

**Charakterisierung von apoFNR, einer weiteren Form des  
Sauerstoffsensors FNR aus *Escherichia coli* und von NreB,  
einem potentiellen Sauerstoffsensor aus *Staphylococcus  
carnosus***

Dissertation  
Zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie  
Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Stephanie Achebach  
geb. am 5.9.1974 in Frankfurt am Main

Mainz, November 2005



---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung</b> .....	1
<b>2. Einleitung</b> .....	2
<b>3. Material und Methoden</b> .....	10
3.1 Stämme und Plasmide.....	10
3.2 Primer .....	12
3.3 Medien und Zucht.....	12
3.4 Biochemische Methoden.....	18
3.5 Molekulargenetische Methoden.....	31
<b>4. Ergebnisse</b> .....	33
4.1 Untersuchungen von isoliertem FNR-Protein.....	33
4.1.1 Redoxzustand der Cysteinreste in apoFNR und in rekonstituiertem [4Fe4S]•FNR.....	33
4.1.2 Redoxzustand der Cysteinreste bei der Inaktivierung von rekonstituiertem [4Fe4S]•FNR durch Luft.....	37
4.1.3 Lage der Disulfide in aerobem und anaerobem apoFNR, und in sauerstoffinaktiviertem [4Fe4S]•FNR.....	41
4.1.4 Quantifizierung der Disulfide in apoFNR nach HPLC-Trennung.....	51
4.1.5 Stimulierung der Rekonstitution von [4Fe4S]•FNR durch Glutaredoxine	55
4.2 Untersuchungen der Funktion von FNR <i>in vivo</i> .....	58
4.2.1 Klonierung und Reinigung von FNR•His.....	58
4.2.2 Aktivitätstest von FNR•His.....	60
4.2.3 Markierung der zugänglichen Thiolreste von FNR durch 4-Acetamido-4'-Maleimidylstilbene-2,2'-Disulfonsäure (AMS) <i>in vivo</i> ....	62
4.3 Untersuchungen der Funktion von NreB aus <i>Staphylococcus carnosus</i> ...	64
<b>5. Diskussion</b> .....	68
<b>6. Veröffentlichungen</b> .....	78
<b>7. Literatur</b> .....	79

## 1. Zusammenfassung

FNR (*Fumarat Nitratreduktase Regulator*) ist ein Sauerstoffsensor aus *Escherichia coli*. Bisher waren zwei Formen von FNR bekannt: Im aktiven Zustand, liegt FNR als Dimer mit je einem [4Fe4S]-Zentrum pro Monomer vor, im inaktiven Zustand, ist FNR ein Monomer mit je einem [2Fe2S]-Zentrum. Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, dass es mit apoFNR eine dritte physiologische Form von FNR gibt. Die Entstehung von apoFNR aus [4Fe4S]•FNR wurde untersucht, und die biochemischen Eigenschaften von apoFNR wurden charakterisiert. Nach 5 min Inkubation mit Luft war die Entstehung von apoFNR *in vitro* abgeschlossen. ApoFNR enthält Disulfidbrücken zwischen den Cysteinresten 16/20 und 23/29. Der Cysteinrest 122 lag immer in der Thiolform vor. Quantifizierung der Disulfidbrücken legt nahe, dass die Disulfidbrücke zwischen den Cysteinresten 16/20 bevorzugt ausgebildet wird. ApoFNR konnte *in vitro* zu [4Fe4S]•FNR rekonstituiert werden, die Lagphase der Rekonstitution konnte durch Zusatz von Glutaredoxinen zum Rekonstitutionsansatz verkürzt werden. Da die Glutaredoxine einen Effekt auf die Gesamtreaktion der Rekonstitution zeigten, nicht aber auf die Sulfidbildung durch die Cysteindesulfurase NifS<sub>AV</sub>, kann gefolgert werden, dass die Stimulierung der Rekonstitution auf der Reduktion von Disulfidbrücken in apoFNR beruht.

Durch Markierung mit AMS (4-Acetamido-4'-Maleimidylstilbene-2,2'-Disulfonsäure) wurde der Redoxzustand der Cysteinreste in FNR *in vivo* untersucht. FNR, dessen Cysteinreste nach Denaturierung unter aeroben bzw. anaeroben Bedingungen mit AMS markiert wurden, zeigt auf SDS-Gelen immer einen Shift zu einer höheren Masse im Vergleich zu unmarkiertem FNR. Allerdings trat in aeroben Zellen eine zusätzliche Bande bei einer niedrigeren Masse auf. Es waren hier also weniger Cysteinreste markierbar.

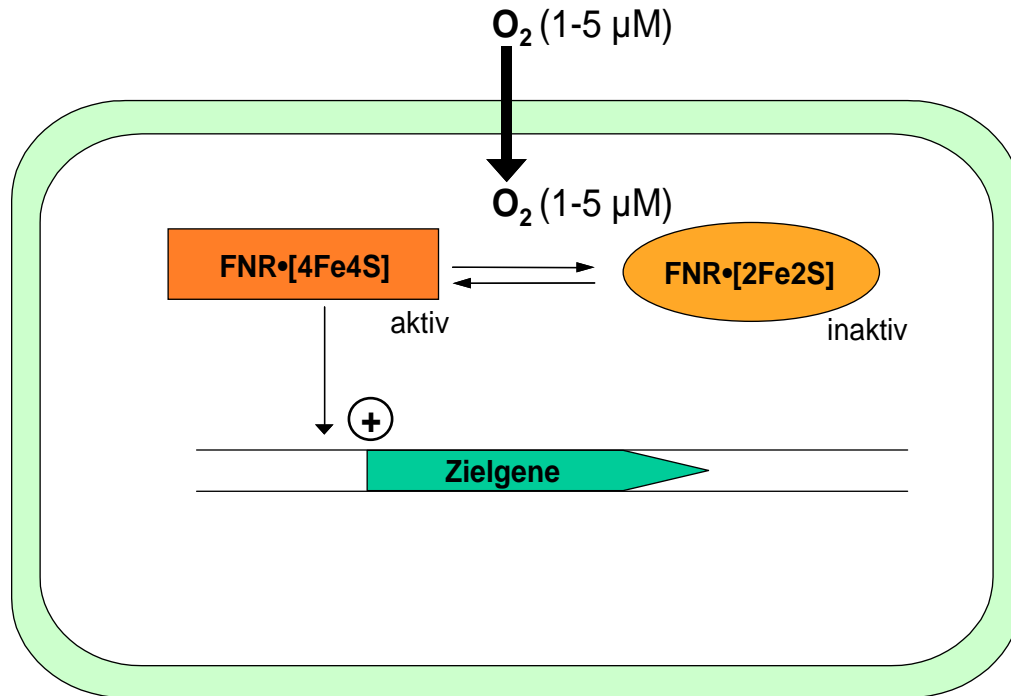
Weiterhin wurde mit NreB ein potentieller Sauerstoffsensor aus *Staphylococcus carnosus* untersucht. NreB ist eine cytosolische Histidin-Proteinkinase und Teil des Zwei-Komponenten-Systems NreB/C. NreB gehört damit einer anderen Sensorklasse als FNR an. Es wurden Hinweise auf ein Eisen-Schwefel-Zentrum vom FNR-Typ als Cofaktor gefunden. Der Einbau dieses Cofaktors war abhängig von der Anwesenheit der Cysteinreste in NreB, von der Cysteindesulfurase NifS<sub>AV</sub> und von Eisenionen. Der Cofaktor war sauerstoffempfindlich und beeinflusste die Autophosphorylierung von NreB.

## 2. Einleitung

### Der Sauerstoffsensor FNR aus *Escherichia coli*

*Escherichia coli* ist ein fakultativ anaerobes Bakterium und kann sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen wachsen. Aus diesem Grund muss *E. coli* in der Lage sein, seinen Stoffwechsel und Zellaufbau dem unterschiedlichen Sauerstoffangebot anzupassen. Das Umschalten zwischen aeroben und anaeroben Stoffwechselwegen erfolgt hauptsächlich auf der Ebene der Transkription (Unden und Trageser, 1991). Um den Gehalt an Sauerstoff in seiner Umgebung zu bestimmen, besitzt *E. coli* zwei Sensorsysteme, mit denen es Sauerstoff erkennen kann. Das erste ist das Zwei-Komponenten-System ArcA/B (aerobic respiratory control), das zweite das Ein-Komponenten-System FNR (Fumarat Nitrat Reduktase Regulator). Von ArcA werden unter anderem Gene des Citratzyklus und der aeroben Atmung reguliert (Perrenoud *et al.*, 2005). Von FNR werden mehr als 200 Gene reguliert. So werden einige Gene, die für Proteine der aeroben Atmung kodieren, unterdrückt, während andere Gene, die für Proteine des anaeroben Stoffwechsels wichtig sind, aktiviert werden (Unden und Trageser, 1991; Green *et al.*, 1996; Salmon *et al.*, 2003). Im Gegensatz zu einem Zwei-Komponenten-System befinden sich bei einem Ein-Komponenten-System Sensor- und Regulatorodomäne in demselben Protein. Ein-Komponenten-Regulatoren sind meist im Cytoplasma der Zelle lokalisiert.

FNR reagiert auf niedrige Sauerstoffkonzentrationen, von 1-5 mbar (oder 1-5  $\mu\text{M}$ )  $\text{O}_2$  im Medium (Unden und Schirawski, 1997, Becker *et al.*, 1996, Tseng *et al.*, 1996) (Abb.1). Da die Diffusionsgeschwindigkeit von Sauerstoff im Vergleich zu der niedrigen Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauchs in der Zelle hoch ist, ist der  $\text{O}_2$ -Partialdruck im Cytoplasma der Bakterienzelle dem  $\text{O}_2$ -Partialdruck im umgebenden Medium unter den meisten Bedingungen vergleichbar.



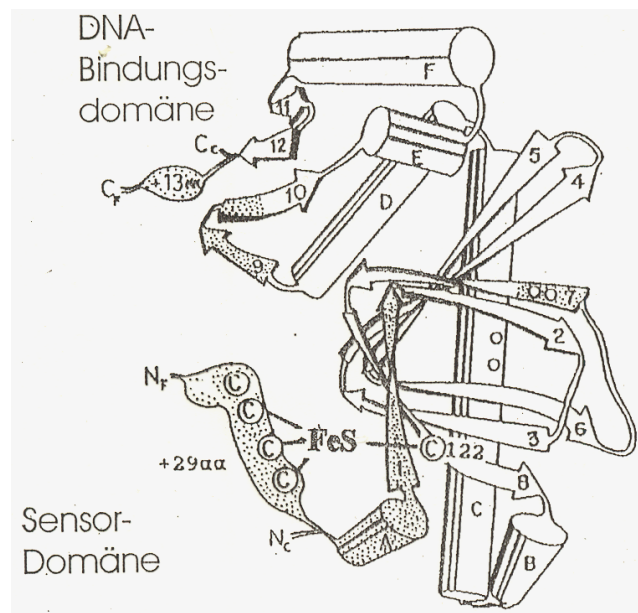
**Abb. 1: Das ein Komponenten System FNR ist im Cytoplasma von *E. coli* lokalisiert.** Unter anaeroben Bedingungen ist der Regulator aktiv und aktiviert oder reprimiert seine Zielgene. Im Medium vorhandener Sauerstoff diffundiert in die Zelle und inaktiviert FNR. Bereits bei 1-5  $\mu\text{M}$  (1-5 mbar)  $\text{O}_2$  diffundiert genügend  $\text{O}_2$  in die Zelle, um FNR zu inaktivieren.

FNR erkennt Sauerstoff über seinen Cofaktor, ein [4Fe4S]-Zentrum, das von vier der fünf Cysteinreste komplexiert wird. Die Liganden sind Cys20, Cys23, Cys29 und Cys122 (Spiro *et al.*, 1988; Ralph *et al.*, 2001; Green *et al.*, 1993; Sharrocks *et al.*, 1990), während Cys16 an der Bindung des FeS-Zentrums nicht beteiligt ist. Die Reste Cys20, Cys23 und Cys29 liegen in der N-terminalen Verlängerung von FNR, während Cys122 in der Mitte der Proteinsequenz liegt, die dem CAP-Protein homolog ist. Unter anaeroben Bedingungen enthält jedes FNR Monomer ein FeS-Zentrum. *In vitro* kann das Eisen-Schwefel-Zentrum in apoFNR durch die Cysteindesulfurase NifS<sub>AV</sub> assembliert werden, NifS<sub>AV</sub> setzt dabei Cystein zu Alanin und Sulfid um, das zusammen mit dem zugesetzten Eisen(II) zum Aufbau des FeS-Zentrums verwendet wird. *E. coli* besitzt mit IscS eine eigene Cysteindesulfurase (Schwartz *et al.*, 2000), die mit ähnlichem Erfolg zur Rekonstitution eingesetzt werden kann (Finger, unveröffentlicht) und wahrscheinlich diese Rolle in *E. coli* übernimmt. In dem *isc*-Operon gibt es zwei weitere Gene, *iscA* und *iscU*, die für Proteine codieren, die wahrscheinlich als

Transport- und Matrizenproteine für Eisen-Schwefel Zentren dienen (Bonomi *et al.*, 2005). Wahrscheinlich werden *in vivo* Eisen-Schwefel Zentren durch IscS in IscA bzw. IscU assembliert und anschließend in die betreffenden Eisen-Schwefel Proteine eingebaut (Bonomi *et al.*, 2005).

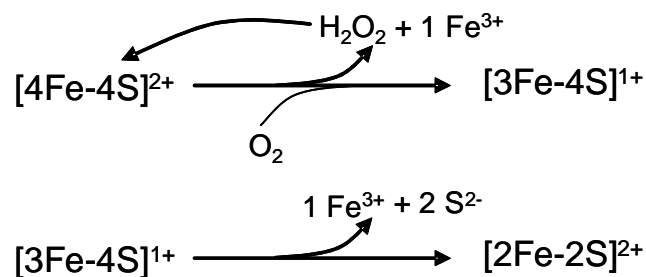
Ein FNR-Monomer besteht aus einer Dimerisierungsdomäne, einer DNA-Bindedomäne und einer Signalerkennungsdomäne am N-Terminus (Abb. 2).

Aufgrund seiner Labilität konnte die Tertiärstruktur von FNR bisher nicht bestimmt werden. FNR besitzt allerdings eine starke Homologie (Spiro und Guest, 1990) zum Catabolite Activator Protein (CAP), dessen Struktur bekannt ist (Weber und Steitz, 1987). Abbildung 2 zeigt eine Struktur für ein FNR-Monomer, die in Anlehnung an die Struktur von CAP dargestellt ist. Allerdings besitzt FNR am N-Terminus 29 und am C-Terminus 13 zusätzliche Aminosäuren. Für diese Bereiche gibt es noch keinen Strukturvorschlag, der sich auf verwandte Strukturen stützen könnte. Dies betrifft vor allem die Sensordomäne von FNR.



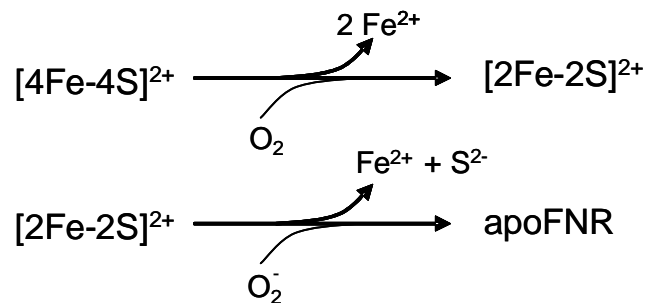
**Abb. 2. Mögliche 3D-Struktur von FNR, die aus der Sequenzhomologie zu CAP abgeleitet wurde.** CAP und FNR weisen eine 22%ige Ähnlichkeit bei 207 verglichenen Aminosäuren auf (Spiro und Guest, 1990). FNR besteht aus einer DNA-Bindedomäne und einer Sensordomäne. Die Helix C ist die Dimerisierungshelix. Die Lage der Dimerisierungshelix, der DNA-Bindedomäne und die Beteiligung der Cysteinreste an der Signalerkennung wurden durch Mutagenese überprüft (Moore *et al.*, 2001; Lamberg *et al.*, 2000; Lamberg *et al.*, 2002; Weber *et al.*, 2005; Green *et al.*, 1993).

In Anwesenheit des [4Fe4S]-Zentrums bildet sich eine Konformation von FNR aus, die eine Dimerisierung des Proteins über die Dimerisierungshelix zur Folge hat. Dieses Dimer bindet an die DNA und reguliert die Expression der Zielgene (Lazazzera *et al.*, 1996; Moore *et al.*, 2001). Gelangt *E. coli* nun unter aerobe Bedingungen, so diffundiert Sauerstoff in die Zelle und reagiert mit dem [4Fe4S]-Zentrum. Das kubische [4Fe4S]-Zentrum zerfällt in ein planares [2Fe2S]-Zentrum. Dies hat eine starke Konformationsänderung im Protein zur Folge. Das Dimer zerfällt in zwei Monomere, die nicht mehr an die DNA binden (Khoroshilova *et al.*, 1997). Die chemischen Reaktionen, die zur Zerstörung des Eisen-Schwefel-Zentrums durch Sauerstoff und Peroxide führen, wurden von Sutton *et al.*, 2004 und Crack *et al.*, 2004 untersucht. Über die Reaktionsweise des O<sub>2</sub> oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit dem [4Fe4S]-Zentrum und die entstehenden Produkte bestehen teilweise unterschiedliche Vorstellungen. Crack *et al.*, 2004 schlagen nachfolgende Reaktionssequenz vor.



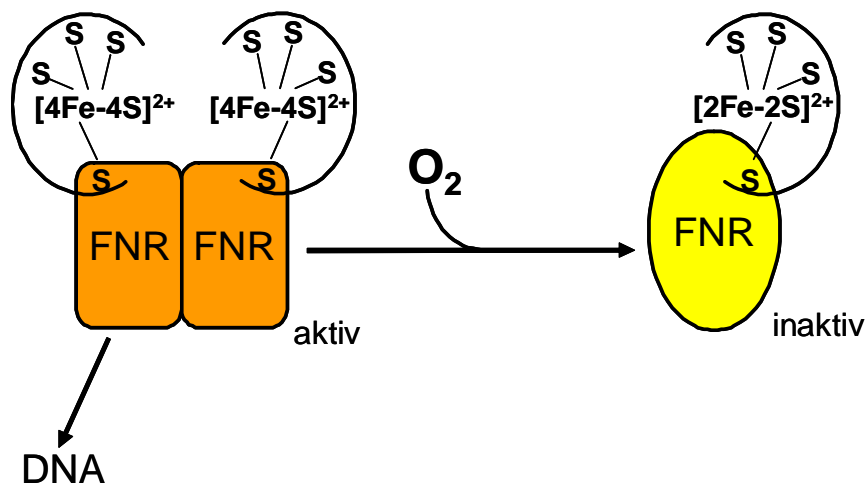
Sie haben das Auftreten von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Fe<sup>3+</sup> nach Kontakt des [4Fe4S]<sup>2+</sup>-Zentrums mit Sauerstoff gemessen, außerdem haben sie durch EPR-Messung ein [3Fe4S]<sup>1+</sup>-Zentrum als Zwischenprodukt nachgewiesen. Daraus vermuten sie nun, dass bei der Umsetzung des [4Fe4S]<sup>2+</sup>-Zentrums zu einem [3Fe4S]<sup>1+</sup>-Zentrum zwei Elektronen aus der Oxidation des Eisens freierwerden, die mit dem Sauerstoff und zwei Protonen zu Wasserstoffperoxid reagieren. In einem [4Fe4S]<sup>2+</sup>-Zentrum liegen zwei Eisen in der Oxidationsstufe +3 und zwei Eisen als 2+ vor. Bei einem [3Fe4S]<sup>1+</sup>-Zentrum liegen alle drei Eisen als 3+ vor. Das entstehende Wasserstoffperoxid reagiert mit einem weiteren [4Fe4S]<sup>2+</sup>-Zentrum, sodass als Gesamtreaktion zwei [4Fe4S]<sup>2+</sup>-Zentren mit einem O<sub>2</sub> und vier Protonen zu zwei [2Fe2S]<sup>2+</sup>-Zentren, vier Fe<sup>3+</sup>, vier S<sup>2-</sup> und zwei Molekülen Wasser reagieren.

Sutton *et al.*, 2004 leiten aus ihren Befunden und Annahmen dagegen nachfolgende Reaktion für die Umsetzung des [4Fe4S]-Zentrums und des [2Fe2S]-Zentrum ab.



Sie haben bei der Umsetzung des [4Fe4S]<sup>2+</sup>-Zentrums mit Sauerstoff zu einem [2Fe2S]<sup>2+</sup>-Zentrum das Entstehen von zwei Fe<sup>2+</sup> gemessen, die nachträglich durch Sauerstoff teilweise zu Fe<sup>3+</sup> oxidiert wurden. Sie fanden keine Hinweise auf bei dieser Reaktion entstehendes Superoxid. Bei der Umsetzung von [2Fe2S]<sup>2+</sup>•FNR zu apoFNR durch Superoxid stellten sie ebenfalls das Freiwerden von Fe<sup>2+</sup> fest. Sie konnten kein auftretendes Fe<sup>3+</sup> nachweisen, fanden in diesem Schritt allerdings nur 63% des erwarteten Eisens und 33% des erwarteten Sulfids.

Bisher wurde für FNR folgendes Modell gezeigt (Abb. 3). Die weitere Umsetzung des [2Fe2S]-Zentrums war bisher unklar, es wurde sowohl die Reaktivierung zu [4Fe4S]•FNR als auch der Zerfall zu apoFNR vermutet. Neuere Untersuchungen weisen allerdings darauf hin, dass das Endprodukt der Reaktion von [4Fe4S]•FNR mit Sauerstoff apoFNR ist.



**Abb. 3: Klassisches Modell von FNR.** In seiner aktiven Form liegt FNR als Dimer mit je einem [4Fe4S]-Zentrum vor. Bei Sauerstoffexposition zerfällt das Dimer in zwei Monomere mit je einem [2Fe2S]-Zentrum, die nicht mehr an die DNA binden können.

Die Umwandlung des [4Fe4S]- in ein [2Fe2S]-Zentrum unter Sauerstoffeinwirkung wurde *in vitro* und in intakten Zellen durch Mößbauerspektroskopie gezeigt. Wachsen die Bakterien längere Zeit unter aeroben Bedingungen, so verschwindet auch das Signal des [2Fe2S]-Zentrums (Sutton *et al.*, 2004a). Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass [2Fe2S]•FNR weiter zu apoFNR zerfällt, das kein FeS-Zentrum mehr trägt. Die Bildung von apoFNR wird auch bei der Isolierung von FNR unter nicht strikt anaeroben Bedingungen beobachtet (Achebach *et al.*, 2004; Uden *et al.*, 2002; Crack *et al.*, 2004).

*E. coli* enthält unter aeroben und anaeroben Bedingungen eine ähnliche Konzentration an FNR (Sutton *et al.*, 2004b; Uden *et al.*, 1987). Die Untersuchungen von Sutton *et al.*, 2004 hatten gezeigt, dass aerob gezüchtete Zellen von *E. coli* keine signifikanten Mengen an [2Fe2S]•FNR enthalten. Daraus kann geschlossen werden, dass die aeroben Zellen nicht wie in den Modellen zur Funktion von FNR gefordert, [2Fe2S]•FNR enthalten (Modelle Kiley, Green), sondern eine andere Form. Diese andere Form ist möglicherweise apoFNR, das bisher als *in vitro* Artefakt betrachtet wurde.

In der vorliegenden Arbeit sollten nun die Eigenschaften von apoFNR in Bezug auf den Redoxzustand der Cysteinreste untersucht werden. Von den fünf in FNR vorhandenen Cysteinresten Cys16, 20, 23, 29 und 122 sind die Cysteinreste 20–122 wichtig, um das Eisen-Schwefel-Zentrum zu ligandieren. Es sollte untersucht werden, in welcher Form, d.h. in welchem Redoxzustand, die Cysteinreste vorliegen und ob spezifische Disulfidbrücken ausgebildet werden. Sollte die Lage der Disulfide in apoFNR definiert sein, so sollte die Menge an Disulfidbrücken in verschiedenen Formen von apoFNR quantifiziert werden. Um die physiologische Bedeutung von apoFNR zu untersuchen, sollte eine Kinetik der Inaktivierung von [4Fe4S]•FNR zu apoFNR durch Sauerstoff aufgenommen werden. Als Marker für das Verschwinden des Eisen-Schwefel-Zentrums sollte die Zugänglichkeit der Cysteine durch Alkylierung verfolgt werden. Das Auftreten von Disulfidbrücken in FNR würde bedeuten, dass in FNR kein Eisen-Schwefel-Zentrum mehr vorhanden ist, da für seine Komplexierung alle Cysteinreste als Thiole vorliegen müssen. Sollte die Geschwindigkeit der Entstehung von apoFNR durch Sauerstoffeinwirkung der Umsetzung von [4Fe4S]•FNR zu [2Fe2S]•FNR und dem Verlust des [2Fe2S]-Zentrums in FNR vergleichbar sein, so wäre dies ein Hinweis auf eine physiologische Funktion.

Falls in apoFNR Disulfide gebildet werden, sollte untersucht werden, ob Glutaredoxine einen Einfluss auf die Rekonstitution von apoFNR besitzen. Von Glutaredoxinen ist bekannt, dass sie Disulfide in Proteinen reduzieren können. Damit wäre es möglich, dass sie einen stimulierenden Effekt auf die Rekonstitution ausüben.

Die Ergebnisse sollten mit *in vivo* Bedingungen verglichen werden. Hierfür musste eine Methode entwickelt werden, um die Cysteinreste *in vivo* zu markieren und FNR unter denaturierenden Bedingungen zu reinigen, bzw. *in vivo* nachzuweisen.

### **Die Sensorkinase NreB aus *Staphylococcus carnosus***

*Staphylococcus carnosus* wird als Starterkultur bei der Produktion von rohfermentierten Würsten eingesetzt. In der AG Götz wurde eine *nreABC* (nitrogen regulation) Deletionsmutante hergestellt, die in der Nitrat- und Nitritreduktion und im Wachstum beeinträchtigt ist. In der Mutante ist die Transkription von *narT*, des *narGHJI*- und des *nir*-Operons selbst in Anwesenheit von Nitrat oder Nitrit unter anaeroben Bedingungen reduziert (Fedtke *et al.*, 2002). Die *nreABC* Deletionsmutante konnte mit den *nreABC* Genen komplementiert werden, nicht aber mit den *nreAB*\*C Genen. In *nreB*\* wurde eine Punktmutation eingeführt, sodass in NreB der Cysteinrest 62 gegen Serin ausgetauscht ist. Außerdem war bekannt, dass die Aktivität des *nir* Operons eisenabhängig ist (Fedtke *et al.*, 2002).

Das Zwei-Komponenten-System NreB/C besteht aus der Sensorkinase NreB und dem Regulator NreC. NreB besteht aus einer Sensordomäne am N-Terminus und einer Kinasedomäne am C-Terminus des Proteins. Insgesamt enthält NreB vier Cysteinreste Cys59, Cys62, Cys74 und Cys77. Homologe Proteine zu NreB wurden außer in *Staphylococcus carnosus* auch noch in *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus* und *Staphylococcus epidermidis* beschrieben. NreB aus *Staphylococcus carnosus* und das SA2180 Protein aus *Staphylococcus aureus* (Stamm N315) hatten eine 57% Homologie bei 197 untersuchten Aminosäuren des SA2180 Proteins und 342 untersuchten Aminosäuren von NreB. Ein Vergleich von NreB aus *Staphylococcus carnosus* mit einer Zwei-Komponenten-Sensor-Histidinkinase (SE1970) aus *Staphylococcus epidermidis* ergab eine 61% Homologie bei 208 untersuchten Aminosäuren in der Zwei-Komponenten-Sensor-Histidinkinase (SE1970) und

336 untersuchten Aminosäuren in NreB. Das NreB Protein aus *Staphylococcus haemolyticus* (Stamm JCS(1435) hatte eine Homologie von 65% bei 225 untersuchten Aminosäuren im NreB Protein und 345 untersuchten Aminosäuren in NreB.

