 Bp langen Bereich am 5'-Ende von Caur\_3920 (Primer CaurACDRTfs und CaurACDRTs), ein zweites einen 542 Bp langen Bereich der eine Region am 3'-Ende von Caur\_3920, den intergenischen Bereich und einen Teil am 5'-Ende von Caur\_3921 überlappte (CaurACDNPTARTfs und CaurACDNPTARTs) sowie ein 547 Bp langes Fragment am 3'-Ende von Caur\_3920 (CaurNPTAfs und CaurNPTAs). Die 25 µl RT-PCR-Ansätze enthielten jeweils 140 ng gereinigte RNA, 5 µl RT-PCR Puffer, 400 µM dNTPs, 2.5 µl Q-Solution, 1 µl RT-Enzyme-Mix, je 250 nM Vorwärts- und Rückwärtsprimer, ad 25 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> Zusätzlich wurden drei dazu identische Kontrollansätze erstellt, bei denen RNA erst nach der Inkubation zur Transkription der RNA in cDNA hinzugegeben wurde. Eine weitere Kontrolle enthielt 60 ng genomische DNA anstelle der RNA, eine zusätzliche Leerkontrolle enthielt alle Komponenten aber kein Template. Diese beiden Kontrollen enthielten die Primer CaurACDNPTARTfs und CaurACDNPTARTs.

Alle Ansätze wurden wie folgt inkubiert: Transkription der mRNA in cDNA bei 50 °C für 30 min, Inaktivierung der Reversen Transkriptase bei 95 °C für 15 min. Anschließend 40 Zyklen aus Denaturierung für 40 s bei 94 °C, Annealing bei 58 °C für 45 s und Amplifikation bei 72 °C für 60 s. Es folgte eine abschließende Amplifikation bei 72 °C für 600 s. Nach der Inkubation wurden 10 µl je Ansatz mit 2 µl Auftragspuffer (Fermentas) versehen und das Ergebnis durch Agarosegelelektrophorese (siehe 4.7.4) analysiert.

#### **4.7.4 Reinigung von PCR-Produkten und Restriktionsansätzen**

Die amplifizierten oder restriktionshydrolysierten DNA-Fragmente wurden entweder mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ oder nach präparativer Gelelektrophorese mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ jeweils nach Angaben des Herstellers von Salzen und Enzymen gereinigt.

#### **4.7.5 Reinheitsanalyse, Größen- und Konzentrationsbestimmung von DNA**

**Absorptionsmessung bei 260 nm und 280 nm.** Die Konzentration von DNA wurde mit dem „Nano-Drop ND-1000“ Spektralphotometer (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, USA) photometrisch durch Absorption bei 260 nm bestimmt. Die Reinheit wurde durch den Absorptionskoeffizienten 260 nm/280 nm ermittelt. Reine DNA hat einen Koeffizienten zwischen 1.8 und 2 (Sambrook et al. 1989).

**Agarosegelelektrophorese.** Mit Hilfe von Agarosegelelektrophorese wurden DNA-Fragmente, PCR-Produkte und Plasmide analytisch oder präparativ nach der Größe aufgetrennt. Je nach Größe der DNA-Fragmente wurden entweder Gele mit 1 % oder 2 % Agarose verwendet. Dazu wurde Agarose in 30 ml (analytisch) oder 50 ml (präparativ) TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA) durch Aufkochen gelöst, nach Abkühlung auf ca. 60 °C wurde 30 µg Ethidiumbromid zugegeben und die Lösung in eine Gießvorrichtung (7 cm x 10 cm) gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 6x Auftragspuffer (Fermentas, St Leon-Rot) versetzt und zusammen mit einem Standard (Gene Ruler 100 bp DNA Ladder plus, oder Gene Ruler 1 kb DNA Ladder, Fermentas, St. Leon-Roth) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte mit einer „Agagel Mini Elektrophorese-Apparatur“ (Biometra, Göttingen) bei konstant 60-120 V in TAE-Puffer bei Raumtemperatur. Die Gele wurden anschließend auf einem UV-Schirm (366 nm) analysiert. Zur Dokumentation wurden die Gele über eine Video-Anlage aufgenommen und die Fotos über einen Video Graphic Printer ausgedruckt. Bei der präparativen Gelelektrophorese wurde die DNA in einem präparativen Agarosegel aufgetrennt und die spezifische DNA-Bande unter UV-Licht mittels Skalpell aus dem Gel extrahiert.

#### **4.7.6 Restriktionshydrolyse von Vektoren und PCR-Produkten.**

Restriktionshydrolysen wurden als Doppelverdau angesetzt. Dazu wurden jeweils zwei Restriktionsendonucleasen (New England Biolabs, Schwalbach, Taunus) in einem Ansatz gemeinsam mit der DNA in einem vom Hersteller angegebenen Puffer für 2-16 Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend die Enzyme bei 80 °C für 20 min denaturiert. Die Ansätze setzten sich wie folgt zusammen: Plasmid-DNA (1.5 - 5 µg DNA), jeweils 20 U Restriktion-

endonuclease, 5 µl Reaktionspuffer, 1x BSA, 0.5 U alkalische Phosphatase pro µg Plasmid-DNA (Calf intestinal phosphatase, New England Biolabs) ad 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>; bzw. PCR-Produkt (0.5 – 2 µg DNA), 5 µl Reaktionspuffer, je 20 U Restrictionsendonuclease, 1x BSA, ad 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>.

#### 4.7.7 Herstellung kompetenter Zellen

Zur Vermehrung von Vektoren wurden die Plasmide in *E. coli* JM109 oder *E. coli* XL1 Blue Mrf<sup>+</sup> transformiert. Zur Expression wurden die Vektoren entweder in *E. coli* BL21(DE3) Codon-Plus-RIL oder *E. coli* Rosetta(DE3) pLysS transformiert. Dazu wurden entweder CaCl<sub>2</sub>-kompetente Zellen oder elektrokompente Zellen verwendet.

**Herstellung CaCl<sub>2</sub>-kompetenter Zellen.** Die Herstellung kompetenter Zellen wurde nach dem Protokoll im T-Cloning Kit Manual der Firma Fermentas durchgeführt. 400 ml LB-Medium (25 g/l LB-Medium, Roth, Karlsruhe) wurden 10 %ig mit einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C unter aeroben Bedingungen bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen 20 min auf Eis gehalten und 15 min zentrifugiert (5000 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet in 200 ml eiskaltem TBS-Puffer (5 mM Tris-HCl, pH 7.0, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min wurde das Pellet in 200 ml eiskalter CaCl<sub>2</sub>-Lösung (5 mM Tris-HCl, pH 7.0, 100 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Suspension ein weiteres Mal für 10 min zentrifugiert, in 20 ml eiskalter CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und 1 h auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde mit Glycerin versetzt (Endkonzentration von 20%) und in 200 µl Aliquots in sterilen Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten Zellen wurden bis zur Verwendung bei -70 °C gelagert.

**Herstellung elektrokompenter Zellen.** Elektrokompente Zellen wurden wie folgt hergestellt: 20 ml LB-Medium wurden 1%ig mit einer über-Nacht Kultur des jeweiligen Stammes angeimpft und bei 37 °C auf einem Reziproschüttler zwölf Stunden inkubiert. Je 5 ml Kultur wurden durch Zentrifugation für 1 min bei 7000 rpm und 4 °C pelletiert (Centrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg), in 1 ml 4 °C kaltem H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> resuspendiert und 1 min bei 7000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 1 ml 10 % Glycerin gelöst und erneut zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 0.12 ml 10 % Glycerin resuspendiert und in 40 µl Aliquots in sterilen Eppendorf-Reaktionsgefäßen abgefüllt. Die Zellen wurden mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -70 °C gelagert.

#### 4.7.8 Ligation und Transformation von Vektoren

**Ligation eines PCR-Produkts in einen Vektor.** Die 20 µl Ligationsansätze enthielten restriktionshydrolysiertes PCR-Produkt und Plasmid, 1 U T4-DNA-Ligase, 2 µl T4-DNA-Ligase Puffer, ad 20 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> Die zu ligierenden PCR-Produkte wurden dabei im drei- bis zehnfachen molaren Überschuss zu den Plasmiden eingesetzt. Die Ansätze wurden 2–16 h bei 22 °C inkubiert und anschließend 20 min bei 65 °C denaturiert. Danach wurden die Ligationensätze 15 min mit einem 0.025 µm Mikrodialysefilter (Sartorius, Göttingen) gegen H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> dialysiert und für die Transformation in *E. coli* eingesetzt.

**Transformation von Plasmidvektoren in *E. coli*.** Es wurden sowohl Ligationsansätze als auch Plasmide in *E. coli* transformiert.

*Transformation von CaCl<sub>2</sub>-kompetenten Zellen.* Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und 80 µl mit 10 µl des dialysierten Ligationsansatzes bzw. 100 bis 400 ng gereinigter Plasmid-DNA vermischt und für 60 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt und weitere 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 400 µl auf 37 °C vorgewärmten SOC-Mediums (0.5 % Hefe-Extrakt, 2 % Trypton, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM Glucose, pH 7.0) wurde die Suspension 30 min bei 37 °C und 800 rpm (Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Aliquots dieser Kulturen wurden auf antibiotikahaltigen LB-Agar-Platten zur Selektion ausplattiert und 12-16 h bei 37 °C inkubiert.

*Transformation von elektrokompetenten Zellen.* 40 µl elektrokompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 2-4 µl Ligationsansatz oder 50 bis 200 ng gereinigter Plasmid-DNA gemischt. Dieser Ansatz wurde in eine eisgekühlte Elektroporations-Küvette mit einem Durchmesser von 2 mm (Biozyme, Hessisch Oldendorf) überführt und bei 2.5 kV, 12.5 kV/cm, 25 µF und 200 Ω (BIO-RAD Pulse Controller und BIO-RAD Gene Pulser<sup>TM</sup>, BIORAD, München) elektroporiert. Nach Zugabe von 700 µl auf 37 °C vorgewärmten SOC-Mediums wurden die Zellen 60 min bei 37 °C und 800 rpm (Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Anschließend wurden Aliquots des Ansatzes auf antibiotikahaltigen LB-Agar-Platten zur Selektion ausplattiert und für 12 bis 16 h bei 37 °C inkubiert.

**Isolierung von Plasmidvektoren aus *E. coli*.** Die Isolation der Plasmide wurde aus 5 ml Flüssigkultur mit dem „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben durchgeführt.

#### 4.7.9 Kontrolle einer Klonierung

Nach der Transformation von *E. coli* mit Ligationsansätzen wurde eine Erfolgskontrolle durchgeführt und die Transformanten auf vorhandenes Insert der erwarteten Länge überprüft. Dies erfolgte entweder durch Amplifikation („Kolonie-PCR“) oder durch eine Form der Plasmidpräparation („Cracking“).

**Kolonie-PCR.** Der 50 µl Reaktionsansatz enthielt einen mit einem sterilen Zahnstocher von der LB-Agarplatte entnommenen Transformanten, je 300 nM T7-Promotor- und T7-Terminator-Primer, 5 µl Reaktionspuffer (enthält 2.5 mM MgSO<sub>4</sub>), 10 µl Enhancer und 300 µM dNTP-Mix. Nach einem initialen Denaturierungsschritt für 300 s bei 94 °C wurden 1 U Taq-Polymerase hinzugegeben. Darauf folgten 30 Zyklen aus Denaturierung für 20 s bei 94 °C, Annealing für 30 s bei 48 °C und Elongation für 90 s bei 72 °C. Abschließend fand ein weiterer Syntheseschritt für 420 s bei 72 °C statt. Die Amplifizierung wurde mit Hilfe von Agarosegelelektrophorese analysiert.

**Cracking.** Diese Methode stellt eine schnelle Form der Plasmidpräparation dar und beruht auf dem Prinzip der alkalische Lyse. Eine Kolonie der Transformationsplatte wurde in 25 µl 10 mM EDTA überführt, gut gemischt und 25 µl Puffer C (100 µl 2 M NaOH, 50 µl 10% SDS, 0.2 g Saccharose ad 1000 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>) hinzugegeben. Der Ansatz wurde bei 70 °C für fünf Minuten inkubiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 3 µl 4 M KCl und 1 µl Bromphenolblau (0.032 g Bromphenolblau in 10 ml 99% Ethanol) wurde der Ansatz vorsichtig durchmischt und 7 min bei 13.200 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert. 15 µl des Überstandes wurden auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen (siehe 4.7.5). Als Kontrolle diente der jeweilige Vektor ohne Insert.

#### 4.7.10 Sequenzierung

Alle im Rahmen dieser Arbeit konstruierten Vektoren wurden sequenziert, um das Insert und die flankierenden Bereiche auf Fehlerfreiheit zu überprüfen. Die Sequenzierung wurde entweder nach dem unten angegebenen Protokoll oder von der Firma MWG (MWG, Ebersberg) durchgeführt. Der Sequenzabgleich mit der Originalsequenz wurde mit der Software Bioedit durchgeführt (Hall 1999).

Für die Sequenzierung wurde das „ABIPRISM<sup>TM</sup> Cycle-Sequencing System“ (Applied Biosystems, Warrington, England) benutzt, welches das Didesoxynukleotid-Kettenabbruch-Verfahren nach Sanger (Sanger et al. 1977) verwendet. Dabei werden durch den Einbau unterschiedlicher, fluoreszenzmarkierter ddNTPs Kettenabbrüche erzeugt. Die fluoreszenzmarkierten Produkte wurden in einer hochauflösenden Polyacrylamid-Kapillargelelektrophorese

aufgetrennt, mit einem Laser angeregt und die emittierte Fluoreszenz detektiert (ABIPRISM<sup>TM</sup> 310, Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA). Die 10 µl Sequenzansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 250 ng Plasmid-DNA, 300 nM des jeweiligen Primers, 2 µl Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Premix, 1 µl Big Dye Sequencing Buffer (ABIPRISM<sup>TM</sup>, Applied Biosystems, Warrington, England) ad 10 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>. Das Programm für die PCR bestand aus einer initialen Denaturierung bei 96 °C für 60 s und 25 Zyklen aus Denaturierung bei 96 °C für 10 s, Annealing bei 48 °C für 5 s und Elongation bei 60 °C für 240 s. Die PCR-Produkte wurden nachfolgend für die Sequenzierung gefällt. Dazu wurden je PCR-Ansatz 3 µl 125 mM EDTA und 30 µl 99,8%-iges Ethanol zugegeben, gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die DNA in einer gekühlten Tischzentrifuge (Centrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg) 30 min bei 4 °C und 13200 rpm pelletiert und das Präzipitat in 30 µl 70%-igem Ethanol aufgenommen. Es folgte eine erneute Zentrifugation unter gleichen Bedingungen. Das Pellet wurde anschließend für 10 min in einer Vakuum-Zentrifuge (Christ, Osterode) bei 30 °C getrocknet und anschließend in 12 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> resuspendiert.



**Tabelle 4 Übersicht über die in dieser Arbeit konstruierten Vektoren.** Es sind die Quelle der DNA, der jeweilige ORF, der verwendete Vektor, die verwendeten Schnittstellen sowie die Bezeichnung der Primer, des konstruierten Vektors und des Genproduktes angegeben.

DNA-Quelle, ORF	Vektor	Schnittstellen	Primer	Bezeichnung Genprodukt	Bezeichnung Konstrukt
<i>C. aurantiacus</i> Caur_3920	pET19b	<i>NdeI</i> <i>XhoI</i>	Caur3920fs Caur3920rs	Caur-ACD	pET19bCaurACD
<i>D. acidovorans</i> fcs-gene	pET19b	<i>NdeI</i> <i>BamHI</i>	DaciFCSfs Da- ciFCSrs	Daci-FCS	pET19bDaciFCS
<i>E. histolytica</i> EHI_178960	pET19b	<i>NdeI</i> <i>XhoI</i>	EHI178960fs EHI178960rs	EH-ACD	pET19bEHACD
<i>Ca. K. cryptophilum</i> kcr_0030	pET17b	<i>NdeI</i> <i>XhoI</i>	kcr_0030fs kcr_0030rs	ckcACDa1	pET17bckcACDa1
<i>Ca. K. cryptophilum</i> kcr_0073	pET17b	<i>NdeI</i> <i>EcoRI</i>	kcr_0073fs kcr_0073rs	ckcACDa2	pET17bckcACDa2
<i>Ca. K. cryptophilum</i> kcr_0115	pET17b	<i>NdeI</i> <i>XhoI</i>	kcr_0115fs kcr_0115rs	ckcACDa3	pET17bckcACDb
<i>Ca. K. cryptophilum</i> kcr_0198	pET17b	<i>NdeI</i> <i>XhoI</i>	kcr_0198fs kcr_0198rs	ckcACDa4	pET17bckcACDa3
<i>Ca. K. cryptophilum</i> kcr_1138	pET17b	<i>NdeI</i> <i>NotI</i>	kcr_1138fs kcr_1138rs	ckcACDb	pET17bckcACDa4
<i>Ca. K. cryptophilum</i> kcr_1392	pET17b	<i>NheI</i> <i>BamHI</i>	kcr_1392fs kcr_1392rs	ckcSCSa	pET17bckcSCSa
<i>Ca. K. cryptophilum</i> kcr_1393	pET17b	<i>NdeI</i> <i>XhoI</i>	kcr_1393fs kcr_1393rs	ckcSCSb	pET17bckcSCSb
<i>M. mazei</i> MM_0358	pET14b	<i>NdeI</i> <i>XhoI</i>	MM0358fs MM0358rs	MM-ACDa	pET14bMMACDa
<i>M. mazei</i> MM_0493	pET14b	<i>NdeI</i> <i>XhoI</i>	MM0493fs MM0493rs	MM-ACDb	pET14bMMACDb
<i>P. furiosus</i> PF_0233	pET14b	<i>NdeI</i> <i>XhoI</i>	Pfu0233fs Pfu0233rs	PF-ACD <sub>succ<sup>a</sup></sub>	pET14bPFACD <sub>succ<sup>a</sup></sub>
<i>P. furiosus</i> PF_1837	pET14b	<i>NdeI</i> <i>XhoI</i>	Pfu1837fs Pfu1837rs	PFACDI <b>II</b> b	pET14bPFACDI <b>II</b> b
<i>R. eutropha</i> H16_B0370	pET19b	<i>NdeI</i> <i>BamHI</i>	RaEuB0370fs RaEuB0370rs	Ra-PCS1	pET19bRaPCS1
pET19bRaPCS1	pET19b	--	RaEuB0370H269fs RaEuB0370H269as	Ra-PCS1 H269A	pET19bRaPCS1-H269A
pET19bRaPCS1	pET19b	--	RaEuB0370H269fs RaEuB0370H269as	Ra-PCS1 H539A	pET19bRaPCS1-H539A
<i>R. eutropha</i> H16_B0404	pET28a	<i>BamHI</i> <i>XhoI</i>	RaEuB0404fs RaEuB0404rs	Ra-PCS2	pET19bRaPCS2

#### 4.8 Wachstum, Zellsuspensionen und Enzymaktivität in Extrakten von *Chloroflexus aurantiacus*

*Chloroflexus aurantiacus* J10-fl (DSM 635) stammte von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ).

Die Anzucht von *C. aurantiacus* fand unter anaeroben Bedingungen in mit Gummiseptum und Stahlkappe verschlossenen 100 ml bis 1000 ml Glasflaschen (Müller + Krempel AG, Bülach, Schweiz) bei 55 °C und 35 rpm in einem Inkubator statt (Infors HT, Einsbach). Die Kulturen wurden von zwei Seiten mit jeweils einer 40 Watt Reflektorlampe aus ca. 30 cm Entfernung mit einer Beleuchtungsintensität von 600-800 Lux illuminiert. Das Wachstum diente neben der Erstellung von Wachstumskurven der Massenkultur (1000 ml) zur Reinigung der ACD und Aktivitätsmessung in Zellüberständen sowie zur Herstellung von Zellsuspensionen (1000 ml). Die Zusammensetzung der verwendeten Lösungen und Medien ist in Tabelle 5 angegeben. Die Medien wurden wie folgt hergestellt: Zunächst wurden Hefeextrakt, Casamino-säuren und Glycylglycin in Wasser, Grundmedium und Spurenelementlösung gelöst. Der pH-Wert wurde mittels 10 M NaOH auf pH 8.0 eingestellt, die Flasche durch viermaligen Austausch der Gasphase mit Stickstoffgas anaerobisiert und dann autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurden steril mit einer Spritze Vitaminlösung und Eisen(III)chlorid-Lösung sowie gegebenenfalls Glucoselösung (Wachstum auf Glucose, Zellsuspensionen) hinzugegeben. Die Kulturen wurden jeweils mit 2 % Inokulum einer exponentiell wachsenden adaptierten Vorkultur steril mit einer Spritze beimpft. Um das Wachstum über die Zeit zu verfolgen und zur Substratbestimmung in Wachstumsüberständen, wurden zu definierten Zeitpunkten Proben steril mit einer Spritze entnommen. Das Wachstum wurde durch die Bestimmung der optischen Dichte bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) im Einstrahl Photometer Ultrospec 2000 (GE Healthcare, Freiburg) verfolgt. Die Proben für die Bestimmung von Acetat und Glucose in Wachstumsüberständen wurden bei 6000 rpm für 15 min zentrifugiert und der Überstand bis zur Verwendung bei -20 °C eingefroren.

**Tabelle 5 Zusammensetzung der Lösungen und Medien für das Wachstum von *C. aurantiacus* (modifiziert nach Herter et al).**

<b>10 x Grundmedium</b>		<b>Medium für Wachstum auf Hefeextrakt</b>	
EDTA	1 g	10 x Grundmedium	100 ml
CaSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	0.6 g	2000 x Spurenelementlösung	0.5 ml
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1 g	Hefeextrakt	1 g
NaCl	0.08 g	Casaminosäuren	2.5 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.11 g	Glycylglycin	3.33 g
Ad 1000 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>		H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 997.5 ml
<b>2000 x Spurenelementlösung</b>		1000 x Eisen(III)chlorid-Lösung*	1 ml
MnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	2.28 g	800 x Vitaminlösung*	1.25 ml
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0.5 g	<b>Medium für Wachstum mit Glucose</b>	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.5 g	10 x Grundmedium	100 ml
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0.025 g	2000 x Spurenelementlösung	0.5 ml
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0.025 g	Hefeextrakt	1 g
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0.045 g	Casaminosäuren	2.5 g
ad 1000 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>		Glycylglycin	3.33 g
<b>800 x Vitaminlösung</b>		H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 977.5 ml
Cobalamin	0.08 g	1000 x Eisen(III)chlorid-Lösung*	1 ml
Thiamin-Hydrochlorid	0.024 g	800 x Vitaminlösung*	1.25 ml
Niacin	0.4 g	50 x Glucoselösung*	20 ml
4-Aminobenzoessäure	0.04 g	<b>Medium für Zellsuspensionen</b>	
Biotin	0.08 g	10 x Grundmedium	100 ml
Calcium-D-Panhotensäure	0.04 g	2000 x Spurenelementlösung	0.5 ml
Pyridoxal-Hydrochlorid	0.008 g	Casaminosäuren	2.5 g
Myoinosit	0.4 g	Glycylglycin	3.33 g
Riboflavin	0.008 g	H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 977.5 ml
Folsäure	0.08 g	1000 x Eisen(III)chlorid-Lösung*	1 ml
Komponenten nacheinander in H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> lösen, pH 7.0 mit 2 M NaOH einstellen, auf 1000 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> auffüllen und sterilfiltrieren		800 x Vitaminlösung*	1.25 ml
		50 x Glucoselösung*	20 ml
<b>1000 x Eisen(III)chlorid-Lösung</b>			
FeCl <sub>3</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	2.9 g		
ad 1000 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> , sterilfiltriert			
<b>50 x Glucoselösung</b>			
Glucose	198.17 g		
ad 1000 ml H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> , sterilfiltriert			

\* Zugabe erfolgte steril nach dem Autoklavieren.

#### 4.8.1 Herstellung von Zellsuspensionen

*C. aurantiacus* wurde in einem Medium für Zellsuspensionen bis zu einer  $OD_{600}$  von 0.75 bis 1 gezüchtet und durch Zentrifugation für 20 min bei 8 °C und 3000 rpm (Beckman Avanti J-25, Beckman Coulter, Krefeld) pelletiert. Um die Zellen zu waschen, wurde das Pellet dreimal zunächst in Suspensionspuffer (100 mM HEPES-KOH pH 8.5, 10 % Grundmedium) resuspendiert und unter gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert. Anschließend wurde die Suspension 45 min bei 55 °C aerob im Dunkeln inkubiert, um potentiell akkumulierte Speicherstoffe abzubauen. Hiernach wurde es erneut einmal gewaschen. Die pelletierten Zellen wurden in 20 ml Suspensionspuffer aufgenommen und gleichmäßig auf zwei sterile 100 ml Glasflaschen verteilt ( $OD_{600} = 16$ ). Die Flaschen wurden mit einem Gummiseptum und einer Stahlkappe verschlossen und die Gasphase nach der bei den Wachstumsexperimenten verwendeten Methode gegen Stickstoff ausgetauscht. Um das Gas zu sterilisieren, wurde es durch einen 0.2 µm-Sterilfilter (Sartorius, Göttingen) geleitet. Die Homogenität der Suspensionsansätze wurde durch Überprüfung der optischen Dichte bei 600 nm sichergestellt. Anschließend wurde dem Testansatz Glucoselösung zu einer Endkonzentration von 10 mM zugesetzt. Dem Kontrollansatz ohne Glucose wurde das entsprechende Volumen Suspensionsmedium zugegeben. Die Zellsuspensionen wurden im Dunkeln bei 55 °C inkubiert. Proben für die Bestimmung von Acetat und Glucose wurden steril mit einer Spritze entnommen, bei 6000 rpm für 15 min zentrifugiert und der Überstand bis zur Verwendung bei -20 °C eingefroren.

#### 4.8.2 Bestimmung von Acetat in Wachstumsüberständen und Zellsuspensionen

Die Bestimmung von Acetat wurde mit der Methode von Dorn et al. mit Hilfe der Enzyme Pyruvatkinase (PK), Lactat-Dehydrogenase (LDH), Myokinase (MK) und Acetyl-CoA Synthetase (AMP-bildend) (ACS) durchgeführt (Dorn et al. 1978). Dabei wird die ATP-abhängige Umwandlung von Acetat zu Acetyl-CoA, AMP und  $PP_i$  durch die ACS an die Oxidation von  $NADH + H^+$  durch MK, PK und LDH gekoppelt. Hierbei werden pro Mol Acetat 2 Mol  $NADH$  oxidiert, was anhand der Extinktionszunahme bei 340 nm ( $\epsilon_{340} = 6.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) gemessen wurde. Der 1 ml Testansatz enthielt 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM  $MgCl_2$ , 100 mM KCl, 2 mM PEP, 0.3 mM  $NADH$ , 2 mM ATP, 1 mM HSCoA, 1 U MK, 2 U PK und 3 U LDH sowie 100 µl Probe mit einer maximalen Acetatkonzentration von 1 mM. Nach Vorinkubation des Testansatzes bei 37 °C bis zu einer konstanten Extinktion ( $E_0$ ), wurde die Reaktion durch Zugabe von 0.2 U ACS gestartet. Nachdem das Acetat vollständig umgesetzt war (nach ca. 60 min), wurde erneut die Extinktion bestimmt

( $E_1$ ). Die Acetatkonzentration ergab sich aus der Differenz zwischen  $E_1$  und  $E_0$  ( $\Delta E$ ) und dem Extinktionskoeffizienten von NADH nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz. Bei jeder Messung wurde ein Standard (0 – 1 mM Acetat) mitgeführt.

#### 4.8.3 Bestimmung von Glucose in Wachstumsüberständen und Zellsuspensionen

Die Bestimmung von Glucose in Zellüberständen aus Wachstumsversuchen erfolgte mit Hilfe der Enzyme Glucoseoxidase (GOD) und Peroxidase (POD). Hierbei wandelt die GOD Glucose mit  $O_2$  und  $H_2O$  in Gluconat und  $H_2O_2$  um. Anschließend wird Wasserstoffperoxid von der POD unter Oxidation von ABTS (2,2-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)) zu  $H_2O$  reduziert. Die Oxidation des ABTS lässt sich photometrisch als Extinktionszunahme bei 436 nm bestimmen. Der Extinktionskoeffizient wurde aus einer mitgeführten Eichgerade aus bekannten Glucosekonzentrationen ermittelt ( $\epsilon_{436} \sim 28.7 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Der Testansatz enthielt 900  $\mu\text{l}$  Glucosereagenz (2.8 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.44 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , 0.1 g ABTS, 8 mg Peroxidase (200 U/mg), 16 mg Glucoseoxidase (200 U/mg) ad 200 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ ) und 100  $\mu\text{l}$  Probe. Die Extinktion war bis zu einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  im Test proportional.

In Zellsuspensionen wurde Glucose enzymatisch mit Hilfe von Hexokinase und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase mit der Methode von Kunst et al. (1986) bestimmt (Kunst et al. 1986). Hierbei wird pro Mol Glucose ein Mol  $\text{NADP}^+$  reduziert, was als Extinktionszunahme bei 365 nm photometrisch bestimmt werden kann. Der Testansatz enthielt in einem ml 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM ATP, 2 mM  $\text{NADP}^+$ , 7.5 U Hexokinase und 20  $\mu\text{l}$  Probe (maximal 0.5 mM Glucose im Test). Nach Vorinkubation des Testansatzes bei 37 °C bis zu einer konstanten Extinktion ( $E_0$ ), wurde die Reaktion durch Zugabe von 3.5 U Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase gestartet. Nach 20 min war die Glucose vollständig umgesetzt. Es wurde erneut die Extinktion bestimmt ( $E_1$ ). Die Glucosekonzentration ergab sich aus der Differenz zwischen  $E_1$  und  $E_0$  ( $\Delta E$ ) und dem Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon_{365} = 3.41 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz. Das System wurde jeweils mit einem Standard aus Glucosekonzentrationen zwischen 0 und 0.5 mM im Test geeicht.

#### 4.8.4 Bestimmung von Enzymaktivitäten in Zellextrakten von *C. aurantiacus*

Um die ACD-Aktivität zu bestimmen, wurden sowohl auf Hefe als auch auf Glucose gewachsene Zellen in der stationären Phase zentrifugiert (3000 rpm, 8 °C für 20 min (Avanti J-25, Beckman Coulter, Krefeld) und in 100 mM HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazin-Ethansulfonsäure)-KOH, pH 7.5 mit 5 mM  $\text{MgCl}_2$  resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch viermalige Hochdruckhomogenisation in einer vorgekühlten French-Press-Zelle (American Instrument Company, Silver Spring, Maryland, USA) bei 14000 Psi (Zellinnendruck). Nicht

lösliche Zellbestandteile und Zelltrümmer wurden durch Ultrazentrifugation bei 40000 rpm bei 4 °C für 120 min abgetrennt (Beckmann Optima L preparative Ultracentrifuge, Rotor Type 70Ti). Die enzymatische Aktivität von ACD und PTA wurde durch den Ellman-Test (siehe 4.11.1) bestimmt. Hierzu wurde Rohextrakt mit 50 bis 400 µg Protein im Test eingesetzt. Der Reaktionsansatz für die ACD-Reaktion enthielt in 100 mM Hepes-KOH-Puffer, pH 7.5 0.1 mM Acetyl-CoA, 1 mM ADP, 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.1 mM DTNB und 5 mM  $\text{MgCl}_2$ . Für den Test auf PTA-Aktivität wurde das gleiche Testsystem ohne ADP verwendet. Die Bestimmung der Acetatkinase (AK) wurde mit einem modifizierten PK/LDH-Test (4.11.2) durchgeführt. Dabei wurde kein HSCoA zugegeben um die AK-Reaktion von der ACD-Reaktion zu unterscheiden. Der Reaktionsansatz enthielt 100 mM Hepes-KOH pH 7.5, 10 mM Acetat, 2 mM ATP, 5 mM  $\text{MgCl}_2$  0.3 mM NADH, 2.5 mM PEP, 3 U PK und 5 U LDH.

#### 4.9 Reinigung der ACD aus *Chloroflexus aurantiacus*

Auf Medium mit Glucose gewachsene Zellen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase durch Zentrifugation geerntet (20 min, 3000 rpm, 8 °C, Avanti J-25, Beckman Coulter, Krefeld). Insgesamt wurden 96 g Feuchtzellmasse in 75 ml 100 mM Hepes-KOH (pH 7.5 bei 70 °C), 5 mM  $\text{MgCl}_2$  resuspendiert. Der Zellaufschluss und die Abtrennung nicht löslicher Zellbestandteile und Zelltrümmer erfolgte wie unter 4.8.4 angegeben. Der zellfreie Rohextrakt wurde für 10 min bei 70 °C inkubiert. Präzipitiertes Protein wurde durch Ultrazentrifugation für 45 min bei 4 °C und 40000 rpm abgetrennt. Der Überstand wurde mit 2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  auf 500 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  Endkonzentration gebracht und erneut für 45 min bei 40000 rpm und 4 °C ultrazentrifugiert. Die erhaltene Proteinlösung wurde auf eine Phenyl-Sepharose 26/10 HiLoad (GE Healthcare) aufgetragen, die in 100 mM Hepes-KOH pH 7.5, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 500 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und 10% Glycerin (v/v) äquilibriert war. Die Elution erfolgte mit einem 160 ml langen, linearen Gradienten von 400 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  bis 200 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  mit einer Flussrate von  $2 \text{ ml min}^{-1}$ . Die Fraktionen mit der höchsten Aktivität (280 – 230 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) wurden zusammengegeben, 50fach mit Puffer A (50 mM Hepes-KOH pH 8.0, 5 mM  $\text{MgCl}_2$  und 10% Glycerin) verdünnt und durch Ultrafiltration (4.6.4, Ausschlussgröße 30 kDa) konzentriert. Das Konzentrat wurde auf eine Q-Sepharose 16/10-Säule (GE Healthcare) aufgetragen, die mit Puffer A äquilibriert war. Nach einem initialen Waschschrift in Puffer A mit 100 mM NaCl für 60 ml wurde das Protein mit einem linearen Gradienten von 100 mM NaCl bis 250 mM NaCl in Puffer A mit einer Flussrate von  $2 \text{ ml min}^{-1}$  über 120 ml eluiert. Das Protein mit ACD-Aktivität eluierte zwischen 140 und 180 mM NaCl.

Die Fraktionen mit höchster Aktivität wurden vereinigt, durch Ultrafiltration (30 kDa Ausschlussvolumen) auf einen Milliliter konzentriert und auf eine Superdex HiLoad 16/60 200 pregrade (GE Healthcare) aufgetragen, die in 100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> und 10% Glycerin (v/v) äquilibriert war. Die Elution erfolgte mit 120 ml des gleichen Puffers mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml min<sup>-1</sup>. Protein mit ACD-Aktivität eluierte zwischen 59 und 67 ml. Die höchste Aktivität (U/ml) wurde bei 62 ml gemessen. Die Fraktionen mit der höchsten Aktivität wurden durch Ultrafiltration in Puffer A umgepuffert. Der Überstand wurde auf eine 1 ml Mono-Q-Sepharose (Biorad, München) aufgetragen, die in Puffer A äquilibriert war. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten von 0 mM bis 170 mM NaCl in Puffer A mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml min<sup>-1</sup>. Die ACD-Aktivität eluierte zwischen 85 und 160 mM NaCl mit der höchsten Aktivität bei 115 mM. Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (4.6.3) zeigte in der Fraktion mit der höchsten Aktivität eine prominente Bande von 75 kDa. Das Protein war zu diesem Zeitpunkt nahezu homogen.

**MALDI-TOF-Analyse.** Der kodierende offene Leserahmen (ORF) der ACD sollte mit Hilfe von Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) analysiert werden. Das gereinigte Protein von 75 kDa wurde aus dem SDS-Gel mit einem Skalpell ausgeschnitten und der ORF durch Frau Dr. Melanie Brocker aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Bott (Forschungszentrum, Jülich) mittels MALDI-TOF MS identifiziert.

## 4.10 Überexpression und Reinigung rekombinanter Proteine

### 4.10.1 Überexpression

Die Expression rekombinanter Proteine wurde mit dem pET-Vektor System (Novagen, Schwalbach) durchgeführt. Die pET-Vektoren wurden mit den Chloramphenicol-resistenten Expressionsstämmen *E. coli* BL21(DE3)-CodonPlus-RIL oder *E. coli* Rosetta(DE3) pLysS kombiniert. Das Wachstum der Expressionskulturen fand in 800 ml LB-Medium (Caur-ACD: 1600 ml) unter den unter Punkt 4.4 aufgeführten Bedingungen statt. Die Induktion der Expression erfolgte bei einer OD<sub>600</sub> von 0.6 bis 1.0 entweder mit 0.4 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) für die Vektoren pET14b und pET17b oder mit 1 mM IPTG für die Vektoren pET19b und pET28a. Anschließend wurden die Kulturen für 4 - 5 h inkubiert. Nach der Expression wurden die Zellen durch 15-minütige Zentrifugation bei 7000 rpm bei 8 °C geerntet und bis zur Verwendung bei - 20 °C eingefroren. In Tabelle 6 sind die Details der durchgeführten Expressionen angegeben.

**Tabelle 6 Bedingungen zur Expression der in dieser Arbeit rekombinant hergestellten Proteine.**

exprimiertes Protein	Vektorkonstrukt	Expressionsstamm	OD <sub>600</sub> Induktion	Expressionsdauer (h)	OD <sub>600</sub> Ernte
Caur-ACD	pET19bCaurACD	<i>E. coli</i> BL21(DE3)-CodonPlus-RIL	0.8	4.5	4.3
ckcACD $\alpha$ 1	pET17bckcACDa1	<i>E. coli</i> BL21(DE3)-CodonPlus-RIL	1.2	4	2.4
ckcACD $\alpha$ 2	pET17bckcACDa2	<i>E. coli</i> BL21(DE3)-CodonPlus-RIL	0.77	4	2.2
ckcACD $\alpha$ 3	pET17bckcACDa3	<i>E. coli</i> BL21(DE3)-CodonPlus-RIL	0.75	4	3.2
ckcACD $\alpha$ 4	pET17bckcACDa4	<i>E. coli</i> BL21(DE3)-CodonPlus-RIL	0.86	4	3.6
ckcACD $\beta$	pET17bckcACDb	<i>E. coli</i> BL21(DE3)-CodonPlus-RIL	0.8	4	1.7
ckcSCS $\alpha$	pET17bckcSCSa	<i>E. coli</i> Rosetta(DE3) pLysS	0.8	4	3.6
ckcSCS $\beta$	pET17bckcSCSb	<i>E. coli</i> Rosetta(DE3) pLysS	0.8	4	4.0
EH-ACD	pET19bEHACD	<i>E. coli</i> Rosetta(DE3) pLysS	0.96	4	5.5
MM-ACD $\alpha$	pET14bMMACDa	<i>E. coli</i> Rosetta(DE3) pLysS	0.6	4	1.8
MM-ACD $\beta$	pET14bMMACDb	<i>E. coli</i> Rosetta(DE3) pLysS	0.6	4	1.9
PF-ACDsucc $\alpha$	pET14bPFACDsucc $\alpha$	<i>E. coli</i> Rosetta(DE3) pLysS	0.6	4	2
PF-ACDII $\beta$	pET14bPFACDII $\beta$	<i>E. coli</i> Rosetta(DE3) pLysS	0.85	5	3.5
RaEuPCS1	pET19bRaEuPCS1	<i>E. coli</i> Rosetta(DE3) pLysS	0.94	4	4.6
RaEuPCS1H269A	pET19bRaeEuPCS1H269A	<i>E. coli</i> Rosetta(DE3) pLysS	0.6	5	3.5
RaEuPCS1H539A	pET19bRaEuPCS1H539A	<i>E. coli</i> Rosetta(DE3) pLysS	0.6	5	4.6
RaEuPCS2	pET19bRaEuPCS2	<i>E. coli</i> Rosetta(DE3) pLysS	0.77	4	2.3
Daci-FCS	pET19bDaciFCS	<i>E. coli</i> Rosetta(DE3) pLysS	0.6	4	2.9



#### 4.10.2 Herstellung von zellfreien Extrakten

Zur Herstellung von zellfreien Extrakten wurden die eingefrorenen Zellen, in denen die Zielproteine exprimiert vorlagen, auf Eis aufgetaut und im angegebenen Puffer im Verhältnis 1:1 (w/v) resuspendiert. Anschließend erfolgte der Zellaufschluss entweder mit einer French-Press-Zelle oder mit Ultraschall nach dem unten angegebenen Protokoll.

**French-Press-Zelle.** Der Zellaufschluss erfolgte im angegebenen Puffer durch viermalige Hochdruckhomogenisation in einer vorgekühlten French-Press-Zelle (American Instrument Company, Silver Spring, Maryland, USA) bei 14000 Psi (Zellinnendruck). Die nicht löslichen Zellbestandteile wurden durch 90-minütige Ultrazentrifugation pelletiert. Der entstandene zellfreie Extrakt wurde sofort zur weiteren Reinigung verwendet.

**Ultraschall.** Der Zellaufschluss erfolgte im angegebenen Puffer mittels Ultraschall (Branson Sonifier 250 Ultraschall desintegrator, Branson Heinemann, Schwäbisch Gmünd) durch 6x 1 min bei 30% Duty cycle und output control 3 im Eisbad. Die Suspensionen wurden anschließend 90 min lang ultrazentrifugiert. Der entstandene zellfreie Extrakt wurde sofort zur weiteren Reinigung verwendet.

**Ultrazentrifugation.** Die Ultrazentrifugation wurde während der Reinigung zur Abtrennung von Zelltrümmern und nicht löslichen Zellbestandteilen nach dem Zellaufschluss sowie präzipitiertem Protein nach Hitze-fällung verwendet. Alle Ultrazentrifugationsschritte wurden mit der Beckmann Optima L preparative Ultracentrifuge (Beckmann Coulter GmbH, Krefeld) und dem zugehörigen Rotor 70Ti bei 4 °C und 40000 rpm (entspricht 90000 x g) für 60 min bis 90 min durchgeführt.

#### 4.10.3 Reinigung von rekombinanten Proteinen

Alle in dieser Arbeit gereinigten Proteine wurden bis zur apparenten Homogenität angereichert. Die säulenchromatographischen Schritte wurden unter Verwendung von FPLC-Systemen von Biorad (BioLogic Workstation, Biorad, München) und GE Healthcare (ÄKTA FPLC, GE Healthcare, Hamburg) und FPLC-Säulen der Firma GE Healthcare (Freiburg) und Qiagen (Hilden) durchgeführt. Die Elution der Proteine von der Säule 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 (4.6.1) bestimmt. Die Reinheit der Proteine und die Größe ihrer Untereinheiten wurden mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (4.6.3) bestimmt.

**Reinigung mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie**

Proteine, die durch die Verwendung eines entsprechenden Vektors (pET14b, pET19b, pET28a) mit einem 6x His-Tag versehen waren, ließen sich spezifisch über Ni-NTA-Affinitätschromatografie reinigen. Hierzu wurden die Zellen vor dem Zellaufschluss in 50 mM oder 100 mM Tris-HCl, pH 8.2, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol (NiNTA-Puffer) resuspendiert. Nach dem Zellaufschluss wurde der Überstand der Ultrazentrifugation auf eine 1 ml Nickel-Trinitrioltriessigsäure (Ni-NTA)-Säule (Qiagen, Hilden) aufgetragen, die in NiNTA-Puffer äquilibriert war. Die Elution erfolgte mit Hilfe eines Stufengradienten von 10 mM, 250 mM und 500 mM Imidazol bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml min<sup>-1</sup>. Das Zielprotein eluierte bei 250 mM und wurde in 1 ml Fraktionen gesammelt.

**Reinigung mittels Gelfiltration (Superdex)**

Alle rekombinanten Proteine wurden unter anderem über Größenausschlusschromatographie durch Gelfiltration gereinigt. Hierzu wurde 1 ml Proteinlösung auf eine Superdex HiLoad 16/60 200 prepgrade (GE Healthcare, Freiburg) aufgetragen. Die Säule war - soweit nicht anders angegeben - in 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl äquilibriert. Die Elution erfolgte im isokratischen Fluss bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml min<sup>-1</sup> mit 120 ml Äquilibrierungspuffer. Das Eluat wurde in Fraktionen von 1 ml gesammelt.

**Im Folgenden sind die Reinigungsprotokolle für die in dieser Arbeit untersuchten Enzyme angegeben:**

**Reinigung der rekombinanten ACD aus *C. aurantiacus***

Das Pellet der Expression wurde in NiNTA-Puffer resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall. Der Überstand der Ultrazentrifugation (120 min) wurde auf eine NiNTA-Säule aufgetragen. Die Fraktionen mit ACD-Aktivität wurden vereinigt, durch Ultrafiltration auf 1 ml konzentriert und über Gelfiltration weiter gereinigt. Die höchste ACD-Aktivität eluierte bei 60 bis 64 ml. Zu diesem Zeitpunkt war das Enzym apparent homogen.

