Taurin und Ciliatin als Stickstoffquellen für Bakterien

Diplomarbeit

AG Cook

Fakultät für Biologie

an der Universität Konstanz

vorgelegt von

Sonja Weinitschke

Konstanz, Oktober 2004

Teile dieser Arbeit wurden übernommen in eine Veröffentlichung:

Denger, K., Weinitschke, S., Hollemeyer, K. & Cook, A. M. (2004). Sulfoacetate generated by *Rhodopseudomonas palustris* from taurine. *Archives of Microbiology* **182**: 254-258.

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. A. M. Cook, Arbeitsgruppe für Mikrobielle Ökologie, an der Fakultät für Biologie der Universität Konstanz von Januar bis Oktober 2004 durchgeführt.

Mein Dank gilt

Prof. Dr. A. M. Cook für die Überlassung des Themas, sein fortwährendes Interesse sowie zahlreiche Ideen und Vorschläge,

Prof. Dr. P. Kroth für die Übernahme des Zweitgutachtens,

Karin Denger für ihren Einsatz und die kompetente und nette Betreuung,

Dr. Jürgen Ruff für die hilfreichen Tipps bei genetischen Experimenten,

Dr. David Schleheck für Ratschläge und Hilfe, nicht nur bei technischen ‚Notfällen',

der gesamten Gruppe für das angenehme Arbeitsklima,

Dr. Hollemeyer für die MALDI-TOF-MS-Analyse,

Dr. Wippermann für die N-terminale Sequenzierung und

meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglichten.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS I

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS V

1 ZUSAMMENFASSUNG 1

2 EINLEITUNG 3

2.1 Eigenschaften und Verbreitung von Taurin und Ciliatin 3

2.2 Bekannte Stoffwechselwege von Taurin in Bakterien 4

2.3 Bekannte Stoffwechselwege von Ciliatin in Bakterien 8

2.4 Zielsetzung dieser Arbeit 10

3 MATERIAL UND METHODEN 11

3.1 Chemikalien, Biochemikalien, Gase und Geräte 11

3.2 Mikrobiologische Methoden 11

3.2.1 Herkunft der verwendeten Bakterienstämme 11

3.2.2 Medien 12

3.2.3 Kultivierung der verwendeten Bakterienstämme 13

3.2.4 Bestimmung von Zellerträgen und Wachstumsparametern 13

3.2.5 Anreicherungskulturen 14

3.2.6 Gram-Typ-Bestimmung mittels KOH-Schnelltest 15

3.2.7 Oxidase-Nachweis 15

3.2.8 Katalase-Nachweis 15

3.3 Biochemische Methoden 15

3.3.1 Herstellung von Zellsuspensionen ... 15
3.3.2 Herstellung von zellfreien Extrakten ... 16
3.3.3 Fraktionierung des zellfreien Extrakts ... 16
3.3.4 Nachweis von Enzymaktivitäten ... 17
3.3.4.1 Taurin:Pyruvat-Aminotransferase (Tpa) und Taurin:2-Oxoglutarat-Aminotransferase ... 17
3.3.4.2 Alanin-Dehydrogenase (Ald) ... 18
3.3.4.3 Taurin-Dehydrogenase (TDH) ... 18
3.3.4.4 Sulfoacetaldehyd-Dehydrogenase (SAA-DH) ... 18
3.3.5 Enzymreinigung ... 19
3.3.5.1 Aufbereitung des zellfreien Extrakts ... 19
3.3.5.2 Ammoniumsulfatfällung ... 19
3.3.5.3 Anionenaustauschchromatographie ... 19
3.3.5.4 Konzentrieren, Entsalzen und Umpuffern ... 20
3.3.6 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ... 20
3.3.7 Bestimmung des nativen Molekulargewichts durch Gelfiltration ... 21
3.3.8 Quantifizierung von Sulfoacetaldehyd mittels Enzym-Assay ... 21

3.4 Analytische Methoden ... 22
3.4.1 Spektralphotometrie ... 22
3.4.2 Kolorimetrische Bestimmungen ... 23
3.4.2.1 Proteinbestimmung ... 23
3.4.2.2 Ammoniumbestimmung ... 23
3.4.3 Massenspektrometrie ... 23
3.4.4 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) ... 24
3.4.4.1 Derivatisierung von Aminogruppen mit DNFB ... 24
3.4.4.2 Derivatisierung von Carbonylgruppen mit DIH ... 25
3.4.5 Ionenchromatographie ... 26
3.4.6 Analyse der N-terminalen Aminosäuresequenz ... 27

3.5 Molekularbiologische Methoden ... 28
3.5.1 Herkunft der Genomsequenzen ... 28

3.5.2 Amplifikation durch Polymerasekettenreaktion (PCR) 28
3.5.3 Reinigung von PCR-Produkten 30
3.5.4 Agarose-Gelelektrophorese 30
3.5.5 Sequenzierung 31
3.5.6 Analyse der Nukleotidsequenzen und Datenbankrecherchen 32

4 ERGEBNISSE 33

***4.1 Rhodopseudomonas palustris* CGA009 und dessen Taurin-Stoffwechsel..... 33**
4.1.1 Morphologische und cytologische Eigenschaften 33
4.1.2 Physiologische Eigenschaften 33
4.1.2.1 Wachstumskurve 33
4.1.2.2 Wachstumsparameter 35
4.1.3 Enzyme im Abbauweg von Taurin zu Sulfoacetat 35
4.1.3.1 Taurin:Pyruvat-Aminotransferase (Tpa) und Taurin:2-Oxoglutarat-Aminotransferase 35
4.1.3.2 Taurin-Dehydrogenase (TDH) 37
4.1.3.2.1 Molekularbiologische Ergebnisse 37
4.1.3.2.2 Biochemische Ergebnisse 37
4.1.3.3 Sulfoacetaldehyd-Dehydrogenase (SAA-DH) 37
4.1.4 Eigenschaften der Sulfoacetaldehyd-Dehydrogenase (SAA-DH) 39
4.1.5 Reinigung der Sulfoacetaldehyd-Dehydrogenase (SAA-DH) 41
4.1.5.1 Ernte und Aufbereitung des zellfreien Extrakts 41
4.1.5.2 Ammoniumsulfatfällung 42
4.1.5.3 Anionenaustauschchromatographie 43
4.1.5.4 Gelfiltration 47
4.1.6 Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz 48

4.2 Anreicherungskulturen mit Taurin als alleiniger Stickstoffquelle 49
4.2.1 Morphologie und Identität der Anreicherungskulturen 49
4.2.2 Stoffwechselwege von Taurin in den Anreicherungskulturen 50

4.3 Ausscheidung von Sulfoacetaldehyd in *Acinetobacter* sp. Stamm SW1..... 52

4.3.1 Quantifizierung von Sulfoacetaldehyd durch Etablieren eines Enzym-Assays ... 52
4.3.2 Morphologische und cytologische Eigenschaften ... 55
4.3.3 Physiologische Eigenschaften ... 55
4.3.3.1 Substratspektrum ... 55
4.3.3.2 Wachstumskurve und Wachstumsparameter ... 57
4.3.4 Enzymaktivitäten im Abbauweg von Taurin zu Sulfoacetaldehyd in *Acinetobacter* sp. Stamm SW1 ... 59
4.3.4.1 Taurin:Pyruvat-Aminotransferase (Tpa) und Taurin:2-Oxoglutarat-Aminotransferase ... 59
4.3.4.2 Taurin-Dehydrogenase (TDH) ... 59

4.4 Ciliatin als Stickstoffquelle für Bakterien ... 59
4.4.1 Ergebnisse der Anreicherungskulturen mit Ciliatin als alleiniger Stickstoffquelle ... 60
4.4.2 Der Stoffwechsel in Stamm OM10 ... 61
4.4.2.1 Morphologische Eigenschaften ... 61
4.4.2.2 Physiologische Eigenschaften ... 61

5 DISKUSSION ... 63

5.1 Der Taurin-Stoffwechsel in *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 ... 63

5.2 Die Diversität und Verbreitung der verschiedenen Wege zur Assimilation des Taurin-Stickstoffs ... 68

5.3 Ausscheidung von Sulfoacetaldehyd in *Acinetobacter* sp. Stamm SW1 ... 70

5.4 Der Ciliatin-Stoffwechsel in Bakterien ... 71

6 LITERATURVERZEICHNIS ... 73

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
A_{280}	Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm
ABC	ATP-binding cassette
Ald	Alanin-Dehydrogenase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
CAPS	3-(Cyclohexylamino)-propansulfonsäure
cm	Zentimeter
Da	Dalton
DCPIP	2,6-Dichlorophenolindophenol
DIH	2-(diphenylacetyl)-indan-1,3-dian-1-hydrazon
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNFB	2,4-Dinitrofluorbenzol
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ε	Extinktionskoeffizient
E_{365}	Extinktion bei einer Wellenlänge von 365 nm
EC	Kennnummer des Enzyme Nomenclature Commitee der International Union of Biochemistry and molecular biology (1992)
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung = 9,81 $m \cdot sec^{-2}$
h	Stunde
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IC	Ionenchromatograph

k	Kilo-
kat	Katal (SI-Einheit der Aktivität)
K_m^{app}	apparente Michaelis-Konstante
KP	Kaliumphosphat
l	Liter
µ	Wachstumsrate bzw. mikro-
m	Meter bzw. milli-
M	molar
MALDI-TOF-MS	Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation Time-of-flight Mass Spectrometry
min	Minute(n)
MOPS	Morpholinpropansulfonsäure
NAD^+	Nicotinamidadenindinukleotid, oxidierte Form
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid, reduzierte Form
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, reduzierte Form
n	nano-
n.u.	nicht untersucht
OD_{580}	Optische Dichte einer Bakteriensuspension bei der Wellenlänge 580 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PLP	Pyridoxal-5'-Phosphat
Pta	Phosphat-Acetyltransferase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
SAA	Sulfoacetaldehyd
SAA-DH	Sulfoacetaldehyd-Dehydrogenase
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
TC	Kennnummer des Transport Classification Systems
TCA	Trichloressigsäure
t_d	Verdopplungszeit
TDH	Taurin-Dehydrogenase

Tpa	Taurin:Pyruvat-Aminotransferase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV/VIS	ultraviolett/visible
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
Xsc	Sulfoacetaldehyd-Acetyltransferase
Y_m	molar Yield (molarer Wachstumsertrag)

1 Zusammenfassung

1. Der Abbau von Taurin als Stickstoffquelle wurde in *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 untersucht. Es wurde bestätigt, dass der Organismus während der Assimilation des Taurin-Stickstoffs die stabile C-SO_3^--Bindung unangetastet ließ und ein Organosulfonat, nämlich Sulfoacetat, bildete und ausschied. Die erste Reaktion dieses Abbauweges führt von Taurin zu Sulfoacetaldehyd und wird vermutlich von einer Taurin-Dehydrogenase, welche auf genetischer Ebene nachgewiesen werden konnte, katalysiert. Eine induzierbare, NAD^+-abhängige Sulfoacetaldehyd-Dehydrogenase katalysiert den zweiten Schritt, bei dem Sulfoacetaldehyd zu Sulfoacetat umgesetzt wird. Diese Bildung von Sulfoacetat aus Taurin ist äußerst interessant, da bisher die pflanzliche Sulfoquinovose als einzige Quelle für Sulfoacetat angesehen wurde. Die Reaktion der Sulfoacetaldehyd-Dehydrogenase wurde daher näher charakterisiert und das Enzym teilweise gereinigt.

2. Die Verbreitung der verschiedenen möglichen Wege zum Abbau von Taurin als Stickstoffquelle wurde durch Anreicherungskulturen untersucht, durch welche neun Reinkulturen gewonnen wurden. Die Bildung von Isethionat sowie von Sulfoacetaldehyd stellten mit je knapp der Hälfte die am häufigsten auftretenden Möglichkeiten dar, während der zuvor einzig bekannte Weg, nämlich die Ausscheidung von Sulfat, mit einer Häufigkeit von nur einem Neuntel wesentlich seltener war. Die Bildung von Sulfoacetat, wie in *R. palustris* vorkommend, konnte dagegen unter den verwendeten Bedingungen gar nicht gefunden werden.

3. Ein durch Anreicherungskulturen isoliertes Bakterium, *Acinetobacter* sp. Stamm SW1, welches Sulfoacetaldehyd bildete und ausschied, wurde weitergehend untersucht, da dieser Abbauweg bislang noch nie beschrieben worden war. Die Reaktion von Taurin zu Sulfoacetaldehyd wurde vermutlich von einer Taurin-Dehydrogenase katalysiert, deren endogener Elektronenakzeptor allerdings noch nicht gefunden wurde. Die Identität des Produktes Sulfoacetaldehyd wurde durch drei verschiedene Methoden sichergestellt.

4. Zur physiologischen Untersuchung von *Acinetobacter* sp. Stamm SW1 mittels Wachstumsversuchen war eine quantitative Sulfoacetaldehyd-Messung unerlässlich. Da bislang jedoch lediglich eine qualitative Methode existierte, musste während der Diplomarbeit eine weitere Methode etabliert werden, die auch die Quantifizierung von Sulfoacetaldehyd erlaubte. Hierbei handelte es sich um einen Enzym-Assay, bei dem das zu messende Sulfoacetaldehyd aus *Acinetobacter* sp. Stamm SW1 mithilfe des Enzyms Sulfoacetaldehyd-Dehydrogenase aus *R. palustris* CGA009 in Sulfoacetat umgewandelt wurde. Die damit gekoppelte Bildung von NADH konnte in einem kontinuierlichen Enzymtest gemessen und das Sulfoacetaldehyd erfolgreich quantifiziert werden.

5. Ciliatin ist das Phosphonat-Analogon des Sulfonates Taurin. Die C-SO_3^-- und die C-PO_3^--Bindung der beiden Substanzen besitzen ähnliche Eigenschaften hinsichtlich ihrer Stabilität. Es wurde in dieser Arbeit untersucht, ob sich während des Abbaus von Phosphonaten ähnliche Reaktionsmechanismen zu denjenigen beim Abbau von Sulfonaten finden. Hinsichtlich der Assimilation des Taurin-Stickstoffs wurden bereits mehrere Reaktionen untersucht, bei denen die stabile C-SO_3^--Bindung nicht gespalten, sondern Ammonium auf anderem Wege gewonnen und ein Organosulfonat ausgeschieden wird. Im Gegensatz dazu waren für den Abbau von Ciliatin ausschließlich Abbauwege bekannt, die eine Spaltung der C-PO_3^--Bindung und anschließende Phosphat-Freisetzung beinhalteten. Analog zur Bildung von Sulfoacetat, Sulfoacetaldehyd oder Isethionat aus Taurin wurde überprüft, ob Ciliatin ebenfalls ohne Spaltung der C-PO_3^--Bindung zu Phosphonoacetat, Phosphonoacetaldehyd oder Phosphonoethanol umgesetzt werden kann. Es wurden Anreicherungskulturen durchgeführt, und die daraus gewonnenen Reinkulturen wurden auf ihre Physiologie hin untersucht. Es wurde jedoch kein Organismus gefunden, der ein Phosphonat ausschied; die C-PO_3^--Bindung wurde grundsätzlich gespalten. Somit zeigte sich, dass die Reaktionen zur Verwertung von Taurin und Ciliatin als jeweilige Stickstoffquelle recht unterschiedlich sind, wenngleich man aufgrund ihrer ähnlichen Strukturen und ähnlicher Eigenschaften der C-PO_3^-- bzw. C-SO_3^--Bindung analoge Reaktionsmechanismen vermuten könnte.

2 Einleitung

2.1 Eigenschaften und Verbreitung von Taurin und Ciliatin

Organosulfonate besitzen eine C-SO_3^--Bindung, die chemisch sehr stabil ist, da sie im Gegensatz zur C-O-SO_3^--Bindung in Sulfatestern nicht durch Hydrolyse gespalten werden kann. In der Natur sind Organosulfonate weit verbreitet, in aeroben Böden liegt Schwefel beispielsweise zu mehr als 80 % in Form von Sulfatestern und Sulfonaten vor (Kertesz & Kahnert 2001). Zu den natürlich vorkommenden Sulfonaten zählen zum Beispiel Huminstoffe in Böden (Autry & Fitzgerald 1990; van Loon *et al.* 1993), Coenzym M (White 1988), Taurocholat im menschlichen Verdauungstrakt, Aeruginosin B als eines der wenigen bekannten aromatischen Organosulfonate (Herbert & Holliman 1964), die im pflanzlichen Sulfolipid vorliegende Sulfoquinovose (Benson 1963) und auch Taurin (2-Aminoethansulfonat). Der Name Taurin leitet sich vom lateinischen Namen des Hausrindes (*Bos taurus*) ab, da diese Substanz erstmals in Ochsengalle gefunden wurde (Demarcay 1838). Taurin ist eine zwitterionische, wasserlösliche β-Aminosulfonsäure und kommt in tierischen Zellen vor, hauptsächlich im Zentralnervensystem, im Herz und in der Leber von Säugetieren. Dort ist es mit einer Menge von 1 g pro kg Körpergewicht eine der häufigsten niedermolekularen organischen Substanzen (Huxtable 1992). Durch seine lipophoben Eigenschaften ist die Diffusion von Taurin durch Membranen nicht möglich, für die Aufnahme ist ein Transportsystem notwendig (Graham *et al.* 2002). Taurin übernimmt in Säugetieren wichtige Funktionen, beispielsweise die strukturelle und funktionelle Stabilisierung von Photorezeptoren in der Retina (Pasantes-Morales & Cruz 1984). Es spielt außerdem eine Rolle bei der Entwicklung des Gehirns (Sturman & Gaull 1975), der Osmoregulation, der Stabilisierung von Membranen (Huxtable & Bressler 1973) und bei Verdauungsvorgängen durch Konjugation mit Gallensäuren in der Leber (Spaeth *et al.* 1974; Vessey *et al.* 1977; Frison *et al.* 1979). Säugetiere können Taurin zwar grundsätzlich aus den schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein und Methionin synthetisieren, allerdings sind einige Arten (Mensch, Katze und einige Affen-Arten) nicht in der Lage, ausreichende Mengen des Stoffes zu produzieren. Der Großteil des

täglichen Bedarfs wird hier über die Nahrungsaufnahme gedeckt (Huxtable 1992). Taurin kann in Säugetierzellen nicht abgebaut werden, es kann lediglich unverändert oder in Form von Gallensalzen, wie zum Beispiel Taurocholat, ausgeschieden werden. Im Gegensatz dazu können Mikroorganismen Taurin als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen und sind außerdem dazu in der Lage, Taurin als Stickstoff- oder Schwefelquelle zu assimilieren (s. 2.2) (Chien *et al.* 1999; Denger *et al.* 2004a).

Ciliatin (2-Aminoethanphosphonat) ist das Phosphonat-Analogon zu Taurin, seine C-PO_3^--Bindung ist – ebenso wie die C-SO_3^--Bindung – chemisch sehr inert und unempfindlich gegenüber Hitze und Hydrolyse (Freedman & Doak 1957). Ciliatin wurde als erstes natürliches Phosphonat in Wimpertierchen entdeckt (Horiguchi & Kandatsu 1959), von diesen Wimpertierchen (Ciliaten) leitet sich der Trivialname der Substanz ab. Im Pansen von Wiederkäuern leben diese Ciliaten als Symbionten und bewerkstelligen den Aufschluss der für die Tiere selbst unverdaulichen Cellulose. Über die Aufnahme von Milchprodukten gelangt Ciliatin in Spuren auch in den menschlichen Körper. Ciliatin findet sich nicht nur im menschlichen Körper, sondern auch in Protozoen, Flagellaten, Coelenteraten, Mollusken und niederen Pilzen und ist dort ein Bestandteil von Membranlipiden (Tan & Tan 1989), Proteinen (Smith & Lepak 1982) und Polysacchariden (Korn *et al.* 1973). Weitere natürliche Phosphonate außer dem eben beschriebenen Ciliatin sind beispielsweise Phosphonopyruvat, Phosphonoacetat (Seidel *et al.* 1988) sowie Antibiotika, die von *Streptomyces* gebildet werden: Phosphonomycin (Hendlin *et al.* 1969) und Bialaphos (Bayer *et al.* 1972).

2.2 Bekannte Stoffwechselwege von Taurin in Bakterien

Taurin kann von Bakterien zur Energiegewinnung sowie zur Bereitstellung von Kohlenstoff für die Synthese von Zellmaterial verwendet werden, weiterhin kann es auch als Schwefel- und Stickstoffquelle dienen. Die Assimilation von Schwefel und Stickstoff ist für Bakterien ebenfalls essentiell, da diese Elemente wichtige Funktionen in der Zelle wahrnehmen. Beispielsweise ist Stickstoff Bestandteil von Aminosäuren und ist daher unerlässlich für die Proteinbiosynthese, außerdem ist es Bestandteil von Nukleinsäuren und wesentlich für die Bildung der Murein-haltigen Zellwand bei grampositiven Bakterien. Auch Schwefel spielt eine wichtige Rolle im bakteriellen Stoffwechsel: Die schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein sowie Methionin werden für

die Proteinbiosynthese benötigt, weiterhin ist Schwefel Bestandteil einer Vielfalt von Enzym-Cofaktoren, wie beispielsweise Biotin, Coenzym A, Coenzym M oder Thiamin. Durch sein Vorkommen in Eisen-Schwefel-Zentren ist Schwefel außerdem an vielen Redox-Prozessen beteiligt.

Die Stoffwechselwege von Taurin als Kohlenstoff- sowie als Schwefelquelle sind bereits seit längerem bekannt: Die Dissimilation des Taurin-Kohlenstoffs erfolgt über das Schlüsselintermediat Sulfoacetaldehyd. Die Deaminierungsreaktion von Taurin zu Sulfoacetaldehyd kann über zwei verschiedene Enzyme erfolgen, erstens über eine Pyridoxal-5'-Phosphat-abhängige Taurin:Pyruvat-Aminotransferase (Tpa [EC 2.6.1.77]), beispielsweise in *Bilophila wadsworthia* und *Rhodococcus opacus* ISO-5 (Laue & Cook 2000a; Cook & Denger 2002; Denger *et al.* 2004a). Die Tpa überträgt die Aminogruppe von Taurin auf Pyruvat unter Bildung von Alanin (s. Abbildung 2-1). Die Aminogruppe von Alanin wird im Anschluss unter Regenerierung von Pyruvat von einer NAD^+-abhängigen Alanin-Dehydrogenase (Ald [EC 1.4.1.4]) als Ammonium-Ion freigesetzt. Der zweite bekannte Weg der Deaminierung von Taurin verläuft über die Taurin-Dehydrogenase (TDH; Taurin:Ferricytochrom *c* Oxidoreduktase [EC 1.4.2.-]), zum Beispiel in *Achromobacter xylosoxidans*, *Sinorhizobium meliloti* und *Paracoccus denitrificans* (Kondo & Ishimoto 1987; Cook & Denger 2002; Ruff *et al.* 2003; Brüggemann *et al.* 2004). Dabei wird der Elektronenakzeptor Cytochrom *c* reduziert und Ammonium freigesetzt (s. Abbildung 2-2). Das in beiden möglichen Reaktionen entstehende Sulfoacetaldehyd wird in aeroben und anaeroben Bakterien durch die Thiamindiphosphat-abhängige Sulfoacetaldehyd-Acetyltransferase (Xsc [EC 2.3.3.15]) zu Acetylphosphat und Sulfit umgesetzt. Acetylphosphat wird im aeroben Stoffwechsel durch die Phosphat-Acetyltransferase (Pta [EC 2.3.1.8]) zu Acetyl-CoA umgewandelt, welches sowohl in den Krebs- als auch in den Glyoxylat-Zyklus eingespeist werden kann (Cook & Denger 2002; Ruff *et al.* 2003; Denger *et al.* 2004a). Das entstandene Sulfit kann spontan oder enzymatisch zu Sulfat oxidiert sowie zu Sulfid reduziert werden (Cook & Denger 2002). Anaeroben Bakterien, zum Beispiel *Bilophila wadsworthia* RZATAU, dient Taurin als Elektronenakzeptor und wird zu Acetat, Sulfid und Ammonium abgebaut (Laue *et al.* 1997). Taurin kann außerdem als fermentatives Substrat zur Gärung verwendet werden, zum Beispiel von *Desulfonispora*

thiosulfatigenes GKNTAU, und wird hier ebenfalls über die Xsc zu Acetat, Thiosulfat und Ammonium umgesetzt (Denger *et al.* 1997; Denger *et al.* 2001).

Die Assimilation des Taurin-Schwefels erfolgt in anaeroben Bakterien über die gleichen Enzyme wie die Dissimilation: Nach einer Deaminierung wird Sulfoacetaldehyd über die Xsc zu Acetylphosphat und Sulfit umgesetzt. Im Gegensatz dazu wird Taurin in aeroben Bakterien über eine Taurin-Dioxygenase (TauD [EC 1.14.11.17]) zu Aminoacetaldehyd und Sulfit umgesetzt (Kertesz 2000).

Die Assimilation des Taurin-Stickstoffs sowie die dort beteiligten Enzyme werden erst seit kurzem untersucht. Neueste Erkenntnisse zeigen, dass *Rhodococcus opacus* ISO-5 Taurin als Stickstoffquelle nutzen kann und für diesen Stoffwechselweg die Enzyme des dissimilatorischen Weges verwendet (Denger *et al.* 2004a). Das Bakterium baut also Taurin ebenfalls über Sulfoacetaldehyd zu Acetyl-CoA und Sulfit ab (s. Abbildung 2-1).

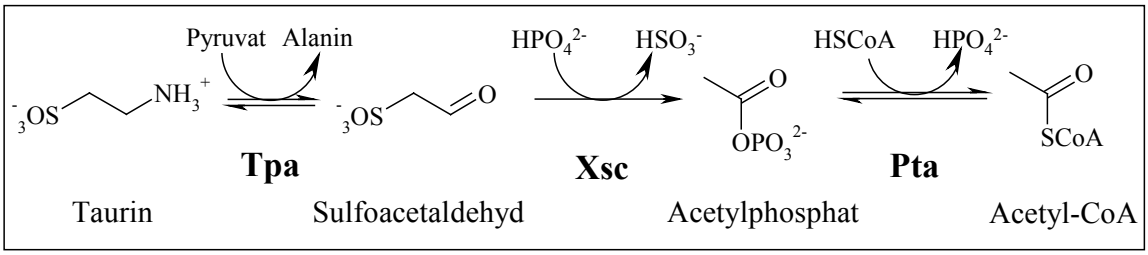

Abbildung 2-1: Einleitende Reaktionen im Abbau von Taurin als Kohlenstoff- sowie auch als Stickstoffquelle in *Rhodococcus opacus* ISO-5. Der Abbau von Taurin erfolgt in diesem Organismus über die Taurin:Pyruvat-Aminotransferase (Tpa), die Sulfoacetaldehyd-Acetyltransferase (Xsc) und die Phosphat-Acetyltransferase (Pta).

Durch Vergleich von Gensequenzen bereits bekannter Enzyme aus dem Taurin-Metabolismus mit Bakterien-Genomen aus Datenbanken stießen Denger *et al.* auf das Purpurbakterium *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 (Denger *et al.* 2004b). *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 ist ein metabolisch äußerst vielseitiges α-Proteobakterium, es kann sowohl photoautotroph als auch heterotroph wachsen. Der benötigte Kohlenstoff kann entweder aus CO_2 fixiert oder aus einer Reihe von organischen Substanzen gewonnen werden, die zum Großteil aus pflanzlichem Material stammen. Stickstoff kann ebenfalls aus der Luft fixiert werden - im Genom wurden drei Gene für Nitrogenasen gefunden - oder aus organischem Material gewonnen werden (Larimer *et al.* 2004). Nach Analyse des vollständig sequenzierten Genoms von *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 (Larimer *et al.* 2004) fand man dort Gene, die

Ähnlichkeiten zu einigen bereits bekannten Genen aus Taurin-abbauenden Bakterien aufwiesen. Dabei handelte es sich um *tauR*, welches wahrscheinlich für einen transkriptionellen Regulator codiert, sowie um *tauXY*, die vermuteten Gene für eine Taurin-Dehydrogenase (Brüggemann *et al.* 2004). Nicht gefunden wurde x*sc*, das heißt, es war vermutlich kein Enzym zur Desulfonierung von Taurin in diesem Bakterium vorhanden; weiterhin wurde festgestellt, dass *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 Taurin nicht als Kohlenstoffquelle nutzen kann. Diese Fakten ließen einen neuartigen Stoffwechselweg vermuten, bei dem die C-SO_3^--Bindung des Taurin vermutlich nicht gespalten wird.

