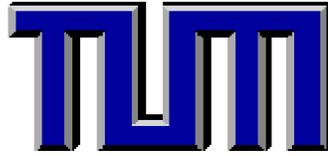




Fachhochschule
Weihenstephan

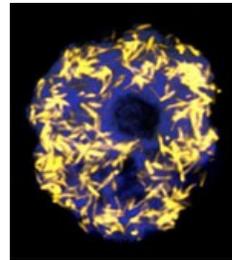
University of Applied Sciences



Technische Universität
München - Weihenstephan

Lehrstuhl für Genomorientierte Bioinformatik der
Technischen Universität München

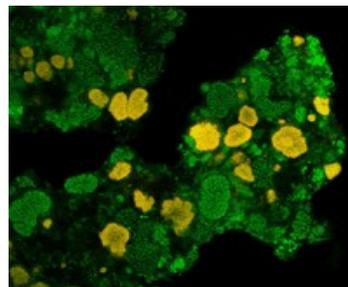
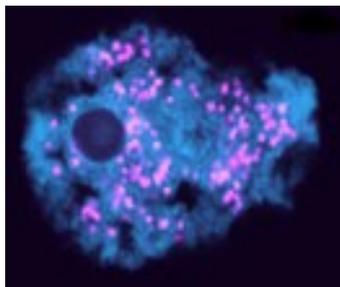
Diplomarbeit in der Bioinformatik



**Vergleichende Analyse der Metabolismen von Vertretern
der Bacteroidetes, Nitrifizierer und Chlamydien**

**Erstellung eines Vorschlages für ein mögliches
Kulturmedium für *Parachlamydia acanthamoebae* UV7**

Christian Hainzinger



Aufgabensteller: Prof. Dr. Bernhard Haubold
Betreuer: Dr. Thomas Rattei
Abgabetermin: 28.04.2008

Eidesstattliche Erklärung:

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit von mir selbst und ohne fremde Hilfe verfasst und noch nicht anderweitig für Prüfungszwecke vorgelegt wurde.

Es wurden keine anderen als die angegebenen Quellen oder Hilfsmittel benutzt. Wörtliche und sinngemäße Zitate sind als solche gekennzeichnet.

Freising, den

.....
Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

1	Abstract	5
2	Einleitung	7
2.1	Grundlagen	8
2.1.1	Reaktion	8
2.1.2	Enzyme	9
2.1.3	Stoffwechselwege	9
2.1.4	Kulturmedium	10
2.2	Vorstellung der untersuchten Bakterien	11
2.2.1	Chlamydien	12
2.2.2	Nitrifizierer	14
2.2.3	Bacteroidetes	15
2.2.4	PEDANT	17
2.3	Analyse der Stoffwechselwege	18
2.3.1	Homologie	18
2.3.2	Funktionelle Module	19
2.3.3	KEGG Datenbanken	21
2.3.4	MetaboloMIPS	21
2.3.5	Pathway Tools	25
2.4	Grundlagen für die Transportervorhersagen	27
2.4.1	Was sind Transporter?	28
2.4.2	Wo findet man Informationen über Transporterproteine	30
2.5	Entwurf eines Kulturmediums anhand von Informationen aus einer Genomanalyse	34
3	Eigene Arbeit	36
3.1	PathKEGG	36
3.2	Änderung an MetaboloMIPS	38
3.3	Transportervorhersage	42
3.3.1	Aminosäuren	42
3.3.2	Nukleotide, Nukleoside oder Basen	42
3.3.3	Zucker und Zuckerderivate	42
3.3.4	Vitamine und Cofaktoren	44
3.3.5	Sekretionssysteme	44
3.3.6	Antidrug -Exporter	45
3.3.7	Kanäle und Porter für Elemente	45
3.3.8	Proteine der Äußeren Membran	45
3.3.9	Transporter für andere Moleküle	47
3.3.10	Hilfsproteine	47
3.3.11	Unklassifizierte Proteine	49
3.4	Vergleich der Chlamydien	49
3.5	Vergleich der Nitrifizierer	53
3.6	Vergleich der Bacteroidetes	59

3.7	Ergebnisse der Stoffwechselwegsvorhersagen mittels der Pathway Tools für <i>Ameobophilus asiaticus</i> und <i>Parachlamydia acanthamoebae</i> UV7	64
3.7.1	<i>Ameobophilus asiaticus</i>	65
3.7.2	<i>Parachlamydia acanthamoebae</i> UV7	67
3.7.3	Vergleich	69
4	Vorschlag für ein Kulturmedium	72
4.1	Zusammenfassung des Metabolismus	72
4.1.1	Import von Zuckern und einschleusen von diesen in die Glykolyse und den Pentose-Phosphat-Weg	72
4.1.2	Zwischenprodukte des Pentose-Phosphat-Weges und ihre Verwendung	72
4.1.3	Zwischenprodukte der Glykolyse und ihre Verwendung	73
4.1.4	Zwischenprodukte des Citratzyklus und ihre Verwendung	73
4.1.5	Synthese von Aminosäuren aus dem L-Serin	73
4.1.6	Synthese von Aminosäuren aus L-Arginin und L-Histidin	74
4.1.7	Weitere von außen aufgenommene Aminosäuren	74
4.1.8	Synthese von Pyrimidin-Nukleotiden	74
4.1.9	Synthese von Purin-Nukleotiden	75
4.1.10	Aufnahme von Spurenelementen, Phosphat, Salzen, Stickstoff und Export von Schwermetallen	75
4.2	Vorschlag für ein Kulturmedium	77
5	Diskussion	78
5.1	Vor- und Nachteile der verwendeten Programme	78
5.1.1	Vorteile	79
5.1.2	Nachteile	79
5.2	Kultivierungsvorschlag	80
5.3	Ausblick	80
5.3.1	Probleme	80
5.3.2	Weiterentwicklungsmöglichkeiten	81
5.4	Danksagung	82
6	Appendix	83
6.1	Anwendung der Pathway Tools	84

1 Abstract

The vast majority (> 99 %) of bacteria, can not be cultivated so far with the established culture media and cultivation techniques. The chlamydiae are a group of bacteria, which are living as symbionts and parasites in a wide range of hosts, like human, cow, mouse, bird and amoebas. To date no representative of the chlamydiae could be axenically cultured. Chlamydia like *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 are usually cultivated together with their hosts in a so called mixed culture. Unfortunately a great number of experiments of transcriptomics and proteomics can't be carried out in mixed culture. These need uncontaminated RNA and proteins samples to obtain reliable results. Therefore it would be very useful, if one bacterium of the Chlamydiae e.g. *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 could be grown on an axenic culture. It seems to be the best candidate for cell-free cultivation, because it has the biggest genome of all Chlamydia sequenced so far. A successful cultivation of UV7 will allow researchers to use experiments and methods which are unfeasible until now. These investigations will lead to new insights in the chlamydial lifestyle and they will identify new targets for drugs and vaccines against the pathogenic agents of the Chlamydiae. Since the culture medium is a critical part of the cultivation, it's interesting to know, which components a culture medium must have, so that *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 could grow in absence of his natural host. To create an appropriate culture medium, I had to know, which compounds would be necessary for generation of energy and the biosynthesis of amino acids; lipids, nucleotides, vitamins and so on. Secondly I needed to know, which of these compounds could be synthesized by UV7, and which could be imported by transporter proteins. To clarify these question I analyzed the metabolic pathways of *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 and predicted possible transporters.

I analyzed the metabolism of *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 with two different programs. Both programs use a homology-based technique to identify enzymes in the genome of UV7 and map these to known reference pathways. Afterwards they use different algorithms to compute a so called pathscore, which quantifies the likelihood, that this pathway exists in UV7. Through the combination of the results of the two programs, I tried to gain as much information as possible about putative pathways and to minimize false-positive hits. Every predicted pathway was checked by myself, against knowledge from literature. This was done using information extracted by a review of the known literature for chlamydia and bacteria. I predicted the possible transporter proteins by a homology approach, where I blasted all proteins of *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 against the TCDB database. The BLAST-hits were used for a consideration on the basis of information from the TCDB database and several papers. Then I combined the results of the metabolic analyzes and the transporter prediction to create an overall picture of the metabolism of *Parachlamydia acanthamoebae* UV7. I used the picture thus created as basis for my design of a draft proposal of a cell-free culture medium.

Due to the fact, that *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 can import glucose and converting it into glucose-6-phosphate, the carbon source of my culture media must be glucose. From the inability to synthesize ribonucleotides de novo and the presence of a transporter for them, I concluded that my culture medium must contain the four ribonucleoside triphosphates ATP, CTP, GTP and UTP. The culture medium also should include the essential amino acids arginine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, threonine, tryptophan and valine, because UV7 is unable to synthesize them. The vitamins coenzyme A, vitamine B₁₂ and vitamine B₆ also have to be a part of the medium, because they are playing important roles in the metabolism of *Parachlamydia acanthamoebae*

UV7, and it can't synthesized them. The culture medium should further contain inorganic salts, which include sodium and potassium, and trace elements like iron, copper, cobalt, nickel and magnesium should be also a part of the medium. I also determined that sulfate and phosphate must be compounds, which should be covered by the medium to fulfill the requirements of *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 after phosphor and sulfur. To provide a nitrogen source in my medium, a component must be nitrite or nitrate. A possible culture medium, which contains all listed constituents, should allow the cell-free cultivation of *Parachlamydia acanthamoebae* UV7.

2 Einleitung

Die Mehrheit (> 99 %) der in der Natur vorkommenden Bakterien konnten mit den bisher vorhandenen Nährmedien und Techniken im Labor noch nicht kultiviert werden [74]. Eine Klassifikation der Mikroorganismen anhand einer rRNA Analyse zeigte, dass die Mehrheit der in der Natur vorkommenden Mikroben keine Gegenstücke in den bisher kultivierten Organismen haben [59]. Eine Gruppe von Bakterien, bei denen noch nie ein Vertreter axenisch¹ kultiviert werden konnte, sind die Chlamydien. Die Chlamydien, zu denen *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 und *Protochlamydia amoebophila* UWE25 gehören, sind interzelluläre Parasiten bzw. Symbionten unterschiedlichster Lebewesen wie z.B. Mensch, Katze, Kuh, Schaf, Maus, Vögel und Amöben. Ein Wachstum von Vertretern der Chlamydien konnte im Labor nur erfolgen, wenn diese in einer Kultur zusammen mit den dazu gehörigen eukaryontischen Wirtszellen lebten. Kulturen in denen verschiedene Bakterien oder Zelltypen leben, werden Mischkulturen genannt. Allerdings sind mit Mischkulturen eine Vielzahl von Untersuchungen nicht durchführbar. Deshalb wäre es äußerst interessant für die Forschung, einen Vertreter der Chlamydien in Reinkultur zu bringen. Ein guter Kandidat dafür wäre z.B. *Parachlamydia acanthamoebae* UV7, da dieses das größte Genom aller bisher sequenzierten Chlamydien besitzt. Unter Reinkulturen versteht man eine auf einem Nährmedium wachsende Kultur eines einzigen Bakterienstamms. Diese Kultur muss frei von Kontamination wie z.B. anderen Bakterien, Pilzen oder Wirtszellen sein. Moderne experimentelle Ansätze wie z.B. *Transcriptomics* und *Proteomics*, sind nur sinnvoll, wenn die RNA bzw. Proteine unkontaminiert aus einer Kultur extrahiert werden konnten. Dies ist allerdings nur in Reinkulturen möglich.

In der *Transcriptomic* untersucht man die Mengen von verschiedenen synthetisierten mRNA in einer Kultur bei bestimmten Umweltbedingungen, meistens durch *high-throughput* Techniken, die auf der DNA-Microarray Technologie basieren. Unter *Proteomics* versteht man die Untersuchung von allen Proteinen, die von einem Organismus exprimiert werden können. Bei dieser Untersuchung versucht man die Proteine zu identifizieren und sie in Proteinfamilien zu zuordnen. Dies geschieht, indem man ihre Funktionen, 3-D Strukturen und Proteinsequenzen analysiert. Anhand dieser Gesichtspunkte versucht man dann, die Proteine in die jeweiligen Familien einzuordnen. Desweiteren werden in der *Proteomics* die Interaktionen verschiedener Proteine untereinander bzw. mit verschiedenen Substraten untersucht. Außerdem lassen sich nur in Reinkulturen die metabolischen Fähigkeiten eines Organismus experimentell erforschen. Die beliebteste Methode dafür ist, die Markierung eines Substrates mit einem radioaktiven Element, welches dann vom untersuchten Mikroorganismus aufgenommen wird und somit in seinen Metabolismus eingebracht wird. Durch die Umwandlung des markierten Substrates im Stoffwechsel entstehen nun ebenfalls markierte Zwischen- und Endprodukte, anhand derer man auf den genauen Ablauf der verschiedenen Stoffwechselwegen schließen kann. Desweiteren lassen sich simple Untersuchungen wie z.B. mikroskopische Analysen oder die Bestimmung von Wachstumskriterien (z.B. *wird das Wachstum durch bestimmte Antibiotika gehemmt?*) am Besten an Reinkulturen durchführen.

Durch solche Untersuchungen an *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 könnte man z.B. mehr über den chlamydialen Lebenszyklus und den genetischen bzw. biologischen Besonderheiten² der Chlamydien erfahren. Im Zuge dieser Untersuchungen könnte man vielleicht auf neue Ansätze für die Therapie bzw. für Impfstoffe gegen die pathogenen Vertreter der Chlamydien stoßen. Aus diesen Gründen wäre eine Reinkultur für *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 erstrebenswert. Da für die Kultivierung eines

¹Wachstum von Bakterien in einer Kultur ohne die Anwesenheit von Wirtszellen bzw. keimfreies Wachstum von Zellen oder Mikroorganismen

²z.B. könnte dann vielleicht das Problem des Peptidoglykans gelöst werden, siehe Kapitel 2.2.1

Bakteriums in Reinform das Kulturmedium bzw. -lösung von entscheidender Bedeutung ist, stellt sich die Frage, welche Komponenten ein Medium enthalten muss, damit nur *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 allein, ohne die Anwesenheit von Wirtszellen wachsen kann. Um ein passendes Nährmedium zu gestalten, sollte man nun folgende Punkte über das zu kultivierende Bakterium wissen:

- Welche Substrate benötigt das Bakterium zur Energiegewinnung und für die Biosynthese von z.B. Phospholipiden, Aminosäuren, Nukleotiden, Vitaminen usw.?
- Welche dieser Substrate kann das Bakterium selbst erzeugen, entweder durch Synthese oder Abbau?
- Welche Substrate (z.B. Zucker, Aminosäuren oder Vitamine) kann das Bakterium über Transporter aufnehmen?

Um diese Fragen zu klären, wäre es interessant zu wissen, welche Stoffwechselwege und Transportsysteme in diesem Bakterium vorhanden sind. Diese wurden geklärt, indem eine Analyse der Stoffwechselwege mit den Pathway Tools und MetaboloMIPS durchgeführt wurde. Eine Beschreibung über die Pathway Tools ist im Kapitel 2.3.5 zu finden, während die Ergebnisse der Stoffwechselwegsanalyse für *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 im Kapitel 3.7.2 beschrieben sind. Es wurde auch eine Analyse der möglichen Transporter von *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 durchgeführt. Die Ergebnisse und eine nähere Beschreibung der verwendeten Methodik dafür finden sich im Kapitel 3.3. Das aus den beiden Analysen resultierende Gesamtbild des Metabolismus von *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 wird im Kapitel 4.1 beschrieben, und dazu verwendet um auf die notwendigen Komponenten eines möglichen Kultivierungsmediums für *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 zu schließen (siehe Kapitel 4.2).

Im Zuge der Diplomarbeit wurde nicht nur ein nützliches Programm mit dem Namen *PathKEGG* zur Analyse von Stoffwechselwege in Java entwickelt, sondern es wurden auch noch die Stoffwechselwege von *Ameobophilus asiaticus* mit Hilfe der Pathway Tools untersucht. Desweiteren wurden die Stoffwechselwege von mehreren Bakterien bestimmter Ordnungen mittels MetaboloMIPS miteinander verglichen.

2.1 Grundlagen

In den nun folgenden Kapiteln werden die untersuchten Bakterien vorgestellt, die Grundlagen der Stoffwechselweg- und Transporteranalyse erläutert und die wichtigsten chemischen und biologischen Begriffe erklärt. Zusätzlich werden ähnliche bereits durchgeführte Versuche zur Erstellung eines Kulturmediums für andere Bakterien beschrieben und mit meinem Ansatz verglichen.

2.1.1 Reaktion

Wenn aus bestimmten chemischen Verbindungen (*den so genannten Edukten oder Reaktanten*) andere chemische Verbindungen (*die so genannten Produkte*) entstehen, indem die Atome der Edukte andere Bindungen eingehen, nennt man diesen Vorgang eine chemische Reaktion. Dabei wird Energie umgewandelt (endotherme Reaktion: d.h. man muss Energie aufwenden, damit die Reaktion abläuft) bzw. freigesetzt (exotherme Reaktion: Reaktion läuft von alleine ab, und dabei wird auch noch Energie in Form von z.B. Wärme oder Licht frei). Die Reaktion unterliegt dabei den Gesetzen der Energieerhaltung und der Entropie. Eine Reaktion endet, wenn sich ein *Chemisches Gleichgewicht* (Die Konzentrationen von Edukten und Produkten bleiben konstant) eingestellt hat oder die Reaktanten komplett umgewandelt

worden sind. Bei reversiblen Reaktionen können sowohl die Edukte in Produkte als auch gleichzeitig die Produkte in Edukte umgewandelt werden. Der Ablauf einer chemischen Reaktion wird als Reaktionsgleichung dargestellt. Eine mögliche Reaktionsgleichung sieht wie folgt aus: $A + B \rightarrow C + D$. Durch die Verwendung von Katalysatoren kann die Aktivierungsenergie³ bei sowohl endothermen als auch exothermen Reaktionen gesenkt bzw. angehoben werden. Ein Katalysator ist ein chemischer Stoff, welcher die Aktivierungsenergie einer Reaktion herauf- bzw. herabsetzt ohne selbst dabei verbraucht zu werden. Bei biochemischen Reaktionen in Zellen nennt man die Katalysatoren Enzyme.

2.1.2 Enzyme

Proteine, welche chemische Reaktionen katalysieren können, werden Enzyme genannt. Sie spielen eine bedeutende Rolle im Stoffwechsel aller Organismen, denn fast alle biochemischen Reaktionen, von der Glykolyse bis zum Abbau von Ethanol, werden von Enzymen katalysiert und gesteuert. Die EC-Nummern (*engl. Enzyme Commission numbers*) stellen ein numerisches Klassifikationsschema für Enzyme dar, welches vom Komitee für Nomenklatur der Internationalen Union für Biochemie und Molekularbiologie (IUBMB) eingeführt wurde. Dieses Klassifikationsschema basiert nicht auf den verschiedenen Enzymen, sondern auf den chemischen Reaktionen, die von den jeweiligen Enzymen katalysiert werden. Jede EC-Nummer ist eine einzigartige vierstellige Kennzahl, deren einzelne Zahlen durch Punkte getrennt werden. Die erste Ziffer codiert für eine von sechs Enzymhauptklassen. Dazu gehören Oxidoreduktasen (1), Transferasen (2), Hydrolasen (3), Lyasen (4), Isomerasen (5) und Ligasen (6). Die Zahl an der zweiten Stelle beschreibt, welche Klasse von Substrat (*Komponente oder Gruppe*) an der Reaktion teilnimmt. Die dritte Ziffer beschreibt, welche Reaktion abläuft, welche darstellt welche anderen chemischen Komponenten noch an der Reaktion beteiligt sind. Die Zahl an der vierten Stelle ist eine sequenzielle Nummer, welche dazu da ist, Enzyme der gleichen Sub-Subklasse zu unterscheiden. Ein Beispielaufbau der Codierung einer EC-Nummer ist: 2.x.x.x (Transferasen), 2.6.x.x (Transferasen, die stickstoffhaltig Gruppen übertragen), 2.6.99.x (Transferasen, die andere stickstoffhaltig Gruppen übertragen) und 2.6.99.2 (pyridoxine 5'-phosphate synthase).

2.1.3 Stoffwechselwege

Ein Stoffwechselweg ist ein durch Enzyme katalysierter Auf- bzw. Ab- oder Umbauprozess in einer Zelle, der aus mehreren hintereinander folgenden Reaktionen bestehen kann. Zwei Reaktionen bilden z.B. einen Stoffwechselweg, wenn das Produkt der ersten Reaktion als Edukt der zweiten Reaktion verwendet werden kann. Man unterscheidet zwischen zyklischen und linearen Stoffwechselwegen. Im zyklischen Stoffwechselweg können Metabolite eintreten und wieder entnommen werden, der Ring wird durch Regenerierung und Nachlieferung des Ausgangsmoleküls geschlossen. Beispiele für zyklische Stoffwechselwege sind der Citratzyklus, der Ureazyklus (Harnstoffzyklus) und der Calvin-Zyklus. In einem linearen Stoffwechselweg wird aus dem Startmolekül ein Endmetabolit hergestellt, welcher nicht identisch mit dem Startmolekül ist. Beispiele für lineare Stoffwechselwege sind die Glykolyse, der Pentose-Phosphat-Weg und die Biosynthese von Häm. Die Gesamtheit aller Stoffwechselwege in der Zelle nennt man den Stoffwechsel bzw. Metabolismus, und dieser läßt sich in drei Kategorien unterteilen. Die erste Kategorie ist der Katabolismus, in dem aufgenommene Nährstoffe oder selbstproduzierte Reservestoffe (wie z.B.

³Die Aktivierungsenergie ist die Energie, die erforderlich ist, um ein Teilchen aus einem bestimmten Energieniveau in ein höheres Energieniveau zu überführen.

Glykogen) in kleinere Bausteine zerlegt werden (Stoffwechselwege dieser Kategorie sind z.B. die Glykolyse, der Citratzyklus oder die Fettsäureoxidation). Im Intermediärstoffwechsel dienen die Stoffwechselwege zur Energiegewinnung und der Bereitstellung von Bausteinen (z.B. Acetyl-CoA, Zucker) für den Anabolismus. Zum Anabolismus gehören alle Stoffwechselwege, die für die Biosynthesen von Proteinen, Nukleinsäuren, Vitaminen, Phospholipiden, Kohlenhydraten und Zellstrukturen zuständig sind (z.B. Synthesen von Coenzym A, Häm, Lectin oder Peptidoglykan).

2.1.4 Kulturmedium

Ein Kulturmedium, auch Nährmedium oder Substrat genannt, kann zur Kultivierung von Mikroorganismen, Zellen und Geweben dienen. Man unterscheidet zwischen flüssigen (dann auch Nährlösung genannt) und gelierten, also festen (dann auch Nährböden genannt) Nährmedien. Nährmedien werden zum Beispiel eingesetzt, um Bakterien bzw. Pilze oder Hefen in Bioreaktoren wachsen zu lassen, zur Kultivierung von Zellen und Mikroorganismen zu Forschungszwecken, zur Prüfung auf bestimmte StoffwechsellLeistungen von Mikroorganismen und deren Identifizierung, und zur Identifizierung oder Quantifizierung von bestimmten Mikroorganismen. Prinzipiell muss ein Medium eine für den Organismus verwendbare Energiequelle (z.B. organische Stoffe, Schwefel oder Nitrat) und alle von ihm benötigten Nährstoffe (Kohlenstoff, Stickstoff, Schwefel, Phosphat, Spurenelemente) enthalten. Ein übliches Medium enthält die folgenden Komponenten:

- Kohlenstoffquelle (Glukose, Laktose, Saccharose usw.)
- Stickstoffquelle (Harnstoff, Ammoniak, Peptone)
- Phosphatquelle
- Spurenelemente (Eisen, Kupfer, Cobalt)
- anorganische Salze (können Natrium, Kalium, Ammonium enthalten)

Optional können auch noch Hemmstoffe (z.B. Antibiotika, um das Wachstum von unerwünschten Mikroorganismen zu verhindern), Puffersubstanzen (zu Stabilisierung des pH-Wertes), Indikatoren (um bestimmte Änderungen anzuzeigen) oder Wachstumshilfsstoffe (z.B. Vitamine oder Hormone, um das Wachstum der Mikroorganismen zu beschleunigen) im Medium enthalten sein. Bei der Herstellung eines Nährmediums werden je nach Rezeptur alle Nähr- und Zusatzstoffe in destillierten und demineralisiertem Wasser gelöst. Es wurde im Zuge der Diplomarbeit versucht ein solches Rezept für *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 zu erstellen.

Komplexe Medien:

Medien, welche aus Nährstoffen bestehen, deren Inhalte nicht chemisch und quantitativ bestimmt sind, werden Komplexe Medien genannt. Beispiele für diese Nährstoffe sind Hefeextrakt, Rindfleisch-Extrakt oder Caseinhydrolysat. Die Vorteile eines Komplexmediums sind, dass es sich schnell und einfach herstellen lässt und alle essentiellen Wachstumsstoffe enthält. Außerdem gibt es das Komplexmedium auch als Fertigmedium, bei dem das Mikroorganismenwachstum getestet ist und garantiert wird. Ein Nachteil der Fertigmedien ist, dass sie oft teuer sind, und ihre Aufreinigung nicht leicht durchzuführen ist.

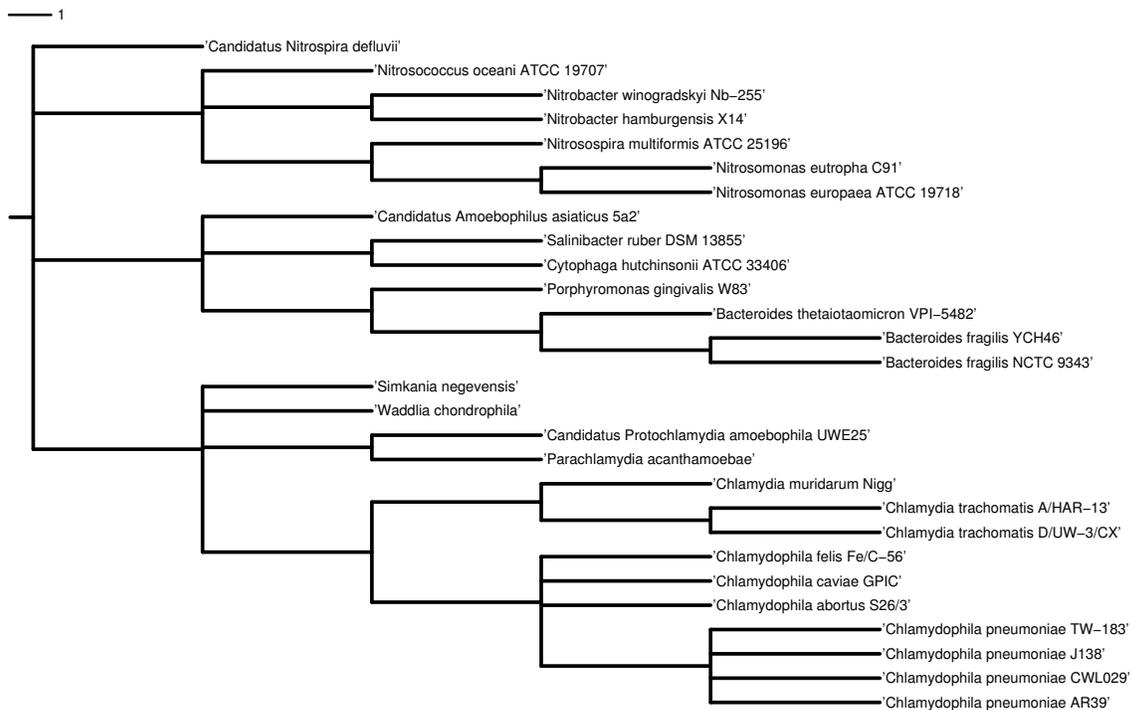


Abbildung 1: taxonomischer Baum aller untersuchten Bakterien

Minmalmedien:

Definierten Medien auch Minimalmedien genannt, sind Medien bei denen die genaue Zusammensetzung der Inhaltsstoffe bekannt ist. Diese werden normalerweise genau auf den jeweiligen Mikroorganismus zugeschnitten. Nachteile dieser Medien sind, dass ihre Herstellung aufwendig ist, da die Einzelkomponenten genau einzuwiegen sind, und es sind Vorversuche zur Medienoptimierung notwendig.

2.2 Vorstellung der untersuchten Bakterien

Nun werden die untersuchten Bakterien vorgestellt, indem zu jedem Bakterium Informationen zur Lebensweise, Phylogenie und besondere Eigenschaften aufgelistet werden. Um die verwandtschaftlichen Beziehungen der untersuchten Bakterien zu verdeutlichen, wurde ein taxonomischen Baum erstellt (siehe Abb. 1). Bei der Vorstellung der einzelnen Bakterien wird immer ihre Form mit angegeben, dabei wurde die Morphologie verwendet, wie sie beim NCBI⁴ benutzt wird, und in den Einträgen der Genomprojekte der einzelnen Bakterien auf der NCBI-Webseite⁵ gefunden werden kann.

⁴National Center for Biotechnology Information

⁵www.ncbi.nlm.nih.gov

2.2.1 Chlamydien

Für 15 Bakterien aus der Ordnung Chlamydiales wurden die Stoffwechselwege vorhergesagt und miteinander verglichen. Eine Auflistung der Bakterien inklusive Informationen über Namen, Genomgröße, Anzahl der Gene, der Proteine und der vorhergesagten Stoffwechselwege⁶ findet sich in der Tabelle 10. Die Größe und Vielfalt der Ordnung Chlamydiales wurde lange Zeit unterschätzt (bis 1966 wurden die Chlamydien zu den Viren gezählt). Dies ist nicht verwunderlich, denn alle Individuen dieser Ordnung sind Symbionten oder Parasiten und lassen sich ohne Wirtszellen nicht kultivieren. Die Chlamydien sind Pathogene bzw. Symbionten bei einer Vielzahl von Lebewesen, wie z.B. Säugetieren, Vögel und Amöben. Die human-pathogenen Chlamydien sind weltweit die häufigsten Verursacher von sexuell übertragbaren Krankheiten, und in den Entwicklungsländern sind sie die häufigsten Verursacher von vermeidbaren Erblindungen. Des Weiteren können sie noch andere Krankheiten wie Lungenentzündung, Arthritis, Alzheimer und Fehlgeburten verursachen. Die Chlamydien haben im Vergleich zu anderen Bakterien einen ungewöhnlichen Lebenszyklus, denn die Chlamydien besitzen zwei unterschiedliche Erscheinungsformen [71]. Die erste Erscheinungsform ist das so genannte *Elementarkörperchen* (EK), in welchem ein Chlamyidium auftritt, bevor es die nächste Wirtszelle befällt. Chlamydien sind nur in der EK-Form infektiös, denn sie haben in dieser Form so gut wie keinen Metabolismus und sind in ihr ca. 0.2 bis 0.3 Mikrometer (= 10^{-6} m) groß. Die zweite Erscheinungsform ist das so genannte *Retikularkörperchen* (RK), welches die Chlamydien innerhalb einer Wirtszelle haben. In dieser Form sind die Chlamydien nicht infektiös, ihr Metabolismus läuft dabei auf Hochtouren und sie sind ungefähr 1 Mikrometer groß. Die Chlamydiaceae bauen kein Peptidoglykan in ihre äußere Membran ein, was verwunderlich ist, denn sie sind sehr wohl in der Lage Peptidoglykan zu synthetisieren. Es wird vermutet, dass das Peptidoglykan vielleicht eine Rolle bei der Teilung der *Retikularkörperchen* und bei der Umwandlung von diesen in die *Elementarkörperchen* spielt [17]. Prinzipiell wird über das Thema Chlamydien und Peptidoglykan diskutiert, und auch die *Chlamydial Anomaly* [62] genannt. Die *Parachlamydiaceae* haben es geschafft, innerhalb von Amöben zu überleben, was sehr erstaunlich ist, denn Amöben ernähren sich normalerweise von Bakterien. Der Lebenszyklus der Chlamydien sieht wie folgt aus:

1. Infektion einer Wirtszelle durch EK
2. manchmal Einschluss in einer Vakuole
3. Transformation von EK zu RK
4. Vermehrung durch Zellteilung der RK's
5. Transformation von RK zu EK
6. Lyse der Zelle

Die Chlamydien wurden in die Gruppen der pathogenen Chlamydien und der Umweltchlamydien unterteilt. In die Gruppe der pathogenen Chlamydien gehören alle Vertreter der Gattungen *Chlamydophila* und *Chlamydia* aus der Familie *Chlamydiaceae*. Während zu den Umweltchlamydien die Gattungen *Parachlamyida*, *Neochlamydia* und *Candidatus Protochlamydia* aus der Familie *Parachlamydiaceae* und die Gattung *Waddlia* aus der Familie *Waddliaceae* und die Gattung *Simkania* aus der Familie *Simkaniaceae* gehört. Nun werden die untersuchten Chlamydien der jeweiligen Gruppen kurz vorgestellt.

⁶Die Anzahl der Stoffwechselweg kommt von der Vorhersage mit den Pathway Tools

pathogene Chlamydien:

Chlamydia:

Chlamydia muridarum Nigg ist ein pathogenes, gramnegatives⁷, stäbchenförmiges Bakterium, das Mäuse befällt und bei ihnen eine Lungenentzündung verursacht [41].

Chlamydia trachomatis A/HAR-13 ist ein gramnegatives, pathogenes, stäbchenförmiges Bakterium, das beim Menschen Erblindung verursachen kann. Es kann im Gegensatz zu seinem nächsten untersuchten Verwandten, dem *Chlamydia trachomatis* D/UW-3/CX, kein Tryptophan synthetisieren [49].

Chlamydia trachomatis D/UW-3/CX ist ein gramnegatives, pathogenes, stäbchenförmiges Bakterium, das beim Menschen den Genitaltrakt befällt. Das Genom von *Chlamydia trachomatis* D/UW-3/CX wurde im Zuge der Publikation [35] untersucht.

Chlamydophila abortus S26/3 ist ein gramnegatives, pathogenes und stäbchenförmiges Bakterium, das bei Wiederkäuern die Plazenta besiedeln kann und Fehlgeburten oder schwächliche Neugeborene verursachen kann. Sein Genom wurde in der Publikation [31] näher untersucht.

Chlamydophila caviae GPIC ist ein gramnegatives, pathogenes und stäbchenförmiges Bakterium, das bei Meerschweinchen eine Entzündung der Augenlider verursachen kann. Es befällt nur Meerschweinchen, denn es kann nicht auf andere Tiere wie Hamster, Hasen oder Mäuse übertragen werden [42]. *Chlamydophila caviae* GPIC ist eines der wenigen Chlamydien, die Tryptophan synthetisieren können [42].

Ein in Katzen vorkommendes pathogenes Chlamydium ist *Chlamydophila felis* Fe/C-56, welches ein stäbchenförmiges und gramnegatives Bakterium ist. Es kann in Katzen Atmungsprobleme, Entzündung der Augenlider und Rhinitis (eine Entzündung der Nasenschleimhaut = Schnupfen) verursachen. Auch *Chlamydophila felis* Fe/C-56 besitzt keine Stoffwechselwege zur Tryptophansynthese [43].

Chlamydophila pneumoniae AR39 ist ein stäbchenförmiges, gramnegatives Bakterium, das bei Menschen eine Bronchitis, Pharyngitis (Rachenentzündung) oder Pneumonie (Lungenentzündung) auslösen kann. Der Stamm AR39 wurde 1983 aus einem Studenten der *University of Washington*, welcher eine akute Infektion der Atemwege (acute respiratory (=AR) tract infection) hatte, isoliert. Das Genome von *Chlamydophila pneumoniae* AR39 wurde in der Publikation [41] sequenziert.

Chlamydophila pneumoniae CWL029 ist ein stäbchenförmiges, gramnegatives Bakterium, das bei Menschen eine Bronchitis, Pharyngitis (Rachenentzündung) oder Pneumonie (Lungenentzündung) auslösen kann. Bei der Sequenzierung des Genoms von CWL029 stellte sich heraus, dass CWL029 zwar Tryptophan abbauen kann, es allerdings nicht selbst synthetisieren kann [39].

Chlamydophila pneumoniae J138 ist ein gramnegatives und stäbchenförmiges Bakterium, welches zu einer Rachen- (Pharyngitis), Lungenentzündung (Pneumonie) oder einer Entzündung der Bronchien (Bronchitis) führen kann. Der Stamm J138 wurde 1994 in Japan aus einem fünfjährigen Jungen mit akuter Bronchitis isoliert. Sein Genom wurde im Zuge der Publikation [30] mit dem Genom des Stamms CWL029 verglichen.

Das stäbchenförmige und gramnegative Bakterium *Chlamydophila pneumoniae* TW-183 verursacht bei

⁷Gramnegativ bedeutet, dass bei einer so genannten Gram-Färbung, das Bakterium nach der Einfärbung nicht dunkelblau wird, sondern farblos bleibt.

Menschen Bronchitis, Pharyngitis (Rachenentzündung) oder Pneumonie (Lungenentzündung). Der Stamm TW183 wurde erstmals 1965 aus der Bindehaut eines Kindes in Taiwan isoliert.

Umweltchlamydien:

Candidatus Protochlamydia amoebophila UWE25 ist ein gramnegatives, stäbchenförmiges Bakterium, das als Symbiont in freilebenden Amöben vom Typ *Acanthamoeba sp.* UWE25 lebt. Sein Genom ist zweimal so groß wie die Genome der pathogenen Chlamydien (siehe Tabelle 10). Es hat im Gegensatz zu den pathogenen Chlamydien einen vollständigen Citratzyklus, benutzt Menaquinone als Ersatz für Ubiquinone und kann einige Aminosäuren mehr synthetisieren als die pathogenen Chlamydien [27].

Parachlamydia acanthamoebae UV7 ist ebenfalls ein in Amöben vom Typ *Acanthamoebae* lebender Symbiont, dessen Genom dreimal so groß ist wie jedes der Genome der pathogenen Chlamydien. Eine Analyse seines möglichen Metabolismus wurde im Zuge dieser Diplomarbeit durchgeführt und die dazugehörigen Ergebnisse sind im Kapitel 3.7.2 zu finden. *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 wurde erstmals in der Publikation [53] in die Ordnung *Chlamydiales* eingeordnet.

Simkania negevensis Z, dessen natürliche Wirte wohl ebenfalls Amöben sind, kann im Menschen zu Bronchitis und Pneumonie führen. *Simkania negevensis* Z wurde 1993 zum ersten Mal von Simona Kahane in einer kontaminierten Zellkultur in Ber Sheva, welches in der Negev-Wüste liegt, beobachtet. Es wurde im Zuge von [53] erstmals in die Ordnung *Chlamydiales* eingeordnet. Beim Vergleich der Stoffwechselwege der Chlamydien (siehe Kapitel 3.4) wurden zwei verschiedene Versionen von *Simkania negevensis* Z verwendet. Die Genomsequenz von beiden ist identisch, allerdings unterscheiden sich ihre vorhergesagten Proteine. Das liegt daran dass die Annotation der Proteine von *Simkania negevensis* Z (@TIGR) am *The Institute for Genomic Research* (TIGR) durchgeführt wurde, während für *Simkania negevensis* Z die Annotationen automatisch mit Hilfe von Pedant3 am *Lehrstuhl für genomorientierte Bioinformatik* von Patrick Tischler durchgeführt wurden.