**Reinigung der rekombinanten ACDs und SCS aus *Ca. K cryptophilum***

*Reinigung und Rekonstitution der rekombinanten ACDs.* Die Zellpellets der getrennt exprimierten ACD-Untereinheiten (ckcACD $\alpha$ 1-4 und ckcACD $\beta$ ) wurden jeweils in 100 mM Tris-HCl pH 8.86, 5 mM MgCl<sub>2</sub> resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte jeweils über French-Press. Die Überstände der Ultrazentrifugation wurden 20 min bei 85 °C im Wasserbad inkubiert und präzipitiertes Protein durch erneute Ultrazentrifugation (90 min) abgetrennt. Im

Überstand wurde die Proteinkonzentration nach Bradford (4.6.1) bestimmt. Aus der Proteinkonzentration und dem Molekulargewicht der Untereinheiten wurde die Molarität der Proteinlösungen ermittelt. Es wurde jeweils eine putative  $\alpha$ -Untereinheit und die putative  $\beta$ -Untereinheit im äquimolaren Verhältnis gemischt und eine Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 1 ml des rekonstituierten Proteins auf eine Superdex aufgetragen. Danach war das Protein apparent homogen.

*Reinigung und Rekonstitution der rekombinanten SCS.* Die Zellpellets von *E. coli* Rosetta(DE3) pLysS-pET17bckcSCS $\alpha$  und *E. coli* Rosetta(DE3) pLysS-pET17bckcSCS $\beta$ , in denen die jeweiligen Untereinheiten der SCS exprimiert waren, wurden jeweils in 100 mM Tris-HCl pH 7.8, 5 mM MgCl<sub>2</sub> resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch French-Press. Die Überstände wurden 15 min bei 70 °C im Wasserbad inkubiert. Das präzipitierte Protein wurde durch erneute Ultrazentrifugation (90 min) abgetrennt. Im Überstand wurde die Proteinkonzentration nach Bradford (4.6.1) bestimmt. Aus der Proteinkonzentration und dem Molekulargewicht der Untereinheiten wurde die Molarität der Proteinlösungen ermittelt. Die so präparierten Untereinheiten ckcSCS $\alpha$  und ckcSCS $\beta$  wurden im äquimolaren Verhältnis gemischt und eine Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 1 ml des rekonstituierten Proteins auf eine Superdex aufgetragen, die mit 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl und 5 mM MgCl<sub>2</sub> äquilibriert war. Das eluierte Protein war apparent homogen.

**Tabelle 7 Übersicht über die in dieser Arbeit hergestellten rekombinanten Proteins aus *Ca. K cryptophilum*** Aufgeführt sind die Bezeichnungen der jeweiligen  $\alpha$ -Untereinheit und der  $\beta$ -Untereinheit, mit der diese kombiniert wurde. Darüber hinaus ist die Bezeichnung des jeweiligen rekonstituierten Proteins angegeben, die in dieser Arbeit verwendet wurde.

Bezeichnung der $\alpha$ -Untereinheit	Bezeichnung der $\beta$ -Untereinheit	Bezeichnung des rekonstituierten Proteins
ckcACD $\alpha$ 1	ckcACD $\beta$	ckcACD1
ckcACD $\alpha$ 2	ckcACD $\beta$	ckcACD2
ckcACD $\alpha$ 3	ckcACD $\beta$	ckcACD3
ckcACD $\alpha$ 4	ckcACD $\beta$	ckcACD4
ckcSCS $\alpha$	ckcSCS $\beta$	ckcSCS

**Reinigung der rekombinanten ACD aus *Entamoeba histolytica***

Zur Reinigung der ACD wurde das Zellpellet der Expression in NiNTA-Puffer resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch French-Press. Der Überstand der Ultrazentrifugation wurde auf eine Ni-NTA-Säule aufgetragen. Die Fraktionen mit ACD-Aktivität wurden vereinigt, durch Ultrafiltration auf 1 ml konzentriert und auf eine Superdex aufgetragen, die mit 100 mM Tris-HCl pH 7.5 150 mM NaCl und 10% Glycerin (v/v) äquilibriert war. Das gereinigte Protein wird im Folgenden als EH-ACD bezeichnet.

**Reinigung der rekombinanten ACD aus *Methanosarcina mazei***

Zur Reinigung der exprimierten ACD-Untereinheiten MMACD $\alpha$  und MMACD $\beta$  wurden die Zellpellets der Expression jeweils in NiNTA-Puffer resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch French-Press. Der Überstand nach Ultrazentrifugation wurde auf eine Ni-NTA-Säule aufgetragen. Zu diesem Zeitpunkt waren beide Proteinlösungen apparent homogen. Im Überstand wurde die Proteinkonzentration nach Bradford (siehe 4.6.1) bestimmt. Aus der Proteinkonzentration und dem Molekulargewicht der Untereinheiten wurde die Molarität der Proteinlösungen ermittelt. Die so präparierten Untereinheiten MM-ACD $\alpha$  und MM-ACD $\beta$  wurden im äquimolaren Verhältnis gemischt und eine Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 1 ml des rekonstituierten Proteins auf eine Superdex aufgetragen, die mit 100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl und 5 mM MgCl<sub>2</sub> äquilibriert war. Das gereinigte, rekonstituierte Protein wird im Folgenden als MM-ACD bezeichnet.

**Reinigung der rekombinanten ACDs aus *Pyrococcus furiosus***

Zellen mit exprimierten ACD-Untereinheiten ACDI $\alpha$  und ACDI $\beta$  wurden freundlicherweise von Frau K. Lutter-Mohr bereitgestellt. Für die Untereinheit ACDI $\alpha$  kodiert der ORF Pfu\_1540 und für die Untereinheit ACDI $\beta$  kodiert ORF Pfu\_1787. Zur Reinigung wurden sowohl die gestellten Zellpellets mit der exprimierten ACDI $\alpha$  und ACDI $\beta$  als auch die Zellpellets der Expression von ACD $\alpha_{succ}$  und ACDII $\beta$  jeweils in 100 mM Tris-HCl, pH 8.86 mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall. Der Überstand nach Ultrazentrifugation wurde 15 min bei 80 °C im Wasserbad inkubiert und erneut ultrazentrifugiert (60 min). Die Konzentration der so präparierten Proteinlösungen wurde nach Bradford (4.6.1) bestimmt und die Molarität der Proteinlösungen ermittelt. Die Untereinheiten wurden im äquimolaren Verhältnis miteinander kombiniert und eine Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 1 ml des rekonstituierten Proteins über Gelfiltration gereinigt. Die Säule war mit 100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl und 5 mM MgCl<sub>2</sub> äquilibriert. Die Aktivität

in den Fraktionen wurde mit der Methode nach Ellmann (siehe 4.11.1) bestimmt. Die Fraktionen mit der höchsten ACD-Aktivität wurden kombiniert und 15 min bei 90 °C inkubiert. Präzipitiertes Protein wurde durch 45-minütige Zentrifugation bei 13000 rpm und 4 °C (Centrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg) abgetrennt. Nach diesem Schritt waren die rekonstituierten Proteine apparent homogen.

### **Reinigung rekombinanter PCSs aus *Ralstonia eutropha***

*Reinigung von RaPCS1 und RaPCS2.* RaPCS1 und RaPCS2 wurden unabhängig voneinander nach folgendem Protokoll gereinigt: Die Zellpellets der Expressionen wurden in NiNTA-Puffer resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall. Die Reinigung des Proteins aus dem Überstand der Ultrazentrifugation erfolgte zunächst mit Ni-NTA. Die Fraktionen mit PCS-Aktivität wurden vereinigt und 1 ml der Proteinlösung über eine Gelfiltrationssäule, die mit 100 mM Tris-HCl pH 7.5 150 mM NaCl und 10% Glycerin (v/v) äquilibriert war, bis zur apparenten Homogenität gereinigt.

**Reinigung der mutierten Proteine.** Die Reinigung der mutierten und exprimierten Pimeloyl-CoA Synthetasen war identisch mit dem Protokoll für die RaPCS1.

### **Reinigung der rekombinanten FCS aus *Delftia acidovorans***

Zur Reinigung der FCS wurde das Zellpellet der Expression in NiNTA-Puffer resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall. Nach der Ultrazentrifugation erfolgte die weitere Reinigung des zellfreien Extraktes zunächst mit Ni-NTA-Affinitätschromatographie. Die Fraktionen mit FCS-Aktivität wurden vereinigt und über eine Gelfiltrationssäule, die mit 100 mM Tris-HCl, pH 7.5 150 mM NaCl und 10% Glycerin (v/v) äquilibriert war, bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Das Protein wird im Folgenden als Daci-FCS bezeichnet.

## **4.11 Messung von Enzymaktivitäten**

Für die Bestimmung der Enzymaktivitäten wurde ein beheizbares Photometer (Varian Cary 50 Bio UV-visible Spectrophotometer, Varian, Palo Alto, USA) mit der zugehörigen Computer-Software verwendet. Die Tests wurden in Einweg-Kunststoffmikroküvetten (Roth, Karlsruhe) durchgeführt. Für Messungen bei Temperaturen über 60 °C wurden Glasküvetten (Hellma-Präzisionsküvetten, Ochs, Bovenden) verwendet. Die Küvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm, wurden mit dem entsprechenden Puffer bei der jeweiligen Temperatur vorinkubiert. Dabei wurde der angegebene pH-Wert für die jeweilige Temperatur eingestellt. Alle

verwendeten Tests wurden durch Variation der Substratreihenfolge bzw. des Proteins auf ihre Startbarkeit und Proteinabhängigkeit überprüft. Die spezifischen Aktivitäten und die kinetischen Konstanten der Enzyme wurden jeweils im linearen Bereich der Proteinabhängigkeit bestimmt. Die Bestimmung der kinetischen Parameter erfolgte aus der Darstellung nach Lineweaver-Burk. Die Einheit der Enzymaktivität (Unit) ist definiert als der Verbrauch von 1  $\mu\text{mol}$  Substrat bzw. der Bildung von 1  $\mu\text{mol}$  Produkt pro Minute. Bei der Bestimmung der  $K_m$ -Werte für ADP bzw. ATP, wurde  $\text{MgCl}_2$  stets im gleichbleibenden Verhältnis zu ADP bzw. ATP eingesetzt.

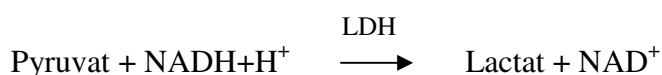
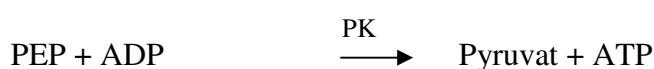
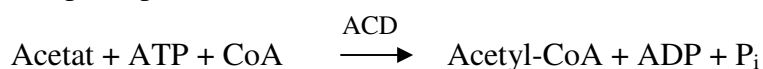
#### 4.11.1 Aktivitätsassays mit Ellmans Reagenz (Ellman-Test)

Die ACD katalysiert die Reaktion:  $\text{Acetyl-CoA} + \text{ADP} + \text{P}_i \rightleftharpoons \text{Acetat} + \text{ATP} + \text{HSCoA}$ . Die ADP und Phosphat abhängige Freisetzung des HSCoA wurde mit Ellmans Thiolreagenz, DTNB (5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure)) durch Bildung eines Thiophenolat-Anions als Extinktionszunahme bei 412 nm gemessen ( $\epsilon_{412 \text{ nm}} = 13.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Srere et al. 1963). Da HSCoA als Nachweisgröße dient, konnte dieser Test auch für die Bestimmung der Aktivität mit Succinyl-CoA bei der SCS aus *Ca. K. cryptophilum* sowie für die Messungen mit Phenylacetyl-CoA und Isobutyryl-CoA (je 0.1 mM im Test) im Rahmen der Analyse der Substratspektren verwendet werden.

#### 4.11.2 Aktivitätsassays mit Pyruvatkinase/Lactatdehydrogenase (PK/LDH-Test)

Die ATP- und HSCoA abhängige Umsetzung von organischen Säuren zu ihren korrespondierenden CoA-Estern, ADP und  $\text{P}_i$  durch Acyl-CoA Synthetasen wurde über die Enzyme Pyruvatkinase (PK) und Lactatdehydrogenase (LDH) an die Oxidation von NADH gekoppelt. Die Bildung des  $\text{NAD}^+$  kann dabei photometrisch bei 340 nm ( $\epsilon_{340 \text{ nm}} = 6.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) verfolgt werden. Das Testsystem mit PK und LDH bestand - wenn nicht anders angegeben - aus 0.3 mM NADH, 2.5 mM PEP, 0.8 U PK und 1.2 U LDH.

##### Testprinzip (für Acetat):



Da das System ADP als Nachweisgröße verwendet, konnte es sowohl für die Charakterisierung der ACDs als auch der SCS und der PCSs sowie für die Bestimmung der Substratspektren in Richtung CoA-Ester-Bildung aller getesteten Enzyme verwendet werden. Bei der Bestimmung des Substratspektrums für die untersuchten Acyl-CoA Synthetasen wurden - wenn nicht anders angegeben - die folgenden Substrate mit einer Konzentration von je 10 mM eingesetzt:

*ACD und SCS.* Acetat, Butyrat, Propionat, 2-Methylbutyrat, Isobutyrat, Isovalerat, Imidazol-4-acetat, Indol-3-acetat, Phenylacetat, 4-Hydroxyphenylacetat, Succinat, Citrat, Thioglycolat, Glutarat (nur SCS).

*PCS und FCS.* Acetat, Adipat, Butyrat, Ferulat, Imidazol-4-acetat, Indol-3-acetat, Isobutyrat, Phenylacetat, 4-Hydroxyphenylacetat, Pimelat, Succinat, Thioglycolat.

### 4.11.3 Aktivitätsassays mit Ferulat (Ferulat-Test)

Die Feruloyl-CoA Synthetase synthetisiert in Anwesenheit von  $Mg^{2+}$  die Reaktion:

Ferulat + ATP + HSCoA  $\longrightarrow$  Feruloyl-CoA + ADP +  $P_i$ . Die Bildung des Feruloyl-CoA lässt sich als Absorptionzunahme bei 345 nm photometrisch verfolgen ( $\epsilon_{345 \text{ nm}} = 19 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Narbad and Gasson 1998; Gross 2008). Da Ferulat eine hohe Absorption bei 345 nm hat, liegen Messungen mit mehr als 2 mM im Test außerhalb des proportionalen Messbereichs des Photometers.

## 4.12 Charakterisierung rekombinanter Enzyme

### 4.12.1 ACD aus *Chloroflexus aurantiacus*

Zur Aktivitätsbestimmung während der Reinigung, zur Bestimmung der kinetischen Parameter in Richtung Acetatbildung und zur Ermittlung der pH- und Temperaturoptima wurde der Ellman-Test (4.11.1) verwendet. Die Aktivität wurde bei 55 °C bestimmt. Der Testansatz enthielt in 1 ml: 100 mM Hepes-KOH, pH 7.5, 0.1 mM DTNB, 5 mM  $MgCl_2$ , 0.1 mM Acetyl-CoA, 1 mM ADP, 20 mM  $KH_2PO_4$ . Es wurden 0.6 – 1.35  $\mu\text{g}$  gereinigtes, rekombinantes Protein eingesetzt. Für die Bestimmung des pH-Werts enthielten die Ansätze entweder 100 mM Piperazin (pH 5.0 bis 6.0), 100 mM MES (pH 6.0 bis 7.0), 100 mM Hepes (pH 7.0 bis 8.0) oder 100 mM Glycylglycin (pH 8.0 bis 8.5). Die Bestimmung des Temperaturoptimums erfolgte zwischen 20 °C und 75 °C. In Richtung der CoA-Ester-Bildung erfolgten die Bestimmung der kinetischen Parameter und die Ermittlung des Substratspektrums mit dem PK/LDH-Test. Der Reaktionsansatz enthielt 100 mM Hepes-KOH pH 7.5, 10 mM der getesteten Acyl- oder Aryl-Säure, 2 mM ATP, 0.1 mM HSCoA und 5 mM  $MgCl_2$  sowie das Test-

system, das (abweichend von den Angaben unter 4.11.2) aus 0.3 mM NADH, 2.5 mM PEP, 3 U PK und 5 U LDH bestand.

#### 4.12.2 ACDs und SCS aus *Ca. K. cryptophilum*

**ckcACD1-4.** Während der Reinigung und zur Bestimmung der kinetischen Parameter in Richtung Acetatbildung wurde der Ellman-Test (siehe 4.11.1) verwendet. Die Aktivitäten der ACDs wurden bei 55° und bei 85 °C in 400 µl Testansätzen bestimmt. Der Reaktionsansatz enthielt 100 mM MES-NaOH, pH 7.0, 0.1 mM DTNB, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM Acetyl-CoA, 1 mM ADP und 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Es wurden für die ckcACD1 4.8 bis 12 µg, für die ckcACD2 5 bis 500 µg, für die ckcACD3 0.5 bis 1 µg und für die ckcACD4 1.9 bis 4.7 µg Protein eingesetzt. Für die Bestimmung des pH-Werts enthielten die Ansätze entweder 100 mM Piperazin (pH 5.0 bis 6.0), 100 mM MES (pH 6.0 bis 7.0), 100 mM Hepes (pH 7.0 bis 7.3). Die Bestimmung des Temperaturoptimums erfolgte zwischen 50 °C und 95 °C. Die MgCl<sub>2</sub>-Konzentration wurde zur Bestimmung des Mg<sup>2+</sup>-Optimums zwischen 0 und 20 mM variiert. In Richtung der CoA-Ester-Bildung erfolgten die Bestimmung der kinetischen Parameter und die Ermittlung des Substratspektrums mit dem PK/LDH-Test bei 55 °C. Der Reaktionsansatz enthielt 100 mM MES-NaOH, pH 7.0, 10 mM Acetat (bzw. eine andere getestete Säure), 1 mM ATP, 0.1 mM HSCoA, 5 mM MgCl<sub>2</sub> sowie das Testsystem. Die Temperaturstabilität wurde für die ckcACD3 bei 65 °C, 75 °C und 85 °C bestimmt. Hierzu wurde Proteinlösung für 0 bis 120 min bei der jeweiligen Temperatur inkubiert und dann 5 min auf Eis abgekühlt. Die Restaktivität des Enzyms wurde anschließend bei 55 °C mit dem PK/LDH-Test bestimmt.

**ckcSCS.** Die Aktivität der SCS wurde in Richtung Succinat-Synthese bei 35 °C bestimmt. Der Reaktionsansatz für die Bestimmung der kinetischen Parameter und des Substratspektrums enthielt in 400 µl 100 mM Hepes-KOH, pH 7.3, 0.1 mM DTNB, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM Succinyl-CoA (bzw. des getesteten CoA-Esters), 1 mM ADP, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und 1.25 bis 5 µg Protein. In Richtung der CoA-Ester-Bildung erfolgten die Bestimmung der kinetischen Parameter und die Ermittlung des Substratspektrums mit dem PK/LDH-Test bei 35 °C und 55 °C. Der Reaktionsansatz enthielt in 400 µl 100 mM Hepes-KOH, pH 7.3, 10 mM Succinat (bzw. der jeweiligen Acyl- oder Aryl-Säure), 1 mM ATP, 0.1 mM HSCoA, 5 mM MgCl<sub>2</sub> und das Testsystem. Für die Bestimmung des pH-Werts mit dem PK/LDH-Test enthielten die Ansätze entweder 100 mM Piperazin (pH 5.0 bis 6.0), 100 mM MES (pH 6.0 bis 7.0) oder 100 mM Hepes (pH 7.0 bis 8.0). Die Temperaturstabilität der ckcSCS wurde bei 65 °C, 75 °C und 85 °C getestet. Hierzu wurde Proteinlösung für 0 bis 120 min bei der jeweiligen Tempe-



ratur inkubiert und dann 5 min auf Eis abgekühlt. Die Restaktivität des Enzyms wurde anschließend bei 55 °C mit dem PK/LDH-Test bestimmt.

Die Ermittlung des Temperaturoptimums der SCS erfolgte zwischen 55 °C und 95 °C mit einem diskontinuierlichen Test, der auf dem PK/LDH-Test basierte. Hierzu wurde 100 mM HEPES-KOH, pH 7.3 bei der entsprechenden Temperatur vorgewärmt und dann 1 mM ATP, 0.1 mM HSCoA, 5 mM MgCl<sub>2</sub> und 10 mM Succinat sowie 1 bis 2 µg SCS zu einem Endvolumen von 1 ml hinzugefügt. Die Ansätze wurden bei der jeweiligen Temperatur für 0 bis 8 min inkubiert und dann die Reaktion auf Eis abgestoppt. Anschließend wurden 200 µl Probe entnommen und zu 800 µl 4 °C kalter Detektionslösung (100 mM HEPES-KOH, pH 7.3, 2.5 mM PEP, 0.3 mM NADH) gegeben. Nach Bestimmung der Extinktion bei 340 nm ( $E_0$ ) wurde die Detektionsreaktion mit 4 U PK und 6 U LDH gestartet. Nach der vollständigen Umsetzung des entstandenen ADP wurde  $E_1$  bestimmt. Aus den ermittelten Werten ließ sich die spezifische Aktivität (U/mg) bei der jeweiligen Temperatur bestimmen.

#### **4.12.3 ACD aus *Entamoeba histolytica***

Die Charakterisierung der ACD erfolgte bei 37 °C in 400 µl Testansätzen. Der Ellman-Test (4.11.1) wurde sowohl für Aktivitätsbestimmungen während der Reinigung und zur Bestimmung der kinetischen Parameter in Richtung Acetatbildung sowie zur Ermittlung der Magnesiumabhängigkeit und des Temperatur- und pH-Optimums der ACD verwendet. Der Testansatz enthielt 100 mM HEPES-KOH, pH 7.5, 0.1 mM DTNB, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM Acetyl-CoA, 1 mM ADP und 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und 0.6 bis 1 µg Protein. Die pH-Abhängigkeit des Enzyms wurde zwischen pH 5.8 und pH 8.0 bestimmt. Die Ansätze enthielten dazu entweder 100 mM Piperazin (pH 5.8 bis 6.3), 100 mM MES (pH 6.3 bis 7.0) oder 100 mM HEPES (pH 7.0 bis 8.0). Das Temperaturoptimum wurde zwischen 30 °C und 55 °C ermittelt. Die Bestimmung der kinetischen Parameter und die Ermittlung des Substratspektrums in Richtung der CoA-Ester-Bildung erfolgten mit dem PK/LDH-Test. Der Reaktionsansatz enthielt 100 mM HEPES-KOH pH 7.5, 10 mM der jeweiligen Säure, 1 mM ATP, 0.1 mM HSCoA, 5 mM MgCl<sub>2</sub> und das Testsystem.

#### **4.12.4 ACD aus *Methanosarcina mazei***

Die Charakterisierung erfolgte bei 35 °C in 400 µl Testansätzen. Für Aktivitätsbestimmungen während der Reinigung und zur Bestimmung der kinetischen Parameter in Richtung Acetatbildung sowie der Magnesiumabhängigkeit der ACD wurde der Ellman-Test (4.11.1) verwendet. Der Testansatz setzte sich zusammen aus 100 mM HEPES-KOH, pH 7.5, 0.1 mM DTNB, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM Acetyl-CoA (bzw. Isobutyryl-CoA), 1 mM ADP, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und

1.2 bis 2.4  $\mu\text{g}$  Protein. Zur Bestimmung der pH-Abhängigkeit des Enzyms mit dem Ellman-Test enthielten die Ansätze entweder 100 mM Piperazin (pH 5.8 bis 6.3), 100 mM MES (pH 6.3 bis 7.0) oder 100 mM Hepes (pH 7.0 bis 8.0). Die Bestimmung der kinetischen Parameter und die Ermittlung des Substratspektrums in Richtung der CoA-Ester-Bildung erfolgten mittels PK/LDH-Test. Der Reaktionsansatz enthielt 100 mM Hepes-KOH, pH 7.5, 10 mM der verwendeten Acyl- oder Aryl-Säure, 1 mM ATP, 0.1 mM HSCoA, 5 mM  $\text{MgCl}_2$  und das Testsystem.

#### 4.12.5 ACDs aus *Pyrococcus furiosus*

Die Aktivität wurde bei 55 °C in 400  $\mu\text{l}$  Testansätzen bestimmt. Der Testansatz für die Aktivitätsbestimmung in Richtung Säurebildung enthielt 100 mM MES-NaOH, pH 6.5, 0.1 mM DTNB, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.1 mM Acetyl-CoA (bzw. Phenylacetyl-CoA), 1 mM ADP und 20 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . In Richtung der CoA-Ester-Bildung erfolgten die Bestimmung der kinetischen Parameter und die Ermittlung des Substratspektrums mit dem PK/LDH-Test. Der Reaktionsansatz enthielt 100 mM MES-NaOH pH 6.5, 10 mM der jeweiligen Säure, 1 mM ATP, 0.1 mM HSCoA, 5 mM  $\text{MgCl}_2$  und das Testsystem. Es wurden für die  $\text{ACD}_{\text{succ}}$  6.6 bis 13.2  $\mu\text{g}$ , für die ACDI 1.8 bis 3.6  $\mu\text{g}$ , für die  $\text{ACD}_{\text{succ}}\alpha\text{ACDI}\beta$  6.4 bis 12.8  $\mu\text{g}$  und für die  $\text{ACDI}\alpha\text{ACD}_{\text{succ}}\beta$  1.4 bis 2.8  $\mu\text{g}$  Protein eingesetzt.

#### 4.12.6 FCS aus *Delftia acidovorans*

Die Aktivitätsbestimmung während der Reinigung, die Bestimmung der kinetischen Parameter sowie die Ermittlung des pH-Optimums und der Magnesiumabhängigkeit des Enzyms wurden mit dem Ferulattest bei 35 °C durchgeführt. Der Standardassay enthielt in 400  $\mu\text{l}$  Volumen 100 mM Bis-Tris, pH 7.7, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM ATP, 1 mM HSCoA, 1 mM Ferulat und 0.5  $\mu\text{g}$  bis 1.9  $\mu\text{g}$  Protein. Für die Bestimmung der Magnesiumabhängigkeit wurde die  $\text{MgCl}_2$ -Konzentration zwischen 0 mM und 10 mM variiert. Die pH-Abhängigkeit des Enzyms wurde zwischen pH 5.7 und pH 8.2 bestimmt. Die Ansätze enthielten entweder 100 mM Bis-Tris (pH 5.7 bis pH 7.7) oder 100 mM Tris-HCl (pH 7.7 bis pH 8.2). Die Bestimmung des Substratspektrums erfolgte mit dem PK/LDH-Test. Der Reaktionsansatz enthielt 100 mM Bis-Tris pH 7.7, entweder 1 mM oder 10 mM der getesteten Acyl- oder Aryl-Säure, 1 mM ATP, 0.1 mM HSCoA, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , Testsystem sowie 4.7  $\mu\text{g}$  bis 9.4  $\mu\text{g}$  Protein. Auf Grund der Überlappung der Absorptionsmaxima von Feruloyl-CoA und NADH konnte die Aktivität mit Ferulat mit diesem Test nicht bestimmt werden.

**Nachweis der ADP-Bildung durch die FCS aus *D. acidovorans*.** Um die ADP-Bildung durch die FCS nachzuweisen, wurde das Enzym in einem Standardassay mit Ferulatkon-

zentrationen von 0.025 – 0.1 mM inkubiert und der Ferulatverbrauch photometrisch verfolgt (siehe 4.11.3). Nachdem das Ferulat vollständig verbraucht war, wurde gebildetes ADP mit dem PK/LDH-Test nachgewiesen. Dazu wurden nach Ablauf der FCS-Reaktion 0.1 mM NADH, 2.5 mM PEP, 0.8 U PK und 1.2 U LDH zur Reaktion gegeben und die Extinktionsabnahme bei 340 nm verfolgt. Die PK ist spezifisch für ADP und akzeptiert AMP nicht als Substrat. Dadurch konnte dieses System als Nachweis der ADP-Bildung durch die FCS dienen. Da pro Mol Feruloyl-CoA in der FCS-Reaktion ein Mol ADP gebildet werden, war die Menge an verbrauchtem NADH im PK/LDH-Test zur Menge an gebildetem Feruloyl-CoA durch die FCS proportional.

#### 4.12.7 PCSs aus *Ralstonia eutropha*

Die Bestimmung der Aktivität während der Reinigung und Charakterisierung erfolgte mit dem PK/LDH-Test. Die Messungen wurden bei 35 °C in 400 µl Testansätzen durchgeführt.

**RaPCS1.** Die Standard-Reaktionsansätze enthielten 100 mM Bis-Tris, pH 7.7, 2 mM Pimelat, 1 mM ATP, 0.1 mM HSCoA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, das PK/LDH-Testsystem sowie 2.3 µg bis 4.6 µg Protein. Für die Bestimmung der Magnesiumabhängigkeit wurde die MgCl<sub>2</sub>-Konzentration zwischen 0 mM und 10 mM variiert. Die Ansätze für die Bestimmung des pH-Optimums enthielten entweder 100 mM Bis-Tris (pH 5.7 bis pH 7.7) oder 100 mM Tris-HCl (pH 7.7 bis pH 8.7) und 13 µg bis 30 µg Protein. Der Reaktionsansatz für die Bestimmung des Substratspektrums in Richtung CoA-Esterbildung enthielt 100 mM Bis-Tris, pH 7.7, 10 mM der zu testenden Acyl- oder Aryl-Säure, 1 mM ATP, 0.1 mM HSCoA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, Testsystem, sowie 4.6 µg bis 9.2 µg Protein. In Richtung der Säurebildung wurde die Aktivität mit dem Ellman-Test analysiert. Der Reaktionsansatz enthielt 100 mM Bis-Tris, pH 7.7, 0.1 mM DTNB, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM bis 0.4 mM des jeweiligen CoA-Esters (Acetyl-CoA, Isobutyryl-CoA oder Phenylacetyl-CoA), 1 mM ADP, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und 28.7 µg Protein. Die Bestimmung des K<sub>m</sub>-Wertes der RaPCS1 mit Ferulat als Substrat wurde mit dem Ferulat-Test durchgeführt (4.11.3). Der Standardassay enthielt in 400 µl Volumen 100 mM Bis-Tris, pH 7.7, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, 1 mM HSCoA, 0 bis 1.5 mM Ferulat und 14.4 µg Protein.

**RaPCS1H269A und RaPCS1H539A.** Der Aktivitätstest der Mutante wurde mit dem Standardsystem der RaPCS1 durchgeführt. Es wurden 200 µg bis 500 µg Protein für die RaPCSH269A und 37.5 µg bis 100 µg Protein für die RaPCS1H539A eingesetzt.

**RaPCS2.** Die Reaktionsansätze enthielten 100 mM Hepes-KOH, pH 7.5, 2 mM Pimelat, 1 mM ATP, 0.1 mM HSCoA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, das PK/LDH-Testsystem sowie 3.1 µg Protein. Der Reaktionsansatz für die Bestimmung des Substratspektrums enthielt in Richtung CoA-Esterbildung 100 mM Hepes-KOH, pH 7.5, 10 mM der getesteten Acyl- oder Aryl-Säure,

1 mM ATP, 0.1 mM HSCoA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.3 mM NADH, 2.5 mM PEP, 0.8 U PK und 1.2 U LDH sowie 8.8 µg bis 17.6 µg Protein. Die Charakterisierung der RaPCS2 mit Ferulat als Substrat wurde mit dem Ferulat-Test durchgeführt (4.11.3). Der Standardassay enthielt in 400 µl Volumen 100 mM Hepes-KOH, pH 7.5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, 1 mM HSCoA, 1 mM Ferulat und 11.8 µg bis 18.9 µg Protein. Für die Bestimmung der Magnesiumabhängigkeit wurde die MgCl<sub>2</sub>-Konzentration zwischen 0 mM und 20 mM variiert. Die pH-Abhängigkeit des Enzyms wurde zwischen pH 5.7 und pH 8.2 bestimmt. Die Ansätze enthielten entweder 100 mM Bis-Tris (pH 5.7 bis pH 7.7) oder 100 mM Tris-HCl (pH 7.7 bis pH 8.2) und 6 µg bis 12 µg Protein.

### 4.13 Bioinformatische Methoden

Mit den Aminosäuresequenzen von Acyl-CoA Synthetasen aus Archaea, Bacteria und Eukarya wurden multiple Sequenzvergleiche („Alignments“) und phylogenetische Stammbäume erstellt. Die Sequenzalignments wurden mit dem Programm ClustalX (Thompson et al. 1997) unter Verwendung der Standardeinstellungen mit einer Gonnet-Matrix erstellt. Phylogenetische Stammbäume wurden - wenn nicht anders angegeben - ebenfalls mit ClustalX mittels Neighbor-joining-Methode erstellt und mit dem Programm Treeview oder MEGA 5.1 visualisiert. Konfidenzintervalle wurden durch 1000 Bootstrapping-Wiederholungen bestimmt. Um phylogenetische Analysen von Acyl-CoA Synthetasen auf Grund eines Sequenzvergleiches der Domänen 1 und 2 oder der Domäne 5 treffen zu können, wurden diese *in silico* von der restlichen Sequenz abgespalten. Hierzu wurde zunächst die Sequenz am Beginn der Ligase-CoA Domäne (Domäne 5) mit Hilfe der bekannten Proteinstruktur der  $\beta$ -Untereinheit der SCS aus *E. coli* mit dem über NCBI bereitgestellten Programm Cn3D (Cn3D macromolecular structure viewer (Wang et al. 2000)) identifiziert. Mit Hilfe des Strukturmodells der ACD aus *P. furiosus* (Bräsen et al. 2008) wurden die dazu homologen Positionen in der  $\alpha$ -Untereinheit der ACD aus *P. furiosus* bestimmt. Durch multiple Sequenzvergleiche von Succinyl-CoA Synthetasen mit der SCS aus *E. coli* und ACDs, PCS und FCS mit der Acetyl-CoA Synthetase aus *P. furiosus* wurden die homologen Sequenzbereiche in ausgewählten Acyl-CoA Synthetasen gefunden. Mit Hilfe des Programms Bioedit (Hall 1999) wurde die Sequenz der jeweiligen Ligase-CoA Domäne in einem Sequenzbereich geringer Ähnlichkeit kurz vor dem identifizierten Bereich abgetrennt. Die so generierten Aminosäuresequenzen der Ligase-CoA Domänen bzw. der Domänen 1 und 2 wurden für phylogenetische Analysen verwendet.

## 5 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zu der Funktion von ADP-abhängigen Acyl-CoA Synthetasen, insbesondere ADP-bildenden Acetyl-CoA Synthetasen (ACD), Feruloyl-CoA Synthetasen (FCS) und Pimeloyl-CoA Synthetasen (PCS) sowie Succinyl-CoA Synthetasen (SCS) aus Archaea, Bacteria und Eukarya durchgeführt. Im Einzelnen wurden folgende Fragestellungen untersucht:

1. Die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten von zwei ACD-Isoenzymen aus *Pyrococcus furiosus* wurden getrennt exprimiert und jeweils eine ACD $\alpha$ - mit einer ACD $\beta$ -Untereinheit zu insgesamt vier chimären ACDs kombiniert. Die gereinigten Holoenzyme wurden charakterisiert, um den Einfluss der Untereinheiten auf das Substratspektrum zu untersuchen.
2. Im Genom des Archaeons *Candidatus korarchaeum cryptophilum* sind vier  $\alpha$ -Untereinheiten und eine  $\beta$ -Untereinheit der ACD sowie die Gene für die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit der Succinyl-CoA Synthetase identifiziert. Die ACD- und SCS-Gene wurden kloniert, in *E. coli* exprimiert und die rekombinanten Enzyme charakterisiert.
3. Eine putative ACD in dem Archaeon *Methanosarcina mazei* wurde heterolog exprimiert und das rekombinante Enzym als ACD charakterisiert.
4. Die ACD aus dem Eukaryoten *Entamoeba histolytica* wurde heterolog exprimiert und das rekombinante Protein biochemisch detailliert charakterisiert.
5. Die glucosespezifische Bildung von Acetat in Wachstumsversuchen und Zellsuspensionen von *Chloroflexus aurantiacus* wurde analysiert. Das für die Acetatbildung verantwortliche Enzym wurde als ACD identifiziert, gereinigt und das kodierende Gen identifiziert. Die heterolog exprimierte ACD wurde biochemisch charakterisiert.
6. Eine putative FCS aus *Delftia acidovorans* wurde in *E. coli* exprimiert und das rekombinante Enzym als erste ADP-bildende FCS biochemisch charakterisiert.
7. Zwei putative PCSs aus dem Bakterium *Ralstonia eutropha* H16 wurden heterolog exprimiert und biochemisch charakterisiert. Um Hinweise auf den Reaktionsmechanismus der PCS zu erhalten, wurden durch ortsspezifische Mutagenese zwei Histidine gegen Alanin ausgetauscht und der Effekt auf die Aktivität bestimmt.

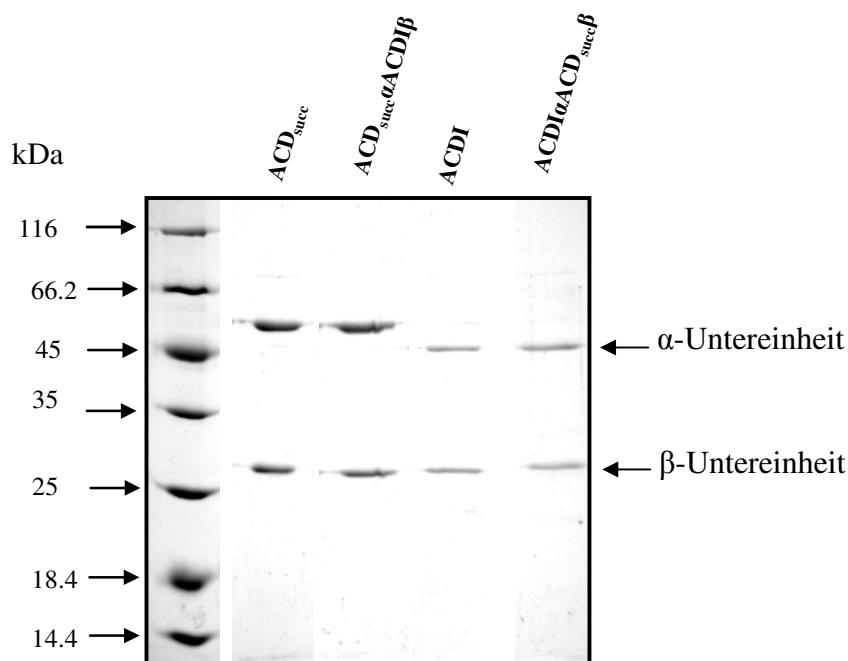
## 5.1 Experimente zum Einfluss der Untereinheiten von ACDs aus *P. furiosus* auf Substratspektrum und Reaktionskinetik

In *P. furiosus* sind zwei ACD-Isoenzyme beschrieben, ACDI und ACDII, die sich hinsichtlich ihres Substratspektrums unterscheiden. Die ACDI setzt mit der höchsten spezifischen Aktivität Acetyl-CoA bzw. Acetat um, während ACDII die Reaktion mit Phenylacetyl-CoA bzw. Phenylacetat am schnellsten katalysiert. Beide Enzyme bilden  $\alpha_2\beta_2$ -Heterotetramere und sind jeweils aus unterschiedlichen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten aufgebaut (Mai and Adams 1996b). In *Thermococcus kodakaraensis* wurde kürzlich ein weiteres Isoenzym identifiziert, das mit der höchsten spezifischen Aktivität Succinat umsetzt und an der Succinatbildung beteiligt ist. Die Homologen ORFs in *P. furiosus* mit der höchsten Identität ( $> 80\%$ ) sind PF\_0233 (ACD $\alpha$ ) und Pf\_1837 (ACD $\beta$ ) (Shikata et al. 2007). Pf\_1837 entspricht der  $\beta$ -Untereinheit des bereits charakterisierten ACD-Isoenzym II, während Pf\_0233 noch keiner bisher charakterisierten ACD aus *P. furiosus* zugeordnet werden kann. Es sollte geprüft werden, ob Pf\_0233 und Pf\_1837 für eine Succinat bildende ACD kodieren. Dafür wurden die beiden ORFs kloniert, in *E. coli* separat exprimiert und das gereinigte, rekonstituierte Enzym hinsichtlich seines Substratspektrums charakterisiert. Zusätzlich wurden  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit des ACD-Isoenzym I (Pf\_1540 bzw. Pf\_1787) aus *P. furiosus* heterolog exprimiert und gereinigt. Mit jeweils einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit wurden *in vitro* vier chimäre ACDs rekonstituiert und damit der Einfluss der Untereinheiten auf das Substratspektrum und die Kinetik des Enzyms untersucht.

**Herstellung der rekombinanten ACDs.** Die Gene des ACD-Isoenzym I (kodiert in ORF Pf\_1540 und ORF Pf\_1787) aus *P. furiosus* lagen bereits jeweils im Vektor pET17b in *E. coli* BL21(DE3)CodonPlus kloniert vor. Die Gene Pf\_0233 und Pf\_1837 wurden in den Vektor pET14b kloniert und getrennt in *E. coli* exprimiert. Durch die Verwendung des Vektors pET14b wurde die Basensequenz von Pf\_0233 und Pf\_1837 mit sechs Histidin-Codonen (CAT) versehen (6xHistidin-tag). Alle vier ACD-Untereinheiten wurden durch Hitzefällung angereichert und rekonstituiert. Anschließend wurden die vier verschiedenen rekonstituierten Proteine über Gelfiltration und eine weitere Hitzefällung bei 90 °C für 15 min bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Für alle vier Holoenzyme konnte über Gelfiltration eine  $\alpha_2\beta_2$ -heterotetramere Struktur mit einer apparenten molekularen Größe von 150 bis 160 kDa bestimmt werden. Abbildung 9 gibt einen Überblick über die Kombination der Untereinheiten und die daraus resultierenden in dieser Arbeit hergestellten chimären ACDs.

**Tabelle 8 Kombination der ACD-Untereinheiten aus *P. furiosus* und Bezeichnung der resultierenden Holoenzyme**

$\alpha$ -Untereinheit	$\beta$ -Untereinheit	Bezeichnung des Holoenzym
Pf_0233	Pf_1837	ACD <sub>succ</sub>
Pf_0233	Pf_1787	ACD <sub>succ</sub> $\alpha$ -ACDI $\beta$
Pf_1540	Pf_1787	ACDI
Pf_1540	Pf_1837	ACDI $\alpha$ -ACDI $\beta$

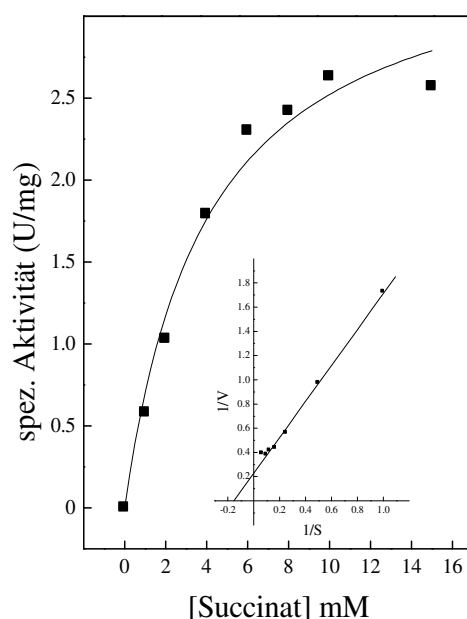


**Abbildung 9 SDS-PAGE der gereinigten ACDs aus *P. furiosus*.** 12 % Polyacrylamid-Gel mit Coomassie Brilliantblau gefärbt. Spurbelegung von links nach rechts: Molekulargewichtsmarker, ACD<sub>succ</sub> (Pf\_0233 + Pf\_1837), ACD<sub>succ</sub> $\alpha$ -ACDI $\beta$  (Pf\_0233 + Pf\_1787), ACDI (Pf\_1540 + Pf\_1787), ACIDI $\alpha$ -ACDI $\beta$  (Pf\_1540 + Pf\_1837). Die Pfeile auf der linken Seite deuten die molekulare Größe an. Die Pfeile auf der rechten Seite deuten auf die  $\alpha$ -Untereinheit bzw. die  $\beta$ -Untereinheit.

**Substratspezifität und biochemische Charakterisierung.** Die vier ACDs wurden auf ihre Substratspezifität hin untersucht. Die Messungen wurden bei 55 °C durchgeführt. In Richtung Säureaktivierung dienten Acetat, Succinat, Isobutyrat, Isovalerat, Phenylacetat, Indol-3-acetat, Citrat und Pimelat als Substrat (je 10 mM im Test). Die Rückreaktion wurde mit Acetyl-CoA und Phenylacetyl-CoA (je 0.1 mM) geprüft. Die relativen Aktivitäten der erstellten ACD-Isoenzyme mit den verwendeten Substraten ist in Abbildung 11 dargestellt, die absoluten Werte in Tabelle 9.

