

**Die anaerobe Nitratreduktion
bei dem obligat aeroben *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 Herrn Marco Fischer

geb. am 17.09.1982 in Karl-Marx-Stadt

Gutachter

Prof. Dr. Sawers

Prof. Dr. Wohlleben

Prof. Dr. Deising

Öffentlich verteidigt am 20.10.2014

- Inhaltsverzeichnis -

Einleitung	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) – Vertreter einer filamentös wachsenden und sporenbildenden Bakteriengattung des Bodens	1
-------------------	---	----------

Kumulativer Abschnitt

Kapitel 1	<i>S. coelicolor</i> A3(2) als Modellorganismus für Respiratorische Nitratreduktasen bei Streptomyceten	12
	<i>The obligate aerobic Streptomyces coelicolor A3(2) synthesizes three active respiratory nitrate reductases</i>	15
Kapitel 2	Anaerobe Nitratreduktion bei Sporen	29
	<i>A respiratory nitrate reductase active exclusively in resting spores of the obligate aerobic Streptomyces coelicolor A3(2)</i>	32
	<i>... Supplementary Information</i>	47
Kapitel 3	Wachstum im Kontext der Nitrat/Nitrit-Verwertung	48
	<i>Terminal reduction reactions of nitrate and sulphate Assimilation in Streptomyces coelicolor A3(2): identification of genes encoding nitrite and sulfite reductases</i>	55
	<i>A Universally Applicable and Rapid Method for Measuring the Growth of Streptomyces and Other Filamentous Microorganisms by Methylene Blue Adsorption-Desorption</i>	64
	<i>... Supplementary Information</i>	68
Kapitel 4	Anaerobe Nitratreduktion bei filamentösen Stadien	71
	<u>Manuskript</u> : <i>Conditions for a Nar2 and Nar3 dependent active respiratory Nitrate Reduction in S. coelicolor A3(2)</i>	75

Diskussion	Zusammenfassende Diskussion und Perspektiven	84
	D.1. Die Funktion der Nitratreduktion bei <i>S. coelicolor</i> A3(2)	84
	D.2. Stoffwechselprozesse bei ausdauernden <i>Streptomyces</i> -Sporen	92
	D.3. Aspekte der Regulation der Nitratreduktion bei <i>S. coelicolor</i> A3(2)	95

Abbildungsverzeichnis	i
Literaturverzeichnis	ii
Curriculum Vitae und Publikationsliste	xi
Darlegung des prozentualen Eigenanteils an den Veröffentlichungen	11
Danksagung	xiii
Eidesstattliche Erklärung	xiv

- Einleitung -

***Streptomyces coelicolor* A3(2) – Vertreter einer filamentös wachsenden und sporenbildenden Bakteriengattung des Bodens**

Bei seinen Studien zur Klassifizierung und Nomenklatur von Bakterien fasste Buchanan (1918) eine Gruppe schimmelähnlicher Organismen unter der Ordnung Actinomycetales (Strahlenpilze) zusammen. Der Name geht auf einen, anfänglich als Pilz aufgefassten Mikroorganismus zurück, der aus verzweigt wachsenden Zellfäden besteht und im Gewebe von Rinderwangen kompakte Kolonien mit herausragenden strahlenförmigen Strukturen bildet (*Actinomyces bovis*; Hopwood, 2007 [bezugnehmend auf: Harz, 1878]). Die Ausbildung derartig verzweigt wachsender Zellen erscheint für Bakterien eher ungewöhnlich, stellt aber, unter Berücksichtigung stark reduzierter oder nur zeitweise auftretender Formen, ein kennzeichnendes Merkmal der Ordnung Actinomycetales dar. Ihre weitere Klassifizierung erfolgte schließlich anhand der unterschiedlich starken morphologischen Ausprägung dieses Merkmals und beinhaltet den unterschiedlichen Verzweigungsgrad der Zellen, das Auftreten ganzer Zellfäden (Filamenten) und das Eintreten von Fragmentierungsereignissen (Waksman, 1940). Für die vorwiegend aus dem Boden isolierten „schimmelähnlichen“ Vertreter, die neben langen Filamenten auch gewundene (griechisch *streptos*) Sporenketten bilden können, wurde letztendlich ein neues Taxon gebildet - die Familie Streptomycetae mit der Gattung **Streptomyces** (Waksman und Henrici, 1943).

Ihre Vertreter haben einen hohen Anteil an Guanin und Cytosin in der DNA (66-74 %), besitzen eine grampositiv anfärbbare Zellwand und reagieren Katalase-positiv. Des Weiteren handelt es sich um obligat aerob wachsende Bakterien mit einem chemoorganotrophen Stoffwechsel (Kämpfer, 2012). Sie können dabei eine Vielzahl der im Boden vorkommenden polymeren Substrate wie Lignozellulosen, Hemizellulosen, Pektin, Keratin und Chitin abbauen (Goodfellow und Williams, 1983). Ermöglicht wird dies durch eine große Vielfalt hydrolytisch aktiver Exoenzyme (Peczynska-Czoch und Mordarski, 1988). Ihre Synthese und Nutzung ist aber in vielfältige extrazelluläre Mechanismen eingebunden (Chater *et al.*, 2010). Dies betrifft vor allem Prozesse der Sensierung und Regulation, um im komplexen Gefüge des Bodens eng mit anderen Organismen biochemisch und physisch in Wechselwirkung zu treten oder auf abiotische Faktoren zu reagieren (Chater *et al.*, 2010). Die für Streptomyceten charakteristischen, sich verzweigenden, vegetativen Filamente (Hyphen)

erlauben in diesem Zusammenhang beispielsweise ein lokal gerichtetes Wachstum innerhalb der Bodenmatrix und das Umschließen distinkter Nährstoffpartikel (Korn-Wendisch und Kutzner, 1992). Ein Vorgang, der unter anderem durch chitin- und kohlenhydratbindende Proteine befördert wird. Sie unterstützen das Anheften und das Durchdringen unlöslicher organischer Reste von Pilzen, Pflanzen und anderen Bodenorganismen (Chater *et al.*, 2010). Die so gebildeten Hyphengeflechte der Streptomyceten (Myzelien) zeichnen sich durch eine überwiegend saprophytische Lebensweise aus und sind nach einer entsprechenden Differenzierung in der Lage, hydrophobe Sporen auszubilden. Diese Sporen sind aber keine jener Dauerformen, die widrigste physikalische Umweltbedingungen überstehen könnten, wie es etwa Endosporen vermögen. Unter moderaten Bedingungen zeigen Streptomyceten-Sporen aber durchaus ein Überlebenspotential von über 70 Jahren (Morita, 1985). Das umfasst auch Bedingungen, unter denen das Myzel schon längst nicht mehr wachsen kann, wie z.B. Trockenheit (Williams *et al.*, 1972). Im Hinblick auf ungünstige, aber nicht extreme Umweltbedingungen werden Streptomyceten-Sporen daher als semi-dormante Überdauerungsformen beschrieben (Kämpfer, 2006; Elliot und Flärdh, 2012). Darüber hinaus leisten sie einen wesentlichen Beitrag zur Verbreitung (Ruddik und Williams, 1972).

Untersuchungen zum Anteil der Streptomyceten in Böden - sie gelten als ubiquitär vorkommend - ergeben für die meisten Böden 10^4 - 10^7 koloniebildende Einheiten pro Gramm (1-20 %) (Korn-Wendisch und Kutzner, 1992). Unabhängig von dem rein quantitativen Anteil wird den Streptomyceten vor allem aufgrund ihres ausgeprägten katabolen und anabolen Stoffwechsels eine große Bedeutung unter den bakteriellen Mikroorganismen oxidischer Bodenareale zugesprochen.

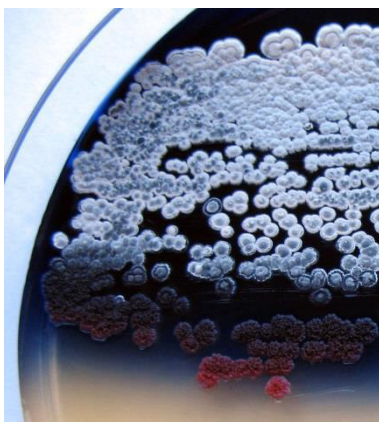


Abb.1.1.: Unterschiedlich weit entwickelte Kolonien (grau, weiß, blaurot) von *Streptomyces coelicolor* A3(2). Das Festmedium wird durch die Sekretion eines Sekundärmetabolits (Actinorhodin) blau gefärbt.

Ein wichtiger Aspekt des Stoffwechsels von Streptomyceten ist das breite Spektrum gebildeter Sekundärmetabolite. Dazu gehören unter anderem Antibiotika, Fungizide und Zytostatika. Am auffälligsten ist die Synthese einer Vielzahl unterschiedlicher grüner, brauner, gelber, roter oder blauer Pigmente. Sie werden in der Regel direkt ins Medium sekretiert und stellen ein leicht zu unterscheidendes Merkmal dar (Abb. 1.1.). Die Pigmentfarbe wurde daher auch teilweise für die Eingruppierung und Benennung von Streptomycetenarten bzw. -stämmen genutzt.

Für blaue Farbstoffe ist die Bildung und Sekretion unter anderem bei zwei taxonomisch distinkten Gruppen beschrieben (Kutzner und Waksman, 1959); zum einen bei der Gruppe um *Streptomyces coelicolor* (Müller 1908), dessen Name sich von der blauen „Himmelsfarbe“ ableitet und zum anderen bei der Gruppe um ***Streptomyces violaceoruber*** (Waksman und Curtis, 1916). Der Name *violaceoruber* steht dabei in Zusammenhang mit dem antibiotisch wirksamen und farbigen Polyketid Actinorhodin. Es weist ein pH-abhängiges Farbspektrum auf und erscheint daher in einem alkalischen Nährmedium blau, verfärbt sich nach der Zugabe von Säure jedoch rot.

Der dieser Doktorarbeit zu Grunde liegende Stamm ***Streptomyces coelicolor A3(2)*** produziert ebenfalls Actinorhodin (Bystrykh, 1996) und geht auf ein blau-pigmentiertes Isolat zurück, das interessanter Weise einer Arbeit mit agarabbauenden Bodenmikroorganismen entstammt (Stanier, 1942; Hopwood 1999). Der Bodentyp oder der Standort aus dem das Isolat stammt, ist aber nicht dokumentiert. Der Name mit dem Zusatz „A3(2)“ wurde erstmals in einer Studie zur ausgeprägten Entwicklungsvariabilität von Streptomyceten publiziert (Erikson, 1955) und wird seitdem unverändert weitergeführt. Dies geschieht nach allgemeiner Konvention unberührt von der Tatsache, dass der Stamm *S. coelicolor* A3(2) zu *S. violaceoruber* gehört und nicht zum namensvorrangigen *S. coelicolor* von Müller (Hopwood, 1999). Ein Sachverhalt, der eine besondere Rolle erkennen lässt. Und in der Tat, nach der Nutzung des blauen Farbstoffes als leicht zu bestimmenden Marker bei genetischen Rekombinationsstudien (Hopwood, 1957), etablierte sich der Stamm *S. coelicolor* A3(2) in vielen Laboratorien und wurde zum genetischen Modellorganismus der Gattung.

Neben dem blauen Actinorhodin produziert *S. coelicolor* A3(2) auch ein rotes Prodigiosin-gemisch (Tsao *et al.*, 1985), ein calciumabhängiges Lipopeptidantibiotikum (Kempter *et al.*, 1997), den erdig-muffig riechenden, bicyclischen Alkohol Geosmin (Jiang *et al.*, 2007) und das antibiotisch wirksame Methylenomycin (Wright und Hopwood, 1976). Die Synthesegene für Letzteres sind auf einem 365 kb großen, linearen Plasmid (SCP1) lokalisiert (Bentley *et al.*, 2004). Neben diesem befindet sich in der Zelle noch ein kleineres, zirkuläres Plasmid (SCP2). Es umfasst 31 kb und trägt einen Fertilisationsfaktor (Haug *et al.*, 2003).

Der Stamm ***S. coelicolor M145*** ist das plasmidfreie Derivat von *S. coelicolor* A3(2) und kann weiterhin prototroph wachsen (Hopwood *et al.*, 1985). Alle in dieser Doktorarbeit durchgeführten Arbeiten erfolgten an diesem Derivat bzw. dessen Mutanten. Das Genom

von *S. coelicolor* M145 bzw. *S. coelicolor* A3(2) liegt komplett sequenziert vor (Bentley *et al.*, 2002). Es handelt sich um ein GC-reiches (72 %), insgesamt ca. 8,7 Mb großes, lineares Genom mit zwei 21,7 kb langen terminalen *inverted repeats*. Es enthält 7825 kodierende Gensequenzen und unterteilt sich in eine Kernregion und zwei Seitenarme (1,5 und 2,3 Mb groß). Die große Anzahl von Genen – im Vergleich zum Eukaryot *Saccharomyces cerevisiae* sind es 1544 mehr (Borodina *et al.*, 2005) – spiegelt dabei die Komplexität und Variabilität seiner Lebensweise wider. So kodieren ca. 10% der Gene (819) für Proteine, die sekretiert werden; darunter sind allein 60 Proteasen, 13 Chitinasen/Chitosanasen, acht Zellulasen/Endoglucanasen und drei Amylasen. Einige Stoffwechselgene bzw. -gencluster liegen aber auch dupliziert vor oder repräsentieren eines von mehreren Homologen im Genom (Tabelle 1.1.). Dazu gehören unter anderem drei Gencluster, die als **Respiratorische Nitratreduktasen (Nar)** annotiert wurden (Bentley *et al.*, 2002). Van Keulen *et al.* (2005) berichteten daraufhin, dass sich alle drei *nar*-Transkripte nachweisen lassen und Hinweise vorliegen, dass die Expression, zumindest eines der drei Isoenzyme, von der Sauerstoffkonzentration abhängig ist. Bedingungen, unter denen die Expression in Zusammenhang mit der Nitratkonzentration bzw. -anwesenheit steht, konnten dabei nicht ermittelt werden.

Tabelle 1.1.: Anzahl duplizierter und anaerober Stoffwechselgene im Genom von *S. coelicolor* A3(2)

Beschreibung	Anzahl	Quelle
Im Genom mehrfach auftretende Gene/Gencluster für		
Glykogen-Synthese	2	Schneider <i>et al.</i> (2000)
Tryptophan-Biosynthese	4	Bentley <i>et al.</i> (2002)
Ketosynthese der Fettsäurebiosynthese	5	Bentley <i>et al.</i> (2002)
Pentose-Phosphat-Stoffwechsel	2	Bentley <i>et al.</i> (2002)
Untereinheiten der NADH-DH der Atmungskette	2	Bentley <i>et al.</i> (2002)
<u>Respiratorische Nitratreduktasen</u>	3	van Keulen <i>et al.</i> (2005)
Mit anaerobem Stoffwechsel assoziierte Gene	24	van Keulen <i>et al.</i> (2007)

Das Vorhandensein von Nitrat geht im natürlichen Habitat von *Streptomyces* auf den bakteriellen Prozess der Nitrifikation zurück (Abb. 1.2.A). Dabei wird Ammonium aus dem Abbau von organischem Material mit Hilfe autotropher ammoniumoxidierender Bakteriengattungen (*Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira*) zu Nitrit oxidiert und in einem zweiten Schritt durch autotrophe nitritoxidierende Gattungen (*Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospira*) zu Nitrat umgewandelt (Prosser, 2007). Im Stoffkreislauf des Bodens ist dieses Nitrat kein Endprodukt, sondern steht anderen Organismen als Stickstoffquelle für die Assimilation zur Verfügung, kann aber auch in respiratorische Prozesse eingebunden

sein. Bei beiden Vorgängen findet eine, der Nitrifikation gegenläufige, enzymatische Katalyse von Nitrat zu Nitrit statt (Abb. 1.2.A). Im Gegensatz zur Nitrifikation kann diese Reaktion von einer großen Zahl von Organismen durchgeführt werden (Richardson *et al.*, 2007). Bei Bacteria wird sie mit Hilfe der im Cytoplasma befindlichen assimilatorischen Nitratreduktase (Nas), der periplasmatischen Nitratreduktase (Nap) oder der membrangebundenen Nitratreduktase (Nar) realisiert. Die letzten beiden Kategorien von Nitratreduktasen beziehen die zur Reduktion notwendigen Elektronen dabei vom Chinonpool in der Membran und benötigen für die Umsetzung eines Nitratmoleküls zwei Elektronen. Ihre Übertragung auf Transferkomponenten der Enzyme geht mit der Freisetzung von zwei Protonen an der Außenseite der Membran einher.

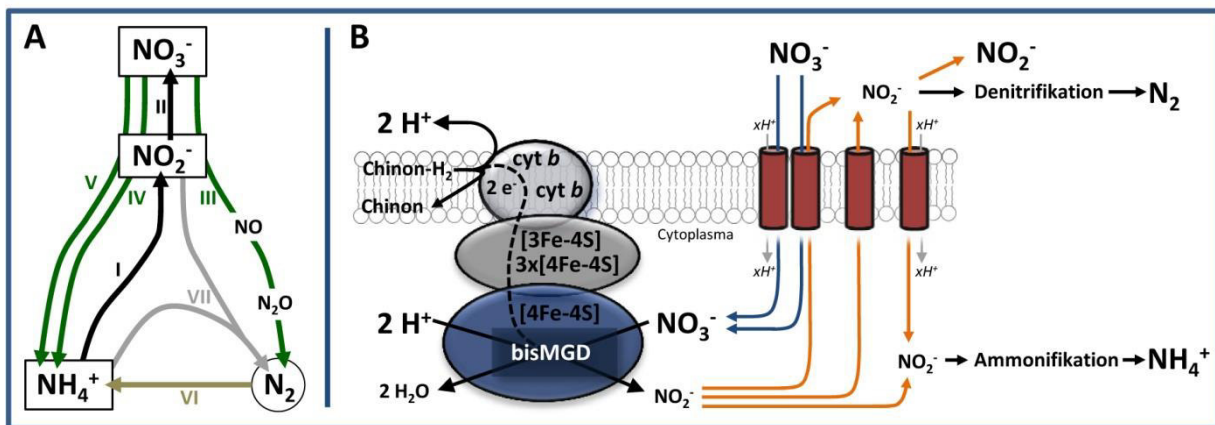


Abb. 1.2.: Wege der bakteriellen Nitratreduktion im Kontext des Stickstoffkreislaufes.

A) Vereinfachtes Schema des bakteriellen Stickstoffkreislaufes mit resp. Nitrifikation (I und II), resp. Denitrifikation (III), resp. Nitrat/Nitrit-Reduktion bzw. Ammonifikation (IV), ass. Nitrat/Nitrit-Reduktion bzw. Ammonifikation (V), Stickstofffixierung (VI) und anaerober Ammoniumoxidation (VII).

B) Schema der membrangebundenen bakteriellen Nitratreduktion mit einer Lokalisation des aktiven Zentrums (bisMGD – Molybdänkofaktor) im Cytoplasma. Die Aktivität dieser Nar-Typ-Nitratreduktase erfordert den Transport von Nitrat ins Cytoplasma. Er wird unter anderem als Antiport mit Nitrit betrieben (Zheng *et al.*, 2013). Das toxische Nitrit kann ggf. zu Ammonium weiterreduziert werden oder wird ggf. außerhalb des Cytoplasmas im Rahmen der Denitrifikation weiter umgesetzt.

Während die periplasmatischen Nitratreduktasen diese zwei Protonen aber in demselben Kompartiment (Periplasma) gleich wieder bei der Katalyse von Nitrat zu Nitrit in das Nebenprodukt Wasser umsetzen, findet der protonenverbrauchende Schritt bei Nar-Enzymen im Cytoplasma statt (Abb. 1.2.B). In der Bilanz ergibt sich ein Unterschied von vier Protonen bzw. vier hydratisierten H⁺-Ionen an der Membran. Diese Beteiligung am respiratorischen Elektronentransfer und der Aufbau eines Protonengradienten erlaubt den Bakterien die Nutzung von Nitrat als alternativen Elektronenakzeptor bei Sauerstoffmangel. Diese Form der anaeroben Atmung wird auch als Nitratatmung bezeichnet und kann durch nachgeschaltete enzymatische Reduktionen in mehreren Schritten über Nitrit, Stickstoffmonoxid und Distickstoffmonoxid bis hin zum molekularen Stickstoff fortgesetzt werden. Bei diesen zum Beispiel von *Paracoccus denitrificans* durchgeführten Reaktionen

wird dem Boden der Stickstoff entzogen und der vollständige Prozess daher als Denitrifikation bezeichnet (Zumft, 1997; van Spanning *et al.*, 2007).

Viele nitratreduzierende Bakterien - darunter bspw. *Bacillus subtilis* und *Escherichia coli* – können keine Denitrifikation durchführen. Sie sekretieren das aus der Nitratreduktion entstandene Nitrit ins Medium oder überführen es im Rahmen einer ammonifizierenden Nitritreduktion in Ammonium (Zumft, 1997). Die notwendige Genausstattung für eine Denitrifikation fehlt ihnen. Für *S. coelicolor* A3(2) wurden in diesem Zusammenhang neben den drei Nar-Enzymen bislang nur zwei putative assimilatorische Nitratreduktasen und eine putative Nitritreduktase annotiert (Bentley *et al.*, 2002).

Die Tatsache, dass *S. coelicolor* A3(2) drei respiratorische Nitratreduktasen besitzt, spricht dafür, dass es Nitrat als Elektronenakzeptor unter Sauerstoffmangel nutzen kann. Inwieweit diese Hypothese zutrifft und inwieweit die Auswirkungen der Nutzung von Nitrat sich auch im Wachstum und der Überlebensfähigkeit widerspiegeln, wurde bisher wenig untersucht. Daher ist die in der Literatur immer wieder aufgeworfene Frage nach der Funktion und Bedeutung dieser, mit einem anaeroben Stoffwechsel assoziierten Enzyme bei *S. coelicolor* A3(2), ungeklärt. Ihre Beantwortung erfordert eine Charakterisierung der drei Nitratreduktasen und insbesondere eine Betrachtung der Aktivität der Nar-Enzyme im Kontext der komplexen Lebensweise von Streptomycceten. Dieser Aufgabe widmete sich die praktische Forschungsarbeit dieser Dissertation und baute dabei auf molekularbiologische Vorarbeiten von Janet White und Jess Alderson (2002-2005, John Innes Centre, Norwich, UK) auf. Im Vordergrund stand dabei vor allem der Aspekt, ob gezeigt werden kann, dass alle drei Enzyme aktiv sind und ob sie sich durch einzigartige Merkmale der Expression, der Aktivität oder Regulation unterscheiden. Der Blick war diesbezüglich auch darauf gerichtet, festzustellen, ob in der Zukunft detailliertere Untersuchungen der Streptomycceten-Nars sinnvoll sind und ob *S. coelicolor* A3(2) das Potential zum Modellorganismus für die Nitratreduktion bei Streptomycceten hat. Ein Aspekt, der es unter anderem erforderte, bisherige methodische Limitierungen bei der quantitativen Wachstumsbestimmung von filamentösen Mikroorganismen zu überwinden und Arbeiten unter sauerstofflimitierten und anoxischen Bedingungen durchzuführen.

Die bisher vorliegenden Kenntnisse über die stoffwechselbedingte Notwendigkeit von Sauerstoff münden bei Streptomycceten in ein **Anaerobes Paradoxon** (Borodina *et al.*, 2005).

So existieren und behaupten sie sich zwar in einem Lebensraum, der *per se* anoxische Phasen aufweist, gelten aber gleichzeitig als sensitiv gegenüber niedrigen Sauerstoffkonzentrationen, wie sie z.B. in den Poren der Erde bei vernässten Böden ($pF=1$) auftreten (Kämpfer, 2006). Das ist insofern erstaunlich, weil genomische Analysen den Streptomycceten eine anaerobe Lebensweise nicht absprechen können. Van Keulen *et al.* (2007) listen in diesem Zusammenhang 24 Gene von *S. coelicolor* A3(2) auf, deren bioinformatisch vorhergesagten Genprodukte mit einem anaeroben Stoffwechsel assoziiert werden; zehn davon stehen im Zusammenhang mit dem Stickstoffwechsel. Des Weiteren werden insbesondere zwei D-Lactat-Dehydrogenasen, eine Acetat-Kinase, eine Phosphat-Transacetylase und eine sauerstoffunabhängige Klasse-II-Ribonukleotid-Reduktase erwähnt. Damit ist bei *S. coelicolor* A3(2) eigentlich eine sauerstoffunabhängige Desoxynucleotid-Synthese und auch ein fermentativer Stoffwechsel mit Lactat als Hauptprodukt möglich (Borodina *et al.*, 2005). Im Gegensatz zu *B. subtilis*, der lange Zeit als strikt aerob galt, heute aber mit Gärungsstoffwechsel und Nitratatmung beschrieben wird (Nakano und Zuber, 1998), konnten für Streptomycceten bisher keine anaeroben Wachstumsbedingungen gefunden werden; über ein mikroaerobes Wachstum liegen jedoch Berichte vor (van Keulen *et al.*, 2007).

Im Rahmen der angestrebten Differenzierung der drei Nitratreduktasen müssen neben den aeroben, mikroaeroben und anaeroben Bedingungen, aber vor allem auch die **Entwicklungsphasen von *Streptomycces*** berücksichtigt werden. Dies geschieht vor dem Hintergrund, dass für einige der in Tabelle 1.1. aufgeführten Gencluster bekannt ist, dass die gebildeten Isoenzyme nur in einem bestimmten Myzeltyp (Glykogen-Gencluster; Schneider *et al.*, 2000) oder nur im Primär- oder Sekundärstoffwechsel (Tryptophan-, Fettsäure-Biosynthese; Huang *et al.*, 2001; Revall *et al.*, 2001) aktiv sind. Ausdruck dieser, für *S. coelicolor* A3(2) sehr relevanten Ebene, ist das Vorliegen von 965 Genen, deren Produkte vermutlich an regulatorischen Prozessen beteiligt sind; darunter allein 65 Sigma-Faktoren, 44 Serin-Threonin-Proteinkinasen, 53 identifizierte Sensor-Regulator-Paare, 85 Sensor-Kinasen und 79 Response-Regulatoren (Bentley *et al.*, 2002).

Ein regulatorisch bedeutender Aspekt bei *S. coelicolor* A3(2) stellt die Differenzierung in Spore und Myzel dar (Abb. 1.3.). Beide differenzierten Formen sind Gegenstand der physiologischen Untersuchungen in dieser Dissertation. Wie in nahezu allen der bisher in der

Literatur erschienenen regulatorischen und entwicklungsphysiologischen Studien zu *S. coelicolor* A3(2) wurden diese Untersuchungen an artifiziellen Kultivierungssystemen im Labor durchgeführt. Diese klammern die Komplexität des Bodens aus und stellen der stetig geforderten physiologischen Variabilität unter natürlichen Bedingungen eine Konstanz der artifiziellen Wachstumsbedingungen entgegen. Im Hinblick darauf werden in dieser Arbeit allerdings zwei Szenarien unterschieden: Die Situation unter aeroben und die Situation unter strikt anaeroben Bedingungen.

Der Vorgang der Sporulation ist dabei nur unter aeroben Bedingungen und auch nur auf einem Festmedium möglich; nie bei einer submersen Kultivierung (Abb. 1.3. [B6-10]). Die reifen *Streptomyces*-Sporen können in den artifiziellen Kultivierungssystemen direkt nach

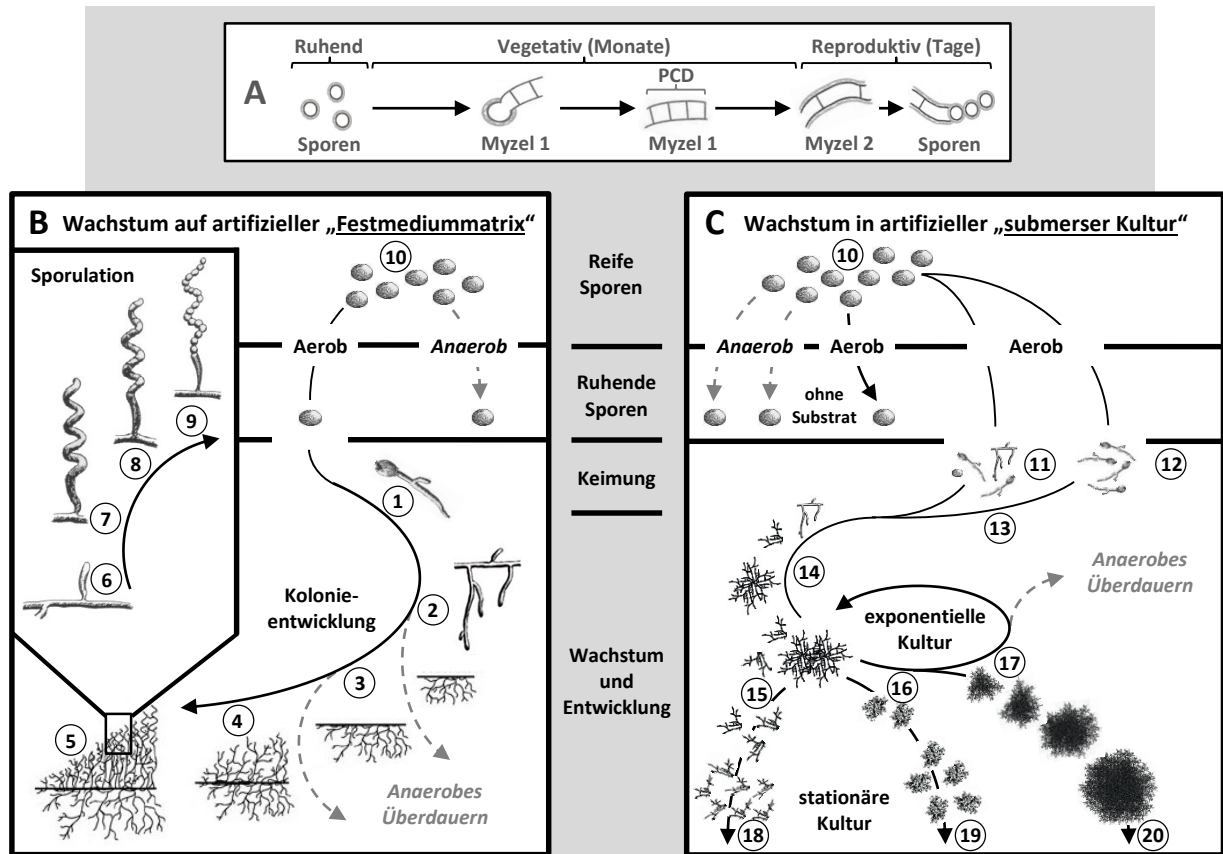


Abb. 1.3.: Schema des Wachstums und der Differenzierung von *S. coelicolor* A3(2).

A) Von Yagüe *et al.* (2013a) vorgeschlagenes Modell für die Entwicklung unter natürlichen Bedingungen im Boden, Myzel 1 – primäres kompartimentiertes Myzel, PCD – programmierter Zelltod, Myzel 2 – sekundäres „mehrkerniges“ Myzel.

B) Keimen von Sporen auf nährstoffhaltigem Agar (1), Ausbildung von verzweigten vegetativen Hyphen mit einer Differenzierung in wachsende Hyphenspitzen und distale, unseptierte Hyphenzellen (2), Einwachsen des Substratmyzels in die Festmediummatrix (2-3) und Bildung eines mediaufgelagerten Myzelgeflechtes (4), Ausbildung eines unverzweigten hydrophoben Luftmyzels (5), Differenzierung des hydrophoben Luftmyzels in Sporophor (6), Sporophordifferenzierung in gedrückte Sporenketten (7-9).

B und C) Freigesetzte reife Sporen (10), die unter anaeroben Bedingungen bzw. ohne notwendige Substrate ruhend verbleiben.