Diese Hypothese ließ sich bei Wachstum von *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 auf Taurin als einziger Stickstoffquelle bestätigen, denn erstmals konnte beobachtet werden, dass der Sulfonat-Schwefel nicht in Form von anorganischem Schwefel (Sulfat) freigesetzt wurde. Stattdessen wurde Taurin zum bereits erwähnten Sulfoacetaldehyd deaminiert, welches ein Schlüsselintermediat vieler Abbauwege von Taurin ist; der neuartige Schritt war der darauf folgende, in dem Sulfoacetaldehyd von einer NAD^+-abhängigen Sulfoacetaldehyd-Dehydrogenase (SAA-DH; 2-Sulfoacetaldehyd:NAD-Oxidoreduktase [EC 1.2.1.-]) zu Sulfoacetat oxidiert wurde (s. Abbildung 2-2) (Denger *et al.* 2004b).

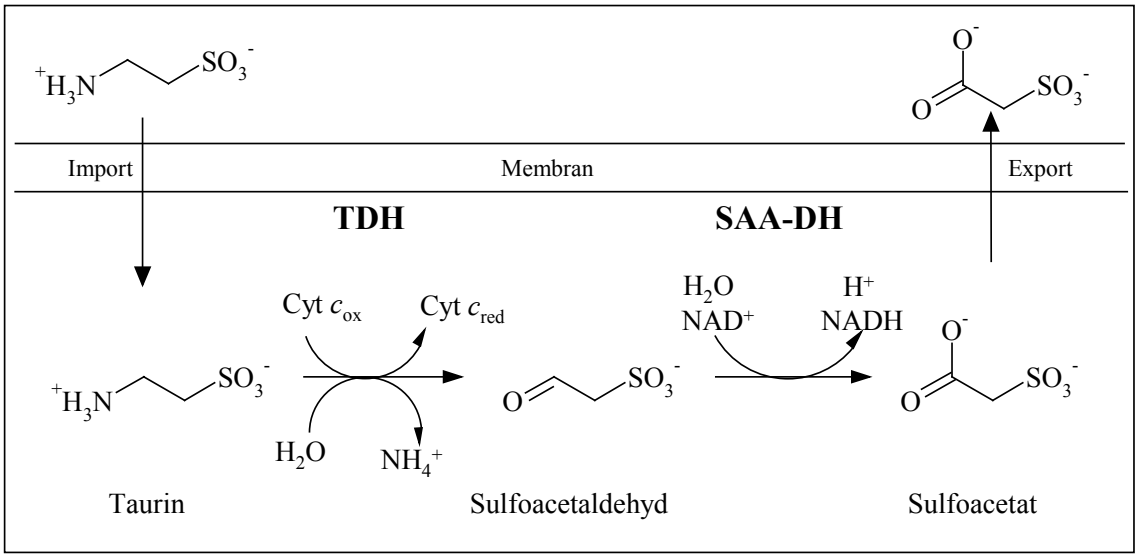

Abbildung 2-2: Vermuteter Stoffwechselweg von Taurin als Stickstoffquelle in *Rhodopseudomonas palustris* CGA009. Der Abbau von Taurin als Stickstoffquelle in *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 vollzieht sich vermutlich über die Taurin-Dehydrogenase (TDH) sowie eine Sulfoacetaldehyd-Dehydrogenase (SAA-DH).

Diese Bildung von Sulfoacetat aus Taurin in einem Bakterium wurde noch nie zuvor beobachtet; als alleinige Quelle des natürlichen Sulfonates Sulfoacetat wurde bisher Sulfoquinovose angesehen. Wie in 2.1 erwähnt, zählt Sulfoquinovose zu den natürlich vorkommenden Sulfonaten und ist ein sulfoniertes Derivat von Glucose. Dieses ist in Sulfolipiden enthalten, welche wiederum einen Hauptbestandteil von pflanzlichen Thylakoidmembranen darstellen (Benson 1963). Sulfoquinovose wird von Mikroorganismen zu Sulfoacetat abgebaut (Martelli & Benson 1964), was den bisher einzigen bekannten Weg zur Bildung von Sulfoacetat darstellte (Martelli 1967; Martelli & Sousa 1970). Nachdem nun gefunden wurde, dass *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 aus Taurin Sulfoacetat bildet, steht fest, dass es noch eine weitere natürliche Quelle für Sulfoacetat gibt, nämlich Taurin. Taurin ist ebenso weit verbreitet wie Sulfoquinovose, allerdings beschränkt sich sein Vorkommen - wie bereits oben beschrieben - auf das Tierreich, in pflanzlichen Zellen tritt es nur in Spuren auf.

2.3 Bekannte Stoffwechselwege von Ciliatin in Bakterien

Während die stabile C-PO_3^--Bindung von höheren Organismen nicht gespalten werden kann (Kononova & Nesmeyanova 2002), sind einige Bakterien in der Lage, Ciliatin und andere Phosphonate als Kohlenstoff-, Phosphor- oder Stickstoffquelle zu nutzen (La Nauze *et al.* 1970; Cook *et al.* 1978; Jiang *et al.* 1995; Ternan & Quinn 1998). Die Bedeutung der Kohlenstoff- sowie Stickstoff-Gewinnung für Bakterien wurde bereits in Abschnitt 2.2 besprochen. Die Assimilation von Phosphor ist ebenfalls wichtig für Mikroorganismen, denn Phosphor ist ein wesentlicher Bestandteil vieler Biomoleküle wie Phospholipide und Nukleinsäuren. Weiterhin ist Phosphor Bestandteil von Nukleotid-Cofaktoren wie NADPH und ist in Energietransport und Energiebereitstellung durch ATP involviert.

Im initialen Schritt wird Ciliatin (2-Aminoethanphosphonat, AEP) zu Phosphonoacetaldehyd deaminiert über eine 2-Aminoethanphosphonat:Pyruvat-Aminotransferase (AEPT, [EC 2.6.1.37]), zum Beispiel in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium und *Pseudomonas aeruginosa* (Dumora *et al.* 1983; Kim *et al.* 2002). Das entstandene Phosphonoacetaldehyd wird in mehreren Bakterien, beispielsweise *Bacillus cereus* sowie *Pseudomonas aeruginosa*, von einer Phosphonoacetaldehyd-Hydrolase (Trivialname: Phosphonatase, [EC 3.11.1.1]) zu Phosphat und Acetaldehyd abgebaut

(La Nauze *et al.* 1970; Dumora *et al.* 1989; Olsen *et al.* 1992; Baker *et al.* 1998; Morais *et al.* 2000). Beide eben genannten Enzyme sind gut untersucht, sowohl in ihren Eigenschaften als auch in ihrer Struktur. Ciliatin kann auch über ein zweites Enzym abgebaut werden, die C-P-Lyase, wie zum Beispiel in *Enterobacter aerogenes* (Lee *et al.* 1992), die Aktivität dieses Enzyms konnte allerdings bisher noch nicht in zellfreien Extrakten nachgewiesen werden. Beide bekannten Wege des Ciliatin-Abbaus beinhalten eine Spaltung der C-PO_3^--Bindung. Es ist bisher keine Reaktion bekannt, bei der die C-PO_3^--Bindung erhalten bleibt (s. Abbildung 2-3). Weitere Phosphonate außer Ciliatin wurden auf ihren Abbau hin untersucht, sämtliche aufgeklärten Stoffwechselwege vollziehen sich ebenfalls über eine Spaltung der C-PO_3^--Bindung (McMullan & Quinn 1992; McGrath *et al.* 1995; Kulakova *et al.* 1997; Ternan *et al.* 1998). Es wurde bisher kein Abbau von Phosphonaten gefunden, bei dem die C-PO_3^--Bindung unberührt bleibt.

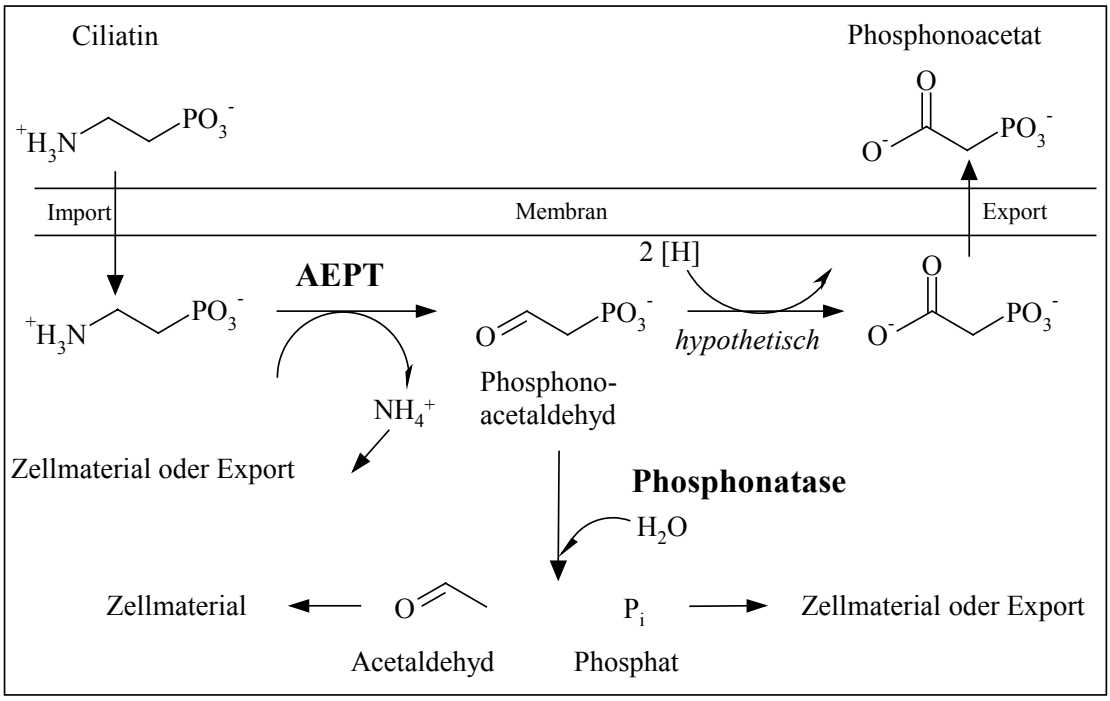

Abbildung 2-3: Abbau von Ciliatin als Kohlenstoff-, Phosphor- oder Stickstoffquelle sowie eine Arbeitshypothese zur Bildung von Phosphonoacetat aus Ciliatin. Die Deaminierung von Ciliatin zu Phosphonoacetaldehyd erfolgt über eine Aminoethanphosphonat:Pyruvat-Aminotransferase (AEPT), die Spaltung von Phosphonoacetaldehyd in Acetaldehyd und Phosphat wird von der Phosphonoacetaldehyd-Hydrolase (auch Phosphonatase) bewerkstelligt. Der alternative Weg über eine C-P-Lyase ist nicht dargestellt. Eine mögliche Bildung von Phosphonoacetat sollte in dieser Arbeit untersucht werden und ist als rein hypothetisch anzusehen.

2.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Stickstoff-limitierten Abbau von Taurin zu Sulfoacetat in *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 genauer zu untersuchen. Besonderes Augenmerk lag dabei auf der Reaktion der Sulfoacetaldehyd-Dehydrogenase, deren Reaktion von Sulfoacetaldehyd zu Sulfoacetat genauer charakterisiert werden sollte. Das Enzym sollte außerdem gereinigt werden, um eine N-terminale Sequenz zu erhalten und zu beweisen, dass das vermutete Gen im komplett sequenzierten Genom von *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 tatsächlich für dieses Enzym codiert. Dadurch sollte eine Grundlage für weitere Experimente - beispielsweise Expressionsexperimente - geschaffen werden.

Die Verbreitung des oben genannten Stoffwechselweges sowie der anderen möglichen Abbauwege von Taurin sollte durch Anreicherungskulturen untersucht werden.

Die Diversität des Ciliatin-Stoffwechsels in Bezug auf Verwertung der Substanz als Stickstoffquelle sollte untersucht werden. Da nun ein Stoffwechselweg in *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 bekannt war, in dem bei der Assimilation des Taurin-Stickstoffs die C-SO_3^--Bindung nicht angegriffen wurde, stellte sich folgende Frage: Gibt es analog zum eben genannten Metabolismus auch im Falle von Ciliatin die Möglichkeit, die C-PO_3^--Bindung während des Abbaus der Substanz unberührt zu lassen und ein Phosphonat - Phosphonoacetat, Phosphonoacetaldehyd oder Phosphonoethanol - auszuscheiden? Diese Möglichkeit sowie deren Verbreitung sollte ebenfalls mithilfe von Anreicherungskulturen untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien, Biochemikalien, Gase und Geräte

Handelsübliche Chemikalien in p.A.-Qualität wurden von den Firmen Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland), Fluka (Neu-Ulm, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Riedel de Haen (Seelze, Deutschland), Serva (Heidelberg, Deutschland) und Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Biochemikalien stammten von Merck, Boehringer (Mannheim, Deutschland), Sigma-Aldrich, BIOMOL (Plymouth, UK) und DIFCO (Heidelberg, Deutschland).

Sulfoacetaldehyd wurde von Saskia Schulz im Rahmen ihrer Diplomarbeit nach Kondo *et al*. hergestellt (Kondo *et al.* 1971) und als Bisulfitaddukt zur Verfügung gestellt.

Ein N_2/CO_2-Gemisch (80 % / 20 %) wurde vom Sauerstoffwerk Friedrichshafen bezogen.

Für Zentrifugationen kleiner Volumina wurde eine Tischzentrifuge der Firma Heraeus (Langenselbold, Deutschland), Modell Biofuge pico verwendet; für Zentrifugationen größerer Volumina wurde eine Kühlzentrifuge der Firma Sorvall (Langenselbold, Deutschland), Modell RC 5B Plus verwendet, wahlweise mit den Rotoren SS-34 und SLA-1000. Ultrazentrifugationen wurden mit einer Optima TL-Ultrazentrifuge (Beckman Instruments, München, Deutschland) in einem TLA-100.4-Rotor durchgeführt.

3.2 Mikrobiologische Methoden

3.2.1 Herkunft der verwendeten Bakterienstämme

Der Bakterienstamm *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 wurde mir freundlicherweise von Dr. C. S. Harwood (Department of Microbiology, University of Iowa, USA), der Bakterienstamm OM10 von Dr. J. P. Quinn (Department of Molecular Microbiology, Queen's University of Belfast, UK) zur Verfügung gestellt.

3.2.2 Medien

Zur Anzucht von *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 wurde ein selektives Mineralsalzmedium (50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,2, 0,25 mM $MgSO_4$ und 10 mM D,L-Natrium-Malat als Kohlenstoffquelle) mit jeweils 2 mM Taurin oder NH_4Cl als alleiniger Stickstoffquelle verwendet. Das Medium wurde mit einer Spurenelementlösung (s. Tabelle 3-1) versehen und autoklaviert. Anschließend wurde eine 7-Vitamine-Lösung (Pfennig 1978) zugegeben, bestehend aus Cyanocobalamin, p-Aminobenzoesäure, D(+)-Biotin, Nicotinsäure, D(+)-Panthothenat, Pyridoxamin-dichlorid sowie Thiamindichlorid.

Tabelle 3-1: Zusammensetzung der verwendeten Spurenelementlösung

Substanz	µM (1-fach)
Na_2EDTA x 2 H_2O	13,40
$FeCl_2$ x 4 H_2O	7,20
$ZnCl_2$	0,35
$MnCl_2$ x 4 H_2O	0,15
H_3BO_3	4,85
$CoCl_2$ x 6 H_2O	0,84
$CuCl_2$ x 2 H_2O	0,06
$NiCl_2$ x 6 H_2O	0,08
Na_2MoO_4 x 2 H_2O	0,12
$CaCl_2$ x 2 H_2O	6,80

Zur Anzucht von *Acinetobacter sp*. Stamm SW1 wurde oben beschriebenes Medium verwendet, jedoch diente 5 mM Adipinat als Kohlenstoffquelle.

Zur Ausplattierung von Bakterienkulturen wurden Agarplatten mit Luria Bertani (LB)-Medium hergestellt (10 g l^{-1} Trypton, 10 g l^{-1} NaCl, 5 g l^{-1} Hefe-Extrakt und 15 g l^{-1} Agar).

Stamm OM10 wurde in einem selektiven Mineralsalzmedium angezogen (50 mM MOPS pH 7,2, 0,25 mM $MgSO_4$, 0,5 mM Kaliumphosphat, 1-fach Spurenelementlösung, 5 mM Glucose als Kohlenstoffquelle sowie 2 mM Ciliatin als Stickstoffquelle).

3.2.3 Kultivierung der verwendeten Bakterienstämme

Die Bakterien wurden im kleinen Maßstab (5 ml) zur Stammhaltung bzw. für Substrattests und Anreicherungskulturen in 30- oder 50-ml-Kulturröhrchen angezogen. Ansätze für Wachstumsversuche (50 ml) wurden in 300-ml-Erlenmeyerkolben, Ansätze in größerem Maßstab (1 l) zur Enzymreinigung wurden in 5-l-Erlenmeyerkolben angezogen. Alle Kulturen wurden mit einem Inokulum von 1% (v/v) beimpft und bei 30 °C im Dunkeln unter Schütteln inkubiert.

Ausplattierte Kulturen wurden im Brutschrank bei 30 °C inkubiert.

3.2.4 Bestimmung von Zellerträgen und Wachstumsparametern

Für Wachstumsversuche wurden Erlenmeyerkolben mit 50 ml Medium verwendet, das mit 1% (v/v) Inokulum aus einer wachsenden Vorkultur angeimpft wurde. Als Maß für das Wachstum der Bakterienkultur wurde die Zunahme der Trübung der Kultur bei 580 nm (OD_{580}) photometrisch gemessen (s. 3.4.1). Zur Bestimmung von Trübung, Proteingehalt, Substrat- und Produktkonzentrationen wurden aus der wachsenden Kultur in regelmäßigen Zeitabständen mit einer sterilen Glaspipette Proben entnommen.

Die Wachstumsrate (μ) ergibt sich aus $\mu = \frac{(\ln x_t - \ln x_0)}{(t - t_0)}$

Die Verdopplungszeit (t_d) ergibt sich aus $t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$

Dabei ist x_t die OD_{580} zu einem Zeitpunkt t in der exponentiellen Wachstumsphase, x_0 die OD_{580} zu einem früheren Zeitpunkt t_0 in der exponentiellen Wachstumsphase.

Zur Bilanzierung der Stoffwechselreaktionen wurden Anfangs- und Endkonzentrationen der Substrate und Produkte sowie das Wachstum der Bakterien anhand der Proteinkonzentration nach Erreichen der stationären Phase ermittelt. Der molare Wachstumsertrag Y_m gibt an, wieviel g Protein pro verbrauchtem mol Substrat gebildet wurden. Die Spezifische Abbaurate (auch ‚*in-vivo*-Umsatzrate') beschreibt die Mindestaktivität jedes Enzyms, welches am Abbau des eingesetzten Substrates beteiligt ist.

Die Spezifische Abbaurate ergibt sich aus $\frac{\mu}{3{,}6\, Y_m}$

3.2.5 Anreicherungskulturen

Für die Anreicherungskulturen mit Taurin als alleiniger Stickstoffquelle wurde ein selektives Mineralsalzmedium (50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,2, 0,25 mM $MgSO_4$, 2 mM Taurin sowie ein Gemisch aus Kohlenstoffquellen) verwendet. Als Kohlenstoffquelle diente ein Gemisch aus 10 mM Glycerin sowie 5 mM Glucose und 10 mM D,L-Malat oder 10 mM Succinat.

Für die Anreicherungskulturen mit Ciliatin als alleiniger Stickstoffquelle wurde das oben beschriebene Anreicherungsmedium verwendet, wobei 2 mM Taurin durch 2 mM Ciliatin ersetzt wurde. Bei später durchgeführten Anreicherungskulturen mit Ciliatin als alleiniger Stickstoffquelle wurde als Kohlenstoffquelle jeweils 20 mM Acetat, 10 mM Succinat oder 10 mM D,L-Lactat eingesetzt. Alle Medien wurden mit einer Spurenelementlösung (s. Tabelle 3-1) versehen und autoklaviert.

Als Impfgut für die Anreicherungskulturen wurde Waldboden (Mainauwald, Konstanz), Ackerboden (Konstanz-Litzelstetten) oder Belebtschlamm (Kläranlage Konstanz) verwendet. Das jeweilige Impfgut wurde dreimal mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer gewaschen, um restlichen Stickstoff zu entfernen. Vom gewaschenen Impfgut wurden 100 µl in 5 ml des oben beschriebenen Mediums inokuliert.

Es wurden Positivkontrollen, die 2 mM NH_4Cl als Stickstoffquelle enthielten, sowie Negativkontrollen ohne Stickstoff im Medium angeimpft.

Nach erfolgtem Wachstum wurden 50 µl der Kultur jeweils in frisches Medium überimpft und nach der zweiten sowie der dritten Überimpfung auf LB-Vollmedium ausplattiert. Anschließend wurden einzelne Kolonien von der Platte erneut in selektives Medium überführt, um Reinkulturen zu gewinnen. Die Reinheit und Morphologie der Isolate wurde mikroskopisch überprüft.

Für die Messung von Taurin, Ciliatin, Sulfoacetat, Sulfoacetaldehyd, Isethionat und Sulfat wurden die Bakterien in oben genanntem Medium belassen. Um eine Messung von Phosphat in einem Bereich von etwa 2 mM zu ermöglichen, mussten die mit Ciliatin wachsenden Kulturen in ein Medium mit geringem Phosphatgehalt umgepuffert werden (50 mM MOPS pH 7,2, 0,25 mM $MgSO_4$, 0,5 mM Kaliumphosphat, Kohlenstoff- und Stickstoffquellen s.o.).

3.2.6 Gram-Typ-Bestimmung mittels KOH-Schnelltest

Der KOH-Test (Gregersen 1978) beruht auf der Tatsache, dass gramnegative Zellen in alkalischer Lösung schnell lysieren. Die dadurch freigesetzte DNA führt zu einer schleimigen Konsistenz der Zelltrümmer. Dagegen werden grampositive Zellen nicht so schnell in alkalischer Lösung lysiert. Einige Bakterienkolonien einer Platte wurden mit der Impföse in einem Tropfen 3%-iger KOH auf einem Objektträger 5 bis 10 Sekunden verrieben. Lassen sich beim vorsichtigen Anheben der Impföse schleimige Fäden ziehen, ist das Bakterium gramnegativ. Wenn dies nicht der Fall ist, handelt es sich um ein grampositives Bakterium.

3.2.7 Oxidase-Nachweis

Der Oxidase-Nachweis wurde mit Teststäbchen (Bactident Oxidase, Merck) gemäß Vorschrift durchgeführt. Die Cytochrom-Oxidase kann in Gegenwart von molekularem Sauerstoff das sogenannte NaDi-Reagenz (1-Naphthol und Dimethylparaphenylen-diamin) auf dem Teststäbchen reduzieren. Dabei entsteht das Kondensationsmolekül Indophenolblau. Bei Bakterien mit Cytochrom-Oxidase färbt sich infolge dessen die Reaktionszone blau bis violett. Das Ergebnis ist nach 20 bis 60 sec sichtbar.

3.2.8 Katalase-Nachweis

Zum Nachweis der Katalase wurden Bakterienkolonien mit einem Tropfen 10%-iger Wasserstoffperoxidlösung verrieben. Die Anwesenheit der Katalase ist anhand von Blasenbildung durch Spaltung des Reagenz in Sauerstoff und Wasser ersichtlich.

3.3 Biochemische Methoden

3.3.1 Herstellung von Zellsuspensionen

Einer Kultur von *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 wurde nach 7 bis 8 Tagen Inkubation bei einer optischen Dichte (OD_{580}) von etwa 0,3 bis 0,4 erneut 2 mM Taurin zugegeben. Da sich das zu reinigende Enzym - die Sulfoacetaldehyd-Dehydrogenase - bereits in der späten exponentiellen Phase als nicht mehr induziert erwies, wurde mithilfe dieser Technik das Enzym erneut induziert. 24 Stunden nach dieser Taurin-Zugabe wurden die Zellen geerntet.

Nach Überführen in 250-ml-Zentrifugenbecher wurden die Zellen bei 4 °C und 30 000 *g* für 15 min abzentrifugiert. Nach einmaligem Waschen des Pellets in Waschpuffer (50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,2 mit 5 mM $MgCl_2$) wurden die Zellen bis zur Verwendung bei –20 °C aufbewahrt. Die Pellets wurden in 3 bis 4 ml Waschpuffer resuspendiert und auf mehrere 6-ml-Glasröhrchen aufgeteilt.

3.3.2 Herstellung von zellfreien Extrakten

Das Glasröhrchen, in dem sich die Zellsuspension befand, wurde mit einem Septum versehen. Die Suspension wurde über eine Kanüle in eine gekühlte French-Pressure-Zelle (Aminco, Silver Spring, USA) gesaugt und bei 140 MPa durch 3 (bei *Acinetobacter* sp. Stamm SW1) oder 8 (bei *Rhodopseudomonas palustris* CGA009) Passagen aufgeschlossen. Der Erfolg des Aufschlusses wurde mikroskopisch kontrolliert. Die Zelltrümmer wurden bei 20 000 *g* für 3 min abzentrifugiert und verworfen.

3.3.3 Fraktionierung des zellfreien Extrakts

Die DNA des zellfreien Extrakts wurde mit 20 % Streptomycinsulfat bzw. Protaminsulfat (20 mg ml^{-1}) gefällt. Dazu wurde Streptomycinsulfat oder Protaminsulfat über 30 min hinweg durch eine Kanüle tropfenweise zum zellfreien Extrakt gegeben, wobei der Extrakt auf Eis gerührt wurde. Die Zugabe erfolgte bis zu einer Endkonzentration von 2 % Streptomycinsulfat oder 2 mg ml^{-1} Protaminsulfat im Extrakt. Der zellfreie Extrakt wurde weitere 30 min gerührt, und anschließend wurde die gefällte DNA bei 20 000 *g* für 2 min abzentrifugiert.

Die Fraktionierung in Membranfraktion und lösliche Cytoplasmafraktion erfolgte durch Ultrazentrifugation des Extrakts bei 200 000 *g* und 4 °C für 30 min. Die Membranfraktion wurde in Waschpuffer (50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,2 mit 5 mM $MgCl_2$) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die lösliche Fraktion sowie die gewaschene, in Waschpuffer resuspendierte Membranfraktion wurden in den Enzymtest eingesetzt.