Außer in *Staphylococcus carnosus* wurde dem NreB/C System noch in keinem Stamm eine eindeutige Funktion zugeordnet. In *Staphylococcus carnosus* scheint es die Funktion eines Sauerstoffsensor zu übernehmen (Fedtke *et al.*, 2002). Bisher wurde in Staphylokokken noch kein homologes Protein zu FNR oder ein anderer Sauerstoffsensor beschrieben. Da Staphylokokken fakultativ anaerob sind, d.h. unter aeroben und anaeroben Bedingungen wachsen können, müssen sie einen Sauerstoffsensor besitzen, um ihren Stoffwechsel den jeweiligen Bedingungen anzupassen.

NreB hat in *Staphylococcus carnosus* wahrscheinlich die Funktion eines Sauerstoffsensors. Da seine Funktion von den vier N-terminal vorhandenen Cysteinresten und von der Anwesenheit von Eisen abhängig ist (Fedtke *et al.*, 2002), sollte in der vorliegenden Arbeit geklärt werden, ob NreB ein Eisen-Schwefel-Zentrum als Cofaktor besitzt und ob dieses die Funktion von NreB als O<sub>2</sub>-Sensor beeinflusst, z.B. durch die Kontrolle der Autophosphorylierung von NreB.

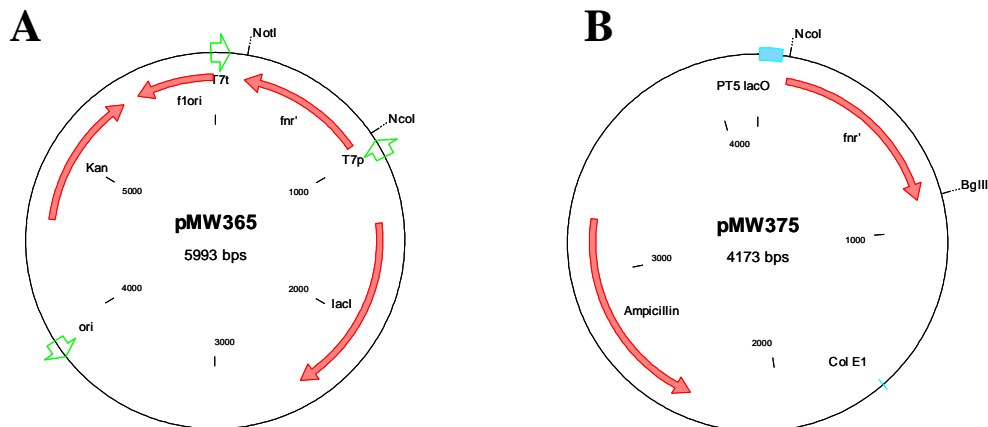
### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Stämme und Plasmide

Tab.1: Verwendete Stämme und Plasmide

Stämme	Relevanter Genotyp	Quelle / Referenz
<i>E. coli</i> -CAG627	<i>lacZ<sub>am</sub> trp<sub>am</sub> pho<sub>am</sub> supC<sup>ts</sup> mal rpsL lon</i>	Trageser <i>et al.</i> , (1990)
<i>E. coli</i> -BL21(DE3)	<i>E. coli</i> B, F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub>m<sub>B</sub>) gal dcm λ(DE3)</i>	Studier & Moffatt (1986)
<i>E. coli</i> -JM109	<i>recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi, Δ(lac-proAB) F<sup>+</sup>[traD36 proAB<sup>+</sup> lacI<sub>q</sub> lacZΔM15]</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , (1985)
<i>E. coli</i> -IMW212	JCB331 <i>fnr::tet</i>	Holighaus (1998)
<i>E. coli</i> -JCB331	<i>nirB::lacZ chl<sup>+</sup> F<sup>-</sup> Nar<sup>+</sup> Lac<sup>-</sup></i>	Griffith & Cole (1987)
<i>E. coli</i> -AN387	Wildtyp	Wallace & Young (1977)
<i>S. carnosus</i> -TM300	Wildtyp	Schleifer & Fischer (1982)
<i>S. carnosus</i> -m1	<i>S. carnosus</i> -TM300 <i>ΔnreABC::ermB</i>	Fedtke <i>et al.</i> , (2002)
<b>Plasmide</b>		
pMW68	pGEX-4T-1 mit 750 bp BamHI/SmaI Fragment von <i>fnr</i>	Holighaus (1998)
pMW32	pTrc99A mit 750 bp NcoI/BamHI Fragment von <i>fnr</i> aus pGS199	Holighaus (1998)
pGS199	Expressionsvektor, Amp <sup>r</sup>	Spiro & Guest (1987)
pTrc99A	Expressionsvektor, Amp <sup>r</sup>	Amersham Bioscience

Plasmide	Relevanter Genotyp	Quelle / Referenz
pNifS	Expressionsplasmid für NifS <sub>AV</sub> , Amp <sup>r</sup>	Zheng <i>et al.</i> , (1993)
pMW365	pET28a mit 748 bp NotI/NcoI Fragment von <i>fnr</i>	Diese Arbeit
pMW375	pQE60 mit 750 bp NcoI/BglII Fragment von <i>fnr</i>	Diese Arbeit
pGEX-4T-1	Proteinfusionsvektor, Amp <sup>r</sup>	Amersham Bioscience
pET28a	Proteinfusionsvektor, Kan <sup>r</sup>	Novagen
pQE60	Proteinfusionsvektor, Amp <sup>r</sup>	Qiagen
pCQE1nreB	Expressionsplasmid für NreB, Cm <sup>r</sup>	Fedtke <i>et al.</i> , (2002)
pCQE1nreB*	Expressionsplasmid für NreBC62S, Cm <sup>r</sup>	Kamps <i>et al.</i> , (2004)



**Abb. 4: Überexpressionsplasmide für FNR•His<sub>6</sub>.** A) *fnr* wurde über die Schnittstellen NotI / NcoI in pET28a kloniert. B) *fnr* wurde über NcoI / BglII in pQE60 gebracht.

### 3.2 Primer

**Tab.2: Verwendete Primer, die Restriktionsschnittstellen der Enzyme wurden unterstrichen.**

Name	T <sub>m</sub> [°C]	Sequenz (5' → 3')
fnr2-NotI	61	GAAAG <u>CGGCCGCA</u> ACGTTAC
fnr-XhoI	58	GGAAAAATCACTCGAGGTTACG
fnr2-NcoI	64	GAGCCCATGGATGATCCCGGAAAA
fnr-BglII	62	GAAAGATCTGGCAACGTTACGCG

### 3.3 Medien und Zucht

Luria Bertani (LB)-Medium (Sambrook *et al.*, 2001):

- 10 g/l Pepton (Gibco)
- 5 g/l Yeast-Extract (Gibco)
- 5 g/l NaCl
- ad 1 l H<sub>2</sub>O

LB-Platten:

- LB-Medium
- 15 g/l Agar
- ad 1 l H<sub>2</sub>O

2× YTG (Sambrook *et al.*, 2001) :

- 16 g/l Trypton (Gibco)
- 10 g/l Yeast-Extract (Gibco)
- 5 g/l NaCl
- ad 1 l H<sub>2</sub>O
- 2% Glucose, vor Verwendung steril hinzufügen

Ampicillin: Stammlösung 50 mg/ml; Endkonzentration im Medium 100 µg/ml

Isopropylthiogalactosid (IPTG): Stammlösung 1 M;

Endkonzentration im Medium 1 mM

Basic Medium (BM) (Götz und Schumacher, 1987):

- 10 g/l Caseinhydrolysat-Pepton
- 5 g/l Hefeextrakt
- 5 g/l NaCl
- 1 g/l  $K_2HPO_4$
- ad 1 l  $H_2O$
- pH 7,2

D(+)-Xylose: Stammlösung 50%; Enkonzentration im Medium 0,5%

Erythromycin: Stammlösung 2,5 mg/ml; Endkonzentration im Medium 2,5  $\mu$ g/ml

Chloramphenicol: Stammlösung 10 mg/ml;

Endkonzentration im Medium 10  $\mu$ g/ml

## **Lösungen und Puffer**

### **Präparation von FNR:**

Puffer A:

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

Puffer B:

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

Puffer C:

- 50 mM Tris/HCl, pH 7,6

Thrombin:

- 20 U Thrombin (Amersham) in 1 ml 50 mM Tris/HCl, pH 7,6

### **Regeneration der Glutathion-Sepharose Säule:**

GST-Elutionspuffer:

- 10 mM reduziertes Glutathion (Roth) in 50 mM Tris/HCl, pH 8

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

6 M Guanidiniumhydrochlorid

70% (v/v) Ethanol

### **SDS-Gele (nach Laemmli 1970):**

Acrylamidmix:

- 30% Acrylamid
- 0,8% Bisacrylamid

Puffer für das Trenngel:

- 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8

Puffer für das Sammelgel:

- 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8

N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)

10% (w/v) Ammoniumpersulfat (APS)

10% (w/v) Sodiumdodecylsulfat (SDS)

2 x Auftragspuffer für SDS-Gele (Sambrook *et al.*, 2001):

- 100 mM Tris/HCl, pH 6,8
- 4% (w/v) SDS
- 200 mM DTT
- 0,2% (w/v) Bromphenolblau
- 20% (v/v) Glycerin

Laemmli Auftragspuffer für SDS-Gele:

- 10 g Saccharose
- 9 ml 10%iges SDS
- 7,9 ml SDS-Laufpuffer
- 4,9 ml  $\beta$ -Mercaptoethanol
- 2,5 ml 0,1% Bromphenolblau
- 1,7 ml Wasser

SDS-Laufpuffer:

- 5,44 g/l Tris
- 25,92 g/l Glycin
- 9 ml/l SDS (10% (w/v))

Färbelösung für SDS-Gele:

- 2 g/l Coomassie Brilliant Blue
- 10% (v/v) Eisessig + 5% (v/v) Methanol in Wasser

Entfärbelösung für SDS-Gele:

- 10% (v/v) Eisessig + 5% (v/v) Methanol in Wasser

**Methylenblau-Test:**

Zinklösung:

- 5,5% Zinkacetat x 2 H<sub>2</sub>O
  - 1,4% Natriumacetat x 3 H<sub>2</sub>O
- in Wasser lösen und mit Essigsäure auf pH 4,7 einstellen

Eisenlösung:

- 12% NH<sub>4</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> x 12 H<sub>2</sub>O in 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- Das Salz zuerst in möglichst viel Wasser lösen und dann mit konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> auf 0,5 M bringen.

DMD-Lösung:

- 1% N, N'- Dimethyl-p-phenylendiamin x 2 HCl (DMD) in 3,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

### **Bestimmung von Eisen mit Ferrozin:**

Ferrozinreagenz:

- 6,5 mM Ferrozin
- 13,1 mM Neocuproin
- 2 M L-Ascorbinsäure
- 5 M Ammoniumacetat

Zuerst die Ascorbinsäure und das Ammoniumacetat in Wasser lösen und erst dann das Ferrozin und das Neocuproin zugeben.

Kaliumpermanganatlösung:

1. 4,5% (w/v)  $\text{KMnO}_4$  in  $\text{H}_2\text{O}$
2. 1,2 M HCl

Direkt vor Verwendung werden gleiche Teile von Lösung 1 und 2 gemischt.

### **Zucht von CAG627pMW 68 für die Überexpression von GST-FNR**

Als Vorkultur wurden die Bakterien in 40 ml LB-Medium mit 100  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin in einem 300 ml-Erlenmeyerkolben mit Schikanen über Nacht bei 37°C im Schüttler bei 200 U/min inkubiert. Die Erlenmeyerkolben wurden zu 13% gefüllt. Für die Hauptkultur (2,4 l) wurden 2 l-Erlenmeyerkolben mit Schikanen zu 15% (300 ml) des Nominalvolumens mit 2 $\times$  YTG-Medium und Ampicillin (100  $\mu\text{g/ml}$ ) gefüllt. Sie wurden mit 1% Inokulum beimpft und im Schüttler bei 37°C und 200 U/min inkubiert. Bei einer  $\text{OD}_{578}$  von 0,8-1,0 wurde mit 300  $\mu\text{l}$  1 M IPTG induziert. Die Kulturen wurden weitere 2 Stunden geschüttelt.

Die Zellen wurden durch Zentrifugation in einer Sorvall Zentrifuge (RC-5B) bei 5.000 U/min und 4°C geerntet. Das Pellet wurde bei -80°C gelagert. Jede Anzucht wurde vor Verwendung auf einem SDS-Gel auf den Gehalt an GST-FNR überprüft. Bei geringem Gehalt von GST-FNR wurde CAG627 neu mit pMW68 transformiert.

### **Zucht von BL21(DE3)pNifS zur Überexpression von NifS<sub>AV</sub>**

Als Vorkultur wurden 40 ml LB mit Ampicillin (100 µg/ml) komplementiert und in 300 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen über Nacht bei 30°C im Schüttler bei 200 U/min gezüchtet. Die Erlenmeyerkolben wurden zu 13% gefüllt.

Für die Hauptkultur (2,4 l) wurden 2 l Erlenmeyerkolben mit Schikanen zu 15% mit LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) gefüllt. Beimpft wurde mit 1% Inokulum.

Die Kolben wurden bei 30°C im Schüttler inkubiert. Bei einer OD<sub>578</sub> von 0,7-0,9 wurde mit 300 µl 1 M IPTG induziert. Die Zellen wurden weitere 2 h bei 30°C inkubiert und auf dieselbe Art und Weise geerntet wie CAG627pMW68.

Auch dieses Pellet wurde bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Da das Pellet bei erfolgreicher Überexpression gelb aussah, wurden diese Zuchten nicht auf einem SDS-Gel kontrolliert.

### **Zucht von *Staphylococcus carnosus* m1 (pCQE1nreB) und (pCQE1nreBC62S) zur Überexpression von NreB und NreBC62S**

Als Vorkultur wurden 40 ml BM mit Erythromycin (2,5 µg/ml) und Chloramphenicol (10 µg/ml) komplementiert und in 300 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen über Nacht bei 37°C im Schüttler bei 200 U/min gezüchtet. Die Erlenmeyerkolben wurden zu 13% gefüllt.

Für die Hauptkultur (2,4 l) wurden 2 l Erlenmeyerkolben mit Schikanen zu 16% ihres Volumens mit BM-Medium, Chloramphenicol (10 µg/ml) und Erythromycin (2,5 µg/ml) gefüllt. Bei einer OD<sub>578</sub> von 0,3-0,6 wurde mit 0,5% D(+)-Xylose induziert. Nach weiteren 2 h Inkubation bei 37°C wurden die Zellen durch Zentrifugation für 20 min bei 6000 x g geerntet (JA-10). Die Pellets wurden bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

### 3.4 Biochemische Methoden

#### 3.4.1 Proteinpräparation

##### **Präparation von FNR unter aeroben bzw. anaeroben Bedingungen**

Das Pellet aus 1,2 l Kulturvolumen wurde auf Eis aufgetaut und in 30 ml Puffer A suspendiert. Die Suspension wurde dreimal mit der French Press (French Pressure Cell-Press, SLM Amico) bei 83 bar aufgeschlossen. Anschließend wurde 20 min bei 10.000 U/min und 4°C zentrifugiert (Sigma 2K 15). Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet verworfen.

Für die Glutation-Sepharose-Säule wurden 2 ml Säulenmaterial (Glutathion Sepharose 4B von Pharmacia) in eine Plastiksäule (14×66 mm, 1,5 ml Bettvolumen, Pharmacia) gegeben und mit 15 ml Puffer A gewaschen. Die Lösungen wurden nicht mit einer Pumpe durch die Säule gezogen, sondern es wurde die Schwerkraft ausgenutzt.

Nun wurde der Überstand aus der Zentrifugation auf die Säule geladen. Der Durchlauf wurde aufgefangen und erneut auf die Säule gegeben. Im Anschluss wurde mit 15 ml Puffer B gewaschen. Sobald der Überstand der Waschlösung abgelaufen war, wurden 20 U Thrombin in 1 ml Puffer C gelöst und auf die Säule gegeben. Der Durchlauf wurde aufgefangen und erneut auf die Säule aufgetragen. Insgesamt wurde der Durchlauf dreimal auf die Säule geladen. Nach dem letzten Laden wurde die Säule verschlossen und zwei Stunden bei 20°C inkubiert.

FNR wurde in zwei Fraktionen à 1 ml mit Puffer C eluiert. Die Proteinkonzentration der Fraktionen wurde nach Bradford bestimmt und die beiden Fraktionen vereinigt. FNR, das für die Alkylierung bzw. für den enzymatischen Verdau bestimmt war, wurde bei -80°C eingefroren.

Für die anaerobe Präparation wurden alle Puffer in Müller-Krempel Flaschen gefüllt, an der Entgasungsanlage anaerobisiert und anschließend mindestens 12 Stunden offen auf einem Magnetrührer im Anaerobenzelt (Coy) gerührt. Es wurden die gleichen Puffer wie für die aerobe Präparation verwendet. Die Atmosphäre im Zelt bestand aus 98% Stickstoff und 2% Wasserstoff. Der Sauerstoffanteil lag bei  $\leq 3$  ppm. Außer der Zentrifugation und dem Zellaufschluss fanden alle Schritte im Anaerobenzelt statt. Für den Aufschluss wurde die French-Press-Zelle im Anaerobenzelt zusammen gebaut, mit der

Zellsuspension gefüllt und verschlossen. Beim French-Press-Aufschluss wurde der Extrakt über einen Gummischlauch in eine anaerobisierte Müller-Krempel Flasche geleitet, die zum Druckausgleich über Kanülen (0,9 x 36 mm) mit Stickstoff durchspült wurde. Für die Zentrifugation wurde der Aufschluss im Anaerobenzelt in Zentrifugenröhrchen (50 ml) mit einer Gummidichtung im Deckel gefüllt.

Die aerobe Präparation erfolgte auf der Laborbank.

### **Präparation von NifS<sub>AV</sub> (Zheng *et al.*, 1993)**

Für die Präparation wurde das Pellet von *E. coli* BL21(DE3)pNifS aus 1,2 l Kulturvolumen verwendet. Daraus wurden im Durchschnitt 30 mg NifS<sub>AV</sub> erhalten.

Die bei -80°C gelagerten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und in 15 ml 25 mM Tris/HCl (pH 7,6) resuspendiert. Die Suspension wurde dreimal mit der French Press bei 83 bar aufgeschlossen. Der Extrakt wurde 20 min bei 10.000 U/min und 4°C zentrifugiert (Sigma 2K 15). Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet verworfen.

Der löslichen Fraktion wurde solange festes Streptomycinsulfat zugesetzt, bis nichts mehr ausfiel (bei 15 ml Lösung ungefähr 700 mg).

Der Ansatz wurde 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 15 min bei 10.000 U/min und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in einen Messzylinder gegeben. Zum Überstand wurden portionsweise 134 mg/ml sehr fein zermörsertes Ammoniumsulfat zugesetzt. Die Lösung wurde erneut 10 min bei 10.000 U/min und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in einem Messzylinder gemessen. Es wurden 115 mg/ml Ammoniumsulfat zugesetzt und das Ganze wurde 30 min bei 4°C inkubiert. Der Ansatz wurde 15 min bei 10.000 U/min und 4°C zentrifugiert. Das Protein befand sich im Pellet, der Überstand wurde verworfen.

Das Pellet wurde auf Eis in 3 ml 25 mM Tris/HCl (pH 7,6) gelöst. Anschließend wurde das Protein aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Es wurde längstens 5 Tage aufbewahrt. Jedes Aliquot wurde nur einmal aufgetaut.

### **Reinigung von FNR•His unter denaturierenden Bedingungen**

Eine Säule mit 0,5 ml Bettvolumen Ni-NTA-Sepharose wurde mit 40 Bettvolumina Puffer 1 (50 mM Natriumphosphat, 0,5 M NaCl, 10 mM Imidazol,

6 M GnHCl, pH 8) äquilibriert. Nun wurde das Zelllysate auf die Säule gegeben. Nach Durchlauf wurde mit 50 Bettvolumina Puffer 2 (50 mM Natriumphosphat, 0,5 M NaCl, 20 mM Imidazol, 6 M GnHCl, pH 8) gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden in 5 Fraktionen von jeweils 0,5 ml Puffer 3 (50 mM Natriumphosphat, 0,5 M NaCl, 250 mM Imidazol, 6 M GnHCl, pH 8) eluiert. Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford bestimmt. Über Ni-NTA spin columns (Qiagen) wurde das Zelllysate nach Herstellerangaben gereinigt, allerdings wurden entgegen der Angaben des Herstellers dieselben Puffer wie für die größere Säule verwendet.

### **Präparation von NreB**

Das Pellet aus 1,2 l Kultur wurde auf Eis aufgetaut und in 15 ml Puffer 1 (50 mM Natriumphosphat, 300 mM NaCl, 10% Glycerin, 10 mM Imidazol, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, pH 8) resuspendiert. Es wurden 25 g Glasperlen mit einem Durchmesser von 0,13 mm zugesetzt, und das Ganze wurde dreimal für jeweils 3 min in der Zelmühle (Vibrogen-Zelmühle, Edmund Bühler, Johanna Otto GmbH) aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden für 20 min bei 10.000 U/min und 4°C abzentrifugiert (Sigma 2K-12). Der Überstand wurde auf eine Ni-NTA-Säule mit 0,5 ml Bettvolumen gegeben, die mit 20 ml Puffer 1 äquilibriert worden war. Die Säule wurde mit 20 ml Puffer 2 (50 mM Natriumphosphat, 1 M Natriumchlorid, 10% Glycerin, 20 mM Imidazol, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, pH 8) gewaschen. Es wurden 5 Fraktionen von jeweils 0,5 ml mit Puffer 3 (50 mM Natriumphosphat, 300 mM Natriumchlorid, 10% Glycerin, 150 mM Imidazol, 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, pH 8) eluiert.

Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford bestimmt. Bis zur weiteren Verwendung wurde das Protein bei -80°C gelagert.

### **3.4.2 Regeneration der Säulen**

#### **Regeneration der GST-Sepharose Säule (Pharmacia)**

Nach jeder Verwendung wurde die Säule mit 8 ml Regenerationspuffer (100 mM Glutathion, 50 mM Tris/HCl, pH 8) gespült. Für diese Lösung wurde zuerst der Tris-Puffer hergestellt und mit Salzsäure auf pH 8 gebracht. Anschließend wurde eine entsprechende Menge von reduziertem Glutathion

zugesetzt. Die Lösung wurde in Portionen von 8 ml aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Nach dem glutathionhaltigen Puffer wurden abwechselnd 7 ml Niedrig-pH- bzw. Hoch-pH-Puffer über die Säule gegeben. Die Spülung mit dem Niedrig-pH/Hoch-pH-Puffer wurde zweimal wiederholt.

Bei jeder 3. Regeneration wurde die Säule nach dem GSH-Puffer mit 2 Bettvolumina 6 M Guanidiniumhydrochlorid und 4 Bettvolumina 70% (v/v) Ethanol gewaschen. Die weitere Regeneration erfolgte wie beschrieben. Die Säule wurde nach Abschluss der Regeneration mit 1 ml Puffer C überschichtet und bei 4°C gelagert. Jede Säulenfüllung konnte etwa 10-mal verwendet werden

#### **Regeneration der Gelfiltrationssäule (Nap-10-Säule, Pharmacia)**

Nach Verwendung wurden 8 ml 6 M GnHCl über die Säule gegeben. Im Anschluss daran wurde die Säule mit 15 ml Puffer C gespült und in Puffer C bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

#### **Regeneration der Ni-NTA-Säule (Qiagen)**

Nach jeder Verwendung wurde die Säule nacheinander mit jeweils 4 Bettvolumina 0,2 M Natriumacetat, 30% (w/v) Glycerin, entionisiertem Wasser und 30% (v/v) Ethanol gespült. Nach der Regeneration wurde die Säule in 30% (v/v) Ethanol bei 4°C gelagert. Jede Säulenfüllung wurde dreimal verwendet.

### **3.4.3 Modifizierung der Thiolreste und Verdau durch Proteasen**

#### **Alkylierung von apoFNR**

Für die Alkylierung konnte frisch isoliertes FNR verwendet werden oder auf eine FNR-Präparation zurückgegriffen werden, die einige Zeit bei -80°C gelagert worden war. Aerob bzw. anaerob präpariertes FNR wurde auf Eis aufgetaut. Je nachdem, ob aerob oder anaerob präpariertes FNR alkyliert werden sollte, wurde die Alkylierung im Anaerobenzelt bzw. unter aeroben Bedingungen durchgeführt. Die Reinigung des alkylierten Proteins über die C<sub>18</sub>-Säule fand immer unter aeroben Verhältnissen statt.

Um alle Cysteinreste alkylieren zu können, musste das Protein zuerst denaturiert werden. Dazu wurde zu einer Lösung, die 250-350 µg FNR enthielt, das gleiche Volumen an 8 M Guanidiniumhydrochlorid (GnHCl) gegeben, sodass die Lösung 4 M an GnHCl war. Hierzu wurde Ammoniumjodacetat bis zu einer Konzentration von 10 mM gegeben. Der Ansatz wurde 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.

Zur Herstellung der Ammoniumjodacetat-Lösung wurde eine 500 mM Lösung von Jodessigsäure mit Ammoniak (25% (v/v)) auf pH 8 gebracht. Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20°C dunkel gelagert. Jedes Aliquot wurde nur einmal verwendet. Weder Lösung noch Feststoff durften eine Braunfärbung aufweisen. Das alkylierte Protein wurde über eine C<sub>18</sub>-Säule (Sep-Pak-Vac-Säule, Waters) gereinigt. Jede Säule wurde nur einmal verwendet. Die Säule wurde dazu zuerst mit 1,25 ml Methanol, dann dreimal mit 1,25 ml 0,1% (v/v) Trifluoressigsäure (TFA) äquilibriert. Die 0,1% (v/v) Trifluoressigsäure wurde jeweils frisch aus rauchender TFA und Wasser hergestellt. Das Wasser wurde durch Ultrafiltration mit dem Gerät Milli-Q Plus 185 (membraPure) gereinigt.

Auf die so vorbereitete Säule wurde die alkylierte Probe (500-1.000 µl) gegeben. Die Säule wurde einmal mit 1,25 ml 0,1% (v/v) TFA gewaschen. Anschließend wurde das gebundene Protein mit 500 µl Puffer (60% (w/v) Acetonitril/0,1% (v/v) TFA) eluiert.

Die Proteinkonzentration wurde mit einem Bradford-Test bestimmt. Das eluierte Protein wurde in einer Zentrifuge unter Vakuum (Eppendorf Concentrator 5301) getrocknet.

Das getrocknete Protein wurde bis zur Messung durch MALDI-TOF-Massenspektrometrie bei -80°C gelagert, längstens jedoch drei Wochen und ungekühlt verschickt. Das Pellet sollte farblos und durchsichtig sein.

### **Verdau von apoFNR mit der Endoproteinase AspN**

Auch für den enzymatischen Verdau musste FNR nicht frisch präpariert werden. Das Protein wurde aerob bzw. anaerob alkyliert, danach unter aeroben Bedingungen über die C<sub>18</sub>-Säule (Sep-Pak-Vac-Säule, Waters) gereinigt und verdaut.