C) Asynchrone (11) oder Synchroner (12) Keimung in aerobem Flüssigmedium, der synchronen Keimung folgend ein kurzzeitiges *balanced growth* (13), Ausbildung von verzweigten vegetativen Hyphen mit einer Differenzierung in wachsende Hyphenspitzen und distalen, unseptierten Hyphenzellen (14), kultivierungsbedingungsabhängige Bildung disperser (15), leicht aggregierter (16) oder pelletbildender Myzelien (17) mit exponentieller Trockengewichtszunahme der Biomasse, Eintreten lokaler (19, 20) sowie globaler Nährstofflimitierungen (18) führen zu stationären Kulturen.

Detailzeichnungen bei 1, 2, 6 - 12 (aus Kieser *et al.*, 2000) und bei 3-5 (aus Angert, 2005) wurden für das Schema adaptiert.

der Freisetzung auskeimen. Voraussetzung dafür ist nur das Vorliegen von aeroben Bedingungen, Kohlenstoffdioxid, Calcium-Ionen und exogenen Nährstoffen (Abb. 1.3. [B1; C11, C12]). Fehlen jedoch Substrate oder ist kein Sauerstoff zur Verfügung verbleiben sie zunächst als ruhende Sporen (Abb. 1.3. [B10; C10]). Für die anaerobe Überdauerung von *S. coelicolor* A3(2) wurde in diesem Zusammenhang ein über 20 Tage langes, nahezu verlustfreies Überleben dokumentiert (van Keulen *et al.*, 2007).

In der weiteren Entwicklung nach der Keimung verzweigt sich die austretende Hyphe und differenziert sich in wachsende Hyphenspitzen und in distale Hyphenabschnitte. Die ausgebildeten Hyphen können dabei durch membranartige Septen in einzelne Kompartimente aufgeteilt sein oder in „mehrkernigen Strukturen“ (*multinucleate hyphae*) vorliegen (Manteca *et al.*, 2009; Yagüe *et al.*, 2013a). Bei Letzteren sind unregelmäßig auftretende Septen beschrieben, deren Membranen ein größerer Anteil an Zellwandmaterial aufgelagert ist. Mit dem Begriff „mehrkernig“ wird bei Streptomyceten der Umstand beschrieben, dass innerhalb eines septenbegrenzten Abschnittes mehrere Genomkopien vorliegen. Diese sind aber dennoch in der für Prokaryoten typischen Nucleoid- und nicht etwa einer Nucleolusstruktur organisiert (Hopwood, 1999). Weitere, im Zusammenhang mit Streptomyceten verwendete Begrifflichkeiten, wie Lebenszyklus, mehrzellige Entwicklung, Gewebe, partieller Zelltod oder Sekundärmetabolismus erinnern stark an eukaryotische Mikroorganismen, sind aber häufig verwendete Begriffsanleihen für diese Bakterien.

Bei der Kultivierung auf Festmedium wachsen die mehr oder minder septierten Hyphen einerseits als Substratmyzel in den Agar ein und bilden zum anderen ein mediumaufgelagertes Myzelgeflecht, aus dem wiederum ein unverzweigtes hydrophobes Luftmyzel hervorgeht (Abb. 1.3. [B1-5]). Diese Luftmyzelbildung geht auf ein besonderes regulatives Element zurück - eine tRNA mit dem Anticodon UUA. Nur Gene, die das seltene Codon TTA für Leucin besitzen, sind bei ihrer Expression auf diese tRNA angewiesen. Das Gen *bltA* ist für die Bildung dieser tRNA verantwortlich und ermöglicht damit die Expression entwicklungspezifischer Gene und initiiert damit die regulatorischen Kaskaden, die letzten Endes die Sporulationsprozesse beim Luftmyzel steuern oder auch bestimmte Gencluster des Sekundärmetabolismus beeinflussen (Hopwood *et al.*, 1999). Die Kolonieentwicklung bis hin zu Sporen dauert auf einem optimalen Festmedium ca. 7-10 Tage. Unter natürlichen Bedingungen schlagen Yagüe *et al.* (2013a) ein Modell vor, bei dem monatelang ein gut

septiertes vegetatives Myzel vorliegen kann, ehe Prozesse eines programmierten Zelltodes einsetzen und es zur Differenzierung mit abschließender Sporenbildung kommt (Abb. 1.3. [A]).

Bei der submersen Kultivierung wird kein hydrophobes Luftmyzel ausgebildet. Charakteristisch ist aber eine Zusammenlagerung der wachsenden Myzelgeflechte zu unterschiedlich stark ausgeprägten Aggregationsformen (Abb. 1.3. [C 14-20]). Des Weiteren liegen innerhalb der Flüssigkulturen die Zellen aufgrund des differenzierten Hyphenwachstums nicht in der gleichen Wachstumsphase vor. Nur bei einer synchronen Keimung folgt ein kurzzeitiges *balanced growth*, bei dem nahezu alle Zellen in der gleichen Phase vorliegen (3-5 Verdopplungen, Abb. 1.3. [C12-13], Riesenberg und Bergter, 1984). Bei der Ausbildung von größeren Myzelgeflechten entstehen zudem wachsende Außenbereiche und substratlimitierte innere Bereiche. Bei letzteren werden auch Zustände lokaler Anaerobiose vermutet – eine Situation, unter denen respiratorische Nitratreduktasen eine sinnvolle Funktion haben könnten.

Inwieweit die drei Nitratreduktasen in die verschiedenen Phasen des Entwicklungszyklus eingebettet sind, wird in dieser kumulativen Dissertation gezeigt. Dazu wurden die wissenschaftlichen Publikationen in vier thematische Kapitel eingeordnet.

Das erste Kapitel schlägt *S. coelicolor* A3(2) als Modell für die Nitratreduktasen bei Streptomyceten vor und untersucht, ob die drei Nar-Enzyme aktiv und redundant sind.

Im zweiten Kapitel wird die anaerobe Nitratreduktion im Sporenstadium vorgestellt. Das dritte Kapitel beschäftigt sich mit dem Wachstum der Streptomyceten im Kontext der Nitrat/Nitrit-Verwertung und das vierte Kapitel fasst in einem Manuskript die Bedingungen der Nar-Enzym-Aktivitäten der Myzelstadien zusammen.

Der **eigene Anteil an den Ergebnisabschnitten** der Publikationen ist in der jeweiligen Kapiteleinleitung in einem grau hinterlegten Informationsfeld aufgeführt. Dort ist ebenfalls notiert, in welchem Bezug die Co-Autoren zu dem Projekt stehen.

Kumulativer Abschnitt

Allgemeine Informationen zu den Fachzeitschriften

<i>Titel</i>	Microbiology	Molecular Microbiology	Research in Microbiology	Applied and Environmental Microbiology
<i>Impact Factor (2012)</i>	2,852	4,961	2,889	3,678
<i>5 Year Impact Factor</i>	3,173	5,099	2,943	4,406
<i>Cited Half-Life</i>	8,1	8,6	7,2	9,6
<i>Herausgeber</i>	Society for General Microbiology	Wiley Blackwell	Elsevier	American Society for Microbiology
<i>Ausgaben pro Jahr</i>	12	24	10	12

Darlegung des prozentualen Eigenanteils an den nachfolgenden Veröffentlichungen

- A** - eigener Anteil an Planung, Durchführung, Auswertung der Experimente und Anfertigung der dazugehörigen Abbildungen
- B** - eigener Anteil an Entwurf bzw. Anfertigung von Teilen des Manuskripts

Paper 1 **Fischer, M., Alderson, J., van Keulen, G., White, J., and Sawers, R.G. (2010).**
The obligate aerobic *Streptomyces coelicolor* A3(2) synthesizes three active respiratory nitrate reductases. Microbiology (Reading, Engl.) 156: 3166–3179.

Eigenanteil: **A = ca. 70 % B = ca. 40 %**

Paper 2 **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). Molecular Microbiology 89, 1259–1273.

Eigenanteil: **A = ca. 50 % B = ca. 60 % * gleichberechtigte Erstautorenschaft**

Paper 3 **Fischer, M., Schmidt, C., Falke, D., and Sawers, R.G. (2012).**
Terminal reduction reactions of nitrate and sulphate assimilation in *Streptomyces coelicolor* A3(2): Identification of genes encoding nitrite and sulfite reductases. Research in Microbiology 163: 340-348.

Eigenanteil: **A = ca. 85 % B = ca. 50 %**

Paper 4 **Fischer, M., Sawers, R.G. (2013).**
A Universally Applicable and Rapid Method for Measuring the Growth of *Streptomyces* and Other Filamentous Microorganisms by Methylene Blue Adsorption-Desorption. Applied and Environmental Microbiology 79: 4499-4502.

Eigenanteil: **A = ca. 100 % B = ca. 90 %**

Manuskript **Fischer, M., Falke, D., Pawlik, T., and Sawers, R.G. (unpublished).**
Conditions for Nar2- and Nar3-Dependent Respiratory Nitrate reduction in *Streptomyces coelicolor* A3(2).

Eigenanteil: **A = ca. 90 % B = ca. 95 %**

- Kapitel 1 -

***S. coelicolor* A3(2) als Modellorganismus**

für respiratorische Nitratreduktasen bei Streptomycceten

Nitratreduktasen sind bei Prokaryoten weit verbreitet und ihr Vorkommen ist sowohl bei den Bacteria als auch den Archaea gut dokumentiert. Auch ist bekannt, dass bei einer Spezies mehr als eine Nar-Typ-Nitratreduktase ausgebildet werden kann und dass verschiedene Typen von Nitratreduktasen (Nars, Naps und gegebenenfalls Nas') bei einem Organismus vorkommen können (Moreno-Vivián *et al.*, 1999; Richardson *et al.*, 2007). Dass aber mit *S. coelicolor* A3(2) gleich **drei membrangebundene respiratorische Nitratreduktasen** im Genom eines Bakteriums codiert sind, ist ungewöhnlich. Noch mehr erstaunt, dass Nars bei einer so weit verbreiteten und wichtigen Gattung von Bodenmikroorganismen auftreten, ohne, dass sie oder die Streptomycceten in den gängigen *Reviews* zum Stickstoffkreislauf oder der bakteriellen Nitratreduktion erwähnt werden.

Taxonomische Werke hingegen belegen in indirekter Weise schon länger die Existenz von Nars. So geben Kämpfer *et al.* (2012) im *Bergeys Manual of Sytematics Bacteriology* - ohne selber eine bestimmte Quelle zu zitieren - für die gesamte Gattung *Streptomycces* grundsätzlich an, dass sie Nitrat zu Nitrit reduzieren. Ihre Information geht scheinbar darauf zurück, dass vor der Etablierung des 16S-ribosomalen-RNA-Verwandtschaftsschlüssels (Woese, 1987; Weisburg *et al.*, 1992) eine Vielzahl morphologischer und physiologischer Merkmale dazu herangezogen wurden, eine allgemeine Matrix zur Identifizierung und Differenzierung von Streptomycceten-*Clustern* aus über 300 Isolaten aufzustellen (Williams *et al.*, 1983a, 1983b). Von den relevanten und entsprechend gewichteten 41 Merkmalskriterien wird dabei an 31ster Stelle der biochemische Test auf Nitratreduktion geführt. Die Auswertung der Matrix hinsichtlich dieses Merkmals offenbart dabei, dass viele Streptomycceten in der Lage sind, Nitrat zu Nitrit zu reduzieren. Lediglich 4 *Cluster* von Isolaten zeigten keine Nitratreduktion. Bei 10 gebildeten *Clustern* waren 17-55 % der jeweils untersuchten Isolate positiv und bei 7 *Clustern* konnten mindestens 80 % der jeweils untersuchten Isolate Nitrat reduzieren (Williams *et al.*, 1983b). Sie besitzen demnach mindestens eine **aktive Nitratreduktase**.

S. coelicolor A3(2) wurde in der Matrix von Williams hinsichtlich der Fähigkeit Nitrat zu reduzieren nicht erfasst. Gleichwohl wird für die selektive Isolierung von Vertretern der Art *S. violaceoruber* der biochemische Test auf Nitratreduktion als positive phänotypische Eigenschaft gelistet (Duangmal *et al.*, 2005). Taxonomisch korrekt gehört *S. coelicolor* A3(2) zu diesem *S. violaceoruber* (Hopwood, 1999).

Die allgemein für Streptomycceten nachgewiesene Nitratreduktion (Williams *et al.*, 1983a, 1983b) und die Kenntnis um das offensichtliche Alleinstellungsmerkmal von gleich drei Nar-Typ-Nitratreduktasen prädestinieren den Modellorganismus *S. coelicolor* A3(2) dazu, die bisher noch völlig offenen genetischen, physiologischen und biochemischen Untersuchungen zu den Nars der Streptomycceten an ihm durchzuführen und mit ihm die entsprechenden Untersuchungsmethoden aufzubauen.

Die für die drei Nars codierenden *nar*-Operone liegen bei *S. coelicolor* A3(2) in weit voneinander entfernten, unterschiedlichen Stellen des linearen Genoms: das *nar1*-Operon im rechten Arm, das *nar2*-Operon im linken Arm und das *nar3*-Operon im *Core*-Bereich.

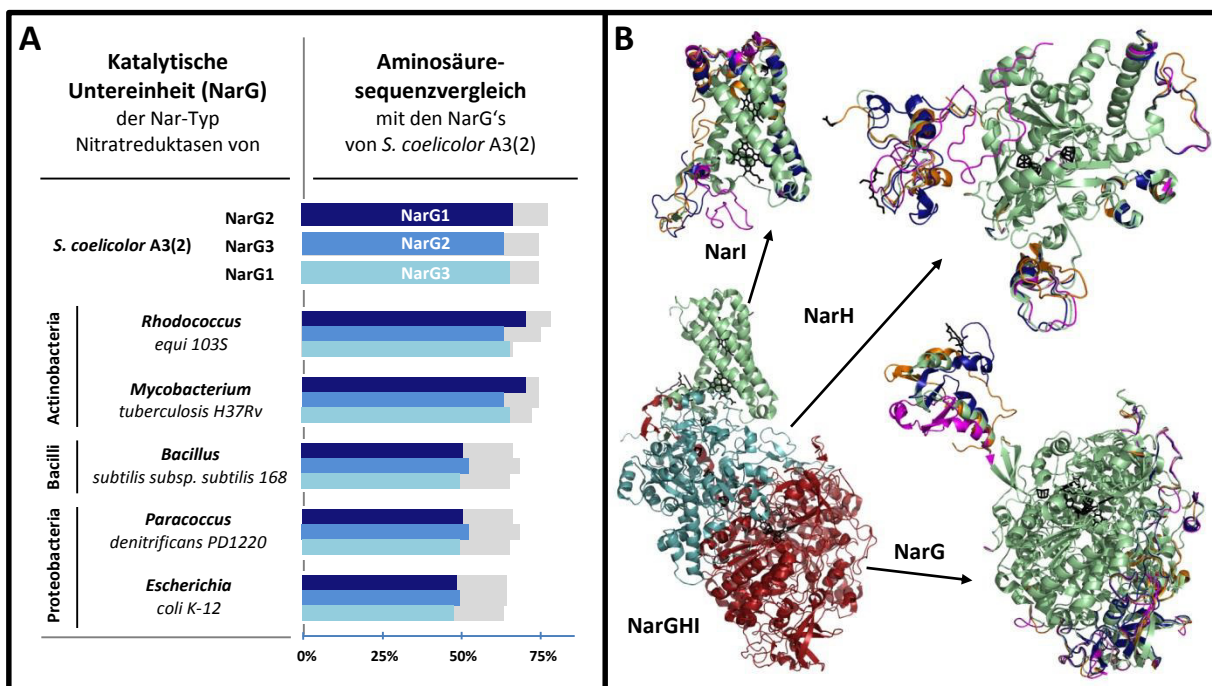


Abb. 1.4.: Ausgewählte Vergleiche der Sequenzidentitäten, -ähnlichkeiten und Strukturvorhersagen der drei Nars von *S. coelicolor* A3(2).

A) Vergleich der prozentualen Aminosäuresequenzidentität der drei NarG-Untereinheiten von *S. coelicolor* zueinander (oben) sowie zu den katalytischen Nar-Untereinheiten anderer Bakterien. Auftretende höhere prozentuale Werte bei der Aminosäuresequenzähnlichkeit im Vergleich zur Aminosäuresequenzidentität sind grau gekennzeichnet. Kommen mehrere Nar-Enzyme bei den ausgewählten Arten vor, so ist der Vergleich mit den drei *Streptomyccetes*-NarG-Untereinheiten (NarG1 - dunkelblau, NarG2 - azurblau und NarG3 - hellblau) nur für das Nar-Enzym mit der insgesamt größten Übereinstimmung aufgeführt.

B) Links unten: Bekannte NarGHI-Kristallstruktur von *E. coli* mit NarG (rot), NarH (blau) und NarI (grün) (PDB 1R27). Oben und rechts: Nach Kelley und Sternberg (2009) mit Phyre² erstellte Strukturvorhersage der Untereinheiten von Nar1 (blau), Nar2 (orange) und Nar3 (violett) zu der bekannten Struktur von *E. coli* (grün). Die mit *E. coli* homologen Strukturbereiche der Streptomycceten-Nars werden nur durch die farbliche Kennzeichnung der homologen *E. coli* Struktur (grün) dargestellt.

Jedes Operon wiederum besteht aus vier Genen: narG für die katalytische Untereinheit (NarG), narH für die Elektronentransferkomponente (NarH), narJ für ein Chaperon und narI für die membranintegrale Chinon-Dehydrogenaseuntereinheit (NarI). Die Reihenfolge der Gene und damit der Operon-Aufbau als *narGHJI* ist für alle bakteriellen Nars identisch.

Für die NarG-Untereinheit untersuchten van Keulen *et al.* (2005) die phylogenetische Beziehung der Sequenzen von 50 bakteriellen Referenzen. Sie identifizierten sieben phylogenetische Stämme. Die drei NarG-Sequenzen von *S. coelicolor* A3(2) bilden dabei einen Stamm mit Mycobacteria, wohingegen die ebenfalls zu den Actinobacteria gehörenden Rhodococci einen eigenen bilden. Interessanterweise betragen die Sequenzidentitäten und -ähnlichkeiten von NarG1, NarG2 und NarG3 untereinander weniger als 75 % und damit in etwa so viel wie im Vergleich zu *Rhodococcus* oder *Mycobacterium* (Abb. 1.4.A). Strukturvorhersagen für die drei Untereinheiten der Nars von *S. coelicolor* A3(2) verdeutlichen, dass die Möglichkeiten einer ähnlichen Strukturausbildung bestehen (Abb. 1.4.B), wie sie für NarG, NarH und NarI von *E. coli* kristallographisch ermittelt wurden (Abb. 1.4.B).

Für *E. coli* wurden die meisten Mutanten im Zusammenhang mit der Nitratreduktion mit Hilfe von Chlorat selektiert. Dieses chemische Analogon zu Nitrat wird von den Nars an der Membran reduziert und das dabei entstehende Produkt Chlorit führt zum Absterben der Zelle. Dieser letale Ansatz war auch der ursprüngliche Ausgangspunkt der Untersuchungen zur Aktivität der Nars bei *S. coelicolor* A3(2), die zu der nachfolgenden Publikation führten.

Co-Autoren der Publikation

Jess Alderson (*Post-Doc*)

Geertje van Keulen (*Post-Doc*)

Janet White (*technical assistant*)

Prof. Dr. Gary Sawers

arbeiteten in der Zeit von 2002-2005 am John Innes Centre in Norwich (Norfolk, UK) an dem Projekt

ist der *Corresponding Author* und Arbeits-/Projektgruppenleiter

Kennzeichnung des eigenen Anteils an den Ergebnissen der veröffentlichten Publikation

Abbildungen: Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5, Fig. 7

Tabellen: -

Die Inhalte aus den Abschnitten:

1 „*S. coelicolor* reduces nitrate during aerobic growth in liquid culture”

2 „*S. coelicolor* mutants unable to synthesize Nar enzymes do not respire nitrate”

3 „The *moaA* mutant cannot use nitrate as an inorganic nitrogen donor”

4 „Analysis of solid cultures reveals differential Nar activity in response to oxygen levels during the cell cycle”

6 „Nitrite production by NM92 ($\Delta narI23$) complemented with *narGHJI* operons”

- Inhaltliche Zusammenfassung der Veröffentlichung -

Die bisher nur bioinformatisch als respiratorische Nitratreduktasen (NarGHJI) charakterisierten drei Operone SCO0216-SCO0219 (*nar2*), SCO4947-SCO04950 (*nar3*) und SCO6532-SCO6535 (*nar1*) wurden deletiert und die so erzeugten Stämme (NM-Stämme) hinsichtlich ihrer Nitratreduktions-Aktivitäten untersucht:

- 1) In Gegenwart aller drei *nar*-Operone (Wildtyp-Stamm) wird vom Myzel bei aerober Kultivierung das im Medium vorhandene Nitrat vollständig und stöchiometrisch zu Nitrit umgesetzt. Für diese Katalyse sind ausschließlich ein oder mehrere der genannten *nar*-Operone verantwortlich. Fehlen alle drei *nar*-Operone (NM92-Stamm) findet keine respiratorische Nitratumsetzung statt, sie kann jedoch durch Einbringen der ursprünglichen *nar*-Operone vollständig komplementiert werden.
- 2) In Abgrenzung zur assimilatorischen Nitratreduktion wurde festgestellt, dass *nar*-Deletions-Stämme weiterhin mit Nitrat als einziger Stickstoffquelle wachsen können. Dabei wurde auch gezeigt, dass sowohl die enzymatische Aktivität der assimilatorischen als auch der respiratorische Nitratreduktion bei *S. coelicolor* A3(2) von dem Vorhandensein eines bis-MGD-Kofaktors abhängig ist; fehlt ein initiales Gen für dessen Biosynthese (*moaA*) wird kein Nitrit mehr gebildet und es ist auch kein Wachstum mit Nitrat als Stickstoffquelle mehr möglich.
- 3) Die respiratorische Nitratreduktion mit der Freisetzung von Nitrit tritt beim Wildtyp-Stamm sowohl in Sporen als auch in Keimlingen und Myzel auf. Für die Nar-Aktivität deutet sich dabei eine Abhängigkeit zur Sauerstoffverfügbarkeit an.
- 4) Die von den drei *nar*-Operonen gebildeten Nar-Enzyme sind nicht redundant. Lethale Phänotypen mit dem Nitratanalogon Chlorat zeigen bei anaerober Inkubation für die jeweiligen Nar-Einzel-Deletionsmutanten unterschiedliche Überlebensraten für Sporen und Myzel.

- Publikation -

The obligate aerobe *Streptomyces coelicolor* A3(2) synthesizes three active respiratory nitrate reductases.

Marco Fischer¹, Jesse Alderson^{2,3}, Geertje van Keulen^{2,3}, Janet White² and R. Gary Sawers^{1,2}

Abstract

Streptomyces coelicolor A3(2) synthesizes three membrane-associated respiratory nitrate reductases (Nars). During aerobic growth in liquid medium the bacterium was able to reduce 50 mM nitrate stoichiometrically to nitrite. Construction and analysis of a mutant in which all three *narGHJ* operons were deleted showed that it failed to reduce nitrate. Deletion of the gene encoding MoaA, which catalyses the first step in molybdenum cofactor biosynthesis, also prevented nitrate reduction, consistent with the Nars being molybdoenzymes. In contrast to the triple *narGHJ* mutant, the *moaA* mutant was also unable to use nitrate as sole nitrogen source, which indicates that the assimilatory nitrate reductases in *S. coelicolor* are also molybdenum-dependent. Analysis of *S. coelicolor* growth on solid medium demonstrated that Nar activity is present in both spores and mycelium (hypha). Development of a survival assay with the nitrate analogue chlorate revealed that wild-type *S. coelicolor* spores and mycelium were sensitive to chlorate after anaerobic incubation, independent of the presence of nitrate, while both the *moaA* and triple *nar* mutants were chlorate-resistant. Complementation of the triple *nar* mutant with the individual *narGHJ* operons delivered on cosmids revealed that each operon encoded an enzyme that was synthesized and active in nitrate or chlorate reduction. The data obtained from these studies allow a tentative assignment of Nar1 activity to spores, Nar2 to spores and mycelium, and Nar3 exclusively to mycelium.

Full text published in: *Microbiology*, October 2010, vol. 156 no. 10, pp. 3166-3179

Received 14 June 2010
Accepted 28 June 2010

¹ Institute of Biology/Microbiology, Martin-Luther University Halle-Wittenberg, 06120 Halle (Saale), Germany

² Department of Molecular Microbiology, John Innes Centre, Norwich, UK

³ Institute of Life Sciences, School of Medicine, Swansea University, Swansea, UK

Kapitel 2 - Anaerobe Nitratreduktion bei Sporen

Myzelien des filamentös wachsenden Bakteriums *Streptomyces coelicolor* können sich differenzieren und dabei ein einzelliges Entwicklungsstadium ausbilden. Zellen dieses Stadiums wurden als widerstandsfähiger gegenüber Temperaturen bis 60°C, Trockenheit und Detergenzien charakterisiert und dienen bei *Streptomyces* vorwiegend der Verbreitung (Kalakoutskii und Agre, 1976; Ensign, 1978). Die Differenzierung und Funktion dieser Zellen entsprechen demnach der allgemeinen Definition einer Spore. Dabei sind sie nicht ohne Einschränkungen mit denen anderer sporenbildender Pro- und Eukaryoten zu vergleichen, sondern stellen eher eine eigene Ausprägung dar. In der Fachliteratur werden dennoch, neben dem konsensual verwendbaren Begriff der *Streptomyces*-Spore, die vier unterschiedlichen und näher klassifizierenden Oberbegriffe Arthrospore (Kämpfer, 2012), Konidiospore (Ochi, 1986), Exospore (Swiercz und Elliot, 2012) oder auch - weniger deterministisch - *aerial spore* (Chater, 2000) genutzt.

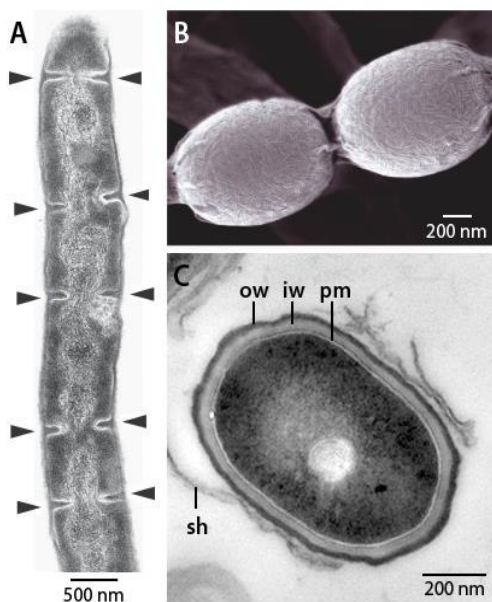


Abb.2.1.: Morphologie- und Strukturänderung während der Sporenbildung bei *S. coelicolor*.

A) Die Transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Aufnahme einer *aerial hypha* verdeutlicht die synchrone Septierung (schwarze Pfeile) in Vorsporenkompartimente. (aus Elliot *et al.*, 2008).

B) Ausschnitt aus einer Sporenkette mit zwei reifen Sporen. Die Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme zeigt, wie der *hyphal sheath* die Sporen zusammenhält. (aus Flärdh und Buttner, 2009).

C) TEM-Aufnahme einer für die Experimente dieser Arbeit genutzten freien Spore mit sh (*hyphal sheath* Fragmente), ow (äußerer Zellwandbereich), iw (innerer Zellwandbereich), pm (Plasmamembran) (Foto: Gerd Hause, IPB Halle).

Die *Streptomyces*-Spore geht aus einer langen unverzweigten Vorläuferzelle hervor, die sich bei ihrer Elongation mit einer äußeren hydrophoben Proteinschicht (*hyphal sheath*) aus Chaplins und Rodlins umhüllt (Talbot, 2003). Dies führt zur Abwendung von der Mediummatrix, der Erhebung als *aerial hypha* in die Luft und dem apikalen Anwachsen bis zur genregulatorisch definierten Endlänge (Elliot *et al.*, 2008). Ab diesem Zeitpunkt durchläuft die mit mehreren Chromosomenkopien ausgestattete Sporophore eine synchrone Zellseptierungs- und Chromosomensegregationsphase in bis zu 50 Vorspor-Kompartimente (Flärdh und Buttner, 2009) (Abb. 2.1.A). Diese entwickeln sich durch hydrolytische und biosynthetische Umbauprozesse der vormaligen Sporophorenzellwand zu abgerundeten Sporen und werden durch die hydrophobe Proteinhülle des vormaligen

Sporophors in Ketten zusammengehalten (Swiercz und Elliot, 2012) (Abb. 2.1.B).

In die Untersuchung der Nitratreduktaseaktivität bei *S. coelicolor* A3(2) wurde auch das Entwicklungsstadium der *Streptomyces*-Spore mit einbezogen. Dafür wurden aus den Kettenstrukturen unter mechanischer Einwirkung Sporen freigesetzt und in wässrige Suspension gebracht (*wetted spores*). Elektronenmikroskopische Aufnahmen dieser reifen Sporen (Abb. 2.1.C) zeigen den in der Literatur als charakteristisch beschriebenen Aufbau aus einer zweischichtigen Zellwand. Der äußere Teil entstammt der parenteralen Hyphen- und Septenwand wohingegen der innere Teil neu gebildet wurde (Vobis und Henssen, 1983). Der Spore haftet dabei noch die lose *hyphal sheath* an. Darüber hinaus ist der detaillierte Aufbau und die Zusammensetzung der Spore und vor allem seines Protoplasten bei *Streptomyces*-Sporen wenig untersucht worden (Swiercz und Elliot, 2012). Vieles wird dabei in Konvergenz zu den molekular und chemisch sehr gut untersuchten Endosporen von *Bacillus* und *Clostridien* angenommen und übertragen. Im Gegensatz zu diesen wesentlich stärker abgegrenzten und auch dormanteren Endosporen, gibt es aber für *Streptomyces* Berichte, dass wasserbenetzte *Streptomyces*-Sporen unabhängig von Keimungsprozessen Stoffe mit der Umgebung austauschen und eine messbare Stoffwechselaktivität besitzen (McBride and Ensign, 1987; Cruz Martín *et al.*, 1986; Garcia Diaz *et al.*, 1983).

Ob und wie reife *Streptomyces*-Sporen nach der Freisetzung auf anaerobe Stressbedingungen reagieren, war jedoch unbekannt und sollte am Beispiel der Nitratreduktion untersucht werden.