3.3.4 Nachweis von Enzymaktivitäten

Enzymaktivitäten wurden in zellfreien Extrakten, in der löslichen Cytoplasmafraktion oder in Fraktionen von Anionenaustauschchromatographie bzw. Gelfiltration kontinuierlich oder diskontinuierlich bestimmt. Die Konzentration der Reaktionsprodukte in diskontinuierlichen Enzymtests wurde anhand von Standards bekannter Konzentrationen berechnet. Die spezifische Aktivität für kontinuierliche und diskontinuierliche Enzymmessungen wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Spezifische Aktivität} = \frac{\Delta\text{c (mM)} \cdot 1000}{(60 \cdot \text{t (min)} \cdot \text{c Protein (mg ml}^{-1}))}$$

Da die Enzymreaktionen von mehr als nur einem Substrat abhängig waren, konnten die Michaelis-Konstanten (K_m) nicht über ein Lineweaver-Burk-Diagramm berechnet werden. Es wurden daher nur apparente Michaelis-Konstanten (K_m^{app}) ermittelt. Zur Messung dieser apparenten Michaelis-Konstanten wurden alle anderen Substrate im Überschuss eingesetzt und die Konzentration des zu bestimmenden Substrates schrittweise soweit erniedrigt, dass die Reaktionsgeschwindigkeit abnahm. Für die Berechnung der K_m^{app}-Werte wurde eine Hyperbel mit der Gleichung $y = \frac{(P1 \cdot x)}{(P2 + x)}$ an die Messpunkte angelegt. Die Grenzwerte wurden als P1 und P2 bezeichnet, wobei P1 V_{max} entsprach und P2 K_m^{app}.

3.3.4.1 Taurin:Pyruvat-Aminotransferase (Tpa) und Taurin:2-Oxoglutarat-Aminotransferase

Die Aktivitätsbestimmung der Tpa erfolgte diskontinuierlich durch die Messung der Abnahme von Taurin und der Bildung von Alanin aus Pyruvat. Alternativ zu Pyruvat wurde 2-Oxoglutarat eingesetzt und eine mögliche Bildung von Glutamat gemessen für den Fall, dass es sich um eine Taurin:2-Oxoglutarat-Aminotransferase handeln könnte.

Der 1-ml-Reaktionsansatz bestand aus 50 mM Tris/HCl pH 9,0 mit 5 mM $MgCl_2$, 5 mM Taurin, 10 mM Pyruvat (oder 10 mM 2-Oxoglutarat), 0,1 mM Pyridoxal-5'-Phosphat und 0,3 mg ml^{-1} Protein. Als Positivkontrolle diente zellfreier Extrakt aus Zellen von *Rhodococcus opacus* ISO-5 (Denger *et al.* 2004a).

Der Testansatz wurde bei 37 °C im Wasserbad inkubiert, in regelmäßigen Zeitabständen wurden Proben entnommen und zur weiteren Messung bei –20 °C gelagert. In den

Proben wurden Taurin, Alanin und Glutamat mittels Derivatisierung und anschließender HPLC-Analyse bestimmt (s. 3.4.4).

3.3.4.2 Alanin-Dehydrogenase (Ald)

Zur Bestimmung der Ald-Aktivität wurde die Bildung von NADH bei einer Wellenlänge von 365 nm kontinuierlich am Spektralphotometer gemessen (Laue & Cook 2000b). NADH hat bei dieser Wellenlänge einen Extinktionskoeffizienten von $\varepsilon = 3{,}4\ cm^2\ \mu mol^{-1}$. Der 1-ml-Reaktionsansatz bestand aus 50 mM CAPS-Puffer pH 10,0, 1 mM NAD^+, 10 mM L-Alanin und etwa 0,1 bis 0,2 mg ml^{-1} Protein.

3.3.4.3 Taurin-Dehydrogenase (TDH)

Zur Bestimmung der TDH-Aktivität wurde die Reduktion des künstlichen Elektronenakzeptors 2,6-Dichlorophenolindophenol (DCPIP) spektrometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm kontinuierlich gemessen. Bei dieser Wellenlänge hat DCPIP einen molaren Extinktionskoeffizienten von $\varepsilon = 16{,}1\ cm^2\ \mu mol^{-1}$. Die Konzentration wurde über das Lambert-Beer'sche Gesetz $E = \varepsilon\ c\ d$ berechnet (wobei gilt: c, Konzentration; d, Schichtdicke; E, Extinktion).

Der 1-ml-Reaktionsansatz bestand aus 50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7,2 mit 5 mM $MgCl_2$, 0,1 mM DCPIP, 25 mM Taurin und etwa 0,2 bis 0,8 mg ml^{-1} Protein.

Zur Bestimmung der Taurin-Dehydrogenase-Aktivität wurde außerdem die Reduktion des Elektronenakzeptors Cytochrom *c* spektrometrisch bei einer Wellenlänge von 550 nm kontinuierlich gemessen. Cytochrom *c* hat bei dieser Wellenlänge einen molaren Extinktionskoeffizienten von $\varepsilon = 21{,}1\ cm^2\ \mu mol^{-1}$.

Der 1-ml-Reaktionsansatz bestand aus 50 mM Tris/HCl-Puffer pH 9,0 mit 5 mM $MgCl_2$, 0,05 mM Cytochrom *c*, 25 mM Taurin und etwa 0,2 bis 0,8 mg ml^{-1} Protein.

Als Positivkontrolle diente zellfreier Extrakt aus Zellen von *Paracoccus denitrificans* NKNIS (Brüggemann *et al.* 2004).

3.3.4.4 Sulfoacetaldehyd-Dehydrogenase (SAA-DH)

Zur Bestimmung der SAA-DH-Aktivität wurde die Reduktion des Elektronenakzeptors NAD^+ spektrometrisch bei einer Wellenlänge von 365 nm kontinuierlich gemessen (Denger *et al.* 2004b). NADH hat bei dieser Wellenlänge einen molaren Extinktionskoeffizienten von $\varepsilon = 3{,}4\ cm^2\ \mu mol^{-1}$.

Der 1-ml-Reaktionsansatz bestand aus 50 mM Tris/HCl-Puffer pH 9,0 mit 5 mM $MgCl_2$, 4 mM NAD^+, 0,4 mM Sulfoacetaldehyd und etwa 0,1 bis 0,3 mg ml^{-1} Protein. Weiterhin wurde das durch die Reaktion entstehende Sulfoacetat am Ionenchromatographen gemessen und über Standards bekannter Konzentrationen quantifiziert (s. 3.4.5).

3.3.5 Enzymreinigung

3.3.5.1 Aufbereitung des zellfreien Extrakts

Der zellfreie Extrakt der Zellen von *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 wurde wie in 3.3.3 beschrieben in die lösliche Cytoplasmafraktion und in die Membranfraktion getrennt. Die so gewonnene lösliche Fraktion wurde entweder für eine Ammoniumsulfatfällung verwendet oder in eine Anionenaustauschchromatographie eingesetzt. Für letzteres wurde sie mit Millipore-Wasser auf eine Pufferkonzentration von 20 mM Kaliumphosphat eingestellt und bei –20 °C gelagert. Fielen nach Auftauen weitere Proteine aus, so wurden diese bei 30 000 *g* 10 min lang abzentrifugiert.

3.3.5.2 Ammoniumsulfatfällung

Bei der Ammoniumsulfatfällung wurde die lösliche Fraktion über 30 min hinweg unter Rühren auf Eis auf eine Ammoniumsulfat-Konzentration von 30 % oder 40 % (w/v) gebracht. Anschließend wurden ausgefallene Proteine bei 20 000 *g* 3 min abzentrifugiert und der Überstand sowie das Pellet auf ihre Proteinkonzentration und Aktivität getestet. Die Ammoniumsulfat-Konzentration im Überstand wurde nun auf 60 % oder 70 % erhöht. Wiederum wurden ausgefallene Proteine bei 20 000 *g* 3 min abzentrifugiert und Überstand sowie Pellet auf ihre Proteinkonzentration und Aktivität getestet.

3.3.5.3 Anionenaustauschchromatographie

Mit der aufbereiteten löslichen Fraktion wurde eine Anionenaustauschchromatographie auf einer FPLC Mono Q HR 10/10-Säule (8 ml; Pharmacia, Freiburg, Deutschland) mithilfe einer HPLC-Anlage durchgeführt. Die Säule wurde mit 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,2 oder pH 7,8 äquilibriert. Der Probenauftrag erfolgte über eine 5-ml-Probenschleife. Bei einer Flussrate von 2 ml min^{-1} oder 1 ml min^{-1} wurde die

Säule zunächst für 15 min mit 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,2 oder 7,8 gespült. Im Anschluss wurde ein Na_2SO_4-Gradient von 0 bis 50 mM innerhalb von 5 min, ein Na_2SO_4-Gradient von 50 bis 100 mM innerhalb von 100 min und abschließend ein Na_2SO_4-Gradient von 100 bis 500 mM in 10 min angelegt. Die Fraktionen wurden mithilfe eines Fraktionssammlers gesammelt und auf ihre Aktivität hin getestet.

3.3.5.4 Konzentrieren, Entsalzen und Umpuffern

Im Falle einer zweiten Anionenaustauschchromatographie oder einer Gelfiltration im Anschluss an die erste Anionenaustauschchromatographie wurde die betreffende Probe entsalzt und umgepuffert sowie nötigenfalls konzentriert.

Entsalzen, Umpuffern und Konzentrieren erfolgte mittels eines 6-ml-Vivaspin-Konzentrators (Vivascience, Stonehouse, UK), wobei die Ausschlussgröße der Membran 20 kDa betrug. Die betreffende Fraktion wurde durch Zentrifugieren in einem Konzentrator bei 2500 *g* in einer Zentrifuge der Firma Hettich (Tuttlingen, Deutschland), Modell Hettich Universal, auf 20 bis 50 µl konzentriert und im jeweiligen neuen Puffer aufgenommen.

3.3.6 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen wurde die denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach der Methode von Laemmli (Laemmli 1970) oder Schägger (Schägger & von Jagow 1987) durchgeführt. Die Gele setzten sich zusammen aus einem Sammelgel mit 4% und einem Trenngel mit 13 %, 10 % oder 8 % Polyacrylamid.

Die Proben (zellfreie Extrakte und lösliche Fraktion jeweils 30 µg, Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie jeweils 10 µg) wurden vor dem Auftragen 5 min mit Auftragspuffer (Roti-Load; Roth) gekocht und anschließend bis zum Auftrag auf Eis inkubiert, um eine Renaturierung zu verhindern. Die Trennung der Proteine erfolgte in einem vertikalen Elektrophoresesystem der Firma BioRad (München, Deutschland) bei 30 bis 50 mA für 1,5 bis 2 h in Laufpuffer (25 mM Tris/HCl pH 8,3; 250 mM Glycin; 0,1 % (v/v) SDS). Es wurden handelsübliche Proteingemische (Low Range, BioRad) als Molekulargewichtsmarker verwendet. Die molekularen Massen der denaturierten Proteine konnten anhand dieser Eichproteine ermittelt werden.

Nach der Elektrophorese wurden die Gele 30 min mit einer Coomassie-Färbelösung (0,02 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 in 1 x Methanol : 1 x Wasser : 0,5 x Eisessig) gefärbt und anschließend 1,5 h in dem gleichen Methanol:Wasser:Eisessig-Gemisch ohne Farbstoff entfärbt.
Die Gele wurden bei 70 °C für 3 h im Vakuum getrocknet (Geltrockner SE1160, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA).

3.3.7 Bestimmung des nativen Molekulargewichts durch Gelfiltration

Für eine Bestimmung des nativen Molekulargewichts der Sulfoacetaldehyd-Dehydrogenase aus *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 wurde eine aktive Fraktion einer vorangegangenen Anionenaustauschchromatographie umgepuffert (siehe 3.3.5.4) und konzentriert. Die Gelfiltration wurde mithilfe einer Superose 12 HR 10/30 Säule (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) und einer HPLC-Anlage (s. 3.3.5.3) durchgeführt. Die Säule wurde bei einer Flussrate von 0,4 ml min^{-1} mit Puffer (20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,2 mit 150 mM Na_2SO_4) äquilibriert, der Probenauftrag (0,5 bis 1,5 mg Protein) erfolgte über eine 500-µl-Probenschleife.
Das native Molekulargewicht wurde über Standardproteine bestimmt, die ebenfalls auf die Säule aufgetragen wurden. Für die Eichgerade wurden die Molekulargewichte der Standardproteine Chymotrypsinogen (25 kDa), Ovalbumin (43 kDa), BSA (67 kDa) und Aldolase (158 kDa) logarithmisch gegen die Retentionszeiten aufgetragen.

3.3.8 Quantifizierung von Sulfoacetaldehyd mittels Enzym-Assay

Die Analyse von Sulfoacetaldehyd konnte durch HPLC-Analyse nur qualitativ erfolgen, da das chemisch synthetisierte Sulfoacetaldehyd-Eichmaterial als Bisulfitaddukt vorlag und sich dieses nicht zu 100 % in das Aldehyd umwandeln ließ. Dies führte zu einer Eichgerade, welche zu niedrige Eichwerte vortäuschte (s. 3.4.4.2). In dieser Diplomarbeit wurde nach einer Methode gesucht, mit der Sulfoacetaldehyd auch quantitativ bestimmt werden konnte. Es gelang schließlich, einen Enzym-Assay zu entwickeln, mithilfe dessen die Quantifizierung von Sulfoacetaldehyd erfolgreich vorgenommen werden konnte.

Dazu wurde mithilfe des Enzyms Sulfoacetaldehyd-Dehydrogenase aus der löslichen Fraktion von *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 das zu messende Sulfoacetaldehyd in Sulfoacetat überführt. Während dieser Reaktion wurde die Reduktion des Elektronenakzeptors NAD^+ bei einer Wellenlänge von 365 nm an einem Spektralphotometer (s. 3.4.1) verfolgt. Über eine Eichgerade, für die in den Enzymtest das Sulfoacetaldehyd-Bisulfitaddukt eingesetzt wurde, konnte das Sulfoacetaldehyd nun quantifiziert werden. Im Gegensatz zu den Eichgeraden, die mittels Derivatisierung und HPLC-Analyse erstellt wurden, konnte diese Eichgerade zur Quantifizierung verwendet werden, da das Hilfsenzym das Bisulfitaddukt genauso effektiv umsetzte wie das Aldehyd (s. 4.3.1) (Gritzer *et al.* 2003).

Das bei der Reaktion gebildete Sulfoacetat konnte zusätzlich am Ionenchromatographen gemessen werden, die Empfindlichkeit dieser Messmethode war allerdings wesentlich geringer als die spektralphotometrische Quantifizierung der NADH-Bildung.

Der 1-ml-Reaktionsansatz bestand aus 50 mM Tris/HCl-Puffer pH 9,0 mit 5 mM $MgCl_2$, 4 mM NAD^+, löslicher Fraktion aus *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 (1 mg ml^{-1} Protein) sowie Sulfoacetaldehyd. Das Sulfoacetaldehyd wurde in Form von Eichmaterial oder Überstand von ausgewachsenen Kulturen sowie Überstände aus Wachstumsversuchen zugegeben und 40-fach verdünnt, um eine vollständige Umsetzung des im Test vorhandenen Sulfoacetaldehyds sicherzustellen und den Test zu verkürzen.

3.4 Analytische Methoden

3.4.1 Spektralphotometrie

Zur Messung der optischen Dichte von Bakterienkulturen, der Proteinmenge und Ammoniumbestimmung diente ein Novaspec II-Spektralphotometer (Pharmacia Biotech, Cambridge, UK). Um Enzymaktivitäten in kontinuierlichen Testverfahren zu bestimmen, wurde ein Uvikon 922-Spektralphotometer (Kontron, Zürich, Schweiz) verwendet.

3.4.2 Kolorimetrische Bestimmungen

3.4.2.1 Proteinbestimmung

Protein in zellfreien Ansätzen wurde nach Bradford bestimmt (Bradford 1976), als Standard diente 0 bis 120 µg ml^{-1} BSA. Für die Eichgerade wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

Protein in ganzen Zellen wurde mittels einer abgeänderten Methode nach Lowry bestimmt (Kennedy & Fewson 1968). Hierbei wurden die Proteine zunächst mit 3 M Trichloressigsäure gefällt und die Bakterienzellen dann durch Einfrieren und nachfolgende Inkubation mit Natronlauge bei 80 °C in einem Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) schüttelnd aufgeschlossen. Als Standard für die Konzentrationsbestimmung diente 0 bis 72 µg ml^{-1} BSA, für die Eichgerade wurden ebenfalls Doppelbestimmungen durchgeführt.

3.4.2.2 Ammoniumbestimmung

Die Ammoniumbestimmung erfolgte stark verändert nach der Gesellschaft Deutscher Chemiker (Gesellschaft Deutscher Chemiker 1996). 50 µl der zu vermessenden Probe wurden auf 1 ml mit H_2O verdünnt und mit 100 µl einer Natriumnitroprussid-Lösung (0,65 g Natriumsalicylat; 0,65 g Trinatriumcitrat x 2 H_2O und 10 mg Natriumnitroprussid in 5 ml H_2O) und 100 µl einer Natriumdichloroisocyanurat-Lösung (10 mg Natriumdichloroisocyanurat in 5 ml 0,8 M NaOH) gemischt. Der Ansatz wurde 2 bis 3 h im Dunkeln inkubiert und anschließend die Absorption bei einer Wellenlänge von 655 nm im Spektralphotometer gemessen. Als Standard diente 0 bis 100 µM $(NH_4^+)_2SO_4$.

3.4.3 Massenspektrometrie

Zur Identifizierung von Sulfoacetaldehyd wurde eine mit Matrix-unterstützter Laserdesorption/Ionisation gekoppelte Massenspektrometrie (MALDI-MS) verwendet. Die Messungen wurden von Dr. Hollemeyer (Arbeitsgruppe Prof. Heinzle, Universität Saarbrücken, Deutschland) mit einem MALDI-Massenspektrometer Reflex III (Bruker, Bremen, Deutschland) durchgeführt.

Die Probenmoleküle wurden auf der Matrixsubstanz α-Cyanozimtsäure getrocknet und durch den Puls eines Stickstofflasers der Wellenlänge 336 nm desorbiert und ionisiert. Ein Flugzeit-(time of flight, TOF)Analysator rechnete die gemessene Flugzeit des Ions in dessen Masse um. Bei der Auswertung der Massenspektren musste berücksichtigt werden, dass im negativen Modus gemessen wurde, also ausschließlich negativ geladene Ionen mit einem Molekulargewicht von M-1 detektiert wurden.

3.4.4 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Taurin, Ciliatin, Alanin, Glutamat, 2-Oxoglutarat und Sulfoacetaldehyd konnten nach Derivatisierung der Amino- bzw. der Carbonylgruppe mittels Reversed-Phase-HPLC analysiert werden. Verwendet wurde das Beckman System Gold (Beckman Instruments) mit zwei Hochdruckpumpen (Modell 126), welche die Mischung binärer Gradienten ermöglichten, mit einem System Gold Autosampler 507 und mit einem System Gold Dioden-Array-Detektor (Modell 168). Die Trennung erfolgte über eine Nucleosil 5-C18-Säule (125 x 3 mm; Knauer, Berlin, Deutschland) als stationäre Phase und je nach Methode verschieden zusammengesetzten mobilen Phasen mit einer Flussrate von 0,5 ml min^{-1}. Die Auswertung erfolgte über die Integration der Peaks durch die Software von Beckman System Gold. Die Verbindungen wurden anhand der Retentionszeiten und durch Cochromatographie identifiziert.

3.4.4.1 Derivatisierung von Aminogruppen mit DNFB

2,4-Dinitrofluorbenzol (DNFB; Sanger's Reagenz) wird zur Bestimmung von N-terminalen Aminosäureresten von Proteinen und zum Nachweis von Aminosäuren und biogenen Aminen eingesetzt (Sanger 1945). Durch nukleophile Substitution mit deprotonierten Aminogruppen biogener Amine und Aminosäuren wird das Fluoratom des DNFB-Moleküls durch die Aminogruppe ersetzt (s. Abbildung 3-1).

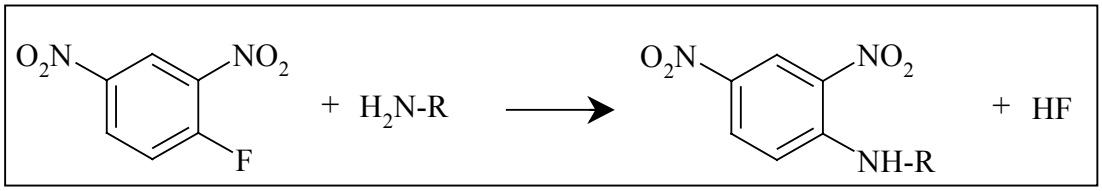

Abbildung 3-1: Derivatisierung von Aminogruppen mit DNFB

Die Derivatisierung der Aminogruppen von Taurin, Ciliatin, Glutamat und Alanin mit DNFB und die Analyse der Derivate durch Reversed Phase-HPLC wurden wie folgt durchgeführt: Nach Zugabe von 1 ml Derivatisierungspuffer (0,1 M $NaHCO_3$) zu 50 µl der Probe wurde 200 µl DNFB (5 % DNFB in Ethanol) zugegeben, und die Ansätze wurden zwei Stunden schüttelnd bei 30 °C im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Ansäuern der Proben mit 50 µl 37 %-iger HCl. Die verwendeten Puffer bei der HPLC-Trennung waren 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 2,2 und Methanol mit einem 17-minütigen Gradienten von 0 bis 80 % Methanol. Die Detektorwellenlänge betrug 360 nm und das Injektionsvolumen 50 µl. Unter diesen Bedingungen hatte Taurin eine Retentionszeit von etwa 15,8 min, Ciliatin 16,0 min, Glutamat 18,3 min und Alanin 19,5 min.

In den Proben, die zur Quantifizierung von Taurin, Glutamat oder Alanin durch DNFB-Derivatisierung und HPLC-Analytik aus diskontinuierlichen Enzymtests entnommen wurden, wurde die Enzymreaktion durch die Zugabe von Derivatisierungspuffer (0,1 M $NaHCO_3$) gestoppt, und die Ansätze wurden bis zur Messung bei –20 °C gelagert.

3.4.4.2 Derivatisierung von Carbonylgruppen mit DIH

2-(Diphenylacetyl)-indan-1,3-dian-1-hydrazon (DIH) ist eine schwach basische Stickstoffverbindung, die in saurer Umgebung durch Addition an Carbonylverbindungen neutrale Endprodukte (substituierte Hydrazone) bildet (s. Abbildung 3-2).

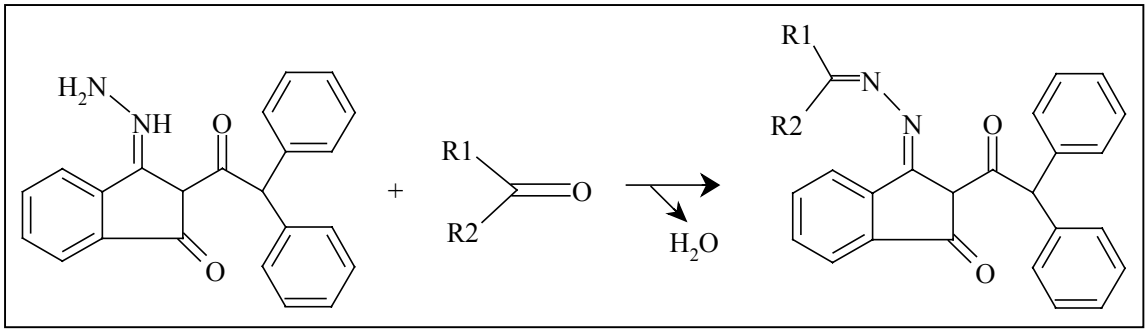

Abbildung 3-2: Derivatisierung von Carbonylgruppen mit DIH

In einer von Cunningham *et al*. entwickelten Derivatisierungsmethode (Cunningham *et al.* 1998) wurden zunächst 100 µl einer Probe, die 0,5 bis 2 mM einer Carbonylverbindung enthielt, mit 300 µl DIH-Reagenz (0,03 % (w/v) DIH in

Acetonitril) gemischt und für 5 min auf Eis vorinkubiert. Durch die Zugabe von 20 µl 2 M HCl wurde die Reaktion gestartet, worauf eine 60-minütige Inkubation bei 50 °C schüttelnd (Thermomixer, Eppendorf, Hamburg) stattfand. Anschließend wurde der Ansatz durch die Zugabe von 600 µl Wasser verdünnt. Das Auftragen der Derivate auf die Reversed-Phase-HPLC-Säule fand mit 30 % Acetonitril in 0,11 M $NaClO_4$ statt, das Injektionsvolumen betrug 100 µl. Die Elution erfolgte über einen aufsteigenden Gradienten von 30 bis 80 % Acetonitril in 0,11 M $NaClO_4$ innerhalb von 17 min. Die Carbonylderivate wurden durch ihre Absorption bei 400 nm detektiert und anhand der Retentionszeiten oder durch Cochromatographie mit Referenzsubstanzen identifiziert. Das Sulfoacetaldehyd-Derivat hatte unter diesen Bedingungen eine Retentionszeit von etwa 11,6 min.

Die Analyse von Sulfoacetaldehyd durch HPLC-Analyse konnte nur qualitativ erfolgen (s. 3.3.8), da das Eichmaterial als Bisulfitaddukt vorlag und sich dieses nicht zu 100 % in das Aldehyd umwandeln ließ. Die vollständige Umwandlung des Bisulfitadduktes in das Aldehyd gelang auch mittels einer Methode nach White nicht. Bei dieser Methode wurde die Probe mit HCl angesäuert und anschließend mit Stickstoff begast, wobei Sulfit abgespalten werden sollte (White 1988). Dies erfolgte jedoch nicht.

Zur Quantifizierung von Sulfoacetaldehyd wurde daher in dieser Diplomarbeit ein Enzym-Assay etabliert (s. 3.3.8).

3.4.5 Ionenchromatographie

Die Quantifizierung von Sulfat, Phosphat, Isethionat, Sulfoacetat und Phosphonoacetat wurde mit einem Ionenchromatographen (Sykam, Fürstenfeldbruck) durchgeführt. Zur Quantifizierung von Produkten aus Wachstumsversuchen wurden Proben entnommen, abzentrifugiert und die Überstände auf den Ionenchromatographen aufgetragen. Über eine Probenschleife wurden jeweils 50 µl Probe injiziert. Die Trennung erfolgte mit Anionenaustauscher-Säulen (Säulen 3 AS oder LCA A03, Sykam) als stationärer Phase und einem Eluenten (5 mM Na_2CO_3; 0,005 % (w/v) 4-Hydroxybenzonitril; 10 % (v/v) Acetonitril) als mobiler Phase. Die Flussrate betrug 1,5 bis 2 ml min^{-1} und die Temperatur des Säulenofens 40 oder 50 °C. Die zwei Suppressorsäulen (suppressor units S 4260A und S4260B, Sykam) wurden automatisch abwechselnd in Betrieb genommen und in den Zwischenzeiten mit 0,5 M H_2SO_4 und Millipore-Wasser

regeneriert. Die Detektion der Anionen erfolgte über einen Leitfähigkeitsdetektor (S3110, Sykam), und die Chromatogramme wurden mittels Software (Peak Simple, Sykam) aufgezeichnet. Die getrennten Substanzen wurden durch den Vergleich von Retentionszeiten und Peakflächen mit Standards bekannter Konzentration sowie durch Cochromatographie mit Referenzmaterial identifiziert und quantifiziert.

Isethionat und Sulfat wurden mit Säule 3 AS gemessen, Sulfoacetat und Phosphonoacetat mit Säule LCA A03. Phosphat konnte mit beiden Säulen bestimmt werden. Die Methode zur Messung von Isethionat wurde von Katharina Styp von Rekowski optimiert (Styp von Rekowski 2004). Die Temperatur des Säulenofens betrug nur für die Phosphonoacetat-Messung 50 °C, für alle anderen Messungen 40 °C.

