

**Charakterisierung des aeroben und anaeroben Respirationssystems  
von *Streptomyces coelicolor* A3(2)**

Dissertation

zur Erlangung des  
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der Naturwissenschaftlichen Fakultät I (Biowissenschaften)

der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg

vorgelegt von

**Frau Dörte Falke**

geboren am 19.09.1984 in Halberstadt

eingereicht am: 30.11.2015

Gutachter: Prof. Dr. G. Sawers  
Prof. Dr. J. Boch  
Prof. Dr. M. Bott

Tag der öffentlichen Verteidigung: 12.5.2016

## Inhaltsverzeichnis

	<b>Seite</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>v</b>
<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b>	<b>vii</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<hr/>	
<b>1.1. Aerobe Stoffwechselwege von <i>S. coelicolor</i></b>	<b>4</b>
I. Elektronentransport über Komplex III und Komplex IV der aeroben Atmungskette	5
II. Das aerobe Respirationssystem von <i>S. coelicolor</i>	8
<b>1.2. Anaerobe Atmung mit Nitrat</b>	<b>12</b>
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>18</b>
<hr/>	
<b>2.1. Geräte, Chemikalien und Lösungen</b>	<b>18</b>
<b>2.2. Organismen, Plasmide, Cosmide</b>	<b>20</b>
<b>2.3. Nährmedien und Zusätze</b>	<b>23</b>
2.3.1. Vollmedien zur Anzucht und Kultivierung von <i>E. coli</i> und <i>S. coelicolor</i>	23
2.3.2. Nährmedienzusätze	25
<b>2.4. Mikrobiologische Methoden</b>	<b>25</b>
2.4.1. Zellanzucht und Ernte von <i>E. coli</i>	25
2.4.2. Zellanzucht und Ernte von <i>S. coelicolor</i>	26
I. Herstellung eines Standardmyzelgemisches für Inokula	26
II. Herstellung einer Standardsporensuspension für Inokula	26
III. Aerobe Anzucht auf Festmedium	26
IV. Aerobe Anzucht in Flüssigmedium	27
V. Anaerobe Inkubation von Sporen und aerobe Inkubation von Myzel in Puffer	28
VI. Zellaufschluss und Fraktionierung	29
2.4.3. Stammhaltung	30
I. Herstellung von Stammkulturen <i>E. coli</i>	30
II. Herstellung von Stammkulturen <i>S. coelicolor</i>	30
<b>2.5. Molekularbiologische Methoden</b>	<b>30</b>
2.5.1. Isolierung von Nukleinsäuren	30
I. Isolierung von Plasmid- und Cosmid-DNA mit kommerziellem Kit	30
II. Isolierung von genomischer DNA aus Myzel von <i>S. coelicolor</i> mit kommerziellem Kit	30
III. Isolierung von Gesamt-RNA aus <i>S. coelicolor</i> (Fischer, Falke <i>et al.</i> , 2013)	31
IV. cDNA-Synthese von isolierter Gesamt-RNA	31
2.5.2. Konzentrationsbestimmung von isolierten Nukleinsäuren	31
2.5.3. Amplifikation von DNA-Fragmenten	31
I. Standard-PCR	32
II. RT-PCR (Reverse Transkriptase-PCR)	34

2.5.4.	Enzymatische Modifikation von DNA-Abschnitten	34
I.	DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	34
II.	Ligation von DNA-Fragmenten	34
III.	Mikrodialyse von DNA-Lösungen (Marusyk und Sergeant, 1990)	35
2.5.5.	Herstellung und Selektion rekombinanter <i>E. coli</i> -Klone	35
I.	Herstellung elektrokompenter Zellen	35
II.	Elektroporation	35
III.	DNA-Sequenzierung	36
2.5.6.	Analyse von Nukleinsäuren durch Agarosegel-Elektrophorese	36
2.5.7.	Herstellung von Komplementationskonstrukten mit dem <i>shuttle</i> -Vektor pMS82	37
2.5.8.	Herstellung von Transposon-Insertionsmutanten	37
2.5.9.	Übertragung von rekombinanter DNA durch Konjugation	38
<b>2.6.</b>	<b>Herstellung rekombinanter Proteine</b>	<b>39</b>
2.6.1.	Herstellung von Proteinen mit His-Tag-Fusion durch heterologe Genexpression	39
I.	Klonierung in pET30a(+) und Herstellung der Expressionskulturen	40
II.	Zellanzucht, Induktion der Expression und Zellernte	40
III.	Anreicherung von His-Tag-Fusionsproteinen unter denaturierenden Bedingungen	40
2.6.2.	Herstellung von Proteinen mit <i>Strep</i> -Tag-II-Fusionen durch heterologe Genexpression	41
I.	Klonierung in die pASK-IBA-Vektoren und Herstellung der Expressionskulturen	41
II.	Zellanzucht, Induktion der Expression und Zellernte	42
III.	Reinigung von <i>Strep</i> -Tag-II-Fusionsproteinen	42
<b>2.7.</b>	<b>Proteinchemische Methoden</b>	<b>43</b>
2.7.1.	Bestimmung der Proteinkonzentration (Lowry <i>et al.</i> , 1951)	43
2.7.2.	Bestimmung der Proteinkonzentration mit Hilfe des spezifischen Extinktionskoeffizienten	44
2.7.3.	Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	45
2.7.4.	Native Polyacrylamidgelelektrophorese (Nativ-PAGE)	46
I.	Aktivitätsfärbung mit Methylviologen	47
II.	Aktivitätsfärbung mit Diaminobenzidin (modifiziert nach Saber <i>et al.</i> , 2005)	47
III.	Aktivitätsfärbung mit Nitroblau-Tetrazoliumsalz (NBT)	48
2.7.5.	Coomassie-Färbung von Proteinen (Weber und Osborn, 1969)	48
2.7.6.	Häm-Färbung zum Nachweis von kovalent gebundenem Häm (modifiziert nach Thomas <i>et al.</i> , 1976)	49
2.7.7.	Western Blot-Analyse	49
I.	Antikörperdepletion	49
II.	Transfer der Proteine auf Nitrocellulosemembran	50
III.	Proteindetektion mittels ECL-Reaktion ( <i>Enhanced Chemiluminescence</i> )	50
2.7.8.	Kontinuierlicher Nitratreduktase-Assay in Sporen und Myzel	52
2.7.9.	UV-VIS-Spektroskopie	53
I.	Redoxdifferenzspektroskopie (DTH- <i>reduced-minus-ferricyanide-oxidized</i> Spektrum)	53
II.	UV-VIS-Spektrum zum Nachweis eines Hämerythrins	53
<b>2.8.</b>	<b>Analytische Methoden</b>	<b>54</b>
2.8.1.	Nitritbildungs-Assay – Nitritbestimmung im Überstand	54
2.8.2.	Analyse von Prodigiosinen von <i>S. coelicolor</i>	54
I.	Isolierung von Prodigiosinen aus <i>S. coelicolor</i>	54
II.	Messung hochauflösender Massenspektren	54

## **3 Ergebnisse** **55**

### **Kapitel 1: Charakterisierung von Nar1 und dessen Regulation durch die aerobe Atmungskette: Identifizierung einer sporenspezifischen Oxidase**

<b>3.1. Charakterisierung von Nar1 als sporenspezifische Nitratreduktase</b>	<b>55</b>
3.1.1. Nar1 liegt ausschließlich in Sporen und nicht im Myzel vor	56
3.1.2. Nar1 ist in Sporen permanent vorhanden und im Rohextrakt immer nachweisbar	58
<b>3.2. Die Enzym-Aktivität von vorliegendem Nar1 ist abhängig von Komponenten der aeroben Atmungskette</b>	<b>60</b>
3.2.1. Der Verlust des $bc_1$ -Komplexes und der Cytochrom $aa_3$ Oxidase führt zum Verlust der Nitratreduktaseaktivität in Sporen in vivo und in vitro	61
3.2.2. Durch einzeln oder kombiniert eingebrachte Atmungskettengene ist die fehlende Synthese von Komplex III und Komplex IV teilweise komplementierbar	64
3.2.3. Der Verlust der Nar1-Nitratreduktaseaktivität bei COE192 ist durch einzelne oder kombiniert eingebrachte Gene von SCO2148-56 nicht komplementierbar	67
3.2.4. Die Cytochrom <i>c</i> Häm-bindende Untereinheit SCO2150 nimmt direkten Einfluss auf die Nar1 Aktivität in Sporen	68
<b>3.3. Transkript-Analysen zu COE502 im Kontext der Bildung terminaler Atmungskettenkomplexe (Spore versus Myzel)</b>	<b>71</b>
<b>3.4. Identifizierung einer neuen Oxidase, die sporenspezifisch ist</b>	<b>73</b>
3.4.1. Nachweis einer möglichen Interaktion der neu identifizierten Oxidase mit den bereits charakterisierten Atmungskettenkomplexen III und IV	74
3.4.2. <i>In vitro</i> -Studien zum Einfluss der neu identifizierten Oxidase auf das Nar1-Enzym in Sporen	76
<b>3.5. Zusammenfassung Kapitel 1</b>	<b>79</b>

### **Kapitel 2: Charakterisierung von Nar2 und dessen Regulation durch das Zweikomponentensystem (ZKS) NarXL - Der Einfluss von NarK2 und SCO0212 auf Nar2**

<b>3.5. Nar2 katalysiert die Nitratreduktion in Myzel</b>	<b>80</b>
<b>3.6. Post-transkriptionelle Regulation der Enzymaktivität von Nar2</b>	<b>83</b>
3.6.1. Sauerstoff-unabhängiger Einbau von Nar2 in die Membran	84
3.6.2. Elektronenfluss zu Nar2 – Verknüpfung aerober Atmungskettenkomplexe mit Nitratatmung	86
3.6.3. NarX beeinflusst die Transkription von Nar2 und den Nitrat/Nitrit-Transporter NarK2	88
3.6.4. Abhängigkeit der Nar2-vermittelten Nar-Aktivität vom Transport zur zytoplasmatischen Seite	90
<b>3.7. Der Einfluss von SCO0212 auf den essentiellen Nitrattransport für Nar2</b>	<b>92</b>
3.7.1. SCO0212 und <i>narK2</i> bilden ein Operon	92
3.7.2. Nachweis der Synthese von SCO0212 und Charakterisierung als Hämyerythrin	94
<b>3.8. Zusammenfassung Kapitel 2</b>	<b>96</b>

<b>Kapitel 3 Charakterisierung von Nar3 und seine Regulation durch Phosphat, inverse Korrelation der Nar3-Synthese und der RED-Antibiotika-Biosynthese</b>		
<b>3.9.</b>	<b>Die Synthese von Nar3-Transkripten wird unter Substratlimitierung bei Eintritt in die stationäre Phase (Sekundärmetabolismus) induziert</b>	<b>98</b>
<b>3.10.</b>	<b>Phosphat reguliert Nar3 auf post-transkriptioneller Ebene</b>	<b>99</b>
<b>3.11.</b>	<b>Inverse Korrelation von Nar3-Synthese und Undecylprodigiosin-Biosynthese – Phosphat induziert die Bildung von Prodigininen</b>	<b>102</b>
<b>3.12.</b>	<b>Zusammenfassung Kapitel 3</b>	<b>105</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>106</b>
<hr/>		
<b>4.1.</b>	<b>Funktionelle Verknüpfung von aerobem Respirationssystem und anaerober Atmung bei <i>S. coelicolor</i></b>	<b>106</b>
I.	Das aerobe Respirationssystem von <i>S. coelicolor</i> im Kontext bekannter bakterieller Respirationssysteme	107
II.	Die Notwendigkeit eines alternativen <i>bc<sub>1</sub></i> -Komplexes	110
III.	Evidenzen für die Existenz eines respiratorischen Superkomplexes – Respirasom in <i>S. coelicolor</i>	115
<b>4.2.</b>	<b>Putative Regulationsmechanismen des aeroben Respirationssystems in Assoziation mit anaerober Nitratrepiration bei <i>S. coelicolor</i></b>	<b>120</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>127</b>
<b>6</b>	<b>Ausblick</b>	<b>129</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>130</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>I</b>
<b>Danksagung</b>		
<b>Eidesstattliche Erklärung</b>		

## Abkürzungsverzeichnis

Δ	Deletion
A	Adenin
A <sub>x nm</sub>	Absorption bei x nm
AHT	Anhydrotetracyclin
Amp <sup>R</sup>	Ampicillin-Resistenz
Apra <sup>R</sup>	Apramycin-Resistenz
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
BV	Benzyliologen
C	Cytosin
c	Konzentration
Cyt	Cytochrom
Cm <sup>R</sup>	Chloramphenicol-Resistenz
dest.	destilliert (zweifach-deionisiert)
C-Terminus	Carboxyterminus
DAB	Diaminobenzidin
DDM	Dodecyl-β-maltosid
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
ε <sub>280</sub>	spezifischer Extinktionskoeffizient bei 280 nm [M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i> , Detektionsverfahren für Western Blot-Analyse
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
G	Guanin
HABA	4-Hydroxyazobenzol-2-carbonsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
Hyg <sup>R</sup>	Hygromycin-Resistenz
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl β-D-Thiogalacto-pyranosid
Kan <sup>R</sup>	Kanamycin-Resistenz
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	<i>lysogeny broth</i>
M	Molar
Mb	Megabasenpaare
MCS	<i>multiple cloning site</i>
μF	Mikrofarad
MOPS	3-Morpholino-1-propansulfonsäure
MV	Methylviologen
NM	Nitratreduktasemutante
N-Terminus	Aminoterminus

---

Ω	Ohm
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
pmol	Picomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
QH <sub>2</sub> , Q	reduziertes, oxidiertes Chinon
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuclease
RT	Raumtemperatur (25 °C)
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SFM	<i>Soya Flour Mannitol</i>
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tet <sup>R</sup>	Tetracyclin-Resistenz
TB	<i>terrific broth</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
U	unit(s), Einheit(en) der Enzymaktivität
Upm	Umdrehung pro Minute
UTP	Uridin-5'-triphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
% (v/v)	<i>volume per volume</i> , Volumenprozent
% (w/v)	<i>weight per volume</i> , Gewichtsprozent

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>Seite</b>
<b>Abbildung 1.1.:</b> Sekundärmetabolitbildung bei <i>S. coelicolor</i> .	<b>2</b>
<b>Abbildung 1.2.:</b> Elektronentransport über die aerobe Atmungskette.	<b>8</b>
<b>Abbildung 1.3.:</b> Lokalisation putativer Komponenten der aeroben Atmungskette auf dem linearen Genom von <i>S. coelicolor</i> .	<b>10</b>
<b>Abbildung 1.4.:</b> Modell der Nar-vermittelten Nitratreduktion.	<b>13</b>
<b>Abbildung 1.5.:</b> Vergleich der durch Phyre <sup>2</sup> (Kelley <i>et al.</i> , 2015) vorhergesagten Tertiärstrukturen von NarG (A), NarH (B) und NarI (C) der drei Nar-Enzyme.	<b>15</b>
<b>Abbildung 3.1.:</b> Nachweis der gebildeten katalytischen Untereinheit NarG1 in ausdauernden Sporen und exponentiellem Myzel.	<b>56</b>
<b>Abbildung 3.2.:</b> Detektion der mRNA-Transkripte von <i>narG1</i> in den verschiedenen Lebenszyklusphasen.	<b>57</b>
<b>Abbildung 3.3.:</b> Nachweis der spezifischen Nitratreduktaseaktivität im Rohextrakt von ausdauernden Sporen und der Einfluss einer anaeroben Präinkubation der Sporen auf die <i>in vitro</i> Aktivität.	<b>59</b>
<b>Abbildung 3.4.:</b> Untersuchung einer möglichen Korrelation der Nitratreduktaseaktivität und des Komplex III der aeroben Atmungskette in ausdauernden Sporen.	<b>62</b>
<b>Abbildung 3.5.:</b> Komplementationskonstrukte für COE190.	<b>64</b>
<b>Abbildung 3.6.:</b> Überprüfung der Komplementationsfähigkeit der erzeugten Konstrukte für COE192 Spore <i>versus</i> Myzel.	<b>65</b>
<b>Abbildung 3.7.:</b> Erzeugung der Mutante COE502.	<b>69</b>
<b>Abbildung 3.8.:</b> Nachweis der Korrelation einer Mutation in der Cytochrom <i>c</i> -bindenden Untereinheit des Komplexes III und der Nitratreduktion in ausdauernden Sporen.	<b>70</b>
<b>Abbildung 3.9.:</b> Detektion der mRNA-Transkripte von Atmungskettenkomplex-Komponenten in ausdauernden Sporen vergleichend mit exponentiellem Myzel.	<b>72</b>
<b>Abbildung 3.10.:</b> Charakterisierung einer neu identifizierten Oxidase als sporenspezifisches Enzym.	<b>73</b>
<b>Abbildung 3.11.:</b> <i>In gel</i> Oxidase-Aktivitätsfärbung zum Nachweis der Komplex IV-Aktivität	<b>75</b>
<b>Abbildung 3.12.:</b> Untersuchung des Einflusses von SCO7236 und SCO7234 auf die Nar-vermittelte Nitratreduktion in ausdauernden Sporen.	<b>77</b>
<b>Abbildung 3.13.:</b> Transkriptstudien der artifiziellen Atmungskettenkomplex-Komponenten in ausdauernden Sporen vergleichend mit exponentiellem Myzel.	<b>78</b>
<b>Abbildung 3.14.:</b> Analyse der Myzel-Rohextrakte auf Gesamt-Nar-Aktivität und immunologischer Nachweis von Nar2.	<b>81</b>
<b>Abbildung 3.15.:</b> Nachweis spezifischer <i>narG2</i> -mRNA in den Lebenszyklusphasen von <i>S. coelicolor</i> .	<b>83</b>
<b>Abbildung 3.16:</b> Immunologischer Nachweis von NarG2 in den Proteinfractionen von M145 nach Kultivierung in Abhängigkeit des verfügbaren Sauerstoffs.	<b>85</b>
<b>Abbildung 3.17.:</b> Untersuchung eines möglichen Einflusses der aeroben Atmungskette auf die Gesamt-Nar-Aktivität im exponentiellen Myzel.	<b>86</b>



<b>Abbildung 3.18:</b>	Transkriptnachweis von <i>nark2</i> und <i>narG2</i> sowie immunologischer Nachweis von NarG2 in exponentiellem Myzel im Stammhintergrund einer <i>nark2</i> – und einer <i>narX</i> -Deletionsmutante.	<b>88</b>
<b>Abbildung 3.19.:</b>	Analyse der spezifischen Nitratreduktaseaktivität und immunologischer n NarG2 im Myzel-Rohextrakt bei Deletion vom Nitrat/Nitrittransporter NarK2.	<b>91</b>
<b>Abbildung 3.20.:</b>	Analyse der Bildung eines möglichen Kotranskripts SCO0212- <i>nark2</i> sowie der gebildeten mRNA der Gene <i>nark2</i> und SCO0212.	<b>93</b>
<b>Abbildung 3.21.:</b>	Nachweis von SCO0212 in Proteinfractionen von <i>S. coelicolor</i> .	<b>95</b>
<b>Abbildung 3.22.:</b>	UV-VIS-Spektrum von gereinigtem SCO0212 vor und nach Behandlung mit 50 mM Na-Azid zum Nachweis eines Hämerythrin-ähnlichen Charakters.	<b>96</b>
<b>Abbildung 3.23.:</b>	Untersuchungen zu Nar3-Induktionsbedingungen auf RNA- Ebene - Transkriptanalyse zum Nachweis spezifischer <i>narG3</i> -Transkripte in den verschiedenen Lebenszyklusphasen von <i>S. coelicolor</i> .	<b>99</b>
<b>Abbildung 3.24.:</b>	Abhängigkeit der Nar3-Synthese von der Phosphatkonzentration bei Übergang zur stationären Phase.	<b>100</b>
<b>Abbildung 3.25.:</b>	Phosphat induziert die Bildung des RED-Phänotyps.	<b>103</b>
<b>Abbildung 3.26.:</b>	Untersuchung eines möglichen <i>downstream</i> - Effekts der RED-Antibiotika-Bildung auf die Nar3-Synthese.	<b>104</b>
<b>Abbildung 4.1.:</b>	Nach Refojo <i>et al.</i> (2010, 2012) postulierte Komposition eines alternativen Komplex III (ACIII).	<b>111</b>
<b>Abbildung 4.2.:</b>	Alignment der durch Phyre <sup>2</sup> postulierten Tertiärstrukturen der neu identifizierten Atmungskettenkomplexkomponenten.	<b>112</b>
<b>Abbildung 4.3.:</b>	Verzweigte Atmungskette in <i>S. coelicolor</i> unter Berücksichtigung aller im Genom annotierten Komponenten für den Elektronen-Eintritt in die Atmungskette und Komponenten der Endoxidation.	<b>114</b>
<b>Abbildung 8.1.:</b>	Genorganisation des Lokus SCO2148-56 und SCO3945-46 von <i>S. coelicolor</i> .	<b>IV</b>
<b>Abbildung 8.2.:</b>	Immunodetektion nach Western Blot-Analyse zum Nachweis eines möglichen Defizits beim Einbau des Molybdän-haltigen Kofaktors.	<b>IV</b>
<b>Abbildung 8.3.:</b>	Komparative <i>In gel</i> -Aktivitätsfärbung nach Auftrennung der Proteine aus Myzel in einer Nativ-PAGE.	<b>V</b>
<b>Abbildung 8.4.:</b>	<i>In gel</i> -Aktivitätsnachweis der Cytochrom <i>c</i> Oxidase-Aktivität nach Nativ-Page von Sporen-Rohextrakten.	<b>V</b>
<b>Abbildung 8.5.:</b>	Immunodetektion nach Western Blot-Analyse zum Nachweis von NarG2 in den Proteinfractionen von Myzel von COE190 ( $\Delta$ SCO3945-46) und COE192 ( $\Delta$ SCO2148-56).	<b>VI</b>
<b>Abbildung 8.6.:</b>	Detektion der mRNA-Transkripte von <i>nark2</i> und <i>narG2</i> im exponentiellen Myzel.	<b>VI</b>
<b>Abbildung 8.7.:</b>	(+)-ESI-MS des isolierten Extraktes aus Myzel von <i>S. coelicolor</i> .	<b>VII</b>
<b>Abbildung 8.8.:</b>	(+)-ESI-MS <sup>2</sup> (positiver Modus) der detektierten molekularen Summenformel C <sub>25</sub> H <sub>36</sub> ON <sub>3</sub> (Undecylprodigiosin)	<b>VII</b>
<b>Abbildung 8.9.:</b>	(+)-ESI-MS <sup>2</sup> der detektierten molekularen Summenformel C <sub>25</sub> H <sub>34</sub> ON <sub>3</sub> (Streptorubin B)	<b>VIII</b>
<b>Abbildung 8.10.:</b>	Redoxdifferenzspektren von hochkonzentrierten Membranfraktion (Myzel) von <i>S. coelicolor</i> zum Nachweis der am Elektronentransport beteiligten Cytochrome.	<b>IX</b>
<b>Abbildung 8.11.:</b>	Durch <i>in silico</i> -Studien neu identifizierte Komponenten der aeroben Atmungskette.	<b>IX</b>

<b>Abbildung 8.12.:</b>	<i>In gel</i> -Aktivitätsfärbung zum Nachweis der Succinat-Dehydrogenaseaktivität (SDH) und Cytochrom c Oxidase-Aktivität.	<b>X</b>
-------------------------	--	----------

<b>Tabellenverzeichnis</b>		<b>Seite</b>
<b>Tabelle 1.1.:</b>	Alignment der Primärsequenzen der jeweiligen Nar-Untereinheiten nach Strukturaufklärung durch Phyre <sup>2</sup> .	<b>15</b>
<b>Tabelle 2.1.:</b>	Übersicht der verwendeten Plasmide und Cosmide	<b>20</b>
<b>Tabelle 2.2.:</b>	Übersicht der verwendeten und neu konstruierten <i>E. coli</i> -Stämme	<b>21</b>
<b>Tabelle 2.3.:</b>	Übersicht der verwendeten und neu konstruierten <i>S. coelicolor</i> -Stämme	<b>22</b>
<b>Tabelle 2.4.:</b>	TB-Medium Zusätze	<b>24</b>
<b>Tabelle 2.5.:</b>	Übersicht der verwendeten Antibiotika	<b>25</b>
<b>Tabelle 2.6.:</b>	Herstellung eines Standardmyzelgemisches für Inokula	<b>26</b>
<b>Tabelle 2.7.:</b>	verwendete Inkubationspuffer zur Nar3-Induktion	<b>28</b>
<b>Tabelle 2.8.:</b>	PCR-Ansätze bei Verwendung der verschiedenen Polymerasen	<b>32</b>
<b>Tabelle 2.9.:</b>	Amplifikationsprogramme der verwendeten Polymerasen	<b>33</b>
<b>Tabelle 2.10.:</b>	spezifische Extinktionskoeffizienten der rekombinanten Proteine	<b>44</b>
<b>Tabelle 2.11.:</b>	Zusammensetzung eines Minigels für SDS-PAGE	<b>45</b>
<b>Tabelle 2.12.:</b>	Zusammensetzung eines Minigels für Nativ-PAGE	<b>47</b>
<b>Tabelle 2.13.:</b>	Aminosäuresequenzen der 3 katalytischen Untereinheiten zur Ableitung AS-spezifischer Antikörper	<b>50</b>
<b>Tabelle 3.1.:</b>	Komplementationsstudien der konstruierten Mutanten hinsichtlich ihrer Nar-Aktivität in Sporen und ihrer Cytochrom c Oxidase-Aktivität in Sporen und Myzel.	<b>68</b>
<b>Tabelle 8.1.</b>	Liste der verwendeten Oligonukleotide	<b>I</b>
<b>Tabelle 8.2.:</b>	Identifizierte Peptide nach massenspektrometrischer Analyse der isolierten Banden 1-9.	<b>X</b>
<b>Tabelle 8.3.:</b>	Detaillierte Auflistung der identifizierten Peptide nach massenspektrometrischer Analyse	<b>XI</b>

## 1 Einleitung

Atmung ist ein fundamentaler Prozess aller lebenden Organismen, um Energie durch Oxidation von Reduktionsäquivalenten wie NADH und FADH<sub>2</sub> zu konservieren. Die Konservierung erfolgt durch Elektronentransfer über eine Elektronentransportkette. Die Fähigkeit dabei Sauerstoff als Endelektronenakzeptor zu nutzen, ist das Hauptcharakteristikum von sowohl aeroben als auch fakultativ anaerob lebenden Bakterien. Letztere besitzen verzweigte Atmungsketten und nutzen auch alternative Elektronenakzeptoren. Aber auch aerobe Bakterien können verzweigte Atmungsketten mit zumindest zwei unterschiedlich terminalen Oxidasen besitzen. Derartige Atmungsketten zeigen eine optimale Anpassung an wechselnde Sauerstoffverfügbarkeiten, was Bakterien die Besiedlung vielseitiger mikrobieller Habitats ermöglicht.

Streptomyceten können als obligat aerobe, filamentös wachsende Bodenmikroorganismen nur in Anwesenheit von Sauerstoff wachsen und sind damit zur Energiekonservierung auf Sauerstoff als Endelektronenakzeptor angewiesen.

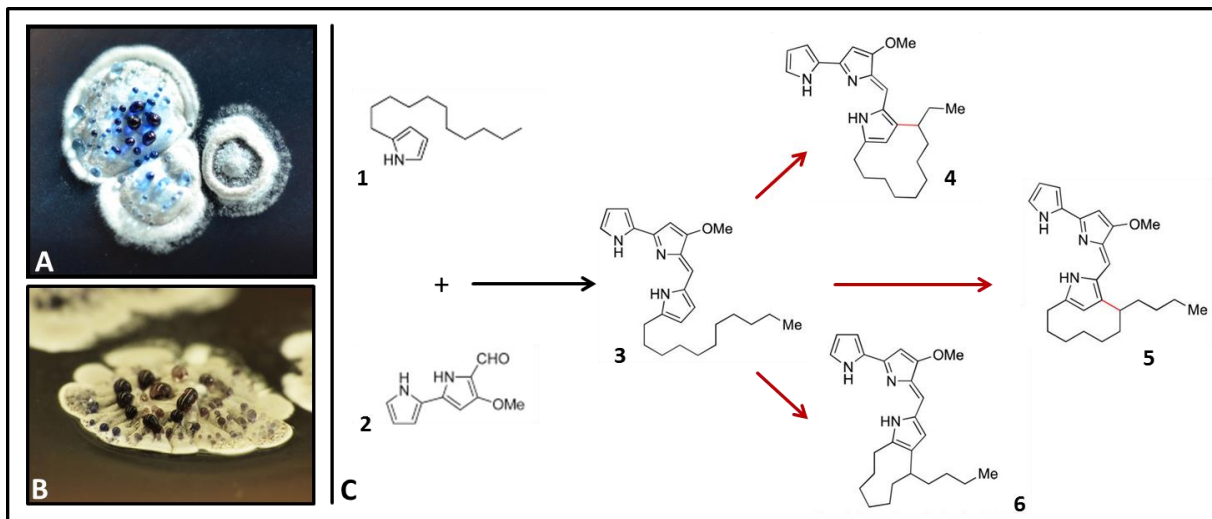
Sie zählen zu den Hoch-GC-reichen *Actinobacteria* (66-74 %), leben saprophytisch und zeigen durch die Vollziehung eines komplexen Lebenszyklus eine außerordentlich präzise Anpassung an ihr natürliches Habitat Boden. Streptomyceten wachsen multizellulär und bilden somit während der Morphogenese ausgehend von einem verzweigten unseptierten, vegetativen Substratmyzel, multikernhaltige Filamente (Luftmyzel), die wiederum septierte Sporenketten und damit (Exo-) Sporen ausbilden (Chater, 2000). *Streptomyces*-Sporen sind relativ resistent gegenüber Austrocknung und Hitzestress, dennoch sind sie längst nicht so robust wie Endosporen von Niedrig-GC-reichen Sporenbildnern wie *Bacillus subtilis* (Hardisson *et al.*, 1978; Elliot und Flärdh, 2012). Sie scheinen damit eher die Funktion einer schnellen und effektiven Anpassung an veränderte Bedingungen und die Möglichkeit zur Verbreitung einzunehmen.

Im Allgemeinen sind Streptomyceten für ihre Fähigkeit bekannt, eine Vielzahl von bioaktiven und mikrobiellen Sekundärmetaboliten (Tetrazykline, zyklische Lipopeptide und Aminoglykoside wie Kanamycin und Hygromycin B) zu synthetisieren, die vorwiegend nach einem metabolischen *Switch* vom Primär- zum Sekundärmetabolismus gebildet werden (Hodgson *et al.*, 2000). Nach Angaben von Kieser *et al.* (2000) bilden Streptomyceten mehr als 50 % der 11.900 bekannten mikrobiellen Antibiotika. Damit gelten Streptomyceten als maßgeblich beteiligt an der Gewinnung natürlicher Antibiotika und haben somit eine hohe Relevanz für die humanmedizinische Forschung.

Der Vertreter *Streptomyces coelicolor* A(3)2, welcher als Untersuchungsmodell in der vorliegenden Dissertation verwendet wird, etablierte sich schon früh als genetischer Modellorganismus für

Streptomyceten. Seine Namensgebung ist auf das von ihm gebildete blau gefärbte Polyketid Actinorhodin zurückzuführen (Bystrykh, 1996; Hopwood, 1999).

Neben dem antibiotischen Polyketid Actinorhodin bildet *S. coelicolor* auch den erdig-riechenden bizyklischen Alkohol Geosmin (Jiang *et al.*, 2007), das antibiotische Methylenomycin und ein rotes Prodigiosingemisch aus vier Verbindungen, darunter Undecylprodigiosin (Rudd und Hopwood, 1980). Die Bildung der beiden Polyketide Actinorhodin und Undecylprodigiosin unterliegt der Transkriptionskontrolle von Transkriptionsfaktoren, die von *actII-ORF4* (Actinorhodin) und *redD* (Undecylprodigiosin) kodiert werden (Bibb, 1996). Für die humanmedizinische Forschung vor allem relevant, ist gegenwärtig die antibiotische Wirkung von Undecylprodigiosin sowie seinen Derivaten, die als antiproliferativ und damit tumorsuppressiv beschrieben werden (Tsuji *et al.*, 1992; Magae *et al.*, 1996). Generell erfolgt die Antibiotikasythese bei *S. coelicolor* aus Vorläuferverbindungen wie Malonyl-CoA und Methylmalonyl-CoA durch die Aktivität einer Polyketidsynthase. Letztere ist in einem Gen-Cluster (*red-Gen-Cluster* SCO5877-98) zusammen mit den Strukturgenen für die Antibiotikasythese kodiert. Für die Synthese der medizinisch relevanten Prodigiosine ist Malonyl-CoA die Vorläuferverbindung, aus der das Intermediat 2-Undecylpyrrol gebildet wird (Mo *et al.*, 2008). Dieses ist die Vorläuferverbindung für die Biosynthese von Undecylprodigiosin und seinen isomeren und zyklischen Derivaten Butylcycloheptylprodigiosin (Tsao *et al.*, 1985), Metacycloprodigiosin (Mo *et al.*, 2008) und Streptorubin B (Abbildung 1.1. C) (Haynes *et al.*, 2010; Withall *et al.*, 2015).



**Abbildung 1.1.: Sekundärmetabolitbildung bei *S. coelicolor*.** A. und B. Sekundärmetabolitbildung auf Festmedium. *S. coelicolor* sekretiert während der Differenzierung aus einer sporulierten Einzelkolonie das blau gefärbte antibiotisch wirksame Actinorhodin. In Folge der Antibiotikabildung färbt sich das umgebende Medium dunkel (Aufnahme T. Pawlik, MLU Halle-Wittenberg, 2011). C. Biosyntheseweg des Undecylprodigiosins und seinen isomeren und zyklischen Derivaten. Undecylprodigiosin (3) wird aus den Vorläuferverbindungen 2-Undecylpyrrol (1) und 4-Methoxy-2,2-bipyrrol-5-carboxaldehyd (MBC, 2) gebildet. Durch oxidative Carboxylierungsreaktionen werden aus Undecylprodigiosin die isomeren Derivate Metacycloprodigiosin (4), Butylcyclohexylprodigiosin (5) und Streptorubin B (6) gebildet. [verändert nach Haynes *et al.* (2010) und Jones *et al.* (2013)]

Der Nutzen der Antibiotikabildung beruht bislang nur auf Vermutungen. Während der Differenzierung ist *S. coelicolor* anfällig gegenüber Nährstoffkonkurrenz. Die Bildung von Antibiotika ist vermutlich ein Abwehrmechanismus, der verhindert, dass konkurrierende Bodenmikroorganismen die während der Differenzierung freigesetzten Nährstoffe verstoffwechseln können (Kieser *et al.*, 2000).

Die Differenzierung von *S. coelicolor* in Sporen und Myzel stellt einen wichtigen Aspekt für die Untersuchungen am Modellorganismus dar. Beide differenzierten Stadien sind Gegenstand der Untersuchungen in dieser Dissertation. Während *S. venezuelae* sowohl in Flüssigkultur als auch auf Festmedium sporulieren kann (Glazebrook *et al.*, 1990), ist der Prozess der Sporulation bei *S. coelicolor* nur auf Festmedium möglich. Die Kultivierung und Entwicklung auf Festmedium unterscheidet sich stark von der Differenzierung in submersen Kulturen. Unter Laborbedingungen vollzieht sich auf SFM-Agar (*Soya Flour Mannitol*) ein kompletter Sporulationszyklus in 7 bis 10 Tagen. Für die Initiation der Keimung werden aerobe Bedingungen, Kohlenstoffdioxid, exogene Nährstoffe und divalente Kationen ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  oder  $\text{Fe}^{2+}$ ), die als ‚Trigger‘-Faktoren wirken, benötigt. Fehlen diese Faktoren verharren Sporen im Zustand der **Dormanz (ruhende Sporen)**. Nach Hardisson *et al.* (1978) verläuft die Keimung in drei Phasen: *darkening* (Phasenkontraständerung), Quellen (*swelling*) und die Ausbildung des Keimschlauches. Yagüe *et al.* (2013) postulierten ein Modell zum Lebenszyklus, bei dem Sporen zunächst zu einem jungen, kompartimentierten primären Myzel (MI) auskeimen, was sich durch die Initiation eines programmierten Zelltods (PCD) in ein multikernhaltiges sekundäres Myzel (MII) differenziert. Dieses bildet das, in das Nährmedium einwachsende, verzweigte Substratmyzel (Yagüe *et al.*, 2013). Nach einem zweiten PCD bildet das überlebende Substratmyzel eine hydrophobe Hülle und differenziert sich zum Luftmyzel (Yagüe *et al.*, 2013). Substratmyzel und Luftmyzel sekretieren die antibiotisch wirkenden Sekundärmetabolite in das umgebende Medium, ein Prozess der das Konkurrieren um das Nährstoffangebot mit anderen Mikroorganismen während der Sporulation ermöglicht (Yagüe *et al.*, 2013). Der letzte Schritt des Lebenszyklus auf Festmedium beinhaltet die Septierung der Hyphen und die Bildung von Sporen in den Septen.

In submersen Kulturen differenziert sich *S. coelicolor* durch Durchlaufen des PCD-Stadiums vom kompartimentierten Myzel (MI) zu multikernhaltigen Substratmyzel (MII). Ein hydrophobes Luftmyzel wird dabei nicht gebildet (Yagüe *et al.*, 2013). Allerdings kommt es zur Zusammenlagerung von Myzelgeflechten, die in unterschiedlich stark ausgeprägte Aggregationsformen münden.

Proteom- und Transkriptom-Analysen der MI- und MII-Stadien belegen, dass, unabhängig von der Differenzierung auf Festmedium oder in submerser Kultur, Proteine des Primärmetabolismus

vorwiegend im MI-Stadium hochreguliert sind. Proteine und Transkripte, die in den Sekundärmetabolismus involviert sind, sind dagegen im MII-Stadium hochreguliert.

Generell liegen derzeit nur wenige aktuelle Studien zum Metabolismus in *S. coelicolor* vor. Es ist aber davon auszugehen, dass sich dieser in Sporen und Myzel unterscheidet.

### **1.1. Aerobe Stoffwechselwege von *S. coelicolor***

Anhaltspunkte zur Energiekonservierung und zu aeroben Stoffwechselwegen liefern bislang nur Genomanalysen (Borodina *et al.*, 2005) und einige frühere Studien von Hey-Ferguson *et al.* (1973), Hardisson *et al.* (1980), Quiros *et al.* (1986); McBride und Ensign (1990). *S. coelicolor* verstoffwechselt Kohlenhydrate über die Glykolyse, den Pentosephosphatweg und den TCA-Zyklus (Borodina *et al.*, 2005). Glukose wird in *S. coelicolor* über einen Protonensymport transportiert. Der dafür benötigte Protonengradient wird hauptsächlich über die aerobe Atmungskette gebildet. Die beim Kohlenhydratmetabolismus gebildeten Reduktionsäquivalente NADPH, NADH und FADH<sub>2</sub> werden in die Elektronentransportkette eingespeist und können somit für die Energiekonservierung genutzt werden (Borodina *et al.*, 2005).

Der Metabolismus dormanter Sporen unterscheidet sich bereits durch das Substratangebot vom Metabolismus des Myzels. Sporen von *S. coelicolor* können ohne exogenes Substrat überleben. Der Mechanismus ist bislang allerdings wenig verstanden. Frühere Studien belegen, dass Sporen eine Reihe von Enzymen, wie Trehalase, Trehalose-Phosphat-Synthetase und einen Pool an stabilen mRNAs synthetisieren, um ihren Grundstoffwechsel aufrecht zu erhalten (Hey-Ferguson *et al.*, 1973; Hardisson *et al.*, 1980; Quiros *et al.*, 1986; McBride und Ensign, 1990). Um ihre Überlebensfähigkeit über lange Zeit beizubehalten, nutzen sie als Speicherstoff Trehalose (Hey-Ferguson *et al.*, 1973; Garcia Diaz *et al.*, 1983) und bauen Glukose ebenfalls über den Pentose-Phosphat-Weg und TCA-Zyklus ab (Salas und Hardisson, 1981; Garcia Diaz *et al.* 1983, Salas *et al.*, 1984). Die Atmung mit Sauerstoff ist in Sporen im Vergleich zu Myzel stark vermindert aber messbar (Ensign, 1978; Salas und Hardisson, 1981; Garcia Diaz *et al.*, 1983). Quiros *et al.* (1986) konnten darüberhinaus die Aktivitäten einer NADH-Oxidase, NADH(P)H-DCPIP-Reduktase, NADH-Cytochrom *c*-Reduktase, Succinat-DCPIP-Reduktase und DL-alpha-Glycerophosphate-DCPIP Reduktase nachweisen. Damit ist in beiden Entwicklungsstadien die Hauptquelle für ATP die oxidative Phosphorylierung.

Die oxidative Phosphorylierung ist Teil des Energiestoffwechsels und ein Merkmal aller aeroben Lebewesen. Die zur ATP-Synthese benötigte Energie wird durch Elektronentransport über ein Membranproteinsystem generiert, das im Allgemeinen vier Enzymkomplexe beinhaltet. Die Elektronen-Eintrittsstellen in die Atmungskette werden durch die Aktivität der NADH-Dehydrogenase (Komplex I) und der Succinat-Dehydrogenase (Komplex II) aus dem Citratzyklus gewährleistet, die durch die Oxidation der Reduktionsäquivalente NADH (Komplex I) und FADH<sub>2</sub> (Komplex) die

freiwerdenden Elektronen auf ein membrangängiges Chinon transferieren. Der weitere Elektronentransport erfolgt über ein Cytochrom-System, welches den Komplex III (Cytochrom  $bc_1$ -Komplex) und Komplex IV (Cytochrom Oxidase) repräsentiert. Beide Komplexe des verwendeten Modellorganismus sind Untersuchungsgegenstand in der vorliegenden Dissertation.

### **I. Elektronentransport über Komplex III und Komplex IV der aeroben Atmungskette**

Cytochrom  $bc_1$ -Komplexe sind oligomere Membranproteinkomplexe, die die Elektronen vom Ubichinon bzw. Menachinon mit niedrigerem Redoxpotenzial auf Cytochrom  $c$  oder Plastocyanin übertragen. Der Elektronentransfer auf zwei Moleküle Cytochrom  $c$  wird dabei an die Translokation von vier  $H^+$ -Protonen über die Zytoplasmamembran gekoppelt. Der elektrochemische Protonengradient dient letztendlich zur Aufrechterhaltung des Membranpotentials. Bakterien, die den Elektronentransport über den  $bc_1$ -Komplex leiten, verfügen über mindestens einen alternativen Ubichinol-Oxidase-Weg, der die Beteiligung des  $bc_1$ -Komplexes am Elektronentransfer über die respiratorische Atmungskette nicht erfordert (Trumpower, 1990). Generell sind diese alternativen Oxidasen nicht an der Aufrechterhaltung des Membranpotentials beteiligt, das heißt, sie pumpen keine Protonen.

Gewöhnlich assemblieren drei Untereinheiten mit jeweils vier prosthetischen Gruppen zu einem  $bc_1$ -Komplex. Die Cytochrom  $b$  Untereinheit fungiert als hydrophobes, integrales Membranprotein und trägt zwei nicht-kovalent gebundene Häm  $b$ -Gruppen ( $b$ -566,  $b$ -560). Über *bis*-Histidin-Reste sind diese mit der Untereinheit verbunden. Die Cytochrom  $c$ -Untereinheit ist über eine hydrophobe Domäne am C-Terminus mit der bakteriellen Membran verankert und enthält ein kovalent gebundenes Häm  $c$ , das über 2 Cystein-Reste an das Protein gebunden ist (Trumpower, 1990). Das Rieske-Eisen-Schwefel-Protein bildet die dritte Untereinheit des  $bc_1$ -Komplexes und ist, über am N-Terminus lokalisierte, hydrophobe Seitenketten in der bakteriellen Membran als monotopisches Protein verankert. Über zwei Histidine und zwei Cysteine ist das Eisen-Schwefel-Protein im assemblierten Protein gebunden. Mitchell beschrieb 1975 erstmals den Elektronentransfer im und über den  $bc_1$ -Komplex und prägte den Begriff protonenmotorischer Q-Zyklus. Der Q-Zyklus beschreibt dabei den Elektronentransfer zwischen den redox-prosthetischen Gruppen im  $bc_1$ -Komplex. In der Summe werden zwei Moleküle Ubichinol/ Menachinol zu Ubichinon/ Menachinon oxidiert und zwei Moleküle Cytochrom  $c$  reduziert. Dabei werden zwei Protonen auf die positive Membranseite transloziert und zwei Protonen werden auf der negativen Membranseite verbraucht (Trumpower, 1990). Das  $H^+/e^-$ -Verhältnis beträgt damit 2.

Die Elektronen, die den  $bc_1$ -Komplex passieren, werden gewöhnlich über einen mobilen Elektronencarrier, meist Cytochrom  $c$  oder Ubichinon auf die terminale Cytochrom  $c$  Oxidase transferiert, die die Oxidation von Substrat (Cytochrom  $c$  oder Ubichinol) an die 4-Elektronen-

Reduktion von Sauerstoff zu Wasser koppelt. Wie der  $bc_1$ -Komplex koppelt die Cytochrom *c* Oxidase den Elektronentransport an die Translokation von Protonen: vier Moleküle Cytochrom *c* bzw. Ubichinol werden oxidiert und vier Protonen ins Periplasma transloziert. Das  $H^+/e^-$ -Verhältnis beträgt damit 2.

Cytochrom *c* Reduktasen werden wie Chinol-Oxidasen in die Klasse der Häm-Kupfer-Oxidasen eingeordnet und bilden eine Sub-Familie der terminalen Oxidasen. Letztere lassen sich nach Borisov *et al.* (2011) in insgesamt 3 Familien untergliedern:

1. Häm-Kupfer-Oxidasen
2. alternative Oxidasen
3. Cytochrom *bd* Oxidasen

#### 1. Häm-Kupfer-Oxidasen

Häm-Kupfer-Oxidasen verfügen über 2 Hämgruppen (Häm  $aa_3$ ,  $ca_3$ ,  $o_3$  oder  $b_3$ ) und als zentrale Zentren Kupferkomplexe. Kupfer-Ion und Häm dienen als Elektronenüberträger und bilden das binukleäre Zentrum für die Sauerstoffreduktion. Sie sind in der Lage, Protonen zu pumpen und sind dadurch an der Aufrechterhaltung des Membranpotentials beteiligt. Zu ihnen zählen sowohl **Cytochrom *c* Oxidasen** als auch **Quinol-Oxidasen** (Borisov *et al.*, 2011).

#### 2. Alternative Oxidasen

Alternative Oxidasen (AOX) sind sowohl in Mitochondrien von höheren Pflanzen als auch Pilzen und allen taxonomischen Bakteriengruppen verbreitet (Borisov *et al.*, 2011; Rogov *et al.*, 2014). Der Elektronentransport durch AOX spaltet sich bereits am Ubichinon bzw. Menachinon von der Atmungskette ab und ist nicht an die ATP-Synthese und Energiekonservierung gekoppelt (Rogov *et al.*, 2014). Durch diese Verzweigung wird bei Aktivität der AOX kein Elektronentransfer über Komplex III nötig. AOX sind nach Angaben von Rogov *et al.* (2014) nicht durch Cyanid hemmbar und zählen somit zu den **Cyanid-resistenten Oxidasen**. Sie nehmen vor allem eine regulatorische Funktion bei der Hitzeregulation, der Regulation vom Energiemetabolismus sowie dem Schutz vor oxidativem Stress und Homöostase ein (Rogov *et al.*, 2014, Borisov *et al.*, 2015).

#### 3. Cytochrom *bd* Oxidasen

Cytochrom *bd* Oxidasen bilden die dritte Familie der terminalen Oxidasen. Zu ihnen zählen die Quinol-Oxidasen, die im aktiven Zentrum kein Kupfer und kein Eisen-Schwefel-Zentrum tragen (Borisov *et al.*, 2011). Sie sind im Allgemeinen aus zwei Untereinheiten aufgebaut – Untereinheit I



und II - und tragen drei redox-aktive Häme (*b558*, *b595*, *d*). Häm *b558* ist in der Untereinheit I gebunden und in die Chinoloxidation involviert, Häm *b595* und Häm *d* sind für gewöhnlich an der Schnittstelle zwischen Untereinheit I und II lokalisiert (Borisov *et al.*, 2011). Während Häm *d* molekularen Sauerstoff bindet, ist die Funktion von Häm *b595* bislang unklar, wobei wissenschaftliche Studien suggerieren, dass Häm *b595* den Elektronentransfer zwischen Häm *b558* und Häm *d* vermittelt (Poole und Williams, 1987; Hata-Tanaka *et al.*, 1987; Borisov *et al.*, 2015). Durch transmembrane Ladungstrennung/aufteilung sind Cytochrom *bd* Oxidasen an der Aufrechterhaltung des Membranpotentials beteiligt, können aber selbst keine Protonen pumpen. Die Expression des *cyd*-Operons (Synthesegene der Cytochrom *bd* Oxidase) wird unter sauerstofflimitierenden Bedingungen und eisenlimitierenden Bedingungen induziert, weshalb sich Cytochrom *bd* Oxidasen durch eine höhere Sauerstoffaffinität als Cytochrom *c* Oxidasen auszeichnen. Der Ubichinon/Menachinon-Pool ist Elektronenlieferant der Cytochrom *bd* Oxidasen. Damit wird eine Beteiligung des *bc*<sub>1</sub>-Komplexes am Elektronentransfer wie bei den alternativen Oxidasen überflüssig. Somit beträgt das H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup> Verhältnis lediglich 1.

Im Allgemeinen zeigt sich die physiologische Relevanz der Cytochrom *bd*-Oxidasen jedoch bei der Toleranz gegenüber sauerstofflimitierenden Bedingungen, der Funktion als Sauerstoff-*Scavenger* zur Inhibierung der Degradierung Sauerstoff-sensitiver Enzyme wie Nitrogenasen und der Toleranz gegenüber nitrosativen Stress (Borisov *et al.*, 2015).

Einige Cytochrom *bd* Oxidasen sind wie alternative Oxidasen Cyanid-resistent und bilden daher als **Cyanid-insensitive Oxidasen (CIO)** eine Subklasse der Cytochrom *bd* Oxidasen. Vermutlich erlangen sie ihre Resistenz durch die variable Menge an Häm *d* im aktiven Zentrum.

Miura *et al.* (2013) konnten für die CIO aus *Gluconobacter oxydans* durch Reinigung neben reduziertem Häm *b* und oxidierten Eisen-Häm auch Häm *d* nachweisen, das möglicherweise als Liganden-Bindestelle von CIO dient. Darüberhinaus scheint die Häm-Komposition der CIO wachstums-spezifisch zu sein (Miura *et al.*, 2013).

Ist Sauerstoff der terminale Elektronenakzeptor, folgen die aus der Oxidation der Reduktionsäquivalente freiwerdenden Elektronen somit den Weg von Komplex I bzw. Komplex II über den Chinon-Pool zum *bc*<sub>1</sub>-Komplex und der terminalen Cytochrom *c* Oxidase bzw. einer Ubichinol-Oxidase [Cytochrom *bo*<sub>3</sub> Oxidase aus *E. coli* (Abramson *et al.*, 2000)], die die Reduktion von Sauerstoff zu Wasser katalysiert (Abbildung 1.2. A). Unter sauerstofflimitierenden Bedingungen werden die Elektronen dagegen direkt vom Chinon-Pool zur Cytochrom *bd* Oxidase transferiert (Abbildung 1.2. B). Eine derartige Variation des Elektronenflusses ist als verzweigte Atmungskette definiert. Beide Wege der Energiekonservierung führen zur Translokation von H<sup>+</sup>-Protonen und

damit zur Aufrechterhaltung des Membranpotentials und Generierung von ATP durch Komplex V (ATP-Synthase).

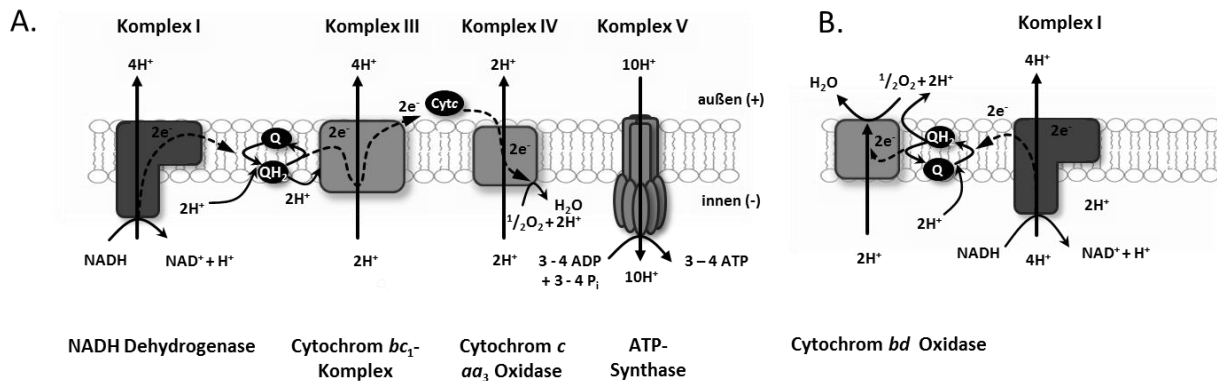


Abbildung 1.2.: Elektronentransport über die aerobe Atmungskette.

**A.** Elektronentransport über die Membranzusammensetzung Komplex I (NADH-Dehydrogenase), Komplex III (Cytochrom  $bc_1$ -Komplex) und Komplex IV (Cytochrom  $c aa_3$ -Oxidase). Die dabei translozierten Protonen werden zur Aufrechterhaltung des Membranpotentials und zur ATP-Synthese genutzt (Komplex V, ATP-Synthase). Die Succinat-Dehydrogenase (Komplex II) bildet den zweiten Eintrittspunkt für die Elektronen in die Atmungskette und katalysiert als Enzym des Citratzyklus die Oxidation von Succinat zu Fumarat. Sie überträgt die Elektronen direkt in den Chinon-Pool (nicht abgebildet).

**B.** Unter sauerstofflimitierenden Bedingungen werden die Elektronen direkt vom Chinon-Pool auf die Cytochrom  $bd$ -Oxidase übertragen. Da der Cytochrom  $bc_1$ -Komplex nicht am Elektronentransfer beteiligt ist und die Cytochrom  $bd$ -Oxidase selber keine Protonen pumpen kann, werden in der Summe 6 Protonen weniger über die Membran transloziert.

## II. Das aerobe Respirationssystem von *S. coelicolor*

Aktuell existieren für *S. coelicolor* nur wenige Studien zur Respiration mit Sauerstoff. Generell beschränken sich wissenschaftliche Arbeiten zur aeroben Atmungskette bei grampositiven Bakterien bisher zumeist auf *Corynebacterium glutamicum*, *Bacillus subtilis* und *Mycobacterium*. Nur wenig ist bislang bekannt über Aufbau, Anordnung, Verteilung sowie Verknüpfung der funktionellen Komponenten der aeroben und anaeroben Atmungskette in Streptomyceten. Als obligat aerobes Bodenbakterium generiert *S. coelicolor* über oxidative Phosphorylierung durch Elektronentransfer vom Substrat über eine Elektronentransportkette Energie in Form von ATP. Sato *et al.* (1940) beschrieben erstmals die Existenz von Cytochromen in Streptomyceten. Fundierte Erkenntnisse zum Nachweis der Cytochrome in der Atmungskette von Streptomyceten erzielten Heim *et al.* (1957). Durch spektrophotometrische Analysen war es ihnen möglich, in 13 *Streptomyces* Arten Cytochrom  $b$  nachzuweisen, wohingegen kein Cytochrom  $a$  und kein Cytochrom  $c$  nachzuweisen war. Auf Grundlage ihrer Ergebnisse suggerierten Heim *et al.* (1957) erstmals die Präsenz einer atypischen respiratorischen Atmungskette, die mit einer **Cyanid-insensitiven Cytochrom  $b$ -Komponente** endet. In *Streptomyces griseus* dagegen konnte Inoue (1958) die Existenz von  $a$ -,  $b$ - und  $c$ -Typ-Cytochromen nachweisen, was von Niederpruem und Hacket (1961) durch die spektroskopische Analyse von zellfreiem Myzel-Extrakt bestätigt wurde: Messbare Aktivitäten konnten von der Diphosphopyridinnukleotid-Oxidase (DPNH), DPNH Diaphorase und Succinoxidase bestimmt werden.

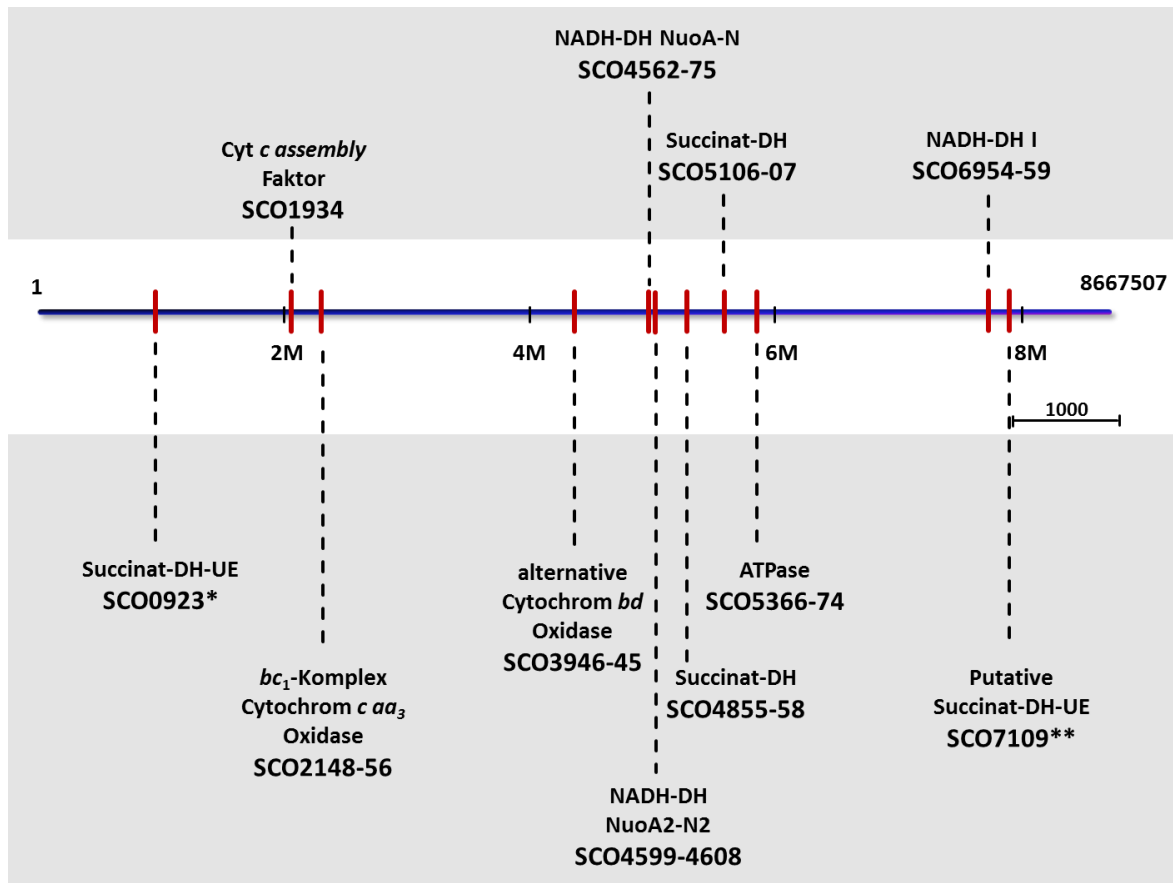
Die Sauerstoffrespiration war zwischen 50-70 % durch Zugabe von 0,001 M Cyanid hemmbar. Mit diesem Ergebnis ist davon auszugehen, dass *Streptomyces* bislang keine nachweisbare CIO bildet.

Der postulierte respiratorische Elektronentransfer vom Substrat zu Sauerstoff erfolgt nach Erkenntnissen der ersten Studien über Flavoprotein, *b*-, *c*- und *α*-Typ-Cytochrome bis zu einer terminalen Cyanid-sensitiven Cytochrom-Oxidase (Niederpruem und Hackett, 1961). Die Atmungskette von *Streptomyces* beinhaltet damit ein komplettes Cytochrom-System, was am Elektronenfluss zur terminalen Oxidase beteiligt ist.

Für *Streptomyces antibioticus* konnte 1967 von Rehacek *et al.* eine aktive respiratorische Atmungskette nachgewiesen werden, die die Oxidation von reduziertem NADH<sub>2</sub> katalysiert. Die Reduktion von molekularem Sauerstoff durch die terminale Oxidase konnte ebenfalls durch Cyanid gehemmt werden.

Trotz der geringen Datenlage zum Aufbau und den Elektronentransport über das Membransystem geben Sequenzanalysen von *S. coelicolor* Aufschluss über den möglichen Weg der oxidativen Phosphorylierung. Das lineare 8,7 Mb große Genom liegt seit 2002 vollständig sequenziert vor (Bentley *et al.*, 2002) und umfasst 7825 kodierende Sequenzbereiche. Neben dem linearen Genom besitzt *S. coelicolor* noch das 365 kb große, lineare Plasmid SCP1, was unter anderem die Synthesegene für das antibiotisch wirksame Methylenomycin enthält (Bentley *et al.*, 2004) und das kleine, 31 kb große, zirkuläre Plasmid SCP2, was einen Fertilitätsfaktor trägt (Haug *et al.*, 2003). Alle experimentellen Arbeiten dieser Dissertation wurden mit seinem plasmidfreien Derivat Stamm M145 bzw. seinen Mutanten durchgeführt.

Das lineare Genom von *S. coelicolor* lässt sich in einen linken Arm (bis 1,5 Mb), den Kern/Core (1,5 bis 6,4 Mb) und den rechten Arm gliedern (Bentley *et al.*, 2002). Sequenzbereiche, die für putative aerobe Respirationskomponenten kodieren, sind über das gesamte lineare Genom verteilt und liegen vorwiegend in duplizierter oder höherer Anzahl im Genom vor (Abbildung 1.3.).



**Abbildung 1.3.:** Lokalisation putativer Komponenten der aeroben Atmungskette auf dem linearen Genom von *S. coelicolor*.

Das lineare Genom gliedert sich in einen linken Arm (bis 1,5 Mb), den *Core*-Bereich (1,5 bis 6,4 Mb) und einen rechten Arm (Bentley *et al.*, 2002). Kodierende Sequenzen für putative Respirationssystemkomponenten sind über das gesamte Genom verteilt und liegen vorwiegend in duplizierter oder höherer Anzahl im Genom vor. Succinat-DH-UE\* – Succinat-Dehydrogenase-Untereinheit mit Ähnlichkeit zu FrdA (Fumarat-Reduktase-Flavoprotein Untereinheit) aus *Mycobacterium tuberculosis*, Cyt *c* assembly Faktor – Cytochrom *c* Assemblierungsfaktor, NADH-DH – NADH-Dehydrogenase, putative Succinat-DH-UE\*\* - putative Succinat-Dehydrogenase-Untereinheit mit Ähnlichkeit zu SDHA (Succinat-Dehydrogenase-Flavoprotein) aus *Methanobacterium thermoautotrophicum*.

Der *Core*-Bereich des Genoms enthält 3 Genbereiche, die für 3 differentielle putative NADH-Dehydrogenasen (**Komplex I der aeroben Atmungskette**) kodieren (SCO4562-75, SCO4599-4608, SCO6954-59). Diese oxidieren die Reduktionsäquivalente NADH aus den Stoffwechselprozessen und koppeln sie an die Reduktion eines Chinons. In der Folge werden Protonen durch die Membran transloziert, was zur Entstehung eines Membranpotenzials beiträgt. Des Weiteren beinhaltet das Genom von *S. coelicolor* drei Module zur Synthese einer Succinat-Dehydrogenase (**Komplex II der aeroben Atmungskette**, SCO0923, SCO4855-58; SCO5106-07), die die Oxidation von Succinat zu Fumarat im TCA-Zyklus katalysiert. Die prosthetische Gruppe FAD dient dabei als Oxidans und wird selbst zu FADH<sub>2</sub> reduziert. Die dabei freiwerdenden Elektronen werden direkt in einen Chinon-Pool der aeroben Atmungskette transferiert. Studien von Pandya und King (1966) und Yassin *et al.* (1988) bewiesen, dass *Streptomyces* Menachinon als mobilen Elektronen-Carrier nutzt, was im Zuge der Elektronenübertragung zu Menachinol reduziert wird. Im *Core*-Bereich liegen zusätzlich Gene zur

Synthese einer Ubichinol-Cytochrom *c*-Reduktase vor (***bc*<sub>1</sub>-Komplex/Komplex III der aeroben Atmungskette, kodiert durch SCO2148-50**) sowie Sequenzbereiche für zwei terminale Cytochrom-Oxidasen (**Komplex IV: Cytochrom *c aa*<sub>3</sub> Oxidase kodiert durch SCO2151-56, Cytochrom *bd* Oxidase kodiert durch SCO3945-46**), die sich, basierend auf den Daten anderer Organismen in ihrer Affinität zu Sauerstoff unterscheiden (D'mello *et al.*, 1996) und damit einhergehend bei unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen aktiv sind. Die Komplexe III und IV sind beide an der oxidativen Phosphorylierung beteiligt. Komplex III nimmt zunächst die Elektronen vom reduzierten Chinon auf, welches infolge dessen wieder reoxidiert wird. Die Elektronen werden vom Komplex III üblicherweise auf einen mobilen Elektronen-Carrier (meist Cytochrom *c*) übertragen. Letztere werden zur Reduktion von Sauerstoff zu H<sub>2</sub>O genutzt, was durch die terminalen Oxidasen katalysiert wird. Werden die Elektronen auf die Cytochrom *c* Oxidase übertragen (**SCO2148-50**) wird die Reduktion an die Translokation von Protonen über die Membran gekoppelt, was mit der Erzeugung einer protonenmotorischen Kraft (*pmf*) einhergeht. Die Gene SCO5366-74, ebenfalls im *Core* des linearen Genoms gelegen, kodieren für eine membranständige ATPase, die die Protonentranslokation ins Zellinnere an die Synthese von ATP koppelt.

Die beschriebene Genorganisation im Genom zeigt damit, dass *S. coelicolor* ein komplettes aerobes Respirationssystem synthetisiert und in der Lage ist, sich durch Variation der terminalen Oxidasen an unterschiedliche Sauerstoffverfügbarkeiten anzupassen. Die Bildung mehrerer terminaler Oxidasen mit unterschiedlichen Affinitäten zu Sauerstoff scheint angesichts der Sauerstoffverfügbarkeit im Boden notwendig, da der Lebensraum Boden hinsichtlich der Sauerstoffverfügbarkeit ein sehr variables Habitat repräsentiert.

Inwieweit *S. coelicolor* seinen Stoffwechsel an wechselnde Sauerstoffbedingungen adaptiert hat, zeigen die Genomanalysen von Bentley *et al.* (2002) und Studien von van Keulen *et al.* (2005).

Interessanterweise konnten in diesem Zusammenhang tatsächlich neben den Genbereichen für die aerobe Respiration auch Sequenzbereiche von Genen fakultativ anaerober bzw. strikt anaerober Bakterien annotiert werden (van Keulen *et al.*, 2005). Im Hinblick auf die obligat aerobe Lebensweise von *S. coelicolor* wird dieses Phänomen als **anaerobes Paradoxon** bezeichnet (Borodina *et al.*, 2005). So ist *S. coelicolor* in der Lage eine sauerstoffunabhängige Klasse I- und Klasse II-Ribonukleotidreduktase zu synthetisieren, um die DNA-*de novo*-Synthese unter anaeroben Bedingungen zu gewährleisten (Bentley *et al.*, 2002; Borovok *et al.*, 2006). Des Weiteren liegen Gene für die Synthese eines Pta/Ack-Systems (Phosphotransacetylase-Acetatkinase) vor, das den Acetat-Metabolismus ermöglicht. Zusätzlich sind im Genom kodierende Bereiche für zwei Lactat-Dehydrogenasen annotiert. Damit ist für *S. coelicolor* auch ein fermentativer Stoffwechsel mit dem Hauptfermentationsprodukt Lactat möglich (Borodina *et al.*, 2005). Hockenull *et al.* (1954) konnten

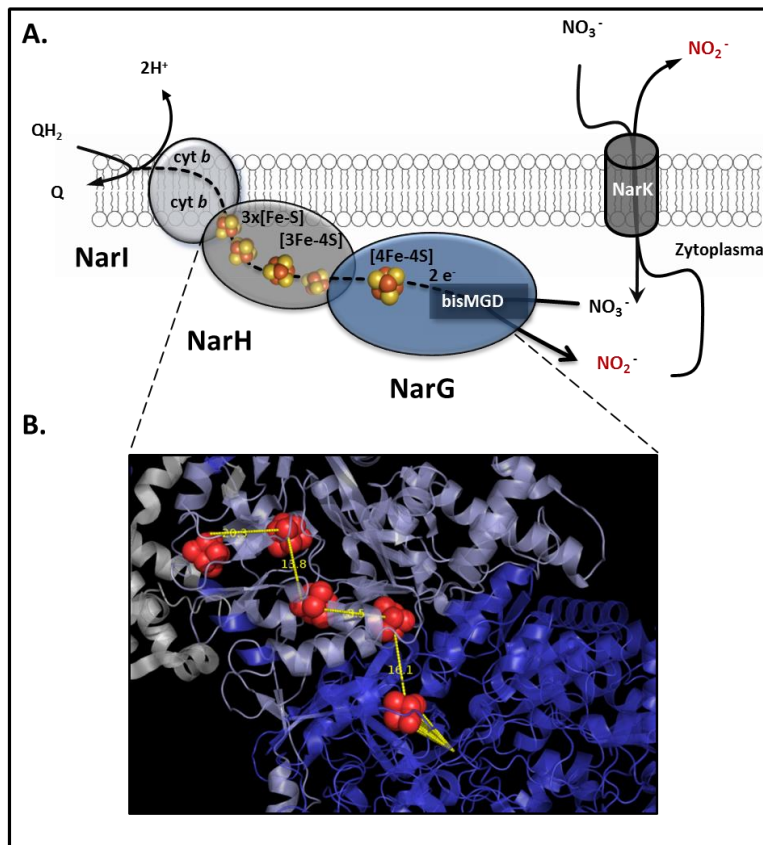
für *S. griseus* die Aktivität der Lactat-Dehydrogenase unter mikroaerophilen Bedingungen bereits nachweisen.

Neben den annotierten Genen, die *S. coelicolor* die Fermentation mit dem Hauptfermentationsprodukt Lactat ermöglichen würden (Borodina *et al.*, 2005) liegen im Genom von *S. coelicolor* gleich drei Operone vor, deren Genprodukte für respiratorische Nitratreduktasen (Nars) kodieren (Bentley *et al.*, 2002; van Keulen *et al.*, 2007). Damit kann *S. coelicolor* unter sauerstofflimitierenden Bedingungen, wie sie im Boden auftreten, Nitrat als Elektronenakzeptor nutzen.

### 1.2. Anaerobe Atmung mit Nitrat

Respiratorische Nitratreduktasen sind molybdänhaltige, membranassoziierte Enzyme mit einer heterotrimeren Struktur, die die Reduktion von Nitrat zu Nitrit katalysieren und die Reaktion an die Energiekonservierung koppeln (Abbildung. 1.4. A). Unter anaeroben Bedingungen kann somit durch die Entstehung einer *pmf* das Membranpotential aufrechterhalten werden.

