



Doctoral Thesis

Sulfate ester utilization in *Pseudomonas*

Author(s):

Kahnert, Antje Maren

Publication Date:

2001

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004281617> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH Nr.14469

SULFATE ESTER UTILIZATION IN *PSEUDOMONAS*

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY
for the degree of
DOCTOR OF NATURAL SCIENCE

presented by
ANTJE MAREN KAHNERT
Dipl. Natw. ETH

born on February 28th, 1973
from Germany

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. Th. Leisinger, examiner
Prof. Dr. H. Hennecke, co-examiner
PD Dr. M. Kertesz, co-examiner

2001

Summary

Bacteria can utilize a broad variety of sulfur-containing compounds as sources of sulfur for growth. In the absence of preferred sulfur sources such as inorganic sulfate, cysteine or thiocyanate, several prokaryotic species synthesize a special set of proteins, the sulfate-starvation induced stimulon (SSIS), which enables them to scavenge traces of sulfate and mobilize organically bound sulfur. A major part of the SSI proteins comprises transporters as well as transcriptional regulators and enzymes that allow the assimilation of sulfur from sulfate esters (C-O-SO₃H) and sulfonates (C-SO₃H). The sewage sludge isolate *Pseudomonas putida* S-313 is the most versatile among the subjects of investigation of aerobic bacterial organosulfur assimilation. Like *Escherichia coli*, it is able to utilize a broad range of aliphatic sulfonates as sulfur sources, but it is additionally capable of desulfurizing aromatic sulfonates, as well as aliphatic and aromatic sulfate esters.

This work contains the identification of the *ssu* gene cluster in *P. putida* S-313. Like its counterpart in *E. coli*, it encodes an ABC-type transporter for the uptake of aliphatic sulfonates (SsuABC), together with a two-component desulfonative monooxygenase system. The latter consists of the FMNH₂-dependent desulfonative monooxygenase SsuD and the NADPH:FMN reductase SsuE. However, in *P. putida*, the *ssuED* genes are additionally required for growth with aromatic sulfonates, and it has been shown elsewhere that the oxygenase SsuD exhibits a different substrate range than the corresponding *E. coli* enzyme. Another difference between the *P. putida* *ssu* cluster and its counterpart in *E. coli* consisted in the presence of an additional open reading frame, encoding the SsuF protein. SsuF was strongly expressed when the cells grew with sulfonates as the sulfur source, and showed sequence similarity to clostridial molybdopterin-binding proteins. It was not only required for growth with aromatic and aliphatic sulfonates, but also with aromatic and aliphatic sulfate esters.

Transposon mutagenesis of *P. putida* S-313 and subsequent screening for the loss of the ability to utilize aromatic sulfate esters led to the identification of a second gene cluster (the *ats-sft* cluster) encoding further SSI proteins. The cytoplasmic sulfotransferase AstA was found to catalyse the first step in arylsulfurization by

transferring the sulfate moiety from aromatic sulfate esters to an unknown in vivo acceptor. Growth with aliphatic sulfate esters such as hexylsulfate (HS) and sodium dodecylsulfate (SDS) required the presence of the α -ketoglutarate dependent dioxygenase AtsK. The purified AtsK enzyme catalysed oxygenolytic cleavage of aliphatic sulfate esters to sulfate and the corresponding aldehydes, with the concomitant oxidation of α -ketoglutarate to succinate and carbon dioxide. Enzyme activity was dependent on Fe^{2+} . Unlike most other characterised α -ketoglutarate-dependent dioxygenases, AtsK accepted a range of α -ketoacids as co-substrates, including α -ketoglutarate (K_m 140 μM), α -ketoadipate, α -ketovalerate and α -ketoctanoate. The K_m values for hexylsulfate and SDS were 40 and 34 μM , respectively.

The *ats-sft* genes further encoded an ABC-type transporter (AtsRBC). While the ATPase component (AtsC) and the integral membrane component (AtsB) were required for growth with both aromatic and aliphatic esters and aromatic sulfonates, the periplasmic binding protein (AtsR) was only required for growth with aromatic and aliphatic sulfate esters. The product of a gene (*sftP*) cotranscribed with the sulfotransferase gene *astA* displayed sequence similarity to TonB-dependent receptors and was identified among outer membrane proteins. A further reading frame in the *ats-sft* cluster encoded the LysR-type regulator SftR. Expression of *sftR* was strongly upregulated when the cells grew with aromatic and aliphatic sulfonates and sulfate esters, as well as during growth with methionine. Similarly, expression of *atsK*, *astA*, and *atsB* was strongly induced during growth with all types of sulfonates and sulfate esters, but, when the cells grew with methionine, no upregulation was observed. An SftR mutant (PH18) was no longer able to grow with any type of sulfate esters, and the presence of SftR was required for upregulation of expression of *atsK*, *astA*, and *atsB* during growth with aliphatic sulfonates, but not aromatic sulfonates. Initial studies demonstrated that the mutant PH18 was impaired in survival in different bulk and rhizosphere soils, in comparison to the wildtype.