300 µg aerob oder anaerob präpariertes apoFNR wurden auf Eis aufgetaut und wie beschrieben alkyliert. Statt über eine C<sub>18</sub>-Säule wurde der Alkylierungsansatz über eine Gelfiltrationssäule (Nap-10-Säule, Pharmacia

Biotech) gereinigt. Die Säule wurde mit 15 ml Äquilibrationpuffer, bestehend aus 50 mM Ammoniumacetat / 1 M GnHCl, pH 8 äquilibriert. Diese Lösung wurde jedes Mal kurz vor Gebrauch in ultrafiltriertem Wasser hergestellt und mit 25%igem Ammoniak auf pH 8 gebracht. Das für die Äquilibration benötigte Wasser wurde ebenso wie der Messzylinder, die verwendeten Spitzen und Eppendorfgefäße autoklaviert.

Auf die vorbereitete Säule wurde 1 ml der Probe gegeben. Es wurden 8 Fraktionen mit jeweils 500 µl des Äquilibrationpuffers eluiert. Das Protein befand sich in den Fraktionen 3 und 4. Auch hier wurde der Proteingehalt nach Bradford bestimmt. Die Fraktionen 3 und 4 wurden vereinigt und die neue Proteinkonzentration wurde errechnet. Hiervon wurden 100 µg FNR mit 1 µg AspN (Endoproteinase AspN, sequencing grade, Roche) gemischt. AspN wurde nach Vorschrift gelöst. AspN kann trocken bei 2-8°C stabil gelagert werden, eine Lösung sollte maximal eine Woche bei 2-8°C gelagert werden. Der Verdauungsansatz wurde 5 Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach dieser Zeit wurde er über eine C<sub>18</sub>-Säule, wie unter Alkylierung beschrieben, gereinigt. Die Probe wurde im Stickstoffstrom (N<sub>2</sub> 5.0, Reinheit >99,999%, Linde) getrocknet. Das Proteinpellet wurde bis zur MALDI-TOF-Messung bei -80°C gelagert, allerdings ungekühlt verschickt. Das Pellet sollte farblos und durchsichtig sein.

### **Verdau mit Trypsin**

Alkyliertes FNR wurde über Gelfiltration gereinigt. Es wurden Nap10-Säulen (Pharmacia) verwendet, die mit 10% (w/v) Acetonitril, 50 mM Ammoniumacetat (pH 8,6) äquilibriert wurden. Die eluierten Proteinfractionen wurden vereinigt und mit 7-9% (w/w) modifiziertem Trypsin (sequencing grade, Roche) für 8 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Peptide in der Speed Vac (Eppendorf concentrator 5301) getrocknet und bis zur Messung bei -20°C gelagert.

**Ellman's -Test (Ellman *et al.*, 1959)**

ApoFNR wurde wie präpariert in den Test eingesetzt, während die rekonstituierten Proben im Anaerobenzelt über Gelfiltration gereinigt wurden.

Testansatz: 100 µl 1 M Tris /HCl, pH 8,0

100 µl 2 mM DTNB in 50 mM Natriumacetat

100 – 400 µl Probe

ad 1 ml H<sub>2</sub>O

Die Absorption der Probe wurde sofort bei 412 nm gemessen, für den Blindwert wurde statt der Probe dasselbe Volumen an Probenpuffer in den Test eingesetzt. Die Konzentration des freien Thionitrobenzoatanions wurde über den Extinktionskoeffizienten  $\epsilon = 13.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  berechnet. Da jeder freie Thiolrest einem Molekül Thionitrobenzoat entspricht, konnte die Konzentration des Thionitrobenzoatanions der Konzentration an freien Thiolresten gleichgesetzt werden. Die Proteinkonzentration der Proben wurde mit einem Bradford Test bestimmt und anschließend die molare Thiolkonzentration pro mol FNR berechnet.

**Rekonstitution, Inaktivierung und radioaktive Markierung von FNR**

Frisch präpariertes FNR wurde anaerobisiert, 1 ml Probe wurde in eine gasdicht verschließbare Flasche gegeben und 15 min auf Eis entgast. Anschließend wurde kurz Stickstoff (N<sub>2</sub> 5.0, Reinheit >99,999%, Linde) bis zum Druckausgleich zugegeben und danach erneut entgast. Dieser Zyklus wurde sowohl für FNR, als auch für NifS dreimal durchgeführt.

Nach Überführung ins Anaerobenzelt wurde folgender Ansatz zusammenpipettiert:

- 200–300 µg FNR
- 2 µl 0,5 M L-Cysteiniumchlorid in Wasser
- 1,5 µl 0,1 M Ammonium Eisen(II)sulfat in Wasser
- 5-10 µg NifS<sub>AV</sub>
- Ad 500 µl 50 mM Tris/HCl (pH 7, 6)

Der Rekonstitutionsansatz wurde auf einem Kühlblock zusammengegeben, und der Puffer wurde dabei auf eine ähnliche Temperatur wie die FNR-Lösung gebracht. Die Küvette wurde mit einem Gummistopfen verschlossen und aus dem Anaerobenzelt ausgeschleust. Für die Kinetik wurde alle 10 min ein Spektrum von 250 nm bis 550 nm im Zeiss Photometer Specord S 10 aufgenommen. Die Probe wurde hierbei auf 20°C gekühlt. Für die Auswertung wurde der Quotient  $A_{420}/A_{280}$  gegen die Zeit aufgetragen und ein Differenzspektrum berechnet.

Für die Untersuchung der Inaktivierung wurde FNR nach erfolgreicher Rekonstitution wieder in das Anaerobenzelt eingeschleust und mit EDTA (Endkonzentration 5 mM) inkubiert. Anschließend wurde die Probe in eine Petrischale überführt und unter leichtem Schwenken mit Luft inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben genommen und in 4 M GnHCl mit  $^{14}\text{C}$ -Jodacetat (Endkonzentration 12 mM, spezifische Radioaktivität 43 Bq/mmol) gegeben. Die Proben wurden 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### **Rekonstitution von FNR in Gegenwart von Glutaredoxinen**

ApoFNR wurde wie oben beschrieben präpariert und anaerobisiert.

Nach Überführung in das Anaerobenzelt wurde folgender Ansatz angesetzt:

- 98 -300 µg apoFNR
- 0,3 mM Ammonium Eisen(II)sulfat
- 1-2 mM L-Cysteiniumchlorid
- 5-15 µg NifS<sub>AV</sub>
- 1 mM Glutathion
- 0,27 mM NADPH
- 6 µg/ml Glutathionreduktase aus Hefe
- 0,2 µM Grx 1 oder 1 bzw. 5 µM Grx 2 oder 2,5 µM Grx 3 oder 5 µM Grx 2C12S
- ad 500 µl mit 50 mM Tris/HCl, pH 7,6

Grx2C12S musste vor Verwendung mit 1 mM DTT reduziert werden.

Die Ansätze wurden in Quarzküvetten mit Gummistopfen überführt. Für die Kinetik wurde alle 5-10 min ein Spektrum von 250 nm bis 550 nm im Zeiss Photometer Specord S 10 aufgenommen. Für die Auswertung wurde der Quotient  $A_{420}/A_{280}$  gegen die Zeit aufgetragen. Als Vergleich wurde eine Probe mit Ammonium Eisen(II)sulfat, L-Cysteiniumchlorid, Glutathion, NifS<sub>AV</sub> und FNR gemessen.

### **Rekonstitution und Autophosphorylierung von NreB**

NreB wurde wie oben beschrieben präpariert und anaerobisiert. Nach Überführung ins Anaerobenzelt wurde folgender Ansatz hergestellt:

- 410 µg NreB-His bzw. 328 µg NreBC62S-His
- 2 mM L-Cysteiniumchlorid
- 0,3 mM Ammonium Eisen(II)sulfat
- 2,5 mM Dithiothreitol
- 41 µg NifS<sub>AV</sub> bzw. 33 µg NifS<sub>AV</sub>
- ad 500 µl mit 50 mM Natriumphosphat, 300 mM Natriumchlorid, 10% Glycerin, 150 mM Imidazol, 10 mM β-Mercaptoethanol, pH 8

Nach Überführung in Quarzküvetten mit Gummistopfen wurde im Zeiss Photometer Specord S 10 alle 10-20 min ein Spektrum von 250-550 nm aufgenommen. Für die Kinetik wurde der Quotient  $A_{420}/A_{280}$  gegen die Zeit aufgetragen.

Außer der Gelelektrophorese wurden alle Schritte zur Messung der Autophosphorylierung von NreB im Anaerobenzelt durchgeführt. Für die Autophosphorylierung wurde folgender Ansatz hergestellt:

- 7 µl NreB-His (3 µM)
- 9 µl 5 x Reaktionspuffer (250 mM HEPES, 250 mM KCl, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 mM EDTA, 10 mM DTT)
- 26 µl 50 mM Natriumphosphat, 300 mM Natriumchlorid, 10% Glycerin, 150 mM Imidazol, 10 mM β-Mercaptoethanol, pH 8)
- 3 µl [ $\gamma$ -<sup>33</sup>P]-ATP (Endkonz. 0,22 µM, 0,37 MBq, Hartmann Analytic)

Für die Kinetik wurden an den jeweiligen Zeitpunkten 4 µl Probe gezogen und mit 8 µl Stopp-Lösung (1 Teil Laemmli-Probenpuffer und 1 Teil 1 x Reaktionspuffer) abgestoppt. Kurz vor der Gelelektrophorese wurden die Proben für 5 min bei 37°C inkubiert. Bis zu diesem Zeitpunkt wurden sie auf Eis gelagert.

Die Radioaktivität wurde mit einer Phosphorimagerplatte (FUJIFILM Imaging Plate) detektiert. Die Platte konnte im FUJIFILM Bio-imaging Analyser FUJI BAS-1500 mit den Programmen BAS-Reader und Aida Version 2.0 ausgewertet werden.

#### **Proteinfällung mit Methanol/Chloroform (Flügge *et al.*, 1984)**

1 Teil der Probe wurde mit 4 Teilen konz. Methanol gemischt und 10 min bei 9.000 x g zentrifugiert (SIGMA 1k 15). Anschließend wurde 1 Teil Chloroform zugegeben, erneut gemischt und 10 min bei 9.000 x g zentrifugiert. Jetzt wurden 3 Volumina Wasser zugesetzt und gut gemischt. Danach wurde die Probe 1 min bei 9.000 x g zentrifugiert. Die obere Phase wurde vorsichtig abgenommen, die Interphase enthält das präzipitierte Protein, und verworfen. Zu dem Rest wurden 3 Volumen Methanol gegeben, gemischt und 2 min bei 9.000 x g zentrifugiert. Der gesamte Überstand wurde verworfen und das Pellet an der Luft getrocknet. Die Pellets wurden in 50 µl SDS (5% (w/v)) resuspendiert, mit 2 ml Szintillationsflüssigkeit gemischt und im Szintillationszähler (WINSPECTRAL Perkin Elmer) bestimmt.

#### **Alkylierung von FNR in vivo und Nachweis über Western Blot**

Der Bakterienstamm *E. coli* CAG627pMW32 (siehe Tabelle 1) wurde aerob bzw. anaerob in 2 x YTG-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) bei 37°C gezüchtet. Bei einer OD<sub>578 nm</sub> von 0,5–0,7 wurde mit 1 mM IPTG induziert und die Kultur weitere 2 h inkubiert.

Für die Alkylierung der anaeroben Kultur wurden 2 ml Kultur anaerob abzentrifugiert. Von dem Überstand wurden 1,5 ml abgenommen und das Pellet in den restlichen 0,5 ml Kulturüberstand resuspendiert. Für die aeroben Proben wurde mit 0,5 ml Kultur gearbeitet. 0,5 ml Kultur wurden durch 20 sec Mischen mit 25 µl 50% (v/v) Toluol, 0,5% (v/v) Deoxycholat permeabilisiert. 125 µl dieser Probe wurden mit 125 µl 8 M GnHCl und 119 µl 47 mM AMS (4-Acetamido-4'-Maleimidylstilbene-2,2'-Disulfonsäure in DMSO) 20 min bei RT markiert. Zur

Reinigung wurden die Proben mit demselben Volumen 10% (w/v) Trichloressigsäure versetzt. Nach 20–60 min Inkubation bei 4°C wurde 15 min bei 10.000 U/min zentrifugiert (Sigma 2K 15). Das Pellet wurde mit 100% (v/v) Ethanol gewaschen und erneut 15 min bei 10.000 U/min zentrifugiert. Die getrockneten Pellets wurden in 2 x SDS-Auftragspuffer ohne Reduktionsmittel resuspendiert und 10 min bei 99°C inkubiert. Bis zur Verwendung wurden die Proben bei -20°C gelagert.

Zur Detektion wurden alle Proben auf ein 12%iges SDS-Gel (18,5 cm x 15,3 cm) aufgetragen. Nach 5 h bei 140 V wurden die Proben auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. FNR wurde mit Antikörpern gegen FNR und einem peroxidase gekoppelten sekundären Antikörper (Renner) nachgewiesen.

#### **3.4.4 Quantifizierung der Peptide**

##### **HPLC-Reinigungen und Quantifizierung der Peptide**

ApoFNR wurde alkyliert und über Festphasenextraktion mit C<sub>18</sub>-Material gereinigt. Die eluierten Peptide wurden in der Speed Vac getrocknet und erneut in 0,1% (v/v) Trifluoressigsäure und 4 M GnHCl gelöst. Die Proben wurden über Gelfiltration mit 10% (w/v) Acetonitril, 50 mM Ammoniumacetat (pH 8,6) entsalzt und mit 5% (w/w) modifiziertem Trypsin (sequencing grade, Roche) für 11 Stunden bei 37°C verdaut. Die Peptide wurden über HPLC mit einer Gelfiltrationssäule (Superdex™ Peptide 10/30) aufgetrennt. Als Fließmittel wurde 10% (w/v) Acetonitril, 0,1% (v/v) Trifluoressigsäure verwendet, hierbei sollten die größeren Peptide, die die 5 Cysteinreste enthalten, von der Masse an kleinen Peptiden (<3 kDa) getrennt werden. Nach Identifizierung dieser Peptide durch Massenspektrometrie wurden die entsprechenden Fraktionen vereinigt und getrocknet. Die Peptide wurden erneut in 1 M GnHCl, 20 mM Tris/HCl (pH 8) gelöst und mit 2 µg Endoproteinase AspN (Roche) 9 Stunden bei 37°C inkubiert. Die entstandenen Peptide wurden über reversed phase HPLC mit einer C<sub>8</sub>-Säule (Aquapore RP 300, 2,1 x 100 mm) getrennt. Das HPLC-Chromatogramm wurde bei 215 nm aufgenommen. Die Fraktionen wurden manuell gesammelt und im Massenspektrometer identifiziert.

### **Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time Of Flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS)**

Der Vorteil eines MALDI-TOF Massenspektrometers besteht darin, dass Proteine ohne Fragmentierung in die Gasphase überführt und so gemessen werden können. Die Probe wird mit einer geeigneten organischen Matrix gemischt, um ionisierte Proteinmoleküle zu erhalten. Durch die Mischung und anschließende Trocknung entstehen kristalline Stellen. Beschießt man nun diese Stellen mit einem Laser, so verdampft die Matrix und reißt die Proteinmoleküle mit. Hierbei entstehen meist positiv geladene Proteinionen, in der Regel einfach protonierte Moleküle. Auf welche Weise die Ionen gebildet werden ist noch nicht völlig bekannt. Die entstandenen Ionen können in einem Time of Flight Massenanalysator aufgetrennt und anschließend detektiert werden (van Baar, 2000).

Als Matrix für die Proben wurde entweder Sinapinsäure oder  $\alpha$ -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure verwendet.

Die MALDI-TOF Spektren wurden von Dr. Thorsten Selmer, Laboratorium für Mikrobiologie, Philipps Universität Marburg, aufgenommen.

### **3.4.5 Eisen-und Sulfidbestimmung**

#### **Bestimmung von Sulfid als Methylenblau**

Für die Bestimmung von Sulfid als Methylenblau wurden verschiedene Methoden kombiniert (King *et al.*, 1967; Siegel, 1964; Lacourciere *et al.*, 1998). Da Sulfid durch Sauerstoff oxidiert wird, wurde der gesamte Test im Anaerobenzelt durchgeführt. Alle für den Test benötigten Lösungen wurden anaerobisiert und im Anaerobenzelt gelagert, außer der N, N'-Dimethyl-p-phenylendiamin-Lösung, die jedes Mal frisch hergestellt werden musste. In Eppendorfgefäßen (1,5 ml) wurden 100  $\mu$ l Zinklösung und 780-x  $\mu$ l Wasser vorgelegt. Hierzu wurden x  $\mu$ l Probe gegeben. Das Eppendorfgefäß wurde zum Mischen mehrmals invertiert. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden zu jedem Reaktionsansatz 100  $\mu$ l DMD-Lösung gegeben und das Gefäß zum Mischen mehrmals invertiert. Nun wurden 20  $\mu$ l Eisenlösung hinzugefügt und der Ansatz erneut durch Invertieren gemischt.

Nach 16 h Inkubation bei RT im Dunkeln wurden alle Ansätze 3 min bei 15.000 U/min im Anaerobenzelt zentrifugiert (MIKROLITER, Hettich). Vom

Überstand jeder Probe wurde am Photometer (Zeiss S-10) ein Absorptionsspektrum von 550-800 nm aufgenommen, um das gemessene Spektrum mit dem Spektrum von Methylenblau zu vergleichen. Aus jedem Spektrum wurde die Differenz  $A_{664 \text{ nm}} - A_{710 \text{ nm}}$  berechnet (Programm Aspect Plus). Dieser Wert wurde in die vorher erstellte Kalibrationsgerade eingesetzt, um die Sulfidkonzentration zu erhalten.

Sollte eine Kinetik der Sulfidbildung durch NifS<sub>AV</sub> aufgenommen werden, so wurden jeweils 100 µl des Testansatzes in den Methylenblau-Test eingesetzt. Sollte das säurelabile Sulfid in NreB bestimmt werden, so wurde alles freie Sulfid vor dem Methylenblau-Test über Gelfiltration (Nap-10 Säule) abgetrennt.

### **Bestimmung von Eisen (Fish, 1988; Trageser, 1990)**

Für die Eisenbestimmung in NreB wurden dieselben Fraktionen der Gelfiltrationsäule verwendet wie für den Methylenblau-Test. Es wurden 100 µl Probe mit 500 µl Kaliumpermanganatlösung gemischt und 4 h bei 60°C inkubiert. Um Verluste durch Kondenswasser zu vermeiden, wurden alle Proben zentrifugiert. Das entstandene Pellet aus Braunstein wurde durch vortexen wieder resuspendiert. Nun wurden zu jeder Probe 100 µl Ferrozinreagenz gegeben, die Proben wurden gut gemischt und 42 min bei RT inkubiert. Um eventuell ausgefallenes Protein abzutrennen, wurden die Proben zentrifugiert, und die Extinktion des Überstandes wurde bei 562 nm bestimmt. Die in der Probe vorhandene Eisenkonzentration wurde über eine Kalibrationsgerade berechnet.

### **3.4.6 Kinetik der Sulfidbildung durch NifS<sub>AV</sub>**

NifS<sub>AV</sub> wurde nach Präparation anaerobisiert, wie bei der Rekonstitution beschrieben, und die Kinetik wurde im Anaerobenzelt durchgeführt. Es wurden folgende Stammlösungen hergestellt:

Stammlösungen:

- 0,25 M Cystein (Cys) in H<sub>2</sub>O
- 1 M Dithiothreitol (DTT) in H<sub>2</sub>O
- 0,1 M Glutathion (GSH) in H<sub>2</sub>O
- 54 mM NADPH in H<sub>2</sub>O

- 0,5 µg/µl Glutathionreduktase (GR) in Puffer C
- 26,2 µM Glutaredoxin 1 (Grx 1) in Puffer C

Aus diesen Stammlösungen wurden folgende Probenansätze hergestellt:

**Tab. 3: Zusammensetzung der verschiedenen Ansätze für die Kinetik der Sulfidbildung von NifS<sub>AV</sub>.**

Ansatz	Cys (µl)	DTT (µl)	GSH (µl)	Grx 1 (µl)	GR (µl)	NADPH (µl)	NifS <sub>AV</sub> (mg)
DTT	2	1	/	/	/	/	2
DTT + Grx 1	2	1	/	12	7,6	5	2
GSH	2	/	20	/	/	/	2
GSH + Grx 1	2	/	20	12	7,6	5	2

Alle Ansätze wurden mit Puffer C auf 1 ml aufgefüllt und durch Invertieren gemischt. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden aus jedem Ansatz 100 µl entnommen und in den Methylenblau-Test eingesetzt. Als Blindwert wurde einmal für jeden Ansatz die beschriebene Kinetik ohne NifS<sub>AV</sub> aufgenommen. Bei späteren Messungen wurden für jeden Ansatz zwei Blindwerte bestimmt. Dazu wurde der jeweilige Ansatz nach 40 min ohne NifS<sub>AV</sub> gemessen.

### 3.5 Molekulargenetische Methoden

Molekulargenetische Standardmethoden wurden nach Sambrook *et al.*, (2001) durchgeführt. Genomische DNA wurde mit dem Nucleo Spin C+T-Kit von Macherey-Nagel aus dem Bakterienstamm AN387 (siehe Tabelle 1) isoliert. Für Plasmidisolierung wurde der Qiaprep-Spin (Mini)-Kit der Firma Qiagen verwendet. Die Aufreinigung von PCR-Produkten und Restriktionsverdauen erfolgte mit dem PCR Purification-Kit von Qiagen. Die verwendeten Restriktionsenzyme stammten von den Firmen Boehringer und Fermentas. Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde der Qiaquick Gel

Extraction-Kit (Qiagen) benutzt. Ligationen wurden nach Sambrook *et al.*, (2001) durchgeführt und erfolgten über Nacht bei 16°C. Das Verhältnis von Insert zu Vektor betrug jeweils 3:1, 3:2 und 1:1. Die Herstellung elektrokompetenter Zellen und die Transformation erfolgte nach Farinha *et al.*, (1990).

### **Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde im icycler (Biorad) durchgeführt. Ein Reaktionsansatz von 50 µl enthielt je 10 pmol Primer, ca. 100 ng DNA-Matrize, 1,5 oder 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP-Mix, 1 U Taq-DNA-Polymerase (Invitrogen) oder 1 U Pfu-Ultra-DNA-Polymerase (Stratagene) und Reaktionspuffer in einfacher Konzentration. Zur Amplifizierung wurden folgende Zyklen durchgeführt:

Denaturierung 2 min 95°C

30 Zyklen-Denaturierung 30 sec 95°C

Hybridisierung 30 sec 55-60°C

Elongation 1 min 72°C

Elongation 10 min 72°C

### **Bestimmung der β-Galactosidaseaktivität**

Die β-Galactosidaseaktivität wurde nach Miller (1992) bestimmt. Die aeroben Kulturen wurden in 20 ml LB mit 25 mM Glucose und entsprechenden Antibiotika in 300 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen gezüchtet. Für die anaeroben Kulturen wurden 10 ml LB mit 25 mM Glucose, 50 mM Nitrat und entsprechenden Antibiotika zur Zucht verwendet. Inkubiert wurden die aeroben Kulturen unter Schütteln bei 37°C und die anaeroben Kulturen bei 37°C im Wasserbad. Die Zellen wurden bei einer OD<sub>578nm</sub> von 0,6–0,8 geerntet und direkt gemessen. Für die β-Galactosidaseaktivität wurden mindestens zwei unabhängige Zuchten in jeweils vier Parallelbestimmungen gemessen.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Untersuchungen von isoliertem FNR-Protein

#### 4.1.1 Redoxzustand der Cysteinreste in apoFNR und in rekonstituiertem [4Fe-4S]•FNR

Der Redoxzustand der Cysteinreste von FNR und seine Bedeutung für den Funktionszustand sollte *in vitro* und *in vivo* untersucht werden. Für isoliertes apoFNR gab es bereits Hinweise, dass sich der Redoxzustand der Cysteinreste verändern kann (Green *et al.*, 1993; Ohlberger, 2000). Aerob präpariertes apoFNR zeigte in nicht reduzierenden SDS-Gelen zwei Proteinbanden, eine bei  $M_r$  30.000 und eine bei  $M_r$  27.000. Das Auftreten der Bande bei  $M_r$  30.000 entspricht der Molmasse von FNR. Die Bande bei  $M_r$  27.000 konnte durch anaerobe Bedingungen bzw. Reduktionsmittel unterdrückt werden (Ohlberger 2000), während die Bande von  $M_r$  30.000 immer vorhanden war. Die FNR-Bande von  $M_r$  27.000, die durch Reduktionsmittel in die FNR-Form von  $M_r$  30.000 umgewandelt werden kann, ist ein Hinweis auf die Ausbildung von Disulfidbrücken in FNR unter bestimmten Bedingungen.

In aerob bzw. anaerob präpariertem apoFNR wurde der Thiolgehalt aller Cysteinreste mit dem Ellman's-Test bestimmt, mit dem alle frei zugänglichen Thiolgruppen erfasst werden (Tabelle 4). In aerob präpariertem apoFNR lagen 2,8 Cysteinreste pro FNR Monomer als Thiole vor, während es in anaerob präpariertem apoFNR 4,0 Thiole pro FNR Monomer waren. Dies zeigt, dass aerobes apoFNR gegenüber anaerobem apoFNR zusätzliche Disulfide enthält. Dadurch scheint eine Form von apoFNR gebildet zu werden, die eine kompaktere Struktur besitzt und so eine höhere Mobilität in der SDS-Gelelektrophorese zeigt. Die vier Thiolreste pro FNR Monomer in anaerob präpariertem apoFNR bedeuten, dass ein Cysteinrest als Disulfid vorliegt. Diese Zahl lässt sich aus einem Gemisch von apoFNR, das insgesamt fünf Cysteinreste enthält, aus Formen mit null und einem Disulfid erhalten. Mit dem Ellman's-Test kann nur der Durchschnitt aller Monomere bestimmt werden. Auch in anaerob präpariertem apoFNR gibt es damit eine gewisse Anzahl an

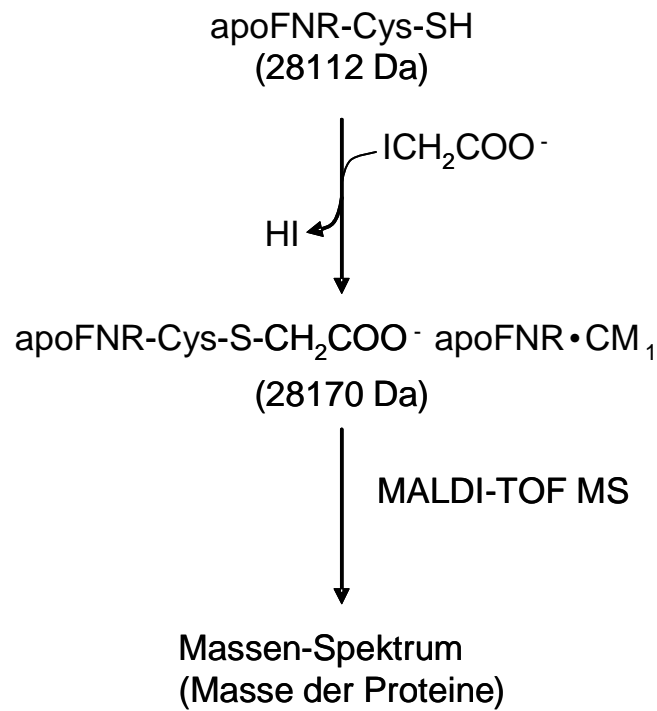
Disulfiden, allerdings sind es deutlich weniger als in aerob präpariertem apoFNR.

