

# Die Sulfitreduktase aus *Spinacia oleracea* — ein Ferredoxin-abhängiges Enzym

A Ferredoxin-linked Sulfite Reductase from *Spinacia oleracea*

H.-H. Hennies

Lehrstuhl für Biochemie der Pflanzen, Abteilung Biologie der Ruhr-Universität Bochum

(Z. Naturforsch. **30 c**, 359–362 [1975]; eingegangen am 17. März 1975)

Sulfite Reductase, Sulfate Assimilation, Ferredoxin, Chloroplasts

A sulfite reductase from spinach has been purified 125 fold. Throughout all stages of purification the reduction of sulfite has been found dependent on ferredoxin. Reduced ferredoxin has been provided either by photosynthetic reduction in isolated, broken chloroplasts or by NADPH via the ferredoxin-NADP-oxidoreductase. During the purification procedure ferredoxin as electron donor has been replaced by reduced methylviologen.

## Einleitung

Die Sulfitreduktase aus Spinat ist eingehend von Asada<sup>1</sup> und Asada *et al.*<sup>2,3</sup> untersucht worden. NADH oder NADPH konnten nicht als Elektronendonatoren verwendet werden. Da in ihren Arbeiten nur im Rohextrakt Ferredoxin als Elektronencarrier dienen konnte und das gereinigte Enzym Methylviologen abhängig war, nannten diese Autoren das Enzym ausdrücklich Methylviologen-abhängige Sulfitreduktase. Schmidt<sup>4,7</sup> gelang es mit einer 16,5-fach und Tamura<sup>5</sup> mit einer 29-fach angereicherten Spinat-Sulfitreduktase eine Ferredoxin-Abhängigkeit nachzuweisen. In dieser Arbeit soll die Abhängigkeit der Sulfitreduktion von dem natürlichen Elektronencarrier Ferredoxin mit dem gereinigten Enzym in zwei unterschiedlichen Testsystemen beschrieben werden.

## Material und Methoden

Die verwendeten Lamellarsysteme (osmotisch aufgebrochene und dreimal gewaschene Chloroplasten) (broken chloroplasts) sind nach der Methode von Arnon<sup>6</sup> hergestellt worden. Das Ferredoxin wurde nach Shin, Tagawa und Arnon<sup>8</sup> und Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase in Anlehnung an die Vorschrift von Wessels<sup>9</sup> und Shin, Tagawa und Arnon<sup>8</sup> isoliert.

Requests for reprints should be sent to Dr. H.-H. Hennies, Lehrstuhl für Biochemie der Pflanzen, D-4630 Bochum, Postfach 2148, West Germany.

## Testsysteme für die Sulfitreduktion

### a. Optisches Testsystem mit reduziertem Methylviologen als Elektronendonator

Dieses anaerobe Testsystem, das in dieser Arbeit für die Enzymreicherung verwendet wurde, ist von Asada<sup>1</sup> entwickelt worden. In Thunbergküvetten wird die Oxidation des reduzierten Methylviologens im Spektralphotometer bei 604 nm gemessen. Aus dem Extinktionskoeffizienten und der Stöchiometrie von 6:1 (MV<sub>ox</sub> zu H<sub>2</sub>S) lässt sich die gebildete H<sub>2</sub>S-Menge errechnen (Asada<sup>1</sup>).

### b. Radioaktives Testsystem mit reduziertem Ferredoxin als Elektronendonator

### 1. Photosynthetische Reduktion des Elektronendonators mit isolierten Lamellarsystemen aus Spinatchloroplasten im Licht

Der Ansatz von 3 ml enthält in  $\mu$ mol: Natriumsulfit 2,5 mit einer Radioaktivität von 5  $\mu$ Ci S<sup>35</sup>; Tris-HCl-Puffer pH 7,8 100; MgCl<sub>2</sub> 10; Ferredoxin aus Spinat 0,03; ADP 5; anorganisches Phosphat 5; Sulfitreduktase mit wechselnden Proteinmengen je nach Reinheit des Enzyms und 0,4 mg Chlorophyll. Nach 3 min Begasung mit Stickstoff in Warburg-Gefäßen wird für 30 min mit 35 000 lx bei 25 °C belichtet.