3.4.6 Analyse der N-terminalen Aminosäuresequenz

Zur Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz der Sulfoacetaldehyd-Dehydrogenase aus *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 wurde ca. 1 bis 2 nmol Protein aus einem 10 %igen SDS-Polyacrylamid-Gel mit einem Semi-Dry-Blotsystem (Semi-Phor, Hoefer Scientific Instruments) auf eine PVDF-Membran (Hybond, Amersham) übertragen, die zuvor nach Angaben des Herstellers behandelt worden war. Als Transferlösung wurde 10 mM CAPS pH 11 in 10 % Methanol verwendet. Der Transfer erfolgte bei 35 mA innerhalb von 2 h. Das Gel wurde nach dem Elektroblot angefärbt, um den Transfererfolg zu beurteilen. Die Membran wurde nach Angaben des Herstellers gefärbt, anschließend entfärbt und gründlich getrocknet. Die gewünschte Proteinbande wurde aus der Membran ausgeschnitten, in ein Eppendorf-Cup überführt und bis zum Versand bei –20 °C gelagert.

Die Sequenzierung der N-terminalen Aminosäuresequenz wurde unter Auftrag von Dr. Wippermann (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Reh, Fachhochschule Bingen, Deutschland) über automatisierten Edman-Abbau durchgeführt.

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 Herkunft der Genomsequenzen

Die verwendeten Sequenzen des Bakteriums *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 (Larimer *et al.* 2004) stammten aus einer Datenbank im Internet (http://genome.ornl.gov/microbial/rpal/).

3.5.2 Amplifikation durch Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für PCR-Amplifikationen von DNA-Fragmenten wurde ein Thermoblockgerät der Firma Biometra, Modell T*personal* 48, verwendet. Die Reaktionen wurden mithilfe von thermostabiler DNA-Polymerase mit Taq-Exonukleaseaktivität der Firma Eppendorf und Primern der Firma Hermann GbR Synthetische Biomoleküle (Freiburg, Deutschland) durchgeführt.

Ganze Zellen aus einer Bakterienkultur wurden 5-fach konzentriert als Template eingesetzt. Die Ansätze setzten sich wie folgt zusammen:

Tabelle 3-2: Ansatz der PCR-Reaktionen

Stammlösung	20 µl Ansatz	Konzentration im Ansatz
DNA-Polymerase (5U/µl)	0,2 µl	1 unit
Puffer P2*	2 µl	2,25 mM $MgCl_2$
100 % DMSO	2 µl	10 %
dNTP-Mischung (10 mM)	1 µl	0,5 mM
Primer 1 und 2 (je 3 µM)	je 2 µl	je 0,3 µM
Template	2 µl	s.o.
Millipore-Wasser	8,8 µl	

*Puffer P2: 22,5 mM $MgCl_2$, 500 mM Tris/HCl und 140 mM $(NH_4)_2SO_4$, pH 9,2

Zur Amplifizierung von *tauY* wurden folgende Primersequenzen verwendet:

tauYcons-f: 5'-taygcgccgacctactggrycg-3'

tauYcons-r: 5'-cgcggcatcatgtcgtggctsac-3'

Die Primer wurden in der Arbeitsgruppe von bekannten *tauY*-Sequenzen aus α- und β-Proteobakterien abgeleitet (Brüggemann *et al.* 2004). Zur Amplifizierung des *tauY*-Gens wurde folgendes PCR-Programm verwendet:

Tabelle 3-3: PCR-Programm zur Amplifizierung von *tauY*

Reaktionsschritt	Zeit (min)	Temperatur (°C)	Zyklen
Vordenaturierung	4 min	94	1
Denaturierung	30 sec	92	9
Annealingphase	30 sec	62 (-0,5 / Zyklus)	
Elongationsphase	90 sec	72	
Denaturierung	30 sec	92	24
Annealingphase	30 sec	58	
Elongationsphase	90 sec	72	
Nachelongation	5 min	72	1

Als Positivkontrolle diente DNA aus *Paracoccus denitrificans* NKNIS (Brüggemann *et al.* 2004).

Es wurden außerdem Sequenzierungen der 16S-ribosomalen DNA durchgeführt, um Isolate aus Anreicherungskulturen zu identifizieren. Zur Sequenzierung der 16S-ribosomalen DNA wurde zunächst mit Hilfe von äußeren Primern in einer vorgeschalteten PCR ein ca. 1,4 kbp langes Fragment der 16S-rDNA amplifiziert (s. Tabelle 3-4). Folgende Primersequenzen wurden verwendet (Weisburg *et al.* 1991):

16S-27f: 5'-cagagtttgatcctggctcag-3'

16S-1492r: 5'-tacggytaccttgttacgactt-3'

Für die sich anschließende Sequenzierreaktion (s. 3.5.5) wurden interne Primer verwendet, die in der AG Cook von Dr. Jürgen Ruff abgeleitet wurden.

Tabelle 3-4: Programm zur Amplifizierung der 16S-ribosomalen DNA

Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur (°C)	Zyklen
Vordenaturierung	5 min	94	1
Denaturierung	30 sec	92	9
Annealingphase	30 sec	52 (-0,5 / Zyklus)	
Elongationsphase	1 min	72	
Denaturierung	30 sec	94	15
Annealingphase	30 sec	47	
Elongationsphase	1 min	72	
Nachelongation	5 min	72	1

3.5.3 Reinigung von PCR-Produkten

Für die Reinigung von PCR-Produkten zur späteren Verwendung als Sequenziertemplate wurde der „QIAquick PCR Purification Kit“ (Firma Quiagen, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers verwendet, wobei abweichend der Ethanol-Waschschritt zweimal durchgeführt und zwischen Waschen und Elution der gereinigten DNA eine etwa zweiminütige Trocknung eingeschoben wurde. Zur Elution wurde das verwendete Wasser zuvor erwärmt.

3.5.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Größe und Reinheit der PCR-Produkte und gereinigten DNA-Fragmente wurden durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Dafür wurden 20 ml TBE-Puffer (89 mM Tris-Borat, 0,2 mM EDTA, pH 8) und 1 % (w/v) Agarose in einem Mikrowellengerät erhitzt, bis die Agarose gelöst war, und in einer Mini-Gelkammer bis zum Erstarren abgekühlt. Nach dem Erstarren wurde das Gel in eine Gelkammer mit TBE-Puffer gelegt. Die Proben wurden mit 4-fach-Probenpuffer (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) versehen und in die Geltaschen pipettiert. Die Laufzeit des Gels betrug 30 min bei einer Spannung von 180 V (entspricht etwa 27 V (cm Gellänge)$^{-1}$). Das Gel wurde anschließend für 10 min in einer Ethidiumbromid-Lösung unter Schütteln angefärbt und für 10 min mit Wasser gewaschen. Die gefärbten DNA-Fragmente wurden durch UV-Licht einer Foto-Dokumentationsanlage (GelDoc 1000, BioRad mit

Multi Analyst 1.0.2, BioRad) sichtbar gemacht und als Bilddatei im Computer gespeichert.

3.5.5 Sequenzierung

Die Sequenzierung von PCR-Produkten erfolgte durch „Cycle-Sequencing“ mit fluoreszenzmarkierten Terminations-ddNTPs, wobei die Reaktion mithilfe des „Applied Biosystems BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit“ (ABI, Foster City, USA) durchgeführt wurde. Der Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Tabelle 3-5: Sequenzieransatz

Substanz	**Menge pro 10 µl-Ansatz**
Template	30-80 ng DNA / kb Länge
100 % DMSO	0,5 µl
5-fach-Sequenzierpuffer	1 µl
Primer	1,5 µl
Big Dye Kit RR-100 (mit ddNTPs)	1,5 µl

Als Sequenziertemplate wurde gereinigtes PCR-Produkt (s. 3.5.3) verwendet und mit 30 bis 80 ng DNA pro 1 kb Templatelänge im Reaktionsansatz eingesetzt. Die folgenden Primer für die Sequenzierreaktion wurden in der Arbeitsgruppe abgeleitet:

16S-533f: 5’-gtgccagcagccgcggtaa-3’

16S-907r: 5’-cccgtcaattcmtttgagttt-3’

Die Sequenzierreaktion wurde mit folgendem Programm durchgeführt (modifiziert nach „ABI Prim® Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits“-Handbuch):

Tabelle 3-6: Programm zur Sequenzierung von PCR-Produkten

Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur (°C)	Zyklen
Vordenaturierung	70 sec	95	1
Denaturierung	20 sec	95	25
Annealingphase	20 sec	50	
Elongationsphase	4 min	60	

Die Produkte der Sequenzierreaktion wurden gelelektrophoretisch in einem PE-ABI-377-Sequenzierautomaten als Auftragsarbeit bei der Firma GATC Biotech AG in Konstanz analysiert. Die Ergebnisse wurden als digitalisierte Elektropherogramme auf der Homepage von GATC (http://www.gatc.de/) zum Herunterladen zur Verfügung gestellt. Die Auswertung der Elektropherogramme erfolgte mithilfe des Programms EditView (Firma ABI).

3.5.6 Analyse der Nukleotidsequenzen und Datenbankrecherchen

Programme des DNAStar-Programm-Pakets wurden zur Sequenzverknüpfung (Seqman) und für Sequenzanalysen (EditSeq) verwendet.

Die Suche nach DNA-Abschnitten, zu denen die Sequenzabschnitte Homologien aufwiesen, erfolgte via Internet in der NCBI-Datenbank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) über das Suchprogramm BLAST („Basic Local Alignment Search Tool“, (Altschul *et al.* 1997)). Die eingegebene Sequenz wird dabei mit den Sequenzen der Datenbank verglichen, und die Angabe über die Höhe der Homologie erfolgt entsprechend als Anzahl gleicher Nukleotide in Bezug auf den homologen Sequenzabschnitt.

4 Ergebnisse

4.1 *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 und dessen Taurin-Stoffwechsel

4.1.1 Morphologische und cytologische Eigenschaften

Es konnte durch mikroskopische Untersuchungen bestätigt werden, dass es sich bei *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 um ein bewegliches Bakterium handelte. Die Zellen waren stäbchenförmig und besaßen eine Breite von etwa 0,6 bis 2 µm sowie eine Länge von etwa 1 bis 5 µm. Eine Gram-Typ-Bestimmung zeigte, dass das Bakterium gramnegativ war. Das Purpurbakterium wies aufgrund seiner photosynthetischen Pigmente (Bakteriochlorophyll a sowie verschiedene Carotinoide) eine rötliche Farbe auf. Die ausgewachsene Kultur in Flüssigmedium sowie auf Agarplatte, das Zellpellet und der zellfreie Extrakt waren stark rot gefärbt; nach der Ultrazentrifugation besaß die Membranfraktion diese rote Farbe, wohingegen die lösliche, cytoplasmatische Fraktion gelblich-orangefarben war.

4.1.2 Physiologische Eigenschaften

4.1.2.1 Wachstumskurve

In der vorliegenden Arbeit wurde der Bakterienstamm *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 heterotroph kultiviert und konnte unter diesen Bedingungen Taurin als alleinige Schwefelquelle sowie als alleinige Stickstoffquelle, nicht aber als Kohlenstoffquelle nutzen. Während des Wachstums mit Taurin als alleiniger Stickstoffquelle wurde kein Sulfat freigesetzt, sondern ein Organosulfonat ausgeschieden: Sulfoacetat (Denger *et al.* 2004b).

In einem Wachstumsversuch mit etwa 3 mM Taurin als alleiniger Stickstoffquelle sowie 10 mM D,L-Malat als alleiniger Kohlenstoffquelle (s. Abbildung 4-1) wurden die Taurin-Abnahme sowie die Bildung von Sulfoacetat und Ammonium gemessen (s. Abbildung 4-2).

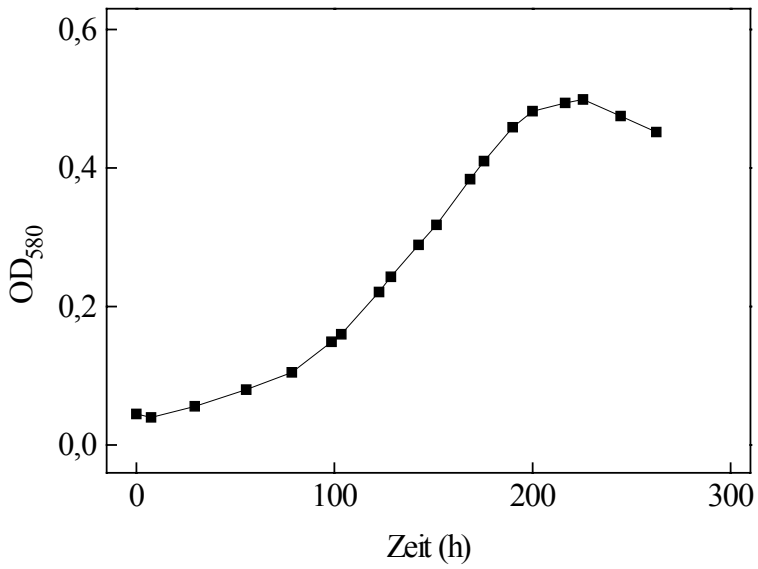

Abbildung 4-1: Wachstum von *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 mit Taurin als alleiniger Stickstoffquelle. ■, OD_{580}.

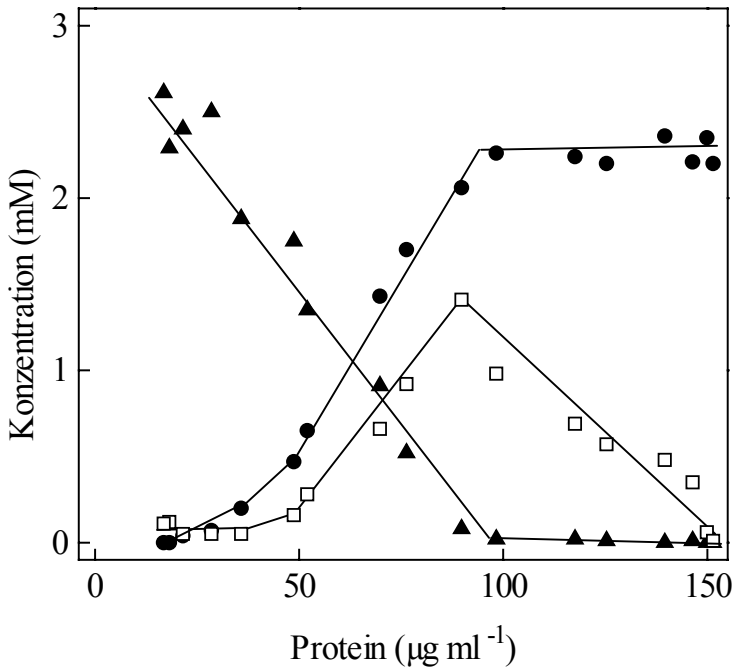

Abbildung 4-2: Substratverbrauch und Produktbildung während des Wachstums von *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 mit Taurin als alleiniger Stickstoffquelle. ▲, Taurin; ●, Sulfoacetat; □, Ammonium.

Taurin wurde derivatisiert und durch anschließende HPLC-Analyse detektiert, Ammonium wurde kolorimetrisch am Photometer gemessen. Sulfoacetat konnte mittels Ionenchromatographie als Produkt identifiziert und quantifiziert werden, wobei der Sulfoacetat-Peak deutlich vom 50 mM Phosphat-Peak des Medium getrennt war. In dem Wachstumsversuch (s. Abbildung 4-2) konnte die Abnahme von Taurin beobachtet werden sowie die stöchiometrische Bildung von Sulfoacetat. Jedoch zeigten der Taurin-Verbrauch und die Sulfoacetat-Bildung einen unüblichen Verlauf: Sie erfolgten wesentlich schneller als das Wachstum der Kultur selbst. Bereits nach knapp zwei Drittel des erfolgten Wachstums war Taurin vollständig abgebaut und die maximale Menge an Sulfoacetat gebildet. Gleichzeitig mit der Taurin-Abnahme konnte eine Ausscheidung von Ammonium in das Kulturmedium beobachtet werden. Das ausgeschiedene Ammonium wurde nach vollständigem Abbau von Taurin weiter verbraucht, also vermutlich wieder in die Zelle aufgenommen und bis zum Ende des Wachstums als Stickstoffquelle verwendet. Nachdem offenbar ein Enzym benötigt wird, welches aus Taurin Ammonium freisetzt, wurde im Verlauf der vorliegenden Arbeit nach einem solchen Enzym gesucht (s. 4.1.3.1 und 4.1.3.1).

4.1.2.2 Wachstumsparameter

Bei dem eben beschriebenen Wachstumsversuch wuchs die Kultur mit einem Inokulum von 1 % (v/v) unter oxischen Bedingungen innerhalb von 10 Tagen bis zu einer stationären Phase mit einer OD_{580} von 0,5. Dies entsprach einer Wachstumsrate von 0,013 h^{-1} und einer Verdopplungszeit von 55 h, der errechnete molare Ertrag betrug 58 g Protein (mol Stickstoff)$^{-1}$. Aus Wachstumsrate und Ertrag ließ sich eine spezifische Abbaurate von 0,06 mkat (kg Protein)$^{-1}$ errechnen.

4.1.3 Enzyme im Abbauweg von Taurin zu Sulfoacetat

4.1.3.1 Taurin:Pyruvat-Aminotransferase (Tpa) und Taurin:2-Oxoglutarat-Aminotransferase

Die Taurin:Pyruvat-Aminotransferase katalysiert die Übertragung der Aminogruppe von Taurin auf Pyruvat unter Bildung von Alanin. Die Aminogruppe von Alanin wird im Anschluss von der Alanin-Dehydrogenase (Ald) als Ammonium freigesetzt, um den

Aminogruppenakzeptor Pyruvat zu regenerieren und der Zelle freies Ammonium für das Wachstum zur Verfügung zu stellen.

In *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 wurde mittels diskontinuierlichem Enzymtest untersucht, ob die Aktivität einer Tpa nachweisbar war. Dabei wurden während der Enzymreaktion Proben entnommen, derivatisiert und anschließend mittels HPLC analysiert. Es konnte jedoch keine Taurin-Abnahme und auch keine Alanin-Bildung nachgewiesen werden. Auch eine Ald-Aktivität wurde in einem kontinuierlichen Enzymtest am Photometer nicht gefunden.

Weiterhin wurde untersucht, ob stattdessen die Transaminierung von Taurin evtl. über eine Taurin:2-Oxoglutarat-Aminotransferase verlaufen könnte. Als Aminogruppenakzeptor wurde hierbei 2-Oxoglutarat eingesetzt. Im Anschluss an die Enzymreaktion wurden auch diese Proben derivatisiert und per HPLC auf Taurin sowie auf Glutamat hin analysiert, jedoch konnte keine Bildung von Glutamat beobachtet werden.

Somit konnte weder die Aktivität einer Tpa noch die einer Taurin:2-Oxoglutarat-Aminotransferase festgestellt werden (s. Abbildung 4-3).

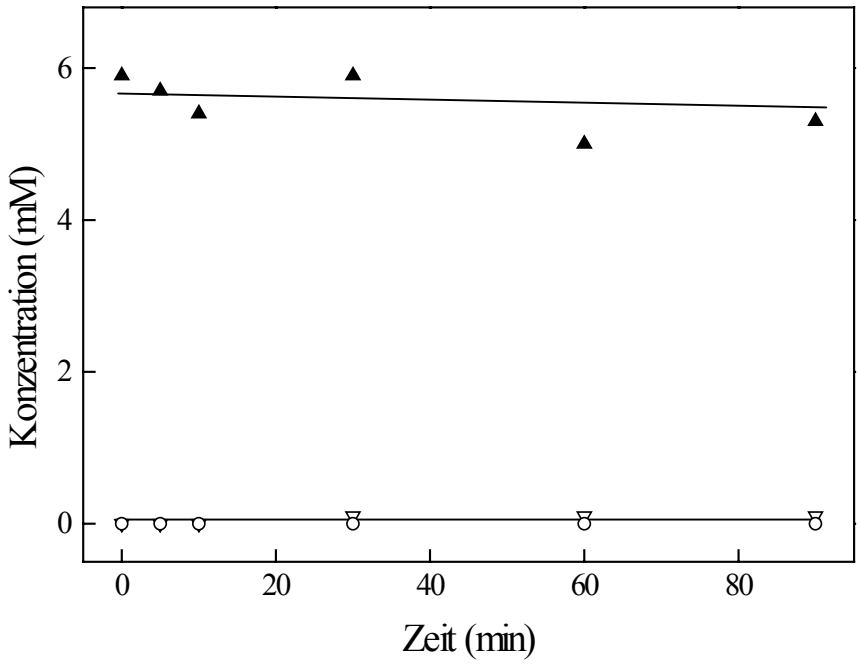

Abbildung 4-3: Enzymtest zur Messung einer möglichen Taurin-Transaminase. ▲, Taurin; ○, Glutamat; ▽, Alanin;

4.1.3.2 Taurin-Dehydrogenase (TDH)

Die TDH katalysiert die Reaktion von Taurin zu Sulfoacetaldehyd und besteht aus zwei Untereinheiten: TauX und TauY (Ruff *et al.* 2003; Brüggemann *et al.* 2004). In *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 sollte die Anwesenheit des Gens für TauY bestätigt und das Enzym auch auf biochemischer Ebene nachgewiesen werden.

4.1.3.2.1 Molekularbiologische Ergebnisse

Wie bereits erwähnt (s. 2.2), konnte im Genom von *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 ein Gen *in silico* gefunden werden, welches Ähnlichkeiten zu dem bereits bekannten *tauY*-Gen aufwies. Es wurde eine PCR durchgeführt, um zu bestätigen, dass sich tatsächlich das Gen für eine TDH in *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 befindet. Hierfür wurden konservierte Primer verwendet, die zur Amplifizierung eines 1 kb großen *tauY*-Fragments in α- und β-Proteobakterien verwendet werden können. Die Anwesenheit von *tauY* in *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 konnte bestätigt werden, indem durch die eben beschriebene PCR ein 1 kb großes Fragment gefunden wurde (Abbildung nicht gezeigt).

4.1.3.2.2 Biochemische Ergebnisse

Um die Aktivität der TDH auf biochemischer Ebene nachzuweisen, wurden Enzymtests in verschiedenen Puffern (Kaliumphosphatpuffer sowie Tris/HCl-Puffer) und bei verschiedenen pH-Werten (pH 6 bis pH 9,5) durchgeführt. Weiterhin wurden als Elektronenakzeptoren DCPIP sowie Cytochrom *c* getestet. Zur Herstellung von zellfreien Extrakten wurden die Kulturen in verschiedenen Wachstumsphasen geerntet (frühe, mittlere sowie späte exponentielle Phase), und es wurde außerdem versucht, das Enzym mit erneuter Taurin-Zugabe zu induzieren. Es konnte jedoch keine TDH-Aktivität gemessen werden.

4.1.3.3 Sulfoacetaldehyd-Dehydrogenase (SAA-DH)

Die SAA-DH katalysiert die Oxidation von Sulfoacetaldehyd (SAA) zu Sulfoacetat unter Bildung von NADH, welche mittels kontinuierlichem Enzymtest am Spektralphotometer nachvollzogen werden kann (Denger *et al.* 2004b).

Mit Ammonium als Stickstoffquelle gewachsene Zellen besaßen keine SAA-DH-Aktivität. Dagegen war in zellfreiem Extrakt von Kulturen, die mit Taurin gewachsen

waren, eine SAA-DH-Aktivität messbar, der Elektronenakzeptor NAD^+ wurde dabei reduziert. Ohne Zugabe von Substrat (SAA) oder Cosubstrat (NAD^+) sowie mit hitzeinaktiviertem zellfreien Extrakt konnte keinerlei Aktivität gemessen werden. Die Aktivität der SAA-DH betrug unter den anfangs verwendeten Bedingungen in zellfreiem Extrakt 0,04 mkat (kg Protein)$^{-1}$. Durch mehrere Verbesserungen (s. Abbildung 4-4) konnte eine über das 20-fache gesteigerte Aktivität gemessen werden, sodass schließlich die Aktivität im zellfreien Extrakt bei 0,8 bis 1,2 mkat (kg Protein)$^{-1}$ lag.

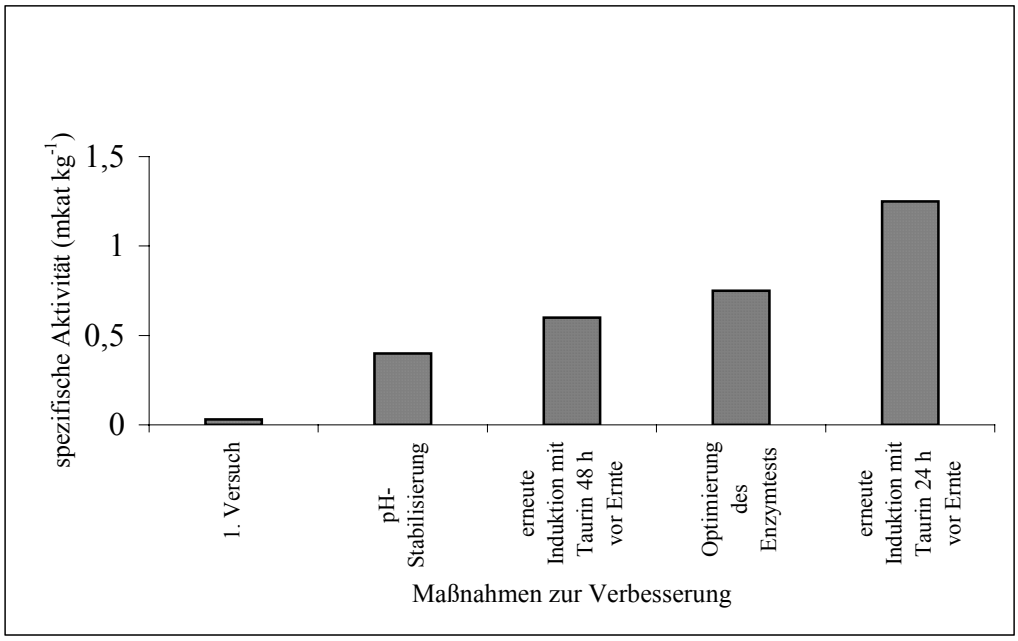

Abbildung 4-4: Die Steigerung der spezifischen Aktivität der SAA-DH durch verschiedene Faktoren.

Optimiert wurden dabei sowohl der Enzymtest als auch die Anzucht der Bakterien selbst. Zu Beginn der Arbeit wurde *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 mit 20 mM Malat als Kohlenstoffquelle angezogen, es stellte sich aber nach pH-Messungen im Kulturüberstand heraus, dass diese Menge der Dicarbonsäure den pH-Wert im Verlauf des Wachstums in den alkalischen Bereich (von pH 7,2 auf ca. pH 8,5) verschob und das Enzym unter diesen Bedingungen geringer induziert war. Für weitere Versuche wurde Malat in einer geringeren Konzentration (10 mM) eingesetzt.

Eine weitere Steigerung der Aktivität konnte erzielt werden, indem 48 h vor der Ernte der Zellen erneut 2 mM Taurin zugegeben wurde, um eine stärkere Induktion des

Enzyms zu erreichen. Bei einer Messung von Sulfoacetat im Kulturüberstand kurz vor der Ernte wurde jedoch festgestellt, dass 48 h nach der erneuten Taurin-Zugabe bereits sämtliches Taurin zu Sulfoacetat umgesetzt worden war. Somit bestand die Möglichkeit, dass das Enzym bereits wieder schwächer induziert war. Tatsächlich konnte die Aktivität weiter gesteigert werden, wenn erst 24 h vor der Ernte erneut Taurin zugegeben wurde. Eine weitere Verbesserung wurde erreicht durch eine Optimierung des Enzymtests, indem festgestellt wurde, dass die Aktivität bei einem pH von 9,0 höher war als bei einem pH von 7,2.