In *S. coelicolor* werden die drei respiratorischen Nitratreduktasen durch jeweils ein *narGHJI*-Operon kodiert. Die drei mutmaßlichen Operone sind in relativ weit voneinander entfernten Bereichen des Genoms lokalisiert, das *nar1*-Operon befindet sich im rechten Arm, das *nar2*-Operon im linken Arm und das *nar3*-Operon im *Core*-Bereich. Der strukturelle Aufbau der Operone ist untereinander identisch. *narG* kodiert für die katalytische Untereinheit des Nar-Enzyms. Die cytoplasmatisch orientierte 135 kDa große Untereinheit bindet den *bis*-Molybdopterin-Guanidin-Dinukleotid-Kofaktor (*bis*-MGD) in seinem aktiven Zentrum und trägt ein 4Fe-4S-Cluster. *narH* kodiert für die ca. 60 kDa große Elektronentransferkomponente, die vier Fe-S-Cluster bindet, während *narI* für die ca. 27 kDa große Membrankomponente kodiert, die das Nar-Holoenzym in der Membran verankert. NarI bindet ein *di-b*-Typ-Cytochrom und fungiert als Chinol-Dehydrogenase (Blasco *et al.*, 2001; Rothery *et al.*, 2001). Für das Genprodukt von *narJ* wird bislang eine Funktion als Chaperon bei der Assemblierung des Nar-Komplexes postuliert (Lanziano *et al.*, 2007). Die prosthetischen Gruppen sind als Elektronentransferkette organisiert, während das Nar-Enzym *in situ* ein Dimer bildet (Richardson *et al.*, 2001).



**Abbildung 1.4.: Modell der Nar-vermittelten Nitratreduktion.**

**A.** Das Nar-Holoenzym ist aus den drei Untereinheiten NarI (membranassoziierte Untereinheit), NarH (Elektronentransferkomponente) und NarG (katalytische Untereinheit) assembliert. Die Elektronen zur Reduktion von Nitrat zu Nitrit stammen vom reduzierten Chinon (QH<sub>2</sub>) und werden über die vier Fe-S-Cluster der Elektronentransferkomponente NarH auf die katalytische Untereinheit transferiert. Dort erfolgt die Kofaktor-abhängige Reduktion von Nitrat zu Nitrit. Letzteres wird über einen Nitrat/Nitrit-Antiporter aus der Zelle geschleust.

**B.** Anordnung der für den Elektronentransfer relevanten Fe-S-Cluster in den Untereinheiten NarH und NarG (PDB1q16, nach Bertero *et al.*, 2003). Die ermittelte Distanz (in Ångström) zwischen den prosthetischen Gruppen verdeutlicht die Effizienz des Elektronentransports.

Respiratorische Nars haben ihr aktives Zentrum an der inneren Zytoplasmamembran. Die derzeit gängige Theorie zum Elektronenfluss und damit zur Funktionalität des Nar-Enzyms ist die Elektronenübertragung durch ein membrangängiges Chinon auf die Membrankomponente NarI des Nar-Enzyms. Unter anaeroben Bedingungen erfüllt Menachinon die Funktion als mobiler Elektronen-Carrier (Newton, 1971; Young, 1975). Dieser überträgt die Elektronen direkt auf Cytochrom *b* im NarI, welches infolge dessen reduziert wird. Über eine Anordnung von einem [4Fe-4S]-Cluster und 3 [Fe-S] im NarH-Protein werden die Elektronen auf die katalytische Untereinheit NarG geleitet (Abbildung 1.4. A + B). NarG selber trägt ebenfalls ein [4Fe-4S]-Cluster, über das die Elektronen schließlich zum aktiven Zentrum, dem *bis*-MGD-Kofaktor, transferiert werden (Abbildung 1.4. B). Am aktiven Zentrum in der katalytischen Untereinheit erfolgt die 2-Elektronen-Reduktion von Nitrat zum Nitrit. Die bei der Übertragung frei werdenden Protonen werden zur Aufrechterhaltung des Membranpotentials genutzt.

Da das aktive Zentrum der respiratorischen Nitratreduktasen auf der inneren Zytoplasmamembran lokalisiert ist, muss Nitrat über ein Nitrat/Nitrit-Antiporter, der gleichzeitig durch Transport von Nitrit aus der Zelle der Akkumulation toxischer Nitritmengen entgegenwirkt, in die Zelle gelangen. Dieser wird durch das Gen *narK* kodiert (Moir und Wood, 2001).

Gewöhnlich ist das *narK*-Gen stromaufwärts bzw. in unmittelbarer Nähe zum *narGHJI*-Operon lokalisiert (Moir und Wood, 2001). *E. coli* besitzt neben *narK*, was stromaufwärts des Gens für die

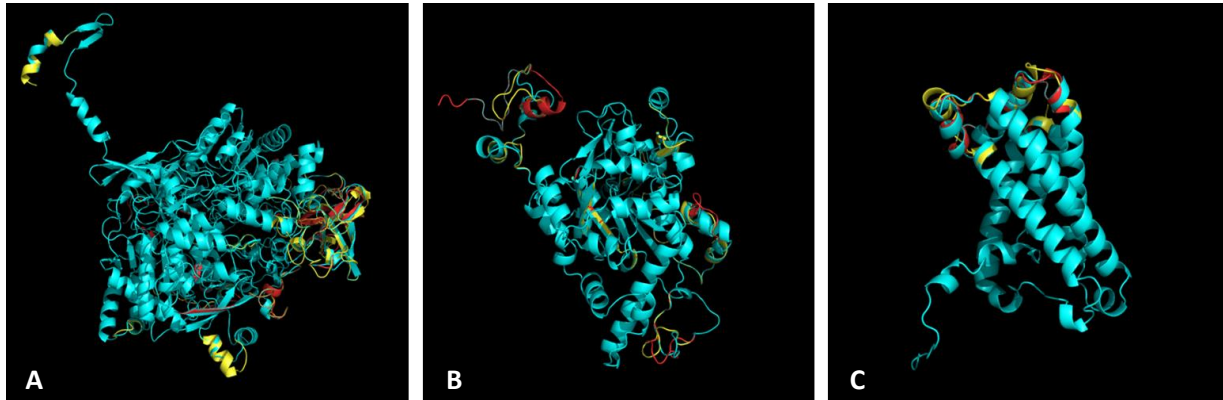
Nitratreduktase A gelegen ist, das NarK-Homologon NarU. Diese ist stromaufwärts einer zweiten Nitratreduktase, NarZ, lokalisiert. Studien von Clegg *et al.* (2002) und Jia *et al.* (2009) identifizierten NarK und sein Homologon NarU als Nitrat/Nitrit-Antiporter.

Für *S. coelicolor* konnten die Gene SCO2959 und SCO0213 als NarK1- und NarK2-homologe Proteine identifiziert werden (van Keulen *et al.*, 2005). Auf Aminosäureebene zeigt NarK1 eine Übereinstimmung von 39 % mit NarK und 37 % mit NarU aus *E. coli*. Das *narK1*-Gen liegt nicht in unmittelbarer Nähe zu Genen, die am Stickstoffmetabolismus beteiligt sind. Das Gen für NarK2 ist dagegen 3 Gene stromaufwärts vor dem *nar2*-Operon lokalisiert. Auf Aminosäureebene zeigt NarK2 eine Übereinstimmung von 22 % mit NarK und 23 % mit NarU. Studien der *Streptomyces*-Arbeitsgruppe zeigen, dass NarK2 der spezifische Nitrat/Nitrit-Antiporter für das Nar2-Enzym ist (Diplomarbeit, Tony Pawlik, MLU Halle-Wittenberg, 2011). Ob auch NarK1 als ein spezifischer Transporter für eins der drei Nar-Enzyme fungiert, ist bislang noch nicht geklärt.

Im Gegensatz zum verwendeten Modellorganismus, besitzt *S. avermitilis* keine respiratorischen Nitratreduktasen (van Keulen *et al.*, 2007). Damit nimmt *S. coelicolor* in der Gattung *Streptomyces* durch die Bildung von gleich **3 Nitratreduktasen** eine Sonderstellung ein. Das Vorkommen von zwei Nitratreduktasen ist aber bereits für *E. coli* (Iobbi *et al.*, 1987), *Salmonella typhimurium* (Barrett und Riggs, 1982) und *Ralstonia eutropha* (Cramm, 2009) beschrieben. Für *E. coli* konnte die Kristallstruktur der Nitratreduktase A bereits aufgeklärt werden (Bertero *et al.*, 2003; Jormakka *et al.*, 2004), sie ist damit in dieser Arbeit Grundlage für erste Strukturanalysen der *Streptomyces*-Nar-Enzyme. Die zweite respiratorische Nitratreduktase, NarZ, von *E. coli* wird durch das *narUZYW*-Operon kodiert und ist nur schwach exprimiert. Clegg *et al.* (2006) postulierten für NarZ eine Expression unter nährstoffarmen Bedingungen.

Die primären Aminosäuresequenzen von NarG der Nitratreduktase und der katalytischen Untereinheit von NarZ aus *E. coli* zeigen eine Identität von 78 % und eine Übereinstimmung von 90 %, die Nitratreduktasen scheinen damit redundant bezüglich Funktion und biochemischer Struktur. *S. coelicolor* synthetisiert drei Nar-Enzyme, deren katalytische Untereinheiten NarG1, NarG2 und NarG3 eine Identität von lediglich ca. 65 % und eine Übereinstimmung von 78 % auf Aminosäureebene zeigen (Abbildung 1.5.). Die postulierten Tertiärstrukturen der Monomere aller drei katalytischen Untereinheiten sowie der Elektronentransportkomponente NarH und der Membrankomponente NarI verdeutlichen aber, dass die drei Nitratreduktasen von *S. coelicolor* im strukturellen Aufbau dennoch große Homologien aufweisen und damit funktionell sehr ähnlich sind.





**Abbildung 1.5.:** Vergleich der durch Phyre<sup>2</sup> (Kelley *et al.*, 2015) vorhergesagten Tertiärstrukturen von NarG (A), NarH (B) und NarI (C) der drei Nar-Enzyme (Untereinheiten von Nar1 cyan, Nar2 orange, Nar3 rot) von *S. coelicolor*.

Die homologen Sequenzbereiche aller drei Nars werden in den einzelnen Untereinheiten durch die farbliche Kennzeichnung der Nar1-Struktur (cyan) dargestellt.

**Tabelle 1.1.:** Alignment der Primärsequenzen der jeweiligen Nar-Untereinheiten nach Strukturaufklärung durch Phyre<sup>2</sup>. Vergleich der Identitäten nach Alignment der jeweiligen Nar-Untereinheiten von *S. coelicolor*. Der Abgleich der primären Aminosäuresequenzen wurde mit UCSF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004) durchgeführt.

Untereinheit	NarG (A)	NarH (B)	NarI (C)
<b>Identitäten [%]</b>			
<b>Nar1 zu Nar2</b>	64,31	62,3	45,95
<b>Nar1 zu Nar3</b>	64,5	70,02	49,1
<b>Nar2 zu Nar3</b>	63,4	62,37	54,05

Die Ausbildung von Nitratreduktasen, wie sie für *S. coelicolor* annotiert sind, ist unter gram-positiven Mikroorganismen nicht etwa einzigartig. Neben dem gram-positiven Sporenbildner *Bacillus subtilis* (Hoffmann *et al.*, 1995) konnten respiratorische Nitratreduktasen auch in den gram-positiven *Actinobacteria Corynebacterium glutamicum* (Takeno *et al.*, 2007) und *Mycobacterium* (Sohaskey und Wayne, 2003) identifiziert und charakterisiert werden. Vor allem in *M. tuberculosis* konnte ein Zusammenhang zwischen der Ausbildung der Nitratreduktasen und seiner Überdauerung im NRP-I-Stadium (*non-replicating persistence*) nachgewiesen werden. Demnach ist die Aktivität des Nar-Enzyms essentiell für die Bildung des NRP-I-Stadiums in *M. tuberculosis* und sichert damit die Überdauerung in Makrophagen (Sohaskey und Wayne, 2003).

Neben den respiratorischen Nars kann Nitrat auch von der löslichen, assimilatorischen Nitratreduktase NasA und der periplasmatischen Nitratreduktase Nap als Elektronenakzeptor genutzt werden (Kraft *et al.*, 2011). Da *S. coelicolor* kein Periplasma besitzt, bildet es neben den respiratorischen Nars nur die assimilatorische NasA (kodiert durch SCO7374, Wang und Zhao, 2009). Das durch die Nitratreduktion entstandene Nitrit wird anschließend durch die Nitritreduktase NirBC

(kodiert durch SCO2487-SCO2488) zu Ammonium reduziert, welches in der Folge durch das GS-GOGAT-System (Glutaminsynthetase und Glutamin-2-Oxoglutarat-Aminotransferase) in die Biomasse eingebaut werden kann (Tiffert *et al.*, 2008, Fischer *et al.*, 2012).

Der evolutionäre Nutzen respiratorischer Nitratreduktasen ist im Allgemeinen als Anpassung an sauerstofflimitierende Bedingungen zu sehen. Nitrat kann bei Sauerstofflimitierung als alternativer Elektronenakzeptor genutzt werden, um unter anaeroben Bedingungen durch die Generierung einer *pmf* die Energiekonservierung zu gewährleisten (Richardson *et al.*, 2001).

Nar-Enzyme werden in *M. tuberculosis* beim Eintritt von Hypoxie verstärkt induziert. Der Transporter NarK2 sensiert den Redoxstatus der Zelle, so dass Nitrat unter hypoxischen Bedingungen unmittelbar ins Zytoplasma transportiert wird (Sohaskey, 2008). Die Reduktion von Nitrat zu Nitrit ermöglicht für *M. tuberculosis* dadurch eine Adaption an wechselnde Sauerstoff- und/bzw. Nitrat-Bedingungen (Khan und Sakar, 2012) und damit das Überleben im Wirt im *non-replicating state* (Sohaskey, 2008). Tan *et al.* (2010) konnten außerdem belegen, dass die Respiration mit Nitrat *M. tuberculosis* eine Resistenz gegenüber Säurestress vermittelt.

*S. coelicolor* kann zwar anaerobe Perioden überdauern, allerdings nicht auskeimen oder wachsen, wenn Fumarat oder Nitrat als mögliche Elektronenakzeptoren zur Verfügung stehen (van Keulen *et al.*, 2007). Fischer *et al.* (2010) konnten demnach durch Analyse von *nar*-Deletionsmutanten zeigen, dass die Expression aller drei *nar*-Operone zur Bildung von anaerob aktiven Nar-Enzymen führt (*in vivo*). Damit kann *S. coelicolor* Nitrat als Elektronenakzeptor nutzen. Die Nar-Enzyme sind untereinander nicht redundant und in unterschiedlichen Phasen des Lebenszyklus aktiv [Nar1 in Sporen, Nar2 in Myzel, Nar3 in stationärem Myzel (Fischer *et al.*, 2010)].

Welche Relevanz die drei Nar-Enzyme für die Energiekonservierung für *S. coelicolor* bei Eintreten anaerober Bedingungen tragen, ist bislang allerdings nicht geklärt, da nur wenige Daten über das Überdauern und die Überlebensfähigkeit von *S. coelicolor* mit Nitrat existieren. Da *S. coelicolor* als Modellorganismus für die anaerobe Nitratreduktion bisher nicht in den Fokus gerückt ist, liegen außerdem wenig genetische noch biochemische Studien zu den Nar-Enzymen vor. Interessant ist in diesem Zusammenhang vor allem, wie die drei Nar-Enzyme funktionell in den komplexen Lebenszyklus eingebettet sind und welchen regulatorischen Mechanismen ihre Synthese und Aktivität unterliegen.

Im Kontext der Energiekonservierung über das aerobe Respirationssystem ist vor allem der Aspekt relevant, ob eine Schnittstelle zwischen der aeroben Atmung mit Sauerstoff und der anaeroben Atmung mit Nitrat existiert, um eine Anpassung von *S. coelicolor* an spontan wechselnde Sauerstoffbedingungen zu gewährleisten.

Die Beantwortung dieser These führt zur experimentellen Abfassung dieser Arbeit. Auf Grundlage der molekularbiologischen Vorarbeiten von Janet White und Jesse Alderson (JIC, Norwich) sowie den physiologischen Vorarbeiten von Dr. M. Fischer, war es Ziel dieser Arbeit, die drei Nar-Enzyme von *S. coelicolor* funktionell und biochemisch zu charakterisieren und zu zeigen, inwiefern die Bildung von gleich drei Nar-Enzymen in Bezug auf die Energiekonservierung bei Sauerstoffmangel während des komplexen Lebenszyklus gerechtfertigt ist. Des Weiteren wird der Aspekt untersucht, inwiefern das bislang relativ unerforschte Respirationssystem von *S. coelicolor* mit den bereits untersuchten Systemen anderer gram-positiver Mikroorganismen vergleichbar ist.

Erstmals erforderte die experimentelle Umsetzung die Etablierung von *in vitro*-Untersuchungssystemen und proteinbiochemischen Ansätzen, um sowohl die Funktionalität der aeroben Respirationssysteme als auch der Nar-Enzyme in den einzelnen Lebenszyklusphasen zu charakterisieren.

Gegenstand und Ziel dieser Dissertation sind somit die Charakterisierung eines nitrat-abhängigen anaeroben Energiekonservierungssystems/Respirationssystems und dessen potenzielle Verbindung zur aeroben Atmung am Untersuchungsmodell *S. coelicolor*.

## 2 Material und Methoden

### 2.1. Geräte, Chemikalien und Lösungen

Nachfolgend sind alle in der vorliegenden Dissertation verwendeten Geräte und Chemikalien aufgelistet. Anderweitige Geräte, die an dieser Stelle nicht gelistet wurden, sind an entsprechender Stelle im Material-und Methoden-Teil zu finden.

Anaerobzelt	Vinyl Glove Box; Coy Laboratories (Michigan, USA)
Blotting-Aparatur	Fastblot Semi-Dry Blotter (Biometra, Göttingen)
Elektroporator	BioRad <i>Gene Pulser</i> , Pulse Controller (BioRad, München)
Gel-Dokumentation	UV-Transilluminator (Intas, Göttingen)
	Gelelektrophorese Mini-Agarose-Gelkammer (Peqlab, Erlangen)
	Midi-Agarose-Gelkammer Professionel II (Roth, Karlsruhe)
	Polyacrylamid-Gelkammer Mini-Protean Tetra Cell, BioRad
Inkubationsschüttler	TS1 Thermoshaker (Biometra, Göttingen)
Kugelmühle	Schwingmühle Typ MM2 (Retsch, Haan)
Laborwippen	ST5 (CAT, Staufen)
Laminarbox	LF MRF 06.12 GS (Steag, Pfullingen)
Lyophilisator	Alpha 4 (Christ)
Magnetrührer	MLW R3T; Rührgerätewerk Medingen (Freital)
	VWR VMS-A, VWR (Darmstadt)
Mikrotiterplatten-Reader	Tecan Sunrise (Crailsheim)
PCR-Thermocycler	T3000, Biometra (Göttingen)
pH-Meter	MV870, Präcitronic (Dresden) 761 Calimetric Fa. Knick
(UV/VIS-)Photometer	Spekol 1500 (Analytik Jena, Jena)
	NanoDrop ND-1000 (Peqlab, Erlangen)
	Uvikon 900, Kontron Instruments (Großzimmern)
Spannungsgeber	Power Supplies EV 243 (Peqlab, Erlangen)
	PHERO-stab. 300 (Biotec-Fischer, Wembley, Australien)
Thermoblock	Trio-Thermoblock, Nr. 9511386 (Biometra, Göttingen)
Ultraschall	Generator: Sonoplus GM3100, Ultraschallwandler: Sonoplus UW 3100, Kegelspitze: KE76 (Bandelin electronic, Berlin)
Vortexer	Vortex Genie-2; Scientific Industries (New York, USA)
Waagen	Feinwaage GR200 Electronic Balance (A&D Company, Tokyo, Japan)
	Kern 572 (Kern & Sohn, Balingen-Frommern)
	FX-200 Electronic Balance (Tokyo, Japan)
Zentrifugen	Sorvall RC6 Plus (SLA-3000, SS34, Dupont Instruments, USA)
	Rotanta 460R (Hettich-Zentrifugen, Tuttlingen)
	Hettich Universal 30 RF (Hettich-Zentrifugen, Tuttlingen)
	Eppendorf Zentrifuge 5415C (Eppendorf, Hamburg)
	Z216 MK (Hermle Labortechnik, Wehningen)
	Sorvall Discovery M120 SE (Kendro, Osterode)
	L8-60M Ultrazentrifuge (Beckmann, München)
	Sorvall MX120+ Micro-Ultrazentrifuge (ThermoScientific, Braunschweig)

Die Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von folgenden Firmen bezogen:

Amersham Bioscience Europe	(Freiburg)
Fluka	(Buchs, CH)
Gerbu	(Gaiberg)
Invitrogen	(Karlsruhe)
Merck	(Darmstadt)
Riedel de Haen/Sigma-Aldrich	(Seelze)
Roche Diagnostics	(Mannheim)
Roth	(Karlsruhe)
SERVA	(Heidelberg)
Sigma-Aldrich	(Steinheim)

Verwendete kommerzielle Kits:

High Pure PCR Template Preparation Kit	(Roche Diagnostics, Mannheim)
QIAprep Spin Miniprep Kit	(Qiagen, Hilden)
QIAquick Gel Extraction Kit	(Qiagen, Hilden)
RNeasy Mini Kit	(Qiagen, Hilden)
RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	(Thermo Fisher Scientific, Braunschweig)

## 2.2. Organismen, Plasmide, Cosmide

Alle in der vorliegenden Dissertation verwendeten sowie neu konstruierten Bakterienstämme, Plasmide und Cosmide sind in der nachfolgenden Übersicht tabellarisch nach Genotyp und Herkunft gelistet.

Tabelle 2.1.: Übersicht der verwendeten Plasmide und Cosmide

Plasmid/Cosmid	Vektor	Genotyp	Referenz
pET-30a(+)	pET30a(+)	Expressionsvektor	Novagen, USA
pET-30a/narG1	pET30a(+)	pET30a(+) mit SCO6535, Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
pET-30a/narG2	pET30a(+)	pET30a(+) mit SCO0216, Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
pET-30a/narG2	pET30a(+)	pET30a(+) mit SCO4947, Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
pMS82	pMS82	φBT1-Derivat, integriert in SCO4848, Hyg <sup>R</sup>	Gregory <i>et al.</i> , 2003
pMS82/SCO2152	pMS82	pMS82 mit SCO2152, Hyg <sup>R</sup>	diese Arbeit
pMS82/SCO2148-50	pMS82	pMS82 mit SCO2148-50, Hyg <sup>R</sup>	diese Arbeit
pMS82/SCO2148-51	pMS82	pMS82 mit SCO2148-51, Hyg <sup>R</sup>	diese Arbeit
pMS82/SCO2153-56	pMS82	pMS82 mit SCO2153-56, Hyg <sup>R</sup>	diese Arbeit
pMS82/SCO3945-46	pMS82	pMS82 mit SCO3945-46, Hyg <sup>R</sup>	diese Arbeit
1C07.2.e05.EZR1.seq	Supercos1	SCO7235::Tn5062, Carb <sup>R</sup> , Apra <sup>R</sup>	diese Arbeit
1C07.2.h09.EZR1.seq	Supercos1	SCO7236::Tn5062, Carb <sup>R</sup> , Apra <sup>R</sup>	diese Arbeit
6G10A.1.F03	Supercos1	SCO2152::Tn5062, Carb <sup>R</sup> , Apra <sup>R</sup>	diese Arbeit
6G10A.2.G04	Supercos1	SCO2153::Tn5062, Carb <sup>R</sup> , Apra <sup>R</sup>	diese Arbeit
6G10A.1.F02	Supercos1	SCO2150::Tn5062, Carb <sup>R</sup> , Apra <sup>R</sup>	diese Arbeit
pASK-IBA3(+)	pASK-IBA3(+)	Expressionsvektor, fl-IG, <i>bla</i> , <i>ori</i> , <i>t<sub>lpp</sub></i> , <i>tet</i> -Repressor, <i>tetA</i> -Promotor/Operator, <i>Strep</i> -Tag II C-terminal	IBA Technologies, Göttingen
pASK-IBA5(+)	pASK-IBA5(+)	Expressionsvektor, fl-IG, <i>bla</i> , <i>ori</i> , <i>t<sub>lpp</sub></i> , <i>tet</i> -Repressor, <i>tetA</i> -Promotor/Operator, <i>Strep</i> -Tag II N-terminal	IBA Technologies, Göttingen
pASK-IBA30212	pASK-IBA3(+)	pASK-IBA3(+) mit SCO0212	diese Arbeit
pASK-IBA50212	pASK-IBA5(+)	pASK-IBA5(+) mit SCO0212	diese Arbeit

Tabelle 2.2.: Übersicht der verwendeten und neu konstruierten *E. coli*-Stämme

<i>Escherichia coli</i> -Stamm	Genotyp	Referenz
MC4100	F <sup>-</sup> <i>araD 139 Δ (argF-lac) U 169 ptsF25 deoC1 relA1 flbB530 rpsL 150 λ<sup>-</sup></i>	Casadaban und Cohen, 1979
XL1-Blue	<i>hsdR17 endA1 supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac</i>	Stratagene, Amsterdam, NL
DH5α	[F <sup>-</sup> <i>proAB, lacI<sup>q</sup>ΔM15, Tn10</i> ], Tet <sup>R</sup> F- <i>φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rk<sup>-</sup>,mk<sup>-</sup>) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1λ<sup>-</sup></i>	Bethesda Research Laboratories
JM109	F <i>traD36 proAB lacI<sup>q</sup> Δ(lacZ)M15/Δ(lac-proAB) glnV44 e14- gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi hsdR17</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
Rosetta (DE3)/pLysS	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub>(R<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm λ(DE3[<i>lacI</i>lavUV5-T7 gene 1 ind1 sam7nin5])pLysSRARE (Cam<sup>R</sup>)Cm<sup>R</sup></i>	Novagen
XL1-pET30a-narG1	XL1-Blue mit pET30a-narG1, Tet <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
XL1-pET30a-narG2	XL1-Blue mit pET30a-narG2, Tet <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
XL1-pET30a-narG3	XL1-Blue mit pET30a-narG3, Tet <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
XL1-IBA3/0212	XL1-Blue mit pASK-IBA3SCO0212, Tet <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
XL1-IBA5/0212	XL1-Blue mit pASK-IBA5SCO0212 Tet <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
Rosetta-pET30a/narG1	Rosetta mit pET30a-narG1, Cm <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
Rosetta-pET30a/narG2	Rosetta mit pET30a-narG2, Cm <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
Rosetta-pET30a/narG3	Rosetta mit pET30a-narG3, Cm <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
Rosetta-IBA3/0212	Rosetta mit pASK-IBA3SCO0212, Cm <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
Rosetta-IBA5/0212	Rosetta mit pASK-IBA5SCO0212 Cm <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	diese Arbeit
JM109-E05	Cosmid 1C07.2.e05.EZR1.seq, Carb <sup>R</sup> , Apra <sup>R</sup>	Fernández-Martínez <i>et al.</i> , 2010
JM109-H09	Cosmid 1C07.2.h09.EZR1.seq, Carb <sup>R</sup> , Apra <sup>R</sup>	Fernández-Martínez <i>et al.</i> , 2010
JM109-F03	Cosmid 6G10A.1.F03, Carb <sup>R</sup> , Apra <sup>R</sup>	Fernández-Martínez <i>et al.</i> , 2010
JM109-G04	Cosmid 6G10A.2.G04, Carb <sup>R</sup> , Apra <sup>R</sup>	Fernández-Martínez <i>et al.</i> , 2010
JM109-F02	Cosmid 6G10A.1.F02, Carb <sup>R</sup> , Apra <sup>R</sup>	Fernández-Martínez <i>et al.</i> , 2010
JM109/pMS82	JM109 mit pMS82, Hyg <sup>R</sup>	diese Arbeit
DH5α/pMS82-3945-46	DH5α mit pMS82/SCO3945-46, Hyg <sup>R</sup>	diese Arbeit
DH5α/pMS82-2148-50	DH5α mit pMS82/SCO2148-50, Hyg <sup>R</sup>	diese Arbeit
DH5α/pMS82-2148-51	DH5α mit pMS82/SCO2148-51, Hyg <sup>R</sup>	diese Arbeit
DH5α/pMS82-2153-56	DH5α mit pMS82/SCO2153-56, Hyg <sup>R</sup>	diese Arbeit
DH5α/pMS82-2152	DH5α mit pMS82/SCO2152, Hyg <sup>R</sup>	diese Arbeit
ET12567/pUZ8002	<i>Δdam, Δdcm, ΔhsdS; tra</i> auf pUZ8002, Cm <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	MacNeil <i>et al.</i> , 1992
ET12567/pMS82-3945-46	Wie ET12567/pUZ8002 mit pMS82/SCO3945-46, Hyg <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
ET12567/pMS82-2148-50	Wie ET12567/pUZ8002 mit pMS82/SCO2148-50, Hyg <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
ET12567/pMS82-2148-51	Wie ET12567/pUZ8002 mit pMS82/SCO2148-51, Hyg <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit

ET12567/pMS82-2153-56	Wie ET12567/pUZ8002 mit pMS82/SCO2153-56, Hyg <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
ET12567/pMS82-2152	Wie ET12567/pUZ8002 mit pMS82/SCO2152, Hyg <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
ET12567-E05	Wie ET12567/pUZ8002 mit 1C07.2.e05.EZR1.seq, Kan <sup>R</sup> , Carb <sup>R</sup> , Apra <sup>R</sup>	diese Arbeit
ET12567-H09	Wie ET12567/pUZ8002 mit 1C07.2.h09.EZR1.seq, Kan <sup>R</sup> , Carb <sup>R</sup> , Apra <sup>R</sup>	diese Arbeit
ET12567-F03	Wie ET12567/pUZ8002 mit 6G10A.1.F03, Kan <sup>R</sup> , Carb <sup>R</sup> , Apra <sup>R</sup>	diese Arbeit
ET12567-G04	Wie ET12567/pUZ8002 mit 6G10A.2.G04, Kan <sup>R</sup> , Carb <sup>R</sup> , Apra <sup>R</sup>	diese Arbeit
ET12567-F02	Wie ET12567/pUZ8002 mit 6G10A.1.F02, Kan <sup>R</sup> , Carb <sup>R</sup> , Apra <sup>R</sup>	diese Arbeit

Tabelle 2.3.: Übersicht der verwendeten und neu konstruierten *S. coelicolor*-Stämme

<i>S. coelicolor</i> A3(2) Stamm	Genotyp	Referenz
M145 (Wildtyp)	SCP1 <sup>-</sup> , SCP2 <sup>-</sup>	Kieser <i>et al.</i> , (2000)
<b>Untersuchung der Nar-Enzyme</b>		
NM92	$\Delta narGHJI$ ; $\Delta narG2H2JI2$ ; $\Delta narG3H3JI3$	Fischer <i>et al.</i> , 2010
NM1821	M145 $\Delta SCO1821::aac(3)IV$	Fischer <i>et al.</i> , 2010
NM29	$\Delta narGHJI$ ; $\Delta narG2H2JI2$	Fischer, Falke <i>et al.</i> , 2013
NM59	$\Delta narGHJI$ , $\Delta narG3H3JI3$	Fischer, Falke <i>et al.</i> , 2013
NM68	$\Delta narG2H2JI2$ ; $\Delta narG3H3JI3$	Fischer, Falke <i>et al.</i> , 2013
NM24	$\Delta narGHJI$	Fischer, Falke <i>et al.</i> , 2013
NM3	$\Delta narG2H2JI2$	Fischer, Falke <i>et al.</i> , 2013
NM27	$\Delta narG3H3JI3$	Fischer, Falke <i>et al.</i> , 2013
M559	$\Delta redA$	Janet White, JIC Norwich, Stamm ist Bestandteil der Laborsammlung
COE285	M145 SCO0213::Tn5062	Fischer <i>et al.</i> , 2014
COE404	M145 SCO0213::Tn5062 + pMS82narK2	Fischer <i>et al.</i> , 2014
COE301	M145 SCO2959::Tn5062	Fischer <i>et al.</i> , 2014
COE403	M145 SCO2959::Tn5062 + pMS82narK1	Fischer <i>et al.</i> , 2014
COE382	M145 SCO0203::Tn5062	P. Haase, MLU Halle
COE432	M145 SCO0203::Tn5062 + pMS82-SCO0203	T. Pawlik, MLU Halle
<b>Untersuchung der Cytochrom-Oxidasen</b>		
COE190	$\Delta SCO3945-46$	Jesse Alderson, JIC Norwich
COE192	$\Delta SCO2148-56$	Jesse Alderson, JIC Norwich
COE193	wie COE192, $\Delta SCO2148-56$	Jesse Alderson, JIC Norwich



COE437	COE190 pMS82/SCO3945-46	diese Arbeit
COE441	COE192 pMS82/SCO2152	diese Arbeit
COE450	COE192 pMS82/SCO2148-50	diese Arbeit
COE452	COE192 pMS82/SCO2148-51	diese Arbeit
COE454	COE192 pMS82/SCO2153-56	diese Arbeit
COE460	M145 SCO7236::Tn5062	diese Arbeit
COE462	M145 SCO7234::Tn5062	diese Arbeit
COE464	COE192 SCO7234::Tn5062	diese Arbeit
COE466	COE192 SCO7236::Tn5062	diese Arbeit
COE468	COE190 SCO7236::Tn5062	diese Arbeit
COE470	COE190 SCO7234::Tn5062	diese Arbeit
COE472	M145 SCO2152::Tn5062	diese Arbeit
COE474	M145 SCO2153::Tn5062	diese Arbeit
COE502	M145 SCO2150::Tn5062	diese Arbeit
COE520	COE502 pMS82/SCO2148-50	diese Arbeit
COE522	COE502 pMS82/SCO2148-51	diese Arbeit

### 2.3. Nährmedien und Zusätze

Die Anzucht und Kultivierung der verwendeten Bakterienstämme erfolgte in den nachfolgend aufgelisteten Nährmedien. Alle Nährmedien wurden zuvor bei 121 °C für 20 min autoklaviert, hitzelabile Substanzen und Antibiotika wurden sterilfiltriert (Porengröße 0,22 µM) und nach dem Autoklavieren dem abgekühlten Medium steril zugesetzt. Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Medien und Zusätze in zweifach entionisiertem H<sub>2</sub>O (H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>) gelöst.

#### 2.3.1. Vollmedien zur Anzucht und Kultivierung von *E. coli* und *S. coelicolor*

##### Lysogenic Broth (LB) (Sambrook et al., 1989)

Zur Anzucht von *E. coli* im Vollmedium wurde LB-Medium nach Miller verwendet:

Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
Pepton (aus Casein, tryptisch verdaut)	1 % (w/v)
NaCl	0,5 % (w/v)
(Agar-Agar)	1,5 % (w/v)

Zur Selektion rekombinanter Klone über Zusätze wie Apramycin und/oder Hygromycin, erfolgte die Anzucht von *E. coli* in LB-Medium nach Luria mit der niedrigsten Salzkonzentration (0,05 %), da hohe

Salzkonzentration die freie Verfügbarkeit und somit die Wirkstoffkonzentration der Antibiotika beeinflusst. Zur Herstellung von LB-Festmedium wurde dem Nährmedium 1,5 % (w/v) Agar-Agar zugesetzt.

#### Soya Flour Mannitol (SFM) Medium

Zur Anzucht und Kultivierung von *S. coelicolor* wurde SFM-Medium, gelöst in Leitungswasser, als Sporulationsmedium verwendet:

Sojamehl	2 % (w/v)
D-Mannitol	2 % (w/v)
Agar-Agar	2 % (w/v)

#### Tryptone Soya Broth (TSB)

Für die Anzucht in Flüssigkultur wurde als Vollmedium 3 % TSB (Oxoid) in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gelöst.

#### TB-Medium (*terrific broth*)

Zur Produktion von *Strep*-Tag-II-Fusionen wurden die Expressionskulturen in *terrific broth* TB-Medium kultiviert.

Pepton (aus Casein, tryptisch verdaut)	12 g
Hefeextrakt	24 g
Glycerin	4 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 850 ml

Die Zusätze sind der Tabelle 2.4 zu entnehmen. Soweit nicht anders angegeben wurde diese ebenfalls bei 121 °C autoklaviert oder sterilfiltriert und dem Medium separat zugesetzt.

**Tabelle 2.4.: TB-Medium Zusätze**

Zusatz	Stammlösung	Endkonzentration
Aspartat	20 % (w/v) in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> ; steril filtriert	0,375 % (v/v)
Kaliumphosphatpuffer pH 7,0	1 M in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	100 mM
Glucose	20 % (w/v) in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	0,8 % (v/v)
MgSO <sub>4</sub>	1 M in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	2 mM
Anhydrotetracyclin (AHT)	2 mg/ml in DMF; steril filtriert	0,2 µg/ml

### 2.3.2. Nährmedienzusätze

#### MOPS-Puffer

Für die Kultivierung von *S. coelicolor* in Flüssigkultur sowie für Inkubationsassays wurde 2 M MOPS-Puffer mit einem pH-Wert von 7,2 zur Einstellung eines pH-Wertes von 7,0 im Medium verwendet.

#### Natrium-Kalium-Phosphat-Puffer

Für Inkubationsversuche mit dem Zusatz Phosphat wurde eine 0,5 molare Stammlösung Natrium-Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,0 hergestellt. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte über das Mischungsverhältnis der 0,5 molaren Komponenten Dikaliumhydrogenphosphat und Natriumdihydrogenphosphat.

#### Antibiotika

Nachfolgend sind die bei den Anzuchten und Inkubationsassays verwendeten Antibiotika gelistet. Die Stammlösungen wurden steril filtriert und bei -20 °C gelagert.

**Tabelle 2.5.: Übersicht der verwendeten Antibiotika**

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration im Medium
Ampicillin	125 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	125 µg/ml
Chloramphenicol	50 mg/ml in Ethanol	25 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	25 µg/ml
Apramycin	100 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	25 µg/ml
Carbenicillin	100 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	100 µg/ml
Hygromycin B	50 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	8 µg/ml
Nalidixinsäure	25 mg/ml in 0,3 M NaOH	25 µg/ml

## 2.4. Mikrobiologische Methoden

### 2.4.1. Zellanzucht und Ernte von *E. coli*

Zur Standardkultivierung wurden die in Tabelle 2.1 gelisteten *E. coli*-Stämme in LB-Flüssigmedium (schüttelnd bei 200 Upm) oder LB-Festmedium mit den in Tabelle 2.5 angegebenen Antibiotika-Zusätzen für 12 h bei 37 °C kultiviert. Dabei erfolgte das Beimpfen der Flüssigkultur generell mit Einzelkolonien eines 13-Strich-Verdünnungsausstriches. Zur Plasmid- bzw. Cosmid-Präparation wurden die Kulturen bei 2.370 x g für 5 min pelletiert.

#### **Aerobe Anzucht von Expressionskulturen**

Zur Produktion von Fusions-Proteinen wurden die Expressionsstämme in Schikanekolben kultiviert, die das 5fache des Anzuchtvolumens fassen, was eine optimale Sauerstoffversorgung gewährleistet. Dem Medium wurde vor dem Beimpfen das entsprechende Antibiotikum zugesetzt und die Kultur

anschließend bei 37 °C (Überexpression von His-Tag-Fusionen) bzw. 30 °C (Überexpression von *Strep*-Tag-II-Fusionen) auf einem Rundschüttler bei 100 Upm inkubiert. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation bei 4 °C, 2.990 x g für 20 min.

## 2.4.2. Zellanzucht und Ernte von *S. coelicolor*

### I. Herstellung eines Standardmyzelgemisches für Inokula

Durch das filamentöse Wachstum von *S. coelicolor* ist eine Zelldichtebestimmung mit den gängigen Methoden über Bestimmung der optischen Dichte nicht möglich. Für die Herstellung eines Standardmyzelgemisches wurde die Pelletgröße nach dem Zentrifugieren als indirekter Zelldichteparameter gemessen. Dafür wurden die Kulturen in einem 15 ml Greiner-Röhrchen bei 2.000 x g für 10 min pelletiert und das Pellet an der Mantellinie des Kreiskegels vom Zentrifugenröhrchen mit einem Lineal vermessen (Tabelle 2.6). Nach einem in der Arbeitsgruppe festgelegten Standard wurde das Pellet entsprechend seiner Größe in 1 x TSB gelöst und definierte Volumen des Standardmyzelgemisches als Inokulum für die jeweiligen Kulturansätze eingesetzt.

Tabelle 2.6.: Herstellung eines Standardmyzelgemisches für Inokula

Pelletgröße (mm)	ad TSB-Medium (ml)
5	2,5
6	4
7	5
8	6,25
9	7,5
10	10
11	11,25
12	15
13	17,5
14	20
15	25

### II. Herstellung einer Standardsporensuspension für Inokula

Sporulierte SFM-Agarplatten wurden steril geerntet, filtriert und nach zweimaligen Spülen mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> 2,5 µl bzw. 5 µl der Sporensuspension in eine Küvette mit 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> überführt. Es wurde die OD bei 450 nm ermittelt, beide Messwerte gemittelt und die so bestimmte OD<sub>450</sub> der Sporensuspension für die Herstellung einer Suspension mit einer OD<sub>450</sub> von 10 bzw. 20 genutzt.

### III. Aerobe Anzucht auf Festmedium

Die aerobe Anzucht auf Festmedium (SFM) wurde genutzt, um sporulierte Kolonien von *S. coelicolor* als Ausgangsmaterial für weitere Sporulationsplatten und zur Flüssiganzucht zu erhalten. Mit Hilfe

einer Impföse wurden dafür aus Sporenstammkulturen Vereinzelungsausstriche auf SFM-Agar angefertigt und die erhaltenen Einzelkolonien für flächendeckende Ausstriche zur Gewinnung großer Sporenmengen oder zur Anzucht in Flüssigkultur genutzt. Die Platten wurden für mindestens 4 Tage bei 30 °C inkubiert.

#### **IV. Aerobe Anzucht in Flüssigmedium**

##### Anzucht von Myzel als Vorkultur

Für die Anzucht von Myzel als Vorkultur wurden 20 ml TSB-Flüssigmedium (Reagenzgläser Duran, Wertheim/Main) mit 100 mM MOPS-Puffer versetzt und mit einer sporulierten Einzelkolonie oder 10%ig mit einer bei 4 °C gelagerten Flüssigkultur beimpft. Pro Reagenzglas wurde, um eine ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten und um Myzelaggregationen zu vermeiden eine Spiralfeder (Druckfeder, Stump und Schüle, Beuren) eingesetzt. Die Kulturen wurden bei 200 Upm und 30 °C für ca. 2 Tage inkubiert. Der Erntezeitpunkt wurde anhand der Flockendichte festgelegt.

##### Anzucht von Myzel als standardisierte 15-Stunden-Anzucht – Herstellung exponentielles Myzel

Die standardisierte 15-Stunden-Anzucht wurde genutzt, um exponentielles Myzel der jeweiligen *S. coelicolor*-Stämme herzustellen. Eine Vorkultur, wie zuvor beschrieben, diente zunächst als Ausgangsmaterial für die Herstellung eines Standardmyzelgemisches (2.4.2 I). 20 ml TSB-Flüssigmedium + 100 mM MOPS-Puffer wurden als Hauptkultur 10%ig mit dem Standardmyzelgemisch angeimpft und die Hauptkultur für 15 h bei 30 °C und 200 Upm schüttelnd inkubiert.

##### Anzucht von Myzel zur Präparation hochkonzentrierter Membranfraktionen

Zur Präparation hochkonzentrierter Membranfraktion für die Aufnahme von Redox-Differenzspektren wurden 300 ml TSB-Flüssigmedium in einem 500 ml Erlenmeyerkolben mit 40 ml exponentiellem Myzel beimpft und auf einem Rührer bei 200 Upm bis zur Bildung einer hochdispersen Myzelkultur bei 30 °C inkubiert. Um eine gesteigerte Schaumbildung zu vermeiden wurden dem Ansatz 1 µl Struktol J70 (Antischaummittel, "Struktol" GmbH, Germany) zugesetzt. Für eine optimale Belüftung und Sauerstoffversorgung erfolgte die Anzucht unter kontinuierlicher Begasung mit Druckluft über zwei Ausströmersteine. Das Myzel wurde bei 2.570 x g für 10 min pelletiert, einmal mit 100 mM Kalium/Kalium-Phosphatpuffer (KPP, pH 7,2) gespült und das Pellet bis zum Zellaufschluss bei -20 °C gelagert.

## V. Anaerobe Inkubation von Sporen und aerobe Inkubation von Myzel in Puffer

### Anaerobe Inkubation von Sporen

Zur Untersuchung der Nar1-bedingten Nitritbildung in Sporen wurden in sterile *Hungate*-Kulturröhrchen jeweils 500 µl doppelt konzentrierter Sporenenkubationspuffer (100 mM MOPS pH 7,2, 10 mM NaNO<sub>3</sub>) und 500 µl einer Standardsporensuspension mit einer OD<sub>450</sub> von 10 bzw. 20 überführt, sodass im Ansatz Sporendichten mit einer OD<sub>450</sub> von 5 bzw. 10 vorlagen. Die *Hungate*-Röhrchen wurden mit sterilen Stopfen verschlossen und die Ansätze unter Stickstoff-Atmosphäre 10 min bei 0,25 bar steril begast (Sterilfilter PTFE vor der Eingangskanüle). Die Inkubation erfolgte für 5 bzw. 24 h bei 30 °C und schüttelnd bei 200 Upm.

### Aerobe Inkubation von Myzel

Zur Induktion der Nar3-Synthese wurde exponentiell angezogenes Myzel (20 x 20 ml Flüssigkultur) 5 min bei 2.570 x g und 4 °C pelletiert, zweimal mit eiskaltem H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> gespült und das Pellet in 300 ml eiskaltem H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> suspendiert. Je 20 ml des gespülten Myzels wurden in 20 ml doppelt konzentrierten Myzel-Inkubationspuffer (MIP I-VI, Tabelle 2.7) umgesetzt und in 250 ml Serumflaschen für 5 bis 6,5 h liegend bei 170 Upm und 30 °C inkubiert. Um der Entstehung eines anaeroben Milieus in der nicht begasten Serumflasche entgegenzuwirken, wurde nach 2,5 h über eine Kanüle steril Luft zugeführt. Das Myzel wurde bei 2.570 x g, 4 °C und für 10 min geerntet und bis zum Zellaufschluss bei -20 °C gelagert.

**Tabelle 2.7.: verwendete Inkubationspuffer zur Nar3-Induktion**

<b>2fach konzentriert</b>	<b>MIP-I</b>	<b>MIP-II</b>	<b>MIP-III</b>	<b>MIP-IV</b>	<b>MIP-V</b>	<b>MIP-VI</b>
Glukose (1 M)	180 mM	180 mM	180 mM	180 mM	180 mM	180 mM
MOPS (2 M)	200 mM	200 mM	200 mM	200 mM	200 mM	200 mM
Na/K-Phosphatpuffer (0,5 M)	-	40 mM	-	40 mM	-	40 mM
TSB	-	-	2 %	2 %	4 %	4 %
NaNO <sub>3</sub> (1 M)	+/- 20 mM	+/- 20 mM	+/- 20 mM	+/- 20 mM	+/- 20 mM	+/- 20 mM

### Aerobe Anzucht von Myzel unter Nar3-Bedingungen zur RNA-Isolation

Zur vergleichenden Analyse der gebildeten *narG3*-Transkripte und Synthese der katalytischen Untereinheit NarG3 unter Phosphateinfluss wurde exponentiell angezogenes Myzel geerntet, mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> gespült und in Myzelinkubationspuffer (2fach konzentriert: 80 mM Glukose, 2 mM NaNO<sub>3</sub>, 100 mM MOPS, +/- 50 mM Na/Kalium-Phosphatpuffer) umgesetzt. Die Inkubation erfolgte für mind. 5 Stunden bei 30 °C und 60 Upm in 300 ml Erlenmeyerkolben mit einem Anzuchtvolumen von 50 ml.

Die Induktion von Nar3 wurde mittels Nitritbildungs-Assay (2.8.1.) überprüft. Das Myzel wurde für 5 min bei 2.570 x g, 4 °C zentrifugiert und bis zur Protein- und RNA-Isolation bei -20 °C gelagert.

## **VI. Zellaufschluss und Fraktionierung**

### Sporenaufschluss und Fraktionierung

Die zentrifugierten Sporen wurden vor dem Aufschluss bei -20 °C gelagert. Für den Aufschluss wurde das Sporenpellet im 2fachen Volumen 100 mM KPP pH 7,2 mit Zusatz von 4 µl/ml DNase (Stammlösung 10 U/µl, Gerbu, Gaiberg) und 2 µl/ml PMSF (Stammlösung 0,2 M, gelöst in Isopropanol) suspendiert und in 1,5 ml *safe-lock-tubes* mit Sporenaufschlussmischung überführt. Die Sporen wurden für 30 min in der Kugelmühle (bei -80 °C vorgekühlt Einsätze) mit maximaler Schwingung aufgeschlossen. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zelltrümmer und nicht aufgeschlossene Sporen bei 21.380 x g, 4 °C für 20 min zentrifugiert. Das erhaltene Rohextrakt wurde bis zur Verwendung auf Eis gelagert oder zur Membranfraktion bei 130 000 x g und 4 °C für 1 h weiter fraktioniert. Die Membranfraktion wurde zur Entfernung unspezifisch gebundener cytoplasmatischer Proteine mit 100 mM Tris-HCl pH 7,4 + 150 mM NaCl gewaschen.

### Sporenaufschlussmischung

1 Glasperle Kalknatron-Glas (Roth)	0,08 g
Glasperlen Kalknatron-Glas 1,25 mm,- 1,55 mm	0,4 g
Miniglasperlen (0,1 mm)	0,4 g

### Myzelaufschluss und Fraktionierung

Geerntetes Myzel wurde ebenfalls vor dem Aufschluss bei -20 °C gelagert. Zur Gewinnung von Myzel-Rohextrakt wurde dieses im 2fachen Volumen 100 mM KPP pH 7,2 mit Zusatz von 4 µl/ml DNase (Gerbu, Gaiberg) und 2 µl/ml PMSF (Stammlösung 0,2 M, gelöst in Isopropanol) suspendiert und mittels Ultraschall (KE76, Puls 0,5-0,5 s, 3 x 2 min, 25 Watt) aufgeschlossen. Das Lysat wurde durch Zentrifugation bei 21.380 x g und 4 °C für 20 min von Zelltrümmern und nicht aufgeschlossenem Myzel getrennt. Das erhaltene Rohextrakt wurde bis zur Verwendung auf Eis gelagert oder zur Membranfraktion bei 130.000 x g und 4 °C für 1 h weiter fraktioniert. Zur Entfernung unspezifisch gebundener zytoplasmatischer Proteine wurde die Membranfraktion mit 100 mM Tris-HCl pH 7,4 mit 150 mM NaCl gewaschen.

### 2.4.3. Stammhaltung

#### I. Herstellung von Stammkulturen *E. coli*

*E. coli*-Stämme wurden auf LB-Agar (je nach Antibiotika-Einsatz auf Miller bzw. Luria, 2.3.1) vereinzelt und bei 37 °C für 12 h kultiviert. Zur längerfristigen Lagerung wurden die Nähragarplatten bei 4 °C aufbewahrt. Für eine dauerhafte Lagerung wurden Einzelkolonien der *E. coli*-Stämme in Flüssigkultur für 12 h bei 37 °C schüttelnd kultiviert und anschließend 1 ml der Kultur mit 450 µl LB-Glycerin-1:2-Gemisch versetzt und als Glycerinkultur bei -80 °C gelagert.

#### II. Herstellung von Stammkulturen *S. coelicolor*

Zur dauerhaften Lagerung von *S. coelicolor* wurden frisch geerntete Sporen 2-mal mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> gespült, das Pellet in 20 % Glycerin suspendiert und nach Inkubation für 10 min auf Eis ebenfalls bei -80 °C gelagert.

### 2.5. Molekularbiologische Methoden

Zur Inaktivierung von Nukleasen wurden alle hitzebeständigen Geräte, verwendete Lösungen, Pipettenspitzen für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Für Arbeiten mit RNA wurden alle verwendeten Geräte 2-mal autoklaviert. Alle hitzelablen Geräte sowie die Arbeitsflächen wurden zum Schutz vor Kontaminationen zuvor mit 70%igem (v/v) Ethanol behandelt.

#### 2.5.1. Isolierung von Nukleinsäuren

##### I. Isolierung von Plasmid- und Cosmid-DNA mit kommerziellem Kit

Die Isolierung reiner Plasmid-DNA für Transformationsexperimente und Sequenzierungsreaktionen erfolgte mit dem *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen, Hilden). 5 ml Flüssigkultur wurden pelletiert und nach Protokoll des Herstellers zur Plasmid-Isolation eingesetzt. Die Elution erfolgte in 30 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> (Plasmid-Isolation) bzw. 30 µl 70 °C-temperiertem H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> (Cosmid-Isolation).

##### II. Isolierung von genomischer DNA aus Myzel von *S. coelicolor* mittels kommerziellem Kit

Für die Isolierung genomischer DNA aus Myzel wurde dieses als 20 ml Kultur in TSB angezogen, pelletiert (2.570 x g, 5 min) und in 2 Aliquots aufgeteilt. Das Pellet wurde in 700 µl TE25S-Puffer (25 mM Tris-HCl, pH 8, 25 mM EDTA, 0,3 M Saccharose) resuspendiert, dem Ansatz zum Zellaufschluss 1 mg Lysozym (Stammlösung 100 mg/ml, was 100.000 U/mg entspricht) und 0,1 mg RNase A (Typ II A, Stammlösung mit 10 mg/ml, entspricht 93 Kunitz U/mg) zugesetzt und der Aufschluss unter mehrmaligen Invertieren bei 37 °C für 60 min inkubiert. Die Isolation der GesamtdNA erfolgte mit Hilfe des *High Pure PCR Template Preparation Kit* von Roche nach Protokoll des



Herstellers. Die Gesamt-DNA wurde mit 200 µl 70 °C temperierten Elutionspuffer eluiert. Das Eluat wurde bei -20 °C gelagert.

### III. Isolierung von Gesamt-RNA aus *S. coelicolor* (Fischer, Falke *et al.*, 2013)

Die Anzucht/Vorbehandlung der *Streptomyces*-Kulturen sowie der gewebespezifische Zellaufschluss zur Isolierung der Gesamt-RNA aus Sporen, Luftmyzel, exponentiellem Myzel sowie stationär angezogenem Myzel ist den *Experimental Procedures* von Fischer, Falke *et al.* (2013) zu entnehmen. Für die RNA-Isolation von Nar3-induzierten Myzelproben wurde das Myzel wie unter 2.4.2 V beschrieben inkubiert und mittels Ultraschall aufgeschlossen. Die Isolation der Gesamt-RNA selbst wurde mit dem *RNeasy Mini-Kit* (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben durchgeführt.

#### Qualitätskontrolle der isolierten Gesamt-RNA

Durch elektrophoretische Auftrennung der isolierten Gesamt-RNA auf ein 1%iges Agarosegel (2.5.6) wurde eine mögliche Degradierung der RNA überprüft. Bei hochwertiger, reiner RNA sollte die 16S und 23S-rRNA als scharfe Banden detektierbar sein.

### IV. cDNA-Synthese von isolierter Gesamt-RNA

Die isolierte Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Fisher Scientific) in cDNA umgeschrieben. Sofern nicht anders angegeben wurden für die cDNA-Synthese 600 – 2.000 ng Gesamt-RNA eingesetzt und mit *Random Hexamer* Primern nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben.

#### 2.5.2. Konzentrationsbestimmung von isolierten Nukleinsäuren

Die Konzentration der gereinigten Nukleinsäurelösungen wurde photometrisch mit Hilfe des Nanodrops (Peqlab, Erlangen) bestimmt. Bei doppelsträngiger DNA entspricht die  $OD_{260}=1$  einer Konzentration von 50 µg/ml, bei RNA entspricht diese einer Konzentration von 40 µg/ml. Der Quotient  $OD_{260}:OD_{280}$  gibt Aufschluss über die Reinheit der DNA- bzw. RNA-Proben, der unter optimalen Bedingungen zwischen 1,8 – 1,9 liegt.

#### 2.5.3. Amplifikation von DNA-Fragmenten

Um spezifische DNA-Fragmente aus der genomischen DNA von *S. coelicolor* sowie rekombinanter Plasmid-DNA zu amplifizieren, wurde das Prinzip der PCR (*polymerase chain reaction*; Mullis *et al.*,

1992) angewendet. Dies ermöglicht die Amplifikation einzelner DNA-Fragmente in hoher Kopienzahl (Saiki *et al.*, 1992).

### I. Standard-PCR

Die PCR-Reaktionen wurden im PCR-Thermocycler T 3000 (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Je nach Verwendungszweck des erzeugten Amplifikats wurden verschiedene hitzestabile Polymerasen genutzt. GC-reiche Amplifikate von *S. coelicolor* für Klonierungsreaktionen (Herstellung der Expressionsvektoren, Erstellung der Komplementationskonstrukte) wurden unter Verwendung der *Herculase II Fusion*-DNA Polymerase (Agilent) oder der *Q5 Hot-Start* DNA Polymerase (NEB) erzeugt. Diese besitzen eine 3'→5'-Exonuklease-Aktivität (*proof-reading*), was zur Reduktion der Fehlerrate bei der Amplifikation führt. Um eine vollständige Denaturierung der GC-reichen *Streptomyces*-DNA zu ermöglichen, erfolgte vor Zugabe der Polymerase eine initiale Denaturierung für 5 min bei 98 °C. Für analytische PCRs zur Überprüfung eines Plasmid-Inserts wurde die *Dream-Taq*-DNA-Polymerase (MBI Fermentas, St. Leon-Roth) genutzt. Die Zusammensetzung der Standard-PCR-Ansätze sowie die Amplifizierungsprogramme sind nachfolgend tabellarisch gelistet.

**Tabelle 2.8.: PCR-Ansätze bei Verwendung der verschiedenen Polymerasen**

Komponenten	<i>Dream-Taq</i> -DNA-Polymerase	<i>Herculase II Fusion</i> DNA-Polymerase	<i>Q5 Hot Start High-Fidelity</i> DNA-Polymerase
template-DNA (50-200 ng)	1 µl	1 µl	1 µl
DMSO	4 %	4 %	4 %
10 x Reaktionspuffer	2 µl	-	
5 x <i>Herculase</i> -Puffer	-	10 µl	
5 x Q5 Reaktionspuffer			10 µl
5 x Q5 <i>High GC Enhancer</i>			10 µl
Primer <i>forward</i> (10 pmol/µl)	0,5 µl	1,25 µl	1,25
Primer <i>reverse</i> (10 pmol/µl)	0,5 µl	1,25 µl	1,25
dNTP-Mix (40 mM)	0,5 µl	-	0,25 µl
dNTP-Mix (100 mM)	-	0,5 µl	-
Polymerase (1 U)	1 µl	0,5 µl	0,5 µl
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad 20	ad 50	ad 50 µl

Tabelle 2.9.: Amplifikationsprogramme der verwendeten Polymerasen

Amplifikationsprogramm	<i>Dream-Taq</i> -DNA-Polymerase	<i>Herculase II Fusion</i> DNA-Polymerase	<i>Hot Start High-Fidelity</i> Q5 DNA-Polymerase
Initiale Denaturierung	95 °C, 10 min	98 °C, 5 min	98 °C, 5 min
Pause	-	Zugabe der Polymerase	Zugabe der Polymerase
Denaturierung	95 °C, 15 s	98 °C, 20 s	98 °C, 20 s
<i>Annealing</i>	55°C – 66 °C, 30 s	58 °C – 68 °C, 20 s	58 °C – 68 °C, 20 s
<i>Extension</i>	72 °C, 30 s - 4 min s	72 °C, 60 s - 130 s	72 °C, 60 s - 130 s
<i>Final Extension</i>	72 °C, 5 min	72 °C, 3 min	72 °C, 3 min
Pause	4 °C	4 °C	4 °C

Die *Extension*-Zeit variierte je nach Länge des zu erwartenden PCR-Produktes. Zudem wurde die gewählte *Extension*-Zeit an die Syntheseleistung der jeweiligen Polymerase angepasst.

Die *Annealing*-Temperatur in den Amplifizierungsprogrammen wurde in Abhängigkeit der errechneten Schmelztemperatur der verwendeten Primer ermittelt (Gleichung 1).

#### Berechnung der Schmelztemperatur (Bertram und Gassen, 1991)

$$\text{Gleichung 1} \quad T_m = 2 \text{ °C} \times \text{Anzahl der A/T-Paare} + 4 \text{ °C} \times \text{Anzahl der G/C-Paare}$$

$T_m$  = Schmelztemperatur

A/T = Adenin/Thymin

G/C = Guanin/Cytosin

Für eine optimale Anlagerung der Primer wurde diese 5 °C unter der berechneten Schmelztemperatur der Primer gewählt.

Die verwendeten Primer für die PCR-Reaktion sind der Tabelle 8.1. (Anhang) zu entnehmen.

Zur direkten Überprüfung von Transformanden auf das Vorhandensein des korrekten Plasmid-Inserts wurden *E. coli*-Einzelkolonien als Matrize für die PCR eingesetzt (**Kolonie-PCR**). Das Koloniematerial wurde direkt im PCR-Gefäß in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  suspendiert und die Zellen durch 10-minütige Denaturierung bei 98 °C im PCR-Cycler mit anschließender 10-minütiger Inkubation bei 80 °C aufgeschlossen. Die PCR am aufgeschlossenen Zellmaterial erfolgte nach Zugabe des PCR-Reaktionsmixes mit der *DreamTaq* DNA-Polymerase.

## II. RT-PCR (Reverse Transkriptase-PCR)

Zum Nachweis spezifischer mRNA-Transkripte in *S. coelicolor* wurde die isolierte Gesamt-RNA zunächst wie unter 2.5.1 IV beschrieben mit *Random Hexamer*-Primern umgeschrieben und anschließend an der synthetisierten cDNA die PCR mit der *DreamTaq* DNA-Polymerase und genspezifischen Primern zum Nachweis gebildeter Transkripte durchgeführt (Reverse Transkriptase-PCR). Als *template* wurden 50 - 100 ng cDNA eingesetzt.

### 2.5.4. Enzymatische Modifikation von DNA-Abschnitten

#### I. DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Die Restriktion von isolierter DNA erfolgte nach Herstellerangaben für die verwendeten Restriktionsenzyme (New England Biolabs; MBI Fermentas) unter den jeweiligen angegebenen Bedingungen für Reaktionstemperatur, Restriktionspuffer und der einsetzbaren Enzymkonzentration. Für die DNA-Spaltung wurden 0,5 µg DNA in einem 30 µl Ansatz eingesetzt und die Reaktion durch die Zugabe von 0,1 Vol. des entsprechenden Reaktionspuffers bzw. 0,2 Vol. bei Einsatz eines 2fach Puffers bei Doppelverdau sowie der Zusatz des Restriktionsenzym in einer Konzentration von 2 – 10 U/µg DNA (maximaler Anteil des Enzyms am Gesamtvolumen = 10%) gestartet. Die Restriktionsansätze wurden für mindestens 3 h oder über Nacht bei 37 °C inkubiert und die Restriktionsendonukleasen zum Abstoppen der Reaktion bei 65 °C für 10 min hitzeinaktiviert. Zur Kontrolle der Restriktion wurde der Ansatz auf ein 1%iges (w/v) Agarosegel aufgetragen.

#### Stopplösung/Probenpuffer

Glycerin (v/v)	40 %
Bromphenolblau (w/v)	0,25 %
Xylencyanol (w/v)	0,25 %

#### II. Ligation von DNA-Fragmenten

Die Reaktionen wurden für gewöhnlich in einem 10 µl Ligationsansatz durchgeführt. Für die Ligation von spezifischen DNA-Fragmenten in einen linearisierten Vektor wurden die Fragmente sowie der Vektor mit dem gleichen Restriktionsenzym gespalten, um kohäsive Enden für die Ligation zu erzeugen und anschließend über Gelextraktion gereinigt. Vektor und DNA wurden in einem Vektor:DNA-Verhältnis von 1:3 gemischt und zur Freilegung kohäsiver Enden für 10 min bei 50 °C erhitzt. Der Ansatz wurde auf Eis abgekühlt und 1 µl 10 x Ligasepuffer sowie 1 U T4-DNA-Ligase

(Roche Diagnostics, Mannheim) zugefügt. Die Ligationsreaktion erfolgte über Nacht bei 16 °C. und wurde durch Erhitzen bei 65 °C für 10 min abgestoppt.

### III. Mikrodialyse von DNA-Lösungen (Marusyk und Sergeant, 1980)

Hohe Salzkonzentrationen beeinflussen die Effizienz des Elektroorationsprozesses. Zur Entfernung der im Ligationspuffer präsenten Salze wurden Ligationsansätze und Vektoren, die mit Elutionspuffer von der Säule isoliert wurden, auf einer Dialysemembran (Durapore Membrane Filters 0,025 µm GV, Millipore, Billerica, USA) 30 min gegen H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> dialysiert.

## 2.5.5. Herstellung und Selektion rekombinanter *E. coli*-Klone

### I. Herstellung elektrokompetenter Zellen

Für die Herstellung elektrokompetenter Zellen wurden 100 ml LB-Medium mit einer Vorkultur des *E. coli*-Stammes XL1-Blue (Zusatz von Tetrazyklin zum Medium) bzw. DH5α 1 – 2%ig in einem Klettkolben beimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 – 0,8 bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert. Die Zellen wurden auf zwei sterile 50 ml Greiner-Röhrchen verteilt, für 20 min auf Eis inkubiert und 10 min bei 4 °C und 2.570 x g pelletiert. Das erhaltene Zellpellet wurde nacheinander zweimal mit 1 Vol. eiskaltem H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> gewaschen und anschließend mit 30 ml sterilem eiskaltem 10%igen (v/v) Glycerin gespült. Das Zellpellet wurde in 0,6 ml eiskaltem 10%igen (v/v) Glycerin suspendiert und die Zellen zu je 50 µl in sterile 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert. Bis zur Verwendung wurden die Aliquots bei -80 °C gelagert.

### II. Elektroporation

Für die Elektroporation mit dem *Gene Pulser* (Biorad, München) wurden für gewöhnlich 200 – 250 ng gereinigter und dialysierter Plasmid-DNA oder maximal 5 µl eines dialysierten Ligationsansatzes eingesetzt. Ein 50 µl Aliquot elektrokompetenter DH5α-Zellen oder XL1-Blue-Zellen wurde auf Eis aufgetaut, die DNA zugesetzt und die Suspension für 1 min auf Eis inkubiert. Nach Überführung in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (0,2 cm Elektrodenabstand; VWR, Darmstadt) erfolgte der Transfer der DNA in die *E. coli* Zellen bei 25 µF, 2,5 kV und 200 Ω. Den Zellen wurde unmittelbar nach der Pulsgebung 800 µl LB-Medium zugefügt. Der Transformationsansatz wurde anschließend für mind. 1 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert und anschließend je 200 µl auf Antibiotika-haltigen Agarplatten ausplattiert. Die Platten wurden für 12 h Stunden bei 37 °C inkubiert.

### III. DNA-Sequenzierung

Um die Korrektheit des Inserts zu überprüfen und falsch eingebaute Nukleotide durch die DNA-Polymerase ausschließen zu können wurden die amplifizierten DNA-Sequenzen von der Firma Seqlab/Microsynth (Göttingen) nach dem Prinzip der Kettenabbruchmethode von Sanger *et al.* (1977) analysiert. Ein Sequenzieransatz von 7 µl enthielt 0,6 µg Plasmid-DNA und 100 pmol spezifische Primer. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Computerprogramm FinchTV ausgewertet und der Abgleich im *Serial Cloner* mit gespeicherten DNA-Sequenzen über das „National Center for Biotechnological Information“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) und der Datenbank StrepDB (<http://strepdb.streptomyces.org.uk/>) durchgeführt.

#### 2.5.6. Analyse der Nukleinsäuren durch Agarosegel-Elektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte zu analytischen oder präparativen Zwecken mittels horizontaler Gelelektrophorese (Roth). Sofern nicht anders angegeben, wurden je nach der zu erwartenden Größe des DNA-Fragmentes ein 0,8 – 1%iges Agarosegel (w/v in 1 x TAE) angefertigt. Als Laufpuffer diente ebenfalls 1 x TAE-Puffer. Die Proben wurden vor dem Elektrophorese-Lauf mit 0,2 Vol. DNA-Probenpuffer versetzt und anschließend bei 80 – 100 V für ca. 1 h separiert. Als Längenstandard wurde PstI-verdaute λ-Phagen-DNA (0,3 µg/µl; MBI Fermentas) in einem Größenbereich von 0,25 kb – 1,5 kb eingesetzt.

#### 50 x TAE-Puffer

EDTA	0,05 M
Tris/HCl	2 M
Essigsäure (v/v)	1 %
pH 8,0	

Für die Detektion der aufgetrennten Fragmente wurde das Gel nach dem Gellauf für ca. 30 min in einem Ethidiumbromidbad (1 µg/ml) gefärbt. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA, wodurch diese mit UV-Licht detektierbar ist. Mit Hilfe des UV-Transilluminators (Intas GDS, Göttingen) wurden die separierten Fragmente dokumentiert.

#### **Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen**

Durch PCR amplifizierte DNA-Abschnitte sowie linearisierte Vektoren wurden auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt, mit einem Skalpell unter UV ausgeschnitten, das Agarosestück bei 50 °C geschmolzen und mittels Gelextraktion unter Verwendung des *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen,

Hilden) nach Herstellerangaben gereinigt. Die eluierten Amplifikate wurden bis zur weiteren Verwendung zur Spaltung durch Restriktionsendonukleasen bei -20 °C gelagert.

### 2.5.7. Herstellung von Komplementationskonstrukten mit dem *shuttle*-Vektor pMS82

Zur Komplementation der Cytochrom-Oxidase-Mutanten wurde ein für *Streptomyces* etabliertes System für Klonierungen genutzt. Mit den in Tabelle 8.1. angegebenen Oligonukleotiden wurden unter Verwendung der *Herculase* II-DNA-Polymerase die Komplementationsamplifikate mit flankierenden Schnittstellen für KpnI und HindIII bzw. NsiI und HindIII erstellt. Als Matrizen-DNA diente genomische DNA des Wildtyps M145. Die Oligonukleotide lagerten sich dabei stromaufwärts und stromabwärts mindestens 70 bp vor bzw. nach dem Gen an, um die Amplifikation der Erkennungssequenz des nativen Promotors zu gewährleisten. Die Amplifikate wurden mittels der spezifischen Restriktionsendonukleasen geschnitten und mit den zuvor linearisierten *shuttle*-Vektor pMS82 (Gregory *et al.*, 2003) durch gerichtetes Klonieren ligiert. Bis zum jetzigen Zeitpunkt (November, 2015) liegt keine Sequenzanalyse des verwendeten Klonierungsvektors vor. Es ist aber bekannt, dass pMS82 eine Integrase aus der Serin-Rekombinase-Familie besitzt, die eine ortspezifische Rekombination zwischen der *attP*-Site in pMS82 und der *attB*-Site im Gen SCO4848 (putatives integrales Membranprotein) in *S. coelicolor* ermöglicht. Damit kann bei Integration des Komplementationskonstruktes eine Änderung des Phänotyps ausgeschlossen werden. Über die durch pMS82 vermittelte Hygromycinresistenz wurden positive Transformanden selektiert und die Komplementationskonstrukte auf ihre Korrektheit sequenziert.

