

Aktivierung des Sauerstoffsensors FNR von *Escherichia coli* durch Glutathion *in vivo* und *in vitro*

Dissertation
zur Erlangung des Grades
"Doktor
der Naturwissenschaften"

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Quang Hon Tran
geb. in Long An (Vietnam)

Mainz, 2000

Tag der mündlichen Prüfung: 2000

Inhaltsverzeichnis	Seite
1 Zusammenfassung.....	2
2 Einleitung.....	3
3 Material und Methoden.....	10
3.1 <i>E. coli</i> K-12 Stämme.....	10
3.2 Medien.....	10
3.3 Zucht von <i>Escherichia coli</i>	11
3.4 Isolierung von FNR-Protein unter anoxischen Bedingungen.....	12
3.5 Bestimmung des Gehaltes an reduzierten Cysteinresten in anaerobem und aerobem apoFNR.....	15
3.6 Isolierung von NifS _{AV}	16
3.7 Rekonstitution von FNR.....	17
3.8 Absorptionsspektroskopie.....	18
3.9 Das Phosphorylierungspotential $\Delta G'_{\text{phos}}$	18
3.10 Messung des cytoplasmatischen Volumens.....	21
3.11 Bestimmung des Membranpotential $\Delta\Psi$	23
3.12 Messung von ΔpH und Berechnung des Protonenpotentials $\Delta\text{p}...$	25
4 Ergebnisse.....	26
4.1 Reduktive Aktivierung von FNR durch Glutathion Glutathion, Glutathion-Reduktase und Glutaredoxine.....	26 27
<i>In vivo</i> Untersuchungen des Aktivitätszustandes von FNR.....	28
Isolierung von FNR.....	32
Anreicherung von NifS _{AV}	36
Untersuchungen an isoliertem FNR <i>in vitro</i>	38
4.2 Energetische Parameter von <i>Escherichia coli</i> in der aeroben und anaeroben Atmung und in der Fermentation.....	46 47
Das Phosphorylierungspotential $\Delta G'_{\text{phos}}$	47
Das Membranpotential $\Delta\Psi$ und das Protonenpotential $\Delta\text{p}...$	53
5 Diskussion.....	57
5.1 Glutathion als Reduktionsmittel für die Bildung von $[4\text{Fe}_4\text{S}]^{2+}\cdot\text{FNR}$	57
5.2 Änderungen der energetischen Parameter im aeroben und anaeroben Stoffwechsel.....	60
6 Veröffentlichungen.....	64
7 Literatur.....	65

1. Zusammenfassung

Der Sauerstoffsensor FNR (Fumarat-Nitratreduktase-Regulator) von *Escherichia coli* spielt eine wichtige Rolle beim Umschalten vom aeroben zum anaeroben Stoffwechsel. FNR ist ein Transkriptionsregulator, der im aktiven Zustand ein [4Fe4S]-Zentrum besitzt. Bei Kontakt mit O₂ zerfällt das [4Fe4S]- zu einem [2Fe2S]-Zentrum. Weitere Inkubation mit O₂ führt zur Bildung von FeS-freiem FNR (apoFNR) und Verlust der Aktivität. Die Reaktionen, die zum Aufbau des [4Fe4S]-Zentrums und der reduktiven Aktivierung von apoFNR führen, wurden *in vivo* und *in vitro* untersucht. In einer *gshA*-Mutante, die kein Glutathion enthält, nahm der regulatorische O₂-Partialdruck, bei dem eine halbmaximale Expression FNR-abhängig regulierter Gene zu beobachten war, gegenüber dem Wildtyp um den Faktor 4 bis 5 ab. Dies spricht für einen Einfluß von Glutathion auf den funktionellen Zustand von FNR. Bei der Rekonstitution des [4Fe4S]-Zentrums in isoliertem apoFNR konnte Glutathion als Reduktionsmittel für die Bildung und den Einbau von Sulfid aus Cystein durch die Cystein-Desulfurase (NifS) verwendet werden. O₂-inaktiviertes FNR (apoFNR ohne FeS-Zentrum) konnte mit gleicher Effizienz zum [4Fe4S]-FNR rekonstituiert werden wie apoFNR, das unter anaeroben Bedingungen isoliert wurde. Diese Experimente zeigen eine wichtige Rolle von Glutathion bei der *de novo* Assemblierung von [4Fe4S]-FNR und bei der reduktiven Aktivierung von O₂-inaktiviertem FNR.

Die energetischen Parameter von *E. coli* und ihre Änderungen beim Übergang vom aeroben zum anaeroben Stoffwechsel wurden untersucht. Das elektrochemische Protonenpotential Δp über der Cytoplasmamembran wurde im Gleichgewichtszustand in der Respiration mit O₂, Nitrat, Fumarat, Dimethylsulfoxid (Me₂SO) und in der Fermentation bestimmt. Δp betrug in der aeroben Atmung -160 mV, in der anaeroben Nitrat-, Fumarat- oder Me₂SO-Atmung sank Δp entgegen früheren Vermutungen lediglich um 20 mV. Allein in der Fermentation fiel die Abnahme mit ca. 40 mV deutlich stärker aus. Unter all den genannten Bedingungen trug das Membranpotential ($\Delta \Psi$) den größten Anteil zum Protonenpotential bei. Der zelluläre ATP-Gehalt war in der aeroben Respiration mit 13 $\mu\text{mol/g}$ Trockengewicht am höchsten, und fiel in der anaeroben Atmung auf 3-6 $\mu\text{mol/g}$ ab. Das Phosphorylierungspotential ($\Delta G'_{\text{phos}}$), das durch das Verhältnis des ATP-Gehaltes zum ADP-Gehalt bestimmt wird, blieb beim Übergang von der aeroben zur anaeroben Atmung unverändert, da der ADP-Gehalt um den gleichen Anteil wie der ATP-Gehalt abnahm. Die energetischen Verhältnisse (Δp , $\Delta G'_{\text{phos}}$) in der anaeroben und aeroben Atmung sind also miteinander vergleichbar. Lediglich in der Fermentation wurde eine deutliche Abnahme von Δp beobachtet. Die energetischen Parameter $\Delta G'_{\text{phos}}$ und Δp können wegen der geringen Änderungen deshalb vermutlich nicht als regulatorisches Signal für das Umschalten vom aeroben zum anaeroben Stoffwechsel genutzt werden.

Einleitung

Der Sauerstoffsensor FNR von *Escherichia coli*: Kontrolle des Funktionszustandes durch Sauerstoff und Reduktionsmittel

Das Enterobacterium *Escherichia coli* ist in der Lage zwischen aerobem und anaerobem Stoffwechsel umzuschalten (Gunsalus, 1992; Uden & Bongaerts, 1997). Dieses Umschalten erfolgt dabei hauptsächlich auf der Ebene der Transkription. Mehr als 200 Gene werden durch die Verfügbarkeit von O₂ in der Genexpression positiv oder negativ beeinflusst (Uden und Trageser, 1991; Uden *et al.*, 1995). Das Fehlen von O₂ wird unter anderem durch den Genregulator FNR (fumarat and nitrate respiration) erkannt.

FNR reguliert hauptsächlich Gene des anaeroben Stoffwechsels und aktiviert so die Expression von Genen der anaeroben Atmung, des Substrattransports und der Biosynthese von Coenzymen des anaeroben sowie fermentativen Stoffwechsels (Uden *et al.*, 1995; Gunsalus, 1992; Spiro & Guest 1990). Reprimiert durch FNR werden einige Gene der aeroben Atmung. FNR ist daher ein wichtiger Regulator, der es *Escherichia coli* ermöglicht, seine Enzymausstattung der Verfügbarkeit von O₂ anzupassen.

Die Primärstruktur von FNR weist eine große Ähnlichkeit zu dem CAP-Protein (catabolite gene activator protein) auf. Aufgrund der Sequenzähnlichkeiten von FNR zu CAP wurde für FNR ein räumliches Modell postuliert (Spiro und Guest, 1990), das sich an die dreidimensionale Struktur von CAP anlehnt, die durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt werden konnte (Weber und Steiz, 1987). Beide Proteine bestehen aus drei Domänen. FNR besitzt, wie CAP, ein *Helix-Turn-Helix* DNA Bindemotiv am C-terminus, eine Dimerisierungsdomäne und eine Nukleotidbindedomäne.

Im Unterschied zum CAP-Protein, das cycloAMP als Effektor bindet, konnte eine Bindung von Nukleotiden an FNR bisher nicht nachgewiesen werden (Unden und Duchene, 1987). Ein weiterer Unterschied besteht darin, daß FNR im Gegensatz zum CAP-Protein am N-terminus ein FeS-Zentrum trägt, das für die Sauerstoff-Erkennung verantwortlich ist (Abb. 1) (Green *et al.*, 1993; Khoroshilova *et al.*, 1997). Da die Sensordomäne und die Regulatordomäne (DNA-Bindedomäne) in einem Protein realisiert sind, wird FNR zu den Ein-Komponenten-Regulatoren gezählt (Unden *et al.*, 1995).

Die Konzentration von FNR ist in aeroben und anaeroben Zellen ähnlich (Unden & Duchene, 1987). Da der Regulator jedoch nur unter anaeroben Bedingungen aktiv ist, bedeutet dies, daß ein Funktionswechsel von FNR in Abhängigkeit vom O₂-Angebot stattfindet (Engel *et al.*, 1991; Lazazzera *et al.*, 1993). Eine wichtige Rolle bei diesem Funktionswechsel von FNR spielt ein FeS-Zentrum, das von vier essentiellen Cysteinresten (Cys₂₀, Cys₂₃, Cys₂₉, Cys₁₂₂) koordiniert wird und die Anwesenheit von O₂ registriert (Trageser und Unden, 1989; Green *et al.*, 1993; Khoroshilova *et al.*, 1995; Melville und Gunsalus, 1996).

Aktives FNR bindet als Dimer an die DNA und kontrolliert so die Genexpression. Es enthält in der aktiven Form ein [4Fe4S]²⁺-Zentrum (Abb. 1). Neben dieser aktiven Form wurden drei inaktive Formen von FNR nachgewiesen, die ein [2Fe2S]²⁺-Zentrum, ein [3Fe4S]⁺-Zentrum oder kein FeS-Zentrum (apoFNR) enthalten (Khoroshilova *et al.*, 1997; Jordan *et al.*, 1997). FNR mit dem [2Fe2S]²⁺-Zentrum scheint die physiologisch wichtigste Form von inaktivem FNR zu sein, die durch Reaktion von aktivem [4Fe4S]²⁺-FNR mit O₂ entsteht. FNR mit dem [3Fe4S]⁺-Zentrum wird durch Inkubation mit Sauerstoff nur im geringem Maße gebildet. Diese Form entsteht auch *in vitro* durch Inkubation mit Ferricyanid. Sie stellt jedoch wahrscheinlich eine unphy-

siologische, inaktive Form dar (Khoroshilova *et al.*, 1997). Längere Sauerstoffexposition führt zu einem völligen Verlust des FeS-Zentrums.

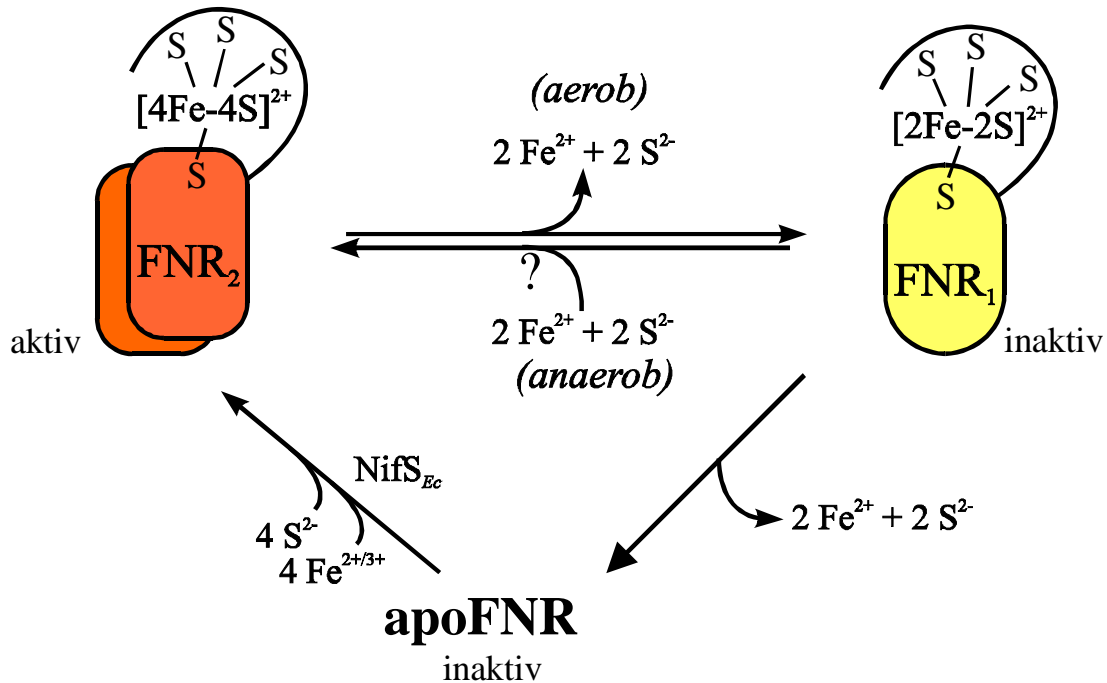


Abb. 1 Modell zur Funktion von FNR als O₂-Sensor: Verschiedene physiologische Formen des FNR-Proteins von *E. coli*. Das Modell zeigt die verschiedenen Formen von FNR. Die aktive Form ([4Fe4S]²⁺·FNR) wird durch O₂ in zwei Schritten über [2Fe2S]²⁺·FNR in apoFNR umgewandelt (oxidative Inaktivierung). ApoFNR, möglicherweise auch [2Fe2S]²⁺·FNR, kann in Abwesenheit von O₂ und in Gegenwart von Reduktionsmitteln wieder zu [4Fe4S]²⁺·FNR rekonstituiert werden (reduktive Aktivierung) (Tran *et al.*, 2000).

Der Zerfall des [4Fe4S]²⁺ Zentrums bei einer Inaktivierung durch O₂ ist gut untersucht (Khoroshilova *et al.*, 1995; Green *et al.*, 1996; Lazazzera *et al.*, 1996; Khoroshilova *et al.*, 1997). Weniger Beachtung wurde hingegen der Bildung von aktivem FNR geschenkt. [4Fe4S]²⁺·FNR kann aus anaerobem apoFNR mit Cystein, Cystein-Desulfurase (NifS), Fe²⁺-Ionen und DTT als Reduktionsmittel rekonstituiert werden (Khoroshilova *et al.*, 1995; Lazazzera *et al.*, 1996). Cystein Desulfurase bildet in Anwesenheit von Reduktionsmitteln aus Cystein Sulfid, welches in das FeS-Zentrum eingebaut wird. Zusätzlich gibt es aber Hinweise, daß auch O₂-inaktiviertes FNR ([2Fe2S]²⁺·FNR, O₂-inaktiviertes apoFNR) wieder zu aktivem FNR reaktiviert werden

kann (Engel *et al.*, 1991; Khoroshilova *et al.*, 1995). Diese Prozesse werden im Gegensatz zur oxidativen Inaktivierung als reduktive Aktivierung bezeichnet. Es war jedoch unklar, ob O₂-inaktiviertes apoFNR zu [4Fe4S]²⁺-FNR rekonstituiert werden kann, und welche Reduktionsmittel in der Zelle für die reduktive Aktivierung verwendet werden.

Ziel der Arbeit war es, die Faktoren und Reaktionen zu identifizieren, die für die reduktive Aktivierung wichtig sind. In der Arbeit sollte untersucht werden, welches Reduktionsmittel für diesen Zweck in der Zelle genutzt wird, und welche Reduktionsmittel für die Reaktivierung von O₂-inaktiviertem apoFNR verwendet werden.

Ein wichtiges, zelluläres Reduktionsmittel ist reduziertes Glutathion. Glutathion ist ein Tripeptid (Gly-Cys-Glu) mit einer freien SH-Gruppe und dient als Sulfhydrylpuffer, der die Cysteinreste in Proteinen im reduzierten Zustand hält. *E. coli* besitzt einen hohen Gehalt an Glutathion (intrazelluläre Konzentration ca. 5 mM), der fast gänzlich in reduziertem Zustand vorliegt (Kosower & Kosower, 1978). Das Verhältnis von reduziertem zu oxidiertem Glutathion in *E. coli* beträgt zwischen 50:1 und 200:1 (Hwang *et al.*, 1992). Daher sollte getestet werden, ob Glutathion auch an der Synthese von aktivem FNR beteiligt ist. Diese Untersuchungen wurden zunächst *in vivo* durchgeführt. Nachdem *in vivo* Messungen eine wichtige Rolle von Glutathion zeigten, wurde diese *in vitro* mit isoliertem FNR überprüft. Die Bedeutung von reduziertem Glutathion für die reduktive Aktivierung von FNR soll in der Arbeit *in vitro* näher beleuchtet werden.

Um die Untersuchungen zu der reduktiven Aktivierung von FNR durchführen zu können, war es nötig, FNR schnell und in größeren Mengen zu isolieren. Dazu wird FNR als Fusionsprotein exprimiert. Der Proteinanhang ist die Glutathion-S-Transferase, die eine schnelle affinitätschromatographische Isolierung von FNR ermöglicht.

Energetische Parameter von *Escherichia coli* im aeroben und anaeroben Stoffwechsel: Regulatorisches Signal für Aerobiose und Anerobiose?

In einem zweiten Teil beschäftigt sich die Arbeit mit dem energetischen Status von *E. coli* im aeroben und anaeroben Stoffwechsel und seiner Bedeutung für die Physiologie und Regulation der Zelle. Der energetische Status wird hauptsächlich durch zwei Parameter, das Phosphorylierungspotential $\Delta G'_{\text{phos}}$ und das Protonenpotential Δp , charakterisiert (Skulachev, 1992). Das Phosphorylierungspotential $\Delta G'_{\text{phos}}$ wird aus den Gehalten der Zellen an ATP, ADP und Phosphat berechnet. Es ist also ein direktes Maß für den Energiezustand der Zelle. Das elektrochemische Protonenpotential Δp setzt sich aus dem Membranpotential $\Delta\Psi$ und dem pH-Gradienten ΔpH über der Membran zusammen.

Das Protonenpotential wird durch den Protonen-Efflux in der aeroben und anaeroben Atmung gebildet. Die Energie für den Protonen-Efflux stammt aus dem Elektronentransport. In dem Elektronentransport werden die Elektronen auf eine Reihe von verschiedenen Elektronenakzeptoren übertragen (Unden *et al.*, 1994; Tran *et al.*, 1997). Der terminale Elektronenakzeptor in der aeroben Atmung ist O_2 , in der anaeroben Atmung sind es unter anderen auch Nitrat, Fumarat, Trimethyl-N-Oxid (TMAO) und Dimethylsulfoxid (DMSO).

Die Energieausbeute in der aeroben und anaeroben Atmung differieren stark. Die freie Energie (ΔG^0) für die Oxidation von Glukose (Elektronendonator) in der aeroben Atmung beträgt -2830 kJ/mol Glukose, in der anaeroben Atmung nur noch -858 kJ/mol Glukose mit Nitrat oder -550 kJ/mol Glukose mit Fumarat als terminalen Elektronenakzeptor (Unden *et al.*, 1994; Unden und Bongaerts, 1997). Diese Ergebnisse kommen durch die unterschiedlichen Redoxpotentiale (ε_0') der Elektronenakzeptoren zustande. Sie reichen von $\varepsilon_0' = +820$ mV für O_2 über $\varepsilon_0' = +420$ mV für Ni-

trat bis hin zu $\varepsilon_0' = +30$ mV für Fumarat. Je größer die Redoxpotentialdifferenz zwischen Elektronenakzeptor und Elektronendonator, desto größer ist auch die theoretisch maximale Menge an freier Energie. Da mit dieser Energie das Protonenpotential aufgebaut wird, wurde angenommen, daß der Unterschied in der Energieausbeute zwischen aerober und anaerober Atmung auch das Protonenpotential absenkt (Hellingwerf *et al.*, 1981).

$\Delta G'_{\text{phos}}$ und Δp stellen wichtige Parameter für den energetischen Zustand der Zelle dar. Da also vermutet wurde, daß das Protonenpotential mit dem Redoxpotential der Elektronenakzeptoren korreliert, wurde deshalb immer wieder postuliert, daß diese von der Zelle auch als Signale oder Kenngrößen für aerobes und anaerobes Wachstum genutzt werden und das Umschalten vom aeroben zum anaeroben Wachstum auslösen (Bogachev *et al.*, 1993; Bogachev *et al.*, 1995). Ein wichtiges Regulationssystem, das für diesen Umschaltprozeß benötigt wird, stellt neben dem FNR-Protein das ArcBA Zweikomponenten-Regulationssystem dar. Während für das FNR-Protein bereits einiges zur Erkennung des regulatorischen Signals, O_2 , bekannt ist, ist das für ArcBA nicht der Fall. Das ArcBA-System besteht aus einem membranständigen Sensor (ArcB) und einem cytoplasmatischen Regulator (ArcA), der durch ArcB in seiner Funktion kontrolliert wird. ArcB reagiert nicht direkt mit O_2 , deshalb wurde angenommen, daß ArcB eine Größe mißt, die in den Bakterien direkt von O_2 abhängt. Wegen der Lokalisation von ArcB in der Membran könnte es sich bei dieser Größe um Δp , $\Delta\Psi$ oder ΔpH handeln.