### 2. Reduktion des Elektronendonators mit der Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase und NADPH

Das reduzierte Pyridinnucleotid wird durch ein NADPH-regenerierendes System erhalten (G-6-P und G-6-P-dehydrogenase). Der Ansatz von 3 ml enthält in  $\mu$ mol: Natriumsulfit 2,5 mit einer Radioaktivität von 5  $\mu$ Ci S<sup>35</sup>; Tris-HCl-Puffer pH 7,8 100; MgCl<sub>2</sub> 10; G-6-P 5; Ferredoxin aus Spinat



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

0,03; NADP 0,4; G-6-P-Dehydrogenase 7,5  $\mu$ g Protein, Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase 0,7 mg Protein; Sulfitreduktase mit wechselnden Proteingehalten je nach Reinheit des Enzyms. Nach Begrenzung mit Stickstoff wird 1 Stunde bei 30 °C inkubiert.

#### Bestimmung des radioaktiven Sulfids

Die Enzymansätze mit radioaktivem Substrat werden nach beendeter Inkubation in Eis gestellt und anschließend in eine Destillationsapparatur<sup>4</sup> übergeführt. Nach Zugabe von einigen Tropfen Oktanol, 20  $\mu$ mol Trägersulfid und 0,4 ml 6 N Salzsäure können im Stickstoffstrom Sulfat, Sulfid und Sulfit voneinander getrennt werden. Das Sulfid, als CdS ausgefällt, wird am Endfesterzählrohr ausgezählt.

#### Ergebnisse

Zur Enzymanreicherung (in Anlehnung an Asada<sup>1</sup> und Asada *et al.*<sup>3</sup>) wurde von 6 kg Spinat ausgegangen. Die Blätter mit entfernten Mittelrippen wurden durch die Dreiwalzenmühle gepresst und der Presssaft abzentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das lösliche Protein des Presssaftes mit Hilfe von Aceton fraktioniert. Das Protein, das bei einem Acetongehalt von 30–50% ausfiel, wurde bei 10 000  $\times$  g für 10 min abzentrifugiert und in 0,01 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,75 dialysiert. Nach der angeschlossenen Ammoniumsulfatfällung (festes Salz) wurde das Protein, das zwischen 40–55% Sättigung ausfiel, abzentrifugiert und in 0,01 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,75 aufgenommen und dialysiert. Die nächste Anreicherung fand auf einer DE-52-Cellulosesäule (Fließgeschwindigkeit 50 ml/h, Säule 3,7  $\times$  5,0 cm) statt. Zur Elution dienten 1000 ml Kaliumphosphatpuffer pH 7,75 mit einem linearen Gradienten von 0,01–0,1 M (Abb. 1) (Fraktionen zu 5 ml wurden gesammelt).

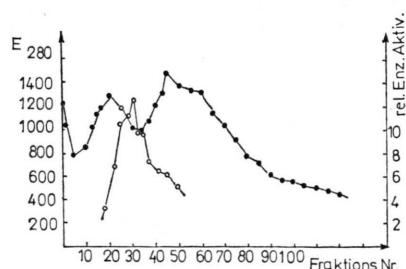


Abb. 1. Enzymchromatographie an der DE-52-Cellulosesäule. —○—○—, relative Sulfitreduktase-Aktivität, —●—●—, Protein.

Die sulfitreduzierenden Hauptfraktionen, von 0–65% Sättigung mit festem Ammoniumsulfat gefällt, zentrifugiert und in 0,01 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,75 aufgenommen, wurden dialysiert.

Bei der sich anschließenden Gelfiltration auf Sephadex G-200 (Säule 2,2  $\times$  67 cm, Fließgeschwindigkeit 10,4 ml/h, Fraktionen zu 5 ml) ist Tris-HCl-Puffer pH 7,8; 0,02 M als Elutionsmittel verwendet worden (Abb. 2).

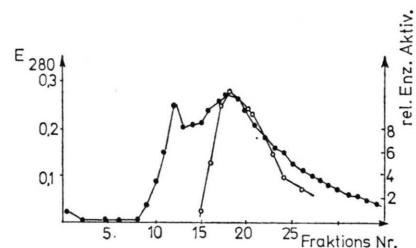


Abb. 2. Enzymchromatographie an der Sephadex G-200-Säule. —○—○—, relative Sulfitreduktase-Aktivität, —●—●—, Protein.