Co-Autoren der Publikation

Dörte Falke (*PhD-student*)

arbeitet im selben Labor seit Sept. 2010 an der fkt. Charakterisierung der Nars

Prof. Dr. Gary Sawers

ist der *Corresponding Author* und Arbeits-/Projektgruppenleiter

Kennzeichnung des eigenen Anteils an den Ergebnissen der veröffentlichten Publikation

Abbildungen: Fig. 1A-B, Fig. 2, Fig. 3, Fig. 5A-C, Fig. S1, Fig. S3

Tabellen: Table 1, Table 2, Table S1

Die Inhalte aus den Abschnitten:

1 „Analysis of chlorate-resistance phenotype suggest that Nar-1 is the main Nar active in dormant spores”

2 „Nar-1 is mainly responsible for nitrate reduction in developmentally arrested wetted spore suspension”

3 „Comparison of rates of nitrate and oxygen reduction in wetted spores”

4 „Nar-1 is exclusively active in spores and not in mycelium”

7 „Oxygen inhibits nitrate reduction in arrested wetted spores”

8 „Anaerobic induction of Nar-1 activity in spores does not require protein synthesis“, die Angaben zu Table 2

9 „Nitrate reduction is inhibited by oxygen”

10 „Oxygen-dependent inhibition of Nar-1 activity is reversible”

- Inhaltliche Zusammenfassung der Veröffentlichung -

Ausgehend von der Beobachtung, dass die Genprodukte der drei *nar*-Operone (*nar1*, *nar2*, *nar3*) von *S. coelicolor* A3(2) nicht redundant sind, sondern in verschiedenen Phasen des Lebenszyklus aktiv zu sein scheinen (Kapitel 1), wurden Untersuchungen mit den *nar*-Deletionsstämmen (NM-Stämme) hinsichtlich ihrer Nitratreduktions-Aktivitäten in *Streptomyces*-Sporen durchgeführt:

- 1) In Gegenwart des *nar1*-Operons führt eine dreitägige anaerobe Inkubationsphase mit dem Nitrat analogon Chlorat zu einem 100%igen lethalen Effekt. Fehlt das *nar1*-Operon (NM24-Stamm) überleben alle Sporen. Die anaerobe Inkubation von Keimlingen und Myzel mit Chlorat hingegen führt unabhängig von dem *nar1*-Operon zu einem lethalen Phänotyp.
- 2) Bei der anaeroben Inkubation von Sporen mit Nitrat wird Nitrit gebildet. Diese Nitritbildung kann reversibel durch die Zuführung von Luftsauerstoff gehemmt werden. Diese Hemmung geht zurück, wenn weniger als 0,5 Vol% Luftsauerstoff im Gasraum der geschlossenen Röhren verbleibt.
- 3) Suspensionen von *Streptomyces*-Sporen veratmen Luftsauerstoff mit einer Rate von $1,59 \pm 0,35 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}_{\text{DW}}^{-1}$. Die Umsetzung von Nitrat beträgt gemäß der stöchiometrisch gebildeten Nitritmenge mit $3,65 \pm 0,44 \text{ nmol NO}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}_{\text{DW}}^{-1}$ etwas mehr als doppelt soviel. Beide metabolischen Prozesse finden ohne weitere zugesetzte Substrate statt.
- 4) Fehlen die Operone für *nar2* und *nar3* (NM68-Stamm), findet im Myzel keine respiratorische Nitratreduktion mehr statt, die Nitratreduktion in Sporen hingegen bleibt erhalten. Werden diese Sporen zusätzlich mit Chloramphenicol inkubiert wird weiterhin Nitrat umgesetzt. Die Nar1-Enzymaktivität und die Anwesenheit der katalytischen Untereinheit (NarG) von Nar1 lassen sich im Rohextrakt reifer *Streptomyces*-Sporen nachweisen.

- Publikation -

A respiratory nitrate reductase active exclusively in resting spores of the obligate aerobe *Streptomyces coelicolor* A3(2).

Marco Fischer^{1*}, Dörte Falke^{1*} and R. Gary Sawers¹

Abstract

The Gram-positive aerobe *Streptomyces coelicolor* undergoes a complex life cycle including growth as vegetative hyphae and the production of aerial hyphae and spores. Little is known about how spores retain viability in the presence of oxygen; however, nothing is known about this process during anaerobiosis. Here, we demonstrate that one of the three respiratory nitrate reductases, Nar-1, synthesized by *S. coelicolor* is functional exclusively in spores. A tight coupling between nitrite production and the activity of the cytoplasmically oriented Nar-1 enzyme was demonstrated. No exogenous electron donor was required to drive nitrate reduction, which indicates that spore storage compounds are used as electron donors. Oxygen reversibly inhibited nitrate reduction by spores but not by spore extracts, suggesting that nitrate transport might be the target of oxygen inhibition. Nar-1 activity required no de novo protein synthesis indicating that Nar-1 is synthesized during sporulation and remains in a latently active state throughout the lifetime of the spore. Remarkably, the rates of oxygen and of nitrate reduction by wetted spores were comparable. Together, these findings suggest that *S. coelicolor* spores have the potential to maintain a membrane potential using nitrate as an alternative electron acceptor.

Full text published in: *Molecular Microbiology*. September 2013, vol. 89 issue 6, pp. 1259–1273

Accepted 24 July 2013

¹ Institute of Biology/Microbiology, Martin-Luther University Halle-Wittenberg, 06120 Halle (Saale), Germany

* Equal contributions

- Kapitel 3 -

Wachstum im Kontext der Nitrat/Nitrit-Verwertung

Nitrit als Produkt von assimilatorischer und respiratorischer Nitratreduktion

Streptomyces-Sporen können sich unter adäquaten Bedingungen wieder zu filamentösen Myzelien entwickeln. Die dafür notwendigen anabolen Prozesse können nur bei Anwesenheit einer nutzbaren Stickstoffquelle ablaufen. Neben dem bevorzugten Ammonium und gut verwertbaren Aminosäuren (Hodgson, 2000; Kieser *et al.*, 2000) wird bei *S. coelicolor* auch Nitrat für die Stickstoffversorgung genutzt (Wang und Zhao, 2009). Nach Mutanten- und Genomuntersuchungen geht man bei *S. coelicolor* davon aus, dass das Nitrat nach der Aufnahme mit Hilfe der assimilatorischen Nitratreduktase NasA (Wang und Zhao, 2009) und einer assimilatorischen Nitritreduktase zu Ammonium umgewandelt wird. Die weitere Assimilation erfolgt über das regulatorisch gut charakterisierte GS/GOGAT-System zu Glutamat (Reuther und Wohlleben, 2007; Tiffert *et al.*; 2008).

Nitrit ist das erste gebildete Intermediat bei der assimilatorischen Verwertung von Nitrat; es entsteht aber auch bei der anaeroben Inkubation von Streptomyceten-Sporen in Folge der enzymatischen Aktivität einer respiratorischen Nitratreduktase (Nar1) (Fischer *et al.*, 2013). Im Gegensatz zur Assimilation wird es dabei aber nicht intermediär gebildet, sondern als potentiell cytotoxisches Endprodukt (Bollag und Henninger, 1978) äquimolar ins Medium sekretiert (Fischer *et al.*, 2010). Letztendlich bedeutet daher die vollständige Umwandlung des Nitrats in einem anoxischen Milieu den Entzug der aerob nutzbaren Stickstoffquelle. Im Medium verbleibt nur noch Nitrit, das unter neutralen und basischen pH-Bedingungen stabil ist (Cleemput und Baert, 1984). Treten nach Beendigung anoxischer Phasen wieder aerobe Keimungsbedingungen auf, so erfordert ein von *Streptomyces* angestrebtes Wachstum die Verwertung des extrazellulär vorliegenden Nitrits. Es liegt daher nahe, dass das Nitrit des intermediären und extrazellulären Ursprungs über die gleiche enzymatische Schnittstelle einer Nitritreduktase in die Assimilation eingehen kann.

Parallel zu unseren Studien führten Shao *et al.* (2011) heterologe Expressionsstudien zum Nitratassimilierungs-Operon *nasACKBDEF* bei *Amycolatopsis mediterranei* U32 durch. Im Rahmen eines *Knockout*-Kontrollexperimentes zeigten sie dabei auch, dass die Existenz des

Gencluster SCO2486-SCO2487-SCO2488 von *S. coelicolor* essentiell für die Nitritreduktion ist. Dieses Gencluster galt seit der Identifizierung des globalen Stickstoffmetabolismus-Regulators GlnR (Tiffert *et al.* 2008) als möglicherweise in den Nitritstoffwechsel von *S. coelicolor* involviert. Hintergrund unserer angefangenen Studien zu SCO2487 und SCO2488 war die Ähnlichkeit ihrer Genprodukte mit der - auch anaerob relevanten - Nitratreduktase NirBD aus *E. coli* (Lin und Stewart, 1998). Darüber hinaus rückte auch das Gen SCO6102 in den Fokus. Es ist als putative Nitrit- oder Sulfitreduktase annotiert. Beide sirohäm-abhängigen Enzyme sind sich sehr ähnlich, wobei über Sulfitreduktasen von Aktinobakterien nur wenig bekannt ist. Daher sollte die nitritreduzierende Funktion von SCO2487, SCO2488 und SCO6102 mit *Knockout*-Mutanten bestätigt oder ausgeschlossen werden.

Notwendigkeit neuer methodischer Ansätze bei physiologischen Untersuchungen

Die Charakterisierung des Wachstums derartiger *Streptomyces*-Mutanten erfolgt zum überwiegenden Teil durch die Charakterisierung der Koloniemorphologie und -entwicklung auf festen Nährmedien. Die Voraussetzung für eine Vielzahl weiterführender physiologischer und biochemischer Studien ist jedoch - neben der Notwendigkeit der Gewinnung großer Mengen Zellmaterials - die Charakterisierung des Wachstums in submersen Flüssigkulturen. Bei dieser Kultivierung bilden Streptomyceten ein vegetatives Myzel sich verzweigender Zellfäden. Unter der Voraussetzung einer synchronen Auskeimung wachsen dabei nur innerhalb der ersten fünf Verdopplungen alle Hyphenabschnitte mit der gleichen Rate (*balanced growth*); es liegt demnach nur kurzzeitig eine physiologisch homogene Kultur vor (Riesenberg und Bergter, 1984). Im weiteren Verlauf differenziert sich das Myzelium physio-

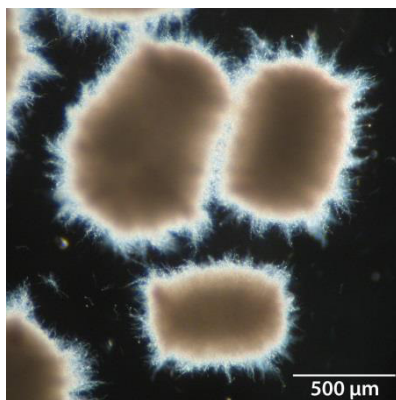


Abb. 3.1. Mikroskopische Hellfeld-Aufnahme aggregierter Myzelien (Pellets) während des Wachstums von *Streptomyces coelicolor* in submerser Flüssigkultur (*tryptic soy broth*). (Foto: Marco Fischer)

logisch deutlich in wachsende Zellen an den Hyphenspitzen und dahinter liegende Zellen eher nährstofflimitierter Hyphenabschnitte (Kieser *et al.*, 2000). Je nach Stamm und Kultivierungsbedingung bilden die Hyphen hierbei – analog den Einflüssen und Begrifflichkeiten des Wachstums von filamentösen Pilzen (Paul und Thomas, 1998; Cox *et al.*, 1998; Gibbs *et al.*, 2000) – disperse Myzelsuspensionen, lockere Aggregationen (*clumps*) oder hagelkorngroße kugelförmige Einheiten mit hoher Zelldichte (Pellets) (Abb. 3.1.).

Für *Streptomyces coelicolor* A3(2) kann eine hohe Affinität zur Zusammenballung lockerer Myzelflocken, zur nichtkoagulierenden Pelletbildung (Pellet geht aus einer Spore hervor) und zur koagulierenden Pelletbildung (durch Aggregation von Sporen sowie der Zusammenlagerung mehrerer Keimlingsaggregationen) dokumentiert werden (Abb. 3.2.).

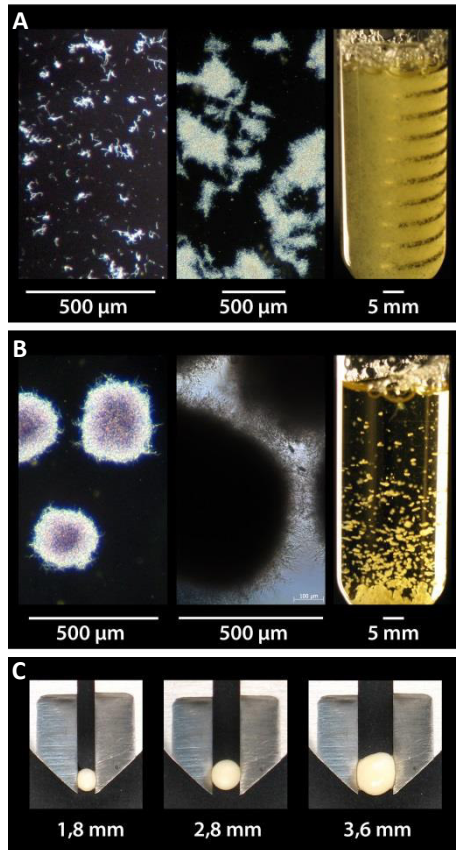


Abb. 3.2.: Morphologie von *S. coelicolor* bei submerser Kultivierung in tryptic soy broth

A) *links* disperses Myzel und geringe Aggregation nach Keimung (Hellfeld (hf)); *mitte* Aggregation zu *clumps* (hf); *rechts* immerwährende Auflockerung von *clumps* durch mechanische Dispersion beim Wachstum.

B) *links* Aggregation zu kompakten Pellets (hf); *mitte* auf der Außenseite von Pellets hervorragende Hyphen mit direktem Mediumkontakt (Durchlicht); *rechts* Aggregation bei normaler Schüttelinkubation.

C) *Streptomyces*-Groß-Pellets in den Außenmaßgreifern eines digitalen Messschiebers; die Pellets gehen aus einer einzelnen Spore nach einer mehrstufigen Kultivierung hervor.

(Fotos: Marco Fischer)

Das Vorliegen physiologisch unterschiedlich differenzierter Hyphenabschnitte sowie das aggregative Wachstum führen zu heterogenen Verhältnissen innerhalb submerser Kulturen. Als eine Folge, insbesondere der Pelletbildung, werden ein verringertes Sauerstoffangebot und das Auftreten von lokaler Anaerobiose angenommen. Dabei ist davon auszugehen, dass die respiratorische Verwertung von Nitrat abhängig vom Sauerstoffangebot ist. Für aerob wachsende Vollmedium-Flüssigkulturen wurde in diesem Zusammenhang bereits gezeigt, dass in aerob wachsenden Myzelpellet-Kulturen Nitrat Nitrat-abhängig zu Nitrit reduziert wird (Fischer *et al.*, 2010). In Minimalmedium-Flüssigkultur von *S. coelicolor* erscheint es daher nicht ausgeschlossen, dass aerob wachsende Zellen Nitrat assimilieren und gleichzeitig jene Hyphenabschnitte, die lokaler Anaerobiose ausgesetzt sind, Nitrat zu Nitrit veratmen.

Die Untersuchung des NasA/NirBD-abhängigen Nitratassimilierungswachstums erfordert unter diesen Gesichtspunkten, den weitestgehenden Ausschluss einer denkbaren anaeroben Nitratreduktion bei submerser Kultivierung. Mit dem Ziel, den Aufwand

dafür klein zu halten, wurde ein Kultivierungssystem mit einem kleinen Maßstab, einem großen Volumen-Oberflächenverhältnis und einem sich einstellenden hohen Dispersionsgrad des Myzels aufgebaut. Parallel zu unseren Studien arbeiteten auch Sohoni *et al.* (2012) an einer Verkleinerung des Maßstabs und publizierten mit einer „robust small-scale cultivation platform“ ebenfalls ein auf mechanische Dispersion abzielendes 24-well-Zellkulturplatten-

System für *S. coelicolor*. Bei Ihrem Ansatz wurde das Wachstum in einer 3 ml Kultur anfänglich über die Optische Dichte und mit beginnender Aggregation über das Trockengewicht bestimmt. Für die Maximierung des Oberflächen-Volumen-Verhältnisses zielte unser System aber auf ein Kulturvolumen von 1 ml ab. Die exakte Bestimmung der Zunahme des darin enthaltenen Zellmaterials und damit die Ableitung von Wachstumsparametern für mikrobielle physiologische Studien machte unter dieser Prämisse die Anwendung anderer Methoden der quantitativen Wachstumsbestimmung erforderlich.

Die Farbstoffadsorption als experimenteller Ansatz der Zellmengenbestimmung

Insbesondere die quantitative Bestimmung kleiner Zellmengen ist für filamentöse und zur Aggregation neigende Mikroorganismen methodisch beschränkt. Das ist darin begründet, dass die klassischen Methoden der direkten und indirekten Zellzahlbestimmung gut suspendierte homogene Zelllösungen benötigen; sei es für den Einsatz mikroskopischer und elektronischer Zählkammern oder für das Aufbringen auf Festmedien für die Lebendzellzahl.

Für Zelldichtebestimmungen hingegen, ist *per definitionem* die Bestimmung des Trockengewichts die grundlegende Methode. Sie ist aber nur bei Nutzung relativ großer Zellmengen exakt (Monod, 1949; Mallette, 1969). Dies und der für die Durchführung nötige Zeitaufwand führten in der Vergangenheit zur Etablierung einer Vielzahl indirekter Alternativen. Sie enthalten das Trockengewicht nur noch als Bezugsgröße. Die schnellste, einfachste und am weitesten verbreitete Methode, die zudem noch mit der Lebendzellzahl korreliert (Dalgaard *et al.*, 1994), ist die Messung der Turbidität (Optische Dichte). Sie ist in der Anwendung jedoch auf einzellige Mikroorganismen beschränkt. Andere Methoden wiederum, wie die wenig reproduzierbare Messung des Volumens oder des Feuchtgewichtes von Zentrifugationspellets sind unpräzise. Dennoch gibt es auch auf filamentöse Mikroorganismen anwendbare und exakte Alternativen: zum einen die direkten chemischen Methoden, die das Wachstum mit dem absoluten Stickstoff-, Protein-, RNA-, DNA-, ATP- oder Phospholipid-Gehalt in einer Kulturprobe in Beziehung setzen (Mallette, 1969; Anderson und Domsch, 1978; White *et al.*, 1979; Christian *et al.*, 1982), zum anderen die indirekten Messverfahren, die die Rate der Sauerstoff- oder Kohlenstoffdioxidumsetzung, die Aufnahme von Nährstoffen oder spezifische Enzymaktivitäten (Nannipieri *et al.*, 1978) verfolgen. Darüber hinaus wurden spannungsbasierte Messungen des bakteriellen Wachstums durch die *Impedance Microbiology* (Ur und Brown, 1974; Richards *et al.*, 1978;

Silley und Forsythe, 1996) entwickelt. Unter Beachtung eines gewünschten geringen analytischen Aufwandes eignen sie sich aber alle nur bedingt für unser System mit einer maximal angestrebten Zellmenge von 1-2 mg Trockengewicht in einem 1 ml Gesamtansatz.

Die bisher nicht erwähnten, gut quantifizierbaren Farbstoffe werden im Zusammenhang mit Zellmengenbestimmungen vor allem als Fluorochrome in epifluoreszenzbasierten Zellzählungen genutzt (Francisco *et al.*, 1973; Newell *et al.*, 1986; Matsunaga *et al.*, 1995) oder dienen über die Bestimmung der Reduktionsaktivität von Zellkulturen als indirekter Wachstumsparameter (Tengerdy *et al.*, 1967; Hazan *et al.*, 2012). Im Hinblick auf das physikalisch-chemische Verhalten von Farbstoffen bei dem Kontakt mit Zellbestandteilen lag es aus unserer Perspektive aber nahe, die Zellmenge indirekt über die Analyse der Menge des an die Zelle adsorbierten Farbstoffes zu bestimmen.

Die Farbstoffadsorption ist in diesem Zusammenhang in den Vorgang der Adsorption eines Stoffes an eine Festphase/Festphasenadsorption einzuordnen. Sie tritt als üblicher Vorgang beim Anfärben auf und wird unter dem Begriff der Biosorption derzeit in größerem Umfang mit kostengünstigen biologischen Adsorbentien zur Bindung und damit Reinigung von Farbstoffen aus Industrieabwässern erprobt (Rafatullah *et al.*, 2010). Aus diesen Studien lässt sich das Potential für unsere beabsichtigte Zellmengenbestimmung ableiten. Die detailliertesten Studien liegen aber zu Farbstoffadsorptionsprozessen bei Schlämmen, Mineralien und Aktivkohle vor (Hang und Brindley, 1970; Rafatullah *et al.*, 2010). Bei ihnen hat sich die quantitative Adsorption von Methylenblau zur Bestimmung der Adsorptionskapazität und der Kationen-Ausstauschkapazität bewährt (Stapel und Verhoff, 1989; Yukselen und Kaya, 2008).

Auch in der Biologie, Chemie und Medizin wird Methylenblau seit über hundert Jahren vielseitig genutzt und ist als Bestandteil verschiedener Färbelösungen in den Disziplinen der Histologie, Zytologie, Histochemie, Parasitologie, Mykologie und Mikrobiologie gut etabliert (Barbosa und Peters, 1971; Schirmer *et al.*, 2011). Er bot sich daher neben anderen gut etablierten Farbstoffen zur adsorptionsbasierten Zellmengenbestimmung in unseren Studien an. Im Verlauf von Färbeprozessen interagieren derartige Farbstoffe über Chemisorption und Physisorption mit dem biologischen Material. Die Physisorption ist dabei ein reversibler Prozess, bei dem das Adsorbat nicht modifiziert wird. Bei der angestrebten quantitativen Bestimmung von Zellmengen mittels Methylenblau galt es daher beide

Möglichkeiten, d.h. die verlässliche Bestimmung der adsorbierenden und desorbierenden Farbstoffmenge zu betrachten.

Im Laufe dieser Arbeit wurde zunächst im Rahmen der Fragestellung der Nitrat/Nitritverwertung durch NasA/NirBD/SCO6102 der Einsatz eines dispergierenden 24-well-Zellkulturplatten-Systems angewendet und mit der Methylenblaufärbung zur visuell differenzierbaren Wachstumsbestimmung kombiniert (publiziert in *Research-in-Microbiology*).

Anschließend wurde die quantitative Korrelation von Trockengewicht und Methylenblausorption ermittelt. Dafür wurde exemplarisch jeweils ein einzelliger wie auch filamentöser pro- bzw. eukaryotischer Mikroorganismus genutzt. Dabei ergaben sich unter Beachtung unterschiedlicher Adsorptions- und Desorptionsvermögen organismenspezifische Sorptionskennzahlen. Für die separate Publikation der Methode wurden im letzten Schritt die Anwendbarkeit für Wachstumskurven im 1-2 ml Maßstab dokumentiert und darüber hinaus gezeigt, dass es mit der „Methylenblauadsorption“ auch möglich ist, die Zellmenge in einzelnen großen filamentösen Pellets zu bestimmen (publiziert in *Applied-and-Environmental-Microbiology*).

Co-Autoren der Publikation

Christopher Schmidt

fertigte im selben Labor unter meiner Betreuung seine Diplomarbeit „Die Klasse 1D Chlorat resistenten Mutanten und das Sco6102-Genprodukt im Kontext des Stickstoffmetabolismus in *Streptomyces coelicolor* A3(2)“ an
arbeitet im selben Labor seit Sept. 2010 an der fkt. Charakterisierung der Nars
ist der *Corresponding Author* und Arbeits-/Projektgruppenleiter

Dörte Falke (*PhD-student*)

Prof. Dr. Gary Sawers

Kennzeichnung des eigenen Anteils an den Ergebnissen der veröffentlichten Publikation

- 1) „Terminal reduction reactions of nitrate and sulfate assimilation in *Streptomyces coelicolor* A3(2): identification of genes encoding nitrite and sulfite reductases“

Abbildungen: Fig. 3, Fig. 4A-C

Die Inhalte aus den Abschnitten:

- 2 „The *nirBD* genes are required for growth with nitrate as a nitrogen source“
- 3 „NirBD is required for growth with exogenously supplied nitrite as nitrogen source“

- 2) „A Universally Applicable and Rapid Method for Measuring the Growth of *Streptomyces* and Other Filamentous Microorganisms by Methylene Blue Adsorption-Desorption“

sämtliche Abbildungen, Tabellen und Ergebnisinhalte

- Inhaltliche Zusammenfassung der 2 Veröffentlichungen -

Die Aktivität der drei Nitratreduktasen von *S. coelicolor* A3(2) (Nar1, Nar2, Nar3) führt zur Anhäufung des Produktes Nitrit im Kulturmedium (Kapitel 1, Kapitel 2). Beide, Nitrat und Nitrit, sind potentielle Stickstoffquellen für den anabolischen Baustoffwechsel zu dem auch die Assimilation von Sulfat über Sulfit gehört. Bioinformatische Analysen ordnen den Genen SCO2487/SCO2488 und SCO6102 die Funktion als Nitrit- oder Sulfitreduktase zu. An Deletionsmutanten in diesen Genen wurden Analysen zur Funktionsklärung durchgeführt. Im Hinblick auf die oft unbefriedigenden Möglichkeiten der Wachstumsbestimmung von Streptomyceten in Minimalmedium und die Notwendigkeit solcher für fortführende Versuche zur respiratorischen Nitratreduktion wurde in diesem Zusammenhang ein einfacheres und schnelleres Verfahren zur Bestimmung des Wachstums von filamentösen Bakterien etabliert:

- 1) Die Gene SCO2487-SCO2488 (*nirBD*, NM7-Stamm) sind wie auch das Gen *moaA* und *nasA* für das Wachstum mit Nitrat als einziger Stickstoffquelle essentiell. Das Gen SCO6102 (*sirA*) hingegen beeinflusst das Wachstum mit Nitrat nicht. Es ist für das Wachstum mit Sulfat essentiell.
- 2) Der Wildtyp von *S. coelicolor* A3(2) zeigt in Gegenwart der potentiell toxischen Stickstoffquelle Nitrit ein geringes Wachstum in Minimalmedium. Dieses Wachstum und der zweckgebundene Verbrauch von Nitrit im Nährmedium ist bei Fehlen von SCO2487-SCO2488 nicht festzustellen.
- 3) Die Hyphen des Myzels von *S. coelicolor* A3(2) adsorbieren 1029 ± 82 nmol Methylenblau pro 1 mg Myzel-Trockengewicht. Die nachträgliche Adsorption ist dabei mit einer Toleranz von 100 nmol unabhängig von dem zuvor verwendeten Anzuchtmedium, der Wachstumsphase oder der Myzelaggregation und kann daher für die Bestimmung der Zellmenge in Kulturproben genutzt werden. Eine Bestimmung über das Gegenverfahren einer Methylenblau-Desorption ist möglich. *Proof-of-Principles* mit anderen pro- und eukaryotischen Mikroorganismen zeigen eine universelle Anwendbarkeit.

- Publikation -**Terminal reduction reactions of nitrate and sulfate assimilation in *Streptomyces coelicolor* A3(2): identification of genes encoding nitrite and sulfite reductases.**Marco Fischer¹, Christopher Schmidt¹, Dörte Falke¹ and R. Gary Sawers¹**Abstract**

The model actinobacterium *Streptomyces coelicolor* A3(2) uses nitrate and sulfate as nitrogen and sulfur sources, respectively. The final step prior to assimilation into amino acids is the 6-electron reduction of the nitrite and sulfite anions, catalyzed by siroheme-dependent nitrite (NirBD) and sulfite (SirA) reductases. There are two predicted nitrite/sulfite reductases annotated in the genome of *S. coelicolor*, but it is unclear which is responsible for nitrite and which for sulfite reduction. Here we demonstrate that a knock-out in the genes SCO2487 and SCO2488 encoding NirBD prevents use of nitrite as a nitrogen source, while a knock-out in SCO6102 encoding SirA prevents sulfate assimilation. Both mutations could be phenotypically complemented by supplementation of the growth medium with ammonium or casamino acids in the case of the *nirBD* mutants or sulfur-containing amino acids in the case of the *sirA* mutants. No functional redundancy between the genes was observed and we demonstrate that NirBD is exclusively required for assimilatory nitrite (it does not detoxify nitrite) and SirA exclusively for assimilatory sulfite reduction.

Full text published in: Research in Microbiology. June 2012, vol. 163 issue 5, pp. 340–348

Accepted 19 April 2012

¹ Institute of Biology/Microbiology, Martin-Luther University Halle-Wittenberg, 06120 Halle (Saale), Germany

- Publikation -

**A Universally Applicable and Rapid Method for Measuring
the Growth of *Streptomyces* and Other Filamentous
Microorganisms by Methylene Blue Adsorption-Desorption.**

Marco Fischer^{1*} and R. Gary Sawers¹

Abstract

Quantitative assessment of growth of filamentous microorganisms, such as streptomycetes, is generally restricted to determination of dry weight. Here, we describe a straightforward methylene blue-based sorption assay to monitor microbial growth quantitatively, simply, and rapidly. The assay is equally applicable to unicellular and filamentous bacterial and eukaryotic microorganisms.

Full text published in:

Applied and Environmental Microbiology. July 2013, vol. 79 issue 14, pp. 4499–4502.

Accepted May 6 2013

¹ Institute of Biology/Microbiology, Martin-Luther University Halle-Wittenberg, 06120 Halle (Saale), Germany

- Kapitel 4 -

Anaerobe Nitratreduktion bei filamentösen Stadien

Während die Untersuchung der Nar1-Nitratreduktion relativ schnell auf frisch geerntete Sporen fokussiert werden konnte (Kapitel 2), ergaben die anfänglichen Untersuchungen für Nar2 und Nar3, dass sie eine Aktivität vornehmlich in Myzel aufweisen (Kapitel 1). Bei der weiteren funktionellen Charakterisierung zeigte sich jedoch, dass die quantitative Schwankungsbreite der ermittelten Enzymaktivitäten für weitergehende Untersuchungen zu hoch ist. Als Ursache und Optimierungsnotwendigkeit wurden die experimentell schwer zu beherrschenden vielgestaltigen Einflüsse bei der Entwicklung von *Streptomyces* vermutet.

In einfachen Modellen wird diese Entwicklung in zwei wesentliche Abschnitte unterteilt: In die Ausbildung eines mehrfach verzweigten vegetativen Myzels (Substratmyzel) und in die Differenzierung bestimmter Teile des vegetativen Hyphengeflechts zu einem sporulierenden reproduktiven Myzel (Luftmyzel) (Chater, 2013; Abb. 4.1.A). Tatsächlich vollzieht sich aber eine wesentlich komplexere multizelluläre Entwicklung.

Der erste Entwicklungsschritt, die Keimungsinitiation, ist ein noch größtenteils unverstandener Prozess. Allerdings wurde bei der Verwendung unvoreilhafter Auskeimungsbedingungen (Inkubation in destilliertem Wasser) erkannt, dass das NepA-Protein als strukturelle Komponente der Sporenzellwand für die Aufrechterhaltung der Sporen-Dormanz verantwortlich ist. Liegt NepA nicht vor, können die Sporen von *S. coelicolor* A3(2) innerhalb von 2-3 Tagen in Wasser auskeimen, wohingegen Wildtypsporen selbst nach 7 Tagen keine Veränderung zeigen (de Jong *et al.*, 2009). Ein derartig langer Sporenarrest wurde in die bisherigen Untersuchungen zur Nitratreduktion noch nicht einbezogen und sollte in einem ersten Schritt zusätzlich in die funktionelle Charakterisierung von Nar2 und Nar3 mit einbezogen werden.

Für die eigentliche Keimung werden zweiwertige Kationen (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+}) und CO_2 benötigt; letzteres kann aber auch durch solche Substrate ersetzt werden, die es erlauben, den keimungsnotwendigen Tricarbonsäurezyklus über anaplerotische Reaktionen aufrecht zu erhalten (Hardisson *et al.*, 1978; Grund und Ensign, 1978).

In der ersten Entwicklungsphase nach der Keimung wird zunächst ein primäres Myzel (M1) ausgebildet. Seine Existenz wurde erst in jüngster Zeit durch Manteca *et al.* (2005, 2006)

beobachtet und letztendlich auch näher charakterisiert: Es hat einen durchweg vegetativen Charakter, ist vollständig kompartimentiert und durchläuft zu gegebener Zeit einen ersten PCD-Prozess (*programmed cell death*), an dessen Ende tote und lebende Zellen in der Hyphe mehr oder weniger alternieren. Aus den überlebenden Zellen entwickelt sich ein zweites Myzel (M1/M2-Transition). Dieses M2-Myzel ist nur gelegentlich kompartimentiert und hat von daher einen synzytialen bzw. „*multinucleated*“ Charakter (Yagüe *et al.*, 2013a).