4.1.4 Eigenschaften der Sulfoacetaldehyd-Dehydrogenase (SAA-DH)

Die Reaktion der SAA-DH in *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 wurde genauer charakterisiert. Zu diesem Zweck wurden pH- und Temperatur-Optimum der Reaktion ermittelt sowie Substrattests durchgeführt und die K_m^{app}-Werte der SAA-DH für die verschiedenen Substrate und Cosubstrate ermittelt.

Zur Bestimmung des pH-Optimums wurde lösliche Fraktion (0,1 mg Protein ml^{-1}) aus Taurin-gewachsenen Zellen verwendet, das pH-Optimum der Reaktion der SAA-DH lag bei etwa pH 9,0 (s. Abbildung 4-5).

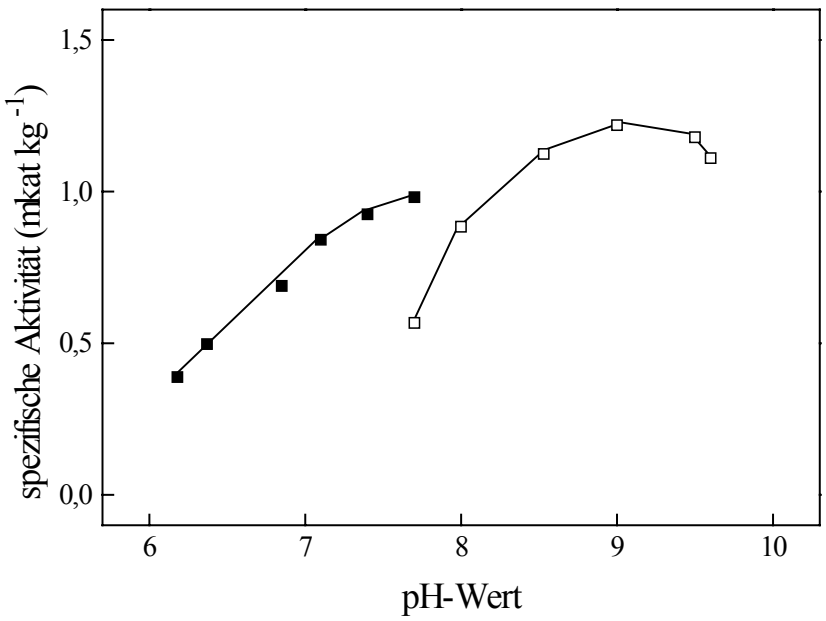

Abbildung 4-5: Abhängigkeit der SAA-DH-Aktivität vom pH-Wert des Reaktionspuffers. ■, Messung erfolgte in KP-Puffer; □, Messung erfolgte in Tris/HCl-Puffer.

Zur Bestimmung des Temperatur-Optimums wurde ebenfalls lösliche Fraktion (0,3 mg Protein ml^{-1}) eingesetzt. Der Enzymtest fand in einem durch ein Wasserbad beheizbaren Küvettenblock statt, die Temperatur wurde in der Küvette selbst gemessen. Mit Steigern der Temperatur stieg die Aktivität beständig bis zu einem Optimum von etwa 40°C an, sank dann wieder bis zu einem Wert von 50 °C, und ab einer Temperatur von 55°C fielen massiv Proteine in der Küvette aus, und es war keine Aktivität mehr zu messen (s. Abbildung 4-6).

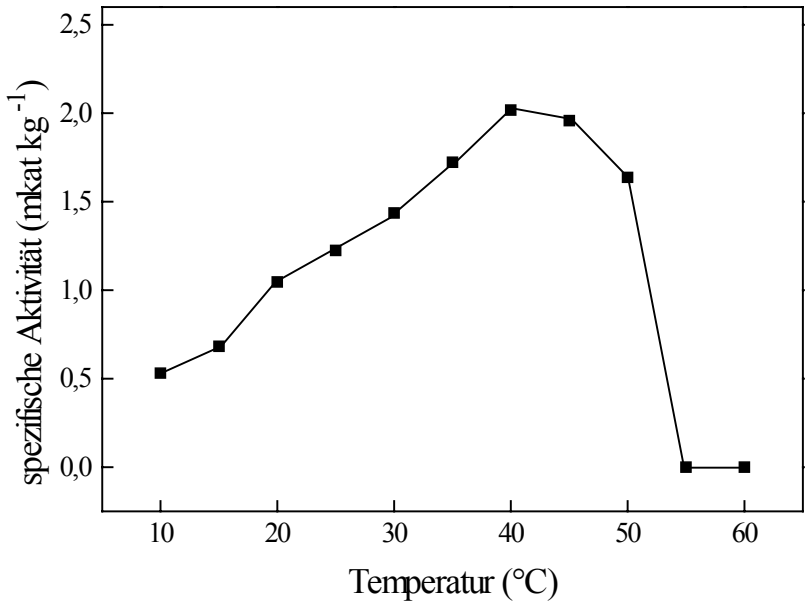

Abbildung 4-6: Abhängigkeit der SAA-DH-Aktivität von der Temperatur.

Die folgenden Versuche wurden mit einer aktiven Fraktion (0,03 mg Protein ml^{-1}) einer ersten Anionenaustauschchromatographie (s. 4.1.5.3) durchgeführt. In einem Substrattest wurde untersucht, ob Substrate, die dem SAA strukturell ähneln, ebenfalls von der SAA-DH umgesetzt werden können; getestet wurden Acetaldehyd sowie Phosphonoacetaldehyd. Keiner der beiden Stoffe konnte von der SAA-DH umgesetzt werden. Außerdem wurde getestet, ob $NADP^+$ ebenfalls als Cofaktor dienen kann; die spezifische Aktivität bei Einsetzen von $NADP^+$ statt NAD^+ betrug dabei nur etwa 35 bis 38 % jener Aktivität, die mit NAD^+ als Elektronenakzeptor gemessen wurde.

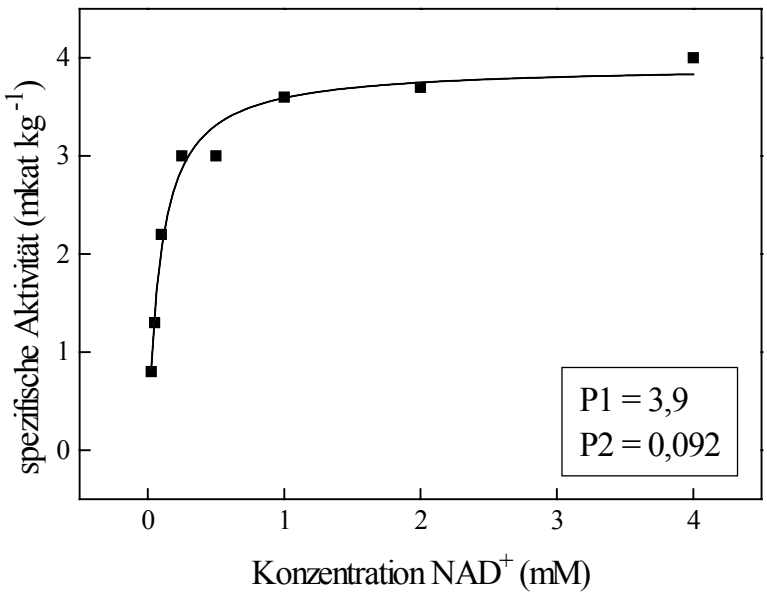

Abbildung 4-7: Hyperbolischer Plot zur Bestimmung des K_m^{app}-Wertes der SAA-DH für NAD^+. P1 entspricht V_{max}, P2 entspricht K_m^{app}.

Der bestimmte K_m^{app}-Wert der SAA-DH für SAA war sehr niedrig und betrug 26 µM, der K_m^{app}-Wert für NAD^+ war mit 92 µM ebenfalls sehr niedrig (s. Abbildung 4-7), woraus resultiert, dass die SAA-DH eine sehr hohe Affinität für ihr Substrat als auch für ihren Cofaktor besaß. Im Gegensatz dazu betrug der K_m^{app}-Wert der SAA-DH für $NADP^+$ 12 mM und war damit, wie nach dem Substrattest zu erwarten, vergleichsweise hoch.

4.1.5 Reinigung der Sulfoacetaldehyd-Dehydrogenase (SAA-DH)

4.1.5.1 Ernte und Aufbereitung des zellfreien Extrakts

Zur Reinigung der SAA-DH wurden die Zellen aus 2 l Kultur mit einer French-Pressure-Zelle aufgeschlossen, die DNA des zellfreien Extrakts wurde mit Streptomycinsulfat gefällt und abzentrifugiert. Da dies eine Verringerung der Aktivität des Enzyms um ca. 25 % mit sich brachte, wurde bei weiteren Experimenten stattdessen Protaminsulfat zur DNA-Fällung verwendet. Im Anschluss an die Fällung der DNA wurde eine Ultrazentrifugation durchgeführt, welche zu zwei Fraktionen führte, der Membranfraktion und der löslichen, cytoplasmatischen Fraktion. Die Aktivität der

SAA-DH fand sich ausschließlich in der cytoplasmatischen Fraktion wieder. Die lösliche Fraktion konnte bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C ohne signifikanten Aktivitätsverlust gelagert werden.

4.1.5.2 Ammoniumsulfatfällung

Für einen möglichen ersten Reinigungsschritt wurde eine zweistufige Ammoniumsulfatfällung in Betracht gezogen. Bei dieser Fällung wurde die lösliche Fraktion auf eine definierte Ammoniumsulfat-Konzentration gebracht, ausgefallene Proteine wurden abzentrifugiert, und der Überstand wurde dann auf eine noch höhere Ammoniumsulfat-Konzentration gebracht. Im ersten Versuch wurden Stufen von 30 % und 70 % Ammoniumsulfat gewählt. Die SAA-DH-Aktivität nach dem ersten Schritt der Fällung fand sich vollständig im Überstand der Lösung wieder. Eine Proteinmessung zeigte, dass auch keine anderen Proteine ausgefallen waren. Nach Erhöhen der Ammoniumsulfat-Konzentration auf 70 % konnte die SAA-DH-Aktivität ausschließlich im Pellet gemessen werden, das heißt, dass die SAA-DH bei dieser Konzentration vollständig ausfiel. Im Überstand fanden sich wiederum keine Proteine, was bedeutet, dass auch alle anderen Proteine der löslichen Fraktion bei einer Ammoniumsulfat-Konzentration von 70 % ausfielen. Nachdem dieser erste Versuch keinen Reinigungserfolg gebracht hatte, wurden andere Ammoniumsulfat-Konzentrationen gewählt, als erste Stufe 40 % und als zweite Stufe 60 % Ammoniumsulfat. Bei der Wahl dieser Stufen fand sich nach dem ersten Fällungsschritt die SAA-DH-Aktivität zu ca. zwei Drittel im Pellet, ein Drittel des Gesamtproteins fand sich ebenfalls dort wieder. Nach Erhöhen der Ammoniumsulfat-Konzentration auf 60 % fand sich die SAA-DH-Aktivität wiederum zu ca. zwei Drittel im Pellet als auch zwei Drittel des Gesamtproteins. Bei beiden Stufen fiel also nur ein Teil der SAA-DH aus, sodass jeweils relativ hohe Verluste in Kauf genommen werden müssten, wenn man mit einer Fraktion (Pellet oder Überstand) weiterarbeiten wollte.

Da sich durch die Ammoniumsulfatfällung mit den bisher getesteten Stufen keine deutliche Reinigung erreichen ließ, wurde die Methode nicht weiter verfolgt.

4.1.5.3 Anionenaustauschchromatographie

Für eine Anionenaustauschchromatographie wurde die Pufferkonzentration der löslichen Fraktion auf die des Laufpuffers eingestellt. Falls dabei Proteine ausfielen, wurden diese abzentrifugiert. Die so behandelte cytoplasmatische Fraktion (zwischen 20 und 70 mg Protein) wurde auf eine MonoQ-Anionenaustauschersäule geladen. Mit einem Gradienten von 0 bis 500 mM Na_2SO_4 über 115 min wurden die Proteine eluiert und gesammelt.

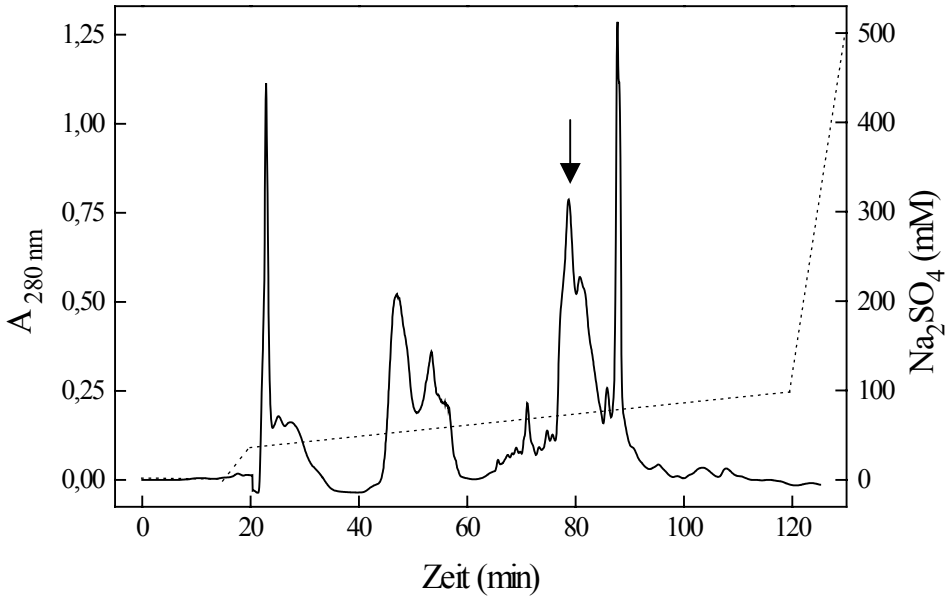

Abbildung 4-8: Chromatogramm einer ersten Anionenaustauschchromatographie. Die gepunktete Linie stellt den Na_2SO_4-Gradienten, die durchgezogene Linie die Absorption bei 280 nm dar. Der Pfeil hebt den Peak hervor, der die hauptsächliche Aktivität der SAA-DH besaß.

Das Chromatogramm (s. Abbildung 4-8) zeigte mehrere deutlich voneinander getrennte proteinhaltige Peaks, die in getrennten Fraktionen (im folgenden MonoQ-Fraktionen genannt) gesammelt und anschließend auf ihre Aktivität hin untersucht wurden. Die SAA-DH eluierte bei etwa 75 mM Na_2SO_4 mit einer spezifischen Aktivität von 5 bis 8 mkat (kg Protein)$^{-1}$ in der aktivsten Fraktion, im Gegensatz dazu zeigten die Nachbar-Fraktionen nur SAA-DH-Aktivitäten zwischen 0 und 1,5 mkat (kg Protein)$^{-1}$. In den restlichen MonoQ-Fraktionen war keine SAA-DH-Aktivität zu messen. Die MonoQ-Fraktion, in der die SAA-DH stets nach der ersten Anionenaustauschchromatographie zu finden war, besaß eine deutliche gelbe Farbe. Im Anschluss an die

Anionenaustauschchromatographie wurde zur Kontrolle jeweils ein Enzymansatz ohne Substrat oder ohne Cosubstrat getestet, und Sulfoacetat wurde nach erfolgter Enzymreaktion am Ionenchromatographen gemessen. Die Reaktion fand nur mit Substrat und Cosubstrat statt, und eine Sulfoacetat-Bildung konnte beobachtet werden, das heißt, bei dem zum Teil gereinigten Protein handelte es sich tatsächlich um die SAA-DH.

Die Reinheit der MonoQ-Fraktion, welche die höchste SAA-DH-Aktivität besaß, wurde durch SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) überprüft (s. Abbildung 4-9, Spur 4). Dafür wurden von allen MonoQ-Fraktionen jeweils 10 µg aufgetragen. Ebenfalls gelelektrophoretisch untersucht wurden zellfreie Extrakte Ammonium- und Taurin-gewachsener Kulturen sowie lösliche Fraktion. In zellfreien Extrakten aus Kulturen, die mit Taurin gewachsen waren, ließen sich keine deutlich induzierten Banden feststellen im Gegensatz zu zellfreien Extrakten aus Kulturen, die mit Ammonium gewachsen waren. In der aktivsten Fraktion einer ersten Anionenaustauschchromatographie befand sich stets die stärkste Bande bei einer apparenten Molekulargewichtsgröße von etwa 75 kDa.

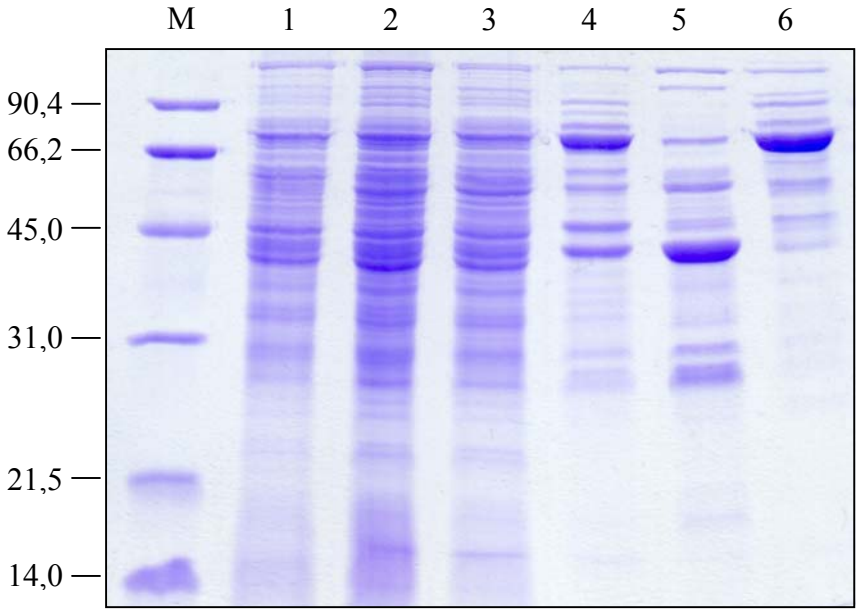

Abbildung 4-9: SDS-PAGE einiger Proben von *Rhodopseudomonas palustris* CGA009. Spur M, Molekulargewichtsmarker; Spur 1, zellfreier Extrakt Ammonium-gewachsener Zellen; Spur 2, zellfreier Extrakt Taurin-gewachsener Zellen; Spur 3, lösliche, cytoplasmatische Fraktion Taurin-gewachsener Zellen; Spur 4, aktivste Fraktion einer ersten Anionenaustauschchromatographie; Spur 5, aktivste Fraktion einer zweiten Anionenaustauschchromatographie; Spur 6, aktivste Fraktion einer Gelfiltration.

Mittels der ersten Anionenaustauschchromatographie konnte eine 8,8-fache Anreicherung erreicht werden mit einer Ausbeute von 28 % (s. Tabelle 4-1). Die Reinheit war jedoch nicht ausreichend, um eine N-terminale Sequenzierung des Enzyms in Lösung durchführen zu können (s. Abbildung 4-9, Spur 4).

Tabelle 4-1: Reinigung der SAA-DH aus Zellen von *Rhodopseudomonas palustris* CGA009. ZE, zellfreier Extrakt; LF, lösliche Fraktion; MQ, MonoQ-Fraktion nach erster Anionenaustausch-chromatographie. Die geringere Ausbeute der löslichen Fraktion ist auf Aktivitätsverluste während der DNA-Fällung mit Streptomycinsulfat zurückzuführen.

Probe	Gesamtprotein (mg)	Gesamtaktivität (µkat)	Spezifische Aktivität (mkat kg^{-1})	Anreicherungs-faktor	Ausbeute (%)
ZE	127,4	0,35	0,8	1,0	100
LF	94,3	0,25	0,9	1,1	72
MQ	0,5	0,10	7,9	8,8	28

Ein nötiger zweiter Reinigungsschritt setzte allerdings voraus, dass das Enzym konzentriert und entsalzt werden konnte. Nach einer Konzentrierung mithilfe eines Konzentrators, dessen Membran eine Ausschlussgröße von 5 kDa besaß, konnte weder im Überstand noch im Durchfluss eine SAA-DH-Aktivität detektiert werden. Eine Vermutung war, dass das Enzym möglicherweise an der Membran haften blieb. Dieses Problem wurde schon bei TsaD (*p*-Sulfobenzaldehyd-Dehydrogenase), ebenfalls einer Aldehyd-Dehydrogenase, beobachtet und gelöst (Junker *et al.* 1997). Wie in der Literatur angegeben, wurde die Konzentratormembran über Nacht mit 20 % Tween inkubiert und vor der Verwendung gründlich mit Wasser gespült. Durch diese Vorbehandlung der Membran konnten nach dem Konzentrieren jedoch lediglich ca. 50 % der SAA-DH-Aktivität wiedergefunden werden. Nach Verwenden von Konzentratoren, deren Membranen Ausschlussgrößen von 20 bis 30 kDa besaßen, konnten die MonoQ-Fraktionen schließlich ohne signifikante Verluste konzentriert, entsalzt oder umgepuffert werden.

Weiterhin setzte ein zweiter Reinigungsschritt eine ausreichende Stabilität des Enzyms in einer MonoQ-Fraktion voraus, was zu Beginn ebenfalls nicht der Fall war. Weder bei Raumtemperatur, noch bei 4°C oder bei –20°C blieb das Enzym zufriedenstellend stabil. Nach 1 bis 2 Tagen war die Aktivität bei MonoQ-Fraktionen, die bei 4°C

gelagert wurden, vollständig erloschen. Bei denjenigen Fraktionen, die bei –20°C gelagert wurden, war die Aktivität um ca. 80 % gesunken. Auch Stabilisationsversuche mit Glycerin oder dem Cofaktor des Enzyms, NAD^+, brachten nicht den gewünschten Erfolg. Dabei wurde den aktiven Fraktionen nach der Anionenaustausch-chromatographie 10 % Glycerin, 5 % NAD^+ oder 10 % NAD^+ zugesetzt, und die Fraktionen wurden bei –20°C gelagert.

Zur Verbesserung der Stabilität trugen schließlich mehrere Faktoren bei: Es wurde für die Anionenaustauschchromatographie eine langsamere Flussrate (1 statt 2 ml min^{-1}) eingestellt, was eine bessere Trennleistung zur Folge hatte, weiterhin wurde eine neue Säule verwendet. Nach Verwenden dieser neuen Säule bestand kein Problem mehr mit der Stabilität: Die MonoQ-Fraktionen blieben nach Lagerung bei –20°C vollständig stabil. Nachdem die Stabilitätsprobleme beseitigt waren, wurde mit einer MonoQ-Fraktion eine zweite Anionenaustauschchromatographie durchgeführt, jedoch bei einem anderen pH als der erste Schritt, der bei pH 7,2 stattfand. Da das pH-Optimum des Enzyms im alkalischen Bereich lag, wurde für den zweiten Reinigungsschritt ein höherer pH gewählt (pH 7,8), Elution und Aktivitätstests wurden gehandhabt wie bei der ersten Anionenaustauschchromatographie.

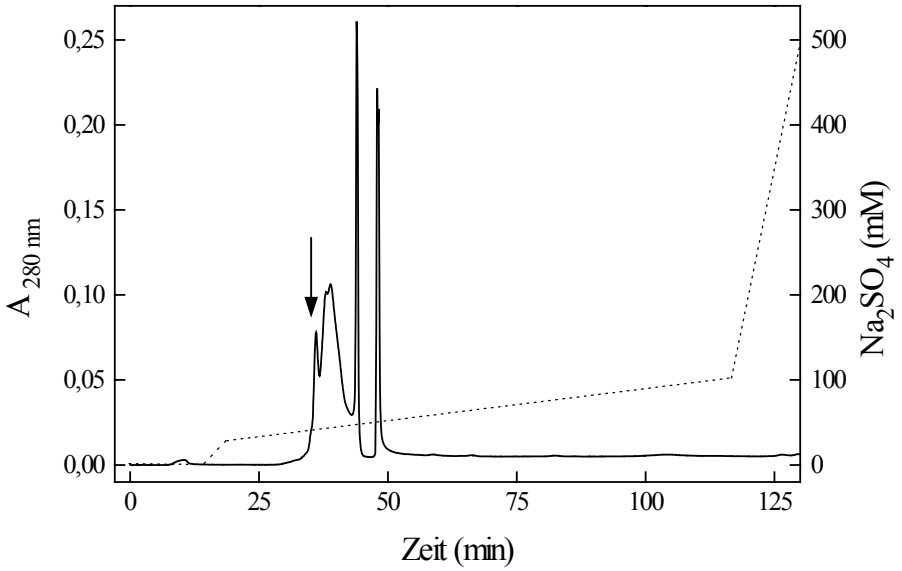

Abbildung 4-10: Chromatogramm einer zweiten Anionenaustauschchromatographie. Die gepunktete Linie stellt den Na_2SO_4-Gradienten, die durchgezogene Linie die Absorption bei 280 nm dar. Der Pfeil hebt den Peak hervor, der die hauptsächliche Aktivität der SAA-DH besaß.

Das Chromatogramm (s. Abbildung 4-10) zeigte wiederum mehrere deutlich voneinander getrennte proteinhaltige Peaks, die erneut manuell fraktioniert und anschließend auf ihre Aktivität hin untersucht wurden. Die SAA-DH eluierte bei etwa 60 mM Na_2SO_4 mit einer spezifischen Aktivität von 28 mkat (kg Protein)$^{-1}$, im Gegensatz dazu zeigten die Nachbar-Fraktionen nur SAA-DH-Aktivitäten zwischen 0 und 2 mkat (kg Protein)$^{-1}$. In den anderen gesammelten MonoQ-Fraktionen war keine SAA-DH-Aktivität zu messen. Die Fraktion, in der die SAA-DH-Aktivität nach der zweiten Anionenaustauschchromatographie zu finden war, war farblos, die gelbe Farbe war in einer inaktiven Nachbarfraktion zu finden. Die Reinheit der Fraktion, welche die höchste SAA-DH-Aktivität besaß, wurde wiederum durch eine SDS-PAGE überprüft. In der aktivsten Fraktion einer zweiten Anionenaustauschchromatographie befand sich die stärkste Bande bei einer apparenten Molekulargewichtsgröße von etwa 40 kDa (s. Abbildung 4-9, Spur 5). Nach zwei Anionenaustauschchromatographien konnte eine 28-fache Anreicherung mit einer Ausbeute von 14 % erreicht werden (s. Tabelle 4-2).

Tabelle 4-2: Verbesserte Reinigung der SAA-DH aus Zellen von *Rhodopseudomonas palustris* CGA009. ZE, zellfreier Extrakt; LF, lösliche Fraktion; 1. MQ, aktivste Fraktion einer ersten Anionenaustauschchromatographie; 2. MQ, aktivste Fraktion einer zweiten Anionenaustauschchromatographie.

Probe	Gesamtprotein (mg)	Gesamtaktivität (µkat)	Spezifische Aktivität (mkat kg^{-1})	Anreicherungsfaktor	Ausbeute (%)
ZE	48,40	0,51	1,0	1,0	100
LF	41,80	0,51	1,2	1,2	100
1. MQ	0,83	0,20	5,4	5,4	40
2. MQ	0,02	0,07	28	28	14

4.1.5.4 Gelfiltration

Das Molekulargewicht der nativen SAA-DH sollte durch Gelfiltration bestimmt werden. Dafür wurden ca. 1,3 mg einer aktiven MonoQ-Fraktion auf eine Superose 12 HR 10/30 Säule geladen und die Retentionszeit mit Eichprotein-Lösungen verglichen.