*ACD<sub>succ</sub>*. Das Enzym setzte Succinat (2.2 U/mg = 100 %) mit siebenfach höherer Geschwindigkeit als Acetat um (14 %). Mit Isovalerat wurde eine ähnliche Aktivität wie mit Succinat erreicht (ca. 120 %), wohingegen Isobutyrat (9 %) und Phenylacetat (23 %) ähnlich schnell wie Acetat umgesetzt wurden. Indol-3-acetat, Citrat und Pimelat wurden nicht verwendet. Die *ACD<sub>succ</sub>* katalysierte die Rückreaktion mit Acetyl-CoA (1.11 U/mg), nicht aber mit Phenylacetyl-CoA. Der  $K_m$ -Wert für Succinat wurde mit 6.53 mM bestimmt (Abbildung 10). Mit Succinyl-CoA konnte die Reaktion nicht getestet werden, da dieses Substrat über 35 °C thermolabil ist. Bei 35 °C zeigte die *ACD<sub>succ</sub>* mit keinem der getesteten Substrate Aktivität.

*ACD<sub>succ</sub> $\alpha$ -ACDI $\beta$* . Die chimäre ACD zeigte in beiden Reaktionsrichtungen eine nahezu identische Substratspezifität und Affinität wie die *ACD<sub>succ</sub>*. Succinat wurde mit 2.3 U/mg umgesetzt (100 %). Indol-3-acetat, Citrat und Pimelat wurden nicht verwendet. Acetat (17 %), Isovalerat (110 %), Isobutyrat (15 %), und Phenylacetat (13 %) wurden mit einer der *ACD<sub>succ</sub>* vergleichbaren Effektivität umgesetzt. Die Säurebildung wurde mit 1.12 U/mg (Acetyl-CoA) katalysiert. Mit Phenylacetyl-CoA war die *ACD<sub>succ</sub> $\alpha$ -ACDI $\beta$*  nicht aktiv (Tabelle 9).



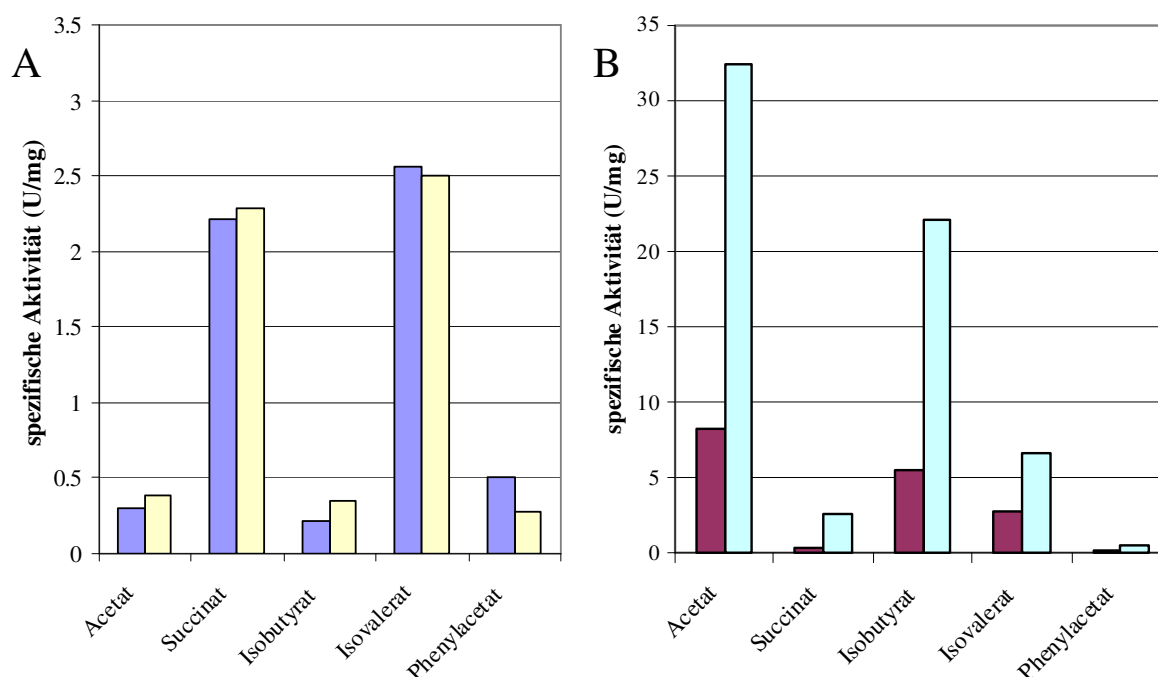
**Abbildung 10** Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der *ACD<sub>succ</sub>* von der Succinat-Konzentration. Die Einschübe zeigen die doppelt-reziproke Auftragung nach Lineweaver-Burk.

*ACDI*. Die *ACDI* katalysierte die Reaktion mit Acetat mit einer spezifischen Aktivität von 8.2 U/mg (100 %). Verzweigt-kettige Monocarbonsäuren wurden mit 68 % (Isobutyrat) oder 33 % (Isovalerat) der Aktivität umgesetzt. Succinat wurde mit 5 % dieser Rate umgesetzt.



Arylsäuren wurden nicht umgesetzt (< 2 %). Die Rückreaktion mit Acetyl-CoA wurde mit einer spezifischen Aktivität von 20.7 U/mg katalysiert. Das Enzym zeigte keine Aktivität mit Phenylacetyl-CoA.

*ACDI $\alpha$ -ACDI $\beta$* . Der Austausch der ACDI $\beta$ -Untereinheit gegen ACDI $\beta$  hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Substratspezifität. Die Affinität für Acetat war mit einem  $K_m$  von 1.6 mM (*ACDI $\alpha$ ACDI $\beta$* ) dem der ACDI vergleichbar ( $K_m = 0.9$  mM). Allerdings wurde die spezifische Aktivität mit Acetat (32.4 U/mg) und Isobutyrat (22.1 U/mg) um das 4fache gesteigert, mit Succinat (2.7 U/mg) um das 7fache. Isovalerat wurde durch die *ACDI $\alpha$ -ACDI $\beta$*  2.5fach schneller umgesetzt als durch die ACDI (Abbildung 11). Die spezifische Aktivität der chimären *ACDI $\alpha$ -ACDI $\beta$*  mit Acetyl-CoA war mit 17.7 U/mg vergleichbar zur Aktivität der ACDI (20.7 U/mg). Mit Phenylacetyl-CoA konnte die Reaktion nicht katalysiert werden.



**Abbildung 11** Substratspektren der *ACD<sub>succ</sub>* und *ACD<sub>succ</sub> $\alpha$ -ACDI $\beta$*  (A) sowie der ACDI und *ACDI $\alpha$ -ACDI $\beta$*  (B) in Richtung Säureaktivierung. Dargestellt ist die spezifische Aktivität (U/mg) mit den getesteten Substraten. Zuordnung der Farben: (A) *ACD<sub>succ</sub>*: blau; *ACD<sub>succ</sub> $\alpha$ -ACDI $\beta$* : gelb; (B) ACDI: dunkelrot; *ACDI $\alpha$ -ACDI $\beta$* : türkis

**Tabelle 9 Molekulare und kinetische Parameter der rekombinanten ACDs aus *P. furiosus*.** Die apparenten molekularen Massen wurden durch Gelfiltration bestimmt. Die Ermittlung der  $K_m$ -Werte erfolgte aus der doppelt-reziproken Darstellung nach Lineweaver-Burk. n.b. = nicht bestimmt; n.m. = nicht messbar; gemessen bei 55 °C.

	Substrat	ACD <sub>succ</sub>	ACD <sub>succ</sub> $\alpha$ - ACDI $\beta$	ACDI	ACDI $\alpha$ - ACDI $\beta$
<b>kalkulierte molekul. Masse der Untereinheit (kDa)</b>					
	$\alpha$ -Untereinheit	50.4	50.4	49.9	49.9
	$\beta$ -Untereinheit	26.4	25.9	25.9	26.4
<b>apparente molekul. Masse der Untereinheit (kDa)</b>					
	$\alpha$ -Untereinheit	52.7	52.7	49.1	49.1
	$\beta$ -Untereinheit	27.4	25.5	25.5	27.4
<b>apparente molekulare Masse des Enzyms (kDa)</b>		150	150	150 (145) <sup>1</sup>	163
<b>oligomere Struktur</b>		$\alpha_2\beta_2$	$\alpha_2\beta_2$	$\alpha_2\beta_2$ ( $\alpha_2\beta_2$ ) <sup>1</sup>	$\alpha_2\beta_2$
<b>apparenter <math>K_m</math>-Wert (mM)</b>	Succinat	6.53	5.7	n.b. (n.b.) <sup>1</sup>	n.b.
	Acetat	n.b.	n.b.	0.9 (0.7) <sup>1</sup>	1.6
<b>Spezifische Aktivität (U/mg)</b>					
	Succinat	2.2	2.3	0.4	2.7
	Acetat	0.3	0.4	8.2 (20) <sup>1</sup>	32.4
	Isobutyrat	0.2	0.35	5.6	22.1
	Isovalerat	2.6	2.5	2.7	6.7
	Phenylacetat	0.5	0.3	0.2	0.6
	Acetyl-CoA	1.11	1.12	20.7 (11) <sup>1</sup>	17.7
	Phenylacetyl-CoA	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.

<sup>1</sup> Daten in Klammern aus Musfeldt et al. 1999

Die Ergebnisse zeigen:

1. *P. furiosus* enthält ein effektiv Succinat umsetzendes ACD-Isoenzym (ACD<sub>succ</sub>)
2. Bei gleicher ACD $\alpha$ -Untereinheit zeigten die chimären Isoenzyme unabhängig von der verwendeten ACD $\beta$ -Untereinheit ein konstantes Substratspektrum. Der Austausch der  $\beta$ -Untereinheit hat demnach keinen signifikanten Einfluss auf die Substratspezifität der ACD, kann aber, wie im Fall der ACDI $\alpha$ ACDI $\beta$ , die Reaktionsgeschwindigkeit in Richtung der Säureaktivierung beeinflussen. Die Reaktionsgeschwindigkeit in Richtung Säurebildung mit Acetyl-CoA und Phenylacetyl-CoA wurde nicht beeinflusst. Dies deutet darauf hin, dass die Substratspezifitäten der ACDs in *P. furiosus* durch die  $\alpha$ -Untereinheit determiniert werden.

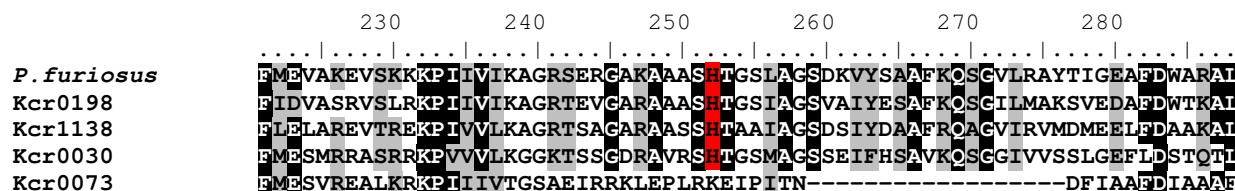
## 5.2 Acyl-CoA Synthetasen in *Candidatus korarchaeum cryptophilum*

Die Abteilung der Korarchaeota beschreibt eine Gruppe bislang unkultivierter Archaeen, die im phylogenetischen Stammbaum sehr früh zwischen Crenarchaeota und Euryarchaeota abzweigen (Elkins et al. 2008). Bisher wurde nur ein Vertreter, *Candidatus korarchaeum cryptophilum*, aus stabilen Mischkulturen angereichert und das Genom sequenziert. Im Genom sind die homologen Gene für vier putative  $\alpha$ -Untereinheiten von ACDs (kcr\_0030, kcr\_0073, kcr\_0198 und kcr\_1138) annotiert und ein ORF, kcr\_0115, der für die putative  $\beta$ -Untereinheit einer ACD kodiert. Zusätzlich wurden die Gene für die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit einer SCS (kcr\_1392 und kcr\_1393) identifiziert (Elkins et al. 2008). Die hypothetischen Untereinheiten der ACDs und der SCS wurden in *E.coli* exprimiert, gereinigt und die rekonstituierten Holoenzyme biochemisch charakterisiert.

### 5.2.1 Charakterisierung von ACDs aus *Ca. K. cryptophilum*

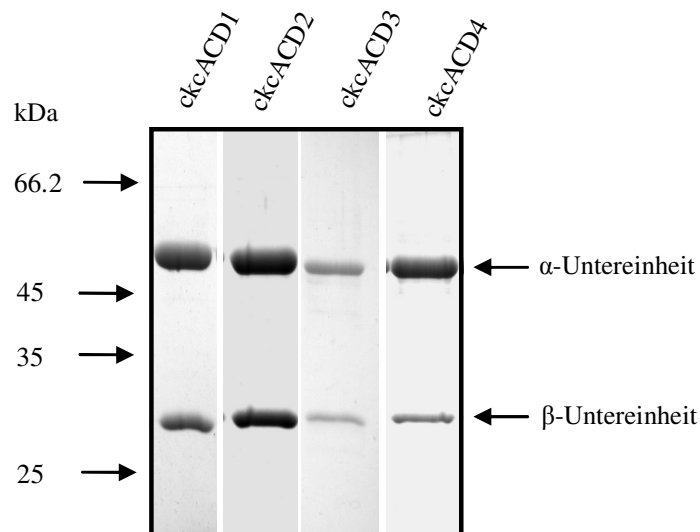
**Sequenzanalysen.** Ein Aminosäurealignment mit den Sequenzen der  $\alpha$ -Untereinheit der ACDI aus *P. furiosus* zeigte hohe Identitäten zu den ORFs kcr\_0030 (38 %), kcr\_0073 (32 %), kcr\_0198 (52 %) und kcr\_1138 (45 %). Die hypothetische  $\beta$ -Untereinheit (kcr\_0115) zeigte eine Identität von 52 % zu der  $\beta$ -Untereinheit der ACD I aus *P. furiosus*.

Für die *P. furiosus*-ACDI wurde gezeigt, dass ein in allen bisher charakterisierten ACDs konserviertes Histidin in der  $\alpha$ -Untereinheit (H<sup>257</sup> $\alpha$ ) am Reaktionsmechanismus beteiligt und katalytisch essentiell ist (Bräsen et al. 2008). Aus dem Aminosäure-Sequenzalignment ergab sich, dass dieses essentielle Histidin in drei  $\alpha$ -Untereinheiten aus *Ca. K. cryptophilum* ebenfalls konserviert ist (kcr\_0198, kcr\_0030, kcr\_1138). In kcr\_0073 ist neben weiteren Sequenzunterschieden dieses Histidin durch Lysin substituiert (Abbildung 12).



**Abbildung 12** Multiples Alignment der Aminosäuresequenz der ACDI  $\alpha$ -Untereinheit aus *P. furiosus* mit den putativen Homologen aus *Ca. K. cryptophilum*. Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt des Alignments. Das katalytisch essentielle Histidin ist rot unterlegt. Die Positionsangaben beziehen sich auf die ACDI $\alpha$  aus *P. furiosus*. Die schwarze Markierung gibt identische, die graue Markierung konservierte Aminosäuren an.

**Molekulare Eigenschaften.** Die hypothetischen ACD-Untereinheiten, im Folgenden *ckcACD* $\alpha$ 1, *ckcACD* $\alpha$ 2, *ckcACD* $\alpha$ 3, *ckcACD* $\alpha$ 4 und *ckcACD* $\beta$  genannt, wurden kloniert und getrennt in *E. coli* exprimiert. Nach Zellaufschluss und einem Reinigungsschritt durch Hitze-fällung bei 85°C wurden die Holoenzyme aus jeweils einer *ckcACD* $\alpha$ -Untereinheit und der *ckcACD* $\beta$  rekonstituiert. Nach erfolgter Rekonstitution wurden die Enzyme über Gelfiltration bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Alle vier hypothetischen ACDs stellten sich im SDS-Gel als zwei Banden von ca. 50 kDa und ca. 27.5 kDa Größe dar (Abbildung 13). Die Größe der Holoenzyme wurde über Gelfiltration mit 150 bis 159 kDa bestimmt. Diese Ergebnisse lassen auf eine  $\alpha_2\beta_2$ -heterotetramere Struktur der vier Proteine schließen.



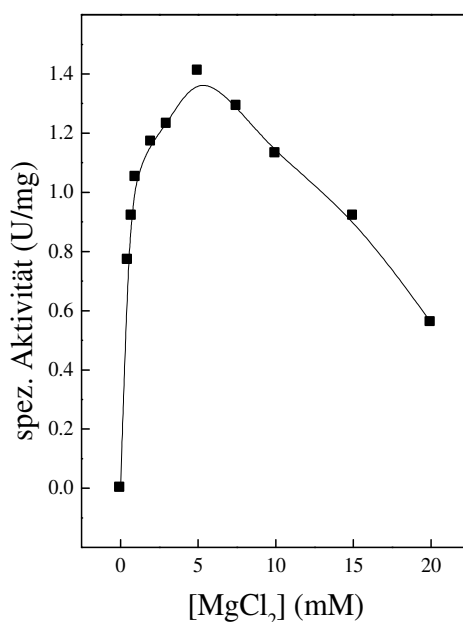
**Abbildung 13 SDS-PAGE der gereinigten ACD-Homologen aus *Ca. K. cryptophilum*.** 12%iges SDS-Polyacrylamidgel mit Coomassie Brilliantblau gefärbt. Spurbelegung von links nach rechts: *ckcACD*1 (*kcr\_0030+kcr\_0115*), *ckcACD*2 (*kcr\_0073+kcr\_0115*), *ckcACD*3 (*kcr\_0198+kcr\_0115*), *ckcACD*4 (*kcr\_1138+kcr\_0115*). Die Pfeile auf der rechten Seite deuten auf die  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Untereinheit der ACD. Die Pfeile auf der linken Seite deuten die molekulare Größe an.

### Charakterisierung der rekombinanten ACDs aus *Ca. K. cryptophilum*

Die *ckcACD*2 zeigte mit keinem der getesteten Substrate Aktivität, was auf das Fehlen des katalytisch essentiellen Histidins in der  $\alpha$ -Untereinheit zurückzuführen sein könnte. *ckcACD*1, *ckcACD*3 und *ckcACD*4 katalysierten die reversible Reaktion:

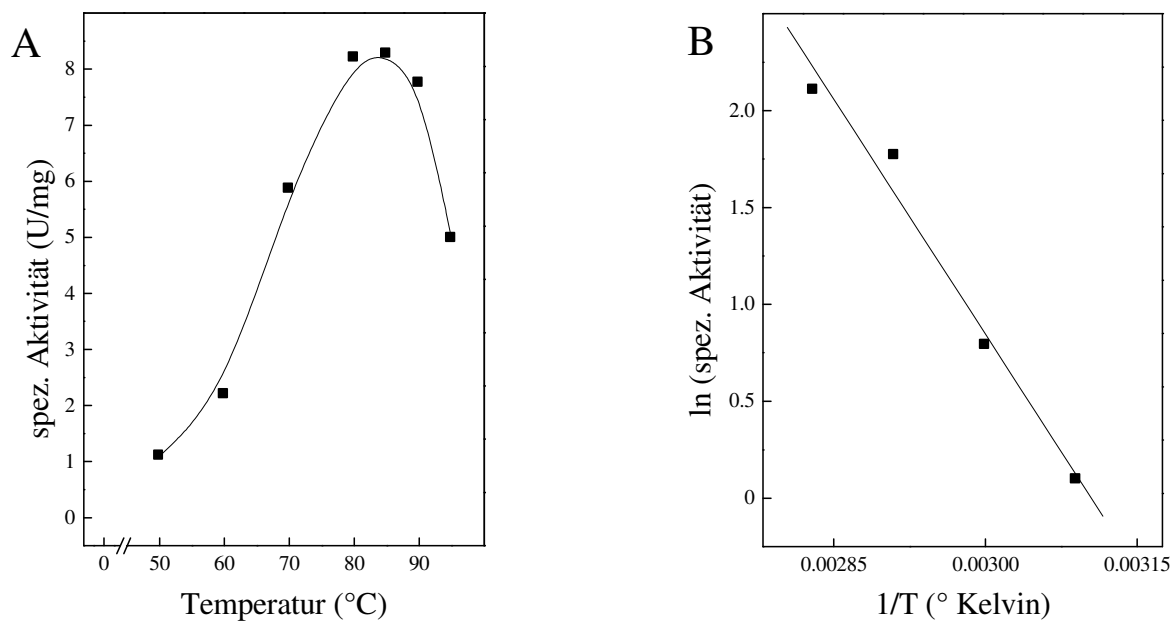
Acetyl-CoA + ADP + Pi  $\rightleftharpoons$  Acetat + ATP + HSCoA. Die Substratabhängigkeit der Rate folgte in allen Fällen einer Michaelis-Menten-Kinetik. Die Ermittlung der kinetischen Parameter erfolgte aus der doppelt-reziproken Darstellung nach Lineweaver-Burk. Die drei aktiven Enzyme wurden hinsichtlich ihrer katalytischen Eigenschaften, des Substratspektrums, sowie ihrer Abhängigkeit von Magnesiumkonzentration und Temperatur charakterisiert. Die molekularen und kinetischen Parameter der ACDs sind in Tabelle 10 dargestellt.

*ckcACD1*. Die *ckcACD1* zeigte mit der Arylsäure Indol-3-acetat die höchste Aktivität (7.3 U/mg = 100 %). Die anderen getesteten Aryl-Säuren wurden noch mit 35 % (Phenylacetat) und 25 % (4-Hydroxyphenylacetat) der Rate umgesetzt. Imidazol-4-acetat wurde nicht als Substrat akzeptiert. Das Enzym setzte die verzweigten Acylsäuren Isovalerat (95 %) und Isobutyrat (83 %) mit annähernd gleicher Effizienz wie Indol-3-acetat um. Die kurzkettigen Monocarbonsäuren Butyrat (57 %) und Propionat (92 %) wurden zwei- bis viermal besser akzeptiert als Acetat (25 %). Die Reaktion konnte nicht mit Succinat oder Citrat als Substrat katalysiert werden. Die *ckcACD1* zeigte mit den CoA-Estern eine 50 % bis 75 % geringere Aktivität als mit den korrespondierenden Säuren. Phenylacetyl-CoA (1.3 U/mg) und Isobutyryl-CoA (1.6 U/mg) wurden dabei doppelt so schnell umgesetzt wie Acetyl-CoA (0.64 U/mg).  
*Magnesiumabhängigkeit*. Die *ckcACD1* zeigte eine Abhängigkeit der Reaktion von  $MgCl_2$ . Die optimale  $MgCl_2$ -Konzentration wurde mit 5 mM bestimmt. Es wurden noch ca. 50 % der Aktivität bei 0.5 bzw. 15 mM  $MgCl_2$  erreicht (Abbildung 14).



**Abbildung 14** Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der *ckcACD1* von der Magnesiumkonzentration. Spezifische Aktivität der *ckcACD1* in Abhängigkeit der  $MgCl_2$ -Konzentration bei 55 °C mit Isobutyryl-CoA.

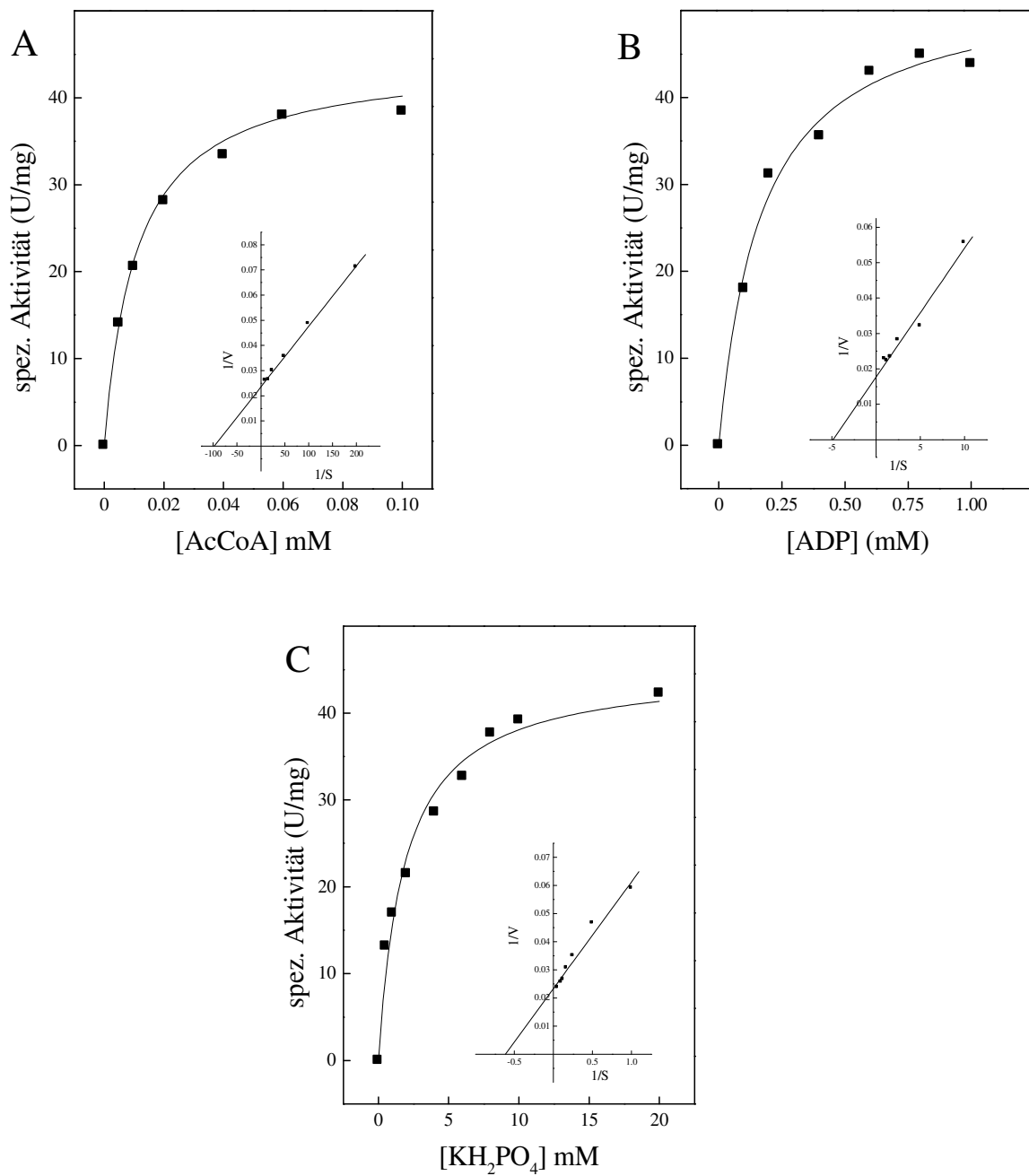
*Temperaturoptimum.* Für die *ckcACD1* wurde das Temperaturoptimum zwischen 50 °C und 95 °C ermittelt. Die höchste spezifische Aktivität zeigte die ACD bei 85 °C. Die Darstellung der Daten nach Arrhenius ergab einen linearen Bereich zwischen 60 °C und 80 °C. Die daraus errechnete Aktivierungsenergie betrug 67.2 kJ/mol (Abbildung 15).



**Abbildung 15 Temperaturabhängigkeit der *ckcACD1*** **A:** Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit (U/mg) von der Temperatur (°C) der *ckcACD1*. **B:** Darstellung der Daten nach Arrhenius.

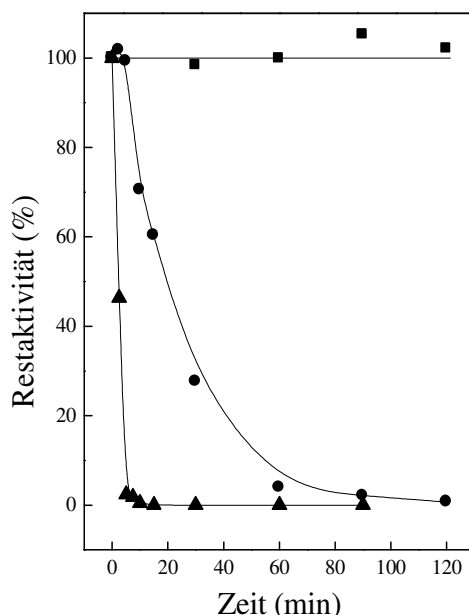
*ckcACD3* Die *ckcACD3* zeigte in Richtung der Säureaktivierung die höchste Aktivität mit Acetat (51 U/mg = 100 %). Propionat (88 %) und Butyrat (62 %) wurden mit ähnlicher Effizienz umgesetzt. Von den getesteten verzweigten Monocarbonsäuren wurde nur Isobutyryl gut angenommen (55 %). Mit 2-Methylbutyrat und Isovalerat zeigte die *ckcACD3* weniger als 10 % Aktivität. Arylsäuren sowie Succinat und Citrat wurden nicht als Substrat akzeptiert.

In Richtung Säurebildung wurde Acetyl-CoA mit der höchsten spezifischen Aktivität umgesetzt (50 U/mg). Die  $K_m$ -Werte wurden mit 15  $\mu\text{M}$  (Acetyl-CoA), 186  $\mu\text{M}$  (ADP) und 1600  $\mu\text{M}$  ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) bestimmt (Abbildung 16). Mit Isobutyryl-CoA konnten noch 19 U/mg gemessen werden, Phenylacetyl-CoA wurde nicht als Substrat akzeptiert.



**Abbildung 16** Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der ckcACD3 von der Substratkonzentration bei 55 °C. Abhängigkeit von der Konzentration von **A**: Acetyl-CoA; **B**: ADP; **C**: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Die Einschübe zeigen die jeweiligen Daten in der doppelt-reziproken Auftragung nach Lineweaver-Burk.

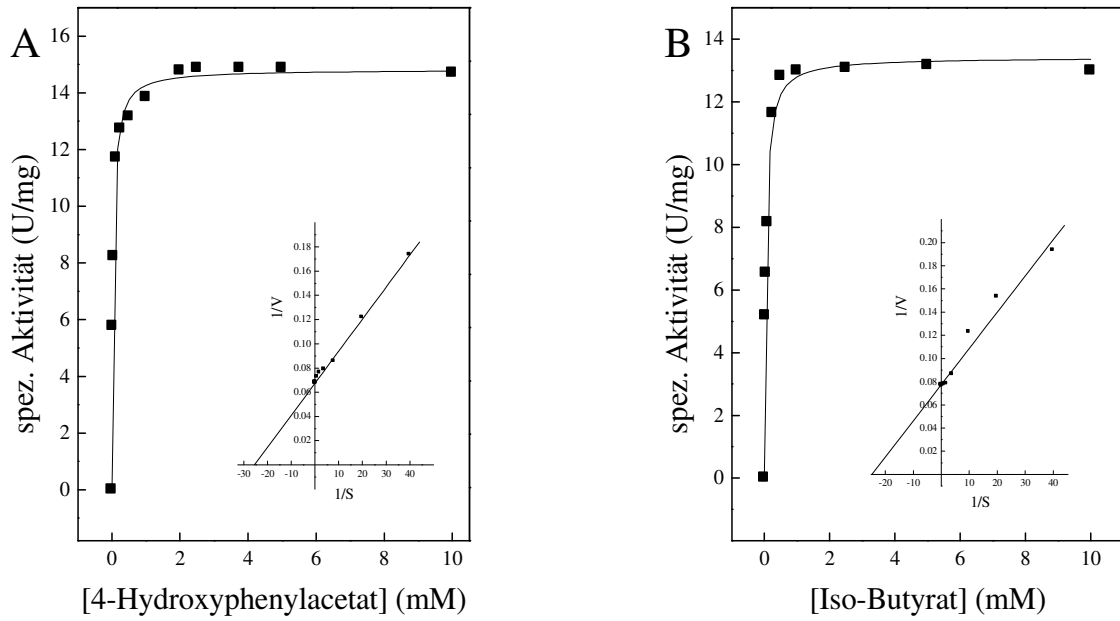
*Thermostabilität.* Die Thermostabilität wurde für die *ckcACD3* bei 75 °C, 85 °C und 95 °C über einen Zeitraum von 120 min bestimmt. Bei 75 °C zeigte sich kein Aktivitätsverlust. Bei 85 °C betrug die errechnete Halbwertszeit 16 min und bei 95 °C nur noch 1.3 min (Abbildung 17).



**Abbildung 17 Temperaturstabilität der *ckcACD3*.** Restaktivität in Prozent (%) der Anfangsgeschwindigkeit (50 U/mg = 100 %) nach Inkubation bei 75 °C (■), 85 °C (◆) und 95 °C (▲).

*ckcACD4.* Die Arylsäure 4-Hydroxyphenylacetat wurde von der *ckcACD4* mit der höchsten spezifischen Aktivität umgesetzt (15.6 U/mg = 100 %). Die verzweigten Carbonsäuren Isobutyryrat (78 %), Isovalerat (78 %) und 2-Methylbutyryrat (79 %), sowie die kurzkettigen Monocarbonsäuren Butyryrat (73 %) und Propionat (59 %) wurden ähnlich effizient als Substrat genutzt. Mit Acetat wurde die Reaktion noch mit 40 % der Rate katalysiert. Die Arylsäuren Phenylacetat und Indol-3-acetat wurden im Vergleich dazu lediglich mit rund 26 % der spezifischen Aktivität verwendet; Imidazol-4-acetat nur mit 4 %. Succinat und Citrat wurden nicht als Substrat akzeptiert. Das Enzym zeigte für 4-Hydroxyphenylacetat ( $K_m = 39 \mu\text{M}$ ) und Isobutyryrat ( $K_m = 40 \mu\text{M}$ ) eine 48fach höhere Affinität als für Acetat ( $K_m = 1920 \mu\text{M}$ ). In Richtung Säureaktivierung wurde Acetyl-CoA mit 2.7 U/mg schlechter umgesetzt als Isobutyryl-CoA (13.7 U/mg) und Phenylacetyl-CoA (8.2 U/mg).

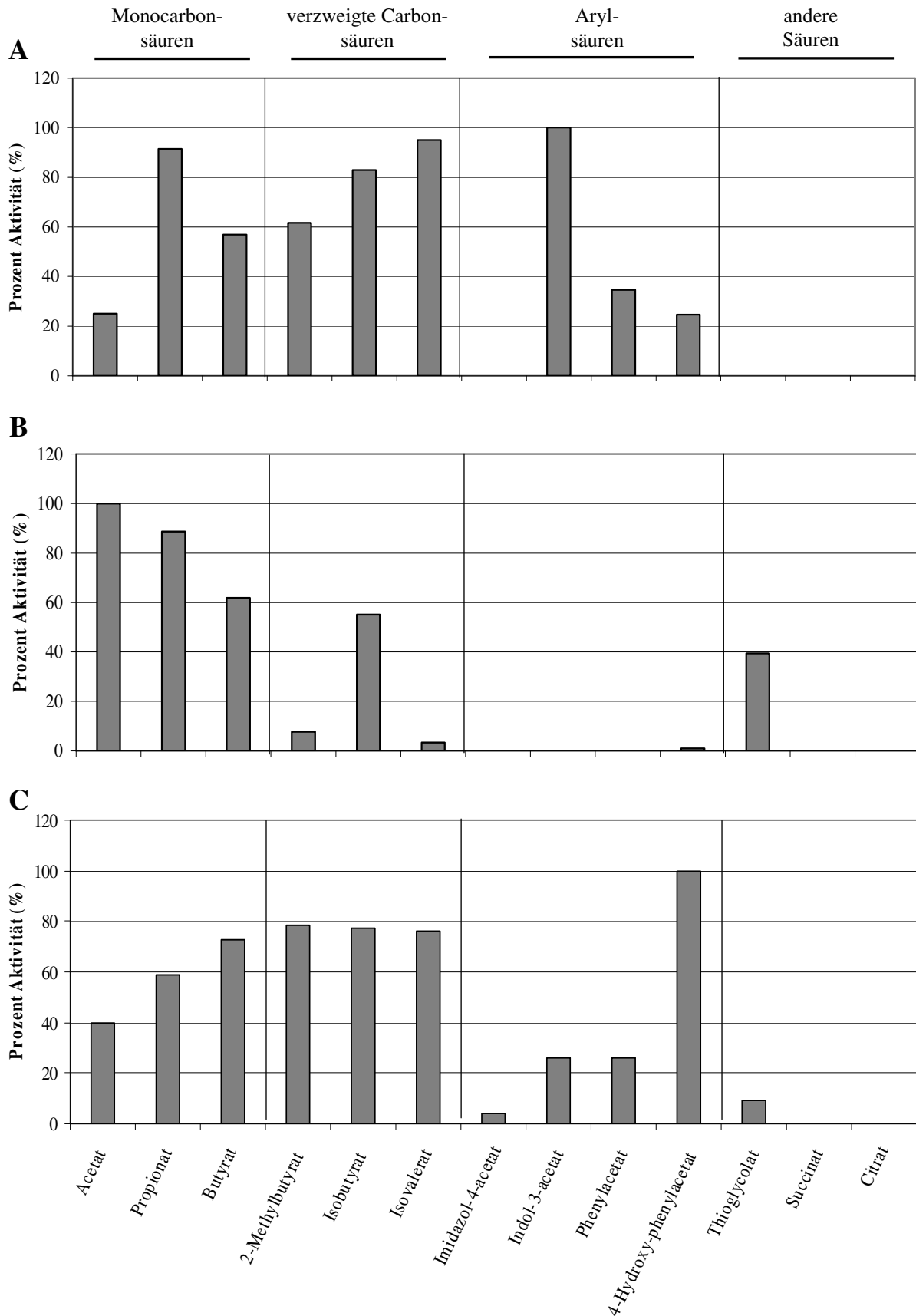




**Abbildung 18** Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der ckcACD4 von der Substratkonzentration von 4-Hydroxyphenylacetat und Isobutytrat. Die Einschübe zeigen die doppelt-reziproke Auftragung nach Lineweaver-Burk. Dargestellt sind die Graphen für **A**: 4-Hydroxyphenylacetat, **B**: Isobutytrat.

**Tabelle 10 Molekulare und kinetische Eigenschaften der aktiven rekombinanten ACDs aus *Ca. K. cryptophilum*.** n.b. = nicht bestimmt, n.m. = nicht messbar; die kinetischen Konstanten wurden bei 55 °C bestimmt. Die apparenten molekularen Massen der Untereinheiten wurden aus dem SDS-Gel ermittelt.

	Substrat	ckcACD 1	ckcACD 3	ckcACD 4
<b>kalkulierte molekulare Masse der Untereinheiten (kDa)</b>				
	$\alpha$ -Untereinheit	49.6	49.3	52.2
	$\beta$ -Untereinheit	25.6	25.6	25.6
<b>apparente molekulare Masse der Untereinheiten (kDa)</b>				
	$\alpha$ -Untereinheit	51.3	50.2	51.3
	$\beta$ -Untereinheit	27.7	27.5	27.6
<b>apparente molekulare Masse des Enzyms (kDa)</b>				
		152	150	159
<b>oligomere Struktur</b>				
		$\alpha_2\beta_2$	$\alpha_2\beta_2$	$\alpha_2\beta_2$
<b>apparenter <math>K_m</math>-Wert (<math>\mu</math>M)</b>				
	Acetyl-CoA	31	15	219
	ADP	60	186	125
	Pi	194	1600	491
<b>apparenter <math>V_{max}</math>-Wert Säurebildung (U/mg)</b>				
	Acetyl-CoA	2.7	50	6.9
	Isobutyryl-CoA	1.6	19	13.7
	Phenylacetyl-CoA	1.3	0	8.2
<b>apparenter <math>K_m</math>-Wert (<math>\mu</math>M)</b>				
	ATP	204	960	308
	HS-CoA	37	20	62
	Acetat	4170	812	1920
	3-Hydroxyphenylacetat	n.b.	n.m.	39
	Isobutyrat	n.b.	n.b.	40
	Indol-3-acetat	309	n.m.	232
<b>apparenter <math>V_{max}</math>-Wert Säureaktivierung (U/mg)</b>				
	Acetat	2.5	51	7.5
	3-Hydroxyphenylacetat	1.8	0.5	15.6
	Isobutyrat	6	28	12
	Indol-3-acetat	7.3	n.m.	4
	Phenylacetat	2.5	n.m.	4



**Abbildung 19 Substratspezifitäten von ckcACD1, ckcACD3 und ckcACD4 in Richtung Säureaktivierung.** Dargestellt ist die spezifische Aktivität in Prozent mit den angegebenen Substraten (10 mM). **A:** ckcACD1 (Indol-3-acetat: 7.3 U/mg = 100 %); **B:** ckcACD3 (Acetat: 51 U/mg = 100 %); **C:** ckcACD4 (4-Hydroxyphenylacetat: 15.6 U/mg = 100 %)

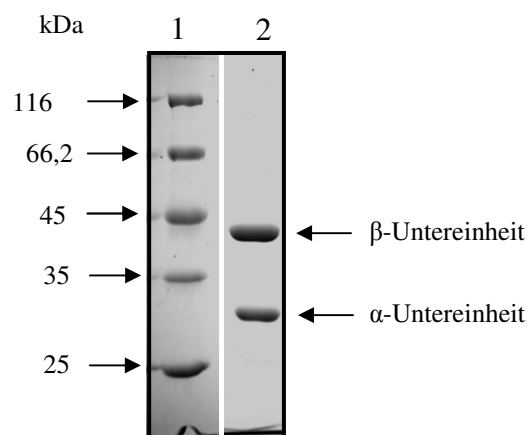
Im Genom von *Ca. K. cryptophilum* sind vier ACD $\alpha$ -Untereinheiten und eine ACD $\beta$ -Untereinheit annotiert. Die Ergebnisse zeigen, dass sich daraus drei aktive ACD-Homologe, ckcACD1, ckcACD3 und ckcACD4, rekonstituieren lassen. Die ACDs dienen dabei vermutlich der ATP-Synthese über Substratstufenphosphorylierung bei der Peptidfermentation. Auf Grund der unterschiedlichen Substratspektren lassen sich ckcACD1 und ckcACD4 dem Abbau von aromatischen und verzweigt-kettigen Aminosäuren zuordnen, während die ckcACD3 wahrscheinlich vor allem am Abbau der Aminosäuren Alanin, Serin, Threonin und Cystein über Pyruvat beteiligt ist. Ein viertes ACD-Homolog, ckcACD2, zeigte in Übereinstimmung mit dem Fehlen des katalytisch essentiellen Histidins in der Sequenz der  $\alpha$ -Untereinheit mit keinem der getesteten Substrate Aktivität.

### 5.2.2 Charakterisierung der SCS aus *Ca. K. cryptophilum*

Im Genom von *Ca. K. cryptophilum* liegen der ORF Kcr\_1393 als Homolog der SCS $\alpha$ -Untereinheit und Kcr\_1392 als Homolog der SCS $\beta$ -Untereinheit aus *E. coli* vor. Die Gene bestehen aus 875 (Kcr\_1393) bzw. 1136 Basenpaaren (Kcr\_1392) und kodieren für ein Polypeptid von 291 Aminosäuren und 378 Aminosäuren mit kalkulierten Molekulargewichten von 30.3 kDa (Kcr\_1393) bzw. 41 kDa (Kcr\_1392). Die Gene wurden kloniert, in *E. coli* exprimiert, gereinigt und charakterisiert.

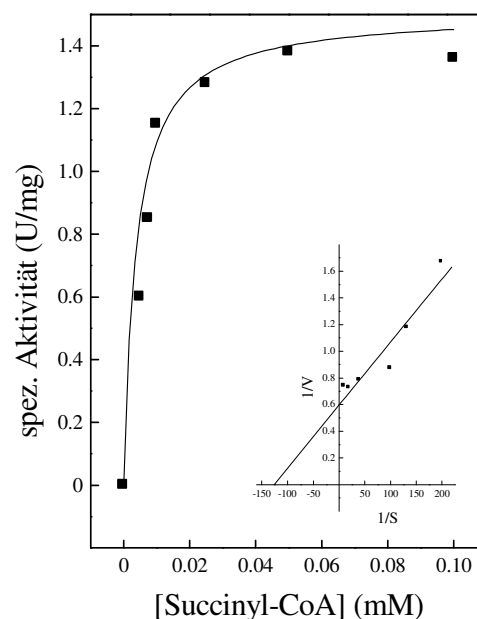
**Sequenzanalyse der klonierten Gene.** Bei der Sequenzierung der klonierten Gene zeigte sich in der  $\alpha$ -Untereinheit (ckcSCS $\alpha$ ) insgesamt neun Unterschiede im Vergleich zur in der Datenbank annotierten Sequenz (Accession-Nummer: YP\_001737822.1). Diese Sequenzunterschiede wurden in drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten nachgewiesen und führen in der abgeleiteten Aminosäuresequenz zu acht stille Mutationen und einem konservierten Austausch von Isoleucin zu Valin an Position 35 der Aminosäuresequenz. Ein Alignment der annotierten Sequenz mit der Sequenz dieser Arbeit befindet sich im Anhang (Abbildung A1).

