

1 ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Arbeit wurden polyklonale Antikörper gegen die A- und die B-Untereinheit der Ammoniakmonooxygenase (AMO) von *Nitrosomonas eutropha* hergestellt. Die AmoA-Antikörper wurden mit Hilfe eines AmoA-Oligopeptids gewonnen. Die Herstellung der AmoB-Antikörper erfolgte über die Isolierung des AmoB-Proteins.

Die Antikörper dienten immunologischen Untersuchungen ganzer Zellen von Ammoniakoxidanten und der Isolierung und Charakterisierung der AMO.

Beide Antiseren waren spezifisch für die AMO-Untereinheiten der Ammoniakoxidanten. Im Immunblot detektierten die AmoA-Antikörper das AmoA-Protein von vier Arten der Gattung *Nitrosomonas*. Die AmoB-Antikörper markierten dagegen das AmoB-Protein aller getesteten Ammoniakoxidanten der β -Proteobakterien. Beide Antikörper reagierten nicht mit der AMO der Ammoniakoxidanten der γ -Proteobakterien sowie mit den Proteinen der Methanoxidanten, Nitritoxidanten und weiteren getesteten Bakterien.

Mit Hilfe der Antikörper wurde der prozentuale Anteil der AMO-Untereinheiten am Gesamtprotein von *Nitrosomonas eutropha* bestimmt. Die A- und B-Untereinheiten kamen in den Zellen in etwa im Verhältnis 1:1 vor. Der AMO-Gehalt war abhängig von der Substratkonzentration. Zellen, die mit wenig Ammonium gewachsen waren, enthielten deutlich mehr AMO als Zellen, die mit viel Substrat angezogen wurden. Außerdem war die Anzahl der intracytoplasmatischen Membranen in den Ammoniummangelzellen erhöht.

In hungernden Zellen, die lange Zeit ohne Ammonium gestanden hatten, wurde bis zu einem Jahr nach dem Ammoniumverbrauch noch AMO nachgewiesen. Der AMO-Gehalt korrelierte nicht mit der Ammoniakoxidationsaktivität.

Weiterhin konnten ammoniakoxidierende Zellen in Reinkulturen mit Hilfe der Immunfluoreszenz (IF)-Färbung sichtbar gemacht werden. Die Gattung *Nitrosomonas* reagierte mit beiden Antiseren. Dagegen wurden die übrigen Gattungen der Ammoniakoxidanten nur mit den AmoB-Antikörpern detektiert. Die Fluoreszenzsignale traten bei allen Gattungen in Verbindung mit den Cytoplasmamembranen auf. Dadurch konnten die morphologischen Zelltypen der einzelnen Gattungen unterschieden werden. Die IF-Färbung ermöglichte eine eindeutige Zuordnung von Neuisolaten zu einer bestehenden Gattung der Ammoniakoxidanten.

Neben der Anwendung der Antiseren in Reinkulturen wurden Ammoniakoxidanten mit der IF-Färbung auch in Anreicherungskulturen nachgewiesen. In Anreicherungen von Belebtschlamm und Sandsteinproben dominierte die Gattung *Nitrosomonas*. In Anreicherungen von Teichsediment und Boden wurden überwiegend Vertreter der Gattungen *Nitrospira*, *Nitrosolobus* und *Nitrosovibrio* detektiert.

Mit den AmoB-Antikörpern war ein immuncytochemischer Nachweis der AmoB in Ultradünnschnitten von Ammoniakoxidanten möglich. Die AmoB von *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira* und *Nitrosovibrio* wurde stets in der Zellperipherie in Nähe der äußeren Cytoplasmamembran markiert. Die Immungoldmarkierung der AmoB trat nur selten in Verbindung mit den intracytoplasmatischen Membranen (ICMs) von *Nitrosomonas* und *Nitrosococcus* auf. Dagegen wurden die AmoB in Zellen von *Nitrosolobus* auch an den ICMs detektiert.

Die Antiseren ermöglichten die Isolierung der AMO. Die AMO-Untereinheiten wurden während der Reinigung der AMO mittels Ionenaustauschchromatographie und anschließender Gradientenzentrifugation mit Hilfe der Antiseren identifiziert. Das Enzym wies sowohl unter oxischen Bedingungen mit O_2 als auch unter anoxischen Bedingungen in Gegenwart von N_2O_4 Ammoniakoxidationsaktivität auf. Wurde die AMO in Abwesenheit von Sauerstoff isoliert, so wurde das Enzym durch O_2 , nicht jedoch durch N_2O_4 vollständig gehemmt.

Die aufgereinigte AMO wurde charakterisiert. In der nativen Gelelektrophorese wurden vorwiegend Dimere und Trimere des AMO-Heterodimers (A_nB_n) detektiert. Die isolierte AMO enthielt Kupfer jedoch kein Eisen. In elektronenmikroskopischen Untersuchungen der AMO waren Partikel einheitlicher Größe sichtbar.

Mit Hilfe der gewonnenen Erkenntnisse über die Eigenschaften des Enzyms konnte ein Modell der Enzymreaktion der AMO entwickelt werden.