Allerdings konnte die SAA-DH-Aktivität stets nicht nur in einer, sondern in zwei Fraktionen der Gelfiltration gefunden werden, deren Retentionszeiten 32,1 und 34,8 min betrugen (s. Abbildung 4-11). Somit ließ sich nur feststellen, dass das native

Molekulargewicht der SAA-DH zwischen 80 und 160 kDa lag. Allerdings war die Fraktion, deren Retentionszeit auf ein Molekulargewicht von 160 kDa hindeutete, mehr als doppelt so aktiv (11,7 mkat (kg Protein)$^{-1}$) wie die Fraktion, deren Retentionszeit auf ein geringeres Molekulargewicht hinwies (5,1 mkat (kg Protein)$^{-1}$). Die Reinheit der aktivsten Fraktion wurde wiederum durch eine SDS-PAGE überprüft. In der aktivsten Fraktion einer Gelfiltration befand sich, ebenso wie nach der ersten Anionenaustausch-chromatographie, die stärkste Bande bei einer apparenten Molekulargewichtsgröße von etwa 75 kDa (s. Abbildung 4-9, Spur 6).

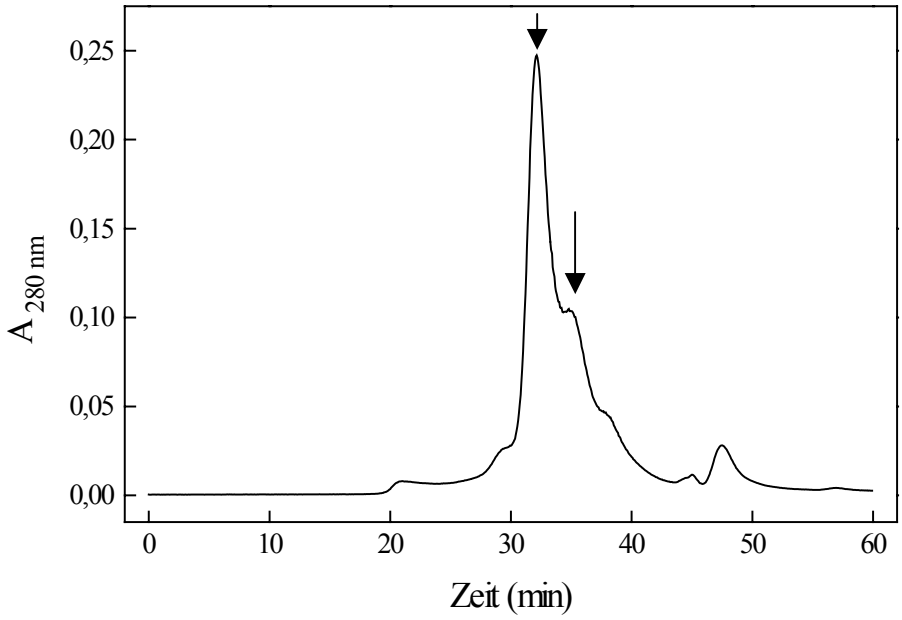

Abbildung 4-11: Chromatogramm einer Gelfiltration. Die Pfeile heben die Fraktionen hervor, in denen die hauptsächliche Aktivität der SAA-DH gefunden wurde.

4.1.6 Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz

Nach zwei Reinigungsschritten war die Reinheit immer noch nicht ausreichend, um eine N-terminale Sequenzierung des Enzyms in Lösung durchführen zu können (s. Abbildung 4-9, Spur 5). Aus Zeitmangel konnten keine weiteren Schritte vorgenommen werden, um das Enzym weiter zu reinigen. Es wurde entschieden, die Banden mit apparenten Molekulargewichtsgrößen von 75 kDa (erster Reinigungsschritt) und 40 kDa (zweiter Reinigungsschritt) mithilfe eines Elektroblots auf eine PVDF-

Membran zu übertragen, um sie anschließend auszuschneiden und N-terminal ansequenzieren zu lassen. Die Proben wurden zu Dr. Wippermann (Fachhochschule Bingen) gesendet, und es wurde die Sequenzierung von 7 Aminosäuren des N-Terminus in Auftrag gegeben, um daraus die Nukleotidsequenz abzuleiten und im Genom von *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 das dazugehörige Gen zu finden. Aus technischen Gründen verzögerte sich die Bearbeitung der Proben in Bingen, sodass die Ergebnisse nicht mehr in die Diplomarbeit einfließen konnten.

4.2 Anreicherungskulturen mit Taurin als alleiniger Stickstoffquelle

Um in Erfahrung zu bringen, in welcher Häufigkeit die verschiedenen Abbaumöglichkeiten von Taurin - insbesondere der Weg von Taurin zu Sulfoacetat - in Bakterien vorkommen, wurden Anreicherungskulturen mit Taurin als alleiniger Stickstoffquelle sowie einem Gemisch aus Kohlenstoffquellen (Glycerin, Glucose und Malat) durchgeführt. Dafür wurden drei Impfgüter verwendet: Belebtschlamm, Ackerboden und Waldboden. Die Impfgüter wurden gründlich gewaschen, um im Impfgut Reste vorhandener Stickstoffquellen zu eliminieren, anschließend wurde Selektivmedium mit je einem Impfgut inokuliert. Durch mehrfaches Überimpfen in frisches Medium und abwechselndes Ausstreichen und Vereinzeln auf Vollmedium und Selektivmedium konnten neun Reinkulturen gewonnen werden, deren Morphologie und Taurin-Stoffwechsel untersucht wurden.

4.2.1 Morphologie und Identität der Anreicherungskulturen

Die neun gewonnenen Reinkulturen wurden mikroskopisch untersucht, und es wurden mehrere morphologische Typen gefunden. Am häufigsten fanden sich dicke, kurze Stäbchen, die unbeweglich waren und zum Teil eine Kapsel besaßen. Weiterhin konnten dünne, längliche Stäbchen beobachtet werden, die zum Teil beweglich und zum Teil unbeweglich waren. Eines der Isolate bestand aus dünnen, kurzen, unbeweglichen Stäbchen (s. Tabelle 4-3).

Von jeweils zwei Vertretern der beiden häufigsten morphologischen Typen wurde eine Analyse der 16S-ribosomalen DNA durchgeführt, um die Reinkulturen phylogenetisch zu analysieren und auf Gattungsebene zu identifizieren. Dazu wurde eine Amplifizierung der 16S-ribosomalen DNA sowie eine anschließende Seqenzierung

eines ca. 400 bp langen Fragments der 16S-ribosomalen DNA durchgeführt. Die gewonnenen Sequenzen wurden mittels BLAST mit anderen Sequenzen aus Datenbanken verglichen und führten zu folgenden Ergebnissen: Bei zwei Reinkulturen mit dem Impfgut Klärschlamm stimmte das sequenzierte Fragment zu 99,9 % bzw. 99,8 % mit Sequenzen aus *Acinetobacter* sp. überein, bei einer Reinkultur mit dem Impfgut Ackerboden zu 99,9 % mit *Pseudomonas putida* und bei einer Reinkultur mit dem Impfgut Waldboden zu 96,5 % ebenfalls mit *Pseudomonas putida* (s. Tabelle 4-3).

4.2.2 Stoffwechselwege von Taurin in den Anreicherungskulturen

Die ausgewachsenen Reinkulturen wurden zuerst auf die Taurin-Abnahme hin getestet, um sicher zu gehen, dass es sich nicht etwa um Stickstoff-fixierende Bakterien handelte, sondern Taurin auch wirklich verstoffwechselt wurde. Eine der neun Kulturen wuchs schlechter als die anderen und baute Taurin nur zu 50 % ab, bei den anderen acht Isolaten war ein vollständiger Abbau von Taurin zu beobachten.

Im Anschluss daran wurden die aus Taurin entstehenden Produkte ermittelt, dafür wurden Sulfat, Sulfoacetat und Isethionat am Ionenchromatographen gesucht. Vier der neun Reinkulturen schieden Isethionat als Endprodukt des Taurin-Stoffwechsels aus, und nur in einer Kultur wurde eine Ausscheidung von Sulfat beobachtet. Sulfoacetat wurde in keinem der neun Fälle gefunden, dafür wurden in vier Kulturen bis dahin nicht identifizierte Peaks im Chromatogramm des Ionenchromatographen aufgezeichnet (s. Tabelle 4-3).

Überstände dieser vier Kulturen wurden mit DIH derivatisiert und durch anschließende HPLC-Analyse analysiert. Mithilfe von Vergleichen mit Standards und durch Cochromatographie konnte in allen vier Fällen die Bildung und Ausscheidung von Sulfoacetaldehyd festgestellt werden. Die Identität des Sulfoacetaldehyds wurde zusätzlich durch MALDI-TOF-Massenspektroskopie bestätigt, welche von Dr. Hollemeyer (Universität Saarbrücken) durchgeführt wurde.

Tabelle 4-3: Auflistung der gewonnenen Reinkulturen und deren Eigenschaften nach Anreicherung mit Taurin als Stickstoffquelle.

Name	BLAST-Treffer	Morphologie	Taurin-Abbau	Produkt
K 1a	n.u.	Dicke, kurze Stäbchen, unbeweglich, Kapsel	+	Sulfoacetaldehyd
K 1b	*Acinetobacter* sp. Stamm TUT 1001 (99,8 %)	Dicke, kurze Stäbchen, unbeweglich, Kapsel	+	Sulfoacetaldehyd
K 2a	*Acinetobacter* sp. Stamm TUT 1001 (99,9 %)	Dicke, kurze Stäbchen, unbeweglich, Kapsel	+	Sulfoacetaldehyd
K 2b	n.u.	Dünne, lange Stäbchen, beweglich	nur zu 50 %	Sulfoacetaldehyd
A 1a	*Pseudomonas putida* AJ (99,9 %)	Dünne, lange Stäbchen, beweglich	+	Isethionat
A 1b	n.u.	Dicke, kurze Stäbchen, unbeweglich, Kapsel	+	Isethionat
W 1a	*Pseudomonas putida* (96,5 %)	Dünne, lange Stäbchen, beweglich	+	Isethionat
W 1b	n.u.	Dünne, kurze Stäbchen, unbeweglich	+	Sulfat
W 1c	n.u.	Dicke, kurze Stäbchen, unbeweglich, Kapsel	+	Isethionat

Verwendete Abkürzungen: K, Klärschlamm; A, Ackerboden; W, Waldboden; n. u., nicht untersucht

4.3 Ausscheidung von Sulfoacetaldehyd in *Acinetobacter* sp. Stamm SW1

Da die Ausscheidung von Sulfoacetaldehyd erstmals beobachtet wurde und ein überraschendes Ergebnis war, wurde eine der Reinkulturen, in denen dieser Stoffwechsel gefunden wurde, weitergehend physiologisch untersucht. Dafür wurde die Reinkultur „K1b“ (s. Tabelle 4-3), die auf Sequenzebene zu 99,8 % als *Acinetobacter* sp. identifiziert wurde, verwendet und wird im Folgenden als *Acinetobacter* sp. Stamm SW1 bezeichnet.

Um den Stoffwechsel des Stammes SW1 weitergehend untersuchen zu können, wurde eine Messung benötigt, mit der sich Sulfoacetaldehyd quantitativ messen ließ. Die Entwicklung einer solchen Methode wird im folgenden beschrieben.

4.3.1 Quantifizierung von Sulfoacetaldehyd durch Etablieren eines Enzym-Assays

In einem Wachstumsversuch mit *Acinetobacter* sp. Stamm SW1 mit 2 mM Taurin als alleiniger Stickstoffquelle sowie 10 mM D,L-Malat als Kohlenstoffquelle wurden Taurin-Abnahme sowie die Bildung von Sulfoacetaldehyd (SAA) und Ammonium gemessen. Taurin wurde mit DNFB derivatisiert und durch anschließende HPLC-Analyse detektiert, Ammonium wurde kolorimetrisch am Photometer gemessen. Die Carbonylgruppe von SAA wurde mit DIH derivatisiert, sodass SAA in der anschließenden HPLC-Analyse qualitativ gemessen werden konnte, wohingegen die Quantifizierung des SAA anfänglich nicht möglich war. SAA ist im Handel nicht käuflich zu erwerben und wurde in der Arbeitsgruppe nach Kondo *et al*. in Form eines Bisulfitadduktes chemisch synthetisiert (Kondo *et al.* 1971). Dieses ließ sich jedoch nicht vollständig in das Aldehyd umwandeln, was problematisch war, da sich das Bisulfitaddukt vermutlich nicht so gut derivatisieren ließ wie das freie Aldehyd, das in den Bakterien aus Taurin gebildet wurde. Dies führte zu einer Eichgerade, welche zu niedrige Eichwerte vorgab. Es wurde versucht, die komplette Umwandlung des Bisulfitadduktes in das Aldehyd mittels einer Methode nach White zu erreichen (White 1988), was jedoch keinen Erfolg lieferte. Ebenfalls wurde versucht, das in den Bakterien entstandene SAA durch Kochen oder Behandeln mit rauchender

Salpetersäure in Sulfoacetat zu überführen, um dieses mittels Ionenchromatographie zu messen; dies schlug allerdings fehl, da das SAA eine unerwartet hohe Stabilität aufwies. Schließlich gelang es, einen Enzym-Assay zu entwickeln, mithilfe dessen es nun möglich war, das SAA zu quantifizieren. Wie in 3.3.8 beschrieben, wurde dabei die Aktivität des in 4.1.4 charakterisierten Enzyms Sulfoacetaldehyd-Dehydrogenase (SAA-DH) aus R*hodopseudomonas palustris* CGA009 genutzt, um das von *Acinetobacter* sp. Stamm SW1 ausgeschiedene SAA enzymatisch in Sulfoacetat zu überführen und die gleichzeitige NADH-Bildung während dieser Reaktion am Spektralphotometer zu verfolgen (s. Abbildung 4-12).

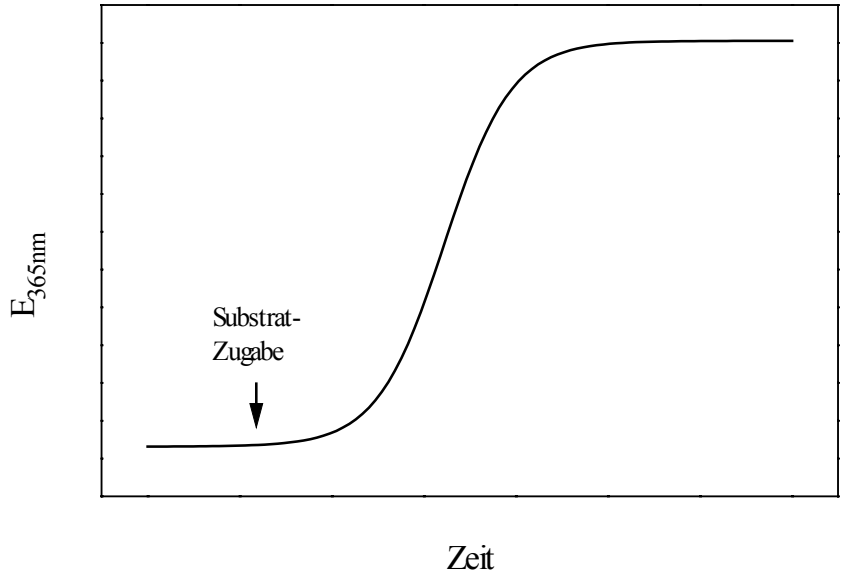

Abbildung 4-12: Skizzierung des durchgeführten Enzymtests. Zur Quantifizierung von SAA wurden zu dem Kulturüberstand von *Acinetobacter* sp. Stamm SW1, der das gebildete SAA enthielt, das Enzym SAA-DH aus *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 sowie dessen Cofaktor NAD^+ zugegeben. Dabei konnte unmittelbar nach der Zugabe von Substrat (SAA) die Bildung von NADH bei einer Wellenlänge von 365nm gemessen werden, bis sämtliches SAA vollständig umgesetzt war.

Über eine Eichgerade konnte das SAA nun quantifiziert werden; im Gegensatz zu den Eichgeraden, die mittels Derivatisierung und HPLC-Analyse erstellt wurden, konnte die Eichgerade des Enzym-Assays zur Quantifizierung verwendet werden, da das Hilfsenzym das Bisulfitaddukt nahezu genauso effektiv umsetzte wie das freie Aldehyd. Dies wurde bewiesen durch Erstellen von zwei Eichgeraden, eine wurde mit Bisulfitaddukt als Eichmaterial erstellt; die zweite wurde anhand von Kulturüberständen

ausgewachsener Kulturen von *Acinetobacter* sp. Stamm SW1 erstellt, die mit jeweils 0,5 bis 2,5 mM Taurin angeimpft worden waren. Nach Auswachsen der „Eichkulturen“ wurde die vollständige Taurin-Abnahme gemessen, um sicher zu stellen, dass sich tatsächlich 0,5 bis 2,5 mM Sulfoacetaldehyd im Kulturüberstand befanden, die nun als Eichmaterial eingesetzt wurden. Die beiden Eichgeraden lieferten - abgesehen von leichten Schwankungen - nahezu gleiche Ergebnisse.

Die so erstellte Eichgerade ermöglichte eine äußerst genaue, schwankungsarme Messung von SAA, was anhand der Doppelbestimmung und des Bestimmtheitsmaßes ($R^2 = 0{,}99$) der Eichgerade sichtbar wurde (s. Abbildung 4-13).

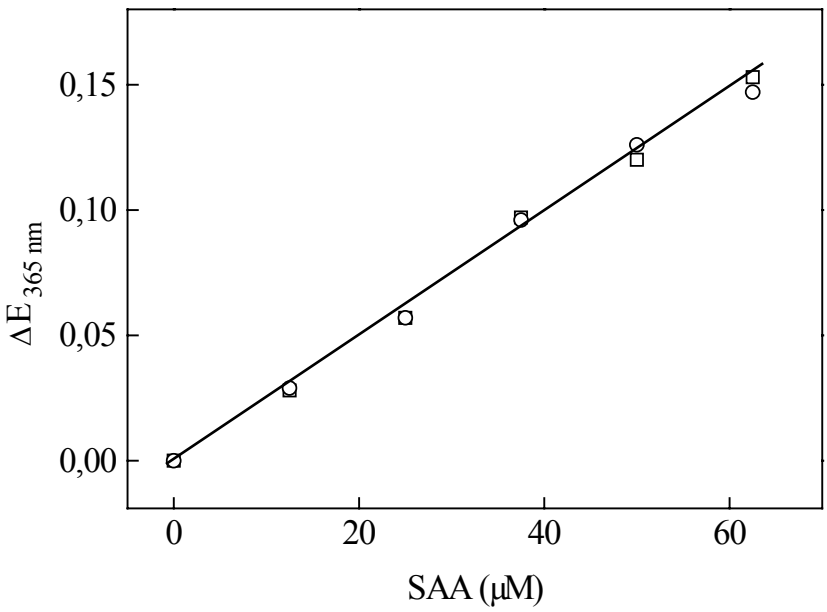

Abbildung 4-13: Eichgerade zur Messung von Sulfoacetaldehyd (SAA).○, □, Doppelbestimmungen.

Das bei der Reaktion gebildete Sulfoacetat wurde zusätzlich am Ionenchromatographen gemessen, wurde allerdings lediglich als Kontrolle für die erfolgte Enzymreaktion und nicht als Messmethode verwendet, denn die Empfindlichkeit dieser Messmethode war wesentlich geringer.

Eine letzte Hürde auf dem Weg zum optimierten Enzymtest stellte die Verwendung von D,L-Malat als Kohlenstoffquelle sowohl für *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 als auch für *Acinetobacter* sp. Stamm SW1 dar: Im ersten Versuch der Quantifizierung von SAA wurde die SAA-DH-Aktivität von einer wesentlich höheren andersartigen

Aktivität überlagert, sodass keine Messung möglich war. Es wurde die Vermutung angestellt, dass es sich bei der überlagernden Aktivität um die einer Malat-Dehydrogenase handeln könnte. Zur Kontrolle dieser Hypothese wurde statt SAA nun D,L-Malat als Substrat in den Enzymtest eingesetzt und wiederum eine hohe Aktivität, vermutlich tatsächlich die einer Malat-Dehydrogenase, festgestellt. In der verwendeten löslichen Fraktion von *Rhodopseudomonas palustris* CGA009, in der sich die SAA-DH befand, lag also vermutlich eine induzierte Malat-Dehydrogenase vor, welche das von *Acinetobacter* sp. Stamm SW1 nicht verwertete Malat umsetzte und somit den Test störte. Dass das Problem bei Erstellen der Eichgeraden nicht in Erscheinung getreten war, lag wahrscheinlich daran, dass die verwendeten „Eichkulturen" vollständig ausgewachsen waren und kein oder nur noch sehr wenig Malat vorlag. Im Gegensatz dazu enthielten die Kulturüberstände der ersten Werte der zu messenden Wachstumskurve vermutlich noch sehr viel des 10 mM eingesetzten Malats. Zur Lösung dieses Problems wurde in den folgenden Wachstumsversuchen *Acinetobacter* sp. Stamm SW1 mit Adipinat (vgl. Tabelle 4-4) als Kohlenstoffquelle angezogen, sodass der Enzym-Assay nicht mehr gestört wurde. Somit war nun eine äußerst sensitive Methode zur quantitativen Bestimmung von SAA entwickelt worden, die das Erstellen einer Wachstumskurve (s. 4.3.3.2) ermöglichte.

4.3.2 Morphologische und cytologische Eigenschaften

Bei *Acinetobacter* sp. Stamm SW1 handelte es sich um dicke, kurze Stäbchen, die nicht beweglich waren; das Bakterium stellte sich mittels Gram-Typ-Bestimmung (KOH-Test) als gramnegativ heraus. Die Bakterien traten zum Teil in Paaren auf und besaßen eine Katalase, aber keine Oxidase. *Acinetobacter* sp. gehört zur Gruppe der γ-Proteobakterien. Alle untersuchten morphologischen und cytologischen Eigenschaften treffen auf *Acinetobacter*-Arten zu (Holt *et al.* 1994).

4.3.3 Physiologische Eigenschaften

4.3.3.1 Substratspektrum

Acinetobacter sp. Stamm SW1 wuchs auf verschiedenen Kohlenstoffquellen, nicht jedoch auf einigen Hexosen, die getestet wurden (s. Tabelle 4-4).

Tabelle 4-4: Nutzung verschiedener Substanzen als alleinige Stickstoff- oder Kohlenstoffquellen durch *Acinetobacter* sp. Stamm SW1. Bei allen verwendeten Salzen handelte es sich um Natriumsalze.

Substrat	Konzentration (mM)	Wachstum
Stickstoffquellen		
Taurin	2	+
Hypotaurin	2	+
N-Methyltaurin	2	-
Taurocholat	2	-
Cysteat	2	+
Aminomethansulfonat	2	-
3-Aminopropansulfonat	2	-
Cysteamin	2	-
Ciliatin	2	-
Kohlenstoffquellen		
D,L-Malat	10	+
Succinat	10	+
D,L-Lactat	10	+
Acetat	20	+
Adipinat	5	+
Formiat	40	-
D-Glucose	5	-
D-Fructose	5	-
D-Galactose	5	-
Benzoat	3	+
4-Hydroxybenzoat	3	+
Phenylsuccinat	3	-
4-Aminobenzolsulfonat	3	-
4-Sulfobenzoat	3	-
4-Phenolsulfonat	3	-
4-Toluolsulfonat	3	-
Salicylat	3	-
Saccharin	3	-

Diese Erkenntnis weist auch auf physiologischer Ebene Übereinstimmungen mit *Acinetobacter*-Arten auf, denn diese können zum Großteil keine Hexosen verwerten, lediglich D-Glucose kann von einigen Stämmen als Kohlenstoffquelle genutzt werden (Holt *et al.* 1994). *Acinetobacter* sp. Stamm SW1 wuchs mit einigen aromatischen Verbindungen als Kohlenstoffquelle, beispielsweise mit Benzoat sowie 4-Hydroxybenzoat. Sulfonierte Aromaten konnten von *Acinetobacter* sp. Stamm SW1 nicht als Kohlenstoffquellen verwertet werden. Als Stickstoffquellen konnten lediglich Taurin, Hypotaurin sowie Cysteat dienen, mit den anderen getesteten Substanzen erfolgte kein Wachstum (s. Tabelle 4-4).

4.3.3.2 Wachstumskurve und Wachstumsparameter

Nach einem Wachstumsversuch mit *Acinetobacter* sp. Stamm SW1 mit 3 mM Taurin als alleiniger Stickstoffquelle sowie 5 mM Adipinat als Kohlenstoffquelle (s. Abbildung 4-14) konnte schließlich dank der nun ermöglichten Quantifizierung von SAA eine Wachstumskurve erstellt werden (s. Abbildung 4-15).

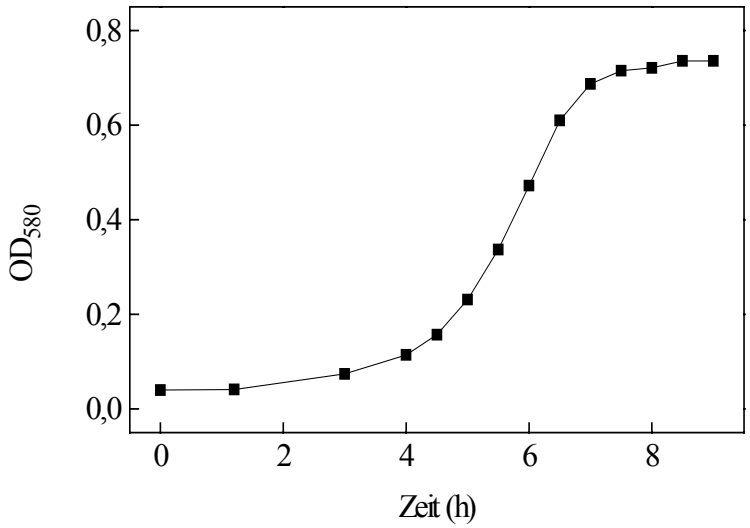

Abbildung 4-14: Wachstum von *Acinetobacter* sp. Stamm SW1 auf Taurin als alleiniger Stickstoffquelle. ■, OD_{580}.

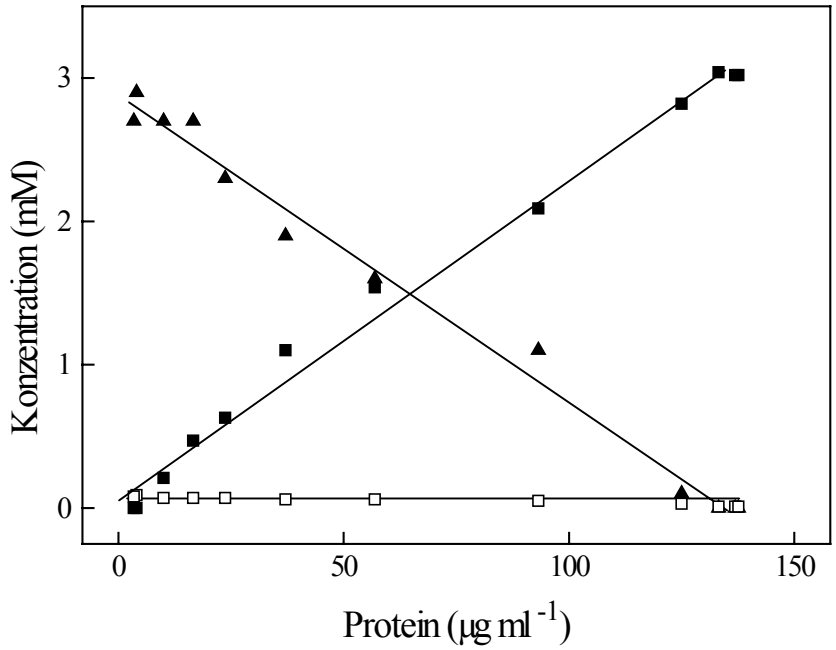

Abbildung 4-15: Substratverbrauch und Produktbildung während des Wachstums von *Acinetobacter* sp. Stamm SW1 mit Taurin als alleiniger Stickstoffquelle. ▲, Taurin; ■, Sulfoacetaldehyd; □, Ammonium.

