A ZUSAMMENFASSUNG

Ein tieferes Verständnis des Nitratstoffwechsels von Staphylokokken ist im Hinblick auf ihre Verwendung in der Lebensmittelindustrie und als Pathogenitätsfaktor von großer Bedeutung. Auf der Basis von bereits erlangten Erkenntnissen über die Grundlagen der dissimilatorischen Nitrat- und Nitritreduktion im apathogenen *Staphylococcus carnosus* sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingehendere Untersuchungen bezüglich der potentiellen Regulatorproteine NirR und NreB vorgenommen werden. Eine Bindung von NirR an die Promotorregion des *nir*-Promotors und eine direkte Beteiligung am enzymatischen Prozess oder beim Assembly der Nitritreduktase wurden allerdings nicht nachgewiesen. Auch vergleichende Primer Extension- und Northern Blot-Analysen mit RNA des Wildtyps und einer *nirRsirA*-Deletionsmutante erklärten nicht, ob NirR auf RNA-Ebene eine stabilisierende Rolle spielt.

Darüber hinaus bestätigten Untersuchungen zur Regulation der von NreBC regulierten Gene (*nir*- und *nar*-Operon, *narT*-Gen), dass die Deletion von *nreABC* mit einer drastischen Reduktion der Transkriptionsinitiation und somit auch der Menge an Gesamttranskript korrelierte. Ein zuvor prognostiziertes NreC-Bindemotiv konnte in Gelretardationsexperimenten bestätigt werden.

In Komplementationsstudien wurde eine essentielle Bedeutung des zweiten von vier Cysteinresten für die NreB-Funktion nachgewiesen. Dabei wurde die *nreABC*-Deletionsmutante m1, die starke Beeinträchtigungen in der dissimilatorischen Nitrat- und Nitritreduktion sowie beim aeroben und anaeroben Wachstum aufweist, chromosomal durch Integration der Gene (i) *nreABC* und (ii) *nreAB*C* in den *lac*-Locus komplementiert. Die Komplementation mit den nativen Genen ermöglichte eine Reversion der beschriebenen Defekte. Wurde hingegen mit den Genen *nreAB*C* komplementiert, wobei *nreB* aufgrund einer Punktmutation im Codon 62 statt eines Cysteins für ein Serin kodiert, so blieb der Mutanten-Phänotyp erhalten.

Anaerobiose, Nitrat und Nitrit sind Induktionsfaktoren der dissimilatorischen Nitrat- und Nitritreduktase. Für eine differentielle Untersuchung der Effekte der einzelnen Umweltfaktoren auf die Promotoraktivität war unter anderem die Etablierung eines Promotortestsystems notwendig, welches regulatorische Untersuchungen im Genom von *S. carnosus* in *single copy* ermöglichte. Das dabei verwendetete Reportergen, die β-Galaktosidase aus *S. carnosus*, musste vorab charakterisiert werden.

Neben der Bedeutung der Cysteinreste für die NreB-Aktivität favorisierte auch die mit NreB in Zusammenhang stehende Eisenabhängigkeit des *nir*-Promotors Sauerstoff als Signal für die NreB-Autophosphorylierung. Diese Hypothese konnte in so genannten Rekonstitutionsexperimenten bestätigt werden. Hierbei wurde *in vitro* unter anaeroben, reduzierenden Bedingungen ein Eisen-Schwefel-Cluster in aerob aufgereinigtes (vermutlich Fe-S-Cluster freies) NreB-His inseriert. Die Insertion des Eisen-Schwefel-Clusters stellte einen reversiblen Prozess dar, da durch Sauerstoffeinwirkung das inserierte Eisen-Schwefel-Cluster wieder zerstört wurde. Ein Vergleich der

Kinase-Aktivität von (i) anaerob rekonstituiertem und (ii) aerobem NreB-His-Protein demonstrierte, dass die Rekonstitution mit einer deutlichen Steigerung der NreB Kinase-Aktivität einherging.
Schließlich sollte der Frage nachgegangen werden, ob dem Zweikomponenten-System NreBC eine globalere Funktion zufällt, und ob im pathogenen *S. aureus* die Sauerstoff-empfindliche Biofilmbildung von NreBC kontrolliert wird. Die Charakterisierung einer *nreB*- und einer *nreBC*-Deletionsmutante in *S. aureus* sowie der komplementierten Stämme bezüglich der Biofilmbildung unter anaeroben Bedingungen lieferten erste Hinweise, die eine solche Beteiligung möglich erscheinen lassen.

