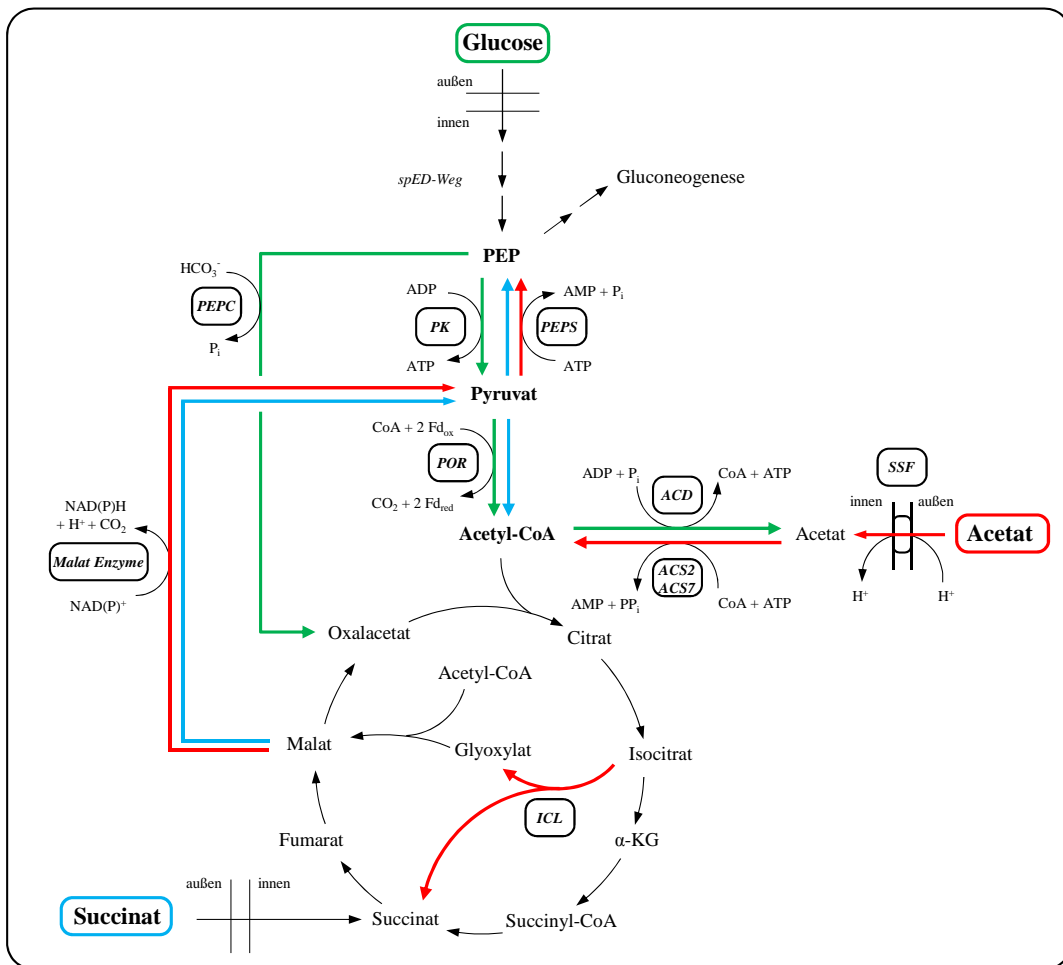


# Glucose-, Acetat- und Succinat-Stoffwechsel in dem halophilen Archaeon *Haloferax volcanii*

Identifizierung und Charakterisierung von Enzymen  
und Analysen von Deletionsmutanten



Dissertation

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

vorgelegt von

Tom Kuprat

Kiel 2016

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Februar 2012 bis März 2016 am Institut für Allgemeine Mikrobiologie der Christian-Albrechts Universität zu Kiel im Labor von Herrn Prof. Dr. Peter Schönheit durchgeführt.

Erster Gutachter: Prof. Dr. P. Schönheit

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. K. Heller

Tag der mündlichen Prüfung: 27.07.2016

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 27.07.2016

Die Dekanin

## **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. Die Arbeit war bislang noch nicht Bestandteil eines Prüfungsverfahrens. Andere Promotionsvorhaben wurden nicht unternommen.

.....

Tom Kuprat

Teile der während dieser Doktorarbeit erzielten Ergebnisse wurden bzw. werden in den folgenden Artikeln zur Veröffentlichung eingereicht:

**Tom Kuprat** and Peter Schönheit

Acetate formation and acetate activation in the halophilic archaeon *Haloferax volcanii*.

(Poster) VAAM Tagung 2016, Jena

**Tom Kuprat** and Peter Schönheit

Acetate metabolism in *Haloferax volcanii*: Characterization of an acetate transporter and of enzymes involved in acetate activation and gluconeogenesis.

**Tom Kuprat** and Peter Schönheit

Function and characterization of an ADP-forming acetyl-CoA synthetase from *Haloferax volcanii*.

Ulrike Johnsen, **Tom Kuprat**, Andreas Reinhardt and Peter Schönheit

Characterization of bacterial-type pyruvate kinase and phosphoenolpyruvate carboxylase from the halophilic archaeon *Haloferax volcanii*.

**Tom Kuprat** and Peter Schönheit

Succinate metabolism in *Haloferax volcanii*: Function of malic enzymes, phosphoenolpyruvate synthetase and pyruvate-ferredoxin oxidoreductase.

# Inhalt

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>Summary</b> .....	<b>10</b>
<b>3</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>12</b>
<b>3.1</b>	<b>Glucose-Stoffwechsel</b> .....	<b>15</b>
<b>3.2</b>	<b>Acetat-Stoffwechsel</b> .....	<b>20</b>
<b>3.3</b>	<b>Succinat-Stoffwechsel</b> .....	<b>23</b>
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>26</b>
<b>4.1</b>	<b>Wachstum von <i>Haloferax volcanii</i></b> .....	<b>26</b>
<b>4.2</b>	<b>Molekularbiologische Standardmethoden</b> .....	<b>30</b>
4.2.1	Plasmide und Primer.....	30
4.2.2	Polymerase-Kettenreaktion .....	34
4.2.3	Isolation, Reinigung, Konzentrations- und Größenbestimmung von DNA und RNA ..	36
4.2.4	Restriktionshydrolyse und Ligation .....	37
4.2.5	Herstellung elektrokompenter Zellen und Transformation von <i>E. coli</i> .....	37
4.2.6	Sequenzierung .....	38
4.2.7	Transformation von <i>H. volcanii</i> .....	38
4.2.8	Konstruktion von Deletionsmutanten und deren Komplementationen .....	39
4.2.9	Southern Blot Analysen.....	40
4.2.10	Transkriptnachweis mittels Northern Blot und RT-PCR.....	41
<b>4.3</b>	<b>Analytische Methoden</b> .....	<b>43</b>
4.3.1	Glucose-Bestimmung .....	44
4.3.2	Acetat-Bestimmung.....	44
4.3.3	Nachweis des putativen Acetat-Transporters in <i>H. volcanii</i> .....	44
<b>4.4</b>	<b>Reinigung und Charakterisierung von Proteinen</b> .....	<b>46</b>
4.4.1	Reinigung und Charakterisierung der AMP-bildenden Acetyl-CoA-Synthetase .....	46
4.4.2	Reinigung und Charakterisierung rekombinanter Proteine .....	47
4.4.2.1	Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase .....	48
4.4.2.2	Phosphoenolpyruvat-Carboxylase .....	49
4.4.2.3	AMP-bildende Acetyl-CoA-Synthetasen .....	49
4.4.2.4	Malat-Enzyme .....	50

---

<b>5</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>51</b>
<b>5.1</b>	<b>Enzyme des Glucose-Stoffwechsels .....</b>	<b>51</b>
5.1.1	Pyruvat-Kinase .....	53
5.1.2	Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase .....	56
5.1.3	Phosphoenolpyruvat-Carboxylase .....	60
5.1.4	ADP-bildende Acetyl-Coenzym A-Synthetase .....	63
<b>5.2</b>	<b>Enzyme des Acetat-Stoffwechsels .....</b>	<b>66</b>
5.2.1	Acetat-Transport.....	67
5.2.2	AMP-bildende Acetyl-Coenzym A Synthetasen .....	72
5.2.3	Isocitrat-Lyase .....	80
5.2.4	Enzyme der Gluconeogenese .....	81
5.2.4.1	Malat-Enzyme .....	81
5.2.4.2	Phosphoenolpyruvat-Synthetase.....	85
<b>5.3</b>	<b>Enzyme des Succinat-Stoffwechsels.....</b>	<b>87</b>
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>90</b>
<b>6.1</b>	<b>Enzyme des Glucose-Stoffwechsels .....</b>	<b>90</b>
6.1.1	Pyruvat-Kinase .....	90
6.1.2	Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase .....	92
6.1.3	Phosphoenolpyruvat-Carboxylase .....	94
6.1.4	ADP-bildende Acetyl-CoA-Synthetase.....	98
<b>6.2</b>	<b>Enzyme des Acetat-Stoffwechsels .....</b>	<b>100</b>
6.2.1	Acetat-Transport in <i>H. volcanii</i> .....	100
6.2.2	AMP-bildende Acetyl-Coenzym A Synthetasen .....	107
6.2.3	Isocitrat-Lyase .....	112
6.2.4	Enzyme der Gluconeogenese .....	113
<b>6.3</b>	<b>Enzyme des Succinat-Stoffwechsels.....</b>	<b>116</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>119</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>121</b>

# 1 Zusammenfassung

*Haloferax volcanii* ist ein aerobes Haloarchaeon, das auf verschiedenen Kohlenstoffquellen, wie z. B. Glucose oder Acetat, wachsen kann. *H. volcanii* baut Glucose über einen semiphosphorylierenden Entner-Doudoroff-Weg (spED-Weg) zu Pyruvat ab, wobei im letzten Schritt eine Umsetzung von Phosphoenolpyruvat (PEP) zu Pyruvat durch eine Pyruvat-Kinase (PK) postuliert, jedoch bisher nicht funktionell nachgewiesen wurde. Auch sind die weitere Umsetzung von Pyruvat zu Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) sowie anaplerotische Enzymreaktionen in *H. volcanii* bisher nicht untersucht. Bei einem Wachstum von *H. volcanii* auf Glucose wurde die Bildung von Acetat im Rahmen eines Overflow-Metabolismus beschrieben. Dabei wird Acetyl-CoA durch eine ADP-bildende Acetyl-CoA-Synthetase (ACD) zu Acetat umgesetzt. Funktionelle Analysen stehen noch aus. Der Acetat-Stoffwechsel ist in *H. volcanii* noch nicht untersucht. Genomanalysen deuten darauf hin, dass *H. volcanii* über einen Acetat-Transporter verfügt. Weiterhin sind im Genom mehrere Gene für putative AMP-bildende Acetyl-CoA-Synthetasen (ACS) annotiert, die an der Aktivierung von Acetat zu Acetyl-CoA beteiligt sein könnten. Bisher gibt es in *H. volcanii* weder Untersuchungen zum Acetat-Transport noch sind ACS-Enzyme charakterisiert und eine funktionelle Beteiligung gezeigt worden. In *H. volcanii* gibt es Hinweise auf die Beteiligung eines Glyoxylatzyklus an der anaplerotischen Bildung von Oxalacetat. Eine funktionelle Beteiligung der Schlüsselenzyme Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase am Wachstum auf Acetat wurde noch nicht nachgewiesen. Auch sind die Enzyme der Phosphoenolpyruvat (PEP)-Synthese im Zuge der Gluconeogenese bisher nicht untersucht worden. Schließlich ist nicht bekannt, ob *H. volcanii* auf Dicarbonsäuren wachsen kann und welche Enzyme im Energiestoffwechsel und in der Gluconeogenese beteiligt sind.

Daher sollten in der vorliegenden Arbeit bisher nicht untersuchte Schlüsselenzyme des Glucose- und Acetat-Stoffwechsels charakterisiert werden. Außerdem sollte das Wachstum auf Succinat etabliert werden und die funktionelle Beteiligung von Enzymen gezeigt werden. Dazu wurden Transkriptanalysen, biochemische Charakterisierungen von beteiligten Enzymen sowie Wachstumsexperimente mit entsprechenden Deletionsmutanten durchgeführt.

**Glucose-Stoffwechsel.** Der Nachweis der Glucose-spezifischen Induktion des für die PK kodierenden Gens und ein eingeschränktes Wachstum auf Glucose der  $\Delta pk$ -Mutante im Vergleich zum Wildtyp zeigen eine funktionelle Beteiligung der PK am spED-Weg. Eine katabole Funktion der PEP-Synthetase (PEPS) im Glucose-Abbau wurde ausgeschlossen. In

Transkriptanalysen wurde gezeigt, dass die für die Untereinheiten der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase (POR) kodierenden *porA*- und *porB*-Gene cotranskribiert und Glucose-spezifisch induziert werden. Das rekombinante Protein wurde als Heterotetramer ( $\alpha_2\beta_2$ ) charakterisiert und katalysierte die Methylviologen-abhängige Umsetzung von Pyruvat zu Acetyl-CoA. Eine *porAB*-Depletionsmutante zeigte kein Wachstum auf Glucose und Pyruvat, was für eine essentielle Funktion der POR im Glucose-Abbau spricht. Dies ist der erste Nachweis einer essentiellen Funktion der POR in der Domäne der Archaea. Für die PEP-Carboxylase (PEPC) wurde eine Glucose-spezifische Induktion des kodierenden Gens gezeigt. Das rekombinante Enzym katalysierte die Carboxylierung von Phosphoenolpyruvat zu Oxalacetat. Eine PEPC-Deletionsmutante war nicht in der Lage auf Glucose zu wachsen. Diese Ergebnisse zeigen eine essentielle Beteiligung der PEPC am Glucose-Abbau. Eine  $\Delta$ *acd*-Mutante zeigte in Wachstumsexperimenten auf Glucose im Vergleich zum Wildtyp eine um 64 % reduzierte Acetat-Bildung. Durch eine *in trans* Komplementation mit dem *acd*-Gen wurde die Bildung von Acetat wiederhergestellt. Dies ist der erste funktionelle Nachweis der Beteiligung einer ACD an der Bildung von Acetat aus Glucose im Rahmen eines Overflow-Metabolismus.

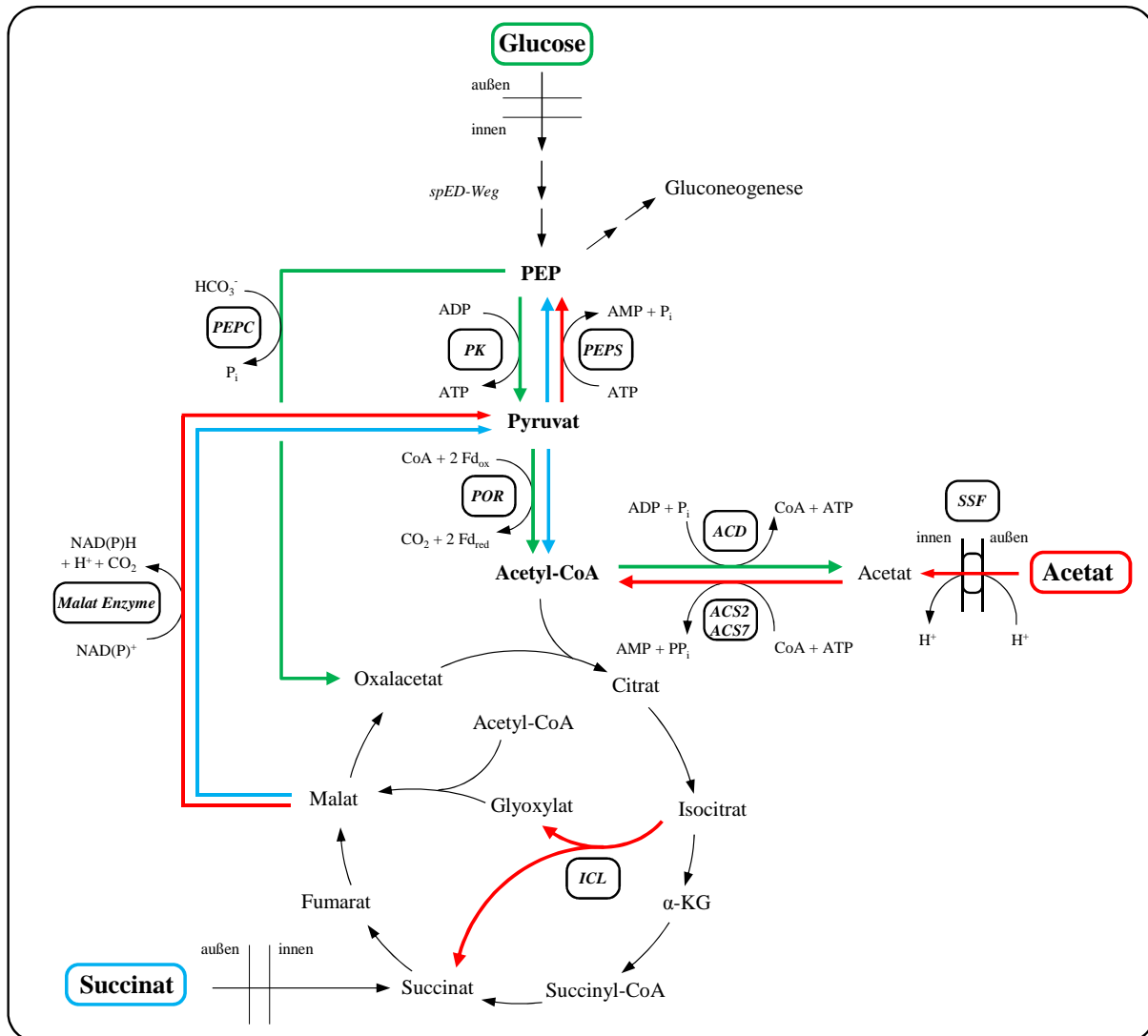
**Acetat-Stoffwechsel.** Es wurde ein Operon, das für einen Acetat-Transporter der *sodium/solute-symporter* Proteinfamilie (SSF-Familie) und eine ACS kodiert, identifiziert und eine Acetat-spezifische Induktion der Transkription festgestellt. Zellsuspensionen von *H. volcanii* katalysierten die Aufnahme von Acetat mit einem apparenten  $K_m$ -Wert von 24,6  $\mu$ M und einer maximalen Rate von 1,9  $\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ . In einer SSF-Transporter-Deletionsmutante war nur eine geringe Aufnahmerate (0,18  $\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ ) in die Zellen detektierbar. Durch eine *in trans* Komplementation mit dem Wildtypgen wurde die Aufnahmerate wiederhergestellt. Dies ist der erste funktionelle Nachweis eines Acetat-Transporters in der Domäne der Archaea. Aus Acetat-gewachsenen Zellen wurde die ACS gereinigt, charakterisiert und als ACS2 identifiziert. Die Acetat-spezifische Induktion des kodierenden Gens wurde nachgewiesen. Eine  $\Delta$ *acs2*-Mutante wuchs unverändert auf Acetat, was für eine Ersetzbarkeit durch paraloge ACS-Enzyme spricht. Drei weitere ACS wurden homolog überexprimiert und charakterisiert. Die funktionelle Beteiligung der paralogen ACS7 und der ACS2 am Acetat-Stoffwechsel wurde mit einer Doppelmutante in Wachstumsexperimenten nachgewiesen. Das eingeschränkte Wachstum spricht dafür, dass die ACS2 und die ACS7 durch weitere paraloge ACS funktionell ersetzt werden können. Eine Isocitrat-Lyase-Deletionsmutante konnte nicht auf Acetat wachsen, was zeigt, dass die Funktion des Glyoxylatzyklus essentiell für ein Wachstum von *H. volcanii* ist. Die anabole

Synthese von PEP aus Intermediaten des Glyoxylatzyklus wurde untersucht. Zwei paraloge Malat-Enzyme wurden homolog überexprimiert und charakterisiert. Das rekombinante Malat-Enzym 1 katalysierte die Umsetzung von Malat zu Pyruvat. In Wachstumsexperimenten auf Acetat wurde mit Deletionsmutanten eine essentielle Funktion beider Malat-Enzyme nachgewiesen, wobei sich die paraloge Enzyme gegenseitig funktionell ersetzen können. Die anschließende gluconeogenetische Umsetzung von Pyruvat zu PEP wird durch die Phosphoenolpyruvat-Synthetase katalysiert. In Wachstumsexperimenten mit einer Deletionsmutante wurde die essentielle Funktion der PEPS für ein Wachstum auf Acetat nachgewiesen.

**Succinat-Stoffwechsel.** In der Domäne der Archaea wurde erstmals ein Wachstum auf Dicarbonsäuren untersucht. *H. volcanii* kann Succinat, jedoch nicht Malat, als Energie- und Kohlenstoffquelle nutzen. Die essentielle Beteiligung der Malat-Enzyme und der PEPS an der Gluconeogenese sowie der POR an der Synthese von Acetyl-CoA wurde nachgewiesen.



Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit charakterisierten Enzyme des Glucose-, Acetat- und Succinat-Stoffwechsels von *H. volcanii* sind in Abbildung 1 zusammengefasst.



**Abbildung 1** Schematische Darstellung des Glucose-, Acetat- und Succinat-Stoffwechsels in *H. volcanii*. Im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Reaktionen des Glucose- (grün), Acetat- (rot) und Succinat-Stoffwechsels (blau) sind farbig hervorgehoben.  $\alpha$ -KG,  $\alpha$ -Ketoglutarat; ACD, ADP-bildende Acetyl-Coenzym A Synthetase; ACS, AMP-bildende Acetyl-Coenzym A Synthetase; CoA, Coenzym A;  $\text{Fd}_{\text{ox}}$ , Ferredoxin (oxidiert);  $\text{Fd}_{\text{red}}$ , Ferredoxin (reduziert); ICL, Isocitrat-Lyase; PEP, Phosphoenolpyruvat; PEPC, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase; PEPS, Phosphoenolpyruvat-Synthetase; PK, Pyruvat-Kinase; POR, Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase; spED-Weg, semiphosphorylierender ED-Weg; SSF, Acetat-Transporter der *sodium-solute-symporter* Familie.

## 2 Summary

*Haloferax volcanii* is an aerobic haloarchaeon that can grow on diverse carbon sources such as sugars or acetate. Glucose is degraded to pyruvate via the semiphosphorylative Entner-Doudoroff (spED) pathway. It has been postulated that pyruvate is formed from phosphoenolpyruvate (PEP) by a pyruvate kinase (PK) in the last step of this pathway, but experimental evidence is still missing. Further enzymes of *H. volcanii* catalyzing the conversion of pyruvate to acetyl-coenzyme A (acetyl-CoA) and of anaplerotic reactions have not been identified. Furthermore it has been reported that acetate is formed during aerobic growth on glucose as part of an overflow metabolism. An ADP-forming acetyl-CoA synthetase (ACD) was proposed to catalyze formation of acetate from acetyl-CoA, but functional analyses are still missing. Moreover the metabolic pathways of *H. volcanii* during growth on acetate are unknown. Genomic analyses suggest the presence of an acetate transporter and of nine genes encoding putative AMP-forming acetyl-CoA synthetase (ACS) likely to be involved in the activation of acetate to acetyl-CoA. Further studies suggest the function of a glyoxylate cycle in *H. volcanii* during growth on acetate, but an *in vivo* evidence of a functional involvement of the key enzymes, isocitrate lyase and malate synthase is still missing. Enzymes in *H. volcanii* catalyzing the gluconeogenic formation of PEP from intermediates of the glyoxylate cycle have not been analyzed yet. Also growth and metabolism of *H. volcanii* on dicarboxylates have not been investigated yet.

In the present study the key enzymes of glucose-, acetate- and succinate metabolism of *H. volcanii* were identified and characterized. Transcript analyses, biochemical characterizations of enzymes and growth studies with the respective deletion mutants were performed.

**Glucose-metabolism.** The glucose-specific induction of the *pk*-gene and a significantly reduced growth of the  $\Delta pk$ -mutant on glucose prove the functional involvement of PK in the spED pathway. A glycolytic function of PEP-synthetase has been ruled out. Transcriptional analyses revealed a cotranscription of the *porA*- and *porB*-genes encoding pyruvate-ferredoxin oxidoreductase (POR) during glycolytic growth. The recombinant POR has been shown to be heterotetrameric enzyme ( $\alpha_2\beta_2$ ) catalyzing the methylviologen-dependent formation of acetyl-CoA from pyruvate. A *porAB*-depletion mutant was unable to grow on glucose and pyruvate indicating the essential function of the POR during growth these substrates. This is the first proof of an essential function of a POR in the domain of archaea.

Transcription of the gene encoding PEP-carboxylase (PEPC) has been shown to be glucose-specific and the recombinant enzyme catalyzed the carboxylation of PEP to oxaloacetate. A PEPC-deletion mutant was unable to grow on glucose. During aerobic growth of a  $\Delta acd$ -mutant on glucose the amount of acetate formed was decreased by 64 % as compared to the wild type. Acetate formation in the  $\Delta acd$ -mutant was restored upon an *in trans* complementation with the wild type gene. This is the first proof of a functional involvement of an ACD in acetate formation from glucose as part of an overflow metabolism.

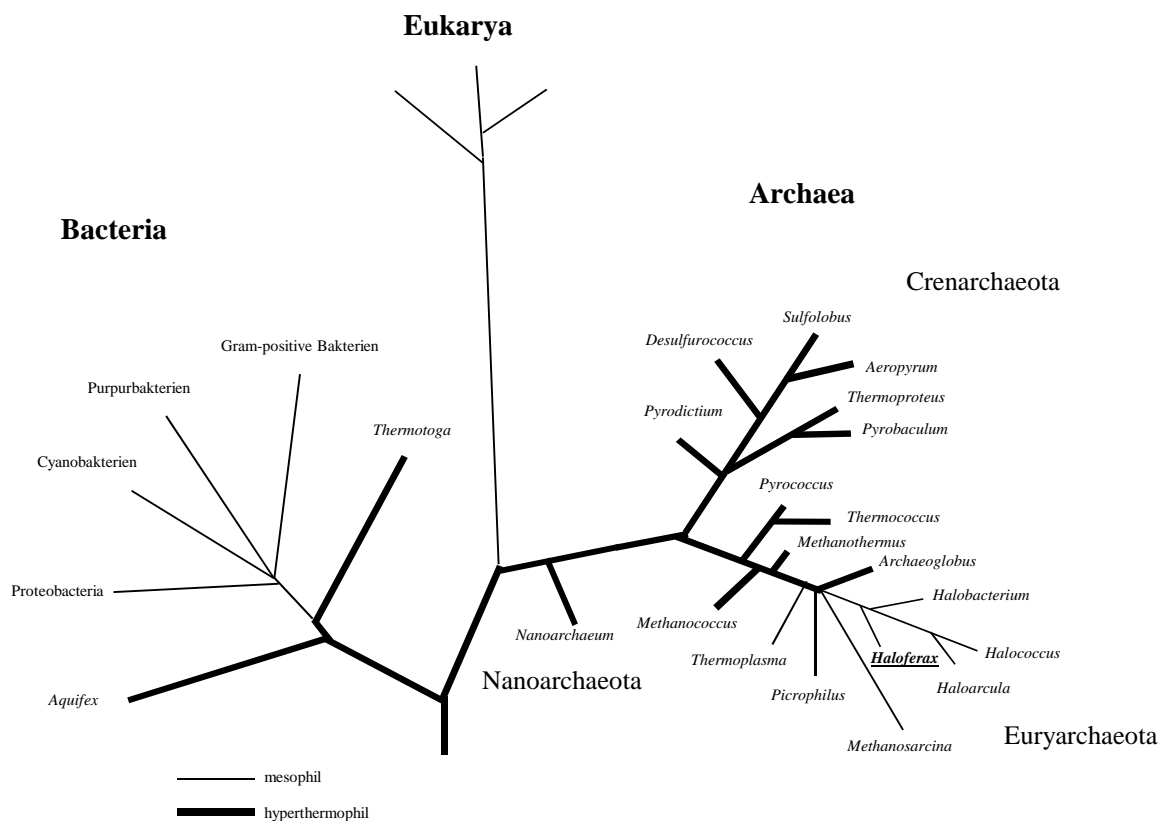
**Acetate-metabolism.** An operon encoding an acetate transporter of the sodium-solute-symporter (SSF) family and an ACS has been identified and shown to be induced during growth on acetate. Cell suspensions of *H. volcanii* catalyzed the uptake of acetate with a  $K_m$ -value of 24,6  $\mu\text{M}$  and a maximum uptake rate of 1,9  $\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ . In transport experiments with a SSF-transporter deletion mutant the uptake rate was significantly reduced (0,18  $\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ ). The acetate uptake rate was restored upon an *in trans* complementation with the wild type gene. This is the first functional evidence of an acetate-transporter in the domain of archaea. An ACS-enzyme was purified from acetate-grown cells, biochemically characterized and identified as ACS2. Growth of the  $\Delta acs2$ -mutant on acetate was unaffected indicating a functional replacement by paralogues enzymes. Three additional ACS-enzymes of *H. volcanii* have been overexpressed and biochemically characterized. The functional involvement of ACS7 and ACS2 in acetate metabolism has been proven with a double mutant. However reduced growth of this double mutant on acetate implies a functional replacement by other paralogues ACS. The essential function of the glyoxylate cycle in *H. volcanii* has been demonstrated with an isocitrate lyase-deletion mutant being unable to grow on acetate. The anabolic synthesis of PEP from intermediates of the glyoxylate cycle has been investigated. Two paralogues malic enzymes have been overexpressed and biochemically characterized. The recombinant malic enzyme 1 catalyzed the  $\text{NADP}^+$ -dependent decarboxylation of malate to pyruvate. Growth experiments with deletion mutants revealed an essential function of both malic enzymes, which were capable of substituting each other. The formation of PEP from pyruvate is catalyzed by PEP-synthetase. Growth experiments with a deletion mutant on acetate revealed an essential function of PEPS.

**Succinate-metabolism.** In the present study growth on dicarboxylates was investigated for the first time in the domain of the archaea. *H. volcanii* can grow on succinate, but not on malate. The essential involvement of malic enzymes, of PEPS and of POR in the succinate-metabolism has been proven with the respective deletion mutants.

### 3 Einleitung

Der Stammbaum des Lebens basiert auf 16S und 18S-rRNA-Analysen und gliedert sich in die drei Domänen der Archaea, Bacteria und Eukarya (Abbildung 2) (Woese 1987; Woese et al. 1990). Organismen aus der Domäne der Archaea weisen in molekularer und biochemischer Hinsicht sowohl einige Unterschiede als auch Gemeinsamkeiten zu denen aus Bacteria und Eukarya auf. Sie sind ebenso wie die Bacteria Prokaryoten, d. h. sie besitzen keinen echten Zellkern und keine Organellen. Eukaryoten hingegen sind ein- oder mehrzellige Lebewesen, deren Zellen von Membranen umschlossene Zellkerne und Mitochondrien besitzen. In pflanzlichen Zellen sind außerdem Plastiden vorhanden. Die Cytoplasmamembran der Archaea ist aus Di- oder Tetraetherlipiden aufgebaut, während jene der Bacteria und Eukarya aus Glycerin-Fettsäure-Ester-Lipiden besteht (Langworthy und Pond 1986; De Rosa und Gambacorta 1988). Neben der Cytoplasmamembran unterscheidet sich auch die Zellwand der Archaea von jener der Bacteria. Sie besteht nicht aus Murein, sondern setzt sich hauptsächlich aus Proteinen, Glykoproteinen und Polysacchariden zusammen (Albers und Meyer 2011). Während der basale Transkriptionsapparat und die Translation von Archaea jenen Prozessen in Eukarya ähneln, ist die Transkriptionsregulation mit jener der Bacteria vergleichbar (Londei 2007; Thomm 2007).

Die meisten Archaea besiedeln Lebensräume mit hohen Temperaturen, niedrigen pH-Werten oder sehr hohen Salzkonzentrationen und sind an diese angepasst. Hyperthermophile Organismen wachsen optimal bei Temperaturen über 80 °C und gelten aufgrund der Tatsache, dass sie die frühen Verzweigungen im Stammbaum des Lebens bilden, als ursprünglich (Abbildung 2). In der Domäne der Bacteria sind nur wenige hyperthermophile Organismen bekannt und bilden die Ordnungen der Aquificales und der Thermotogales.



**Abbildung 2 Phylogenetischer Stammbaum des Lebens.** Verzweigungsgrad und -längen basieren auf 16S- bzw. 18S-rRNA-Sequenzvergleichen (schematisch nach (Woese et al. 1990; Huber et al. 2002; Stetter 2006); modifiziert). Hyperthermophile Organismen sind durch dicke Linien dargestellt. In dieser Arbeit wurden Untersuchungen mit dem halophilen Archaeon *Haloferax volcanii* durchgeführt.

Die meisten Archaea gehören zu den seit langem bekannten Phyla der Euryarchaeota und Crenarchaeota (Woese et al. 1990). Erst in den letzten Jahren wurden archaeelle Organismen identifiziert, welche die Phyla der Kor- und Nanoarchaeota bilden (Barns et al. 1996; Huber et al. 2002). Zu den Crenarchaeota gehören u. A. die hyperthermophilen Ordnungen Thermoproteales, mit Vertretern wie zum Beispiel dem anaeroben *Thermoproteus tenax* oder dem microaerophilen *Pyrobaculum aerophilum*, sowie die Desulfurococcales wie beispielsweise *Aeropyrum pernix* oder *Desulfurococcus sp.* (Zillig et al. 1982; Huber et al. 2006; Huber und Stetter 2006). Ebenfalls zu den Crenarchaeota gehören thermoacidophile, aerobe Organismen der Ordnung Sulfolobales wie zum Beispiel *Sulfolobus solfataricus*, welche in sauren Lebensräumen wie heißen, vulkanischen Quellen mit einem pH-Wert von 2 bis 4 leben (Kletzin 2007).

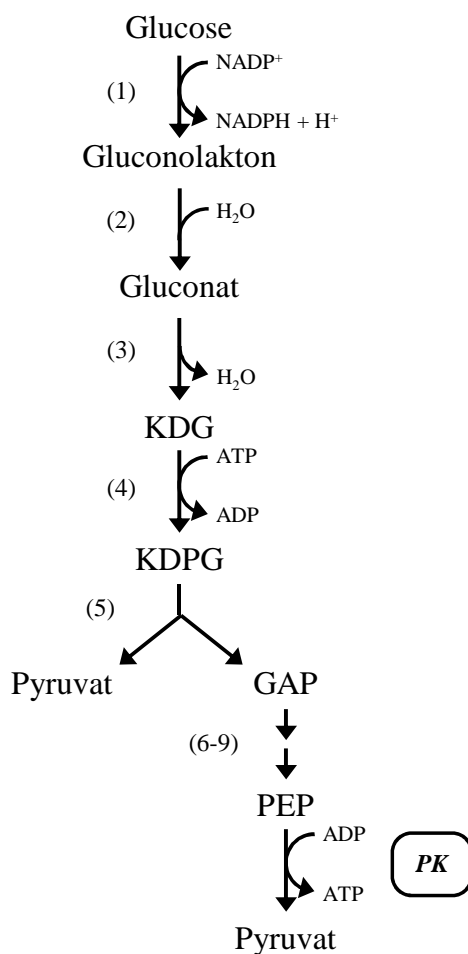
Die Lebensweise von Organismen der Euryarchaeota ist sehr divers. Neben den hyperthermophilen, anaeroben Ordnungen wie z. B. den Thermococcales mit bekannten Vertretern wie *Thermococcus kodakarensis* oder *Pyrococcus furiosus* sind auch thermophile

und mesophile Organismen zu finden. Methanogene sind strikt anaerobe Organismen, wie z. B. *Methanothermobacter thermautotrophicus* oder *Methanosarcina mazei*, die  $H_2$  und  $CO_2$  oder einige auch Acetat zu Methan umsetzen. Thermoacidophile Organismen der Thermoplasmatales hingegen, wie zum Beispiel *Picrophilus torridus*, wachsen aerob bei Temperaturen von ca. 60 °C und einem optimalen pH-Wert von 0,7 (Schleper et al. 1995a; Schleper et al. 1995b). Zu den Euryarchaeota gehört auch die große Gruppe der aeroben Halobacteria mit Vertretern wie z. B. *Haloferax volcanii*, *Haloarcula marismortui* und *Halobacterium salinarum*. Sie sind an Lebensräume mit sehr hohen Salzkonzentrationen von 1 bis 5 M Natriumchlorid, wie z. B. das Tote Meer, andere Salzseen oder Salinen, angepasst. Um zu verhindern, dass der Zelle durch die osmotische Wirkung des Salzes Wasser entzogen wird, akkumulieren Haloarchaea intrazellulär hohe Konzentrationen Kaliumchlorid (Oren 2002; Oren 2013). Proteine dieser Organismen sind an die hohen intrazellulären Kaliumchlorid-Konzentrationen angepasst, indem sich vermehrt saure Aminosäuren an der Oberfläche der Proteine befinden, deren negativ geladene Seitenketten eine stabile Hydrathülle ausbilden und ein Ausfällen verhindern (Dennis und Shimmin 1997; Danson und Hough 1998). Viele halophile Archaea können chemoorganoheterotroph mit Kohlenhydraten, Acetat oder Aminosäuren als Kohlenstoff- und Energiequelle wachsen (Siebers und Schönheit 2005; Sato und Atomi 2011).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen zu Schlüsselenzymen des zentralen Kohlenstoffwechsels mit dem halophilen Modellorganismus *H. volcanii* durchgeführt und die Ergebnisse mit bereits charakterisierten Stoffwechselwegen aus Archaea und Bacteria verglichen. *H. volcanii* wurde 1975 aus dem Toten Meer isoliert (Mullakhanbhai und Larsen 1975). Die optimale Salzkonzentration für das Wachstum liegt bei 1,7 bis 2,5 M Natriumchlorid und ein Wachstum ist auf organischen Kohlenstoffquellen wie Glucose oder Acetat sowohl aerob mit Sauerstoff als Elektronenakzeptor als auch anaerob durch eine Nitratatmung möglich. Das Genom ist vollständig sequenziert und es wurden Systeme zur Konstruktion von Deletionsmutanten etabliert (Allers und Mevarech 2005; Hartman et al. 2010; Gäbel et al. 2013). Außerdem ermöglicht ein etabliertes System die homologe Überexpression von Proteinen (Allers 2010). Dies ist insbesondere deshalb von Bedeutung, weil halophile Proteine nach heterologer Expression, z. B. in *E. coli*, aggregieren und zeitaufwendig entfaltet und rückgefaltet werden müssen.

### 3.1 Glucose-Stoffwechsel

Es ist lange bekannt, dass Organismen aus der Domäne der Bacteria Glucose entweder über einen klassischen Embden-Meyerhof (EM)- oder einen klassischen Entner-Doudoroff (ED)-Weg zu Pyruvat abbauen. Auch in Archaea wird der Abbau von Kohlenhydraten, insbesondere Glucose, intensiv untersucht. Es hat sich gezeigt, dass Glucose nicht über die klassischen EM- oder ED-Wege, sondern über modifizierte Varianten dieser Wege abgebaut wird, in denen eine Vielzahl neuartiger Enzyme identifiziert und charakterisiert wurden (Siebers und Schönheit 2005; Bräsen et al. 2014). So konnten insbesondere in hyperthermophilen Vertretern der Thermococcales, wie z. B. *Pyrococcus furiosus* oder *Thermococcus kodakarensis*, modifizierte EM-Wege identifiziert werden, an denen ADP-abhängige Gluco- und Phosphofructo-Kinasen beteiligt sind. Die Analyse dieser Wege ergab, dass unter anderem die Kinasen und Isomerasen zu anderen Proteinfamilien gehören als die bis dahin bekannten Enzyme der Bacteria. Auch wird die Umsetzung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) zu 3-Phosphoglycerat (3PG), die in klassischen EM- oder ED-Wegen von einer GAP-Dehydrogenase (GAP-DH) und einer Phosphoglycerat-Kinase katalysiert wird, in hyperthermophilen Archaea durch eine GAP-Ferredoxin-Oxidoreduktase (GAPOR) katalysiert (Mukund und Adams 1995). Für aerobe thermoacidophile und halophile Archaea wurde ein Abbau von Glucose über verschiedene modifizierte ED-Wege nachgewiesen (Ahmed et al. 2005; Reher et al. 2010; Sutter et al. 2016). Das thermoacidophile Euryarchaeon *Picrophilus torridus* baut Glucose über einen nicht-phosphorylierenden ED (npED)-Weg ab, während für das thermoacidophile Crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* ein verzweigter ED-Weg nachgewiesen wurde (Ahmed et al. 2005; Lambie et al. 2005; Reher et al. 2010). In halophilen Archaea hingegen wird Glucose über einen semiphosphorylierenden ED (spED)-Weg zu Pyruvat abgebaut (Abbildung 3) (Sutter et al. 2016). In diesem Weg katalysiert eine Glucose-Dehydrogenase die Oxidation von Glucose zu Gluconat, welches anschließend durch eine Gluconat-Dehydratase zu 2-Keto-3-Desoxygluconat (KDG) umgesetzt wird. Im spED-Weg findet im Vergleich zum klassischen ED-Weg aus Bacteria eine Phosphorylierung des Substrates erst auf der Stufe der Umsetzung von KDG zu 2-Keto-3-Desoxy-6-Phosphogluconat (KDPG) statt, welche durch eine KDG-Kinase katalysiert wird. Die KDPG-Aldolase spaltet anschließend KDPG zu Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP), welches im Anschluss durch die klassischen Enzyme eines ED-Weges zu einem weiteren Molekül Pyruvat abgebaut wird.

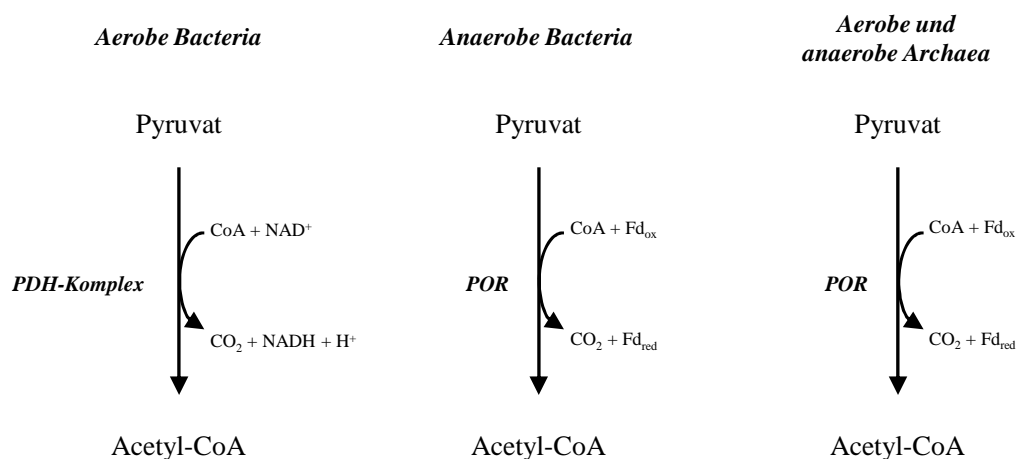


**Abbildung 3** Postulierter Glucose-Abbau über einen semiphosphorylierenden Entner-Doudoroff-Weg in *Haloferax volcanii*. (1) Glucose-Dehydrogenase, (2) putative Laktanase, (3) Gluconat-Dehydratase, (4) 2-Keto-3-Desoxygluconat-Kinase, (5) 2-Keto-3-Desoxy-6-Phosphogluconat-Aldolase, (6) Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, (7) 3-Phosphoglycerat-Kinase, (8) Phosphoglycerat-Mutase, (9) Enolase. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Pyruvat-Kinase (PK) ist hervorgehoben. Modifiziert nach (Sutter et al. 2016).

Kürzlich wurde die Pyruvat-Kinase (PK), die in *H. volcanii* im letzten Schritt des spED-Weges die Umsetzung von Phosphoenolpyruvat (PEP) zu Pyruvat katalysiert, in der AG Schönheit biochemisch charakterisiert. Eine detaillierte Analyse der Transkription des *pk*-Gens sowie des Wachstumsphänotyps einer  $\Delta pk$ -Mutante wurden bisher noch nicht durchgeführt.



Die weitere Umsetzung von Pyruvat zu Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) ist in *H. volcanii* bisher ebenfalls nicht untersucht. In Bacteria und Eukarya wird Pyruvat unter aeroben Wachstumsbedingungen durch den Pyruvat-Dehydrogenase (PDH)-Komplex zu Acetyl-CoA umgesetzt (Abbildung 4). In strikt anaeroben Bacteria wie z. B. *Clostridium acetobutylicum* oder *Desulfovibrio piger* wird die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-CoA durch die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase (POR) katalysiert (Abbildung 4) (Meinecke et al. 1989; Kushkevych 2015).



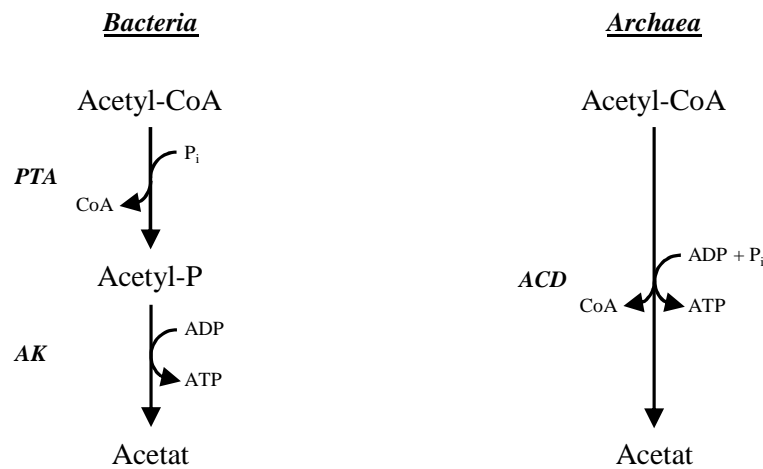
**Abbildung 4 Schematische Darstellung ausgewählter Enzyme in aeroben und anaeroben Bacteria und Archaea, die eine Umsetzung von Pyruvat zu Acetyl-Coenzym A katalysieren.** Es ist zu beachten, dass ein oder zwei Moleküle Ferredoxin als Elektronenakzeptor dienen können (Martinez-Espinosa et al. 2003; Park et al. 2006). Acetyl-CoA, Acetyl-Coenzym A; CoA, Coenzym A;  $\text{Fd}_{\text{ox}}$ , Ferredoxin (oxidiert);  $\text{Fd}_{\text{red}}$ , Ferredoxin (reduziert); PDH-Komplex, Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex; POR, Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase.

In der Domäne der Archaea wird Pyruvat in allen bisher untersuchten aeroben Organismen, wie z. B. *S. solfataricus* und *P. aerophilum*, und auch anaeroben Organismen, wie z. B. *P. furiosus* und *Thermococcus guaymasensis*, mittels einer POR zu Acetyl-CoA umgesetzt, wobei ein oder zwei Moleküle Ferredoxin als Elektronenakzeptor dienen (Abbildung 4) (Blamey und Adams 1993; Blamey und Adams 1994; Martinez-Espinosa et al. 2003; Siebers und Schönheit 2005; Park et al. 2006; Eram et al. 2014). Auch in dem aeroben Haloarchaeon *Halobacterium salinarum* wurde eine POR identifiziert und charakterisiert (Kerscher und Oesterhelt 1981a; Plaga et al. 1992). In *H. volcanii* liegen keine Untersuchungen zu der Umsetzung von Pyruvat zu Acetyl-CoA vor. Der funktionelle Nachweis einer Beteiligung der POR ist insbesondere deshalb von Bedeutung, da im Genom von *H. volcanii* auch die Gene für einen putativen PDH-Komplex annotiert sind.

Acetyl-CoA wird unter aeroben Bedingungen in Eukarya, Bacteria und Archaea über die Enzyme des Citratzyklus vollständig zu CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O oxidiert (Danson et al. 2007). Dabei werden Reduktionsäquivalente gebildet und diese in der Atmungskette für die ATP-Synthese genutzt. Da Intermediate des Citratzyklus auch als Substrate für die Biosynthese von z. B. Aminosäuren dienen, muss durch anaplerotische Reaktionen Oxalacetat gebildet werden, damit der Citratzyklus nicht zum Erliegen kommt (Owen et al. 2002). In Bacteria erfolgt die anaplerotische Bildung von Oxalacetat bei einem Wachstum auf Glucose entweder durch eine Pyruvat-Carboxylase (PC), welche die ATP- und Bicarbonat-abhängige Carboxylierung von Pyruvat katalysiert, oder durch eine PEP-Carboxylase (PEPC), welche die Bicarbonat-abhängige Carboxylierung von PEP katalysiert (Sauer und Eikmanns 2005). Sowohl PCs als auch PEPCs sind sowohl in aeroben als auch in anaeroben Organismen aller drei Domänen identifiziert und charakterisiert worden (Matsumura et al. 2006; Jitrapakdee et al. 2008). Auch in anaeroben Organismen, die nicht über einen geschlossenen Citratzyklus verfügen, katalysieren diese Enzyme die Bildung von Oxalacetat, welches für die Synthese von Aminosäuren der Aspartatfamilie essentiell ist. Eine Synthese von Oxalacetat durch PCs wurde zum Beispiel in dem Bacterium *Corynebacterium glutamicum* und in dem Eukaryoten *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben (Jitrapakdee und Wallace 1999; March et al. 2002). In Archaea wurden PCs bisher nur in anaeroben Methanogenen identifiziert und charakterisiert (Jitrapakdee et al. 2008). PEPCs wurden in der Domäne der Bacteria z. B. aus *E. coli*, *C. glutamicum* und *Clostridium perfringens* charakterisiert (Teraoka et al. 1972; Dharmarajan et al. 2009; Dharmarajan et al. 2011; Chen et al. 2014). Bisher wurden PEPCs in der Domäne der Archaea aus wenigen Organismen wie z. B. *Sulfolobus solfataricus* und *Methanothermobacter thermautotrophicus* identifiziert und charakterisiert (Ettema et al. 2004; Patel et al. 2004). In Haloarchaea, so auch in *H. volcanii*, wurden PCs oder PEPCs bisher nicht identifiziert.

Viele Bacteria, wie z. B. *E. coli* setzen Zucker unter anaeroben Wachstumsbedingungen in unterschiedlichen Gärungsprozessen vor allem zu Säuren wie Acetat oder Laktat als Fermentationsprodukte um. Für *E. coli* wurde jedoch auch gezeigt, dass unter aeroben Bedingungen bei Wachstum auf Glucose signifikante Mengen Acetat gebildet werden (Wolfe 2005). Dieser sogenannte Overflow-Metabolismus wird dadurch erklärt, dass die Umsatzrate der Glykolyse höher ist als die Rate der anschließenden Oxidation von Acetyl-CoA über den Citratzyklus. In allen bisher untersuchten Bacteria katalysieren eine Phosphotransacetylase (PTA) und eine Acetat-Kinase (AK) die Umsetzung von Acetyl-CoA zu Acetat als

Fermentationsprodukt oder auch als Produkt eines Overflow-Metabolismus (Abbildung 5) (Decker et al. 1970; Thauer et al. 1977; Gottschalk 1986; Schäfer et al. 1993). Dabei wird ATP über den Mechanismus der Substratstufen-Phosphorylierung gebildet.



**Abbildung 5 Acetat-bildende Enzymreaktionen in Bacteria und Archaea.** Bakterieller Mechanismus (links) über eine Phosphotransacetylase (PTA) und eine Acetat-Kinase (AK). Archaeeller Mechanismus (rechts) über eine ADP-bildende Acetyl-Coenzym A Synthetase (ACD). Acetyl-P, Acetyl-Phosphat; CoA, Coenzym A.

