

**Für Laura**

**Biochemische Charakterisierung  
des O<sub>2</sub>-Sensors NreB aus  
*Staphylococcus carnosus***

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität  
in Mainz

vorgelegt von

**Martin Müllner**

geb. am 08.06.1978 in Konstanz

Mainz, Mai 2008

Tag der mündlichen Prüfung: 27.06.2008

<b>1. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2. EINLEITUNG.....</b>	<b>2</b>
<b>3. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>10</b>
3.1 Verwendete Stämme .....	10
3.1.1 Stämme von <i>Staphylococcus carnosus</i> .....	10
3.1.2 Stämme von <i>Escherichia coli</i> .....	10
3.1.3 Stammhaltung .....	11
3.2 Medien und Anzucht .....	11
3.2.1 Medien zur Anzucht von <i>S. carnosus</i> .....	11
3.2.2 Medien zur Anzucht von <i>E. coli</i> .....	14
3.2.3 Antibiotika Stammlösungen .....	15
3.2.4 Lösungen zur Induktion.....	15
3.2.5 Anzucht von <i>S. carnosus</i> m1 unter aeroben Bedingungen .....	15
3.2.6 Anzucht von <i>S. carnosus</i> m1 bei anschließender anaerober Inkubation .....	16
3.2.7 Anzucht von <i>S. carnosus</i> m1 unter eisenarmen Bedingungen.....	16
3.2.8 Anzucht von <i>S. carnosus</i> unter anaeroben Bedingungen.....	16
3.2.9 Anzucht von <i>E. coli</i> BL21DE3 (pNifS) zur Präparation von NifS <sub>AV</sub> .....	17
3.3 Biochemische Methoden .....	17
3.3.1 Bestimmung von Nitrit .....	17
3.3.2 Bestimmung von säure-labilem Sulfid.....	18
3.3.3 Bestimmung von komplexiertem Eisen in biologischen Proben.....	20
3.3.4 Synthese einer FeCl <sub>2</sub> -Lösung aus <sup>57</sup> Fe.....	21
3.3.5 Synthese des Mohr'schen Salzes aus <sup>57</sup> Fe-Metallpulver .....	21
3.3.6 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford .....	22
3.3.7 SDS-PAGE zur Separation von Proteinen.....	22
3.3.8 Western-Blot und Antikörper-Färbung .....	24
3.3.9 Anreicherung von NifS <sub>AV</sub> .....	26
3.3.10 Präparation von NreB unter aeroben Bedingungen.....	27
3.3.11 Rekonstitution von NreB .....	28
3.3.12 Präparation von NreB unter anaeroben Bedingungen .....	30
3.3.13 Reinigung von Nickel-NTA-Säulen .....	31
3.3.14 Reinigung von Gelfiltrationssäulen.....	32
3.3.15 Reduktion von anaerob präpariertem NreB .....	32
3.3.16 Luftexposition von anaerob präpariertem NreB.....	34
3.3.17 Messung der Autophosphorylierung von NreB .....	34
3.4 Molekularbiologische Methoden .....	36
3.4.1 Isolation genomischer DNA aus <i>S. carnosus</i> .....	36
3.4.2 Plasmid Mini-Präparation aus <i>E. coli</i> und <i>S. carnosus</i> .....	37
3.4.3 Agarosegel-Elektrophorese .....	37
3.4.4 Restriktion von DNA-Molekülen .....	38
3.4.5 Ligation von DNA-Molekülen.....	39
3.4.6 Konzentrationsbestimmung von DNA-Molekülen.....	39
3.4.7 Sequenzierung von DNA-Molekülen.....	39
3.4.8 Protoplastentransformation von <i>S. carnosus</i> .....	40
3.4.9 Elektrotransformation von <i>S. carnosus</i> .....	43
3.4.10 Elektrotransformation von <i>E. coli</i> .....	44
3.4.11 Konstruktion der Vektors pET28a nreB.....	44
3.4.12 Konstruktion des Vektors pRB473nreABC.....	45
3.4.13 Gerichtete Mutagenese der Cysteinreste von NreB .....	47
3.5 Geräte .....	49

3.6 Chemikalien .....	50
3.7 Internetadressen .....	51
<b>4. ERGEBNISSE .....</b>	<b>52</b>
4.1 Optimierung der Präparation von NreB .....	52
4.1.1 Optimierung der Überexpression von NreB .....	52
4.1.2 Etablierung einer anaeroben Präparations-Methode für NreB .....	53
4.2 Charakterisierung der anaeroben Form von NreB.....	55
4.2.1 Spektrale Eigenschaften.....	55
4.2.2 Präparation von NreB für die Mössbauer-Spektroskopie .....	57
4.2.3 Untersuchung des FeS-Zentrums mit Mössbauer-Spektroskopie .....	60
4.2.4 Untersuchung des FeS-Zentrums mit EPR-Spektroskopie .....	65
4.3 Luftexposition der anaeroben Form von NreB .....	70
4.3.1 Änderungen im UV/Vis-Spektrum .....	70
4.3.2 Auswirkung der Luftexposition auf die Kinaseaktivität von NreB.....	71
4.3.3 EPR- und Mössbauer-Spektren von anaerobem NreB nach Luftexposition.....	73
4.4 Rekonstitution des [4Fe-4S] <sup>2+</sup> -Zentrums in apoNreB.....	77
4.4.1 Eigenschaften von rekonstituiertem NreB.....	77
4.4.2 Synthese des Mohr'schen Salzes aus <sup>57</sup> Fe-Metallpulver .....	79
4.4.3 Mössbauer-Spektren von rekonstituiertem NreB.....	81
4.4.4 Autophosphorylierungsaktivität von rekonstituiertem NreB .....	83
4.5 Luftexposition von rekonstituiertem NreB.....	84
4.5.1 Änderungen im UV/Vis-Spektrum .....	84
4.5.2 Änderungen im Mössbauer-Spektrum .....	85
4.6 Funktionsstudien zu NreB <i>in vivo</i> .....	87
4.6.1 Komplementation von <i>S. carnosus</i> m1.....	87
4.6.2 Eigenschaften von NreB-Cysteinmutanten .....	88
<b>5. DISKUSSION .....</b>	<b>91</b>
5.1 Redoxeigenschaften des [4Fe-4S] <sup>2+</sup> -Zentrums von NreB .....	91
5.2 Reaktion des [4Fe-4S] <sup>2+</sup> -Zentrums von NreB auf Luftexposition.....	92
5.3 Eigenschaften der Sensor-Domäne von NreB .....	94
5.4 Ähnlichkeit der Sensor-Domäne von NreB zu bakteriellen PAS-Domänen.....	99
5.5 NreB ist ein neuer FeS-haltiger O <sub>2</sub> -Sensor .....	104
5.6 Systeme zur Biosynthese von FeS-Zentren in <i>S. aureus</i> RF122.....	107
5.7 Abschließendes Arbeitsmodell zum NreBC Zwei-Komponentensystem.....	108
<b>6. LITERATUR .....</b>	<b>110</b>
<b>7. VERÖFFENTLICHUNGEN.....</b>	<b>120</b>
<b>8. ANHANG.....</b>	<b>121</b>

---

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-Triphosphat
BC	<i>Bacillus clausii</i>
BJ	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
BM	Basic-Medium
BSA	Bovine Serum Albumin
Cam	Chloramphenicol
cAMP	cyclisches Adenosin-Monophosphat
cGMP	cyclisches Guanosin-Monophosphat
CRP	cAMP receptor protein
Cys	Cystein
DMPD	N,N'-Dimethyl-p-phenylendiamin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleotid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EC	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPR	Electron Pramagnetic Resonance
Ery	Erythromycin
FAD	Flavin Adenin Dinukleotid
FNR	Fumarat-Nitrat-Reduktase-Regulator
H <sub>2</sub> O <sub>Dest.</sub>	Destilliertes Wasser
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Kb	Kilo Basen
kDa	Kilo Dalton
LB	Luria-Bertani
MCP	Methyl-akzeptierendes Chemotaxis Protein
min	Minuten
MOPS	N-Morpholino Propansulfonsäure
M <sub>r</sub>	relative Atommasse

MT	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NaP <sub>i</sub>	Natriumphosphat anorganisch
NEM	N-Ethylmaleinimid
Nre	Nitrogen regulation
OD	Optische Dichte
PAB	Penassy Broth
PAC	<u>P</u> AS- <u>a</u> ssociated <u>C</u> -terminal
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDE	Phosphodiesterase
RT	Raumtemperatur
SC	<i>Staphylococcus carnosus</i>
SDS-PAGE	Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SMM	Saccharose Maleinsäure MgCl <sub>2</sub>
SMMP-B	Saccharose Maleinsäure MgCl <sub>2</sub> PAB-BSA
Tab.	Tabelle
TAE	Tris Acetat EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
U/min	Umdrehungen pro Minute
ÜNK	Über Nacht Kultur
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht (weight) pro Volumen
WT	Wildtyp

## 1. Zusammenfassung

*Staphylococcus carnosus* wird in der Lebensmittelindustrie als Starterkultur in der Rohwurstfermentation eingesetzt. Das Gram-positive Bakterium ist fakultativ anaerob und kann unter anaeroben Bedingungen Nitrat und Nitrit zu Ammonium reduzieren. Die Expression der Gene der Nitrat-, Nitritreduktase und des potentiellen Nitrattransporters, wird vom NreBC Zwei-Komponentensystem reguliert. NreB ist eine cytoplasmatische Sensor-Histidinkinase, die Ähnlichkeiten zu HämB-bindenden PAS-Domänen aufweist. NreB reagiert auf Sauerstoff und kontrolliert zusammen mit dem Response-Regulator NreC die Expression der Gene der Nitrat/Nitrit-Atmung.

Die Gene *nreBC* wurden in *Staphylococcus* Arten, *Bacillus clausii* und anderen *Bacillus* Arten gefunden. Anaerob präpariertes NreB von *S. carnosus* enthält ein diamagnetisches  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum, das durch Mössbauer-Spektroskopie identifiziert wurde. Nach Luftexposition wurde das  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum mit einer Halbwertszeit von 2,5 Minuten zu nicht an das Protein gebundenem  $\gamma\text{-FeOOH}$  oxidiert. Mit EPR- und Mössbauer-Spektroskopie konnten keine signifikanten Mengen von Zwischenstufen detektiert werden. Photoreduktion mit Deazaflavin lieferte kleine Mengen von  $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ , die aber nicht stabil waren und sofort wieder zerfielen. Das magnetische Mössbauer-Spektrum des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums wies eine hohe Symmetrie auf, woraus man auf eine vollständige Delokalisation der Elektronen und dieselben Liganden für alle Eisenionen schließen kann.

In Übereinstimmung mit ihrer Rolle als Liganden des FeS-Zentrums inaktivierte der Austausch der einzelnen Cysteinreste (Cys59, Cys62, Cys74, Cys77) gegen Alanin oder Serin die Funktion von NreB *in vivo*. Die  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -enthaltende Form von NreB besaß eine hohe Kinaseaktivität. Luftexposition erniedrigte den Gehalt an  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum und die Kinaseaktivität mit ähnlichen Halbwertszeiten von 2,5 min.

Die Sensor-Domäne von NreB ist eine neuartige PAS-Domäne, die einen FeS-haltigen Co-Faktor (in diesem Fall ein  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum) zur Reizperzeption besitzt. Das  $\text{O}_2$ -sensitive  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum von NreB ist dem  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum des DNA-bindenden FNR Proteins aus *Escherichia coli* ähnlich und kommt möglicherweise in anderen  $\text{O}_2$ -wahrnehmenden bakteriellen Proteinen vor. Daraus kann man schließen, dass der Mechanismus der Sauerstoffwahrnehmung über  $\text{O}_2$ -sensitive  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentren in der Evolution mehrfach und unabhängig voneinander in verschiedenen bakteriellen  $\text{O}_2$ -Sensoren entstanden ist.



## 2. Einleitung

### 2.1 O<sub>2</sub>-Sensoren von Bakterien

Bakterien besitzen eine sehr hohe Anpassungsfähigkeit, mit der sie sich an unterschiedlichste Umweltbedingungen adaptieren können. Zu diesem Zweck haben sie Sensorsysteme, mit denen sie die Umgebung und Änderungen in der Umgebung wahrnehmen und den Stoffwechsel und die Zellzusammensetzung darauf abstimmen. Dadurch kann die Zelle beispielsweise auf den pH-Wert, den Sauerstoffpartialdruck, die Nährstoffverfügbarkeit, die Osmolarität und viele andere Eigenschaften der Umgebung reagieren. Die Sensorsysteme der Bakterien gehören oft zu den „Zweikomponenten-Regulationssystemen“ und bestehen aus einem membranständigen Sensorprotein und einem im Cytoplasma lokalisierten Regulator. Der Sensor erkennt Umweltreize und leitet das empfangene Signal über die Membran zum Regulator. Das Regulatorprotein aktiviert und reguliert die Genexpression.

In dem Darmbakterium *Escherichia coli* sind zahlreiche dieser Sensorsysteme bekannt. *E. coli* ist fakultativ anaerob und kann mit (aerob) oder ohne (anaerob) Sauerstoff Stoffwechsel betreiben. Dabei konserviert *E. coli* über die aerobe Atmung, die anaerobe Atmung (z.B. mit Nitrat) oder durch Fermentation Energie. Die Nutzung der Stoffwechselwege unterliegt einer Hierarchie, wobei die aerobe Atmung gegenüber der anaeroben Atmung und diese gegenüber der Fermentation bevorzugt wird (Guest *et al.*, 1995; Unden und Trageser, 1991).

Es wurden O<sub>2</sub>-Sensoren identifiziert die diese Hierarchie aufrechterhalten, indem sie die Anwesenheit von Sauerstoff überwachen und das „Umschalten“ zwischen aeroben und anaeroben Stoffwechsel koordinieren (Sawers, 1999). Die große Anzahl bekannter O<sub>2</sub>-Sensoren reflektiert ihre immense Bedeutung für die bakterielle Zellfunktion. Die verschiedenen bakteriellen O<sub>2</sub>-Sensoren verwenden jegliche redoxsensitive Gruppe zur O<sub>2</sub>-Wahrnehmung, wie z.B. [4Fe-4S]-Zentren (FNR), Thiole/Disulfide (FLP), FAD (Aer-, NifA-Sensoren), HämC (Dsr) oder HämB (FixL-Sensor).

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Aufklärung der Funktionsweise eines neuen bakteriellen Eisen-Schwefel-haltigen O<sub>2</sub>-Sensors, dem Sauerstoffsensor-Protein NreB aus *Staphylococcus carnosus*.

## 2.2 FeS-Zentren in Proteinen

FeS-Zentren sind Cofaktoren vieler Proteine und kommen ubiquitär in allen Organismen vor. Sie übernehmen unter anderem Funktionen im Elektronentransport oder in der Katalyse von Stoffwechselreaktionen (Johnson *et al.*, 2005). In O<sub>2</sub>-Sensoren besitzt das FeS-Zentrum jedoch eine sensorische Funktion.

FeS-Zentren bestehen nur aus Eisen- und Sulfidionen, die meist über Cysteinreste an das Protein gebunden werden. Die häufigsten Typen von FeS-Zentren sind [1Fe]- (Rubredoxintyp), [2Fe-2S]- (Rieske Protein), [3Fe-4S]- (Aconitase) und [4Fe-4S]- (Ferredoxin) Zentren (Abb. 1).

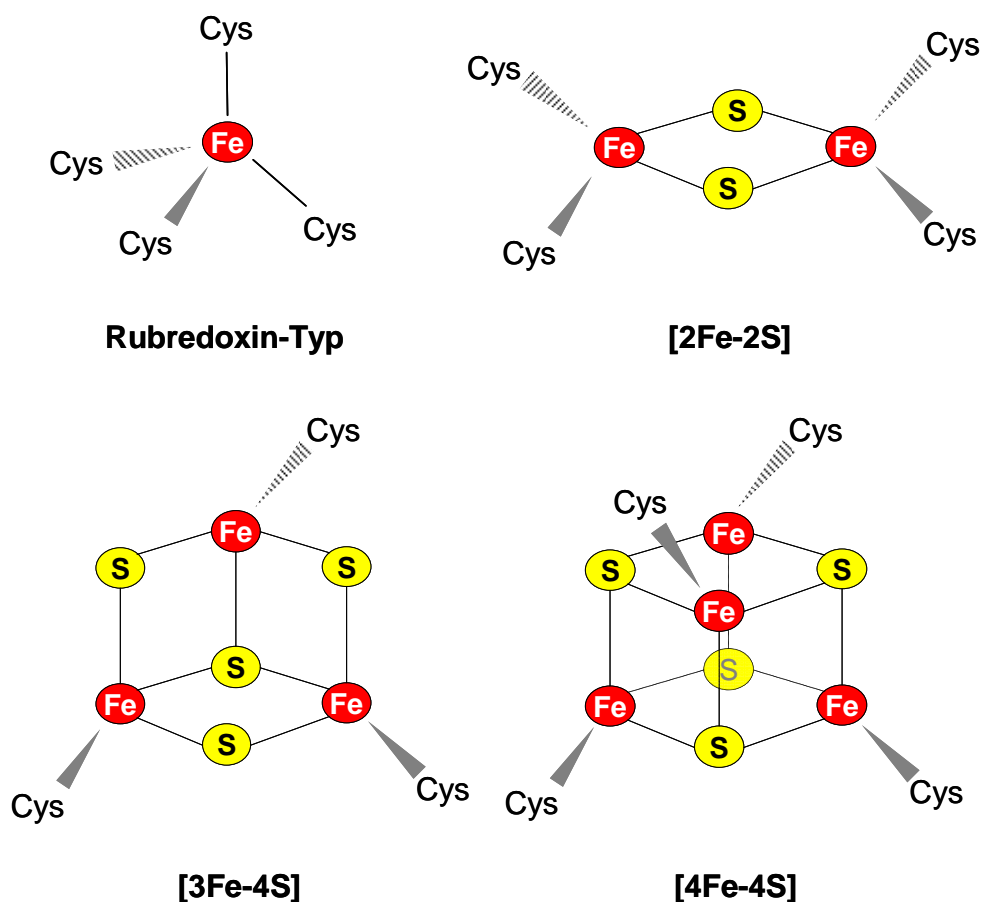


Abb. 1: Koordination von Eisen und Sulfid in den vier einfachsten FeS-Zentren von Proteinen (Kiley *et al.*, 2003).

Die Proteinumgebung hat einen großen Einfluss auf die Redox-Eigenschaften der FeS-Zentren. Die Redoxpotentiale können von +360 bis -600 mV variieren, was auch

erklärt, warum sie im Elektronentransport eine große Rolle spielen (Kiley *et al.*, 2003; Beinert 2000, Hughes und Poole, 1989).

Die FeS-Zentren müssen nicht immer über Cysteine an das Protein gebunden werden, es können auch andere Aminosäurereste an der Bindung beteiligt sein. Das [2Fe-2S]-Zentrum des Rieske-Proteins wird über zwei Histidine und zwei Cysteine gebunden (Mason *et al.*, 1992) und das [4Fe-4S]-Zentrum in Ferredoxin aus *Pyrococcus furiosus* wird über drei Cysteine und einen Aspartatrest gebunden (Zhou *et al.*, 1997). Anstelle von Aspartat kann auch Glutamat als Ligand dienen. Weiterhin können auch exotischere Moleküle an der Bindung des Eisenschwefelzentrums beteiligt sein. Die Aconitase und die Coproporphyrinogen III Oxidase besitzen beide ein [4Fe-4S]-Zentrum, das über drei Cysteine gebunden wird. Der fehlende vierte Ligand ist im ersten Fall H<sub>2</sub>O (Robinson *et al.*, 1989) und im zweiten Fall S-Adenosyl-Methionin (Layer *et al.*, 2003).

Die Bildung von biologischen FeS-Zentren kann in einigen apo-Formen von [2Fe-2S]- und [4Fe-4S]-haltigen Proteinen *in vitro* aktiviert werden. Die dafür benötigten Mengen an S<sup>2-</sup> und Fe<sup>2+/3+</sup> sind jedoch toxisch für die Zelle (Johnson *et al.*, 2005). Die Biosynthese von FeS-Zentren *in vivo* erfordert daher eine komplexe Enzymmaschinerie. Bis jetzt wurden drei FeS-Biosynthese-Systeme gefunden: Nif (nitrogen fixation), Isc (iron-sulfur-cluster formation) und Suf (sulfur utilization factor). Alle Systeme bestehen aus einer Cystein-Desulfurase (NifS<sub>AV</sub>, IscS<sub>EC</sub>, SufS<sub>EC</sub>) und einem [FeS]-Gerüst-Protein (NifU<sub>AV</sub>, IscU<sub>EC</sub> und SufU<sub>EC</sub>). Die Cystein-Desulfurase mobilisiert Sulfid aus Cystein und das FeS-Zentrum wird zunächst in dem [FeS]-Gerüst-Protein assembliert, das dann das FeS-Zentrum auf entsprechende Zielproteine überträgt.

### **2.3 FNR, ein [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-haltiger O<sub>2</sub>-Sensor aus *E. coli***

FNR (Fumarat-Nitrat-Reduktase-Regulator) von *Escherichia coli* ist der am besten charakterisierte bakterielle O<sub>2</sub>-Sensor. Er ist im Cytoplasma lokalisiert und besteht im Gegensatz zu anderen Sensorsystemen nur aus einer Komponente, welche Sensor- und Regulatorfunktion in sich vereint.

Unter anaeroben Bedingungen ist FNR ein Dimer und besitzt als prosthetische Gruppe ein sauerstofflabiles [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Zentrum pro Monomer, das über vier Cysteinreste an das Protein gebunden ist (Abb. 2). In diesem Zustand wirkt FNR•[4Fe-4S] als Transkriptionsaktivator seiner Zielgene und kontrolliert die Expression der Gene der Fumarat- und Nitrat-Reduktase und vieler anderer Gene, die für den anaeroben Me-

tabolismus benötigt werden. Weiterhin wirkt  $\text{FNR}\cdot[4\text{Fe-4S}]$  inhibierend auf die Expression von Genen, die für den aeroben Stoffwechsel gebraucht werden (Unden und Trageser, 1991; Guest 1992).

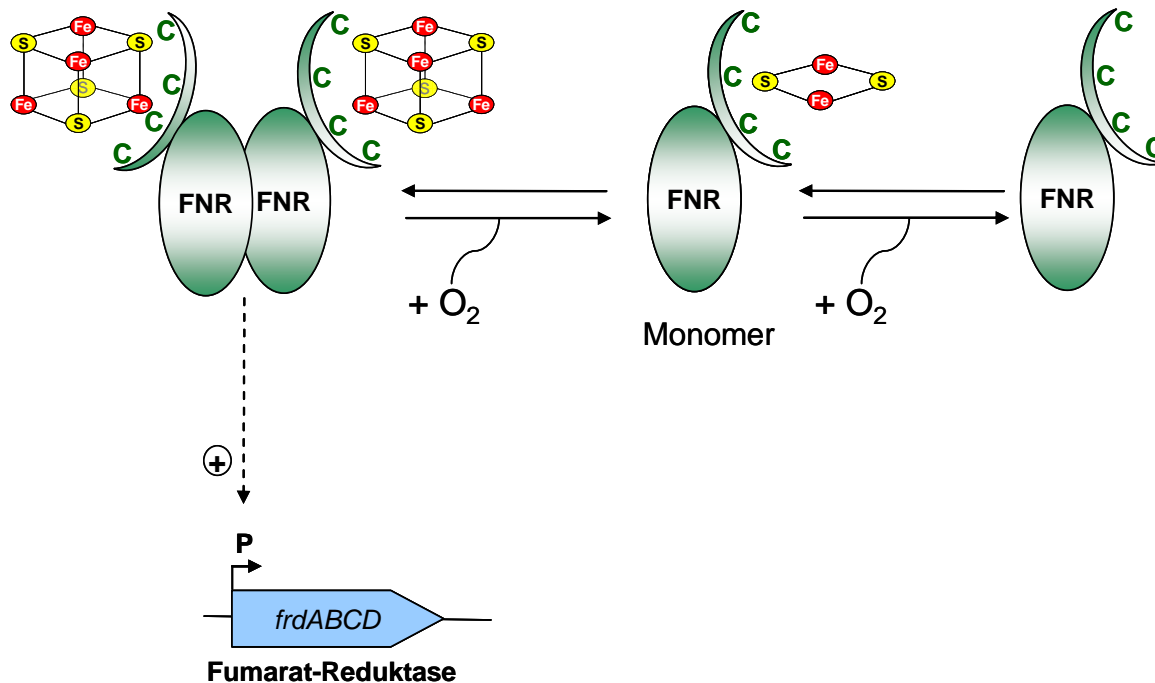


Abb. 2: **FNR, ein  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -haltiger  $\text{O}_2$ -Sensor und Transkriptionsregulator aus *E. coli*.** Unter anaeroben Bedingungen ist FNR ein Dimer mit je einem  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum pro Monomer. In diesem Zustand ist der Transkriptionsregulator aktiv und stimuliert die Expression von Genen, die unter Anaerobiose benötigt werden (z. B. die Fumarat-Reduktase). Unter Sauerstoffexposition zerfällt das  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum über die Zwischenstufe eines  $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ -Zentrums, was mit dem Zerfall des Dimers und dem Verlust der DNA-Bindeaktivität einhergeht. Dieses Modell basiert auf der Arbeit der Arbeitsgruppen Kiley & Beinert, Green & Guest, Gunsalus & Unden (siehe Literatur).

Der Mechanismus der Sauerstoffwahrnehmung basiert auf der  $\text{O}_2$ -Sensitivität dieses FeS-Zentrums. Unter aeroben Bedingungen diffundiert  $\text{O}_2$  ins Cytoplasma der Zelle und reagiert mit dem FeS-Zentrum von FNR (Unden und Schirawski, 1997). Die Anwesenheit von  $\text{O}_2$  führt zur Degradation des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ - in ein  $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ -Zentrum (< 5 min) und zur Inaktivierung des FNR-Proteins. Das  $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ -Zentrum zerfällt nach weiterer Sauerstoffexposition (< 5 min) vollständig, und in der Folge entsteht apoFNR ohne FeS-Zentrum (Reinhart *et al.*, 2007; Green *et al.*, 1996; Lazazerra *et al.*, 1996; Jordan *et al.*, 1997; Khoroshilova *et al.*, 1997; Popescu *et al.*, 1998).

FNR-homologe Proteine, die ebenfalls ein FeS-Zentrum enthalten, sind in Gram-negativen und Gram-positiven Bakteriengruppen zu finden (Green *et al.*, 2001; Körner *et al.*, 2003). Bei der großen und medizinisch bedeutenden Gruppe der Staphylokok-

ken wurden bisher noch keine FNR-homologen Proteine gefunden (Throup *et al.*, 2001; Fedtke *et al.*, 2002) und ein O<sub>2</sub>-Sensor wartet auf seine Entdeckung.

#### **2.4 NreB: Ein neuer FeS-haltiger O<sub>2</sub>-Sensor aus *Staphylococcus carnosus***

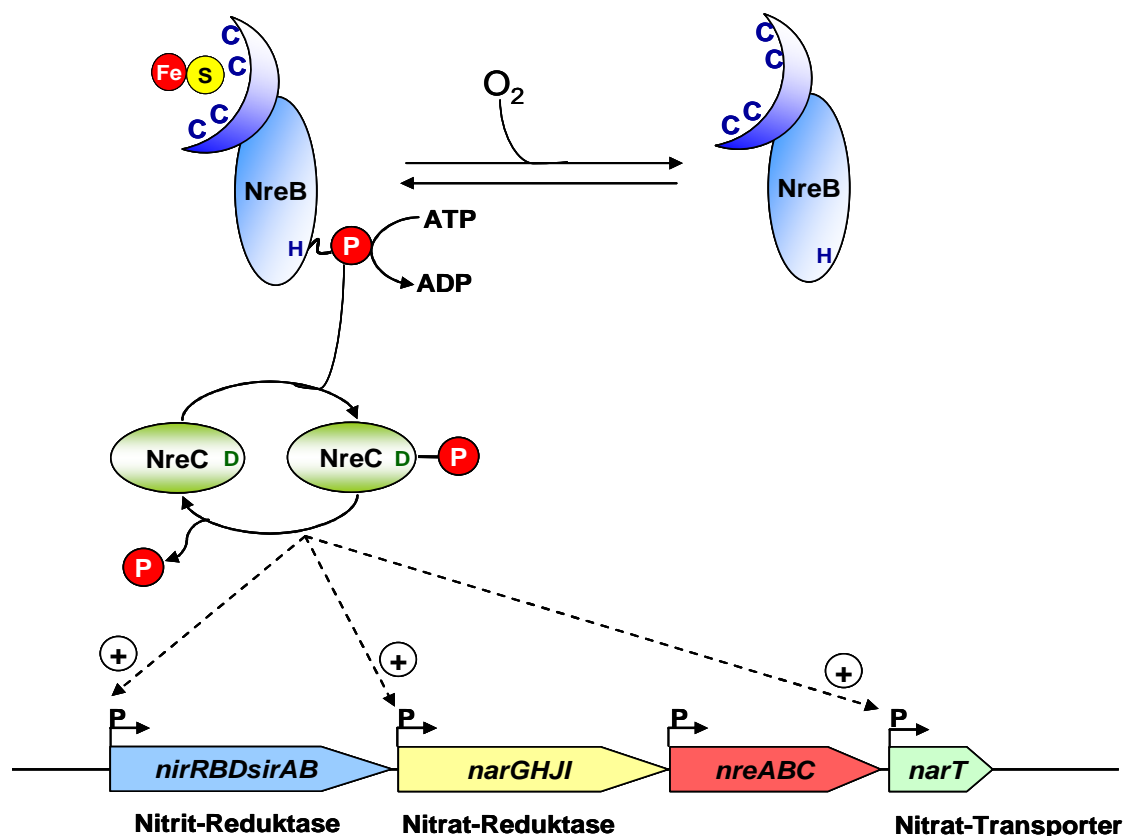
*Staphylococcus carnosus* wird als Starterkultur zur Rohwurstherstellung (z.B. Salami) in der Lebensmittelindustrie eingesetzt. Das Gram-positive Bakterium ist fakultativ anaerob und kann unter anaeroben Bedingungen Energie für seinen Stoffwechsel aus der Reduktion von Nitrat und Nitrit beziehen. Vor kurzem wurden die Gene für die dissimilatorische Nitrat-Reduktase *narGHJI* (Pantel *et al.*, 1998) und die NADH-abhängige Nitrit-Reduktase *nirBD* (Neubauer *et al.*, 1999) identifiziert. In *E. coli* und *Bacillus subtilis* wird die Expression dieser Gene unter anaeroben Bedingungen von FNR-Proteinen reguliert (Klinger *et al.*, 1998; Stewart, 1988; Wu *et al.*, 1998; Cruz Ramos *et al.*, 2000). In *S. carnosus* wurde das *nreABC*-Operon identifiziert, das ein neues Zwei-Komponentensystem NreBC enthält. Dies stimuliert in Abwesenheit von O<sub>2</sub> die Expression des Nitrat- und Nitrit-Reduktase Operons, und des *narT* Gens, welches für einen Nitrat-Nitrit Antiporter kodiert (Fedtke *et al.*, 2002; Fast *et al.*, 1996). Eine *nreABC*-Deletionsmutante von *S. carnosus* kann weder Nitrat noch Nitrit reduzieren und weist einen Wachstumsdefekt auf. Die Transkription des *narT* Gens, der *narGHJI* und *nir* Gene ist selbst unter anaeroben Bedingungen in Gegenwart von Nitrat und Nitrit in dieser Mutante reduziert. Dagegen wird das *nreABC*-Operon, wie man es für ein regulatorisches System vermuten würde, konstitutiv exprimiert (Fedtke *et al.*, 2002).

NreA enthält eine GAF-Domäne (Aravind und Ponting, 1997) und es wurde vermutet, dass das Protein an der Erkennung von Nitrat und Nitrit beteiligt ist (Fedtke *et al.*, 2002). In einer *nreA*-Deletionsmutante werden unter aeroben Bedingungen die *narT*, *narGHJI* und *nir* Gene verstärkt exprimiert. Eine Überexpression von *nreA* unter aeroben Bedingungen im *S. carnosus* Wildtyp führte zur Reprimierung derselben Gene (Steffen Schlag, unveröffentlicht).

NreC wird *in vitro* unter anaeroben Bedingungen von NreB phosphoryliert und bindet dann spezifisch an die GC-reichen palindromischen Sequenzen der Promotoren von *narGHJI*, *nir* und *narT* (Fedtke *et al.*, 2002).

Die Sensor-Histidinkinase NreB besitzt eine N-terminale sensorische Domäne, die vier Cysteinreste enthält, und eine C-terminale Histidinkinase Domäne. In NreB, das unter aeroben Bedingungen isoliert wurde, kann mit der gleichen Methode, die auch

für FNR verwendet wurde (Tran *et al.*, 2000), ein FeS-Zentrum eingebaut werden (Kamps *et al.*, 2004). Die Assemblierung des FeS-Zentrums erfolgt unter anaeroben Bedingungen in der Gegenwart von  $\text{Fe}^{2+}$ , Cystein (als Quelle für Sulfid) und NifS<sub>AV</sub>. NifS<sub>AV</sub> ist eine Cystein-Desulfurase, die Cystein desulfuriert und zu Alanin und Sulfid umsetzt. Die Bildung des FeS-Zentrums konnte mit spektroskopischen Methoden durch eine zunehmende Absorption bei 420 nm beobachtet werden. Zugabe von  $\text{O}_2$  führte zur Umkehrung der Reaktion. Inaktivierung der Cysteinreste durch Alkylierung mit N-Ethylmaleinimid oder durch Mutation einer der vermuteten Cystein Liganden führte zur kompletten Inhibierung der Rekonstitution (Kamps *et al.*, 2004). *In vitro* funktioniert das Protein als Histidinkinase, deren Aktivität von anaeroben Bedingungen, der Assemblierung eines FeS-Zentrums und der Verfügbarkeit von Eisen abhängt. Aus diesen vorläufigen Ergebnissen und Analogieschlüssen zu FNR wurde das folgende Arbeitsmodell abgeleitet (Abb. 3).



**Abb. 3: Arbeitsmodell zur Funktion des NreBC Zwei-Komponentensystems von *S. carnosus*.** NreB ist eine Sensor-Histidinkinase, die eine N-terminale sensorische Domäne mit vier konservierten Cysteinresten besitzt. NreC ist der korrespondierenden Response-Regulator und weist ein „Helix-Turn-Helix“ DNA-Bindungs-Motiv auf. Unter aeroben Bedingungen ist das System inaktiv und wird durch den Wechsel zu anaeroben Bedingungen aktiviert. Unter anaeroben Bedingungen enthält NreB ein FeS-Zentrum, das vermutlich über vier Cysteinreste gebunden wird, und besitzt eine hohe Autophosphorylierungsaktivität. NreB•[FeS] wird phosphoryliert und transferiert die Phosphatgruppe auf den Aspartatrest von NreC. Dadurch wird NreC aktiviert und bindet an die Promotorregionen der Nitrit- und Nitrat-Reduktase und des potentiellen Nitrat-Transporters.

Unter aeroben Bedingungen ist NreB inaktiv und wird durch den Wechsel zu Anaerobiose aktiviert. Im aktiven Zustand enthält NreB ein bisher nicht näher identifiziertes FeS-Zentrum, das wahrscheinlich über die vier konservierten Cysteinreste an das Protein gebunden wird. Die Bindung des FeS-Zentrums stimuliert die Autophosphorylierungsaktivität, was zur Phosphorylierung des konservierten Histidinrests (159) führt. In einer Transphosphorylierungsreaktion wird der Phosphatrest auf den Aspartatrest des Response-Regulators NreC übertragen. Dadurch wird NreC als Transkriptionsfaktor aktiviert und bindet an die Promotorregionen des *nir*- und *nar*- Operons und an die Promotorregion von *narT*.

## 2.5 Ziele der Arbeit

NreB hat in der Funktion als Sauerstoffsensor viele Ähnlichkeiten zu FNR. Die Aktivität von FNR, und vermutlich auch von NreB, ist an die Bildung eines FeS-Zentrums unter anaeroben Bedingungen gekoppelt. Beide Proteine besitzen eine sensorische Domäne mit essentiellen Cysteinresten. Die sensorischen Domänen zeigen aber keine Sequenzähnlichkeit, auch die Sequenzen der Cysteincluster in NreB (Cys-X<sub>2</sub>-Cys-X<sub>11</sub>-Cys-X<sub>2</sub>-Cys) und FNR (Cys-X<sub>2</sub>-Cys-X<sub>5</sub>-Cys-X<sub>92</sub>-Cys) unterscheiden sich deutlich. Die Funktionsweise und Signalverarbeitung sollte ebenfalls unterschiedlich sein. Im Gegensatz zum Transkriptionsregulator FNR ist NreB eine Histidinkinase und Sauerstoff kontrolliert nicht die Dimerisierung und DNA-Bindung, sondern die Kinaseaktivität des Proteins.

An NreB wurden vorläufige biochemische Studien durchgeführt (Kamps *et al.*, 2004), der Mechanismus der O<sub>2</sub>-Wahrnehmung ist aber unklar. Zu dessen Beantwortung sollen die biochemischen Vorgänge in NreB und am vermuteten FeS-Zentrum untersucht werden. Vor allem soll die Frage beantwortet werden, welcher Art das FeS-Zentrum ist, und welche Veränderungen nach Kontakt mit Sauerstoff auftreten. Zentraler Punkt der Untersuchungen ist deshalb die Bestimmung der Art des FeS-Zentrums in anaerobem und O<sub>2</sub>-inaktiviertem NreB.

Dies setzt zunächst eine Überproduktions- und Präparationsmethode für das O<sub>2</sub>-empfindliche Protein voraus. Bisher wurde NreB nur unter aeroben Bedingungen in geringen Mengen (0,8 mg / 1 Liter Kulturvolumen) präpariert (Kamps *et al.*, 2004). Es muss daher eine Methode zur anaeroben Präparation des Proteins ausgearbeitet werden, die eine Untersuchung mit Mössbauer- und EPR-Spektroskopie erlaubt. Mit der EPR-Spektroskopie (Electron Paramagnetic Resonance) können paramagneti-

sche, mit der Mössbauer-Spektroskopie para- und diamagnetische Verbindungen untersucht werden. Die Mössbauer-Spektroskopie ist die einzige Methode, um EPR-stille FeS-Zentren von Proteinen zu charakterisieren (Khoroshilova *et al.* 1997; Popescu *et al.*, 1998). Es soll untersucht werden, ob bei Reaktion des FeS-Zentrums mit Sauerstoff, die gleichen Zwischenstufen wie in FNR entstehen und ob der FeS-Gehalt von NreB mit der Autophosphorylierungsaktivität korreliert. Diese Untersuchungen sollen mit anaerob präpariertem NreB, aber auch mit *in vitro* rekonstituiertem NreB durchgeführt werden.

Die Beteiligung der Cysteinreste bei der Bindung des FeS-Zentrums und ihre Rolle für die Funktion von NreB soll geklärt werden. In dieser Arbeit sollen auch die Cysteinreste C59, C74 und C77 gegen Serin und Alanin ausgetauscht werden, deren Bedeutung für die Funktion von NreB bisher nicht bekannt ist. Die Mutanten werden auf Wachstum und Nitrat- und Nitrit-Reduktion getestet.



### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Verwendete Stämme

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden die folgenden Stämme eingesetzt:

##### 3.1.1 Stämme von *Staphylococcus carnosus*

Stamm	Plasmid	Genotyp	Referenz
TM300	-	Wildtyp	Schleifer und Fischer, 1982
m1	-	$\Delta nreABC::ermB$	Fedtke <i>et al.</i> , 2002
m1	pCQE1nreB	$\Delta nreABC::ermB$ , Cam <sup>R</sup>	Fedtke <i>et al.</i> , 2002
m1	pCQE1nreBC62S	$\Delta nreABC::ermB$ , Cam <sup>R</sup>	Kamps <i>et al.</i> , 2004
m1	pRB473	$\Delta nreABC::ermB$ , Cam <sup>R</sup>	Brückner <i>et al.</i> , 1992
m1	pRB473nreABC	$\Delta nreABC::ermB$ , Cam <sup>R</sup>	Diese Arbeit
m1	pRB473nreAB <sub>C59A</sub> C	$\Delta nreABC::ermB$ , Cam <sup>R</sup>	Diese Arbeit
m1	pRB473nreAB <sub>C62S</sub> C	$\Delta nreABC::ermB$ , Cam <sup>R</sup>	Diese Arbeit
m1	pRB473nreAB <sub>C74S</sub> C	$\Delta nreABC::ermB$ , Cam <sup>R</sup>	Diese Arbeit
m1	pRB473nreAB <sub>C77S</sub> C	$\Delta nreABC::ermB$ , Cam <sup>R</sup>	Diese Arbeit

##### 3.1.2 Stämme von *Escherichia coli*

Stamm	Plasmid	Genotyp	Referenz
JM109	-	<i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96</i> <i>relA1 thiΔ(lac-proAB)</i> F <sup>+</sup> [ <i>traD36 proAB<sup>+</sup>, lacI<sup>q</sup> lacZΔM15</i> ]	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
XL1-Blue	-	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17</i> <i>supE44 relA1 lac</i> [F <sup>+</sup> <i>proAB</i> <i>lacIqZΔM15 Tn10</i> (Tetr)]	Stratagene
BL21(DE3)	-	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm</i> (DE3)	Studier and Moffatt <i>et al.</i> , 1986
JM109	pRB473	<i>E. coli</i> - <i>S. carnosus</i> Shuttle-Vektor Cam <sup>R</sup> in <i>S. carnosus</i> Amp <sup>R</sup> in <i>E. coli</i>	Brückner <i>et al.</i> , 1992
BL21(DE3)	pNifS	mit chromosomal kodierter, IPTG induzierbarer T7-RNA-Polymerase mit NifS Expressions-Plasmid, Amp <sup>R</sup>	Zheng <i>et al.</i> , 1993
BL21(DE3)	pET28a-nreB	<i>nreB</i> in pET28a über <i>NcoI/HindIII</i> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit
Rosetta	pET28a-nreB	<i>nreB</i> in pET28a über <i>NcoI/HindIII</i> , Kan <sup>R</sup>	Diese Arbeit

### 3.1.3 Stammhaltung

Vom betreffenden Stamm wurde eine ÜNK in 5 ml LB-Medium (*E. coli*) oder 5 ml BM (*S. carnosus*) mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte angeimpft. Am nächsten Tag wurde die Kultur in sterilen 10 ml Zentrifugenröhrchen (Fa. Greiner) zentrifugiert (5.000 U/min, 1 min, RT). Das Pellet wurde in 2 ml sterilem LB-Medium resuspendiert und mit 2 ml sterilem Glycerin 50 % (v/v) ergänzt. Die Zellsuspension wurde in Portionen à 1 ml in Reaktionsgefäßen (1,5 ml) mit Schraubdeckel aliquotiert. Die Stammhaltungskulturen wurden in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren und bei -80 °C gelagert.

### 3.2 Medien und Anzucht

#### 3.2.1 Medien zur Anzucht von *S. carnosus*

<b>BM (Basic-Medium) pH 7,2</b>	<b>(Götz und Schumacher 1987)</b>
Caseinhydrolysat-Pepton	10 g/L
Hefeextrakt (servabacter)	5 g/L
NaCl	5 g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g/L
Glukose	1 g/L
Agar (Zusatz für Agarplatten)	15 g/L

Die einzelnen Komponenten wurden zusammen in H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> gelöst und autoklaviert. Glukose wurde bei Anzucht von *S. carnosus* m1 (pCQE1nreB) zur Überexpression von NreB weggelassen, da *nreB* in pCQE1 unter Kontrolle eines *xyIA*-Promotors steht, der durch Glukose reprimiert wird.

<b>Hefeextrakt-Medium</b>	<b>(Kempf <i>et al.</i>, 1999)</b>
Hefeextrakt (servabacter)	45 g/L
Natriumphosphat (pH 7,2)	50 mM
Glycerin	40 mM
*Natriumnitrat	10 mM
*Ammoniumeisen(III)-citrat	10 mM
<sup>57</sup> FeCl <sub>2</sub>	84 µM

Das Hefeextrakt-Medium (YEPD = Yeast Extract Production-Media) wurde von einem Medium mit hohem Anteil an Hefeextrakt abgeleitet, dass in Kempf *et al.*, 1999 beschrieben wurde. Natriumnitrat und Ammoniumeisen(III)-citrat wurden nur bei anschließender anaerober Inkubation der Zellen verwendet. Anstatt Ammoniumei-

sen(III)-citrat wurde zur Markierung von NreB für die Mössbauer-Spektroskopie  $^{57}\text{FeCl}_2$  verwendet. Alle Komponenten wurden getrennt voneinander angesetzt, autoklaviert und vor Verwendung zusammengefügt.

**K-Medium: Definiertes Medium für *S. carnosus* (Krismer, 1999):**

Für eine eisenarme Zucht, um NreB mit  $^{57}\text{FeCl}_2$  als einziger Eisenquelle für die Mössbauer-Spektroskopie zu markieren, wurde ein definiertes Medium verwendet. Dafür wurde das K-Medium leicht modifiziert. Es setzt sich aus sechs verschiedenen Lösungen zusammen, die alle separat autoklaviert und anschließend gemischt wurden. Zur Überexpression wurde das  $\text{K}^+$ -Medium verwendet, das die vierfache Aminosäurekonzentration enthält.

***Lösung 1: Phosphatpuffer (20x) pH 7,2***

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	1 M
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1 M

***Lösung 2: Kohlenstoffquelle (50x) (alle C-Quellen werden steril filtriert)***

Glycerin	2, 5 M
----------	--------

***Lösung 3: Salze (100x) (alle Salze zusammen lösen und autoklavieren)***

$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	20 g/L
$\text{NH}_4\text{Cl}$	50 g/L
$\text{NaCl}$	50 g/L

***Lösung 4: Aminosäuren (30x)***

Casamino Acids (Bacto™)	150 g/L
-------------------------	---------

***Lösung 5: Vitamine (1000 x)***

Cyanocobalamin (Vitamin $\text{B}_{12}$ )	100 mg/L
para-Aminobenzoat	80 mg/L
Biotin (Vitamin H)	20 mg/L
Nicotinsäure	200 mg/L
Ca-D-Panhotenat (Vitamin $\text{B}_5$ )	100 mg/L
Pyridoxamin-2HCl (Vitamin $\text{B}_6$ )	300 mg/L
Thiamindichlorid (Vitamin $\text{B}_1$ )	200 mg/L
Riboflavin (Vitamin $\text{B}_2$ )	200 mg/L
$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	ad 1 L

Alle Vitamine wurden zusammen gelöst und steril filtriert. Die Lagerung erfolgte dunkel bei 4°C.

**Lösung 6 Spurenelemente (1000 x):**

FeCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O	1500 mg/L
ZnCl <sub>2</sub>	70 mg/L
MnCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O	100 mg/L
Borsäure	6 mg/L
CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	190 mg/L
CuCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	2 mg/L
NiCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	24 mg/L
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	36 mg/L
H <sub>2</sub> O <sub>Bidest</sub>	ad 1L

Alle Spurenelemente wurden zusammen gelöst und 1 ml pro Liter Medium zugegeben.

**Mischungsschema: (steril vereinigen)**

Lösung 1	50 ml
Lösung 2	20 ml
Lösung 3	10 ml
Lösung 4	33,33 ml
Lösung 5	1 ml
Lösung 6	1 ml
H <sub>2</sub> O <sub>Bidest</sub>	ad 1L

Anstelle von Glycerin können auch andere Zucker wie Mannose, Mannitol, Fruktose oder Glukose eingesetzt werden.

ACHTUNG: Beim Überimpfen von Vollmedium in definiertes Medium kommt es zu einer sehr langen lag-Phase! Um dies zu Vermeiden zieht man vorher die Zellen auf Agarplatten aus K-Medium an.

### 3.2.2 Medien zur Anzucht von *E. coli*

<b>LB(Luria-Bertani)-Medium:</b>	(Sambrook <i>et al.</i> , 2001)
Pepton	10 g/L
Hefeextrakt (servabacter)	5 g/L
NaCl	5 g/L
Agar (Zusatz für Agarplatten)	15 g/L
<b>2 x YTG-Medium:</b>	(Sambrook <i>et al.</i> , 2001)
Tryptone (Difco)	16 g/L
Hefeextrakt (servabacter)	10 g/L
NaCl	5 g/L
Glukose	2 % (w/v)
Glukose wurde separat angesetzt und autoklaviert 1 M Glukose = 20% (w/v)	
80 g Glukose wurden in 400 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> gelöst.	
<b>SOC-Medium:</b>	(Sambrook <i>et al.</i> , 2001)
Tryptone (Difco)	20 g/L
Hefeextrakt (servabacter)	5 g/L
NaCl	584 mg/L
KCl	190 mg/L
MgCl <sub>2</sub> (6H <sub>2</sub> O)	2,03 g/L
MgSO <sub>4</sub> (7H <sub>2</sub> O)	2,46 g/L
Glukose	3,96 g/L
<b>NZY<sup>+</sup>Medium (pH 7,5):</b>	(Sambrook <i>et al.</i> , 2001)
Casein	10 g/L
Hefeextrakt (servabacter)	5 g/L
NaCl	5 g/L
MgCl <sub>2</sub> (1M)	12,5 ml/L
MgSO <sub>4</sub> (1M)	12,5 ml/L
Glukose (2M)	10 ml/L

### 3.2.3 Antibiotika Stammlösungen

Erythromycin und Chloramphenicol wurden in 100 % Ethanol gelöst, steril filtriert und bei 4 °C gelagert. Ampicillin und Kanamycin wurden in H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> angesetzt, steril filtriert und in Portionen von 1 ml bei -20 °C gelagert.

Tab. 1: Antibiotika-Stammlösungen

Antibiotika	Stammlösung	Konzentration im Medium
Chloramphenicol (Cam)	20 mg/ml	10 µg/ml
Ampicillin (Amp)	50 mg/ml	100 µg/ml
Erythromycin (Ery)	2,5 mg/ml	2,5 µg/ml
Kanamycin (Kan)	50 mg/ml	50 µg/ml

### 3.2.4 Lösungen zur Induktion

IPTG (1M): wurde in Wasser gelöst, steril filtriert, in Portionen à 1 ml aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Die zur Induktion eingesetzte Konzentration im Medium betrug 1 mM.

Xylose (3,3M): Xylose konnte als Induktor des *xyIA*-Promotors eingesetzt werden, da die meisten Staphylokokken Spezies Xylose nicht metabolisieren können (Kloos *et al.*, 1991). Die Stammlösung wurde in H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> hergestellt (50% w/v), steril filtriert und bei 4°C gelagert. Die zur Induktion eingesetzte Konzentration im Medium betrug 33 mM.

### 3.2.5 Anzucht von *S. carnosus* m1 unter aeroben Bedingungen

*S. carnosus* m1 (pCQE1nreB) wurde aus der Stammhaltung auf einer Erythromycin (2,5 µg/ml) und Chloramphenicol (10 µg/ml) enthaltenden BM-Agarplatte ausgestrichen und 24 h bei 37°C inkubiert. Von dieser Platte wurde eine Vorkultur (40 ml) in Hefeextrakt-Medium mit mehreren Kolonien angeimpft und bis zum Erreichen von OD<sub>578</sub> > 30 unter Schütteln inkubiert (bis zu 24 h bei 37°C und 160 U/min). Die Hauptkultur (8 Erlenmeyerkolben mit je 300 ml Kulturvolumen) wurde mit 2-3 % Inokulum auf eine OD<sub>578</sub> von 1 - 2 angeimpft. Zur Anzucht der Hauptkultur wurden 2,4 L Hefeextrakt-Medium (ohne Antibiotikum) und mehrere 2 L Erlenmeyerkolben mit Schikanen verwendet, die bis zu 15 % ihres Nominalvolumens gefüllt wurden. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 250 U/min. Bei einer OD<sub>587</sub> von 10 - 12 wurde mit 33 mM Xylose induziert. Nach 6 h Induktion wurden die Zellen in 500 ml Zentrifugen-

bechern durch Zentrifugation (8.000 U/min, 10 min, 4°C) geerntet. Das Zellpellet wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### 3.2.6 Anzucht von *S. carnosus* m1 bei anschließender anaerober Inkubation

Die Anzucht wurde wie unter aeroben Bedingungen durchgeführt. Im Unterschied dazu enthielt die Hauptkultur zusätzlich 10 mM NO<sub>3</sub> und 10 mM Ammoniumeisen(III)-citrat. Zur Umstellung auf anaerobe Bedingungen wurde die Hauptkultur nach 6 h Induktion in gasdichte, sterile Müller-Krempel Flaschen (1 L) umgefüllt und 12 h bei 4°C auf einem Magnetrührer (Heidolph MR 300) bei 300 U/min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen sofort unter anaeroben Bedingungen abzentrifugiert und präpariert.

### 3.2.7 Anzucht von *S. carnosus* m1 unter eisenarmen Bedingungen

Um das Eisenschwefelzentrum von NreB mit Hilfe der Mössbauer-Spektroskopie zu untersuchen, musste das Protein während der Überexpression mit dem mittels Mössbauer-Spektroskopie detektierbarem <sup>57</sup>Fe markiert werden. Der Anteil an natürlich vorkommendem <sup>56</sup>Fe musste so gering wie möglich gehalten werden. Zum Ansetzen des Hefeextrakt-Mediums wurden nur Substanzen mit sehr geringem Anteil an Eisen (≤ 0,001 %) und H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> (MilliQ®) verwendet. Um vorhandenes Eisen zu entfernen wurden, die zur Anzucht verwendeten Erlenmeyerkolben zwei Tage mit 1 M HCl gespült und anschließend einen Tag mit 10 mM EDTA inkubiert (Niehaus *et al.*, 1991). Der Konzentration an natürlichem <sup>56</sup>Fe im Hefeextrakt-Medium wurde bestimmt und betrug 1,35 mg/ml. In einer Hauptkultur von 2,4 L befanden sich demnach 3,24 mg <sup>56</sup>Fe. Durch Zugabe von 11,2 mg <sup>57</sup>Fe wurde der Anteil von <sup>56</sup>Fe auf 22% verdünnt. Das Eisen in der Kultur und damit auch das Eisen im FeS-Zentrum bestand so zu ca. 78 % aus <sup>57</sup>Fe, was für Mössbauer-Spektroskopie ausreichend war. Die Anzucht wurde wie unter 3.2.5 beschrieben durchgeführt, doch anstatt Ammoniumeisen(III)-citrat enthielt das Medium 84 µM <sup>57</sup>FeCl<sub>2</sub>.

### 3.2.8 Anzucht von *S. carnosus* unter anaeroben Bedingungen

Zunächst wurden alle Stämme auf BM-Agarplatten (mit den entsprechenden Antibiotikazusätzen) aus der Stammhaltung ausgestrichen und 24 h bei 37 °C inkubiert. Von den Platten wurden anaerobe Kulturen in Sovirell-Röhrchen angeimpft, die entsprechende Antibiotikazusätze und 1 mM Nitrat enthielten. Die Kulturen wurden durch

3 x Evakuieren der Luft mittels einer Vakuumpumpe und anschließendes 3 x Begasen mit N<sub>2</sub> anaerobisiert und über Nacht inkubiert (37°C 160 U/min). Die Anzucht der Hauptkultur erfolgte in sterilen Müller-Krempel Flaschen (50 ml), die mit Gummistopfen und Metallkrempe verschlossen wurden. Die Hauptkultur wurde anaerobisiert, mit 3 - 4% Inokulum beimpft und bei 37 °C und 120 U/min inkubiert.

### **3.2.9 Anzucht von *E. coli* BL21DE3 (pNifS) zur Präparation von NifS<sub>AV</sub>**

Die Vorkultur wurde in 40 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) über Nacht in einem Schüttler (New Brunswick Scientific, G10 Gyrotory® Shaker) bei 30°C und 200 U/min inkubiert. Die Hauptkultur von 2,4 L LB-Medium wurde mit 1 % Inokulum angeimpft. Gezüchtet wurde in mehreren 2 L Erlenmeyerkolben mit Schikanen, die mit 300 ml LB-Medium + Ampicillin (100µg/ml) zu 15 % des Nominalvolumens gefüllt waren. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C und 180 U/min. Bei Erreichen einer OD<sub>578</sub> von 0,6 - 0,8 wurde durch Zugabe von 300 µl IPTG (1 M) pro Kolben induziert. Nach 2 - 3 Stunden wurde eine OD<sub>578</sub> von 1,5 - 2,0 erreicht und die Zellen konnten geerntet werden. Dazu wurde die Zellkultur zentrifugiert (4.500 U/min, 20 min, RT, Fa. Heraeus Christ). Das Zellpellet wurde bis zum Zellaufschluss bei -80 °C eingefroren. Eine Kontrolle der Überexpression auf einem SDS-Gel war nicht notwendig, da bei erfolgreicher Überexpression das Pellet eine intensive gelbe Färbung zeigte.