B EINLEITUNG

B.1 Die gesundheitliche Bedeutung von Nitrat

Seit langem ist bekannt, dass ein erhöhter Nitratgehalt im Trinkwasser und auch im Gemüse gesundheitsschädlich ist. Bereits 1962 wurden von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) und der Sonderorganisation der Vereinten Nationen für Ernährung und Landwirtschaft (FAO) Grenzwerte für eine maximale Nitratbelastung festgelegt. Für Trinkwasser wurde eine Höchstmenge von 45 mg/l festgesetzt (Fan & Steinberg, 1996), beim Gemüse liegt der vertretbare Wert für die tägliche Nitrataufnahme bei 3,65 mg/kg Körpergewicht. Diätetische Lebensmittel und Babynahrung unterliegen einer noch strikteren Regelung, sie dürfen einen Nitritgehalt von 250 mg/kg nicht überschreiten (Mayer-Miebach & Schubert, 1991).

Die eigentliche gesundheitliche Gefährdung geht nicht vom Nitrat aus, welches nur eine geringe primäre Toxizität besitzt. Bedingt durch bakterielle Umsetzungen, die exogen im Lebensmittel oder endogen nach Resorption im menschlichen Körper auftreten können, wird Nitrat zu Nitrit reduziert. Dieses reagiert mit sekundären Aminen zu so genannten Nitrosaminen. Die Mehrzahl dieser Nitrosamine zeichnet sich durch eine äußerst hohe Karzinogenität aus (Classen *et al*., 1987).

Wird Nitrat oder Nitrit in hohen Konzentrationen aufgenommen, so besteht die Gefahr einer Methämoglobinämie. Bei oraler Verabreichung von Nitrit beträgt die letale Dosis für den Menschen 71 mg/kg. Für Nitrat hat man bei Ratten einen LD_{50}-Wert von 3,36 g/kg ermittelt (Roth & Daunderer, 1991). Durch die Bindung von Nitrit an Hämoglobin entsteht Methämoglobin, welches Eisen in der dreiwertigen statt der zweiwertigen Oxidationsstufe enthält. Sauerstoff wird hier irreversibel gebunden. Die Folge ist eine Unfähigkeit der Erythrozyten, weiterhin Sauerstoff zu transportieren, was eine Cyanose verursacht. Zudem ist die Kapazität des Methämoglobin-Reduktase-Systems zur Revertierung des Prozesses begrenzt (Fan & Steinberg, 1996). Säuglinge unter sechs Monaten sind besonders gefährdet aufgrund der leichten Oxidierbarkeit des fetalen Hämoglobins. Außerdem können Nitrat-reduzierende Bakterien den Magen eines Säuglings offenbar ungeschädigt passieren; erst im Darm reduzieren sie Nitrat und akkumulieren Nitrit. Bei älteren Kindern und Erwachsenen werden die Nitrat-reduzierenden Bakterien im stark sauren Magensaft abgetötet (Schlegel, 1992). Eine Begrenzung der Nitrataufnahme als vorbeugende Gesundheitsmaßnahme ist erstrebenswert. Einen Beitrag dazu könnte eine Reduzierung des Nitratgehaltes in Trinkwasser und Gemüse darstellen. In kontrollierter Dosierung hingegen haben Nitrat und Nitrit eine Bedeutung als Konservierungsmittel in der Lebensmittelindustrie.

B.2 Die Rolle von *Staphylococcus carnosus* als Starterkultur in der Lebensmittelindustrie

In der Lebensmittelindustrie werden Starterkulturen aus verschiedenen Gründen eingesetzt. Die durch sie zugeführten Enzyme beschleunigen die Ausbildung der typischen Reifungsflora und bewirken somit eine Verkürzung des Herstellungsprozesses. Gleichzeitig wird durch Zusatz einer definierten Starterkultur die Konzentration an sensorisch relevanten Verbindungen erhöht, die die Qualität der Produkte verbessern. Ferner wird ein Wachstum von Verderbniserregern und pathogenen Organismen unterdrückt (Hammes & Knauf, 1994).

Staphylococcus carnosus übernimmt bei der Rohwurstreifung drei wichtige Funktionen. (i) Als so genannte Schutzkultur wird durch ein Absenken des pH-Wertes das Wachstum unerwünschter Begleitflora unterdrückt. (ii) Mittels Katalase wird das von Milchsäurebakterien gebildetet Wasserstoffperoxid abgebaut und somit ein Ranzigwerden der Wurst verhindert. (iii) Die Hauptfunktion von *S. carnosus* besteht jedoch darin, Nitrat zu Nitrit zu reduzieren (Schleifer & Fischer, 1982; Götz & Schleifer, 1983). Denn bei der Rohwurstreifung werden Kaliumnitrat und Natriumnitrit als Pökelsalze zugesetzt. Nitrit verbindet sich mit dem Myoglobin zum Nitrosomyoglobin, welches der Wurst die typische rote Farbe verleiht. Bei diesem als Umrötung bezeichneten Prozess entstehen durch Disproportionierung nicht unerhebliche Mengen Nitrat. Diese werden nach Reduktion von Nitrat zu Nitrit dem Pökelprozess wieder zugeführt. Somit besteht die Möglichkeit, die Menge an zugesetztem Pökelsalz zu verringern bzw. den Restgehalt an Nitrat und Nitrit zu reduzieren. Darüber hinaus ist der Nitrit-Metabolismus auch von Bedeutung für die Ausbildung des Pökelaromas und die Konservierung. Überschüssiges Nitrit wird zu Ammonium reduziert. (Möhler, 1980; Krämer, 1992).