Während das M1-Myzel im Lebensraum Boden vorherrschend ist (Manteca und Sanchez, 2009), tritt es nach dem gegenwärtigen Stand des Wissens unter Laborbedingungen nur kurzzeitig auf. Das M2-Myzel hingegen, macht den vorherrschenden Teil der auf bzw. in der

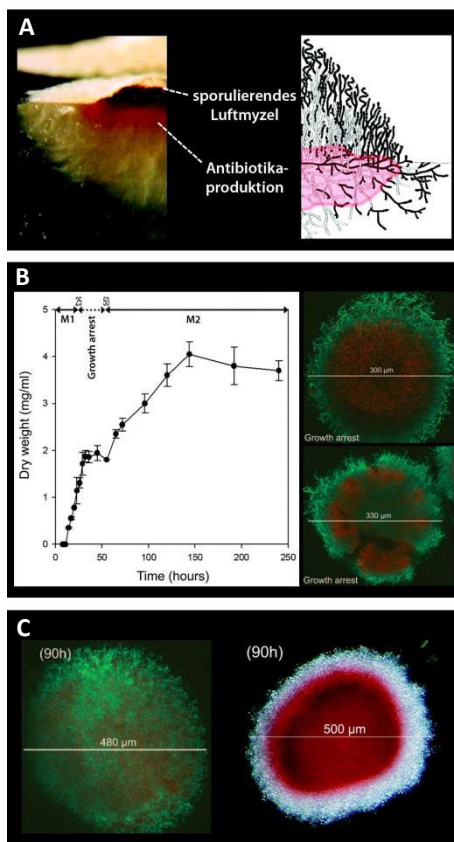


Abb. 4.1. Multizelluläre Entwicklung, Growth Arrest und Antibiotikabildung von *S. coelicolor*

A) Fotografie (links) und schematischer Querschnitt (rechts) einer auf Festmedium gewachsenen *Streptomyces*-Kolonie (Aus Chater, 2013).

B) Biphasisches Wachstumsverhalten in Flüssigkultur (Medium R5A, M1 - Myzel 1; M2 - Myzel 2) **rechts:** CLSM-Aufnahmen von mit SYTO 9 und Propidiumiodid als „LIVE-DEAD“ - gefärbte Myzelaggregate der frühen (oben) und späten (unten) *Growth-Arrest*-Phase (Aus Manteca *et al.*, 2008).

C) Myzelaggregate der zweiten Wachstumsphase; **links:** LIVE-DEAD-gefärbte CLSM-Aufnahme **rechts:** phasenkontrastmikroskopische Aufnahme mit erkennbarer roter Antibiotikabildung.

(Aus Manteca *et al.*, 2008)

Agarmatrix wachsenden Hyphen (Substratmyzel) aus (Abb. 4.1.A). Orientiert man sich an den natürlichen Bedingungen, so ist das M2-Myzel aber eher eine länger andauernde erste Stufe des reproduktiven Myzels (*pre-sporulating* M2) (Yagüe *et al.*, 2013a). Tatsächlich wachsen bei dem nächsten Entwicklungsschritt speziell differenzierte Lufthyphen aus den M2-Myzelgeflechten heraus (Abb. 4.1.A). Sie ernähren sich auf parasitäre Weise von sich auflösenden M2-Hyphen (zweiter PCD-Prozess) (Mendez *et al.*, 1985; Chater, 2013).

Die Initiation und Steuerung der reproduktiven Entwicklung wird über die Präsenz und Konzentration extrazellulärer Signale und extrazellulärer Enzyme realisiert. Sie sind Bestandteil des für *Streptomyces* charakteristischen Sekundärmetabolismus. Dieser wird vorwiegend durch das M2-Myzel betrieben und findet seinen evolvierten Ursprung in der extrazellulär vermittelten Transition von Substratmyzel zu Luftmyzel. Die Expression der meisten Antibiotika-Gencluster wird von daher über die Initiierung der reproduktiven Entwicklung (*bld*-Kaskade) reguliert. Dieser Zusammenhang wird auch bei der Kultivierung auf Festmedium deutlich (Abb. 4.1.A). In submersen

Kulturen hingegen wird nur die Bildung von Sekundärmetaboliten offenkundig (Abb. 4.1.B und C), denn bei den meisten Streptomyceten ist die extrazelluläre Auflagerung sekretierter hydrophober Proteine (*Sky-pathway*) innerhalb der Flüssigkeit und damit die Entwicklung zu hydrophoben Sporophoren nicht möglich.

In diesem Kontext einer multizellulären Entwicklung und Regulation findet, entsprechend den Ergebnissen unserer Vorversuche, die Nar2 bzw. Nar3-vermittelte Nitratreduktion statt. Gemäß Manteca *et al.* (2010) und Yagüe *et al.* (2013b) werden im M1-Myzel vor allem Proteine und Transkripte des Primärmetabolismus hochreguliert, wohingegen im M2-Myzel vor allem die Gene der Sekundärmetabolitbiosynthese verstärkt exprimiert werden. Die M1/M2-Transition mit den erwähnten PCD-Prozessen findet dabei auch in submerser Kultur statt. Sie kann in geeigneten Medien zu einem deutlich sichtbaren zwischenzeitlichen Wachstumsarrest führen. Auf ihn folgt dann unmittelbar die Phase der Sekundärmetabolitbildung (Abb. 4.1.B und C) (Manteca *et al.*, 2008).

In Kenntnis dieser Fakten sollten reproduzierbare Untersuchungssysteme für die Nitratreduktion in submerser Kultur und auf Festmedium etabliert werden, die in ihrer Ausgestaltung die Kontrolle der Sauerstoffverfügbarkeit mit einbeziehen. Letztendlich sollte sowohl die quantitative Charakterisierung wichtiger Einflussgrößen sowie der quantitative Vergleich der Nar-Aktivität regulatorischer Mutanten bei filamentösen Stadien möglich sein.

Co-Autoren der Publikation

Dörte Falke (*PhD-student*)

Tony Pawlik

Prof. Dr. Gary Sawers

arbeitet im selben Labor seit Sept. 2010 an der fkt. Charakterisierung der Nars
fertigte im selben Labor unter meiner Betreuung seine Diplomarbeit
„*Untersuchungen zum Nitrattransport in Streptomyces coelicolor*“ an
ist der *Corresponding Author* und Arbeits-/Projektgruppenleiter

Die komplette Rohfassung (Draft) des Manuskriptes wurde von Marco Fischer geschrieben.

Kennzeichnung des eigenen Anteils an den Ergebnissen der veröffentlichten Publikation

Abbildungen: Fig. 1A-B, Fig. 2A-C, Fig. 3A-C, Fig. 4, Fig. 5, Fig. 6A

Tabellen: -

Die Inhalte aus den Abschnitten:

- 1 „Long-term anaerobic incubation of resting spores induces Nar2-dependent nitrate respiration.“
- 2 „Hypoxic stress and oxygen-limitation induce the synthesis of an active Nar-dependent nitrate respiration in substrate mycelium.“
- 3 „Nitrite production by cells causes self-inflicted toxicity.“
- 4 „Nar2-dependent nitrate respiration requires the transporter NarK2, a NarX-like sensor protein and a lack of oxygen.“
- 5 „Phosphate-dependent Nar3 induction accompanies entry into the stationary phase.“, die *in vivo* Daten

- Inhaltliche Zusammenfassung des Manuskripts -

Nach der Charakterisierung einer der drei respiratorischen Nitratreduktasen von *S. coelicolor* A3(2) als sporenspezifisches Enzym (Nar1, Kapitel 2) blieb bisher die Charakterisierung der im Myzel detektierten Nitratreduktaseaktivität (Kapitel 1) und ihre Zuordnung zu dem Nar2-Enzym und Nar3-Enzym offen. Es wurden daher Untersuchungen mit den *nar*-Deletionsstämmen (NM-Stämme) hinsichtlich ihrer Nitratreduktase-Aktivitäten durchgeführt. Dabei wurden zuvor erhaltene Hinweise einer sauerstoffabhängigen Aktivität in die experimentellen Versuchsansätze integriert und mit der neu etablierten Myzelmengenbestimmung (Kapitel 3) auch im Hinblick auf mögliche Nitrittoxizitätseffekte analysiert:

- 1) Die Expression des *nar2*-Operons bei der Kultivierung von Myzel ist von der Sauerstoffkonzentration abhängig. Die katalytische Untereinheit (NarG) von Nar2 kann vor allem bei hypoxisch (<2,5 mg/l O₂) angezogenem Myzel nachgewiesen werden. Wird hingegen aerob (>2,5 mg/l O₂) angezogenes Myzel unvermittelt anaerobisiert wird keine signifikant verstärkte NarG2-Proteinmenge detektiert.
- 2) Bei einer normalen aeroben Kultivierung auf Festmedium oder Flüssigkultur kommt es innerhalb der Kolonie bzw. innerhalb sich ausbildender Myzelaggregationen der Flüssigkultur zu lokaler Anaerobiose. In solchen Kulturen findet eine Nar2-bedingte Nitratreduktion statt, dessen Aktivität von dem Genprodukt von SCO0213 (NarK2, vorgeschlagen als Nitrattransporter) und SCO0203 (NarX ähnliches Sensorprotein) abhängig ist. Das gebildete Nitrit ist toxisch und führt bei emerser und submerser Kultivierung zu negativen Wachstumseffekten.
- 3) Die sauerstoffabhängige Synthese des Nar2-Enzyms findet auch in Sporen statt. Sie müssen dafür mindestens 24 h anaerob inkubiert werden.
- 4) In Myzel wird auch das Nar3-Enzym synthetisiert. Eine Voraussetzung dafür ist die Limitierung von Phosphat im Medium, wie sie auch während der Kultivierung in einer normalen *Batch*-Kultur auftritt.

Manuscript: Conditions for Nar2- and Nar3-Dependent Respiratory Nitrate Reduction in S. coelicolor A3(2)

M. Fischer, D. Falke, T. Pawlik and G. Sawers

Abstract: Several members of the aerobic genus *Streptomyces* are able to reduce nitrate. This reaction is catalyzed by Nar-type respiratory nitrate reductases yielding nitrite as product, which is stoichiometrically excreted into the surrounding medium. A unique feature of *Streptomyces coelicolor* A3(2) compared with other streptomycetes is that it synthesizes three non-redundant Nar enzymes. One of these (Nar1) is known to be exclusively active in spores. In this study we identified the conditions for synthesis of active Nar2 and Nar3 enzymes. Synthesis of Nar2 is induced in resting spores that have been incubated for long periods of anaerobic stress, as well as in mycelium grown under oxygen-limitation. Its activity in mycelium is dependent on the presence of a predicted nitrate transporter, NarK2, and on a NarX-like histidine kinase sensor protein. In contrast, active Nar3 is synthesized in mycelium subjected to phosphate limitation.

INTRODUCTION

Streptomyces coelicolor A3(2) is a high-GC gram-positive, filamentous soil-dwelling bacterium and represents the most important genetic model within the order *Streptomycetales* (1). Most recent studies on *Streptomyces* species have dealt either with the regulation of its complex life cycle, which includes spores, vegetative mycelium and aerial hyphae, or with its complex secondary metabolism, especially the synthesis of antibiotics and exoenzymes. Several early studies (2) and some more recent work focused on primary metabolism, including the global nitrogen regulator GlnR (3, 4), the phosphate dependent *pho*-regulon (5, 6), the oxidative pentose phosphate pathway (7) or the global carbon response regulator CRP (8). In contrast, only very few studies have addressed the regulation of respiration in *Streptomyces* (9, 10, 11) or what has been referred to as the ‘anaerobic paradox’ (12). According to this paradox although streptomycetes are unable to grow in the absence of oxygen their genomes nevertheless encode genes whose products are associated with anaerobic metabolism (12). Some of these might be responsible for the ability of *S. coelicolor* A3(2) to survive extended periods of anoxia (13). The physiological adaptation behind this phenomenon is, however, poorly understood. An experimental approach to address this issue is to examine the roles of the respiratory nitrate reductase (Nar) enzymes.

S. coelicolor A3(2) encodes three non-redundant and active Nar enzymes (14). Nar1 has been characterized as the first known spore-specific nitrate reductase (15). Nar1 is always present in a ‘ready-to-use’ mode in mature spores but so far has never been found in mycelium. The *in vivo* activity of Nar1-dependent nitrate reduction is initiated only in the absence of ambient oxygen and results in stoichiometric release of nitrite when exogenous nitrate is available. Nar2 and Nar3, however, are primarily active in mycelium and not spores (14).

In the present study we have used optimized methods to improve our understanding of the conditions that result in the synthesis of Nar2 and Nar3. In particular, we determine the conditions that result in induction of Nar2 and Nar3 synthesis in response to oxygen levels and the presence of nitrate. In this regard we have analyzed different stages of

the life cycle, particularly the transition from spores to germlings, the ‘normal’ mycelial growth phase, as well as the transition phase to secondary metabolism. Moreover, because *in vivo* Nar activity is likely influenced by the nitrate:nitrite transport (14) and possibly by nitrate-sensing, we expand our studies for Nar2 to encompass two genes upstream of the *nar2* operon, which encode on the one hand a predicted nitrate:nitrite antiporter NarK2 (SCO0213) and on the other a protein (SCO0203) showing 27% amino acid sequence identity to the nitrate-responsive sensor NarX of *E. coli* (16).

RESULTS

Long-term anaerobic incubation of resting spores induces Nar2-dependent nitrate respiration.

In contrast to Nar1, previous studies demonstrated that neither Nar2 nor Nar3 are active in spores during a five-hour anaerobic incubation period (15). Nevertheless, RT-PCR analysis of total RNA derived from freshly harvested spores revealed the presence of *narG2* transcripts (data not shown). In order to clarify whether these transcripts perhaps allow for a rapid synthesis of Nar2 upon germination or if they maybe exist as templates characteristic of stressed spores, we incubated anaerobic, arrested spores and germlings up to three days on a solid media with nitrate (Fig. 1A, Fig. 3A). After this incubation Nar-activity was determined qualitatively by optical detection of a nitrite-responsive indicator. A strain without *nar*-genes (NM92) and anaerobic incubations without nitrate in the medium served as negative controls. A further incubation included adding the protein synthesis inhibitor chloramphenicol. As shown previously (15), spores of the wild type and the strain NM68 ($\Delta nar2 \Delta nar3$) reduced nitrate. Unexpectedly, however, nitrite levels were higher in the wild type and in a strain lacking *nar1* genes (NM24) than in NM68 (Fig. 1A right panel). Moreover, this Nar1-independent nitrate reduction required protein *de novo* synthesis because it was prevented by the presence of chloramphenicol (Fig. 1A left panel). It was apparent from strains lacking Nar3 (data not shown) that this activity is associated with Nar2 and so the strain NM59 ($\Delta nar1 \Delta nar3$) was used for further quantitative analyses (Fig. 1B).

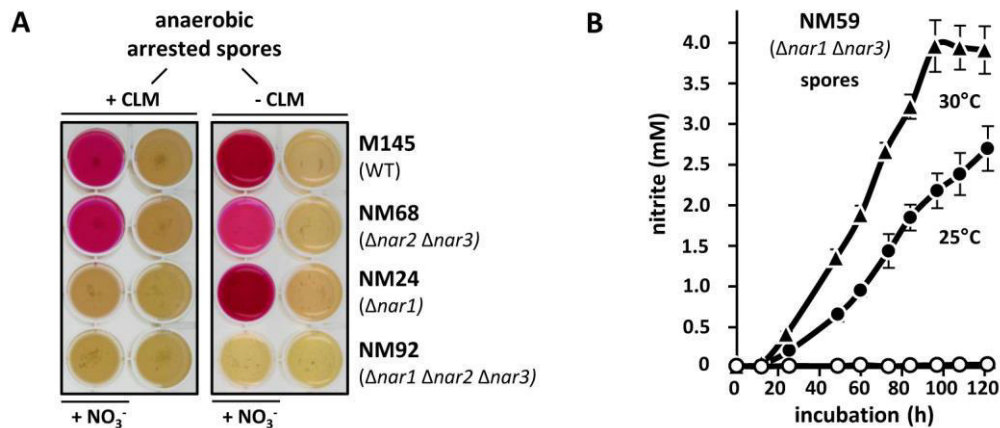


Fig. 1.: Qualitative (A) and quantitative (B) analysis of nitrite production by developmentally arrested (non-germinated) spores of *S. coelicolor*.

In (A) Nar-dependent nitrate reduction was determined for the *S. coelicolor* strains indicated. Spore suspensions ($5 \mu\text{l}$ of $\text{OD}_{450} = 20$) were dropped onto LB agar (3 ml) containing $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ chloramphenicol (CLM; left panel of A; from reference (15)) or without chloramphenicol (right panel of A) in a 24-well plate and incubated immediately under anaerobic conditions for 3 days at 30°C . The right panel was prepared and processed in the same manner as (A) but without chloramphenicol. The wells labeled NO_3^- included 5 mM sodium nitrate in the medium. Excreted nitrite was determined colorimetrically as described in *Experimental procedures* and the presence of nitrite is revealed as a darkening (violet staining) of the well. In (B) the Nar2-dependent nitrate reduction of NM59 ($\Delta nar1 \Delta nar3$) was determined quantitatively in anaerobic spore suspensions with an OD_{450} of 5 at 25°C (circles) and 30°C (triangles). Spore suspensions were incubated in MOPS-NaOH with 5 mM nitrate for 6 days under a nitrogen atmosphere. A control spore suspension contained $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ chloramphenicol (open circles); another spore suspension was incubated aerobically (open triangles; hidden by the open circles). Excreted nitrite was detected in the supernatant as described in the *Experimental procedures*. The experiment shows data with standard deviation obtained from triplicates. For each data point individual incubation flasks were used.

Spore suspensions ($\text{OD}_{450} = 2.5$) were incubated in MOPS buffer with 4 mM nitrate for 5 days. No germination occurs under these conditions (14, 15). While no release of nitrite was observed aerobically, the first significant amounts of nitrite were produced and detected after one day in the absence of oxygen; afterwards a continuous linear nitrite release of $0.133 \text{ nmol NO}_2^- \text{ h}^{-1} \text{ min}^{-1} \text{ OD}^{-1}$ (30°C) was detected when no chloramphenicol was added (Fig. 1B). This long-term stable nitrate-reducing activity was about 70% lower than the Nar1-dependent *in vivo* activity that we measured previously during the first 5 h of the anaerobic incubation of NM68 and the wild type (15). Interestingly, an anoxic preincubation without nitrate for 48 hours did not affect rate of nitrate reduction (data not shown). The reducing equivalents for this nitrate respiration in spores are provided solely from internal storage compounds. Moreover, addition of glucose, mannose, trehalose or incubation in rich medium did not result in a higher activity (data not shown). Nevertheless, in contrast to Nar1, controls incubated in the presence of chloramphenicol revealed that *de novo* protein synthesis is required for the synthesis of Nar2 in spores (Fig. 1B).

Hypoxic stress and oxygen-limitation induce the synthesis of an active Nar-dependent nitrate respiration in substrate mycelium.

Besides spores, we also detected a Nar-dependent nitrite release in germlings (Fig. 3A) and in mycelium for the wild type. Notably, in the case mycelium, we detected this *in vivo* Nar-activity during apparently aerobic conditions (14). However, due to the tendency of *S. coelicolor* A3(2) to grow in aggregates, especially when high amounts of mycelium were present, these aggregates rapidly become oxygen-limited. This is why we decided to standardize mycelial growth with respect to the oxygen concentration for the analysis of Nar-activity (Fig. 2A). If mycelium was

grown with more than $2.5 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$ no significant Nar-activity was detectable, whereas the same mycelium, which was grown for further 2 hours at a lower oxygen concentration (hypoxic) showed an activity of 14.8 mU mg^{-1} in crude extracts (Fig. 2B top). It was remarkable, however, that such an activity was not detectable for aerobically ($> 2.5 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$) grown mycelium that had been transferred abruptly for two hours to anoxic conditions. Western blot analyses demonstrated that these differences correlate with the appearance of the catalytic subunit NarG2 in the crude extract (Fig. 2C bottom); the strongest signals appear in crude extracts of hypoxically ($< 2.5 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$) grown mycelium. These data suggest a hypoxic induction of the Nar2-dependent nitrate respiration system in mycelium.

These results were only reproducible with highly disperse mycelium (see Methods). This implies a local hypoxic or anoxic effect for aggregated mycelium cultures. To prove this, we analyzed chloramphenicol-treated mycelium (grown hypoxically) for its ability to reduce nitrate at different oxygen concentrations in the medium; it is known that oxygen inhibits nitrate reduction in whole mycelium (15). While highly disperse mycelium only reduced nitrate to nitrite in the complete absence of oxygen, mycelium aggregated to form mini-pellets (0.25 or 0.5 mm in diameter) reduced nitrate proportionally to the oxygen level in the medium (Fig. 2C). This suggests an oxygen gradient within the aggregate and hence this resulted in anaerobic nitrate reduction during aerobic cultivation of *S. coelicolor* A3(2).

Nitrite production by cells causes self-inflicted toxicity.

The occurrence of an anaerobic nitrate respiration in hypoxic cultures *S. coelicolor* A3(2) suggests a benefit to energy balance and therefore growth of the organism. However, contrary to this hypothesis, the growth rate of the

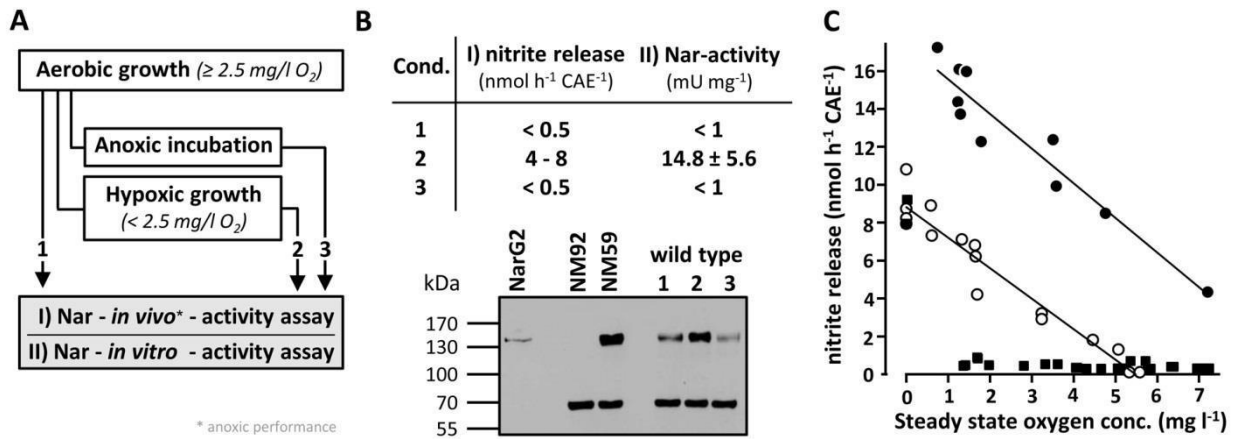


Fig. 2: General nitrate reductase activity in substrate mycelium of *S. coelicolor* A3(2) M145 (wild type). Data distinguish between dispersed (A, B, 1-3; C squares) and self-aggregated, grown mycelial populations (C, filled and open circles). The cell material was obtained after 5 hours aerobic growth (1), 2 hours hypoxic growth (2; C) or after an anoxic incubation period of 2 hours (3). NM92 ($\Delta nar1 \Delta nar2 \Delta nar3$), NM59 ($\Delta nar1 \Delta nar3$). (A) Scheme for preparation of cell material. For the *in vitro* assay (II) crude extract was used to measure specific nitrate reductase activity with benzyl viologen and nitrate. In the *in vivo* assay (I), small amounts of cells were transferred to anoxic Hungate vials with nitrate added freshly to the medium and these were incubated for at least 30 min. (B) Top: Comparison of Nar activities. The nitrite release of *in vivo* assay was referred to as the cell amount, which was determined by methylene blue adsorption and specified as CAE (cell amount equivalence) (23). Bottom: Detection of Nar2 with peptide antibodies raised against the catalytic subunit NarG2. (C) Nitrite released by mycelium which was incubated in TSB with 200 $\mu\text{g/ml}$ chloramphenicol. The use of different amounts of mycelium resulted in different steady-state oxygen concentrations. Nitrate was added after reaching steady state. Each point represents an individual measure attempt with dispersed mycelium (squares), 0.25 mm mycelial-pellets (open circle) and 0.5 mm (filled circle). To achieve zero oxygen, vials were closed and flushed with nitrogen.

wild type was better without nitrate (Fig. 3B). In this regard there was no difference between the 1 ml and 2 ml growth system used or their relationship to varying oxygen concentration. In both cases, which are described in more detail in (23), it was reduced by an amount equivalent to ca. 200 CAE ml⁻¹ of mycelium. To verify this effect with respect to the potential toxic character of accumulated nitrite we prepared growth curves in the presence of

exogenously added nitrite (Fig. 3C). Even 5 mM nitrite reduced the growth significantly. A higher amount of nitrite (25 and 50 mM) reduced growth proportionally more; a total of 22.5 CAE of mycelium was generated per 1 mM nitrite produced after 12 hours of growth. This toxicity effect of nitrite was also detectable in a developmental assay on YEME-MOPS-agar. Colonies of wild type and NM59 showed a strongly retarded colony development in

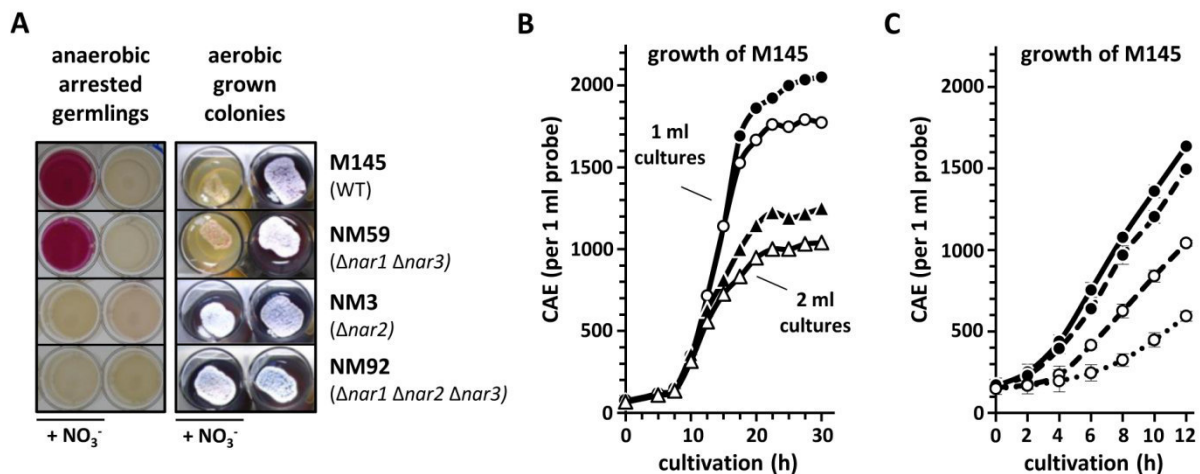


Fig. 3: Nitrite release by vegetative stages of *S. coelicolor* A3(2) and its influence on growth in liquid cultures (B, C) as well as the development on solid media (A).

In the left panel of part A Nar-dependent nitrate reduction in germlings was determined for the *S. coelicolor* strains indicated to the right of the panels. Spore suspensions (5 μl of $\text{OD}_{450} = 20$) were dropped onto LB agar (3 ml) in a 24-well plate and incubated for 10 h aerobically. After germination, plates were incubated under anaerobic conditions for 3 days at 30°C. The wells labelled NO_3^- included 5 mM sodium nitrate in the medium. The presence of excreted nitrite was determined colorimetrically and is revealed as a darkening (violet staining) of the well. In the right panel of part A spore suspensions (5 μl of $\text{OD}_{450} = 1$) were dropped onto YEME-MOPS-agar (3 ml) and incubated for 9 days aerobically with or without 50 mM nitrate. Complete colony development was indicated by a grey-white colony surface and substantial secretion of the blue pigment actinorhodin.

In (B, C) growth curves for the wild type M145 were carried out in 24-well plates using 1 ml (circles) or 2 ml (triangles) of TSB medium. The different volumes caused different degrees of oxygen limitation during the growth. The cultures in part B were inoculated with spores to an OD_{450} of 0.25 whereas the cultures in part C were inoculated with highly dispersed mycelium (see methods) to 150 CAE/ml. The plates were incubated without nitrate (B, filled symbols), with 20 mM nitrate (B, open symbols) or with different concentrations of nitrite (C: filled circles and full line – no nitrite; filled circles and dashed line – 5 mM nitrite; empty circles and dashed line – 25 mM nitrite; empty circles and dotted line – 50 mM nitrite). Cell amount was measured by the methylene blue adsorption assay and displayed as Cell Amount Equivalents (CAE) for 1 ml culture probes. (see Methods for details).

the presence of 50 mM nitrate, whereas colonies without nitrate sporulated normally (Fig. 3A right panel). As controls strains NM3 and NM92, which lack Nar2 exhibited a normal sporulation phenotype in the presence of 50 mM nitrate.

Nar2-dependent nitrate respiration requires the transporter NarK2, a NarX-like sensor protein and a lack of oxygen.

As mentioned above, the NarG2 subunit of Nar2 was detected in crude extracts of hypoxically grown wild type mycelium by western blot analysis (Fig. 2B) and is the Nar enzyme responsible in mycelium. Nevertheless, it has been shown that both Nar2 and Nar3 are active in mycelium (14). Therefore, to differentiate between the *in vivo* activity of Nar2 and Nar3 we used mutants with either only Nar2 (NM59) or only Nar3 (NM29) or with both Nar1 and Nar3 (NM3). Anaerobically incubated germlings of NM59 and the wild type were able to release nitrite on solid medium whereas in strains NM3 and NM92, which lacked Nar2, no nitrite was detectable (Fig. 3A). This result was confirmed by analysis of colony development effects on YEME-MOPS-Nitrate-agar. Nevertheless, colonies of strains NM29 (only Nar3 present) and NM3 (lacks Nar2) also showed a release of nitrite (data not shown); thus further investigations were performed in liquid cultures. Based on the identified hypoxic Nar-induction (Fig. 2), we used a standardized three-day staged cultivation procedure ending with a 15h growth period in TSB to achieve reproducible cell densities and aggregation sizes of mycelium. Aliquots of these mycelia (*ca.* 250 CAE) were used for determination of *in vivo* Nar activity in MOPS-buffer (pH 7.0) with nitrate (20 mM) but without other substrates (Fig. 4). It was observed ultimately that NM59 (only Nar2) reduces *ca.* 3 mM nitrate anaerobically within 2.5 hours. This was also noted when the incubation was performed in standing-liquid cultures or if chloramphenicol was added. However, aerobic incubation clearly inhibited the nitrate reduction activity. In contrast, mycelium of NM29 harbouring only Nar3 failed to show a comparable or significant activity under these conditions.

To identify other factors essential for the Nar2-dependent nitrate respiration disruption mutants for a possible nitrate:nitrite antiporter NarK2 (NiTra1) and a predicted NarX-like sensor protein (NMreg2E) were constructed. Analysis of these mutants in the standing-liquid culture assay in the presence of nitrate showed a complete loss of the *in vivo* activity if the putative *narX* gene (SCO0203) was disrupted (Fig. 5). Similarly, a 90% reduction in Nar activity was observed when the *narK2* gene (SCO0213) was disrupted (Fig. 5). The phenotypes of both mutants could be complemented when the respective genes were re-introduced onto the chromosome using the integrative plasmid pMS82.

Analysis of Nar enzyme activity in crude extracts of NiTra1 ($\Delta narK2$) and NMreg2E ($\Delta narX$) revealed that strain NMreg2E showed no activity, whereas extracts of NiTra1 showed 75 % activity of the wild type. This indicates that the *in vivo* Nar2 activity depends on NarK2.