## **3.3 Biochemische Methoden**

### **3.3.1 Bestimmung von Nitrit**

Die Nitritgehalte wurden nach einer Methode von Nicholas und Nason bestimmt (Nicholas und Nason 1957). Grundlage dieser Methode ist eine Diazotierung, die durch Umsetzung von Sulfanilamid mit N-(1-Naphtyl)-Ethylendiamin-Lösung in Anwesenheit von Nitrit stattfindet. Dabei entsteht aus Sulfanilamid in saurer Lösung unter Einwirkung von Nitrit ein Diazoniumsalz, welches im nächsten Schritt mit dem aromatischen Amin einen rotvioletten Azofarbstoff bildet (Abb. 4). Der Azofarbstoff besitzt sein Absorptionsmaximum bei 546 nm. Die Intensität der Färbung ist proportional zur Nitritkonzentration und kann somit zur Quantifizierung herangezogen werden. Für die Bestimmung der Nitritgehalte der Medien wurde jeweils 1 ml Medium entnommen. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation (13.000 U/min, 1 min, RT) abgetrennt. Vom Überstand wurden 200 µl in den Test eingesetzt. Die Nitritkonzentration der Proben wurde auf 20 - 100 µM eingestellt. Zum Start des Tests wurden



200 µl Sulfanilamid-Lösung (1% w/v in 2,5 M HCl) dazu pipettiert und die Probe 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 200 µl N-(1-Naphtyl)-Ethyldiamin-Lösung (0,2 w/v) hinzu pipettiert und die Mischung 30 min bei RT inkubiert. Vor Bestimmung der Extinktion bei 546 nm (Hitachi U-1100) wurde jede Probe mit 400 µl  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  verdünnt.

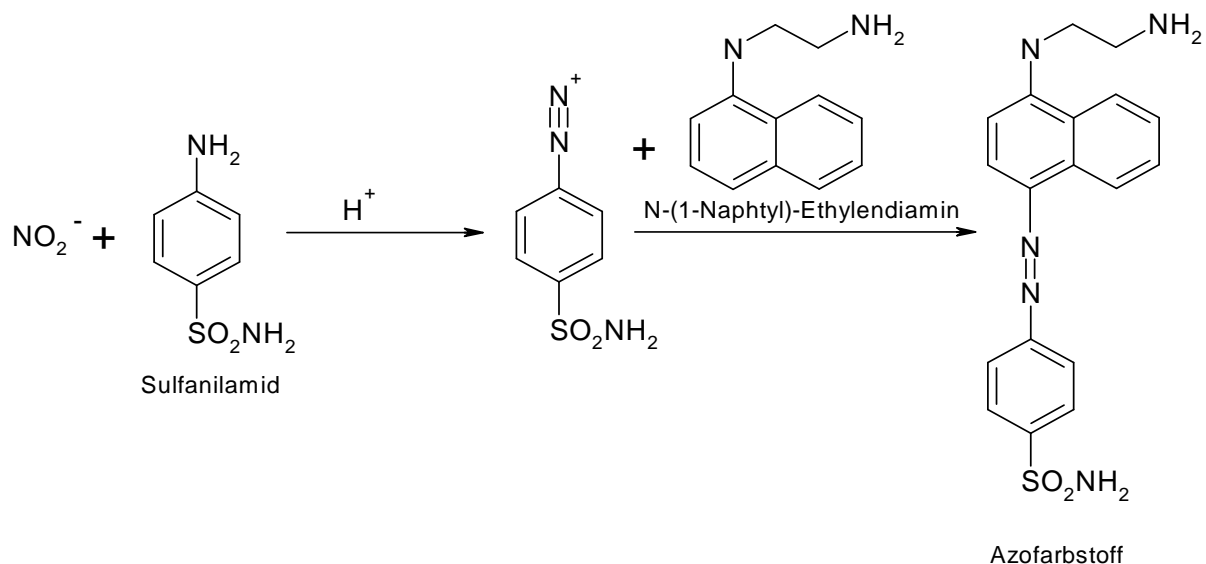


Abb. 4: **Reaktionsfolge für die Bestimmung des Nitritgehalts.** Nitrit reagiert mit Sulfanilamid unter sauren Bedingungen zu einem Diazoniumsalz, welches dann mit N-(1-Naphtyl)-Ethyldiamin zu einem Azofarbstoff reagiert.

Zur Kalibrierung wurde ein  $\text{NO}_2$ -Standard (100 µM) verwendet. Davon wurden Standard-Proben, die Konzentrationen von 20, 40, 60, 80 und 100 µM Nitrit enthielten, vermessen. Eine Kalibrierungsgerade wurde mit Excel erstellt ( $R^2$ -Wert von 0,99).

### 3.3.2 Bestimmung von säure-labilem Sulfid

(Siegel *et al.*, 1964; Beinert 1983; King *et al.*, 1967; Pierik 2001)

**Prinzip:** Das zu untersuchende Protein wird zunächst in einem alkalischen Medium mit Zinkhydroxid denaturiert. Entstehendes freies Sulfid co-präzipitiert als ZnS zusammen mit  $\text{Zn}(\text{OH})_2$ . Nach Ansäuerung entsteht  $\text{H}_2\text{S}$ , das mit zwei Molekülen DMPD (N,N'-Dimethyl-p-phenylendiamin•2HCl) Methylenblau bildet. Methylenblau besitzt ein Absorptionsmaximum bei 670 nm und kann photometrisch bestimmt werden.

**Durchführung:** Der Test ist sehr sauerstoffempfindlich, da Sulfid leicht oxidiert wird und bei Ansäuerung als  $\text{H}_2\text{S}$ -Gas verloren gehen kann. Aus diesen Gründen wurden

alle Arbeitsschritte, soweit nicht anders angegeben in einem Anaeroben-Zelt durchgeführt (Coy; 95% N<sub>2</sub> und 5% H<sub>2</sub>). Vor jeder Sulfidbestimmung wurde zunächst eine Kalibrierung durchgeführt. Dafür wurde ein Sulfid-Standard (~ 2 mM) gravimetrisch aus Na<sub>2</sub>S•9H<sub>2</sub>O (M<sub>r</sub> = 240,18 g) hergestellt. Ein Na<sub>2</sub>S-Kristall von geeigneter Größe (ca. 0,5 g) wurde abgewogen, woraus im Anaeroben-Zelt eine Stammlösung mit NaOH (10 mM) im Messkolben (1L) hergestellt wurde. Die Lösung wurde auf einem Magnetrührer bis zur Lösung gerührt und war dann für minimal 10 Stunden stabil. In den Test wurden 5 - 25 µl eingesetzt, um Sulfidgehalte von 10, 20, 30, 40 und 50 nmol pro Reaktionsansatz zu vermessen. Aus diesen Werten wurde eine Kalibrierungsgerade mit Excel erstellt, die einen R<sup>2</sup>-Wert von 0,99 hatte.

Die Anwesenheit des zu untersuchenden Proteins konnte die Bildung von Methylblau beeinflussen und die Ergebnisse verfälschen. Um dies zu testen, wurde das Protein zu zwei Sulfidstandards (10 und 50 nmol) hinzugefügt und mit Sulfidstandards ohne Protein verglichen.

In den Test wurden bis 1 - 200 µl Probe eingesetzt und mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> wenn nötig auf ein Endvolumen von 200 µl aufgefüllt. Um einen Verlust von Sulfid als H<sub>2</sub>S-Gas zu vermeiden, wurden die folgenden Arbeitsschritte für jedes Reaktionsgefäß einzeln durchgeführt:

Zur Probe wurden erst 600 µl Zinkacetat (1%) und dann sofort 50 µl NaOH (7%) pipettiert, die Lösung wurde durch Invertieren gemischt und für 15 min bei RT inkubiert. Der entstandene Niederschlag wurde abzentrifugiert (12.000 U/min, 1 min, RT). Beim Pipettieren der DMPD-Lösung wurde die Pipettenspitze bis zum Boden des Reaktionsgefäßes eingetaucht. Während des vorsichtigen Hinzufügens der Lösung wurde die Pipette langsam rotiert. Dabei löste sich der weiße Niederschlag (Zn(OH)<sub>2</sub> und ZnS) auf. Sofort wurden 150 µl FeCl<sub>3</sub> Lösung dazugegeben und die Gefäße für 30 s mit einem Vortexer geschüttelt. Nach der DMPD/FeCl<sub>3</sub> Behandlung wurden alle Proben 20 min bei RT inkubiert und die störende Trübung anschließend durch Zentrifugation abgetrennt (12.000 U/min, 1 min, RT). Die Extinktion wurde mit einem Photometer (Hitachi U-1100) bei 670 nm abzüglich des Blindwertes bestimmt.

**Lösungen:**

---

Zinkacetat 1% (w/v), wurde immer frisch aus einer 10% (w/v) Lösung angesetzt.

Natriumhydroxid 7 % (w/v)

N,N´-Dimethyl-p-Phenylen-Diamin (DMPD) 0,1 % (w/v) gelöst in 5 M HCl (giftig)

10 mM FeCl<sub>3</sub> in 1 M HCl

Na<sub>2</sub>S-Standard in 10 mM NaOH (~ 2 mM)

---

**3.3.3 Bestimmung von komplexiertem Eisen in biologischen Proben**

Prinzip: Die Quantifizierung der Eisengehalte von NreB wurde nach der Methode von Wayne Fish durchgeführt (Fish *et al.*, 1988). Das Prinzip des kolorimetrischen Tests basiert darauf, dass die eisenhaltige Probe zunächst mit Kaliumpermanganatlösung bei 60 °C für 2 h verascht wird. Anschließend wird es dann zu Fe<sup>2+</sup> reduziert, das mit Ferrozin (Stookey *et al.*, 1970) zu einem farbigen, wasserlöslichen Komplex reagiert, der eine maximale Absorption bei 562 nm aufweist.

Durchführung: Zur Bestimmung von Eisen in Präparationen von NreB wurden 200 µl NreB in Puffer C eingesetzt. Wenn weniger als 200 µl in den Test eingesetzt werden sollten, wurde das Endvolumen mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> auf 200 µl eingestellt.

Diese 200 µl Probe wurden mit 500 µl Kaliumpermanganatlösung (0,6 M HCL, 0,193 M KMnO<sub>4</sub>; frisch angesetzt) für 2 h bei 60 °C verascht (The rmomixer comfort, Eppendorf). Anschließend wurden 100 µl Ferrozin-Reagenz dazu pipettiert und der Ansatz 30 min bei RT inkubiert. Danach wurde die Absorption bei 562 nm im Spektralphotometer (Hitachi-1100) bestimmt.

Zur Bestimmung der Eisengehalte wurde eine Kalibrierungsgerade mit einem Eisenstandard der Firma Merck (1.09972. Titrisol®) hergestellt. Dafür wurden Proben mit folgenden Eisengehalten in den Test eingesetzt: 0,5 µg; 1 µg; 1,5 µg; 2 µg und 2,5 µg. Die Kalibrierungsgerade wurde mit Excel erstellt und hatte einen R<sup>2</sup>-Wert von 0,99.

Lösungen:**Kaliumpermanganatlösung (0,6 M HCL, 0,193 M KMnO<sub>4</sub>)**

---

Die Lösung ist nicht stabil, deshalb wurde sie vor Versuchsbeginn durch Mischen der beiden Lösungen A) und B) im Verhältnis (1:1) jeweils frisch angesetzt:

A) 0,285 M (4,5 % (w/v)) KMnO<sub>4</sub> in H<sub>2</sub>O (Lagerung: Braunglasflasche)

B) 1,2 M HCl

---

**Ferrozin-Reagenz:**

Zunächst löst man Ammoniumacetat und Ascorbinsäure in 3 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ , fügt Neocuproin und Ferrozin hinzu. Nachdem sich die Chemikalien gelöst hatten, wurde mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  auf ein Endvolumen von 10 ml aufgefüllt. Die Lösung ist lichtempfindlich und wurde deshalb in einer Braunglasflasche aufbewahrt. Mit zunehmendem Alter wurde sie immer dunkler, so dass sich der Blindwert erhöhte. Die Haltbarkeit der Ferrozin-Lösung lag bei maximal 3 - 6 Wochen.

**Ferrozin-Reagenz (10 ml)**

Ferrozin	6,5 mM	32 mg
Neocuproin	13,1 mM	27,3 mg
L-Ascorbinsäure	2 M	3,52 g
Ammoniumacetat	5 M	3,85 g

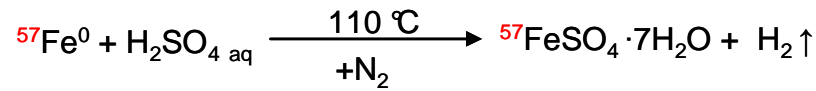
**3.3.4 Synthese einer  $\text{FeCl}_2$ -Lösung aus  $^{57}\text{Fe}$** 

$^{57}\text{Fe}$ -angereichertes Eisenmetall (99 %) wurde von Dr. Eckhard Bill (MPI-Mülheim an der Ruhr) zur Verfügung gestellt. Das Metall (22,3 mg) wurde mit einem Platindraht (99,99%) umwickelt und bis zur Lösung in 335  $\mu\text{l}$   $\text{HCl}$  (37%) für 72 Stunden bei RT im Anaeroben-Zelt inkubiert. Zur Beschleunigung der Reaktion wurde der Ansatz für kurze Zeit im Trockenschrank bei 80 °C inkubiert. Dann wurde die Stammlösung durch Zugabe von 1897  $\mu\text{l}$  anaerobem  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  (MilliQ®) auf eine Konzentration von 179 mM eingestellt (Shima *et al.*, 2005). Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

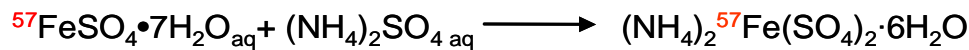
**3.3.5 Synthese des Mohr'schen Salzes aus  $^{57}\text{Fe}$ -Metallpulver**

Für die Mössbauer-Messungen mussten Proben von NreB mit dem stabilen  $^{57}\text{Fe}$ -Isotop rekonstituiert werden, da nur dieses Eisenisotop in der Mössbauer-Spektroskopie detektierbar ist. Es wurde als angereichertes metallisches  $^{57}\text{Fe}$ -Metallpulver bezogen (Fa. AMT Isotopes), aus dem eine stabile  $\text{Fe}^{2+}$ -Lösung hergestellt werden sollte. Für die enzymatische Synthese von FeS-Zentren *in vitro* ist bevorzugt  $\text{Fe}^{2+}$  in Form von Mohr'schem Salz  $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$  zu verwenden, da dieses besonders stabil ist.  $^{57}\text{Fe}$ -haltiges Mohr'sches Salz wurde aus  $^{57}\text{Fe}$ -Metallpulver in einer Kooperation mit dem AK Renz (Institut für Anorganische Chemie und Analytische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) synthetisiert (Jander-Blasius, 2002).

Das Eisenpulver wurde in 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bei 110 °C (Ölbad) unter Rückflusskühlung und N<sub>2</sub>-Atmosphäre bis zur vollständigen Lösung (5 Tage) inkubiert.



Das so entstandene  ${}^{57}\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  wurde durch Zugabe von heißer Ammoniumsulfat-Lösung direkt zum Doppelsalz  $(\text{NH}_4)_2{}^{57}\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$  umgesetzt.



Nach der Synthese wurde das Produkt mittels Mössbauer-Spektroskopie überprüft. Das Mohr'sche Salz wurde in Eppendorfgläsern à 2 mg portioniert und im Anaeroben-Zelt gelagert. Vor Verwendung wurde eine Stammlösung (100 mM) angesetzt, indem die Aliquots (2 mg) in 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> gelöst wurden.

### 3.3.6 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Prinzip: Der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 bildet im sauren pH-Bereich vor allem mit basischen Aminosäuren Komplexe aus. Dadurch wird der Farbstoff in seiner anionischen Sulfatform stabilisiert, wodurch sich das Absorptionsmaximum von 470 nm (rot) zu 595 nm (blau) verschiebt (Bradford, 1976).

Durchführung: Ein Reaktionsansatz bestand aus 800 µl Probe (1- 25 µg Protein) und 200 µl Roti®-Quant (5x). Durch mehrmaliges Invertieren wurde der Ansatz gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Die OD<sub>595</sub> der Proben und der Standards wurden gegen den Blindwert (800 µl Probenpuffer(1x) + 200 µl Roti®-Quant) bestimmt. BSA (Bovine Serum Albumin) wurde als Standardprotein (1mg/ml) in den Test eingesetzt. Dafür wurden 0, 5, 10, 15 und 20 µg BSA pro Ansatz verwendet. Die Kalibrierungsgerade wurde mit Excel erstellt und hatte einen R<sup>2</sup>-Wert von 0,97.

### 3.3.7 SDS-PAGE zur Separation von Proteinen

Prinzip: Bei der Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamidgelektrophorese werden die Proteine aufgrund ihres Molekulargewichts voneinander getrennt (Laemmli, 1970). SDS bindet an die hydrophoben Regionen der Proteine und löst ihre 3D-Struktur auf. Dabei bleiben sie stabil in Lösung und lassen sie sich anhand ihrer Länge, die nun proportional zu ihrem Molekulargewicht ist, auftrennen.

Durchführung:

a) Herstellung der Acrylamidgele: Trenngel (12,5%) und Sammelgel (6,6%) wurden separat voneinander angesetzt. Ammoniumpersulfat (APS) startet die Polymerisation und wurde erst direkt vor dem Gießen der Gele dazu pipettiert. Zuerst wurde das Trenngel gegossen (ca. 5 ml) und mit 0,5 ml Butanol überschichtet. Die Polymerisation dauert 30 - 40 min. Das Butanol wurde abgegossen und das fertig polymerisierte Trenngel mit Sammelgel überschichtet. Sofort wurde (luftblasenfrei) ein entsprechender Teflonkamm in das Sammelgel (am besten den Kamm leicht schräg einführen) hineingesteckt. Nach 30 - 40 min war das Gel vollständig polymerisiert und konnte entweder sofort verwendet werden oder bis zur Verwendung in feuchtes Küchenpapier eingewickelt und mit Frischhaltefolie eingepackt, bei 4 °C gelagert werden.

## b) Präparation der Proben und Lauf des Gels:

Die Proben wurden 1:1 mit SDS-Puffer (2x) gemischt und 5 min bei 99°C inkubiert. Die Nachweisgrenze der nachfolgenden Coomassie-Färbung lag bei 200 ng pro Bande. Eine Menge von 2 µg Protein lieferte ein deutliches Signal, deshalb wurden Proben mit bekanntem Proteingehalt dementsprechend aufgetragen.

Zellsuspensionen von *E. coli* wurden auf die gleiche optische Dichte eingestellt, 1:1 mit SDS-Puffer (2x) gemischt, 5 min bei 99 °C inkubiert und dann auf das Gel aufgetragen. Zellsuspensionen von *S. carnosus* wurden mit 25 mM Tris/HCl (pH 7,6) auf  $OD_{578} = 20$  eingestellt (40 µl) und dann 20 min bei 37 °C mit 10 µl Lysostaphin (0,5 U/µl) behandelt. Danach wurden sie 1:1 mit SDS-Puffer (2x) gemischt, 5 min bei 99 °C inkubiert und auf das Gel aufgetragen. Wenn möglich wurden alle Taschen des Gels mit Proben beladen, verbleibende Taschen wurden mit SDS-Puffer (1x) gefüllt. Anschließend wurde das Gel bei einer angelegten Spannung von 120 V für 1 - 2 h inkubiert.

Zur Fixierung der Proteinbanden wurde das SDS-Gel 30 min in Färbelösung unter einem Abzug auf einem Taumelschüttler inkubiert. Zum Sichtbarmachen der Banden wurde die Färbelösung verworfen und das Gel bis zu 2 h mit Entfärbelösung entfärbt. Über Nacht wurde das Gel in  $H_2O_{dest.}$  gewaschen. So behandelte Gele wurden zur Dokumentation fotografiert, oder auf Filterpapier (Schleicher und Schüll) gelegt und mit Hilfe einer Geltrocknungsanlage (Biotec-Fischer) getrocknet.

Lösungen:

<b>Trenngel (12,5 % Acrylamid)</b>	<b>Sammelgel (6,6 % Acrylamid)</b>
9,4 ml Rotiphorese® Gel 30 <sup>1</sup>	2,6 ml Rotiphorese® Gel 30
7,1 ml H <sub>2</sub> O	6,4 ml H <sub>2</sub> O
5,6 ml Tris/HCl pH 6,8 (1,5 M)	2,85 Tris/HCl pH 8,8 (0,5 M)
225 µl SDS 10% (w/v)	112,5 µl SDS 10% (w/v)
45 µl TEMED	30 µl TEMED
90 µl APS 10 % (w/v)	45 µl APS 10% (w/v)

<b>SDS-Probenpuffer (2x) (Sambrook <i>et al.</i>, 2001)</b>	<b>Laufpuffer:</b>	<b>Färbelösung (1L):</b>	<b>Entfärbelösung (2L):</b>
100 mM Tris/HCl pH 6,8	5,44 g/L Tris	2 g Coomassie Brillant Blue	200 ml Eisessig (10%)
200 mM Dithiothreitol	25,92 g/L Glycin	500 ml Methanol 50 %	100 ml Methanol (5%)
SDS 4% (w/v)	9 ml/L SDS 10% (w/v)	100 ml Eisessig 10%	1,7 L H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>
Bromphenolblau (w/v)	0,2%	400 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	
Glycerin 20% (v/v)			

**3.3.8 Western-Blot und Antikörper-Färbung**

Prinzip: Nach der Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen und dann mit einem ersten His-Anhang-spezifischen (Penta-Histag) Antikörper inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit einem zweiten Antikörper (Anti-Kaninchen), der an den ersten Antikörper bindet, inkubiert. Der zweite Antikörper war mit einer Peroxidase gekoppelt (horseradish peroxidase), die nach Inkubation mit Chlornaphtol eine Schwarzfärbung verursachte. Die Sensitivität liegt bei 10 - 20 pg, die jedoch auch vom Protein und Antikörper abhängig ist (Bers and Garfin, 1985).

<sup>1</sup> 30 % Acrylamid/Bisacrylamid im Mischungsverhältnis 37,5:1

Durchführung: Der Blot wurde wie in Abb. 5 aufgebaut. Dazu wurden die Filterpapiere und die Nitrocellulose-Membran auf die Größe des SDS-Gels zugeschnitten.

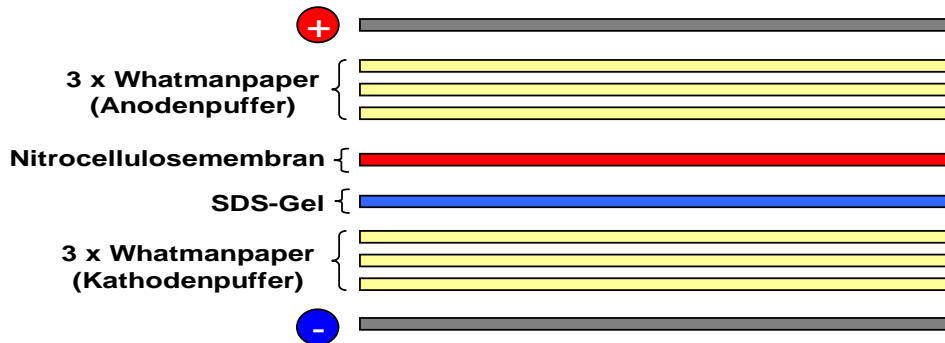


Abb. 5: **Aufbau eines Western Blot (Semi-dry Blot).** Zunächst wurden drei Filterpapiere in Kathodenpuffer getränkt und auf die Kathode gelegt. Dann wurde das SDS-Gel daraufgelegt und darauf die Nitrocellulosemembran. Darauf kamen dann wieder drei Filterpapiere, diesmal jedoch in Anodenpuffer getränkt. Dieses Sandwich wurde zwei Stunden bei der berechneten Ampère-Zahl inkubiert.

Die notwendige Stromstärke (Ampère-Zahl) errechnet sich aus der Fläche der Nitrocellulose-Membran ( $\text{cm}^2$ )  $\times 0,8 = \text{mA}$ . Das Gel wurde bei der erforderlichen Stromstärke 2 h geblottet. Nach dem Blotten war es möglich die Nitrocellulose-Membran entweder mit Ponceaurot zu färben oder gleich mit BSA-Lösung (3%) in PBS-Puffer (15 ml) über Nacht zu inkubieren, um unspezifische Bindungen des Antikörpers zu verhindern.

Am nächsten Tag wurde der gegen den His-Anhang spezifische Penta-Histag Antikörper (Kaninchen) für 3,5 h mit der Membran inkubiert. Daran schloss sich ein zweimaliger Waschschrift (2  $\times$  15 min) mit 0,1 % Triton-X 100 in PBS-Puffer (15 ml) an, bevor der zweite Antikörper (Anti-Kaninchen und Peroxidase gekoppelt) für 1,5 h mit der Membran inkubiert wurde. Bevor die Entwicklungslösung auf den Blot gegeben wurde, musste noch zweimal gewaschen werden. Nach der Inkubation mit der Entwicklungslösung dauerte es nicht lange, bis spezifische Banden sichtbar wurden. Der Blot wurde getrocknet und anschließend zur Dokumentation photographiert. Die einzelnen Banden wurden mittels der Software Gel-Pro Analyzer 6.0 im Vergleich zu einem Standard quantifiziert.



Lösungen:**Anodenpuffer:**

Tris/HCl (pH 10,4)	0,3 M
Methanol	20 % (v/v)

**Kathodenpuffer:**

Tris/HCl (pH 9,4)	0,025 M
Aminocaprinsäure	0,04 M
Methanol	20 % (v/v)

**Entwicklungslösung: (immer frisch ansetzen)**

Chlornaphtol (in 20 ml Etthanol lösen)	30 mg
Tris/HCl 0,1 M	80 ml
30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	50 µl
NaCl	140 mM

**PBS-Puffer:**

KCl	2,7 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,8 mM

**3.3.9 Anreicherung von NifS<sub>AV</sub>**

(Zheng *et al.*, 1993)

Das Zellpellet (*E. coli* BL21(DE3) pNifS) von 0,6 L Kultur wurde 30 min auf Eis aufgetaut und in 7,5 ml 25 mM Tris/HCl (pH 7,6) resuspendiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit der French-Press bei 83 bar aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (13.000 U/min, 20 min, 4°C, Sigma 2K 15) abgetrennt. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß dekantiert und das Pellet verworfen. Der löslichen Fraktion wurde so lange Streptomycinsulfat hinzugefügt, bis nichts mehr ausfiel (bei 7,5 ml ungefähr 350 mg).

Dann wurde der Ansatz für 15 min auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (10.000 U/min, 15 min, 4°C). Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet verworfen. Zum Überstand wurde portionsweise 134 mg/ml fein gemörsertes (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub> gegeben und anschließend erneut zentrifugiert (10.000 U/min, 10 min, 4°C). Der Überstand wurde in einen Messzylinder gegeben. Zur Fällung von NifS<sub>AV</sub> wurden 115 mg/ml (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub> hinzugefügt und 30 min auf Eis inkubiert.

Nach Zentrifugation (13.000 U/min, 15 min, 4°C) wurde der Überstand verworfen. NifS<sub>AV</sub> befand sich im Pellet und wurde auf Eis in 1,5 ml 25 mM Tris/HCl (pH 7,6) resuspendiert und à 250 µl aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -80 °C. Es wurde nicht länger als fünf Tage aufbewahrt und jedes Aliquot wurde nur einmal verwendet.

### 3.3.10 Präparation von NreB unter aeroben Bedingungen

Die Anzucht und Überexpression wurde wie unter 3.2.5 beschrieben durchgeführt. Zur Präparation wurden die Puffer in Tab. 2 verwendet. Das Zellnassgewicht (30 - 60 g) wurde bestimmt und das Pellet in Puffer A (2 ml/g) resuspendiert. Dann wurden zur Zellsuspension Glasperlen (Ø 0,1 mm) 4 g/g Zellnassgewicht gemischt und in einen Zelmühlenzylinder (120 ml) gefüllt. Der Zellaufschluss erfolgte in einer Zelmühle (Vibrogen VI-4) bei 4°C (Sizemore *et al.*, 1991). Es wurden vier Zyklen von 2:30 min Aufschluss und 30 s Pause durchgeführt. Danach wurden dem Zellaufschluss 200 ml Puffer A hinzugefügt. Das Gemisch aus Zellextrakt und Glasperlen wurde in eine flache Glasschale gefüllt. Nachdem sich die Glasperlen deutlich abgesetzt hatten, wurde der Überstand in acht Zentrifugenröhrchen (40 ml) dekantiert. Der Zellextrakt wurde zentrifugiert (13.000 U/min, 20 min, 4 °C, Beckmann Coulter CH-J2 MC, Rotor F21B), das Pellet verworfen und der Überstand mit 3 ml (Bettvolumen) Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose (Qiagen) unter Rühren auf einem Magnetrührer (250 U/min) für 4 h bei 4 °C inkubiert. Zuvor wurde die Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose mit 20 ml Puffer A äquilibriert. Die Suspension wurde in eine Säule gefüllt (+300 ml Reservoir), die mit einer Fritte verschlossen war. Die zurückgebliebene Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose hatte sich durch Bindung des NreB•His Fusionsproteins gräulich verfärbt.

Die Säule wurde mit Puffer B (20 ml) gewaschen und NreB•His mit Puffer C (12 ml) eluiert. Bei der Elution wurde das Totvolumen (1,5 ml) vorab eluiert und verworfen. Die Eluatfraktionen wurde gesammelt und zur Ultrafiltration (Vivaspin 6, MWCO 10.000, Sartorius) 1 - 2 h bei 4°C und 6.000 - 8.000 U/min (Beckmann Coulter CH-J2 MC, Rotor F14B + entsprechende Einsätze) zentrifugiert und so auf ein Volumen von 1 - 1,5 ml eingengt. Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford bestimmt und die Probe in flüssigem N<sub>2</sub> gefroren. Bis zur Verwendung erfolgte die Lagerung bei -80°C.

Tab. 2: **Puffer zur aeroben Reinigung von NreB•His.** NaCl wurde als 5 M Stammlösung bei RT und Imidazol als 1 M Stammlösung bei 4 °C gelagert.  $\beta$ -Mercaptoethanol wurde immer erst kurz vor Verwendung des Puffers aus der Stammlösung dazu pipettiert.

Komponenten	Puffer		
	A	B	C
Natriumphosphat (pH 7,2)	50 mM	50 mM	50 mM
NaCl	300 mM	1 M	300 mM
Glycerin	20 % (v/v)	20 % (v/v)	20 % (v/v)
Imidazol	10 mM	20 mM	150 mM
$\beta$ -Mercaptoethanol	10 mM	10 mM	10 mM

### 3.3.11 Rekonstitution von NreB

Prinzip: NreB befindet sich nach aerober Präparation im inaktiven Zustand ohne FeS-Zentrum. Für die Mössbauer-Spektroskopie wurde es unter anaeroben Bedingungen *in vitro* nach einer für FNR beschriebenen Methode mit  $\text{Fe}^{2+}$ , Cystein, und der Cystein-Desulfurase NifS<sub>AV</sub> rekonstituiert (Tran *et al.*, 2000). Alle Arbeitsschritte erfolgten unter anaeroben Bedingungen (Schmitz *et al.*, 2004).

Durchführung: In Puffer C gelöstes NreB wurde in einen mit Gummistopfen und Aludeckel versiegelten Glasbehälter gegeben (10 ml). Durch Einstechen einer Kanüle, die an ein Be- und Entgasungssystem angeschlossen war, wurde die Lösung insgesamt 45 min abwechselnd mit 1 bar  $\text{N}_2$  ( $\text{N}_2$  5.0, Reinheit > 99,99 %, Fa. Linde) für 2 s gegast und 15 min evakuiert. Während der Anaerobisierung wurde der Glasbehälter auf Eis gelagert. Die für die Rekonstitution wichtige Cystein-Desulfurase NifS<sub>AV</sub> wurde auf die gleiche Weise anaerobisiert. Puffer C und  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  wurden in Müller-Krempel-Flaschen (50 ml) gefüllt und mit Gummistopfen und Metallkrempe verschlossen. Die Anaerobisierung erfolgte auf die zuvor beschriebene Art. Zusätzlich wurden die Flüssigkeiten im Anaeroben-Zelt (Coy) mindestens 12 h bei geöffnetem Deckel auf einem Magnetrührer (250 U/min) inkubiert.

Die Atmosphäre des Zelts bestand aus Formiergas (95%  $\text{N}_2$ , 5%  $\text{H}_2$ ). Der Anteil an Sauerstoff lag bei 1 ppm. Die Messung der  $\text{O}_2$ -Konzentration läuft über eine kontrollierte Knallgas-Reaktion mit  $\text{H}_2$  ab. Um eine korrekte Funktionsweise des  $\text{O}_2$ -Sensors zu gewährleisten, sollte der Anteil an  $\text{H}_2$  immer über 1,8 % liegen. Zur Kontrolle des Feuchtigkeitsgehalts wurde blaues Silicagel als Indikator verwendet. Bei zu hoher Feuchtigkeit büßen die Katalysatoren (BASF R 0-20) an Effektivität ein und müssen für 12 h bei 180 °C getrocknet werden.

$(\text{NH}_4)_2^{57}\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ , L-Cysteiniumchlorid, und L-Arginin wurden eingewogen und erst kurz vor Verwendung im Anaeroben-Zelt in anaerobisiertem  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  gelöst. Dithiothreitol (Cleland, 1963) wurde im Anaeroben-Zelt in anaerobem  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  gelöst, in Portionen à 1 ml aliquotiert und bis zur Verwendung bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

Tab. 3: **Zusammensetzung eines Rekonstitutionsansatzes für NreB.** Die Konzentration an Eisen wurde im vierfachen Überschuss zu NreB eingesetzt. Alle Lösungen wurden auf RT gebracht, bevor sie vermischt wurden.

<b>Komponenten</b>	<b>Ausgangskonz.</b>	<b>Endkonz.</b>
NreB	100 - 350 $\mu\text{M}$	80 - 300 $\mu\text{M}$
NifS <sub>AV</sub>	200 - 400 $\mu\text{M}$	5 $\mu\text{M}$
$(\text{NH}_4)_2^{57}\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$	0,1 M	0,3 - 1,2 mM
L-Cysteiniumchlorid	0,5 M	1 mM
Dithiothreitol (DTT)	1 M	2,5 mM
L-Arginin	0,57 M	50 mM

Die Komponenten, mit Ausnahme von NifS<sub>AV</sub>, wurden im Anaerobenzelt zusammen in eine Quarzküvette (Halb-Mikro-Küvette, 114F-QS, Hellma) pipettiert (Tab. 3). Dabei wurden zuerst die kleinen Mengen vorgelegt und durch Zugabe der großen Mengen miteinander vermischt. Mit Puffer C wurde auf ein Endvolumen von 1,2 ml aufgefüllt. Die Assemblierungsreaktion wurde durch die Zugabe von NifS<sub>AV</sub> gestartet. Anschließend wurde die Quarzküvette mit einem Gummistopfen verschlossen und aus dem Anaeroben-Zelt ausgeschleust. Alle 5 - 10 Minuten wurde ein Absorptionsspektrum (180 - 900 nm) gemessen (Ultrospec 2100 pro, Pharmacia) und mit dem Programm SWIFT II - Wavescan aufgenommen. Zur Auswertung der Daten wurde das Programm Excel (Microsoft) verwendet. Die Zunahme des Absorptionsquotienten A420/A280 ist ein Indiz für eine Inkorporierung eines FeS-Zentrums. Solange A420/A280 bei niedriger Gesamtabsorption zunahm und die Lösung klar blieb, wurde der Rekonstitutionsansatz inkubiert. Zum Abstoppen wurde die Quarzküvette wieder ins Anaeroben-Zelt geschleust. Der Rekonstitutionsansatz wurde zur Entfernung von Präzipitaten abzentrifugiert (12.000 U/min, 1min, RT) und dann mit einer Spritze (5 ml) über eine 5 ml Gelfiltrationssäule (Sephadex G-25 superfine, GE Healthcare) von ungebundenem Eisen und Sulfid getrennt (Instructions 71-7154-00 AK HiTrap™ Desalting columns). Davor wurde die Gelfiltrationssäule mit 25 ml Puffer C äquilibriert. Das Totvolumen von 1,5 ml wurde vorab eluiert und verworfen. Danach wurden 0,7 - 1,5 ml eluiert und damit weitergearbeitet. Auf eine anschließende Konzent-

rierung mit Ultrafiltration (Vivaspin 500, PES MWCO 10.000, Sartorius) musste verzichtet werden, da NreB bei diesem Arbeitsschritt aus der Lösung präzipitierte.

Nach Bestimmung der Protein-, Eisen- und Sulfidgehalte wurden 700 µl Probe in eine Mössbauer-Kapsel (Delrin) gefüllt und in flüssigem N<sub>2</sub> unter anaeroben Bedingungen eingefroren. Ein kleinerer Teil (50 µl) wurde in eine EPR-Kapillare gefüllt, eingefroren und mit EPR-Spektroskopie untersucht. Bis zur Aufnahme der Mössbauer- und EPR-Spektren wurden die Proben in flüssigem Stickstoff (-196 °C) gelagert.

### 3.3.12 Präparation von NreB unter anaeroben Bedingungen

Um das O<sub>2</sub>-sensitive FeS-Zentrum in NreB zu erhalten, musste die gesamte Präparation des Proteins unter anaeroben Bedingungen vollzogen werden. Die Zucht wurde wie unter 3.2.5 beschrieben durchgeführt. Nach 6 h Induktion wurden 2,4 L Zellkultur in zwei Müller-Krempel-Flaschen (1L) gefüllt und luftdicht verschlossen. Die Flaschen wurden auf einem Magnetrührer (100 U/min) über Nacht (12 - 16h) bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden sie in das Anaeroben-Zelt (Coy, 95 % N<sub>2</sub> und 5 % H<sub>2</sub>) eingeschleust und dort in Zentrifugenbecher (500 ml) umgefüllt, die mit einem Deckel mit O-Ringabdichtung luftdicht verschlossen wurden. Die Zellernte erfolgte durch Zentrifugation (8.000 U/min, 15 min, 4°C, Beckmann Coulter CH-J2 MC, Rotor JA10). Die Zentrifugenbecher wurden wieder ins Anaeroben-Zelt eingeschleust und der Überstand dekantiert und verworfen. Zur Präparation wurden die Puffer in Tab. 4 verwendet. Das Zellnassgewicht wurde bestimmt und das Pellet in Puffer A (2 ml/g) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit Glasperlen (Ø 0,1 mm) 4 g/g Zellnassgewicht gemischt und in einen Zelmühlenzylinder (120 ml) gefüllt. Dieser wurde mit Hilfe einer Gummidichtung und einem mit Halteklammern befestigtem Metalldeckel luftdicht verschlossen. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Zelmühle, wie unter 3.3.10 beschrieben. Danach wurde der Zelmühlenzylinder wieder in das Anaeroben-Zelt eingeschleust. Beim Einschleusen wurde weniger Vakuum (< 15 Hg) angelegt, um ein Aufschäumen des Zellaufschlusses zu verhindern. Im Anaeroben-Zelt wurde der Zellaufschluss mit Kühlakkus gekühlt und zum Abtrennen der Glasperlen in ein flaches Becherglas gegossen. Dazu wurden 200 ml Puffer A gegeben. Nachdem sich die Glasperlen deutlich vom Zellextrakt abgesetzt hatten, wurde der Überstand auf acht Zentrifugenröhrchen (40 ml) aufgeteilt. Sie wurden mit einem Deckel + O-Ringabdichtung luftdicht verschlossen und aus dem Zelt ausgeschleust. Die Zelltrümmer wurden mittels Zentrifugation (13.000 U/min, 20 min, 4 °C, Beckmann Coul-

ter CH-J2 MC, Rotor F21B) abgetrennt. Nach der Zentrifugation wurden die Proben wieder ins Zelt eingeschleust. Der Überstand wurde mit 3 ml (Bettvolumen) Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose (Qiagen) auf einem Magnetrührer (250 U/min) für 4 h bei 4 °C inkubiert. Danach wurde die Suspension auf eine mit einer Fritte verschlossene Säule (Reservoir 300 ml) gegeben. Der Puffer wanderte durch die Säule unter Sedimentation des Säulenmaterials. Die zurückbleibende Matrix hatte sich nun durch Bindung des NreB•His Fusionsproteins grünlich bis dunkel verfärbt. Es wurde mit Puffer B (20 ml) gewaschen und mit Puffer C (10 ml) eluiert. Das Totvolumen (1,5 ml) wurde vorab eluiert und verworfen. Es wurden Fraktionen à 1 ml eluiert. Alle Fraktionen, die NreB enthielten, waren gelbbraun gefärbt und wurden zusammen nach dem Prinzip der Lösungsmittelabsorption (Vivapore 10/20, MWCO 7.500, Sartorius, VP-2003) auf ein Volumen von ca. 500 µl eingengt. 350 µl davon wurden (luftblasenfrei) in eine Mössbauer-Kapsel (Delrin) pipettiert und sofort in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren, der vorher in einer offenen Styroporbox in das Anaeroben-Zelt eingeschleust wurde. Bis zur Messung wurde die Probe in flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagert.

Der Transport erfolgte auf Trockeneis (-80 °C). Die Messungen wurden von Bernd Mienert durchgeführt und von Dr. Eckhard Bill ausgewertet (Max-Planck-Institut für Bioanorganische Chemie in Mülheim an der Ruhr).

Tab. 4: **Puffer zur anaeroben Präparation von NreB.** Zum Anaerobisieren wurden die Puffer dreimal entgast und anschließend dreimal mit N<sub>2</sub> (Fa. Linde) begast. Anschließend wurden sie im Anaeroben-Zelt mindestens 12 h auf einem Magnetrührer (120 U/min) inkubiert. β-Mercaptoethanol wurde erst kurz vor Verwendung der Puffer hinzugefügt.

Komponenten	Puffer		
	A	B	C
Natriumphosphat (pH 7,2)	50 mM	50 mM	50 mM
NaCl	300 mM	1 M	300 mM
Glycerin	20 % (v/v)	20 % (v/v)	20 % (v/v)
Imidazol	10 mM	20 mM	150 mM
β-Mercaptoethanol	10 mM	-	-

### 3.3.13 Reinigung von Nickel-NTA-Säulen

Nach jeder Verwendung der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose (Qiagen) wurde anschließend eine Reinigung durchgeführt. Dafür wurden folgende Lösungen per Schwerkraft (Höhe der Wassersäule betrug 10 - 20 cm) über die Matrix transportiert:

4 x Säulenvolumen Natriumacetat (0,2 M)

4 x Säulenvolumen Glycerin 30% (v/v)

4 x Säulenvolumen H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>

4 x Säulenvolumen Ethanol 30% (v/v)

Wenn die Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose danach nicht wieder vollständig blau oder gar noch verschmutzt war, wurde eine umfangreichere Reinigung nach dem Protokoll des Herstellers Qiagen (The QIAexpressionist Fifth Edition 06/2003, Seite 109) durchgeführt. Die Lagerung erfolgte in 30% Ethanol bei 4°C.

### 3.3.14 Reinigung von Gelfiltrationssäulen

Nach jeder Verwendung der Gelfiltrationssäule (Hitrap<sup>TM</sup> Desalting, GE Healthcare) wurden 8 ml Guanidium-HCl (6 M) über die Säule gegeben. Im Anschluss daran wurde die Säule mit 25 ml Puffer C (ohne β-Mercaptoethanol) äquilibriert und in diesem bei RT gelagert. Für längere Lagerung wurde die Säule in 20 % Ethanol aufbewahrt.

### 3.3.15 Reduktion von anaerob präpariertem NreB

Es wurde mittels EPR(Electron Paramagnetic Resonance)-Spektroskopie untersucht, ob sich das FeS-Zentrum von NreB reduzieren lässt. Alle Arbeitsschritte wurden soweit nicht anders beschrieben unter anaeroben Bedingungen durchgeführt und die Proteinlösung soweit handhabbar bei 4 °C inkubiert.

a) Reduktion mit Dithionit: 180 µl NreB (0,55 mM) wurden direkt nach der Präparation im Anaeroben-Zelt mit frisch in anaerobem H<sub>2</sub>O gelöstem Dithionit (5 mM) für 40 min reduziert und danach in eine EPR-Kapillare gefüllt. EPR-Kapillaren sind lang (15 cm) und dünn (Ø 3,5 mm), um die Proteinlösung (luftblasenfrei) auf den Boden zu pipetieren wurde ein dünner Plastikschauch (Ø 1 mm) an einer Plastikspitze (gelb) für eine Gilson-Pipette befestigt. Das EPR-Röhrchen wurde luftdicht mit Plastilin verschlossen und aus dem Anaeroben-Zelt ausgeschleust. Es wurde zunächst in mit flüssigem N<sub>2</sub> gekühlten Petroleum Ether (Benzin 40 - 60) eingefroren und dann in flüssigem Stickstoff. Der Versand der Proben erfolgte auf Trockeneis (-80°C). Die

EPR-Messungen und die Auswertung der Spektren wurde von Dr. Eckhard Bill (MPI für Bioanorganische Chemie in Mülheim an der Ruhr) durchgeführt.

b) Photoreduktion mit Deazaflavin (Abb. 6) und Licht: ist eine besonders schonende Methode, Verbindungen mit sehr niedrigem Reduktionspotential ( $< -600$  mV) zu reduzieren. Deazaflavin wurde freundlicherweise von Thorsten Selmer (AG Buckel, Philipps-Universität Marburg) zur Verfügung gestellt. Die Stammlösung (10 mg/ml) wurde in Dimethylformamid gelöst. Deazaflavin ist sehr lichtempfindlich, deshalb erfolgte die Lagerung im Dunkeln bei  $-20$  °C. Als Elektronenquelle wurde Natriumoxalat (20 mM) verwendet. Um die reduzierende Wirkung zu überprüfen wurden 100  $\mu$ M Methylviologen (Paraquat) einer 0,1 molaren Stammlösung in den Test eingesetzt. Methylviologen ist im oxidierten Zustand farblos und im reduzierten Zustand blau (Absorptionsmaximum bei 604 nm). Als Lichtquelle wurde ein Diaprojektor verwendet.

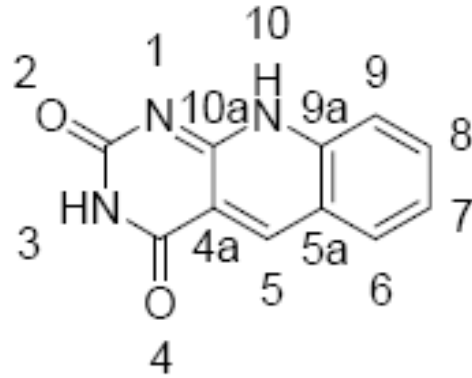


Abb. 6: **5-Deazaflavin**  
(5-Deazaisoalloxazine oder Pyrimido  
[4,5-b]quinolin-2,4-(3H,10H) dion)

NreB lag nach Präparation in Puffer C vor, dessen hohe Konzentration an Imidazol (150 mM) die Photoreduktion störte. Puffer C wurde mit einer Gelfiltrationssäule (Hitrap Desalting<sup>TM</sup> (5 ml), GE Healthcare) gegen Puffer A (ohne  $\beta$ -Mercaptoethanol) getauscht. Die Säule wurde zunächst mit 25 ml Puffer A (ohne  $\beta$ -Mercaptoethanol) äquilibriert. Dann wurde die Probe (0,7 - 1,5 ml) mit einer Plastikspritze (5 ml) aufgetragen und mit insgesamt 5 ml eluiert. Das Tot-Volumen (1,5 ml) wurde vorab eluiert und verworfen. Danach wurden die ersten 1,5 - 2 ml gesammelt und konzentriert (Vivapore 10/20, MWCO 7.500, Sartorius).

Es wurden 300  $\mu$ l NreB (0,4 - 0,9 mM) in eine 0,5 ml Küvette (Mikro-Küvette, 115-QS, Hellma) pipettiert und ein Absorptionsspektrum aufgenommen (Ultrospec 2001 pro, Pharmacia), und Puffer A als Blindwert abgezogen.

Die Photoreduktion fand dann im 4°C Raum statt. Dafür wurde die Lichtquelle (Diaprojektor) in einem Abstand von 30 cm aufgestellt und die Probe in eine mit Alufolie ausgekleidete Box gestellt. Alle zehn Minuten wurde ein Absorptionsspektrum aufgenommen. Eine Verringerung der Absorption war ein Indiz für eine erfolgreiche Reduktion. Dann wurde die Probe im Anaeroben-Zelt in eine EPR-Kapillare gefüllt und luft-



dicht mit Plastilin verschlossen. Die Probe wurde in mit flüssigem N<sub>2</sub> gekühlten Petroleum Ether (Benzin 40 - 60) eingefroren und dann in flüssigem Stickstoff. Der Versand der Proben erfolgte auf Trockeneis (-80°C). Die EPR-Messungen und die Auswertung der Spektren wurde von Dr. Eckhard Bill (MPI für Bioanorganische Chemie in Mülheim an der Ruhr) durchgeführt.

### **3.3.16 Luftexposition von anaerob präpariertem NreB**

Um die O<sub>2</sub>-Sensitivität des FeS-Zentrums zu untersuchen, wurde anaerob präpariertes oder rekonstituiertes NreB an Luft exponiert. Der Puffer, in dem sich NreB bei Luftexposition befand, durfte keine Reduktionsmittel enthalten.

NreB (0,1 - 0,6 mM) wurde im Anaeroben-Zelt in einen Plastikbehälter (Fa. Nalgene) pipettiert (0,2 - 1 ml) und dieser mit einem Deckel (mit O-Ring Gummidichtung) luftdicht verschlossen. Das Gefäß wurde ausgeschleust und zur Luftexposition geöffnet und leicht geschwenkt. In definierten Zeitabständen wurden Proben entnommen und zur Aufnahme von EPR-Spektren oder Mössbauer-Spektren auf die gleiche Art und Weise wie unter 3.3.15 und 3.3.12 beschrieben eingefroren. Um den Einfluss der Luftexposition auf das Absorptionsspektrum zu untersuchen, wurde zunächst ein UV/Vis-Spektrum vor Luftexposition aufgenommen. Nach Luftexposition wurde die Probe vor Messung neuer Absorptionsspektren zentrifugiert (14.000 U/min, 1 min, RT), um Präzipitate abzutrennen. Zur Auswertung wurden die Integrale der beiden Absorptionsschultern bei 325 nm (318 - 361nm) und bei 420 nm (398 - 441 nm) mit der Software SWIFT II - Wavescan berechnet.

### **3.3.17 Messung der Autophosphorylierung von NreB**

Zur Bestimmung der Phosphorylierungsaktivität von anaerob präpariertem und rekonstituiertem NreB wurden alle Arbeitsschritte soweit nicht anders angegeben im Anaeroben-Zelt durchgeführt. Zur Bestimmung des Einflusses von Sauerstoff auf die Aktivität wurde NreB vor dem Start der Autophosphorylierungsreaktion zunächst mit Luft exponiert (3.3.14). Die Verwendung von anaerobisierten Puffern und DTT im Phosphorylierungsansatz verhinderte eine weitere Oxidation.

Autophosphorylierungsansatz:

7 µl NreB (100 - 200µM)  
9 µl Reaktionspuffer (5x)  
26 µl Puffer C

---

3 µl [<sup>33</sup>P]-ATP (0,22 µM; 5,5 TBq/mmol; Hartman Analytic)

Die Reaktion fand bei RT statt und wurde durch Zugabe von [<sup>33</sup>P]-ATP gestartet. Nach 0 s, 30 s, 60 s, 90 s, 120 s und 150 s wurden jeweils 4 µl Probe entnommen und sofort mit 8 µl Stopp-Lösung gestoppt. NreB wurde in einem 12,5 % SDS-Gel separiert. Nach der Elektrophorese wurde das Gel zur Messung der Radioaktivität auf eine Phosphoimagerplatte (FUJIFILM Imaging Plate BAS 2040) gelegt. Um eine Kontamination der Imaging Plate zu verhindern, wurde das SDS-Gel in Saran® Wrap (Dow Chemical Company) gewickelt (luftblasenfrei). Die Inkubationszeit der Proben auf der Phosphoimagerplatte hing von der Höhe der Radioaktivität ab. In den durchgeführten Experimenten waren Inkubationszeiten von 20 - 24 h ausreichend. Um eine Diffusion der Proteinbanden im SDS-Gel zu verhindern, wurde die Platte bei 4°C inkubiert. Die emittierte Energie (β-Strahlen) des [<sup>33</sup>P]-ATP verursachte eine proportionale Änderung der kristallinen Schicht der Phosphoimagerplatte, die mit dem Bioimaging Analyzer FUJI BAS-1500 (FUJIFILM) und dem Programm BAS-Reader ausgewertet werden konnte. Die detektierte Radioaktivität wurde als Schwärzung im Autoradiogramm angezeigt und mit der Software Gel-Pro Analyzer 6.0 quantifiziert. Auswertung von Parallelversuchen haben eine Abweichung der Intensitäten von ± 15% gezeigt. Dies wurde in den Grafiken in Form von Fehlerbalken dargestellt.

Lösungen:

**5x-Reaktionspuffer (pH 8,0):**

HEPES	250 mM
KCl	250 mM
MgCl <sub>2</sub>	25 mM
EDTA	2,5 mM
DTT	10 mM

**Stopp-Lösung (pH 8,0):**

SDS-Probenpuffer (2x)	1 Volumen
Reaktionspuffer (1x)	1 Volumen

**3.4 Molekularbiologische Methoden****3.4.1 Isolation genomischer DNA aus *S. carnosus***

(Marmur *et al.*, 1961)

Es wurde eine ÜNK des betreffenden Stamms (5 ml) gezüchtet. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation (12.000 U/min, 1min, RT) pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 400 µl P1-Puffer (Qiagen) resuspendiert und nach Zugabe von 20 µl Lysostaphin 0,5 U/ml (Genmedics GmbH) für 20 - 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Danach wurden 40 µl SDS (gesättigte Lösung in 45% Ethanol) hinzugefügt, kurz gevortext und 5 min bei 37 °C inkubiert. Dazu wurden 100 µl NaClO<sub>4</sub> (5 M) hinzugefügt und erneut auf einem Vortexer gemischt.

Zur Phenol-Chloroform Extraktion wurden 500 µl Phenol/Chloroform Gemisch (1:1) mit der Probe vermischt, 1 min gevortext und dann zentrifugiert (14.000 U/min, 30 min, RT). Nach der Zentrifugation wurde die obere Phase abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Anschließend wurden 500 µl Chisom (Chloroform/Isoamylalkohol 24:1) hinzugefügt, 1 min gevortext und zentrifugiert (14.000 U/min, 30 min, RT). Erneut wurde die obere Phase abgenommen und in einem neuen Gefäß mit 350 µl Isopropanol auf einem Vortexer gemischt. Der weiße Niederschlag der chromosomalen DNA wurde mit einem Zahnstocher in ein neues Gefäß überführt und mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen. Nach Zentrifugation (14.000 U/min, 5 min, RT) wurde der Überstand dekantiert und das Pellet eine Stunde bei RT getrocknet.

Abschließend wurde das Pellet in 100 µl sterilem H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> (pH 8,0) gelöst und bis zur Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

### 3.4.2 Plasmid Mini-Präparation aus *E. coli* und *S. carnosus*

Die Plasmidisolierung wurde nach dem Protokoll des Herstellers (QIAprep® Miniprep Handbook, Second Edition, Dezember 2006) unter Verwendung eines QIAprep Spin Miniprep Kits und einer Tischzentrifuge durchgeführt. Bei Plasmid-Isolierung aus *Staphylococcus carnosus* wurde nach Zugabe von P1-Puffer ein weiterer Arbeitsschritt eingeführt. Zum Abbau der Gram-positiven Zellwand wurden dem Ansatz 10 µl Lysostaphin (0,5 U/µl) hinzugefügt. Anschließend wurden die Zellen im Wasserbad bei 37°C bis zu 20 min inkubiert, bis eine schleimig-viskose Suspension entstanden war. Die weiteren Arbeitsschritte wurden nach dem Protokoll von Qiagen durchgeführt.

### 3.4.3 Agarosegel-Elektrophorese

Durchführung: Abhängig von der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente (0,1 - 1 µg) wurden 0,5 - 2% (w/v) Agarosegele verwendet (Tab. 5). Agarose wurde in TAE-Puffer (1x) bis zur Lösung in einer Mikrowelle aufgeköcht. Nach dem Abkühlen auf 50 - 60 °C wurden zu 100 ml Agarose 4 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) hinzugefügt.

Vor dem Auftragen wurden die Proben mit DNA-Auftragspuffer (5x) gemischt. Als Größenstandard wurde *BsteII* restringierte λ-DNA (0,00225 pmol/µl) verwendet. Die Elektrophorese wurde mit TAE (1x) als Laufpuffer bei einer konstanten Spannung von 90 V durchgeführt. Nach 20 - 30 min, wurde das Agarosegel auf einen UV-Tisch gelegt und photographiert.

