



Annegret Kamps (Autor)

**Molekularbiologische Studien zur Regulation der
dissimilatorischen Nitrat- und Nitritreduktion bei
*Staphylococcus carnosus***

Annegret Kamps

**Molekularbiologische Studien zur Regulation der
dissimilatorischen Nitrat- und Nitritreduktion bei
*Staphylococcus carnosus***



Cuvillier Verlag Göttingen

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/3613>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,
Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

INHALTSVERZEICHNIS

A	Zusammenfassung	1
B	Einleitung	3
B.1	Die gesundheitliche Bedeutung von Nitrat	3
B.2	Die Rolle von <i>Staphylococcus carnosus</i> als Starterkultur in der Lebensmittelindustrie	4
B.3	Die Bedeutung von Nitrat für den Stoffwechsel	5
B.4	Nitratreduktion bei <i>Escherichia coli</i>	6
B.5	Nitritreduktion bei <i>E. coli</i>	8
B.6	Regulation der Nitrat- und Nitritreduktion bei <i>E. coli</i>	10
B.6.1	Sauerstoff-abhängige Regulation in <i>E. coli</i> durch FNR	10
B.6.2	Nitrat-/Nitrit-abhängige Regulation in <i>E. coli</i> durch NarXL und NarQP	12
B.7	Nitrat-/Nitritreduktion bei <i>S. carnosus</i>	14
B.8	Biofilmbildung durch Staphylokokken	17
B.8.1	Medizinische Bedeutung der Staphylokokken	18
B.8.2	Prinzip der Biofilmbildung	19
B.9	Sauerstoff-Sensoren	20
B.10	Aufgabenstellung	21
C	Material und Methoden	22
C.1	Material, Stämme und Plasmide	22
C.1.1	Bakterienstämme	22
C.1.2	Plasmide	23
C.1.3	Kultivierung der Bakterienstämme	23
C.1.3.1	Kultivierungsmedien	23
C.1.3.2	Anzuchtbedingungen	25
C.1.3.3	Stammhaltung	25
C.1.4	Synthetische Oligonukleotide	26
C.1.4.1	Synthetische Oligonukleotide zur DNA-Sequenzierung	26
C.1.4.2	Synthetische Oligonukleotide für PCR	27
C.1.5	Enzyme	29
C.1.6	Antibiotika	30
C.1.7	Chemikalien	30
C.1.8	Spezielle Laborgeräte	31
C.2	Analytische Methoden	31
C.2.1	Nachweis von Nitrat	31
C.2.2	Nachweis von Nitrit	32
C.3	Molekulargenetische Methoden	32
C.3.1	Plasmidisolierung	32
C.3.1.1	Plasmid-Mini-Präparation aus <i>E. coli</i> , <i>S. carnosus</i> , <i>S. epidermidis</i> und <i>S. aureus</i>	32
C.3.1.2	Plasmid-Midi-Präparationen aus <i>E. coli</i> und <i>S. carnosus</i>	33
C.3.1.3	Plasmid-Maxi-Präparation aus <i>S. carnosus</i>	33
C.3.2	Isolierung chromosomaler DNA aus Staphylokokken	34
C.3.2.1	Isolierung chromosomaler DNA aus <i>S. carnosus</i> und <i>S. aureus</i>	34
C.3.2.2	Isolierung chromosomaler DNA aus Koloniematerial	35
C.3.3	Phenolextraktion von DNA und RNA	35