**Molekulare Eigenschaften.** Nach getrennter Überexpression eines 40 kDa (ckcSCS $\beta$ ) und eines 28 kDa (ckcSCS $\alpha$ ) Proteins in *E.coli* wurden die Untereinheiten separat mittels Hitzefällung bei 70 °C für 15 min angereichert, rekonstituiert und über Gelfiltration bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Das apparente native Molekulargewicht der rekonstituierten ckcSCS wurde mit 139 kDa bestimmt, was auf eine  $\alpha_2\beta_2$ -heterotetramere Struktur hindeutet. Diese oligomere Struktur ist bei den meisten prokaryotischen SCS bestimmt worden.



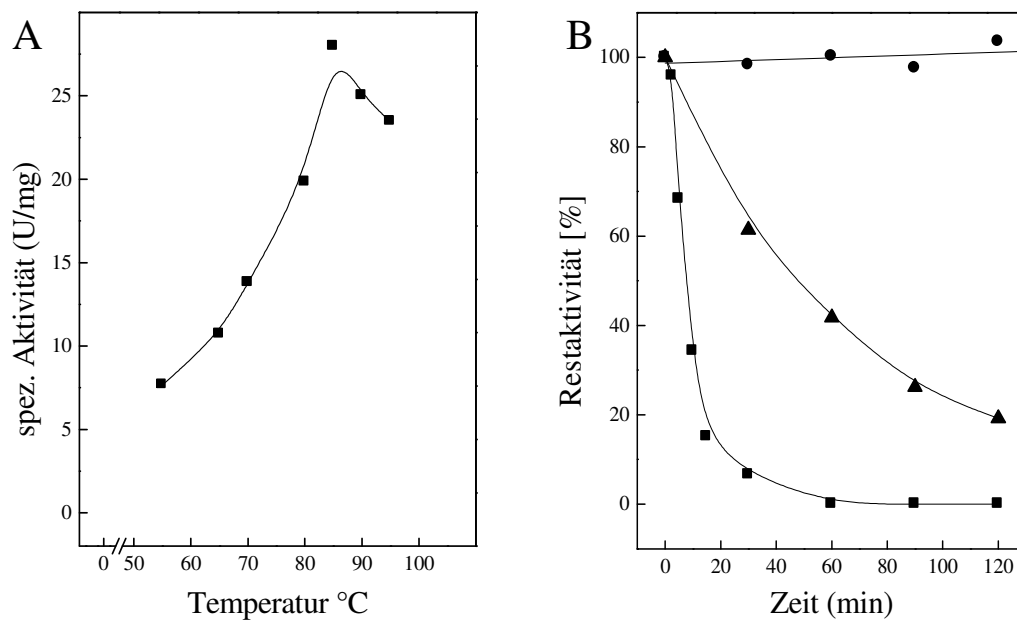
**Abbildung 20 SDS-PAGE der gereinigten SCS aus *Ca. K. cryptophilum*.** 12 % Polyacrylamid-SDS-Gel mit Coomassie Brilliantblau gefärbt. **Spur 1:** Molekulargewichtstandard, **Spur 2:** Rekonstituiertes Protein nach Superdex-Gelfiltration.

**Kinetische Eigenschaften der ckcSCS.** Das Enzym katalysierte die reversible Umsetzung von Succinyl-CoA, ADP und  $P_i$  zu Succinat, ATP und HSCoA. Die kinetischen Parameter in Richtung der Succinataktivierung wurden bei 35 °C und 55 °C bestimmt. Auf Grund der thermischen Instabilität von Succinyl-CoA bei Temperaturen über 35 °C wurden die kinetischen Parameter in Richtung Succinatbildung bei 35 °C ermittelt. Die Abhängigkeit der Rate von der Substratkonzentration folgte in allen Fällen einer Michaelis-Menten Kinetik. Das Enzym zeigte eine hohe Affinität für Succinyl-CoA ( $K_m = 8 \mu\text{M}$ ) (Abbildung 21). Die ermittelten  $K_m$ - und  $V_{\text{max}}$ -Werte sind in (Tabelle 11) zusammengefasst. Das pH-Optimum wurde mit pH 7.3 in Richtung der Succinat-Aktivierung bestimmt. 50 % der Aktivität konnten noch bei pH 6.0 nachgewiesen werden. Die Reaktion der SCS zeigte eine Abhängigkeit von  $\text{MgCl}_2$ . Die optimale Magnesiumkonzentration für die Reaktion lag bei 5 mM. Die SCS ist hochspezifisch für Succinyl-CoA. Das Enzym zeigte keine Aktivität mit Isobutyryl-CoA oder Acetyl-CoA. In Richtung Säureaktivierung akzeptierte die ckcSCS neben Succinat (18.9 U/mg) nur Glutarat mit einer spezifischen Aktivität von 4 U/mg.



**Abbildung 21** Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der ckcSCS von der Konzentration von Succinyl-CoA bei 35°C. Die Einschübe zeigen die doppelt-reziproken Auftragungen nach Lineweaver-Burk.

Bei der ckcSCS handelte es sich um ein hyperthermophiles Enzym mit einem Temperaturoptimum von 85 °C (Abbildung 22A). Aus dem linearen Auftrag nach Arrhenius im Bereich zwischen 55 °C und 85 °C ergab sich eine Aktivierungsenergie von 41.25 kJ/mol. Für die ckcSCS wurde die Temperaturstabilität ermittelt. Bei 65 °C konnte über einen Zeitraum von 120 min kein signifikanter Aktivitätsverlust beobachtet werden. Bei 75 °C wies das Enzym eine Halbwertszeit von 50 min auf. Bei 85 °C verkürzte sich die Halbwertszeit auf 7 min (Abbildung 22B).



**Abbildung 22 Temperaturabhängigkeit der Aktivität und Thermostabilität der SCS aus *Ca. K. cryptophilum*.** **A:** spezifische Aktivität in Abhängigkeit von der Temperatur. **B:** Thermostabilität nach Inkubation bei 65 °C (●), 75 °C (▲) und 85 °C (■). 100 % entsprechen ca. 28 U/mg.

**Tabelle 11** Molekulare und kinetische Eigenschaften der rekombinanten SCS (ckcSCS) aus *Ca. K. cryptophilum*.

	Substrat	ckcSCS
<b>kalkuliertes Molekulargewicht (kDa)</b>		
$\alpha$ -Untereinheit		30.3
$\beta$ -Untereinheit		41
<b>apparentes Molekulargewicht (kDa)</b>		
$\alpha$ -Untereinheit		28
$\beta$ -Untereinheit		40
<b>apparentes Molekulargewicht Holoenzym (kDa):</b>		134
<b>oligomere Struktur</b>		$\alpha_2\beta_2$
<b>apparenter <math>K_m</math> (<math>\mu</math>M) Succinataktivierung</b>	Succinat	312 <sup>1</sup>
	Succinat	237 <sup>2</sup>
	ATP	233 <sup>2</sup>
	HSCoA	156 <sup>2</sup>
<b>apparentes <math>V_{max}</math> Säureaktivierung (U/mg)</b>	Succinat	4.3 <sup>1</sup>
	Succinat	18.9 <sup>2</sup>
	Glutarat	4 <sup>2</sup>
<b>apparenter <math>K_m</math> (<math>\mu</math>M) Succinatbildung</b>	Succinyl-CoA	8 <sup>1</sup>
	ADP	32 <sup>1</sup>
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1129 <sup>1</sup>
<b>apparentes <math>V_{max}</math> Succinatbildung (U/mg)</b>		1.7 <sup>1</sup>

<sup>1</sup> wurde bei 35 °C bestimmt

<sup>2</sup> wurde bei 55 °C bestimmt

Die Ergebnisse zeigen, dass es sich bei der SCS aus *Ca. K. cryptophilum* um ein hyperthermophiles Protein handelt, das hochspezifisch für Succinyl-CoA und Succinat ist. Auf Grund des niedrigen  $K_m$ -Wertes für Succinyl-CoA ist das Enzym wahrscheinlich funktionell an der Succinatbildung beteiligt.



### 5.3 Acetyl-CoA Synthetase aus *Methanosarcina mazei*

Im Genom von *M. mazei* sind die ORFs MM\_0358 und MM\_0493 annotiert, die für eine putative ACD $\alpha$ - (MM\_0358) bzw. ACD $\beta$ -Untereinheit (MM\_0493) kodieren. Ein Aminosäuresequenz-Alignment zeigte eine Identität von 35 % von MM\_0358 mit der ACDI $\alpha$  aus *P. furiosus*. Der ORF hat eine Länge von 1407 Basenpaaren und kodiert für ein Polypeptid von 468 Aminosäuren mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 50.4 kDa. Der ORF MM\_0493 ist als ACD $\beta$ -Untereinheit annotiert und zeigte 51 % Identität mit der Sequenz der ACDI $\beta$  aus *P. furiosus*. MM\_0493 besteht aus 753 Basenpaaren und kodiert für ein 250-Aminosäuren Polypeptid mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 27.2 kDa. Beide Untereinheiten enthalten die für die ACD-Reaktion essentiellen Histidin-Reste (Bräsen et al. 2008). Über die Funktion der putativen ACD in *M. mazei* ist bisher nichts bekannt. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob MM\_0358 (MM-ACD $\alpha$ ) und MM\_0493 (MM-ACD $\beta$ ) für eine katalytisch aktive ACD kodieren. Die Gene wurden kloniert und getrennt in *E. coli* exprimiert. Anschließend wurden die beiden rekombinanten Untereinheiten über Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt und das rekonstituierte Holoenzym charakterisiert.

**Charakterisierung der ACD.** MM-ACD $\alpha$  wurde als 54.8 kDa-Protein und MM-ACD $\beta$  als 30.3 kDa-Protein mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt. Die Untereinheiten wurden anschließend rekonstituiert und das Holoenzym mittels Gelfiltration bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Das native apparente Molekulargewicht des rekonstituierten Proteins wurde über Gelfiltration mit 172 kDa bestimmt, was für eine  $\alpha_2\beta_2$ -heterotetramere Struktur spricht. Die ACD katalysierte die reversible Reaktion: Acetyl-CoA + ADP + Pi  $\rightleftharpoons$  Acetat + ATP + HSCoA mit einer Rate von 1.4 U/mg. Die kinetischen Parameter wurden bei 35 °C bestimmt. Die Substratabhängigkeit der Rate folgte in allen Fällen einer Michaelis-Menten-Kinetik. Die Ermittlung der kinetischen Parameter erfolgte aus der doppelt-reziproken Darstellung nach Lineweaver-Burk. Die  $K_m$ -Werte in Richtung der Säurebildung wurden mit 9  $\mu$ M (Acetyl-CoA), 122  $\mu$ M (ADP), 1980  $\mu$ M ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) und 7  $\mu$ M (Isobutyryl-CoA) bestimmt. In Richtung der Säureaktivierung wurden folgende  $K_m$ -Werte ermittelt: Acetat 4666  $\mu$ M, ATP 368  $\mu$ M, HSCoA 30  $\mu$ M. Der  $V_{\max}$ -Wert wurde mit 0.09 U/mg bestimmt (Tabelle 12). Die ACD zeigte in Richtung der Säureaktivierung eine Präferenz für unverzweigte und verzweigte Monocarbonsäuren und setzte Butyrat mit der höchsten spezifischen Aktivität (1.1 U/mg = 100 %) um. Propionat und die verzweigten Carbonsäuren Isobutyryl-CoA, 2-Methylbutyrat und Isovalerat wurden jeweils mit ca. 60 % bis 65 % der Rate umge-

setzt, Acetat lediglich mit 8 %. Die Aryl-Säuren Indol-3-acetat, Phenylacetat und 4-Hydroxyphenylacetat wurden ebenso wie Citrat und Succinat nicht als Substrat akzeptiert. In Richtung Säurebildung wurden Isobutyryl-CoA (1.4 U/mg) und Acetyl-CoA (1.5 U/mg) von der ACD mit vergleichbarer Effektivität umgesetzt (Tabelle 12). Das pH-Optimum lag bei pH 7.5. Die optimale Magnesiumkonzentration für die Reaktion wurde mit 5 mM bestimmt.

**Tabelle 12 Molekulare und kinetische Parameter der rekombinanten ACD aus *M. mazei*.** Die kinetischen Konstanten wurden bei 35 °C bestimmt. n.m. = nicht messbar.

	Substrat	MM-ACD
<b>kalkuliertes Molekulargewicht (kDa)</b>		
$\alpha$ -Untereinheit		50.4
$\beta$ -Untereinheit		27.2
<b>apparentes Molekulargewicht (kDa)</b>		
$\alpha$ -Untereinheit		54.8
$\beta$ -Untereinheit		30.3
<b>apparentes Molekulargewicht (kDa):</b>		172
<b>oligomere Struktur</b>		$\alpha_2\beta_2$
<b>apparenter <math>K_m</math> (<math>\mu</math>M) Säureaktivierung</b>	Acetat	4666
	ATP	368
	HSCoA	30
<b>apparentes <math>V_{max}</math> (U/mg)</b>	Acetat	0.09
	Butyrat	1.1
	Propionat	0.7
<b>apparenter <math>K_m</math> (<math>\mu</math>M) Säurebildung</b>	Acetyl-CoA	9
	Isobutyryl-CoA	7
	ADP	122
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1980
<b>apparentes <math>V_{max}</math> (U/mg)</b>	Acetyl-CoA	1.4
	Isobutyryl-CoA	1.5

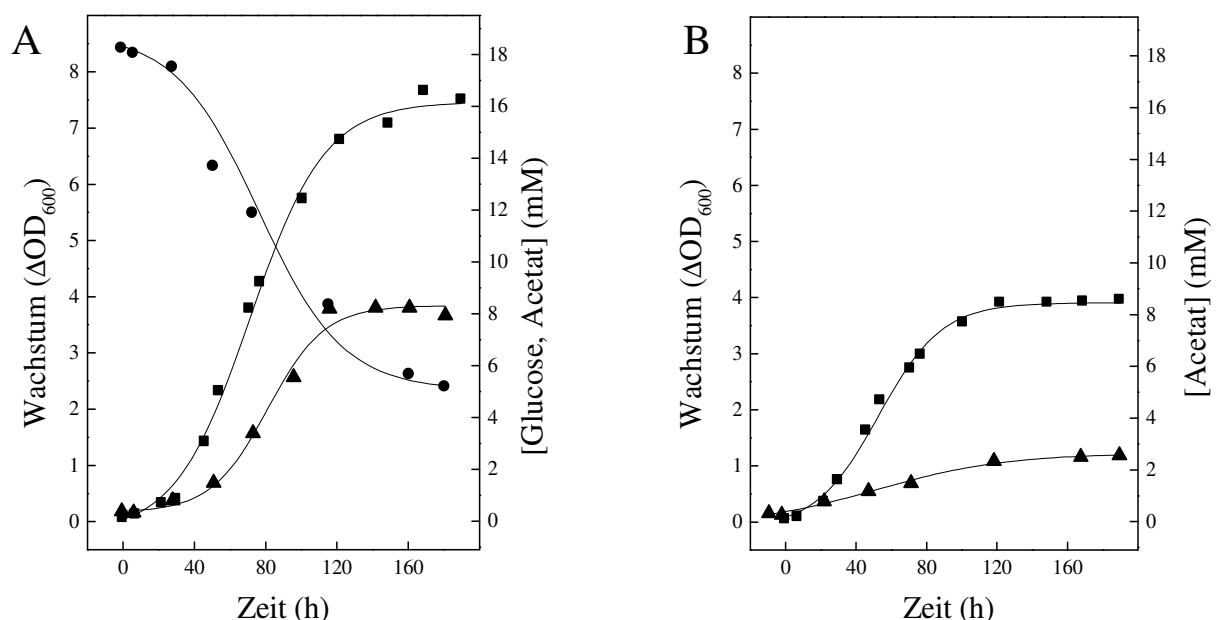
Die Ergebnisse zeigen, dass MM\_0358 und MM\_0493 für eine katalytisch aktive ACD kodieren. Das Substratspektrum der ACD aus *M. mazei* beschränkt sich auf unverzweigte und verzweigte Monocarbonsäuren. Aromatische Verbindungen wurden nicht akzeptiert.

## 5.4 Acetatbildung aus Glucose in *Chloroflexus aurantiacus*

Für *Chloroflexus aurantiacus* wurde Acetatbildung bei photoheterotrophen Wachstum auf Glucose beschrieben (Krasil'nikova und Kondrat'eva 1987). Eine detaillierte Analyse der Acetatbildung und der daran beteiligten Enzyme liegen bislang aber nicht vor. Daher wurden Wachstumsversuche, Experimente mit Zellsuspensionen und Enzymstudien durchgeführt, um die Acetatbildung zu analysieren und das Acetat bildende Enzym zu identifizieren.

### 5.4.1 Wachstumsexperimente mit *Chloroflexus aurantiacus* J10-fl

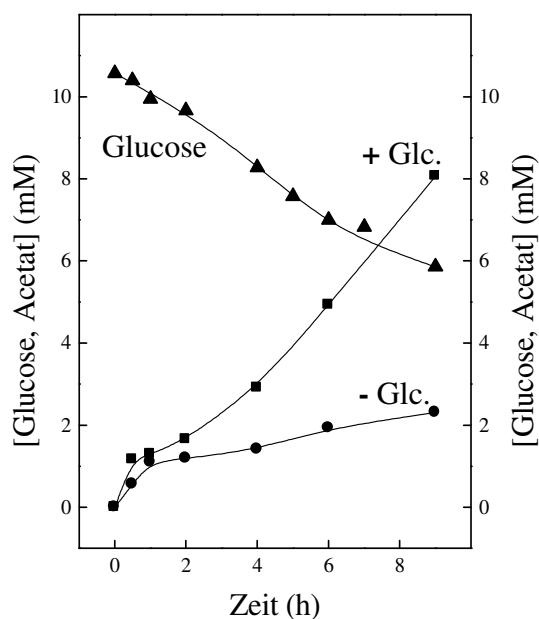
*C. aurantiacus* wurde anaerob bei 55 °C unter phototrophen Bedingungen auf Medium mit bzw. ohne Glucose gezüchtet. *C. aurantiacus* wuchs in Medium mit Glucose mit einer Verdopplungszeit von 19 Stunden bis zu einer optischen Dichte von 7.5. Dabei wurden 8.6 mM Acetat ins Medium ausgeschieden und parallel dazu etwa 12 mM Glucose verbraucht. In Abwesenheit von Glucose wuchsen die Zellen bis zu einer OD<sub>600</sub> von 4 bei einer Verdopplungszeit von 22 Stunden. Dabei wurden 2.5 mM Acetat gebildet (Abbildung 23). Damit ergibt sich pro Mol verbrauchter Glucose eine Netto-Acetatbildung von ca. 0.5 Mol Acetat.



**Abbildung 23** Wachstum von *C. aurantiacus* auf Glucose. **A:** Wachstum mit Glucose (20 mM) in Gegenwart von 0.1% Hefeextrakt, 0.25% Casaminsäuren und 0.33% Glycylglycin. **B** Wachstum ohne Glucose unter gleichen Bedingungen. Die Kulturen wurden bei 55°C inkubiert und das Wachstum als Zunahme der OD<sub>600</sub> verfolgt. Zu den gegebenen Zeitpunkten wurden Proben steril aus der Kultur entnommen und die Glucose- bzw. Acetatkonzentration bestimmt. Dargestellt sind die Zunahme der OD<sub>600</sub> (■) und der Acetatkonzentration (▲), sowie die Abnahme der Glucosekonzentration (●) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

### 5.4.2 Experimente mit Zellsuspensionen

Suspensionen von Glucose-gewachsenen Zellen (13 mg/ml Protein) wurden für 9 Stunden in Gegenwart von 10 mM Glucose bzw. ohne Glucose unter anaeroben Bedingungen im Dunkeln bei 55 °C inkubiert und der Glucoseverbrauch und die Acetatbildung analysiert (Abbildung 24). Hierbei zeigte sich in beiden Ansätzen ein schneller Anstieg der Acetatkonzentration auf ca. 1 mM innerhalb von 60 min. Dieser initiale Anstieg könnte auf Reservestoffe in den Zellen zurückzuführen sein. Anschließend wurde in den Suspensionen ein linearer Anstieg der Acetatkonzentration auf 8 mM in Gegenwart von Glucose und auf 2 mM ohne Glucose festgestellt. Parallel dazu sank die Glucosekonzentration um 5 mM. Daraus ergibt sich pro Mol aufgenommener Glucose die Bildung von 1.2 Mol Acetat. Abbildung 24 zeigt die Acetatbildung über die Zeit in Zellsuspensionen mit und ohne Glucose und die entsprechende Glucoseabnahme. Die Ergebnisse zeigen, dass *C. aurantiacus* J10-fl Acetat aus Glucose bildet.



**Abbildung 24** Umsetzung von Glucose zu Acetat in Zellsuspensionen von *C. aurantiacus*. Es ist die Acetatbildung in Zellsuspensionen über die Zeit vergleichend für einen Ansatz mit Glucose (■) und ohne Glucose (●) dargestellt. Zusätzlich ist die Abnahme der Glucosekonzentration (▲) in dem Ansatz mit Glucose gezeigt. Die Ansätze wurden bei 55 °C anaerob im Dunkeln inkubiert.

### 5.4.3 Bestimmung von ACD-Aktivität in Zellextrakten

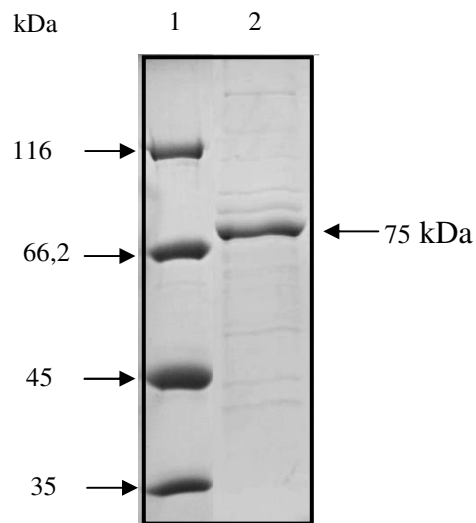
*C. aurantiacus* wurde auf die Aktivität der Acetat bildenden Enzyme Acetatkinase (AK), Phosphotransacetylase (PTA) und ACD hin untersucht. Dazu wurden Zellextrakte sowohl aus auf Glucose- als auch auf Hefeextrakt gewachsenen Zellen jeweils aus der frühen stationären Phase präpariert. Aktivität von AK und PTA wurde nicht gefunden, es wurde jedoch ACD-Aktivität festgestellt. Die spezifische Aktivität der ACD war in auf Glucose gewachsenen Zellen zehnfach höher (0.2 U/mg), als in Zellen deren Medium keine Glucose enthielt (0.022 U/mg). Diese Daten sprechen für eine starke Induktion der ACD bei Wachstum auf Glucose.

### 5.4.4 Reinigung der ACD aus *C. aurantiacus* und Identifizierung des codierenden Gens

Die ACD wurde aus Glucose-gewachsenen Zellen von *C. aurantiacus* präpariert. Die Reinigung erfolgte zunächst mit Hitzefällung. Es folgten vier chromatographische Reinigungsschritte an einer Phenyl-Sepharose Säule, einer Q-Sepharose Säule, einer Superdex-Gelfiltrationssäule und einer weiteren hochauflösenden Mono-Q-Sepharose Säule. Die ACD wurde 507fach mit einer spezifischen Aktivität von 46 U/mg nahezu bis zur apparenten Homogenität gereinigt (Tabelle 13). Anhand des Elutionsprofils konnte eine spezifische Bande eindeutig dem Aktivitätsprofil zugeordnet werden (Abbildung 25). Die apparente molekulare Masse des nativen Enzyms wurde mit 300 kDa bestimmt, die der Untereinheit mit 75 kDa. Diese Werte sprechen für eine für ACDs ungewöhnliche  $\alpha$ 4-homotetramere Struktur.

**Tabelle 13** Reinigung der nativen ACD aus *C. aurantiacus*. Die Enzymaktivität wurde im Ellman-Test bei 55 °C bestimmt.

Reinigungsschritt	Protein (mg)	Aktivität (Units)	Spez. Aktivität (Units/mg)	Anreicherung -fach	Ausbeute (%)
Zellfreier Extrakt	4698	441	0.09	1	100
Hitzefällung	2533	432	0.17	1.9	98
Phenyl-Sepharose	95	93	0.98	10	21
Q-Sepharose	3.6	15.	4.34	48	3.5
Superdex	0.9	13	15.5	172	3
Mono-Q-Sepharose	0.016	0.73	45.6	507	0.17

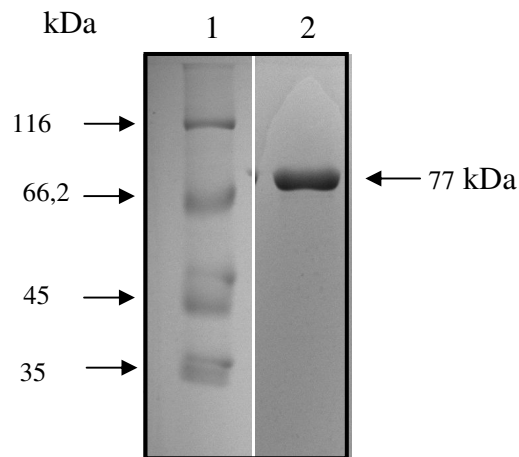


**Abbildung 25 SDS-PAGE der gereinigten ACD aus *C. aurantiacus*.** 10 % Polyacrylamid-SDS-Gel mit Coomassie Brilliantblau gefärbt. **Spur 1:** Molekulargewichtstandard, **Spur 2:** Proteinextrakt nach Mono-Q-Sephrose. Die Pfeile auf der linken Seite deuten auf die Markerproteine, der Pfeil auf der rechten Seite deutet auf die Bande, die aus dem Gel für MALDI-TOF MS extrahiert wurde.

**Identifizierung des ACD-kodierenden Gens.** Die gereinigte Proteinbande von 75 kDa Größe wurde aus dem Gel extrahiert und das kodierende Gen über MALDI-TOF MS identifiziert. Durch die massenspektroskopische Analyse wurde ein einzelner ORF (Caur\_3920) mit einer Übereinstimmung der identifizierten Peptide mit dem Protein von 42 % eindeutig bestimmt. Somit stellt Caur\_3920 eindeutig das für die ACD aus *C. aurantiacus* kodierende Gen dar.

#### 5.4.5 Klonierung des *acd*-Gens, heterologe Expression und Reinigung der ACD

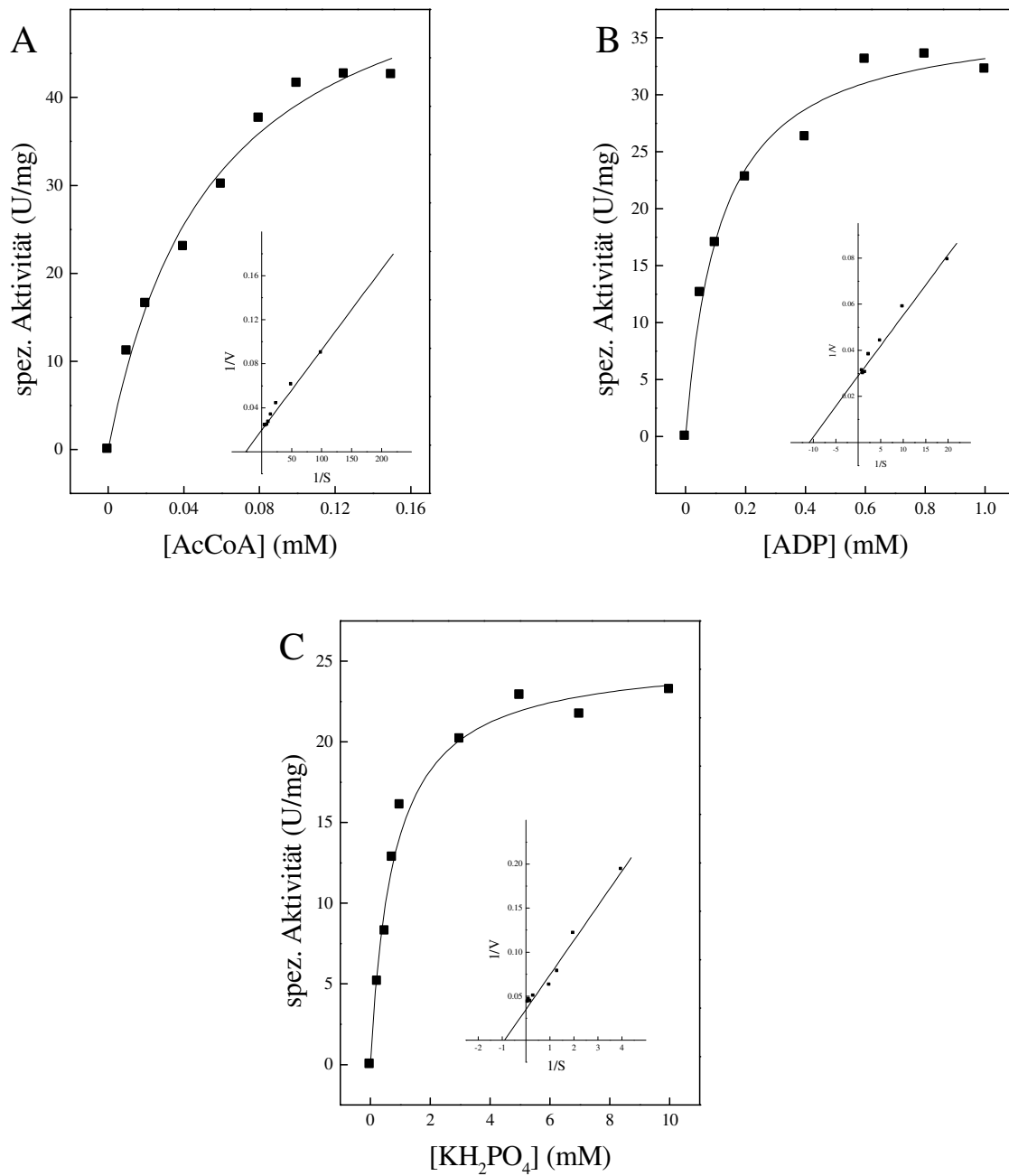
Der ORF Caur\_3920 aus *C. aurantiacus*, der für eine putative ACD kodiert, hat eine Länge von 2091 Basenpaaren und kodiert für ein 696 Aminosäuren großes Polypeptid mit einer molekularen Masse von 75.1 kDa. durch Klonierung des *acd*-Gens in den Vektor pET19b wurde das translatierte Polypeptid N-terminal mit einem 6x Histidin-*tag* versehen. Nach Transformation in *E. coli* wurde das Protein überexprimiert. Die Reinigung erfolgte über Ni-NTA-Affinitätschromatographie und Gelfiltration bis zur apparenten Homogenität. Die Untereinheit der rekombinanten ACD wies im SDS-Polyacrylamidgel eine apparente Größe von 77 kDa auf. Diese Daten ähneln den ermittelten Größen von fusionierten ACDs aus *A. fulgidus* und *M. jannaschii* (Musfeldt und Schönheit 2002). Mittels Gelfiltration wurde die native Größe auf 317 kDa bestimmt. Dies deutet auf eine homotetramere Struktur des Enzyms hin. Diese Werte stimmen mit den Daten für das nativ gereinigte Enzym aus *C. aurantiacus* überein.



**Abbildung 26 SDS-PAGE der gereinigten rekombinanten ACD aus *C. aurantiacus*.** 12 %-Polyacrylamid-SDS-Gel mit Coomassie Brilliantblau gefärbt. Die Pfeile auf der linken Seite deuten auf die Markerproteine, der Pfeil auf der rechten Seite deutet auf die Bande der gereinigten ACD. **Spur 1:** Molekulargewichtsstandard, **Spur 2:** gereinigte ACD nach Superdex.

#### 5.4.6 Biochemische Charakterisierung der rekombinanten ACD

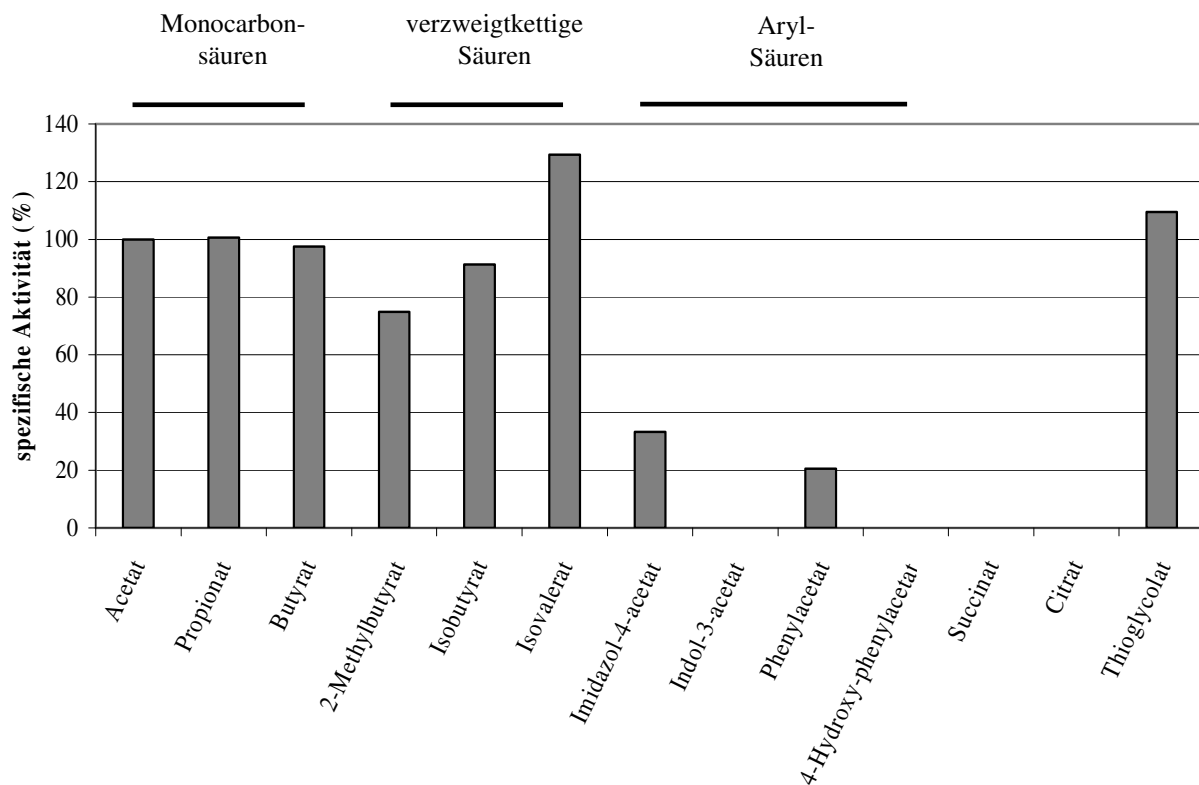
Die ACD katalysiert die reversible Reaktion:  $\text{Acetyl-CoA} + \text{ADP} + \text{P}_i \rightleftharpoons \text{Acetat} + \text{ATP} + \text{HSCoA}$  und folgt in beiden Reaktionsrichtungen einer Michaelis-Menten Kinetik. Die apparenten  $K_m$ -Werte in Richtung der Acetatbildung betragen 0.037 mM (Acetyl-CoA), 0.09 mM (ADP) und 1.0 mM (Phosphat) bei einem apparenten  $V_{\max}$ -Wert von 51 U/mg. In Richtung der Acetataktivierung wurden die apparenten  $K_m$ -Werte mit 0.9 mM (Acetat), 0.57 mM (ATP) und 0.024 mM (HSCoA) bestimmt. Der apparente  $V_{\max}$ -Wert betrug in Richtung der Acetataktivierung 49 U/mg. Das pH-Optimum wurde mit pH 7.5 bestimmt, wobei 50 % der Aktivität noch bei pH 7.3 und pH 8.0 gemessen wurden. Das Temperaturoptimum lag bei 55 °C. Die Darstellung der Daten nach Arrhenius ergab einen linearen Bereich zwischen 20 und 55 °C. Die daraus ermittelte Aktivierungsenergie lag bei 48.5 kJ/mol. Die für die Aktivität optimale Magnesiumkonzentration lag bei 5 mM.



**Abbildung 27** Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der rekombinanten ACD aus *C. aurantiacus* von der Substratkonzentration. Dargestellt ist die spezifische Aktivität bei 55 °C in Abhängigkeit von der Konzentration von **A**: Acetyl-CoA, **B**: ADP, **C**: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Die Einschübe zeigen die Daten in der doppelt-reziproken Auftragung nach Lineweaver-Burk.



**Substratspezifität.** Für die rekombinante ACD aus *C. aurantiacus* wurden verschiedene Acyl- und Aryl-Säuren sowie CoA-Ester als Substrat getestet. Das Enzym setzte neben Acetat (100 %) mit nahezu gleicher Aktivität auch Butyrat (97.5 %), Propionat (100 %) und Thioglycolat (110 %) sowie Isobutyrat (91.4 %), Isovalerat (130 %) und 2-Methylbutyrat (75 %) um. Die Aryl-Säuren Imidazol-4-acetat (33 %) und Phenylacetat (21 %) wurden nur mit geringer Effizienz genutzt. Indol-3-acetat, 4-Hydroxyphenylacetat und Succinat wurden nicht als Substrat umgesetzt (Abbildung 28). In Richtung der Säureaktivierung katalysierte die ACD die Reaktion mit Acetyl-CoA (51 U/mg = 100 %), Isobutyryl-CoA (32 %) und mit geringer Aktivität Phenylacetyl-CoA (13 %). Damit zeigt die ACD aus *C. aurantiacus* ein ähnliches Substratspektrum wie die ACIDI aus *P. furiosus*.



**Abbildung 28** Substratspektrum der ACD aus *Chloroflexus aurantiacus*. Dargestellt ist das prozentuale Verhältnis der spezifischen Aktivitäten der getesteten organischen Säuren (jeweils 10 mM) im Vergleich zu Acetat (49 U/mg = 100 %)

**Tabelle 14 Molekulare und kinetische Parameter der rekombinanten ACD aus *C. aurantiacus*.** Die kinetischen Parameter wurden bei 55 °C ermittelt.

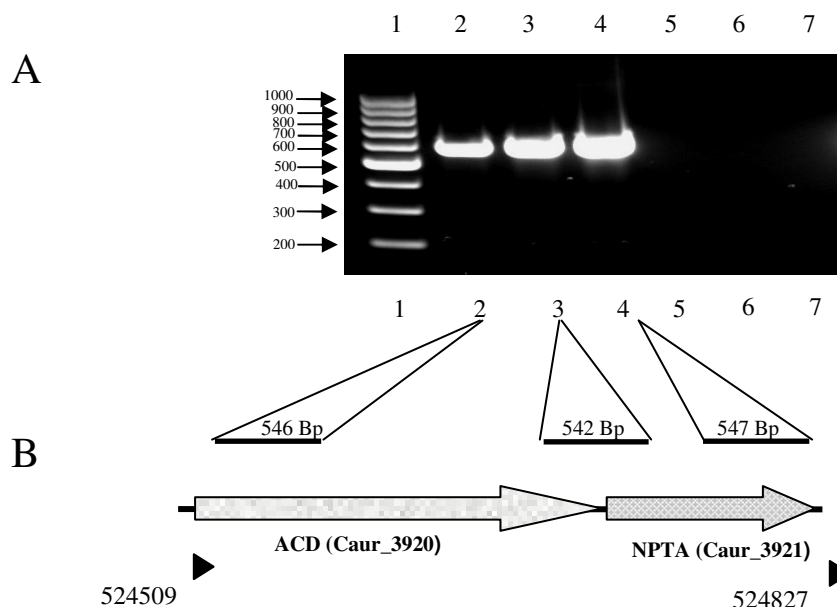
	Substrat	Caur-ACD
<b>kalkuliertes Molekulargewicht der Untereinheit (kDa)</b>		75
<b>apparentes Molekulargewicht der Untereinheit (kDa)</b>		77
<b>apparentes Molekulargewicht des nativen Enzyms (kDa):</b>		317
<b>oligomere Struktur</b>		$\alpha$ 4
<b>apparenter <math>K_m</math> (mM) Acetatbildung</b>	Acetyl-CoA	0.037
	ADP	0.09
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0
<b>apparentes <math>V_{max}</math> (U/mg)</b>	Acetyl-CoA	51
	Isobutyryl-CoA	16.5
	Phenylacetyl-CoA	6.1
<b>apparenter <math>K_m</math> (<math>\mu</math>M) Acetataktivierung</b>	Acetat	0.9
	HSCoA	0.024
	ATP	0.57
<b>apparentes <math>V_{max}</math> (U/mg)</b>	Acetat	49
	Isobutyrat	45.9
	Phenylacetat	10.3

### 5.4.7 Nachweis des Transkripts von Caur\_3920

Die biochemische Charakterisierung zeigt, dass Caur\_3920 aus *C. aurantiacus* für eine ACD-kodiert. Der Nachweis der *in-vivo*-Transkription von Caur\_3920 erfolgte durch Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion- (RT-PCR) Experimente. Außerdem wurde gezeigt, dass Caur\_3920 und der benachbarte ORF Caur\_3921 cotranskribiert werden (Abbildung 29). Dazu wurde Gesamt-RNA aus Glucose-gewachsenen Zellen präpariert. Mittels dreier spezifischer Primerpaare, die drei unterschiedliche Bereiche sowohl von Caur\_3920 als auch von Caur\_3921 sowie einen Teil beider Gene und den intergenen Bereich überspannten (Abbildung 29), konnte gezeigt werden, dass aus mRNA die spezifischen PCR-Produkte in der erwarteten Größe amplifiziert werden. Als Negativkontrolle diente jeweils ein Ansatz bei dem die Transkription der RNA nicht durchgeführt wurde.

Der für die ACD kodierende ORF Caur\_3920 hat eine Länge von 2091 Bp. Über die Amplifikation eines 546 Bp langen Fragments wurde eindeutig nachgewiesen, dass das *acd*-Gen in Glucose gewachsenen Zellen transkribiert wird (Abbildung 29 Spur 2).

Caur\_3921 hat eine Länge von 1071 Bp und liegt in der gleichen Orientierung wie Caur\_3920. Die intergenische Region hat nur eine Länge von 12 Bp, was eine gemeinsame Transkription von Caur\_3920 und Caur\_3921 vermuten lässt. Die Ergebnisse zeigen, dass alle drei Fragmente spezifisch amplifiziert wurden (Abbildung 29). Dies lässt darauf schließen, dass es sich bei dem Transkript von Caur\_3920 und Caur\_3921 um eine bicistronische mRNA handelt. Caur\_3921 weist hohe Homologien zu der N-terminalen Domäne einer PTA auf. Diesem etwa 360 Aminosäuren langen Bereich wird in der PTA aus *E. coli* eine Funktion bei der Regulation der PTA durch metabolische Effektoren zugeschrieben (Campos-Bermudez et al. 2010). Die Funktion dieses Gens in *C. aurantiacus* ist nicht bekannt.



**Abbildung 29 Agarose-Gelelektrophorese von RT-PCR Produkten.** Die cDNA-Templates wurden aus der Gesamt-RNA von *C. aurantiacus* gewonnen. **A:** 1 % Agarose-Gel mit Ethidiumbromid gefärbt. Es wurden jeweils 10  $\mu$ l PCR-Ansatz + 2  $\mu$ l Auftragspuffer aufgetragen. Als Kontrolle diente für jeden Ansatz eine Kontrolle bei der die RNA erst nach dem RT-Schritt zugegeben wurde. Spurbelegung: 1) molekularer Marker; 2) Fragment von Caur\_3920; 3) Fragment das Caur\_3920 und Caur\_3921 überlappt; 4) Fragment von Caur\_3921; 5) Kontrollansatz für Spur 2; 6) Kontrollansatz für Spur 3; 7) Kontrollansatz für Spur 4; **B:** Schematische Darstellung der Lage der drei Fragmente auf den Genen von ACD und NPTA. Die Zahlen unterhalb der Dreiecke geben die Position auf dem DNA-Strang von *C. aurantiacus* an.

Die Ergebnisse zeigen, dass in *C. aurantiacus* eine funktionelle ACD an der Bildung von Acetat aus Acetyl-CoA beteiligt ist. Die ACD ist spezifisch durch Glucose induziert. Das Enzym wurde nativ gereinigt und das codierende Gen (Caur\_3920) identifiziert. Es handelt

sich um eine fusionierte ACD mit einer für ACDs bisher nicht bekannten homotetrameren Struktur. Das rekombinante Enzym zeigte ein ähnlich breites Substratspektrum wie die ACIDI aus *P. furiosus*. Die Induzierbarkeit der ACD durch Glucose und das Substratspektrum sprechen für eine funktionelle Beteiligung des Enzyms am Kohlenhydratstoffwechsel. Die ACD aus *C. aurantiacus* ist die erste untersuchte funktionelle ACD in der Domäne der Bacteria.