Tab. 5: **Konzentration des Agarosegels zur Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größen (bp)**

<b>Fragmentgröße linearer DNA (bp)</b>	<b>Agarose (%)</b>
30.000 - 1.000	0,5
12.000 - 800	0,7
10.000 - 500	1,0
7.000 - 400	1,2
3.000 - 200	1,5
2.000 - 50	2,0

Lösungen:**TAE(50x)-Puffer (pH 8):**

Tris	242 g
Essigsäure	57,1 ml
0,5 M EDTA	100 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	à 1 L

**DNA-Auftragspuffer (5x):**

Saccharose	40% (w/v)
Bromphenolblau	0,25% (w/v)
Xylencyanol in Wasser	0,25% (w/v)
OrangeG	0,25% (w/v)

**3.4.4 Restriktion von DNA-Molekülen**

Für analytische Restriktionsansätze wurden DNA Mengen von 100 - 200 ng eingesetzt (Tab. 6). Die Restriktionsenzyme und die dazugehörigen Puffer wurden von der Firma Fermentas ([www.fermentas.com](http://www.fermentas.com)) bezogen und laut Angaben des Herstellers eingesetzt. Nach der Restriktion wurde der Ansatz mit DNA-Auftragspuffer (5x) gemischt und auf einem 1% Agarosegel aufgetrennt (35 min, 90 V). Für präparative Ansätze wurde eine höhere Menge an DNA verwendet und die Menge an Restriktionsenzym dementsprechend erhöht. Zur Entfernung der Restriktionsenzyme wurde die DNA mit einem PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt und ein Aliquot zur Auftrennung auf einem analytischen Agarosegel entnommen. Restriktionsreaktionen mit zwei Endonukleasen wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Tab. 6: **Analytische- und präparative Restriktionsansätze**

<b>Komponente</b>	<b>präparativer Ansatz</b>	<b>analytischer Ansatz</b>
	<b>Volumen (µl)</b>	<b>Volumen (µl)</b>
DNA (ca. 100 ng/µl)	30	6
10x Reaktionspuffer	5	5
Restriktionsenzym	2	1
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> (steril)	à 50	à 20

### 3.4.5 Ligation von DNA-Molekülen

In einem Ligationsansatz wurden Vektor (100 ng) und Insert in Verhältnissen (1:1), (1:3) und (1:5) eingesetzt.

x µl Vektor (100 ng)  
x µl Insert (300 ng)  
2 µl 10x Puffer  
1 µl T<sub>4</sub>-DNA-Ligase  
x µl H<sub>2</sub>O

---

20 µl H<sub>2</sub>O

Alle Ansätze wurden über Nacht bei 16 °C inkubiert und anschließend mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> auf 50 µl aufgefüllt. Zur Fällung wurden 500 µl n-Butanol hinzugefügt und sofort 10 s gevortext. Anschließend wurde die Probe zentrifugiert (13.300 U/min, 10 min, RT) und danach der Überstand dekantiert. Zum Waschen der DNA wurden 500 µl eiskaltes Ethanol 75% (v/v) hinzugefügt und erneut zentrifugiert (13.300 U/min, 5 min, RT). Der Überstand wurde dekantiert und 5 min bei RT im Rotationsverdampfer (Concetrator 5301, Eppendorf) bei 30 °C getrocknet. Danach wurde das DNA-Pellet in 20 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 3.4.6 Konzentrationsbestimmung von DNA-Molekülen

Konzentrationsbestimmungen von DNA-Molekülen wurden mit einem BioPhotometer (Eppendorf) durchgeführt. Eine geeignete Verdünnung der DNA-Lösung wurde gegen H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> als Blindwert gemessen (2 µl DNA + 48 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>). Vor der Messung wurden die Proben 1 min gevortext. Der Quotient  $A_{260}^2 / A_{280}^3$  sollte zwischen 1,8 - 2 liegen und gibt Aufschluss über die Reinheit der DNA.

### 3.4.7 Sequenzierung von DNA-Molekülen

DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma AGOWA ([www.agowa.de](http://www.agowa.de); Berlin) durchgeführt. Ein Sequenzierungsansatz enthielt 10 µl (80 ng/µl) zu sequenzierendes Plasmid und 4 µl Sequenzierungsprimer (5 pmol/µl).

---

<sup>2</sup> Absorptionsmaximum von DNA-Molekülen

<sup>3</sup> Absorptionsmaximum von Proteinen

### 3.4.8 Protoplastentransformation von *S. carnosus*

Herstellung der Protoplasten: (Götz und Schumacher, 1987)

300 ml BM wurden mit 1 ml einer ÜNK von *S. carnosus* angeimpft und bei 37°C und 160 U/min bis zum Erreichen von  $OD_{578} \leq 0,5$  inkubiert. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation (8.000 g, 15 min, 4°C) in sterilen Zentrifugenbechern geerntet. Das Zellpellet wurde vorsichtig in 30 ml SMMP-B resuspendiert und in ein steriles 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Dazu wurden 21 µl Lysostaphin (0,5 U/µl) hinzugefügt (10 - 12 U Lysostaphin für 300 ml Kultur). Die Suspension wurde vorsichtig gemischt und stehend (leicht schräg stellen) über Nacht (max. 16 h) bei 30 °C inkubiert.

Die Bildung von Protoplasten wurde mikroskopisch überprüft. Das Verhältnis von ganzen Zellen zu Protoplasten sollte ca. 1:1 betragen. Protoplasten sind im Lichtmikroskop vergrößert und vereinzelt. Bei diesen Protoplasten handelt es sich im eigentlichen Sinne um Sphäroplasten, da sie noch Zellwandfragmente besitzen.

Die Zellen wurden durch Zentrifugation (4.500 U/min, 25 min, RT) geerntet. Danach wurde der Überstand dekantiert. Es wurde darauf geachtet, dass sich ein eindeutiges Pellet gebildet hatte und kein „Schmier“ entlang des Zentrifugenröhrchens. Bei der Bildung eines „Schmiers“ waren die Zellen zu stark lysiert und mussten neu hergestellt werden. Das Protoplasten-Pellet wurde mit 5 ml SMMP-B gewaschen, um Spuren von Lysostaphin zu entfernen und erneut zentrifugiert (4.500 U/min, 25 min, RT). Danach wurde das Pellet vorsichtig (Glaspipette verwenden, um Scherkräfte zu vermeiden) in 2 ml SMMP-B resuspendiert. Die Protoplasten wurden à 300 µl in sterile Greiner-Röhrchen (10 ml) aliquotiert und bei -80 °C bis zur Verwendung aufbewahrt.

Durchführung der Protoplastentransformation:

Ein Aliquot (300 µl) der Protoplastensuspension wurde auf Eis aufgetaut. Zur Transformation von intaktem Plasmid wurden 15 µl (100 - 150 ng/µl ~ 2 µg) und zur Transformation eines Ligationsansatzes 150 µl (20 µg) DNA eingesetzt.

Um eine Lyse der Protoplasten nach Kontakt mit der hypotonischen Plasmid-Lösung zu verhindern, wurde die DNA an den Rand des Röhrchens pipettiert und dann zusammen mit 2 ml Fusogen (Glaspipette) in die Protoplasten gespült. Das Röhrchen wurde vorsichtig durch Invertieren für 1 min gemischt und eine weitere Minute stehend inkubiert (Vorsicht: Zu langes Einwirken von Fusogen kann die Protoplasten schädigen). Dann wurden sofort 7 ml SMMP-B Medium dazu pipettiert und die Suspension erneut durch Invertieren gemixt. Die Protoplasten wurden zentrifugiert (4.500

U/min, 25 min, RT) und der Überstand dekantiert. Das Pellet wurde im Rücklauf (300 µl) resuspendiert.

Die Protoplastensuspension (2 x 150 µl) wurde unverdünnt auf DM3-Agarplatten (Tab. 7) ausplattiert. Beim Ausplattieren war darauf zu achten, dies nur kurz und ohne starken Druck durchzuführen. Die Agarplatten sollten feucht bleiben und wurden mit dem Deckel nach oben 4 h bei 37 °C inkubiert. Nach der phänotypischen Expression (manchmal kann man nach 4 h schon Kolonien erkennen, die nach Zugabe des Antibiotikums wieder verschwinden) wurden die Platten mit 3 ml Softagar (Tab. 8 und 9) und dem entsprechenden Antibiotikum überschichtet (immer nur auf eine Antibiotikaresistenz selektieren). Die Platten wurden 2 Tage bei 37°C inkubiert.

Medien und Lösungen:

---

**Lysostaphin 0,5 U/µl**

Lysostaphin wurde in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> gelöst und steril filtriert (Sartorius Minisart RC 25; Porengröße 0,45 µM) Aliquots von 1 ml wurden bei -20 °C gelagert.

---

**2 x SMM**

**(250 ml)**

Saccharose	1 M	85,6 g
Maleinsäure	40 mM	1,16 g
MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	40 mM	2,03 g

pH 6.8 mit NaOH (6 N) eingestellt; Lösung wurde steril filtriert (Millipore, Steritop™ Filter).

---

**4 x PAB (Penassy Broth)**

Difco Antibiotic Medium 3	70 g/L
---------------------------	--------

Medium wurde 12 min autoklaviert.

---

**BSA-Lösung (5%)**

BSA (Bovine Serum Albumin)	5 g
2 x SMM	100 ml

BSA wurde in 2 x SMM gelöst und der pH mit NaOH (1 N) auf 7,5 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung steril filtriert (Sartorius Minisart RC 25; Porengröße 0,45 µM) und bei 4 °C gelagert.

---



**SMMP-B: (jedes Mal frisch herstellen!)**

	<b>100 ml</b>	<b>50 ml</b>
2 x SMM	75 ml	37,5 ml
4 x PAB	20 ml	10 ml
BSA (5%)	5 ml	2,5 ml

**Fusogen:**

Polyethylenglykol 6000	40 g
2 x SMM	50 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	à 100 ml

Der pH wurde auf 6,5 eingestellt und die Lösung anschließend steril filtriert (Millipore, Steritop™ Filter)

Tab. 7: **DM3-Agarplatten zur Regeneration der Protoplasten.** Lösungen 1 - 4 wurden separat autoklaviert und Glukose- und BSA- Lösung wurden steril filtriert. Die Komponenten wurden nachdem alle auf ca. 50 °C abgekühlt waren gemischt. Zu erst wurde Lösung 2 in Lösung 1 (ohne Blasen zu erzeugen) gekippt und dabei auf einem Magnetrührer gemischt. Es wurden 30 ml pro Platte verwendet, die bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert werden konnten (ca. 1 Monat).

<b>Komponenten</b>		<b>DM3-Medium (1 L)</b>
1	Agar	1,5 % (w/v) 200 ml
2	Natriumsuccinat (6H <sub>2</sub> O) pH 7,3 (pH mit Bernsteinsäure einstellen)	500 ml
3	Select Peptone 140	3,5 % (w/v) 100 ml
	Select Hefeextrakt	10 % (w/v) 60 ml
4	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (3H <sub>2</sub> O)	3,5 % (w/v) 100 ml
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 % (w/v)
5	Glukose	50 % (w/v) 10 ml
6	MgCl <sub>2</sub>	1 M 20 ml
7	BSA	5 % (w/v) 10 ml

**CY-3-Soft Agar ( Selektion der Transformanden): 400 ml**

Peptone No. 140 (Select)	10 g
Hefeextrakt (Select)	10 g
NaCl	6 g
Agar (Select)	4 g

CY-3-Agar wird für 12 min autoklaviert

Tab. 8: „Mix“-Lösung (Lagerung erfolgte bei 4 °C)

Komponenten	40 ml	20 ml
MgCl <sub>2</sub> (1 M)	10 ml	5 ml
Glukose 50% (w/v)	5 ml	2,5 ml
Na-β-glycerol-phosphat (1,5 M)	20 ml	10 ml
BSA (5%)	5 ml	2,5 ml

Tab. 9: **Präparation des Softagars:** CY-3-Agar wurde in der Mikrowelle geschmolzen und mit vorgewärmter (60 °C) Succinat-Lösung vereinigt. Danach wurde die Mix-Lösung und Chloramphenicol hinzugefügt und jede Agarplatte mit 3 ml überschichtet. Nach erfolgreicher Transformation wurden Klone gepickt und auf Erythromycin- und Chloramphenicol-haltigen BM-Platten ausgestrichen.

Komponenten	3 Platten	12 Platten
CY-3	5 ml	20 ml
Na-Succinat (1 M) pH 7,3	5 ml	20 ml
Mix-Lösung	0,8 ml	3,2 ml
Chloramphenicol (10 mg/ml)	108 µl	432 µl

### 3.4.9 Elektrotransformation von *S. carnosus*

Herstellung elektrokompeter Zellen (Löfblom *et al.*, 2007): Zunächst wurden 500 ml BM mit einer ÜNK auf eine OD<sub>578</sub> von 0,5 angeimpft und in einem Erlenmeyerkolben (2 L) mit Schikanen inkubiert (37 °C und 160 U/min), bis eine OD<sub>578</sub> von 0,6 erreicht war. Zum Stoppen des Wachstums wurden die Zellen 15 min auf Eis inkubiert und anschließend in einem sterilen Zentrifugenbecher (500 ml) durch Zentrifugation (15 min, 4.000 U/min, 4°C) geerntet. Das Zellpellet wurde dreimal mit jeweils 500 ml, 250 ml und 80 ml sterilem, eiskaltem H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> gewaschen. Weitere Waschschritte wurden mit 10 ml und 5 ml eiskaltem Glycerin (10%) durchgeführt. Danach wurde das Zellpellet in 2 ml eiskaltem Glycerin (10%) resuspendiert (ca. 4x10<sup>10</sup> Zellen/ml). Aliquots à 60 µl wurden bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Elektrotransformation (Löfblom *et al.*, 2007): Die Zellen wurden 5 min im Eisbad aufgetaut und anschließend 30 min bei RT inkubiert. Es wurden 1 - 10 µl (4 µg) DNA hinzugefügt, gemischt und wieder 10 min bei RT inkubiert. Zur Inaktivierung des Restriktionssystems von *S. carnosus*, wurden die Zellen einem Hitzeschock ausgesetzt. Dafür wurden die Zellen pelletiert und in einem Heizblock 2 min bei 56 °C erhitzt. Sofort danach wurde das Pellet in 500 µl Elektroporationspuffer (0,5 M Saccharose und 10 % Glycerin) resuspendiert, zentrifugiert (5.000 g, 15 min, RT) und in 40 µl Elektroporationspuffer aufgenommen. Der Ansatz wurde in eine Elektroporationsküvet-

te (2 mm) gefüllt und mit einem Elektroporator (EasyjecT Prima EQUIBIO) bei 1800 V transformiert. Alle Arbeitsschritte wurden bei RT durchgeführt. Sofort nach der Elektrottransformation wurde 1 ml BM hinzugefügt. Die Zellen wurden 2 h bei 37 °C und 160 U/min inkubiert, anschließend zentrifugiert (5.000 U/min, 1 min, RT) und in 200 µl BM resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf BM-Agarplatten, die Chloramphenicol (10 µg/ml) enthielten, ausplattiert und 48 h bei 37 °C inkubiert.

#### **3.4.10 Elektrotransformation von *E. coli***

Herstellung elektrokompeter Zellen (Farinha *et al.*, 1990): Eine ÜNK des benötigten Stammes wurde in 5 ml LB-Medium angezogen. 30 ml LB-Medium wurde in einem Erlenmeyerkolben (300 ml) mit Schikanen mit 1% Inokulum beimpft. Die Kultur wurde in einem Inkubationsschüttler (Innova 4000 Incubator shaker; New Brunswick Scientific) bei 37 °C und 160 U/min gezüchtet. Nach dem eine OD<sub>578</sub> von 0,5 erreicht war, wurden die Zellen durch Zentrifugation (5.000 U/min, 10 min, 4 °C) geerntet. Alle weiteren Schritte wurden soweit möglich auf Eis durchgeführt. Nach der Zentrifugation wurde das Pellet jeweils mit 10 ml und 1 ml eiskaltem MOPS-Puffer (1 mM MOPS, 15% Glycerin (v/v)) gewaschen. Nach dem Waschschrift wurde das Pellet in 200 µl MOPS-Puffer resuspendiert und à 40 µl aliquotiert. Die Zellen wurden in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren und bis zu Verwendung bei -80°C gelagert.

Elektrotransformation kompetenter *E. coli* - Zellen (Dower *et al.*, 1988): Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und entweder mit Ligationsansatz (10 µl) oder intaktem Plasmid (5 - 10 ng) gemischt. Das Gemisch wurde in eine sterile, vorher auf Eis gekühlte Elektroporationsküvette (2 mM, EQUIBIO) pipettiert. Die Elektroporation erfolgte bei 2500 Volt. Sofort danach wurde 1 ml SOC-Medium (37°C) zu den Zellen pipettiert. Der gesamte Ansatz wurde in sterile Reaktionsgefäße (1,5 ml) überführt und 1 - 3 h inkubiert (37 °C, 160 U/min).

Von den transformierten Zellen wurden jeweils 100 µl auf selektiven LB-Agarplatten ausplattiert. Nach der Transformation eines Ligationsansatzes wurden die Zellen durch Zentrifugation (5.000 U/min, 30 s, RT) pelletiert und der Überstand bis auf ca. 200 µl abgegossen. Das Zellpellet wurde im verbleibenden Überstand resuspendiert und auf selektiven LB-Agarplatten ausplattiert. Zum Wachstum der rekombinanten Klone wurden die Agarplatten über Nacht bei 37 °C inkubiert.

#### **3.4.11 Konstruktion der Vektors pET28a nreB**

Das *nreB* Gen wurde von pCQE1*nreB* aus *S. carnosus* m1 inklusive His•Tag® amplifiziert. Mit den Primern (Tab. 10) wurden Schnittstellen für *Hind*III und *Nco*I in das PCR-Produkt eingebracht, über die *nreB* in pET28a gerichtet kloniert werden konnte. In pET28a befand sich *nreB* unter Kontrolle des T7-Promoters, der mit IPTG induziert werden konnte (Abb. 7).

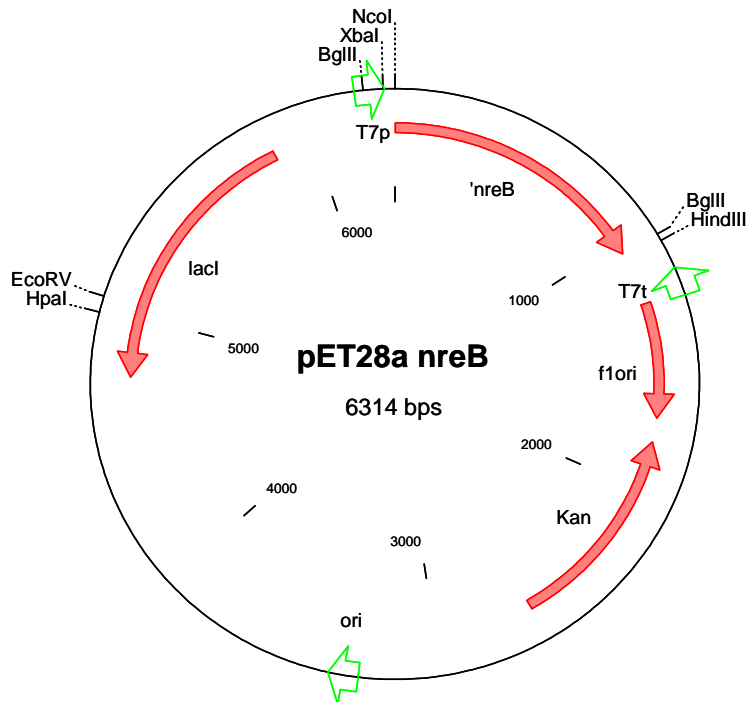


Abb. 7: Das Plasmid pET28a *nreB* zur Überexpression von NreB•His in *E. coli*. NreB•His steht unter Kontrolle des T7-Promoters, der durch IPTG induzierbar ist und wurde über die Schnittstellen *Hind*III und *Nco*I kloniert. Das Plasmid vermittelt *E. coli* eine Resistenz gegenüber Kanamycin.

Tab. 10: Synthetische Oligonukleotide (MWG Biotech, [www.mwg-biotech.com](http://www.mwg-biotech.com), HPSF gereinigt) zur Amplifizierung von *nreB*•His aus pCQE1*nreB* mittels PCR. Die Schnittstellen für *Nco*I und *Hind*III sind unterstrichen. Die Stammlösungen der Oligonukleotide hatten eine Konzentration von 100 pmol/μl. In der PCR wurden Konzentrationen von 10 pmol/μl eingesetzt.

Name	Sequenz (5'→3')	T <sub>m</sub> (°C)	Zielgen
NreBpCQE1-F	GTT AAC <u>CC</u> 'C ATG <u>GAA</u> TCA ATA AG	57,1	<i>nreB</i>
NreBpCQE1-R	GCT AAT CA' <u>A</u> GCT <u>TAA</u> TGG TGA TG	57,1	<i>nreB</i>

### 3.4.12 Konstruktion des Vektors pRB473*nreABC*

Der Vektor pRB473nreABC wurde zur Komplementation von *S. carnosus* m1 ( $\Delta nreABC::ermB$ ) konstruiert. Dafür wurde aus *S. carnosus* TM300 genomische DNA isoliert und das 2,8 kb große *nreABC*-Operons amplifiziert. Die PCR-Reaktion (Tab. 11) wurde in einem Thermocycler (Techne, Progene-02) nach folgenden Parametern (Tab. 12) durchgeführt. Die Primer (Tab. 13) wurden so gewählt, dass das Operon mit seinem nativen Promotor amplifiziert werden konnte. Über die verwendeten Primer wurde eine *Bam*HI und eine *Sal*I Schnittstelle in das PCR-Produkt eingefügt. So konnte das *nreABC*-Insert gerichtet in den ebenfalls mit *Sal*I und *Bam*HI restringierten Vektor pRB473 kloniert werden. Das entstandene Plasmid wurde pRB473nreABC benannt (Abb. 8).

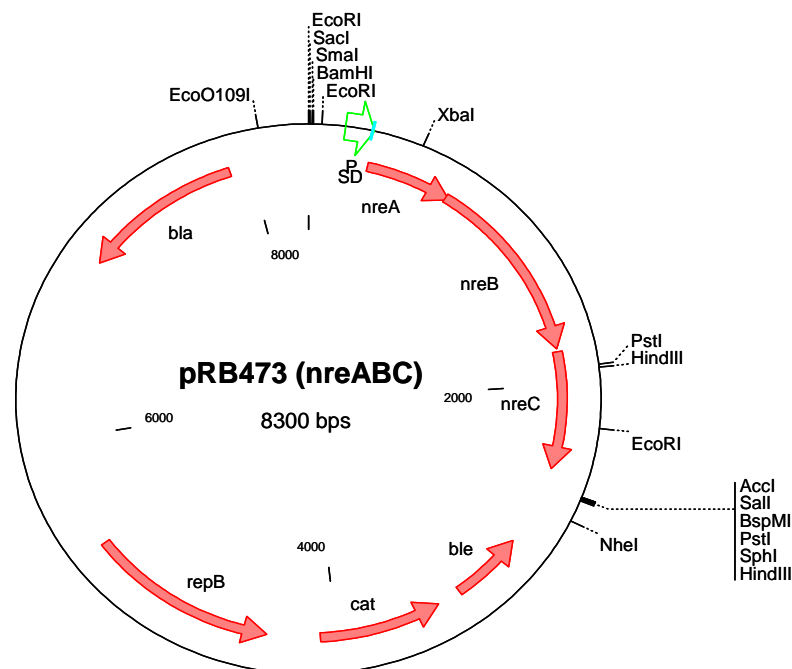


Abb. 8: **Das Plasmid pRB473nreABC ist ein *E. coli* / *S. carnosus* Shuttle-Vektor.** Es trägt die Antibiotikaresistenzgene gegen Ampicillin und Chloramphenicol. In *E. coli* wird die Resistenz gegen Ampicillin exprimiert und in *S. carnosus* die Resistenz gegen Chloramphenicol. Das *nreABC*-Operon wurde mit seinem nativen Promotor über die Schnittstellen *Bam*HI und *Sal*I kloniert.

pRB473 ist ein *E. coli* - *S. carnosus* Shuttle-Vektor, der mit 10 - 20 Kopien in der Zelle vorliegt (von Prof. F. Götz zur Verfügung gestellt). Der Vektor wurde nach der Ligation zunächst in *E. coli* transformiert und dann für eine Sequenzierung präpariert. Das *nreABC* Operon in pRB473nreABC wurde unter Verwendung von Sequenzierungs-Primern (Tab. 14) komplett sequenziert. Anschließend wurde pRB473nreABC für Komplementations- und Funktionsstudien in *S. carnosus* m1 (*nreABC::ermB*) transformiert.

Tab. 11: **PCR-Ansatz zur Amplifizierung des *nreABC*-Operons aus genomischer DNA von**

<b><i>S. carnosus</i> TM300</b>		
<b>Komponente</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Volumen [µl]</b>
10x PfuUltra™-Puffer	-	5
PfuUltra™ (Stratagene)	2,5 U/µl	1
dNTPs (Stratagene)	10 mM	0,4
nreABC-BamHI-F	10 pmol/µl	1
nreABC-BamHI-R	10 pmol/µl	1
DNA-Matrize	0,8 - 1,4 µg/µl	1
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> (DNase-, RNase frei)	-	40,6

Tab. 12: **PCR-Programm zur Amplifizierung des *nreABC*-Operons aus genomischer DNA von *S. carnosus* TM300**

<b>Zyklus</b>	<b>Temperatur (°C)</b>	<b>Zeit</b>	<b>Anzahl der Zyklen</b>
Denaturierung	95	2 min	1
Denaturierung	95	30 s	30
Annealing <sup>4</sup>	48	30 s	30
Elongation	72	3 min	30
Finale Elongation	72	10	1

Tab. 13: **Synthetische Oligonukleotide für PCR** (MWG Biotech, [www.mwg-biotech.com](http://www.mwg-biotech.com), HPSF gereinigt) Die Schnittstellen für *Bam*HI und *Sa*II sind unterstrichen. Die Stammlösungen der Oligonukleotide hatten eine Konzentration von 100 pmol/µl. Zur PCR wurden Konzentrationen von 10 pmol/µl eingesetzt.

<b>Name</b>	<b>Sequenz (5'→3')</b>	<b>T<sub>m</sub>(°C)</b>	<b>Zielgen</b>
nreABC- <i>Bam</i> HI-F	CTG TAT <u>GG</u> 'G <u>ATC</u> CTA TTC TAC	55,9	<i>nreABC</i>
nreABC- <i>Sa</i> II-R	GTT TAA TAG <u>G</u> 'TC <u>GAC</u> ACC TTG	55,9	<i>nreABC</i>

Tab. 14: **Synthetische Oligonukleotide für die Sequenzierung von pRB473nreABC** (MWG Biotech, [www.mwg-biotech.com](http://www.mwg-biotech.com), HPSF gereinigt) Die Stammlösungen der Oligonukleotide hatten eine Konzentration von 100 pmol/µl. Für Sequenzierungsreaktionen wurden Konzentrationen von 5 pmol/µl eingesetzt.

<b>Name</b>	<b>Sequenz (5'→3')</b>	<b>T<sub>m</sub>(°C)</b>	<b>Zielgen</b>
pRB473nreB-F	ACT AAC AGC AAT GGT GGC TAT C	58,4	<i>nreB</i>
pRB473nreB-R	CCC GAT CAC TCA CTT CTG C	58,8	<i>nreB</i>
pRB473nreABC-F	GAT GCC TCA AGC TAG AGA GTC	59,8	<i>nreABC</i>
pRB473nreABC-R	TTC AGA ACG CTC GGT TGC C	58,8	<i>nreABC</i>

### 3.4.13 Gerichtete Mutagenese der Cysteinreste von NreB

<sup>4</sup> "Annealing"-Temperatur für PCR-Reaktionen = Schmelzpunkt der Primer (T<sub>m</sub>) – 5°C

Die Cysteinreste von *nreB* in pRB473*nreABC* wurden mittels QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) gegen Alanin oder Serin ausgetauscht. Zum Einfügen der Punktmutationen wurden entsprechende Primer kreiert (Tab. 15). Die Schmelztemperatur ( $T_M$ ), bei der PCR mit den Mutagenese-Oligos wurde nach folgender Formel berechnen:

$$T_M = 81,5 + 0,41 \times \text{GC}(\%)^5 - (675/N^6 - \text{Fehlpaarung}(\%)^7)$$

Tab. 15: **Synthetische Oligonukleotide für Mutagenese der Cysteinreste von NreB in pRB473*nreABC***. (MWG Biotech, [www.mwg-biotech.com](http://www.mwg-biotech.com), HPSF gereinigt) Die Stammlösung der Oligonukleotide hatte jeweils eine Konzentration von 100 pmol/µl. Mutationstragende Basentriplets sind unterstrichen und mutierte Basen gelb markiert.

Name	Sequenz (5'→3')	$T_M$ (°C)
F-C59A- <i>nreB</i>	CTC AAA TGA CGA ATG CAG TT <u>G</u> <u>CTC</u> GCA GAT GTG AAG GAT ATT C	72,3
R-C59A- <i>nreB</i>	GAA TAT CCT TCA CAT CTG CGA <u>GAA</u> ACT GCA TTC GTC ATT TGA G	72,3
F-C59S- <i>nreB</i>	CTC AAA TGA CGA ATG CAG TTT <u>CTC</u> GCA GAT GTG AAG GAT ATT C	71,3
R-C59S- <i>nreB</i>	GAA TAT CCT TCA CAT CTG CGA <u>GCA</u> ACT GCA TTC GTC ATT TGA G	71,3
F-C62S- <i>nreB</i>	GAC GAA TGC AGT TTG TCG CAG <u>ATC</u> <u>TGA</u> AGG ATA TT	68,3
R-C62S- <i>nreB</i>	AAT ATC CTT <u>CAG</u> <u>ATC</u> TGC GAC AAA CTG CAT TCG TC	68,3
F-C74S- <i>nreB</i>	GAT ATT ATG TCT <u>TCI</u> GAA AAC TGC TTT TTA GAA GCC TTA G	66,4
R-C74S- <i>nreB</i>	CTA AGG CTT CTA AAA AGC AGT TTT <u>CAG</u> <u>AAG</u> ACA TAA TAT C	66,4
F-C77S- <i>nreB</i>	GAT ATT ATG TCT TGT GAA AAC <u>TCC</u> TTT TTA GAA GCC TTA G	66,4
R-C77S- <i>nreB</i>	CTA AGG CTT CTA AAA <u>AGG</u> <u>AGT</u> TTT CAC AAG ACA TAA TAT C	66,4

<sup>5</sup> prozentualer GC-Gehalt des Primers

<sup>6</sup> Anzahl der Basen des Primers

<sup>7</sup> Prozentualer Anteil an Fehlpaarungen des Primers

Zur Überprüfung der Punktmutationen wurden die Plasmide mit dem Primer pRB473nreb-F (Tab. 14) sequenziert.

### 3.5 Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Anaeroben-Zelt		COY
Autoklav	2540 ELV	Tuttnauer Systec
BAS cassette	Bas cassette 2040	Fujix
Biophotometer	BioPhotometer	Eppendorf
Brutschrank	BD115 ATP-LIN	WTB Binder
Eraser	Analyzer Diana II	Raytest
Geltrocknungsgerät	PH-t20	Biotec-Fischer
Heizblock	Thermomixer comfort 5355 m. Wechselblock	Eppendorf
Imaging plate	BAS-MP2040(s)	Fujifilm
Inkubationsschüttler	Innova 4000 Incubator shaker	New Brunswick Scientific
Magnetrührer	MR 3000	Heidolph
pH-Meter	Digital-pH-Meter	Knick
Photometer	U-1100 Spectrophotometer	Hitachi
Rotationsverdampfer	Concentrator 5301	Eppendorf
Schüttelinkubator	Certomat®/S	B. Braun Biotech International
Spannungsgerät	PowerPac 200, Power Pac Basic	Biorad
Taumelschüttler	Duomax 1030	Heidolph
Thermocycler	My Cyclers™ thermal cyclers	BIORAD
Thermocycler	Progene-02	Techne
Tischzentrifuge	Hereaus Pico™ 17	Thermo Scientific
Tischzentrifuge	Mikroliter	Hettich
Tischzentrifuge	2K15	Sigma
UV/Vis Photometer	Ultrospec 2100 pro	Amersham Biosciences
Vortexer	VF2	JANKE&KUNKEL IKA®-Labortechnik
Waage	PE 626	Bosch
Waage	510-61	Kern & Sohn GmbH
Wasserbad	1002	GF-L



### 3.6 Chemikalien

Substanz	Anbieter	Bestellnummer
[ $\gamma$ -P <sup>33</sup> ] ATP	Hartman Analytic	SCF-301
Agar	Fluka	5040
Agarose	Carl Roth GmbH	2267.4
AHC Casein-Hydrolysat	Serva	48614
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth GmbH	8076.2
Ammoniumacetat	RPL B-3030 Leuven	1136
Ammoniumchlorid	Fluka	9718
Bacto™ Casamino Acids	BD (Becton Dickinson)	5273651
Bacto™-Trypton	BD (Becton Dickinson)	217293.1
BASF Katalysator R0-20	BASF	116 8678
Bernsteinsäure (Dinatriumsalz)	Carl Roth GmbH	3195
D-Saccharose	Carl Roth GmbH	4621.1
EDTA (Dinatriumsalz Dihydrat)	Carl Roth GmbH	8043.2
Eisen-57 (Barren)	AMT stable isotopes	
Erythromycin	Fluka	45673
Ferrozin	Sigma	P-5338
Fleischextrakt (Beef extract)	Carl Roth GmbH	X975.1
Glasperlen (Ø = 0,1mm)	Carl Roth GmbH	N029.1
Glukose	Carl Roth GmbH	6887.1
Glycerin	Carl Roth GmbH	4043.3
Guanidium-HCl	Fluka	50950
Hefeextrakt (servabacter)	Serva	24540
Imidazol	Carl Roth GmbH	3899.2
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Carl Roth GmbH	6878.1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Carl Roth GmbH	3904.1
L-Arginin	Carl Roth GmbH	3144.1
L-Cysteiniumchlorid	Merck	2839
Lysostaphin	Genmedics	
Na <sub>2</sub> S•9H <sub>2</sub> O (nonahydrate)	Sigma	S2006-500g
NaCl	Carl Roth GmbH	9265.2
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	J.T.Baker B.V.	303
Neocuproine	Sigma	N-1501
Ni-NTA Agarose	Qiagen GmbH	30210
Oxalsäure	Sigma	0-0501
PEG 6000	Carl Roth GmbH	0158.4
Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth GmbH	3029.1
Roti-Quant	Carl Roth GmbH	K015.1
Select Peptone 140	GibcoBRL®	30392-021
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH	4227.1
Sulfanilamid	Merck	11799
TEMED	Fluka	87699
Titrisol	Merck	1.09972.
Tris Ultra Qualität	Carl Roth GmbH	5429.3

Wasser, DNase-, RNase-frei und steril filtriert ( 0,2 µM)	Sigma	W4502
Zinkacetat Dihydrat	Fluka	96459

### 3.7 Internetadressen

Information	Webseite
Bacteriological Anal. Manual <i>Online</i>	<a href="http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-mi.html">http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-mi.html</a>
AMT-Isotopes	<a href="http://www.isotope-amt.com">www.isotope-amt.com</a>
ChemExper: Chemical Directory	<a href="http://www.chemexper.com">www.chemexper.com</a>
Deutsch-Englisches Wörterbuch	<a href="http://dict.leo.org/ende?lang=de&amp;lp=ende">http://dict.leo.org/ende?lang=de&amp;lp=ende</a>
DNA-Sequenzierung	<a href="http://www.agowa.de">www.agowa.de</a>
<i>E. coli</i> Codon Usage Analyzer 2.1	<a href="http://www.faculty.ucr.edu/~mmaduro/codonusage/usage.htm">www.faculty.ucr.edu/~mmaduro/codonusage/usage.htm</a>
EBI Tools: ClustalW	<a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html">http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html</a>
EBI Tools: Pairwise alignments	<a href="http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/">http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/</a>
Encyclopedia of <i>E. coli</i> K-12	<a href="http://ecocyc.org/">http://ecocyc.org/</a>
Fermentas	<a href="http://www.fermentas.com">www.fermentas.com</a>
Datenbank von FeS-Proteinen	<a href="http://metallo.scripps.edu/promise/FESMAIN.html">http://metallo.scripps.edu/promise/FESMAIN.html</a>
Landolt-Börnstein	<a href="http://lb.chemie.uni-hamburg.de/static/">http://lb.chemie.uni-hamburg.de/static/</a>
Molecular Biologist's Workbench	<a href="http://www.bioinformatics.org/JaMBW/">http://www.bioinformatics.org/JaMBW/</a>
NEWT: Taxonomy Browser	<a href="http://www.ebi.ac.uk/newt/display">http://www.ebi.ac.uk/newt/display</a>
Oligonucl. Properties Calculator	<a href="http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html">www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html</a>
PredictProtein-Server	<a href="http://www.predictprotein.org/">www.predictprotein.org/</a>
PSIPRED-Sever	<a href="http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/psiform.html">http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/psiform.html</a>
NCBI-PubMed	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/">www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/</a>
Qiagen	<a href="http://www1.qiagen.com/">http://www1.qiagen.com/</a>
Restriction Enzyme Database	<a href="http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html">http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html</a>
Science Direct	<a href="http://www.science-direct.com/science/journals">www.science-direct.com/science/journals</a>
ExpASY Proteomics Server	<a href="http://www.expasy.org/sprot/">www.expasy.org/sprot/</a>
Eurofin mwg/operon	<a href="http://www.mwg-biotech.com">www.mwg-biotech.com</a>

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Optimierung der Präparation von NreB

#### 4.1.1 Optimierung der Überexpression von NreB

Um NreB in ausreichenden Mengen (>10 mg) für die Mössbauer-Spektroskopie zu erhalten, wurden Zellzucht und Überexpression verbessert. Dazu wurde ein Stamm von *S. carnosus* verwendet, der ein Plasmid (pCQE1nreB) zur Überproduktion eines NreB•His Fusionsproteins trägt. Das Gen steht unter Kontrolle des *xyIA*-Promotors und ist durch Xylose induzierbar (Wieland *et al.*, 1995). Die Expression des *nreB*-Gens in *E. coli* von einem Plasmid auf der Basis des pET28a Vektors lieferte dagegen zehnfach geringere Gehalte an NreB (nicht gezeigt).

Die Anzucht von *S. carnosus* und die Isolierung von NreB•His wurden optimiert. Gegenüber dem früheren Verfahren (Kamps *et al.*, 2004) konnte die Ausbeute von NreB um den Faktor zwölf gesteigert werden (Tab. 15). Die wichtigsten Parameter, die optimiert wurden, waren die Bedingungen zur Anzucht der Bakterien, zur Induktion, zum Zellaufschluss und zur Präparation des Proteins. Den größten Effekt auf die Ausbeute hatte dabei die Optimierung der Zuchtbedingungen. Durch ein verbessertes Medium mit hohen Gehalten an Hefeextrakt (45 g/L), Glycerin als C-Quelle und Phosphatpuffer konnten die erzielten Zelldichten von  $OD_{578} = 1$  mit dem bisherigem Medium auf  $OD_{578} > 30 - 60$  gesteigert werden.

Tab. 15: **Optimierung des Zellwachstums von *S. carnosus* m1 (pCQE1nreB) und der Ausbeute an gereinigtem NreB•His aus 2,4 L Kulturvolumen.** Die Proteingehalte wurde nach Bradford bestimmt (Bradford, 1976).

	vor Optimierung	nach Optimierung
Zellnassgewicht (g)	3,4	34
Gesamtprotein (mg)	120	1350
NreB•His (mg)	1,7	20

Der Einfluss von Temperatur, Induktionszeitpunkt und Induktionsdauer auf die Überexpression wurde ebenfalls untersucht. Dazu wurden die Zellen nach Anzucht und Induktion unter verschiedenen Bedingungen mit SDS und Lysostaphin aufgeschlossen. Das Gesamtprotein wurde im SDS-Gel aufgetrennt. Bei Überproduktion war das NreB•His Protein als Bande bei 41 kDa zu erkennen (Abb. 9). Die Intensität der Ban-

de wurde verwendet, um die Überproduktion abzuschätzen. Der NreB-Gehalt der Zellen nahm nach Induktion mit 33 mM Xylose zu und erreichte nach sechs Stunden ein Maximum.

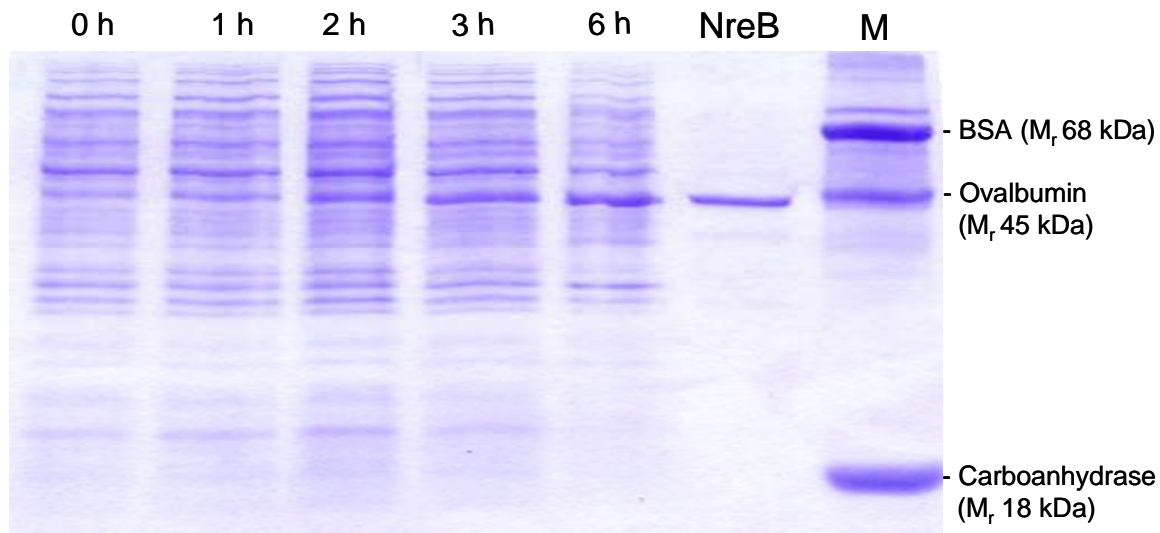


Abb. 9: **Einfluss der Induktionsdauer auf die Überexpression von NreB•His.** Die SDS-PAGE zeigt Gesamtzellproteinproben aus, mit Lysostaphin behandelten Zellsuspensionen ( $20 \mu\text{l}$   $\text{OD}_{578} = 8$ ) von *S. carnosus* m1 (pCQE1nreB) vor und nach Induktion. Zusätzlich wurde aus demselben Stamm isoliertes NreB•His (41 kDa) und ein Proteinstandard (M) aufgetragen. Nach Induktion mit 33 mM Xylose erkennt man eine zeitliche Zunahme der Intensität der NreB entsprechenden Bande.

In ähnlicher Form wurden die Inkubationstemperatur und der Induktionszeitpunkt getestet. Optimale Resultate wurden bei  $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$  und sechsstündiger Induktion erzielt. Eine Änderung des Induktionszeitpunktes von  $\text{OD}_{578} = 1$  auf  $\text{OD}_{578} = 10 - 12$  hatte einen signifikanten Effekt und führte zu einer höheren Ausbeute an NreB aufgrund höherer Zelldichten.

#### 4.1.2 Etablierung einer anaeroben Präparations-Methode für NreB

NreB besitzt ein sauerstoffsensitives FeS-Zentrum, das bisher nur nach aerober Präparation von NreB nachträglich *in vitro* assembliert und mit UV/Vis-Spektroskopie untersucht wurde (Kamps *et al.*, 2004). Um den nativen Zustand des FeS-Zentrums zu erhalten wurde in dieser Arbeit eine anaerobe Präparation von NreB etabliert. Die Anzucht und Überexpression von NreB erfolgte zunächst unter aeroben Bedingungen. Dem Hefeextrakt-Medium wurden 10 mM Natriumnitrat als Substrat für die anschließende Inkubation unter anaeroben Bedingungen und Ammoniumeisen(III)citrat als zusätzliche Eisenquelle hinzugefügt (Reents *et al.*, 2006). Zur Erhöhung der Aus-

beute an FeS-haltigem NreB wurde eine Methode leicht abgewandelt, die für FNR aus *E. coli* entwickelt wurde (Khoroshilova *et al.*, 1997). Nach der Überexpression wurden die Zellen in gasdicht verschlossenen Müller-Krempel-Flaschen (1000 ml), die zu 90 % des Nominalvolumens befüllt waren bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Zellen hatten zu Beginn der Inkubation  $OD_{578} = 20 - 30$  erreicht. Die hohe Zelldichte und Stoffwechselaktivität führte zu einer Anaerobisierung der Zellen. Anschließend wurden die Zellen unter anaeroben Bedingungen mittels Zentrifugation geerntet. Die Präparation wurde immer sofort im Anschluss durchgeführt und fand im Anaeroben-Zelt statt. Bei Arbeitsschritten außerhalb des Anaeroben-Zelts wurden Zellen und Zellextrakt immer in luftdicht verschlossenen Gefäßen aufbewahrt. Dem Zellaufschlusspuffer wurde vor Verwendung 10 mM frisches  $\beta$ -Mercaptoethanol als Oxidationsschutz hinzugefügt. Im Wasch- und Elutionspuffer wurde auf den Einsatz von Reduktionsmittel verzichtet, da die weiteren Arbeitsschritte alle im Anaeroben-Zelt durchgeführt wurden. Dadurch war eine anschließende  $O_2$ -Inaktivierung des FeS-Zentrums möglich. NreB•His wurde aus zellfreiem Extrakt nach einem Standardverfahren (The QIAexpressionist, Fifth Edition, Juni 2003) mit  $Ni^{2+}$ -Agarose im Anaeroben-Zelt gereinigt (Abb. 10).

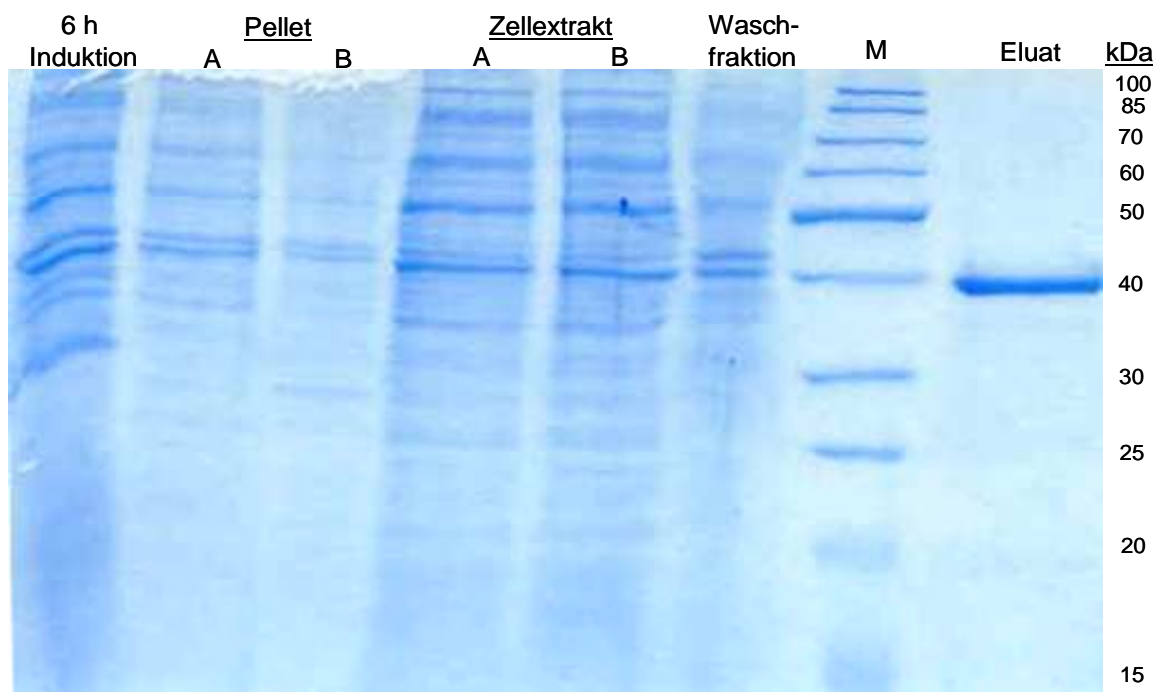


Abb. 10: **Reinigung von NreB•His aus *S. carnosus* m1 (pCQE1nreB).** Isoliertes Gesamtzellprotein, aus mit Lysostaphin behandelten Zellsuspensionen ( $20 \mu\text{l}$   $OD_{578} = 8$ ) von *S. carnosus* m1 (pCQE1nreB) wurde auf einer SDS-PAGE separiert. Es wurden Proben nach der Induktion, vom Rückstand in den Glasperlen nach Zellaufschluss mit der Zelmühle (A), vom Zellpellet nach Zentrifugation des Zellextrakts (B), vom Zellextrakt vor (A) und nach (B) Inkubation mit  $Ni^{2+}$ -NTA (Qiagen), nach Waschen der Matrix ( $50 \mu\text{l}$ ) und nach Elution ( $4 \mu\text{g}$ ) aufgetragen. Als Proteinstandard (M) wurden  $5 \mu\text{l}$  Page Ruler™ (unstained Protein-Ladder, Fermentas) verwendet.

NreB•His wurde mit 150 mM Imidazol von der Säule eluiert und mit einer Reinheit  $\geq 90\%$  erhalten. Die Fraktionen des Eluats mit NreB•His wurden durch Lösungsmittelabsorption konzentriert. Dieses Verfahren eignet sich besonders gut für empfindliche Lösungen und wurde aufgrund der einfachen Handhabung einer Ultrafiltration vorgezogen. Außerdem hatten Experimente gezeigt, dass NreB bei der Ultrafiltration denaturierte.

Aus 1350 mg Gesamtprotein konnten 20 mg Fusionsprotein isoliert werden (Tab. 16). Das Protein wurde in flüssigem  $N_2$  gefroren und bis zur Verwendung bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

Tab. 16: **Proteinreinigung von anaerobem NreB•His aus anaerob inkubiertem *S. carnosus* m1 (pCQE1nreB).** Es wurden 34 g Zellfeuchtgewicht mit der Zelmühle aufgeschlossen. NreB•His wurde aus dem Zellextrakt über eine  $Ni^{2+}$ -NTA Säule (2 ml) aufgereinigt und mit einer Reinheit  $\geq 90\%$  erhalten.

Arbeitsschritt:	Protein	
	(mg)	(%)
Zellaufschluss	1350	100
Säulendurchlauf	1282	94
Waschfraktion	53	3,9
NreB•His	20	1,5

## 4.2 Charakterisierung der anaeroben Form von NreB

### 4.2.1 Spektrale Eigenschaften

Nach anaerober Präparation zeigte NreB eine konzentrationsabhängige, intensive, gelb-bräunliche Farbe, die charakteristisch für FeS-haltige Proteine ist (Khoroshilova *et al.*, 1997; Reents *et al.*, 2006; Wollenberg *et al.*, 2003). Besonders  $O_2$ -labile FeS-Zentren weisen eine intensive Färbung auf. Im Anaeroben-Zelt wurde die Proteinlösung in eine Quarzküvette gefüllt, die mit einem Gummistopfen luftdicht verschlossen wurde. Das UV/Vis-Spektrum (Abb. 11) wies drei signifikante Absorptionsmaxima auf. Die Absorption bei 280 nm wird durch das Protein verursacht. Die Absorptionsmaxima bei 325 nm und 420 nm und der Quotient  $A_{420}/A_{280} = 0,61$  sind typisch für Eisenschwefelproteine (Khoroshilova *et al.*, 1995; Palmer 1973). FNR aus *Bacillus subtilis* ist ein  $[4Fe-4S]^{2+}$ -haltiger  $O_2$ -Sensor und weist ein ähnliches Absorptionsspektrum auf (Reents *et al.*, 2006). Das isolierte Protein konnte unter anaeroben Bedingungen bei  $4^\circ\text{C}$  bis zu drei Wochen gelagert werden, ohne dass sich die Färbung

oder das Absorptionsspektrum änderten. Um einen Hinweis auf die Art des FeS-Zentrums zu erhalten, wurden die Eisen- und Sulfidgehalte bestimmt.

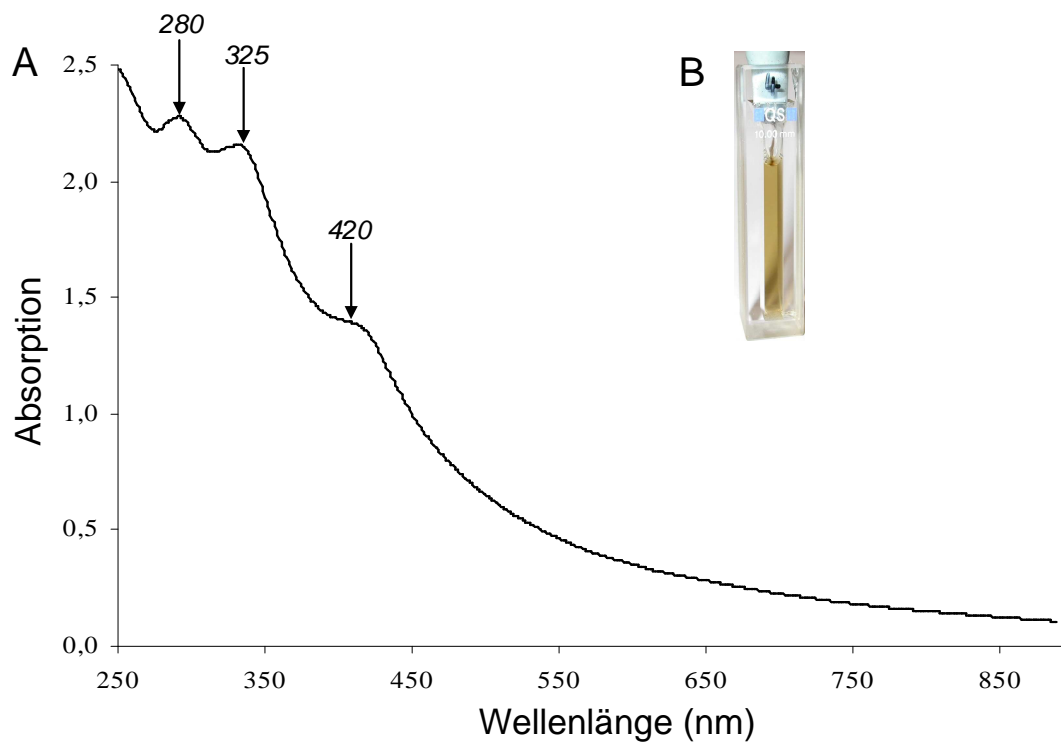


Abb. 11: **Absorptionsspektrum (A) und Färbung (B) von anaerob isoliertem NreB (0,55 mM) aus *S. carnosus* m1 (pCQE1nreB) nach Konzentrierung.** NreB wurde unter anaeroben Bedingungen aus *S. carnosus* m1 (pCQE1nreB) präpariert. Die gelb-braune Färbung der Proteinlösung (B) und das Absorptionsspektrum (A) mit drei Absorptionsmaxima bei 280, 325 und 420 nm sind charakteristisch für FeS-haltige Proteine (Khoroshilova *et al.*, 1997 ; Wollenberg *et al.*, 2003).

Sulfid ist selten eine Kontamination und in Gegenwart von Eisen ein guter Hinweis für ein FeS-Zentrum. Ein Mol NreB enthielt durchschnittlich 0,9 Mol Eisen und 0,8 Mol säurelabiles Sulfid (Tab. 17). Der Quotient  $\text{Fe}/\text{S}^{2-}$  (mol/mol) lag bei 1,1 was für einen geringen Anteil an Nicht-Cluster Eisen spricht. Die Eisen- und Sulfidgehalte entsprechen einem Gehalt an  $[\text{2Fe-2S}]$  oder  $[\text{4Fe-4S}]$ -Zentrum von 0,5 bzw. 0,25 pro NreB. Es scheint, dass NreB nach anaerober Präparation nicht vollständig in der FeS-haltigen Form vorliegt. FNR aus *E. coli* besitzt ein  $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum pro Monomer, enthält nach anaerober Präparation aber auch nur 0,5 - 0,58 Mol  $[\text{4Fe-4S}]$  / Mol FNR (Khoroshilova *et al.*, 1997).

Tab. 17: **Eisen- und Sulfidgehalte von anaerob präpariertem NreB aus *S. carnosus* m1 (pCQE1nreB).** Die Eisen- und Sulfidgehalte wurden aus vier anaeroben Präparationen von NreB (0,36 - 0,49 mM) bestimmt. Dargestellt sind der Mittelwert und die berechnete Standardabweichung.