### Transformation von pMS82-Konstrukten in *E. coli*

Die Transformation der Komplementationskonstrukte erfolgte zunächst in den *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$ , um die Komplementationskonstrukte in hoher Kopienzahl zu erzeugen. Dabei wurden 2  $\mu$ l Komplementationskonstrukt wie unter 2.5.5. II beschrieben durch Elektroporation in DH5 $\alpha$  eingebracht und die Transformationsansätze zur Selektion auf Nähragarplatten mit 8  $\mu$ g/ml Hygromycin ausplattiert. Die Inkubation erfolgte anschließend über Nacht bei 37 °C.

### 2.5.8. Herstellung von Transposon-Insertionsmutanten

Zur Herstellung von Transposon-Insertionsmutanten wurden Cosmide mit Transposon-Insertionen für die jeweiligen Gene von Fernández-Martínez *et al.* (2010) erworben. Die in der vorliegenden Dissertation verwendeten Cosmide zur Generierung neuer Cytochrom-Oxidase-Mutanten sind der Tabelle 2.1. zu entnehmen.

Das Cosmid wurde aus einem ca. 33,8 kb DNA-Abschnitt des *S. coelicolor*-Chromosoms und dem Klonierungsvektor SuperCos 1 (Stratagene) konstruiert. Der SuperCos 1-Vektor vermittelt Carbenicillin- und Kanamycin-Resistenz. Das Transposon Tn5062 selbst trägt eine Apramycin-Kassette, kodiert durch das Gen *aac(3)IV*. Die Selektion erfolgte daher auf 100 µg/ml Carbenicillin, 50 µg/ml Kanamycin und 25 µg/ml Apramycin. Die Cosmide wurden aus Flüssigkulturen mittels *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen, Hilden) isoliert und in den Helferstamm transformiert.

### **Transformation von Cosmiden mit Transposon-Insertionen und pMS-Konstrukten in den Helferstamm ET12567/pUZ8002**

Nach Isolation der Cosmide aus dem *E. coli*-Stamm JM109 wurden diese sowie die pMS-Komplementationskonstrukte durch Elektroporation in den Zwischendonator ET12567/pUZ8002 transformiert. Das Plasmid pUZ8002 vermittelt die Ausbildung des Pilus durch die Transfer-Gene (*tra*). Dieser ist essentiell für die Übertragung der rekombinanten DNA durch Konjugation. Die Selektion transformierter Cosmide erfolgte auf LB-Nähragarplatten mit 100 µg/ml Carbenicillin, 25 µg/ml Kanamycin und 25 µg/ml Apramycin. Transformierte pMS-Konstrukte wurden auf 25 µg/ml Chloramphenicol, 25 µg/ml Kanamycin und 8 µg/ml Hygromycin selektiert.

### **2.5.9 Übertragung von rekombinanter DNA durch Konjugation**

Zur Übertragung der rekombinanten DNA wurden die *E. coli*-Stämme als 5 ml Flüssigkultur angezogen, mit dieser Kultur 25 ml LB im Erlenmeyerkolben beimpft und bei 37 °C und 200 Upm schüttelnd inkubiert. Zur optimalen Pilus-Ausbildung wurden die Kulturen bei einer OD<sub>600</sub> von 0,4 steril geerntet und zur Entfernung der bei der Konjugation störenden Antibiotika 2-mal mit LB-Medium gespült. Das Zellpellet wurde anschließend in Restflüssigkeit suspendiert. Ein Aliquot von 500 µl *E. coli*-Zellsuspension wurde mit 10 – 20 µl einer Sporensuspension für 20 min auf Eis inkubiert und eine Verdünnungsreihe bis 10<sup>-5</sup> in LB-Medium angelegt. 100 µl der jeweiligen Verdünnung sowie der unverdünnten *E. coli*-Sporen-Suspension wurden anschließend auf SFM-Agar ausplattiert und die Platten für 16 h bei 30 °C inkubiert.

### **Selektion nach Konjugation**

Durch Konjugation vermittelte Resistenzen werden erst nach dem Auskeimen und der Protein *de novo*-Synthese ausgebildet. Daher wurden die SFM-Platten 16 h nach der Konjugation mit 1 ml *Overlay*-Lösung überschichtet. Dies ermöglicht die Selektion auf *Streptomyces*-Kolonien, die nicht nur die DNA vom Zwischenwirt aufgenommen haben, sondern auch die rekombinante DNA durch homologe Rekombination ins Genom eingebaut haben. Zur Eliminierung des Zwischenwirts *E. coli*



und Selektion von pMS82 enthaltenden Konstrukten wurde der *Overlay*-Lösung 25 µg/ml Nalidixinsäure und 625 µg/ml Hygromycin zugesetzt und die Platten nach Überschichtung bis zur Sporulation bei 30 °C inkubiert. Die Selektion wurde nach dem Sporulationszyklus erneut durchgeführt.

Die Selektion von Transposon-Insertionsmutanten erfolgte durch ein erstes *Screening* mit 25 µg/ml Nalidixinsäure und 25 µg/ml Apramycin, dessen Resistenz durch die Integration des Transposon vermittelt wird. Es folgte ein zweites Screening zum Nachweis eines zweiten Rekombinationsereignis (*Doppel-cross-over*), um die Integration des SuperCos 1-Vektor (vermittelt Kanamycinresistenz) auszuschließen. Dazu wurden 96 *well*-Zellkulturtestplatten (TPP, Trasatingen, Schweiz) steril mit 200 µl SFM-Agar befüllt und pro Kolonie zwei Vertiefungen der Mikrotiterplatten beimpft. Die Platten wurden für 16 h bei 30 °C inkubiert, pro Kolonie eine Vertiefung mit 20 µl Kanamycin (25 µg/ml) bzw. Apramycin (25 µg/ml) überschichtet und auf Kanamycinsensitivität, was den Verlust des SuperCos1-Rückgrads widerspiegelt, selektiert. Die Platten wurden bis zur Sporulation bei 30 °C inkubiert.

## 2.6. Herstellung rekombinanter Proteine

### 2.6.1. Herstellung von Proteinen mit His-Tag-Fusion durch heterologe Genexpression

#### I. Klonierung in pET30+ und Herstellung der Expressionskulturen

Die Expression der Gene für die 3 katalytischen Untereinheiten *narG1*, *narG2* und *narG3* aus *S. coelicolor* wurde im Expressionsstamm *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS durchgeführt. Um eine optimale Reinigung der Proteine über eine Affinitätschromatographie zu ermöglichen, wurden die Gene mit einer C-terminalen His-Tag-Fusion markiert. Dafür wurden die Gene in den Vektor pET-30a(+) kloniert, der sowohl die *codons* für einen C- als auch N-terminalen His-Tag trägt. Alle 3 Gene wurden durch PCR unter Verwendung der *Herculase* II-DNA-Polymerase und genspezifischen Primern, die an das Amplifikat eine NdeI- und XhoI-Schnittstelle anfügen, amplifiziert. Als Matrize diente dabei genomische DNA von *S. coelicolor* M145. Durch gerichtetes Klonieren in den pET30a(+)-Vektor über NdeI und XhoI-Schnittstellen wurde der N-terminale His-Tag entfernt, wodurch das Zielprotein später lediglich eine C-terminale His-Tag-Fusion trägt. Die Ligationsansätze wurden in den *E. coli* Stamm XL1-Blue durch Elektroporation transformiert. Positive Klone wurden auf selektiven Nähragarplatten mit Kanamycin selektiert und zunächst mittels Kolonie-PCR und Restriktionsverdau der isolierten Plasmide auf die Insertion überprüft.

Die Plasmide sowie die Korrektheit des Inserts wurden durch Sequenzierung nochmals überprüft. Die Produktion der Fusionsproteine erfolgte durch heterologe Genexpression nach Transformation der hergestellten Expressionsvektoren in den Expressionsstamm Rosetta (DE3)pLysS durch Elektroporation.

## II. Zellanzucht, Induktion der Expression und Zellernte

Für die Produktion der Fusionsproteine mit C-terminalem His-Tag wurden die Zellen in 1 l LB-Medium mit Kanamycin (Resistenz auf dem Plasmid), Chloramphenicol (Resistenz des Expressionsstammes) und 1 mM Natriummolybdat (essentiell für Kofaktor-Biosynthese) auf eine Start-OD<sub>600</sub> von 0,07 – 0,09 angeimpft und diese bei 37 °C schüttelnd bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 inkubiert. Die Expression der Gene wurde bei einer OD<sub>600</sub> von 0,8 durch die Zugabe von 0,1 mM IPTG induziert und die Kulturen für weitere 4 Stunden bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Die Ernte der Zellen erfolgte nach 10-minütiger Inkubation der Kultur auf Eis durch Zentrifugation für 25 min bei 4 °C und 2.990 x g. Das erhaltene Zellpellet wurde bis zum Zellaufschluss bei -20 °C aufbewahrt. Die Synthese des Proteins erfolgte durch Induktion mit 0,1 mM IPTG. Zur Überprüfung der Synthese wurde je 1 ml Kultur vor und nach der Induktion entnommen und nach dem Pelletieren (5 min, 2.370 x g) und Aufnahme des Pellets in 5 x SDS-Probenpuffer (in 0,1 ml x OD<sub>600</sub>) mittels Immunodetektion auf gebildetes Protein mit C-terminalem His-Tag untersucht.

## III. Anreicherung von His-Tag-Fusionsproteinen unter denaturierenden Bedingungen

In Vorversuchen konnte durch Fraktionierung des geernteten Zellpellets und anschließender Affinitätschromatographie unter nativen Bedingungen bereits festgestellt werden, dass alle produzierten Proteine mit His-Tag-Fusion in *inclusion bodies* vorlagen und der His-Tag des Proteins in seiner nativ gefalteten Form für die Affinitätschromatographie unzugänglich ist.

Die Proteinfraction wurde daher zunächst aus den *inclusion bodies* solubilisiert und die Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen mit den entfaltenen Proteinen durchgeführt.

### Reinigung der His-Tag-Fusionsproteine aus *inclusion bodies*

Für die Aufreinigung der His-Tag-Fusionsproteine aus *inclusion bodies* wurde das Zellpellet in 20 ml Puffer A (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, pH 8,0) resuspendiert, mittels Ultraschall (KE76, Puls 0,5-0,5 s, 3 x 4 min, 30 Watt) aufgeschlossen und die Zelltrümmer bei 19.000 Upm, 4 °C für 45 min pelletiert. Durch Zentrifugation werden Rohextrakt und *inclusion bodies* voneinander getrennt. Letztere befinden sich nach Zentrifugation im erhaltenen Zelltrümmerpellet. Das Zelltrümmerpellet wurde anschließend in 20 ml Puffer A + 8 M Urea (Puffer A\*) resuspendiert, für 30 min bei 4 °C rührend inkubiert und nochmals mit Ultraschall (KE76, Puls 0,5-0,5 s, 3 x 4 min, 30 Watt) aufgeschlossen und bei 19.000 Upm, 45 min bei 4 °C zentrifugiert. Es schloss sich eine erneute Suspendierung der sedimentierten Fraktion in Puffer A\* und eine Inkubation für 30 min auf einem Rührer bei 4 °C an. Die Suspension wurde erneut einer Ultraschallbehandlung unterzogen (KE76, Puls 0,5-0,5 s, 3 x 4

min, 30 Watt) und bei 19.000 Upm, 45 min bei 4 °C zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde fortan als *inclusion body*-Fraktion bezeichnet und zur Affinitätschromatographie eingesetzt.

#### Denaturierende Affinitätschromatographie von Proteinen mit His-Tag-Fusion

Die Affinitätschromatographie zur Anreicherung der His-Tag-Fusionsproteine aus der *inclusion body*-Fraktion erfolgte bei Raumtemperatur unter denaturierenden Bedingungen. Eine Polypropylen-Säule (Qiagen, Hilden) wurde mit 2 ml *Cobalt*-Chromatographie-Matrix (50 %) befüllt, um so ein Säulenvolumen von 1 ml zu erreichen. Die Säule wurde mit 10 Säulenvolumen Puffer A\* äquilibriert und anschließend mit 10 ml *inclusion body*-Fraktion beladen. Nicht gebundene Proteine wurden durch Waschen mit 10 Säulenvolumen Puffer A\*+ 10 mM Imidazol entfernt. Die Elution der gebundenen rekombinanten Proteine erfolgte fraktioniert durch einen Imidazolgradienten (je 2 Säulenvolumen) von 20 mM, 30 mM und 300 mM Imidazol in Puffer A\*. Die Säule wurde mit 10 Säulenvolumen MES-Puffer regeneriert, mit H<sub>2</sub>O gespült und bis zur Wiederverwendung in 20 % Ethanol bei 4 °C gelagert.

#### Gradientendialyse zur schrittweisen Entfernung von Imidazol und Harnstoff

Die 300 mM-Imidazol-Elutionsfraktionen wurden zur Gradientendialyse eingesetzt. Nach Überführung in einen zuvor in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> äquilibrierten Dialyseschlauch (Spectra/Por, Spectrum Laboratories, MWCO 6-8 kDa) erfolgte der erste Dialyseschritt für 2 h bei 4 °C gegen 500 ml Puffer A + 6 M Urea. Es folgte ein 2-stündiger Dialyseschritt gegen 500 ml Puffer A + 3 M Urea und 2 h gegen 500 ml Puffer A + 1,5 M Urea. Zur restlosen Entfernung von Imidazol und Urea schloss sich ein finaler Dialyseschritt über Nacht bei 4 °C gegen 500 ml Puffer A ohne Urea an.

Die dialysierte Proteinlösung wurde durch Inkubation auf PEG 20.000 bei 4 °C auf definierte Endvolumen konzentriert. Zur längerfristigen Lagerung wurde der Proteinlösung 0,5 % Glycerin zugesetzt und in 500 µl Aliquots bei -20 °C gelagert. Die gereinigten His-Tag-Fusionsproteine dienten als Positivkontrolle bei der Immunodetektion von *S. coelicolor*-Proteinen.

## **2.6.2. Herstellung von Proteinen mit *Strep*-Tag-II-Fusion durch heterologe Genexpression**

### **I. Klonierung in die pASK-IBA-Vektoren und Herstellung der Expressionskulturen**

Das in der Datenbank StrepDB als hypothetisches Protein annotierte SCO0212 wurde durch heterologe Genexpression im Expressionsstamm *E. coli* Rosetta (DE3)pLysS produziert und über *Strep*-Tag-Affinitätschromatographie gereinigt. Dafür erfolgte die Klonierung des Gens in die Vektoren pASK-IBA5 und pASK-IBA3, die beide die *codons* für die AS des *Strep*-Tag tragen. Die

Klonierung in pASK-IBA5 ermöglicht eine N-terminale Fusion mit SCO0212, während durch die Klonierung in pASK-IBA3 eine C-terminale Fusion mit SCO0212 möglich ist.

Die codierende Sequenz des Gens SCO0212 wurde zunächst durch PCR mit der *Herculase* II-DNA-Polymerase und genspezifischen Primern, die eine BsaI-Schnittstelle an das Amplifikat anfügen, amplifiziert. Als Matrize diente hierfür die genomische DNA des *S. coelicolor* Stammes M145. Über gerichtete Klonierung durch die angefügte BsaI-Schnittstelle wurde das Amplifikat mit den Vektoren ligiert und die Ligationsansätze durch Elektroporation in den *E. coli*-Stamm XL1-Blue transformiert. Nach Ausplattieren der Transformationsansätze auf selektiven Nähragarplatten mit Ampicillin erfolgte mittels Kolonie-PCR mit den Primern *Strep-up* und *Strep-down* und Restriktionsverdau der isolierten Plasmide ein *Screen* auf positive Klone mit Plasmid und Insert. Die Plasmide sowie die Korrektheit des Inserts in den Plasmiden wurden durch Sequenzierung nochmals überprüft. Für die anschließende heterologe Genexpression wurden die sequenzierten Expressionsvektoren in den Expressionsstamm Rosetta (DE3)pLysS durch Elektroporation (2.5.5.) transformiert.

## II. Zellanzucht, Induktion der Expression und Zellernte

Für die Induktion der Genexpression erfolgte die Anzucht in 1 l TB-Medium mit Ampicillin (Resistenz auf dem pASK-IBA-Plasmid) und Chloramphenicol (Resistenz des Expressionsstammes). Dafür wurde zunächst eine Tageskultur mit einer OD<sub>600</sub> von 0,1 mit einer Übernachtskultur angeimpft und diese bei 37 °C schüttelnd bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,8 inkubiert. Anschließend wurde eine Hauptkultur (1 l TB-Medium) 1%ig mit der Tageskultur beimpft und bei 30 °C schüttelnd inkubiert. Die Kultur wurde bei einer OD<sub>600</sub> von 0,5 – 0,6 mit 0,2 µg/ml Anhydrotetracyclin (AHT) induziert und über Nacht bei 16 °C und 100 Upm schüttelnd inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 25 min bei 4 °C und 2.990 x g pelletiert und das erhaltene Zellpellet bis zum Zellaufschluss bei -20 °C gelagert. Um das gebildete Protein nachweisen zu können, wurde je 1 ml Kultur vor und nach der Induktion entnommen. Die Proben wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 21.380 x g pelletiert, das Pellet anschließend in 0,1 ml x OD<sub>600</sub> 5 x SDS-Probenpuffer suspendiert und mittels Immunodetektion auf gebildetes rekombinantes Protein untersucht.

## III. Reinigung von *Strep-Tag-II-Fusionsproteinen*

### Zellaufschluss und Solubilisierung der Membranfraktion

Das geerntete Zellpellet wurde pro 1 g Zellpellet in 3 ml Aufschlusspuffer [50 mM Tris-HCl, 170 mM NaCl, pH 8,0, pro 1 ml Aufschlusspuffer Zusatz von 1 mg Lysozym (gelöst in 200 µl Tris-HCl pH 7,4), 2 µl 0,2 M PMSF (gelöst in Isopropanol) und 2 µl DNase I (10 U/µl)] suspendiert, durch Ultraschall (KE76, Puls 0,5-0,5 s, 3 x 4 min, 30 Watt) aufgeschlossen und bis zur Membranfraktion fraktioniert. Die pelletierte Membranfraktion wurde in 7 ml Puffer W (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM

EDTA, pH 8,0) resuspendiert und der Proteingehalt der Suspension im Nanodrop bei 280 nm ermittelt. In Abhängigkeit von der Proteinkonzentration wurde der Membranfraktion die 3-fache Menge an Dodecylmaltosid (DDM) (3 mg DDM/1 mg Protein; maximal 12 – 15 mM in der Proteinlösung) zugesetzt und die Lösung zur Solubilisierung der Proteine aus der Membranfraktion über Nacht bei 4 °C langsam rührend inkubiert. Zum Trennen unlöslicher Komponenten wurde die Proteinlösung zentrifugiert (1 h, 4 °C, 130.000 x g; L8-60 M, Ti50, Beckmann, München). Dem erhaltenen Überstand wurde 240 µl/l Ansatz Avidin (Stammlösung 2 mg/ml) zugesetzt und der Ansatz 30 min auf Eis inkubiert. Avidin dient zur Maskierung von *E. coli*-Biotin, welches ansonsten ebenfalls an das Säulenmaterial binden würde. Der Überstand wurde anschließend sofort zur Reinigung eingesetzt.

#### Reinigung mittels Affinitätschromatographie von Proteinen mit *Strep*-Tag-Fusion

Die Reinigung der *Strep*-Tag-II-Fusionsproteine erfolgte durch Chromatographie an *Strep*-Tactin-Sepharose-Material (IBA, Göttingen) bei 4 °C. Eine Polypropylen-Säule (Qiagen, Hilden) wurde mit 2 ml *Strep*-Tactin-Sepharose (50 %) befüllt (entspricht 1 Säulenvolumen), mit 5 Säulenvolumen Puffer W\* (Puffer W + 1 mM DDM) äquilibriert und anschließend mit der Proteinlösung beladen. Alle nicht gebundenen Proteine wurden durch Waschen mit 5 Säulenvolumen Puffer W\* entfernt. Die Elution der gebundenen rekombinanten Proteine erfolgte fraktioniert mit 6 x 0,5 ml Elutionspuffer (2,5 mM  $\alpha$ -Desthiobiotin in Puffer W\*). Die Säule wurde mit 20 Säulenvolumen Puffer R [1 mM 4-Hydroxyazobenzol-2-carbonsäure (HABA) in Puffer W] regeneriert, mit 10 ml Puffer W und 10 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> gespült und zur längerfristigen Lagerung auf 20 % Ethanol bei 4 °C belassen.

## **2.7. Proteinchemische Methoden**

### **2.7.1. Bestimmung der Proteinkonzentration (Lowry *et al.*, 1951)**

Die Bestimmung der Gesamt-Proteinkonzentration in Proteinextrakten von *S. coelicolor* erfolgte nach Lowry *et al.* (1951). Ein 10 µl Aliquot einer Proteinlösung wurde in einer 1 ml Küvette mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> auf 100 µl Endvolumen aufgefüllt, mit 1 ml Lösung C gemischt und der Ansatz 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dem Ansatz wurde anschließend 150 µl Lösung D zugesetzt und für 30 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Die Extinktion wurde bei 750 nm im Uvikon bestimmt. Als Proteinstandard wurde BSA (Type H1, Gerbu, Gaiberg) in einem Konzentrationsbereich von 5 - 60 µg Protein als Kalibriergerade mitgeführt.

Lösung A

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (w/v)	2 %
Natriumtartrat (w/v)	0,5 %
NaOH	1 N

Lösung B

CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O (w/v)	0,1 %
--	-------

Lösung C

Lösung A (v/v)	90 %
Lösung B (v/v)	10 %
SDS (w/v)	0,5 %

Lösung D

Folin-Ciocalteu's Phenol Reagenz (Fluka, Steinheim)	50 %
--	------

### 2.7.2. Bestimmung der Proteinkonzentration mit Hilfe des spezifischen Extinktionskoeffizienten

Die Proteinkonzentration gereinigter Fusions-Proteine wurde mit Hilfe des spezifischen Extinktionskoeffizienten des gereinigten Proteins bei 280 nm ermittelt. Der spezifische Extinktionskoeffizient wurde auf Grundlage des errechneten Molekulargewichts des Proteins und unter Einbezug der angefügten Fusion (*Strep*-Tag II bzw. His-Tag) über *ExpASy Proteomics* (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) bestimmt und als Parameter im NanoDrop (Peqlab, Erlangen) angegeben. Nachfolgend sind die abgeleiteten Parameter für die rekombinanten Proteine NarG1-His, NarG2-His, NarG3-His, SCO0212<sub>Strep-N</sub>, SCO0212<sub>Strep-C</sub>, gelistet.

Tabelle 2.10.: spezifische Extinktionskoeffizienten der rekombinanten Proteine

Protein	berechnete Molekularmasse [kDa]	$\epsilon_{280}$ [M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> ]
NarG1-His	136,86	259.130
NarG2-His	138,11	257.070
NarG3-His	136,03	276.090
SCO0212 <sub>Strep</sub>	18,4	19.605

### 2.7.3. Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ermöglicht die Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe in einem denaturierenden Gel. Zur Auftrennung von zytoplasmatischen Proteinen wurde zunächst durch initiale Denaturierung (95 °C, 10 min) und Behandlung mit  $\beta$ -Mercaptoethanol (führt zur Reduzierung der Disulfidbrücken) die Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen aufgebrochen, was die Auftrennung der Proteine in ihrer Primärstruktur ermöglicht. Die Denaturierung von Membranproteinen erfolgte durch 60-minütige Inkubation bei Raumtemperatur und ohne Zusatz von  $\beta$ -Mercaptoethanol. Die Zugabe von SDS bewirkt eine negativ Nettoladung der Proteine, weshalb diese elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt werden können. Für die SDS-PAGE wurden vertikale Minigel-Apparaturen (Biorad, Göttingen) eingesetzt, die Auftrennung erfolgte in 7,5 – 12,5%igen SDS-Gelen (Laemmli, 1970). Die Konzentration des Acrylamids in den Gelen wurde dabei in Abhängigkeit der errechneten Molekularmasse des zu analysierenden Proteins gewählt, je kleiner die Molekularmasse, desto höher die Acrylamid-Konzentration.

Die Zusammensetzung eines SDS-Gels für eine Minigel-Apparatur ist in der Tabelle 2.11. aufgelistet.

Tabelle 2.11.: Zusammensetzung eines Minigels für SDS-PAGE

Komponente	7,5 % Acrylamid Trenngel	10 % Acrylamid Trenngel	12,5 % Acrylamid Trenngel	5 % Acrylamid Sammelgel	Einheit
Rotiphorese Gel 30 (Roth, Karlsruhe)	1,5	2	2,5	0,33	ml
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	1,2	1,2	1,2	-	ml
0,5 M Tris/HCl pH 6,8	-	-	-	0,4	ml
0,5 % (w/v) SDS	1,2	1,2	1,2	0,4	ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	2,1	1,6	1,1	0,87	ml
TEMED	5	5	5	2	$\mu$ l
10 % (w/v) APS	30	30	30	10	$\mu$ l

Die Proteinlösungen wurden mit 0,2 Vol. 5 x SDS-Probenpuffer (zytoplasmatische Proteine) bzw. 0,25 Vol. 5 x Membranprobenpuffer (Membranproteine) versetzt und nach initialer Denaturierung (95 °C für zytoplasmatische Proteine, 1 h Raumtemperatur für Membranproteine) im SDS-Gel aufgetrennt. Die Proben wurden im Sammelgel bei einer Stromstärke von 12,5 mA gesammelt und bei Übergang ins Trenngel bei 25 mA/Gel im 1 x SDS-Laufpuffer der Größe nach separiert.

#### SDS-Laufpuffer

Tris	25 mM
Glycin	192 mM
SDS (w/v)	0,1 %

### 2 x SDS-Proben-Puffer

Tris-HCl pH 6,8	125 mM
Glycerin (v/v)	50 %
$\beta$ -Mercaptoethanol (v/v)	5 %
Bromphenolblau (w/v)	0,01 %
SDS (w/v)	2 %

### 5 x Probenpuffer für Membranproteine

Tris-HCl pH 6,8	160 mM
Glycerin (v/v)	25 %
Bromphenolblau (w/v)	0,025 %
DTT (w/v)	25 mM
SDS (w/v)	5 %

Als Molekularmassenmarker der Proteine diente der PageRuler Prestained (MBI, Fermentas, St. Leon-Rot; 11 kDa – 170 kDa).

#### **2.7.4. Native Polyacrylamidgelelektrophorese (Nativ-PAGE)**

Proteine können bei Verzicht auf SDS auch nach ihrer Eigenladung im Polyacrylamidgel aufgetrennt werden. Dabei bleibt die nativ gefaltete Form der Proteine erhalten, Protein-Protein-Komplexe können angefärbt werden und Aktivitäten durch Zusatz von Redoxfarbstoffen nachgewiesen werden. Tabelle 2.12. zeigt die Zusammensetzung eines 10%igen nativen Polyacrylamidgels. Für die Auftrennung von Proteinen in einer Nativ-PAGE wurden diese nach Fraktionierung bis zum Gellauf auf Eis gelagert, um die nativ gefaltete Form durch einfrieren nicht zu zerstören und Protein-Komplex-Aktivitäten zu erhalten. Die Proben wurden zur Solubilisierung aus Membranen mit 1 % Triton X-100 (bei Nachweis der Nitratreduktase-Aktivität) bzw. 4 % Triton X-100 (bei Nachweis der Cytochrom *c* Oxidase-Aktivität) sowie mit Beschwererlösung (5-fach Beschwererlösung: 20 % (w/v) Saccharose, 0,01 % (w/v) Bromphenolblau) versetzt und nach kurzer Inkubation auf Eis im Polyacrylamidgel separiert. Die Auftrennung erfolgte in 1 x Nativ-Laufpuffer (10 x Stammlösung: 1 M Tris, 1 M Glycin) bei 15 mA/Gel und bei 4 °C für ca. 4 Stunden.



Tabelle 2.12.: Zusammensetzung eines Minigels für Nativ-PAGE

Komponente	Trenngel 10 %	Sammelgel 5 %
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	3,4 ml	1,47 ml
Rotiphoresegel 30 (Roth)	2 ml	0,33 ml
2,5 M Tris-HCl pH 8,5	0,6 ml	0,4 ml
20 % (v/v) Triton X-100	30 µl	20 µl
TEMED	5 µl	10 µl
APS	80 µl	20 µl

### I. Aktivitätsfärbung mit Methylviologen

Die Aktivität der respiratorischen Nitratreduktase kann zymografisch durch die Reduktion von externem zugeführtem Nitrat zu Nitrit durch *In-gel*-Aktivitätsfärbung nachgewiesen werden. Die dafür benötigten Elektronen werden dabei durch den Redoxfarbstoff Methylviologen (MV, Sigma-Aldrich) bereitgestellt, der infolge der Elektronenabgabe oxidiert wird und einen Farbumschlag von dunkelblau (reduzierte Form) zu farblos (oxidierte Form) bewirkt. Eine Entfärbung im sonst durchgehend blau gefärbten Gel ist damit der Indikator für die enzymatische Aktivität der respiratorischen Nitratreduktase.

Für die Aktivitätsfärbung wurde das Nativ-Gel nach dem Gellauf mit 50 mM MOPS-Puffer (pH 7,0) gespült und in ein Anaerob-Zelt (95 % N<sub>2</sub>, 5 % H<sub>2</sub>) eingeschleust. 20 ml entgaster MOPS-Puffer wurde durch die Zugabe von 2 mM Natriumdithionit reduziert und mit 100 mM NaNO<sub>3</sub> versetzt. Das Gel wurde mindestens 15 min in diesem Präinkubationspuffer äquilibriert, bevor es bis zum Sichtbarwerden von Aktivität in Aktivitätspuffer (50 mM MOPS, 2 mM Natriumdithionit, 10 mM MV, 100 mM NaNO<sub>3</sub>) belassen wurde. Die Inkubation des Gels in Aktivitätspuffer führt zunächst durch das reduzierte MV zur kompletten Blaufärbung, bei Reduktion des zugesetzten Nitrats zu Nitrit wird das MV oxidiert und weiße Bande erscheinen auf Laufhöhe der Nitratreduktase. Je nach Aktivität erfolgte die Inkubation des Gels bis zu einer Stunde unter anaeroben Bedingungen.

### II. Aktivitätsfärbung mit Diaminobenzidin (modifiziert nach Sabar *et al.*, 2005)

Zum Nachweis der Komplex-IV-Aktivität (Cytochrom *c* Oxidase der aeroben Atmungskette) wurde die Komplex-IV-bedingte Oxidation von Cytochrom *c* zymografisch durch *In-gel*-Aktivitätsfärbung nachgewiesen. Als Elektronendonator fungiert der Redoxfarbstoff Diaminobenzidin (DAB), der die Elektronen auf Cytochrom *c* überträgt. Bei Oxidation von Cytochrom *c* durch Komplex IV wird DAB selber oxidiert und akkumuliert als braune Bande im Gel.

Das Nativ-Gel wurde nach Gellauf zunächst für 30 min in Präinkubationspuffer [10 ml Kaliumphosphatpuffer (50 mM) + 500 µl DAB (Stammlösung 10 mg/ml)] äquilibriert und anschließend in Aktivitätspuffer [10 ml Kaliumphosphatpuffer (50 mM) + 500 µl DAB (Stammlösung

10 mg/ml)] mit Cytochrom *c* als Substrat [1 ml Cytochrom *c* (Stammlösung 10 mg/ml)] bis zur Bildung brauner Banden inkubiert.

Die Reaktion wurde durch mehrmaliges Inkubieren des Gels in Fixier-Lösung (50 % Methanol, 10 % Essigsäure) abgestoppt.

### III. Aktivitätsfärbung mit Nitroblau-Tetrazoliumsalz (NBT) zum Nachweis der Succinat-Dehydrogenase (Komplex II der aeroben Atmungskette)

Zum Nachweis der Succinat-Dehydrogenase-Aktivität aus *S. coelicolor* wurden 65 µg Membranfraktion von Sporen und Myzel in einer Nativ-PAGE aufgetrennt und der Umsatz von Succinat zu Fumarat durch die Succinat-Dehydrogenase unter Bildung von Formazan zymografisch detektiert. Das Gel wurde nach Gellauf bei 4 °C bis zur nachweisbaren Aktivität in Aktivitätspuffer (50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,2, 0,2 mM PMS, 10 mM Succinat, 1 mM NBT) lichtgeschützt und schüttelnd inkubiert.

Die Färbung wurde durch mehrmaliges Inkubieren des Gels in Fixier-Lösung (50 % Methanol, 10 % Essigsäure) abgestoppt.

### 2.7.5. Coomassie-Färbung von Proteinen (Weber und Osborn, 1969)

Zur Anfärbung der Proteine mit Coomassie wurde das Gel für 12 h in Coomassie-Färbelösung geschwenkt. Die Färbelösung wurde entfernt und das Gel anschließend bis zur gewünschten Farbintensität der Banden durch Inkubation in Entfärbelösung entfärbt.

#### Coomassie-Färbelösung

Serva Blau R250 (w/v)	0,2 %
Serva Blau G250 (w/v)	0,05 %
Methanol (v/v)	5 %
Essigsäure (v/v)	10 %
Ethanol (v/v)	42,5 %

#### Entfärbelösung

Essigsäure (v/v)	10 %
Ethanol (v/v)	45 %
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	45 %

### **2.7.6. Häm-Färbung zum Nachweis von kovalent gebundenem Häm (modifiziert nach Thomas *et al.*, 1976)**

Zum Nachweis der Synthese und des korrekten Einbaus der Komplex III- und Komplex IV-Komponenten in die Membran wurde das kovalent gebundene Häm in der Membranfraktion mittels TMBZ (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) als Farbstoffindikator angefärbt. 50 µg Membranfraktion wurden dafür in einer 12,5%igen SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel nach Gellauf für 10 min in Präinkubationspuffer [9,9 ml Na-Acetat (0,1 M) pH 5,2 + 100 µl TMBZ (Stammlösung 10 mg/ml in DMSO)] äquilibriert. Durch Zugabe von 34 µl 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurde die Reaktion gestartet. Kovalent gebundenes Häm wird im Proteinkomplex mit SCO2150 (Cytochrom *c*-Häm-bindende Untereinheit im Komplex III) als blaue Bande mit einer Molekularmasse von 27,5 kDa angefärbt. Die Färbung ist nach Fixierung in 30 % Isopropanol (Acetat-gepuffert) stabil.

### **2.7.7. Western Blot-Analyse (Towbin *et al.*, 1979)**

Mittels Western Blot-Analyse war es möglich, über Immunodetektion Zielproteine spezifisch in Proteinextrakten von *E. coli* und *S. coelicolor* nachzuweisen.

#### **I. Antikörperdepletion**

Zum Nachweis der 3 katalytischen Untereinheiten NarG1, NarG2 und NarG3 sowie das als zytoplasmatisches Protein annotierte SCO0212 von *S. coelicolor* wurden von der Firma Seqlab (Göttingen) polyklonale Peptidantikörper (NarG1, NarG2, NarG3) durch Immunisierung von Kaninchen gegen die in Tabelle 2.13. aufgelistete jeweilige Peptidsequenz des Zielproteins generiert und mittels Immunoblotting auf ihre Spezifität getestet. Zur Entfernung unspezifisch synthetisierter Antikörper in den erhaltenen Kaninchenseren (*final bleeding*) wurden diese durch Antikörperdepletion mit dem Myzel-Rohextrakt der entsprechenden Deletionsmutante gereinigt. Zur Herstellung des Rohextraktes wurde exponentielles Myzel der Deletionsmutante wie unter 2.4.2. IV beschrieben angezogen, das Zellpellet in 4fachem Volumen pro Gramm Zellpellet in 1 x PBS suspendiert und zur Herstellung von Rohextrakt mit Ultraschall aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden bei 21.380 x g für 30 min zentrifugiert und das erhaltene Rohextrakt für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Letzteres bewirkt die Denaturierung der Proteine, so dass diese in ihrer Primärstruktur vorliegen. Das erlaubt eine bessere Zugänglichkeit der Peptidsequenz für den Antikörper. Die Absättigung erfolgte über Nacht bei 4 °C auf einem Rotator (Labortechnik Fröbel, Lindau) durch Zugabe des finalen Serums (*final bleeding*) im Verhältnis 1:100 bis 1:50. Unspezifische freie Antikörper werden dabei von Proteinen des Rohextrakts als Antigen-Antikörper-Komplex gebunden, welcher durch Zentrifugation bei 21.380 x g für 30 min pelletiert werden kann. Der Überstand, fortan

als depletierter Antikörper bezeichnet, beinhaltet idealerweise hauptsächlich Antikörper, die gegen das Zielprotein gerichtet sind. Der depletierte Antikörper wurde, soweit nicht anders angegeben, in einer Verdünnung von 1:50 bis 1:250 eingesetzt.

**Tabelle 2.13.: Aminosäuresequenzen der 3 katalytischen Untereinheiten zur Ableitung AS-spezifischer Antikörper**

Katalyt. Untereinheit	Abgeleitete Peptidsequenz zur Peptid-Antikörpersynthese
NarG1	MHRLFGEPRLGPDGHR <b>AS1065-1080</b>
NarG2	NSPRHYGDERLHED <b>AS1067-1079</b>
NarG3	NLAELGDAPITGDG <b>AS1062-1075</b>

## II. Transfer der Proteine auf Nitrocellulosemembran

Nach Auftrennung der Proteinfractionen durch SDS-PAGE (2.7.3.) wurden die Proteine mittels einer *semi-dry*-Fastblot B34-Apparatur (Biometra, Göttingen) auf eine Nitrocellulose-Membran (Machery & Nagel, Düren) transferiert, welche zuvor ebenso wie das Polyacrylamid-Gel und 6 Lagen Whatman-Papier (Schleicher & Schüll, Dresden) für mind. 5 min in Towbin-Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol) inkubiert wurden. Für *semi-dry-electroblotting* erfolgte die Schichtung der einzelnen Lagen, ausgehend von der Anode, luftblasenfrei wie folgt:

3 Lagen Whatman-Papier (Stärke 3 mm)  
 Nitrocellulose-Membran  
 SDS-Polyacrylamidgel  
 3 Lagen Whatman-Papier (Stärke 3 mm)

Der Transfer der Proteine aus dem SDS-Polyacrylamidgel auf die Nitrocellulosemembran erfolgte für 1,5 h in Abhängigkeit von der Molekularmasse der nachzuweisenden Zielproteine bei einer berechneten Stromstärke von 1,2 mA/cm<sup>2</sup> Membranfläche und einer elektrischen Leistung von maximal 8 W.

## III. Proteindetektion mittels ECL-Reaktion (*Enhanced Chemiluminescence*)

Nach Transfer der Proteine auf die Nitrocellulose-Membran folgte die Blockierung unspezifischer freier Bindungsstellen durch Inkubation der Membran für mindestens 1 h oder über Nacht in 1 x PBS + 7 % (w/v) Magermilchpulver (Sucofin, TSI & Co. KG GmbH, Zeven). Die Membran wurde anschließend 3 x 5 min mit 1 x PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem Primärantikörper (depletierter Antikörper anti-NarG1, anti-NarG2, anti-NarG3 sowie anti-SCO0212) erfolgte generell über Nacht bei 4 °C. Um ungebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Membran im Anschluss 3 x 15 min mit 1 x PBS + 0,5 % Tween 20 gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper [1: 5.000

in 1 x PBS + 0,5 % (w/v) BSA; *goat-anti-rabbit* IgG (H+L)-HRP Konjugat, Biorad, München] für 1 h mit einem anschließendem Waschschrift für 3 x 15 min mit 1 x PBS + 0,5 % Tween 20 an. Da das verwendete IgG (H+L)-HRP Konjugat mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist können die geblotteten Proteine indirekt durch die Oxidation von Luminol in Anwesenheit von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu einem lichtemittierenden Produkt detektiert werden. Für die Luminolreaktion wurden Lösung A und Lösung B im Dunkeln miteinander vermischt und die geblottete Membran für 1 min darin geschwenkt. Die Membran wurde anschließend luftblasenfrei in einer Fotokassette fixiert und durch Auflegen eines Röntgenfilms (Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film, Roche Diagnostics, Mannheim) exponiert. Die Zeit der Exposition richtete sich dabei nach der Stärke des zu erwartenden Detektionssignals. Zur Entwicklung wurde der Röntgenfilm für 1 – 2 min in Entwicklerlösung (Calbe Fotochemie, Calbe) geschwenkt, mit Wasser gespült und in Fixierlösung (Calbe Fotochemie, Calbe) für ebenfalls 1 – 2 min belassen.

#### 1 x PBS-Puffer

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	16 mM
NaCl	115 mM

#### Lösung A

5 ml 100 mM Tris/HCl pH 8,0  
50 µl 250 mM Luminol (Fluka, Steinheim) in DMSO  
22 µl 90 mM *p*-Coumarsäure (Fluka, Steinheim) in DMSO

#### Lösung B

5 ml 100 mM Tris/HCl pH 8,0  
5 µl 30 % (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

#### Wiederverwendung der Nitrocellulosemembran durch Entfernung gebundener Polypeptide (*Mild Stripping*)

Für eine zweite Detektion mit einem primären Protein-spezifischen Antikörper wurden bereits gebundene Primär- und Sekundärantikörper durch „*Mild Stripping*“ (Abcam, Cambridge, UK) entfernt. Dazu wurde die Membran zunächst kurz in 1 x PBS getränkt und anschließend nacheinander 2 x 10 min in *Mild Stripping*-Puffer und 2 x 10 min in 1 x PBS gewaschen. Zum Nachweis des erfolgreichen *stripping* wurde eine „Blinddetektion“ durchgeführt. Vor der erneuten Inkubation mit einem Antikörper wurden freie Bindungsstellen durch Inkubation in 1 x PBS + 7 % (w/v) Magermilchpulver blockiert.

Mild Stripping-Puffer

Glycin	15 g
SDS	1 g
Tween 20	10 ml
pH 2,2	
ad 1 l H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	

**2.7.8. Kontinuierlicher Nitratreduktase-Assay in Sporen und Myzel**

Zur Bestimmung der spezifischen Gesamt-Nar-Aktivität (Nitratreduktase-Aktivität) im Rohextrakt von Sporen und Myzel wurde der kontinuierliche Nitratreduktaseassay genutzt. Rohextrakte von Sporen und Myzel von *S. coelicolor* wurden dafür wie unter 2.4.2 VI angegeben durch Fraktionierung synthetisiert und bis zur Messung auf Eis gelagert. Für die Herstellung des Aktivitätspuffers wurde anaerober MOPS-Puffer (50 mM, pH 7,0) unter anaeroben Bedingungen mit 10 mM Natriumdithionit reduziert und mit 4 mM des Redoxfarbstoffes Benzylviologendichlorid (BV, Sigma Aldrich) versetzt. Insgesamt 800 µl des Aktivitätspuffers wurden in 1 ml Quarzküvetten überführt und mit Gummistopfen anaerob verschlossen. Die Gesamt-Nar-Aktivität kann durch die Reduktion von Nitrat zu Nitrit photometrisch durch die Änderung der Extinktion von reduziertem Benzylviologen zum oxidierten Benzylviologen ermittelt werden. Die Messung der Extinktionsänderung erfolgte dabei über einen Zeitraum von 3 - 5 min (Programm Time Drive), bei einer Wellenlänge von 578 nm im Uvikon 900 (Kontron Instruments, Großzimmern). 50 µl Rohextrakt wurden dem MOPS-BV-Gemisch in der Küvette zugesetzt, welches zuvor, wenn nötig mit Natriumdithionit auf einen Wert von 1,9 bis 2 eingestellt wurde, und anschließend der Extinktionsverlauf für 3 - 5 min aufgezeichnet. Durch Zusatz von 6 µl einer 1,25 M Natriumnitrat-Stammlösung wurde die Reaktion gestartet und die Extinktion ebenfalls für 3 – 5 min gemessen. Pro Stamm wurden, wenn nicht anders angegeben, drei unabhängige biologische Replikate gemessen, wobei jedes Rohextrakt 2mal (technische Replikate) gemessen wurde.

Bestimmung der spezifischen Nitratreduktaseaktivität:

Die Bestimmung der spezifischen Nitratreduktaseaktivität erfolgte aus der Berechnung der Volumenaktivität  $A_v$ , die auf dem auf dem Lambert-Beerschen Gesetz basiert. Nach Ableitung der allgemeinen Formel für das Lambert-Beersche Gesetz ergab sich zur Berechnung der Volumenaktivität folgende Gleichung:

$$A_V = \frac{m}{\varepsilon \times d} \times VF \times n$$

m = Anstieg ( $\text{min}^{-1}$ )

$\varepsilon$  = molarer Extinktionskoeffizient

d = Schichtdicke der Küvette (1 cm)

VF = Verdünnungsfaktor ( $V_{\text{Ansatz}}/V_{\text{Rohextrakt}}$ )

n = stöchiometrischer Ausgleichsfaktor (0,5)

Bei einer Wellenlänge von 578 nm beträgt der molare Extinktionskoeffizient von BV  $8,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . BV ist ein Eielektronenüberträger, die Reduktion von Nitrat zu Nitrit benötigt allerdings zwei Elektronen, weshalb je reduziertem Nitrat zwei Moleküle BV oxidiert werden. Es wird daher ein stöchiometrischer Ausgleichsfaktor von 0,5 eingeführt.

## 2.7.10. UV-VIS-Spektroskopie

### I. Redox-Differenzspektroskopie (DTH-reduced-minus-ferricyanide-oxidized Spektrum)

Zur Analyse der in *S. coelicolor* synthetisierten End-Oxidasen wurden UV-VIS-Spektren der aus Myzel isolierten Membranfraktionen aufgenommen. Myzel der jeweiligen Stämme wurde wie unter 2.4.2. IV beschrieben aerob angezogen und bei Erreichen einer hochdispersen Myzelkultur (ca. 4 h) pelletiert und vor dem Aufschluss bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert. Das Pellet wurde im 2fachen Volumen Tris-HCl-Puffer pH 7,4 resuspendiert, mittels Ultraschall (30 Watt, Puls 0,5 s - 0,5 s, 4 x 3 min) aufgeschlossen und bei 19.000 Upm und  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  für 45 min zentrifugiert. Das erhaltene Rohextrakt wurde durch Ultrazentrifugation ( $130.000 \times g$ , 1 h,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ) zur Membranfraktion fraktioniert. Zur Gewinnung hochkonzentrierter Membranfraktion ( $25\text{-}30 \text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) wurde diese nach einem Waschschrift ( $100 \text{ mM}$  Tris-HCl,  $150 \text{ mM}$  NaCl pH 7,4) in Restpuffer suspendiert.

Die Membranfraktionen wurden auf eine Konzentration von  $2,8 \text{ mg}/100 \text{ }\mu\text{l}$  bzw.  $800 \text{ }\mu\text{g}/100 \text{ }\mu\text{l}$  eingestellt. Für die Aufnahme eines Redox-Differenzspektrums in einem Wellenlängenbereich von  $300 - 700 \text{ nm}$  wurden dem Mess-Ansatz  $1,25 \text{ mM}$  DTH (Stammlösung  $100 \text{ mM}$ ) zur Reduktion bzw.  $1,25 \text{ mM}$  Kaliumhexacyanoferrat (Stammlösung  $100 \text{ mM}$ ) zur Oxidation zugesetzt.

### II. UV-VIS-Spektrum zum Nachweis eines Hämerythrins (modifiziert nach Kendall *et al.*, 2014)

Hämerythrine zeigen bei Aufnahme eines UV-VIS-Spektrums bei Zugabe von Na-Azid eine Schulter bei  $450 \text{ nm}$ , die auf die Bildung einer Azido-Fe(III)-Liganden-Form zurückzuführen ist. Für die Untersuchung eines möglichen Hämerythrin-ähnlichen Charakters von SCO0212 wurden  $0,284 \text{ mM}$  gereinigtes SCO0212<sub>Strep-N</sub> mit  $50 \text{ mM}$  Na-Azid versetzt und der Kurvenverlauf bei einer Wellenlänge

von 350 nm bis 700 nm aufgezeichnet. Als Referenz diente ein Ansatz des gereinigten Proteins ohne Zusatz von Na-Azid.

## 2.8. Analytische Methoden

### 2.8.1. Nitritbildungs-Assay - Nitritbestimmung im Überstand

Zur Bestimmung der gebildeten Nitritmenge wurden Sporen wie unter 2.4.2 beschrieben in Nitrat-haltigem Inkubationspuffer für 5 h bzw. 24 h inkubiert und die Inkubation durch Erhitzen bei 80 °C für 10 min abgestoppt. Die Proben konnten bis zur Messung anschließend bei 4 °C gelagert werden. Nach Trennung des Inkubationsmediums von den Sporen durch Zentrifugation für 5 min bei 2.370 x g wurde der Nitritgehalt im Medium (Fischer *et al.*, 2010) spektrophotometrisch gemessen. In einer 96 *well*-Zellkulturtestplatte wurde eine 50 µl Probe unverdünnt, 1:10 verdünnt und 1:110 verdünnt jeweils mit 50 µl 4 % Sulfanilsäure (in 20 % HCl) versetzt, für 5 min inkubiert und durch Zugabe von 50 µl 0,2 % Naphthylethylendiaminhydrochlorid die Reaktion gestartet. Nach 10-minütiger Inkubation wurde die Extinktion bei 540 nm am Mikrotiterplatten-Reader (Tecan Sunrise) bestimmt und die Nitritmenge anhand einer Kalibriergerade mit 0,5 mM bis 10 mM Nitrit als Standard ermittelt.

### 2.8.2 Analyse von Prodigiosinen von *S. coelicolor*

#### I. Isolierung von Prodigiosinen aus *S. coelicolor*

Exponentiell angezogenes Myzel von *S. coelicolor* wurde zur Induktion der Prodigiosin-Bildung in Inkubationspuffer mit 20 mM Phosphat und 4 % TSB umgesetzt und bis zur Rotfärbung, was der Indikator für die Bildung von Prodigiosinen ist, aerob schüttelnd in 1 l Serumflaschen bei 30 °C und liegend bei 170 Upm inkubiert. Das Myzel wurde durch Zentrifugation geerntet, in H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> gespült und das Zellpellet zur Extraktion vakuumgetrocknet. Die Extraktion der Prodigiosine aus dem lyophilisierten Zellpellet erfolgte mit HCl-angesäuertem Methanol bei -20 °C.

Isoliertes Extrakt wurde durch Aufnahme eines UV-VIS-Spektrum (Spekol 1500, Analytik Jena) im Wellenlängenbereich 400 nm bis 600 nm analysiert und anschließend die Pigmentkonzentration mit Hilfe des spezifischen Extinktionskoeffizienten bei 530 nm ( $\epsilon_{530} = 100.500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) bestimmt.

#### II. Messung hochauflösender Massenspektren

Durch die Aufnahme hochauflösender Massenspektren (MS/MS) wurden die chemischen Verbindungen im isolierten Extrakt ermittelt. Die Massenspektren wurden in Kooperation mit Prof. Dr. N. Arnold [IPB, Institut für Pflanzenbiochemie, Halle (Saale)] durchgeführt.



## 3 Ergebnisse

### Kapitel 1

#### **Charakterisierung von Nar1 und dessen Regulation durch die aerobe Atmungskette: Identifizierung einer sporenspezifischen Oxidase**

---

Entgegen des für *Streptomyces* charakteristischen Merkmals einer obligat aeroben Lebensweise, weisen Annotationen auch die Existenz anaerober Gencluster im Genom von *Streptomyces coelicolor* A3(2) nach (Bentley *et al.*, 2002); darunter drei Operone, die jeweils für eine unterschiedliche respiratorische Nitratreduktase (Nar1, Nar2, Nar3) kodieren könnten. Fischer *et. al* (2010) zeigten daraufhin, dass alle drei Nar-Enzyme während des komplexen Lebenszyklus von *S. coelicolor* synthetisiert werden und tatsächlich die Reduktion von Nitrat zu Nitrit katalysieren.

Die Ergebnisse im folgenden Kapitel zeigen die Details der Präsenz eines ausschließlich in ausdauernden Sporen aktiven Nar Enzyms und verdeutlichen erste Indizien für eine regulatorische Verbindung zwischen aerober Atmung mit Sauerstoff und anaerober Atmung mit Nitrat als terminaler Elektronenakzeptor in Sporen.

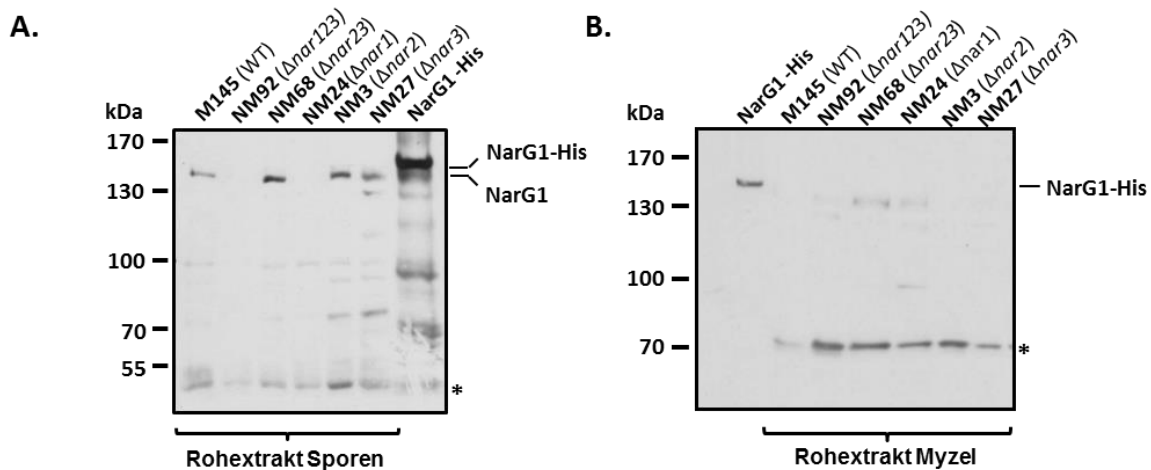
#### **3.1. Charakterisierung von Nar1 als sporenspezifische Nitratreduktase (Daten publiziert in Fischer, Falke *et al.*, 2013)**

Vorangegangene Studien zeigten, dass anaerob inkubierte Sporensuspensionen von *S. coelicolor* Nitrat reduzieren, während Sporensuspensionen einer Mutante, die keines der drei Nar-Enzyme synthetisiert, nicht in der Lage war, vorhandenes Nitrat im Medium zu Nitrit zu reduzieren (Fischer *et al.*, 2010). Anschließend durchgeführte Analysen von Einzel- und Doppel-*nar*-Deletionsmutanten hinsichtlich ihrer gebildeten Nitritmenge zeigten, dass bei dieser Art eines durchgeführten anaeroben Nitritbildungs-Assay das Nar-Enzym 1 hauptverantwortlich für die Nitratreduktion in Sporen bei diesen anaeroben Nitritbildungs-Assays ist (Fischer, Falke *et al.*, 2013). Ausgehend von diesen *in vivo* Daten sollte die Präsenz der Transkripte bzw. Proteine von *nar1*, *nar2*, *nar3* und die messbare Nitratreduktase-Aktivität in ausdauernden Sporen charakterisiert werden. Dafür wurden zunächst die jeweiligen katalytischen Untereinheiten NarG1, NarG2 und NarG3 der drei respiratorischen Nitratreduktasen mit einem C-terminalen His-Tag markiert, überproduziert, mittels Affinitätschromatographie gereinigt und als Positivkontrolle für die Analysen verwendet. Da alle 3 katalytischen Untereinheiten nicht in ausreichender Menge und nur unter denaturierenden Bedingungen gereinigt werden konnten, dienten diese nicht als *template* für die Synthese spezifische Proteinantikörper. Stattdessen wurden anhand von Proteindatensequenzen Peptidantikörper über

die Firmen Seqlab und Bioscience synthetisiert und im Rahmen dieser Doktorarbeit aus dem Kaninchenserum gereinigt und depletiert eingesetzt.

### 3.1.1. Nar1 liegt ausschließlich in Sporen und nicht im Myzel vor

Die Analyse von Proteinfractionen der verwendeten *nar*-Deletionsmutanten sollte Aufschluss über die Präsenz eines synthetisierten Nar1-Proteins liefern. Sporen wurden dafür nach 5-7 tägiger Inkubation geerntet, aufgeschlossen, bis zur Gewinnung des Rohextraktes fraktioniert und 60 µg des erhaltenen Rohextraktes mittels Immunodetektion auf synthetisiertes Nar1 hin untersucht. Da das zur NarG1-Detektion verwendete, unbehandelte Kaninchenserum zu starken Kreuzreaktionen führt wurde der Reinheitsgrad sowie die Bindungsspezifität des verwendeten Antikörpers mittels Antikörperdepletion erhöht und fortan der depletierte Antikörper für Western Blot-Analysen eingesetzt. Abbildung 3.1. zeigt die Immunodetektion nach Western Blot-Analyse.



**Abbildung 3.1.:** Nachweis der gebildeten katalytischen Untereinheit NarG1 in ausdauernden Sporen und exponentiellem Myzel

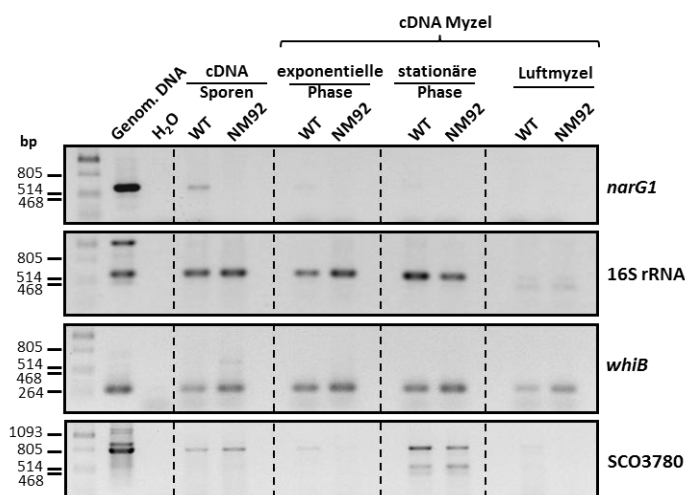
Immunodetektion nach Western Blot-Analyse mit 60 µg Rohextrakt von ausdauernden Sporen (**A**) und Myzel (**B**). NarG1 migriert bei einer erwarteten Größe von 136 kDa. „\*“ markiert ein bislang unbekanntes kreuzreagierendes Signal bei ca. 50 kDa (**A**) bzw. 70 kDa (**B**), das als Ladekontrolle fungiert. Gereinigtes, mit einem C-terminalem His-Tag markiertes NarG1 (1 µg) wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit anti-NarG1 1:25 (depletiert) über Nacht.

Die katalytische Untereinheit NarG1 migriert bei einer Größe von ca. 136 kDa im SDS-Gel und konnte mit depletierten Peptidantikörpern, gerichtet gegen die AS-Sequenz (AS1065-1080 MHRFLGEPRLGPDGHR) der katalytischen Untereinheit NarG, detektiert werden (Abbildung 3.1. A). Gereinigtes, mit einem C-terminalem His-Tag markiertes NarG1 diente als Positivkontrolle und zeigte eine starke Interaktion mit dem depletierten Antikörper. Die Synthese des His-Tags führt zu einer Zunahme der Molekularmasse um 0,84 kDa, was sich in einem veränderten Laufverhalten im Vergleich zum Wildtyp-NarG1 äußert. NarG1 konnte zudem in den Proteinfractionen des Wildtypstammes M145 und den Mutanten NM68 ( $\Delta nar2 \Delta nar3$ ), NM3 ( $\Delta nar2$ ) und NM27 ( $\Delta nar3$ ) bei

135 kDa detektiert werden. Die Rohextrakte der Mutanten, die durch Gendeletion des *nar1*-Operons kein Nar1-Protein mehr synthetisieren (NM92 und NM24), zeigen dagegen keine Reaktion mit dem Antikörper bei 136 kDa. Lediglich ein unspezifisches, kreuzreagierendes Signal wird, wie bei allen analysierten Stämmen, bei ca. 53 kDa detektiert (Kreuzreaktion durch Stern markiert).

Um Evidenzen zu erhalten, ob Nar1 ausschließlich in Sporen vorliegt, wurde exponentielles Myzel der verwendeten Stämme fraktioniert und das erhaltene Rohextrakt auf Vorhandensein der katalytischen Untereinheit (NarG1) mittels Immunodetektion untersucht (Abbildung 3.1. B). Gereinigtes, His-Tag-markiertes NarG1 agierte erneut als Positivkontrolle und zeigte ein klares detektierbares Signal bei ca. 137 kDa. In allen Proteinfractionen konnte eine Kreuzreaktion bei ca. 70 kDa mit dem Peptidantikörper detektiert werden. Des Weiteren konnte in den Rohextrakten der Mutanten NM92 ( $\Delta nar1\Delta nar2\Delta nar3$ ), NM68 ( $\Delta nar2\Delta nar3$ ) und NM24 ( $\Delta nar1$ ) ein unspezifisches Signal bei 130 kDa detektiert werden. Die Analyse der *nar1*-Deletionsmutanten NM92 und NM24 verdeutlicht, dass es sich bei diesem Signal nicht um NarG1 handeln kann. Folglich zeigte kein Rohextrakt des exponentiellen Myzels ein NarG1-spezifisches Signal. Dieses Ergebnis deutet darauf, dass das Nar1-Protein ausschließlich in Sporen und nicht im exponentiellen Myzel vorhanden ist.

Die Daten der Western Blot-Analyse lassen zunächst noch offen, ob lediglich das Protein nicht im Myzel vorhanden war oder auch keine spezifische mRNA im Myzel vorlag. Zur Charakterisierung von Nar1 als sporenspezifisches Nar-Enzym erfolgte daher zusätzlich die Analyse der Stämme auf Transkriptionsebene in den verschiedenen Zellzyklusstadien von *S. coelicolor* mittels RT-PCR. Isolierte Gesamt-RNA von geernteten Sporen, exponentiellem und stationärem Myzel sowie Luftmyzel wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die erhaltene cDNA-Bibliothek wurde eingesetzt, um spezifische mRNA in den Lebenszyklusphasen nachzuweisen. Abbildung 3.2. zeigt das Ergebnis der RT-PCR unter Verwendung verschiedener Primerkombinationen.



**Abbildung 3.2.: Detektion der mRNA-Transkripte von *narG1* in den verschiedenen Lebenszyklusphasen.**

Gesamt-RNA der Stämme M145 (Wildtyp) und NM92 (Dreifach-*nar*-Deletionsmutante) wurde aus ausdauernden Sporen, exponeniellem Myzel, stationärem Myzel und Luftmyzel isoliert und in cDNA umgeschrieben. 100 ng cDNA dienten als *template* für die RT-PCRs mit den in Tabelle 8.1. angegebenen Primerkombinationen. Genomische DNA des Wildtypstammes M145 diente als Positivkontrolle, H<sub>2</sub>O wurde als Negativkontrolle eingesetzt. [Anmerkung: Das Experiment aus Abb. 3.2., Abb. 3.15. und Abb. 3.23 wurde gleichzeitig durchgeführt und somit die Bilder der Kontrollen (*whiB*, 16S rRNA) geteilt und jeweils mitgeführt.]

Genomische DNA des Wildtyps M145 wurde als Positiv-Kontrolle eingesetzt und zeigt ein *narG1*-spezifisches PCR-Produkt mit einer Größe von 600 bp. Spezifische *narG1*-Transkripte konnten deutlich in Sporen des Wildtypstammes M145 nachgewiesen werden, wogegen lediglich ein sehr schwaches Signal im exponentiellen Myzel detektierbar war. Kein *narG1*-Transkript war dagegen in stationärem Myzel und Luftmyzel detektierbar. Als Negativkontrolle diente isolierte RNA der Dreifach-*nar*-Deletionsmutante NM92, in der keine *narG1*-Transkripte detektiert werden konnten. Der Nachweis der *whiB*-Transkripte fungierte als Kontrolle für das Luftmyzel und zeigt die Synthese eines für die Entwicklung des Luftmyzels essentiellen Proteins (Soliveri *et al.*, 1992). In beiden verwendeten Stämmen konnten spezifische *whiB*-Transkripte nachgewiesen werden. Die Analyse der 16S rRNA stellt sicher, dass die vergleichbare Menge Gesamt-RNA in allen Fällen eingesetzt wurde. Als Kontrolle für das Sporenstadium wurde die mRNA des Gens SCO3780, eine putative Trehalose-6-Phosphat-Hydrolase, gewählt und erwartungsgemäß als *House-Keeping*-Gen für Sporen detektiert. Auffallend ist die äußerst schwache Transkriptmenge von SCO3780 im exponentiellen Myzel und Luftmyzel, wohingegen in Sporen und im stationären Myzel verstärkte Transkriptmengen nachweisbar sind.

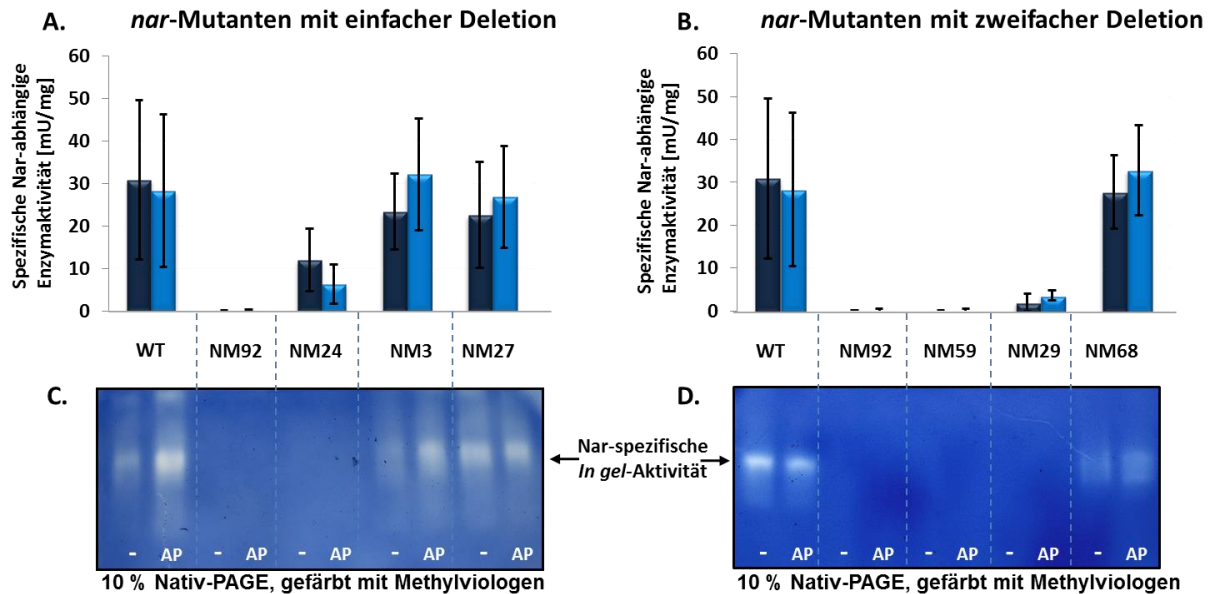
Die Daten der RT-PCR-Analyse belegen, dass *narG1*-Transkripte hauptsächlich in Sporen vorliegen. Es kann vermutet werden, dass diese bereits während der Sporenbildung gebildet werden. Im Vergleich zu Sporen wird die *narG1*-spezifische mRNA nur zu einem geringen Anteil im exponentiellen Myzel gebildet. Diese Daten bestätigen damit eine sporenspezifische Relevanz von Nar1.

### 3.1.2. Nar1 ist in Sporen permanent vorhanden und im Rohextrakt immer nachweisbar

Die Transkriptdaten aus 3.1. zeigen, dass die Synthese von aktivem Nar1 prinzipiell kontinuierlich möglich ist. Dieses Ergebnis wirft die Frage auf, ob das Nar1-Enzym in intakten ausdauernden Sporen bereits aktiv vorliegt oder erst bei anaeroben oder hypoxischen Stressbedingungen gebildet und aktiviert wird. Die *in vivo*-Daten von Fischer, Falke *et al.* (2013) ließen für Sauerstoff eine regulatorische Funktion bei der Nitratreduktion in Sporen vermuten, da in der Anwesenheit von Sauerstoff die Nitratreduktion gehemmt wurde. Diese Regulation verlief reversibel und gleicht daher einem *on-off*-Schalter-Mechanismus. Auf welcher Ebene die regulatorische Funktion von Sauerstoff angreift, das heißt, wird durch Sauerstoff der Nitrattransport in die Zelle blockiert oder wird das Nar1-Enzym durch Sauerstoff selber inaktiviert? Dies wurde durch Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität in aufgeschlossenen Sporen ermittelt.

Zur Bestimmung des Sauerstoffeinflusses auf die Enzymaktivität wurde ein Teil der geernteten Sporen vor dem Aufschluss 1 h bei 30 °C anaerob inkubiert und ein Teil 1 h auf Eis aerob inkubiert.

Nach dem Sporenaufschluss wurde im Rohextrakt durch einen DTH/BV-basierenden Assay die spezifische Nar1-Enzymaktivität gemessen (Abbildung 3.3. A+B).



**Abbildung 3.3.:** Nachweis der spezifischen Nitratreduktaseaktivität im Rohextrakt von ausdauernden Sporen und der Einfluss einer anaeroben Präinkubation der Sporen auf die *in vitro* Aktivität.

**A+B.** Nachweis der spezifischen Nitratreduktaseaktivität im Rohextrakt von ausdauernden Sporen der *Nar*-Mutanten mit **(A)** einfachem *Knockout* (NM24 – Deletion von *nar1*, NM3 – Deletion von *nar2*, NM27 – Deletion von *nar3*) und **(B)** eines zweifachen *Knockout* (NM59 – Deletion von *nar1* und *nar3*, NM29 – Deletion von *nar1* und *nar2*, NM68 – Deletion von *nar2* und *nar3*) mit Hilfe eines BV-DTH-basierten Enzym-Assays ohne anaerobe Präinkubation (dunkelblaue Balken) und mit anaerober Präinkubation (hellblaue Balken) der Sporen vor dem Aufschluss.

**C.+D.** *In-gel* *Nar*-Aktivitätsfärbung nach Auftrennung der mit Detergenz behandelten Proteine (30 µg) der *Nar*-Mutanten mit einfachem *Knockout* **(C)** und zweifachem *Knockout* **(D)** in einer 10%igen Nativ-PAGE. Zum Nachweis der *Nar*-Aktivität im Gel wurde dieses mit DTH-Methylviologen und Nitrat als Substrat unter Sauerstoffausschluss gefärbt. Die *Nar*-abhängige Oxidation von Methylviologen wird als weiße Lauffront im blau gefärbten Gel sichtbar. Ein (-) ist definiert als Rohextrakt ohne vorherige anaerobe Präinkubation der Sporen, (AP) ist definiert als Rohextrakt mit einer einstündigen Präinkubation der Sporen bei 30 °C vor dem Aufschluss.