It was known at the beginning of this work that in *Pseudomonas aeruginosa* PAO, aromatic sulfate ester desulfurization is catalysed by the arylsulfatase AtsA. Unlike the sulfotransferase in *P. putida*, AtsA hydrolytically liberates sulfate from arylsulfate esters without requiring an acceptor. The X-ray structure of AtsA was solved, which clarified

the general hydrolytic sulfate ester cleavage reaction mechanism. It was demonstrated that a 2-amino-3-oxo-propionic acid residue, which had previously been shown to be generated by posttranslational modification of a cysteine residue, is present in the hydrated form in the active site of the resting enzyme. Sulfate ester cleavage occurs by a nucleophilic attack of one of the hydroxyl groups of the hydrated aldehyde on the ester sulfur atom. The posttranslational modification mechanism, which is a prerequisite for sulfatase activity, remains unknown.

Zusammenfassung

Prokaryoten sind in der Lage, mit einer breiten Palette von verschiedenen Schwefelverbindungen zu wachsen. In Abwesenheit von bevorzugten Schwefelquellen wie Sulfat, Cystein oder Thiocyanat synthetisieren viele Bakterienarten einen Satz von Proteinen, das SSIS (sulfate-starvation induced stimulon), der es ihnen erlaubt, letzte Spuren von Sulfat mit erhöhter Effizienz aufzunehmen und gleichzeitig alternative Schwefelquellen zu erschliessen, in denen der Schwefel organisch gebunden vorliegt. Das SSIS enthält Transportsysteme, Regulatoren und eine Reihe von Enzymen, die es erlauben, den Schwefel aus Sulfonaten ($C-SO_3H$) und Sulfatestern ($C-O-SO_3H$) abzuspalten und in den Sulfatassimilationsweg einzuspeisen.

Im Klärschlammissolat *Pseudomonas putida* S-313 ist bisher die grösste Vielfalt an Abbauwegen für organische Schwefelverbindungen unter aeroben Bedingungen gefunden worden. Wie *Escherichia coli* ist der Stamm in der Lage mit aliphatischen Sulfonaten als Schwefelquelle zu wachsen. Zusätzlich kann er jedoch den Schwefel auch aus den stabilen aromatischen Sulfonaten sowie aus aliphatischen und aromatischen Sulfatestern abspalten.

In dieser Arbeit sind die *ssu* Gene in *P. putida* S-313 identifiziert worden. Wie in *E. coli* codieren sie für einen Transporter des ABC-Typs, der die Aufnahme von Alkylsulfonaten katalysiert (SsuABC), sowie für ein desulfonierendes Zweikomponenten-Monooxygenase-System. Dabei ist SsuD eine falvinabhängige Sulfonatase, die aus Sulfonaten oxygenolytisch Sulfit freisetzt. Die NADPH-abhängige FMN-Reduktase SsuE liefert das benötigte $FMNH_2$. Die SsuED-Proteine sind in *P. putida* jedoch zusätzlich für Wachstum mit Arylsulfonaten notwendig, und es ist unabhängig von dieser Arbeit gezeigt worden, dass die Sulfonatase aus diesem Bakterium ein anderes Substratspektrum aufweist als diejenige aus *E. coli*. Ein weiterer Unterschied zwischen den *ssu* Genclustern dieser beiden Arten ist das Vorhandensein eines zusätzlichen offenen Leserasters in *P. putida*, welches für das SsuF-Protein codiert. Die Expression von SsuF ist während des Wachstums mit Sulfonaten als Schwefelquelle stark aufreguliert, und die Aminosäuresequenz des Proteins zeigt Ähnlichkeit zu Molybdopterin-Bindeproteinen aus *Clostridium*. SsuF wird sowohl für das Wachstum mit

aliphatischen und aromatischen Sulfonaten als auch mit Sulfatestern beiden Typs gebraucht.