**Tab. 4: Anzahl der Cysteinreste, die in der Thiol bzw. Disulfidform in aerob bzw. anaerob präpariertem apoFNR vorliegen.** Die Anzahl an Thiolen wurde in isoliertem apoFNR mit 5,5'-Dithiobis-2-Nitrobenzoesäure (DTNB) bestimmt. Vor der Bestimmung wurde FNR mit Guanidiniumhydrochlorid denaturiert. Die Anzahl der Cysteine, die als Disulfide vorliegen, wurde aus der Differenz der gemessenen Werte zu den fünf insgesamt vorhandenen Cysteinen bestimmt.

	Thiole mol / mol FNR	Disulfid-Cysteinreste
Aerob präpariertes apoFNR	2,8	2,2
Anaerob präpariertes apoFNR	4,0	1,0

Zusätzlich wurde die Anzahl der Disulfide in apoFNR durch Reaktion des isolierten apoFNR mit Jodacetat und anschließender MALDI-TOF-Massenspektrometrie bestimmt. Die MALDI-TOF-Massenspektrometrie wurde von Dr. T. Selmer (Universität Marburg) durchgeführt. Dazu wurde der in Abbildung 5 dargestellte Versuchsansatz gewählt. FNR wurde unter aeroben bzw. anaeroben Bedingungen präpariert. Das Protein wurde dann in 4 M Guanidiniumhydrochlorid denaturiert und mit Jodacetat alkyliert. Jodacetat reagiert mit allen freien Thiolgruppen und erhöht die Masse des Proteins um jeweils 58 Da. FNR, dessen Cysteinreste mit Acetat markiert sind, wird im Nachfolgenden alkyliertes bzw. S-carboxymethyliertes (CM) FNR genannt. Nach Reinigung der Proben wurde ein Massenspektrum von FNR aufgenommen und anhand der gefundenen Massen konnte man die Anzahl an markierbaren Thiolresten berechnen. Da FNR insgesamt fünf Cysteinreste enthält, konnte daraus auf die Menge an Disulfiden in FNR geschlossen werden. Diese Messungen zeigten außerdem, ob es sich bei der Präparation

um eine homogene Form von apoFNR handelte, bei der alle Proteine die gleiche Anzahl an reduzierten Cysteinresten enthielten, oder ob ein Gemisch verschiedener Formen vorlag.

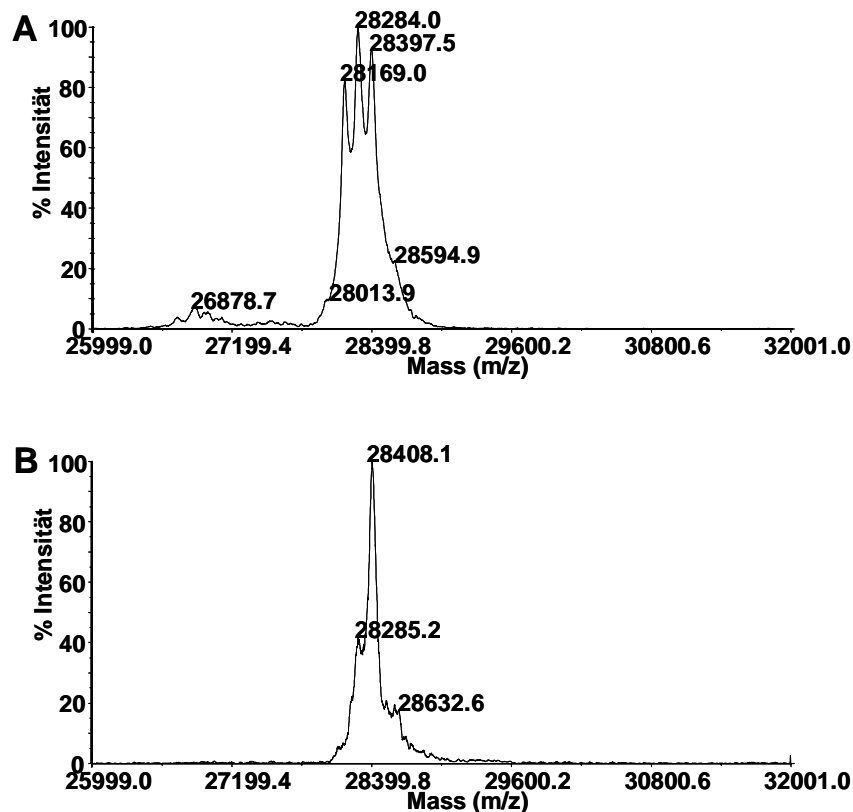


**Abb. 5: Prinzip der Markierung und Nachweis alkylierter Thiolreste in FNR *in vitro*.** Alkylierung durch (CH<sub>2</sub>COO<sup>-</sup>) führt zur Massenzunahme um jeweils 58 Da.

Unmodifiziertes apoFNR, das unter aeroben bzw. anaeroben Bedingungen präpariert wurde, zeigte im Massenspektrum eine Molmasse von  $28.112 \pm 14$  Da. Diese Masse entspricht der berechneten Masse von 28.112 Da für das rekombinante FNR-Protein. FNR, das als GST-FNR Fusionsprotein präpariert wurde, besitzt nach Abspaltung des GST-Proteins mit Glycin und Serin zwei zusätzliche N-terminale Aminosäuren aus der Thrombin-erkennungssequenz des GST-FNR. Für aerob präpariertes apoFNR wurden nach Alkylierung drei Formen mit den Massen 28.169 Da, 28.284 Da und 28.398 Da gefunden (Abb. 6a). Unmodifiziertes apoFNR wurde nicht gefunden. Da gebundenes Acetat die Masse von FNR pro Thiolrest um 58 Da erhöht, bedeutet dies, dass aerob präpariertes apoFNR aus einer Mischung von Proteinen, die einen, drei bzw. fünf Thiolreste enthalten, besteht. Die Proteine, in denen nur ein Thiolrest markiert war, enthielten dementsprechend zwei

Disulfidbrücken. Waren drei Thiolreste markiert, so war nur eine Disulfidbrücke gebildet worden. Konnten dagegen fünf Cysteinreste markiert werden, so bedeutete dies, dass kein Disulfid im Protein vorhanden war. Aerob präpariertes apoFNR war also eine Mischung aus Molekülen, die keine, eine bzw. zwei Disulfidbrücken enthielten.

Das Spektrum von anaerob präpariertem apoFNR (Abb. 6b) zeigte nur zwei Gipfel. Der Gipfel der Masse 28.285 Da entspricht FNR mit drei Thiolresten, also einer Disulfidbrücke. Das Protein der Masse 28.408 Da entspricht apoFNR mit fünf alkylierten Thiolresten, dieses Protein enthält damit keine Disulfidbrücke. Auch hier wurde kein unmodifiziertes FNR gefunden. ApoFNR mit zwei Disulfidbrücken, wie es in aerob präpariertem apoFNR gemessen wurde, war in der Probe ebenfalls nicht enthalten.



**Abb. 6: MALDI-TOF Spektrum von aerob (A) und anaerob (B) präpariertem apoFNR nach Alkylierung.** ApoFNR wurde mit 10 mM Jodacetat alkyliert und mit 4 M GnHCl denaturiert. Die Proben wurden über Festphasenextraktion gereinigt und im MALDI-TOF Massenspektrometer bestimmt. Die Spektren wurden im linearen Modus des Massenspektrometers bei einer Beschleunigungsspannung von 25 kV, einer Gitterspannung von 89% und einer Verzögerungszeit von 300 ns aufgenommen. Als Matrix wurde Sinapinsäure verwendet.

In rekonstituiertem [4Fe-4S]•FNR reagierten vier Thiolreste mit Jodacetat, wenn der Einbau von  $^{14}\text{C}$ -markiertem Acetat untersucht wurde (Tabelle 5). Die Thiolreste waren erst nach Denaturierung des Proteins für die Markierung zugänglich. Wurde von dieser Probe ein Massenspektrum aufgenommen, so wurde eine Masse bei 28.395 Da gefunden, die der berechneten Masse für fünffach alkyliertes FNR von 28.402 Da entsprach. Für drei- und vierfach alkyliertes FNR wurden nur schwache Signale gefunden. In rekonstituiertem FNR befinden sich damit alle Cysteinreste in der Thiolform. FNR mit Eisen-Schwefel-Zentrum unterscheidet sich damit deutlich von FNR ohne Eisen-Schwefel-Zentrum (apoFNR), das Disulfidbrücken enthält. Diese Methode eignet sich deshalb, zwischen FNR mit gebundenem FeS-Zentrum ([4Fe4S] oder [2Fe2S]) und apoFNR zu unterscheiden. Allerdings ist es mit dieser Methode nicht möglich, zwischen einem [4Fe4S]- und einem [2Fe2S]-Zentrum in FNR zu unterscheiden.

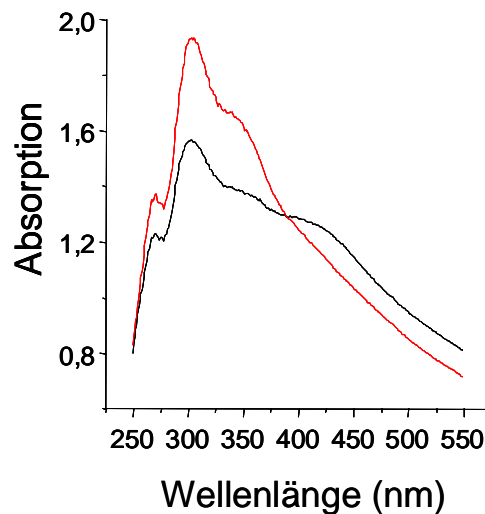
**Tab. 5: Anzahl der Thiole und Disulfide in rekonstituiertem [4Fe4S]•FNR und in [4Fe4S]•FNR, das durch Luft inaktiviert wurde.** Der Gehalt an Thiolresten wurde durch Alkylierung mit  $^{14}\text{C}$ -Jodacetat bestimmt. Die Anzahl an Disulfiden wurde aus der Differenz zu fünf Cysteinresten bestimmt.

	Thiole mol / mol FNR	Disulfid-Cysteinreste
Rekonstituiertes [4Fe4S]•FNR	4,0	1,0
Luft inaktiviertes [4Fe4S]•FNR	2,2	2,8

#### 4.1.2 Redoxzustand der Cysteinreste bei der Inaktivierung von rekonstituiertem [4Fe4S]•FNR durch Luft

Wird apoFNR durch die Cysteindesulfurase NifS<sub>AV</sub>, Eisen (II) und Cystein zu [4Fe4S]•FNR rekonstituiert, so lässt sich der Einbau des Eisen-Schwefel-Zentrums durch das Auftreten einer Schulter bei 420 nm im UV/VIS Spektrum

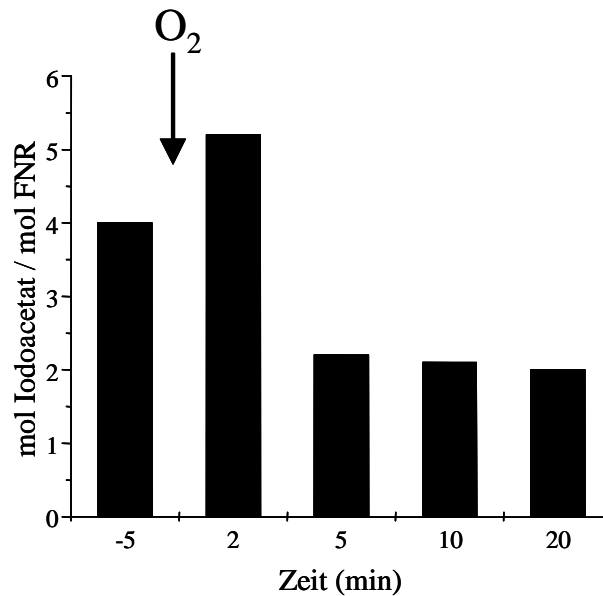
verfolgen. Bei Inaktivierung des [4Fe4S]-Zentrums durch Sauerstoff verschwindet diese Schulter wieder (Abb. 7). Allerdings kann aufgrund des UV/VIS Spektrums keine Aussage über den Redoxzustand der Cysteinreste während der Inaktivierung von [4Fe4S]•FNR durch Sauerstoff getroffen werden. Aus diesem Grund wurde rekonstituiertes [4Fe4S]•FNR mit Sauerstoff inaktiviert und zu verschiedenen Zeiten wurden Proben genommen. Der Redoxzustand der Cysteinreste wurde durch Alkylierung mit  $^{14}\text{C}$ -Jodacetat, DTNB und Alkylierung mit nicht radioaktiv markiertem Jodacetat und anschließender Massenspektrometrie bestimmt (Tabelle 5, Abb.8 und 9).



**Abb. 7: Spektren von FNR.** Das schwarze Spektrum ist das Differenzspektrum von rekonstituiertem FNR–apoFNR vor Zugabe von Luft. Das rote Spektrum zeigt das Differenzspektrum von rekonstituiertem FNR–apoFNR nach Inkubation mit Luft.

Für die Bestimmungen wurde FNR mit Guanidiniumhydrochlorid denaturiert, um die eventuell vorhandenen Eisen-Schwefel Zentren zu destabilisieren und die Thiolreste für die Bestimmung zugänglich zu machen. In rekonstituiertem FNR wurden mit DTNB (Abb. 9) und  $^{14}\text{C}$ -Jodacetat (Abb. 8) jeweils vier Cysteinreste markiert. Nach Zusatz von Luft nahm der Anteil der  $^{14}\text{C}$ -Jodacetat markierbaren Cysteinreste für zwei Minuten auf fünf Cysteinreste zu, bevor er in den nächsten drei Minuten auf zwei Thiolreste abfiel (Abb. 8). Längere Inkubation mit Luft verringerte den Anteil reaktiver Thiolreste nicht mehr. Ohne Zusatz von Luft blieb die Anzahl der markierbaren Cysteinreste in der gleichen Zeit

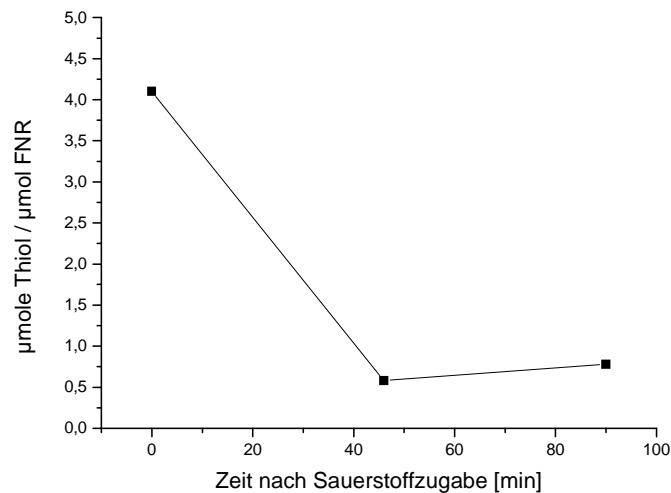
dagegen konstant. Die Experimente zeigen, dass bei Sauerstoffexposition nach zwei Minuten Disulfide gebildet werden, und dass dies nach insgesamt fünf Minuten abgeschlossen ist. Dies bedeutet, dass in der Zeitspanne von zwei bis fünf Minuten nach Luftzusatz der Verlust des FeS-Zentrums einsetzt und nach fünf Minuten beendet ist. Diese Kinetik wurde in Abwesenheit überschüssiger freier Eisenionen gemessen. Freie Fe-Ionen reagieren mit den Cysteinresten oder Sauerstoff und wurden deshalb vor der Inaktivierung durch Luft durch EDTA komplexiert.



**Abb. 8: Alkylierungskinetik von rekonstituiertem [4Fe-4S]•FNR anhand der carboxymethylierbaren Cysteinreste.** Aerob präpariertes apoFNR wurde nach Rekonstitution in eine Petrischale überführt und mit Luft inkubiert (0 min). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben genommen, in 4 M GnHCl denaturiert und mit  $^{14}\text{C}$ -Jodacetat (12 mM, 43 MBq/mmol Jodacetat) markiert. Das Protein wurde nach Wessel und Flügge (1984) extrahiert. Die Radioaktivität wurde im Szintillationszähler bestimmt. Es wurde jeweils der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten gebildet.

Wurde der Ellman's-Test zur Quantifizierung der Thiolreste während der Inaktivierung von [4Fe4S]•FNR durch Luft verwendet, so wurden zum Zeitpunkt 0 min, vor Inkubation mit Luft, ebenfalls vier Thiolreste gemessen (Abb. 9). Nach Inkubation mit Luft fiel die Anzahl an zugänglichen Thiolresten auf einen Thiolrest pro FNR ab und blieb dann ebenfalls konstant. Dass mit der radioaktiven Methode am Ende der Inaktivierung 2 Thiolreste gemessen

wurden, während es bei Bestimmung mit DTNB nur ein Thiolrest war, könnte daran liegen, dass für den Ellman's-Test erheblich mehr Protein benötigt wurde, als für die radioaktiven Untersuchungen. Möglicherweise wurde die Messgenauigkeit durch die geringe Proteinkonzentration beeinträchtigt. Außerdem wurde diese Kinetik in Gegenwart von überschüssigen Eisenionen durchgeführt. Möglicherweise wird durch die Eisenionen nicht nur die Geschwindigkeit der Disulfidbildung sondern auch die Anzahl an Disulfiden erhöht (Abb. 9).



**Abb. 9: Kinetik der Inaktivierung von [4Fe4S]•FNR anhand der mit DTNB bestimmbaren freien Thiolreste.** Rekonstituiertes FNR wurde über Gelfiltration gereinigt, und die freien Thiolreste wurden mit dem Ellman's-Test bestimmt. Die Probe zum Zeitpunkt 0 min wurde vor Inkubation mit Luft gemessen, die anderen beiden Proben nach Zusatz von Luft.

Wurde [4Fe4S]•FNR durch Luft inaktiviert, mit Jodessigsäure alkyliert und durch MALDI-TOF Massenspektrometrie analysiert, so wurde eine Molmasse von 28.262 Da bestimmt. Dies entspricht wahrscheinlich FNR mit drei Thiolresten und einem Disulfid. Die theoretische Masse für diese Form von alkyliertem FNR ist 28.286 Da. Der Unterschied von 24 Da zwischen der gemessenen Masse und der erwarteten Masse beruht wahrscheinlich auf der Schwankung, die durch unspezifische Absorption von Ionen an FNR hervorgerufen wird und  $\pm 28$  Da beträgt.

Insgesamt zeigen die Experimente, dass in sauerstoffinaktiviertem [4Fe4S]•FNR, wie in apoFNR, Disulfide gebildet werden. Sauerstoffinaktiviertes

FNR scheint eine Mischung aus FNR zu sein, das eine und zwei Disulfidbrücken enthält. Dementsprechend liegen drei bzw. ein Cysteinrest als Thiole vor. Da mit den chemischen Bestimmungen nur ein Durchschnitt aller vorhandenen Thiolreste bestimmt werden konnte, wurden mit der radioaktiven Methode 2,2 Thiolreste und mit dem Ellman's-Test ungefähr ein Thiolrest gemessen.

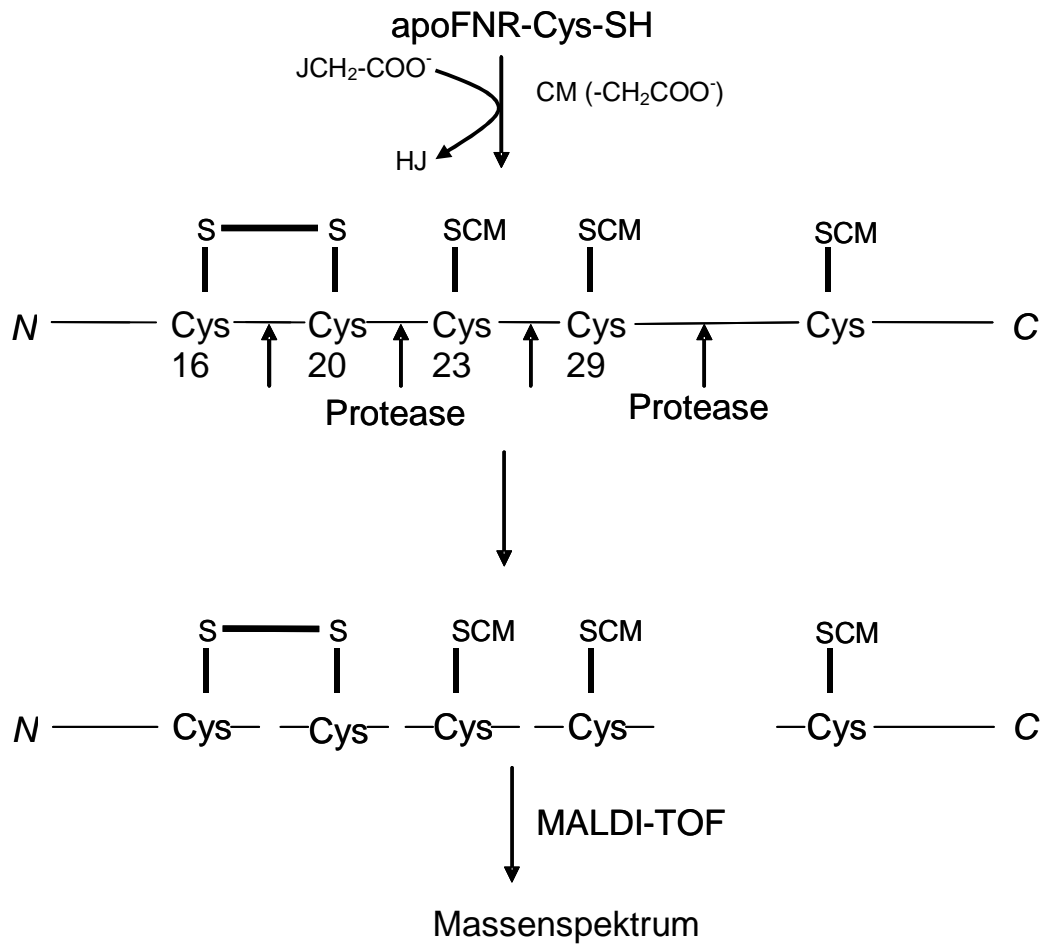
#### **4.1.3 Lage der Disulfide in aerobem und anaerobem apoFNR und in sauerstoffinaktiviertem [4Fe4S]•FNR**

Um nicht nur die Anzahl der Disulfide in FNR sondern auch ihre Lage herauszufinden, musste ein anderes Vorgehen gewählt werden (Abbildung 10). Auch diesmal wurde das Protein nach Denaturierung mit Jodacetat markiert. Im Anschluss wurde das Protein mit einer Protease gespalten. Jede Protease besitzt eine bestimmte Erkennungssequenz, an der sie schneidet. Bei bekannter Aminosäuresequenz können die Fragmente und die Massen der entstehenden Peptide mit einem Programm (Webcutter der Universität Tour) berechnet werden. Würde zwischen zwei Peptiden eine Disulfidbrücke gebildet, so würde im Massenspektrum ein Peak mit einer Masse, die der Summe beider Einzelpeptide entspricht, auftauchen.

Die durch den Proteaseverdau entstandenen Peptide wurden nach Reinigung im Massenspektrometer bestimmt. Aus den gefundenen Massen konnte man nun auf die Lage der Disulfide in FNR schließen.

Als erste Protease wurde Trypsin verwendet. Wie in Tabelle 6 gezeigt ist, schneidet Trypsin C-terminal von Arginin und Lysin. Am C-Terminus von FNR entstehen mehrere kleine Peptide und ein größeres, das die vier N-terminalen Cysteine Cys16, 20, 23 und 29 enthält. Der Cysteinrest 122 befindet sich auf einem weiteren, separaten Peptid charakteristischer Masse. Bestimmt man nun mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie die Massen dieser Proben, so kann man Aussagen darüber treffen, ob einer der vier C-terminalen Cysteinreste eine Disulfidbrücke mit dem Cysteinrest 122 ausbildet. Außerdem lässt sich aus den Massen erkennen, ob die drei Formen von aerobem apoFNR, die nach Alkylierung auftreten, bzw. die zwei Formen von anaerobem apoFNR auf

Unterschieden zwischen den vier N-terminalen Cysteinresten oder zwischen den N-terminalen Cysteinresten und Cysteinrest 122 beruhen.



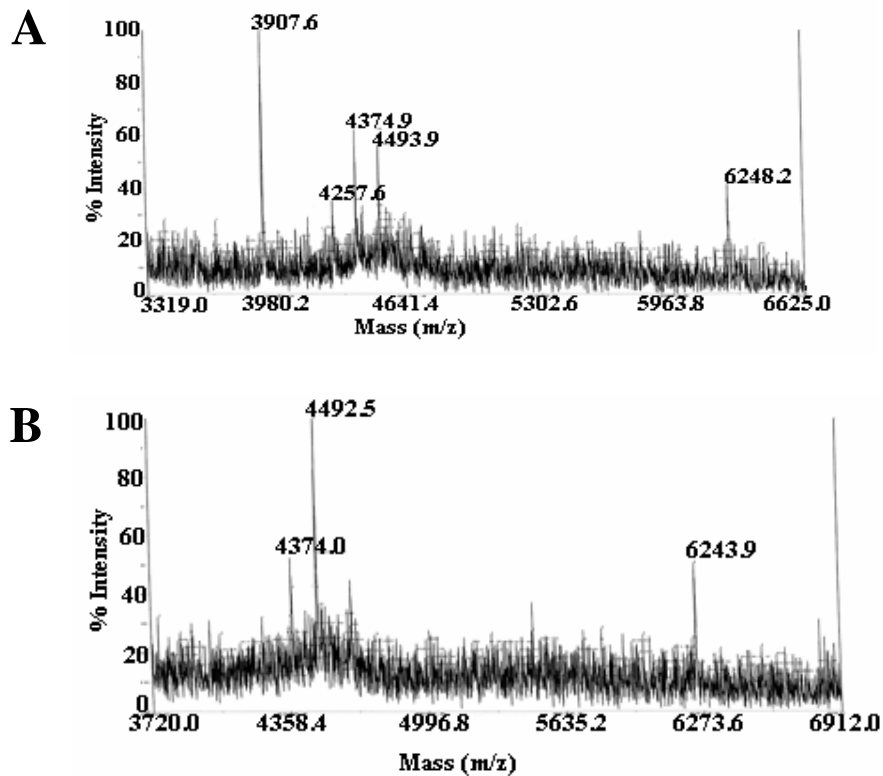
**Abb. 10: Prinzip der Bestimmung der Lage der Disulfide in FNR *in vitro* durch Alkylierung mit Jodacetat und Massenspektrometrie.**

Abbildung 11a zeigt ein Massenspektrum von aerob präpariertem apoFNR, das mit Jodacetat alkyliert und mit Trypsin gespalten wurde. Die Proteine der Massen 4.258 Da, 4.375 Da und 4.494 Da entsprechen dem Peptid mit den Aminosäuren 11/48 von FNR, das die vier N-terminalen Cysteinreste enthält. Die Masse 4.258 Da entspricht Peptid 11/48 ohne zusätzliche Alkylierung, d.h. dieses Peptid enthält zwei Disulfidbrücken. Ein Peptid mit einer Disulfidbrücke hätte eine berechnete Masse von 4.375 Da. Abbildung 11a zeigt einen Peak dieser Masse. Der Peak der Masse 4.494 Da entspricht vierfach alkyliertem FNR (siehe Tabelle 7). Dieses Peptid enthält also keine Disulfidbrücke. Der

Peak der Masse 6.244 Da entspricht dem Peptid 78/135. Dieses Peptid enthält den Cysteinrest 122. Es wurde kein Peptid gefunden, dessen Masse der Summe der Massen des Peptids 11/48 und des Peptids 78/135 entspricht. Folglich ist der Cysteinrest 122 an keiner Disulfidbrücke beteiligt.