Waddlia chondrophila wurde erstmals 1999 aus einer Mischprobe von Lungen- und Lebergewebe eines Kälberfötus [15] isoliert. Freilebende Amöben scheinen der natürliche Lebensraum von *Waddlia chondrophila* zu sein. Sein Genom ist ca. zweimal so groß, wie das der pathogenen Chlamydien.

2.2.2 Nitrifizierer

Bei den untersuchten Nitrifizierern handelt es sich um sechs Bakterien vom Stamm der Proteobacteria und um ein Bakterium vom Stamm Nitrospirae. In der Tabelle 11 finden sich Informationen über Namen, Genomgröße, Anzahl der Gene, Anzahl der Proteine und der Anzahl der vorhergesagten Stoffwechselwege⁸ der einzelnen Bakterien. Die Bakterien *Nitrobacter hamburgensis* X14 und *Nitrobacter winogradskyi* Nb-255 gehören zur Klasse der Alphaproteobakterien und sind Nitritoxidierer [48]. Die Nitritoxidierer decken ihren Energiebedarf durch die Oxidation von Nitrit zu Nitrat (siehe Abb. 2), und spielen somit eine wichtige Rolle im globalen Stickstoff-Zyklus.

Nitrobacter hamburgensis X14 ist ein stäbchenförmiges, gramnegatives, aerobes Bakterium, welches im Boden vorkommt.

Nitrobacter winogradskyi Nb-255 ist ein stäbchenförmiges, gramnegatives, fakultatives Bodenbakteri-

⁸Die Anzahl der Stoffwechselwege kommt von der Vorhersage mit den Pathway Tools

um. Es kann sowohl unter heterotrophischen⁹ Bedingungen als auch unter lithotrophischen¹⁰ Bedingungen wachsen [37].

Zur Klasse der Betaproteobakterien gehören *Nitrospira multiformis* ATCC 25196, *Nitrosomonas eutropha* C91 und *Nitrosomonas europaea* ATCC 19718, während *Nitrosococcus oceani* ATCC 19707 zur Klasse der Gammaproteobakterien zählt. Allerdings sind sie alle Ammoniakoxidierer [19], und decken ihren Energiebedarf durch die Oxidation von Ammoniak zu Nitrit (siehe Abb. 3), dadurch spielen sie ebenfalls eine wichtige Rolle im globalen Stickstoff-Zyklus.

Nitrospira multiformis ATCC 25196 ist ein gramnegatives, pleomorphisches¹¹, aerobes Bakterium, dessen Lebensraum der Erdboden ist.

Nitrosomonas eutropha C91 ist ein gramnegatives, pleomorphisches Bakterium, das in verschiedenen Lebensräumen (z.B. Boden und Gewässer) gefunden werden kann. Aufgrund einer Vielzahl von Transportern, welche in keinem der anderen Ammoniakoxidierer vorkommen, ist *Nitrosomonas eutropha* C91 besonders resistent gegenüber Schwermetallen [22].

Nitrosomonas europaea ATCC 19718 ist ein gramnegatives, aerobes Bakterium, das sich mit anderen Bakterien seiner Art zu Cocci¹² zusammenlagern kann. *Nitrosomonas europaea* ATCC 19718 benötigt viel Eisen, welches es aus der Umwelt aufnimmt. Diese Eisen benutzt es, um vielen Cytochrome-Proteine zu synthetisieren. Allerdings besitzt es zwar sehr viele Rezeptoren für Siderophore¹³, kann aber Siderophore nicht selbst synthetisieren. Woraus man schließt, dass *Nitrosomonas europaea* ATCC 19718 auf andere Bakterien angewiesen ist, die diese Siderophore ausscheiden. Die Fe³⁺-Siderophore-Komplexe werden einfach von *Nitrosomonas europaea* ATCC 19718 abgeerntet [33].

Nitrosococcus oceani ATCC 19707 ist ein ellipsenförmiges, gramnegatives Bakterium, das nur in Meeren oder anderen salzhaltigen Gewässern gefunden werden kann. *Nitrosococcus oceani* und *Nitrosococcus halophilus* sind bis jetzt die einzigen bekannten Ammoniakoxidierer aus der Klasse der Gammaproteobakterien [24].

Candidatus Nitrospira defluvii ist ein gramnegativer Nitritoxidierer von Stamm der Nitrospirae, der eine spirale Stäbchenform hat und dessen Lebensraum Gewässer sind, allerdings wurde er erstmals im Schlamm einer Kläranlage gefunden [14]. Die *Nitrospira spp.* sind bedeutend wichtigere und effektivere Nitritoxidierer als die *Nitrobacter spp.* [40], obwohl beide Spezies in der gleichen biologischen Nische unter gleichen Umweltbedingungen leben.

2.2.3 Bacteroidetes

Es wurden die Stoffwechselwege von sieben Bakterien aus der Klasse Bacteroidetes vorhergesagt und miteinander verglichen. Die Bakterien in der Klasse haben sich an sehr verschiedene Lebensräume angepasst und besitzen somit unterschiedliche Stoffwechsel, was dazu führt, dass ein Vergleich der Stoffwechselwege nicht viele Gemeinsamkeiten aufzeigen wird. Trotzdem wurde einen Vergleich durchgeführt, da die sechs ausgewählten Bakterien aus phylogenetischer Sicht die nächsten Verwandten zum Bakterium *Candidatus Amoebophilus asiaticus* 5a2 sind, welches gerade von den Wiener Kooperationspartnern

⁹in diesem Fall, dienen organische Stickstoffverbindungen als Energie- und Stickstoffquelle

¹⁰in diesem Fall, dient Nitrit mineralischen Ursprungs als Energie- und Stickstoffquelle

¹¹Ein pleomorphisches Bakterium kann seine Form verändern, z.B. von stäbchenförmig zu spheroid

¹²Cocci sind weintraubenförmige Kluster

¹³Siderophore sind eisenbindende Oligopeptide, die komplexbildende Eigenschaften haben, von aeroben Bakterien gebildet werden und in das umgebende Medium ausgeschieden werden. Durch ihre hohe Affinität zu Fe(III)-Ionen, können sie mit diesen Ionen Komplexe bilden, die wieder per Transporter in das Zellinnere von Bakterien aufgenommen werden.

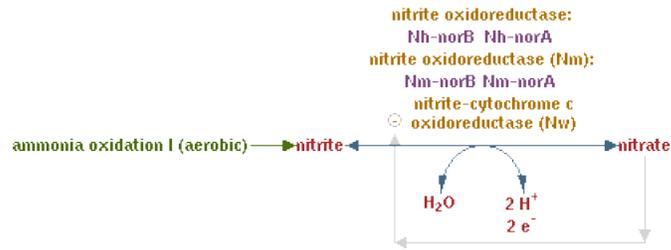


Abbildung 2: Oxidation von Nitrit zu Nitrat

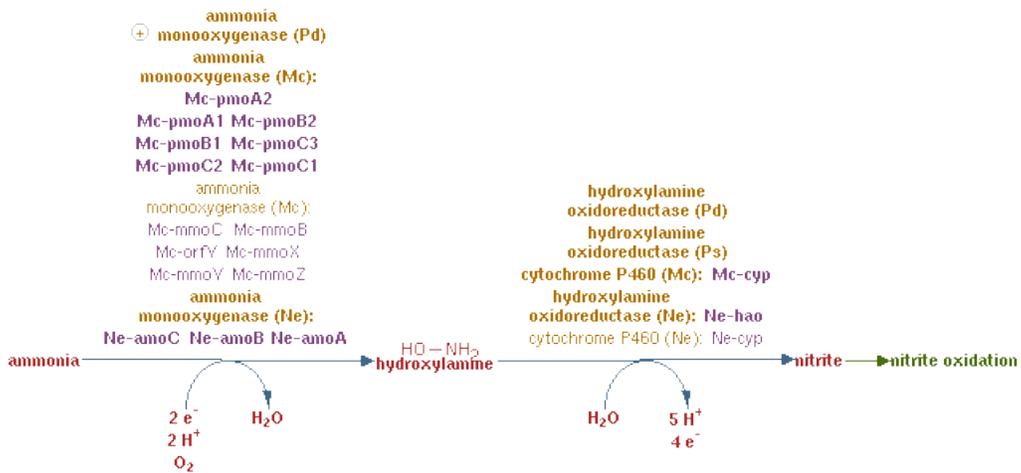


Abbildung 3: Oxidation von Ammoniak zu Nitrit

näher untersucht und sequenziert wird. Eine Liste der Bakterien mit Informationen über Namen, Genomgröße, Anzahl der Gene, Anzahl der Proteine und der Menge der vorhergesagten Stoffwechselwege¹⁴ finden sich in der Tabelle 12.

Die Bakterien *Bacteroides thetaiotaomicron* VPI-5482, *Bacteroides fragilis* YCH46 und *Bacteroides fragilis* NCTC 9343 gehören zur Gattung *Bacteroides* und ihr normaler Lebensraum ist der Darmtrakt von Säugetieren.

Bacteroides thetaiotaomicron ist das am häufigsten vorkommende Darmbakterium bei Säugetieren [20]. Es ist ein gramnegatives, anaerobes, stäbchenförmiges Bakterium, das normalerweise die symbiontische Lebensweise bevorzugt, es kann allerdings auch ein opportunistisches Pathogen werden.

Bacteroides fragilis ist ein gramnegatives, anaerobes, stäbchenförmiges Bakterium, das im Darmtrakt von Säugetieren als opportunistisches Pathogen lebt. *Bacteroides fragilis* gilt als das virulenteste Bakterium aus der Gattung *Bacteroides*, da es eine Vielzahl von DNA-Inversionen im Genom besitzt, welche eine variable Genexpression ermöglichen [10]. Es kann Diarrhöe verursachen und bei einer Infektion im Körper Abszesse bilden.

Porphyromonas gingivalis W83 gehört zur Gattung der *Porphyromonas* und ist ein stäbchenförmiges, gramnegatives, anaerobes Bakterium. Der Lebensraum dieses Bakteriums ist der menschliche Mund und es kann dort zur Parodontose führen [21].

Cytophaga hutchinsonii ATCC 33406 ist ein gramnegatives, stäbchenförmiges, aerobes Bakterium, das oft im Boden, in Süßgewässern und marinen Lebensräumen gefunden werden kann. Dieses Bakterium hat zwei besondere Eigenschaften. Es kann schwerabbaubare organische Makromoleküle wie Chitin, Pectin und Cellulose zerlegen und es benutzt zur Bewegung ein *Gliding motility system*, welches kein Flagellum benötigt [16].

Salinibacter ruber DSM 13855 ist ein gramnegatives, aerobes, halophiles¹⁵ Bakterium, welches aus einer spanischen Meerwasserentsalzungsanlage isoliert wurde. Besonders an diesem Bakterium ist, dass es seinen interzellulären Salzgehalt nicht mittels Protonenpumpen reguliert, sondern seine Proteinsynthese so verändert hat, dass sie unter hohen ionischen Verhältnissen funktioniert [13].

Das Bakterium auf dem das Augenmerk bei der Vorhersage der Stoffwechselwege dieser Gruppe von Bakterien lag, war *Candidatus Amoebophilus asiaticus* 5a2. Es ist ein stäbchenförmiges, gramnegatives Bakterium, das als obligater Symbiont in freilebenden Amöben vorkommt. Es wurde in einer Amöbe vom Typ *Acanthamoeba* sp. TUMSJ-321 gefunden, und konnte weder außerhalb seines Originalwirtes überleben, noch konnte es in eine Amöbe eines anderen Typs transferiert werden [26].

2.2.4 PEDANT

Die Informationen zu den Genomen der untersuchten Bakterien wurden aus der PEDANT¹⁶-Genomdatenbank entnommen. Die PEDANT Genome Datenbank enthält Annotationen zu Sequenzen und Proteinen aus über 450 komplett sequenzierten Genomen [23]. Dies wird ermöglicht durch die gründliche und automatische Benutzung von bioinformatischen Algorithmen zur Analyse von Genomsequenzen. So wird zum Beispiel für jede Sequenz eine Blast-Similarity-Suche gegen die Uniprot Datenbank durchgeführt, außerdem werden Motiv-Suchen gegen die Datenbanken Pfam, BLOCKS und Prosite durchgeführt. Eine Proteinstrukturanalyse, zur Ermittlung von strukturelle Domänen oder der 3-D Proteinstruktur, wird

¹⁴Die Anzahl der Stoffwechselweg kommt von der Vorhersage mit den Pathway Tools

¹⁵halophil: salzliebend. Der Lebensraum von halophile Bakterien enthält eine hohe Konzentration an Salzen.

¹⁶PEDANT steht für *Protein Extraction, Description and ANalysis Tool*

in PEDANT ebenfalls durchgeführt, indem man eine gleichheitsbasierte Identifikation mittels BLAST an den Datenbanken PDB und SCOP verwendet. Zur Erstellung meiner Diplomarbeit verwendete ich die PEDANT Genome Datenbanken der Version 3, die für akademische Benutzer unter der Adresse <http://pedant.gsf.de> frei zugänglich sind. Die Vorhersage der EC-Nummer wird in PEDANT anhand einer Blast-Suche gegen die UniProt Datenbank durchgeführt [4]. Dies bedeutet, dass für jede Proteinsequenz eines Genoms mit Hilfe von blastp [38] die UniProt Datenbank durchsucht wird. Diese Datenbank enthält die größte Sammlung an Informationen für alle bekannten Proteinsequenzen. Falls man von blastp einen Treffer unter einem bestimmten E-Value bekommt, wird aus dem entsprechenden Datenbankeintrag des Treffers die Enzyme Commission Nummer extrahiert (*falls vorhanden*). Diese wird dann der Proteinsequenz mit der gesucht wurde zugeordnet. Die EC-Klassifizierung der Enzyme eines Organismus mit Hilfe von PEDANT basiert also auf Homologie.

2.3 Analyse der Stoffwechselwege

Es gibt eine Vielzahl von Programmen, mit den unterschiedlichsten Ansätzen zur Analyse von Stoffwechselwegen. Da wären z.B. Methoden, die Stoffwechselwege anhand der Homologie oder mit Hilfe von funktionellen Modulen vorhersagen. Es werden nun die Ansätze der Homologie und der funktionellen Module erklärt und anschließend wird die Funktionsweisen, der verwendeten Programmen für die Stoffwechselwegsanalysen erläutert. Die verwendeten Programme wie MetaboloMIPS, PathKEGG und Pathway Tools basieren auf dem Ansatz der Homologie, allerdings besitzen die Pathway Tools auch die Methode *Pathway Hole Filler*, welche teilweise auf dem Ansatz der funktionellen Module basiert.

2.3.1 Homologie

Homologie bedeutet in der Biologie und der Anatomie eine grundsätzliche Übereinstimmung von Organen, Körperstrukturen oder Verhaltensweisen aufgrund eines gemeinsamen evolutionären Ursprungs bei verschiedenen Lebewesen. Wenn man aber in der Bioinformatik von Homologie spricht, meint man oft die Ähnlichkeit von zwei bzw. mehreren DNA- oder Proteinsequenzen aus unterschiedlichen Organismen, wenn diese von einer Sequenz im letzten gemeinsamen Vorfahren dieser Organismen abstammen. Sequenzähnlichkeit kann auch auf andere Weisen entstehen, z.B. dadurch dass kurze Sequenzen schon durch Zufall gleich sein, oder Sequenzen können ähnlich sein, weil sie die gleichen Proteine (z.B. Transkriptionsfaktoren) binden. In diesen Fällen sind sie zwar ähnliche Sequenzen, aber nicht homologe Sequenzen.

Wieso sind aber nun homologe Sequenzen interessant für den Bioinformatiker? Dies liegt daran, dass man davon ausgeht, dass homologe Sequenzen die gleiche Funktion haben bzw. ausüben können. Wenn zwei Proteinsequenzen aus unterschiedlichen Organismen homolog zueinander sind, üben diese Proteine in den jeweiligen Organismen oft die gleiche Funktion aus. Zwei homologe DNA-Sequenzen können dann z.B. in ähnlichen mRNA transkribiert werden. Man macht sich die Tatsache, dass homologe Sequenzen die gleiche Funktion haben, bei den Genomsequenzierungsprojekten zu nutze, wenn es zum Punkt der Annotation der Funktion von Proteinen kommt, die von bestimmte Genen im Genom codiert werden.

Die Ähnlichkeit von zwei bzw. mehreren Sequenzen wird in der Bioinformatik bewertet, indem man mit verschiedenen Algorithmen so genannte Sequenzalignments erstellt. Sequenzalignments sind ein Weg, um Sequenzen anzuordnen, damit man identische bzw. ähnliche Regionen in den Sequenzen identi-

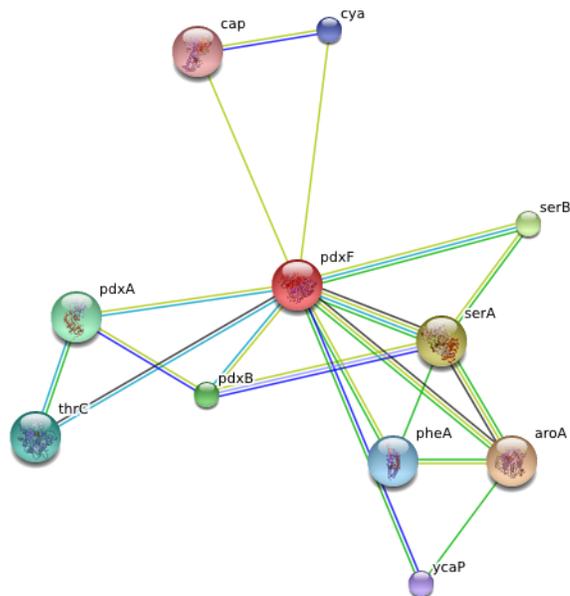


Abbildung 5: Ein mit STRING erstelltes funktionelles Modul für L-Serin

können¹⁹.

gene fusion: Es kommt vor, dass miteinander interagierende Proteine eines Organismus, Homologe in anderen Organismen besitzen, die zu einem einzigen Protein verschmolzen sind.

common phylogenetic distribution: Bedeutet, dass Gene, die für die selbe Funktion benötigt werden, in verschiedenen Spezies entweder alle in einem Genom vorhanden sind, oder es ist keines dieser Gene im Genom vorhanden.

Mehrere funktionelle Assoziationen bilden ein Netzwerk mit ungerichteten und ungewichteten Kanten, die Proteine miteinander verbinden. Wenn man nun Clusteringtechniken wie *unweighted pair group method with arithmetic mean* (UPGMA), *single-linkage* Methode oder Markov Clustering [2] auf dieses Netzwerk anwendet, entstehen dabei Cluster, welche dann die funktionellen Module sind. Anhand der in den Clustern enthaltenen Proteine, kann man auf die Funktion des Moduls schließen. Ein Beispiel für ein funktionelles Modul ist das KEGG-Modul: M10030, welches die Gene serA, serB und serC enthält, die alle an der Synthese von L-Serin aus 3-Phospho-D-Glycerat teilhaben²⁰. Die funktionellen Module können mit den bereits seit langen konsolidierten Stoffwechselwegen verglichen werden. Dadurch können z.B. Proteine mit noch unbekannter Funktion einem Stoffwechselweg zugeordnet werden bzw. Verbindungen zweier Stoffwechselwege aufgezeigt werden.

¹⁹bei Prokaryonten

²⁰Informationen stammen von http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?md+M10030

2.3.3 KEGG Datenbanken

Das Programm PathKEGG wurde von im Zuge dieser Diplomarbeit entwickelt, und es wird später im Kapitel 3.1 näher besprochen. Trotzdem wird in diesem Kapitel auf die Grundlagen des PathKEGG-Programm eingegangen, weil diese Programm die KEGG-Maps einfärbt. Die **Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes** (kurz KEGG) ist eine Sammlung von Datenbanken, welche vom *Kyoto University Bioinformatics Center* betrieben werden, und entweder per Webzugriff²¹ oder Webservice mit Hilfe der KEGG-API erreichbar ist. In Datenbanken stehen die unterschiedlichsten Informationen über Gene (Datenbank: KEGG GENES), Stoffwechselwege (Datenbank: KEGG PATHWAY), Medikamente (Datenbank: KEGG DRUG), Krankheiten (Datenbank: KEGG DISEASE) und chemische Reaktionen und Substanzen (Datenbank: KEGG LIGAND). Jeder Eintrag besitzt eine Referenz auf einen Eintrag in einer der anderen Datenbanken, der mit diesem Eintrag assoziiert werden kann. Der Eintrag für die Reaktion $Methanol + H_2O_2 \rightleftharpoons Formaldehyde + 2 H_2O$ in der KEGG-LIGAND Datenbank²² enthält neben der Gleichung, dem Namen und der REACTION_ID auch noch Informationen über die katalysierenden Enzyme und den Stoffwechselweg in dem die Reaktion vorkommt (siehe Abb. 6). Durch die Entwicklung von PathKEGG sollte ein Programm zur Visualisierung der Enzyme eines ausgewählten Stoffwechselweges dreier verschiedener Organismen geschaffen werden, bei dem auf einen Blick die Enzyme der verschiedenen Organismen miteinander vergleichbar sind. Da dabei die KEGG-Maps anhand von EC-Nummern und Gennamen eingefärbt werden, wird die KEGG-Pathway Datenbank am häufigsten verwendet. Diese Datenbank enthält alle molekularen Interaktionen, Reaktionen und Informationen, die auch auf den Stoffwechselwegskarten, den KEGG-Maps enthalten sind [29]. Eine KEGG-Map ist eine Karte eines Stoffwechselwege, die aufgrund von wissenschaftlichen Fakten entstand und im Internet als .gif Datei auf der Webseite der KEGG-Pathway Datenbank²³ frei verfügbar ist (Für ein Beispiel siehe Abb. 7). Die verwendeten KEGG-Flatfiles sind einzelne Textdateien, die Daten aus den KEGG-Datenbanken enthalten. Diese wurden verwendet, da bestimmte Funktionen des KEGG-Webservice für die Anwendung zu langsam waren. Der KEGG-Webservice, auch KEGG-API genannt basiert auf SOAP/WSDL, und kann aus Programmen heraus angesprochen werden, falls diese Programme in den Programmiersprachen Ruby, Perl oder Java geschrieben sind. Da PathKEGG in Java entwickelt wurde, wird die von KEGG angebotene keggapi.jar²⁴ Datei verwendet. Diese Datei enthält alle verfügbaren Methoden in Java, um auf den Webservice zugreifen zu können.

2.3.4 MetaboloMIPS

MetaboloMIPS ist eine Software zur Analyse von Stoffwechselwegen [54] und wurde von Gabi Kastenmüller am *Munich Information Center for protein sequences* (MIPS) entwickelt. MetaboloMIPS sieht einen Stoffwechselweg als einen Graph von Reaktionen an. Dabei enthält MetaboloMIPS alle Reaktionen, die auch in BioPath [25] enthalten sind. Dies sind im Prinzip alle Reaktionen, die auf der Boehringer Biochemical Pathway Map²⁵ (*nun Roche Applied Science Biochemical Pathways Map*) vorhanden sind. Das hat den Vorteil, dass MetaboloMIPS beliebige Reaktion (*unter der Annahme dass z.B. das Pro-*

²¹URL: www.genome.jp/kegg

²²zu finden unter: www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?rn+R00602

²³www.genome.jp/kegg/pathway.html

²⁴zu finden auf www.genome.jp/kegg/soap/

²⁵Allerdings sind zwar alle Reaktionen von Poster1 'Metabolic Pathways' in BioPath, aber nur einige wenige von Poster2 'Cellular and Molecular Processes'.

Entry	R00602	Reaction
Name	Hydrogen-peroxide:hydrogen-peroxide oxidoreductase	
Definition	Methanol + H2O2 <=> Formaldehyde + 2 H2O	
Equation	C00132 + C00027 <=> C00067 + 2 C00001	
RPair	RP: A00094 C00067_C00132 main	
Pathway	PATH: rn00680 Methane metabolism	
Enzyme	1.11.1.6 1.11.1.7	
Orthology	KO: K00429 catalase KO: K00430 peroxidase KO: K03781 catalase KO: K03782 catalase/oxidase	
LinkDB	All DBs	

Abbildung 6: Ein Eintrag aus der KEGG-LIGAND Datenbank

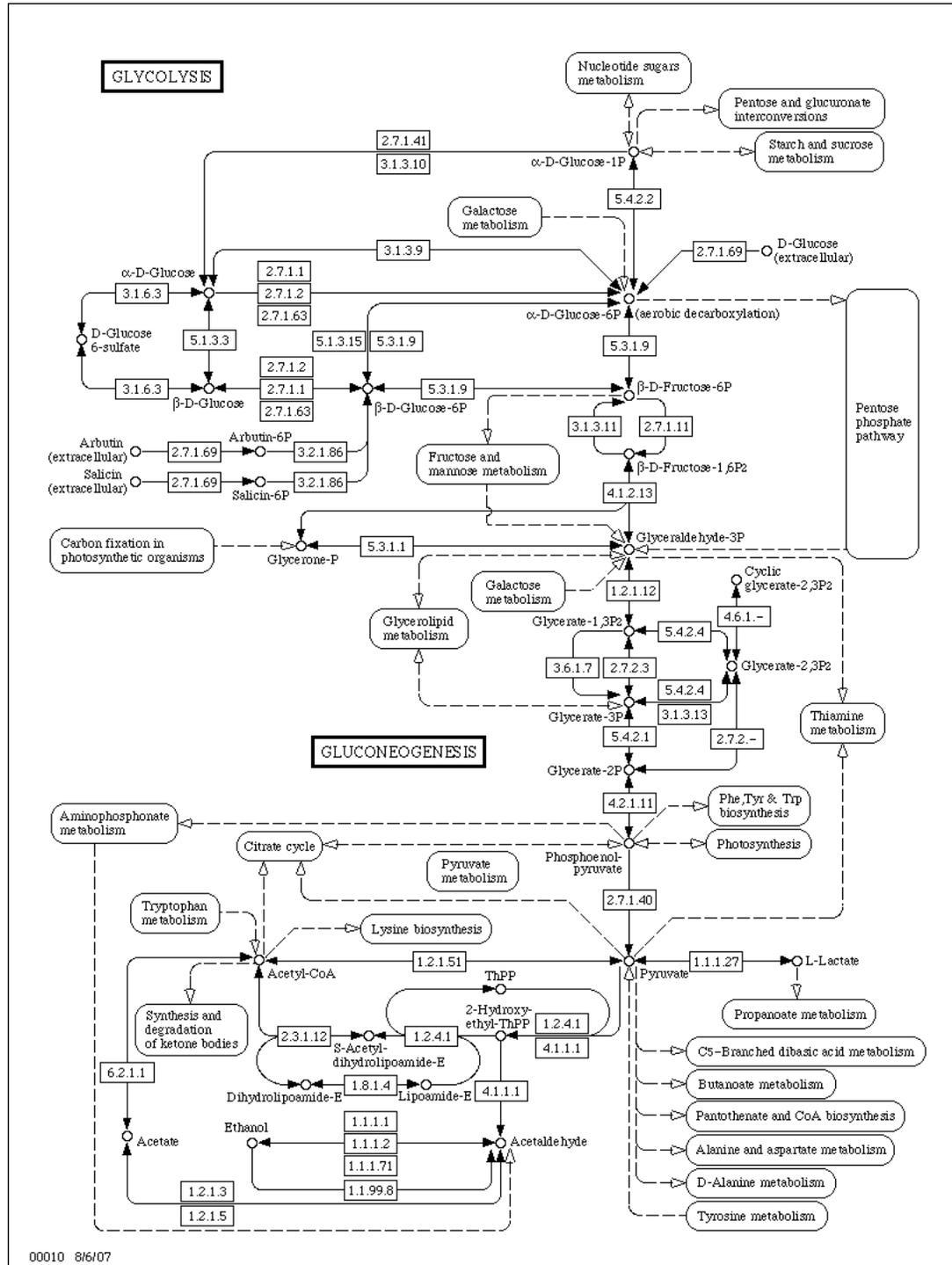


Abbildung 7: Eine KEGG-Map für die Glykolyse

dukt von Reaktion 1 als Edukt der 2 Reaktion verwendet werden kann) zu einem Pathway kombinieren kann, und sich nicht immer an die Stoffwechselwege aus den Lehrbüchern halten muss. Allerdings gibt es die klassischen Stoffwechselwege auch als Referenzstoffwechselwege in MetaboloMIPS, auch wenn diese manchmal in kleinere Bereiche zerlegt sind. Diese Aufteilung von größeren Stoffwechselwegen in mehrere kleinere, kann auch Probleme mit sich bringen, wie es im Fall von *Amoebophilus asiaticus* bei der Vorhersage der Glykolyse auftrat. Mit MetaboloMIPS lassen sich nicht nur Stoffwechselwege vorhersagen und betrachten, sondern man kann auch ausgewählte Stoffwechselwege oder Reaktionen verschiedener Organismen miteinander vergleichen.

Bei der Erstellung der PathwayProfile untersucht MetaboloMIPS in wie weit die Referenzstoffwechselwege vollständig in einem Organismus vorkommen. Die Bewertung der Vollständigkeit eines Stoffwechselweges wird durch die Berechnung eines PathScores verwirklicht.

Der PathScore wird wie folgt berechnet:

$$score(p) = \frac{\sum_{rep} \frac{k(r)}{occ(r)}}{\sum_{rep} \frac{1}{occ(r)}} \quad (1)$$

$$k(r) = \begin{cases} 1, & \text{wenn ein Enzym für eine Reaktion verfügbar ist} \\ 0, & \text{andernfalls} \end{cases}$$

Stoffwechselweg p , Reaktion r und $occ(r)$ ist die Häufigkeit der Reaktion r in den Referenzstoffwechselwegen.

Als erstes wird das Vorhandensein eines Enzyms einer Reaktion überprüft. Dies geschieht durch eine Abfrage auf die Pedant3 Genomedatenbanken. Wie die Enzyme mit Hilfe von Pedant3 vorhergesagt werden, wurde bereits im Kapitel 2.2.4 besprochen. MetaboloMIPS überprüft nun, welches Enzym für eine bestimmte Reaktion im Genom eines Organismus vorhanden ist, indem es kontrolliert, ob die mit dem Enzym verbundene EC-Nummer in der zum Organismus gehörenden Pedant3 Genomedatenbank gefunden werden kann. Diese Methodik führt allerdings zu zwei Problemen. Erstens gibt es Enzyme, die keine EC-Nummern haben. Reaktionen, die von solchen Enzymen katalysiert werden, können in der Stoffwechselwegsvorhersage von MetaboloMIPS nicht verwendet werden. Zweitens gibt es immer wieder neue EC-Nummern bzw. Umbenennungen der bestehenden EC-Nummern durch die Enzyme Commission, weshalb die zugrundeliegende BioPath-Datenbank entsprechend aktualisiert werden müsste. Wann dies das letzte mal geschehen ist, ist mir nicht bekannt. Außerdem ist anzumerken, dass spontane Reaktionen, falls sie in einem Stoffwechselweg auftreten, nicht in die Berechnung des dazu gehörigen PathScore mit einbezogen werden, weil sie ja theoretisch immer ablaufen könnten.

Falls ein Enzym vorhanden ist, wird der Wert von k auf 1 gesetzt, falls nicht bekommt k den Wert 0. Die Häufigkeit $occ(r)$ einer Reaktion ist die Anzahl der verschiedenen Referenzstoffwechselwegen an denen diese Reaktion teilnimmt. Der Wert k wird für jedes Enzym einer Reaktion anschließend durch die Einzigartigkeit $occ(r)$ der gerade betrachteten Reaktion geteilt. Dies wird für alle Reaktionen eines Pathways wiederholt und die so entstandenen Werte werden aufsummiert. Diese Summe wird dann durch die Summe der Kehrwerte der Einzigartigkeiten aller Reaktionen dieses Stoffwechselweges geteilt, und somit ergibt sich der PathScore (siehe Gleichung 1). Der resultierende PathScore liegt dann zwischen den Werten 0 und 1, wobei ein Score in der Nähe von 1 bedeutet, dass die meisten Enzyme vorhanden sind und der Organismus diesen Stoffwechselweg benutzen kann. Ein Score in der Nähe von 0 bedeutet,

mit denen die Pathway Tools arbeiten, sind Datenbanken des Schemas PGDB (Pathway/genome database) und können als ocelot-Datei oder in einer MySQL- oder Oracle-Datenbank abgespeichert werden. Das PGDB Schema wurde von Peter D. Karp und seinem Team, welche bei der Bioinformatics Research Group von SRI International arbeiten, entwickelt, um ein mögliches Standarddatenbankschema für alle noch kommenden Genomsequenzierprojekte von individuellen Organismen zu schaffen, und außerdem die Pflege dieser Datenbanken zu vereinfachen [34]. Alle nach diesem Schema erstellten und veröffentlichten Datenbanken werden unter dem Begriff Biocyc zusammengefasst und sind unter der Adresse (www.biocyc.org) erreichbar.

Der Ablauf einer Analyse der Stoffwechselwege für z.B. *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 mit Hilfe der Pathway Tools sieht wie folgt aus. Normalerweise wird eine PathwayGenome-DataBase (PGDB) für *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 erstellt, indem die Pathway Tools alle notwendigen Informationen wie z.B. EC-Nummern, Proteinnamen, Sequenzen, Orfs usw. aus einer Genbank-Datei und einer Fasta-Datei lesen. Diese beiden Dateien waren aber für *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 nicht vorhanden, mussten deshalb mit Hilfe zweier Skripten und der Pedant3-Genomedatenbank erstellt werden. Als nächstes versuchen die Pathway Tools, die im ersten Schritt extrahierten EC-Nummern und Enzymnamen bestimmten Reaktionen zu zuordnen, diese Reaktionen kommen aus der Vergleichsdatenbank MetaCyc [64]. Es werden also die EC-Nummern und Enzymnamen, die in der Genbank-Datei hinter den Tags /EC_number und /product stehen, mit den Enzymnamen und EC-Nummern der MetaCyc Datenbank lexikographisch verglichen. Wobei bei den Enzymnamen Postfixes wie z.B. 'subunit A' ignoriert werden. Die Pathway Tools benutzen bei der Vorhersage der Stoffwechselwege keine Homologie, sondern verlassen sich auf die Informationen, die aus der Genbank-Datei extrahiert worden sind. Ein Ansatz zur Identifizierung von Enzymen anhand von Homologie, kommt erst durch die Anwendung der *Pathway Hole Filler* Methode ins Spiel. Da es aber für *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 keine Genbank-Datei gab, wurde diese mit Hilfe eines Skriptes und Abfragen auf die Pedant3-Datenbank erstellt. Die Informationen zu Enzymen in der Pedant3-Genomdatenbank werden aber anhand von Homologie (siehe Kapitel 2.2.4) gewonnen. Dadurch wurde bei der Vorhersage der Stoffwechselwege von *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 mit den Pathway Tools, doch mit Homologie gearbeitet.

Bei Übereinstimmungen werden die mit den Enzymnamen bzw. EC-Nummern verbundenen Reaktionen aus MetaCyc herausgesucht und als Grundlage zur Vorhersage der Stoffwechselwege benutzt. Im nächsten Schritt berechnen die Pathway Tools die Wahrscheinlichkeit, dass ein Stoffwechselweg vorhanden ist. Die Wahrscheinlichkeitsberechnung basiert auf dem Anteil der Reaktionen eines Stoffwechselweges, für den Enzyme vorhanden sind und darauf wie viele von ihnen einzigartig sind. *Einzigartig* bedeutet, dass diese Reaktion nur in diesem einen Stoffwechselweg vorkommt. Somit besitzt sie eine größere Aussagekraft als Indiz für das Vorhandensein des Stoffwechselweges, als eine Reaktion, die noch in anderen Stoffwechselwegen vorkommt.

Allerdings muss man sagen, dass die Stoffwechselwegsvorhersage mit den Pathway Tools äußerst sensitiv bzw. liberal eingestellt ist. Um einen Stoffwechselweg als vorhanden vorherzusagen, genügt es teilweise schon, wenn eine einzigartige Reaktion bzw. zwei nicht einzigartige Reaktionen jenes Stoffwechselweges identifiziert worden sind [64]. Dies führt sehr leicht zu falschen positiven Treffern, wie man später bei der Auswertung für *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 sehen kann. Diese niedrige Sensitivität war gewollt, denn die Pathway Tools sollten eine erste grobe und schnelle Stoffwechselwegsanalyse ermöglichen, und nicht manuelle Kurationen ersetzen. Die Pathway Tools sollen außerdem solide Ansatzpunkte liefern, um weitere manuelle Analysen zu beschleunigen und in die richtigen Wege zu lenken.

Man kann seine so erstellen Datenbanken von Hand verfeinern, dazu kann man verschiedene Methoden auswählen, z.B. Proteinkomplexe von Hand erzeugen, Transkriptionseinheiten vorhersagen zu lassen oder die Pathway Hole Filler Methode anwenden. Die Methode *Pathway Hole Filler* dient dazu, fehlende Reaktionen eines möglichen Stoffwechselweges anhand der Identifikation von Enzymen zu finden und somit zu beweisen, dass dieser Stoffwechselweg in dem jeweiligen Organismus vorhanden ist. Für einen vereinfachten Überblick über den Ablauf der *Pathway Hole Filler* Methode siehe Abb. 9. Als Erstes wird der Benutzer gefragt, ob er für alle Pathway Holes²⁶ oder für eine von ihm erstellte Auswahl, mögliche Kandidaten suchen will. Für die ausgewählten Reaktionen werden anschließend bekannte Sequenzen für die fehlenden Enzyme aus den Datenbanken SwissProt und PIR abgeholt. Dabei ist anzumerken, dass es für ein Enzym mehrere homologe Sequenzen und in einigen Fällen auch nicht homologe Sequenzen geben kann, man spricht deshalb von Isozymen. Die abgeholten Sequenzen aller fehlenden Enzyme werden dann gegen das Genom, an dessen Stoffwechselwegen man interessiert ist, *geblastet*. Anschließend wird eine *Shotgun-based data consolidation* durchgeführt, d.h. dass die Blast Hits aller Isozyme eines Enzyms einem Ranking Verfahren unterzogen werden, und nur der Blast Hit an erster Stelle dieses Rankings als Kandidat für den weiteren Ablauf dient. Als nächstes werden die möglichen Kandidaten an ein Bayes'sches Netzwerk übergeben, das vorher mit Hilfe vom Benutzer ausgewählter Daten der bereits identifizierten Reaktionen eines Organismus trainiert, worden ist. Das Bayes'sche Netzwerk errechnet die Wahrscheinlichkeit, dass die Kandidatensequenz für ein Protein codiert, welches die Funktion besitzt, die für eine fehlende Reaktion in einem Stoffwechselweg benötigt wird. Die Wahrscheinlichkeit wird vom Bayes'schen Netzwerk anhand von operon-, homologie- und stoffwechselwegsbasierten Daten berechnet. Kandidaten, die eine Wahrscheinlichkeit über 0,9 haben, werden automatisch als Treffer klassifiziert, und die mit ihnen assoziierten Reaktionen als vorhanden betrachtet. Anschließend werden die Stoffwechselwege neu überprüft, da sich nun die Anzahl der verfügbaren Reaktionen verändert hat. Ein gefundener Stoffwechselweg wird in den Pathway Tools als eigene HTML-Seite angezeigt, auf der man einen Graph²⁷ des Stoffwechselweges und nähere Informationen (kurze Erklärung und Literaturangaben) zu diesem Stoffwechselweg findet. Im Graphen sieht man nicht nur die Namen der Produkte, Edukte und Enzyme, die in diesem Stoffwechselweg auftreten, sondern auch die zu den Enzymen gehörenden EC-Nummern und Orfs. Es werden auch die Namen der Stoffwechselwege eingezeichnet, die diesem Stoffwechselweg vorauslaufen bzw. an ihn anschließen. Dies macht die Überprüfung und das Weiterarbeiten mit den Ergebnissen der Pathway Tools einfacher und komfortabler, als das Arbeiten mit den Ergebnissen von MetaboloMIPS.

