

PRELIMINARY NOTES

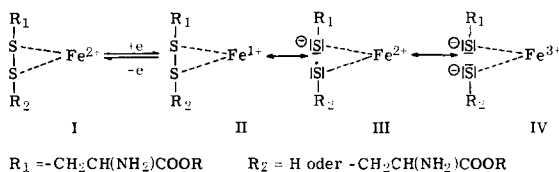
BBA 41 IIII

Abbau und Resynthese des Aktivzentrums vom Pflanzenferredoxin

Die Abspaltung des Eisens zu enzymatisch inaktivem Apoferredoxin und die Wiedereinführung des Metallions zu enzymatisch wieder wirksamem Ferredoxin ist für Bakterienferredoxin aus *Clostridium pasteurianum*¹⁻³ berichtet worden. Es wurden jedoch bisher weder Ultraviolett-Spektren der oxydierten Form noch ESR-Spektren vorgelegt, die die Identität von nativem und resynthetisiertem Ferredoxin eindeutig sicherstellen würden. Auch ist es bisher noch nicht gelungen, Pflanzenferredoxin auf ähnlichem Weg zu rekonstituieren.

Pflanzenferredoxin aus Spinat ist nach einem gegenüber der Methode von BENDALL, GREGORY UND HILL⁴ vereinfachten Verfahren hergestellt worden. Das für die Versuche verwendete Präparat hatte ein Absorptionsverhältnis $A_{420\text{ m}\mu}/A_{276\text{ m}\mu}$ von 0.45 und 2 Eisen und 2 "labile Schwefel" pro Molekül (Mol.-Gew. 12000).

Nach ESR-Untersuchungen an Modells-substanzen⁵ unterscheiden sich reduziertes und oxydiertes Ferredoxin formal nicht in der Redoxstufe des Eisenatoms, da die oxydierte Form durch einen Persulfidkomplex I und die reduzierte Form durch ein Resonanzhybrid II-IV festgelegt ist.



Der Radikal-Eisen (II)-komplex III ist die reagierende Form bei der Abspaltung des Eisens mit Dithionit und α, α' -Dipyridyl. Es müsste aber auch möglich sein, mit α, α' -Dipyridyl alleine ohne Reduktion mit Dithionit aus oxydiertem Ferredoxin Eisen abzuspalten, wenn Formulierung I zutrifft. Dies gelingt nun tatsächlich nach folgender Vorschrift.

100 mg Spinatferredoxin gelöst in 20 ml etwa 1 M Acetat-Puffer (pH 7.4) wurden mit 50 ml einer 0.5 % α, α' -Dipyridyllösung (in 0.1 M Acetat-Puffer, pH 5.4) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei Zimmertemperatur stehengelassen und anschliessend auf eine Chelex 100-Säule (2 cm \times 3 cm) aufgetragen. Die Säule wurde mit 50 ml Wasser gewaschen. Der Eisen-Dipyridyl-Komplex blieb auf der Säule, während sich das Apoferredoxin im Durchlauf befand. Der Durchlauf wurde lyophilisiert, in wenig Wasser gelöst und mit 2 ml der oben beschriebenen Dipyridyllösung versetzt (um die letzten Eisenspuren zu entfernen). Nach 5 Std. wurde die Lösung auf eine mit Wasser equilibrierte Sephadex-G-25-Säule (2.5 cm \times 50 cm) aufgetragen und mit Wasser eluiert. Nach etwa 80 ml erhielt man das Apoferredoxin, gut getrennt von dem Eisen-Dipyridyl-Komplex, dem Dipyridyl und dem Acetat. Die Apo-

ferredoxin enthaltenden, farblosen Fraktionen wurden vereinigt und gefriergetrocknet. Ausbeute 67 mg.

