

DIE PARALLELE INDUKTION VON NITRATREDUKTASE UND NITRITREDUKTASE BEI *BACILLUS CEREUS* DURCH VERSCHIEDENE ANIONEN

E. HACKENTHAL

Pharmakologisches Institut der Universität Heidelberg

(Received 21 December 1965; accepted 9 February 1966)

Abstract—The appearance of nitrate and nitrite reductase activity in cell suspensions obtained from cells of *Bacillus Cereus* growing anaerobically in the presence of mono-valent inorganic anions has been compared. The biosynthesis of both enzymes was induced by the following anion in decreasing order of effectiveness: nitrate, nitrite, azide, cyanate, iodide, thiocyanate, perhenate and selenocyanate. All the anions tested are competitive inhibitors of nitrate reductase with respect to nitrate (with the exception of iodide), but have no affinity for nitrite reductase, because they fail to inhibit nitrite reduction in cell-free extracts. The results obtained are interpreted as an example of coordinate induction.

EINLEITUNG

IN EINER früheren Arbeit wurde gezeigt, daß mehrere monovalente anorganische Anionen kompetitive Hemmer der Nitratreduktase aus *B. cereus* sind.¹ In einer weiteren Arbeit wurde die Induktion der Nitratreduktase durch einige dieser Anionen beschrieben.² In Zellen und zellfreien Extrakten ließ sich nach Induktion mit Nitrat außerdem eine Nitritreduzierende Aktivität nachweisen.³ In der Fortführung dieser Versuche wird in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob auch die Nitritreduktase bei *B. cereus* durch die betreffenden Anionen induziert werden kann.

MATERIAL UND METHODEN

Zellen von *B. cereus* ATCC 8035 wurden durch 5 stündige aerobe Kultivierung in Tryptikase-Soy-Broth (Baltimore Biological Laboratories) Anfangs-pH 7,3 bei 37° gewonnen. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren bei 4000 g vom Medium abgetrennt, einmal mit 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,0 gewaschen und in gleichem Puffer resuspendiert.

Induktionsansätze

Die Suspensionen aerob kultivierter Zellen wurde mit 500 ml frischem Nährmedium versetzt und unter möglichst sterilen Bedingungen in 25 ml Portionen in 50 ml Thunberggefäße pipettiert, die das zu untersuchende Anion in einem Volumen von 0,2 ml Phosphatpuffer enthielten. Die Konzentration der Zellsuspension wurde so angesetzt, daß in jedem Induktionsansatz eine Zellmenge mit einem Trockengewicht von 10–12 mg enthalten war. Die Thunberggefäße wurden sofort mehrmals evakuiert und mit reinem Argon ($O_2 < 1\text{ppm}$) gefüllt und darauf bei 37° inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten nach Induktionsbeginn wurden die Zellen vom Medium bei 3000 g abzentrifugiert, einmal mit 10 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,0 gewaschen, in 3–6 ml des

gleichen Puffers resuspendiert und anschließend die Nitrat und Nitritreduktion dieser Suspension bestimmt.

Bestimmungen der Nitrat- und Nitritreduktion

Thunberggefäße enthielten 0,2 ml Zellsuspension, 100 μ M Natriumpyruvat, 30 μ Mol KNO_3 bzw. 200 μ g NaNO_2 in einem Gesamtvolumen von 1,0 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,0. Nach mehrmaligem Evakuieren und Füllen mit Argon wurden die Thunberggefäße 15 min bei 30° inkubiert, dann 0,5 ml des Reaktionsansatzes in 0,2 ml 1 M Bariumacetat einpipettiert und in dem durch Zentrifugieren gewonnenen klaren Überstand wie früher beschrieben⁴ Nitrit bestimmt.