In der Wachstumskurve waren eine Abnahme von Taurin sowie die gleichzeitige stöchiometrische Bildung von Sulfoacetaldehyd zu beobachten. Beides ging mit dem Wachstum einher, es wurde zu keinem Zeitpunkt Ammonium ausgeschieden, wie es bei *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 der Fall ist.

Bei diesem Wachstumsversuch wuchs *Acinetobacter* sp. Stamm SW1 mit einem Inokulum von 1 % (v/v) unter oxischen Bedingungen innerhalb von 9 Stunden bis zu einer stationären Phase mit einer OD_{580} von 0,75. Dies entsprach einer Wachstumsrate von 0,71 h^{-1} und einer Verdopplungszeit von 0,98 h, ein molarer Ertrag von 47 g Protein (mol Stickstoff)$^{-1}$ wurde ermittelt. Aus Wachstumsrate und Ertrag ließ sich eine spezifische Abbaurate von 4,2 mkat (kg Protein)$^{-1}$ errechnen.

4.3.4 Enzymaktivitäten im Abbauweg von Taurin zu Sulfoacetaldehyd in *Acinetobacter* sp. Stamm SW1

4.3.4.1 Taurin:Pyruvat-Aminotransferase (Tpa) und Taurin:2-Oxoglutarat-Aminotransferase

Es wurde mittels diskontinuierlichem Enzymtest untersucht, ob die Aktivität einer Tpa nachweisbar war. Die Durchführung erfolgte wie in Abschnitt 4.1.3.1 beschrieben. Es konnte jedoch weder eine Taurin-Abnahme noch eine Bildung von Alanin oder Glutamat beobachtet werden. Auch eine Alanin-Dehydrogenase-Aktivität konnte in einem kontinuierlichen Enzymtest am Photometer nicht gemessen werden. Es wurde in keinem der Tests eine Aktivität einer Tpa oder einer Taurin:2-Oxoglutarat-Aminotransferase nachgewiesen (Abbildung nicht gezeigt).

4.3.4.2 Taurin-Dehydrogenase (TDH)

Es wurde eine PCR durchgeführt, um zu überprüfen, ob sich das Gen für eine TDH in *Acinetobacter* sp. Stamm SW1 befindet. Hierfür wurden konservierte Primer verwendet, die zur Amplifizierung von 1 kb großen *tauY*-Fragmenten in α- und β-Proteobakterien verwendet werden können. In γ-Proteobakterien - wie zum Beispiel *Acinetobacter* sp. - waren sie hingegen noch nicht getestet worden. Die PCR brachte kein *tauY*-Fragment hervor.

Um die Aktivität der TDH auf biochemischer Ebene zu bestätigen, wurden Enzymtests unter denselben Bedingungen, wie in Abschnitt 4.1.3.2.2 angegeben, durchgeführt. Mit Cytochrom *c* als Elektronenakzeptor konnte keine TDH-Aktivität gefunden werden. Mit DCPIP als Elektronenakzeptor konnte in Kaliumphosphatpuffer pH 7,2 mit 5 mM $MgCl_2$ eine TDH-Aktivität von 0,4 mkat (kg Protein)$^{-1}$ gemessen werden.

4.4 Ciliatin als Stickstoffquelle für Bakterien

Wie bereits geschildert (s. 2.3), war bisher kein Abbau von Ciliatin bekannt, bei dem die Phosphonat-Bindung nicht gespalten wurde. Dies war im Hinblick auf die Assimilation von Taurin bis vor kurzem ebenso, nun wurde jedoch die Reaktion von Taurin zu Sulfoacetat in *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 gefunden, bei der die Sulfonat-Bindung unberührt bleibt. Es sollte untersucht werden, ob bei der Assimilation

von Ciliatin ein analoger Reaktionsmechanismus existiert. Um in Erfahrung zu bringen, ob und wenn ja, wie häufig Ciliatin in Bakterien unter Ausscheidung eines Phosphonats assimiliert wird, wurden Anreicherungskulturen mit Ciliatin als alleiniger Stickstoffquelle durchgeführt. Dafür wurden dieselben drei Impfgüter wie für die Anreicherungen mit Taurin verwendet - Klärschlamm, Ackerboden und Waldboden -, auch die Methodik der Anreicherungskulturen war dieselbe.

Mit einem Kohlenstoffgemisch aus Glycerin, Glucose und Malat wurden zehn Reinkulturen gewonnen, bei einem weiteren Anreicherungsversuch mit einzelnen Kohlenstoffquellen (jeweils entweder Adipinat, Succinat oder Acetat) wurden insgesamt 19 Reinkulturen gewonnen. Alle Isolate wurden auf ihre Morphologie und ihren Stoffwechsel hin untersucht.

4.4.1 Ergebnisse der Anreicherungskulturen mit Ciliatin als alleiniger Stickstoffquelle

Es herrschten zwei morphologische Typen unter den Reinkulturen vor: dicke, kurze, bewegliche Stäbchen und dicke, kurze, unbewegliche Stäbchen.

Die ausgewachsenen Reinkulturen wurden zuerst auf die Ciliatin-Abnahme hin getestet, in allen Isolaten war ein vollständiger Abbau von Ciliatin zu beobachten.

Im Anschluss daran wurde Phosphat am Ionenchromatographen gemessen, um zu überprüfen, ob es Isolate gab, die kein Phosphat, sondern möglicherweise ein Phosphonat ausschieden. Um die zu erwartende Phosphat-Bildung messen zu können, die sich bei Einsatz von 2 mM Ciliatin ebenfalls in einer Größenordnung von 2 mM gebildetem Phosphat bewegen sollte, mussten die Kulturen umgepuffert werden. Denn das Anreicherungsmedium enthielt 50 mM Kaliumphosphatpuffer, sodass der hohe Phosphat-Peak aus dem Medium den wesentlich kleineren Peak des durch den Ciliatin-Abbau gebildeten Phosphats überlagern würde. Die Kulturen wurden daher in ein Medium umgepuffert, welches lediglich 0,5 mM Phosphat enthielt. Nach der Umpufferung wurden die Überstände der ausgewachsenen Kulturen am Ionenchromatographen gemessen, und es wurde festgestellt, dass alle Reinkulturen Phosphat ausschieden; das heißt, es wurde in keinem Bakterium ein Stoffwechsel gefunden, bei dem die C-PO_3^--Bindung erhalten blieb und ein Phosphonat ausgeschieden wurde.

4.4.2 Der Stoffwechsel in Stamm OM10

Von Dr. Quinn (Queen's University, Belfast, UK) erfuhren wir von einem in seiner Arbeitsgruppe vorhandenen Bakterium, das aus einer früheren Anreicherungskultur mit Ciliatin als Stickstoffquelle stammte. Nachdem in der Arbeitsgruppe von Dr. Quinn festgestellt worden war, dass diese Kultur kein Phosphat ausschied, wurde ein Versuch unternommen, eine vermutete Phosphonoacetaldehyd-Dehydrogenase zu messen, die eine mögliche Reaktion von Phosphonoacetaldehyd zu Phosphonoacetat katalysieren könnte (s. Abbildung 2-3). Dies geschah über einen indirekten Enzym-Assay, bei dem Phosphonoacetaldehyd als Substrat zugesetzt wurde. Da in der Arbeitsgruppe von Dr. Quinn keine direkte Phosphonoacetat-Messung möglich war, wurde eine Phosphonoacetat-Hydrolase (Kulakova *et al.* 2003) hinzugegeben, die Phosphonoacetat hydrolysieren sollte; während der Reaktion konnte eine Phosphat-Freisetzung gemessen werden. Daraus wurde geschlossen, dass Stamm OM10 aus Ciliatin Phosphonoacetat bildete und ausschied (persönliche Mitteilung, Dr. J. P. Quinn).

In einer Kooperation sollte ein Projekt begonnen werden, um diesen Stamm, genannt Stamm OM10, zu charakterisieren.

4.4.2.1 Morphologische Eigenschaften

Bei Stamm OM10 handelte es sich um ein unbewegliches, Tetraden-bildendes Bakterium, welches eine gelbliche Farbe besaß. Laut Gram-Typ-Bestimmung (KOH-Test) stellte sich das Bakterium als grampositiv heraus. Zu den Tetraden-bildenden Bakterien gehören einige grampositive Kokken, zum Beispiel *Sarcina* und *Pediococcus* (Holt *et al.* 1994) sowie *Micrococcus* (Wieser *et al.* 2002).

4.4.2.2 Physiologische Eigenschaften

Nach Erhalt des Bakteriums wurde es in einem Selektivmedium mit 2 mM Ciliatin als alleiniger Stickstoffquelle angeimpft. In diesem Medium wuchs Stamm OM10 nicht, erst nach Zugabe von 0,05 % Hefeextrakt - wie es in Belfast gehandhabt worden war - konnte Wachstum beobachtet werden. Es wurde eine Phosphonoacetat-Messung mit Referenzmaterial am Ionenchromatographen entwickelt und eine Eichgerade erstellt, doch der Kulturüberstand wies kein Phosphonoacetat auf. Phosphat konnte ebenfalls nicht gemessen werden, deshalb wurde Ciliatin nach derselben Methode wie Taurin

derivatisiert und mittels HPLC-Analyse untersucht. Es stellte sich heraus, dass Ciliatin nicht abgebaut worden war, lediglich die Peaks des zugesetzten Hefe-Extrakts verschwanden mit der Zeit.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bildung eines Sulfonates, Sulfoacetat, aus Taurin in dem Purpurbakterium *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 untersucht. Die Reaktion des Enzyms Sulfoacetaldehyd-Dehydrogenase (SAA-DH) wurde dabei biochemisch näher charakterisiert, das Enzym zum Teil gereinigt. In einer Serie von Anreicherungskulturen wurde festgestellt, wie häufig diese und andere bekannte Reaktionen zum Abbau von Taurin in Bakterien unter den gewählten selektiven Bedingungen auftreten. Dabei wurde das Bakterium *Acinetobacter* sp. Stamm SW1 isoliert, welches ebenfalls ein Sulfonat, Sulfoacetaldehyd, aus Taurin bildete und auch ausschied; dieser Organismus wurde ebenfalls physiologisch und biochemisch genauer untersucht.

Analog zu den bekannten Abbauwegen des Sulfonates Taurin wurde auch der Abbau des Phosphonates Ciliatin untersucht.

5.1 Der Taurin-Stoffwechsel in *Rhodopseudomonas palustris* CGA009

Bei Wachstum von *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 mit Taurin als alleiniger Stickstoffquelle wurden die Abnahme von Taurin und die Bildung von Sulfoacetat in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 sowie eine transiente Bildung von Ammonium beobachtet (s. 4.1.2.1). Die Wachstumsrate betrug dabei 0,013 h^{-1}, die Verdopplungszeit 55 h. Der errechnete molare Ertrag von 58 g Protein (mol Stickstoff)$^{-1}$ impliziert eine ausgeglichene Massenbilanz. Im Allgemeinen geht man bei Bakterien von einem Richtwert von 50 g Protein aus, die pro mol Stickstoff in etwa gebildet werden können (Cook 1987), sodass angenommen werden kann, dass der Taurin-Stickstoff komplett in das Zellmaterial von *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 eingebaut wurde. Aus Wachstumsrate und Ertrag ließ sich eine spezifische Abbaurate von 0,06 mkat (kg Protein)$^{-1}$ errechnen. Diese Rate wird auch *in-vivo*-Umsatzrate genannt und gibt an, welche Aktivität alle an diesem Abbauweg beteiligten Enzyme mindestens besitzen müssen, um den Umsatz von Taurin zu Sulfoacetat bewerkstelligen zu können. Die Aktivität eines Enzyms, welche die Deaminierung von Taurin vornimmt – beispielsweise Taurin-Dehydrogenase (TDH) oder Taurin:Pyruvat-Aminotransferase

(Tpa) -, konnte bisher nicht gemessen werden (s. 4.1.3.1; 4.1.3.2). Es kann lediglich aufgrund des genetischen Nachweises die Aktivität einer TDH postuliert werden, die allerdings biochemisch nicht nachweisbar war, da vermutlich der natürliche Elektronenakzeptor des Enzyms noch nicht gefunden wurde. Der auf die Deaminierungsreaktion folgende Schritt von Sulfoacetaldehyd zu Sulfoacetat wurde von einer induzierbaren, NAD^+-abhängigen Sulfoacetaldehyd-Dehydrogenase (SAA-DH) katalysiert. Das Enzym besaß eine hohe Affinität sowohl für sein Substrat SAA als auch für seinen Cofaktor NAD^+, was sich in den niedrigen gemessenen K_m^{app}-Werten (26 bzw. 92 µM) wiederspiegelte. Eine Reaktion mit $NADP^+$ statt NAD^+ als Cofaktor war möglich, jedoch wesentlich schwächer, da die Affinität des Enyzms für $NADP^+$ deutlich geringer war: Der K_m^{app}-Wert für $NADP^+$ war über hundertmal so hoch wie der für NAD^+. Die gemessene Enzymaktivität der SAA-DH in Zellen, die mit Taurin als Stickstoffquelle gewachsen waren, betrug 0,8 bis 1,2 mkat (kg Protein)$^{-1}$ (s. 4.1.3.3) und lag somit deutlich über der mindestens nötigen Aktivität von 0,06 mkat (kg Protein)$^{-1}$. Es kann also daraus geschlossen werden, dass die SAA-DH in der Lage ist, den Abbau von Sulfoacetaldehyd zu Sulfoacetat zu bewerkstelligen. Damit ist nun ein weiteres Enzym bekannt, welches an der Assimilation des Taurin-Stickstoffs beteiligt ist. Für die Assimilation des Taurin-Stickstoffs war bisher lediglich ein Weg, nämlich derjenige in *Rhodococcus opacus* ISO-5, bekannt, welcher über dieselben Enzyme verläuft, die in diesem Organismus auch für die Dissimilation von Taurin zuständig sind. Im Gegensatz dazu sind für die Assimilation des Taurin-Schwefels bereits verschiedene Enzyme bekannt (s. 2.2), beispielsweise verläuft dieser Abbau in anaeroben Bakterien über die Enzyme, die auch den dissimilatorischen Weg bewerkstelligen. In aeroben Bakterien dagegen wird beim Abbau von Taurin als Schwefelquelle für die einleitende Reaktion ein anderes Enzym verwendet (Taurin-Dioxygenase) als in der Dissimilation (Taurin:Pyruvat-Aminotransferase oder Taurin-Dehydrogenase). Es ist daher nicht verwunderlich, dass nun auch ein separater Weg für die Assimilation des Taurin-Stickstoffs gefunden wurde, der ein Enzym involviert, welches speziell darauf ausgerichtet ist und nicht gleichzeitig in den Dissimilations-Stoffwechsels eingebunden ist.

Der untersuchte Abbau von Taurin in *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 lieferte neue Erkenntnisse über das natürliche Vorkommen von Sulfoacetat. Bisher wurde

Sulfoquinovose aus dem Pflanzen-Sulfolipid als alleinige Quelle für Sulfoacetat angesehen. Nun wurde eine neue biologische Quelle für Sulfoacetat bekannt, nämlich die im Tierreich vorkommende nicht-proteinogene Aminosäure Taurin. Sulfoquinovose ist in der Pflanzenwelt weit verbreitet, denn sie stellt einen wichtigen Bestandteil der Thylakoidmembran dar, welche unerlässlich für die Photosynthese ist. Taurin seinerseits ist im Tierreich weit verbreitet, da es ebenso wie Sulfoquinovose wichtige Funktionen im Organismus besitzt. Taurin kann somit als bisher einzig bekannte alternative Quelle von Sulfoacetat betrachtet werden. Wie häufig bzw. wie weit verbreitet die Bildung von Sulfoacetat aus Taurin in Bakterien möglicherweise ist, wird in Abschnitt 5.2 eingehend behandelt. Sulfoacetat selbst stellt ein weit verbreitetes Substrat für Bakterien dar und wird von vielen aeroben und anaeroben Mikroorganismen dissimiliert (Martelli & Sousa 1970; King & Quinn 1997; Denger & Cook 2001; Cook & Denger 2002), weiterhin kann der Sulfonat-Schwefel von aeroben und anaeroben Mikroorganismen assimiliert werden (Lechner & Cook, nicht publiziert). Der Sulfoacetat-Abbau verläuft beispielsweise in *Comamonas* sp. Stamm SFCD1 und *Ralstonia* sp. Stamm EDS1 über das Schlüsselintermediat Sulfoacetaldehyd und involviert bisher unbekannte Enzyme (Denger & Cook 2001; Cook & Denger 2002). Möglicherweise existiert auch ein Abbau-Mechanismus, bei dem aus Sulfoacetat Glycolat entsteht (Martelli & Sousa 1970), die betroffenen Stämme konnten jedoch nicht erhalten werden, was weitere Untersuchungen verhinderte.

Zusätzlich zur physiologischen Untersuchung des Taurin-Abbaus in *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 wurde das Enzym SAA-DH teilweise gereinigt und N-terminal sequenziert. Im Genom von *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 wurden – wie bereits erwähnt – mehrere Gene gefunden mit Ähnlichkeiten zu bekannten Genen, die in den Taurin-Stoffwechsel involviert sind (s. Abbildung 5-1). Beispielsweise wiesen die Gene RPA0112a-0113 eine Ähnlichkeit von 50 bis 60 % zu bekannten *tauX*- und *tauY*-Fragmenten (entspricht den zwei Untereinheiten der Taurin-Dehydrogenase) auf. Außerdem wurde ein *tauR*-ähnliches Gen (RPA0105) gefunden, TauR ist vermutlich ein Regulator des Taurin-Katabolismus. Als mögliches Gen, welches die Sulfoacetaldehyd-Dehydrogenase codieren könnte, wurde RPA0112 gefunden, welches zwischen den eben genannten Genen liegt und bisher als mögliche Betain-Aldehyd-Dehydrogenase annotiert ist.

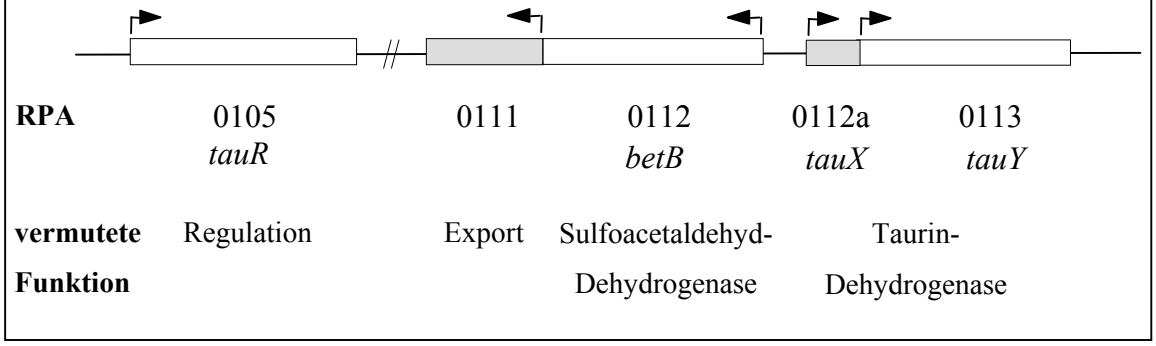

Abbildung 5-1: Anordnung der für den Taurin-Abbau vermutlich relevanten Gene in *Rhodopseudomonas palustris* CGA009. *tauR*, Gen für den vermutlichen Regulator des Taurin-Metabolismus; *betB*, Betain-Aldehyd-Dehydrogenase; *tauX*, *tauY*, Gene der vermutlichen Taurin-Dehydrogenase.

Während der Diplomarbeit wurde versucht entweder nachzuweisen, dass die SAA-DH von dem Gen RPA0112 codiert wird, oder ein anderes mögliches Gen nachzuweisen, welches für die SAA-DH codiert. Bei Analyse von zellfreien Extrakten Taurin-gewachsener sowie Ammonium-gewachsener Zellen mittels SDS-PAGE ließ sich keine deutliche Induktion einer bestimmten Bande bei Taurin-gewachsenen Zellen erkennen (s. Abbildung 4-9). Dies muss zwar nicht weiter verwundern, da assimilatorische Enzyme im Gegensatz zu dissimilatorischen nicht so stark exprimiert sein müssen, dass sich ein signifikanter Unterschied erkennen lässt, denn die *in-vivo*-Umsatzraten in der Stickstoff-Assimilation sind wesentlich niedriger als in der Kohlenstoff-Dissimilation. Allerdings gestaltete dieser Umstand die Reinigung der SAA-DH wesentlich schwieriger, da keine eindeutigen prominenten Banden auf einem SDS-Gel zu sehen waren, wogegen induzierte Enzyme aus dem Kohlenstoff-Stoffwechsel meist eindeutig und schnell zu identifizieren sind.

Nach verschiedenen Reinigungsschritten des Enzyms wurden anhand der Betrachtung der gewonnenen Fraktionen mittels SDS-PAGE zwei Proteine ersichtlich, bei denen es sich am wahrscheinlichsten um die SAA-DH handeln könnte. Bis zum Ende der Diplomarbeit konnte nicht bestätigt werden, welches das zutreffende war. Es ließ sich jedoch sagen, dass keines der beiden in Erwägung gezogenen Proteine von der abgeschätzten Größe her zu derjenigen Größe passte, die sich aus der Sequenz des Gens RPA0112 errechnen ließ. Das Protein, welches von RPA0112 codiert wird, besitzt eine

Größe von ca. 52 kDa, die beiden möglichen Proteine nach der Enzymreinigung hingegen wiesen Größen von ca. 75 bzw. 40 kDa auf (s. 4.1.6). Da sich die Reinigung des Enzyms - wie bereits beschrieben - schwierig und sehr zeitaufwendig gestaltete, konnte das Enzym nicht vollständig gereinigt werden. Es blieben stets ca. 10 Banden pro Fraktion auf einem SDS-Gel sichtbar, von denen die oben genannten beiden Proteine stark hervortraten. Außer dem Vorhandensein von mindestens zwei in Frage kommenden Proteinen, die für die SAA-DH codieren könnten, stellte die anfängliche geringe Aktivität des Enzyms ein Problem dar, welche jedoch kontinuierlich gesteigert werden konnte (s. 4.1.3.3). Das größte Problem stellte die Instabilität des Enzyms dar, es konnte erst in einer späten Phase der Diplomarbeit durch das Verwenden einer neuen Säule (s. 4.1.5.3) gelöst werden. Möglicherweise wurde mithilfe der neuen Säule und einer daraus resultierenden andersartigen Auftrennung der Proteine eine Protease aus der Fraktion der SAA-DH entfernt, sodass das Enzym stabil blieb und für einen zweiten Reinigungsschritt zur Verfügung stand. Es war trotz der nicht vollständig erfolgten Reinigung möglich, die beiden Proteine, bei denen es sich am wahrscheinlichsten um die SAA-DH handeln könnte, N-terminal zu sequenzieren. Hierfür wurden die Proteine einer MonoQ-Fraktion auf eine PVDF-Membran übertragen und die beiden betreffenden Banden ausgeschnitten. Die Ergebnisse der Sequenzierung, die zum Zeitpunkt der Abgabe dieser Arbeit noch nicht vorlagen, könnten durch Ableiten der Nukleotidsequenz und Suche im vollständig sequenzierten Genom des Bakteriums zu dem Gen führen, das die SAA-DH tatsächlich codiert. Auf dieser Grundlage wäre es möglich, anschließend Experimente zur Expression des Gens durchzuführen. Sollte es sich bei keinem der zwei N-terminal sequenzierten Proteine um eine mögliche SAA-DH handeln, müsste die Reinigung verbessert werden, indem beispielsweise für die Ionenaustauschchromatographie weitere Säulen getestet werden.

Der Transport von Sulfonaten über Membranen wird als axiomatisch angesehen (Graham et al. 2002), somit sind vermutlich verschiedene Transporter für den Taurin-Stoffwechsel notwendig, einerseits um Taurin zu importieren und andererseits um Sulfoacetat aus der Zelle zu exportieren. Es sind bislang ABC-Transporter (ATP-binding cassette transporters) (Kertesz 2001; Masepohl *et al.* 2001) sowie TRAP-Transporter (tripartite ATP-independent periplasmic transporter) (Forward *et al.* 1997; Kelly & Thomas 2001; Brüggemann *et al.* 2004) bekannt, die eine Rolle im Taurin-

Stoffwechsel spielen. ABC-Transporter koppeln die ATP-Hydrolyse mit der Translokation eines Stoffes über die Cytoplasmamembran. TRAP-Transporter hingegen nutzen als treibende Kraft nicht die ATP-Hydrolyse, sondern einen elektrochemischen Ionen-Gradienten. Die Zusammensetzung eines TRAP-Systems ist zum Beispiel anhand des C_4-Dicarboxylat-Transportsystems (Dct-System) aus *Rhodobacter capsulatus* gut untersucht (Forward *et al.* 1997; Kelly & Thomas 2001), es ist für den Transport der Dicarboxylate Malat, Succinat und Fumarat zuständig. Das Dct-System besteht aus drei Proteinen: aus einem periplasmatischen Bindeprotein (DctP), einem kleinen (DctQ) und einem großen (DctM) integralen Membranprotein. Dazu ähnliche Systeme wurden in diversen Prokaryoten (Eubacteria sowie Archaea) gefunden, nicht jedoch in Eukaryoten. TRAP-Transporter sind weit verbreitete Systeme, die eine Vielzahl von diversen Substanzen transportieren können (Kelly & Thomas 2001). Ein TRAP-Transportersystem, welches in den Taurin-Stoffwechsel involviert ist, wurde beispielsweise in *Rhodobacter sphaeroides* gefunden, es handelt sich hierbei um die Proteine TauKLM [TC 2.A.56.4.1] (Brüggemann *et al.* 2004).

Gene für beide Arten von Transportern, ABC- sowie TRAP-Transporter, wurden im Genom von *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 gefunden (Larimer *et al.* 2004). Besonders ein Gen für einen möglichen Transporter fällt beim Betrachten des Genoms ins Auge: 8 bp stromabwärts vom ursprünglichen hypothetischen Gen für die SAA-DH befindet sich RPA0111, welches ein Membranprotein unbekannter Funktion codiert. Diese Tatsache ist ein interessanter Ansatzpunkt für weiterführende Experimente, in denen die Transportmechanismen für Taurin sowie Sulfoacetat in *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 näher untersucht werden könnten.

5.2 Die Diversität und Verbreitung der verschiedenen Wege zur Assimilation des Taurin-Stickstoffs

Um zu untersuchen, wie häufig die mittlerweile bekannten Assimilationswege des Taurin-Stickstoffs sind, wurden Anreicherungskulturen mit Taurin als alleiniger Stickstoffquelle und einem Gemisch aus Kohlenstoffquellen (Glycerin, Glucose und D,L-Malat) durchgeführt. 4 von 9 gewonnenen Reinkulturen bildeten Isethionat, nur in einem der 9 Isolate konnte die Bildung von Sulfat gemessen werden. Letztere Tatsache war zunächst überraschend, da dieser Weg den ersten bekannten und in der Literatur

beschriebenen Abbauweg von Taurin als Stickstoffquelle darstellt (Denger *et al.* 2004a). Es konnten keine Bakterien angereichert werden, die Sulfoacetat bildeten, allerdings konnte ein neuer Weg zur Assimilation des Taurin-Stickstoffs nachgewiesen werden: die Ausscheidung von Sulfoacetaldehyd, welche in 4 von 9 Isolaten auftrat (s. Tabelle 4-3). In Anreicherungskulturen, die von Katharina Styp von Rekowski in der gleichen Arbeitsgruppe ebenfalls im Rahmen einer Diplomarbeit durchgeführt wurden, ergab sich auch bei Verwenden anderer Kohlenstoffquellen ein ähnliches Muster: 4 der 6 Reinkulturen bildeten Isethionat, 2 schieden Sulfoacetaldehyd aus, während sich in keinem der Isolate eine Sulfat- oder Sulfoacetat-Bildung beobachten ließ (Styp von Rekowski 2004). Die Bildung von Sulfoacetat aus Taurin, die bisher ausschließlich aus *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 bekannt ist, kann somit bei den verwendeten Bedingungen als relativ selten angesehen werden.