### 5.5 Feruloyl-CoA Synthetase (FCS) in *Delftia acidovorans*

FCSs katalysieren die ATP und HSCoA-abhängige Aktivierung von Ferulat zu Feruloyl-CoA bei Wachstum auf Ferulat oder im Rahmen der Vanillin-Biosynthese. Bisher beschriebene FCSs sind AMP-bildende Enzyme, die hohe Ähnlichkeiten zu AMP-bildenden Acyl-CoA Ligasen aufweisen (Overhage et al. 1999). In *Delftia acidovorans* und *Sphingomonas paucimobilis* wurde dagegen jeweils eine funktionelle Feruloyl-CoA Synthetase identifiziert, die hohe Sequenzhomologien zu ADP-bildenden Acyl-CoA Synthetasen aufweisen. (Plaggenborg et al. 2001; Masai et al. 2002). Die Gene dieser Feruloyl-CoA Synthetasen stellen eine Fusion der homologen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit der ACD aus *P. furiosus* dar. In ihrer Aminosäuresequenz sind beide für die Reaktion der ACD essentiellen Histidine konserviert. Für *D. acidovorans* wurde eine funktionelle Beteiligung des Enzyms bei Wachstum auf Ferulat durch Deletionsexperimente gezeigt (Plaggenborg et al. 2001). Bislange liegen aber nur wenige biochemische Daten zu FCS vor. Daher sollte das *fcs*-Gen aus *D. acidovorans* kloniert, in *E. coli* exprimiert und das gereinigte Enzym charakterisiert werden.

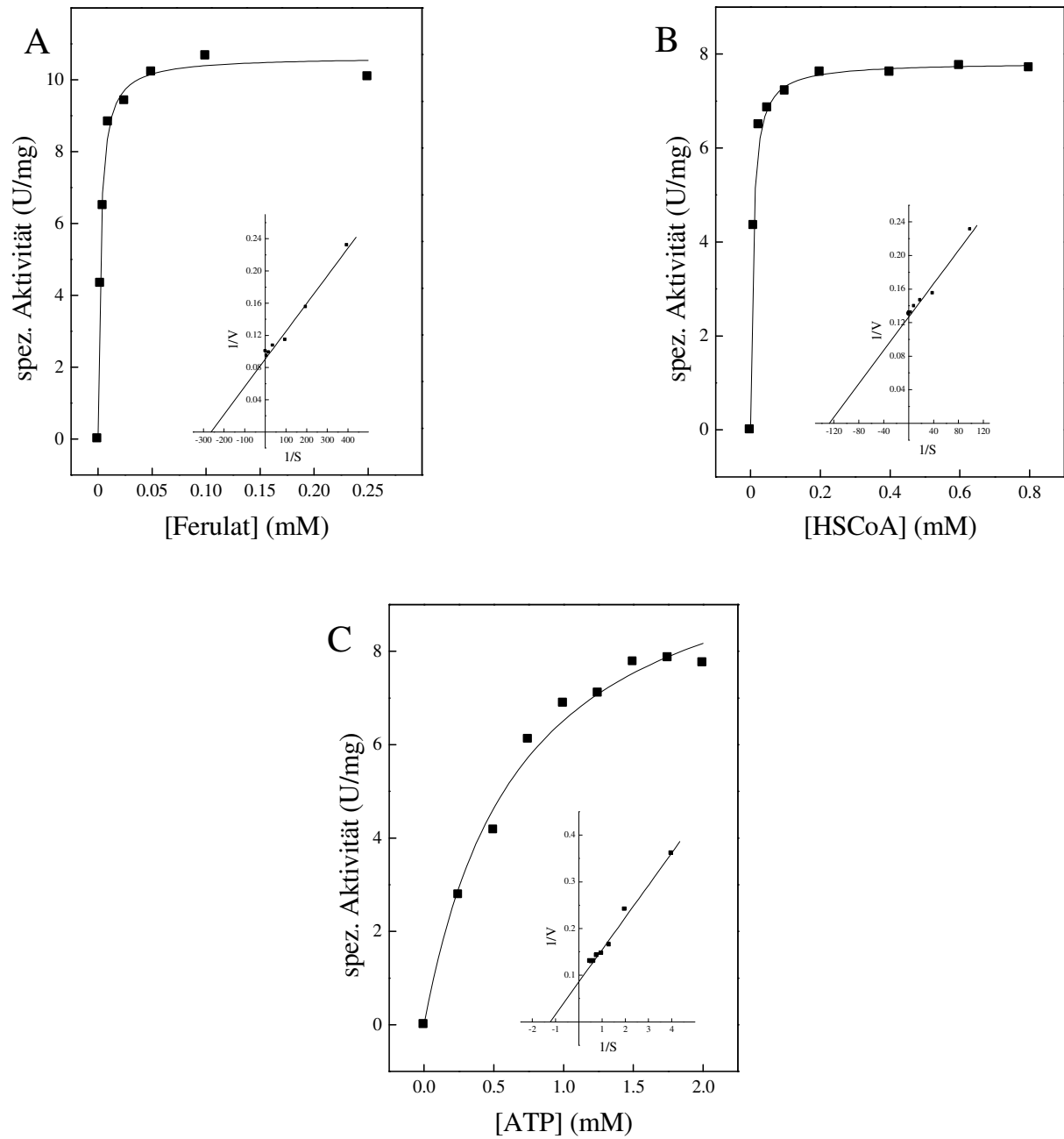
**Sequenzanalyse des klonierten Gens.** Das in der Datenbank abgelegte *fcs*-Gen aus *D. acidovorans* hat eine Länge von 2172 Basenpaaren und kodiert für ein 725 Aminosäuren langes Polypeptid mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 75.93 kDa.

In unabhängig reproduzierten Amplifikationen des *fcs*-Gens zeigten sich bei der Sequenzanalyse des klonierten Gens Unterschiede zu der in der Datenbank abgelegten Sequenz. Durch 9 verschiedene Insertionen von einzelnen Basen und 11 Punktmutationen in der DNA-Sequenz entstehen in der Aminosäuresequenz 3 Aminosäureinsertionen und 48 Mutationen. Die in dieser Arbeit identifizierte Aminosäuresequenz wies eine Identität von 93 % zu der Originalsequenz auf. Ein Sequenzvergleich der originalen Sequenz mit der Sequenz des klonierten Gens befindet sich im Anhang (Abbildung A2).

**Molekulare und kinetische Eigenschaften.** Der Vektor pET19bDaciFCS wurde in *E. coli* transformiert und exprimiert. Das rekombinante Protein wurde über Ni-NTA-Affinitätschromatographie und Gelfiltration bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Im SDS-Gel zeigte sich eine einzelne Bande von 77 kDa Größe. Die apparente Größe des nativen Proteins wurde über Gelfiltration als 170 kDa bestimmt.

Die FCS katalysierte die ATP und HSCoA-abhängige Umsetzung von Ferulat zu Feruloyl-CoA. Die kinetischen Parameter wurden über die Bildung von Feruloyl-CoA bei 345 nm photometrisch mit dem Ferulat-Test bestimmt. Die Messungen wurden bei 35 °C durchgeführt. Die Abhängigkeit der Rate von der Substratkonzentration folgte in allen Fällen einer Michaelis-Menten-Kinetik. Die Bestimmung der  $V_{\max}$ - und  $K_m$ -Werte erfolgte in Richtung der Ferulat-Aktivierung aus der doppelt-reziproken Auftragung nach Lineweaver-Burk. Die  $K_m$ -Werte waren 4  $\mu\text{M}$  (Ferulat), 8  $\mu\text{M}$  (HSCoA) und 750  $\mu\text{M}$  (ATP) (Abbildung 30). Der  $V_{\max}$ -Wert wurde mit 12 U/mg (= 100 %) bestimmt (Tabelle 15). Neben Ferulat wurden ab einer Konzentration von 10 mM mit geringen Raten Butyrat (12 %), Adipat (7 %) und Pimelat (4 %) von der FCS umgesetzt. Andere Aryl-Säuren (Phenylacetat, Indol-3-acetat, Imidazol-4-acetat, 4-Hydroxyphenylacetat) wurden nicht akzeptiert, ebenso zeigte sich keine Aktivität mit Acetat, Isobutyrat oder Succinat.

**Nachweis der ADP-Bildung durch die FCS.** Um die ADP-Bildung durch die FCS aus *D. acidovorans* nachzuweisen, wurde zunächst die FCS mit einer definierten Menge Ferulat unter Standardbedingungen mit ATP und HSCoA in einer Küvette inkubiert und die Zunahme der Extinktion bei 345 nm verfolgt. Nachdem das Ferulat vollständig verbraucht war wurde gebildetes ADP durch Zugabe der Enzyme Pyruvatkinase und Lactatdehydrogenase mit Hilfe von PEP und NADH nachgewiesen. Dabei zeigte sich eine Abnahme der Extinktion. Die aus der Änderung der Extinktion errechnete ADP-Konzentration entsprach in allen Fällen der eingesetzten Menge an Ferulat. Mit diesem Test konnte eine ADP-Bildung bei der ATP und HSCoA-abhängigen Umsetzung von Ferulat zu Feruloyl-CoA durch die FCS aus *D. acidovorans* nachgewiesen werden und damit die FCS als ADP-bildendes Enzym charakterisiert werden.



**Abbildung 30** Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Konzentration von Ferulat (A), HSCoA (B) und ATP (C) der FCS aus *D. acidovorans*. Die Einschübe zeigen die doppelt-reziproke Darstellung nach Lineweaver-Burk.

**Tabelle 15 Molekulare und kinetische Parameter der FCS aus *D. acidovorans*.** Die kinetischen Konstanten wurden bei 35 °C bestimmt.

	Substrat	Daci-FCS
kalkuliertes Molekulargewicht der Untereinheit (kDa)		76
apparentes Molekulargewicht der Untereinheit (kDa)		77
apparentes Molekulargewicht des nativen Enzyms (kDa):		170
oligomere Struktur		$\alpha_2$
apparentes pH-Optimum		7.3
apparentes Optimum der Magnesiumkonzentration (mM)		5
apparenter $K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	Ferulat	4
	ATP	750
	HSCoA	8
apparentes $V_{\max}$ (U/mg)	Ferulat <sup>1</sup>	12
	Butyrat <sup>2</sup>	1.5
	Adipat <sup>2</sup>	0.8
	Pimelat <sup>2</sup>	0.5

<sup>1</sup> mit Ferulattest bestimmt, Konzentration 1 mM im Test

<sup>2</sup> Mit PK/LDH-Test bestimmt, Konzentration 10 mM im Test.

Die Daten zeigen, dass das *fcs*-Gen aus *Delftia acidovorans* für eine aktive FCS kodiert. Das 170 kDa große homodimere Enzym setzt spezifisch und mit hoher Affinität ( $K_m = 4 \mu\text{M}$ ) Ferulat zu Feruloyl-CoA unter ADP-Bildung um. Somit konnte die erste ADP-bildende FCS charakterisiert werden.

## 5.6 Pimeloyl-CoA Synthetasen in *Ralstonia eutropha*

Pimeloyl-CoA Synthetasen (PCS) katalysieren die ATP und HSCoA-abhängige Umsetzung von Pimelat zu Pimeloyl-CoA. Neben mehreren AMP-bildenden FCS in einigen Bacteria und höheren Pflanzen, wurde in dem Bakterium *P. mendocina* eine PCS identifiziert und charakterisiert, die auf Grund ihrer Proteinstruktur zu den NDP-bildenden Acyl-CoA Synthetasen gezählt wird (Binieda et al. 1999; Sanchez et al. 2000). Zusätzlich ist in dem Bakterium *Ralstonia eutropha* H16 der zur PCS aus *P. mendocina* 41 % identische ORF H16\_B0370 als Pimeloyl-CoA Synthetase annotiert aber bislang nicht untersucht worden. Darüber hinaus finden sich im Genom von *R. eutropha* sechs weitere zu H16\_B0370 homologe ORFs (H16\_B0358, H16\_B0386, H16\_B0404, H16\_B0928, H16\_B1438, und H16\_A2018). H16\_B0404 wies sogar eine Identität von 56 % mit der PCS aus *P. mendocina* auf, die anderen ORFs 29 % bis 37 %. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die beiden ORFs mit der höchsten Identität zu der PCS aus *P. mendocina*, H16\_B0370 und H16\_B0404, für katalytisch aktive Pimeloyl-CoA Synthetasen kodieren. Dazu wurden die Gene kloniert, in *E.coli* transformiert, gereinigt und anschließend charakterisiert.

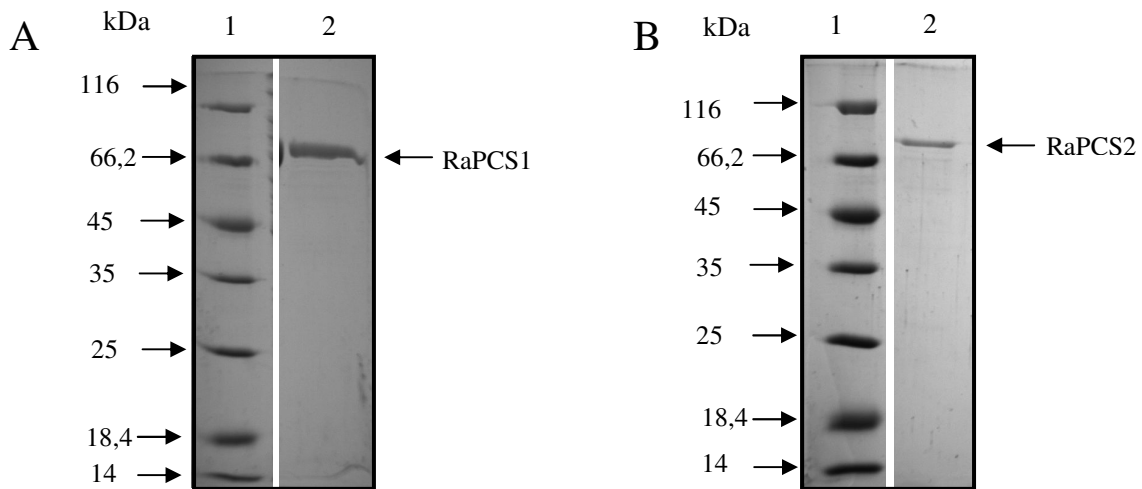
Durch Aminosäuresequenzalignments konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass beide für die Reaktion der ACD essentielle Histidine auch in den PCS-Homologen aus *R. eutropha* und der PCS aus *P. mendocina* konserviert sind. Auf Grund der hohen Sequenzhomologien zur ACDI aus *P. furiosus* wurde für die PCS-Reaktion daher ein ähnlicher Reaktionsmechanismus wie für die ACD angenommen. Um zu prüfen, ob die konservierten Histidine für die Aktivierung des Pimelats durch die PCS essentiell sind, wurde in dieser Arbeit jeweils eines der konservierten Histidine in H16\_B0370 (H<sup>269</sup> und H<sup>539</sup>) durch ortsspezifische Mutagenese gegen Alanin substituiert. Die so mutierten Proteine wurden exprimiert, gereinigt und auf ihre Aktivität hin untersucht.

### 5.6.1 Charakterisierung von PCS aus *R. eutropha*

**Molekulare Parameter und Reinigung der rekombinanten Proteine.** Der 2157 Basenpaare lange ORF H16\_B0370 kodiert für ein 718 Aminosäuren Polypeptid. Die kalkulierte molekulare Masse beträgt 75.87 kDa. H16\_B0404 hat eine Länge von 2106 Basenpaaren und kodiert für ein Polypeptid aus 701 Aminosäuren mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 72.92 kDa. Beide Gene wurden kloniert und überexprimiert. Die rekombinanten Proteine wurden über NiNTA-Affinitätschromatographie und Gelfiltration als RaPCS1 (H16\_B0370) und RaPCS2 (H16\_B0404) bis zur apparenten Homogenität gereinigt.



Die apparente Größe der Untereinheiten wurde über SDS-PAGE mit 75 kDa (RaPCS1) und 77 kDa (RaPCS2) bestimmt. Die apparente Größe der nativen Enzyme wurde durch Gelfiltration mit ca. 160 kDa bestimmt. Die Ergebnisse sprechen für eine homodimere Struktur der beiden Enzyme.



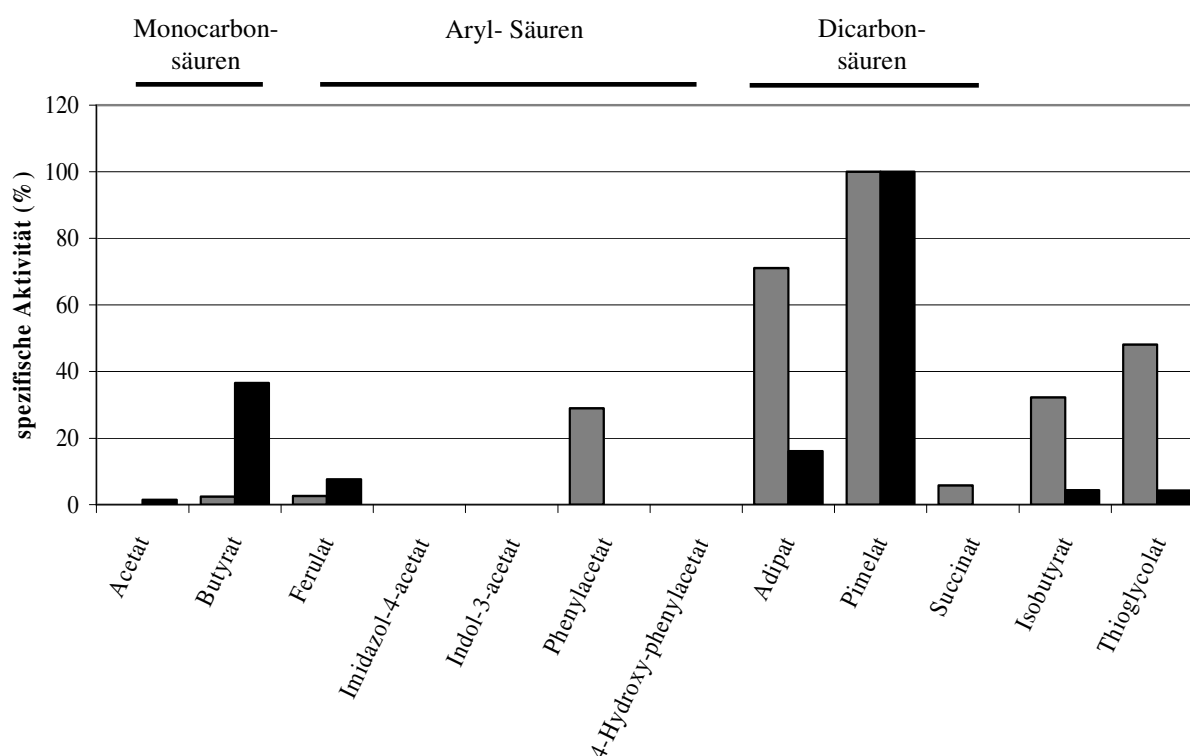
**Abbildung 31 SDS-PAGE der gereinigten PCS aus *R. eutropha*.** 12 % Polyacrylamid-SDS-Gel mit Coomassie Brilliantblau gefärbt. **A:** RaPCS1 Spur 1: Molekulargewichtstandard, Spur 2: nach Superdex-Gelfiltration. **B:** RaPCS2 Spur 1: Molekulargewichtstandard, Spur 2: nach Superdex-Gelfiltration. Die Pfeile auf der linken Seite deuten jeweils auf die Markerproteine, der Pfeil rechts auf die RaPCS1 (A) oder RaPCS2 (B).

**Biochemische Charakterisierung von RaPCS1 und RaPCS2.** Beide Enzyme katalysierten die ATP und HSCoA-abhängige Umsetzung von Pimelat zu Pimeloyl-CoA, ADP und  $P_i$ . Die ADP-Bildung wurde dabei über den PK/LDH-Test nachgewiesen. Die Abhängigkeit der Rate von der Substratkonzentration folgte in beiden Fällen einer Michaelis-Menten-Kinetik. Die beiden rekombinanten PCS wurden bei einer Temperatur von 35 °C charakterisiert.

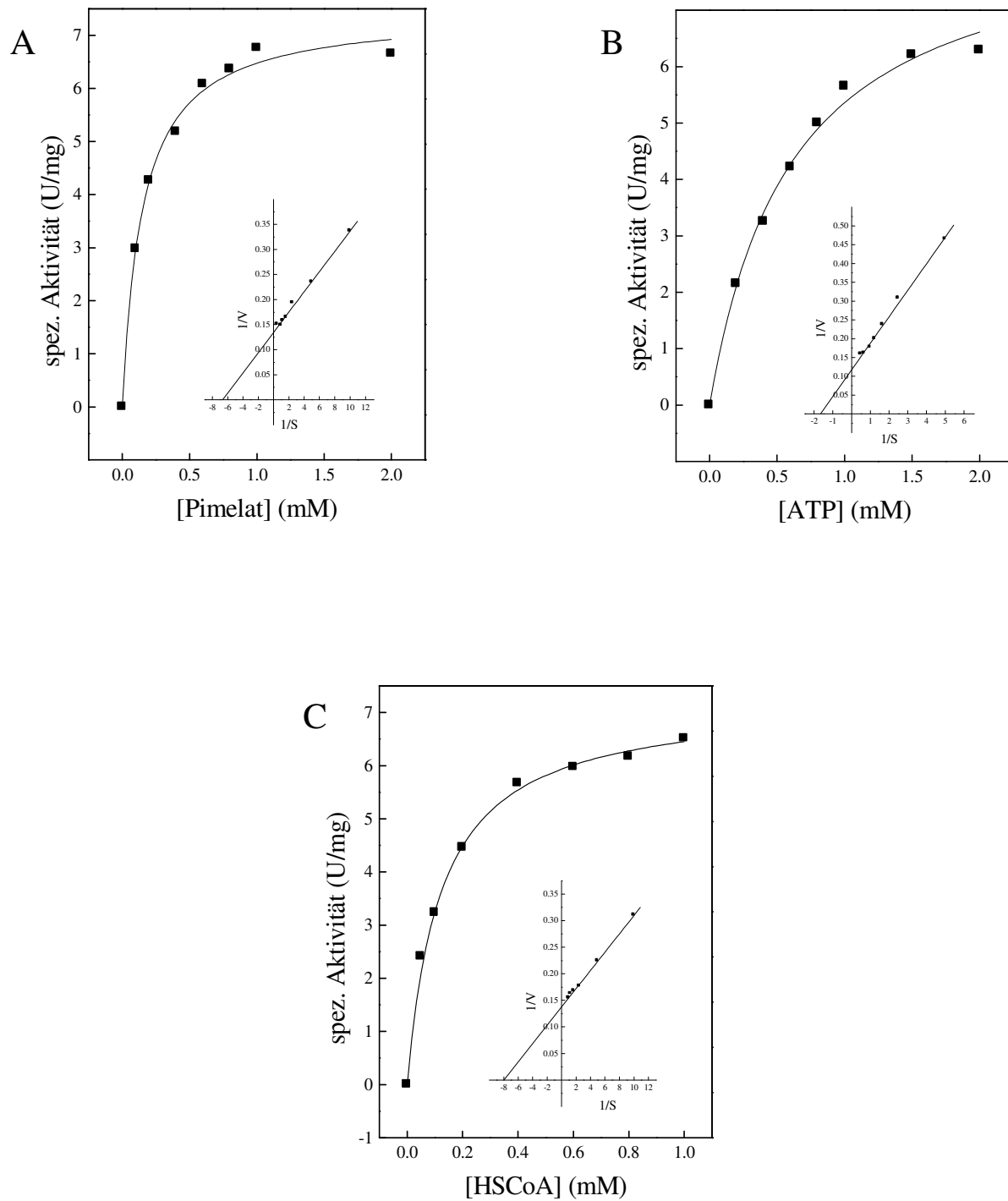
*RaPCS1.* Die PCS katalysiert die Reaktion mit einem apparenten  $V_{max}$ -Wert von 9.5 U/mg. Die  $K_m$ -Werte betragen 0.15 mM (Pimelat), 0.6 mM (ATP) und 0.125 mM (HSCoA). Es zeigte sich eine Substrathemmung mit Pimelat ab einer Konzentration über 2.5 mM. Das pH-Optimum lag bei pH 7.7. Fünfzig Prozent der Rate wurden noch bei pH 6.7 und pH 8.7 erreicht. Die Reaktion der PCS war magnesiumabhängig. Die optimale Magnesiumkonzentration betrug 5 mM. Neben Pimelat (100 %) wurden auch Thioglycolat (48 %) und die Dicarbonsäure Adipat (71 %) mit hoher Aktivität umgesetzt. Die Umsetzung von Isobutytrat konnte mit 32 % der Rate katalysiert werden. Die Monocarbonsäuren wurden nicht (Acetat) oder nur mit geringer Aktivität (Butyrat = 2.4 %) genutzt. Phenylacetat wurde mit 29 % der Aktivität mit Pimelat umgesetzt, mit Indol-3-acetat und 4-Hydroxyphenylacetat wurde die Reaktion nicht katalysiert. Die PCS war auch in der Lage Ferulat mit einer geringen spezifischen Aktivität (3 %) umzusetzen. Die Ferulatumsetzung wurde mit dem Ferulattest bestimmt.

*RaPCS2*. Die ermittelten  $K_m$ -Werte für die PCS-Reaktion der *RaPCS2* ähnelten den für die *RaPCS1* ermittelten Werten (Tabelle 16). Die *RaPCS2* zeigte ebenfalls eine Substrathemmung mit Pimelat und darüber hinaus mit HSCoA. Bei einer Konzentration von 2.5 mM HSCoA wurden nur noch 50 % der Rate gemessen. Eine Hemmung mit HSCoA wurde bislang noch nicht für ACDs oder ACD-ähnliche Acyl-CoA Synthetasen beschrieben. Der apparente  $V_{max}$ -Wert für die HSCoA- und ATP-abhängige Umsetzung von Pimelat zu Pimeloyl-CoA wurde mit 11.5 U/mg bestimmt (= 100 %). Die Monocarbonsäure Butyrat wurde mit 37 % der Rate akzeptiert, wohingegen Acetat nur mit 1.5 % umgesetzt wurde. Im Gegensatz zur *RaPCS1* wurden Adipat und Thioglycolat nur wenig effizient genutzt (16 % und 4 %). Das Enzym zeigte mit keiner der getesteten Aryl-Säuren mit Ausnahme von Ferulat (8 %) eine Reaktion.

Sowohl *RaPCS1* als auch *RaPCS2* wurden mit Acetyl-CoA, Isobutyryl-CoA und Phenylacetyl-CoA auf Aktivität getestet. Keines der beiden getesteten Enzyme zeigte mit einem der CoA-Ester Aktivität.



**Abbildung 32 Vergleich der Substratspezifitäten von *RaPCS1* und *RaPCS2* aus *R. eutropha*.** Dargestellt ist das Verhältnis der spezifischen Aktivitäten in Prozent (%) bezogen auf Pimelat. Grau: *RaPCS1* (100 % = 9.5 U/mg); Schwarz: *RaPCS2* (100 % = 11.5 U/mg). Die Konzentration der angegebenen Substrate betrug 2 mM im Test.



**Abbildung 33** Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration der RaPCS1. Dargestellt ist die spezifische Aktivität in Abhängigkeit von der Pimelat- (A), ATP- (B) und der HSCoA-Konzentration (C). Der Einschub zeigt die doppelt-reziproke Darstellung nach Lineweaver-Burk.

**Tabelle 16 Molekulare und kinetische Parameter der beiden PCS aus *R. eutropha*.** Die Werte wurden bei 35 °C bestimmt. n.b. = nicht bestimmt; \* mit Ferulattest ermittelt.

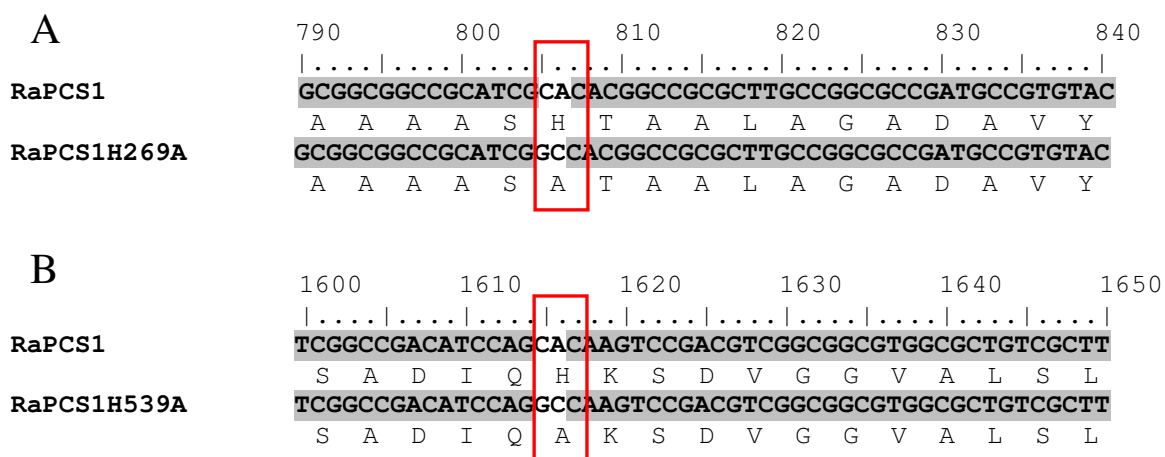
	Substrat	RaPCS1	RaPCS2
<b>kalkuliertes Molekulargewicht der Untereinheit (kDa)</b>		75.9	73
<b>apparentes Molekulargewicht der Untereinheit (kDa)</b>		75	77
<b>apparentes natives Molekulargewicht (kDa):</b>		156	162
<b>oligomere Struktur</b>		$\alpha_2$	$\alpha_2$
<b>apparentes pH-Optimum</b>		7.7	7.5*
<b>apparentes Optimum der Magnesiumkonzentration (mM)</b>		5	5
<b>apparenter <math>K_m</math> (mM) Pimeloyl-CoA Bildung</b>	Pimelat	0.15	0.34
	ATP	0.6	0.37
	HSCoA	0.125	0.15
<b>apparentes <math>V_{max}</math> (U/mg) Pimeloyl-CoA-Bildung</b>		9.5	11.5
<b>apparenter <math>K_m</math> (mM) Feruloyl-CoA Bildung</b>	Ferulat	0.018	0.36
<b>apparentes <math>V_{max}</math> (U/mg) Feruloyl-CoA Bildung</b>		0.2	0.72
<b>katalytische Effizienz <math>k_{cat}/K_m</math> (<math>s^{-1} mM^{-1}</math>)</b>	Ferulat	13.9	2.6
	Pimelat	79.3	43.5

Beide Enzyme setzen primär die Dicarbonsäure Pimelat zu Pimeloyl-CoA unter ADP-Bildung um. Acetat wird kaum oder gar nicht umgesetzt, wodurch ausgeschlossen werden kann, dass es sich um funktionell Acetat bildende ACDs handelt. Die Ergebnisse belegen, dass es sich bei den getesteten Acyl-CoA Synthetasen aus *Ralstonia eutropha* um katalytisch aktive, ADP-bildende PCSs handelt.

### 5.6.2 Aktivitätstests mit RaPCS1-Mutanten aus *R. eutropha*

Um zu prüfen, ob zwei in PCS konservierte Histidine für die Aktivierung des Pimelats durch die PCS essentiell sind, wurde bei der RaPCS1 jeweils ein Histidin durch ortsspezifische Mutagenese gegen Alanin ausgetauscht. Das Plasmid pET19bRaPCS1 enthält das *pcs*-Gen von H16\_B0370. Die ortsspezifische Mutation an diesem Plasmid erfolgte mittels zweier komplementärer Oligonucleotide, die die Mutation des Histidincodons an Position 269 bzw. 539 der Aminosäuresequenz der RaPCS1 gegen das Alanincodon vermittelten. Der Erfolg der Mutagenese wurde mittels Sequenzierung geprüft. Die Sequenz der mutierten Plasmide enthielt die neuen Alanincodone an Position 805-807 (RaPCS1H269A) bzw. 1615-1617

(RaPCS1H539A) der DNA-Sequenz (Abbildung 34). Die mutierten Plasmide wurden in *E. coli* kloniert. Expression und Reinigung der mutierten Proteine wurden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wie die des Wildtyp-Proteins (RaPCS1).



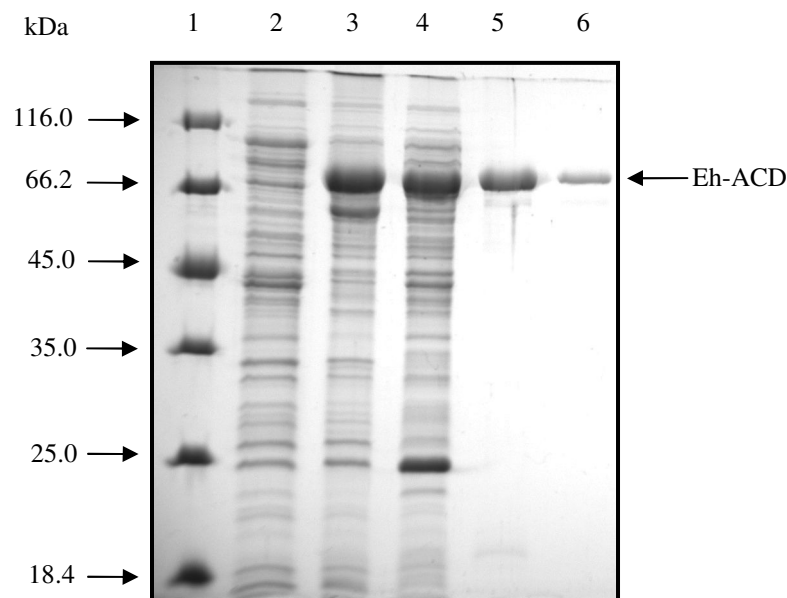
**Abbildung 34 Ausschnitt aus dem Aminosäuresequenzalignment der Originalsequenz des RaPCS1 und der mutierten Sequenz.** In der oberen Reihe ist jeweils der Ausschnitt aus der Originalsequenz (RaEu-PCS1) der DNA- und Aminosäuresequenz gezeigt und darunter die jeweils mutierte Sequenz. Das mutierte Codon ist jeweils mit einem roten Kasten gekennzeichnet. **A:** Alignment von RaPCS1 und RaPCS1H269A; **B:** Alignment von RaPCS1 und RaPCS1H539A.

**Molekulare und katalytische Eigenschaften.** Die mutierten Proteine zeigten die gleichen molekularen Eigenschaften wie der Wildtyp. Die Fähigkeit von RaPCS1H269A und RaPCS1H539A zur Katalyse der ATP- und HSCoA-abhängigen Umsetzung von Pimelat zu Pimeloyl-CoA wurde im selben System geprüft, das zur Charakterisierung des Wildtyps genutzt wurde. Hierbei zeigte RaPCS1H269A keinerlei Aktivität. RaPCS1H539A zeigte noch eine Restaktivität von 1 % der Wildtyp-Aktivität (0.09 U/mg), Dies lässt darauf schließen, dass die beiden Histidine essentiell für die Katalyse der Säureaktivierung durch die PCS sind. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die PCS-Reaktion, ähnlich wie für die ACD gezeigt, in einem vierstufigen Mechanismus ablaufen könnte (siehe Diskussion S. 119).

## 5.7 Acetyl-CoA Synthetase in *Entamoeba histolytica*

In dem eukaryotischen Protisten *Entamoeba histolytica* wurde erstmals eine Acetyl-CoA Synthetase Aktivität identifiziert und partiell angereichert (Reeves et al. 1977). Das Enzym wurde jedoch bisher nicht gereinigt und charakterisiert. In der vorliegenden Arbeit wurde die ACD aus *Entamoeba histolytica* kloniert und nach Expression in *E. coli* gereinigt und detailliert charakterisiert.

**Identifikation der ACD im Genom von *E. histolytica*.** Für die annotierte ACD aus *Entamoeba histolytica* HM1:IMSS (Eh-ACD) codiert der ORF EHI\_178960. Der ORF enthält keine Introns. Das 2141 Basenpaare lange Gen kodiert für ein Polypeptid von 713 Aminosäuren mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 77.5 kDa. Die Aminosäuresequenz der Eh-ACD weist 41 % Identität mit der Sequenz der ACDI $\alpha$  bzw. 39 % Identität zu der ACDI $\beta$  aus *P. furiosus* auf. Das Gen der Eh-ACD wurde in *E. coli* exprimiert und das rekombinante Protein über Ni-NTA-Affinitätschromatographie und Gelfiltration bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Im SDS-Gel zeigte sich eine einzelne Bande von 74.3 kDa Größe (Abbildung 35). Die apparente molekulare Masse des nativen Proteins wurde über Größenausschlusschromatographie mit 164 kDa bestimmt. Dies spricht für eine  $\alpha_2$ -homodimere Struktur der ACD aus *E. histolytica*.



**Abbildung 35 SDS-PAGE der Expression und Reinigung der Eh-ACD.** 12 % Polyacrylamid-Gel mit Coomassie Brilliantblau gefärbt. Belegung der Spuren: Spur 1: Größenmarker, Spur 2: Probe der Expression vor Induktion (15  $\mu$ g), Spur 3: Probe nach 4 h Expression (15  $\mu$ g), Spur 4: Rohextrakt nach Zellaufschluss (15  $\mu$ g), Spur 5: Probe der vereinten Fraktionen nach Ni-NTA (5  $\mu$ g), Spur 6: Vereinte Fraktionen nach Gelfiltration (2  $\mu$ g). Die Pfeile rechts deuten auf die Banden des Größenmarkers. Der Pfeil links deutet auf die Bande der gereinigten Eh-ACD-Untereinheit.

**Katalytische Eigenschaften.** Die ACD katalysierte die reversible Reaktion: Acetyl-CoA + ADP + P<sub>i</sub>  $\rightleftharpoons$  Acetat + ATP + HSCoA. Die Abhängigkeit der Rate von der Substratkonzentration folgte in allen Fällen einer Michaelis-Menten-Kinetik. Die Ermittlung der kinetischen Parameter erfolgte aus der doppelt-reziproken Darstellung nach Lineweaver-Burk. Die Messungen wurden bei 37 °C durchgeführt.

In Richtung der Acetatbildung wurde der V<sub>max</sub>-Wert mit 25 U/mg bestimmt. Die K<sub>m</sub>-Werte waren 64 µM (Acetyl-CoA), 340 µM (ADP) und 2500 µM (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). In Richtung der Säureaktivierung betrug der apparente V<sub>max</sub>-Wert ca. 50 % der spezifischen Aktivität in Richtung Säurebildung (12 U/mg). Die K<sub>m</sub>-Werte wurden mit 2960 µM (Acetat), 260 µM (ATP) und 50 µM (HSCoA) ermittelt. Das pH-Optimum wurde mit pH 7.5 bestimmt. Über fünfzig Prozent der Aktivität konnten noch bei pH 6.5 und pH 7.7 ermittelt werden. Das Temperaturoptimum wurde mit 40 °C bestimmt.

**Substratspektrum der Eh-ACD.** Die Eh-ACD wurde mit verschiedenen Acyl- und Aryl-Säuren (je 10 mM) sowie den CoA-Estern Acetyl-CoA, Isobutyryl-CoA und Phenylacetyl-CoA (je 0.1 mM) auf ihre Substratspezifität getestet. Das Enzym zeigte in Richtung der Säurebildung ausschließlich mit Acetyl-CoA Aktivität. In Richtung der Säureaktivierung wurde neben Acetat (12 U/mg = 100 %) nur Propionat (87.5 %) und Thioglycolat (40 %) mit einer signifikanten Rate umgesetzt. Butyrat katalysierte die Reaktion nur mit 3.6 % der Rate mit Acetat. Verzweigte Monocarbonsäuren und Aryl-Säuren wurden nicht als Substrat akzeptiert.

**Tabelle 17 Molekulare und kinetische Parameter der ACD aus *E. histolytica*.** Die kinetischen Parameter wurden aus der doppelt-reziproken Auftragung nach Lineweaver-Burk ermittelt. Die Werte wurden bei 37 °C bestimmt.

	Substrat	Eh-ACD
<b>kalkuliertes Molekulargewicht der Untereinheit (kDa)</b>		77.5
<b>apparentes Molekulargewicht der Untereinheit (kDa)</b>		74.3
<b>apparentes Molekulargewicht (kDa):</b>		164
<b>oligomere Struktur</b>		$\alpha_2$
<b>apparenter <math>K_m</math> (<math>\mu</math>M) Säureaktivierung</b>	Acetat	2960
	ATP	260
	HSCoA	50
<b>apparentes <math>V_{max}</math> (U/mg)</b>	Acetat	12
	Propionat	10.5
	Butyrat	0.43
	Thioglycolat	4.8
<b>apparenter <math>K_m</math> (<math>\mu</math>M) Säurebildung</b>	Acetyl-CoA	64
	ADP	340
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2500
<b>apparentes <math>V_{max}</math> (U/mg)</b>	Acetyl-CoA	25

In dieser Arbeit wurde die ACD aus *Entamoeba histolytica* erstmalig bis zur apparenten Homogenität gereinigt und detailliert charakterisiert. Das Enzym zeigt ein ungewöhnlich spezifisches Substratspektrum. Mit Ausnahme von Thioglycolat wurden ausschließlich die Monocarbonsäuren Acetat und Propionat mit signifikanter Aktivität umgesetzt. Die Ergebnisse sprechen für eine physiologische Rolle der ACD bei der Säurebildung aus Acetyl-CoA und Propionyl-CoA.

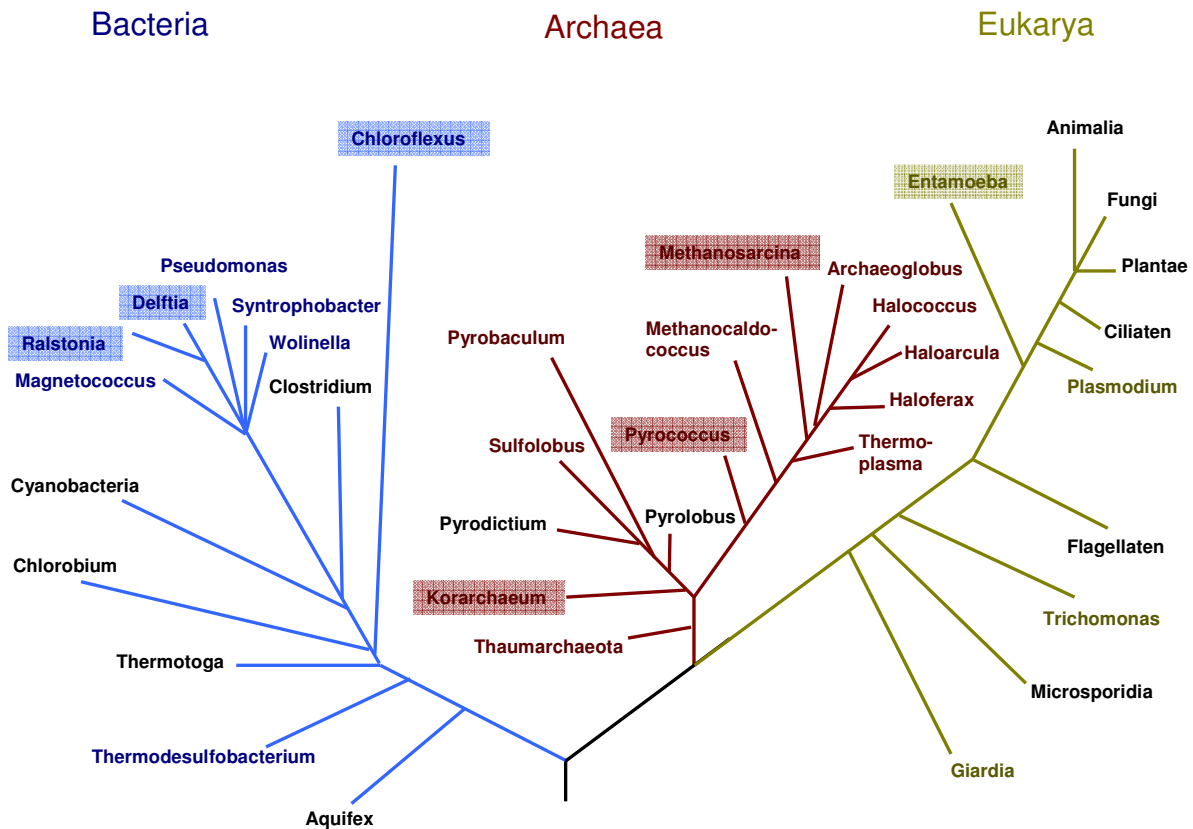


## 6 Diskussion

ADP-bildende Acetyl-CoA Synthetasen (ACD) bilden eine Familie multifunktioneller Synthetasen, die in allen drei Domänen des Lebens vorkommen. ACDs gehören, wie Succinyl-CoA Synthetasen (SCS), zu der Superfamilie der NDP-bildenden Acyl-CoA Synthetasen. Die Mitglieder dieser Superfamilie zeigen hohe Sequenzhomologien, unterscheiden sich aber in der Anordnung ihrer Domänen. Anders als die detailliert untersuchten SCSs, sind ACDs bislang nur in der Domäne der Archaea gut untersucht. Zu ACDs in Eukaryoten liegen dagegen nur wenige und in Bakterien überhaupt keine Informationen vor. Neben den ACDs wurden in Bakterien ACD-homologe Acyl-CoA Synthetasen identifiziert, für die, anderes als für ACDs, eine funktionelle Beteiligung bei der Säureaktivierung während des Wachstums auf Pimelat oder Ferulat nachgewiesen wurde (Binieda et al. 1999, Plaggenborg et al. 2001). Je nach Substrat werden diese ACD-Homologe als Pimeloyl-CoA Synthetasen (PCS) oder Feruloyl-CoA Synthetasen (FCS) bezeichnet. Bislang ist zu diesen Enzymen nur wenig bekannt. Insbesondere liegt keine Charakterisierung einer FCS vor. Um die Rolle von ACD-Homologen in Archaea, Eukarya und Bacteria besser zu verstehen, wurden in dieser Arbeit folgende Untersuchungen durchgeführt, deren Ergebnisse in diesem Kapitel diskutiert werden.