Die Parameter $\Delta G'_{\text{phos}}$ und Δp ($\Delta\Psi + \Delta pH$) sind in *E. coli* vielfach bestimmt worden (Cole *et al.*, 1967; Hellingwerf *et al.*, 1981; Kashket *et al.*, 1981, 1982, 1983). Die Ergebnisse konnten die Frage nach Änderungen dieser energetischen Parameter in der aeroben und anaeroben Atmung aber nicht klären, da die Resultate aufgrund

verschiedener Methoden stark schwankten und widersprüchlich waren (Hellingwerf *et al.*, 1981). Außerdem wurden in keiner Arbeit die Werte für alle Bedingungen vergleichend gemessen. Direkte Vergleiche sind für solche Parameter sehr wichtig, da sie sehr empfindlich auf unterschiedliche, physiologische Verhältnisse und Meßbedingungen ansprechen. Darüberhinaus wurde in dem anaeroben Bakterium *Wolinella succinogenes* gezeigt, daß das Protonenpotential nicht mit der Redoxpotential der Elektronenakzeptoren korreliert. Δp blieb in der Nitratatmung ($\epsilon_0' = +420$ mV) oder der Fumaratatmung ($\epsilon_0' = +30$ mV) konstant bei etwa -170 mV (Wloczyk *et al.*, 1989; Mell *et al.*, 1986).

Um ein aussagekräftiges Gesamtbild zu erhalten, sollten in der Arbeit $\Delta G'_{\text{phos}}$ und Δp der aeroben und anaeroben Atmung und der Fermentation von *E. coli* vergleichend bestimmt werden. Die Bestimmung dieser Parameter unter den entsprechenden Bedingungen sollte damit auch die Frage beantworten, ob Δp , $\Delta \Psi$ und ΔpH ausreichenden Änderungen unterworfen sind, um eine Signalfunktion für aerobe und anaerobe Verhältnisse übernehmen zu können.

3. Material und Methoden

3.1 *E. coli* K-12 Stämme

Stämme	Relevanter Genotyp	Quelle / Referenz
AN387	Wildtyp	Wallace & Young (1977)
CAG627 pMW68	pGEX 4T-1 mit <i>gst'</i> - <i>fnr</i>	Holighaus, 1998
BL21(DE3) pNifS	NifS (<i>Azotobacter vinelandii</i>) Expressionsstamm	Zheng <i>et al.</i> , 1993

3.2 Medien

Komplexmedium:

LB-Medium (Sambrook *et al.*, 1989)

10 g/l Pepton (Gibco, Nr. 140)

5 g/l Yeast-Extract (Gibco)

5 g/l NaCl

LB-Agar

LB-Medium + 15 g/l Agar

2 x YTG-Medium (U.S.E. Mutagenese Kit, Pharmacia)

16 g/l Pepton (Gibco, Nr. 140)

10 g/l Yeast-Extract (Gibco)

5 g/l NaCl

2 % Glucose

M9-Medium (Miller, 1992)

Stammlösung

6 g/l Na₂HPO₄

3 g/l KH₂PO₄

0,5 g/l NaCl

1 g/l NH₄Cl

Zusätze für das M9-Medium

10 ml/l CaCl₂, 10 mM

1 m/l MgSO₄, 1M

Aminosäurezusatz für das M9-Medium

10 ml/l Säurehydrolysiertes Casein, 10 % (Serva, No. 48614)

5 ml/l L-Tryptophan, 1 %

Ansetzen nach Miller (Miller, 1992), bei Bedarf Zusätze steril zufügen.

C-Quelle

Glucose

Glycerin

Elektronenakzeptoren

je 50 mM Fumarat, Nitrat,

Trimethylamin-N-Oxid (TMAO), Dimethylsulfoxid (DMSO)

Antibiotikazusätze

100 µg/ml Ampicillin

3.3 Zucht von *Escherichia coli*

Für Vorkulturen (5 ml) wurden die Bakterien in LB-Medium über Nacht gezüchtet, dem nach Bedarf Antibiotika zugesetzt wurden. Angeimpft wurden für aerobe und anaerobe Kulturen jeweils mit 1 % Inokulum aus einer unter den gleichen Bedingungen gezogenen Vorkultur. Die aeroben Hauptkulturen wurden in Kolben mit Schikanten bei 37°C unter Schütteln (200 U/min) durchgeführt. Das Kulturvolumen betrug ca. 10 % des Gefäßvolumen. Für die anaeroben Zuchten, ebenfalls bei 37°C, wurden Glasgefäße mit Gummistopfen verwendet (Müller-Krempel-Flaschen), in denen die Luft durch Stickstoff ersetzt wurde. Dazu wurde das Gefäß mit einer Vakuumpumpe evakuiert und anschließend mit Stickstoff begast. Diese Behandlung wurde mindestens dreimal durchgeführt. Zwischen der Pumpe und dem Glasgefäß waren Sterilfilter geschaltet. Die Glasgefäße wurden anschließend in ein Wasserbad oder einen Brutschrank gestellt.

Für die Überexpression von FNR-Protein wurden die Zellen in 2 x YTG-Medium (1,2 L) aerob mit Ampicillin gezüchtet. Die Kulturen wurden bei $OD_{578} = 0,7 - 0,9$ mit 1 mM IPTG induziert. Danach wurden sie für weitere zwei Stunden bis zur OD_{578} 1,3 bis 1,5 inkubiert. Für die Überexpression von NifS_{Av} erfolgte die Zucht in LB-Medium (1,8 L) aerob mit Ampicillin (ohne zusätzliche C-Quelle). Die Induktion mit 1 mM IPTG erfolgte bei $OD_{578} = 0,8 - 1,0$. Danach wurden sie für weitere zwei Stunden bis zur OD_{578} 1,4 bis 1,5 inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren (Sorvall Zentrifuge, RC-5B) bei 10 000 U/min und 4°C geerntet. Das so erhaltene Pellet wurde bei -75°C bis zur Verwendung gelagert. In der Regel betrug die Lagerungszeit nicht länger als 2 Wochen.

Für die Bestimmung des Phosphorylierungspotentials und des Membranpotentials wurden die Bakterien unter aeroben und anaeroben Bedingungen in supplementiertem M9-Medium (je 100 ml) gezüchtet. Die aeroben Kulturen enthielten 20 mM Glycerin, die anaeroben 40 mM Glycerin und 50 mM Fumarat, Nitrat, DMSO oder TMAO. Die Zucht unter fermentativen Bedingungen wurden mit 20 mM Glucose durchgeführt. Für die Bestimmung des Membranpotentials wurden die Zellen in der exponentiellen Phase geerntet. Die aerob gezüchteten Zellen wurden bei 10 000 U/min (Sorvall Zentrifuge, RC-5B) abzentrifugiert. Die anaeroben Kulturen wurden in 100 ml Müller-Krempel Flaschen verschlossen und mit Gummiansatz bei 5000 Upm im GSA-Rotor (Sorvall Zentrifuge, RC-5B) zentrifugiert. Mit diesen Zellen wurde in parallelen Ansätzen auch das cytoplasmatischen Volumen bestimmt.

3.4 Isolierung von FNR-Protein unter anoxischen Bedingungen

Alle Puffer und Lösungen wurden in Glasgefäßen mit Gummistopfen (Müller-Krempel-Flaschen) unter Rühren 3 mal 20 min lang evakuiert und anschließend mit

Stickstoff begast. Die so behandelten Puffer und Lösungen wurden im Anaerobenzelt (Coy) geöffnet und mindestens 12 Stunden auf dem Magnetrührer gerührt.

Puffer A 50 mM Tris/HCl pH 7,6
 10 % Glycerin (w/v)

Puffer B 50 mM Tris/HCl pH 7,6
 10 % Glycerin (w/v)
 200 mM NaCl

Puffer C 50 mM Tris/HCl pH 7,6

GST-Elutionspuffer 10 mM reduziertes Glutathion (Roth)

 100 mM NaCl in

 50 mM Tris/HCl pH 8

 festes Glutathion in Puffer lösen, Aliquots (10 ml) bei -20°C lagern

Hoch-pH-Puffer 100 mM Tris/HCl pH 8,5
 500 mM NaCl

Niedrig-pH-Puffer 100 mM Na-Acetat pH 4,5
 500 mM NaCl

Thrombin-Lösung 1 Unit / μl Thrombin (Pharmacia) in
 50 mM Tris/HCl pH 7,6

Alle nachfolgenden Schritte mit Ausnahme des Zellaufschlusses mit der French Press wurden bis zur Fertigstellung der Meßproben für die Absorptionsspektroskopie im Anaerobenzelt bei Raumtemperatur durchgeführt. Für die Reinigung wurden aerob gezogenen Zellen verwendet. Die bei -75°C gelagerten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und in das Anaerobenzelt mit einer Atmosphäre aus 95% N_2 , 5% H_2 und max 3 ppm O_2 geschleust. Die Zellen aus 1,2 L Kultur wurden in 50 ml Puffer A im Zelt resuspendiert und in den French Press-Zylinder gefüllt. Die Öffnung des Zylinders wurde mit einem Gummistopfen abgedichtet. Der Auslauf des Zylinders wurde mit einer Müller-Krempel-Flasche (100 ml) über einen gasdichten Gummischlauch

verbunden. Der Zylinder wurde samt Flasche aus dem Anaerobenzelt geschafft und an die French Press gebracht. Der Zellaufschluß erfolgte mit der French Press (French Pressure Cell-Press, SLM Amico) bei maximalem Druck ($1,2 \times 10^8$ Pa). Die aufgeschlossenen Zellen wurden in der Müller-Krempel-Flasche aufgefangen, die unter Druckausgleich (Kanüle) ebenfalls ständig mit Stickstoff gespült wurde.

Im Anaerobenzelt wurden die aufgeschlossenen Zellen in 40 ml Zentrifugenröhrchen umgefüllt, luftdicht (Schraubverschluß mit Gummidichtung) verschlossen und bei 10 000 U/min und 4°C für 20 min zentrifugiert (Sorvall SS-34).

Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand (Zellextrakt) in einem 50 ml Meßzylinder überführt und das Volumen bestimmt (ca. 45 ml). Ein Aliquot wurde zur Proteinbestimmung abgenommen. Der Zellextrakt wurde auf eine Glutathion-Sepharose-Säule (Glutathion Sepharose 4B von Pharmacia) aufgetragen, die mit 10-20 ml anaerobisiertem Puffer A äquilibriert worden war. Die Säule (11 x 66 mm, 1,5 ml Bettvolumen, Pharmacia) wurde nach Herstellerangaben gegossen. Für den Durchlauf des Zellextraktes wurde eine peristaltische Pumpe (LKB, Varioperpex 12.000) mit einer Geschwindigkeit von 0,35 – 0,40 ml/min verwendet.

Mit derselben Geschwindigkeit erfolgte das Waschen der Säule mit 15 ml anaerobisiertem Puffer B. Danach wurde 1 ml verdünnte Thrombinlösung (insgesamt 50 Units in Puffer B) durch die Säule durchlaufen gelassen und das Eluat aufgefangen. Die Prozedur wurde noch zweimal durchgeführt. Zum Schluß wurde das Eluat noch einmal auf die Säule gegeben und der Ablauf der Säule verschlossen. Die so vorbereitete Spaltung mit Thrombin erfolgte im Anaerobenzelt bei Raumtemperatur für drei Stunden.

Nach der Spaltung wurde FNR mit anaerobisiertem Puffer C unter Schwerkraftfluß von der Säule gewaschen und in 4 x 1 ml Fraktionen aufgefangen. Die beiden er-

sten Fraktionen enthielten das FNR (bis 35 μM bzw. 1 mg/ml). Die Glutathion-S-Transferase wurde mit 10-15 ml GST-Elutionspuffer von der Affinitätssäule eluiert. Zur Regeneration der Glutathion-Sepharose Säule wurden 5 ml Hoch-pH-Puffer, nach Ablauf dann 5 ml Niedrig-pH-Puffer auf die Säule aufgetragen und dieser Zyklus dreimal wiederholt. Abschließend wurde die Säule mit Puffer B überschichtet und bei 4°C bis zur nächsten Verwendung gelagert.

Isolierung von FNR unter oxischen Bedingungen

Für die Isolierung wurden aerob gezogenen Zellen verwendet. Die Reinigungsschritte beim aeroben FNR entsprechen denen bei der Isolierung von anaerobem FNR. Die Reinigung wurde unter aeroben Bedingungen bei Raumtemperatur mit nicht anaerobisierten Puffern durchgeführt.

3.5 Bestimmung des Gehaltes an reduzierten Cysteinresten in anaerobem und aerobem apoFNR

Bei diesem colorimetrischen Test bildet ein freier Cysteinrest (Thiolgruppe) mit DTNB (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoat)) einen farbigen Komplex, der photometrisch bei 412 nm nachweisbar ist (Ellman, 1959).

Meßansatz	0,65 ml FNR-Lösung (10-20 μM)
	0,67 ml Na-Phosphatpuffer (100 mM, pH 8,0)
	2,05 ml Bidest
	0,02 ml DTNB (10 mM, in obigem Na-Phosphatpuffer, frisch angesetzt)

Bereits nach 2 min tritt eine Gelbfärbung auf. Die Absorption wird bei 412 nm verfolgt und bleibt nach ca. 15 min konstant. Die Konzentration der Thiolgruppe in dem Meßansatz wird nach folgender Gleichung bestimmt:

$$C = A / \varepsilon \times D$$

C: Konzentration der Thiolgruppe

A: Absorption bei 412 nm

ε : Extinktionskoeffizient,

13 600 / M / cm

D = Verdünnungsfaktor

Der Gehalt an freien Cysteinresten wurde in anaerob und aerob isolierten apoFNR bestimmt. Anaerobes apoFNR wurde wie beschrieben mit und ohne DTT (5 mM DTT in den Reinigungspuffern A, B) gereinigt. Bei der aeroben Reinigung wurde kein Reduktionsmittel zugesetzt.

3.6 Isolierung von NifS_{Av}

Alle Schritte zur Isolierung von NifS_{Av} erfolgten unter aeroben Bedingungen bei 4°C. Die Zellen aus 1,8 L Kulturvolumen wurden in 10-15 ml 25 mM Tris/HCl pH 8,4 resuspendiert. Die Zellen wurden mit der French Press (1,2 x 10⁸ Pa) dreimal aufgeschlossen. Nicht aufgeschlossene Zellen und Zelltrümmer wurden bei 15 000 U/min bei 4°C für 20 min abzentrifugiert (Sorvall SS-34). Der Zellextrakt war deutlich gelb gefärbt.

Zu dem Zellextrakt wurden ca. 0,2 g/ml festes Streptomycin-Sulfat nach und nach unter ständigem, leichtem Rühren zugegeben. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation mit 13 000 U/min vom Extrakt abgetrennt. Die Gelbfärbung des Überstandes wurde kräftiger. Zu dem Überstand wurde Ammoniumsulfat (Endkonz. 25 %) unter ständigem Rühren hinzugegeben. Nach der Zugabe war nur in seltenen Fällen war ein winziges Pellet zu beobachten. Nach Zentrifugation (13 000 U/min) wurde der Extrakt mit 45 % Ammoniumsulfat fraktioniert. Die Zugabe erfolgt auch wieder nach und nach. Bereits nach der Hälfte der Menge an Ammoniumsulfat ist eine deutliche Ausfällung zu beobachten gewesen. Es entstand eine trübe, gelbliche Suspension.

Nach dem Abzentrifugieren (13 000 U/min) war der Extrakt nur noch zart gelb. Das Präzipitat dagegen war kräftig gelb und enthielt das NifS_{AV}-Protein.

Der NifS_{AV}-Extrakt wurde anschließend gegen 0,5 M Ammonium Sulfat Lösung für ca. 14 Stunden bei 4°C dialysiert. Ein Teil des NifS_{AV}-Extraktes wurde am selben Tag für die Rekonstitution von FNR verwendet, der Rest in kleinen Aliquots bei –75°C gelagert. Nach ca. einer Woche Lagerung verlor NifS_{AV} stark an Aktivität.

3.7 Rekonstitution von FNR

Für die Rekonstitution des [4Fe4S]²⁺ Zentrums von FNR wurden von dem Glutathion-Sepharose-Säule Eluat die erste und zweite Fraktion verwendet. Diese beiden wurden vereinigt und wurden auf mehrere Meßproben verteilt. Der Rekonstitutionsansatz bestand aus folgenden Komponenten:

FNR-Protein (600-800 µl, 0,7-0,9 µg Protein/µl entspricht 23 µM-30 µM FNR)
 2 mM Cystein
 10 mol Fe²⁺-Ionen / 1 mol FNR
 2-10 mM DTT
 oder
 2-10 mM reduziertes Glutathion
 Start der Assemblierungsreaktion mit
 10-20 µg NifS_{AV}-Extrakt-Protein (ca. 1 µg/µl)

Cystein: 0,5 M Stammlösung in anaerobisiertem Bidest, für jede Präparation frisch angesetzt

Fe²⁺: 0,1 M (NH₄)₂Fe(SO₄)₂ Stammlösung in anaerobisiertem Bidest, für jede Präparation frisch angesetzt

DTT: 1 M DTT Stammlösung in anaerobisiertem Bidest, in kleinen Aliquots (50 µl) bei –20°C gelagert, für jede Präparation ein neues Aliquot verwendet)

Glutathion: 0,5 M Stammlösung in anaerobisiertem Bidest, für jede Präparation frisch angesetzt)

Für die Rekonstitution von anaerobem apoFNR wurde der Reaktionsansatz im Anaerobenzelt angesetzt. Die FNR-Proteinlösung wurde in einer Quartz-Küvette (Halbmikro, Hellma) vorgelegt. Nach Zugabe der Zusätze und NifS_{AV} wurde die Küvette mit einem Gummistopfen luftdicht verschlossen und aus dem Anaerobenzelt gebracht. Die Probe ist für die spektroskopische Messung bereit.

Für die Rekonstitution von O₂-inaktiviertem apoFNR wurde die Lösung mit dem aerob isoliertem FNR-Protein anaerobisiert (siehe "Zucht von *Escherichia coli*"). Die FNR-Proteinlösung wurde ins Anaerobenzelt gebracht. Die nachfolgenden Schritte erfolgten wie oben beschrieben.

3.8 Absorptionsspektroskopie

Die Aufnahme einer Assemblierungskinetik dauerte bis zu zwei Stunden. Die Küvette wurde ca. alle 20 Minuten für ein paar Minuten wieder ins Zelt geschafft. Die Absorptionsspektren wurden auf dem Specord UV-VIS S10 (Zeiss) aufgenommen. Als Referenz diente ein entsprechend in einer Quartzküvette vorbereiteter Reaktionsansatz ohne FNR-Protein. Die Spektren wurden mit dem Programm "Aspect" (Zeiss) aufgenommen. Für die Aufbereitung der Daten und anschließende Auswertung wurde das Programm "Origin" (Version 5.0, Microcal) herangezogen.

Alle gezeigten Absorptionsspektren sind bereits gegen die Referenzprobe korrigiert. Für die Assemblierungskinetik wurden in Abständen von 2-5 min ein Absorptionsspektrum aufgenommen. Von jedem einzelnen Spektrum wurde der Absorptionsquotient $A_{420} : A_{280}$ berechnet und diese gegen die Zeit aufgetragen.

3.9 Das Phosphorylierungspotential $\Delta G'_{\text{phos}}$

$\Delta G'_{\text{phos}}$ wird mittels folgender Gleichung berechnet:

$$\Delta G'_{\text{phos}} = \Delta G^0 + RT \ln[\text{ATP}] / ([\text{ADP}] + [\text{P}_i]) \quad \Delta G'_{\text{phos}} = 30,5 \text{ kJ/mol}$$

In der Gleichung sind die Gehalte von ATP, ADP und Phosphat zu bestimmen. Die intrazelluläre $[P_i]$ wird unter allen Wachstumsbedingungen bei 10 mM (20 $\mu\text{mol/g}$ Trockengewicht) konstant gehalten (Rao *et al.*, 1993; Shulman *et al.*, 1979; Willsky & Malamy, 1976). Daher wurde auch mit diesem Wert gearbeitet. Die Gehalte von ATP und ADP wurden zu verschiedenen Zeiten des Wachstumsverlaufes unter den verschiedenen Wachstumsbedingungen bestimmt.