INHALTSVERZEICHNIS

C.3.4	EtOH-Präzipitation von DNA und RNA	36
C.3.5	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	36
C.3.5.1	Doppelstrang-DNA	36
C.3.5.2	Oligonukleotide	36
C.3.5.3	RNA.....	36
C.3.6	Modifikation von DNA	37
C.3.6.1	Restriktion von DNA mit Restriktionsendonukleasen	37
C.3.6.2	Behandlung von DNA mit Klenow-Enzym	37
C.3.6.3	Behandlung von DNA mit alkalischer Phosphatase.....	37
C.3.6.4	Ligation von DNA-Fragmenten	38
C.3.7	Agarosegelelektrophorese.....	38
C.3.7.1	Analytische und präparative Agarosegelelektrophorese von DNA-Fragmenten	38
C.3.7.2	Agarosegelelektrophorese von RNA.....	39
C.3.8	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	40
C.3.9	Transformation.....	40
C.3.9.1	Transformation von <i>E. coli</i>	40
C.3.9.1.1	Elektrotransformation von <i>E. coli</i>	40
C.3.9.2	Transformation von <i>S. carnosus</i>	41
C.3.9.2.1	Protoplasten-Transformation	41
C.3.9.2.2	Elektrotransformation von <i>S. epidermidis</i> und <i>S. aureus</i>	44
C.3.10	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	44
C.3.10.1	Durchführung	44
C.3.10.2	Inverse PCR.....	45
C.3.11	Southern Blot Analyse	46
C.3.11.1	Vakuumblot.....	46
C.3.11.2	DNA-DNA-Hybridisierung.....	47
C.3.12	DNA-Sequenzierung.....	48
C.3.12.1	Sequenzierung mit dem Li-Cor DNA-Sequencer	48
C.3.13	Arbeiten mit RNA.....	49
C.3.13.1	RNA-Isolierung aus <i>S. carnosus</i>	49
C.3.13.2	RNA-Isolierung mittels des RNeasy Mini- bzw. Maxi-Kits.....	51
C.3.13.3	Primer Extension	51
C.3.14	Northern Blot Analyse	53
C.3.14.1	Northern Transfer (Kapillar-Blot).....	53
C.3.14.2	RNA-RNA-Hybridisierung	55
C.3.14.2.1	Herstellung einer RNA-Sonde.....	55
C.3.14.2.2	Hybridisierung	55
C.3.14.2.3	Detektion.....	56
C.3.15	Insertionsinaktivierung von Genen von <i>S. carnosus</i> und <i>S. aureus</i>	57
C.4	Proteinchemische und enzymatische Methoden	58
C.4.1	Aufschluß von Bakterien	58
C.4.1.1	Ultraschallaufschluß von <i>E. coli</i> -Zellen.....	58
C.4.1.2	Glasperlenaufschluß von Staphylokokken-Zellen.....	58
C.4.1.3	Lysostaphinaufschluß von Staphylokokken zur Isolierung von Gesamtzellprotein ..	59
C.4.1.4	Bestimmung der β -Galaktosidaseaktivität	59
C.4.2	Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	60
C.4.2.1	Proteinbestimmung nach Bradford.....	60

C.4.3	Bestimmung von Enzymaktivitäten in <i>S. carnosus</i>	60
C.4.3.1	Nitratreduktase-Aktivität.....	61
C.4.3.1.1	Benzylyviologen-Nitratreduktase-Aktivität in ganzen Zellen.....	61
C.4.3.2	Nitritreduktase-Aktivität	62
C.4.3.2.1	Nitritreduktase-Aktivität in ganzen Zellen	62
C.4.3.2.2	Nitritreduktaseaktivität in Zellextrakten.....	63
C.4.3.2.3	Direkte Rekonstitution von Nitritreduktase-Aktivität mit Zellextrakten.....	63
C.4.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	64
C.4.4.1	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	64
C.4.4.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli.....	66
C.4.5	Immunoblot-Analyse	67
C.4.6	Ponceau-Färbung von Proteinen	68
C.4.7	Aufreinigung von Proteinen mittels Affinitätschromatographie	68
C.4.7.1	Fusion von Proteinen an ein His-Tag und Aufreinigung durch Affinitätschromatographie an Nickel-NTA-Harz.....	68
C.4.7.1.1	Prinzip des His-Tag-Systems.....	68
C.4.7.1.2	C-terminaler His-Tag von NreB(C62S) unter Verwendung des pCQE1 Expressionsvektors	69
C.4.7.1.3	Expression und Aufreinigung des Fusionsproteins	70
C.4.7.2	MAL-E-Fusionsproteine (pMAL™ Protein Fusion and Purification System, New England BioLabs)	70
C.4.7.2.1	Prinzip des pMAL-Systems.....	70
C.4.7.2.2	Expression und Aufreinigung des Fusionsproteins	71
C.4.7.3	Ionenaustauschchromatographie	71
C.4.8	Gelretardationsexperimente	72
C.4.8.1	Vorgehensweise.....	72
C.4.9	Protein-Protein-Interaktions-Analyse	73
C.4.9.1	Prinzip einer Biosensor-Analyse.....	73
C.4.9.2	Vorgehensweise.....	73
C.4.9.3	Durchführung	74
C.4.10	Test auf Biofilmbildung	75
C.4.10.1	Prinzip des Biofilmtests.....	75
C.4.11	Rekonstitutionsexperimente.....	76
C.4.11.1	Durchführung	76
C.4.11.2	Hemmung der NreB-Aktivität.....	77
C.4.11.3	Probenvorbereitung für EPR -Spektroskopie	77
C.4.12	Phosphorylierungsassays	78
C.4.13	Auswertungen der Phosphorylierungsassays mittels Phosphoimager	78
C.4.14	Analyse von Protein- und DNA-Sequenzen mit Hilfe von Computerprogrammen ..	79
C.5	Plasmidkonstruktionen.....	79
C.5.1	Plasmide zur Konstruktion des genomischen Reporter-Gen-Systems.....	79
C.5.1.1	Plasmidkonstruktionen zur Subklonierung der <i>lacPRH</i> -Gene.....	79
C.5.1.2	Plasmide zur Insertionsinaktivierung der <i>lacRH</i> Gene und zur Konstruktion eines <i>single copy reporter gene</i> Systems	80
C.5.2	Plasmide zur Komplementation der $\Delta nreABC$ Mutante m1	81
C.5.3	Plasmidkonstruktionen zur Insertionsinaktivierung von <i>nreB</i> bzw. <i>nreBC</i> in <i>S. aureus</i> Sa113.....	81