1. In dem hyperthermophilen Archaeon *Pyrococcus furiosus* wurde eine Succinat umsetzende ACD (ACD<sub>succ</sub>) charakterisiert. Zusätzlich wurden mit den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten dieser ACD<sub>succ</sub> und einem weiteren ACD-Isoenzym aus *P. furiosus*, der ACIDI, chimäre ACDs erstellt und der Einfluss der Untereinheiten auf das Substratspektrum analysiert.
2. Aus dem phylogenetisch ursprünglichen Korarchaeon *Candidatus Korarchaeum cryptophilum* wurden vier ACD-Homologe und eine SCS gereinigt und charakterisiert.
3. Aus dem methanogenen Archaeon *Methanosarcina mazei* und dem eukaryotischen Parasiten *Entamoeba histolytica* wurden jeweils eine ACD charakterisiert.
4. Durch Wachstums- und Suspensionsversuche wurde in dem Bakterium *Chloroflexus aurantiacus* die Acetatbildung aus Glucose analysiert und eine ACD als Enzym der Acetatsynthese identifiziert und charakterisiert.
5. In *Ralstonia eutropha* wurden zwei ACD-homologe PCS charakterisiert und erstmals eine ADP-Bildung durch diese Enzyme nachgewiesen. Zusätzlich wurde durch die Erstellung von Proteinmutanten der Reaktionsmechanismus der PCS untersucht.
6. Erstmals wurde eine FCS aus *Delftia acidovorans* charakterisiert.

In Abbildung 36 wird eine Einordnung der in dieser Arbeit charakterisierten ACD-Homologen im phylogenetischen Stammbaum gezeigt.



**Abbildung 36 Verteilung von charakterisierten ACD-Homologen in den drei Domänen des Lebens.** Schematischer Stammbaum zur Verteilung von ACD-Homologen in Bacteria (blau), Archaea (rot) und Eukarya (grün). Es sind nur Homologe ohne Acetyltransferasedomäne aufgeführt. Der Stammbaum basiert auf phylogenetischen Analysen mit 16S/18S-RNA (modifiziert nach Madigan et al. 2002; Spang et al. 2010). Namen von Organismen ohne ACD-Homolog sind schwarz gedruckt. Organismen, deren Genom ACD-Homologe enthält, sind in der Farbe der jeweiligen Domäne angegeben. Organismen, in denen ACD-Homologe in dieser Arbeit untersucht worden sind, sind farbig hinterlegt.

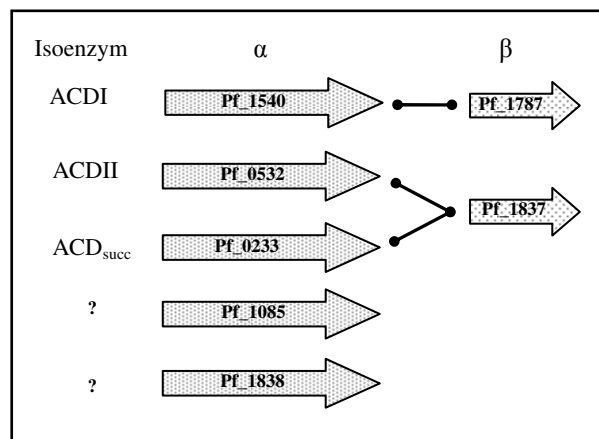
## 6.1 Rolle der ACDs in Archaea

ACDs wurden zum ersten Mal in der Domäne der Archaea in dem hyperthermophilen Euryarchaeon *P. furiosus* detailliert untersucht. Dort wurden zwei funktionelle  $\alpha_2\beta_2$ -heterotetramere ACD-Isoenzyme, ACDI und ACDII, mit distinkten Substratspektren charakterisiert, die am fermentativen Kohlenhydrat- und Peptidabbau beteiligt sind und vermutlich die hauptsächlich Energie konservierende Reaktion in *P. furiosus* katalysieren (Mai und Adams 1996b). Inzwischen wurden ACDs in allen Acetat bildenden Archaea nachgewiesen und Informationen zu deren Funktion in dieser Domäne verfügbar (Musfeldt und Schönheit 2002; Bräsen und Schönheit 2004b).

**Succinat bildende ACD in *Pyrococcus furiosus*.** Im Genom des hyperthermophilen Archaeon *P. furiosus* finden sich fünf paraloge ACD $\alpha$ - sowie zwei ACD $\beta$ -Untereinheiten. Bislang wurden jedoch erst ACDI und ACDII charakterisiert. Bei Stoffwechselanalysen wurde gezeigt, dass beim Peptidabbau in *P. furiosus* Aminosäuren zunächst über Transaminasen in 2-Ketosäuren umgewandelt und diese über 2-Ketosäure:Ferredoxin-Oxidoreduktasen in CoA-Ester überführt werden. Diese CoA-Ester werden über ACDI und ACDII in die korrespondierenden Acyl- bzw. Arylsäuren umgewandelt. Dabei setzt die ACDI bevorzugt Acetyl-CoA um, das aus Kohlenhydraten oder bestimmten Aminosäuren gebildet wird. Die ACDII setzt hingegen vor allem aromatische CoA-Ester wie Phenylacetyl-CoA um. Beide ACDs katalysieren die Reaktion auch mit verzweigten Acyl-CoA Estern wie Isobutyryl-CoA. Keine der beiden ACDs setzt jedoch Succinyl-CoA um. Dennoch ist in *P. furiosus* unter anderem eine 2-Ketoglutarat-Oxidoreduktase (KGOR) aktiv, die 2-Ketoglutarat in Succinyl-CoA umwandelt (Mai und Adams 1996b). Da in *Thermococcales* keine Gene für eine SCS vorhanden sind, war die Verwendung des gebildeten Succinyl-CoA in *P. furiosus* bislang unklar. In dem mit *P. furiosus* nahe verwandten *Thermococcus kodakaraensis* sind Homologe aller sieben ACD-Untereinheiten aus *P. furiosus* konserviert. Darunter wurde bei Untersuchungen zur Succinatbildung eine funktionelle, Succinat umsetzende ACD identifiziert (Shikata et al. 2007). Dies ist ungewöhnlich, da alle anderen in Archaea charakterisierten ACDs nicht in der Lage waren die Reaktion mit Succinat effizient zu katalysieren. In *P. furiosus* wurden bei Sequenzvergleichen die homologen ORFs Pf\_0233 (ACD $\alpha$ ) und Pf\_1837 (ACD $\beta$ ) identifiziert, die jeweils zu über 80 % identisch mit der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit der Succinat umsetzenden ACD aus *T. kodakaraensis* waren (Shikata et al. 2007). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Pf\_0233 und Pf\_1837 für eine katalytisch aktive ACD kodieren, die mit hoher spezifischer Aktivität Succinat umsetzt (ACD<sub>succ</sub>). Neben Succinat wird nur Isovalerat effizient umgesetzt und mit geringen Raten Isobutyrat, Phenylacetat und Acetat. Indol-3-acetat wurde hingegen nicht als Substrat genutzt. Das Enzym aus *T. kodakaraensis* zeigte in Bezug auf diese Substrate eine ähnliche Spezifität (Shikata et al. 2007). Über Größenausschlusschromatografie wurde für das native Enzym eine Größe von 150 kDa bestimmt, was für eine  $\alpha_2\beta_2$ -heterotetramere Struktur spricht. Diese Molekularstruktur stimmt mit der Struktur von anderen charakterisierten thermococcalen ACDs überein (Mai und Adams 1996b; Shikata et al. 2007). Es ist denkbar, dass *P. furiosus* bei der Umsetzung der Aminosäure Glutamat entstehendes Succinyl-CoA über die ACD<sub>succ</sub> zu Succinat umwandelt und dabei ATP über Substratstufenphosphorylierung generiert. Eine ähnliche Rolle wurde auch für das ACD-Isoenzym aus *T. kodakaraensis* diskutiert (Shikata et al. 2007). Die Succinat bildenden

ACDs in *P. furiosus* und *T. kodakaraensis* würden dadurch die fehlende SCS in den *Thermococcales* komplementieren. Um diese Funktion zu verifizieren, müssten weitere Untersuchungen zeigen, ob *P. furiosus*, wie für *T. kodakaraensis* gezeigt, Succinat bei Wachstum auf Peptiden bildet und eine funktionelle Beteiligung der ACD<sub>succ</sub> nachgewiesen werden kann.

Die in dieser Arbeit beschriebene ACD<sub>succ</sub> aus *P. furiosus* verwendet die gleiche ACD $\beta$ -Untereinheit wie die bereits charakterisierte ACDII (ACDII $\beta$ ). Abbildung 37 skizziert die Zuordnung der paralogen ACD-Untereinheiten in *P. furiosus*.



**Abbildung 37 Kombination paraloger  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten in *P. furiosus*.** Die Kombinationen der fünf paralogen  $\alpha$ -Untereinheiten und der zwei  $\beta$ -Untereinheiten für bekannte ACD-Isoenzyme aus *P. furiosus* sind schematisch dargestellt und die ORF-Bezeichnungen angegeben. Für Pf\_1085 und Pf\_1838 liegen bislang keine Informationen vor.

Die ACD-Isoenzyme ACDII und ACD<sub>succ</sub> weisen trotz der gleichen  $\beta$ -Untereinheit ein völlig unterschiedliches Substratspektrum auf. Ähnliches ist für das ACD-Isoenzym II und die Succinat umsetzende ACD aus *T. kodakaraensis* beschrieben (Shikata et al. 2007). Dies weist darauf hin, dass das Substratspektrum primär durch die  $\alpha$ -Untereinheit determiniert wird. Aus der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit der ACDI (ACDI $\alpha$ - und ACDI $\beta$ ) und der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit der ACD<sub>succ</sub> (ACD<sub>succ</sub> $\alpha$ - und ACDII $\beta$ ) aus *P. furiosus* wurden in dieser Arbeit vier aktive, chimäre ACD-Isoenzyme aus jeweils einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit rekonstituiert. Die Enzyme wiesen alle eine  $\alpha_2\beta_2$ -heterotetramere Struktur auf und wurden hinsichtlich ihres Substratspektrums analysiert. Hierbei wurde gezeigt, dass der Austausch der  $\beta$ -Untereinheit keinen Einfluss auf die Substratspezifität und die Substrataffinität der ACD hat. Allerdings konnte bei der chimären ACD aus ACDI $\alpha$  und ACDII $\beta$  eine Steigerung der spezifischen Aktivität in Richtung Säureaktivierung um das 3 bis 7fache festgestellt werden. Die Affinität für Acetat und die spezifische Aktivität in Richtung Säurebildung wurden jedoch nicht beeinflusst. Die Ursache für diese Steigerung ist unbekannt. Bei der Chimäre aus ACD<sub>succ</sub> $\alpha$  und ACDI $\beta$  wurde keine

solche Steigerung festgestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass allein die  $\alpha$ -Untereinheit das Substratspektrum definiert. Die genaue Lokalisation der Substratbindung in der  $\alpha$ -Untereinheit der ACD muss in weiteren Studien untersucht werden. Hierzu sind Analysen von Kristallstrukturen erforderlich, die mit gebundenem Substrat (CoA-Ester oder Säure) erstellt wurden.

**Acyl-CoA Synthetasen in *Candidatus Korarchaeum cryptophilum*.** Die Abteilung der Korarchaeota ist eine Gruppe bislang unkultivierter, hyperthermophiler Archaea, die sehr früh im phylogenetischen Stammbaum zwischen Crenarchaeota und Euryarchaeota abzweigt (Auchtung et al. 2006; Elkins et al. 2008). Im Genom des einzigen bisher sequenzierten Korarchaeoten *Ca. K. cryptophilum* sind vier hypothetische ACD $\alpha$ -Untereinheiten (kcr\_0030, kcr\_0073, kcr\_0198 und kcr\_1138) annotiert sowie eine putative ACD $\beta$ -Untereinheit (kcr\_0115) (Elkins et al. 2008). Aus je einer ACD $\alpha$ - und der ACD $\beta$ -Untereinheit konnten in der vorliegenden Arbeit drei katalytisch aktive ACD-Isoenzyme rekonstituiert werden (ckcACD1, ckcACD3, ckcACD4). Die Kombination von kcr\_0073 mit der  $\beta$ -Untereinheit führte erwartungsgemäß zur Bildung eines inaktiven Enzyms (ckcACD2), da ein katalytisch essentielles Histidin in der Sequenz der  $\alpha$ -Untereinheit fehlt. Alle vier Enzyme wiesen eine  $\alpha_2\beta_2$ -heterotetramere Struktur von 150 bis 160 kDa Größe auf, wie sie auch für *P. furiosus*, *T. kodakaraensis*, und *P. aerophilum* beschrieben ist (Mai und Adams 1996b; Bräsen und Schönheit 2004b; Shikata et al. 2007).

Die drei aktiven ACD-Isoenzyme unterscheiden sich signifikant in Bezug auf ihr Substratspektrum und die kinetischen Konstanten. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass das Substratspektrum durch die  $\alpha$ -Untereinheit determiniert wird, wie es in der vorliegenden Arbeit schon für *P. furiosus* bewiesen wurde. Auf Grund der Genomanalyse wird für *Ca. K. cryptophilum* ein heterotrophes Wachstum auf Peptiden angenommen. Dabei werden Peptide über Transaminasen und 2-Ketosäure:Ferredoxin-Oxidoreductasen zu Acyl- und Aryl-CoA Estern abgebaut und diese von ACDs in die korrespondierende Säure umgewandelt, wobei ATP über Substratstufenphosphorylierung generiert wird (Elkins et al. 2008). Ein ähnlicher Peptidstoffwechsel ist bereits für *P. furiosus* vorgeschlagen worden (Mai und Adams 1996b). Anders als *P. furiosus* kann *Ca. K. cryptophilum* vermutlich nicht auf Kohlenhydraten wachsen (Elkins et al. 2008). Sowohl ckcACD1 als auch ckcACD4 zeigten ein neuartiges Substratspektrum und setzten bevorzugt Arylverbindungen und verzweigt-kettige Carbonsäuren um. Die ckcACD1 katalysierte die Reaktion mit höchster Aktivität mit Indol-3-acetat, das beim Abbau von Tryptophan entsteht. Die katalytische Effizienz ( $K_{cat}/K_m$ ) der ckcACD1 war für dieses Substrat

44fach höher als für Acetat. Die *ckcACD4* zeigte eine 100fach höhere katalytische Effizienz für 4-Hydroxyphenylacetat als für Acetat. 4-Hydroxyphenylacetat entsteht beim Abbau der Aminosäure Tyrosin über Transaminase und 2-Ketosäure:Ferredoxin-Oxidoreduktase. Für die Indolpyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase aus *P. furiosus* wurde gezeigt, dass sie auch andere Aryl-Pyruvate wie Phenylpyruvat und 4-Hydroxyphenylpyruvat als Substrat akzeptiert (Mai und Adams 1994).

Anderes als *ckcACD1* und *ckcACD4* zeigte die *ckcACD3* eine hohe Affinität für Acetat bzw. Acetyl-CoA und verzweigte Carbonsäuren, setzte aber Arylsäuren nicht um. Diese Substratspezifität ist vergleichbar mit dem Substratspektrum der *ACDI* aus *P. furiosus*. Dies spricht dafür, dass die *ckcACD3* ähnlich wie die *ACDI* an der Fermentation kurzkettiger Aminosäuren wie Alanin, Serin oder Cystein beteiligt ist, die über Transaminasen und die *POR* zu Acetyl-CoA bzw. Acetyl-CoA Derivaten abgebaut werden könnten. Dafür spricht die Substratspezifität für Acetyl-CoA sowie Thioglycolat. Letzteres entspräche dem Abbauprodukt von Cystein über Transaminase, 2-Ketosäure:Ferredoxin-Oxidoreduktase und *ACD*. Zusätzlich könnte die *ACD* am Abbau von Valin über Isobutyrat als Intermediat beteiligt sein. Ein Vergleich der Substratspektren der *ckcACDs* mit anderen hyperthermophilen *ACDs* ist in Tabelle 18 dargestellt.

**Tabelle 18 Vergleich der Substratspezifitäten von *ACDs* aus *Ca. K. cryptophilum* mit anderen hyperthermophilen *ACDs*.** Es ist die relative Aktivität in Prozent in Richtung Säureaktivierung angegeben. 100 % entsprechen: *ckcACD1* = 7.3 U/mg; *ckcACD3* = 50 U/mg, *ckcACD4* = 14.8 U/mg; *ACDI* = 40 U/mg (*P. furiosus*); *ACDII* = 37 U/mg (*P. furiosus*); *Tk-ACDII* = 36.1 U/mg (*T. kodakaraensis*). Hinter den Substraten ist in Klammern die zugeordnete Aminosäure angegeben, deren Abbau zu den angegebenen Produkten führt. n.b. = nicht bestimmt; n.m. = nicht messbar.

Substrat	<i>ckcACD1</i> <sup>1</sup>	<i>ckcACD3</i> <sup>1</sup>	<i>ckcACD4</i> <sup>1</sup>	<i>ACDI</i> <sup>2</sup>	<i>ACDII</i> <sup>3</sup>	<i>Tk-ACDII</i> <sup>4</sup>
Acetat (Ala)	25	100	40	100	75	43
Propionat	91	89	59	100	n.b.	n.b.
Butyrat	57	62	73	92	n.b.	n.b.
2-Methylbutyrat (Ile)	62	8	78	n.b.	n.b.	57
Isobutyrat (Val)	83	55	77	79	25	27
Isovalerat (Leu)	95	3	76	34	n.b.	100
Imidazol-4-acetat (His)	n.m.	n.m.	4	n.b.	n.b.	7
Indol-3-acetat (Trp)	100	n.m.	26	>2	74	34
Phenylacetat (Phe)	35	n.m.	26	>2	100	77
4-Hydroxyphenylacetat (Tyr)	25	1	100	n.b.	n.b.	59
Thioglycolat (Cys)	n.m.	39	9	n.b.	n.b.	15
Succinat (Glu,Gln)	n.m.	n.m.	n.m.	3	n.m.	6

<sup>1</sup> diese Arbeit

<sup>2</sup> Glasemacher et al. 1997

<sup>3</sup> Mai und Adams 1996

<sup>4</sup> Shikata et al. 2007

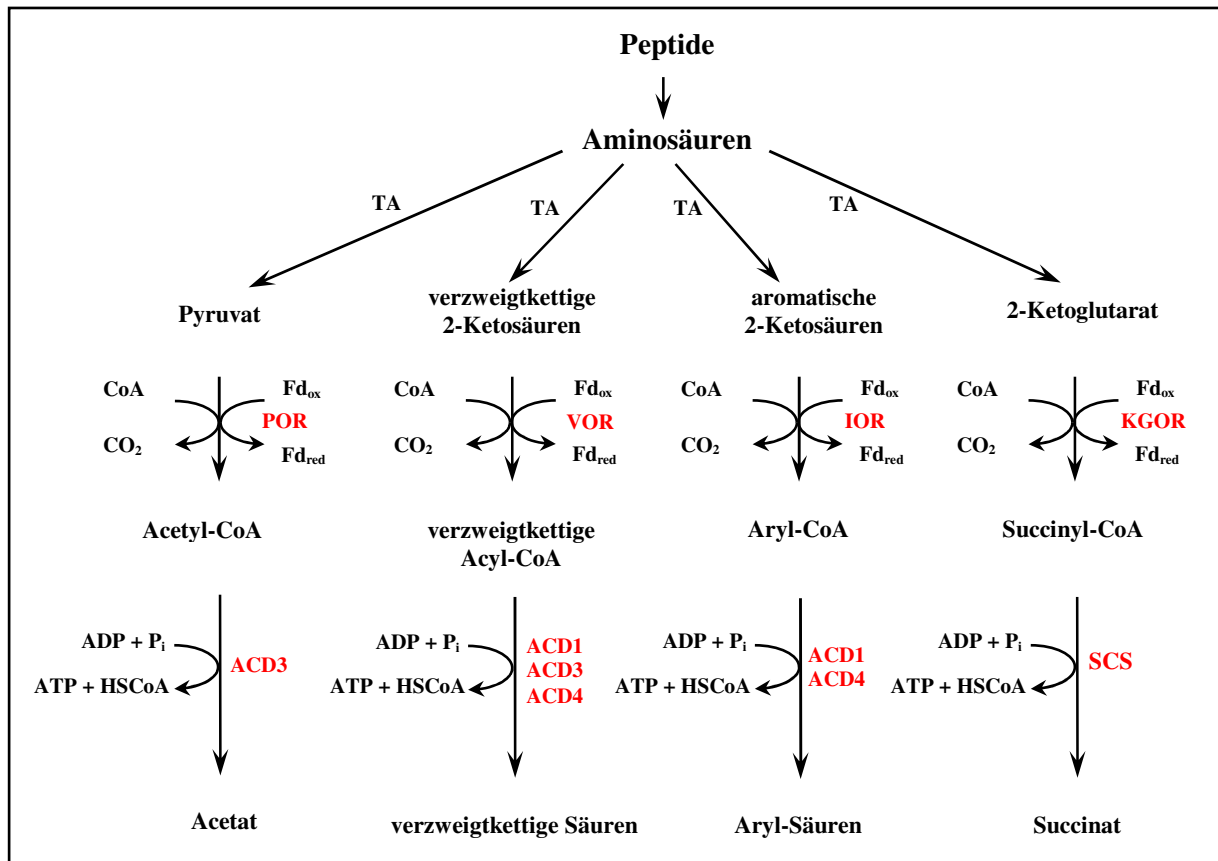
Die ORFs kcr\_1392 und kcr\_1393 kodieren in *Ca. K. cryptophilum* für die Untereinheiten einer katalytisch aktiven SCS. Das Molekulargewicht des nativen Enzyms wurde mit 134 kDa bestimmt, das der Untereinheiten mit 28 kDa (SCS $\alpha$ ) und 40 kDa (SCS $\beta$ ). Diese Ergebnisse sprechen für eine  $\alpha_2\beta_2$ -heterotetramere Struktur, wie sie auch für gram-negative Bacteria sowie für thermoacidophile und halophile Archaea beschrieben ist (Danson et al. 1985). Die SCS aus *Ca. K. cryptophilum* ist ein hyperthermophiles Enzym mit einem Temperaturoptimum von 85 °C. Das Enzym ist in Richtung Säurebildung hochspezifisch für Succinyl-CoA. Acetyl-CoA, Isobutyryl-CoA und Phenylacetyl-CoA werden nicht umgesetzt. In Richtung Säureaktivierung wurde die Reaktion neben Succinat (18.9 U/mg) nur mit Glutarat (4 U/mg) katalysiert. Andere Acyl- und Arylsäuren wurden nicht akzeptiert. Anders als für ACDs, die in der Regel ein breites Substratspektrum zeigen, ist eine hohe Spezifität für Succinyl-CoA bzw. Succinat typisch für SCSs. So zeigten auch die SCSs aus *E. coli* und *Spinacia oleracea* eine hohe Spezifität für Succinat, waren aber nicht in der Lage Glutarat umzusetzen (Kaufman und Alivisatos 1955; Gibson et al. 1967). Die hohe Affinität für Succinyl-CoA spricht für die Succinatbildung als hauptsächliche Reaktionsrichtung. Die kinetischen Parameter sind mit anderen bislang charakterisierten SCSs - z.B. in *E. coli* oder *Nitrosomonas europaea* - vergleichbar (Gibson et al. 1967; Kondo et al. 1995).

Die SCS könnte in *Ca. K. cryptophilum* eine funktionelle Rolle bei der Energiekonservierung beim Abbau von Glutamat übernehmen. Die Aminosäure Glutamat entsteht z.B. bei der Übertragung der Aminogruppe von anderen Aminosäuren auf  $\alpha$ -Ketoglutarat durch Pyridoxalphosphat abhängige Transaminasen wie sie auch im Genom von *Ca. K. cryptophilum* gefunden wurden (Berg et al. 2003; Elkins et al. 2008). Glutamat könnte anschließend über eine Glutamat-Dehydrogenase desaminiert werden. Das entstehende  $\alpha$ -Ketoglutarat wird über eine  $\alpha$ -Ketoglutarat:Ferredoxin-Oxidoreduktase zu Succinyl-CoA umgewandelt, was wiederum über die SCS unter ATP-Synthese zu Succinat abgebaut wird.

Aus den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen zu ACDs und der SCS in *Ca. K. cryptophilum* lässt sich in Verbindung mit den Genomanalysen ein ähnliches Schema für den Aminosäureabbau postulieren, wie es auch von Mai und Adams für *P. furiosus* vorgeschlagen wurde (Mai und Adams 1996b). Das für *Ca. K. cryptophilum* postulierte Schema des Peptidabbaus ist in Abbildung 38 dargestellt.

Anders als in *Ca. K. cryptophilum* besitzen *Thermococcales* keine SCS. Die Tatsache, dass die sehr ursprünglichen Korarchaeoten hingegen eine SCS besitzen spricht dafür, dass *Thermococcales* im Laufe der Evolution die Gene für eine SCS zunächst verloren haben könnten

und später eine ACD - wie beschrieben - für die Funktion der SCS umgebildet haben. Weiterhin spricht das Vorkommen von ACD und SCS in *Ca. K. cryptophilum* dafür, dass ACD und SCS sehr ursprüngliche Enzyme der Substratstufenphosphorylierung sind.



**Abbildung 38** Postuliertes Schema der Fermentation von Aminosäuren und Funktion der ACDs und der SCS in *Ca. K. cryptophilum*. Abbau von Peptiden über Transaminasen, 2-Ketosäure:Ferredoxin-Oxidoreduktasen und ACDs sowie der SCS in Anlehnung an *P. furiosus* (modifiziert nach Mai und Adams 1996). TA = Transaminase, Fd<sub>ox</sub> = oxidiertes Ferredoxin; Fd<sub>red</sub> = reduziertem Ferredoxin; POR = Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase, VOR = 2-Ketoisovalerat: Ferredoxin-Oxidoreduktase, IOR = Indolpyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase, KGOR = 2-Ketoglutarat:Ferredoxin-Oxidoreduktase, ACD = Acetyl-CoA Synthetase (ADP-bildend).

**ACD in *Methanosarcina mazei*.** Das methanogene Archaeon *M. mazei* kann auf H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub>, Methanol, Methylamin oder Acetat wachsen. Im Genom finden sich - anders als in anderen Archaea - die Gene für die typischen Enzyme des bakteriellen Acetatstoffwechsels, Acetatkinase (AK) und Phosphotransacetylase (PTA). Zusätzlich konnten die ORFs MM\_0358 und MM\_0493 identifiziert werden, die für eine putative ACD $\alpha$  bzw. ACD $\beta$  und damit das typische Enzym der archaellen Acetatbildung kodieren. Der ORF MM\_0493 liegt in einem Gencluster mit AK (MM\_0495) und PTA (MM\_0496). Für *M. mazei* ist die Aktivierung von Acetat über die Enzyme Acetatkinase und Phosphotransacetylase beschrieben worden (Ferry



1999). DNA-Microarray-Analysen und qRT-Experimente zeigten eine Steigerung der Expression der Gene für die ACD $\beta$ -Untereinheit, der AK und der PTA bei Wachstum auf Acetat. (Hovey et al. 2005). In dieser Arbeit konnten die getrennt heterolog exprimierten und gereinigten Untereinheiten der ACD zu einem katalytisch aktiven  $\alpha_2\beta_2$ -heterotetrameren Enzym von 172 kDa Größe rekonstituiert werden. Die rekombinante ACD setzte Acetyl-CoA und Isobutyryl-CoA mit hoher Affinität ( $K_m = 9 \mu\text{M}$  bzw.  $7 \mu\text{M}$ ) und ähnlicher Aktivität ( $V_{\max} = 1.4 \text{ U/mg}$  bzw.  $1.5 \text{ U/mg}$ ) um. In Richtung der Säureaktivierung zeigte die ACD die höchste spezifische Aktivität mit Butyrat ( $1.1 \text{ U/mg}$ ) und setzte darüber hinaus Propionat sowie verzweigte Acylsäuren effizient um. Mit Acetat wurde die Reaktion nur mit geringer spezifischer Aktivität katalysiert ( $0.09 \text{ U/mg}$ ). Arylsäuren wurden nicht umgesetzt. Die ACD aus *M. mazei* unterscheidet sich damit im Substratspektrum von der einzigen anderen bislang in methanogenen Archaea charakterisierten ACD aus *Methanocaldococcus jannaschii*, die nicht in der Lage ist, die Säureaktivierung zu katalysieren (Musfeldt und Schönheit 2002). Die für ACDs ungewöhnlich geringe spezifische Aktivität und die Bevorzugung von unverzweigten C<sub>3</sub>- und C<sub>4</sub>-Carbonsäuren sowie verzweigten Carbonsäuren vor Acetat als Substrat sind neuartig.

Die physiologische Rolle der ACD in *M. mazei* kann nicht eindeutig bestimmt werden. Die leichte Induktion der ACD (4fach) bei Wachstum auf Acetat, lässt eine funktionelle Beteiligung der ACD an der Acetataktivierung vermuten. Allerdings wird in *M. mazei* Acetat über AK und PTA zu Acetyl-CoA aktiviert und die Induktion beider Enzyme ist 4fach stärker als die der ACD (Hovey et al. 2005). Darüber hinaus konnte für *H. marismortui* gezeigt werden, dass ACDs *in vivo* nicht an der Säureaktivierung beteiligt sind (Bräsen und Schönheit 2004a). Die äußerst geringe Aktivität und der hohe  $K_m$ -Wert der ACD mit Acetat spricht zusätzlich gegen eine Funktion bei der Aktivierung von Acetat.

## 6.2 ACD in Eukarya

**ACD in *Entamoeba histolytica*.** ACD-Homologe wurden in Eukaryoten bislang nur in den Acetat bildenden parasitären Pathogenen *Entamoeba histolytica* und *Giardia lamblia* beschrieben. Bei Sequenzanalysen wurde darüber hinaus ein Homolog in dem Malariaerreger *Plasmodium falciparum* identifiziert (Reeves et al. 1977; Sanchez und Müller 1996; Sanchez et al. 2000). Bei im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten BLAST-P-Analysen (Altschul et al. 1990) konnten, neben den bereits beschriebenen Sequenzen, ACD-homologe Sequenzen zusätzlich in den zu den Stramenopiles zählenden *Blastocystis hominis*, in dem zu den Fornicata gehörenden Fischparasiten *Spironucleus barkhanus* und in *Trichomonaden*

(Parabasalia) nachgewiesen werden (Einordnung der Organismen nach Adl et al. (Adl et al. 2005). In parasitären Eukaryoten stellen ACDs neben Acetat:Succinat CoA-Transferasen die einzigen bislang identifizierten Enzyme dar, die Acetat aus Acetyl-CoA bilden (Tielens et al. 2010). „Höhere“ Eukaryoten wie Plantae, Funghi oder Animalia scheinen keine ACD-Homologen im Genom zu enthalten (siehe Abbildung 36, S. 101).

Die Reaktion der ACD wurde in *E. histolytica* erstmals beschrieben, aber nie detailliert charakterisiert (Reeves et al. 1977). Daher wurde in dieser Arbeit die ACD aus *E. histolytica* (Eh-ACD) kloniert, in *E. coli* heterolog exprimiert, bis zur apparenten Homogenität gereinigt und detailliert charakterisiert. Der für die ACD kodierende ORF EHI\_178960 hat eine Länge von 2141 Basenpaaren und weist keine Introns auf. Dies ist typisch für Gene die *E. histolytica* über lateralen Gentransfer von Prokaryoten erhalten hat (Roy et al. 2006). Phylogenetische Analysen sprechen für einen horizontalen Gentransfer der ACD von Archaea, wobei aber keine eindeutige Herkunft bestimmt werden konnte (Field et al. 2000). Bei der nativen ACD handelt es sich um ein 176 kDa großes Homodimer aus einer 74.3 kDa großen Untereinheit in fusionierter Form, wie sie auch für die ACDs aus den Archaea *H. marismortui* und *M. jannaschii* sowie für den Eukaryoten *Giardia lamblia* beschrieben wurde (Sanchez und Müller 1996; Musfeldt und Schönheit 2002; Bräsen und Schönheit 2004b). Das Enzym aus *E. histolytica* katalysierte sowohl die Säurebildung als auch die Säureaktivierung. Die Eh-ACD setzte in Richtung Säureaktivierung neben Acetat (12 U/mg = 100 %) mit signifikanter Aktivität nur Propionat (ca. 88 %) und Thioglycolat (40 %) um und zeigte damit ein für ACDs ungewöhnlich spezifisches Substratspektrum. In Richtung Säurebildung setzte die ACD von den getesteten Acyl-CoA Estern nur Acetyl-CoA um; Phenylacetyl-CoA, Succinyl-CoA und Isobutyryl-CoA wurden nicht als Substrat akzeptiert. Darüber hinaus wurde für die ACD aus *E. histolytica* die Umsetzung von Propionyl-CoA beschrieben (Reeves et al. 1977). Die ACD aus dem parasitären Protisten *G. lamblia* hingegen katalysiert nur die Säurebildung aus CoA-Estern und setzt neben Acetyl-CoA und Propionyl-CoA auch Succinyl-CoA um (Sanchez und Müller 1996).

In *E. histolytica* wird für die ACD auf Grund von Genomanalysen eine energiekonservierende Rolle im Kohlenhydratstoffwechsel und bei der Aminosäurefermentation diskutiert (Anderson und Loftus 2005b; Müller et al. 2012). Bei Wachstum auf Glucose wird über die Glykolyse gebildetes Pyruvat über eine Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (POR) zu Acetyl-CoA umgewandelt. Die ACD katalysiert die Bildung von Acetat aus Acetyl-CoA und generiert dabei ATP über Substratstufenphosphorylierung. Alternativ kann Acetyl-CoA in zwei Schrit-

ten über eine bifunktionelle Aldehyd/Alkohol-Dehydrogenase zu Ethanol abgebaut werden, um Redoxäquivalente zu regenerieren (Lo und Reeves 1978; Müller et al. 2012).

Für *E. histolytica* wurde unter anderem Wachstum auf den Aminosäuren Threonin, Leucin, Isoleucin, Methionin, Tryptophan, Aspartat und Serin nachgewiesen (Zuo und Coombs 1995). Die Metabolisierung von Leucin und Isoleucin führt in Eukaryoten zur Bildung von Propionyl-CoA und Acetyl-CoA (Berg et al. 2003). Bei der Fermentation der anderen Aminosäuren entstehen Pyruvat und 2-Oxobutanoat, die über die bifunktionelle POR zu Acetyl-CoA bzw. Propionyl-CoA aktiviert werden. Diese Substrate können von der ACD zu den korrespondierenden Säuren Acetat und Propionat umgewandelt werden. Dabei wird ATP über Substratstufenphosphorylierung generiert (Anderson und Loftus 2005a). Die Analyse der Substratspezifität der Eh-ACD deutet auf eine solche Rolle des Enzyms in *E. histolytica* hin. Anders als z. B. die ACIDI aus *P. furiosus*, kann die Eh-ACD dabei anscheinend keine Intermediate des Stoffwechsels von verzweigt-kettigen Aminosäuren, wie das Isovaleryl-CoA direkt zur Säure umwandeln, sondern muss diese bis zu Acetyl-CoA bzw. Propionyl-CoA abbauen.

### 6.3 ACD-Homologe in Bacteria

**ACD in *Chloroflexus aurantiacus*.** In allen Acetat bildenden Archaea findet die Acetatsynthese über die ACD statt, während die Acetatbildung in Bacteria in der Regel über zwei Enzyme, AK und PTA erfolgt. Daher wurde postuliert, dass die Synthese von Acetat in Archaea und Bacteria domänenspezifisch verläuft. (Schäfer et al. 1993). Für das Bakterium *Chloroflexus aurantiacus* wurde Acetatbildung aus verschiedenen Kohlenhydraten beschrieben (Krasil'nikova et al. 1986). In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine detaillierte Analyse der Acetatbildung aus Glucose und der daran beteiligten Enzyme in *C. aurantiacus* durchgeführt. In Wachstumsversuchen und Experimenten mit Zellsuspensionen wurde nachgewiesen, dass *C. aurantiacus* bei Wachstum auf Glucose pro Mol Glucose bis zu 1.2 Mol Acetat bildet. Darüber hinaus konnte zudem eine geringe Acetatbildung bei Wachstum auf Hefeextrakt und Casaminosäuren bestimmt werden. In Acetat bildenden Zellen konnte in Übereinstimmung mit den Genominformationen ACD-Aktivität, aber keine Aktivität von AK und PTA nachgewiesen werden. Die Aktivität der ACD in auf Glucose gewachsenen Zellen war dabei gegenüber auf Hefeextrakt gewachsenen Zellen 10fach induziert, was für eine Beteiligung der ACD am Glucoseabbau spricht. In den Zellsuspensionsexperimenten wurde zunächst eine schnelle Acetat-Bildung von ca. 1 mM sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von Glucose registriert. Anschließend stieg die Acetatkonzentration ohne Glucose nur

noch leicht an, während in Gegenwart von Glucose viermal mehr Acetat gebildet wurde. Der initiale Anstieg der Acetatkonzentration in beiden Ansätzen sowie die Bildung von Acetat ohne Glucose könnte auf die Metabolisierung von Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrat zurückzuführen sein, das von *C. aurantiacus* gebildet wird (Hanada und Pierson 2006).

Die ACD wurde aus auf Glucose gewachsenen Zellen von *C. aurantiacus* gereinigt und als kodierender ORF Caur\_3920 identifiziert. Darüber hinaus konnte über RT-Experimente Transkript des *acd*-Gens in Glucose gewachsenen Zellen nachgewiesen werden. Caur\_3920 wurde kloniert und heterolog in *E. coli* exprimiert. Die gereinigte rekombinante ACD wurde charakterisiert. Die Untereinheit der ACD aus *C. aurantiacus* hat eine Größe von 77 kDa. Das kodierende Gen stellt ähnlich den ACDs der Archaea *M. jannaschii* und *H. marismortui* eine Fusion der Homologen der ACD $\alpha$ - und ACD $\beta$ -Untereinheit aus *P. furiosus* dar. Die native Größe des rekombinanten Enzyms wurde mit 317 kDa bestimmt, was einer für ACDs bisher nicht beschriebenen homotetrameren Struktur entspricht. Das Substratspektrum und die kinetischen Parameter des thermophilen Enzyms ( $T_{opt} = 55\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) ähneln denen der ACIDI aus *P. furiosus* sowie den ACDs aus *H. marismortui* und *Archaeoglobus fulgidus* (AF1211), was für eine hauptsächliche Funktion der ACD bei der Fermentation von Kohlenhydraten spricht (Tabelle 19). Dies stimmt mit den Ergebnissen der Wachstums- und Suspensionsversuche überein.

**Tabelle 19 Substratspektrum und kinetische Parameter der ACD aus *C. aurantiacus* im Vergleich zu archaeellen ACDs.** Es sind die kinetischen Parameter und das Substratspektrum in Richtung Säurebildung und in Richtung Säureaktivierung für die ACD aus *C. aurantiacus*, *P. furiosus* (ACDI), *H. marismortui* und *A. fulgidus* (AF1211) angegeben. Angegeben sind die relativen Aktivitäten mit verschiedenen Säuren im Vergleich zu Acetat bzw. mit verschiedenen CoA-Estern im Vergleich zu Acetyl-CoA in Prozent (%) Aktivität. *C. aurantiacus*: 100 % = 50 U/mg (Acetat) bzw. 51 U/mg (Acetyl-CoA), *P. furiosus*: 100 % = 27 U/mg (Acetat) bzw. 65 U/mg (Acetyl-CoA), *H. marismortui*: 100 % = 40 U/mg (Acetat) bzw. 48 U/mg (Acetyl-CoA), *A. fulgidus* 70 U/mg (Acetat) bzw. 60 U/mg (Acetyl-CoA). n.m. = nicht messbar, n.b. = nicht bestimmt.

Substrat	<i>C. aurantiacus</i> <sup>1</sup>	<i>P. furiosus</i> <sup>2</sup>	<i>H. marismortui</i> <sup>3</sup>	<i>A. fulgidus</i> <sup>4</sup>
Relative Aktivität (%)				
Acetat	100	100	100	100
Isobutyrat	91	85	38	56
Indol-3-acetat	n.m.	n.m.	2	4
Phenylacetat	21	n.m.	3	8
Succinat	n.m.	n.m.	n.m.	9
Acetyl-CoA	100	100	100	100
Phenylacetyl-CoA	13	n.m.	1	n.m.
Isobutyryl-CoA	32	32	n.b.	n.b.
Km-Werte (mM) Säureaktivierung				
Acetat	0.90	1.1	1.7	0.34
ATP	0.57	0.48	0.38	0.133
HSCoA	0.02	0.018	0.06	0.027
Km-Werte (mM) Säurebildung				
Acetyl-CoA	0.037	0.025	0.41	0.01
ADP	0.09	0.15	0.02	0.01
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0	0.396	1.3	0.11

<sup>1</sup> Diese Arbeit

<sup>2</sup> Mai und Adams 1996

<sup>3</sup> Bräsen und Schönheit 2004

<sup>4</sup> Musfeldt und Schönheit 2001

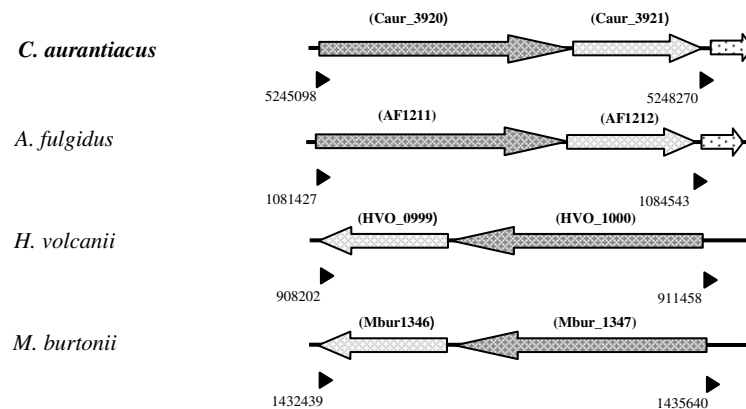
Mit der ACD aus *C. aurantiacus* konnte in dieser Arbeit erstmals eine funktionelle ACD in der Domäne der Bacteria nachgewiesen werden, die für die Bildung von Acetat aus Acetyl-CoA verantwortlich ist. Das Enzym übernimmt dort wahrscheinlich die Funktion der typischen bakteriellen Enzyme der Acetat-Bildung, AK und PTA. Dadurch ergäbe sich eine Art chimärer Stoffwechselweg des Glucoseabbaus zu Acetat, wobei der Abbau der Glucose zu Pyruvat dem - für Bacteria „klassischen“ - EM-Weg folgt und der Abbau des Acetyl-CoA zu Acetat über die „archaeelle“ ACD erfolgt. Die ACD würde damit das Fehlen von AK und PTA komplementieren.