2.4 Grundlagen für die Transportervorhersagen

Nun werden die Grundlagen für die Transportervorhersage erläutert. In diesem Kapitel wird erklärt was Transporter sind, und andererseits wo man Informationen zu ihnen findet, und wie man Transporter vorhersagt.

²⁶Pathway Hole = fehlende Reaktion eines Stoffwechselweges, d.h. bei der Annotation des Genoms, wurde kein Enzym für diese Reaktion identifiziert.

²⁷Diesen Graphen wurden intensive bei den Berichten zu *Ameobophilus asiaticus* und *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 verwendet.

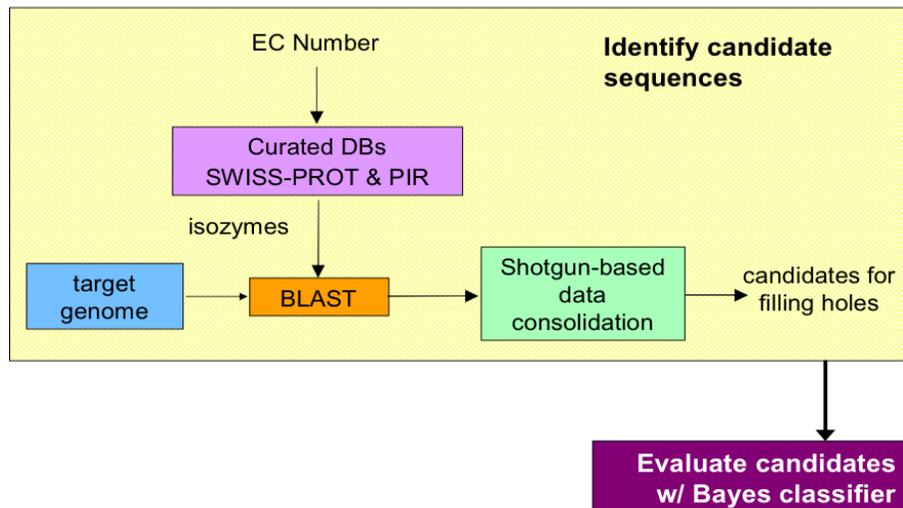


Abbildung 9: Ablauf des *Pathway Hole Filler* - Programms. Entnommen aus der dazugehörigen Publikation [45].

2.4.1 Was sind Transporter?

Unter Transporter versteht man im biologischen Bereich Proteine, welche einen Transport von bestimmten Substanzen durchführen oder erleichtern, der Zielort kann dabei innerhalb der Zelle oder außerhalb sein. Solche Substanzen können Ionen, kleine Moleküle (wie z.B. NH_3) und Makromoleküle (wie z.B. Glukose, Proteine usw.) sein. Es gibt zwei Gruppen von Transportern, die normalerweise in die Zellmembran eingebaut sind. Die passive Transporter wie z.B. Ionenkanäle oder aktive Transporter wie z.B. Ionenpumpen. Im Gegensatz zur Diffusion haben Transportprozesse typische kinetische Parameter, die analog zu denen von enzymkatalysierten Reaktionen sind. So können Transportproteine genau wie Enzyme von bestimmten Stoffen inhibiert werden und sie zeigen ebenfalls bei steigender Substratkonzentration ein Sättigungsverhalten.

Diffusion ist ein physikalischer Prozess, welcher auf den molekularen Eigenbewegungen der Teilchen beruht, und dafür sorgt, dass es zu einer gleichmäßigen Verteilung von Teilchen kommt, was zur einer vollständigen Durchmischung zweier Stoffe führt. Lipophile²⁸ und kleine ungeladene aber polare Moleküle können mittels Diffusion durch die Membran gelangen. Dabei folgen sie immer ihrem Konzentrationsgefälle, mit dem Bestreben dieses auszugleichen. Ist die Konzentration innerhalb und außerhalb der Zelle gleich, stellt sich ein Fließgleichgewicht ein. Wenn Moleküle die Membran ohne jegliche Zuführung von Energie von außen oder von der Zelle in Richtung des Konzentrations- bzw. Potentialgefälles überwinden, spricht man von passiven Transport. Allerdings ist der passive Transport nur ein Sonderfall der Diffusion, bei dem größere Moleküle und Ionen, wie z.B. Zucker, Aminosäuren oder Nu-

²⁸Stoffe die fettlöslich sind

kleotide, die normalerweise die Membran nicht überwinden können, mit Hilfe von Transportproteinen, welche in die Membran eingebaut sind, von einer Seite auf die andere Seite befördert werden können. Dafür gibt es zwei Möglichkeiten: Ionenkanäle (= Freie Diffusion) und Carrier (Erleichterte Diffusion).

Freie Diffusion: Bei dieser Möglichkeit kommen die Kanäle zum Einsatz. Die Kanäle bestehen aus Transmembranproteinen (auch Kanalproteine genannt), welche die Membran tunnelartig durchspannen. Im Inneren des Kanals besitzen die Kanalproteine polare Aminosäuren, wodurch kleine polare oder geladene Teilchen (z.B. Ionen) über diese Kanäle in die Zelle gelangen können. Die Kanäle weisen eine Spezifität hinsichtlich der Leitfähigkeit vom bestimmten Ionen oder Molekülen auf, und lassen nur diese Moleküle passieren. Fast alle Kanäle öffnen bzw. schließen sich erst auf ein bestimmte Signal hin, dieses Signal kann ein Botenstoff (z.B. ein Hormon), eine Änderung des Membranpotentials oder ein Reiz (z.B. Druck oder Scherung) sein. Sobald die Kanäle auf sind, diffundieren die Moleküle entlang des Konzentrationsgradienten bis der Konzentrationsausgleich erreicht ist oder die Kanäle sich wieder schließen.

Erleichterte Diffusion: Carrier-Proteine transportieren das Molekül bei der erleichterten Diffusion von einer Seite zur anderen. Die Carrier-Proteine sind molekulspezifisch, d.h. sie transportieren nur die Moleküle, welche genau an ihre Bindungsstellen andocken können. Wenn das Substrat an das Carrier-Protein gebunden hat, ändert sich dessen Konformation, wodurch das Substrat durch die Membran geschleust wird, und auf der anderen Seite wieder freigesetzt wird. Es gibt drei Arten von Carrier (siehe Abb. 10), welche sich durch die Anzahl der transportierenden Moleküle, und der Richtung in die sie transportiert werden unterscheiden. Wenn ein Carrier nur ein Molekül auf einmal befördern kann spricht man vom Uniport. Ein Carrier der Bindungsstellen für zwei verschiedene Moleküle hat und seine Konformation erst ändert wenn beide Bindungsstellen besetzt sind, kann entweder beide Substrate in die gleiche Richtung durch die Membran transportieren (dann spricht man von Symport), oder er transportiert sie ihn entgegengesetzte Richtungen (dann spricht man von Anitport).

Während beim passiven Transport Moleküle eigenständig die Membran in Richtung des Konzentrationsgefälles ohne Energieverbrauch überwinden, können beim aktiven Transport Moleküle auch gegen den Kozenrationgradienten transportiert werden, allerdings wird dafür Energie in Form von ATP benötigt. Es gibt drei Arten von aktivem Transport, primär, sekundär und tertiär.

primär aktiver Transport: Hierbei werden unter ATP-Verbrauch Protonen oder anorganische Ionen mit Hilfe von Transport-ATPasen²⁹ durch die Membran hindurch aus der Zelle gepumpt. Ein wichtiges Beispiel dieser Kategorie ist die Natrium-Kalium-Pumpe, welche in der Zellmembran integriert ist und unter Verbrauch von ATP, drei positive geladene Natrium-Ionen aus der Zelle hinauspumpt, während es gleichzeitig zwei ebenfalls positiv geladene Kalium-Ionen in die Zelle hinein pumpt. Dieses Beispiel für den primär aktiven Transport ist auch auf der Abb. 11 zu sehen. Dadurch wird z.B. das Ruhepotential in Nervenzellen aufrecht gehalten, welches zur Erzeugung und Weiterleitung von Aktionspotentialen notwendig ist.

sekundär aktiver Transport: Dabei wird ein Ion passiv entlang seines Konzentrationsgefälles befördert, die potentielle Energie diese Gefälles wird ausgenutzt und ein zweites anderes Substrat gegen dessen Konzentrationsgradienten in gleicher bzw. entgegengesetzter Richtung zu befördern.

tertiär aktiver Transport: Dabei wird ein Konzentrationgradient als Energiequelle für den Transport genutzt, welcher durch einen sekundär aktiven Transport aufgebaut wurde.

Es werden nun die vier Arten von Pumpen genannt, die beim aktiven Transport verwendet werden.

²⁹ATPasen sind Enzyme, welche den Abbau bzw. Aufbau von ATP mit dem Transport von Ionen von einer Seite der Zellmembran zur anderen koppeln.

ABC Pumpen: Die Pumpen aus der Klasse ABC, transportieren kleine Moleküle (wie z.B. Aminosäuren, Zucker oder Peptide) durch die Membran in die Zelle. Sie besteht aus zwei Transmembrandomänen und zwei ATP-Bindungsdomänen.

P-Klasse Pumpen: Pumpen dieser Klasse benutzen ATP um Ionen gegen ihren Gradienten zu transportieren. Dabei werden sie phosphoryliert, was sie von allen anderen Pumpen unterscheidet.

V-Klasse Pumpen: Sie gehören zu den ATPasen, welche die Energie benutzen, welche bei dem Abbau von ATP frei wird, um damit Protonen gegen ihren Konzentrationsgradienten zu transportieren. Sie werden dazu genutzt um den pH-Wert einer Zelle zu regulieren.

F-Klasse Protonen Pumpe: Sie benutzen einen H^+ Gradienten und ATP zu produzieren, allerdings funktionieren sie auch in die andere Richtung.

Für eine Zelle gibt es noch andere Möglichkeiten um Substanzen aufzunehmen bzw. abzugeben, diese basieren auf einer Membranverlagerung und haben somit nichts mit Transportproteinen zu tun. Ich will diese Möglichkeiten hier nur kurz erwähnen. Bei der Endozytose werden Flüssigkeitstropfen, Makromoleküle, größere Nahrungsteilchen oder sogar kleinere Zellen von der Membran eingestülpt. Wenn dieser Einstülpungsvorgang beendet ist, wird das dadurch entstandene Vesikel im Zellinneren abgeschnürt bzw. abgestoßen und kann dann zersetzt werden, damit der Inhalt verfügbar wird. Die Exozytose arbeitet in die andere Richtung, bei ihr werden Stoffe aus der Zelle an die Zellumgebung abgegeben. Diese Stoffe können entweder selbst produziert worden sein, oder unverdauliche Überreste einer Zellverdauung sein. Es verschmilzt immer ein Transportvesikel mit der Zellmembran. Wenn dies geschehen ist, wird dieses Vesikel dann außerhalb der Zelle abgeschnürt und wird somit in die Umgebung freigesetzt.

Eine Besonderheit der gramnegativen Bakterien ist, dass diese Porine besitzen. Gramnegative Bakterien haben zwei Membranen, die erste von ihnen ist die so genannte Cytoplasmamembran, welche das Zellinnere gegen die Außenwelt abschließt. Über ihr liegt das Mureinnetzwerk, welches der Zelle mechanische Stabilität und Form gibt. Dies alles wird von einer weiteren Membran umschlossen der Äußeren Membran, welche nur wenige Kontaktstellen zur Cytoplasmamembran hat. Der Zwischenraum zwischen den Membranen heißt Periplasma, in diesem laufen einige Stoffwechselwege ab, wie z.B. die Umsetzung von toxischen Substanzen. Der Stoffaustausch zwischen Periplasma und Cytosplasma geschieht durch spezifische Transportsystem wie die, die ich bereits beschrieben habe, also Ionenkanäle, Pumpen und Carrier. Der Austausch zwischen Periplasma und der Umwelt geschieht über die in der Äußeren Membran eingebauten Porine. Porine sind β -Faltblattproteine durch welche verschiedene Moleküle diffundieren können. Sie erlauben also einen passiven Transport durch die Äußere Membran, indem sie als Kanäle wirken. Sie sind entweder unspezifisch (z.B. outer membran protein OmpF) oder gruppenspezifisch (z.B. LamB (Zucker) oder TsX (Nukleoside)). Die Ergebnisse einer Vorhersage von Porinen wurden mir von Eva Heinz vom Fachbereich Mikrobielle Ökologie der Universität Wien zur Verfügung gestellt.

2.4.2 Wo findet man Informationen über Transporterproteine

Um an Informationen wie z.B. Funktionen, Sequenzen und Namen von Transporterproteine zu kommen, kann man die zwei gebräuchlichsten Datenbanken für Transporter verwenden. Das sind die Datenbanken TransportDB und TCDB, diese Datenbanken werden nachher noch etwas ausführlicher beschrieben. Prinzipiell wurde *blastp* [38] verwendet, um die TCDB Datenbank anhand der Proteinsequenzen von *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 zu durchsuchen. Alle BLAST-Treffer mit einem *E-Value* unter 0,001 wurden erstmals in die engere Auswahl übernommen und anschließend näher analysiert (siehe Kapitel 3.3). Der Ansatz zur Vorhersage der Transporter basiert also auf Homologie (siehe Kapitel 2.3.1).

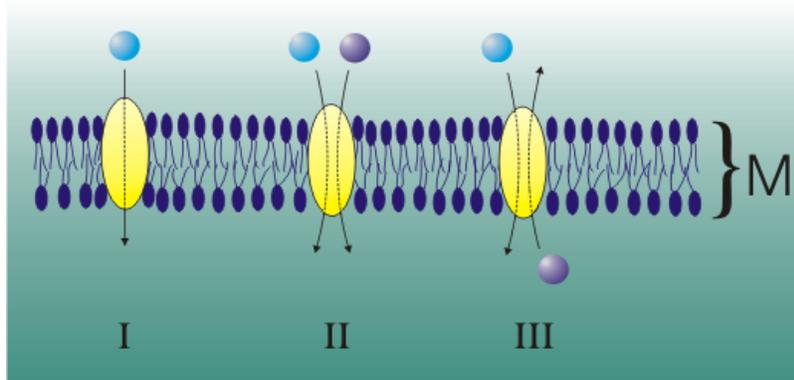


Abbildung 10: Die drei möglichen Funktionsweisen von Carrier-Proteinen: Uniport (I), Symport (II) und Antiport (III)

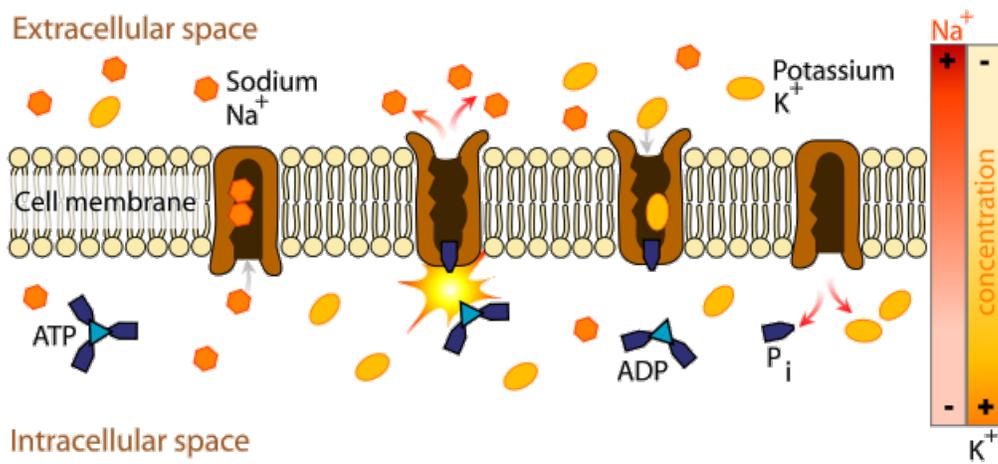


Abbildung 11: Primär aktiver Transport mittels der Natrium-Kalium-Pumpe

TCDB:

Die *Transport Classification Database* (TCDB) ist eine Transporter-Datenbank, welche von der *University of California at San Diego* (UCSD) betrieben wird, und im Web unter <http://www.tcdb.org> erreichbar ist. Diese Datenbank enthält Informationen über Sequenzen, Klassifikation, Struktur und Funktionalität von Transportsystemen aus einer Vielzahl von Lebewesen und wird laufend gepflegt. Sie ist eine Quelle von mehr als 30000 Referenzen für ca. 3000 Transportern, welche in 400 Familien klassifiziert sind [61]. Die Datenbank teilt die Transporter nach dem *Transport Classification*(TC)-System ein. Dieses System ist ein Ansatz, um ein dem EC-System ähnliches Klassifikationssystem für Transporterproteine zu schaffen. Dieses Klassifikationssystem wurde vom Komitee für Nomenklatur der Internationalen Union für Biochemie und Molekularbiologie (IUBMB) anerkannt und hat 9 Kategorien. Das TC-System wurde anhand von funktionellen und phylogenetischen Methoden entwickelt [60].

1. Channels/Pores: Transportsysteme dieser Kategorie verwenden die Diffusion um Moleküle mittels Kanäle oder Poren durch die Membran zu schleusen, dafür benutzen sie nicht den Carrier-Mechanismus. In diese Kategorie fallen alle Proteine die Ionenkanäle, Porine, Holine usw. in den Membranen ausbilden.

2. Electrochemical Potential-driven transporters: Wenn ein Carrier-Mechanismus vom Transportsystem genutzt wird, um Substanzen durch die Membran zu schleusen, wird das Transportsystem in diese Kategorie eingeordnet. Hierzu gehören alle Antiporter, Symporter und Uniporter.

3. Primary Active Transporters: In diese Kategorie gehören alle Transportsysteme, die eine primäre Energiequelle benutzen, um einen Stoff gegen einen Konzentrationsgradienten zu transportieren. Ein sekundärer Ionengradient gilt nicht als primäre Energiequelle, somit fallen Transporter, die einen solchen verwenden, nicht in diese Kategorie. Als primäre Energiequelle können die freiwerdende Energie bei der Hydrolyse von ATP zu ADP (z.B. ABC-Transporter), die Energie von absorbierten Licht (z.B. Photosynthetic Reaction Center (PRC) Family) oder die freiwerdende Energie bei einer Redoxreaktion (z.B. Proton-translocating Cytochrome Oxidase (COX) Superfamily) genutzt werden. Typische Transporter dieser Kategorie sind: ABC-Transporter, P-Type ATPase, Type III Secretory System usw.

4. Group Translocators: Das einzige Transportsystem dieser Kategorie ist das Phosphotransferase System (PTS), dieses System wird von Bakterien eingesetzt um verschiedene Zucker aufzunehmen, und dabei wird das Phosphoenolpyruvat als Energiequelle benötigt. Typische Zucker, die mittels des PTS aufgenommen werden können sind Glukose, Mannose, Fructose und Cellobiose.

5. Transport Electron Carriers: Transportsysteme, welche einen Elektronfluß durch die Membran ermöglichen, wobei Donatoren auf der einen Seite und Akzeptoren auf der anderen Seite der Membran sind, fallen in diese Kategorie. Dadurch regulieren sie das Membranpotential und spielen eine wichtige Rolle in der Zellulären Energetik. Vertreter dieser Kategorie sind z.B. Cytochrome b_{561} Family, Geobacter Nanowire Electron Transfer (G-NET) Family, Difsulfide Bond Oxidoreductase D Family.

8. Accessory Factors Involved in Transport: Proteine, die bekannte Transportproteine unterstützen oder aktivieren, fallen in diese Kategorie. So können diese Hilfsproteine bei der Regulation des Transports, bei der Komplexbildung von Transportern und Substrat oder bei der Energienutzbarmachung für den Transportvorgang eine Rolle spielen. Typische Proteine dieser Kategorie können aus den folgenden Familien sein: Membran Fusion Protein (MFP) Family, Secretin Auxiliary Lipoprotein (SAL) Family, Phosphotransferase System Enzyme I (EI) Family, Fatty Acid Binding Protein (FABP) Family und Endophilin Family.

9. Incompletely Characterized Transport Systems: In diese Kategorie fallen alle Transporter, bei denen eine mögliche Klassifikation unklar ist. Das können z.B. Transporter mit einem unbekanntem bio-

chemischen Mechanismus (z.B. Peroxisomal Protein Importer (PPI) Family) sein, oder Transporter deren Funktionalität bekannt ist, für die es allerdings keine Sequenzen gibt und somit zu keiner Proteinfamilie zugeordnet werden können (z.B. Volume-sensitive Anion Channels (VAC) oder Rhodococcus erythropolis Porin (REP) Family), oder Transporter, deren Funktionität bisher nur vermutet wird (z.B. Metal Homeostasis Protein (MHP) Family oder Putative Cobalt Transporter (CbtAB) Family), aber noch nicht bewiesen wurde. Es kann sein, dass Transportproteine dieser Kategorie in andere Kategorien eingeordnet werden, sobald mehr über sie herausgefunden wurde.

Man kann die Datenbank auf verschiedene Wege nutzen. Einmal kann man sie anhand des TC-Systems durchstöbern oder mittels BLAST für eine beliebige Sequenz Homologe in ihr suchen. Andererseits kann man sich Transporter anzeigen lassen, die z.B. im Menschen vorkommen, mit Krankheiten assoziiert sind oder zu einer bestimmten Familie gehören. Bei jedem Eintrag für ein Transporterprotein sieht man die TC-Nummer, Namen, Gewicht, Länge, Sequenz und gegebenenfalls das Substrat des Transporterproteins. Außerdem sind noch weiterführende Links zu anderen Datenbanken (z.B. COG, Swiss-Pfam, ExPasy usw.) vorhanden.

TransportDB:

Die *TransportDB* ist eine Transporter-Datenbank, die vom TIGR (nun J. Craig Venter Institute) betrieben wird und unter der Webadresse <http://www.membranetransport.org> erreichbar ist. In dieser Datenbank sind Transporter der Cytoplasmamembran und die Kanäle der Äußeren Membran aller Organismen enthalten, deren Genomsequenzen verfügbar sind. Die Transporter und Kanäle jedes Organismus wurden durch Experimenten und bioinformatischen Methoden annotiert [67] und in verschiedene Typen und Familien aufgrund von phylogenetischen, bioenergetischen, substrat- und transportspezifischen Eigenschaften eingeordnet [66]. Die Einordnung der einzelnen Transporterfamilien ist bei dieser Datenbank anders als bei der TCDB-Datenbank.

ATP-Dependent: In diese Kategorie fallen alle Transporter, die ATP benötigen, um den Transportvorgang durchzuführen. Typische Vertreter dieser Kategorie sind z.B. ABC Superfamily, F-ATPase Superfamily, P-ATPase Superfamily.

Ion-Channels: Alle Proteinfamilien, die Ionenkanäle ausbilden gehören in diese Gruppe. Wie z.B. Annexin Family, Connexin Family, Intracellular Chloride Channel (ICC) Family und Urea Transporter (UT) Family.

Secondary Transporter: Alle Carrier und sonstige Transporter werden dieser Klasse zugeordnet. Die folgenden Familien sind Mitglieder dieser Gruppierung: K⁺ Transporter (Trk) Family, Reduced Folate Carrier (RFC) Family, Ca²⁺:Cation Antiporter (CaCA) Family, Organic Solute Transporter (OST) Family und Tricarboxylate Transporter (TTT) Family.

Mitochondrial Outer Membrane Porins: Wenn Proteine ein Porin in der Mitochondria oder in der Äußeren Membran bilden, werden sie in diese Kategorie eingeordnet. Beispiele sind: OmpA-OmpF Porin (OOP) Family, Outer Membrane Protein Insertion Porin (OmpIP) Family oder Mitochondrial and Plastid Porin (MPP) Family.

Phosphotransferase System (PTS): Alle Proteinfamilien, die ein PTS ausbilden, sind Teil dieser Klasse. Es gibt das General PTS oder das Sugar Specific PTS.

transport Electron Carriers: Alle Transporter, welche Elektronen transportieren können, fallen in diese Gattung. Dazu gehören z.B. Low Affinity Fe²⁺ Transporter (FeT) Family, Nicotinamide Mononucleotide (NMN), Uptake Permease (PnuC) Family oder Peroxisomal Protein Importer (PPI) Family.

Unknown: Zu dieser Gruppe gehören alle Transporter, bei denen eine mögliche Klassifikation unklar ist.

Bei dieser Datenbank kann man sich alle Transporterproteine eines Organismus anzeigen lassen oder die Transporterproteine mehrerer Organismen miteinander vergleichen. Es kann natürlich auch mit dieser Datenbank mittels BLAST nach Homologe für eine beliebige Sequenz durchsucht werden. Eine Textsuche kann in vier Stufen durchgeführt werden, so kann nach einem bestimmten Transportertyp, einer Transporterfamilie, einem Transporterprotein oder einem Substrat gesucht werden. Auch kann die 3-D Struktur eines jeden in der Datenbank vorhandenen Transportproteins, angezeigt werden. Der Eintrag jedes Transporterproteins enthält die TC-Nummer, Namen, Sequenz, Typ und gegebenenfalls das Substrat des Transporterproteins. Außerdem sind noch weiterführende Links zu anderen Datenbanken (z.B. TMHMM und Entrez) vorhanden.

2.5 Entwurf eines Kulturmediums anhand von Informationen aus einer Genomanalyse

Ein Kulturmedium für axenisches Wachstum eines pathogenen oder symbiontischen Bakteriums anhand von Informationen, die aus einer Genomanalyse stammen, zu gestalten ist, an sich keine neue Idee. Dieser Ansatz wurde bereits für das humanpathogene Bakterium *Tropheryma whipplei* [32] und das pflanzenpathogene Bakterium *Xylella fastidiosa* [8] erfolgreich durchgeführt. Dabei wurde jeweils anhand der, aus den Sequenzierprojekten der beiden Bakterien gewonnenen, Informationen über Proteine bzw. Enzyme, die Metabolismen der Bakterien analysiert. Die Proteine bzw. Enzyme wurden annotiert, indem die Sequenzen der vorhergesagten ORF's³⁰ dazu benutzt wurden, mittels BLAST Homologe in den Datenbanken SWISS-PROT und TrEMBL zu finden [1, 11]. Die Stoffwechselwege wurden zumindest für *Tropheryma whipplei*³¹ mit Hilfe der KEGG-Maps analysiert [11]. Aus den Informationen³², die aus den analysierten Stoffwechselwegen kamen, wurden dann die Kulturmedien zusammengemischt.

Die Erfahrungen bzw. Erkenntnisse, die bei der Erstellung eines Kulturmediums für *Tropheryma whipplei* [32] gewonnen wurden, verwendet man dazu um eine Datenbank zu erstellen, welche Regeln enthält, die es einem Benutzer ermöglichen sollten, ein axenisches Kulturmedium für bestimmte humanpathogene Bakterien zu entwerfen. Diese Datenbank heißt *Metagrowth* und ist unter der Webadresse <http://www.igs.cnrs-mrs.fr/axenic> zu erreichen. Sie enthält bisher 220 Einträge zu *Rickettsia prowazekii* (verursacht Typhus), *Rickettsia conorii* (Verursacher des Rocky-Mountain-Fleckfieber), *Tropheryma whipplei* (Auslöser der Whipple Krankheit auch Morbus Whipple genannt), *Treponema pallidum* (Verursacher der Syphilis), *Mycobacterium leprae* (Erreger, welcher die Lepra verursacht) und *Coxiella burnetii* (Verursacher des Q-Fiebers). Die *Metagrowth* Datenbank enthält für jedes Bakterium eine Liste mit physikalischen Voraussetzungen (z.B. Temperatur und CO₂ Gehalt) und Nährstoffen (Glukose, Cystein, Adenin, Tetrahydrofolat usw.). Für jeden dieser Einträge sind ein oder mehrere Beweise eingetragen (siehe Abb. 12). Es gibt vier Klassen von Beweisen [63].

Class I: Cannot make evidence: Beweise dieser Art sagen aus, dass ein Bakterium einen bestimmten Stoff (z.B. Cystein) nicht selbst synthetisieren kann, da der dazugehörige Stoffwechselweg aufgrund von fehlenden Enzymen unvollständig ist.

Class II: Can up take evidence: Wenn ein Bakterium einen Transporter für einen bestimmten Stoff (z.B. Glukose) besitzt, wird dies als Beweis in diese Kategorie aufgenommen. Die Transporter beruhen hierbei auf der von mir bereits vorgestellten TransportDB.

Class III: Utilizing evidence: Diese Beweise bedeuten, dass ein Bakterium ein bestimmtes Substrat

³⁰ORF: Open Reading Frame

³¹Für *Xylella fastidiosa* lassen sich keine Informationen finden, in wie weit die Stoffwechselwege analysiert wurden

³²z.B. über die Vollständigkeit der Aminosäuresynthesen oder des Energiemetabolismus

C00078		arginine, proline, lysine, methionine, cysteine and asparagine). In addition, de novo synthesis of glutamate and glutamine was impossible due to the consequence the glutamate-dependent biosyntheses of aspartate, threonine, valine, isoleucine become impossible. Finally, PheA, an enzyme for pl suggested that <i>T. whipplei</i> acquires amino acids or precursors from its host, through membrane transport systems.
L-Phenylalanine C00079	DG	E0630 Amino acid metabolism has been analyzed ([1,2] and according to KEGG [3]). The pathways were entirely missing (absence of genes) for arginine, proline, lysine, methionine, cysteine and asparagine). In addition, de novo synthesis of glutamate and glutamine was impossible due to the consequence the glutamate-dependent biosyntheses of aspartate, threonine, valine, isoleucine become impossible. Finally, PheA, an enzyme for pl suggested that <i>T. whipplei</i> acquires amino acids or precursors from its host, through membrane transport systems.
L-Valine C00183	GT	E0605 Presence of transporters for branched chain amino acid (TransportDB [1]).
Adenine C00147	S	E0627 Biosynthetic pathway for purines is complete. Salvage pathway may utilize adenine and guanine (according to KEGG [1]).
Guanine C00242	S	E0627 Biosynthetic pathway for purines is complete. Salvage pathway may utilize adenine and guanine (according to KEGG [1]).
Thymidine C00214	S	E0628 Biosynthetic pathway for pyrimidine is complete. Salvage pathway may utilize thymidine, UMP, CMP, dCMP (according to KEGG [1]).
CMP C00055	S	E0628 Biosynthetic pathway for pyrimidine is complete. Salvage pathway may utilize thymidine, UMP, CMP, dCMP (according to KEGG [1]).
dCMP C00239	S	E0628 Biosynthetic pathway for pyrimidine is complete. Salvage pathway may utilize thymidine, UMP, CMP, dCMP (according to KEGG [1]).
UMP C00105	S	E0628 Biosynthetic pathway for pyrimidine is complete. Salvage pathway may utilize thymidine, UMP, CMP, dCMP (according to KEGG [1]).

Abbildung 12: Ausschnitt eines Eintrages der Metagrowth-Datenbank

benötigt, um daraus z.B. andere Aminosäuren zu synthetisieren, oder es als Kofaktor für ein gefundenes Enzym verwendet oder damit es als Ausgangsstoff eines gefundenen Stoffwechselweges fungieren kann.

Other evidences: Hierbei kann es sich um durch Experimente gewonnene Fakten handeln.

Durch das Anschauen der Einträge inkl. der Beweise kann der Benutzer sehr leicht eine Liste mit Komponenten zusammenstellen, welche in einem möglichen Kulturmedium vorhanden sein müssen. Diese Liste kann er dann dazu verwenden, um ein passendes Fertigmedium zu finden, oder ein eigenes Medium mit den notwendigen Komponenten zu erstellen. Obwohl dieser Ansatz für die bis jetzt in MetaGrowth vorhandenen Bakterien erfolgreich war, wurde er auch bei anderen Bakterien verwendet und führte bei ihnen zu Fehlschlägen.

Nun werden die Unterschiede zwischen dem Ansatz, welcher für einen Entwurf eines Kulturmediums für *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 verwendet wurde, und dem Ansatz der bei *Tropheryma whipplei* [32] verwendet wurde, kurz erläutert. Die Annotation der Proteine bzw. Enzyme geschah sowohl bei meinem Ansatz als auch bei dem anderen Ansatz aufgrund von Homologie. Der erste Unterschied liegt in der Analyse der Stoffwechselwege. Während bei *Tropheryma whipplei* KEGG verwendet wurde, benutzte ich dafür die Pathway Tools (siehe Kapitel 2.3.5) und MetaboloMIPS. Diese enthalten nicht nur mehr verschiedene Varianten von Stoffwechselwegen, als die KEGG-Maps, sondern die Pathway Tools ermöglichen auch eine Identifikation von fehlenden Enzymen eines Stoffwechselweges mittels der Methode *Pathway Hole Filler*. Somit konnten bei meinem Ansatz mehr Stoffwechselwege vorhergesagt und analysiert werden. Der zweite Unterschied ist, dass bei der Erstellung eines Mediums für *Tropheryma whipplei* keine Vorhersage von Transportern gemacht wurde, was bei meinem Ansatz aber der Fall war. Die Ergebnisse der Transportervorhersage und der Analyse des Metabolismus wurden dazu verwendet, mögliche Komponenten für ein Nährmedium aufzuzeigen (siehe Kapitel 4.2). Während bei dem Ansatz für *Tropheryma whipplei* die Informationen der Stoffwechselwegsanalyse dazu verwendet wurden, ein fertiges Nährmedium aus käuflichen Komponenten zu erstellen [32].

3 Eigene Arbeit

In diesem Abschnitt werden die Durchführung und die Ergebnisse der gemachten Untersuchungen erläutert. Im ersten Kapitel wird die Methodik hinter dem Programm PathKEGG vorgestellt und ein Grund für seine Entwicklung genannt. Anschließend werden die vorgenommenen Änderungen an MetaboloMIPS aufgezeigt, und erklärt wieso diese Änderungen notwendig waren. In den darauf folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse der Transportvorhersage und die Resultate der Vergleiche der Metabolismen der verschiedenen Bakteriengruppen aufgelistet. Im letzten Kapitel werden dann die Ergebnisse der Stoffwechselwegsanalysen, welche mit Hilfe der *Pathway Tools* für *Ameobophilus asiaticus* und *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 erstellt wurden, gezeigt und miteinander verglichen.

3.1 PathKEGG

Durch die Entwicklung von PathKEGG sollte eine Brücke zwischen den bereits vorhandenen Datenbanken Pedant3 und KEGG Pathways geschlagen werden. Denn die Biologen des Fachbereichs Mikrobielle Ökologie der Universität Wien konnten zwar die Annotationen zu ihren selbst sequenzierten Genomen mit Hilfe von Pedant3 betrachten und bearbeiten. Allerdings gibt es in Pedant3 keine Möglichkeit, die annotierten Enzyme in die dazu gehörigen Stoffwechselwegen einzuordnen. Die Möglichkeit einer Zuordnung von Enzymen zu einem Stoffwechselweg bieten aber die KEGG Pathway Maps an, denn auf ihnen sind die EC-Nummern der teilhabenden Enzyme des jeweiligen Stoffwechselweges eingezeichnet. Da es bis zur Entwicklung meines Programms pathKEGG kein Programm gab, das die Informationen dieser beiden Datenbanken benutzt, um Enzyme einem Stoffwechselweg zu zuordnen, behelfen sich die Wiener Biologen mit einer etwas umständlichen Methode. Sie luden die KEGG-Pathway Maps als .jpg Datei von der KEGG-Webseite herunter, und bearbeiteten sie in MS PaintBrush. Dabei färbten sie von Hand die EC-Nummern der annotierten Enzyme ein. Mein Programm sollte diese umständliche Prozedur ersetzen, indem es Informationen von Enzymen dreier verschiedener Organismen aus Pedant3 abholt, und diese an den KEGG-Webservice übermittelt, welcher eine eingefärbte KEGG-Pathway Map zurückliefert.

So sollte ein Programm geschaffen werden, das Biologen ermöglicht, die Enzyme eines ausgewählten Stoffwechselweges dreier verschiedener Organismen auf einen Blick miteinander vergleichen zu können. Man hätte auch mehr Organismen auf einmal vergleichen können, allerdings werden die gefundenen Enzyme auf der KEGG-Map farblich markiert, was bei mehr als drei Organismen zu sehr vielen Mischfarben geführt hätte. Diese vielen Farben hätten die zurückgelieferte KEGG-Map sehr schwer verständlich gemacht. Deshalb wurde die Darstellung auf nur drei Organismen zu beschränkt, denn einerseits gibt es dann nur sieben Farben, und andererseits läßt sich die Zuordnung der Farben zu den jeweiligen Organismen leicht mit Hilfe eines Venn-Diagramms darstellen.

Das PathKEGG-Programm wird auch nach dem Ende dieser Diplomarbeit weiterverwendet werden, denn einerseits wird es immer noch von den Biologen des Fachbereich Mikrobielle Ökologie der Universität Wien benutzt. Andererseits wird es als ein zusätzliches Feature in der von Patrick Tischler im Zuge seiner Doktorarbeit geschaffenen Chlamydien-Datenbank bald einer breiten Menge von Chlamydienforschern zugänglich sein. Man könnte es vielleicht auch irgendwann einmal in MetaboloMIPS oder Pedant3 integrieren.

Um dieses Programm den Biologen des Fachbereichs Mikrobielle Ökologie der Universität Wien im Zuge des Beta-Testing verfügbar zu machen, wurde das Programm als ein Java-Servlet implementiert, das

auf dem Apache Tomcat Webserver des Lehrstuhls läuft und nur mittels Passwort zugänglich ist. Bei der Initialisierung des Servlets werden folgenden Informationen aus den KEGG Flatfiles, welche lokal gespeichert sind, ausgelesen und in HashMaps abgespeichert.

- Welcher Pathway enthält welche KEGG Orthology IDs ?
- Welcher Gename und welche EC-Nummer gehören zu welcher KEGG Orthology ID ?
- Welche PathwayID hat welchen Pathwaynamen (z.B. path:map00010 ist 'Glycolysis / Gluconeogenesis')

Beim Aufruf des Servlets erscheint eine HTML Oberfläche mit 2 Frames (siehe Abb. 14). Im linken durchgehenden Frame ist oben das Venn-Diagramm lokalisiert, darunter befindet sich die Pathwayliste mit einer Einteilung der Pathways nach der Funktion (z.B. Energiemetabolismus oder Metabolismus der Aminosäuren). Diese Liste enthält alle Stoffwechselwege, die in der KEGG Pathwaydatenbank vorhanden sind, und wird erzeugt, indem Informationen für diese Pathways aus den dazugehörigen KEGG Flatfiles ausgelesen werden. Darunter sind die drei Organismenlisten platziert, aus denen der Benutzer jeweils einen Organismus per Klick auswählen kann. Diese Listen werden erstellt, indem per MySQL über JDBC aus der Pedant3-Genomedatenbank abgefragt wird, welche Organismen in den Datenbanken vorhanden sind. Dabei wird der Organismusname und der Datenbankname in einer HashMap gespeichert. Diese Map wird dazu verwendet, um im Frame die HTML Tables zu befüllen. Unter den Listen befindet sich der *Drawbutton*, welcher den eigentlichen Bearbeitungsvorgang startet. Für einen Screenshot des PathKEGG-Servlets siehe Abb. 14. Der Frame auf der rechten Seite wird dazu verwendet, die Seite anzuzeigen, auf der später die eingefärbte Map dargestellt wird. Ein Ablaufdiagramm zum Programm PathKEGG ist auf der Abbildung 13 zu sehen.