Im Rohextrakt des Wildtypstammes M145 war eine vergleichbare *Nar1*-spezifische Enzymaktivität von 30 mU/mg messbar, unabhängig von der aeroben oder anaeroben Präinkubation der Sporen vor dem Aufschluss. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass Sauerstoff seine regulatorische Funktion beim Nitrattransport in die Zelle hat und *Nar1* trotz Exposition mit Sauerstoff wieder aktiviert werden kann. Die Dreifach-*nar*-Deletionsmutante NM92 diente in diesem Aktivitätsassay als Negativkontrolle und zeigte keine messbare Enzymaktivität. Im Rohextrakt einer Mutante ohne funktionelles *Nar2* oder *Nar3* (NM3,  $\Delta nar2$ ; NM27,  $\Delta nar3$ ) war dagegen eine Enzymaktivität analog zum Wildtyp M145 messbar. Eine Mutante, ohne funktionelles *Nar1*-Enzym (NM24), zeigte hingegen eine stark verringerte messbare Enzymaktivität von 12 mU/mg, die auf die Aktivität von *Nar2* oder *Nar3* zurückzuführen ist. Die Analyse der Doppel-*nar*-Deletionsmutanten (Abbildung 3.3. B) korreliert mit den Ergebnissen der Einzel-*nar*-Deletionsmutanten und zeigt durch eine geringe messbare aber reproduzierbare Aktivität im Rohextrakt der Mutante NM29 ( $\Delta nar1\Delta nar2$ ), dass diese Restaktivität

(25-30 % der Wildtypaktivität) auf Nar3 beruht. Um eine Differenzierung der gemessenen Gesamt-Nar-Aktivität in Nar1-, Nar2- und Nar3-Aktivität zu ermöglichen, wurde die Nar-Aktivität zymografisch durch Aktivitätsfärbung nach Nativ-PAGE visuell dokumentiert (Abbildung 3.3. C+D). Die Rohextrakte anaerob und aerob präinkubierter Sporen wurden in einer nicht-denaturierenden PAGE aufgetrennt und die Nar-Aktivität durch DTH/Methylviologen (MV)-*In gel*-Färbung als weiße Bande im blau gefärbten Gel sichtbar gemacht. Das Ergebnis der Aktivitätsfärbung steht im Einklang mit der gemessenen Enzymaktivität: Eine Aktivitätsbande mit vergleichbarer Intensität war detektierbar im Rohextrakt des Wildtypstammes sowohl nach aerober als auch anaerober Präinkubation. In den Mutanten ohne Nar1-Protein war dagegen keine Gesamt-Nar-Aktivität detektierbar. Die qualitative Analyse der Gesamt-Nar-Enzymaktivität der Einzel- und Doppelmутanten sowie die zymografisch sichtbare Aktivität im Nativgel konkretisieren die ersten Ergebnisse des Nitritbildungsassays bei Fischer, Falke *et al.* (2013), dass die Nitratreduktion in Sporen auf der Aktivität von Nar1 beruht und dieses ausschließlich in Sporen präsent und aktiv ist.

Die bisher beschriebenen Daten definieren Nar1 eindeutig als sporenspezifisches Nar-Enzym, welches vermutlich bereits während der Sporenbildung in der Spore synthetisiert wird und somit bei einem *Shift* von aerober zur anaeroben Atmung sofort die Reduktion von Nitrat zu Nitrit katalysieren kann. Sauerstoff hemmt die Nitratreduktion in intakten Sporen, wobei, wie die spezifischen Enzymaktivitäten zeigen, nicht das Enzym *per se* durch Sauerstoff inaktiviert wird. Vermutlich scheint die Regulation vielmehr über den Nitrat-Transport in die Zellen zu erfolgen, welcher in der Anwesenheit von Sauerstoff blockiert wird.

### **3.2. Die Enzym-Aktivität von vorliegendem Nar1 ist abhängig von Komponenten der aeroben Atmungskette**

Als membranständiges Enzym katalysiert Nar1 die Reduktion von Nitrat zu Nitrit direkt an der, dem Zytoplasma zugewandten Seite der Zytoplasmamembran. NarI ist als Membrananker direkt mit der Zytoplasmamembran assoziiert, während NarH und NarG lediglich als membranassoziierte Komponenten des Nar1-Holoenzym fungieren. Unklar ist zum jetzigen Zeitpunkt, woher das Nar1-Enzym in Sporen die für die Reduktion nötigen Elektronen bezieht, d. h. was als Elektronenquelle für das Nar1-Enzym agiert. Denkbar wäre eine Kopplung der Nitratreduktion an Membran-Komponenten der aeroben Atmungskette, weil bereits im vorangegangenen Abschnitt gezeigt werden konnte, dass das Nar1-Protein in Sporen permanent präsent ist. Eine mögliche Korrelation zwischen der aeroben Atmungskette und der Nar1-bedingten Nitratreduktion in Sporen sollte zunächst mit der Charakterisierung zweier von Jesse Alderson (JIC, Norwich) hergestellten Mutanten (COE190,

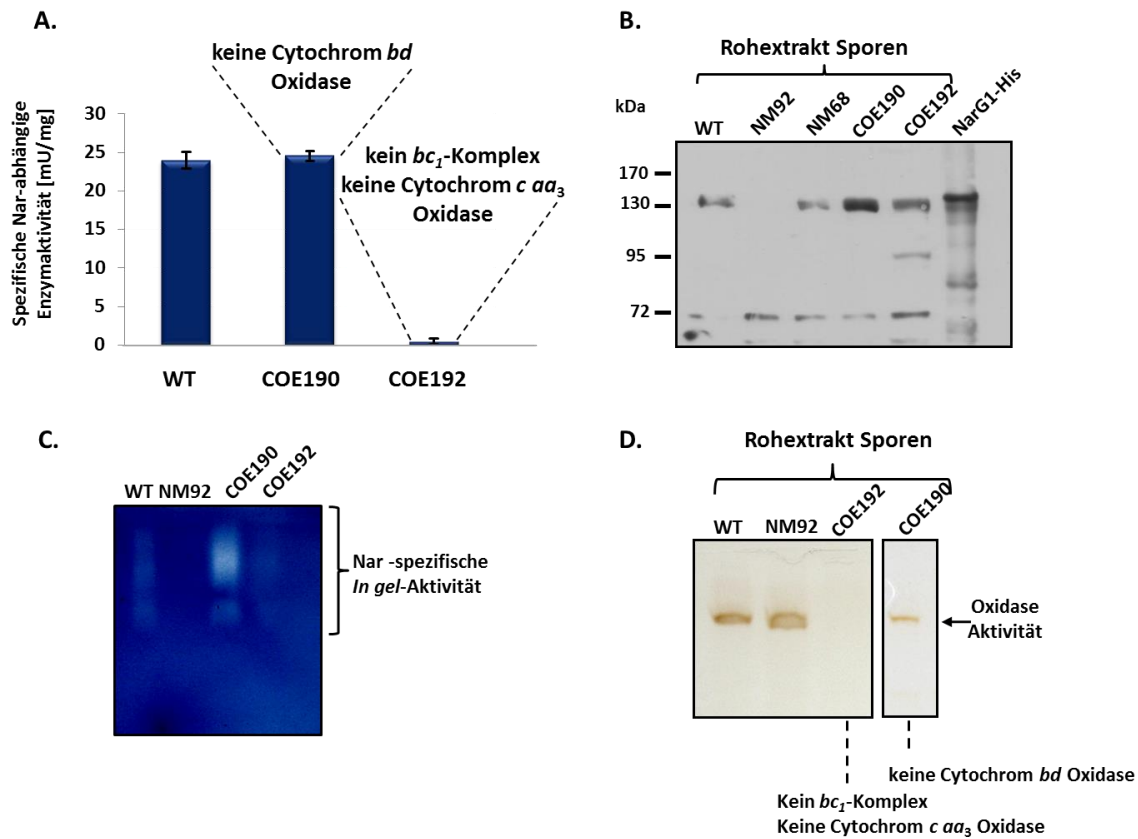
COE192) mit Gendelektionen in essentiellen Komponenten der aeroben Atmungskette untersucht werden.

Die Mutante COE190 ist durch Deletion der Gene SCO3945-46 nicht mehr in der Lage, die sauerstoffaffinere Cytochrom *bd* Oxidase, die unter sauerstofflimitierenden Bedingungen aktiv ist, auszubilden; die Mutante COE192 bildet durch die Deletion der Gene SCO2148-56 weder einen *bc1*-Komplex noch eine terminale Cytochrom *c aa<sub>3</sub>* Oxidase aus. Der genaue Aufbau des Lokus von SCO2148-56 und SCO3945-46 ist im Anhang grafisch dargestellt (Abb. 8.1., Anhang).

### **3.2.1. Der Verlust des *bc<sub>1</sub>*-Komplexes und der Cytochrom *aa<sub>3</sub>* Oxidase führt zum Verlust der Nitratreduktaseaktivität in Sporen *in vivo* und *in vitro***

Nitritbildungsassays von Sporensuspensionen beider Atmungskettenkomplex-Mutanten, durchgeführt von Dr. M. Fischer, zeigten bereits im Vorfeld die Ausbildung eines Phänotyps von COE192. Die Mutante COE192 war im Vergleich zum Wildtyp nicht länger in der Lage, Nitrat zu Nitrit zu reduzieren, wohingegen COE190 Nitrit in äquivalenten Mengen zum Wildtyp bildete. Der Verlust des Komplex III und Komplex IV geht damit einher mit dem Verlust der Nitratreduktaseaktivität in intakten oder ausdauernden Sporen. Der Verlust der Cytochrom *bd* Oxidase hat dagegen keinen Einfluss auf die Nitratreduktaseaktivität *in vivo*.

In der vorliegenden Doktorarbeit wurden beide Mutanten auf das Vorliegen eines aktiven Nar1-Enzyms im Rohextrakt hin untersucht. Aerob geerntete Sporen wurden aerob aufgeschlossen und bis zum Rohextrakt fraktioniert. Die Nar1-spezifische Enzymaktivität im Rohextrakt wurde wie zuvor angegeben durch einen DTH/BV-basierenden Assay anaerob gemessen, bei dem die Elektronen direkt vom Benzylviologen auf die Nitratreduktase übertragen werden.



**Abbildung 3.4.: Untersuchung einer möglichen Korrelation der Nitratreduktaseaktivität und des Komplex III der aeroben Atmungskette in ausdauernden Sporen.**

**A.** Nachweis der spezifischen Nitratreduktaseaktivität im Rohextrakt von ausdauernden Sporen der Atmungskettenkomplexmutanten COE190 und COE192 mit Hilfe eines BV-DTH-basierten Enzym-Assays. Die Balken repräsentieren die Messung von 3 unabhängigen Sporenernten, wobei bei jeder Messung das Rohextrakt mindestens zweimal gemessen wurde.

**B.** Immunodetektion nach Western Blot-Analyse von 60 µg Sporen-Rohextrakt. Die Detektion erfolgte mit anti-NarG1 1:25 (depletiert). Gereinigtes, mit einem C-terminalem His-Tag markiertes NarG1 (1 µg) wurde als Positivkontrolle eingesetzt.

**C.** In gel Nar-Aktivitätsfärbung nach Auftrennung der mit Detergenz behandelten Proteine (30 µg) der Atmungskettenkomplexmutanten in einer 10%igen Nativ-PAGE. Zum Nachweis der Nar-Aktivität im Gel wurde dieses mit DTH-Methylviologen und Nitrat als Substrat unter Sauerstoffausschluss gefärbt. Die Nar-abhängige Oxidation von Methylviologen wird als weiße Lauffront im blau gefärbten Gel sichtbar.

**D.** In gel Oxidase-Aktivitätsfärbung zum Nachweis der Komplex IV-Aktivität (Cytochrom *c* Oxidase-Färbung) im Rohextrakt von ausdauernden Sporen der Atmungskettenkomplexmutanten COE190 und COE192 sowie Wildtyp M145 und NM92 (Dreifach-*nar*-Deletionsmutante). Die mit Detergenz behandelten Proteine (150 µg) wurden in einer 10%igen Nativ-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und mit einer Diaminobenzidin-Cytochrom *c*-Aktivitätsfärbung ihre Komplex IV-Aktivität im Gel nachgewiesen. Die Aktivität wird als braune Bande im farblosen Gel sichtbar.

Das Rohextrakt der Mutante COE190 zeigte eine dem Wildtyp entsprechende spezifische Enzymaktivität von ca. 23 mU/mg, wohingegen die Mutante COE192 keine messbare Nitratreduktaseaktivität im Rohextrakt aufweist (Abbildung 3.4. A). Der Verlust des *bc*<sub>1</sub>-Komplexes und der Cytochrom *c aa*<sub>3</sub> Oxidase kann nicht direkt für die fehlende Enzymaktivität von COE192 verantwortlich sein, da aufgrund des direkten Übergangs der Elektronen von Benzylviologen auf Nar1 die Atmungskettenkomplexkomponenten im Enzym-Assay nicht essentiell sind. Um zu klären, ob die fehlende Enzymaktivität von COE192 mit dem Fehlen eines aktiven Nars begründet werden kann, wurden die Mutanten mittels Immunodetektion untersucht (Abbildung 3.4. B). Die katalytische



Untereinheit wurde durch die Detektion mit depletierten Peptitantikörpern bei einer molekularen Masse von 135 kDa nachgewiesen. Das gereinigte, mit einem C-terminalen His-Tag markierte NarG1 fungierte als Positivkontrolle für den depletierten Antikörper. Wildtyp M145, Stamm NM68 ( $\Delta nar2\Delta nar3$ ) und die Mutante COE190 ( $\Delta cydAB$ ) zeigten ein klar detektierbares Signal für NarG1 bei ca. 136 kDa. Überraschenderweise war im Rohextrakt der Mutante COE192 ebenfalls NarG1 bei ca. 136 kDa detektierbar. Allerdings zeigte sich ein weiteres detektierbares Signal bei ca. 95 kDa, das auf Degradierung von NarG1 hindeuten könnte. Auch im Nativgel war nach Aktivitätsfärbung zymografisch keine Nar1-spezifische Aktivität im Rohextrakt von COE192 nachweisbar, wohingegen der Wildtypstamm M145 und die Mutante COE190 deutlich eine Aktivität, sichtbar als weiße Lauffront im blaugefärbten Gel, zeigten. Stamm NM92 diente als Negativkontrolle und zeigte ebenfalls keine Nar-spezifische Aktivität.

Der Verlust der Nar1-Enzymaktivität im Sporen-Rohextrakt der Mutante COE192 ist folglich nicht auf das Fehlen von Nar1 zurückzuführen. Nar1 muss in Sporen demnach inaktiv vorliegen. Möglich wäre eine gestörte Kofaktor-Biosynthese, weshalb Nar1 nicht mehr vollständig assembliert wird. Ein Indiz für diese Hypothese zeigt das detektierte Degradierungsmuster nach Western Blot-Analyse, welches sich ebenfalls nach Western Blot Analyse einer *moaA*-Mutante abzeichnet (Abbildung 8.2. Anhang).

Eine weitere Möglichkeit für inaktiv vorliegendes Nar1 könnte in einer regulatorischen Abhängigkeit bei Fehlen der Gene SCO2148-56 (Komplex III und Komplex IV), die in der Mutante COE192 deletiert sind, begründet sein. Ist dies der Fall, kann angenommen werden, dass diese regulierende Abhängigkeit auch in beide Richtungen wirkt. Das heißt, ein Fehlen eines Nar1-Enzyms würde somit auch einen Effekt auf die Aktivität des  $bc_1$ -Komplexes oder die Cytochrom *c*  $aa_3$ -Oxidase zeigen. Ziel war es daher zu prüfen, ob das Fehlen der Nar-Enzyme einen Einfluss auf die Funktionalität der Atmungskettenkomplexe haben könnte. Um Aussagen über die Funktionalität der respiratorischen Atmungskettenkomplexe III und IV treffen zu können, wurde daher die Cytochrom *c* Oxidase-Aktivität in den Mutanten untersucht (Abbildung 3.4. D). Die Aktivität lässt sich über die Cytochrom *c* Oxidase-vermittelte Reduktion von Cytochrom *c* mittels Diaminobenzidin durch *In-gel* Aktivitätsfärbung nach Nativ-PAGE zymografisch nachweisen. Abbildung 3.4. D zeigt, dass im Rohextrakt von Sporen des Wildtyps M145 und der Mutante NM92 ( $\Delta nar1\Delta nar2\Delta nar3$ ) die respiratorischen Atmungskettenkomplexe III und IV aktiv/funktionell vorliegen. Das Rohextrakt der Mutante COE192 zeigt, dass der Aktivitätsnachweis spezifisch für die Cytochrom *c* Oxidase ist. Über eine aktiv vorliegende Cytochrom *bd* Oxidase ist durch Mangel an Nachweismethoden keine Aussage möglich. Der vermutete regulatorische Einfluss der Gene SCO2148-56 auf die Nar1-Aktivität scheint zudem nur in eine Richtung angelegt. Das Fehlen der Nar-Enzyme hat gemäß den Ergebnissen der Mutante NM92 ( $\Delta nar1\Delta nar2\Delta nar3$ ) keinen Einfluss auf die Cytochrom *c* Oxidase-Aktivität (Abbildung 3.4. B),

sodass der vermutete regulatorische Einfluss der Gene SCO2148-56 auf die Nar1-Aktivität nur in eine Richtung angelegt zu sein scheint.

### 3.2.2. Durch einzeln oder kombiniert eingebrachte Atmungskettengene ist die fehlende Synthese von Komplex III und Komplex IV teilweise komplementierbar

Die Ergebnisse der Mutante COE192 (Kapitel 3.2.1.) lieferten erste Hinweise auf Verknüpfung von aerober Atmung mit Sauerstoff und anaerober Nitratreduktion in Sporen. Dabei scheint der *bc1* Komplex und/oder Komplex IV eine regulatorische Funktion bei der Nitratreduktion in Sporen einzunehmen. Mit der Erstellung verschiedener Komplementationskonstrukte für COE192 sollte zunächst analysiert werden, bei welcher Kombination der eingebrachten Gene der Wildtypphänotyp der Mutante COE192 wiederhergestellt wird. Abbildung 3.5. gibt einen Überblick über die erstellten Komplementationskonstrukte für die Mutante COE192.

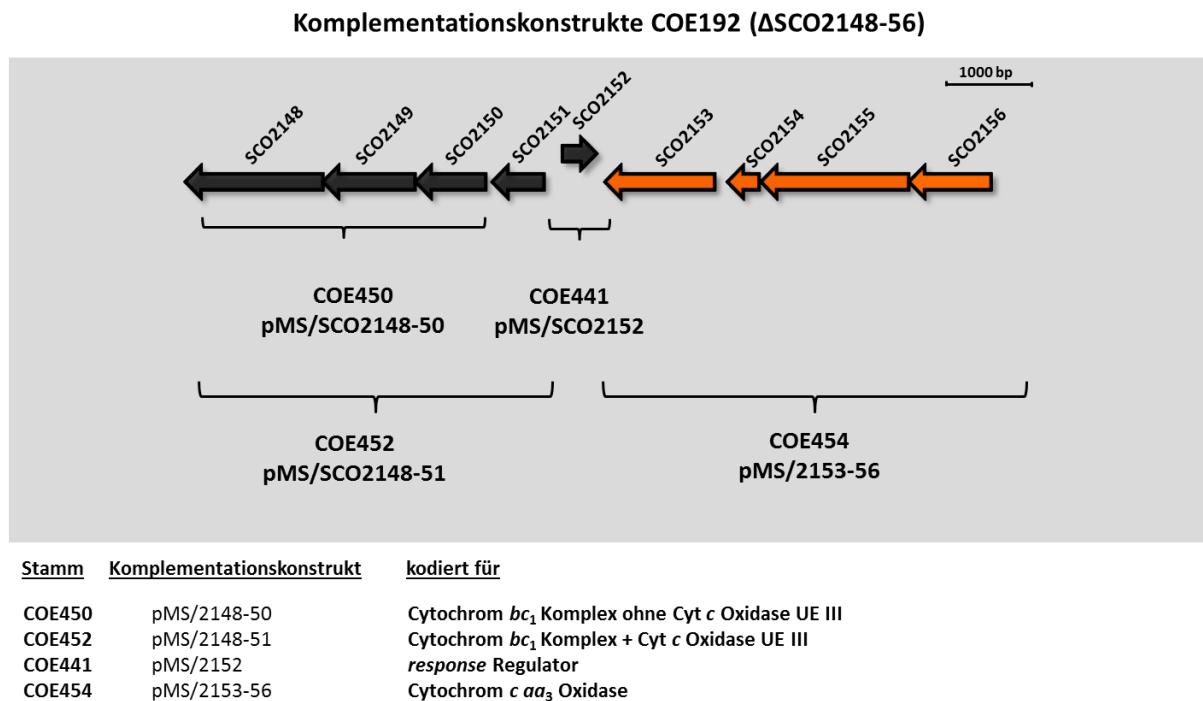
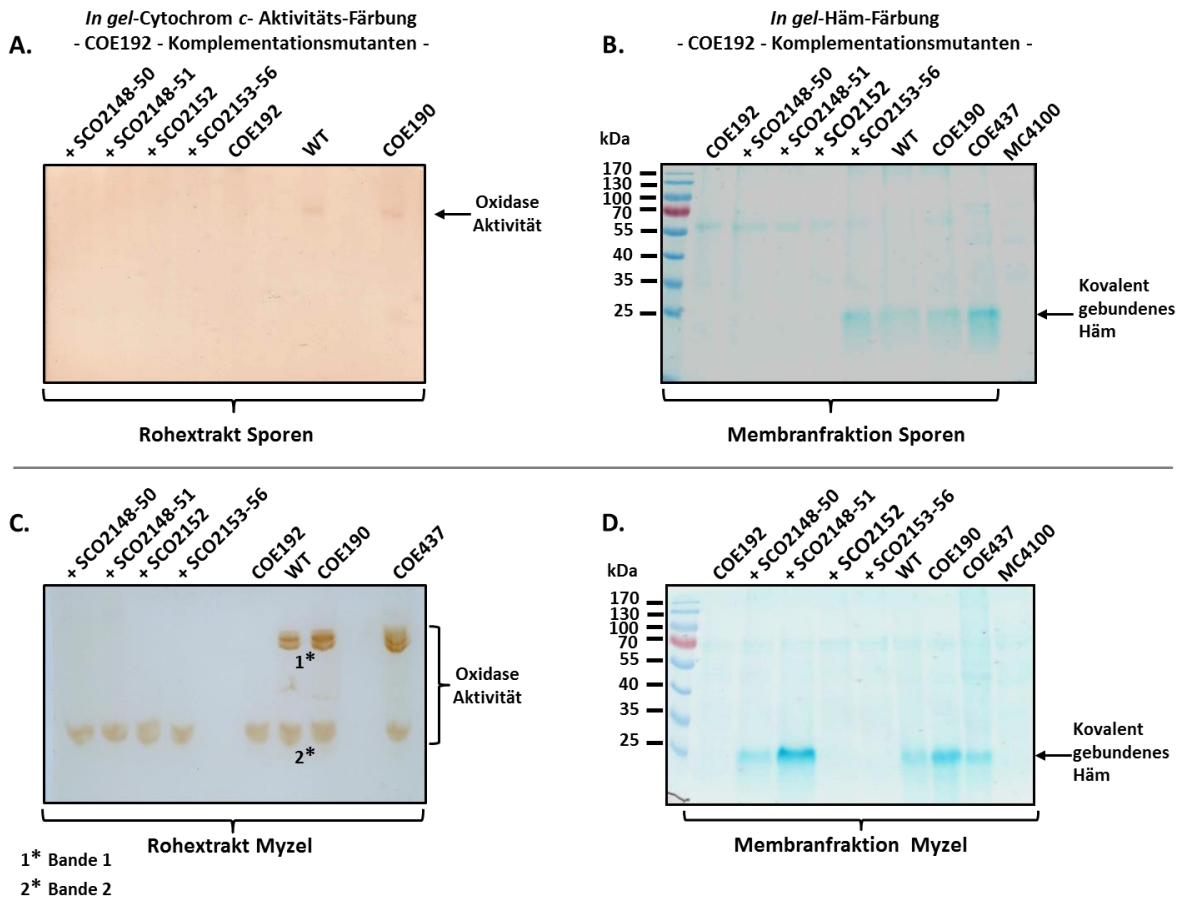


Abbildung 3.5.: Komplementationskonstrukte für COE190.

Zur Überprüfung der Komplementationsfähigkeit der erstellten Konstrukte wurden die neu konstruierten Mutanten auf ihre Cytochrom *c* Oxidase-Aktivität sowohl in Sporen als auch im Myzel mittels *In-gel*-Aktivitätsfärbung und Häm-Färbung untersucht (Abbildung 3.5.).



**Abbildung 3.6.:** Überprüfung der Komplementationsfähigkeit der erzeugten Konstrukte für COE192 Spore versus Myzel.

**A und C.** In-gel Oxidase-Aktivitätsfärbung zum Nachweis der Komplex IV-Aktivität (Cytochrom *c* Oxidase-Färbung) im Rohextrakt von ausdauernden Sporen (A) und exponentiellem Myzel (B) der Atmungskettenkomplexmutanten und den Komplementationsmutanten. Die mit Detergenz behandelten Proteine (150 µg für A und 40 µg für B) wurden nach elektrophoretischer Auftrennung mit einer Diaminobenzidin-Cytochrom *c*-Aktivitätsfärbung ihre Komplex IV-Aktivität im Gel nachgewiesen. Die Aktivität wird als braune Bande im farblosen Gel sichtbar.

**B und D.** In-gel Häm-Färbung zum Nachweis von kovalent gebundenem Häm in Membranfraktionen der Atmungskettenkomplexmutanten und deren Komplementationskonstrukte für (I) Sporen und (II) exponentielles Myzel. 50 µg Membranfraktion von Sporen wurden in einer 15%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Zum Nachweis von kovalent gebundenem Häm wurde das Gel mit TMBZ und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gefärbt. Gebundenes Häm wird sichtbar als blaue Bande und zeigt den korrekten Einbau der Komplementationskonstrukte.

Abbildung 3.6. zeigt, dass außer der Positivkontrolle M145 (Wildtyp) und COE190 ( $\Delta$ *cydAB*) in keinem Rohextrakt der Komplementationsmutanten die Cytochrom *c*-Oxidase-Aktivität zurückgebracht werden konnte. Durch Nachweis eines kovalent gebundenen Häms in der Membranfraktion der, in der Cytochrom *c* Oxidase-Färbung analysierten Extrakte konnte allerdings die Bildung der Komponenten SCO2156-52 nachgewiesen werden (Abbildung 3.6. B). Die Cytochrom *c* Oxidase scheint damit korrekt in die Membran eingebaut zu sein. Die Membranfraktionen des Wildtypstammes M145 und der Mutante COE190 wurden bei der Häm-Färbung als Positivkontrolle eingesetzt und zeigten eine blaue Häm-Bande bei einer molekularen Masse von ca. 23 kDa. Die Membranfraktion des *E. coli*-Wildtypstammes MC4100 (Cytochrom *c* Oxidase-negativ) diente als Negativkontrolle. Bei der Interpretation der durch die Häm-Färbung erhaltenen Ergebnisse, sind

generell zwei Aspekte zu beachten: zum einen die Synthese der eingebrachten Komplementationskonstrukte und zum anderen der Membraneinbau der gebildeten Proteine. Der Nachweis eines kovalent gebundenen Häms zeigt zunächst die Synthese der Komplex III- und Komplex IV-Komponenten. Kann das kovalent gebundene Häm in der Membranfraktion detektiert werden, zeigt das den Membraneinbau der gebildeten Proteine. Bei der Anfärbung der Sporen-Membranfraktionen der Komplementationskonstrukte SCO2148-50, SCO2148-51 sowie SCO2152 ist keine Häm-Bande detektierbar. Es ist somit davon auszugehen, dass die Genprodukte der Konstrukte SCO2148-50, SCO2148-51 sowie SCO2152 in Sporen nicht komplementieren, d.h. es erfolgen weder der Membraneinbau noch die Synthese des gebildeten  $bc_1$ -Komplexes. Letzteres konnte durch Anfärbung der löslichen Proteinfractionen aller Stämme nachgewiesen werden. Denn auch in der löslichen Fraktion ist kein kovalent gebundenes Häm detektierbar, was impliziert, dass die Proteine der eingebrachten Gene erst gar nicht synthetisiert wurden (Daten nicht gezeigt).

Vergleichend zur Analyse der Sporenrohextrakte ist auch im Myzel keine der Komplementationsmutanten in der Lage, den Oxidase-negativen Phänotyp der Mutante COE192 zu komplementieren (Abbildung 3.6. C). Der Wildtypstamm M145, die Mutante COE190 sowie deren Komplementationsmutante wurden bei der Aktivitätsfärbung als Positivkontrolle eingesetzt und zeigten die Aktivität von zwei Komplexen (Bande 1\* und 2\*), wobei jeder Komplex als Doppelbande im Nativ-Gel migriert. Die Analyse des Rohextraktes der Mutante COE192 zeigte, dass die Bande 1 der Aktivität der Cytochrom c Oxidase zuzuschreiben ist, da die Mutante COE192 als Cytochrom c-Oxidase-negativer Stamm keine Aktivität besitzt. Die Aktivitätsbande 2 hingegen war in allen Myzel-Rohextrakten detektierbar, beruht jedoch ebenfalls auf der Aktivität einer Oxidase. Die Häm-Färbung im Nativ-Gel zeigt, dass die Bande 2 kovalent gebundenes Häm im Komplex trägt (Abbildung 8.3., Anhang). Auffällig ist, dass diese Aktivitätsbande ausschließlich im Myzel detektierbar ist und Bande 1 und Bande 2 als Doppelbande auftreten, nicht jedoch im Rohextrakt von Sporen. Dieses Ergebnis zeigt erste Indizien für eine unterschiedliche Verfügbarkeit an Oxidasen in Sporen und Myzel.

Da durch die Oxidase-Aktivitätsfärbung keine funktionelle Komplementation der eingebrachten Gene im Myzel nachgewiesen werden konnte, wurde über Häm-Färbung nach SDS-PAGE die Komplementation über Synthese der Genprodukte und damit der Einbau des Häm untersucht (Abbildung 3.6. D). Die Membranfraktion des Oxidase-negativen *E. coli*-Stammes MC4100 diene als Negativkontrolle, wohingegen der *S. coelicolor* Wildtypstamm M145, der Mutante COE190 sowie deren Komplementationsmutante als Positivkontrollen eingesetzt wurden und eine Häm-Bande mit einer molekularen Masse von ca. 23 kDa anfärbbar war. Vergleichend zur Hämfärbung in Sporen ist im Myzel allerdings die Synthese der  $bc_1$ -Komplex-Komponenten (Konstrukt SCO2148-50, Konstrukt SCO2148-51) nachweisbar, das Genprodukt des Konstrukts SCO2153-56, was der gebildeten Cytochrom c-Oxidase entspricht, wird dagegen in Myzel nicht gebildet. Das Ergebnis der Hämfärbung

bestätigt damit die erste Annahme, dass in Sporen und Myzel verschiedene End-Oxidasen aktiv sind und somit unterschiedliche Atmungskettenkomplexe existieren könnten.

### **3.2.3. Der Verlust der Nar1-Nitratreduktaseaktivität bei COE192 ist durch einzelne oder kombiniert eingebrachte Gene von SCO2148-56 nicht komplementierbar**

Die bisherigen Ergebnisse der Komplementationsversuche für die Mutante COE192 zeigten, dass die Atmungskettenproteine zwar synthetisiert werden, allerdings ihre Funktion in der aeroben Atmungskette nicht nachgewiesen werden kann. Ob sich dennoch durch Einbringen der Konstrukte die Nar1-Aktivität zurückführen lässt, wurde anschließend sowohl *in vivo* mit dem Nitritbildungs-Assay als auch *in vitro* mit Messung der spezifischen Nar-Enzymaktivität im Rohextrakt von Sporen untersucht.

Alle Komplementationsmutanten wurden zuvor mittels RT-PCR auf die Anwesenheit von *narG1*-Transkript getestet. Genomische DNA diente als Positivkontrolle. Im Wildtypstamm M145 und COE192 konnte ein starkes Signal für das *narG1*-Transkript nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Überraschenderweise war in keiner Komplementationsmutante von COE192 *narG1*-Transkript nachweisbar. Die Komplementation in Sporen beeinflusst demnach die Bildung *narG1*-spezifischer mRNA. Ob kein *narG1*-Transkript vorliegt, weil bereits Nar1-Enzym synthetisiert wurde und keines nachgebildet wird, kann bislang nur vermutet werden.

Wie bereits der Komplementationsversuch des Cytochrom *c* Oxidase-negativen Phänotyps von COE192, zeigte auch der Nitritbildungs-Assay, dass bei keinem Konstrukt die Nitratreduktaseaktivität *in vivo* nach 5 Stunden wiederhergestellt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Die Messung der *in vitro*-Enzymaktivität bestätigte ebenfalls, dass durch Einbringen der Konstrukte keine Komplementation der Nar1-Aktivität möglich ist. Es liegt daher nahe, dass nur das Einbringen des gesamten Operons (SCO2148-56) den Phänotyp von COE192 komplementieren kann. Die Klonierung des gesamten Genbereichs (SCO2148-56) war nach mehrmaligen Versuchen allerdings nicht möglich, wobei jedoch ohnehin davon auszugehen ist, dass nur eine Teil-Komponente der deletierten Gene für den Verlust der Nar1-Aktivität verantwortlich ist. In diesem Zusammenhang konnten auch die Gene SCO2152 (unbekannte Funktion, annotiert als putativer *response* Regulator) und SCO2153 (unbekannte Funktion, annotiert als Flavin-ähnliches, sekretiertes Protein) durch Herstellung der Transposon-Mutanten SCO2152::Tn5062 (COE472) und SCO2153::Tn5062 (COE474) und deren Charakterisierung als relevante Komponenten mit Einfluss auf die Aktivität von Nar1 ausgeschlossen werden.

Nachfolgend sind die Daten der bisher durchgeführten Komplementationsstudien zum besseren Überblick noch einmal tabellarisch zusammengefasst.

**Tabelle 3.1.: Komplementationsstudien der konstruierten Mutanten hinsichtlich ihrer Nar-Aktivität in Sporen und ihrer Cytochrom c Oxidase-Aktivität in Sporen und Myzel.**

Stamm/ Mutante	Nar-Aktivität (Sporen)	Cytochrom c Oxidase-Aktivität		Synthese + Membraneinbau der AKK* (Komplementationsnachweis durch Häm-Färbung)	
		Sporen	Myzel	Sporen	Myzel
M145 (WT)	+	+	+	+	+
COE190	+	+	+	+	+
COE190K (COE190 +SCO3945-64)	+	+	+	+	+
COE192 (SCO2148-56)	-	-	-	-	-
COE192+SCO2148-50	-	-	-	-	+
COE192+SCO2148-51	-	-	-	-	+
COE192+SCO2152	-	-	-	-	-
COE192+SCO2153-56	-	-	-	+	-

\*AKK = Atmungskettenkomponenten

### 3.2.4. Die Cytochrom c Häm-bindende Untereinheit SCO2150 nimmt direkten Einfluss auf die Nar1-Aktivität in Sporen

Die Ergebnisse der Häm-Färbung und der Oxidase-Aktivitätsfärbung in Sporen zeigten die Relevanz des  $bc_1$ -Komplexes für die Nar1-Aktivität. Die komplementationsvermittelte Synthese der Cytochrom c  $aa_3$  Oxidase führte nicht zur Ausbildung der Nar1-Aktivität, was mit dem Fehlen des  $bc_1$ -Komplexes begründet werden kann, da dessen Synthese in der Häm-Färbung in Sporen nicht nachgewiesen werden konnte (Tabelle 3.1.). Es liegt daher nahe, dass die Elektronen für die Nitratreduktion von einer Komponente des  $bc_1$ -Komplexes übertragen werden, bzw. diese Komponente essentiell für die Aktivität oder den Elektronenfluss auf Nar1 ist. Die Erzeugung einer neuen Einzel-Genmutante mittels Transposon-Insertion in den Wildtypstamm M145 (Mutante COE502), ermöglichte die Untersuchung von SCO2150 als potenziell essentielles Element für die Nar1-Aktivität in Sporen (Abbildung 3.7.).

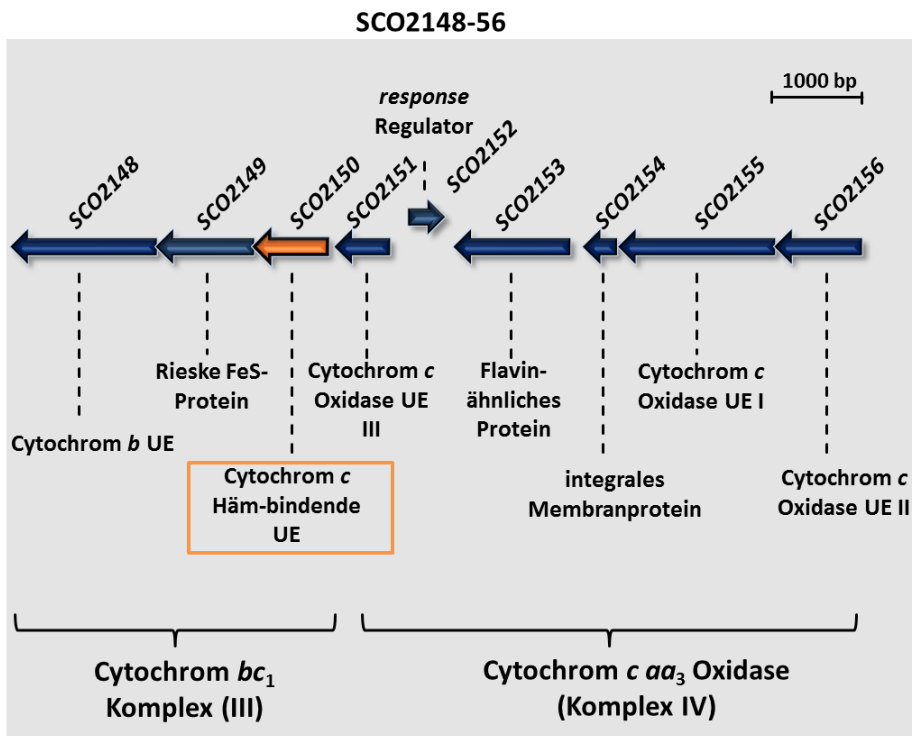
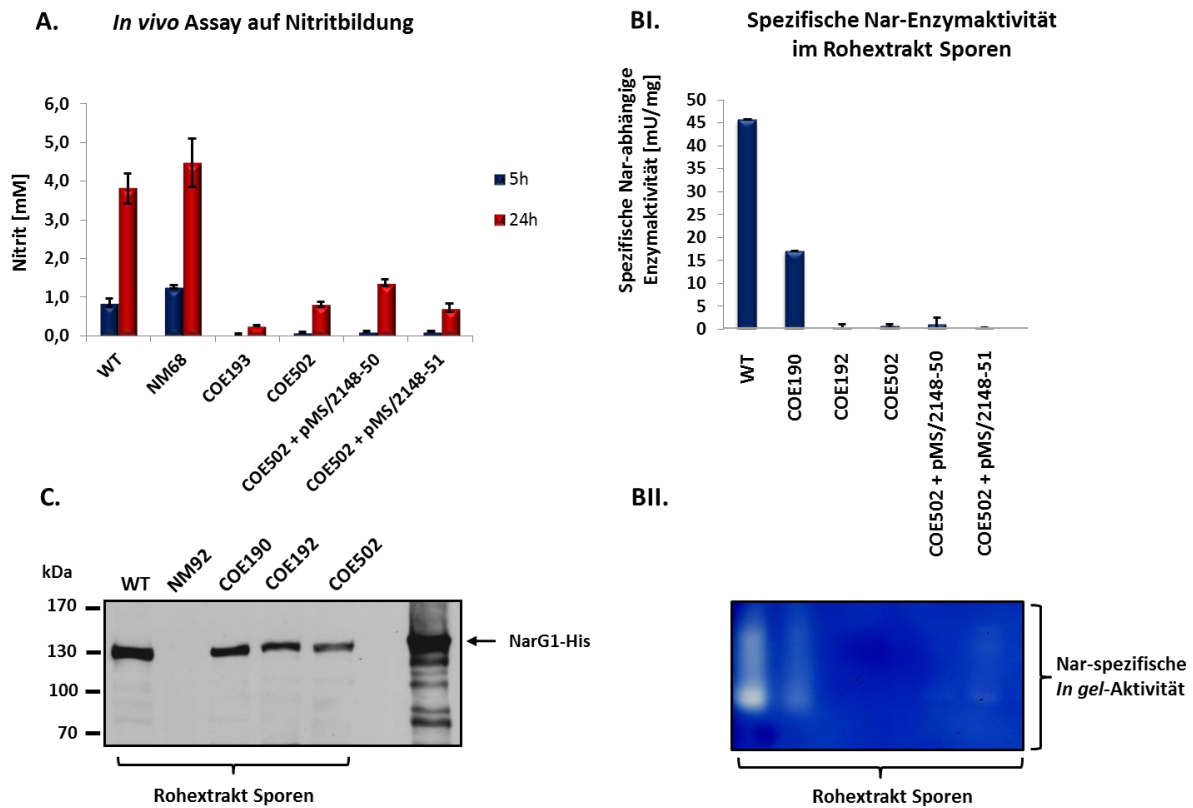


Abbildung 3.7.: Erzeugung der Mutante COE502.

Die neu konstruierte Mutante COE502 (SCO2150::Tn5062) wurde sowohl *in vivo* auf die Nitritbildung in ganzen Sporen als auch *in vitro* auf ihre spezifische Nar-Enzymaktivität untersucht (Abbildung 3.8. A). Durch Einbringen der Komplementationskonstrukte pMS/2148-50 und pMS/2148-51 in die Mutante COE502 sollte ein möglicher Phänotyp von COE502 gleich komplementiert werden. Sie wurden bei den durchgeführten Experimenten daher mitgeführt.



**Abbildung 3.8.: Nachweis der Korrelation einer Mutation in der Cytochrom *c*-bindenden Untereinheit des Komplexes III und der Nitratreduktion in ausdauernden Sporen.**

**A.** Quantitative Bestimmung der Nitritbildung in Sporen. Die Nar-Enzymaktivität wurde in anaeroben Sporensuspensionen mit einer  $OD_{450}=5$  ermittelt. Die Sporensuspensionen wurden in MOPS-NaOH-Puffer mit 5 mM Nitrat für 5 h (blaue Balken) und 24 h (rote Balken) unter Stickstoffatmosphäre inkubiert. Gebildetes Nitrit wurde im Mediumüberstand gemessen.

**BI.** Nachweis der spezifischen Nitratreduktaseaktivität im Rohextrakt von ausdauernden Sporen der Atmungskettenkomplexmutanten COE190 ( $\Delta$ SCO3945-46), COE192 ( $\Delta$ SCO2148-56) und COE502 (M145 SCO2150::Tn5062) mit Hilfe eines BV-DTH-basierten Enzym-Assays. Die Balken repräsentieren die Messung von 3 unabhängigen Sporenernnten, wobei bei jeder Messung das Rohextrakt mindestens zweimal gemessen wurde.

**BII.** *In gel* Aktivitätsfärbung nach Auftrennung der mit Detergenz behandelten Proteine (30  $\mu$ g) der Atmungskettenkomplexmutanten in einer 10%igen Nativ-PAGE. Zum Nachweis der Nar-Aktivität im Gel wurde dieses mit DTH-Methylviologen und Nitrat als Substrat unter Sauerstoffausschluss gefärbt. Die Nar-abhängige Oxidation von Methylviologen wird als weiße Lauffront im blau gefärbten Gel sichtbar.

**C.** Immunodetektion nach Western Blot-Analyse von 60  $\mu$ g Sporen-Rohextrakt nach Auftrennung in einer 7,5%igen SDS-PAGE. Die Detektion erfolgte mit anti-NarG1 1:25 (depletiert). Gereinigtes, mit einem C-terminalem His-Tag markiertes NarG1 (1  $\mu$ g) wurde als Positivkontrolle eingesetzt.

Der Wildtypstamm M145 wurde als Positivkontrolle, die Mutante COE193 ( $\Delta$ SCO2148-56) als Negativkontrolle eingesetzt. *In vivo* war eine kaum messbare Aktivität in Sporen der Mutante COE502 detektierbar, die Mutante COE502 zeigt somit *in vivo* den gleichen Phänotyp wie die Mutante COE193 (Abbildung 3.8. A). Dieses Ergebnis lieferte das erste Indiz, dass eine Transposon-Insertion in SCO2150 die Nitratreduktion *in vivo* erheblich beeinflusst. Die Analyse der Komplementationsmutanten zeigt, dass der Phänotyp von COE502 sich *in vivo* nicht komplementieren lässt. Die geringe messbare *in vivo* Restaktivität in COE502-Sporen ist vermutlich auf Nar3 zurückzuführen, da mittels Immunodetektion kein Nar2-Protein, aber Nar3 in Sporen-Rohextrakt nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt).

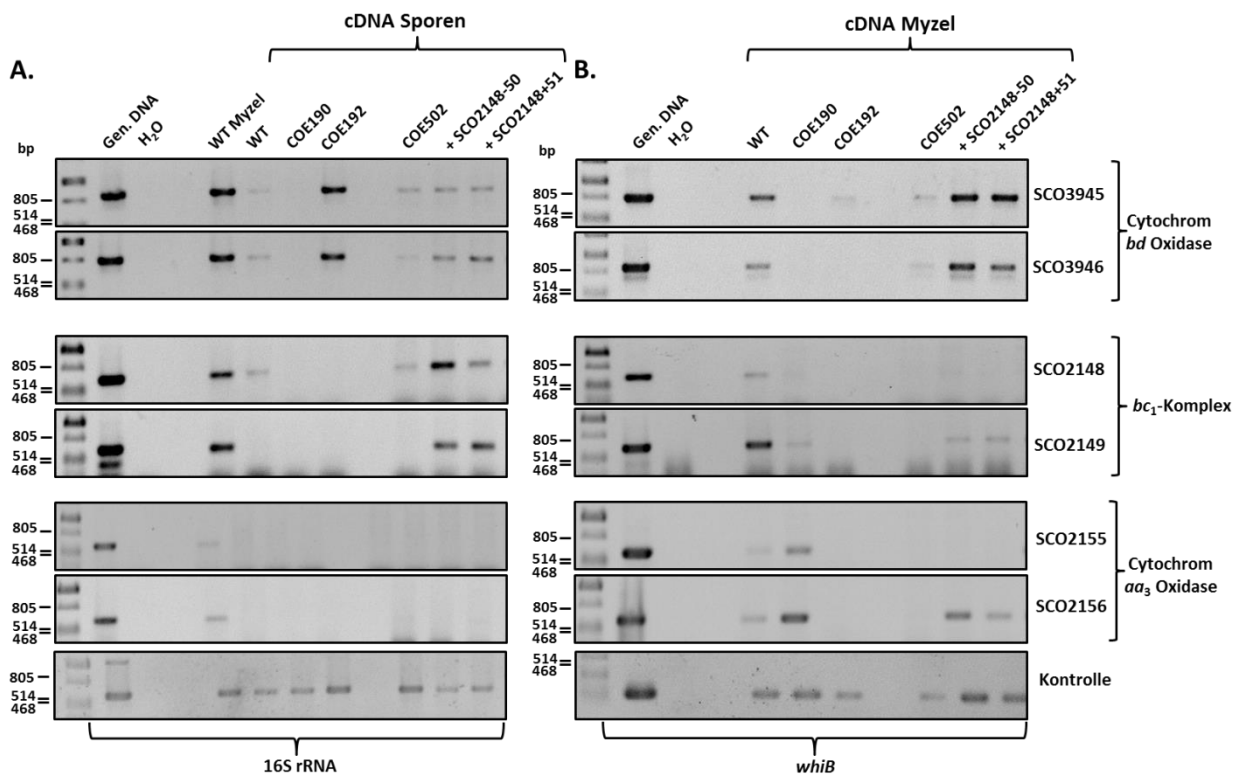


Um die potenziell regulatorische Rolle des Gens SCO2150 auf die Nar1-Aktivität *in vitro* zu untersuchen, wurden Rohextrakte von Sporen hergestellt, die spezifische Nitratreduktase-Aktivität im Rohextrakt gemessen und mittels Aktivitätsfärbung nach Nativ-PAGE analysiert (Abbildung 3.8. BI+BIJ). Das Rohextrakt des Wildtyps M145 wurde als Positivkontrolle eingesetzt, die Mutante COE192 diente als Negativkontrolle. Die Mutante COE502 zeigte wie die Negativkontrolle COE192 keine messbare Nar-Aktivität. Die Transposon-Integration in SCO2150 führt also direkt zum Verlust der Nar1-Aktivität *in vitro*. Überraschenderweise war nur in der Komplementationsmutante mit Konstrukt pMS82/2148-50 eine schwache Aktivität detektierbar (1 mU/mg). Trägt das Komplementationskonstrukt zusätzlich SCO2151 war keine Nar1-spezifische Aktivität nachweisbar.

Die Daten der Aktivitätsfärbung korrelieren mit den Daten der Enzym-Aktivitätsmessung und zeigen, dass *in vitro* die Nar1-Aktivität nur zu einem Teil komplementiert werden kann. Dabei spielt offensichtlich die Genanordnung der Gene für den  $bc_1$ -Komplex eine entscheidende Rolle: SCO2148-50 kann zu einem geringen Teil die Nar1-Aktivität komplementieren. Wird zusätzlich SCO2151, was für eine Untereinheit der Cytochrom *c*  $aa_3$  Oxidase kodiert, eingefügt, ist auch diese Komplementation nicht mehr funktionell. Dass durch die Integration des Transposons nicht die Synthese des Nar1-Proteins betroffen ist, zeigt das Autoradiogramm nach Immunodetektion mit depletierten NarG1-spezifischen Peptidantikörpern (Abbildung 3.8. C). Gereinigtes, mit einem C-terminalen His-Tag markiertes NarG1 und das Rohextrakt des Wildtyps M145 dienten als Positivkontrolle, die Dreifach-*nar*-Deletionsmutante NM92 diente als Negativkontrolle. Im Rohextrakt der Mutanten COE192 und COE502 war NarG1 als spezifisches Signal bei ca. 135 kDa detektierbar. Diese Daten implizieren damit, dass Nar1 durch die Transposon-Insertion in der Mutante COE502 inaktiv vorliegt und die Transposon-Insertion in SCO2150 zum gleichen Phänotyp wie der komplette Gen-*Knockout* von SCO2148-56 bei der Mutante COE192 führt.

### **3.3. Transkript-Analysen zu COE502 im Kontext der Bildung terminaler Atmungskettenkomplexe (Spore versus Myzel)**

Neben dem Effekt von SCO2150 auf die Aktivität von Nar1 in Sporen (Einfluss auf Ebene der Enzymaktivität) sollte ein möglicher Einfluss der Transposon-Insertion in SCO2150 im Kontext der Synthese und Aktivität der Atmungskettenkomplex-relevanten Komponenten untersucht werden. Vergleichend für Sporen und Myzel wurden dafür Transkriptanalysen der Oxidase-Gene für die Cytochrom *bd* Oxidase, die terminale Cytochrom *c*  $aa_3$  Oxidase sowie Gene des  $bc_1$ -Komplexes im Stammhintergrund der Mutante COE502 (M145 SCO2150::Tn5062) und deren Komplementationsmutanten durchgeführt (Abbildung 3.9.)



**Abbildung 3.9.: Detektion der mRNA-Transkripte von Atmungskettenkomplex-Komponenten in ausdauernden Sporen vergleichend mit exponentiellem Myzel.**

**A.** Gesamt-RNA des Wildtypstammes M145, der Atmungskettenkomplexmutanten COE190 ( $\Delta$ SCO3945-46), COE192 ( $\Delta$ SCO2148-56), COE502 (M145 SCO2150::Tn5062) sowie deren Komplementationsmutanten wurde von ausdauernden Sporen isoliert und zur cDNA-Synthese eingesetzt. 100 ng cDNA dienten als *template* für die RT-PCR mit den in Tabelle 8.1. angegebenen Primerkombinationen. Genomische DNA von M145 diente als Positivkontrolle, H<sub>2</sub>O wurde als Negativkontrolle eingesetzt.

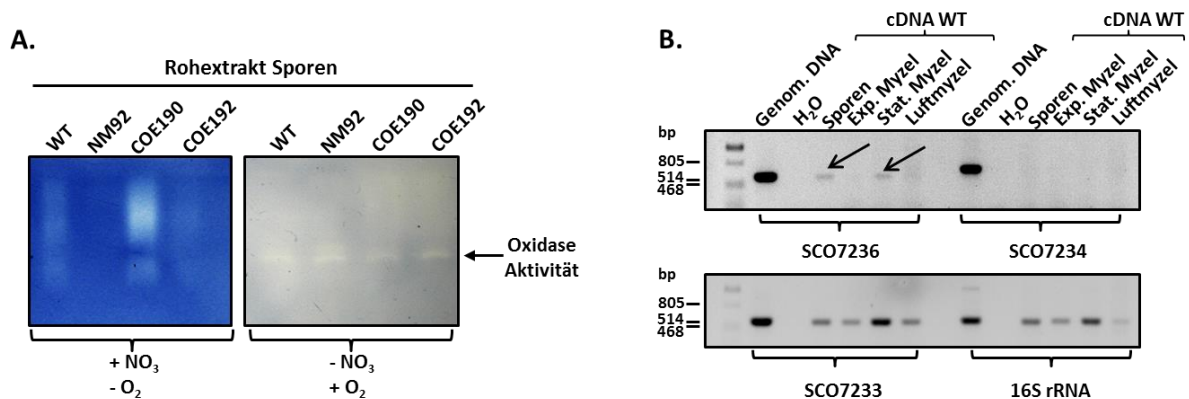
**B.** Gesamt-RNA des Wildtypstammes M145, der Atmungskettenkomplexmutanten COE190, COE192, COE502 sowie deren Komplementationsmutanten wurde von exponentiellem Myzel isoliert und zur cDNA-Synthese eingesetzt. cDNA wurde für die RT-PCRs wie für Sporen beschrieben eingesetzt. (Die Experimente aus Abbildung 3.13. und Abbildung 3.9. wurden gleichzeitig durchgeführt und somit die Bilder der Kontrollen (*whiB*, 16S rRNA) sowie SCO2148, SCO2155 geteilt und jeweils mitgeführt.)

Genomische DNA wurde fortwährend als Positivkontrolle, H<sub>2</sub>O als Negativkontrolle mitgeführt. Die Transposon-Insertion in SCO2150 der Mutante COE502 zeigt keinen Einfluss auf die Sporen-mRNA der Cytochrom *bd* Oxidase-Komponenten. Im Myzel ließ sich die durch Transposon-Insertion bedingte schwache Transkription der Cytochrom *bd* Oxidase-Gene durch Einbringen der Konstrukte komplementieren. Eine erfolgreiche Komplementation des schwachen Transkriptions-Phänotyps zeigte sich auch bei Analyse der mRNA des *bc*<sub>1</sub>-Komplexes in Sporen als auch Myzel und der Komponenten der Cytochrom *c aa*<sub>3</sub> Oxidase (Abbildung 3.9. B, Transkript-Daten Myzel). Die Daten der RT-PCRs zeigen deutlich, dass die Komplementationskonstrukte auf Ebene der Transkription funktionell sind und implizieren, dass die Transkription der Gene für den *bc*<sub>1</sub>-Komplex und die Cytochrom *c aa*<sub>3</sub> Oxidase abhängig vom Sporen-oder Myzelstadium erfolgt. Die Transkript-Analyse vom Wildtyp M145 zeigte, dass eine differenzielle Expression der Atmungskettenkomplex-Gene in

Sporen und Myzel vorliegt: das heißt, während die Transkripte der Cytochrom *bd* Oxidase nur schwach in Sporen nachweisbar sind, zeigt sich in Myzel eine erhöhte Transkriptmenge. Die Transkripte des *bc*<sub>1</sub>-Komplexes und der Cytochrom *c aa*<sub>3</sub> Oxidase konnten ebenfalls verstärkt im exponentiellen Myzel nachgewiesen werden. In diesen Stadien sind somit vermutlich unterschiedlich zusammengesetzte Atmungskettenkomplexe (Komplex III und IV) vorhanden und aktiv.

### 3.4. Identifizierung einer neuen Oxidase, die sporenspezifisch ist

Ausgehend von der Beobachtung, dass in einem zunächst anaerob präparierten Nativgel bei Versuchen zur *In gel*-Nitratreduktaseaktivität nach Exposition mit Luftsauerstoff eine zusätzliche sauerstoffabhängige Aktivitätsbande sichtbar wird, deutet dies auf die Existenz einer weiteren Oxidase in den untersuchten Sporen-Rohextrakten hin (Abbildung 3.10. A).



**Abbildung 3.10.: Charakterisierung einer neu identifizierten Oxidase als sporenspezifisches Enzym.**

**A.** *In gel*-Nar-Aktivitätsfärbung von 60 µg Sporen-Rohextrakt vom Wildtyp M145, NM92 (Dreifach-*nar*-Deletionsmutante) sowie der Mutanten COE190 ( $\Delta$ SCO3945-46) und COE192 ( $\Delta$ SCO2148-56). Die Nar-Aktivität wird als weiße Lauffront im blau gefärbten Gel unter anaeroben Bedingungen sichtbar. Sauerstoffexposition führt zum Nachweis einer neuen sauerstoffabhängigen-Aktivität, die weder auf Komplex IV noch auf der Cytochrom *bd* Oxidase beruht.

**B.** Transkriptanalysen von SCO7236, SCO7234, SCO7233, die nach *in silico* Studien einen alternativen *bc*<sub>1</sub>-Komplex und eine alternative Cytochrom-Oxidase-Untereinheit bilden können. Die Gesamt-RNA vom Wildtyp M145 wurde in den verschiedenen Lebenszyklusstadien isoliert und in cDNA umgeschrieben. Als *template* für die RT-PCR-Analysen dienen 100 ng cDNA.

Diese Aktivität tritt unabhängig von der Zugabe von Nitrat und der Präsenz eines Nar-Enzyms auf. Die Analyse der Rohextrakte der Mutanten COE190 und COE192 verdeutlicht außerdem, dass die neu identifizierte sauerstoffabhängige Bande nicht auf die Aktivität der Cytochrom *bd* Oxidase und der Cytochrom *c aa*<sub>3</sub> Oxidase zurückzuführen ist. Überraschenderweise konnte diese neue Aktivitätsbande bislang nicht im Myzel-Rohextrakt nach Sauerstoff-Exposition nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Nach ersten Hinweisen für eine weitere aktive Oxidase bei der praktischen Versuchsdurchführung wurde ein Abgleich des Genoms von *S. coelicolor* durchgeführt. *In silico* Analysen führten letztendlich zur Identifikation neuer Oxidase-ähnlicher Gene (SCO7236, SCO7235,

SCO7234 und SCO7120) im Genom von *S. coelicolor*. Ein Sequenzabgleich mit den bereits untersuchten strukturellen Oxidase-Komponenten (SCO2148-56, SCO3945-46) verdeutlicht dabei eine enge Assoziation der neu identifizierten Gene SCO7236 (*qcrB3*), SCO7235 (putatives integrales Membranprotein) und SCO7234 (*ctaF*) mit SCO2148 (*qcrB1*), SCO2155 und SCO2154.

Damit erscheint die in Kapitel 3.3. bereits aufgestellte Hypothese einer sporenspezifischen und myzelspezifischen Atmungskette umso wahrscheinlicher.

Transkriptstudien von isolierter Gesamt-RNA aus den verschiedenen Lebenszyklusphasen des Wildtypstammes sollten zunächst Aufschluss über eine potenzielle „gewebespezifische“ Bildung von zwei neu identifizierten strukturellen Komponenten, SCO7236 und SCO7234, geben (Abbildung 3.10. B). Die genomische DNA vom Wildtyp M145 diente als Positivkontrolle und zeigte jeweils ein starkes Signal für SCO7236, SCO7234 und SCO7233. Spezifische mRNA-Transkripte von SCO7234 waren ausschließlich in Sporen und stationärem Myzel detektierbar (der Pfeil markiert das Transkript), die Transkripte für SCO7233 zeigten im Vergleich dazu keine Spezifität in einer Lebensphase, sie waren in allen Lebensphasen detektierbar. Die Transkripte von SCO7234 konnten dagegen in keiner Lebensphase nachgewiesen werden. Diese Transkriptdaten deuten darauf hin, dass das Atmungskettenkomplex-Gen SCO7236, was für eine Ubichinol-Cytochrom *c* Reduktase-Untereinheit (QcrB3) kodiert, potenziell sporenspezifisch ist.

#### **3.4.1. Nachweis einer möglichen Interaktion der neu identifizierten Oxidase mit den bereits charakterisierten Atmungskettenkomplexen III und IV**

Zum Nachweis ihrer Funktion bzw. einer möglichen Kreuz-Regulation oder Interaktion mit den bereits charakterisierten Atmungskettenkomplexen, wurden Transposon-Insertionsmutanten (SCO7236::*Tn5062* und SCO7234::*Tn5062*) sowohl im Wildtyphintergrund als auch im Genotyp-Hintergrund der Mutanten COE190 ( $\Delta$ SCO3945-46) und COE192 ( $\Delta$ SCO2148-56) erstellt und hinsichtlich ihrer Cytochrom *c* Oxidaseaktivität mittels Aktivitätsfärbung untersucht (Abbildung 3.10.) im Myzel untersucht. Das Rohextrakt vom Wildtyp M145 wurde als Positivkontrolle eingesetzt, das Rohextrakt von COE192 ( $\Delta$ SCO2148-56) diente durch das Fehlen der Cytochrom *c*  $aa_3$  Oxidase als Negativkontrolle.

Tn5062-Insertionsmutanten

<u>Mutante</u>	<u>Stammhintergrund</u>	<u>betroffenes Gen</u>
COE460	WT M145	SCO7236 (Ubichinol-Cytochrom c-Reduktase, <i>qcrB3</i> )
COE462	WT M145	SCO7234 (Cytochrom c Oxidase Polypeptid I)
COE464	COE192 $\Delta$ SCO2148-56	SCO7234 (Cytochrom c Oxidase Polypeptid I)
COE466	COE192 $\Delta$ SCO2148-56	SCO7236 (Ubichinol-Cytochrom c-Reduktase, <i>qcrB3</i> )
COE468	COE190 $\Delta$ SCO3945-46	SCO7236 (Ubichinol-Cytochrom c-Reduktase, <i>qcrB3</i> )
COE470	COE190 $\Delta$ SCO3945-46	SCO7234 (Cytochrom c Oxidase Polypeptid I)

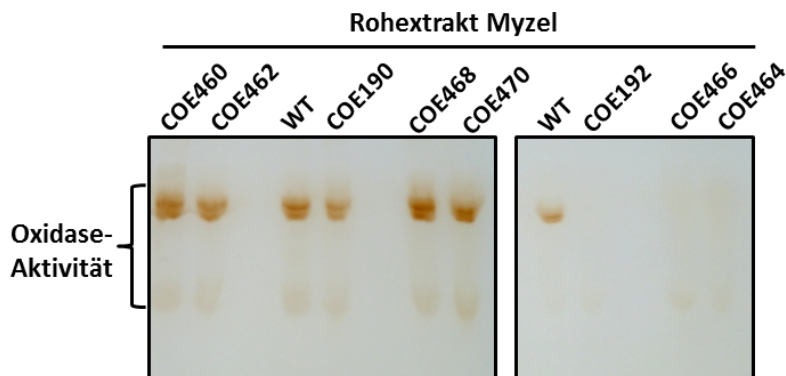


Abbildung 3.11.: *In gel* Oxidase-Aktivitätsfärbung zum Nachweis der Komplex IV-Aktivität (Cytochrom c Oxidase-Färbung) im Rohextrakt von exponentiellem Myzel (45 µg) der erstellten Transposon-Insertionsmutanten (grau unterlegt).

Die mit Detergenz behandelten Proteine wurden nach elektrophoretischer Auftrennung mit einer Diaminobenzidin-Cytochrom c-Aktivitätsfärbung ihre Komplex IV-Aktivität im Gel nachgewiesen. Die Aktivität wird als braune Bande im farblosen Gel sichtbar.

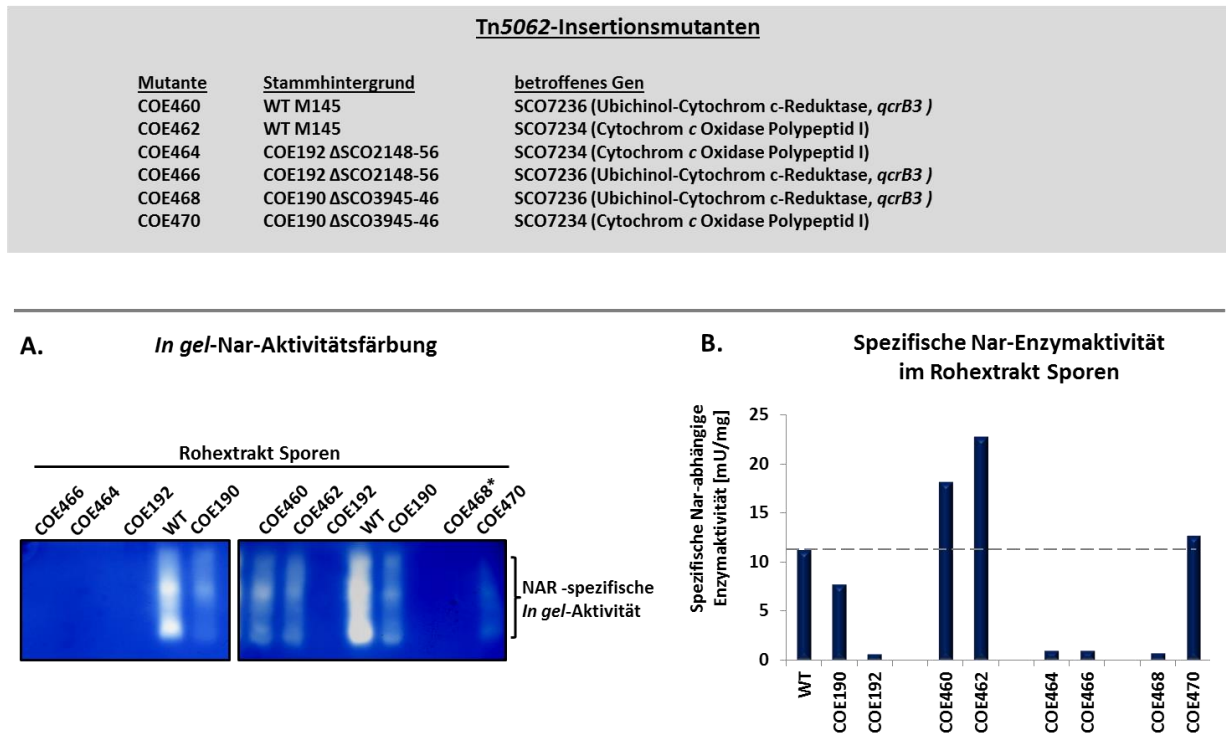
Bei der Analyse der Myzel-Rohextrakte mittels *In gel*-Aktivitätsfärbung (Abbildung 3.11.) zeigte sich, dass in allen analysierten Stämmen außer der Negativkontrolle COE192 ( $\Delta$ SCO2148-56) sowie deren Transposon-Insertionsmutanten COE464 (COE192 mit SCO7234::*Tn5062*) und COE466 (COE192 mit SCO7236::*Tn5062*) Cytochrom c Oxidase-Aktivität im Nativgel nachweisbar ist. Ein Funktionsverlust der neu identifizierten Oxidase hat damit im Myzel-Stadium keinen Einfluss auf die Cytochrom c Oxidase-Aktivität. Diese Daten bestätigen folglich die Interpretation der Transkript-Studien aus Abbildung 3.10. B, dass die neu identifizierten Atmungskettenkomponenten eine sporenspezifische Funktion auszuüben scheinen.

Interessanterweise zeigte die Analyse der Sporenrohextrakte (Abbildung 8.4., Anhang), dass die Mutante COE468 (Stammhintergrund COE190) mit einer zusätzlichen Transposon-Insertion im Gen SCO7236 **keine** nachweisbare Cytochrom c Oxidase-Aktivität in Sporen besitzt. Ein Ausfall der Cytochrom *bd* Oxidase (Mutante COE190) und des Gens SCO7236 (COE468) führt damit zum Verlust der Cytochrom c Oxidase-Aktivität. Es scheint somit eine Kreuz-Regulation oder Verknüpfung dieser Oxidasen in Sporen vorzuliegen. Der Oxidase-negative Phänotyp der Mutante COE192 zeigt zugleich,

dass die Aktivität der neu identifizierten Atmungskettenkomponenten SCO7236 und SCO7234 nicht über die *In gel*-Aktivitätsfärbung nachweisbar sind.

### 3.4.2. *In vitro*-Studien zum Einfluss der neu identifizierten Oxidase auf das Nar1-Enzym in Sporen

Ob die neu identifizierten Atmungskettenkomponenten SCO7236 und SCO7234 ebenfalls mit der Nar-vermittelten Nitratreduktion in Sporen gekoppelt sind, wie es in Kapitel 3.2.4. für Nar1 und Komplex III gezeigt werden konnte, sollte durch die *In gel*-Nar-Aktivitätsfärbung und die Gesamt-Nar-Aktivitätsbestimmung in Sporen untersucht werden. Die nachträgliche Sauerstoffexposition des Gels ergab dabei, dass trotz Transposon-Insertion in den Genen SCO7236 und SCO7234, die Aktivität der zu Beginn auftretenden Bande nach wie vor nachgewiesen werden kann und somit nicht auf SCO7236 und SCO7234 zurückzuführen ist (Daten nicht gezeigt). Durch MS-Analysen der isolierten sauerstoffabhängigen Bande konnte in diesem Zusammenhang aber die Enzymaktivität einer Katalase identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Abbildung 3.12. A zeigt, dass in allen Rohextrakten der Transposon-Insertionsmutanten mit Wildtyphintergrund (COE460, COE462) sowie dem Wildtyp M145 selber, der Mutante COE190 ( $\Delta$ SCO3945-46) und der Mutante COE470 (COE190 mit SCO7236::Tn5062) eine Nar-Aktivität in Sporen nachweisbar ist. Die Mutante COE192 ( $\Delta$ SCO2148-56) wurde als Negativkontrolle eingesetzt und zeigte, wie auch bei Insertion eines Transposons im Gen SCO7236 (COE466) oder SCO7234 (COE464) bei Stammhintergrund COE192 keine Nar-Aktivität im Nativgel. Überraschenderweise konnte allerdings eine Abhängigkeit der Nar1-Aktivität im Rohextrakt von SCO7236 (*qcrB3*) nachgewiesen werden, wenn auch keine Cytochrom *bd* Oxidase mehr synthetisiert wird (COE468 im Stammhintergrund COE190). Das führt in Kombination mit dem Funktionsverlust der neu identifizierten Ubichinol-Cytochrom *c* Reduktase-Untereinheit (QcrB3) SCO7236 zum Ausfall der Nar1-Aktivität (Abbildung 3.12. A, mit „COE468\*“ markiert).