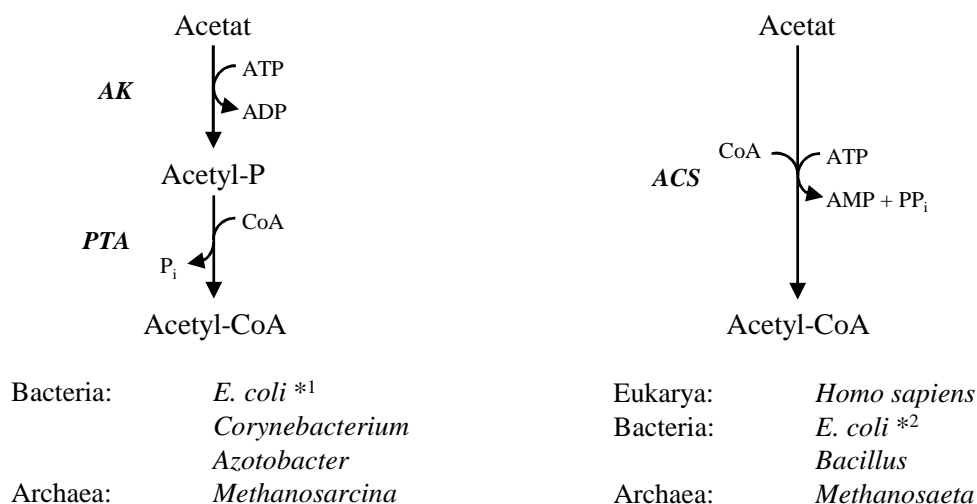
Auch in der Domäne der Archaea fermentieren anaerobe Spezies, wie z. B. *P. furiosus* oder *Thermococcus kodakarensis*, Zucker zu Acetat. Dabei wurde gezeigt, dass Acetat nicht durch die beiden aus Bacteria bekannten Enzyme PTA und AK gebildet wird, sondern durch nur ein Enzym, die ADP-bildende Acetyl-CoA-Synthetase (ACD; Abbildung 5). Diese ungewöhnliche Synthetase katalysiert die ADP und Phosphat-abhängige Umsetzung von Acetyl-CoA zu Acetat, ATP und Coenzym A. Die ACD wurde in allen bisher untersuchten Acetat-bildenden Archaea nachgewiesen (Schäfer et al. 1993). Kürzlich wurden der Reaktionsmechanismus und die Struktur des Enzyms aufgeklärt (Bräsen et al. 2008; Weiße et al. 2016).

Auch für aerobe Haloarchaea wurde, wie für Bacteria bekannt, eine Bildung von Acetat bei einem aeroben Wachstum auf Glucose im Rahmen eines Overflow-Metabolismus beschrieben (Kuprat 2011; Bräsen et al. 2014). Aus Glucose-gewachsenen Zellen von *Ha. marismortui* wurde eine ACD gereinigt und charakterisiert (Bräsen und Schönheit 2004b). In Vorversuchen wurde auch für *H. volcanii* eine Acetat-Bildung bei einem Wachstum auf Glucose nachgewiesen und die rekombinante ACD aus diesem Organismus charakterisiert (Kuprat 2011). Der Nachweis einer funktionellen Beteiligung einer ACD an der Acetat-Bildung wurde in Haloarchaea bisher nicht erbracht.

## 3.2 Acetat-Stoffwechsel

Acetat ist nicht nur ein häufiges Produkt von Fermentationsprozessen oder eines Overflow-Metabolismus sondern kann als Substrat für den Katabolismus und Anabolismus von Bacteria und Eukarya genutzt werden (Thauer 1988b). Acetat ist eine schwache Säure ( $pK_s = 4,8$ ), die bei pH-Werten größer als 6,8 zu 99 % als dissoziiertes Anion vorliegt. Unter der Annahme von geringen Acetat-Konzentrationen in natürlichen Habitaten ist daher ein Transport über die Cytoplasmamembran notwendig. Dennoch wurde ein Transport von Acetat bisher nur in wenigen Bacteria, wie z. B. *E. coli* und *C. glutamicum* untersucht, wobei Acetat-Transporter der *sodium:solute-symporter* (SSF)-Proteinfamilie (TC 2.A.21) nachgewiesen wurden (Gimenez et al. 2003; Jolkver et al. 2009). Neben Proteinen dieser Familie wurden z. B. in den Eukaryoten *Aspergillus nidulans* und *Saccharomyces cerevisiae* sowie auch in *E. coli* Transporter der *acetate uptake transporter* (AceTr)-Familie (TC 2.A.96) beschrieben, die ebenfalls einen Transport von Acetat katalysieren (Soares-Silva et al. 2003; Robellet et al. 2008; Sa-Pessoa et al. 2013). In der Domäne der Archaea hingegen wurde ein Transport von Acetat bisher nicht nachgewiesen.

Die Aktivierung von Acetat wird in den meisten Bacteria wie z. B. *Bacillus subtilis* oder *E. coli* und in Eukaryoten wie Pflanzen, Pilzen oder auch dem Mensch durch die AMP-bildende Acetyl-CoA Synthetase (ACS) katalysiert (Abbildung 6) (Connerton et al. 1990; Roughan und Ohlrogge 1994; Yoshii et al. 2015). ACS-Enzyme katalysieren die ATP- und Coenzym A-abhängige Umsetzung von Acetat zu Acetyl-CoA, AMP und Pyrophosphat. Für *E. coli* wurde gezeigt, dass die ACS nur bei geringen Acetat-Konzentrationen funktionell ist (Kumari et al. 1995; Wolfe 2005). Bei einer hohen Acetat-Konzentration findet dagegen eine Aktivierung über die Enzyme AK und PTA statt (Abbildung 6). In den Bacteria *Corynebacterium glutamicum* und *Azotobacter vinelandii* hingegen wird die Aktivierung von Acetat ausschließlich durch die Enzyme AK und PTA katalysiert (Tauchert et al. 1990; Reinscheid et al. 1999). Nur in wenigen Bacteria wurde eine Aktivierung von Acetat durch Succinyl-CoA:Acetat CoA-Transferasen gezeigt (Thauer et al. 1989).

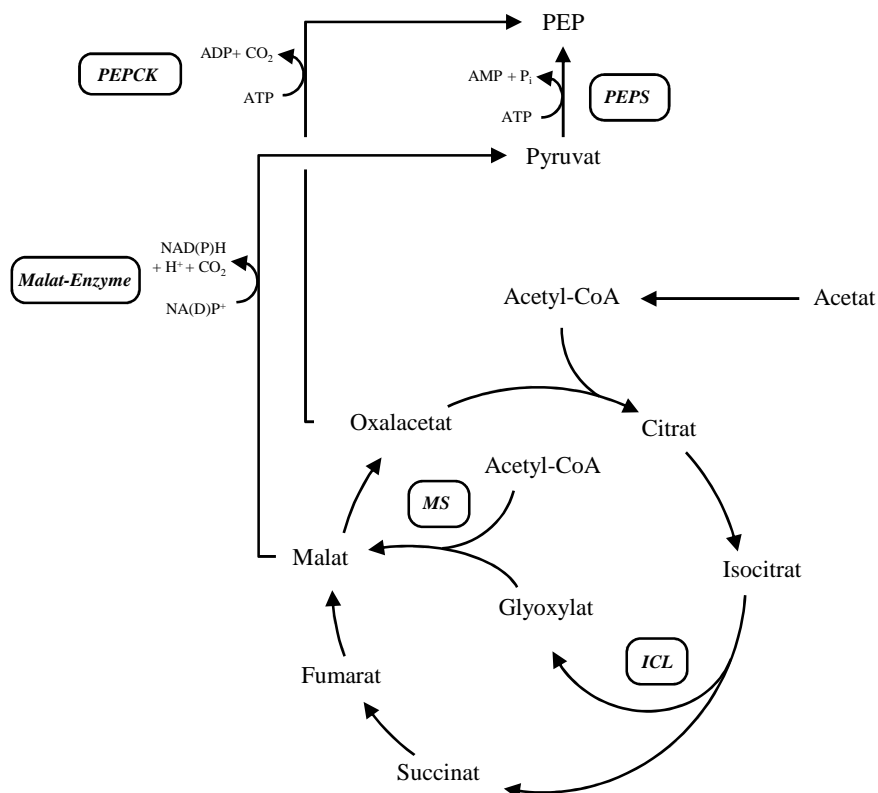


**Abbildung 6 Mechanismen der Aktivierung von Acetat zu Acetyl-CoA.** Zweistufiger Mechanismus (links) über Acetat-Kinase (AK) und Phosphotransacetylase (PTA). Einstufiger Mechanismus (rechts) über eine AMP-bildende Acetyl-CoA Synthetase (ACS). \*<sup>1</sup> bei hohen Acetat-Konzentrationen; \*<sup>2</sup> bei niedrigen Acetat-Konzentrationen. Acetyl-P, Acetyl-Phosphat; CoA, Coenzym A.

In der Domäne der Archaea ist ein Wachstum auf Acetat bisher nur für wenige anaerobe Methanogene, wie z. B. *Methanosarcina sp.* oder *Methanosaeta consilii*, und die aeroben, halophilen Archaea *Ha. marismortui* und *H. volcanii* beschrieben (Bräsen und Schönheit 2001; Ferry und Kastead 2007; Kuprat 2011). Während Acetat in *Methanosarcina sp.* durch die Enzyme AK und PTA aktiviert wird, katalysiert in *Methanosaeta consilii* eine ACS die Aktivierung von Acetat zu Acetyl-CoA (Abbildung 6) (Ferry 1997; Smith und Ingram-Smith 2007). Im Genom von *Ha. marismortui* sind fünf Gene annotiert, die für putative ACS-Enzyme kodieren. Eine ACS aus diesem Haloarchaeon wurde gereinigt und charakterisiert (Bräsen und Schönheit 2005). Eine Analyse der funktionalen Beteiligung des Enzyms anhand von Wachstumsexperimenten mit einer Deletionsmutante ist nicht erfolgt. Auch im Genom von *H. volcanii* sind neun Gene für putative ACS-Enzyme annotiert, die Aktivierung von Acetat wurde in diesem Organismus bisher aber nicht untersucht.

Nach der Aktivierung von Acetat zu Acetyl-CoA wird dieses über den Citratzyklus vollständig zu  $CO_2$  oxidiert, wobei die Reduktionsäquivalente in der Atmungskette für eine ATP-Synthese genutzt werden (Thauer 1988a). Die Intermediate dieses Zyklus dienen bei einem Wachstum auf Acetat auch als Substrate für die Biosynthese von z. B. Aminosäuren und für eine Gluconeogenese. In den meisten aeroben Bacteria wird daher bei einem Wachstum auf Acetat der Glyoxylatzyklus als anaplerotische Reaktionssequenz induziert. Dabei wird Isocitrat durch eine Isocitrat-Lyase (ICL) in Succinat und Glyoxylat gespalten und

anschließend folgt die Kondensation von Glyoxylat mit Acetyl-CoA zu Malat, welche durch eine Malat-Synthase (MS) katalysiert wird (Abbildung 7) (Ensign 2006; Ensign 2011).



**Abbildung 7 Schematische Darstellung der Reaktionen des Glyoxylatzyklus und der Enzyme der Gluconeogenese bei einem Wachstum von *E. coli* auf Acetat.** Es sind ausschließlich die charakteristischen Enzyme des Glyoxylatzyklus und der Gluconeogenese benannt. Acetyl-CoA, Acetyl-Coenzym A; ICL, Isocitrat-Lyase; MS, Malat-Synthase; PEP, Phosphoenolpyruvat; PEPCK, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase; PEPS, Phosphoenolpyruvat-Synthetase.

In der Domäne der Archaea wurde der Glyoxylatzyklus bisher nur in wenigen Organismen untersucht. Aus dem thermoacidophilen *Sulfolobus acidocaldarius* und auch aus *H. volcanii* wurden die Schlüsselenzyme ICL und MS gereinigt und charakterisiert (Serrano et al. 1998; Uhrigshardt et al. 2002). In *H. volcanii* wurde außerdem die Acetat-spezifische Induktion der kodierenden Gene gezeigt (Serrano und Bonete 2001). Gene, die für eine putative ICL und MS kodieren, wurden auch in weiteren Haloarchaea identifiziert, eine funktionelle Beteiligung des Glyoxylatzyklus am Wachstum auf Acetat wurde in *H. volcanii* und auch in anderen Haloarchaea noch nicht gezeigt (Borjian et al. 2016).

Bei einem Wachstum auf Acetat wird die Synthese von PEP im Zuge der Gluconeogenese in den meisten Bacteria, wie z. B. *E. coli* oder *C. glutamicum*, durch eine PEP-Carboxykinase (PEPCK) katalysiert (Abbildung 7) (Sauer und Eikmanns 2005; Klaffl et al. 2013). In *E. coli* wurde außerdem eine Synthese von PEP in einem alternativen Weg über zwei Malat-Enzyme und eine Phosphoenolpyruvat-Synthetase (PEPS) beschrieben (Oh et al. 2002). Dabei katalysieren Malat-Enzyme zunächst eine NAD(P)<sup>+</sup>-abhängige Decarboxylierung von Malat zu Pyruvat, NAD(P)H und CO<sub>2</sub>. Pyruvat wird anschließend unter ATP-Verbrauch durch die PEPS zu PEP, AMP und Phosphat umgesetzt.

In der Domäne der Archaea gibt es bisher nur wenige Untersuchungen der anabolen Synthese von PEP im Rahmen der Gluconeogenese. Aus dem hyperthermophilen Archaeon *Thermococcus kodakarensis* wurde eine PEPCK charakterisiert, die vermutlich an der PEP-Synthese bei einem Wachstum auf Aminosäuren beteiligt ist (Fukuda et al. 2004). Anhand einer bioinformatischen Analyse wurden homologe Enzyme in den Ordnungen Thermoplasmatales, Thermococcales und Sulfolobales identifiziert. Bis auf wenige Ausnahmen sind in den Genomen der meisten Haloarchaea keine putativen PEPCKs kodiert (Bhaumik und Sonawat 1994; Anderson et al. 2011). Daher wurde für die meisten Haloarchaea eine Synthese von PEP durch Malat-Enzyme und PEPS postuliert (Falb et al. 2008). Bisher sind jedoch keine Malat-Enzyme und PEP-Synthetasen aus Haloarchaea charakterisiert worden und es gibt keinen Nachweis einer funktionellen Beteiligung am Anabolismus.

### 3.3 Succinat-Stoffwechsel

Viele Bacteria, wie z. B. *E. coli*, können aerob mit Intermediaten des Citratzyklus wie Succinat und Malat als Energie- und Kohlenstoffquelle wachsen. Die Intermediate werden dabei im Citratzyklus vollständig zu CO<sub>2</sub> oxidiert (Unden und Kleefeld 2004). Dabei katalysiert ein Malat-Enzym die Decarboxylierung von Malat zu Pyruvat. Pyruvat wird anschließend durch den Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex zu Acetyl-CoA umgesetzt, wodurch ein zyklischer Ablauf des Citratzyklus möglich ist. Eine PEP-Synthetase katalysiert gleichzeitig die Umsetzung von Pyruvat zu PEP im Zuge der Gluconeogenese. In der Domäne der Archaea sind bisher weder das Wachstum auf Dicarbonsäuren noch die Enzyme des Dicarbonsäure-Stoffwechsels untersucht worden.

Ausgehend von den dargestellten Sachverhalten sollen im Rahmen dieser Arbeit bisher nicht untersuchte Enzyme des Glucose-, des Acetat- und des Dicarbonsäure-Stoffwechsels in dem aeroben, halophilen Modellorganismus *H. volcanii* identifiziert und charakterisiert werden.

### **Glucose-Stoffwechsel:**

- Die funktionelle Beteiligung der Pyruvat-Kinase am Abbau von Glucose und die transkriptionelle Regulation des kodierenden Gens sollen untersucht werden.
- Die Beteiligung einer Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase und einer Phosphoenolpyruvat-Carboxylase am Glucose-Stoffwechsel soll untersucht werden. Dazu sollen die transkriptionelle Regulation analysiert und die rekombinanten Enzyme charakterisiert werden. Die essentielle Funktion der Enzyme ist in Wachstumsexperimenten mit Deletionsmutanten zu prüfen.
- Die funktionelle Beteiligung der ADP-bildenden Acetyl-CoA-Synthetase an der Acetat-Bildung bei einem aeroben Wachstum auf Glucose ist zu zeigen. Dazu sollen Wachstumsexperimente mit der  $\Delta acd$ -Mutante auf einem geeigneten Medium durchgeführt werden.

### **Acetat-Stoffwechsel:**

- Die Aufnahme von Acetat in die Zelle durch einen putativen Acetat-Transporter der SSF-Proteinfamilie soll in Transportexperimenten mit  $^{14}\text{C}$ -markiertem Acetat bestimmt werden. Eine  $\Delta ssf$ -Mutante soll generiert und die essentielle Beteiligung des Acetat-Transporters an der Acetat-Aufnahme soll nachgewiesen werden.
- Es sollen AMP-bildende Acetyl-CoA-Synthetasen (ACS) identifiziert werden, welche die Aktivierung von Acetat zu Acetyl-CoA katalysieren. Dazu soll die funktionell beteiligte ACS aus Acetat-gewachsenen Zellen gereinigt und charakterisiert werden. Weitere paraloge Enzyme sollen ebenfalls charakterisiert werden. Die an der Acetat-Aktivierung beteiligten Enzyme sollen mit Hilfe von verschiedenen Deletionsmutanten identifiziert werden.
- Das Gen, das für das Schlüsselenzym des Glyoxylatzyklus, die Isocitrat-Lyase, kodiert, soll deletiert werden und in Wachstumsexperimenten gezeigt werden, dass die Isocitrat-Lyase essentiell an einem Wachstum auf Acetat beteiligt ist.
- Die Beteiligung der Malat-Enzyme und der Phosphoenolpyruvat-Synthetase (PEPS) an der Gluconeogenese bei einem Wachstum auf Acetat soll untersucht werden. Dazu sollen die



Malat-Enzyme charakterisiert und das Wachstum von Deletionsmutanten auf Acetat getestet werden. Die transkriptionelle Regulation der PEPS soll in Northern Blot-Experimenten analysiert und das Wachstum einer Deletionsmutante soll mit dem Wildtyp verglichen werden.

**Succinat-Stoffwechsel:**

- Das Wachstum von *H. volcanii* auf Succinat soll getestet werden. Anhand von Wachstumsexperimenten mit Deletionsmutanten sollen Enzyme identifiziert werden, die am Katabolismus und an der Gluconeogenese beteiligt sind.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Wachstum von *Haloferax volcanii*

**Wachstum von *H. volcanii*.** In dieser Arbeit wurden die *H. volcanii*-Stämme H26 und H1209 sowie deren Varianten verwendet (Tabellen 2 und 3). Die Anzucht erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 42 °C und 150 rpm in 100 ml Erlenmeyerkolben mit 20 ml Medium (Tabelle 1). Als Kohlenstoff- und Energiequelle wurden D-Glucose (15 mM), Acetat, Succinat, Pyruvat (jeweils 40 mM) oder Casaminsäuren (1 %) verwendet. Als Vorkultur diente eine logarithmisch wachsende und an eine Kohlenstoffquelle adaptierte Kultur. Für Wachstumsexperimente wurden definierte Volumina einer Vorkultur für 2 min bei 8000 rpm zentrifugiert, das Pellet in 500 µl frischem Medium aufgenommen und als Inokulum verwendet, sodass ein Wachstumsexperiment mit einer optischen Dichte bei 578 nm ( $OD_{578}$ ) von 0,05 gestartet wurde. Die Bestimmung der  $OD_{578}$  erfolgte im Einstrahlphotometer CARY 60 UV-Vis (Agilent) gegen unbeimpftes Medium. Die Proben wurden entsprechend der Zellzahl/Zellstreuungs-Relation unter eine  $OD_{578}$  von 0,5 in Medium verdünnt.

**Tabelle 1 Synthetik- und DM-YPC-Medium für *H. volcanii*.**

Zusammensetzung Synthetikmedium <sup>1</sup>		Salzlösung	
Salzlösung <sup>2</sup>	900 ml	NaCl	125 g
Spurenelementlösung <sup>3</sup>	1 ml	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	45 g
FeSO <sub>4</sub> -Lösung <sup>3</sup>	1 ml	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	10 g
2 M MOPS/KOH, pH 7,2 <sup>2</sup>	50 ml	KCl	10 g
1 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> <sup>2</sup>	1 ml	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	1,34 g
1 M NH <sub>4</sub> Cl <sup>2</sup>	10 ml	1 M Tris-HCl pH 7,2	50 ml
10 % Hefeextrakt <sup>2</sup>	1 ml	Auf 900 ml aufgefüllt, pH auf 7,2 eingestellt, autoklaviert.	
Zusammensetzung Agarplatten <sup>1</sup>		FeSO <sub>4</sub> -Stammlösung	
Salzlösung	200 ml	FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,23 g
Agar-Agar	3 g	ad H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> 100 ml, pH auf 3-4 eingestellt, sterilfiltriert.	
Autoklavieren, vor dem Gießen hinzugeben:		Spurenelementlösung	
Spurenelementlösung <sup>3</sup>	200 µl	ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,1 g
FeSO <sub>4</sub> -Stammlösung <sup>3</sup>	200 µl	MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	0,03 g
Zusammensetzung DM-YPC-Medium		H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,3 g
Salzlösung	900 ml	CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,2 g
10 % Hefeextrakt <sup>2</sup>	50 ml	CuCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,01 g
10 % Bactopecton <sup>2</sup>	10 ml	NiCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,02 g
10 % Casaminsäuren <sup>2,4</sup>	10 ml	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,03 g
Spurenelementlösung <sup>3</sup>	1 ml	pH mit HCl auf 3,5 eingestellt, ad H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> 100 ml, sterilfiltriert.	
FeSO <sub>4</sub> -Lösung <sup>3</sup>	1 ml		

<sup>1</sup> Als Kohlenstoffquelle wurden entweder D-Glucose (15 mM), Acetat, Succinat, Pyruvat (jeweils 40 mM) oder Casaminsäuren (1 %) steril zugegeben; <sup>2</sup> autoklaviert; <sup>3</sup> sterilfiltriert; <sup>4</sup> Caseinhydrolysat, Tryptophan-frei, bezogen von Carl Roth, Bestellnummer A157.

***H. volcanii* H26 und Deletionsmutanten.** *H. volcanii* H26 wurde für die Herstellung von Deletionsmutanten mit Hilfe der Pop-In/Pop-Out-Methode verwendet (für detaillierte Angaben zu dieser Methodik siehe 4.2.7 und 4.2.8). In diesem Stamm ist das Gen für die Orotat-Phosphoribosyl-Transferase (*pyrE2*) deletiert. Daher wurde dem Medium Uracil in einer finalen Konzentration von 50 µg/ml zugegeben (Tabelle 1). Pop-In-Kulturen wurden ohne Zugabe von Uracil zehnmal überimpft bevor 1 ml Zellsuspension für 2 min bei 8000 rpm zentrifugiert wurde. Die Zellen wurden in 100 µl Medium, welches 30 µg/ml Uracil und zusätzlich 50 µg/ml 5-Fluoro-Orotat (FOA) enthielt, resuspendiert und 10 µl dieser Suspension auf einer Agarplatte mit den identischen Konzentrationen Uracil und FOA ausplattiert (Pop-Out). Wachstumsexperimente mit Deletionsmutanten wurden auf einem Medium mit geeigneten Kohlenstoffquellen und 50 µg/ml Uracil durchgeführt. Im Falle eines im Vergleich zum Wildtyp veränderten Wachstums einer Mutante wurde eine *in trans* Komplementation durchgeführt. Dazu wurden diese Mutanten mit dem entsprechenden pTA963-Vektor transformiert, auf dem das Zielgen unter Kontrolle eines durch Tryptophan induzierbaren Promotors stand. Die Expression des Zielgens wurde durch die Zugabe von 80 µM Tryptophan induziert. Die Selektion auf transformierte Deletionsmutanten erfolgte durch ein Wachstum in einem Medium ohne Uracil.

Konditionale Depletionen von Zielgenen erfolgten durch eine Transformation von *H. volcanii* H26 mit geeigneten Vektoren, die sich über ein homologes Rekombinationsereignis ins Genom integrierten, so dass sich das Zielgen nicht mehr unter Kontrolle des nativen, sondern eines durch Tryptophan induzierbaren Promotors befand (Tabelle 2, für detaillierte Angaben zu dieser Methodik siehe 4.2.8). Die Selektion auf Transformanten erfolgte durch ein Wachstum in Medium ohne Uracil über 10 Passagen. Konditionale Depletionen wurden mittels Southern Blot-Analysen überprüft (4.2.9). Wachstumsexperimente mit geeigneten Kohlenstoffquellen wurden mit und ohne die Zugabe von 80 µM Tryptophan als Induktor für die Expression des Zielgens durchgeführt.

**Tabelle 2 *H. volcanii* H26 und Varianten des Stammes.** Die Varianten des Stammes *H. volcanii* H26 weisen zusätzlich zum genannten Genotyp auch die *pyrE2*-Deletion auf. Nicht gesondert gekennzeichnete Stämme wurden im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. *p.tnaA*, Promotor der Tryptophanase; *pyrE2*, Orotat-Phosphoribosyl-Transferase; eckige Klammern stehen für ein episomal eingefügtes Plasmid. <sup>1</sup> (Allers et al. 2004); <sup>2</sup> AG Schönheit; <sup>3</sup> (Kuprat 2011).

Stamm	Genotyp
<u>H26</u> <sup>1</sup>	<u><math>\Delta pyrE2</math></u>
$\Delta$ HVO_0806 <sup>2</sup>	$\Delta$ HVO_0806
$\Delta$ HVO_0806 + HVO_0806 <sup>2</sup>	$\Delta$ HVO_0806 [pTA963_HVO_0806]
$\Delta$ HVO_0806 <i>p.tnaA</i> $\Delta$ HVO_0812	$\Delta$ HVO_0806 <i>p.tnaA</i> $\Delta$ HVO_0812
$\Delta$ HVO_0806 <i>p.tnaA</i> $\Delta$ HVO_0812 + HVO_0806	$\Delta$ HVO_0806 <i>p.tnaA</i> $\Delta$ HVO_0812 [pTA963_HVO_0806]
$\Delta$ HVO_0812	$\Delta$ HVO_0812
$\Delta$ HVO_0812 + HVO_0812	$\Delta$ HVO_0812 [pTA963_HVO_0812]
$\Delta$ HVO_0894	$\Delta$ HVO_0894
$\Delta$ HVO_0894 $\Delta$ HVO_0896	$\Delta$ HVO_0894 $\Delta$ HVO_0896
$\Delta$ HVO_0896	$\Delta$ HVO_0896
$\Delta$ HVO_1000 <sup>3</sup>	$\Delta$ HVO_1000
$\Delta$ HVO_1000 + HVO_1000 <sup>3</sup>	$\Delta$ HVO_1000 [pTA963_HVO_1000]
<i>p.tnaA</i> $\Delta$ HVO_1304	<i>p.tnaA</i> $\Delta$ HVO_1304
$\Delta$ HVO_1984	$\Delta$ HVO_1984
$\Delta$ HVO_1984 + HVO_1984	$\Delta$ HVO_1984 [pTA963_HVO_1984]
$\Delta$ HVO_2158	$\Delta$ HVO_2158
$\Delta$ HVO_2158 $\Delta$ HVO_2436	$\Delta$ HVO_2158 $\Delta$ HVO_2436
$\Delta$ HVO_2158 $\Delta$ HVO_2436 + HVO_2158	$\Delta$ HVO_2158 $\Delta$ HVO_2436 [pTA963_HVO_2158]
$\Delta$ HVO_2158 $\Delta$ HVO_2436 + HVO_2436	$\Delta$ HVO_2158 $\Delta$ HVO_2436 [pTA963_HVO_2436]
$\Delta$ HVO_2436	$\Delta$ HVO_2436
$\Delta$ HVO_2436 + HVO_2436	$\Delta$ HVO_2436 [pTA963_HVO_2436]
$\Delta$ HVO_2621	$\Delta$ HVO_2621
$\Delta$ HVO_2621 + HVO_2621	$\Delta$ HVO_2621 [pTA963_HVO_2621]
$\Delta$ HVO_A0154	$\Delta$ HVO_A0154
$\Delta$ HVO_A0154 + HVO_A0154	$\Delta$ HVO_A0154 [pTA963_HVO_A0154]
$\Delta$ HVO_A0156 <sup>2</sup>	$\Delta$ HVO_A0156
$\Delta$ HVO_A0156 $\Delta$ HVO_0894	$\Delta$ HVO_A0156 $\Delta$ HVO_0894
$\Delta$ HVO_A0156 $\Delta$ HVO_0896	$\Delta$ HVO_A0156 $\Delta$ HVO_0896
$\Delta$ HVO_A0156 $\Delta$ HVO_0896 + HVO_A0156	$\Delta$ HVO_A0156 $\Delta$ HVO_0896 [pTA963_HVO_A0156]
$\Delta$ HVO_A0156 $\Delta$ HVO_0896 + HVO_0896	$\Delta$ HVO_A0156 $\Delta$ HVO_0896 [pTA963_HVO_0896]
$\Delta$ HVO_A0156 $\Delta$ HVO_A0158	$\Delta$ HVO_A0156 $\Delta$ HVO_A0158
$\Delta$ HVO_A0156 $\Delta$ HVO_0894 $\Delta$ HVO_0896	$\Delta$ HVO_A0156 $\Delta$ HVO_0894 $\Delta$ HVO_0896
$\Delta$ HVO_A0158	$\Delta$ HVO_A0158

***H. volcanii* H1209 und homologe Überexpression von Proteinen.** Für die homologe Überexpression von Proteinen wurde der Stamm H1209, der auf DM-YPC-Medium wuchs, verwendet (Tabellen 1 und 3). In dem Stamm sind die Gene für die Orotat-Phosphoribosyl-Transferase (*pyrE2*) sowie für die an der Thymidin-Synthese beteiligte Dihydrofolatreduktase (*hdrB*) deletiert. Dem Medium wurde daher Uracil und Thymidin in finalen Konzentrationen von 50 µg/ml und 40 µg/ml zugegeben. Eine Transformation wurde mit dem pTA963-Vektor durchgeführt, auf dem das Zielgen unter Kontrolle eines durch Tryptophan induzierbaren Promotors stand. Die Selektion auf Transformanten erfolgte durch ein Wachstum in Medium ohne Uracil und Thymidin. Vorkulturen für eine homologe Überexpression eines Proteins wuchsen aerob bei 42 °C für ca. 48 – 72 h in 250 ml Erlenmeyerkolben mit 40 ml DM-YPC-Medium. Mit definierten Volumina dieser Kulturen wurden 2 l Erlenmeyerkolben mit 400 ml DM-YPC-Medium inokuliert, sodass ein Wachstum mit einer OD<sub>600</sub> von 0,1 gestartet wurde. Die Induktion der Expression erfolgte bei einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,6-0,8 mit 2 mM L-Tryptophan. Nach ca. 16 h Wachstum wurden die Zellen bei 8000 rpm und 4 °C für 20 min zentrifugiert (Zentrifuge Avanti™ J-25, Rotor JA 10, Beckman) und die Pellets bis zur Proteinreinigung bei -70 °C gelagert.

**Tabelle 3 *H. volcanii* H1209-Überexpressionsstamm und Varianten des Stammes.** Nicht gesondert gekennzeichnete Stämme wurden im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. Eckige Klammern stehen für ein episomal eingefügtes Plasmid. <sup>1</sup> (Allers 2010); <sup>2</sup> (Kuprat 2011).

Stamm	Genotyp
H1209 <sup>1</sup>	$\Delta pyrE2 \Delta hdrB \Delta pitA_{Nph} \Delta mrrr$
pTA963_HVO_0894	[pTA963_HVO_0894]
pTA963_HVO_0896	[pTA963_HVO_0896]
pTA963_HVO_1000 <sup>2</sup>	[pTA963_HVO_1000]
pTA963_HVO_1304-05	[pTA963_HVO_1304-05]
pTA963_HVO_2158	[pTA963_HVO_2158]
pTA963_HVO_2436	[pTA963_HVO_2436]
pTA963_HVO_2621	[pTA963_HVO_2621]
pTA963_HVO_A0156	[pTA963_HVO_A0156]
pTA963_HVO_A0158	[pTA963_HVO_A0158]

## 4.2 Molekularbiologische Standardmethoden

### 4.2.1 Plasmide und Primer

**pTA131-Plasmide für die Herstellung von Deletionsmutanten.** Mithilfe des Plasmids pTA131 wurden Zielgene in dem Uracil-auxotrophen ( $\Delta pyrE2$ ) Stamm *H. volcanii* H26 deletiert. Auf dem Plasmid pTA131 liegt das *pyrE2*-Gen, welches für die Orotat-Phosphoribosyl-Transferase kodiert, unter der Kontrolle des konstitutiven *p.fdx*-Promotors vor (Tabelle 4), wodurch nach einer Transformation der Zellen mit diesem Plasmid die Uracil-Auxotrophie des Stammes komplementiert wird (Allers et al. 2004). Ein Plasmid enthielt zwei in die *multiple cloning site* hintereinander klonierte, je ca. 500 bp große DNA-Fragmente, welche dem 5'- bzw. 3'-Bereich vor und hinter dem zu deletierenden Gen entsprachen (4.2.8). Ein halophiler Replikationsursprung für eine episomale Vermehrung des Plasmids in *H. volcanii* ist nicht vorhanden. Die Selektion auf Transformanten, welche dieses Plasmid über eine homologe Rekombination in das Genom integriert hatten, erfolgte durch Wachstum in Uracil-freiem Medium. Um eine Vermehrung des Plasmids in *E. coli* zu ermöglichen, sind ein bakterieller Replikationsursprung und eine Carbenicillin-Resistenz als Selektionsmarker kodiert.

**Tabelle 4 Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten bzw. erstellten pTA131-Plasmide für die Herstellung von Deletionsmutanten.** Alle Varianten des Plasmids pTA131 wurden vor einer Ligation mit der Restriktionsendonuklease EcoRV verdaut. <sup>1</sup> (Allers et al. 2004); <sup>2</sup> AG Schönheit.

Bezeichnung	Beschreibung, Verwendung
pTA131 <sup>1</sup>	Plasmid für die Deletion eines Zielgens, <i>pyrE2</i> unter Kontrolle des konstitutiven <i>p.fdx</i> -Promotors
_ΔHVO_0806 <sup>2</sup>	Deletion von HVO_0806
_ΔHVO_0812 <sup>2</sup>	Deletion von HVO_0812
_ΔHVO_0894	Deletion von HVO_0894
_ΔHVO_0896	Deletion von HVO_0896
_ΔHVO_1000 <sup>2</sup>	Deletion von HVO_1000
_ΔHVO_1984	Deletion von HVO_1984
_ΔHVO_2158	Deletion von HVO_2158
_ΔHVO_2436	Deletion von HVO_2436
_ΔHVO_2621	Deletion von HVO_2621
_ΔHVO_A0154	Deletion von HVO_A0154
_ΔHVO_A0156 <sup>2</sup>	Deletion von HVO_A0156
_ΔHVO_A0158	Deletion von HVO_A0158
_p.tnaA_ΔHVO_0812	p.tnaA::6x CAC tag::HVO_0812+1/+254, konditionale Depletionsmutante von HVO_0812
_p.tnaA_ΔHVO_1304	p.tnaA::6x CAC tag::HVO_1304+1/+201, konditionale Depletionsmutante von HVO_1304

**pTA963-Plasmide für die homologe Überexpression von Proteinen in *H. volcanii* und *in-trans* Komplementation von chromosomalen Gendelektionen.** Mithilfe des pTA963-Plasmids wurden Proteine homolog in *H. volcanii* H1209 überexprimiert. Auf dem Plasmid pTA963 ist neben einem bakteriellen Replikationsursprung und einer Carbenicillin-Resistenz als Selektionsmarker für eine Vermehrung des Plasmids in *E. coli* auch ein halophiler Replikationsursprung vorhanden, wodurch eine episomale Vermehrung in *H. volcanii* möglich ist (Tabelle 5) (Allers 2010). Des Weiteren sind sowohl das *pyrE2*- als auch das *hdrB*-Gen unter Kontrolle des konstitutiven *p.fdx*-Promotors kodiert. Die Selektion auf *H. volcanii* H1209-Transformanten erfolgte durch ein Wachstum in Uracil- und Thymidin-freiem Medium. Zielgene waren hinter den Tryptophanase-Promotor *p.tnaA* und eine 6 x CAC-Sequenz (*His-tag*) kloniert. Die Expression des Gens wurde durch die Zugabe von L-Tryptophan zum Medium induziert.

Außerdem dienten diese pTA963-Plasmide für eine *in trans* Komplementation von chromosomalen Gendelektionen in *H. volcanii* H26. Die Selektion auf Transformanten erfolgte hierfür durch ein Wachstum in Uracil-freiem Medium.

**Tabelle 5 Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten bzw. erstellten Plasmide für die *in-trans* Komplementation von Deletionsmutanten und homologe Überexpression von Proteinen.** ÜE = Überexpression; Kompl. = Komplementation; <sup>1</sup> (Allers 2010); <sup>2</sup> AG Schönheit.

Bezeichnung	Beschreibung, Verwendung
pTA963 <sup>1</sup>	Episomaler Expressionsvektor mit 6 x CAC- <i>tag</i> , <i>pyrE2</i> und <i>hdrB</i>
_HVO_0806 <sup>2</sup>	Kompl. in H26 ΔHVO_0806
_HVO_0812	Kompl. in H26 ΔHVO_0812
_HVO_0894	ÜE von HVO_0894
_HVO_0896	ÜE von HVO_0896, Kompl.
_HVO_1000 <sup>2</sup>	ÜE von HVO_1000, Kompl.
_HVO_1304	ÜE von HVO_1304
_HVO_1984	Kompl. in H26 ΔHVO_1984
_HVO_2158	ÜE von HVO_2158, Kompl.
_HVO_2436	ÜE von HVO_2436, Kompl.
_HVO_2621	ÜE von HVO_2621, Kompl.
_HVO_A0154	Kompl. in H26 ΔHVO_A0154
_HVO_A0156 <sup>2</sup>	ÜE von HVO_A0156, Kompl.
_HVO_A0158	ÜE von HVO_A0158

**Primer.** Für Polymerase-Kettenreaktionen (PCRs, 4.2.2) wurden Oligonukleotide der Firma Eurofins MWG Operon verwendet (Tabelle 6).

**Tabelle 6 Verwendete Oligonukleotide.** Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme sind unterstrichen, mutierte Basen fettgedruckt. Kompl. = Komplementation, NB-Sonde = Northern Blot-Sonde, SB-Sonde = Southern Blot-Sonde (...frg1\_s-Primer diente jeweils als sense-Primer), ÜE = Überexpression.

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Verwendung
M13 uni(-21)	TGTAACGACGGCCAGT	Kolonie-PCR
T3	AATTAACCCCTCACTAAAGGG	“
pTA963p.tnaAs	TGGCGAGAACGGAACAGC	“
963-0511p.tnaAs	CGGTACCGGGCCCGTTCTC	p.tnaA_ΔHVO_0812 bzw. _1304
HVO_3038_RT <sub>s</sub>	CGAAGGTTTCATCGGGAAATCCGCC	RT-PCR
HVO_3038_RT <sub>as</sub>	CGTCATCACTGTAGTCGGAGCTGG	“
pTA963_0812_as	GAACAGCTCGTCGTCGATGCC	p.tnaA_ΔHVO_0812
HVO_0812ÜE <sub>s</sub>	CGAACATCC <u>CCATGGCTGTAGTC</u>	Kompl.
HVO_0812ÜE <sub>as</sub> 1	CAGTATATC <u>GGATCCGCTCCA</u>	“
HVO_0894frg1 <sub>s</sub>	GGCGTCAACAAGTACGACACC	ΔHVO_0894
HVO_0894frg1 <sub>as</sub>	GCTTTCGACCTGCTATGTAGTCCAGTCGTCCGC	“
HVO_0894frg2 <sub>s</sub>	ACTACATAGCAGGTGAAAGCGAGTAACCG	“
HVO_0894frg2 <sub>as</sub>	TAAATGTGCGGGCTGCTACCG	“
HVO_0894Son <sub>as</sub>	CTATGTAGTCCAGTCGTCCGC	SB-Sonde
HVO_0894ÜE <sub>s</sub>	AGCACGT <u>ACCATGGCAGACGG</u>	ÜE, Kompl.
HVO_0894ÜE <sub>as</sub>	CATACGCG <u>GGATCC</u> TCTACTAAC	“
HVO_0894RT <sub>s</sub>	CGAGCGGAAAACAGGTGACGC	RT-PCR
HVO_0894RT <sub>as</sub>	GTCGTCTTCGTCTGACCCCTCC	“
HVO_0896frg1 <sub>s</sub>	TCGTCGAGTCGATTCAGCGGC	ΔHVO_0896
HVO_0896frg1 <sub>as</sub>	CTATCCTTCTCCGTCGAGGAACTCCGTCACCAG	“
HVO_0896frg2 <sub>s</sub>	TTCCTCGACGGAGAAGGATAGCAACGACCG	“
HVO_0896frg2 <sub>as</sub>	GAACGGTGACTCGAACTACGC	“
HVO_0896Son <sub>as</sub>	GTCGAGGAACTCCGTCACCAG	SB-Sonde
HVO_0896ÜE <sub>s</sub>	ACCGCT <u>TCATGA</u> AGAAACCACTCC	ÜE, Kompl.
HVO_0896ÜE <sub>as</sub>	CGAAAC <u>GGATCC</u> TAACGCGG	“
HVO_0896RT <sub>s</sub>	CTCGACCCCAACACGCACTACC	RT-PCR
HVO_0896RT <sub>as</sub>	GAGTGCGGCAGACGCCTTTCG	“
pTA963_1304 <sub>as</sub>	GTCGCCGCGGGACTTGACG	p.tnaA_ΔHVO_1304
HVO_1304SSon <sub>as</sub>	CCCTGCGATACGCCAGATAAG	SB-Sonde
HVO_1304ÜE <sub>s</sub>	TTGCGC <u>ATATG</u> CACCACCACCACCACATGACTGACCACGAA CTTATC	ÜE, Kompl.
HVO_1304ÜE <sub>as</sub>	GGACGT <u>GGATCC</u> ATGCCCGT	“
HVO_1304NSon <sub>s</sub>	GGTGACTTCGGTGTCTCAAG	NB-Sonde
HVO_1304NSon <sub>as</sub>	GCGGTTCGTGTTGTGCGAACTC	“
HVO_1305NSon <sub>s</sub>	TACGGGATGGTCCAAGAGGAG	NB-Sonde
HVO_1305NSon <sub>as</sub>	TTCGAGTTCGCTTCCGTCAG	“
HVO_1984frg1 <sub>s</sub>	GACCCTGCGAAACGGATAGTG	ΔHVO_1984



Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Verwendung
HVO_1984frg1as	CTCGATGTCCTGGTTTCAGCATCTCCCGCAGTTC	“
HVO_1984frg2s	ATGCTGAACCAGGACATCGAGACGGAGTTC	“
HVO_1984frg2as	TCGATGATGACCGACATGGCG	“
HVO_1984SSonas	G TTCAGCATCTCCCGCAGTTC	SB-Sonde
HVO_1984ÜEs	CGACACCTCATGAATCCGACC	Kompl.
HVO_1984ÜEas	GGCGCTTGGATCCCGCGG	“
HVO_2158frg1s	CGGTGCTCGTTGGACATACGG	ΔHVO_2158
HVO_2158frg1as	GTGTCGTTCCGCTAGACCTTCGCTCCGACAGC	“
HVO_2158frg2as	GTGCAGTAGGTGGAGGGTCCG	“
HVO_2158frg2s	AAGGGTCTAGCGGAACGACACGACCCGATC	“
HVO_2158SSonas	TAGACCTTCGCTCCGACAGC	SB-Sonde
HVO_2158ÜEs	CGGGTCATGACACTCGGAGAC	ÜE, Kompl.
HVO_2158ÜEas	GATCGGATCCGTGCTCCG	“
HVO_2436frg1s	GATGCAGGTCGAGACGGAGGC	ΔHVO_2436
HVO_2436frg1as	GGGTAGGGATTGACCCACACGTCCTCACGAG	“
HVO_2436frg2s1	GTGTGGGTGCAATCCCTACCCGAACGCGCCACGC	“
HVO_2436frg2as1	CTGGTCATCACCGCACTCTTG	“
HVO_2436POs	GACCATTCAGGGCGCAAAGAG	Pop-Out-PCR
HVO_2436POas	TCGACGACGTTGCGCTCTAC	“
HVO_2436SSonas	GACCCACACGTCCTCACGAG	SB-Sonde
HVO_2436ÜEs	TTGCGCATATGCACCACCACCACCACATGGGACTGGACGAC GACTCA	ÜE, Kompl.
HVO_2436ÜEas	TTCGGGTAGGGATCCGAAGAG	“
HVO_2621frg1s	TGGCGAGTTCGACTTCCACAC	ΔHVO_2621
HVO_2621frg1as	TCGAACCCGTACAAAAGGCCACGAGTAACGCCG	“
HVO_2621frg2s	TGGCCTTTTGTACGGGTTGGAACAGACCGG	“
HVO_2621frg2as	CTCGCGTGGCTCATCGAGAAG	“
HVO_2621SSonas	AAAAGGCCACGAGTAACGCCG	SB-Sonde
HVO_2621ÜEs	TTGCGCATATGCACCACCACCACCACATGCGATTGCACACC AGAGAC	“
HVO_2621ÜEas	GTCTGTTGGATCCCGTACGAC	“
HVO_2621NSons	TACCGCCAGAAGCTCAAGCTG	NB-Sonde
HVO_2621NSonas	GAACAGCGTGCCCATGATTCG	“
HVO_A0153Nsons	GTACGAACACATCCTCGTTCGG	NB-Sonde
HVO_A0153Nsonas	TTACGCGTCCGCTTCCGCTTC	“
HVO_A0154frg1s	GACAACGACGAGCGCTACATC	ΔHVO_A0154
HVO_A0154frg1as	GTCGCTGAAGTGGATCGGTTGGTCGCTCGTAG	“
HVO_A0154frg2s	CAACCGATCCACTTCAGCGACCTCTTCGCC	“
HVO_A0154frg2as	GAACTTCTGATGGCTCGCGC	“
HVO_A0154Ssonas	GATCGGTTGGTCGCTCTCGTAG	SB-Sonde
HVO_A0154ÜEs	AACCGATACATGTCACGCGAATCC	Kompl.
HVO_A0154ÜEas	CCGCGTCCGGATCCGTCAG	“
HVO_A0154Nsons	ATCCTCATCATCGCGTTCCTG	NB-Sonde
HVO_A0154Nsonas	TCGGGGTTGATGATGTTCCGTG	“
HVO_A0155Nsons	GTCACGCGAATCCACCGAGTC	NB-Sonde

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Verwendung
HVO_A0155Nsonas	GCCTCGCTCTCACTCTTCGAG	“
HVO_A0156RTs	GACGATCTCCTCGAAGCCCAGAG	RT-PCR
HVO_A0156RTas	GTA <del>CTT</del> CTCGACGAGTTC <del>CC</del> CACATC	“
HVO_A0158ÜEs	GTACCACCTA <u>CATGTC</u> GAAACCG	ÜE
HVO_A0158ÜEas	GTA <del>ACTGCG</del> <u>GATCC</u> CTTAGAGAG	“

#### 4.2.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde verwendet, um Sequenzabschnitte aus genomischer DNA oder von Plasmiden spezifisch zu amplifizieren. PCR-Reaktionen wurden mit Enzymen und Lösungen der Firmen PeqLab oder Thermo Fisher Scientific Inc. durchgeführt. Ein Ansatz mit einem Volumen von 25 bzw. 50 µl wurde in einem Thermocycler der Firma Biometra inkubiert. Die Dauer und Temperatur einer initialen Denaturierung sowie die Bedingungen der 25-35 folgenden Zyklen richteten sich nach den Herstellerangaben der jeweiligen Polymerase. Die Temperatur während des Annealings wurde an die Schmelztemperatur der verwendeten Oligonukleotide (Tabelle 6) und die Dauer der Synthese an die Länge des Amplifikats angepasst. Eine abschließende Polymerisation erfolgte für 7 min.

**Amplifikation von Genen für die Überexpression und Komplementation.** Die Reaktionen wurden in einem Volumen von 50 µl durchgeführt und enthielten 50 ng genomische DNA, je 300 nM forward und reverse Primer, 200 µM dNTP Mix, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 x Reaktionspuffer und 2,5 U *Pwo*-DNA-Polymerase. In mismatch-Primern (Tabelle 6) wurden maximal 3 nt pro Primer mutiert, um die für die Klonierung in den pTA963-Vektor notwendigen Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen einzufügen. Daher wurde in diesen Reaktionen die Annealingtemperatur der ersten 10 Zyklen um 5 °C verringert.

**Amplifikation von Fragmenten zur Herstellung von Deletionsmutanten.** In zwei voneinander getrennten Fragment-PCR-Ansätzen wurden zunächst für jedes Deletionskonstrukt jeweils zwei 500-750 bp-Fragmente hergestellt, von denen eines den Upstream-Bereich und das andere den Downstream-Bereich des zu deletierenden Genes enthielt. Die verwendeten, in Tabelle 6 angegeben Primer wiesen Schmelztemperaturen von 60-65 °C auf. Für die spätere Fusion der Fragmente wurden an den 3'-Primer des Fragments 1 9-12 nt der Sequenz des 5'-Primers des Fragments 2 und an den 5'-Primer des Fragments 2 9-12 nt des Gegenstrangs des 3'-Primers des Fragments 1 angefügt. Ein 50 µl Fragment-PCR-Ansatz enthielt 50 ng genomische DNA, je 300 nM Fragment 1- bzw. Fragment 2-sense

und -antisense Primer, 200  $\mu$ M dNTP Mix, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 x Reaktionspuffer und 1,25 U *Pwo*-DNA-Polymerase.

Über die Anlagerung der komplementären Bereiche von Fragment 1 und 2 konnte in einer weiteren PCR ein DNA-Fusionsprodukt amplifiziert werden, das keine oder weniger als 10 % der Nukleotide des Zielgens enthielt. Der zu deletierende Bereich umfasste eine durch drei teilbare Anzahl an Nukleotiden, sodass eine *in-frame* Deletion gewährleistet war. Nach Reinigung der in den Fragment-PCR-Ansätzen amplifizierten Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese (4.2.3) wurden für eine anschließende Fusions-PCR äquimolare Mengen der beiden Fragmente als Template (100 ng) eingesetzt. Außerdem enthielt ein Fusions-PCR-Ansatz je 400 nM Fragment 1 sense und Fragment 2 antisense Primer, 400  $\mu$ M dNTP Mix, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 x Reaktionspuffer und 1,25 U *Pwo*-DNA-Polymerase. Anschließend erfolgte die Reinigung des Amplifikats wie oben beschrieben und das Produkt konnte für eine Ligation in pTA131 eingesetzt werden (4.2.4).

**Pop-Out-PCR.** Im Rahmen der Pop-In/Pop-Out-Methode zur Herstellung von Deletionsmutanten wurden Klone auf ein erfolgreiches Herausloopen des Vektors (Pop-Out) überprüft. Es wurden je Deletion 5-6 Klone, in Ausnahmefällen bis zu 100 Klone mittels einer Pop-Out-PCR analysiert. Die Zellen aus 100  $\mu$ l Kultur wurden für 3 min bei 8000 rpm und Raumtemperatur in einer Tischzentrifuge pelletiert. Das Pellet wurde in 100-1000  $\mu$ l sterilem H<sub>2</sub>O lysiert und davon 5  $\mu$ l als Template in einen 25  $\mu$ l PCR-Ansatz eingesetzt. Dieser enthielt außerdem je 200 nM des sense Primers von Fragment 1 und des antisense Primers von Fragment 2, 200  $\mu$ M dNTP Mix, 1 x Reaktionspuffer Y, 1 x Enhancer-Lösung und 0,5 U Taq-DNA-Polymerase.

**Amplifikation von Fragmenten zur Herstellung von konditionalen Depletionsmutanten.**

Als Template für eine PCR diente das jeweilige pTA963-Plasmid, in dem das Zielgen inklusive eines 6 x CAC-*tags* bereits 3' hinter den Tryptophanase-Promotor ligiert wurde (4.2.4). Das Amplifikat dieser PCR umfasste den *p.tnaA*-Promotor, den 6 x CAC-*tag* und 177-201 bp des Zielgens. Ein PCR-Ansatz enthielt ~13 ng Vektor, je 300 nM sense und antisense Primer, 200  $\mu$ M dNTP Mix, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 x Reaktionspuffer und 1,25 U *Pwo*-DNA-Polymerase. Das PCR-Produkt wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese gereinigt (4.2.3) und für eine Ligation in pTA131 eingesetzt (4.2.4).