Das so erhaltene Apoferreredoxin ist enzymatisch inaktiv, zeigt im ESR-Spektrum keine Banden und weist im Ultraviolett bei 276 m μ ein Maximum auf (Abb. 1). Die Rekonstitution des Aktivzentrums von Spinatferredoxin kann wie folgt erzielt werden.

5 mg Apoferreredoxin wurden in 5 ml 0.1 M Tris-HCl-Puffer (pH 7.4) gelöst und

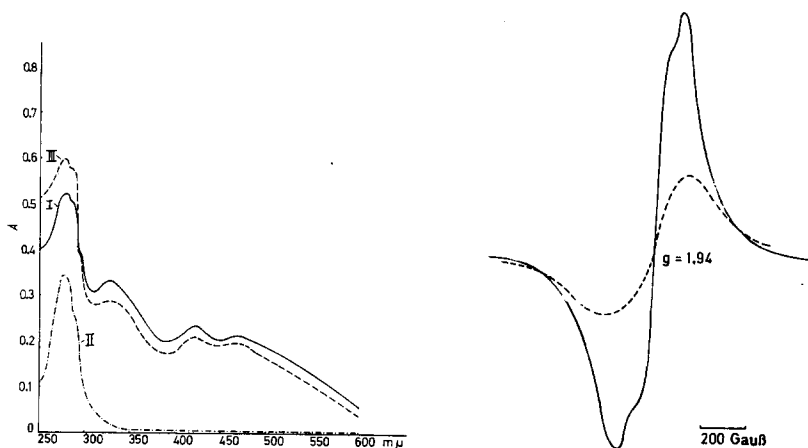


Abb. 1. Lichtabsorptionsspektren von I oxydiertem Spinatferredoxin (0.37 mg/ml), II Apoferreredoxin (0.27 mg/ml) und III oxydiertem resynthetisiertem Spinatferredoxin (0.3 mg/ml) (aus der Extinktion bei 420 m μ bestimmt).

Abb. 2. ———, ESR-Spektrum des reduzierten Spinatferredoxins (12 mg/ml, 1 M Acetatpuffer pH 7.4; SR 200 Gauss/min, Mod. 250, SL 1000, Temp. = -182°); ———, ESR-Spektrum des reduzierten resynthetisierten Spinatferredoxins (2 mg/ml 1 M Acetatpuffer, pH 7.4; SR 200 Gauss/min, Mod. 2000, SL 1000, Temp. = -180°). Beide Proben wurden unter Stickstoff mit festem Dithionit reduziert.

TABELLE I

EIGENSCHAFTEN VON SPINATFERREDOXIN, APOFERREDOXIN UND RESYNTHESTISIERTEM SPINATFERREDOXIN

	$\frac{A_{420 \text{ m}\mu}}{A_{276 \text{ m}\mu}}$	Menge in mg	μMol NADPH*** gebildet ($\mu\text{Atome O}$ entwickelt)	μMol NADPH pro mg Ferredoxin	g-Atom Eisen § pro Mol Ferredoxin	Mol labiler Schwefel §§ pro Mol Ferredoxin
Ferredoxin	0.45	0.082*	4.2 (4.4)	51.2	1.9	1.9
Apoferreredoxin	0.06	0.6**	< 0.1 (0.2)	0	< 0.03	0.0
Resynthetisiertem Ferredoxin	0.33	0.0915*	4.5 (4.3)	49.2	2.2	2.1

* Ferredoxinkonzentration wurde aus der Absorption bei 420 m μ nach SHIN UND ARNON⁷ bestimmt ($A_{420 \text{ m}\mu} = 0.732$ pro mg).

** Bestimmt durch Trockeneinwaage.

*** Die angegebene Menge Ferredoxin wurde mit Spinatchloroplasten mit 0.2 mg Chlorophyll und Trispuffer (pH 8.0) in 3 ml 12 min lang unter N₂ bei 15° mit 35000 Lux belichtet. NADPH wurde bei 340 m μ , die dazu stöchiometrisch entwickelte Menge O₂ manometrisch gemessen.