<b>Fe/NreB (mol/mol)</b>	<b>S<sup>2-</sup>/NreB (mol/mol)</b>	<b>Fe/S<sup>2-</sup> (mol/mol)</b>
<b>0,9 ± 0,17</b>	<b>0,8 ± 0,45</b>	<b>1,1</b>

#### 4.2.2 Präparation von NreB für die Mössbauer-Spektroskopie

Die Mössbauer-Spektroskopie ist eine kernphysikalische Methode, die auf dem 1956 von Rudolf L. Mössbauer entdeckten Mössbauer-Effekt basiert. Mit dieser Methode können Eisenverbindungen und andere Elemente charakterisiert werden, die spezielle Mössbauer-Isotope aufweisen. Bei Eisen ist dies das zu 0,2 % vorkommende stabile Isotop  $^{57}\text{Fe}$ . Wegen der geringen Empfindlichkeit der Methode sind Eisenkonzentrationen von  $\geq 0,5 \text{ mM}$  erforderlich, was bei entsprechender Konzentration des Proteins sehr hohen Proteinkonzentrationen gleichkommt.

Das FeS-Zentrum von NreB wurde für Mössbauer-Spektroskopie mit  $^{57}\text{Fe}$  angereichert. Dafür wurden  $200 \mu\text{Mol } ^{57}\text{FeCl}_2$  in die Anzucht des Expressionsstammes eingesetzt. Hefeextrakt-Medium enthält geringe Gehalte ( $1,35 \text{ mg/L}$ ) von Eisen (d.h.  $^{56}\text{Fe}$ ). Dieses Eisen wird mit dem Medium eingeschleppt, was zu einer verminderten Markierung mit  $^{57}\text{Fe}$  führt. Deshalb sollte getestet werden, ob auch andere Medien mit geringerem natürlichem  $^{56}\text{Fe}$ -Gehalt zur Zucht von *S. carnosus* unter Produktionsbedingungen geeignet sind (Abb. 12).

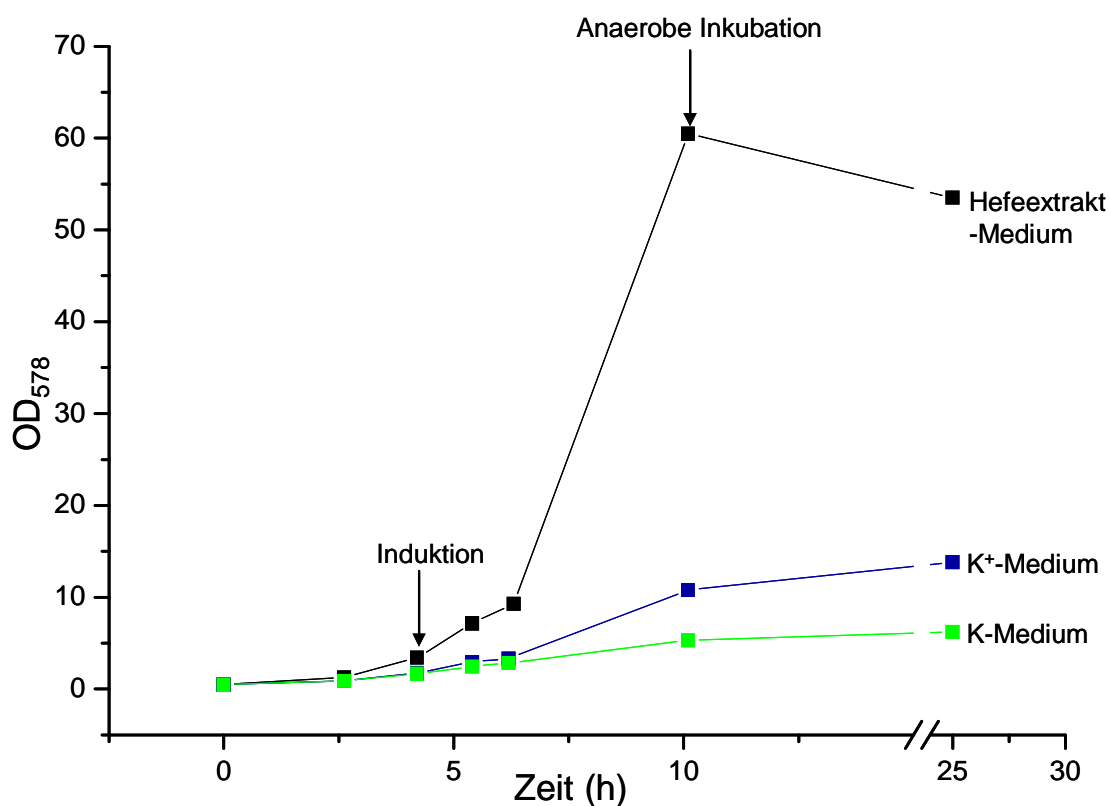


Abb. 12: **Wachstum von *S. carnosus* m1 (pCQE1nreB) und anschließende anaerobe Inkubation.** Das Wachstum erfolgte unter aeroben Bedingungen bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Nach vier Stunden wurden die Kulturen mit Xylose für sechs Stunden induziert und anschließend 15 Stunden bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  unter anaeroben Bedingungen inkubiert.



Das K-Medium ist ein definiertes Medium für Staphylokokken, das sich aus eisenarmen Komponenten zusammensetzen lässt (Krismer, 1999). Zur Überexpression wurde K<sup>+</sup>-Medium verwendet, indem der Zusatz an Aminosäuren erhöht wurde. Wachstum von *S. carnosus* m1 pCQE1nreB in Hefeextrakt-Medium, K-Medium und K<sup>+</sup>-Medium, und Überexpression von NreB bei anschließender anaerober Inkubation wurde verglichen. Die Kulturen wurden nach vier Stunden Wachstum mit Xylose induziert. Nach sechs Stunden Induktion wurden die Zellen weiter unter anaeroben Bedingungen und 4 °C inkubiert. Nach dieser Zucht und Inkubation im K-Medium erreichten die Bakterien eine OD<sub>578</sub> von 6, und im angereicherten K<sup>+</sup>-Medium OD<sub>578</sub> von 14, gegenüber OD<sub>578</sub> > 50 im Hefeextrakt-Medium. Die Überexpression von NreB•His im Hefeextrakt- und K<sup>+</sup>-Medium wurde verglichen, indem das Gesamtzellprotein des Stammes in einer SDS-PAGE analysiert wurde (Abb. 13).

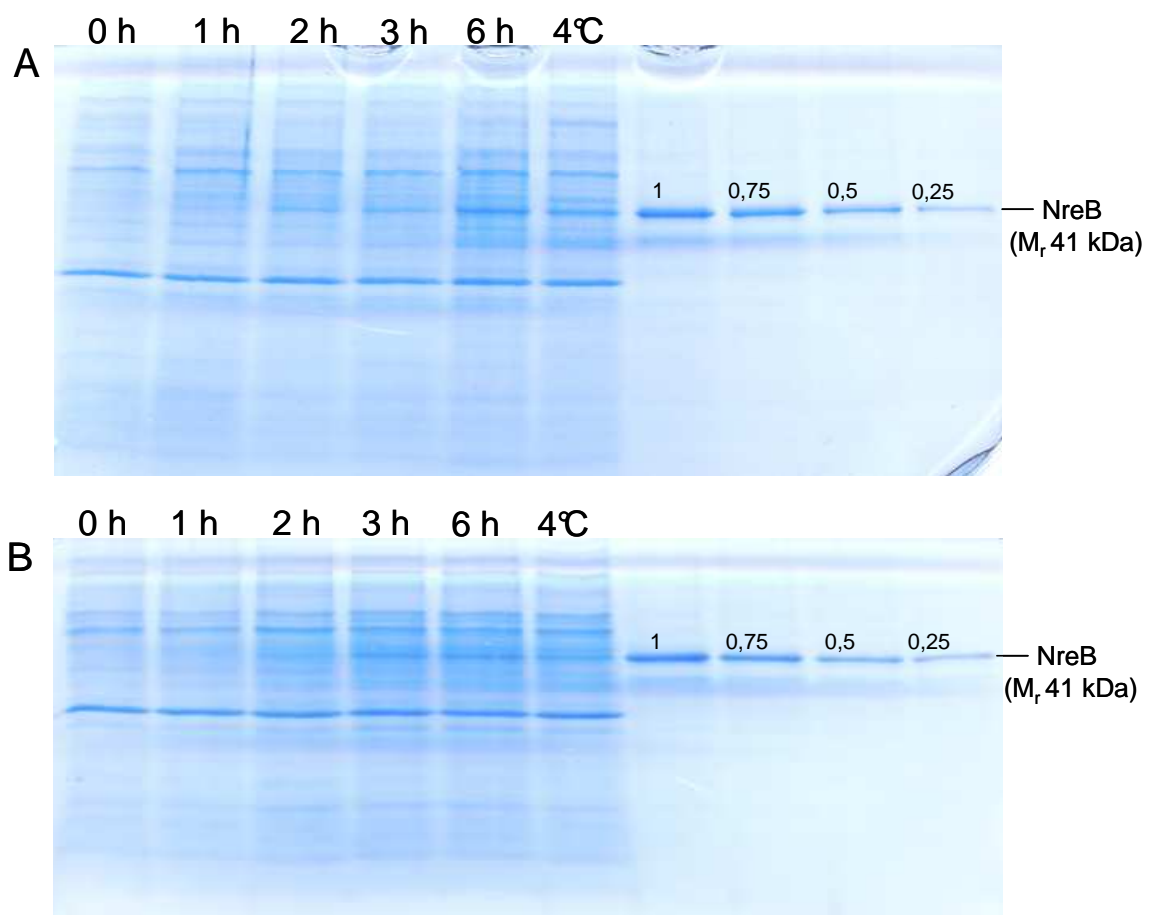


Abb. 13: **Überexpression von NreB•His in Hefeextrakt- (A) und K<sup>+</sup>-Medium (B).** Das NreB•His Fusionsprotein wurde in *S. carnosus* m1 (pCQE1nreB) überproduziert. Es wurde isoliertes Gesamtzellprotein, aus mit Lysostaphin behandelten Zellsuspensionen (20 µl OD<sub>578</sub> = 8) vor/nach Induktion und nach anaerober Inkubation in der SDS-PAGE separiert. Die Effektivität der Überexpression von NreB•His in Hefeextrakt- und K<sup>+</sup>-Medium wurde anhand der Intensität der Bande bei 41 kDa verglichen. Als Proteinstandard wurde aus dem gleichen Stamm isoliertes NreB•His (0,25 - 1 µg) aufgetragen.

Mit zunehmender Induktionsdauer erkennt man in beiden Medien eine Zunahme der NreB (41 kDa) entsprechenden Bande, die auch bei anschließender anaerober Inkubation über Nacht in beiden Medien weiterhin vorhanden ist. Es fällt jedoch auf, dass die Intensität dieser Bande von Zellen aus dem K<sup>+</sup>-Medium deutlich schwächer ist. Außerdem nimmt die Intensität der Bande nach anaerober Inkubation über Nacht im K<sup>+</sup>-Medium weiter ab. Um die Intensität der Proteinbande die NreB•His entspricht zu quantifizieren, wurden entsprechende Proben in der SDS-PAGE separiert und das Protein auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen (Abb.14).

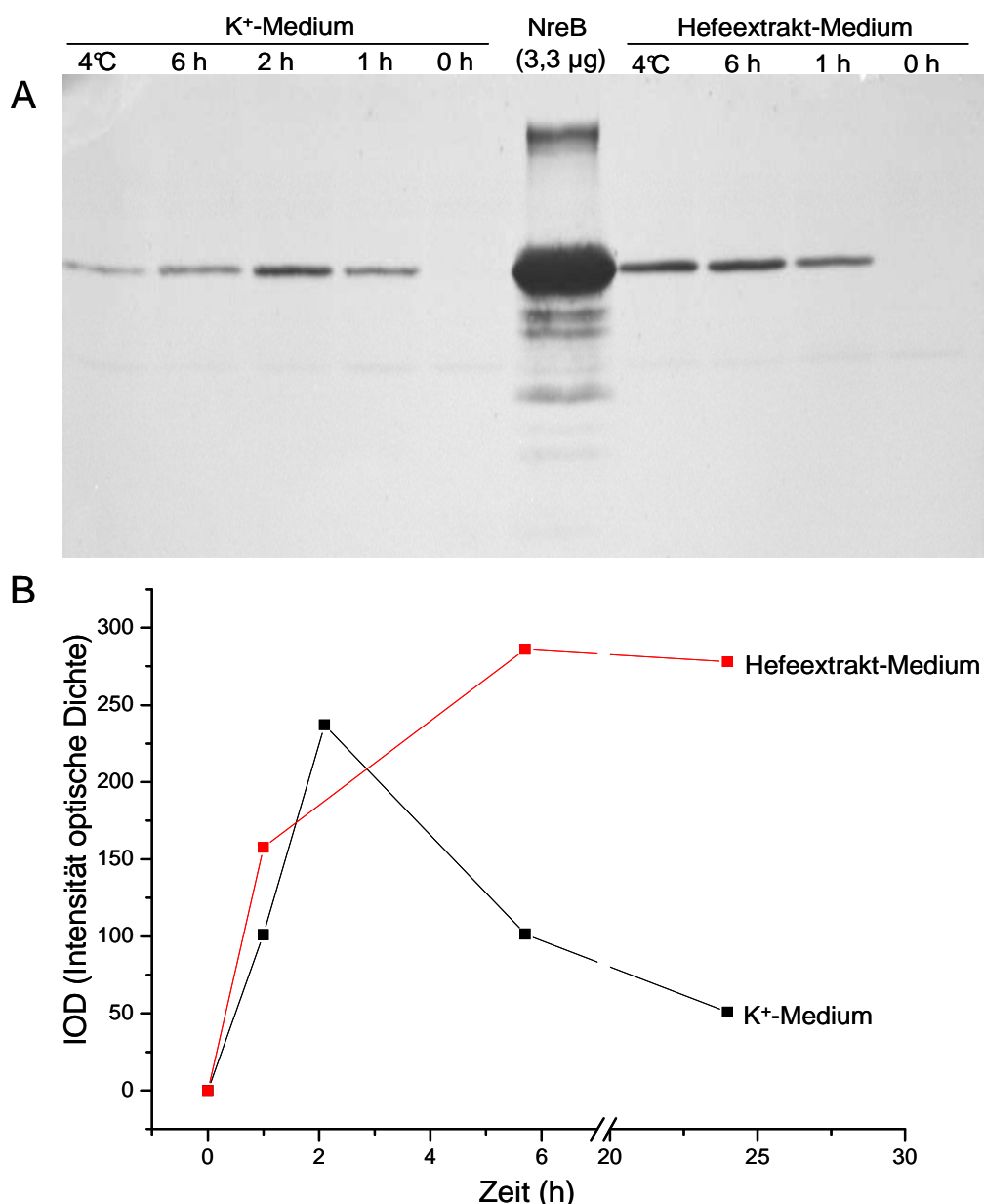


Abb. 14: **A)** Western-Blot von Gesamtzellprotein aus *S. carnosus* m1 (pCQE1nreB). Die Proben wurden vor/nach Expression von NreB•His und anaerober Inkubation über Nacht aus in Hefeextrakt- und K<sup>+</sup>-Medium gezüchteten Zellen isoliert und mit Histidin-Anhang spezifischen Antikörpern inkubiert. Als Proteinstandard wurde aus den gleichen Zellen isoliertes NreB (3,3 µg) aufgetragen.

**B)** Quantifizierung der Banden mit der Software Gel-Pro Analyzer 6.0. Die von der Software berechnete IOD wurde als Funktion der Zeit dargestellt.

Die Membran wurde mit einem ersten Antikörpern gegen den Histidin-Anhang inkubiert und dann mit einem zweiten Antikörper gegen den ersten. Der zweite Antikörper war mit einer Peroxidase gekoppelt, die in einer Farbreaktion nachgewiesen wurde (Abb. 14A).

Die Intensität der Banden wurde durch die Software (Gel-Pro Analyzer 6.0) ausgewertet (Abb. 14B). In beiden Medien war vor Induktion keine Bande zu erkennen, was bedeutet, dass der *xylA*-Promotor nur bei Induktion mit Xylose transkribiert wurde oder der Proteingehalt unter der Nachweisgrenze der Antikörperreaktion lag. Im Hefeextrakt-Medium war nach 1 h Induktion schon eine deutliche Bande zu erkennen, die nach 6 h noch mal an Intensität gewann und auch bei anaerober Inkubation über Nacht bei 4 °C nicht viel schwächer wurde. Im K<sup>+</sup>-Medium war nach 1 h Induktion ebenfalls einer Bande zu erkennen, deren Intensität nach 2 h Induktion zunahm, aber bei andauernder Induktion (6 h) und anschließender anaerober Inkubation wieder abgebaut wurde.

Das Wachstum von *S. carnosus* m1 (pCQE1nreB) und die Überproduktion von NreB•His waren im K<sup>+</sup>-Medium signifikant schlechter als im Hefeextrakt-Medium. Die Ausbeute an NreB•His betrug nur 0,2 mg pro Liter Kulturvolumen. Da große Mengen an Protein für die Mössbauer-Spektroskopie gebraucht wurden, musste von einer Überexpression im K<sup>+</sup>-Medium abgesehen werden. Aus einem Liter Hefeextrakt-Medium konnten dagegen durchschnittlich 8,3 mg NreB•His isoliert werden. Der Anteil an <sup>56</sup>Fe der Kultur (3,24 mg in 2,4 Liter) wurde durch Zugabe von 11,2 mg <sup>57</sup>Fe auf 22% verdünnt. Das Eisen in der Kultur und damit auch im FeS-Zentrum bestand so zu ca. 78 % aus <sup>57</sup>Fe, was für Mössbauer-Messungen ausreichend war.

#### 4.2.3 Untersuchung des FeS-Zentrums mit Mössbauer-Spektroskopie

Die Mössbauer-Spektroskopie basiert auf der rückstoßfreien Kernresonanzabsorption von  $\gamma$ -Strahlen. Zur Untersuchung von Eisenverbindungen verwendet man radioaktives Kobalt (<sup>57</sup>Co). Beim Zerfall von Kobalt zu Eisen werden  $\gamma$ -Strahlen emittiert, mit denen die Probe bestrahlt wird. Jede Eisenverbindung zeigt dabei ein unterschiedliches Absorptionsverhalten, was sich in einem charakteristischen Spektrum äußert. Atomkern 1 (<sup>57</sup>Co) sendet beim Übergang vom angeregten Zustand in den Grundzustand die Energiedifferenz als  $\gamma$ -Quant aus (Abb. 15A). Wenn der  $\gamma$ -Quant auf einen identischen Atomkern 2 (<sup>57</sup>Fe) trifft und die Energie exakt der Energiedifferenz zwischen angeregtem und Grundzustand entspricht, kommt es zum Resonanz-

fall. Die Energie des  $\gamma$ -Quants wird gänzlich absorbiert und der Atomkern wechselt in den angeregten Zustand. Beim Wechsel in den Grundzustand wird die Energiedifferenz erneut als  $\gamma$ -Quant emittiert.

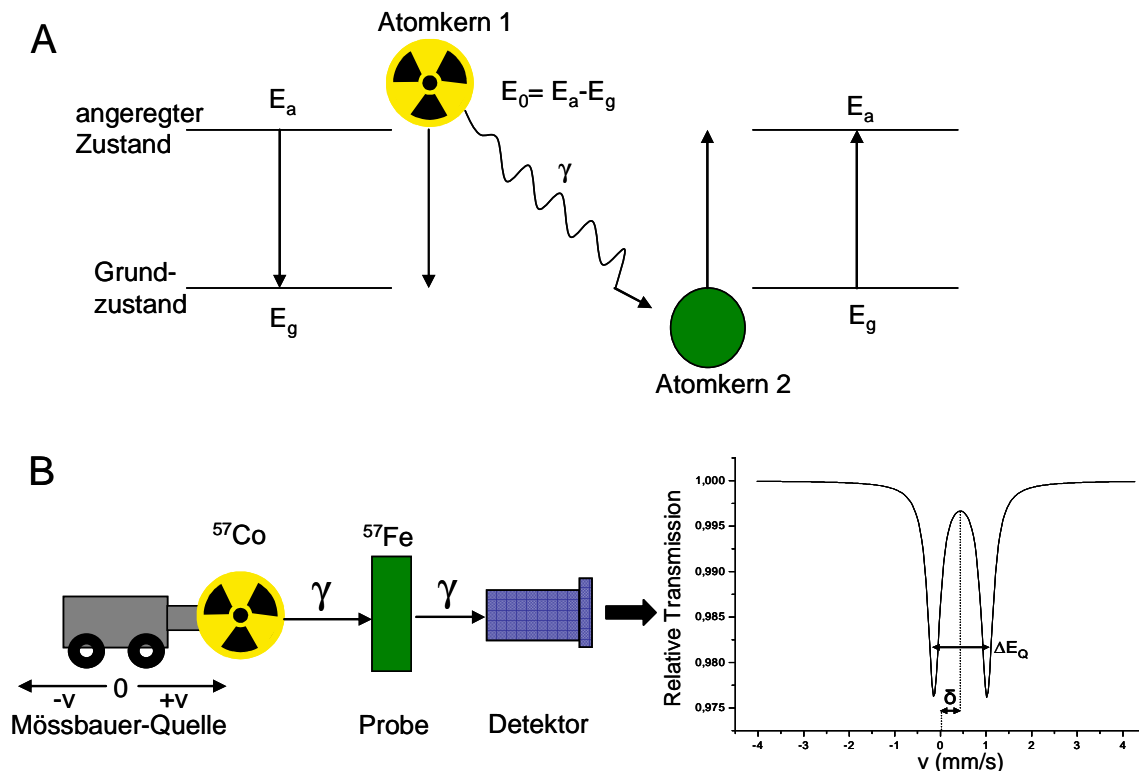


Abb. 15: **Theoretische Grundlagen der Mössbauer-Spektroskopie.** **A** zeigt das Prinzip der Kernresonanzabsorption von  $\gamma$ -Strahlen und **B** die experimentelle Anordnung zum Nachweis des Mössbauer-Effekts.

Der experimentelle Aufbau zum Nachweis des Mössbauer-Effekts besteht aus einer Mössbauer-Quelle ( $^{57}\text{Co}$ ), einem Mössbauer-Absorber (Probe) und einem Detektor, der die Radioaktivität misst (Abb. 15B). Durch Bewegung der Quelle mit nur wenigen Millimetern pro Sekunde erfahren die  $\gamma$ -Quanten infolge des Doppler-Effekts<sup>8</sup> einen zusätzlichen Impuls in oder entgegengesetzt der Emissionsrichtung. Dadurch wird die Energie der  $\gamma$ -Quanten variiert und die Resonanzlinien können so kontrolliert „abgetastet“ werden. Im Resonanzfall emittiert der Absorber Strahlung in alle Richtungen des Raumes und der Detektor registriert einen Abfall der Zählrate. Die Auftragung der relativen Transmission (Y-Achse) als Funktion der Relativgeschwindigkeit (X-Achse) zwischen Quelle und Absorber nennt man Mössbauer-Spektrum.

<sup>8</sup> Der nach dem Entdecker Ch. Doppler (1843) benannte Effekt besagt folgendes: Sendet eine Quelle Schallwellen oder elektromagnetische Wellen der Frequenz  $\nu_Q$  aus, dann nimmt der Beobachter die Frequenz  $\nu_B > \nu_Q$  wahr, wenn sich die Quelle ihm nähert und die Frequenz  $\nu_B < \nu_Q$ , wenn sich die Quelle von ihm entfernt (Gütlich, 1970).

Mössbauer-Spektren unterschiedlicher Verbindungen unterscheiden sich deutlich in zwei Parametern: 1. In der Quadrupolaufspaltung  $\Delta E_Q$ , welche durch den Abstand der Mittelpunkte der Resonanzlinien charakterisiert ist und 2. in der Isomeriever-schiebung  $\delta$ , die durch den Abstand des Mittelpunkts des Quadrupoldubletts zur der Relativgeschwindigkeit Null definiert ist (Abb. 15B). Mit Hilfe dieser Parameter können Aussagen über die Molekülsymmetrie, den Oxidationszustand, die Elektronen-Negativität und die Bindungseigenschaften des Moleküls gemacht werden (Gütlich, 1970). Tabelle 18 zeigt die am häufigsten vorkommenden FeS-Zentren und die zu-gehörigen Mössbauer-Parameter.

Tab. 18: **Typische Parameter von 0-Feld Mössbauer-Spektren der häufigsten FeS-Zentren.**  
a) zwei Subspektren (1:1), b) zwei Subspektren (2:1)

Zentrum	$\delta$ (mm/s) bei 4.2 K	$\Delta E_Q$ (mm/s)
[1Fe] <sup>3+</sup>	0.32	0.5
[1Fe] <sup>2+</sup>	0.70	3.25
[2Fe-2S] <sup>2+</sup>	0.27	0.65
a) [2Fe-2S] <sup>1+</sup>	0.25	0.64
	0.54	3.0
[3Fe-4S] <sup>1+</sup>	0.24 - 0.27	0.54 - 0.71
b) [3Fe-4S] <sup>0+</sup>	0.46	1.47
	0.30	0.47
[4Fe-4S] <sup>3+</sup>	0.40	1.03
	0.29	0.88
[4Fe-4S] <sup>2+</sup>	0.37 - 0.46	1.25 - 1.46

Nach optimierter Anzucht von *S. carnosus* (pCQE1nreB) zur Überexpression in He-feextrakt-Medium mit einem Zusatz an <sup>57</sup>FeCl<sub>2</sub> und anaerober Präparation wurden Proben von anaerobem NreB•<sup>57</sup>FeS hoher Konzentration erhalten. Von diesen Proben wurde ein Mössbauer-Spektrum bei 80 K und ohne Anlegen eines magneti-schen Felds aufgenommen (Abb. 16). Die schwarze durch die experimentellen Daten laufende Linie setzt sich aus der Überlagerung von drei Subspektren zusammen.

Die Hauptkomponente (79 %) mit Isomeriever-schiebung  $\delta = 0,44$  mm/s und Quadru-polaufspaltung  $\Delta E_Q = 1,16$  mm/s ist typisch für [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Zentren vom Ferredoxin-Typ. Alle Eisenatome sind gleichwertig im gemischten Valenz-Zustand Fe<sup>(2+/3+)</sup>. Eine Verwechslung mit einem [2Fe-2S]<sup>2+</sup>- oder [3Fe-4S]<sup>1+</sup>- Zentrum ist nicht möglich (Dr. Eckhard Bill, persönliche Kommunikation). Einen kleineren Anteil (17 %, rotes Sub-

spektrum) der Gesamtmenge trägt eine Substanz bei, dessen Parameter zu  $\gamma$ -FeOOH oder ähnlichen Hydroxiden passen. Es handelt sich vermutlich um ein während der Präparation aufgetretenes Zerfallsprodukt des FeS-Zentrums. Das blaue Subspektrum macht nur einen minimalen Anteil (4 %) aus und stammt von „freiem“  $\text{Fe}^{2+}$ , was unspezifisch mit dem His-Anhang von NreB assoziiert sein könnte.

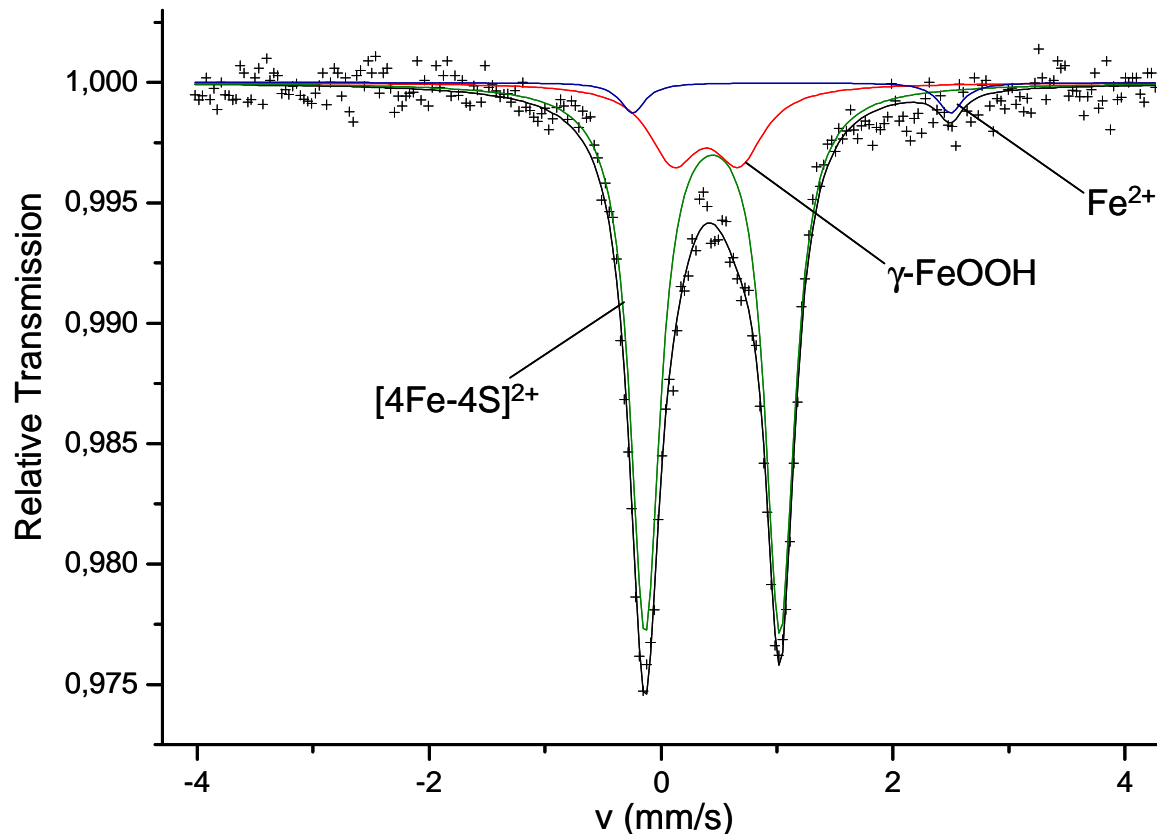


Abb. 16: 0-Feld Mössbauer-Spektrum von anaerob isoliertem NreB (0,66 mM) aufgenommen bei 80 K. Die durchgehende Linie (schwarz) durch die experimentellen Daten ist eine Überlagerung der drei Lorentzischen Dubletten von  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ ,  $\gamma$ -FeOOH und  $\text{Fe}^{2+}$ . Die Mössbauer-Parameter und relativen Anteile der Eisenspezies stehen in Tab. 19.

Tab. 19: Mössbauer-Parameter der Subspektren von anaerob isoliertem NreB (0,66 mM) aus *S. carnosus* m1 (pCQE1nreB). Die Tabelle zeigt die Isomerieverschiebung  $\delta$  (mm/s), die Quadrupolaufspaltung  $\Delta E_Q$  (mm/s) und die relativen Anteile der Subspektren am Gesamtspektrum.

Eisenspezies	Subspektrum	$\delta$ (mm/s)	$\Delta E_Q$ (mm/s)	Anteil (%)
$[4\text{Fe-4S}]^{2+}$	grün	0,44	1,16	79
$\gamma$ -FeOOH	rot	0,39	0,57	17
$\text{Fe}^{2+}$	blau	1,13	2,74	4

Ein Mol anaerob isoliertes NreB enthielt 0,9 Mol Eisen, das zu 79 % in Form eines  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$  Zentrums assoziiert vorliegt. Das entspricht einem Gehalt von 0,71 Mol Eisen, oder 0,18 Mol  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum pro Mol NreB. NreB liegt also nach anaerober Präparation zu 18% als  $\text{NreB} \cdot [4\text{Fe-4S}]$  vor. Für FNR aus *E. coli* wurde nach an-

aerober Präparation ein Gehalt von 0,5 - 0,76 mol [4Fe-4S] /mol FNR bestimmt (Khoroshilova *et al.*, 1997).

Zur weiteren Charakterisierung des FeS-Zentrums wurde von derselben Probe ein Mössbauer-Spektrum mit angelegtem magnetischem Feld aufgenommen. Es sollte den erwarteten Spinzustand  $s = 0$  für ein  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum überprüfen und Details zur Gleichheit oder Ungleichheit der Eisenplätze offenbaren. Die diamagnetischen Eigenschaften des FeS-Zentrums wurden in einem Mössbauer-Spektrum bei 4,2 K und angelegtem magnetischem Feld von 5 T bestätigt (Abb. 17). Als weitere Informationen wurde das positive Vorzeichen der Quadrupolaufspaltung bei 4,2 K ( $\Delta E_Q = +1,16$  mm/s) und der Asymmetrieparameter  $\eta = 0,7$  bestimmt.

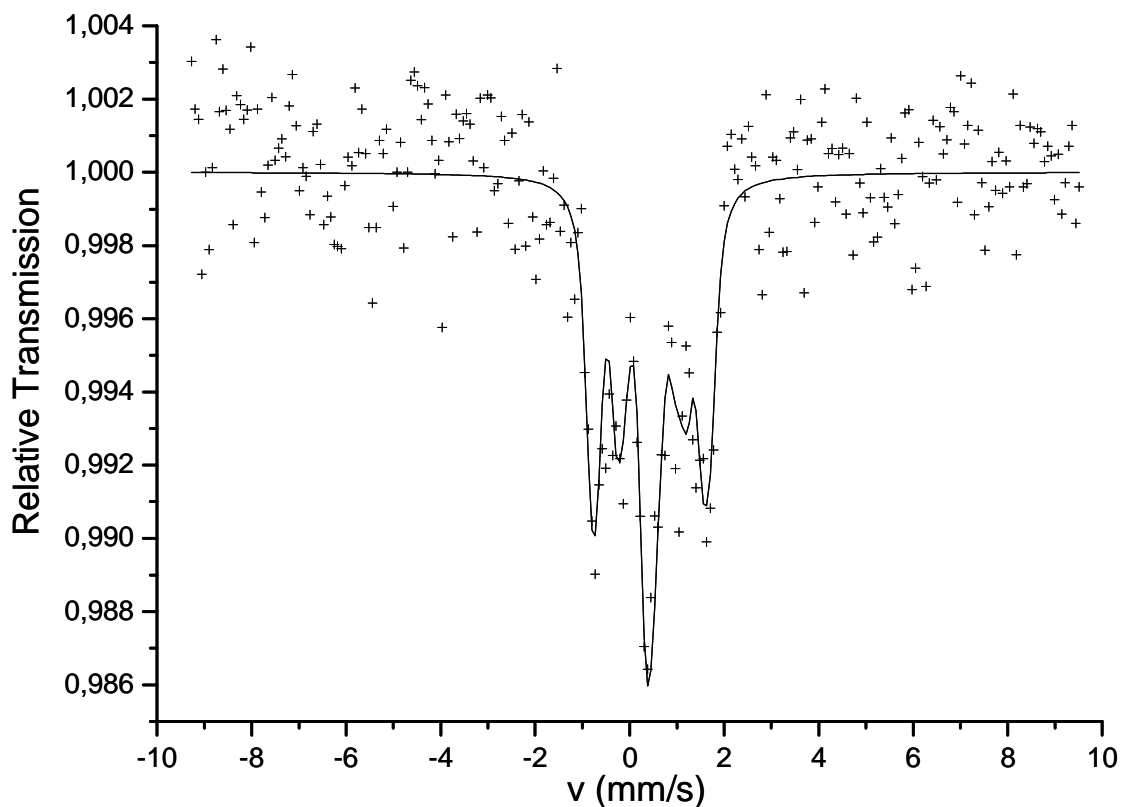


Abb. 17: **Mössbauer-Spektrum von anaerob isoliertem NreB (0,66mM) aufgenommen bei 4,2 K mit angelegtem magnetischen Feld (5 T).** Alle Eisenatome verhalten sich dem Anschein nach absolut gleich, was man bei einem symmetrischen  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum erwarten würde.

Außerdem verhalten sich alle Eisenatome bei angelegtem Feld völlig äquivalent, was für ein über vier Cysteinreste koordiniertes diamagnetisches  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum spricht. Die Identität des FeS-Zentrums konnte damit durch Mössbauer-Spektroskopie aufgeklärt werden. Die anaerobe Form von NreB besitzt ein diamagnetisches  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum, das mit hoher Wahrscheinlichkeit über die vier Cysteinreste koordiniert wird.

#### 4.2.4 Untersuchung des FeS-Zentrums mit EPR-Spektroskopie

Eine weitere Charakterisierung der FeS-haltigen prosthetischen Gruppe wurde mittels EPR (Elelectron Puramagnetic Resonance)-Spektroskopie durchgeführt. EPR ist die Standard-Methode zur Untersuchung paramagnetischer Cofaktoren (Metallionen, Hämgruppen, FeS-Zentren, FAD) in Proteinen. Da das  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum von NreB diamagnetisch ist, musste es vor der Untersuchung reduziert werden.

Im Vergleich zu anderen Eisenschwefelproteinen, die an Redoxreaktionen teilnehmen, lassen sich die FeS-Zentren von  $\text{O}_2$ -Sensoren aufgrund ihres niedrigen Redoxpotentials ( $< -650$  mV) nur sehr schwer oder überhaupt nicht reduzieren. Die  $\text{O}_2$ -Sensoren FNR<sub>EC</sub> aus *Escherichia coli* (Khoroshilova *et al.*, 1997), FNR<sub>BS</sub> aus *Bacillus subtilis* (Reents *et al.*, 2006) und WhiB3 aus *Mycobacterium tuberculosis* (Singh *et al.*, 2007) besitzen alle ein diamagnetisches  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum. In WhiB3 und FNR<sub>BS</sub> kann das Zentrum zu  $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$  reduziert werden und zeigt ein Signal im EPR-Spektrum. Das  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum in FNR<sub>EC</sub> kann nicht reduziert werden und ist EPR-still.

Wenn sich das  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum von NreB reduzieren lässt, sollte es auch ein EPR-Signal liefern. Einen Hinweis auf die Reduzierbarkeit eines FeS-Zentrums erhält man, wenn bei der Reduktion eine Bleichung des Absorptionsspektrums beobachtet werden kann (Green *et al.*, 1996; Chandramouli *et al.*, 2007).

Zuerst wurde untersucht, ob sich das FeS-Zentrum von NreB mit Dithionit reduzieren lässt. Dabei wurde Dithionit in den Konzentrationen 5 und 10 mM verwendet und unterschiedlich lange mit NreB inkubiert (1 – 40 min). Im Absorptionsspektrum wurde eine Verringerung der Absorption bei 420 nm beobachtet, doch die Proben zeigten keine EPR-Signale, die von intakten  $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ -Zentren stammen konnten (nicht gezeigt). In der EPR-Spektroskopie liegen Signale von FeS-Zentren üblicherweise bei g-Werten  $< 2$  (Dr. Eckhard Bill, persönliche Mitteilung). Es wurden zwar Signale  $g < 2$  gemessen, die aber zu schwach waren, um eine eindeutige Aussage zu erlauben (nicht gezeigt).

Eisenschwefelproteine können in Gegenwart von Deazaflavin (3,10-Dimethyl-5-deazaalloxazine) und Licht photoreduziert werden (Massey *et al.*, 1978 und Schering *et al.*, 1977). Die optimalen Bedingungen zur Photoreduktion von NreB wurden mit Methylviologen (Paraquat) im Puffer getestet. Methylviologen ist farblos und verfärbt sich nach Reduktion blau. Die Photoreduktion funktionierte am effektivsten mit 20 mM Natriumoxalat als Elektronenquelle. Eine hohe Imidazolkonzentration



(150 mM) in dem Puffer, in dem sich NreB nach Präparation befindet, verhinderte die Reduktion. Daher wurde NreB für den Test in einen geeigneten Puffer überführt und für 30 min photoreduziert (Abb. 18).

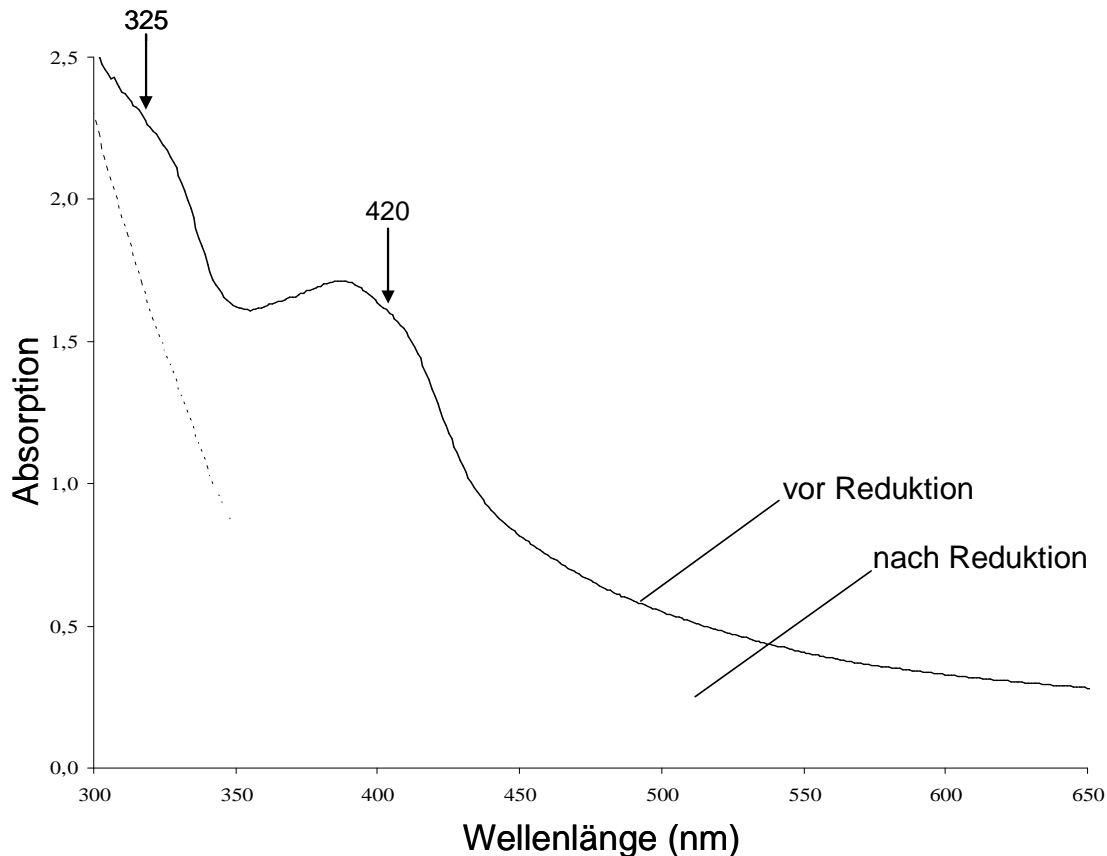


Abb. 18: UV/Vis-Spektrum von anaerob isoliertem NreB (0,42 mM) vor (schwarze Linie) und nach Reduktion mit Deazaflavin (0,41 mM) für 30 min (gestrichelte Linie). Die breiten Absorptionsschultern bei 325 und 420 nm waren nach Reduktion nicht mehr vorhanden.

Die Absorptionsbande bei 420 nm nahm bei der Behandlung stark ab. Eine Verringerung der Absorption ist ein Hinweis für eine Reduktion. Die EPR-Spektren der durch Deazaflavin reduzierten Proben zeigten schwache Signale. Bei Reduktion für 30 min wurden zwei Subspektren simuliert (Abb. 19). Eines der Subspektren (rot) hatte die g-Werte: 2,22; 2,08 und 2,02. Diese lagen deutlich über  $g = 2$ , was nicht zu intakten FeS-Zentren passt. Die g-Werte könnten allerdings von einem  $[4\text{Fe-4S}]^{3+}$ -Zentrum stammen. Ferredoxin Thioredoxin Reduktase (FTR) aus *Spinacia oleracea* besitzt ein  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum, das sich zu  $[4\text{Fe-4S}]^{3+}$  ( $s = \frac{1}{2}$ ) oxidieren lässt und dann ähnliche g-Werte (2,092; 2,045 und 2,008) aufweist (Walters *et al.*, 2004). Die zweite Simulation (blau) lieferte niedrigere g-Werte (2,17; 2,07 und 1,998), die mit höherer Wahr-

scheinlichkeit von einem FeS-Zentrum stammen könnten. Eine Aussage zum Typ des FeS-Zentrums war allerdings nicht möglich.

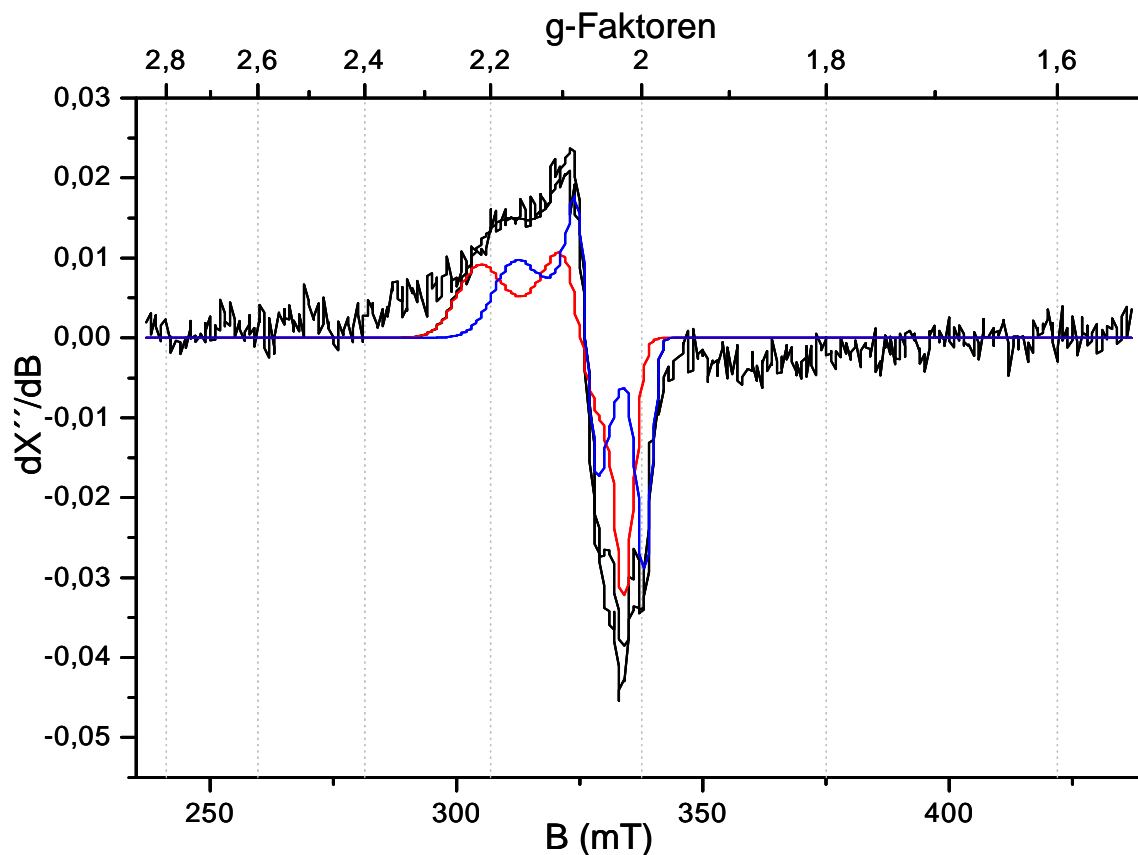


Abb. 19: EPR-Spektrum von anaerob isoliertem NreB (0,42 mM) nach Photoreduktion mit Deazaflavin für 30 min. Es wurden zwei Subspektren mit folgenden g-Werten simuliert: blau (2,17; 2,07 und 1,998) und rot (2,092; 2,045 und 2,008). Aus Doppelintegration der Spektren und Vergleich mit einem Standard wurde für das Signal bei  $g = 2$  eine Intensität von  $19 \mu\text{M}$  bestimmt. Das EPR-Spektrum wurde unter folgenden experimentellen Bedingungen aufgenommen: 9,449 GHz; 0,2 mW und 10 K.

Aus den experimentellen Daten könnte man schließen, dass das FeS-Zentrum von NreB nicht sehr stabil ist und womöglich nach Reduktion für 30 min mit Deazaflavin zerfällt. Deshalb wurde erneut ein EPR-Spektrum nach 5 min Reduktion mit Deazaflavin und Licht aufgenommen (Abb. 20). Das EPR-Spektrum ergab g-Werte von 2,08; 2,06 und 1,86. Auch diesmal lassen sich keine Aussagen machen, da die Signale nicht eindeutig sind. Eindeutig hingegen ist eine neue 'Linie' bei  $g = 1,87$ . Sie ist ein klarer Hinweis auf  $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ - oder  $[2\text{Fe-2S}]^{1+}$ -Zentren. Die Simulation (rot) wurde für eine Komponente dieses g-Wertes durchgeführt, um zu verdeutlichen, wie ein vollständiges EPR-Spektrum dazu aussehen könnte.

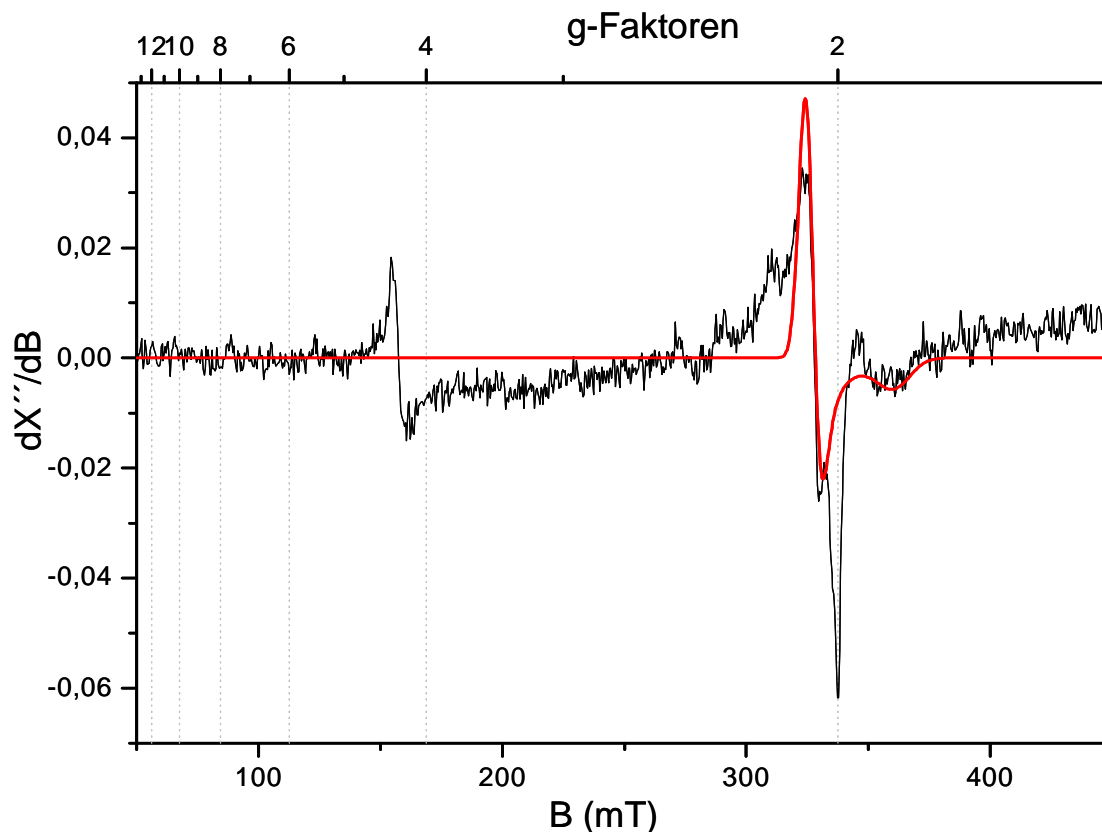


Abb. 20: **EPR-Spektrum von anaerob isoliertem NreB (0,9 mM) nach Photoreduktion mit Deazaflavin für 5 min.** Die Simulation (rot) wurde für die neue 'Linie' bei  $g = 1,87$  gemacht, um zu verdeutlichen, wie das vollständige EPR-Spektrum aussehen könnte. Das Spektrum wurde unter folgenden experimentellen Bedingungen aufgenommen: 9,4502 GHz; 0,2 mW und 10 K.

Die EPR-Spektroskopie konnte nur Hinweise liefern, führte aber zu keiner eindeutigen Identifizierung des FeS-Zentrums. Die einzige Methode EPR-stille FeS-Zentren zu identifizieren ist die Mössbauer-Spektroskopie.

#### 4.2.5 Mössbauer-Spektren nach Reduktion des $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums

Das  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum von NreB zeigte nach Reduktion mit Dithionit und Deazaflavin in den EPR-Spektren nur schwache Signale, was dafür spricht, dass sich das  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum nicht reduzieren lässt. Es scheint ähnlich wie das  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum von FNR aus *E. coli* EPR-still zu sein (Kiley *et al.*, 1998).

Im Unterschied zur EPR-Spektroskopie kann man in der Mössbauer-Spektroskopie jede Veränderung des Eisenschwefelzentrums nachweisen. Deshalb wurde die Reaktion des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums nach Inkubation mit Dithionit anhand des Mössbauer-Spektrums untersucht. Dazu wurde ein Spektrum von anaerob präpariertem NreB vor und nach Reduktion mit Dithionit aufgenommen (Abb. 21). Das Mössbauer-Spektrum und damit auch die Mössbauer-Parameter des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums ver-

änderten sich nicht (Tab. 20). Nur das Spektrum von  $\gamma$ -FeOOH änderte sich und hatte Mössbauer-Parameter, die zu  $\text{Fe}^{2+}$  mit Stickstoff oder Sauerstoff (aber auf keinen Fall Schwefel) als Liganden passten.

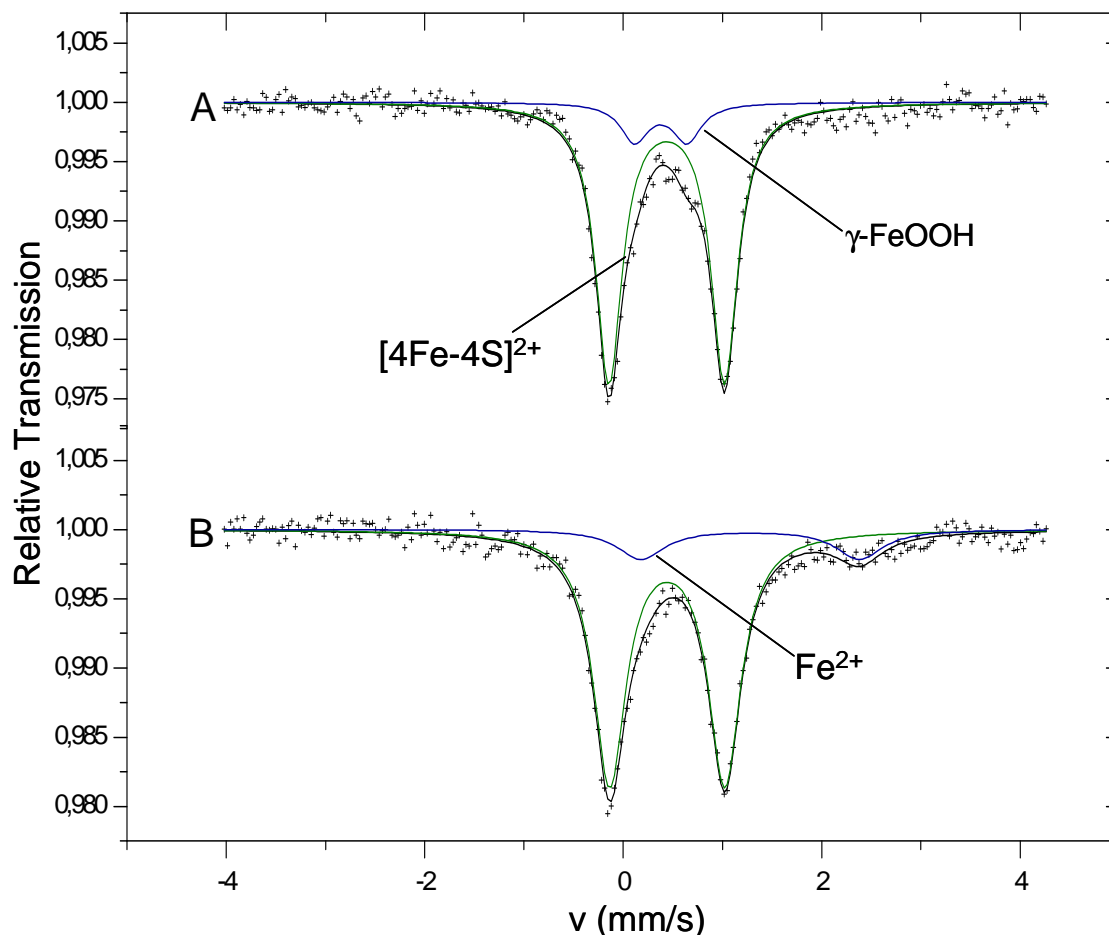


Abb. 21: Mössbauer-Spektren von anaerob isoliertem NreB (0,66 mM) vor (A) und nach Reduktion (B) mit Dithionit (5 mM) für 5 min. Das Subspektrum des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums (grün) hatte sich im Unterschied zum Subspektrums von  $\gamma$ -FeOOH (blau) nicht verändert. Die Änderung im blauen Spektrum erklärt sich durch die Reduktion von  $\gamma$ -FeOOH zu  $\text{Fe}^{2+}$ .