Sequenzvergleiche in dieser Arbeit ergaben, dass es ACD-Homologe in allen Chloroflexacea und einigen Acetat bildenden syntrophen Organismen (z.B. *Pelotomaculum thermopropionicum* und *Syntrophus aciditrophicus*) gibt, die ebenfalls nicht über AK und PTA verfügen. Das Genom von *P. thermopropionicum* enthält dabei vier ACD-Homologe, die, wie die ACD aus

*C. aurantiacus*, eine fusionierte ACD-Untereinheit darstellen (PTH\_0490; PTH\_1507; PTH\_1750; PTH\_2237). Das Genom von *S. aciditrophicus* weist neun Homologe auf (McInerney et al. 2007). In dieser Arbeit durchgeführte Sequenzanalysen ergaben, dass es sich dabei um fünf fusionierte ACD-Untereinheiten (Syn\_00049; Syn\_00748; Syn\_01949; Syn\_02112; Syn\_02609) und um die beiden ORFs einer separat vorliegenden  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit (ACD $\alpha$ : Syn\_00647; ACD $\beta$ : Syn\_00646) handelt. ACDs aus getrennt vorliegenden Untereinheiten sind bislang nur für hyperthermophile und einige methanogene Archaea, z.B. *M. mazei* beschrieben (Glasemacher et al. 1997; Hovey et al. 2005 Shikata et al. 2007). Darüber hinaus finden sich zwei ACD-Homologe mit Proteinacetyltransferasedomäne (Syn\_02878 und Syn\_02607) im Genom von *S. aciditrophicus*. Diese Organismen könnten die ACDs über horizontalen Gentransfer aus Archaea in ihr Genom integriert haben, um das Fehlen von AK und PTA zu kompensieren. Dabei zeigte die ACD aus *C. aurantiacus* bei phylogenetischen Analysen die nächste Verwandtschaft zu ACD-Homologen in methanogenen und halophilen Euryarchaeota (Abbildung 40).

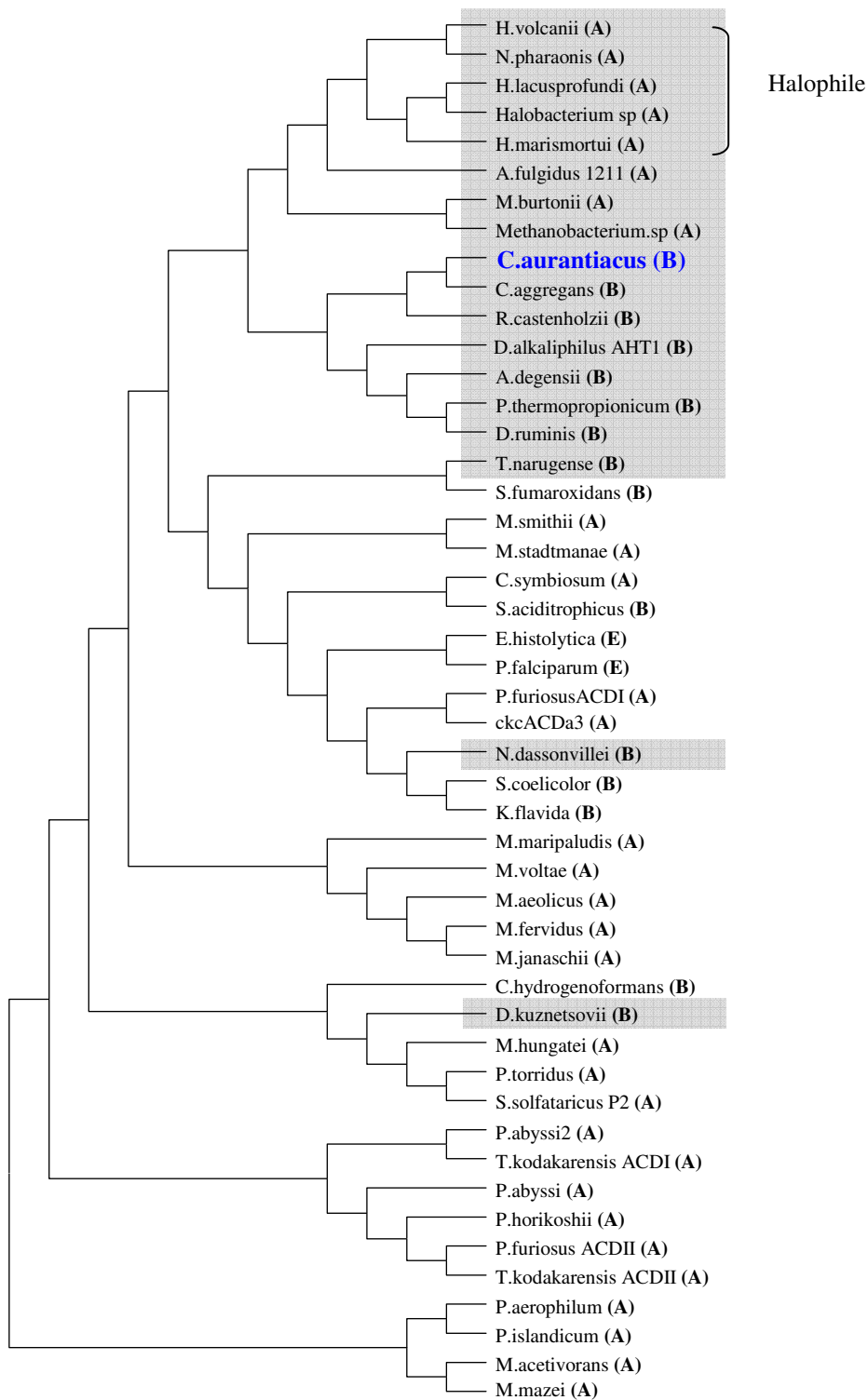
Anders als in den genannten syntrophen Bakterien, fanden sich im Genom von *Syntrophobacter fumaroxidans* sowohl die Gene für AK und PTA, als auch drei ACD-Homologe (Sfum\_1966, Sfum\_2466, Sfum\_0708) (Harmsen et al. 1998). Im Genom des nahe verwandten *Syntrophobacter wolnii* und in *Syntrophomonas wolfei* finden sich keine Gene für ACDs, wohl aber für AK und PTA (Sieber et al. 2010). Diese Ergebnisse zeigen, dass ACDs nicht ubiquitär in syntrophen Bakterien vorkommen.

In dieser Arbeit wurden Analysen der Genomumgebung von ACDs durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine Vielzahl von ACD-Homologen in Bacteria - darunter die ACD aus *C. aurantiacus* und alle vier ACD-Homologe in *P. thermopropionicum* - sowie in halophilen Archaea, einigen methanogenen Archaea und dem thermophilen Sulfatreduzierer *Archaeoglobus fulgidus* jeweils in direkter genomischer Nachbarschaft zu Homologen der N-terminalen Domäne einer PTA liegt (Abbildung 39). Diesem etwa 360 Aminosäuren langen Bereich wird in der PTA aus *E. coli* eine Funktion bei der Regulation der PTA durch metabolische Effektoren wie PEP oder NADH zugeschrieben (Campos-Bermudez et al. 2010). In dieser Arbeit konnte durch RT-PCR belegt werden, dass der für die ACD kodierende ORF Caur\_3920 und der zur NPTA-Domäne homologe ORF Caur\_3921 cotranskribiert werden. Die Funktion dieses Gens in *C. aurantiacus* ist nicht bekannt. Es bleibt zu untersuchen, ob die NPTA-Domäne ebenfalls eine regulatorische Funktion auf ACDs ausübt.



**Abbildung 39 Organisation der Gene für ACD und NPTA in *C. aurantiacus* und Archaea.** Vergleichende Darstellung der ACD und NPTA im Genom von *C. aurantiacus*, *A. fulgidus*, *H. volcanii* und *M. burtonii*. ACDs sind dunkelgrau, NPTAs hellgrau dargestellt; hell gemustert sind hypothetische Proteine. Es sind die ORF-Bezeichnungen angegeben. Die Zahlen an den Dreiecken geben die Basenposition auf dem Sensestrang der DNA an.

Die direkte genomische Nähe der Gene von ACD und NPTA-Domäne in den betreffenden Organismen spricht zusätzlich zu den phylogenetischen Analysen für einen lateralen Gentransfer von halophilen Archaea oder *A. fulgidus* zu *C. aurantiacus*. Die hypothetische ACD des psychrophilen methanogenen Archaeons *Methanococcoides burtonii* zeigt ebenfalls eine hohe phylogenetische Nähe zur ACD des thermophilen *C. aurantiacus* und ist auch mit einem NPTA-Homolog assoziiert (Abbildung 39 und Abbildung 40).



**Abbildung 40 Phylogenetische Verwandtschaft der ACD aus *C. aurantiacus* zu ACDs in Archaea, Bacteria und Eukarya.** Der Stammbaum wurde mit der Domäne 5 (Ligase-CoA) der jeweiligen ACDs berechnet. Der Baum wurde nach der Maximum Parsimony-Methode mit MEGA 5.1 erstellt. ACDs, deren benachbarter ORF ein Homolog der NPTA-Domäne ist, sind grau hinterlegt. (A) = Archaea, (B) = Bakterien, (E) = Eukarya, NCBI-Accession-Nummern der ACDs: *Amonifex degensii* YP\_003239642.1; *Archaeoglobus fulgidus*\_1211 NP\_070039.1; *Chloroflexus aggregans* ZP\_01517440.1; *C. aurantiacus* NC\_010175; *Carboxydotherrhus hydrogenoformans* YP\_359136.1; *Cenarchaeum symbiosum* YP\_874976.1; *Dethiobacter alkaliphilus*\_AHT1 ZP\_03735438.1; *Desulfotomaculum kuznetsovii* YP\_004516207.1; *Desulfotomaculum ruminis* YP\_004545274.1; *Entamoeba histolytica* XP\_656290.1; *Haloarcula lacusprofundi* ZP\_02015929.1; *Haloferax volcanii* YP\_003535057.1; *Kribbella flavida* YP\_003380024.1; *Korarchaeum* YP\_001736641.1; *Methanococcus aeolicus* YP\_001324239.1;



*Methanobacterium*. sp YP\_004290849.1; *Methanococcoides burtonii* YP\_566015.1; *Methanosarcina acetivorans* NP\_618061; *Methanothermobacter formicophilus* YP\_004004558.1; *Methanospirillum hungatei* YP\_502924.1; *Methanocaldococcus janaschii* NP\_247570.1; *Methanococcus maripaludis* YP\_001548749.1; *Methanosarcina mazei* Gö1 NP\_632382.1 *Methanosphaera stadtmanae* YP\_447950.1; *Methanobrevibacter smithii* YP\_001274044.1; *Methanococcus voltae* YP\_003707824.1; *Nocardiopsis dassonvillei* YP\_003682023.1; *Natronomonas pharaonis* YP\_327079.1; *Plasmodium falciparum* XP\_001348531.1; *Pyrococcus abyssi* NP\_126971.1; *Pyrococcus abyssi*2 NP\_127101.1; *P. furiosus*ACDI NP\_579269.1; *P. furiosus* ACDII NP\_578261.1; *Pyrococcus horikoshii* NP\_142703.1; *Pelotomaculum thermopropionicum* YP\_001212057.1; *Picrophilus torridus* YP\_023314.1; *Pyrobaculum aerophilum* NP\_560604; *Pyrobaculum islandicum* YP\_930005.1; *Roseiflexus castenholzii* YP\_001430231.1; *Syntrophus aciditrophicus* YP\_460839.1; *Streptomyces coelicolor* NP\_630661.1; *Sulfolobus solfataricus*\_P2 NP\_343212.1; *Thermococcus kodakaraensis* ACDI YP\_183078.1; *Thermococcus kodakaraensis* ACDII YP\_182552.1; *Thermodesulfobium narugense* YP\_004438172.1.

**PCS in *Ralstonia eutropha*.** Pimeloyl-CoA Synthetasen (PCS) katalysieren die Aktivierung von Pimelat zu Pimeloyl-CoA als ersten Schritt der Biotin-Biosynthese in einigen Bakterien und höheren Pflanzen oder bei Wachstum auf Pimelat (Izumi et al. 1974; Baldet et al. 1993; Gerbling et al. 1994). In einigen *Bacillus*-Arten wurden AMP-bildende PCS beschrieben, die 60 kDa große Homodimere bilden und denen eine Funktion bei der Biosynthese von Biotin zugeschrieben wird. Darüber hinaus wurde in zahlreichen anderen Bakterien, z.B. *Aerobacter aerogenes*, *E. coli* oder *Micrococcus roseus* PCS-Aktivität im Rohextrakt bestimmt (Izumi et al. 1974; Ploux et al. 1992). Demgegenüber wurde in *Pseudomonas mendocina* eine Pimeloyl-CoA Synthetase mit einer hohen Sequenzhomologie zu ADP-bildenden Acetyl-CoA Synthetasen identifiziert, die die Aktivierung von Pimelat bei Wachstum auf diesem Substrat katalysiert (Binieda et al. 1999). Weitere Daten zu diesen ACD-homologen Pimeloyl-CoA Synthetasen lagen aber bislang nicht vor.

Bei in dieser Arbeit durchgeführten Sequenzvergleichen konnten im Genom des Bakteriums *Ralstonia eutropha* sieben Homologe der PCS aus *P. mendocina* identifiziert werden. Die beiden Homologen mit der höchsten Identität wurden kloniert, heterolog in *E. coli* exprimiert, gereinigt und als RaPCS1 und RaPCS2 charakterisiert. Beide Enzyme bilden Homodimere aus ca. 75 kDa Untereinheiten. Die oligomere Struktur der PCS aus *P. mendocina* konnte nur ungenau auf eine Größe zwischen 200 und 400 kDa bestimmt werden, was eher auf eine homotetramere Struktur hindeutet (Binieda et al. 1999). Für beide Enzyme aus *R. eutropha* konnte die Umsetzung von Pimelat, ATP und HSCoA zu Pimeloyl-CoA mit dem PK/LDH-Test gemessen werden. Dabei wird in der PCS-Reaktion entstehendes ADP zusammen mit Phosphoenolpyruvat durch das Enzym Pyruvatkinase (PK) zu ATP und Pyruvat umgewandelt und anschließend das Pyruvat durch Lactatdehydrogenase (LDH) zu Lactat reduziert, wobei NADH oxidiert wird. Da die PK spezifisch für ADP ist und die Reaktion nicht mit AMP katalysiert, konnte damit erstmals eindeutig gezeigt werden, dass es sich bei den PCSs aus *R. eutropha* um ADP-bildende Enzyme handelt. Diese Ergebnisse und die hohe Sequenzähn-

lichkeit zu ACDs lassen darauf schließen, dass auch die PCS aus *P. mendocina* ein ADP-bildendes Enzym ist. Dies wurde bereit von Sanchez et al. (2000) postuliert, das bei der Charakterisierung der PCS verwendete Testsystem differenzierte jedoch nicht zwischen AMP und ADP (Binieda et al. 1999; Sanchez et al. 2000). Die in dieser Arbeit bestimmten  $K_m$ -Werte für Pimelat, ATP und HSCoA der beiden Enzyme aus *R. eutropha* sind sowohl mit den Werten für die ACD-homologe PCS aus *P. mendocina* als auch mit den Parametern der AMP-PCS aus *Bacillus sphaericus* vergleichbar (siehe Tabelle 19). Der  $V_{max}$ -Wert von RaPCS1 (9.5 U/mg) und RaPCS2 (11.5 U/mg) liegt 10fach über dem ermittelten  $V_{max}$ -Wert der PCS aus *B. sphaericus* (ca. 1 U/mg) aber 7-8fach unter dem für die PCS aus *P. mendocina* ermittelten Wert (77 U/mg). Die katalytische Effizienz ( $K_{cat}/K_m$ ) für Pimelat der an der Biotin-Synthese beteiligten AMP-PCS aus *B. sphaericus* ( $3 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) liegt deutlich unter der Effizienz von RaPCS1 ( $79 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) und RaPCS2 ( $44 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) sowie der PCS aus *P. mendocina* ( $196 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) (Ploux et al. 1992; Binieda et al. 1999).

**Tabelle 20 Vergleich der molekularen und kinetischen Parameter AMP- und ADP-bildender PCSs.** Es sind die Molekulargewichte, die kinetischen Parameter und die relativen Aktivitäten in Prozent mit den angegebenen Substraten für die PCS aus *B. sphaericus*, *P. mendocina* und *R. eutropha* aufgeführt. 100 % entsprechen: *B. sphaericus*: 1 U/mg, *P. mendocina*: 77 U/mg, RaPCS1: 9.5 U/mg, RaPCS2: 11.5 U/mg.

	AMP-bildende PCS	ADP-bildende PCS		
	<i>B. sphaericus</i> <sup>1</sup>	<i>P. mendocina</i> <sup>2</sup>	<i>R. eutropha</i> RaPCS1 <sup>3</sup>	<i>R. eutropha</i> RaPCS2 <sup>3</sup>
app. Molekulargewicht (kDa)				
Untereinheit	28	75	75	77
Natives Enzym	60	200-400	156	160
app. $K_m$ -Wert Pimelat (mM)				
	0.145	0.49	0.15	0.34
app. $V_{max}$ Pimelat (U/mg)				
	1	77	9.5	11.5
relative Aktivität (%)				
Pimelat	100	100	100	100
Adipat	2	72	71	16
Thioglycolat	n.b.	n.b.	48	4
Succinat	< 0.1	n.b.	8	n.m.
Isobutytrat	n.b.	n.b.	32	4
Butytrat	n.b.	n.b.	2	37

<sup>1</sup>Ploux et al. 1992

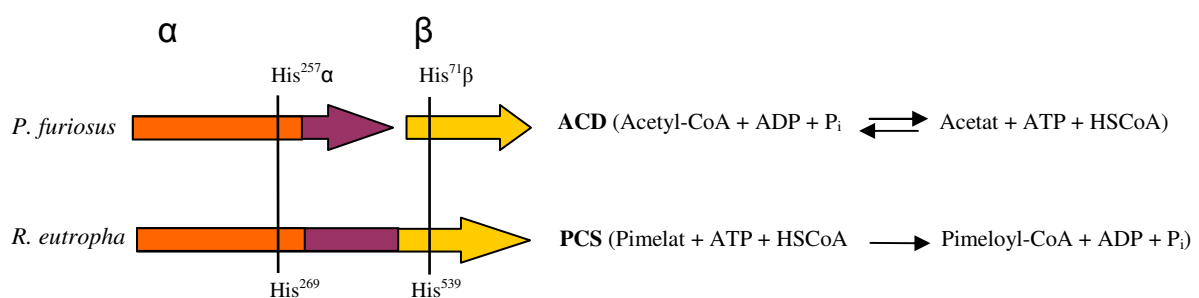
<sup>2</sup>Binieda et al. 1999

<sup>3</sup>diese Arbeit

Die AMP-PCS aus *B. sphaericus* ist hochspezifisch für Pimelat (Ploux et al. 1992). Demgegenüber katalysierte die PCS aus *P. mendocina* die Reaktion außer mit Pimelat (100 %) auch effizient mit Adipat (72 %) (Binieda et al. 1999). Die RaPCS1 aus *R. eutropha* zeigte im

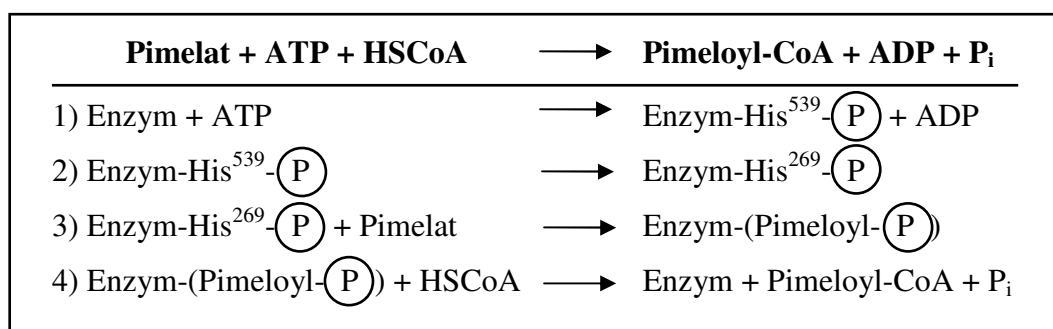
Gegensatz dazu ein wesentlich breiteres Substratspektrum (Tabelle 20). Anders als die RaPCS1, katalysierte die RaPCS2 die Reaktion neben Pimelat (100 %) nur mit Butyrat (37 %) effizient. Die Ergebnisse zeigen, dass sich PCS-Isoenzyme ähnlich wie bei ACDs im Substratspektrum unterscheiden. Neben RaPCS1 und RaPCS2 finden sich im Genom von *R. eutropha* noch vier weitere paraloge Gene. Die Funktion der unterschiedlichen putativen Isoenzyme bleibt noch zu klären. Auf Grund der hohen Spezifität und der niedrigen spezifischen Aktivität wird für die AMP-PCS aus *B. sphaericus* eine anabole Funktion bei der Aktivierung von Pimelat bei der Biotinbiosynthese diskutiert, während für die PCS aus *P. mendocina* eine katabole Funktion bei Wachstum auf Pimelat angenommen wird (Ploux et al. 1992; Binieda et al. 1999). Für *Pseudomonas spec.* ist ein Abbauweg für Pimelat über Pimeloyl-CoA zu Acetyl-CoA ähnlich der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren vorgeschlagen worden (Gallus and Schink 1994). Ein Abgleich mit den bei der „Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes“ (KEGG) verfügbaren Informationen ergab, dass im Genom von *R. eutropha* nicht alle Enzyme des genannten Abbauweges vorhanden sind (Kanehisa und Goto 2000; Kanehisa et al. 2012). Demgegenüber sind aber alle Gene zur Biotinbiosynthese aus Pimeloyl-CoA im Genom existent (Pohlmann et al. 2006). Demnach würden die PCSs in *R. eutropha* wahrscheinlich den ersten Schritt der Biotinbiosynthese katalysieren. Auf Grund der hohen Ähnlichkeit zu der PCS aus *P. mendocina* und der geringen Spezifität der RaPCS1 wäre auch eine Funktion dieses Enzyms für die Substrataktivierung bei Wachstum auf Pimelat vorstellbar, was jedoch noch experimentell zu belegen wäre.

**Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus der PCS.** In dieser Arbeit durchgeführte Sequenzvergleiche ergaben, dass RaPCS1 und RaPCS2 in ihrer Sequenz beide in ACDs katalytisch essentiellen Histidine aufweisen.



**Abbildung 41 Domänenorganisation und konservierte Histidine in der PCS und ACD.** PCS stellen fusionierte Homologe der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit der ACD aus *P. furiosus* dar. Die in ACD katalytisch essentiellen Histidine sind auch in PCS konserviert und an der PCS-Reaktion beteiligt. Die Nummerierung der Histidine gibt ihre Position in der Aminosäuresequenz der ACIDI aus *Pyrococcus furiosus* bzw. der RaPCS1 aus *Ralstonia eutropha* an. Zusätzlich ist die katalysierte Reaktion angegeben. Homologe Bereiche sind durch gleiche Farbgebung kenntlich gemacht. Farbgebung: orange = Domänen 1 und 2, gelb = Domänen 3 und 4 (ATP-graspfold), lila = Domäne 5 (Ligase-CoA).

Um zu prüfen, ob beide Histidine auch für die Reaktion der PCS essentiell sind, wurden zwei Proteinmutanten (RaPCS1H269A und RaPCS1H539A) durch ortsspezifische Mutagenese erstellt, bei denen jeweils ein Histidin gegen Alanin substituiert war. Die Ergebnisse zeigten einen totalen Aktivitätsverlust bei der RaPCS1H269A-Mutante und eine Restaktivität der RaPCS1H539A-Mutante von unter 1 %. Damit wurde erstmals eindeutig gezeigt, dass die beiden Histidine auch für die Säureaktivierung in PCS katalytisch essentiell sind. Auf Grund dieser Ergebnisse und der hohen Sequenzhomologie zu ACDs wird für die PCS analog zu ACDs der folgende vierstufige Reaktionsmechanismus postuliert:



Hierbei wird in Reaktion 1 zunächst ein Phosphorylrest von ATP auf das Histidin in Position 539 übertragen, das anschließend das Histidin<sup>269</sup> transient phosphoryliert (2). Von dort wird der Phosphorylrest im dritten Teilschritt (3) auf Enzym-gebundenes Pimelat übertragen. Abschließend wird in einer vierten Teilreaktion (4) das Enzym-gebundene Pimeloyl-Phosphat zu Pimeloyl-CoA umgewandelt und zusammen mit Phosphat freigesetzt.

**FCS in *Delftia acidovorans*.** Ferulat ist ein häufig vorkommendes Produkt bei der Biodegradation von Lignin und ein wichtiger Grundstoff für die technische Vanillinproduktion (Mathew und Abraham 2006). Feruloyl-CoA Synthetasen katalysieren die Aktivierung von Ferulat zu Feruloyl-CoA bei Wachstum auf Ferulat oder bei der Vanilin-Biosynthese und sind daher von großem biotechnologischen Interesse. Bislang wurde aber noch keine FCS biochemisch charakterisiert. Ähnlich den PCSs wurden bei FCSs bislang hauptsächlich AMP-bildende Enzyme - z. B. in *Pseudomonas sp.* HR199 oder *Amycolatopsis sp.* HR167 - beschrieben, die zur Familie der Adenylat bildenden Acyl-CoA Synthetasen gehören (Overhage et al. 1999; Achterholt et al. 2000). In *Delftia acidovorans* und später in *Sphingomonas paucimobilis* wurde hingegen je eine FCS identifiziert, die hohe Homologien zu der ACD-ähnlichen PCS aus *Pseudomonas mendocina* aufweisen und daher den ADP-bildenden Acyl-CoA Synthetasen zugeordnet wurden (Plaggenborg et al. 2001; Masai et al. 2002). Für die

FCS in *D. acidovorans* wurde durch Deletionsexperimente eine essentielle Beteiligung des Enzyms bei Wachstum auf Ferulat gezeigt (Plaggenborg et al. 2001). In dieser Arbeit wurde die FCS aus *D. acidovorans* heterolog in *E. coli* exprimiert, gereinigt und detailliert biochemisch charakterisiert. Bei einem Sequenzvergleich des klonierten Gens mit der annotierten Sequenz des *fcs*-Gens aus *D. acidovorans* wurden in mehrfach unabhängig reproduzierten Amplifikationen mehrere Sequenzunterschiede festgestellt, die insgesamt in der abgeleiteten Aminosäuresequenz zu 3 Insertionen und 48 Aminosäuremutationen führten. Ein Alignment beider Sequenzen ist im Anhang aufgeführt (Abbildung A2). Die abgeleitete Sequenz war zu 93 % identisch mit der annotierten Sequenz. Bei BLAST-P-Suchen (Altschul et al. 1990) mit der mutierten Aminosäuresequenz konnte auch keine 100%ige Übereinstimmung mit einer anderen Sequenz gefunden werden. Die Ursache für die Mutation konnte nicht abschließend geklärt werden.

Bei dem rekombinanten Enzym handelt es sich um ein 170 kDa großes Homodimer aus 77 kDa Untereinheiten, das mit hoher Affinität ( $K_m$ -Wert für Ferulat = 4  $\mu$ M) Ferulat HSCoA- und ATP-abhängig mit einer spezifischen Aktivität von 12 U/mg zu Feruloyl-CoA aktiviert und dabei ADP und  $P_i$  bildet. Dabei zeigte das Enzym eine hohe Spezifität für Ferulat. Außer Ferulat wurde nur mit geringer Effizienz Butyrat (1.5 U/mg), Adipat (0.8 U/mg) und Pimelat (0.5 U/mg) umgesetzt andere Arylsäuren wurden hingegen nicht akzeptiert. Für die FCS aus *S. paucimobilis* wurde dagegen die effiziente Umsetzung der Arylsäuren Kaffeesäure, Sinapinsäure und Coumarinsäure beschrieben (Masai et al. 2002). In der vorliegenden Arbeit konnte damit erstmals eine ADP-bildende FCS charakterisiert werden.

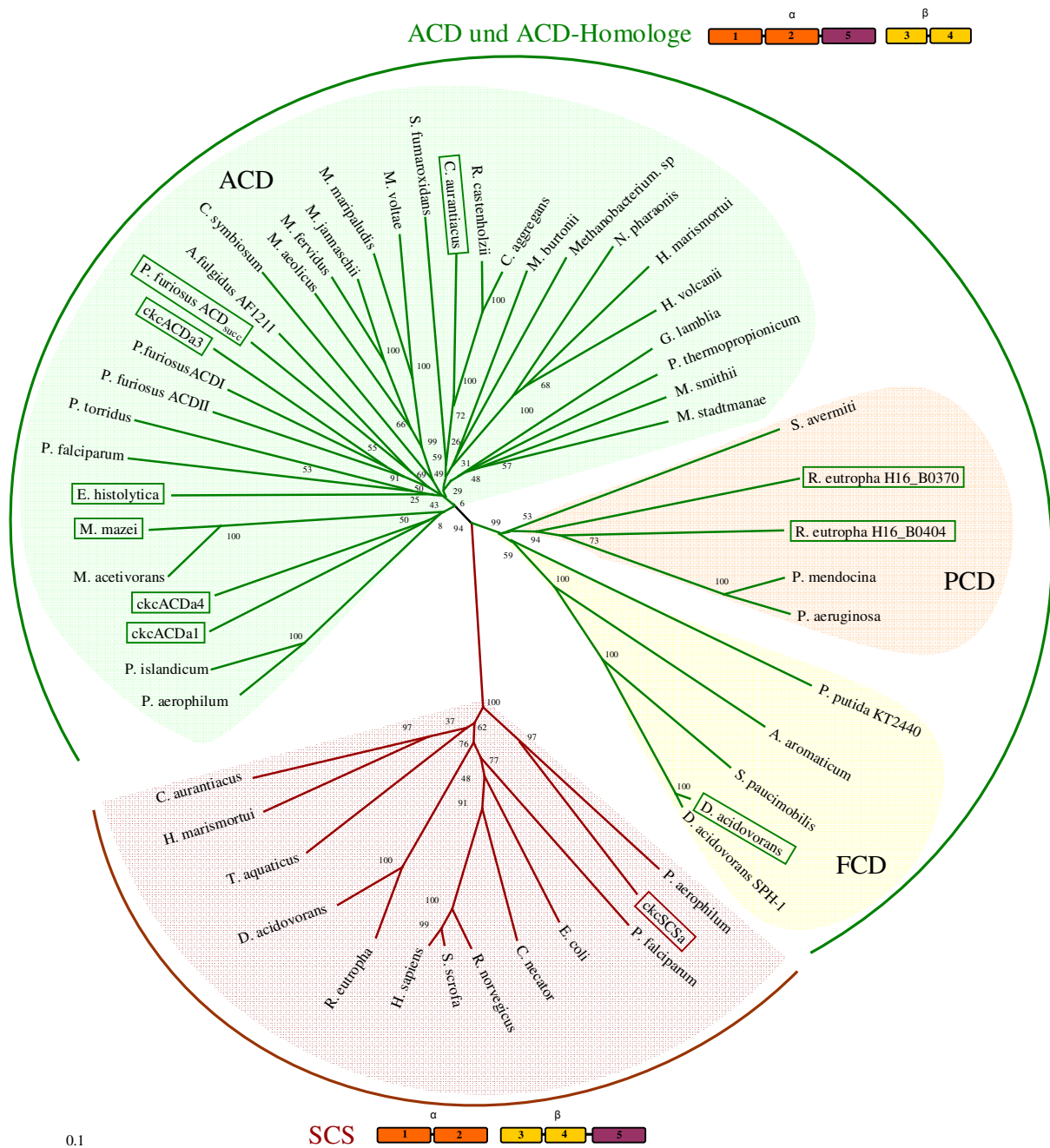
In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass ACD-homologe FCSs und PCSs ADP-bildende Enzyme sind. Zur besseren Unterscheidung von AMP- und ADP-bildenden PCSs und FCSs wird in Anlehnung an die Terminologie der ACDs vorgeschlagen, die Bezeichnung PCD (Pimeloyl-CoA Synthetase, ADP-bildend) und FCD (Feruloyl-CoA Synthetase, ADP-bildend) einzuführen.

### **Phylogenetische Untersuchungen zu ADP-bildenden Acyl-CoA Synthetasen.**

Die zehn in dieser Arbeit charakterisierten ACD-Homologen (ACD, PCD, FCD) und die SCS aus *Ca. K. cryptophilum* wurden bezüglich ihrer evolutionären Verwandtschaft zu ACDs und ACD-Homologen sowie SCSs aus Archaea, Bacteria und Eukarya untersucht. Die phylogenetischen Analysen wurden dabei mit den Domänen 1 und 2 der jeweiligen  $\alpha$ -Untereinheit der ACD-Homologen und SCSs durchgeführt und der Stammbaum mit Hilfe der Neighbor-

Joining-Methode erstellt. Im daraus resultierenden Dendrogramm lassen sich SCSs deutlich von ACD-Homologen differenzieren (Abbildung 42). Bei Aminosäuresequenzvergleichen der Domänen 1 und 2, die der SCS $\alpha$ -Untereinheit entsprechen, zeigen SCS-Sequenzen nur geringe Identitäten von 12 – 16 % zu FCD und PCD-Sequenzen und maximal 20 % zu ACDs. Dem gegenüber sind SCS untereinander 42 – 80 % identisch. Der geringe Grad an Identität spiegelt indirekt die gravierenden Unterschiede zwischen SCS und ACD-Homologen – also ACD, PCD und FCD – in Bezug auf den Reaktionsmechanismus, die Substratspezifität und die Organisation der Domänen wieder. Während bei Succinyl-CoA Synthetasen die Domäne 5 (Ligase-CoA) C-terminal an die Domäne 4 der ATP-graspfold gebunden ist, ist sie bei ACD, PCD und FCD C-terminal an die Domäne 2, einer weiteren Ligase-CoA Domäne, gebunden. Außerdem sind SCSs hinsichtlich ihres Substratspektrums viel spezifischer als dies in der Regel bei ACDs der Fall ist. Zusätzlich wird für SCSs ein dreistufiger Reaktionsmechanismus angenommen, während für ACDs ein vierstufiger Mechanismus gezeigt wurde. In dieser Arbeit durchgeführte Untersuchungen deuten darauf hin, dass in PCDs die Reaktion nach einem ähnlichen Schema wie in ACDs abläuft (siehe S.120).

Innerhalb der ACD-Homologen bilden PCD und FCD eine distinkte phylogenetische Gruppe, sind aber mit ACDs 25 – 30 % identisch (Abbildung 42). Dies ist in Übereinstimmung damit, dass PCDs und FCDs als sehr spezifische, säureaktivierende Enzyme eine vollständig andere Funktion als ACDs haben, die *in vivo* Säuren bilden und in der Regel ein breites Substratspektrum aufweisen. PCD- und FCD-Sequenzen bilden ebenfalls in sich eigenständige Gruppen, sind jedoch zu 35 % identisch und weisen zu ca. 50 % konservierte Bereiche auf. ACDs können im phylogenetischen Stammbaum weder nach Phylum noch nach Funktion voneinander unterschieden werden. Die Bootstrap-Werte an den unteren Verzweigungen der ACD-Gruppe im Dendrogramm haben nur eine geringe Signifikanz (6 – 50 %), sodass diese Verzweigungen wenig robust erscheinen. Auch innerhalb einer Art können verschiedene Isoenzyme an unterschiedlichen Positionen im Stammbaum liegen. So zeigt die ckcACD3 die größte verwandtschaftliche Nähe zur ACIDI aus *P. furiosus* während ckcACD1 und ckcACD4 eine geringere phylogenetische Distanz zum crenarchaeellen *Pyrobaculum* aufweisen. Daher können aus der Position zu bereits charakterisierten ACDs keine Hinweise über die Funktion oder das Substratspektrum unbekannter ACDs abgeleitet werden. Die Sequenzen halophiler Archaea bilden einen gemeinsamen Ast, was in der Anpassung der Aminosäuresequenz an hohe Salzkonzentrationen begründet sein könnte.



**Abbildung 42 Phylogenetischer Stammbaum zur Verwandtschaft von ACD, PCD, FCD und SCS aus Archaea, Bacteria und Eukarya.** Der Stammbaum wurde mit Sequenzen der Domäne 1 und Domäne 2 der  $\alpha$ -Untereinheiten mit der Neighbor-Joining Methode erstellt. Das Bootstrapping-Verfahren umfasste eintausend Wiederholungen. Farbgebung: grüne Äste: ACDs und ACD-Homologe (Domänenorganisation 1-2-5-3-4), rote Äste: SCS (Domänenorganisation 1-2-3-4-5). ACDs sind grün, PCDs sind rosa, FCDs gelb und SCSs rot unterlegt. Die Zahlen an den Knotenpunkten entsprechen den Bootstrap-Werten in Prozent (%). In dieser Arbeit charakterisierte Acyl-CoA Synthetasen sind farbig umrahmt. Accession-Nummern: **ACDs:** *Archaeoglobus fulgidus*\_1211 NP\_070039.1; *Chloroflexus aggregans* ZP\_01517440.1; *C. aurantiacus* NC\_010175; *Cenarchaeum symbiosum* YP\_874976.1; *E. histolytica* XP\_656290.1; *Giardia lamblia* XP\_001705744.1; *Haloarcula marismortui* YP\_135572.1; *Haloferax volcanii* YP\_003535057.1; ckcACD1 YP\_001736473.1; ckcACD3 YP\_001736641.1; ckcACD4 YP\_001737567.1; *Methanococcus aeolicus* YP\_001324239.1; *Methanosarcina acetivorans* NP\_618061.1; *Methanobacterium. sp* YP\_004290849.1; *Methanococcoides burtonii* YP\_566015.1; *Methanothermus fervidus* YP\_004004558.1; *Methanocaldococcus jannaschii* NP\_247570.1; *Methanococcus maripaludis* YP\_001548749.1; *Methanosarcina mazei* NP\_632382.1; *Methanosphaera stadtmanae* YP\_447950.1; *Methanobrevibacter smithii* YP\_001274044.1; *Methanococcus voltae* YP\_003707824.1; *Natronomonas pharaonis* YP\_327079.1; *Pyrobaculum aerophilum* NP\_560604.1; *Plasmodi-*

*um falciparum* XP\_001348531.1; *P. furiosus* ACDI NP\_579269.1; *P. furiosus* ACDII NP\_578261; *P. furiosus* ACD<sub>succ</sub> NP\_577962.1; *Pyrobaculum islandicum* YP\_930005.1; *Pelotomaculum thermopropionicum* YP\_001212057.1; *Picrophilus torridus* YP\_023314.1; *Syntrophobacter fumaroxidans* YP\_846581.1; *Roseiflexus castenholzii* YP\_001430231.1; **SCS:** *C. aurantiacus* YP\_001634330.1; ckcSCS YP\_001737822.1; *Cupriavidus necator* ZP\_16184911.1; *Delftia acidovorans* YP\_001561899.1; *E. coli* YP\_002400553.1; *H. marismortui* YP\_135205.1; *Homo sapiens* NP\_003840.2; *P. aerophilum* NP\_559922.1; *P. falciparum* XP\_001347772.2; *Ralstonia eutropha* YP\_725065.1; *Rattus norvegicus* AAA41233.1; *Sus scrofa* 2FPG; *Thermus aquaticus* ZP\_03497170.1; **PCD:** *Pseudomonas aeruginosa* YP\_001349720.1; *Pseudomonas mendocina* CAA10043.1; *R. eutropha* H16\_B0370 YP\_728535.1; *R. eutropha* H16\_B0404 YP\_728568.1; *Streptomyces avermiti* NP\_825005.1; **FCD:** *Aromatoleum aromaticum* YP\_160221.1; *D. acidovorans* CAC83622.1; *D. acidovorans* SPH-1\_Daci2760 YP\_001563782.1; *Pseudomonas putida* NP\_745856.1; *Sphingomonas paucimobilis* BAB86294.1.

## 6.4 Funktion von ACD-Homologen in den drei Domänen des Lebens

Zusammenfassend lassen sich aus den in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnissen und den bereits verfügbaren Informationen die folgenden Funktionen von ACD-Homologen in Archaea, Eukarya und Bacteria ableiten (siehe auch Abbildung 43):

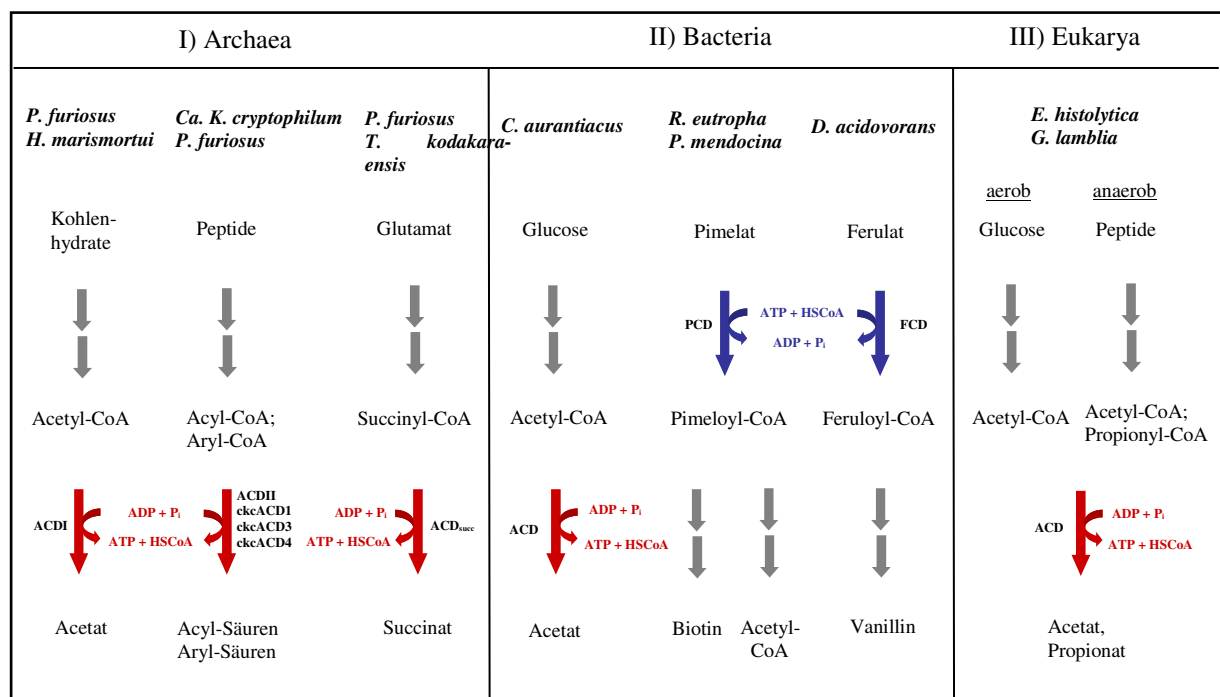
In der Domäne der Archaea katalysieren ACDs die Säurebildung aus unverzweigten und verzweigten Acyl-CoA Estern wie Acetyl-CoA, Propionyl-CoA, Butyryl-CoA oder Isobutyryl-CoA und Isovaleryl-CoA sowie aus Aryl-CoA Estern wie Phenylacetyl-CoA, Indol-3-acetyl-CoA, Imidazol-4-acetyl-CoA und 4-Hydroxypropionyl-CoA, als letzten Schritt bei Wachstum auf Kohlenhydraten oder Peptiden. Dabei wird Energie in Form von ATP über Substratstufenphosphorylierung gewonnen. Zusätzlich wurde in *Thermococcales* eine ACD gefunden, die die Funktion einer Succinyl-CoA Synthetase z. B. bei der Metabolisierung von Glutamat übernimmt. In dem halophilen Archaeon *Haloarcula marismortui* wurde eine Induktion der ACD bei Wachstum auf Glucose gezeigt und eine Funktion als „Overflowmechanismus“ bei hohen glykolytischen Flussraten postuliert (Bräsen and Schönheit 2004a; Bräsen and Schönheit 2004b).

Ähnlich wie in Archaea sind ACDs in den eukaryotischen Protisten *E. histolytica* und *G. lamblia* an der Säurebildung und Energiegewinnung bei Wachstum auf Glucose und Peptiden beteiligt. Bei der Fermentation von Peptiden und Glucose entstehendes Acetyl-CoA und Propionyl-CoA wird hierbei über eine ACD in Acetat und Propionat umgewandelt, wobei ATP entsteht (Müller et al. 2012). Die in dieser Arbeit charakterisierte ACD aus *E. histolytica* setzte Acetyl-CoA bzw. Acetat und Propionat effizient um, was in Übereinstimmung mit der postulierten Funktion ist. Bisher sind keine ACD-Homologen bekannt, die in Eukaryoten *in vivo* der Säureaktivierung dienen.

Für die Domäne der Bacteria konnte in dieser Arbeit erstmals ein ACD-Homolog in *C. aurantiacus* gezeigt werden, das eine zur ACDI aus *P. furiosus* analoge Funktion bei der



Acetatbildung aus Glucose übernimmt. Zusätzlich finden sich in Bacteria die ACD-Homologen PCD und FCD, die *in vivo* ATP- und HSCoA-abhängig die Aktivierung von Pimelat und Ferulat zu Pimeloyl-CoA und Feruloyl-CoA unter Bildung von ADP und  $P_i$  katalysieren. Dies ist der erste Fall, in dem ACD-Homologe *in vivo* an der Aktivierung von spezifischen Säuren zu den korrespondierenden CoA-Estern beteiligt sind. In der Regel verläuft die Aktivierung von Säuren über AMP-bildende Acyl-CoA Synthetasen, die zur Familie der Adenylat bildenden Enzyme gehören, wie z.B. im Fall von Acetat die Acetyl-CoA Synthetase (ACS) (Starai und Escalante-Semerena 2004a). Für ACDs konnte bisher noch keine Funktion bei der Säureaktivierung gezeigt werden. Interessanterweise gibt es demgegenüber für die Aktivierung von Pimelat und Ferulat sowohl AMP bildende Enzyme als auch – wie in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt – ADP bildende Enzyme. Die Verwendung analoger Enzyme für eine vergleichbare biochemische Reaktion (z. B. die Säureaktivierung) ist in Mikroorganismen weit verbreitet (Galperin et al. 1998). Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob auch ACDs *in vivo* an der Säureaktivierung beteiligt sind. Abbildung 43 zeigt schematisch die unterschiedlichen Funktionen von ACD-Homologen in den drei Domänen des Lebens.