**Kolonie-PCR.** Über Nacht gewachsene *E. coli* XL-1 Blue MRF<sup>-</sup>-Klone wurden mittels einer Kolonie-PCR auf Insert tragende Plasmide analysiert, indem sie mittels eines sterilen Zahnstochers von einer LB-Agarplatte gepickt und direkt als Template in einen 25  $\mu$ l

Kolonie-PCR-Ansatz gegeben wurden. Dieser enthielt je 200 nM Primer, die flankierend der Multiple Cloning Site (MCS) binden (forward Primer M13uni (-21) für das Plasmid pTA131 bzw. pTA963p.tnaA\_s für pTA963 und reverse Primer T3, Tabelle 6), 200 µM dNTP Mix, 1 x Reaktionspuffer Y, 1 x Enhancer-Lösung und 0,5 U Taq-DNA-Polymerase.

**Herstellung von DIG-markierten DNA-Sonden für Northern- und Southern-Blot-Experimente.** Der Sequenz-spezifische Nachweis von DNA- oder RNA-Molekülen auf einer Membran im Rahmen eines Southern- bzw. Northern-Blot Experimentes (4.2.9 bzw. 4.2.10) erfolgte über eine Digoxigenin (DIG)-markierte DNA-Sonde. Die Synthese dieser Sonde erfolgte mit dem „PCR DIG Probe Synthesis Kit“ (Roche). Es wurden PCR-Ansätze mit einem Volumen von 25 µl für Southern-Blot- bzw. 50 µl für Northern-Blot-Experimente mit 0,1-25 ng Plasmid-DNA als Template nach Herstellerangaben gemischt.

### 4.2.3 Isolation, Reinigung, Konzentrations- und Größenbestimmung von DNA und RNA

**Isolation genomischer DNA.** Genomische DNA aus *H. volcanii*-Zellen wurde mit Hilfe des Wizard® Genomic DNA Purification Kits (Promega) isoliert. Sie diente der Amplifikation einzelner Sequenzabschnitte mittels PCR (4.2.2) oder für Southern-Blot Experimente (4.2.9). Die DNA wurde nach Angaben des Herstellers aus 1 ml logarithmisch wachsender Kultur isoliert.

**Reinigung von amplifizierten DNA-Fragmenten.** Die Reinigung von PCR-Amplifikaten erfolgte entweder durch die Anwendung des „PCR Purification Kit“ oder mittels einer präparativen Agarosegelelektrophorese mit anschließender Anwendung des „Gel Extraction Kit“ (jeweils Qiagen). Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

**Isolation und Reinigung von Gesamt-RNA.** Logarithmisch wachsende *H. volcanii*-Zellen wurden mittels Zentrifugation für 5 min bei 13.200 rpm und 4 °C geerntet. Die RNA wurde nach Herstellerangaben unter Anwendung von 1 ml TRI Reagent (Sigma-Aldrich) aus  $1-5 \times 10^9$  Zellen isoliert. Die Zellzahl wurde über eine  $OD_{578}$ /Zellzahl-Relation von  $OD_{578} = 1$  entspricht  $1 \times 10^9$  Zellen/ml abgeschätzt.

**DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung.** Die Konzentration von DNA und RNA wurde mittels Absorptionsmessung am NanoDrop ND-1000 Spektralphotometer (Thermo Fisher Scientific Inc.) bei 260 und 280 nm bestimmt. Der Absorptionskoeffizient 260 nm/280 nm gab Aufschluss über die Reinheit der Nukleinsäuren.

**Agarosegelelektrophorese.** PCR-Produkte wurden mittels präparativer oder analytischer Agarosegelelektrophorese getrennt. Es wurden je nach Probenvolumen 30 bzw. 50 ml 1%ige Agarosegele verwendet. Dazu wurden 0,3 bzw. 0,5 g Agarose durch Aufkochen in TBE-Puffer (89 mM Tris-HCl, pH 8,0, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA) gelöst. Nach Abkühlung auf ca. 60 °C wurde 1,5 bzw. 2,5 µl 1%iges Ethidiumbromid zugegeben. Es wurden Auftragspuffer und Größenstandards der Firma Thermo Fisher Scientific Inc. verwendet. Die Agarosegelelektrophorese erfolgte in TBE-Puffer für 30-60 min bei 100 V in einem Agagel Mini-System der Firma Biometra. Die DNA wurde durch Anregung mit UV-Licht der Wellenlänge 312 nm visualisiert.

#### 4.2.4 Restriktionshydrolyse und Ligation

**Restriktionshydrolyse.** PCR-Produkte, Plasmide und genomische DNA wurden mit Restriktionsendonukleasen der Firma New England Biolabs Inc. nach Herstellerangaben behandelt. Die Hydrolyse erfolgte für 2-16 h.

**Ligation.** Für die Ligation eines PCR-Produkts in einen Vektor wurde jeweils die dreifache molare Menge des Inserts im Verhältnis zum Plasmid eingesetzt. In einem 20 µl Ansatz für eine *sticky-end*-Ligation in pTA963 wurden neben 50 ng des restriktionsverdauten Plasmids und der entsprechenden Menge des Inserts 1 x T4-DNA-Ligase-Puffer und 1 U T4-DNA-Ligase (Thermo Fisher Scientific Inc.) zugegeben. Ein 20 µl Ansatz für eine *blunt-end*-Ligation in pTA131 enthielt neben 200 ng des Plasmids und der entsprechenden Menge des Inserts 1 x CutSmart Puffer, 20 U der Restriktionsendonuklease EcoRV (jeweils NEB), 5 % PEG4000, 0,5 mM ATP und 5 U T4-DNA-Ligase. Die Ligationsansätze wurden für 2-16 h bei 22 °C inkubiert, gefolgt von einer Hitzeinaktivierung bei 65 °C für 20 min und einer 25 minütigen Mikrodialyse gegen steriles H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> (0,025 µm Porengröße, Merck Millipore).

#### 4.2.5 Herstellung elektrokompetenter Zellen und Transformation von *E. coli*

**Herstellung elektrokompetenter Zellen.** Zur Herstellung elektrokompetenter *E. coli* XL1 Blue MRF<sup>-</sup>-Zellen wurden 200 ml LB-Medium (5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Trypton, 5 g/l Natriumchlorid, 0,1 mg/ml Carbenicillin, pH 7,5) mit einer über Nacht gewachsenen Vorkultur 1,5%ig inokuliert und aerob bei 37 °C inkubiert. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,7-1,0 wurde die Kultur 15 min auf Eis inkubiert und anschließend 10 min bei 5000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die Zellen wurden in 200 ml sterilem, kaltem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> resuspendiert und erneut wie oben zentrifugiert. Das Pellet wurde in 3 ml sterilem, kaltem H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> resuspendiert. Nach

erneuter Zentrifugation wurden die Zellen schließlich in 4 ml 10%igem Glycerin gelöst, in Aliquots zu je 40 µl mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70 °C gelagert.

**Transformation von *E. coli*.** Ein Aliquot der elektrokompenten Zellen wurde nach dem Auftauen mit 3 µl des Ligationsansatzes gemischt (4.2.4). Die Elektroporation erfolgte in einer eisgekühlten Elektroporationsküvette (Biozym) bei 2,5 kV, 12,5 kV/cm, 25 µF und 200 Ω (Bio-Rad Pulse Controller und Bio-Rad Gene Pulser™, Bio-Rad). Die Zellen wurden anschließend in 700 µl vorgewärmtem SOC-Medium (0,5 % Hefeextrakt, 2 % Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Glucose, pH 7) aufgenommen und für 1 h bei 37 °C und 750 rpm inkubiert (Thermomixer comfort, Eppendorf). 20 bzw. 200 µl dieser Suspension wurden auf LB-Agarplatten (5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Trypton, 5 g/l Natriumchlorid, 15 g/l Agar, 0,1 mg/ml Carbenicillin, pH 7.5) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

**Isolation von Plasmiden.** Nach der Analyse einzelner Klone auf Insert tragende Plasmide mittels einer Kolonie-PCR (4.2.2), wurden positiv getestete Klone in LB-Medium (5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Trypton, 5 g/l Natriumchlorid, 0,1 mg/ml Carbenicillin, pH 7.5) überimpft und bei 37 °C aerob inkubiert. Die Isolation von Plasmiden erfolgte mittels des „Qiaprep Spin Miniprep Kit“ (Qiagen) nach Herstellerangaben aus 3,6 ml über Nacht gewachsener Zellen.

#### 4.2.6 Sequenzierung

Alle hergestellten Plasmide (Tabelle 4, Tabelle 5) wurden sequenziert, um das Insert und die flankierenden Bereiche auf Fehler zu überprüfen. Sequenzierungen wurden von der Firma Eurofins Genomics durchgeführt. Die Chromatogramme und Sequenzen wurden anschließend im BioEdit Sequence Alignment Editor V7.1.3.0 mit den Originalsequenzen der jeweiligen Sequenzabschnitte verglichen.

#### 4.2.7 Transformation von *H. volcanii*

Zur Transformation von *H. volcanii*-Stämmen (Tabellen 2 und 3) wurden 2-4 ml einer über Nacht bei 42 °C und 150 rpm gewachsenen Kultur für 2 min bei 8000 rpm zentrifugiert und die Zellen nach der Entfernung des Überstandes in einem Gemisch aus 162 µl Sphäroblastenbildungslösung (SBL, 0,8 M NaCl, 27 mM KCl, 15 % Saccharose, 50 mM Tris-HCl, pH 8,2) und 18 µl 0,5 M EDTA-Lösung (pH 8,2, in SBL) resuspendiert. Nach einer mikroskopischen Kontrolle der Sphäroblastenbildung wurden 20 µl DNA-Lösung (2-5 µg Plasmid in 0,8 M NaCl) zugegeben, durch 20 maliges Invertieren gemischt und für 5 min bei 20 °C inkubiert. Nach Zugabe von 210 µl 60%iger PEG-Lösung (in SBL) und vorsichtigem

Mischen wurden die Zellen 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Bildung von Zellaggregaten mikroskopisch kontrolliert. Anschließend wurden 1,8 ml Sphäroblastenverdünnungslösung (3,4 M NaCl, 175 mM MgSO<sub>4</sub>, 34 mM KCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 15 % Saccharose, 50 mM Tris-HCl, pH 7,2) zugegeben und 100 µl dieser Suspension auf Agarplatten mit geeigneter Kohlenstoffquelle (Tabelle 1) ausplattiert. Nach ca. 5 tägiger Inkubation bei 42 °C konnten transformierte Klone gepickt und weiter kultiviert werden.

#### 4.2.8 Konstruktion von Deletionsmutanten und deren Komplementationen

**Deletionsmutanten.** Die Herstellung von Deletionsmutanten erfolgte mit Hilfe der Pop-In/Pop-Out-Methode (Allers et al. 2004; Hammelmann und Soppa 2008). Es wurden die Uracil-auxotrophen *H. volcanii*-Stämme H26 und H555 verwendet, in welchen das Gen *pyrE2* deletiert ist, das für die in der Uracil-Biosynthese essentielle Orotat-Phosphoribosyl-Transferase codiert. Diese Stämme wurden mit dem Plasmid pTA131 transformiert, auf dem das funktionelle Gen *pyrE2* unter Kontrolle eines konstitutiv induzierten Promotors steht und als Selektionsmarker in den Uracil-auxotrophen Stämmen dient. Ein solcher Deletionsvektor enthielt außerdem zwei in die *multiple cloning site* hintereinander klonierte, je ca. 500 bp große DNA-Fragmente, welche dem 5'- und 3'-Bereich vor und hinter dem zu deletierenden Gen entsprachen. Da dieser Vektor keinen haloarchaeellen Replikationsursprung für die episomale Replikation in *H. volcanii* besitzt, konnte in Uracil-freiem Medium mit geeigneter Kohlenstoffquelle auf Transformanten selektiert werden, bei denen das Plasmid durch eine homologe Rekombination in das Genom vor bzw. hinter das zu deletierende Gen integriert wurde (Pop-In). Die Wachstumsbedingungen sind in Kapitel 4.1 beschrieben. Die Selektion auf ein zweites homologes Rekombinationsereignis (Pop-Out) erfolgte durch die Zugabe von FOA und Uracil. Zellen, bei denen der Vektor noch in das Genom integriert war, setzten FOA durch die auf dem Vektor kodierte Orotat-Phosphoribosyl-Transferase zu dem für die Zellen toxischen 5-Fluorouracil um. Zellen, welche den Vektor durch ein zweites homologes Rekombinationsereignis aus dem Genom verloren hatten, konnten auf diesem Medium wachsen. Die homologe Rekombination konnte sowohl beim Pop-Out wie auch beim Pop-In entweder im 5'- oder im 3'-Bereich des Gens erfolgen. Falls das Herausloopen des Vektors aus dem Chromosom über ein homologes Rekombinationsereignis in dem identischen Bereich wie das Pop-In-Ereignis erfolgte, lag wieder der Wildtyp vor. Nur bei einem zum Pop-In reziproken Rekombinationsereignis wurde das Zielgen deletiert. Ein Pop-Out-Ereignis wurde mittels einer Pop-Out-PCR (4.2.2) überprüft. Eine Uracil-auxotrophe Deletionsmutante konnte für die Deletion weiterer Gene mithilfe derselben Methode verwendet werden.

**Komplementationen.** Deletionsmutanten, die ein verändertes Wachstum im Vergleich zum Wildtypstamm aufwiesen, wurden mit dem pTA963-Vektor transformiert, der das jeweils funktionelle Gen unter der Kontrolle eines durch Tryptophan induzierbaren Promotors trug (Tabelle 5). Die Expression des entsprechenden Gens wurde mit 80  $\mu$ M Tryptophan induziert und das Wachstum analysiert. Mit dieser *in-trans* Komplementation wurde nachgewiesen, dass der Wachstumsphänotyp der Mutante ausschließlich in der Deletion des Zielgens begründet war.

**Herstellung von konditionalen Depletionsmutanten.** Unter Anwendung dieser Methode wurden Gene chromosomal unter die Kontrolle des durch Tryptophan induzierbaren Promotors gestellt, sodass eine gezielte Expression des Gens möglich war (Gäbel et al. 2013). Dazu wurde ein DNA-Fragment, das am 5'-Ende den Promotor und am 3'-Ende nach einem 6 x CAC-tag nur den 5' Bereich des Zielgens umfasste, in den pTA131-Vektor ligiert (4.2.4). *H. volcanii* H26 wurde mit dem Plasmid transformiert (4.2.7). Eine episomale Vermehrung des Plasmids in *H. volcanii* ist aufgrund des fehlenden haloarchaeellen Replikationsursprungs nicht möglich. Die homologe Rekombination des Plasmids ins Genom (Pop-In) wurde mittels Southern-Blot-Analysen verifiziert (4.2.9). Die Selektion erfolgte durch ein Wachstum in einem Medium, dem kein Uracil zugegeben wurde. Die Wachstumsbedingungen sind in Kapitel 4.1 beschrieben. Durch die Integration des Vektors wurde die Uracil-Auxotrophie ( $\Delta$ *pyrE2*) des Stammes komplementiert. In diesen Transformanten stand nun das Zielgen unter der Kontrolle des durch Tryptophan induzierbaren Promotors, wohingegen der native Promotor des Gens vor dem inkompletten und damit funktionslosen Gen lag. Die Expression des Wildtyp-Gens in Pop-In-Kulturen konnte durch Zugabe von 80  $\mu$ M Tryptophan induziert werden.

#### 4.2.9 Southern Blot Analysen

Die Kontrolle von Deletionen, welche mittels der Pop-In/Pop-Out-Methode durchgeführt wurden, oder von konditionalen Depletionen erfolgte mittels Southern-Blot-Analysen. Für Deletionen nach der Pop-In/Pop-Out Methode wurde aus dem Wildtyp, der Pop-In- und Pop-Out-Kultur genomische DNA isoliert (4.2.3). Für die Überprüfung von Depletionsmutanten wurde die genomische DNA des Wildtyps und der Mutante isoliert. Die DNA wurde mit Restriktionsenzymen so hydrolysiert (4.2.4), dass über die DNA-Fragmentgrößen eine Deletion verifiziert werden konnte. Die DNA-Fragmente wurden dazu in einem 1%igen Agarosegel bei 100 V über 100 min aufgetrennt (4.2.3). Als Größenstandards wurden ein DNA-Standard (GeneRuler 1 kb DNA ladder, Thermo Fisher Scientific Inc.) und ein DIG-



markierter Größenstandard (DNA Molecular Weight Marker III, Roche) verwendet. Im Anschluss erfolgte der Transfer der DNA-Fragmente auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche) mittels eines Vakuum-Blots. Bei einem konstanten Unterdruck von -60 mbar wurde das Agarosegel für 25 min mit Depurinatlösung (250 mM HCl), für 20 min mit Denaturierungslösung (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) und für 25 min mit Neutralisierungslösung (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl, pH 7,5) überschichtet. Für einen Transfer der DNA auf die Membran wurde der Unterdruck auf -80 mbar erhöht und das Gel für 40 min mit 20 x SSC-Lösung (3 M NaCl, 300 mM Na-Citrat, pH 7) bedeckt. Eine Fixierung der DNA auf der Membran erfolgte durch eine Bestrahlung mit UV-Licht (312 nm) für 90 s. Es folgte eine 30 minütige Inkubation der Membran in Hybridisierungsgefäßen bei 50 °C und 6 rpm in vorgewärmter Prähybridisierungslösung (DIG Easy Hyb™, Roche, Hybridisierungssofen OV 2, Biometra). DIG-markierte DNA-Sonden wurden für 7 min bei 99 °C denaturiert, anschließend in 10 ml auf 50 °C vorgewärmter DIG Easy Hyb™-Lösung verdünnt und gegen die Prähybridisierungslösung getauscht. Die Inkubation mit dieser Hybridisierungslösung erfolgte über Nacht bei 50 °C und 6 rpm. Hybridisierungslösungen wurden nach Gebrauch bei -20 °C gelagert und vor wiederholter Verwendung für 10 min bei 68 °C im Wasserbad denaturiert. Nach Entfernung der Hybridisierungslösung wurde die Membran zweimal mit 25 ml Low stringency buffer (2 x SSC, 0,1 % SDS) bei Raumtemperatur und 10 rpm und zweimal mit High stringency buffer (0,5 x SSC, 0,1 % SDS) bei 68 °C und 10 rpm inkubiert. Die Detektion spezifischer Signale erfolgte mit dem „Luminescent Detection Kit“ (Roche) nach Herstellerangaben.

#### **4.2.10 Transkriptnachweis mittels Northern Blot und RT-PCR**

Northern-Blot- und Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)-Experimente wurden für eine semiquantitative Analyse von Transkriptmengen eines Gens eingesetzt. Alle verwendeten Glaswaren wurden vor Benutzung für ca. 4 h bei 240 °C inkubiert und alle Plastikwaren zweifach autoklaviert, um eine Kontamination mit RNasen zu vermeiden. Labortische und Pipetten wurden vor Beginn der Arbeiten mit 0,1 M NaOH und 1 mM EDTA behandelt. Alle verwendeten Lösungen wurden mit 0,1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt, über Nacht bei 37 °C auf einem Reziproschüttler inkubiert und anschließend autoklaviert.

**Northern Blot.** Die Laufkammer für die Agarosegelelektrophorese (Agagel Mini-System, Biometra) wurde vor Benutzung über Nacht in 0,5 % SDS inkubiert. Die RNA wurde in 50 ml Formaldehydgelen (20 mM MOPS, 5 mM Na-Acetat, 2 mM EDTA, pH 7, 2,5 µl 0,01 % EtBr, 1,2 % Formaldehyd) getrennt. Als Laufpuffer wurde MOPS-Puffer mit 0,74 %

Formaldehyd verwendet. Proben wurden mit 2 x RNA-Auftragspuffer (Thermo Fisher Scientific Inc.) versetzt und 10 min bei 65 °C denaturiert. Als Größenstandard diente ein RiboRuler™ High Range RNA Ladder (Thermo Fisher Scientific Inc.) und die Elektrophorese erfolgte für 60 min bei 100 V. Nach der Visualisierung der RNA durch Anregung mit UV-Licht der Wellenlänge 312 nm wurde diese mit Hilfe eines VacuBlot Systems (Vacu-Blot, Biometra) auf eine positiv-geladene Nylonmembran (Roche) übertragen. Der Transfer erfolgte bei -60 mbar für zweimal 25 min mit H<sub>2</sub>O, zweimal 30 min 20 x SSC (3 M NaCl, 300 mM Na-Citrat, pH 7) und bei -80 mbar mit 20 x SSC für 40 min. Die Membran wurde dann für 5 min in 2 x SSC gespült und zur Fixierung der RNA 30 min bei 120 °C inkubiert. Danach wurde die Membran für mindestens 30 min in einem Hybridisierungsgefäß mit 10 ml Prähybridisierungslösung (DIG Easy Hyb™, Roche) bei 50 °C und 6 rpm in einem Hybridisierungsofen (OV 2, Biometra) behandelt. Zuvor für 7 min bei 99 °C denaturierte, DIG-markierte DNA-Sonde wurden in 10 ml auf 50 °C vorgewärmter DIG Easy Hyb™-Lösung verdünnt und gegen die Prähybridisierungslösung getauscht. Die Inkubation mit dieser Hybridisierungslösung erfolgte über Nacht bei 50 °C und 6 rpm. Hybridisierungslösungen wurden nach Gebrauch bei -20 °C gelagert und vor wiederholter Verwendung für 10 min bei 68 °C im Wasserbad denaturiert. Nach Entfernung der Hybridisierungslösung wurde die Membran bei Raumtemperatur und 10 rpm zweimal für 5 min mit 25 ml Low stringency buffer (2 x SSC, 0,1 % SDS) und zweimal für 5 min mit High stringency buffer (0,5 x SSC, 0,1 % SDS) inkubiert. Die Detektion spezifischer Signale erfolgte mit dem „Luminescent Detection Kit“ (Roche) nach Herstellerangaben.

**RT-PCR.** Nach der Isolation von RNA (4.2.3) wurde diese mit DNase I (Thermo Fisher Scientific Inc.) nach dem Protokoll des Herstellers behandelt, um genomische DNA zu verdauen. Die RNA wurde mit dem GoSript™ Reverse Transcription System (Promega) nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. Ein 10 µl Reaktionsansatz enthielt 100 ng gereinigte RNA als Template, 0,25 µg Random Hexamer Primer (Thermo Fisher Scientific Inc.), 500 µM dNTPs, 2 mM MgCl<sub>2</sub> und 0,5 µl GoSript™ Reverse Transkriptase. Es wurden Kontrollansätze ohne Reverse Transkriptase durchgeführt, um auf eine DNA-Kontamination zu prüfen. Anschließende PCR-Reaktionen wurden mit *Taq*-Polymerase (PeqLab) durchgeführt. Ein 12,5 µl Reaktionsansatz enthielt 2 ng cDNA als Template, 200 µM dNTPs, je 500 nM forward und reverse Primer, 1 x Reaktionspuffer S, 1 x Enhancer, und 0,25 U *Taq*-Polymerase (PeqLab). Das PCR-Programm bestand aus einer initialen Denaturierung bei 95 °C für 2 min, darauf folgten 14-28 Zyklen (Primer-Paar HVO\_3038: 14 Zyklen, HVO\_0896: 28 Zyklen) bestehend aus 30 s Denaturierung bei 95 °C, 30 s Annealing bei

62 °C und 30 s Synthese bei 72 °C. Das konstitutiv exprimierte 16 S rDNA-Gen HVO\_3038 (Tabelle 6) wurde als konstitutiv exprimierte Kontrolle verwendet (Maniscalco et al. 2014). Das Ergebnis der PCR wurde mittels einer Agarosegelelektrophorese in einem 1%igen Agarosegel analysiert.

### 4.3 Analytische Methoden

**SDS-PAGE.** Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde für die Reinheitskontrolle während der Proteinreinigung und die Größenbestimmung von Proteinuntereinheiten genutzt. Die Elektrophorese erfolgte dabei in 10%igen oder 12%igen diskontinuierlichen Gelen nach der Methode von Laemmli (Laemmli 1970) in einer Mini Protean 3 Elektrophorese Zelle (Bio-Rad). Alle Proben wurden vor dem Auftrag auf das Gel mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt. Es wurde Auftragspuffer (5x) der Firma Thermo Fisher Scientific Inc. verwendet und als Molekulargewichtsmarker diente Precision Plus Protein™ Standard (Bio-Rad).

**Bestimmung des apparenten Molekulargewichts von Proteinen.** Für die Bestimmung des apparenten Molekulargewichts der gereinigten Proteine wurde eine Größenausschlusschromatographie an einer Superdex 200 HiLoad 16/60 Gelfiltrationssäule (GE Healthcare) verwendet. Es wurden 1-2 ml Probe aufgetragen, die Flussgeschwindigkeit betrug 1 ml/min. Als Laufpuffer diente 50 mM Tris-HCl, 1,5 M KCl, pH 7,5. Proteine aus dem HMW und LMW Gel Filtration Calibration Kit (GE Healthcare) dienten als Molekulargewichtsstandards. Die Kalibrierung erfolgte nach Herstellerangaben in 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5.

**Bestimmung von Proteinkonzentrationen.** Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe einer modifizierten Methode nach Bradford bestimmt (Bradford 1976). Dazu wurden je 100 µl proteinhaltige Probe mit 900 µl Bradford-Reagenz (70 mg Coomassie Brilliant Blue, 50 ml 99 % Ethanol, 100 ml 85 % Ortho-Phosphorsäure ad 1000 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>, filtriert) gemischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktion wurde bei 595 nm bestimmt (CARY 60 UV-Vis, Agilent) und der Messwert gegen eine Probe ohne Protein korrigiert. Eine Eichgerade wurde mit einem Standard aus Rinder-Serum Albumin Fraktion V (Merck) erstellt. Die Messwerte waren bis zu einer Proteinmenge von 5 µg im Test proportional.

### 4.3.1 Glucose-Bestimmung

Die Glucosekonzentration in den Wachstumsüberständen wurde mit Hilfe der Enzyme Glucoseoxidase (GOD) und Peroxidase (POD) in einem gekoppelten optischen Test bestimmt (Kunst et al. 1981). Die Testansätze enthielten 100  $\mu\text{l}$  Probe mit maximal 500  $\mu\text{M}$  Glucose, die jeweils mit 900  $\mu\text{l}$  Glucosereagenz versetzt (14 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 7,2 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , ad 1 l  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ , 40 mg POD (200 U/mg), 80 mg GOD (130 U/mg), 0,5 g ABTS) und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Anschließend wurde die Extinktion bei 436 nm bestimmt und der Messwert gegen eine Probe ohne Glucose korrigiert. Eine Eichgerade wurde mit Verdünnungen eines 500  $\mu\text{M}$  Glucose-Standards erstellt. Die Extinktion war bis zu einer Glucosekonzentration von 50  $\mu\text{M}$  im Test proportional. Der Extinktionskoeffizient ( $\epsilon$ ) lag bei ca. 28  $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

### 4.3.2 Acetat-Bestimmung

Die Bestimmung der Acetatkonzentration in Wachstumsüberständen erfolgte in einem gekoppelten optischen Test. Dazu wurde die Umsetzung der Acetatmenge mithilfe der Enzyme AMP-abhängige Acetyl-CoenzymA Synthetase (ACS), Myokinase (MK), Pyruvat Kinase (PK) und Lactat Dehydrogenase (LDH) an die Oxidation von NADH gekoppelt und bei 365 nm detektiert ( $\epsilon_{365} = 3,4 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Der Umsatz von 1 mol Acetat entsprach dabei der Oxidation von 2 mol NADH. Ein Testansatz enthielt 100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM KCl, 20 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM PEP, 2 mM ATP, 0,3 mM NADH, 0,3 mM CoA, 3 U LDH, 2 U PK, 4,65 U MK und maximal 0,1 mM Acetat. Die Reaktion wurde nach Messung einer konstanten Extinktion ( $E_1$ ) durch Zugabe von 62,5 mU ACS gestartet. Nach ca. 60 min wurde erneut die Extinktion ( $E_2$ ) der Proben bestimmt. Aus der Extinktionsdifferenz der Probe ( $\Delta E$ ) wurde mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten und nach Korrektur um die Extinktionsdifferenz ohne Zugabe von Acetat die Acetatkonzentration mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes ermittelt. Mithilfe eines Acetatstandards (0,1 mM) wurde die vollständige Umsetzung der eingesetzten Acetatmenge innerhalb von 60 min kontrolliert.

### 4.3.3 Nachweis des putativen Acetat-Transporters in *H. volcanii*

Der Transport von Acetat in *H. volcanii*-Zellen wurde über eine  $^{14}\text{C}$ -Acetat-Aufnahme bestimmt. Dazu wurden Acetat-gewachsene *H. volcanii* H26-Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase mittels 20minütiger Zentrifugation bei 8500 rpm und 4 °C (Zentrifuge Avanti™ J-25, Rotor JA 10, Beckman) geerntet. Die Zellen wurden in 400 ml Suspensionspuffer (100 mM Tris-HCl, 139 mM KCl, 2,1 M NaCl, pH 8) gewaschen und

erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde für 5 min bei 42 °C und 150 rpm in 2 ml Suspensionspuffer homogenisiert und diese Suspension anschließend auf eine OD<sub>578</sub> von 50 mit Suspensionspuffer verdünnt. Die Zellen wurden für ca. 1,5 h auf Eis inkubiert und anschließend die Proteinkonzentration bestimmt (4.3). Eine OD<sub>578</sub> von 50 entsprach einer Proteinkonzentration von 5,4-7,5 mg/ml. Radioaktiv-markiertes <sup>14</sup>C-Acetat (57,5 mCi/mmol) wurde mit nicht-markiertem Acetat zu einer radioaktiv-markierten <sup>14</sup>C-Acetat-Lösung mit einer Konzentration von 109 µM vermischt. Die Aufnahme von Acetat in die Zellen sollte zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt werden. Dazu wurden für jeden Messpunkt 80 µl Zellsuspension vorbereitet und die Aufnahme von Acetat durch die Zugabe von 20 µl der Acetat-Lösung gestartet (entspricht 0,01 µCi/Ansatz). Alle Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt. Die Suspensionen wurden für maximal 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde zu definierten Zeitpunkten gestoppt, indem 1 ml eisgekühlter Suspensionspuffer zu dem jeweiligen Ansatz gegeben wurde und der Ansatz sofort auf einen Membranfilter (GF/C, Porengröße 1,2 µm, Whatman, GE Healthcare) einer Vakuumanlage transferiert wurde. Der Puffer wurde mittels Unterdruck entfernt und die Zellen mit weiteren 7 ml eisgekühltem Puffer auf dem Filter gewaschen. Das Stoppen der Reaktion und Waschen der Zellen sollte maximal 20 s dauern. Die Filter wurden über Nacht bei Raumtemperatur in je 3 ml Szintillationsflüssigkeit (Quicksafe A, Zinsser Analytic) inkubiert. Anschließend wurde die Strahlung (counts per minute, CPM<sub>Probe</sub>) der Proben in einem Packard TriCarb Liquid Scintillation Counter (PerkinElmer Inc.) gemessen. Für jede Substratkonzentration wurde ein Maximalwert der Strahlung (CPM<sub>max</sub>) in Triplikaten bestimmt, indem die jeweilige Substratmenge direkt in die Szintillationsflüssigkeit gegeben wurde. Je Ansatz errechnete sich die Aufnahmemenge wie folgt:

$$\text{Aufnahme [nmol]} = \text{CPM}_{\text{Probe}} \times \text{Substrat [nmol]} / \text{CPM}_{\text{max}}$$

Die Bestimmung der Substrataffinität des Transporters erfolgte nach dem oben beschriebenen Verfahren, wobei verschiedene Konzentrationen von 4 bis 55 µM Acetat bei einer konstant gehaltenen Strahlungsaktivität des Substrats von 0,01 µCi je Ansatz eingesetzt wurden.

## 4.4 Reinigung und Charakterisierung von Proteinen

### 4.4.1 Reinigung und Charakterisierung der AMP-bildenden Acetyl-CoA-Synthetase

Die AMP-bildende Acetyl-CoA-Synthetase 2 (ACS2) wurde aus 9,8 g Acetat-gewachsenen *H. volcanii*-Zellen gereinigt. Dazu wurden die Zellen in 25 ml Puffer 1 (0,1 M Tris-HCl, 2 M Ammoniumsulfat, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8,0) resuspendiert und mittels viermaliger Hochdruckhomogenisation in einer gekühlten French Press Zelle (American Instruments Company) bei 18000 psi aufgeschlossen. Diese Suspension wurde für 1,5 h bei 40000 rpm und 4 °C zentrifugiert (Optima L Preparative Ultracentrifuge, 70 Ti Rotor, Beckman). Der Überstand wurde mit Puffer 1 auf 100 ml aufgefüllt und auf eine mit Auftragspuffer equilibrierte Phenyl-Sepharose Säule (HiLoad 26/10 Phenyl Sepharose High Performance, GE Healthcare) mit einer Flussrate von 3 ml/min aufgetragen. Nach einem Waschschrift mit Puffer 1 über 150 ml erfolgte die Elution mit Puffer 2 (0,1 M Tris-HCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8,0) mit einem linearen Gradienten von 2 bis 0 M Ammoniumsulfat über 540 ml. Eluiertes Protein wurde in 6 ml Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen mit den höchsten spezifischen Aktivitäten wurden vereint und mit Puffer 3 (50 mM Tris-HCl, 3 M Ammoniumsulfat, pH 7,5) gemischt, sodass eine finale Ammoniumsulfat-Konzentration von 1,5 M erreicht wurde. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 20000 rpm und 4 °C (Zentrifuge Avanti™ J-25, Rotor JA 25.50, Beckman) wurde die Probe auf eine 1 ml HiTrap Phenyl-Sepharose (GE Healthcare) aufgetragen, die mit Puffer 4 (50 mM Tris-HCl, 1,5 M Ammoniumsulfat, pH 7,5) equilibriert worden war. Bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min erfolgte nach einem Waschschrift mit 10 ml Puffer 4 die Elution mit Puffer 5 (0,1 M Tris-HCl, pH 7,5) und einem linearen Gradienten von 1,5 bis 0 M Ammoniumsulfat über 20 ml. Eluiertes Protein wurde in 1 ml Fraktionen gesammelt. Die Fraktion mit der höchsten spezifischen Aktivität wurde auf eine mit Puffer 6 (50 mM Tris-HCl, 1,5 M KCl, pH 7,5) equilibrierte Gelfiltrationssäule (HiLoad 16/60 Superdex, GE Healthcare) aufgetragen. Die Proteine wurden mit einem isokratischen Fluss von 1 ml/min von der Säule eluiert und in Fraktionen zu je 1 ml gesammelt. Die Fraktionen mit der höchsten spezifischen Aktivität wurden vereint und mit Puffer 7 (50 mM Tris-HCl, 2 M Ammoniumsulfat, pH 8) auf 20 ml aufgefüllt. Die Probe wurde auf eine mit Puffer 7 equilibrierte 1 ml Butyl-Sepharose Säule (HiTrap Butyl Fast Flow, GE Healthcare) mit einer Flussrate von 1 ml/min aufgetragen. Nach einem Waschschrift mit 10 ml Puffer G wurde die Elution mit Puffer 8 (50 mM Tris-HCl, pH 8) und einem linearen Gradienten von 2 bis 0 M Ammoniumsulfat über 20 ml durchgeführt. Eluiertes

Protein wurde in 1 ml Fraktionen gesammelt. Während des gesamten Reinigungsprozesses wurden die Proteinkonzentrationen der Proben bestimmt und mittels SDS-PAGE die Reinheit des Proteins abgeschätzt (4.3). Eine Analyse mittels SDS-PAGE ergab, dass das Protein bis zur apparenten Homogenität gereinigt vorlag. Die Proteinbande wurde aus dem SDS-PAGE-Gel ausgeschnitten und die Identifizierung des Proteins erfolgte mit Hilfe einer Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Bott im Forschungszentrum Jülich.

#### 4.4.2 Reinigung und Charakterisierung rekombinanter Proteine

**Reinigung rekombinanter Proteine.** Die in *H. volcanii* H1209 homolog überexprimierten Proteine (4.1) wurden säulenchromatographisch bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Die Zellpellets wurden dazu in 25 ml Puffer 9 (20 mM Tris-HCl, 1,5 M KCl, 5 mM Imidazol, pH 8,0) resuspendiert und mittels viermaliger Hochdruckhomogenisation in einer gekühlten French Press Zelle (American Instruments Company) bei 18000 psi aufgeschlossen. Diese Suspensionen wurden jeweils für 1,5 h bei 40000 rpm und 4 °C zentrifugiert (Optima L Preparative Ultracentrifuge, 70 Ti Rotor, Beckman). Der Überstand wurde mit Puffer I auf 50 ml aufgefüllt und auf eine mit Puffer 9 equilibrierte 1 ml Nickel-NTA-Säule (Ni-NTA Superflow, Qiagen) mit einer Flussrate von 1 ml/min aufgetragen. Die Elution erfolgte mit Puffer 10 (20 mM Tris-HCl, 1,5 M KCl, 500 mM Imidazol, pH 8,0) über einen Stufengradienten für jeweils 10 ml mit 20 mM, 100 mM und 500 mM Imidazol. Protein wurde spezifisch bei 100 mM eluiert und in 2 ml Fraktionen gesammelt. Die Fraktion mit der höchsten Proteinkonzentration wurde auf eine Gelfiltrationssäule (HiLoad 16/60 Superdex, GE Healthcare) aufgetragen, die mit Puffer 6 equilibriert worden war. Die Elution erfolgte mit einem isokratischen Fluss von 1 ml/min und die Proteine wurden in 1 ml Fraktionen gesammelt.

Für die Reinigung der rekombinanten PEPC HVO\_2621 wurde allen oben angegebenen Puffern final 5 mM 1,4-Dithioerythritol (DTE) zugegeben. In den Fraktionen mit der PEPC wurde die DTE Konzentration sofort nach der Elution auf 25 mM erhöht.

**Charakterisierung von Proteinen.** Die Messung von Aktivitäten gereinigter Enzyme erfolgte in einem Volumen von 0,3 ml in Kunststoff-Einmalküvetten (Halbmikro-Küvetten, Brand) mit einer Schichtdicke von 10 mm. Es wurde ein Photometer Cary 60 UV-Vis verwendet und die Daten mit Hilfe der Cary Win UV Software (jeweils Agilent Technologies) ausgewertet. Enzymreaktionen, die an eine Oxidation von NADH gekoppelt waren (ACS) bzw. eine Umsetzung von NADPH/NADP<sup>+</sup> katalysierten (Malat-Enzyme), wurden über eine

Änderung der Extinktion bei 340 nm ( $\epsilon_{340} = 6,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) bestimmt. Enzymaktivitäten, die eine Freisetzung von HS-CoA katalysierten, wurden mittels 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB) nach Ellman bei 412 nm ( $\epsilon_{412} = 13,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) bestimmt (Ellman 1958). Jede Küvette wurde vor der Messung inkubiert bis die gewünschte Temperatur von 42 °C erreicht war. Der pH-Wert der Puffer war jeweils auf die entsprechende Temperatur eingestellt. Sowohl die Substratreihenfolge als auch die Enzymmengen wurden variiert, um mögliche unspezifische Raten und eine Abhängigkeit der Rate von der Proteinkonzentration zu zeigen.  $K_m$ - und  $V_{\max}$ -Werte wurden nach Lineweaver-Burk ermittelt. Die Enzymaktivität 1 Unit (U) ist definiert als die Umsetzung von 1  $\mu\text{mol}$  Substrat, bzw. die Bildung von 1  $\mu\text{mol}$  Produkt pro Minute. pH-Abhängigkeiten von Enzymen wurden im Bereich von 5-7 in BisTris- und im Bereich von 7-8,5 in Tris-Puffer bestimmt. Optima für KCl,  $\text{MgCl}_2$  und  $\text{MnCl}_2$  wurden in Bereichen von 0-4,5 M KCl, 0-12 mM  $\text{MgCl}_2$  und 0-10 mM  $\text{MnCl}_2$  nachgewiesen.

#### 4.4.2.1 Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase

Die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase (POR) katalysiert die Coenzym A-abhängige oxidative Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-CoA. Der natürliche Elektronenakzeptor dieser Reaktion, Ferredoxin, wurde im Test durch Methylviologen (MV) ersetzt, dessen Reduktion durch zwei Elektronen bei der Oxidation von einem Pyruvat über die Änderung der Extinktion bei 578 nm ( $\epsilon_{578} = 19,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1} / 2 e^-$ ) bestimmt werden konnte. Die Messung der Enzymaktivität erfolgte unter anaeroben Bedingungen. Dazu wurden alle verwendeten Puffer und Wasser zunächst unter  $\text{N}_2$ -Begasung aufgeköcht und kochend in eine verschlossene Serumflasche abgefüllt. Anschließend wurden diese während der Abkühlung auf Raumtemperatur ca. fünfmal abwechselnd bei einem Unterdruck von ca. 0,9 bar entgast und bei einem Überdruck von ca. 0,5 bar mit  $\text{N}_2$  begast. Die Substrate wurden in luftdichten Glasgefäßen eingewogen und ca. fünfmal bei einem Unterdruck von ca. 0,9 bar entgast und bei einem Überdruck von ca. 0,2 bar mit  $\text{N}_2$  begast. Anschließend wurden die Substrate in anaerobisiertem Wasser gelöst. Die Fraktionen mit der POR wurden direkt nach der Elution ca. fünfmal bei Unter- bzw. Überdruck wie die Substrate anaerobisiert. Aktivitätsmessungen erfolgten unter anaeroben Bedingungen in Glasküvetten, die mit Gummistopfen verschlossen und wie die Substrate anaerobisiert wurden. Der Puffer wurde mit einer Spritze in die Küvetten gefüllt und nochmals be- und entgast. Substrate und Protein wurden anschließend mit einer Spritze in die vorgewärmten Küvetten gegeben. Um anaerobe Bedingungen während der Messung zu gewährleisten, wurden ca. 0,75 mM Natrium-Dithionit zu jeder



Messung gegeben. Weiterhin enthielt ein 1000  $\mu$ l Testansatz 950  $\mu$ l Testpuffer (0,1 M Tris-HCl, 2 M KCl, pH 7,0), 5 mM MV, 10 mM Pyruvat, 0,3 mM Coenzym A und POR.

#### 4.4.2.2 Phosphoenolpyruvat-Carboxylase

Die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (PEPC) katalysiert die Bicarbonat-abhängige Carboxylierung von PEP zu Oxalacetat und anorganischem Phosphat. Diese Reaktion wurde durch eine Malat-Dehydrogenase (MDH) an eine Oxidation von NADH gekoppelt. Ein 300  $\mu$ l Testansatz enthielt 282  $\mu$ l Testpuffer (0,1 M Tris-HCl, 2 M KCl, pH 7), 5 mM  $MgCl_2$ , 0,3 mM NADH, 10 mM  $NaHCO_3$ , 5 mM PEP, 10 mM Acetyl-CoA, 3,6 U MDH und PEPC.

#### 4.4.2.3 AMP-bildende Acetyl-CoA-Synthetasen

AMP-bildende Acetyl-CoA-Synthetasen (ACS) katalysieren in einer reversiblen Reaktion die ATP- und CoenzymA-abhängige Aktivierung von Acetat zu Acetyl-CoA, AMP und  $PP_i$ .

In Richtung der Acetataktivierung wurde diese Reaktion durch die Enzyme Myokinase (MK), Pyruvatkinase (PK) und Lactat-Dehydrogenase (LDH) an eine Oxidation von NADH gekoppelt. Als Puffer wurden für die ACS7 (HVO\_A0156) und ACS1 (HVO\_0894) 0,1 M Tris-HCl, 1 M KCl, pH 7,0 und für die ACS2 (HVO\_0896) 0,1 M Tris-HCl, 2 M KCl, pH 7,5 eingesetzt. Ein 300  $\mu$ l Testansatz enthielt außerdem 2,5 mM  $MgCl_2$ , 0,3 mM NADH, 1 mM PEP, 2 mM ATP, 10 mM Acetat, 3 mM HS-CoA, 9,3 U MK, 4 U PK, 6 U LDH und ACS. Testansätze für die Bestimmung der Substratspezifität der Enzyme ACS1 (HVO\_0894), ACS2 (HVO\_0896) und ACS7 (HVO\_A0156) enthielten abweichend von den oben genannten Konzentrationen 0,1 M Tris-HCl, 1 M KCl, pH 7,0 und je 2,5 bzw. 0,2 mM Substrat.

Aktivitätsmessungen in Richtung der Acetatbildung erfolgten nach Ellman (Ellman 1958). Im Test wurden als Puffer für die ACS7 (HVO\_A0156) 0,1 M Tris-HCl, 1 M KCl, pH 7,0 und für die ACS1 (HVO\_0894) 0,1 M BisTris, 2 M KCl, pH 7,0 eingesetzt. Ein 300  $\mu$ l Ansatz enthielt außerdem 2,5 mM  $MgCl_2$ , 2 mM Acetyl-CoA, 2 mM AMP, 1 mM  $PP_i$ , 0,1 mM DTNB und ACS.

Die Aktivität der ACS-Enzyme mit verschiedenen Carbonsäuren wurde mit je 2,5 mM der jeweiligen Säure und mit 0,2  $\mu$ l Triton X-100 je Ansatz in Richtung der Aktivierung gemessen. Eine pH-Abhängigkeit sowie die optimalen Konzentrationen von KCl und der  $K_m$ -Wert für  $Mg^{2+}$  der ACS2 (HVO\_0896) wurden in Richtung der Acetataktivierung ermittelt. Diese Optima wurden für die ACS1 (HVO\_0894) und ACS7 (HVO\_A0156) in Richtung der Acetatbildung bestimmt.

#### 4.4.2.4 Malat-Enzyme

Malat-Enzyme (HVO\_2158 und HVO\_2436) katalysieren die NADP<sup>+</sup>-abhängige Decarboxylierung von L-Malat zu Pyruvat. 300 µl Ansätze für Aktivitätsmessungen in Richtung der Pyruvatbildung enthielten 0,1 M BisTris, 4 M KCl, pH 5,75, 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 0,5 mM NADP<sup>+</sup>, 1,5 mM L-Malat und Malat-Enzym.

Eine reduktive Carboxylierung von Pyruvat zu Malat wurde im gleichen Puffer mit 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 0,2 mM NADPH, 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 20 mM Pyruvat und Malat-Enzym in 300 µl Ansätzen gemessen. Eine pH-Abhängigkeit sowie KCl- und MnCl<sub>2</sub>-Optima des Malat-Enzyms (HVO\_2436) wurden mit diesem Testsystem gezeigt.

## 5 Ergebnisse

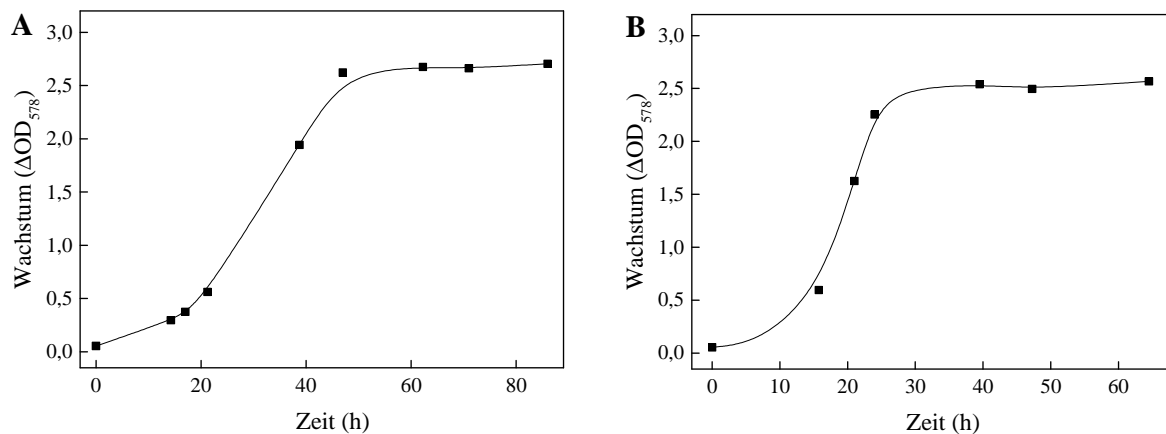
In der vorliegenden Arbeit sollten bisher nicht untersuchte Schlüsselenzyme des zentralen Kohlenstoffwechsels in dem aeroben, halophilen Modellorganismus *H. volcanii* untersucht werden. Dies betrifft Enzyme des Glucose-, des Acetat- und des Succinat-Stoffwechsels.

### 5.1 Enzyme des Glucose-Stoffwechsels

Es sollten folgende Enzyme des Glucose-Stoffwechsels in *H. volcanii* untersucht werden:

- a) Es wurde postuliert, dass *H. volcanii* Glucose über einen semiphosphorylierenden Entner-Doudoroff-Weg (spED-Weg) abbaut, wobei die terminale Umsetzung von Phosphoenolpyruvat (PEP) zu Pyruvat durch eine Pyruvat-Kinase (PK) katalysiert wird. Die transkriptionelle Regulation des *pk*-Gens sollte nach Wachstumsexperimenten auf Glucose und Pyruvat analysiert werden. Mit Hilfe einer  $\Delta pk$ -Mutante sollte die funktionelle Beteiligung der PK am Glucose-Abbau nachgewiesen werden.
- b) Es sollte die Rolle der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase (POR) im Katabolismus sowie die anaplerotische Funktion der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (PEPC) im Glucose-Stoffwechsel untersucht werden. Dazu sollten Transkriptionsanalysen durchgeführt sowie die rekombinanten Proteine charakterisiert werden. Die funktionelle Beteiligung der Enzyme sollte in Wachstumsexperimenten mit Deletionsmutanten gezeigt werden.
- c) Die Bildung von Acetat bei aerobem Wachstum von *H. volcanii* auf Glucose sollte analysiert werden. Die funktionelle Beteiligung der ADP-bildenden Acetyl-Coenzym A-Synthetase (ACD) an der Bildung von Acetat war zu untersuchen. Dazu sollten Transkriptionsanalysen und Wachstumsexperimente mit einer  $\Delta acd$ -Mutante durchgeführt werden.

*H. volcanii* wurde auf Glucose und zum Vergleich auf Pyruvat und Acetat gezüchtet, um die transkriptionelle Regulation von ausgewählten Genen zu untersuchen. Auch wurden Wachstumsexperimente mit Deletionsmutanten auf diesen Wachstumssubstraten durchgeführt. *H. volcanii* wuchs exponentiell in einem Medium mit 15 mM Glucose mit einer Verdopplungszeit von 6,2 h bis zu einer optischen Dichte ( $\Delta OD_{578}$ ) von 2,8 (Abbildung 8 A). Die stationäre Phase wurde nach ca. 48 h erreicht. Auf 40 mM Pyruvat wuchs *H. volcanii* mit einer Verdopplungszeit von 4,1 h bis zu einer optischen Dichte ( $\Delta OD_{578}$ ) von 2,7 (Abbildung 8 B). Die stationäre Phase war nach ca. 25-30 h erreicht. Das Wachstum auf Acetat ist in Kapitel 5.2 detailliert beschrieben.

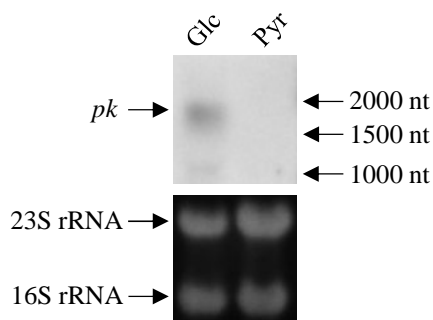


**Abbildung 8** Wachstum von *H. volcanii* H26 auf 15 mM Glucose (A) und 40 mM Pyruvat (B). Die Vorkulturen waren jeweils auf 1 % Casaminsäuren gewachsen. Das Wachstum (■) wurde anhand der optischen Dichte bei 578 nm bestimmt.

### 5.1.1 Pyruvat-Kinase

Die Pyruvat-Kinase (PK) katalysiert im letzten Schritt des spED-Weges die ADP-abhängige Umsetzung von PEP zu Pyruvat und ATP. Das Enzym, kodiert durch HVO\_0806 (*pk*), wurde kürzlich in der AG Schönheit charakterisiert. Im Folgenden wurden Transkriptionsanalysen und Wachstumsexperimente mit der bereits vorliegenden  $\Delta pk$ -Mutante durchgeführt.