Bestimmung der ATP- und ADP-Gehalte

Vorbereitungen

Der Nachweis von ATP mit Hilfe der Bioluminescence ist eine bewährte Methode. Bei der Bioluminescence wird durch die Luciferase katalysierte, ATP verbrauchende Oxidation von Luciferin Licht emittiert. Die Lichterzeugung ist stöchiometrisch mit dem ATP-Umsatz verknüpft. Dieses Licht kann in einem Detektor (Luminometer) mit sehr großer Empfindlichkeit gemessen werden. Damit gelingt es, ATP auch in sehr niedrigen Konzentrationen quantitativ nachzuweisen.

In dem verwendeten ATP Bioluminescence Assay Kit HS II (Roche) kommt die Luciferase aus *Photinus pyralis* (amerikanischer Leuchtkäfer) zum Einsatz. Die Messung erfolgte in einem Luminometer (Biocounter 2010, Lumac/3M).

Da die Detektion mit dem Kit höchst sensitiv ist, können geringste ATP-Verunreinigungen, die in Spitzen, Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5 ml) und in dem Bidest-Wasser natürlich vorkommen, das Ergebnis verfälschen. Daher wurden grundsätzlich nur autoklavierte Gefäße und Lösungen verwendet. Für alle Lösungen, die direkt oder indirekt mit der Messung selbst zu tun haben, wurden nur quartzdestilliertes Bidest verwendet (Empfehlung Assay Kit).

Das Luminometer-Gerät arbeitet mit Plastikkuvetten (rund, 5 x 1 cm). Diese wurden über Nacht in 2 M HCl getaucht, danach gründlich mit Bidest gespült. Dann wurden die Küvetten bei 60°C getrocknet und bis zur Verwendung staubgeschützt gelagert.

Zellaufschluß

Die Probenvorbereitung ist dank eines schnellen Zellaufschlusses unkompliziert (persönliche Mitteilung Prof. Krämer, Köln). Es werden 180 µl DMSO in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß bei Raumtemperatur vorgelegt (Gefrierpunkt 18-20°C). Aus einer wachsenden Bakterienkultur (exponentielle oder stationäre Wachstumsphase) wurden 20 µl entnommen und sofort in die DMSO-Lösung gegeben. Dann wird die Lösung mit einer Gilson-Pipette dreimal aufgezogen und kurz angetippt. Danach werden sofort 800 µl eiskalter Puffer (25 mM HEPES, pH 7,75) dazugegeben. Die Probe ist für die Messung bereit. Sie wurde sofort verwendet oder bei -75°C gelagert und nach spätestens einer Woche gemessen.

Messung am Luminometer

Das ATP Assay Kit enthält u.a. das Luciferase-Luciferin Reagenz. Luciferin ist das Substrat der Luciferase.

1. Schritt

100 µl Luciferase-Luciferin Reagenz in der Küvette vorlegen. Da eine gewisse ATP-Kontamination in der Küvette nicht vermieden werden kann, kann die Aktivität bis zu 1000 Einheiten betragen. Der Wert nimmt kontinuierlich ab, da die ATP-Kontamination durch Reaktion mit dem Luciferase-Luciferin Reagenz abnimmt. Es wurde mit Messung fortgefahren, sobald der Wert unter 50 Einheiten sank.

2. Schritt

Dispenser am Gerät hochstellen, 100 µl von der vorbereiteten Probe (siehe Zellaufschluß) auf den Boden der Küvette geben (Küvette dabei im Meßraum lassen), Dis-

penser niederdrücken und Startknopf drücken. Bei allen Messungen wurde eine Integrationszeit von 10 Sekunden ausgewählt, d. h. die Einheiten wurden nach 10 sec abgelesen. Die Zeit zwischen der Zugabe der Probe und dem Drücken des Startknopfes ist entscheidend. Je länger dieser Zeitraum ist, desto niedriger ist der Wert nach der Integrationszeit von 10 Sekunden. Diese Zeitdauer konnte bei allen Messungen annähernd konstant gehalten werden.

Die Gehalte von ATP und ADP in den Proben wurden anhand von Eichgeraden bestimmt. Die Eichgerade wurde in einem Bereich zwischen 10^{-8} und 10^{-10} M ATP bestimmt. Der Gehalt von ADP wurde nach Umwandlung zu ATP in einer von der Pyruvat-Kinase katalysierten Bildung von Pyruvat aus Phosphoenolpyruvat gemessen (Spielmann *et al.*, 1981). Dazu wurde in einer Eichlösung, die ATP und ADP enthielt, die ATP-Konzentration ermittelt. Eine zweite Eichlösung, die ebenfalls beide Metabolite enthält, wurde mit Phosphoenolpyruvat und Pyruvat für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Differenz in der ATP-Konzentration zwischen der ersten und der zweiten Eichlösung ist die Konzentration an ADP. Auf die gleiche Weise wurden mit den Proben verfahren.

3.10 Messung des cytoplasmatischen Volumens

Das cytoplasmatische Volumen wird für die Berechnung der intrazellulären Konzentration von TPP^+ bei der Bestimmung des Membranpotentials verwendet. Die Bestimmung des Innenvolumens der Zellen erfolgte mit Hilfe von ^{14}C -Taurin als impermeablem Marker zur Messung des extrazellulären Raumes und $^3\text{H}_2\text{O}$ als permeablem Marker (Rottenberg, 1979). Für die Bestimmung des cytoplasmatischen Volumens wurden Zellen nach EDTA-Behandlung (siehe "Bestimmung des Membranpotentials $\Delta\Psi$ ") verwendet.

Um die Zellen von dem umgebenden Medium zu trennen, wird eine Silikonölzentrifugation durchgeführt. Dazu wurden Mikroteströhrchen (0,4 ml, Eppendorf) mit 30 μ l Perchlorsäure und anschließend mit 50 μ l Silikonöl (PN 200, Roth, 4130) gefüllt. Darüber wird die Zellsuspension gegeben und horizontal zentrifugiert (Mikrofuge, Beckman). Die Zellen können durch die Silikonölschicht wandern und befinden sich nach der Zentrifugation in der Perchlorsäure (Pellet). Der Puffer liegt auf der Ölschicht, Zellen und Lösung sind getrennt.

Ansatz zur Bestimmung des Zellinnenvolumens:

Reaktionsgefäß	2,5 μ l	$^3\text{H}_2\text{O}$	($1,2 \times 10^8$ Bq/ml, 1:10 verdünnt)
	10 μ l	^{14}C -Taurin	(3,38 MBq/ml, 1:5 verdünnt)
	10 μ l	10 mM Taurin	

Zu dem Ansatz wurde 470 μ l Zellsuspension gegeben und 2 min bei RT inkubiert. Jeweils 4 X 100 μ l wurden auf ein Silikonölröhrchen gegeben und zentrifugiert. Je 10 μ l des Überstandes wurde 1:5 verdünnt, und davon 10 μ l mit 3 ml Szintillator (Rotiszint ecoplus, Roth) gemessen. Um das Pellet aufzuarbeiten, wurde das Mikroteströhrchen auf der Höhe der Silikonölschicht durchgeschnitten und die Spitze umgekehrt in eine Eppendorf-Reaktionsgefäß (1 ml) gegeben. Anschließend wurde 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 780 μ l H_2O resuspendiert. 700 μ l der Suspension wurden in 3 ml Szintillator gemessen.

Die Tritium- und ^{14}C -Aktivitäten im Pellet (30 μ l Perchlorsäure mit Zellen) und im Überstand (100 μ l) wurden auf das gemeinsame Ausgangsvolumen (100 μ l) bezogen. Anschließend wurde der Innenraum (^3H -Volumen) und der Außenraum (^{14}C -Volumen) bestimmt.

$$^3\text{H}\text{-Volumen} = \frac{^3\text{H}\text{-Aktivität im Pellet}}{^3\text{H}\text{-Aktivität im Überstand}} \quad [\mu\text{l}/100\mu\text{l}]$$

$$^{14}\text{C}\text{-Volumen} = \frac{^{14}\text{C}\text{-Aktivität im Pellet}}{^{14}\text{C}\text{-Aktivität im Überstand}} \quad [\mu\text{l}/100\mu\text{l}]$$

Die Volumina wurden anschließend für die eingesetzte Zellmasse in 1 Liter [mg Trockengewicht/L] korrigiert.

$${}^3\text{H-Raum} = {}^3\text{H-Volumen} \times 10 / \text{Zellmasse} / \text{L} \quad [\mu\text{l}/\text{mg TG}]$$

$${}^{14}\text{C-Raum} = {}^{14}\text{C-Volumen} \times 10 / \text{Zellmasse} / \text{L} \quad [\mu\text{l}/\text{mg TG}]$$

Für die Berechnung des cytoplasmatischen Volumens [V_i] wird der ${}^{14}\text{C}$ -Raum vom ${}^3\text{H}$ -Raum subtrahiert.

$$V_i = {}^3\text{H-Raum} - {}^{14}\text{C-Raum}$$

3.11 Bestimmung des Membranpotentials $\Delta\Psi$

Das Membranpotential $\Delta\Psi$ wurde in EDTA-behandelten Zellen durch die Verteilung des lipophilen Kations [${}^{14}\text{C}$]-Tetraphenylphosphonium-Bromid (TPP^+) bestimmt.

Die Behandlung der Zellen mit EDTA wurde wie folgt durchgeführt. Nach dem Ernten wurden die Zellen (aus je 100 ml Kultur) mit Puffer (120 mM TrisHCl, pH 8,0) zweimal gewaschen und in demselben Puffer mit einer OD_{578} von 3 bis 4 aufgenommen. Dann wurde EDTA (1 mM, pH7) zugegeben und die Suspension für 15 min bei 37°C unter gelegentlichem leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit HEPES-Puffer (200 mM, pH 7,5) gewaschen und in demselben Puffer mit einer OD_{578} von 4 aufgenommen. Mit den EDTA-behandelten Zellen wurden in parallelen Ansätzen das Membranpotential und das cytoplasmatische Volumen bestimmt.

Die Verteilung von TPP^+ in den Zellen wurde unter denselben Bedingungen gemessen, die auch im Wachstum vorgelegen haben. Bei den aerob gezogenen Zellen wurden 500 μl Zellsuspension nach EDTA-Behandlung in einem kleinen Glasgefäß mit dem Wuchssubstrat und TPP^+ bei 37°C für 15 min inkubiert. Dabei tauchte eine Kanüle in die Suspension ein, durch die Luft angesaugt wurde. Dadurch wird Luftsauerstoff in die Suspension eingetragen. Bei den anaerob gezüchteten Zellen wur-

den die EDTA-Behandlung und die Inkubation (37°C Heizblock) mit Wuchssubstrat und TPP⁺ unter anoxischen Bedingungen mit anaerobisierten Puffern in einem Anaerobenzelt (3 ppm O₂, 3 ppm H₂) durchgeführt.

500 µl der Zellsuspension wurden mit 15 µl [¹⁴C]-TPP⁺ (260 µM, 0,71 GBq/mmol) in einer Endkonzentration von 7,8 µM sorgfältig gemischt. Nach 15 min Inkubation (siehe oben) wurden 3 x 100 µl durch Silikonöl zentrifugiert und jeweils 50 µl von den Überständen sowie 50 µl des Reaktionsansatzes mit Szintillator versehen. Durch Messung der Radioaktivität in den Proben wurden die intrazellulären und extrazellulären TPP⁺-Konzentrationen und somit das Membranpotential gemäß der Gleichung

$$\Delta\Psi = 59 \text{ mV} * \lg [\text{Ph}_4\text{P}^+_{\text{in}}] / [\text{Ph}_4\text{P}^+_{\text{ex}}]$$

berechnet (Rottenberg, 1979).

Beispiel:

Radioaktivität im Reaktionsansatz	19 000 dpm/50 µl
Radioaktivität nach Silikonöl-Zentrifugation im Überstand	10 500 dpm/50 µl
Aufgenommene Radioaktivität	8 500 dpm/50 µl

2,15 µl/mg TG (cytoplasmatisches Volumen) x 1,124 mg TG/ml (bei OD₅₇₈=4)

= 2,42 µl/ml

$$[\text{TPP}^+]_{\text{in}} = 8500 \text{ dpm/50 } \mu\text{l} \times 20 = 170\,000 \text{ dpm/ml} : 2,42 \text{ } \mu\text{l/ml} = 70\,248 \text{ dpm/} \mu\text{l}$$

$$[\text{TPP}^+]_{\text{ex}} = 10\,500 \text{ dpm/50 } \mu\text{l} : 50 = 210 \text{ dpm/} \mu\text{l}$$

$$\Delta\Psi = 59 \text{ mV} \times \log 70\,248 \text{ dpm/} \mu\text{l} : 210 \text{ dpm/} \mu\text{l} = 149 \text{ mV}$$

Die gemessenen intrazellulären TPP⁺-Konzentrationen müssen noch um den Anteil an TPP⁺ korrigiert werden, der unspezifisch an die innere Membran bindet (Mell, 1985). Gemessen wurde hierzu in Parallelansätzen die TPP⁺-Bindung an mit EDTA behandelten, durch Toluolzusatz (0,5%) permeabilisierten und de-energetisierten Zellen. Die tatsächliche, freie [TPP⁺]_{in} wurde nach folgendem, iterativen Näherungsverfahren (Zaritzky *et al.*, 1981) errechnet:

$$[\text{Ph}_4\text{P}^+_{\text{in}}]_{n+1} = [\text{Ph}_4\text{P}^+_{\text{ex}}] + \frac{[\text{Ph}_4\text{P}^+_{\text{zelle}}] - [\text{Ph}_4\text{P}^+_{\text{in}}]_n}{K} * \ln \frac{[\text{Ph}_4\text{P}^+_{\text{in}}]_n}{[\text{Ph}_4\text{P}^+_{\text{ex}}]}$$

Die Bindungskonstante K hat in *Escherichia coli* mit 0,5% Toluol als Entkoppler einen Wert von 19 (Bakker, 1982). Für $n = 0$ wird mit $[\text{Ph}_4\text{P}^+_{\text{in}}] = 20 \mu\text{M}$ gestartet. Mit den gemessenen internen und externen TPP^+ -Konzentrationen wird die tatsächliche TPP^+ -Konzentration solange angenähert, bis der Unterschied zur vorherigen TPP^+ -Konzentration weniger als 1% beträgt.

3.12 Messung von ΔpH und Berechnung des Protonenpotentials Δp

Das pH-Potential (ΔpH) konnte in mit EDTA behandelten Zellen über die Verteilung von ^{14}C Benzoessäure (5 mM, 2,04 GBq/mmol) bestimmt werden. ^{14}C Benzoessäure kann als neutrales Molekül über die innere Membran ins Zellinnere diffundieren. Aufgrund des alkalischen Zellinneren deprotoniert die ^{14}C Benzoessäure dort und kann als Anion die Zelle nicht mehr verlassen. Somit reichert sich die ^{14}C Benzoessäure bis zu einem pH-Ausgleich in der Zelle an. Methodisch entsprach die ΔpH -Messung der Bestimmung des Membranpotentials.

Das Protonenpotential Δp setzt sich zusammen aus dem Membranpotential $\Delta\Psi$ und dem pH-Gradienten ΔpH an der Membran.

$$\Delta\text{p} = \Delta\Psi + \Delta\text{pH}$$

4. Ergebnisse

4.1 Reduktive Aktivierung von FNR durch Glutathion

Der Fumarat-Nitrat-Reduktase Regulator (FNR) ist ein wichtiger Genregulator in *Escherichia coli*. Treten anoxische Milieubedingungen auf, so sorgt FNR dafür, daß die Zelle durch Produktion entsprechender Enzyme sich auf einen anaeroben Stoffwechsel umstellt. Aktives FNR bindet als Dimer an die DNA und sorgt für die Transkription dieser Gene. Unter oxidischen Bedingungen wird FNR inaktiv und verliert die Fähigkeit, spezifisch an DNA zu binden. Unter diesen Bedingungen wird die Expression der Gene des anaeroben Stoffwechsel nicht aktiviert.

Aktives FNR ist ein Homodimer und besitzt pro Monomer ein $[4Fe4S]^{2+}$ Zentrum. In Anwesenheit von O_2 zerfällt dieses Zentrum in ein $[2Fe2S]^{2+}$ -Zentrum, und das FNR-Protein geht in eine inaktive Form über. Eine weitere Form von FNR ist apoFNR, welche kein FeS-Zentrum enthält. Apo-FNR ist in der Biosynthese Vorläufer von aktivem FNR.

Der Zerfall des $[4Fe4S]^{2+}$ Zentrums bei einer Inaktivierung durch O_2 ist relativ gut untersucht (Khoroshilova *et al.*, 1995; Green *et al.*, 1996; Lazazzera *et al.*, 1996; Khoroshilova *et al.*, 1997). Weniger Beachtung wurde hingegen der Bildung von aktivem FNR bei einer Neusynthese oder bei der Reaktivierung von inaktiviertem FNR geschenkt. Das für die Bildung des FeS-Zentrums benötigte Sulfid wird von einer Cystein-Desulfurase (NifS) bereitgestellt. Bei der Reaktivierung von Sauerstoff-inaktiviertem FNR (apoFNR oder $[2Fe2S]^{2+}$ -FNR) sind vermutlich ähnliche Reaktionen beteiligt. Deshalb wird die Bildung von aktivem FNR aus apoFNR auch als reduktive Aktivierung bezeichnet. Es ist nicht klar, welches der vielen intrazellulären Reduktionsmitteln in *E. coli* dazu verwendet wird. Erste *in vivo* Experimente wiesen auf die Bedeutung von Glutathion bei der reduktiven Aktivierung von FNR hin.

Glutathion, Glutathion-Reduktase und Glutaredoxine

Das reduzierte Tripeptid Glutathion (γ -Glutamylcysteinylglycin) ist ein wichtiges Reduktionsmittel in der Zelle. Mit seiner freien SH-Gruppe stellt es einen Thiolpuffer dar, welches die Cysteinreste von Proteinen in reduziertem Zustand hält. Die Reduktion von Disulfidbindungen stellt für zahlreiche wichtige Enzyme einen notwendigen Schritt innerhalb ihrer katalytischen Zyklen dar. *E. coli* besitzt einen hohen Gehalt an Glutathion (intrazelluläre Konzentration ca. 5 mM), der fast gänzlich in reduziertem Zustand vorliegt (Kosower & Kosower, 1978). GSH wird aus der Reduktion von oxidiertem Glutathion mit NADPH gebildet. Diese Reaktion wird von der Glutathion-Reduktase katalysiert (Abb. 2).

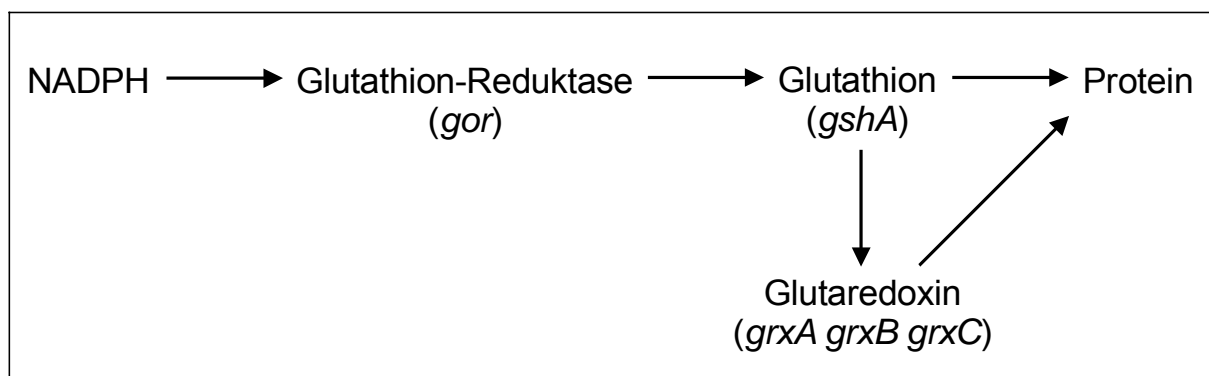


Abb. 2 Komponenten des Glutaredoxin-Systems in Escherichia coli. Die entsprechenden Gene sind in Klammern angegeben. Verändert nach Prinz *et al.*, 1997

Neben Glutathion besitzt *E. coli* Oxidoreduktasen, die Proteine reduzieren. Diese Enzyme weisen in ihrem aktiven Zentrum ein redox-aktives Disulfid auf. Darüber können sie Disulfidbindungen in zahlreichen Proteinen reduzieren. Eine Klasse dieser Oxidoreduktasen sind die Glutaredoxine, von denen in *E. coli* drei bekannt sind: Glutaredoxin 1, 2 und 3. Die bestuntersuchte davon ist Glutaredoxin 1 mit einer Größe von 9 kDa. Die notwendigen Reduktionsäquivalente für diese Reaktionen werden von NADPH geliefert.