**Abbildung 43 Schematische Darstellung der postulierten Funktion von ACD-Homologen in Archaea, Bacteria und Eukarya.** Es sind vereinfacht die Stoffwechselwege dargestellt, in denen ACD-Homologe implementiert sind. Reaktionen von ACD-Homologen sind farbig dargestellt. Rot: Säurebildung (ACD); Blau: Säureaktivierung (PCD; FCD). **I) ACDs in Archaea:** In *P. furiosus* katalysiert die ACDI hauptsächlich die Umsetzung von Acetyl-CoA zu Acetat im Rahmen der Kohlenhydratfermentation (Mai und Adams 1996). Ein homologes Enzym mit ähnlicher Funktion ist auch für *H. marismortui* beschrieben (Bräsen und Schönheit 2004). Zusätzlich sind ACD-Isoenzyme an der Bildung von Acylsäuren ( $C_2$ - $C_4$  Carbonsäuren und verzweigte Verbindungen wie Isobutyrat, 2-Methylbutyrat und Isovalerat) und Arylsäuren. (Phenylacetat, Indol-3-acetat-, Imidazol-4-acetat und 4-Hydroxypropionat) aus den korrespondierenden Acyl- und Aryl-CoA Estern im Rahmen der

Peptidfermentation beteiligt Eine derartige Funktion ist für die ACDII aus *P. furiosus* gezeigt und wird auf Grund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit für die ACDs aus *Ca. K. cryptophilum* (ckcACD1, ckcACD3 und ckcACD4) angenommen (Mai und Adams 1996; diese Arbeit). Für *P. furiosus* und *T. kodakaraensis* wurde zusätzlich ein ACD-Isoenzym gefunden, das dort die Funktion der fehlenden SCS übernimmt und vermutlich die Umsetzung von Succinyl-CoA zu Succinat beim Abbau von Glutamat katalysiert (Shikata et al. 2007; diese Arbeit). **II) ACD-Homologe in Bacteria:** Für *C. aurantiacus* konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine ACD die Bildung von Acetat aus Acetyl-CoA beim Abbau von Glucose katalysiert. Zusätzlich gibt es in Bacteria ACD-Homologe - PCD und FCD - die *in vivo* die Säureaktivierung unter ATP-Verbrauch katalysieren. PCDs katalysieren die Aktivierung von Pimelat zu Pimeloyl-CoA. Pimeloyl-CoA kann dann entweder zur Biotin-Biosynthese verwendet werden, oder wird - z.B. in Pseudomonaden - zu Acetyl-CoA abgebaut (Binieda et al. 1999, Gallus und Schink 1994). In *D. acidovorans* wird Ferulat über eine FCD zu Feruloyl-CoA aktiviert. Feruloyl-CoA wird anschließend über Vanillin zu Protocatechuinsäure abgebaut (Plaggenborg et al. 2001). **III) ACDs in Eukarya:** In den Acetat bildenden Eukaryoten *E. histolytica* und *G. lamblia* katalysiert eine ACD die Umsetzung von Acetyl-CoA und Propionyl-CoA zu Acetat bzw. Propionat im Rahmen des Glucoseabbaus und der Peptidfermentation. Dabei wird ATP über Substratstufenphosphorylierung generiert (Müller et al. 2001).

## 7 Literaturverzeichnis

- Achterholt,S., Priefert,H. and Steinbüchel,A. (2000) Identification of *Amycolatopsis* sp. strain HR167 genes, involved in the bioconversion of ferulic acid to vanillin. *Appl. Microbiol Biotechnol.* **54**, 799-807.
- Adl,S.M., Simpson,A.G.B., Farmer,M.A., Andersen,R.A., Andersen,O.R., Barta,J.R., Bowser,S.S., Brugerolle,G., Fensome,R.A., Fredericq,S., James,T.Y., Karpov,S., Kugrens,P., Krug,J., Lane,C.E., Lewis,L.A., Lodge,J., Lynn,D.H., Mann,D.G., Mccourt,R.M., Mendoza,L., Moestrup,O., Mozley-Standridge,S.E., Nerad,T.A., Shearer,C.A., Smirnov,A.V., Spiegel,F.W. and Taylor,M.F.J.R. (2005) The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **52**, 399-451.
- Altschul,S.F., Gish,W., Miller,W., Myers,E.W. and Lipman,D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.
- Anderson,I.J. and Loftus,B.J. (2005b) *Entamoeba histolytica*: observations on metabolism based on the genome sequence. *Exp. Parasitol.* **110**, 173-177.
- Anderson,I.J. and Loftus,B.J. (2005a) *Entamoeba histolytica*: observations on metabolism based on the genome sequence. *Exp. Parasitol.* **110**, 173-177.
- Andreotti,G., Cubellis,M.V., Nitti,G., Sannia,G., Mai,X., Adams,M.W. and Marino,G. (1995) An extremely thermostable aromatic aminotransferase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Biochim. Biophys. Acta* **1247**, 90-96.
- Aoshima,M., Ishii,M. and Igarashi,Y. (2004) A novel enzyme, citryl-CoA synthetase, catalysing the first step of the citrate cleavage reaction in *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. *Mol. Microbiol* **52**, 751-761.
- Auchtung,T.A., Takacs-Vesbach,C.D. and Cavanaugh,C.M. (2006) 16S rRNA phylogenetic investigation of the candidate division "Korarchaeota". *Appl. Environ. Microbiol* **72**, 5077-5082.
- Baldet, P., Gerbling, H., Axiotis, S. and Douce, R. (1993) Biotin biosynthesis in higher plant cells. pp. 479-485.
- Barry,R.J. and Dunaway Mariano,D. (1987) The kinetic mechanism of yeast inorganic pyrophosphatase. *Arch. Biochem. Biophys.* **259**, 196-203.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L. and Stryer, L. (2003) Proteinumsatz und Aminosäurekatabolismus. In *Biochemie* pp. 703-707.
- Binieda,A., Fuhrmann,M., Lehner,B., Rey-Berthod,C., Frutiger-Hughes,S., Hughes,G. and Shaw,N.M. (1999) Purification, characterization, DNA sequence and cloning of a pimeloyl- CoA synthetase from *Pseudomonas mendocina* 35. *Biochem. J.* **340**, 793-801.

- Blamey, J.M. and Adams, M.W.W. (1993) Purification and characterization of pyruvate ferredoxin oxidoreductase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Biochim. Biophys. Acta* **1161**, 19-27.
- Bode, C., Goebell, H. and Stähler, 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.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Bräsen, C., Schmidt, M., Grötzinger, J. and Schönheit, P. (2008) Reaction Mechanism and Structural model of ADP-forming Acetyl-CoA Synthetase from Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus*. In *Evidence for a second active site histidine residue* pp. 15409-15418.
- Bräsen, C. and Schönheit, P. (2004a) Regulation of acetate and acetyl-CoA converting enzymes during growth on acetate and/or glucose in the halophilic archaeon *Haloarcula marismortui*. *FEMS Microbiol Lett* **241**, 21-26.
- Bräsen, C. and Schönheit, P. (2004b) Unusual ADP-forming acetyl-coenzyme A synthetases from the mesophilic halophilic euryarchaeon *Haloarcula marismortui* and from the hyperthermophilic crenarchaeon *Pyrobaculum aerophilum*. *Arch Microbiol* **182**, 277-287.
- Brondijk, T.H., Durand, R., van der, G.M., Gottschal, J.C., Prins, R.A. and Fevre, M. (1996) *scsB*, a cDNA encoding the hydrogenosomal  $\beta$  subunit of succinyl-CoA synthetase from the anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. *Mol. Gen. Genet.* **253**, 315-323.
- Campos-Bermudez, V.A., Bologna, F.P., Andreo, C.S. and Drincovich, M.F. (2010) Functional dissection of *Escherichia coli* phosphotransacetylase structural domains and analysis of key compounds involved in activity regulation. *FEBS J* **277**, 1957-1966.
- Danson, M.J., Black, S.C., Woodland, D.L. and Wood, P.A. (1985) Citric acid cycle enzymes of the archaeobacteria: citrate synthase and succinate thiokinase. *FEBS Letters* **179**, 120-124.
- de Souza, S.J., Long, M., Schoenbach, L., Roy, S.W. and Gilbert, W. (1996) Intron positions correlate with module boundaries in ancient proteins [published erratum appears in *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997 Feb 18;94(4):1603]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 14632-14636.
- Dorn, M., Andreesen, J.R. and Gottschalk, G. (1978) Fermentation of fumarate and L-malate by *Clostridium formicoaceticum*. *J. Bacteriol.* **133**, 26-32.
- Elkins, J.G., Podar, M., Graham, D.E., Makarova, K.S., Wolf, Y., Randau, L., Hedlund, B.P., Brochier-Armanet, C., Kunin, V., Anderson, I., Lapidus, A., Goltsman, E., Barry, K., Koonin, E.V., Hugenholtz, P., Kyrpides, N., Wanner, G., Richardson, P., Keller, M. and Stetter, K.O. (2008) A korarchaeal genome reveals insights into the evolution of the Archaea. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **105**, 8102-8107.

- Farhoud, M.H., Wessels, H.J., Steenbakkens, P.J., Mattijssen, S., Wevers, R.A., van Engelen, B.G., Jetten, M.S., Smeitink, J.A., van den Heuvel, L.P. and Keltjens, J.T. (2005) Protein complexes in the archaeon *Methanothermobacter thermoautotrophicus* analyzed by blue native/SDS-PAGE and mass spectrometry. *Mol. Cell Proteomics* **4**, 1653-1663.
- Ferry, J.G. (1999) Enzymology of one-carbon metabolism in methanogenic pathways. *FEMS Microbiol. Rev.* **23**, 13-38.
- Field, J., Rosenthal, B. and Samuelson, J. (2000) Early lateral transfer of genes encoding malic enzyme, acetyl-CoA synthetase and alcohol dehydrogenases from anaerobic prokaryotes to *Entamoeba histolytica*. *Molecular Microbiology* **38**, 446-455.
- Fraser, M.E., Joyce, M.A., Ryan, D.G. and Wolodko, W.T. (2002) Two glutamate residues, Glu 208  $\alpha$  and Glu 197  $\beta$ , are crucial for phosphorylation and dephosphorylation of the active-site histidine residue in succinyl-CoA synthetase. *Biochemistry* **41**, 537-546.
- Gallus, C. and Schink, B. (1994) Anaerobic degradation of pimelate by newly isolated denitrifying bacteria. pp. 409-416.
- Galperin, M. Y., Walker, D. R. and Kooter, I. M. (1998) Analogous Enzymes: Independent Inventions in Enzyme Evolution. pp. 779-790.
- Gerbling, H., Axiotis, S. and Douce, R. (1994) A new Acyl-CoA Synthetase, Located in Higher Plant Cytosol. pp. 561-564.
- Gibson, J., Upper, C.D. and Gunsalus, I.C. (1967) Succinyl coenzyme A synthetase from *Escherichia coli*. I. Purification and properties. *J Biol. Chem.* **242**, 2474-2477.
- Glasemacher, J., Bock, A.-K., Schmid, R. and 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*. *European Journal of Biochemistry* **244**, 561-567.
- Gross, G.G. (2008) From lignins to tannins: Forty years of enzyme studies on biosynthesis of phenolic compounds. *Phytochemistry* **69**, 3018-3031.
- Hall, T. A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. pp. 95-98.
- Hanada, S. and Pierson, B.K. (2006) The family *Chloroflexaceae*. *Prokaryotes* **7**, 815-842.
- Hanson, R.S. and Hanson, T.E. (1996) Methanotrophic Bacteria. *Microbiol. Rev.* **60**, 439-471.
- Harmsen, H. J. M., van Kuijk, B. L. M., Plugge, C. M., Akkermans, A. D. L., De Vos, W. M. and Stams, A. J. M. (1998) *Syntrophobacter fumaroxidans* sp. nov., a syntrophic propionate-degrading sulfate-reducing bacterium. pp. 1383-1387.
- Heider, J., Ma, K. and Adams, M.W.W. (1995) Purification, characterization, and metabolic function of tungsten-containing aldehyde ferredoxin oxidoreductase from the hyperthermophilic and proteolytic archaeon *Thermococcus* strain ES-1. *J. Bacteriol.* **177**, 4757-4764.

- Hovey,R., Lenten,S., Ehrenreich,A., Salmon,K., Saba,K., Gottschalk,G., Gunsalus,R.P. and Deppenmeier,U. (2005) DNA microarray analysis of *Methanosarcina mazei* Go1 reveals adaptation to different methanogenic substrates. *Mol. Genet. Genomics* **273**, 225-239.
- Izumi, Y., Morita, H., Tani, Y. and Ogata, K. (1974) The pimeloyl-CoA synthetase responsible for the first step in biotin biosynthesis by microorganisms. pp. 2257-2262.
- Joyce,M.A., Fraser,M.E., James,M.N., Bridger,W.A. and Wolodko,W.T. (2000) ADP-binding site of *Escherichia coli* succinyl-CoA synthetase revealed by x-ray crystallography. *Biochemistry* **39**, 17-25.
- Kanehisa, M. and Goto, S. (2000) KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. pp. 27-30.
- Kanehisa, M., oto, S., ato, Y., urumichi, M. and anabe, M. (2012) KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular datasets. pp. 109-114.
- Kaufman, S. and Alivisatos, S.G. (1955) Purification and properties of the phosphorylating enzyme from spinach. *J Biol. Chem.* **216**, 141-152.
- Kondo, H., Ohmori, T., Shibata, H., Sase, K., Takahashi, R. and Tokuyama, T. (1995) Thermostable Succinyl-Coenzyme A Synthetase from *Nitrosomonas europaea* ATCC 25978: Purification and Properties. pp. 499-502.
- Krasil'nikova,E.N., Keppen,O.I., Gorlenko,V.M. and Kondrat'eva,E.N. (1986) Growth of *Chloroflexus aurantiacus* on media with different organic compounds and pathways of their metabolism. *Microbiology* **55**, 325-329.
- Krasil'nikova,E.N. and Kondrat'eva,E.N. (1987) Growth of *Chloroflexus aurantiacus* under anerobic conditions in the dark and the metabolism of organic substrates. *Microbiology* **56**, 281-285.
- Kunst, A., Draeger, B. and Ziegenhorn, J. (1986) D-Glucose. In *Methods of Enzymatic Analysis* ed. Bergmeyer,H.-U.D-Glucose pp. 163-172. Verlag Chemie, Weinheim.
- Lo,H.S. and Reeves,R.E. (1978) Pyruvate-to-ethanol pathway in *Entamoeba histolytica*. *Biochem J* **171**, 225-230.
- Loftus,B., Anderson,I., Davies,R., Alsmark,U.C., Samuelson,J., Amedeo,P., Roncaglia,P., Berriman,M., Hirt,R.P., Mann,B.J., Nozaki,T., Suh,B., Pop,M., Duchene,M., Ackers,J., Tannich,E., Leippe,M., Hofer,M., Bruchhaus,I., Willhoeft,U., Bhattacharya,A., Chillingworth,T., Churcher,C., Hance,Z., Harris,B., Harris,D., Jagels,K., Moule,S., Mungall,K., Ormond,D., Squares,R., Whitehead,S., Quail,M.A., Rabbinowitsch,E., Norbertczak,H., Price,C., Wang,Z., Guillen,N., Gilchrist,C., Stroup,S.E., Bhattacharya,S., Lohia,A., Foster,P.G., Sicheritz-Ponten,T., Weber,C., Singh,U., Mukherjee,C., El-Sayed,N.M., Petri,W.A., Jr., Clark,C.G., Embley,T.M., Barrell,B., Fraser,C.M. and Hall,N. (2005) The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. *Nature* **433**, 865-868.

- Madigan, M. T., Martinko, J. M. and Parker, J. (2002) *Brock-Mikrobiologie*.
- Mai, X. and Adams, M. W. (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. and Adams, M. W. W. (1996a) Characterization of a fourth type of 2-keto acid-oxidizing enzyme from a hyperthermophilic archaeon: 2-ketoglutarate ferredoxin oxidoreductase from *Thermococcus litoralis*. *J. Bacteriol.* **178**, 5890-5896.
- Mai, X. and Adams, M. W. W. (1996b) 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, J. R. and Bridger, W. A. (1991) Functional consequences of substitution of the active site (phospho)histidine residue of *Escherichia coli* succinyl-CoA synthetase. *Biochim. Biophys. Acta* **1076**, 86-90.
- Masai, E., Harada, K., Peng, X., Kitayama, H., Katayama, Y. and Fukuda, M. (2002) Cloning and characterization of the ferulic acid catabolic genes of *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. *Appl. Environ. Microbiol* **68**, 4416-4424.
- Mathew, S. and Abraham, T. E. (2006) Bioconversions of Ferulic Acid, an Hydroxycinnamic Acid. pp. 115-125.
- McInerney, M. J., Rohlin, L., Mouttaki, H., Kim, U., Krupp, R. S., Rios-Hernandez, L., Sieber, J., Struchtemeyer, C. G., Bhattacharyya, A., Campbell, J. W. and Gunther, S. (2007) The genome of *Syntrophus aciditrophicus*: Life at the thermodynamic limit of microbial growth. pp. 7600-7605.
- Müller, M., Mentel, M., Van Hellemond, J. J., Henze, K., Woehle, C., Gould, B. J., Yu, R.-Y., van der Giezen, M., Tielens, A. G. and Martin, W. F. (2012) Biochemistry and Evolution of Anaerobic Energy Metabolism in Eukaryotes. pp. 444-495.
- Musfeldt, M. (2001) ADP-bildende Acetyl-CoA Synthetasen aus hyperthermophilen *Archaea*: Molekularbiologische und biochemische Charakterisierung von neuartigen Enzymen der Acetat-Bildung und ATP-Synthese. pp. 79-80. Institut für allgemeine Mikrobiologie der CAU Kiel.
- Musfeldt, M. and 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. and 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.
- Narbad, A. and Gasson, M. J. (1998) Metabolism of ferulic acid via vanillin using a novel CoA-dependent pathway in a newly-isolated strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiology* **144** ( Pt 5), 1397-1405.

- Overhage, J., Priefert, H. and Steinbüchel, A. (1999) Biochemical and genetic analyses of ferulic acid catabolism in *Pseudomonas* sp. strain HR199. *Appl. Environ. Microbiol* **65**, 4837-4847.
- Pierson, B.K. and Castenholz, R.W. (1974) A phototrophic gliding filamentous bacterium of hot springs, *Chloroflexus aurantiacus*, gen. and sp. nov. *Arch. Microbiol.* **100**, 5-24.
- Plaggenborg, R., Overhage, J., Steinbüchel, A. and Priefert, H. (2003) Functional analyses of genes involved in the metabolism of ferulic acid in *Pseudomonas putida* KT2440. *Appl. Microbiol Biotechnol.* **61**, 528-535.
- Plaggenborg, R., Steinbüchel, A. and Priefert, H. (2001) The coenzyme A-dependent, non-beta-oxidation pathway and not direct deacetylation is the major route for ferulic acid degradation in *Delftia acidovorans*. *FEMS Microbiol Lett.* **205**, 9-16.
- Ploux, O., Soularue, P., Marquet, A., Gloeckler, R. and Lemoine, Y. (1992) Investigation of the first step of biotin biosynthesis in *Bacillus sphaericus*. Purification and characterization of the pimeloyl-CoA synthase, and uptake of pimelate. *Biochem. J.* **287**, 685-690.
- Pohlmann, A., Fricke, W.F., Reinecke, F., Kusian, B., Liesegang, H., Cramm, R., Eitinger, T., Ewering, C., Pötter, M., Schwartz, E., Strittmatter, A., Voß, I., Gottschalk, G., Steinbüchel, A., Friedrich, B. and Bowien, B. (2006) Genome sequence of the bioplastic-producing "Knallgas" bacterium *Ralstonia eutropha* H16. *Nat. Biotechnol.* **24**, 1257-1262.
- Reeves, R.E., Warren, L.G., Susskind, B. and Lo, H.S. (1977) An energy-conserving pyruvate-to-acetate pathway in *Entamoeba histolytica*. Pyruvate synthase and a new acetate thiokinase. *J Biol. Chem.* **252**, 726-731.
- Robertson, C.E., Harris, J.K., Spear, J.R. and Pace, N.R. (2005) Phylogenetic diversity and ecology of environmental Archaea. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 638-642.
- Roy, S.W., Irimia, M. and Penny, D. (2006) Very little intron gain in *Entamoeba histolytica* genes laterally transferred from prokaryotes. *Mol. Biol. Evol.* **23**, 1824-1827.
- Sambrook, S., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sanchez, L.B., Galperin, M.Y. and Müller, M. (2000) Acetyl-CoA synthetase from the amitochondriate eukaryote *Giardia lamblia* belongs to the newly recognized superfamily of acyl-CoA synthetases (nucleoside diphosphate-forming). *Journal of Biological Chemistry* **275**, 5794-5803.
- Sanchez, L.B. and Müller, M. (1996) Purification and characterization of the acetate forming enzyme, acetyl-CoA synthetase (ADP-forming) from the amitochondriate protist, *Giardia lamblia*. *FEBS Letters* **378**, 240-244.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 5463-5467.
- Schäfer, T. and 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. and Schönheit,P. (1993) Acetyl-CoA synthetase (ADP-forming) in archaea, a novel enzyme involved in acetate and ATP synthesis. *Arch. Microbiol.* **159**, 72-83.
- Schönheit, P. (2008) Glycolysis in hyperthermophiles. In *Thermophiles. Biotechnology and Technology at High Temperatures* ed. Robb,F., Antranikian,G., Grogan,D. and Driessen,A. Glycolysis in hyperthermophiles pp. 99-112. Boca Raton: CRC Press.
- Shikata,K., Fukui,T., Atomi,H. and Imanaka,T. (2007) A novel ADP-forming succinyl-CoA synthetase in *Thermococcus kodakaraensis* structurally related to the archaeal nucleoside diphosphate-forming acetyl-CoA synthetases. *J Biol. Chem* **282**, 26963-26970.
- Sieber, J., Sims, D. R., Cliff, H., Kim, E., Lykidis, A., Lapidus, A., McDonnald, E., Rohlin, L., Culley, D. E., Gunsalus, R. P. and McInerney, M. J. (2010) The genome of *Syntrophomonas wolfei*: new insights into syntrophic metabolism and biohydrogen production. pp. 2289-2301.
- Siebers,B. and Schönheit,P. (2005) Unusual pathways and enzymes of central carbohydrate metabolism in Archaea. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 695-705.
- Spang,A., Hatzenpichler,R., Brochier-Armanet,C., Rattei,T., Tischler,P., Spieck,E., Streit,W., Stahl,D.A., Wagner,M. and Schleper,C. (2010) Distinct gene set in two different lineages of ammonia-oxidizing archaea supports the phylum Thaumarchaeota. *Trends Microbiol* **18**, 331-340.
- Srere,P.A., Brazil,H. and Gonen,L. (1963) The citrate condensing enzyme of pigeon breast muscle and moth flight muscle. *Acta Chem. Scand.* **17**, 129-134.
- Starai,V.J. and Escalante-Semerena,J.C. (2004a) Acetyl-coenzyme A synthetase (AMP forming). *Cell Mol. Life Sci.* **61**, 2020-2030.
- Starai,V.J. and Escalante-Semerena,J.C. (2004b) Identification of the protein acetyltransferase (Pat) enzyme that acetylates acetyl-CoA synthetase in *Salmonella enterica*. *J Mol. Biol.* **340**, 1005-1012.
- Sun,T., Hayakawa,K., Bateman,K.S. and Fraser,M.E. (2010) Identification of the citrate-binding site of human ATP-citrate lyase using X-ray crystallography. *J Biol. Chem* **285**, 27418-27428.
- Tang,K.H., Barry,K., Chertkov,O., Dalin,E., Han,C.S., Hauser,L.J., Honchak,B.M., Karchbach,L.E., Land,M.L., Lapidus,A., Larimer,F.W., Mikhailova,N., Pitluck,S., Pierston,B.K. and Blankenship,R.E. (2011) Complete genome sequence of the filamentous anoxygenic phototrophic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. *BMC. Genomics* **12**, 334.
- Thierry,A., Fairhead,C. and Dujon,B. (1990) The complete sequence of the 8.2 kb segment left of MAT on chromosome III reveals five ORFs, including a gene for a yeast ribokinase. *Yeast.* **6**, 521-534.

- 
- Thompson,J.D., Gibson,T.J., Plewniak,F., Jeanmougin,F. and Higgins,D.G. (1997) The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**, 4876-4882.
- Tielens,A.G., van Grinsven,K.W., Henze,K., Van Hellemond,J.J. and Martin,W. (2010) Acetate formation in the energy metabolism of parasitic helminths and protists. *Int. J Parasitol.* **40**, 387-397.
- Wang,Y., Bryant,S., Tatusov,R. and Tatusova,T. (2000) Links from genome proteins to known 3-D structures. *Genome Res.* **10**, 1643-1647.
- Weitzman,P.D. and Kinghorn,H.A. (1978) Occurrence of 'large' or 'small' forms of succinate thiokinase in diverse organisms. *FEBS Letters* **88**, 255-258.
- Wolodko,W.T., Fraser,M.E., James,M.N. and Bridger,W.A. (1994) The crystal structure of succinyl-CoA synthetase from *Escherichia coli* at 2.5-Å resolution. *J. Biol. Chem* **269**, 10883-10890.
- Zuo, X. and Coombs, G. H. (1995) Amino acid consumption by the parasitic, amoeboid protists *Entamoeba histolytica* and *E. invadens*. pp. 253-258.

## 8 Anhang

	10	20	30	40	50	60	70	80
Diese Arbeit	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....							
	ATGGCGATACTAGTCAGGGAAGGGATGAGGTACTAGTTCAGGGGATAACTGGAAGGCAGGGGACTATACATACGAAGCT							
YP_001737822.1	M A I L V R E G M R V L V Q G I T G R Q G T I H T K L							
	ATGGCGATACTAGTCAGGGAAGGGATGAGGTACTAGTTCAGGGGATAACTGGAAGGCAGGGGACTATACATACGAAGCT							
	M A I L V R E G M R V L V Q G I T G R Q G T I H T K L							
	90	100	110	120	130	140	150	160
Diese Arbeit	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....							
	GATGCTCGAATATGGACGAAGCTAGTTCGCGGGCCTCACTCCTGGGAAGTCTGGAGCTAAGGTATAAGATGCTCCAGTTT							
YP_001737822.1	M L E Y G T K V V A G V T P G K S G A K V Y D V P V							
	GATGCTCGAATATGGACGAAGCTAGTTCGCGGGCCTCACTCCTGGGAAGTCTGGAGCTAAGGTATAAGATGCTCCAGTTT							
	M L E Y G T K I V A G V T P G K S G A K V Y D V P V							
	170	180	190	200	210	220	230	240
Diese Arbeit	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....							
	TCGATTCCGTTGAGGAGGCTGTGAGGGAGAAGGGACCTATAGATGCATCTATAGTCTTCGTCGCCAGCCCTTATGCGATG							
YP_001737822.1	F D S V E E A V R E K G P I D A S I V F V P A P Y A M							
	TCGATTCCGTTGAGGAGGCTGTGAGGGAGAAGGGACCTATAGATGCATCTATAGTCTTCGTCGCCAGCCCTTATGCGATG							
	F D S V E E A V R E K G P I D A S I V F V P A P Y A M							
	250	260	270	280	290	300	310	320
Diese Arbeit	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....							
	GATGCTGTTATAGAGGCTGTGGATAACGCTATTCGTTGGTTCGTTAGTTCATAACTGAGGGGATACCTGTACACGATACCCG							
YP_001737822.1	D A V I E A V D N A I P L V V V I T E G I P V H D T A							
	GATGCTGTTATAGAGGCTGTGGATAACGCTATTCGTTGGTTCGTTAGTTCATAACTGAGGGGATACCTGTACACGATACCCG							
	D A V I E A V D N A I P L V V V I T E G I P V H D T A							
	330	340	350	360	370	380	390	400
Diese Arbeit	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....							
	TAAATTCGTCAGCTATGCGAGGAGCATGGGTACAACAATAATAGTCCCAACTGCCCGGCATAATAGCTCCAGTAAGG							
YP_001737822.1	K F V S Y A R S M G T T I I G P N C P G I I A P G K							
	TAAATTCGTCAGCTATGCGAGGAGCATGGGTACAACAATAATAGTCCCAACTGCCCGGCATAATAGCTCCAGTAAGG							
	K F V S Y A R S M G T T I I G P N C P G I I A P G K							
	410	420	430	440	450	460	470	480
Diese Arbeit	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....							
	TGAAGATAGGGATAATGCCAGCTGACTCCTTCGCACCAGGACCAGTCCGGTATAGTATCGAGGAGCGGGACCTGACTTAC							
YP_001737822.1	V K I G I M P A D S F A P G P V G I V S R S G T L T Y							
	TGAAGATAGGGATAATGCCAGCTGACTCCTTCGCACCAGGACCAGTCCGGTATAGTATCGAGGAGCGGGACCTGACTTAC							
	V K I G I M P A D S F A P G P V G I V S R S G T L T Y							
	490	500	510	520	530	540	550	560
Diese Arbeit	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....							
	GAGATCTCCCTATCCCTGAAGAATGCTGGTATATGGGTCAAGCAGACTATAGGAATAGGGGAGATCCCATAACTGGTTT							
YP_001737822.1	E I S L S L K N A G Y G S S T T I G I G G D P I T G L							
	GAGATCTCCCTATCCCTGAAGAATGCTGGTATATGGGTCAAGCAGACTATAGGAATAGGGGAGATCCCATAACTGGTTT							
	E I S L S L K N A G Y G S S T T I G I G G D P I T G L							
	570	580	590	600	610	620	630	640
Diese Arbeit	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....							
	GAACTTCATAGAGTCTTAGAGTTATTCAAGGAGGATCCAGAGACTAAAGCAGTCTGATAGTCCGGGAGATAGGGGGAG							
Original	N F I E V L E L F K E D P E T K A V V I V G E I G G							
	GAACTTCATAGAGTCTTAGAGTTATTCAAGGAGGATCCAGAGACTAAAGCAGTCTGATAGTCCGGGAGATAGGGGGAG							
	N F I E V L E L F K E D P E T K A V V I V G E I G G							
	650	660	670	680	690	700	710	720
Diese Arbeit	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....							
	ATGCTGAGGAGAGGGCAGCCAAGTACATAGCTCAGGGCTATCCCAAGCCTGTAGTGGCTTACGTGGCGGGAGCAGCT							
YP_001737822.1	D A E E R A A K Y I A Q G Y P K P V V A Y V A G R T A							
	ATGCTGAGGAGAGGGCAGCCAAGTACATAGCTCAGGGCTATCCCAAGCCTGTAGTGGCTTACGTGGCGGGAGCAGCT							
	D A E E R A A K Y I A Q G Y P K P V V A Y V A G R T A							
	730	740	750	760	770	780	790	800
Diese Arbeit	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....							
	CCCCCTGGGAAGAGGATGGGTACACGGGGGGCGATAAACAAGCTGGTCAGGGGACAGTCGAAAGCAAGGAAGAGCTTT							
YP_001737822.1	P P G K R M G H A G A I I T A G Q G T V E S K E R A F							
	CCCCCTGGGAAGAGGATGGGTACACGGGGGGCGATAAACAAGCTGGTCAGGGGACAGTCGAAAGCAAGGAAGAGCTTT							
	P P G K R M G H A G A I I T A G Q G T V E S K E R A F							
	810	820	830	840	850	860	870	
Diese Arbeit	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....							
	CTCAGAGGGGGGTTCTCTGATAGTACCCCTTCGAAGTGGCTCCCTCCTAGCTGAAAGATTAGGCCATTAA							
YP_001737822.1	S E A G V P V A R T P F E V A P L L A E R L R H *							
	CTCAGAGGGGGGTTCTCTGATAGTACCCCTTCGAAGTGGCTCCCTCCTAGCTGAAAGATTAGGCCATTAA							
	S E A G V P V A R T P F E V A P L L A E R L R H *							

Abbildung A 1 Sequenzvergleich zwischen der annotierten Sequenz und dem klonierten Gen der *ckcSCS $\alpha$* . Dargestellt sind die Basensequenz und die Aminosäuresequenz des in dieser Arbeit erstellten Genprodukts (Diese Arbeit) und der annotierten Sequenz (YP\_001737822.1). Das Alignment wurde mit ClustalX erstellt. Identische Basen sind grau unterlegt; abweichende Basen rot. Abweichende Aminosäuren sind rot hinterlegt und umrahmt.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
Diese Arbeit  MTTTEMAAAPRPDIGRLLRPRSIAIVGASATPGALGASVLGNLERNFGAGDIHLINPKRSEIAGRACLASVDQLPEGVDV
CAC83622.1    MTTTEMAAAPRPDIGRLLRPRSIAIVGASATPGALGASVLGNLERNFGAGDIHLINPKRSEIAGAACLASVDQLPEGVDV
Clustal Cons *****

      90      100     110     120     130     140     150     160
Diese Arbeit  AVLAIPOPFVLDTVRALAARRVGAIVFSAGFAEAGERGMAEQREIARIAAEAGMVVEGPNCLGCINYLQRPVPLTFVEVN
CAC83622.1    AVLAIPOPFVLDTV-AHWRRRVGAIVFSAGFAEAGERGMAEQREIARIAAEAGMVVEGPNCLGCINYLQRPVPLTFVEVN
Clustal Cons ***** *

      170     180     190     200     210     220     230     240
Diese Arbeit  IDAQADATRPAIGVVSQSGAMMTVLCTTLASRALPLSHAISTGNEAASHAEDYVDFLLEQPSTRVVMIVEQIROPARI
CAC83622.1    IDAQADATRPAIGVVSQSGAMMTVLCTTLASRALPLSHAISTGNEAASHAEDYVDFLLEQPSTRVVMIVEQIROPARI
Clustal Cons *****

      250     260     270     280     290     300     310     320
Diese Arbeit  LPAVARARSLGKSVLLHPGKSSAARASAAHTTGAMAGDYALMRKLERAGAVFAETLEELGDIAEIAIRCPVLPISAGAA
CAC83622.1    LAAVARARSLGKSVLLHPGKSTGAR-SAAHTTGAMAGDYALMRKLERAGAVFAETLEELGDIAEIAIRCPVLPISIVRP
Clustal Cons * *****

      330     340     350     360     370     380     390     400
Diese Arbeit  AAAGAAAAGVAVLGESGAFKALTDWAEELGLALPAIGDDSPALRAALPEFVGVSNPDLTAQGLVEPDLYFRITDAL
CAC83622.1    LQPVQPLQRELAVLGESGAFKAVTDWAEELGLALPAIGDDSPALRAALPEFVGVSNPDLTAQGLVEPDLYFRITDAL
Clustal Cons *****

      410     420     430     440     450     460     470     480
Diese Arbeit  FGDARFSTVLVGLIQGDPVTCGIKMPVLRVRELRPAKPVIVAGLDEGAAPAEFIAEMRALGVPYFPSTERALRAVQR
CAC83622.1    FGDARFSTVLVGLIQGDPVTCGIKMPVLRVRELRPAKPVIVAGLDEGAAPAEFIAEMRALGVPYFPSTERALRAVQR
Clustal Cons *****

      490     500     510     520     530     540     550     560
Diese Arbeit  LTAFSQRSFERTDAQPVALTLPAGRTVVPEYESKAVLAQAGIPFARGRLATSAEQAVAIASEIGWPVALKAQSADLSHKS
CAC83622.1    LTAFSQRSFERTDAQPVALTLPAGRTVVPEYESKAVLAQAGIPFARGRLATSAEQAVAIASEIGWPVALKAQSADLSHKS
Clustal Cons *****

      570     580     590     600     610     620     630     640
Diese Arbeit  DAGGVILNIADAQAMGEAWGRLHANVAAYDSAIALDGVLIEMAMQGRLEMIIGARNDPQWGPVILAGLGGVTAEIMRDAR
CAC83622.1    DAGGVILNIADAQAMGEAWGRLHANVAAYDSAIALDGVLIEMAMQGRLEMIIGARNDPQWGPVILAGLGGVTAEIIMRA
Clustal Cons *****

      650     660     670     680     690     700     710     720
Diese Arbeit  LLDADLSTGEVRLDRLQGAPLLHGYRGAPALDRQALAEILIVRLGQVLRGTPAIREIDLNPVIVLPEGLVVVALDALML
CAC83622.1    CWTPTCPPARCCANWTACR-PPLLHGYRGAPALDRQALAEILIVRLGQVLRGTPAIREIDLNPVIVLPEGLVVVALDALML
Clustal Cons *****

      . . . . |
Diese Arbeit  VEHSAG
CAC83622.1    VEHSAG
Clustal Cons *****

```

**Abbildung A 2** Vergleich der Aminosäuresequenz zwischen der klonierten FCS-Sequenz (Diese Arbeit) und der annotierten Sequenz (CAC83622.1) der FCS aus *D. acidovorans*. Die Aminosäuresequenz der klonierten FCS-Sequenz wurde aus der Nucleotidsequenz der Sequenzierung mit Hilfe von Bioedit translatiert. Das Alignment wurde mit ClustalX erstellt. Identische Aminosäuren sind grau unterlegt und in der Clustal-Consensus-Sequenz (Clustal Cons) mit \* gekennzeichnet.

## 9 Abkürzungen

Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ACD	ADP-bildende Acetyl-CoA-Synthetase
ACS	AMP-bildende Acetyl-CoA-Synthetase
ADP	Adenosindiphosphat
AF	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>
AK	Acetat-Kinase
AMP	Adenosinmonophosphat
AMP-FCS	AMP-bildende Feruloyl-CoA Synthetase
AMP-PCS	AMP-bildende Pimeloyl-CoA Synthetase
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bar	Bar (Druckeinheit)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Caur	<i>Chloroflexus aurantiacus</i>
ckcACD	ACD aus <i>Candidatus Korarchaeum cryptophilum</i>
CoA	Coenzym A
Da	Dalton
Daci	Delftia acidovorans
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DTE	Dithiotreitol
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)
E <sub>x</sub>	Extinktion bei x nm
ε	molarer Extinktionskoeffizient
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Eh-ACD	ACD aus <i>Entamoeba histolytica</i>
et al.	et alii
FCS	Feruloyl-CoA Synthetase
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
g	Gramm
h	Stunde
H <sup>+</sup>	Proton
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	deionisiertes Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	Reinstwasser Typ I
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethan-sulfonsäure

---

HiLoad	high load capacity
HSCoA	protoniertes Coenzym A
SCoA	deprotoniertes Coenzym A
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kDa	Kilodalton
$K_m$	Michaelis-Menten-Konstante
l	Liter
IOR	Indolpyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase
LB	Luria-Bertani
LDH	Lactat-Dehydrogenase
M	molar
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minute
mol	Mol (Stoffmenge), Mol/l
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NADH	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NAM	Nicotinamid
n.b.	nicht bestimmt
n.m.	nicht messbar
ORF	offener Leserahmen
OD	optische Dichte
PCS	Pimeloyl-CoA Synthetase
Pf-ACD	ACD aus <i>Pyrococcus furiosus</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEP	Phosphoenolpyruvat
P <sub>i</sub>	anorganisches Phosphat
POR	Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase
PP <sub>i</sub>	Pyrophosphat
PTA	Phosphotransacetylase
Ra	<i>Ralstonia</i>
RaEu	<i>Ralstonia eutropha</i>
RaPCS1	PCS1 aus <i>Ralstonia eutropha</i>
RaPCS2	PCS2 aus <i>Ralstonia eutropha</i>
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunden
S	Substratkonzentration
SCS	Succinyl-CoA Synthetase
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure

TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
UE	Untereinheit
U/mg	Spezifische Aktivität
UV	Ultraviolett
V	Geschwindigkeit des Substratumsatzes
$V_{\max}$	Maximalgeschwindigkeit des Substratumsatzes
(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Masse pro Volumen
°C	Grad Celsius

#### 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. Peter Schönheit für die Überlassung des Themas, für die gute Betreuung und andauernde Förderung sowie die vielen hilfreichen Diskussionen.

Frau Dr. Ulrike Johnsen danke ich für die umfassende und geduldige Hilfe und Unterstützung in allen Belangen meiner Promotionszeit und die fortwährende Gesprächsbereitschaft beim Verfassen dieser Arbeit.

Herrn Dr. Christopher Bräsen danke ich für die Unterstützung in den ersten zwei Jahren.

Frau Kerstin Lutter-Mohr danke ich für die technische Assistenz bei der Klonierung und Expression der ACD<sub>succ</sub> aus *P. furiosus* und der Mutagenese der RaPCS1 sowie für die gute Zusammenarbeit in E28.

Frau Dr. Melanie Brocker vom Forschungszentrum Jülich danke ich für die MALDI-TOF MS Analyse der *Chloroflexus*-ACD.

Herrn Dr. Oliver Lenz vom Institut für Biologie/Mikrobiologie der Humboldt-Universität zu Berlin danke ich für die Überlassung der DNA von *Ralstonia eutropha*.

Ich danke meinen Eltern herzlich für die permanente und liebevolle Unterstützung meines Studiums und der Promotion.

Besonders danke ich meiner Frau Ann-Kathrin Schmidt dafür, dass sie einfach alles leichter gemacht hat und immer da ist.

Nina Rottgardt und Thomas Fedderke danke ich für die viele Unterstützung bei der Fehlersuche.

Mein besonderer Dank gilt auch Julia, Andreas, Moritz, Tom, Angelika, Holger und Dagmar sowie allen anderen Mitarbeitern des IfaM für die jahrelange angenehme und kollegiale Zusammenarbeit.



## Lebenslauf

Name: Marcel Clemens Schmidt  
 Geb. am: 01. Oktober 1979  
 Geburtsort: Rheinfeldten/Baden  
 Nationalität: deutsch  
 Wohnort: Kiel

### *Schule:*

1986 – 1990      Grundschule  
 1990 – 1999      Gymnasium  
 06/1999          Abitur

### *Studium:*

10.2000 – 07.2007      Studium der Biologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel  
 04.2006                  Diplomprüfung in den Fächern Mikrobiologie, Anthropologie und Rechtsmedizin  
 06.2006 – 05.2007      Experimentelle Diplomarbeit am Institut für allgemeine Mikrobiologie der CAU zu Kiel  
 in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Peter Schönheit mit dem Thema „ADP-  
 bildende Acyl-CoA Synthetasen in Archaea und Bacteria: Untersuchungen zum Reakti-  
 onsmechanismus der ACD aus dem Archaeon *Pyrococcus furiosus* und Charakterisie-  
 rung der ACD aus dem Bakterium *Chloroflexus aurantiacus*“  
 08.2007                  Beginn der experimentellen Arbeiten zu der vorliegenden Dissertation am Institut für  
 allgemeine Mikrobiologie der CAU zu Kiel in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr.  
 Peter Schönheit

### *Berufsausbildung und Zivildienst:*

07.1999 – 01.2000      Zivildienst: Mobile Soziale Dienste bei der JUH Trier  
 02.2000 – 07.2000      Zivildienst: Behindertenfahrdienst und Hausnotrufdienst bei der Johanniter-Unfallhilfe  
 (JUH) Preetz  
 03.2001 – 07.2001      Ausbildung zum Rettungssanitäter  
 11.2002 – 07.2005      Ausbildung zum Rettungsassistenten  
 07.2005                  Berufsanerkennung und Erlaubnis zum Führen der Berufsbezeichnung Rettungsassistent

### *Berufliche und ehrenamtliche Tätigkeit:*

12.2001 – 07.2005      Nebennamtlicher Dienst als Rettungssanitäter beim Deutschen Roten Kreuz im Ret-  
 tungsdienst der Stadt Kiel  
 Seit 07.2005              Ehrenamtlicher Dienst als Rettungsassistent beim Deutschen Roten Kreuz im Rettungs-  
 dienst der Stadt Kiel  
 Seit 08.2007              Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für allgemeine Mikrobiologie der CAU zu  
 Kiel  
 Seit 11.2010              Projektleiter nach §3 GenTG der gentechnischen Anlage der Arbeitsgruppe von Herrn  
 Prof. Schönheit am Institut für allgemeine Mikrobiologie der CAU Kiel