In Abbildung 11b ist das Massenspektrum von anaerob präpariertem apoFNR nach Alkylierung und Spaltung durch Trypsin gezeigt. Dieses Spektrum lässt für das Peptid mit den vier N-terminalen Cysteinresten (Pep 11/48) zwei Peaks mit den Massen 4.374 Da und 4.493 Da erkennen. Die Masse bei 4.374 Da entspricht dem Peptid mit einer Disulfidbrücke und zwei Cysteinresten in alkylierter Form. Das vierfach alkylierte Peptid 11/48 mit der Masse 4.493 Da war ebenfalls vorhanden. Peptid 11/48 mit zwei Disulfidbrücken (erwartete Masse 4.259 Da) wurde nicht gefunden. Der Cysteinrest 122 erscheint in dem Peptid der Masse 6.244 Da. Auch in anaerob präpariertem apoFNR wurde kein Peptid der Größe gefunden, das durch Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen dem Cysteinrest 122 und einem der vier N-terminalen Cysteinreste zu erwarten wäre.

Folglich werden in aerob und anaerob präpariertem FNR nur Disulfidbrücken zwischen den vier N-terminalen Cysteinresten ausgebildet.



**Abb. 11: MALDI TOF Spektren von aerob (A) bzw. anaerob (B) präpariertem, alkyltem apoFNR, das mit Trypsin verdaut wurde.** Die Proben des tryptischen Verdau wurden über Festphasenextraktion gereinigt und mit MALDI-TOF Massenspektrometrie bestimmt. Die Spektren wurden im Reflektormodus des Instruments aufgenommen, mit einer Beschleunigungsspannung von 20 kV, einer Gitterspannung von 58 % und einer Verzögerungszeit von 100 ns. Als Matrix wurde  $\alpha$ -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure verwendet.

**Tab. 6: Peptide der enzymatischen Spaltung von alkyliertem FNR (FNR-CM<sub>5</sub>) durch die Protease Trypsin** (Webcutter, Universität Tour, 2005). Die ersten beiden Aminosäuren stammen aus dem GST-FNR Fusionsprotein. Wird das Fusionsprotein mit Thrombin gespalten, so erhält FNR zwei zusätzliche Aminosäuren am N-Terminus. Für die „Average Mass“ wurde die Masse der Peptide aufgrund der natürlichen Isotopenverteilung berechnet. Außerdem wurde für alle Cysteinreste der mit Acetat alkylierte Zustand angenommen. Die Cysteinreste wurden in der Tabelle fett gedruckt.

Aminosäurereste	[M+H] <sup>+</sup> Average Mass	Sequenz
-2/5	761.92	GSMIPEK
6	175.21	R
7/9	401.53	IIR
10	175.21	R
11/48	4490.98	IQSGGCAIHCQDCSISQLCIPFTLNEHELDQLDNIIR
49	147.20	K
50/54	613.78	KPIQK
55/60	693.82	GQTLFK
61/66	632.69	AGDELK
67/72	722.86	SLYAIR
73/77	505.59	SGTIK
78/135	6243.83	SYTITEQGDEQITGFHLAGDLVGFDAIGSGHHPSFAQALET MV <b>C</b> EIPFETLDDL <b>S</b> GK
136/140	630.79	MPNLR
141/145	693.87	QQMMR
146/152	777.96	LMSGEIK
153/163	1233.47	GDQDMILLLSK
164	147.20	K
165/169	618.63	NAEER
170/179	1168.38	LAAFIYNLSR
180	175.21	R
181/184	521.60	FAQR
185/189	563.64	GFSPR
190/192	451.50	EFR
193/197	621.78	LTMTR
198/213	1708.91	GDIGNYLGLTVETISR
214/217	458.58	LLGR
218/220	422.51	FQK
221/227	705.90	SGMLAVK
228/229	204.25	GK
230/247	2001.21	YITIENNDALAQLAGHTR
248/250	303.34	NVA

**Tab. 7: Massen der Fragmente von aerob bzw. anaerob präpariertem apoFNR nach Markierung mit Jodacetat und Verdau mit der Protease Trypsin.** Es wurden nur die Peptide aufgeführt, die Cysteinreste enthalten. Die Nummerierung entspricht der Nummerierung in FNR; es sind jeweils die erste und die letzte Aminosäure eines Peptids angegeben. Die Massen der Fragmente wurden durch MALDI-TOF Massenspektrometrie bestimmt. Die kalkulierten Massen wurden aus der Masse der Peptide und der jeweiligen Alkylierung erhalten. Jede Alkylierung eines Cysteinrestes durch Jodacetat erhöht die Masse des Peptids um 58 Da. Die berechnete Masse entspricht der „Average Mass“ aus Tabelle 6.

Cysteine enthaltende Peptide	Thiolreste	Disulfide	Berechnete Masse (m/z)	Beobachtete Masse (m/z ± 4)
<i><u>Aerob präpariertes apoFNR</u></i>				
Pep11/48 (Cys16, 20, 23, 29)	4	0	4491	4494
Pep11/48 (Cys16, 20, 23, 29)	2	1	4375	4375
Pep11/48 (Cys16, 20, 23, 29)	0	2	4259	4258
Pep78/135 (Cys122)	1	0	6244	6248
<i><u>Anaerob präpariertes apoFNR</u></i>				
Pep11/48 (Cys16, 20, 23, 29)	4	0	4491	4493
Pep11/48 (Cys16, 20, 23, 29)	2	1	4375	4374
Pep78/135 (Cys122)	1	0	6244	6244

Durch Spaltung mit der Protease Trypsin konnten die vier N-terminalen Cysteinreste nicht getrennt werden. Aus diesem Grund wurde eine weitere Protease verwendet, AspN. AspN spaltet am N-Terminus von Asparagin (siehe Tabelle 8). Bei den hierbei entstehenden Peptiden liegen die Cysteinreste 16/20 und 23/29 jeweils auf einem Peptid. Es ist damit möglich, die genaue Lage der Disulfidbrücken zwischen den N-terminalen Cysteinresten zu erkennen.

**Tab. 8: Peptide der enzymatischen Spaltung von alkyliertem FNR (FNR-CM<sub>5</sub>) durch die Protease AspN (Webcutter, Universität Tour, 2005).** Die ersten beiden Aminosäuren stammen aus dem GST-FNR Fusionsprotein. Wird das Fusionsprotein mit Thrombin gespalten, so erhält FNR zwei zusätzliche Aminosäuren am N-Terminus. Für die „Average Mass“ wurde die Masse der Peptide aufgrund der natürlichen Isotopenverteilung berechnet, außerdem wurde für alle Cysteinreste der mit Acetat alkylierte Zustand angenommen. Die Cysteinreste in FNR wurden fett gedruckt.

Amino- säurereste	[M+H] <sup>+</sup> Average Mass	Sequenz
-2/21	2671.15	GSMIPEKRIIRRIQSGG <b>CAIHCQ</b>
22/39	2179.44	DCSISQL <b>C</b> IPFTLNEHEL
40/42	375.40	DQL
43/62	2285.70	DNIIERKKPIQKGQTLFKAG
63/85	2574.88	DELKSLYAIRSGTIKSYTITEQG
86/96	1188.29	DEQITGFHLAG
97/101	550.63	DLVGF
102/129	3047.40	DAIGSGHHPSFAQALETSMV <b>CE</b> IPFETL
130	134.11	D
131/153	2622.18	DLSGKMPNLRQQMMRLMSGEIKG
154/155	262.24	DQ
156/198	5106.00	DMILLLSKKNAAERLAAFIYNLSRRFAQRGFSPREFRLTMTRG
199/236	4214.92	DIGNYLGLTVETISRLLGRFQKSGMLAVKGYITIENN
237/250	1437.60	DALAQLAGHTRNVA

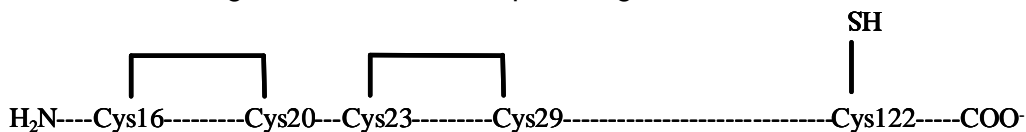
Das Peptid1/21, das die Cysteinreste 16/20 enthält, wurde mit den Massen 2.674 Da und 2.556 Da in aerob präpariertem apoFNR gefunden (siehe Tabelle 9). Das zweifach alkylierte Protein entspricht der Masse 2.674 Da, während das

Peptid mit der Disulfidbrücke der Masse von 2.556 Da entspricht (siehe Tabelle 8). Auch das Peptid 22/39 wurde sowohl in der zweifach alkylierten Form, als auch mit einer Disulfidbrücke gefunden. Die zweifach alkylierte Form hatte eine Masse von 2.181 Da, während das Peptid 22/39 mit Disulfidbrücke einer Masse von 2.062 Da entsprach. Es wurde kein Peptid gefunden, dessen Masse der Summe aus den Massen der Peptide 1/21 und 22/39 entsprach. Da der Cysteinrest 122 im Peptid 102/129 erneut nur als Thiolrest gefunden wurde, wurde das Ergebnis der Trypsinspaltung bestätigt, dass in aerob präpariertem apoFNR nur Disulfidbrücken zwischen den Cysteinresten 16/20 und 23/29 gebildet werden.

In anaerob präpariertem apoFNR wurde das Peptid 1/21 nicht gefunden. Peptid 22/39 war mit zwei Peaks vorhanden, die Masse von 2.181 Da entspricht der zweifach alkylierten Form, während die Masse von 2.062 Da der Form mit Disulfidbrücke entspricht. Auch für das anaerobe apoFNR wurde kein Peptid der Aminosäuren 1/39 gefunden. Das Peptid 102/129 hatte eine Masse von 3.050 Da. Dies entspricht einem alkylierten Cysteinrest 122. Auch diesmal gab es keine Hinweise auf Disulfide zwischen dem Cysteinrest 122 und einem der vier N-terminalen Cysteine. Da die Peptide 11/21 und 22/39 sowohl in der unmodifizierten Form als auch in der zweifach alkylierten Form nach HPLC-Trennung gefunden wurden, ist nicht sicher, welches der beiden Disulfide in der einfach alkylierten Form von apoFNR vorkommt. Da das Disulfid des Peptids 11/21 allerdings in deutlich größerer Menge als das Disulfid des Peptids 22/39 vorhanden war, ist es wahrscheinlich, dass die Disulfidbrücke zwischen den Cysteinresten 16 und 20 bevorzugt gebildet wird (Tabelle 10).

Die Disulfidbrücken in apoFNR werden nur zwischen bestimmten Cysteinresten gebildet und sind unter aeroben und anaeroben Bedingungen gleich. Sie werden also in definierter Form ausgebildet, kommen aber unter aeroben und anaeroben Bedingungen in unterschiedlicher Häufigkeit vor.

Damit konnte folgendes Schema für apoFNR gezeichnet werden:



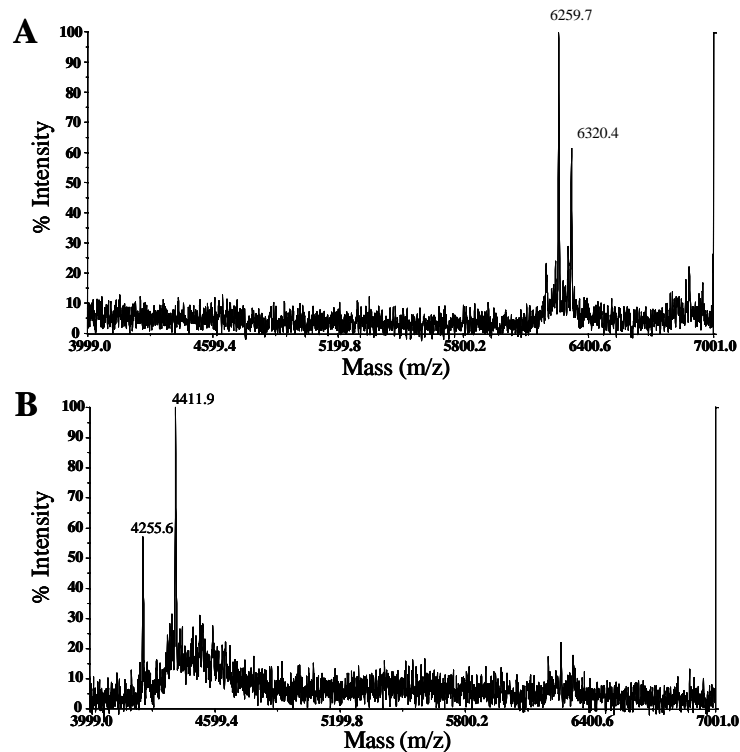
**Abb. 12: Lage der Disulfidbrücken in apoFNR.** Sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen werden ausschließlich Disulfidbrücken zwischen Cys16/20 und Cys23/29 gebildet. Allerdings kommen die einzelnen Disulfidbrücken in unterschiedlicher Häufigkeit vor.

**Tab. 9: Masse der Peptide von aerob bzw. anaerob präpariertem apoFNR nach Markierung mit Jodacetat und Spaltung mit der Protease AspN.** Die Nummerierung gibt jeweils die erste bzw. letzte Aminosäure des Peptids an, sie orientiert sich an der Nummerierung in FNR. Pep1/21 enthält daher N-terminal zwei zusätzliche Aminosäuren, Gly-Ser, aus dem GST-FNR Fusionsprotein. Die Massen wurden durch MALDI-TOF Massenspektrometrie bestimmt. Die kalkulierten Massen wurden aus der Masse der Peptide und der Massenzunahme von 58 Da pro markiertem Cysteinrest berechnet. N.b.: nicht bestimmt

Cysteine enthaltende Peptide	Thiolreste	Disulfide	Berechnete Masse (m/z)	Beobachtete Masse (m/z $\pm$ 3)
<i><u>Aerob präpariertes apoFNR</u></i>				
Pep1/21 (Cys16, 20)	2	0	2671	2674
Pep1/21 (Cys16, 20)	0	1	2555	2556
Pep22/39 (Cys 23, 29)	2	0	2179	2181
Pep22/39 (Cys 23, 29)	0	1	2063	2062
Pep102/129 (Cys122)	1	0	3047	3049
<i><u>Anaerob präpariertes apoFNR</u></i>				
Pep1/21 (Cys16, 20)	2	0	2671	n.b.
Pep1/21 (Cys16, 20)	0	1	2555	n.b.
Pep22/39 (Cys 23, 29)	2	0	2179	2181
Pep22/39 (Cys 23, 29)	0	1	2063	2062
Pep102/129 (Cys122)	1	0	3047	3050

Zur Bestimmung der Lage der Disulfide in sauerstoffinaktiviertem [4Fe4S] $\bullet$ FNR wurde dieses alkyliert und mit Trypsin bzw. AspN verdaut, und durch MALDI-TOF Massenspektrometrie analysiert (Abb. 13). Für das tryptisch verdaute FNR wurden Massen gefunden, die dem Peptid 11/48 mit zwei Disulfidbrücken entsprechen. Der Cysteinrest 122 wurde nur in der Thioform gefunden, es gab keinen Hinweis auf eine Disulfidbrücke zwischen dem Cysteinrest 122 und

einem der vier N-terminalen Cysteinreste. Wurde sauerstoffinaktiviertes [4Fe4S]•FNR mit AspN gespalten, so wurden das Peptid 1/21 mit einer Masse von 2.555 Da und das Peptid 22/39 mit einer Masse von 2.062 Da gefunden. Beide Massen entsprechen der Form von FNR mit Disulfidbrücke. Auch in sauerstoffinaktiviertem FNR wurden keine Hinweise auf Disulfidbrücken zwischen anderen Cysteinresten gefunden. Es werden also in sauerstoffinaktiviertem [4Fe4S]•FNR dieselben Disulfidbrücken gebildet, die auch in isoliertem apoFNR zu finden sind.



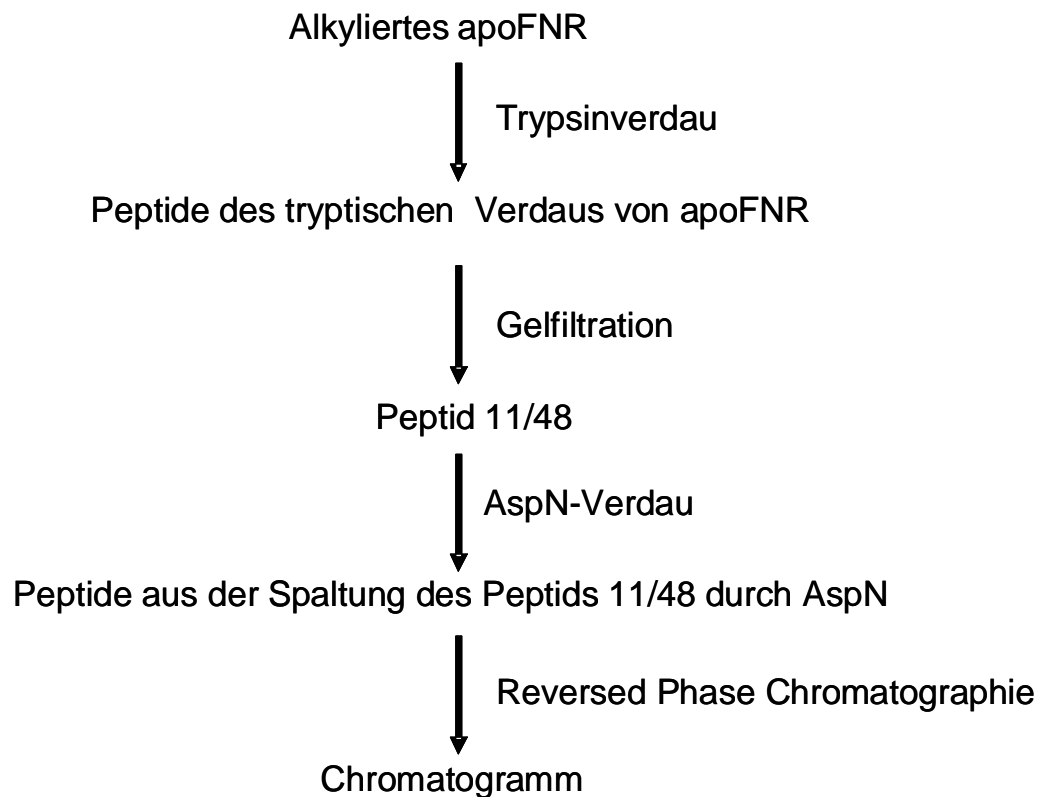
**Abb. 13 Redoxzustand der Cysteinreste der Peptide 78/135 (A) und 11/48 (B) von rekonstituiertem [4Fe4S]•FNR nach Inaktivierung durch Luft und Verdau mit Trypsin.** Rekonstituiertes und anschließend Luft inaktiviertes [4Fe4S]•FNR wurde in 4M GnHCL denaturiert und mit Jodacetat alkyliert. Nach Festphasenextraktion wurde das Protein mit Trypsin verdaut. Die Peptide wurden über Gelfiltration getrennt und mit MALDI-TOF MS analysiert. (A) das Peptid 78/135 mit dem Cysteinrest 122 hat im einfach alkylierten Zustand eine berechnete Masse von 6.244 Da. (B) das Peptid 11/48 enthält die Cysteinreste 16/29. In der unmodifizierten Form hat es eine berechnete Masse von 4.259 Da, d.h. es enthält zwei Disulfide. Die Masse 4.411,9 Da entspricht dem Peptid 11/48, das zusätzlich den Argininrest 10 enthält. Für dieses Peptid wurde eine Masse von 4.416 Da berechnet.

#### 4.1.4 Quantifizierung der Disulfide in apoFNR nach HPLC-Trennung

Nachdem nun die Lage der Disulfidbrücken in apoFNR bekannt war, sollten diese quantifiziert werden. Da die einzelnen Peptide im Massenspektrometer unterschiedlich gut in die Gasphase übertreten, konnte über die Höhe der einzelnen Peaks keine Aussage über die Konzentration der betreffenden Peptide getroffen werden. Ein Peptid, das nur in geringer Menge in der Probe vorhanden ist, aber im MALDI-TOF Massenspektrometer sehr gut in die Gasphase überführt werden kann, zeigt ein intensiveres Signal, als ein Peptid, das zwar in hoher Konzentration in der Probe vorliegt, aber nur schlecht in die Gasphase geht.

Daher wurde der in Abbildung 14 gezeigte Versuchsaufbau gewählt, um das Verhältnis der einzelnen Peptide zueinander quantitativ zu bestimmen. Mangels eines geeigneten Standards konnten nur relative Verhältnisse und keine absoluten Konzentrationen bestimmt werden.

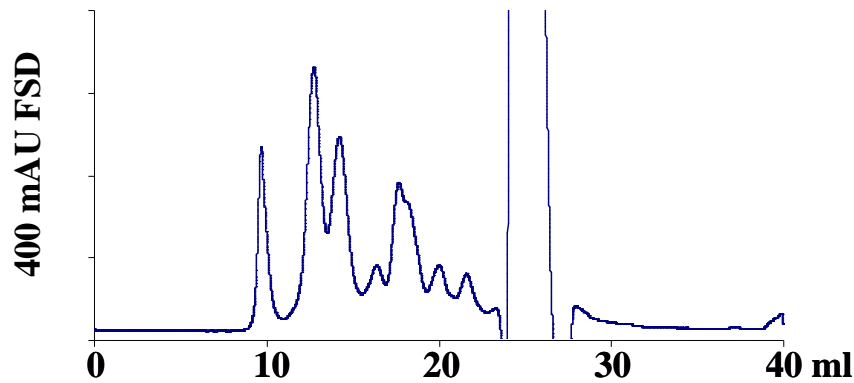
ApoFNR wurde zuerst wie bisher mit Jodacetat markiert. Anschließend wurde das Protein mit Trypsin gespalten und die einzelnen Peptide über präparative HPLC mit einer Gelfiltrationssäule getrennt. Mittels Massenspektrometrie wurden aus den einzelnen eluierten Fraktionen diejenigen herausgesucht, die das Peptid mit den vier N-terminalen Aminosäuren enthielten. Dieses Peptid wurde nun mit der Protease AspN erneut gespalten. Die Peptide wurden über Reversed-phase HPLC getrennt. Mit Massenspektrometrie wurden die einzelnen Fraktionen den entsprechenden Peptiden zugeordnet. Die Verhältnisse der Peptide wurden nun über die Peakflächen berechnet.



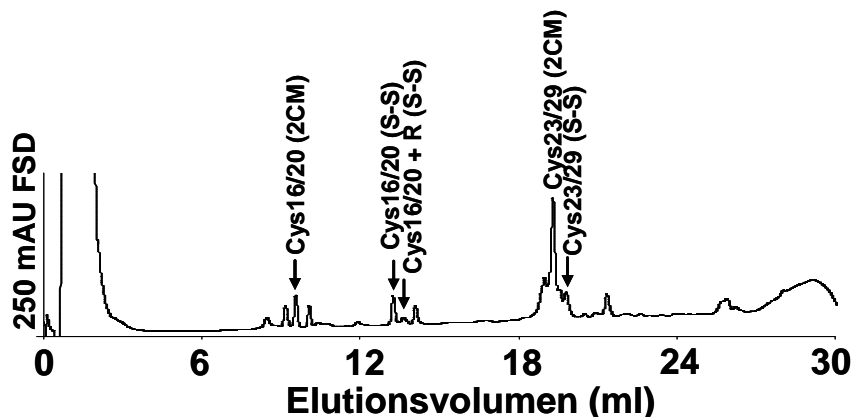
### Quantifizierung (UV 215 nm) alkylierter und nicht alkylierter Peptide

**Abb. 14 Schema der Quantifizierung der in apoFNR vorhandenen Disulfide und Thiole.** ApoFNR wurde mit Jodacetat alkyliert und durch die Protease Trypsin gespalten. Die entstandenen Peptide wurden durch HPLC über eine Gelfiltrationssäule getrennt und fraktioniert. Die Fraktionen, die das Peptid 11/48 mit den vier N-terminalen Cysteinresten enthielten, wurden durch MALDI-TOF Massenspektrometrie identifiziert und vereinigt. Diese Fraktion wurde nun mit der Protease AspN gespalten. Die entstandenen Peptide wurden durch HPLC über eine C<sub>8</sub>-Säule getrennt und erneut fraktioniert. Durch Massenspektrometrie wurden die einzelnen Peptide den Fraktionen zugeordnet.

In den Abbildungen 15 und 16 sind die Chromatogramme von Trypsin und von Trypsin + AspN verdauten Proben nach HPLC-Chromatographie gezeigt. Die Cysteine enthaltenden Fraktionen sind in Abbildung 16 markiert.



**Abb. 15: HPLC-Diagramm von tryptisch verdautem aerob präpariertem und alkyliertem apoFNR.** Aerob präpariertes apoFNR wurde alkyliert, und der Puffer wurde durch Gelfiltration über eine Nap10-Säule gegen 10% (v/v) Acetonitril, 50 mM Ammoniumacetat, pH 8,6 ausgetauscht. Diese Probe wurde in den tryptischen Verdau eingesetzt. Zur Trennung der Peptide wurde eine Gelfiltrationssäule (Superdex Peptide column) verwendet. Es wurden Fraktionen von 0,265 ml gesammelt. Mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie wurden die Fraktionen den Peptiden zugeordnet.



**Abb. 16: HPLC-Diagramm von Peptiden von aerob präpariertem apoFNR, das alkyliert und mit Trypsin und AspN verdaut wurde.** Die Fraktionen des tryptischen Verdau, die das Peptid 11/48 mit den Cysteinresten 16, 20, 23 und 29 enthielten wurden vereinigt und mit AspN verdaut. Die entstandenen Peptide wurden über Reversed Phase Chromatographie (AquaPore RP300) getrennt und von Hand fraktioniert. Über MALDI-TOF Massenspektrometrie wurden die Peptide identifiziert.

Sowohl für aerob präpariertes apoFNR, als auch für anaerob präpariertes apoFNR wurden jeweils drei Experimente durchgeführt. Die HPLC-Chromatogramme der einzelnen Experimente waren dabei vergleichbar. Die

Werte, die aus den Peakflächen des Chromatogramms des zweiten HPLC-Laufs gewonnen wurden, sind in Tabelle 10 aufgeführt. Die Flächen, die für ein alkyliertes bzw. nicht alkyliertes Peptid gefunden wurden, wurden dabei als 100% gesetzt. Der Anteil an Disulfid zwischen den Cysteinresten 16/20 ist unter aeroben und anaeroben Bedingungen mit 65% identisch. Allerdings gibt es einen Unterschied bei der zweiten Disulfidbrücke. Unter aeroben Bedingungen wurden hier mit 36% mehr Disulfidbrücken ausgebildet, als unter anaeroben Bedingungen mit 22%. Dies könnte bedeuten, dass die Disulfidbrücke zwischen den Cysteinresten 16/20 bevorzugt zu der Disulfidbrücke zwischen 23/29 gebildet wird.

**Tab. 10: Quantitative Bestimmung der Thiol- bzw. Disulfidgehalte in apoFNR durch HPLC.** ApoFNR wurde nach Denaturierung mit GnHCl und Markierung mit Jodacetat mit Trypsin verdaut. Das Peptid mit Cys16-Cys29 wurde über Gelfiltration abgetrennt und mit AspN verdaut. Diese Peptide wurden über HPLC mit einer  $C_8$  – Säule getrennt und über MALDI-TOF identifiziert. Die Gehalte wurden durch die Absorption der entsprechenden Peaks und die Peakflächen im Chromatogramm bestimmt. Die Werte sind Mittelwerte aus drei Experimenten. Die maximale Standardabweichung betrug 10%.