Der Bearbeitungsvorgang läuft wie folgt ab: Nachdem das Servlet registriert hat, welche Organismen und welcher Pathway ausgewählt wurden, werden für die einzelnen Organismen die EC-Nummern und Gennamen per MySQL-Abfragen aus den Pedant3 Datenbanken ausgelesen. Wie bereits im Kapitel 2.2.4 erwähnt wurde, beruhen diese EC-Nummern und Gennamen auf der von Pedant3 ausgeführten Ähnlichkeitssuche, welche mit blastp durchgeführt wurde. Das Programm fragt per MySQL alle Enzyme Classification Nummern und Gennamen eines Genoms ab.

Dann wird mit Hilfe der Daten aus den KEGG Dateien, welche sich nun in HashMap's befinden, analysiert, welcher Organismus mindestens ein Element aus einem der möglichen Pathways enthält. Dies geschieht dadurch, dass den Gennamen und EC-Nummern eines jeden Organismus mit Hilfe einer HashMap, welche aus den KEGG-Flatfiles erstellt wurde, eine KEGG Orthology ID zugeordnet wird. Mit Hilfe der KEGG Orthology ID's werden dann die KEGG-Maps dadurch durchsucht, ob sie eine der KEGG Orthology ID's enthalten. Wenn ja, wird der gerade überprüfte KEGG-Stoffwechselweg in eine Liste aufgenommen. Somit entsteht eine Liste von Pathways, welche diesem Organismus zugeordnet werden können. Danach wird überprüft, ob die Listen mit den Pathways der einzelnen Organismen den vom Benutzer gewählten Pathway enthalten. Sollte dies der Fall sein, werden die Elemente des vom Benutzer ausgewählten KEGG-Referenzpathway, mit den Elementen aus den gefundenen Pathways der verschiedenen Organismen verglichen. Falls ein Element des Referenzstoffwechselweges in einem der Organismen vorkommt, wird in einer HashMap genannt *ColorOrder*, welche als Schlüssel die KEGG Orthology ID eines bestimmten Elements und eine Liste als Wert enthält, zur Liste, welche zur ID des Elementes zugeordnet werden kann, der Datenbankname des Organismus, hinzugefügt.

Wenn dies für alle Organismen geschehen ist, wird eine Funktion der KEGG API verwendet, um eine individuell eingefärbte KEGG Map auf dem KEGG Server erstellen zu lassen. Die Methode bekommt die Pathway ID des gewählten Pathways, ein Array von einzufärbenden Elementen (das sind alle gefundenen KEGG Orthology ID), ein Array von Hintergrundfarben und ein Array von Schriftfarben mit übergeben. Um nun sehen zu können, welches Element aus welchem Organismus bzw. aus mehreren Organismen stammt, wurde eine Methode geschrieben, die als Eingabe die oben erwähnte HashMap *ColorOrder* benutzt, und mit Hilfe der klassischen Grundfarben (rot, blau und grün) und deren möglichen Mischfarben Cyan, Gelb, Magenta und Silber (als Ersatz für Weiß), den Hintergrund eines gefundenen Elementes dementsprechend einfärbt. Die Standardfarben sind wie folgt verteilt: Organismus A:rot, Organismus B:blau und Organismus C:grün. Wenn nun z.B. ein Element in den beiden Organismen A und B vorkommt, bekommt das Element in der Map als Hintergrundfarbe die Farbe Magenta. Damit es für den User einfach verständlich ist, was diese möglichen Farbkombinationen bedeuten, ist oben links das Venn-Diagramm platziert. Wobei in den Kreisen der Grundfarben die Zuordnungsbuchstaben der einzelnen Organismenlisten stehen. So steht z.B. im roten Kreis der Buchstabe A.

Nachdem der KEGG Server die Web-Adresse der angeforderten eingefärbten KEGG Map zurück geliefert hat, wird das Frame auf der rechten Seite dazu benutzt, diese Seite anzuzeigen. Dies geschieht durch eine einfache Weiterleitung. Außerdem wird in dem /tmp Verzeichnis eine Kopie der KEGG-Map als .jpg-Bild abgespeichert. Sollte der Webservice des KEGG-Webserver nicht erreichbar bzw. funktionsuntüchtig sein, wird das letzte abgespeicherte Bild eines angeforderten Stoffwechselweges angezeigt, mit einer Information dazu, dass es sich um das letzte erstellte Bild handelt und dass der KEGG-Webservice zur Zeit nicht verfügbar ist. Der Sourcecode inkl. JavaDoc für dieses Programm befindet sich auf der CD, die der Diplomarbeit beigelegt wurde, im Verzeichnis PathKEGG.

3.2 Änderung an MetaboloMIPS

MetaboloMIPS ist modulartig aufgebaut. Dies sollte eine einfache Umstellung der zugrunde liegenden Datenbanken ermöglichen, und das Austauschen von verschiedenen Methoden vereinfachen. Im Zuge des neuen Datenbankzugriff auf Pedant3 für MetaboloMIPS wurde eine neue Klasse Pedant3Query entworfen. Diese leitet sich von der bereits vorhandenen OrfAndEcQuery Klasse ab. Somit hat die Pedant3Connection Klasse, die gleichen Parameter, wie die alte PedantQuery Klasse, welche sich ebenfalls von der OrfAndEcQuery Klasse ableitet. Es wurden in MetaboloMIPS einfach alle Aufrufe von Methoden der PedantQuery Klasse in der Klasse MetabolomipsQueryForOutsideOrganisms, durch Aufrufe der identischen Methoden der Pedant3Query Klasse ersetzt. Dadurch mussten keinerlei Parameter verändert oder neue Objekte entwickelt werden. Der direkte Zugriff auf die Pedant3 Datenbank wurde in der Pedant3Query Klasse mit Hilfe von JDBC verwirklicht, welche eine neue Verbindung zum Pedant3 Host mit Hilfe bestimmter Loggingdaten aufbaut. Außerdem wurden neue SQL Abfragen geschrieben. Denn die alten Abfragen, welche auf Pedant2 zugegriffen, funktionieren nicht mehr bei Pedant3, da sich das Datenbankschema grundlegend verändert hat. Um an Informationen zu kommen, welche früher in einer Tabelle waren, muss man nun über mehrere Tabellen joinen. Ein Klassendiagramm von MetaboloMIPS ist auf Abb. 15 zu finden.

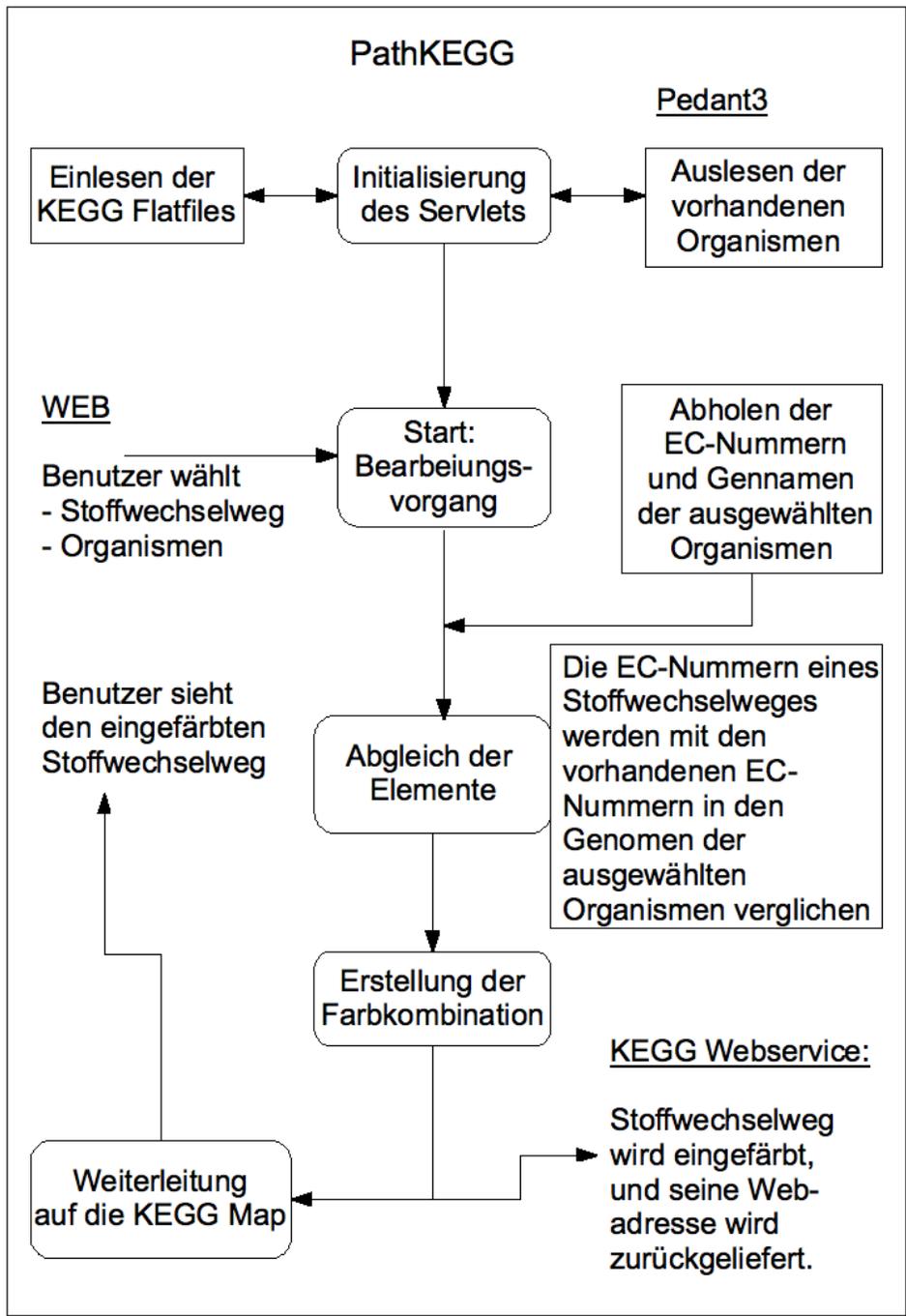


Abbildung 13: Ablaufdiagramm des PathKEGG Programms

Choose a pathway:

- Streptomycin biosynthesis
- Tetracycline biosynthesis
- Clavulanic acid biosynthesis
- Puromycin biosynthesis
- Novobiocin biosynthesis
- Benzoquinone biosynthesis
- Carbohydrate Metabolism**
- Glycolysis / Gluconeogenesis
- Citrate cycle (TCA cycle)**
- Pentose phosphate pathway

Choose an organism for A:

- Campylobacter fetus subsp. fetus 82-40
- Campylobacter jejuni RM1221
- Campylobacter jejuni subsp. jejuni NCTC 11471
- Candida dubliniensis
- Candidatus Amoebophilus asiaticus
- Candidatus Blochmannia floridanus
- Candidatus Blochmannia pennsylvanicus sp. nov.
- Candidatus Carsonella ruddii PV
- Candidatus Kuenenia stuttgartiensis
- Candidatus Nitrospira defluvii**

Choose an organism for B:

- Candidatus Nitrospira defluvii
- Candidatus Pelagibacter ubique HTCC106
- Candidatus Prochloromydia amoebophila
- Candidatus Ruthia magnifica str. Cm (Ca)
- Carboxydotherrnus hydrogeniformans Z-
- Caulobacter crescentus CB15
- Chaetomium globosum CBS 148.51
- Chlamydia muridarum Nigg

CITRATE CYCLE (TCA cycle)

00020 02/07

Abbildung 14: Servlet nach der Berechnung

3.3 Transportervorhersage

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Transportervorhersage näher betrachtet. Dies geschieht, indem die gefundenen Transporterproteine anhand ihrer Funktion in Kategorien einordnet und anschließend die gefundenen Ergebnisse interpretiert werden. Prinzipiell wurden die Ergebnisse der Transportervorhersage durch eine Blast-Suche aller Proteine von *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 gegen die TCDB-Datenbank³³ erzeugt. Alle BLAST-Treffer mit einem E-Value unter 0,001 wurden erstmals in die engere Auswahl übernommen und anschließend näher analysiert und gegebenenfalls verworfen. Eine ausführliche Liste aller BLAST-Treffer inklusive ihrer E-Values, Bitscores, TC-Nummer und Orfnamen findet sich im TransporterPredictionResults.pdf auf der beigelegten CD.

3.3.1 Aminosäuren

Parachlamydia acanthamoebae UV7 sollte auf jeden Fall die Aminosäuren Arginin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Tryptophan und Valin aufnehmen können, denn für diese Aminosäuren wurden bei der Stoffwechselwegesanalyse (mehr dazu ist im Kapitel 3.7.2 zu finden) für *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 keine bzw. unvollständige Stoffwechselwege gefunden. Bei der Vorhersage der Transporterproteine für *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 wurden Transporter für die nicht selbst produzierbaren Aminosäuren Arginin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Tryptophan und Valin gefunden. Bei den Aminosäuren Homocystein, Homoserin, Methionin, Threonin und Seleocystein bin ich mir nicht sicher, ob *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 sie synthetisieren kann, da die Stoffwechselwege für ihre Synthesen sehr unvollständig sind. Allerdings konnten nur für Methionin und Threonin Transporter ausgemacht werden. Das führt dazu, dass vermutet werden kann, dass *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 Homocystein, Homoserin und Seleocystein selbst herstellen kann. Desweiteren wurden Transporter für die Aminosäuren Alanin, Aspartat, Glutamat, Glutamin, Glycin, Lysin, Phenylalanin, Prolin, Tyrosin, und Serin gefunden, welche von *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 auch selbst produziert werden können. Eine Liste mit den gefundenen Transportern und ihrer Funktionalität ist in der Tabelle 1 zu finden.

3.3.2 Nukleotide, Nukleoside oder Basen

Bei der Vorhersage der Transporterproteine wurden vier Antiporter für die Aufnahme bzw. Abgabe von ATP, ADP, UTP, NAD⁺ und aller vier Ribonukleosid-Triphosphate gefunden. Diese Ntt1, Ntt2, Ntt3 und Ntt4 genannten Proteine wurden erstmals in *Candidatus Protochlamydia amoebophila* UWE25 gefunden [18]; deshalb erscheint mir die Vorhersage dieser Transporterproteine als sinnvoll. Ebenfalls wurden Permeasen für die Aufnahme von Cytosin und den Deoxy- und Ribonukleotiden von Cytidin, Uridin und Adenosin gefunden. Außerdem scheint *Parachlamydia acanthamoebae* UV in der Lage zu sein, Purinbasen und Purinnukleoside zu exportieren. Eine Auflistung aller gefundenen Transportern, die Nukleotide, Nukleoside oder Basen transportieren, ist in der Tabelle 2 zu finden.

3.3.3 Zucker und Zuckerderivate

Es wurden Transporter für den Import von verschiedensten Zuckern wie z.B. Maltose, Trehalose, Saccharose, Glucose-6-Phosphat, Galactose, Glucose, Mannose und Fructose gefunden. Die meisten der

³³mehr Informationen zur Datenbank gibt es im Kapitel 2.4.2

trivialer Genname	Funktionalität
TnaT	Tryptophan-Symporter
DagA	Alanin oder Glycin:Na ⁺ Symporter
YqiX	Aufnahmesystem für Arginin
PutP	Prolin:Na ⁺ Symporter
BrnQ	transportiert Leucin, Isoleucin, Phenylalanin und Methionin
TyrP	Tyrosin Permease
GlnH, GlnP, GlnQ	Glutamin Porter (ATP-binding Cassette)
GltT	Glutamat/Aspartat:Na ⁺ + H ⁺ Symporter
PrIS	Prolin Sensorrezeptor
HisJ, HisP, ArgT, HisM	Histidin, Arginin, Lysin, Ornithin ABC-Transporter
LivG	Leucin, Isoleucin, Valin Porter (auch Phenylalanin und Tyrosin)
SteT	Serin/Threonin Exchange Transporter
LeuT _{Aa}	Leucin: 2 Na ⁺ Symporter

Tabelle 1: Liste mit den vorhergesagten Transporterproteinen für Aminosäuren

trivialer Genname	Funktionalität
Ntt1	ATP/ADP Antiporter
Ntt2	Antiporter von NTP, alle vier Ribonukleosid-Triphosphate
Ntt3	UTP:H ⁺ Antiporter
Ntt4	NAD ⁺ :ADP Antiporter
HI0354	<i>putative hydroxymethylpyrimidine uptake permease</i>
CodB	Cytosine Permease
RnsB	Permease zur Aufnahme von Deoxy- und Ribonukleotiden
YdhL	Purin Basen/Nukleosid Effluxpumpe

Tabelle 2: Liste mit den vorhergesagten Transporterproteinen für Nukleotide

trivialer Genname	Funktionalität
MalG1, MalG2, MalK	Maltose, Trehalose (ABC) Porter
CscB	Sucrose Transporter
Hpt	Glucose-6-Phosphat: P_i Antiporter
FruA, FRUB	Fructose-Porter (PTS): auch Fructose-1-Phosphat
yhji	Glucose/Mannose: H^+ Symporter
DctA	C_4 -Dicarboxylate Transporter
UhpT	Zucker-Phosphat: P_i Antiporter
GalP	Galactose: H^+ Symporter
AlsA	D-Allose Porter
RtpF	Rhamnose Porter
BxlG	Xylobiose Porter

Tabelle 3: Liste mit den vorhergesagten Transporterproteinen für Zucker

genannten Zucker werden über Porter aufgenommen. Nur die Fructose scheint mit Hilfe des Phosphotransferase-System aufgenommen zu werden. Die Vorhersage von Transportern für die Zucker Mannose, Trehalose, Saccharose, Glucose und Glucose-6-Phosphat erscheint mir sinnvoll, denn für diese Zucker besitzt *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 Abbaustoffwechselwege. Für eine vollständige Liste aller Transporter für Zucker und Zuckerderivate siehe Tabelle 3.

3.3.4 Vitamine und Cofaktoren

Es wurde nur ein Transporter für die Aufnahme von Biotin vorhergesagt. Dies ist erstaunlich, da man wegen des symbiontischen Charakters von *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 davon ausgeht, dass es die meisten Vitamine und Cofaktoren aus der Wirtszelle importiert. So wäre eine größere Anzahl von Transportsysteme für Vitamine und Cofaktoren zu erwarten. Dies könnte bedeuten, dass *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 im Gegensatz zu allen bisher sequenzierten Chlamydien in der Lage ist, alle notwendigen Vitamine und Cofaktoren selbst zu synthetisieren. Ein weiterer Hinweis auf diese Tatsache sind die vielen vorhergesagten Stoffwechselwege für die Synthese von Vitaminen und Cofaktoren, die in einer solchen Menge noch nie in einem Chlamydium vorgefunden wurden.

3.3.5 Sekretionssysteme

Wie schon bereits für *Candidatus Protochlamydia amoebophila* UWE25 [27] entdeckt, scheint auch *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 ein Typ 4 Sekretionssystem zu besitzen. Außerdem wurde ein Typ 3 Sekretionssystem vorhergesagt, dieses ist für die Pathogenität von Bakterien wichtig, denn mit ihm werden Proteine in die Wirtszelle injiziert. Die Vorhersage ist nicht verwunderlich, da alle Chlamydien ein Typ 3 Sekretionssystem besitzen. Desweiteren wurden Proteine des Typ 2 Sekretionssystem (*General Secretory Pathways* Systems) gefunden.

trivialer Genname	Funktionalität
YknX, YknY, YknZ	antimikrobielle Peptidresistenz-Pumpe
EbrAB	<i>Heterooligomeric drug resistance efflux pump</i>
TetA	Tetracycline:H ⁺ Antiporter
MacA, MacB	Macrolide Exporter
NorM	Drug:Na ⁺ Antiporter
CmlA	Chloramphenicol:H ⁺ Antiporter
MarC	Transporter für verschiedene Antibiotika
CmeA, CmeB	Bile and multidrug efflux pump
yegN	Antiport von Norfloxacin, Enoxacin, Kanamycin usw...
Bcr	Bicyclomycin, Sulfathiazole:H ⁺ Antiporter
CarA	Carbomycin-Resistenz ATPase
VceA, VceB	<i>multidrug resistance pump</i>
MtrC	Fettsäuren, Gallensäure und antibakterielle Peptide Abflusspumpe
SvrA	<i>Drug (e.g. biocides, fluoroquinolones) efflux pump</i>

Tabelle 4: Liste mit den vorhergesagten Transporterproteinen für Antibiotika

3.3.6 Antidrug-Exporter

Es konnten eine Vielzahl von Transportern vorhergesagt werden, die die unterschiedlichsten antimikrobiellen Stoffe und Antibiotika aus der Zelle exportieren können. So wurden zum Beispiel Transporter für Norfloxacin, Enoxacin, Kanamycin, Tetracycline, Rifampicin, Erythromycin, Streptomycin, Macrolide und Sulfathiazole gefunden. Eine Liste aller Transporter für den Export von Antibiotika und anderen antimikrobiellen Stoffen ist in der Tabelle 4 zu finden.

3.3.7 Kanäle und Porter für Elemente

Es wurden sowohl Kanäle und als auch Carrier für die verschiedensten chemischen Elemente gefunden. Die meisten dienen zur Aufnahme von wichtigen anorganischen Ionen wie Natrium, Kalium und Magnesium und zur Aufnahme von Spurenelementen wie Eisen, Kupfer und Kobalt. Nur ein kleiner Teil von ihnen wird dazu genutzt, um chemische Elemente aus der Zelle zu transportieren. Für das Natrium wurden die meisten Transporter gefunden. Dies ist nicht verwunderlich, da Natrium neben H⁺ das am meisten verwendete Element für Symporter bzw. Antiporter ist. Es wurden Ionenkanäle und Porter für die Aufnahme von Kalium (K⁺), Kupfer (Cu²⁺), Kobalt (Co²⁺), Lithium (Li⁺), Magnesium (Mg²⁺), Nickel (Ni²⁺), Silber (Ag⁺) und Protonen (H⁺) gefunden. Es wurden auch Transportproteine für die Abgabe der Schwermetalle Zink, Cadmium, Blei und der giftigen Elemente Arsen und Antimon vorhergesagt. Für einen ausführlichen Überblick über die Transporter dieser Kategorie siehe Tabelle 5.

3.3.8 Proteine der Äußeren Membran

Der Austausch zwischen Periplasma und der Umwelt geschieht über die in der Äußeren Membran eingebauten Porine. Porine sind β -Faltblattproteine, durch welche verschiedene Moleküle diffundieren

trivialer Genname	Funktionalität
CorA	Transportsystem für divalente Kationen
CopA	Kupfer Cu ²⁺ -ATPase (Aufnahme)
CopB	Kupfer Cu ²⁺ , Silber Ag ⁺ -ATPase (Abfluss)
CnrA	Exporter für Nickel und Kobalt
YfeA, YfeB, YfeD	Transporter für Eisen und Magnesium
Fet3	Transporter für Eisen
ATP[ABCDFG]	Na ⁺ -translocating F-type ATPase
ATKA, ATKB, ATKC	K ⁺ transportierende ATPase
VATA, VATB, VATD	H ⁺ -translocating A-type ATPase
NtpI, NtpK	Na ⁺ -translocating V-type ATPase
ZntA	Zink, Cadmium, Cobalt, Quecksilber, Nickel, Kupfer und Blei - ATPase
FUPA33a	Kationen-transporting P-type ATPase (genaue Funktion unbekannt)
MgtA	Mg ²⁺ und Ni ²⁺ -ATPase (Aufnahme)
MgtC	vermeintlicher Mg ²⁺ Transporter
MgtE	Mg ²⁺ und Co ²⁺ Transporter
NatA	Na ⁺ Exporter
KefA	mechanosensitiver Ionenkanal für K ⁺
KefB	Glutathion reguliertes K ⁺ Efflux-Protein
KefC	Glutathion reguliertes K ⁺ Efflux-Protein
GcdA, GcdB, GcdC	Na ⁺ -transporting glutaconyl-CoA decarboxylase
CadA	Zink, Cadmium und Blei ATPase (efflux)
TroA, TroB, TroC, TroD	Magnesium, Zink und Eisen Transporter
YlmG	Protein für die Aufnahme von Kalium
SLL1864	Chlorid Kanalprotein
CLC	Chlorid Kanalprotein
TerC	Tellurium Ionenkanal
ArsB	Antiporter von Arsen und Antimon:H ⁺
VceA	Multidrug:H ⁺ Antiporter
TrkA, TrkH	K ⁺ Transporter
PbrT	Blei-Aufnahmetransporter
RRPP	H ⁺ -translocating pyrophosphatase synthase
HTM1	Schwermetall Transporter
UreQ	Nickel Permease
NapA	Na ⁺ :H ⁺ Exporter
CusC	Kupfer und Silber Efflux Pumpe
SilP	Ag ⁺ -ATPase
MmdA	Na ⁺ -transporting methylmalonyl-CoA decarboxylase
NhaD	Na ⁺ , Li ⁺ :H ⁺ Antiporter
GerN	Na ⁺ :H ⁺ -K ⁺ Antiporter
fieF	Zn ²⁺ /Cd ²⁺ /Hg ²⁺ /Fe ²⁺ :H ⁺ Antiporter
CbrA	Nitrogen:Na ⁺ Symporter

Tabelle 5: Liste mit Ionenkanäle und Transportern für die Aufnahme von Ionen.

trivialer Genname	Funktionalität
TolC	Outer membrane exporter (OMF): Hemolysin, Siderphoren
oprM	Outer membrane Protein: Multidrug-Efflux-Pump
CzcC	Outer membrane exporter (OMF) of Co^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+}
MisL	<i>autotransporter/fibronectin binding protein</i>
Wza	<i>OMA component of the group 1 K30 export system</i>
PltH, PltI, PltJ, PltK, PltN	Pyoluteorin Efflux Pumpe
ExcC, tolB, tolQ, tolA	Teil des TolA Energieumwandlungsystems
OpcM	Outer membrane Exporter: Multiple drugs
VceC	Outer membrane Exporter of drugs
PulD, PulE, PulF	Pullulanase Sekretionssystem
D15	<i>Protective surface antigen D15 precursor</i>
SalD	Salicylat-Ester/Hydrocarbon Outer mebrane Porin
Omp85	Outer mebrane Protein Omp85

Tabelle 6: Liste mit vorhergesagten Outer Membrane Proteinen.

können. Sie erlauben also einen passiven Transport durch die Äußere Membran in der sie als Kanäle eingebaut sind. Sie sind allerdings entweder unspezifisch (z.B. outer membran protein OmpF) oder gruppenspezifisch (z.B. LamB (Zucker) oder TsX (Nukleoside)). Bei einem Vergleich der vorhergesagten Porine (siehe Tabelle 6) mit den Ergebnissen einer Clusteranalyse von Eva Heinz vom Fachbereich Mikrobielle Ökologie der Universität Wien zeigte sich, dass sich mit der Blast-Analyse 41 der 56, der von Eva Heinz gefundenen Porinen, finden lassen. Allerdings sind bei neun der 41 Treffer, die E-Values über 0.001, so dass diese möglicherweise keine Porine sind. Im Großen und Ganzen konnte ich mit der Blast-Suche 32 von den 56 Porinen (57,1%), welche ich von Eva Heinz bekam, finden. Dass die Blast-Suche so schlecht abschneidet, könnte daran liegen, dass manche der Einträge nicht aktuell sind [70].

3.3.9 Transporter für andere Moleküle

Es wurden Transporter für die unterschiedlichsten Moleküle wie z.B. Dipeptide, Acetat, Arsenit und Polyamine ausgemacht. Es wurden Aufnahmesysteme für Cholin, Sulfat, Eisenoxid, Chloridverbindungen und Nitrogen gefunden, während für Stoffe wie das O-Antigen, Glycolipid, Daunorubicin, Microcin, Phospholipide und Lipid A Exporterproteine entdeckt wurden. Ein vollständige Liste ist in der Tabelle 7 zu sehen.

3.3.10 Hilfsproteine

Die Proteine in dieser Kategorie sind nicht unbedingt Teil von Transportersystemen, sondern haben unterstützende Funktionen, wie z.B. CzcB, das eine Verbindung zwischen dem *Outer Membrane* Protein OMF und Transportern der Cytoplasmamembran erzeugt, oder wie das TolQ Protein, welches eine Interaktion der Cytoplasmamembran mit der *Outer Membrane* ermöglicht. Desweiteren wurde noch ein Hilfsprotein PT1 für das Phosphotransferase-System und das Regulatorprotein nfeD für den Durchlass

trivialer Genname	Funktionalität
BenK	Benzoat:H ⁺ Symporter
rsB	Arsenit-Resistenz Pumpe
licB	Choline Transporter
AatA	Acetat Exporter
DppB, DppC, DppD, DppE	Dipeptid Transportpermease ³⁴
FeoB	<i>Iron(II) oxide uptake</i> -System
FecD, FecE	<i>Iron (Fe³⁺) or ferric-dicitrate porter</i>
yeg0	Exporter von Gallensuren
SulP	Sulfat:Na ⁺ Symporter
SecD	Protein-export Membran Protein
PitA	anorganisches Phosphat(P _i):H ⁺ Symporter
ToxG, ToxH	Toxoflavin Exporter
PerM	Export von Autoinducer 2
Mth347	O-Antigen Transporter
CaiC	Carnitine/Crotonobetaine CoA Synthase
TatE, TatC	TatABCE translocase
PecM	Exporter von Indigoidine
MccC	Microcin Exportprotein
LplT	Lysophospholipid tTransporter
DrrA, DrrB	Daunorubicin Exporter
PotA, PotB, PotC, PotD	Polyamine (Putrescine/Spermidine) Uptakeporter
LinL, LinK	γ-hexachlorocyclohexane (γHCH) uptake
ChoV	Choline spezifisches Aufnahmesysteme
OpuBA	Choline Porter
Ssp	Autoexporter für Serin-Protease
efeU	Eisenoxid Permease
GlpF	Glycerol facilitator
MsbA	Phospholipid und Lipid A Exporter
UrtE	Harnstoff Porter
LolD, LolE	Lipoprotein Translocase
DevC	Glycolipid Exporter

Tabelle 7: Liste mit Transportern für verschiedene Moleküle.

trivialer Genname	Funktionalität
CzcB	Verbindet OMF mit Transportern der Cytoplasma Membran
TolQ	Protein für die Interaktion von Cytoplasma Membran mit der Outer Membrane
ygbF	Verbindungsprotein zwischen Cytoplasma Membran und Outer Membrane
PT1	Hilfprotein für das PTS in Bakterien
nfeD	Regulatorprotein
AcrA	Acridin-Efflux-Pumpen Konstituent
EpsD	Teil des PST-type Exopolysaccharid Exportsystems
ComB	Competence factor transport accessory protein
YopD	<i>Bacterial Type III-Target Cell Pore-Protein</i>
MesE	Mesentericin Y105 secretion accessory protein

Tabelle 8: Liste mit allen vorhergesagten Hilfsproteinen.

von Kationen durch die Cytoplasmamembran gefunden. Für einen vollständigen Überblick über alle Hilfsproteine siehe Tabelle 8.

3.3.11 Unklassifizierte Proteine

In diese Kategorie fallen die unterschiedlichsten Proteine, die irgendwie mit Transportern in Verbindung gebracht werden können. So gehören z.B. die Colicine E1 und K in diese Kategorie. Colicine sind proteinogene Toxine, die von Bakterien abgesondert werden um das Wachstum ähnlicher Bakteriegattungen zu inhibieren. Die Colicine E1 und K schleußen sich in die Membranen anderer Bakterien ein, und bilden dort einen Ionenkanal aus, was dazu führt das diese Bakterien, einerseits ihr Membranpotential nicht mehr aufrecht erhalten können und andererseits können sie dem osmotischen Druck nicht mehr widerstehen. Ebenfalls in diese Kategorie gehören die Cytotoxine A, B, C und Hemolysin C. Desweiteren habe ich hier Proteine wie z.B. MviN der Maus-Virulenzfaktor, SpoVE das Sporulationsprotein und DnaK ein Chaperon Protein eingeordnet. Eine komplette Liste aller in diese Kategorie eingeordneten Proteine ist in der Tabelle 9 zu finden.

3.4 Vergleich der Chlamydien

Glykolyse und Kohlenhydrate

Für alle Chlamydien wurde mittels MetaboloMIPS sowohl eine vollständige Glykolyse als auch ein vollständiger Pentose-Phosphat-Zyklus vorhergesagt. Diese Tatsache erscheint sinnvoll, denn aus der Literatur [27, 35, 30] ist bekannt, dass die Chlamydien *Candidatus Protochlamydia amoebophila* UWE25, *Chlamydia trachomatis* D/UW-3/CX und *Chlamydomphila pneumoniae* CWL029 eine Glykolyse und einen Pentose-Phosphat-Zyklus besitzen. In allen Chlamydien wurden Stoffwechselwege gefunden, in denen N-Acetyl-D-Glucosamine 6-Phosphat zu UDP-N-Acetyl-Muramate umgewandelt wird, welches wiederum als Grundbaustein für Peptidoglykan dient, das normalerweise in den Zellwänden von Bakterien vorkommt. Es wird von den Chlamydien vermutet, dass sie zwar Peptidoglykan synthetisieren können, es aber nicht in die Zellwand einbauen, statt dessen spielt es vielleicht bei ihnen eine Rolle bei der Tei-

trivialer Genname	Funktionalität
DnaK	Chaperone Protein
MCP	Methyl-accepting chemotaxis protein sensory transducer
IcaA	Putative Vectorial Glycosyl Polymerization
CEA1	Colicin E1
CEAK	Colicin K
RTX	RTX (repeat in toxin) Cytotoxin
TOXA	Cytotoxin A
TOXB	Toxin B
TpeL	Cytotoxin C
Wzc	Tyrosine Protein Kinase (MPA1-C)
ComFA, ComEC	DNA-Translocase
ScsB	Suppressor of copper-sensitivity
HlyC	Hemolysin C
rodA	Exporter für einen Murein Vorgängermolekül
MotX	Flagellar Motor 1ExbBD Outer Membrane Transport Energizer
SpoVE	Sporulationsprotein
MviN	Maus-Virulenzfaktor
YidC	Inner membrane protein
CcpA-1	Elektronentransferkette zur Reduktion von extrazellularen Fe ₂ O ₃

Tabelle 9: Eine Liste der verschiedensten Proteine, die mit Transporter in Verbindung gebracht werden.

lung der *Reticulate Body*s und der Umwandlung von diesen in die *Elementary Body*s [17]. Prinzipiell wird über das Thema Chlamydien und Peptidoglykan diskutiert und auch die *Chlamydial Anomaly* genannt [62]. Es wurden außerdem Stoffwechselwege in alle Chlamydien gefunden, die eine Synthese von Glykogen ermöglichen. Es wurde zwar für alle Chlamydien der Stoffwechselweg pathCC3 vorhergesagt, in dem das α -Ketoglutarat über das Succinyl-CoA zum Succinat umgewandelt wird, dieser allein bildet aber noch keinen kompletten Citratzyklus. Dies steht aber in Einklang mit der Literatur [35, 71, 58]. Nur für die Umweltchlamydien konnten die restlichen Teilstoffwechselwege des Citratzyklus gefunden werden, woraus folgt, dass diese einen kompletten Citratzyklus besitzen. Dies stimmt wieder mit der Literatur überein, weil man vom Umweltchlamydium *Candidatus Protochlamydia amoebophila* UWE25 weiß, dass es einen kompletten Citratzyklus benutzt [27].

Aminosäuren

Alle Chlamydien scheinen die Fähigkeit zu haben, das L-Glycin in L-Serin bzw. L-Serin in L-Glycin umzuwandeln. Außerdem können sie L-Aspartat aus L-Arginin herstellen und Chorismat aus dem D-Erythrose-4-Phosphat synthetisieren. Das Chorismat kann dann laut MetaboloMIPS von allen Chlamydien zu Ubiquinone umgewandelt werden. Diese Vorhersage ist zumindest für *Candidatus Protochlamydia amoebophila* UWE25 seltsam, weil man weiß, dass es nicht in der Lage ist, Ubiquinone zu synthetisieren, sondern statt dessen Menaquinone [27] herstellt. Wenn man sich den Stoffwechselweg für die Synthese von Ubiquinone näher ansieht, erkennt man, dass vier der fünf Reaktionen spontan ablaufen, und nur das Enzym der fünften Reaktion, konnte als vorhanden klassifiziert werden. Aufgrund dieser Tatsachen bekommt dieser Stoffwechselweg von MetaboloMIPS einen PathScore von 1.0. Es ist aber fraglich, ob diese spontanen Reaktionen auch in *Candidatus Protochlamydia amoebophila* UWE25 ablaufen. Allerdings besitzen alle Umweltchlamydien einen Stoffwechselweg, in dem aus Chorismat das Menaquinone erzeugt wird. Somit scheint es wahrscheinlich, dass die Umweltchlamydien Menaquinone anstatt Ubiquinone erzeugen. Das L-Lysin wiederum kann von allen Chlamydien aus dem L-Aspartat hergestellt werden, während das L-Glutamat aus L-Aspartat erzeugt wird. *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 und *Waddlia chondrophila* scheinen zusätzliches L-Glutamat durch den Abbau von Histidin zu gewinnen. Nur die Umweltchlamydien *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 und *Waddlia chondrophila* sind laut der Vorhersage in der Lage die Aminosäuren L-Cystein, L-Methionin, L-Ornithin und L-Prolin zu synthetisieren. Nach MetaboloMIPS scheint nur *Simkania negevensis* Z in der Lage zu sein, mittels des pathGLUTAMATE5 Stoffwechselweges, das reduzierte Glutathion (GSH) aus dem L-Glutamat herzustellen. Der Stoffwechselweg pathAAA6, in dem das L-Tryptophan aus Chorismat hergestellt wird, wurde nur für *Simkania negevensis* Z, *Chlamydophila felis* Fe/C-56, *Chlamydophila caviae* GPIC, *Chlamydia muridarum* Nigg, *Chlamydia trachomatis* A/HAR-13 und *Chlamydia trachomatis* D/UW-3/CX vorhergesagt. Nur für *Parachlamydia acanthamoebae* UV7, *Simkania negevensis* Z und *Chlamydia trachomatis* A/HAR-13 wurden die Stoffwechselwege pathAAA4 und pathAAA5 vorhergesagt, in welchen aus Chromisat entweder Phenylalanin (pathAAA4) oder das Tyrosin (pathAAA5) hergestellt wird.

Tetrapyrrole

Die Stoffwechselwege für die Biosynthese von Siroheme bzw. Protoheme aus dem (S)-Glutamat-1-Semialdehyde wurden für alle Chlamydien gefunden. Das Protoheme ist ein Bestandteil der Cytochrom-Proteine, diese sind Bestandteile der Membran und zuständig für den Elektronentransport.