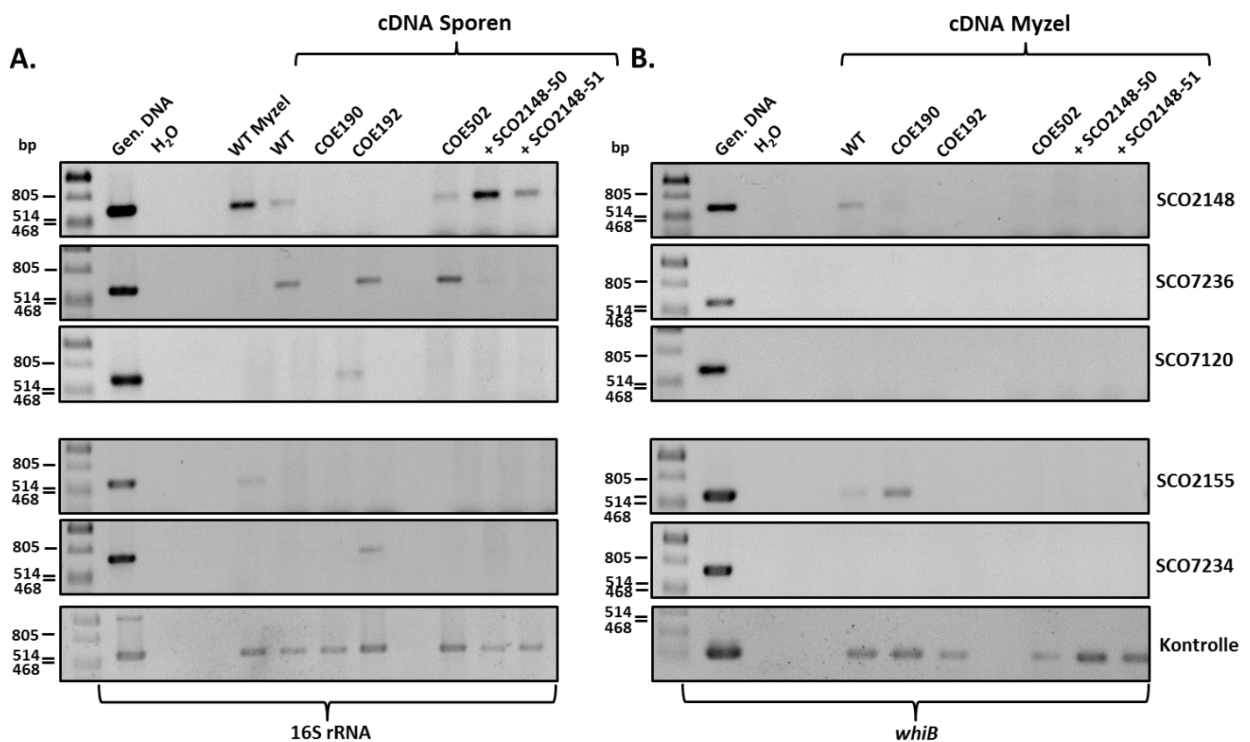
**Abbildung 3.12.:** Untersuchung des Einflusses von SCO7236 und SCO7234 auf die Nar-vermittelte Nitratreduktion in ausdauernden Sporen.

**A.** In gel-Aktivitätsfärbung nach Auftrennung der mit Detergenz behandelten Proteine (30 µg) der Transposon-Insertionsmutanten von SCO7236, SCO7234 im Stammhintergrund des Wildtyp M145, der Mutanten COE190 (ΔSCO3945-46) und COE192 (ΔSCO2148-56) in einer 10%igen Nativ-PAGE. Zum Nachweis der Nar-Aktivität im Gel wurde dieses mit DTH-Methylviologen und Nitrat als Substrat unter Sauerstoffausschluss gefärbt. Die Nar-abhängige Oxidation von Methylviologen wird als weiße Lauffront im blau gefärbten Gel sichtbar.

**B.** Nachweis der Gesamt-Nar-Aktivität im Rohextrakt von ausdauernden Sporen der Transposon-Insertionsmutanten mit Hilfe eines BV-DTH-basierten Enzym-Assays. Die Balken repräsentieren die Messung von zwei unabhängigen Sporenernten, wobei bei jeder Messung das Rohextrakt mindestens zweimal gemessen wurde.

Die Daten der spektrophotometrisch ermittelten Gesamt-Nar-Aktivität korrelieren mit den Ergebnissen der Aktivitätsfärbung und ermöglichten die Quantifizierung der visuellen Aktivitäten (Abbildung 3.12. B). Der Wildtyp M145 und die Mutante COE190 (Δ*cydAB*) wurden als Positivkontrollen eingesetzt und zeigten messbare Nar1-Aktivität von 11,2 mU/mg (M145) und 7,7 mU/mg (COE190), die Mutante COE192 (ΔSCO2148-56) diente als Negativkontrolle. Eine Transposon-Insertion im Gen SCO7236 bzw. SCO7234 führte zu einer erhöhten Nar1-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp. Vergleichbar mit COE190 war in COE470 (Transposon-Insertion im Gen SCO7234) ebenfalls eine leicht erhöhte Nar1-Aktivität von 12,7 mU/mg messbar. Im Rohextrakt der Mutante COE468 (Transposon-Insertion im Gen SCO7236) war dagegen keine Nar1-spezifische Enzymaktivität mehr messbar. Sowohl die Nar1-Aktivität in Sporen als auch die Cytochrom c-Aktivität aus Abbildung 8.4. (Anhang) scheinen somit negativ beeinflusst durch eine Transposon-Insertion im Gen SCO7236, was für eine zusätzliche Ubichinol-Cytochrom c Reduktase-Untereinheit (QcrB3) kodiert.

Diese Daten verdeutlichen damit einen ersten regulatorischen *Crosslink* zwischen den verschiedenen Oxidasen und dem Nar1 Enzym in Sporen und bestärken die Hypothese, dass es möglich ist, einen fehlenden Atmungskettenkomplex in Sporen durch die Synthese einer alternativen Atmungskettenkomponente (SCO7236 bzw. SCO7120, SCO7235 und SCO7234) zu ersetzen. Letzteres konnte durch Transkriptionsanalysen der Mutanten COE190 ( $\Delta cydAB$ ), COE192 ( $\Delta SCO2148-56$ ), COE502 (M145 mit SCO2150::Tn5062) und deren Komplementationsmutanten bestätigt werden (Abbildung 3.13. A und B).



**Abbildung 3.13.:** Transkriptstudien der artifizellen Atmungskettenkomplex-Komponenten in ausdauernden Sporen vergleichend mit exponentiellem Myzel.

**A.** Gesamt-RNA des Wildtypstammes M145, der Atmungskettenkomplexmutanten COE190 ( $\Delta cydAB$ ), COE192 ( $\Delta SCO2148-56$ ), COE502 (M145 mit SCO2150::Tn5062) sowie deren Komplementationsmutanten wurde von ausdauernden Sporen isoliert und zur cDNA-Synthese eingesetzt. 100 ng cDNA dienten als *template* für die RT-PCR mit den in Tabelle ... angegebenen Primerkombinationen. Genomische DNA von M145 diente als Positivkontrolle, H<sub>2</sub>O wurde als Negativkontrolle eingesetzt.

**B.** Gesamt-RNA des Wildtypstammes M145, der Atmungskettenkomplexmutanten COE190, COE192, COE502 sowie deren Komplementationsmutanten wurde von exponentiellem Myzel isoliert und zur cDNA-Synthese eingesetzt. Die cDNA wurde für die RT-PCRs wie für Sporen beschrieben eingesetzt. (Anmerkung: Die Experimente aus Abbildung 3.13. und Abbildung 3.9. wurden gleichzeitig durchgeführt und somit die Bilder der Kontrollen (*whiB*, 16S rRNA) sowie SCO2148, SCO2155 geteilt und jeweils noch einmal mitgeführt.)

Der Nachweis der Transkripte der neu identifizierten Komponenten SCO7234 und SCO7236 zeigt, dass der fehlende *bc*<sub>1</sub>-Komplex in COE192 durch die alternative *bc*<sub>1</sub>-Komplex-Komponente ersetzt werden könnte, was sich durch nachweisbares Transkript zeigt. Gleichzeitig verdeutlichen die Transkriptdaten, dass das Transkript von SCO7236 auch bei Ausfall des *bc*<sub>1</sub>-Komplexes (COE192) nur in Sporen gebildet wird. Es liegt daher nahe, dass die Elektronen für die Nitratreduktion in Sporen



somit nicht nur ausschließlich vom  $bc_1$ -Komplex auf Nar1 übertragen werden, sondern auch über eine der alternativen Atmungskettenkomponenten auf Nar1 transferiert werden könnten.

Alle bisherigen Daten deuten darauf hin, dass der Effekt einer Mutation in der neuen  $bc_1$ -Komplexkomponente SCO7236 sich vorerst auf den Verlust der Nar1-Aktivität beschränkt, wenn die alternative Cytochrom *bd* Oxidase in Sporen ebenfalls nicht synthetisiert wird. Eine essentielle Funktion der neu entdeckten Atmungskettenkomponenten konnte bislang allerdings nicht nachgewiesen werden.

### 3.5. Zusammenfassung Kapitel 1

Kapitel 1 vermittelt einen Einblick, wie komplex und metabolisch aktiv das Ruhestadium der Sporen von *S. coelicolor* ist. Es ist dabei gelungen, sowohl aerobe als auch anaerob ablaufende Prozesse in intakten Sporen und Proteinextrakten nachzuweisen:

1. Die Identifikation einer neuen sporenspezifischen Oxidase und der Nachweis der *in vitro*-Aktivität der Atmungskettenkomplexe zeigen, dass ausdauernde Sporen durchaus eine nachweisbare metabolische Aktivität *in vivo* aufweisen.
2. Neben der Respiration mit Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor können Sporen auch Nitrat als alternativen Elektronenakzeptor nutzen, um unter Sauerstoffmangel die Nitratreduktion für die Energiekonservierung zu verwenden.
3. Nar1 wurde in diesem Kapitel dabei als sporenspezifische Nitratreduktase identifiziert. Es liegt in einem *ready-to-use*-Modus in Sporen vor und zeigte eine sauerstoffabhängige Regulation. Die Nar1-bedingte Nitratreduktion ist eng gekoppelt an den Elektronenfluss der aeroben Atmungskette, wobei der  $bc_1$ -Komplex als regulatorische Verknüpfung zwischen Atmung mit Sauerstoff und Nitratatmung im Sporenstadium identifiziert werden konnte.

Bislang konnte auch in Myzel von *Streptomyces coelicolor* die Aktivität einer Nitratreduktase nachgewiesen werden (Fischer *et al.*, 2010). Woher diese allerdings die Elektronen für die Nitratreduktion bezieht und welche Komponenten die Aktivität beeinflussen und regulieren ist noch nicht bekannt. Die Charakterisierung des Nar-Enzyms im Myzel sowie die Regulation seiner Synthese und Aktivität ist Gegenstand des nachfolgenden Kapitels.

## Kapitel 2

### Charakterisierung von Nar2 und dessen Regulation durch das Zweikomponentensystem (ZKS) NarXL

#### - Der Einfluss von NarK2 und SCO0212 auf Nar2 -

---

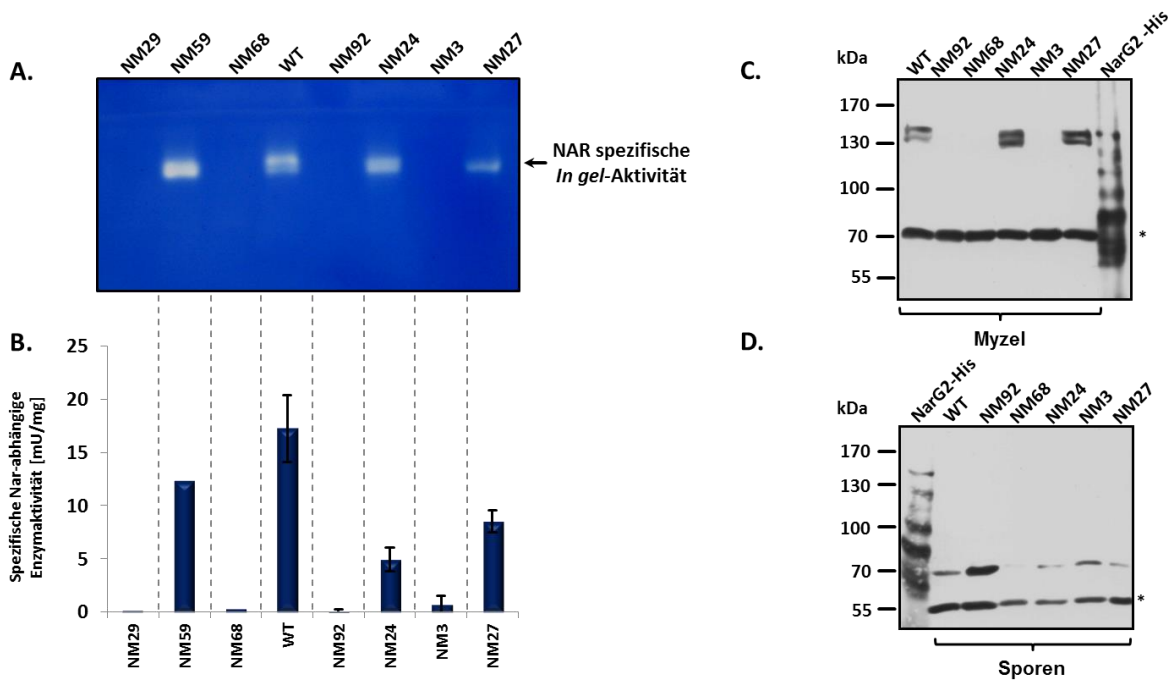
Fischer *et al.* (2010) konnten durch *in vivo*-Studien neben der Nar1-vermittelten Nitratreduktion in Sporen auch in Myzel eine *in vivo* Nitratreduktion zeigen. Dass diese nicht auf Nar1 beruht, zeigte der immunologische Test auf Vorhandensein von Nar1 in Myzel (Kapitel 1). Welches der anderen vorhandenen Nar-Enzyme für die Nitratreduktion in Myzel verantwortlich ist, ist Gegenstand dieses Kapitels. Auf molekularbiologischer als auch biochemischer Ebene sollte dieses Nar-Enzym im Kontext der Nar-vermittelten Nitratreduktion charakterisiert werden und darüber hinaus die Einflüsse, sowie Regulationsebenen, die auf die Synthese und Aktivität des Enzyms einwirken, näher analysiert werden.

#### 3.5. Nar2 katalysiert die Nitratreduktion in Myzel (Daten z. T. publiziert in Fischer *et al.*, 2014)

Zur Identifikation, welches Nar-Enzym hauptverantwortlich für die Nitratreduktion in Myzel ist, wurden *nar*-Deletionsmutanten mit einfacher Gen-Deletion [NM24 ( $\Delta nar1$ ); NM3 ( $\Delta nar2$ ); NM27 ( $\Delta nar3$ )] sowie zweifacher Gen-Deletion [NM29 ( $\Delta nar1\Delta nar2$ ); NM59 ( $\Delta nar1\Delta nar3$ ); NM68 ( $\Delta nar2\Delta nar3$ )] hinsichtlich ihrer Nitratreduktase-Aktivität zymografisch untersucht. (Abbildung 3.14. A). Dafür wurden 60  $\mu$ g der Rohextrakte des exponentiellen Myzels in einer Nativ-PAGE aufgetrennt und mittels *In-Gel*-Aktivitätsfärbung die Nar-Aktivität nachgewiesen (Abbildung 3.14. A). Die spezifische Nar-Aktivität ist im blauen Gel als weiße Lauffront detektierbar. Das Rohextrakt des Wildtypstammes M145 diente als Positivkontrolle, das Rohextrakt der Dreifach-*nar*-Deletionsmutante NM92 wurde als Negativkontrolle eingesetzt.

Abbildung 3.14. A zeigt, dass nur in Mutanten mit vorliegendem Nar2 eine Nar-Aktivität detektierbar war (NM59, NM24, NM27). Dagegen konnte in den Rohextrakten der Mutanten NM3 ( $\Delta nar2$ ), NM29 ( $\Delta nar1\Delta nar2$ ), NM68 ( $\Delta nar2\Delta nar3$ ) sowie im Rohextrakt der Dreifach-*nar*-Deletionsmutante NM92 keine Aktivitätsbande nachgewiesen werden. Die Aktivitätsbande migriert dabei in allen Mutanten

auf gleicher Laufhöhe. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die Nitratreduktase-Aktivität im Gel, und damit die Nitratreduktion im exponentiellen Myzel, Nar2-bedingt ist.



**Abbildung 3.14.: Analyse der Myzel-Rohextrakte auf Gesamt-Nar-Aktivität und immunologischer Nachweis von Nar2.**

**A.** In-gel-Aktivitätsfärbung zum Nachweis der spezifischen Nar-Aktivität der Mutanten NM29 ( $\Delta nar1\Delta nar2$ ), NM59 ( $\Delta nar1\Delta nar3$ ), NM68 ( $\Delta nar2\Delta nar3$ ), NM92 ( $\Delta nar1\Delta nar2\Delta nar3$ ), NM24 ( $\Delta nar1$ ), NM3 ( $\Delta nar2$ ), NM27 ( $\Delta nar3$ ) sowie Wildtyp M145.

60  $\mu$ g Rohextrakt wurden nach Behandlung mit Triton X-100 in einer 10%igen nativen PAGE aufgetrennt und unter Sauerstoffausschluss nach Reduktion mittels DTH-MV als Elektronendonator und Natriumnitrat als Substrat die Aktivitätsfärbung durchgeführt. Eine spezifische Nar2-Aktivität wird im blau gefärbten Gel als weiße Bande/Lauffront sichtbar.

**B.** Messung der spezifischen Enzymaktivität im Myzel-Rohextrakt der unter A angegebenen Mutanten mittels BV-DTH-basierendem Enzym-Assay. Die Messung wurde in Duplikaten bzw. Triplikaten (Standardabweichung) durchgeführt, wobei mit jedem Rohextrakt die Messung mind. zweimal erfolgte.

**C.+D.** Immunodetektion nach Western Blot-Analyse mit 60  $\mu$ g Rohextrakt von und exponentiellem Myzel (C) und ausdauernden Sporen (D). Die Detektion erfolgte mit anti-NarG2 (1:250). NarG2 migriert bei einer erwarteten Größe von 137 kDa. Der Stern markiert ein bislang unbekanntes kreuzreagierendes Signal bei ca. 70 kDa (A) bzw. 55 kDa (B), das als Ladekontrolle fungiert. Gereinigtes, mit einem C-terminalem His-Tag markiertes NarG2 (1  $\mu$ g) wurde als Positivkontrolle eingesetzt.

Mittels DTH/BV-basierten Enzymassays wurde bestimmt, ob quantitative Nar-Aktivitätsunterschiede zwischen den bisher im Nativgel analysierten Mutanten bestehen (Abbildung 3.14. B).

Im Rohextrakt des Wildtypstammes liegt demnach eine spezifische Enzymaktivität von 17,26 mU/mg vor, wohingegen die Rohextrakte ohne vorliegendes Nar2 einen Aktivitätsverlust im Vergleich zum Wildtyp von über 95 % [NM29 ( $\Delta nar1\Delta nar2$ ), NM68 ( $\Delta nar2\Delta nar3$ )] bzw. von über 80 % [NM3 ( $\Delta nar2$ )] aufweisen. Im Gegensatz dazu weisen die Rohextrakte mit Nar2 aber ohne vorliegendem Nar1 und/oder Nar3 nur einen Aktivitätsverlust von 30 % auf (NM59, NM24, NM3). Diese Daten verdeutlichen, dass die Gesamt-Nar-Aktivität in den Rohextrakten ohne Nar2 fast

verloren geht. Ist nur Nar2 als Nar-Enzym vorhanden, liegt diese Gesamt-Nar-Aktivität allerdings geringer als im Wildtyp vor.

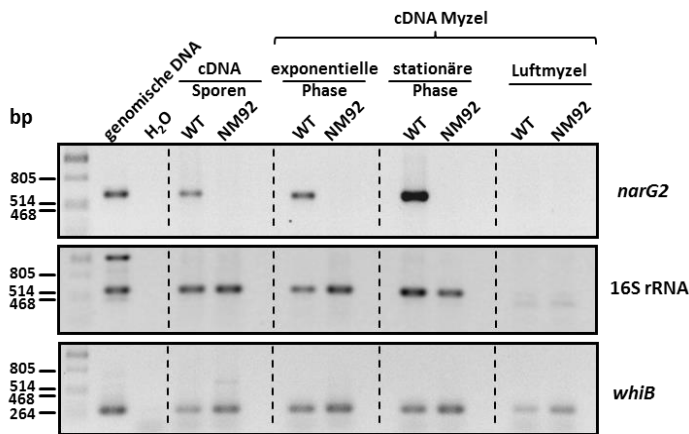
Eine Immunodetektion der analysierten Rohextrakte mit Peptidantikörpern, die gegen die katalytischen Untereinheiten NarG1 und NarG3 von Nar1 und Nar3 gerichtet sind, zeigte, dass bei Vorliegen der Gene beider Proteine, diese im Myzel nicht detektierbar sind (Daten nicht gezeigt). Die Detektion mit NarG2-spezifischen Peptidantikörpern weist dagegen das Vorliegen von NarG2 in den Rohextrakten der analysierten Mutanten nach (Abbildung 3.14. C). Das gereinigte, mit einem C-terminalen His-Tag markierte NarG2 diente als Positivkontrolle und zeigte eine starke Interaktion mit dem Antikörper. In allen Rohextrakten mit messbarer Gesamt-Nar-Aktivität [M145, NM24 ( $\Delta nar1$ ), NM27 ( $\Delta nar3$ ), NM59 ( $\Delta nar1\Delta nar3$ )] war NarG2 als katalytische Untereinheit von Nar2 bei etwa 137 kDa detektierbar. Im Rohextrakt migrierte NarG2 stets als Doppelbande. Eine kreuzreagierende Proteinbande bei ca. 70 kDa aller aufgetragenen Rohextrakte wurde in diesem und weiteren Western Blot-Analysen als Ladekontrolle genutzt.

Um letztendlich zu überprüfen, ob Nar2 ausschließlich im Myzel synthetisiert wird, wurden die Sporen-Rohextrakte der analysierten Mutanten ebenfalls auf synthetisiertes Nar2 untersucht (Abbildung 3.14. D). Gereinigtes NarG2 diente erneut als Positivkontrolle. Die Detektion mit NarG2-spezifischen Peptidantikörpern führte in allen Rohextrakten lediglich zum Nachweis von zwei kreuzreagierenden Signalen mit einer molekularen Masse von etwa 70 kDa und 55 kDa.

Die Immunodetektion sowie die Aktivitätsdaten belegen eindeutig, dass Nar2 unter den getesteten Bedingungen ausschließlich in Myzel vorliegt und aktiv ist, dagegen nicht in ausdauernden Sporen nachgewiesen werden kann. Nar2 ist damit hauptverantwortlich für die Nitratreduktion in Myzel. Die quantitative Messung der Nar-Aktivitäten zeigte, dass die geringfügig erhöhte Gesamt-Nar-Aktivität in Rohextrakten des Wildtyps zunächst nicht auf die Addition der Einzelaktivitäten zurückzuführen ist, sondern vielmehr für einen *Cross-Talk* zwischen den Nars auf genetischer oder enzymatischer Ebene spricht.

Ob die Bildung des Nar2-Enzyms in Myzel daher einer transkriptionellen oder gar post-transkriptionellen Regulation unterliegt, wurde nach Isolation der Gesamt-RNA vom Wildtypstamm M145 und der Dreifach-*nar*-Deletionsmutante NM92 durch Nachweis spezifischer *narG2*-mRNA mittels Transkriptionsanalyse untersucht (Abbildung 3.15.).

Genomische DNA des Wildtypstammes wurde als Negativkontrolle eingesetzt, der Nachweis der 16S rRNA und der *whiB*-Transkripte diente zur Kontrolle für den Einsatz gleicher RNA-Mengen zur cDNA-Synthese. Sowohl in Sporen als auch dem Myzel der exponentiellen und stationären Phase des Wildtypstammes war es möglich, *narG2*-Transkript mittels RT-PCR nachzuweisen. Bei der gleichen eingesetzten RNA-Menge wurde dabei in der stationären Phase im Vergleich zu Sporen und dem



**Abbildung 3.15.: Nachweis spezifischer *narG2*-mRNA in den Lebenszyklusphasen von *S. coelicolor*.**

Gesamt-RNA von M145 (Wildtyp) und NM92 ( $\Delta nar1\Delta nar2\Delta nar3$ ) wurde aus ausdauernden Sporen, exponentiellem Myzel, stationärem Myzel und Luftmyzel isoliert und in cDNA umgeschrieben. 100 ng cDNA dienten als *template* für die Transkript-Analyse mit den in Tabelle 8.1. angegebenen Primerkombinationen. Genomische DNA des Wildtypstammes M145 diente als Positivkontrolle, H<sub>2</sub>O wurde als Negativkontrolle eingesetzt. [Anmerkung: Das Experiment aus Abb. 3.2., Abb. 3.15. und Abb. 3.23 wurde gleichzeitig durchgeführt und somit die Bilder der Kontrollen (*whiB*, 16S rRNA) geteilt und jeweils mitgeführt.]

Myzel der exponentiellen Phase deutlich mehr Transkript gebildet. Kein *narG2*-Transkript war dagegen im Luftmyzel nachweisbar. Die Analyse der RT-PCRs belegt demzufolge, dass die Synthese von Nar2 möglicherweise einer post-transkriptionellen Kontrolle unterliegt. Es bleibt zu bemerken, dass, obwohl *narG2*-Transkripte bereits in Sporen vorliegen, kein Protein nachweisbar ist (Abbildung 3.14. D).

### 3.6. Post-transkriptionelle Regulation der Enzymaktivität von Nar2

Eigene Studien sowie die Transkriptdaten deuteten zunächst darauf hin, dass Nar2 konstitutiv im Myzel gebildet wird. Die Verifizierung der Hypothese führten zur näheren Untersuchung der Nar2-Synthese. Hinsichtlich des Widerspruchs der scheinbar konstitutiven Expression von Nar2, gab es dennoch Grund zur Annahme, dass aufgrund des morphologischen Wachstums von *S. coelicolor* in Aggregationen die Vermutung nahe liegt, dass vor allem bei hohen Myzelmengen, sauerstofflimitierende Bedingungen in den Aggregationen vorherrschen, was die messbare Nitratreduktion in gewachsenen Kulturen erklärt. 2014 gelang es Dr. M. Fischer die Kultivierungsbedingungen für unsere Myzelkultur so zu optimieren, dass unter Vermeidung von Myzelaggregaten und kontrollierter Sauerstoffzufuhr eine standardisierte Anzucht aerob und/oder hypoxisch gewachsenen Myzels möglich wurde (Fischer *et al.*, 2014).

Die Western Blot-Analyse zum Nachweis der Nar2-Synthese während der Myzelanzuchten belegte, dass in aerob gewachsenem Myzel ein Grundlevel an Nar2 gebildet wurde, dass aber *in vivo* und *in vitro* nicht aktiv ist. Ein abrupter *Shift* zur anoxischen Inkubation führt weder zur gesteigerten Nar2-Synthese noch zum aktiven Protein. Wird das Myzel dagegen hypoxisch weiter kultiviert, wird ein erhöhtes Level Nar2 synthetisiert, was auch *in vivo* und *in vitro* aktiv ist (Fischer *et al.*, 2014).

Denn obwohl van Keulen *et al.* (2007) und Fischer *et al.* (2010) die Nitratreduktion in einem obligat aeroben Bodenbakterium nachwiesen, wurde die Nitratreduktion eindeutig als anaerob ablaufender Prozess verstanden. Sauerstoff könnte damit eine regulatorische Rolle für die Nar2-vermittelte Nitratreduktion einnehmen. Auf welcher Ebene Sauerstoff den Prozess der Nitratreduktion in Myzel reguliert, war zu diesem Zeitpunkt spekulativ. Zum einen könnte das Nar2 Enzym selber durch Sauerstoff reguliert werden, oder der Nitrattransport ist Angriffspunkt für Sauerstoff und O<sub>2</sub>-sensitiv. Im Rahmen dieser Dissertation sollte dabei charakterisiert werden, welche Einflüsse generell auf die Synthese und Aktivität von Nar2 im Myzel einwirken.

Dafür sollten:

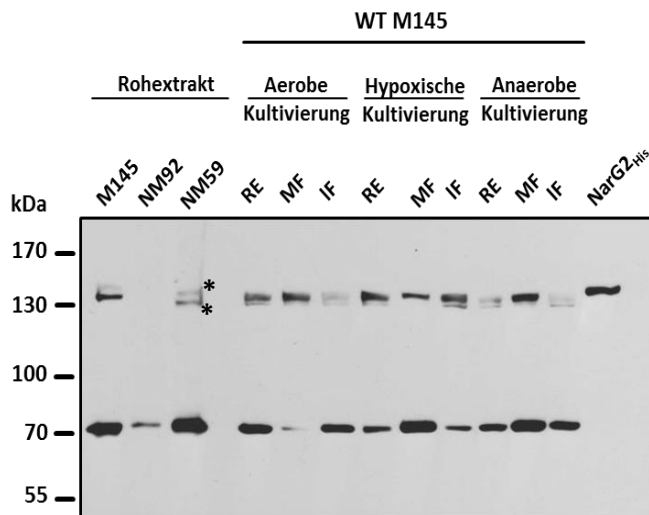
1. Die Assemblierung/der Einbau von Nar2 in die Membran
2. Der für die Aktivität notwendige Elektronenfluss zu Nar2
3. Der Einfluss von putativ Nitrat-sensierenden Proteinen
4. Der Transport von Nitrat zum zytoplasmatisch gelegenen NarG2

untersucht werden.

### **3.6.1. Sauerstoff-unabhängiger Einbau von Nar2 in die Membran**

Um zu untersuchen, ob die Variation der Kultivierungsbedingungen (aerobe Kultivierung, hypoxische Kultivierung, anaerobe Kultivierung) den Membraneinbau von Nar2 beeinflussen, was die kaum messbare Nitritbildungsrate unter aeroben und anoxischen Bedingungen erklären würde, wurden derartig angezogene Myzel-Proben bis zur Membranfraktion fraktioniert und alle Fraktionen mittels Western Blot-Analyse auf NarG2-Bildung untersucht.

Abbildung 3.16. zeigt die Immunodetektion mit NarG2-spezifischen Peptidantikörpern. Das gereinigte, mit einem C-terminalen His-Tag markierte NarG2 wurde als Positivkontrolle mitgeführt und zeigte eine starke Interaktion mit dem Peptidantikörper bei ca. 138 kDa.



**Abbildung 3.16.:** Immunologischer Nachweis von NarG2 in den Proteinfractionen von M145 nach Kultivierung in Abhängigkeit des verfügbaren Sauerstoffs

25 µg Rohextrakt (RE), Membranfraktion (MF) bzw. lösliche Fraktion (I. F.) wurden in einer 7,5%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Die Detektion nach Transfer auf Nitrocellulose erfolgte mit anti-NarG2 1:250 (depletiert) über Nacht. NarG2 migriert bei einer erwarteten Größe von 137 kDa. Ein unspezifisches Signal bei ca. 70 kDa fungierte als Ladekontrolle.

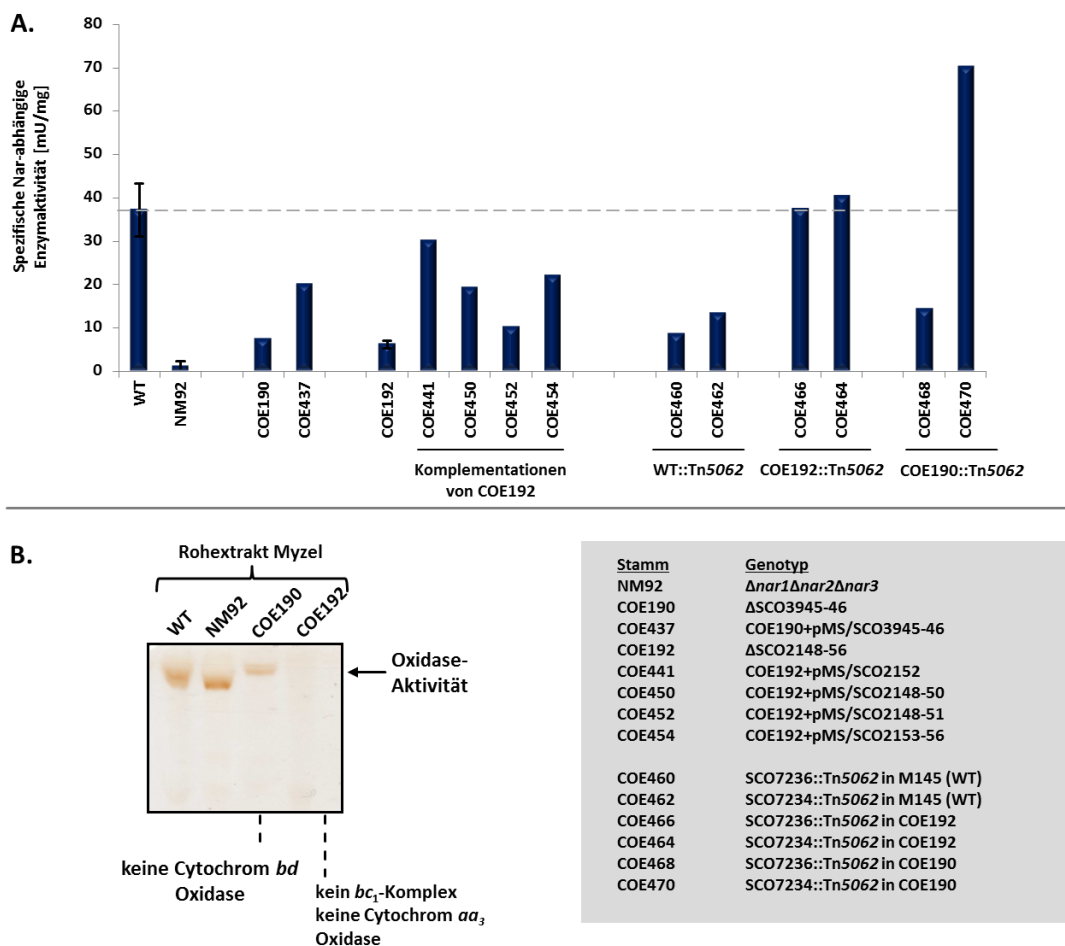
Membran. Bei der hypoxischen Kultivierung ist sowohl in der Membran auch in der löslichen Fraktion NarG nachweisbar, was vermutlich auf die verstärkte Synthese von Nar2 zurückzuführen ist: möglicherweise kann nicht alles gebildete Nar2 in die Membran eingebaut werden. Bei anaerober Kultivierung ist NarG2 zum überwiegenden Teil in der Membranfraktion detektierbar. Durch Fraktionierung der Rohextrakte ist es außerdem gelungen, die zwei Laufformen von NarG2, die bei Western Blot-Analyse des Rohextraktes auftreten, durch Membranfraktionierung zu separieren (Abbildung 3.16., Laufform mit Stern markiert). Dabei ist das Auftreten der beiden Laufformen Sauerstoff-unabhängig. Es ist außerdem anzumerken, dass die Laufform mit einer höheren Molekularen Masse nach Fraktionierung in der Membranfraktion detektiert werden kann, nicht dagegen die Lauffront mit geringerer Molekularer Masse. Dieses Ergebnis führt zur Annahme, dass die beiden Migrationsformen dem aktiven und inaktiven Zustand von NarG2 entsprechen könnten und die inaktive Form nach wie vor als zytoplasmatische Komponente durch Degradierung oder noch nicht vollständige Prozessierung schneller im Gel migriert.

Die Dreifach-*nar*-Deletions-Mutante NM92 diente als Negativkontrolle, Rohextrakt des Wildtypstammes M145 und der Mutante NM59 ( $\Delta nar1\Delta nar3$ ) wurden als Positivkontrolle eingesetzt. Die Analyse von Proteinfractionen aus Kulturen, die im letzten Drittel der Kultivierung mit unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen inkubiert wurden, zeigte, dass die Sauerstoffkonzentration der verschiedenen Kultivierungsbedingungen das Verhältnis von -membrangebundenem NarG2 und löslichen NarG2 beeinflusst.

Die aerobe Kultivierung führte zur Integration von vorhandenem Nar2 in die

### 3.6.2. Elektronenfluss zu Nar2 – Verknüpfung aerober Atmungskettenkomplexe mit Nitratatmung

Um einen möglichen Einfluss der aeroben Atmungskettenkomplexe auf die Nitratreduktion in Myzel zu untersuchen wurden die bereits für das Sporenstadium charakterisierten Atmungskettenkomplex-Mutanten COE190 und COE192, sowie die Transposon-Insertionsmutanten der neu identifizierten Atmungskettenkomplex-Gene SCO7234-36 aus Kapitel 1 im Myzelstadium untersucht. Zur Bestimmung der Gesamt-Nitratreduktaseaktivität wurde exponentiell gewachsenes Myzel geerntet und im fraktionierten Rohextrakt mittels DTH/BV basierten Nitratreduktase-Assay die spezifische Enzymaktivität ermittelt. Abbildung 3.17. A zeigt die grafische Auswertung der Aktivitätsbestimmung.



**Abbildung 3.17.: Untersuchung eines möglichen Einflusses der aeroben Atmungskette auf die Gesamt-Nar-Aktivität im exponentiellen Myzel.**

**A.** Nachweis der spezifischen Nitratreduktaseaktivität *in vitro* im Rohextrakt von exponentiellem Myzel der Atmungskettenkomplexmutanten COE190 ( $\Delta cydAB$ ) und COE192 ( $\Delta SCO2148-56$ ), deren Komplementationsmutanten COE437, COE441, COE450, COE452, COE454 sowie den Transposon-Insertionsmutanten COE460, COE462, COE466, COE464, COE468, COE470 mit Hilfe eines BV-DTH-basierten Enzym-Assays. Die Balken repräsentieren die Messung von 3 unabhängigen Sporenernten (Standardabweichung) bzw. Duplikaten, wobei bei jeder Messung das Rohextrakt mindestens zweimal gemessen wurde.

**B.** *In gel* –Oxidase-Aktivitätsfärbung zum Nachweis der Komplex IV-Aktivität (Cytochrom *c* Oxidase-Färbung) im Rohextrakt von exponentiellem Myzel von WT M145, NM92 (Dreifach-*nar*-Deletionsmutante) und den Atmungskettenkomplexmutanten COE190 und COE192. Die mit Detergenz behandelten Proteine (45  $\mu$ g) wurden in einer 10%igen Nativ-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und mit einer Diaminobenzidin-Cytochrom *c*-Aktivitätsfärbung ihre Komplex IV-Aktivität im Gel nachgewiesen. Die Aktivität wird als braune Bande im farblosen Gel sichtbar.



Im Myzel-Rohextrakt des Wildtypstammes M145 liegt eine Gesamt-Nar-Aktivität von 17,2 mU vor. Die Dreifach-*nar*-Deletions-Mutante NM92 wurde als Negativkontrolle eingesetzt und zeigte keine messbare Nar-Aktivität. Sowohl die Mutante COE190 ( $\Delta$ *cydAB*) als auch die Mutante COE192 ( $\Delta$ SCO2148-56) zeigten im Vergleich zum Wildtyp M145 eine verminderte Gesamt-Nar-Aktivität im Rohextrakt. Eine Immunodetektion der Rohextrakte mit NarG2-spezifischen Peptidantikörpern zeigte, dass der Aktivitätsverlust nicht auf einen Mangel an Nar2 zurückzuführen ist, sondern auf einen Aktivitätseffekt. Sowohl COE190 ( $\Delta$ *cydAB*) als auch COE192 ( $\Delta$ SCO2148-56) synthetisieren Nar2-Mengen auf Wildtypniveau (Abbildung 8.5., Anhang). Ein vermuteter regulatorischer Einfluss der Gene SCO2148-56 (kodiert für den *bc*<sub>1</sub>-Komplex und die Cytochrom *c aa*<sub>3</sub> Oxidase) und SCO3945-46 (kodiert für die Cytochrom *bd* Oxidase) auf die Nar2-Aktivität scheint zudem nur in eine Richtung angelegt, da ein Fehlen aller Nar-Enzyme [NM92 ( $\Delta$ *nar1* $\Delta$ *nar2* $\Delta$ *nar3*)] in Myzel keinen Einfluss auf die Cytochrom *c* Oxidase-Aktivität zeigt (Abbildung 3.17. B).

Um Rückschlüsse auf einen gestörten Elektronenfluss von den Atmungskettenkomplexen, die in COE190 und COE192 deletiert sind, auf Nar2 zu ermöglichen, wurden die Komplementationsmutanten der Mutante COE190 und der Mutante COE192 gleichermaßen auf ihre Gesamt-Nar-Aktivität im exponentiellen Myzel untersucht (Abbildung 3.17. A). Die Analyse der Komplementationsmutanten zeigt, dass der Aktivitätseffekt in beiden Mutanten durch Rückführung der deletierten Gene teilweise komplementiert werden kann. Die Rohextrakte des Wildtyps M145, der Mutante COE190 und der Mutante COE192 wurden als Kontrollen eingesetzt. Das Einbringen der Gene SCO2152 (COE441), SCO2150-48 (COE450) und SCO2156-53 (COE454) komplementiert den Aktivitätseffekt der Mutante COE192. In allen genannten Rohextrakten wird mindestens die Gesamt-Nar-Aktivität auf Wildtypniveau erreicht, im Rohextrakt der Mutante COE441 liegt eine zweifach gesteigerte Gesamt-Nar-Aktivität vor. Das Einbringen des Komplementationskonstruktes SCO3945-46 stellt ebenfalls die Wildtyp-Gesamt-Nar-Aktivität wieder her.

Um zu untersuchen, ob die neu identifizierten aeroben Atmungskettenkomplex-Komponenten SCO7236-34 eventuell über Elektronenfluss oder regulatorisch mit der Nitratreduktion in Myzel gekoppelt sind, wurden Transposon-Insertionsmutanten von SCO7234 und SCO7236 im Wildtyphintergrund (COE460, COE462), im Stammhintergrund von COE190 (COE468, COE470) und COE192 (COE466, COE464) aus Kapitel 1 ebenfalls hinsichtlich ihrer Gesamt-Nar-Aktivität im exponentiellen Myzel untersucht (Abbildung 3.17. A). Dabei zeigte sich, dass eine Transposon-Insertion im Gen SCO7234 (COE462) und SCO7236 (COE460) im Wildtyphintergrund zu einer stark verminderten Gesamt-Nar-Aktivität führt, wohingegen eine Transposon-Insertion im Gen SCO7234 der Ursprungsmutante COE190 (COE470) zu einer vielfach gesteigerten Nar-Aktivität im Vergleich zur

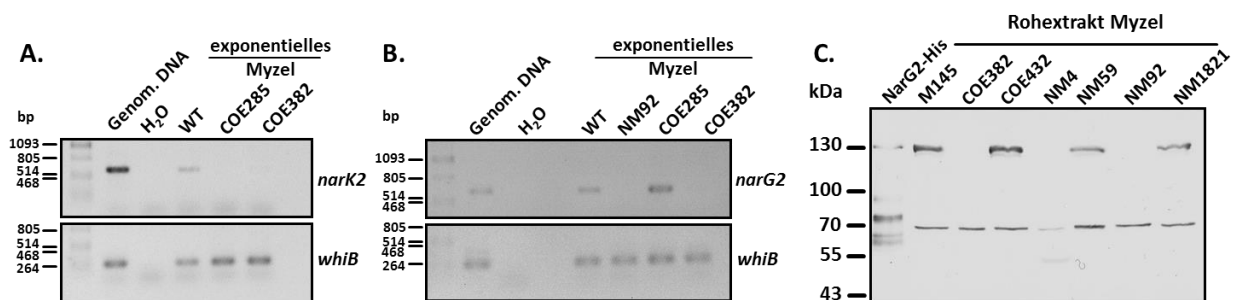
Ursprungsmutante COE190 führt. Eine Transposon-Insertion im Gen SCO7234 oder SCO7236 beeinflusst die Gesamt-Nar-Aktivität in COE192 nicht.

Die Ergebnisse deuten damit an, dass die Aktivität von Nar2 und der für die Nitratreduktion in Myzel essentielle Elektronenfluss an Komponenten der aeroben Atmungskette gekoppelt zu sein scheint, da beim Fehlen von essentiellen aeroben Atmungskettenkomplex-Komponenten eine verminderte Gesamt-Nar-Aktivität vorliegt, das Enzym allerdings in Wildtypmengen nachweisbar ist (Daten nicht gezeigt).

### 3.6.3. NarX beeinflusst die Transkription von Nar2 und den Nitrat/Nitrit-Transporter NarK2

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Aufklärung der Nar2-vermittelten Nitratreduktion ist die Sensierung von Nitrat. Für *E. coli* ist ein Zweikomponentensystem beschrieben, welches Nitrat direkt sensiert und so die Nitratreduktion unter anaeroben Bedingungen reguliert.

Im Genom von *Streptomyces coelicolor* konnten ebenfalls Gene für ein NarXL-ähnliches Zweikomponentensystem annotiert werden, dessen generelle Funktionalität bereits in den Bachelorarbeiten von Phillip Haase und Timon Damelang nachgewiesen wurde. Um eine mögliche Korrelation zwischen der Aktivität des NarXL-Sensorsystems und der Nar2-vermittelten Nitratreduktion in Myzel zu untersuchen, wurde in dieser Dissertation eine Transposon-Insertionsmutante COE382, das Gen SCO0203 (*narX*) betreffend, zunächst mittels Transkript-Analyse auf Vorhandensein von *narK2*-Transkript und *narG2*-Transkript untersucht (Abbildung 3.18. A+B).



**Abbildung 3.18.:** Transkriptnachweis von *narK2* und *narG2* sowie immunologischer Nachweis von NarG2 in exponentiellem Myzel im Stammhintergrund einer *narK2* – und einer *narX*-Deletionsmutante.

**A. + B.** Detektion von *narK2*-(A) und *narG2*-Transkripten (B) im exponentiellen Myzel von M145, der Dreifach-*nar*-Deletionsmutante NM92 ( $\Delta nar1\Delta nar2\Delta nar3$ ), der Nitrattransportmutante COE285 ( $\Delta narK2$ ) und COE382 ( $\Delta narX$ ). Gesamt-RNA wurde von exponentiellem Myzel isoliert und zur cDNA-Synthese eingesetzt. 100 ng cDNA dienten als *template* für die Transkriptanalyse mit den in Tabelle 8.1. angegebenen Primerkombinationen. Genomische DNA von M145 diente als Positivkontrolle, H<sub>2</sub>O wurde als Negativkontrolle eingesetzt. Die Detektion von *whiB* diente als Nachweis für den Einsatz gleicher RNA-Mengen zur cDNA-Synthese.

**C.** Immunologischer Nachweis von NarG2 in 30  $\mu$ g Rohextrakt von COE382 ( $\Delta narX$ ), COE432 (COE382 + pMS/*narX*), NM4 ( $\Delta nar2$ ), NM59 ( $\Delta nar1\Delta nar3$ ), NM92 ( $\Delta nar1\Delta nar2\Delta nar3$ ) und NM1821 ( $\Delta moaA$ ). Die Detektion erfolgte mit anti-NarG2 1:250 (depletiert) über Nacht.

Abbildung 3.18. A zeigt den Transkriptionsnachweis von *nark2*-spezifischer mRNA im exponentiellen Myzel des Wildtyps, der *nark2*-Mutante COE285 sowie der *narX*-Mutante COE382. Genomische DNA diente als Positivkontrolle und zeigte ein *nark2*-spezifisches PCR-Produkt mit einer Größe von ca. 600 bp. Mit der cDNA des exponentiellen Myzels des Wildtyps konnte ebenfalls, jedoch deutlich schwächer, ein PCR-Produkt, was *nark2*-spezifischer mRNA entspricht, detektiert werden. Die cDNA der Mutante COE285 ( $\Delta nark2$ ) wurde als Negativkontrolle eingesetzt. Die Transkriptanalyse der Mutante COE382 ( $\Delta narX$ ) zeigte überraschenderweise ebenfalls den Phänotyp einer *nark2*-Mutante. Der Nachweis vorhandener *narG2*-Transkripte zeigt, dass durch Deletion von *nark2* (COE285) die Bildung *narG2*-spezifischer mRNA nicht beeinflusst wird, allerdings in der Mutante COE382 ( $\Delta narX$ ) neben dem Fehlen von *nark2*-Transkript auch kein *narG2*-Transkript gebildet wird (Abbildung 3.18. B). Der Nachweis *whiB*-spezifischer mRNA wurde als Kontroll-Standard verwendet und beweist, dass für die durchgeführten RT-PCRs in allen Fällen die gleiche Menge an cDNA eingesetzt wurde. Die RT-PCR-Daten belegen zunächst, dass das Fehlen von *narX* die Bildung von *nark2*- und *narG2*-Transkripten beeinflusst und zeigt damit einen regulatorischen Einfluss auf die Nar2-vermittelte Nitratreduktion. Nach der Komplementation von *narX* (Mutante COE432) konnte auf Transkriptionsebene sowohl für *nark2* als auch für *narG2* der Wildtypphänotyp wieder hergestellt werden (Abbildung 8.6., Anhang). Ein direkter Zusammenhang zwischen *narX* sowie *nark2* und *narG2* ist somit bewiesen.

Der Nachweis spezifischer mRNA-Transkripte lässt dennoch bislang keine Aussage über die Synthese der Proteine NarK2 und Nar2 zu. Die Rohextrakte des exponentiellen Myzels aller für die Transkriptanalyse verwendeten Stämme wurden daher mittels Immunodetektion auf Vorhandensein von NarG2 untersucht (Abbildung 3.18. C). Das gereinigte, mit einem C-terminalen His-tag markierte NarG2, diente als Positivkontrolle und zeigte ein starkes Signal bei einer Größe von 138 kDa. Das Rohextrakt vom Wildtyp M145, sowie der Mutante NM59 ( $\Delta nar1\Delta nar3$ ) wurden ebenfalls als Positivkontrolle eingesetzt und zeigten ein detektierbares Signal bei etwa 135 kDa, was dem NarG2 ohne C-terminalen His-Tag entspricht. Die Dreifach-*nar*-Deletionsmutante NM92 sowie die Mutante NM3 ( $\Delta nar2$ ) dienten als Negativkontrolle. Die Analyse des Rohextraktes der Mutante COE382 ( $\Delta narX$ ) zeigte, dass bei Fehlen von NarX auch die Synthese von Nar2 im exponentiellen Myzel betroffen ist. Der Verlust von Nar2 ließ sich durch Rückführung von *narX* in der Mutante COE432 in äquivalent vergleichbaren Mengen zum Wildtyp M145 komplementieren.

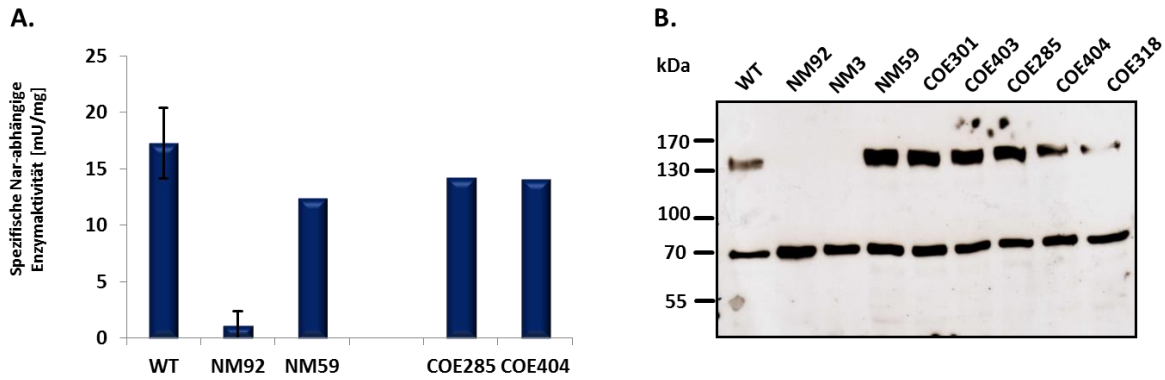
Die Ergebnisse der Transkript-Analyse (Abbildung 3.18. A und B) sowie der Immunodetektion (Abbildung 3.18. C) belegen, dass die Deletion von *narX* und damit der Funktionsverlust des putativen Nitrat-Sensor-Systems einen direkten Einfluss auf die Nar2-vermittelte Nitratreduktion in Myzel

ausüben. Nar2 wird bei Fehlen der Sensordomäne NarX nicht synthetisiert. Das NarXL-Zweikomponentensystem reguliert damit die Nar2-vermittelte Nitratreduktion in Myzel. Darüber hinaus nimmt das NarXL-System direkten Einfluss auf die Genexpression von *nark2* und scheint dadurch auch den Import von Nitrat in die Zelle zu regulieren. Ob lediglich die *nark2*-Transkripte nicht nachweisbar waren oder auch die Synthese des NarK2-Proteins beeinflusst ist, wurde bislang mittels Immunodetektion aufgrund fehlender Antikörper gegen den Transporter NarK2 nicht untersucht.

#### **3.6.4. Abhängigkeit der Nar2-vermittelten Nar-Aktivität vom Transport zur zytoplasmatischen Seite**

Der Transport von Nitrat erfolgt in der Regel über NarK-ähnliche Transportproteine. *S. coelicolor* besitzt laut Annotation zwei Gene, die für putative Nitrattransportproteine (NarK1 und NarK2) kodieren. 2011 konnte Tony Pawlik in seiner Diplomarbeit zeigen, dass eine Transposon-Insertionsmutante den NarK2-Transporter SCO0213 betreffend, eine stark verringerte Nitritakkumulation im Medium bei Myzel aufwies, während der Phänotyp in Sporen nicht betroffen war. Durch Einbringen von *nark2* war der Myzel-Phänotyp wieder komplementierbar. NarK2 konnte damit vorerst als ein für die respiratorische Nitratreduktion in Myzel spezifischer Nitrat-Transporter identifiziert werden.

Es stellte sich daher die Frage, inwieweit ein funktioneller Nitrattransporter die Aktivität von Nar2 bestimmt. Um einen möglichen regulatorischen Einfluss des Nitrat/Nitrittransporters NarK2 auf die Synthese und Aktivität von Nar2 zu untersuchen, wurden die Mutanten COE285 (kein NarK2) und COE404 (Rückführung von *nark2* in der Mutante COE285) hinsichtlich ihrer Gesamt-Nitratreduktase-Aktivität analysiert und mittels Immunoblotting auf vorhandenes Nar2 getestet (Abbildung 3.19. A und B).



**Abbildung 3.19.: Analyse der spezifischen Nitratreduktaseaktivität und immunologischer Nachweis von NarG2 im Myzel-Rohextrakt bei Deletion vom Nitrat/Nitrittransporter NarK2.**

**A.** Messung der spezifischen Enzymaktivität im Myzel-Rohextrakt der Stämme NM92 ( $\Delta nar1\Delta nar2\Delta nar3$ ), NM59 ( $\Delta nar1\Delta nar3$ ), COE285 ( $\Delta narK$ ) und COE404 (COE285 + pMS82/narK2) mittels BV-DTH-basierendem Enzym-Assay. Die Messung wurde in Triplikaten (Standardabweichung) oder Duplikaten durchgeführt, wobei mit jedem Rohextrakt die Messung mind. zweimal erfolgte.

**B.** Immunologischer Nachweis von NarG2 in 60 µg Rohextrakt der Mutanten NM92 ( $\Delta nar1\Delta nar2\Delta nar3$ ), NM3 ( $\Delta nar2$ ), NM59 ( $\Delta nar1\Delta nar3$ ), COE301 ( $\Delta narK1$ ), COE403 (COE301 + pMS/narK1), COE285 ( $\Delta narK2$ ), COE404 (COE285 + pMS/narK2) und COE318 ( $\Delta narK3$ ). Die Detektion nach Transfer auf Nitrocellulose erfolgte mit anti-NarG2 1:250 (depletiert) über Nacht. NarG2 migriert bei einer erwarteten Größe von 137 kDa. Ein kreuzreagierendes Signal bei etwa 70 kDa fungierte als Ladekontrolle.

Die Dreifach-*nar*-Deletionsmutante NM92 wurde als Negativkontrolle eingesetzt und zeigte keine messbare Nar-Aktivität. Der Wildtyp zeigte eine messbare Gesamt-Nar-Aktivität von ca. 17 mU/mg, wohingegen die Mutante NM59 ( $\Delta nar1\Delta nar3$ ) nur 70 % der Wildtypaktivität erreicht. Bei der Analyse der Rohextrakte der Mutanten COE285 und COE404 war eine 80%ige Aktivität zum Wildtyp messbar (Abbildung 3.19. A).

Die Rohextrakte aller Stämme wurden mittels Western Blot-Analyse auf die gebildete Menge an Nar2 überprüft (Abbildung 3.19. B). Es zeigte sich, dass sowohl in der Mutante COE285 ( $\Delta narK2$ ) als auch der Komplementationsmutante COE404 äquivalente Mengen an Nar2 im Vergleich zum Wildtyp M145 gebildet wurden. Die Dreifach-*nar*-Deletionsmutante NM92 als auch die Mutante NM3 ( $\Delta nar2$ ) wurden als Negativkontrollen mitgeführt.

Neben NarK2 existiert in *Streptomyces coelicolor* ein weiteres putatives Membranprotein, welches eine Sequenzähnlichkeit von 39 % auf Aminosäureebene mit NarK aus *E. coli* aufweist und von unserer Arbeitsgruppe als NarK1 annotiert wurde. Um einen möglichen Einfluss von NarK1 auf die Bildung von Nar2 zu untersuchen, wurde das Rohextrakt einer *narK1*-Mutante (COE301) auf gebildetes Nar2 untersucht. Da sowohl in COE301 ( $\Delta narK1$ ) als auch seiner Komplementationsmutante COE403 (Rückführung von *narK1* in COE301) äquivalente Mengen an NarG2 im Vergleich zum Wildtyp vorliegt, kann ein Einfluss auf die Synthese von Nar2 ausgeschlossen werden.

### 3.7. Der Einfluss von SCO0212 auf den essentiellen Nitrattransport für Nar2

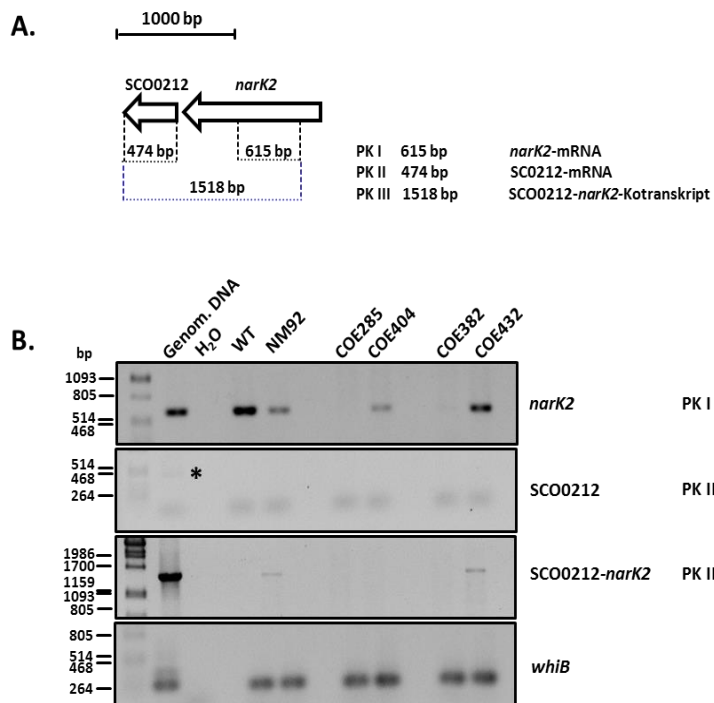
Die unmittelbar stromabwärts von *nark2* annotierte Lokalisation von SCO0212 mit einem intergenen Bereich von lediglich 19 bp, lässt die Hypothese aufstellen, dass *nark2* und SCO0212 möglicherweise ein Operon bilden und damit von einem gemeinsamen Promotor transkribiert werden. Ein direkter funktioneller Zusammenhang beider Gene im Kontext der Nar2-vermittelten Nitratreduktion ist dahingehend denkbar. Die unmittelbare Nähe von SCO0212 zu *nark2* im Genom sowie die strukturelle Ähnlichkeit zu Hämerythrin gaben daher Anlass zur näheren Untersuchung von SCO0212 und deren Beteiligung an der Nar2-vermittelten Nitratreduktion.

#### 3.7.1. SCO0212 und *nark2* bilden ein Operon

SCO0212 ist in der StrepDB-Datenbank als hypothetisches Protein mit einer molekularen Masse von 17,4 kDa annotiert. Ein Abgleich der Nukleotidsequenz von SCO0212 mit der NCBI-Datenbank zeigte eine Einordnung von SCO0212 in die Familie der Hämerythrin-ähnlichen Proteine, die durch eine sauerstoffbindende Domäne (Hämerythrin-nicht-Häm-Eisen-Zentrum) als Sauerstoff-Speicherprotein ausüben, als Detoxifizierungsprotein oder O<sub>2</sub>-Sensor fungieren. Denkbar wäre daher eine Regulation des Nitrat/Nitrittransporters NarK2 durch SCO0212.

Um eine mögliche Kotranskription nachzuweisen, wurde mittels RT-PCR die Bildung einer gemeinsamen mRNA überprüft. Abbildung 3.20. A zeigt, welche möglichen mRNAs bei der RT-PCR erwartet wurden. Bei Verwendung der Primerkombination I (RT-*nark2*\_214fw, RT-*nark2*\_829rv) sollte eine gebildete *nark2*-mRNA von 615 bp nachweisbar sein. Bei der Primerkombination II (RT-SCO0212\_fw, RT-SCO0212\_rv) sollte für die SCO0212-mRNA ein Transkript mit 474 bp nachweisbar sein. Im Falle eines Kotranskripts sollte mit der Primerkombination III (RT-*nark2*\_214fw, RT-SCO0212\_rv) eine mRNA von 1518 bp gebildet werden. Isolierte Gesamt-RNA wurde in cDNA umgeschrieben.

Abbildung 3.20. B zeigt die Transkriptanalysen der Stämme NM92 ( $\Delta nar1\Delta nar2\Delta nar3$ ), COE285 ( $\Delta narK2$ ), COE404 (COE285 mit pMS/*nark2*), COE382 ( $\Delta narX$ ), COE432 (COE382 mit pMS/*narX*) sowie der Wildtypstamm M145 unter Verwendung der genannten unterschiedlichen Primerkombinationen.



**Abbildung 3.20.: Analyse der Bildung eines möglichen Kotranskripts SCO0212-*narK2* sowie der gebildeten mRNA der Gene *narK2* und SCO0212.**

**A.** Erwartete mRNA-Transkripte der Transkriptanalyse

**B.** Transkriptanalyse auf *narK2*-, SCO0212- und *narK2*-SCO0212-Kotranskript. Gesamt-RNA der Stämme M145, NM92, COE285 ( $\Delta narK2$ ), COE404 (COE285 + pMS/*narK2*), COE382 ( $\Delta narX$ ), COE432 (COE382 + pMS/*narX*) wurde isoliert und 2  $\mu$ g isolierte RNA zur cDNA-Synthese eingesetzt. 100 ng cDNA dienten als *template* für die Transkriptanalyse mit den in Tabelle 8.1. angegebenen Primerkombinationen. Genomische DNA von M145 wurde als Positivkontrolle eingesetzt, H<sub>2</sub>O fungierte als Negativkontrolle. Der Stern markiert den Nachweis von SCO0212 in der Positivkontrolle.

unter Verwendung von SCO0212 spezifischen Primern (Primerkombination II) zeigte lediglich bei der Positivkontrolle (genomische DNA) ein spezifisches PCR-Produkt bei 474 bp. Ein Transkript dieser Größe konnte in keiner cDNA der untersuchten Stämme detektiert werden. Überraschenderweise war bei der genutzten Primerkombination III (RT-*narK2*\_214fw, RT-SCO0212\_rv) ein PCR-Produkt mit einer Größe von 1518 bp beim Wildtyp M145 schwach und bei der Dreifach-*nar*-Deletionsmutante NM92 deutlich detektierbar. Dieses entspricht der Größe eines *narK2*-SCO0212-Kotranskripts. Eine Transposon-Insertion in *narK2* (COE285), führt dagegen nicht zur Bildung eines *narK2*-SCO0212-Kotranskripts. Eine Komplementation der Mutante COE285 durch das Konstrukt pMS82/*narK2* (Mutante COE404) ist daher auch nicht funktionell, da das Komplementationskonstrukt im Gen SCO4848 inseriert und somit auch keine gemeinsame mRNA gebildet werden kann. Die Transkriptanalyse der Mutanten COE382 ( $\Delta narX$ ) und COE431 (Rückführung von *narX* in COE382) bestätigt die Transkription durch einen gemeinsamen vorangestellten Promotor von *narK2* und SCO0212. Die Rückführung von *narX* komplementiert in der Mutante COE431 den *narK2*-negativen

Die genomische DNA des Wildtyps M145 wurde jeweils als Positivkontrolle eingesetzt; H<sub>2</sub>O ohne Zusatz von DNA diente in jedem Fall als Negativkontrolle. Die Transkriptanalyse zum Nachweis *narK2*-spezifischer mRNA (Primerkombination I) bestätigte das Ergebnis des vorherigen Ergebnisabschnittes aus Kapitel 2.2.3., der zeigte, dass der *narK2*-negative Phänotyp von COE285 durch Rückführung von *narK2* komplementierbar ist. In der Mutante COE382 ist dagegen nur schwach ein *narK2*-Transkript detektierbar, was allerdings ebenfalls durch Rückführung des deletierten Gens komplementiert werden kann. Die Transkriptanalyse

Phänotyp und führt somit auch zur Bildung des *nark2*-SCO0212-Kotranskripts. Die Transkriptanalyse zum Nachweis spezifischer *whiB*-mRNA diente wie in vorherigen RT-PCRs als Kontrolle für den Einsatz gleicher cDNA-Mengen. Die Daten der Transkriptanalyse beweisen, dass *nark2* und SCO0212 durch einen gemeinsamen Promotor transkribiert werden und damit ein Operon bilden. Die Bildung einer gemeinsamen mRNA untermauert die Annahme, dass SCO0212 als eisenbindendes Hämerythrin und damit als Sauerstoffsensoren im Nitrat-Stoffwechsel eingreifen könnte.

### 3.7.2. Nachweis der Synthese von SCO0212 und Charakterisierung als Hämerythrin

Bislang basieren sämtliche Informationen über das Genprodukt von SCO0212 auf dem Ergebnis eines Nukleotid-BLASTS, der SCO0212 als putatives Hämerythrin identifizierte.

Hämerythrine üben ihre Funktion als lösliche Proteine im Zytoplasma aus und sind in der Lage, über gebundenes Eisen den Sauerstoffgehalt/Redoxstatus der Zelle zu erfassen. Um Anhaltspunkte über die putative Funktion sowie die Eigenschaften des Proteins zu erhalten, wurde SCO0212 sowohl mit einem N- als auch C-terminalem *Strep*-Tag durch heterologe Genexpression im *E. coli*-Stamm Rosetta überproduziert und über Affinitätschromatographie gereinigt. Beide Proteinvarianten wurden zur *Far-Western*-Analyse eingesetzt, um mögliche Interaktionspartner im Sporen-Rohextrakt und Myzel-Rohextrakt zu identifizieren. Um eine mögliche Interaktion von SCO0212 mit den Nars sowie die für die Nitratreduktion essentiellen Transporter zu untersuchen, wurden Rohextrakte der Nar-Einzel- und Doppelmutanten, sowie der *NarK2*- und *NarK1*-Mutanten in der *Far-Western*-Analyse berücksichtigt (Daten nicht gezeigt). Die *Far-Western*-Analyse führte allerdings zu keinen Rückschlüssen auf etwaige/potenzielle Interaktionspartner von SCO0212, die mit der Nar-vermittelten Nitratreduktion in Verbindung stehen.

Um zunächst die Synthese des Proteins in *S. coelicolor* nachzuweisen und zu untersuchen, wurden mit Hilfe des überproduzierten und gereinigten SCO0212<sub>Strep-N</sub> spezifische Antikörper gegen die Gesamt-Peptid-Sequenz generiert und SCO0212 über Western Blot-Analyse im Rohextrakt von *S. coelicolor* nachgewiesen (Abbildung 3.21.).



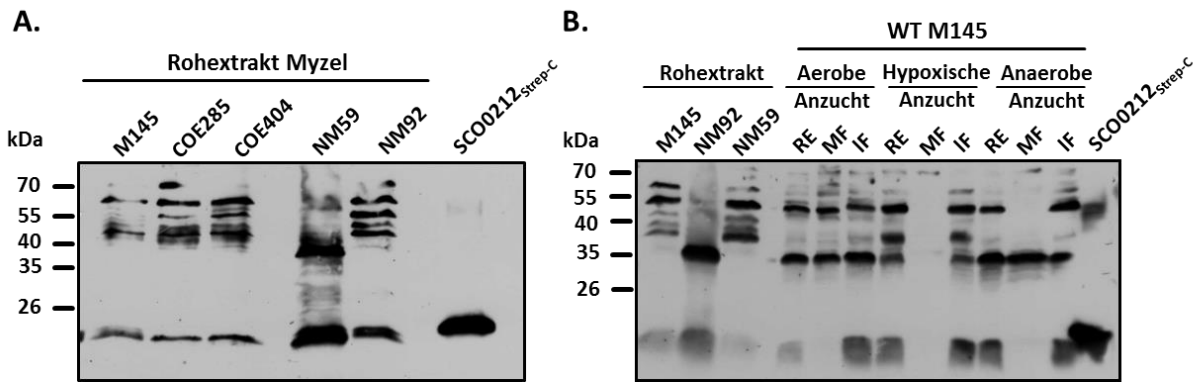


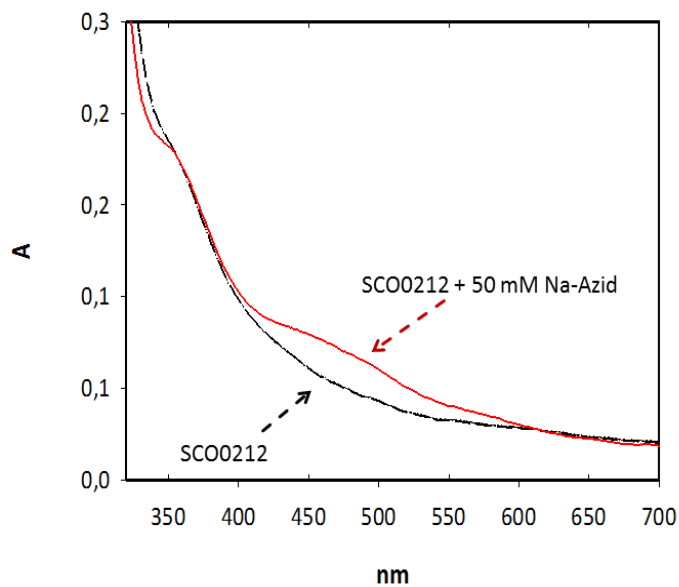
Abbildung 3.21.: Nachweis von SCO0212 in Proteinfractionen von *S. coelicolor*.

**A.** Nachweis von SCO0212 im Rohextrakt von exponentiellem Myzel. Die Proteine wurden in einer 15%igen SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Detektion erfolgte mit anti-SCO0212 1:8000 (*bleed 3*). SCO0212 migriert bei einer erwarteten Größe von etwa 18 kDa. Gereinigtes SCO0212<sub>Strep-C</sub> diente als Positivkontrolle. **B.** Nachweis von SCO0212 im Rohextrakt (RE), Membranfraktion (MF) und lösliche Fraktion (IF) des Wildtypstammes M145 nach Kultivierung unter verschiedenen Sauerstoffbedingungen (Aerobe Anzucht – Hypoxische Anzucht – Anaerobe Anzucht). Die Proteine wurden, wie für Abbildung A beschrieben in einer SDS-PAGE getrennt, die Detektion erfolgte mit anti-SCO0212 1:8000 (*bleed 3*).

Gereinigtes SCO0212 agierte als Positivkontrolle und zeigte nach Western Blot-Analyse eine starke Interaktion mit dem Antikörper bei ca. 18,7 kDa. Im Rohextrakt des Wildtypstammes M145 war bei einer Größe von ca. 18 kDa ein Signal detektierbar, welches dem Wildtyp-SCO0212 entspricht. Auch im Rohextrakt der Mutanten COE285, deren Komplementationsmutante COE404 sowie der Dreifach-*nar*-KO-Mutante NM92 und NM59 (kein funktionelles Nar1 und Nar3) war SCO0212 bei etwa 18 kDa nachweisbar. Die Analyse der Membranfraktionen und löslichen Fraktionen (Abbildung 3.21. B) zeigt, dass SCO0212 nicht membrangebunden ist, sondern als zytoplasmatisches Protein vorliegt. Zusätzlich zeigt SCO0212 durch ein diffuses Laufverhalten ein Merkmal eisenhaltiger Proteine.