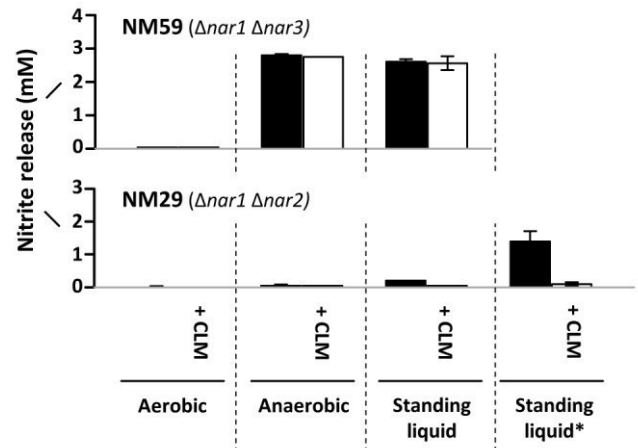


Fig. 4: Nitrite production by mycelium of *S. coelicolor* A3(2) within 2.5 hours of incubation in MOPS buffer in the presence of 10 mM nitrate. Mycelium was incubated aerobically, anaerobically or in standing liquid culture. The asterisk denotes a further standing liquid culture variant with a 2.5 h aerobic preincubation in the presence of 20 mM glucose. One of each variant was additionally incubated with 200 μ g/ml chloramphenicol (CLM).

Phosphate-dependent Nar3 induction accompanies entry into the stationary phase.

Based on our observations that NM29 excreted nitrite during colony growth on solid agar we initiated a systematic analysis in liquid cultures to determine the point at which Nar3 induction occurs and the conditions required for Nar3-dependent nitrate reduction. Considering the hypoxic Nar induction observed for Nar2, for our Nar3 studies we used homogeneously grown mycelial mini-pellets. Using this approach we could analyze the entire range of possible oxygen levels down to local anaerobiosis in a single assay. Transfer of pellets (2 mg/ml) to fresh TSB-medium (supplemented with 5 mM nitrate) resulted in nitrite release after 15 h of growth (Fig. 6), which represented the late phase of growth. To prove this, we varied the TSB concentrations (50%, 25% and 10%) and as expected for substrate-limiting effects, a proportionally more rapid appearance of nitrite release was observed (Fig. 6A). Therefore, these data suggest a direct correlation between Nar3 induction and the onset of secondary metabolism. Nevertheless, the nitrate-reducing activity in a

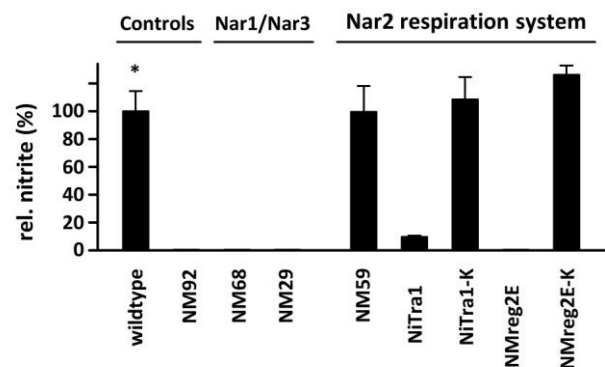


Fig. 5: Relative nitrite production of mutant strains of *S. coelicolor* A3(2) in comparison to the wild type M145 (100%, asterisk). Nitrite was determined after 2.5 hours of incubation in MOPS buffer (supplemented with 10 mM nitrate). The incubation was carried out with standing liquid cultures.

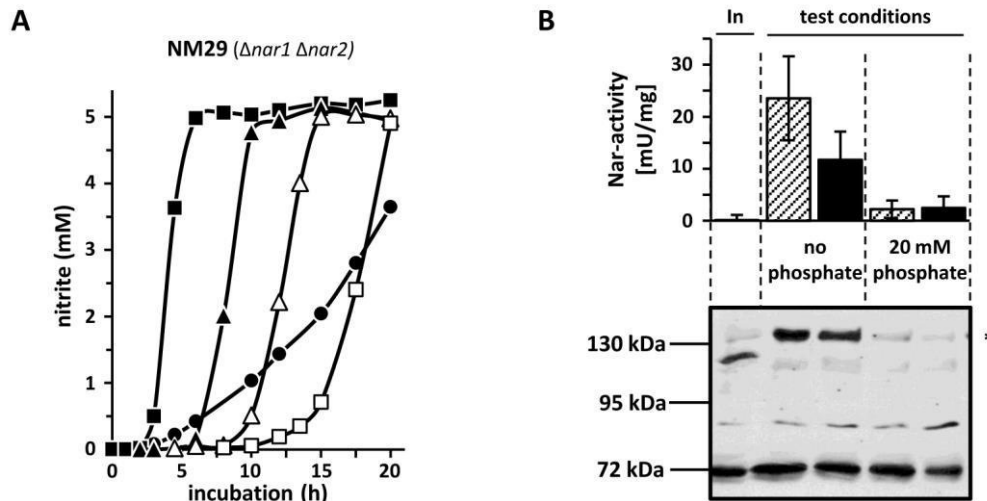


Fig. 6: Onset of a Nar3-dependent nitrate reduction of *Streptomyces coelicolor* A3(2) by using defined homogenous mycelial pellets. **(A)** Monitoring of nitrite production by strain NM29 during cultivation in different strengths of TSB medium (10% - filled squares, 25% - filled triangles, 50% - open triangles, 30 g/l TSB - open squares) supplemented with 5 mM nitrate. Cultivation was initiated using a standardized inoculum of 2 mg/ml dry weight. For **(B)** and **(C)** 15 h exponential mycelium was used as inoculum (In) for precocious Nar3 induction in MOPS buffer with 20 mM glucose under different test conditions. **(B, top)** Determination of Nar3 activity in crude extracts of mycelium after aerobic incubation under different phosphate and nitrate concentrations (no nitrate - pattern bar, 10 mM nitrate - filled bar) Nar3 activity in extracts was determined by monitoring the nitrate-dependent oxidation of reduced benzyl viologen. **(B, bottom)** Verification of Nar3 synthesis via Western blot of crude extracts of the mycelium from **(B)**. 60 μ g crude extracts were loaded on a 7.5% SDS gel.

control with MOPS-buffer (Fig. 6A) suggested the possibility to develop a defined system with a precocious Nar3 induction and high activities as described for Nar2 (Fig. 4). Therefore, we tested all TSB media components in different concentrations individually and in combinations to identify activation of Nar3 synthesis. It turned out that low phosphate induced precocious nitrite release and that this nitrite production was much higher when carbon sources like glucose, mannose, galactose, fructose, cellobiose, glycerol, xylose or mannitol were added in excess concentrations (data not shown). With this information we cultivated and prepared the mycelium of NM29 in the same way as NM59, but incubated it aerobically with 20 mM glucose after the transfer to MOPS-buffer. Subsequently an incubation as standing-liquid culture was performed and nitrite production measured. It was possible to measure 1.4 mM nitrite in the cultures (Fig. 4). Furthermore *in vitro* activity measurement with crude extracts and western blot analysis demonstrated that this precocious Nar3 induction was not reliant on the prior presence of nitrate, and it was strongly inhibited by 20 mM phosphate (Fig. 6B).

DISCUSSION

Early studies on nitrate respiration in vegetative stages of aerobically grown streptomycetes suggested a co-respiration of nitrate and oxygen in a process termed aerobic denitrification. The possible mechanisms and ecological implications of such a process have been controversially discussed (29, 30). More recent studies reported in the current literature for *Microvirgula aerodenitrificans*, *Paracoccus denitrificans* and *Pseudomonas aeruginosa* that the premise of the process has gained wider acceptance (31, 32). In contrast to these organisms *S. coelicolor* A3(2) is a gram-positive bacterium without a periplasm.

However, to date aerobic denitrification shows a strict link to periplasmic nitrate reductases (Naps) (32). This is because Naps do not require that nitrate is transported across the membrane and in any case, the transport by NarK-like proteins would normally be inhibited by oxygen (33). Accordingly, an aerobic nitrate reduction for vegetative stages of streptomycetes would be unexpected.

The results presented in this study demonstrate that our previously observed nitrate reduction in aerobically growing cultures of *S. coelicolor* A3(2) was actually caused by rapid oxygen consumption in cell aggregates, which resulted in localized anaerobiosis and nitrate reduction. Therefore, our results agree with previous reports that inhomogeneity of cultures is responsible for the generation of anaerobic micro-niches (30).

Although reports that some streptomycete species carry out a near complete denitrification have been published (34, 35, 36), the reduction of nitrate in *S. coelicolor* A3(2) is completed at the stage of nitrite excretion due to the genetically determined lack of further denitrifying enzymes (21). The NirBD nitrite reductase was shown to be functional only for aerobic nitrite assimilation (28) and is regulated by the global nitrogen regulator GlnR together with the co-activator NnaR (37).

As has been shown for other bacteria, our results could also demonstrate that the growth of *S. coelicolor* A3(2) is negatively influenced by toxic nitrite. This fact seems to have been disregarded in standard *Streptomyces* culture media recipes, e.g. the commonly used minimal medium HMM (38, 39) contains 50 mM sodium nitrate as sole nitrogen source. When growing as colonies on such minimal media (or as cell aggregates in liquid) a temporary intracellular nitrite accumulation cannot be excluded (data not shown). Indeed, our studies of the differentiation of *S.*

coelicolor A3(2) on such solid media (40) with regard to sporulation and growth developmental effects were believed to be induced by nitrate limitation. Due to the strong developmental effect of nitrite accumulation in our rich solid media assay, it must be clarified whether the so-called nitrate-limitation effect is partially due to a nitrite-toxicity effect.

With our improved and highly reproducible experimental approaches it was possible to evaluate the influence of oxygen on nitrate respiration in spores (15) and vegetative mycelium, providing us with the opportunity to identify and characterize genes and enzymes, which are associated with the Nar-system.

Our data revealed a prerequisite for the absence of oxygen, or oxygen-limitation, for the synthesis of Nar2 in spores while in mycelium oxygen caused immediate cessation of nitrate reduction, even in the presence of previously hypoxically induced Nar2 (data not shown). This latter finding suggests that the putative NarK2 of *S. coelicolor* A3(2) is an oxygen responsive nitrate transporter.

The role of the NarX-like protein is clearly different because in its absence no Nar2 synthesis was observed. In *E. coli* NarX is part of the two-component system that senses nitrate in the periplasm. NarX is a membrane-associated histidine kinase that, in the presence of nitrate, phosphorylates the cognate response regulator NarL. NarL-P together with the global oxygen-sensing transcription factor FNR is then responsible for inducing transcription of the *nar* genes (41). For *S. coelicolor* A3(2), although an essential role of the NarX-like protein for the Nar2-dependent nitrate reduction was demonstrated, no apparent nitrate-sensing was observed, as Nar2 was synthesized even without added nitrate. Notably so far, no FNR transcription factor is described for *S. coelicolor* A3(2).

Future characterization of our defined respiratory, regulatory (including *nar*-promotor exchanges) and chlorate-resistant mutants will hopefully help to address this issue further questions. It nevertheless appears that the regulation of nitrate reduction in streptomycetes is different to that known for *E. coli* or *B. subtilis* (41). In particular, the developmental regulation of Nar2, and especially the phosphate-dependent regulation of Nar3 synthesis, warrants further study.

Phosphate limitation is a well-characterized signal, which is sensed in *Streptomyces* by the two-component system PhoR-PhoP and it has been shown that the response regulator PhoP negatively regulates important genes of nitrogen metabolism both in a direct and in an indirect manner (42). Nevertheless neither these studies nor the widespread proteomic studies of metabolic switches and adaptations of a *phoP* mutant (43) have revealed a direct link of the Nar enzymes induction to the *pho*-regulon. But interestingly, according to our results, they observed a high level expression of Nar2 and Nar3 proteins even though the medium contained neither nitrate nor nitrite (43).

While other studies use an holistic approach, including proteomics and transcriptomics, to elaborate the general physiological aspects of the developmental control of *S. coelicolor* A3(2) growth (43, 44, 45) we believe that the establishment of a dedicated and controllable system, which

will allow us to monitor the impact of stress conditions and developmental changes on cellular physiology directly by use of measurable reporters, will be a useful addition to these more global studies. The three Nar enzymes are synthesized and active at different stages of the developmental cycle of *S. coelicolor* A(2) and they provide us with an excellent experimental system to study the effects of hypoxic stress and anaerobic survival on streptomycete biology.

METHODS

Bacterial strains and culture conditions. Media and culture conditions for *E. coli* and *S. coelicolor* were the same as those described (17, 18). Strains are listed in Table 1. *E. coli* DH5 α (Stratagene) was used as a host for cosmids and plasmid constructions. *E. coli* ET12567/pUZ8002 (19) as well as J TU007/pUZ8002 (20) were the non-methylating plasmid donor strains used for intergeneric conjugation with *S. coelicolor* strain M145 (21). Apramycin (Apra, 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$), carbenicillin (Carb, 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$), chloramphenicol (Cm, 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$), kanamycin (Kan, 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$), spectinomycin (Spc, 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$) or hygromycin (Hyg, 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$), all from Sigma were added to growth media when required. *S. coelicolor* A3(2) wild type strain M145 and mutant derivatives (Table 1) were grown on R2YE, SFM, R5, LB or Difco™ Nutrient Broth (DNB) agar media as indicated or in liquid tryptic soy broth (Oxoid) or DNB broth supplemented with antibiotics to maintain selection when appropriate. The growth medium composition and standard culture techniques used have been described previously (18).

Construction of gene disruption mutants. Cosmids (Table 1) with transposon insertions (Tn5062) in the gene SCO0213 (*narK2*) and SCO0203 (*narX*-like) were introduced into *E. coli* ET12567/pUZ8002 or J TU007/pUZ8002 by electroporation and then transferred to *Streptomyces* by conjugation (18). Exconjugants with double cross-overs were selected for Kan^S and Apra^R. *S. coelicolor* mutant strains were confirmed by PCRs and by Southern hybridization (data not shown).

Complementation of gene disruptions. A 1239 bp DNA fragment corresponding to the coding region of SCO0213 (*narK2*) plus 236 bp upstream and 227 bp of downstream flanking sequences, including potential regulatory elements, was amplified by PCR using oligonucleotides 0213F (5'-CAT GGG GTC CCG GCT TCC AG-3') and 0213R (5'-GGG CCA TCG CGG GAA AGA GC-3') and cloned between the HindIII and KpnI restriction sites of integrative *Streptomyces* vector pMS82 (22) (Table 1) to deliver pMSnarK2. The same procedure was done to deliver pMSnarX. Therefore, a 1758 bp DNA fragment corresponding to the coding region of SCO0203 (*narX*-like) plus 168 bp upstream and 240 bp of downstream flanking sequences was amplified by PCR using oligonucleotides 0203F (5'-GGC GGC AAG CTT CGT ATC CAG GCC GCC GTC AT-3') and 0203R (5'-CCG GTA CCG CCA TGC ATG CGT ACT TCT CCT GGC CAC C-3'). Plasmid pMSnarK2 or pMSnarX was introduced into M145 via conjugation using the plasmid-containing *E. coli* strain ET12567 (pUZ8002), which mobilizes the *oriT*-containing plasmid pMS82 for conjugation *in trans* (Table 1).

Culture conditions adapted for physiological studies.

S. coelicolor A3(2) strains (Table 1) were grown as highly dispersed liquid cultures in Duran-F tubes with MOPS-buffered TSB as described (23). For oxygen-monitored cultivations, the medium of aerobic cultures was flushed continuously with compressed air through a needle (0.8 mm, 20-40 l/h). Hypoxic cultures were individually tested for oxygen concentration by

empirically determining the relationship between the cell amount, the surface-to-volume ratio (of vessel and media) as well as the stirring or shaking parameters. Anoxic conditions were achieved by flushing the vessels with nitrogen for 5 - 10 min. For a preparation of growing mini-pellets, highly disperse exponential pre-cultures were transferred to fresh medium at a ratio of 4000 CAE per 50 ml of TSB. Afterwards they were incubated in Erlenmeyer flasks or 24-well plates and shaken orbitally (170 rpm) until the desired size (0.25 - 0.5 mm) of aggregate was attained.

Standardized 15h exponential cultures (20 ml) were inoculated with 2 ml of a standard mycelium suspension. This suspension was prepared from a highly disperse pre-culture by the determination of the cell pellet size after centrifugation (2000 g, 10 min, 6°C). A pellet volume of 200 µl was filled up to 10 ml. Afterwards the cultures were incubated in Duran-F-vials for 15h as described (23).

Standard liquid cultures were performed in small reaction tubes (2 ml volume size) or 24-well plates. Therefore 0.5 ml of double-concentrated incubation buffer (normal: 25 mM MOPS-NaOH, pH 7.2, 10 mM NaNO₃) was supplemented with washed mycelium and water up to 1 ml volume.

Oxygen monitoring during the growth and incubation assays was done using oxygen-dependent luminescence sensor spots. These spots were affixed to the inner side (glass wall) of vials and were non-invasively connected with bare fibers to an optical oxygen meter (FirestingO2). Signals were analyzed using the Firesting Logger Software (PyroScience, Aachen, Germany).

Methylene blue adsorption (MBA) measurements for calculating cell amount equivalents (CAE), as well as small-scale growth curves were performed as described before (23).

Cloning of *narG2*, overproduction and purification of the His-tagged NarG2 polypeptide. The construction of the *narG2* expression plasmid pET30-*narG2* was achieved by amplifying the complete *narG2* gene using genomic DNA from *S. coelicolor* M145 as template. Amplification was performed using the oligonucleotides NarG2/NdeI_forward (5'-GGT GGT CAT ATG GAG AAC GAT CAG AAC GCA CGC-3') and NarG2/XhoI_reverse (5'-GGT GGT CTC GAG GTA CTC CAC TCG CTG GTC GCG-3'), which introduced XhoI and NdeI restriction sites. The PCR was carried out using *Herculase II* Fusion DNA polymerase (Agilent Technologies). The resulting 3720 bp DNA fragment was cloned into XhoI- and NdeI-digested pET-30a (+) vector (Novagen) to deliver pET30-*narG2*.

For overproduction of His-tagged NarG2, cultures of *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS (Novagen) were used. The overproduction and purification were performed as described for *narG1* (15). The purified His-tagged NarG2 was stored at -20°C.

Antibody preparation and Western blotting. Antibodies were prepared commercially (Seqlab, Göttingen) against a 14-amino-acid peptide (NSPRHYGDERLHED – amino acid position 1066–1079) in the NarG2 polypeptide; for NarG3 a 15-amino-acid peptide (NLAELGDAPIPTGDG – amino acid position 1061–1075) was used. To minimize unspecific cross-reactions antiserum raised against the NarG2 peptide was treated by depleting unspecific cross-reacting antibodies using a crude extract derived from mycelium of the *nar2* knockout mutant NM3; for the NarG3 antiserum the mutant NM27 was used. The procedure for the depletion was carried out as described (15). The supernatant obtained from depletion was used as primary antibody for Western blot analysis. The treated antiserum was used in the dilution range of 1:25–150.

Table 1. Strains and vectors used in this study

Strain	Genotype and characteristics	Reference or source
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)		
M145 (wildtype)	SCP1 ⁻ SCP2 ⁻	(18)
NM24 (<i>nar1</i> ⁻)	M145 ΔSCO6535–6532:: <i>aadA</i> (deletion of 6209 bp removing <i>narG1H1J111</i>)	(15)
NM3 (<i>nar2</i> ⁻)	M145 ΔSCO0216–0219:: <i>aac(3)IV</i> (deletion of 6531 bp removing <i>narG2H2J212</i>)	(14)
NM27 (<i>nar3</i> ⁻)	M145 ΔSCO4947–4950:: <i>aadA</i> (deletion of 6497 bp removing <i>narG3H3J313</i>)	(14)
NM59 (<i>nar1</i> ⁻ <i>nar3</i> ⁻)	NM39 ΔSCO6535–6532:: <i>aadA</i> (deletion of 6209 bp removing <i>narG3H3J313</i>)	(15)
NM29 (<i>nar1</i> ⁻ <i>nar2</i> ⁻)	NM4 ΔSCO6535–6532:: <i>aadA</i> (deletion of 6209 bp removing <i>narG3H3J313</i>)	(15)
NM68 (<i>nar2</i> ⁻ <i>nar3</i> ⁻)	NM3 ΔSCO4947–4950:: <i>aadA</i> (deletion of 6497 bp removing <i>narG3H3J313</i>)	(14)
NM92 (<i>nar1</i> ⁻ <i>nar2</i> ⁻ <i>nar3</i> ⁻)	NM90 ΔSCO6532–6535:: <i>aadA</i> (deletion of 6209 bp removing <i>narG1H1J111</i>)	(14)
NiTra1	M145 SCO0213::Tn5062	This study
NiTra1-K	NiTra1 with integrative vector pMSnarK2 (SCO0213 ⁺)	This study
NMreg2E	M145 SCO0203::TN5062	This study
NMreg2E-K	NMreg2E with integrative vector pMSnarX (SCO0203 ⁺)	This study
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	F ϕ 80 <i>lacZ</i> M15 <i>endA recA hsdR</i> (r _k m _k) <i>supE thi gyrA relA</i> Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169	Laboratory stock
ET12567(pUZ8002)	<i>dam dcm</i> ; with <i>trans</i> -mobilizing plasmid pUZ8002	(46)
JTU007(pUZ8002)	<i>dam dcm</i> ; with <i>trans</i> -mobilizing plasmid pUZ8002	(47)
Rosetta(DE3)pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdSB</i> (RB- mB-) <i>gal dcm</i> λ(DE3 [<i>lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5</i>]) pLysSRARE (CamR)	Novagen
Plasmids and Cosmids		
SCJ12.2.03_04081112EO	Cosmid SCJ12 disrupted in SCO0203 with Tn5062	(48)
SCJ12.1.F10_040807014A	Cosmid SCJ12 disrupted in SCO0213 with Tn5062	(48)
pMS82	ΦBT1 <i>attP-int</i> derived integration vector for the conjugal transfer of DNA from <i>E. coli</i> to <i>Streptomyces</i> (Hyg ^r)	(22)
pMSnarK2	pMS82 SCO0213 (with 236 bp upstream and 227 bp downstream sequence)	This study
pMSnarX	pMS82 SCO0203 (with 168 bp upstream and 240 bp downstream sequence)	This study
pET-30a	(+) Expression plasmid, Kan ^R	Novagen
pET30- <i>narG2</i>	Like pET-30a (+) but <i>narG2</i> ⁺	This study

Polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting.

Aliquots (60 µg of protein) from the indicated subcellular reactions were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) using 7.5% (w/v) polyacrylamide gels (24) and transferred to nitrocellulose membranes as described (25). Purified anti-NarG2 antibodies (dilution 1:25) were used to detect NarG2 polypeptide in crude extracts of spores. Secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase was obtained from Bio-Rad. Visualization was done by the enhanced chemiluminescent reaction (Stratagene).

Other methods. Quantitative determination of nitrite in culture supernatants and mycelial dry weight measurement were performed exactly as described (14). *In vivo* nitrate reduction assay in spores was performed as described (15). Nitrate reductase enzyme activity in crude extracts was determined using the continuous assay procedure with reduced dithionite and benzyl viologen (0.4 mM) at 30°C as described (26, 14). Crude cell extracts of *S. coelicolor* mycelium were prepared by sonication of mycelium in buffer (100 mM potassium phosphate, pH 7.2). Resuspended mycelium (2–5 ml) was sonicated four times for 3 min at 30 W (pulses of 0.5 s on and 0.5 s off) using a Sonoplus sonifier with sonotrode KE76 tip (Bandelin, Berlin). Standard cloning methods (27) were used.

ACKNOWLEDGEMENT

We thank Philip Hase and Timon Damelang for the support during the experimental work with the mutant NMReg2E.

REFERENCES

- Kämpfer, P. (2012).** Genus I. *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943, 339^{AL} emend. Witt and Stackebrandt 1990, 370, emend. Wellington, Stackebrandt, Sanders, Wolstrup and Jorgensen 1992, 159. In: Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H.-J., Trujillo, M.E., Suzuki, K.-I., Ludwig, W., Whitman, W.B. (eds) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Part B, vol. 5, 2nd edn. Springer, New York, pp 1455–1767.
- Hodgson, D.A. (2000).** Primary metabolism and its control in streptomycetes: a most unusual group of bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* **42**, 47–238.
- Fink, D., Weissschuh, N., Reuther, J., Wohlleben, W., and Engels, A. (2002).** Two transcriptional regulators GlnR and GlnRII are involved in regulation of nitrogen metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.* **46**, 331–347.
- Tiffert, Y., Supra, P., Wurm, R., Wohlleben, W., Wagner, R., and 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. *Mol. Microbiol.* **67**, 861–880.
- Sola-Landa, A., Moura, R.S., and Martín, J.F. (2003).** The two-component PhoR-PhoP system controls both primary metabolism and secondary metabolite biosynthesis in *Streptomyces lividans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 6133–6138.
- Martín, J.F., Sola-Landa, A., Santos-Beneit, F., Fernández-Martínez, L.T., Prieto, C., and Rodríguez-García, A. (2011).** Cross-talk of global nutritional regulators in the control of primary and secondary metabolism in *Streptomyces*. *Microb Biotechnol* **4**, 165–174.
- Jonsbu, E., Christensen, B., and Nielsen, J. (2001).** Changes of *in vivo* fluxes through central metabolic pathways during the production of nystatin by *Streptomyces noursei* in batch culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**, 93–100.
- Derouaux, A., Dehareng, D., Lecocq, E., Halici, S., Nothaft, H., Giannotta, F., Moutzourelis, G., Dusart, J., Devreese, B., Titgemeyer, F., et al. (2004).** Crp of *Streptomyces coelicolor* is the third transcription factor of the large CRP-FNR superfamily able to bind cAMP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **325**, 983–990.
- Niederpruem, D.J., and Hackett, D.P. (1961).** Respiratory chain of *Streptomyces*. *J. Bacteriol.* **81**, 557–563.
- Scott, R.I., and Poole, R.K. (1988).** The carbon monoxide- and oxygen-reacting haemoproteins of *Streptomyces clavuligerus*: cytochrome aa 3 is the predominant terminal oxidase of the respiratory chain. *Arch. Microbiol.* **150**, 465–470.
- Blundell, K.L.I.M., Wilson, M.T., Svistunenko, D.A., Vijgenboom, E., and Worrall, J.A.R. (2013).** Morphological development and cytochrome c oxidase activity in *Streptomyces lividans* are dependent on the action of a copper bound Sco protein. *Open Biol* **3**, 120163.
- Borodina, I., Krabben, P., and Nielsen, J. (2005).** Genome-scale analysis of *Streptomyces coelicolor* A3(2) metabolism. *Genome Res.* **15**, 820–829.
- Van Keulen, G., Alderson, J., White, J., and Sawers, R.G. (2007).** The obligate aerobic actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2) survives extended periods of anaerobic stress. *Environ. Microbiol.* **9**, 3143–3149.
- Fischer, M., Alderson, J., van Keulen, G., White, J., and Sawers, R.G. (2010).** The obligate aerobe *Streptomyces coelicolor* A3(2) synthesizes three active respiratory nitrate reductases. *Microbiology (Reading, Engl.)* **156**, 3166–3179.
- Fischer, M., Falke, D., and Sawers, R.G. (2013).** A respiratory nitrate reductase active exclusively in resting spores of the obligate aerobe *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Microbiol.* **89**, 1259–1273.
- Rabin, R.S., and Stewart, V. (1993).** Dual response regulators (NarL and NarP) interact with dual sensors (NarX and NarQ) to control nitrate- and nitrite-regulated gene expression in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **175**, 3259–3268.
- Datsenko, K.A., and Wanner, B.L. (2000).** One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 6640–6645.
- Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F., and Hopwood, D.A. (2000).** *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich, UK: John Innes Foundation.
- Gust, B., Chandra, G., Jakimowicz, D., Yuqing, T., Bruton, C.J., and Chater, K.F. (2004).** λ Red-Mediated Genetic Manipulation of Antibiotic-Producing *Streptomyces*. *Adv. Appl. Microbiol.* **54**, 107–128.
- Zhou, H., Wang, Y., Yu, Y., Bai, T., Chen, L., Liu, P., Guo, H., Zhu, C., Tao, M., and Deng, Z. (2012).** A non-restricting and non-methylating *Escherichia coli* strain for DNA cloning and high-throughput conjugation to *Streptomyces coelicolor*. *Curr. Microbiol.* **64**, 185–190.
- Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdeño-Tárraga, A.-M., Challis, G.L., Thomson, N.R., James, K.D., Harris, D.E., Quail, M.A., Kieser, H., Harper, D., et al. (2002).** Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **417**, 141–147.
- Gregory, M.A., Till, R., and Smith, M.C.M. (2003).** Integration site for *Streptomyces* phage phiBT1 and development of site-specific integrating vectors. *J. Bacteriol.* **185**, 5320–5323.
- Fischer, M., and Sawers, R.G. (2013).** A universally applicable and rapid method for measuring the growth of *Streptomyces* and other filamentous microorganisms by methylene blue adsorption-desorption. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 4499–4502.
- Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.

25. **Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1992).** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology* 24, 145–149.
26. **Jones, R.W., and Garland, P.B. (1977).** Sites and specificity of the reaction of bipyridylum compounds with anaerobic respiratory enzymes of *Escherichia coli*. Effects of permeability barriers imposed by the cytoplasmic membrane. *Biochem. J.* 164, 199–211.
27. **Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989).** Molecular Cloning: a Laboratory Manual. 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
28. **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, 340–348.
29. **Robertson, L.A., and Kuenen, J.G. (1984a).** Aerobic denitrification: a controversy revived. *Arch. Microbiol.* 139, 351–354.
30. **Robertson, L.A., and Kuenen, J.G. (1984b).** Aerobic denitrification - old wine in new bottles? *Antonie Van Leeuwenhoek* 50, 525–544.
31. **Takaya, N., Catalan-Sakairi, M.A.B., Sakaguchi, Y., Kato, I., Zhou, Z., and Shoun, H. (2003).** Aerobic denitrifying bacteria that produce low levels of nitrous oxide. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3152–3157.
32. **Carter, J.P., Hsiao, Y.H., Spiro, S., and Richardson, D.J. (1995).** Soil and sediment bacteria capable of aerobic nitrate respiration. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2852–2858.
33. **Moir, J.W., and Wood, N.J. (2001).** Nitrate and nitrite transport in bacteria. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 215–224.
34. **Albrecht, A., Ottow, J.C.G., Benckiser, G., Sich, I., and Russow, R. (1997).** Incomplete Denitrification (NO and N₂O) from Nitrate by *Streptomyces violaceoruber* and *S. nitrosporeus* Revealed by Acetylene Inhibition and 15N Gas Chromatography-Quadrupole Mass Spectrometry Analyses. *Naturwissenschaften* 84, 145–147.
35. **Shoun, H., Kano, M., Baba, I., Takaya, N., and Matsuo, M. (1998).** Denitrification by actinomycetes and purification of dissimilatory nitrite reductase and azurin from *Streptomyces thioluteus*. *J. Bacteriol.* 180, 4413–4415.
36. **Kumon, Y., Sasaki, Y., Kato, I., Takaya, N., Shoun, H., and Beppu, T. (2002).** Codenitrification and denitrification are dual metabolic pathways through which dinitrogen evolves from nitrate in *Streptomyces antibioticus*. *J. Bacteriol.* 184, 2963–2968.
37. **Amin, R., Reuther, J., Bera, A., Wohlleben, W., and Mast, Y. (2012).** A novel GlnR target gene, *nnaR*, is involved in nitrate/nitrite assimilation in *Streptomyces coelicolor*. *Microbiology (Reading, Engl.)* 158, 1172–1182.
38. **Hopwood, D.A. (1960).** Phase-contrast observations on *Streptomyces coelicolor*. *J. Gen. Microbiol.* 22, 295–302.
39. **Hobbs, G., Frazer, C.M., Gardner, D.C.J., Cullum, J.A., and Oliver, S.G. (1989).** Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture. *Appl Microbiol Biotechnol* 31, 272–277.
40. **Karandikar, A., Sharples, G.P., and Hobbs, G. (1997).** Differentiation of *Streptomyces coelicolor* A3(2) under nitrate-limited conditions. *Microbiology* 143, 3581–3590.
41. **Tielen, P., Schobert, M., Härtig, E., and Jahn, D. (2012).** Anaerobic Regulatory Networks in Bacteria *In: Filloux, A.A.M. (ed) Bacterial Regulatory Networks*. Caister Academic Press, Norfolk UK, pp. 273-305.
42. **Rodríguez-García, A., Sola-Landa, A., Apel, K., Santos-Beneit, F., and Martín, J.F. (2009).** Phosphate control over nitrogen metabolism in *Streptomyces coelicolor*: direct and indirect negative control of *glnR*, *glnA*, *glnII* and *amtB* expression by the response regulator PhoP. *Nucleic Acids Res.* 37, 3230–3242.
43. **Thomas, L., Hodgson, D.A., Wentzel, A., Nieselt, K., Ellingsen, T.E., Moore, J., Morrissey, E.R., Legaie, R., STREAM Consortium, Wohlleben, W., et al. (2012).** Metabolic switches and adaptations deduced from the proteomes of *Streptomyces coelicolor* wild type and *phoP* mutant grown in batch culture. *Mol. Cell Proteomics* 11, M111.013797.
44. **Nieselt, K., Battke, F., Herbig, A., Bruheim, P., Wentzel, A., Jakobsen, Ø.M., Sletta, H., Alam, M.T., Merlo, M.E., Moore, J., et al. (2010).** The dynamic architecture of the metabolic switch in *Streptomyces coelicolor*. *BMC Genomics* 11, 10.
45. **Castro-Melchor, M., Charaniya, S., Karypis, G., Takano, E., and Hu, W.-S. (2010).** Genome-wide inference of regulatory networks in *Streptomyces coelicolor*. *BMC Genomics* 11, 578.
46. **MacNeil, D.J., Gewain, K.M., Ruby, C.L., Dezeny, G., Gibbons, P.H., MacNeil, T. (1992).** Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin synthesis utilizing a novel integration vector. *Gene* 111, 61–68.
47. **Zhou, H., Wang, Y., Yu, Y., Bai, T., Chen, L., Liu, P., Guo, H., Zhu, C., Tao, M., Deng, Z. (2012).** A non-restricting and non-methylating *Escherichia coli* strain for DNA cloning and high-throughput conjugation to *Streptomyces coelicolor*. *Curr. Microbiol.* 64, 185–89.
48. **Fernández-Martínez, L.T., Del Sol, R., Evans, M.C., Fielding, S., Herron, P.R., Chandra, G., 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* 99, 515–522.