Tab. 20: Mössbauer-Parameter der Subspektren von anaerob isoliertem NreB vor (A) und nach Reduktion (B) mit Dithionit (5 mM) für 5 min.  $\gamma$ -FeOOH wurde vollständig zu  $\text{Fe}^{2+}$  reduziert, wobei sich die Mössbauer-Parameter des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums nicht veränderten.

Mössbauer-Spektrum	Eisenverbindung	Subspektrum	$\delta$ (mm/s)	$\Delta E_Q$ (mm/s)	Anteil (%)
A	$[4\text{Fe-4S}]^{2+}$	grün	0,44	1,16	87
	$\gamma$ -FeOOH	blau	0,38	0,53	13
B	$[4\text{Fe-4S}]^{2+}$	grün	0,44	1,16	86
	$\text{Fe}^{2+}$	blau	1,28	2,20	14

Somit konnte zumindest der Anteil des Eisens reduziert werden, der nicht im FeS-Zentrum vorlag. Wenn reduzierte  $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ -Zentren entstanden sind, war ihr Anteil zu gering, um sie mit Mössbauer-Spektroskopie nachzuweisen. Auch im EPR-Spektrum der mit Dithionit inkubierten Probe zeigte sich kein auf die Bildung eines reduzierten FeS-Zentrums hindeutendes Signal.

Das  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum von NreB scheint genau wie FNR aus *E. coli* ein sehr niedriges Redoxpotential ( $< -650$  mV) zu besitzen (Kiley *et al.*, 1998), und ließ sich weder mit Dithionit noch mit Deazaflavin und Licht reduzieren.

### 4.3 Luftexposition der anaeroben Form von NreB

#### 4.3.1 Änderungen im UV/Vis-Spektrum

Um die  $\text{O}_2$ -Sensitivität von  $\text{NreB}\cdot[4\text{Fe-4S}]$  zu untersuchen, wurde zunächst der Einfluss von Luftexposition auf das UV/Vis-Spektrum von anaerob isoliertem NreB gemessen. Vor Luftexposition besaß das Absorptionsspektrum (orange) die beiden charakteristischen Schultern bei 325 und 420 nm (Abb. 22A). Nach Exposition der Lösung für eine Minute mit Luft nahm die Gesamtabsorption zu, aber die beiden Schultern wurden flacher. Mit zunehmender Expositionsdauer für 30 und 60 min nahmen die Flächen unter den Schultern immer stärker ab, bis sie nach 60 Stunden schließlich ganz verschwunden waren. Zur Auswertung wurden die Flächen unter den beiden Schultern berechnet und ihre Änderung in Form einer Kinetik dokumentiert (Abb. 22B). Die Abnahme der Absorptionsschultern folgte einer zweiphasigen Kinetik mit einer schnellen Abnahme innerhalb der ersten zehn Minuten, gefolgt von einer langsameren Abnahme. Die Absorptionsschulter bei 325 nm verschwand schneller, als die Schulter bei 420 nm.

Nach Luft-Inaktivierung wurden die Eisen- und Sulfidgehalte von NreB bestimmt (Tab. 21). Vor der Bestimmung wurden lose assoziierte niedermolekulare Bestandteile durch Gelfiltration von der Probe getrennt. Im Vergleich zu anaerob isoliertem NreB sanken der Eisengehalt um 67 % und der Sulfidgehalt um 91 %. Dabei nahm der Quotient  $\text{Fe}/\text{S}^{2-}$  von 1,1 auf 4,3 zu. Dies war ein Hinweis darauf, dass nach der  $\text{O}_2$ -Inaktivierung das verbliebene Eisen nicht mehr in Form eines FeS-Zentrums, sondern unspezifisch gebunden vorlag.

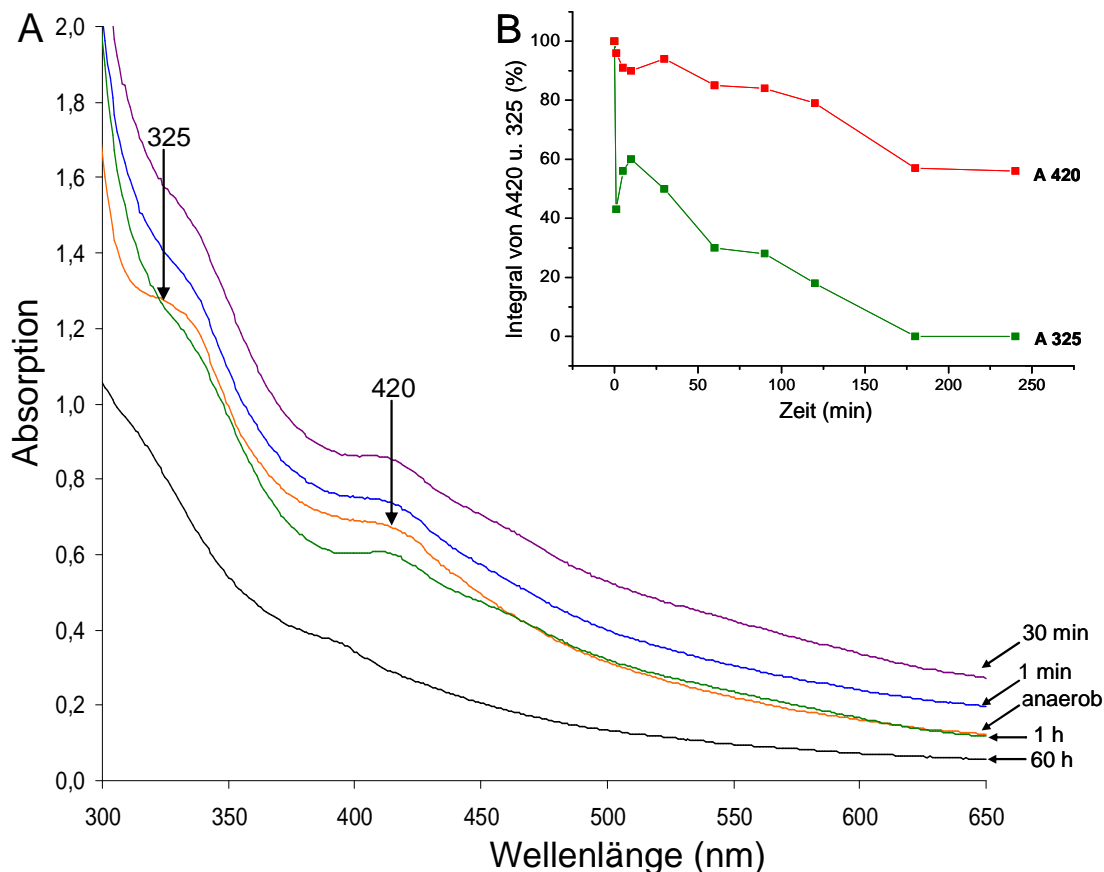


Abb. 22: **UV/Vis-Spektren anaerob isoliertem NreB (0,25 mM) nach Luftexposition.** **A:** Es sind die Absorptionsspektren von anaerob isoliertem NreB vor (orange Linie) und nach Exposition an Luft für 1 min (blaue Linie), für 30 min (lila Linie), für 60 min (grüne Linie) und für 60 h (schwarze Linie) gezeigt. **B:** Zeitliche Abnahme der Flächen unter den Absorptionsschultern A325 (318-361 nm) und A420 (398-441 nm).

Tab. 21: **Eisen- und Sulfidgehalte von anaerob präpariertem NreB aus *S. carnosus* m1 (pCQE1nreB) nach O<sub>2</sub>-Inaktivierung für 1-2 h.** Die Eisen- und Sulfidgehalte wurden aus drei anaeroben Präparationen und anschließend O<sub>2</sub>-Inaktivierten Proben von NreB (0,36 - 0,49 mM) bestimmt. Dargestellt sind der Mittelwert und die berechnete Standardabweichung.

<b>NreB</b>	<b>Fe/NreB</b>	<b>S<sup>2-</sup>/NreB</b>	<b>Fe/S<sup>2-</sup></b>
<b>(0,4 - 0,5 mM)</b>	<b>(mol/mol)</b>	<b>(mol/mol)</b>	<b>(mol/mol)</b>
anaerob isoliert	<b>0,9 ± 0,17</b>	<b>0,8 ± 0,45</b>	<b>1,1</b>
+ O <sub>2</sub> (1-2 h)	<b>0,3 ± 0,17</b>	<b>0,07 ± 0,03</b>	<b>4,3</b>

#### 4.3.2 Auswirkung der Luftexposition auf die Kinaseaktivität von NreB

Anaerob präpariertes NreB weist eine hohe Autophosphorylierungsaktivität auf (Hammel, 2007). Im Folgenden wurde der Effekt einer Luftexposition auf die Autophosphorylierungsaktivität untersucht. Anaerob isoliertes NreB wurde in definierten Zeitabständen an Luft exponiert und dann unter anaeroben Bedingungen mit

$[\gamma^{33}\text{P}]$ -ATP inkubiert. Anschließend wurde in der SDS-PAGE nicht eingebaute Radioaktivität von NreB getrennt. In dem Autoradiogramm wurde dann die NreB assoziierte Radioaktivität bestimmt und im Phosphoimager quantitativ ausgewertet. Abb. 23 zeigt das Autoradiogramm und die daraus erstellte Kinetik. Die Geschwindigkeit der Autophosphorylierung nahm in der Probe, die zwei Minuten Luft-exponiert wurde um den Faktor 2,4 ab. Nach 30 min Luftexposition hatte die Autophosphorylierungsaktivität um den Faktor 5 abgenommen. Eine längere Luftexposition führte zu keiner weiteren Senkung der Phosphorylierungsaktivität. Anscheinend besitzt NreB unter aeroben Bedingungen zumindest *in vitro* eine Basalaktivität. Schon zuvor wurde gezeigt, dass aerob präpariertes NreB eine basale Phosphorylierungsaktivität besitzt, die sich durch Inkubation mit dem Thiol-spezifischen Alkylierungsreagenz N-Ethylmaleinimid senken lässt (Hammel, 2007).

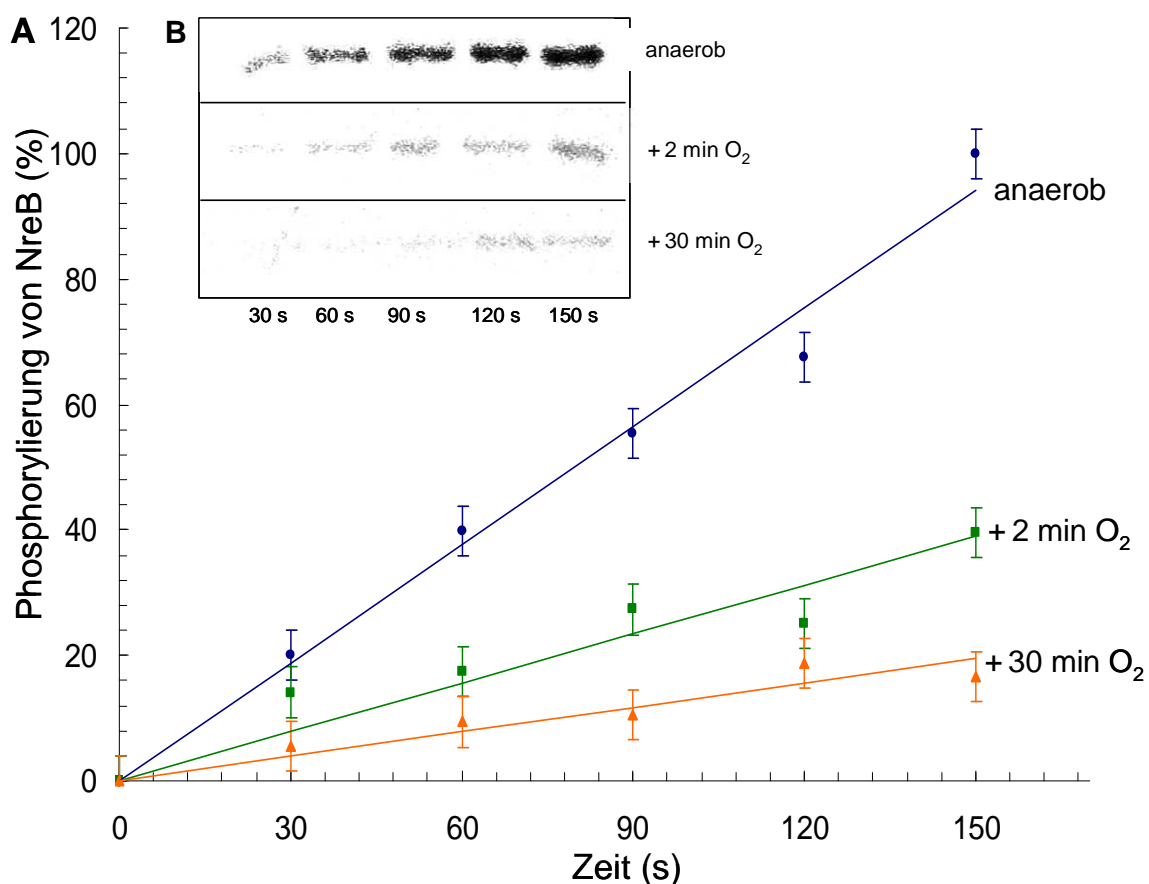


Abb. 23: **Effekt von Luft auf die Autophosphorylierung von anaerob isoliertem NreB•[4Fe-4S] (0,18 mM) mit  $[\gamma^{33}\text{P}]$ -ATP.** Anaerob isoliertes NreB wurde mit  $[\gamma^{33}\text{P}]$ -ATP bei RT inkubiert. In Abständen von 30 s wurden Proben entnommen und abgestoppt. Nach SDS-PAGE wurde die Radioaktivität in den Proteinbanden von NreB im Phosphoimager gemessen. Das Autoradiogramm (B) wurde mit der Software Gel-Pro Analyzer 6.0 quantifiziert und in einer Kinetik dargestellt (A). Der Gehalt an Phosphorylierung von anaerob isoliertem NreB (-●-) nach 150 s wurde auf 100 % gesetzt. Die Geschwindigkeit der Autophosphorylierung nahm nach Exposition an Luft für 2 min (-■-) um Faktor 2,4 ab und nach Exposition für 30 min (-▲-) um Faktor 5 ab.

Die Abnahme der Phosphorylierungsaktivität und der Absorptionsschultern bei 325 nm und 420 nm wurde zusammen in einer Kinetik dargestellt (Abb. 24). In den ersten fünf Minuten nach Luftexposition nahm die Phosphorylierungsaktivität zusammen mit der Absorptionsschulter bei 325 nm signifikant ab. Die Absorptionsschulter bei 420 nm nahm nur geringfügig ab. Es ist anzunehmen, dass die chromophore Gruppe, welche die Absorption bei 325 nm verursacht, für die Phosphorylierungsaktivität von NreB erforderlich ist.

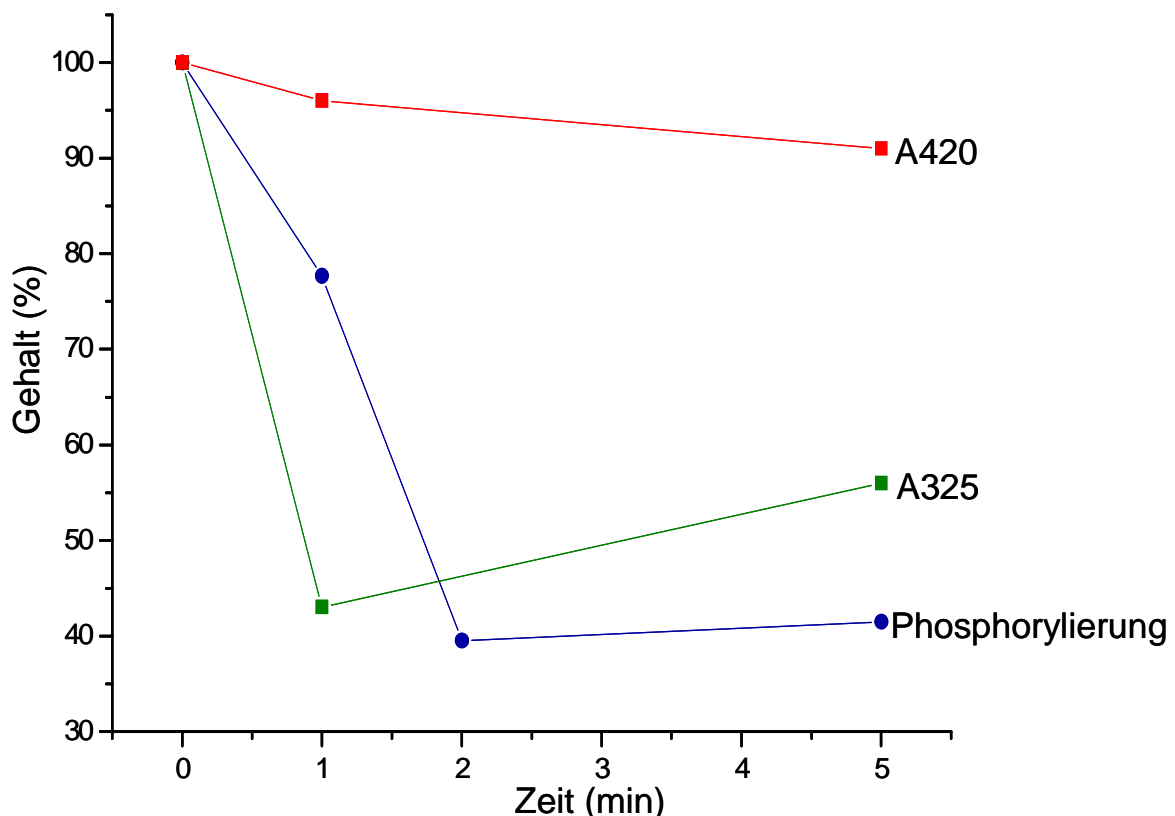


Abb. 24: O<sub>2</sub>-induzierte Veränderung im UV/Vis-Spektrum und Abnahme der Phosphorylierungsaktivität von NreB. Um die Veränderung nach Luftexposition im UV/Vis-Spektrum zu quantifizieren wurde die Flächen unter der Absorptionsschultern bei 325 nm (-■-) (318 nm - 361 nm) und 420 nm (-■-) (398 nm - 441 nm) berechnet. Die Abnahme der Phosphorylierungsaktivität (-●-) nach Luftexposition korreliert mit der Abnahme der Absorptionsschulter bei 325 nm.

#### 4.3.3 EPR- und Mössbauer-Spektren von anaerobem NreB nach Luftexposition

In FNR wird das [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Zentrum nach Kontakt mit Sauerstoff zu einem [3Fe-4S]<sup>1+</sup>-Zentrum oxidiert, was dann weiter zu einem [2Fe-2S]<sup>2+</sup>-Zentrum zerfällt (Crack *et al.*, 2008; Kiley *et al.*, 1998). Ein [3Fe-4S]<sup>1+</sup>-Zentrum weist ein ungepaartes Elektron auf, das mittels EPR-Spektroskopie detektiert werden kann. Proben von anaerob isoliertem NreB wurden für zunehmende Zeit an Luft exponiert. Von jeder Probe wur-



de ein EPR-Spektrum aufgenommen (Abb. 25). Die Spektren zeigten keine Signale, die auf Entstehung eines  $[3\text{Fe-4S}]^{1+}$ -Zentrums hinweisen. Nach 2 min wurde ein Signal bei einem g-Wert von 4,3 detektiert. Es war sehr schwach und stammte offensichtlich von  $\text{Fe}^{3+}$ , das beim Zerfall des Zentrums entstand.

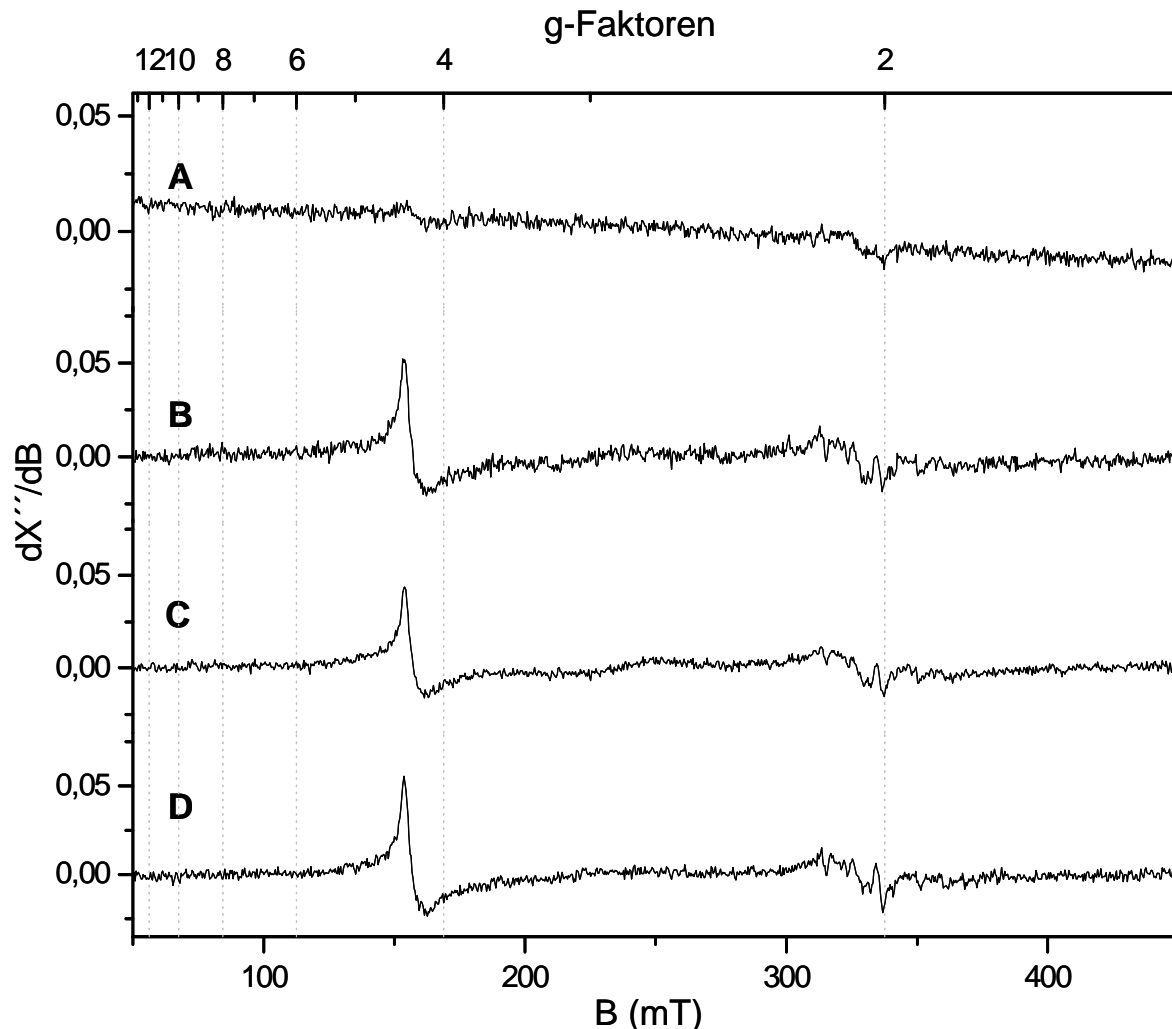


Abb. 25: **EPR-Spektren von NreB•[4Fe-4S] nach Luftexposition.** Anaerob präpariertes NreB•[4Fe-4S] wurde für 30 s (A), 2 min (B), 10 min (C) und 18 min (D) an Luft exponiert. Es wurden keine EPR-Signale gemessen, die die Entstehung eines  $[3\text{Fe-4S}]^{1+}$ -Zentrums gezeigt hätten. Experimentelle Bedingungen für A: 9,451978 GHz; 0,2 mW; 10,02 K; 10 G/100kHz Modulation B: 9,44513 GHz; 0,2 mW und 10,04 K C: 9,44830 GHz; 0,2 mW und 10,11 K und D: 9,45062 GHz; 0,2 mW und 10,02 K.

Da anscheinend auch bei Oxidation des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums keine EPR-aktiven Spezies in messbaren Mengen entstanden, wurden  $\text{O}_2$ -inaktivierten Proben mit Mössbauer-Spektroskopie untersucht. Dafür wurden Proben von anaerob isoliertem NreB für 30 Sekunden, zwei Minuten und fünfzehn Minuten mit Luft inkubiert. Anschließend wurde von jeder Probe ein Mössbauer-Spektrum aufgenommen.

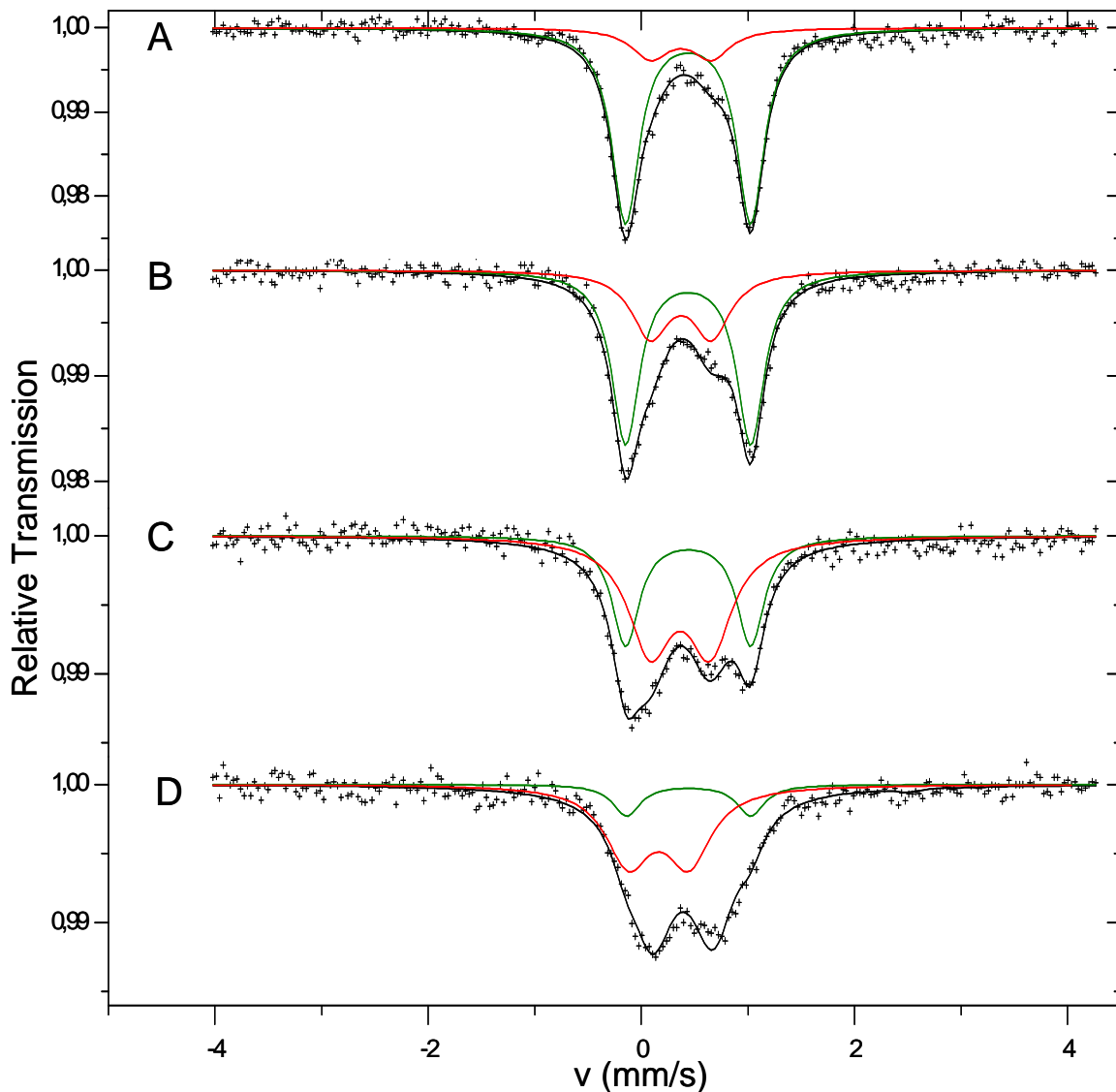


Abb. 26: **Beobachtung des O<sub>2</sub>-induzierten Zerfalls des [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Zentrums mit Mössbauer-Spektroskopie.** Die Mössbauer-Spektren wurden von anaerob isoliertem NreB (A), 30 Sekunden Luft exponiertem (B), zwei Minuten Luft exponiertem (C) und fünfminhalb Minuten Luft exponiertem NreB (D) aufgenommen. Die durch die experimentellen Daten verlaufende Linie (schwarz), ist die Überlagerung von zwei Lorentzischen Dubletts von [4Fe-4S]<sup>2+</sup> (grün) mit  $\Delta E_Q = 1,17$  und  $\delta = 0,44$  mm/s und von  $\gamma$ -FeOOH (rot) mit  $\Delta E_Q = 0,58$  und  $\delta = 0,39$  mm/s. Nach Luftexposition für fünfminhalb Minuten wurde das [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Zentrum fast vollständig zu  $\gamma$ -FeOOH oxidiert.

Abb. 26 zeigt das Mössbauer-Spektrum von nativem [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Zentrum in anaerob isoliertem NreB (A). Es setzt sich zu 87 % aus dem Spektrum des [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Zentrums (grün) mit  $\Delta E_Q = 1,17$  (mm/s) und  $\delta = 0,44$  (mm/s) und zu 13 % aus dem Spektrum (rot) von  $\gamma$ -FeOOH mit  $\Delta E_Q = 0,58$  (mm/s) und  $\delta = 0,39$  (mm/s) zusammen. Nach 30 s Luftexposition nimmt der Gehalt von [4Fe-4S]<sup>2+</sup> auf 66 % ab und der Gehalt an  $\gamma$ -FeOOH steigt auf 34 %. Weitere Luftexposition für zwei Minuten vergrößert den Anteil des  $\gamma$ -FeOOH (61 %), wobei der Anteil an [4Fe-4S]<sup>2+</sup> weiter abnimmt (39%). Nach fünfminhalb Minuten war der Gehalt von [4Fe-4S]<sup>2+</sup> auf 12 % gesunken

und wurde so fast vollständig in  $\gamma$ -FeOOH (88 %) umgewandelt. Zwischenstufen der Oxidation z.B.  $[3\text{Fe-4S}]^{1+}$  oder  $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ -Zentren konnten nicht detektiert werden. Die Umwandlung des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums von anaerob isoliertem NreB in  $\gamma$ -FeOOH und die Abnahme der Phosphorylierungsaktivität nach Luftexposition sind in einer Kinetik dargestellt (Abb. 27).

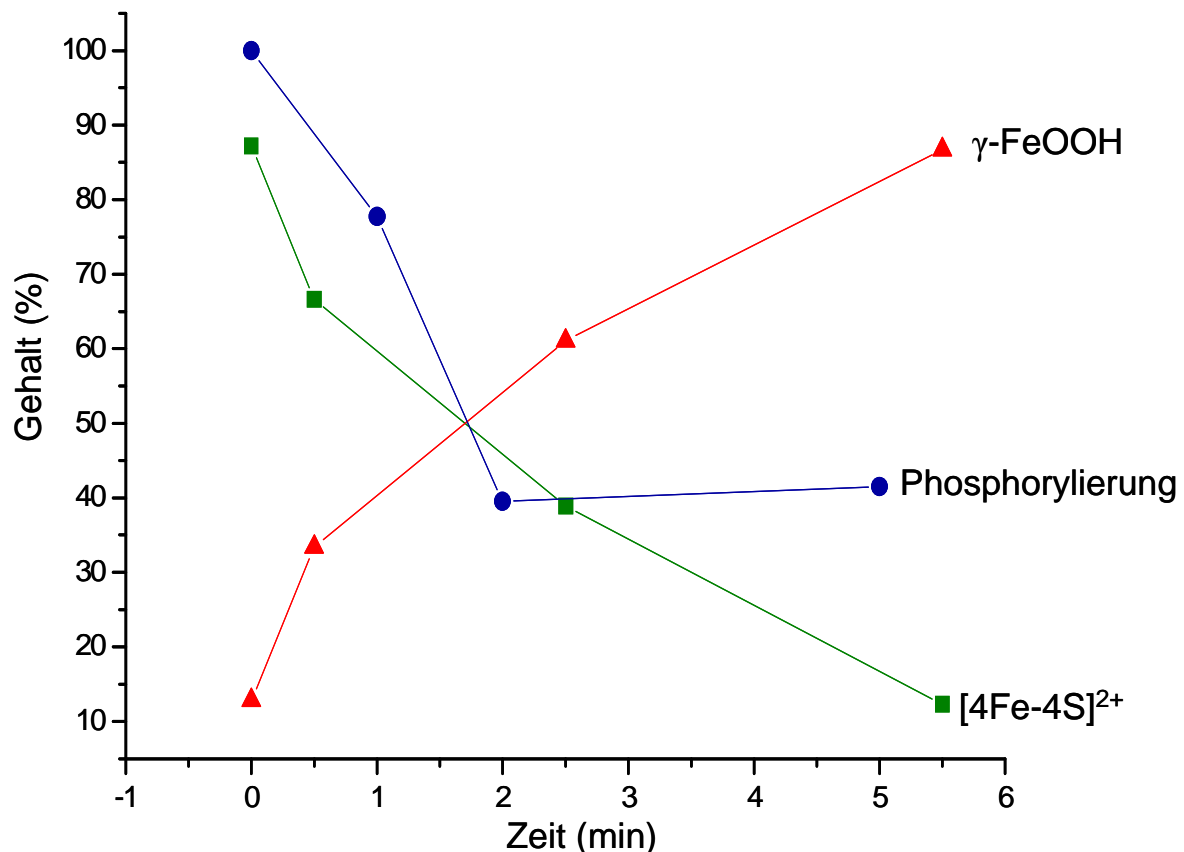


Abb. 27: Korrelation des Gehalts an  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum und der Phosphorylierungsaktivität von NreB. Nach 5,5 min Luftexposition wurde das  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum (-■-) fast vollständig in  $\gamma$ -FeOOH (-▲-) umgewandelt. Die Abnahme der Phosphorylierung (-●-) korrelierte mit dieser Beobachtung.

Nach fünfminhalb Minuten Luftexposition hatte der Anteil des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums um 86 % und die Phosphorylierungsaktivität von NreB um 59 % abgenommen. Die schnelle Abnahme des Gehalts des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums korreliert mit der Abnahme der Phosphorylierungsaktivität. Daraus kann man schließen, dass das  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum für die Kinaseaktivität von NreB erforderlich ist.

#### 4.4 Rekonstitution des $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums in apoNreB

##### 4.4.1 Eigenschaften von rekonstituiertem NreB

NreB befindet sich nach aerober Präparation im inaktiven Zustand und ist frei von FeS-Zentren (apoNreB). Es wurde untersucht, ob das Eisenschwefelzentrum in apoNreB unter anaeroben Bedingungen nach einer für FNR beschriebenen Methode assembliert werden kann. Dabei wird das FeS-Zentrum mit  $\text{Fe}^{2+}$ , Cystein, und der Cystein-Desulfurase NifS<sub>AV</sub> rekonstituiert (Tran *et al.*, 2000). Zur Bindung von FeS-Zentren in Proteinen werden Cysteinreste benötigt, die in der reduzierten Form vorliegen müssen. Die Reduktion der Cysteinreste erfolgte mit Dithiothreitol (DTT).  $\text{Fe}^{2+}$  wurde als Mohr'sches Salz  $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$  zugesetzt, Sulfid wurde durch Desulfurierung von Cystein gebildet. NifS<sub>AV</sub> katalysiert diese Desulfurierung, in dem es Cystein zu Alanin und  $\text{S}^{2-}$  umsetzt, und  $\text{S}^{2-}$  für die Bildung der FeS-Zentren zur Verfügung stellt (Zheng *et al.*, 1993). Der Einbau des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$  Zentrums wurde über die Änderung des UV/Vis-Spektrums verfolgt. Abb. 28 zeigt die Absorptionsspektren von aerob präpariertem (gestrichelte Linie) und für 45 min rekonstituiertem NreB (durchgezogene Linie).

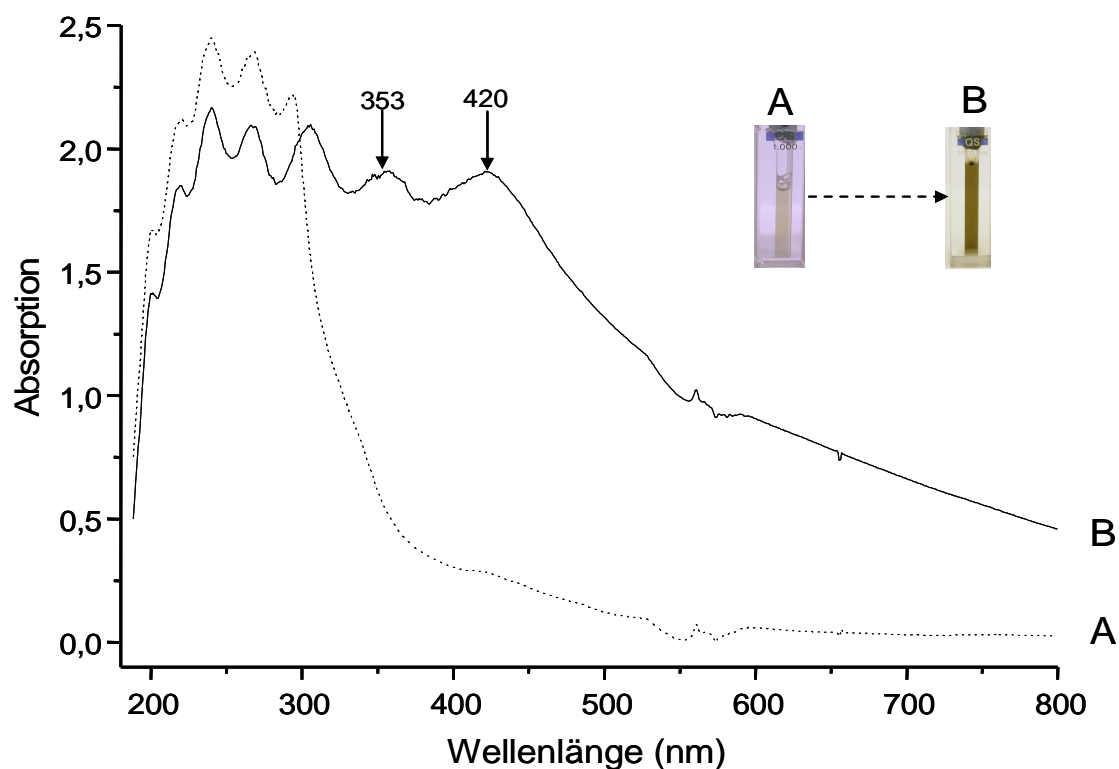


Abb. 28: UV/Vis-Spektrum von aerob präpariertem NreB vor (A) und nach (B) Rekonstitution *in vitro* für 45 min. Aerob präpariertes NreB wurde unter anaeroben Bedingungen in Gegenwart von Cystein, Dithiothreitol und  $\text{Fe}^{2+}$  mit der Cystein-Desulfurase NifS<sub>AV</sub> rekonstituiert.

Die Färbung der Proteinlösung veränderte sich von blassgelb zu olivgrün und die gesamte Absorption von 300 bis 800 nm stieg an. Es hatten sich drei Absorptionsmaxima bei 300 nm, 353 nm und 420 nm gebildet, die charakteristisch für FeS-Proteine sind (Khoroshilova *et al.*, 1995; Green *et al.*, 1996). Das Absorptionsspektrum von anaerob präpariertem NreB hatte leicht abweichende Absorptionsschultern bei 280 nm und 325 nm, aber die charakteristische Absorption bei 420 nm stimmte überein.

Zur Bestimmung der Eisen- und Sulfidgehalte von NreB wurde der Rekonstitutionscocktail über eine Gelfiltrationssäule von nicht gebundenem Eisen und Sulfid gereinigt. Abb. 29 zeigt ein Chromatogramm von rekonstituiertem NreB, Eisen und Sulfid. Die Fraktionen 5 und 6 enthielten an NreB gebundenes Eisen und Sulfid. „freies“ Eisen eluierte von Fraktion 8 - 11. Ungebundenes Sulfid konnte nicht nachgewiesen werden.

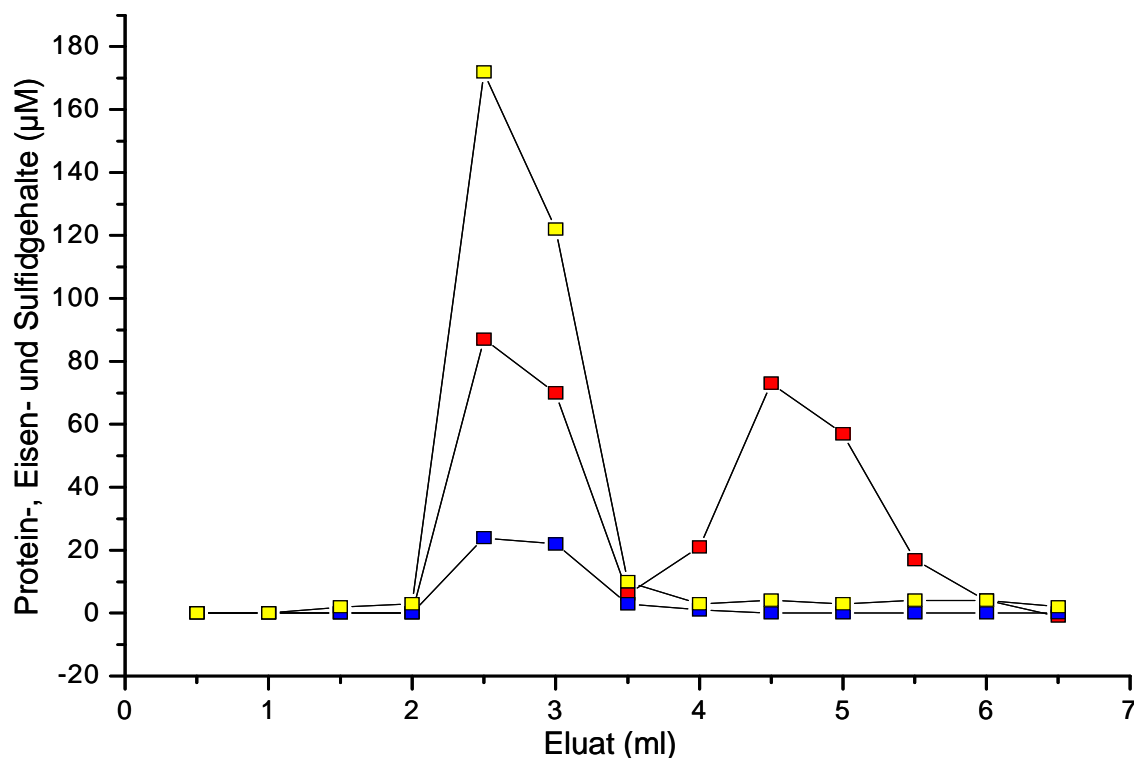


Abb. 29: **Chromatogramm von Protein-, Eisen- und Sulfidgehalten nach Rekonstitution von NreB *in vitro* für 217 min.** Von einem für 217 min inkubierten Rekonstitutionsansatz (137 µM NreB; 6,85 µM NifS<sub>AV</sub>; 2 mM Cystein und 822 µM Fe<sup>2+</sup> in 50 mM Tris/HCl pH 7,6) wurde 1 ml auf eine NAP-10 Säule mit Sephadex G-25 Medium (Pharmacia) aufgetragen, um freies Fe<sup>2+</sup> und S<sup>2-</sup> abzutrennen. Es wurde in Fraktionen à 0,5 ml eluiert, wovon anschließend die Gehalte an Eisen (-■-), Sulfid (-■-) und Protein (-■-) bestimmt wurden. Die Arbeiten wurden unter anoxischen Bedingungen durchgeführt.

Tab. 22 zeigt die durchschnittlichen Eisen- und Sulfidgehalte von NreB. Rekonstituiertes NreB enthält etwa vier Mol Eisen und Sulfid pro Mol NreB. Das entspricht einem Gehalt von einem  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum pro NreB.

Vor der Rekonstitution enthielt NreB fast kein Eisen und Sulfid. Eisen und Sulfid sind auch nicht unspezifisch mit NreB assoziiert, da nur bei Rekonstitution mit der Cystein-Desulfurase NifS<sub>AV</sub> entsprechende Gehalte in NreB gefunden werden.

Tab. 22: **Eisen- und Sulfidgehalte von aerob isoliertem NreB aus *S. carnosus* m1 (pCQE1nreB)** Die Gehalte von rekonstituiertem NreB wurden aus sechs Proben bestimmt, die 15 -45  $\mu\text{M}$  NreB; 0,45 - 2,2  $\mu\text{M}$  NifS<sub>AV</sub>; 300  $\mu\text{M}$  Fe<sup>2+</sup>; 2,5 mM Dithiothreitol und 2 mM Cystein enthielten und für 4 h unter anaeroben Bedingungen inkubiert wurden. Die gleichen Proben wurden 4 h ohne NifS<sub>AV</sub> inkubiert.

NreB	Fe/NreB (mol/mol)	S <sup>2-</sup> /NreB (mol/mol)
nach Isolierung	0,3	0,1
nach Inkubation ohne NifS <sub>AV</sub>	0,1	0,5
nach Rekonstitution	4,4	4,1

#### 4.4.2 Synthese des Mohr'schen Salzes aus <sup>57</sup>Fe-Metallpulver

Um das FeS-Zentrum in aerob präpariertem NreB zu assemblieren und dann mittels Mössbauer-Spektroskopie zu untersuchen, musste es mit <sup>57</sup>Fe markiert werden. <sup>57</sup>Fe wurde als Metallpulver bezogen und musste in eine verwendbare Form umgesetzt werden. Bei *in vitro* Rekonstitutionen von FeS-haltigen Proteinen wird bevorzugt Fe<sup>2+</sup> in Form von Ammoniumeisen(II)sulfat eingesetzt. Das Mohr'sche Salz ist relativ oxidationsunempfindlich und eignet sich besonders gut zur Herstellung von stabilen Fe<sup>2+</sup>-Lösungen. Nach der Synthese wurde ein Mössbauer-Spektrum des Produkts aufgenommen (Kooperation AK Renz). Das Mössbauer-Spektrum des Produkts wurde mit dem Mössbauer-Spektrum von Ammoniumeisen(II)sulfat, das <sup>56</sup>Fe (mit geringem Anteil an <sup>57</sup>Fe) enthielt, verglichen (Abb. 30). Beide Spektren setzen sich aus zwei Subspektren zusammen, die unterschiedliche Mössbauer-Parameter besaßen (Tab. 23). Der prozentuale Anteil der Subspektren unterscheidet sich zwischen beiden Proben signifikant. Die Parameter des blauen Subspektrums ( $\delta = 1,14$  mm/s und  $\Delta E_Q = 2,79$  mm/s), das den größten Anteil des synthetisierten Mohr'schen Salzes ausmacht, passen gut zu den Mössbauer-Parametern von FeSO<sub>4</sub> (Grant *et al.*, 1966), das anscheinend auch zu geringem Anteil in käuflich erhältlichem Mohr'schem Salz vorhanden ist.

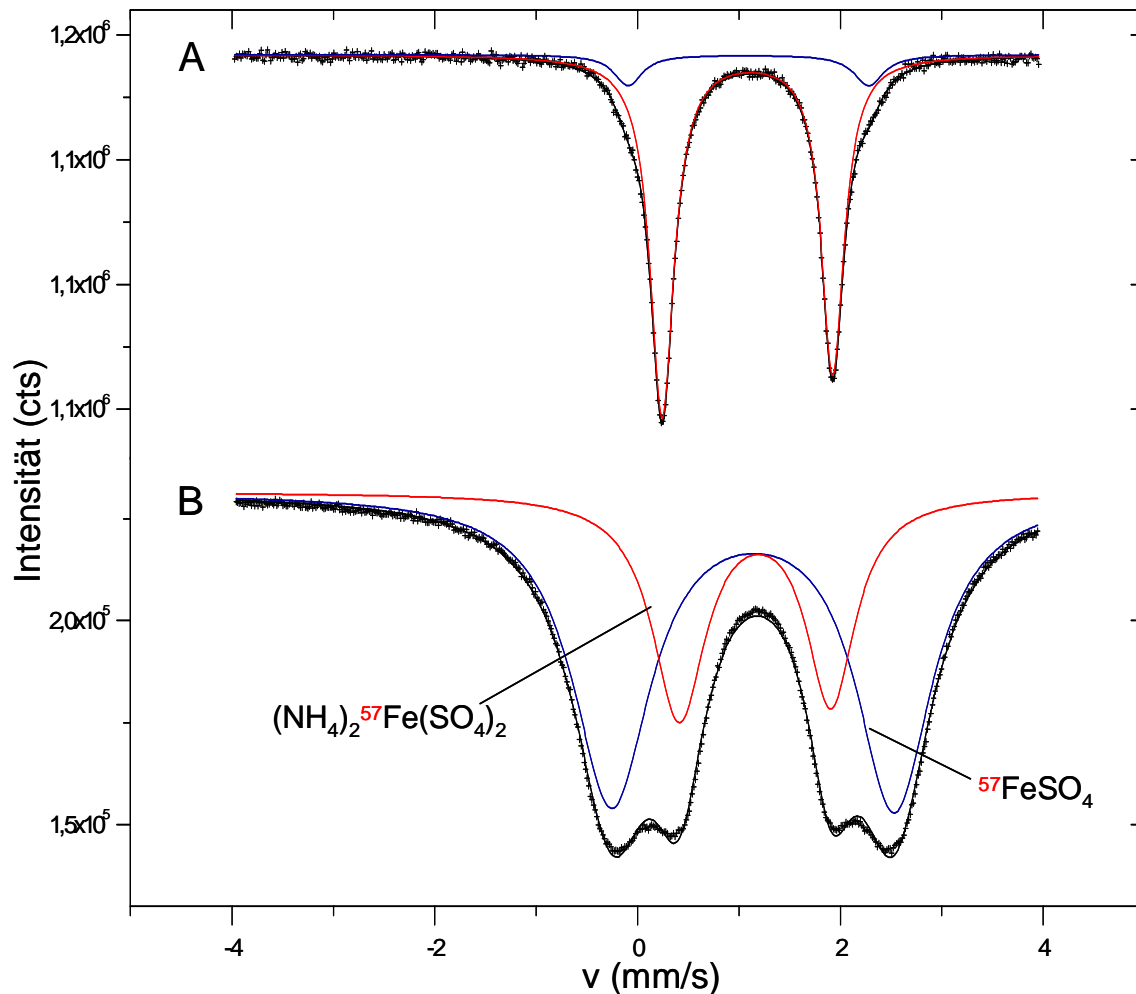


Abb. 30: Mössbauer-Spektren des Mohr'schen Salzes  $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ . Die Abbildung zeigt das Mössbauer-Spektrum von käuflich erhältlichem Mohr'schem Salz (A) und von aus  $^{57}\text{Fe}$ -Metallpulver hergestelltem Mohr'schem Salz (B).

Tab. 23: Mössbauer-Parameter von Mohr'schem Salz.  
(A) gekauft (Merck) (B) aus  $^{57}\text{Fe}$ -Metallpulver synthetisiert

Mohr'sches Salz	Subspektrum	$\delta$ (mm/s)	$\Delta E_Q$ (mm/s)	Anteil (%)
(A) $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$	rot	1,1	1,7	90
	blau	1,1	2,4	10
(B) $(\text{NH}_4)_2^{57}\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$	blau	1,14	2,79	68
	rot	1,16	1,49	32

Das aus  $^{57}\text{Fe}$  hergestellte Mohr'sche Salz war somit ein Gemisch aus Ammoniumeisen(II)sulfat (32%) und Eisen(II)sulfat (68%). Die Tatsache, dass es sich um ein Gemisch handelte, war aber nicht störend für den Einsatz in der Rekonstitutionsreaktion. Aus 1,4 mMol  $^{57}\text{Fe}$  wurden 0,64 mMol  $(\text{NH}_4)_2^{57}\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$  synthetisiert. Damit lag die Ausbeute bei 45 %.

#### 4.4.3 Mössbauer-Spektren von rekonstituiertem NreB

Das *in vitro* rekonstituierte FeS-Zentrum wurde mittels Mössbauer-Spektroskopie untersucht. Dazu wurde das aus  $^{57}\text{Fe}$  synthetisierte Mohr'sche Salz als Eisenquelle im Rekonstitutionsansatz verwendet. Zuvor durchgeführte Experimente hatten gezeigt, dass zuviel Eisen (vierfacher Überschuss zur molaren Menge an NreB) im Rekonstitutionsansatz stört und lange Rekonstitution ( $> 40$  min) zur Entstehung von FeS führt. Deshalb wurde NreB mit zweifachem Überschuss an  $\text{Fe}^{2+}$  für 15 Minuten inkubiert. Bei der Rekonstitution wurde durch niedrige Konzentration von NifS<sub>AV</sub> (5-7  $\mu\text{M}$ ) und L-Cysteiniumchlorid (1mM) die Bereitstellung von Sulfid verlangsamt. Dadurch sollte der Einbau des gebildeten FeS-Zentrums in NreB verbessert werden. NreB ist in Tris/HCl-Puffer in den nötigen hohen Konzentrationen (0,1 - 1 mM) nicht stabil (nicht gezeigt). Durch Optimierung der Pufferkomponenten und des pH-Wertes wurde ein Puffer (50 mM NaP<sub>i</sub> (pH 8), 150 mM Imidazol, 300 mM NaCl, 20% Glycerin, 2,5 mM DTT und 50 mM L-Arginin) gefunden, in dem NreB bei Konzentrationen bis zu 1 mM stabil in Lösung blieb. Nicht eingebaute  $^{57}\text{Fe}$ - sowie  $\gamma\text{-Fe}^{3+}\text{OOH}$ -Partikel führten bei der Messung zu einem hohen Hintergrund an Signalen, die nicht von NreB stammten. Deshalb wurde der rekonstituierte Ansatz über eine Gelfiltrationssäule von ungebundenem Eisen befreit (Abb. 31).

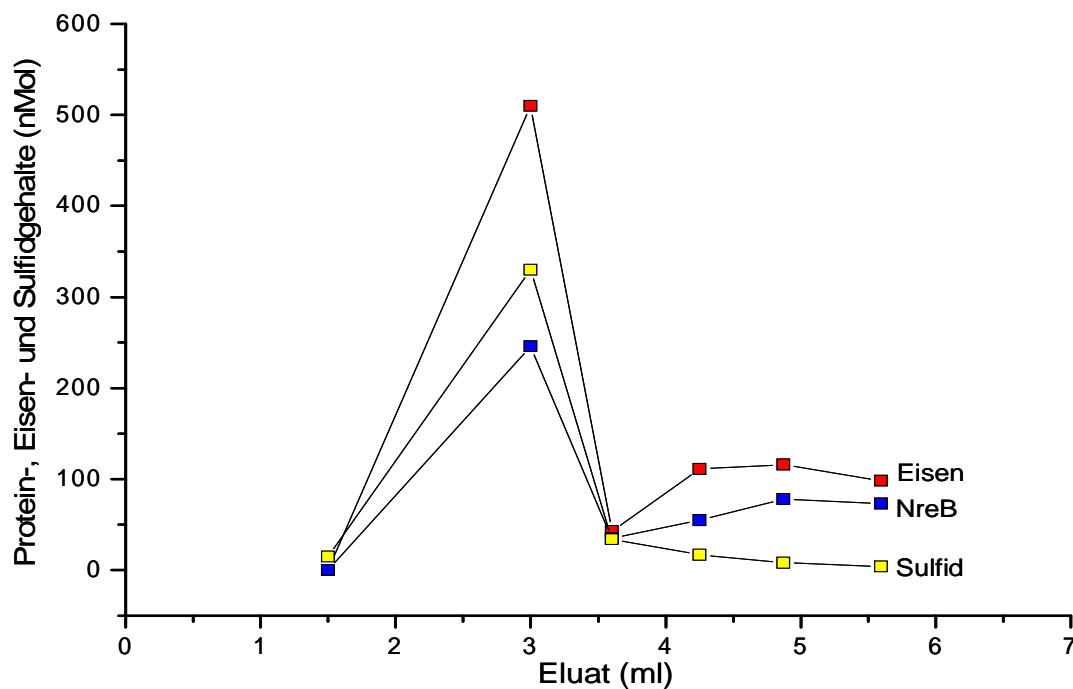


Abb. 31: **Chromatogramm von Protein-, Eisen- und Sulfidgehalten nach Rekonstitution von NreB *in vitro* für 15 min.** Unter anaeroben Bedingungen wurden 1,5 ml Probe von rekonstituiertem NreB (0,3 mM) über eine Gelfiltrationssäule (Hitrap™ Desalting (5 ml) GE Healthcare) gereinigt und mit 5,6 ml Puffer C (50 mM NaP<sub>i</sub> (pH 8), 300 mM NaCl, 150 mM Imidazol, 2,5 mM Dithiothreitol, 20% Glycerin) eluiert. Von den gesammelten Fraktionen wurden die Protein- (■), Eisen- (■), und Sulfidgehalte (■) bestimmt.