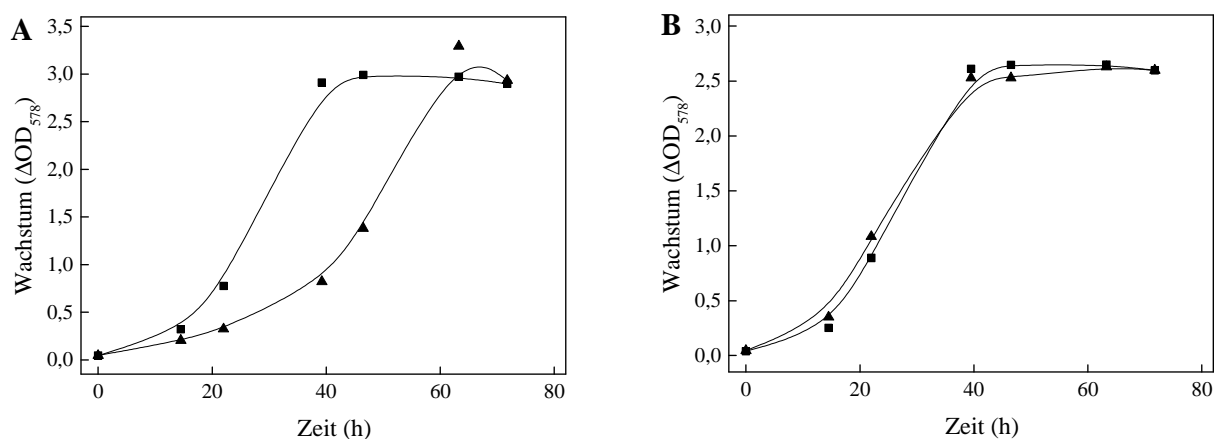
**Transkriptanalyse.** In Northern Blot-Analysen wurde untersucht, ob eine Transkription des *pk*-Gens Glucose-spezifisch induziert wird. Dazu wurde RNA aus Glucose- und Pyruvat-gewachsenen Zellen isoliert, elektrophoretisch getrennt, auf eine Membran geblottet und mittels einer spezifischen Sonde gegen HVO\_0806 analysiert. In Glucose-gewachsenen Zellen wurde ein spezifisches Signal nachgewiesen, das einer Transkriptlänge von ca. 1800 nt entsprach (Abbildung 9). Die Länge des Transkripts stimmt mit der Größe des Gens HVO\_0806 von 1758 bp überein. In Pyruvat-gewachsenen Zellen war dieses Signal nicht detektierbar, was auf eine Glucose-spezifische Induktion und eine Funktion der PK im Katabolismus hindeutet.



**Abbildung 9 Transkriptionsanalyse des *pk*-Gens aus *H. volcanii* mittels Northern Blot.** Abgebildet ist ein Northern Blot mit RNA aus Zellen, die auf Glucose (Glc) oder Pyruvat (Pyr) gewachsen waren. Die Transkripte wurden mit Hilfe einer für das *pk*-Gen spezifischen Sonde nachgewiesen. Ausgewählte Banden des verwendeten Größenstandards sind durch Pfeile dargestellt. Die 23S und 16S rRNA wurden mittels Ethidiumbromid sichtbar gemacht, um die Gesamt-RNA-Menge der Proben zu vergleichen.

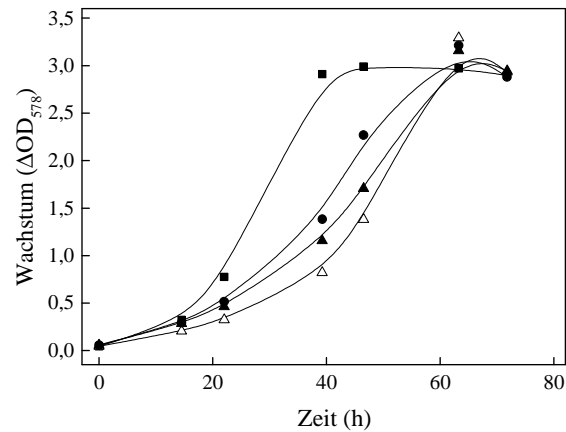
**Analyse der  $\Delta pk$ -Mutante.** Die funktionelle Beteiligung der Pyruvat-Kinase am Glucose-Abbau sollte mittels der  $\Delta pk$ -Mutante verifiziert werden. Die Mutante zeigte im Vergleich zum Wildtyp eine um ca. 20 h verlängerte *lag*-Phase auf einem Medium mit Glucose als Energie- und Kohlenstoffquelle (Abbildung 10 A). Der Übergang des Wachstums in die stationäre Phase wurde erst nach ca. 60 h erreicht, wohingegen der Wildtyp bereits nach ca. 40 h die stationäre Phase erreichte. Eine *in trans* Komplementation mit dem *pk*-Gen führte dazu, dass die  $\Delta pk$ -Mutante wieder ein mit dem Wildtyp vergleichbares Wachstum zeigte (nicht abgebildet). Das Wachstum der Mutante auf Pyruvat war im Vergleich zum Wildtyp

nicht verändert (Abbildung 10 B), was in Übereinstimmung mit den Transkriptanalysen für eine katabole Funktion der PK im Glucose-Abbau spricht. Das eingeschränkte Wachstum der  $\Delta pk$ -Mutante deutet darauf hin, dass die Funktion der PK durch ein anderes Enzym teilweise ersetzbar ist. Für das hyperthermophile Euryarchaeon *Thermococcus kodakarensis* wurde die Beteiligung einer Phosphoenolpyruvat-Synthetase (PEPS) an der katabolen Umsetzung von PEP zu Pyruvat bei Wachstum auf Glucose beschrieben (Imanaka et al. 2006). Im Genom von *H. volcanii* kodiert das Gen HVO\_0812 (*ppsA*) für eine putative PEPS.



**Abbildung 10** Wachstum der *H. volcanii*  $\Delta pk$ -Mutante auf 15 mM Glucose (A) und 40 mM Pyruvat (B). Dargestellt ist das Wachstum der  $\Delta pk$ -Deletionsmutante (▲) im Vergleich zum Wildtyp (■). Die Vorkulturen waren jeweils auf 1 % Casaminsäuren gewachsen. Das Wachstum wurde anhand der optischen Dichte bei 578 nm bestimmt.

**Depletion der PEPS in der  $\Delta pk$ -Mutante.** Um zu prüfen, ob die PEPS die PK in der  $\Delta pk$ -Mutante ersetzen kann, wurde eine konditionale Depletion des *ppsA*-Gens in der  $\Delta pk$ -Mutante durchgeführt. Dazu wurde ein geeigneter Vektor über homologe Rekombination so in das Genom der  $\Delta pk$ -Mutante integriert, dass der natürliche Promotor des *ppsA*-Gens gegen einen künstlich induzierbaren Promotor getauscht wurde. So wurde eine Expression des *ppsA*-Gens durch Zugabe von Tryptophan zum Medium erzielt, während dieses Gen ohne die Zugabe von Tryptophan nicht exprimiert wurde. Es zeigte sich, dass die Depletion der PEPS zu keiner weiteren Einschränkung des Wachstums der  $\Delta pk$ -Mutante auf Glucose führte (Abbildung 11). Auch wurde durch eine gezielte Induktion des *ppsA*-Gens kein verbessertes Wachstum erreicht. Diese Ergebnisse sprechen gegen eine Beteiligung der PEPS am Glucose-Abbau.



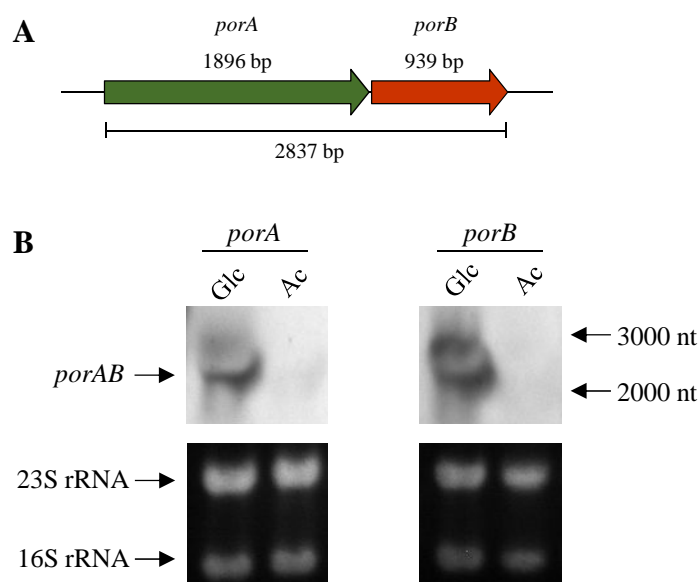
**Abbildung 11 Analyse der konditionalen Depletion des *ppsA*-Gens in der *H. volcanii*  $\Delta pk$ -Mutante auf 15 mM Glucose.** Dargestellt ist das Wachstum der Doppelmutante ohne Tryptophan ( $\blacktriangle$ ) und mit Zugabe von 80  $\mu$ M Tryptophan ( $\bullet$ ) im Vergleich zum Wildtyp ( $\blacksquare$ ) und zur  $\Delta pk$ -Einzelmutante ( $\triangle$ ). Die Vorkulturen waren jeweils auf 1 % Casaminsäuren gewachsen. Das Wachstum wurde anhand der optischen Dichte bei 578 nm bestimmt.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die PK transkriptionell auf Glucose induziert und funktionell am Glucose-Abbau beteiligt ist. Eine katabole Funktion der PEPS kann ausgeschlossen werden. Die anabole Funktion der PEPS wurde im Rahmen dieser Arbeit in Kapitel 5.2.4.2 untersucht.

### 5.1.2 Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase

Die Umsetzung von Pyruvat zu Acetyl-CoA wurde in *H. volcanii* bisher nicht untersucht. Die Gene für Untereinheiten einer putativen Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase (POR) sind im Genom von *H. volcanii* annotiert. HVO\_1305 (*porA*) mit einer Länge von 1896 bp und HVO\_1304 (*porB*) mit einer Länge von 939 bp liegen mit einem Abstand von nur 4 bp in direkter Nachbarschaft im Genom (Abbildung 12 A). Mittels Transkriptanalysen, der Charakterisierung des rekombinanten Proteins und Wachstumsexperimenten mit einer  $\Delta porAB$ -Mutante wurde untersucht, ob die POR essentiell an der Umsetzung von Pyruvat zu Acetyl-CoA beteiligt ist.

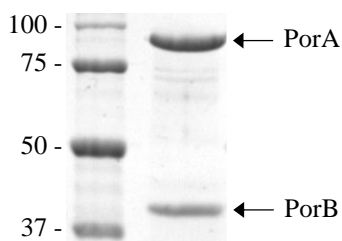
**Transkriptanalyse.** In Northern Blot-Analysen wurde die Transkription der *porA*- und *porB*-Gene in Glucose- und Acetat-gewachsenen *H. volcanii*-Zellen analysiert. Mit einer Sonde gegen *porA* sowie einer Sonde gegen *porB*, wurde jeweils das Signal eines Transkripts mit einer Größe von ca. 2900 nt in Glucose-gewachsenen Zellen detektiert (Abbildung 12 B). Die Größe des Transkripts zeigt, dass die Gene *porA* und *porB* als Operon mit einer kalkulierten Größe von 2837 bp cotranskribiert werden. In Acetat-gewachsenen Zellen war dieses Transkript nicht nachweisbar, was für eine Glucose-spezifische Induktion beider Gene spricht.



**Abbildung 12 Analyse der Gene *porA* und *porB*.** **A:** Anordnung im Genom von *H. volcanii*. Die Gene sind als Pfeile dargestellt. Der Strich unter beiden Genen zeigt die Größe eines Transkripts beider Gene. **B:** Transkriptionsanalyse der Gene mittels Northern Blot. Abgebildet sind Northern Blot-Experimente mit RNA aus Zellen, die auf Glucose (Glc) oder Acetat (Ac) gewachsen waren. Die Transkripte wurden mit Hilfe von Sonden nachgewiesen, die entweder spezifisch für *porA* (links) oder für *porB* waren (rechts). Ausgewählte Banden des verwendeten Größenstandards sind durch Pfeile dargestellt. Die 23S und 16S rRNA wurden mittels Ethidiumbromid sichtbar gemacht, um die Gesamt-RNA-Menge der Proben zu vergleichen.



**Charakterisierung der rekombinanten POR.** Zur Bestimmung der katalytischen Aktivität der POR wurde das *porAB*-Operon, das für die PorA-Untereinheit des Enzyms mit einer Größe von 68,4 kDa und die PorB-Untereinheit mit einer Größe von 34,5 kDa kodiert, in einen Überexpressionsvektor kloniert. Das rekombinante Enzym wurde nach der homologen Überexpression über eine Ni-NTA- und eine Gelfiltrationssäule bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Eine SDS-PAGE-Analyse zeigte zwei Banden mit Größen von 82 kDa und 44 kDa (Abbildung 13). Es ist bekannt, dass das apparente Molekulargewicht halophiler Proteine in einer SDS-PAGE-Analyse aufgrund des erhöhten Anteils saurer Aminosäuren überbestimmt wird (Bonete et al. 1996). Die Größe des nativen Proteins wurde mittels einer Größenausschlusschromatographie auf ca. 190 kDa bestimmt, was für eine heterotetramere Struktur ( $\alpha_2\beta_2$ ) der POR spricht. Die Aktivität des rekombinanten Proteins wurde unter anaeroben Bedingungen mit Methylviologen (MV) als artifiziellem Elektronenakzeptor analysiert. Die rekombinante POR katalysierte die Coenzym A (CoA)- und MV-abhängige Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-CoA mit einer apparenten maximalen Umsatzrate ( $V_{\max}$ ) von 2,07 U/mg (Reaktion 1). Die apparenten  $K_m$ -Werte waren 4,79 mM für Pyruvat und 0,06 mM für Coenzym A (Abbildung 14).



**Abbildung 13 SDS-PAGE-Analyse der rekombinanten POR aus *H. volcanii*.** 12 %ige SDS-PAGE mit gereinigtem Protein. Das *porAB*-Operon wurde so in einen Vektor kloniert, dass die PorA-Untereinheit N-terminal zusätzlich sechs Histidine aufweist. Nach einer homologen Überexpression wurden beide Untereinheiten gemeinsam über eine Ni-NTA-Affinitätschromatographie und eine Größenausschluss-Chromatographie gereinigt. Die Größen der Proteine des Molekulargewichtsstandards sind auf der linken Seite in kDa angegeben.

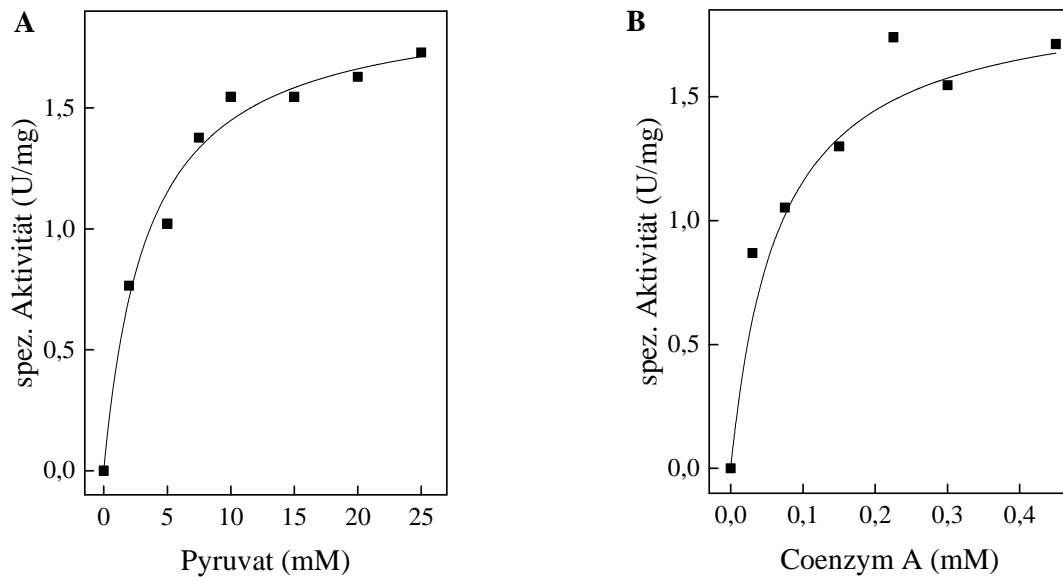
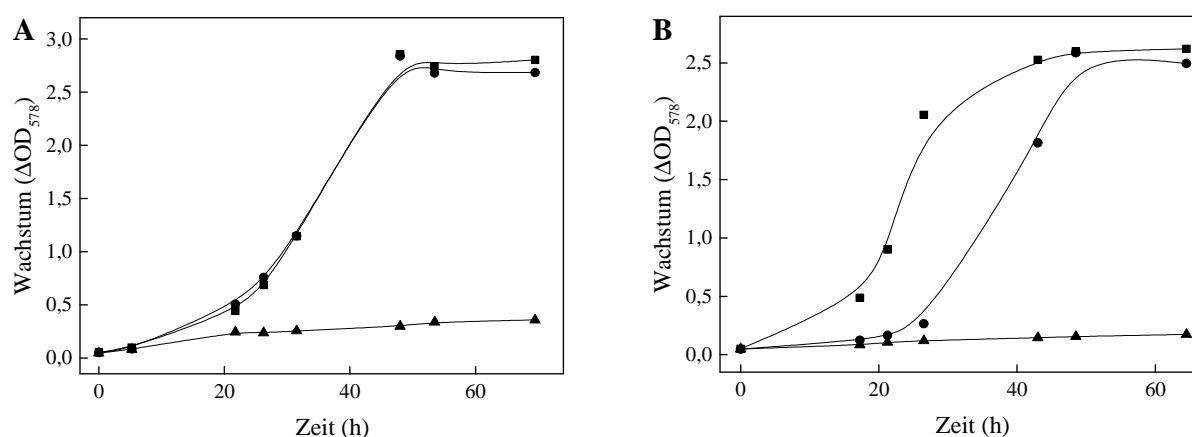


Abbildung 14 Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der rekombinanten POR aus *H. volcanii* von der Pyruvat- (A) und Coenzym A-Konzentration (B).

**Herstellung und Analyse einer konditionalen *porAB*-Depletionsmutante.** Eine funktionelle Beteiligung der POR an der Umsetzung von Pyruvat zu Acetyl-CoA wurde in Wachstumsexperimenten mit einer konditionalen *porAB*-Depletionsmutante nachgewiesen. Dabei wurde das *porAB*-Operon unter die Kontrolle eines durch Tryptophan induzierbaren Promotors gestellt, sodass bei Zugabe von Tryptophan die Expression des Operons induziert wurde, während ohne Tryptophan keine Expression stattfand. Die Ergebnisse zeigen, dass die *porAB*-Mutante ohne Zugabe von Tryptophan weder auf Glucose noch auf Pyruvat wachsen konnte, während durch Zugabe von Tryptophan und damit der Expression des Operons das Wachstum wiederhergestellt wurde (Abbildung 15). Im Gegensatz dazu war das Wachstum auf Acetat von der Expression des *porAB*-Operons unabhängig (nicht abgebildet).



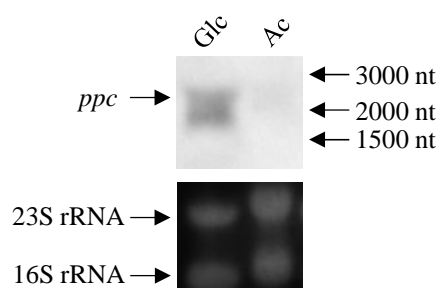
**Abbildung 15** Wachstum der *H. volcanii porAB*-Depletionsmutante auf 15 mM Glucose (A) und 40 mM Pyruvat (B). Dargestellt ist das Wachstum der *porAB*-Depletionsmutante ohne Tryptophan (▲) und mit Zugabe von 80 µM Tryptophan (●) im Vergleich zum Wildtyp (■). Die Vorkulturen waren jeweils auf 40 mM Acetat gewachsen. Das Wachstum wurde anhand der optischen Dichte bei 578 nm bestimmt.

Die Daten zeigen, dass die Expression des *porAB*-Operons Glucose-spezifisch induziert ist und die rekombinante POR die Umsetzung von Pyruvat zu Acetyl-CoA katalysiert. Eine essentielle Beteiligung der POR an der katabolen Umsetzung von Pyruvat zu Acetyl-CoA wurde nachgewiesen.

### 5.1.3 Phosphoenolpyruvat-Carboxylase

*H. volcanii* verfügt über einen geschlossenen Citratzyklus, der Intermediate für den Baustoffwechsel zur Verfügung stellt. Durch anaplerotische Reaktionen müssen die Intermediate des Citratzyklus aufgefüllt werden. Im Genom von *H. volcanii* kodiert das *ppc*-Gen (HVO\_2621) für eine putative Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (PEPC). Im Folgenden sollte die Transkription des *ppc*-Gens analysiert und die Umsetzung von PEP zu Oxalacetat durch die rekombinante PEPC geprüft werden. Außerdem wurde die essentielle Funktion der PEPC in Wachstumsexperimenten mit einer  $\Delta pp c$ -Mutante untersucht.

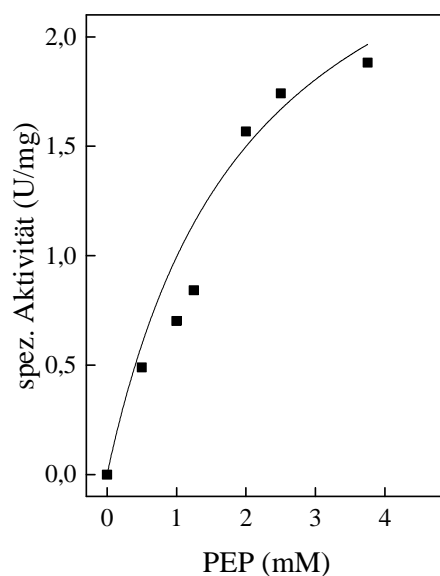
**Transkriptanalyse.** Die Transkription des *ppc*-Gens wurde in Glucose- und Acetatgewachsenen Zellen anhand von Northern Blot-Analysen untersucht. Mit einer spezifischen Sonde gegen das *ppc*-Gen wurde in Glucose-gewachsenen Zellen ein Transkript mit einer Größe von ca. 2650 nt nachgewiesen, was der Länge des *ppc*-Gens von 2694 bp entspricht (Abbildung 16). Dieses Signal war in Acetat-gewachsenen Zellen nicht nachweisbar. Es wurde eine Glucose-spezifische Induktion der Expression des *ppc*-Gens nachgewiesen.



**Abbildung 16 Transkriptionsanalyse des *ppc*-Gens aus *H. volcanii* mittels Northern Blot.** Abgebildet ist ein Northern Blot mit RNA aus Zellen, die auf Glucose (Glc) oder Acetat (Ac) gewachsen waren. Der Transkriptnachweis wurde mit Hilfe einer für das *ppc*-Gen spezifischen Sonde erbracht. Ausgewählte Banden des verwendeten Größenstandards sind durch Pfeile dargestellt. Die 23S und 16S rRNA wurden mittels Ethidiumbromid sichtbar gemacht, um die Gesamt-RNA-Menge der Proben zu vergleichen.

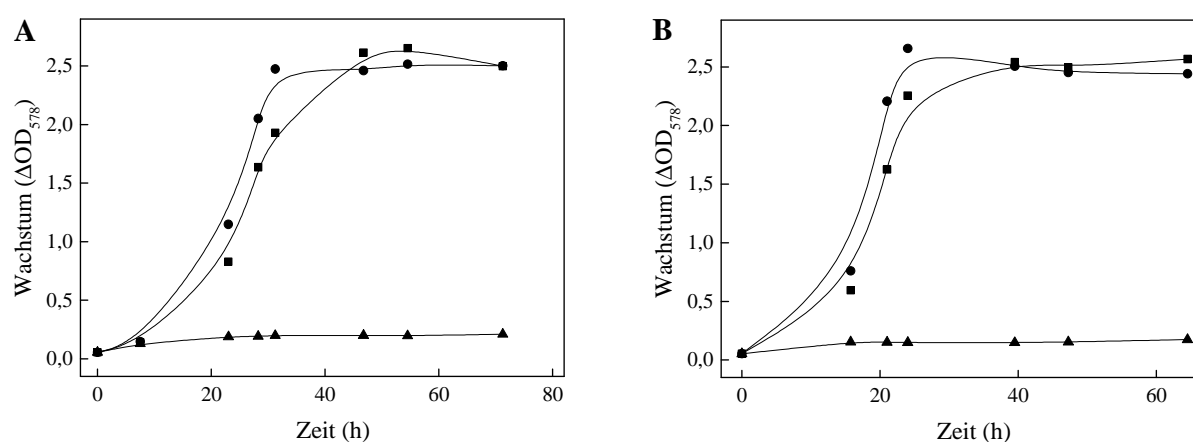
**Charakterisierung der rekombinanten PEPC.** Die PEPC wurde homolog überexprimiert und über eine Ni-NTA-Affinitätschromatographie sowie eine Gelfiltrationssäule bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Das Protein besteht aus 897 Aminosäuren und das kalkulierte Molekulargewicht beträgt 102,3 kDa. Die Größe des rekombinanten Proteins wurde mittels SDS-PAGE auf 105 kDa und mittels Größenausschlusschromatographie auf 125 kDa bestimmt, was für eine monomere Struktur des nativen Proteins spricht.

Die PEPC katalysierte in Anwesenheit von 10 mM Acetyl-CoA, eines positiven allosterischen Effektors bakterieller PEPCs, die Bicarbonat-abhängige Umsetzung von PEP zu Oxalacetat und Phosphat mit einem apparenten  $V_{\max}$ -Wert von 3,1 U/mg (Reaktion 2). Der apparente  $K_m$ -Wert von PEP betrug 1,1 mM (Abbildung 17). Bei geringen Acetyl-CoA-Konzentrationen (< 3 mM) konnte keine Enzymaktivität nachgewiesen werden. Acetyl-CoA konnte nicht durch Fructose-1,6-Bisphosphat oder Glucose-6-Phosphat (je 10 mM) ersetzt werden, die auch als positive Effektoren bakterieller PEPCs beschrieben wurden.



**Abbildung 17** Abhängigkeit der spezifischen Aktivität der rekombinanten PEPC aus *H. volcanii* von der Phosphoenolpyruvat (PEP)-Konzentration. Die Aktivität des Enzyms wurde in Anwesenheit von 10 mM Acetyl-Coenzym A bestimmt.

**Herstellung und Analyse der  $\Delta ppc$ -Mutante.** Für den Nachweis einer anaplerotischen Funktion der PEPC in *H. volcanii* wurde eine  $\Delta ppc$ -Mutante mit Hilfe der Pop-In/Pop-Out-Methode erstellt. Die erfolgreiche Deletion des *ppc*-Gens wurde in einem Southern Blot-Experiment überprüft (siehe Anhang, Abbildung 47). Sowohl in Wachstumsexperimenten auf Glucose als auch auf Pyruvat zeigte die Mutante kein Wachstum (Abbildung 18). Durch eine *in trans* Komplementation mit dem *ppc*-Gen konnte das Wachstum auf beiden Substraten wiederhergestellt werden. Im Gegensatz zum Wachstum auf Glucose und Pyruvat war das Wachstum der  $\Delta ppc$ -Mutante auf Acetat nicht verändert (nicht abgebildet).



**Abbildung 18 Wachstum der *H. volcanii*  $\Delta ppc$ -Mutante auf 15 mM Glucose (A) und 40 mM Pyruvat (B).** Dargestellt ist das Wachstum der  $\Delta ppc$ -Mutante (▲) im Vergleich zum Wildtyp (■) und der  $\Delta ppc$ -Mutante, die mit dem *ppc*-Gen komplementiert wurde (●). Die Vorkulturen waren jeweils auf 1 % Casaminsäuren gewachsen. Das Wachstum wurde anhand der optischen Dichte bei 578 nm bestimmt.

Die Ergebnisse der Transkriptionsanalysen, der Charakterisierung der rekombinanten PEPC und der Wachstumsexperimente mit der  $\Delta ppc$ -Mutante zeigen, dass die PEPC in *H. volcanii* bei einem Wachstum auf Glucose und Pyruvat eine essentielle, anaplerotische Funktion erfüllt.

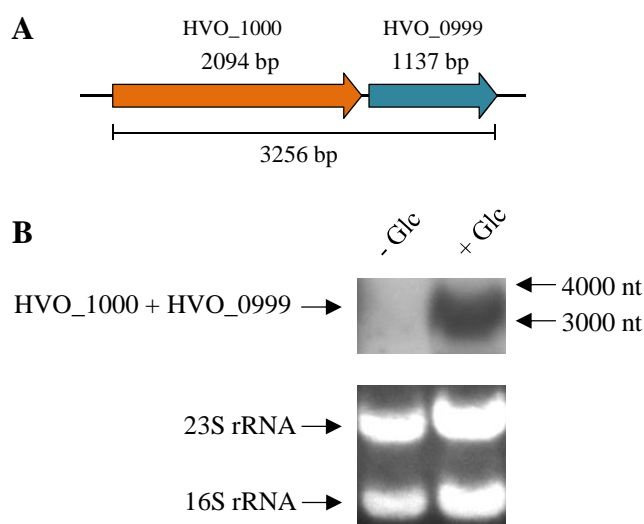
#### 5.1.4 ADP-bildende Acetyl-Coenzym A-Synthetase

Bisherige Untersuchungen deuten darauf hin, dass während des aeroben Wachstums von *H. volcanii* auf Glucose Acetat durch die Aktivität einer ADP-bildenden Acetyl-CoA-Synthetase (ACD) in einem Overflow-Metabolismus gebildet wird. Die rekombinante ACD wurde bereits charakterisiert und katalysiert die ADP- und Phosphat-abhängige Umsetzung von Acetyl-CoA zu Acetat, Coenzym A und ATP mit einer spezifischen Aktivität von 350 U/mg (Reaktion 3).



Erste Transkriptanalysen wurden bereits durchgeführt und eine  $\Delta acd$ -Mutante stand zur Verfügung (Zitat Masterarbeit). In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst ein Medium etabliert, auf dem hohe und reproduzierbare Mengen Acetat während des aeroben Wachstums von *H. volcanii* auf Glucose gebildet werden. Anschließend wurde die funktionale Beteiligung der ACD an der Bildung von Acetat anhand von Transkriptionsanalysen und in Wachstumsexperimenten mit der  $\Delta acd$ -Mutante untersucht. *H. volcanii* wuchs auf 15 mM Glucose und 0,25 % Hefeextrakt mit einer Verdopplungszeit von 3,7 h bis zu einer optischen Dichte ( $\Delta OD_{578}$ ) von 4,4 (siehe Seite 65, Abbildung 20 A). Während des Verbrauchs von Glucose wurden 10,7 mM Acetat ins Medium abgegeben. Nach dem Übergang in die stationäre Phase wurde das gebildete Acetat innerhalb von 10 h wieder vollständig verbraucht. Ohne die Zugabe von Glucose wuchs *H. volcanii* bis zu einer optischen Dichte ( $\Delta OD_{578}$ ) von etwa 1,8, wobei kein Acetat gebildet wurde (nicht abgebildet).

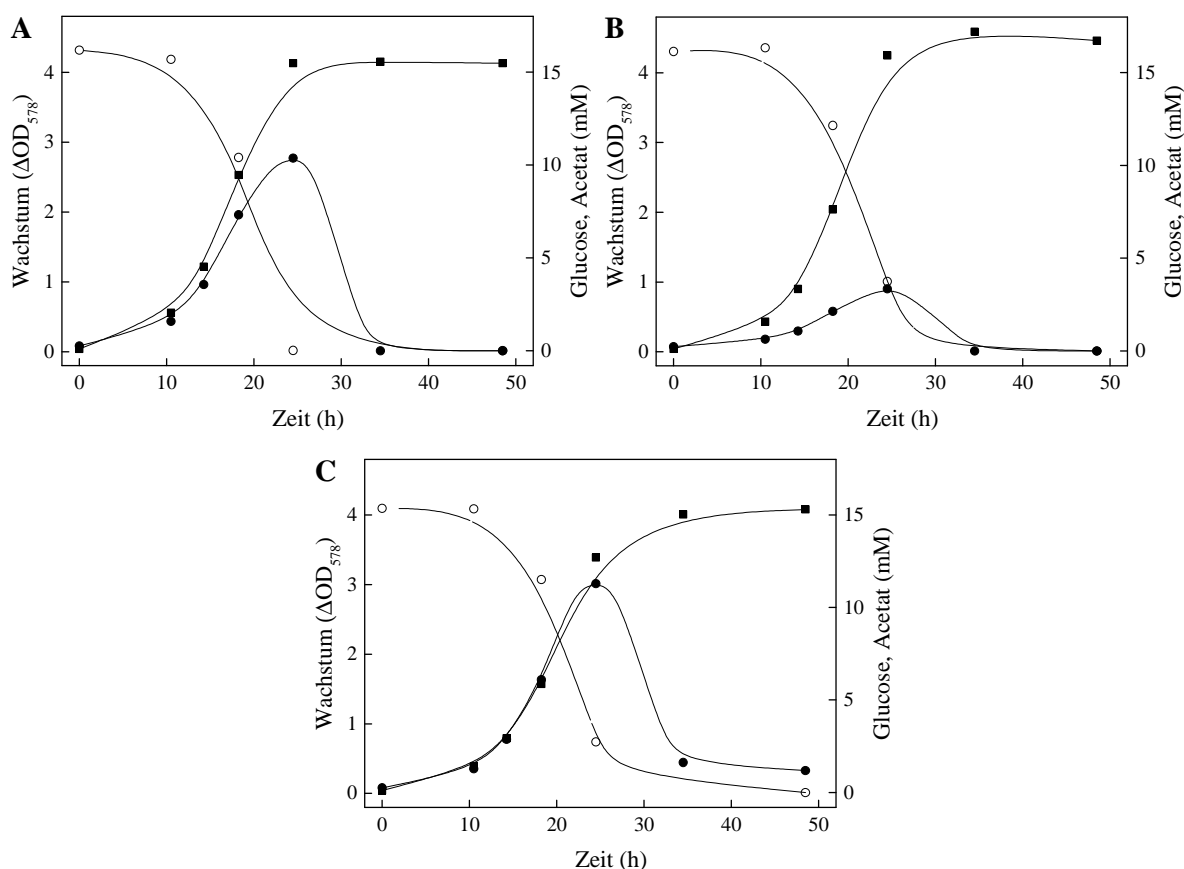
**Transkriptanalyse.** Die ACD ist durch das Gen HVO\_1000 mit einer Länge von 2094 bp kodiert. Im 3'-Bereich von HVO\_1000 befindet sich mit einem Abstand von 27 bp das Gen HVO\_0999 mit einer Größe von 1137 bp (Abbildung 19 A). Mit einer spezifischen Sonde gegen HVO\_1000 wurde in Northern Blot-Analysen mit RNA aus Zellen, die auf dem optimierten Medium mit Glucose gewachsen waren, ein Transkript mit einer Größe von ca. 3200 nt detektiert, was mit der Länge von 3256 bp eines polycistronischen Transkripts beider Gene übereinstimmt (Abbildung 19 B). Dieses Transkript wurde ebenfalls mit einer Sonde gegen HVO\_0999 nachgewiesen (nicht abgebildet). In Zellen, die auf dem identischen Medium, allerdings ohne Glucose gewachsen waren, konnte sowohl mit der Sonde gegen HVO\_1000 als auch der Sonde gegen HVO\_0999 kein Signal detektiert werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass HVO\_1000 und HVO\_0999 als bicistronische Transkripte exprimiert werden und dass die Transkription Glucose-spezifisch induziert ist.



**Abbildung 19 Analyse der Gene HVO\_1000 und HVO\_0999.** A: Anordnung im Genom von *H. volcanii*. Die Gene sind als Pfeile dargestellt. Der Strich unter beiden Genen zeigt die Größe eines Transkripts beider Gene. B: Transkriptionsanalyse mittels Northern Blot. Abgebildet ist ein Northern Blot mit RNA aus Zellen, die in einem Medium (0,25 % Hefe) mit 15 mM Glucose (+ Glc) oder ohne Glucose (- Glc) gewachsen waren. Die Transkripte wurden mit Hilfe einer spezifischen Sonde gegen HVO\_1000 nachgewiesen. Ausgewählte Banden des verwendeten Größenstandards sind durch Pfeile dargestellt. Die 23S und 16S rRNA wurden mittels Ethidiumbromid sichtbar gemacht, um die Gesamt-RNA-Menge der Proben zu vergleichen.



**Analyse der  $\Delta acd$ -Mutante.** Um den Nachweis zu erbringen, dass die ACD essentiell an der Bildung von Acetat aus Glucose beteiligt ist, wurden Wachstumsexperimente mit der  $\Delta acd$ -Mutante auf dem optimierten Medium durchgeführt. Das Wachstum der Mutante auf Glucose-haltigem Medium war nicht verändert. Allerdings wurden während der exponentiellen Wachstumsphase nur noch 36 % der Menge Acetat ( $3,9 \text{ mM} \pm 0,5$ ) im Vergleich zum Wildtyp ( $10,7 \text{ mM} \pm 1,4$ ) im Medium nachgewiesen (Abbildung 20 B). Das gebildete Acetat war nach ca. 10 h wieder verbraucht. Durch eine *in trans* Komplementation mit dem *acd*-Gen wurde die Bildung von Acetat in der exponentiellen Wachstumsphase wiederhergestellt (Abbildung 20 C). Dies zeigt, dass die ACD essentiell an der Bildung von Acetat bei einem aeroben Wachstum von *H. volcanii* auf Glucose beteiligt ist.



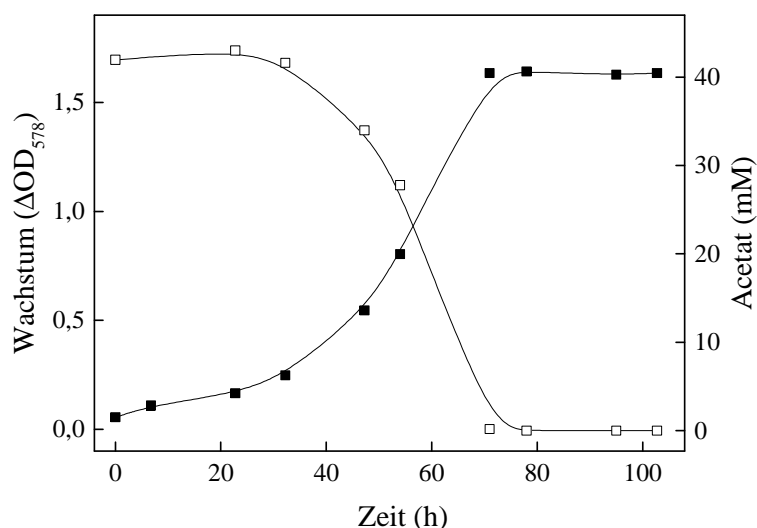
**Abbildung 20** Wachstum von *H. volcanii* H26 (A), der  $\Delta acd$ -Mutante (B) und der  $\Delta acd$ -Mutante, die mit dem HVO\_1000-Gen komplementiert wurde (C) auf 15 mM Glucose und 0,25 % Hefeextrakt. Es wurden das Wachstum (■) sowie die Konzentrationen von Glucose (○) und Acetat (●) bestimmt. Die Vorkulturen waren jeweils auf 1 % Casaminsäuren gewachsen. Das Wachstum wurde anhand der optischen Dichte bei 578 nm bestimmt.

## 5.2 Enzyme des Acetat-Stoffwechsels

Bisherige Untersuchungen zeigten, dass Haloarchaea, so auch *H. volcanii*, auf Acetat wachsen können. Zum Transport von Acetat in die Zellen sowie zur Aktivierung von Acetat zu Acetyl-CoA, die vermutlich über AMP-bildende Acetyl-CoA-Synthetasen (ACS) katalysiert wird, liegen für *H. volcanii* keine Analysen vor. Es wurde die anaplerotische Reaktion eines Glyoxylatzyklus in *H. volcanii* postuliert, dessen funktionelle Beteiligung bisher nicht nachgewiesen wurde. Auch sind die Enzyme der Synthese von Phosphoenolpyruvat (PEP) im Verlauf der Gluconeogenese nicht bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher folgende Fragestellung untersucht werden:

- a) Im Genom von *H. volcanii* wurde ein putativer Acetat-Transporter identifiziert. Die Beteiligung des Transporters am Wachstum von *H. volcanii* auf Acetat sollte analysiert werden. Dazu sollte in Transport-Experimenten die Aufnahme von radioaktiv-markiertem Acetat in die Zellen bestimmt werden. Die funktionelle Beteiligung des Transporters sollte anhand von Transkriptionsanalysen und mit einer Deletionsmutante nachgewiesen werden.
- b) Im Genom von *H. volcanii* sind insgesamt neun Gene annotiert, die für putative ACS kodieren. Die Enzyme, die an der Aktivierung von Acetat beteiligt sind, sollten identifiziert und charakterisiert werden. Transkriptionsanalysen sollten durchgeführt und das Wachstum von Deletionsmutanten analysiert werden.
- c) Die Enzyme des Anabolismus bei Wachstum von *H. volcanii* auf Acetat sollten untersucht werden. Ein Schlüsselenzym des Glyoxylatzyklus, die Isocitrat-Lyase (ICL), sollte deletiert werden. In Wachstumsexperimenten mit der Mutante sollte die essentielle Funktion des Glyoxylatzyklus nachgewiesen werden.
- d) Im Genom von *H. volcanii* sind zwei Malat-Enzyme (MEs) und eine Phosphoenolpyruvat-Synthetase (PEPS) kodiert. Es wurde eine Bildung von PEP im Rahmen der Gluconeogenese durch diese Enzyme postuliert. Die rekombinanten MEs sollten überexprimiert und charakterisiert werden. Es sollte die transkriptionelle Regulation der PEPS untersucht und die Beteiligung der MEs und der PEPS an der Gluconeogenese anhand von Wachstumsexperimenten mit Deletionsmutanten untersucht werden.

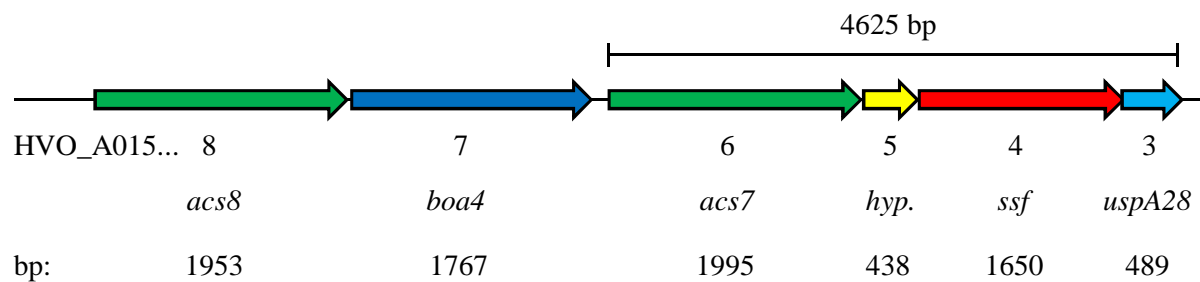
*H. volcanii* wuchs in einem Medium mit 40 mM Acetat mit einer Verdopplungszeit von 12,6 h bis zu einer optischen Dichte ( $\Delta OD_{578}$ ) von 1,7 (Abbildung 21). Bis zum Erreichen der stationären Phase nach 72 h wurde das Acetat vollständig verbraucht.



**Abbildung 21** Wachstum von *H. volcanii* H26 auf 40 mM Acetat. Es wurden das Wachstum (■) und die Acetatkonzentration (□) bestimmt. Die Vorkultur war auf 1 % Casaminsäuren gewachsen. Das Wachstum wurde anhand der optischen Dichte bei 578 nm bestimmt.

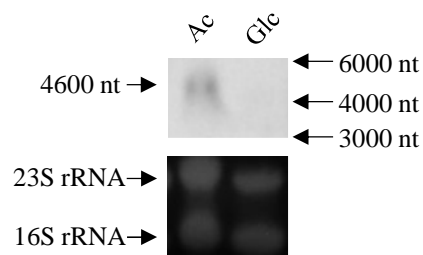
### 5.2.1 Acetat-Transport

Im Genom von *H. volcanii* wurde HVO\_A0154 als *ssf*-Gen annotiert, das für einen putativen Acetat-Transporter der *solute:sodium symporter* (SSF)-Familie kodiert. Dieses Gen liegt in direkter genomischer Nähe der Gene *acs7* (HVO\_A0156) und *acs8* (HVO\_A0158), welche für putative ACS-Enzyme kodieren, die an der Aktivierung von Acetat beteiligt sein könnten (Abbildung 22). In direkter Nähe kodieren außerdem das Gen HVO\_A0155 für ein hypothetisches Protein und das Gen HVO\_A0153 für ein putatives, regulatorisches uspA-Protein.



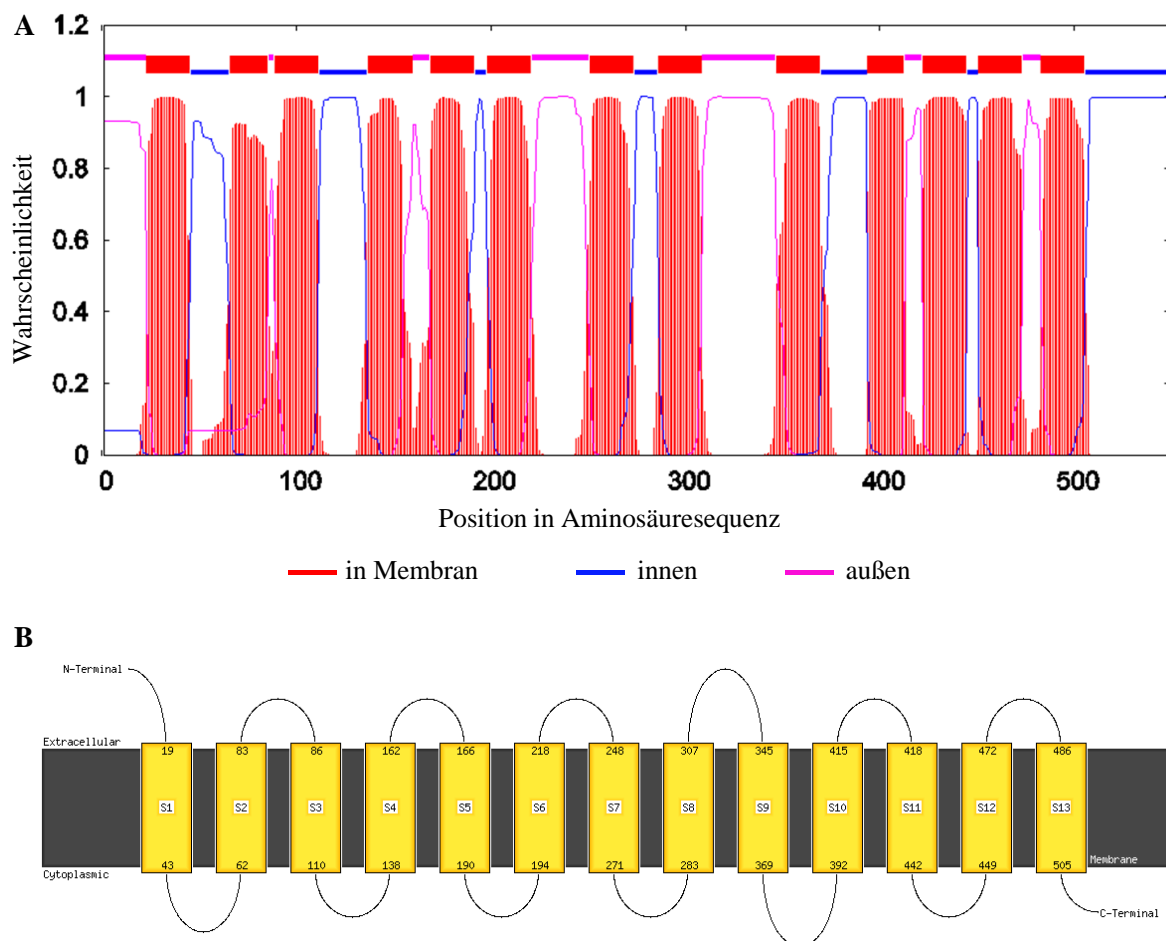
**Abbildung 22 Schematische Darstellung der genomischen Region mit putativen Genen für einen Acetat-Transporter und zwei ACS-Paraloge.** Offene Leserahmen sind als Pfeile dargestellt. Der putative Acetat-Transporter ist durch das *ssf*-Gen kodiert (roter Pfeil). Das Gen HVO\_A0155 (*hyp.*, gelber Pfeil) kodiert für ein hypothetisches Protein und das *uspA*-Gen (*uspA28*, hellblauer Pfeil) kodiert für ein putatives, regulatorisches Protein. Im 5'-Bereich des *ssf*-Gens liegen die Gene für die putativen ACS-Enzyme (*acs7*, *acs8*, grüne Pfeile) und ein Gen für ein putatives *bacterio-opsin activator-like* Protein (*boa4*, dunkelblauer Pfeil). Die Größe der offenen Leserahmen in Basenpaaren (bp) ist unter den Bezeichnungen der Gene angegeben. Die Größe eines polycistronischen Transkripts der Gene HVO\_A0156 bis HVO\_A0153 ist über den Pfeilen dargestellt.

**Transkriptionsanalyse.** Anhand von Northern Blot-Analysen wurde die Transkription des Gens HVO\_A0154 in Acetat- und Glucose-gewachsenen Zellen analysiert. In Acetat-gewachsenen Zellen wurde das Signal eines Transkripts mit einer Größe von ca. 4600 nt detektiert (Abbildung 23), welches der Summe von 4625 nt eines polycistronischen Transkripts der vier Gene HVO\_A0156 bis HVO\_A0153 entspricht (Abbildung 22). Auch mit spezifischen Sonden gegen die Gene HVO\_A0155 und HVO\_A0153 wurde ein polycistronisches Transkript des Operons mit dieser Größe detektiert (nicht abgebildet). Hingegen war eine Expression in Glucose-gewachsenen Zellen nicht nachweisbar. Die Acetat-spezifische Induktion des Operons deutet auf eine Beteiligung des putativen Acetat-Transporters am Transport sowie der ACS7 an der Aktivierung von Acetat hin.



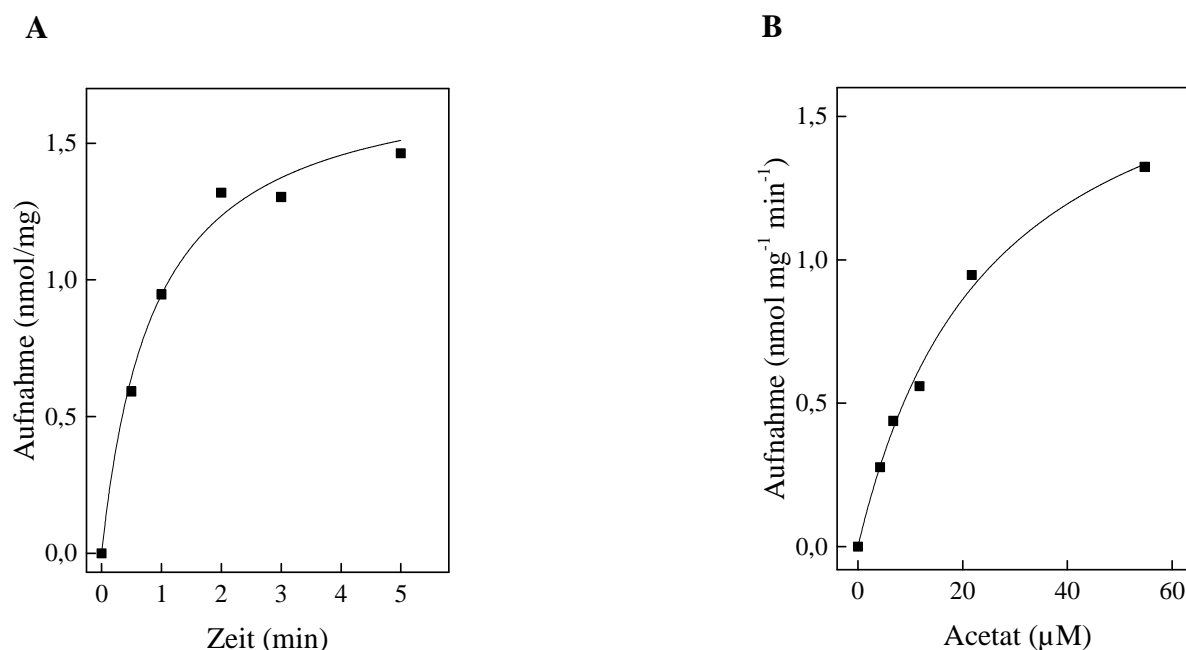
**Abbildung 23 Transkriptionsanalyse der Gene HVO\_A0156 bis HVO\_A0153 mittels Northern Blot.** Abgebildet ist ein Northern Blot-Experiment mit RNA aus Zellen, die auf Acetat (Ac) oder Glucose (Glc) gewachsen waren. Die Transkripte wurden mit Hilfe einer Sonde nachgewiesen, die spezifisch für HVO\_A0154 war. Der Pfeil bildet die mit Hilfe des verwendeten Größenstandards berechnete Größe des Signals ab. Ausgewählte Banden des verwendeten Größenstandards sind durch Pfeile dargestellt. Die 23S und 16S rRNA wurden mittels Ethidiumbromid sichtbar gemacht, um die Gesamt-RNA-Menge der Proben zu vergleichen.