Die gesammelten Hauptfraktionen wurden mit festem Ammoniumsulfat von 0 bis 80% Sättigung gefällt. Der Niederschlag wurde in 0,02 M Tris-HCl-pH 7,8 aufgenommen und gegen denselben Puffer dialysiert. Das erhaltene Protein, von schwach bräunlicher Färbung, zeigte bei einer Elektrophorese auf 7,5-prozentigen Polyacrylamidgelen nur eine Bande<sup>17</sup>.

Tab. I. Enzymanreicherung der Spinat-Sulfitreduktase.

Enzym nach:	nmol MV <sub>ox</sub> /h/mg Prot.	nmol H <sub>2</sub> S/h/mg Prot.	Anreiche- rung
Aceton und Ammoniumsulfat-Fällung	618	103	1
DE-52-Cell. Chromatogr.	15 600	2 600	25
SG-200-Chromatogr.	76 800	12 800	125

In Tab. I ist die Enzymanreicherung der Spinat-Sulfitreduktase mit Methylviologen als Elektronendonator wiedergegeben. Der Anreicherungsfaktor beträgt 125.

Die Enzymanreicherung wurde mit dem Methylviologentestsystem (Tab. I) bestimmt. In den folgenden Tabn. II und III ist die Sulfitreduktion auf allen Anreicherungsstufen in Abhängigkeit von dem Elektronendonator Ferredoxin gemessen worden.

Tabn. I – III zeigen, daß die Spinat-Sulfitreduktase neben dem artifiziellen Elektronencarrier Methylviologen auch an den Cofaktor Ferredoxin angekoppelt werden kann. Dabei bleibt die Abhängigkeit von dem natürlichen Elektronendonator Ferredoxin bei der Anreicherung bis zum homogenen Enzym erhalten.

Tab. II. Reduktion von Sulfit zu Sulfid über Ferredoxin. Das Ferredoxin wurde photosynthetisch mit Hilfe von isolierten Lamellarsystemen aus Spinatchloroplasten reduziert. Enzymatischer Ansatz, siehe Methoden.

Enzym nach:	Zugabe zum kompletten Ansatz ohne Ferredoxin	nmol H <sub>2</sub> S/h/mg Prot.
Aceton- und Ammonsulfat-Fällung	– Fd	0,61
DE-52-Cell.	+ Fd	15,50
Chromatogr.	– Fd	18,50
SG-200-Chromatogr.	+ Fd	93,00
	– Fd	15,70
	+ Fd	161,88

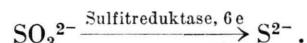
Tab. III. Reduktion von Sulfit zu Sulfid mit Ferredoxin als Elektronendonator. Das reduzierte Ferredoxin wurde durch NADPH und der Ferredoxin-NADP-Oxidoreduktase erhalten. Enzymatischer Ansatz, siehe Methoden.

Enzym nach:	Zugabe um kompletten Ansatz ohne Ferredoxin	nmol H <sub>2</sub> S/h/mg Prot.
Aceton- und Ammoniumsulfat-Fällung	– Fd	0,42
DE-52-Cell.	+ Fd	1,90
Chromatogr.	– Fd	17,50
SG-200-Chromatogr.	+ Fd	79,00
	– Fd	19,46
	+ Fd	147,60

Auf Grund der obigen Ergebnisse kann angenommen werden, daß Ferredoxin der *in vivo* Elektronencarrier der Spinat-Sulfitreduktase ist.

## Diskussion

Sulfitreduktasen katalysieren in einem 6-Elektronenübergang die Reduktion von Sulfit zu Sulfid nach folgender Gleichung:



Die Sulfitreduktasen vieler Mikroorganismen sind NADPH-abhängig. Diese Enzyme, die in der Regel ein recht hohes Molekulargewicht aufweisen, verfügen über einen Flavinanteil<sup>10, 11</sup>. Neben diesen hochmolekularen Enzymen kommt eine zweite, weniger gut untersuchte Gruppe von Sulfitreduktasen vor, die Ferredoxin-abhängig ist.