***in vivo* Untersuchungen des Aktivitätszustandes von FNR**

Das *in vivo* Testsystem

Der Funktionszustand von FNR läßt sich *in vivo* indirekt über die Expression von Genen, die FNR-abhängig reguliert werden, untersuchen. Die Expressionsstärke solcher Gene stellt also ein Maß für die regulatorische Aktivität von FNR dar. Wird die Expression eines Genes bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen im Medium bestimmt, so erhält man ein Expressionsmuster dieses Genes als Funktion des Sauerstoffpartialdruckes. Diese Sauerstoff-abhängige Expression wird von FNR verursacht und spiegelt den Funktionszustand von FNR wider. Dieses Aktivitätsmuster von FNR läßt sich außer im Wildtyp auch in Stämmen mit anderem genetischen Hintergrund betrachten. Ändert sich in Abwesenheit eines Effektors, z. B. eines Reduktionsmittels, das Aktivitätsmuster von FNR, so kann daraus geschlossen werden, daß dieser Effektor die Funktion von FNR beeinflusst.

Die Analyse des O₂-konzentrationsabhängigen Aktivitätsmusters von FNR wurde in unserer Arbeitsgruppe zu einem wichtigen Mittel, um den Aktivitätszustand von FNR in Abhängigkeit von bestimmten Faktoren zu untersuchen (Becker *et al.*, 1996; Arras *et al.*, 1998).

Die Experimente wurden in einem Oxystaten durchgeführt (Becker *et al.*, 1996; Arras *et al.*, 1998). Der Sauerstoffpartialdruck im Medium (pO₂) konnte über einen Bereich von 0,3 bis 212 mbar (Luftsättigung) genau eingestellt und konstant gehalten werden. Damit ließ sich das Wachstum von *E. coli* bei konstantem pO₂ unter aerobem und anaerobem Wachstum durchführen und die Expression in Abhängigkeit des Sauerstoffpartialdruckes verfolgen..

Um die Expression der FNR-abhängig regulierten Gene zu studieren, wurden *lacZ*-Reporterfusionen mit den entsprechenden Genen konstruiert. Für die Experi-

mente wurde das Gen *nirB* ausgewählt, das für die cytoplasmatische NADH-Nitrit-Reduktase kodiert. Das *nirB*-Gen wird nur unter anaeroben Bedingungen und in Anwesenheit von FNR exprimiert (Griffith und Cole, 1987; Tyson *et al.*, 1994). Die Zellen, die das *nirB'*-*lacZ* Fusionsgen enthielten, wurden bei verschiedenen pO_2 -Werten gezüchtet und die Expression von *nirB* in der exponentiellen Phase ($OD_{578} = 0,5$) bestimmt. Dies galt für anaerobe, mikroaerobe und aerobe Wachstumsbedingungen. Um die Frage des Effekts von Reduktionsmitteln auf die Funktion von FNR zu untersuchen, wurde die *nirB'*-*lacZ* Expression in Abwesenheit von Glutathion, Glutathion-Reduktase oder Glutaredoxin 1 gemessen. Dazu wurden in den Stämmen die entsprechenden Gene *gshA*, *gor* und *grxA* durch Insertion einer Resistenzkassette ausgeschaltet. *gshA* kodiert für die γ -glutamyl-cystein Synthetase, deshalb sind *gshA*-Mutanten in der Glutathionbiosynthese defekt und enthalten kein Glutathion (Becker *et al.*, 1996; vgl. Tab. 1). In der *gor*-Mutante ist die Glutathion-Reduktase inaktiviert, in der *grxA*-Mutante die Glutaredoxin 1.

Einfluß von Glutathion auf die reduktive Aktivierung von FNR *in vivo*

Abbildung 3 zeigt die Expression von *nirB'*-*lacZ* im Wildtyp und in der *gshA*-Mutante in Abhängigkeit vom pO_2 -Partialdruck im Medium. Die Expression von *nirB* im Wildtyp ist unter anaeroben Bedingungen mit knapp 150 Miller Units am höchsten. Mit zunehmendem pO_2 nimmt die Expression ab und erreicht bei voller Luftsättigung (212 mbar) den niedrigsten Wert. Die Abnahme folgt einer hyperbolischen Funktion.

Um die Expressionsmuster untereinander vergleichen zu können, wird ein $pO_{0,5}$ definiert. Der $pO_{0,5}$ -Wert gibt den Sauerstoffpartialdruck an, bei dem eine halbmaximale Expression bzw. Repression der Genfusion erreicht ist. Im Wildtyp liegt der $pO_{0,5}$ -Wert der *nirB-lacZ* Expression bei 35 mbar O_2 .

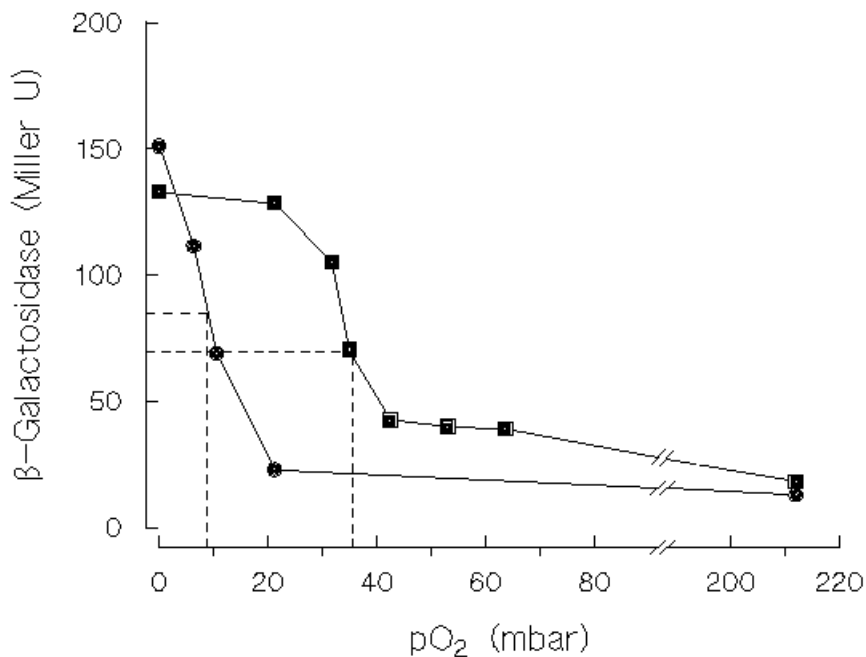


Abb. 3 Expression von *nirB'*-*lacZ* im Wildtyp (-■-) und in der Glutathion-Mutante (*gshA*, -●-) als Funktion von pO₂ im Medium. Die β-Galactosidase Aktivitäten wurden während der exponentiellen Phase bestimmt (OD₅₇₈ = 0,5).

In der *gshA*-Mutante ist die Antwort der *nirB'*-*lacZ* Expression auf die Änderung des pO₂ prinzipiell ähnlich wie im Wildtyp. Die Repression von *nirB'*-*lacZ* beginnt aber schon bei niedrigeren pO₂. Die hyperbolische Kurve ist deutlich nach links verschoben. Liegt der pO_{0,5}-Wert im Wildtyp bei 35 mbar, so sinkt er in der Glutathion-Mutante um rund ein viertel auf 8,8 mbar ab (Tab. 1).

Die Abwesenheit von Glutathion macht sich also dadurch bemerkbar, daß FNR bereits bei niedrigerem pO₂-Wert als im Wildtyp vermehrt in inaktiver Form vorliegt. Diese Beobachtung deutet also daraufhin, daß bei Fehlen von Glutathion im Gegensatz zum Wildtyp bereits geringere Sauerstoffkonzentrationen ausreichen, um FNR zu inaktivieren. Die Änderung des pO_{0,5}-Wertes für ein FNR-abhängig reguliertes Gen ist also eine sensitive Methode, um den Einfluß von Faktoren, die die regulatorische Aktivität von FNR beeinflussen, zu messen (Becker *et al.*, 1996).

Auch die Glutathion-Reduktase (*gor*) und Glutaredoxin 1 (*grxA*) wurden auf ihren Einfluß auf den $pO_{0,5}$ -Wert hin untersucht. Der zelluläre Glutathion-Gehalt in den Mutanten ist ähnlich hoch (*gor*-Mutante 2,2 mM) oder etwas höher als im Wildtyp. In der *gor*-Mutante (Glutathion-Reduktase) wurde eine *lacZ*-Reporterengenfusion mit einem künstlichen Promotor, der eine FNR Konsensussequenz trägt, gemessen. Das Prinzip der Messung ist aber das gleiche wie für die *nirB-lacZ* Fusion. In beiden Mutanten sind die $pO_{0,5}$ -Werte ähnlich hoch wie im Wildtyp. Weder die Glutathion-Reduktase noch Glutaredoxin 1 haben also einen Einfluß auf den funktionellen Zustand von FNR.

Tab. 1 Einfluß von Glutathion und Glutaredoxin 1 auf den pO_2 -Wert der *nirB-lacZ* Expression und auf die Glutathion-Gehalte. *gshA* kodiert für Glutathion-Reduktase, *grxA* kodiert für Glutaredoxin 1.
n.b. (nicht bestimmt)

Genotyp	Glutathion (mM, zellulär)	<i>nirB-lacZ</i> pO_2
Wildtyp	2,4	35,2
<i>gshA</i>	$\leq 0,03$	8,8
<i>grxA</i>	3,2	34,7
<i>grxA gshA</i>	n. b.	9,0

In dem Syntheseweg von reduziertem Glutathion ist die Glutathion-Reduktase anscheinend nicht das einzige Enzym, welches Glutathion reduziert. Es existieren alternative Synthesewege, daher ist das Verhältnis von oxidiertem zu reduziertem Glutathion in der *gor*-Mutatante nicht wesentlich niedriger als im wildtyp (Tuggle & Fuchs, 1985). Daher zeigt auch die *grxA gshA* Doppelmutante keinen erhöhten Ef-

fekt auf den $pO_{0,5}$ -Wert verglichen mit dem Wildtyp. Der fehlende Effekt von Glutaredoxin 1 auf den pO_2 -Wert läßt vermuten, daß Glutathion ohne Beteiligung von Glutaredoxin 1 das FNR-Protein direkt reduziert. Eine Rolle von Glutaredoxin 2 und 3 kann aber nicht ausgeschlossen werden. Nur Glutathion, nicht aber Glutaredoxin 1 und Glutathion-Reduktase, hat also einen Einfluß auf den funktionellen Zustand von FNR *in vivo*.

Das *in vivo* Experiment hat also zeigen können, daß von den untersuchten Komponenten des Glutaredoxin-Systems einzig Glutathion den Funktionszustand von FNR beeinflusst. Reduziertes Glutathion (GSH) sorgt also dafür, daß ständig die aktive Form von FNR aus der inaktiven zurückgebildet wird. Ohne GSH wird diese Rückbildung unterbunden und FNR liegt schon bei geringerer O_2 -Konzentration vermehrt in inaktiver Form vor.

Um die Ergebnisse der *in vivo* Experimente zu bestätigen, wurde an isoliertem FNR die Bildung des $[4Fe4S]^{2+}$ Zentrums aus der apoFNR Form in Anwesenheit von Glutathion *in vitro* beobachtet.

Isolierung von FNR

Das GST'-FNR Fusionsprotein

Das FNR-Protein sollte als Fusionsprotein durch Affinitätschromatographie isoliert werden. (Holighaus, 1998). Dazu wurde *fnr* in einen durch IPTG induzierbaren Expressionsvektor (pGex-4T-1, Pharmacia) in Form eines Fusionsproteins kloniert, das eine leichte und schnelle Isolierung von FNR ermöglichen sollte. Als Proteinanhang bot sich die Glutathion-S-Transferase (GST) an. Dieses Enzym aus *Schistosoma japonicum* kann an Glutathion-Sepharose spezifisch isoliert werden.

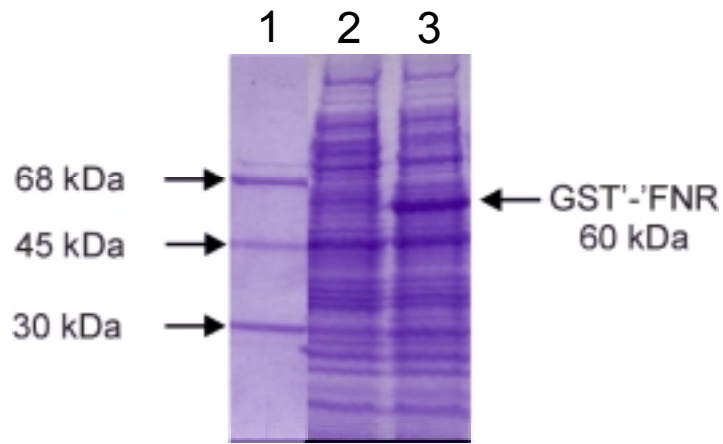


Abb. 4 Nachweis des überexprimierten GST'-FNR Fusionsproteins durch SDS-Gelelektrophorese. Bahn 1: Standardproteine (von oben: BSA, Ovalbumin, Carboanhydrase), 2: Zellextrakt (CAG627pMW68) vor Induktion, 3: nach Induktion

Nach IPTG-Induktion wiesen die Zellen eine deutliche Überexpressionsbande auf, die vor Induktion nicht vorhanden ist (Abb. 4). Das Molekulargewicht des Fusionsproteins entspricht der Summe der Größe von FNR (30 kDa) und GST (30 kDa). Das Fusionsprotein reagierte im Immunoblot mit polyklonalen Antikörpern, die gegen FNR gerichtet sind (Abb. 5).

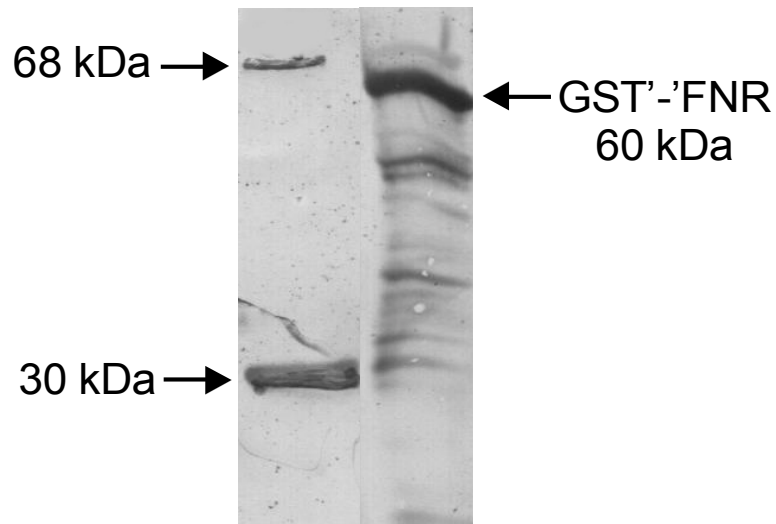


Abb. 5 Western-Blot zum Nachweis des überexprimierten GST'-FNR Fusionsproteins. Der Proteinnachweis erfolgte mit Peroxidase, die an polyklonalen Antikörpern gekoppelt war, welche gegen FNR gerichtet sind. Die Lage der Standards (oben BSA, unten Carboanhydrase) im Proteingel wurde nachträglich markiert.

Die Überexpression wurde im Stamm CAG627 vorgenommen, da diesem eine periplasmatische Proteaseaktivität fehlt, die die ersten neun Aminosäuren von FNR beim Aufbrechen der Zellen abspaltet (Trageser *et al.*, 1990).

Um zu überprüfen, ob FNR als Fusionsprotein funktionsfähig und sauerstoffsensibel ist, wurde die Induktion von *nirB'-lacZ* Genfusion untersucht (Holighaus, 1998). Die Expression von *nirB'-lacZ* hängt vollständig von anaeroben Bedingungen und von der Anwesenheit von FNR ab (Griffith und Cole, 1987; Tyson *et al.*, 1994). Dazu wurde die Expression von *nirB'-lacZ* in einem Stamm mit deletiertem *fnr*-Gen nach aerober und anaerober Zucht gemessen. In diesem Stamm fehlte die Expression der *nirB-lacZ* Fusion nach aerober und anaerober Zucht fast vollständig. Nach Komplementation mit dem *gst-fnr* Expressionsplasmid wurde *nirB-lacZ* unter anaeroben Bedingungen wieder mit ähnlichen Aktivitäten exprimiert wie im Wildtyp. Diese Messungen zeigen, daß die GST-FNR Fusion unter anaeroben Bedingungen (wie FNR) als Genaktivator aktiv ist.

Isolierung von FNR

Das FNR-Protein wurde als Fusionsprotein mit der Glutathion-S-Transferase (GST) isoliert. In der Fusion ist das induzierbare Gen für das C-terminal verkürzte GST-Protein über eine Thrombin-Erkennungsequenz mit FNR fusioniert. Nach Isolierung läßt sich der GST-Anhang durch proteolytische Spaltung mit Thrombin von FNR abspalten. Das so erhaltene FNR-Protein enthält damit zwei zusätzliche Aminosäurereste (Glyc-Ser) am N-terminalen Ende.

Nach der Spaltung wurde ein Protein mit einem Molekulargewicht von M_r 30 000 von der GSH-Sepharose-säule eluiert (Abb. 6). Das Molekulargewicht entspricht dem von FNR (Green *et al.*, 1996b; Trageser *et al.*, 1990). Das Protein reagierte im Immunblot spezifisch mit Anti-FNR-Serum (Abb. 7). Aus 1,2 Liter Kultur läßt sich auf diese Wei-

se 1,0 - 1,5 mg FNR isolieren. Die Reinheit betrug nach Abschätzung des SDS-Gels mehr als 95%.

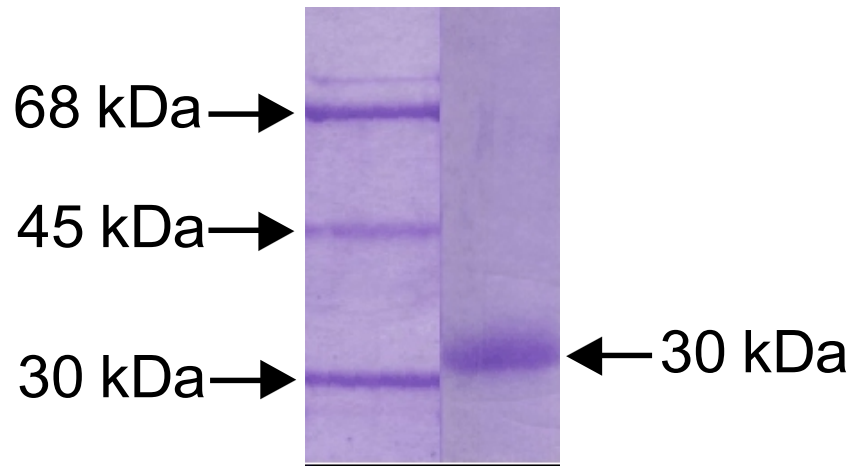


Abb. 6 Nachweis der Isolierung von FNR an der Glutathion-Sepharose-Säule durch SDS-Gelelektrophorese. Standardproteine (von oben: BSA, Ovalbumin, Carboanhydrase), erste FNR-Protein enthaltende Fraktion nach der Spaltung mit Thrombin.

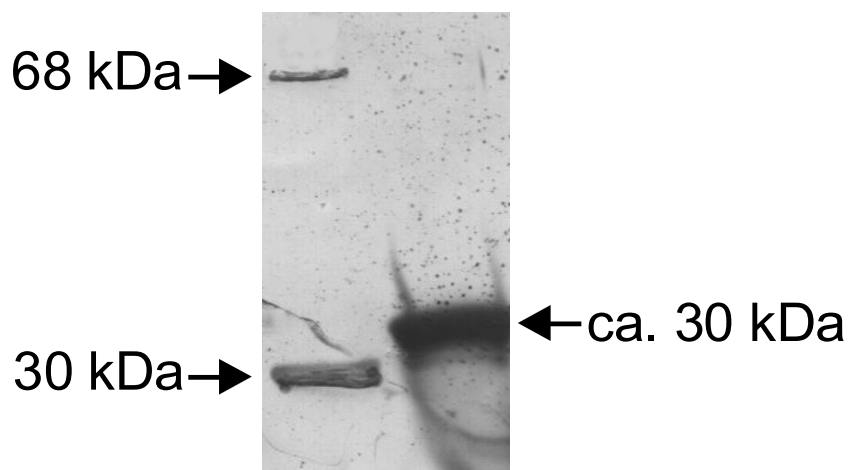


Abb. 7 Nachweis von isoliertem FNR an der Glutathion-Sepharose-Säule durch Immunblot mit AntiFNR-Serum. Lage der Standardproteine (oben: BSA, unten: Carboanhydrase) wurde nachträglich markiert, erste FNR-Protein enthaltende Fraktion nach der Spaltung mit Thrombin.