**Hydrophobizitätsanalyse.** Transportproteine weisen in der Regel mehrere hydrophobe Transmembrandomänen auf, die eine Lokalisation des Proteins in der Cytoplasmamembran ermöglichen. Um eine Lokalisation des putativen Acetat-Transporters aus *H. volcanii* in der Cytoplasmamembran zu prüfen, wurde eine Hydrophobizitätsanalyse (TMHMM Server v. 2.0) und eine Vorhersage von Transmembrandomänen (MEMSAT3) angewendet (Sonnhammer et al. 1998; Jones 2007). Es wurde eine Struktur des Acetat-Transporters mit 13 Transmembrandomänen vorhergesagt, wobei der N-terminale Sequenzbereich extrazellulär und der C-terminale Sequenzbereich im Cytoplasma vorliegen (Abbildung 24). Diese Struktur spricht für eine Lokalisation des putativen Acetat-Transporters in der Cytoplasmamembran von *H. volcanii*.



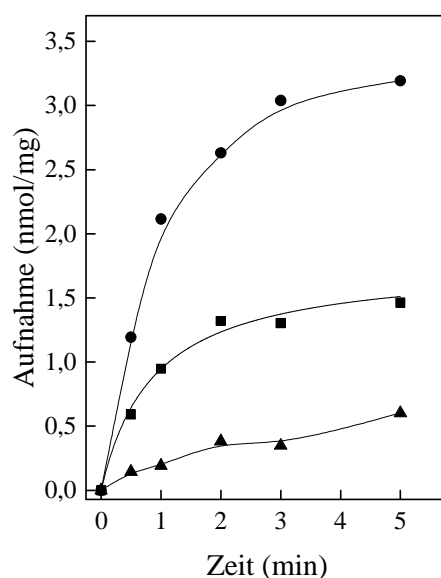
**Abbildung 24 Hydrophobizitätsanalyse (A) und Vorhersage von Transmembranhelices (B) für den putativen Acetat-Transporter HVO\_A0154 von *H. volcanii*.** **A:** Hydrophobizitätsanalyse (TMHMM Server v. 2.0) (Sonnhammer et al. 1998). Aufgetragen ist die Wahrscheinlichkeit einer Orientierung der Aminosäuren in der Membran (rot, senkrechte Balken), auf der Innenseite (blaue Linie) und auf der Außenseite der Membran (pinke Linie) gegen die Aminosäuresequenz von HVO\_A0154. Darüber ist eine schematische Darstellung der Aminosäuresequenz mit Transmembrandomänen, Sequenzbereichen auf der Außen- bzw. Innenseite der Membran gezeigt. **B:** Schematische Darstellung der 13 Transmembrandomänen (S1-S13) von HVO\_A0154 anhand einer MEMSAT3-Vorhersage (Jones 2007). Die Position der Aminosäuren sind jeweils N- und C-terminal in jeder Domäne angegeben.

**Acetat-Transport in *H. volcanii*.** Um einen Acetat-Transport in die Zellen von *H. volcanii* nachzuweisen, wurde die Aufnahme von Acetat in Zellsuspensionen untersucht. Dazu wurde eine konzentrierte Zellsuspension (7,5 mg Protein/ml) mit *H. volcanii*-Zellen hergestellt, die exponentiell auf Acetat gewachsen waren, und diese mit  $^{14}\text{C}$ -markiertem Acetat inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurden Proben genommen, die Zellen auf einen Membranfilter transferiert und unter Vakuum mit Puffer gewaschen. Anschließend wurde die in die Zellen aufgenommene Acetatmenge über die radioaktive Strahlung in einem Szintillationszähler bestimmt. Die Ergebnisse zeigen, dass Acetat mit einer Geschwindigkeit von  $1,1 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$  in die Zellen aufgenommen wurde (Abbildung 25 A). Diese Rate war über einen Zeitraum von ca. 60 s proportional. Die Abhängigkeit der Aufnahmerate von der Acetat-Konzentration wurde getestet. Dabei wurde eine halbmaximale Aufnahmerate bei einer Acetatkonzentration von  $24,6 \mu\text{M}$  und die maximale Aufnahmerate mit  $1,9 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$  berechnet (Abbildung 25 B).



**Abbildung 25 Acetat-Aufnahme in Zellsuspensionen mit *H. volcanii*-Wildtypzellen.** Es wurden Zellsuspensionen mit einer Proteinkonzentration von 7,5 mg/ml verwendet. **A:** Zeitabhängigkeit der Aufnahme von Acetat in Zellsuspensionen mit *H. volcanii*-Wildtypzellen. Es wurden  $21,8 \mu\text{M}$   $^{14}\text{C}$ -markiertes Acetat ( $0,01 \mu\text{Ci}/\text{Ansatz}$ ) eingesetzt. **B:** Abhängigkeit der Aufnahmerate von der Acetat-Konzentration. Es wurde  $^{14}\text{C}$ -markiertes Acetat mit einer Strahlungsintensität von  $0,01 \mu\text{Ci}/\text{Ansatz}$  verwendet.

Um zu prüfen, ob die Aufnahme von Acetat auf das SSF-Protein zurückzuführen war, wurde eine  $\Delta ssf$ -Mutante generiert und die erfolgreiche Deletion anhand eines Southern Blots nachgewiesen (siehe Anhang, Abbildung 47). Es wurde die Acetat-Aufnahme sowohl in der Mutante als auch in der mit dem *ssf*-Gen komplementierten Mutante mit der Acetat-Aufnahme in Wildtypzellen verglichen. Die Daten zeigen, dass die  $\Delta ssf$ -Mutante Acetat mit einer etwa sechsfach geringeren Rate ( $0,18 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) aufnehmen konnte (Abbildung 26). Durch die *in trans* Komplementation der  $\Delta ssf$ -Mutante mit dem *ssf*-Gen war die Acetat-Aufnahmefähigkeit wiederhergestellt, wobei die Geschwindigkeit der Acetataufnahme im Vergleich zum Wildtyp zweifach höher war (Abbildung 26). Diese erhöhte Aufnahme rate lässt sich durch eine Überexpression des *ssf*-Gens erklären. Die Ergebnisse zeigen eine funktionelle Beteiligung des Acetat-Transporters an der Aufnahme von Acetat in die Zellen von *H. volcanii*. Dies ist der erste Nachweis eines Acetat-Transporters in der Domäne der Archaea.



**Abbildung 26 Zeitabhängigkeit der Aufnahme von  $^{14}\text{C}$ -markiertem Acetat.** Dargestellt ist die zeitabhängige Aufnahme von  $21,8 \mu\text{M}$   $^{14}\text{C}$ -markiertem Acetat ( $0,01 \mu\text{Ci/Ansatz}$ ) in die Zellen des *H. volcanii*-Wildtyps (■), der  $\Delta ssf$ -Mutante (▲) und der mit dem *ssf*-Gen komplementierten  $\Delta ssf$ -Mutante (●). Es wurden Zellsuspensionen mit einer Proteinkonzentration von  $7,5 \text{ mg/ml}$  verwendet.

### 5.2.2 AMP-bildende Acetyl-Coenzym A Synthetasen

Nach der Aufnahme des Acetats in die Zellen wird die Aktivierung von Acetat zu Acetyl-CoA vermutlich durch AMP-bildende Acetyl-Coenzym A Synthetasen (ACS) katalysiert. Die Acetat-spezifische Induktion eines polycistronischen Transkripts des Operons, das für den Acetat-Transporter und die putative ACS7 kodiert, spricht dafür, dass die ACS7 an der Aktivierung von Acetat zu Acetyl-CoA beteiligt ist. Im Genom von *H. volcanii* sind aber neben dem *acs7*-Gen noch acht weitere paraloge Gene annotiert, die für putative ACS-Enzyme mit zum Teil hohen Sequenzidentitäten von bis zu 87 % kodieren. Tabelle 7 gibt eine Übersicht über die ACS-Paralogen in *H. volcanii*.

**Tabelle 7 Übersicht der putativen *acs*-Gene aus *H. volcanii* und Identität der kodierten Proteine mit der ACS7.** \*Die Bezeichnungen der Gene und Proteine wurden der Halolex-Datenbank entnommen (Pfeiffer et al. 2008) (Stand Mai, 2016).

Gen	(bp)	Annotation*	Protein*	Aminosäuren	Identität mit ACS7 (%)
HVO_A0156	1995	<i>acs7</i>	ACS7	664	100
HVO_0894	1989	<i>acs1</i>	ACS1	662	87
HVO_A0158	1953	<i>acs8</i>	ACS8	650	64
HVO_1585	2007	<i>acs5</i>	ACS5	668	35
HVO_1236	1608	<i>acs3</i>	ACS3	535	21
HVO_1374	1662	<i>acs4</i>	ACS4	553	16
HVO_A0551	1617	<i>acs9</i>	ACS9	538	15
HVO_0896	1623	<i>acs2</i>	ACS2	540	15
HVO_1917	2001	<i>acs6</i>	ACS6	666	12

**Reinigung der ACS.** Um zu prüfen, welche der ACS funktionell an der Aktivierung von Acetat zu Acetyl-CoA beteiligt ist, wurde eine ACS aus Extrakten Acetat-gewachsener *H. volcanii*-Zellen säulenchromatographisch gereinigt und das kodierende Gen identifiziert. In Extrakten von Acetat-gewachsenen Zellen war keine signifikante ACS-Aktivität messbar. Daher wurde der Extrakt mit Hilfe einer Phenyl-Sepharose-Säule fraktioniert, indem die Proteine mit abnehmender Ammoniumsulfat-Konzentration von der Säule eluiert wurden. Alle Fraktionen wurden auf eine ACS-Aktivität geprüft. Protein mit einer spezifischen ACS-Aktivität von 0,4 U/mg eluierte in einem Peak bei einer Konzentration von ca. 0,5 M Ammoniumsulfat. Die weitere Reinigung bis zur apparenten Homogenität erfolgte mit Hilfe einer weiteren Phenyl-Sepharose-Säule, einer Größenausschlusschromatographie und einer Butyl-Sepharose-Säule. Eine SDS-PAGE-Analyse ergab eine Bande bei 69 kDa (Abbildung 27 A). Diese Bande wurde mittels einer Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) als ACS2

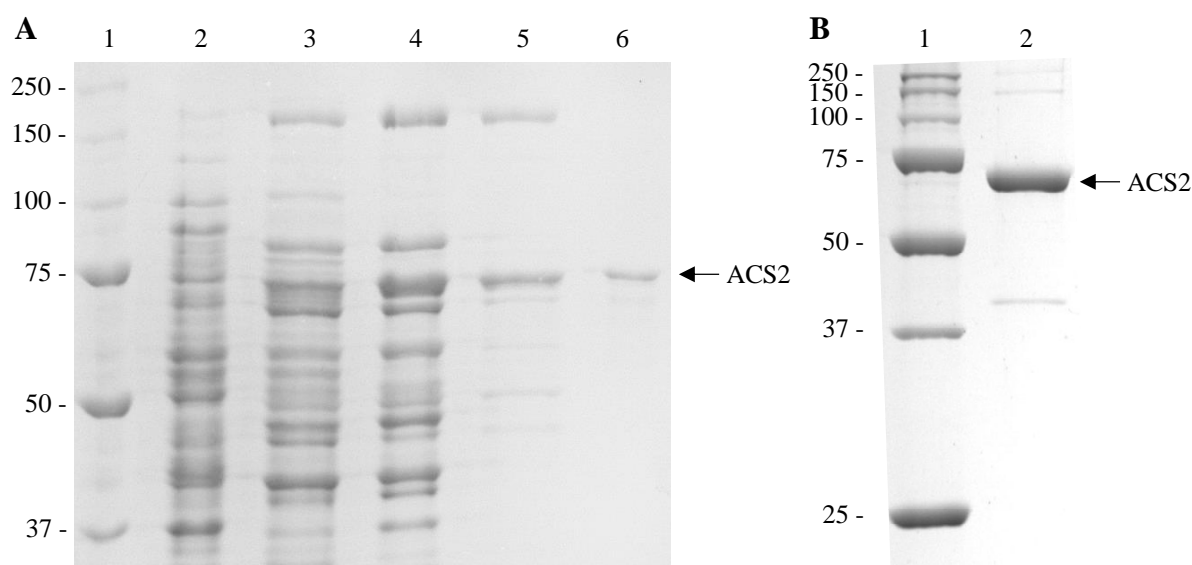


identifiziert, welche durch das Gen HVO\_0896 kodiert ist. Die ACS2 besteht aus 540 Aminosäuren und das kalkulierte Molekulargewicht beträgt 59,8 kDa. Die Größe des nativen Proteins wurde mittels einer Größenausschlusschromatographie auf 139 kDa bestimmt, was für eine homodimere Struktur der ACS2 spricht.

Das Enzym katalysierte die ATP- und Coenzym A-abhängige Aktivierung von Acetat zu Acetyl-CoA, AMP und PP<sub>i</sub> mit einer spezifischen Aktivität von 3,5 U/mg (Reaktion 4).

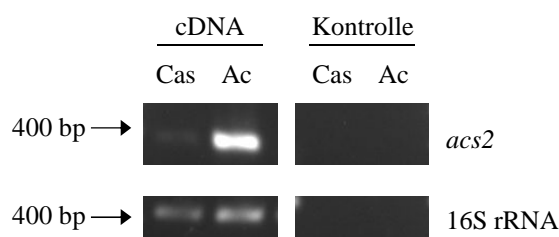


Die Abhängigkeit der Rate von den Substrat-Konzentrationen folgte einer Michaelis-Menten Kinetik mit apparenten K<sub>m</sub>-Werten von 2,3 mM für Acetat, 1,3 mM für CoenzymA und 0,2 mM für ATP (nicht abgebildet). Die ACS2 zeigte keine messbare Aktivität in Richtung der Acetat-Bildung aus Acetyl-CoA, was auf eine spezifische Funktion in der Aktivierung von Acetat hinweist.



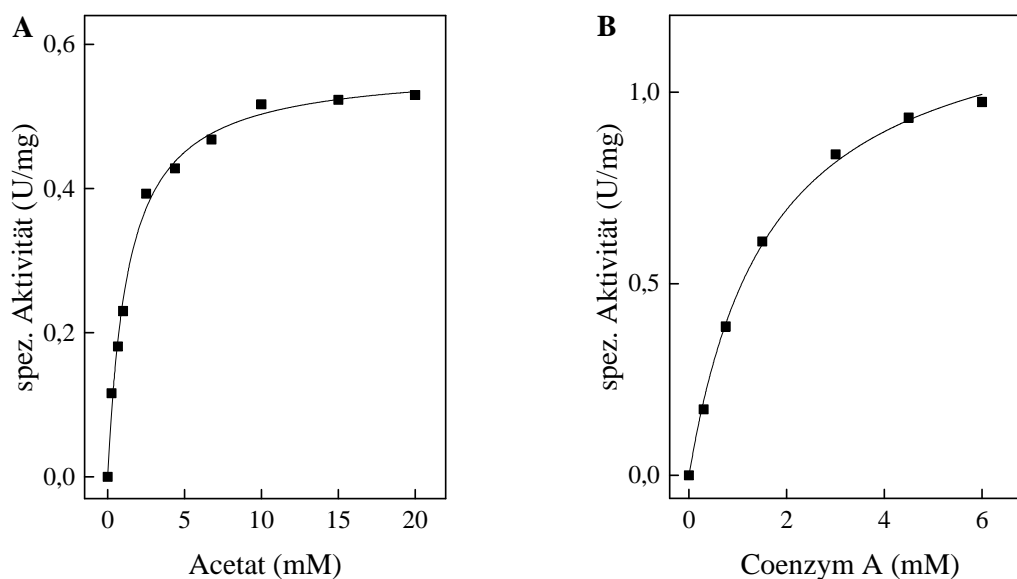
**Abbildung 27 SDS-PAGE-Analyse der ACS2 von *H. volcanii*.** Die Größen der Proteine des Molekulargewichtsstandards in kDa sind jeweils links angegeben. **A:** Analyse der Reinigung der ACS2. Es wurde ein 10 %iges Gel verwendet. Spur 1: Molekulargewichtsstandard, Spur 2: Zellfreier Rohextrakt (20 µg), Spur 3: nach HiLoad-Phenyl-Sepharose (15 µg), Spur 4: nach HiTrap-Phenyl-Sepharose (10 µg), Spur 5: nach Superdex 16/60 (2 µg), Spur 6: nach HiTrap-Butyl-Sepharose (0,85 µg). **B:** Gereinigte rekombinante ACS2. 12 %ige SDS-PAGE mit gereinigtem Protein, das N-terminal zusätzlich sechs Histidine aufweist. Spur 1: Molekulargewichtsstandard, Spur 2: nach Superdex 16/60 (2 µg).

**Transkriptanalyse.** In einer semiquantitativen Analyse der Transkriptmengen mittels RT-PCR sollte die Expression des *acs2*-Gens untersucht werden. In Acetat-gewachsenen *H. volcanii*-Wildtypzellen war im Vergleich zu Komplex-gewachsenen Zellen deutlich mehr Transkript des *acs2*-Gens detektierbar, was auf eine Acetat-spezifische Induktion des Gens in *H. volcanii* hindeutet (Abbildung 28).



**Abbildung 28 Transkriptionsanalyse des *acs2*-Gens (HVO\_0896).** Die RT-PCR wurde mit RNA aus Komplex-gewachsenen (1 % Casaminsäuren, Cas) und Acetat-gewachsenen (Ac) *H. volcanii*-Wildtypzellen und spezifischen Primern für das *acs2*-Gen (Fragmentgröße: 379 bp) durchgeführt. Als Kontrolle wurde ein 422 bp Fragment der konstitutiv exprimierten 16S rRNA HVO\_3038 amplifiziert (Maniscalco et al. 2014). Um Verunreinigungen mit genomischer DNA auszuschließen, wurde DNase-verdaute RNA ohne RT-Schritt als Kontrolle verwendet. Die Pfeile stehen für ausgewählte Banden des DNA-Größenstandards.

**Charakterisierung der rekombinanten ACS2.** Für eine weitere Charakterisierung wurde die ACS2 homolog überexprimiert und das rekombinante Enzym mit Hilfe einer Nickel-Affinitätschromatographie und einer Gelfiltrationssäule bis zur apparenten Homogenität gereinigt (Abbildung 27 B). Die kinetischen Eigenschaften der rekombinanten ACS2 stimmten weitgehend mit den Parametern des nativ gereinigten Proteins überein. Der apparente  $V_{\max}$ -Wert des Proteins betrug 1,5 U/mg. Die apparenten  $K_m$ -Werte lagen bei 1,5 mM für Acetat, bei 2,2 mM für Coenzym A und bei 0,4 mM für ATP (Abbildung 29, Tabelle 8). Maximale Enzymaktivitäten wurden in einem pH-Bereich von 7,5 bis 8,5 und bei einer KCl-Konzentration von 2 M gemessen. Die Enzymaktivität war von  $Mg^{2+}$ -Ionen abhängig. Es wurde ein apparenter  $K_m$ -Wert von 0,4 mM für  $Mg^{2+}$  bestimmt. Die rekombinante ACS2 zeigte wie das nativ gereinigte Enzym keine messbare Aktivität in Richtung der Acetat-Bildung aus Acetyl-CoA.



**Abbildung 29** Abhängigkeit spezifischen Aktivität der rekombinanten ACS2 aus *H. volcanii* von den Substrat-Konzentrationen. Die Aktivitäten wurden bei 42 °C in Testpuffer (0,1 M Tris-HCl, 2 M KCl, pH 7,5) mit 2 mM ATP und 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> bestimmt. **A:** Abhängigkeit von der Acetat-Konzentration. Es wurden 1,5 mM Coenzym A eingesetzt. **B:** Abhängigkeit von der Coenzym A-Konzentration. Es wurden 10 mM Acetat eingesetzt.

Um zu testen ob die ACS2 neben Acetat noch weitere Substrate umsetzen konnte, wurde eine Aktivität des rekombinanten Enzyms mit verschiedenen kurzkettigen Carbonsäuren getestet (je 2,5 mM). Die ACS2 setzte Valerat (160 %) und Butyrat (122 %) mit höherer Aktivität um als Acetat (100 %; 90 mU/mg). Die Umsetzung von Propionat (20 %) und von Oktansäure (11 %) erfolgte nur in geringem Maße. Aktivitätsmessungen mit langkettigen Fettsäuren waren aufgrund der hohen Salzkonzentration im Testsystem nicht möglich.

Die Abhängigkeit der Rate von der Valerat- bzw. Butyrat-Konzentration folgte einer Michaelis-Menten Kinetik. Der  $K_m$ -Wert für Valerat lag bei 0,17 mM und der apparente  $V_{max}$ -Wert bei 0,17 U/mg. Der apparente  $K_m$ -Wert für Butyrat lag bei 0,03 mM und der apparente  $V_{max}$ -Wert wurde auf 0,15 U/mg bestimmt.

**Herstellung und Analyse der  $\Delta acs2$ -Mutante.** Um eine funktionelle Beteiligung der ACS2 am Wachstum von *H. volcanii* auf Acetat zu testen, wurde eine *acs2*-Deletionsmutante hergestellt. In Wachstumsexperimenten auf Acetat zeigte die  $\Delta acs2$ -Mutante kein verändertes Wachstum, was darauf hindeutet, dass in der  $\Delta acs2$ -Mutante die Funktion der ACS2 von paralogen ACS-Enzymen übernommen wird (nicht abgebildet).

**Charakterisierung rekombinanter ACS.** Da kein Wachstumsphänotyp der  $\Delta acs2$ -Mutante auf Acetat festgestellt werden konnte, sollte getestet werden, ob das Gen *acs7*, das in einem Operon mit dem Acetat-Transporter cotranskribiert wird, sowie die paralogen Gene mit der höchsten Sequenzidentität zu dem *acs7*-Gen, das *acs1*- und das *acs8*-Gen, für katalytisch aktive ACS-Enzyme kodieren. Dazu wurden die Proteine homolog überexprimiert, über eine Nickel-Affinitätschromatographie und eine Gelfiltrationssäule bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Die ACS-Aktivität der rekombinanten Enzyme wurde analysiert. Die ACS7 und die ACS1 waren katalytisch aktiv, während für die ACS8, kodiert durch HVO\_A0158, keine ACS-Aktivität nachgewiesen werden konnte.

**Charakterisierung der rekombinanten ACS7.** Das *acs7*-Gen kodiert für ein Protein mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 74 kDa. Die Größe des rekombinanten Proteins wurde anhand einer SDS-PAGE auf ca. 76,5 kDa und anhand einer Größenausschlusschromatographie auf ca. 79 kDa bestimmt, was für eine monomere Struktur der ACS7 spricht (Tabelle 8). Die Aktivität des Enzyms wurde sowohl in Richtung der Aktivierung als auch in Richtung der Bildung von Acetat getestet. Der apparente  $V_{\max}$ -Wert in Richtung der Acetat-Aktivierung lag bei 26,1 U/mg. Die apparenten  $K_m$ -Werte wurden mit 0,84 mM für Acetat, 0,59 mM für ATP und 0,23 mM für Coenzym A bestimmt. In Richtung der Acetat-Bildung betrug der apparente  $V_{\max}$ -Wert 6,2 U/mg. Die apparenten  $K_m$ -Werte wurden mit 0,15 mM für Acetyl-CoA, 0,09 mM für AMP und 0,37 mM für  $PP_i$  gemessen. Des Weiteren wurde die Aktivität der ACS7 mit verschiedenen Carbonsäuren mit einer Größe von bis zu acht C-Atomen getestet (je 2,5 mM). Neben der Aktivierung von Acetat (100 %; 17 U/mg) konnte nur Propionat (34 %) von der ACS7 umgesetzt werden. Dies deutet auf eine hohe Spezifität der ACS7 für kurzkettige Carbonsäuren hin.

**Charakterisierung der rekombinanten ACS1.** Das *acs1*-Gen kodiert für eine ACS mit der kalkulierten, molekularen Masse einer Untereinheit von 74,3 kDa. Die Größe einer Untereinheit wurde mittels SDS-PAGE auf ca. 82 kDa und die Größe der rekombinanten ACS1 anhand einer Größenausschlusschromatographie auf ca. 150 kDa bestimmt, was auf eine homodimere Struktur des Enzyms hindeutet (Tabelle 8). Die Aktivität des Enzyms wurde in Richtung der Aktivierung und in Richtung der Bildung von Acetat getestet. Das Enzym katalysierte die Acetataktivierung mit einem apparenten  $V_{\max}$ -Wert von 0,4 U/mg. Die apparenten  $K_m$ -Werte lagen bei 0,09 mM für Acetat, 0,48 mM für ATP und 0,73 mM für Coenzym A. In Richtung der Acetatbildung betrug der apparente  $V_{\max}$ -Wert 0,25 U/mg und die apparenten  $K_m$ -Werte wurden mit 0,57 mM für Acetyl-CoA, 0,15 mM für AMP und

0,41 mM für  $PP_i$  bestimmt. Neben Acetat (100 %; 0,4 U/mg) wurden auch die kurzkettigen Carbonsäuren Propionat (79 %), Formiat (42 %), Valerat (40 %), und Butyrat (36 %) umgesetzt.

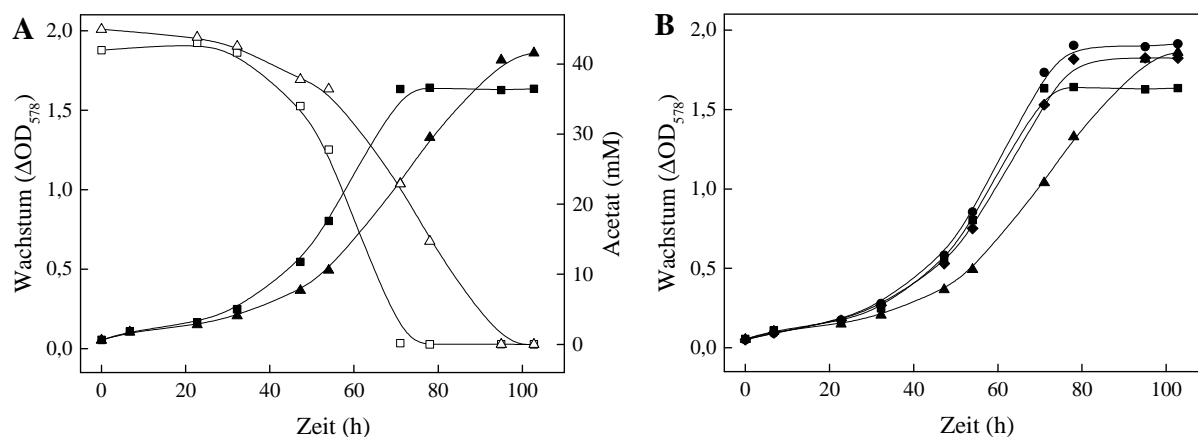
Zusammenfassend zeigt die Charakterisierung der rekombinanten Proteine ACS2, ACS7 und ACS1, dass jedes dieser Enzyme *in vitro* eine Aktivierung von Acetat katalysiert. Interessanterweise katalysierte die rekombinante ACS2, welche zuvor auch aus Acetat-gewachsenen Zellen von *H. volcanii* gereinigt wurde, ausschließlich die Aktivierung von Acetat, während die ACS7 und die ACS1 auch die umgekehrte Reaktionsrichtung katalysierten. Ein Vergleich der Substratspektren zeigt, dass die ACS2 und die ACS1 eine Aktivierung von verschiedenen kurzkettigen Fettsäuren katalysieren, während die ACS7 relativ spezifisch für Acetat ist. In Northern Blot Experimenten wurde bereits die Induktion des Operons, das für den Acetat-Transporter und die ACS7 kodiert, gezeigt (siehe 5.2.1). In einer semiquantitativen Analyse der Transkriptmengen mittels RT-PCR wurde eine Acetat-spezifische Induktion des *acs2*-Gens nachgewiesen (siehe oben). Auch die Ergebnisse einer vorläufigen Analyse der Transkription des *acs1*-Gens mittels RT-PCR deuten auf eine Acetat-spezifische Induktion hin (nicht abgebildet).

**Tabelle 8** Molekulare und kinetische Eigenschaften der rekombinanten ACS-Enzyme aus *H. volcanii*. -, nicht nachweisbar.

Eigenschaft	Substrat	ACS2	ACS7	ACS1
Apparente molekulare Masse einer Untereinheit (kDa)		68,7	76,5	82,4
Apparente molekulare Masse des Enzyms (kDa)		139	79	150
Oligomere Struktur		$\alpha_2$	$\alpha$	$\alpha_2$
Apparenter $K_m$ -Wert (mM)	Acetat	1,5	0,84	0,09
	ATP	0,43	0,59	0,48
	CoA-SH	2,21	0,23	0,73
Apparenter $V_{max}$ -Wert (in Richtung der Acetataktivierung, U/mg)		1,5	26,1	0,4
Apparenter $K_m$ -Wert (mM)	Acetyl-CoA	-	0,15	0,57
	AMP	-	0,09	0,15
	$PP_i$	-	0,37	0,41
Apparenter $V_{max}$ -Wert (in Richtung der Acetatbildung, U/mg)		-	6,2	0,25

**Herstellung und Analyse von  $\Delta$ acs-Mutanten.** Es wurde bereits gezeigt, dass eine Deletion der ACS2 keinen Einfluss auf das Wachstum von *H. volcanii* auf Acetat hat (siehe oben). Im Folgenden wurden daher Mutanten generiert, in denen die ACS7 und ACS1, für die eine ACS-Aktivität gezeigt wurde, deletiert waren. Es zeigte sich, dass weder die Deletion der ACS7 noch der ACS1 einen Einfluss auf das Wachstum von *H. volcanii* auf Acetat hatte (nicht abgebildet). Um zu prüfen, ob die ACS2, ACS7 und ACS1 sich gegenseitig funktionell ersetzen können, wurden gezielt verschiedene Doppel- und Triple-Mutanten generiert und das Wachstum auf Acetat analysiert. Von allen getesteten Varianten führte nur die gleichzeitige Deletion der *acs2*- und *acs7*-Gene in *H. volcanii* zu einem verlangsamten Wachstum auf Acetat (Tabelle 9; Abbildung 30 A). Die Wachstumsrate dieser  $\Delta$ acs2 $\Delta$ acs7-Doppelmutante war um 32 % ( $\mu = 0,038 \text{ h}^{-1} \pm 0,007$ ) im Vergleich zum Wildtyp ( $\mu = 0,056 \text{ h}^{-1} \pm 0,008$ ) reduziert und die stationäre Phase wurde erst mit ca. 20 h Verzögerung erreicht. Während des Wachstums wurde das Acetat mit einer Verzögerung von ebenfalls ca. 20 h vollständig verbraucht. Der Wachstumsphänotyp des Wildtyps konnte durch eine *in trans* Komplementation mit dem *acs2*- oder mit dem *acs7*-Gen vollständig wiederhergestellt werden (Abbildung 30 B). Allerdings konnte auch durch eine zusätzliche Deletion der katalytisch aktiven ACS1 in diesem Stamm das Wachstum der  $\Delta$ acs2 $\Delta$ acs7-Doppelmutante nicht weiter eingeschränkt werden (Tabelle 9; nicht abgebildet), was gegen eine funktionelle Beteiligung der ACS1 an der Aktivierung von Acetat spricht.

Zusammenfassend haben die Analysen der Acetataktivierung in *H. volcanii* ergeben, dass die ACS2 und die ACS7 an der Aktivierung von Acetat zu Acetyl-CoA beteiligt sind, wobei diese Enzyme jedoch wahrscheinlich durch weitere ACS-Paraloge funktionell ersetzt werden können.



**Abbildung 30** Wachstum der *H. volcanii*  $\Delta acs2 \Delta acs7$ -Doppelmutante auf 40 mM Acetat. Die Vorkulturen waren jeweils auf 1 % Casaminsäuren gewachsen. Das Wachstum wurde anhand der optischen Dichte bei 578 nm bestimmt. **A:** Wachstum der  $\Delta acs2 \Delta acs7$ -Doppelmutante (▲) im Vergleich zum Wildtyp (■). Es wurden die Acetat-Konzentrationen im Medium der Doppelmutante (Δ) und des Wildtyps (□) bestimmt. **B:** Dargestellt sind die identischen Wachstumsexperimente mit der  $\Delta acs2 \Delta acs7$ -Doppelmutante (▲) und dem Wildtyp (■) im Vergleich zu der Doppelmutante, die mit dem *acs2*-Gen (◆) bzw. mit dem *acs7*-Gen (●) komplementiert wurde.

**Tabelle 9** Übersicht über die Phänotypen der verschiedenen Deletionsmutanten von *H. volcanii* bei einem Wachstum auf 40 mM Acetat. ++ entspricht einer Wachstumsrate von  $\mu = 0,056 \text{ h}^{-1}$ ; + entspricht einer Wachstumsrate von  $\mu = 0,038 \text{ h}^{-1}$ . WT, Wildtyp.

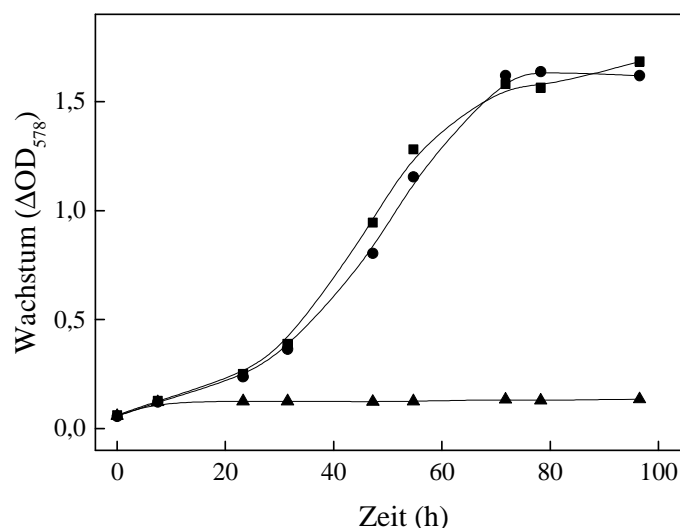
Stamm	Wachstum auf Acetat
<i>H. volcanii</i> H26 (WT)	++
$\Delta acs1$	++
$\Delta acs2$	++
$\Delta acs7$	++
$\Delta acs2 \Delta acs7$	+
$\Delta acs2 \Delta acs1$	++
$\Delta acs1 \Delta acs7$	++
$\Delta acs2 \Delta acs7 \Delta acs1$	+

### 5.2.3 Isocitrat-Lyase

Bei aerobem Wachstum von Bacteria auf Acetat wird Acetyl-CoA im Energiestoffwechsel über die Enzyme des Citratzyklus vollständig oxidiert. In vielen Bacteria erfüllt der Glyoxylatzyklus dabei eine anaplerotische Funktion, indem zwei Moleküle Acetyl-CoA zu Malat umgesetzt werden. Auch im Genom von *H. volcanii* sind die beiden Schlüsselenzyme des Glyoxylatzyklus, die Isocitrat-Lyase, kodiert durch das *icl*-Gen (HVO\_1984) und die Malat-Synthase, kodiert durch *aceB1* (HVO\_1983), annotiert. Beide Enzyme wurden bereits charakterisiert und eine Acetat-spezifische Induktion der Transkription beider Gene wurde gezeigt (Serrano et al. 1998; Serrano und Bonete 2001). Die funktionelle Beteiligung der beiden Schlüsselenzyme des Glyoxylatzyklus am Wachstum von *H. volcanii* auf Acetat wurde bisher nicht nachgewiesen.

**Analyse einer  $\Delta icl$ -Mutante.** Es wurde eine  $\Delta icl$ -Mutante hergestellt und das Wachstum mit Acetat als Energie- und Kohlenstoffquelle getestet. Es zeigte sich, dass die Mutante nicht in der Lage war auf Acetat zu wachsen (Abbildung 31). Durch eine *in trans* Komplementation mit dem *icl*-Gen konnte das Wachstum wiederhergestellt werden. Die  $\Delta icl$ -Mutante zeigte ein unverändertes Wachstum auf Glucose und Pyruvat (nicht abgebildet).

Die Daten zeigen, dass die Isocitrat-Lyase und damit der Glyoxylatzyklus für ein Wachstum von *H. volcanii* auf Acetat essentiell ist.



**Abbildung 31** Wachstum der *H. volcanii*  $\Delta icl$ -Mutante auf 40 mM Acetat. Dargestellt ist das Wachstum der  $\Delta icl$ -Mutante (▲) im Vergleich zum Wildtyp (■) und der  $\Delta icl$ -Mutante, die mit dem *icl*-Gen komplementiert wurde (●). Die Vorkulturen waren auf 15 mM Glucose gewachsen. Das Wachstum wurde anhand der optischen Dichte bei 578 nm bestimmt.



## 5.2.4 Enzyme der Gluconeogenese

In den meisten aeroben Bacteria, die bei einem Wachstum auf Acetat über einen Glyoxylatzyklus verfügen, wird die Synthese von PEP für die Gluconeogenese durch eine PEP-Carboxykinase (PEPCK) katalysiert. Da im Genom von *H. volcanii* kein Gen für eine PEPCK annotiert ist, wurde ein alternativer Weg über die Decarboxylierung von Malat zu Pyruvat durch Malat-Enzyme (ME) und eine Umsetzung von Pyruvat zu PEP durch eine PEP-Synthetase (PEPS) postuliert (Falb et al. 2008).

### 5.2.4.1 Malat-Enzyme

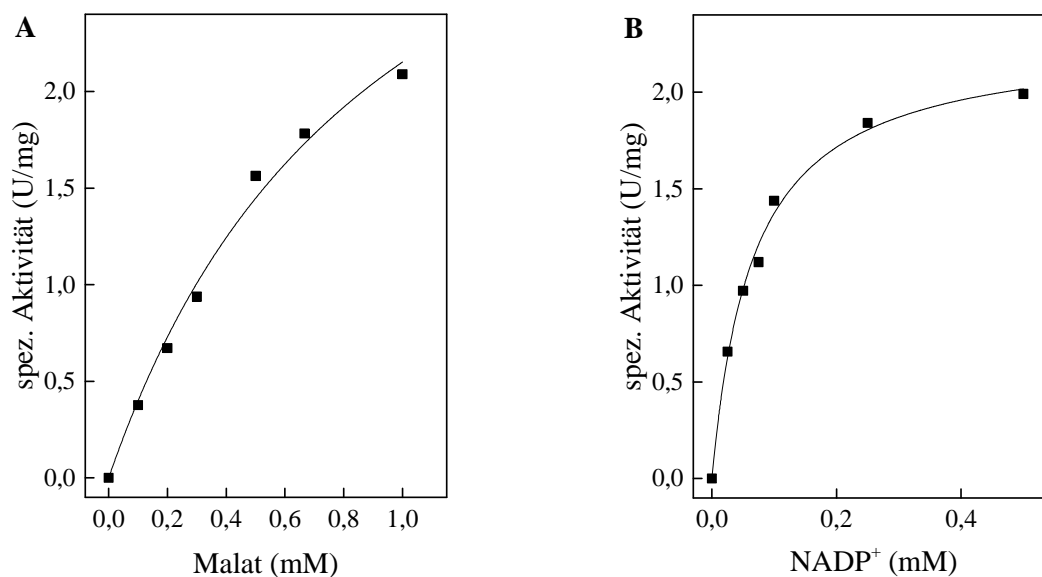
Im Genom von *H. volcanii* kodieren die Gene *tme* (HVO\_2436) für das putative Malat-Enzym 1 und *mdh* (HVO\_2158) für das putative Malat-Enzym 2. Im Folgenden werden diese Gene daher mit *mae1* bzw. *mae2* bezeichnet. Die Aminosäuresequenzen der kodierten Proteine sind zu 83 % identisch und weisen je ein kalkuliertes Molekulargewicht von 81,4 kDa einer Untereinheit auf.

**Charakterisierung rekombinanter Malat-Enzyme.** Die putativen Malat-Enzyme wurden homolog überexprimiert und anschließend über eine Nickel-Affinitätschromatographie sowie eine Gelfiltrationssäule bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Für das Malat Enzym 1 wurde anhand einer Größenausschlusschromatographie ein apparentes Molekulargewicht von 612 kDa festgestellt. Dies spricht für eine homooktamere Struktur.

Das rekombinante Enzym katalysierte die reversible  $\text{NADP}^+$ -abhängige Decarboxylierung von Malat zu Pyruvat mit einem apparenten  $V_{\max}$ -Wert von 4,8 U/mg (Tabelle 10; Reaktion 5).



In Richtung der Pyruvatbildung wurden  $K_m$ -Werte von 1,2 mM für Malat und 0,06 mM für  $\text{NADP}^+$  bestimmt (Abbildung 32). Die Aktivität wurde durch Malat-Konzentrationen größer als 1,5 mM inhibiert.  $\text{NADP}^+$  konnte nicht durch  $\text{NAD}^+$  als Elektronenakzeptor ersetzt werden. In Richtung der Malat-Bildung lag der apparente  $V_{\max}$ -Wert bei 17,6 U/mg. Die  $K_m$ -Werte wurden mit 0,2 mM für NADPH, 4 mM für Pyruvat und 5,5 mM für  $\text{NaHCO}_3$  bestimmt. Das Enzym zeigte keine Aktivität mit NADH. Die höchste Aktivität wurde bei 4 M KCl und pH 5,75 detektiert. Die Aktivität des Enzyms war von zweiwertigen Kationen abhängig, wobei  $\text{MnCl}_2$  (5 mM im Test,  $K_m < 0,5$  mM) durch  $\text{MgCl}_2$  ersetzt werden konnte.



**Abbildung 32** Abhängigkeit der spezifischen Aktivität des rekombinanten Malat-Enzyms 1 aus *H. volcanii* von den Substrat-Konzentrationen. Die Aktivitäten wurden bei 42 °C in Testpuffer (0,1 M BisTris, 4 M KCl, pH 5,75) mit 5 mM MnCl<sub>2</sub> bestimmt. **A:** Abhängigkeit von der Malat-Konzentration. Es wurden 0,5 mM NADP<sup>+</sup> eingesetzt. **B:** Abhängigkeit von der NADP<sup>+</sup>-Konzentration. Es wurden 1,5 mM Malat eingesetzt.

**Tabelle 10** Molekulare und kinetische Eigenschaften des rekombinanten Malat-Enzyms 1 aus *H. volcanii*.

Eigenschaft	Substrat	Malat-Enzym 1
Apparente molekulare Masse einer Untereinheit (kDa)		91,5
Apparente molekulare Masse des Enzyms (kDa)		612
Oligomere Struktur		$\alpha_8$
Apparenter $K_m$ -Wert (mM)	Malat	1,17
	NADP <sup>+</sup>	0,06
Apparenter $V_{max}$ -Wert (in Richtung der Pyruvat-Bildung, U/mg)		4,75
Apparenter $K_m$ -Wert (mM)	Pyruvat	3,95
	NADPH	0,19
	NaHCO <sub>3</sub>	5,54
Apparenter $V_{max}$ -Wert (in Richtung der Malat-Bildung, U/mg)		17,63

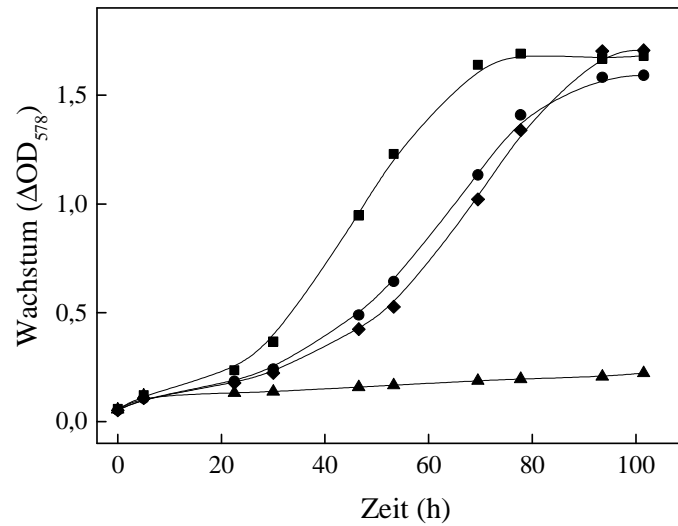
Die Aminosäuresequenz des Malat-Enzyms 2 stimmt zu 83 % mit der Sequenz des Malat-Enzyms 1 überein. Das Malat-Enzym 2 wurde unter identischen Bedingungen ebenfalls überexprimiert und anschließend über eine Ni-NTA und Gelfiltrationssäule gereinigt. Anhand einer Größenausschlusschromatographie wurde für dieses Protein ein Molekulargewicht von ca. 600 kDa berechnet, wodurch eine homooktamere Struktur nachgewiesen wurde.

Es konnte jedoch unter den für das Malat-Enzym 1 optimalen Bedingungen weder eine NADP<sup>+</sup>- oder NAD<sup>+</sup>-abhängige Umsetzung von Malat zu Pyruvat noch eine NADPH- oder NADH-abhängige Katalyse der Rückreaktion nachgewiesen werden.

**Herstellung und Analyse von Deletionsmutanten.** Um eine funktionelle Beteiligung des Malat-Enzyms 1 am Wachstum auf Acetat nachzuweisen, wurde eine  $\Delta mae1$ -Mutante hergestellt und Wachstumsexperimente durchgeführt. Die Wachstumsrate der Mutante auf Acetat war um 11 % ( $\mu = 0,048 \text{ h}^{-1}$ ) im Vergleich zum Wildtypwachstum ( $\mu = 0,054 \text{ h}^{-1}$ ) reduziert (nicht abgebildet). Eine *in trans* Komplementation mit dem *mae1*-Gen hatte keinen Effekt ( $\mu = 0,049$ ). Das Wachstum der Mutante war auf den Substraten Glucose und Pyruvat nicht eingeschränkt (nicht abgebildet). Eine  $\Delta mae2$ -Mutante zeigte kein verändertes Wachstum.

Der wenig veränderte Phänotyp der  $\Delta mae1$ -Mutante und das unveränderte Wachstum der  $\Delta mae2$ -Mutante auf Acetat lassen vermuten, dass sich beide Enzyme funktionell ersetzen können. Deshalb wurde eine Mutante generiert, in der sowohl das Malat-Enzym 1 als auch das Malat-Enzym 2 deletiert waren.

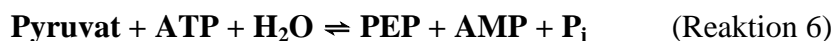
Es zeigte sich, dass diese Doppelmutante nicht in der Lage war, Acetat als Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen (Abbildung 33). Das Wachstum der Mutante konnte durch eine *in trans* Komplementation entweder mit dem *mae1*- oder mit dem *mae2*-Gen wiederhergestellt werden. Die Doppelmutante wuchs unverändert auf Glucose oder Pyruvat (nicht abgebildet). Die Ergebnisse sprechen dafür, dass die Malat-Enzyme 1 und 2 essentiell am Wachstum von *H. volcanii* auf Acetat beteiligt sind und sich gegenseitig funktionell ersetzen können.



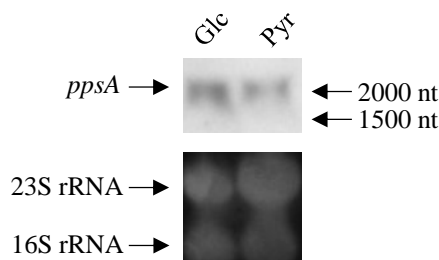
**Abbildung 33 Wachstum der *H. volcanii*  $\Delta mae1 \Delta mae2$ -Doppelmutante auf 40 mM Acetat.** Dargestellt ist das Wachstum der  $\Delta mae1 \Delta mae2$ -Doppelmutante (▲) im Vergleich zum Wildtyp (■) sowie der Doppelmutante, die mit dem *mae1*-Gen (◆) bzw. mit dem *mae2*-Gen (●) komplementiert wurde. Die Vorkulturen waren auf 15 mM Glucose gewachsen. Das Wachstum wurde anhand der optischen Dichte bei 578 nm bestimmt.

### 5.2.4.2 Phosphoenolpyruvat-Synthetase

Im Genom von *H. volcanii* kodiert das Gen *ppsA* (HVO\_0812) für eine putative Phosphoenolpyruvat-Synthetase (PEPS), die eine ATP-abhängige Umsetzung von Pyruvat zu PEP, AMP und Phosphat katalysiert (Reaktion 6). Um eine Beteiligung des Enzyms an der Gluconeogenese zu prüfen, wurden Transkriptionsuntersuchungen durchgeführt und das Wachstum einer  $\Delta ppsA$ -Mutante auf Acetat, Pyruvat und Glucose analysiert.

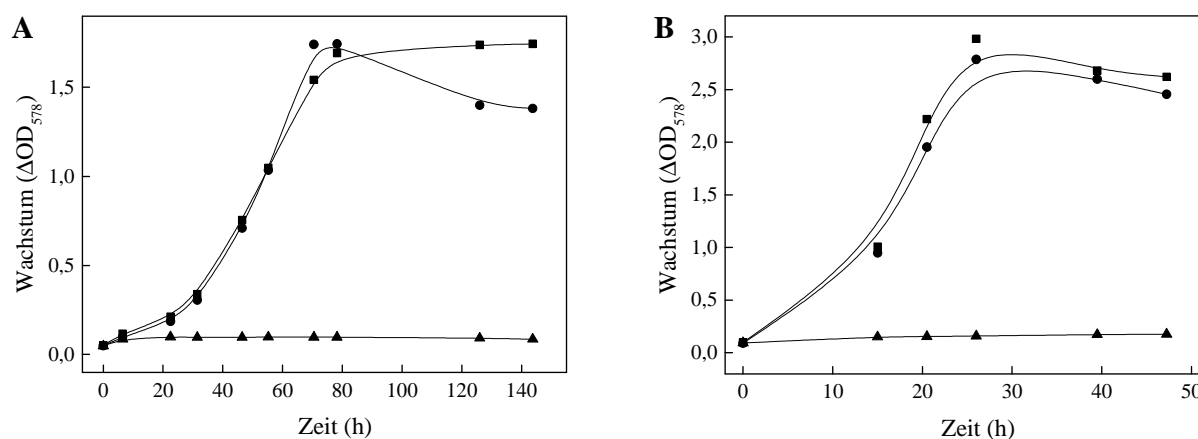


**Transkriptanalyse.** Der Nachweis eines Transkripts von *ppsA* (HVO\_0812) erfolgte mit Hilfe von Northern Blot-Analysen. Mittels einer spezifischen Sonde gegen *ppsA* wurde ein Transkript mit einer Größe von ca. 2100 nt sowohl in Glucose- als auch in Pyruvatgewachsenen *H. volcanii*-Zellen detektiert (Abbildung 34). Die Größe dieses Transkripts entsprach in etwa der Länge des *ppsA*-Gens (2286 bp). Dies deutet auf eine konstitutive Expression des *ppsA*-Gens bei Wachstum von *H. volcanii* auf Glucose und auf Pyruvat hin.