- Zusammenfassende Diskussion und Perspektiven -

D.1. Die Funktion der Nitratreduktion bei *S. coelicolor* A3(2)

Die physiologische Relevanz der von Nar-Enzymen durchgeführten respiratorischen Nitratreduktion äußert sich bei Mikroorganismen wie *Paracoccus denitrificans*, *Pseudomonas stutzeri*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Escherichia coli* oder *Bacillus subtilis* mit einem verbesserten oder überhaupt erst ermöglichten Wachstum unter anaeroben Bedingungen (Spanning *et al.*, 2007; Fernández-López *et al.*, 1994; Zumft, 1997; Nakano und Zuber, 1997). Die während dieser Doktorarbeit an *S. coelicolor* A3(2) durchgeführten Untersuchungen zur respiratorischen Nitratreduktion von Streptomyceten konnten jedoch keine positiven Effekte auf das Wachstum unter anoxischen oder hypoxischen Bedingungen erfassen. Wie groß die Bedeutung der drei nicht redundanten respiratorischen Nitratreduktasen von *S. coelicolor* A3(2) für seine Physiologie ist, bleibt daher eine offene und komplizierte Frage.

Ein prinzipieller Vorteil von funktionellen Nar-Systemen ist ihre Fähigkeit, mit der membrangebundenen Reduktion von Nitrat eine für die ATP-Synthese und Transportprozesse ausreichende *proton motive force* aufzubauen. Der offensichtlichste Nutzen dieses Vorgangs tritt aber nur dann in Erscheinung, wenn die so zur Verfügung stehende Energie des Membranpotentials in jene Syntheseleistungen des Anabolismus fließt, die eine Zunahme der Biomasse in Form von vergrößerten oder vervielfältigten Zellen zur Folge haben. Nur so ist ein eindeutiger Phänotyp als kausaler Zusammenhang zum Wachstum messbar.

Ein subtilerer und nicht auf das Wachstum bezogener Phänotyp ist für die Nitratreduktion bei *M. tuberculosis* durch Sohaskey (2008) beschrieben. Er zeigte zunächst, dass die Zugabe von Nitrat zum dormanten Mykobakterien-Stadium (*state of nonreplicating persistence*) bei einer kontinuierlich abnehmenden Sauerstoffkonzentration keinen Effekt auf die Überlebensfähigkeit hat (Betrachtungsspanne: 46 Tage). Er konnte aber auch zeigen, dass zugesetztes Nitrat und damit die Nitratreduktion das Überleben signifikant verbessern kann - und zwar dann, wenn der Sauerstoffentzug schlagartig erfolgt. Nar-bedingte Phänotypen sind also nicht nur in der Verbesserung des Wachstums, sondern auch in der Verbesserung lang angelegter Überdauerungsphasen bei den richtigen Bedingungen zu suchen.

Unter dem Gesichtspunkt der Überdauerung geht man im allgemeinen davon aus, dass alle lebensfähigen Zellstadien in der Lage sein müssen, entweder ein Membranpotential auf

einem niedrigen Level aufrechtzuerhalten oder es in kürzester Zeit wieder aufbauen zu können. Daher scheint es für den Fall, dass der bevorzugte terminale Elektronenakzeptor ausfällt, sinnvoll, ein sofort verfügbares *back-up*-System zu haben, welches das Membranpotential augenblicklich wieder stabilisieren kann. Mit dem Nar1-Nitratreduktase-System von *S. coelicolor* A3(2) wurde die Existenz und Funktionalität eines solchen potentiellen *back-up*-Systems erstmals für Sporen nachgewiesen. Physiologisch ist es dabei für Sporen sehr sinnvoll, alle notwendigen Komponenten dieses Systems (Nitrat/Nitrittransporter, Nar-Enzym, mögliche funktionelle Mediatorproteine) bereits vor dem Eintreten eines Sauerstoffentzuges und damit schon in der Spore vorliegen zu haben; andernfalls würde die nachträgliche Biosynthese in der reifen Spore einen Teil jenes Membranpotentials erfordern, das eigentlich stabilisiert werden soll.

Die offensichtliche Notwendigkeit eines Atmungsprozesses bei ausdauernden *Streptomyces*-Sporen konnte durch eigene Sauerstoff-Respirationsmessungen und den Abgleich mit früheren Daten verifiziert werden (Garcia Díaz *et al.*, 1983). Beziehen wir unsere eigenen Erfahrungen mit der Überlebensfähigkeit von Sporen in den Kontext von Untersuchungen anderer Autoren (van Keulen *et al.*, 2007), so ergibt sich jedoch, dass die Sporen von *S. coelicolor* A3(2) auch ohne terminale Elektronenakzeptoren wie Sauerstoff und Nitrat künstlich herbeigeführte anoxische Bedingungen überdauern können. Welcher Mechanismus dem zugrunde liegt ist bisher nicht klar. Aber dass wir am Beispiel der Synthese von Nar2 zeigen konnten, dass auch ohne Sauerstoff oder Nitrat eine Protein-*de-novo*-Synthese in Sporen stattfinden kann, verdeutlicht ein nicht zu vernachlässigendes anaerobes Stoffwechsellpotential von Sporen. Im Hinblick auf den bisher nicht identifizierten nitratatmungsabhängigen Phänotyp für Sporen bedeuten diese Erkenntnisse, dass es neben der Nitratreduktion auch andere, eher endogene Mechanismen geben muss, die die anaerobe Fitness zu realisieren helfen. Erst eine Schwächung oder Deletion dieser noch unbekanntenen Mechanismen könnte helfen, Bedingungen für eine essentielle Nitratatmung in Sporen zu finden.

Während Sporen generell als Verbreitungs- und Überdauerungsstadien angesehen werden, ist über die Bildung, Ausprägung oder physiologische Anpassung der vegetativen Stadien von *S. coelicolor* A3(2) mit dem Ziel einer Überdauerung nichts bekannt. Dennoch haben van Keulen *et al.* (2007) zeigen können, dass auch vegetative Stadien von *S. coelicolor* A3(2) befähigt sind, künstlich herbeigeführte anoxische Bedingungen 20 Tage und länger zu

überdauern (Abb. 5.1.A). Berichte zur Anaerobiose anderer Bakterien (Lim *et al.*, 1999; Sohaskey, 2008), aber auch zur allgemeinen Ausbildung von VBNC-Stadien (*viable but not culturable*; Oliver, 2005), machen dabei deutlich, dass es grundsätzlich einen Unterschied macht, ob sich eine Umweltbedingung wie die Verfügbarkeit von Sauerstoff plötzlich oder allmählich ändert. Unsere Analyse der Synthese von Nar2 in filamentösen und vegetativen Stadien von *S. coelicolor* A3(2) zeigt in diesem Zusammenhang, dass sie zwar kausal mit dem Entzug des Sauerstoffs zusammenhängt, aber unterschiedlich zwischen jenen Fällen ausgeprägt ist, bei denen für eine gewisse Zeit noch geringe Sauerstoffkonzentrationen vorhanden sind (Hypoxie) oder der Sauerstoff schnell entzogen wird (abrupte Anoxie). In den bereits erwähnten anaeroben Studien zur Überlebensrate von Streptomyceten von van Keulen *et al.* (2007) wurden für die Durchführung im Anaerobiertopf bereits auf Festmedium angewachsene Kolonien (ca. 24 h) genutzt. Unseren Messungen nach existieren in aerob gewachsenen Streptomyceten-Kolonien jedoch hypoxische Subpopulationen (Daten nicht publiziert). Darüber hinaus führt die Nutzung von GasPaks zu einer graduellen Abnahme der Sauerstoffkonzentration über einen Zeitraum von 30 min und stellt laut dem Hersteller nur einen atmosphärischen Sauerstoffgehalt von unter einem Prozent sicher. In der kritischen Betrachtung der Festmediumversuche von van Keulen *et al.* (2007) und der eigenen Versuche mit Myzel in Flüssigkultur muss gesagt werden, dass der Anspruch einer absolut aeroben Anzucht und einer plötzlich eintretenden Anaerobiose durch den Effekt einer lokalen Hypoxie/Anaerobiose in Kolonien bzw. Filamentaggregationen konterkariert wird.

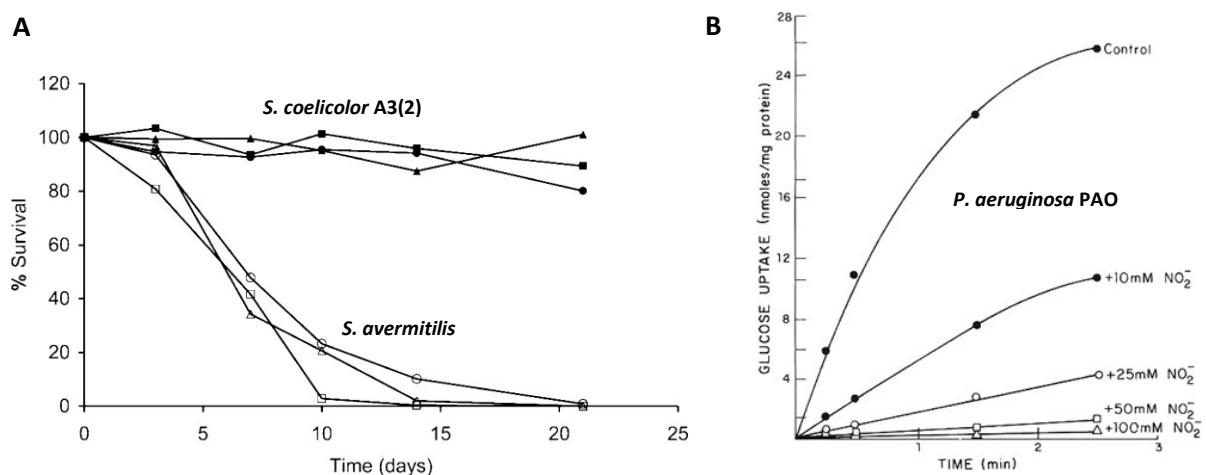


Abb. 5.1.: Aus der Literatur zitierte Daten der anaeroben Überdauerung von Streptomyceten (A) und der allgemeinen Nitrittoxizität (B)

A) In den Studien von van Keulen *et al.* (2007) bestimmte anaerobe Überlebensraten der Sporen (●) und Kolonien (■ 16h alt, ▲ 24h alt) von *Streptomyces coelicolor* sowie der Sporen (○) und Kolonien (□ 16h alt, △ 24h alt) von *Streptomyces avermitilis* auf SFM-Agar.

B) In den Studien von Rowe *et al.* (1979) untersuchter Einfluss verschiedener Nitritkonzentrationen auf die aerobe Glucose-Aufnahme in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. Die Kontrolle (Control) repräsentiert die Glucose-Aufnahme ohne Nitrit im Ansatz.

Dennoch, auch bei hypoxischen Bedingungen wurde am Beispiel von *M. tuberculosis* ein Überdauerungsphänotyp ermittelt. Bei ihm führt die Abwesenheit eines terminalen Elektronenakzeptors zum Verlust des Membranpotentials und letztendlich zum Rückgang des ATP-Pools und somit zum Zelltod (Sohaskey, 2008); allerdings war dieser Phänotyp nur bei einem zusätzlichen Säurestress mit pH 5,5 festzustellen. Eigene Versuche, um derartig subtile bzw. auf die Zellviabilität abzielende Phänotypen für *Streptomyces*-Sporen und -Myzelien zu bestimmen, brachten bisher weder durch Nutzung von pH-Gradienten noch durch Protonenionophoren wie 2,4-Dinitrophenol einen Erfolg (Daten nicht gezeigt). Letztere sollten das Membranpotential schwächen und so eine gesteigerte Stoffwechselrate durch die zusätzliche Verwendung von Nitrat als Endelektronenakzeptor bei der Atmung offenlegen.

Geht man bei den Versuchen von van Keulen *et al.* (2007) davon aus, dass der Sauerstoff im Topf restlos verbraucht wurde, dann zeigt sich für Kolonien von *S. coelicolor* A3(2) (bzw. Teilen davon), dass sie auch ohne zugesetztes Nitrat eine allmählich einsetzende anoxische Phase zu über 90 % für 20 Tage (Abb. 5.1.A) bzw. zu 80 % für 6 Wochen überdauern können (van Keulen *et al.*, 2007). Wie bereits für Sporen postuliert, spricht dies für die Existenz eines endogenen Mechanismus im vegetativen Myzel, der dieses Überleben realisieren muss. Angesichts dieser hohen und nitratunabhängigen Kolonie-Überlebensraten, ist das Untersuchungssystem von van Keulen *et al.* (2007) nicht geeignet, um Phänotypen der Nitratatmung zu detektieren. Denn selbst wenn ohne Nitratatmung nur wenige Zellen einer Kolonie überleben würden, so wäre dies schwer von dem Fall zu unterscheiden, bei dem alle Zellen der Kolonie überleben. In beiden Fällen wird die Kolonie bei der Auswertung als ganzes betrachtet, d.h. als weiterwachsend und damit überlebend detektiert. Ein ersichtlicherer Phänotyp wäre zu erwarten, wenn der bisher unbekannt anaerobe Überlebensmechanismus geschwächt würde oder wenn Bedingungen gefunden würden, bei denen die Zelle den energetischen Ertrag für ein anaerobes Wachstum nutzt. Zur Bestimmung von letzterem wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Verfahren entwickelt, das für filamentöse Mikroorganismen auch geringe Zuwachsraten in einem kleinen Maßstab sicher bestimmen und auflösen kann (Methylenblau-Adsorption/Desorption).

Hinsichtlich der Energiekonservierung für Wachstumsprozesse kann gesagt werden, dass der Nar-vermittelte enzymatische Schritt der Nitrat/Nitrit-Atmung eine H⁺-Netto-Translokation

im stöchiometrischen Verhältnis von $2\text{H}^+/2\text{e}^-$ ermöglicht (van Spanning *et al.*, 2007). Unter Hinzuziehung allgemeiner Literaturwerte für die stöchiometrischen H^+/ATP -Verhältnisse bakterieller F_1F_0 -ATPasen (Fillingame, 1997; Cross und Müller, 2004) sollte die Reduktion von 3 Nitratmolekülen daher ein Membranpotential für die Synthese von 1,5 - 2 ATP generieren. Die Effektivität der Nutzung von Nitrat für Atmungsprozesse kann darüber hinaus jedoch durch eine sequentielle Reduktion gesteigert werden, indem Nitrat, nicht als einmaliger, sondern initialer Elektronenakzeptor eingesetzt wird, dessen nachfolgende Reaktionsprodukte Nitrit, Stickstoffmonoxid und Distickstoffmonoxid (N_2O) im Rahmen einer vollständigen Denitrifikation in den Membranaufbau einbezogen werden.

Zur Denitrifikation bei Streptomyceten liegen meiner Kenntnis nach nur drei Publikationen vor (Albrecht *et al.*, 1996; Shoun *et al.*, 1998; Kumon *et al.*, 2002). In allen drei Studien wurden bereits vorhandene *Streptomyces*-Isolate auf die Freisetzung von N_2O überprüft. Tatsächlich wurde für *S. nitrosporeus*, *S. antibioticus* und *S. thioluteus* die Nitratreduktion bis zur Freisetzung von N_2O gezeigt. Für *S. antibioticus* konnte im Weiteren die Aktivität einer Nitratreduktase, Nitritreduktase und N_2O -Reduktase im Rohextrakt bestimmt werden (Kumon *et al.*, 2002). Sowohl für *S. antibioticus* als auch *S. thioluteus* wurde in diesem Zusammenhang sogar ein anaerobes Wachstum gezeigt (Kumon *et al.*, 2002; Shoun *et al.*, 1998). Ihren Ergebnissen zufolge haben einige Streptomyceten also die Möglichkeit, Nitratatmung zum Zwecke eines anaeroben Wachstums zu betreiben. Es wäre dies überhaupt das erste Mal, dass für *Streptomyces* ein anaerobes Wachstum gezeigt wurde. Von daher ist auf jeden Fall anzumerken, dass eine notwendige Analyse dieses anaeroben Wachstums, insbesondere der direkte Vergleich mit unterschiedlichen Substraten und Stickstoffquellen in Bezug zum anaeroben Wachstum, in den genannten Arbeiten nicht durchgeführt wurde. Tatsächlich gesteht die genauere Betrachtung der Daten von Kumon *et al.* (2002), dem anaeroben Wachstum von *S. antibioticus* nur 2,5 % der erreichbaren Trockenmasse des parallel dazu mitgeführten aeroben Wachstums zu. Für die so, meines Erachtens umstritten charakterisierten *S. antibioticus* und *S. thioluteus* wäre eine bioinformatische Analyse des Genoms interessant – bisher liegen aber für beide Stämme noch keine Genomdaten vor. Der Genomanalyse von *S. coelicolor* A3(2) nach zu urteilen, ist es dem in dieser Doktorarbeit verwendeten Stamm aber aufgrund fehlender Enzyme nicht möglich eine vollständige Denitrifikation durchzuführen (Bentley *et al.*, 2002; Borodina *et al.*, 2005). Im Sinne einer verkürzten dissimilatorischen Nitratreduktion kann es den

Elektronenakzeptor Nitrat daher nur bis zur Stufe des Nitrits reduzieren. Im Gegensatz zu *E. coli* (Simon, 2002) oder *B. subtilis* (Hoffmann *et al.*, 1998) zeigen unsere Daten, dass dieses Produkt unter anaeroben Bedingungen auch nicht weiter dissimilatorisch oder assimilatorisch ammonifiziert werden kann. Die vorhandene Nitritreduktase NirBD ist nur für eine aerobe Assimilation relevant. In der Konsequenz verbleibt unter Laborbedingungen das Nitrit bei einer fehlenden Vergesellschaftung mit potenten Denitrifizierern im anoxischen Medium und führt aufgrund seiner Toxizität zu einer Verschlechterung des allgemeinen Wachstums von *S. coelicolor* A3(2).

Die Toxizität von Nitrit und damit ein gehemmtes Wachstumspotential ist nicht auf einen einzelnen kausalen Effekt zurückzuführen, sondern ergibt sich aus der Summe verschiedener durch Nitrit hervorgerufener Beeinträchtigungen der Zellphysiologie. Entscheidend ist die Reaktivität von Nitrit. Sie führt zur Zerstörung der Kofaktoren von Proteinen und zur Bildung weiterer reaktiver Stickstoffspezies. Der diesen Prozessen zugrunde liegende Mechanismus wird unter sauren Bedingungen durch das Auftreten von salpetriger Säure (HONO) und damit der Bildung von Stickstoffmonoxid bzw. seinen redoxrelevanten Nitrosylkationen (NO^+) und Nitroxylanionen (NO^-) begünstigt. Von daher tritt eine größere Wachstumshemmung bei sauren pH-Bedingungen auf (Dykhuizen *et al.*, 1998; Davidson *et al.*, 2002). Die durch Nitrosylierung vom Nitrit abgeleiteten bakteriostatischen Verbindungen sind vor allem Nitrosothiole, N-Nitrosoverbindungen und Eisen-Schwefel-Nitrosyl-Komplexe (FE-S-NO). Insbesondere die Bildung letzterer hat schwerwiegende Folgen für die Funktion essentieller Eisen-Schwefel-Proteine (Cammack *et al.*, 1999). Am Beispiel von *Pseudomonas aeruginosa* wurde unter aeroben Bedingungen gezeigt, dass Nitrit sowohl den aktiven Transport von Glucose als auch den glucoseunabhängigen Sauerstoffverbrauch und die oxidative Phosphorylierung hemmt (Rowe *et al.*, 1979). Die von ihnen für die Transportuntersuchung genutzten Nitritkonzentrationen (Abb. 5.1.B [Seite 82]), bewegen sich dabei in einem Rahmen, wie sie in unseren Versuchen von *S. coelicolor* A3(2) ins Medium sekretiert wurden (0-100 mM). Bisher unbekannt ist, wie das im Medium befindliche Nitrat wieder in die Zelle aufgenommen wird.

Aufgrund des breiten Spektrums möglicher Nitrosylierungspartner und unterschiedlich stark ausgeprägter Entgiftungsmechanismen (Nitritexporter, Nitritreduktasen) ist für die Empfindlichkeit von Bakterien gegenüber Nitrit und anderen reaktiven Stickstoffspezies keine allgemeingültige taxonomische Klassifizierung ableitbar. Die Empfindlichkeit ist unter

anaeroben Bedingungen jedoch höher. Dennoch tritt sie bei aeroben und anaeroben Bakterien gleichermaßen auf. Die Toleranzgrenze innerhalb der gleichen Gattung kann interessanter Weise sehr unterschiedlich sein (Bollag und Henninger, 1978; Davidson *et al.*, 2002). Trotz der eigenen Empfindlichkeit könnte es für *S. coelicolor* A3(2) unter diesen Gesichtspunkten von Vorteil sein, Nitrit zu produzieren und an die unmittelbare Umgebung abzugeben. Konkurrierende Organismen, die empfindlicher gegenüber Nitrit sind, würden mehr Schaden nehmen als *Streptomyces* selbst. Damit stünde *S. coelicolor* A3(2) auch unter anaeroben Bedingungen ein Mittel zur Verfügung, welches auf die, von ihm nur unter aeroben Bedingungen synthetisierten Antibiotika, Bezug nimmt. Andererseits ist fraglich, ob die dafür notwendigen Konzentrationen am natürlichen Standort überhaupt erreicht werden oder eher ein Artefakt artifizierlicher Laboruntersuchungen darstellen. Cleemput und Samater (1996) beziehen sich bei ihrer Untersuchung der Akkumulation von Nitrit in verschiedenen Böden auf Werte, die besagen, dass normalerweise weniger als $0,1 \text{ mg NO}_2^- \text{-N kg}^{-1}$ und nur sehr selten $50 \text{ mg NO}_2^- \text{-N kg}^{-1}$ auftreten. Für einen theoretisch angenommenen Fall, dass 10 ml Porenwasser in 1 kg Boden enthalten sind, könnten daher für normale Böden weniger als 0,7 mM Nitrit kalkuliert werden. Eine Aussage über die Konzentration von Nitrit in Mikrohabitaten ist nicht möglich. Dennoch ist der berechnete Vergleichswert siebenmal geringer als die von uns genutzte Konzentration, bei der Toxizitätseffekte festgestellt wurden.

Die natürliche Lebensweise von Streptomyceten in Mikrohabitaten ist mit dem Umwachsen von abgelösten und abgestorbenen Pflanzenresten aber auch mit der Kolonisation von bzw. Vergesellschaftung mit Pflanzenwurzeln beschrieben (Kortemaa, 1994; Tarkka, 2008). Ob die Toxizität des ausgeschiedenen Nitrits in Zusammenhang mit der saprophytischen Lebensweise dieser Bakterien stehen kann, bleibt indes Spekulation. Generell ist die Toxizität von Nitrit aber nicht auf Bakterien beschränkt. Laborbedingungen, wie sie in dieser Arbeit genutzt wurden, repräsentieren derartig komplexe Stoffflüsse in der Natur nicht und sie nehmen auch keinerlei Bezug zu dem biotischen Wechselwirkungsgefüge.

Bei der Betrachtung unserer artifizierlichen Laboruntersuchungen fällt auf, dass *S. coelicolor* A3(2) keine erkennbare Repression der anaeroben Nitratreduktion betreibt; selbst dann nicht, wenn ihn die selbst produzierten hohen Nitritkonzentrationen stark beeinträchtigen. Entweder er ist aus ungeklärten Gründen auf die Nitratreduktion fokussiert oder aber es wurde kein Mechanismus gegen hohe Nitritkonzentrationen evolviert, weil unter normalen

Bedingungen die Exkretion über die Transporter NarK2 und NarK1 ausreichend ist. Für die Reduzierung bzw. Detoxifizierung des so abgegebenen Nitrits kommen im natürlichen Habitat spezialisierte Nitritverwerter wie zum Beispiel *Nitrobacter* oder anaerobe Denitrifikanten wie *P. denitrificans* in Frage.

Bei dieser Interpretation der Ergebnisse wäre die Entgiftung von Nitrit eine der wichtigsten Voraussetzungen, um einen gegebenenfalls nur schwach ausgeprägten Nar-Phänotyp für *S. coelicolor* A3(2) zu detektieren. Andernfalls wird er durch nitrosylierungsbedingte negative Effekte überdeckt. Die Untersuchung von immobilisierten Streptomyceten in einem hypoxischen oder anoxischen Durchflussreaktor ist daher ein experimenteller Ansatz, der diesem Anspruch gerecht wird. Bei ihm kann das gebildete toxische Nitrit abgeführt werden. Denkbar ist auch, dass Gene zur natürlichen Entgiftung mit Hilfe molekularbiologischer Methoden zusätzlich eingebracht werden oder ihre Expression erhöht wird. In diesem Zusammenhang ist nicht ausgeschlossen, dass der genutzte Stamm *S. coelicolor* A3(2) M145 erst durch rekombinante Ereignisse die Fähigkeit zu einer vollständigen Denitrifikation verloren hat. Ein Indiz für diese These liefern Albrecht *et al.* (1997). Sie ordnen in einer der bereits erwähnten Denitrifikationsstudien über *Streptomyces* den Stamm *S. sp.* H83/a der Art *S. violaceoruber* zu. Für diesen Stamm ermitteln sie eine große Freisetzung von N₂O und führen diese auf Denitrifikationsprozesse zurück. *S. coelicolor* A3(2) gehört trotz der anders lautenden Bezeichnung ebenfalls zu *S. violaceoruber* (siehe Abschnitt Taxonomy [Seite 3]). Überraschender Weise zeigen Albrecht *et al.* (1997) aber auch Daten, in denen die Nitratumsetzung durch *S. violaceoruber* ausschließlich zur Akkumulation von Nitrit führt. Was diese Versuche von denen mit überwiegender NO- oder N₂O-Bildung unterscheidet ist nicht ersichtlich. Unabhängig von diesem Aspekt betonen Albrecht *et al.* (1997) aber auch, dass keiner ihrer untersuchten Stämme anaerob wachsen kann.

Angesichts der Tatsache, dass Streptomyceten nur an den Hyphenspitzen wachsen können und dass die Nitratreduktion - meiner Erfahrung nach - auch von distalen Abschnitten und Sporen durchgeführt wird, erscheint ein allgemeiner Beitrag der anaeroben Nitratreduktion zur Stabilisierung des Membranpotentials mit dem **Ziel einer Steigerung der anaeroben Fitness** am wahrscheinlichsten.

D.2. Stoffwechselprozesse bei ausdauernden *Streptomyces*-Sporen

Die Bezeichnung der „bakteriellen Spore“ wird im Allgemeinen mit den dormanten Ruhephasen der *Firmicutes* und ihren Eigenschaften, wie z.B. metabolischer Inaktivität und ein geringes Maß an Stoffaustausch mit der Umgebung (Pedraza-Ryes *et al.*, 2012), assoziiert. Unsere Ergebnisse stellen dieser Begriffsassoziation mit den *Streptomyces*-Sporen ein metabolisch aktiveres Beispiel entgegen, das im ausdauernden Zustand zu einer anaeroben Nitratreduktion befähigt ist. Damit einhergehend erfährt die Verfügbarkeit von Substraten und Gasen eine größere Bedeutung bei der Betrachtung des Potentials der Überdauerung von *Streptomyces*-Sporen.

Van Keulen *et al.* (2007) zeigten sowohl für Sporen als auch für Kolonien von *S. coelicolor* A3(2), dass sie anoxische Bedingungen ohne Zusatz von Nitrat für zwanzig und mehr Tage überleben können (Abb. 5.1.A, [Seite 82]). Besonders bemerkenswert in ihrer Untersuchung ist aber, dass *S. avermitilis* unter den gleichen Bedingungen eine deutlich geringere anaerobe Fitness aufweist. Mit dem Begriff anaerobe Fitness ist in diesem Zusammenhang jenes Maß an Anpasstheit gemeint, welches es einer Zelle erlaubt, auch ohne den terminalen Elektronenakzeptor Sauerstoff zu überleben. Konsequenterweise ist dafür nicht unbedingt die Nutzung eines anderen externen Elektronenakzeptors erforderlich. Streptomyceten scheint es vielmehr möglich, ihre physiologischen Prozesse derart umzusteuern, dass noch vorhandene Energiereserven des aeroben Stoffwechsels möglichst effektiv zur Aufrechterhaltung eines Leerlaufstoffwechsels eingesetzt werden; anstatt eines Wachstums kommt es zur anaeroben Überdauerung (Hypothese). Wie lange eine derart eingegangene physiologische Ruhephase vital bliebe, wäre in diesem Fall durch die Menge mobilisierbarer Energiereserven und dem Vorhandensein nutzbarer interner oder externer Elektronenakzeptoren bestimmt. Beide Faktoren sind dabei durch die Umsatzrate des Ruhestoffwechsels miteinander verknüpft. Demzufolge würden hohe Umsatzraten oder geringe Energiereserven die anaerobe Überlebensfähigkeit verringern.