Anreicherung von NifS_{Av}

Überexpression von NifS_{Av}

Das FNR-Protein verliert, auch bei vorsichtiger Reinigung im Anerobenzelt, weitgehend sein [4Fe4S]²⁺ Zentrum, das für seine Funktion notwendig ist (Beinert und Kiley, 1996; Green *et al.*, 1996). Aus diesem Grund wurde ein Enzym in *Escherichia coli* überexprimiert, das in der Lage ist, solche FeS-Zentren in Proteinen aufzubauen. Ein solches Enzym ist die Cystein-Desulfurase NifS aus *Azotobacter vinelandii*. Das Enzym katalysiert die Bildung von L-Alanin und elementarem Schwefel aus Cystein. Sulfid wird zusammen mit den Fe²⁺-Ionen in das FeS-Zentrum eingebaut. Es ist noch unklar, ob NifS_{Av} lediglich den Schwefel mobilisiert oder auch in die Assemblierung des FeS-Zentrums involviert ist. NifS ist in *Azotobacter vinelandii* dafür zuständig, Schwefel für die Bildung von Metalloclustern in Enzymen zu mobilisieren (Zheng *et al.*, 1993). Es wurde bereits erfolgreich zur Rekonstitution von isoliertem FNR und anderen Proteinen eingesetzt (Khoroshilova *et al.*, 1995; Hidalgo und Demple, 1996). In *E. coli* gibt es 3 offene Leseraster, die dem NifS_{Av} homolog sind (Flint, 1996). Für die Versuche wurde dennoch NifS_{Av} verwendet, da dieses Enzym gut charakterisiert und stabil ist.

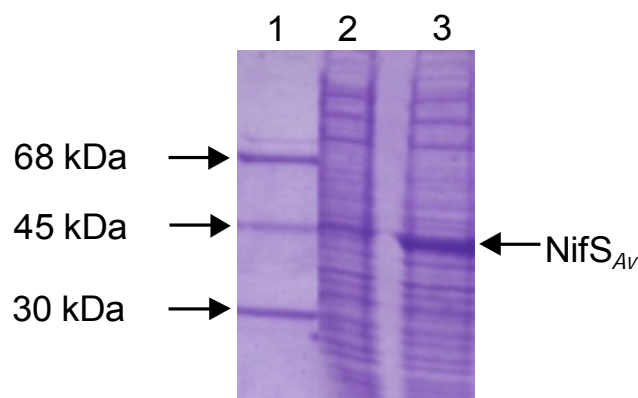


Abb. 8 Nachweis der Überexpression von NifS_{Av} durch SDS-Gelelektrophorese. Bahn 1: Standardproteine (von oben: BSA, Ovalbumin, Carboanhydrase) , Bahn 2: Zellextrakt [BL21(DE3) pNifS], vor Induktion, 3: nach Induktion.

NifS_{AV} wird heterolog in *E. coli* überexprimiert. Der Überexpressionsstamm wurde von Dean zur Verfügung gestellt (Zheng *et al.*, 1993). Nach Induktion durch IPTG wiesen die Zellen eine deutliche Überexpressionsbande auf, die vor der Induktion nicht vorhanden ist (Abb. 8). Die Bande besitzt die erwartete Größe von 44 kDa.

Anreicherung von NifS_{AV}

Nach Überproduktion von NifS_{AV} sind die Zellen *E. coli* wegen des Cofaktors Pyridoxal-Phosphat von NifS_{AV} gelb gefärbt. Das NifS_{AV}-Protein konnte durch eine Streptomycin- und Ammoniumsulfatfällung angereichert werden.

Das SDS-Gel in Abb. 9 zeigt die Aufkonzentrierung von NifS_{AV}. Aus der Färbung läßt sich abschätzen, daß NifS_{AV} mindestens 50% des Proteins in der angereicherten Fraktion ausmacht. die für die Rekonstitution von isoliertem FNR verwendet wird. Aus 1,8 Liter Kultur lassen sich so ca. 24 mg NifS_{AV} gewinnen.

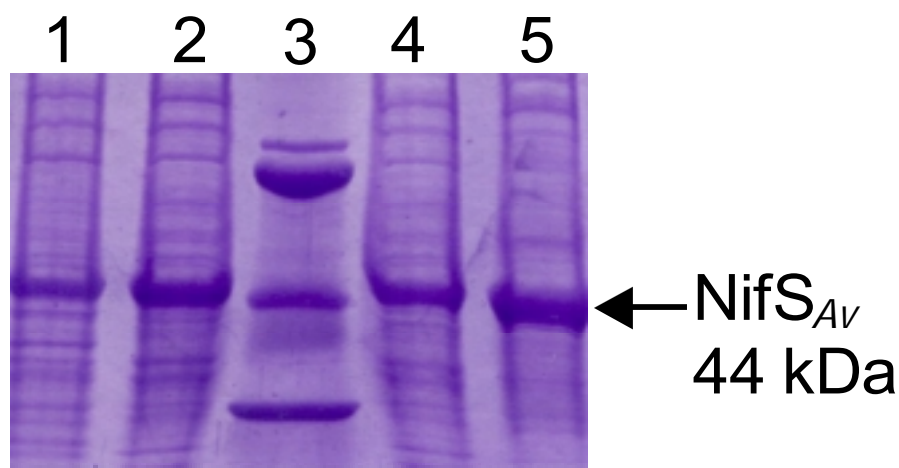


Abb. 9 Anreicherung von NifS_{AV} durch Fällung mit Streptomycinsulfat und Ammoniumsulfat. Bahn 1: Zellextrakt [BL21(DE3) pNifS], nach Induktion, 2: Überstand nach Fällung mit Streptomycinsulfat, 3: Standardproteine [von oben: BSA (68 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Carboanhydrase (30 kDa)], 4: Überstand nach Fällung mit 25% Ammoniumsulfat, 5: in Puffer resuspendiertes Präzipitat nach Fällung mit 45% Ammoniumsulfat. In allen Bahnen wurden je ca. 10 µg Protein aufgetragen.

Die Anwesenheit von NifS_{Av} in der angereicherten Fraktion läßt sich in einem einfachen Aktivitätstest zeigen. In Anwesenheit von Cystein, Fe²⁺-Ionen und DTT fällt nach wenigen Minuten schwarzes Eisensulfid aus.

Untersuchungen an isoliertem FNR *in vitro*

Anaerobes und aerobes apoFNR

Anaerobes und aerobes FNR wurden aus aerob gezüchteten Zellen isoliert. Die Reinigungsschritte für das anaerobe FNR wurden in einem anaeroben Stickstoffzelt mit anaerobisierten Puffern durchgeführt. Für die Isolierung von aerobem FNR erfolgten diese Reinigungsschritte unter aeroben Bedingungen.

Aus anderen Untersuchungen ist bekannt, daß aerob und anaerob gereinigtes FNR sehr geringe Konzentrationen an Fe²⁺ und säurelabilem Sulfid aufweisen: 0,02 mol Fe²⁺/mol FNR, ≤0,02 säurelabilem S²⁻ (Green *et al.*, 1991); 0,07 mol Fe²⁺/mol FNR, 0,08 mol säurelabilem S²⁻/mol FNR (Green *et al.*, 1996). Dies spricht dafür, daß bei der anaeroben und aeroben Reinigung von FNR die FeS-Zentren verloren gehen. Das [4Fe4S]²⁺ Zentrum ist sehr sauerstofflabil und wird auch bei anaerober Reinigung zerstört.

Das aerob isolierte FNR stellt also O₂-inaktiviertes FNR dar, das auch sein [2Fe2S]²⁺-Zentrum verloren hat (aerobes apoFNR). Anaerobes und aerobes apoFNR wurden für die Rekonstitutionsversuche verwendet.

Spektrale Eigenschaften des [4Fe4S]²⁺-Zentrums

Das isolierte FNR wird zusammen mit NifS_{Av}, Cystein, Fe²⁺-Ionen und DTT inkubiert. Das aus Cystein durch NifS_{Av} mobilisierte Sulfid wird dann zusammen mit den Fe²⁺-Ionen in das FeS-Zentrum eingebaut. Dank spektraler Eigenschaften des [4Fe4S]²⁺ Zentrums kann ein FNR-Protein mit einem [4Fe4S]²⁺ Zentrum ohne großen Aufwand

nachgewiesen werden. Ein Protein mit einem $[4Fe4S]^{2+}$ -Zentrum zeigt in einem UV / VIS Spektrum eine Schulter bei 315 nm und ein Maximum bei 410 – 420 nm innerhalb einer breiten Schulter bei 380 – 450 nm (Palmer, 1973; Galla, 1988). Die Absorptionen bei diesen Wellenlängen führt zu einer gelb-braunen Färbung der FNR-Proteinlösung (Khoroshilova *et al.*, 1995; Green *et al.*, 1996).

Als Index für den Gehalt an FeS-Zentren in FNR wird der Quotient $A_{420} : A_{280}$ herangezogen. Einer Abschätzung zufolge sollte für FNR mit einem $[4Fe4S]^{2+}$ Zentrum pro Monomer der Quotient ca. 0,6 betragen (Green *et al.*, 1996). Niedrigere Werte können daher rühren, daß an isoliertem FNR häufig Nukleinsäuren (5 Nukleotide pro Monomer) gebunden sind und diese zu einer höheren Absorption bei 260 nm und damit auch bei 280 nm führen (Green *et al.*, 1996). In dieser Publikation wurde ein Wert von 0,36 gefunden. Für das sauerstoffunempfindliche FNR*, das ebenfalls mit NifS_{Av} rekonstituiert wurde, wurde ein Quotient $A_{420} : A_{280}$ von 0,16 gefunden. Ähnliche Quotienten wurden auch bei anderen Proteinen mit 4Fe4S-Zentren gefunden (Palmer, 1973). Die Geschwindigkeit der Bildung bzw. des Abbaus des FeS-Zentrum läßt sich also hervorragend durch die Zu- bzw. Abnahme des Quotienten $A_{420} : A_{280}$ verfolgen.

Die Rekonstitution von isoliertem FNR mit NifS aus *Azotobacter vinelandii* und anschließende spektroskopische Untersuchungen wurden in ähnlicher Form bereits durchgeführt (Khoroshilova *et al.*, 1995; Green *et al.*, 1996). Es konnte gezeigt werden, daß auf diese Weise rekonstituiertes FNR-Protein dimerisiert und an die DNA bindet. Es weist ein $[4Fe4S]^{2+}$ -Zentrum pro Monomer auf. Die Existenz des $[4Fe4S]^{2+}$ -Zentrums konnte durch Mössbauer-Spektroskopie nachgewiesen werden. Es kann also davon ausgegangen werden, daß in der vorliegenden Arbeit mit demselben verwendeten System FNR auch erfolgreich rekonstituiert und aktives FNR erhalten werden kann.

Die Isolierung und Rekonstitution von FNR wurden in einem Anaerobenzelt durchgeführt, welches anoxische Arbeitsbedingungen sicherstellt. Die FNR-Lösung wird zusammen mit den Zusätzen in einer Quartzküvette gefüllt und diese wird gasdicht mit einem Gummistopfen verschlossen. Für die spektroskopischen Messungen wird die Küvette aus dem Zelt genommen und nach der Messung wieder ins Zelt gebracht.

Assemblierung des $[4\text{Fe}4\text{S}]^{2+}$ Zentrums in anaerobem apoFNR und oxidative Disassemblierung

Das FNR-Protein wurde nach anaerober Isolierung zusammen mit NifS_{Av}, DTT, Fe²⁺-Ionen und Cystein in einer anaeroben Küvette inkubiert. Die Messungen wurden an einem UV/VIS Spektralphotometer durchgeführt.

Das UV/VIS Spektrum zeigte nach etwa 20 Minuten eine Schulter bei 325 nm und eine breite Schulter mit einem Maximum bei 419 nm (Abb. 10A). Diese spezifischen Absorptionen sind auf die Bildung von $[4\text{Fe}4\text{S}]^{2+}$ -FNR zurückzuführen. Die Rekonstitution ist abhängig von der Zugabe von Fe²⁺-Ionen, Cystein, Reduktionsmittel (DTT) und NifS_{Av}. Bei Fehlen einzelner Komponenten fand keine Rekonstitution statt. Die FNR-Lösung ist wie beschrieben gelb-braun gefärbt (Khoroshilova *et al.*, 1995; Green *et al.*, 1996).

Der Einbau des $[4\text{Fe}4\text{S}]^{2+}$ -Zentrums konnte über die Bestimmung des Absorptionsverhältnisses $A_{419} : A_{280}$ verfolgt werden. Die Rekonstitution zeigt nach einer Verzögerungsphase, die von den Reaktionsbedingungen (wie z.B. Aktivität und eingesetzte Menge an NifS_{Av}) abhängig ist, einen stetigen Anstieg und erreicht einen Höchstwert von 0,36 (Abb. 10B). Der Quotient $A_{419} : A_{280}$ von 0,36 entspricht Werten, die bereits für auf diese Weise rekonstituiertes FNR gefunden wurden (Green *et al.*, 1996). Nach Zugabe von O₂ fällt der Quotient $A_{419} : A_{280}$ wieder auf die Ausgangs-

werte zurück, die für apoFNR charakteristisch sind. Diese Abnahme spricht für ein O_2 -abhängiger Verlust bzw. Disassemblierung des $[4Fe4S]^{2+}$ -Zentrums.

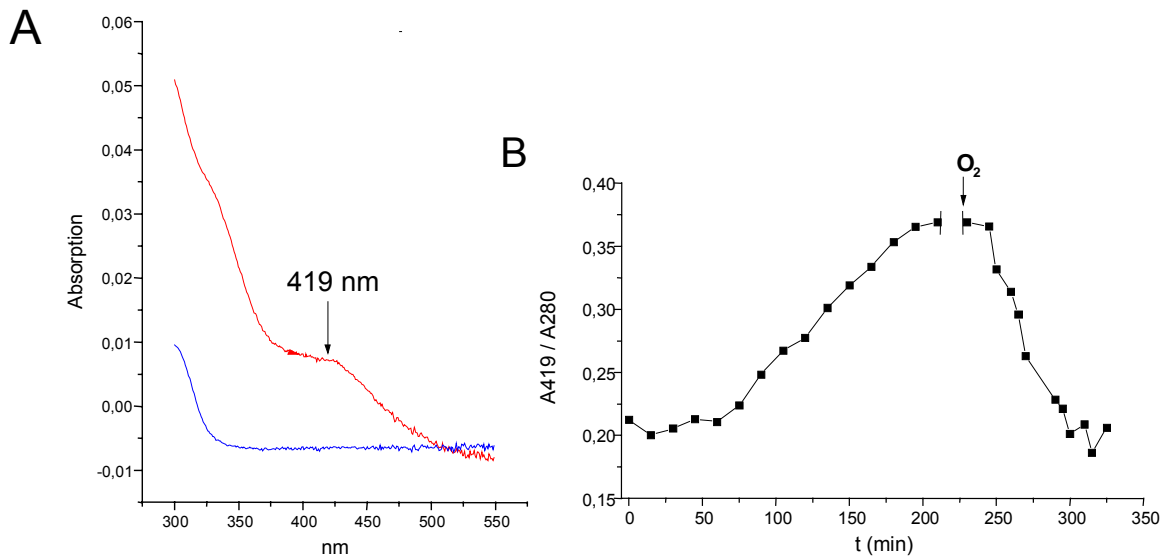


Abb. 10 (A) UV/Vis Spektrum vor und nach Assemblierung des $[4Fe4S]^{2+}$ -Zentrums. ApoFNR (blau) und apoFNR nach Assemblierung (rot) mit $NiFS_{Av}$, Fe(II), Cystein und DTT. Spektrum zeigt die Rekonstitution von anaerobem apoFNR ($23\mu M$ bzw. $0,69\text{ mg/ml}$) nach 20 min.

(B) Kinetik der Assemblierung des $[4Fe4S]^{2+}$ -Zentrums und Inaktivierung durch O_2 . Die Zunahme und Abnahme von rekonstituiertem FNR wurde anhand der Absorptionzunahme bei 419 nm verfolgt und ist als Verhältnis A_{419nm}/A_{280nm} wiedergegeben.

Messung des Quotienten $A_{419} : A_{280}$ ist also unter diesen experimentellen Bedingungen geeignet, die Kinetik der Bildung und des Abbaus des $[4Fe4S]^{2+}$ Zentrums von FNR zu verfolgen. Das anaerob isolierte FNR lässt sich mit dem gereinigten $NiFS_{Av}$ rekonstituieren.

Glutathion als Reduktionsmittel für die Assemblierung des $[4Fe4S]^{2+}$ Zentrums in anaerobem apoFNR

In vitro wird allgemein DTT als bevorzugtes Reduktionsmittel für die Bildung des $[4Fe4S]^{2+}$ -Zentrums in FNR und anderen Proteinen verwendet. Die Zunahme der Absorption bei 419 nm bzw. die Assemblierung des $[4Fe4S]$ Zentrums ist abhängig

von der Anwesenheit von DTT. Die Geschwindigkeit der Rekonstitution steigt mit der Konzentration von DTT an (Abb. 11A). Die schnellste Kinetik wurde mit 10 mM DTT erreicht, bei höheren Konzentrationen aggregierte FNR schnell.

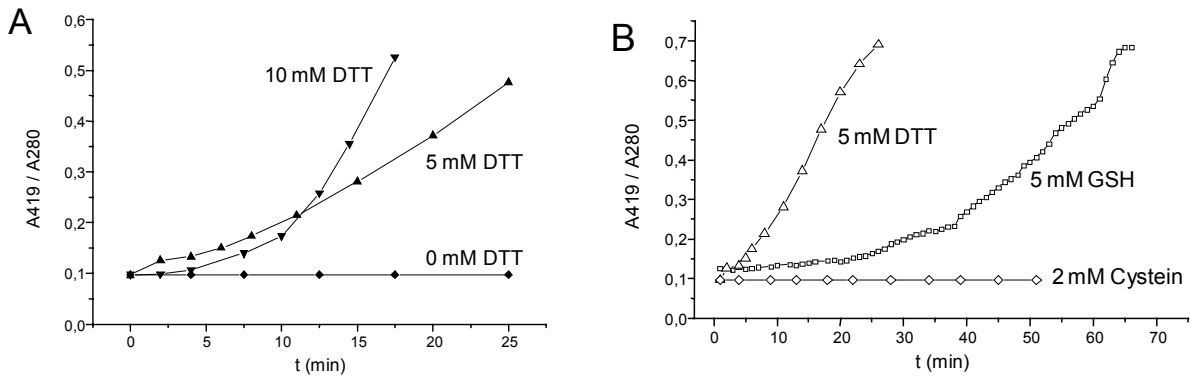


Abb. 11 Effekt von DTT (A) und Glutathion oder Cystein (B) auf die Bildung von [4Fe4S]-FNR. Anaerobes apoFNR (23 μ M oder 0,69 mg/l) wurde unter anaeroben Bedingungen mit Fe(II), Cystein, NifS_{Av} und verschiedenen Konzentrationen an DTT, GSH oder Cystein als Reduktionsmittel inkubiert. Die Rekonstitution mit DTT und GSH wurden in parallelen Ansätzen durchgeführt.

In dem Rekonstitutionsansatz konnte DTT durch Glutathion, aber nicht durch Cystein, ersetzt werden (Abb. 11B, Tab. 2). Die Rekonstitutionsbedingungen waren für alle Reduktionsmitteln gleich, da die Messungen in parallelen Ansätzen durchgeführt wurden. Mit Glutathion zeigte FNR dasselbe Absorptionsspektrum (Abb.12). Die Verzögerungsphase, nach dem der Quotient $A_{419} : A_{280}$ zu steigen beginnt, ist mit Glutathion länger als mit DTT. Zusätzlich ist die Geschwindigkeit der Rekonstitution etwa um einen Faktor 2 geringer als mit DTT (Tabelle 2). Höhere Konzentrationen an GSH führten dazu, daß FNR schnell präzipitierte. Das maximal gemessene $A_{419\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ Verhältnis war bei 0,8 und damit ähnlich den Werten, die mit DTT erhalten wurde. Die Experimente zeigen also, daß die Assemblierung des [4Fe4S] Zentrums in FNR mit physiologischen Konzentrationen an GSH möglich ist und schnell abläuft.

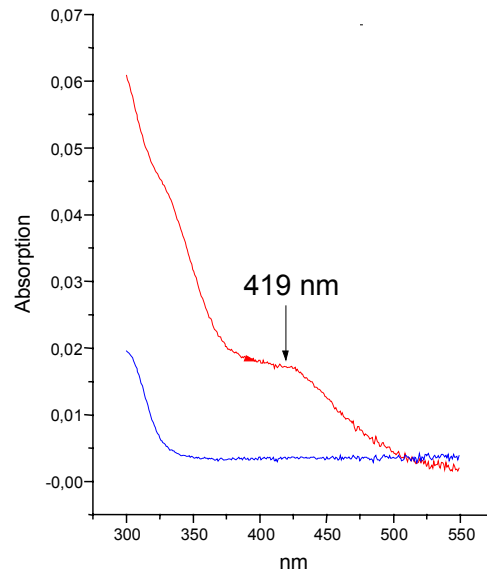


Abb. 12 UV/Vis Spektrum vor und nach Assemblierung des [4Fe4S]-Zentrums mit Glutathion. ApoFNR (blau) (20 μ M) und apoFNR nach Assemblierung (rot) mit NIFS_{AV}, Fe(II), Cystein und GSH. Spektrum zeigt Zustand 20 min nach Start der Rekonstitution.