Als putativ Hämerythrin-ähnliches Protein würde sich SCO0212 ebenfalls durch einen gebundenen Kofaktor in Form eines Eisen-Zentrums auszeichnen, welches bei Konzentrierung eines gereinigten Proteins mit diesem Kofaktor eine typisch braune Farbe aufweist. Weder die N-terminal markierte, noch die C-terminal markierte Variante des Proteins zeigte einen Farbumschlag. Auch mittels UV-VIS-Spektrum konnte bislang kein gebundener Kofaktor im gereinigten SCO0212 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Kendall *et al.* (2014) identifizierten durch Zugabe von Natriumazid und den damit verbundenen charakteristischen Kurvenverlauf bei Aufnahme eines UV-VIS-Spektrums ein putatives gereinigtes Protein als Hämerythrin. Um eine Zuordnung von SCO0212 zur Hämerythrinfamilie eindeutig zu belegen, wurde bei der Aufnahme eines UV-VIS-Spektrums dem gereinigten Protein mit einer Konzentration von 0,284 mM Natrium-Azid (50 mM) zugesetzt und der Kurvenverlauf von 300 nm – 700 nm dokumentiert (Abbildung 3.22.).



**Abbildung 3.22.:** UV-VIS-Spektrum von gereinigtem SCO0212 vor und nach Behandlung mit 50 mM Na-Azid zum Nachweis eines Hämerythrin-ähnlichen Charakters.

0,284 mM gereinigtes SCO0212<sub>Strep-N</sub> wurde zur Aufnahme eines UV-VIS-Spektrums im Wellenlängenbereich 300 – 700 nm eingesetzt (schwarzer Kurvenverlauf). Durch Zugabe von 50 mM zeigt sich eine Absorptionsbande bei ca 450 nm durch die Bildung einer Azido-Fe(III)-Liganden-Form (rote Kurve).

nachweisbar ist. SCO0212 zeigt daher im UV-VIS-Spektrum nach Na-Azid-Behandlung das charakteristische Absorptionsspektrum eines Hämerythrins. Eine Funktion als Sauerstoffsensor und damit eine mögliche Regulation des Nitrat/Nitrittransporters NarK2, oder sogar der Aktivität von Nar2, erscheint somit möglich.

### 3.8. Zusammenfassung Kapitel 2

In diesem Kapitel konnte Nar2 als myzelspezifisches Nar-Enzym charakterisiert werden, welches unter den aufgeführten Inkubationsbedingungen ausschließlich im Myzel nachweisbar ist.

1. Die Synthese und Aktivität von Nar2 in Myzel erfolgt unter hypoxischen Bedingungen und unterliegt der Kontrolle der NarX-Histidinkinase eines möglichen NarXL-Zweikomponentensystems. Letzteres übt seine regulatorische Funktion nicht nur auf die Synthese des Nar2 Enzyms aus, sondern reguliert gleichermaßen die Transkription des *nark2* Gens und damit die Synthese des Nar2-spezifischen Nitrat/Nitrit-Antiporters NarK2.

Der schwarze Kurvenverlauf in Abbildung 3.22. beschreibt das Spektrum des nativ gefalteten SCO0212-Proteins. Es ist deutlich eine Absorptionsbande bei ca. 350 nm detektierbar, was auf chromophore Molekülgruppen hinweist und somit ein Indiz für die Existenz eines Eisen-Schwefel-Komplexes im Protein ist. Die Zugabe von 50 mM Natriumazid zum Ansatz führt zur Ausbildung eines deutlichen Absorptionsmaximums bei 450 nm (roter Kurvenverlauf) bei einem direkt überlagerten Kurvenverlauf zum unbehandelten Ansatz. Die Zugabe von Natriumazid führt bei Anwesenheit eines FeS-Clusters zur Bildung einer Azido-Fe(III)-Liganden-Form, die durch eine Absorptionsbande bei 450 nm

2. Darüber hinaus ist es gelungen, das hypothetische Protein SCO0212 als putatives Hämerythrin-Protein näher zu charakterisieren und eine Kotranskription dessen Gens mit *nark2* nachzuweisen. Die Bildung eines gemeinsamen Operons von SCO0212 und *nark2* (SCO0213) stützt die Annahme, SCO0212 könne als zytoplasmatisches Hämerythrin Sauerstoff sensieren und so die Synthese von Nar2 oder Nark2 regulieren. Es ist auch denkbar, dass SCO0212 durch direkte Interaktion mit dem Transporter oder Nar2 oder beiden, die Nitratreduktion in Myzel reguliert. Da die Funktion von SCO0212 bei der Nitratreduktion bislang nicht eindeutig nachgewiesen wurde, unterliegt der Mechanismus der Regulation von Nark2 und Nar2 durch SCO0212 vorerst reiner Spekulation.

3. Für Sporen konnte gezeigt werden, dass *nar2*-Transkripte trotz fehlendem Nar2-Protein vorliegen. Aktuelle Studien von Dr. M. Fischer belegen in diesem Zusammenhang, dass die Nar2-Synthese unter hypoxischen Bedingungen bzw. anderen Stressbedingungen in Sporen induziert werden kann.

## Kapitel 3

### **Charakterisierung von Nar3 und seine Regulation durch Phosphat, inverse Korrelation der Nar3-Synthese und der Undecylprodigiosin- Antibiotika-Biosynthese**

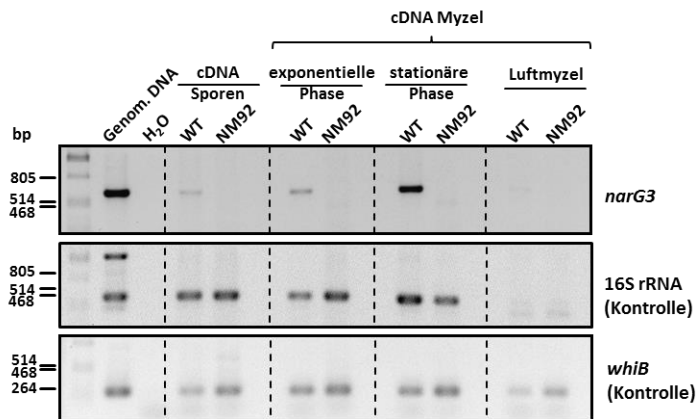
---

Die Tatsache, dass *S. coelicolor* gleich drei Operone, deren Genprodukte jeweils ein Nar-Holo-Enzymkomplex bilden, besitzt und die Expression von *nar1* und *nar2* in verschiedenen Lebensstadien nachgewiesen werden konnte (Fischer *et al.*, 2010; Fischer, Falke *et al.*, 2013), lässt vermuten, dass auch das dritte Operon unabhängig von *nar1* und *nar2* im Lebenszyklus exprimiert wird. Das folgende Kapitel zeigt, dass eine Nar-vermittelte Nitratreduktion auch während des Sekundärmetabolismus im stationären Myzel von *S. coelicolor* stattfindet - sie beruht auf der Aktivität von Nar3. Auf molekularbiologischer als auch biochemischer Ebene sollte die Synthese und Regulation seiner Aktivität analysiert werden. Untersuchungen zur Regulation von Nar3 lieferten dabei erste Hinweise auf eine inverse Korrelation der Nar3-Synthese im Myzel und der Biosynthese eines Prodigiosin-Gemisches, was den roten Phänotyp von *S. coelicolor* bewirkt (RED-Phänotyp).

Die nachfolgend dokumentierten Ergebnisse entstanden in Kooperation mit Dr. M. Fischer. Fischer *et al.* (2010) konnten für Nar3 nachweisen, dass es im Myzelstadium aktiv ist. Unklar war jedoch, wie die Synthese und Aktivität von Nar3 genau reguliert ist und ob Nar3 auch in anderen Stadien des Entwicklungszyklus aktiv sein kann. Frühere Ergebnisse von Dr. M. Fischer deuteten bereits darauf hin, dass die Nar3-Synthese und seine Aktivität an Substratmangel gekoppelt ist.

#### **3.9. Die Synthese von Nar3-Transkripten wird unter Substratlimitierung bei Eintritt in die stationäre Phase (Sekundärmetabolismus) induziert**

Die Analyse von mRNA-Transkripten sollte erste Hinweise auf die Bildung spezifischer *narG3*-mRNA während des Lebenszyklus liefern. Gesamt-RNA wurde dafür vom Wildtyp-Stamm M145 und der Dreifach-*nar*-Deletionsmutante (Negativkontrolle für den Nachweis spezifischer mRNA) isoliert und nach cDNA-Synthese für Transkriptionsanalysen unter Verwendung verschiedener Primerkombinationen eingesetzt. Abbildung 3.23. zeigt die Analyse dieser mRNA-Transkripte.



**Abbildung 3.23.:** Untersuchungen zu Nar3-Induktionsbedingungen auf RNA- Ebene - Transkriptanalyse zum Nachweis spezifischer *narG3*-Transkripte in den verschiedenen Lebenszyklusphasen von *S. coelicolor*.

Gesamt-RNA der Stämme M145 (Wildtyp) und NM92 (Dreifach-*nar*-Deletionsmutante) wurde aus ausdauernden Sporen, exponentiellem Myzel, stationärem Myzel und Luftmyzel isoliert und in cDNA umgeschrieben. 100 ng cDNA dienten als *template* für die RT-PCRs mit den in Tabelle 8.1. angegebenen Primerkombinationen. Genomische DNA des Wildtypstammes M145 diente als Positivkontrolle, H<sub>2</sub>O wurde als Negativkontrolle eingesetzt. [Anmerkung: Das Experiment aus Abb. 3.2., Abb. 3.15. und Abb. 3.23. wurde gleichzeitig durchgeführt und somit die Bilder der Kontrollen (*whiB*, 16S rRNA) geteilt und jeweils mitgeführt.]

Genomische DNA vom Wildtyp M145 wurde als Positivkontrolle eingesetzt. H<sub>2</sub>O diente als Negativkontrolle. Der Nachweis der 16S rRNA sowie der *whiB*-Transkripte zeigt den Einsatz gleicher RNA-Mengen zur cDNA-Synthese (Kontrollen).

Spezifische *narG3*-Transkripte waren deutlich im stationären Myzel detektierbar, wohingegen in Sporen und exponentiellem Myzel *narG3*-Transkript nur schwach detektiert werden konnte.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass *narG3*-Transkript bereits im Sporenstadium vorliegt, es aber zur Neusynthese von Transkripten hauptsächlich beim Übergang zur

stationären Phase kommt. Letzteres spricht für die verstärkte Bildung des Proteins.

Alle nachfolgenden Untersuchungen fokussieren sich daher auf das Myzelstadium und in diesem vor allem auf die durch Substratmangel induzierte stationäre Phase.

### 3.10. Phosphat reguliert Nar3 auf posttranskriptioneller Ebene

Ausgehend von den Transkriptdaten aus 3.1 stellte sich die Frage, wie die Regulation von Nar3 beim Übergang von exponentieller zur stationären Phase reguliert wird. Wichtige Hinweise hierzu lieferte die Kooperation mit Dr. M. Fischer, der die Nar3-*in-vivo*-Aktivität des Myzels in Abhängigkeit verschiedener Anzucht/Inkubationsbedingungen untersuchte. Er stellte fest, dass die Nar3-*in-vivo*-Aktivität des Myzels unabhängig von der Konzentration der Kohlenstoff- und Energiequelle in bisher verwendetem Vollmedium TSB ist. Er identifizierte anstelle dessen die Phosphatkonzentration als entscheidenden Faktor und etablierte ein Verfahren, bei dem aerob geerntetes Myzel (exponentiell) aus TSB in ein Glukose-MOPS-Puffer mit Nitrat überführt wurde und bei dem sich reproduzierbar nach 5 h eine Nar3-*in-vivo*-Aktivität nachweisen aber mit Phosphat hemmen ließ.

Es liegt daher die Vermutung nahe, dass Phosphat einen entscheidenden Einfluss auf die Aktivität und/oder Synthese von Nar3 haben könnte. Um diese Hypothese zu verifizieren, wurde in der vorliegenden Dissertation die Mutante NM29 ( $\Delta nar1\Delta nar2$ ) nach Anzucht im Vollmedium TSB bei Simulation der stationären Phase durch Inkubation in Glukose-MOPS-Puffer mit und ohne Phosphat bei 30 °C aerob inkubiert, anschließend die spezifische Gesamt-Nar-Aktivität im Rohextrakt gemessen und mittels Immunoblot-Detektion die Fraktionen auf vorhandenes Nar3 getestet.

Um gleichzeitig eine Aussage zu treffen, ob Nitrat für die Synthese von Nar3 essentiell ist wurde ein Ansatz mit 10 mM Nitrat mitgeführt.

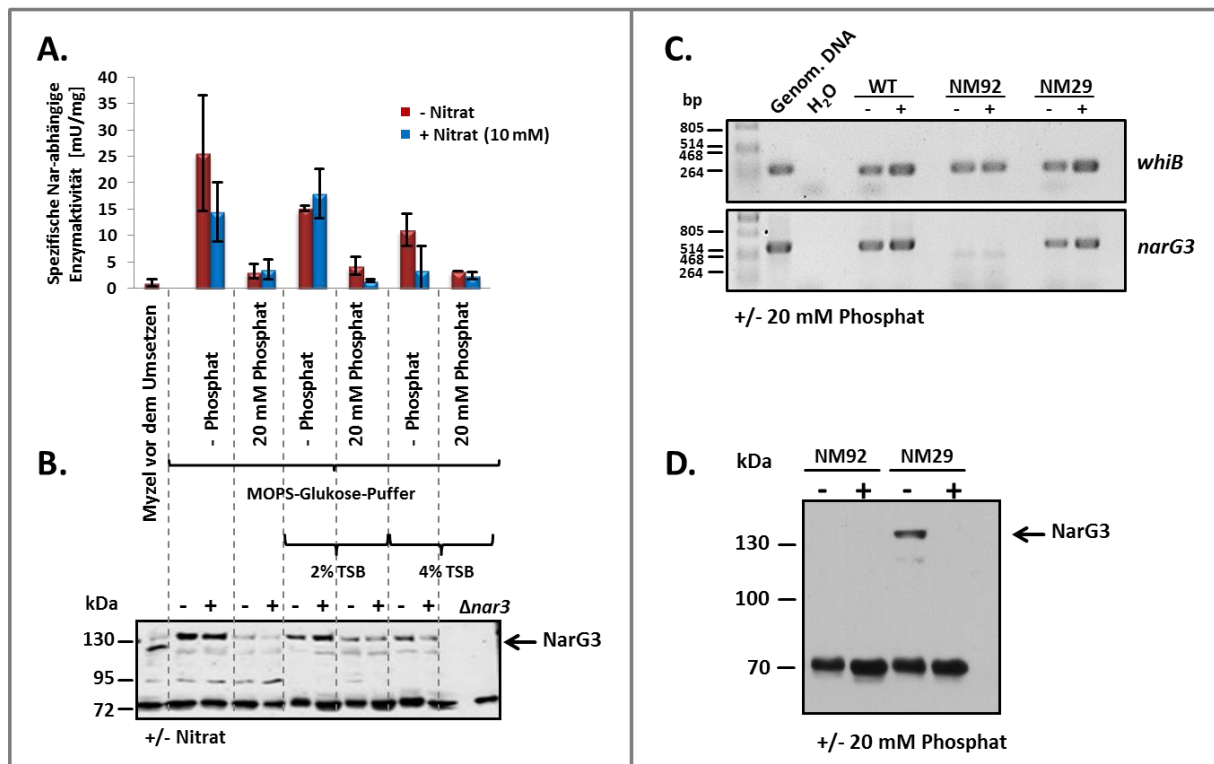


Abbildung 3.24.: Abhängigkeit der Nar3-Synthese von der Phosphatkonzentration bei Übergang zur stationären Phase.

**A.** Bestimmung der Gesamt-Nar-Aktivität im Rohextrakt von NM29 ( $\Delta nar1\Delta nar2$ ) nach Inkubation des Myzels mit (+) 20 mM Phosphat oder ohne (-) Phosphat sowie mit 10 mM Nitrat (rote Balken) oder ohne Nitrat (blaue Balken).

**B.** Immunodetektion nach Western Blot-Analyse mit 60  $\mu$ g Rohextrakt von unterschiedlich inkubierten Myzel wie unter A beschrieben. Die Detektion erfolgte mit anti-NarG3 1:75. NarG3 migriert bei einer erwarteten Größe von 135 kDa.

**C.** Nachweis spezifischer *narG3*-mRNA im Myzel nach unterschiedlicher Inkubation in MOPS-Glukose-Puffer mit (+) oder ohne (-) Phosphat. Gesamt-RNA von M145 (Wildtyp), NM92 (Dreifach-*nar*-Deletionsmutante) und NM29 ( $\Delta nar1\Delta nar2$ ), wurde aus stationärem Myzel nach Zusatz von Phosphat (+) bzw. ohne Phosphat (-) isoliert und in cDNA umgeschrieben. 50 ng cDNA dienen als *template* für die Transkript-Analyse mit den in Tabelle 8.1. angegebenen Primerkombinationen. Genomische DNA des Wildtypstammes M145 diene als Positivkontrolle, H<sub>2</sub>O wurde als Negativkontrolle eingesetzt.

**D.** Immunodetektion nach Western Blot-Analyse mit 45  $\mu$ g Rohextrakt von unterschiedlich inkubierten Myzel der Stämme wie unter C beschrieben. Die Detektion erfolgte mit anti-NarG3 1:75. NarG3 migriert bei einer erwarteten Größe von 135 kDa.

Die Messung der Gesamt-Nar-Aktivität zeigt, dass im exponentiellen Myzel vor dem Umsetzen in MOPS-Glukose-Puffer keine Nar-Aktivität im Rohextrakt nachweisbar war (Abbildung 3.24.). Dieser Ansatz diente als Nullprobe, da eine Nar3-Aktivität erst unter Substratlimitierung, wie sie in der stationären Phase auftritt, nachweisbar ist. Nach Umsetzen des Myzels in MOPS-Glukose-Puffer und einer Inkubation für 5 h, 30 °C war sowohl mit Nitratzugabe (blaue Balken) als auch ohne Nitratzugabe (rote Balken) eine Gesamt-Nar-Aktivität messbar. Der Zusatz von Nitrat hat demnach keinen Einfluss auf die Synthese und/oder Aktivität von Nar3, wenn man die ermittelte Standardabweichung einbezieht. Mit Zusatz von Phosphat zum MOPS-Glukose-Puffer ist dagegen nur eine sehr geringe Nar-Aktivität messbar (Abbildung 3. A). Ob der inhibitorische Effekt von Phosphat auf Aktivitätsebene oder bereits auf die Synthese von Nar3 wirkt, zeigt der immunologische Nachweis von gebildetem Nar3 der gemessenen Rohextrakte (Abbildung 3.24. B).

Vor dem Umsetzen des Myzels (Nullprobe) in MOPS-Glukose-Puffer (exponentielles Myzel, Nullprobe) konnte bereits schwach NarG3 bei 135 kDa detektiert werden, welches allerdings nicht aktiv ist. Nach 5-stündiger Inkubation in MOPS-Glukose-Puffer ohne Phosphat zeigt sich dagegen ein deutlich stärkeres NarG3-spezifisches Signal nach Immunoblot-Detektion. Das Umsetzen des Myzels in MOPS-Glukose-Puffer führt damit zur Neusynthese des Proteins, was mit den Transkriptdaten aus 3.1. korreliert. Die Zugabe von Nitrat zeigt keinen Einfluss auf die Menge an gebildeten NarG3 und wird somit nicht als Induktor für die Nar3-Synthese benötigt. Bei Zusatz von Phosphat zum MOPS-Glukose-Puffer wird die Neusynthese von Nar3 dagegen gehemmt. NarG3 ist in schwacher, aber vergleichbarer Menge zur Nullprobe bei 135 kDa detektierbar. Wurde dem MOPS-Glukose-Puffer 2 % oder 4 % TSB (dient durch enthaltene Phosphatkomponente als zusätzliche Phosphatquelle) zugesetzt, führte das ebenfalls zur verminderten Nar3-Synthese im Vergleich zur Inkubation ohne TSB. Die Zugabe von Phosphat zum MOPS-Glukose-TSB-Puffer verstärkt diesen Effekt. Der regulatorische Effekt von Phosphat zeigt sich damit schon auf Ebene der Proteinbiosynthese.

Diese Daten lassen allerdings zunächst noch offen, ob Phosphat nicht bereits auf die Expression von *narG3* Einfluss nimmt, d.h. ob Phosphat bereits die Transkription von *narG3* hemmt. Transkriptionsanalysen der Stämme M145 (Wildtyp), NM92 ( $\Delta nar1\Delta nar2\Delta nar3$ ), NM29 ( $\Delta nar1\Delta nar2$ ) nach Inkubation mit und ohne Phosphat sollten einen möglichen Einfluss von Phosphat auf Transkriptebene zeigen (Abbildung 3.24. C). Die Dreifach-*nar*-Deletionsmutante NM92 wurde als Negativkontrolle mitgeführt und zeigte kein detektierbares *narG3*-Transkript. Die Transkriptdaten aller weiteren Stämme belegen, dass sowohl mit als auch ohne Phosphat in allen Stämmen, die Nar3 synthetisieren können (M145, NM29) *narG3*-Transkript gebildet wird. Die Transkription bleibt durch Phosphat unbeeinflusst, Phosphat scheint damit einen post-transkriptionellen Effekt auf Nar3 auszuüben.

Um die post-transkriptionelle Kontrolle durch Phosphat zu verifizieren, wurden die Proteinfractionen der analysierten Mutanten durch Immunoblot-Detektion auf gebildetes NarG3 untersucht (Abbildung 3.24. D). Die Dreifach-*nar*-Deletionsmutante NM92 diente erneut als Negativkontrolle und zeigte daher weder mit noch ohne Phosphatzusatz kein gebildetes NarG3. Die Analyse der Proteinfraction der Mutante NM29 ( $\Delta nar1\Delta nar2$ ) zeigt jedoch, dass die Bildung von Nar3 in Abhängigkeit von Phosphat erfolgt. Das heißt, Eine Inkubation der Stämme ohne Zusatz von Phosphat führt zur Bildung von NarG3, wohingegen bei Zusatz von Phosphat in keinem Rohextrakt der Stämme (WT, NM29) gebildetes NarG3 nachweisbar ist.

Die Daten der Transkriptionsanalyse sowie der immunologische Nachweis der katalytischen Untereinheit NarG3 zeigen, dass Phosphat keinen Einfluss auf die *narG3*-Transkriptbildung hat, Phosphat allerdings die Translation von *narG3* inhibiert, weshalb kein Nar3 im Rohextrakt nachweisbar ist. Die Anzucht im Vollmedium TSB (Nullprobe) führt durch die enthaltene Phosphatkomponente demnach offenbar zur Inhibierung der *nar3*-Translation. Beim Übergang zur stationären Phase dagegen, ist Phosphat limitierend (Substratlimitierung), weshalb die Translation nicht länger blockiert wird und die Nar3-Synthese und deren Aktivität nachweisbar sind.

### **3.11. Inverse Korrelation von Nar3-Synthese und Undecylprodigiosin-Biosynthese – Phosphat induziert die Bildung von Prodigininen**

Im untersuchten System zur Nar3-Induktion ließen sich weitere Effekte beobachten: Das System gewährleistete zusätzlich definierte Bedingungen zur reproduzierbaren Sekundärmetabolit-Synthese (Farbstoffbildung).

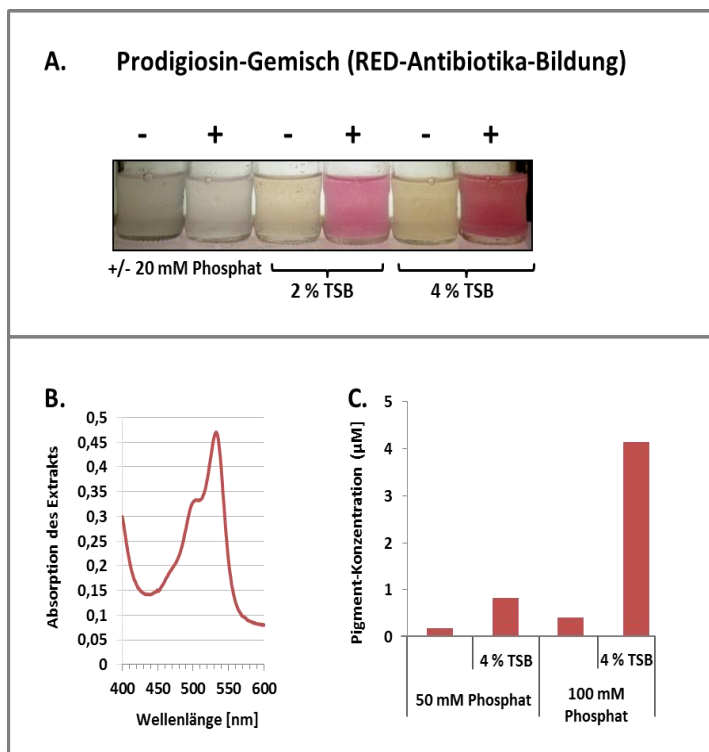
Es ist bekannt, dass Phosphat während des Sekundärmetabolismus über eine Signaltransduktionskaskade sowohl durch Transkriptionskontrolle als auch post-transkriptionelle Kontrolle die Synthese einiger Polyketide reguliert, darunter das rot-gefärbte Polyketid Undecylprodigiosin, welches von seiner chemischen Struktur in die Gruppe der Prodigiosine einzuordnen ist (RED-Antibiotika). Letztere bewirken die Ausbildung des RED-Phänotyps bei *S. coelicolor* (Rudd und Hopwood, 1980). Da Antibiotikabildung ein aerob ablaufender Prozess ist, Nitratreduktion allerdings nur unter anaeroben Bedingungen stattfindet, lässt sich die Hypothese aufstellen, ob Antibiotikabildung und Nitratreduktion in dem untersuchten System zur Nar3-Induktion gleichzeitig ablaufen können oder nicht eher konkurrierende Prozesse sind und Phosphat als „Regulator“ fungiert.

Im verwendeten Nar3-Untersuchungssystem zeigt die Zugabe von Phosphat und ein Zusatz von 2 % bzw. 4 % TSB (enthält 14 mM  $PO_4^{3-}$ ) eine verstärkte Induktion der Bildung eines roten



Sekundärmetabolits während der Inkubationsphasen. Ohne Zugabe von Phosphat zeigt sich dagegen eine stark verzögerte Induktion des roten Farbstoffes (Abbildung 3.25. A). Dieses Ergebnis deutet unter den gewählten Bedingungen auf eine inverse Korrelation der Nar3-Synthese und Farbstoffbildung hin.

Um Evidenzen zu erhalten, welche chemische Verbindung unter den gewählten Inkubationsbedingungen verstärkt durch Phosphat induziert wird, wurde der Farbstoff nach Induktion dessen Bildung mit Phosphat und Zusatz 4 % TSB aus dem stationären Myzel extrahiert, mittels UV-Vis-Spektrum analysiert und die Pigment-Konzentration in Abhängigkeit von der zugesetzten Phosphat-Konzentration ermittelt (Abbildung 3.24. B+C). Des Weiteren wurde das Extrakt durch MS/MS (Tandem-Massenspektrometrie) und ESI-MS (Elektrospray-Ionisations-MS) analysiert (Abbildung 8.7. – 8.9., Anhang).



**Abbildung 3.25.: Phosphat induziert die Bildung des RED-Phänotyps**

**A.** Bildung des RED-Antibiotikums nach Umsetzen des exponentiellen Myzels in MOPS-Glukose-Puffer mit (+) und ohne (-) Phosphat und aerober Inkubation für 5 Stunden.

**B.** UV-Vis-Spektrum des mit angesäuerten Methanol extrahierten roten Farbstoffes nach Anzucht wie unter A beschrieben.

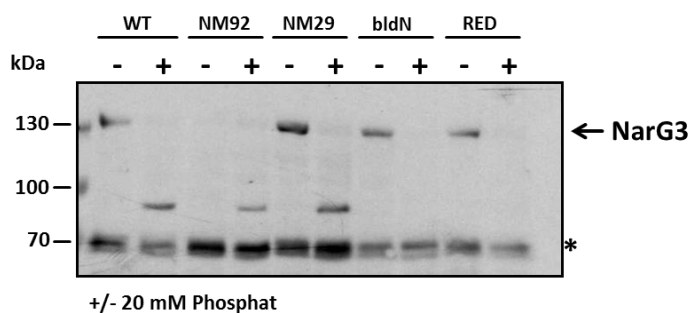
**C.** Bestimmung der Pigmentkonzentration vom Prodigiosingemisch (rote Balken) in Abhängigkeit der Phosphat- und TSB-Konzentration.

Das UV-Vis-Spektrum zeigt ein Absorptionsmaximum bei 525 nm, was dem Absorptionsmaximum von Undecylprodigiosin entspricht. Die Bestimmung der Pigmentkonzentration in Abhängigkeit von der zugesetzten Phosphatkonzentration bestätigt die verstärkte Induktion von Undecylprodigiosin bei 100 mM Phosphat und 4 % TSB im Vergleich zu 50 mM Phosphat und 4 % TSB (rote Balken). Diese Daten lassen allerdings offen, ob nicht eher ein Prodigiosingemisch bzw. Synthesestufen/Intermediat von Undecylprodigiosin im Extrakt vorliegt. Über hochauflösende MS/MS (Tandem-Massenspektrometrie) und ESI-MS (Elektrospray-Ionisations-MS) (Abbildung 8.7. –

8.9., Anhang) war es möglich, Streptorubin B mit einer Masse von 392,27 [M+H]<sup>+</sup> und Undecylprodigiosin (394,28 [M+H]<sup>+</sup>) zu differenzieren. Beide chemischen Verbindungen unterscheiden sich lediglich durch eine aromatische Seitenkette (Abbildung 1.1. Einleitung). Unter ESI-MS-Bedingungen (Elektrospray-Ionisations-MS, Abbildung 8.8. und 8.9., Anhang) zeigt sich der Nachweis von Undecylprodigiosin durch Fragmentierung der Alkylketten (m/z 394 – 379 – 362, Abbildung 8.8., Anhang; Chen *et al.*, 2008) und von Streptorubin durch Fragmentierung von m/z 392 – 377 (Abbildung 8.9., Anhang; Chen *et al.*, 2008).

Phosphat induziert damit die verstärkte Bildung eines Prodigiosin-Gemisches aus Undecylprodigiosin und Streptorubin B unter aeroben Bedingungen, wobei gleichzeitig die Synthese von Nar3 gehemmt wird. Die RED-Antibiotikabildung und die Nar3-Synthese können somit unter diesen Bedingungen als konkurrierende Prozesse verstanden werden.

Um einen möglichen *downstream*-Effekt der Undecylprodigiosin-Biosynthese auf die Nar3-Synthese auszuschließen, sollte eine Mutante, deren Syntheseweg von Undecylprodigiosin durch eine Deletion des *redA*-Gens im *red*-Genclusters gestört ist (Mutante M559), hinsichtlich der Nar3-Synthese mit und ohne Phosphatzugabe untersucht werden. Die Rohextrakte vom Wildtyp M145 und NM29 ( $\Delta nar1\Delta nar2$ ) wurden als Positivkontrolle eingesetzt, die Mutante NM92 (Dreifach-*nar*-Deletionsmutante) diente als Negativkontrolle.



**Abbildung 3.26.: Untersuchung eines möglichen *downstream*- Effekts der RED-Antibiotika-Bildung auf die Nar3-Synthese**

Immunodetektion von NarG3 in Rohextrakten (45 µg) von WT, NM92, NM29, *bldN*, und RED Mutanten nach Inkubation des stationären Myzel mit (+) und ohne (-) Phosphat. Die Detektion erfolgte mit anti-NarG3 1:75. Der Pfeil markiert NarG3, der Stern repräsentiert die Ladekontrolle (unspezifische Induktion).

Abbildung 3.26. zeigt, dass NarG3 in vergleichbarer Menge in NM29 ( $\Delta nar1\Delta nar2$ ) und im Wildtyp nachweisbar sind. Die Zugabe von Phosphat verhindert dagegen die Bildung von Nar3.

Eine Deletion im *red*-Gen-Cluster (Mutante  $\Delta redA$ ) zeigt außerdem keinen Einfluss auf Nar3-Bildung beweist, dass die regulatorische Kontrolle beider Prozesse allein auf Phosphat beruht.

### 3.12. Zusammenfassung Kapitel 3

In diesem Kapitel konnte ein erster Bezug der Nar3-vermittelten Nitratreduktion zur RED-Antibiotika-Bildung definiert werden, der auf einer inversen Korrelation der Nar3-Synthese und der Bildung eines Prodigiosin-Gemisches im Nar3-Induktions-System beruht.

1. Es konnte gezeigt werden, dass die Nar3-Synthese unter Substratlimitierung mit Übergang zur stationären Phase induziert wird. Das *narG3*-Transkript liegt dagegen bereits im Sporenstadium vor, erfährt aber bei Übergang zur stationären Phase eine Neusynthese.
2. Phosphat konnte im untersuchten System zur Nar3-Induktion als regulatorisches Agens identifiziert werden: Zum einen zeigt die Nar3-Synthese eine post-transkriptionelle Regulation durch Phosphat und damit eine inverse Korrelation mit der Phosphat-Konzentration. Zum anderen induziert Phosphat unter diesen Bedingungen die Biosynthese eines Prodigiosin-Gemisches aus den chemischen Verbindungen Undecylprodigiosin und Streptorubin B.
3. Die aerob ablaufende RED-Antibiotika-Bildung und der anaerobe Prozess der Nar3-vermittelten Nitratreduktion sind damit in unserem Inkubationssystem gegenläufige Prozesse, deren Regulation der verfügbaren Phosphatkonzentration unterliegt.

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Dissertation ist es gelungen, die drei synthetisierten Nar-Enzyme von *S. coelicolor* näher zu charakterisieren und ihre Relevanz sowie ihre Funktionalität beim *switch* von aerober Atmung zu anaerober Atmung nachzuweisen.

Die erzielten Ergebnisse führten, neben dem Gesichtspunkt der für Charakterisierung der drei Nitratreduktasen, überraschenderweise zu einem neuen und bislang kaum untersuchten Aspekt zum aeroben Respirationssystem von *S. coelicolor*.

Demzufolge wurde die Diskussion thematisch in zwei Haupt-Aspekte gegliedert, welche zunächst eine putative Verknüpfung zwischen dem aeroben und anaeroben Respirationssystem erörtert (Abschnitt 4.1.) und anschließend mögliche Regulationsmechanismen unter Berücksichtigung der neu erhobenen Daten diskutiert (Abschnitt 4.2.).

### 4.1. Funktionelle Verknüpfung von aerobem Respirationssystem und anaerober Atmung bei *S. coelicolor*

Die Daten aus Kapitel 1 des Ergebnisteils (Charakterisierung von Nar1) zeigten, dass sich für das Sporenstadium eine regulatorische Verbindung der anaeroben Nitratreduktion und des aeroben Respirationssystems andeutet. Als Verknüpfungsstelle konnten dabei Komplex III und Komplex IV (Cytochrom  $bc_1$ -Komplex, kodiert durch SCO2148-52; terminale Cytochrom  $c aa_3$  Oxidase, kodiert durch SCO2153-56) identifiziert werden.

Auf Grundlage bereits untersuchter Komplex III- und Komplex IV-Kompositionen bekannter Vertreter der *Actinobacteria*, wie *Corynebacterium* und gram-negative Bakterien wie *Paracoccus* soll im nachfolgenden Diskussionsabschnitt der Elektronentransfer über die bislang wenig untersuchte Atmungskette von *S. coelicolor* näher diskutiert werden und mögliche Verzweigungswege zur Nitratreduktion diesbezüglich erörtert werden. Im ersten Teil (I + II) wird aus den wenigen bekannten Daten zum Respirationssystem von Streptomyceten und den Daten dieser Doktorarbeit ein alternativer  $bc_1$ -Komplex für das Respirationssystem bei *S. coelicolor* abgeleitet. Im zweiten Teil (III) werden die Evidenzen für die Existenz eines ‚Respirasoms‘ (respiratorischer Superkomplex) dargelegt.

## I. Das aerobe Respirationssystem von *S. coelicolor* im Kontext bekannter bakterieller Respirationssysteme

Bezüglich des Aufbaus der aeroben Atmungskette geht man im Allgemeinen davon aus, dass ein komplettes Respirationssystem, welches NADH-Dehydrogenase (Komplex I), Succinat-Dehydrogenase (Komplex II), Ubichinol-Cytochrom *c* Reduktase (*bc*<sub>1</sub>-Komplex, Komplex III) und Cytochrom *c aa*<sub>3</sub> Oxidase umfasst, existiert (Bentley *et al.*, 2002). Erstaunlicherweise zeigen Sequenz-Analysen, dass Komponenten von sowohl Komplex I als auch Komplex II mehrfach im Genom annotiert sind (Bentley *et al.*, 2002; Abbildung 1.2., Einleitung). Das legt die Vermutung nahe, dass *S. coelicolor* in Abhängigkeit der Lebenszyklusphasen die Komplexkomposition der Atmungskette verändern könnte. Dieser Aspekt soll im Teil III noch einmal aufgegriffen werden.

Die aerobe Atmungskette in *S. coelicolor* folgt somit dem postulierten Elektronentransfer vom Substrat über NADH-Dehydrogenase (Komplex I) zur Succinat-Dehydrogenase. Die Elektronen werden bei *S. coelicolor* in einen Menachinon-Pool eingespeist und auf Komplex III (Ubichinol-Cytochrom *c*-Reduktase) übertragen. Der Elektronentransfer endet mit der terminalen Cytochrom *c aa*<sub>3</sub>-Typ-Oxidase, die die Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser ermöglicht.

Über die Komposition bzw. Assemblierung der einzelnen Respirationssysteme liegen dahingegen nur ungenügend Daten vor. Der Cytochrom *bc*<sub>1</sub>-Cytochrom *aa*<sub>3</sub>-Zweig der *Actinobacteria* zeigt ungewöhnliche Charakteristika im Vergleich zu den gut charakterisierten Komplexen von *Paracoccus denitrificans* oder von Rinderherzmitochondrien (Baker *et al.*, 1998; Lenaz *et al.*, 2012; Hopkins *et al.*, 2013).

*Paracoccus denitrificans* verfügt über einen *bc*<sub>1</sub>-Komplex, der in seiner funktionellen Form ein Dimer bildet (Mayer *et al.*, 2002). Er ist aus drei grundlegenden katalytischen Untereinheiten assembliert: die Cytochrom *b* Untereinheit mit 2 *b*-Typ Hämen, der Cytochrom *c* Untereinheit mit kovalent gebundenem *c*-Typ Cytochrom und dem Rieske Eisen-Schwefel-Protein. Alle Gene des *bc*<sub>1</sub>-Komplexes sind in einem Operon angeordnet (Kurowski *et al.*, 1987). Die Reduktion von molekularem Sauerstoff kann in *Paracoccus* über drei terminale Oxidasen erfolgen, die alle neben ihrer Funktion als Elektronenüberträger als Protonenpumpen fungieren (Saraste *et al.*, 1991). Alle drei Oxidasen (Cytochrom *aa*<sub>3</sub> Oxidase, *cbb*<sub>3</sub> Oxidase und *ba*<sub>3</sub>-Oxidase) zählen zur Familie der Häm-Kupfer-Oxidasen, die in Abhängigkeit des verfügbaren Sauerstoffpartialdruckes (Cytochrom *aa*<sub>3</sub> unter normalen Sauerstoffpartialdruck, *cbb*<sub>3</sub>-Oxidase unter sauerstofflimitierenden Bedingungen) und in der Anwesenheit von Nitrat und Nitrit (*ba*<sub>3</sub>-Oxidase) gebildet werden. Die Cytochrom *c aa*<sub>3</sub> Oxidase sowie die *cbb*<sub>3</sub>-Oxidase akzeptieren die Elektronen vom *bc*<sub>1</sub>-Komplex, sie können damit bis zu 6H<sup>+</sup>/2e<sup>-</sup> translozieren. Die Cytochrom *ba*<sub>3</sub> Oxidase transloziert dagegen nur 4H<sup>+</sup>/2e<sup>-</sup> (Otten *et al.*, 1999).

Differenzen in der Komposition der aeroben Atmungskette zu *Actinobacteria* zeigen sich vor allem deutlich bei der Assemblierung des *bc*<sub>1</sub>-Komplexes. Die Cytochrom *b* Komponente der *Actinobacteria*,

kodiert durch das Gen *qcrB*, umspannt die Membran mit 9 vorhergesagten Transmembranhelices, anstelle von 8 Transmembranhelices wie für den mitochondrialen Komplex III hervorgesagt. Allerdings zeigen die letzten 4 Transmembranhelices schwache Homologien zum mitochondrialen Gegenspieler. Die Cytochrom *c* Komponente, kodiert durch *qcrC*, ist bei *Corynebacterium* als membranverankertes Di-Häm *c*-Typ Cytochrom beschrieben (Sone *et al.*, 2001; Niebisch und Bott, 2001). Das kovalent gebundene *c*-Typ-Cytochrom ist das einzige identifizierte Cytochrom *c* im Respirationssystem von *Corynebacterium glutamicum*, *M. tuberculosis* und *Streptomyces*. Damit verfügen sie nicht über ein membrangängiges Cytochrom *c* als Elektronencarrier und leiten die Elektronen offensichtlich direkt zur terminalen Cytochrom-Oxidase weiter. Das Rieske-Eisen-Schwefel-Protein, kodiert durch *qcrA* zeichnet sich durch eine höhere Hydrophobizität aus. Im Vergleich zu bereits untersuchten Rieske-Eisen-Schwefel-Proteinen (Xia *et al.*, 1997) ist es über drei Transmembranhelices als polytopisches Protein in der Membran verankert. Gängige Rieske-Eisen-Schwefel-Proteine aus anderen Organismen weisen einen monotopischen Charakter auf.

Hopkins *et al.* (2013) untersuchten die Assemblierung des Cytochrom *bc*<sub>1</sub> Komplexes in die Membran von *S. coelicolor* und konnten einen Tat-abhängigen Transport und damit eine Tat-abhängige Aktivität vom Cytochrom *bc*<sub>1</sub>-Komplex nachweisen. Darüberhinaus identifizierten sie einen ungewöhnlichen, sowohl Tat-abhängigen als auch Tat-unabhängigen Transportmechanismus vom Rieske-Eisen-Schwefel-Protein in die Membran. Der atypische polytopische Charakter des Rieske-Proteins (zusätzliche Transmembranhelices) vermittelt dabei die hydrophoben Interaktionen mit den Cytochrom-Untereinheiten.

Eigene, in dieser Dissertation durchgeführte Studien dokumentieren die Existenz von *a*-Typ-, *b*-Typ- und *c*-Typ-Cytochromen sowie die Funktionalität des *bc*<sub>1</sub>-Komplexes und der Cytochrom *c* *aa*<sub>3</sub> Oxidase. Sporen- und Myzelmembranfraktionen wurden auf die Existenz von kovalent gebundenem Häm in der Atmungskette untersucht (Abbildung 3.6.). Der Nachweis von Häm im Komplex III und Komplex IV der Atmungskette ist ein Indiz auf die korrekte und vollständige Assemblierung beider Komplexe. Zusätzlich zeigten auch differentielle Redoxspektren ausgewählter Cytochrom-Oxidase-Mutanten und des Wildtyps M145 den Nachweis der prosthetischen Gruppen von Komplex III (Cytochrom *b*, kovalent gebundenes Cytochrom *c*) und Komplex IV (Cytochrom *a*) der aeroben Atmungskette (Abbildung 8.10., Anhang).

Für beide Komplexe konnten die charakteristischen Absorptionsmaxima (Cytochrom *b* 560 nm, Cytochrom *a* 600 nm) detektiert werden. Ein Absorptionsmaximum bei 660 nm, was auf Cytochrom *d* hindeutet, und bei 550 nm, was dem Cytochrom *c* entspricht, konnte

hingegen nicht detektiert werden. Cytochrom *d* ist im aktiven Zentrum der Cytochrom *bd* Oxidase gebunden, die verstärkt unter sauerstofflimitierenden Bedingungen exprimiert wird. Die strikt aerobe Anzucht mit zusätzlicher Sauerstoffzufuhr würde somit zur Inhibierung der Bildung der Cytochrom *bd* Oxidase führen.

Damit kongruieren diese Ergebnisse mit den Daten der differentiellen Redoxspektren von Hopkins *et al.* (2013). Des Weiteren zeigen sie, dass für *S. coelicolor* die Cytochrom *c aa*<sub>3</sub> Oxidase die vorwiegend präsente und aktive terminale Oxidase ist.

Analoge Cytochrom-Kompositionen und ein vergleichbarer Respirationszweig sind bereits für *Corynebacterium glutamicum* beschrieben (Bott und Niebisch, 2003). Die Succinat-Dehydrogenase, kodiert durch das *sdhCAB*-Operon, transferiert die Elektronen auf Menachinon, welches durch die Aktivität des Cytochrom *bc*<sub>1</sub> Komplexes reoxidiert wird. Letzterer überträgt die Elektronen auf die terminale Cytochrom *c aa*<sub>3</sub>-Typ-Oxidase. *C. glutamicum* synthetisiert kein lösliches Cytochrom *c*, die Elektronen werden daher durch direkte Assoziation von Komplex III und Komplex IV als Cytochrom *bc*<sub>1</sub>-*aa*<sub>3</sub>-Superkomplex übertragen (Bott und Niebisch, 2003; Niebisch und Bott, 2003). Der Menachinon-Pool fungiert als Verzweigungspunkt für den Elektronenfluss auf den vermutlich konstitutiv exprimierten *bc*<sub>1</sub>-*aa*<sub>3</sub>-Superkomplex oder alternativ auf die Cytochrom *bd* Oxidase. Beide Verzweigungswege unterscheiden sich zusätzlich zur Sauerstoffaffinität auch hinsichtlich ihrer Protonentranslokation: Folgen die Elektronen dem Weg über den *bc*<sub>1</sub>-Komplex zur terminalen Cytochrom *c* Oxidase werden zwei H<sup>+</sup>-Protonen über den Q-Zyklus, plus 2 Protonen über den *bc*<sub>1</sub>-Komplex und zwei H<sup>+</sup>-Protonen über die Cytochrom *c* Oxidase transloziert, mit deren Hilfe ein Protonengradient aufrechterhalten wird. Unter sauerstofflimitierenden Bedingungen werden die Elektronen über die Succinat-Dehydrogenase direkt zur alternativen, sauerstoffaffinieren Cytochrom *bd* Oxidase ohne Beteiligung des *bc*<sub>1</sub>-Komplexes weitergeleitet, weshalb letztendlich sechs Protonen weniger zur Aufrechterhaltung des Membranpotentials transloziert werden.

Eine Verzweigung der Atmungskette ermöglicht das Wachstum unter variierenden Sauerstoffkonzentrationen. Da bereits durch eigene als auch vorherige Studien (van Keulen *et al.*, 2007) bekannt ist, dass *S. coelicolor* sauerstofflimitierende Bedingungen überdauern kann, scheint die Bildung einer alternativen Cytochrom *bd* Oxidase mit einer gesteigerten Affinität zu Sauerstoff, deren Strukturgene ebenfalls annotiert sind, relevant (Bentley *et al.*, 2002).

Unter diesem Gesichtspunkt sowie unter Einbezug der, in der vorliegenden Dissertation erzielten Ergebnisse ist für *S. coelicolor* ebenfalls der Elektronenfluss über ein verzweigtes Respirationssystem möglich, das bei niedrigen Sauerstoffkonzentrationen die Elektronen direkt vom Menachinon auf die

alternative Cytochrom *bd* Oxidase, ohne Mitwirkung der Ubichinol-Cytochrom *c*-Reduktase, transferiert.

Eine derartig verzweigte Atmungskette bietet damit die Grundlage für die funktionelle Verknüpfung der aeroben Atmung und der Nitratrangung in Sporen- und Myzelstadium. Eine andersartige Komposition/Organisation der respiratorischen Komponenten könnte unter diesem Gesichtspunkt einen alternativen Elektronenfluss zur Nitratreduktase gewährleisten.

Letzteres ist eine interessante Hypothese, die im Folgenden näher diskutiert werden soll.

## II. Die Notwendigkeit eines alternativen *bc*<sub>1</sub>-Komplexes

Die Fähigkeit von *Streptomyces*, widrige Bedingungen, wie Temperaturstress, Substratmangel mit minimaler metabolischer aber dennoch messbarer Aktivität im Sporenstadium zu überdauern, zwingt zur Annahme, dass möglicherweise ein artifizielles Respirationssystem für eben solche Bedingungen existieren muss. Eine vermutete ungewöhnliche Zusammensetzung der Atmungskomplex-Komponenten in Sporen scheint im Vergleich zu Myzel daher plausibel.

Sequenzanalysen der bereits untersuchten respiratorischen Komponenten (*bc*<sub>1</sub>-Komplex, Cytochrom *c aa*<sub>3</sub> Oxidase) offenbarten, dass im Genom von *S. coelicolor* analoge Genbereiche dieser Komponenten kodiert sind, die die Synthese eines alternativen *bc*<sub>1</sub>-Komplexes und einer alternativen Cytochrom *c* Oxidase-Komponente mit ungewöhnlicher Zusammensetzung ermöglichen (Abbildung 8.11., Anhang). Damit verfügt *S. coelicolor* über gleich drei *qcrB*-Untereinheiten, die am respiratorischen Elektronentransport involviert sein könnten.

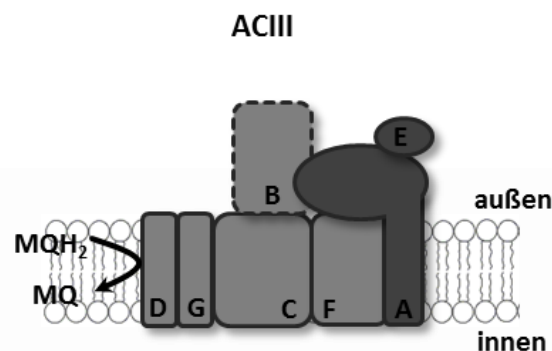
Konventionelle *bc*<sub>1</sub>-Komplexe waren bis vor kurzem die einzigen Enzymkomplexe, die in der Lage sind, die Elektronen vom reduzierten Chinon-Pool auf Cytochrom *c* zu transferieren (Refojo *et al.*, 2010). Dass neben diesen allerdings auch alternative Elektronenüberträger existieren müssen, zeigt die Membranzusammensetzung von *Chloroflexus aurantiacus*. Das Fehlen eines konventionellen *bc*<sub>1</sub>-Komplexes und die Abwesenheit von löslichem Cytochrom *c* werden durch einen alternativen Komplex III (ACIII) ersetzt, der die Elektronen von Menachinon auf Auracyanin überträgt (Gao *et al.*, 2009). Letzteres fungiert im anoxischen phototrophen Bakterium als Elektronencarrier anstelle von Cytochrom *c*.

Ein alternativer Komplex III wird in der Literatur als respiratorischer Komplex mit einer Chinon-Elektronakzeptor-Oxidoreduktaseaktivität beschrieben und wird nicht in die Gruppe der *bc*<sub>1</sub>-Komplex-Familie eingeordnet (Refojo *et al.*, 2010). Aufgrund der Sequenzhomologie einiger Untereinheiten zählt der alternative Komplex III zur CISM-Familie (*complex iron-sulfur molybdoenzyme*), denen die Nitratreduktase, Formiat-Dehydrogenase und DMSO-Oxidoreduktase zuzuordnen sind (Refojo *et al.*, 2010). Derartige alternative Enzymkomplexe konnten auch in



*Rhodothermus marinus* identifiziert werden (Pereira *et al.*, 2007). *R. marinus* verfügt über drei verschiedene Oxidasen (*caa*<sub>3</sub>, *ba*<sub>3</sub>, *cbb*<sub>3</sub>), allerdings zeigten Sequenzanalysen das Fehlen eines *bc*<sub>1</sub>-Komplexes (Lucas *et al.*, 2009). Diese drei Oxidasen sind hingegen nicht in der Lage, die Elektronen direkt vom Chinon-Pool zu nutzen. Der alternative Komplex III fungiert in diesem Fall als Verknüpfungspunkt zwischen Chinon-Oxidation und Reduktion des Elektronencarriers HiPIP. Er gleicht damit das Fehlen des *bc*<sub>1</sub>-Komplexes aus.

Interessanterweise konnte für alternative funktionsgleiche Komplexe eine einzigartige Komposition der funktionellen Untereinheiten nachgewiesen werden (Refojo *et al.*, 2010). Die Gene zur Bildung eines alternativen Komplex III sind für gewöhnlich in einem *Cluster*, bestehend aus 6-8 Genen (*actABCDEFGG*) angeordnet. Die Genanordnung selbst wird als sehr variabel beschrieben: während in manchen Organismen ganze Gene im Cluster fehlen, können Gene im *Cluster* auch gesplittet vorliegen (Refojo *et al.*, 2010). Es ist nicht ungewöhnlich, dass dem *Cluster* für den alternativen Komplex III, das Gen-*Cluster* für die terminalen Oxidasen folgt (Refojo *et al.*, 2010; Yanyushin *et al.*, 2005). Die Untereinheiten zur Bildung eines alternativen Komplex III können variabel als Module in der Membran angeordnet sein (Abbildung 4.1.). Die variable Orientierung der unterschiedlichen Module (Membranverankerungsmodule und Elektronentransfermodule) ermöglichen verschiedene Wege der Energiekonservierung: zum einen den linearen Elektronentransfer und zum anderen einen als Bifurcation definierten Elektronentransfer (Refojo *et al.*, 2010).



**Abbildung 4.1.:** Nach Refojo *et al.* (2010, 2012) postulierte Komposition eines alternativen Komplex III (ACIII).

Dieser wird durch die Anordnung von Membranverankerungsmodulen (hellgrau dargestellt) und Elektronentransfermodulen (dunkelgrau dargestellt) gebildet. Das Membranverankerungsmodul B (gestrichelt umrandet) kann sowohl an zur periplasmatischen als auch zytosolischen Seite orientiert sein. Je nach Orientierung werden dadurch verschiedene Wege der Energiekonservierung ermöglicht.

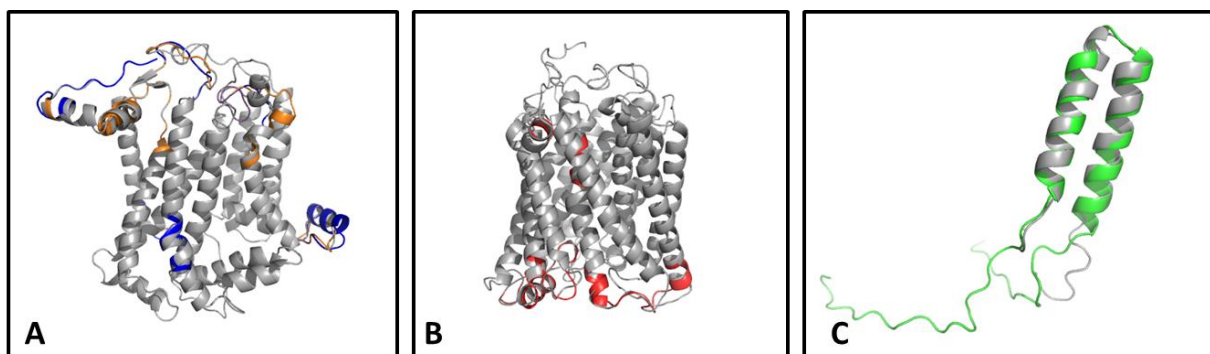
Basierend auf den bisherigen strukturellen Erkenntnissen zum alternativen Komplex III (Abbildung 4.1.) muss allerdings eine differentielle Gruppierung für die in *S. coelicolor* identifizierten alternativen Respirationskomponenten vorgenommen werden. Da es sich bei den identifizierten Genen für zwei Ubichinol-Cytochrom *c* Reduktase-Untereinheiten (SCO7236, SCO7120) und ein Cytochrom *c* Oxidase-Polypeptid (SCO7234) nur um jeweils **eine** Komponente eines am Elektronentransfer

beteiligten Komplex handelt, liegt eher die Vermutung nahe, dass diese bei Bedarf in die respiratorische Atmungskette (SCO7236 und SCO7120 in Komplex III, SCO7234 in Komplex IV) integriert werden können und die Funktion am Elektronentransfer durch Reaktion mit Menachinon und Cytochromen partiell ersetzen kann. Die Komponenten würden somit lediglich eher die Elektronentransfermodule bilden, die durch Assoziation mit den Membranverankerten Modulen von Komplex III und Komplex IV einen alternativen Komplex III bilden. Bekannt ist ein derartiges Phänomen bereits durch die Existenz multipler Rieske/cytb Komplexe innerhalb eines Organismus (Brink *et al.*, 2013). Den Kern des Komplexes bilden ein transmembranes Cytochrom *b* und eine Rieske-Untereinheit.

Rieske/cytb-Komplexe sind in der Lage, mit Chinonen und Cytochromen zu interagieren. Aufgrund ihrer einzigartigen Struktur metabolisieren sie kein exogenes Substrat und sind dadurch ausschließlich am inneren Elektronentransfer beteiligt. Damit können sie in jede beliebige respiratorische Atmungskette integriert werden (Brink *et al.*, 2013).

Bislang war es nicht möglich, eine *bc*<sub>1</sub>-Komplex-Cytochrom *c* Oxidase-Cytochrom *bd* Oxidase Dreifachmutante von *S. coelicolor* zu konstruieren. Damit wird deutlich, dass die neu identifizierten Respirationskomponenten SCO7236, SCO7234 und SCO7120 nicht alleinig die Funktion des *bc*<sub>1</sub>-Komplexes und der terminalen Cytochrom *c* Oxidase komplementieren können. Eine partielle Ersetzung der einzelnen Komponenten scheint deshalb offensichtlich, da für einen fortlaufenden Elektronenfluss wesentliche Elektronenüberträger fehlen würden.

Die Ähnlichkeit der Tertiärstrukturen von SCO7236 und SCO7234 mit analogen Komponenten des konventionellen *bc*<sub>1</sub>-Komplexes bzw. der terminalen Cytochrom *c* Oxidase bestätigt außerdem die letztgenannte Vermutung und verdeutlicht, warum die Funktion potenziell übernommen werden kann (Abbildung 4.2.).



**Abbildung 4.2.:** Alignment der durch Phyre<sup>2</sup> postulierten Tertiärstrukturen der neu identifizierten Atmungskettenkomplexkomponenten SCO7236, SCO7120, SCO7234 und SCO7235 mit SCO2148, SCO2155 und SCO2154. **A.** Alignment der Tertiärstrukturen von SCO2148 (grau), SCO7236 (blau) und SCO7120 (orange). **B.** Alignment der Tertiärstrukturen von SCO2155 (grau) und SCO7234 (rot). **C.** Alignment der Tertiärstrukturen von SCO2154 (grau) und SCO7235 (grün). Sequenzidentitäten sind in allen Analysen in grau dargestellt.

Ein Alignment der Tertiärstrukturen verdeutlicht die hohe Sequenzidentität (grau dargestellt) der verglichenen Aminosäuresequenzen. SCO7236 (blau) und SCO7120 (orange) zeigen lediglich Unterschiede in den *Loop*-Regionen beim strukturellen Vergleich mit SCO2148 (grau). Ein ähnliches Bild zeigt sich beim strukturellen Vergleich von SCO7234 (rot) und SCO2155, die sich ebenfalls fast ausschließlich in der *Loop*-Region unterscheiden. Die durch Phyre<sup>2</sup> ermöglichte Strukturaufklärung gibt allerdings keinen Hinweis über putative gebundene prosthetische Gruppen im Molekül. Dennoch ist anhand der stark konservierten Regionen eindeutig belegt, dass es sich beim jeweiligen Alignment um homologe Proteine handelt, die funktionell ähnlich sind.

Das bedeutet, bei Deletion von SCO2148, SCO2149 des  $bc_1$ -Komplexes und SCO2150, SCO2155 der Cytochrom *c* Oxidase, wäre *S. coelicolor* nach wie vor in der Lage, das Membranpotenzial durch Elektronentransfer über die alternativen Module (SCO7236, SCO7120, SCO7234, SCO7235) aufrecht zu erhalten.

Zu Beginn dieses Diskussionsabschnittes wurde bereits die These aufgestellt, dass Sporen und Myzel sich in der Komposition der aeroben Atmungskettenkomponenten vermutlich unterscheiden. Die Entdeckung der artifizialen Respirationssysteme charakterisierte diese mittels Transkriptstudien als sporenspezifische Analogie zum konventionellen  $bc_1$ -Komplex und bestätigt damit diese These. Transkripte, das alternative Respirationssystem betreffend, konnten ausschließlich in Sporen nachgewiesen werden. Vergleichend dazu liegen Transkripte von Komponenten des konventionellen  $bc_1$ -Komplexes und der terminalen Cytochrom *c* Oxidase sowohl in Sporen als auch Myzel vor (Abbildung 3.13.). Diese Daten sprechen dafür, dass in Sporen und Myzel der Elektronentransfer über ein Respirationssystem mit divergierender Zusammensetzung erfolgt. Die Komplementationsstudien der Mutante COE190 bestätigen diese These: Der Test auf kovalent gebundenes Häm in der Membranfraktion dient als Indiz für die korrekte Assemblierung der Komplex III- und Komplex IV-Untereinheiten in die Membran. Erstaunlicherweise zeigte sich eine Komplementation der deletierten Gene für die Cytochrom *c*  $aa_3$  Oxidase nur in Sporen (Abbildung 3.6.), das heißt die Assemblierung der Komplex III- und Komplex IV-Untereinheiten erfolgt in Abhängigkeit von Myzel und Sporenstadium: Die Bildung der Untereinheiten SCO2153-56 (Cytochrom *c*  $aa_3$  Oxidase) konnten nur in Sporen nachgewiesen werden, wohingegen die Untereinheiten SCO2148-51 des  $bc_1$ -Komplexes nur in Myzel gebildet wurden. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die Existenz von SCO2148-51 im Sporenstadium nicht essentiell ist, um den elektrochemischen Gradienten durch oxidative Phosphorylierung aufrecht zu erhalten und spricht erneut für die Hypothese, dass diese Untereinheiten in Sporen durch die Komponenten des alternativen Respirationssystems partiell ersetzt werden können.

Das bislang postulierte Modell einer verzweigten Atmungskette, die entweder mit der End-Oxidation durch die Cytochrom *c aa*<sub>3</sub> Oxidase oder die End-Oxidation über die Cytochrom *bd* Oxidase endet, erfordert somit eine Erweiterung zum Verständnis des Elektronenflusses über die Respirationskomplexe im Sporenstadium (Abbildung 4.3.): Der Eintrittsweg der Elektronen in die Atmungskette wird durch die Aktivität der NADH-Dehydrogenase, der Succinat-Dehydrogenase, Pyruvat-Dehydrogenase oder auch der Lactat-Dehydrogenase und der ETFAB-Komplex ermöglicht. Die Elektronen werden in den Menachinon-Pool eingespeist und je nach Sauerstoffverfügbarkeit über den *bc*<sub>1</sub>-Komplex oder direkt zur Cytochrom *bd* Oxidase geleitet. Passieren die Elektronen den *bc*<sub>1</sub>-Komplex, könnten die alternativen, sporenspezifischen Respirationskomponenten als Elektronentransfermodule in bestehende Membranverankerungskomponenten eingebaut werden und die Elektronen über diese umleiten. Derzeit ist allerdings unklar, unter welchen Bedingungen die Assemblierung der alternativen Komponenten erfolgt bzw. unter welchen Bedingungen sie am Elektronentransfer beteiligt sind. Eine aktive Teilnahme der artifiziellen Respirationskomponenten bleibt bislang ebenfalls weiter rein spekulativ, da bisher keine enzymatischen Aktivitäten nachgewiesen werden konnten.

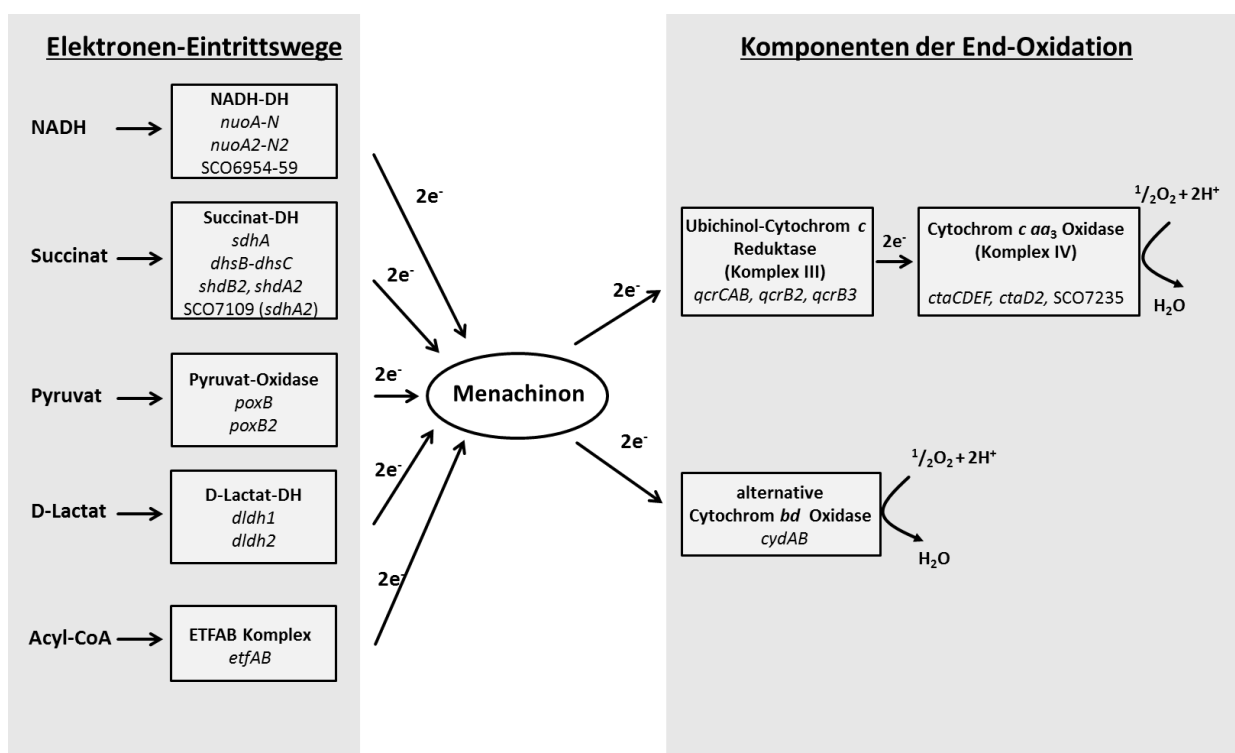


Abbildung 4.3.: Verzweigte Atmungskette in *S. coelicolor* unter Berücksichtigung aller im Genom annotierten Komponenten für den Elektronen-Eintritt in die Atmungskette und Komponenten der Endoxidation. (verändert nach Bott und Niebisch, 2003)

Bei Blick auf die Genanordnung der Gene für die Respirationskomponenten ist anzumerken, dass die Gene des konventionellen *bc*<sub>1</sub>-Komplex bzw. der artifiziellen Komplexkomponenten und die Gene für die Cytochrom *c* Oxidase bzw. das Cytochrom *c* Oxidase-Polypeptid SCO7234 in unmittelbarer

räumlicher Nähe lokalisiert sind. Diese Anordnung ist nicht ungewöhnlich und wird in der Literatur als Indiz für eine Assoziation der Komplexe untereinander beschrieben (Refojo *et al.*, 2010; Yanyushin *et al.*, 2005). Damit wäre für *S. coelicolor* die Möglichkeit gegeben, den Elektronenfluss über ein Respirationssystem zu leiten, das für einen effizienteren Elektronentransfer in supramolekularen Strukturen (Superkomplexen) assoziiert/assembliert ist. Teil III der Diskussion erörtert somit die Möglichkeit zur Bildung eines respiratorischen Superkomplexes im verwendeten Modellorganismus.

### III. Evidenzen für die Existenz eines respiratorischen Superkomplexes – Respirasom in *S. coelicolor*

Die Fähigkeit, über oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) Energie in Form von ATP zu konservieren, ist in Säugetieren, höheren Pflanzen, Pilzen und Bakterien ubiquitär verbreitet. Membranständige respiratorische Enzymkomplexe ermöglichen die Oxidation von Reduktionsäquivalenten in Form von NADH oder FADH<sub>2</sub>. Diese ist gekoppelt an das Pumpen von Protonen in den Interzellularraum bzw. Periplasma. Der daraus resultierende Protonengradient wird von der ATPase (Komplex V) zur ATP-Generierung genutzt. Die bislang gängige Theorie des Fluid-Modells (auch *liquid-state* Modell) beschrieb die respiratorischen Komponenten als voneinander unabhängige Strukturen, die in der Membran eingebettet die Elektronen über mobile, membrangängige *Carrier*, wie Cytochrom *c*, übertragen (Rich, 1984). Dieses Modell leitete sich schrittweise zum „*liquid-state* Modell“ ab. Die Komplexe sind dabei in der Lage, sich frei und durch laterale Diffusion unabhängig voneinander zu bewegen, wobei der Elektronentransfer an diffusionskontrollierte Kollisionen der Komponenten gekoppelt ist (Gupte *et al.*, 1984, 1988, 1988a; Hackenbrock *et al.*, 1986). Mittlerweile konnte von Schägger (2002) auch dieses Modell zum Teil widerlegt werden. Er postulierte das *Random Diffusion Model* (Schägger *et al.*, 2000, Schägger, 2002) wonach respiratorische Enzymkomplexe lediglich Fragmente von größeren funktionellen Einheiten sind, die er als **Respirasom** definiert. In einem Respirasom liegen nach Angaben von Schägger (2002) die respiratorischen Enzymkomplexe als assemblierte Superkomplexe vor. Bislang konnten assemblierte Superkomplexe hauptsächlich zwischen Komplex I und III und Komplex III und IV nachgewiesen werden. Erste Evidenzen zur Existenz von Superkomplexen zwischen Komplex II und III in Mitochondrien konnten in *Saccharomyces cerevisiae* durch Bruel *et al.* (1996) und Rinderherzmitochondrien bestätigt werden.

Die Bildung assemblierter Superkomplexe konnten bereits auch in gramnegativen Bakterien wie *Paracoccus denitrificans* (Berry *et al.*, 1985; Stroh *et al.*, 2004) und *Escherichia coli* (Sousa *et al.*, 2011; 2012) als auch in grampositiven Organismen wie *C. glutamicum*, *M. smegmatis* und *B. subtilis* nachgewiesen werden. 2001 postulierten Niebisch und Bott auf Grundlage des Fehlens zusätzlicher *c*-Typ-Cytochrome in *C. glutamicum* einen direkten Kontakt zwischen Cytochrom *c*<sub>1</sub> und der Cu<sub>A</sub>-Stelle in der Untereinheit II der Cytochrom *aa*<sub>3</sub> Oxidase, was eine direkte Interaktion zwischen *bc*<sub>1</sub> Komplex und Cytochrom *aa*<sub>3</sub> Oxidase vermuten lässt. Präparationen von gereinigten QcrB-*Strep*-Tag-Varianten

zeigten anschließend die Ko-Reinigung von 3 Untereinheiten des  $bc_1$ -Komplexes als auch 4 Untereinheiten der Cytochrom  $aa_3$ -Oxidase. Dass der gereinigte  $bc_1$ - $aa_3$ -Superkomplex nach wie vor über einen funktionsfähigen Elektronentransfer zwischen Cytochrom  $c_1$  und dem  $Cu_A$ -Center der Cytochrom  $aa_3$ -Oxidase verfügt, zeigte die messbare Chinol-Oxidase-Aktivität von 1,5 bis 1,7 U/mg (Niebisch und Bott, 2003).