Der Einsatz in der Lebensmitteltechnologie begründet sich unter anderem darauf, dass *S. carnosus* keine Pathogenitätsfaktoren bildet, wie z. B. Koagulase, Hämolysine, Toxine oder Adhäsine, wie sie von bestimmten *Staphylococcus aureus*-Stämmen produziert werden (Götz, 1986). Daher wurde *S. carnosus* als so genannter GRAS (*generally recognized as safe*)-Organismus eingestuft, der in der Lebensmittelindustrie seit Jahren als Starterkultur allein oder in Kombination mit Mikrokokken (*Micrococcus varians*), Laktobazillen (*Lactobacillus sake* und *Lb. curvatus*) und anderen Staphylokokken (*S. xylosus*) eingesetzt wird (Hammes *et al.,* 1995).

Aufgrund dieser Lebensmitteltauglichkeit und der Einstufung als GRAS-Organismus werden auch weitere Anwendungsgebiete für *S. carnosus* in Betracht gezogen, z. B. die Denitrifikation von Lebensmitteln und Trinkwasser. Eine Anwendung bei der Eliminierung von Nitrat aus Gemüse wurde bereits getestet. Dabei stellte sich heraus, dass *S. carnosus* für eine solche Aufgabe prinzipiell geeignet ist. Die Umsatzrate war aber im Vergleich zu *Paracoccus denitrificans* unter den gewählten Bedingungen wesentlich geringer (Emig, 1989; Mayer-Miebach & Schuber, 1991; Reiß, 1992).

B.3 Die Bedeutung von Nitrat für den Stoffwechsel

Nitrat kann prinzipiell über zwei verschiedene Stoffwechselwege verwertet werden: Während bei der assimilatorischen Nitratreduktion Nitrat als Stickstoff-Quelle zum Aufbau von N-haltigen Zellbausteinen genutzt wird, dient es bei der dissimilatorischen Nitratreduktion als alternativer terminaler Elektronenakzeptor der Atmungskette (Schlegel, 1992).

Die assimilatorische Nitratreduktion kann sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen erfolgen. Die beteiligten Enzyme unterliegen einer Substrat-Induktion durch Nitrat und Endprodukt-Hemmung durch Ammonium (Stewart, 1988). Die Reaktionen werden von zwei cytoplasmatischen Enzymen, der assimilatorischen Nitrat-Reduktase und der assimilatorischen Nitritreduktase, katalysiert. Bei diesem Reduktionsprozeß werden sechs Elektronen verbraucht, die über $NAD(P)H_2$ (in Bakterien und Pilzen) oder Ferredoxine (in Pflanzen und Bakterien) angeliefert werden. Die Nitratreduktion führt über mehrere Zwischenverbindungen (HNO, NH_2OH), die nicht freigesetzt werden, zum Nitrit (Schlegel, 1992).

Die Enzyme der dissimilatorischen Nitratreduktion sind bislang fast ausschließlich bei Bakterien beschrieben worden. Bei diesem, auch als Nitratatmung bezeichneten Prozess, fungiert Nitrat anstelle von Sauerstoff als terminaler Elektronenakzeptor. Dadurch wird eine bessere Energieausbeute erzielt, als es dem Bakterium allein durch Gärung möglich wäre. Man unterscheidet zwei Formen der dissimilatorischen Nitratreduktion: (i) Denitrifikation und (ii) Nitratammonifikation.

Bei der Denitrifikation handelt es sich um die Reduktion von Nitrat unter Bildung von Zwischenprodukten bis zur Freisetzung von elementarem Stickstoff. Als Zwischenprodukte treten Stickstoffdioxid (NO_2), Stickstoffmonoxid (NO) und Distickstoffoxid (N_2O) auf. Jeder einzelne Schritt ist mit einem Energiegewinn gekoppelt (Stewart, 1988). Das zur Denitrifikation benötigte Enzymsystem wird nur in Abwesenheit von Sauerstoff exprimiert. Die gleichzeitige Anwesenheit von Nitrit ist nicht unbedingt erforderlich. Die Denitrifikation ist der einzige biologische Prozess, durch den gebundener Stickstoff in molekularen Stickstoff überführt wird (Schlegel, 1992).