Assemblierung des [4Fe4S]²⁺ Zentrums in O₂-inaktiviertem apoFNR

Nach Inkubation in dem Rekonstitutionsansatz zeigte O₂-inaktiviertes apoFNR eine Zunahme der Absorption bei den Wellenlängen 419 nm und 325 nm und das UV/VIS Spektrum war nahezu identisch mit dem Spektrum, welches für die Rekonstitution des apoFNR erhalten wurde (Abb.13A).

Die Assemblierung hängt wie in anaerobem apoFNR, von Fe(II), Cystein, NifS_{AV} und Glutathion oder DTT ab. Die Kinetik der Rekonstitution ähnelt der für anaerobes apoFNR bezüglich Verzögerungsphase und Rekonstitutionsrate. Diese ist in O₂-inaktiviertem FNR sogar etwas höher als in anaeroben apoFNR (Abb. 13B, Tab. 2). O₂-inaktiviertem apoFNR lässt sich also mit gleicher Effizienz wie anaerobes apoFNR in [4Fe4S]•FNR überführen.

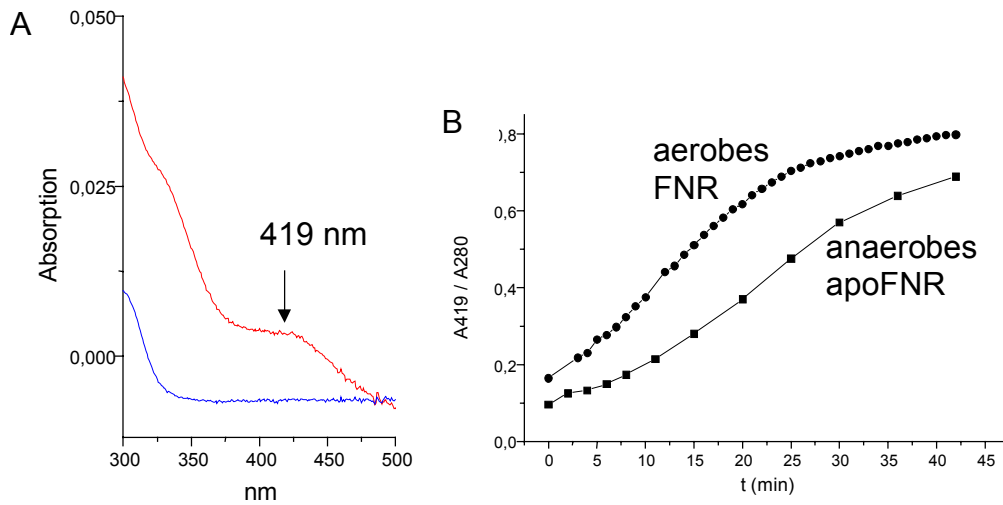


Abb. 13 (A) Rekonstitution von O₂-inaktiviertem FNR und (B) Kinetik der Assemblierung des [4Fe4S] Zentrums in O₂-inaktiviertem apoFNR und in anaerobem apoFNR. O₂-inaktiviertes FNR (23 μM) und anaerobes apoFNR (23 μM) FNR wurden mit 0,23 mM Fe(II), 2mM Cystein, 5 mM DTT und NifS_{AV} inkubiert.

Tab. 2 Vergleich der Rekonstitutionsrate für anaerobes apoFNR und aerobes apoFNR mit DTT, Glutathion und Cystein. ApoFNR wurde unter anaeroben Bedingungen isoliert, luftoxidiertes apoFNR unter aeroben Bedingungen. n.b. = nicht bestimmt

Reduktionsmittel	Rekonstitutionsgeschwindigkeit von [4Fe4S]·FNR oder $\Delta A_{419nm} \text{ mg}^{-1} \text{ NifS min}^{-1}$ aus	
	anaerobes apoFNR	aerobes apoFNR
Dithiothreitol (5 mM)	0.05	0.07
Glutathion (5 mM)	0.02	n.b.
Cystein (5 mM)	< 0.005	< 0.005

Anzahl der reduzierten Cysteinresten in anaerobem und aerobem apoFNR

Der Gehalt an freien Cysteinresten (Thiolgruppen) in anaeroben und aeroben apoFNR wurde mittels eines colorimetrischen Testes (Ellman, 1959) bestimmt.

Tab. 3 Anzahl an reduzierten Cysteinresten (Thiolgruppen) in aerob und anaerob isoliertem apoFNR. Freie Thiolgruppen bilden mit DTNB einen farbigen Komplex, der bei 412 nm nachweisbar ist (Ellman, 1959). Aerobes FNR-Protein wurde unter aeroben Bedingungen ohne Zusatz von Reduktionsmittel isoliert. Anaerobes FNR-Protein wurde im Stickstoffzelt mit und ohne Zusatz von Reduktionsmittel gereinigt (siehe Material und Methoden).

FNR	[SH] / FNR (mol/mol)
Aerob isoliertes FNR-Protein	3,5
Anaerob isoliertes FNR-Protein	2,9
Anaerob isoliertes FNR-Protein mit 5 mM DTT im Isolierungspuffer	~ 6,0

Wird FNR in Anwesenheit von DTT isoliert, so liegen alle in FNR vorhandenen 5 Cysteinreste als freie Thiolgruppen vor (Tab. 3). Das aerob isolierte FNR-Protein besitzt 3,5 Cysteinreste in der reduzierten Form. Es liegen also 70% der 5 Cysteinreste als Thiolgruppen vor. Das anaerob isolierte FNR-Protein lieferte hingegen einen ähnlichen Anteil an reduzierten Cysteinresten. Wieso in dieser Probe der Anteil an reduzierten Cysteinresten nicht höher lag, ist unklar.

4.2 Energetische Parameter von *Escherichia coli* in der aeroben und anaeroben Atmung und in der Fermentation

Fakultativ anaerobe Bakterien wie *Escherichia coli* können sowohl unter aeroben als auch anaeroben Bedingungen wachsen. Dabei hängt die Energetik und die ATP-Aubeute wesentlich von dem verfügbaren terminalen Elektronenakzeptor ab. In Anwesenheit von O₂ ist die Freie Energie bei der Oxidation von Glukose ($\Delta G'_0 = -2870$ kJ/mol Glukose) um ein Vielfaches höher als die bei der Glukose-Fermentation ($\Delta G'_0 = -218$ kJ/mol Glukose). Aus diesem Grunde gehen bisherige Annahmen davon aus, daß die energetischen Bedingungen im aeroben und anaeroben Stoffwechsel sich stark unterscheiden.

Der energetische Status einer Zelle wird durch folgende Parameter wiedergegeben: das Phosphorylierungspotential $\Delta G'_{\text{phos}}$, das Membranpotential $\Delta\Psi$ und das Protonenpotential Δp . Diese energetischen Parameter in der aeroben Respiration und in der Fermentation sind Gegenstand bereits vieler Forschungsarbeiten, jedoch hat sich bisher noch kein zusammenhängendes Bild der energetischen Verhältnisse ergeben. Zudem wurde die anaerobe Respiration nicht hinreichend berücksichtigt.

In vielen Veröffentlichungen wird immer wieder diskutiert, ob diese möglicherweise veränderten energetischen Parameter (Membranpotential, Protonenpotential) als regulatorisches Signal dienen, das Aerobiose oder Anaerobiose anzeigt (Bogachev *et al.*, 1993 und 1995).

Voraussetzung dafür, daß die energetischen Parameter als Signal für Aerobiose und Anaerobiose fungieren können, ist eine wesentliche Änderung dieser Parameter unter den beiden Bedingungen. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit die energetischen Parameter von Zellen untersucht, die durch aerobe

und anaerobe Atmung oder Fermentation gewachsen waren. Die relevanten Parameter sind das Phosphorylierungspotential $\Delta G'_{\text{phos}}$, das Membranpotential $\Delta\Psi$ und das Protonenpotential Δp .

Das Phosphorylierungspotential $\Delta G'_{\text{phos}}$

Das Phosphorylierungspotential $\Delta G'_{\text{phos}}$ ist ein Maßstab für den energetischen Status einer Bakterienzelle. $\Delta G'_{\text{phos}}$ wird nach folgender Gleichung berechnet:

$$[1] \quad \Delta G'_{\text{phos}} = \Delta G'_0 + RT \ln \frac{[\text{ATP}]}{([\text{ADP}] \times [\text{P}_i])} \quad \Delta G'_0 = 30,5 \text{ kJ/mol}$$

Für die intrazelluläre Phosphatkonzentration $[\text{P}_i]$ wurde ein Wert von 20 mM (20 $\mu\text{mol/g TG}$) verwendet. $[\text{P}_i]$ ist unter allen Wachstumsbedingungen und bei variablen externen P_i Konzentrationen konstant, da die Aufnahme reguliert wird (Kashket, 1982; Rao et al., 1993; Shulman et al., 1979; Willsky and Malamy, 1976).

Die zellulären Gehalte an ATP und ADP wurden unter aeroben und anaeroben Bedingungen gemessen. Gemäß Gleichung [1] wurden daraus die Phosphorylierungspotentiale unter den verschiedenen Wachstumsbedingungen berechnet.

Gehalte von ATP und ADP während des aeroben Wachstums

Die ATP und ADP Gehalte wurden in wachsenden Kulturen mit dem Luciferase-Test bestimmt. Die Gehalte und ihre Änderungen wurden in den verschiedenen Wachstumsphasen verfolgt. Als Substrat wurde den Zellen Glycerin angeboten, da es nicht fermentierbar ist und nur respiratorisch umgesetzt werden kann.

Der ATP-Gehalt ist in der exponentiellen Wuchsphase hoch ($\geq 11 \mu\text{mol/g TG}$), und fällt in der stationären Phase schnell auf einen niedrigen Wert ($\leq 2,5 \mu\text{mol/gTG}$) ab (Abb. 14A). Dagegen ist die Konzentration an ADP in der expo-

entiellen Phase um einen Faktor von 10 niedriger als die an ATP, zeigt in der stationären Phase aber nur eine minimale Abnahme.

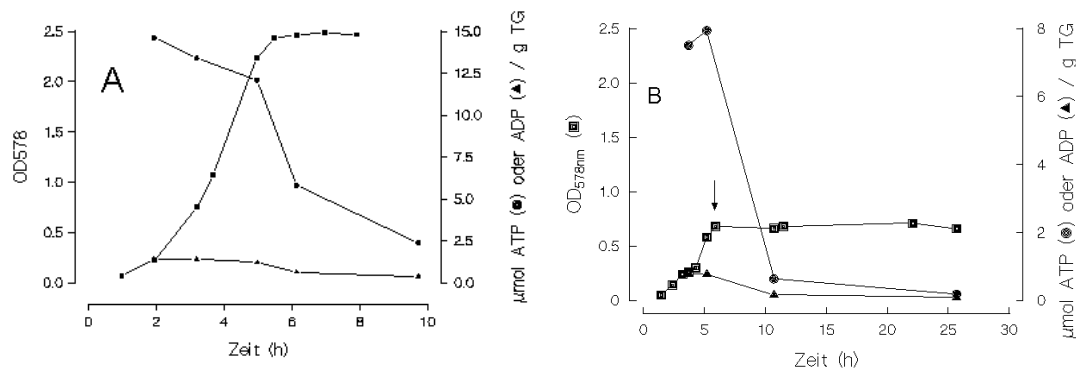


Abb. 14 ATP und ADP Gehalte von AN387 unter aeroben Wachstumsbedingungen mit Glycerin (A, 20 mM und B, 5 mM). Verwendet wurde M9 Medium mit (A) und ohne (B) Zusatz von Aminosäuren. In der Abb. B ist ab dem mit dem Pfeil angedeuteten Zeitpunkt das Substrat Glycerin aufgebraucht. Glycerin im Medium wurde durch HPLC-Analyse nachgewiesen (Tran *et al.*, 1997).

Wird das Wachstum durch Limitierung von Glycerin gestoppt (Abb. 14B), fällt der zelluläre ATP Gehalt abrupt ab und ist in der stationären Wachstumsphase niedriger als der beim allmählichen Übergang zum stationären Wachstum (Abb. 14A). Dieser geordnete Übergang in die stationäre Wachstumsphase (Abb. 14A) ist nicht durch Glycerinmangel induziert (Glycerinverbrauch ≤ 20 mM).

Das hohe ATP / ADP Verhältnis und die Abnahme des ATP Gehaltes von der exponentiellen zur stationären Wachstumsphase hin zeigt, daß die tatsächlichen *in vivo* Gehalte an ATP und ADP bestimmt wurden. Die rasche Abnahme (Abb 14A) weist daraufhin, daß der ATP-Pool einem hohem Umsatz unterworfen ist. Wegen diesem hohen Umsatz ist vor allen Dingen die Probennahme wichtig. Der Zellaufschluss und das Stoppen des Stoffwechsels müssen schnell erfolgen. Zu niedrig bestimmte ATP / ADP Quotienten in der exponentiellen Wachstumsphase sind in der Regel ein Hinweis darauf, daß die Probennahme nicht schnell genug erfolgt ist.

Gehalte von ATP und ADP in der anaeroben Respiration und in der Fermentation

In ähnlichen Experimenten wie für die aerobe Atmung wurden die ATP- und ADP-Gehalte in wachsenden Zellen von *E. coli* bestimmt, die fermentativ oder durch anaerobe Atmung wuchsen. Für die Fermentation wurde Glukose als Substrat verwendet, während die Bakterien in der anaeroben Respiration Glycerin als C- und H-Quelle und Nitrat oder Fumarat als Akzeptor nutzten.

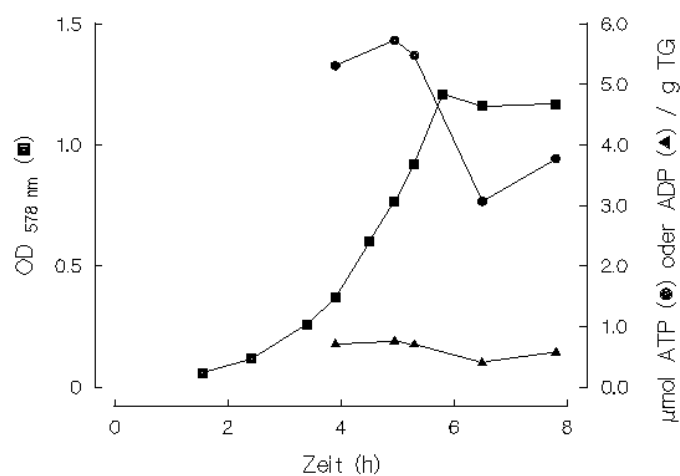


Abb. 15 ATP und ADP Gehalte wachsender Zellen während der Fermentation von Glukose. Die Zellen (AN387) wurden in supplementiertem M9-Medium und 20 mM Glukose gezüchtet.

In der Fermentation (Abb. 15) und in der anaeroben Respiration (Abb. 16) werden ähnliche Verhältnisse wie in der aeroben Atmung beobachtet. Der ATP Gehalt ist im exponentiellen Wachstum hoch, nimmt beim Übergang von der exponentiellen zur stationären Phase stark ab. Eine geringere Abnahme ist bei dem ADP Gehalt zu beobachten. In der Nitratrespiration ist der maximal gemessene ATP Gehalt ähnlich hoch wie in der aeroben Atmung. In der Fumaratrespiration und der Fermentation sind die ATP Gehalte dagegen deutlich niedriger.

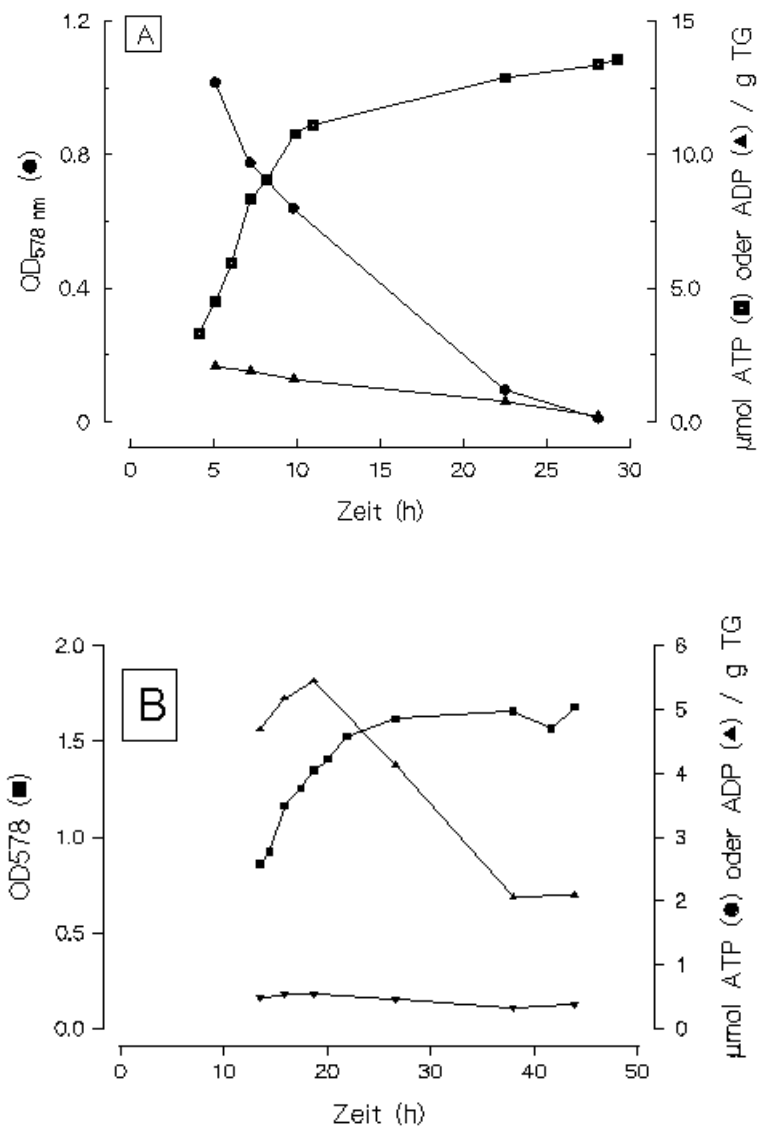


Abb. 16 ATP und ADP Gehalte wachsender Zellen (AN387) in der anaeroben Respiration mit Nitrat (A) oder Fumarat (B). Die Zucht erfolgte in supplementiertem M9-Medium mit Glycerin (40 mM) und Nitrat (50 mM) oder Fumarat (50 mM).

Vergleich der $\Delta G'_{\text{phos}}$ Werte in der exponentiellen und in der stationären Wachstumsphase für die verschiedenen Elektronenakzeptoren

Zur Berechnung der Phosphorylierungspotentiale $\Delta G'_{\text{phos}}$ von *E. coli* bei Wachstum durch aerobe und anaerobe Respiration oder durch Fermentation wurden die ATP und ADP Gehalte aus der exponentiellen Phase ermittelt (Tab. 4). In der aeroben Atmung sind die ATP Gehalte am höchsten, nehmen in der

Nitratrespiration geringfügig und in der Fumarat- und TMAO-Respiration, und in der Fermentation deutlich ab. Eine ähnliche Abnahme ist auch beim ADP Gehalt zu beobachten.

Tab. 4 Effekt von Elektronenakzeptoren auf die ATP und ADP Gehalte sowie auf das Phosphorylierungspotential $\Delta G'_{\text{phos}}$ während des exponentiellen Wachstums. $\Delta G'_{\text{phos}}$ wurde berechnet aus $\Delta G'_{\text{phos}} = 30,5 \text{ kJ/mol} + RT \ln[\text{ATP}] / ([\text{ADP}] * [\text{P}_i])$. Die ATP und ADP Gehalte sind Mittelwerte von Werten aus der exponentiellen Phase. Der Berechnung lag für $[\text{P}_i]$ ein Wert von 20 $\mu\text{mol/g}$ TG zugrunde.

Substrate	ATP ($\mu\text{mol} / \text{g TG}$)	ADP	ATP/ADP	$\Delta G'_{\text{Phos}}$ (kJ / mol)
Glyc + O ₂	13.4	1.3	10.3	47.7
Glyc + NO ₃ ⁻	11.2	2.0	5.6	46.2
Glyc+ TMAO	6.4	0.72	8.9	47.3
Glyc + Fum	5.1	0.5	10.2	47.6
Gluc + N ₂	5.5	0.7	7.6	46.9

Mit Ausnahme der Nitratatmung nimmt der ADP-Gehalt von der aeroben in die anaerobe Atmung und Fermentation um denselben Anteil ab wie der ATP-Gehalt. Daher sind die ATP/ADP Quotienten für die verschiedenen Elektronenakzeptoren relativ ähnlich und variieren maximal um den Faktor von 1,8. Dieser geringe Unterschied hat aufgrund der logarithmischen Funktion in der Gleichung zur Berechnung von $\Delta G'_{\text{phos}}$ keinen Einfluß auf $\Delta G'_{\text{phos}}$ selbst. Entsprechend weisen die Phosphorylierungspotentiale für die aerobe und anaerobe

Atmung sowie für die Fermentation nur geringe Unterschiede auf und liegen alle in dem Bereich zwischen 46,2 – 47,7 kJ/mol.