Für *C. glutamicum* konnte damit eine verzweigte Atmungskette identifiziert werden, die es ermöglicht, die Elektronen von Menachinol über den Cytochrom  $bc_1/aa_3$ -Superkomplex oder die alternative Cytochrom  $bd$  Oxidase zu transferieren. Beide Verzweigungen unterscheiden sich in der Effizienz der Energiekonservierung während die Cytochrom  $bd$  Oxidase mit höherer Sauerstoffaffinität unter Sauerstofflimitierenden Bedingungen verstärkt aktiv ist und nicht als Protonenpumpe fungiert, ist der Cytochrom- $bc_1/aa_3$ -Superkomplex in der Lage, durch Protonenpumpen eine höhere energetische Effizienz zu erzielen.

Superkomplexassemblierungen treten auch in der Atmungskette humanpathogener und klinisch relevanter grampositiver *Actinobacteria* wie *M. tuberculosis* und *M. smegmatis* auf (Black *et al.*, 2014, 2015; Lu *et al.*, 2014, Weinstein *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2015). Dabei gelang es erstmal ein Hybrid-Superkomplex aus Cytochrom  $bcc$  (Komplex III) von *M. tuberculosis* und Cytochrom  $aa_3$ -Oxidase aus *M. smegmatis* zu reinigen, der während der Extraktion und der Reinigung trotz Anwesenheit vom Detergenz DDM stabil vorliegt. Letzteres spricht für eine starke Assoziation beider Komplexe.

Neben dem  $bc_1/aa_3$ -Superkomplex verfügt die Gattung *Mycobacteria* durch die Synthese der alternativen Cytochrom  $bd$  Oxidase ebenfalls über eine verzweigte Atmungskette und kann Energie durch Elektronentransfer vom Menachinon-Pool über den  $bc_1/aa_3$ -Superkomplex oder die alternative Cytochrom  $bd$  Oxidase generieren. Shi *et al.* (2005) konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass Proteine des  $bc_1/aa_3$ -Superkomplexes bei Hypoxie runterreguliert werden, wohingegen die Expression der alternativen Cytochrom  $bd$  Oxidase induziert wurde. Fehlt allerdings der  $bc_1/aa_3$ -Superkomplex zeigt *M. smegmatis* ein verlangsamtes Wachstum unter aeroben Bedingungen (Matoso *et al.*, 2005). Damit wird die Relevanz des  $bc_1/aa_3$ -Superkomplexes beim mikrobiellen Wachstum unter aeroben Bedingungen deutlich.

Dass assemblierte Superkomplexe nicht nur als  $bc_1/aa_3$  Superkomplex oder Komplex I und III-Assoziation vorliegen müssen, lässt sich am Beispiel der Atmungskettenkomplexe vom grampositiven Sporenbildner *B. subtilis* verdeutlichen. 2012 postulierten Montes de Oca *et al.* erstmals eine supramolekulare Organisation der aeroben Atmungskette von *B. subtilis*. Durch CNE (*Clear Native Electrophoresis*), BN-PAGE (*Blue native PAGE*) und anschließender Massenspektrometrie identifizierten sie gleich zwei Superkomplexorganisationen: Komplex  $b_6c$  (Komplex III) konnte als Superkomplex mit membrangebundenem Cytochrom  $c_{550}$  und der ATP-Synthase nachgewiesen

werden, Komplex II (Succinat-Dehydrogenase) zeigte eine starke Assoziation mit der respiratorischen Nitratreduktase. Die NADH-Dehydrogenase konnte lediglich als einzelnes Protein, was nicht mit den anderen Komplexen assoziiert ist, detektiert werden. Auf Grundlage der Studien von Montes de Oca *et al.* (2012) war es Sousa *et al.* (2013) möglich, die Stöchiometrien der assemblierten Superkomplexe zu ermitteln, woraus sie die Bildung eines Megakomplexes in der Membran ableiten konnten.

Die Vielzahl an Modellen konstatiert, dass die Organisation der Atmungskettenkomplexe in Superkomplexen sowohl in Eukaryoten als auch Prokaryoten weit verbreitet ist und ihnen eine fundamentale Rolle beim Elektronentransfer über die aerobe Atmungskette zugesprochen werden muss. Nahezu allen aufgelisteten Organismen (*Paracoccus*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Bacillus*) gemein, ist das Fehlen einer membrangängigen Cytochrom *c*-Einheit, was als mobiler Elektronen-Carrier zwischen Komplex III und Komplex IV agiert. Somit erscheint die Bildung eines Superkomplexes beider Atmungskettenkomponenten plausibel, um einen direkten Elektronentransfer zu ermöglichen. Die Tatsache, dass auch in der aeroben Atmungskette des in dieser Dissertation untersuchten Modellorganismus *S. coelicolor* A3(2) kein lösliches Cytochrom *c* vorzufinden ist, stützt die Vermutung zur Bildung eines assemblierten Superkomplexes.

Darüberhinaus ist aus bisherigen Studien zur Superkomplexbildung eine veränderte Membranzusammensetzung bekannt (Arias-Cartin *et al.*, 2012): Cardiolipin konnte als Schlüsselkomponente bei der Energieübertragung in Membranen identifiziert werden. Als *non-bilayer* anionisches Phospholipid bindet es vorwiegend an Kontaktflächen der Komplex-Untereinheiten und fungiert als flexible amphipatische Verknüpfung und ermöglicht dadurch die Stabilisierung der Superkomplexe. Mit einem Anteil von 25 % an der Gesamt-Phospholipid-Menge sind auch die Membranen von *Bacillus*-Sporen reich an Cardiolipin. Die Anreicherung von Cardiolipin ist auch für Streptomyceten beschrieben (Hoischen *et al.*, 1997), bislang ist allerdings nichts über das Vorkommen von Cardiolipin in der Membran von *S. coelicolor* bekannt. Sandoval-Calderón *et al.* (2009) postulierten allerdings die Präsenz einer Cardiolipin-Synthase in *S. coelicolor*, deren Funktionalität während der Morphogenese nachgewiesen wurde (Jyothikumar *et al.*, 2012).

Meinem Wissen nach existieren bislang keine Studien über Superkomplexbildung in Streptomyceten, da auch nur wenig zur Atmungskette in Streptomyceten publiziert wurde. Evidenzen zur Superkomplexbildung in *Streptomyces* lassen aber eigene Studien während der Dissertation erkennen.

Ergebnisse der vorliegenden Dissertation postulieren einen klaren Zusammenhang zwischen der aeroben Atmungskette und der Nar-vermittelten Nitratreduktion im Sporenstadium, wonach der Elektronentransfer vom Menachinon bis zur End-Oxidase bzw. Nar-Enzym über einen bisher unbekanntem Verzweigungsweg erfolgt. Denn nach wie vor ist nicht klar, ob die Nitratreduktase die Elektronen direkt vom Menachinol bezieht oder, was energetisch durchaus möglich ist, eine Komponente der aeroben Atmungskette zwischengeschaltet ist. Letzteres erscheint denkbar, da das Gen SCO2152 (Cytochrom *c*-bindende Untereinheit) im Operon des *bc*<sub>1</sub>-Komplexes zumindest als notwendige/erforderliche Komponente für die Nitratreduktaseaktivität in Sporen identifiziert werden konnte. Ein Vergleich mit den Daten von Montes de Oca *et al.* (2012) und Sousa *et al.* (2013) lassen außerdem eine Assoziation des Komplex II mit der Nitratreduktase in *Streptomyces coelicolor* vermuten.

Um eine mögliche Superkomplexassemblierung in *S. coelicolor* zu verifizieren, wurden im Zuge der vorliegenden Dissertation durch Nativ-PAGE komparative Komplex II-, Komplex IV- und Nar-Aktivitäten in Sporen- und Myzelmembranfraktionen massenspektrometrisch analysiert (Abbildung 8.12, Tabelle 8.2. + 8.3., Anhang, die massenspektrometrische Analyse wurde freundlicherweise von Dr. Ch. Ihling, Pharmazie, MLU Halle-Wittenberg durchgeführt).

Die Daten der massenspektrometrischen Analyse der Komplex II-Aktivitätsbanden implizieren, dass sowohl für das Sporenstadium als auch das Myzelstadium von *S. coelicolor* Superkomplexassemblierungen in der Membran möglich sind. Interessanterweise zeigen sich eindeutige Unterschiede hinsichtlich der gefundenen Peptide in Sporen und Myzel. Nur in Sporen scheinen die artifiziellen Respirationskomponenten (SCO7236, SCO7234) an der Assemblierung eines Superkomplexes beteiligt zu sein und könnten somit in den Elektronentransport involviert sein. Das bestätigt die im Teil II erörterte Hypothese einer differentiellen Organisation der respiratorischen Komplexe in Sporen und Myzel.

Vergleicht man die Daten der massenspektrometrischen Analyse mit den publizierten Daten von Sousa *et al.* (2013), so zeigt sich, basierend auf der Anzahl der identifizierten Peptide, eine Superkomplexassemblierung zwischen der Succinat-Dehydrogenase (SDH) und einem Nar-Enzym sowohl in Sporen als auch in Myzel. Durch Superkomplexbildung des Nar-Enzyms mit der SDH wäre für *S. coelicolor* direkt die Kopplung der Nitratreduktion an die Menachinol-Produktion durch SDH möglich, vermutlich um überschüssige Reduktionsenergie zu eliminieren (Richardson, 2000).

In Sporen wurden interessanterweise die Peptide von gleich 2 synthetisierten Succinat-Dehydrogenasen gefunden, die mit dem Nar-Enzym assoziiert sein könnten. Erstaunlicherweise konnten zudem hauptsächlich Peptide des Nar3-Enzyms in Sporen und einige Peptide des Nar2-Enzyms detektiert werden. Dr. M. Fischer zeigte bereits während seiner Dissertation, dass Nar2 auch



in Sporen unter hypoxischen Bedingungen induziert sein kann. Dass kaum Peptide vom Nar1-Enzym vorliegen lässt sich mit der durch Western Blot-Analysen nachgewiesenen geringen Menge an Enzym erklären. Zusätzlich wurden Peptide der NADH-Dehydrogenase, Ubichinol-Cytochrom *c* Reduktase (Komplex III) und der terminalen Cytochrom *c* Oxidase sowie der ATPase in der isolierten Bande identifiziert. Damit liegt die Assemblierung zu einem Megakomplex, wie es bereits für *B. subtilis* beschrieben ist, nahe (Montes de Oca *et al.*, 2010; Sousa *et al.*, 2013). Die komparative Färbung der Cytochrom *c* Oxidase bestätigt die Bildung eines Superkomplexes mit Assoziation aller fünf Komponenten (SDH, Nar-Enzym, Ubichinol-Cytochrom *c* Reduktase, Cytochrom *c* Oxidase, ATPase) (Tabelle 8.2., Anhang, eine detaillierte Auflistung der Peptide ist der Tabelle 8.3. im Anhang zu entnehmen).

Für Myzel zeichnet sich ein annähernd gleiches Bild ab. Der Nachweis von Nar2-Peptiden und Peptiden zweier SDHs in der isolierten Bande ist ein Indiz für die Formation als Superkomplex. Desweiteren scheint den Daten der Massenspektrometrie zufolge auch hier die Ubichinol-Cytochrom *c* Reduktase, die Cytochrom *c*  $aa_3$  Oxidase und die ATPase an der Assoziation beteiligt zu sein.

Derzeit ist aber davon auszugehen, dass der  $bc_1$ -Komplex (Ubichinol-Cytochrom *c* Reduktase) und die Cytochrom *c*  $aa_3$  Oxidase durch das Fehlen von Cytochrom *c* als mobiler *Carrier* einen Superkomplex mit konstanter Assoziation bilden, die SDH, das Nar-Enzym und der  $bc_1$ - $aa_3$ -Komplex zusammen dagegen nur temporär einen Superkomplex bilden.

Bei den derzeit aufgeführten Gesichtspunkten scheint daher eine Superkomplexassemblierung in der Membran von *S. coelicolor* relativ wahrscheinlich. Liegen die aeroben Respirationskomponenten und die Nitratreduktase als Superkomplex vor, könnte dieser die nachfolgenden der Funktionen übernehmen: Die Bildung von Superkomplexen trägt zunächst zur Stabilisierung von Einzelkomplexen bei. Desweiteren werden die Wege der Elektronentranslokation zum Ubichinon/Menachinon verkürzt, was der Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies vorbeugt (Kotlyar *et al.*, 1990; Acin-Perez und Enriquez, 2013). Durch Reduktion der Diffusionsstrecken und Diffusionszeiten („*catalytic enhancement*“) steigt somit auch die Transfereffizienz (Genova *et al.*, 2003; Acin-Perez und Enriquez, 2013). Als weiterer funktioneller Aspekt gilt „*substrate channeling*“ (Schägger, 2002). Dabei werden die Intermediate direkt zwischen den aktiven Zentren zweier Enzyme weitergeleitet. Substratmoleküle, wie Chinol und Cytochrom *c*, sind örtlich gebunden, so dass die Reaktion unabhängig von der Menge an Molekülen im Substrat-Pool ist. Boumanns *et al.* (1998) postulierten angesichts der Abwesenheit eines Cytochrom *c* Pools, wie es für *S. coelicolor* ebenfalls der Fall ist, *substrate channeling* in *S. cerevisiae*.

Mögliche Superkomplexassemblierungen in *S. coelicolor* könnten noch über Ko-Migration in BN-PAGE und Ko-Reinigungen mit Sucrose-Gradienten verifiziert werden, um die aufgeführten Hypothesen zu bestätigen. Die Organisation in Superkomplexen ermöglicht letztendlich den Elektronentransfer über drei potentielle Wege in Abhängigkeit der verfügbaren terminalen Elektronenakzeptoren.

**1. Superkomplex Succinat-Dehydrogenase +Komplex III + Komplex IV**

**2. Superkomplex Succinat-Dehydrogenase + Nar-Enzym**

**3. Superkomplex/Assoziation Komplex III + Nar-Enzym**

Angesichts der Datenlage und der aufgeführten Argumentationsstruktur für einen assemblierten Superkomplex können wir derzeit davon ausgehen, dass die Membranzusammensetzung von *S. coelicolor* temporäre und strukturell permanente Superkomplexassemblierungen der aeroben Respirationssysteme untereinander **und** in Verbindung/Assoziation mit den Nar-Enzymen beinhaltet. Dieses Respirationssystem bildet damit eine neue, bislang unbekannt Organisation von aeroben und anaeroben Respirationssystemen, die die direkte Kopplung der aeroben Atmung mit der anaeroben Nitratatmung ermöglicht. Weiterführende Arbeiten sollten somit auf die Untersuchung dieser direkten Kopplung abzielen.

**4.2. Putative Regulationsmechanismen des aeroben Respirationssystems in Assoziation mit anaerober Nitratrespiration bei *S. coelicolor***

Die Regulationsebenen von aeroben Respirationssystemen sowie der anaeroben Atmung mit Nitrat in Abhängigkeit des verfügbaren Sauerstoffpartialdrucks sind bislang vor allem im gram-negativen Bakterium *E. coli* und dem gram-positiven Sporenbildner *B. subtilis* weitgehend untersucht. In *Streptomyces* dagegen sind die Regulationsebenen der aeroben Atmung und anaeroben Atmung mit Nitrat in den verschiedenen Lebenszyklusphasen noch relativ wenig erforscht. Auf Grundlage der bisher diskutierten Aspekte zur aeroben und anaeroben Atmung mit Nitrat bietet sich daher eine Reflexion von divergenten Regulationsebenen an.

Zu Beginn steht in jedem Fall die Sensierung von Sauerstoff, der je nach Verfügbarkeit unter aeroben Bedingungen als terminaler Elektronenakzeptor eingesetzt wird und damit indirekt die Expression und Synthese der terminalen Oxidasen reguliert. Ist Sauerstoff verfügbar unterliegt die Expression der Gene für die Cytochrom *bd*-Oxidase (*cydAB*) und die *o*-Oxidase (*cyoABCDE*) aus *E. coli* der Kontrolle des ArcAB-Systems und von FNR, wobei ArcA als indirekter Sauerstoffsensoren durch Bindung an den membrangebundenen Sensor ArcB und FNR als direkter Sauerstoffsensoren fungiert. Die

Aktivität beider Transkriptionsfaktoren wird über den Sauerstoffverbrauch der terminalen Oxidasen reguliert.

In der Abwesenheit von Sauerstoff sensiert ArcB von *E. coli* den Redoxstatus der Elektronentransportkette durch Autophosphorylierung (Cotter *et al.*, 1997; Bai *et al.*, 2014). Als Folge wird gebundenes ArcA ebenfalls phosphoryliert und bildet durch Oligomerisierung ein Octamer, das als Transkriptionsfaktor die Transkription der *cydAB*-Gene induziert und gleichzeitig die Expression der Gene der Cytochrom *o* Oxidase inhibiert (Bai *et al.*, 2014).

FNR sensiert in *E. coli* durch sein 4Fe-4S-Cluster Sauerstoff dagegen direkt im Zytoplasma. Die N-terminale Sensor-Domäne trägt vier essentielle Cystein-Reste für die Bildung eines Dimers bei Sauerstoffabwesenheit. Das 4Fe-4S-Cluster reagiert mit Sauerstoff, was zur Konformationsänderung von FNR führt und die DNA-Bindung an Zielgene verhindert. Unter sauerstofflimitierenden Bedingungen bewirkt FNR damit die Repression von *cydAB* (Cytochrom *bd* Oxidase) und *cyoABCDE* (Cytochrom *o* Oxidase) (Bai *et al.*, 2014). FNR kann zusätzlich als Transkriptionsregulator die Expression von ArcA unter anaeroben Bedingungen regulieren.

In *Streptomyces* wird der Redoxstatus der Zelle von Rex (*redox sensing repressor*) erfasst. Dieser bindet an die Operator-Sequenz ROP, die stromaufwärts von respiratorischen Genen gelegen ist (*cydABCD* und *rex-hemACD*-Operon) (Brekasis und Paget, 2003). Die DNA-bindende Aktivität von Rex selber wird durch das Redoxgleichgewicht von NADH/NAD<sup>+</sup> kontrolliert: NADH inhibiert die DNA-Bindeaktivität von Rex während NAD<sup>+</sup> mit NADH um die Bindung an Rex konkurriert. NADH wird durch Sauerstoff über die aerob induzierte Elektronentransportkette wieder reoxidiert. Der sich aufbauende elektrochemische Gradient wird anschließend zur Generierung von ATP genutzt (Brekasis und Paget, 2003).

Die in der vorliegenden Dissertation erzielten Ergebnisse zu den neu identifizierten sporenspezifischen Respirationskomponenten (SCO7236, SCO7234, SCO7120) deuten darauf hin, dass *S. coelicolor* die Komposition der Atmungskomplexe III und IV in Abhängigkeit des Entwicklungsstadiums durch die Organisation in Modulen variieren kann. Es scheint offensichtlich, dass die Expression der sporenspezifischen Komplexkomponenten (SCO7236, SCO7234, SCO7210) dem gleichen Regulationsmechanismus über das Rex-System unterliegen könnte und somit je nach verfügbarem Sauerstoffpartialdruck die Expression der neu identifizierten Gene induziert wird. *S. coelicolor* wäre damit in der Lage, die Elektronen über die neu identifizierten Komponenten auf den terminalen Elektronenakzeptor zu transferieren und die Energiekonservierung über die Elektronentransportkette den Lebenszyklusphasen und damit dem Substratangebot anzupassen.

Steht Sauerstoff durch Auftreten hypoxischer bzw. sauerstofflimitierender Bedingungen nicht länger als terminaler Elektronenakzeptor zur Verfügung, kann *S. coelicolor* alternative Elektronenakzeptoren

wie Nitrat nutzen, um das Membranpotential aufrecht zu erhalten. Die Nar-vermittelte Nitratreduktion ist in allen Lebenszyklusphasen existent und wird an die Energiekonservierung gekoppelt. Die Untersuchung einer SCO2150-Transposon-Mutante (Cytochrom *c* bindende Untereinheit im *bc*<sub>1</sub>-Komplex, Kapitel 3.2.) zeigt dabei, dass die Regulation der Nitratreduktion vor allem in Sporen eng mit der Regulation und Expression der aeroben Atmungskomplexkomponenten gekoppelt ist. Dass Sporen von *S. coelicolor* für einen abrupten Switch von aerober zur anaeroben Atmung mit Nitrat vorbereitet sind, zeigen die permanente Präsenz des Nar1-Enzyms in Sporen sowie der Nachweis von *narG1*-mRNA in Transkriptionsanalysen in dieser Arbeit. Das Nar1-Enzym selber ist nicht durch Sauerstoff hemmbar und ist auch unter aeroben Bedingungen durch Western Blot-Hybridisierung in Sporen nachweisbar, allerdings ist es nur unter anaeroben Bedingungen aktiv. Die Elektronen folgen somit, wenn Nitrat in Sporen als Elektronenakzeptor zur Verfügung steht, dem Weg von der NADH-Dehydrogenase bzw. Succinat-Dehydrogenase in den Menachinon-Pool. Von diesem können die Elektronen zum einen direkt auf den *bc*<sub>1</sub>-Komplex und unter Ausschluss der terminalen Oxidase auf Nar1 übertragen werden, oder vom Menachinon-Pool direkt auf Nar1 transferiert werden. Die Assemblierung von Komplex II und Nar1 oder Komplex II, Komplex III und Nar1 in Superkomplexen verringert dabei die Elektronentransportwege und erhöht deren Effizienz.

Die Regulation der Aktivität von Nar1 beruhte bislang überwiegend auf Spekulation. Experimentelle Ansätze der vorliegenden Dissertation und Daten der *Streptomyces*-Gruppe zeigen einen direkten Einfluss des *bc*<sub>1</sub>-Komplexes auf die Aktivität von Nar1 (Kapitel 1 des Ergebnisteils). Bei Funktionsverlust der Cytochrom *c*-bindenden Untereinheit, was einhergeht mit der gestörten Assemblierung des *bc*<sub>1</sub>-Komplexes in die Membran, wird Nar1 zwar nach wie vor gebildet, ist allerdings nicht mehr aktiv (Abbildung 3.8.). Die fehlerhafte Assemblierung verhindert die Formation der Komplex-Komponenten und des Nar1-Enzyms als Superkomplex. Das könnte vermutlich zu einem verminderten Elektronentransport führen. Eine potenzielle regulatorisch relevante Signalweiterleitung zu Nar1 wäre dadurch ebenfalls beeinträchtigt.

Ein weiterer regulatorischer Ansatzpunkt könnte der verfügbare NADH-Pool sein, der das Signal für die Nar1-Aktivität liefert. Das würde bedeuten, dass der Überschuss an NAD<sup>+</sup> unter aeroben Bedingungen die Aktivität von Nar1 hemmen kann. Bei einem *Switch* zu anaeroben Bedingungen verschiebt sich das Redoxgleichgewicht zugunsten von NADH. Das hat zur Folge, dass Nar1 nicht länger gehemmt ist und die Reduktion von Nitrat zu Nitrit katalysieren kann. Letzteres wird an die Energiekonservierung gekoppelt. Eine enzymatische Aktivierung von Nar1 wäre auch über Autophosphorylierung möglich. Die Elektronentransferkomponente NarH trägt eine Phosphorylierungsstelle am Tyr288, deren chemische Modifikation die Aktivität von Nar1 bedingen könnte (M. Bibb, persönliche Mitteilung). Weiterhin ist denkbar, dass der Verlust der Nar1-Aktivität auf gestörte Synthese oder Einbaus des Molybdän-Kofaktors zurückzuführen ist.

Im Myzelstadium nutzt *S. coelicolor* bei Sauerstoffanwesenheit ebenfalls aerobe Respirationssysteme, um Energie über eine Elektronentransportkette zu konservieren. Unter Einbezug der bisherigen Ergebnisse (Transkriptionsdaten, Kapitel 3.4.) ist davon auszugehen, dass *S. coelicolor* im Myzelstadium lediglich das konventionelle aerobe Respirationssystem synthetisiert und die Expression der aeroben Respirationsgene, wie auch für Sporen vermutet, durch die Aktivität von Rex reguliert wird.

Unter sauerstofflimitierenden Bedingungen nutzt *S. coelicolor* Nitrat als Elektronenakzeptor, was durch die Aktivität des Nar2-Respirationssystems zu Nitrit reduziert werden kann.

Die Regulation von Nar2 ist im Gegensatz zu Nar1 direkt sauerstoffabhängig und die Bildung nicht nur auf das Myzelstadium beschränkt sondern auch in hypoxisch inkubierten Sporen induzierbar (Dissertation Dr. M. Fischer, 2014). Die Aktivität von Nar2 ist sowohl in Sporen als auch Myzel dabei nicht direkt an Komplex III und Komplex IV der aeroben Atmungskette gekoppelt, dennoch ist nach derzeitigen Erkenntnissen davon auszugehen, dass Nar2, Komplex II, Komplex III und Komplex IV in Superkomplexen organisiert und assoziiert sind (Daten der massenspektrometrischen Analyse, Abbildung 8.12., Tabelle 8.2., Anhang). Die Tatsache, dass Nar2 die Elektronen scheinbar direkt vom Menachinon-Pool bezieht, die durch die Succinat-Dehydrogenase bzw. Komplex I zuvor eingespeist werden, ist ein Indiz für die eine Superkomplexassemblierung zwischen Nar2-Enzym und Succinat-Dehydrogenase bzw. Komplex I. Eigene Daten und Daten der *Streptomyces*-Arbeitsgruppe liefern außerdem erste Ansätze, dass die Bildung und Aktivität von Nar2 zwei regulatorischen Einheiten unterliegt: zum einen ist die Nar2-Aktivität direkt abhängig vom NarK2-vermittelten Nitrattransport in die Zelle und zum anderen vermutlich von der Sensierungsaktivität von SCO0212. Eine zweite Regulationsebene bildet das NarXL-Zweikomponenten-System. Im Folgenden werden die Mechanismen beider identifizierter Regulationsmechanismen kurz näher erläutert.

Die Nar2-Reduktion in Myzel ist direkt gekoppelt an den Nar2-spezifischen Nitrat-Transporter NarK2. Für *E. coli* NarK2 konnte gezeigt werden, dass der Transportmechanismus durch Sauerstoff gehemmt wird. Eine mögliche Erklärung für die Hemmung durch Sauerstoff ist die Tatsache, dass es thermodynamisch günstiger ist, die Elektronen direkt auf den Komplex III der aeroben Atmungskette weiterzuleiten. Damit wäre die Nar-Aktivität durch fehlenden Elektronenfluss gehemmt. Ein möglicher sauerstoffabhängiger Transportmechanismus für Nitrat kann für *S. coelicolor* derzeit nur postuliert werden. Sohaskey (2005) beschrieben, dass die Nitratreduktion durch die Kontrolle von Transport von Nitrat durch NarK2 reguliert wird. NarK2 sensiert den Redoxstatus der Zelle durch Kontrolle des Elektronenflusses zur Cytochrom Oxidase und reguliert darüber seine Aktivität. Folglich wird Nitrat unter reduzierenden Bedingungen transportiert und der Transport bei oxidierenden Bedingungen gehemmt (Sohaskey, 2005). Im Falle eines sauerstoffabhängigen

Transportmechanismus ist eine direkte Sauerstoffsensierung durch das Genprodukt von SCO0212 denkbar, das in dieser Dissertation als putatives Hämerythrin identifiziert wurde. Eine direkte Assoziation mit dem NarK2-vermittelten Transport liegt aufgrund der Bildung einer gemeinsamen *narK2-SCO0212* mRNA nahe. Hämerythrine sind sauerstoffbindende Proteine, die entgegen ihrer Namensgebung kein Häm als prosthetische Gruppe tragen (*non heme*) sondern ein Fe-S-Cluster gebunden haben (French *et al.*, 2007). Neben der Involvierung in der Detoxifizierung können sie Sauerstoff durch Bindung im aktiven Zentrum direkt im Cytoplasma sensieren. Damit würde das Genprodukt von SCO0212 dieselbe Funktion wie DcrH aus *Desulfovibrio vulgaris* übernehmen (Xiong *et al.*, 2000) und nach Initiation der Transkription von *narK2* und SCO0212 als cytoplasmatisches Protein Sauerstoff direkt sensieren. Ob die Expression der Transkriptionseinheit durch ein Signal initiiert wird, ist bislang noch nicht bekannt. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt gehen wir von einer konstitutiven Expression aus. Es ist denkbar, dass die Sauerstoffsensierung durch SCO0212 nachträglich die Aktivität von NarK2 und die Synthese von Nar2 reguliert, so dass einerseits der Nitrat-Transport blockiert ist und Nar2 tatsächlich erst bei Sauerstofflimitierung gebildet wird. Diese Hypothese würde durch die experimentelle Analyse einer SCO0212-Disruptions- oder *Knockout*-Mutante bestätigt werden können, was während dieser Dissertation bereits begonnen wurde. Weitere experimentelle Ansätze müssen allerdings noch durchgeführt werden.

Die zweite Regulationsebene umfasst die Beteiligung der als NarX und NarL annotierten Gene in *S. coelicolor* an der Nar2-vermittelten Nitratreduktion gezeigt werden. Eine Gendisruption im putativen Nitratsensor-Protein NarX führt zum Totalausfall der Nar2-Nitratreduktion, da NarX Nar2-transkriptionell positiv reguliert (Abbildung 3.18., Transkriptionsanalysen).

Trotz des regulatorischen Einflusses auf die Nar2-Synthese ist bis zum jetzigen Zeitpunkt die Funktion beider Gene in *S. coelicolor* nicht eindeutig nachgewiesen und es bleibt offen, ob sie die Funktion als Nitratsensor-Einheit wie in *E. coli* ausüben können.

Neben den bereits beschriebenen Regulationsmechanismen ist eine gemeinsame Regulation der Nar-Enzyme über ResD/ResE und das Zweikomponentensystem DosR-DosS/DosT ebenfalls denkbar. Für beide regulatorischen Komponenten sind Gene mit strukturellen Ähnlichkeiten annotiert (van Keulen *et al.*, 2007).

Das DosR-DosS/DosT-System (*direct oxygen sensor*) ist für grampositive Organismen bislang vor allem bei *M. tuberculosis* charakterisiert. Bei Anwesenheit von Sauerstoff wird das Eisen seines Häm-Kofaktors oxidiert, wodurch DosS und DosT direkt als Sauerstoffsensor wirken. In der Folge wird die katalytische Aktivität der Phosphodiesterase gehemmt. In der Abwesenheit von Sauerstoff kann DosR als *response regulator* mit den Sensorkinasen interagieren und wird phosphoryliert, was die Bindung an die DNA als Transkriptionsfaktor ermöglicht (Unden *et al.*, 2010; Sivaramakrishnan und Ortiz de

Montellano, 2013). Derzeit ist die Aktivität des DosR-DosS/DosT für *S. coelicolor* allerdings noch nicht nachgewiesen und sollte durch experimentelle Ansätze untersucht werden.

Als indirekter Sauerstoffsensor wirkt dagegen das Res-System, das für *B. subtilis* beschrieben ist. Die Veränderung des Redoxstatus bei Aktivität/bzw. Inaktivität der terminalen Oxidasen ist vermutlich der Impulsgeber für die Aktivität von ResD. Phosphoryliertes ResD induziert die Genexpression für FNR (Fumarat-Nitrat-Regulator), der die Expression des *nar*-Operons und *narK2* initiiert (Uden *et al.*, 2010). Weiterhin reguliert ResD die Transkription des *cydABCD* Operon positiv, sein Gegenspieler CcpA (*carbon catabolite regulator protein*) reprimiert die Transkription dieser Gene (Puri-Taneja *et al.*, 2007). Für *S. coelicolor* muss es allerdings einen anderen Mechanismus geben, da Genomanalysen bisher kein FNR identifizieren konnten.

Die Nar3-bedingte Nitratreduktion ist nach aktuellen Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe wie Nar2 unter hypoxischen Bedingungen induziert.

Die Regulationsprozesse in der substratlimitierten stationären Phase, die die Induktionsbedingungen für Nar3 definieren, beinhalten Phosphat als regulatorisches Agens, was bereits in Konzentrationen von 20 mM die Bildung von Nar3 hemmt (Abbildung 3.24.). Demgegenüber steht die Synthese eines Undecylprodigiosin/Streptorubin B-Gemisches, was in unserem etablierten Untersuchungssystem durch Phosphat induziert zu sein scheint.

Das Phosphatlevel wird in *Streptomyces* durch das PhoR/P-System sensiert (Martin, 2004). In *E. coli* und *B. subtilis* können dem Phosphat-Regulon mehr als 30 Gene zugeordnet werden. Unter Phosphatmangel wird die Sensorkinase PhoR autophosphoryliert. In der Konsequenz wird auch das dephosphorylierte PhoP phosphoryliert, das in seinem aktivierten Zustand die Expression von über 30 Genen induziert, darunter die Biosynthese-Gene zur Polyketidsynthese von Undecylprodigiosin (RED) (Martin, 2004). Eine Regulation anderer bakterieller respiratorischer Nitratreduktasen durch Phosphat ist nach meinen Kenntnissen bislang nicht beschrieben. Phosphat hemmt in unserem Untersuchungssystem die Translation der *narG3*-mRNA, und reguliert Nar3 dadurch post-translationell. Die Transkription der *narG3*-mRNA selber bleibt dagegen unbeeinflusst. Unter diesem Gesichtspunkt erscheint es möglich, dass Phosphat regulatorisch auf tRNA-Ebene wirken könnte und damit die Translation der *nar3*-mRNA hemmt. Der Wirkmechanismus von Phosphat ist aber experimentell bislang nur ansatzweise untersucht. Weitere Analysen sind daher nötig, um diesen Aspekte zu bestätigen.

Die bereits identifizierten als auch die postulierten Regulationsmechanismen der aeroben und anaeroben Atmung mit Nitratzeigen, dass im verwendeten Modellorganismus *S. coelicolor* ein bisher

unbekanntes, neues Respirationssystem existiert, das nur ansatzweise mit bereits untersuchten Systemen in *B. subtilis*, *M. tuberculosis* und *C. glutamicum* vergleichbar ist.

Die erhobenen Daten in dieser Dissertation zählen zusammen mit den Daten von Hopkins *et al.* (2013) seit den ersten Studien zur aeroben Atmungskette von Niederpruem und Hacket (1959, 1961) zu den, nach meinem Wissen, ersten experimentellen Untersuchungen, die die Struktur und Funktionsweise der aeroben Respirationskomponenten in Verbindung mit der anaeroben Atmung aufklären. Unter diesem Aspekt ist es notwendig, auf Grundlage der bislang erhobenen Daten weitere Untersuchungen durchzuführen, um ein bislang nicht identifiziertes oder beschriebenes aerobes Respirationssystem zu charakterisieren und phylogenetisch einzuordnen. Für dieses hat sich durch die experimentellen Vorarbeiten in dieser Arbeit *S. coelicolor* als Untersuchungsmodell/Modellorganismus als besonders geeignet herausgestellt.



## 5 Zusammenfassung

Die vorliegende Dissertation greift zwei bislang wenig untersuchte Aspekte des Energiestoffwechsels des obligat aeroben Modellorganismus *S. coelicolor* auf: die Zusammensetzung und Regulation des aeroben und anaeroben Respirationssystems.

**Zum einen ist es gelungen, das anaerobe Respirationssystem durch biochemische Untersuchungen der drei respiratorischen Nitratreduktasen (Nar1, Nar2, Nar3) unter Verwendung neuer experimenteller Ansätze näher zu charakterisieren:**

- Nar1 konnte dabei als sporenspezifische Nitratreduktase identifiziert werden. Es liegt in einem *ready-to-use*-Modus vor und zeigt eine sauerstoffabhängige Regulation.
- Nar2 konnte als myzelspezifische Nitratreduktase identifiziert werden. Seine Synthese wird unter hypoxischen Bedingungen induziert und unterliegt der Regulation durch die NarX-Histidinkinase des möglichen NarXL-Zweikomponentensystems. Eine Deletion von *narX* führt zum Verlust der Nar2-Proteinsynthese.
- Die Nitratreduktion in Myzel ist abhängig vom Nar2-spezifischen Nitrat/Nitrit-Antiporter NarK2. Dieser bildet ein Operon mit SCO0212, was als putatives Hämerythrin identifiziert werden konnte und möglicherweise als Sauerstoffsensor aktiv ist.
- Die Synthese des Nar3-Enzyms ist abhängig von der Substratlimitierung bei Eintritt in die stationäre Phase. Dabei scheint die Synthese von Nar3 unter hypoxischen Bedingungen zu erfolgen, die Nar3-vermittelte Nitratreduktion findet jedoch nur unter anaeroben Bedingungen statt.
- Phosphat hemmt die Proteinsynthese von Nar3, während die Transkription von *narG3* unbeeinflusst bleibt. Gleichzeitig induziert Phosphat in unserem Untersuchungssystem die Bildung eines Prodigiosin-Gemisches (RED-Antibiotika) aus Undecylprodigiosin und Streptorubin B. Die Nar3-vermittelte Nitratreduktion zeigt damit eine inverse Korrelation zur RED-Antibiotikasythese.
- Die Transkription aller drei *nar*-Operone scheint bisher konstitutiv zu erfolgen, sie wird weder durch Sauerstoff noch durch Nitrat reguliert. Alle Nar-Enzyme sind dagegen *in vivo* nur anaerob aktiv und durch Western Blot-Hybridisierungen im jeweiligen Entwicklungsstadium nachweisbar.

**Die Untersuchungen zum Nar-System unter Einbezug der Cytochrom-Oxidase-Mutanten in *S. coelicolor* ermöglichte gleichzeitig die Charakterisierung des aeroben Respirationssystems und offenbarte eine Zweigstelle beider Stoffwechselwege:**

1. Eine Mutante ohne  $bc_1$ -Komplex (SCO2148-50) und terminaler Cytochrom  $c aa_3$  Oxidase (SCO2151, SCO2153-56) zeigt im Sporenstadium keine Nar-Aktivität, obwohl das Nar1-Enzym gebildet wird. Eine Transposon-Insertion im Gen SCO2150 (Cytochrom  $c$  Häm-bindende Untereinheit) führt zum selben Nar1-Phänotyp. Damit konnte der  $bc_1$ -Komplex als regulatorische Verknüpfung zwischen aerober Atmung mit Sauerstoff und Nar1-bedingter Nitratatmung im Sporenstadium identifiziert werden.

2. Im Sporen- und Myzelstadium zeigen die aeroben Atmungskettenkomplexe eine differentielle Zusammensetzung. Sporen können durch Modulation der beständigen Komplex III- und Komplex IV-Kompositionen mit alternativen Komponenten einen alternativen Komplex III bilden. In diesem Zusammenhang konnte eine neue sporenspezifische Oxidase sowie drei alternative QcR-Komponenten identifiziert werden, deren einzelne Module (SCO7236, SCO7235, SCO7234; SCO7120) am Elektronentransfer beteiligt sein könnten.

3. Die Komponenten der aeroben und anaeroben Atmungskette sind sowohl in Sporen als auch in Myzel in supramolekularen Strukturen als Superkomplexe organisiert. Dabei bilden der  $bc_1$ -Komplex und die Cytochrom  $c aa_3$  Oxidase durch fehlendes Cytochrom  $c$  als Elektronen-Carrier einen permanenten Superkomplex. Damit konnte eine direkte Verbindung zwischen aerober Atmung und anaerober Atmung nachgewiesen werden. Für Nar1 und Nar3 in Sporen und Nar2 in Myzel konnte gezeigt werden, dass sie mit Komponenten der aeroben Atmungskette (NADH-Dehydrogenase, Succinat-Dehydrogenase,  $bc_1$ -Komplex, Cytochrom  $c aa_3$  Oxidase) als temporärer Superkomplex assoziiert sind. Für *S. coelicolor* deutet sich damit die Organisation eines gemeinsamen Megakomplexes der aeroben und anaeroben Respirationssysteme in der Membran an.

**Die Untersuchungen zum aeroben und anaeroben Respirationssystem zeigen letztendlich, dass sich *S. coelicolor* für weiterführende Fragestellungen zum aeroben und anaeroben Respirationssystem bei obligat aeroben Vertretern als Modellorganismus eignet.**

## 6 Ausblick

Basierend auf den erhobenen Daten der vorliegenden Dissertation sollte der Fokus weiterführender experimenteller Ansätze in der detaillierten Analyse der identifizierten Schnittstelle zwischen aerober Atmung und anaerober Atmung mit Nitrat liegen. Dafür ist es notwendig:

1. zunächst die Ursache für den Aktivitätsverlust vom Nar1-Enzym in Sporen mit vorliegender Deletion des Operons vom *bc<sub>1</sub>*-Komplex zu untersuchen. Durch Mutagenese des Tyr288 in NarH, was als Phosphorylierungsstelle identifiziert wurde (M. Bibb, persönliche Mitteilung), kann ein möglicher Einfluss der Phosphorylierungsstelle auf die Nar1-Aktivität untersucht werden. Weiterhin könnten ICP-MS-Messungen zum Molybdän-Gehalt im Sporenrohextrakt der Mutanten COE190 ( $\Delta$ SCO2148-56), COE502 (M145 mit SCO2150::Tn5062) und NM1821 ( $\Delta$ *moaA*) darüber Aufschluss geben, ob der Aktivitätsverlust von Nar1 in Sporen auf eine gestörte Kofaktor-Synthese zurückzuführen ist. Darüberhinaus ist eine Komplementation des Nar1-Phänotyps beider Mutanten (Rückführung von SCO2148-56 in die Mutante COE192 und Rückführung von SCO2150 in die Mutante COE502) unabdingbar.

2. Für Nar2 sollte ein möglicher direkter Einfluss von SCO0212 auf den Nitrattransport und/oder das Nar2 Enzym in Myzel untersucht werden. Die Charakterisierung der bereits konstruierten *Knockout*-Mutanten von SCO0212 würde dabei erste Anhaltspunkte liefern, ob die hypoxisch induzierte Nar2-Synthese funktionell an die Aktivität von SCO0212 gekoppelt ist und im Fall einer Deletion von SCO0212 Nar2 konstitutiv auch aerob gebildet werden kann. Da die Daten von Dr. M. Fischer belegen, dass Nar2 unter Hypoxie auch in Sporen synthetisiert wird, ist es notwendig eine mögliche Beteiligung von SCO0212 und der NarX-Histidinkinase an der Nar2-Synthese in Sporen zu untersuchen.

3. Für Nar3 konnte eine post-transkriptionelle Regulation durch Phosphat unter substratlimitierenden Bedingungen gezeigt werden. In diesem Zusammenhang sollte vor allem die Fragestellung überprüft werden, wie Phosphat regulatorisch auf die Nar3-Synthese wirkt. Dafür ist es notwendig, zunächst eine *phoP*-Mutante auf eine Nar3-vermittelte Nitratreduktion zu untersuchen.

4. Der Hinweis auf mögliche Superkomplexassemblierungen sollte über Ko-Migration in BN-PAGE und Ko-Reinigungen mit Sucrose-Gradienten nachgewiesen werden, um die direkte Kopplung zwischen aerober Atmung mit Sauerstoff und anaerober Atmung mit Nitrat zu verifizieren.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abramson, J., Riistama, S., Larsson, G., Jasaitis, A., Svensson-Ek, M., Laakkonen, L., et al. (2000).** The structure of the ubiquinol oxidase from *Escherichia coli* and its ubiquinone binding site. *Nature Structural Biology*, 7(10), 910–917.
- Acin-Perez, R., und Enriquez, J. A. (2014).** The function of the respiratory supercomplexes: The plasticity model. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1837(4), 444–450.
- Arias-Cartin, R., Grimaldi, S., Arnoux, P., Guigliarelli, B., und Magalon, A. (2012).** Cardiolipin binding in bacterial respiratory complexes: Structural and functional implications. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1817(10), 1937–1949.
- Bai, H., Rolfe, M. D., Jia, W., Coakley, S., Poole, R. K., Green, J., und Holcombe, M. (2014a).** Agent-Based Modeling of Oxygen-Responsive Transcription Factors in *Escherichia coli*. *PLoS Computational Biology*, 10(4).
- Baker, S. C., Ferguson, S. J., Ludwig, B., Page, M. D., Richter, O.-M. H., und van Spanning, R. J. M. (1998).** Molecular Genetics of the Genus *Paracoccus*: Metabolically Versatile Bacteria with Bioenergetic Flexibility. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(4), 1046–1078.
- Barrett, E. L., und Riggs, D. L. (1982).** Evidence for a second nitrate reductase activity that is distinct from the respiratory enzyme in *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, 150(2), 563–571.
- Bentley, S., Chater, K., Cerdeño-Tárraga, A.-M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D., et al. (2002).** Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, 417(6885), 141–147.
- Bentley, S. D., Brown, S., Murphy, L. D., Harris, D. E., Quail, M. A., Parkhill, J., et al. (2004).** SCP1, a 356 023 bp linear plasmid adapted to the ecology and developmental biology of its host, *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Molecular Microbiology*, 51(6), 1615–1628.
- Bertram, S., und Gassen, H. G. (1991).** Gentechnische Methoden. *G. Fischer, Stuttgart*, 2.
- Bibb, M. (1996).** 1995 Colworth Prize Lecture. The regulation of antibiotic production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology (Reading, England)*, 142(1 996).
- Black, P. A., Warren, R. M., Louw, G. E., van Helden, P. D., Victor, T. C., und Kana, B. D. (2014).** Energy metabolism and drug efflux in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(5), 2491–2503.
- Blasco, F., Guigliarelli, B., Magalon, A., Asso, M., Giordano, G., und Rothery, R. A. (2001).** The coordination and function of the redox centres of the membrane-bound nitrate reductases. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 58(2), 179–193.
- Borisov, V. B., Forte, E., Siletsky, S. A., Arese, M., Davletshin, A. I., Sarti, P., und Giuffr, A. (2015).** Cytochrome *bd* Protects Bacteria against Oxidative and Nitrosative Stress : A Potential Target for Next Generation Antimicrobial Agents, 80(5).
- Borisov, V. B., Gennis, R. B., Hemp, J., und Verkhovsky, M. I. (2011).** The cytochrome *bd* respiratory oxygen reductases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1807(11), 1398–1413.

- Borodina, I., Krabben, P., und Nielsen, J. (2005).** Genome-scale analysis of. *Genome Research*, 3(2), 820–829.
- Borovok, I., Gorovitz, B., Schreiber, R., Aharonowitz, Y., und Cohen, G. (2006).** Coenzyme B12 Controls Transcription of the *Streptomyces* Class Ia Ribonucleotide Reductase *nrdABS* Operon via a Riboswitch Mechanism. *Journal of Bacteriology*, 188(7), 2512–2520.
- Bott, M., und Niebisch, A. (2003).** The respiratory chain of *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biotechnology*, 104(1-3), 129–153.
- Boumans, H., Grivell, L. A., und Berden, J. A. (1998).** The respiratory chain in yeast behaves as a single functional unit. *Journal of Biological Chemistry*, 273(9), 4872–4877.
- Brekasis, D., und Paget, M. S. B. (2003).** A novel sensor of NADH/NAD<sup>+</sup> redox poise in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *EMBO Journal*, 22(18).
- Bruel, C., Brasseur, R., und Trumpower, B. L. (1996).** Subunit 8 of the *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome *bc*<sub>1</sub> complex interacts with succinate-ubiquinone reductase complex. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 28(1), 59–68.
- Chater, K. F. (2000).** *Developmental decisions during sporulation in the aerial mycelium in Streptomyces*. Washington, DC: American Society for Microbiology Press.
- Chen, K., Rannulu, N. S., Cai, Y., Lane, P., Liebl, A. L., Rees, B. B., et al. (2008).** Unusual odd-electron fragments from even-electron protonated prodiginine precursors using positive-ion electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 19(12), 1856–66.
- Clegg, S., Yu, F., Griffiths, L., und Cole, J. A. (2002).** The roles of the polytopic membrane proteins NarK, NarU and NirC in *Escherichia coli* K-12: two nitrate and three nitrite transporters. *Molecular Microbiology*, 44(1), 143–155.
- Cotter, P. A., Melville, S. B., Albrecht, J. A., und Gunsalus, R. P. (1997).** Aerobic regulation of cytochrome d oxidase (*cydAB*) operon expression in *Escherichia coli*: roles of Fnr and ArcA in repression and activation. *Molecular Microbiology*, 25(3), 605–615.
- D’mello, R., Hill, S., und Poole, R. K. (1996a).** The cytochrome *bd* quinol oxidase in *Escherichia coli* has an extremely high oxygen affinity and two oxygen-binding haems: implications for regulation of activity in vivo by oxygen inhibition. *Microbiology*, 142(4), 755–763.
- Elliot, M. A., und Flärdh, K. (2012).** Streptomycete spores. In *Encyclopedia of Life Science (eLS)*. John Wiley & Sons.
- Ensign, J. (1978).** Formation, properties and germination of actinomycete spores. *Annual Reviews in Microbiology*, 32(1), 185–219.
- Fernández-Martínez, L. T., Del Sol, R., Evans, M. C., Fielding, S., Herron, P. R., Chandra, G., und Dyson, P. J. (2011).** A transposon insertion single-gene knockout library and new ordered cosmid library for the model organism *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 99(3), 515–522.
- Fischer, M. (2014).** Die anaerobe Nitratreduktion bei dem obligat aeroben *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Dissertation. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*
- Fischer, M., Alderson, J., Van Keulen, G., White, J., und Sawers, R. G. (2010).** The obligate aerobe *Streptomyces coelicolor* A3(2) synthesizes three active respiratory nitrate reductases. *Microbiology*, 156(10), 3166–3179.

- Fischer, M., Falke, D., und Sawers, R. G. (2013).** A respiratory nitrate reductase active exclusively in resting spores of the obligate aerobe *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Molecular Microbiology*, 89(6), 1259–1273.
- Fischer, M., Falke, D., Pawlik, T., & Sawers, R. G. (2014).** Oxygen-Dependent Control of Respiratory Nitrate Reduction in Mycelium of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology*, 196(23), 4152–4162.
- Fischer, M., Schmidt, C., Falke, D., und Sawers, R. G. (2012).** Terminal reduction reactions of nitrate and sulfate assimilation in *Streptomyces coelicolor* A3(2): Identification of genes encoding nitrite and sulfite reductases. *Research in Microbiology*, 163(5), 340–348.
- French, C. E., Bell, J. M. L., und Ward, F. B. (2008).** Diversity and distribution of hemerythrin-like proteins in prokaryotes. *FEMS Microbiology Letters*, 279(2), 131–145.
- Gao, X., Xin, Y., und Blankenship, R. E. (2009).** Enzymatic activity of the alternative complex III as a menaquinol: auracyanin oxidoreductase in the electron transfer chain of *Chloroflexus aurantiacus*. *FEBS Letters*, 583(19), 3275–3279.
- Genova, M. L., Bianchi, C., und Lenaz, G. (2003).** Structural organization of the mitochondrial respiratory chain. *The Italian Journal of Biochemistry*, 52(1), 58–61.
- Glazebrook, M. a, Doull, J. L., Stuttard, C., und Vining, L. C. (1990).** Sporulation of *Streptomyces venezuelae* in submerged cultures. *Journal of General Microbiology*, 136(1990), 581–588.
- Green, J., Crack, J. C., Thomson, A. J., und LeBrun, N. E. (2009).** Bacterial sensors of oxygen. *Current Opinion in Microbiology*, 12(2), 145–151.
- Gregory, M. A., Till, R., und Smith, M. C. M. (2003).** Integration site for *Streptomyces* phage  $\phi$ BT1 and development of site-specific integrating vectors. *Journal of Bacteriology*, 185(17), 5320–5323.
- Gupte, S. S., und Hackenbrock, C. R. (1988).** Multidimensional diffusion modes and collision frequencies of cytochrome *c* with its redox partners. *Journal of Biological Chemistry*, 263(11), 5241–5247.
- Gupte, S. S., und Hackenbrock, C. R. (1988).** The role of cytochrome *c* diffusion in mitochondrial electron transport. *Journal of Biological Chemistry*, 263(11), 5248–5253.
- Gupte, S., Wu, E.-S., Hoehli, L., Hoehli, M., Jacobson, K., Sowers, A. E., und Hackenbrock, C. R. (1984).** Relationship between lateral diffusion, collision frequency, and electron transfer of mitochondrial inner membrane oxidation-reduction components. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(9), 2606–2610.
- Hackenbrock, C. R., Chazotte, B., und Gupte, S. S. (1986).** The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 18(5), 331–368.
- Hardisson, C., Manzanal, M. B., Salas, J. a, und Suárez, J. E. (1978).** Fine structure, physiology and biochemistry of arthrospore germination in *Streptomyces antibioticus*. *Journal of General Microbiology*, 105(1978), 203–214.
- Hata-Tanaka, A., Matsuura, K., Itoh, S., und Anraku, Y. (1987).** Electron flow and heme-heme interaction between cytochromes b-558, b-595 and d in a terminal oxidase of *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 893(2), 289–295.
- Haug, I., Weissenborn, A., Brolle, D., Bentley, S., Kieser, T., und Altenbuchner, J. (2003).** *Streptomyces coelicolor* A3(2) plasmid SCP2\*: deductions from the complete sequence. *Microbiology (Reading, England)*, 149(Pt 2), 505–13.

- Haynes, S. W., Sydor, P. K., Corre, C., Song, L., und Challis, G. L. (2010). Stereochemical elucidation of streptorubin B. *Journal of the American Chemical Society*, 133, 1793–1798.
- Heim, A. H., Silver, W. S., und Birk, Y. (1957). Cytochrome composition of some strains of *Streptomyces*.
- Herrema, J. A. N. K., Bystrykh, L. V., Ferna, M. A., Malpartida, F., Hopwood, D. A., und Dijkhuizen, L. (1996). Production of Actinorhodin-Related “ Blue Pigments ’ by *Streptomyces coelicolor* A3 ( 2 ), 178(8), 2238–2244.
- Hey-Ferguson, A., Mitchell, M., und Elbein, A. D. (1973). Trehalose metabolism in germinating spores of *Streptomyces hygroscopicus*. *Journal of Bacteriology*, 116(2), 1084–5.
- Hockenull, D. J. D., Fantes, K. H., Herbert, M., und Whitehead, B. (1954). Glucose utilization by *Streptomyces griseus*. *Journal of General Microbiology*, 10(3), 353–370.
- Hodgson, D. A. (2000). Primary metabolism and its control in streptomycetes: A most unusual group of bacteria. *Advances in Microbial Physiology*, 42, 47–238.
- Hoffmann, T., Troup, B., Szabo, A., Hungerer, C., und Jahn, D. (1995). The anaerobic life of *Bacillus subtilis*: cloning of the genes encoding the respiratory nitrate reductase system. *FEMS Microbiology Letters*, 131(2), 219–225.
- Hoischen, C., Gura, K., Luge, C., und Gumpert, J. (1997). Lipid and fatty acid composition of cytoplasmic membranes from *Streptomyces hygroscopicus* and its stable protoplast-type L form. *Journal of Bacteriology*, 179(11), 3430–3436.
- Hopkins, A., Buchanan, G., und Palmer, T. (2014). Role of the Twin Arginine Protein Transport Pathway in the Assembly of the *Streptomyces coelicolor* Cytochrome bc(1) Complex. *Journal of Bacteriology*, 196(1), 50–59.
- Hopwood, D. A. (1999). Forty years of genetics with *Streptomyces*: from in vivo through in vitro to in silico. *Microbiology*, 145(1999), 2183–2202.
- Inoue, Y. (1958). The metabolism of *Streptomyces griseus*. IV. The terminal pathway of the respiration of *Streptomyces griseus*. *The Journal of Antibiotics*, 11(3), 109–115.
- Iobbi, C., Santini, C., Bonnefoy, V., und Giordano, G. (1987). Biochemical and immunological evidence for a second nitrate reductase in *Escherichia coli* K12. *European Journal of Biochemistry*, 168(2), 451–459.
- Jiang, J., He, X., und Cane, D. (2007). Biosynthesis of the earthy odorant geosmin by a bifunctional *Streptomyces coelicolor* enzyme. *Nat Chem Biol*, 3(11), 711–715.
- Jones, B. T., Hu, D. X., Savoie, B. M., & Thomson, R. J. (2013). Elimination of Butylcycloheptylprodigiosin as a Known Natural Product Inspired by an Evolutionary Hypothesis for Cyclic Prodigiosin Biosynthesis. *Journal of Natural Products*, 76(10), 10.1021/np400531b.
- Jormakka, M., Richardson, D., Byrne, B., und Iwata, S. (2004). Architecture of NarGH reveals a structural classification of Mo-bisMGD enzymes. *Structure*, 12(1), 95–104.
- Jyothikumar, V., Klanbut, K., Tiong, J., Roxburgh, J. S., Hunter, I. S., Smith, T. K., und Herron, P. R. (2012). Cardiolipin synthase is required for *Streptomyces coelicolor* morphogenesis. *Molecular Microbiology*, 84(1), 181–197.
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., und Sternberg, M. J. E. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat. Protocols*, 10(6), 845–858. Retrieved from

- Kendall, J. J., Barrero--Tobon, A. M., Hendrixson, D. R., und Kelly, D. J. (2014).** Hemerythrins in the microaerophilic bacterium *Campylobacter jejuni* help protect key iron–sulphur cluster enzymes from oxidative damage. *Environmental Microbiology*, *16*(4), 1105–1121.
- Khan, A., und Sarkar, D. (2012).** Nitrate reduction pathways in mycobacteria and their implications during latency. *Microbiology*, *158*(2), 301–307.
- Kieser, T. (2000).** *Practical streptomyces genetics*. John Innes Foundation.
- Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F., und Hopwood, D. A. (2002).** General introduction to actinomycete biology. *Norwich, England: John Innes Foundation*, 1–18.
- Kotlyar, A. B., Sled, V. D., Burbaev, D. S., Moroz, I. A., und Vinogradov, A. D. (1990).** Coupling site I and the rotenone-sensitive ubiquinone in tightly coupled submitochondrial particles. *FEBS Letters*, *264*(1), 17–20.
- Kraft, B., Strous, M., und Tegetmeyer, H. E. (2011).** Microbial nitrate respiration - Genes, enzymes and environmental distribution. *Journal of Biotechnology*, *155*(1), 104–117.
- Kurowski, B., und Ludwig, B. (1987).** The genes of the *Paracoccus denitrificans* *bc*<sub>1</sub> complex. Nucleotide sequence and homologies between bacterial and mitochondrial subunits. *Journal of Biological Chemistry*, *262*(28), 13805–13811.
- Laemli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, *227*(5259), 680–685.
- Lanciano, P., Vergnes, A., Grimaldi, S., Guigliarelli, B., und Magalon, A. (2007).** Biogenesis of a respiratory complex is orchestrated by a single accessory protein. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(24), 17468–17474.
- Lenaz, G., und Genova, M. L. (2012).** Supramolecular organisation of the mitochondrial respiratory chain: a new challenge for the mechanism and control of oxidative phosphorylation. In *Mitochondrial Oxidative Phosphorylation* (pp. 107–144). Springer.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., und Randall, R. J. (1951).** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, *193*(1), 265–275.
- Lucas, S., Copeland, A., Lapidus, A., del Rio, T. G., Dalin, E., Tice, H., et al. (2009).** The draft genome of *Rhodothermus Marinus*.
- MacNeil, D. J., Gewain, K. M., Ruby, C. L., Dezeny, G., Gibbons, P. H., und MacNeil, T. (1992).** Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene*, *111*(1), 61–68.
- Magae, J., Miller, M. W., Nagai, K., und Shearer, G. M. (1996).** Effect of metacycloprodigiosin, an inhibitor of killer T cells on murine skin and heart transplants. *J Antibiot (Tokyo)*, *49*(1), 86–90. Retrieved from
- Martín, J. F., und Martín, J. F. (2004).** Phosphate Control of the Biosynthesis of Antibiotics and Other Secondary Metabolites Is Mediated by the PhoR-PhoP System : an Unfinished Story Phosphate Control of the Biosynthesis of Antibiotics and Other Secondary Metabolites Is Mediated by the PhoR-Pho.
- Marusyk, R., und Sergeant, A. (1980).** A simple method for dialysis of small-volume samples. *Analytical Biochemistry*, *105*(1), 403–404.



- Matsoso, L. G., Kana, B. D., Crellin, P. K., Lea-Smith, D. J., Pelosi, A., Powell, D., et al. (2005).** Function of the cytochrome *bc<sub>1</sub>-aa<sub>3</sub>* branch of the respiratory network in mycobacteria and network adaptation occurring in response to its disruption. *Journal of Bacteriology*, 187(18), 6300–6308.
- Mayer, G., Anderka, O., Ludwig, B., und Schubert, D. (2002).** The state of association of the cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex from *Paracoccus denitrificans* in solutions of dodecyl maltoside. In *Analytical Ultracentrifugation VI* (pp. 77–83). Springer.
- McBride, M. J., und Ensign, J. C. (1990).** Regulation of trehalose metabolism by *Streptomyces griseus* spores. *Journal of Bacteriology*, 172(7), 3637–3643.
- Mitchell, P. (1975).** The protonmotive Q cycle: A general formulation. *FEBS Letters*, 59(2), 137–139.
- Miura, H., Mogi, T., Ano, Y., Migita, C. T., Matsutani, M., Yakushi, T., et al. (2013).** Cyanide-insensitive quinol oxidase (CIO) from *Gluconobacter oxydans* is a unique terminal oxidase subfamily of cytochrome *bd*. *Journal of Biochemistry*, 153(6), 535–45.
- Mo, S., Sydor, P. K., Corre, C., Alhamadsheh, M. M., Stanley, A. E., Haynes, S. W., et al. (2008).** Elucidation of the *Streptomyces coelicolor* Pathway tom2-Undecylpyrrole, a Key Intermediate in Undecylprodiginine and Streptorubin B Biosynthesis. *Chemistry und Biology*, 15(2), 137–148.
- Moir, J. W., und Wood, N. J. (2001).** Nitrate and nitrite transport in bacteria. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 58(2), 215–224.
- Montes De Oca, L. Y. J. G., Chagolla-López, A., De La Vara, L. G., Cabellos-Avelar, T., Gómez-Lojero, C., und Cirlos, E. B. G. (2012).** The composition of the *bacillus subtilis* aerobic respiratory chain supercomplexes. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 44(4), 473–486.
- Mullis, K. B., Faloona, F. A., Scharf, S. J., Saiki, R. K., Horn, G. T., und Erlich, H. (1992).** Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Biotechnology Series*, 17.
- Newton, N. A., Cox, G. B., und Gibson, F. (1971).** The function of menaquinone (vitamin K2) in *Escherichia coli* K-12. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 244(1), 155–166.
- Niebisch, A., und Bott, M. (2001).** Molecular analysis of the cytochrome *bc<sub>1</sub>-aa<sub>3</sub>* branch of the *Corynebacterium glutamicum* respiratory chain containing an unusual diheme cytochrome *c<sub>1</sub>*. *Archives of Microbiology*, 175(4), 282–294.
- Niebisch, A., und Bott, M. (2003).** Purification of a Cytochrome *bc<sub>1</sub>-aa<sub>3</sub>* Supercomplex with Quinol Oxidase Activity from *Corynebacterium glutamicum* Identification of a fourth subunit of Cytochrome *aa<sub>3</sub>* Oxidase and mutational analysis of diheme Cytochrome *c<sub>1</sub>*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(6), 4339–4346.
- Niederpruem, D. J., und Hackett, D. P. (1959).** Cytochrome system of streptomycetes.
- Niederpruem, D. J., und Hackett, D. P. (1961).** Respiratory Chain of *Streptomyces*. *Journal of Bacteriology*, 81(4), 557–563.
- Pandya, K., und King, H. (1966).** Ubiquinone and menaquinone in bacteria: A comparative study of some bacterial respiratory systems. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 114, 154 – 157.
- Pawlik, T. (2011.).** Untersuchungen zum Nitrattransport in *Streptomyces coelicolor*. *Diplomarbeit. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*
- Pereira, M. M., Refojo, P. N., Hreggvidsson, G. O., Hjorleifsdottir, S., und Teixeira, M. (2007).** The alternative complex III from *Rhodothermus marinus* - A prototype of a new family of quinol:electron acceptor oxidoreductases. *FEBS Letters*, 581(25), 4831–4835.

- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., und Ferrin, T. E. (2004).** UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605–1612.
- Pinske, C., und Sawers, R. G. (2012).** A-type carrier protein ErpA is essential for formation of an active formate-nitrate respiratory pathway in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 194(2), 346–353.
- Poole, R. K., und Williams, H. D. (1987).** Proposal that the function of the membrane-bound cytochrome  $a_1$ -like haemoprotein (cytochrome b-595) in *Escherichia coli* is a direct electron donation to cytochrome *d*. *FEBS Letters*, 217(1), 49–52.
- Puri-Taneja, A., Schau, M., Chen, Y., und Hulett, F. M. (2007).** Regulators of the *Bacillus subtilis* *cydABCD* operon: Identification of a negative regulator, CcpA, and a positive regulator, ResD. *Journal of Bacteriology*, 189(9), 3348–3358.
- Quiros, L. M., Hardisson, C., und Salas, J. a. (1986).** Isolation and properties of *Streptomyces* spore membranes. *Journal of Bacteriology*, 165(3), 923–928.
- Refojo, P. N., Sousa, F. L., Teixeira, M., und Pereira, M. M. (2010).** The alternative complex III: A different architecture using known building modules. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1797(12), 1869–1876.
- Refojo, P. N., Teixeira, M., und Pereira, M. M. (2012).** The Alternative complex III: Properties and possible mechanisms for electron transfer and energy conservation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1817(10), 1852–1859.
- Reháček, Z., Ramankutty, M., und Kozová, J. (1968).** Respiratory chain of antimycin A-producing *Streptomyces antibioticus*. *Applied Microbiology*, 16(1), 29–32.
- Rich, P. R. (1984).** Electron and proton transfers through quinones and cytochrome *bc* complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Bioenergetics*, 768(1), 53–79.
- Richardson, D. J. (2000).** Bacterial respiration: a flexible process for a changing environment. *Microbiology (Reading, England)*, 146, 551–571.
- Richardson, D. J. (2001).** Introduction : nitrate reduction and the nitrogen cycle interactions in these two fields, 58, 163–164.
- Richardson, D. J., Berks, B. C., Russell, D. a, Spiro, S., und Taylor, C. J. (2001).** Functional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 58(2), 165–178.
- Rogov, A. G., Sukhanova, E. I., Uralskaya, L. A., Aliverdieva, D. A., und Zvyagilskaya, R. A. (2014).** Alternative Oxidase: Distribution, Induction, Properties, Structure, Regulation, and Functions. *Biochemistry (Moscow)*, 79(13), 1615–1634.
- Rothery, R. A., Blasco, F., Magalon, A., und Weiner, J. H. (2001).** The diheme cytochrome *b* subunit (NarI) of *Escherichia coli* nitrate reductase A (NarGHI): structure, function, and interaction with quinols. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 3(2), 273–283.
- Rudd, B. A. M., und Hopwood, D. A. (1980).** A pigmented mycelial antibiotic in *Streptomyces coelicolor*: control by a chromosomal gene cluster. *Journal of General Microbiology*, 119(2), 333–340. Retrieved from
- Sabar, M., Balk, J., und Leaver, C. J. (2005).** Histochemical staining and quantification of plant mitochondrial respiratory chain complexes using blue-native polyacrylamide gel electrophoresis. *The Plant Journal*, 44(5), 893–901.

- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., und Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230(4732), 1350–1354.
- Garcia Diaz, L. A., Salas, J. A., und Hardisson, C. (1983). Intracellular pool of *Streptomyces* spores: amino acids , nucleosides , adenine nucleotide levels and energy charge, *FEMS Microbiology Letters*, 19, 215–219.
- Salas, J. A., und Hardisson, C. (1981). Sugar Uptake during Germination of *Streptomyces antibioticus* Spores. *Microbiology*, 125(1), 25–31.
- Salas, J. A., Quiros, L. M., und Hardisson, C. (1984). Pathways of glucose catabolism during germination of *Streptomyces* spores. *FEMS Microbiology Letters*, 22(3), 229–233.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., und Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning* (Vol. 2). Cold spring harbor laboratory press New York.
- Sandoval-Calderón, M., Geiger, O., Guan, Z., Barona-Gómez, F., und Sohlenkamp, C. (2009). A eukaryote-like cardiolipin synthase is present in *Streptomyces coelicolor* and in most actinobacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 284(26), 17383–17390.
- Sanger, F., Nicklen, S., und Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463–5467.
- Saraste, M., Holm, L., Lemieux, L., Lübben, M., und Van der Oost, J. (1991). The happy family of cytochrome oxidases. *Biochemical Society Transactions*, 19(3), 608.
- Sato, S. (1940). Studies concerning cytochrome in bacteria, especially Actinomyces. *Kitasato Arch Exp Med*, 17(2).
- Schägger, H. (2002). Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1555(1-3), 154–159.
- Schägger, H., und Pfeiffer, K. (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *The EMBO Journal*, 19(8), 1777–1783.
- Shi, L., Sohaskey, C. D., Kana, B. D., Dawes, S., North, R. J., Mizrahi, V., und Gennaro, M. L. (2005). Changes in energy metabolism of Mycobacterium tuberculosis in mouse lung and under in vitro conditions affecting aerobic respiration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(43), 15629–15634.
- Sivaramakrishnan, S., und Ortiz de Montellano, P. R. (2013). The DosS-DosT/DosR Mycobacterial Sensor System. *Biosensors*, 3(3), 259–282.
- Sohaskey, C. D. (2005). Regulation of nitrate reductase activity in *Mycobacterium tuberculosis* by oxygen and nitric oxide. *Microbiology*, 151(11), 3803–3810.
- Sohaskey, C. D. (2008). Nitrate enhances the survival of Mycobacterium tuberculosis during inhibition of respiration. *Journal of Bacteriology*, 190(8), 2981–2986.
- Sohaskey, C. D., und Wayne, L. G. (2003). Role of *narK2X* and *narGHJ1* in hypoxic upregulation of nitrate reduction by *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology*, 185(24), 7247–7256.
- Soliveri, J. a, Gomez, J., Bishai, W. R., und Chater, K. F. (2000). Multiple paralogous genes related to the *Streptomyces coelicolor* developmental regulatory gene *whiB* are present in *Streptomyces* and other actinomycetes. *Microbiology*, 146(2000), 333–343.