In der Gelfiltrationssäule eluieren hochmolekulare Komponenten ( $> M_r = 5.000$ ) zwischen 1,5 - 4,5 ml und niedermolekulare Bestandteile ( $< M_r = 1.000$ ) beginnen nach 3,5 ml zu eluieren. Um sicherzustellen, dass alles ungebundene Eisen von der Probe abgetrennt wurde, wurden nur die ersten 0,7 - 1,5 ml nach der Elution des Leervolumens zur weiteren Messung verwendet.

Die Proben wurden mit EPR- und Mössbauer-Spektroskopie untersucht. Alle Proben waren EPR-still. Abb. 32 zeigt ein Mössbauer-Spektrum der Probe, das bei 80 K und ohne Anlegen eines magnetischen Felds aufgenommen wurde.

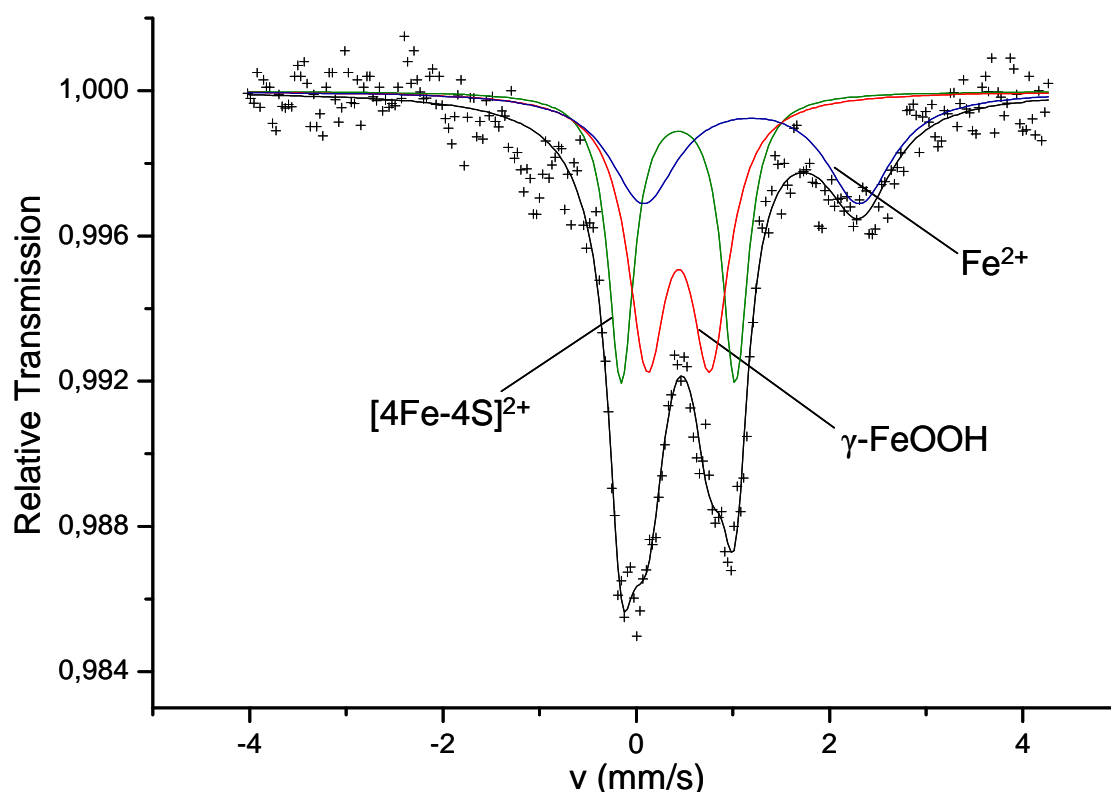


Abb. 32: 0-Feld Mössbauer-Spektrum von apoNreB (0,26 mM) nach Rekonstitution für 15 min *in vitro* aufgenommen bei 80 K. Die durch die experimentellen Daten verlaufende Linie (schwarz) ist eine Überlagerung der drei Lorentz-Dubletts von  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$  (grün),  $\gamma\text{-FeOOH}$  (rot) und  $\text{Fe}^{2+}$  (blau).

Tab. 24: Mössbauer-Parameter der Subspektren von apoNreB nach Rekonstitution für 15 min *in vitro*

Eisenverbindung	Subspektrum	$\delta$ (mm/s)	$\Delta E_Q$ (mm/s)	Anteil (%)
$[4\text{Fe-4S}]^{2+}$	grün	0,44	1,17	34
$\gamma\text{-FeOOH}$	rot	0,44	0,65	37
$\text{Fe}^{2+}$	blau	1,21	1,81	29

Die durch die experimentellen Daten verlaufende Linie (schwarz) ist eine Überlagerung aus drei Lorentz-Dubletten von  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$  (grün),  $\text{Fe}^{2+}$  (blau) und  $\gamma\text{-FeOOH}$  (rot), deren Parameter in Tab. 24 aufgelistet sind. Das Eisen in Form eines  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums stellt mit 34 % nur ca.  $\frac{1}{3}$  des gesamten Eisens dar. Der Rest des Eisens liegt als  $\gamma\text{-FeOOH}$  (39%) und  $\text{Fe}^{2+}$  (34%) unspezifisch an NreB gebunden vor. Dadurch kann zwischen unspezifisch gebundenem Eisen und Eisen, das als  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum assembliert vorliegt, unterschieden werden (Tab. 25). Es wurden 19 nmol  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum in 13% NreB *in vitro* assembliert.

Tab. 25: Eisen- und Sulfidgehalte von NreB (144 nmol) nach Rekonstitution *in vitro* für 15 min. Die Probe enthielt 107 nmol Sulfid und 221 nmol Eisen.

Eisen	nmol	Fe/NreB (mol/mol)	S <sup>2-</sup> /NreB (mol/mol)	Fe/S <sup>2-</sup> (mol/mol)
Gesamt	221	1,5	0,7	2,1
$[4\text{Fe-4S}]^{2+}$	75	0,5	0,7	0,7

#### 4.4.4 Autophosphorylierungsaktivität von rekonstituiertem NreB

Um die Funktionalität des in apoNreB künstlich eingebauten  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums nachzuweisen, wurde der Einfluss auf die Autophosphorylierungsaktivität untersucht. Dafür wurde die Autophosphorylierungsaktivität von apoNreB vor und nach Rekonstitution *in vitro* verglichen.

Die Proben wurden mit  $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$  inkubiert und aus dem Autoradiogramm wurden Kinetiken erstellt (Abb. 33). Die Aktivität der Autophosphorylierung von apoNreB konnte durch Rekonstitution signifikant (Faktor 2,9) erhöht werden. Das künstlich eingebaute  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum ist demnach funktionell und stimuliert die Phosphorylierungsaktivität von NreB. Die basale Phosphorylierungsaktivität von apoNreB konnte durch Inkubation mit NEM (N-Ethylmaleinimid), das spezifisch Cysteinreste alkyliert, weiter gesenkt werden (Faktor 2,9).

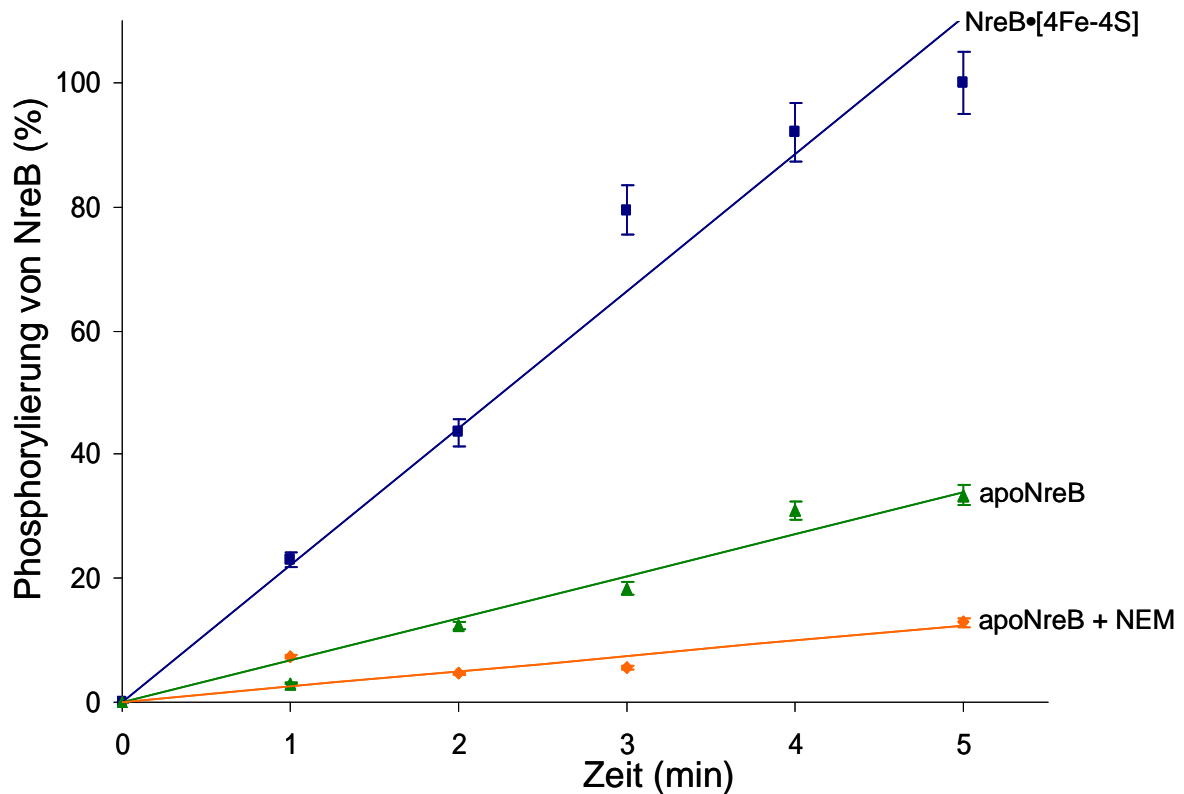


Abb. 33: **Stimulierung der Phosphorylierungsaktivität von apoNreB durch Rekonstitution *in vitro*.** NreB wurde mit  $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$  bei RT inkubiert. In Abständen von 1 min wurden Proben entnommen und abgestoppt. Nach SDS-PAGE wurde die Radioaktivität in den Proteinbanden von NreB im Phosphoimager gemessen. Das Autoradiogramm (nicht gezeigt) wurde mit der Software Gel-Pro Analyzer 6.0 quantifiziert und in einer Kinetik dargestellt. Der Phosphorylierungsgehalt von rekonstituiertem NreB (-●-) nach 5 min wurde auf 100 % gesetzt. Die Zunahme der Phosphorylierung von apoNreB (-◇-) kann durch Rekonstitution (-■-) unter anaeroben Bedingungen in Gegenwart von Cystein,  $\text{Fe}^{2+}$ , und DTT mit Hilfe einer Cystein-Desulfurase NifS<sub>AV</sub> um den Faktor 2,9 stimuliert werden. Inkubation mit der Thiol-spezifischen Alkylierungsreagenz N-Ethylmaleinimid (NEM) (-▲-) senkte die Aktivität um den Faktor 2,9.

## 4.5 Luftexposition von rekonstituiertem NreB

### 4.5.1 Änderungen im UV/Vis-Spektrum

In den vorangegangenen Versuchen wurde gezeigt, dass sich das  $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum in apoNreB mit Hilfe der Cystein-Desulfurase NifS<sub>AV</sub> *in vitro* assemblieren lässt und dass seine Präsenz die Autophosphorylierungsaktivität stimuliert. Nun sollte nachgewiesen werden, dass rekonstituiertes NreB auch empfindlich gegenüber Sauerstoff ist. Dafür wurde der Einfluss von Luft auf das Absorptionsspektrum von rekonstituiertem NreB untersucht (Abb. 34A). Nach Luftexposition für 10 und 20 min wurde ein Absorptionsspektrum aufgenommen. Man erkennt eine signifikante Abnahme der Absorptionsschulter bei 420 nm. In Abb. 34B wurde die Assemblierung

des FeS-Zentrums (A420) auf den Proteingehalt (A280) bezogen. Dazu wurde der Quotient A420/A280 gebildet und in einer Kinetik dargestellt.

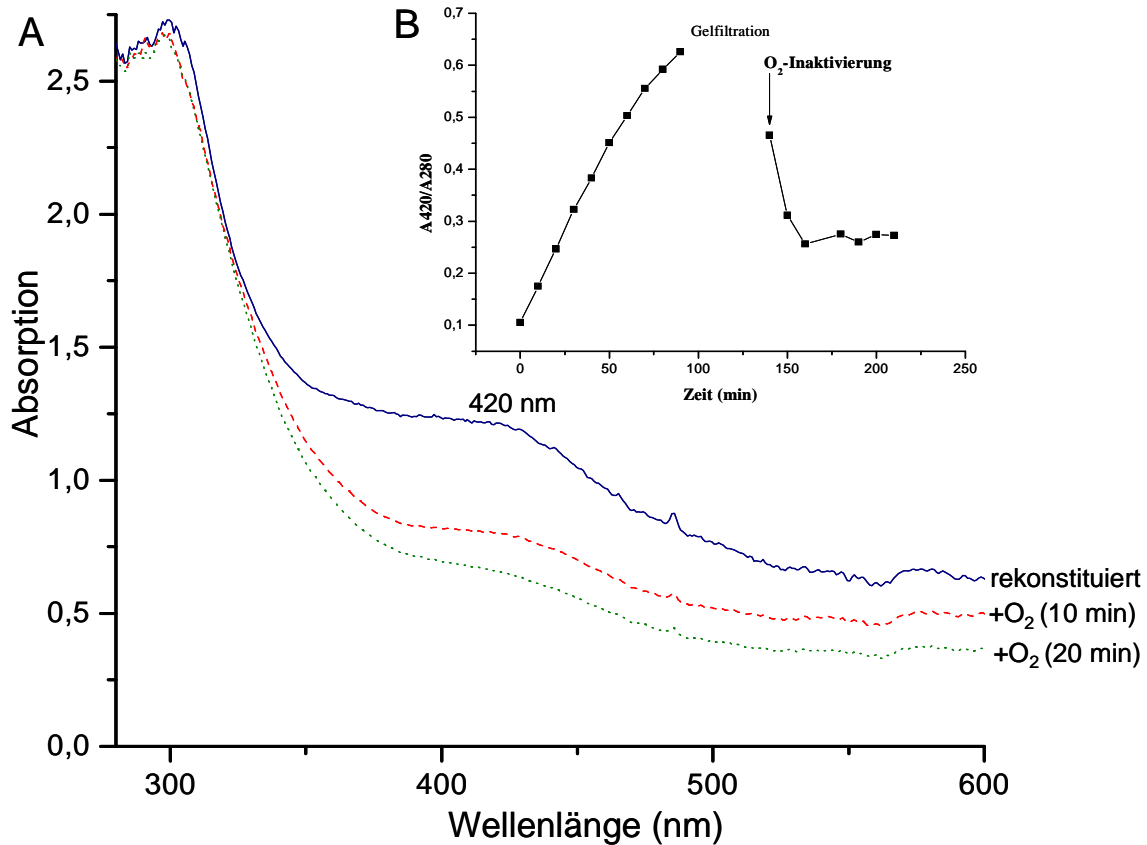


Abb. 34: **UV/Vis-Spektren von apoNreB nach Rekonstitution *in vitro* und anschließender Luftexposition.** **A:** Die Absorptionsschulter bei 420 nm von rekonstituiertem NreB (0,15 mM) nahm nach Luftexposition für 10 und 20 min signifikant ab. **B:** Gezeigt ist die Kinetik des Quotienten A420/A280 während Rekonstitution und anschließender Luftexposition.

Zunächst ist die Kinetik der Rekonstitution gezeigt. Vor der Sauerstoffinaktivierung wurden niedermolekulare Bestandteile über eine Gelfiltrationssäule abgetrennt, danach wurde die O<sub>2</sub>-Inaktivierung gestartet. Man erkennt bei Rekonstitution eine deutliche Zunahme des Quotienten und nach Gelfiltration und Luftexposition eine signifikante Abnahme.

So konnte gezeigt werden, dass das *in vitro* assemblierte [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Zentrum seine Sensitivität gegenüber Sauerstoff behalten hatte.

#### 4.5.2 Änderungen im Mössbauer-Spektrum

Die Luftexposition von rekonstituiertem NreB wurde durch Mössbauer-Spektroskopie untersucht. Dafür wurden apoNreB (0,26 mM) zunächst für 96 min *in vitro* rekonstitu-

iert. Anschließend wurde ein Teil der Probe 10 min an Luft exponiert. Von beiden Proben wurde ein Mössbauer-Spektrum bei 80 K aufgenommen (Abb. 35).

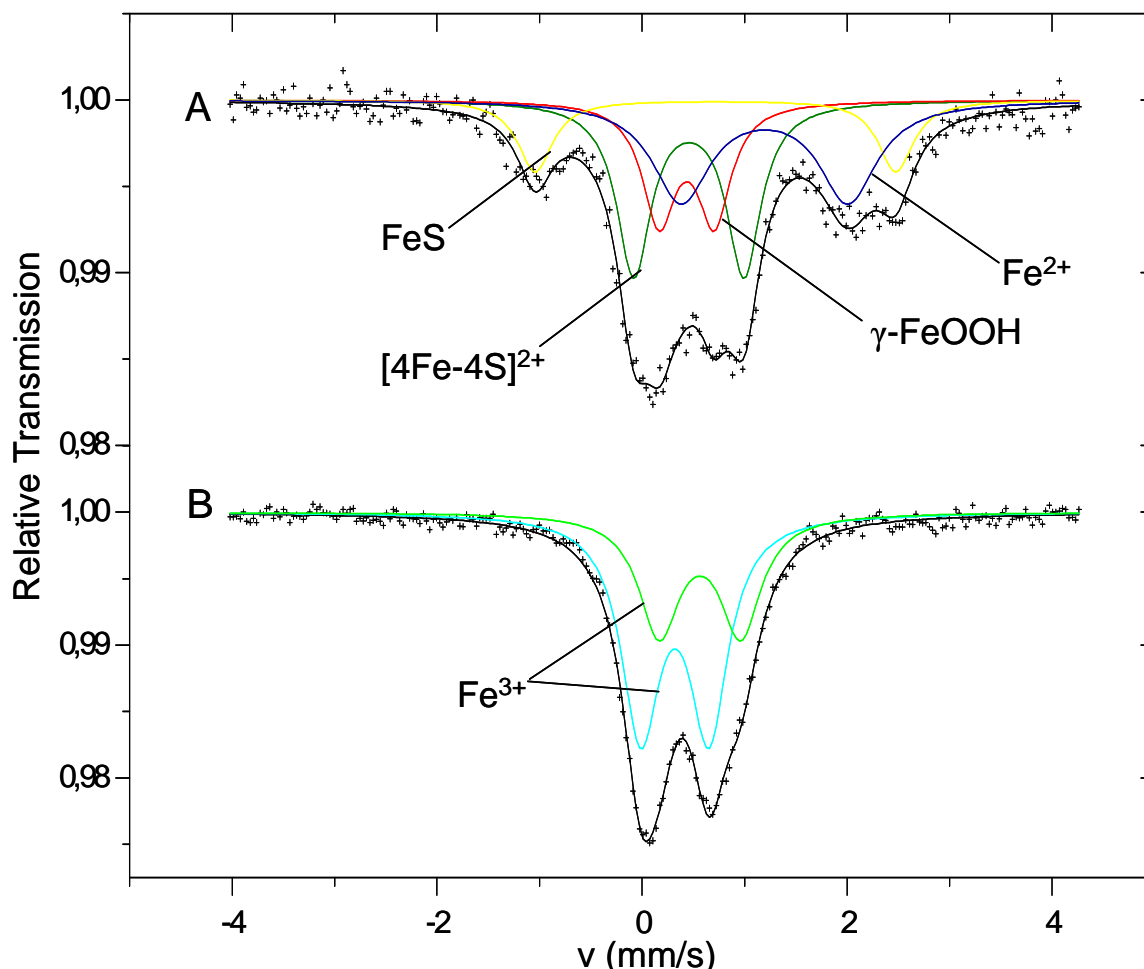


Abb. 35: 0-Feld Mössbauer-Spektren von *in vitro* rekonstituiertem apoNreB vor (A) und nach Luftexposition für 10 min (B) aufgenommen bei 80 K. Die durchgehende Linie (schwarz) durch die experimentellen Daten ist eine Überlagerung der vier Lorentz-Dubletts von  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$  (grün),  $\gamma\text{-FeOOH}$  (rot),  $\text{Fe}^{2+}$  (blau) und  $\text{FeS}$  (gelb). Im Mössbauer-Spektrum nach Luftexposition für 10 min war das  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$  nicht mehr vorhanden. Das gesamte Eisen wurde zu zwei verschiedenen  $\text{Fe}^{3+}$ -Spezies oxidiert (türkis und hellgrün).

Tab.25: Mössbauer-Parameter von apoNreB nach Rekonstitution *in vitro* (A) und nach  $\text{O}_2$ -Inaktivierung für 10 min (B). apoNreB (0,26 mM) wurde für 94 min *in vitro* rekonstituiert. Danach wurde ein Teil der Probe für 10 min an Luft exponiert.

Spektrum	Subspektrum	$\delta$ (mm/s)	$\Delta E_Q$ (mm/s)	Anteil (%)
A	$[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ (grün)	0,456	1,077	33
	$\text{Fe}^{3+}$ (rot)	0,434	0,543	22
	$\text{FeS}$ (gelb)	0,715	3,520	14
	$\text{Fe}^{2+}$ (blau)	1,195	1,629	31
B	$\text{Fe}^{3+}$ (türkis)	0,319	0,666	63
	$\text{Fe}^{3+}$ (hellgrün)	0,564	0,794	37

Vor Sauerstoff-Inaktivierung liegt 33% des mit NreB assoziierten Eisens in Form eines  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums vor (Tab. 25), der größte Teil des restlichen Eisens als  $\text{Fe}^{2+}$  (31%) oder oxidiert als  $\text{Fe}^{3+}$  (22%). Ein kleiner Teil liegt als FeS (14%) vor, das vermutlich durch zu lange Inkubation mit NifS<sub>AV</sub> entstanden war. Nach Luftexposition für 10 min waren die ursprünglichen Eisenspezies nicht mehr vorhanden. Das Spektrum setzt sich nun aus zwei Subspektren zusammen. Dabei handelt es sich vermutlich um zwei verschiedene  $\text{Fe}^{3+}$ -Verbindungen. Eine genauere Aussage war aufgrund der nicht eindeutigen Mössbauer-Parameter nicht möglich.

#### 4.6 Funktionsstudien zu NreB *in vivo*

NreB besitzt vier Cysteinreste, die alle als Liganden des FeS-Zentrums in Frage kommen. Alkylierung der Cysteinreste mit N-Ethylmaleinimid verhinderte die Bildung des FeS-Zentrums und inaktivierte die Autophosphorylierung von NreB. Der Austausch von Cystein zu Serin an Position 62 führte zum gleichen Effekt (Kamps *et al.*, 2004). Dies waren sichere Hinweise darauf, dass die Cysteinreste für die Funktion von NreB essentiell sind und möglicherweise die Liganden des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums darstellen.

##### 4.6.1 Komplementation von *S. carnosus* m1

Durch zielgerichtete Mutagenese sollten die Cysteinreste von NreB genauer charakterisiert werden. Dafür wurde der *E. coli* / *S. carnosus* Shuttle-Vektor pRB473nreABC konstruiert. Er enthält das *nreABC*-Operon unter Kontrolle seines nativen Promotors. Die niedrige Kopienzahl des Vektors (10-20 Kopien pro Zelle) und die Verwendung des nativen Promotors dienen dazu, die Gendosis möglichst im physiologischen Bereich zu halten. Frühere Experimente haben gezeigt, dass eine zu starke Expression von regulatorischen Genen eine Wiederherstellung des Wildtypphänotyps verhindern kann (Fedtke *et al.*, 2002).

Zunächst wurde getestet, ob das Plasmid mit Wildtyp *nreABC* den Defekt in Wachstum und Nitrat-Nitritreduktion von *S. carnosus* m1  $\Delta nreABC$  (Fedtke *et al.*, 2002) komplementieren kann. Dazu wurde ein Wachstumsexperiment mit *S. carnosus* TM300 (WT), *S. carnosus* m1 (*nreABC*-Mutante) und *S. carnosus* m1 (pRB473*nreABC*) unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Das Medium enthielt 500  $\mu\text{M}$  Nitrit. Wenn die Stämme eine Nitritreduktase-Aktivität besaßen, sollte die Konzentration an Nitrit während des Wachstums abnehmen. Der Wildtyp konnte das

Nitrit innerhalb von 9 h vollständig abbauen, im Gegensatz war die Mutante hierzu nicht mehr in der Lage (Abb. 36). Dieser Defekt im Nitrit-Abbau konnte mit pRB473nreABC komplementiert werden. Der Wachstumsdefekt von *S. carnosus* m1 konnte damit aber nicht vollständig kuriert werden.

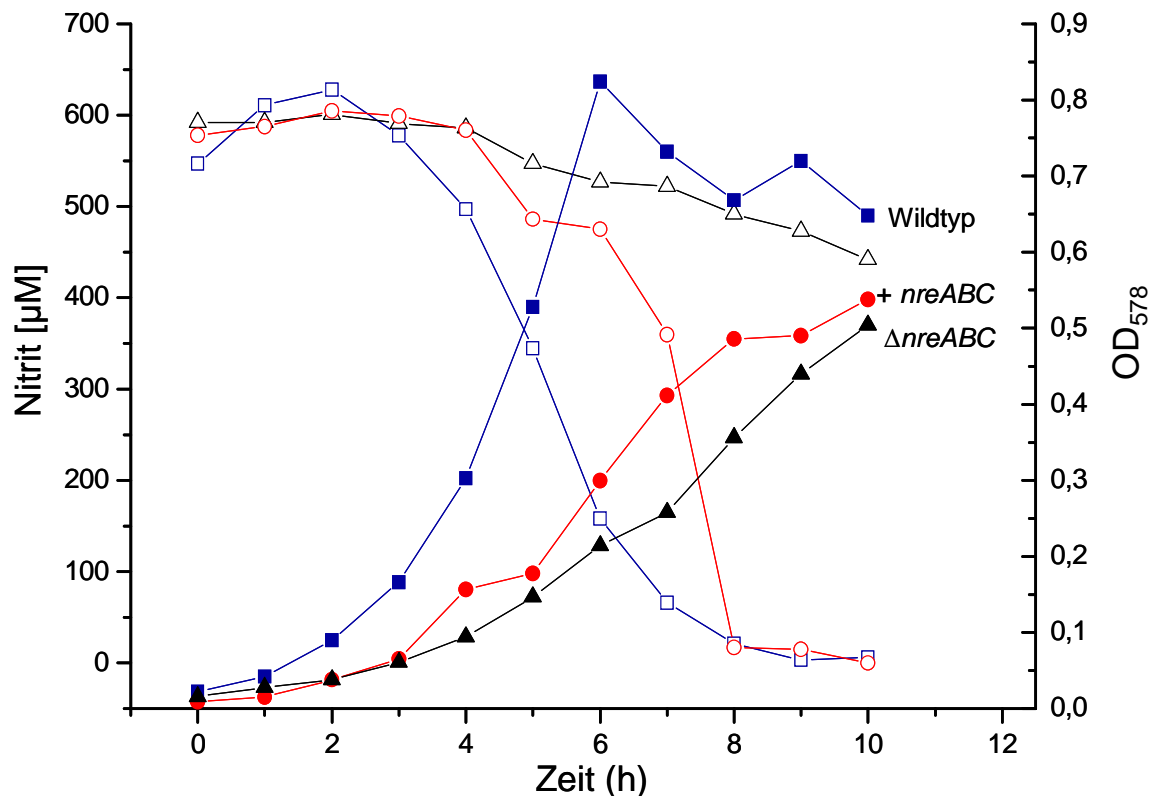


Abb. 36: **Anaerobes Wachstum von *S. carnosus* auf BM mit 0,5 mM Nitrit.** Der Wildtyp *S. carnosus* TM300 (-■-) zeigt ein deutlich besseres Wachstum (gefüllte Symbole) als *S. carnosus* m1 (*ermB::nreABC*) (-▲-) und *S. carnosus* m1 (pRB473nreABC) (-●-). Das Nitrit wird ebenfalls am besten vom Wildtyp abgebaut. *S. carnosus* m1 ist nicht fähig das Nitrit abzubauen. Durch Komplementation mit pRB473nreABC konnte die Fähigkeit zur Nitritreduktion wieder hergestellt werden. Gefüllte Symbole = OD<sub>578</sub>, ungefüllte Symbole = Nitritkonzentration.

#### 4.6.2 Eigenschaften von NreB-Cysteinmutanten

In einem weiteren Wachstumsexperiment unter anaeroben Bedingungen enthielt das Medium 1 mM Nitrat (Abb. 37). Es wurden der Wildtyp *S. carnosus* TM300, *S. carnosus* m1 und *S. carnosus* m1 pRB473nreABC mit und ohne Punktmutationen in den Cysteinresten untersucht. *S. carnosus* m1 ist eine *nreABC*-Komplettmutante und weist unter diesen Bedingungen einen deutlichen Wachstumsdefekt auf (Fedtke *et al.*, 2002), der durch Einbringen eines intakten *nreB* auf pRB473nreABC komplementiert werden konnte. Plasmide, die für NreB mit Mutationen in den Cysteinresten C59A, C62S, C74S und C77S kodieren, konnten den Wachstumsdefekt der Mutante m1 nicht kurieren. In Abb. 37 ist nur das Wachstum der Cysteinmutanten C59A und

C74S gezeigt. Parallel zum Wachstum wurden die Stämme auf die Fähigkeit zur Nitrat- und Nitritreduktion untersucht. Dafür wurde die Nitritkonzentration während des Wachstums bestimmt. Bei funktionierender Nitrat- und Nitritreduktion steigt die Nitritkonzentration zunächst an, da Nitrit aus Nitrat durch die Nitrat-Reduktase entsteht.

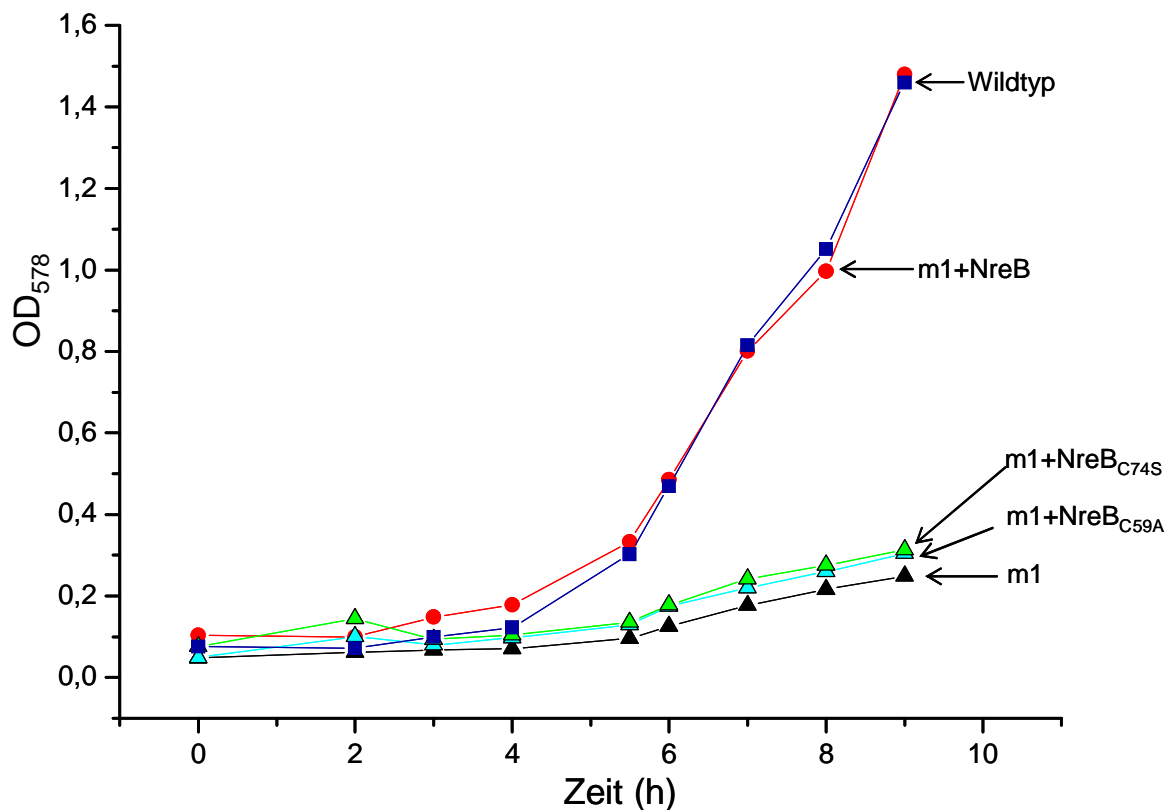


Abb. 37: **Anaerobes Wachstum von *S. carnosus* auf BM mit 1 mM Nitrat.** Die Mutante m1 (*ermB::nreABC*) (-▲-) hat im Vergleich zum Wildtyp (-■-) einen Defekt im Wachstum, der mit dem Plasmid pRB473*nreABC* (-●-) ausgeglichen werden kann. Punktmutationen in den konservierten Cysteinresten verhinderten die Komplementation. Hier gezeigt sind die Mutanten C59A (-▲-) und C74S (-▲-).

Anschließend nimmt der Nitritgehalt wieder ab, weil Nitrit von der Nitritreduktase zu Ammonium reduziert wird. In Abb. 38 sieht man dies deutlich anhand des Wildtyps *S. carnosus* TM300 (blau). Die Mutante (schwarz) ist nicht mehr zur Nitratreduktion fähig und zeigte dementsprechend keine Zunahme der Nitritkonzentration. Dieser Defekt kann, auch wenn die vollständige Umsetzung 2,5 Stunden länger dauert, durch pRB473*nreABC* komplementiert werden (rot). Einführung der Punktmutationen C59A, C62S, C74S und C77S resultiert abermals in einem Ausfall der Komplementation (Daten von C62 und C77 nicht gezeigt). Alle Cysteinmutanten zeigten den Phänotyp der Mutante. Die Funktionsstudien zu NreB *in vivo* haben damit gezeigt, dass die vier Cysteinreste Cys59, Cys62, Cys74 und Cys77 für die Funktion von NreB essentiell sind.



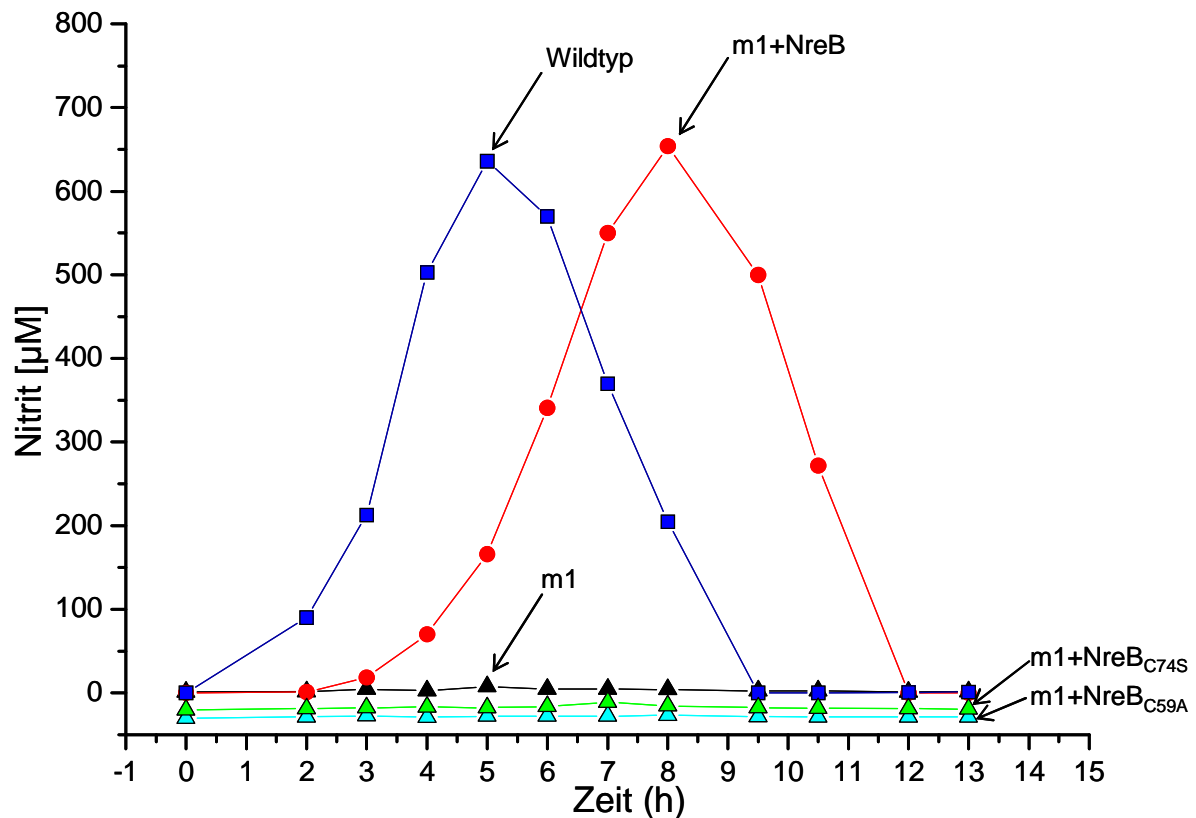


Abb. 38: Zu- und Abnahme der Nitritkonzentration im BM-Medium bei anaerobem Wachstum von *S. carnosus* auf 1 mM Nitrat. Gezeigt sind die Nitritkonzentration im Medium beim anaeroben Wachstum von folgenden Stämmen: *S. carnosus* TM300 (-■-), *S. carnosus* m1 (-▲-) und *S. carnosus* m1 (pRB473nreABC) (-●-). pRB473nreABC komplementiert den Defekt in der Nitrat-Nitritreduktion von *S. carnosus* m1. Der Austausch der Cysteinreste gegen Alanin C59A (-▲-) oder Serin C74S (-▲-) verhinderte die Komplementation. Die Datenreihen von *S. carnosus* m1 und der Cysteinmutanten waren fast identisch. Zur besseren graphischen Darstellung wurden die Werte der bestimmten Nitritkonzentration von C74S um 10 und von C59A um 20 erniedrigt.

## 5. Diskussion

### 5.1 Redoxeigenschaften des $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums von NreB

Anaerob präpariertes und rekonstituiertes NreB weisen eine intensive gelbbraune Färbung und eine Absorption bei 325 - 353 nm und vor allem bei 420 nm auf. Nach Anreicherung mit  $^{57}\text{Fe}$  konnte mit Hilfe der Mössbauer-Spektroskopie ein  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum identifiziert werden. Das  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum ist diamagnetisch und besitzt eine Isomerieverschiebung von  $\delta = 0,44$  mm/s und eine Quadrupolaufspaltung von  $\Delta E_Q = +1,16$  mm/s. Diese Eigenschaften sind typisch für ein über vier Cystein Ligan- den gebundenes  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum vom Ferredoxin-Typ. Zudem verhalten sich alle Eisenatome im Mössbauer-Spektrum beim Anlegen eines magnetischen Felds völlig äquivalent, wie man es von Eisenatomen, die über vier Schwefelatome koordiniert sind, erwarten würde.

Das  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum ließ sich weder mit Dithionit noch mit Deazaflavin und Licht reduzieren, deshalb wird ein sehr niedriges Redoxpotential von  $< -650$  mV vermutet. Eine Reduktion mit Deazaflavin führte zu einer Bleichung des Absorptionsspektrums. Nach Reduktion für fünf Minuten wurde ein Signal bei  $g = 1,84$  detektiert, das von einem  $[4\text{Fe-4S}]^{1+}$ - oder  $[2\text{Fe-2S}]^{1+}$ -Zentrum stammen könnte. Nach weiterer Reduktion wurde dieses Signal durch eines bei  $g$ -Werten  $> 2$  ersetzt. Diese  $g$ -Werte passten am ehesten zu  $[4\text{Fe-4S}]^{3+}$ -Zentren. Es ist jedoch sehr unwahrscheinlich, dass unter diesen Bedingungen  $[4\text{Fe-4S}]^{3+}$ -Zentren entstanden sind. Was allerdings vorstellbar wäre, dass das  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum bei Reduktion zerfiel und dabei für kurze Zeit oxidierte Zerfallsprodukte (z.B.  $[4\text{Fe-4S}]^{3+}$ -Zentren) entstanden. Der Zerfall des FeS-Zentrums findet wahrscheinlich erst nach längerer Reduktion statt, da nach Reduktion für fünf Minuten mit Dithionit im Mössbauer-Spektrum keine Veränderung gesehen werden konnte.

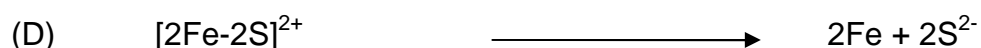
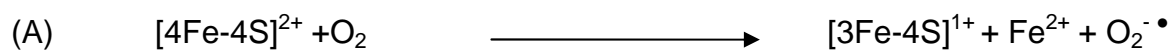
Das  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum ist  $\text{O}_2$ -labil, was an der Abnahme der spezifischen Absorption bei 420 nm erkennbar ist. Anaerob präpariertes NreB besaß eine zusätzliche Absorptionsschulter bei 325 nm, die bei rekonstituiertem NreB bei 353 nm lag. Nach Luftexposition von anaerob isoliertem NreB verschwanden beide Absorptionsschultern in einer zweiphasigen Kinetik, in der die Absorption zunächst sehr schnell und dann über einen längeren Zeitraum langsamer abnahm. Mössbauer-Spektren von anaerob präpariertem NreB zeigten nach Kontakt mit Luftsauerstoff, dass das  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum innerhalb von fünfeinhalb Minuten zerfiel und vollständig zu

$\gamma$ -FeOOH oxidiert wurde. Der Zerfall des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums folgte dabei einer einphasigen Kinetik.

## 5.2 Reaktion des $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums von NreB auf Luftexposition

Die spektralen Eigenschaften, insbesondere die intensive Färbung, die Sensitivität gegenüber Sauerstoff und das niedrige Redoxpotential ( $< -650$  mV) des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums von NreB entsprechen nicht den typischen Eigenschaften eines FeS-Zentrums vom Ferredoxin-Typ, sondern erinnern eher an ein  $\text{O}_2$ -labiles  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum von FNR-Typ.

Der Zerfall des  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums von FNR nach Luftexposition wurde von den Arbeitsgruppen Kiley, Green und Uden gut untersucht (Sutton *et al.*, 2004; Crack *et al.*, 2007 Reinhart *et al.*, 2008). Das  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum besteht aus zwei  $\text{Fe}^{3+}$ - und zwei  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen, deren Valenzelektronen delokalisiert sind, und die deshalb eine formale Ladung von  $\text{Fe}^{2.5+}$  aufweisen. Nach Luftexposition in einer ersten Reaktion mit Sauerstoff zerfällt das  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$  zu einem  $[3\text{Fe-4S}]^{1+}$ -Zentrum (A). Dabei wird ein  $\text{Fe}^{2+}$  zu einem  $\text{Fe}^{3+}$ -Ion oxidiert und ein  $\text{Fe}^{2+}$ -Ion verlässt das FeS-Zentrum. Dadurch entsteht ein  $[3\text{Fe-4S}]^{1+}$  Zentrum, indem alle Eisenionen oxidiert vorliegen. Das Elektron wird auf Sauerstoff übertragen und es entsteht ein Superoxidradikal. Superoxid dismutiert unter Aufnahme von Protonen zu  $\text{O}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$ , diese wiederum zu  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{O}_2$ . So werden vier Superoxidradikale zu zwei Molekülen Wasser und drei Molekülen  $\text{O}_2$  umgewandelt (B). Das  $[3\text{Fe-4S}]^{1+}$ -Zentrum zerfällt weiter spontan zu einem  $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ -Zentrum, wobei ein  $\text{Fe}^{3+}$ -Ion und zwei Sulfidionen frei werden (C). Das  $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ -Zentrum zerfällt unter weiterer Einwirkung von  $\text{O}_2$  oder  $\text{O}_2^- \cdot$  zu Eisen- und Sulfidionen, wodurch apoFNR ohne FeS-Zentrum entsteht (D).



Die Sauerstoff-induzierten Veränderungen des FeS-Zentrums sind in Abb. 39 dargestellt. Die Abbildung zeigt neben den Reaktionsmechanismen auch die gemessenen Reaktionsgeschwindigkeiten.

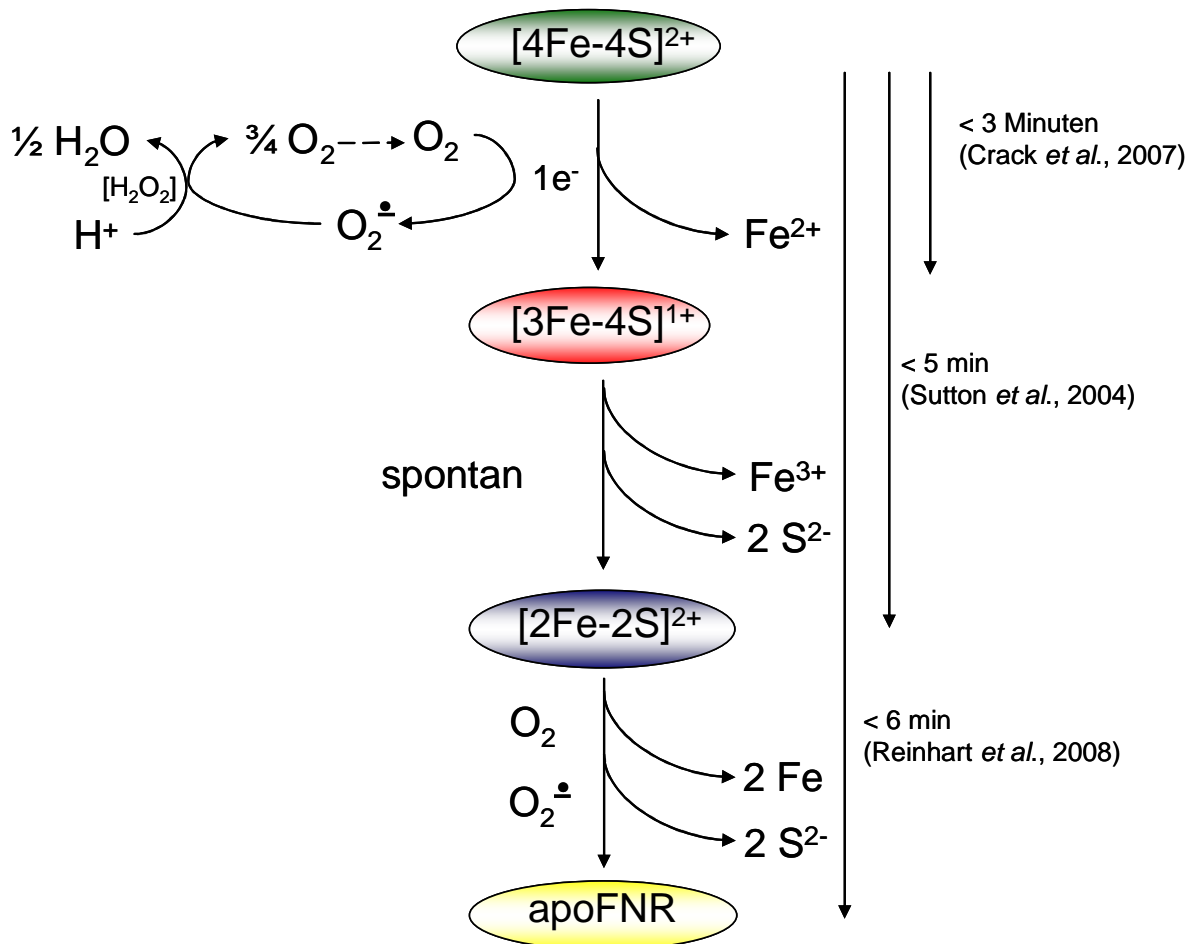


Abb. 39: O<sub>2</sub>-induzierte Reaktionen des [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Zentrums von FNR aus *E. coli*. Zwischenprodukte sind Formen von FNR mit [3Fe-4S]<sup>1+</sup>- und [2Fe-2S]<sup>2+</sup>-Zentren. Die Reaktionspartner, die die Umwandlung der Zentren auslösen, sind links der vertikalen Pfeile angegeben, die Ionen, die abgegeben werden, auf der rechten Seite. Die gemessenen Reaktionszeiten sind auf der rechten Seite angegeben.

Das [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Zentrum von NreB zerfällt innerhalb von 5,5 min vollständig zu  $\gamma$ -FeOOH. Die Aktivität der Autophosphorylierung von NreB nimmt mit dem Zerfall des FeS-Zentrums ab. Auch das [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Zentrum von FNR zerfällt mit ähnlicher Geschwindigkeit (< 6 min).

Die Zwischenprodukte aus dem Zerfall des [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Zentrums von NreB, konnten weder mit EPR- noch mit Mössbauer-Spektroskopie detektiert werden. Die Entstehung selbst kleiner Mengen eines [3Fe-4S]<sup>1+</sup>-Zentrums wäre im EPR-Spektrum erkennbar gewesen. Die EPR-Spektren lieferten keinen Hinweis hierfür. Nach zwei Minuten Luftexposition wurde ein Signal bei  $g = 4,3$  gemessen, das charakteristisch für

rhombisches  $\text{Fe}^{3+}$  (high-spin) ist. Daraus kann man schließen, dass in einer ersten Reaktion mit Sauerstoff vermutlich ein freies  $\text{Fe}^{3+}$ -Ion entsteht. Dagegen entsteht beim Zerfall des  $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums von FNR zunächst ein freies  $\text{Fe}^{2+}$ -Ion und es wurde kein EPR-Signal bei  $g = 4,3$  gemessen (Crack *et al.*, 2007).  $[\text{2Fe-2S}]^{2+}$ -Zentren sind EPR-still, aber im Mössbauer-Spektrum hätte man ihre Entstehung sehen können.

Der Zerfall des  $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums und die Bildung von  $\gamma\text{-FeOOH}$  besaßen beide eine einphasige Kinetik, ähnliche  $t_{1/2}$ -Werte und waren nicht zeitlich versetzt. Dies spricht für eine direkte Umwandlung von  $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$  zu  $\gamma\text{-FeOOH}$ .

Wahrscheinlich entstehen aber auch beim oxidativen Zerfall des  $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrums von NreB  $[\text{3Fe-4S}]^{1+}$ - und  $[\text{2Fe-2S}]^{2+}$ -Zentren als Zwischenprodukte, da die Elektronen in zwei Schritten auf verschiedene  $\text{O}_2$ -Moleküle übertragen werden müssen. Wenn die ersten Schritte der Oxidation langsam und die folgenden Schritte schnell ablaufen, werden die Zwischenprodukte nur in geringen Konzentrationen auftreten und sind daher kaum nachzuweisen.

### 5.3 Eigenschaften der Sensor-Domäne von NreB

PAS-Domänen sind in der Natur sehr häufig und erfüllen entweder eine sensorische Funktion oder vermitteln Protein-Protein Wechselwirkungen. Es sind PAS-Domänen bekannt, die Änderung der Lichtintensität, des Redoxpotentials, des Sauerstoffpartialdrucks, der Konzentration von kleinen Liganden und des Energiehaushalts der Zelle detektieren (Taylor & Zhulin, 1999). Der Name PAS ist ein Akronym aus den Proteinen, in denen die ersten PAS-Domänen gefunden wurden: Dem *Drosophila* period clock protein (PER), dem Wirbeltier aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT), und dem *Drosophila* single-minded protein (SIM). PAS-Domänen weisen eine typische Sekundärstruktur auf, zeigen aber kaum Sequenzübereinstimmungen. Eine PAS-Domäne beginnt mit einer N-terminalen Kappe (n-terminal cap) aus einer  $\alpha$ -Helix und geht über in den PAS-Kern (PAS core), der aus zwei hintereinander liegenden  $\beta$ -Faltblättern und drei darauf folgenden  $\alpha$ -Helices besteht. Der PAS-Kern wird über eine Verbindungshelix (helical connector) mit dem  $\beta$ -Gerüst ( $\beta$ -scaffold) verbunden, das aus drei  $\beta$ -Faltblättern besteht. Die Abb. 40 zeigt die räumliche Strukturvorhersage der PAS-Domäne des bakteriellen PYP Proteins (photoactive yellow protein).

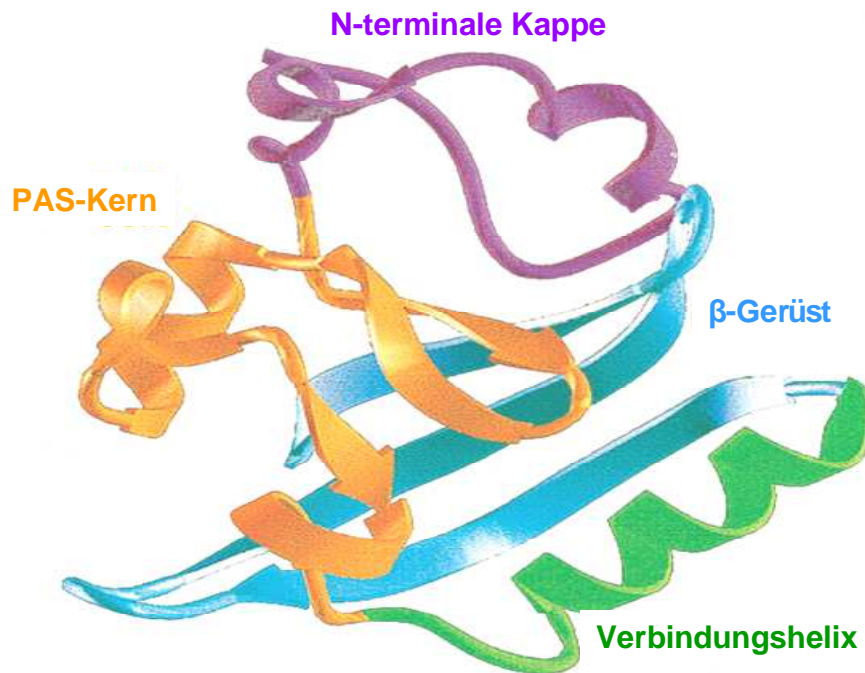


Abb. 40: **3D-Strukturvorhersage der PAS-Domäne des PYP-Proteins (Pellequer et al., 1998).** Die N-terminale Kappe (lila) beinhaltet die Reste 1 - 28, der PAS-Kern (orange) die Reste 29 - 69, die Verbindungshelix (grün) die Reste 70 - 87 und das beta-Gerüst (blau) die Reste 88-125.

Der PAS-Kern und das beta-Gerüst sind die am stärksten konservierten Bereiche. Sie entsprechen den älteren Bezeichnungen S<sub>1</sub>-Box (PAS) und S<sub>2</sub>-Box (PAC = PAS-associated C-terminal), die eingeführt wurden, um das PAS Motiv bei Homologiesuchen zu definieren. Die Region um die zentrale Verbindungshelix F<sub>α</sub> enthält oft Bindestellen benötigter Co-Faktoren wie Häm (FixL<sub>BJ</sub>) oder Hydroxy-Zimtsäure (PYP) und scheint eine für die Regulation kritische Rolle zu spielen.

NreB besteht aus 347 Aminosäuren mit einer Sensor-Domäne, die die essentiellen Cysteinreste enthält (AS 1 - 150) und einer Histidinkinase-Domäne (AS 150 - 347). Die Histidinkinase-Domäne enthält einen konservierten Histidinrest (His 159) und konservierte Asparagin- und Glycin-reiche Regionen. Für die Berechnung einer Sekundärstrukturvorhersage für NreB wurden die Server PSIPRED (Protein Structure Prediction) und PredictProtein verwendet. Die Strukturvorhersage des PredictProtein-Servers (Abb. 41) zeigt in NreB signifikante Homologien zur allgemeinen Struktur von PAS-Domänen. Die Abbildung zeigt in der ersten Zeile die Aminosäure-Sequenz und in der zweiten Zeile die vorhergesagte Sekundärstruktur im Ein-Buchstaben-Code. Dabei entspricht H = alpha-Helix, E = beta-Faltblatt (extended) und Freizeichen = Schleife (Loop).