Trübungsmessungen

Als Bezugswert für die gemessene Nitrat- und Nitritreduktion wurde das Trockengewicht einmal mit destilliertem Wasser gewaschener Zellsuspensionen verwendet. In den Induktionsversuchen reichte jedoch die im Einzelversuch verfügbare Zellmenge für eine Trockengewichts-Bestimmung nicht aus. Deshalb wurden von den verwendeten Suspensionen nach entsprechender Verdünnung die Extinktionen bei 450 $m\mu$ in 0,5 cm Küvetten gemessen. Die Umrechnung auf das Trockengewicht erfolgte auf Grund einer Eichkurve der Extinktionen von Suspensionen bekannten Trockengewichts, die im Extinktionsbereich von 0,08 bis 0,6 linear ist und in jedem Versuch durch den Vergleich der Extinktionswerte gesammelter Suspensionen und deren Trockengewichte kontrolliert wurde.

Zellfreie Extrakte

Suspensionen Nitrat-induzierter Zellen (2 Stunden) wurden im MSE Ultrasonic desintegrator Typ 60 W 10 min unter Eiswasserkühlung mit Ultraschall behandelt, grobe Zelltrümmer und intakte Zellen (< 5%) abzentrifugiert und der zellfreie Überstand ohne weitere Reinigung verwendet.

Bestimmung der Nitritreduktion zellfreier Extrakte

Thunberggefäße enthielten: 20 μ g NaNO_2 , 0,2 ml zellfreien Extrakt und im Seitengefäß 0,75 μ Mol DPNH (0,2 ml) in einem Gesamtvolumen von 1,0 ml 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,0. Nach mehrmaligem Evakuieren und Füllen mit Argon wurde die Reaktion durch Zugabe des DPNH aus dem Seitengefäß gestartet. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei 30° wurde die Reaktion durch Einpipettieren von 0,5 ml des Reaktionsansatzes in 0,2 ml Bariumacetatlösung und Zugabe von 1,8 ml abgestoppt und die Nitritbestimmung⁴ im Überstand nach Abzentrifugie Äthonalren des Präzipitates angeschlossen.

ERGEBNISSE

Die Induktion der Nitrat- und Nitritreduktion durch verschiedene Anionen ist in den Abbildungen 1–4 dargestellt. In jedem Versuch wurde die Induktion mit Nitrat als Bezugswert und der Verlauf der Aktivitäten ohne Zusatz eines Induktors eingeschlossen.

Wie die Abbildungen 2 und 4 zeigen, haben die Zellsuspensionen vor Zusatz des Induktors (Zeit 0) praktisch keine Aktivität. Die etwas höheren Startwerte in den Abbildungen 1 und 3 kamen dadurch zustande, daß in diesen Versuchen die Werte für die Zeit 0 mit Zellen gewonnen wurden, die nach Zugabe des Induktors sofort

abzentrifugiert, gewaschen und getestet wurden, während in den Werten der Abbildungen 2 und 4 nicht induzierte Zellen zur Bestimmung der Aktivitäten verwendet wurden. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Enzymsynthese nach Zusatz des Induktors sehr schnell beginnt, da diese Zellen nur etwa 5 min (während des Zentrifugierens) mit dem Induktor in Kontakt waren. Wie die Abbildungen weiter zeigen, entwickeln die Zellen auch ohne Zusatz eines Induktors im Verlauf der anaeroben Inkubation eine Nitrat- und Nitrit-reduzierende Aktivität, die während der vorhergehenden aeroben Kultivierung außerordentlich gering ist.

Den Abbildungen 1–4 ist weiterhin zu entnehmen, daß alle die Nitratreduktion induzierenden Anionen auch die Nitritreduktion induzieren (Mit Ausnahme von Perchlorat s. unten).

Diese Parallelität ist nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ vorhanden. Die Zeitabhängigkeit der Induktion verläuft bei Nitrat- und Nitritreduktion in fast übereinstimmenden Kurven. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, daß die Aktivität der Nitritreduktion jeweils nur die Hälfte oder ein Drittel der Nitratreduktion beträgt. Die Werte für die Nitratreduktion sind nicht korrigiert für die gleichzeitige Nitritreduktion, sodaß die Nitratreduktion effektiv noch über den angegebenen Werten liegt. Danach sind als gute Induktoren der Nitrat- und Nitritreduktase Nitrat, Nitrit, Azid, Oxycyanid, Jodid und Rhodanid anzusprechen, von geringerer Wirksamkeit Perrhenat und Selenocyanid. Bei der Induktion mit Nitrit fällt die in beiden Aktivitäten parallele Verzögerung auf. Eine deutliche Steigerung der Aktivitäten ist erst 2 Stunden nach Induktionsbeginn meßbar (Abb. 1).