Die Nitratammonifikation wird durchweg von fakultativ anaeroben Bakterien durchgeführt, die unter anaeroben Bedingungen Gärung betreiben können (Berks *et al.*, 1995a). Wenn Nitrat zur Verfügung steht, wird es als alternativer Elektronenakzeptor genutzt und zunächst zu Nitrit reduziert. Nitrit kann ebenfalls reduziert werden, aber nicht zu molekularem Stickstoff, N_2, sondern durch eine assimilatorische, wie z. B. für *Escherichia coli* beschrieben (Page *et al.*, 1990), oder dissimilatorische Nitritreduktase (andere Enterobacteriaceae) zu Ammoniak (NH_3) bzw. Ammonium (NH_4^+). Nur der durch die Nitratreduktase katalysierte Schritt ist mit Elektronentransportphosphorylierung und Energieumwandlung verbunden (Stewart, 1988). Die Reduktion von Nitrit zu Ammonium ermöglicht keine direkte Energiegewinnung. Jedoch kann bei dieser Reaktion NAD^+ aus NADH regeneriert

werden, welches dann wieder für die Glykolyse zur Verfügung steht. Dies ist ein wichtiger energetischer Aspekt, da eine Regeneration von Reduktionsäquivalenten unter anaeroben Bedingungen über die Atmungskette nicht möglich ist (Cole, 1996).
Beiden Prozessen, Denitrifikation und Nitratammonifikation, ist gemeinsam, dass der erste Schritt durch eine membrangebundene, molybdänhaltige Nitratreduktase ausgeführt wird, die durch Aufbau eines Protonengradienten mit ATP-Regenerierung gekoppelt ist (Stewart, 1988).
Einige Bakterien sind sowohl zur assimilatorischen als auch zur dissimilatorischen Nitrat-/Nitritreduktion befähigt (*Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*), wohingegen andere ausschließlich den anabolen (*Azotobacter vinelandii*) bzw. nur den katabolen Prozess (*E. coli*, *Rhodobacter capsulatus*, *Paracoccus denitrificans*) ausführen (Gangeswaran *et al*., 1993).
In *Bacillus subtilis* stehen für die dissimilatorische bzw. assimilatorische Nitratreduktion zwei unterschiedliche Enzyme, kodiert von den Genen *narGHI* und *nasBC*, zur Verfügung. Hingegen übernimmt ein einziges Enzym, eine NADH-abhängige lösliche Nitritreduktase, kodiert von den Genen *nasDE*, sowohl die katabole als auch die anabole Funktion. In Abhängigkeit von den Sauerstoff- und Stickstoff-Bedingungen erfolgt die Transkription (i) vom eigentlichen Promotor des *nas*-Operons aus (Anaerobiose, Anwesenheit von Nitrit) oder (ii) von einem Promotor, der zwischen *nasC* und *nasD* liegt (Stickstofflimitierung in Anwesenheit von Sauerstoff; Nakano *et al*., 1998). Bei Stickstofflimitierung unter aeroben Bedingungen wird die Transkription von beiden Promotoren aus durch den Stickstoff-Regulator TnrA reguliert (Wray *et al*., 1996). Unter anaeroben Bedingungen in Anwesenheit von Nitrit wird das Zweikomponenten-System ResDE benötigt (Nakano *et al*., 1996).
Das Nitrat- und Nitrit-reduzierende System aus *E. coli* soll nun näher beschrieben werden, da es als Grundlage für den Vergleich mit dem homologen System in *S. carnosus* dient.

B.4 Nitratreduktion bei *Escherichia coli*

E. coli verfügt über zwei dissimilatorische Nitratreduktasen, NRA und NRZ. Diese Isoenzyme ähneln sich in biochemischer, immunologischer und genetischer Hinsicht (Blasco *et al.,* 1990; Blasco *et al.,* 1992a). Sie werden von den Genen *narGHJI* (NRA) und *narZYWV* (NRZ) kodiert, die jeweils als Transkriptionseinheit organisiert sind. Die abgeleiteten Proteine weisen eine Identität von mehr als 70% auf und sind funktionell untereinander austauschbar. Beide Enzyme setzen sich aus den drei Untereinheiten α, β und γ zusammen, die von den Strukturgenen *narG* bzw. *narZ* (α), *narH* bzw. *narY* (β) und *narI* bzw. *narV* (γ) kodiert werden (Blasco *et al*., 1989; Blasco *et al*., 1990). Die Gene *narJ* bzw. *narW* kodieren für die δ-Untereinheit, die keinen festen Bestandteil des Enzymkomplexes darstellt (Blasco *et al.*, 1992b). Vielmehr handelt es sich hierbei um ein spezifisches Chaperon, welches die α-Untereinheit durch Bindung an dieselbe in eine Konformation bringt, die die Insertion des essentiellen Molybdän-Cofaktors ermöglicht (Blasco *et al.,* 1998).