Fettsäuren und Phospholipide

Alle Chlamydien haben laut MetaboloMIPS den Stoffwechselweg pathFA1, bei dem durch mehrere Durchläufe des Zyklus, unterschiedlich lange Fettsäuren synthetisiert werden können. Diese Vorhersage scheint sinnvoll, weil man zumindest von *Chlamydia trachomatis* und *Chlamydia pneumoniae* weiß, dass sie Fettsäuren synthetisieren können [30, 35, 50]. Interessant ist auch, dass laut MetaboloMIPS *Waddlia chondrophila* und *Parachlamydia acanthamoebae* UV7, die einzigen Chlamydien sind, die Fettsäuren oxidieren können. Nur für diese beiden Chlamydien wurde der Stoffwechselweg pathFA2 vorhergesagt, in dem zyklisch Fettsäuren zu Acetyl-CoA abgebaut werden. Alle Chlamydien scheinen in der Lage zu sein, die synthetisierten Fettsäureketten später in die Phospholipide Cardiolipin und Phosphatidylserin umzuwandeln. Das Cardiolipin (Diphosphatidylglycerin) kommt ausschließlich in den Membranen von Bakterien und Mitochondrien [28] vor, und von Phosphatidylserin weiß man, dass es ein Bestandteil der Membran ist. Für die Umweltchlamydien *Parachlamydia acanthamoebae* UV7, *Simkania negevensis* Z und *Candidatus Protochlamydia amoebophila* UWE 25 wurde auch ein Stoffwechselweg vorhergesagt, in dessen Verlauf aus dem Cholin das Lecithin hergestellt wird. Des Weiteren scheint nur *Simkania negevensis* Z in der Lage zu sein, das 3-Phosphatidyl-Ethanolamin, einem Hauptbestandteil von Cephalin, welches das am häufigsten vorkommende Phospholipid in Bakterien ist, zu synthetisieren. Interessant ist, dass *Simkania negevensis* Z, das 3-Phosphatidyl-Ethanolamin auch mit Hilfe verschiedenster Phospholipasen zu z.B. δ -1,2-Diacyl-Glycerol oder L-1-Lyso-Phosphatidyl-Ethanolamin abbauen kann. Dies ist bemerkenswert, da für die restlichen Chlamydien keinerlei Phospholipasen gefunden werden konnten, und es somit unwahrscheinlich ist, dass in diesen Phospholipide abgebaut werden.

Isoprenoide

Aufschlussreich ist, dass nur für *Waddlia chondrophila* der Melovate-Stoffwechselweg vorhergesagt wurde, in dem aus zwei Acetyl-CoA über das Zwischenprodukt Melovat das Moleküle Isopentenyl-Pyrophosphat (IPP) und dessen Isomer Dimethylallyl-Pyrophosphat erzeugt wird. Diese Moleküle sind die Grundbausteine der Isoprenoide, von denen bekannt ist, dass sie in allen Lebewesen vorkommen. Zu den Isoprenoiden gehören die Steroide und Terpene. Die Hopanoide sind äußerst stabile Triterpene, die in Bakterien Komponenten der Membran sind. Und dort an der Regulierung von Stabilität und Fluidität der Membran teilnehmen[52]. Dieses Ergebnis ist deshalb interessant, weil die meisten Bakterien und der Malaria-Parasit *Plasmodium falciparum* den *Methylerythritol-Phosphat-Stoffwechselweg* für die Synthese der Moleküle Isopentenyl-Pyrophosphat (IPP) und Dimethylallyl-Pyrophosphat benutzen [68]. Wenn man nun die restlichen untersuchten Chlamydien unter diesem Gesichtspunkt näher betrachtet³⁵, erkennt man, dass für diese keinerlei Vorhersagen des Melovat-Stoffwechselweges gemacht wurden, sondern alle den *Methylerythritol-Phosphat- Stoffwechselweg* für die Synthese von IPP benutzen. Einzige Ausnahmen dabei sind die Stämme J138, CWL029 und TW-183 von *Chlamydophila pneumoniae* und *Chlamydia trachomatis* D/UW-3/CX, für welche keinerlei Anzeichen für den *Methylerythritol-Phosphat-Stoffwechselweg* und den Melovat-Stoffwechselweg gefunden wurden.

³⁵Wurde mit den Pathway Tools gemacht.

Nukleotide

Die untersuchten Chlamydien können laut Vorhersage die Nukleotide Adenosin, Deoxyadenosin, Guanin, Deoxyguanin, Xanthosin, Inosin, Uridin, Cytidin und Deoxythymidin synthetisieren.

Vitamine

Mit Ausnahme von *Simkania negevensis* Z scheinen alle anderen Chlamydien in der Lage zu sein, Folsäure herzustellen. Folsäure (auch Folat genannt) ist notwendig für die Synthese von DNA und somit lebenswichtig für alle Lebewesen. Es ist bekannt, dass einige Chlamydien Folat synthetisieren können [47]. Die Umweltchlamydien *Parachlamydia acanthamoebae* UV7, *Waddlia chondrophila* und *Simkania negevensis* Z können NAD produzieren und phosphorylieren, während *Candidatus Protochlamydia amoebophila* UWE25 NAD nur phosphorylieren kann. Die restlichen notwendigen Vitamine bzw. Kofaktoren wie Coenzym A, Cobalamin, Ascorbat oder Biotin werden dann von den Chlamydien mit Hilfe von Transporterproteinen aus der Wirtszelle importiert.

Synthese und Elongation von RNA und DNA

Alle Chlamydien scheinen in der Lage zu sein, sowohl RNA- als auch DNA-Stränge aus den jeweiligen Nukleotiden zu synthetisieren. Dies scheint logisch, da die Elongation bzw. Synthese von RNA- und DNA-Strängen überlebenswichtig für einen Organismus ist, und es fatal wäre, wenn er die dazugehörigen Stoffwechselwege nicht besitzen würde.

Spezialmetabolismen

Auch erstaunlich ist, dass nur *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 und *Waddlia chondrophila* laut MetaboloMIPS Stoffwechselwege besitzen, in denen sie Acetyl-CoA zu Ethanol bzw. 1-Butanol fermentieren können.

Die ausführlicheren Daten zum Vergleich der Chlamydien sind in ChlamydiaReport.pdf auf der CD zu finden.

3.5 Vergleich der Nitrifizierer

Glykolyse und Kohlenhydrate

Alle untersuchten Bakterien dieser Gruppe besitzen laut MetaboloMIPS eine funktionsfähige Glykolyse. Man weiß zumindest von *Nitrosococcus oceani* ATCC 19707 [24] und *Nitrosomonas europaea* ATCC 19718 [33], dass diese Bakterien die Glykolyse zur Energiegewinnung benutzen. Bei *Nitrobacter winogradskyi* Nb-255 ist laut Publikation der Genomsequenz [37] keine klassische Glykolyse vorhanden, was meinen Ergebnissen für *Nitrobacter winogradskyi* Nb-255 nicht widerspricht. Bei einer näheren Betrachtung der Glykolyse sieht man nämlich, dass das entscheidende Enzym für die klassische Glykolyse, die Phosphofruktokinase (EC: 2.7.1.1) im Genom von *Nitrobacter winogradskyi* Nb-255 fehlt. Allerdings könnte die Glykolyse bei Fructose-1,6-Bisphosphat startend ohne Probleme bis zum Pyruvat

ablaufen. Die Gluconeogenese scheint laut MetaboloMIPS in allen Bakterien dieser Gruppe vorhanden zu sein. Aus der Literatur [24, 33] ist bekannt, dass einige der Bakterien die Gluconeogenese benutzen. Interessant ist, dass zwar alle Nitrifizierer das UDP-N-Acetyl-D-Glucosamine, einen Bestandteil des Peptidoglykan und des O-Antigens, synthetisieren können, aber nur *Nitrospira defluvii* ist nicht dazu fähig, aus dem UDP-N-Acetyl-D-Glucosamine das UDP-N-Acetyl-Muramate herzustellen. UDP-N-Acetyl-Muramate ist wiederum der Grundbaustein von Peptidoglykan, welches normalerweise in den Zellwänden von Bakterien vorkommt. Ob *Nitrospira defluvii* Peptidoglykan synthetisieren kann, ist unklar und konnte nicht mit Hilfe von MetaboloMIPS geklärt werden. Während alle Bakterien mit Ausnahme von *Nitrosospira multiformis* ATCC 25196 das UDP-N-Acetyl-D-Glucosamine zu UDP-N-Acetyl-D-Galactosamine, welches ein Bestandteil von verschiedenen Strukturen der Zelloberfläche ist, umwandeln können, sind nur die Bakterien *Nitrosospira multiformis* ATCC 2519, *Nitrobacter winogradskyi* Nb-255 und *Nitrosomonas europaea* ATCC 19718 dazu in der Lage, aus dem UDP-N-Acetyl-D-Galactosamine das N-Acetyl-Neuraminate zu erzeugen. Das N-Acetyl-Neuraminate ist ein Bestandteil von Glykoproteinen und Glykolipiden.

Desweiteren wurde für alle untersuchten Bakterien dieser Gruppe die Fähigkeit der Synthese von Glykogen vorhergesagt. Von *Nitrosomonas europaea* ATCC 19718 [33] und *Nitrosococcus oceani* ATCC 19707 [24] ist bekannt, dass diese Glykogen abbauen können. Von *Nitrobacter winogradskyi* Nb-255 [37] weiß man allerdings, dass es Energie in Form von Polyhydroxybutyrat anstatt in Form von Glykogen speichert. Bei einer Überprüfung dieser Tatsache mit Hilfe der Pathway Tools stellte sich heraus, dass alle Bakterien mit Ausnahme der *Nitrobacter* spp. dazu fähig sind, Glykogen aus ADP-D-Glucose 16 zu synthetisieren, während die *Nitrobacter* spp. dazu fähig sind, Polyhydroxybutyrat zu erzeugen. Alle untersuchten Bakterien besitzen einen Calvin-Zyklus, um aus Kohlendioxid Glucose zu erzeugen. Dieser Vorgang dient chemoautotrophen Lebewesen, wie es die untersuchten Bakterien dieser Gruppe sind, zur Assimilation von Kohlenstoff. Es ist laut Literatur für *Nitrosococcus oceani* ATCC 19707 [24], *Nitrosomonas europaea* ATCC 19718 [33] und *Nitrosomonas eutropha* C91 [22] bekannt, dass sie den Calvin-Zyklus benutzen. Alle Bakterien besitzen einen vollständigen Pentose-Phosphat-Zyklus und Citratzyklus. Dies steht im Einklang mit der Literatur [24, 33, 37]. Die *Nitrobacter* spp. sind die einzigen Bakterien in dieser Gruppe, die aus Pyruvat das Oxalacetat herstellen können. Alle Nitrifizierer können laut Vorhersage das Lactat in Acetyl-CoA umzuwandeln.

Aminosäuren

Alle Nitrifizierer scheinen in der Lage zu sein, Serin aus 3-Phosphat-D-Glycerat und aus dem Serin das Glycin herzustellen. Alle Bakterien können Valin, Leucin und Isoleucin entweder aus Pyruvat oder Threonin herstellen. Das L-Arginin kann von allen Bakterien mit Ausnahme von *Nitrospira defluvii* und *Nitrosospira multiformis* ATCC 2519 zu Citrulin oder NO abgebaut werden. Allerdings können alle Nitrifizierer aus dem Arginin auch das L-Aspartat herstellen. Das L-Aspartat können sie dann zu D-Alanin, L-Threonin oder L-Glutamat umwandeln. Alle Nitrifizierer mit Ausnahme von *Nitrospira defluvii* können das L-Aspartat zu L-Lysin umwandeln und aus L-Glutamat das L-Prolin herstellen. Das L-Lysin kann nur nicht von *Nitrosococcus oceani* ATCC 19707 und *Nitrospira defluvii* zu Cadaverin abgebaut werden. Alle Nitrifizierer können aus L-Threonin das L-Homocystein produzieren. Das Homocystein kann von allen Nitrifizierern mit Ausnahme von *Nitrospira defluvii* später dann in L-Methionin umgewandelt werden. Threonin kann dann auch noch von alle Nitrifizierer mit Ausnahme von *Nitrospira defluvii* zu 2-Oxobutyrat abgebaut werden, *Nitrospira defluvii* und *Nitrosococcus oceani* ATCC

Organism	Evidence Glyph	Enzymes and Genes for glycogen biosynthesis I (from ADP-D-Glucose)	Operons
N. hamburgensis X14		EC# 2.7.7.27 None EC# 2.4.1.21 None EC# 2.4.1.18 1,4-alpha-glucan branching enzyme: NHAM_1464	
N. winogradskyi Nb-255		EC# 2.7.7.27 None EC# 2.4.1.21 None EC# 2.4.1.18 1,4-alpha-glucan branching enzyme: NWI_1207	
N. oceani ATCC19707		EC# 2.7.7.27 Glucose-1-phosphate adenyltransferase: NOC_0905 EC# 2.4.1.21 Glycogen/starch synthases, ADP-glucose type: NOC_0100 Glycogen/starch synthases, ADP-glucose type: NOC_0771 Glycosyl transferase, group 1: NOC_1973 EC# 2.4.1.18 1,4-alpha-glucan branching enzyme: NOC_0904	
N. europaea ATCC 19718		EC# 2.7.7.27 ADP-glucose pyrophosphorylase: NE0190 ADP-glucose pyrophosphorylase: NE0175 ADP-glucose pyrophosphorylase: NE2030 EC# 2.4.1.21 Glycosyl transferases group 1: ggA1 EC# 2.4.1.18 Glycoside hydrolase family 13:Isoamylase N-terminus: ggB	
N. eutropha C91		EC# 2.7.7.27 glucose-1-phosphate adenyltransferase: NEUT_1292 EC# 2.4.1.21 None EC# 2.4.1.18 1,4-alpha-glucan branching enzyme: NEUT_1291	
N. multiformis ATCC 25196		EC# 2.7.7.27 Glucose-1-phosphate adenyltransferase: NMUL_A0718 EC# 2.4.1.21 None EC# 2.4.1.18 1,4-alpha-glucan branching enzyme: NMUL_A0717	
N. defluvii		EC# 2.7.7.27 glucose-1-phosphate adenyltransferase: NIDE1796 EC# 2.4.1.21 Glycogen synthase (Starch [bacterial glycogen] synthase): NIDE2906 putative Glycosyl transferase, group 1: NIDE2993 EC# 2.4.1.18 1,4-alpha-glucan branching enzyme: NIDE3464	

Abbildung 16: Überprüfung des Glykogenstoffwechselweges mit den Pathway Tools für alle Nitrifizierer. Am linken Rand sieht man die Namen der untersuchten Bakterien. In den mittleren Spalten sieht man, welche Enzyme des Stoffwechselweges in dem jeweiligen Bakterium vorhanden sind, und welche Reaktion von diesen im Stoffwechselweg katalysiert werden. Rechts befindet sich eine Darstellung der Operons, auf denen die gefundenen Enzyme des Stoffwechselweges zu finden sind.

19707 können das Threonin aber zu Glycin und Acetaldehyde oder L-2-Aminoacetat abbauen. Ebenfalls können alle Bakterien das L-Cystein aus L-Serin herstellen. Alle Nitrifizierer mit Ausnahme von *Nitrospira defluvii* können Histidin synthetisieren. Auch können nur diese Bakterien das L-Glutamat zu Ornithin, Glutamin oder Prolin umwandeln oder daraus das reduzierte Glutathion (GSH) herstellen. Alle Nitrifizierer können aus dem D-Erythrose-4-Phosphat das Chorismat synthetisieren, das allen Bakterien dieser Gruppe als Ausgangsstoff für die Synthesen von Tryptophan und Anthranilat dient. Alle Bakterien außer *Nitrospira defluvii* können das Chorismat auch als Ausgangsmolekül für die Synthese der Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin und dem Coenzym Ubiquinone benutzen. Des weiteren können alle Nitrifizierer Tyrosin zu Fumarat und Acetoacetat abbauen.

Alle Bakterien mit Ausnahme von *Nitrosococcus oceani* ATCC 19707 und *Nitrospira defluvii* können aus Ornithin die Polyamine Putrescine und Spermidin synthetisieren. Alternativ können diese beiden auch von allen Nitrifizierern mit Ausnahme der *Nitrobacter* spp. aus L-Arginin synthetisiert werden. Nur die *Nitrosomonas* spp. und *Nitrobacter hamburgensis* X14 können laut der Vorhersage mit MetaboloMIPS das L-4-Hydroxy-Prolin synthetisieren. Allerdings können alle Bakterien mit Ausnahme von *Nitrosomonas eutropha* C91 aus Prolin das Pyruvat und das Glyoxylat produzieren. Das so entstandene Pyruvat wird zusammen mit L-Glutamat verwendet, um das L-Alanin und das 2-Oxo-Glutarat zu erzeugen. Alle Nitrifizierer scheinen in der Lage zu sein, aus dem L-Ornithin das L-Citrulin zu erzeugen, und das Carbamoyl-Phosphat zu Kohlenstoff und Ammoniak abzubauen.

Alle Bakterien mit Ausnahme von *Nitrospira defluvii* können aus dem l-Citrullin das L-Arginin und aus L-Glutamat das L-Ornithin produzieren. Alle Nitrifizierer mit Ausnahme von *Nitrosomonas eutropha* C91 können aus dem L-Ornithin und Harnstoff direkt das L-Arginin synthetisieren. Nur *Nitrosococcus oceani* ATCC 19707 und *Nitrosospira multififormis* ATCC 25196 besitzen das Urease Enzym mit dem sie Harnstoff zu L-Citrullin umwandeln können. Die *Nitrobacter* spp. und *Nitrosococcus oceani* ATCC 19707 scheinen in der Lage zu sein, Tryptophan entweder in Indolacetat oder 5-Hydroxy-Indolacetat abzubauen. Den lebenswichtigen Vorgang der Beladung der tRNA's mit den jeweiligen Aminosäuren scheinen alle Nitrifizierer für alle Aminosäuren ausführen zu können. Im Großen und Ganzen können alle Nitrifizierer mit Ausnahme von *Nitrospira defluvii* alle Aminosäuren synthetisieren. Die Eigenschaft von *Nitrospira defluvii* nur wenige Aminosäuren selbst zu produzieren, kann der Grund sein, wieso es als ein schwer kultivierbares Bakterium gilt.

Tetrapyrrole

Alle untersuchten Bakterien dieser Gruppen können aus dem (S)-Glutamat-1-Semialdehyde über verschiedene Zwischenstufen das Siroheme, das Protoheme, das Coproporphyrin I und das Coproporphyrin III synthetisieren. Protoheme sind Bestandteile der verschiedenen Cytochrom-Proteine. Die Cytochrom-Proteine wiederum sind Bestandteile der Membran und zuständig für den Elektronentransport. Einzig allein die *Nitrobacter* spp. scheinen laut MetaboloMIPS in der Lage zu sein, aus Succinyl-CoA die 5-Aminolävulinsäure ein alternatives Ausgangsmolekül zur Synthese des Häms, zu synthetisieren. Man weiß anhand der Genomannotationen von *Nitrobacter winogradskyi* Nb-255 [37] und *Nitrosomonas europaea* ATCC 19718 [33], dass diese Bakterien Tetrapyrrole produzieren können. Zusätzlich weiß man aus Untersuchungen, dass die Enzyme der für diese Bakterien wichtige und typischen, Reaktionen der chemoautotrophischen Energiegewinnung Cytochrom-Proteine sind. Aus diesen beiden Fakten sieht man, dass die Vorhersage einer Biosynthese von Häm sinnvoll ist.

Fettsäuren und Phospholipide

Alle Nitrifizierer können lange Fettsäureketten synthetisieren und auch wieder zu Acetyl-CoA abbauen. Für alle Bakterien dieser Gruppe wurden die Stoffwechselwege pathPHOSPHOLIPIDS1 und pathPHOSPHOLIPIDS3 gefunden, allerdings mit einem Score unter 0.5, was normalerweise dazu führt, dass diese Stoffwechselwege als nicht vorhanden klassifiziert werden. Bei näherer Betrachtung sieht man, dass beide Stoffwechselwege Reaktionen enthalten, die zwar von Enzymen katalysiert werden, es aber für diese Enzyme keine EC-Nummern gibt. Was dazu führt, dass der PathScore sehr niedrig ausfällt. Da aber im Stoffwechselweg pathPHOSPHOLIPIDS1 das Cardiolipin (Diphosphatidylglycerin) hergestellt wird, welches ausschließlich in den Membranen von Bakterien und Mitochondrien vorkommt [28], erscheint die Vorhersage dieses Stoffwechselweges für die Nitrifizierer sinnvoll zu sein. Im Stoffwechselweg pathPHOSPHOLIPIDS3 wird das Phosphatidylserin, ein weiteres Phospholipid, synthetisiert. Auch dieses ist ein Bestandteil der Membran. Aus der Literatur [33, 37] weiß man, dass *Nitrobacter winogradskyi* Nb-255 und *Nitrosomonas europaea* ATCC 19718 dazu in der Lage sind, Fettsäure und Phospholipide zu synthetisieren. *Nitrosomonas eutropha* C91, *Nitrosomonas europaea* ATCC 19718 und *Nitrosospira multiformis* ATCC 25196 scheinen die einzigen zu sein, die Choline aus Lecithin herstellen können. *Nitrosococcus oceani* ATCC 19707, *Nitrosomonas europaea* ATCC 19718 und die *Nitrobacter* spp. können das 3-Phosphatidyl-Ethanolamin mit Hilfe verschiedenster Phospholipasen zu δ -1,2-Diacyl-Glycerol oder L-1-Lyso-Phosphatidyl-Ethanolamin abbauen. Nur *Nitrobacter winogradskyi* Nb-255 und *Nitrosococcus oceani* ATCC 19707 können Lecithin zu z.B. Fettsäuren oder δ -1,2-Diacyl-Glycerol abbauen. Des Weiteren scheinen alle Bakterien mit Ausnahme der *Nitrobacter* spp. und *Nitrosomonas eutropha* C91 in der Lage zu sein, Triacylglycerole abzubauen. Alle Ammoniakoxidierer sind dazu fähig, aus Cholin das O-Acetylcholin zu erzeugen und Sarcosine zu synthetisieren.

Nukleotide

Die untersuchten Nitrifizierer können laut Vorhersage die Nukleotide Adenosin, Deoxyadenosin, Guanosin, Deoxyguanosin, Xanthosin, Inosin, Uridin, Deoxyuridin, Cytidin und Deoxythymidin synthetisieren.

Vitamine

Das Coenzym A sollten alle Nitrifizierer laut Vorhersage aus Pantothenat herstellen können. Für alle Bakterien dieser Gruppe wurde der Stoffwechselweg pathPTERINE2 vorhergesagt, in welchem aus guanosine-5'-triphosphat (GTP) das 6(R)-5,6,7,8-Tetrahydroxybiopterin (BH₄) hergestellt wird. Das BH₄ ist ein Cofaktor, der bei der Synthese von Stickstoffmonoxid, bei der Umwandlung von Phenylalanin zu Tyrosin durch das Enzym *phenylalanin-4-hydroxylase*, bei der Umwandlung von Tyrosin zu L-Dopa durch das Enzym *tyrosine hydroxylase* und bei der Umwandlung von Tryptophan zu 5-Hydroxytryptophan durch die *tryptophan hydroxylase* benötigt wird. Ebenfalls wurde der Stoffwechselweg pathPTERINE3, in dem 5,6,7,8-Tetrahydromethanopterin aus guanosine-5'-triphosphat (GTP) erzeugt wird, für alle Bakterien vorhergesagt. Das Tetrahydromethanopterin ist normalerweise ein Coenzym in der Methanogenese. Auch der Stoffwechselweg pathPTERINE4, in welchem aus guanosine-5'-triphosphat (GTP) das Folat (also Folsäure) bzw. das Tetrahydrofolat (THF) erzeugt wird, wurde für alle Nitrifizierer vorhergesagt. Die Bakterien *Nitrobacter winogradskyi* Nb-255 und *Nitrobacter hamburgensis* X14 scheinen die einzigen zu sein, die das 5,10-methylen-Tetrahydrofolat und das 10-formyl-Tetrahydrofolat, welche wichtige

Derivate von Tetrahydrofolat (THF) sind, aus verschiedenen anderen Derivaten wie z.B. 10-formyl-THF, 5,10-methylen-THF, 5-methyl-THF oder 5-formyl-THF synthetisiert können. Tetrahydrofolate fungieren im Stoffwechsel als wichtiger Methylgruppendonator und sind in den Stoffwechselwegen der Aminosäuren und Purinen von Bedeutung. Alle Nitrifizierer besitzen die Fähigkeit Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD) aus Quinolinat zu erzeugen, wobei das Quinolinat in diesem Stoffwechselweg aus L-Aspartat erzeugt wird. Eine alternative Route zur Erstellung von NAD ist der Stoffwechselweg pathNAD1. In diesem wird das NAD ebenfalls aus Quinolinat erzeugt, aber dieses mal wird das Quinolinat aus Tryptophan synthetisiert. Allerdings wurde dieser Stoffwechselweg in fast allen Nitrifizierern gefunden, nur bei *Nitrospira defluvii* und *Nitrosomonas eutropha* C91 fehlt dieser Stoffwechselweg. Des Weiteren scheinen alle Nitrifizierer in der Lage zu sein, Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NADPH) aus dem NAD zu erzeugen. In den für *Nitrospira defluvii*, *Nitrosococcus oceani* ATCC 19707 und *Nitrosospira multiformis* ATCC 25196 vorhergesagten und fast identischen Stoffwechselwegen pathNAD4 und pathNAD5 wird aus Nicotinamid, einem Abbauprodukt von NADP, das Fumarat erzeugt. Der einzige Unterschied dieser beiden Stoffwechselwege ist, dass die Reaktion, in welcher NADP zu Nicotinamid abgebaut wird, von unterschiedlichen Enzymen katalysiert wird. Wobei das Enzym NADP+ nucleosidase (EC-Nummer: 3.2.2.6) des Stoffwechselweges pathNAD5, effektiver arbeitet als das Enzym NAD+ nucleosidase (EC-Nummer: 3.2.2.5) des Stoffwechselweges pathNAD4. Es ist aus der Literatur bekannt, dass *Nitrobacter winogradskyi* Nb-255 [37] und *Nitrosomonas europaea* ATCC 19718 [33] das Coenzym A, Folat, Pantothenat und NAD selbst produzieren können.

DNA- und RNA Elongation

Alle Nitrifizierer scheinen in der Lage zu sein, sowohl RNA- als auch DNA-Stränge aus den jeweiligen Nukleotiden selbst synthetisieren. Dies erscheint logisch, weil die Elongation bzw. Synthese von RNA- und DNA-Strängen für einen jeden Organismus ist essentiell, und es wäre katastrophal, wenn er die dazugehörigen Enzyme nicht besitzen würde.

Spezialmetabolismen

Nitrosococcus oceani ATCC 19707 und die Nitritoxidierer *Nitrospira defluvii*, *Nitrobacter hamburgensis* X14 und *Nitrobacter winogradskyi* besitzen laut Vorhersage einen Stoffwechselweg, um aus Succinyl-CoA das Propionat zu erzeugen. Für alle Bakterien wurde der Stoffwechselweg pathGLF4 vorhergesagt. Somit sollten die Bakterien Ethanol aus Acetyl-CoA, bzw. Acetyl-CoA aus Ethanol produzieren können, da alle Reaktionen des Stoffwechselweges reversibel sind. Für *Nitrospira defluvii* wurde ein Stoffwechselweg gefunden, in dem laut BioPath die Herstellung von Ethanol aus Pyruvat möglich ist. Nur für die Nitritoxidierer *Nitrospira defluvii*, *Nitrobacter hamburgensis* X14 und *Nitrobacter winogradskyi* Nb-255 wurde der Stoffwechselweg pathGL3 gefunden, allerdings mit einem Score von unter 0,5. Dieser Stoffwechselweg steht für die Fermentation von Acetyl-CoA zu drei möglichen Endprodukten. Die Endprodukte sind 2-Propanol, 1-Butanol und Butyrat. Wenn man sich nun die vorhandenen Enzyme ansieht, merkt man, dass nur die Enzyme für die Produktion von 1-Butanol³⁶ vorhanden sind, während alle Enzy-

³⁶Dies wären die Enzyme: Acetyl-CoA C-acetyltransferase (EC-Nummer: 2.3.1.9), Butyryl-CoA dehydrogenase (EC-Nummer: 1.3.99.2) und 3-Hydroxybutyryl-CoA dehydratase (EC-Nummer: 4.2.1.55)

me für die Produktion von 2-Propanol³⁷ und Butyrat³⁸ fehlen, weshalb der PathScore auch unter 0,5 liegt. Trotzdem sollten die Nitritoxidierer die Fähigkeit besitzen Acetyl-CoA zu 1-Butanol zu fermentieren, da alle dafür notwendigen Enzyme vorhanden sind. *Nitrospira defluvii* sollte laut MetaboloMIPS dazu fähig sein, das L-Glutamat in Pyruvat und Acetat zu zerlegen. Im Fall der chemoautotrophischen Energiegewinnung³⁹ wurde für *Nitrosococcus oceani* ATCC 19707, *Nitrosomonas europaea* ATCC 19718, *Nitrosomonas eutropha* C91 und *Nitrospira multififormis* ATCC 25196 die Fähigkeit vorhergesagt Ammoniak über Hydroxylamin zu Nitrit zu oxidieren, während für *Candidatus Nitrospira defluvii*, *Nitrobacter hamburgensis* X14 und *Nitrobacter winogradskyi* Nb-255 die Fähigkeit besitzen das Nitrit zu Nitrat zu oxidieren. Dies stimmt der Literatur [22, 24, 33, 37, 40] zu diesen Bakterien überein.

3.6 Vergleich der Bacteroidetes

Glykolyse und Kohlenhydrate

Alle der untersuchten Bacteroidetes dieser Gruppe besitzen laut MetaboloMIPS, eine funktionsfähige Glykolyse. Aus Untersuchungen [70] weiß man, dass *Ameobophilus asiaticus* keine klassische Glykolyse besitzt, da das entscheidende Enzym für die klassische Glykolyse, die Phosphofruktokinase (EC: 2.7.1.1) im Genom von *Ameobophilus asiaticus* fehlt. Allerdings könnte die Glykolyse vom Fructose-1,6-Biphosphat ausgehend bis zum Pyruvat ablaufen. Von den Bakterien *Salinibacter ruber* DSM 13855, *Cytophaga hutchinsonii* ATCC 33406, *Porphyromonas gingivalis* W83 und *Bacteroides thetaiotaomicron* weiß man, dass diese eine Glykolyse besitzen [13, 16, 20, 21]. Die Gluconeogenese scheint laut MetaboloMIPS in allen Bakterien dieser Gruppe ablaufen zu können. Aus der Literatur [70, 16, 13] ist bekannt, dass einige der Bakterien die Gluconeogenese benutzen.

Interessant ist das alle Bacteroidetes mit Ausnahme von *Ameobophilus asiaticus* und *Porphyromonas gingivalis* W83 einen vollständigen Pentose-Phosphat-Zyklus besitzen, während diese beiden nur den partiellen Pentose-Phosphat-Zyklus besitzen. Dass die *Bacteroides* spp. und *Cytophaga hutchinsonii* ATCC 33406 einen vollständigen Pentose-Phosphat-Zyklus besitzen, erscheint sinnvoll zu sein, den man weiß aus dem *Supporting material* der Publikation der Genomsequenz von *Cytophaga hutchinsonii* ATCC 33406 [16], das dies zutrifft. Ebenfalls kann man daraus entnehmen, dass *Porphyromonas gingivalis* W83 einen partiellen Pentose-Phosphat-Zyklus besitzt. Des weiteren scheinen alle Bakterien der Klasse Bacteroidetes mit Ausnahme von *Ameobophilus asiaticus* und *Porphyromonas gingivalis* W83 einen voll funktionsfähigen Citratzyklus zu besitzen. Bei *Ameobophilus asiaticus* und *Porphyromonas gingivalis* W83 wurden keinerlei Anzeichen für einen Citratzyklus gefunden. Aus Untersuchungen [70] weiß man, dass *Ameobophilus asiaticus* keinen Citratzyklus besitzt. Aus der Publikation der Genomsequenz von *Porphyromonas gingivalis* W83 [21] kann man entnehmen, dass dies ebenfalls für diesen gilt. Für *Cytophaga hutchinsonii* ATCC 33406 [16], *Bacteroides fragilis* NCTC 9343 [10] und *Salinibacter ruber* DSM 13855 [13] ist bekannt das sie einen vollständigen Citratzyklus besitzen.

Es können zwar alle untersuchten Bakterien der Klasse Bacteroidetes aus dem UDP-N-Acetyl-D-Glucos-

³⁷Enzyme, die für die Fermentation von 2-Propanol fehlen: Acetate CoA-transferase (EC-Nummer: 2.8.3.8) und Acetoacetate decarboxylase (EC-Nummer: 4.1.1.4)

³⁸fehlende Enzyme für die Fermentation von Butyrat: Phosphate butyryltransferase (EC-Nummer: 2.3.1.19) und Butyratekinase (EC-Nummer: 2.7.2.7)

³⁹Diese Untersuchungen wurden mit den Pathway Tools durchgeführt, da die dazugehörigen Stoffwechselwege nicht in der BioPath-Datenbank vorhanden sind, und somit auch nicht von MetaboloMIPS analysiert werden können.

amine das UDP-N-Acetyl-Muramate herstellen, welches der Grundbaustein von Peptidoglykan ist. Allerdings kann nur *Cytophaga hutchinsonii* ATCC 33406 das UDP-N-Acetyl-D-Glucosamine aus N-Acetyl-D-Glucosamine 6-Phosphat erzeugen. Das N-Acetyl-D-Glucosamine-6-Phosphat kann von allen Bacteroidetes entweder aus dem β -D-Fructose-6-Phosphat oder der Cellobiose hergestellt werden. Cellobiose ist das häufigste Abbauprodukt von Zellulose, welches das am häufigsten vorkommende Biopolymer auf der Erde ist. MetaboloMIPS hat für alle Bakterien der Klasse Bacteroidetes einen Stoffwechselweg zum Abbau von Zellulose zu Cellobiose vorhergesagt. Man weiß auch von *Cytophaga hutchinsonii* ATCC 33406 [16] das es in der Lage ist Zellulose abzubauen. Alle Bakterien außer *Ameobophilus asiaticus* und *Porphyromonas gingivalis* W83 sind dazu fähig das UDP-N-Acetyl-D-Glucosamine zu UDP-N-Acetyl-D-Galactosamine umzuwandeln. Alle Bakterien mit Ausnahme von *Ameobophilus asiaticus* und *Porphyromonas gingivalis* W83 und *Bacteroides fragilis* NCTC 9343 können aus dem N-Acetyl-D-Mannosamine das N-Acetyl-Neuraminate zu erzeugen. Das N-Acetyl-Neuraminate ist Bestandteil von Glykoproteinen und Glykolipiden. Nur *Bacteroides thetaiotaomicron* VPI-5482 hat laut MetaboloMIPS die Fähigkeit, dass UDP-D-Glucuronat zu D-Galacturonat umzuwandeln.

Alle Bakterien mit Ausnahme von *Ameobophilus asiaticus* können Glykogen synthetisieren und wieder abbauen. Bei *Porphyromonas gingivalis* W83 wurde die Synthese und der Abbau von Glykogen nachgewiesen [21]. Während nur *Salinibacter ruber* DSM 13855 die Saccharose aus UDP-D-Glucose synthetisieren kann, ist *Bacteroides thetaiotaomicron* VPI-5482 das einzige Bakterium, das die Saccharose zur D-Glucose abbauen kann. Nur *Bacteroides fragilis* NCTC 9343 kann laut MetaboloMIPS aus UDP-D-Glucuronat die UDP- α -D-Xylose herstellen. *Bacteroides fragilis* NCTC 9343 und *Bacteroides thetaiotaomicron* VPI-5482 können aus dem UDP-D-Glucuronat auch die UDP-L-Arabinose herstellen, allerdings kann nur *Bacteroides thetaiotaomicron* VPI-5482 diese dann in L-Ribulose umwandeln. Dagegen können die *Bacteroides* spp. und *Salinibacter ruber* DSM 13855 aus der D-Xylose die D-Xylulose oder die D-Xylulose aus D-Xylose herstellen. Nur *Salinibacter ruber* DSM 13855 und *Cytophaga hutchinsonii* ATCC 33406 sind dazu fähig, aus Lactat das Acetyl-CoA zu synthetisieren. Einzig allein *Salinibacter ruber* DSM 13855 scheint laut Vorhersage Pyruvat zu Oxaloacetat umwandeln zu können. Nur die *Bacteroides* spp. können laut MetaboloMIPS aus dem Acetat über das Zwischenprodukt Acetyl-Adenylat das Acetyl-CoA erzeugen.

Aminosäuren

Alle Bacteroidetes mit Ausnahme von *Ameobophilus asiaticus* und *Salinibacter ruber* DSM 13855 können aus 3-Phosphat-D-Glycerat das Serin herstellen. Während alle Bakterien der Klasse Bacteroidetes das Glycin in Serin oder Serin in Glycin umwandeln können, sind nur die *Bacteroides* spp. und *Porphyromonas gingivalis* W83 in der Lage, das Serin in Pyruvat zu zerlegen [21]. Zur Synthese von O-Acetylserin aus Serin sind alle Bakterien mit Ausnahme von *Ameobophilus asiaticus* fähig. *Ameobophilus asiaticus* und *Porphyromonas gingivalis* W83 produzieren Valin, Leucin und Isoleucin durch eine Umwandlung von Threonin. Während die restlichen Bacteroidetes Valin, Leucin und Isoleucin entweder aus Pyruvat oder auch aus Threonin herstellen können. Alle Bacteroidetes mit Ausnahme von *Ameobophilus asiaticus* und *Porphyromonas gingivalis* W83 scheinen aus dem L-Ornithin das L-Citrullin, welches sie später in L-Arginin umwandeln können, zu synthetisieren. Nur *Ameobophilus asiaticus* und *Cytophaga hutchinsonii* ATCC 33406 können aus dem Arginin dann das Putrescin herstellen. Nur *Cytophaga hutchinsonii* ATCC 33406 kann aus Urea das L-Citrullin herstellen. Alle Bacteroidetes scheinen dazu fähig zu sein, das Carbamoyl-Phosphat zu Kohlenstoff und Ammoniak zu zerlegen. Während

anscheinend nur *Cytophaga hutchinsonii* ATCC 33406 aus Prolin das Hydroxyprolin herstellen kann, können alle Bacteroidetes mit Ausnahme von *Ameobophilus asiaticus* daraus Glyxolat oder Pyruvat produzieren. Das so entstandene Pyruvat wird von ihnen dazu verwendet, um zusammen mit L-Glutamat das L-Alanin und 2-Oxo-Glutarat zu erzeugen. Alle Bakterien der Klasse Bacteroidetes scheinen in der Lage zu sein, aus dem L-Aspartat das L-Glutamat herzustellen. Allerdings kann das Glutamat von allen mit Ausnahme von *Ameobophilus asiaticus* und *Porphyromonas gingivalis* W83 zu Ornithin, Glutamin oder 4-Amino-Butyrat umgewandelt werden. Das L-Prolin kann von allen Bacteroidetes mit Ausnahme von *Ameobophilus asiaticus* und *Porphyromonas gingivalis* W83 aus dem L-Glutamat synthetisiert werden, allerdings können sie es auch wieder zu L-Glutamat abbauen.