Für die verschiedentlich von Bakteriengattungen ausgebildeten spezialisierten Ruhestadien (*resting cells*) werden im Allgemeinen unterschiedliche Grade der verbleibenden metabolischen Aktivität angenommen (Shimkets und Brun, 2000). Der dokumentierte Sauerstoffverbrauch unserer Respirationmessungen bei Sporen von *S. coelicolor* A3(2) deutet auf eine aerob ablaufende Stoffwechselaktivität hin. Bestätigt wird eine solche

metabolische Aktivität durch Daten früherer Respirationsmessungen von Garcia Diaz *et al.* (1983) für vier andere Streptomyceten. Damit grenzen sich *Streptomyces*-Sporen deutlich von den Endosporen der Bacilli ab. Für sie wird das Konzept eines stillgelegten metabolischen Stoffwechsels beschrieben (Pedraza-Ryes *et al.*, 2012). Ausschlaggebend für diesen Zustand ist der Wassergehalt des Protoplasten. Er beträgt für Endosporen zwischen 27 % und 55 % des Trockengewichts (Pedraza-Ryes *et al.*, 2012; Setlow, 1980). Die Wassermoleküle sind dabei meist als einschichtige Hydrathülle an Proteine gebunden, so dass nur wenig freies Wasser für einen Makromolekültransport bereitsteht. Zur Aufrechterhaltung des geringen Wassergehaltes der Spore liegen die Lipidmoleküle der inneren Membran unbeweglich vor. Sie bilden eine Art kristalline Struktur, durch die nur wenig Wassermoleküle und Ionen diffundieren können. Dennoch ist ein begrenzter Stofffluss möglich und Rezeptoren auf der Innenseite der Membran initiieren nach Bindung von Keimungssignalstoffen die Wiederherstellung der Fluidität der Membran und damit den Ionenaustausch bzw. die Rehydratisierung des Protoplasten. Die Dormanzeigenschaften gehen in der Folge verloren und die Enzymaktivitäten kommen wieder zur Ausprägung (Pedraza-Ryes *et al.*, 2012).

Für *Streptomyces*-Sporen wurde ein Wassergehalt von ca. 81 % bestimmt (Quirós und Salas, 1996). Dieser Wert liegt im Bereich des Wassergehaltes vegetativer Stadien von *Bacillus* (Pedraza-Ryes *et al.*, 2012). Über die weitere Zusammensetzung und Details von *Streptomyces*-Sporen ist im Allgemeinen viel weniger bekannt als für Endosporen. Während in Endosporen jedoch vor allem Calcium-Dipicolinsäure eingelagert ist, macht im Protoplasten der *Streptomyces*-Sporen das Disaccharid Trehalose mit 10-20 % des Trockengewichts einen großen Anteil aus (McBride und Ensign, 1987a). Ihm werden die ausgebildeten Trockenresistenzigenschaften der Spore zugeschrieben und ist wohl gleichzeitig auch der Energiespeicher der Spore (Elbein, 2003). Cruz-Martin *et al.* (1986) konnten für *S. antibioticus* interessanter Weise zeigen, dass der Trehalosegehalt unter aeroben Bedingungen bei der Inkubation in destilliertem Wasser innerhalb von 6 h um 70 % zurückgeht; danach verbleibt er stabil. Der Abbau von Trehalose kann durch das Enzym Trehalase katalysiert werden. Die Präsenz einer Trehalase-Aktivität in frisch geernteten Sporen wurde durch McBride und Ensign (1987b) gezeigt. Letzten Endes wird ein Molekül Trehalose zu zwei Molekülen Glucose hydrolysiert. Glucose wird von Streptomyceten über die Glykolyse und den Pentosephosphatweg verwertet (van Keulen *et al.*, 2011). Die

Hauptaufgabe des Pentosephosphatwegs ist in diesem Zusammenhang jedoch die Bereitstellung von Biosynthese-Vorstufen. Sie werden in ausdauernden Sporen vermutlich nur begrenzt benötigt. Hinsichtlich einer existierenden Atmungskette in Sporen, konnten Quirós *et al.* (1986) unter anderem die Enzymaktivität einer Succinat-Dehydrogenase und Cytochrom-c-Reduktase zeigen.

Unter **aeroben Bedingungen** ergibt sich demnach für den Ruhestoffwechsel von *Streptomyces*-Sporen eine angenommene Umsetzung von Trehalose zu Glucose und deren weiterer Abbau über die Glykolyse und den Citratzyklus, wobei die Reduktionsäquivalente über die Kopplung an eine Elektronentransportphosphorylierung mit dem Endelektronenakzeptor Sauerstoff regeneriert werden. Unter **anaeroben Bedingungen** kann der gleiche Weg allerdings mit der terminalen Reduktion von Nitrat über Nar1 postuliert werden. Dennoch überleben Sporen von *S. coelicolor* A3(2) auch ohne Nitrat. Was ihn dabei von *S. avermitilis*, der eine geringere anaerobe Fitness hat, unterscheidet ist bislang nicht geklärt. Neben einer möglichen unterschiedlichen Ausbildung von Reservestoffen könnten auch Unterschiede in anaerob relevanten Genen in Betracht gezogen werden. Ein aktueller Abgleich der Gene zeigt, dass die bereits von van Keulen *et al.* (2005) aufgeführten zwei putativen Lactat-Dehydrogenasen von *S. coelicolor* A3(2) kein orthologes Gen bei *S. avermitilis* besitzen. Sollten diese Enzyme in Sporen aktiv sein können, ergibt sich für *S. coelicolor* A3(2) die Möglichkeit, NADH zu NAD⁺ durch den internen Elektronenakzeptor Pyruvat zu regenerieren und dadurch als anaerob ausdauernde *Streptomyces*-Spore länger zu überleben als *S. avermitilis*.

Unabhängig vom Vorliegen einer aeroben Atmung, einer anaeroben Nitrataatmung oder einer anaerob stattfindenden Gärung mit Lactat müssen sowohl unsere als auch die Versuche anderer Autoren mit der Einschränkung betrachtet werden, dass sie mit wasserbenetzten Sporen in destilliertem Wasser oder Puffer durchgeführt wurden. Es stellt sich die Frage, ob die im natürlichen Habitat freigesetzten und wasserbenetzten Sporen tatsächlich in der postulierten Ruhephase verbleiben oder im nährstoffhaltenden und feuchten Habitat nicht eher relativ zügig auskeimen. Ein Indiz für längere Ruhephasen liefern Untersuchungen, die zeigen, dass Sporen in steriler Erde eine hohe Keimungsrate aufweisen. Werden Sie unsteriler Erde zugesetzt, findet kaum eine Keimung statt (Lloyd, 1969; Mayfield *et al.*, 1972). Folgt man der Interpretation, dass sie erst in einem für sie günstigen biotischen

Umfeld auskeimen, so verbleiben sie als ausdauernde Sporen. Eine denkbare Möglichkeit, dies bei einem hohen Verbrauch der zuvor angelegten Speicherstoffe auch über ein längeren Zeitraum tun zu können, deuten die Daten von Salas und Hardisson (1981) sowie McBride und Ensign (1987a) an; sie zeigten, dass ausdauernde Sporen in der Lage sind, exogen applizierte Glucose aufzunehmen und sogar wieder zu Trehalose zu verknüpfen (Abb.5.2).

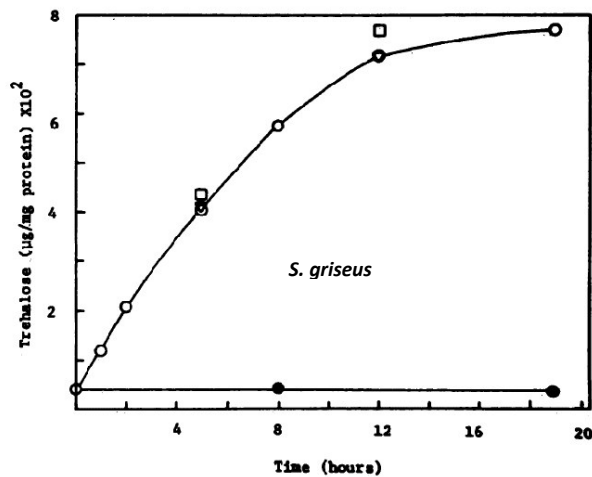


Abb. 5.2.: Zitierte Daten von McBride und Ensign (1987a) über den Trehalosegehalt in ausdauernden Sporen von *Streptomyces griseus*.

Dargestellt ist die Messung der Akkumulation von Trehalose während der Inkubation reifer Sporen. Als C-Quelle wurden dem Inkubationspuffer 50 mM Glucose (○, □, △) zugesetzt. Die Negativkontrolle (●) enthielt keine Glucose. Eine weitere Kontrolle (Δ) enthielt zusätzlich zu Glucose noch Rifampicin und Neomycin. Die Inkubation erfolgte jeweils in 10 mM Phosphatpuffer pH 7,0 (●, ○, △) oder 10 mM MOPS-Puffer pH 7,0 (□). Die Sporen weisen aufgrund des genutzten Sporulationsmediums einen initial niedrigen Trehalosegehalt auf.

D.3. Aspekte der Regulation der Nitratreduktion bei *S. coelicolor* A3(2)

Die Regulation der respiratorischen Nitratreduktion ist sowohl für das gram-negative γ -Proteobacterium *E. coli* als auch für den gram-positiven *B. subtilis* (niedriger GC-Gehalt) grundlegend untersucht worden (Tielen *et al.*, 2012). In beiden Fällen steht am Beginn der Regulation die direkte Sensierung von Sauerstoffmangel (*E. coli*) bzw. die Sensierung der mit Sauerstoffmangel verbundenen Parameter des Elektronen-Transports (*B. subtilis*). Bei dem in dieser Arbeit untersuchten gram-positiven *S. coelicolor* (hoher GC-Gehalt) kommt ein übergeordneter, auf entwicklungsspezifische Aspekte zurückgehender Einfluss hinzu, der die Regulation der Nitratreduktion zusätzlich bestimmt (Abb. 5.3. rechts unten). Im Fall der Expression des Operons von *nar1* scheint Sauerstoff keinen Einfluss zu haben – zumindest herrscht außerhalb des Sporophors kein Sauerstoffmangel und dennoch ist Nar1 in Sporen vorhanden (Kapitel 2 [Seite 35]). Die Ergebnisse zu *nar2* hingegen offenbaren, dass das Protein Nar2 nur infolge der Abwesenheit von Sauerstoff gebildet wird (Kapitel 4 [Seite 74]). Interessanterweise ist dies sowohl in Sporen als auch Myzel möglich. Für die Bildung von

Nar2 in Sporen deutet sich dabei an, dass die Regulation posttranskriptionell ansetzt, denn obwohl in frisch geernteten Sporen kein Protein nachweisbar ist, so ist das Transkript für Nar2 nachweisbar (nicht publizierte Daten; persönliche Kommunikation D. Falke). Für die Expression von *nar3* ist es momentan noch nicht absehbar, ob es nur infolge von Phosphatmangel bzw. in der durch Phosphatmangel induzierten Transitions-Phase exprimiert wird oder zusätzlich durch Sauerstoffmangel induziert werden muss. Die Anwesenheit von Nitrat hingegen scheint in unseren Versuchen keine notwendige Voraussetzung für die Expression der drei *nar*-Operone zu sein; allerdings wollen van Keulen *et al.* (2005) eine verstärkte *nar2*-Expression (Myzel) in Gegenwart von Nitrat detektiert haben - sie zeigen diese Daten aber nicht. Die sich so für *S. coelicolor* A3(2) ergebende nitrat- und sauerstoffunabhängige *nar*-Expression ist indes auch bei anderen Bakterien nicht unbekannt. Bei *M. tuberculosis* und *M. bovis* wird das *narGHJ*_{MT}-Operon beispielsweise konstitutiv exprimiert, obwohl die eigentliche Nitratreduktion hypoxisch induziert wird. Die sauerstoffabhängige Regulation beruht bei ihnen auf der Induktion des

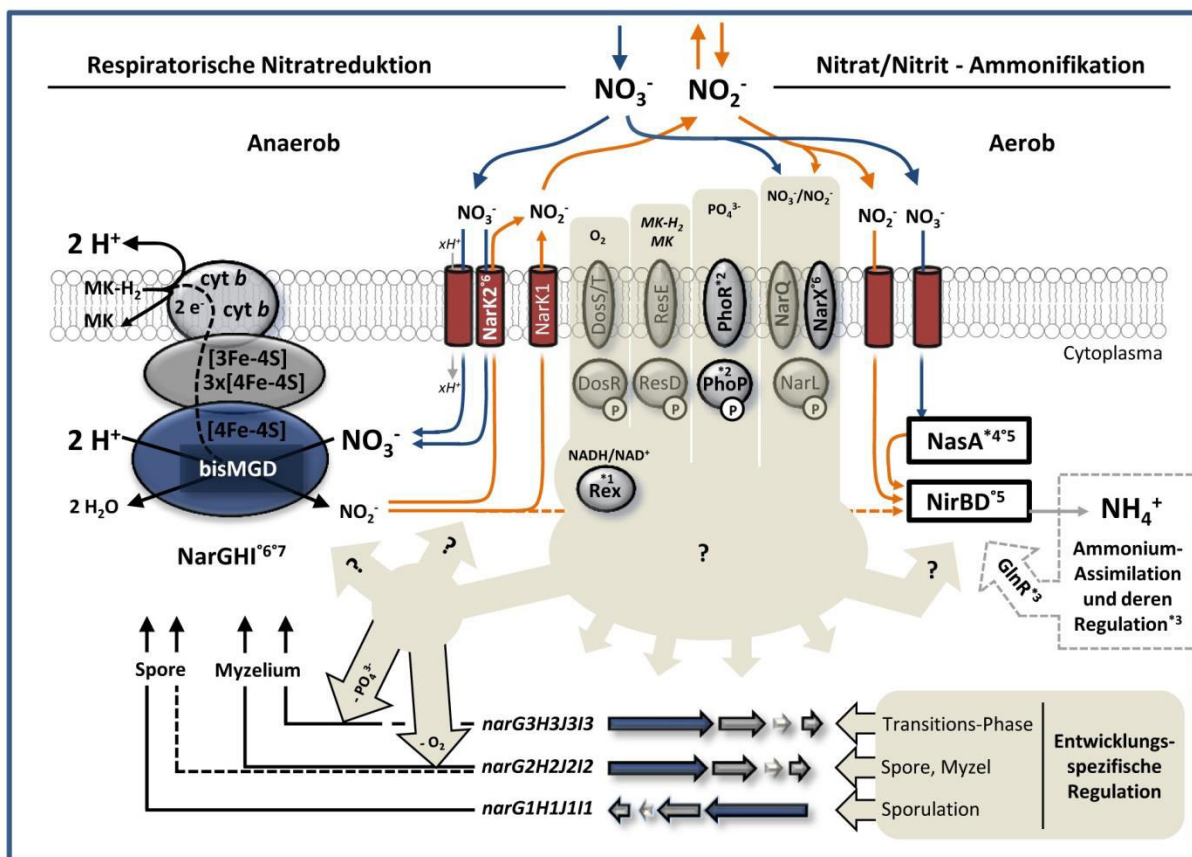


Abb. 5.3.: Schema der Regulation der respiratorischen und assimilatorischen Nitratreduktion bei *S. coelicolor* A3(2). Die Einflüsse/Funktionen bekannter (*1 – Brekasis und Paget, 2003; *2 – Sola-Landa *et al.*, 2003; *3 – Fink *et al.*, 2002; *4 – Wang und Zhao, 2009) und postulierter, sowie mit dieser Doktorarbeit zum Teil charakterisierter Elemente (*5 – Fischer *et al.*, 2012; *6 – unpublished manuscript *7 – Fischer *et al.*, 2010 und Fischer *et al.*, 2013) wurden hypothetisch zusammengeführt. Details siehe Text. Mögliche regulatorische Vorgänge, über die bisher keine Informationen oder Hypothesen vorliegen sind mit einem Fragezeichen gekennzeichnet.

Nitrattransporters NarK2_{Mt} unter Sauerstoffmangel. Das Fehlen von Sauerstoff ist letztlich auch der gemeinsame Faktor, der die unterschiedlichen Nitratreduktasesysteme von *S. coelicolor* A3(2) funktionell vereint. Zwar werden die drei mit Western-Blot-Hybridisierung nachgewiesenen Nar-Enzyme von *S. coelicolor* A3(2) in unterschiedlichen Entwicklungs- bzw. Wachstumsphasen des Bakteriums synthetisiert, aber *in vivo* aktiv sind sie alle nur anaerob (Abb. 5.3. links). Es liegt daher zunächst nahe, dass auch bei *S. coelicolor* A3(2) eine sauerstoffabhängige Synthese eines Nitrattransporters die Sauerstoffabhängigkeit reguliert, jedoch gibt es bisher keine Hinweise dafür. Allerdings wird durch Untersuchungen am Transporter von *E. coli* (NarK2_{Ec}) deutlich, dass es auch möglich ist, dass der Mechanismus des Nitrattransportes am Transporter selbst durch Sauerstoff gehemmt wird (Moir und Wood, 2001). Der Nitrat/Nitrit-Transporter NarK2_{SCO} von *S. coelicolor* A3(2) könnte ebenfalls über diesen Mechanismus regulierend auf die Nitratreduktion einwirken. Essentiell ist NarK2_{SCO} nach gegenwärtigem Stand allerdings nur für die Nitratreduktion des Nar2-Nitratreduktasesystems. Ob ein anderer, momentan noch unbekannter Transporter für den *Aerob/Anaerob-Switch* des Nar1-Nitratreduktasesystem von Sporen verantwortlich ist, müssen zukünftige Arbeiten zeigen. Für den als NarK1_{SCO} annotierten zweiten putativen Nitrat/Nitrit-Transporter wurde jedenfalls bisher kein Phänotyp für Sporen oder Myzel festgestellt (Daten nicht publiziert).

Neben einem möglicherweise sauerstoffabhängigen Transport von Nitrat sind aber andere Mechanismen der Regulation denkbar. So wurden im Genom von *S. coelicolor* A3(2) direkte bzw. indirekte Sauerstoffsensierungsmechanismen annotiert, die einen regulatorischen Einfluss auf die Nitratreduktion haben könnten. Beispielsweise werden Gene mit Ähnlichkeiten für das Zweikomponentensystem ResE/ResD und DosS-DosT/DosR angegeben (van Keulen *et al.*, 2007). Letzteres steht für *direct oxygen sensor* (Dos) und wurde bei *M. tuberculosis* insoweit charakterisiert, als dass es die hypoxische Adaptation und damit den Eintritt in den dormanten Zustand kontrolliert. In Gegenwart von Sauerstoff wird entweder das Eisen seines Häm-Kofaktors oxidiert oder ein Ligand verdrängt, wodurch die Phosphodiesterase-Aktivität gehemmt wird. Bei Abwesenheit von Sauerstoff wird der Regulator DosR dadurch phosphoryliert und kann an die DNA als Transkriptionsfaktor binden (Unden *et al.*, 2010; Sivaramkrishnan und Ortiz de Montellano, 2013). Das Res-System („*regulation of respiration*“) wurde im Zusammenhang mit der Nitratrespiration bei *B. subtilis* als indirekter Sauerstoffsensoren charakterisiert. Das eigentliche sensierte Signal ist

unbekannt, wird von einigen Autoren aber als Menachinon-Redoxstatus angenommen (Nakano und Zuber, 1998). Bei einem ungünstigen Redoxstatus wird daher über phosphoryliertes ResD die Gen-Expression für das Fumarat-Nitrat-Regulator-Protein FNR_{Bs} initiiert, welches wiederum *narGHJ*_{Bs} und *narK*_{Bs} positiv reguliert (Unden *et al.*, 2010). Für *S. coelicolor* A3(2) wurde bisher kein FNR identifiziert und die von der Genomsequenz abgeleiteten Funktionen von Dos und Res müssen erst noch experimentell bewiesen werden.

Völlig unklar ist gegenwärtig die Funktion der als NarX, NarQ und NarL annotierten Gene bei *S. coelicolor* A3(2). Zwar wurde in dieser Doktorarbeit am Beispiel von NarX gezeigt, dass eine Gen-Disruption den Ausfall der Funktion des Nar2-Nitratreduktasesystems zur Folge hat, allerdings ist fraglich, ob dieses System die gleiche Funktion wie bei *E. coli* ausübt. Bei ihm sensieren beide Systeme das Vorhandensein von Nitrat, wobei NarX/L die membrangebundene Nitratreduktase (Nar) positiv und die periplasmatische (Nap) negativ reguliert; NarQ/P hingegen sensiert Nitrat und Nitrit und reguliert die Nap und eine Nitritreduktase positiv (Tielen *et al.*, 2012).

Bei *E. coli* ist dieser Regulationsmechanismus somit auch Gegenstand der dissimilatorischen Nitrit-Ammonifikation. Für *S. coelicolor* A3(2) konnte nur eine aerobe Nitrit-Ammonifikation festgestellt werden (Abb. 5.3. rechts). Dabei wird aufgenommenes Nitrat über NasA zu Nitrit reduziert und über NirBD weiter zu Ammonium umgesetzt. Die Regulation der Nitritreduktase steht dabei unter der Kontrolle des globalen Stickstoffregulators GlnR von *S. coelicolor* A3(2), der bereits gut charakterisiert wurde (Fink *et al.*, 2002; Tiffert *et al.*, 2008).

Letztendlich gibt es noch zwei, bereits funktionell charakterisierte Mechanismen, die in das erstmals aufgestellte Modell der Regulation der Nitratreduktion bei *S. coelicolor* A3(2) involviert sein könnten: das Rex-System und das PhoR-PhoP-System (Abb. 5.3. mitte). Mit dem Rex-System („redox“) wurde bei *S. coelicolor* A3(2) ein NADH/NAD⁺-Sensierungsmechanismus charakterisiert, der bei den gram-positiven Mikroorganismen weit verbreitet ist (Brekasis und Paget, 2003). Allerdings werden dem Regulon bisher nur 10 Operone zugeordnet, von denen keine Beziehung zu den *nar*-Genen abgeleitet werden kann. Das PhoR/PhoP-System wiederum sensiert niedrige Phosphatkonzentrationen (Sola-Landa *et al.*, 2003; Rodríguez-García *et al.*, 2007), wie sie in unseren Versuchen mit der Expression von *nar3* einhergehen. Bisher ist aber auch hier noch kein direkter Zusammenhang zum Pho-Regulon ersichtlich.

Alle so im Modell der Regulation (Abb 5.3.) eingeordneten, bekannten oder putativen Einflussfaktoren offenbaren letztendlich Perspektiven und Ansatzpunkte für die weitere Aufklärung der Nitratreduktion bei *Streptomyces*. Die Berechtigung bzw. Notwendigkeit einer solchen ergibt sich daraus, dass mit der leicht detektierbaren *in vivo*-Aktivität der Nar-Enzyme von *S. coelicolor* A3(2) ein experimenteller Zugang zur Untersuchung der Regulation und Aufrechterhaltung seiner anaeroben Überdauerungsphasen (Sporen und Myzel) besteht. Im Fall von Nar1 ist darüber hinaus ein relativ leicht zu untersuchendes sporenspezifisches Stoffwechsellenzym identifiziert worden, das mit der Untersuchung seiner zeitlichen und lokalen Synthese die Möglichkeit bietet, neue Erkenntnisse über die Prozesse der Sporulation zu gewinnen.

Gegenwärtig ist mit den Ergebnissen dieser Doktorarbeit bekannt, dass alle drei genetisch determinierten respiratorischen Nitratreduktasesysteme von *S. coelicolor* A3(2) funktionell sind und sie ihre Hauptaktivität entweder in Sporen (Nar1, Nar2) oder Myzel (Nar2, Nar3) besitzen. Darüber hinaus konnte ein entwicklungspezifischer (Nar1), sauerstoffabhängiger (Nar2) oder phosphatabhängiger (Nar3) Einfluss auf die Expression identifiziert werden. Trotz dieser Unterschiede liegt bei allen drei Nar-Enzymen eine *in vivo* - Aktivität nur unter Sauerstoffabschluss vor. Diese Situation ist für den obligat aeroben *S. coelicolor* A3(2) sowohl im natürlichen Habitat, als auch unter den im Labor genutzten Kultivierungsbedingungen ein ständig auftretender Stressfaktor. Über die Anpassung an diesen ist aber weiterhin wenig bekannt.

- Tabellen- und Abbildungsverzeichnis -

- Tabelle 1.1.** Anzahl duplizierter und anaerober Stoffwechselgene im Genom von *S. coelicolor* A3(2)
- Abb. 1.1.:** Unterschiedlich weit entwickelte Kolonien (grau, weiß, blaurot) von *Streptomyces coelicolor* A3(2)
- Abb. 1.2.:** Wege der bakteriellen Nitratreduktion im Kontext des Stickstoffkreislaufes
- Abb. 1.3.** Schema des Wachstums und der Differenzierung von *S. coelicolor* A3(2)
- Abb. 1.4.:** Ausgewählte Vergleiche der Sequenzidentitäten, -ähnlichkeiten und Strukturvorhersagen der drei Nar's von *S. coelicolor* A3(2)
- Abb. 2.1.** Morphologie- und Strukturänderung während der Sporenbildung bei *S. coelicolor* A3(2)
- Abb. 3.1.** Mikroskopische Hellfeld-Aufnahme aggregierter Myzelien (Pellets) während des Wachstums von *Streptomyces coelicolor* in submerser Flüssigkultur (*tryptic soy broth*)
- Abb. 3.2.** Morphologie von *S. coelicolor* bei submerser Kultivierung in *tryptic soy broth*
- Abb. 4.1.** Multizelluläre Entwicklung, *Growth Arrest* und Antibiotikabildung
- Abb. 5.1.** Zitierte Daten der anaeroben Überdauerung von Streptomyceten und der allgemeinen Nitrittoxizität
- Abb. 5.2.** Zitierte Daten über den Trehalosegehalt in ausdauernden Sporen von *Streptomyces griseus*
- Abb. 5.3.** Schema der Regulation der Nitratreduktion bei *S. coelicolor* A3(2)

- Literaturverzeichnis -

- Albrecht, A., Ottow, J.C.G., Benckiser, G., Sich, I., and Russow, R. (1997).** Incomplete Denitrification (NO and N₂O) from Nitrate by *Streptomyces violaceoruber* and *S. nitrosporeus* Revealed by Acetylene Inhibition and ¹⁵N Gas Chromatography-Quadrupole Mass Spectrometry Analyses. *Naturwissenschaften* 84, 145–147.
- Anderson, J.P.E., and Domsch, K.H. (1978).** A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biology and Biochemistry* 10, 215–221.
- Angert, E.R. (2005).** Alternatives to binary fission in bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 3, 214–224.
- Barbosa, P., and Peters, T.M. (1971).** The effects of vital dyes on living organisms with special reference to Methylene Blue and Neutral Red. *The Histochemical Journal* 3, 71–93.
- Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdeño-Tárraga, A.-M., Challis, G.L., Thomson, N.R., James, K.D., Harris, D.E., Quail, M.A., Kieser, H., Harper, D., et al. (2002).** Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* 417, 141–147.
- Bentley, S.D., Brown, S., Murphy, L.D., Harris, D.E., Quail, M.A., Parkhill, J., Barrell, B.G., McCormick, J.R., Santamaria, R.I., Losick, R., 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, 1615–1628.
- Bollag, J.-M., and Henninger, N.M. (1978).** Effects of nitrite toxicity on soil bacteria under aerobic and anaerobic conditions. *Soil Biology and Biochemistry* 10, 377–381.
- Borodina, I., Krabben, P., and Nielsen, J. (2005).** Genome-scale analysis of *Streptomyces coelicolor* A3(2) metabolism. *Genome Research* 15, 820–829.
- Brekasis, D., and Paget, M.S.B. (2003).** A novel sensor of NADH/NAD⁺ redox poise in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *The EMBO Journal* 22, 4856–4865.
- Buchanan, R.E. (1918).** Studies in the Nomenclature and Classification of the Bacteria: VIII. The Subgroups and Genera of the Actinomycetales. *Journal of Bacteriology* 3, 403–406.
- Bystrykh, L.V., Fernández-Moreno, M.A., Herrema, J.K., Malpartida, F., Hopwood, D.A., and Dijkhuizen, L. (1996).** Production of actinorhodin-related “blue pigments” by *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology* 178, 2238–2244.
- Cammack, R., Joannou, C.L., Cui, X.Y., Torres Martinez, C., Maraj, S.R., and Hughes, M.N. (1999).** Nitrite and nitrosyl compounds in food preservation. *Biochimica et biophysica acta* 1411, 475–488.
- Chater, K.F. (2000).** Developmental decisions during sporulation in the aerial mycelium in *Streptomyces*. In: Brun, Y.V., Shimkets, L.J. (eds) *Prokaryotic Development*. American Society for Microbiology, Washington, pp. 33–48.
- Chater, K.F. (2006).** *Streptomyces* inside-out: a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 361, 761–768.
- Chater, K.F., Biró, S., Lee, K.J., Palmer, T., and Schrempf, H. (2010).** The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *FEMS Microbiology Reviews* 34, 171–198.
- Christian, R.R., Hanson, R.B., and Newell, S.Y. (1982).** Comparison of methods for measurement of bacterial growth rates in mixed batch cultures. *Applied and Environmental Microbiology* 43, 1160–1165.