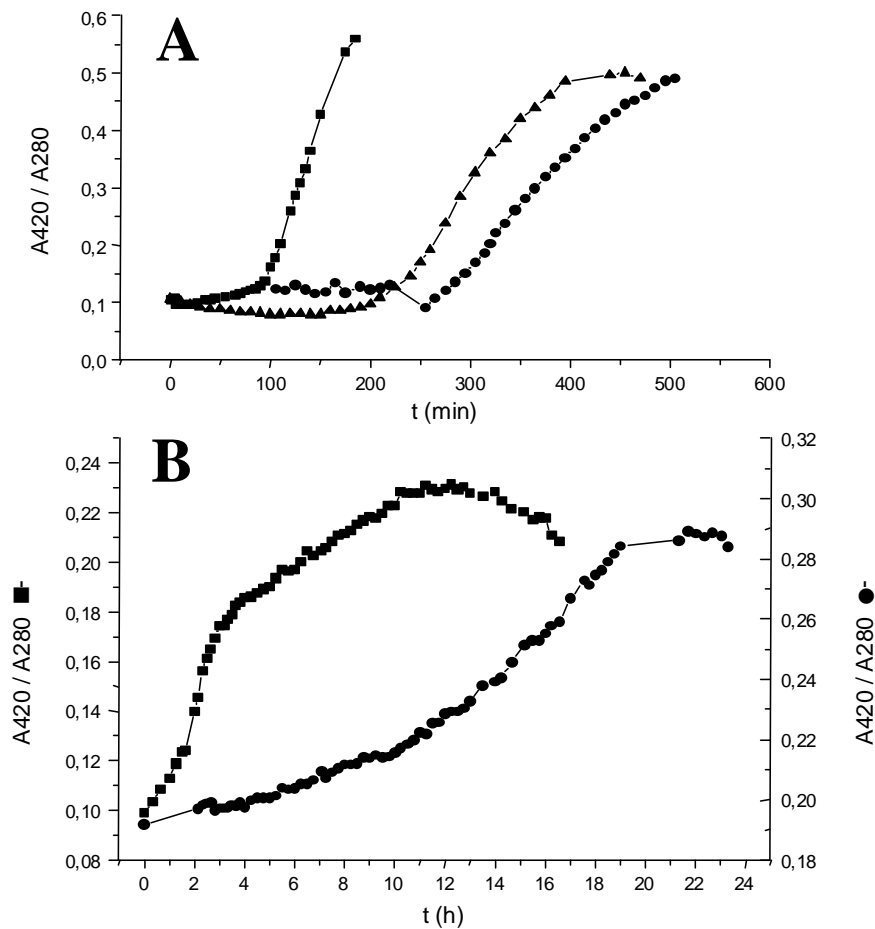
Peptide	Aerobes apoFNR		Anaerobes apoFNR	
	Disulfid (%)	Thiolrest (%)	Disulfid (%)	Thiolrest (%)
Pep11/21 (Cys16, Cys20)	65	35	65	35
Pep22/39 (Cys23, Cys29)	36	64	22	78
Pep102/129 (Cys122)	0	100	0	100

#### 4.1.5 Stimulierung der Rekonstitution von [4Fe4S]•FNR durch Glutaredoxine

ApoFNR und sauerstoffinaktiviertes [4Fe4S]•FNR enthalten signifikante Konzentrationen an Disulfidbrücken. Deshalb sollte untersucht werden, ob Proteindisulfidreduktasen wie die Glutaredoxine die Rekonstitution von apoFNR stimulieren. Glutaredoxine sind in der Lage, Disulfidbrücken in Proteinen zu reduzieren (Lundstrom-Ljung *et al.*, 1999). Es wurde daher vermutet, dass sie einen Effekt auf die Rekonstitution von apoFNR haben könnten.

Aerob und anaerob präpariertes apoFNR wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen an Glutaredoxin 2 (Grx 2) inkubiert (Abb. 17). Glutaredoxin 2 wird in Konzentrationen bis 5  $\mu\text{M}$  in *E. coli* gefunden (Vlami-Gardikas *et al.*, 1997; Potamitou *et al.*, 2002). Glutaredoxin 2 verkürzte die Lagphase der Rekonstitution von aerob präpariertem apoFNR deutlich. Die Lagphase wurde von 300 min ohne Zusatz von Grx 2, auf weniger als 100 min bei Zusatz von 5  $\mu\text{M}$  Grx 2 erniedrigt. Gleichzeitig erhöhte sich die Geschwindigkeit der Rekonstitution um den Faktor drei. Die gebildete Menge an [4Fe4S]•FNR änderte sich allerdings nicht (Abb. 17A, Tabelle 11). Auch auf die Rekonstitution von anaerob präpariertem apoFNR zeigte Grx 2 einen Einfluss. Anaerob präpariertes apoFNR enthält ebenfalls einen Anteil an Disulfidbrücken, allerdings ist er geringer als in aerob präpariertem apoFNR. Hier begann die Rekonstitution von apoFNR nach Zusatz von Grx 2 direkt ohne Lagphase (Abb. 17B, Tabelle 11).

Auch der Einfluss der alternativen Glutaredoxine (Grx 1 und Grx 3) auf die Rekonstitution von aerob präpariertem apoFNR wurde getestet. Dazu wurden zelluläre Konzentrationen in die Rekonstitution eingesetzt. Alle Glutaredoxine erhöhten die Geschwindigkeit der Rekonstitution bis maximal Faktor drei. Glutaredoxin 1 allein erniedrigte die Lagphase nur geringfügig, wurden aber alle drei Glutaredoxine verwendet, so verschwand die Lagphase nahezu vollständig. Die einzelnen Glutaredoxine haben also einen additiven Effekt (Tabelle 11).



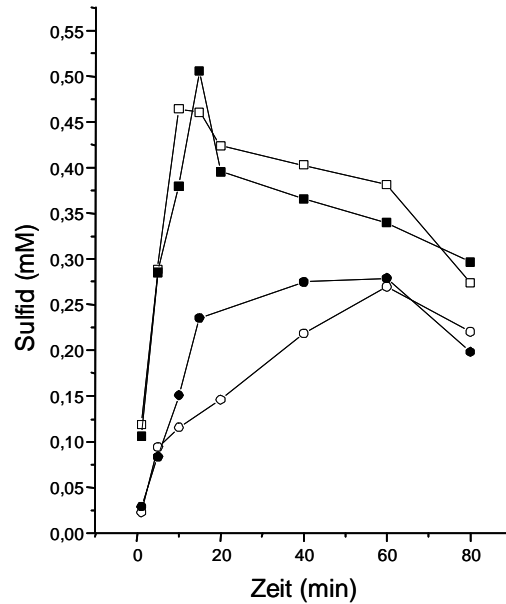
**Abb. 17: Einfluss von Grx2 auf die Rekonstitution von aerob (A) und anaerob (B) präpariertem apoFNR.** Aerob bzw. anaerob präpariertes apoFNR (20  $\mu$ M) wurde mit NifS<sub>AV</sub>, Fe(II), Cystein, 1 mM Glutathion, NADPH, Glutathionreduktase und verschiedenen Konzentrationen an Grx 2 (-●-, 0  $\mu$ M; -▲-, 1  $\mu$ M; -■-, 5  $\mu$ M) unter anaeroben Bedingungen inkubiert. Der Einbau des [4Fe4S]-Zentrums in FNR wurde photometrisch bei 420 nm verfolgt und durch Quotientbildung mit den Werten bei 280 nm auf die Proteinkonzentration normiert.

Eine Monothiolmutante von Grx 2 (Grx2C12S) zeigte ebenfalls einen starken Effekt auf die Lagphase der Rekonstitution. Monothiolmutanten der Glutaredoxine besitzen im Gegensatz zu Wildtyp-Glutaredoxin, das ein Disulfid im aktiven Zentrum trägt, nur eine Monothiolgruppe. Die Geschwindigkeit der Rekonstitution wurde dagegen schwächer stimuliert, als durch den Wildtyp. Das bedeutet, dass nicht nur Dithiolglutaredoxine, sondern auch Monothiolglutaredoxine *in vitro* einen Effekt auf die Rekonstitution von apoFNR haben können.

**Tab. 11: Effekte von Grx 1, 2 und 3 auf die Rekonstitution von apoFNR *in vitro*.** Die Rekonstitution von apoFNR (20  $\mu$ M) wurde mit 1 mM Glutathion als Reduktionsmittel und verschiedenen Glutaredoxinen durchgeführt. Die Rekonstitutionsgeschwindigkeiten und Lagphasen wurden aus den Kinetiken berechnet (Abb. 17). N.b.: nicht bestimmt, GSH: reduziertertes Glutathion

Messbedingungen	Rekonstitutions- geschwindigkeit (nmol FNR/min)	Lagphase (min)
<u><i>Aerobes apoFNR</i></u>		
GSH (1 mM)	0,03	300
GSH (1 mM) + Grx1 (0,2 $\mu$ M)	0,07	$\leq$ 300
GSH (1 mM) + Grx2 (5 $\mu$ M)	0,09	< 100
GSH (1 mM) + Grx3 (2,5 $\mu$ M)	0,06	n.b.
GSH + Grx1 (0,2 $\mu$ M) + Grx2 (5 $\mu$ M) + Grx3 (2,5 $\mu$ M)	0,08	< 20
GSH (1 mM) + Grx 2C12S (5 $\mu$ M)	0,05	100
<u><i>Anaerobes apoFNR</i></u>		
GSH (1 mM)	0,02	n.b.
GSH (1 mM) + Grx2 (5 $\mu$ M)	0,04	< 20

Um zu überprüfen, ob die Stimulierung der Rekonstitution durch die Reduktion der Disulfidbrücken in apoFNR verursacht wird, oder ob eine Stimulierung der Sulfidbildung durch NifS<sub>AV</sub> für die Stimulierung verantwortlich ist, wurde die Sulfidbildung durch die Cysteindesulfurase NifS<sub>AV</sub> in Anwesenheit und Abwesenheit von Glutaredoxin 1 durch einen Methylenblau-Test bestimmt (Abb. 18). Weder mit Dithiothreitol noch mit Glutathion als Reduktionsmittel erhöhte Glutaredoxin 1 die Bildung von Sulfid. Die Stimulierung der Rekonstitution durch Glutaredoxine beruht demnach wahrscheinlich auf einer Reduktion der Disulfidbrücken in apoFNR.



**Abb. 18: Bildung von Sulfid in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von Grx 1 durch die Cysteindesulfurase NifS<sub>AV</sub> unter anaeroben Bedingungen.** NifS<sub>AV</sub> wurde unter anaeroben Bedingungen mit Cystein und Glutathion (-●-) oder Dithiothreitol (-■-) mit (schwarze Symbole) und ohne (weiße Symbole) 0,3 μM Grx 1 plus NADPH und Glutathionreduktase inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben genommen, und die Sulfidkonzentration wurde mit dem Methylenblau-Test bestimmt.

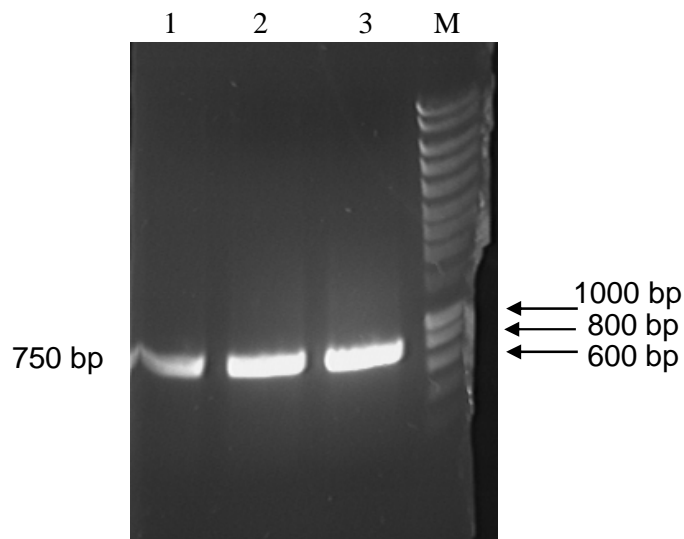
## 4.2 Untersuchungen der Funktion von FNR *in vivo*

### 4.2.1 Klonierung und Reinigung von FNR•His

Die bisherigen Versuche hatten gezeigt, dass [4Fe4S]•FNR durch Luft schnell bis zum apoFNR umgesetzt wird. Ein weiteres Ziel ist der Nachweis, dass diese Reaktion auch *in vivo*, d.h. in der Zelle, stattfindet. Da eine Differenzierung von [4Fe4S] oder [2Fe2S]•FNR von apoFNR in der Zelle sehr schwierig ist, sollte untersucht werden, ob diese Formen auch *in vivo* durch Alkylierung unterschieden werden können. FNR sollte dazu in den Zellen alkyliert werden und nach Reinigung unter denaturierenden Bedingungen sollte der Redoxzustand der Cysteinreste analysiert werden. Dazu musste FNR mit einem neuen Affinitätsanhang fusioniert werden, da GST-FNR nicht unter denaturierenden Bedingungen über Affinitätschromatographie gereinigt werden kann. Ein His-tag erfüllt dagegen diese Kriterien. Daher sollte FNR für diese Experimente als Protein mit einem His<sub>6</sub>-Anhang überproduziert werden. Da der His<sub>6</sub>-Anhang Metallionen bindet, sollte der His<sub>6</sub>-Anhang C-terminal an FNR

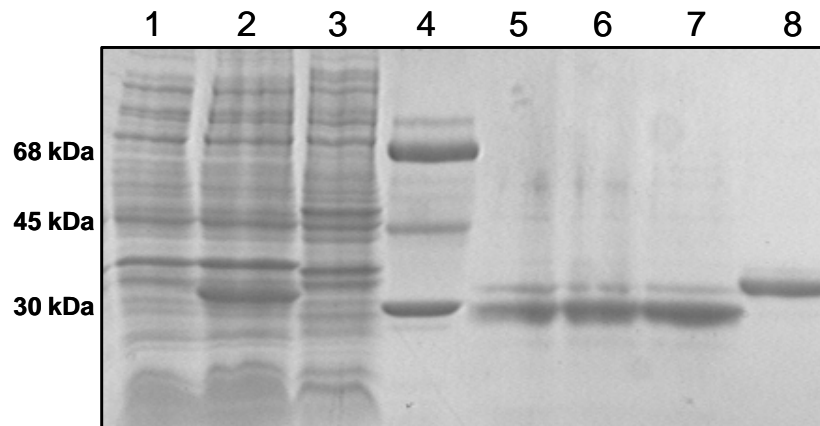
fusioniert werden, damit ein ausreichender Abstand zwischen dem Anhang und dem FeS-Zentrum am N-Terminus eingehalten wird.

Das *fnr* Gen konnte erfolgreich amplifiziert (Abb. 19) und in die Vektoren pET28a und pQE60 kloniert werden. Durch Ligation von *fnr* mit dem Vektor pET28a entstand das Plasmid pMW365. In diesem Vektor steht das Gen *fnr* unter der Kontrolle eines mit IPTG (Isopropylthiogalaktosid) induzierbaren T7-Promotors. Wurde das Plasmid in den Vektor pQE60 kloniert, so entstand das Plasmid pMW375. Der Vektor pQE60 enthält einen mit IPTG induzierbaren T5-Promotor.



**Abb. 19: Amplifizierung des *fnr*-Gens durch PCR.** Die DNA wurde mit den Primern *fnr*2-NcoI und *fnr*-BglII vom Plasmid pMW365 mit der Pfu-Polymerase (Stratagene) unter Verwendung verschiedener Hybridisierungstemperaturen (1 = 60°C, 2 = 58,5°C, 3 = 54,9°C) amplifiziert. Als Marker wurde Smart Ladder (Eurogentec) aufgetragen.

Mit beiden Plasmiden konnte FNR erfolgreich überproduziert und unter denaturierenden Bedingungen gereinigt werden (Abb.20). Allerdings hatte das aus JM109pMW375 präparierte FNR•His auf dem SDS-Gel eine geringere Masse als das aus BL21(DE3)pMW365 präparierte Protein. Aus BL21(DE3)pMW365 wurde FNR•His unter denaturierenden Bedingungen mit einer Ausbeute von 2% des Gesamtproteins gereinigt. Wurde zur Überexpression und Reinigung der Stamm JM109 mit dem Plasmid pMW375 verwendet, so erhielt man unter denaturierenden Bedingungen FNR•His mit einer Ausbeute von 1% und unter nativen (oder aktiven) Bedingungen eine Ausbeute von 0,2% FNR.



**Abb. 20: Überexpression und Reinigung von FNR•His.** Die Proteine wurden durch SDS-PAGE getrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt.

Spur:

1. Zellhomogenat von BL21(DE3) (pMW365) vor Induktion,
2. wie 1., nach 2 h Induktion
3. Zellhomogenat von JM109 (pMW375) nach 2,5 h Induktion
4. Proteinstandard  
BSA ( $M_r$  68 kDa), Ovalbumin ( $M_r$  45 kDa), Carboanhydrase ( $M_r$  30 kDa)
5. Fraktion 1 der Ni-NTA-Agarosesäule, 10  $\mu$ g Protein aus JM109pMW375
6. Fraktion 2 der Ni-NTA-Agarosesäule, 10  $\mu$ g Protein aus JM109pMW375
7. Fraktion 3 der Ni-NTA-Agarosesäule, 10  $\mu$ g Protein aus JM109pMW375
8. Fraktion 1 der Ni-NTA-Agarosesäule, 7  $\mu$ g Protein aus BL21(DE3)pMW365

#### 4.2.2 Aktivitätstest von FNR•His

Da der Redoxzustand der Cysteinreste von FNR durch Alkylierung *in vivo* untersucht werden sollte, musste überprüft werden, ob die neuen FNR-His-Fusionen *in vivo* aktiv sind. Dazu wurden die Plasmide in *E. coli* IMW212 transformiert. IMW212 ist *fnr* negativ und enthält eine *nirB-lacZ* Reporterfusion. Beide Plasmide wurden unter aeroben und anaeroben Bedingungen mit und ohne Zusatz von IPTG untersucht. Als Negativkontrolle diente IMW212 ohne Plasmid und als Positivkontrolle wurde JCB331 verwendet. Das Plasmid pMW375, das für FNR•His kodiert, war in der Lage, das fehlende *fnr* Gen in Stamm IMW212 unter anaeroben Bedingungen zu komplementieren, wodurch unter anaeroben Bedingungen eine starke Expression von *nirB-lacZ* erreicht wurde, nicht aber unter aeroben Bedingungen. Das bedeutet, dass FNR•His aus pMW375 sauerstoffsensitiv ist. Komplementation mit pMW365 in IMW212 war weder unter aeroben noch unter anaeroben Bedingungen möglich. Auch Zusatz von IPTG änderte nichts. Entweder ist das von pMW365 gebildete FNR•His Protein inaktiv, oder der

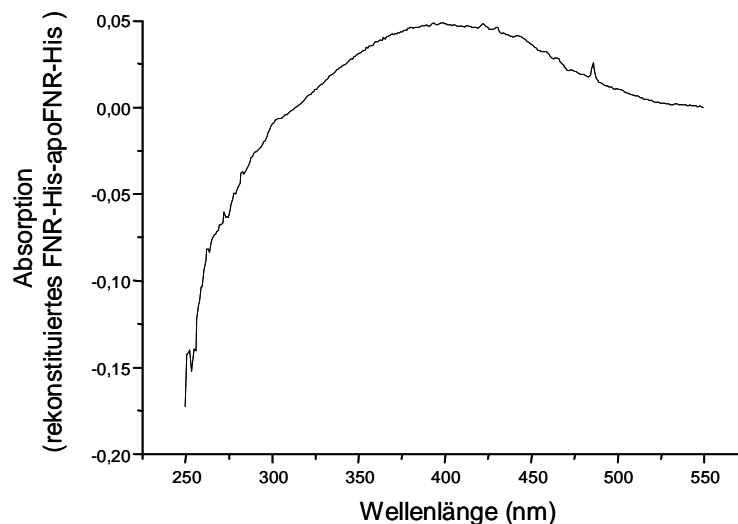
Stamm IMW212 ist nicht in der Lage von dem Plasmid zu exprimieren, da sich in seinem Genom keine T7-Polymerase befindet (Tabelle 12).

**Tab. 12: Die Aktivität von FNR•His wurde anhand der Expression einer *nirB-lacZ* Fusion bestimmt.** IMW212 (*nirB-lacZ* und *fnr::tet*) wurde mit den Plasmiden pMW365 (pET28a mit *fnr*) und pMW375 (pQE60 mit *fnr*) transformiert. JCB331 ist der entsprechende Wildtyp. Die Zucht erfolgte unter aeroben (O<sub>2</sub>) bzw. anaeroben (N<sub>2</sub>) Bedingungen in LB-Medium mit Glucose bzw. anaerob zusätzlich mit Nitrat, jeweils mit und ohne IPTG. N.b.: nicht bestimmt

Stämme	β-Galaktosidaseaktivität (MU)			
	O <sub>2</sub>	O <sub>2</sub> + IPTG	N <sub>2</sub>	N <sub>2</sub> + IPTG
IMW212	9	7	4	4
IMW212(pMW365)	5	7	6	5
IMW212(pMW375)	21	20	744	682
JCB331	16	n.b.	577	n.b.

Zusätzlich sollte untersucht werden, ob das aus JM109pMW375 präparierte FNR•His-Protein rekonstituiert werden kann. Dazu wurde FNR•His unter nativen Bedingungen präpariert und unter anaeroben Bedingungen mit NifS<sub>AV</sub>, Eisen (II) und Cystein inkubiert. Die Kinetik des [4Fe4S]-Einbaus in apoFNR wurde aufgenommen und das Differenzspektrum von rekonstituiertem FNR•His-apoFNR•His berechnet (Abb. 21). Da in dem Spektrum die Schulter bei 420 nm fehlt, die typisch für den Einbau des Eisen-Schwefel-Zentrums in FNR ist, gibt es keinen Hinweis auf den Einbau eines FeS-Zentrums. Das isolierte Protein konnte also nicht rekonstituiert werden, obwohl FNR•His *in vivo* aktiv war. Möglicherweise ist nur ein sehr geringer Teil von FNR•His aus pMW375 aktiv, der zwar ausreichte, um die *nirB-lacZ* Reporterfusion zu regulieren, in den Rekonstitutionsexperimenten allerdings nicht gesehen werden konnte.

Da möglicherweise ein großer Teil des überexprimierten FNR•His inaktiv ist, konnten diese Plasmide bzw. FNR•His nicht für die Untersuchungen der Cysteinreste von FNR *in vivo* verwendet werden. Es wäre nicht möglich zwischen modifizierten Thiolresten mit einer *in vivo* Funktion und artifiziell modifizierten Thiolresten zu unterscheiden.

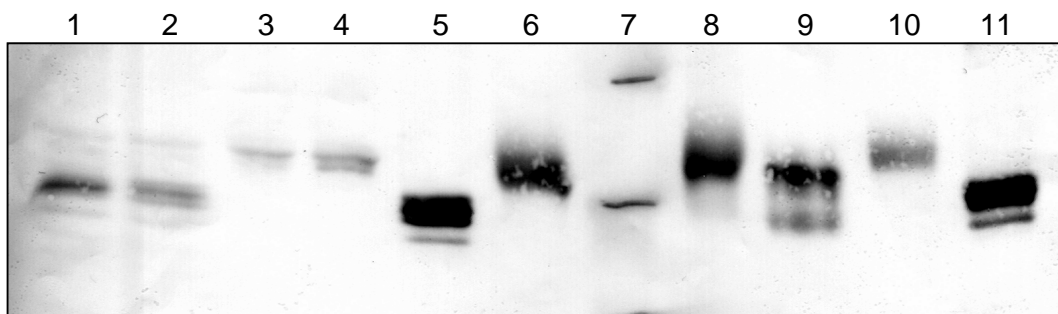


**Abb. 21: Differenzspektrum von rekonstituiertem FNR•His-apoFNR•His.**

#### **4.2.3 Markierung der zugänglichen Thiolreste von FNR durch 4-Acetamido-4'-Maleimidylstilbene-2,2'-Disulfonsäure (AMS) *in vivo***

Um die Zugänglichkeit der Cysteinreste in FNR *in vivo* zu untersuchen, wurde der Stamm CAG627pMW32 verwendet. In diesem Stamm ist es möglich, FNR mit einem vollständigen N-Terminus, aber ohne Affinitätstag überzuproduzieren (Trageser *et al.*, 1990). FNR aus pMW32 hat sich in früheren Versuchen bereits als aktiv erwiesen (Holighaus 1998). Die Thiolreste von FNR, die in der Bakterienzelle zugänglich waren, wurden mit AMS (4-Acetamido-4'-Maleimidylstilbene-2,2'-Disulfonsäure) unter denaturierenden Bedingungen blockiert. Dazu wurden die Zellen zunächst permeabilisiert, denaturiert und mit AMS inkubiert. Im Anschluss wurde das Gesamtzellprotein durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und FNR durch einen Western Blot

nachgewiesen (Abb. 22). Inkubation der Zellen mit AMS verursachte sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen einen Shift der FNR-Bande auf dem Western Blot. Der größte Teil der Cysteinreste in FNR muss also sowohl unter aeroben, als auch unter anaeroben Bedingungen für AMS zugänglich sein. Allerdings gab es in aeroben Zellen eine zusätzliche Bande von FNR, die einen etwas geringeren Shift zeigte und in anaeroben Zellen fehlte. In diesem Anteil von FNR waren vermutlich weniger Cysteinreste für die Markierung zugänglich. Allerdings waren einige Cysteinreste noch zugänglich und markierbar, da die Bande eine geringere Mobilität aufwies als das unmarkierte Protein. Leider konnte sie in ihrer Mobilität keiner *in vitro* Form von FNR eindeutig zugeordnet werden. Dies lag möglicherweise daran, dass *in vitro* keine scharfen Banden von FNR erhalten wurden, was eine Analyse erschwerte.



**Abb. 22: Untersuchung der verschiedenen Formen von FNR durch SDS-Page und anschließenden Western Blot mit FNR-spezifischen Antikörpern.** Alle Proben wurden durch Zusatz von Guanidiniumhydrochlorid denaturiert, mit 5 % (w/v) Trichloressigsäure gefällt und in SDS-Auftragspuffer ohne Reduktionsmittel resuspendiert.

1. Zellhomogenat von *E. coli* CAG627pMW32 unter anaeroben Bedingungen
2. Zellhomogenat von *E. coli* CAG627pMW32 unter aeroben Bedingungen
3. Zellhomogenat von *E. coli* CAG627pMW32 unter anaeroben Bedingungen nach Markierung mit AMS
4. Zellhomogenat von *E. coli* CAG627pMW32 unter aeroben Bedingungen nach Markierung mit AMS
5. 4 µg apoFNR<sub>ox</sub>
6. 4 µg apoFNR<sub>ox</sub> mit AMS markiert
7. Prestained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas)
8. 6 µg rekonstituiertes, mit AMS markiertes FNR
9. 6 µg rekonstituiertes und sauerstoff inaktiviertes FNR, das anschließend mit AMS markiert wurde
10. 4 µg apoFNR<sub>ox</sub> wurde mit DTT reduziert und mit AMS markiert
11. 4 µg mit DTT reduziertes apoFNR<sub>ox</sub>

### 4.3 Untersuchungen der Funktion von NreB aus *Staphylococcus carnosus*

*Staphylococcus carnosus* ist ein fakultativ anaerobes Bakterium, das als Starterkultur in der Produktion von roh fermentierten Würsten eingesetzt wird. In der AG Götze wurde mit dem NreB/C-System ein zwei-Komponenten-System gefunden, das die Expression der Nitrat- und Nitritreduktase in *Staphylococcus carnosus* in Anwesenheit von Sauerstoff reprimiert (Fedtke *et al.*, 2002). Eine *nreABC* Deletionsmutante wies Defekte in der Nitrat- und Nitritreduktion sowie im Wachstum auf.