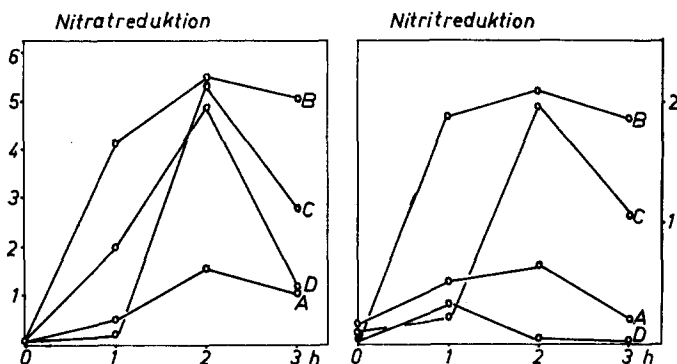


ABB. 1. Induktion der Nitrat- und Nitritreduktion durch Nitrat, Nitrit und Perchlorat
Standardversuchsbedingungen siehe Methodik. Konzentration der Anionen im Induktionsansatz: A
ohne Induktor, B 10^{-2} M KNO_3 , C 10^{-2} M NaNO_2 , D 10^{-2} M NaClO_4 .
Reduktion in μ Mol/mg Zellrockengewicht. Zeit in Stunden nach Induktionsbeginn.

Keine Induktionsfähigkeit haben Cyanid, Chlorid, Chlorat und Sulfat, von denen keine Abbildungen wiedergegeben sind.

Fast regelmäßig nimmt die Aktivität von Nitrat- und Nitritreduktion bei längeren Induktionszeiten wieder ab (Abb. 1–4). Dieser Effekt kann bei den metabolisierten Induktoren Nitrat, Nitrit und Perchlorat auf deren Verschwinden aus dem Ansatz beruhen. Eine weitere Erklärung liegt darin, daß häufig nach 2 oder 3 Stunden Induktionszeit das Ende der logarithmischen Wachstumsphase erreicht war (gemessen

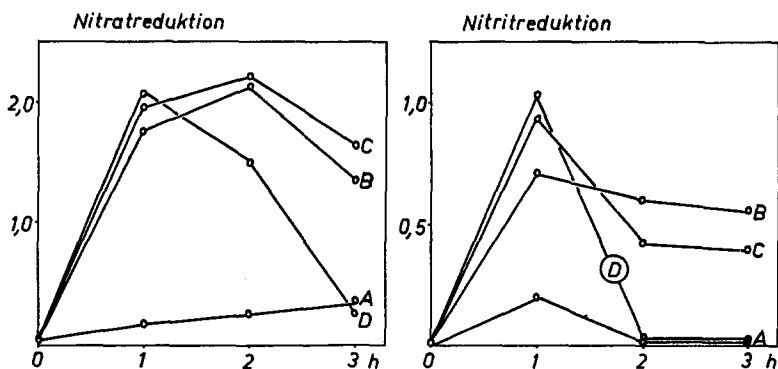


ABB. 2. Induktion der Nitrat- und Nitritreduktion durch Nitrat, Oxycyanid und Azid. Standardversuchsbedingungen siehe Methodik. Konzentration der Anionen im Induktionsansatz: A ohne Induktor, B 10^{-4} M NaN_3 , C 2×10^{-3} M KOCN , D 10^{-2} M KNO_3 . Reduktion in μ Mol/mg Zelltrockengewicht. Zeit in Stunden nach Induktionsbeginn.