- Cleemput, O.V., and Baert, L. (1984).** Nitrite: a key compound in N loss processes under acid conditions? *Plant and Soil* 76, 233–241.
- Cleemput, O.V., and Samater, A.H. (1995).** Nitrite in soils: accumulation and role in the formation of gaseous N compounds. *Fertilizer Research* 45, 81–89.
- Cox, P.W., Paul, G.C., and Thomas, C.R. (1998).** Image analysis of the morphology of filamentous microorganisms. *Microbiology (Reading, Engl.)* 144 (Pt 4), 817–827.
- Cross, R.L., and Müller, V. (2004).** The evolution of A-, F-, and V-type ATP synthases and ATPases: reversals in function and changes in the H⁺/ATP coupling ratio. *FEBS Letters* 576, 1–4.
- Cruz Martín, M., Díaz, L.A., Manzanal, M.B., and Hardisson, C. (1986).** Role of trehalose in the spores of *Streptomyces*. *FEMS Microbiology Letters*, 35, 49–54.
- Dalgaard, P., Ross, T., Kamperman, L., Neumeyer, K., and McMeekin, T.A. (1994).** Estimation of bacterial growth rates from turbidimetric and viable count data. *International Journal of Food Microbiology*. 23, 391–404.
- Davidson, P.M., Juneja, V.K., and Branen, J.K. (2002).** Antimicrobial Agents *In*: Branen, L., Davidson, P.M., Salminen, S., Thorngate, J.H. (eds) *Food Additives*. 2nd edition, Marcel Dekker, New York: USA, pp. 97-100.
- Duangmal, K., Ward, A.C., and Goodfellow, M. (2005).** Selective isolation of members of the *Streptomyces violaceoruber* clade from soil. *FEMS Microbiology Letters* 245, 321–327.
- Dykhuisen, R.S., Fraser, A., McKenzie, H., Golden, M., Leifert, C., and Benjamin, N. (1998).** *Helicobacter pylori* is killed by nitrite under acidic conditions. *Gut* 42, 334–337.
- Elbein, A.D., Pan, Y.T., Pastuszak, I., and Carroll, D. (2003).** New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology* 13, 17R–27R.
- Elliot, M.A., and Flärdh, K. (2012).** Streptomycete Spores. In *Encyclopedia of Life Sciences (eLS)*, Chicester: John Wiley & Sons [WWW document]. URL <http://www.els.net>
- Elliot, M.A., Buttner, M.J., and Nodwell, J.R. (2008).** Multicellular Development in *Streptomyces* *In*: Whitworth, D.E. (ed) *Myxobacteria: Multicellularity and Differentiation*. American Society for Microbiology Press, Washington, D.C., pp. 419-438.
- Ensign, J.C. (1978).** Formation, properties, and germination of actinomycete spores. *Annual Review of Microbiology* 32, 185–219.
- Erikson, D. (1955).** Loss of aerial mycelium and other changes in *Streptomyces* development due to physical variations of cultural conditions. *Journal of General Microbiology* 13, 136–148.
- Fernández-López, M., Olivares, J., and Bedmar, E.J. (1994).** Two differentially regulated nitrate reductases required for nitrate-dependent, microaerobic growth of *Bradyrhizobium japonicum*. *Archives of Microbiology* 162, 310–315.
- Fillingame, R.H. (1997).** Coupling H⁺ transport and ATP synthesis in F₁F₀-ATP synthases: glimpses of interacting parts in a dynamic molecular machine. *The Journal of Experimental Biology* 200, 217–224.
- Fink, D., Weissschuh, N., Reuther, J., Wohlleben, W., and Engels, A. (2002).** Two transcriptional regulators GlnR and GlnRII are involved in regulation of nitrogen metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Molecular Microbiology* 46, 331–347.
- Fischer, M., Alderson, J., van Keulen, G., White, J., and Sawers, R.G. (2010).** The obligate aerobic *Streptomyces coelicolor* A3(2) synthesizes three active respiratory nitrate reductases. *Microbiology (Reading, Engl.)* 156, 3166–3179. [*Bestandteil dieser Doktorarbeit (Kapitel 1)*]

- Fischer, M., Falke, D., and Sawers, R.G. (2013).** A respiratory nitrate reductase active exclusively in resting spores of the obligate aerobe *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Molecular Microbiology* 89, 1259–1273. [Bestandteil dieser Doktorarbeit (Kapitel 2)]
- Flårdh, K., and Buttner, M.J. (2009).** *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature Reviews Microbiology* 7, 36–49.
- Francisco, D.E., Mah, R.A., and Rabin, A.C. (1973).** Acridine Orange-Epifluorescence Technique for Counting Bacteria in Natural Waters. *Transactions of the American Microscopical Society* 92, 416.
- García Díaz, L.A., Salas, J.A., and Hardisson, C. (1983).** Intracellular pool of *Streptomyces* spores: Amino acids, nucleosides, adenine nucleotide levels and energy charge. *Microbiology Letters* 19, 215–219.
- Gibbs, P.A., Seviour, R.J., and Schmid, F. (2000).** Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions. *Critical Reviews in Biotechnology* 20, 17–48.
- Goodfellow, M., and Williams, S.T. (1983).** Ecology of Actinomycetes. *Annual Review of Microbiology* 37, 189–216.
- Grund, A.D., and Ensign, J.C. (1978).** Role of carbon dioxide in germination of spores of *Streptomyces viridochromogenes*. *Archives of Microbiology* 118, 279–288.
- Hang, P.T., and Brindley, G.W. (1970).** Methylene Blue absorption by clay minerals. Determination of surface areas and capacities (clay-organic studies XVIII). *Clays and Clay Minerals* 18, 203–212.
- Hardisson, C., Manzanal, M.B., Salas, J.A., and Suárez, J.E. (1978).** Fine structure, physiology and biochemistry of arthrospore germination in *Streptomyces antibioticus*. *Journal of General Microbiology* 105, 203–214.
- Harz, C.O. (1878).** *Actinomyces bovis*, ein neuer Schimmel in den Geweben des Rindes. *Jahresbericht der Kaiserlichen Zentral-Tierarznei-Schule in München* 125–140.
- Haug, I., Weissenborn, A., Brolle, D., Bentley, S., Kieser, T., and Altenbuchner, J. (2003).** *Streptomyces coelicolor* A3(2) plasmid SCP2*: deductions from the complete sequence. *Microbiology* 149, 505–513.
- Hazan, R., Que, Y.-A., Maura, D., and Rahme, L.G. (2012).** A method for high throughput determination of viable bacteria cell counts in 96-well plates. *BMC Microbiology* 12, 259.
- 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., Frankenberg, N., Marino, M., and Jahn, D. (1998).** Ammonification in *Bacillus subtilis* utilizing dissimilatory nitrite reductase is dependent on *resDE*. *Journal of Bacteriology* 180, 186–189.
- Hopwood, D.A. (1957).** Genetic recombination in *Streptomyces coelicolor*. *Journal of General Microbiology* 16, ii–iii.
- Hopwood, D.A. (1999).** Forty years of genetics with *Streptomyces*: from *in vivo* through *in vitro* to *in silico*. *Microbiology (Reading, Engl.)* 145 (Pt 9), 2183–2202.
- Hopwood, D.A. (2007).** Actinomycetes and Antibiotics. In: *Streptomyces in Nature and Medicine - The Antibiotic Makers*. Oxford University Press, pp. 1-27.
- Hopwood, D.A., Bibb, M.J., Chater, K.F., Kieser, T., Bruton, C.J., Kieser, H.M., Lydiate, D.J., Smith, C.P., Ward, J.M., and Schrempf, H. (1985).** Genetic manipulation of *Streptomyces*. A laboratory manual. The John Innes Institute, Norwich, United Kingdom.

- Huang, J., Lih, C.J., Pan, K.H., and Cohen, S.N. (2001).** Global analysis of growth phase responsive gene expression and regulation of antibiotic biosynthetic pathways in *Streptomyces coelicolor* using DNA microarrays. *Genes & Development* 15, 3183–3192.
- Jiang, J., He, X., and Cane, D.E. (2007).** Biosynthesis of the earthy odorant geosmin by a bifunctional *Streptomyces coelicolor* enzyme. *Nature Chemical Biology* 3, 711–715.
- De Jong, W., Manteca, A., Sanchez, J., Bucca, G., Smith, C.P., Dijkhuizen, L., Claessen, D., and Wösten, H.A.B. (2009).** NepA is a structural cell wall protein involved in maintenance of spore dormancy in *Streptomyces coelicolor*. *Molecular Microbiology* 71, 1591–1603.
- Kalakoutskii, L.V., and Agre, N.S. (1976).** Comparative aspects of development and differentiation in actinomycetes. *Bacteriological Reviews* 40, 469–524.
- Kämpfer, P. (2006).** The Family Streptomycetaceae. Part I: Taxonomy. *In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H., Stackebrandt, E. (eds) The Prokaryotes: a Handbook on the Biology of Bacteria, Archaea, Bacteria, Firmicutes, Actinomycetes. vol. 3, 3rd edn., Springer, New York, pp. 538-604.*
- Kämpfer, P. (2012).** Genus I. *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943, 339AL emend. Witt and Stackebrandt 1990, 370, emend. Wellington, Stackebrandt, Sanders, Wolstrup and Jorgensen 1992, 159. *In: Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H.J., Trujillo, M.E., Suzuki, K.I., Ludwig, W., Whitman, W.B. (eds) Bergey's manual of systematic bacteriology, Part B, vol. 5, 2nd edn. Springer, New York, pp. 1455–1767.*
- Kelley, L.A., and Sternberg, M.J.E. (2009).** Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nature Protocols* 4, 363–371.
- Kempter, C., Kaiser, D., Haag, S., Nicholson, G., Gnau, V., Walk, T., Gierling, K.H., Decker, H., Zähler, H., Jung, G., et al. (1997).** CDA: Calcium-Dependent Peptide Antibiotics from *Streptomyces coelicolor* A3(2) Containing Unusual Residues. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 36, 498–501.
- van Keulen, G., Alderson, J., White, J., and Sawers, R.G. (2005).** Nitrate respiration in the actinomycete *Streptomyces coelicolor*. *Biochemical Society Transactions* 33, 210–212.
- van Keulen, G., Alderson, J., White, J., and Sawers, R.G. (2007).** The obligate aerobic actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2) survives extended periods of anaerobic stress. *Environmental Microbiology* 9, 3143–3149.
- van Keulen, G., Siebring, J., and Dijkhuizen, L. (2011).** Central Carbon Metabolic Pathways in *Streptomyces*. *In: Dyson, P. (ed) Streptomyces: Molecular Biology and Biotechnology. Norfolk UK: Caister Academic Press, pp. 105–123.*
- Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F., and Hopwood, D.A. (2000).** *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich, UK: John Innes Foundation.
- Korn-Wendisch, F., and Kutzner, H.J. (1992).** The family Streptomycetaceae. *In: Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.H. (eds) The Prokaryotes: a Handbook on the Biology of bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications. 2nd edn., Springer, New York, pp. 921-995.*
- Kortemaa, H., Rita, H., Haahtela, K., and Smolander, A. (1994).** Root-colonization ability of antagonistic *Streptomyces griseoviridis*. *Plant and Soil* 163, 77–83.
- Kumon, Y., Sasaki, Y., Kato, I., Takaya, N., Shoun, H., and Beppu, T. (2002).** Codenitrification and denitrification are dual metabolic pathways through which dinitrogen evolves from nitrate in *Streptomyces antibioticus*. *Journal of Bacteriology* 184, 2963–2968.

- Kutzner, H.J., and Waksman, S.A. (1959).** *Streptomyces coelicolor* MÜLLER and *Streptomyces violaceoruber* WAKSMAN AND CURTIS, two distinctly different organisms. *Journal of Bacteriology* 78, 528–538.
- Lim, A., Eleuterio, M., Hutter, B., Murugasu-Oei, B., and Dick, T. (1999).** Oxygen Depletion-Induced Dormancy in *Mycobacterium bovis* BCG. *Journal of Bacteriology* 181, 2252–2256.
- Lin, J.T., and Stewart, V. (1998).** Nitrate assimilation by bacteria. *Advances in Microbial Physiology* 39, 1–30, 379.
- Lloyd, A.B. (1969).** Dispersal of Streptomycetes in air. *Journal of General Microbiology* 57, 35–40.
- Mallette, M.F. (1969).** Chapter XV Evaluation of Growth by Physical and Chemical Means. *In: Norris, J.R., Ribbons, D.W. (eds) Methods in Microbiology.* Academic Press, New York, pp. 521–566.
- Manteca, A., Fernández, M., and Sánchez, J. (2005).** A death round affecting a young compartmentalized mycelium precedes aerial mycelium dismantling in confluent surface cultures of *Streptomyces antibioticus*. *Microbiology (Reading, Engl.)* 151, 3689–3697.
- Manteca, A., Fernandez, M., and Sanchez, J. (2006).** Cytological and biochemical evidence for an early cell dismantling event in surface cultures of *Streptomyces antibioticus*. *Research in Microbiology* 157, 143–152.
- Manteca, A., Alvarez, R., Salazar, N., Yagüe, P., and Sanchez, J. (2008).** Mycelium differentiation and antibiotic production in submerged cultures of *Streptomyces coelicolor*. *Applied and Environmental Microbiology* 74, 3877–3886.
- Manteca, A., and Sanchez, J. (2009).** *Streptomyces* development in colonies and soils. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 2920–2924.
- Manteca, A., Jung, H.R., Schwämmle, V., Jensen, O.N., and Sanchez, J. (2010).** Quantitative proteome analysis of *Streptomyces coelicolor* Nonsporulating liquid cultures demonstrates a complex differentiation process comparable to that occurring in sporulating solid cultures. *Journal of Proteome Research* 9, 4801–4811.
- Matsunaga, T., Okochi, M., and Nakasono, S. (1995).** Direct Count of Bacteria Using Fluorescent Dyes: Application to Assessment of Electrochemical Disinfection. *Analytical Chemistry* 67, 4487–4490.
- Mayfield, C.I., Williams, S.T., Ruddick, S.M., and Hatfield, H.L. (1972).** Studies on the ecology of actinomycetes in soil IV. Observations on the form and growth of streptomycetes in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 4, 79–91.
- McBride, M.J., and Ensign, J.C. (1987a).** Effects of intracellular trehalose content on *Streptomyces griseus* spores. *Journal of Bacteriology* 169, 4995–5001.
- McBride, M.J., and Ensign, J.C. (1987b).** Metabolism of endogenous trehalose by *Streptomyces griseus* spores and by spores or cells of other actinomycetes. *Journal of Bacteriology* 169, 5002–5007.
- Méndez, C., Braña, A.F., Manzanal, M.B., and Hardisson, C. (1985).** Role of substrate mycelium in colony development in *Streptomyces*. *Canadian Journal of Microbiology* 31, 446–450.
- Moir, J.W., and Wood, N.J. (2001).** Nitrate and nitrite transport in bacteria. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58, 215–224.
- Monod, J. (1949).** The Growth of Bacterial Cultures. *Annual Review of Microbiology* 3, 371–394.
- Moreno-Vivián, C., Cabello, P., Martínez-Luque, M., Blasco, R., and Castillo, F. (1999).** Prokaryotic nitrate reduction: molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases. *Journal of Bacteriology* 181, 6573–6584.

- Morita (1985).** Starvation and miniaturization of heterotrophs, with special emphasis on maintenance of the starved viable state. *In: Flechter, M., Floodgate, G.D. (eds) Bacteria in their Natural Environments.* Academic Press, London, pp. 111-130.
- Müller, R. (1908).** Eine Diphtheridee und eine Streptothrix mit gleichem blauen Farbstoff, sowie Untersuchungen über Streptothrixarten im allgemeinen Zentr. Bakteriolog. Parasitenk. Infektionskr. Abt. II, 46, 195-212.
- Nakano, M.M., and Zuber, P. (1998).** Anaerobic growth of a "strict aerobe" (*Bacillus subtilis*). *Annual Review of Microbiology* 52, 165–190.
- Nannipieri, P., Johnson, R.L., and Paul, E.A. (1978).** Criteria for measurement of microbial growth and activity in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 10, 223–229.
- Newell, S.Y., Fallon, R.D., Tabor, P.S. (1986).** Direct Microscopy of natural assemblages. *In: Poindexter J.S., Leadbetter, E.R. (eds) Bacteria in Nature. Methods and Special Applications in Bacterial Ecology.*, vol 2., Plenum Press, New York, pp. 1-48.
- Ochi, K. (1986).** Occurrence of the stringent response in *Streptomyces* sp. and its significance for the initiation of morphological and physiological differentiation. *Journal of General Microbiology* 132, 2621–2631.
- Oliver, J.D. (2005).** The viable but nonculturable state in bacteria. *The Journal of Microbiology* 43 Spec No, 93–100.
- Paul, G.C., and Thomas, C.R. (1998).** Characterisation of mycelial morphology using image analysis. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 60, 1–59.
- Peczynska-Czoch, W., and Mordarski, M. (1988).** Actinomycete enzymes. *In: Goodfellow, M., Williams, S.T., Motdarksi, M. (eds.) Actinomycetes in Biotechnology.* Academic Press, San Diego, CA., pp. 219-283.
- Prosser, J.I. (2007).** The Ecology of Nitrifying Bacteria. *In: Bothe, H., Ferguson, S.J., Newton, W.E. (eds) Biology of the Nitrogen cycle.* 1st edn., Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 223-243.
- Quirós, L.M., and Salas, J. (1996).** Intracellular water volume and internal pH of *Streptomyces antibioticus* spores. *FEMS Microbiology Letters* 141, 245–249.
- Quirós, L.M., Hardisson, C., and Salas, J.A. (1986).** Isolation and properties of *Streptomyces* spore membranes. *Journal of Bacteriology* 165, 923–928.
- Rafatullah, M., Sulaiman, O., Hashim, R., and Ahmad, A. (2010).** Adsorption of methylene blue on low-cost adsorbents: A review. *Journal of Hazardous Materials* 177, 70–80.
- Reuther, J., and Wohlleben, W. (2007).** Nitrogen metabolism in *Streptomyces coelicolor*: transcriptional and post-translational regulation. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 12, 139–146.
- Revill, W.P., Bibb, M.J., Scheu, A.K., Kieser, H.J., and Hopwood, D.A. (2001).** Beta-ketoacyl acyl carrier protein synthase III (FabH) is essential for fatty acid biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology* 183, 3526–3530.
- Richards, J.C., Jason, A.C., Hobbs, G., Gibson, D.M., and Christie, R.H. (1978).** Electronic measurement of bacterial growth. *Journal of Physics E: Scientific Instruments* 11, 560–568.
- Richardson, D.J., van Spanning, R.J.M., and Ferguson, S.J. (2007).** The Prokaryotic Nitrate Reductase. *In: Bothe, H., Ferguson, S.J., Newton, W.E. (eds) Biology of the Nitrogen cycle.* 1st edn., Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 21-35.

- Riesenberg, D., and Bergter, F. (1984).** Establishment of a system suitable for analysis of balanced and unbalanced growth of *Streptomyces hygroscopicus*. *Journal of General Microbiology* 130, 2543–2548.
- Rodríguez-García, A., Barreiro, C., Santos-Beneit, F., Sola-Landa, A., and Martín, J.F. (2007).** Genome-wide transcriptomic and proteomic analysis of the primary response to phosphate limitation in *Streptomyces coelicolor* M145 and in a Δ phoP mutant. *Proteomics* 7, 2410–2429.
- Rowe, J.J., Yarbrough, J.M., Rake, J.B., and Eagon, R.G. (1979).** Nitrite inhibition of aerobic bacteria. *Current Microbiology* 2, 51–54.
- Ruddick, S.M., and Williams, S.T. (1972).** Studies on the ecology of actinomycetes in soil V. Some factors influencing the dispersal and adsorption of spores in soil. *Soil Biology and Biochemistry* 4, 93–103.
- Schirmer, R.H., Adler, H., Pickhardt, M., and Mandelkow, E. (2011).** Lest we forget you - methylene blue *Neurobiology of Aging* 32, 2325.e7–16.
- Schneider, D., Bruton, C.J., and Chater, K.F. (2000).** Duplicated gene clusters suggest an interplay of glycogen and trehalose metabolism during sequential stages of aerial mycelium development in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Molecular & General Genetics* 263, 543–553.
- Shao, Z., Gao, J., Ding, X., Wang, J., Chiao, J., and Zhao, G. (2011).** Identification and functional analysis of a nitrate assimilation operon *nasACKBDEF* from *Amycolatopsis mediterranei* U32. *Archives of Microbiology* 193, 463–477.
- Shimkets, L.J., and Brun, Y.V. (2000).** Prokaryotic Development: Strategies to Enhance Survival. In: Brun, Y.V., Shimkets, L.J. (eds) *Prokaryotic Development*. American Society for Microbiology, Washington, pp. 1-7.
- Shoun, H., Kano, M., Baba, I., Takaya, N., and Matsuo, M. (1998).** Denitrification by actinomycetes and purification of dissimilatory nitrite reductase and azurin from *Streptomyces thioluteus*. *Journal of Bacteriology* 180, 4413–4415.
- Silley, P., and Forsythe, S. (1996).** Impedance microbiology - a rapid change for microbiologists. *Journal of Applied Microbiology* 80, 233–243.
- Simon, J. (2002).** Enzymology and bioenergetics of respiratory nitrite ammonification. *FEMS Microbiology Reviews* 26, 285–309.
- Sivaramakrishnan, S., and Ortiz de Montellano, P.R. (2013).** The DosS-DosT/DosR Mycobacterial Sensor System. *Biosensors* 3, 259–282.
- Sohaskey, C.D. (2008).** Nitrate enhances the survival of *Mycobacterium tuberculosis* during inhibition of respiration. *Journal of Bacteriology* 190, 2981–2986.
- Sohoni, S.V., Bapat, P.M., and Lantz, A.E. (2012).** Robust, small-scale cultivation platform for *Streptomyces coelicolor*. *Microbial Cell Factories* 11: 9.
- Sola-Landa, A., Moura, R.S., and Martín, J.F. (2003).** The two-component PhoR-PhoP system controls both primary metabolism and secondary metabolite biosynthesis in *Streptomyces lividans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 6133–6138.
- van Spanning, R.J.M., Richardson, D.J., and Ferguson, S.J. (2007).** Introduction to the Biochemistry and Molecular Biology of Denitrification. In: Bothe, H., Ferguson, S.J., Newton, W.E. (eds) *Biology of the Nitrogen cycle*. 1st edn., Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 3-20.
- Stanier, R.Y. (1942).** Agar-Decomposing Strains of the *Actinomyces coelicolor* Species-Group. *Journal of Bacteriology* 44, 555–570.

- Stapel, E.E., and Verhoef, P.N.W. (1989).** The use of the methylene blue adsorption test in assessing the quality of basaltic tuff rock aggregate. *Engineering Geology* 26, 233–246.
- Swiercz, J.S., and Elliot, M.A. (2012).** *Streptomyces* Sporulation. In: Abel-Santos, E. (ed) *Bacterial Spores: Current Research and Applications*. Horizon Scientific Press, Norwich, U.K., pp. 39-55.
- Talbot, N.J. (2003).** Aerial morphogenesis: enter the chaplins. *Current Biology* 13, R696–698.
- Tarkka, M.T., Lehr, N.-A., Hampp, R., and Schrey, S.D. (2008).** Plant behavior upon contact with Streptomyces. *Plant signaling & behavior* 3, 917–919.
- Tengerdy, R.P., Nagy, J.G., and Martin, B. (1967).** Quantitative measurement of bacterial growth by the reduction of tetrazolium salts. *Applied Microbiology* 15, 954–955.
- Tielen, P., Schobert, M., Härtig, E., and Jahn, D. (2012).** Anaerobic Regulatory Networks in Bacteria In: Filloux, A.A.M. (ed) *Bacterial Regulatory Networks*. Caister Academic Press, Norfolk UK, pp. 273-305.
- Tiffert, Y., Supra, P., Wurm, R., Wohlleben, W., Wagner, R., and 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, 861–880.
- Tsao, S.W., Rudd, B.A., He, X.G., Chang, C.J., and 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, 128–131.
- Uden, G., Müllner, M., and Reinhart, F. (2009).** Sensing of Oxygen by Bacteria. In: Krämer, R., Jung, K. (eds) *Bacterial Signaling*. Wiley-VCH, Weinheim, pp. 289–305.
- Ur, A., and Brown, D.F. (1975).** Impedance monitoring of bacterial activity. *Journal of Medical Microbiology* 8, 19–28.
- Vobis, G., and Henssen, A. (1983).** Ultrastructure of tuberculate spores in *Streptomyces thermoviolaceus*. *Archives of Microbiology* 134, 295–298.
- Waksman, S.A. (1940).** On the Classification of Actinomycetes 1. *Journal of Bacteriology* 39, 549–558.
- Waksman, S.A., and Curtis, R.E. (1916).** The Actinomycetes of the soil. *Soil Science*, 1, 99-134.
- Waksman, S.A., and Henrici, A.T. (1943).** The Nomenclature and Classification of the Actinomycetes 1. *Journal of Bacteriology* 46, 337–341.
- Wang, J., and Zhao, G.-P. (2009).** GlnR positively regulates *nasA* transcription in *Streptomyces coelicolor*. *Biochemical and biophysical research communications* 386, 77–81.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., and Lane, D.J. (1991).** 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173, 697–703.
- White, D.C., Davis, W.M., Nickels, J.S., King, J.D., and Bobbie, R.J. (1979).** Determination of the sedimentary microbial biomass by extractable lipid phosphate. *Oecologia* 40, 51–62.
- Williams, S.T., Shameemullah, M., Watson, E.T., and Mayfield, C.I. (1972).** Studies on the ecology of actinomycetes in soil - VI. The influence of moisture tension on growth and survival. *Soil Biology and Biochemistry* 4, 215–225.
- Williams, S.T., Goodfellow, M., Alderson, G., Wellington, E.M., Sneath, P.H., and Sackin, M.J. (1983a).** Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *Journal of General Microbiology* 129, 1743–1813.
- Williams, S.T., Goodfellow, M., Wellington, E.M., Vickers, J.C., Alderson, G., Sneath, P.H., Sackin, M.J., and Mortimer, A.M. (1983b).** A probability matrix for identification of some Streptomyces. *Journal of General Microbiology* 129, 1815–1830.

- Woese, C.R. (1987).** Bacterial evolution. *Microbiological Reviews* 51, 221–271.
- Wright, L.F., and Hopwood, D.A. (1976).** Identification of the Antibiotic Determined by the SCP1 Plasmid of *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Journal of General Microbiology* 95, 96–106.
- Yagüe, P., López-García, M.T., Rioseras, B., Sánchez, J., and Manteca, A. (2013a).** Pre-sporulation stages of *Streptomyces* differentiation: state-of-the-art and future perspectives. *FEMS Microbiology Letters* 342, 79–88.
- Yagüe, P., Rodríguez-García, A., López-García, M.T., Martín, J.F., Rioseras, B., Sánchez, J., and Manteca, A. (2013b).** Transcriptomic analysis of *Streptomyces coelicolor* differentiation in solid sporulating cultures: first compartmentalized and second multinucleated mycelia have different and distinctive transcriptomes. *PLoS ONE* 8, e60665.
- Yukselen, Y., and Kaya, A. (2008).** Suitability of the methylene blue test for surface area, cation exchange capacity and swell potential determination of clayey soils. *Engineering Geology* 102, 38–45.
- Zheng, H., Wisedchaisri, G., and Gonen, T. (2013).** Crystal structure of a nitrate/nitrite exchanger. *Nature* 497, 647–651.
- Zumft, W.G. (1997).** Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61, 533–616.

Personal information

First name / Surname	Marco Fischer
Correspondance	Pfälzer Straße 13, 06108 Halle, Germany
Nationality and gender	German, male
Date of birth	September 17, 1982
Place of birth	Karl-Marx-Stadt (today Chemnitz), GDR

Professional Activities

Dates	November 2009 – currently
Occupation or position held	Scientific assistant
Main activities and responsibilities	Installation of a streptomycetes lab, assistance in teaching, mentoring BA- and MA- students
Name of employer	Martin-Luther-University, Institute of Biology/Microbiology, Halle, Germany
Dates	April – June 2009 and Mai 2008
Occupation or position held	graduate assistant with diploma certificate
Main activities and responsibilities	Assistance in practical courses for microbial food analysis
Name of employer	Martin-Luther-University Institute of Biology/Microbiology, Halle, Germany
Dates	July – September 2006 and May – July 2005
Occupation or position held	graduate assistant
Main activities and responsibilities	Tutorials to the professors basic lecture in general microbiology
Name of employer	Martin-Luther-University Institute of Biology/Microbiology, Halle, Germany

Academic qualification phases

Dates	Currently
Qualification phase	Doctoral candidate with the project "Anaerobic stress in the physiology of the strict aerobic actinobacteria <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)" in the group of Prof. Dr. Gary Sawers
Dates	September 2008 – December 2008
Qualification phase	International research stay
Name and type of institute	Lab of Dr. Matt Hutching, University of East Anglia (Norwich, UK)
Dates	April 2008 – October 2009
Qualification phase	State Scholar of Saxony-Anhalt (federal state of Germany) for initiating a streptomycetes research project
Dates	2002 – December 2007
Title of qualification awarded	Diploma
Principal subjects	Student of Biology main subject microbiology, subsidiary subjects genetic, biochemistry and biotechnology Diploma thesis " <i>Anreicherung von Dehalococcoides sp. Stamm DCMB5 unter Einbeziehung eines Dichtegradienten.</i> " in the group of Prof. Dr. Andreesen, Dr. Lechner
Name and type of institute	Martin-Luther-University Halle-Wittenberg

- **Publications and International Conference Contributions** -

Peer-reviewed publications

Fischer M, Sawers R.G. (2013). A Universally Applicable and Rapid Method for Measuring the Growth of *Streptomyces* and Other Filamentous Microorganisms by Methylene Blue Adsorption-Desorption. Appl. Environ. Microbiol., 79: 4499-4502.

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

Fischer M, Schmidt C, Falke D, Sawers RG. (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, 340–348

Fischer M, Alderson J, van Keulen G, White J, Sawers RG. (2010) The obligate aerobe *Streptomyces coelicolor* A3(2) synthesizes three active respiratory nitrate reductases. Microbiology, 156, 3166-79

Bunge M, Wagner A, Fischer M, Andreesen JR, Lechner U. (2008) Enrichment of a dioxin-dehalogenating *Dehalococcoides* species in two-liquid phase cultures. Environ. Microbiol., 10, 2670-83

Conference contributions - Oral presentations

Fischer M, Sawers RG. “Developmental Control of Respiratory Nitrate Metabolism in *Streptomyces coelicolor*” Conference: Actinobacteria within soils, Münster 2012

Fischer M, Sawers RG. “Characterization of Nitrate Respiration in the Genus *Streptomyces*” Conference: VAAM Annual Conference, Hannover 2010

Fischer M, van Keulen G, Alderson J, White J and Sawers RG. “Regulation of nitrate reductase synthesis in *Streptomyces coelicolor*” Conference: Biology of Streptomycetes, Münster 2009

Conference contributions - Poster

Fischer M, Falke D and Sawers RG. “Anaerobic Nitrate Respiration in resting spores of the aerobe *Streptomyces coelicolor*” Conference: How dead is dead II, Tübingen September 2011

Fischer M, Falke D and Sawers RG. “Dormant spores of *Streptomyces coelicolor* harbor an active respiratory nitrate reductase” Conference: VAAM Annual Conference, Karlsruhe März 2011

Fischer M, Falke D and Sawers RG. “Nitrate Reductase 3 activity correlates with the onset of secondary Metabolism in *Streptomyces coelicolor* A3(2)” VAAM Workshop Biology of Bacteria Producing Natural Products, Tübingen September 2010

Fischer M, Alderson J, van Keulen G, Sawers G. “Differential Expression of *nar*-genes encoding Respiratory Nitrate Reductase in *Streptomyces coelicolor*” Conference: VAAM Annual Conference, Bochum 2009

Fischer M., A. Wagner, and U. Lechner. „Enrichment of *Dehalococcoides* sp. strain DCMB5 using centrifugation on a Percoll density gradient.“ Conference: VAAM Annual Conference, Frankfurt, März 2008

- Danksagung -

In erster Linie danke ich Herrn Prof. Dr. Gary Sawers für sein stetiges mir entgegengebrachtes Vertrauen bei der Arbeit am Streptomyceten-Projekt. Insbesondere sein grundlegendes Verständnis für die zeitaufwendige Konzeptionierung neuer Lösungsansätze im Zusammenhang mit denen mir zum Projekt gereichten Aufgabenstellungen, verdient ein Dankeschön. Auch wenn ihm sicherlich nicht alle kleinteiligen Lösungsansätze auf Anhieb zweckdienlich erschienen und vieles – insbesondere was die Kultivierung betrifft – noch nicht alle erwarteten Erfolge erbrachte, so war es wohl doch nur in einer derartig guten und vertrauensvollen Atmosphäre der Betreuung möglich, die anaerobe Untersuchung von obligat aeroben Bakterien in eine erfolgsversprechende Bahn zu lenken.

Lieber Gary, dein Gespür, mich am Beginn deiner hallischen Professur von den vielen zur Verfügung stehenden Themen, auf eben dieses Projekt anzusetzen, war im Nachhinein wohl genau richtig. Denn, obwohl ich so manches Mal an der komplexen Biologie von Streptomyceten zu verzweifeln drohte, so konnte ich wohl gerade dadurch meine forschersische Kreativität ausleben, die bei klar strukturierten Projekten häufig nicht gefragt ist.

Ein zweiter großer Dank geht an die gesamte bunte Truppe der Doktoranden und Diplomanden/Master, die stets für gute Stimmung im Haus sorgten, auch und insbesondere in den späten Stunden der experimentellen Nachtschichten. Mit vielen von Euch bin ich mittlerweile freundschaftlich verbunden. Für den zweiten Abschnitt meiner Promotion ist dabei auf jeden Fall Dörte Falke hervorzuheben. Ich wünsche mir für die Zukunft, dass ich stets mit so unkomplizierten und fähigen Leuten zusammenarbeiten darf.

Liebe Dörte, Danke für die tolle, produktive und freundschaftliche Zeit als unzertrennliches Streptomycetenteam des Labors 202; Probleme schweißen eben zusammen.

Herrn Prof. Dr. Wohlleben und Prof. Dr. Deising danke ich für die Übernahme der Zweit- und Drittgutachten. Dr. Erhard Jöx danke ich für die angenehmen Gespräche über Technik und über all die Fragen, die die Welt bewegen. PD Dr. Ute Lechner danke ich dafür, dass ich mich auch nach meiner Diplomarbeit stets mit wissenschaftlichen und organisatorischen Fragen an sie wenden konnte.

Des Weiteren danke ich meinen privaten Freunden und natürlich meinen Familienangehörigen. Auch wenn einige von Euch die Fertigstellung meiner Arbeit nicht mehr miterleben konnten, seit euch gewiss, dass ich eure Unterstützung stets zu schätzen wusste und meine Wurzeln der Herkunft nie vergessen werde.

- Eidesstattliche Erklärung -

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die eingereichte Doktorarbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt habe und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle, den

.....

Marco Fischer