C.5.4	Plasmide zur Komplementation der <i>nreB</i> - und <i>nreBC</i> - Mutante in <i>S. aureus</i>	82
C.5.5	Plasmid zur Revertierung der $\Delta nreABC$ -Mutation in m1	82
C.5.6	Plasmide zur Herstellung von Northern Blot-Sonden	82
D	Ergebnisse	84
D.1	Untersuchungen zur Funktionsaufklärung von NirR	84
D.1.1	NirR lässt sich als MalE-Fusionsprotein aufreinigen, nicht aber als His-Tag-Protein.....	84
D.1.2	Studien zum Nachweis einer potentiellen enzymatischen Funktion von NirR.....	86
D.1.2.1	Versuche zur Rekonstitution der Nitritreduktase-Aktivität durch Vereinigung von Zellextrakten und Zugabe von aufgereinigtem MalE-NirR.....	86
D.1.2.2	Studien zum Nachweis einer potentiellen Protein-Protein-Interaktion zwischen NirR und der Nitritreduktase.....	87
D.1.2.2.1	Interaktionsstudien mit aufgereinigtem MalE-NirR und verschiedenen Zellextrakten aus <i>S. carnosus</i>	88
D.1.3	Studien zum Nachweis einer potentiellen regulatorischen Funktion von NirR auf DNA-Ebene.....	91
D.1.3.1	DNA-Protein Interaktionsstudien (Gelretardationsstudien).....	91
D.1.3.2	Primer Extension-Untersuchungen.....	92
D.1.3.3	Northern Blot Untersuchungen	93
D.2	Vergleichende Primer-Extension und Northern Blot-Untersuchungen hinsichtlich des <i>nir</i> - und <i>nar</i> -Operons, des <i>narT</i> -Gens und des postulierten <i>nre</i> -Operons im <i>S. carnosus</i> Wildtyp und in der Mutante m1	95
D.2.1	Regulation des <i>nir</i> - und <i>nar</i> -Operons und des <i>narT</i> -Gens.....	95
D.2.2	Untersuchungen zur Transkriptionsstartbestimmung des mutmaßlichen <i>nreABC</i> -Operons	96
D.2.3	Primer Extension.....	96
D.2.4	Die <i>nreABC</i> -Operonstruktur wurde durch Northern Blot-Analysen indirekt bestimmt.....	97
D.3	NreC bindet spezifisch an die Promotorregionen von <i>nir</i> - und <i>nar</i> -Operon und <i>narT</i> -Gen.....	100
D.4	Regulation der Transkriptionsinitiation des <i>moeB</i> -Gens in <i>S. carnosus</i> Wildtyp und <i>S. carnosus</i> m1	102
D.5	Konstruktion eines genomischen Reporter-gen-Systems.....	103
D.5.1	Voraussetzungen für ein genomisches Reporter-gen-System	103
D.5.2	Sequenzanalyse der <i>lac</i> -Region	104
D.5.3	Insertionsinaktivierung der Gene <i>lacRH</i> und ihrer Promotorregionen	107
D.5.4	Promorteststudien	108
D.6	Charakterisierung des Sensor-Proteins NreB und Identifizierung des Effektormoleküls.....	110
D.6.1	Identifizierung von Sauerstoff als Effektormolekül des Sensors NreB	110
D.6.1.1	Die Cystein-Deletion an Position 62 inhibiert die Funktionalität von NreB	111
D.6.1.2	Untersuchungen zur Eisenabhängigkeit des <i>nir</i> -Promotors	112
D.6.2	Rekonstitutionsanalysen des Sauerstoffsensors NreB	112
D.6.2.1	Aufreinigung von NreB und NreB(C62S).....	113
D.6.2.2	Identifizierung von Fe-S-Clustern im NreB-Protein mittels Rekonstitutionsanalyse	114
D.6.3	Nachweis der Funktionalität von rekonstituiertem NreB	121