**Abbildung 34** Transkriptionsanalyse des *ppsA*-Gens aus *H. volcanii* mittels Northern Blot. Abgebildet ist ein Northern Blot mit RNA aus *H. volcanii*-Zellen, die auf Glucose (Glc) oder Pyruvat (Pyr) gewachsen waren. Die Transkripte wurden mit Hilfe einer für das *ppsA*-Gen spezifischen Sonde nachgewiesen. Ausgewählte Banden des verwendeten Größenstandards sind durch Pfeile dargestellt. Die 23S und 16S rRNA wurden mittels Ethidiumbromid sichtbar gemacht, um die Gesamt-RNA-Menge der Proben zu vergleichen.

**Herstellung und Analyse der  $\Delta ppsA$ -Mutante.** Um eine funktionelle Beteiligung der PEPS an der Umsetzung von Pyruvat zu PEP in *H. volcanii* zu untersuchen, wurde eine  $\Delta ppsA$ -Mutante generiert und das Wachstum der Mutante mit verschiedenen Kohlenstoff- und Energiequellen analysiert. Die Mutante zeigte kein Wachstum auf Acetat oder Pyruvat (Abbildung 35). Mit Hilfe einer *in trans* Komplementation mit dem *ppsA*-Gen konnte das Wachstum wiederhergestellt werden. Das Wachstum der Mutante auf Glucose war nicht verändert (nicht abgebildet). Die Daten deuten darauf hin, dass die PEPS an der gluconeogenetischen Umsetzung von Pyruvat zu PEP bei Wachstum von *H. volcanii* auf Acetat oder Pyruvat beteiligt ist. Eine katabole Funktion der PEPS im Glucose-Abbau konnte ausgeschlossen werden.



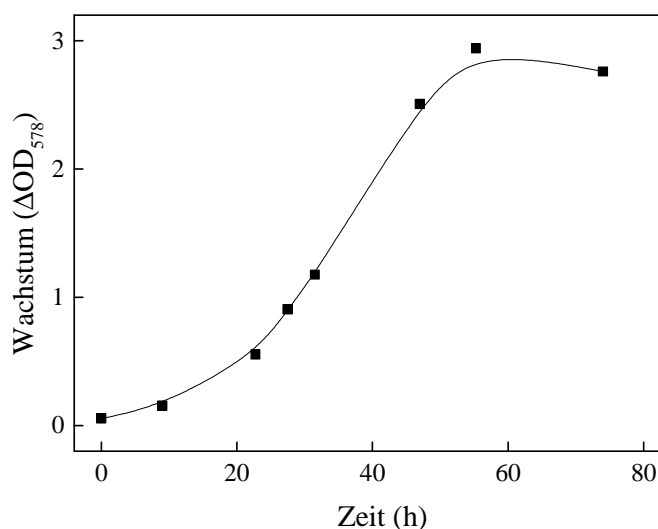
**Abbildung 35** Wachstum der *H. volcanii*  $\Delta ppsA$ -Mutante auf 40 mM Acetat (A) und 40 mM Pyruvat (B). Dargestellt ist das Wachstum der  $\Delta ppsA$ -Mutante (▲) im Vergleich zum Wildtyp (■) und der  $\Delta ppsA$ -Mutante, die mit dem *ppsA*-Gen komplementiert wurde (●). Die Vorkulturen waren auf 15 mM Glucose gewachsen. Das Wachstum wurde anhand der optischen Dichte bei 578 nm bestimmt.

### 5.3 Enzyme des Succinat-Stoffwechsels

Viele aerobe Bacteria können die Dicarbonsäuren Succinat und Malat als Energie- und Kohlenstoffquelle für ein aerobes Wachstum nutzen und durch die Enzyme des Citratzyklus vollständig zu  $\text{CO}_2$  oxidieren (Unden und Kleefeld 2004). Es wurde gezeigt, dass viele Bacteria, wie z. B. *E. coli*, bei einem Wachstum auf Dicarbonsäuren eine Umsetzung von Malat zu Pyruvat durch Malat-Enzyme katalysieren. Aus Pyruvat wird durch einen Pyruvat-Dehydrogenase (PDH)-Komplex Acetyl-CoA gebildet, damit ein zyklischer Ablauf des Citratzyklus möglich ist. Gleichzeitig wird Pyruvat im Rahmen der Gluconeogenese durch eine PEPS zu PEP umgesetzt.

Für Organismen aus der Domäne der Archaea wurde bisher kein Wachstum auf Dicarbonsäuren gezeigt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals ein Wachstum von *H. volcanii* auf Succinat und Malat untersucht. Es wurde gezeigt, dass *H. volcanii* Succinat, als Energie- und Kohlenstoffquelle nutzen kann, jedoch nicht in der Lage war, auf Malat zu wachsen.

Auf Succinat (40 mM) wuchs *H. volcanii* mit einer Verdopplungszeit von  $7,3 \text{ h} \pm 0,6$  bis zu einer optischen Dichte ( $\Delta\text{OD}_{578}$ ) von  $2,6 \pm 0,2$  (Abbildung 36). Die stationäre Phase wurde nach ca. 60 h erreicht.



**Abbildung 36** Wachstum von *H. volcanii* H26 auf 40 mM Succinat. Die Vorkultur war auf 15 mM Glucose gewachsen. Das Wachstum (■) wurde anhand der optischen Dichte bei 578 nm bestimmt.

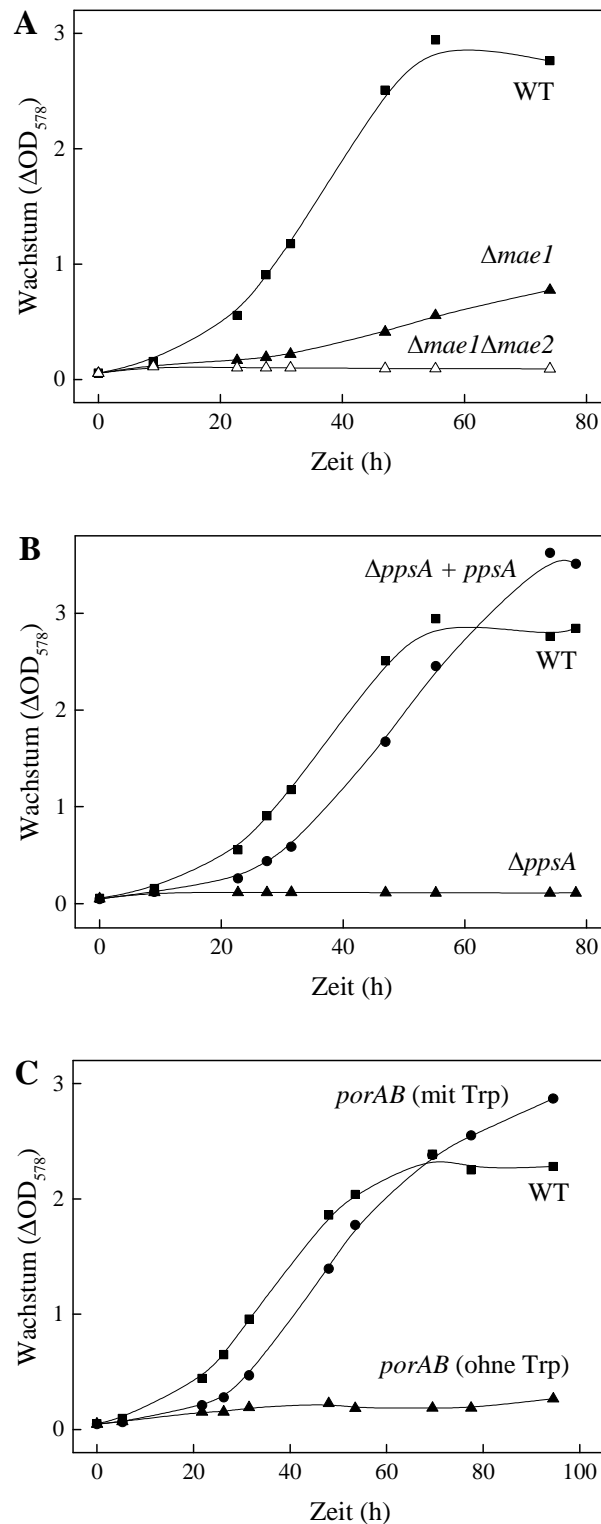
Im Folgenden wurden mit Hilfe von Wachstumsexperimenten mit verschiedenen Deletionsmutanten die Funktionen der Malat-Enzyme (Mae1 und Mae2), der Phosphoenolpyruvat-Synthetase (PEPS) und der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase (POR) bei einem Wachstum auf Succinat untersucht. Die Wachstumsexperimente lieferten folgende Ergebnisse:

1. Die  $\Delta mae1$ -Mutante zeigte ein sehr eingeschränktes Wachstum (Abbildung 37 A). Ein mit dem Wildtypstamm vergleichbares Wachstum konnte mit Hilfe einer *in trans* Komplementation mit dem *mae1*-Gen wiederhergestellt werden. Dagegen war das Wachstum einer  $\Delta mae2$ -Mutante nicht verändert (nicht abgebildet). Die  $\Delta mae1 \Delta mae2$ -Doppelmutante war nicht in der Lage auf Succinat zu wachsen (Abbildung 37 A). Das Wachstum konnte durch die Komplementation mit dem *mae1*- und auch mit dem *mae2*-Gen wiederhergestellt werden (nicht abgebildet).
2. Die  $\Delta ppsA$ -Mutante war nicht in der Lage auf Succinat zu wachsen, während eine Komplementation mit dem *ppsA*-Gen ein Wachstum ermöglichte (Abbildung 37 B).
3. In Wachstumsexperimenten mit einer *porAB*-Depletionsmutante, in welcher die für die Untereinheiten der POR kodierenden Gene *porA* und *porB* unter der Kontrolle eines durch Tryptophan induzierbaren Promotors standen, wurde gezeigt, dass diese Mutante ohne eine Induktion der Expression mittels Tryptophan nicht wachsen konnte, während die Expression der Gene durch eine Tryptophanzugabe zum Medium ein Wachstum ermöglichte (Abbildung 37 C).

Die Malat-Enzyme und die POR wurden für die Untersuchung des Acetat-Stoffwechsels bereits homolog überexprimiert und charakterisiert (siehe 5.2).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass bei einem aeroben Wachstum von *H. volcanii* auf Succinat die Malat-Enzyme 1 und 2 essentiell an der Umsetzung von Malat zu Pyruvat beteiligt sind. Im Rahmen der Gluconeogenese katalysiert die PEPS die anschließende Phosphorylierung von Pyruvat zu PEP. Außerdem ist die Synthese von Acetyl-CoA aus Pyruvat durch die POR essentiell für die Oxidation von Succinat über den Citratzyklus. Erstmals in der Domäne der Archaea wurden Enzyme des Dicarbonsäure-Stoffwechsels identifiziert und die funktionelle Beteiligung nachgewiesen.





**Abbildung 37** Wachstum der  $\Delta mae1$ -,  $\Delta mae1 \Delta mae2$ - (A),  $\Delta ppsA$ -Deletionsmutanten (B) und der *porAB*-Depletionsmutante (C) von *H. volcanii* auf 40 mM Succinat. Das Wachstum wurde anhand der optischen Dichte bei 578 nm bestimmt. A: Dargestellt ist das Wachstum der  $\Delta mae1$ - (▲) und der  $\Delta mae1 \Delta mae2$ -Mutante (△) im Vergleich zum Wildtyp (■). Die Vorkulturen der Stämme waren je auf 15 mM Glucose gewachsen. B: Dargestellt ist das Wachstum der  $\Delta ppsA$ -Mutante (▲) im Vergleich zum Wildtyp (■) und der  $\Delta ppsA$ -Mutante, die mit dem *ppsA*-Gen komplementiert wurde (●). Die Vorkulturen der Stämme waren je auf 15 mM Glucose gewachsen. C: Dargestellt ist das Wachstum der *porAB*-Mutante ohne Tryptophan (▲) und mit Zugabe von 80  $\mu$ M Tryptophan (●) im Vergleich zum Wildtyp (■). Die Vorkulturen waren je auf 40 mM Acetat gewachsen.

## 6 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden bisher nicht untersuchte Enzyme des zentralen Kohlenstoffwechsels in *H. volcanii* identifiziert und charakterisiert. Dazu wurden Transkriptionsanalysen durchgeführt und Enzyme, die nativ gereinigt oder homolog überexprimiert wurden, charakterisiert. In Wachstumsexperimenten mit Deletionsmutanten wurde die Funktion der Enzyme im Glucose-, Acetat- und Succinat-Stoffwechsel analysiert. Im Folgenden werden die erzielten Ergebnisse diskutiert.

### 6.1 Enzyme des Glucose-Stoffwechsels

#### 6.1.1 Pyruvat-Kinase

Es wurde bereits gezeigt, dass die Pyruvat-Kinase (PK) im letzten Schritt des semiphosphorylierenden Entner-Doudoroff-Weges (spED-Weges) die Umsetzung von Phosphoenolpyruvat (PEP) zu Pyruvat katalysiert (AG Schönheit). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit haben Northern Blot-Analysen ergeben, dass die Transkription des *pk*-Gens in Glucose-gewachsenen Zellen, nicht jedoch in Pyruvat-gewachsenen Zellen induziert ist. Wachstumsexperimente mit einer  $\Delta pk$ -Mutante haben gezeigt, dass diese Mutante im Vergleich zum Wildtyp verzögert wuchs. Um auszuschließen, dass eine PEP-Synthetase (PEPS), ein Enzym welches in der Regel die gluconeogenetische Umsetzung von Pyruvat zu PEP katalysiert, die Funktion der PK in der  $\Delta pk$ -Mutante ersetzen kann, wurde eine konditionale Depletion der PEPS in der  $\Delta pk$ -Mutante durchgeführt. Das Wachstum dieser Doppelmutante unterschied sich nicht vom Wachstum der  $\Delta pk$ -Mutante. Diese Ergebnisse sprechen eindeutig für eine katabole Funktion der PK und gegen eine katabole Funktion der PEPS im Glucose-Abbau.

In der Domäne der Archaea gibt es bisher nur wenige Untersuchungen zur funktionalen Beteiligung einer PK am Glucose-Abbau. Für das hyperthermophile Crenarchaeon *Thermoproteus tenax* wurde gezeigt, dass die PK, ebenso wie in *H. volcanii*, transkriptionell bei einem Wachstum auf Glucose induziert wird (Schramm et al. 2000). Die Transkriptanalysen zeigten auch, dass eine PEPS nur während eines autotrophen Wachstums exprimiert wird, was für eine anabole Funktion der PEPS aus *Th. tenax* spricht. Es wird außerdem diskutiert, dass eine konstitutiv exprimierte Pyruvat-Phosphat-Dikinase (PPDK) neben der PK an der katabolen Umsetzung von PEP zu Pyruvat beteiligt sein könnte (Tjaden

et al. 2006). Bioinformatische Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit haben ergeben, dass im Genom von *H. volcanii* kein zur PPK homologes Gen kodiert ist.

Neben *Th. tenax* sind auch für das hyperthermophile Euryarchaeon *Thermococcus kodakarensis* funktionelle Analysen zur Beteiligung einer PK am Glucose-Abbau beschrieben (Imanaka et al. 2006). In *Th. kodakarensis* ist neben der PK auch die PEPS bei Wachstum auf Maltooligosacchariden transkriptionell induziert. Auch die Analyse von PK- und PEPS-Deletionsmutanten ergab, dass beide Enzyme essentiell an der Umsetzung von Maltooligosacchariden beteiligt sind, was für eine katabole Funktion der PK und insbesondere der PEPS spricht. Das Wachstum einer  $\Delta peps$ -Mutante von *Th. kodakarensis* war sogar vollständig inhibiert. Es wurde diskutiert, dass die AMP- und Phosphat-abhängige Umsetzung von PEP zu Pyruvat und ATP durch eine PEPS im Vergleich zu der ADP-abhängigen Reaktion der PK zu einem höheren ATP-Gewinn führt (Imanaka et al. 2006). Es wird vermutet, dass die katabole Funktion der AMP-abhängigen PEPS von Bedeutung ist, da hohe intrazelluläre Konzentrationen an AMP durch die Aktivität ADP-abhängiger Gluco- und Phosphofruktokinasen im modifizierten Embden-Meyerhof-Weg (EM-Weg) verfügbar sind. Da in *H. volcanii* Glucose über einen spED-Weg abgebaut wird, an dem keine ADP-abhängigen Kinasen beteiligt sind, liegt AMP nur in geringen Konzentrationen in der Zelle vor.

Auch in Bacteria sind Untersuchungen zur Funktion der PK im letzten Schritt des Glucose-Abbaus durchgeführt worden. Anhand von *metabolic flux*-Analysen in einer *E. coli*  $\Delta pk$ -Mutante konnte gezeigt werden, dass die katabole Funktion der PK durch eine Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (PEPC), eine Malat-Dehydrogenase (Malat-DH) und zwei Malat-Enzyme ersetzt werden kann (Emmerling et al. 2002). In der *E. coli*  $\Delta pk$ -Mutante katalysiert die PEPC eine Carboxylierung von PEP zu Oxalacetat, welches nach einer Umsetzung zu Malat durch die Malat-DH wiederum durch Malat-Enzyme zu Pyruvat decarboxyliert wird. Auch in *Corynebacterium glutamicum* wurde gezeigt, dass die Deletion der PK neben einer Verringerung der Wachstumsrate auch zu einer erhöhten PEPC-Aktivität führte (Sawada et al. 2010). In zukünftigen Analysen sollte in Wachstumsexperimenten mit *H. volcanii* Deletionsmutanten auf Glucose geprüft werden, ob eine PEPC und Malat-Enzyme die Funktion der PK in der  $\Delta pk$ -Mutante teilweise ersetzen können.

### 6.1.2 Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase

Die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase (POR) aus *H. volcanii* wurde homolog überexprimiert und das rekombinante Enzym charakterisiert. Die heterotetramere POR ( $\alpha_2\beta_2$ ) katalysiert die Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-CoA mit einem apparenten  $V_{\max}$ -Wert von 2,1 U/mg. Die Glucose-spezifische Induktion des für die POR kodierenden Operons und die Wachstumsexperimente mit einer konditionalen *porAB*-Depletionsmutante zeigen eine essentielle Funktion des Enzyms im Glucose-Stoffwechsel.

In allen aeroben Bacteria wird im Gegensatz zu Archaea die Umsetzung von Pyruvat zu Acetyl-CoA durch einen Pyruvat-Dehydrogenase (PDH)-Komplex katalysiert. Warum sowohl in anaeroben als auch in allen aeroben Archaea eine Umsetzung von Pyruvat zu Acetyl-CoA durch eine POR und nicht durch einen PDH-Komplex katalysiert wird, ist bisher nicht verstanden. Obwohl im Genom vieler aerober Archaea vollständige Gen-Cluster für einen PDH-Komplex annotiert sind, konnte eine *in vivo* Beteiligung an der Umsetzung von Pyruvat zu Acetyl-CoA bisher nicht gezeigt werden. Kürzlich konnte jedoch für den heterolog exprimierten PDH-Komplex aus dem thermoacidophilen Archaeon *Thermoplasma acidophilum* eine *in vitro* Umsetzung von verzweigt-kettigen 2-Oxosäuren und auch von Pyruvat zu den korrespondierenden Acyl-CoA-Derivaten nachgewiesen werden (Heath et al. 2007). Auch in *H. volcanii* wurde die Funktion eines putativen PDH-Komplexes untersucht. In früheren Studien konnte ausschließlich eine Beteiligung des putativen PDH-Komplexes am Abbau der verzweigt-kettigen Aminosäure Isoleucin, jedoch nicht von Pyruvat belegt werden (Jolley et al. 1996; Sisignano et al. 2010). Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals in aeroben Archaea die essentielle Funktion der POR im Glucose-Stoffwechsel nachgewiesen. Die Ergebnisse zeigen, dass die POR nicht funktional ersetzt werden kann.

PORs gehören zu der Enzymfamilie der 2-Oxosäuren-ORs, der z. B. auch die  $\alpha$ -Ketoglutarat-ORs und die verzweigt-kettigen 2-Oxosäuren-ORs zugeordnet werden (Schut et al. 2001; Gibson et al. 2016). Inzwischen gibt es eine Vielzahl an charakterisierten PORs aus anaeroben Bacteria und sowohl anaeroben als auch aeroben Archaea. Auch für die POR aus dem Haloarchaeon *Halobacterium salinarum* konnte, wie für die POR aus *H. volcanii*, eine heterotetramere Struktur bestehend aus je zwei  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten ( $\alpha_2\beta_2$ ) gezeigt werden (Kerscher und Oesterhelt 1981b; Plaga et al. 1992). Diese Zusammensetzung aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten trifft vermutlich auch auf die putative  $\alpha$ -Ketoglutarat-OR von *H. volcanii* zu, welche durch die zwei Gene *korA* und *korB* kodiert ist. Auch die charakterisierten PORs aus den aeroben Archaea *Sulfolobus solfataricus* und *Aeropyrum*

*pernix* sind heterodimere ( $\alpha\beta$ ) Enzyme (Nishizawa et al. 2005; Park et al. 2006). Im Gegensatz dazu weisen bisher charakterisierte PORs aus anaeroben Archaea, wie z. B. aus *Pyrococcus furiosus*, *Thermococcus guaymasensis* oder *Methanosarcina barkeri*, eine Zusammensetzung aus vier Untereinheiten ( $\alpha\beta\gamma\delta$  oder  $\alpha_2\beta_2\gamma_2\delta_2$ ) sowie PORs aus strikt anaeroben oder fakultativen Bacteria eine homodimere Struktur ( $\alpha_2$ ) auf (Wahl und Orme-Johnson 1987; Meinecke et al. 1989; Brostedt und Nordlund 1991; Blamey und Adams 1993; Blamey und Adams 1994; Bock et al. 1996; Yoon et al. 1997; Eram et al. 2014). Tabelle 11 zeigt eine Übersicht charakterisierter PORs aus Archaea und Bacteria. Die einzigartige Zusammensetzung der PORs aerober Archaea aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten spricht für eine konvergente Entwicklung dieser Enzyme.

**Tabelle 11 Molekulare Eigenschaften archaeller und bakterieller Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktasen.** Für alle aufgeführten Enzyme wurde die Umsetzung von Pyruvat zu Acetyl-Coenzym A nachgewiesen. MW, Molekulargewicht.

Organismus	MW (kDa)					Oligomer	Referenz
	nativ	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\delta$		
<b>Aerobe Archaea</b>							
<i>Haloferax volcanii</i>	208	68	35	-	-	$\alpha_2\beta_2$	Diese Arbeit
<i>Halobacterium salinarum</i>	204	68	34	-	-	$\alpha_2\beta_2$	(Kerscher und Oesterheld 1981a; Plaga et al. 1992)
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	103	69	34	-	-	$\alpha\beta$	(Park et al. 2006)
<i>Aeropyrum pernix</i> Enzym1	110	72	35	-	-	$\alpha\beta$	(Nishizawa et al. 2005)
<i>Aeropyrum pernix</i> Enzym2	100	67	34	-	-	$\alpha\beta$	(Nishizawa et al. 2005)
<b>Anaerobe Archaea</b>							
<i>Pyrococcus furiosus</i>	115	47	31	24	13	$\alpha\beta\gamma\delta$	(Blamey und Adams 1993; Blamey und Adams 1994)
<i>Thermococcus guaymasensis</i>	258	46	35	26	12	$\alpha_2\beta_2\gamma_2\delta_2$	(Eram et al. 2014)
<i>Methanosarcina barkeri</i>	130	48	30	25	15	$\alpha\beta\gamma\delta$	(Bock et al. 1996)
<b>Bacteria</b>							
<i>Thermotoga maritima</i>	113	43	34	23	13	$\alpha\beta\gamma\delta$	(Blamey und Adams 1994)
<i>Hydrogenobacter thermophilus</i>	135	46	32	29	25	$\alpha\beta\gamma\delta$	(Yoon et al. 1997)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	240	120	-	-	-	$\alpha_2$	(Wahl und Orme-Johnson 1987)
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	246	123	-	-	-	$\alpha_2$	(Meinecke et al. 1989)
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	252	114	-	-	-	$\alpha_2$	(Brostedt und Nordlund 1991)

### 6.1.3 Phosphoenolpyruvat-Carboxylase

Die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (PEPC) aus *H. volcanii* wurde homolog überexprimiert und charakterisiert. Das monomere Enzym zeigte eine allosterische Regulation durch den positiven Effektor Acetyl-CoA. In Anwesenheit von 10 mM Acetyl-CoA katalysierte die rekombinante PEPC die Bicarbonat-abhängige Umsetzung von PEP zu Oxalacetat und Phosphat mit einem apparenten  $V_{\max}$  von 3,1 U/mg. Die Transkription des kodierenden Gens war Glucose-spezifisch induziert. Eine PEPC-Deletionsmutante konnte nicht auf Glucose wachsen, was für die essentielle anaplerotische Funktion des Enzyms spricht.

PEPCs sind in allen drei Domänen des Lebens weit verbreitet und bilden eine eigene Proteinfamilie. Ein Vergleich mit bereits charakterisierten PEPCs zeigt, dass sich die monomere *H. volcanii* PEPC mit einem Molekulargewicht von ca. 100 kDa deutlich von anderen archaeellen PEPCs unterscheidet, deren Untereinheiten mit ca. 55-60 kDa deutlich kleiner sind (Ettema et al. 2004; Patel et al. 2004; Matsumura et al. 2006). Stattdessen stimmt die Größe der *H. volcanii* PEPC mit jener der Untereinheiten pflanzlicher und bakterieller PEPCs überein (Teraoka et al. 1972; Ting und Osmond 1973; Ettema et al. 2004; Matsumura et al. 2006). Interessanterweise ist das Enzym von *H. volcanii* die erste PEPC, für die eine monomere Struktur nachgewiesen wurde.

Kinetische Analysen haben ergeben, dass die meisten sowohl pflanzlichen als auch bakteriellen PEPCs einer positiven allosterischen Regulation durch Intermediate des Stoffwechsels unterliegen (Wohl und Markus 1972; Matsumura et al. 2006). So werden bakterielle Enzyme meist durch Acetyl-CoA und pflanzliche Enzyme meist durch Glucose-6-Phosphat aktiviert. Die Anstauung dieser Metabolite zeigt eine Limitierung der Oxidation von Acetyl-CoA über den Citratzyklus an und signalisiert somit die Notwendigkeit anaplerotischer Reaktionen. In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich eine allosterische Regulation der PEPC durch Acetyl-CoA festgestellt, jedoch nicht durch Glucose-6-Phosphat, welches kein Intermediat der Glykolyse über einen spED-Weg in *H. volcanii* ist. Für PEPCs aus anaeroben Archaea, die über keinen geschlossenen Citratzyklus verfügen, ist eine positive allosterische Regulation nicht bekannt. Die Funktion von PEPCs in diesen Organismen besteht allein in der Synthese von Oxalacetat als Substrat für die Biosynthese von Aminosäuren wie zum Beispiel Aspartat. Die einzige bisher untersuchte PEPC aus anaeroben Bacteria, welche Acetyl-CoA nicht über einen Citratzyklus oxidieren, stammt aus *Clostridium perfringens* (Dharmarajan et al. 2009; Dharmarajan et al. 2011). Dieses Enzym ist die einzige bekannte bakterielle PEPC, die mit Untereinheiten mit

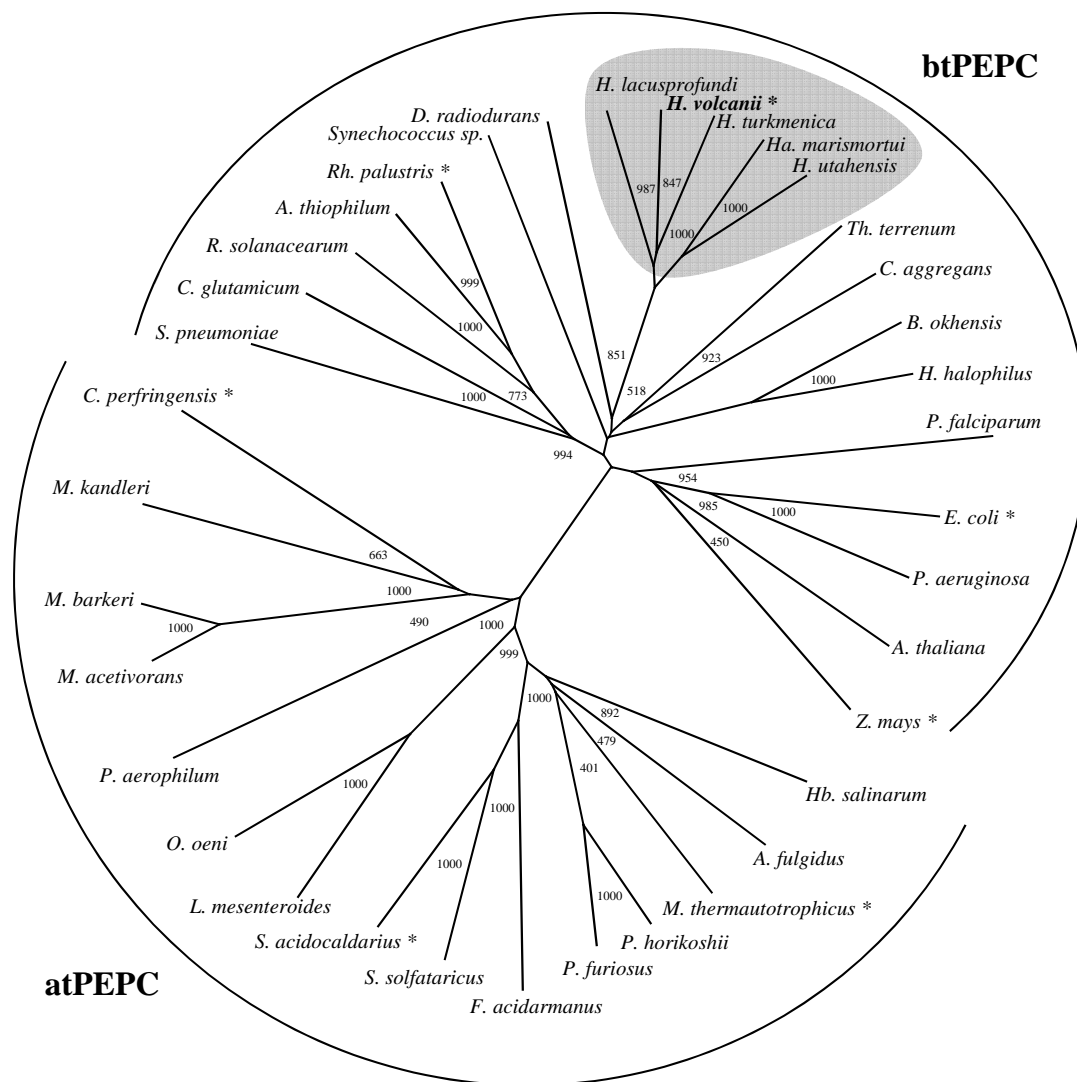
einer Größe von 62 kDa und einer fehlenden positiven Regulation wesentliche Eigenschaften einer archaeellen PEPC aufweist. Tabelle 12 zeigt eine Übersicht charakterisierter PEPCs aller drei Domänen des Lebens.

**Tabelle 12 Molekulare Eigenschaften archaeeller, bakterieller und eukaryotischer Phosphoenolpyruvat-Carboxylasen.** Ein „x“ zeigt an, dass eine Aktivierung durch Acetyl-Coenzym A getestet wurde, aber nicht messbar war. Ein „-“ zeigt an, dass eine Aktivierung durch Acetyl-Coenzym A nicht getestet wurde. AcCoA, Acetyl-Coenzym A; at, archaea-type Phosphoenolpyruvat-Carboxylase; bt, bacteria-type Phosphoenolpyruvat-Carboxylase; MW, Molekulargewicht; pos. Eff., positive Effektoren; UE, Untereinheit.

Organismus	Typ	MW (kDa)		Oligomer	pos. Eff.	Referenz
		UE	nativ			
<b>Archaea</b>						
<i>Haloferax volcanii</i>	bt	102	125	$\alpha$	AcCoA	Diese Arbeit
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	at	60	260	$\alpha_4$	x	(Sako et al. 1997)
<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i>	at	55	277	$\alpha_4$	x	(Patel et al. 2004)
<i>Methanothermus sociabilis</i>	at	60	240	$\alpha_4$	x	(Sako et al. 1996)
<b>Bacteria</b>						
<i>Escherichia coli</i>	bt	90	360	$\alpha_4$	AcCoA	(Teraoka et al. 1972)
<i>Clostridium perfringens</i>	at	62	130	$\alpha_2$	-	(Dharmarajan et al. 2009; Dharmarajan et al. 2011)
<i>Rhodospseudomonas palustris</i>	bt	102	400	$\alpha_4$	AcCoA	(Inui et al. 1997; Sadaie et al. 1997)
<b>Eukarya</b>						
<i>Zea mays</i>	bt	100	400	$\alpha_4$	G6P	(Ting und Osmond 1973)

Die Analyse der Aminosäuresequenzen verschiedener PEPCs hat gezeigt, dass in archaeellen PEPCs große Sequenzabschnitte, welche für eine allosterische Regulation durch Acetyl-CoA essentiell sind, nicht vorhanden sind (Ettema et al. 2004; O'Leary et al. 2011; Peng et al. 2012). Das Fehlen dieser Sequenzabschnitte erklärt auch das deutlich geringere Molekulargewicht dieser Enzyme. Phylogenetische Analysen haben ergeben, dass pflanzliche und bakterielle PEPCs zusammen ein distinktes Cluster bilden und sich deutlich von archaeellen Enzyme unterscheiden (Ettema et al. 2004; O'Leary et al. 2011; Peng et al. 2012). Aufgrund dieser phylogenetischen Zuordnung wird zwischen *archaea-type* (at) und *bacteria-type* (bt) PEPCs unterschieden. Eine Abstammung pflanzlicher PEPCs von bakteriellen Enzymen wird vermutet, die vermutlich auf einen lateralen Gentransfer aus der Gruppe der  $\gamma$ -Proteobacteria zurückzuführen ist (Peng et al. 2012). Eine phylogenetische Einordnung der *H. volcanii* PEPC ist in Abbildung 38 dargestellt. Dabei bilden die *H. volcanii* PEPC und weitere putative PEPCs aus Haloarchaea eine distinkte Gruppe innerhalb der btPEPCs. Diese Zuordnung lässt vermuten, dass auch die halophilen PEPCs aus einem lateralen Gentransfer von Bacteria stammen. Eine Ausnahme bildet die putative PEPC aus dem Haloarchaeon *Halobacterium salinarum*, die sich, wie bereits in vorangegangenen phylogenetischen Studien beobachtet, im Cluster der atPEPCs befindet (Ettema et al. 2004; O'Leary et al. 2011; Peng et al. 2012).





**Abbildung 38 Phylogenetische Einordnung von Phosphoenolpyruvat-Carboxylasen (PEPC) aus Archaea, Bacteria und Eukarya.** Der Stammbaum wurde mit dem Neighbor-Joining Algorithmus aus ClustalX erstellt, wobei das Bootstrapping-Verfahren 1000 Wiederholungen umfasste (Larkin et al. 2007). Die Bootstrap-Werte befinden sich an den Knotenpunkten. Der Baum basiert auf einem multiplen Aminosäure-Sequenzalignment, das mit ClustalX unter Verwendung der Gonnet Matrix erstellt wurde. Charakterisierte Enzyme sind mit einem \* gekennzeichnet. Der Balken stellt 0,1 Substitutionen pro Aminosäure dar. Folgende Sequenzen, mit Accession-Nummern in Klammern (PDB, UniProt bzw. NCBI Reference), wurden verwendet: *bacteria-type* PEPC (btPEPC): *Streptococcus pneumoniae* (Q97QX6.1), *Corynebacterium glutamicum* (P12880.4), *Ralstonia solanacearum* (Q8XWW2.1), *Azospirillum thiophilum* (A0A0F2KMC6), *Rhodospseudomonas palustris* (O32483), *Synechococcus sp.* (P06516.1), *Deinococcus radiodurans* (Q9RUU8), *Haloferax volcanii* (D4GUG0), *Haloterrigena turkmenica* (D2RVU2), *Haloarcula marismortui* (Q5V4H5), *Halorhabdus utahensis* (C7NNW9), *Thermobaculum terrenum* (D1CE74), *Chloroflexus aggregans* (B8G3G1), *Bacillus okhensis* (A0A0B0IGX7), *Halobacillus halophilus* (I0JJ14), *Plasmodium falciparum* (Q8ILJ7), *Escherichia coli* (1QB4), *Pseudomonas aeruginosa* (Q9HXV3.1), *Arabidopsis thaliana* (Q8GVE8), *Zea mays* (1JQO); *archaea-type* PEPC (atPEPC): *Clostridium perfringens* (Q8XLE8), *Methanopyrus kandleri* (WP\_011018562.1), *Methanosarcina barkeri* (ZP\_00077334.1), *Methanosarcina acetivorans* (Q8TMG9), *Pyrobaculum aerophilum* (NP\_560717.1), *Oenococcus oeni* (ZP\_00070236.1), *Leuconostoc mesenteroides* (ZP\_00063059.1), *Sulfolobus acidocaldarius* (Q4JJC1), *Sulfolobus solfataricus* (Q97WG4), *Ferroplasma acidarmanus* (ZP\_00000247.1), *Pyrococcus furiosus* (Q8TZL5), *Pyrococcus horikoshii* (WP\_010884136.1), *Methanothermobacter thermotrophicus* (WP\_010876576.1), *Archaeoglobus fulgidus* (O28786), *Halobacterium salinarum* (Q9HN43).

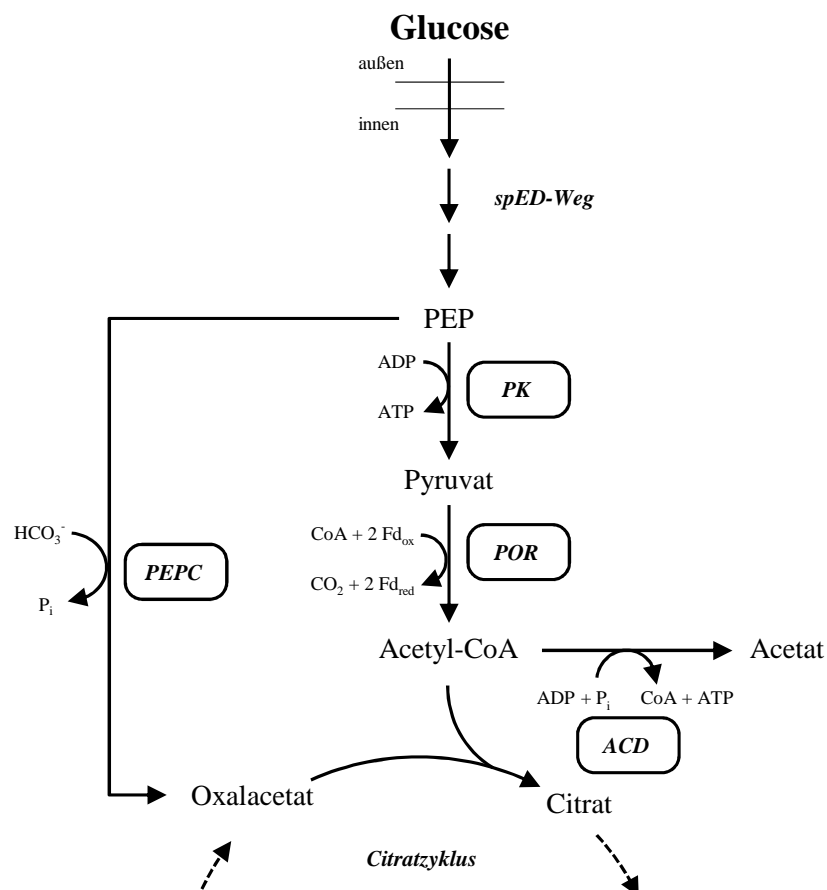
#### 6.1.4 ADP-bildende Acetyl-CoA-Synthetase

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und der vorangegangenen Masterarbeit zeigen, dass *H. volcanii* bei einem aeroben Wachstum auf Glucose signifikante Mengen Acetat bildet. Die ACD, welche die ADP- und Phosphat-abhängige Umsetzung von Acetyl-CoA zu Acetat, Coenzym A und ATP katalysiert, wurde zuvor bereits überexprimiert und charakterisiert. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Glucose-spezifische Induktion des kodierenden Gens nachgewiesen. Analysen einer  $\Delta acd$ -Mutante haben ergeben, dass im Vergleich zum Wildtyp nur 36 % der Menge Acetat gebildet wird, was für eine funktionelle Beteiligung der ACD an der Acetat-Bildung spricht.

Eine Bildung von Acetat bei einem aeroben Wachstum auf Glucose wurde auch für das Haloarchaeon *Haloarcula marismortui* gezeigt (Bräsen und Schönheit 2004a). Die Beteiligung der ACD an der Acetat-Bildung wurde aber nur aufgrund von Aktivitätsmessungen in Extrakten Glucose-gewachsener Zellen vermutet. Ein funktioneller Nachweis ist nicht erfolgt.

Die Acetat-Bildung während eines aeroben Wachstums auf Glucose im Rahmen eines sogenannten Overflow-Metabolismus ist in der Domäne der Bacteria bereits gut untersucht und wurde z. B. für *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* und *Corynebacterium glutamicum* beschrieben (Brown et al. 1977; Grundy et al. 1993; Reinscheid et al. 1999; Tobisch et al. 1999). Im Gegensatz zu den Archaea erfolgt in Bacteria jedoch eine Acetat-Bildung über die zwei Enzyme Phosphotransacetylase und Acetat-Kinase (Grundy et al. 1993; Presecan-Siedel et al. 1999; Oh et al. 2002). Es wird vermutet, dass Acetat unter aeroben Bedingungen gebildet wird, da die Umsatzrate der Glykolyse höher ist als die Rate der anschließenden Oxidation von Acetyl-CoA über den Citratzyklus (Hochstein 1978; Andersen und von Meyenburg 1980; el-Mansi und Holms 1989; Wolfe 2005). Für *E. coli* und *B. subtilis* wurde ebenso wie für *H. volcanii* nachgewiesen, dass eine hohe Glucose-Konzentration die Expression der Enzyme des Citratzyklus reprimiert (Tobisch et al. 1999; Oh et al. 2002; Zaigler et al. 2003). Daher wird Acetyl-CoA zu Acetat umgesetzt und in das Medium abgegeben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die funktionelle Beteiligung von Enzymen des Zentralstoffwechsels am Abbau von Glucose in *H. volcanii* nachgewiesen. Die Ergebnisse sind schematisch in Abbildung 39 zusammengefasst. Die funktionelle Beteiligung der Pyruvat-Kinase an der Umsetzung von Phosphoenolpyruvat (PEP) zu Pyruvat im letzten Schritt des semiphosphorylierenden Entner-Doudoroff-Weges wurde gezeigt. Erstmals in der Domäne der Archaea wurde die essentielle Funktion der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase in der anschließenden Umsetzung von Pyruvat zu Acetyl-Coenzym A nachgewiesen. Ebenso wurde die essentielle anaplerotische Funktion einer Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, welche PEP zu Oxalacetat carboxyliert, bei Wachstum auf Glucose nachgewiesen. Es wurde außerdem gezeigt, dass die ADP-bildende Acetyl-Coenzym A Synthetase funktionell an der Acetat-Bildung aus Glucose beteiligt ist. Damit wurden zentrale, bisher nicht analysierte Reaktionen des Glucose-Stoffwechsels in *H. volcanii* aufgeklärt.



**Abbildung 39 Schematische Darstellung des Glucose-Stoffwechsels in *H. volcanii*.** Es sind ausschließlich die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Enzyme genannt. ACD, ADP-bildende Acetyl-Coenzym A Synthetase; CoA, Coenzym A; Fd<sub>ox</sub>, Ferredoxin (oxidiert); Fd<sub>red</sub>, Ferredoxin (reduziert); PEP, Phosphoenolpyruvat; PEPC, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase; PK, Pyruvat-Kinase; POR, Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase; spED-Weg, semiphosphorylierender Entner-Doudoroff-Weg.

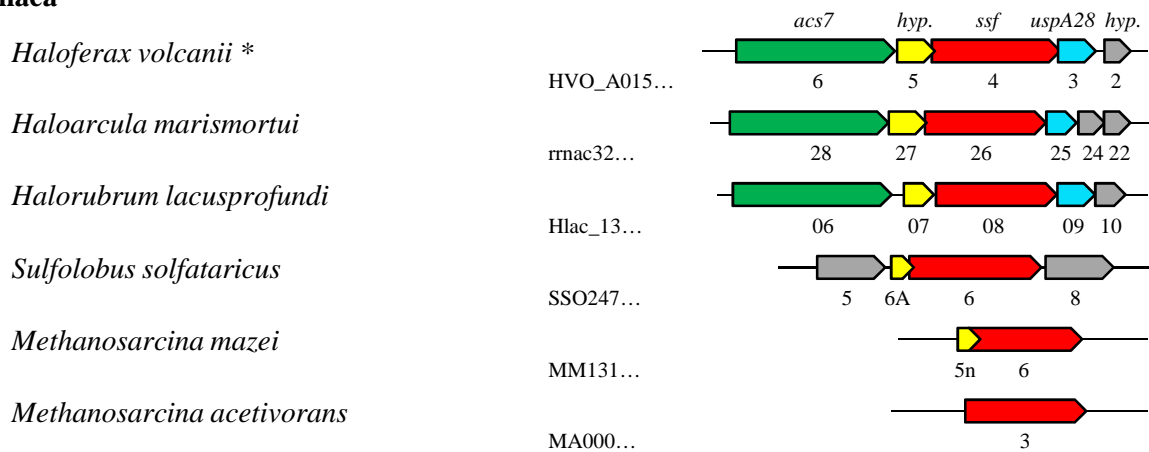
## 6.2 Enzyme des Acetat-Stoffwechsels

### 6.2.1 Acetat-Transport in *H. volcanii*

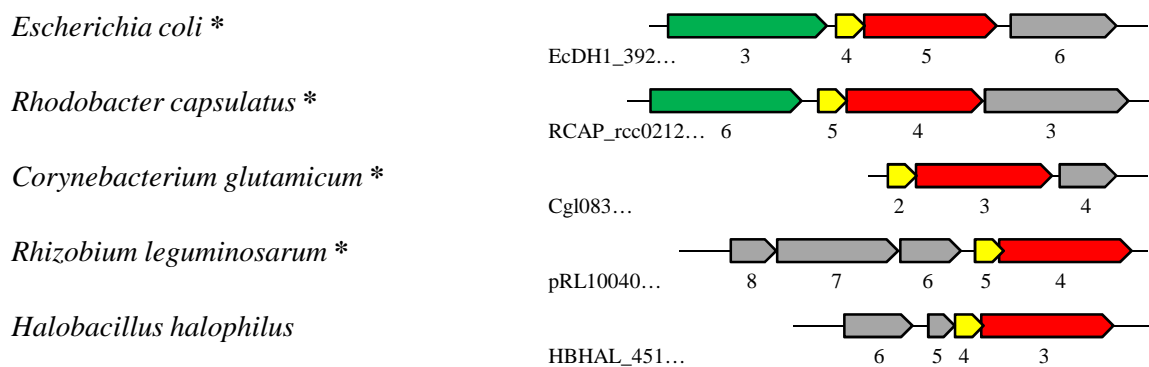
Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Transport von Acetat in die Zellen von *H. volcanii* untersucht. Es wurde ein Operon identifiziert, das u. a. Gene für einen Acetat-Transporter der *sodium-solute-symporter* (SSF)-Proteinfamilie (IPR001734, TC 2.A.21) und eine putative ACS7 enthält. Die Acetat-spezifische Induktion des Operons weist auf eine Beteiligung der Proteine am Transport und an der Aktivierung von Acetat hin. In Zellsuspensions-Experimenten mit  $^{14}\text{C}$ -markiertem Acetat wurde gezeigt, dass Acetat mit einer apparenten maximalen Aufnahmerate von  $1,9 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$  und einem apparenten  $K_m$ -Wert von  $24,6 \mu\text{M}$  in *H. volcanii*-Zellen aufgenommen wird. Eine  $\Delta\text{ssf}$ -Mutante zeigte nur eine geringe Aufnahmerate ( $0,18 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ). Durch eine *in trans* Komplementation mit dem Wildtypgen wurde die maximale Aufnahmerate wiederhergestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass der in dem Operon kodierte Acetat-Transporter für die Aufnahme von Acetat in *H. volcanii* essentiell ist.

Bioinformatische Analysen im Rahmen der vorliegenden Arbeit haben ergeben, dass eine homologe Operonstruktur auch in den Genomen weiterer Haloarchaea, wie z. B. *Haloarcula marismortui* und *Halorubrum lacusprofundi*, vorliegt (Abbildung 40). Die putativen SSF-Transporter dieser Organismen weisen eine hohe Sequenzidentität von ca. 61-70 % auf, was darauf hindeutet, dass auch in diesen Haloarchaea ein Transport von Acetat durch ein SSF-Protein katalysiert wird. Die Analysen zeigen auch, dass eine vergleichbare Operonstruktur nicht in den Genomen anderer Archaea zu finden ist. Homologe Sequenzen zu dem einzelnen *ssf*-Gen aus *H. volcanii* wurden auch in einigen anderen Archaea, wie z. B. *Sulfolobus solfataricus*, *Methanosarcina mazei* oder *Methanosarcina acetivorans* identifiziert.

## Archaea



## Bacteria



**Abbildung 40** Übersicht über die Genomumgebung der Gene für putative und charakterisierte Transporter der SSF-Familie in Organismen der Archaea und Bacteria. Organismen, in denen ein Transport von Acetat durch den jeweiligen Acetat-Transporter der SSF-Familie nachgewiesen wurde, sind unterstrichen. Jedes Gen ist als farbiger Pfeil dargestellt: ACS7 (*acs7*, HVO\_A0156) in grün, ein hypothetisches Transmembranprotein (*hyp.*, HVO\_A0155) in gelb, der Acetat-Transporter (*ssf*, HVO\_A0154) in rot und ein putatives, regulatorisches *universal-stress*-Protein 28 (*uspA28*, HVO\_A0153) in hellblau.