- Sone, N., Nagata, K., Kojima, H., Tajima, J., Kodera, Y., Kanamaru, T., *et al.* (2001). A novel hydrophobic diheme c-type cytochrome. Purification from *Corynebacterium glutamicum* and analysis of the QcrCBA operon encoding three subunit proteins of a putative cytochrome reductase complex. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1503(3), 279–290.
- Sousa, P. M. F., Silva, S. T. N., Hood, B. L., Charro, N., Carita, J. N., Vaz, *et al.* (2011). Supramolecular organizations in the aerobic respiratory chain of *Escherichia coli*. *Biochimie*, 93(3), 418–425.
- Sousa, P. M. F., Videira, M. a M., Bohn, A., Hood, B. L., Conrads, T. P., Goulao, L. F., und Melo, A. M. P. (2012). The aerobic respiratory chain of *Escherichia coli*: From genes to supercomplexes. *Microbiology (United Kingdom)*, 158(9), 2408–2418.
- Sousa, P. M. F., Videira, M. a M., Santos, F. a S., Hood, B. L., Conrads, T. P., und Melo, A. M. P. (2013). The *bc:caa<sub>3</sub>* supercomplexes from the Gram positive bacterium *Bacillus subtilis* respiratory chain: A megacomplex organization? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 537(1), 153–160.
- Stroh, A., Anderka, O., Pfeiffer, K., Yagi, T., Finel, M., Ludwig, B., und Schägger, H. (2004). Assembly of respiratory complexes I, III, and IV into NADH oxidase supercomplex stabilizes complex I in *Paracoccus denitrificans*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(6), 5000–5007.
- Takeno, S., Ohnishi, J., Komatsu, T., Masaki, T., Sen, K., und Ikeda, M. (2007). Anaerobic growth and potential for amino acid production by nitrate respiration in *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 75(5), 1173–1182.
- Tan, M. P., Sequeira, P., Lin, W. W., Phong, W. Y., Cliff, P., Ng, S. H., *et al.* (2010). Nitrate respiration protects hypoxic *Mycobacterium tuberculosis* against acid- and reactive nitrogen species stresses. *PLoS ONE*, 5(10), 1–8.
- Ten Brink, F., Schoepp-Cothenet, B., Van Lis, R., Nitschke, W., und Baymann, F. (2013). Multiple Rieske/cytb complexes in a single organism. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1827(11-12), 1392–1406.
- Thomas, P. E., Ryan, D., und Levin, W. (1976). An improved staining procedure for the detection of the peroxidase activity of cytochrome P-450 on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 75(1), 168–176.
- Tiffert, Y., Supra, P., Wurm, R., Wohlleben, W., Wagner, R., und Reuther, J. (2008). The *Streptomyces coelicolor* GlnR regulon: Identification of new GlnR targets and evidence for a central role of GlnR in nitrogen metabolism in actinomycetes. *Molecular Microbiology*, 67(4), 861–880.
- Towbin, H., Staehelin, T., und Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(9), 4350–4354.
- Trumpower, B. L. (1990). Cytochrome *bc<sub>1</sub>* complexes of microorganisms. *Microbiological Reviews*, 54(2), 101–129.
- Tsao, S.-W., Rudd, B. a M., He, X.-G., Chang, C.-J., und Floss, H. G. (1985). Identification of a red pigment from *Streptomyces coelicolor* A3(2) as a mixture of prodigiosin derivatives. *The Journal of Antibiotics*, 38(1), 128–131.
- Tsuji, R. F., Magae, J., Yamashita, M., Nagai, K., und Yamasaki, M. (1992). Immunomodulating properties of prodigiosin 25-C, an antibiotic which preferentially suppresses induction of cytotoxic T cells. *The Journal of Antibiotics*, 45(8), 1295–302.
- Uden, G., Müllner, M., und Reinhart, F. (2010). Sensing of oxygen by bacteria. *Bacterial Signaling*, 289–305.

- van Keulen, G., Alderson, J., White, J., und Sawers, R. G. (2005). Nitrate respiration in the actinomycete *Streptomyces coelicolor*. *Biochemical Society Transactions*, 33(Pt 1), 210–212.
- van Keulen, G., Alderson, J., White, J., und Sawers, R. G. (2007). The obligate aerobic actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2) survives extended periods of anaerobic stress. *Environmental Microbiology*, 9(12), 3143–3149.
- Wang, J., und Zhao, G.-P. (2009). GlnR positively regulates *nasA* transcription in *Streptomyces coelicolor*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 386(1), 77–81.
- Weber, K., und Osborn, M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Biological Chemistry*, 244(16), 4406–4412.
- Weinstein, E. A., Yano, T., Li, L.-S., Avarbock, D., Avarbock, A., Helm, D., et al. (2005). Inhibitors of type II NADH: menaquinone oxidoreductase represent a class of antitubercular drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(12), 4548–4553.
- White, J., und Bibb, M. J. (1997). *bldA* dependence of undecylprodigiosin production in *Streptomyces coelicolor* A3(2) involves a pathway-specific regulatory cascade. *Journal of Bacteriology*, 179(3), 627–633.
- Withall, D. M., Haynes, S. W., und Challis, G. L. (2015). Stereochemistry and mechanism of undecylprodigiosin oxidative carbocyclization to streptorubin B by the Rieske oxygenase RedG. *Journal of the American Chemical Society*, 5(Figure 1), 150529193541009.
- Xia, D., Yu, C.-A., Kim, H., Xia, J.-Z., Kachurin, A. M., Zhang, L., et al. (1997). Crystal structure of the cytochrome bc1 complex from bovine heart mitochondria. *Science*, 277(5322), 60–66.
- Xiong, J., Kurtz, D. M., Ai, J., und Sanders-Loehr, J. (2000). A hemerythrin-like domain in a bacterial chemotaxis protein. *Biochemistry*, 39(17), 5117–5125.
- Yagüe, P., López-garcía, M. T., Rioseras, B., Sánchez, J., und Manteca, Á. (2013). Europe PMC Funders Group Pre-sporulation stages of *Streptomyces* differentiation : state-of- the-art and future perspectives, 342(2), 79–88.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., und Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mpl8 and pUC19 vectors. *Gene*, 33(1), 103–119.
- Yanyushin, M. F., del Rosario, M. C., Brune, D. C., und Blankenship, R. E. (2005). New class of bacterial membrane oxidoreductases. *Biochemistry*, 44(30), 10037–10045.
- Yassin, A. F., Brzezinka, H., Schaal, K. P., Trüper, H. G., und Pulverer, G. (1988). Menaquinone composition in the classification and identification of aerobic actinomycetes. *Zentralblatt Für Bakteriologie, Mikrobiologie Und Hygiene. Series A: Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology*, 267(3), 339–356.
- Young, I. G. (1975). Biosynthesis of bacterial menaquinones. Menaquinone mutants of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 14(2), 399–406.

# Anhang

---

## 8 Anhang

### I. Verwendete Oligonukleotide (Primer)

Tabelle 8.1.: Liste der verwendeten Oligonukleotide (Primer)

Primer	Sequenz 5'-3'	Verwendung
<b><u>Klonierung <i>narG1</i>, <i>narG2</i>, <i>narG3</i></u></b>		
NarG1/NdeI_forward	GGTGGTCATATGACCGACACGCGGACACCGCCC	Klonierung von <i>narG1</i> in pET30a(+)
NarG1/XhoI_reverse	GGTGGTCTCGAGGTACTCGACCTCTGGGAACG	Klonierung von <i>narG1</i> in pET30a(+)
NarG2/NdeI_forward	GGTGGTCATATGGAGAACGATCAGAACGCACGC	Klonierung von <i>narG2</i> in pET30a(+)
NarG2/XhoI_reverse	GGTGGTCTCGAGGTACTCCACTCGCTGGTCGCG	Klonierung von <i>narG2</i> in pET30a(+)
NarG3/NdeI_forward	GGTGGTCATATGGCCGACGCCGCTGACCGGCTTC	Klonierung von <i>narG3</i> in pET30a(+)
NarG3/XhoI_reverse	GGTGGTCTCGAGGTACGTGACCTCTGGGAGCGGCG	Klonierung von <i>narG3</i> in pET30a(+)
<b><u>Sequenzierung <i>narG</i>-Konstrukte</u></b>		
NarG1/710f	CGTCCCCGAGGTATTCC	Sequenzierung intern von <i>narG1</i>
NarG1/1902f	GCTGGGCGAGGGGCGGCTGGC	Sequenzierung intern von <i>narG1</i>
NarG1/2145r	CCCTTGCCCGACGAACCGAGC	Sequenzierung intern von <i>narG1</i>
NarG1/2955r	ATCCGCTTGCCCTCGTGCTCG	Sequenzierung intern von <i>narG1</i>
Nar2/807f	CAACATCCCCGTACCCGCAC	Sequenzierung intern von <i>narG2</i>
Nar2/2450r	AGCTGTCGTAGTCGGTGCGGG	Sequenzierung intern von <i>narG2</i>
Nar2/1617f	CCTCGGGGCGGGCACCAACCA	Sequenzierung intern von <i>narG2</i>
Nar2/3076r	CTTGCTCGGTGTTGATGAC	Sequenzierung intern von <i>narG2</i>
Nar3/840f	GAAGGTCGTCGTCTCGCC	Sequenzierung intern von <i>narG3</i>
Nar3/2449r	GCGGGCGAGGAGTGGAAGAT	Sequenzierung intern von <i>narG3</i>
Nar3/1623f	GTTCCACTCCGACCATCTA	Sequenzierung intern von <i>narG3</i>
Nar3/3046r	GACGGTGAAGGGCGAGTAGCG	Sequenzierung intern von <i>narG3</i>
<b><u>Klonierung SCO0212 in pASK-IBA</u></b>		
Sco0212/Bsal_IBA3+fw	ATGGTAGGTCTCAAATGTGTGAGTACTGCGGCTGCCAG	Klonierung SCO0212 in pASK-IBA3+
Sco0212/Bsal_IBA3+rv	ATGGTAGGTCTCAGCGCTCGGCAGCGATCGCGGCAGC	Klonierung SCO0212 in pASK-IBA3+
Sco0212/IBA5+_Bsalfw	ATGGTAGGTCTCAGGCCATGTGTGAGTACTGCGGCTGCC	Klonierung SCO0212 in pASK-IBA5+
Sco0212/IBA5+_Bsalrv	ATGGTAGGTCTCATATCACGGCAGCGATCGCGGCAGC	Klonierung SCO0212 in pASK-IBA5+
<b><u>Komplementation der Cytochrom-Oxidase-Mutanten COE190 (<math>\Delta</math>SCO3945-46) und COE192 (<math>\Delta</math>SCO2148-56)</u></b>		
Sco2150_HindIII_fw	GGCGGCAAGCTTACCAGAAGCATCGACAG	Komplementation der Mutante COE192, <b>Konstrukt I</b> (SCO2148-50)
**Sco2148_KpnI_rv	GGCGGCGGTACCAACGGGGCCCTTCGACCG	Komplementation der Mutante COE192, <b>Konstrukt I</b> (SCO2148-50)
Sco2151_HindIII_fw	GGCGGCAAGCTTACTCCCTCGAAGCTCC	Komplementation der Mutante COE192, <b>Konstrukt II</b> (SCO2148-51)
Sco2152_HindIII_fw	GGCGGCAAGCTTAACCAAGTGCTGACGGGAC	Komplementation der Mutante COE192, <b>Konstrukt III</b> (SCO2152)
Sco2152_KpnI_rv	GGCGGCGGTACTACAAGGACCCGCACTCC	Komplementation der Mutante COE192, <b>Konstrukt III</b> (SCO2152)
Sco2156_HindIII_fw	GGCGGCAAGCTTAGAAGGACGGCCGACAGC	Komplementation der Mutante COE192, <b>Konstrukt IV</b> (SCO2153-56)
Sco2153_Nsil_rv	GGCGGCATGCATGTCGCGCAGTTCCCGC	Komplementation der Mutante COE192, <b>Konstrukt IV</b> (SCO2153-56)
Sco3945_HindIII_fw	GGCGGCAAGCTTCTCCGGTGTGAAAAGC	Komplementation der Mutante COE190, <b>SCO3935-46</b>
Sco3946_KpnI_rv	GGCGGCGGTACTCCGGGACTCAGTG	Komplementation der Mutante COE190, <b>SCO3935-46</b>

\*\*Sco2148\_KpnI\_rv gleichzeitig als reverse-Primer für das Konstrukt SCO2148-51 verwendet

**Sequenzierung der Komplementationskonstrukte**

SCO3945_720fw	CTTCTCGGCGCCTTCCTCAC	Sequenzierung intern von SCO3935-46
SCO3945_300rv	CTTCTCCTTCTCCGTGCGGAC	Sequenzierung intern von SCO3935-46
SCO3945_1319fw	GGATGTA CTGGCTGCTGGCGC	Sequenzierung intern von SCO3935-46
SCO3945-46_2007fw	TGGCAGCGCAACTGGGAGACG	Sequenzierung intern von SCO3935-46
SCO3945-46_2427fw	GCCCTGTCCGGCGTCACCATC	Sequenzierung intern von SCO3935-46
SCO2150-48_394rv	TCCGCCTGGGAGTAGATGACC	Sequenzierung intern von SCO2148-50
SCO2150-48_721fw	ACACCGAGAGCCCCGGTGGTC	Sequenzierung intern von SCO2148-50
SCO2150-48_1361fw	ACGATGCTGGGCGCGCTCACC	Sequenzierung intern von SCO2148-50
SCO2150-48_2092fw	TTCATCATCATCCTCCTCACG	Sequenzierung intern von SCO2148-50
SCO2150-48_2812fw	CGGCCCGACCAGTCTCCACC	Sequenzierung intern von SCO2148-50
SCO2151-48_397rv	GGGAGGAGAGACCAGGATCG	Sequenzierung intern von SCO2148-51
SCO2151-48_1020rv	CGACGGCGTAGAGCTTCTTGC	Sequenzierung intern von SCO2148-51
SCO2156-53_700fw	CTCTGGCTCCCAAGGGCAAG	Sequenzierung intern von SCO2148-51
SCO2156-53_1441fw	GCTCGACCATCGCGGTGGGCG	Sequenzierung intern von SCO2153-56
SCO2156-53_2161fw	GTGGTCTGACCGGTGTCATCC	Sequenzierung intern von SCO2153-56
SCO2156-53_2801fw	AGCGTCTTCATCCTCGCCGTG	Sequenzierung intern von SCO2153-56
SCO2156-53_3500fw	ACCCGGACAAACCCCTGGAGG	Sequenzierung intern von SCO2153-56
SCO2156-53_4200fw	CGTACGCATGCGCAGCAGCAC	Sequenzierung intern von SCO2153-56
SCO2156-53_398rv	TACAGCGCCTCGATGGGCAGG	Sequenzierung intern von SCO2153-56

**Primer für Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)**

16S_fw	ACAAGCGGCGGAGCATGTGGC	RT-PCR Primer 16SrRNA
16S_rv	AGCCGCACCTTCCGGTACGGC	RT-PCR Primer 16SrRNA
RTnarG1_fw	ATCACCTCGCCGGAGTGGTGC	RT-PCR Primer <i>narG1</i> hinterer Bereich
RTnarG1_rv	CCAGGACAACCTGGGCGTAGCC	RT-PCR Primer <i>narG1</i> hinterer Bereich
RT-narG2_212fw	CGTGCTCTGGATGGTGTACG	RT-PCR Primer <i>narG2</i> vorderer Bereich
RT-narG2_821rv	GTGACGGGGATGTTGGAGCCC	RT-PCR Primer <i>narG2</i> vorderer Bereich
RT-narG3_207fw	CCTGGGAGACCCAGCAGACGG	RT-PCR Primer <i>narG3</i> vorderer Bereich
RT-narG3_821rv	TCCGCCATCCAGTGC CGCTCG	RT-PCR Primer <i>narG3</i> vorderer Bereich
SCO3034_fw	ATGACCGAGCTGGTGCAGCAA	RT-PCR Primer SCO3034
SCO3034_rv	TCAGACCGCGCCTTCTTGAG	RT-PCR Primer SCO3034
SCO3780_fw	GTGACCGTACGCAGCACCGCC	RT-PCR Primer SCO3780
SCO3780_817rv	AGGCGTCGAGGATCTTGCGCC	RT-PCR Primer SCO3780
RT-narK2_214fw	CTGGGGCGGATACCCGTCGGC	RT-PCR Primer <i>narK2</i> vorderer Bereich
RT-narK2_829rv	CCATCGGGCGCATGGCGACCG	RT-PCR Primer <i>narK2</i> vorderer Bereich
RT-200fw_SCO2148	TGTACCTGACGCTGTTCTTCC	RT-PCR Primer SCO2148
RT-811rv_SCO2148	GAAGACCAGGAAGAAGAAGCC	RT-PCR Primer SCO2148
RT-203fw_SCO2149	TGGCCACCATCGCCTTCATCG	RT-PCR Primer SCO2149
RT-810fw_SCO2149	TTCGAGTACGCCACGATGCC	RT-PCR Primer SCO2149
RT-139fw_SCO3945	GAGAAGGAGAAGTACCTC	RT-PCR Primer SCO3945
RT-921rv_SCO3945	TTGTTGGTGTGCTTGATG	RT-PCR Primer SCO3945
RT-14fw_SCO3946	ACGTCTGGTTCTGTTCTGA	RT-PCR Primer SCO3946
RT-873rv_SCO3946	ATGATCTTCAGCGTGTAG	RT-PCR Primer SCO3946
RT-217fw_SCO7120	CCTTCCTCGAACTCGTGGTC	RT-PCR Primer SCO7120
RT-817rv_SCO7120	GAAGAAGATCACGCCGCCAC	RT-PCR Primer SCO7120
RT-SCO7236_211fw	TTCTTCAAGCCCTCCATGACG	RT-PCR Primer SCO7236
RT-SCO7236_806rv	GTGGAGTTCGTCATGAACTGC	RT-PCR Primer SCO7236
RT-SCO7234_254fw	TGCAGTTGTTAGCAACGAGC	RT-PCR Primer SCO7234
RT-SCO7234_961rv	AGAGAAAGGTGATGGCGATGG	RT-PCR Primer SCO7234
RT-SCO7233_228fw	ACGGGTGGAGTTCACACCCGC	RT-PCR Primer SCO7233
RT-SCO7233_805rv	CCTGGCCGTTGATGCCGTTGG	RT-PCR Primer SCO7233
RT-SCO0212_fw	ATGTGTGAGTACTGCGGCTGC	RT-PCR Primer SCO0212
RT-SCO0212_rv	TTACGGCAGCGATCGCGGCAG	RT-PCR Primer SCO0212



---

RT-SCO0203_347fw	AGCTGATCCGACATCCCGAGC	RT-PCR Primer <i>narX</i>
RT-SCO0203_1025rv	AACTCCTGACCACCCGACTGC	RT-PCR Primer <i>narX</i>

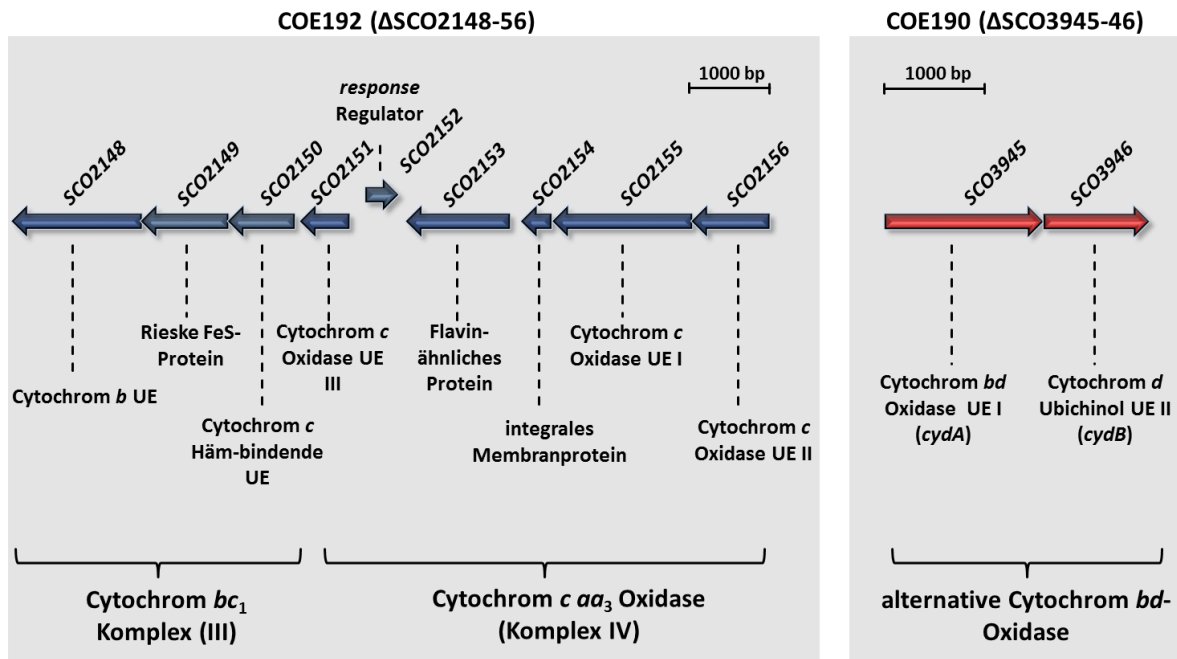
---

**Überprüfung auf Transposon-Insertion Tn5062**

SCO7236_fw	GTGCTGTTGCAGAGGAGAAGG	Überprüfung der Transposon-Insertion in SCO7236
SCO7236_rv	TCAGCGCTCCGGCTCGCCCGA	Überprüfung der Transposon-Insertion in SCO7236
SCO7234_fw	GTGTCGTGGGCCTGAGCCCA	Überprüfung der Transposon-Insertion in SCO7234
SCO7234_rv	TCACTGCACATGCCTCTGATC	Überprüfung der Transposon-Insertion in SCO7234
TP16Tn5062-for	GAGGGCGAGGGCGATGCCACCTAC	Nachweis des Transposons Tn5062, 173 bp stromaufwärts im Transposon
TP17Tn5062-rev	GCTCGGTTGATCCGCTCCCGCGAC	Nachweis des Transposons Tn5062, 1456 bp stromabwärts im Transposon

---

## II. Untersuchung von Cytochrom-Oxidase-Mutanten



2

Abbildung 8.1.: Genorganisation des Lokus SCO2148-56 und SCO3945-46 von *S. coelicolor*.

Die in der Dissertation untersuchten Cytochrom-Oxidase-Mutanten COE192 und COE190 zeichnen sich durch Deletionen von Komplex III, Komplex IV (COE192,  $\Delta$ SCO2148-56) bzw. eine Deletion der Gene für die alternative Cytochrom *bd* Oxidase (COE190,  $\Delta$ SCO3945-46) aus. Der *bc*<sub>1</sub>-Komplex von *S. coelicolor* wird von den Genen SCO2148-50 kodiert, die terminale Cytochrom *c aa*<sub>3</sub> Oxidase wird durch die Gene SCO2153-56 kodiert. Das Schema der Genanordnung von Komplex III und Komplex IV verdeutlicht eine ungewöhnliche Genanordnung, da SCO2151, was für die Cytochrom *c* Oxidase Untereinheit III kodiert, in unmittelbarer Anordnung zu den Genen des *bc*<sub>1</sub>-Komplexes gelegen ist und somit in räumlicher Entfernung zum Cytochrom *c* Oxidase-Operon lokalisiert ist.

## III. Nachweis eines möglichen Defizits beim Einbau des Molybdän-Kofaktors

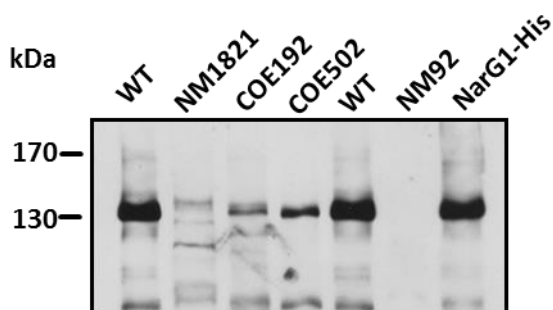


Abbildung 8.2.: Immunodetektion nach Western Blot-Analyse zum Nachweis eines möglichen Defizits beim Einbau des molybdän-haltigen Kofaktors in COE192 ( $\Delta$ SCO2148-56) und COE502 (WT mit SCO2150::Tn5062).

Die Proteine der Mutanten NM1821 ( $\Delta$ *moaA*), COE192 ( $\Delta$ SCO2148-56), COE502 (WT mit SCO2150::Tn5062), NM92 ( $\Delta$ *nar1* $\Delta$ *nar2* $\Delta$ *nar3*) und des Wildtyps M145 wurden in einer 7,5%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Der Gellauf erfolgte zur optimalen Dokumentation von selbst geringen Laufunterschieden für 4 h bei 4 °C. Unter diesen Bedingungen zeigt eine Kofaktor-Mutante ein verändertes Laufverhalten im Vergleich zum Wildtyp (Pinske und Sawers, 2011). Der Wildtyp M145 und das gereinigte NarG1-His wurden als Positivkontrolle eingesetzt, die Dreifach-*nar*-Deletionsmutante NM92 diente als Negativkontrolle. Die Detektion erfolgte mit anti-NarG1 1:25 (depletiert) über Nacht.

#### IV. Nachweis eines kovalent gebundenen Häms nach Oxidase-Aktivität

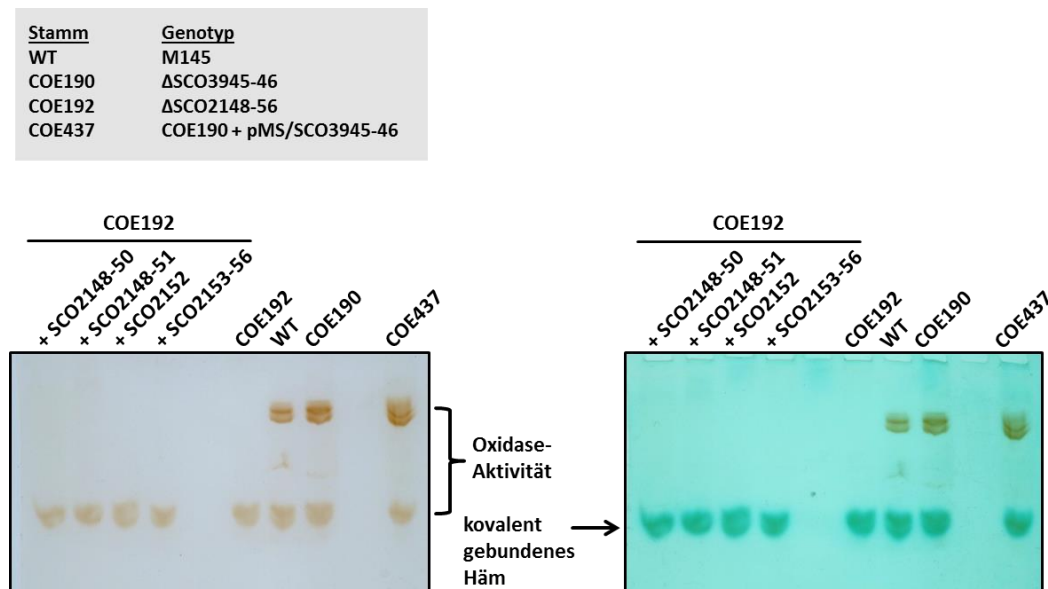


Abbildung 8.3.: Komparative *In gel*-Aktivitätsfärbung nach Auftrennung der Proteine aus Myzel in einer Nativ-PAGE zum Nachweis der (A) Cytochrom *c* Oxidase und (B) dem Nachweis des kovalent gebundenem Häms.

Der Wildtyp (M145) und die Mutante COE190 ( $\Delta$ SCO3945-46) dienen als Positivkontrolle, die Mutante COE192 ( $\Delta$ SCO2148-56) wurde als Negativkontrolle eingesetzt. Die Häm-färbung nach Oxidase-Aktivitätsnachweis zeigt, dass die Aktivitätsbande, die in allen untersuchten Stämmen nachweisbar ist, ein kovalent gebundenes Häm trägt.

#### V. Komplementationstudien von COE192 ( $\Delta$ SCO2148-56) in Sporen

Mutante	Stammhintergrund	betroffenes Gen
COE460	WT M145	SCO7236 (Ubichinol-Cytochrom <i>c</i> -Reduktase, <i>qcrB3</i> )
COE462	WT M145	SCO7234 (Cytochrom <i>c</i> Oxidase Polypeptid I)
COE464	COE192 $\Delta$ SCO2148-56	SCO7234 (Cytochrom <i>c</i> Oxidase Polypeptid I)
COE466	COE192 $\Delta$ SCO2148-56	SCO7236 (Ubichinol-Cytochrom <i>c</i> -Reduktase, <i>qcrB3</i> )
COE468	COE190 $\Delta$ SCO3945-46	SCO7236 (Ubichinol-Cytochrom <i>c</i> -Reduktase, <i>qcrB3</i> )
COE470	COE190 $\Delta$ SCO3945-46	SCO7234 (Cytochrom <i>c</i> Oxidase Polypeptid I)

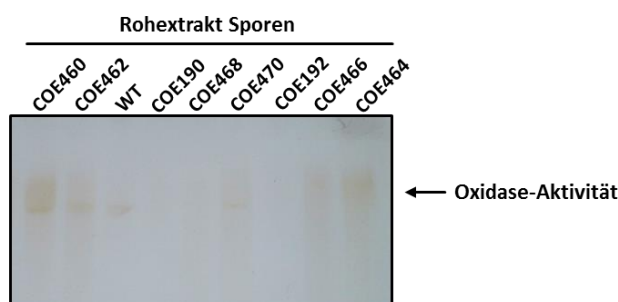


Abbildung 8.4.: *In gel*-Aktivitätsnachweis der Cytochrom *c* Oxidase-Aktivität nach Nativ-Page von Sporen-Rohextrakten.

Es wurden 65  $\mu$ g Rohextrakt von Sporen eingesetzt und in einer 10%igen Nativ-PAGE aufgetrennt. Der Wildtyp M145 und die Mutante COE190 ( $\Delta$ SCO3945-46) wurden als Positivkontrolle eingesetzt, die Mutante COE192 ( $\Delta$ SCO2148-56) wurde als Negativkontrolle eingesetzt. Bei Cytochrom *c* Oxidase-Aktivität wird diese als braune Bande im farblosen Gel sichtbar.

## VI. Nachweis von NarG2 in Proteinfractionen von COE190 und COE192

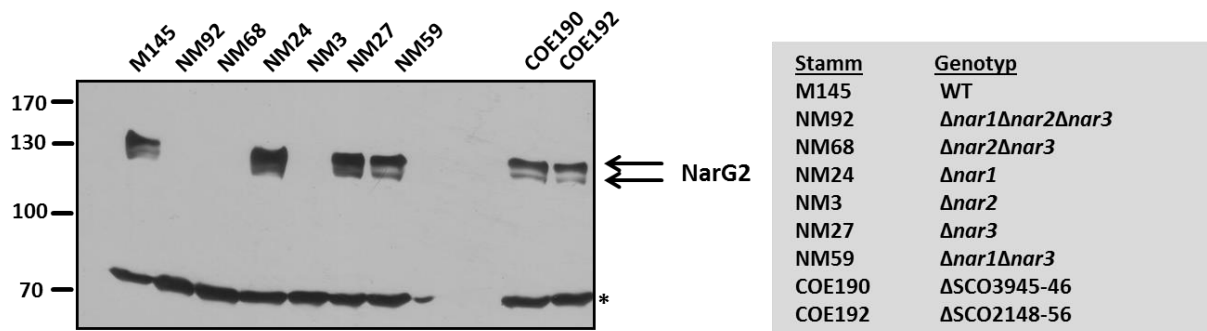


Abbildung 8.5.: Immunodetektion nach Western Blot-Analyse zum Nachweis von NarG2 in den Proteinfractionen von Myzel von COE190 ( $\Delta SCO3945-46$ ) und COE192 ( $\Delta SCO2148-56$ ).

Dafür wurden 60  $\mu$ g der Rohextrakte auf einer 7,5%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Der Wildtyp M145 wurde als Positivkontrolle eingesetzt, die Mutante NM92 ( $\Delta nar1\Delta nar2\Delta nar3$ ) und NM68 ( $\Delta nar2\Delta nar3$ ) dienen als Negativkontrolle. NarG2 ist durch Immunodetektion mit einer molekularen Masse von 137,1 kDa detektierbar. Der Stern markiert eine unspezifische Kreuzreaktion bei ca. 60 kDa, die als Ladekontrolle genutzt wurde. Die Detektion erfolgte mit anti-NarG2 1:25 (depletiert) über Nacht.

## VII. Nachweis der Komplementation von *narX* auf Transkriptionsebene

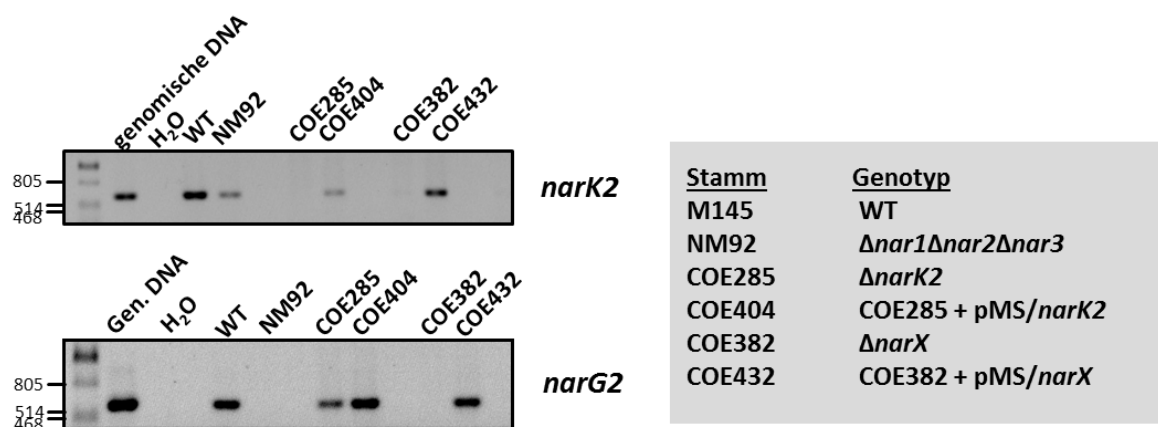


Abbildung 8.6.: Detektion der mRNA-Transkripte von *narK2* und *narG2* im exponentiellen Myzel.

Die Gesamt-RNA der Stämme M145 (Wildtyp), NM92 (Dreifach-*nar*-Deletionsmutante), COE285 ( $\Delta narK2$ ), COE404 (COE285 + pMS/*narK2*), COE382 ( $\Delta narX$ ) und COE432 (COE382 + pMS/*narX*) wurde aus exponentiellem Myzel isoliert und in cDNA umgeschrieben. Als *template* für die RT-PCRs dienten 100 ng cDNA mit den in Tabelle 8.1. angegebenen Primerkombinationen. Die genomische DNA des Wildtypstammes M145 diente als Positivkontrolle, H<sub>2</sub>O wurde als Negativkontrolle eingesetzt.

## VIII. MS/MS-Analysen zum Nachweis chemischer Verbindungen im isolierten Extrakt von *S. coelicolor*

XAN153-1pos\_150326112341 #1-25 RT: 0.00-0.06 AV: 25 NL: 1.77E6  
T: FTMS + p ESI Full ms [150.00-1500.00]

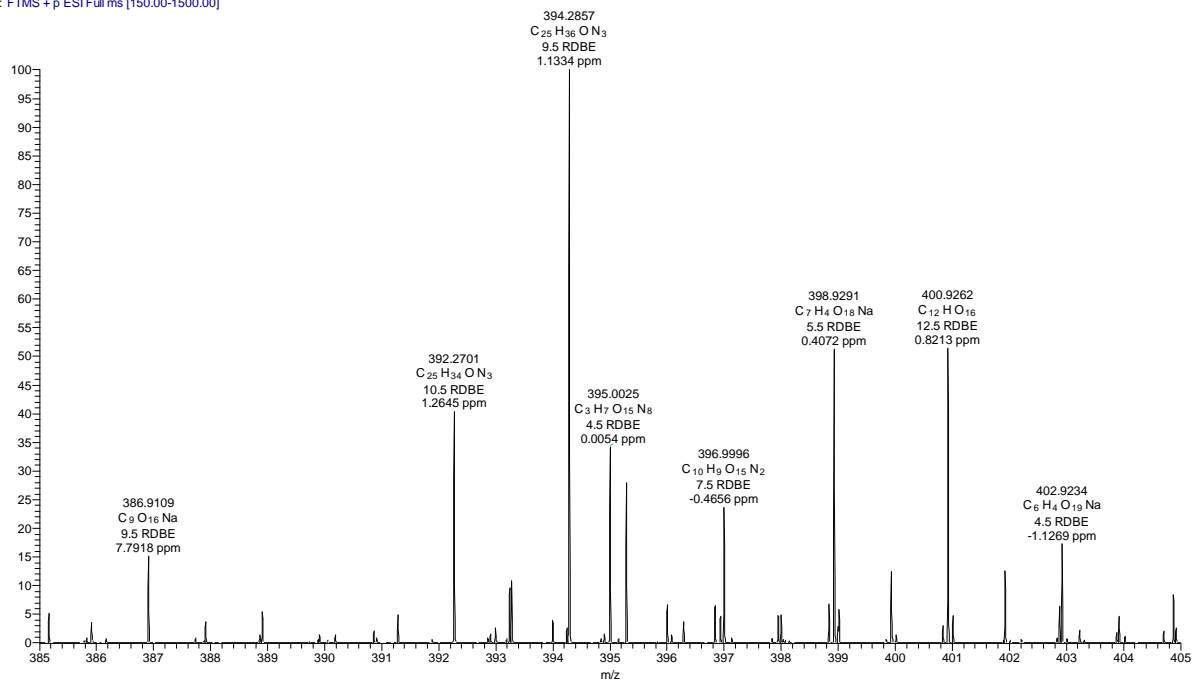


Abbildung 8.7.: (+)-ESI-MS des isolierten Extraktes aus Myzel von *S. coelicolor*.

Die molekularen Summenformeln C<sub>25</sub>H<sub>36</sub>ON<sub>3</sub> und C<sub>25</sub>H<sub>35</sub>ON<sub>3</sub> wurden durch ESI-FT-ICR-MS (positiver Modus) als m/z 394.2857 [(M+H)<sup>+</sup> berechnet für C<sub>25</sub>H<sub>35</sub>ON<sub>3</sub> 393.278] und m/z 392.2701 [(M+H)<sup>+</sup> berechnet für C<sub>25</sub>H<sub>33</sub>ON<sub>3</sub> 391.262] ermittelt. Nach Chen *et al.* (2008) ist Undecylprodigiosin mit [M+H]<sup>+</sup> von 394.28 und Streptorubin B mit [M+H]<sup>+</sup> von 393.27 detektierbar.

XAN153-1MS2-394pos\_150326112341 #1-25 RT: 0.00-0.09 AV: 25 NL: 1.18E6  
T: FTMS + p ESI Full ms2 394.00@cid40.00 [105.00-400.00]

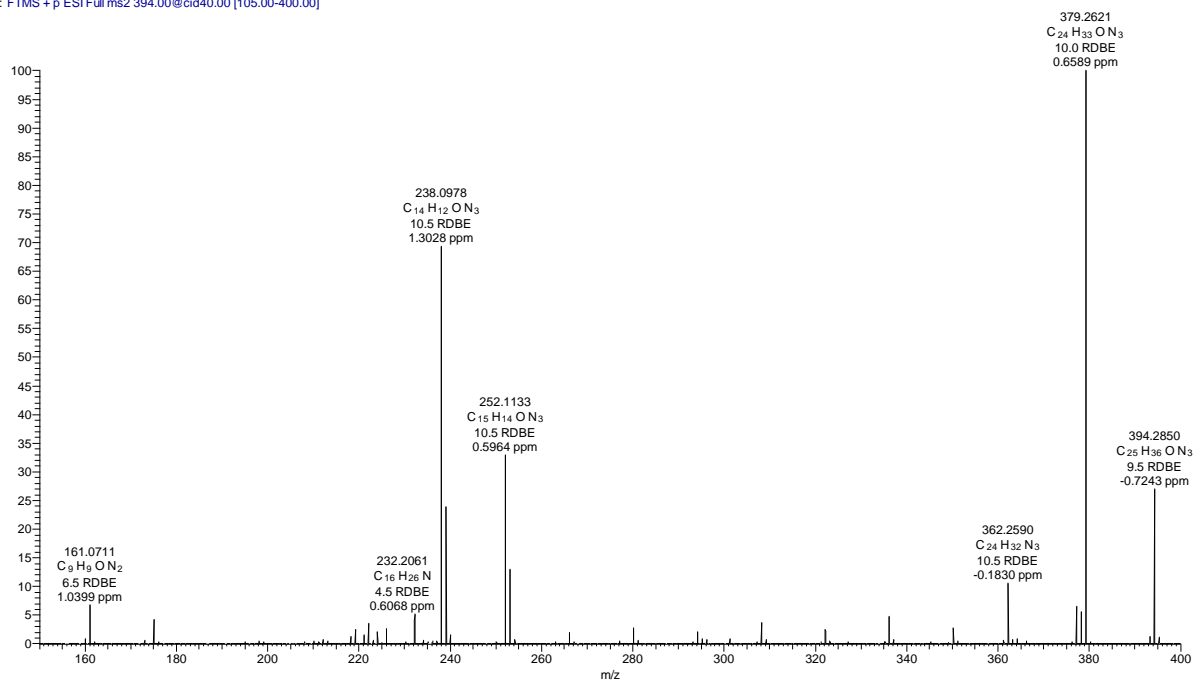
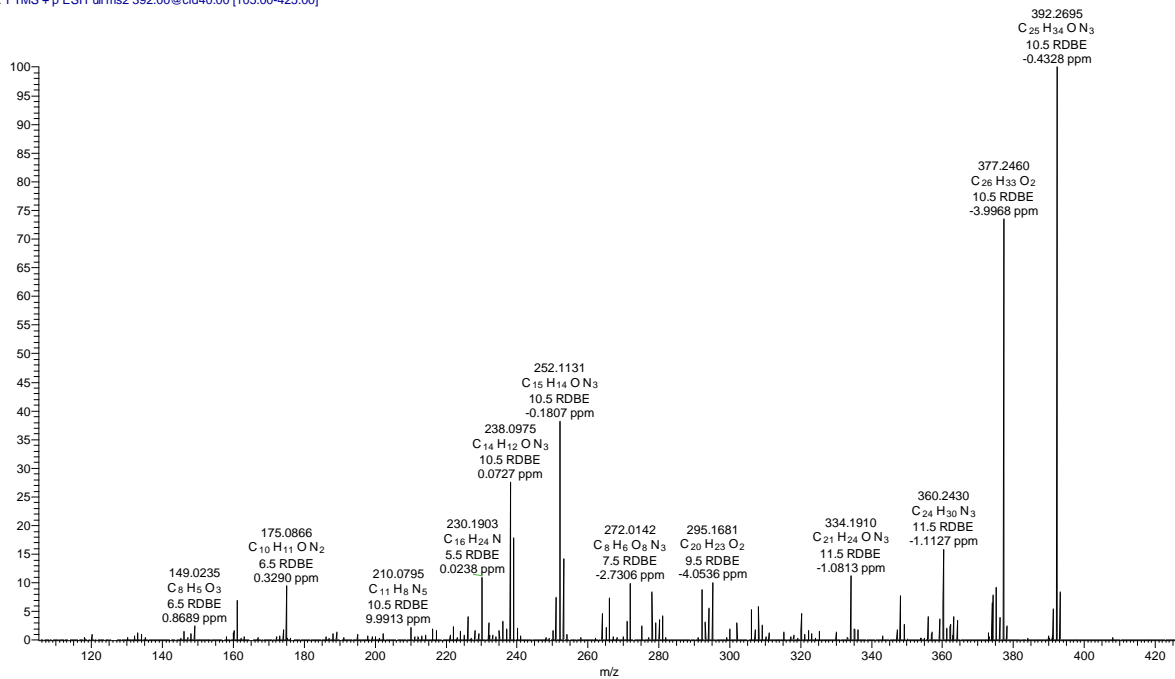


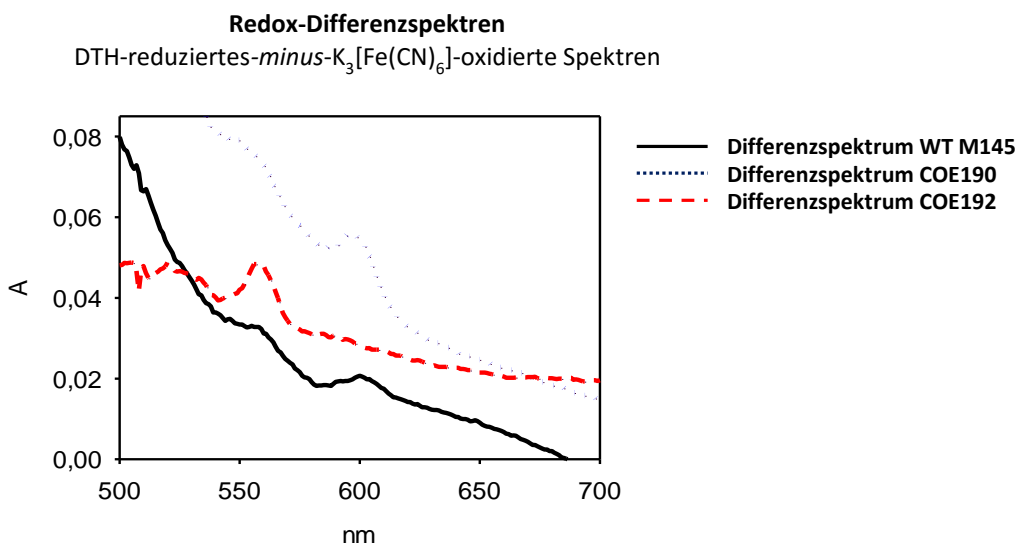
Abbildung 8.8.: (+)-ESI-MS<sup>2</sup> (positiver Modus) der detektierten molekularen Summenformel C<sub>25</sub>H<sub>36</sub>ON<sub>3</sub> (Undecylprodigiosin). Die Verbindung zeigt einen Massenverlust, der nach Chen *et al.* (2008) bereits für Undecylprodigiosin definiert ist (m/z 394 – 379 – 362).

XAN153-1-MS2-392pos\_150918164359 #1-25 RT: 0.00-0.12 AV: 25 NL: 9.02E3  
T: FTMS + p ESI Full ms2 392.00@cid40.00 [105.00-425.00]



**Abbildung 8.9.:** (+)-ESI-MS<sup>2</sup> der detektierten molekularen Summenformel C<sub>25</sub>H<sub>34</sub>ON<sub>3</sub> (Streptorubin B) Die Verbindung zeigt einen Massenverlust, der nach Chen *et al.* (2008) bereits für Streptorubin B definiert ist (m/z 392 – 377).

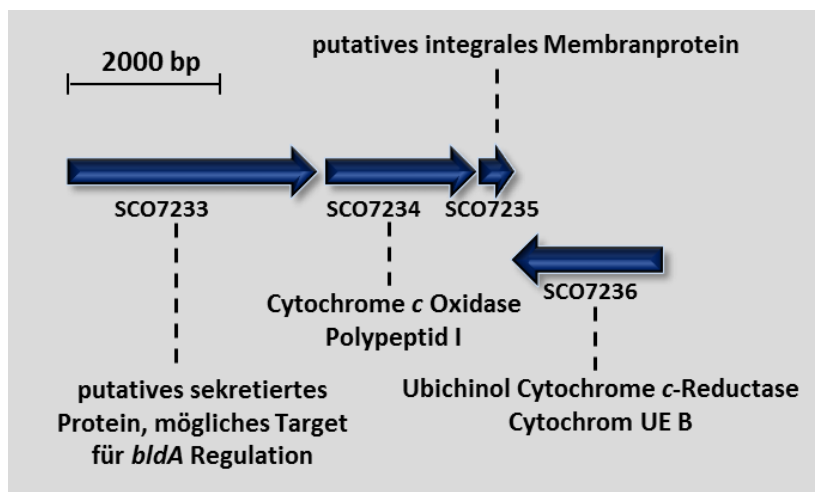
## IX. UV-VIS-Spektroskopie zum Nachweis der Cytochrome



**Abbildung 8.10.:** Redoxdifferenzspektren von hochkonzentrierter Membranfraktion (Myzel) von *S. coelicolor* zum Nachweis der am Elektronentransport beteiligten Cytochrome.

Der Wildtyp M145 (schwarze durchgezogene Linie) wurde als Positivkontrolle eingesetzt, die Mutante COE192 ( $\Delta$ SCO2148-56, rote gestrichelte Linie) wurde als Negativkontrolle eingesetzt; sie zeigt im Gegensatz zum Wildtyp und der Mutante COE190 ( $\Delta$ SCO3945-46) kein Absorptionsmaximum für Cytochrom *aa*<sub>3</sub>. Die einzelnen Cytochrome haben ihr Absorptionsmaximum wie folgt: bei 550 nm Cytochrom *c*, bei 600 nm Cytochrom *aa*<sub>3</sub>, bei 630 nm Cytochrom *d*.

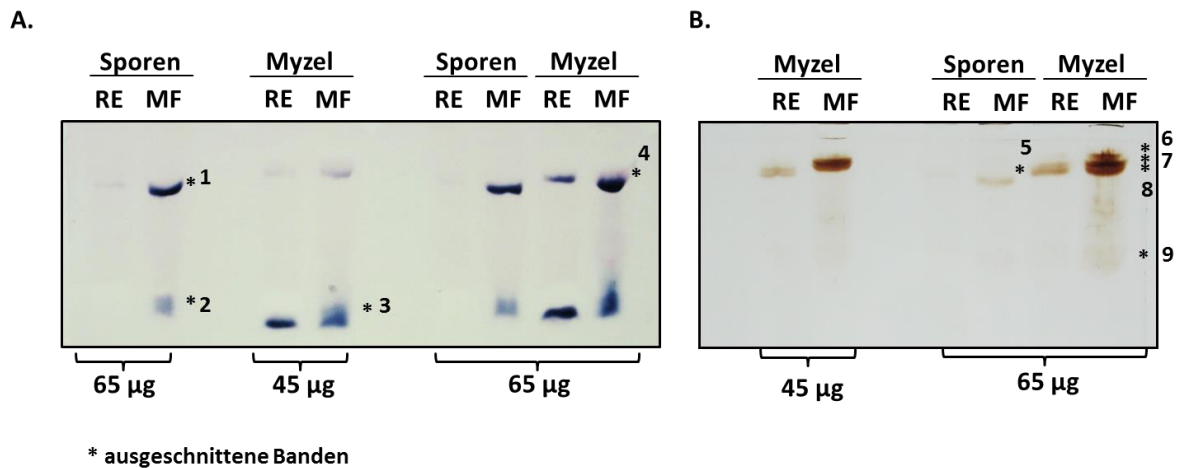
## X. Identifikation eines neuen Oxidase-Operons (SCO7233-36)



**Abbildung 8.11.:** Durch *in silico*-Studien neu identifizierte Komponenten der aeroben Atmungskette.

Die Genanordnung zeigt eine ungewöhnliche Zusammensetzung der Genprodukte. Sie bilden keinen assemblierten Komplex, wie es für die Genprodukte SCO2148-50 und SCO2151-56 üblich ist, sondern bilden lediglich Komponenten bzw. Untereinheiten eines alternativen Komplexes III oder Komplexes IV.

## XI. Nachweis einer Superkomplexassemblierung durch *In gel*-Aktivitätsfärbung



**Abbildung 8.12.:** *In gel*-Aktivitätsfärbung zum Nachweis der Succinat-Dehydrogenaseaktivität (SDH, A) und Cytochrom c Oxidase-Aktivität (B). Die mit \* markierten Banden wurden isoliert und zum Nachweis möglicher Superkomplexassoziationen massenspektrometrisch analysiert (Die MS-Analyse wurde freundlicherweise von Dr. Ch. Ihling (Pharmazie, MLU-Halle-Wittenberg durchgeführt).

**Tabelle 8.2.:** Identifizierte Peptide nach massenspektrometrischer Analyse der isolierten Banden 1-9. Die Anzahl der identifizierten Peptide für die Untereinheiten der in Spalte 3 und Spalte 7 gelisteten Komplexe wurden summiert.

Färbung	Band e	Identifizierte Komplexe	Identifizierte Peptide	Färbung	Bande	Identifizierte Komplexe	Identifizierte Peptide
SDH (Sporen)	1	SDH ATPase Cytochrom <i>c aa</i> <sub>3</sub> Oxidase Nar3 Ubichinol-Cytochrom <i>c</i> Reduktase SCO7236	40 33 9 24 5 4	Oxidase (Sporen)	5	ATPase Cytochrom <i>c aa</i> <sub>3</sub> Oxidase Ubichinol-Cytochrom <i>c</i> Reduktase NADH-Dehydrogenase SDH Nar3 Cytochrom <i>bd</i> Oxidase	53 14 8 11 5 5 4
SDH (Sporen)	2	SDH ATPase Cytochrom <i>c aa</i> <sub>3</sub> Oxidase NADH-Dehydrogenase Ubichinol-Cytochrom <i>c</i> Reduktase	53 16 10 4 3	Oxidase (Myzel)	6	Nar2 ATPase NADH-Dehydrogenase Cytochrom <i>c aa</i> <sub>3</sub> Oxidase SDH Cytochrom <i>bd</i> Oxidase Ubichinol-Cytochrom <i>c</i> Reduktase	60 43 24 27 25 15 17
SDH (Myzel)	3	SDH ATPase Nar2 Cytochrom <i>c aa</i> <sub>3</sub> Oxidase Ubichinol-Cytochrom <i>c</i> Reduktase Cytochrom <i>bd</i> Oxidase	81 36 21 14 5 3	Oxidase (Myzel)	7	Nar2 ATPase Cytochrom <i>c aa</i> <sub>3</sub> Oxidase Cytochrom <i>bd</i> Oxidase Ubichinol-Cytochrom <i>c</i> Reduktase SDH NADH-Dehydrogenase	46 69 29 18 20 21 8
SDH (Myzel)	4	Nar2 ATPase SDH Cytochrom <i>c aa</i> <sub>3</sub> Oxidase Cytochrom <i>bd</i> Oxidase Ubichinol-Cytochrom <i>c</i> Reduktase	87 49 46 11 8 16	Oxidase (Myzel)	8	Nar2 Cytochrom <i>c aa</i> <sub>3</sub> Oxidase SDH Cytochrom <i>bd</i> Oxidase ATPase Ubichinol-Cytochrom <i>c</i> Reduktase NADH-Dehydrogenase	16 27 28 16 25 18 7
				Oxidase (Myzel)	9	SDH ATPase Nar2 Cytochrom <i>c aa</i> <sub>3</sub> Oxidase Ubichinol-Cytochrom <i>c</i> Reduktase Cytochrom <i>bd</i> Oxidase	29 41 29 12 10 5



**Tabelle 8.3.: detaillierte Auflistung der identifizierten Peptide nach massenspektrometrischer Analyse.** Bei der Auflistung wurden nur Peptide mit einer Anzahl  $\geq 3$  berücksichtigt.

Bande	Enzym	SCO- Nummer	ident. Peptide	PSMs- Wert	MW [kDa]
<b>1</b>	succinate dehydrogenase	SCO4856	26	41	64,748
	FOF1 ATP synthase subunit alpha	SCO5371	23	30	57,221
	cytochrome C oxidase subunit II	SCO2156	15	34	35,424
	nitrate reductase A subunit alpha	SCO4947	14	14	134,98
	succinate dehydrogenase [Streptomyces]	SCO4855	10	18	29,283
	ubiquinol-cytochrome C reductase [Streptomyces]	SCO2149	9	22	38,55
	cytochrome C oxidase subunit I	SCO2155	9	13	64,08
	FOF1 ATP synthase subunit B	SCO5378	6	10	20,201
	menaquinol-cytochrome C reductase cytochrome b subunit	SCO2148	5	8	60,847
	succinate dehydrogenase	SCO4858	4	10	14,1
	FOF1 ATP synthase subunit A	SCO5367	4	4	30,597
	menaquinol-cytochrome C reductase cytochrome b subunit	SCO7236	4	4	61,428
	nitrate reductase subunit beta	SCO4948	3	3	59,809
<b>2</b>	succinate dehydrogenase	SCO4856	32	128	64,748
	succinate dehydrogenase	SCO4855	16	34	29,283
	FOF1 ATP synthase subunit alpha	SCO5371	11	20	57,221
	succinate dehydrogenase [Streptomyces]	SCO0923	9	17	71,975
	cytochrome C oxidase subunit I	SCO2155	5	8	64,08
	cytochrome C oxidase subunit II	SCO2156	5	8	35,424
	FOF1 ATP synthase subunit B	SCO5369	5	7	20,201
	succinate dehydrogenase [Streptomyces]	SCO0922	5	6	26,581
	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit L	SCO4573	4	4	69,181
	menaquinol-cytochrome C reductase cytochrome b subunit	SCO2148	3	4	60,847
<b>3</b>	succinate dehydrogenase [Streptomyces]	SCO0923	33	225	71,975
	succinate dehydrogenase	SCO4856	32	165	64,748
	FOF1 ATP synthase subunit alpha	SCO5371	25	55	57,221
	succinate dehydrogenase	SCO4855	17	48	29,283
	nitrate reductase subunit beta	SCO0217	15	20	57,249
	succinate dehydrogenase [Streptomyces]	SCO0922	11	64	26,581
	cytochrome C oxidase subunit II	SCO2156	8	11	35,424
	FOF1 ATP synthase subunit B	SCO5369	7	10	20,201
	nitrate reductase A subunit alpha	SCO0216	6	8	137,03
	cytochrome C oxidase subunit I [Streptomyces]	SCO2155	6	7	64,08
	ubiquinol-cytochrome C reductase	SCO2149	5	7	38,55
	succinyl-CoA synthetase subunit beta	SCO4808	5	6	41,577
	FOF1 ATP synthase subunit gamma	SCO5372	4	6	32,969
cytochrome BD ubiquinol oxidase subunit I	SCO3945	3	6	55,85	
<b>4</b>	nitrate reductase A subunit alpha	SCO0216	57	122	137,03
	nitrate reductase subunit beta	SCO0217	30	63	57,249
	FOF1 ATP synthase subunit alpha	SCO5371	29	61	57,221
	succinate dehydrogenase	SCO4856	23	53	64,748
	succinate dehydrogenase	SCO0923	18	28	71,975

	F0F1 ATP synthase subunit B	SCO5369	14	37	20,201
	ubiquinol-cytochrome C reductase	SCO2149	12	27	38,55
	succinate dehydrogenase	SCO4855	12	19	29,283
	cytochrome C oxidase subunit II	SCO2156	11	22	35,424
	cytochrome C oxidase subunit I	SCO3945	9	16	64,08
	cytochrome C biosynthesis protein	SCO4474	9	13	61,875
	cytochrome BD ubiquinol oxidase subunit I	SCO3945	8	18	55,85
	F0F1 ATP synthase subunit gamma	SCO5372	6	7	32,969
	succinate dehydrogenase	SCO4858	5	12	14,1
	menaquinol-cytochrome C reductase cytochrome b subunit	SCO2148	5	8	60,847
<b>5</b>	F0F1 ATP synthase subunit alpha	SCO5371	24	38	57,221
	ATP synthase subunit beta	SCO5373	19	33	52,145
	cytochrome C oxidase subunit II	SCO2156	14	40	35,424
	menaquinol-cytochrome C reductase cytochrome b subunit	SCO2148	8	12	60,847
	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit L	SCO4573	7	14	69,181
	ubiquinol-cytochrome C reductase	SCO2149	6	10	38,55
	F0F1 ATP synthase subunit gamma	SCO5372	6	6	32,969
	ubiquinone oxidoreductase subunit H	SCO4569	5	7	51,126
	succinate dehydrogenase	SCO4856	5	7	64,748
	nitrate reductase A subunit alpha	SCO4947	5	5	134,98
	cytochrome BD ubiquinol oxidase subunit I	SCO3945	4	7	55,85
	NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit M	SCO4574	4	7	55,945
	F0F1 ATP synthase subunit A	SCO5367	4	6	30,597
<b>6</b>	nitrate reductase A subunit alpha	SCO0216	50	82	137,03
	F0F1 ATP synthase subunit alpha	SCO5371	36	95	57,221
	ATP synthase subunit beta	SCO5373	26	70	52,145
	NADH dehydrogenase	SCO3092	20	31	48,439
	F0F1 ATP synthase subunit gamma	SCO5372	17	22	32,969
	nitrate reductase subunit beta	SCO0217	16	24	57,249
	cytochrome C oxidase subunit II	SCO2156	15	35	35,424
	succinate dehydrogenase	SCO0923	14	20	71,975
	cytochrome C oxidase subunit I	SCO2155	12	31	64,08
	cytochrome BD ubiquinol oxidase subunit I	SCO3945	10	39	55,85
	F0F1 ATP synthase subunit B	SCO5369	10	14	20,201
	pyruvate dehydrogenase E1	SCO2183	10	11	98,739
	ubiquinol-cytochrome C reductase	SCO2149	9	25	38,55
	cytochrome C biosynthesis protein	SCO4474	9	15	61,875
	menaquinol-cytochrome C reductase cytochrome b subunit	SCO2148	8	15	60,847
	succinate dehydrogenase	SCO4856	7	8	64,748
	F0F1 ATP synthase subunit delta	SCO5370	6	8	29,165
	F0F1 ATP synthase subunit A	SCO5367	5	14	30,597
	cytochrome C oxidase assembly protein	SCO3946	5	9	36,978
	cytochrome C biogenesis protein	SCO4475	5	7	40,534
	NADH dehydrogenase	SCO4606	4	8	68,367
	succinate dehydrogenase	SCO4855	4	6	29,283
	nitrate reductase subunit gamma	SCO0219	4	6	27,908

<b>7</b>	nitrate reductase A subunit alpha	SCO0216	46	76	137,03
	FOF1 ATP synthase subunit alpha	SCO5371	34	69	57,221
	cytochrome C oxidase subunit II	SCO2156	17	46	35,424
	FOF1 ATP synthase subunit B	SCO5369	17	29	20,201
	MULTISPECIES: nitrate reductase subunit beta	SCO0217	16	25	57,249
	cytochrome BD ubiquinol oxidase subunit I	SCO3945	13	39	55,85
	cytochrome C oxidase subunit I	SCO2155	12	38	64,08
	menaquinol-cytochrome C reductase cytochrome b subunit	SCO2148	12	27	60,847
	succinate dehydrogenase	SCO0923	11	14	71,975
	FOF1 ATP synthase subunit gamma	SCO5372	10	13	32,969
	succinate dehydrogenase	SCO4856	10	12	64,748
	ubiquinol-cytochrome C reductase	SCO2149	8	24	38,55
	NADH dehydrogenase	SCO3092	8	13	48,439
	FOF1 ATP synthase subunit A	SCO5367	6	11	30,597
	cytochrome C oxidase assembly protein	SCO3946	5	8	36,978
<b>8</b>	nitrate reductase subunit beta	SCO0217	16	30	57,249
	cytochrome C oxidase subunit II	SCO2156	15	47	35,424
	succinate dehydrogenase	SCO0923	14	21	71,975
	cytochrome BD ubiquinol oxidase subunit I	SCO3945	12	45	55,85
	cytochrome C oxidase subunit I	SCO2155	12	35	64,08
	MULTISPECIES: FOF1 ATP synthase subunit B	SCO5369	11	17	20,201
	FOF1 ATP synthase subunit gamma	SCO5372	11	13	32,969
	menaquinol-cytochrome C reductase cytochrome b subunit	SCO2148	10	16	60,847
	succinate dehydrogenase	SCO4856	9	10	64,748
	ubiquinol-cytochrome C reductase	SCO2149	8	23	38,55
	NADH dehydrogenase	SCO3092	7	13	48,439
	succinate dehydrogenase	SCO4855	5	7	29,283
	FOF1 ATP synthase subunit A	SCO5367	4	11	30,597
	cytochrome C oxidase assembly protein	SCO3946	4	6	36,978
<b>9</b>	succinate dehydrogenase	SCO0923	24	45	71,975
	FOF1 ATP synthase subunit alpha	SCO5371	20	35	57,221
	nitrate reductase A subunit alpha	SCO0216	19	23	137,03
	ATP synthase subunit beta	SCO5373	17	30	52,145
	nitrate reductase subunit beta	SCO0217	10	14	57,249
	cytochrome C oxidase subunit I	SCO2155	7	11	64,08
	ubiquinol-cytochrome C reductase	SCO2149	7	10	38,55
	cytochrome BD ubiquinol oxidase subunit I [Streptomyces]	SCO3945	5	7	55,85
	cytochrome C oxidase subunit II	SCO2156	5	7	35,424
	succinate dehydrogenase	SCO4856	5	6	64,748
	FOF1 ATP synthase subunit B	SCO5369	4	9	20,201
	menaquinol-cytochrome C reductase cytochrome b subunit	SCO2148	3	6	60,847

# Curriculum Vitae

## Persönliche Informationen

Vorname/ Nachname **Dörte Falke**  
Adresse Kleine Gosenstraße 6  
06114 Halle, Deutschland  
Geburtsdatum 19. September, 1984; Halberstadt

## Berufliche Tätigkeiten

Gegenwärtig **Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für medizinische Immunologie**  
Assistenz und Unterstützung bei Arbeitsaufgaben in der Professur, Forschung  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg/UK Halle, Deutschland

September 2010 – September 2014 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin**  
Assistenz in Lehre, Betreuung von BA- und Projektstudenten  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Biologie/Mikrobiologie, Halle, Deutschland

März 2010 – August 2010 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin**  
Assistenz bei Praktika, Betreuung von Projektstudenten, Forschungsprojekt „Charakterisierung von FocA und Protein-Protein-Interaktionsstudien von FocA und PflB in *Escherichia coli*“  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Biologie/Mikrobiologie, Halle, Deutschland, Exzellenznetzwerk (EXNW) Strukturen und Mechanismen der biol. Informationsverarbeitung

## Qualifizierungsphasen, Studium und Schule

Gegenwärtig Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg/UK Halle, Institut für medizinische Immunologie

September 2010 – Oktober 2015 **Promovendin** zum Thema „Funktionelle Charakterisierung der drei respiratorischen Nitratreduktasen des obligat aeroben Bakteriums *Streptomyces coelicolor*“ in der Arbeitsgruppe von Prof. Gary Sawers

August 2012 – September 2012 FEMS geförderte Teilnahme an der *Summer School* “Microbial Metabolites in Nature and Medicine” des John Innes Centre Norwich UK /Rudjer Bošković IUC Dubrovnik, Kroatien

September 2004 – Februar 2010 Diplom-Studium der Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg zur Erlangung des akademischen Grades Diplom-Biologin

Mai 2009 – Februar 2010 **Diplomandin** am Institut für Biologie/Mikrobiologie mit dem Thema “Untersuchungen zu Protein-Protein-Wechselwirkungen von FocA in *Escherichia coli*“

April 2004 **Abitur** am Gymnasium Ascaneum in Aschersleben

## Publikationsliste

### Peer-reviewed Publikationen (seit 2010)

**Seliger B., Meinhardt A., Falke D. (2015).** The role of immune modulatory microRNAs in tumors. *Intech open, accepted*

**Fischer, M., Falke D., Pawlik T. and Sawers, R. G. (2014).** Oxygen-Dependent Control of Respiratory Nitrate Reduction in Mycelium of *Streptomyces coelicolor* A3(2) *J. Bacteriol* 196(23):4152-62

**Doberenz, C., Zorn, M., Falke, D., Nannemann, D., Hunger, D., Beyer, L., Ihling, C. H., Meiler, J., Sinz, A. and Sawers, R. G. (2014).** Pyruvate Formate-Lyase Interacts Directly with the Formate Channel FocA to Regulate Formate Translocation. *J Mol Biol.* 426(15):2827-39

**Beyer, L., Doberenz, C., Falke, D., Hunger, D., Suppmann, B. and Sawers, R. G. (2013).** Coordination of FocA and pyruvate formate-lyase synthesis in *Escherichia coli* demonstrates preferential translocation of formate over other mixed-acid fermentation products. *J Bacteriol* 195(7): 1428-1435.

**Fischer, M., Falke, D. and Sawers, R. G. (2013).** A respiratory nitrate reductase active exclusively in resting spores of the obligate aerobic *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* 89(6): 1259-1273.

**Fischer, M., Schmidt, C., Falke, D. and Sawers, R. G. (2012).** Terminal reduction reactions of nitrate and sulfate assimilation in *Streptomyces coelicolor* A3(2): identification of genes encoding nitrite and sulfite reductases. *Res Microbiol* 163(5): 340-348.

**Falke, D., Schulz, K., Doberenz, C., Beyer, L., Lilie, H., Thiemer, B. and Sawers, R. G. (2010).** Unexpected oligomeric structure of the FocA formate channel of *Escherichia coli* : a paradigm for the formate-nitrite transporter family of integral membrane proteins. *FEMS Microbiol Lett* 303(1): 69-75.

## Danksagung

Mein größter Dank gilt Herrn Prof. Sawers:

Ich danke ihm für die Bereitstellung des Themas, was immer wieder neue Herausforderungen barg, an die ich aber stets mit Experimentierfreude heranging. Ich danke ihm für das Vertrauen, dass er mir entgegengebracht hat, neue Ideen, eigene Vorstellungen und experimentelle Ansätze zu verwirklichen und den stetigen wissenschaftlichen Austausch sowie das durchweg positive Arbeitsklima. Gleichzeitig möchte ich mich für die Übernahme des Erstgutachtens bedanken.

Herrn Prof. Dr. J. Boch möchte ich für die freundliche Bereitschaft danken, das Zweitgutachten zu übernehmen.

Für die Übernahme des externen Gutachtens möchte ich Herrn Prof. Dr. M. Bott danken.

Einen einzelnen Abschnitt möchte ich meinem Streptomyceten-Teampartner Dr. Marco Fischer widmen:

Lieber Marco, es war eine reine Freude mit dir zusammen zu arbeiten. Ich möchte dir danken für deine stetige Diskussionsbereitschaft, für deinen Rat bei neuen experimentellen Herausforderungen, für die erholsamen Mittagspausen, vor allem in meiner Schreibphase, für die vielen lustigen Momente im Büro und Labor und für die Ablenkungsmanöver, wenn sie mal nötig waren. Ich danke dir, dass du mir Raum und Platz geboten hast, um ständig für Diskussionen bereit zu stehen während meiner Schreibphase, für die unerlässliche Motivation (Erhard, Heribert und Olga) und für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Dr. Jöx möchte ich danken, für die vielen heiteren Stunden, die fachübergreifenden Gespräche und vor allem musikalischen Ergüsse im Büro 2.17. Vor allem die morgendlichen Zettelbotschaften haben meinen Tag erheitert.

Erwähnen möchte ich auch Hannes und Katja, für die Gespräche während meiner Schreibphase sowie das Lesen meiner Arbeit und das Teilen der Unermüdlichkeit. Ein großer Dank geht auch an die Mädelsgruppe Steffi, Lydia K., Kinga, Doreen und Claudia H. für die vielen heiteren Momente, die geselligen Abendstunden, die aufmunternden Worte sowie die ständige Motivation. Danken möchte ich auch Lydia B., Marlén und Janine und Claudia D., die mich seit der Entscheidung, schon mein Forschungspraktikum in der Mikrobiologie zu absolvieren, stetig begleitet haben und stets ein offenes Ohr hatten.

Ich möchte nicht vergessen, Tony, Christopher sowie Phillip, Timon, Theresa, Scarlett und Elena zu danken, die ein Teil der *Streptomyces*-Gruppe waren und mich durch ihre Arbeit unterstützt haben. Ein Dank geht dabei vor allem an Christopher, der mich vor allem in der Schreibphase motiviert hat.

Mein Dank gilt darüber hinaus der gesamten Mikrobiologie für die Bereitschaft zur Diskussion, die tollen Betriebsausflüge und Feiern bei den VAAM-Tagungen.

Meinen Eltern gebührt ein großer Dank für die emotionale Unterstützung während meiner Promotion und das Vertrauen in mich, diesen Weg einzuschlagen.

Ein besonderer Dank geht an Mike: er hat eine Engelsgeduld bewiesen und mich unentwegt unterstützt, was mich motiviert und angespornt hat.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der aufgeführten Literatur und der angegebenen Hilfsmittel angefertigt zu haben und die den benutzen Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht zu haben.

Diese Arbeit wurde keiner anderen Einrichtung zur Begutachtung vorgelegt.

Halle, den 30.11.2015

.....

Dörte Falke