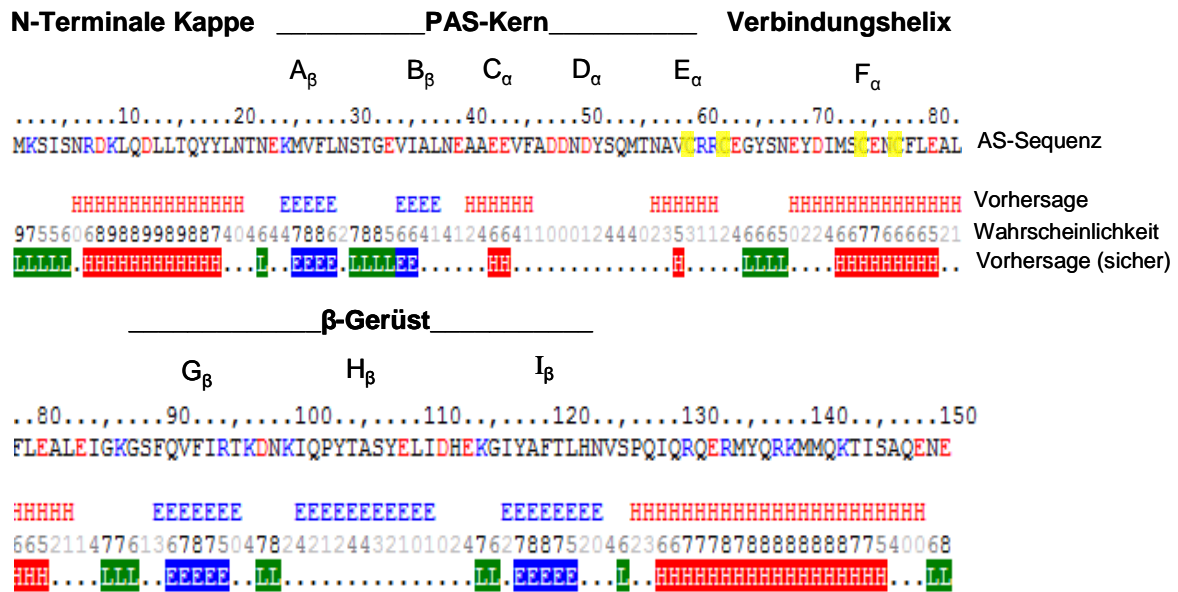


Abb. 41: Sekundärstrukturvorhersage für die Sensor-Domäne von NreB (AS 1 - 150) des PredictProtein-Servers (Rost et al., 2004). Die erste Zeile zeigt die Aminosäure-Sequenz. In der zweiten und vierten Zeile steht die Vorhersage der Sekundärstruktur im Ein-Buchstaben-Code: H =  $\alpha$ -Helix, E =  $\beta$ -Faltblatt (extended) und ein L = Schleife (loop). Die dritte Zeile gibt die Wahrscheinlichkeit der Vorhersage in Zahlen von null (niedrig) bis neun (hoch) an. In der vierten Zeile wird nur die Strukturvorhersage für Wahrscheinlichkeiten  $\geq$  fünf angezeigt. Die für PAS-Domänen typische Sekundärstruktur setzt sich aus einem PAS-Kern, der aus zwei  $\beta$ -Faltblättern und drei anschließenden  $\alpha$ -Helices besteht, und einem aus drei  $\beta$ -Faltblättern bestehendem  $\beta$ -Gerüst zusammen, die über eine Verbindungshelix verbunden sind. Die essentiellen Cysteinreste sind gelb markiert.

Die Zahlen der dritten Zeile stehen für die Wahrscheinlichkeit der Vorhersage. Die vierte Zeile nennt die resultierende Sekundärstruktur für Bereiche mit hoher Wahrscheinlichkeit ( $\geq 5$ ). Die Domäne von NreB beginnt mit einer N-terminalen Kappe (AS 1 - 21) und geht über in den PAS-Kern (PAS core), der nach der Vorhersage die konservierten  $\beta$ -Faltblätter A<sub>β</sub> (AS 24 - 28) und B<sub>β</sub> (AS 34 - 37) und zwei von drei konservierten  $\alpha$ -Helices C<sub>α</sub> (AS 40 - 45) und E<sub>α</sub> (AS 56 - 61) enthält. In und am Ende von E<sub>α</sub> liegen zwei der essentiellen Cysteinreste C59 und C62. Für die fehlende dritte Helix D<sub>α</sub> konnte das Programm keine Vorhersage machen, da die Wahrscheinlichkeiten der Vorhersage in diesem Bereich (AS 46 - 55) alle  $\leq 4$  waren. Anschließend wird das potentielle Kernstück über eine Schleife (AS 64 - 67) mit der Verbindungshelix (helical connector) verknüpft. In F<sub>α</sub> (AS 67 - 82) liegen die anderen beiden essentiellen Cysteinreste C74 und C77. Nach der Verbindungshelix wurde das  $\beta$ -Gerüst (AS 89 - 123), das aus drei über kurze Schleifen verbundenen  $\beta$ -Faltblättern aufgebaut ist, vorhergesagt. Die  $\beta$ -Faltblätter G<sub>β</sub> (AS 89 - 95) und I<sub>β</sub> (AS 116 - 123) können mit ausreichender Wahrscheinlichkeit vorhergesagt werden. Es wurde auch ein drit-

tes  $\beta$ -Faltblatt vorhergesagt, aber für  $H_\beta$  (AS 100 - 110) ist die Wahrscheinlichkeit der Vorhersage niedrig. Demnach schlägt der PredictProtein-Server für die sensorische Domäne von NreB eine Sekundärstruktur vor, die einer typischen PAS-Domäne entspricht.

Um diese Aussage abzusichern wurde eine weitere Strukturvorhersage mit dem PSIPRED-Server durchgeführt (Abb. 42).

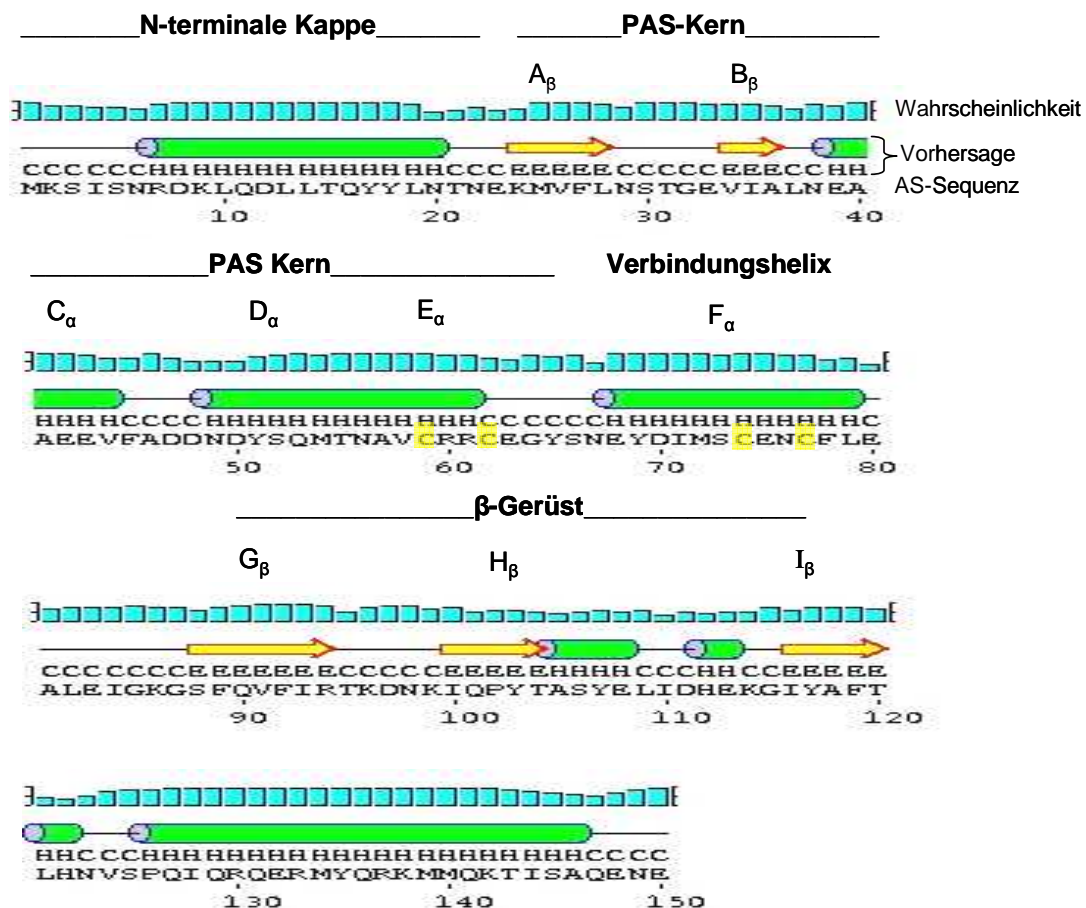


Abb. 42: Sekundärstrukturvorhersage für die Sensor-Domäne von NreB (AS 1 - 150) des PSIPRED-Servers (Bryson *et al.*, 2005) mit der Methode „Predict Secondary Structure“ (PSIPRED v. 2.6) (Jones *et al.*, 1999). Die erste Zeile gibt die Wahrscheinlichkeit der Vorhersage an. In der zweiten und dritten Zeile ist die Vorhersage graphisch und im Ein-Buchstaben-Code: H =  $\alpha$ -Helix, E =  $\beta$ -Faltblatt (extended) und C = Schleife (coil) dargestellt. Die vierte Zeile zeigt die Aminosäuresequenz. Die für PAS-Domänen typische Sekundärstruktur besteht aus einem PAS-Kern, der aus zwei  $\beta$ -Faltblättern und drei anschließenden  $\alpha$ -Helices besteht, und mit einem aus drei  $\beta$ -Faltblättern bestehendem  $\beta$ -Gerüst, über eine Verbindungshelix verbunden ist. Die essentiellen Cysteinreste von NreB sind gelb markiert.

Auch diesmal konnten für PAS-Domänen typische Sekundärstrukturmotive vorhergesagt werden. Im Bereich des PAS-Kerns wurden an der gleichen Stelle die beiden  $\beta$ -Faltblätter  $A_\beta$  (AS 24 - 28) und  $B_\beta$  (AS 34 - 36) mit zwei folgenden  $\alpha$ -Helices vor-



hergesagt. Doch diesmal wurde nach  $C_\alpha$  (AS 39 - 44) eine längere  $E_\alpha$  (AS 49 - 61) Helix vorhergesagt, wobei man sich auch vorstellen könnte, dass es sich dabei um zwei getrennte Helices  $D_\alpha$  und  $E_\alpha$  handeln könnte. In der Region des  $\beta$ -Gerüsts (AS 88 - 120) liegen die drei  $\beta$ -Faltblätter  $G_\beta$  (AS 88 - 94),  $H_\beta$  (AS 100 - 104) und  $I_\beta$  (AS 116 - 120). Zwischen  $H_\beta$  und  $I_\beta$  liegen zwei kleine  $\alpha$ -Helices, die jedoch nur mit geringer Wahrscheinlichkeit vorhergesagt wurden.

Abb. 43 zeigt die Sekundärstrukturvorhersage beider Programme zusammen. Beide schlagen Motive für die Sensor-Domäne von NreB vor, die denen einer typischen PAS-Domäne entsprechen. Die Cysteinreste als potentielle Liganden des  $[4Fe-4S]^{2+}$ -Zentrums liegen am Ende der  $E_\alpha$ -Helix des PAS-Kerns und in der Verbindungshelix  $F_\alpha$ . Diese enthält auch in anderen PAS-Domänen die Bindestellen für Co-Faktoren und besitzt eine kritische Rolle in der Regulation. Vorhersagen der Sekundärstruktur von PAS-Domänen *in silico* konnten in vielen Fällen experimentell bestätigt werden (Etzkorn *et al.*, 2008). NreB enthält damit die erste bekannte PAS-Domäne, die ein  $[4Fe-4S]^{2+}$ -Zentrum bindet.

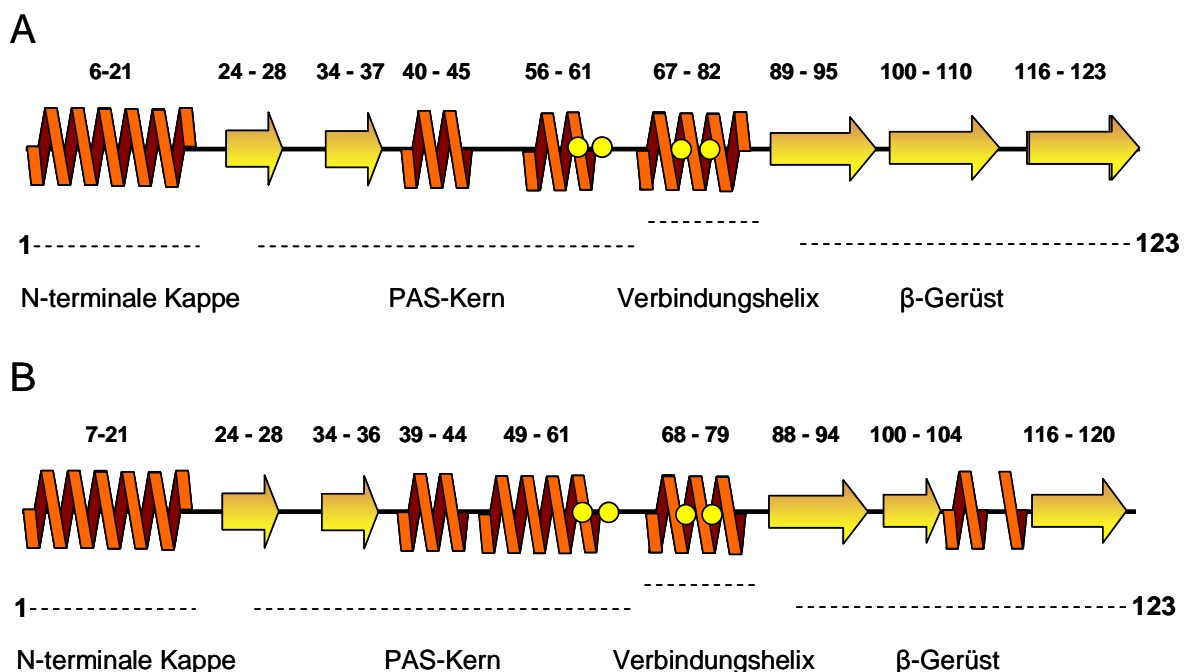


Abb. 43: **Sekundärstruktur-Vorhersagen des PredictProtein-Servers (A) und des PSIPRED-Servers (B) für die Sensor-Domäne von NreB aus *Staphylococcus carnosus*.** Die essentiellen Cysteine sind als gelbe Punkte eingezeichnet.

#### 5.4 Ähnlichkeit der Sensor-Domäne von NreB zu bakteriellen PAS-Domänen

Die sensorische Domäne von NreB ist die erste bekannte PAS-Domäne mit einem FeS-haltigen Co-Faktor. Es wurden Sequenzvergleiche mit anderen PAS-Domänen, die entweder eine hohe Sequenzähnlichkeit aufwiesen, Häm-Gruppen enthielten oder in bakteriellen O<sub>2</sub>-Sensoren vorkommen, durchgeführt (Tab. 26). Die Länge der PAS-Domänen wurde aufgrund der Vorhersage des PSIPRED-Servers bestimmt (siehe Anhang). PAS-Domänen besitzen eine stark konservierte Sekundärstruktur, können sich aber in der Primärsequenz stark unterscheiden (Pellequer *et al.*, 1999). Dennoch sollten Vergleiche zeigen, ob die untersuchten PAS-Domänen Ähnlichkeiten aufweisen und eventuell verwandt sind.

Tab. 26: **Ähnlichkeit der PAS-Domäne von NreB aus *S. carnosus* zu bakteriellen PAS-Domänen.** Die PAS-Domäne von NreB (AS 1 - 120) wurde mit dem Programm EMBOSS Pairwise Alignment Algorithms mit anderen PAS-Domänen verglichen. Es wurden PAS-Domänen ausgesucht, die entweder hohe Sequenzähnlichkeiten aufwiesen oder redoxsensitive Co-Faktoren wie Häm oder FAD besaßen. Alle PAS-Domänen wurden mit dem PSIPRED-Server vorhergesagt (siehe Anhang). Erklärung von Abkürzungen: MCP (Methyl-akzeptierendes Chemotaxis Protein), cGMP-PDE (cyclisches-Guanosin-monophosphat- Phosphodiesterase) und AC-Nr. = Accession Number.

Protein AC-Nr.	Organismus	Signal	Ligand	Funktion	PAS- Domäne (AS)	Similarität zu NreB <sub>Sc</sub>
NreB	<i>S. haemolyticus</i>	?	?	His-Kinase	1 - 108	> 70%
SA2180	<i>S. aureus</i> N315	?	?	His-Kinase	1 - 107	> 68%
NreB	<i>S. epidermidis</i>	?	?	His-Kinase	1 - 106	> 67%
NreB	<i>B. clausii</i>	?	?	His-Kinase	1 - 111	> 55%
A7Z5R4	<i>B. amyloliquefaciens</i>	?	?	His-Kinase	1 - 112	> 31%
FixL	<i>R. meliloti</i>	O <sub>2</sub>	HämB	His-Kinase	122 - 249	> 31%
Q9HPU8	<i>H. salinarium</i>	O <sub>2</sub> (?)	?	Opsin-Aktivator	139 - 270	> 30%
Q1U971	<i>L. reuteri</i>	?	?	His-Kinase	1 - 96	> 28%
Q88WX3	<i>L. plantarum</i>	?	?	His-Kinase	1 - 101	> 27%
FixL	<i>B. japonicum</i>	O <sub>2</sub>	HämB	His-Kinase	126 - 255	> 27%
PDEA1	<i>Acetobacter xylinus</i>	-	HämB	cGMP-PDE	1 - 126	> 26%
ArcB	<i>E. coli</i>	O <sub>2</sub>	?	His-Kinase	139 - 264	> 23%
Dos	<i>E. coli</i>	O <sub>2</sub>	HämB	cGMP-PDE	1 - 123	> 21%
Aer	<i>E. coli</i>	O <sub>2</sub>	FAD	MCP	1 - 116	> 10%
NifL	<i>A. vinelandii</i>	O <sub>2</sub>	FAD	His-Kinase	10 - 134	> 7%

Es sind einige PAS-Domänen bekannt, die Häm binden. Dazu gehören die cGMP-Phosphodiesterasen Dos (Direct oxygen sensing) aus *E. coli* und PDEA1 (Phospho-

diesterase) aus *Acetobacter xylinus*, und die O<sub>2</sub>-Sensoren FixL aus *R. meliloti* und *B. japonicum* (Gilles-Gonzalez und Gonzalo Gonzalez 2004).

Die Häm-bindende PAS-Domäne des O<sub>2</sub>-Sensors FixL aus *R. meliloti* weist die größte Sequenzähnlichkeit von > 31% zu NreB auf. FixL aus *B. japonicum* weist eine etwas geringere Sequenzähnlichkeit von > 27% auf und die Phosphodiesterasen PDEA1 und Dos haben eine Sequenzähnlichkeit von > 26% und > 21%.

Die FixL-Proteine und Dos sind direkte Sauerstoff-Sensoren, die O<sub>2</sub> über eine Häm-Gruppe wahrnehmen (Gilles-Gonzalez und Gonzalo Gonzalez 2004). Das FixL Protein aus *R. meliloti* ist Teil eines Zwei-Komponentensystems, das die N<sub>2</sub>-Fixierung reguliert. Die N<sub>2</sub>-Fixierung wird von der sehr sauerstoffempfindlichen Nitrogenase katalysiert und kann nur unter strikt anaeroben Bedingungen stattfinden. In FixL induziert die Bindung von O<sub>2</sub> einen Wechsel des Fe<sup>2+</sup>-Ions der Häm-Gruppe von high-spin zum low-spin Zustand und inaktiviert die Kinase-Domäne (Pellequer *et al.*, 1999). Der Mechanismus erinnert an die Bindung von O<sub>2</sub> an Hämoglobin. Die Häm-Gruppe wird im Bereich der Verbindungshelix an Histidin (proximaler Ligand) und bei Dos zusätzlich an Methionin (distaler Ligand) gebunden.

Es wurde ein multiples Alignment mit den PAS-Domänen des NreB Proteins aus den Staphylokokken und aus *Bacillus clausii* mit den Häm-bindenden PAS-Domänen der FixL-Sensoren und der Phosphodiesterase Dos durchgeführt (Abb. 44). Die potentiellen Cystein Liganden des [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Zentrums sind gelb und die Bindungsstellen der Häm-Gruppe rot markiert. Die Cystein- und Histidinreste liegen in unmittelbarer Nähe zueinander in der Region um die zentrale Bindungshelix. Demnach könnten das [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Zentrum und die Häm-Gruppe vermutlich an einer ähnlicher Stelle binden. Die zentrale Verbindungshelix spielt eine kritische Rolle in der Regulation und man könnte sich eine ähnliche Signalverarbeitung bei [4Fe-4S]<sup>2+</sup>- und Häm- enthaltenden PAS-Domänen vorstellen.

In den Sensoren FixL und NreB wird die O<sub>2</sub>-sensitive Kinaseaktivität über ihre prosthetischen Gruppen gesteuert. Deren Reaktion mit Sauerstoff unterscheidet sich aber. In FixL bindet Sauerstoff an das Fe<sup>2+</sup>-Ion der Häm-Gruppe und löst einen Wechsel vom high-spin in den low-spin Zustand des Eisens aus. Dabei handelt es sich um keine Oxidation, weshalb man wie beim Hämoglobin von einer Oxygenierung spricht. Im Gegensatz dazu wird das [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Zentrum von NreB tatsächlich von Sauerstoff oxidiert und zerfällt.

```

S.epidermidis_NreB      -----MLEQTDLS-LEQLLNYYETTNEKIVFVNRRQGGKI IAMNDAAKDILTEEDN--- 49
S.aureus_NreB          -----MINEDSIQ-LDTLLKYYEHSIEKIVFADDNGKI IAMNDAAKDILSEEDN--- 49
S.haemolyticus_NreB    -----MLDVDNLD-LENLLKYYEKTNEKIVFVNKDGKVIAMNDAAEIISKDNN--- 49
S.carnosus_NreB       -----MKSISNRDKLDLLTQYYLNTNEKVMFLNSTGEVIALNEAAEEVFAADDND--- 50
B.clausii_NreB        -----MKTMTGEH-LSSELMNKLYRNSMEAMIFIDEEGNVIDMNPAAEQIIDPQVIRRI 52
R.melioti_FixL        RRAID---RTEDVVRARDAHLRSILDTPVDPATVVSATDGTIVSFNAAAVRQFGYAEVEVI 57
B.japonicum_FixL      -LDIDEKQVEGALRTRETHLRSLHTIPDAMIVIDGHGIIQLFSTAAERLFGWSELEAI 59
E.coli_DOS             -----MKLTDADNAADGIFFPALQNMGAVLINENDEVMFFNPAAEKLWGYKREEVI 53
                        . :           :. . : . : **

S.epidermidis_NreB    ----YNAMTNAICHRCEGYSNEYDVQS----CKCFLETTQLHSNFQVFMKTKDNE-- 98
S.aureus_NreB        ----YSAVANAICHRCEGYTNAYDVQS----CKCFLESMQVQATNFQVFMKTKDQK-- 98
S.haemolyticus_NreB  ----YSAMTNAICNRCEGYSNEFALQS----CHNCVLDTKPNDMNFQVFMKTVDNK-- 98
S.carnosus_NreB     ----YSQMTNAVCRRCCEGYSNEFDLMS----CENCFLEALEIGKGSFQVFIRTKDNK-- 99
B.clausii_NreB      ----RAGTDESFCQTCKGYTDEQLIS----CANCHLDVPQGEFSSFQLFLKTKDGA-- 101
R.melioti_FixL      GQNLRIILMPEPYRHEHDGVLQRMATGEKRIIGIDRVVSGQRKDGSTFPMKLAVGEMRSG 117
B.japonicum_FixL    GQNVNIIIMPEPDRSHDSVISRVRTSDPHIIGIRIVTGKRRDGTTFPMHLSIGEMQSG 119
E.coli_DOS          GNNIDMLIPRDLRPAHPEYIRHNREGGKARVEGMSRELQLEKKDGSKIWTRFALSKVSAE 113
                        . *           . : . : . : .

S.epidermidis_NreB    IKPFTAMY----- 106
S.aureus_NreB       VMPFTATYQ----- 107
S.haemolyticus_NreB  IQPFTASYQC----- 108
S.carnosus_NreB     IQPYTASYELIDHEKGIYAFT 120
B.clausii_NreB      VVPFAASYHT----- 111
R.melioti_FixL      GERFFTGFIRD----- 128
B.japonicum_FixL    GEPYFTGFVRD----- 130
E.coli_DOS          GKVYYLALVR----- 123
                        :

```

Abb. 44. Multiples Alignment von O<sub>2</sub>-sensitiven PAS-Domänen der NreB, FixL und Dos Proteine mit ClustalW 2.0.5 (Larkin *et al.*, 2007). Es wurden die PAS-Domänen des NreB Proteins aus Staphylokokken und aus *Bacillus clausii* mit den Häm-bindenden PAS-Domänen von FixL aus *R. melioli* und *B. japonicum* und Dos aus *E. coli* verglichen. Die potentiellen Cystein-Liganden des [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Zentrums sind gelb, die Liganden der Häm-Gruppe sind rot und die Lage der Verbindungshelix ist grün markiert. Konservierte AS (\*), konservative AS-Austausche (: ) und nicht konservative AS-Austausche (.) sind entsprechend markiert.

In einem weiteren multiplen Alignment wurden die PAS-Domänen von NreB Proteinen aus Bakterien, die der Familie Staphylococcaceae angehören mit den PAS-Domänen von NreB ähnlichen Proteinen aus Bakterien der Familie der Bacillaceae und Lactobacillaceae verglichen (Abb. 45). Die Familien Staphylococcaceae und Bacillaceae sind phylogenetisch nicht weit voneinander entfernt und gehören zur Klasse der Bacilli und der Ordnung Bacillales. Die Familie Lactobacillaceae gehört zwar zur selben Klasse der Bacilli aber zur Ordnung der Lactobacillales und ist so phylogenetisch etwas weiter entfernt. Die größte Sequenzähnlichkeit zu NreB aus den Staphylokokken weist NreB aus *Bacillus clausii* auf. Es besitzt ebenfalls die vier konservierten Cysteinreste in der PAS-Domäne und noch zwei zusätzliche in der Histidinkinase-Domäne. Das NreB-ähnliche Protein aus *Bacillus amyloliquefaciens*, der phylogenetisch von *B. clausii* nicht weit entfernt ist, besitzt fünf Cysteinreste. Davon liegen drei in dem Bereich der konservierten Cysteinreste. Von den anderen liegt einer in der PAS-Domäne sehr nahe am N-Terminus und einer innerhalb der Histidinkinase-

Domäne. Die NreB-ähnlichen Proteine aus den Milchsäurebakterien *Lactobacillus plantarum* und *Lactobacillus reuteri* besitzen nur zwei konservierte Cysteinreste. Das erinnert an den in Milchsäurebakterien vorkommenden FNR-ähnlichen O<sub>2</sub>-Sensor FLP (FNR-like protein), der ebenfalls nur noch zwei Cysteinreste besitzt und Sauerstoff über eine Thiol/Disulfid Änderung wahrnimmt (Green *et al.*, 2001). Die NreB-ähnlichen Proteine der Milchsäurebakterien könnten mit den zwei verbleibenden Cysteinen Sauerstoff ebenfalls über diesen eisenfreien Mechanismus wahrnehmen, der eine Anpassung an eisenarme Bedingungen darstellt.



Abb. 45. Multiples Alignment von O<sub>2</sub>-sensitiven PAS-Domänen der NreB-Familie mit ClustalW 2.0.5 (Larkin *et al.*, 2007). Die PAS-Domänen der NreB Proteine aus den Staphylokokken wurden mit den PAS-Domänen von sequenzähnlichen Proteinen aus *Bacillus clausii*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Lactobacillus plantarum* und *Lactobacillus reuteri* verglichen. Alle Cysteinreste sind gelb und die Lage der Verbindungshelix ist grün markiert. Konservierte AS (\*), konservative AS-Austausche (: ) und nicht konservative AS-Austausche (.) sind entsprechend markiert.

Aus einem mit allen O<sub>2</sub>-sensitiven PAS-Domänen durchgeführtem multiplem Alignment wurde ein phylogenetischer Stammbaum erstellt (Abb. 46). Zusätzlich zu den bisher vorgestellten Proteinen wurden unter anderem die PAS-Domänen der O<sub>2</sub>-Sensoren Aer (>10%) und ArcB (> 23%) aus *E. coli* aufgenommen. Aer ist ein Aero-taxis-Protein und besitzt eine Sauerstoff-sensitive FAD-Gruppe (Watts *et al.*, 2006). Der O<sub>2</sub>-Sensor ArcB ist eine membran-gebundene Sensor-Histidinkinase (Malpica *et al.*, 2004). Weiterhin wurde noch die Häm-bindende PAS-Domäne in PDEA1 (>26%) aus *Acetobacter xylinus* und die vermutlich Sauerstoff wahrnehmende PAS-Domäne

von Bat aus dem Archaeobakterium *Halobacterium salinarium* aufgenommen. Als letzte PAS-Domäne wurde die von NifL aus *Azotobacter vinelandii* aufgenommen, die zwar die geringste Sequenzübereinstimmung mit dem Staphylokokken NreB (> 7%) aufweist, aber ebenfalls ein Sauerstoff-Sensor ist, der FAD als Co-Faktor besitzt. Im Stammbaum konnten die PAS-Domänen in Familien eingeteilt werden, die teils experimentell bestimmte, teils potentielle redox-sensitive Gruppen zur Sauerstoff-Wahrnehmung verwenden.

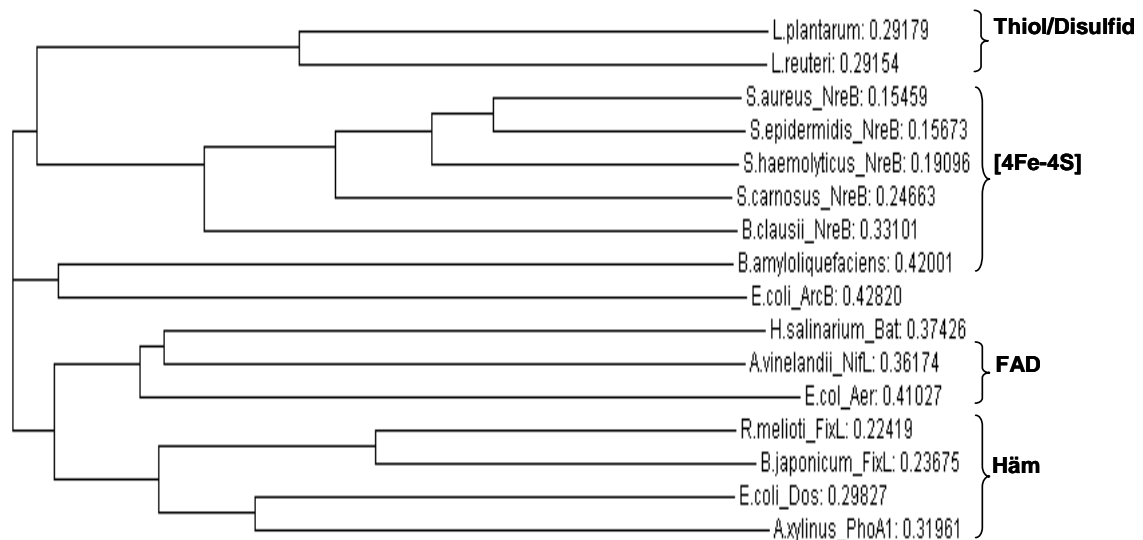


Abb. 46. **Phylogenetischer Stammbaum von O<sub>2</sub>-sensitiven PAS-Domänen.** Mit allen zuvor aufgeführten PAS-Domänen wurde ein multiples Alignment mit ClustalW2 (Larkin *et al.*, 2007) durchgeführt. Aus diesen Ergebnissen wurde nach der Neighbor-Joining Methode der folgende Stammbaum berechnet (Saitu und Nei, 1987). Die berechneten Distanzwerte sind hinter den Namen angegeben. Die bestimmten und potentiellen redoxsensitiven Gruppen stehen auf der rechten Seite.

Die NreB Proteine der Staphylokokken zeigen die kürzesten Distanzen zueinander und zum NreB Protein aus und *B. clausii*. Etwas weiter entfernt dazu befindet sich das NreB ähnliche Protein aus *B. amyloliquefaciens*. Alle Proteine, bis auf das aus *B. amyloliquefaciens*, besitzen vier konservierte Cysteinreste. Die für NreB aus *S. carnosus* essentiellen Cysteinreste und potentiellen Liganden des [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Zentrums, binden vermutlich in allen Proteinen ein O<sub>2</sub>-labiles [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Zentrum. Die NreB-ähnlichen Proteine aus den Milchsäurebakterien stehen im Stammbaum nicht weit entfernt von den NreB Proteinen aus den Staphylokokken. Der Verlust von zwei Cysteinresten und der daraus resultierende vermutete Mechanismus der Sauer-

stoffwahrnehmung, über einen Thiol/Disulfid-Wechsel, stellt eine Anpassung des NreB Proteins an eisenarme Bedingungen dar.

Häm- und FAD- enthaltende PAS-Domänen wiesen untereinander Ähnlichkeiten auf und sind von NreB-Proteinen weit entfernt. Sie bildeten im Stammbaum zwei eigene Gruppen.

### 5.5 NreB ist ein neuer FeS-haltiger O<sub>2</sub>-Sensor

NreB aus *S. carnosus* ist der Prototyp eines neuen O<sub>2</sub>-Sensors mit einem [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Zentrum, der sich von bisher bekannten FeS-haltigen O<sub>2</sub>-Sensoren in der Sequenz und Signalverarbeitung deutlich unterscheidet. Abb. 47 zeigt bisher bekannte FeS-haltige O<sub>2</sub>-Sensoren. Für NifA ist allerdings nicht bekannt, ob dieser ein FeS-Zentrum trägt und ein direkter O<sub>2</sub>-Sensor ist.

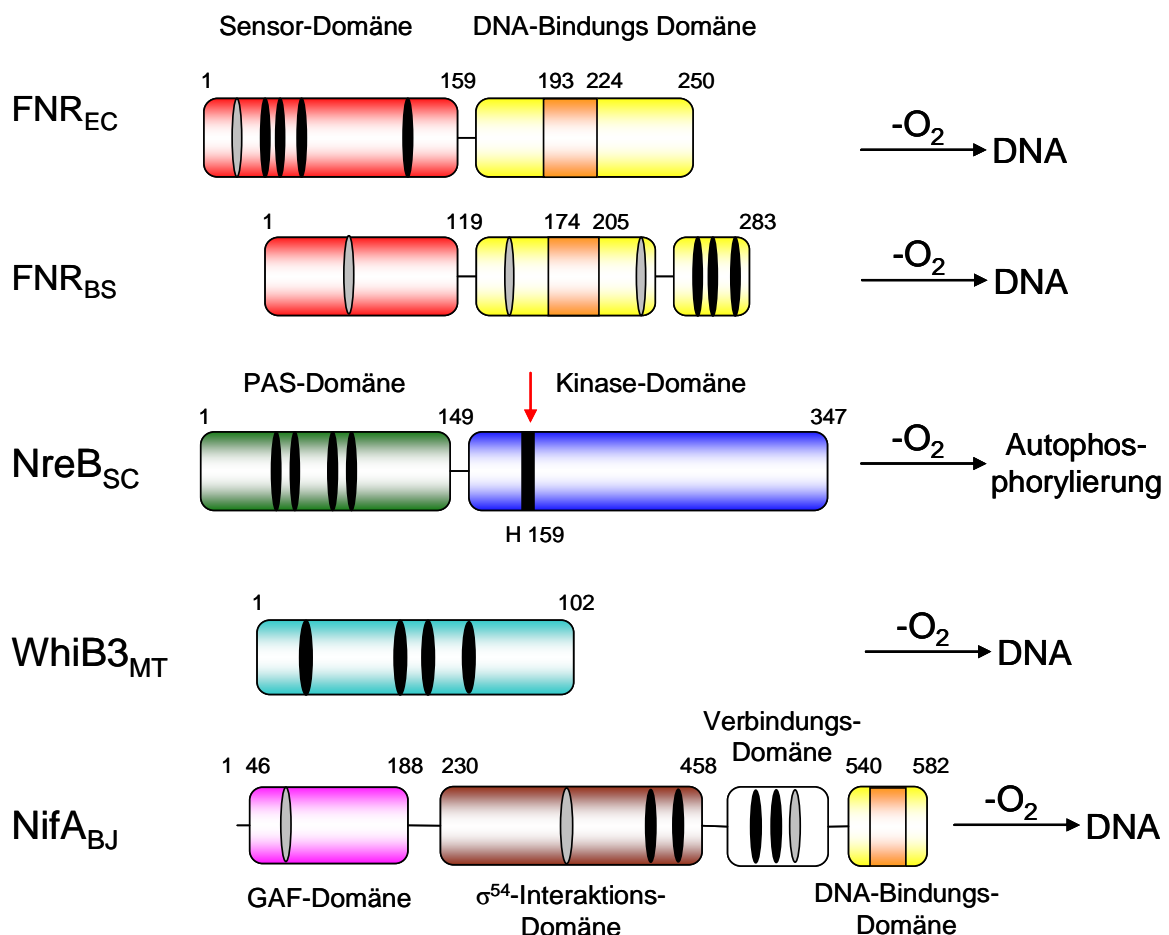


Abb. 47: Domänenorganisation von O<sub>2</sub>-Sensoren, die ein [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Zentrum enthalten. Gezeigt sind die DNA-Bindedomänen (gelb mit HTH-Bindemotiv, orange) und die CRP-homologen Sensordomänen (rot) der FNR-Proteine. Im Gegensatz dazu besitzt NreB eine potentielle PAS-Domäne (grün) und eine Kinase-Domäne (blau). Über die 102 Aminosäuren umfassende Domäne von WhiB3 (Aquamarin) ist nichts bekannt. NifA enthält eine GAF-Domäne (rosa), eine Sigma<sup>54</sup>-Interaktions-Domäne, eine Verbindungs-Domäne und eine DNA-Bindungs-Domäne (gelb) mit HTH-Motiv (orange). Cystein Liganden der [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Zentren sind schwarz, übrige Cysteinreste grau dargestellt. ■ (roter Pfeil), konservierter Histidinrest der Kinase-Domäne.

Der Sauerstoffsensor FNR aus *E. coli* ist innerhalb der Gram-negativen Bakterien weit verbreitet (Körner *et al.*, 2003; Spiro, 1994) und kommt auch in Abwandlungen in einigen Gram-positiven Bakterien vor (z.B. *Bacillus subtilis* (FNR) und *Lactobacillus casei* (FLP)). Alle FNR-Proteine gehören zur großen Superfamilie der CRP-FNR (cAMP receptor protein oder CAP catabolite gene activator protein) Transkriptionsregulatoren (Körner *et al.*, 2003). FNR<sub>EC</sub> aus *E. coli* und FNR<sub>BS</sub> aus *Bacillus subtilis* besitzen beide eine CRP-homologe sensorische Domäne und eine DNA-Bindungsdomäne, die ein „Helix-Turn-Helix“ Motiv enthält. Das [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Zentrum wird in FNR<sub>EC</sub> in der sensorischen Domäne über vier Cysteinreste gebunden. In der [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-haltigen Form von FNR<sub>EC</sub> wird die Dimerisierung aktiviert und das aktive FNR<sub>EC</sub> Dimer kann an die DNA binden. FNR<sub>EC</sub> reguliert über 100 Gene und ist damit ein globaler Transkriptionsregulator, der das Umschalten vom aeroben zum anaeroben Stoffwechsel kontrolliert (Crack *et al.*, 2008).

FNR<sub>BS</sub> aus *Bacillus subtilis* liegt mit und ohne FeS-Zentrum als Dimer vor, dennoch kontrolliert die Bindung des FeS-Zentrums die DNA-Bindung (Reents *et al.*, 2006). Das FeS-Zentrum wird über drei Cysteinreste gebunden, die am C-terminalen Ende in der DNA-Bindungsdomäne liegen (Klinger *et al.*, 1998). Bisher wurde der fehlende vierte Ligand noch nicht identifiziert. Es sind aber anscheinend weder die restlichen Cysteinreste noch die Histidinreste (Reents *et al.*, 2006). Für FNR<sub>BC</sub> konnten bisher nur Bindestellen vor den Genen *narGHJI*, *narK* und *arfM* gefunden werden (Reents *et al.*, 2005). Er scheint keine globale Rolle wie FNR aus *E. coli* zu spielen.

Neben FNR<sub>EC</sub> und FNR<sub>BS</sub> wurde WhiB3, ein weiterer [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Zentrum enthaltender, redoxsensitiver Transkriptionsfaktor der WhiB-Familie in *Mycobacterium tuberculosis* gefunden. Er ist essentiell für ein optimales Wachstum auf zahlreichen Kohlenhydratquellen in Abhängigkeit vom umgebenden Partialdruck pO<sub>2</sub> und pNO (Singh *et al.*, 2007).

NifA aus *B. japonicum* ist ein Transkriptionsfaktor, der seine eigene Expression und die der Gene *nif* und *fix* in Abhängigkeit von anaeroben Bedingungen und der Verfügbarkeit von Eisen und seiner Cysteinreste reguliert (Morett *et al.*, 1991). Ein FeS-Zentrum wurde noch nicht nachgewiesen, aber die experimentellen Daten sprechen für die Anwesenheit eines metallischen Co-Faktors.

Die Aminosäure-Sequenz der Cys-haltigen Sequenz der FeS-haltigen Domäne wurde mit der von NreB aus *S. carnosus* verglichen (Tab. 27). In keinem Fall wurden signifikante Übereinstimmungen in Sequenz und Abstand der Cys-Reste gefunden,



Es ist allerdings auffällig ist, dass in NreB, FNR<sub>EC</sub> und FNR<sub>BS</sub> jeweils die ersten beiden Cysteine den gleichen Abstand von zwei Aminosäuren zueinander aufweisen.

Tab. 27: **Sequenzvergleich von FeS-haltigen bakteriellen Sauerstoffsensoren.** Die AS-Sequenzen wurden mit dem Programm: EMBOSS Pairwise Alignment Algorithms verglichen.

O <sub>2</sub> -Sensoren	Sequenz-Cysteincluster	Ähnlichkeit	Organismus
NreB <sub>SC</sub>	C <sup>59</sup> -X <sub>2</sub> -C <sup>62</sup> -X <sub>11</sub> -C <sup>74</sup> -X <sub>2</sub> -C <sup>77</sup>	100 %	<i>S. carnosus</i>
FNR <sub>BS</sub>	C <sup>227</sup> -X <sub>2</sub> -C <sup>229</sup> -X <sub>4</sub> -C <sup>235</sup>	< 25 %	<i>B. subtilis</i>
FNR <sub>EC</sub>	C <sup>20</sup> -X <sub>2</sub> -C <sup>23</sup> -X <sub>5</sub> -C <sup>29</sup> -X <sub>92</sub> -C <sup>122</sup>	< 20 %	<i>E. coli</i>
NifA <sub>BJ</sub>	C <sup>440</sup> -X <sub>11</sub> -C <sup>452</sup> -X <sub>19</sub> -C <sup>472</sup> -X <sub>4</sub> -C <sup>477</sup>	< 20 %	<i>B. japonicum</i>
WhiB3 <sub>MT</sub>	C <sup>23</sup> -X <sub>29</sub> -C <sup>53</sup> -X <sub>2</sub> -C <sup>56</sup> -X <sub>5</sub> -C <sup>62</sup>	< 11 %	<i>M. tuberculosis</i>

NreB ist ein neuer [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-haltiger Sauerstoffsensor, der mit keinem bisher charakterisierten O<sub>2</sub>-Sensor Sequenzähnlichkeit besitzt. Es ist anzunehmen, dass die Sensoren in der Evolution unabhängig voneinander entstanden sind und unabhängig voneinander einen ähnlichen Mechanismus zur O<sub>2</sub>-Wahrnehmung über ein [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Zentrum erworben haben.

Das NreBC Zwei-Komponentensystem reguliert die Expression der Gene *nirBD*, *narGHJI* und *narT*. Es wurden keine weiteren DNA-Bindungssequenzen für NreC identifiziert, weshalb NreB vermutlich nicht die Rolle eines globalen O<sub>2</sub>-Sensors wie FNR aus *E. coli* einnimmt. In diesem Punkt erinnert NreB eher an FNR aus *B. subtilis*, das ebenfalls nur wenige Gene reguliert. In *B. subtilis* sind neben FNR das ResDE Zwei-Komponentensystem und ArfM (anaerobic respiration and fermentation modulator) am Umschalten zum anaeroben Stoffwechsel beteiligt (Härtig *et al.*, 2004; Marino *et al.*, 2001). In *S. aureus* wurde das Res-homologe Zwei-Komponentensystem SrrAB (staphylococcal respiratory response) gefunden, das die Expression von Virulenz-Faktoren in Abhängigkeit von Sauerstoff reguliert (Yarwood *et al.*, 2001). Man könnte sich vorstellen, dass dieses System ebenfalls in *S. carnosus* existiert und zusammen mit NreB und bisher noch nicht identifizierten weiteren O<sub>2</sub>-Sensoren das Umschalten vom aeroben zum anaeroben Stoffwechsel kontrolliert.

## 5.6 Systeme zur Biosynthese von FeS-Zentren in *S. aureus* RF122

Da FeS-Zentren entstehen nicht spontan, sondern in einer komplexen Biogenese. Eine Cystein-Desulfurase mobilisiert Sulfid aus Cystein. Sulfid und Eisen werden in einem [FeS]-Gerüst-Protein zu Eisen-Schwefel-Zentren zusammengesetzt und dann auf Zielproteinen übertragen. Diese Systeme müssen ubiquitär zu finden sein. Das [4Fe-4S]<sup>2+</sup>-Zentrum von NreB konnte *in vitro* mit Hilfe der Cystein-Desulfurase NifS<sub>AV</sub> in apoNreB assembliert werden, und es war Bestandteil von anaerob präpariertem NreB.

In *E. coli* und *A. vinelandii* wurden die drei Biosynthese-Systeme Nif (nitrogen fixation), Isc (iron-sulfur-cluster formation) und Suf (sulfur utilization factor) gefunden, die aus einer Cystein-Desulfurase und einen [FeS]-Gerüst-Protein bestehen. Da das Gesamtgenom von *S. carnosus* noch nicht veröffentlicht war, wurde das Genom von dem nah verwandten *S. aureus* RF122 nach homologen Biosynthese-Systemen durchsucht. Es wurden jeweils zwei homologe Proteine identifiziert, die den Cystein-Desulfurasen IscS und SufS aus *E. coli* entsprechen und zwei [FeS]-Gerüst-Proteine gefunden, die den Proteinen IscU aus *E. coli* und NifU aus *A. vinelandii* ähnlich sind (Tab. 28). *S. carnosus* RF122 codiert auch für ein Protein, das Homologien zur Glutathionperoxidase aus *S. aureus* N315 aufweist.

Tab. 28: ***E. coli* und *A. vinelandii* homologe FeS-Biosynthese Systeme in *S. aureus* RF122.** Mit Hilfe der Proteinsequenzen einiger Biosynthese-Systeme von *E. coli* und *A. vinelandii* wurden im Gesamtgenom von *S. aureus* RF122 homologe Gene identifiziert.

Protein	Organismus	Gen	Funktion
IscS	<i>E. coli</i>	3794977 SAB1493c	FeS Co-Faktor Synthese Protein
IscS		3794848 csdB	Cystein-Desulfurase
SufS	<i>E. coli</i>	ref YP_416267.1	Cystein-Desulfurase
		ref YP_416963.1	FeS Co-Faktor Synthese Protein
IscU	<i>E. coli</i>	ref YP_416268.1	N <sub>2</sub> -Fixierungs Protein
NifU	<i>A. vinelandii</i>		

### 5.7 Abschließendes Arbeitsmodell zum NreBC Zwei-Komponentensystem

Das NreBC Zwei-Komponentensystem reguliert die Synthese der  $O_2$ -abhängigen Nitrat- Nitritreduktion in *S. carnosus* (Fedtke *et al.*, 2002). Das System besteht aus der Sensor-Histidinkinase NreB und dem Response-Regulator NreC (Abb. 45). Dabei ist Sauerstoff das zentrale Signal und wird von einem  $O_2$ -sensitiven  $[4Fe-4S]^{2+}$ -Zentrum in NreB detektiert. Unter anaeroben Bedingungen bildet sich ein  $[4Fe-4S]^{2+}$ -Zentrum in NreB, das in anaerob präpariertem und rekonstituiertem NreB mit Mössbauer-Spektroskopie eindeutig nachgewiesen wurde. Durch die Bildung des  $[4Fe-4S]^{2+}$ -Zentrums wird die Autophosphorylierung von NreB um den Faktor drei bis fünf stimuliert. Die Phosphorylierung findet vermutlich am konservierten Histidinrest (H159) der Kinase-Domäne statt. Der Phosphatrest wird in einer Transphosphorylierungsreaktion auf den konservierten Aspartatrest von NreC übertragen. Phosphoryliertes NreC bindet an die Promotorregionen des *nir*- und *nar*-operons und von *narT* und stimuliert deren Expression.

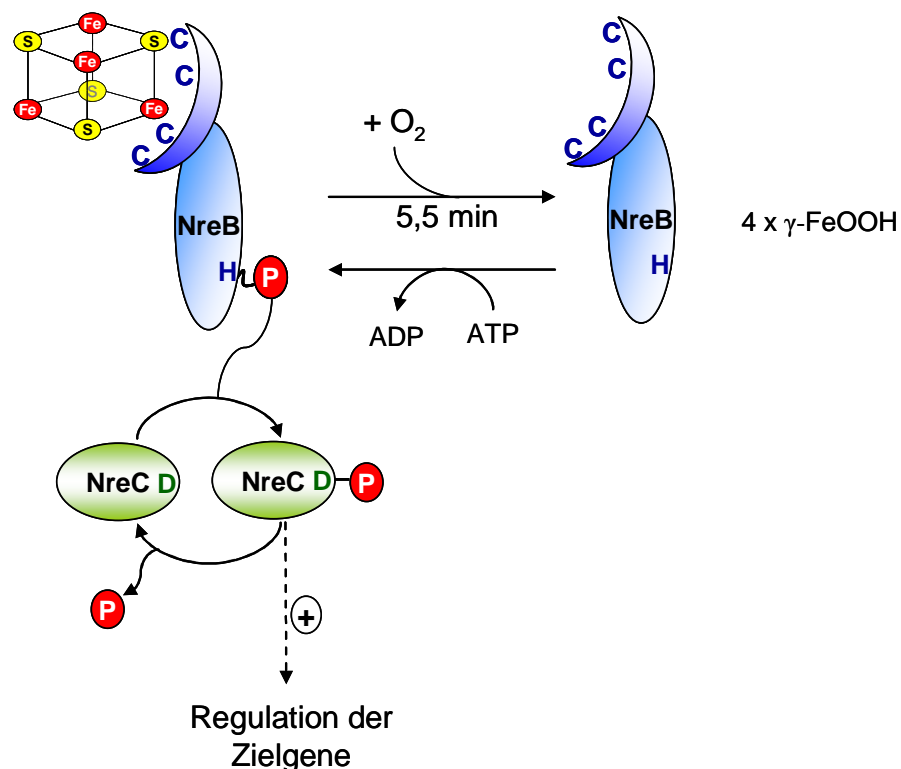


Abb. 48: Arbeitsmodell zu Aufbau und Funktion des NreBC Zwei-Komponentensystems als  $O_2$ -Sensor der Transkription. Unter Anaerobiose besitzt NreB ein  $O_2$ -sensitives  $[4Fe-4S]^{2+}$ -Zentrum, das innerhalb von 5,5 Minuten zu  $\gamma$ -FeOOH zerfällt. Der Verlust des  $[4Fe-4S]^{2+}$ -Zentrums korreliert mit dem Verlust der Autophosphorylierungsaktivität, wodurch auch die Phosphorylierung von NreC abnimmt und damit die Expression der Zielgene.

So werden die für die Verwertung von Nitrat und Nitrit benötigten Enzyme induziert. Unter Einwirkung von Sauerstoff wird das  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum oxidiert und zerfällt innerhalb von 5,5 min Minuten vollständig zu  $\gamma\text{-FeOOH}$ . Vermutlich zerfällt das  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum auf ähnliche Art und Weise wie in FNR aus *E. coli*, über die Zwischenstufen eines  $[3\text{Fe-4S}]^{1+}$ - und eines  $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ -Zentrums. Es wird angenommen, dass die Folgereaktionen schneller ablaufen und deshalb keine Zwischenprodukte gemessen wurden. Die Abnahme der Autophosphorylierungsaktivität korreliert mit der Abnahme des Gehalts an  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentren. Mit der Abnahme der Kinasaktivität von NreB nimmt die Phosphorylierung von NreC ab und das NreBC Zweikomponentensystem ist nicht mehr aktiv. Das  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum wird mit aller Wahrscheinlichkeit über die vier essentiellen Cysteinreste der sensorischen PAS-Domäne von NreB gebunden. Dafür sprechen zu einem die Ergebnisse der Mössbauer-Spektroskopie, deren Daten eindeutig zu einem  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ -Zentrum vom Ferredoxin-Typ passen, in dem alle vier Eisenatome über Cysteine gebunden werden. Außerdem führen Punktmutationen der Cysteinreste in jedem Fall zu einem vollständigen Funktionsverlust *in vivo*.

NreA besteht fast ausschließlich aus einer GAF-Domäne und führt bei Überexpression unter aeroben Bedingungen im *S. carnosus* Wildtyp zur Reprimierung der Gene *narT*, *narGHJ* und *nir*. In einer *nreA*-Deletionsmutante werden unter aeroben Bedingungen dieselben Gene verstärkt exprimiert. (Steffen Schlag, unveröffentlicht) Welche Funktion NreA in dem System übernimmt, ist bisher noch unbekannt und wird Ziel weiterführender Studien sein.

## 6. Literatur

**Augustin, J. and Götz, F. (1989)**

Transformation of *Staphylococcus epidermidis* and other staphylococcal species with plasmid DNA by electroporation  
*FEMS Microbiology Letters* **66**:203-208.

**Aravind, L., Ponting, C.P. (1997)**

The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins.  
*Trends Biochem. Sci.* **22**:458-9.

**Beinert, H. (2000)**

Iron-sulfur proteins: ancient structures, still full of surprises.  
*J. Biol. Inorg. Chem.* **5**:2-15.

**Beinert, H. (1983)**

Semi-micro Methods for analysis of Labile Sulfide and of Labile Sulfide plus Sulfane Sulfur in Unusually Stable Iron-Sulfur Proteins  
*Analytical Biochemistry* **131**:373-378.

**Bers G., Garfin D. (1985)**

Protein and nucleic acid blotting and immunobiochemical detection  
*BioTechniques* **3**:276-288.

**Braford, M. M. (1976)**

A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.  
*Anal. Biochem.* **72**:248-54.

**Brückner, R. (1992)**

A series of shuttle vectors for *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*.  
*Gene* **122**:187-92.

**Bryson, K., McGuffin, L.J., Marsden, R.L., Ward, J.J., Sodhi, J.S. & Jones D.T. (2005)**

Protein structure prediction servers at University College London.  
*Nucl. Acids Res.* **33**: W36-38.

**Chandramouli, K., Unciuleac, M.C., Naik, S., Dean, D.R., Huynh, B.H., Johnson MK. (2007)**

Formation and properties of [4Fe-4S] clusters on the IscU scaffold protein.  
*Biochemistry* **46**:6804-11.

**Cleland, W. W. (1963)**

Dithiothreitol, a new protective reagent for SH Groups  
*Biochemistry* **3**:480-2.

**Crack, J.C., Le Brun, N.E., Thomson, A.J., Green, J., Jervis, A.J. (2008)**

Reactions of Nitric Oxide and Oxygen with the Regulator of Fumarate and Nitrate Reduction, a Global Transcriptional Regulator, during Anaerobic Growth of *Escherichia coli*.  
*Methods Enzymol.* **437**:191-209.

- Crack J.C., Gaskell A.A., Green, J., Cheesman, M.R., Le Brun, N.E., Thomson, A.J. (2008)**  
Influence of the environment on the [4Fe-4S]<sup>2+</sup> to [2Fe-2S]<sup>2+</sup> cluster switch in the transcriptional regulator FNR.  
*J. Am. Chem. Soc.* **130**:1749-58.
- Crack, J.C., Green, J., Cheesman, M.R., Le Brun, N.E., Thomson, A.J. (2007)**  
Superoxide-mediated amplification of the oxygen-induced switch from [4Fe-4S] to [2Fe-2S] clusters in the transcriptional regulator FNR.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **104**:2092-7.
- Cruz Ramos, H., Hoffmann, T., Marino, M., Nedjari, H., Presecan-Siedel, E., Dreesen, O., Glaser P., Jahn D. (2000)**  
Fermentative metabolism of *Bacillus subtilis*: physiology and regulation of gene expression.  
*J. Bacteriol.* **182**:3072-80.
- Dower, W.J., Miller, J.F., Ragsdale, C.W. (1988)**  
High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation.  
*Nucleic Acids Res.* **16**:6127-45.
- Etzkorn, M., Kneuper, H., Dünwald, P., Vijayan, V., Krämer, J., Griesinger, C., Becker, S., Unden G. & Baldus M. (2008)**  
Structural aspects of intracellular, PAS mediated, signal transduction in the membrane-embedded histidine-kinase DcuS  
(in Bearbeitung)
- Farinha, M.A., Kropinski, A.M. (1990)**  
High efficiency electroporation of *Pseudomonas aeruginosa* using frozen cell suspensions.  
*FEMS Microbiol. Lett.* **58**:221-5.
- Fast B., Lindgren P., Götz F. (1996)**  
Cloning, sequencing, and characterization of a gene (*narT*) encoding a transport protein involved in dissimilatory nitrate reduction in *Staphylococcus carnosus*.  
*Arch. Microbiol.* **166**:361-7.
- Fedtke, I., Kamps, A., Krismer, B., Götz F. (2002)**  
The nitrate reductase and nitrite reductase operons and the *narT* gene of *Staphylococcus carnosus* are positively controlled by the novel two-component system NreBC.  
*J Bacteriol.* **184**:6624-34.
- Fish, W.W. (1988)**  
Rapid colorimetric micromethod for the quantitation of complexed iron in biological samples  
*Methods in Enzymology* **158**:357-364.
- Götz, F. (1990)**  
*Staphylococcus carnosus*: A new host organism for gene cloning and protein production.  
*Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser.* **19**:49S-53S.
- Götz, F. and Schumacher, B. (1987)**  
Improvement of Protoplast transformation in *Staphylococcus carnosus*  
*FEMS Microbiology Letters* **40**:285-288

**Grant, R.W., Wiedersich, H., Muir, Jr., A.H., Gonser, U. and Delgass W.N. (1966)**

*J.Chem. Phys.* **45**:1015.