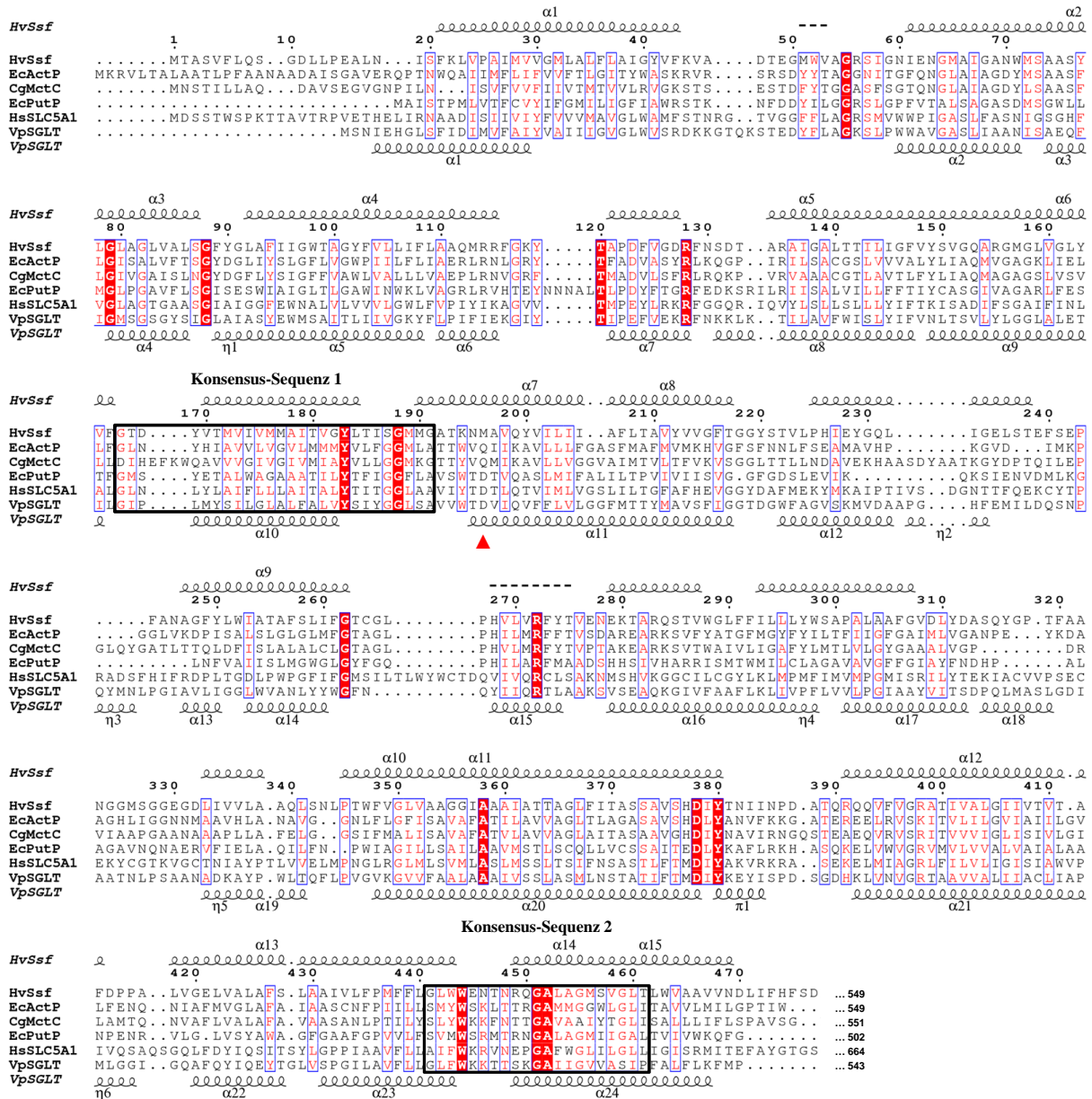
In der Domäne der Bacteria wurden SSF-Proteine, die einen Transport von Acetat katalysieren, anhand von Transportexperimenten bereits in *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum*, *Rhizobium leguminosarum* und *Rhodobacter capsulatus* identifiziert und charakterisiert (Hosie et al. 2002; Gimenez et al. 2003; Jolkver et al. 2009; Borghese und Zannoni 2010). Die jeweilige Genomumgebung des kodierenden Gens ist in diesen Organismen unterschiedlich. Die für die SSF-Transporter aus *E. coli* und *Rh. capsulatus* kodierenden Gene liegen in einer vergleichbaren Operonstruktur wie in *H. volcanii* vor (Abbildung 40). In *E. coli* wird die Transkription dieses Operons ebenfalls Acetat-spezifisch induziert (Gimenez et al. 2003). In einer weiteren Studie wurde außerdem ein Succinat-Transporter aus *E. coli* charakterisiert, der neben Succinat auch einen Transport von Acetat katalysierte (Sa-Pessoa et al. 2013). Dieser Transporter wurde der Proteinfamilie der AcTr-Transporter zugeordnet. Es zeigte sich, dass erst die Deletion beider Transporter das

Wachstum auf Acetat vollständig inhibierte. Ein Transporter der AcTr-Familie konnte anhand von Proteinsequenz-Vergleichen in *H. volcanii* nicht identifiziert werden.

In der Domäne der Archaea gibt es bisher keinen weiteren direkten Nachweis eines Acetat-Transports. Es gibt Hinweise auf einen Transport von Acetat durch ein Protein aus der Familie der *acetate uptake transporter* (AcTr, TC 2.A.96) in der Gruppe der acetoklastischen Methanoarchaea. Eine Acetat-spezifische Induktion dieses putativen Acetat-Transporters wurde in *Methanosarcina acetivorans* gezeigt (Rohlin und Gunsalus 2010). Dieser Transporter wurde in *Methanosarcina mazei* deletiert und eine um 50-75 % verringerte Methanbildung dieser Mutante beobachtet (Welte et al. 2014). Es wurde diskutiert, dass diese reduzierte Methanbildung indirekt auf eine verringerte Aufnahme von Acetat zurückzuführen sei. Der direkte Nachweis eines Acetat-Transports in die Zellen wurde nicht erbracht.

Die SSF-Proteinfamilie, zu der auch der in der vorliegenden Arbeit charakterisierte Transporter aus *H. volcanii* gehört, umfasst neben Acetat-Transportern auch die Sub-Familien der Natrium/Pantothenat Symporter, Natrium/Prolin Symporter und Natrium/Glucose Symporter (Reizer et al. 1994; Jung 2002). Proteine dieser Sub-Familien sind in allen drei Domänen identifiziert worden und transportieren unterschiedliche Substrate wie z. B. Zucker, Aminosäuren, Vitamine, Iodid und Ionen (Reizer et al. 1994; Hosie et al. 2002; Jung 2002; Gimenez et al. 2003; Jolkver et al. 2009). Bisher analysierte SSF-Proteine weisen 11-15 hydrophobe Transmembrandomänen auf, wobei für charakterisierte Acetat-Transporter dieser Familie 13 Transmembrandomänen beschrieben wurden (Hosie et al. 2002; Gimenez et al. 2003; Jolkver et al. 2009; Borghese und Zannoni 2010). Auch für den Acetat-Transporter aus *H. volcanii* wurden 13 Transmembrandomänen vorhergesagt (siehe 5.2.1; Abbildung 24). Für ein Protein der SSF-Familie, den Natrium/Galactose Symporter aus *Vibrio parahaemolyticus*, wurde bereits die Kristallstruktur aufgeklärt (Faham et al. 2008). Ein Vergleich der Aminosäuresequenz des *H. volcanii* Acetat-Transporters mit beschriebenen Transportern der SSF-Familie in einem multiplen Aminosäuresequenz-Alignment zeigt eine hohe Übereinstimmung der Sequenzen (Abbildung 41). In der Aminosäuresequenz des *H. volcanii* Acetat-Transporters wurden die Konsensus-Sequenzen 1 und 2 der SSF-Familie mit wenigen Abweichungen identifiziert. Die Sekundärstruktur des Acetat-Transporters aus *H. volcanii* wurde mit PSIPRED berechnet und stimmt mit der bekannten Sekundärstruktur des bereits kristallisierten Symporters aus *V. parahaemolyticus* nahezu überein (Abbildung 41) (Jones 1999; Faham et al. 2008).

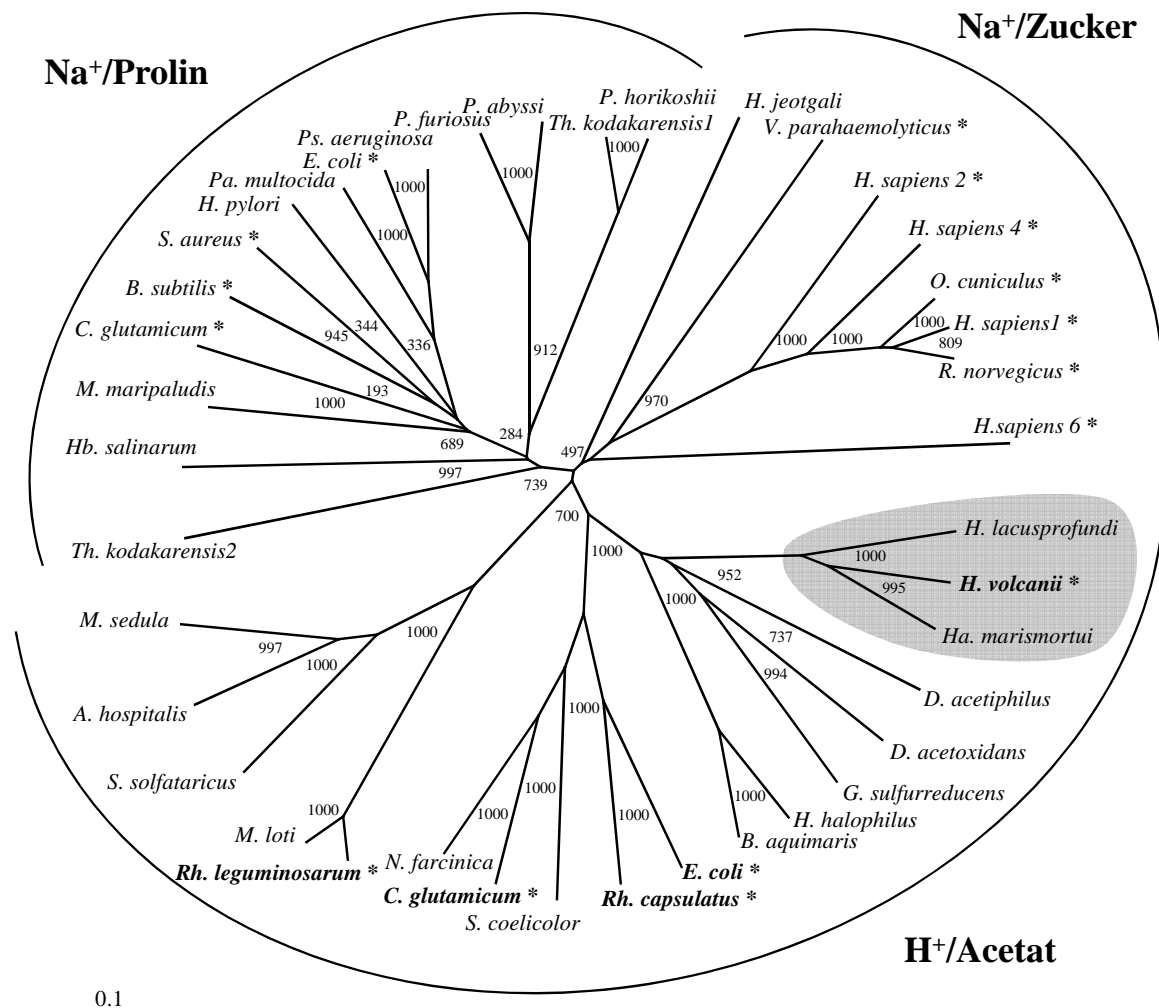
Der für die SSF-Familie namensgebende Symport von Substrat und Natriumionen wurde insbesondere für den humanen Natrium-Glucose-Symporter SLC5A1 der SSF-Familie nachgewiesen (Quick et al. 2001). Es konnte gezeigt werden, dass der Natrium-Gradient über die Membran, der z. B. in humanen Zellen durch die Funktion der Natrium-Kalium-ATPase erzeugt wird, die treibende Kraft für den Symport ist (Quick et al. 2001; Jung 2002). Mutagenese-Experimente mit dem SLC5A1-Transporter zeigten, dass durch den Austausch der Aminosäure Asp<sup>204</sup> gegen eine ungeladene Aminosäure Glucose nicht mit Natriumionen sondern mit Protonen in die Zellen transportiert wird (Quick et al. 2001). Ein Symport von Substrat und Natriumionen konnte jedoch für Acetat-Transporter der SSF-Familie, die bisher ausschließlich in Prokaryoten identifiziert wurden, nicht nachgewiesen werden. Stattdessen wurde für einen Acetat-Transporter dieser Familie, den MctC-Symporter aus *C. glutamicum*, ein Symport von Acetat und Protonen gezeigt (Jolkver et al. 2009). Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen des *H. volcanii* Acetat-Transporters und bereits charakterisierter Acetat-Transporter mit dem humanen Natrium/Glucose-Symporter zeigt, dass in den Sequenzen aller Acetat-Transporter der SSF-Familie, anstelle des Asp<sup>204</sup> eine ungeladene Aminosäure an der entsprechenden Position vorzufinden ist (Abbildung 41). Dies deutet auf einen Symport von Acetat und Protonen in *H. volcanii* und einen einheitlichen Mechanismus des Acetat-Transports innerhalb der SSF-Familie hin, welcher statt an einen Natrium-Gradienten an den Protonen-Gradienten prokaryotischer Cytoplasmamembranen angepasst ist.



**Abbildung 41 Multiples Aminosäure Sequenz-Alignment von Acetat-, Zucker- und Prolin-Transportern der SSF-Proteinfamilie.** Das Alignment wurde mit ClustalX erstellt und mit Hilfe von ESPRIPT dargestellt (Larkin et al. 2007; Robert und Gouet 2014). Der C-terminale Sequenzbereich ist nicht dargestellt und die jeweilige Sequenzlänge daher am Ende der Sequenzen angegeben. Die Konsensus-Sequenz 1 ([GS]-x(2)-[LIY]-x(3)-[LIVMFYWSTAG](7)-x(3)-[LIY]-[STAV]-x(2)-G-G-[LMF]-x-[SAP]) und die Konsensus-Sequenz 2 ([GAST]-[LIVM]-x(3)-[KR]-x(4)-G-A-x(2)-[GAS]-[LIVMGS]-[LIVMW]-[LIVMGAT]-G-x-[LIVMGA]) sind durch schwarze Boxen markiert. Das bei dem humanen Glucose-Transporter (HsSLC5A1; P13866) für den Symport mit Natriumionen essentielle Asp<sup>204</sup> ist durch ein ▲-Symbol gekennzeichnet (Quick et al. 2001). Die Sekundärstruktur des *H. volcanii* Acetat-Transporters (HvSsf; D4GQI3) wurde mit PSIPRED berechnet und ist schematisch über den Sequenzen dargestellt (Jones 1999). Die Sekundärstruktur des *Vibrio parahaemolyticus* Natrium-Galactose-Symporters (VpSGLT; 3DH4) ist schematisch unter den Sequenzen gezeigt (Faham et al. 2008). Neben der Sequenz des Natrium-Prolin-Symporters aus *Escherichia coli* (PutP; P07117) wurden folgende Sequenzen bereits charakterisierter Acetat-Transporter verwendet (Accession-Nummern in Klammern; PDB, UniProtKB bzw. NCBI Reference): *E. coli* ActP (WP\_000832573.1); *Corynebacterium glutamicum* MctC (CCH24019.1).



Phylogenetische Analysen zeigen, dass Transporter der SSF-Familie drei distinkte funktionelle Cluster bilden (Abbildung 42) (Jung 2002; Jolkver et al. 2009). Das Cluster der Natrium/Zucker-Symporter umfasst neben dem kristallographisch analysierten Natrium/Galactose-Symporter aus *V. parahaemolyticus* sowohl die charakterisierten humanen Natrium/Glucose- und Natrium/Multivitamin-Symporter als auch einen putativen Transporter aus dem Euryarchaeon *Halalkalicoccus jeotgali* (Quick et al. 2001; Faham et al. 2008). Im Cluster der Natrium/Prolin-Symporter sind sowohl charakterisierte Proteine aus Bacteria, wie z. B. *Bacillus subtilis* und *C. glutamicum*, als auch putative archaeelle Transporter zusammengefasst (Peter et al. 1997; von Blohn et al. 1997). Bisher charakterisierte Acetat-Transporter bilden eine Gruppe, die sich von Zucker- und Prolin-Transportern abgrenzt. Innerhalb des Clusters der Acetat-Transporter bildet der charakterisierte Transporter aus *Rh. leguminosarum* eine Gruppe mit putativen SSF-Sequenzen weiterer  $\alpha$ -Proteobacteria und thermoacidophiler Crenarchaea wie z. B. *Sulfolobus solfataricus* (Hosie et al. 2002). Im Gegensatz dazu weisen die charakterisierten Transporter aus *E. coli* und *C. glutamicum* eine hohe Sequenzidentität auf (Gimenez et al. 2003; Jolkver et al. 2009). Der *H. volcanii* SSF-Transporter bildet zusammen mit putativen Transportern aus Haloarchaea ein Sub-Cluster innerhalb der Acetat-Transporter, welches in phylogenetischer Nähe zu putativen Acetat-Transportern aus gram-positiven Bacteria und aus  $\delta$ -Proteobacteria liegt. Eine hohe Sequenzidentität von 37 % weist der Acetat-Transporter aus *H. volcanii* zu putativen SSF-Proteinen aus gram-positiven Bacteria, wie z. B. *Halobacillus halophilus* auf. Weiter besteht eine hohe Identität von 43 % zu einem putativen SSF-Protein aus dem  $\delta$ -Proteobacterium *Desulfuromonas acetoxidans*, für welches eine Oxidation von Acetat unter anaeroben Bedingungen beschrieben ist (Pfennig und Biebl 1976). Die Sequenz-Identität der SSF-Transporter aus Haloarchaea und Bacteria lässt einen lateralen Gentransfer aus der Domäne der Bacteria vermuten.



**Abbildung 42 Phylogenetische Einordnung von Transportern der SSF-Familie aus Archaea, Bacteria und Eukarya.** Die drei distinkten Cluster der Natrium/Prolin (Na<sup>+</sup>/Prolin)-, Natrium/Zucker (Na<sup>+</sup>/Zucker)- und der Protonen/Acetat- (H<sup>+</sup>/Acetat)-Symporter sind hervorgehoben. Der Stammbaum wurde mit dem Neighbor-Joining Algorithmus aus ClustalX erstellt, wobei das Bootstrapping-Verfahren 1000 Wiederholungen umfasste (Larkin et al. 2007). Die Bootstrap-Werte befinden sich an den Knotenpunkten. Der Baum basiert auf einem multiplen Aminosäure-Sequenzalignment, das mit ClustalX unter Verwendung der Gonnet Matrix erstellt wurde. Charakterisierte Transporter sind mit einem \* gekennzeichnet und charakterisierte Acetat-Transporter zusätzlich dickgedruckt. Modifiziert nach (Jung 2002). Der Balken stellt 0,1 Substitutionen pro Aminosäure dar. Folgende Sequenzen, mit Accession-Nummern in Klammern (PDB, UniProt bzw. NCBI Reference), wurden verwendet: H<sup>+</sup>/Acetat-Symporter: *Halorubrum lacusprofundi* (B9LNG2), *Haloferax volcanii* (D4GQI3), *Haloarcula marismortui* (WP\_049939090.1), *Denitrovibrio acetiphilus* (D4H7M3), *Desulfuromonas acetoxidans* (WP\_050770049.1), *Geobacter sulfurreducens* (Q74FT7), *Halobacillus halophilus* (D9ZZC8), *Bacillus aquimaris* (WP\_044339976.1), *Escherichia coli* (ALQ61142), *Rhodobacter capsulatus* (A0A0Q0UUG2), *Streptomyces coelicolor* (O70003), *Corynebacterium glutamicum* (CCH24019.1), *Nocardia farcinica* (Q5YYV2), *Rhizobium leguminosarum* (Q1M7A2), *Mesorhizobium loti* (A0A101KLS1), *Sulfolobus solfataricus* (Q97VX6), *Acidianus hospitalis* (4B8W9), *Metallosphaera sedula* (A0A0K1SS06); Na<sup>+</sup>/Prolin-Symporter: *Thermococcus kodakaraensis 2* (YP\_183981), *Halobacterium salinarum* (B0R4E9), *Methanococcus maripaludis* (Q6M0P8), *Corynebacterium glutamicum* (H7C679), *Bacillus subtilis* (O06493), *Staphylococcus aureus* (Q2FWY7), *Helicobacter pylori* (O24896), *Pasteurella multocida* (Q9CN55), *Escherichia coli* (P07117), *Pseudomonas aeruginosa* (Q9I5F5), *Pyrococcus furiosus* (Q8U3M8), *Pyrococcus abyssi* (Q9V2P3), *Thermococcus kodakaraensis 1* (YP\_182528), *Pyrococcus horikoshii* (O59086); Na<sup>+</sup>/Zucker-Symporter: *Halalkalicoccus jeotgali* (D8J8N1), *Vibrio parahaemolyticus* (3DH4), *Homo sapiens SLC5A2* (P31639), *Homo sapiens SLC5A4* (Q9NY91), *Oryctolagus cuniculus* (P11170), *Homo sapiens SLC5A1* (P13866), *Rattus norvegicus SLC5A1* (P53790), *Homo sapiens SLC5A6* (Q9Y289); Na<sup>+</sup>/Multivitamin-Symporter).

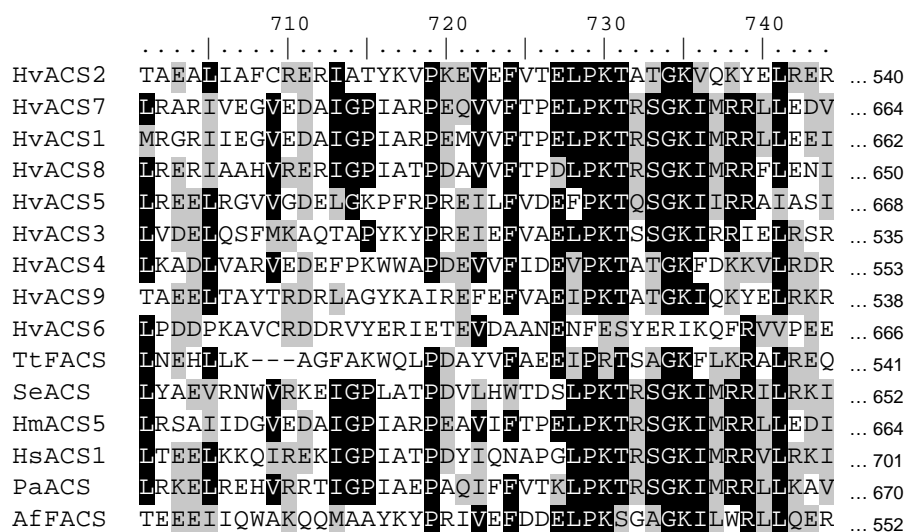
## 6.2.2 AMP-bildende Acetyl-Coenzym A Synthetasen

Im Genom von *H. volcanii* sind neun Gene annotiert, die für putative AMP-bildende Acetyl-CoA Synthetasen (ACS) kodieren. Um die ACS-Enzyme zu identifizieren, die an der Aktivierung von Acetat zu Acetyl-CoA funktional beteiligt sind, wurde zunächst die ACS aus Acetat-gewachsenen Zellen gereinigt und charakterisiert sowie das kodierende Gen (*acs2*) identifiziert. Die gereinigte ACS2 wies eine homodimere Struktur auf und katalysierte neben der Aktivierung von Acetat auch die Aktivierung von Butyrat und Valerat mit sehr hoher katalytischer Effizienz. Die ACS2 zeigte nur eine geringe Aktivität mit Propionat (20 %). Aktivitätsmessungen mit langkettigen Fettsäuren waren aufgrund der hohen Salzkonzentration im Testsystem nicht möglich. In Richtung der Acetat-Bildung war das Enzym nicht aktiv. Da eine  $\Delta acs2$ -Mutante unverändert auf Acetat wuchs, wurden drei weitere paraloge ACS-Enzyme homolog überexprimiert und charakterisiert. Die ACS8 war nicht aktiv. Die ACS1 und die ACS7 setzten Acetat im Vergleich zu weiteren getesteten Carbonsäuren mit der höchsten Aktivität um. Umfassende Wachstumsexperimente mit Doppel- und Dreifach-Mutanten haben ergeben, dass nur die  $\Delta acs2 \Delta acs7$ -Mutante ein eingeschränktes Wachstum auf Acetat zeigte, was dafür spricht, dass die ACS2 und die ACS7 an der Aktivierung von Acetat beteiligt sind, aber vermutlich durch weitere paraloge ACS funktionell ersetzt werden können.

Bei einem Vergleich der kinetischen Parameter der nativ gereinigten ACS2 mit der bereits charakterisierten ACS aus dem Haloarchaeon *Haloarcula marismortui* fällt auf, dass die ACS2 aus *H. volcanii* ein relativ breites Substratspektrum aufweist, während die *Ha. marismortui* ACS hochspezifisch für Acetat ist und nur geringe Aktivität mit Propionat zeigt (Bräsen und Schönheit 2005). Das relativ breite Substratspektrum der ACS2 ähnelt eher der ACS aus *Pyrobaculum aerophilum*, die neben Acetat auch Propionat, Formiat und Butyrat umsetzt (Bräsen et al. 2005). Eine mit der ACS1 und der ACS7 vergleichbar hohe Spezifität für Acetat ist auch für die ACS-Enzyme aus den Methanogenen *Methanosaeta thermophila* und *Methanothermobacter thermautotrophicus* bekannt (Ingram-Smith und Smith 2007; Berger et al. 2012).

Diese charakterisierten ACS-Enzyme gehören alle zu der Superfamilie der Acyladenylat/Thioester-bildenden Enzyme (Babbitt et al. 1992). In diese Proteinfamilie werden u. a. auch Fettsäure-CoA Synthetasen, die eine Aktivierung von mittelkettigen (MACS) oder langkettigen Fettsäuren (FACS) katalysieren, eingeordnet sowie Acyl- und Aryl-CoA Synthetasen und Luciferasen. In der ersten von zwei Teilreaktionen wird durch all

diese Enzyme ein Acyladenylat-Intermediat gebildet, wobei Pyrophosphat freigesetzt wird (Gulick et al. 2003). Anschließend wird in der zweiten, Coenzym A-abhängigen Teilreaktion Acyladenylat zu Acetyl-CoA umgesetzt und AMP freigesetzt. Für die Bildung des Acyladenylat-Intermediats in der ersten Teilreaktion ist ein konserviertes Lysin in der C-terminalen Domäne essentiell (Gulick et al. 2003). Außerdem ist dieses Lysin für eine posttranslationale Regulation in Form einer Acetylierung entscheidend. So wurde für die ACS-Enzyme aus *Salmonella enterica* und *Saccharomyces cerevisiae* gezeigt, dass eine Acetylierung des Lysins zu einer Inaktivierung des Enzyms führt (Starai et al. 2002; Starai et al. 2003). Ein Aminosäure-Sequenzalignment der paralogen ACS-Enzyme aus *H. volcanii* mit ACS-Enzymen aus Archaea, Bacteria und Eukarya zeigt, dass dieses Lysin auch in den ACS-Enzymen aus Archaea, Bacteria und Eukarya zeigt, dass dieses Lysin auch in den ACS-Enzymen aus *H. volcanii* hoch konserviert ist (Abbildung 43). Einzig in der Sequenz der *H. volcanii* ACS6 ist an der entsprechenden Position ein Leucin anstelle des Lysins vorhanden, was darauf hindeutet, dass dieses Protein katalytisch nicht aktiv ist.

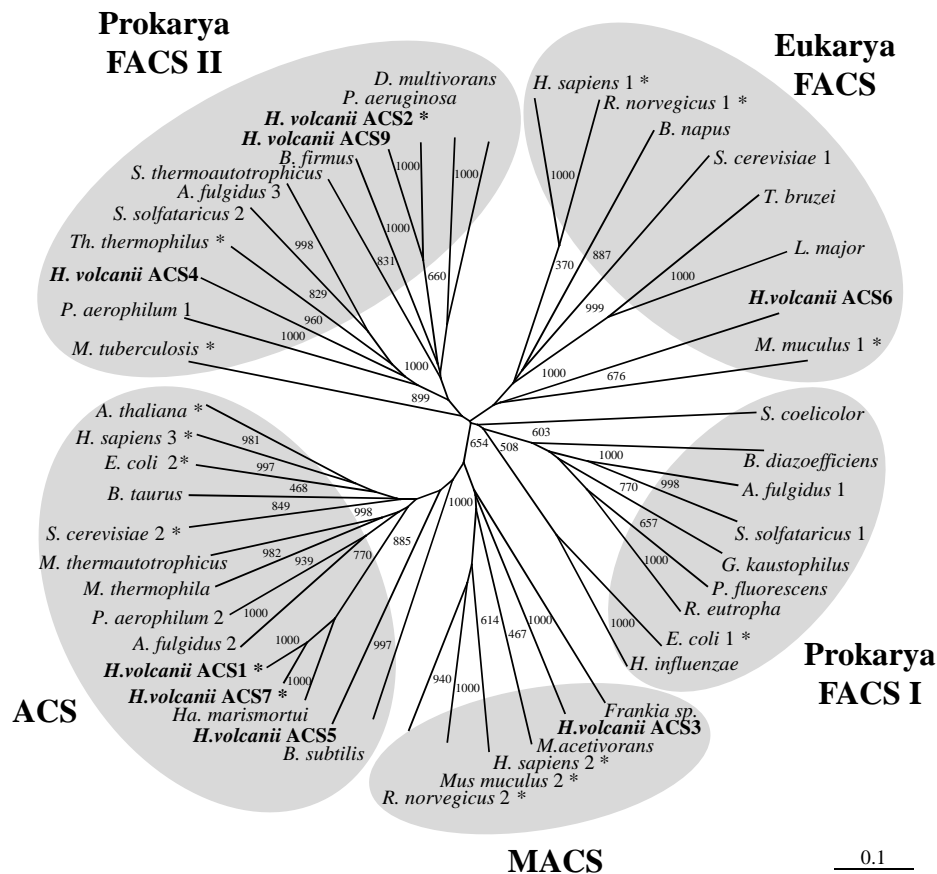


**Abbildung 43** Multiples Aminosäure Sequenz-Alignment charakterisierter Acetat-aktivierender (ACS) und Fettsäure-aktivierender (FACS) AMP-bildender Acetyl-Coenzym A Synthetasen aus der den Domänen der Archaea, Bacteria und Eukarya. Das für die Bildung des Acyladenylat-Intermediats essentielle Lysin ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Das Alignment wurde mit ClustalX unter Verwendung der Gonnet Matrix erstellt (Larkin et al. 2007). Folgende Sequenzen, mit Accession-Nummern in Klammern (PDB bzw. UniProt), wurden verwendet: *Haloferax volcanii* ACS2 (D4GUW5), ACS7 (D4GQI5), ACS1 (D4GUW1), ACS8 (D4GQI7), ACS5 (D4GZ14), ACS3 (D4GX28), ACS4 (D4GXS7), ACS9 (D4GRL3), ACS6 (D4GTE6), *Thermus thermophilus* FACS (1ULT), *Salmonella enterica* ACS (1PG4), *Haloarcula marismortui* ACS5 (Q5UXS3), *Homo sapiens* ACS1 (P33121), *Pyrobaculum aerophilum* ACS (O93730), *Archaeoglobus fulgidus* FACS (O28762).

Ein Sequenzvergleich von ACS-Enzymen mit MACS- und FACS-Enzymen aus allen drei Domänen des Lebens zeigt, dass die Sequenzen der funktionell unterschiedlichen Enzyme untereinander eine geringe Identität aufweisen (20 %), innerhalb eines funktionellen Clusters aber konserviert sind (nicht abgebildet). Es sei allerdings angemerkt, dass es in der Gruppe der FACS-Enzyme signifikante Unterschiede gibt. So weisen prokaryotische FACS-Enzyme eine um ca. 150 Aminosäuren kürzere Sequenz auf als eukaryotische FACS-Enzyme. Alle diese Enzyme enthalten die konservierten Sequenzmotive 1 und 2 der Acyladenylat/Thioester-bildenden Superfamilie (nicht abgebildet) (Toh 1991; Chang et al. 1997; Lee et al. 2001; Hulo et al. 2006). Diese Sequenzen stellen Bindestellen für ATP bzw. AMP dar (Weimar et al. 2002).

ACS-Enzyme aus Archaea und Bacteria sind, wie auch die ACS2, ACS1 und ACS7 aus *H. volcanii*, meist monomere oder homodimere Proteine (Jetten et al. 1989; Bräsen und Schönheit 2005). Eine Ausnahme bildet das homooktamere Enzym aus dem hyperthermophilen Archaeon *P. aerophilum* (Bräsen et al. 2005). Bei einem Vergleich der paralogen ACS-Enzyme von *H. volcanii* untereinander fällt auf, dass die ACS7 und die ACS1 eine Größe einer Untereinheit von ca. 75 kDa und eine hohe Sequenz-Identität von 87 % aufweisen. Daher entsprechen die ACS1 und ACS7 sowohl in Bezug auf die Größe einer Untereinheit als auch in Bezug auf die Sequenz-Identität den ACS-Enzymen aus Archaea, Bacteria und Eukarya. Dagegen ist die Aminosäuresequenz der ACS2 nur zu 15 % mit jener der ACS7 identisch. Eine höhere Sequenzidentität weist die ACS2 zu den FACS-Enzyme aus den Bacteria *Thermus thermophilus* und *Mycobacterium tuberculosis* auf (33 bzw. 34 %), die bereits charakterisiert und die Kristallstrukturen der Proteine aufgeklärt wurden (Hisanaga et al. 2004; Andersson et al. 2012). Diese setzen langkettige Fettsäuren mit mindestens 14 Kohlenstoffatomen zu den korrespondierenden CoA-Estern um. Eine Aktivierung von kleinen Fettsäuren, insbesondere Acetat, wurde nicht getestet.

Der phylogenetische Vergleich von Proteinen der Acyladenylat/Thioester-bildenden Superfamilie in einem Stammbaum zeigt die distinkten Cluster und Sub-Cluster der ACS-, MACS- und der eukaryotischen bzw. prokaryotischen FACS-Enzyme (Abbildung 44) (Oba et al. 2005). ACS-Enzyme aus Archaea, Bacteria und Eukarya bilden ein funktionelles Cluster. In diese Gruppe gehören auch die ACS1 und die ACS7 aus *H. volcanii*, die im Rahmen dieser Arbeit als Acetat-spezifische Enzyme charakterisiert wurden sowie die bisher nicht untersuchte ACS5. Dies lässt vermuten, dass diese ACS5 spezifisch Acetat zu Acetyl-CoA aktiviert. Das Cluster der MACS bilden Enzyme aus Organismen aller drei Domänen des Lebens, wie z. B. den bereits charakterisierten MACS-Enzymen aus dem Menschen oder aus *Methanosarcina acetivorans* (Fujino et al. 2001; Meng et al. 2010). Diesem MACS-Cluster ist auch die putative ACS3 aus *H. volcanii* zugeordnet, was darauf hindeutet, dass die ACS3 nicht an der Aktivierung von Acetat beteiligt ist. Die funktionelle Gruppe der FACS gliedert sich in die drei Sub-Cluster der eukaryotischen FACS sowie der prokaryotischen FACS I und der FACS II. Innerhalb des Clusters der eukaryotischen FACS liegt auch die putative ACS6 aus *H. volcanii*, was gegen eine Beteiligung dieses Enzyms an der Aktivierung von Acetat spricht. Zudem fehlt der ACS6 das katalytisch essentielle Lysin (s. o.). Zu dem Sub-Cluster der prokaryotischen FACS I gehört auch die bereits charakterisierte FACS aus *E. coli* (Black et al. 1992). Die in dieser Arbeit nativ gereinigte ACS2 bildet zusammen mit den bereits kristallisierten FACS-Enzymen aus *Thermus thermophilus* und aus *Mycobacterium tuberculosis* das Cluster der prokaryotischen FACS II innerhalb der Acyladenylat/Thioester-bildenden Superfamilie. In dieses Cluster und in direkter Nähe zu der ACS2 fällt auch die putative ACS9 aus *H. volcanii*. Zukünftige Untersuchungen müssen zeigen, ob die ACS9 sowie die bisher ebenfalls nicht untersuchte ACS5 aus dem Cluster der Acetat-spezifischen ACS-Enzyme eine Aktivierung von Acetat katalysieren und ob sie die ACS2 und die ACS7 funktionell ersetzen können.



**Abbildung 44** Phylogenetische Einordnung von archaeellen, bakteriellen und eukaryotischen AMP-bildenden Acetyl-Coenzym A Synthetasen der Acyladenylat/Thioester-bildenden Superfamilie. Innerhalb der AMP-bildenden Acetyl-Coenzym A Synthetasen wird zwischen den funktionalen Gruppen der Acetat-aktivierenden (ACS), kurzketttige Fettsäure-aktivierenden (MACS), prokaryotischen Fettsäure-aktivierenden (prok. FACS I und prok. FACS II) und eukaryotischen Fettsäure-aktivierenden (euk. FACS) Enzyme unterschieden. Der Stammbaum wurde mit dem Neighbor-Joining Algorithmus aus ClustalX erstellt, wobei das Bootstrapping-Verfahren 1000 Wiederholungen umfasste (Larkin et al. 2007). Die Bootstrap-Werte befinden sich an den Knotenpunkten. Der Baum basiert auf einem multiplen Aminosäure-Sequenzalignment, das mit ClustalX unter Verwendung der Gonnet Matrix erstellt wurde. Charakterisierte Enzyme sind mit einem \* gekennzeichnet. Der Balken stellt 0,1 Substitutionen pro Aminosäure dar. Folgende Sequenzen, mit Accession-Nummern in Klammern (PDB, UniProt bzw. NCBI Reference), wurden verwendet: Prokaryota FACS II: *Mycobacterium tuberculosis* (3R44), *Pyrobaculum aerophilum* 1 (Q8ZVD8), *Haloferax volcanii* ACS4 (D4GXS7), *Thermus thermophilus* (1ULT), *Sulfolobus solfataricus* 2 (Q97VU7), *Archaeoglobus fulgidus* 3 (O29977), *Streptomyces thermoautotrophicus* (A0A132MT87), *Bacillus firmus* (W7LBI7), *Haloferax volcanii* ACS9 (D4GRL3), *Haloferax volcanii* ACS2 (D4GUW5), *Pseudomonas aeruginosa* (WP\_034035131.1), *Desulfococcus multivorans* (S7TP35). Eukaryota FACS: *Homo sapiens* 1 (P33121), *Rattus norvegicus* 1 (O88813), *Brassica napus* (Q9FNT6), *Saccharomyces cerevisiae* 1 (P47912), *Trypanosoma brucei* (Q38FC0), *Leishmania major* (E9AC38), *Haloferax volcanii* ACS6 (D4GTE6), *Mus musculus* 1 (Q99PU5). Prokaryota FACS I: *Streptomyces coelicolor* (Q9Z5A6), *Bradyrhizobium diazoefficiens* (Q89Q01), *Archaeoglobus fulgidus* 1 (O28762), *Sulfolobus solfataricus* 1 (Q7VT6), *Geobacillus kaustophilus* (Q5KZU6), *Pseudomonas fluorescens* (Q4KGN4), *Ralstonia eutropha* (Q8Y1B0), *Escherichia coli* 1 (P69451), *Haemophilus influenzae* (P46450). MACS: *Frankia* sp. (Q2J5R6), *Haloferax volcanii* ACS3 (D4GX28), *Methanosarcina acetivorans* (WP\_011022861.1), *Homo sapiens* 2 (Q08AH1), *Mus musculus* 2 (Q3UNX5), *Rattus norvegicus* 2 (Q7TN78). ACS: *Bacillus subtilis* (G4ESD6), *Haloferax volcanii* ACS5 (D4GZ14), *Haloarcula marismortui* (Q5UXS3), *Haloferax volcanii* ACS7 (D4GQI5), *Haloferax volcanii* ACS1 (D4GUW1), *Archaeoglobus fulgidus* 2 (O29881), *Pyrobaculum aerophilum* 2 (O93730), *Methanosaeta thermophila* (A0B8F1), *Methanothermobacter thermoautotrophicus* (Q2XNL6), *Saccharomyces cerevisiae* 2 (P52910), *Bos taurus* (Q9BEA3), *Escherichia coli* 2 (P27550), *Homo sapiens* 3 (Q9NR19), *Arabidopsis thaliana* (B9DGD6).

### 6.2.3 Isocitrat-Lyase

Im Genom von *H. volcanii* ist ein Gen für eine Isocitrat-Lyase (ICL), das Schlüsselenzym des Glyoxylatzyklus, annotiert. In Wachstumsexperimenten mit einer  $\Delta icl$ -Mutante wurde nachgewiesen, dass diese nicht in der Lage war auf Acetat zu wachsen. Durch eine *in trans* Komplementation mit dem *icl*-Gen wurde das Wachstum wiederhergestellt. Dies zeigt, dass der Glyoxylatzyklus für das Wachstum von *H. volcanii* auf Acetat essentiell ist.

In den meisten aeroben Bacteria erfüllt der Glyoxylatzyklus eine anaplerotische Funktion bei einem Wachstum auf Acetat (Sauer und Eikmanns 2005; Ensign 2006). In diesem Zyklus katalysiert die ICL die Spaltung von Isocitrat in Glyoxylat und Succinat. Anschließend erfolgt die Kondensation von Glyoxylat und Acetyl-CoA zu Malat, welche durch das zweite Enzym des Glyoxylatzyklus, die Malat-Synthase, katalysiert wird. Die ICL und die Malat-Synthase wurden bereits aus *Sulfolobus acidocaldarius* und auch aus *H. volcanii* gereinigt und charakterisiert (Serrano et al. 1998; Uhrigshardt et al. 2002). Für *H. volcanii* wurde außerdem gezeigt, dass die Transkription der ICL in einem Operon zusammen mit der Malat-Synthase Acetat-spezifisch induziert wird (Serrano und Bonete 2001). Im Rahmen dieser Arbeit wurde nun erstmals anhand der Wachstumsexperimente mit der  $\Delta icl$ -Mutante gezeigt, dass der Glyoxylatzyklus in *H. volcanii* als anaplerotische Reaktionssequenz für ein Wachstum auf Acetat essentiell ist. Die vollständige Inhibition des Wachstums der  $\Delta icl$ -Mutante zeigt, dass der Glyoxylatzyklus funktionell nicht ersetzt werden kann.

Nicht in allen Archaeen wird die anaplerotische Funktion bei Wachstum auf Acetat durch den Glyoxylatzyklus erfüllt. Kürzlich wurde in *Haloarcula marismortui*, in dessen Genom kein Gen für eine ICL annotiert ist, der Methylasspartatzyklus als anaplerotische Reaktionssequenz beschrieben (Borjian et al. 2016). Die Enzyme des Methylasspartatzyklus setzen in mehreren aufeinanderfolgenden Reaktionen, ohne die Beteiligung der ICL,  $\alpha$ -Ketoglutarat über das charakteristische Methylasspartat zu Succinyl-CoA und Glyoxylat um. Das gebildete Glyoxylat wird durch die Malat-Synthase mit einem weiteren Molekül Acetyl-CoA zu Malat umgesetzt.



## 6.2.4 Enzyme der Gluconeogenese

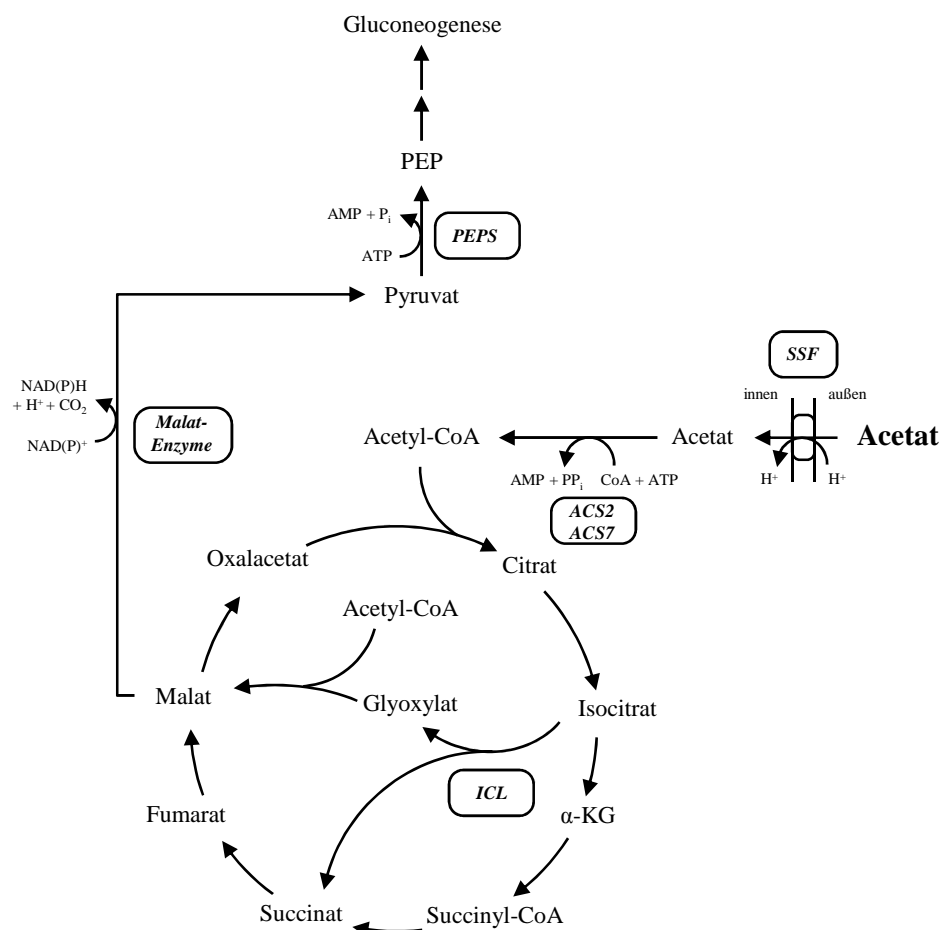
Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Enzyme der PEP-Synthese aus Malat im Zuge der Gluconeogenese in *H. volcanii* untersucht. In Wachstumsexperimenten mit Deletionsmutanten auf Acetat konnte erstmals in der Domäne der Archaea gezeigt werden, dass zwei Malat-Enzyme und eine Phosphoenolpyruvat-Synthetase (PEPS) essentiell für die Gluconeogenese sind. Die Malat-Enzyme wurden zunächst homolog überexprimiert und charakterisiert. Für das Malat-Enzym 1 (Mae1) wurde gezeigt, dass das rekombinante Protein die reversible, NADP<sup>+</sup>-abhängige Decarboxylierung von Malat zu Pyruvat katalysiert. Das Malat-Enzym 2 (Mae2) war *in vitro* nicht aktiv. Dennoch haben die Analysen der Deletionsmutanten ergeben, dass nur eine  $\Delta mae1 \Delta mae2$ -Mutante nicht mehr in der Lage war auf Acetat zu wachsen, was für die gegenseitige *in vivo* Ersetzbarkeit der beiden Malat-Enzyme spricht. Analysen zur PEPS haben gezeigt, dass das kodierende Gen sowohl in Glucose- als auch in Pyruvat-gewachsenen *H. volcanii*-Zellen transkribiert wird. Die PEPS-Deletionsmutante wuchs auf Glucose, aber nicht auf Pyruvat, was auf eine essentielle, ausschließlich anabole Funktion des Enzyms hindeutet.

In den meisten Bacteria, wie z. B. *E. coli* oder *C. glutamicum*, wird im Gegensatz zu *H. volcanii* die Synthese von Phosphoenolpyruvat (PEP) durch eine PEP-Carboxykinase (PEPCK) katalysiert (Sauer und Eikmanns 2005). Dieses Enzym katalysiert die ATP-abhängige Decarboxylierung von Oxalacetat zu PEP, ADP und CO<sub>2</sub>. Im Genom von *H. volcanii* wurde kein Gen für eine PEPCK identifiziert. *E. coli* verfügt aber neben der PEPCK auch über zwei Malat-Enzyme und eine PEPS, die ebenso wie die PEPCK Acetat-spezifisch induziert werden, wodurch eine PEP-Synthese auch über diese Enzyme möglich ist (Oh et al. 2002). Die Analyse von *E. coli*-Deletionsmutanten hat ergeben, dass sich die alternativen Wege der PEP-Synthese, d. h. über eine PEPCK oder über die zwei Malat-Enzyme und eine PEPS, funktionell ersetzen können (Oh et al. 2002). Außerdem wurde, wie im Rahmen dieser Arbeit für *H. volcanii* gezeigt, eine gegenseitige Ersetzbarkeit beider Malat-Enzyme bei Wachstum auf Acetat beschrieben (Oh et al. 2002). Auch in dem hyperthermophilen Archaeon *Thermococcus kodakarensis* wurden, wie in *E. coli*, Untersuchungen der PEP-Synthese über eine PEPCK, ein Malat-Enzym und eine PEPS durchgeführt (Fukuda et al. 2004; Fukuda et al. 2005; Imanaka et al. 2006). Diese Analysen deuten auf eine anabole Funktion der PEPCK hin. Eine Beteiligung des Malat-Enzyms und der PEPS an der Gluconeogenese konnte aber nicht ausgeschlossen werden (Fukuda et al. 2004). Insbesondere gibt es keine Untersuchungen mit Malat-Enzym- oder PEPS-

Deletionsmutanten. Es sei angemerkt, dass die *Th. kodakarensis* PEPS die bisher einzige beschriebene PEPS ist, für die eine katabole Funktion im Zucker-Abbau vermutet wird (Imanaka et al. 2006). Dieses außergewöhnliche Enzym wurde daher bereits im Rahmen des Glucose-Stoffwechsels von *H. volcanii* in Kapitel 6.1.1 diskutiert.

Ein Malat-Enzym ist in der Domäne der Archaea außer aus *Th. kodakarensis* ansonsten nur aus *Sulfolobus solfataricus* charakterisiert worden (Bartolucci et al. 1987). PEPS-Enzyme sind in Archaea neben dem Enzym aus *Th. kodakarensis* bisher nur in wenigen hyperthermophilen und methanogenen Organismen identifiziert worden. In *P. furiosus* ist die anabole Funktion einer PEPS diskutiert worden, die allerdings aus Maltose-gewachsenen Zellen gereinigt wurde (Hutchins et al. 2001). In *Thermoproteus tenax* wurde die Induktion einer PEPS auf gluconeogenetischen Substraten beschrieben und das rekombinante Enzym charakterisiert (Tjaden et al. 2006). Weitere PEPS wurden aus *Staphylothermus marinus* und aus *Methanothermobacter thermautotrophicus* gereinigt und charakterisiert (Eyzaguirre et al. 1982; Ciccipol et al. 1994). Umfassende funktionelle Analysen zur PEP-Synthese wurden in keinem dieser Organismen durchgeführt. Damit wurde in dieser Arbeit erstmals in der Domäne der Archaea der direkte Nachweis der essentiellen Funktion der Malat-Enzyme und der PEPS erbracht.

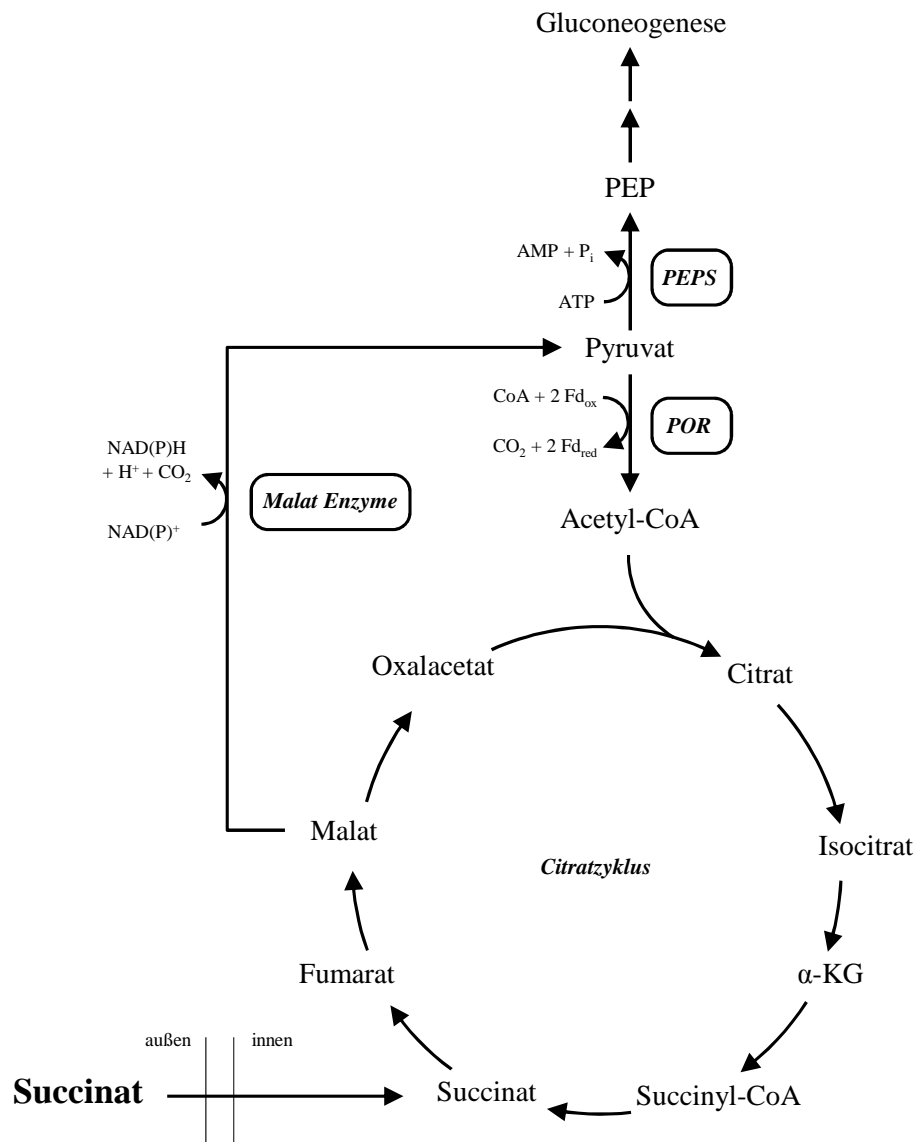
Zusammenfassend wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die funktionale Beteiligung von Enzymen am Acetat-Stoffwechsel in dem halophilen Modellorganismus *H. volcanii* nachgewiesen. Abbildung 45 zeigt eine schematische Darstellung des Acetat-Stoffwechsels in *H. volcanii*. Acetat wird durch den Acetat-Transporter der SSF-Familie in die Zelle aufgenommen und unter Beteiligung der AMP-bildenden Acetyl-CoA-Synthetasen ACS2 und ACS7 zu Acetyl-CoA aktiviert. Die essentielle anaplerotische Funktion des Glyoxylatzyklus wurde in Wachstumsexperimenten mit einer Isocitrat-Lyase-Deletionsmutante nachgewiesen. Die Analyse der anabolen Synthese von Phosphoenolpyruvat (PEP) aus Malat, dem Intermediat des Glyoxylatzyklus, hat ergeben, dass beide Malat-Enzyme essentiell für das Wachstum von *H. volcanii* auf Acetat sind. Die anschließende Umsetzung von Pyruvat zu PEP im Zuge der Gluconeogenese wird durch die ebenfalls für ein Wachstum auf Acetat essentielle Phosphoenolpyruvat-Synthetase katalysiert.