Die Bakterien der Klasse Bacteroidetes, mit Ausnahme von *Ameobophilus asiaticus* können aus dem D-Erythrose-4-Phosphat das Chorismat synthetisieren, welches als Ausgangsstoff für die Synthesen von Tryptophan, Anthranilat und dem Coenzym Menaquinone dient. Desweiteren können alle Bakterien mit Ausnahme von *Ameobophilus asiaticus* und *Porphyromonas gingivalis* W83 das Chorismat auch zur Synthese der Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin benutzen. Nur *Cytophaga hutchinsonii* ATCC 33406 und *Salinibacter ruber* DSM 13855 können das Phenylalanin direkt in Tyrosin umwandeln und allein *Salinibacter ruber* DSM 13855 besitzt die Fähigkeit Tyrosin zu Fumarat und Acetoacetat abzubauen. Während alle Bakterien das Aspartat zu D-Alanin abbauen können, kann das Aspartat und das Asparagin aus Oxaloacetat nur nicht von *Ameobophilus asiaticus* und *Cytophaga hutchinsonii* ATCC 33406 synthetisiert werden. Alternativ können alle Bakterien der Klasse Bacteroidetes das Aspartat auch aus L-Arginin herstellen.

Alle Bakterien scheinen laut MetaboloMIPS in der Lage zu sein, das L-Lysin aus dem L-Aspartat zu synthetisieren. Es wird zwar für *Ameobophilus asiaticus* die Möglichkeit zur Synthese von Lysin vorhergesagt, aber aus Experimenten [70] und meinen eigenen Untersuchungen mit Hilfe der Pathway Tools (siehe Kapitel3.7.1) weiß ich, dass einerseits das Enzym Diaminopimelate Decarboxylase (EC: 4.1.1.20), welches die Umwandlung von Meso-Diaminopimelat zu Lysin katalysiert, fehlt, und andererseits wird das synthetisierte Meso-Diaminopimelat von *Amoebophilus asiaticus* eher als Baustein für Peptidoglykan verwendet. Mit Ausnahme von *Porphyromonas gingivalis* W83 und *Amoebophilus asiaticus* können alle anderen Bacteroidetes aus Aspartat das Threonin herstellen. Alle Bakterien, aber nicht *Amoebophilus asiaticus* und *Cytophaga hutchinsonii* ATCC 33406, können das L-Threonin zu Glycin und Acetaldehyd zerlegen, während *Cytophaga hutchinsonii*, *Porphyromonas gingivalis* W83 und *Salinibacter ruber* DSM 13855 das L-Threonin zu 2-Oxobutyrat und Ammoniak zerlegen können. Außer *Amoebophilus asiaticus* können alle anderen Bacteroidetes aus L-Serin das L-Cystein herstellen. Das Cystein kann nur von *Cytophaga hutchinsonii* ATCC 33406 zu Taurin oder Hypotaurin abgebaut werden. Alle Bacteroidetes außer *Porphyromonas gingivalis* W83 und *Amoebophilus asiaticus* haben laut Vorhersage die Fähigkeit aus L-Threonin das L-Homocystein herzustellen. Welches von ihnen und *Porphyromonas gingivalis* W83 dann zu L-Methionin umgewandelt werden kann. Nur *Ameobophilus asiaticus* und *Cytophaga hutchinsonii* ATCC 33406 können das L-Methionin zu Ethene abbauen. Alle Bacteroidetes mit Ausnahme von *Porphyromonas gingivalis* W83 und *Amoebophilus asiaticus* scheinen in der Lage zu sein Histidin zu synthetisieren. Die *Bacteroides* spp. und *Porphyromonas gingivalis* W83 können das L-Histidin zu L-Glutamat umwandeln. Nur *Salinibacter ruber* DSM 13855 und *Cytophaga hutchinsonii* ATCC 33406 scheinen in der Lage zu sein, Tryptophan entweder in Indolacetat oder 5-Hydroxy-Indolacetat abzubauen.

Den lebenswichtigen Vorgang der Beladung der tRNA's mit den jeweiligen Aminosäuren scheinen alle Bacteroidetes mit Ausnahme von *Ameobophilus asiaticus* und *Cytophaga hutchinsonii* ATCC 33406

für alle Aminosäuren ausführen zu können. Diese beiden können nur Glutamin nicht an eine tRNA anhängen. Das Fehlen der Gln-tRNA synthetase kommt relative häufig vor, was aber durch eine Umwandlung von Glu-tRNA zu Gln-tRNA mittels einer Aminotransferase [78] kompensiert werden kann. Von *Cytophaga hutchinsonii* ATCC 33406 [16] ist bekannt, dass es alle Aminosäuren de novo synthetisieren kann.

Tetrapyrrole

Alle Bakterien dieser Gruppe können aus dem (S)-Glutamat-1-Semialdehyde das Uroporphyrinogen III bzw. Siroheme synthetisieren. Aus diesem Uroporphyrinogen III können alle das Protoporphyrin IX synthetisieren. Alle Bakterien mit Ausnahme von *Ameobophilus asiaticus* und *Porphyromonas gingivalis* W83 scheinen in der Lage zu sein, aus dem Uroporphyrinogen III zusätzlich noch das Coproporphyrin III und Coproporphyrin I zu synthetisieren. Des weiteren scheinen nur *Salinibacter ruber* DSM 13855, *Porphyromonas gingivalis* W83 und *Cytophaga hutchinsonii* ATCC 33406 die Fähigkeit zu besitzen Protoheme zu synthetisieren. Protoheme sind Bestandteile der verschiedenen Cytochrom-Proteine. Die Cytochrom-Proteine wiederum sind Bestandteile der Membran und zuständig für den Elektronentransport. Die Synthese von 5-Amino-Levulinate aus (S)-Glutamat-1-Semialdehyde scheint nur in *Salinibacter ruber* DSM 13855 und *Cytophaga hutchinsonii* ATCC 33406 möglich zu sein.

Fettsäuren und Phospholipid

Alle Bacteroidetes können lange Fettsäurenketten synthetisieren, und alle mit Ausnahme von *Ameobophilus asiaticus* können sie auch wieder zu Acetyl-CoA abbauen. Allein in den Veröffentlichungen der Genomsequenzen von *Cytophaga hutchinsonii* ATCC 33406 [16] und *Porphyromonas gingivalis* W83 [21] findet man Informationen dazu, dass diese beiden Fettsäuren und Phospholipide synthetisieren können. Der Stoffwechselweg pathPHOSPHOLIPIDS1 wird für die *Bacteroides* spp. und *Salinibacter ruber* DSM 13855 und der Stoffwechselweg pathPHOSPHOLIPIDS3 für alle Bakterien dieser Gruppe mit einem Score unter 0.5 vorhergesagt, was normalerweise dazu führt, dass diese Stoffwechselwege als nicht vorhanden klassifiziert werden. Bei näherer Betrachtung sieht man, dass beide Stoffwechselwege Reaktionen enthalten, die zwar von Enzymen katalysiert werden, für die es aber keine EC-Nummern gibt. Was dazu führt, dass der PathScore sehr niedrig ausfällt. Da aber im Stoffwechselweg pathPHOSPHOLIPIDS1 das Cardiolipin (Diphosphatidylglycerin) hergestellt wird, welches ausschließlichen in den Membranen von Bakterien und Mitochondrien vorkommt [28], scheint mir die Vorhersage diese Stoffwechselweges für die Bacteroidetes als sinnvoll. Im Stoffwechselweg pathPHOSPHOLIPIDS3 wird das Phosphatidylserin, ein weiteres Phospholipid, synthetisiert. Auch dieses ist ein Bestandteil der Membran.

Nur die *Bacteroides* spp. scheinen die einzigen Bakterien aus der Gruppe zu sein, die Choline aus Lecithin herstellen können. *Ameobophilus asiaticus* und *Cytophaga hutchinsonii* ATCC 33406 können mit Hilfe verschiedenster Phospholipasen das 3-Phosphatidyl-Ethanolamin, einen Bestandteil von Cephalin, welches das am häufigsten vorkommende Phospholipid in Bakterien ist, zu δ -1,2-Diacyl-Glycerol oder L-1-Lyso-Phosphatidyl-Ethanolamin umwandeln. Interessanterweise kann nur *Ameobophilus asiaticus* das Lecithin zu Fettsäuren oder δ -1,2-Diacyl-Glycerol abbauen. Des weiteren scheinen *Bacteroides thetaiotaomicron* VPI-5482, *Salinibacter ruber* DSM 13855 und *Cytophaga hutchinsonii* ATCC 33406 in der Lage zu sein, Triacylglycerole abzubauen. Nur *Cytophaga hutchinsonii* ATCC 33406 scheint laut

Vorhersage in der Lage zu sein, Sarcosine zu synthetisieren.

Nukleotidsynthese

Die untersuchten Bakterien der Klasse Bacteroidetes mit Ausnahme von *Ameobophilus asiaticus* können laut Vorhersage die Nukleotide Adenosin, Deoxyadenosin, Guanosin, Deoxyguanosin, Xanthosin, Inosin, Uridin, Deoxyuridin, Cytidin und Deoxythymidin synthetisieren. Dass MetaboloMIPS nur Stoffwechselwege für die Umwandlung von Nukleotiden in andere Nukleotide für *Amoebophilus asiaticus* vorhersagt, ist sinnvoll, denn aus Untersuchungen [70] weiß man, dass es sehr unwahrscheinlich ist, dass *Amoebophilus asiaticus* eine de novo Biosynthese von Nukleotiden besitzt. Allerdings ist es sicher, dass *Amoebophilus asiaticus* aufgenommene Nukleotide in andere Nukleotide umwandeln kann. Es ist aus den Veröffentlichungen der Genomesequenzen [16, 21] bekannt, dass *Cytophaga hutchinsonii* ATCC 33406 und *Porphyromonas gingivalis* W83 alle Nukleotide synthetisieren können.

Cofaktoren und Vitamine

Das essentielle Coenzym A sollten alle Bacteroidetes mit Ausnahme von *Ameobophilus asiaticus* laut Vorhersage aus Pantothenat herstellen können. Nur *Cytophaga hutchinsonii* ATCC 33406 scheint in der Lage zu sein, das Vitamin C (auch Ascorbat genannt) aus Glucuronat herzustellen. Auch für alle Bakterien dieser Gruppe, aber nicht für *Ameobophilus asiaticus*, wurde der Stoffwechselweg pathPTERINE2, in welchem aus guanosine-5'-triphosphat (GTP) das 6(R)-5,6,7,8-Tetrahydroxybiopterin (BH₄) hergestellt wird, vorhergesagt. Das BH₄ ist ein Cofaktor, der bei der Synthese von Stickstoffmonoxid, bei der Umwandlung von Phenylalanin zu Tyrosin durch das Enzym *phenylalanin-4-hydroxylase*, bei der Umwandlung von Tyrosin zu L-Dopa durch das Enzym *tyrosine hydroxylase* und bei der Umwandlung von Tryptophan zu 5-Hydroxytryptophan durch die *tryptophan hydroxylase* benötigt wird. Ebenfalls wurde der Stoffwechselweg pathPTERINE3, in dem 5,6,7,8-Tetrahydromethanopterin aus guanosine-5'-triphosphat (GTP) erzeugt wird, für alle Bacteroidetes mit Ausnahme von *Ameobophilus asiaticus* vorhergesagt. Das Tetrahydromethanopterin ist normalerweise ein Coenzym in der Methanogenese.

Auch der Stoffwechselweg pathPTERINE4, in welchem aus guanosine-5'-triphosphat (GTP) das Folat (also Folsäure) bzw. das Tetrahydrofolat (THF) erzeugt wird, wurde für alle Bakterien außer *Ameobophilus asiaticus* vorhergesagt. Alle Bakterien dieser Klasse scheinen in der Lage zu sein, das 5,10-methylen-Tetrahydrofolat aus verschiedenen anderen Derivaten wie z.B. 10-formyl-THF, 5-methyl-THF oder 5-formyl-THF synthetisiert zu können. Alle außer *Ameobophilus asiaticus* scheinen auch die Möglichkeit zu besitzen das 10-formyl-Tetrahydrofolat ebenfalls durch die Umwandlung anderer Tetrahydrofolat (THF) Derivaten gewinnen zu können. Nur die *Bacteroides* spp. und *Porphyromonas gingivalis* W83 sind laut der Vorhersage dazu fähig das 5-forminamino-THF Derivat zu erzeugen. Das 5,10-methylen-Tetrahydrofolat, 10-formyl-THF und 5-forminamino-THF sind wichtige Derivate von Tetrahydrofolat (THF). Tetrahydrofolate fungieren im Stoffwechsel als wichtiger Methylgruppendonator und sind in den Stoffwechselwegen der Aminosäuren und der Purine von Bedeutung.

Alle Bacteroidetes mit Ausnahme von *Ameobophilus asiaticus* besitzen die Fähigkeit Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD) aus Quinolinat erzeugt, wobei das Quinolinat in diesem Stoffwechselweg aus L-Aspartat erzeugt wird. Eine alternative Route zur Erstellung von NAD ist der Stoffwechselweg pathNAD1, in dem das NAD ebenfalls aus Quinolinat erzeugt wird, aber dieses mal wird das Quinolinat aus Tryptophan synthetisiert. Allerdings wurde dieser Stoffwechselweg wieder nur für alle Bacteroidetes nur

nicht für *Ameobophilus asiaticus* vorhergesagt. Des weiteren scheint nur *Ameobophilus asiaticus* nicht in der Lage zu sein, Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NADPH) aus dem NAD zu erzeugen. Nur für *Porphyromonas gingivalis* W83 und *Salinibacter ruber* DSM 13855 wurden die fast identischen Stoffwechselwege pathNAD4 und pathNAD5, in denen aus Nicotinamid, einem Abbauprodukt von NADP, das Fumarat erzeugt wird, vorhergesagt. Der einzige Unterschied dieser beiden Stoffwechselwege ist, dass die Reaktion, in welcher NADP zu Nicotinamid abgebaut wird, von unterschiedlichen Enzymen katalysiert wird. Wobei das Enzym NADP+ nucleosidase (EC-Nummer: 3.2.2.6) des Stoffwechselweges pathNAD5, effektiver arbeitet als das Enzym NAD+ nucleosidase (EC-Nummer: 3.2.2.5) des Stoffwechselweges pathNAD4. Man weiß aus der Literatur [16, 21], dass *Cytophaga hutchinsonii* ATCC 33406 und *Porphyromonas gingivalis* W83 in der Lage sind das Folat, NAD und Menaquinone zu synthetisieren.

DNA- und RNA Elongation

Alle Bakterien aus der Klasse der Bacteroidetes scheinen in der Lage zu sein, sowohl RNA als auch DNA aus den jeweiligen Nukleotiden selbst aufzubauen. Dies erscheint sinnvoll, denn die Elongation bzw. Synthese von RNA und DNA ist überlebenswichtig für jeden Organismus, und es wäre eine Katastrophe für ihn, wenn er die dazugehörigen Enzyme nicht besitzen würde.

Spezialmetabolismen

Alle Bakterien aus der Klasse der Bacteroidetes mit Ausnahme von *Ameobophilus asiaticus* besitzen laut der Vorhersage einen Stoffwechselweg, um aus Succinyl-CoA das Propionat zu erzeugen. Ebenfalls für diese Gruppe wurde der Stoffwechselweg pathGL3 gefunden, mit einem Score von unter 0,5. Allerdings steht dieser Stoffwechselweg für die Fermentation von Acetyl-CoA in die drei mögliche Endprodukte 2-Propanol, 1-Butanol und Butyrat. Wenn man sich nun die vorhandenen Enzyme ansieht, merkt man, dass nur die Enzyme für die Produktion von Butyrat vorhanden sind, weshalb der PathScore auch unter 0,5 liegt. Trotzdem sollten alle Bakterien der Klasse Bacteroidetes mit Ausnahme von *Ameobophilus asiaticus* die Fähigkeit besitzen das Acetyl-CoA zu 1-Butanol fermentieren zu können, da alle dafür notwendigen Enzyme vorhanden sind. Für *Porphyromonas gingivalis* W83 und *Salinibacter ruber* DSM 13855 wurde der Stoffwechselweg pathGLF4 vorhergesagt. Der Stoffwechselweg pathGLF4 steht für die Produktion von Ethanol aus Acetyl-CoA, bzw. die Synthese von Acetyl-CoA aus Ethanol, denn alle Reaktionen des Stoffwechselweges pathGLF4 sind reversibel.

3.7 Ergebnisse der Stoffwechselwegsvorhersagen mittels der Pathway Tools für *Ameobophilus asiaticus* und *Parachlamydia acanthamoebae* UV7

Es wurden die Stoffwechselwege von *Ameobophilus asiaticus* und *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 zwar schon im Zuge der Analyse der Metabolismen der Bacteroidetes und Chlamydien mit MetaboMIPS untersucht, da aber auf diesen beiden Bakterien das besondere Augenmerk lag, wurden ihre Stoffwechselwege nochmals mit den Pathway Tools gründlicher analysiert. *Ameobophilus asiaticus* wurde mit Hilfe der Pathway Tools analysiert, da ich von Stephan Schmitz-Esser von der Universität Wien darum gebeten worden bin. Denn er wollte wissen in weit man mit Hilfe der Pathway Tools bessere Ergebnisse einer Stoffwechselwegsanalyse erzielen kann, als mit dem in Zuge der Diplomarbeit ent-

wickelten Programm PathKEGG. Das Augenmerk lag auf *Parachlamydia acanthamoebae* UV7, da im Zuge der Diplomarbeit ein Entwurf für ein mögliches Kulturmedium für *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 erstellt wurde. Durch die kombinierten Anwendung der Pathway Tools und MetaboloMIPS wurde versucht, möglichst viele Informationen über mögliche Stoffwechselwege von *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 zu gewinnen, und andererseits mögliche falsch-positive Treffer zu minimieren.

Wie die PGDB's für *Ameobophilus asiaticus* und *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 mit Hilfe der Pathway Tools erstellt wurden, und wie man anschließend die Vorhersage der Stoffwechselwege für ein Bakterium durchführt, wird im Kapitel 6.1 beschrieben.

3.7.1 *Ameobophilus asiaticus*

Es wurde zwar die klassische Glykolyse (Glucose-6P zu Pyruvat) mit den *Pathway Tools* für *Amoebophilus asiaticus* vorhergesagt, allerdings ist zu bezweifeln, ob diese auch so in *Amoebophilus asiaticus* abläuft [70], da das dafür entscheidene Enzym die Phosphofruktokinase (EC: 2.7.1.1) fehlt. Allerdings könnte die Glykolyse bei Fructose-1,6-Diphosphat startend ohne Probleme bis zum Pyruvat ablaufen. Eine funktionfähige Gluconeogenese scheint in *Amoebophilus asiaticus* zu existieren [70], denn das Schlüsselenzym die Fructosebisphosphatase (EC: 3.1.3.11) ist vorhanden. Da für *Amoebophilus asiaticus* nur der *pentose phosphate pathway (partial)* gefunden wurde, liegt der Pentose-Phosphat-Zyklus nicht vollständig vor. Dieser Stoffwechselweg produziert aus D-ribulose-5-phosphat und D-erythrose-4-phosphat das D-glyceraldehyde-3-phosphat, welches dann an die Glykolyse weiter gereicht wird. Allerdings konnten mit den *Pathway Tools* keinerlei Stoffwechselwege des Citratzyklus gefunden werden, womit klar scheint, dass *Amoebophilus asiaticus* keinen Citratzyklus besitzt.

Amoebophilus asiaticus scheint in der Lage zu sein, Putrescin aus L-Arginin über das Zwischenprodukt Agmatin herzustellen. Dieser Stoffwechselweg wurde auch mit MetaboloMIPS vorhergesagt und hat dort den Namen *pathUREA4*. Putrescine gehören zur Gruppe der Polyamine, welche eine Gruppe von organischen positiv geladen Polykationen sind, die an vielen biologischen Prozessen teilhaben wie z.B. Stabilisierung von Membranen und die Stimulation von verschiedenen Enzymen [72]. Die Vorhersage für diesen Stoffwechselweg sollte korrekt sein, da einerseits Putrescin in allen Lebensformen beobachtet wurde und andererseits Polyamine notwendig für das normale Zellwachstum sind. Auch sollte *Amoebophilus asiaticus* das UDP-N-acetyl-D-glucosamine, welches ein notwendiger Vorgänger für das Peptidoglykan der Zellwand ist, laut den *Pathway Tools* synthetisieren können.

Es wurden Stoffwechselwege für die Biosynthese der Aminosäuren Alanin, Asparagin, Aspartat, Glutamat, Glycin, Homoserin, Isoleucin, Lysin, Ornithin und Selenocystein vorhergesagt. Es ist aber zu bezweifeln, ob das Lysin und Isoleucin synthetisiert werden können. Denn einerseits fehlt das Enzym Diaminopimelate Decarboxylase (EC: 4.1.1.20) welches die Umwandlung von Meso-Diaminopimelat zu Lysin katalysiert, und andererseits kann das synthetisierte Meso-Diaminopimelat von *Amoebophilus asiaticus* eher als Baustein für Peptidoglykan verwendet werden. Ein Stoffwechselwege für die Synthese von Peptidoglykan einem wichtigen Bestandteil der Membran wurde vorhergesagt. Es ist oft der Fall das obligat intrazelluläre Bakterien keine essentiellen Aminosäuren, wie es Lysin und Isoleucin sind, selbst synthetisieren können [70]. In wie weit diese beiden und die restlichen Aminosäuren aufgenommen werden, könnte vielleicht durch eine Analyse der Transporterproteine geklärt werden. *Amoebophilus asiaticus* scheint aber auch in der Lage zu sein, das aufgenommene Isoleucin zu Acetyl-CoA abzubauen.

Den lebenswichtigen Vorgang der Beladung der tRNA's mit den jeweiligen Aminosäuren scheint *Amoebophilus asiaticus* für alle Aminosäuren, mit Ausnahme von Glutamin durchführen zu können. Das

Fehlen der Gln-tRNA synthetase kommt relativ häufig vor, kann aber durch eine Umwandlung von Glu-tRNA zu Gln-tRNA mittels einer Aminotransferase [78] kompensiert werden [70].

Des Weiteren kann *Amoebophilus asiaticus* laut den Pathway Tools die dTDP-L-rhamnose herstellen. Die dTDP-L-rhamnose und das UDP-N-acetyl-D-glucosamine sind wichtige Bestandteile des O-Antigens. Das O-Antigen ist der Anteil der Zellwand, der aus Lipopolysacchariden besteht. Es wurden zwar Stoffwechselwege für die Synthese der Cofaktoren Biotin, Folat, NAD, Siroheme und Adenosylcobalamin vorhergesagt, es ist aber sehr unwahrscheinlich, dass *Amoebophilus asiaticus* irgendwelche Cofaktoren und Vitamine selbst synthetisieren kann [70]. Laut den *Pathway Tools* scheint *Amoebophilus asiaticus* auch in der Lage zu sein, Phospholipide und Fettsäuren selbst synthetisieren zu können. Es wurden auch Stoffwechselwege vorhergesagt, in denen Fettsäuren oxidiert werden können, und Phosphatidylcholine mittels Phospholipasen abgebaut werden können.

Es sind zwar Stoffwechselwege zur Synthese von Nucleotiden vorhergesagt worden, da diese aber sehr unvollständig sind, ist es unwahrscheinlich, dass *Amoebophilus asiaticus* Nucleotide selbst synthetisieren kann, allerdings ist es sicher, dass *Amoebophilus asiaticus* vorhandene Nucleotide ineinander umwandeln kann [70]. Das Fehlen einer de novo Biosynthese von Nucleotiden ist nichts Ungewöhnliches und von Chlamydien und Rickettsien bekannt.

Es wurde ebenfalls der Methylerythritol Phosphate Pathway vorhergesagt, von dem man weiß, dass dieser Stoffwechselweg für die meisten Bakterien und den Malaria-Parasiten *Plasmodium falciparum* die einzige Möglichkeit ist, die Moleküle Isopentenyl-Pyrophosphat (IPP) und dessen Isomer Dimethylallyl-Pyrophosphat zu erzeugen [68]. Diese Moleküle sind die Grundbausteine der Isoprenoide, die in allen Lebewesen vorkommen. Zu den Isoprenoiden gehören z.B. die Steroide und Terpene. Die Hopanoide sind äußerst stabile Triterpene, die in Bakterien Komponenten der Membran sind, und an der Regulierung von Stabilität und Fluidität der Membran teilnehmen [52].

Des Weiteren scheint *Amoebophilus asiaticus* in der Lage zu sein, die anorganischen Nährstoffe Cyanat (auch Cyansäure), welche innerhalb einer Zelle durch den nicht enzymatischen Abbau von Carbamoyl Phosphat entsteht, und Sulfoacetaldehyd, welches beim Abbau von Organosulfaten wie Taurin und Isoethionat entsteht, abzubauen. Es wurde auch ein Stoffwechselweg gefunden, welcher Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) erzeugt und somit das anorganische Sulfat für die Sulfonation⁴⁰ aktiviert. Allerdings ist es zu bezweifeln, ob dieser letzte Stoffwechselweg wirklich in *Amoebophilus asiaticus* abläuft, weil die beiden Orfs, auf denen angeblich die Enzyme für diesen Stoffwechselweg liegen sollten, bessere Blast-Hits zu einer universell konservierten GTPase bzw. zum Elongationsfaktor TU [70] haben. Dadurch ist es wahrscheinlich, dass dieser Stoffwechselweg nicht in *Amoebophilus asiaticus* abläuft.

Das Fructose-6-Phosphat, welches *Amoebophilus asiaticus* wohl als Ausgangsstoff der Glykolyse dient, kann durch den Abbau von D-Mannose bzw. D-Mannose-6-Phosphat erzeugt werden.

Amoebophilus asiaticus scheint laut den *Pathway Tools* die Fähigkeit zu besitzen, das N,N'-diacetylchitobiose (manchmal auch Chitobiose-6-phosphat oder einfach nur Chitobiose genannt) in N-Acetyl-D-Glucosamin und N-Acetyl-D-Glucosamin-6-Phosphat zerlegen zu können. N-Acetyl-D-Glucosamin wird normalerweise anschließend in Fructose-6-Phosphat umgewandelt, welches dann für die Glykolyse verfügbar ist. Auch MetaboloMIPS hat diesen Stoffwechselweg vorhergesagt, nur hat er dort den Namen pathAMINOSUGARS2. Chitobiose ist das häufigste Abbauprodukt von Chitin. Chitin ist nach der Zellulose das am zweit häufigsten vorkommende Biopolymer auf der Erde. Des Weiteren kann UDP-Glucose zu

⁴⁰Die Sulfonation von biologischen Stoffen (auch Sulfokonjugation genannt) ist ein fundamentaler metabolischer Prozess, bei dem eine Sulfatgruppe zu einem Sauerstoffrest hinzugefügt wird, um eine Sulfat-Esterbindung zu bilden

UDP-Galactose umgewandelt werden.

Außerdem besitzt *Amoebophilus asiaticus* Stoffwechselwege um Methylglyoxal, Superoxidradikale und einige andere Umweltgifte abzubauen.

Die ausführlicheren Daten zur Analyse des Metabolismus von *Amoebophilus asiaticus* mittels der Pathway Tools sind in AsiaticusReport.pdf Datei auf der beigelegten CD zu finden..

3.7.2 *Parachlamydia acanthamoebae* UV7

Mit Hilfe der *Pathway Tools* konnte eine Glykolyse vorhergesagt werden, wobei allerdings zu bezweifeln ist, ob die klassische Variante der Glykolyse ablaufen kann, denn das dafür entscheidene Enzym, die Phosphofruktokinase (EC: 2.7.1.1) fehlt. Allerdings könnte die Glykolyse bei Fructose-1,6-Diphosphat startend ohne Probleme bis zum Pyruvat ablaufen. Eine voll funktionfähige Gluconeogenese scheint ebenfalls zweifelhaft, weil das Schlüsselenzym Fructosebisdiphosphatase (EC: 3.1.3.11) nicht im Genom von *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 vorhanden ist, aber die Gluconeogenese könnte beim Pyruvat startend bis zum Fructose-1,6-Diphosphat ablaufen, denn alle notwendigen Enzyme dafür sind vorhanden. Der Pentose-Phosphat-Zyklus und der Citratzyklus wurden beide für *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 vorhergesagt, was sinnvoll erscheint, denn das Umweltchlamydium *Candidatus Protochlamydia amoebophila* UWE25 besitzt ebenfalls einen vollständigen Citrat- und Pentose-Phosphat-Zyklus [27].

Parachlamydia acanthamoebae UV7 kann die Polyamine Putrescin und UDP-N-acetyl-D-glucosamine synthetisieren. Putrescin wird aus L-Arginin über das Zwischenprodukt Agmatin hergestellt. Dieser Stoffwechselweg wurde auch mit MetaboloMIPS vorhergesagt und hat dort den Namen *pathUREA4*. Polyamine sind eine Gruppe von organischen positiv geladenen Polykationen, die an vielen biologischen Prozessen teilnehmen wie z.B. Stabilisierung von Membranen und die Stimulation von verschiedenen Enzymen [72]. Die Vorhersage für diesen Stoffwechselweg sollte korrekt sein, da einerseits Putrescin in allen Lebensformen beobachtet wurde, und andererseits Polyamine notwendig für das normale Zellwachstum sind. Auch die Synthese von UDP-N-acetyl-D-glucosamine sollte sinnvoll sein, weil UDP-N-acetyl-D-glucosamine ein notwendiger Vorgänger für das Peptidoglykan der Zellwand.

Es wurden für ein Bakterium aus der Familie Chlamydiae vergleichsweise sehr viele Stoffwechselwege für die Biosynthese von Aminosäuren gefunden. *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 muss auf jeden Fall die Aminosäuren Arginin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Tryptophan, und Valin aufnehmen. Bei den Aminosäuren Homocystein, Homoserin, Methionin, Threonin und Selenocystein bin ich mir nicht sicher, ob *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 sie synthetisieren kann, da die Stoffwechselwege für ihre Synthesen sehr unvollständig sind. Die Aminosäuren Alanin, Asparagin, Aspartat, Cystein, Glutamin, Glycin, Lysin, Ornithin, Phenylalanin, Prolin, Serin und Tyrosin sollten, aber von *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 entweder durch Synthese oder Abbau hergestellt werden können. Damit ergibt sich ein Gesamtbild der Biosynthese der Aminosäuren für *Parachlamydia acanthamoebae* UV7, wie es in der Abb. 17 zu sehen ist. Von *Candidatus Protochlamydia amoebophila* UWE25 weiß man, dass es in der Lage ist, Glycin, Serin, Glutamin und Prolin zu synthetisieren, während es sicherlich nicht dazu fähig ist, Threonin, Cystein, Valin, Leucin, Isoleucin, Lysin, Arginin, Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin herzustellen [27]. Man sieht Ähnlichkeiten bei den Biosynthesen der beiden Umweltchlamydien. Ein Unterschied ist, dass *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 laut den Pathway Tools in der Lage ist, Cystein, Phenylalanin, Lysin und Tyrosin herzustellen. Den lebenswichtigen Vorgang der Beladung der tRNA's mit den jeweiligen Aminosäuren scheint *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 für alle Aminosäuren, mit

Ausnahme von Glutamin durchführen zu können. Das Fehlen der Gln-tRNA synthetase kommt relativ häufig vor, kann aber durch eine Umwandlung von Glu-tRNA zu Gln-tRNA mittels einer Aminotransferase [78] kompensiert werden [70].

Außerdem wurden Stoffwechselwege für die Synthese von Bestandteilen der Membran, wie z.B. dTDP-L-rhamnose und UDP-N-acetyl-D-Glucosamin vorhergesagt. Diese beiden sind Bestandteile des O-Antigens, das nichts anderes ist als der Anteil der Zellwand der aus Lipopolysacchariden besteht. Auch das Umweltchlamydium *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 scheint in der Lage zu sein, das Peptidoglykan zu synthetisieren, welches normalerweise in den Zellwänden von Bakterien vorkommt. Es wird von den Chlamydien vermutet, dass sie zwar Peptidoglykan synthetisieren können, es aber nicht in die Zellwand einbauen, sondern dieses spielt vielleicht eine Rolle bei der Teilung der *Reticulate Body*s und bei der Umwandlung von diesen in die *Elementary Body*s [17]. Prinzipiell wird das Thema Chlamydien und Peptidoglykan diskutiert und auch die *Chlamydial Anomaly* [62] genannt. Außerdem besitzt *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 laut den Pathway Tools Stoffwechselwege, um Glykogen und Trehalose zu synthetisieren. Diese Glucose-Polymere können später als Quelle von schnell verfügbarer Energie und Kohlenstoff dienen.

Es wurden für *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 eine Vielzahl von Stoffwechselwegen, für die Synthesen von Cofaktoren und Coenzymen gefunden, was sehr ungewöhnlich ist, da die Chlamydien normalerweise so gut wie keine eigene Biosynthese von Vitaminen und Cofaktoren haben, sondern diese aus der Wirtszelle importieren. Es wurden Stoffwechselwege für die Synthese von Adenosylcobalamin, Biotin, Coenzym A, Folat, Heme, Menaquinon, NAD, Siroheme und einige andere vorhergesagt. Wenn man sich die Stoffwechselwege ansieht, sind die Stoffwechselwege von Biotin, Folat, Heme, Menaquinon, NAD und Siroheme am vollständigsten, deshalb wurde vermutet, dass *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 diese Vitamine bzw. Cofaktoren synthetisieren kann. Des Weiteren sprechen folgende Fakten dafür:

- Folat kann von allen Chlamydien synthetisiert werden [47].
- Während die pathogenen Chlamydien das Ubiquinone produzieren, wird bei den Umweltchlamydien stattdessen das Menaquinone produziert [27].
- Von *Chlamydomonas S26/3* ist bekannt, dass es die Fähigkeit besitzt Biotin selbst synthetisieren zu können [31].
- Meine eigenen Untersuchungen mit MetaboloMIPS (siehe Kapitel 3.4) haben gezeigt, dass die Umweltchlamydien *Waddlia chondrophila* und *Simkania negevensis* Z ebenfalls in der Lage sind NAD zu synthetisieren und phosphorylieren können.
- Die Chlamydien sind in der Lage Protoheme zu synthetisieren [46].

Laut den Pathway Tools scheint *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 auch in der Lage zu sein, Fettsäuren und Phospholipide zu synthetisieren. Im Genom von *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 sind Enzyme vorhanden, damit Fettsäuren und Triacylglycerol abgebaut werden können. Es wurden aber keine Phospholipasen gefunden, welche einen Abbau von Phospholipiden ermöglichen. Der beim Abbau von Triacylglycerol entstehende Alkohol Glycerol kann zu Dihydroxyaceton Phosphat umgewandelt werden. Des Weiteren sind Stoffwechselwege für die Synthese von Pyrimidin-Ribonukleotiden, Pyrimidin-Deoxyribonukleotiden, Purin-Ribonukleotiden und Purin-Deoxyribonukleotiden vorhergesagt worden. Das Chorismat, der Ausgangsstoff für den Cofaktor Menaquinone, kann ebenfalls von *Parachlamydia*

acanthamoebae UV7 produziert werden.

Es wurde ebenfalls der Methylerythritol Phosphate Pathway vorhergesagt, für den bekannt ist, dass dieser Stoffwechselweg für die meisten Bakterien und den Malaria-Parasiten *Plasmodium falciparum* die einzige Möglichkeit ist, die Moleküle Isopentenyl-Pyrophosphat (IPP) und dessen Isomer Dimethylallyl-Pyrophosphat zu erzeugen [68]. Diese Moleküle sind die Grundbausteine der Isoprenoide, von denen bekannt ist, dass sie in allen Lebewesen vorkommen. Zu den Isoprenoiden gehören z.B. die Steroide und Terpene. Die Hopanoide sind äußerst stabile Triterpene, von denen bekannt ist, dass sie in Bakterien Komponenten der Membran sind, und an der Regulierung von Stabilität und Fluidität der Membran teilnehmen [52].

Das L-Aspartat kann zu Oxaloacetat und das L-Glutamat zum α -Ketoglutarat abgebaut werden. Diese beiden Abbauprodukte können dann in den Citratzyklus eingeschleust werden. Anorganischen Nährstoffe wie Cyanat (auch Cyansäure), Sulfoacetaldehyd oder Nitrat können von *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 laut den Pathway Tools verwertet werden. Das Cyanat, welches innerhalb einer Zelle durch den nichtenzymatischen Abbau von Carbamoyl Phosphat entsteht, ist in höheren Konzentrationen für *E.coli* giftig, kann aber auch bei Produktion von Ammoniak durch das Enzym Cyanase als einzige Schwefelquelle dienen. Das Sulfoacetaldehyd, welches beim Abbau von Organosulfaten wie Taurin und Isoethionat entsteht, wird zu Sulfit und Acetyl-CoA abgebaut. Nitrat wird über Nitrit zu einfachen Stickstoff (N_2) abgebaut. Die Enzyme des Stoffwechselweges, welcher Nitrat zu Stickstoff abbaut, wurden in den Genomen einiger Bakterien näher untersucht [65].

Das Fructose-6-Phosphat, welches *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 wohl als Ausgangsstoff der Glykolyse dient, kann durch den Abbau von D-Mannose bzw. D-Mannose-6-Phosphat erzeugt werden. Des Weiteren kann UDP-Glucose zu UDP-Galactose umgewandelt werden.

Laut den PathwayTools wurde für *Parachlamydia acanthamoebae* sowohl eine aerobe als auch eine anaerobe Zellatmung vorhergesagt. Außerdem besitzt *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 Stoffwechselwege um Methylglyoxal, Superoxidradikale und einige andere Umweltgifte (z.B. Arsenat oder Quecksilber) abzubauen.

Die ausführlicheren Daten der Analyse des Metabolismus von *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 sind in ChlamydiaReport.pdf Datei auf der beigelegten CD zu finden.

3.7.3 Vergleich

Sowohl *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 als auch *Ameobophilus asiaticus* haben die Angewohnheit, Amöben als ihre natürliche Wirte zu benutzen. Im Gegensatz zu den Säugetierzellen, die von den pathogenen Chlamyiden als Wirtszellen benutzt werden, ernähren sich Amöben normalerweise von Bakterien. *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 und *Ameobophilus asiaticus* haben nicht nur die Fähigkeit erworben, sich der Zersetzung durch die Enzyme der Amöben zu widersetzen, sondern sie befriedigen einerseits ihre Bedürfnisse nach Nährstoffe, indem sie diese aus der Amöbenwirt importieren, und andererseits können sie sich sogar in Amöben vermehren. Von Bakterien wie *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 und *Ameobophilus asiaticus*, die die Fähigkeit erworben haben, innerhalb von Amöben zu überleben, erwartet man, dass sie Ähnlichkeiten in ihren Stoffwechseln besitzen. Der nun folgende Vergleich dieser beiden Bakterien, versucht gemeinsame Strukturen in den Stoffwechseln (= Stoffwechselwege die in beiden Bakterien vorkommen) und Unterschieden aufzuzeigen.