D.6.3.1	Vergleich der Autophosphorylierungsaktivität von rekonstituiertem und nicht rekonstituiertem NreB.....	121
D.6.4	Untersuchung der Fe-S-Cluster im NreB mittels EPR.....	125
D.7	Konstruktion und Analyse von <i>nreB</i> - und <i>nreBC</i> -Deletionsmutanten in <i>S. aureus</i>	128
D.7.1	Insertionsinaktivierung der Gene <i>nreB</i> und <i>nreBC</i>	128
D.7.2	Analyse der <i>S. aureus nreB</i> - und <i>nreBC</i> -Deletionsmutanten m8 und m9	130
D.7.2.1	Untersuchungen auf Biofilmbildung in einer <i>nreB</i> - und einer <i>nreBC</i> -Deletionsmutante in <i>S. aureus</i>	130
D.7.2.2	Komplementationsstudien	132
D.7.2.3	Vergleichende Northern Blot-Studien hinsichtlich des <i>ica</i> -Operons in <i>S. aureus</i> Sa113 Wildtyp und den <i>S. aureus</i> Sa113 <i>nreB</i> und <i>nreBC</i> -Deletionsmutanten m4 und m5	133
E	Diskussion	135
E.1	NirR – potentieller Regulator der Nitrit-reduktase-Aktivität.....	135
E.2	Regulation der Nitrat-/Nitritreduktion	138
E.2.1	Vergleich von Wildtyp und Mutante m1 auf RNA-Ebene	138
E.2.2	Regulation der Transkriptionsinitiation am <i>nre</i> -Promotor.....	139
E.2.3	Keine direkte Transkriptionsaktivierung von <i>moeB</i> durch NreC.....	139
E.3	Die β -Galaktosidase als genomisches Reporter-gen-System.....	140
E.4	Das NreB-Protein – ein Sauerstoffsensormit Eisenschwefel-Cluster.....	142
E.4.1	NreB ist höchstwahrscheinlich ein Sauerstoff- und kein Nitrat- oder Nitritsensor .	142
E.4.1.1	Bedeutung von Eisen für die Aktivität des NreB-Proteins.....	143
E.4.2	Weiterführende Untersuchungen zur Art des Fe-S-Clusters im NreB-Protein.....	145
E.4.3	NreB – Sensorprotein ohne PAS-Domäne.....	146
E.5	Bestätigung des NreC-Bindemotivs.....	147
E.6	Überlegungen zu NreA	148
E.7	Aktuelles Arbeitsmodell der Funktionsweise von NreB/NreC.....	149
E.8	Einfluss einer Deletion der Gene <i>nreB</i> und <i>nreC</i> auf die Biofilmbildung in <i>Staphylococcus aureus</i>	151
F	Literatur	155
G	Publikationen	178
H	Anhang	179
H.1	Nukleotidsequenz der Gene des Nitrit- / Nitratreduktase-Genlocus` mit abgeleiteter Aminosäure-sequenz	179
H.2	Nukleotidsequenz der Gene des Nitrit-/Nitratreduktase Genlocus aus <i>S. aureus</i> N315 mit abgeleiteter Aminosäuresequenz	202
H.3	Nukleotidsequenz der Gene des β -Galaktosidase-Genlocus` aus <i>S. carnosus</i> TM300 mit abgeleiteter Aminosäuresequenz	207