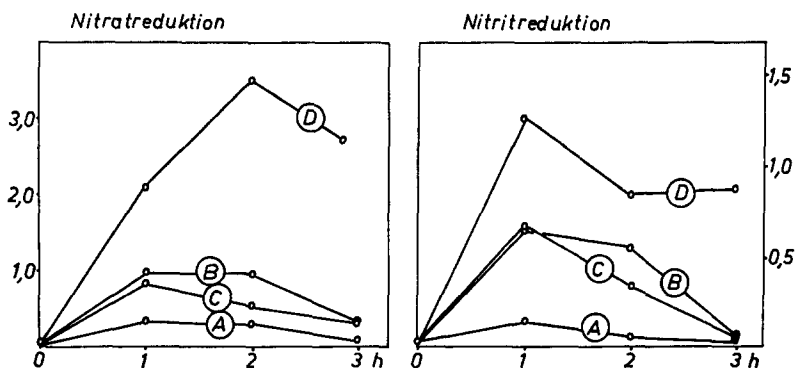


ABB. 3. Induktion der Nitrat- und Nitritreduktion durch Nitrat, Perrhenat und Selenocyanid. Standardversuchsbedingungen siehe Methodik. Konzentration der Anionen: A ohne Induktor, B 10^{-3} M KReO_4 , C 10^{-3} M KSeCN , D 5×10^{-3} M KNO_3 . Reduktion in μ Mol/mg Zelltrockengewicht. Zeit in Stunden nach Induktionsbeginn.

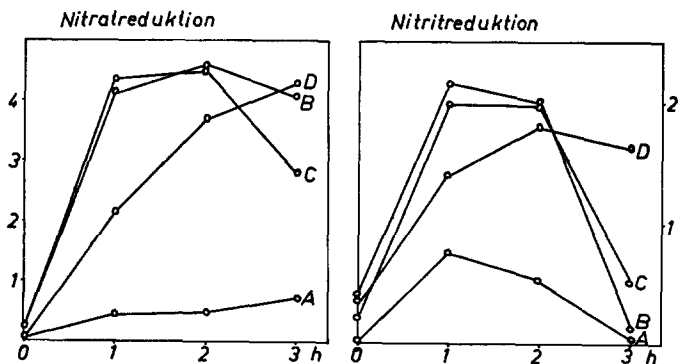


ABB. 4. Induktion der Nitrat- und Nitritreduktion durch Nitrat, Jodid und Rhodanid. Standardversuchsbedingungen siehe Methodik. Konzentration der Anionen im Induktionsansatz: A ohne Induktor, B 10^{-2} M KNO_3 , C 10^{-2} M KJ , D 10^{-2} M NaSCN . Reduktion in μ Mol/mg Zelltrockengewicht. Zeit in Stunden nach Induktionsbeginn.

an den Trübungswerten). Wie früher gezeigt wurde, nimmt dann vor allem die Aktivität des Elektronentransportsystems² der Zellen, langsamer die Nitratreduktaseaktivität ab.

Angeichts der überraschenden Parallelität in der Induktion durch verschiedene Anionen von Nitrat- und Nitritreduktase stellte sich die Frage, ob und welche Anionen eine Affinität zur Nitritreduktase besitzen. Die Beantwortung dieser Frage ist in der Tabelle 1 gegeben. Sie zeigt, daß alle untersuchten Anionen außer ClO_4^- , ClO_3^- und

TABELLE 1. HEMMUNG DER NITRITREDUKTION ZELLFRIER EXTRACTE DURCH VERSCHIEDENE ANIONEN

Anion	Konzentration M	m μ Mol NO_2 reduz.	% Hemmung
ohne		109	
KOCN	10^{-2}	107	0
NaSCN	10^{-2}	106	0
KReO ₄	5×10^{-3}	115	0
NaN ₃	2×10^{-4}	127	0
KJ	10^{-2}	113	0
NaCl	10^{-2}	119	0
NaBF ₄	5×10^{-3}	118	0
NaClO ₄	10^{-2}	60	46
	2×10^{-3}	56	49
	5×10^{-4}	61	44
NaClO ₃	2×10^{-3}	24	78
KSe CN	5×10^{-3}	91	17
	10^{-3}	89	19
NH ₂ OH	2×10^{-3}	107	0

Standardansätze und Bedingungen wie in der Methodik beschrieben. Nitritkonzentration in allen Ansätzen 2.9×10^{-4} M. Keines der Anionen hat in der verwendeten Konzentration einen Einfluß auf die Nitritbestimmung oder reagiert mit Nitrit nichtenzymatisch.