Bei beiden Bakterien fehlt bei der Glykolyse die Phosphofruktokinase (EC: 2.7.1.1), ansonsten ist die Glykolyse aber vollständig. Auch die Gluconeogenese kann bei beiden ablaufen. Der Citratzyklus und

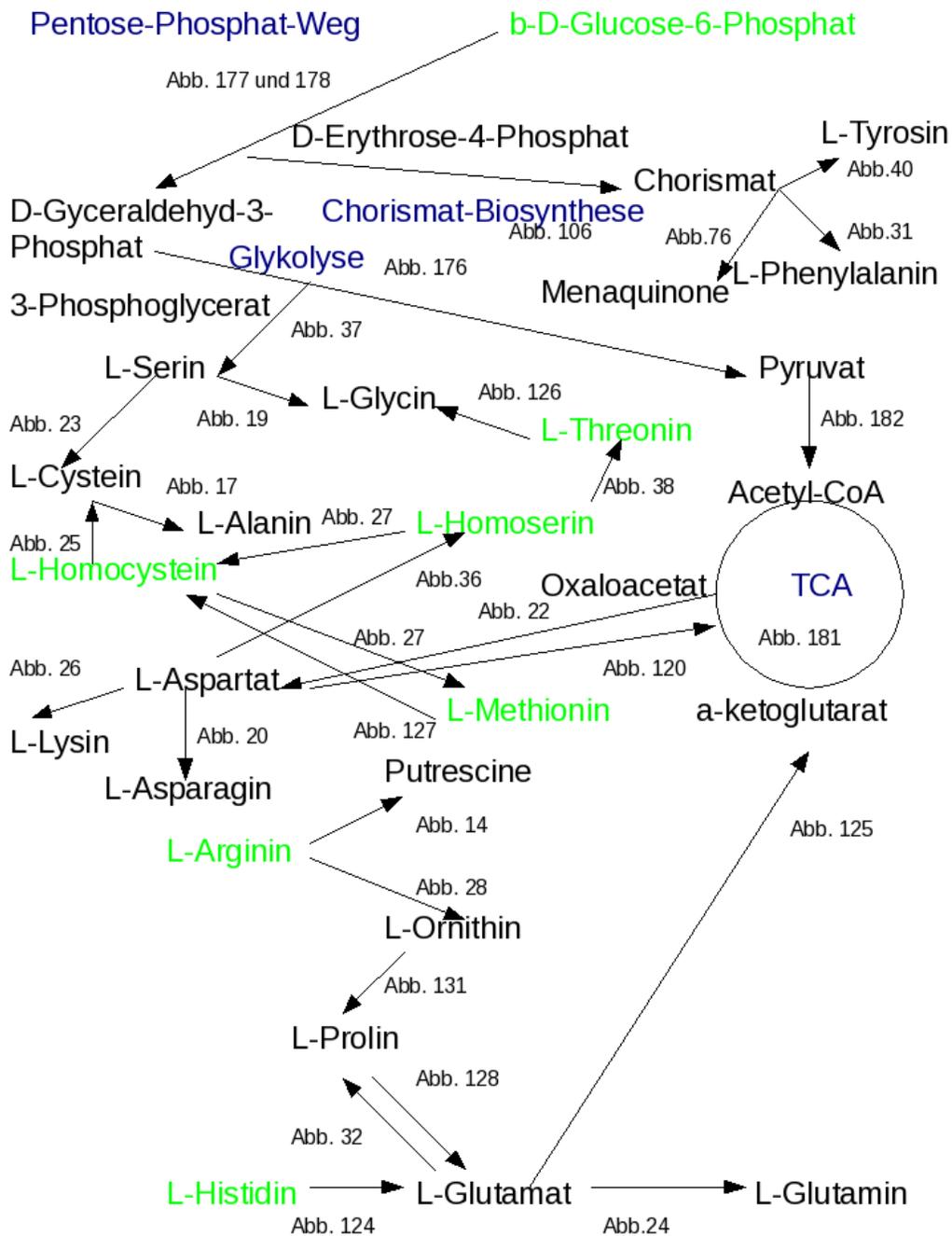


Abbildung 17: Der Aminosäuremetabolismus in *Parachlamydia acanthamoebae* UV7. Die Abbildungsverweise auf dem Bild verweisen auf die Abbildungen der einzelnen Stoffwechselwege im Kapitel ??.

der Pentose-Phosphat-Weg sind bei *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 vollständig, während bei *Ameobophilus asiaticus* der Citratzyklus überhaupt nicht vorhanden ist und der Pentose-Phosphat-Zyklus nur teilweise vorliegt. Beide Bakterien scheinen laut den Pathway Tools in der Lage zu sein, Peptidoglykan und seine Vorläufer UDP-N-acetyl-D-glucosamine und Meso-Diaminopimelat synthetisieren zu können. Beide können nicht alle Aminosäuren selbst synthetisieren, wenn auch *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 mehr Aminosäuren als *Ameobophilus asiaticus* synthetisieren kann. Es sind also beide Bakterien auf einen Import der fehlenden Aminosäuren mittels Transporterproteine aus einer Wirtszelle angewiesen. Der lebenswichtige Vorgang der Beladung der tRNA's mit den jeweiligen Aminosäuren scheint bei beiden Bakterien für alle Aminosäuren, mit Ausnahme von Glutamin durchführbar zu sein, denn es fehlt nur Gln-tRNA synthetase. Beide Bakterien können die Zucker Mannose und Glucose umwandeln, allerdings besitzt nur *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 die Fähigkeit die Glucose-Biopolymere Glykogen und Trehalose zu synthetisieren. Fettsäuren und Phospholipide können von beiden Bakterien synthetisiert werden. Beide können auch Fettsäuren wieder oxidieren, aber während *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 dazu fähig ist Triacylglycerol abzubauen, besitzt *Ameobophilus asiaticus* Phospholipasen um Phospholipide zu zerlegen. Beide Bakterien können keine Nukleotide de novo synthetisieren, sondern importieren diese aus der Wirtszelle, und wandeln sie gegebenenfalls in andere Nukleotide um.

Das Bakterium *Ameobophilus asiaticus* importiert alle benötigten Cofaktoren oder Vitamine aus der Wirtszelle, da es nicht in der Lage ist diese selbst zu produzieren. Während *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 zumindest Biotin, Folat, Heme, Menaquinon, NAD und Siroheme selbst herstellen kann. Zur Synthese von Isopentenyl-Pyrophosphat (IPP) benutzen beide den Methylerythritol Phosphate Pathway, wie es für die meisten Bakterien und dem Malaria-Parasiten *Plasmodium falciparum* üblich ist. *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 als auch *Ameobophilus asiaticus* scheinen in der Lage zu sein, anorganische Nährstoffe wie Cyanat und Sulfoacetaldehyd zu nutzen. Außerdem besitzen beide Bakterien Stoffwechselwege, um Methylglyoxal, Superoxidradikale und einige andere Umweltgifte abzubauen.

Der Metabolismus von *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 ist dem von *Candidatus Protochlamydia amoebophila* UWE25 ähnlich, wenn auch UV7 mehr Fähigkeiten im Bereich der Biosynthesen von Aminosäuren, Vitamin und Cofaktoren besitzt, was aufgrund des größeren Genoms (siehe Tabelle 10) nicht verwunderlich ist. Für einen näheren Einblick in den Metabolismus von *Candidatus Protochlamydia amoebophila* UWE25 siehe die Veröffentlichung seiner Genomsequenz [27].

Im Großen und Ganzen ergibt sich für den Metabolismus von *Amoebophilus asiaticus* ein ähnliches Bild, wie für die Metabolismen einiger pathogener Chlamydien. So haben diese eine, teilweise vorhandene Glykolyse und keinen bzw. einen eingeschränkten Citratzyklus. Auch sie können nur einige wenige Aminosäuren synthetisieren und importieren den Rest aus der Wirtszelle. Auch sind die pathogenen Chlamydien ähnlich wie *Amoebophilus asiaticus* nicht in der Lage, Nukleotide de novo zu synthetisieren, allerdings können sie importierte Nukleotide benutzen um die Elongation von DNA bzw. RNA durchzuführen. Außerdem sind auch sie wie *Amoebophilus asiaticus* nicht in der Lage, Cofaktoren und Vitamine zu synthetisieren. Allerdings haben die Chlamydien eine funktionierende Synthese von Glykogen und Heme, auch scheint der Pentose-Phosphat-Zyklus bei ihnen vollständig zu sein [30]. Die Ähnlichkeiten der Metabolismen von *Amoebophilus asiaticus* und den pathogenen Chlamydien ist aufgrund der symbiontischen Natur von *Amoebophilus asiaticus* und der parasitären Lebensweise der pathogenen Chlamydien nicht weiter verwunderlich.

4 Vorschlag für ein Kulturmedium

Im nächsten Kapitel wird der Metabolismus von *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 kurz zusammengefasst, dabei liegt das Augenmerk auf die Stoffwechselwege der wichtigsten Biosynthesen, und auf den Katabolismus von Zuckern und Nukleotiden. Es beginnt bei der Aufnahme von Zuckern und folgt, dann den metabolischen Wegen bis alle wichtigen Biosynthesen beschrieben worden sind. Für einen schnellen Überblick über den im nächsten Kapitel beschriebenen Metabolismus siehe Abbildung 18. Nun werden bestimmte Aspekte dieses Bildes erläutert: Violette Ellipsen sind Transporter (Import) für chemische Elemente und Chloridverbindungen, orange eingefärbte Ellipsen stehen für Exporter von Schwermetallen, grüne Ellipsen stellen Transportproteine für Zuckermoleküle dar, während hellblaue Ellipsen Aminosäureimporter sind und rote Ellipsen transportieren Nukleotide bzw. Basen. In blauer Schrift sieht man die Namen der wichtigsten katabolischen Stoffwechselwegen wie z.B. Glykolyse oder Citratzyklus. In grüner Schrift sieht man die Namen der Vitamine und Cofaktoren, welche *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 synthetisieren kann. Wörter in Magenta, zeigen die Namen von wichtigen Endproduktgruppen wie z.B. Phospholipiden und Fettsäuren. Das *Glucose-6-Phosphat* stellt so etwas wie den Ausgangsstoff für den ganzen Metabolismus dar, und ist deshalb in Rot geschrieben.

4.1 Zusammenfassung des Metabolismus

4.1.1 Import von Zuckern und einschleusen von diesen in die Glykolyse und den Pentose-Phosphat-Weg

Parachlamydia acanthamoebae UV7 scheint mit Hilfe der Transporter Hpt und yhji (siehe Tabelle 3) in der Lage zu sein, Glucose und Glucose-6-Phosphat aufzunehmen. Die Glucose kann UV7 dann mit Hilfe der Glucokinase (EC: 2.7.1.2) in das Glucose-6-Phosphat umwandeln. Das Glucose-6-Phosphat dient als Ausgangsstoff für die Glykolyse und des Pentose-Phosphat-Weges. Das Zwischenprodukt der Glykolyse das Fructose-6-Phosphat kann auch durch den Abbau von Mannose, welches ebenfalls mit Hilfe des yhji Transporters aufgenommen werden kann, oder durch den Abbau von Fructose von *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 erzeugt werden. Die Fructose wiederum wird mit Hilfe des Phosphotransferase Systems(PTS) aufgenommen. Das Fructose-6-Phosphat dient zur Synthese von UDP-N-acetyl-D-glucosamin, einem Bestandteil des Peptidoglykans. Das Glucose-6-Phosphat dient nicht nur als Ausgangsstoff für die Glykolyse und des Pentose-Phosphat-Weges, sondern kann von *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 auch in die Glucose-Polymere Glykogen und Trehalose umgewandelt werden. UV7 besitzt keine Stoffwechselwege zum Abbau von Glykogen, allerdings kann es das Glykogen in Trehalose umwandeln. Die Trehalose kann später als Kohlenstoff- und Energiequelle genutzt werden. Zusätzlich scheint UV7 auch in der Lage zu sein, Trehalose mit Hilfe eines Transporter aufzunehmen. Egal ob selbst produziert oder aufgenommen *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 kann die Trehalose wieder zu Glucose-6-Phosphat abbauen.

4.1.2 Zwischenprodukte des Pentose-Phosphat-Weges und ihre Verwendung

Aus dem Glucose-6-Phosphat wird das Ribulose-5-Phosphat erzeugt, welches dann zusammen mit GTP zur Synthese von Riboflavin, FAD oder zusammen mit ATP zur Synthese von AMP und dem 5-Phosphoribosyl 1-Pyrophosphat (PRPP) verwendet wird. Das AMP kann später zur Synthese von dATP verwendet werden. Im Zuge des Pentose-Phosphat-Weges kann das Ribulose-5-Phosphat auch weiter zu dem

D-Erythrose-4-Phosphat umgewandelt werden. Dieses D-Erythrose-4-Phosphat dient dann als Ausgangsstoff für die Synthese von Chorismat, welches von *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 als Grundbaustein für die Synthesen der Vitamine Folat und Menaquinon und der Aminosäuren L-Tyrosin und L-Phenylalanin dient. Diese beiden Aminosäuren können zusätzlich noch über Transporter (L-Tyrosin: TyrP und L-Phenylalanin: BrnQ) aufgenommen werden.

4.1.3 Zwischenprodukte der Glykolyse und ihre Verwendung

Das Fructose-6-Phosphat wird durch den normalen Ablauf der Glykolyse über das Zwischenprodukt Fructose-1,6-Biphosphat zum D-Glyceraldehyd-3-Phosphat und dem Dihydroxy-Aceton Phosphat zerlegt. Das Dihydroxy-Aceton Phosphat dient als Startprodukt der Synthese von Phospholipide und das D-Glyceraldehyd-3-Phosphat ist wie Pyruvat ein Ausgangsstoffe für den Methylerythritolphosphat-Stoffwechselweg, in dem das Isopentyl-Pyrophosphat erzeugt wird. Dieses ist wiederum das Startprodukt der Synthese von Polyisoprenoiden. Das D-Glyceraldehyd-3-Phosphat wird in der Glykolyse dann zu 3-Phosphoglycerat umgewandelt. Dieses wird dann zur Synthese der Aminosäure L-Serin oder dem Endprodukt der Glykolyse dem Pyruvat verwendet. Das Pyruvat kann dann entweder in den Methylerythritolphosphat-Stoffwechselweg eingeschleust werden, oder es wird zu Acetyl-CoA umgewandelt, welches als Startprodukt des Citratzyklus dient oder weiter zur Synthese von Fettsäuren benutzt werden kann.

4.1.4 Zwischenprodukte des Citratzyklus und ihre Verwendung

Im Ablauf des Citratzyklus wird das α -Ketoglutarat gebildet, dieses wird bei vielen Reaktionen der Biosynthesen der Aminosäuren benötigt. Desweiteren wird das Oxalacetat gebildet, welches als Ausgangsstoff für die Synthese der Aminosäure L-Aspartat dient. Das L-Aspartat kann auch zusätzlich noch mit Hilfe des GltT Transporters aufgenommen werden. Ob nun aufgenommen oder selbst produziert das L-Aspartat dient als Ausgangsstoff für die Synthese der Aminosäure L-Asparagin, für die Synthese des Vitamins NAD⁺ und für die Synthese des meso-Diaminopimelat, einem weiteren Baustein für die Synthese von Peptidoglykan. Es kann allerdings auch wieder zu Oxalacetat zerlegt werden, und wieder in den Citratzyklus eingeschleust werden. Das NAD⁺ kann alternativ auch mit Hilfe, des in *Candidatus Protochlamydia amoebophila* UWE25 erstmals gefundenen Ntt4 Transporters aufgenommen werden. *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 kann das NAD⁺ zum NADP⁺ phosphorylieren. Das meso-Diaminopimelat dient nicht nur als Baustein für die Synthese des Peptidoglykans, sondern kann auch in L-Lysin umgewandelt werden, allerdings wurde das dafür zuständige Enzym nicht im Genom von *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 gefunden, deshalb bin ich mir nicht sicher, ob die Aminosäure L-Lysin von *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 synthetisiert werden kann. Allerdings kann UV7 auf jeden Fall das L-Lysin mittels eines Transporters aus der ABC Familie aufnehmen.

4.1.5 Synthese von Aminosäuren aus dem L-Serin

Nachdem das L-Serin aus dem 3-Phosphoglycerat hergestellt worden ist, kann es entweder in die Aminosäure L-Glycin oder L-Cystein umgewandelt werden. Das L-Cystein kann dann weiter zur Aminosäure L-Alanin synthetisiert werden. Das L-Alanin kann dann nicht nur zur Synthese des Peptidoglykan, sondern auch zur Synthese des Vitamins Biotin verwendet werden. Mit Hilfe des Transportproteins DagA können L-Alanin und L-Glycin auch aus der Umgebung aufgenommen werden. Zusätzlich kann das L-Glycin auch durch den Abbau der Aminosäure L-Threonin erzeugt werden. Das L-Threonin kann nicht

von *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 synthetisiert werden, und muss deshalb mit dem SteT Transportprotein aufgenommen werden. Dieses kann alternativ auch Serin in die Zellen transportieren kann.

4.1.6 Synthese von Aminosäuren aus L-Arginin und L-Histidin

Der Transporter, der auch das L-Lysin transportiert, kann auch die Aminosäuren L-Ornithin, L-Arginin und L-Histidin aufnehmen. *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 ist in der Lage, aus dem L-Arginin entweder das L-Ornithin oder das Putrescine zu synthetisieren. Die Polyamine wie das Putrescin sind eine Gruppe von organischen positiv geladenen Polykationen, welche an vielen biologischen Prozessen teilhaben wie z.B. Stabilisierung von Membranen und die Stimulation von verschiedenen Enzymen [72]. Das L-Ornithin kann wiederum in die Aminosäure L-Prolin umgewandelt werden, alternativ kann aber auch das L-Prolin mit Hilfe des PutP Symporters aufgenommen werden. Das aufgenommene L-Histidin kann entweder für die Proteinsynthese verwendet werden oder in das L-Glutamat umgewandelt werden. Die Aminosäure L-Glutamat kann auch aus dem L-Prolin erzeugt werden oder mit Hilfe des GltT Symporters aus der Umgebung aufgenommen werden. Das L-Glutamat dient nicht nur zur Synthese von Proteinen, sondern kann auch in die Aminosäuren L-Glutamin und L-Prolin umgewandelt werden. Es kann allerdings auch wieder zum α -Ketoglutarat abgebaut werden, und dieses kann dann in den Citratzyklus eingeschleust werden. Zusätzlich dienen acht L-Glutamat-Moleküle auch als Ausgangsstoffe für die Synthese der Kofaktoren Protoheme und Siroheme. Das L-Glutamin kann auch mit Hilfe eines Glutamin Porter's aus der ABC Familie importiert werden.

4.1.7 Weitere von außen aufgenommene Aminosäuren

Die Aminosäuren Leucin und Isoleucin können mit Hilfe der Transporter BrnQ und LivG aufgenommen werden, während das L-Valin nur von dem LivG Transporterprotein aufgenommen werden kann. Das LivG Transporterprotein kann alternativ auch die Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin aufnehmen, allerdings mit einer bedeutend geringeren Effizienz. Der BrnQ Transporter kann neben Leucin, Isoleucin auch Phenylalanin und Methionin aufnehmen. Das Tryptophan wird mittels des TrnT Symporters aus der Umgebung aufgenommen. Das mit Hilfe von BrnQ aufgenommene Methionin kann in das Coenzym S-Adenosylmethionin umgewandelt werden, dieses ist ein wichtiges Methylierungsmittel in vielen Stoffwechselwegen. Tryptophan, Leucin, Isoleucin und Valin dienen nur zur Synthese von Proteinen, da sie weder umgewandelt noch zu anderen Stoffen abgebaut werden.

4.1.8 Synthese von Pyrimidin-Nukleotiden

Das Uridintriphosphat (UTP) kann entweder mit Hilfe der Ntt2 und Ntt3 Transportern aufgenommen werden, oder aus dem Uridindiphosphat (UDP) synthetisiert werden. Das UDP wiederum kann über das Uridinmonophosphat (UMP) synthetisiert werden. *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 scheint zwar die metabolischen Fähigkeiten⁴¹ zu besitzen, um aus dem Uracil und dem PRPP das UMP zu synthetisieren, allerdings ist nicht klar wie *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 an das Uracil kommt. Vermutlich besitzt es einen Transporter für Basen, allerdings konnte bis jetzt nur eine Permease für die Base Cytosine vorhersagt werden, aber kein Transportsystem für andere Basen. Klar ist nur, dass *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 nicht die Stoffwechselwege besitzt, um Uracil selbst zu synthetisieren. Aus dem

⁴¹Das Enzym Uracil Phosphoribosyltransferase EC:2.4.2.9 ist vorhanden.

UTP kann *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 entweder das Deoxyuridintriphosphat (dUTP) oder das Cytidintriphosphat (CTP) synthetisieren, allerdings kann das CTP auch mit Hilfe des Ntt2 Transporters aufgenommen werden, oder das UTP wird zur Synthese eines RNA-Stranges verwendet. Das dUTP kann dann in das Thymidintriphosphat (TTP) umgewandelt werden. Das CTP kann dann entweder Bestandteil der RNA werden, oder zum Deoxycytidintriphosphat (dCTP) umgewandelt werden, welches ebenfalls wie TTP ein Baustein der DNA ist.

4.1.9 Synthese von Purin-Nukleotiden

Aus Adenosinmonophosphat (AMP) oder aus dem, durch die Ntt2 und Ntt1 Transportern aufgenommene Adenosintriphosphat (ATP) kann *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 das Deoxyadenosintriphosphat (dATP) herstellen. Das Deoxyadenosintriphosphat kann dann zur Elongation bzw. Synthese von DNA-Strängen dienen. Das ATP dient als Energieträger und kann als Baustein der RNA verwendet werden. Das Guanosintriphosphat (GTP) kann entweder mit Hilfe des Ntt2 Transporters aufgenommen werden, oder aus dem Guanosinmonophosphat (GMP) synthetisiert werden. Das GMP kann von *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 aus der Base Guanin und dem PRPP mit Hilfe des Guanin Phosphoribosyltransferase Enzyms synthetisiert werden. Allerdings ist wieder unklar wie *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 an die Base Guanin kommt, da keine Transporter dafür gefunden werden konnte. Das GTP kann entweder zur Synthese von RNA benutzt werden, oder zum Deoxyguanosintriphosphat (dGTP) umgewandelt werden, welches ein Bestandteil der DNA ist

4.1.10 Aufnahme von Spurenelementen, Phosphat, Salzen, Stickstoff und Export von Schwermetallen

Um wichtige Ionen wie K^+ , H^+ und Na^+ aufzunehmen, besitzt *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 eine Vielzahl von ATPasen und Kanälen. Es wurden ebenfalls Transportsysteme für die Aufnahme von divalenten Kationen wie z.B. Mg^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} und Cu^{2+} gefunden, komischerweise wurde kein Transportsystem zur Aufnahme von Calciumionen Ca^{2+} gefunden. Calcium ist aber überlebenswichtig für Organismen, daher sollte Calcium von *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 aufgenommen werden. Es gibt zwei Möglichkeiten wie UV7 an Calcium kommen könnte. Erstens wurde eine P-typ ATPase für Kationen gefunden, allerdings ist ihre genaue Funktion, also welche Kationen aufgenommen werden können, noch unbekannt. Zweitens wurde ein Kanal für Chloride gefunden. So könnte es sein, dass *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 das Calciumchlorid ($CaCl_2$) aufnimmt, und dann in Ca^{2+} und $2 Cl^-$ zerlegt. Außerdem scheint *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 Symporter für anorganisches Phosphat, Sulfat und Nitrogen (Stickstoff) zu besitzen, und in der Lage zu sein, dass für die Synthese von Protoheme wichtige Eisen, in Form von Fe^{2+} und Fe^{3+} Ionen, Eisenoxidverbindungen Fe_2O_3 oder Eisenchelatekomplexe aufzunehmen. *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 besitzt eine ATPase ZntA, welche in der Lage ist Zink, Cadmium, Kobalt, Quecksilber, Nickel, Kupfer und Blei aus der Zelle unter Verbrauch von ATP heraus zu transportieren. Es können ebenfalls Na^{2+} , K^+ , Silber, Eisen, Arsen und Antimon mit Hilfe von verschiedenen Transportproteinen aus der Zelle heraustransportiert werden. Es wurden auch drei verschiedene Aufnahmesysteme für das Cholin gefunden, welches ein Bestandteil der Phospholipide ist.

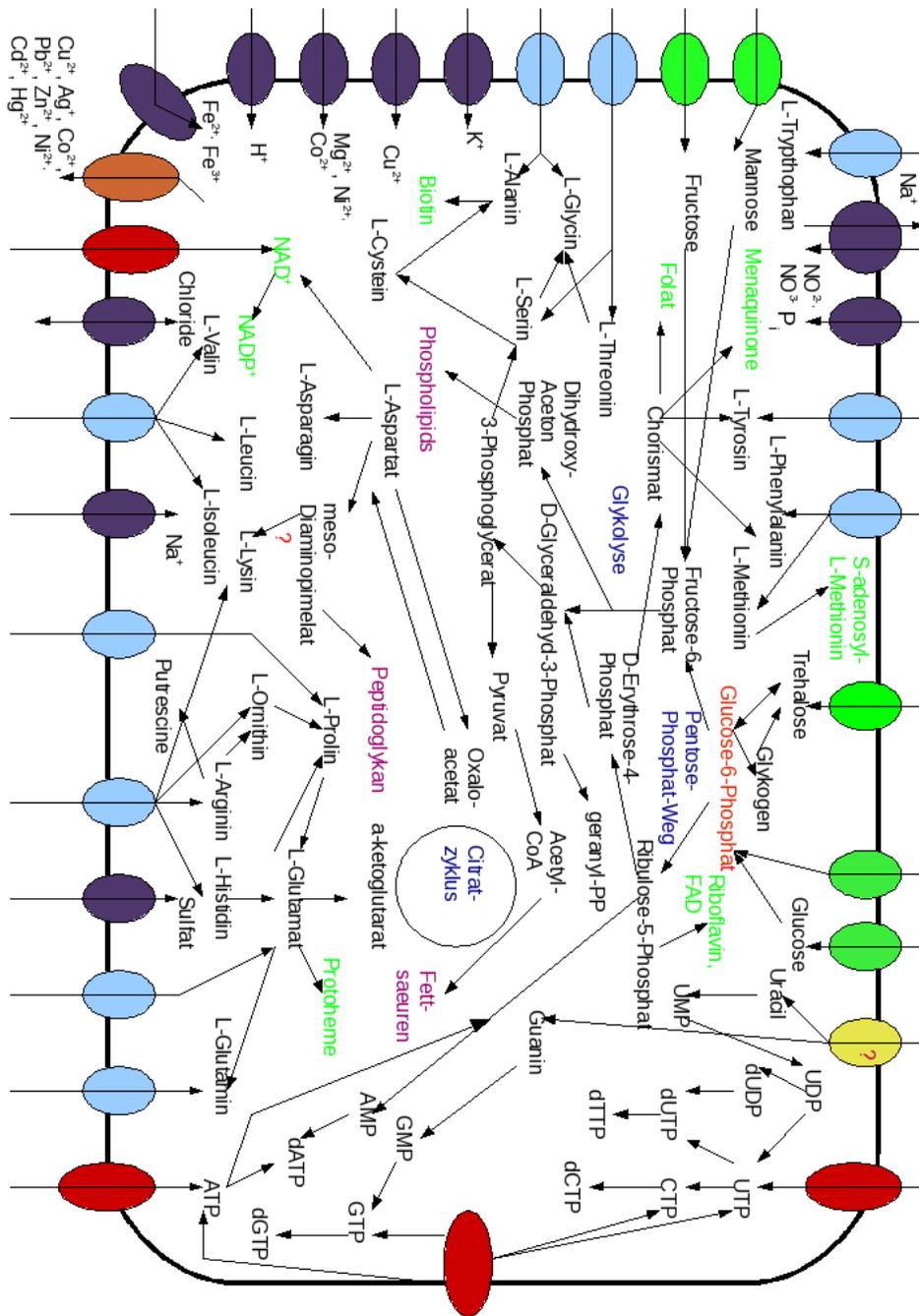


Abbildung 18: Ein Überblick über die Transporter und den Metabolismus von *Parachlamydia acanthamoebae* UV7

4.2 Vorschlag für ein Kulturmedium

Aufgrund der Fähigkeit von *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 Glucose zu importieren und in Glucose-6-Phosphat umzuwandeln, sollte ein mögliches Kulturmedium Glucose als Kohlenstoffquelle verwenden. Aufgrund der Unfähigkeit von *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 die meisten Ribonukleosidtriphosphate selbst zu synthetisieren und die Anwesenheit von Transportern dafür, sollte ein Kulturmedium die vier Ribonukleosidtriphosphate ATP, GTP, UTP und CTP enthalten. Außerdem sollten im Medium die Aminosäuren Arginin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Threonin, Tryptophan und Valin enthalten sein, denn diese Aminosäuren kann *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 nicht selbst synthetisieren, benötigt sie aber zur Synthese von Proteinen und anderen Aminosäuren. Auch sollten die folgenden Vitamine und Coenzyme im Medium vorhanden sein: Coenzym A, Vitamin B₁₂ und Vitamin B₆, da zwar einzelne Enzyme dieser Stoffwechselwege vorhanden sind, allerdings nicht genug damit *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 diese Vitamine selbst synthetisieren kann. Desweiteren sollte das Nährmedium anorganische Salze, die Natrium und Kalium enthalten, beinhalten, weil die Ionen dieser beiden Elemente essentiell für *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 sind. Spurenelemente wie Eisen, Kupfer, Cobalt, Nickel und Magnesium sollten ebenfalls im Kulturmedium vorhanden sein. *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 scheint als Stickstoffquellen Nitrat oder Nitrit verwenden zu können, deshalb sollte das Kulturmedium eines dieser beiden Anionen enthalten. Desweiteren sollte das Nährmedium Sulfat und anorganisches Phosphat enthalten, denn es wurden Transporter für beide Verbindungen gefunden und somit können diese als Schwefel- und Phosphatquelle dienen.

Nun eine kurze Auflistung der Bestandteile eines möglichen Kulturmediums:

Kohlenstoffquelle Glucose

Aminosäuren Arginin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Threonin, Tryptophan und Valin

Ribonukleosidtriphosphate ATP, GTP, UTP und CTP

Vitamine Coenzym A, Vitamin B₁₂ und Vitamin B₆

anorganische Salze Natrium, Kalium

Spurenelemente Eisen, Kupfer, Cobalt, Nickel und Magnesium

Stickstoffquelle Nitrat oder Nitrit

Phosphatquelle anorganisches Phosphat

Schwefelquelle Sulfat

Da es kaum ein passendes Fertigmedium auf dem Markt geben wird, müssen die einzelnen Bestandteile von Hand zum Medium vermischt werden.

5 Diskussion

Im Zuge der Diplomarbeit wurde ein Programm zum Vergleich eines Stoffwechselweges entwickelt, wie er in drei verschiedenen Organismen vorkommt. Dieses Programm wird derzeit von den Biologen der Universität Wien verwendet. Außerdem wurden die Stoffwechselwege von ausgewählten Vertretern der Bakteriengruppen Chlamydien, Nitrifizierer und Bacteroidetes analysiert, und innerhalb der jeweiligen Gruppen verglichen. So zeigte sich bei den Chlamydien, dass alle Vertreter unfähig sind, alle Aminosäuren und Vitamine selbst zu synthetisieren. Allerdings können die Umweltchlamydien mehr Vitamine und Aminosäuren selbstständig erzeugen als die pathogenen Chlamydien. Bei der Analyse der Bacteroidetes fiel auf, dass *Ameobophilus asiaticus* von allen Vertretern dieser Gruppe, die kleinsten metabolischen Fähigkeiten besitzt. Besonders interessant ist die Abwesenheit eines Citratzyklus, wodurch der Energiemetabolismus bedeutend eingeschränkt wird. Die Meisten der untersuchten Nitrifizierer besitzen sehr ähnliche Metabolismen, sie unterscheiden sich nur in wenigen Punkten wie z.B. bei der Speicherung von Energie in Form von Glykogen oder Polyhydroxybutyrat oder beim Abbau von Phospholipiden. Einzig allein *Nitrospira defluvii* scheint wenige Aminosäuren selbst herstellen zu können, dies könnte der Grund sein, wieso die *Nitrospira* spp. als schwer kultivierbare Bakterien gelten. Das Augenmerk dieser Diplomarbeit lag aber, auf der Erstellung eines Entwurfs eines möglichen Kultivierungsmedium für *Parachlamydia acanthamoebae* UV7. Dieser Vorschlag wurde mit Hilfe einer Analyse der Stoffwechselwege und Transportersysteme von *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 entworfen. Dabei zeigte sich das ein mögliches Medium Glucose, die Aminosäuren Arginin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Threonin, Tryptophan und Valin, die Ribonukleosidtriphosphate ATP, GTP, UTP und CTP, die Vitamine Coenzym A, Vitamin B₁₂ und Vitamin B₆, Natrium, Kalium, Sulfat, Phosphat, Nitrat oder Nitrit und Spurenelemente wie Eisen, Kupfer, Cobalt, Nickel und Magnesium enthalten muss.

5.1 Vor- und Nachteile der verwendeten Programme

Ein direkter Vergleich der beiden Programme gestaltet sich schwierig, da sich die *Pathway Tools* prinzipiell nicht mit MetaboloMIPS vergleichen lassen.

Die *Pathway Tools* sind mehr als ein Programm zur Vorhersage⁴² und Visualisierung von Stoffwechselwegen. Wird mit Hilfe einer Genbank-Datei und einer Fasta-Datei eine PathwayGenome-DataBase (PGDB) erstellt, läßt sich danach auch das Genom näher betrachten (*Sprich die Pathway Tools haben eine ähnliche Funktion wie der UCSC Genome Browser [12]*). Es läßt sich dann eine solche PGDB nach Stoffwechselwegen, Reaktionen, Genen, chemischen Verbindungen, und mit Hilfe von BLAST sogar nach Sequenzen durchsuchen. Bei der Erstellung der PGDB wird auch gleichzeitig die Vorhersage der Stoffwechselwege mit Hilfe der MetaCyc-Datenbank durchgeführt. Dies spreche ich deshalb an, weil es später beim Thema Geschwindigkeit der Analysen eine Rolle spielt.

MetaboloMIPS dagegen ist eine Software zur Vorhersage von Stoffwechselwegen. Mit der außerdem eine nähere Betrachtung eines Stoffwechselweges (z.B. welche Reaktionen nehmen daran teil), oder einen Vergleich der Stoffwechselwege verschiedener Organismen möglich ist. Alle notwendigen Informationen für diese Funktionen werden dabei aus der BioPath-Datenbank und den Pedant3-Genomdatenbanken bezogen.

⁴²um genau zu sein, macht die Vorhersage eigentlich das Unterprogramm *PathoLogic*

5.1.1 Vorteile

MetaboloMIPS:

Bei MetaboloMIPS kann man mit Hilfe des erstellten HTML-Dokuments der PathwayProfile von verschiedenen Organismen sehr schnell sehen, wo Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten liegen. Ein weiterer Vorteil ist der Algorithmus von MetaboloMIPS zur Berechnung des PathScores. Dieser macht MetaboloMIPS nicht annähernd so sensitiv wie die Pathway Tools, und somit treten bei der Vorhersage mit MetaboloMIPS weniger falsch-positive Treffer auf.

Pathway Tools:

Für die Pathway Tools spricht einerseits die große Datengrundlage, die aus der Benutzung der MetaCyc-Datenbank kommt. Die MetaCyc Datenbank ist eine gute und umfangreiche Datenbank, wenn es um Stoffwechselwege geht. Immerhin besitzt sie Reaktionen, Enzyme und Stoffwechselwege aus über 500 Spezies, und die dazu gehörigen Literaturangabe. Andererseits gibt es eine klare Einteilung der Stoffwechselwege, die durch die dazugehörigen Graphen leicht ersichtlich ist und in Kombination mit den ebenfalls vorhandenen Erklärungen und Literaturangaben, machen diese ein Weiterarbeiten sehr viel einfacher. Der letzte Vorteil ist wohl die Geschwindigkeit der Stoffwechselwegsvorhersage und der Vergleichsanalysen für mehrere Organismen. Die Erstellung einer PGDB und der damit verbundenen Stoffwechselwegsvorhersage dauert pro Organismus ungefähr 5 min. Die Vergleichsanalyse für z.B. die 15 Chlamydien mit den Pathway Tools durchzuführen dauert ca. 5 min. Insgesamt ergibt sich für die Analyse der Chlamydien damit ein Zeitaufwand von 80 min. Die Erstellung der PathwayProfile der Chlamydien mit MetaboloMIPS dauerte 6218 min (ca. 4,3 Tage).

5.1.2 Nachteile

MetaboloMIPS:

Ein Nachteil von MetaboloMIPS ist die Langsamkeit bei der Erstellung der Pathway Profile, wenn man auch normalerweise bei der Erstellung mit ca. 1 Stunde pro Organismus rechnen kann, was aber bei keinem der Pathway Profile, die erstellt wurden, eintrat. Woran dies nun liegt, ist nicht ganz klar. Wahrscheinlich verzögert sich die Erstellung aber, aufgrund der MySQL-Abfragen an den Pedant3 Server am MIPS. Fakt ist aber, dass keines der drei Profile in unter 2 Tagen fertig wurde. Selbst wenn man die prognostizierte Zeit mit der Zeit der Pathway Tools vergleicht, verliert MetaboloMIPS immernoch (15 Stunden vs. 80 min). Ein weiteres Problem ist die kleine Datengrundlage durch die BioPath-Datenbank. Sie enthält nur alle notwendigen Stoffwechselwege, wenn man nur den Zentralmetabolismus und die Biosynthese von Aminosäuren, Lipiden, Steroiden, Nukleotiden, Cofaktoren und Vitaminen betrachten möchte. Die ungewöhnlichen Stoffwechselwege wie z.B. die Stoffwechselwege des chemoautotrophischen Energiemetabolismus, oder die Stoffwechselwege für die Synthese von Siderophoren fehlen jedoch in BioPath gänzlich. Die Stoffwechselwege *Nitrit-Oxidation* und *Ammoniak-Oxidation* aus der Kategorie *chemoautotrophischer Energiemetabolismus* wären z.B. bei der Stoffwechselwegsvorhersage der Nitrifizierer sehr interessant gewesen, und deshalb wurde diese Stoffwechselwege mit Hilfe der Pathway Tools verglichen.

Ein weiteres Problem ist die Namensgebung der Stoffwechselwege, die meistens nichts über die Stoffwechselwege aussagen (z.B. pathGG1 oder pathCC3 usw.). Außerdem gibt es keine Referenz, in der man nachsehen kann, wie die Stoffwechselwege von MetaboloMIPS aussehen, bzw. aufgeteilt sind (z.B. die klassische Glykolyse setzt sich aus den Stoffwechselwegen pathGG1, pathGG2, pathGG3 und pa-

thGG4 zusammen). Diese zwei Punkte machen die Auswertung der Pathway Profile sehr zeitaufwendig, weil man nur mit Hilfe der Reaktionsnamen, die den Quadranten auf der Boehringer Biochemical Pathway Map im Namen enthält, bzw. des Enzymnamens und der EC-Nummern zu mehr Informationen kommen kann. Eine Tatsache, die anfangs unproblematisch erscheint, ist die Zerstückelung von größeren Stoffwechselwegen wie z.B. der Glykolyse in mehrere kleinere Stoffwechselwege. Denn durch eine ungeschickte Aufteilung der Reaktion auf diese kleineren Stoffwechselwege, kann es dazu führen, dass der eigentliche große Stoffwechselweg nicht mehr als vorhanden klassifiziert wird, obwohl er wirklich vorhanden ist.