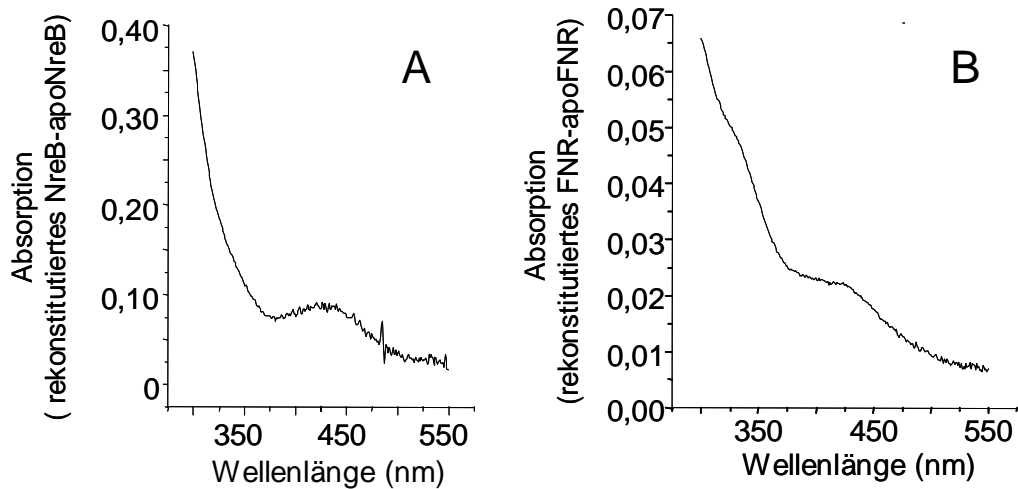
Der Transkriptionsregulator NreC kann *in vitro* von der Sensorkinase NreB phosphoryliert werden und an die Promotoren von *narGHJI*, *nir* und *narT* binden (Fedtke *et al.*, 2002).

Die Sensorkinase NreB enthält in ihrer Sensordomäne vier Cysteinreste. Aus *in vivo*-Versuchen lagen gute Hinweise vor, dass NreB ein FeS-Zentrum zur Erkennung von Sauerstoff als Reiz verwendet (Fedtke *et al.*, 2002). So wurde nachgewiesen, dass die Cysteinreste von NreB für seine Funktion *in vivo* wichtig sind. Die Nitrat- und Nitritreduktaseaktivität der *nreABC* Deletionsmutante m1 kann durch die *nreABC* Gene regeneriert werden. Wenn in dem *nreB*-Gen der Cysteinrest 62 gegen ein Serin ausgetauscht wurde, fand keine Komplementation statt. Außerdem ist die Expression des *nir* Promotors abhängig von der Anwesenheit von Eisen. Diese Befunde legen die Vermutung nahe, dass NreB wie FNR ein FeS-Zentrum zur Sauerstofferkennung nutzt (Fedtke *et al.*, 2002).

Um nachzuweisen, dass NreB ein FeS-Protein ist und ein FeS-Zentrum vom FNR-Typ zur Funktion benötigt, sollte NreB mit der gleichen Methode wie FNR rekonstituiert werden und der Einfluss eines Eisen-Schwefel-Zentrums auf die Autophosphorylierung von NreB untersucht werden. Das NreB-Protein wurde von A. Kamps (Tübingen) bereitgestellt und die Versuche wurden mit A. Kamps gemeinsam durchgeführt. Das verwendete NreB-Protein enthielt einen C-terminalen His<sub>6</sub>-Anhang, um eine leichte Reinigung des Proteins über eine Ni-Säule zu ermöglichen.

Nach Rekonstitution von NreB unter anaeroben Bedingungen war im UV-VIS Spektrum bei 420 nm deutlich eine Schulter zu erkennen, die auf ein Eisen-

Schwefel-Zentrum vom FNR-Typ hindeutet (Abb. 23). Vor Rekonstitution war diese Schulter in NreB nicht zu erkennen.

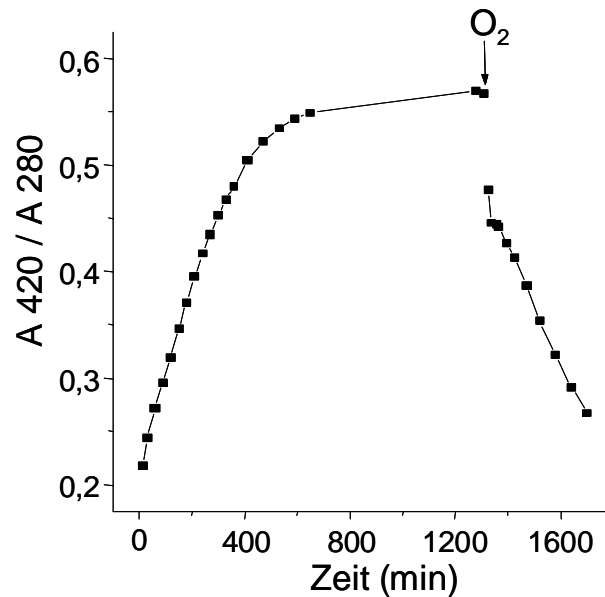


**Abb. 23: Absorptionsspektren von NreB (A) und FNR (B).** Die Rekonstitutionen wurden unter anaeroben Bedingungen mit NifS<sub>AV</sub>, Eisen (II), Cystein und 2,5 mM Dithiothreitol durchgeführt. Die Abbildung zeigt ein Differenzspektrum von NreB bzw. FNR nach Rekonstitution minus apoNreB bzw. apoFNR.

Außerdem wurde in isoliertem und in rekonstituiertem NreB der Gehalt an säure-labilem Eisen und Sulfid bestimmt. Da die Rekonstitution in Gegenwart von Eisen und Sulfid durchgeführt wird, musste alles nicht an NreB gebundene Eisen und Sulfid vor der Messung durch Gelfiltration entfernt werden. Vor Rekonstitution wurden 1 mol Eisen und 0,4 mol Sulfid pro mol NreB bestimmt. Nach Rekonstitution wurden dagegen 4 bis 8 mol Eisen und Sulfid pro mol Protein gemessen. Dies lässt auf ein bis zwei [4Fe4S]-Zentren in rekonstituiertem NreB schließen.

Die Synthese des vermutlichen Eisen-Schwefel-Zentrums war abhängig von anaeroben Bedingungen. Unter aeroben Bedingungen war die Rekonstitution nicht möglich. Wurde rekonstituiertes NreB mit Sauerstoff inkubiert, so fiel der Quotient der Absorption bei 420 nm/280 nm schnell ab (Abb. 24). Unter anaeroben Bedingungen war rekonstituiertes NreB dagegen für mehr als 12 h stabil.

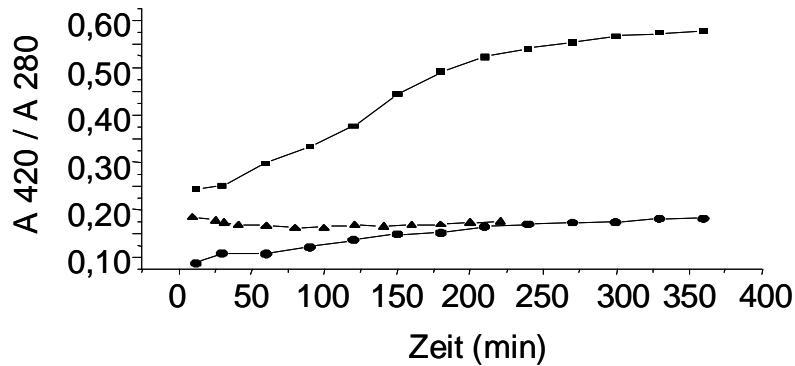
In EPR-Spektren war kein paramagnetisches Eisen in rekonstituiertem NreB zu erkennen. Dies legt die Vermutung nahe, dass das Eisen-Schwefel-Zentrum wie das von FNR EPR still ist (Khoroshilova *et al.*, 1997; Popescu *et al.*, 1998).



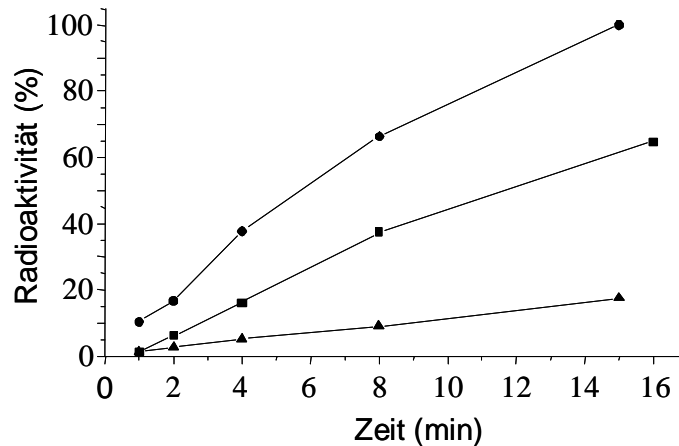
**Abb. 24: Kinetik der Rekonstitution von NreB und anschließende Inaktivierung durch Sauerstoff.** 20  $\mu\text{M}$  NreB wurde mit 80  $\mu\text{g/ml}$  NifS<sub>AV</sub>, Eisen (II), Cystein und 1 mM Dithiothreitol inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Spektren aufgenommen und aus ihnen der Quotient A 420/ A 280 berechnet.

Der Einbau des Cofaktors in NreB war abhängig von der Anwesenheit und Zugänglichkeit der vier N-terminalen Cysteinreste in NreB. Das NreB(C62S) Protein, in dem der Cysteinrest 62 gegen Serin ausgetauscht wurde, zeigte bei Rekonstitution keine Erhöhung der Absorption bei 420 nm. Dies bedeutet, dass kein Cofaktor in das Protein eingebaut wurde. Ebenso wenig konnte NreB nach Inkubation mit N-Ethylmaleimid rekonstituiert werden. N-Ethylmaleimid reagiert mit den Cysteinresten in NreB und blockiert diese so für den Einbau des Cofaktors (Abb.25).

Die Anwesenheit des Eisen-Schwefel Cofaktors beeinflusste die Autophosphorylierung von NreB. Rekonstituiertes NreB konnte deutlich schneller und in größerem Ausmaß phosphoryliert werden als NreB ohne Eisen-Schwefel Cofaktor. Wurde NreB zusätzlich mit Dipyridyl inkubiert, um eventuell vorhandene Eisenionen zu komplexieren, so war die Autophosphorylierung fast um das Vierfache reprimiert im Vergleich zu unbehandeltem NreB. Vergleicht man die Autophosphorylierung von Dipyridyl-behandeltem NreB mit rekonstituiertem NreB, so verstärkt der Cofaktor die Autophosphorylierung fast um das Sechsfache (Abb. 26). Dies sind deutliche Anzeichen dafür, dass NreB ein O<sub>2</sub>-labiles FeS-Zentrum trägt, und dass dieses die Autophosphorylierung von NreB steuert.



**Abb. 25:** Kinetik der Rekonstitution von 20 µM NreB (-■-), 16 µM NreB(C62S) (-●-) und 20 µM NreB, das mit 1 mol N-Ethylmaleimid/mol NreB inaktiviert wurde (-▲-). Die Rekonstitution wurde unter denselben Bedingungen wie in Abb. 23 und 24 durchgeführt.

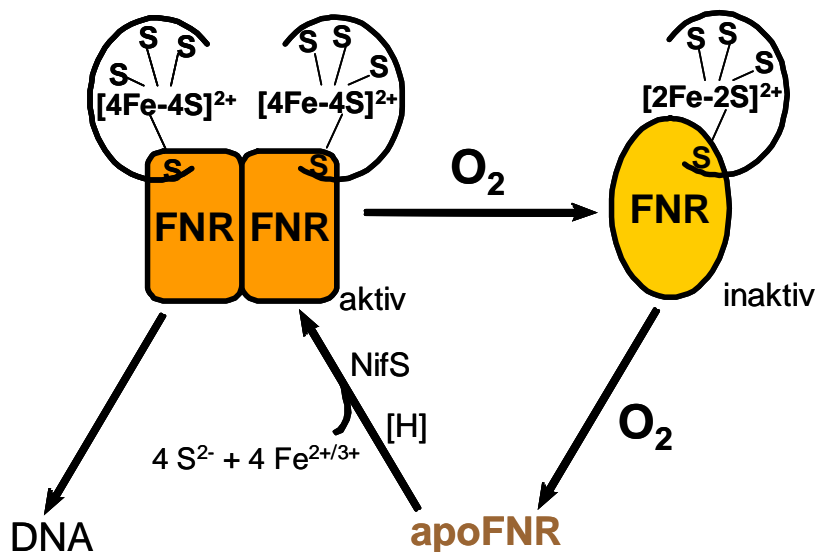


**Abb. 26:** Der Effekt von Sauerstoff und Eisen auf die Autophosphorylierung von NreB wurde in Anwesenheit von  $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$  untersucht. Es wurden drei verschiedene Kinetiken aufgenommen. Für eine wurde NreB 30 min mit Dipyrindyl inkubiert, bevor es in die Autophosphorylierung eingesetzt wurde (-▲-). Für die anderen beiden Kinetiken wurde die Autophosphorylierung von NreB (-■-) und rekonstituiertem NreB (-●-) gemessen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben genommen, mit SDS-Probenpuffer versetzt und durch SDS-Gelelektrophorese getrennt. Die Radioaktivität wurde durch einen Phosphoimager bestimmt. Für die quantitative Auswertung wurde die Software AIDA (Version 2.0) verwendet. Die Radioaktivität von rekonstituiertem NreB nach 15 min wurde als 100 % gesetzt.

## 5. Diskussion

### 5.1 ApoFNR stellt eine dritte wichtige Form von FNR dar

Bisher waren zwei Formen von FNR bekannt. Der aktive Zustand, in dem FNR als Dimer vorliegt, mit je einem  $[4\text{Fe}4\text{S}]$ -Zentrum pro Monomer und ein inaktiver Zustand, in dem FNR ein Monomer mit einem  $[2\text{Fe}2\text{S}]$ -Zentrum ist. In der vorliegenden Arbeit wurde das Auftreten einer dritten Form von FNR untersucht. Das klassische Schema von FNR kann also um die Form von apoFNR erweitert werden (Abb. 27).



**Abb. 27: Erweitertes Schema von FNR.** Aktives FNR ist ein Dimer, das je ein  $[4\text{Fe}4\text{S}]$ -Zentrum enthält. Bei Kontakt mit Sauerstoff zerfällt das Dimer über die Zwischenstufe eines Monomers mit einem  $[2\text{Fe}2\text{S}]$ -Zentrum zu apoFNR ohne Eisen-Schwefel-Zentrum. ApoFNR kann *in vitro* zu aktivem FNR rekonstituiert werden.

$[4\text{Fe}4\text{S}] \cdot \text{FNR}$  wird *in vitro* bei Inkubation mit Luft schnell zu apoFNR umgesetzt (Abb.8). Vor Inkubation mit Luft konnten nach Denaturierung vier Cysteinreste durch  $^{14}\text{C}$ -Jodacetat markiert werden. Nach zwei Minuten Inkubation waren es fünf markierbare Reste, nach fünf Minuten konnten nur noch zwei Cysteinreste markiert werden. Die Kinetik zeigt also eine Lagphase von zwei Minuten bevor die ersten Disulfidbrücken gemessen werden konnten. In dieser Zeit findet wahrscheinlich die Umsetzung des  $[4\text{Fe}4\text{S}]$ -Zentrums in ein  $[2\text{Fe}2\text{S}]$ -Zentrum

statt. Diese Umsetzung ändert nichts an dem Redoxzustand der Cysteinreste in FNR. Dass sich die gemessene Anzahl an Thiolen in FNR von vier auf fünf erhöhte, könnte an der Umsetzung des [4Fe4S]-Zentrums in ein [2Fe2S]-Zentrum und der damit einhergehenden Konformationsänderung in FNR liegen. [4Fe4S]•FNR ist ein Dimer, während [2Fe2S]•FNR als Monomer vorliegt. Möglicherweise sind die Thiolreste in dem Monomer trotz Denaturierung des Proteins für Acetat besser zugänglich als in dem Dimer. Die Rate der Umsetzung von [4Fe4S]•FNR zu apoFNR ist der Geschwindigkeit der Umsetzung des [4Fe4S]-Zentrums in ein [2Fe2S]-Zentrum ähnlich. Bisher war es nicht möglich, die Umsatzrate von [4Fe4S]•FNR zu apoFNR direkt zu messen, da es keinen geeigneten Marker gab. Durch das Auftreten der Disulfidbrücken in apoFNR war es zum ersten Mal möglich, diese Umsetzung direkt am Protein und in einer Kinetik zu verfolgen. Kontakt von [4Fe4S]•FNR mit Luft führt zu einer komplexen Reaktion, die sich *in vitro* und *in vivo* unterscheidet. Die Reaktionen von Eisen-Schwefel-Zentren enthaltendem FNR wurden unter anderem mit Mössbauer Spektroskopie untersucht. *In vitro* wird [4Fe4S]•FNR in ein paar Minuten zu [2Fe2S]•FNR umgesetzt (Popescu *et al.*, 1998, Sutton *et al.*, 2004, Crack *et al.*, 2004, Lazazzera *et al.*, 1996). *In vivo* war nach 15 min Luft kein Eisen-Schwefel-Zentrum durch Mössbauer Spektroskopie in *Escherichia coli* mehr nachweisbar (Sutton *et al.*, 2004). Die langsamere Reaktion *in vivo* ist wahrscheinlich auf experimentelle Bedingungen zurückzuführen (Sutton *et al.*, 2004). Aus Expressionsstudien wurde geschlossen, dass die Inaktivierung von FNR durch Luft nach 4 min 30 sec abgeschlossen ist (Sutton *et al.*, 2004), dies unterstützt die schnelleren *in vitro* Daten. Wurde in aerob gezüchteten Zellen FNR auf dieselbe Art und Weise präpariert wie nach anaerober Inkubation der Zellen, so konnte kein FNR mit Eisen-Schwefel-Zentrum erhalten werden (Sutton *et al.*, 2004). Wurde FNR durch Western Blot in aeroben und anaeroben Zellen quantifiziert, so wurden gleiche Mengen bzw. in aeroben Zellen sogar etwas mehr an FNR gefunden (Unden *et al.*, 1987, Sutton *et al.*, 2004). Diese ganzen Befunde legen nahe, das apoFNR ein wichtiges Produkt bei der Inaktivierung von FNR durch Luft ist. Die konstante Konzentration von FNR lässt vermuten, dass apoFNR nicht einfach ein Abbauprodukt ist, sondern eine Funktion besitzt. Wird FNR in *E. coli* überexprimiert und über Affinitätschromatographie gereinigt, so erhält man, sowohl unter aeroben als auch unter nicht strikt anaeroben Bedingungen, FeS-

freies apoFNR (Tran *et al.*, 2000; Crack *et al.*, 2004). Beide Formen von apoFNR können *in vitro* unter anaeroben Bedingungen mit Eisen, Cystein und NifS<sub>AV</sub>, einer Cysteindesulfurase, zu aktivem [4Fe4S]•FNR rekonstituiert werden (Tran *et al.*, 2000). Die Cysteindesulfurase NifS<sub>AV</sub> setzt dabei das Cystein zu Alanin und Schwefel um (Zheng *et al.*, 1993). Der Schwefel wird durch ein Reduktionsmittel zu S<sup>2-</sup> reduziert, das zusammen mit dem Fe(II) zum Aufbau des [4Fe4S]<sup>2+</sup>-Zentrums in FNR verwendet wird. Für die Rekonstitution von FeS-Zentren wird häufig die Cysteindesulfurase NifS<sub>AV</sub> aus *Azotobacter vinelandii* verwendet.

## 5.2 Unterschiedliche Formen von apoFNR

In apoFNR wurden Disulfidbrücken nur zwischen den Cysteinresten 16/20 und 23/29 ausgebildet. Der Cysteinrest 122 lag immer als Thiolrest vor. Es gab keine Hinweise, dass Cysteinreste durch Luft zu Sulfen- oder Sulfonsäure oxidiert worden waren. Es wurden keine Peptide mit einer entsprechenden Masse gefunden und apoFNR kann mit Reduktionsmitteln wie Dithiothreitol, die über Sulfhydrylgruppen reagieren, rekonstituiert werden. Allerdings variierte die gefundene Menge an Disulfidbrücken bei aerob bzw. anaerob präpariertem FNR. Für FNR mit einer Disulfidbrücke ist nicht klar, ob hier die Disulfidbrücke zwischen Cys16/20 oder Cys23/29 vorherrscht. Allerdings wurde die Disulfidbrücke zwischen den Cysteinresten 16/20 in deutlich höherer Anzahl gefunden, als die Disulfidbrücke zwischen den Cysteinresten 23/29. Dies legt die Vermutung nahe, dass das Disulfid zwischen den Cysteinresten 16/20 bevorzugt gebildet wird. Die deutlich höhere Anzahl an Disulfiden zwischen den Cysteinresten 16/20 passt auch zu früheren Untersuchungen, in denen sich der Cysteinrest 16 als reaktivste herausstellte (Green *et al.*, 1993).

Die Lage der Disulfidbrücken betont die Sonderrolle des Cysteinrestes 122, der sowohl für die Funktion von FNR als auch für die Assemblierung des Eisen-Schwefel-Zentrums essentiell ist (Ralph *et al.*, 2001). Entgegen früherer Vermutungen lag der Cysteinrest 122 nur in der Thiolform vor (Green *et al.*, 1993). Die Lage der Disulfidbrücken in FNR kann sterische Gründe haben, die Abstände zwischen den entsprechenden Cysteinen könnten günstig für die Ausbildung einer Brücke sein, sie können auf der mangelnden Zugänglichkeit

des Thiolrestes 122 beruhen oder durch funktionelle Unterschiede der einzelnen Cysteine begründet sein.

### 5.3 Bildung von freien Cysteinresten

Einen weiteren Hinweis darauf, dass FNR unter aeroben Bedingungen als apoFNR vorliegt, liefert Trageser *et al.*, 1989. In dieser Arbeit wurde FNR *in vivo* ohne Reduktion oder Denaturierung mit Jodessigsäure alkyliert. Es wurde gezeigt, dass die Cysteinreste in FNR unter aeroben Bedingungen für die Jodessigsäure leichter zugänglich waren als unter anaeroben Bedingungen. Wurde während des Wachstums von *Escherichia coli* Eisen durch Phenanthrolin komplexiert, so waren die Cysteinreste in FNR unter anaeroben Bedingungen leichter zugänglich als vorher. Unter aeroben Bedingungen änderte der Zusatz von Phenanthrolin nichts. Wurden der Zucht zweiwertige Ionen, wie z.B. Eisen(II) zugesetzt, so konnte dieser Effekt rückgängig gemacht werden.

Aus diesen Versuchen kann man schließen, dass die Cysteinreste von FNR unter anaeroben Bedingungen durch ein Eisen-Schwefel-Zentrum geschützt sind, nicht aber unter aeroben Bedingungen. FNR würde damit unter aeroben Bedingungen als apoFNR vorliegen.

### 5.4 Einfluss der Glutaredoxine auf die Rekonstitution von FNR

Von Glutaredoxinen ist bekannt, dass sie in der Lage sind, Disulfidbrücken in Proteinen zu reduzieren (Lundstrom-Ljung *et al.*, 1995). Nachdem das Vorhandensein von Disulfidbrücken in apoFNR bekannt war, sollte der Effekt von Glutaredoxinen auf die Rekonstitution von FNR *in vitro* untersucht werden. Erwartungsgemäß stimulierte der Zusatz von Glutaredoxinen die Rekonstitution von aerob präpariertem apoFNR im Vergleich zur Rekonstitution mit Glutathion. Die Stimulierung wirkte sich besonders in einer Verkürzung der Lagphase aus. In dieser Phase müssen die in apoFNR vorhandenen Disulfidbrücken reduziert werden, damit das Eisen-Schwefel-Zentrum assembliert werden kann. Da kein Effekt durch Glutaredoxine auf die Sulfidbildung durch NifS<sub>AV</sub> gemessen wurde, aber ein Gesamteffekt auf die Rekonstitution vorhanden war, ist es

wahrscheinlich, dass die Stimulation auf der Reduktion der Disulfidbrücken in FNR beruht. Erstaunlich war, dass kein Effekt von Thioredoxinen auf die Rekonstitution gemessen wurde. Von Thioredoxinen ist ebenfalls bekannt, dass sie in der Lage sind, Disulfidbrücken in Proteinen zu reduzieren.

Glutaredoxine könnten unter mikroaeroben Bedingungen einen Einfluss auf die Aktivierung von FNR *in vivo* ausüben. In Hefen ist ein Monothiolglutaredoxin  $\gamma$ Grx5 bekannt, das unter aeroben Bedingungen benötigt wird, um Eisen-Schwefel-Proteine zu bilden. Von  $\gamma$ Grx5 wird vermutet, dass es Disulfide in den Proteinen reduziert, um den Einbau des FeS-Zentrums zu ermöglichen (Rodriguez-Manzanares *et al.*, 2002). Für genauere Untersuchungen wären Mutanten des kompletten Glutaredoxinsystems notwendig, die allerdings unter aeroben Bedingungen im Wachstum stark beeinträchtigt sind, was die Untersuchungen erschwert.

### 5.5 Einfluss eines Histidin-Affinitätstags auf die Aktivität von FNR

Ein am C-Terminus von FNR liegender His-Anhang scheint Auswirkungen auf den Einbau des Eisen-Schwefel-Zentrums und damit auf die Aktivität von FNR zu haben (Tab. 13). Von His-Anhängen ist bekannt, dass sie Metallionen binden, es wäre also möglich, dass die Histidine mit dem Eisen-Schwefel-Zentrum um die Eisenionen konkurrieren. Es wurde zwar der größtmögliche Abstand zwischen dem His-tag am C-Terminus und dem Eisen-Schwefel-Zentrum am N-Terminus gewählt, allerdings ist es möglich, dass diese beiden Bereiche in der Tertiärstruktur zu nahe beieinander liegen. Der Strukturvorschlag für ein FNR-Monomer aus Abbildung 3 gibt einen Hinweis darauf. NreB konnte dagegen mit einem His-Anhang am C-Terminus rekonstituiert werden. Das postulierte Eisen-Schwefel-Zentrum liegt auch in diesem Protein am N-Terminus. Die Histidine stören die Rekonstitution also nicht prinzipiell.

FNR•His, das mit dem Vektor pQE60 überproduziert wurde, hatte zumindest zu einem Teil eine Aktivität *in vivo*. Da dieses Protein allerdings *in vitro* nicht rekonstituiert werden konnte, ist nicht klar, welcher Anteil an FNR•His *in vivo* aktiv ist. Damit konnte dieses Protein nicht für *in vivo* Untersuchungen verwendet werden. FNR zeigt auch mit einem GST-tag am N-Terminus eine

Aktivität *in vivo*. Da die Glutathion-S-Transferase nach Präparation von FNR durch die Protease Thrombin entfernt werden kann, ist es auch möglich FNR zu rekonstituieren (Holighaus, 1998). Leider ist es aber nicht möglich, ein Protein mit einer GST-Fusion unter denaturierenden Bedingungen zu reinigen.