So sind Ferredoxin-abhängige Sulfitreduktasen unter anderem aus *Clostridium*<sup>13, 14</sup>, *Desulfovibrio*<sup>15</sup>, der Rotalge *Porphyra*<sup>16</sup> und *Spinacia* beschrieben worden. Die Ferredoxinabhängigkeit des Spinatenzyms wurde in älteren Arbeiten in Frage gestellt, da zunächst nur mit reduziertem Methylviologen eine Sulfitreduktion katalysiert werden konnte. Ergebnisse dieser Arbeit und auch andere Veröffentlichungen<sup>4, 7, 5, 17</sup> zeigen jedoch, daß die Spinat-Sulfitreduktase ein Ferredoxin-abhängiges Enzym ist. Ferner könnte der Elektronendonator für die Sulfitreduktase zahlreicher photosynthetischer Bakterien ebenfalls Ferredoxin sein<sup>12</sup>.

Wie die Ergebnisse gezeigt haben, sind die Umsatzraten der Sulfitreduktase im anaeroben Testsystem über Methylviologen hoch im Vergleich zu den Raten, die mit den Testsystemen über Ferredoxin erreicht werden. In der folgenden Abb. 3 ist die Sulfitreduktion mit Ferredoxin veranschaulicht:

Der Hauptgrund für die unterschiedlichen Reduktionsraten ist in den verschiedenen Testsystemen selbst zu suchen. Dient reduziertes Methylviologen als Elektronencarrier, so wird nicht das gebildete S<sup>2-</sup>, sondern die Oxidation des Methylviologens in Thunberg-Küvetten gemessen. Da diese optische Methode sehr empfindlich ist, kann, bedingt durch

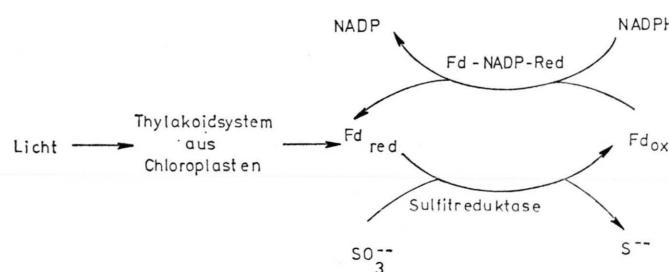


Abb. 3. Schematische Darstellung der Sulfitreduktion über Ferredoxin.

Reaktionszeiten von nur wenigen Minuten, die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion erfaßt werden.

Findet reduziertes Ferredoxin als Elektronendonator Verwendung, so wird das gebildete  $S^{2-}$  direkt bestimmt. Um eine ausreichend hohe Menge dieses Endproduktes zu erhalten die oberhalb der unteren Nachweisgrenze liegt, werden Inkubationszeiten von mindestens 20 min benötigt.

Eine Bestimmung der Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion ist mit diesen Testmethoden nicht möglich, so daß die Umsatzraten außerhalb des linearen Bereiches liegen. Aus diesem Grunde werden nur verhältnismäßig geringe Raten in der Ferredoxin-abhängigen Sulfitreduktion gemessen.

Über die physiologische Bedeutung der Sulfitreduktasen in höheren Pflanzen herrscht zum Teil noch Unklarheit, da freies Sulfit in eukaryotischen Zellen *in vivo* nicht auftreten soll. Bandurski *et al.* (Hefe)<sup>18, 19</sup>, Asahi (Chloroplasten)<sup>26, 27</sup>, Torii und Bandurski (Hefe)<sup>20</sup> und Schwenn (Chloroplasten)<sup>21, 22</sup> beschreiben ein niedermolekulares

Carrierprotein, das in der Literatur als „bound sulfite“<sup>23</sup> eingegangen ist. In der assimulatorischen Sulfatreduktion isolierter Chloroplasten ist nach Schwenn<sup>21</sup> freies Sulfit nur dann meßbar, wenn im Experiment Trägersulfit verwendet wird. Das freigesetzte  $^{35}SO_3^{2-}$  ist kein Intermediärprodukt der Sulfatreduktion, sondern es ist durch Isotopenaustausch aus dem „bound sulfite“ entstanden.

Versuche zur Reduktion des aus Spinatchloroplasten isolierten „bound sulfite“ mit der hier beschriebenen löslichen Sulfitreduktase haben bisher noch zu keinem befriedigenden Ergebnis geführt. Dagegen gelang jedoch die Reduktion dieses Carrierproteins mit Hilfe einer membrangebundenen sulfitreduzierenden Enzymfraktion aus Spinat<sup>24</sup>. Weitere Ergebnisse, auch in bezug auf die Thiosulfonat-reduktase<sup>28</sup>, wurden kürzlich berichtet<sup>25</sup> bzw. befinden sich im Druck<sup>29</sup>.