§ Bestimmt nach FEIGL UND HAMBURG^{8,9}.

§§ Bestimmt nach FOGO UND POPOWSKY¹⁰.

nacheinander mit 0.1 ml 2-Mercaptoäthanol, 4 ml einer Natriumsulfidlösung (4 μ Mol/ml) und 4 ml einer frisch hergestellten Lösung von Mohr'schem Salz (4 μ Mol/ml) versetzt. Die Mischung wurde 10 min bei Raumtemperatur stehengelassen und anschliessend auf eine Whatman DE 52 Cellulosesäule (0.5 cm \times 3 cm) aufgetragen. Die Cellulose wurde mit 50 ml 0.2 M Acetatpuffer (pH 7.4) gewaschen und danach das resynthetisierte Ferredoxin mit 1 M Acetat-Puffer (pH 7.4) eluiert. Ausbeute: 1.7 mg = 34 %. Die Resynthese gelingt auch ohne Sulfidzusatz, wenn handelsübliches 2-Merkaptoäthanol (Serva, Heidelberg) ohne vorherige Reinigung verwendet wird.

Resynthetisiertes Ferredoxin enthält, wie natives Ferredoxin, 2 Atome Eisen und 2 Atome "labilen Schwefel" pro Molekül. Die Eigenschaften sind in Tabelle I zusammengefasst. Die Lichtabsorptionsspektren der oxydierten Formen von ursprünglichem und rekonstituiertem Ferredoxin sowie von Apoferredoxin sind in Abb. 1 wiedergegeben. In der photosynthetischen, Ferredoxin abhängigen NADP-Reduktion unter O₂-Entwicklung mit isolierten Chloroplasten hat das resynthetisierte Ferredoxin gleiche spezifische Aktivität wie das native.

Das ESR-Spektrum des reduzierten rekonstituierten Spinatferredoxins stimmt ebenfalls mit dem des nativen Spinatferredoxins⁸ überein und ist in Abb. 2 wiedergegeben. Nach der Herstellung von Modellkomplexen mit g -Werten um 1.94⁵ ist dies der zweite Fall, dass das charakteristische ESR-Spektrum von Nicht-Häm-Eisenproteiden synthetisch zugänglich gemacht werden konnte.

*Chemisches Institut der Universität,
Tübingen (Germany)*

ERNST BAYER
DIETER JOSEF
PETER KRAUSS
HANSPAUL HAGENMAIER
ALBERT RÖDER
ACHIM TREBST

*Pflanzenphysiologisches Institut der Universität,
Göttingen (Germany)*

- 1 E. BAYER, W. PARR UND B. KAZMAIER, *Arch. Pharm.*, 298 (1965) 196.
- 2 R. MALKIN UND J. C. RABINOWITZ, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 23 (1966) 822.
- 3 E. BAYER UND H. HAGENMAIER, im Druck.
- 4 D. S. BENDALL, R. P. F. GREGORY UND R. HILL, *Biochem. J.*, 88 (1963) 29P.
- 5 A. RÖDER UND E. BAYER, *Angew. Chem.*, 79 (1967) 274.
- 6 D. O. HALL, J. F. GIBSON UND F. R. WHATLEY, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 23 (1966) 81.
- 7 M. SHIN UND D. I. ARNON, *J. Biol. Chem.*, 240 (1965) 1405.
- 8 F. FEIGL UND H. HAMBURG, *Z. Analyt. Chem.*, 86 (1931) 7.
- 9 F. FEIGL, P. KRUMHOLZ UND H. HAMBURG, *Z. Analyt. Chem.*, 90 (1932) 199.
- 10 J. K. FOGO UND M. POPOWSKY, *Analyt. Chem.*, 21 (1949) 732.

Eingegangen am 12. Mai, 1967

Biochim. Biophys. Acta, 143 (1967) 435-437