Pathway Tools:

Die Pathway Tools sind sehr sensitiv, sprich, wenn zwei nicht einzigartige Reaktionen oder eine einzigartige Reaktion eines Stoffwechselweges ausgemacht werden konnten, wird der Stoffwechselweg als vorhanden klassifiziert. Wenn man nur Reaktionen in einem Stoffwechselweg findet, die auch in anderen Stoffwechselwegen vorkommen, stellt sich die Fragen, ob dieser Stoffwechselweg vorkommt, oder vielleicht einer der anderen möglichen Stoffwechselwege, oder vielleicht mehrere dieser Stoffwechselwege. Bei nur einer einzigartigen Reaktion stellen sich dann die Fragen: ist diese Reaktion Teil des Stoffwechselweges, oder katalysiert das gefundene Enzym auch wirklich diese Reaktion in diesem Organismus? Später muss man dann einiges an Arbeit aufwenden, um herauszufinden, ob der Stoffwechselweg ein falsch positiver Treffer ist oder wirklich im Organismus vorkommt. Die MetaCyc Datenbank enthält von einigen Stoffwechselwegen verschiedene Varianten, was bei der Vorhersage der Stoffwechselwege dazu führen kann, dass man zwei bzw. mehrere Varianten eines Stoffwechselweges als vorhanden klassifiziert bekommt. Dies liegt daran, dass die meisten Varianten eines Stoffwechselweges zum Teil die gleichen Reaktionen und die damit verbundenen Enzyme benutzen. Nun muss man wieder durch zusätzliche Arbeit herausfinden, welche dieser Varianten am wahrscheinlichsten im Organismus vorkommen.

5.2 Kultivierungsvorschlag

In wie weit eine Kultivierung von *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 mit Hilfe des vorgeschlagenen Mediums erfolgreich sein wird, kann man nicht sagen. Es läßt sich erst eine Aussage dazu treffen, wenn die Biologen des Fachbereichs Mikrobielle Ökologie der Universität Wien es ausprobiert haben. Da aber bereits für die humanpathogenen Bakterien *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia conorii*, *Tropheryma whipplei*, *Treponema pallidum*, *Mycobacterium leprae* und *Coxiella burnetii* mit einer ähnlichen Methode erfolgreiche Kultivierungsmedien entworfen worden sind, könnte auch mein vorgeschlagenes Medium zum Erfolg führen.

5.3 Ausblick

5.3.1 Probleme

Am meisten Probleme bzw. Aufwand machte mir die unklare bzw. nirgends einsehbare Einteilung und Zusammensetzung der Stoffwechselwege von MetaboloMIPS, denn einerseits sind die Stoffwechselwegsnamen nicht immer hilfreich z.B. pathGLUTAMAT1, pathGLUTAMAT2 usw. und andererseits funktionierte das JavaScript-Visualisierungstool nicht. Dies führte dazu, dass ich anhand des Reaktionsnamens, der den Quadranten in der die Reaktion eingezeichnet ist, im Namen enthält, jedesmal den jeweiligen Quadranten auf der Biochemical Pathway Map nach dem passenden Enzymnamen bzw. EC-Nummer durchsuchen musste. Allerdings ist auch dies nicht einfach, denn es gibt teilweise mehr als nur

eine Bezeichnung für ein Enzym. Wenn ich dann einen Überblick über alle Reaktionen eines Stoffwechselweges auf der Karte hatte, konnte ich erst sagen, was genau in diesem Stoffwechselweg passierte. Dies machte die Auswertung der Stoffwechselwegsvergleiche der einzelnen Bakteriengruppen sehr zeitaufwendig.

Bei den Pathway Tools machte mir die Entscheidung, welche Stoffwechselwege nun wirklich in den untersuchten Bakterien vorhanden sind, die meisten Probleme. Denn die Pathway Tools sind sehr sensitiv eingestellt, was dazu führt, dass man einige falsch-positive Treffer, wie z.B. Stoffwechselwege, die nur in Pflanzen vorkommen oder sehr unvollständige Stoffwechselwege, bekommt. Man muss dann einiges an Zeit für die Recherche aufwenden, um zu klären, welche Stoffwechselwege bestimmt nicht in dem jeweiligen Bakterium vorkommen können. Zusätzlich enthält die MetaCyc-Datenbank eine Vielzahl von Stoffwechselwegen, die als ähnliche Varianten vorliegen, was dazu führt, dass man nun herausfinden muss, welche dieser Varianten am wahrscheinlichsten im Organismus vorkommt, was wieder zeitaufwendig ist.

Ein Problem, das bei der Benutzung von PathKEGG auftreten wird, ist dass jeder Stoffwechselweg der KEGG Pathway-Datenbank zum Einfärben verwendet werden kann, egal ob dieser Stoffwechselweg für ein untersuchtes Bakterium Sinn macht oder nicht. Ein Stoffwechselweg der keinen Sinn macht, wäre z.B. die KEGG-Map für Typ 1 Diabetes. Da aber mein Programm nur zum Einfärben von vorhandenen Enzymen eines Stoffwechselweges gedacht ist, war nie die Anforderung da, einen Algorithmus zu entwickeln, welcher entscheidet, ob ein KEGG-Stoffwechselwege in einem Bakterium vorhanden ist oder nicht. Dafür gibt es bereits Programme wie MetaboloMIPS oder die Pathway Tools. Ein weiteres Problem, das für zukünftige Anwendungen meines PathKegg-Programm gelöst werden muss, ist dass ich die Daten über Namen und Zusammensetzung der Stoffwechselwege und die Zuordnung von Gennamen und EC-Nummer zu den KEGG-Orthology ID's aus den KEGG-Flatfiles heraus ziehe. Ich entschloss mich für diese Vorgehen, weil der KEGG-Webservice für Abfragen dieser Art zu langsam war. Allerdings sind die Daten in diesen Dateien nicht mehr die aktuellsten, was daran lag, dass ich die Dateien von Hand herunterladen musste, weil das Spiegeln immer nach ca. 25% ohne erklärable Gründe abbrach. Deshalb sollten sie nicht nur aktualisiert werden, sondern es sollte auch versucht werden, eine fortlaufende Spiegelung dieser Daten erfolgen zu lassen. Diese Daten könnten auch in eine Datenbank übernommen werden, und somit der Zugriff auf die Dateien durch einen Datenbankzugriff ersetzt werden. Dies könnte zu einen Zeitgewinn führen, wenn das Programm von mehreren Benutzern gleichzeitig benutzt wird.

Ein Problem bei der Transportervorhersage war, dass ich den Standart E-Value bis welchem die Blast-Treffer angezeigt werden sollen, auf 10 beließ anstatt ihn auf meinen Wert von 0,001 zu verringern. Dies führte dazu das ich sehr viele Treffer bekam, die ich dann nochmal in Augenschein nehmen musste, nur um diejenigen unter einen Wert von 0,001 finden zu können. Dies führte dazu, dass die Auswertung der Blast-Hits bei der Transportervorhersage sehr zeitaufwendig wurde.

5.3.2 Weiterentwicklungsmöglichkeiten

Das von mir entwickelte PathKEGG-Programm wird weiterhin von den Biologen des Fachbereich Mikrobielle Ökologie der Universität Wien verwendet, und wird bald als ein zusätzliches Feature in der von Patrick Tischler im Zuge seiner Doktorarbeit geschaffenen Chlamydien-Datenbank einer breiten Menge von Chlamydienforschern zugänglich sein. Man könnte es vielleicht auch irgendwann einmal in MetaboloMIPS bzw. in Pedant3 integrieren.

Zu MetaboloMIPS muss man sagen, dass es bis jetzt nur zur internen Verwendung geeignet ist, aller-

dings ist es vorstellbar, dass man MetaboloMIPS nach einer gründlichen Überarbeitung veröffentlichen könnte, oder es zumindestens in Pedant3 integrieren könnte. Ich glaube, dass sich MetaboloMIPS gegen die Pathway Tools behaupten könnte. Bei der Überarbeitung muss auf jeden Fall die Benutzeroberfläche umgestaltet werden, weil die Anordnung der Listen nicht optimal ist, und außerdem sollte im Html-Code der Webseite keinerlei Informationen über die Datenbanknamen, Passwort und Benutzername für die Abfrage der Pedant-Datenbank enthalten sein. Diese Informationen könnte man leicht in eine XML-Konfiguration Datei auslagern. Außerdem wäre es gut, wenn man die Datengrundlage von der BioPath-Datenbank auf die MetaCyc-Datenbank umstellt. Dies würde die Datengrundlage nicht nur beträchtlich erhöhen, sondern auch die Aktualität von MetaboloMIPS erhöhen, denn im Gegensatz zur BioPath-Datenbank wird die MetaCyc-Datenbank regelmäßig aktualisiert. Die Anbindung von MetaCyc ist ohne weiteres möglich und wurde bereits vor einiger Zeit von Gabi Kastenmüller ausprobiert. Außerdem sollte die Darstellung der Stoffwechselwege mit Hilfe des JavaScripts entweder mit der KEGG-Maps oder MetaCyc-Maps ersetzt werden oder zumindest nicht mehr über JavaScript verwirklicht werden. Denn einerseits sperren viele Administratoren JavaScript, was dazu führt, dass ein Teil der zukünftigen Benutzer dieses Feature nicht verwenden können, und andererseits ist es sehr rudimentär. Das Anzeigen der Orf's in MetaboloMIPS sollte auf die Pedant3-Datenbank umgestellt werden, weil bis jetzt versucht MetaboloMIPS auf Pedant2 zu zugreifen, wenn man mehr Informationen von MetaboloMIPS zu den Orfs anfordert, egal ob die Daten der Enzyme bzw. Orf's aus Pedant3 bzw. Pedant2 stammen. Auch sollte das Zeitproblem gelöst werden, denn für eine Webanwendung ist eine benötigte Zeit von 15 Stunden für einen Vergleich der Stoffwechselwege von 15 Bakterien zu lange. Außerdem wäre das Anzeigen von zusätzlichen Informationen, wie z.B. Literaturverweise oder eine kleine Erklärung, zu den Stoffwechselwege bzw. Enzymen bestimmt noch ein sehr nützliche Erweiterung für MetaboloMIPS.

Meine Methodik für die Erstellung eines möglichen Kultivierungsmediums könnte man in soweit noch erweitern, dass man zu den Vorhersagen der Stoffwechselwege nicht nur die von mir verwendete homologiebasierte Variante benutzt, sondern man könnte vielleicht eine Kombination von *Elementary Flux Modes*, funktionellen Modulen und der Homologiesuche anwenden, um mögliche Stoffwechselwege zu finden. Bei der Bewertung der Ergebnisse der Vorhersagen von Stoffwechselwegen und Transporterproteinen könnte man mit Hilfe zusätzlicher Informationen von Biologen mehr falsch-positive Treffer ausschließen, allerdings erfordert dies mehr Versuche im Labor. Wie richtig meine Vorhersage der Stoffwechselwege der untersuchten Bakterien ist, kann ich erst genauer bewerten, wenn ich ein Feedback für meine Ergebnisse von den Biologen der Universität Wien bekomme. Bisher habe ich nur Antwort auf meine Ergebnisse zu *Ameobophilus asiaticus* bekommen. Diese sind bereits in die Erstellung der Diplomarbeit eingeflossen. Dieses Feedback war sehr positiv, mit Ausnahme von 8 Punkten schienen die Vorhersagen von *Ameobophilus asiaticus* zu stimmen. Wenn sich auch herausstellte, dass die Anwendung des Pathway Hole Fillers der Pathway Tools, nicht immer von Nutzen ist und zu einigen falsch-positiven Treffern führen kann.

5.4 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Bernhard Haubold und Dr. Thomas Rattei. Bei Prof. Haubold möchte ich mich bedanken für die Betreuung seitens der Fachhochschule Weihenstephan, und für die vielen Tipps, die er mir während dieser Zeit gegeben hat. Dr. Rattei gilt mein Dank dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, eine Diplomarbeit am Lehrstuhl zu erstellen, und dass er mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat. An Gabi Kastenmüller geht mein Dank dafür, dass ich Metabolo-

MIPS verwenden durfte, und dass sie mir so manchen Frage beantwortet hat, und bei Problem immer weitergeholfen hat. Mein Dank geht auch an Patrick Tischler und Roland Arnold dafür, dass ich sie noch mit jeder noch so kleinen Frage nerven durfte, und dass sie mir bei so manchen Problem weitergeholfen haben. Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Eva Heinz für die Bereitstellung ihrer Ergebnisse der *Outer Membran Protein*-Analyse von *Parachlamydia acanthamoebae* UV7 für Kontrollzwecke und bei Stephan Schmitz-Esser für die Tipps zum Thema Transportvorhersage und für das Feedback über die Analyse der Stoffwechselwege von *Amoebophilus asiaticus*. Ganz herzlich möchte ich mich noch bei Marion Baur und Stefan Baun für das Korrekturlesen bedanken. Zum Schluß geht mein größter Dank an meine Eltern, die mich immer unterstützt haben und es mir erst ermöglicht haben zu studieren, und deshalb auf so einiges verzichten mussten.

6 Appendix

Um Informationen über die Stoffwechselwege von Bakterien und über Bakterien im Allgemeinen zu finden, verwendete ich die Bücher [3, 44]. Es wurden von mir auch die folgenden Webseiten benutzt um Informationen für meine Diplomarbeit zu finden:

Chlamydien www.chlamydiae.com/

Informationen zu Taxonomie und Bakterien von NCBI www.ncbi.nlm.nih.gov/

KEGG www.genome.jp/kegg/

MetaCyc www.metacyc.org

Metagrowth www.igs.cnrs-mrs.fr/axenic/

Pedant pedant.gsf.de/index.jsp

Tool zur Erstellung des phylogenetischen Baums itol.embl.de/

Wikipedia www.wikipedia.org/

Abbildungsverzeichnis

1	taxonomischer Baum aller untersuchten Bakterien	11
2	Oxidation von Nitrit zu Nitrat	16
3	Oxidation von Ammoniak zu Nitrit	16
4	Ein ClustalW-Sequenzalignment von zwei menschlichen Zinkfingerproteinen	19
5	Ein mit STRING erstelltes funktionelles Modul für L-Serin	20
6	Ein Eintrag aus der KEGG-LIGAND Datenbank	22
7	Eine KEGG-Map für die Glykolyse	23
8	Ausschnitt aus einem mit MetaboloMIPS erstellen PathwayProfile-HTML Dokuments	25
9	Ablauf des <i>Pathway Hole Filler</i> - Programms. Entnommen aus der dazugehörigen Publikation [45].	28

10	Die drei möglichen Funktionsweisen von Carrier-Proteinen: Uniport (I), Symport (II) und Antiport (III)	31
11	Primär aktiver Transport mittels der Natrium-Kalium-Pumpe	31
12	Ausschnitt eines Eintrages der Metagrowth-Datenbank	35
13	Ablaufdiagramm des PathKEGG Programms	39
14	Servlet nach der Berechnung	40
15	Klassendiagramm von MetaboloMIPS (Ausschnitt)	41
16	Überprüfung des Glykogenstoffwechselweges mit den Pathway Tools für alle Nitrifizierer. Am linken Rand sieht man die Namen der untersuchten Bakterien. In den mittleren Spalten sieht man, welche Enzyme des Stoffwechselweges in dem jeweiligen Bakterium vorhanden sind, und welche Reaktion von diesen im Stoffwechselweg katalysiert werden. Rechts befindet sich eine Darstellung der Operons, auf denen die gefundenen Enzyme des Stoffwechselweges zu finden sind.	55
17	Der Aminosäuremetabolismus in <i>Parachlamydia acanthamoebae</i> UV7. Die Abbildungsverweise auf dem Bild verweisen auf die Abbildungen der einzelnen Stoffwechselwege im Kapitel ???.	70
18	Ein Überblick über die Transporter und den Metabolismus von <i>Parachlamydia acanthamoebae</i> UV7	76

Tabellenverzeichnis

1	Liste mit den vorhergesagten Transporterproteinen für Aminosäuren	43
2	Liste mit den vorhergesagten Transporterproteinen für Nukleotide	43
3	Liste mit den vorhergesagten Transporterproteinen für Zucker	44
4	Liste mit den vorhergesagten Transporterproteinen für Antibiotika	45
5	Liste mit Ionenkanäle und Transportern für die Aufnahme von Ionen.	46
6	Liste mit vorhergesagten Outer Membrane Proteinen.	47
7	Liste mit Transportern für verschiedene Moleküle.	48
8	Liste mit allen vorhergesagten Hilfsproteinen.	49
9	Eine Liste der verschiedensten Proteine, die mit Transporter in Verbindung gebracht werden.	50
10	Liste der Chlamydien, für die eine Pathwayanalyse mit den Pathway Tools durchgeführt wurde.	86
11	Liste der Nitrifizierer, für die eine Pathwayanalyse mit den Pathway Tools durchgeführt wurde.	86
12	Liste der untersuchten Bakterien der Gattung Bacteroides, für die eine Pathwayanalyse mit den Pathway Tools durchgeführt wurde.	87
13	Liste mit den vorhergesagten Transporterproteinen, die für die Energiegewinnung genutzt werden.	87

6.1 Anwendung der Pathway Tools

Um für einen bestimmten Organismus eine PGDB Datenbank zu erstellen, benötigt man drei Arten von Dateien. Erstens eine oder mehrere Genbank-Dateien, welche Annotationen (z.B. Proteininformationen

wie EC - Nummern) für z.B. ein Chromosom, Plasmid oder auch nur einen Contigs enthalten, und die dazugehörigen Fasta-Dateien, welche die komplette Sequenz des Contigs bzw. des Chromosoms der entsprechenden Genbank-Datei enthalten. Drittens eine so genannte *genetic-elements.dat* - Datei, welche die Genbank- und Fasta-Dateien einem bestimmten DNA-Molekül (z.B. Chromosom, Plasmid oder Contig) zuordnet, und noch zusätzliche Informationen über dieses DNA-Molekül enthält z.B. Name, ID und, ob es zirkulär ist oder nicht. Um diese Dateien für die privaten Genome der Wiener Kollegen zu erstellen, mußten aber 3 Skripten verwendet werden, da es für diese Genome noch keine Einträge bei Genbank gibt. Das erste Perlskript erstellt eine Genbank-Datei, indem es alle vorhandenen Informationen für ein bestimmtes Contig aus der Pedant3 Datenbank per MySQL Abfrage extrahiert und in das Genbank Format bringt. Das zweite Skript ersetzt ein paar Ausdrücke im Header der Genbank File und das dritte Skript geschrieben in Python, erzeugt aus einer Genbank-File die dazugehörige FASTA - Datei.

Der Ablauf für die Erstellung einer Datenbank sieht wie folgt aus: Als erstes ruft man das Unterprogramm PathoLogic der Pathway Tools Software auf, indem man die entsprechenden Option im Menu Tools anklickt, danach öffnet sich ein neues Fenster, in dessen Menuleiste man nun das Menu Organism auswählt und die Option *Create New* anklickt. Danach wird man gebeten ein paar Informationen zum Organismus anzugeben, wie z.B. der Name, die Taxonomy ID von Genbank, gegebenenfalls den Stamm und man kann zwischen verschiedenen Translation Tabellen wählen. Nachdem man seine Eingabe mit OK bestätigt hat, legt PathoLogic automatisch ein Verzeichnis z.B. *ecocyc/1.0/Input* an, in dieses müssen dann die oben aufgeführten Dateien kopiert werden, damit sie von PathoLogic eingelesen werden können. Nachdem man im Fenster von PathoLogic im Menu Build die Option *Automated Build* ausgewählt hat, läßt PathoLogic alle wichtigen Informationen (z.B. EC-Nummern, Gennamen, Orf's usw.) aus diesen Dateien heraus, und verwendet diese Informationen, um die möglichen Stoffwechselwege vorherzusagen. Dies geschieht dadurch, dass PathLogic versucht, die extrahierten EC-Nummern und Enzymnamen bestimmten Reaktionen zu zuordnen, diese Reaktionen kommen aus der Vergleichsdatenbank MetaCyc. Ein Stoffwechselweg in MetaCyc setzt sich aus mehreren Reaktionen zusammen. Je nachdem wie viele Reaktionen eines Stoffwechselweges vorhanden sind, entscheidet PathoLogic, ob dieser Pathway vorliegt oder nicht. Nachdem die Stoffwechselwegsvorhersage beendet ist, wird die Datenbank gesichert und im Overview Fenster der Pathway Tools angezeigt. Danach hat man die Möglichkeit seine neu erstellte Datenbank zu verfeinern. Dazu gibt es bei PathLogic das Refine Menu. Dort kann man verschiedene Methoden auswählen, z.B. Proteinkomplexe von Hand zu erzeugen, Transkriptionseinheiten vorhersagen zulassen oder die Pathway Hole Filler Methode anzuwenden.

Chlamydien	Genomgröße	Gene	Proteine	Stoffwechselwege
<u>pathogene Chlamydien:</u>				
<i>Chlamydia muridarum</i> Nigg	1.080.451	954	911	51
<i>Chlamydia trachomatis</i> A/HAR-13	1.051.969	961	919	72
<i>Chlamydia trachomatis</i> D/UW-3/CX	1.042.519	939	894	56
<i>Chlamydophila abortus</i> S26/3	1.144.377	1003	961	57
<i>Chlamydophila caviae</i> GPIC	1.181.356	1008	1005	54
<i>Chlamydophila felis</i> Fe/C-56	1.173.791	1054	1013	61
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> AR39	1.229.853	1151	1110	51
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> CWL029	1.230.230	1095	1052	49
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> J138	1.226.565	1107	1069	51
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> TW-183	1.225.935	1154	1113	55
<u>Umweltchlamydien:</u>				
<i>Candidatus Protochlamydia amoebophila</i> UWE25	2.414.465	2075	2031	66
<i>Parachlamydia acanthamoebae</i> UV7	3.072.864	2944	2897	181
<i>Simkania negevensis</i> Z	2.628.375	2562	2523	148
<i>Simkania negevensis</i> Z (von TIGR)	2.628.375	2486	2447	145
<i>Waddlia chondrophila</i>	2.141.577	2036	2036	168

Tabelle 10: Liste der Chlamydien, für die eine Pathwayanalyse mit den Pathway Tools durchgeführt wurde.

Nitrifizierer	Genomgröße	Gene	Proteine	Stoffwechselwege
<u>Nitritoxidierer:</u>				
<i>Candidatus Nitrospira defluvii</i>	4.317.083	4473	4374	203
<i>Nitrobacter hamburgensis</i> X14	5.011.522	4394	4326	174
<i>Nitrobacter winogradskyi</i> Nb-255	3.402.093	3177	3122	212
<u>Ammoniakoxidierer:</u>				
<i>Nitrosococcus oceani</i> ATCC 19707	3.522.111	3073	3019	219
<i>Nitrosomonas europaea</i> ATCC 19718	2.812.094	2622	2574	170
<i>Nitrosomonas eutropha</i> C91	2.781.824	2598	2551	163
<i>Nitrospira multiformis</i> ATCC 25196	3.234.309	2854	2805	147

Tabelle 11: Liste der Nitrifizierer, für die eine Pathwayanalyse mit den Pathway Tools durchgeführt wurde.

Bacteroides	Genomgröße	Gene	Proteine	Stoffwechselwege
<u>untersuchte Bakterien der Gattung Bacteroides</u>				
<i>Candidatus Amoebophilus asiaticus 5a2</i>	1.837.115	1701	1665	86
<i>Bacteroides thetaiotaomicron VPI-5482</i>	6.293.399	4902	4816	170
<i>Bacteroides fragilis YCH46</i>	5.310.990	4717	4625	155
<i>Bacteroides fragilis NCTC 9343</i>	5.241.700	4395	4303	155
<i>Cytophaga hutchinsonii ATCC 33406</i>	4.433.218	3833	3785	168
<i>Porphyromonas gingivalis W83</i>	2.343.476	1974	1909	109
<i>Salinibacter ruber DSM 13855</i>	3.587.328	2881	2833	144

Tabelle 12: Liste der untersuchten Bakterien der Gattung Bacteroides, für die eine Pathwayanalyse mit den Pathway Tools durchgeführt wurde.

trivialer Genname	Funktionalität
DsbD	<i>Disulfide bond oxidoreductase-D</i>
NorBC	<i>Nitric oxide reductase</i> : Teil der anaerobe Atemungskette
Nqr1, Nqr2, Nqr3, Nqr4, Nqr5, Nqr6	Na ⁺ -translocation NADH-quinone reductase
B1603	NAD(P) transhydrogenase subunit alpha
Nqo1 bis Nqo14	NADH dehydrogenase I
cyoA, cyoB, cyoC, cyoD, cyoE	Quinol oxidase
Urc1, CyB, CyA	Ubiquinol:cytochrome C Oxidoreductase
CydB	Cytochrome oxidase
VCA0151	putative oxido-reductase

Tabelle 13: Liste mit den vorhergesagten Transporterproteinen, die für die Energiegewinnung genutzt werden.

Literatur

- [1] Andrew J. D. Simpson et. al. The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Nature*, 406:151–157, 2000.
- [2] Anton J. Enright, Stijn van Dongen and Christos Ouzounis. An efficient algorithm for large-scale detection of protein families. *Nucleic Acids Research*, 30:1575–1584, 2002.
- [3] Garabed Antranikian. *Angewandte Mikrobiologie*. Springer-Verlag, 2005.
- [4] Biomax Informatics AG. *Pedant-Pro Sequence Analysis Suite Administrator Manual*, 3.1 edition, August 2006.
- [5] Christian von Mering et. al. Genome evolution reveals biochemical networks and functional modules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100:15428–433, 2003.
- [6] Christian von Mering et. al. STRING: a database of predicted functional associations between proteins. *Nucleic Acids Research*, 31:258–261, 2003.
- [7] Edward M. Marcotte, Matteo Pellegrini, Ho-Leung Ng, Danny W. Rice, Todd O. Yeates and David Eisenberg. Detecting Protein Function and Protein-Protein Interactions from Genome Sequences. *Science*, 285:751–753, 1999.
- [8] Eliana Gertrudes de Macedo Lemos, Lucia Maria Carareto Alves and Joao Carlos Campanharo. Genomics-based design of defined growth media for the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *FEMS Microbiology Letters*, 219:39–45, 2003.
- [9] Erzsebet Ravasz et. al. Hierarchical Organization of Modularity in Metabolic Networks. *Science*, 297:1551–1555, 2002.
- [10] Ana M. Cerdeno-Tarraga et. al. Extensive DNA Inversions in the *B. fragilis* Genome Control Variable Gene Expression. *Science*, 307:1463–1465, 2005.
- [11] Didier Raoult et. al. *Tropheryma whipplei* Twist: A Human Pathogenic Actinobacteria With a Reduced Genome. *Genome Research*, 13:1800–1809, 2003.
- [12] Donna Karolchik et. al. The UCSC Genome Browser Database. *Nucleic Acids Research*, 31:51–54, 2003.
- [13] Emmanuel F. Mongodin et. al. The genome of *Salinibacter ruber*: Convergence and gene exchange among hyperhalophilic bacteria and archaea. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102:18147–52, 2005.
- [14] Eva Spieck et. al. Selective enrichment and molecular characterization of a previously uncultured 'nitrospira'-like bacterium from activated sludge. *Environmental Microbiology*, 8:405–415, 2006.
- [15] Fred R. Rurangirwa et. al. Analysis of the 16S rRNA gene of micro-organism WSU 86-1044 from an aborted bovine foetus reveals that it is a member of the order *Chlamydiales*: proposal of *Waddliaceae* fam. nov., *Waddlia chondrophila* gen. nov., sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 4:577–581, 1999.

- [16] Gary Xie et. al. Genome Sequence of the Cellulolytic Gliding Bacterium *Cytophaga hutchinsonii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73:3536–3546, 2007.
- [17] Ian Chopra et. al. Antibiotics, peptidoglycan synthesis and genomics: the chlamydial anomaly revisited. *Microbiology*, 144:2673–2678, 1998.
- [18] Ilka Haferkamp et. al. A candidate NAD transporter in an intracellular bacterial symbiont related to *Chlamydiae*. *Nature*, 432:622–625, 2005.
- [19] Jeanette M. Norton et. al. Diversity of ammonia monooxygenase operon in autotrophic ammonia-oxidizing bacteria. *Archives of Microbiology*, 177:139–149, 2002.
- [20] Jian Xu et. al. A Genomic View of the Human-*Bacteroides thetaiotaomicron* Symbiosis. *Science*, 299:2074–2076, 2003.
- [21] Karen E. Nelson et. al. Complete Genome Sequence of the Oral Pathogenic Bacterium *Porphyromonas gingivalis* Strain W83. *Journal of Bacteriology*, 185:5591–5601, 2003.
- [22] Lisa Y. Stein et. al. Whole-genome analysis of the ammonia-oxidizing bacterium, *Nitrosomonas eutropha* C91: implications for niche adaptation. *Environmental Microbiology*, 9:2993–3007, 2007.
- [23] M. Louise Riley et. al. PEDANT genome database: 10 years online. *Nucleic Acids Research*, 35:354–357, 2007.
- [24] Martin G. Klotz et. al. Complete Genome Sequence of the Marine, Chemolithoautotrophic Ammonia-Oxidizing Bacterium *Nitrosococcus oceani* ATCC 19707. *Applied And Environmental Microbiology*, 72:6299–6315, 2003.
- [25] Martin Reitz et. al. Enabling the exploration of biochemical pathways. *Organic And Biomolecular Chemistry*, 2:3226–3237, 2004.
- [26] Matthias Horn et. al. Members of the Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides phylum as intracellular bacteria of acanthamoebae: proposal of 'Candidatus Amoebophilus asiaticus'. *Environmental Microbiology*, 3:440–449, 2001.
- [27] Matthias Horn et. al. Illuminating the evolutionary history of chlamydiae. *Science Magazine*, 304:728–730, 2004.
- [28] Michael Schlame et. al. The biosynthesis and functional role of cardiolipin. *Progress in Lipid Research*, 39:257–288, 2000.
- [29] Minoru Kanehisa et. al. From genomics to chemical genomics: developments in KEGG. *Nucleic Acids Research*, 34:354–357, 2006.
- [30] Mutsunori Shirai et. al. Comparison of whole genome sequences of *Chlamydia pneumoniae* J138 from Japan and CWL029 from USA. *Nucleic Acids Research*, 28:2311–2314, 2000.
- [31] Nicholas R. Thomson et. al. The *Chlamydophila abortus* genome sequence reveals an array of variable proteins that contribute to interspecies variation. *Genome Research*, 15:629–640, 2005.

- [32] Patricia Renesto et. al. Genome-based design of a cell-free culture medium for *Tropheryma whippelii*. *The Lancet*, 362:447–449, 2003.
- [33] Patrick Chain et. al. Complete Genome Sequence of the Ammonia-Oxidizing Bacterium and Obligate Chemolithoautotroph *Nitrosomonas europaea*. *Journal of Bacteriology*, 185:2759–2773, 2003.
- [34] Peter D. Karp et. al. Expansion of the BioCyc collection of pathway/genome databases to 160 genomes. *Nucleic Acids Research*, 33:6083–6089, 2005.
- [35] Richard S. Stephens et. al. Genome Sequence of an Obligate Intracellular Pathogen of Humans: *Chlamydia trachomatis*. *Science Magazine*, 282:754–759, 1998.
- [36] Ron Caspi et. al. MetaCyc: a multiorganism database of metabolic pathways and enzymes. *Nucleic Acids Research*, 34:511–515, 2006.
- [37] Shawn R. Starkenburg et. al. Genome Sequence of the Chemolithoautotrophic Nitrite-Oxidizing Bacterium *Nitrobacter winogradskyi* Nb-255. *Applied And Environmental Microbiology*, 72:2050–2063, 2006.
- [38] Stephen F. Altschul et. al. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215:403–410, 1990.
- [39] Sue Kalman et. al. Comparative genomes of *Chlamydia pneumoniae* and *C. trachomatis*. *Nature Genetics*, 21:385–389, 1999.
- [40] Timothy A. Hovanec et. al. Nitrospira'-like bacteria associated with nitrite oxidation in freshwater aquaria. *Applied And Environmental Microbiology*, 64:258–264, 1998.
- [41] Timothy D. Read et. al. Genome sequences of *Chlamydia trachomatis* MoPn and *Chlamydia pneumoniae* AR39. *Nucleic Acids Research*, 28:1397–1406, 2000.
- [42] Timothy D. Read et. al. Genome sequence of *Chlamydophila caviae* (*Chlamydia psittaci* GPIC): examining the role of niche-specific genes in the evolution of the *Chlamydiaceae*. *Nucleic Acids Research*, 31:2134–2147, 2003.
- [43] Yoshinao Azuma et. al. Genome sequence of the cat pathogen, *Chlamydophila felis*. *DNA Research*, 13:15–23, 2006.
- [44] Georg Fuchs. *Allgemeine Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag, 2007. Begruendet von Hans G. Schlegel.
- [45] Michelle L. Green and Peter D. Karp. A Bayesian method for identifying missing enzymes in predicted metabolic pathway databases. *BMC Bioinformatics*, 5:76–92, 2004.
- [46] Heather Panek and Mark R. O'Brian. A whole genome view of prokaryotic haem biosynthesis. *Microbiology*, 148:2273–2282, 2002.
- [47] Huizhou Fan, Robert C. Brunham, and Grant McClarty. Acquisition and Synthesis of Folates by Obligate Intracellular Bacteria of the Genus *Chlamydia*. *The Journal of Clinical Investigation*, 90:1803–1811, 1992.

- [48] Jens Aamand, Thomas Ahl, and Eva Spieck. Monoclonal antibodies recognizing nitrite oxidoreductase of *Nitrobacter hamburgensis*, *N. winogradskyi*, and *N. vulgaris*. *Applied And Environmental Microbiology*, 62:2352–2355, 1996.
- [49] John H. Carlson, Stephan F. Procella, Grant McClarty and Harlan D. Caldwell. Comparative Genomic Analysis of *Chlamydia trachomatis* Oculotropic and Genitotropic Strains. *Infection and Immunity*, 73:6407–6418, 2005.
- [50] Grant M. Hatch John L. Wylie and Grant McClarty. Host Cell Phospholipids Are Trafficked to and Then Modified by *Chlamydia trachomatis*. *Journal of Bacteriology*, 179:7233–7242, 1997.
- [51] Julie D. Thompson, Desmond G. Higgins and Toby J. Gibson. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22:4673–4680, 1994.
- [52] Elmar L. Kannenberg and Karl Poralla. Hopanoid Biosynthesis and Function in Bacteria. *Naturwissenschaften*, 86:168–176, 1999.
- [53] Karin D. E. Everett, Robin M. Bush and Arthur A. Andersen. Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of *Parachlamydiaceae* fam. nov. and *Simkaniaceae* fam. nov., each containing one monotypic genus, revised taxonomy of the family *Chlamydiaceae*, including a new genus and five new species, and standards for the identification of organisms. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49:415–440, 1999.
- [54] Gabi Kastenmueller. Analysis of Metabolic Networks Based on Annotated Genomes. unpublished, 2005.
- [55] Eugene V. Koonin. Orthologs, Paralogs, and Evolutionary Genomics. *Annual Review of Genetics*, 39:309–338, 2005.
- [56] Leland H. Hartwell, John J. Hopfield, Stanislas Leibler and Andrew W. Murray. From molecular to modular cell biology. *Nature*, 402:C47–C52, 1999.
- [57] Matteo Pellegrini, Edward M. Marcotte, Michael J. Thompson, David Eisenberg and Todd O. Yeates. Assigning protein functions by comparative genome analysis: Protein phylogenetic profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96:4285–4288, 1999.
- [58] Grant McClarty. *Chlamydia: Intracellular Biology, Pathogenesis, and Immunity*, pages 69–100. American Society for Microbiology, 1999.
- [59] Michael S. Rappe and Stephan J. Giovannoni. The uncultured microbial majority. *Annual Review of Microbiology*, 57:369–394, 2003.
- [60] Milton H. Saier. A Functional-Phylogenetic Classification System for Transmembrane Solute Transporters. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64:354–411, 2000.
- [61] Milton H. Saier, Can V. Tran, Ravi D. Barabote. TCDB: the Transporter Classification Database for membrane transport protein analyses and information. *Nucleic Acids Research*, 34:181–186, 2006.

- [62] James W. Moulder. Why is Chlamydia sensitive to penicillin in the absence of peptidoglycan? *Infectious agents and disease*, 2:87–99, 1993.
- [63] Hiroyuki Ogata and Jean-Michel Claverie. Metagrowth: a new resource for the building of metabolic hypotheses in microbiology. *Nucleic Acids Research*, 33:321–324, 2005.
- [64] Suzanne M. Paley and Peter D. Karp. Evaluation of computational metabolic-pathway predictions for Helicobacter pylori. *BMC Bioinformatics*, 18:715–724, 2002.
- [65] Laurent Philippot. Denitrifying genes in bacterial and Archaeal genomes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1577:355–376, 2002.
- [66] Qinghu Ren, Kaixi Chen and Ian T. Paulsen. TransportDB: a comprehensive database resource for cytoplasmic membrane transport systems and outer membrane channels. *Nucleic Acids Research*, 35:274–279, 2007.
- [67] Qinghu Ren and Ian T. Paulsen. Large-Scale Comparative Genomic Analyses of Cytoplasmic Membrane Transport Systems in Prokaryotes. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 12:165–179, 2007.
- [68] Manuel Rodriguez-Concepcion and Albert Boronat. Elucidation of the Methylerythritol Phosphate Pathway for Isoprenoid Biosynthesis in Bacteria and Plastids. A Metabolic Milestone Achieved through Genomics. *Plant Physiology*, 130:1079–1089, 2002.
- [69] Saul B. Needleman, SB and Christian D. Wunsch. A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *Journal of Molecular Biology*, 48:443–453, 1970.
- [70] Stephan Schmitz-Esser and Christian Hainzinger. Private correspondence, 2008. per email.
- [71] Richard S. Stephens. *Chlamydia: Intracellular Biology, Pathogenesis, and Immunity*, pages 9–27. American Society for Microbiology, 1999.
- [72] Celia White Tabor and Herbert Tabor. Polyamines in Microorganisms. *Microbiological Reviews*, 49:81–99, 1985.
- [73] Takuji Yamada, Minoru Kanehisa and Susumu Goto. Extraction of phylogenetic network modules from the metabolic network. *BMC Bioinformatics*, 7:130–139, 2006.
- [74] Tammi Kaeberlein, Kim Lewis and Slava S. Epstein. Isolating 'Uncultivable' Microorganisms in Pure Culture in a Simulated Natural Environment. *Science*, 296:1127–1129, 2002.
- [75] Temple F. Smith, Michael S. Waterman. Identification of Common Molecular Subsequences. *Journal of Molecular Biology*, 147:195–197, 1981.
- [76] Thomas Dandekar, Berend Snela, Martijn Huynena and Peer Bork. Conservation of gene order: a fingerprint of proteins that physically interact. *Trends in Biochemical Sciences*, 23:324–328, 1998.

- [77] Victor Spirin, Mikhail S. Gelfand, Andrey A. Mironov and Leonid A. Mirny. A metabolic network in the evolutionary context: Multiscale structure and modularity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103:8774–8779, 2006.
- [78] Yves Gagnon, Lucille Lacoste, Nathalie Champagne and Jacques Lapointe. Widespread Use of the Glu-tRNA^{Gln} Transamidation Pathway among Bacteria. A MEMBER OF THE α PURPLE BACTERIA LACKS GLUTAMINYL-tRNA SYNTHETASE. *Journal of Biological Chemistry*, 271:14856–63, 1996.