SeCN⁻ keine Affinität zur Nitritreduktase besitzen, da sie auch in höheren Konzentrationen die Nitritreduktion mit kleiner Nitritkonzentration (3×10^{-4} M) nicht beeinflussen.

Die Hemmung durch Selenocyanid ist nur gering, der Typ der Hemmung wurde nicht untersucht.

Bei der Hemmung der Nitritreduktion durch Perchlorat fällt auf, daß diese unabhängig von der Perchloratkonzentration ist. Diese Beobachtung ließ vermuten, daß Perchlorat und möglicherweise auch Chlorat nicht per se, sondern erst nach Reduktion zu sehr viel stärker oxydierend wirkenden Verbindungen wie z.B. Hypochlorit die Nitritreduktion hemmen. Diese Vermutung lag um so näher, als Perchlorat und Chlorat beide Substrate der Nitratreduktase sind⁵, die in dem verwendeten Rohextrakt in höherer Aktivität als die Nitreduktase enthalten war. Zur Sicherung dieser Annahme wurde die Hemmung der Nitritreduktase durch Chlorat und Perchlorat in einer Versuchsanordnung geprüft, die eine Reduktion beider Anionen durch die Nitratreduktase fast vollständig verhinderte. Dies wurde erreicht durch Zugabe von 10^{-4} M Azid, das kompetitiver Hemmer der Nitrat- und Perchloratreduktion ist¹ mit einer sehr hohen Affinität zum Enzym ($\text{N}_3^- K_1 = 3 \times 10^{-7}$ M, $\text{ClO}_4^- K_m = 5 \times 10^{-4}$ M, $\text{ClO}_3^- K_m = 1,3 \times 10^{-4}$ M, $\text{NO}_3^- K_m = 5 \times 10^{-5}$ M). Das Ergebnis ist in der Tabelle 2 dargestellt. Durch Zugabe von Azid, das selbst die Nitritreduktion

nicht hemmt, wird die ohne Azid zu beobachtende Hemmung durch Perchlorat praktisch vollständig aufgehoben, die durch Chlorat wesentlich vermindert. Die unterschiedliche Hemmung der Nitritreduktion durch beide Anionen bei Vergleich der Werte der Tabellen 1 und 2 ist nicht etwa auf methodische Fehler oder unterschiedliche Empfindlichkeit der Nitritreduktase zurückzuführen, sondern bestätigt nur zusätzlich die Annahme, daß die Reduktionsprodukte von Chlorat und Perchlorat mit einer spezifischen Affinität zur Nitratreduktase für die Hemmung verantwortlich sind, da in den Extrakten die Nitratreduktaseaktivität unterschiedlich ist. Dieses Ergebnis erklärt die scheinbare Divergenz in der Induktion der Nitrat- und Nitritreduktion durch Perchlorat (Abb. 1). Es ist zu vermuten, daß während der Induktionsphase zwar Nitritreduktase gebildet wird, durch den oben geschilderten Mechanismus aber sofort wieder inaktiviert wird, da die gleichfalls induzierte Nitratreduktase mit schnell zunehmender Geschwindigkeit Perchlorat reduziert.

TABELLE 2. SCHUTZWIRKUNG VON AZID BEI DER HEMMUNG DER NITRITREDUKTASE DURCH CHLORAT UND PERCHLORAT

Anionen	m μ Mol NO ₂ red.	% Hemmung
ohne	245	—
NaN ₃ 10 ⁻⁴ M	234	5
NaClO ₄ 10 ⁻³ M	70	71
NaClO ₃ 10 ⁻³ M	19	92
NaClO ₄ + NaN ₃	223	9
NaClO ₃ + NaN ₃	175	28

Standardansätze und Bedingungen wie in der Methodik beschrieben. Nitritkonzentration in allen Ansätzen $2,9 \times 10^{-4}$ M.