**Green, J., Scott, C., Guest, J.R. (2001)**

Functional versatility in the CRP-FNR superfamily of transcription factors:  
FNR and FLP.

*Adv. Microb. Physiol.* **44**:1-34.

**Green, J., Bennett, B., Jordan, P., Ralph, E.T., Thomson, A.J., Guest, J.R. (1996)**

Reconstitution of the [4Fe-4S] cluster in FNR and demonstration of the aerobic-anaerobic transcription switch *in vitro*.

*Biochem. J.* **316**:887-92.

**Guest, J.R. (1995)**

Adaption to life without oxygen

*Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **350**:189-202.

**Guest, J.R. (1992)**

Oxygen-regulated gene expression in *Escherichia coli*. The 1992 Marjory Stephenson Prize Lecture.

*J. Gen. Microbiol.* **11**:2253-63.

**Gütlich, Philipp (1970)**

Physikalische Methoden in der Chemie: Mößbauer-Spektroskopie I,

*Chemie in unserer Zeit* **4**:133-144.

**Hammel, Oliver (2007, Diplomarbeit)**

Autophosphorylierung von aerob und anaerob präpariertem

NreB aus *Staphylococcus carnosus*

Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Härtig, E., Geng, H., Hartmann, A., Hubacek, A., Münch, R., Ye, R.W., Jahn, D., Nakano,**

**M.M.(2004)**

*Bacillus subtilis* ResD induces expression of the potential regulatory genes yclJK upon oxygen limitation.

*J. Bacteriol.* **186**:6477-84.

**Hughes, M.N. and Poole, R.K. (1989)**

Metals and Micro-organisms

Chapman and Hall (London New York)

**Jander, G., Blasius, E., Strähle, J. und Schweda, E. (2003)**

Lehrbuch der analytischen und präparativen anorganischen Chemie

Hirzel S. Verlag; Auflage: 14., neubearb. A. (Februar 2002)

**Johnson, D.C., Dean, D.R., Smith, A.D., Johnson, M.K. (2005)**

Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters.

*Annu. Rev. Biochem.* **74**:247-81.

**Jones, D.T. (1999)**

Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices.  
*J. Mol. Biol.* **292**:195-202.

**Kamps, A., Achebach, S., Fedtke, I., Unden, G., Götz F. (2004)**

Staphylococcal NreB: an O(2)-sensing histidine protein kinase with an O(2)-labile iron-sulphur cluster of the FNR type.  
*Mol Microbiol.* **52**:713-23.

**Kamps, Annegret (2002, Dissertation)**

Molekularbiologische Studien zur Regulation der dissimilatorischen Nitrat- und Nitritreduktion bei *Staphylococcus carnosus*  
Eberhard-Karls-Universität, Tübingen

**Khoroshilova, N., Beinert, H., Kiley, P.J. (1995)**

Association of a polynuclear iron-sulfur center with a mutant FNR protein enhances DNA binding.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **92**:2499-503.

**Khoroshilova, N., Popescu, C., Münck, E., Beinert, H., Kiley, P.J. (1997)**

Iron-sulfur cluster disassembly in the FNR protein of *Escherichia coli* by O<sub>2</sub>: [4Fe-4S] to [2Fe-2S] conversion with loss of biological activity.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **94**:6087-92.

**Kiley, P.J., Beinert, H. (1998)**

Oxygen sensing by the global regulator, FNR: the role of the iron-sulfur cluster.  
*FEMS Microbiol. Rev.* **22**:341-52.

**King, T.E. and Morris, R.O. (1967)**

Determination of Acid-Labile Sulfide and Sulfhydryl groups.  
*Methods in Enzymol.* **10**: 634-641.

**Klinger, A., Schirawski, J., Glaser, P., Unden, G. (1999)**

The *fnr* gene of *Bacillus licheniformis* and the cysteine ligands of the C-terminal FeS cluster.  
*J. Bacteriol.* **180**:3483-5.

**Kloos, W., Schleifer, K.H., Götz F. (1991)**

The genus *Staphylococcus* in: Balows, B., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.H. (Eds.), *The Prokaryotes* **2**:1369-1420.

**Körner, H., Sofia, H.J., Zunft, W.G. (2003)**

Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp-Fnr transcription regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling alternative gene programs.  
*FEMS Microbiol.* **27**:559-92.

**Krismer, Bernhard (1999, Dissertation)**

Studium der Funktion der sekretierten Proteine SceA und SceB, Analyse des Galaktoseoperons galRKET und Konstruktion von Sekretions- und Expressionsvektoren in *Staphylococcus carnosus*  
Eberhard-Karls-Universität, Tübingen



**Kempf, M., Theobald, U., Fiedler, H-P. (1999)**

Economic improvement of the fermentative production of gallidermin by *Staphylococcus gallinarum*  
*Biotechnology Letters* **21**:663-667.

**Klinger, A., Schirawski, J., Glaser, P., Uden, G. (1998)**

The *fnr* gene of *Bacillus licheniformis* and the cysteine ligands of the C-terminal FeS cluster.  
*J. Bacteriol.* **180**:3483-5.

**Laemmli, U.K. (1970)**

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4  
*Nature* **227**:680-5.

**Lacourciere, G.M., Stadtman, T.C. (1998)**

The NIFS protein can function as a selenide delivery protein in the biosynthesis of selenophosphate.  
*J. Biol. Chem.* **273**:30921-6.

**Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J. and Higgins D.G. (2007)**

ClustalW2 and ClustalX version 2.  
*Bioinformatics* **23**: 2947-2948.

**Layer, G., Moser, J., Heinz, D.W., Jahn, D., Schubert, W.D. (2003)**

Crystal structure of coproporphyrinogen III oxidase reveals cofactor geometry of Radical SAM enzymes.  
*EMBO J.* **22**:6214-24.

**Lazizzera, B.A., Beinert, H., Khoroshilova, N., Kennedy, M.C., Kiley, P.J. (1996)**

DNA Binding and dimerization of the FeS-containing FNR Protein from *Escherichia coli* are regulated by oxygen  
*The Journal of Biol. Chem.* **271**:2762-2768.

**Löfblom, J., Kronqvist, N., Uhlén, M., Ståhl, S., Wernérus, H. (2007)**

Optimization of electroporation-mediated transformation: *Staphylococcus carnosus* as model organism.  
*J. Appl. Microbiol.* **102**:736-47.

**Malpica R, Franco B, Rodriguez C, Kwon O, Georgellis D. (2004)**

Identification of a quinone-sensitive redox switch in the ArcB sensor kinase.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **101**:13318-23.

**Marino, M., Ramos, H.C., Hoffmann, T., Glaser, P., Jahn, D. (2001)**

Modulation of anaerobic energy metabolism of *Bacillus subtilis* by *arfM* (*ywiD*).  
*J. Bacteriol.* **183**:6815-21.

**Mason, J.R. and Cammack, R. (1992)**

The electrontransport proteins of hydroxylating bacterial dioxygenases.  
*Annu. Rev. Microbiol.* **46**, 277-305.

**Massey, V., Hemmerich, P. (1978)**

Photoreduction of flavoproteins and other biological compounds catalyzed by deazaflavins.  
*Biochemistry* **17**:9-16.

**Marmur, J. (1961)**

A procedure for isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms.  
*J. Mol. Biol.* **3**:208-218.

**Morett, E., Fischer, H.M., Hennecke, H. (1991)**

Influence of oxygen on DNA binding, positive control, and stability of the *Bradyrhizobium japonicum* NifA regulatory protein.  
*J. Bacteriol.* **173**:3478-87.

**Neubauer, H., Pantel, I., Götz, F. (1999)**

Molecular characterization of the nitrite-reducing system of *Staphylococcus carnosus*.  
*J. Bacteriol.* **181**:1481-8.

**Nicholas, D. J. D., and Nason, A. (1957)**

Determination of nitrate and nitrite  
*Methods in Enzymology* **3**:981-984.

**Niehaus, F., Hantke, K. and G. Udden (1991)**

Iron content and FNR-dependent gene regulation in *Escherichia coli*  
*FEMS Microbiology Letters* **84**:319-324.

**Palmer, G. (1973)**

Iron-Sulfur Proteins, ed. Lovenberg, W.  
(Academic, New York) **2**:285-325.

**Pantel, Iris (1999, Dissertation)**

Molekulare und regulatorische Grundlagen der dissimilatorischen Nitrat- und Nitritreduktion bei  
*Staphylococcus carnosus*  
Eberhard-Karls-Universität, Tübingen

**Pantel, I., Lindgren, P.E., Neubauer, H., Götz F. (1998)**

Identification and characterization of the *Staphylococcus carnosus* nitrate reductase operon.  
*Mol. Gen. Genet.* **1**:105-14.

**Pellequer, J.L., Brudler, R., Getzoff, E.D. (1999)**

Biological sensors: More than one way to sense oxygen.  
*Curr. Biol.* **9**:R416-R418.

**Pellequer, J.L., Wager-Smith, K.A., Kay, S.A., Getzoff, E.D. (1998)**

Photoactive yellow protein: a structural prototype for the three-dimensional fold of the PAS domain superfamily.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **95**:5884-90.

**Pierik, A. J. (2001)**

Analysis of metals and acid-labile sulphide in Proteins EU Practical Training Course on  
Chemistry of Metals in Biological systems  
Philipps-Universität, Marburg

**Popescu, C.V., Bates, D.M., Beinert, H., Münck, E., Kiley, P.J. (1998)**

Mössbauer spectroscopy as a tool for the study of activation/inactivation of the transcription regulator FNR in whole cells of *Escherichia coli*  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **95**:13431-5.

**Ralph, E.T., Scott, C., Jordan, P.A., Thomson, A.J., Guest, J.R., and Green, J. (2001)**

Anaerobic acquisition of [4Fe-4S] clusters by the inactive FNR (C20S) variant and restoration of activity by second-site amino acid substitutions.  
*Mol. Microbiol.* **39**:1199-211.

**Reents, H., Gruner, I., Harmening, U., Böttger, L.H., Layer, G., Heathcote, P., Trautwein, A.X., Jahn, D. and Härtig, E. (2006)**

*Bacillus subtilis* FNR senses oxygen via a [4Fe-4S] cluster coordinated by three cysteine residues without change in the oligomeric state  
*Molecular Microbiology* **60**:1432-45.

**Reents, H., Münch, R., Dammeyer, T., Jahn, D., Härtig, E. (2006)**

The Fnr regulon of *Bacillus subtilis*.  
*J. Bacteriol.* **188**:1103-12.

**Reinhart, F., Achebach, S., Koch, T., Uden, G. (2008)**

Reduced apo-fumarate nitrate reductase regulator (apoFNR) as the major form of FNR in aerobically growing *Escherichia coli*.  
*J. Bacteriol.* **190**:879-86.

**Robbins, A.H. and Stout, C.D. (1989)**

Structure of activated aconitase: formation of the [4Fe-4S] cluster in the crystal.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:3639-3643.

**Rost, B., Yachdav, G. and Liu, J. (2004)**

The PredictProtein Server.  
*Nucleic Acids Research* **3**:321-326.

**Saitou, N., Nei, M. (1987)**

The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.  
*Mol Biol Evol.* **4**:406-25.

**Sambrook, J., and Russel, D.W. (2001)**

Molecular cloning a Laboratory Manual (Third Edition) Volume 3  
Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

**Sawers G. (1999)**

The aerobic/ anaerobic interface  
*Curr. opin. Microbiol.* **2**:181-7.

**Scherings, G., Haaker, H., Veeger, C. (1977)**

Regulation of nitrogen fixation by Fe-S protein II in *Azotobacter vinelandii*.  
*Eur. J. Biochem.* **77**:21-30.

**Schleifer, K.H. & Fischer, U. (1982)**

Description of a new species of the genus *Staphylococcus carnosus*.

*Int. J. Syst. Bacteriol.* **32**:152-156.

**Schmitz, R.A., Achebach, S. and Uden, G. (2004)**

Analysis of Fumarate Nitrate Reductase Regulator as an Oxygen sensor in *Escherichia coli*  
*Methods Enzymol.* **381**:628-44.

**Shima, S., Lyon, E.J., Thauer, R.K., Mienert, B., and Bill, E. (2005)**

Mössbauer studies of the iron-sulfur cluster-free hydrogenase: the electronic state of the mononuclear Fe active site.

*J. Am. Chem. Soc.* **127**:10430-5.

**Siegel, L.M. (1965)**

A Direct Microdetermination for Sulfide

*Analytical Biochemistry* **11**:126-132.

**Singh, A., Guidry, L., Narasimhulu, K.V., Mai, D., Trombley, J., Redding, K.E., Giles, G.I., Lancaster, J.R. Jr, Steyn, A.J. (2007)**

*Mycobacterium tuberculosis* WhiB3 responds to O<sub>2</sub> and nitric oxide via its [4Fe-4S] cluster and is essential for nutrient starvation survival.

*Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **104**:11562-7.

**Sizemore, C., Buchner, E., Rygus, T., Witke, C., Götz, F., Hillen, W. (1991)**

Organization, promoter analysis and transcriptional regulation of the *Staphylococcus xylosus* xylose utilization operon.

*Mol. Gen. Genet.* **227**:377-84.

**Spiro, S. (1994)**

The FNR family of transcriptional regulators.

*Antonie Leeuwenhoek* **66**:23-36.

**Stewart, V. (1988)**

Nitrate respiration in relation to facultative metabolism in enterobacteria.

*Microbiol. Rev.* **52**:190-232.

**Stookey, Lawrence L. (1970)**

Ferrozine-A New Spectrophotometric Reagent for Iron

*Analytical Chemistry* **42**:779-781.

**Sutton, V.R., Mettert, E.L., Beinert, H., Kiley, P.J. (2004)**

Kinetic analysis of the oxidative conversion of the [4Fe-4S]<sup>2+</sup> cluster of FNR to a [2Fe-2S]<sup>2+</sup> Cluster.

*J. Bacteriol.* **186**:8018-25.

**Studier, F.W., Moffatt, B.A. (1986)**

Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes.

*J. Mol. Biol.* **189**:113-30.

**Taylor, B.L., Zhulin, I.B. (1999)**

PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light.

*Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**:479-506.

- Throup, J. P., Zappacosta, F., Lunsford, R. D., Annan, R. S., Carr, S. A., Lonsdale, J. T., Bryant, A. P., McDevitt, D., Rosenberg, M. and Burnham M. K. (2001)**  
The *srhSR* gene pair from *Staphylococcus aureus*: genomic and proteomic approaches to the identification and characterization of gene function.  
*Biochemistry* **40**:10392–10401.
- Tran, Q.H., Arras, T., Becker, S., Holighaus, G., Ohlberger, G., Uden, G. (2000)**  
Role of glutathione in the formation of the active form of the oxygen sensor FNR ([4Fe-4S].FNR) and in the control of FNR function.  
*Eur. J. Biochem.* **267**:4817-24.
- Uden, G. and Trageser, M. (1991)**  
Oxygen regulated gene expression in *Escherichia coli*: Control of anaerobic respiration by the FNR protein.  
*Antonie van Leeuwenhoek* **59**:65-76.
- Walters, E. M. & Johnson, M. K. (2004)**  
Ferredoxin:thioredoxin Reductase: Disulfide Reduction Catalyzed via Novel Site-specific [4Fe-4S] Cluster Chemistry.  
*Photosynth. Res.* **79**:249-64.
- Watts, K.J., Johnson, M.S., Taylor, B.L. (2006)**  
Minimal requirements for oxygen sensing by the aerotaxis receptor Aer.  
*Mol. Microbiol.* **59**:1317-26.
- Wieland, K.P., Wieland, B., Götz F. (1995)**  
A promoter-screening plasmid and xylose-inducible, glucose-repressible expression vectors for *Staphylococcus carnosus*.  
*Gene* **158**:91-6.
- Wollenberg, M., Berndt, C., Bill, E., Schwenn, J.D., Seidler, A. (2003)**  
A dimer of the FeS cluster biosynthesis protein IscA from cyanobacteria binds a [2Fe2S] cluster between two protomers and transfers it to [2Fe2S] and [4Fe4S] apo proteins.  
*Eur. J. Biochem.* **270**:1662-71.
- Wu, H., Tyson, K.L., Cole, J.A., Busby, S.J.(1998)**  
Regulation of transcription initiation at the *Escherichia coli* nir operon promoter: a new mechanism to account for co-dependence on two transcription factors.  
*Mol. Microbiol.* **27**:493-505.
- Yanish-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985)**  
Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors.  
*Gene* **33**:103-119.
- Yarwood, J.M., McCormick, J.K., Schlievert, P.M. (2001)**  
Identification of a novel two-component regulatory system that acts in global regulation of virulence factors of *Staphylococcus aureus*.  
*J. Bacteriol.* **183**:1113-23.

**Zheng, L., White, R.H., Cash, V.L., Jack, R.F. and Dean, D.R. (1993)**

Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:2754 - 8.

**Zhou, Z.H. and Adams, M.W.W. (1997)**

Sitedirected mutations of the 4Feferredoxin from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*: Role of the clustercoordinating aspartate in physiological electron transfer reactions.  
*Biochemistry* **36**:10892-10900.

**Zhulin, I.B., Taylor, B.L., Dixon, R. (1997)**

PAS domain S-boxes in Archaea, Bacteria and sensors for oxygen and redox.  
*Trends Biochem. Sci.* **22**:331-3.

## 7. Veröffentlichungen

**Müllner, M., Hammel, O., Schlag, S., Bill, E., Mienert, B., Uden G. (2008)**

A PAS domain with an oxygen labile  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$  cluster in the oxygen sensor kinase NreB of *Staphylococcus carnosus*  
(in Bearbeitung)

**Müllner, M., Hammel, O., Schlag, S., Bill, E., Mienert B., Uden G. (2008)**

NreB of *Staphylococcus carnosus* is a new type of  $\text{O}_2$ -sensor, in which the kinase activity is controlled via an oxygen sensitive  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$  cluster  
VAAM-/GBM-Jahrestagung (Vortrag)

**Uden, G., Müllner, M., Reinhart, F., Hammel, O. (2007)**

Eisen-Schwefel-haltige Regulatoren aus Bakterien  
BIOspektrum 03.07 13. Jahrgang

**Müllner, M., Hammel, O., Mienert, B., Bill, E. Uden, G. (2007)**

NreB, a histidine kinase of *Staphylococcus carnosus* with an  $\text{O}_2$ -labile  $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$  cluster  
Internationale Tagung "Microbial Adaptation to Stress and Environment" (Poster)

**Achebach, S., Tran, Q.H., Vlamis-Gardikas, A., Müllner, M., Holmgren, A., Uden G. (2004)**

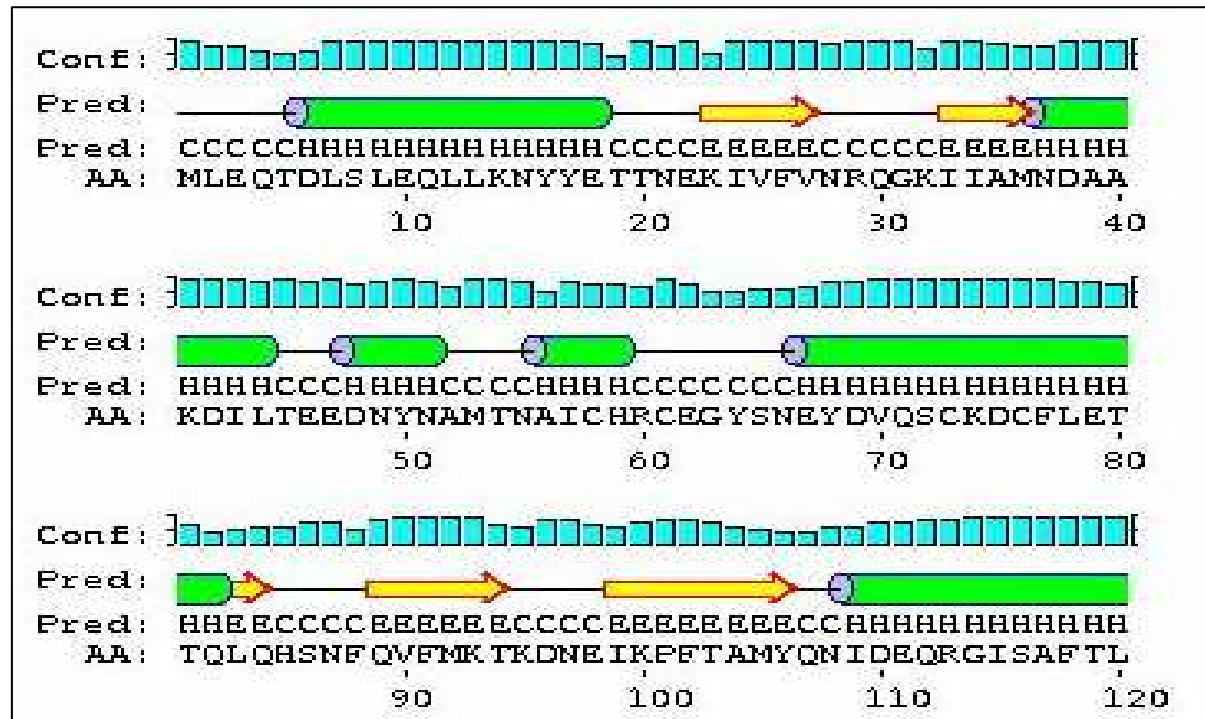
Stimulation of Fe-S cluster insertion into apoFNR by *Escherichia coli* glutaredoxins 1, 2 and 3  
*in vitro*.  
FEBS Lett. **565**:203-6.

## 8. Anhang

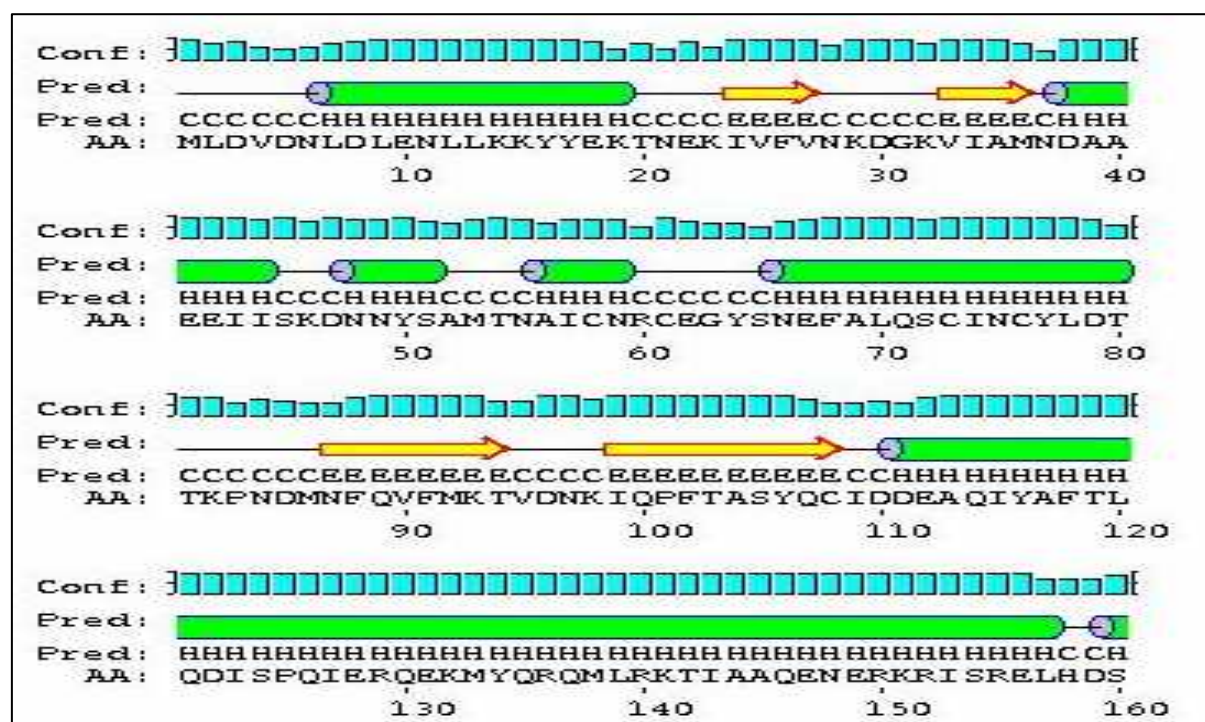
## PAS-Domänen und ihre Sekundärstrukturvorhersage mit PSIPRED

>*S. epidermidis* NreB (AS 1 - 106)

MLEQTDLSLEQLLKNYYETTNEKIVFVNRQGKIIAMNDAAKDILTEEDNYNAMTNAICHRCE  
 GYSNEYDVQSCCKDCFLETTQLQHSNFMKTKDNEIKPFTAMY

>*S. haemolyticus* NreB (AS 1 - 108)

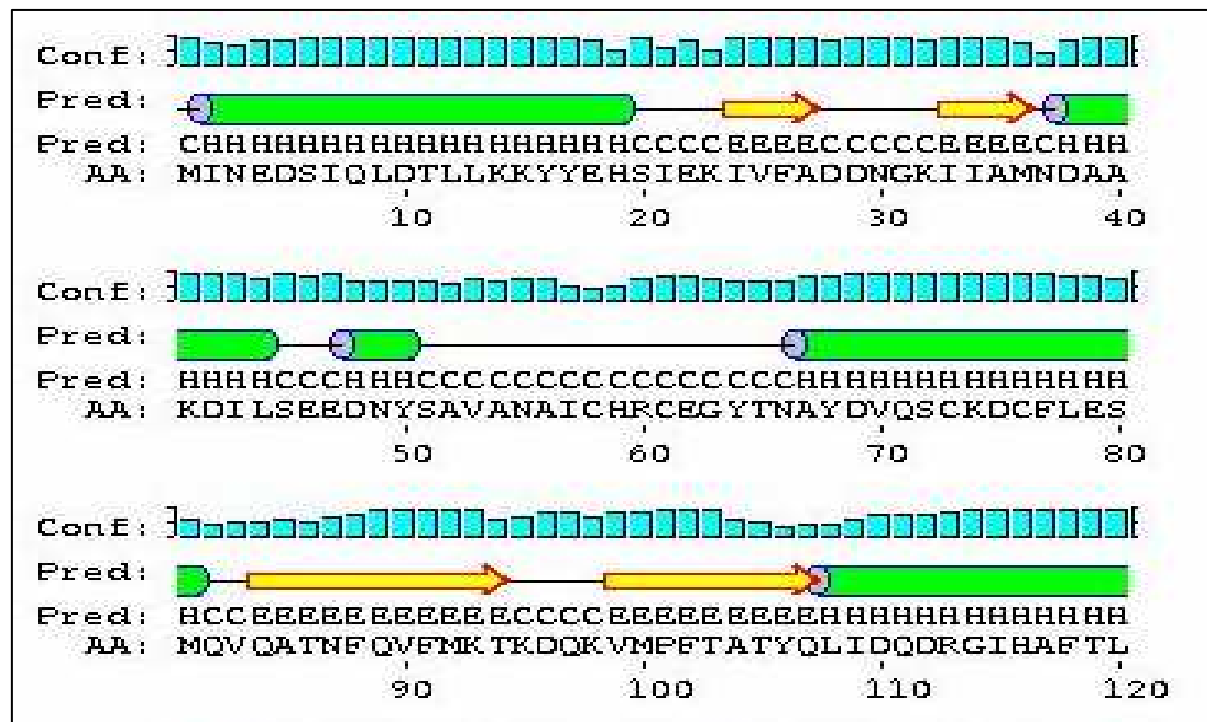
MLDVDNLDLENLLKYYEKTNEKIVFVNKDGKVIAMNDAAEIISKDNNSAMTNAICNRCE  
 GYSNEFALQSCINCYLDTTKPNDMNFQVFMKTVDNKIQPFTASYQC





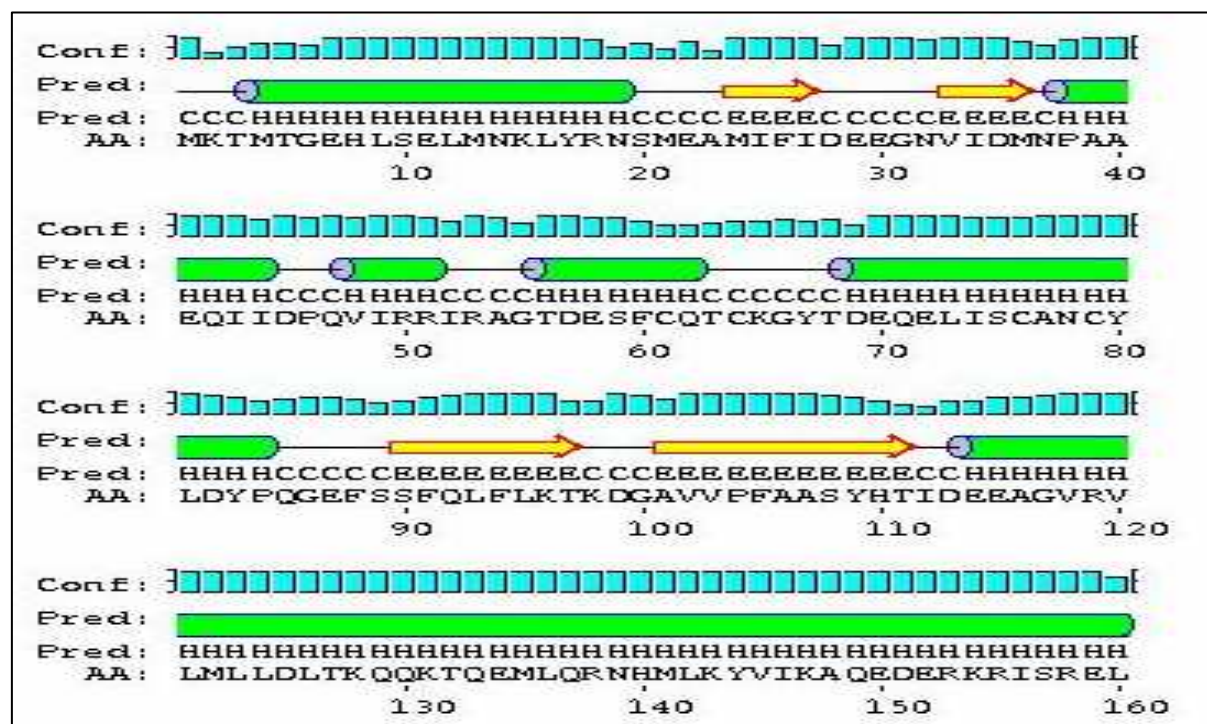
>*S. aureus* NreB (AS 1 - 107)

MINEDSIQLDTELLKKYYEHSIEKIVFADDNGKIIAMNDAAKDILSEEDNYSAVANAICHRCE  
GYTNAYDV QSCKDCFLESMQVQATNFQVFMKTKDQKVMPFTATYQ



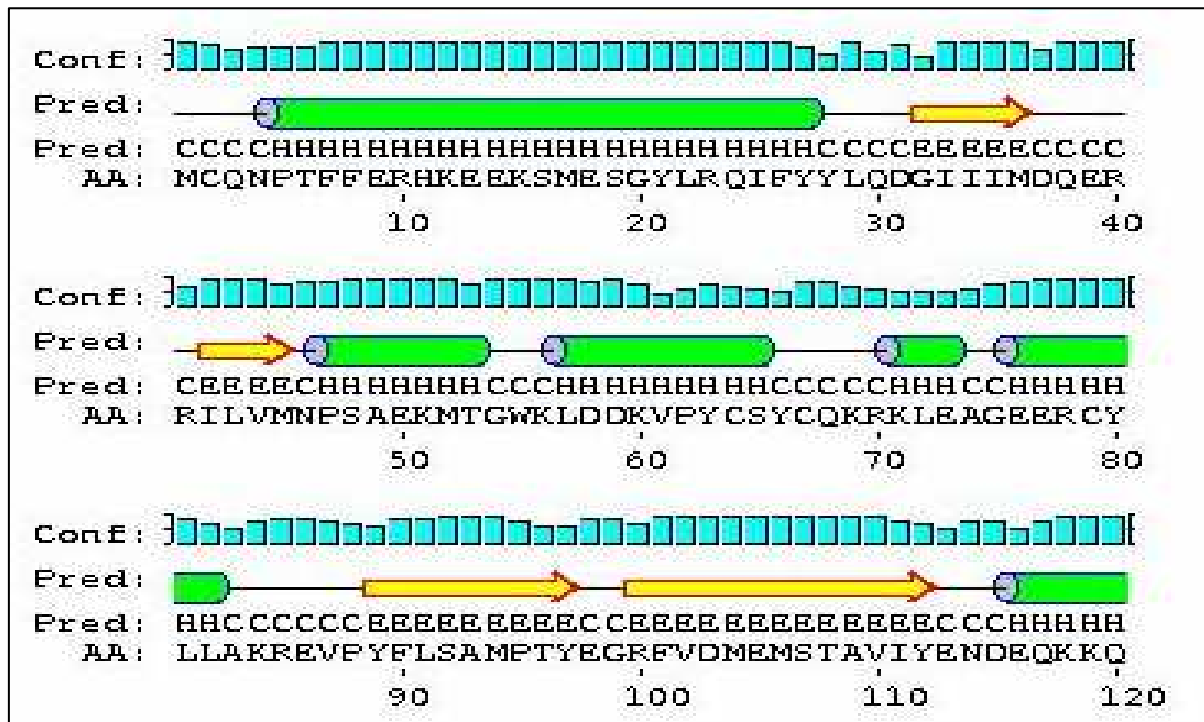
>*B. clausii* NreB (AS 1 - 111)

MKTMTGEHLSELNKLRYNSMEAMIFIDEEGNVIDMNPAAEQIIDPQVIRIRAGTDESFCQT  
CKGYTDEQELISCANCYLDYPOGEFSSFQFLKTKDGAVVPFAASYHT



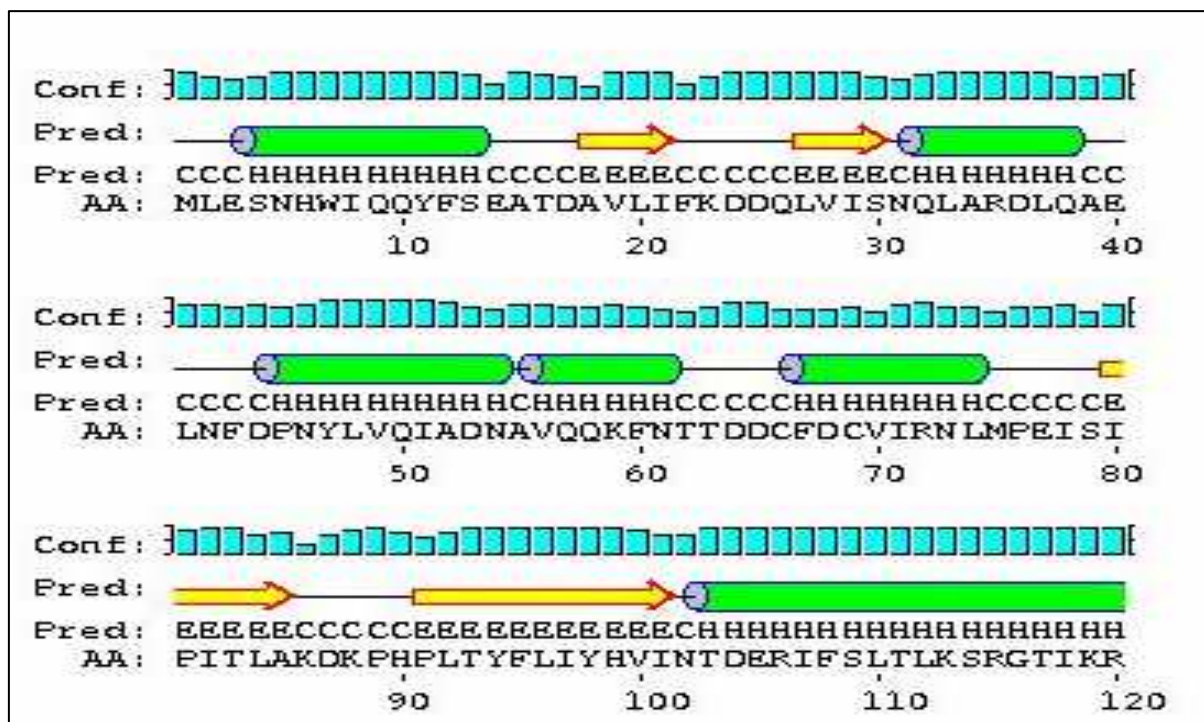
>*B. amyloliquefaciens* (AS 1 - 112)

MCQNPTFFERHKEEKSMESGYLRQIFYYLQDGIIIMDQERRILVMNPSAEKMTGWKLDDKVP  
YCSYCQKRKLEAGEERCYLLAKREVPYFLSAMPTYEGRFVDMEMSTAVIY



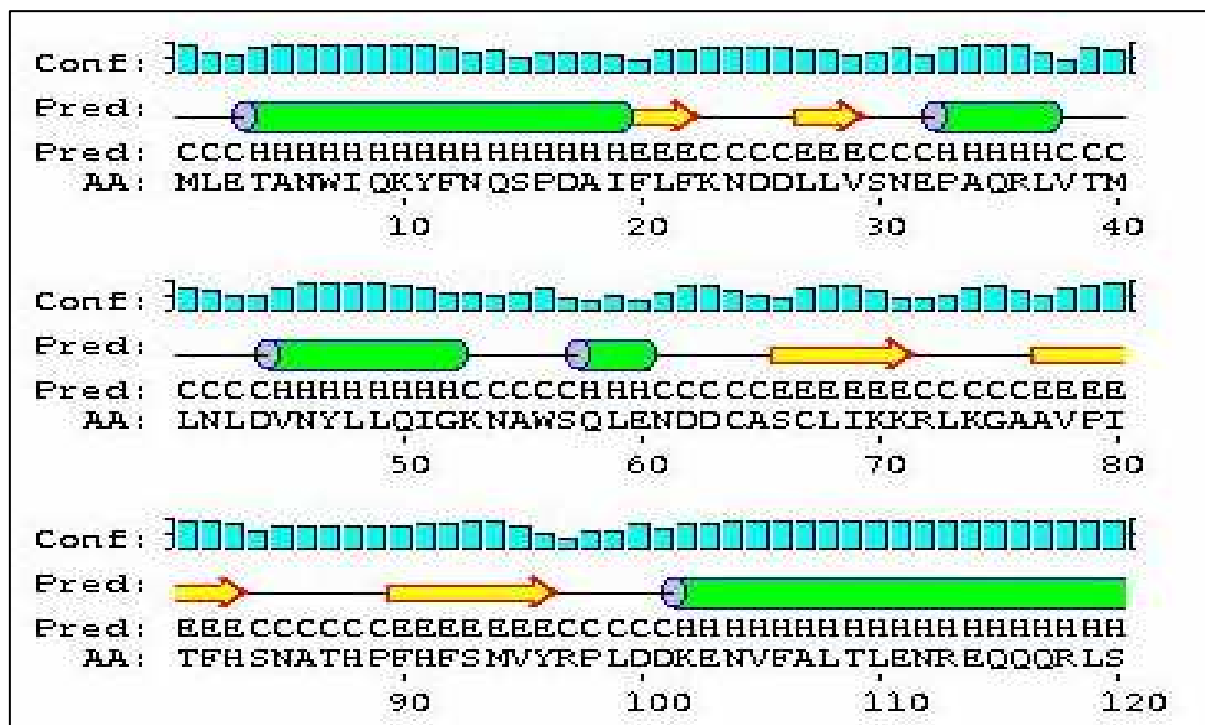
>*L. plantarum* (AS 1 - 101)

MLESNHWIQQYFSEATDAVLIFKDDQLVISNQLARDLQAELNFDPNYLVQIADNAVQQKFNT  
TDDCFDCVIRNLMPEISIPITLAKDKPHPLTYFLIYHVI

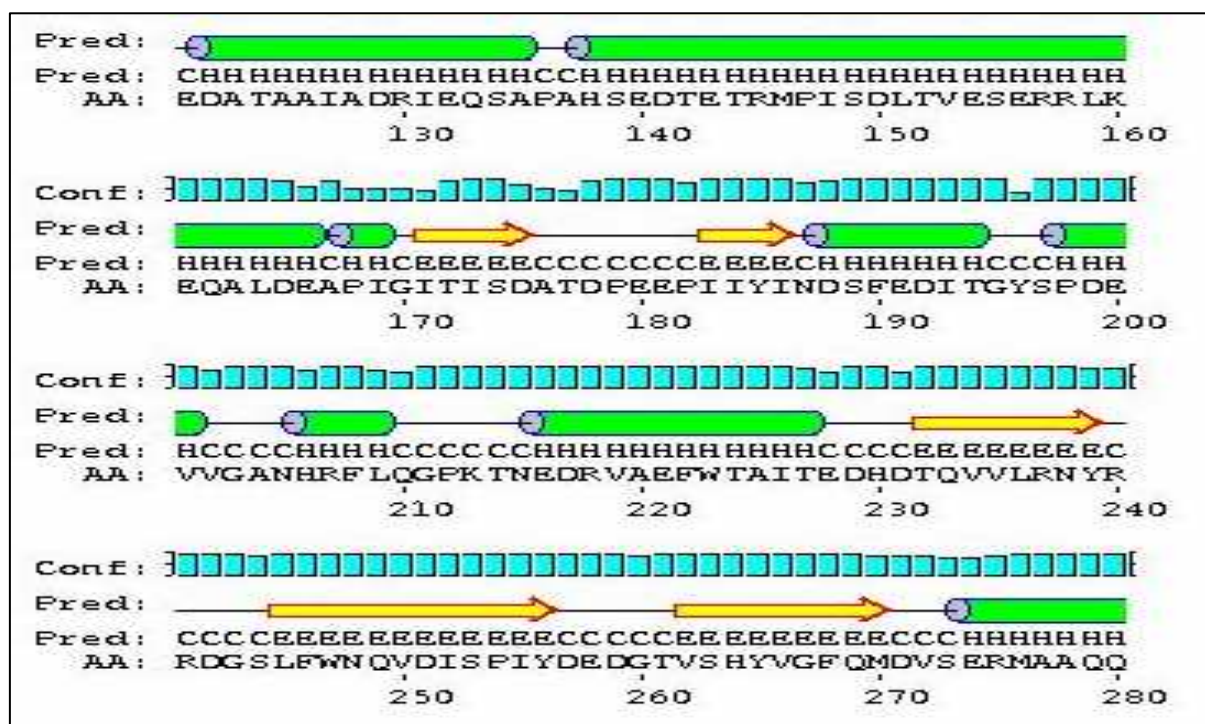


**>*L. reuteri* (AS 1 - 96)**

MLETANWIQKYFNQSPDAIFLFRKNDLLVSNEPAQRLVTMLNLDVNYLLQIGKNAWSQLEND  
DCASCLIK KRLKGAAVPITFHSNATHPFHFSMVY

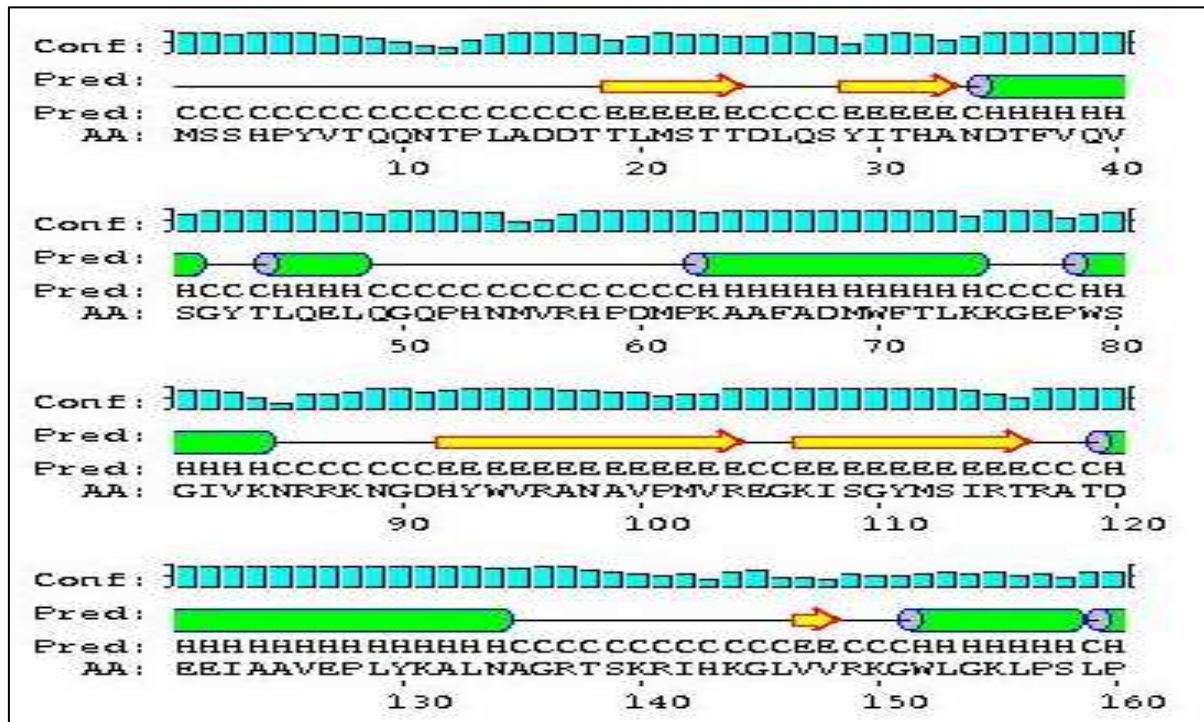
**>*H. salinarium* Bat (AS 139 - 270)**

SEDTE TRMPI SDLTVESERRLKEQALDEAPIGITISDATDPEEPIIYINDSFEDITGYSPDE  
VVGANHRFLQGPKTNEDRVAEFWTAITEDHDTQVVLNRNYRRDGSFLFNQVDISPIYDEDGTV  
SHYVGFQM

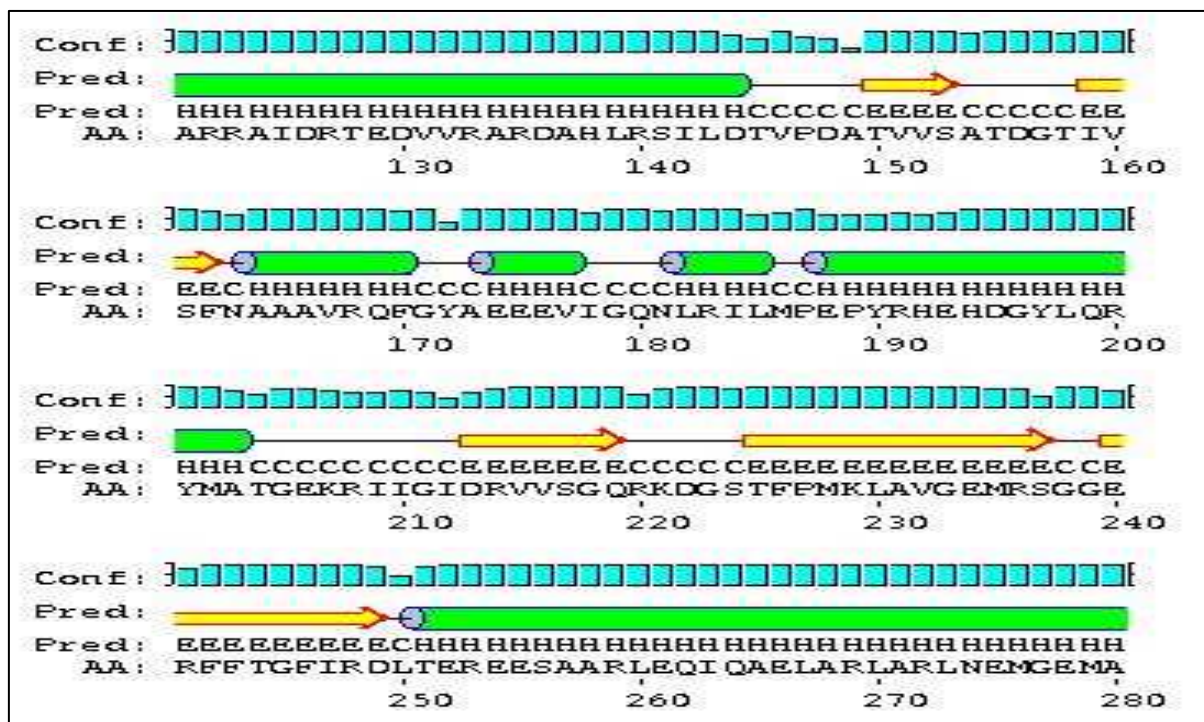


**>*E. coli* Aer (AS 1 - 116)**

MSSHYPVTQQNTPLADDTTLMSTTDLQSYITHANDTFVQVSGYTLQELQGQPHNMVRHPDMP  
KAAFADMWFTLKKGEPWSGIVKNRRKNGDHYWVRANAVPMVREGKISGYMSIRT

**>*R. melioli* FixL (AS 122 - 249)**

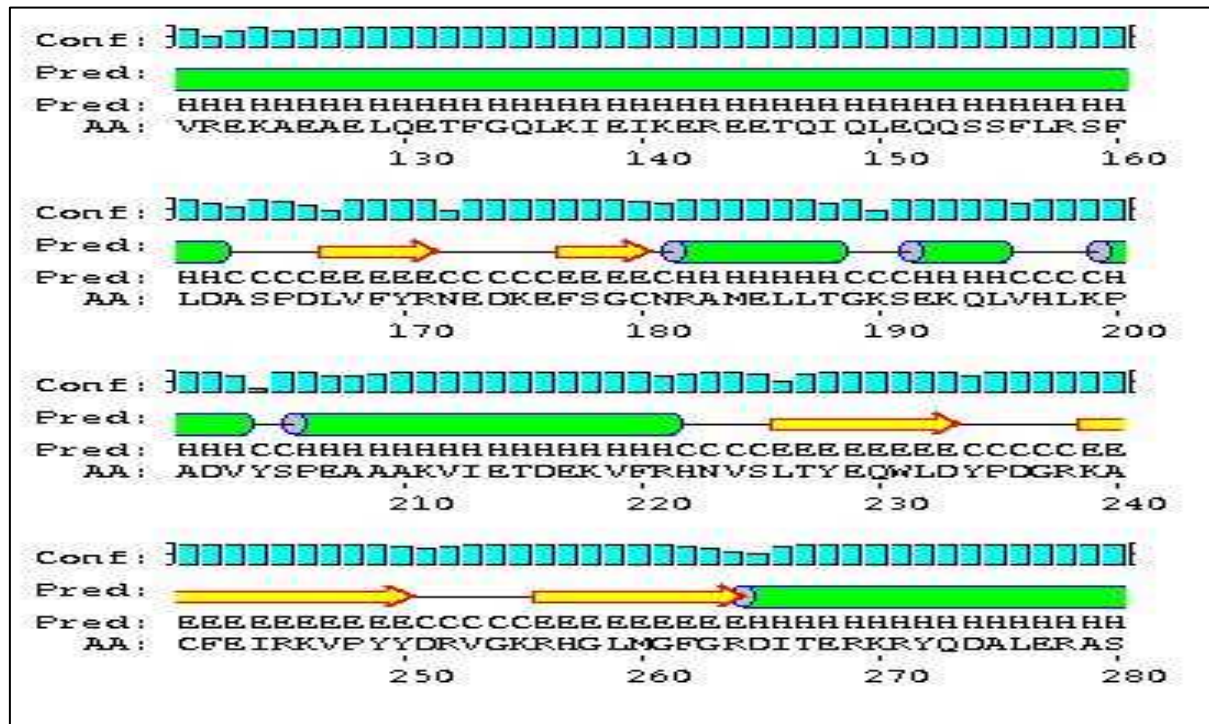
RRAIDRTEDVVRARDAHLRSILDTPVDPATVVSATDGTIVSFNAAAVRQFGYAEVEEVIGQNL  
ILMPEPYRHEHDGYLQRYMATGEKRIIGIDRVVSGQRKDGSTFPMKLAVGEMRSGGERFFFTG  
FIRD





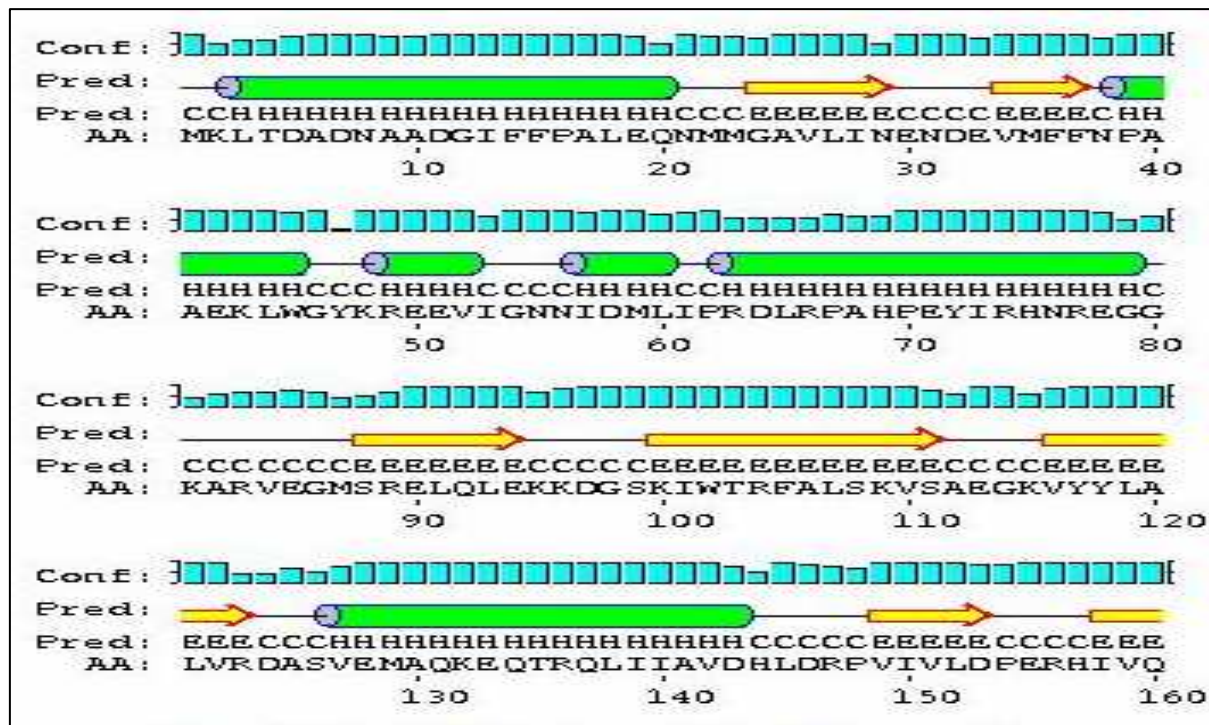
>*E. coli* ArcB (AS 139 - 264)

EIKEREETQIQLEQQSSFLRSFLDASPDLVFYRNEDEKESGCNRAMELLTGKSEKQLVHLKP  
ADVYSPEAAAKVIETDEKVFRHNVSILTIEQWLDYPDGRKACFEIRKVPYYDRVGKRHGLMGF  
GR



>*E. coli* Dos (AS 1 - 123)

MKLTDADNAADGIFFPALQNMVGAVLINENDEVMFFNPAAEKLGWYKREEVIGNNIDMLIP  
RDLRPAHPEYIRHNREGGKARVEGMSRELQLEKKDGSKIWTRFALSKVSAEGKVYYLALVR



>*A. xylinus* PDEA1 (AS 1 - 126)

MPDITALTTEILLPALEQAIDATVIIIGQENEIIIFYNQAAESLWGIPRADVIGRNVDCLVPTRLRHEHNDRYIDRNR  
 ETGHNRIVGTSSREVEFTRADGEYICGELSLSKVQIGQGDKRLTTYMGVM