Ein überraschendes Ergebnis stellte die häufige Ausscheidung von Sulfoacetaldehyd dar, denn die Substanz wurde oft für instabil und sehr reaktiv gehalten (Novak *et al.* 2004), weshalb angenommen wurde, dass sie weiter umgesetzt wird. Die Bildung von Sulfoacetaldehyd aus Taurin an sich ist bestens untersucht und weit verbreitet, und es ist bekannt, dass Sulfoacetaldehyd ein Schlüsselintermediat im Stoffwechsel von Taurin und vielen anderen Sulfonaten darstellt. Neu ist - wie gesagt - die Tatsache, dass keine weiteren Reaktionen erfolgten, sondern in mehreren Kulturen Sulfoacetaldehyd das Endprodukt bildete und ausgeschieden wurde.

Andererseits sollte dieses neuartige Phänomen nicht allzu sehr verwundern, da bereits Bakterien bekannt sind, die mit Sulfoacetaldehyd wachsen können, beispielsweise kann *Desulfovibrio* Stamm IC1 Sulfoacetaldehyd als Substrat für die anaerobe Respiration nutzen (Lie *et al.* 1996). Die Enzyme zum Abbau von Sulfoacetaldehyd sind außerdem in allen Bakterien vorhanden, welche Taurin über Sulfoacetaldehyd als Schlüsselintermediat weitergehend verwerten können. Somit könnte allenfalls der Transport von Sulfoacetaldehyd in die Zelle ein Problem darstellen, das die Nutzung von Sulfoacetaldehyd in manchen Bakterien verhindern könnte.

5.3 Ausscheidung von Sulfoacetaldehyd in *Acinetobacter* sp. Stamm SW1

Eine Reinkultur der eben beschriebenen Anreicherungskulturen, welche Sulfoacetaldehyd aus Taurin bildete und auch ausschied, wurde weitergehend untersucht, da diese Beobachtung neuartig war. Nachdem auf genetischer Ebene hohe Übereinstimmung mit *Acinetobacter* sp. herrschte (99,8 %) und auch auf cytologischer und physiologischer Ebene Ähnlichkeiten gefunden wurden, wurde die Reinkultur *Acinetobacter* sp. Stamm SW1 genannt.

Die qualitative Identifizierung von Sulfoacetaldehyd erfolgte zunächst mittels zwei verschiedener Methoden: Derivatisierung und anschließende HPLC-Analyse einschließlich Cochromatographie sowie MALDI-TOF-Massenspektroskopie. Bevor Wachstumsversuche durchgeführt werden konnten, musste außerdem eine Methode entwickelt werden, um das entstehende Sulfoacetaldehyd zu quantifizieren. Wie bereits ausführlich beschrieben (s. 4.3.1), konnte ein Enzym-Assay entwickelt werden, der die Fähigkeit des Enzyms Sulfoacetaldehyd-Dehydrogenase (SAA-DH) aus *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 ausnutzte, das zu messende Sulfoacetaldehyd in Sulfoacetat umzusetzen. Die Quantifizierung erfolgte mittels kontinuierlichem Enzymtest am Spektralphotometer, die Kontrolle der Reaktion wurde durch Messung des gebildeten Sulfoacetat am Ionenchromatographen nachvollzogen. Obwohl das verwendete Enzym nicht rein vorlag, sondern die cytoplasmatische Fraktion des Bakteriums in den Test eingesetzt wurde, konnte durch Messung des Sulfoacetats und durch Verwenden von Negativkontrollen die korrekt erfolgte Reaktion sichergestellt werden. Nachdem auch bei der Reinigung des Enzyms Fortschritte gemacht wurden und eine Stabilität des Enzyms gegeben ist, wäre es mittlerweile auch möglich, den Assay mit einer MonoQ-Fraktion einer ersten oder gar zweiten Anionen-austauschchromatographie durchzuführen, um die SAA-DH in reinerer Form einsetzen zu können.

Im Anschluss an die Sulfoacetaldehyd-Quantifizierung konnte eine Wachstumskurve erstellt werden. Bei einem Wachstumsversuch verbrauchte *Acinetobacter* sp. Stamm SW1 das Substrat Taurin vollständig und bildete Sulfoacetaldehyd in einer 1:1-Stöchiometrie (s. Abbildung 4-15). Die Kultur wuchs mit einer Wachstumsrate von 0,71 h^{-1} und einer Verdopplungszeit von 0,98 h, ein molarer Ertrag von

47 g Protein (mol Stickstoff)$^{-1}$ wurde ermittelt. Der Ertrag lag wie der von *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 in dem üblichen Rahmen der Proteinbildung pro mol Stickstoff bei vollständigem Einbau des Stickstoffs in das Zellmaterial. Aus Wachstumsrate und Ertrag ließ sich eine spezifische Abbaurate von 4,2 mkat (kg Protein)$^{-1}$ errechnen. Die Aktivität einer Taurin-Dehydrogenase (TDH), welche die Deaminierung von Taurin durchführen könnte, wurde mit dem künstlichen Elektronenakzeptor DCPIP gefunden (s. 4.3.4.1). Allerdings war diese Aktivität mit 0,4 mkat (kg Protein)$^{-1}$ unter dem Gesichtspunkt der eben genannten spezifischen Abbaurate zu gering, als dass sie diese Reaktion in ausreichendem Maß hätte bewerkstelligen können. Der geringe Wert der gemessenen TDH-Aktivität könnte damit zusammenhängen, dass der Enzymtest noch nicht optimiert war. Möglicherweise besaß das Enzym zu DCPIP eine geringere Affinität als zu seinem natürlichen Elektronenakzeptor, der bisher nicht gefunden wurde. Es wurde mithilfe einer PCR zwar kein *tauY*-Gen in *Acinetobacter* sp. Stamm SW1 gefunden, dies bedeutet jedoch nicht zwangsläufig, dass das *tauY*-Gen nicht vorhanden ist: Das negative Ergebnis auf genetischer Ebene könnte falsch-negativ sein, da die verwendeten konservierten Primer ursprünglich für α- und β-Proteobakterien synthetisiert wurden, jedoch nicht für γ-Proteobakterien wie *Acinetobacter* sp. Stamm SW1. Man müsste in folgenden Versuchen entweder degenerierte Primer verwenden oder die PCR-Bedingungen unspezifischer gestalten, um ein Vorhandensein einer TDH eventuell doch noch nachzuweisen oder auch ausschließen zu können. Da auf biochemischer Ebene eine leichte, wenn auch nicht ausreichende Aktivität gefunden wurde und der biochemische Test hinsichtlich einer Taurin:Pyruvat-Aminotransferase (Tpa) negativ war, kann man die Hypothese aufstellen, dass die Anwesenheit einer TDH in *Acinetobacter* sp. Stamm SW1 wahrscheinlicher ist als die Anwesenheit einer Tpa.

5.4 Der Ciliatin-Stoffwechsel in Bakterien

Die mögliche Ähnlichkeit der Abbauwege von Ciliatin zu denen seines Sulfonat-Analogons Taurin war eine interessante Fragestellung und wurde ebenfalls in dieser Arbeit untersucht. Um zu überprüfen, ob die bisher erforschte Spaltung der C-PO_3^--Bindung während des Abbaus von Ciliatin als Stickstoffquelle den einzig möglichen Weg darstellt, wurden Anreicherungskulturen mit Ciliatin als alleiniger Stickstoffquelle

vorgenommen. Als Kohlenstoffquellen dienten dabei entweder ein Gemisch aus drei Kohlenstoffquellen (Glycerin, Glucose und Malat) oder einzelne Kohlenstoffquellen (Succinat, Acetat oder D,L-Lactat). Die Anreicherungskulturen wurden mit drei Impfgütern und vier verschiedenen Kombinationen an Kohlenstoffquellen durchgeführt. Dennoch wurde in allen der 29 gewonnenen Reinkulturen durchweg ein einziger Abbauweg für Ciliatin gefunden: Aus Ciliatin wurde stöchiometrisch 1:1 Phosphat gebildet und freigesetzt (s. 4.4.1). Auch die Untersuchung des Stammes OM10 aus einer Anreicherungskultur aus Nordirland zeigte keinen neuen Stoffwechselweg (s. 4.4.2); entweder besaß der Stamm die vermutete Fähigkeit der Phosphonoacetat-Bildung nicht, oder aber er verlor diese Fähigkeit während des Kultivierens auf Vollmedium, welche für den Transport vorgenommen worden war. Aus diesen Ergebnissen kann man folgern, dass die Spaltung der C-PO_3^--Bindung unter den verwendeten Anreicherungsbedingungen der am häufigsten vorkommende Weg in Bakterien ist. Ob ein Abbau von Ciliatin ohne Spaltung der C-PO_3^--Bindung und die daraus folgende Ausscheidung eines Phosphonats existiert, bleibt weiterhin offen. Diese Möglichkeit kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, denn schließlich wurde auch keine Sulfoacetat-Bildung bei den durchgeführten Anreicherungskulturen mit Taurin gefunden (s. 4.2.2), obwohl dieser Weg nachgewiesenermaßen existiert. Dennoch lässt sich die Aussage treffen, dass die Assimilation von Ciliatin als Stickstoffquelle unter Beibehaltung der C-PO_3^--Bindung äußerst selten sein muss, falls sie existieren sollte. Dies steht im Gegensatz zu der offensichtlich weit verbreiteten Beibehaltung der C-SO_3^--Bindung bei der Assimilation des Taurin-Stickstoffs. Man kann also feststellen, dass Sulfonate und Phosphonate verschiedenartigen Abbaumechanismen bei der Stickstoff-Assimilation unterliegen, wenngleich die Substanzen ähnliche Strukturen besitzen und ihre C-SO_3^-- bzw. C-PO_3^--Bindungen ähnliche Eigenschaften aufweisen.

6 Literaturverzeichnis

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**: 3389-3402.

Autry, A. R. & Fitzgerald, J. W. (1990). Sulfonate S: a major form of forest soil organic sulfur. *Biology and Fertility of Soils* **10**: 50-56.

Baker, A. S., Ciocci, M. J., Metcalf, W. W., Kim, J., Babbitt, P. C., Wanner, B. L., Martin, B. M. & Dunaway-Mariano, D. (1998). Insights into the mechanism of catalysis by the P-C bond-cleaving enzyme phosphonoacetaldehyde hydrolase derived from gene sequence analysis and mutagenesis. *Biochemistry* **37**: 9305-9315.

Bayer, E., Gugel, K. H., Hagele, K., Hagenmaier, H., Jessipow, S., Konig, W. A. & Zahner, H. (1972). Metabolic products of microorganisms. 98. Phosphinothricin and phosphinothricyl-alanyl-analine. *Helvetica chimica acta* **55**: 224-239.

Benson, A. A. (1963). The plant sulfolipid. *Advances in Lipid Research* **1**: 387-394.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254.

Brüggemann, C., Denger, K., Cook, A. M. & Ruff, J. (2004). Enzymes and genes of taurine and isethionate dissimilation in *Paracoccus denitrificans*. *Microbiology* **150**: 805-816.

Chien, C.-C., Leadbetter, E. R. & Godchaux III, W. (1999). *Rhodococcus* spp. utilize taurine (2-aminoethanesulfonate) as sole source of carbon, energy, nitrogen and sulfur for aerobic respiratory growth. *FEMS Microbiology Letters* **176**: 333-337.

Cook, A. M. (1987). Biodegradation of *s*-triazine xenobiotics. *FEMS Microbiological Reviews* **46**: 93-116.

Cook, A. M., Daughton, C. G. & Alexander, M. (1978). Phosphonate utilization by bacteria. *Journal of Bacteriology* **133**: 85-90.

Cook, A. M. & Denger, K. (2002). Dissimilation of the C_2 sulfonates. *Archives of Microbiology* **179**: 1-6.

Cunningham, C., Tipton, K. F. & Dixon, H. B. F. (1998). Conversion of taurine into *N*-chlorotaurine (taurine chloramine) and sulphoacetaldehyde in response to oxidative stress. *Biochemical Journal* **330**: 939-945.

Demarcay, H. (1838). Ueber die Natur der Galle. *Annalen der Pharmacie* **27**: 271-291.

Denger, K. & Cook, A. M. (2001). Ethanedisulfonate is degraded via sulfoacetaldehyde in *Ralstonia* sp. strain EDS1. *Archives of Microbiology* **176**: 89-95.

Denger, K., Laue, H. & Cook, A. M. (1997). Thiosulfate as a metabolic product: the bacterial fermentation of taurine. *Archives of Microbiology* **168**: 297-301.

Denger, K., Ruff, J., Rein, U. & Cook, A. M. (2001). Sulfoacetaldehyde sulfo-lyase [EC 4.4.1.12] from *Desulfonispora thiosulfatigenes*: purification, properties and primary structure. *Biochemical Journal* **357**: 581-586.

Denger, K., Ruff, J., Schleheck, D. & Cook, A. M. (2004a). *Rhodococcus opacus* expresses the *xsc* gene to utilize taurine as a carbon source or as a nitrogen source but not as a sulfur source. *Microbiology* **150**: 1859-1867.

Denger, K., Weinitschke, S., Hollemeyer, K. & Cook, A. M. (2004b). Sulfoacetate generated by *Rhodopseudomonas palustris* from taurine. *Archives of Microbiology* **182**: 254-258.

Dumora, C., Lacoste, A. M. & Cassaigne, A. (1983). Purification and properties of 2-aminoethylphosphonate:pyruvate aminotransferase from *Pseudomonas aeruginosa*. *European Journal of Biochemistry* **133**: 119-125.

Dumora, C., Lacoste, A. M. & Cassaigne, A. (1989). Phosphonoacetaldehyde hydrolase from *Pseudomonas aeruginosa*: purification properties and comparison with *Bacillus cereus* enzyme. *Biochimica et Biophysica Acta* **997**: 193-198.

Forward, J. A., Behrendt, M. C., Wyborn, N. R., Cross, R. & Kelly, D. J. (1997). TRAP transporters: a new family of periplasmic solute transport systems encoded by the *dctPQM* genes of *Rhodobacter capsulatus* and by homologs in diverse gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology* **179**: 5482-5493.

Freedman, L. D. & Doak, G. O. (1957). The preparation and properties of phosphonic acids. *Chemical Reviews* **57**: 479-523.

Frison, J. C., Ras, M. R., Masdeu, S. & Rubies-Prat, J. (1979). Bile acids. I. Nature, physiology, and functions. *Medicina Clinica* **72**: 306-310.

Gesellschaft Deutscher Chemiker (1996). *Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung*. Weinheim, VCH.

Graham, D. E., Xu, H. & White, R. H. (2002). Identification of coenzyme M biosynthetic phosphosulfolactate synthase: a new family of sulfonate biosynthesizing enzymes. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 13421-13429.

Gregersen, T. (1978). Rapid method for distinction of Gram-negative from Gram-positive bacteria. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* **5**: 123-127.

Gritzer, R. F., Moffitt, K., Godchaux, W. & Leadbetter, E. R. (2003). Sulfoacetaldehyde bisulfite adduct is a substrate for enzymes presumed to act on sulfoacetaldehyde. *Journal of Microbiological Methods* **53**: 423-425.

Hendlin, D., Stapley, E. O., Jackson, M., Wallick, H., Miller, A. K., Wolf, F. J., Miller, T. W., Chaiet, L., Kahan, F. M., Foltz, E. L., Woodruff, H. B., Mata, J. M., Hernandez, S. & Mochales, S. (1969). Phosphonomycin, a new antibiotic produced by strains of *streptomyces*. *Science* **166**: 122-123.

Herbert, R. B. & Holliman, F. G. (1964). Aeruginosin B - a naturally occurring phenazinesulphonic acid. *Proceedings of the Chemical Society* **1964**: 19.

Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T. & Williams, S. T. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Baltimore, Williams & Wilkins.

Horiguchi, M. & Kandatsu, M. (1959). Isolation of 2-aminoethane phosphonic acid from rumen protozoa. *Nature* **184**: 901-902.

Huxtable, R. & Bressler, R. (1973). Effect of taurine on a muscle intracellular membrane. *Biochimica et Biophysica Acta* **323**: 573-583.

Huxtable, R. J. (1992). Physiological actions of taurine. *Physiological Reviews* **72**: 101-163.

Jiang, W., Metcalf, W. W., Lee, K. S. & Wanner, B. L. (1995). Molecular cloning, mapping, and regulation of Pho regulon genes for phosphonate breakdown by the phosphonatase pathway of *Salmonella typhimurium* LT2. *Journal of Bacteriology* **177**: 6411-6421.

Junker, F., Kiewitz, R. & Cook, A. M. (1997). Characterization of the *p*-toluenesulfonate operon *tsaMBCD* and *tsaR* in *Comamonas testosteroni* T-2. *Journal of Bacteriology* **179**: 919-927.

Kelly, D. J. & Thomas, G. H. (2001). The tripartite ATP-independent periplasmic (TRAP) transporters of bacteria and archaea. *FEMS Microbiology Reviews* **25**: 405-424.

Kennedy, S. I. T. & Fewson, C. A. (1968). Enzymes of the mandelate pathway in bacterium N.C.I.B. 8250. *Biochemical Journal* **107**: 497-506.

Kertesz, M. A. (2000). Riding the sulfur cycle - metabolism of sulfonates and sulfate esters in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **24**: 135-175.

Kertesz, M. A. (2001). Bacterial transporters for sulfate and organosulfur compounds. *Research in Microbiology* **152**: 279-290.

Kertesz, M. A. & Kahnert, A. (2001). Organoschwefel-Metabolismus in Gram-negativen Bakterien. *Biospektrum* **7**: 325-329.

Kim, A. D., Baker, A. S., Dunaway-Mariano, D., Metcalf, W. W., Wanner, B. L. & Martin, B. M. (2002). The 2-aminoethylphosphonate-specific transaminase of the 2-aminoethylphosphonate degradation pathway. *Journal of Bacteriology* **184**: 4134-4140.

King, J. E. & Quinn, J. P. (1997). Metabolism of sulfoacetate by environmental *Aureobacterium* sp. and *Comamonas acidovorans* isolates. *Microbiology* **143**: 3907-3912.

Kondo, H., Anada, H., Ohsawa, K. & Ishimoto, M. (1971). Formation of sulfoacetaldehyde from taurine in bacterial extracts. *Journal of Biochemistry* **69**: 621-623.

Kondo, H. & Ishimoto, M. (1987). Taurine dehydrogenase. *Methods in Enzymology* **143**: 496-499.

Kononova, S. V. & Nesmeyanova, M. A. (2002). Phosphonates and their degradation by microorganisms. *Biochemistry* **67**: 184-195.

Korn, E. D., Dearborn, D. G., Fales, H. M. & Sokoloski, E. A. (1973). Phosphonoglycan. A major polysaccharide constituent of the amoeba plasma membrane contains 2-aminoethylphosphonic acid and 1-hydroxy-2-aminoethylphosphonic acid. *Journal of Biological Chemistry* **248**: 2257-2259.

Kulakova, A. N., Kulakov, L. A. & Quinn, J. P. (1997). Cloning of the phosphonoacetate hydrolase gene from *Pseudomonas fluorescens* 23F encoding a new type of carbon-phosphorus bond cleaving enzyme and its expression in *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida*. *Gene* **195**: 49-53.

Kulakova, A. N., Wisdom, G. B., Kulakov, L. A. & Quinn, J. P. (2003). The purification and characterization of phosphonopyruvate hydrolase, a novel carbon-phosphorus bond cleavage enzyme from *Variovorax* sp Pal2. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 23426-23431.

La Nauze, J. M., Rosenberg, H. & Shaw, D. C. (1970). The enzymic cleavage of the carbon-phosphorus bond: purification and properties of phosphonatase. *Biochimica et Biophysica Acta* **212**: 332-350.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Larimer, F. W., Chain, P., Hauser, L., Lamerdin, J., Malfatti, S., Do, L., Land, M. L., Pelletier, D. A., Beatty, J. T., Lang, A. S., Tabita, F. R., Gibson, J. L., Hanson, T. E., Bobst, C., Torres y Torres, J. L., Peres, C., Harrison, F. H., Gibson, J. & Harwood, C. S. (2004). Complete genome sequence of the metabolically versatile

photosynthetic bacterium *Rhodopseudomonas palustris*. *Nature Biotechnology* **22**: 55-61.

Laue, H. & Cook, A. M. (2000a). Biochemical and molecular characterization of taurine:pyruvate aminotransferase from the anaerobe *Bilophila wadsworthia*. *European Journal of Biochemistry* **267**: 6841-6848.

Laue, H. & Cook, A. M. (2000b). Purification, properties and primary structure of alanine dehydrogenase involved in taurine metabolism in *Bilophila wadsworthia*. *Archives of Microbiology* **174**: 162-167.

Laue, H., Denger, K. & Cook, A. M. (1997). Taurine reduction in anaerobic respiration of *Bilophila wadsworthia* RZATAU. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 2016-2021.

Lee, K. S., Metcalf, W. W. & Wanner, B. L. (1992). Evidence for two phosphonate degradative pathways in *Enterobacter aerogenes*. *Journal of Bacteriology* **174**: 2501-2510.

Lie, T. J., Pitta, T., Leadbetter, E. R., Godchaux III, W. & Leadbetter, J. R. (1996). Sulfonates: novel electron acceptors in anaerobic respiration. *Archives of Microbiology* **166**: 204-210.

Martelli, H. L. (1967). Oxidation of sulphonic compounds by aquatic bacteria isolated from rivers of the Amazon region. *Nature* **216**: 1238-1239.

Martelli, H. L. & Benson, A. A. (1964). Sulfocarbohydrate metabolism 1. Bacterial production and utilization of sulfoacetate. *Biochimica et Biophysica Acta* **93**: 169-171.

Martelli, H. L. & Sousa, S. M. (1970). Biochemistry of sulfonic compounds. III. Formation of a two-carbon compound during the oxidation of sulfoacetate by a *Pseudomonas* strain. *Biochimica et Biophysica Acta* **208**: 110-115.

Masepohl, B., Führer, F. & Klipp, W. (2001). Genetic analysis of a *Rhodobacter capsulatus* gene region involved in utilization of taurine as a sulfur source. *FEMS Microbiology Letters* **205**: 105-111.

McGrath, J. W., Wisdom, G. B., McMullan, G., Larkin, M. J. & Quinn, J. P. (1995). The purification and properties of phosphonoacetate hydrolase, a novel carbon-phosphorus bond-cleavage enzyme from *Pseudomonas fluorescens* 23F. *European Journal of Biochemistry* **234**: 225-230.

McMullan, G. & Quinn, J. P. (1992). Detection of a novel carbon-phosphorus bond cleavage activity in cell-free extracts of an environmental *Pseudomonas fluorescens* isolate. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **184**: 1022-1027.

Morais, M. C., Zhang, W., Baker, A. S., Zhang, G., Dunaway-Mariano, D. & Allen, K. N. (2000). The crystal structure of *Bacillus cereus* phosphonoacetaldehyde hydrolase: insight into catalysis of phosphorus bond cleavage and catalytic diversification within the HAD enzyme superfamily. *Biochemistry* **39**: 10385-10396.

Novak, R. T., Gritzer, R. F., Leadbetter, E. R. & Godchaux, W. (2004). Phototrophic utilization of taurine by the purple nonsulfur bacteria *Rhodopseudomonas palustris* and *Rhodobacter sphaeroides*. *Microbiology* **150**: 1881-1891.

Olsen, D. B., Hepburn, T. W., Lee, S. L., Martin, B. M., Mariano, P. S. & Dunaway-Mariano, D. (1992). Investigation of the substrate binding and catalytic groups of the P-C bond cleaving enzyme, phosphonoacetaldehyde hydrolase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **296**: 144-151.

Pasantes-Morales, H. & Cruz, C. (1984). Protective effect of taurine and zinc on peroxidation-induced damage in photoreceptor outer segments. *Journal of Neuroscience Research* **11**: 303-311.

Pfennig, N. (1978). *Rhodocyclus purpureus* gen. nov. sp. nov., a ring-shaped, vitamin B_{12}-requiring member of the family Rhodospirillaceae. *International Journal of Systematic Bacteriology* **28**: 283-288.

Ruff, J., Denger, K. & Cook, A. M. (2003). Sulphoacetaldehyde acetyltransferase yields acetyl phosphate: purification from *Alcaligenes defragrans* and gene clusters in taurine degradation. *Biochemical Journal* **369**: 275-285.

Sanger, F. (1945). The free amino groups of insulin. *Biochemical Journal* **39**: 507-515.

Schägger, H. & von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* **166**: 368-379.

Seidel, H. M., Freeman, S., Seto, H. & Knowles, J. R. (1988). Phosphonate biosynthesis: isolation of the enzyme responsible for the formation of a carbon-phosphorus bond. *Nature* **335**: 457-458.

Smith, J. D. & Lepak, N. M. (1982). Purification and characterization of a phosphonic acid-containing glycoprotein from the cell membranes of tetrahymena. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **213**: 565-572.

Spaeth, D. G., Schneider, D. L. & Sarett, H. P. (1974). Taurine synthesis, concentration, and bile salt conjugation in rat, guinea pig, and rabbit. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **147**: 855-858.

Sturman, J. A. & Gaull, G. E. (1975). Taurine in the brain and liver of the developing human and monkey. *Journal of Neurochemistry* **25**: 831-835.

Styp von Rekowski, K. (2004). Taurin als Stickstoffquelle für Bakterien: Isethionat als Produkt? *Diplomarbeit, Universität Konstanz*.

Tan, S. A. & Tan, L. G. (1989). Distribution of ciliatine (2-aminoethylphosphonic acid) and phosphonoalanine (2-amino-3-phosphonopropionic acid) in human tissues. *Clinical Physiology and Biochemistry* **7**: 303-309.

Ternan, N. G., McGrath, J. W. & Quinn, J. P. (1998). Phosphoenolpyruvate phosphomutase activity in an L-phosphonoalanine-mineralizing strain of *Burkholderia cepacia*. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 2291-2294.

Ternan, N. G. & Quinn, J. P. (1998). Phosphate starvation-independent 2-aminoethylphosphonic acid biodegradation in a newly isolated strain of *Pseudomonas putida*, NG2. *Systematic and Applied Microbiology* **21**: 346-352.

van Loon, W. M. G. M., Boon, J. J. & de Groot, B. (1993). Quantitative analysis of sulfonic acid groups in macromolecular lignosulfonic acids and aquatic humic

substances by temperature-resolved pyrolysis-mass spectrometry. *Environmental Science and Technology* **27**: 2387-2396.

Vessey, D. A., Crissey, M. H. & Zakim, D. (1977). Kinetic studies on the enzymes conjugating bile acids with taurine and glycine in bovine liver. *Biochemical Journal* **163**: 181-183.

Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* **173**: 697-703.

White, R. H. (1988). Characterization of the enzymatic conversion of sulfoacetaldehyde and L-cysteine into coenzyme M (2-mercaptomethanesulfonic acid). *Biochemistry* **27**: 7458-7462.

Wieser, M., Denner, E. B., Kampfer, P., Schumann, P., Tindall, B., Steiner, U., Vybiral, D., Lubitz, W., Maszenan, A. M., Patel, B. K., Seviour, R. J., Radax, C. & Busse, H. J. (2002). Emended descriptions of the genus *Micrococcus*, *Micrococcus luteus* (Cohn 1872) and *Micrococcus lylae* (Kloos et al. 1974). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**: 629-637.