In einer anderen Arbeit³ wurde gezeigt, daß Zellsuspensionen und zellfreie Extrakte Nitrat-adaptierter Zellen von *B. cereus* zugesetztes Nitrit sehr schnell zu Ammoniak reduzieren. Freies Hydroxylamin war nicht nachweisbar. Es ergibt sich aus den vorliegenden Befunden der Induzierbarkeit der Nitritreduktion durch einige Anionen die Frage, ob Zellen, die nicht mit Nitrat oder Nitrit induziert sind, ebenfalls Nitrit zu Ammoniak reduzieren können.

Zur Klärung dieser Frage wurde die Nitritreduktion von Nitrat- und Jodid-induzierten Zellen 2 Stunden nach Induktionsbeginn verfolgt und das Auftreten von Ammoniak geprüft. Es zeigte sich in grob abstufendem qualitativen Verfahren, daß in Suspensionen Jodid-induzierter Zellen mit gleicher Geschwindigkeit Ammoniak als Folgeprodukt der Nitritreduktion erschien wie Nitrit verschwand. Nach vollständiger Reduktion des zugesetzten Nitrits war die Farbintensität des Ammoniak-Nachweises gleich der in Suspensionen Nitrit-induzierter Zellen.

Weiterhin wurde eine Mutante von *B. cereus*, die durch mehrfache Passagen auf Medien steigender Perchloratkonzentration gewonnen war, und sich hauptsächlich durch den Verlust des Nitratreduktionsvermögens von dem Wildstamm unterscheidet,^{6,7} auf die Induktionsfähigkeit der Nitritreduktion geprüft. Bei dieser Mutante war weder mit Nitrat noch mit Nitrit eine Nitritreduktase induzierbar.

DISKUSSION

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß bei *B. cereus* die Nitritreduktase durch eine Reihe monovalenter anorganischer Anionen in gleicher Weise induzierbar ist, wie die Nitratreduktase. Die einzige Ausnahme, die Nichtinduktion der Nitritreduktase durch Perchlorat, konnte durch eine Hemmung der Nitritreduktion durch Reduktionsprodukte des Perchlorat an der gleichzeitig induzierten Nitratreduktase plausibel gemacht werden. Die induzierenden Anionen haben keine Affinität zur Nitritreduktase. In einer Nitratase-negativen Variante konnte weder durch Nitrit noch durch Nitrat eine Nitritreduktase induziert werden.

In der Literatur sind mehrere Beispiele für die Induktion mehrerer Enzyme durch einen Induktor beschrieben worden. Es handelt sich dabei immer um funktionell zusammengehörige Enzyme. So untersuchte Stannier⁸ die Induktion der Tryptophan abbauenden Enzyme bei *Pseudomonas*. Tryptophan induziert eine Reihe von Enzymen, die Tryptophan über Kynurenin, Anthranilsäure, Catechol und Muconat zu 3-Oxyadipinsäure abbauen. Stannier interpretierte diesen Vorgang als "sequentielle" Induktion, d.h. jedes Enzym dieser Stoffwechselkette wird durch das Reaktionsprodukt der vorhergehenden Enzymreaktion, also durch sein Substrat induziert. Diese Theorie setzt voraus, daß die entsprechenden Enzyme nacheinander induziert und synthetisiert werden. Eine Induktion der ganzen Kette kann nur durch ein Substrat erfolgen, welches auch die ganze Kette durchläuft.