In der stationären Phase fallen die ATP Gehalte gegenüber dem exponentiellen Wachstum drastisch ab (Tab. 5). In der Nitratatmung ist nur noch 1% des ursprünglichen ATP Gehaltes vorhanden. Da die ADP-Gehalte bei den verschiedenen Elektronenakzeptoren unterschiedlich abnehmen, variieren dadurch die ATP/ADP Verhältnisse und damit auch die $\Delta G'_{\text{phos}}$ -Werte stärker als in der exponentiellen Phase.

Der Übergang von der exponentiellen Wachstumsphase zur stationären Phase hat also eine größere Auswirkung auf den ATP Gehalt und auf das ATP/ADP Verhältnis als das Umschalten vom aeroben zum anaeroben Stoffwechsel.

Tab. 5 Effekt von terminalen Elektronenakzeptoren auf die ATP und ADP Gehalte sowie auf das Phosphorylierungspotential $\Delta G'_{\text{phos}}$ während der stationären Wachstumsphase. Nähere Erläuterungen siehe Tabelle 4

Substrate	ATP ($\mu\text{mol} / \text{g TG}$)	ADP	ATP/ADP	$\Delta G'_{\text{Phos}}$ (kJ / mol)
Glyc + O₂	2.4	0.40	6.0	46.3
Glyc + NO₃⁻	0.1	0.22	0.45	39.9
Glyc+ TMAO	0.7	0.30	2.3	44.0
Glyc + Fum	2.1	0.37	5.7	46.2
Gluc + N₂	3.1	0.41	7.6	46.9

Das Membranpotential $\Delta\Psi$ und das Protonenpotential Δp

Das Membranpotential $\Delta\Psi$ und das Protonenpotential Δp sind weitere wichtige Parameter für den Energiestatus von *E. coli*. $\Delta\Psi$ wird aus der Verteilung des lipophilen Tetraphenylphosphonium-Kations ($[^{14}\text{C}]\text{Ph}_4\text{P}^+$) in den Bakterienzellen ($\text{Ph}_4\text{P}^+_{\text{zelle}}$) und dem sie umgebenden Medium ($\text{Ph}_4\text{P}^+_{\text{ex}}$) bestimmt. Die Anreicherung des Kations in der Zelle hängt nach Gleichung [2] vom Membranpotential $\Delta\Psi$ ab, und $\Delta\Psi$ wird nach dieser Gleichung berechnet. Die Konzentrationen von Ph_4P^+ in der Zelle ($[\text{Ph}_4\text{P}^+_{\text{in}}]$) und im Medium $[\text{Ph}_4\text{P}^+_{\text{ex}}]$ wird bestimmt, nachdem der Elektronentransport und die Verteilung von Ph_4P^+ über der Membranpotential in Gleichgewicht sind.

$$[2] \quad \Delta\Psi = 59 \text{ mV} * \lg [\text{Ph}_4\text{P}^+_{\text{in}}] / [\text{Ph}_4\text{P}^+_{\text{ex}}]$$

Aus der Menge an Ph_4P^+ in der Zelle ($\text{Ph}_4\text{P}^+_{\text{zelle}}$) und dem cytoplasmatischen Volumen läßt sich die intrazelluläre Konzentration an Ph_4P^+ ($[\text{Ph}_4\text{P}^+_{\text{in}}]$) bestimmen.

Das cytoplasmatische Volumen der Zellen wird über die Verteilung des nicht membrangängigen ^{14}C -Taurin und des membrangängigen $^3\text{H}_2\text{O}$ in der Lösung und in der Zelle bestimmt (Rottenberg, 1979). Dadurch lassen sich der extrazelluläre Raum (^{14}C -Taurin) und der $[^3\text{H}_2]\text{O}$ -Raum (extrazellulärer und intrazellulärer Raum) berechnen. Das cytoplasmatische Volumen der Zelle erhält man durch die Subtraktion beider Räume:

$$[3] \quad V_i = ^3\text{H-Raum} - ^{14}\text{C-Raum}$$

Die intrazelluläre Konzentration an Ph_4P^+ gibt allerdings nicht die gesuchte spezifische Konzentration an Ph_4P^+ in der Zelle wieder. Für *E. coli* und andere Bakterien ist bekannt, daß ein beträchtlicher Anteil von $\text{Ph}_4\text{P}^+_{\text{zelle}}$ unspezifisch an Zellkomponenten wie Membranen bindet (Mell et al., 1986; Wloczyk et al.,

1989). Demnach setzt sich die Menge an Ph_4P^+ in der Zelle ($[\text{Ph}_4\text{P}^+_{\text{zelle}}]$) aus Ph_4P^+ im Cytoplasma ($[\text{Ph}_4\text{P}^+_{\text{in}}]$) und aus Ph_4P^+ zusammen, welches unspezifisch an Zellkomponenten bindet. Es existieren einige Methoden, die eine Abschätzung der spezifischen, intrazellulären Konzentration an Ph_4P^+ ($[\text{Ph}_4\text{P}^+_{\text{in}}]$) aus $[\text{Ph}_4\text{P}^+_{\text{zelle}}]$ erlauben. Mit $[\text{Ph}_4\text{P}^+_{\text{in}}]$ und $[\text{Ph}_4\text{P}^+_{\text{ex}}]$ läßt sich dann nach Gleichung [2] das Membranpotential $\Delta\Psi$ berechnen.

Das Elektrochemische Protonenpotential Δp setzt sich zusammen aus:

$$[4] \quad \Delta p = \Delta\Psi + \Delta\text{pH}$$

ΔpH wird ähnlich wie für $\Delta\Psi$ aus der Verteilung von ^{14}C Benzoat zwischen dem Cytoplasma und dem die Zelle umgebenden Medium bestimmt.

$$[5] \quad \Delta\text{pH} = \log [\text{Benzoat}_{\text{in}}] / [\text{Benzoat}_{\text{ex}}]$$

Korrekturmethode bei der Messung von $\Delta\Psi$

Die Bestimmung an freiem intrazellulären Ph_4P^+ erfolgte nach der Korrekturmethode nach Zaritzky (Zaritzky et al., 1981). Das Verfahren geht davon aus, daß die Menge an unspezifisch gebundenen Ph_4P^+ eine Funktion der internen und der externen Konzentration an Ph_4P^+ und einer Bindungskonstante ist. Die Menge an unspezifisch gebundenen Ph_4P^+ steigt also mit $[\text{Ph}_4\text{P}^+_{\text{zelle}}]$ an. Nach Zaritzky wird $[\text{Ph}_4\text{P}^+_{\text{in}}]$ aus $[\text{Ph}_4\text{P}^+_{\text{zelle}}]$, $[\text{Ph}_4\text{P}^+_{\text{ex}}]$ und einer für *E. coli* spezifischen Bindungskonstante ($K = 19 \text{ ml/g TG}$) nach folgendem iterativen Näherungsverfahren ermittelt:

$$[5] \quad [\text{Ph}_4\text{P}^+_{\text{in}}]_{n+1} = [\text{Ph}_4\text{P}^+_{\text{ex}}] + \frac{[\text{Ph}_4\text{P}^+_{\text{zelle}}] - [\text{Ph}_4\text{P}^+_{\text{in}}]_n}{K} * \ln \frac{[\text{Ph}_4\text{P}^+_{\text{in}}]_n}{[\text{Ph}_4\text{P}^+_{\text{ex}}]}$$

Für $n = 0$ wird mit $[\text{Ph}_4\text{P}^+_{\text{in}}] = 20 \mu\text{M}$ gestartet.

Nach der Korrekturmethode von Zaritzky macht $[\text{Ph}_4\text{P}^+_{\text{in}}]$ nur noch einen Anteil von 18 – 22 % von $[\text{Ph}_4\text{P}^+_{\text{zelle}}]$ aus (Tab. 6). 80 % der aufgenommenen Menge

an Ph_4P^+ hat unspezifisch an Zellkomponenten gebunden. In einem Kontrollexperiment wurde Toluol als Entkoppler zu den mit EDTA behandelten Zellen gegeben. Nach Bestimmung von $[\text{Ph}_4\text{P}^+_{\text{in}}]$ nach der Korrekturmethode von Zaritzky war $[\text{Ph}_4\text{P}^+_{\text{in}}]$ gleich groß wie $[\text{Ph}_4\text{P}^+_{\text{ex}}]$. Dies bestätigt also die Richtigkeit der Korrekturmethode nach Zaritzky.

Tab. 6 Gemessene Konzentrationen an Tetraphenylphosphonium-Kationen (^{14}C Ph_4P^+) in der Zelle $[\text{Ph}_4\text{P}^+_{\text{zelle}}]$ und tatsächlich freie, intrazelluläre Konzentration $[\text{Ph}_4\text{P}^+_{\text{in}}]$ nach der Korrekturmethode von Zaritzky

Substrat	$[\text{Ph}_4\text{P}^+_{\text{zelle}}]$	$[\text{Ph}_4\text{P}^+_{\text{in}}]$
	μM	
Glycerin + O_2	4209	945
Glycerin + Nitrat	2809	601
Glycerin + DMSO	2661	545
Glycerin + Fumarat	3183	677
Glukose	1547	279

$\Delta\Psi$ und Δp bei Wachstum mit verschiedenen Elektronenakzeptoren und in der Fermentation

$\Delta\Psi$ wurde in mit EDTA behandelten Zellen, die vorher mit den entsprechenden Substraten inkubiert wurden, gemessen (Tab. 7). Die $\Delta\Psi$ Werte wurden alle aus freien, intrazellulären $[\text{Ph}_4\text{P}^+]$ -Gehalten berechnet, die nach der Methode von Zaritzky erhalten wurden. $\Delta\Psi$ ist in der aeroben Atmung mit Glycerin am höchsten (-140 mV) und nimmt in der Glukose-Fermentation auf -105 mV ab. In der anaeroben Atmung nimmt $\Delta\Psi$ dagegen nur leicht gegenüber der aeroben Atmung ab (10 mV bis 15 mV). Das cytoplasmatische Volumen V_i variiert unter allen Bedingungen um einen Faktor von 2.

Unter allen Bedingungen ist ΔpH höchstens 20 mV groß, dies entspricht einem ΔpH -Wert von 0,3. Das daraus errechnete Protonenpotential Δp ergibt für die

aerobe Atmung mit -160 mV einen für Bakterien typischen Wert. In der anaeroben Atmung nimmt Δp mit 20 mV nur leicht ab. Mit -117 mV weist nur die Fermentation einen deutlich niedrigeren Wert auf.

Tab. 7 Das Membranpotential $\Delta\Psi$ und das Protonenpotential Δp in der aeroben und anaeroben Atmung und in der Fermentation. Das intrazelluläre Volumen V_i , das Membranpotential $\Delta\Psi$ und ΔpH wurden jeweils in drei oder mehr unabhängigen Experimenten gemessen. $\Delta\Psi$ wurde aus der tatsächlichen Verteilung von $[^{14}\text{C}]\text{Ph}_4\text{P}^+$ in der Zelle und im Medium bestimmt (siehe auch Tab. 6). ΔpH wurde aus der Verteilung von $[^{14}\text{C}]\text{Benzoat}$ bestimmt. Bestimmung von V_i siehe Text. $\Delta p = \Delta\Psi + \Delta pH$

Substrat	V_i	$\Delta\Psi$	ΔpH	Δp
	$\mu\text{l}/\text{mg TG}$		mV	
Glycerin + O_2	0,7	-140	-20	-160
Glycerin + Nitrat	1,0	-130	-14	-144
Glycerin + DMSO	1,1	-125	-12	-137
Glycerin + Fumarat	0,9	-130	-15	-145
Glukose	1,4	-105	-12	-117

Festzuhalten ist also, daß das Membranpotential $\Delta\Psi$ und das Protonenpotential Δp in der anaeroben Atmung nur geringfügig gegenüber der aeroben Atmung abnimmt. Diese Abnahme ist für die anaeroben Atmungen mit Nitrat, DMSO und Fumarat vergleichbar. Lediglich die Fermentation zeigt ein deutlich niedrigeres Membranpotential und Protonenpotential.

5 Diskussion

5.1 Glutathion als Reduktionsmittel für die Bildung von $[4\text{Fe}4\text{S}]^{2+}$ -FNR

Assemblierung und Einbau des $[4\text{Fe}4\text{S}]^{2+}$ -Zentrums in FNR benötigt Reduktionsmittel für zwei verschiedene Reaktionen. Zum einen kann mit Hilfe eines Reduktionsmittel Sulfid aus Cystein oder Persulfid gebildet werden. Zum anderen können damit die Cystein-Liganden für das $[4\text{Fe}4\text{S}]^{2+}$ -Zentrum in FNR reduziert werden. Erst damit wird ein Einbau des FeS-Zentrums möglich. Diese Reduktion der Cysteinreste ist wichtig, da sowohl in anaeroben sowie aeroben apoFNR maximal 70% der Cysteinreste in reduziertem Zustand vorliegen. Mit dem zellulären Reduktionsmittel Glutathion konnte im *in vitro* Rekonstitutionsversuch $[4\text{Fe}4\text{S}]^{2+}$ -FNR effizient gebildet werden. Dies zeigt, daß mit reduziertem Glutathion Sulfid gebildet und die Cysteinreste in FNR reduziert werden können. Diese Beteiligung von Glutathion an beiden Reaktionen könnte ein Grund für die biphasische Reaktionskinetik sein, die bei der Rekonstitution mit Glutathion beobachtet werden konnte. Eine schnellere Assemblierungskinetik konnte mit Dithiothreitol (DTT) erreicht werden. Mit Cystein hingegen blieb die Bildung von $[4\text{Fe}4\text{S}]^{2+}$ -FNR aus. Diese Unterschiede könnten aus den unterschiedlichen Redoxpotentialen von DTT ($E^0 = -332 \text{ mV}$), Glutathion ($E^0 = -240 \text{ mV}$) und Cystein ($E^0 = -210 \text{ mV}$) erklärt werden (Clark, 1960; Cleland, 1964; Åslund *et al.*, 1997). Cystein wäre auch in der Lage, die Cysteinreste in FNR zu reduzieren. Die Reduktion von Schwefel aus einem Persulfid in der NifS-katalysierten Bildung von Sulfid ($E^0 \text{ S}_n/\text{HS}^- = -260 \text{ mV}$) ist in hohen Raten hingegen nur mit DTT und reduziertem Glutathion möglich.

Die Bedeutung von Glutathion unter *in vivo* Bedingungen für die Bildung von aktivem $[4\text{Fe}4\text{S}]^{2+}$ -FNR und seine Erhaltung des funktionellen Zustandes kann unter mikroaeroben Verhältnissen beobachtet werden. Dann ist in der *gshA*-Mutante die Um-

schaltung von aeroben apoFNR zum anaeroben, aktiven $[4Fe_4S]^{2+}$ -FNR in hohem Maße gestört. Es ist nicht überraschend, daß unter anaeroben Bedingungen bei Fehlen von Glutathion kein Einfluß auf den funktionellen Zustand von FNR beobachtet werden konnte. Wie später noch zu erläutern wird, scheint der Funktionszustand von FNR von einer O_2 -induzierten, schnellen Inaktivierung und einer konstanten Aktivierung durch zelluläre Reduktionsmittel kontrolliert zu werden. Die Aktivierung läuft vermutlich langsamer als die Inaktivierung ab. Aus der Assemblierungs- und O_2 -induzierten Abbaukinetik des $[4Fe_4S]^{2+}$ -Zentrums (Abb. 10B) kann abgeschätzt werden, daß die Rekonstitution mit DTT dreimal langsamer als der Abbau selbst abläuft. Mit Glutathion ist die Geschwindigkeit sogar um den Faktor 7 geringer. Ohne Glutathion wird die Geschwindigkeit der Assemblierung noch weiter herabgesenkt, und führt, wie hier gezeigt, zu einer Verschiebung des $pO_{0,5}$ zu niedrigeren O_2 -Partialdrücken. Eine Assemblierung findet weiterhin statt, wenn auch viel langsamer. Diese Aktivität ist auf andere zelluläre Reduktionsmittel oder Enzyme zurückzuführen, die Glutathion ersetzen können. Diese geringeren Aktivitäten reichen aus, um aktives $[4Fe_4S]^{2+}$ -FNR unter mikroaeroben bzw. anaeroben Bedingungen neu zu bilden, wenn die Inaktivierung sehr niedrig bzw. nicht mehr da ist.

Glutathion nimmt also eine besondere Bedeutung für die Funktion von FNR ein. Es konnte gezeigt werden, daß im *in vitro* Experiment mit Glutathion als Reduktionsmittel die Assemblierung des $[4Fe_4S]^{2+}$ -Zentrums in FNR schnell ablaufen kann, und daß die *gshA*-Mutante zu einer Verschlechterung des den funktionellen Zustand von FNR kennzeichnenden $pO_{0,5}$ -Wertes führt.

Reaktivierung von O_2 -inaktiviertem FNR (aerobes apoFNR)

Frühere Experimente unter *in vivo* (Engel *et al.*, 1991) und *in vitro* (Green *et al.*, 1996; Khoroshilova *et al.*, 1997) Bedingungen haben gezeigt, daß anaerobes FNR

aus O_2 -inaktiviertem FNR regeneriert werden kann. In der vorliegenden Untersuchung konnte die Bildung von $[4Fe_4S]^{2+}$ -FNR aus dem aeroben apoFNR beobachtet werden. ApoFNR ohne ein FeS-Zentrum wird in *E. coli* auch unter aeroben Bedingungen gebildet. Die Rekonstitution des aeroben apoFNR und des anaeroben apoFNR laufen annähernd gleich schnell ab. Beide Reaktionen scheinen also auch unter *in vivo* Bedingungen wichtig zu sein. Die Bedeutung von aeroben apoFNR gegenüber $[2Fe_2S]^{2+}$ -FNR ist jedoch unklar.

Mit den dargestellten Ergebnissen lassen sich die Aktivierung und Inaktivierung von allen bekannten FNR-Formen als zyklischen Prozeß darstellen (Abb. 17). Zusätzlich zu den in der Abbildung gezeigten Reaktionen kann $[4Fe_4S]^{2+}$ -FNR auch direkt aus $[2Fe_2S]^{2+}$ -FNR wieder gebildet werden (Green *et al.*, 1996; Khoroshilova *et al.*, 1997). Die Bedeutung der verschiedenen Synthesewege für $[4Fe_4S]^{2+}$ -FNR ist unklar.

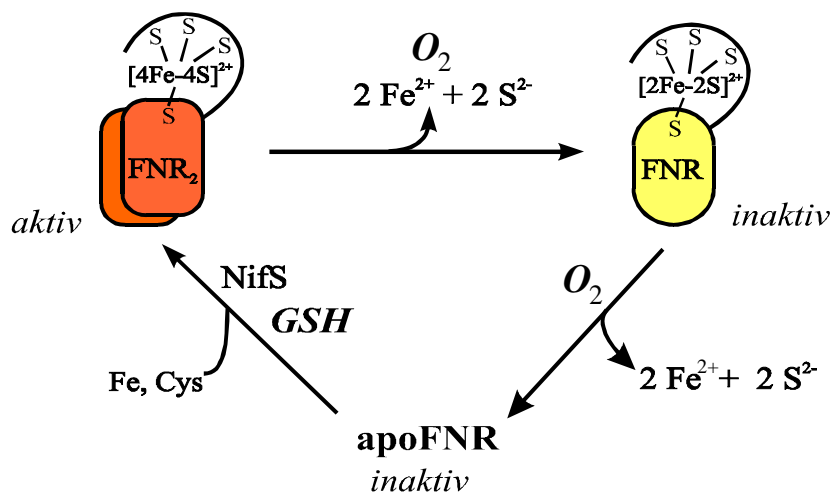


Abb. 17 Schema für die reversible Umwandlung von apoFNR, aktivem $[4Fe_4S]^{2+}$ -FNR und $[2Fe_2S]^{2+}$ -FNR. ApoFNR wurde als Produkt bei der Disassemblierung des $[2Fe_2S]^{2+}$ -FNR erhalten. Die an den Reaktionen beteiligten Faktoren (O_2 , Fe^{2+} , Cystein, Glutathion, NifS) sind angegeben. Das beim Abbau des $[4Fe_4S]^{2+}$ -FNR freigesetzte Fe^{2+} könnte in irgendeiner Weise noch an FNR gebunden bleiben (Jordan *et al.*, 1997).