**Abbildung 45 Schematische Darstellung des Acetat-Stoffwechsels in *H. volcanii*.** Es sind ausschließlich die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Enzyme genannt. ACS, AMP-bildende Acetyl-Coenzym A Synthetase;  $\alpha$ -KG,  $\alpha$ -Ketoglutarat; CoA, Coenzym A; ICL, Isocitrat-Lyase; PEP, Phosphoenolpyruvat; PEPS, Phosphoenolpyruvat-Synthetase; SSF, Acetat-Transporter der SSF-Familie (membranständig).

### 6.3 Enzyme des Succinat-Stoffwechsels

Im Rahmen dieser Arbeit wurden funktionelle Analysen zum Dicarbonsäure-Stoffwechsel in dem Haloarchaeon *H. volcanii* durchgeführt. *H. volcanii* kann auf Succinat, jedoch nicht auf Malat wachsen. In Wachstumsexperimenten mit ausgewählten Deletionsmutanten, die in dieser Arbeit im Rahmen der Untersuchungen zum Glucose- und Acetat-Stoffwechsel generiert wurden, wurde die essentielle Funktion der Malat-Enzyme, der Phosphoenolpyruvat-Synthetase (PEPS) sowie der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase (POR) für das Wachstum von *H. volcanii* auf Succinat nachgewiesen. Abbildung 46 zeigt die schematische Darstellung des Succinat-Stoffwechsels in *H. volcanii*. Es wird davon ausgegangen, dass Succinat in die Zelle transportiert und direkt in den Citratzyklus eingeschleust wird. Nach der Umsetzung von Succinat über Fumarat zu Malat katalysieren Malat-Enzyme, deren essentielle Beteiligung in Wachstumsexperimenten mit Deletionsmutanten gezeigt wurde, die NAD(P)<sup>+</sup>-abhängige Decarboxylierung von Malat zu Pyruvat und CO<sub>2</sub>. Die weitere Coenzym A-abhängige Umsetzung von Pyruvat zu Acetyl-CoA und CO<sub>2</sub> im Katabolismus wird durch die POR katalysiert, die funktionell nicht ersetzt werden kann. Die anschließende Oxidation von Acetyl-CoA zu CO<sub>2</sub> über die Enzyme des Citratzyklus wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Es wurde aber gezeigt, dass die anabole Umsetzung von Pyruvat zu Phosphoenolpyruvat (PEP) im Zuge der Gluconeogenese, welche durch die PEPS katalysiert wird, essentiell für ein Wachstum auf Succinat ist. Damit wurde ein entscheidender Beitrag zum Verständnis des Succinat-Stoffwechsels in *H. volcanii* erbracht.

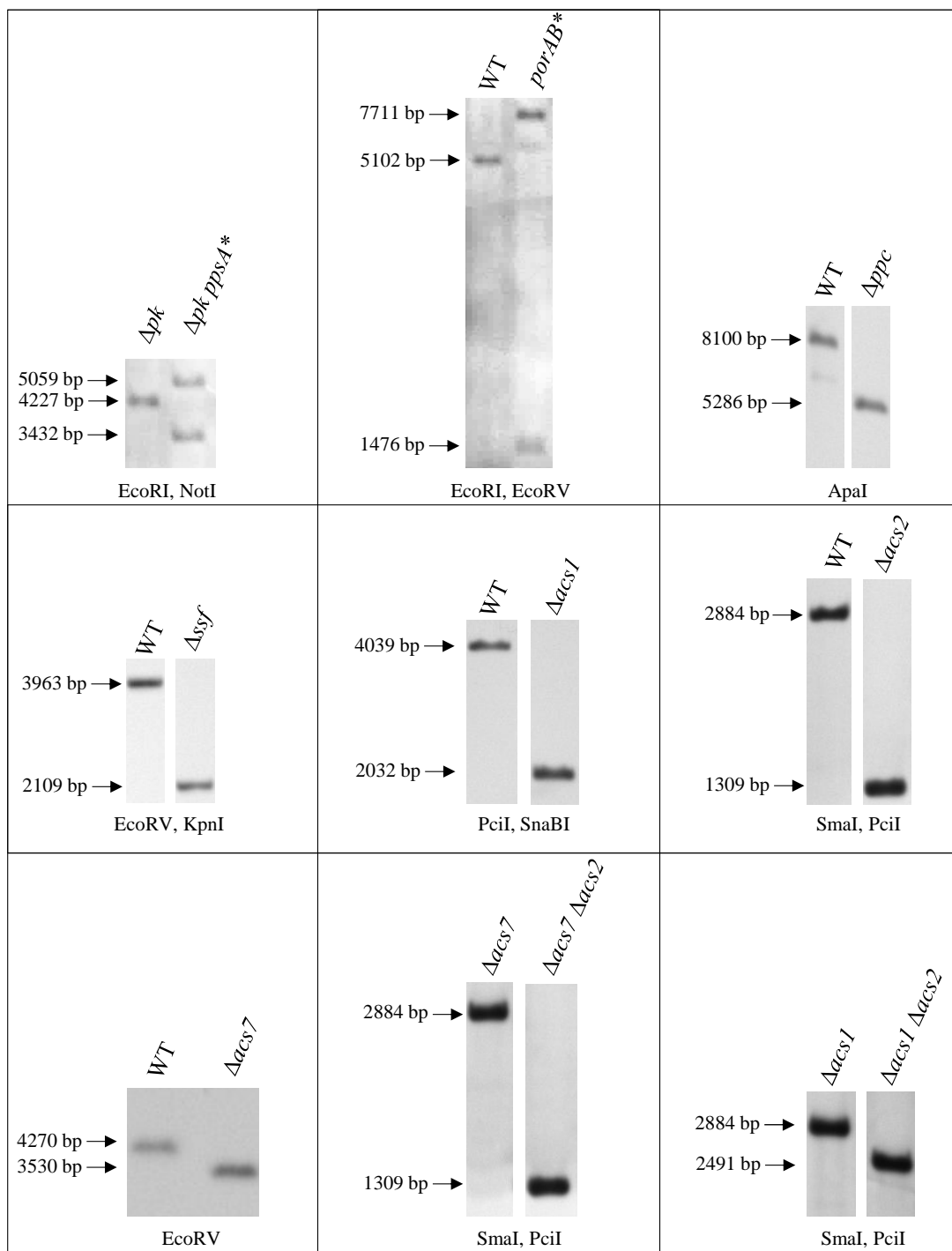


**Abbildung 46 Schematische Darstellung des Succinat-Stoffwechsels in *H. volcanii*.** Es sind ausschließlich die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Enzyme genannt. α-KG, α-Ketoglutarat; CoA, Coenzym A; PEP, Phosphoenolpyruvat; PEPS, Phosphoenolpyruvat-Synthetase.

In den meisten Bacteria, wie z. B. *E. coli*, sind alternative Wege der PEP-Synthese bei aerobem Wachstum auf Dicarbonsäuren wie Succinat beschrieben (Hansen und Juni 1974; Uden und Kleefeld 2004; Sauer und Eikmanns 2005). Im ersten Weg katalysiert eine PEP-Carboxykinase (PEPCK), die im Genom von *H. volcanii* nicht annotiert ist, die direkte Umsetzung von Oxalacetat zu PEP. Im zweiten Weg wird wie in *H. volcanii* Malat zunächst durch zwei Malat-Enzyme zu Pyruvat umgesetzt, bevor eine PEPS die anschließende Phosphorylierung von Pyruvat zu PEP katalysiert. Das gebildete PEP dient im Anabolismus als Substrat für die Gluconeogenese. Im Katabolismus von Bacteria, wie z. B. *E. coli*, wird PEP durch eine Pyruvat-Kinase (PK) und einen Pyruvat-Dehydrogenase (PDH)-Komplex

über Pyruvat zu Acetyl-CoA umgesetzt, welches unter aeroben Bedingungen über die Enzyme des Citratzyklus zu CO<sub>2</sub> oxidiert wird. Die funktionelle Ersetzbarkeit der alternativen Wege der PEP-Synthese wurde in *E. coli* in Wachstumsexperimenten mit Deletionsmutanten nachgewiesen (Hansen und Juni 1974; Hansen und Juni 1975). Nur eine Deletion beider alternativen Wege führte zu einer vollständigen Inhibition des Wachstums auf Dicarbonsäuren. Im Gegensatz dazu haben die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass sich in *H. volcanii* zwar die zwei Malat-Enzyme wie in *E. coli* gegenseitig funktionell ersetzen können, die Synthese von PEP durch Malat-Enzyme und die PEPS aber essentiell für ein Wachstum auf Succinat ist. Auch der Mechanismus der oxidativen Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-CoA durch die POR unter aeroben Bedingungen in *H. volcanii* unterscheidet sich von jenem der Bacteria. Wie bereits in Kapitel 6.1.2 beschrieben, wird diese Umsetzung in allen Bacteria unter aeroben Bedingungen durch einen Pyruvat-Dehydrogenase (PDH)-Komplex katalysiert.

## 7 Anhang



**Abbildung 47 Southern Blot-Experimente zur Überprüfung der Deletionsmutanten und der konditionalen Depletionsmutanten von *H. volcanii*.** Depletionsmutanten sind mit einem \* gekennzeichnet. Es wurde die DNA aus dem Wildtyp (WT) bzw. der Mutante, in der ein weiteres Gen deletiert oder depletiert werden sollte, und der jeweiligen Mutante mit passenden Restriktionsenzymen verdaut. Die verwendeten Restriktionsenzyme sind unter dem jeweiligen Experiment angegeben. Für den Nachweis einer Deletion wurde eine Sonde verwendet, die spezifisch für den unmittelbaren 5'-upstream-Bereich des jeweiligen Gens war. Für den Nachweis einer Depletionsmutante wurde eine Sonde verwendet, die spezifisch für den 5'-Bereich des jeweiligen Gens war. Die Zahlen neben den Pfeilen geben die Größen der detektierten Banden an.

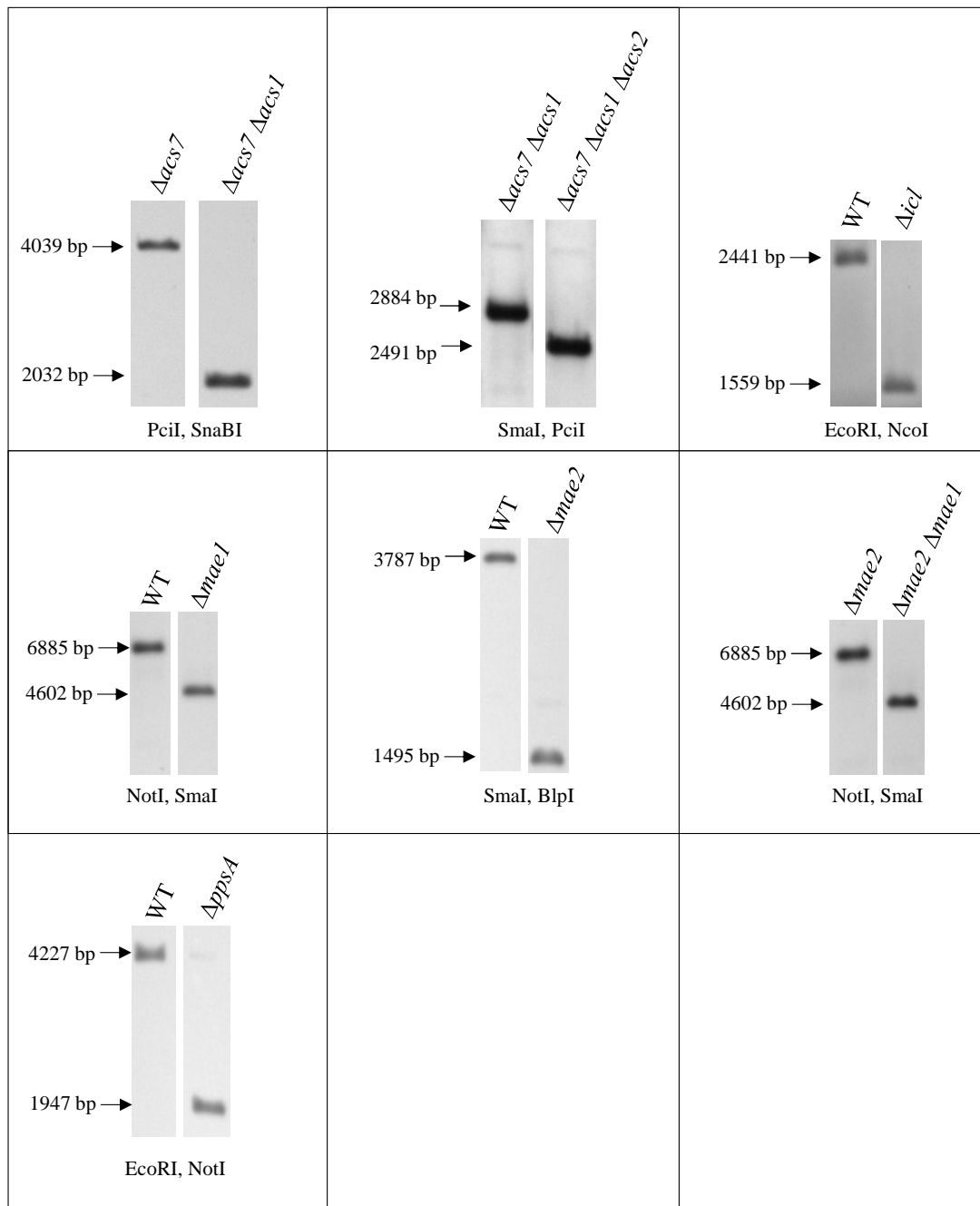


Abbildung 47 Fortsetzung



## 8 Literaturverzeichnis

- Ahmed H, Ettema TJ, Tjaden B, Geerling AC, van der OJ, Siebers B (2005) The semi-phosphorylative Entner-Doudoroff pathway in hyperthermophilic archaea - a re-evaluation. *Biochem J* 390:546
- Albers SV, Meyer BH (2011) The archaeal cell envelope. *Nat. Rev. Microbiol* 9:414-426
- Allers T (2010) Overexpression and purification of halophilic proteins in *Haloflexax volcanii*. *Bioeng. Bugs* 1:288-290
- Allers T, Mevarech M (2005) Archaeal genetics - the third way. *Nat. Rev. Genet* 6:58-73
- Allers T, Ngo HP, Mevarech M, Lloyd RG (2004) Development of additional selectable markers for the halophilic archaeon *Haloflexax volcanii* based on the *leuB* and *trpA* genes. *Appl. Environ. Microbiol* 70:943-953
- Andersen KB, von Meyenburg K (1980) Are growth rates of *Escherichia coli* in batch cultures limited by respiration? *J. Bacteriol* 144:114-123
- Anderson I et al. (2011) Novel insights into the diversity of catabolic metabolism from ten haloarchaeal genomes. *PLoS. ONE* 6:e20237
- Andersson CS et al. (2012) The Mycobacterium tuberculosis very-long-chain fatty acyl-CoA synthetase: structural basis for housing lipid substrates longer than the enzyme. *Structure* 20:1062-1070 doi: 10.1016/j.str.2012.03.012
- Babbitt PC et al. (1992) Ancestry of the 4-chlorobenzoate dehalogenase: analysis of amino acid sequence identities among families of acyl:adenyl ligases, enoyl-CoA hydratases/isomerases, and acyl-CoA thioesterases. *Biochemistry* 31:5594-5604
- Barns SM, Delwiche CF, Palmer JD, Pace NR (1996) Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences [see comments]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93:9188-9193
- Bartolucci S et al. (1987) Malic enzyme from archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus*. Purification, structure, and kinetic properties. *J. Biol. Chem* 262:7725-7731
- Berger S, Welte C, Deppenmeier U (2012) Acetate activation in *Methanosaeta thermophila*: characterization of the key enzymes pyrophosphatase and acetyl-CoA synthetase. *Archaea* 2012:315153
- Bhaumik SR, Sonawat HM (1994) Pyruvate metabolism in *Halobacterium salinarium* studied by intracellular <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Bacteriol* 176:2172-2176
- Black PN, DiRusso CC, Metzger AK, Heimert TL (1992) Cloning, sequencing, and expression of the *fadD* gene of *Escherichia coli* encoding acyl coenzyme A synthetase. *J Biol. Chem* 267:25513-25520

- Blamey JM, Adams MWW (1993) Purification and characterization of pyruvate ferredoxin oxidoreductase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Biochim. Biophys. Acta* 1161:19-27
- Blamey JM, Adams MWW (1994) Characterization of an ancestral type of pyruvate ferredoxin oxidoreductase from the hyperthermophilic bacterium, *Thermotoga maritima*. *Biochemistry* 33:1000-1007
- Bock A-K, Kunow J, Glasemacher J, Schönheit P (1996) Catalytic properties, molecular composition and sequence alignments of pyruvate: ferredoxin oxidoreductase from the methanogenic archaeon *Methanosarcina barkeri* (strain Fusaro). *Eur. J. Biochem* 237:35-44
- Bonete MJ, Pire C, Llorca FI, Camacho ML (1996) Glucose dehydrogenase from the halophilic Archaeon *Haloferax mediterranei*: enzyme purification, characterisation and N-terminal sequence. *FEBS Lett* 383:227-229
- Borghese R, Zannoni D (2010) Acetate permease (ActP) Is responsible for tellurite (TeO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) uptake and resistance in cells of the facultative phototroph *Rhodobacter capsulatus*. *Appl. Environ. Microbiol* 76:942-944
- Borjian F, Han J, Hou J, Xiang H, Berg IA (2016) The methylaspartate cycle in haloarchaea and its possible role in carbon metabolism. *ISME. J* 10:546-557
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* 72:248-254
- Bräsen C, Esser D, Rauch B, Siebers B (2014) Carbohydrate metabolism in Archaea: current insights into unusual enzymes and pathways and their regulation. *Microbiol Mol. Biol. Rev* 78:89-175
- Bräsen C, Schmidt M, Grötzinger J, Schönheit P (2008) Reaction mechanism and structural model of ADP-forming Acetyl-CoA synthetase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: evidence for a second active site histidine residue. *J Biol. Chem* 283:15409-15418
- Bräsen C, Schönheit P (2001) Mechanisms of acetate formation and acetate activation in halophilic archaea [published erratum appears in *Arch.Microbiol.* 2003 180: 504]. *Archives of Microbiology* 175:360-368
- Bräsen C, 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, 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
- Bräsen C, Schönheit P (2005) AMP-forming acetyl-CoA synthetase from the extremely halophilic archaeon *Haloarcula marismortui*: purification, identification and

- expression of the encoding gene, and phylogenetic affiliation. *Extremophiles* 9:355-365
- Bräsen C, Urbanke C, Schönheit P (2005) A novel octameric AMP-forming acetyl-CoA synthetase from the hyperthermophilic crenarchaeon *Pyrobaculum aerophilum*. *FEBS Lett* 597:477-482
- Brostedt E, Nordlund S (1991) Purification and partial characterization of a pyruvate oxidoreductase from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum* grown under nitrogen-fixing conditions. *Biochem. J* 279:155-158
- Brown TDK, Jones-Mortimer MC, Kornberg HL (1977) The enzymic interconversion of acetate and acetyl-coenzyme A in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol* 102:327-336
- Chang KH, Xiang H, Dunaway-Mariano D (1997) Acyl-adenylate motif of the acyl-adenylate/thioester-forming enzyme superfamily: a site-directed mutagenesis study with the *Pseudomonas* sp. strain CBS3 4-chlorobenzoate:coenzyme A ligase. *Biochemistry* 36:15650-15659
- Chen Z, Bommareddy RR, Frank D, Rappert S, Zeng AP (2014) Dereglulation of feedback inhibition of phosphoenolpyruvate carboxylase for improved lysine production in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol* 80:1388-1393
- Cicicopol C, Peters J, Kellermann J, Baumeister W (1994) Primary structure of a multimeric protein, homologous to the PEP-utilizing enzyme family and isolated from a hyperthermophilic archaebacterium. *FEBS Lett* 356:345-350
- Connerton IF, Fincham JR, Sandeman RA, Hynes MJ (1990) Comparison and cross-species expression of the acetyl-CoA synthetase genes of the Ascomycete fungi, *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*. *Mol. Microbiol* 4:451-460
- Danson MJ, Hough DW (1998) Structure, function and stability of enzymes from the Archaea. *Trends. Microbiol* 6:307-314
- Danson MJ, Lamble HJ, Hough DW (2007) Central Metabolism. In: *Archaea*. American Society of Microbiology
- De Rosa M, Gambacorta A (1988) The lipids of archaebacteria. *Prog. Lipid Res* 27:153-175
- Decker K, Jungermann K, Thauer RK (1970) Energy production in anaerobic organisms. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl* 9:138-158
- Dennis PP, Shimmin LC (1997) Evolutionary divergence and salinity-mediated selection in halophilic archaea. *Microbiol. Mol. Biol. Rev* 61:90-104
- Dharmarajan L, Kraszewski JL, Mukhopadhyay B, Dunten PW (2009) Expression, purification and crystallization of an archaeal-type phosphoenolpyruvate carboxylase. *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun* 65:1193-1196
- Dharmarajan L, Kraszewski JL, Mukhopadhyay B, Dunten PW (2011) Structure of an archaeal-type phosphoenolpyruvate carboxylase sensitive to inhibition by aspartate. *Proteins* 79:1820-1829

- el-Mansi EM, Holms WH (1989) Control of carbon flux to acetate excretion during growth of *Escherichia coli* in batch and continuous cultures. *J. Gen. Microbiol* 135:2875-2883
- Ellman GL (1958) A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. *Arch Biochem Biophys* 74:443-450
- Emmerling M et al. (2002) Metabolic flux responses to pyruvate kinase knockout in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 184:152-164
- Ensign SA (2006) Revisiting the glyoxylate cycle: alternate pathways for microbial acetate assimilation. *Mol. Microbiol* 61:274-276
- Ensign SA (2011) Microbiology. Another microbial pathway for acetate assimilation. *Science* 331:294-295
- Eram MS, Oduaran E, Ma K (2014) The bifunctional pyruvate decarboxylase/pyruvate ferredoxin oxidoreductase from *Thermococcus guaymasensis*. *Archaea* 2014:349379
- Ettema TJ et al. (2004) Identification and functional verification of archaeal-type phosphoenolpyruvate carboxylase, a missing link in archaeal central carbohydrate metabolism. *J Bacteriol* 186:7754-7762
- Eyzaguirre J, Jansen K, Fuchs G (1982) Phosphoenolpyruvate synthetase in *Metanobacterium thermoautotrophicum*. *Arch. Microbiol* 132:67-74
- Faham S et al. (2008) The crystal structure of a sodium galactose transporter reveals mechanistic insights into Na<sup>+</sup>/sugar symport. *Science* 321:810-814 doi: 10.1126/science.1160406
- Falb M et al. (2008) Metabolism of halophilic archaea. *Extremophiles* 12:177-196
- Ferry JG (1997) Enzymology of the fermentation of acetate to methane by *Methanosarcina thermophila*. *Biofactors* 6:25-35
- Ferry JG, Kstead KA (2007) Methanogenesis. In: *Archaea*. American Society of Microbiology
- Fujino T, Kondo J, Ishikawa M, Morikawa K, Yamamoto TT (2001) Acetyl-CoA synthetase 2, a mitochondrial matrix enzyme involved in the oxidation of acetate. *J. Biol. Chem* 276:11420-11426
- Fukuda W, Fukui T, Atomi H, Imanaka T (2004) First characterization of an archaeal GTP-dependent phosphoenolpyruvate carboxykinase from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *J. Bacteriol* 186:4620-4627
- Fukuda W, Ismail YS, Fukui T, Atomi H, Imanaka T (2005) Characterization of an archaeal malic enzyme from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *Archaea* 1:293-301
- Gäbel K, Schmitt J, Schulz S, Näther DJ, Soppa J (2013) A comprehensive analysis of the importance of translation initiation factors for *Haloferax volcanii* applying deletion and conditional depletion mutants. *PLoS. ONE* 8:e77188

- Gibson MI, Chen PY, Drennan CL (2016) A structural phylogeny for understanding 2-oxoacid oxidoreductase function. *Curr Opin Struct Biol* 41:54-61
- Gimenez R, Nuñez MF, Badia J, Aguilar J, Baldoma L (2003) The gene *yjcG*, cotranscribed with the gene *acs*, encodes an acetate permease in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol* 185:6448-6455
- Gottschalk G (1986) *Bacterial metabolism*, 2nd edn. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Grundy FJ, Waters DA, Allen SH, Henkin TM (1993) Regulation of the *Bacillus subtilis* acetate kinase gene by CcpA. *J. Bacteriol* 175:7348-7355
- Gulick AM, Starai VJ, Horswill AR, Homick KM, Escalante-Semerena JC (2003) The 1.75 Å crystal structure of acetyl-CoA synthetase bound to adenosine-5'-propylphosphate and coenzyme A. *Biochemistry* 42:2866-2873
- Hammelmann M, Soppa J (2008) Optimized generation of vectors for the construction of *Haloferax volcanii* deletion mutants. *J Microbiol Methods* 75:201-204
- Hansen EJ, Juni E (1974) Two routes for synthesis of phosphoenolpyruvate from C4-dicarboxylic acids in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 59:1204-1210
- Hansen EJ, Juni E (1975) Isolation of mutants of *Escherichia coli* lacking NAD- and NADP-linked malic. *Biochem Biophys Res Commun* 65:559-566
- Hartman AL et al. (2010) The complete genome sequence of *Haloferax volcanii* DS2, a model archaeon. *PLoS. ONE* 5:e9605
- Heath C et al. (2007) The 2-oxoacid dehydrogenase multi-enzyme complex of the archaeon *Thermoplasma acidophilum* - recombinant expression, assembly and characterization. *FEBS J* 274:5406-5415
- Hisanaga Y et al. (2004) Structural basis of the substrate-specific two-step catalysis of long chain fatty acyl-CoA synthetase dimer. *J Biol. Chem* 279:31717-31726
- Hochstein LI (1978) *Energetics and Structure of Halophilic Microorganisms*
- Hosie AH, Allaway D, Poole PS (2002) A monocarboxylate permease of *Rhizobium leguminosarum* is the first member of a new subfamily of transporters. *J Bacteriol* 184:5436-5448
- Huber H, Hohn MJ, Rachel R, Fuchs T, Wimmer VC, Stetter KO (2002) A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* 417:63-67
- Huber H, Huber R, Stetter KO (2006) *Thermoproteales*. In: *The Prokaryotes*, Third Edition edn, pp 10-22
- Huber H, Stetter KO (2006) *Desulfurococcales*. In: *The Prokaryotes*, Third Edition edn. Springer New York, pp 52-68
- Hulo N et al. (2006) The PROSITE database. *Nucleic Acids Res* 34:D227-230 doi: 10.1093/nar/gkj063

- Hutchins AM, Holden JF, Adams MW (2001) Phosphoenolpyruvate synthetase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J. Bacteriol* 183:709-715
- Imanaka H, Yamatsu A, Fukui T, Atomi H, Imanaka T (2006) Phosphoenolpyruvate synthase plays an essential role for glycolysis in the modified Embden-Meyerhof pathway in *Thermococcus kodakarensis*. *Mol. Microbiol* 61:898-909
- Ingram-Smith C, Smith KS (2007) AMP-forming acetyl-CoA synthetases in Archaea show unexpected diversity in substrate utilization. *Archaea* 2:95-107
- Inui M, Dumay V, Zahn K, Yamagata H, Yukawa H (1997) Structural and functional analysis of the phosphoenolpyruvate carboxylase gene from the purple nonsulfur bacterium *Rhodospseudomonas palustris* No. 7. *J Bacteriol* 179:4942-4945
- Jetten MS, Stams AJ, Zehnder AJ (1989) Isolation and characterization of acetyl-coenzyme A synthetase from *Methanotherx soehngeni*. *J. Bacteriol* 171:5430-5435
- Jitrapakdee S, St Maurice M, Rayment I, Cleland WW, Wallace JC, Attwood PV (2008) Structure, mechanism and regulation of pyruvate carboxylase. *Biochem J* 413:369-387 doi: 10.1042/BJ20080709
- Jitrapakdee S, Wallace JC (1999) Structure, function and regulation of pyruvate carboxylase. *Biochem J* 340 ( Pt 1):1-16
- Jolkver E, Emer D, Ballan S, Krämer R, Eikmanns BJ, Marin K (2009) Identification and characterization of a bacterial transport system for the uptake of pyruvate, propionate, and acetate in *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* 191:940-948
- Jolley KA, Rapaport E, Hough DW, Danson MJ, Woods WG, Dyall-Smith ML (1996) Dihydrolipoamide dehydrogenase from the halophilic archaeon *Haloferax volcanii*: homologous overexpression of the cloned gene. *J Bacteriol* 178:3044-3048
- Jones DT (1999) Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J. Mol. Biol* 292:195-202
- Jones DT (2007) Improving the accuracy of transmembrane protein topology prediction using evolutionary information. *Bioinformatics* 23:538-544 doi: 10.1093/bioinformatics/btl677
- Jung H (2002) The sodium/substrate symporter family: structural and functional features. *FEBS Lett* 529:73-77
- Kerscher L, Oesterhelt D (1981a) The catalytic mechanism of 2-oxoacid:ferredoxin oxidoreductases from *Halobacterium halobium*. One-electron transfer at two distinct steps of the catalytic cycle. *Eur. J. Biochem* 116:595-600
- Kerscher L, Oesterhelt D (1981b) Purification and properties of two 2-oxoacid:ferredoxin oxidoreductases from *Halobacterium halobium*. *Eur. J. Biochem* 116:587-594
- Klaffl S, Brocker M, Kalinowski J, Eikmanns BJ, Bott M (2013) Complex regulation of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene *pck* and characterization of its GntR-type regulator IolR as a repressor of *myo*-inositol utilization genes in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol* 195:4283-4296

- Kletzin A (2007) General Characteristics and Important Model Organisms. In: Archaea. American Society of Microbiology
- Kumari S, Tishel R, Eisenbach M, Wolfe AJ (1995) Cloning, characterization, and functional expression of *acs*, the gene which encodes acetyl coenzyme A synthetase in *Escherichia coli*. J. Bacteriol 177:2878-2886
- Kunst A, Draeger B, Ziegenhorn J (1981) Colorimetric methods with glucose oxidase and peroxidase. In: Bergmeyer H-U (ed) Methods of enzymatic analysis, 3rd edn. Verlag Chemie, Weinheim, pp 178-185
- Kuprat T (2011) Acetatstoffwechsel in dem halophilen Archaeon *Haloferax volcanii*: Funktion, Regulation und Charakterisierung der ADP-bildenden Acetyl-CoA Synthetase (ACD). Institut für allgemeine Mikrobiologie, Christian Albrechts Universität zu Kiel
- Kushkevych IV (2015) Kinetic properties of pyruvate ferredoxin oxidoreductase of intestinal sulfate-reducing bacteria *Desulfovibrio piger* Vib-7 and *Desulfomicrobium* sp. Rod-9. Pol. J. Microbiol 64:107-114
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685
- Lamble HJ et al. (2005) Promiscuity in the part-phosphorylative Entner-Doudoroff pathway of the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. FEBS Lett 579:6865-6869
- Langworthy TA, Pond JL (1986) Archaeobacterial ether lipids and chemotaxonomy. System. Appl. Microbiol 7:253-257
- Larkin MA et al. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics 23:2947-2948
- Lee HY, Na KB, Koo HM, Kim YS (2001) Identification of active site residues in *Bradyrhizobium japonicum* acetyl-CoA synthetase. J. Biochem. (Tokyo) 130:807-813
- Londei P (2007) Translation. In: Cavicchioli R (ed) Archaea. Molecular and cellular biology. ASM Prss, Washington, DC, pp 175-197
- Maniscalco M, Nannen J, Sodi V, Silver G, Lowrey PL, Bidle KA (2014) Light-dependent expression of four cryptic archaeal circadian gene homologs. Front Microbiol 5:79 doi: 10.3389/fmicb.2014.00079
- March JC, Eiteman MA, Altman E (2002) Expression of an anaplerotic enzyme, pyruvate carboxylase, improves recombinant protein production in *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol 68:5620-5624
- Martinez-Espinosa RM, Marhuenda-Egea FC, Donaire A, Bonete MJ (2003) NMR studies of a ferredoxin from *Haloferax mediterranei* and its physiological role in nitrate assimilatory pathway. Biochim Biophys Acta 1623:47-51
- Matsumura H, Izui K, Mizuguchi K (2006) A novel mechanism of allosteric regulation of archaeal phosphoenolpyruvate carboxylase: a combined approach to structure-based alignment and model assessment. Protein Eng Des Sel 19:409-419

- Meinecke B, Bertram J, Gottschalk G (1989) Purification and characterization of the pyruvate-ferredoxin oxidoreductase from *Clostridium acetobutylicum*. Arch. Microbiol 152:244-250
- Meng Y, Ingram-Smith C, Cooper LL, Smith KS (2010) Characterization of an archaeal medium-chain acyl coenzyme A synthetase from *Methanosarcina acetivorans*. J. Bacteriol 192:5982-5990
- Mukund S, Adams MWW (1995) Glyceraldehyde-3-phosphate ferredoxin oxidoreductase, a novel tungsten-containing enzyme with a potential glycolytic role in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. J. Biol. Chem 270:8389-8392
- Mullakhanbhai MF, Larsen H (1975) *Halobacterium volcanii* spec. nov., a Dead Sea halobacterium with a moderate salt requirement. Arch. Microbiol 104:207-214
- Nishizawa Y, Yabuki T, Fukuda E, Wakagi T (2005) Gene expression and characterization of two 2-oxoacid:ferredoxin oxidoreductases from *Aeropyrum pernix* K1. FEBS Lett 579:2319-2322
- O'Leary B, Park J, Plaxton WC (2011) The remarkable diversity of plant PEPC (phosphoenolpyruvate carboxylase): recent insights into the physiological functions and post-translational controls of non-photosynthetic PEPCs. Biochem. J 436:15-34
- Oba Y, Sato M, Ojika M, Inouye S (2005) Enzymatic and genetic characterization of firefly luciferase and *Drosophila* CG6178 as a fatty acyl-CoA synthetase. Biosci. Biotechnol. Biochem 69:819-828
- Oh MK, Rohlin L, Kao KC, Liao JC (2002) Global expression profiling of acetate-grown *Escherichia coli*. J. Biol. Chem 277:13175-13183
- Oren A (2002) Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. J. Ind. Microbiol. Biotechnol 28:56-63
- Oren A (2013) *Salinibacter*: an extremely halophilic bacterium with archaeal properties. FEMS Microbiol Lett 342:1-9
- Owen OE, Kalhan SC, Hanson RW (2002) The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function. J. Biol. Chem 277:30409-30412
- Park YJ, Yoo CB, Choi SY, Lee HB (2006) Purifications and characterizations of a ferredoxin and its related 2-oxoacid:ferredoxin oxidoreductase from the hyperthermophilic archaeon, *Sulfolobus solfataricus* P1. J. Biochem. Mol. Biol 39:46-54
- Patel HM, Kraszewski JL, Mukhopadhyay B (2004) The phosphoenolpyruvate carboxylase from *Methanothermobacter thermautotrophicus* has a novel structure. J. Bacteriol 186:5129-5137
- Peng Y, Cai J, Wang W, Su B (2012) Multiple inter-kingdom horizontal gene transfers in the evolution of the phosphoenolpyruvate carboxylase gene family. PLoS. ONE 7:e51159



- Peter H, Bader A, Burkovski A, Lambert C, Kramer R (1997) Isolation of the putP gene of *Corynebacterium glutamicum* and characterization of a low-affinity uptake system for compatible solutes. *Arch Microbiol* 168:143-151
- Pfeiffer F et al. (2008) Genome information management and integrated data analysis with HaloLex. *Arch Microbiol* 190:281-299 doi: 10.1007/s00203-008-0389-z
- Pfennig N, Biebl H (1976) *Desulfuromonas acetoxidans* gen. nov. and sp. nov., a new anaerobic, sulfur-reducing, acetate-oxidizing bacterium. *Arch Microbiol* 110:3-12
- Plaga W, Lottspeich F, Oesterhelt D (1992) Improved purification, crystallization and primary structure of pyruvate:ferredoxin oxidoreductase from *Halobacterium halobium*. *Eur. J. Biochem* 205:391-397
- Presecan-Siedel E et al. (1999) Catabolite regulation of the pta gene as part of carbon flow pathways in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 181:6889-6897
- Quick M, Loo DD, Wright EM (2001) Neutralization of a conserved amino acid residue in the human Na<sup>+</sup>/glucose transporter (hSGLT1) generates a glucose-gated H<sup>+</sup> channel. *J Biol Chem* 276:1728-1734 doi: 10.1074/jbc.M005521200
- Reher M, Fuhrer T, Bott M, Schönheit P (2010) The nonphosphorylative Entner-Doudoroff pathway in the thermoacidophilic euryarchaeon *Picrophilus torridus* involves a novel 2-keto-3-deoxygluconate-specific aldolase. *J Bacteriol* 192:964-974
- Reinscheid DJ, Schnicke S, Rittmann D, Zahn U, Sahn H, Eikmanns BJ (1999) Cloning, sequence analysis, expression and inactivation of the *Corynebacterium glutamicum* pta-ack operon encoding phosphotransacetylase and acetate kinase. *Microbiology* 145:503-513
- Reizer J, Reizer A, Saier MH, Jr. (1994) A functional superfamily of sodium/solute symporters. *Biochim Biophys Acta* 1197:133-166
- Robellet X, Flippi M, Pégot S, Maccabe AP, Vélot C (2008) AcpA, a member of the GPR1/FUN34/YaaH membrane protein family, is essential for acetate permease activity in the hyphal fungus *Aspergillus nidulans*. *Biochem. J* 412:485-493
- Robert X, Gouet P (2014) Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Res* 42:W320-W324
- Rohlin L, Gunsalus RP (2010) Carbon-dependent control of electron transfer and central carbon pathway genes for methane biosynthesis in the Archaeon, *Methanosarcina acetivorans* strain C2A. *BMC Microbiol* 10:62 doi: 10.1186/1471-2180-10-62
- Roughan PG, Ohlrogge JB (1994) On the assay of acetyl-CoA synthetase activity in chloroplasts and leaf extracts. *Anal Biochem* 216:77-82 doi: 10.1006/abio.1994.1010
- Sa-Pessoa J et al. (2013) SATP (YaaH), a succinate-acetate transporter protein in *Escherichia coli*. *Biochem J* 454:585-595 doi: 10.1042/BJ20130412
- Sadaie M, Nagano T, Suzuki T, Shinoyama H, Fujii T (1997) Some properties and physiological roles of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Rhodospseudomonas* sp.

- no. 7 grown on ethanol under anaerobic-light conditions. *Biosci. Biotech. Biochem* 61:425-630
- Sako Y, Takai K, Nishizaka T, Ishida Y (1997) Biochemical relationship of phosphoenolpyruvate carboxylases (PEPCs) from thermophilic archaea. *FEMS Microbiol. Lett* 153:159-165
- Sako Y, Takai K, Uchida A, Ishida Y (1996) Purification and characterization of phosphoenolpyruvate carboxylase from the hyperthermophilic archaeon *Methanothermus sociabilis*. *FEBS Lett* 392:148-152
- Sato T, Atomi H (2011) Novel metabolic pathways in *Archaea*. *Curr. Opin. Microbiol* 14:307-314
- Sauer U, Eikmanns BJ (2005) The PEP-pyruvate-oxaloacetate node as the switch point for carbon flux distribution in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev* 29:765-794
- Sawada K, Zen-in S, Wada M, Yokota A (2010) Metabolic changes in a pyruvate kinase gene deletion mutant of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *Metab Eng* 12:401-407 doi: 10.1016/j.ymben.2010.01.004
- Schäfer T, Selig M, Schönheit P (1993) Acetyl-CoA synthetase (ADP-forming) in archaea, a novel enzyme involved in acetate and ATP synthesis. *Arch. Microbiol* 159:72-83
- Schleper C et al. (1995a) *Picrophilus* gen. nov., fam. nov.: a novel aerobic, heterotrophic, thermoacidophilic genus and family comprising archaea capable of growth around pH 0. *J. Bacteriol* 177:7050-7059
- Schleper C, Pühler G, Kühlmorgen B, Zillig W (1995b) Life at extremely low pH. *Nature* 375:741-742
- Schramm A, Siebers B, Tjaden B, Brinkmann H, Hensel R (2000) Pyruvate kinase of the hyperthermophilic crenarchaeote *Thermoproteus tenax*: physiological role and phylogenetic aspects. *J. Bacteriol* 182:2001-2009
- Schut GJ, Menon AL, Adams MW (2001) 2-keto acid oxidoreductases from *Pyrococcus furiosus* and *Thermococcus litoralis*. *Methods Enzymol* 331:144-158
- Serrano JA, Bonete MJ (2001) Sequencing, phylogenetic and transcriptional analysis of the glyoxylate bypass operon (*ace*) in the halophilic archaeon *Haloferax volcanii*. *Biochim. Biophys. Acta* 1520:154-162
- Serrano JA, Camacho M, Bonete MJ (1998) Operation of glyoxylate cycle in halophilic archaea: presence of malate synthase and isocitrate lyase in *Haloferax volcanii*. *FEBS Lett* 434:13-16
- Siebers B, Schönheit P (2005) Unusual pathways and enzymes of central carbohydrate metabolism in Archaea. *Curr. Opin. Microbiol* 8:695-705
- Sisignano M, Morbitzer D, Gätgens J, Oldiges M, Soppa J (2010) A 2-oxoacid dehydrogenase complex of *Haloferax volcanii* is essential for growth on isoleucine but not on other branched-chain amino acids. *Microbiology* 156:521-529

- Smith KS, Ingram-Smith C (2007) *Methanosaeta*, the forgotten methanogen? Trends Microbiol 15:150-155
- Soares-Silva I, Schuller D, Andrade RP, Baltazar F, Cassio F, Casal M (2003) Functional expression of the lactate permease Jen1p of *Saccharomyces cerevisiae* in *Pichia pastoris*. Biochem J 376:781-787 doi: 10.1042/BJ20031180
- Sonnhammer EL, Eddy SR, Birney E, Bateman A, Durbin R (1998) Pfam: multiple sequence alignments and HMM-profiles of protein domains. Nucleic Acids Res 26:320-322
- Starai VJ, Celic I, Cole RN, Boeke JD, Escalante-Semerena JC (2002) Sir2-dependent activation of acetyl-CoA synthetase by deacetylation of active lysine. Science 298:2390-2392
- Starai VJ, Takahashi H, Boeke JD, Escalante-Semerena JC (2003) Short-Chain Fatty Acid Activation by Acyl-Coenzyme A Synthetases Requires SIR2 Protein Function in *Salmonella enterica* and *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics 163:545-555
- Stetter KO (2006) History of discovery of the first hyperthermophiles. Extremophiles 10:357-362
- Sutter JM, Tastensen JB, Johnsen U, Soppa J, Schönheit P (2016) Key enzymes of the semiphosphorylative Entner-Doudoroff pathway in the haloarchaeon *Haloferax volcanii*: Characterization of glucose dehydrogenase, gluconate dehydratase and 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase. J Bacteriol doi: 10.1128/JB.00286-16
- Tauchert K, Jahn A, Oelze J (1990) Control of diauxic Growth of *Azotobacter vinelandii* on Acetate and Glucose. J. Bacteriol 172:6447-6451
- Teraoka H, Izui K, Katsuki H (1972) Phosphoenolpyruvate carboxylase of *Escherichia coli*: alteration of allosteric properties by photooxidation. Arch. Biochem. Biophys 152:821-827
- Thauer RK (1988a) Citric-acid cycle, 50 years on. Modifications and an alternative pathway in anaerobic bacteria. Eur. J. Biochem 176:497-508
- Thauer RK (1988b) Energy metabolism of anaerobic archaebacteria: a review. In: Anaerobes Today, pp 89-94
- Thauer RK, Jungermann K, Decker K (1977) Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. Bacteriol. Rev 41:100-180
- Thauer RK, Möller-Zinkhan D, Spormann AM (1989) Biochemistry of acetate catabolism in anaerobic chemotrophic bacteria. Annu. Rev. Microbiol 43:43-67
- Thomm M (2007) Transcription: Mechanism and regulation. In: Cavicchioli R (ed) Archaea. Molecular and cellular biology. ASM Press, Washington, DC, pp 139-157
- Ting IP, Osmond CB (1973) Multiple forms of plant phosphoenolpyruvate carboxylase associated with different metabolic pathways. Plant Physiol 51:448-453

- Tjaden B, Plagens A, Dorr C, Siebers B, Hensel R (2006) Phosphoenolpyruvate synthetase and pyruvate, phosphate dikinase of *Thermoproteus tenax*: key pieces in the puzzle of archaeal carbohydrate metabolism. *Mol. Microbiol* 60:287-298
- Tobisch S, Zuhlke D, Bernhardt J, Stulke J, Hecker M (1999) Role of CcpA in regulation of the central pathways of carbon catabolism in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol* 181:6996-7004
- Toh H (1991) Sequence analysis of firefly luciferase family reveals a conservative sequence motif. *Protein Seq. Data Anal* 4:111-117
- Uhrigshardt H, Walden M, John H, Petersen A, Anemüller S (2002) Evidence for an operative glyoxylate cycle in the thermoacidophilic crenarchaeon *Sulfolobus acidocaldarius*. *FEBS Lett* 513:223-229
- Uden G, Kleefeld A (2004) C<sub>4</sub>-dicarboxylate degradation in aerobic and anaerobic growth. *EcoSal. Plus* 1
- von Blohn C, Kempf B, Kappes RM, Bremer E (1997) Osmostress response in *Bacillus subtilis*: characterization of a proline uptake system (OpuE) regulated by high osmolarity and the alternative transcription factor sigma B. *Mol Microbiol* 25:175-187
- Wahl RC, Orme-Johnson WH (1987) Clostridial pyruvate oxidoreductase and the pyruvate-oxidizing enzyme specific to nitrogen fixation in *Klebsiella pneumoniae* are similar enzymes. *J. Biol. Chem* 262:10489-10496
- Weimar JD, DiRusso CC, Delio R, Black PN (2002) Functional role of fatty acyl-coenzyme A synthetase in the transmembrane movement and activation of exogenous long-chain fatty acids. Amino acid residues within the ATP/AMP signature motif of *Escherichia coli* FadD are required for enzyme activity and fatty acid transport. *J. Biol. Chem* 277:29369-29376
- Weiß RH, Faust A, Schmidt M, Schönheit P, Scheidig AJ (2016) Structure of NDP-forming Acetyl-CoA synthetase ACD1 reveals a large rearrangement for phosphoryl transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 113:E519-E528
- Welte C, Kroninger L, Deppenmeier U (2014) Experimental evidence of an acetate transporter protein and characterization of acetate activation in aceticlastic methanogenesis of *Methanosarcina mazei*. *FEMS Microbiol Lett* 359:147-153 doi: 10.1111/1574-6968.12550
- Woese CR (1987) Bacterial evolution. *Bacteriol. Rev* 51:221-271
- Woese CR, Kandler O, Wheelis ML (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 87:4576-4579
- Wohl RC, Markus G (1972) Phosphoenolpyruvate carboxylase of *Escherichia coli*. Purification and some properties. *J. Biol. Chem* 247:5785-5792
- Wolfe AJ (2005) The acetate switch. *Microbiol. Mol. Biol. Rev* 69:12-50

- Yoon KS, Ishii M, Kodama T, Igarashi Y (1997) Purification and characterization of pyruvate:ferredoxin oxidoreductase from *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. Arch Microbiol 167:275-279
- Yoshii Y, Furukawa T, Saga T, Fujibayashi Y (2015) Acetate/acetyl-CoA metabolism associated with cancer fatty acid synthesis: overview and application. Cancer Lett 356:211-216 doi: 10.1016/j.canlet.2014.02.019
- Zaigler A, Schuster SC, Soppa J (2003) Construction and usage of a onefold-coverage shotgun DNA microarray to characterize the metabolism of the archaeon *Haloferax volcanii*. Mol. Microbiol 48:1089-1105
- Zillig W et al. (1982) *Desulfurococcaceae*, the second family of the extremely thermophilic, anaerobic, sulfur-respiring *Thermoproteales*. Zentralbl. Bakteriell. Hyg. ,I. Abt. ,Orig. C 3:304-317

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. P. Schönheit für die Überlassung des Themas, für die Betreuung und Förderung und für viele hilfreiche Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. E. Beitz und Marie Wiechert vom Institut für Pharmazeutische Chemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel danke ich für die Zurverfügungstellung der Labore und Materialien sowie die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Transportexperimente.

Herrn Prof. Dr. M. Bott danke ich für die Durchführung und Auswertung der MALDI-TOF Analysen.

Frau Dr. U. Johnsen möchte ich für die vielen hilfreichen Diskussionen und praktischen Tipps danken.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Allgemeine Mikrobiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel möchte ich für die angenehme und harmonische Zusammenarbeit danken. Mein besonderer Dank gilt hierbei Andreas P., Andreas R., Marcel, Jan-Moritz, Julia, Marius, Holger, Dagmar und Kerstin.

Abschließend möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie bedanken, die mich zu jeder Zeit in meinem Vorhaben bestärkt und mich in jeder Hinsicht unterstützt hat. Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Freundin Julia, die mich immer wieder aufmuntern konnte, auch wenn eine ACS-Mutante wieder keinen Phänotyp zeigte.

## Lebenslauf

Name	Tom Kuprat
Geboren am	24.12.1984
Geburtsort	Essen
Nationalität	deutsch
Wohnort	Kiel

### Schulbildung:

1991-1995	Ludwig-Kessing Grundschule in Essen
1995-2004	Carl-Humann-Gymnasium in Essen, Schulabschluss: Abitur

### Zivildienst:

2004-2005	Seehospiz Norderney
-----------	---------------------

### Studium:

2005 bis 2006	Studium der Biologie an der Ruhruniversität Bochum
2006 bis 2008	Bachelor-Studium der Biologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel; Experimentelle Bachelorarbeit am Institut für Allgemeine Mikrobiologie der CAU zu Kiel in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. P. Schönheit
2008 bis 2009	Master-Studium „Mention Biologie et Santé, Spécialité Microbiologie fondamentale et appliquée“ an der Université de Bretagne Occidentale, Brest, Frankreich
2009 bis 2011	Master-Studium der Biologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel; Experimentelle Masterarbeit am Institut für Allgemeine Mikrobiologie der CAU zu Kiel in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. P. Schönheit
Febr. 2012	Beginn der experimentellen Arbeiten zu der vorliegenden Dissertation am Institut für Allgemeine Mikrobiologie der CAU zu Kiel in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. P. Schönheit