Wenn dieser Mechanismus auch in diesem speziellen Falle wirksam sein kann, gibt es doch genügend Beispiele dafür, daß mehrere Enzyme durch einen Induktor simultan, in gleichen Proportionen und unabhängig voneinander induziert werden können: 2-Desoxygalaktose (Fucose) induziert parallel die bei der Umwandlung von Galaktose in Glukose beteiligten Enzyme Galaktokinase, Hexose-1-Phosphat-uridyltransferase und UDP-Glukose-Epimerase bei *E.coli*.⁹ und *Sacharomyces cerevisiae*.¹⁰ Mit verschiedenen Mutanten, die ein oder zwei Enzyme dieser Reaktionskette nicht besitzen, wurde gezeigt, daß die Induktion der 3 Enzyme nicht sequentiell, sondern gleichzeitig und unabhängig voneinander geschieht. Ähnliche Befunde wurden bei der parallelen Induktion von β -Galaktosidase, Galaktosidoacetyltransferase und der Galaktosidopermease durch β -Galaktoside bei *E. coli* erhoben.^{11, 12} In genetischen Experimenten wurde festgestellt, daß die für die Synthese der einzelnen Enzyme verantwortlichen Strukturgene räumlich eng benachbart und funktionell in einem sogenannten Operon verknüpft sind.¹² Bei der Induktion einer Enzymgruppe wird jeweils der gesamte Informationsinhalt eines Operons für die Enzymsynthese freigegeben. Eine ausführliche Darstellung fand der Vorgang der koordinierten Enzymsynthese in der Theorie der induzierten Proteinsynthese bei Mikroorganismen von Jacob und Monod¹³.

Auch in dem hier beschriebenen Vorgang der parallelen Induktion von Nitrat- und Nitritreduktase scheint eine koordinierte Enzyminduktion vorzuliegen. Die Möglichkeit der sequentiellen Induktion wird dadurch ausgeschlossen, daß keines der verwendeten Anionen eine Affinität zur Nitritreduktion hat und nur wenige durch die Nitratreduktase metabolisiert werden. Die Frage, ob ausser Nitrit- und Nitratreduktase weitere Enzyme induziert werden, ist zunächst nicht zu klären, da unsicher ist, ob die Reduktion von Nitrit zu Ammoniak durch ein oder mehrere Enzyme katalysiert wird.³

ZUSAMMENFASSUNG

Die Induktion von Nitrat- und Nitritreduktase in Kulturen anaerob wachsender Zellen von *Bac. Cereus* wurde untersucht. Beide Enzyme werden parallel durch Nitrat, Nitrit, Azid, Oxycyanid, Jodid, Rhodanid, Perrhenat und Selenocyanat mit abnehmender Reihenfolge der Wirksamkeit induziert. Keines der induzierenden Anionen hat eine Affinität zur Nitritreduktase. Die Ergebnisse werden als Beispiel für eine koordinierte Induktion interpretiert.

LITERATUR

1. E. HACKENTHAL, Manuskript in Vorbereitung.
2. E. HACKENTHAL und R. HACKENTHAL, Manuskript in Vorbereitung.
3. E. HACKENTHAL und P. SHARIFI, Manuskript in Vorbereitung.
4. E. HACKENTHAL und R. HACKENTHAL, *Biochim. biophys. Acta* **107**, 189 (1965).
5. E. HACKENTHAL, *Biochem. Pharmac.* **14**, 1313 (1965).
6. R. BECHER, Dissertation, Heidelberg (1963).
7. E. HACKENTHAL, W. MANNHEIM, R. HACKENTHAL und R. BECHER, *Biochem. Pharmac.* **13**, 195 (1964).
8. R. Y. STANNIER, Symp. sur le metabolisme microbien 2nd Int. Congr. Biochemistry Paris 1962 p. 64 zit. nach M. DIXON and E. C. WEBB. *The Enzymes*, p. 504, Longmans, Green, London (1964).
9. C. BUTTIN, *Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol.* **26**, 213 (1961).
10. H. DE ROBICHON-SZULMAJSTER, *Science*, **127**, 28 (1958).
11. I. ZABIN, A. KEPES and J. MONOD, *J. biol. Chem.* **237**, 253 (1962).
12. I. ZABIN, A. KEPES and J. MONOD, *Biochem. biophys. Res. Commun.* **1**, 289 (1959).
13. F. JACOB and J. MONOD, *J. molec. Biol.* **3**, 318 (1961).