Kontrolle über den funktionellen Status von FNR

Aus der Abb. 17 geht hervor, daß der funktionelle Status von FNR durch das Verhältnis von aktivem FNR ($[4\text{Fe}_4\text{S}]^{2+}\cdot\text{FNR}$) zum inaktiven FNR ($[2\text{Fe}_2\text{S}]^{2+}\cdot\text{FNR}$) und apoFNR) wiedergegeben wird. Dieses Verhältnis wird durch die Bildung von $[4\text{Fe}_4\text{S}]^{2+}\cdot\text{FNR}$ und dessen Abbau bestimmt. Der Abbau hängt von der Anwesenheit von O_2 ab und läuft auch in Anwesenheit von Reduktionsmitteln wie Glutathion und DTT schnell ab. Die Bildung von $[4\text{Fe}_4\text{S}]^{2+}\cdot\text{FNR}$ hingegen verläuft langsam und gleichmäßig ab, da die Konzentrationen oder Aktivitäten der beteiligten Faktoren (NifS, Cystein, FNR, reduziertes Glutathion [Tuggle & Fuchs, 1985] und Fe^{2+} [Niehaus *et al.*, 1991]) unter aeroben und anaeroben Bedingungen annähernd unverändert bleiben. Die Änderung der Konzentration von FNR in der aeroben und anaeroben Atmung ist minimal (Unden & Duchene, 1987), da FNR seine Expression selbst reguliert (Spiro & Guest, 1987). Unter den genannten Faktoren hat daher O_2 und der resultierende Abbau des $[4\text{Fe}_4\text{S}]^{2+}$ -Zentrums den meisten regulatorischen Einfluß auf den funktionellen Zustand von FNR.

5.2 Änderungen der energetischen Parameter im aeroben und anaeroben Stoffwechsel

Ausgangspunkt der Untersuchungen war die Fragestellung, ob das Phosphorylierungspotential oder Protonenpotential in *E. coli* ein Signal für das Umschalten vom aeroben zum anaeroben Stoffwechsel darstellt. Diese Frage war bereits Gegenstand mehrerer Untersuchungen, aber die Untersuchungen waren nur unvollständig. Deshalb wurden die energetischen Parameter hier vergleichend für die aerobe und anaerobe Respiration und fermentativen Stoffwechsel bestimmt.

ATP-Gehalte und das Phosphorylierungspotential $\Delta G'_{\text{phos}}$

Große Änderungen zeigte der Gehalt an ATP. Er sank verglichen mit dem aeroben Wachstum in der anaeroben Dimethylsulfoxid-Respiration um einen Faktor von 4,5 und in der Fumarat-Respiration um 2,6 (Tab. 4).

Die Änderung in den ATP-Gehalten beeinflussen jedoch nicht das Phosphorylierungspotential. Das $\Delta G'_{\text{phos}}$, das durch das Verhältnis des ATP-Gehaltes zum ADP-Gehalt bestimmt wird, bleibt im aeroben, anaeroben und fermentativen Wachstum konstant, da der ADP-Gehalt unter den genannten Bedingungen um denselben Anteil abnahm wie der ATP-Gehalt. Das Phosphorylierungspotential kann in *E. coli* also nicht als Signal für aerobes oder anaerobes Wachstum genutzt werden.

Das Membranpotential $\Delta\Psi$ und Protonenpotential Δp

Die hier bestimmten Werte für $\Delta\Psi$ (-140 mV) und Δp (-160 mV) in der aeroben Respiration sind vergleichbar mit Werten aus früheren Messungen (Kashket *et al.*, 1981; 1982). In der anaeroben Atmung mit Nitrat, Fumarat oder Dimethylsulfoxid sinkt Δp lediglich um 20 mV. Der hier gemessene Unterschied zwischen aerobem und anaerobem Wachstum ist also minimal, während in früheren Untersuchungen in der Fumarat-Atmung eine Abnahme auf -100 mV beobachtet worden war (Hellingwerf *et al.*, 1981). Da hier alle Werte unter vergleichbaren Bedingungen bestimmt worden sind, und fehlerhafte Meßbedingungen eher zu niedrigeren Werten führen, scheinen die hohen Werte zuverlässig gemessen worden zu sein. Die Situation in *E. coli* ist also vergleichbar mit der in *Wolinella succinogenes*. Dort beträgt Δp bei Wachstum mit elektropositiven (Nitrat oder Fumarat) oder elektronegativen (Schwefel) Elektronenakzeptoren gleichbleibend -170 mV (Wloczyk *et al.*, 1989; Mell *et al.*, 1986).

In *E. coli* wird die Messung von $\Delta\Psi$ durch die Anwesenheit von Effluxcarrier für Tetraphenylphosphonium-Kationen (TPP^+) erschwert, die unter ganz bestimmten Be-

dingungen induziert werden (Lewis, 1994; Yerushalmi *et al.*, 1995). Da $\Delta\Psi$ über die Verteilung von TPP^+ bestimmt wird, können solche Carrier das Ergebnis verfälschen. In der vorliegenden Untersuchung wurden solche Bedingungen vermieden, die die Carrier induzieren könnten. Dazu zählen stationäres Wachstum oder die Anwesenheit von Fettsäuren oder Detergentien im Medium.

Die Beträge von $\Delta G'_{\text{phos}}$ und Δp , die für die Bakterien gemessen werden, erlauben Vorhersagen, wieviele Protonen minimal (m_{min}) zur ATP-Synthese durch die ATP-Synthase benötigt werden (H^+/ATP). Diese minimale Stöchiometrie kann aus folgender Gleichung abgeleitet werden:

$$\Delta G'_{\text{phos}} \leq m_{\text{min}} \times F \times \Delta p \quad m_{\text{min}} (\text{H}^+/\text{ATP})$$

$$F \text{ (Faradaysche Konstante, } 9,648456 \times 10^4 \text{ C} \times \text{mol}^{-1}\text{)}$$

Tab. 8 Beziehung zwischen den energetischen Parametern (Δp , $\Delta G'_{\text{phos}}$) und der minimalen Stöchiometrie für die ATP Synthese durch die ATP Synthase (m_{min}). m_{min} wurde berechnet aus $\Delta G'_{\text{phos}} \leq m_{\text{min}} \times F \times \Delta p$. Die Werte für Δp und $\Delta G'_{\text{phos}}$ stammen aus den Tabellen 4 und 7. F (Faradaysche Konstante).

Wachstumssubstrat	Δp [mV]	$\Delta G'_{\text{phos}}$ [kJ/mol]	$m_{\text{min}} (\text{H}^+/\text{ATP})$
Glycerin + O_2	-160	47,7	3,1
Glycerin + Nitrat	-144	46,2	3,3
Glycerin + Me_2SO	-137	47,2	3,6
Glycerin + Fumarat	-145	47,6	3,4

Me_2SO : Dimethylsulfoxid

Mit den Δp und $\Delta G'_{\text{phos}}$ Werten der aeroben und anaeroben Respiration kann berechnet werden, daß mindestens 3,1 - 3,6 H^+/ATP benötigt werden (Tab. 8). Dieser Wert steht in Einklang mit dem vorgeschlagenen Wert von 3-4 (H^+/ATP) (Kashket, 1982, 1983). Mit dem in früheren Untersuchungen bestimmten Wert von -100 mV für

Δp ergibt sich für m_{\min} ein Wert von 5. Da solch hohe H^+/ATP -Quotienten sehr unwahrscheinlich sind, ist ein Wert von $\Delta p = -100$ mV in der anaeroben Atmung auch wegen dieser Überlegungen sehr unwahrscheinlich. In der Fermentation ist der niedrige Wert von -117 mV für Δp dagegen denkbar, da die ATP Synthese unter diesen Bedingungen durch Substratkettenphosphorylierung erfolgt.

$\Delta G'_{\text{phos}}$ und Δp : kein Signal für die aerobe und anaerobe Respiration

Die Änderungen der Werte für das Phosphorylierungspotential und Protonenpotential im aeroben und anaeroben Elektronentransport von *E. coli* sind zu niedrig, um als Kenngröße für das Umschalten vom aeroben zum anaeroben Wachstum oder als Signal für aerobe und oder anaerobe Verhältnisse dienen zu können.

6. Veröffentlichungen

- Tran, Q. H., Bongaerts, J., Vlad, D., Uden, G. (1997) Requirement for the proton-pumping NADH dehydrogenase I of *Escherichia coli* in respiration of NADH to fumarate and its bioenergetics implications
Eur. J. Biochem. 244: 155-160
- Tran, Q. H. & Uden, G. (1998) Changes in the proton potential and the cellular energetics of *Escherichia coli* during growth by aerobic and anaerobic respiration or by fermentation
Eur. J. Biochem. 251: 538-543
- Tran, Q. H., Arras, T., Becker, S., Holighaus, G., Ohlberger, G., Uden, G. (2000) Role glutathione in the formation of the active form of the oxygen sensor FNR ([4Fe4S]-FNR) and in the control of FNR function
Eur. J. Biochem. 267 (15)

7. Literatur

- Åslund, F., Berndt, K. D., Holmgren, A. (1997) Redox potentials of glutaredoxins and other thiol-disulfide oxidoreductase of the thioredoxin superfamily determined by direct protein-protein redox equilibria
J. Biol. Chem. 272: 30 780-30 786
- Arras, T., Schirawski, J., Uden, G. (1998) Availability of O₂ as a substrate in the cytoplasm bacteria under aerobic and microaerobic conditions
J. Bacteriol. 180: 2133-2136
- Bakker, E. P. (1982) Membrane in a potassium transport-negative mutant of *Escherichia coli* K-12 . The distribution of Rubidium in the presence of Valinomycin indicates a higher potential than that of the tetraphenylphosphonium cation
Biochim. Biophys. Acta 681: 474-483
- Becker, S., Holighaus, G., Gabrielczyk, T., Uden, G. (1996) O₂ as the regulatory signal for FNR-dependent gene regulation in *Escherichia coli*
J. Bacteriol. 178: 4515-4521
- Beinert, H., Kiley, P. (1996) Redox control of gene expression involving iron-sulfur proteins. Change of oxidation-state or assembly/disassembly of Fe-S clusters?
FEBS Letters 382: 218-219
- Bogachev, A. V., Murtazina, R. A., Skulachev, V. P. (1993) Cytochrom d induction in *Escherichia coli* growing under unfavorable conditions
FEBS Letters 336: 75-78
- Bogachev, A. V., Murtazina, R. A., Shestopalov, A. I., Skulachev, V. P. (1995) Induction of the *Escherichia coli* cytochrome d by low $\Delta\mu_{H^+}$ and by sodium ions
Eur. J. Biochem. 232: 304-308
- Clark, W. M. (1960) Oxidation-Reduction potentials of organic systems
Williams & Wilkins
- Cleland, W. W. (1964) Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups
Biochemistry 3: 480-482
- Cole, H. A., Wimpenny, J. W. T., Hughes, D. E. (1967) The ATP pool in *Escherichia coli*
Biochim. Biophys. Acta 143: 445-453
- Ellman, G. L. (1959) Tissue sulfhydryl groups
Arch. Biochem. Biophys. 82: 70-77
- Engel, P., Trageser, M., Uden, G. (1991) Reversible interconversion of the functional state of the gene regulator FNR from *Escherichia coli* *in vivo* by O₂ and iron availability
Arch. Microbiol. 156: 463-470

- Flint, D. H. (1996) *Escherichia coli* contains a protein that is homologous in function and N-terminal sequence to the protein encoded by the *nifs* gene of *Azotobacter vinelandii* and that can participate in the synthesis of the Fe-S cluster of dihydroxy-aciddehydratase
J. Biol. Chem. 271: 16 068-16 074
- Galla, H. J. (1988) *Spektroskopische Methoden in der Biochemie*
Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- Green, J., Trageser, M., Six, S., Unden, G., Guest, J. R. (1991) Characterization of the FNR protein of *Escherichia coli*, an iron-binding transcriptional regulator
Proc. R. Soc. Lond. B 244: 137-144
- Green, J., Sharrocks, A. D., Green, B., Geisow, M., Guest, J. R. (1993) Properties of FNR proteins substituted at each of the five cysteine residues
Mol. Microbiol. 8: 61-68
- Green, J., Bennett, B., Jordan, P., Ralph, E.T., Thomson, A. J., Guest, J. R. (1996) Reconstitution of the [4Fe4S] cluster in FNR and demonstration of the aerobic-anaerobic transcription switch *in vitro*
Biochem. J. 316: 887-892
- Green, J., Irvine, A. S., Meng, W., Guest, J. R. (1996b) FNR-DNA interactions at natural and semi-synthetic promoters
Mol. Microbiol. 19(1): 125-137
- Griffith, A. & Cole, J. (1987) Lack of redox control of the anaerobically-induced *nirB*⁺ gene of *Escherichia coli*
Arch. Microbiol. 147:364-369
- Gunsalus R. P. (1992) Control of electron flow in *Escherichia coli*: Coordinated transcription of respiratory pathway genes
J. Bact., 174: 7069-7074
- Hellingwerf K. J., Bolscher, J. G. M., Konings, W. N. (1981) The electrochemical proton gradient generated by fumarate-reductase system in *Escherichia coli* and its bioenergetics implications
Eur. J. Biochem. 113: 369-374
- Hidalgo, E. & Demple, B. (1996) Activation of SoxR-dependent transcription *in vitro* by non-catalytic or NifS-mediated assembly of [2Fe2S] clusters into Apo-SoxR
J. Biol. Chem. 271: 7269-7272
- Holighaus, G. (1998) Doktorarbeit
- Hwang C., Sinskey A. J., Lodish H. F. (1992) Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum
Science 257(5076):1496-1502.

- Jordan, P. A., Edward, A. J., Ralph, T., Guest, J. R., Green, J. (1997) FNR is a direct oxygen sensor having a biphasic response curve
FEBS Letters 416: 349-352
- Kashket, E. R. (1981) Effect of aerobiosis and nitrogen source on the proton motive force in growing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* cells
J. Bacteriol. 146: 377-384
- Kashket, E. R. (1982) Stoichiometry of the H⁺-ATPase of growing and resting, aerobic *Escherichia coli*
Biochemistry 21: 5534-5538
- Kashket, E. R. (1983) Stoichiometry of the H⁺-ATPase of *Escherichia coli* cells during anaerobic growth
FEBS Letters 154: 343-346
- Khoroshilova, N., Beinert, H., Kiley, P. (1995) Association of a polynuclear iron-sulfur center with a mutant FNR protein enhances DNA binding
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 2499-2503
- Khoroshilova, N., Popescu, C., Münck, E., Beinert, H., Kiley, P. (1997) Iron-sulfur cluster disassembly in FNR protein of *Escherichia coli* by O₂: [4Fe4S] to [2Fe2S] conversion with loss of biological activity
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 6087-6092
- Kosower N. S. & Kosower E. M. (1978) The glutathione status of cells.
Int. Rev. Cytol. 54:109-160
- Lazazzera, B. A., Bates, D. M., Kiley, P. J. (1993) The activity of the *Escherichia coli* transcription factor FNR is regulated by a change in oligomeric state
Genes & Development 7: 1993-2005
- Lazazzera, B. A., Beinert, H., Khoroshilova, N., Kennedy, M. C., Kiley, P. J. (1996) DNA binding and dimerization of the Fe-S-containing FNR protein of *Escherichia coli* are regulated by oxygen
J. Biol. Chem. 171: 2762-2768
- Lewis, K. (1994) Multidrug resistance pumps in bacteria: variations on a theme
Trends Biochem. Sci. 19: 119-123
- Melville, S. B., Gunsalus, R. P. (1996) Isolation of an oxygen-sensitive FNR protein of *Escherichia coli*: Interaction at activator and repressor sites of FNR-controlled genes
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 1226-1231
- Mell, H. (1985) Doktorarbeit
- Mell, H., Wellnitz, C., Kröger, A. (1986) The electrochemical proton potential and the proton/electron ratio of the electron transport with fumarate in *Wolinella succinogenes*
Biochim. Biophys. Acta 852: 212-221

- Miller, J. H. (1992) A short course in bacterial genetics
Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Niehaus, F., Hantke, K., Uden, G. (1991) Iron content and FNR-dependent gene regulation in *Escherichia coli*
FEMS Microbiol. Letters 84: 319-323
- Palmer, G. (1973) Iron Sulfur proteins
W. Lovenberg ed., Academic Press, New York 2: 285-325
- Prinz, W. A., Åslund, F., Holmgren, A., Beckwith, J. (1997) The role of thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm
J. Biol. Chem. 272: 15 661-15 667
- Rao, N. N., Roberts, M. F., Torriani, A., Yashphe, J. (1993) Effect of *glpT* and *glpD* mutations on expression of *phoA* gene in *Escherichia coli*
J. Bacteriol. 175: 74-79
- Rottenberg, H. (1979) The measurement of membrane potential and pH in cells, organelles, and vesicles
Methods Enzymol. 55: pp. 547-569
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) Molecular cloning, A laboratory manual, Cold Spring Harbor, New York; Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Shulman, R. G., Brown, T., Ugurbil, K., Ogawa, S., Cohen, S. M., den Hollander, J. A. (1979) Cellular applications of ³¹P and ¹³C nuclear magnetic resonance
Science 205: 160-166
- Skulachev, V. P. (1992) The laws of cell energetics
Eur. J. Biochem. 208: 203-209
- Spielmann, H., Jacob-Müller, U., Schulz, P. (1981) Simple assay of 0,1-1,0 pmol of ATP, ADP und AMP in single somatic cells using purified luciferin luciferase
Anal. Biochem. 113: 172-178
- Spiro, S. & Guest, J. R. (1987) Regulation and overexpression of the *fnr* gene of *Escherichia coli*
J. Gen. Microbiol. 133: 3279-3288
- Spiro, S. & Guest, J. R. (1990) FNR and its role in oxygen-regulated gene expression in *Escherichia coli*
FEMS Microbiol. Reviews 75: 399-428
- Trageser, M. & Uden, G. (1989) Role of cysteine residues and metal ions in the regulatory functioning of FNR, the transcriptional regulator of anaerobic respiration in *E. coli*
Mol. Microbiol. 3: 593-599

- Trageser, M., Spiro, S., Duchene, A., Kojoro, E., Fahrenholz, F., Guest, J. R., Uden, G. (1990) Isolation of intact FNR protein (Mr 30 000) of *Escherichia coli*
Mol. Microbiol. 4(1): 21-27
- Tran, Q. H., Bongaerts, J., Vlad, D., Uden, G. (1997) Requirement for the proton-pumping NADH dehydrogenase I of *Escherichia coli* in NADH → fumarate respiration and bioenergetics implications
Eur. J. Biochem. 244: 155-160
- Tran, Q. H., Arras, T., Becker, S., Holighaus, G., Ohlberger, G., Uden, G. (2000) Role glutathione in the formation of the active form of the oxygen sensor FNR ([4Fe4S]₂-FNR) and in the control of FNR function
Eur. J. Biochem. 267 (15)
- Tuggle, C. K. & Fuchs, J. A. (1985) Glutathione reductase is not required for maintenance of reduced glutathione in *Escherichia coli* K-12
J. Bacteriol. 162: 448-450
- Tyson K. L., Cole J. A., Busby S. J. (1994) Nitrite and nitrate regulation at the promoters of two *Escherichia coli* operons encoding nitrite reductase: identification of common target heptamers for both NarP- and NarL-dependent regulation
Mol Microbiol 13(6):1045-1055
- Uden, G. & Duchene, A. (1987) On the role of cyclic AMP and the FNR protein in *E. coli* growing anaerobically
Arch. Microbiol. 147: 195-200
- Uden, G. & Trageser, M. (1991) Oxygen regulated gene expression in *Escherichia coli*: Control anaerobic respiration by the FNR protein
Antonie van Leeuwenhoek 59: 65-76
- Uden, G., Becker, S., Bongaerts, J., Schirawski, J., Six, S. (1994) Oxygen regulated gene expression in facultatively anaerobic bacteria
Antonie van Leeuwenhoek 66: 3-23
- Uden, G., Becker, S., Bongaerts, J., Holighaus, G., Schirawski, J., Six, S. (1995) O₂-sensing and O₂-dependent gene regulation in facultatively anaerobic bacteria
Arch. Microbiol. 164: 81-90
- Uden, G. & Bongaerts, J. (1997) Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: Energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors
Biochim. Biophys. Acta 1320: 217-234
- Wallace, B. J. & Young, I. G. (1977) Role of quinones in electron transport to oxygen and nitrate in *Escherichia coli*
Biochim. Biophys. Acta 461: 84-100

- Weber J. & Steitz, T. (1987) Structure of a complex of catabolic gene activator protein and cyclic AMP refined at 2,5 Å resolution
J. Mol. Biol. 198: 311-326
- Willsky, G. R., & Malamy, M. H. (1976) Control of the synthesis of the alkaline phosphatase and the phosphate-binding protein in *Escherichia coli*
J. Bacteriol. 127: 595-609
- Wloczyk, C., Kröger, A., Göbel, T., Holdt, G., Steudel, R. (1989) The electrochemical proton potential generated by the sulphur respiration of *Wolinella succinogenes*
Arch. Microbiol. 152: 600-605
- Yerushalmi, H., Lebendiker, M., Schuldiner, S. (1995) EmrE, an *Escherichia coli* 12-kDa multidrug transporter, exchanges toxic cations and H⁺ and is soluble in organic solvents
J. Biol. Chem. 270: 6856-6863
- Zaritzky, A., Kihara, M., MacNab, R. M. (1981) Measurement of membrane potential in *Bacillus subtilis*: a comparison of lipophilic cations, rubidium ion, and a cyanide dye as probes
J. Membr. Biol. 63: 215-231
- Zheng, L., White, R. H., Cash, V. L., Jack, R. F., Dean, D. R. (1993) Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2754-2758