Diese Arbeit wurde aus Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

- <sup>1</sup> K. Asada, J. Biol. Chem. **242**, 3646–3654 [1967].
- <sup>2</sup> K. Asada, G. Tamura u. R. S. Bandurski, Biochem. Biophys. Res. Commun. **30**, 554–559 [1968].
- <sup>3</sup> K. Asada, G. Tamura u. R. S. Bandurski, J. Biol. Chem. **244**, 4904–4915 [1969].
- <sup>4</sup> A. Schmidt, Dissertation Göttingen 1968.
- <sup>5</sup> G. Tamura, Technical Bulletin of Faculty of Horticulture, Chiba University, **18** [1970].
- <sup>6</sup> D. I. Arnon, M. B. Allen u. F. R. Whatley, Biochim. Biophys. Acta **20**, 449–461 [1956].
- <sup>7</sup> A. Schmidt u. A. Trebst, Biochim. Biophys. Acta **180**, 529–535 [1969].
- <sup>8</sup> M. K. Shin, K. Tagawa u. D. I. Arnon, Biochem. Z. **338**, 84 [1963].
- <sup>9</sup> J. S. C. Wessels, Biochim. Biophys. Acta **109**, 357–371 [1965].
- <sup>10</sup> L. M. Siegel, H. Kamin, D. C. Rueger, R. P. Presswood u. Q. H. Gibson, Flavins and Flavoproteins III. International Symp., University Park Press, Butterworths 1971.
- <sup>11</sup> A. B. Roy u. P. A. Trudinger, The Biochemistry of Inorganic Compounds of Sulphur, University Press Cambridge 1970.
- <sup>12</sup> H. D. Peck, Jr., S. Tredo u. M. D. Kamen, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. **71**, 2404–2406 [1974].
- <sup>13</sup> J. M. Akagi, Biochem. Biophys. Res. Commun. **21**, 72–77 [1965].
- <sup>14</sup> E. J. Laishley, P.-M. Lin u. H. D. Peck, Jr., Can. J. Microbiol. **17**, 889–895 [1971].
- <sup>15</sup> J. Le Gall u. N. Dragoni, Biochem. Biophys. Res. Commun. **23**, 145–149 [1966].
- <sup>16</sup> E. Saito, K. W. M. Okuma u. G. Tamura, Bull. Assoc. Nat. Sc., Senshu University **3**, 45–50 [1970].
- <sup>17</sup> H.-H. Hennies, Diplomarbeit Bochum 1971.
- <sup>18</sup> R. S. Bandurski, L. G. Wilson u. T. Asahi, J. Amer. Chem. Soc. **82**, 3218 [1960].
- <sup>19</sup> R. S. Bandurski, Plant Biochemistry, p. 467–490 (Bonner und Varner, ed.), Academic Press, New York 1965.
- <sup>20</sup> K. Torii u. R. S. Bandurski, Biochem. Biophys. Res. Commun. **14**, 537–542 [1964].
- <sup>21</sup> J. D. Schwenn, Dissertation Bochum 1970.
- <sup>22</sup> A. Schmidt u. J. D. Schwenn, II. International Congress on Photosynthesis Research, Stresa, Italy, p. 507–513, 1971.
- <sup>23</sup> J. F. Thompson, Ann. Rev. Plant Physiol. **18**, 59–84 [1967].
- <sup>24</sup> H.-H. Hennies, Dissertation Bochum 1974.
- <sup>25</sup> J. D. Schwenn u. H.-H. Hennies, Proceedings of the Third International Congress on Photosynthesis, September 2–6, 1974, Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel, pp. 629–635 (M. Avron, ed.), Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, The Netherlands, 1974.
- <sup>26</sup> T. Asahi, Agr. Biol. Chem. (Tokyo) **27**, 734 [1963].
- <sup>27</sup> T. Asahi, Biochim. Biophys. Acta **82**, 58–66 [1964].
- <sup>28</sup> A. Schmidt, Arch. Mikrobiol. **93**, 29–52 [1973].
- <sup>29</sup> J. D. Schwenn, B. Depka u. H.-H. Hennies, Plant and Cell Physiol., im Druck.