Transposonmutagenese von *P. putida* S-313 mit anschließender Auswahl von Klonen, welche die Fähigkeit zur Spaltung von Arylsulfatestern verloren hatten, führte zur Entdeckung einer Gruppe von Genen (das *ats-sft* Cluster), die für weitere SSI-Proteine codieren. Die cytoplasmatische Sulfotransferase AstA katalysiert den ersten Schritt in der Assimilation von Arylsulfatestern. Sie überträgt das Sulfat von diesen Verbindungen auf einen bislang unbekanntem Akzeptor. Voraussetzung für das Wachstum mit aliphatischen Sulfatestern wie Hexylsulfat (HS) und Natriumdodecylsulfat (SDS) hingegen ist das Vorhandensein der α -Ketoglutarat-abhängigen Dioxygenase AtsK. Das gereinigte Enzym katalysiert die Spaltung von Alkylsulfaten zu Sulfat und den entsprechenden Aldehyden. Damit einhergehend wird α -Ketoglutarat unter Abspaltung von Kohlendioxid zu Succinat oxidiert. Die Aktivität des Enzyms ist Eisen(II)-abhängig. Im Unterschied zu den bisher charakterisierten α -Ketoglutarat-abhängigen Dioxygenasen akzeptiert AtsK neben α -Ketoglutarat (K_m 140 μ M) eine Reihe von weiteren 2-Oxosäuren als Cosubstrate, wie α -Keto adipat, α -Ketovalerat und α -Keto octanoat. Die K_m -Werte für Hexylsulfat und Natriumdodecylsulfat betragen 40 bzw. 34 μ M.

Weiterhin kodieren die *ats-sft*-Gene für einen Transporter des ABC-Typs (AtsRBC). Während dessen ATPase (AtsC) und Membrankomponente (AtsB) sowohl für Wachstum mit aliphatischen und aromatischen Sulfatestern als auch für die Verwertung von Arylsulfonaten notwendig sind, wird das periplasmatische Bindeprotein (AtsR) nur für die Verwertung von Sulfatestern beiden Typs gebraucht. Es wurde ausserdem ein Gen (*sftP*) identifiziert, welches mit dem die Sulfotransferase kodierenden Gen (*astA*) transkribiert wird. Das SftP-Protein weist Ähnlichkeit zu TonB-abhängigen Rezeptoren auf und wurde in einer Präparation von Proteinen der äusseren Membran identifiziert. Ein weiteres offenes Leseraster des *ats-sft*-Genclusters kodiert den LysR-Typ Regulator SftR. Die Expression von *sftR* ist während des Wachstums mit aliphatischen und aromatischen Sulfonaten und Sulfatestern sowie mit Methionin aufreguliert. Ebenso sind *atsK*, *astA* und *atsB* induziert wenn die Zellen Sulfonate und Sulfatester beiden Typs verwerten. Bei Wachstum mit Methionin wurde jedoch keine Aufregulation beobachtet. Die SftR-Mutante PH18 ist nicht in der Lage, aliphatische und aromatische Sulfatester zu

verwerten, und die Anwesenheit von SftR ist für die Aufregulation von *atsK*, *astA* und *atsB* notwendig, wenn aliphatische, jedoch nicht, wenn aromatische Sulfonate verwertet werden. Erste Studien zeigten, dass die PH18 in verschiedenen Böden sowohl in der Rhizosphäre als auch in Abwesenheit einer Pflanze weniger überlebensfähig war als der Wildtyp.

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass die Spaltung aromatischer Sulfatester in *Pseudomonas aeruginosa* PAO von der Arylsulfatase AtsA katalysiert wird. Im Unterschied zu der Sulfotransferase aus *P. putida* benötigt dieses Enzym keinen Akzeptor, sondern setzt hydrolytisch Sulfat aus diesen Verbindungen frei. Die Aufklärung der Struktur des Enzyms erlaubte es, den allgemeinen Mechanismus der aromatischen Sulfatesterspaltung zu lösen. Im aktiven Zentrum des Enzyms lag der 2-Amino-3-Oxo-Propionsäurerest (Formylglycin) hydriert vor, von dem früher gezeigt worden war, dass er durch eine posttranslationale Modifikation aus einem Cystein im Präprotein generiert wird. Die Esterspaltung wird durch nukleophilen Angriff einer der beiden Hydroxylgruppen des Formylglycins auf das Schwefelatom eingeleitet. Der für die Bildung von Formylglycin verantwortliche posttranslationale Modifikationsmechanismus ist für die katalytische Aktivität von Sulfatasen unabdingbar. Er ist bislang unbekannt.