Auch ein Protein mit Streptag kann nicht nach Denaturierung mit 4 M Guanidiniumhydrochlorid gereinigt werden, da Guanidiniumhydrochlorid in dieser Konzentration die Interaktion zwischen dem Tag und der Säule zu sehr herabsetzen würde.

**Tab. 13: Vergleich unterschiedlicher Affinitätstags an FNR in Bezug auf die Aktivität *in vivo* und *in vitro*. + positiv, - negativ**

Vektor	Schema	Aktivitätstest	Rekonstitution
pGex4T-1		+	+
pET28a		-	n.b.
pQE60		+	-

### 5.6 *In vivo* zugängliche Thiolreste von FNR

Markierung von FNR mit AMS (4-Acetamido-4'-Maleimidylstilbene-2,2'-Disulfonsäure) nach Denaturierung *in vivo* resultierte in unterschiedlichen Formen von FNR unter aeroben bzw. anaeroben Bedingungen. Unter beiden Bedingungen war eine gewisse Anzahl an Cysteinresten markierbar und lag damit in der Thiolform vor. Nach Markierung unter aeroben Bedingungen wurde allerdings eine Form von FNR gefunden, die in der SDS-Gelelektrophorese bei einer geringeren apparenten Masse lief und nach Markierung unter anaeroben

Bedingungen nicht gefunden wurde. Das heißt, in dieser Form waren weniger Cysteinreste für die Markierung zugänglich, allerdings gab es immer noch einige Cysteine in der Thiolform, da die Bande im Vergleich zu unmarkiertem FNR zu einer höheren Masse geschiftet wurde. Zumindest für einen Teil von FNR ist unter aeroben Bedingungen damit allerdings gezeigt, dass er kein Eisen-Schwefel-Zentrum enthält. Um dieses zu komplexieren, müssen alle fünf Cysteinreste als Thiole vorliegen. In der Form von FNR, in der unter aeroben Bedingungen weniger Cysteinreste durch AMS markiert werden konnten, ist dies nicht gegeben. Es ist also wahrscheinlich, dass zumindest dieser Anteil des Proteins kein Eisen-Schwefel-Zentrum mehr enthält und damit als apoFNR vorliegt.

### 5.7 Anwesenheit eines FeS-Zentrums in NreB

Bisher wurde in Staphylokokken noch kein Sauerstoffsensor beschrieben. Erste Untersuchungen der AG Götz deuteten allerdings auf eine Funktion von NreB als Sauerstoffsensor. Ziel dieser Arbeit war es nun den Cofaktor von NreB zu identifizieren. Nachfolgende vier Punkte legen ein sauerstoffsensitives Eisen-Schwefel-Zentrum als Cofaktor nahe:

#### 1. Der Cofaktor ist ein Eisen-Schwefel-Zentrum:

Wurde NreB mit DTT, Eisen (II), Cystein und einer Cysteindesulfurase rekonstituiert, so war nach Rekonstitution in dem Spektrum eine Schulter bei 420 nm zu erkennen. Diese Schulter ist typisch für ein in ein Protein eingebautes [4Fe4S]-Zentrum (Green *et al.*, 1996, Tran *et al.*, 2000). Eine Eisen- und Sulfidbestimmung zeigte nach Rekonstitution erhöhte Werte an an NreB gebundenem Eisen- und Sulfid. Die gefundenen Werte von 4-8 Eisen- und Sulfid pro NreB sind ein weiterer Hinweis für die Anwesenheit eines [4Fe4S]-Zentrums in rekonstituiertem NreB.

#### 2. Die Cysteinreste in NreB waren wichtig für den Einbau des Cofaktors:

Dieser Faktor bei 420 nm war abhängig von der Anwesenheit der Cysteindesulfurase NifS<sub>AV</sub>, anaeroben Bedingungen und dem Vorhandensein der Cysteinreste in NreB. In der Mutante von NreB, NreBC62S, war eine Rekonstitution ebenso wenig möglich wie nach Vorbehandlung von NreB mit N-Ethylmaleimid.

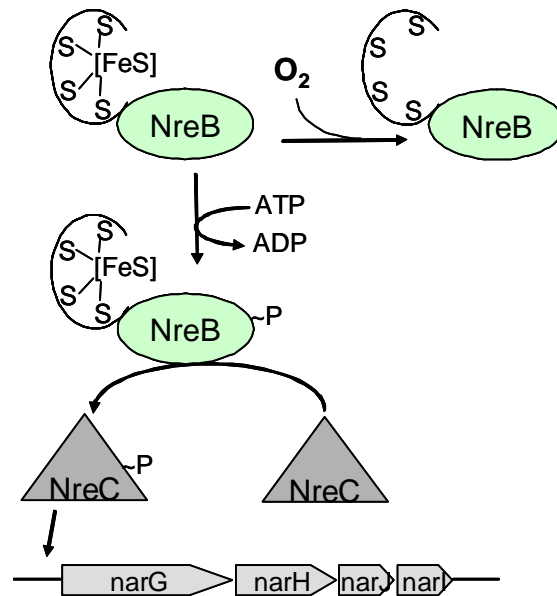
### 3. Der Cofaktor ist sauerstoffsensitiv:

Unter anaeroben Bedingungen war das in NreB eingebaute Zentrum mehrere Stunden stabil, während es bei Kontakt mit Sauerstoff sehr schnell zerfiel. Dies weist auf eine mögliche Funktion bei der Erkennung von Sauerstoff hin.

### 4. Der Cofaktor beeinflusste die Funktion von NreB *in vitro*:

Die Anwesenheit dieses Eisen-Schwefel-Zentrums hatte auch Auswirkungen auf die Autophosphorylierung von NreB. Präpariertes apoNreB zeigte eine Grundaktivität, die durch Rekonstitution verstärkt und durch Komplexierung von noch vorhandenem Eisen mit Dipyridyl vermindert werden konnte. Ein Vergleich durch Entziehen des Sulfids war mangels eines geeigneten Reaktionspartners nicht möglich.

Es kann also folgendes Arbeitsmodell postuliert werden (Abb. 28), das auf den Experimenten dieser Arbeit und auf Fedtke *et al.*, 2002 beruht:



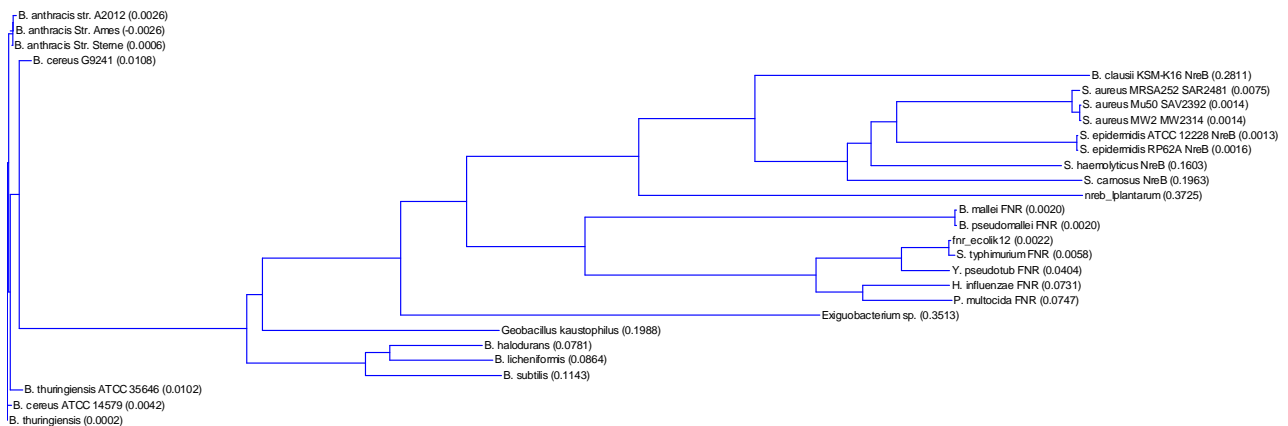
### Abb. 28: Die Histidinkinase ist der Sensor im Zwei-Komponenten-System NreB/C.

Unter anaeroben Bedingungen kann in NreB ein Eisen-Schwefel-Zentrum eingebaut werden, dass die Autophosphorylierung von NreB verstärkt. NreB kann seinerseits NreC phosphorylieren, das nun an den *nar* Promotor binden und die Gene regulieren kann.

In der AG Götz wurde festgestellt, dass die Aktivität des *nir*-Promotors abhängig von der Anwesenheit von Eisenionen ist, und dass das *nir*-Operon von dem Zwei-Komponenten-System NreB/C reguliert wird. Eine *nreABC*

Deletionsmutante war in der Nitrat- und Nitritreduktion beeinträchtigt und dieser Phänotyp konnte durch Komplementation mit den *nreABC* Genen, nicht aber mit *nreAB\*C* aufgehoben werden (Fedtke *et al.*, 2002). Weiterhin wurde festgestellt, dass NreB seinen Phosphatrest auf NreC übertragen kann, das seinerseits die Gene der Nitrat- und Nitritreduktion reguliert.

Bisher wurde kein zu FNR homologes Protein in Staphylokokken gefunden. Stammbaumanalysen zeigen allerdings eine Verwandtschaft zwischen NreB aus Staphylokokken und FNR aus Proteobakterien.



**Abb. 29: Phylogenetischer Stammbaum von FNR homologen Proteinen.**

Bisher bekannte Sequenzen von Proteinen aus Bacillen, Enterobacteriaceae und Staphylokokken wurden verglichen. Der Stammbaum wurde nach der Neighbor Joining Methode von Saitou und Nei erstellt. Die berechneten Distanzwerte sind in Klammern hinter den Namen angegeben.

Bisherige Befunde lassen vermuten, dass diese beiden Gruppen von Proteinen näher mit einander verwandt sind, als jeweils zu den FNR-Proteinen aus Bacillen (Dr. Quang Hon Tran, persönliche Mitteilung).

Dies ist erstaunlich, da die FNR-Proteine aus Proteobakterien und Bacillen Homologien zu CRP zeigen, NreB aber nicht. Sie unterscheiden sich allerdings in der Lage ihrer Eisen-Schwefel-Zentren. Bei FNR aus *Escherichia coli* ist es am N-Terminus lokalisiert, während es sich bei FNR aus *Bacillus subtilis* am C-Terminus befindet. NreB ist dagegen die Sensorkinase eines Zwei-Komponenten-Systems, die N-terminal ein Cysteincluster enthält und C-terminal eine Kinasedomäne. Hier scheint also die Sensordomäne der FNR-Proteine mit einer Kinasedomäne fusioniert worden zu sein. Möglicherweise ist über ein Zwei-Komponenten-System eine feinere Regulation möglich als über

ein Ein-Komponenten-System. In einem Ein-Komponenten-System führt ein Reiz zu einer direkten Regulation. Die Reaktion auf den Reiz ist damit zwar sehr schnell, es gibt aber keine weitere Regulationsmöglichkeit. Bei einem Zwei-Komponenten-System wird der Reiz von dem Sensor auf den Regulator übertragen. An dieser Stelle ist eine weitere Regulation durch Verstärkung bzw. Verminderung möglich. Ausserdem gibt es hier die Möglichkeit der Interaktion mit einem dritten Protein.

Zur endgültigen Aufklärung der Zusammensetzung des Faktors, der bei 420 nm absorbiert, sollten Mössbauerspektren von apoNreB und rekonstituiertem NreB aufgenommen werden. Weiterhin wäre es gut, den gefundenen Einfluss der Cysteinreste auf die Aktivität von NreB durch Mutation weiterer Cysteinreste in NreB zu überprüfen. Für zukünftige Versuche wäre es günstig, wenn NreB im aktiven Zustand präpariert werden könnte. Dazu müsste die anaerobe Präparation von NreB verbessert werden. Da bei EPR-Messungen der AG Götz hohe Mangankonzentrationen in *Staphylococcus carnosus* gefunden wurden (Kamps, 2002), sollte der Vollständigkeit halber der Effekt von Manganionen auf NreB überprüft werden. Weiterhin wäre es interessant, die Zugänglichkeit der Cysteinreste *in vivo* zu untersuchen, wie das in dieser Arbeit bzw. in Trageser *et al.*, 1989 für FNR beschrieben wurde. Für diesen Versuch müssten allerdings erst noch Antikörper gegen NreB hergestellt werden. Ausserdem stellt sich die Frage, ob es weitere Zielgene für das NreB/C-System gibt und ob eine Interaktion zwischen dem NreB/C-System und NreA möglich ist.

## 6. Veröffentlichungen

Uden, G., Achebach, S., Holighaus, G., Tran, H.Q., Wackwitz, B., Zeuner, Y. (2002)

Control of FNR function of *Escherichia coli* by O<sub>2</sub> and reducing conditions. J Mol Microbiol Biotechnol. May; 4(3):263-8.

Achebach, S., Zeuner, Y. & Uden, G. (2003)

Control of the O<sub>2</sub>-sensor/regulator FNR of *Escherichia coli* by O<sub>2</sub> and reducing agents *in vivo* and *in vitro*.

In Regulatory Networks in Prokaryotes (Dürre P & Friedrich B, eds), pp.93-99. Horizon Scientific Press, Norfolk, UK.

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

Stimulation of Fe-S cluster insertion into apoFNR by *Escherichia coli* glutaredoxins 1, 2 and 3 *in vitro*.

FEBS Lett. 2004 May 7; 565(1-3):203-6.

Kamps, A., Achebach, S., Fedtke, I., Uden, G. und Gotz, F. (2004)

Staphylococcal NreB: an O<sub>2</sub>-sensing histidine protein kinase with an O<sub>2</sub>-labile iron-sulphur cluster of the FNR type.

Mol Microbiol. May; 52(3):713-23.

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

Analysis of fumarate nitrate reductase regulator as an oxygen sensor in *Escherichia coli*.

Methods Enzymol. 381:628-44.

Achebach, S., Selmer, T., Uden, G. (2005)

Properties and significance of apoFNR as a second form of air-inactivated [4Fe-4S] •FNR of *Escherichia coli*.

FEBS J. Aug; 272(16):4260-9.

## 7. Literatur

- Achebach, S., Tran, Q.H., Vlamis-Gardikas, A., Müllner, M., Holmgren, A. & Uden, G. (2004)  
Stimulation of Fe-S cluster insertion into apoFNR by *Escherichia coli* glutaredoxins 1, 2 and 3 *in vitro*.  
FEBS Lett 565, 203-206
- Becker, S. (1996)  
Einfluss von Sauerstoff auf die Funktion des Genregulators FNR von *Escherichia coli*.  
Doktorarbeit, Institut für Mikrobiologie und Weinforschung, Johannes Gutenberg Universität Mainz
- Becker, S., Holighaus, G., Gabrielczyk, T. & Uden, G. (1996)  
O<sub>2</sub> as the regulatory signal for FNR-dependent gene regulation in *Escherichia coli*.  
J Bacteriol 178, 4515-4521.
- Bonomi, F., Iametti, S., Ta, D., Vickery, L.E. (2005)  
Multiple turnover transfer of [2Fe2S] Clusters by the iron-sulfur cluster assembly scaffold proteins IscU and IscA.  
J. Biol. Chem. 280 (33):29513-29518
- Crack, J., Green, J. & Thompson, A.J. (2004)  
Mechanism of oxygen sensing by the bacterial transcription factor fumarate-nitrate reduction (FNR).  
J Biol Chem. 279, 9278-9286.
- CUTTER© 1998-1999  
Koen Van Der Straeten, Hervé Choplin and Thierry Moreau.  
<http://delphi.phys.univ-tours.fr/Prolysis/cutter.html>
- Ellman, G. (1995)  
Tissue Sulfhydryl Groups  
Arch. Biochem. Biophys 82,70-77
- Farinha, M.A., Kropinski, A.M. (1990)  
High efficiency electroporation of *Pseudomonas aeruginosa* using frozen cell suspensions.  
FEMS Microbiol Lett 58(2):221-5
- Fedtke, I., Kamps, A., Krismer, B. and Götz, F. (2002)  
The nitrate reductase and nitrite reductase operons and the *narT* gene of *Staphylococcus carnosus* are positively controlled by the novel two-component system NreBC.  
J. Bacteriol. (184):6624-6634

- Fish, W.W. (1988)  
Rapid colorimetric micromethod for the quantitation of complexed iron in biological samples  
Methods. Enzymol. 158:357-364
- Götz, F. und Schumacher, B. (1987)  
Improvements of protoplast transformation in *Staphylococcus carnosus*.  
FEMS Microbiol. Lett. 40:285-288
- 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., Thompson, 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
- Griffiths, L., Cole, J.A. (1987)  
Lack of redox control of the anaerobically-induced nirB<sup>+</sup> gene of *Escherichia coli* K-12.  
Arch Microbiol. May; 147(4):364-9.
- Holighaus, G. (1998)  
Untersuchungen zur Sauerstofferkennung durch den Genregulator FNR von *Escherichia coli*.  
Doktorarbeit, Institut für Mikrobiologie und Weinforschung, Johannes Gutenberg Universität Mainz
- Kamps, A. (2002)  
Molekularbiologische Studien zur Regulation der dissimilatorischen Nitrat- und Nitritreduktion bei *Staphylococcus carnosus*.  
Doktorarbeit, Institut für Mikrobiologie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- Kamps, A., Achebach, S., Fedtke, I., Uden, G. and Götz, F. (2004)  
Staphylococcal NreB: an O<sub>2</sub>-sensing histidine protein kinase with an O<sub>2</sub>-labile iron-sulphur cluster of the FNR type.  
Mol. Microbiol. 52(3):713-723
- Khoroshilova, N., Popescu, C., Münck, E., Beinert, H., Kiley, P.J. (1997)  
Iron-sulfur cluster disassembly in the FNR protein of *Escherichia coli* by O<sub>2</sub>: [4Fe-4S] to [2Fe-2S] conversion with loss of biological activity.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:6087-6092
- King, T.E. and Morris, R.O. (1967)  
Determination of acid-labile sulphide and sulphydryl groups  
Methods Enzymol 10:634-637

- Lacourciere, G.M., Stadtman, T.C. (1998)  
The NIFS protein can function as a selenide delivery protein in the biosynthesis of selenophosphate.  
J. Biol. Chem. 273(47):30921-6
- Laemmli, U.K. (1970)  
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.  
Nature 227, 680-685.
- Lamberg, K.E. und Kiley P.J. (2000)  
FNR-dependent activation of the class II dmsA and narG promoters of *Escherichia coli* requires FNR-activating regions 1 and 3.  
Mol Microbiol. 38(4):817-27.
- Lamberg, K.E., Luther, C., Weber, K.D., Kiley P.J. (2002)  
Characterization of activating region 3 from *Escherichia coli* FNR.  
J Mol Biol. 315(3):275-83.
- 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 from *Escherichia coli* are regulated by oxygen.  
J. Biol. Chem. 271:2762-2768
- Lundstrom-Ljung, J., Holmgren, A. (1995)  
Glutaredoxin accelerates glutathione-dependent folding of reduced ribonuclease A together with protein disulfide-isomerase.  
J Biol Chem. 270(14):7822-8.
- Lundstrom-Ljung, J., Vlamis-Gardikas, A., Aslund, F., Holmgren, A. (1999)  
Reactivity of glutaredoxins 1, 2 and 3 from *Escherichia coli* and protein disulfide isomerase towards glutathionyl-mixed disulfides in ribonuclease A.  
FEBS Lett. 443(2):85-8
- Miller, J.H. (1992)  
A short course in bacterial genetics.  
Cold Spring Harbour, New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Moore, L.J. und Kiley, P.J. (2001)  
Characterization of the dimerization domain in the FNR transcription factor.  
J. Biol. Chem. 276(49):45744-50
- Ohlberger, G. (2000)  
Untersuchungen der aeroben Form des Sauerstoffregulators FNR in *Escherichia coli*.  
Diplomarbeit, Institut für Mikrobiologie und Weinforschung, Johannes Gutenberg Universität Mainz

- Perrenoud, A. und Sauer, U.  
Impact of global transcriptional regulation by ArcA, ArcB, Cra, Crp, Cya, FNR and Mlc on Glucose Catabolism in *Escherichia coli*.  
J Bac. 187(9):3171-3179
- Popescu, C.V., Bates, D.M., Beinert, H., Münck, E., Kiley, P.J. (1998)  
Mössbauer spectroscopy as a tool for the study of activation/inactivation of the transcription regulator FNR in whole cells of *Escherichia coli*.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13431-13435
- Potamitou, A., Holmgren, A. und Vlamis-Gardikas, A. (2002)  
Protein levels of *Escherichia coli* thioredoxins and glutaredoxins and their relation to null mutants, growth phase, and function.  
J. Biol. Chem. (277):18561-18567
- Ralph, E.T., Scott, C., Jordan, P.A., Thompson, A.J., Guest, J.R., Green, J. (2001)  
Anaerobic acquisition of [4Fe4S] clusters by the inactive FNR (C20S) variant and restoration of activity by second-side amino acid substitutions.  
Mol. Microbiol. 39(5):1199-1211
- Rodriguez-Manzanares, M.T., Tamarit, J., Belli, G., Ros, J., Herrero, E. (2002)  
Grx5 Is a Mitochondrial Glutaredoxin Required for the Activity of Iron/Sulfur Enzymes.  
Molecular Biology of the Cell 13:1109-1121
- Salmon, K., Hung, S.P., Mekjian, K., Baldi, P., Hatfield, G.W. & Gunsalus, R.P. (2003)  
Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K-12: the effects of oxygen availability and FNR.  
J Biol Chem. 278, 29837-29855.
- Sambrook, J., Russel, D.W. (2001)  
Molecular Cloning – A Laboratory Manual.  
Cold Spring Harbor Laboratory Press New York.
- Schleifer, K.H. und Fischer, U. (1982)  
Description of a new species of the genus *Staphylococcus carnosus*.  
Int. J. Syst. Bacteriol. 32:152-156
- Schwartz, C.J., Djaman, O., Imlay, J.A., Kiley, P.J. (2000)  
The cysteine desulfurase, IscS, has a major role in in vivo Fe-S cluster formation in *Escherichia coli*.  
PNAS 97(16):9009-9014
- Sharrocks, A.D., Green, J. & Guest, J.R. (1990)  
In vivo and in vitro mutants of FNR the anaerobic transcriptional regulator of *E. coli*.  
FEBS Lett (270):119-122

- Siegel, L.M. (1965)  
A Direct Microdetermination for Sulfide.  
*Analytical Biochemistry* 11:126-132
- Spiro, S., Guest, J.R. (1987)  
Regulation and overexpression of the *fnr* gene of *Escherichia coli*.  
*J Gen Microbiol.* 133(12):3279-88.
- Spiro, S. & Guest, J.R.(1988)  
Inactivation of the FNR protein of *Escherichia coli* by targeted mutagenesis in the N-terminal region.  
*Mol. Microbiol.* 2(6):71-707
- Spiro, S., Guest, J.R. (1990)  
FNR and its role in oxygen-regulated gene expression in *Escherichia coli*.  
*FEMS Microbiol Rev.* 6(4):399-428
- Studier, F.W., Moffatt, B.A. (1986)  
Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes.  
*J Mol Biol* 189:113-130
- Sutton, V.R., Stubna, A., Patschkowski, T., Münck, E., Beinert, H. & Kiley, P.J. (2004a)  
Superoxide destroys the  $[2Fe_2S]^{2+}$  cluster of FNR from *Escherichia coli*.  
*Biochemistry* 43,791-798.
- Sutton, V.R., Mettert, E.L., Beinert, H. & Kiley, P.J. (2004b)  
Kinetic analysis of the oxidative conversion of the  $[4Fe_4S]^{2+}$  cluster of FNR to a  $[2Fe_2S]^{2+}$  cluster.  
*J Bacteriol* 186, 8018-8025.
- Trageser M (1990).  
Die O<sub>2</sub>-abhängige Regulation der anaeroben Atmung in *Escherichia coli* durch den Genaktivator FNR.  
Doktorarbeit, Institut für Mikrobiologie der Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt/Main
- Trageser, M., Uden, G. (1989)  
Role of cysteine residues and of metal ions for the regulatory function of FNR, the transcriptional regulator of anaerobic respiration in *Escherichia coli*.  
*Mol. Microbiol.* 3(5):593-9
- Trageser, M., Spiro, S., Duchene, A., Kojro, E., Fahrenholz, F., Guest, J.R., und Uden, G. (1990)  
Isolation of intact FNR protein (Mr 30,000) of *Escherichia coli*.  
*Mol Microbiol.* Jan; 4(1):21-7.

- Tran, Q.H., Arras, T., Becker, S., Holighaus, G., Ohlberger, G., Uden, G. (2000)  
Role of glutathione in the formation of the active form of the oxygen sensor FNR ([4Fe-4S] FNR) and in the control of FNR function.  
Eur. J. Biochem. 267:4817-4824
- Tseng, C.P., Albrecht, J. & Gunsalus, R.P. (1996)  
Effect of microaerophilic cell growth conditions on expression of the aerobic (*cyoABCD* and *cydABC*) and anaerobic (*narGHJI*, *frdABCD* and *dmsABC*) respiratory pathway genes in *Escherichia coli*.  
J Bacteriol 178, 1094-1098.
- Uden, G. und Duchene, A. (1987)  
On the role of cyclic AMP and the Fnr protein in *Escherichia coli* growing anaerobically.  
Arch Microbiol. 147(2):195-200.
- Uden, G. & Schirawski, J. (1997)  
The O<sub>2</sub> responsive transcriptional regulator FNR of *Escherichia coli*: The search for signals and reactions.  
Mol Microbiol 25, 205-210.
- Uden, G. und Trageser, M. (1991)  
Oxygen regulated gene expression in *Escherichia coli*: Control of anaerobic respiration by the FNR protein.  
Antonie van Leeuwenhoek 59:65-76
- Uden, G., Achebach, S., Holighaus, G., Tran, H.G., Wackwitz, B. & Zeuner, Y. (2002)  
Control of FNR function of *Escherichia coli* by O<sub>2</sub> and reducing conditions.  
J. Mol. Microbiol. Biotechnol. (4):263-268
- Van Baar, B.L.M. (2000)  
Characterisation of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionisation and electrospray mass spectrometry.  
FEMS Microbiology Reviews (24):193-219
- Van Horn, D. (6/2005)  
<http://www.protocol-online.org/prot/Detailed/1536.html>
- Vlamis-Gardikas, A., Aslund, F., Spyrou, G., Bergman, T. und Holmgren, A. (1997)  
Cloning, overexpression, and characterization of glutaredoxin 2, an atypical glutaredoxin from *Escherichia coli*.  
J. Biol. Chem. (272):11236-11243
- Wallace, B.J. und Young, I.G. (1977)  
Role of quinines in electron transport to oxygen and nitrate in *Escherichia coli*  
Biochim. Biophys. Acta 233:109-122

- Weber, I.T., Steitz, T.A. (1987)  
Structure of a complex of catabolite gene activator protein and cyclic AMP refined at 2.5 Å resolution.  
J Mol Biol 198(2):311-26
- Weber, K.D., Vincent, O.D., Kiley P.J. (2005)  
Additional determinants within Escherichia coli FNR activating region 1 and RNA polymerase alpha subunit required for transcription activation.  
J. Bacteriol. 187(5):1724-31
- Wessel, D. & Flügge, U.I. (1984)  
A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids.  
Anal Biochem 138, 141-143.
- Zheng, L., White, R.H., Cash, V.L., Jack, R.F. and Dean, D.R. (1993)  
Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis.  
Proc Natl Acad Sci U S A. Apr 1; 90(7):2754-8.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985)  
Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mpl8 and pUC19 vectors.  
Gene, 33, 103-119

